

## *Candida albicans* KNIH10으로부터 Enolase의 분리 및 면역진단의 응용

국립보건원 병원감염과, 전남의대 임상병리과<sup>1</sup>

박용춘 · 유재일 · 이영선 · 신종희<sup>1</sup> · 김봉수\*

=Abstract=

### Purification of Enolase from *Candida albicans* KNIH10 Isolated in Korea and Application of Immunological Diagnosis

Yong Chjun Park, Jae Il Yoo, Yeong Seon Lee, Jong Hee Shin<sup>1</sup> and Bong Su Kim\*

Department of Nosocomial Pathogens, National Institute of Health, Seoul 122-701,  
Department of Clinical Pathology, Chonnam National University Medical School<sup>1</sup>,  
Kwangju, 501-757, Korea

We purified enolase from *Candida albicans* KNIH10 strain which was isolated from a clinical specimen in Korea. The purified enolase was used to detect anti-*Candida* antibodies in sera of patients with invasive candidiasis. For purification of enolase from the crude extract prepared by French pressure at 20,000 PSI, the fast performance liquid chromatography (FPLC) using DEAE-sepharose column was used. The elutes at 0.3~0.4 M NaCl in FPLC was purified with homogeneity in SDS-PAGE and its enzymatic activity was confirmed in sera of invasive candidiasis with candidemia patient by immunoblotting. The purified enolase indicated no signal (100% specificity) in 40 normal human sera and 75% (6/8) sensitivity in sera of candidemic patients with suspicious invasive candidiasis by immunoblotting.

**Key Words:** *Candida albicans* KNIH10, Enolase, Immunological test, Purification

## 서 론

인체의 피부나 점막에 상재하는 칸디다균은 과거에는 정상균총으로만 여겨 크게 문제시 되지 않았으나 오늘날 각종 항균제, 항암제, 면역억제제, 스테로이드 제제 혹은 마약의 사용 및 악성 혈액종양 환자 및 대수술 환자 증가 등으로 인해 심부성 칸디다증의 주요 원인균이 되고 있다. 또한 병원내에서는 중증 환자들의 요도 카테터나 중심정맥 카테터의 장기 사용으로 인한 칸디다증

환자들이 증가 추세에 있으며 후천성 면역 결핍 증 환자와 인공 장기이식 환자들이 증가함에 따라 이 질환에 대한 정확한 진단은 매우 중요하게 되었다.

침습성 칸디다증의 진단에 현재 주로 사용하는 방법은 혈액, 뇌척수액 등의 비무균 검체로부터 직접 균을 분리, 배양하거나 조직 검사 등인데, 사실상 진단이 어려워 높은 사망률을 나타내고 있다<sup>10,12</sup>. 이에 면역학적 방법으로 혈청내 칸디다 항체를 검출하는 방법들이 시도되고 있다. 라텍스 응집법, 면역확산법 혹은 counterimmunoelectropho-

접수 : 2000년 5월 10일, 게재결정 : 2000년 6월 20일

\*Corresponding author: 김봉수, 122-701 서울시 은평구 녹번동 5, 국립보건원 병원감염과  
Tel: 02) 380-1478; Fax: 02) 380-1550; E-mail: bong sukim@hanmail.net

resis (CIE) 등의 혈청학적 면역진단방법은 분명한 칸디다증이 아님에도 불구하고 침강 항체가 검출되고, CIE의 경우 감수성이 80%로 높으나 특이성이 29%로 매우 낮아 심부성 칸디다증의 혈청학적 진단에 어려움이 많다<sup>10)</sup>. 또한 효소면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 및 Cand-Tec에 의한 항원 검출률도 각각 50~60%, 40~50%로 감수성과 특이성이 떨어진다<sup>3,9)</sup>. 한편 칸디다의 대사물질의 일종인 D-arabinitol을 gas chromatography에 의해 검출할 경우, 특이성은 93%로 높으나 감수성이 13%로 떨어져 심부성 칸디다증 조기진단에 어려움이 있다<sup>12)</sup>.

