

真菌感染的实验室诊断研究进展

Advances in laboratory diagnostic techniques for studying fungal infection

简子娟(JIAN Zi-Juan) 综述 刘文恩(LIU Wen-en) 审校

(中南大学湘雅医院, 湖南长沙 410008)

(Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[关键词] 真菌感染; 诊断; 实验室技术与方法

[中图分类号] R519 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2009)03-0211-04

真菌感染在临床上颇为常见,它不仅包括侵犯表皮角质层、毛发和甲板的浅部真菌感染,也包括侵犯真皮、皮下组织和内脏器官的深部真菌病。近 20 年来,在临床上随着广谱抗菌药物、免疫抑制剂、细胞毒药物的广泛应用;器官移植、导管技术及静脉高营养等技术的开展;严重疾病如恶性肿瘤、糖尿病和艾滋病等使免疫缺陷宿主不断增多;真菌感染率,特别是系统性条件致病性真菌的感染率在不断上升^[1]。实验室检查是临床诊断真菌感染的重要依据,常规的实验室诊断方法包括直接镜检法和培养法、病理学方法、血清学方法和分子生物学方法。本文就这几方面的研究进展进行综述。

1 直接镜检法和培养法

直接镜检法和培养检查法是形态学检查的基本方法。直接镜检是真菌学检查最经典的方法,具有快速、简便的特点,但阳性率较低。1 次取材直接涂片法的漏诊率高达 45%,而 3 次取材直接镜检的累积阳性率可达 99%。因此,阴性结果不能排除诊断,与培养检查结合才能确诊。培养检查法可进一步提高病原体检出的阳性率,验证直接镜检的结果,同时确定致病菌的种类。某些真菌感染的组织寄生形态具有特征性,对于诊断具有重要意义。如假丝酵母菌感染,在组织中可以同时发现酵母细胞和假菌丝;隐球菌感染可见带有荚膜的酵母细胞;曲霉菌感染可见无色、45°分支分隔的菌丝;毛霉菌感染可

见粗大无分隔呈直角分支的菌丝;组织细胞内的酵母细胞常提示组织胞浆菌或马尔尼菲青霉菌感染;棕色菌丝和/或孢子常提示暗色真菌感染^[2]。通过碘酸—雪夫染色、PAS 和银染等特殊染色可以更清楚地显示真菌细胞。

根据研究应用显色培养法,经 37°C 孵育 48 h 观察菌落色泽和形态即可作出鉴定,阳性率为 88.6%^[3]。为了提高假丝酵母菌属血培养阳性率,最重要的进展是使用解离离心管和血培养自动监测培养瓶。解离离心管主要是通过溶细胞混合物将巨噬细胞中吞噬的真菌成分释放,并且将补体和一些影响真菌细胞活力的抗微生物因子灭活,然后进行培养。这种方法能够缩短多器官受累患者血培养阳性的时间,但价格昂贵^[4]。血培养自动监测系统目前有 BacT/ALERT 3D 和 BACTEC 9240 两种,前者在有氧培养基上检出光滑假丝酵母菌时间明显缩短。此外,还有一些可以连续测定压力变化的血培养系统^[5]。除血培养外,其他体液如尿液也可以进行培养,不过其阳性结果应当结合患者病情和治疗情况考虑。

2 组织病理学检查

组织病理学检查对于确定致病菌在组织内寄生并了解宿主的反应十分重要,而且一旦在组织切片中发现真菌菌丝和/或孢子,即为诊断的有力证据。其结果与直接镜检和培养相结合对诊断的意义更

