

# 侵袭性真菌感染的实验诊断研究

## Laboratory diagnosis of invasive fungal infections

孙雯雯(SUN Wen-wen)<sup>1</sup> 综述 刘 丁(LIU Ding)<sup>1</sup>, 张莉萍(ZHANG Li-ping)<sup>2</sup> 审校

(1 第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所 重庆市医院感染控制中心, 重庆 400042; 2 重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400016)

(1 Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2 The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[关键词] 真菌; 侵袭性真菌感染; 诊断; 实验室技术和方法

[中图分类号] R519 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2010)01-0067-04

随着抗菌药物、免疫抑制剂及皮质类固醇激素的应用, 器官移植、侵入性操作的广泛开展, 临床上真菌感染逐年增多, 尤其在免疫力低下和危重患者中, 侵袭性真菌感染已成为主要并发症, 其发病率和死亡率居高不下, 严重威胁着患者的生命<sup>[1]</sup>。通常侵袭性真菌感染的早期诊断比较困难, 一方面因为真菌感染早期无特异的临床表现; 另外, 目前临床常用的培养鉴定方法难以满足早期诊断的要求。因此, 建立非培养的快速真菌感染诊断方法成为研究热点, 这类方法主要包括血清学、免疫学和分子生物学等。本文就此方面的研究综述如下。

### 1 真菌标志物的检测

#### 1.1 半乳甘露聚糖(galactomannan, GM)测定

GM 分布于大多数曲霉及青霉菌真菌细胞壁中, 其半乳糖残基具有抗原性, 因此检测患者血清中的 GM 浓度有助于侵袭性真菌感染的早期诊断, 现多采用双抗体夹心酶联免疫吸附分析法(ELISA)对 GM 抗原进行检测。纪宇等<sup>[2]</sup>采用 ELISA 法测定 46 例进行造血干细胞移植或移植后患者的 167 份血清样本的 GM 浓度, 该试验诊断的灵敏度为 81.8%, 且 GM 浓度与患者疾病的预后具有相关性。但 ELISA 法测定 GM 的临床灵敏度变化较大, 范围波动在 29%~100%。有学者认为这是因为宿主和感染的病程不同所致, 在免疫耐受患者中,

灵敏度>90%; 而在其他疾病如慢性肉芽肿、实体器官移植患者中, 其灵敏度就偏低<sup>[3]</sup>。另外, 有证据表明, 伴随抗真菌疗法会导致灵敏度下降<sup>[3]</sup>; 取样不足也会产生影响。一般临床上 GM 特异性估计将>90%, 在新生儿和儿童中要低一些。这可能与食入了食物和水中的外源性 GM, 以及消化道损坏或发育未成熟有关<sup>[3]</sup>。

以真菌作为原料制成的抗菌药物也是 GM 的重要外来源, 可造成假阳性结果<sup>[4]</sup>。Aubry 等<sup>[5]</sup>检测了血液病患者 3 种  $\beta$ -内酰胺类药物静脉给药后的 GM 结果, 并同时测定停药后 GM 清除率的动力学进行评估, 发现  $\beta$ -内酰胺类药物的使用和 GM 阳性有明显的联系, 并认为  $\beta$ -内酰胺类药物的使用可致 GM 假阳性, 甚至到停药后 5 d 仍可检测出 GM。

#### 1.2 (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖( $\beta$ -D-glucans, BG)测定

BG 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<sup>[6]</sup>, 除少数真菌外, 所有真菌胞壁上都含有 BG, 以酵母样真菌含量最高, 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。 $\beta$ -葡聚糖已成为一个检测真菌病原体的主要靶点。

目前, 对  $\beta$ -葡聚糖的检测方法与革兰阴性菌内毒素检测相似。内毒素主要激活的是鲎的凝血酶原 C 因子, 并引发纤维蛋白凝固。同样, 鲎凝血系统中的凝血酶原 G 因子能识别  $\beta$ -葡聚糖, 也是 BG 的天然检测者。G 因子的  $\alpha$  亚基特异性识别 BG 后, 可

[收稿日期] 2009-04-17

[基金项目] 重庆市自然科学基金(2007BB5079)

[作者简介] 孙雯雯(1983-), 女(汉族), 山东省泰安市人, 硕士研究生, 主要从事医院感染与临床微生物学研究。

[通讯作者] 刘丁 E-mail: liudingcq@sohu.com

激活血清凝固酶原上的  $\beta$  亚基,形成凝固酶,凝固酶可以参与凝血酶原级联反应,使凝固蛋白原转变为凝胶状的凝固蛋白,该反应过程可通过光谱仪测量其光密度来进行量化,精确度可到  $1 \text{ pg/mL}$ <sup>[7]</sup>。目前已有商品化的 BG 试剂盒。