최근에는 칸디다 균주에 존재하는 항원의 일종인 enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolyase)를 이용한 면역진단법이 개발되고 있으며<sup>16)</sup>, enolase를 이용할 경우 감수성과 특이도가 81.5% 및 96.4%로 상승한다고 보고되었다<sup>7,10)</sup>. Enolase의 경우 cytoplasmic antigen의 일종으로 약 47 kDa의 분자량을 지니는 효소로서, 균주가 숙주세포에 정상균총으로 존재할 경우에는 생산되지 않지만, 숙주세포에 침입 (invasion)하여 증식할 경우 다량 생산되며, 당 대사에 관여하고 혈액내로 분비되어 칸디다증의 조기진단이 가능한 immunodominant marker로 보고되어 있다<sup>2,5,13)</sup>.

따라서 본 연구에서는 국내 임상 환자로부터 분리된 칸디다 균주중 생체의 검사에서 acid proteinase 분석과 생체내 동물독성실험을 통해 가장 독력이 강한 *Candida albicans* KNIH10을 우수균주로 선정하고 이 균주로부터 enolase를 분리하였다. 그리고 분리된 항원을 이용하여 정상인과 침습성 칸디다증이 의심되는 칸디다혈증 및 백혈구 감소증 환자의 혈청내 항체 유무를 immunoblotting을 실시하여 enolase의 면역학적 측정용 항원으로서의 감수성과 특이성을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 임상가검물

본 실험에서 enolase 항원분리에 사용한 균주는 국내 칸디다증 환자로부터 분리한 *C. albicans* 균주들로부터 동물실험과 acid proteinase 활성도 시험을 통하여 독력이 가장 강한 *C. albicans* KNIH10을 선발하여 이용하였다.

*C. albicans* KNIH10 균주로부터 분리된 enolase 항원을 이용하여 환자 혈청내 항체의 존재 유무

를 검사하였는데, 임상검체로는 전남대학교병원에서 수집된 40명의 정상인, 24명의 백혈구 감소증 환자 및 15명의 칸디다혈증 환자로부터의 혈청 총 79예를 이용하였다. 칸디다혈증 환자에 대한 enolase 항체 검사 결과는 환자군을 칸디다혈증의 원인에 따라 혈관 카테터 연관 칸디다혈증 (catheter related candidemia, CRC)과 비 카테터 연관 칸디다혈증으로 다시 세분하여 분석하였다. 카테터 연관 칸디다혈증은 제거된 혈관 카테터 tip 배양에서 15개 이상의 집락이 배양된 경우로서 카테터 제거 후 24시간 이후 더 이상 칸디다 균이 분리되지 않은 예로 하였다. 비 카테터 연관 칸디다혈증은 카테터를 하지 않은 환자에서 지속적으로 칸디다가 혈액에서 분리되거나, 카테터 제거 후에도 지속적인 칸디다혈증을 보인 예로 하였다<sup>5)</sup>.

### 시약 및 배지

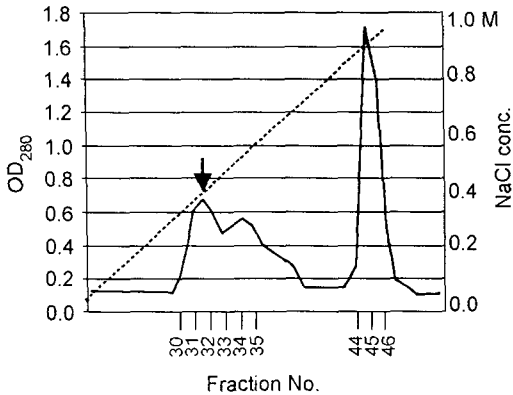
본 실험에 사용된 dextrose, peptone, yeast extract, Sabouraud dextrose agar 등 배지 성분은 Difco사로부터, ammonium sulfate, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP), 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT) 및 phosphate buffered saline (PBS)은 Sigma 사로부터 구입하여 사용하였다. 그리고 균주의 배양에 이용된 YEPD 배지는 증류수 1 L에 dextrose, peptone, yeast extract를 각각 2%, 2% 및 1%씩 첨가하여 사용하였다.