[收稿日期] 2008-07-11

[作者简介] 简子娟(1985-),女(汉族),江西省樟树市人,硕士研究生,主要从事临床微生物学研究。

[通讯作者] 刘文恩 E-mail:liuwenen@hotmail.com

大。除常用的真菌病原体染色方法外,免疫组化特异抗体染色可对临床常见条件致病菌作出特异性诊断。马蕾等^[6]采用微波 Envision 免疫组织化学二步法对 34 例深部真菌病患者的标本用福尔马林固定,石蜡包埋切片进行 PAS 染色,微波 Envision 免疫组织化学标记。结果示免疫组织化学染色在 16 例为可疑曲霉菌感染者中 14 例阳性;11 例可疑隐球菌感染全部阳性;7 例假丝酵母菌感染 6 例阳性。菌体染色清晰无背景。因此,微波 Envision 免疫组化二步法应用于深部真菌感染检测具有高敏感、低背景、快速简便的特点,在真菌病的临床病理诊断中具有很好的应用价值。有学者指出^[7],免疫组化方法较 PAS 方法可特异地对白假丝酵母菌、新生隐球菌和曲霉菌感染作出诊断。

3 血清学方法

血清学诊断方法在国内外开展了数十年,该方法可快速得出结果。近年来,检测真菌抗原、抗体及代谢产物的血清学方法已广泛用于临床。目前主要检测烯醇化酶、葡聚糖、甘露聚糖、Cand-Tec 抗原、半乳甘露聚糖和隐球菌荚膜多糖抗原等。

3.1 烯醇化酶 烯醇化酶(enolase)又称 2-磷酸 D-甘油盐水解酶,是糖酵解所必需的细胞内切酶。烯醇化酶广泛存在于真菌细胞中,是白假丝酵母菌中含量最为丰富的蛋白之一。这种蛋白质含量丰富且高度保守,研究显示只有在深部白假丝酵母菌感染时才大量释放烯醇化酶。Zoller 等^[8]在健康和免疫缺陷的混合人群中,以血清中是否含有抗烯醇化酶抗体来诊断深部假丝酵母菌病,其特异性和敏感性可分别达 96.4%和 81.5%。但烯醇化酶在体内清除较快,且抗白假丝酵母菌烯醇化酶抗体和其他假丝酵母菌烯醇化酶抗体有弱交叉反应。因此,监测患者血清中抗烯醇化酶抗体和抗体滴度的动态变化可提高临床应用价值。

3.2 β -1,3-D-葡聚糖 β -1,3-D-葡聚糖[(1-3)beta-D-glucans]广泛存在于各类真菌的细胞壁中,占真菌胞壁成分 50%以上。研究表明,除接合菌外,所有真菌胞壁上都含有 β -1,3-D-葡聚糖,以酵母样真菌含量为最高,而其他微生物、动物及人的细胞成分和细胞外液都不含这种成分。 β -1,3-D-葡聚糖在真菌细胞生长代谢过程中可自然脱落进入血循环。目前的检测方法为 G 试验。 β -1,3-D-葡聚糖可特异性地激活自噬变形细胞溶解产物提取的 G 因子,从旁

路激活鲎试验,此过程称为 G 试验。国内已经使用微生物快速动态检测系统(MB-80V),以 G 试验原理测定 β -1,3-D-葡聚糖来检测深部真菌感染。廖军^[9]等用 G 试验检测深部假丝酵母菌感染大鼠血浆中的 β -1,3-D-葡聚糖,结果表明,血浆的 β -1,3-D-葡聚糖水平在体内的变化与病程呈平行关系,敏感率为 80%,特异性为 100%。 β -1,3-D-葡聚糖检测作为系统性真菌感染诊断手段,具有早期、快速及适用范围广的优势,目前主要用于深部假丝酵母菌和曲霉感染的诊断、高危人群的监测以及对疗效、预后的评价。目前已有商品化 β -1,3-D-葡聚糖检测试剂盒如 Fungitell 等,2 h 内可以获得结果,美国食品与药品管理局(FDA)已经批准用于诊断真菌感染^[10];国内也有类似产品问世,但有待积累临床资料。由于隐球菌具有较厚的荚膜, β -1,3-D-葡聚糖含量也少,故该成分不能作为隐球菌感染指标。G 试验存在的问题是引起假阳性的因素较多,如内毒素污染、溶血和一些抗肿瘤药物的使用都可使 G 试验呈假阳性。