### 세포의 파쇄 및 enolase의 분리

배양액으로부터 세포를 회수하고 PBS로 3회 세척후 French pressure (SLM-AMINCO)를 이용하여 20,000 PSI 상태에서 세포를 3회 파쇄하였다. 파쇄된 세포액은 원심분리하여 상층액을 회수하고 freeze-dryer를 이용하여 농축하거나 ammonium sulfate를 이용하여 60~80% 침전물을 회수하였다. 회수된 침전물은 PBS에 재 현탁하고 하룻밤 동안 4℃에서 투석을 실시하였다. 그리고 FPLC (fast performance liquid chromatography)를 이용하여 효소를 분리하였다. FPLC에 이용된 column은 DEAE-Sepharose로 충전한후 이용하였고, 완충용액은 0.067 M Tris-Cl (pH 7.5), 유속은 0.5 ml/min, column으로부터 단백질의 분리는 1 M NaCl까지 농도구배를 주어 단백질을 회수하였다.

### Immunoblotting

Laemmli 방법<sup>8)</sup>에 따라 12% sodium dodesyl sul-



**Figure 1.** The protein profile of fraction by FPLC. The values of optical density at 280 nm and concentration of NaCl are indicated linear line and dot line, respectively. The arrow inferred to the peak of enolase.

fate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)에 전기영동을 실시후 Towbin 등<sup>17)</sup>의 방법에 따라 nitrocellulose membrane으로 단백질을 옮겼다. 그리고 5% skim milk-PBS (pH 7.4) 용액에 넣어 단백질 결합부위를 차단시킨후 0.05% tween 20-PBS 용액으로 세척하였다. 세척후 1:1,000으로 희석된 환자의 혈청을 넣고 2시간 동안 실온에서 반응한후 0.05% tween 20-PBS 용액으로 세척하였다. 그리고 1:30,000으로 희석된 AP-conjugated anti-human IgG에서 1시간 동안 반응시키고 0.05% tween 20-PBS 용액을 이용하여 세척하였다. 그후 BCIP와 NBT를 첨가한 기질 완충용액 [0.05 M MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M NaCl, 0.1 M Tris (pH 9.8)]에서 5~10분 동안 반응시킨 다음 증류수로 세척하여 반응을 중지시켰다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 선별

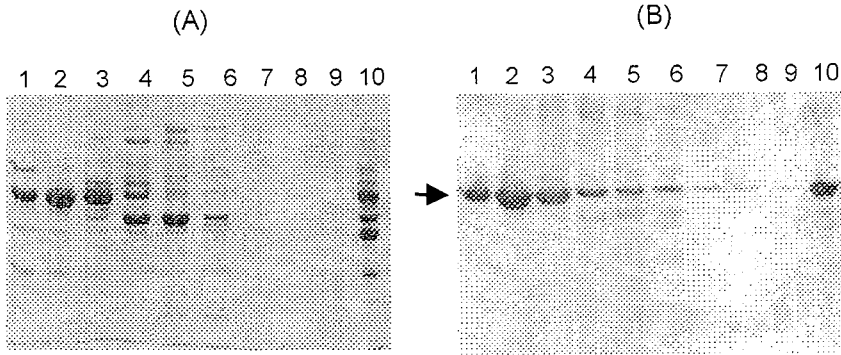
국내 칸디다증 환자로부터 분리된 *C. albicans*를 이용하여 Ollert 등<sup>14)</sup>의 방법에 의한 acid proteinase 측정법과 10<sup>5</sup> cells/ml의 균체를 마우스 꼬리정맥에 접종한 후 치사율 및 침습된 조직의 CFU (colony forming unit)를 측정하였다. 그 결과 *C. albicans* KNIH10주의 경우 acid proteinase의 값이 비교적 높게 측정 (OD<sub>595</sub>=0.457)되었다. 그리고 *C. albicans* KNIH10를 접종한 경우 가장 빠른 치사율을 보였으며, 좌측 신장의 침습된 조직으로부터 CFU를 측정한 결과 0.5 × 10<sup>5</sup> CFU/g로 가장 높게

나타났다 (data not shown). 따라서 동물독성이 강하며, 침습성이 높은 *C. albicans* KNIH10주를 최종 표준항원 대표균주로 선별하였고 선별된 균주를 대상으로 실험을 진행하였다.

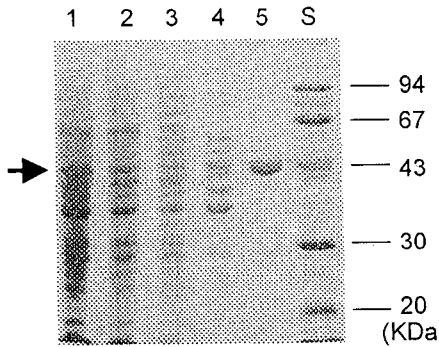
### FPLC에 의한 enolase의 분리

국내 분리주인 *C. albicans* KNIH10주로부터 enolase를 순수 분리하기 위하여 배양된 세포를 회수하고 French pressure로 파쇄후 60~80% ammonium sulfate로 침전시켜서 일차적으로 enolase의 유무를 확인하였다. 그리고 기존에 보고되어 있는 enolase의 아미노산 서열에 대한 pI 값을 계산해본 결과 약 5.25 정도를 나타냄으로<sup>4,11)</sup> anion exchange chromatography인 DEAE-sepharose column에 충전시킨후 FPLC를 이용하였다<sup>18)</sup>. Column으로부터 enolase의 분리는 1 M NaCl까지 농도 구배를 주어 분리하였으며 각각의 fraction별로 시료를 채취하였다 (Fig. 1). Fig. 1에서 보는 바와같이 비결합 단백질은 완충용액으로 유출시키고 NaCl을 이용하여 column에 결합되어 있는 단백질을 분리한 결과 FPLC로부터 유출되는 단백질은 3종류로 나타남을 확인하였다. 따라서 3종류의 peak를 중심으로 획득한 시료들을 농축하고 SDS-PAGE를 이용하여 47 kDa의 단백질 양상을 확인하였다. 그 결과 31번째의 fraction tube에서 단일밴드가 나타남을 알 수 있었으며, 그 위치가 47 kDa의 단백질 위치임을 알 수 있었다 [Fig. 2, (A)]. 따라서 이 단일밴드가 enolase임을 확인하기 위해서 *Saccharomyces cerevisiae*의 enolase를 기준으로 확인하였고, candidemia 환자의 혈청을 이용하여 immunoblotting을 실시하였다. 그 결과 lane 2에서 가장 강력한 항체가 감지됨을 확인할 수 있었으며 [Fig. 2, (B)], lane 1-10의 동일 위치에서도 항체가 감지된 것은 다른 fraction tube에서도 column에 결합되어 있는 enolase가 소량씩 분리된 것으로 추측된다. 그리고 Fig. 1을 분석해 보면 enolase는 약 0.3~0.4 M NaCl에서 가장 잘 분리됨을 알 수 있었다.

Fig. 3에서 보는 바와같이 동일조건에서 실험을 실시할 경우 세포를 파쇄후 freeze-dryer로 전체 단백질을 농축한 경우가 (lane 1) ammonium sulfate를 이용하여 0~80%로 침전후 농축할 경우 (lane 2) 보다는 단백질 회수율이 높았다. 그러나 FPLC를 위하여 column을 사용할 경우 여러 종류의 단백질이 혼합되어 있으면 enolase의 분리율 및 회수율이 감소하기 때문에 ammonium sulfate를 이용하



**Figure 2.** SDS-PAGE (12% separating and 5% stacking gel) profile of proteins collected from *C. albicans* KNIH10 by FPLC or ammonium sulfate. Lane 1, fraction No. 30; No. 31 (lane 2); No. 32 (lane 3); No. 33 (lane 4); No. 34 (lane 5); No. 35 (lane 6); No. 44 (lane 7); No. 45 (lane 8); No. 46 (lane 9); lane 10; crude extract precipitated by 60~80% ammonium sulfate (A). Immunoblotting of SDS-PAGE gel obtained by exposure to sera from patient at risk of invasive candidiasis (B). The arrow indicates to enolase protein.



**Figure 3.** SDS-PAGE (12% separating and 5% stacking gel) profile of proteins collected from *C. albicans* KNIH10 by freeze-dry, ammonium sulfate and FPLC. Lane 1, proteins concentrated by freeze-dry; lane 2, crude extract precipitated by 0~80% ammonium sulfate; 30~80% ammonium sulfate (lane 3); 60~80% ammonium sulfate (lane 4); lane 5, enolase purified by FPLC; lane S, molecular weight marker. The arrow indicates to enolase protein.