3.3 甘露聚糖 甘露聚糖(mannan)是真菌细胞壁含量最高的类多糖,其抗原决定簇成分是真菌病诊断的重要靶点。尤其假丝酵母菌属含量颇丰,所以目前检测甘露聚糖主要用于深部假丝酵母菌感染的诊断。但患者血清中甘露糖清除较快,检测抗甘露糖抗体的特异性和敏感性均差。目前检测外周循环中甘露聚糖的血清学方法包括 Pastorex 假丝酵母菌乳胶凝集试验和双抗体夹心 Platelia 抗原试验,均采用单克隆抗体,以提高其敏感性和特异性^[11]。但其并不与克柔假丝酵母菌的甘露糖发生反应,故不能应用于克柔假丝酵母菌的诊断。Eloy 等^[12]检测甘露糖抗原的敏感性和特异性分别为 43%和 100%,IgM 为 86%和 100%,也认为同时检测抗原、抗体可提高诊断的阳性率。Goins^[13]等应用 FACE 法,即检测寡糖的免疫荧光碳氢化合物电泳方法,将不同大小的寡糖分离开来,可帮助鉴别不同菌种的假丝酵母菌。此方法是一种简单易行且敏感的定量方法,可用于研究寡糖在真菌致病过程中的作用。

3.4 Cand-Tec 抗原 Cand-Tec 抗原是指可用假丝酵母菌检测系统(Cand-Tec,一种颗粒凝集试验系统)检测的一类假丝酵母菌蛋白抗原,其对热不稳定。Misaki 等报道^[14],Cand-Tec MT(微滴度法)优于传统的 Cand-Tec 法。其对 80 份血清标本进行分析,Cand-Tec MT 的敏感性和特异性分别为 100%和 80%,75%的病例随治疗而滴度降低,治疗无效

的患者滴度无降低倾向;部分患者抗原滴度随治疗效果有所升高,但在传统的 Cand-Tec 法上没有表现。因此,Cand-Tec MT 是一种早期诊断深部真菌感染和准确评价治疗效果的有效方法。但是,Cand-Tec 的敏感性和特异性各家报道不一,且在类风湿因子等的干扰下也可产生假阳性,加之其靶抗原的特性和功能不明,限制了其进一步发展。

3.5 半乳甘露聚糖(GM) GM 分布于大多数曲霉及青霉属真菌胞壁中,目前检测该成分主要用于诊断曲霉病。美国 FDA 于 2003 年批准将检测血清曲霉 GM 抗原作为侵袭性曲霉感染的诊断指标。其最灵敏、最常用的检测方法是采用 Platelia 曲霉抗原 ELISA 试剂盒以鼠抗 GM 单克隆抗体 EB-A2 和 ELISA 技术来检测患者体液中 GM 抗原,即双夹心 ELISA 法(double-sandwich ELISA),此法在欧洲国家也已被广泛应用^[15]。多项研究证实^[16-17],此法检测 GM 对诊断侵袭性曲霉病具有较高的特异性,可达 85%;但其灵敏度报道的差异较大,在 30%~100%之间,原因之一是所采用的检测阈值不同。有研究发现^[18]肺曲霉感染患者在临床症状和影像学表现出现之前,采用 ELISA 法检测,有 2/3 的患者在其他方法诊断侵袭性曲霉病前 6~14 d 即可检测到血浆 GM 而获得阳性结果,并证实监测血清 GM 含量动态变化不仅有利于曲霉感染的诊断,同样有利于对治疗效果和病情发展的判断。

3.6 新生隐球菌循环荚膜抗原 新生隐球菌循环荚膜抗原检测用于隐球菌病诊断,尤其针对侵袭性真菌感染是最重要的血清学试验之一。通过乳胶凝集试验可方便、快速、准确地从脑脊液或血液中检测出多糖抗原,其敏感性高于常规墨汁染色和培养。用乳胶凝集试验检测脑脊液新生隐球菌荚膜多糖抗原的敏感性可达 98%,特异性达 99%^[19]。乳胶凝集试验可检测 35 ng/ μ L 的抗原,ELISA 敏感性高于乳胶凝集试验,可检测 6 ng/ μ L,但有时受血中或体液中某些成分如类风湿因子等的干扰。用鼠单克隆抗体检测多糖抗原,可提高敏感性,并可降低因类风湿因子干扰所致的假阳性发生。

4 聚合酶链反应(PCR)技术

近年来,PCR 技术已成功应用于某些深部真菌感染的检测。由于该方法可在极短的时间内检测出极微量的真菌 DNA,故使真菌感染的早期诊断成

为可能,为一些难以靠形态学检查来确诊的深部真菌感染开辟了新的诊断途径。其原则是首先采用真菌通用引物对待检标本进行扩增,然后再采用属或种特异性引物对扩增产物进行二次扩增^[20]。随着真菌学研究的不断深入,许多病原真菌的基因组序列已探明。根据这些已知序列,可以选择合适的区域设计具有种、属特异性的引物用于医学真菌的检测。在对医学上重要的病原真菌采用分子生物学方法进行分型、鉴定的基础上,通过对其 18s、28s rDNA、ITS 区(转录间隔区)、细胞色素 P-450、14- α 脱甲基酶、角鲨烯环氧化酶等目的序列进行分析,结合网络资源,人们分别设计出白假丝酵母菌、烟曲霉、孢子丝菌、皮炎外瓶霉、茄病镰刀菌的 ITS 区种特异性引物用于诊断^[21-22]。目前对筛选出的特异引物还有待经过大量不同种属菌株来证实这些引物的特异性。

随着 PCR 技术的出现,分子杂交技术已被淘汰。用传统 PCR 技术诊断真菌感染存在局限性,如极微量的污染可造成假阳性以及难以区分定植菌和感染菌使其特异性不高。目前一些改进的 PCR 技术如实时 PCR、多重 PCR、荧光 PCR 乃至基因芯片技术等将在较大程度上增加灵敏度与特异度,在鉴别真菌定植和感染以及真菌种属的鉴定方面能提供有益的帮助。近年研究较多、最有前途的 PCR 技术是实时 PCR,包括 2 种方法:一种是 TaqMan-PCR,它是集 PCR、探针杂交和信号产生于一体的检测系统,这一技术成功地鉴定了白假丝酵母菌、克柔假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌,对种属鉴定具有极高的特异性,在人体细胞、细菌、真菌、病毒之间无交叉反应^[23]。另一种称为 LightCycler 检测系统,该技术由玻璃毛细管快速热循环结合扩增产物联机荧光检测构成,其优越性在于:(1)可实现白假丝酵母菌和烟曲霉的特异性检测;(2)可以确定标本中的菌量;(3)大大减少了污染风险;(4)需时仅 4~5 min^[24]。

Kami 等^[25]在一项研究中评价了实时 PCR 技术和血浆 GM 及 β -D-葡聚糖检测在诊断侵袭性曲霉病中的应用,结果显示,实时 PCR 技术的灵敏度和特异度分别为 79% 和 92%,ELISA 法测定血浆 GM 的灵敏度和特异度分别为 58% 和 97%,血浆 β -D-葡聚糖检测的灵敏度和特异度分别为 67% 和 84%。

5 展望

真菌感染的诊断是一个比较复杂的问题。理想的诊断方法应该具备快速、敏感、特异等特点。随着医学真菌学的飞速发展,血清学和分子生物学等非培养法有了较大的进展,但敏感性和特异性仍不能满足临床的需要。为了作出准确的诊断,应将传统的形态学检查、培养法与非培养法结合起来,对真菌感染诊断提供可靠的实验室依据。另外,综合利用多种诊断技术是必要的,包括临床诊断和病原学诊断技术等。

[参 考 文 献]