여 실험을 진행하였다. Fig. 3의 lane 3과 lane 4에서 나타나듯이 30~80% 및 60~80% ammonium sulfate를 이용하여 농축할 경우에 대부분의 단백질은 제거되지만 47 kDa 위치에 존재하는 단백질의 양은 변함이 없음을 알 수 있었다. 그리고 최종적으로 60~80% ammonium sulfate를 이용하여 준비된 시료를 이용하여 FPLC를 실시하였을 경우에 enolase만이 순수 분리됨을 확인할 수 있었다 (lane 5).

#### 분리된 enolase를 이용한 혈청내 항체 검출

임상 혈청검체를 대상으로 *C. albicans* KNIH10 주로부터 순수 분리된 enolase를 사용하여 enolase 항체 측정을 위한 immunoblotting을 실시한 결과는 다음과 같다. 40예의 정상인 혈청 (음성 대조군)은 immunoblotting에 의해 모두 enolase 항체반응이 음성을 보였다. 칸디다혈증 환자에서는 15명 중 7명 (46.7%)에서 enolase 항체 양성을 보였다. 항체 양성반응을 보인 칸디다혈증의 원인균종은 *C. albicans* 5예, *C. tropicalis* 1예, *C. glabrata* 1예였고 *C. parapsilosis* 5예는 모두 음성을 보였다. 칸디다혈증 환자군을 들로 나누어 enolase 항체 양성율을 비교하였을 때, 카테터 연관 칸디다혈증 환자 (CRC)의 경우 7명 중 1명 (14.3%)에서만 양성을 보인 반면, 비 카테터 연관 칸디다혈증 환자 (non-CRC)의 경우 8명 중 2명을 제외한 6명 (75%)에서 양성반응 (환자 1은 34일, 환자 5는 50일, 환자 6은 15일, 환자 7은 20일 그리고 환자 8은 12일간의 혈청을 수집하여 immunoblotting을 실시하였음)을 보였다 (Table 1). 이러한 소견은 카테터 연관 칸디다혈증의 경우 혈관 카테터에서 전지균거를 이루어 증식한 칸디다가 혈관 내에 유입되는 혈류감염이 일어나더라도 인체 조직 침습은 거의 하지 않아 인체내 enolase 항체 생산을 유발하지 않는 반면, 비 카테터 연관 칸디다혈증 환자의 경우는 대부분 칸디다의 조직내 침습이 동시에 존재하여 인체에서는 enolase에 대한 항체가 생성되는 것으로 판단된다.

**Table 1.** Clinical characteristics, causative agent, and antibody detection for 15 candidemic patients

Candidemia categories	Patient no.	Age/sex	Underlying diseases	<i>Candida</i> sp.	Immunoblotting <sup>a</sup>
Non-catheter related persistent candidemia	1	65/F	DM, cerebral infarct	<i>C. tropicalis</i>	+
	2	58/M	Bronchial asthma, ARF	<i>C. albicans</i>	+
	3	71/F	DM, cholangiocarcinoma	<i>C. glabrata</i>	+
	4	63/M	COPD, liver cirrhosis, DM	<i>C. glabrata</i>	-
	5	52/M	Panperitonitis	<i>C. glabrata</i>	-
	6	0/M	Prematurity	<i>C. albicans</i>	+
	7	43/M	Drug poisoning	<i>C. albicans</i>	+
	8	41/F	Unknown	<i>C. albicans</i>	+
Catheter-related candidemia	9	62/M	Lung cancer, ARF	<i>C. glabrata</i>	-
	10	0/F	Prematurity, RDS	<i>C. parapsilosis</i>	-
	11	53/M	Bronchial asthma, Pul. Tb	<i>C. parapsilosis</i>	-
	12	0/M	Prematurity, RDS	<i>C. parapsilosis</i>	-
	13	66/F	HNP, ulcer bleeding	<i>C. parapsilosis</i>	-
	14	62/M	Unknown	<i>C. albicans</i>	+
	15	76/F	ICH, acute pyelonephritis	<i>C. parapsilosis</i>	-

a, immunoblotting test using the purified enolase. Abbreviations; DM, diabetes mellitus; ARF, acute renal failure; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; RDS, respiratory distress syndrome; Pul. Tb, pulmonary tuberculosis; HNP, herniation of nucleus pulposus; ICH, intracranial hemorrhage

백혈구 감소증 환자의 경우 24명 중에서 3명이 항체 양성을 나타내어 12.5%의 양성율을 나타내었다. 그러나 이들 환자의 경우에는 지속적인 관찰이 이루어지지 않아 양성반응을 나타내는 환자의 경우 심부성 칸디다증으로 진행이 될 것인지 아닌지는 관찰하지 못하였다.