- [1] Clark T A, Hajjeh R A. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses[J]. *Curt Opin Infect Dis*, 2002, 15(6): 569 - 574.
- [2] 王端礼. 医学真菌学——实验室检查指南[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 51.
- [3] 程守科. 科玛嘉念珠菌显色培养基用于医院感染深部真菌的快速诊断[J]. *内科急危重症杂志*, 2003, 9(1): 53 - 54.
- [4] Ellepola A N, Morrison C J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis[J]. *Microbiol*, 2005, 43(1): 65 - 84.
- [5] Reimer G, Wilson L, Weinstein M P. Update of detection of bacteremia and fungemia[J]. *Clin Microbiol Rev*, 1997, 10(3): 444 - 465.
- [6] 马蕾, 李挺, 李若瑜. Envision 免疫组织化学二步法在诊断深部真菌感染上的应用[J]. *临床皮肤科杂志*, 2002, 31(8): 501 - 503.
- [7] 狄梅, 涂平, 李若瑜, 等. 重要条件致病真菌感染组织免疫组化研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2000, 33(5): 324 - 326.
- [8] Zoller L, Kramer I, Kappe R, *et al*. Enzyme immunoassays for invasive *Candida* infections: reactivity of somatic antigens of *Candida albicans* [J]. *Clin Microbiol*, 1997, 29(9): 1860 - 1867.
- [9] 廖军, 郝飞. 深部真菌感染血清真菌成分检测方法研究进展[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2002, 23(2): 85 - 86.
- [10] Patterson T F. Advances and challenges in management of invasive mycoses[J]. *Lancet*, 2005, 366(9490): 1013 - 1025.
- [11] Fasahat F Alam, Abu S Mustafa, Zia U Khan. Comparative evaluation of (1, 3)- β -D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2007, 7: 103 - 111.
- [12] Eloy O, Tabella C, Harzic M, *et al*. Detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies; useful for diagnosis of deep-seated candidiasis [J]. *Biol Clin*, 2002, 60(6): 711 - 714.
- [13] Goins T L, Cutler J E. Relative abundance of oligosaccharides in candida species as determined by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis[J]. *Clin Micro Biol*, 2000, 38(8): 2862 - 2869.
- [14] Misaki H, Iwasaki H, Ueda T. A comparison of the specificity and sensitivity of two *Candida* antigen assay systems for the diagnosis of deep candidiasis in patients with hematologic diseases[J]. *Med Sci Monit*, 2003, 9(2): 231 - 237.
- [15] Mennink-Kersten M A, Donnelly J P, Verweij P E. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2004, 4(6): 349 - 357.
- [16] Rovira M, Jimenez M, De La Bellacasa J P, *et al*. Detection of *Aspergillus* galactomannan by enzyme immunosorbent assay in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; a prospective study[J]. *Transplantation*, 2004, 77(8): 1260 - 1264.
- [17] Marr K A, Balajee S A, Mclaughlin L, *et al*. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis; variables that affect performance [J]. *Infect Dis*, 2004, 190(3): 641 - 649.
- [18] Hope W W, Walsh T J, Denning D W. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2005, 5(10): 609 - 622.
- [19] Sivertsen E A, Torfoss D. Cryptococcal meningitis [J]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2004, 12(4): 28 - 30.
- [20] 李若瑜, 李东明, 余进, 等. 分子生物学技术在病原真菌鉴定和真菌感染诊断中的应用[J]. *北京大学学报*, 2004, 36(5): 536 - 539.
- [21] 王晓慧, 冀朝辉, 李若瑜. 种特异性引物鉴定孢子丝菌[J]. *中华皮肤科杂志*, 2004, 37(4): 203 - 205.
- [22] 李东明, 李若瑜, 王端礼, 等. 皮炎外瓶霉分子鉴定的初步研究[J]. *临床皮肤科杂志*, 2003, 32(5): 249 - 251.
- [23] Guiver M, Levi, Oppenheim B A. Rapid identification of candida species by TaqMan PCR[J]. *Clin Pathol*, 2005, 54(5): 362 - 366.
- [24] 赵蓓蕾, 施毅, 桑红. 现代肺部真菌病学[M]. 北京:人民军医出版社, 2004: 57 - 58.
- [25] Kami M, Fukui T, Ogawa S, *et al*. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *Clin infect Dis*, 2001, 33(9): 1504 - 1512.