본 연구에서는 침습성 칸디다증으로 확진된 환자의 혈청을 다량 확보하지 못하여 민감도 및 특이도에 대한 통계는 아직 정확하게 판단하기 어려운 실정이다. 침습성 칸디다혈증의 진단은 쉽지 않다. 현재 주로 혈액배양과 조직 검사가 주로 이용되고 있으나, 조직 검사는 실제 임상에서 거의 행해지지 않고 외국의 경우 사후 부검을 통해 이루어지는 예도 종종 있지만 국내에서는 조직 검사로 확인되는 예가 매우 드문 실정이다. 또 혈액배양으로도 침습성 칸디다증을 진단하기는 어렵다. 혈액배양에서 지속적으로 칸디다균이 분리되더라도 혈관 카테터 사용과 연관된 비 침습성 칸디다혈증이 흔하기 때문이다<sup>9)</sup>. 카테터 연관 칸

다혈증은 대부분 초기에는 조직에 균 침습이 없고 혈관 카테터를 제거한 후 24시간 이내에 칸디다혈증이 사라지므로 침습성 칸디다증으로의 이행 유무를 판단하기가 쉽지 않고 또 침습성 칸디다증과 임상적으로 구분이 필요하다<sup>9)</sup>.

본 연구에서 칸디다혈증 환자 중 비 카테터 관련 환자군에서는 8명 중 2명을 제외하고 6명에서 모두 enolase 항체 양성을 보였다. 이 환자들은 임상적으로 침습성 칸디다증이 강력히 의심되는 환자들로서 모두 항진균제 치료를 받고 있었다. 일반적으로 침습성 칸디다증을 유발하는 균종은 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* 등으로 알려져 있고 *C. parapsilosis*는 주로 카테터와 연관된 혈류 감염을 일으키며 예후가 매우 좋은 것으로 알려져 있는데<sup>1,15)</sup>, 본 연구에서 항체 양성반응을 보인 칸디다혈증의 원인균종은 *C. albicans* 5예, *C. tropicalis* 1예, *C. glabrata* 1예였고 *C. parapsilosis* 5예는 모두 음성을 보였다. 그러나 이 환자들에서도 조직 검사 등 다른 검사 소견이 뒷받침되지 않아

사실상 침습성 칸디다증의 확진이 어려운 실정이다. Enolase 항원은 칸디다의 세포질 효소의 일종으로 균주가 숙주세포에 정상균총으로 존재할 경우에는 생산되지 않지만, 숙주세포에 침입하여 증식할 경우 다량 생산되며, 당 대사에 관여하고 혈액내로 분비되어 칸디다증의 조기진단이 가능한 표식자로 알려져 있다<sup>25,13)</sup>. 본 연구에서 enolase 항체는 카테터 연관 칸디다혈증에서는 14.3%로서 매우 낮은 반면, 비 카테터 연관 칸디다혈증 환자에서는 75%로 매우 높아 본 연구 결과 개발한 enolase 항원에 대한 항체 검사가 이들 두 군간 감별에 어느 정도 가능성을 보여 주었다. 따라서 조직학적 방법으로 침습성 칸디다증으로 확진된 혈청을 다량 확보후 분리된 enolase를 이용하여 민감도 및 특이도에 대한 우수한 결과가 나타날 경우 본 연구에서 개발한 enolase는 심부성 칸디다증에 대한 조기진단용 표준항원으로서 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대한다.

## 결 론

*C. albicans* KNIH10으로부터 분리된 enolase를 이용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Ammonium sulfate를 60~80%로 침전시킬 경우 침전된 효소액중에 enolase가 있음을 확인하였다.

2. DEAE-sepharose column을 이용한 결과 약 0.3~0.4 M NaCl에서 enolase가 용출됨을 확인하였다.

3. SDS-PAGE를 실시한 결과 enolase의 47 kDa의 분자량과 순도를 확인하였다.

4. 분리된 enolase 항원을 이용하여 immunoblotting으로 면역학적 측정을 실시한 결과 40명의 정상인 혈청에서는 전혀 항체가 검출되지 않았다 (100% 특이도).

5. 침습성 칸디다증이 의심된, 비 카테터 연관 칸디다혈증 환자의 혈청을 대상으로 enolase 항체 측정을 실시한 결과 75% (6/8)의 양성반응을 나타내었다.

## 감사 말씀

본 연구는 1997년도 보건 의료기술 연구 개발 사업의 지원 (HMP-97-B-1-0008)에 의하여 이루어진 것임.

## 참 고 문 헌

- 1) Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzowski H, Vartivarian S: The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* **24**: 1122-1128, 1997.
- 2) Angiolella L, Facchin M, Stringaro A, Maras B, Simonetti N, Cassone A: Identification of a glucan-associated enolase as a cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J Infect Dis* **173**(3): 684-690, 1996.
- 3) Deventer AJ, Vliet HJ, Hop WC, Goessens WH: Diagnostic value of anti-candida enolase antibodies. *J Clin Microbiol* **32**(1): 17-23, 1994.
- 4) Franklyn KM, Warmington JR: Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Candida albicans* enolase gene. *FEMS Microbiol Lett* **111**(1): 101-107, 1993.
- 5) Franklyn KM, Warmington JR, Ott AK, Ashman RB: An immunodominant antigen of *Candida albicans* shows homology to the enzyme enolase. *Immunol Cell Biol* **68**: 173-178, 1990.
- 6) Girmenia C, Martino P, de Bernardis F, Cassone A: assessment of detection of *Candida* manno-proteinemia as a method to differentiate central venous catheter-related candidemia from invasive disease. *J Clin Microbiol* **35**(4): 903-906, 1997.
- 7) Kim BS, Lee YS, Cho IS, Kim DH, Park KD, Shin JH: Comparison of immunological methods for diagnosis of invasive candidiasis. *Kor J Med Mycol* **1**(1): 55-62, 1996.
- 8) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685, 1970.
- 9) Lemieux C, Germain ST, Vincelette J, Kaufman L, Repentigny L: Collaborative evaluation of antigen detection by a commercial latex agglutination test and enzyme immunoassay in the diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* **28**(2): 249-253, 1990.
- 10) Louis R, Marr LD, Keller JW, Carter AW, Kuykendall RJ, Kaufman, Reiss E: Comparison of

- enzyme immunoassay and gas-liquid chromatography for the rapid diagnosis of invasive candidiasis in cancer patients. *J Clin Microbiol* **21(6)**: 972-979, 1985.
- 11) Mason AB, Buckley HR, Gorman JA: Molecular cloning and characterization of the *Candida albicans* enolase gene. *J Bacteriol* **175(9)**: 2632-2639, 1993.
- 12) Matthews RC, Burnie JP, Tabaqihali S: Immunoblot analysis of the serological response in systemic candidosis. *The Lancet* **22(29)**: 1415-1418, 1984.
- 13) Mitsutake K, Kohno S, Miyazaki T, Miyazaki H, Maesaki S, Koga H: Detection of candida enolase antibody in patients with candidiasis. *J Clin Lab Anal* **8(4)**: 207-210, 1994.
- 14) Ollert MW, Wende C, Gorlich M, McMullanvogel CG, Vogel CW, Korting HC: Increase expression of *Candida albicans* secretory proteinase a putative virulence factor in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* **33(10)**: 2543-2549, 1995.
- 15) Pfaller MA: Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmission. *Clin Infect Dis* **22(supple 2)**: S89-S94, 1996.
- 16) Sandini S, Melchionna R, Arancia S, Gomez MJ, La Valle R: Generation of a highly immunogenic recombinant enolase of the human opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Biotechnol Appl Biochem* **29**: 223-227, 1999.
- 17) Towbin H, Gordon J: Immunoblotting and dot immunobinding current status and outlook. *J Immuno Methods* **72**: 313-340, 1984.
- 18) van Deventer AJM, van Vliet HJA, Hop WCJ, Goessens WHF: Diagnostic value of anti-candida enolase antibodies. *J Clin Microbiol* **32(1)**: 17-23, 1994.
-