研究表明,BG 先于临床表现出现之前升高,是早期诊断侵袭性真菌感染的手段之一。Pazos 等<sup>[8]</sup>报道 5 例及 3 例临床确诊的侵袭性真菌感染患者,其 BG 值升高出现在发热、咳嗽、胸痛等症状和肺部高分辨率 CT(HRCT)检查发现阳性征象之前。其中 BG 值升高平均早于发热 5 d,早于呼吸道症状平均 10.7 d。Odabasi 等<sup>[7]</sup>对确诊为粒细胞缺乏的人群进行为期 3 周的动态血检测及临床观察,发现 BG 值开始高于  $60 \text{ pg/mL}$  的时间比最后确诊或临床诊断侵袭性真菌感染平均提前了 10 d。因此,BG 值被认为是早期诊断侵袭性真菌感染无创检测手段之一。同时,BG 还可用于监测治疗的效果。BG 水平高低能够提示疾病的发展和预后。Pazos 等<sup>[8]</sup>研究发现,BG 水平在确诊侵袭性真菌感染患者的血清中出现持续升高,而随着药物的使用,对药物敏感者可很快出现 BG 水平下降,药物治疗无效人群 BG 值无明显改变。因此,BG 可以协助临床医生评估药物的疗效,并及时调整药物和剂量。

近来也有 BG 检测结果出现假阳性的报道。Marty 等<sup>[9]</sup>研究认为头孢西丁、头孢唑林、甲氧苄氨嘧啶、头孢噻肟、头孢吡肟等抗菌药物可影响 BG 的检测结果,出现假阳性。同时,由于 BG 的测定原理与内毒素十分相似,所以易受血中革兰阴性菌的干扰,造成假阳性。Pazos 等<sup>[8]</sup>研究发现 1 例大肠埃希菌感染者 BG 为阳性,其测定值  $>120 \text{ pg/mL}$ ;同时对 40 名高危险合并侵袭性曲霉病的中性粒细胞缺乏症成年患者采用一周进行 2 次筛选的方法同时检测 BG 和 GM 来诊断侵袭性曲霉病,发现 BG 和 GM 对诊断血液病患者合并侵袭性曲霉病都有价值,BG 出现阳性结果早于 GM,但联合检测更能有效地排除每项试验的假阳性结果。Pontón 等<sup>[10]</sup>认为 BG 和真菌 DNA 的联合检测,也利于侵袭性酵母菌感染的诊断。

## 2 血清免疫学试验

2.1 单克隆抗体检测真菌特异性抗原 随着单克隆技术的发展和运用,制备针对真菌特异性抗原或其代谢产物的单克隆抗体在诊断深部真菌感染中的

意义非常重大。例如白假丝酵母菌是一种双相菌,在患者体内检测到孢子抗原不能说明有系统性感染的存在,当孢子转向致病相——芽管、假菌丝时,便有相应的可溶性抗原释放入血,因此检测到芽管、菌丝相的抗原即可确诊系统性假丝酵母菌感染<sup>[11]</sup>。Marot-Leblond 等<sup>[12]</sup>报道用间接免疫荧光筛选的方法制备出全球第 1 例抗白假丝酵母菌芽管的单抗,该 McAb 只同白假丝酵母菌的芽管相反应,不同孢子反应,而且也不与同属其他种类的假丝酵母菌反应,在检测早期白假丝酵母菌系统性感染中有着重要的意义。

在真菌某些代谢产物的检测中,可采用蛋白质连接技术,使分子量低且无免疫原性的真菌毒素与载体蛋白偶联,将偶合的真菌毒素抗原免疫小鼠,建立分泌抗真菌毒素单克隆抗体杂交瘤细胞株。采用 ELISA、RIA 和免疫亲和层析技术进行检测。该种抗真菌毒素的单抗检测与传统检测方法相比,具有快速、敏感、简便等特点,可用于粮食、食品、饲料及生物体液、组织中真菌毒素及其相关代谢物检测<sup>[11]</sup>。单克隆抗体除可用于测定抗原外,还可诱导有效的体液免疫,具有保护性,达到治疗的目的<sup>[13]</sup>。寻求用单克隆抗体来治疗真菌疾病也成为现在的热点。

2.2 真菌的免疫学检测 真菌的培养需要较长的时间,而且阳性率较低,而真菌的感染发展迅猛,须尽早治疗。因此,真菌的免疫学检查对真菌感染的早期诊断具有重要价值。

免疫学检查可以检测抗真菌抗体并观察其滴度的动态变化,判断是否有真菌感染,这种方法在诊断假丝酵母菌、曲霉菌、组织胞浆菌感染中有一定作用。另外,也可检测真菌抗原,这对早期诊断或确定某种特殊真菌感染具有很大的价值。常见于检测新生隐球菌的荚膜多糖抗原、假丝酵母菌的甘露糖及葡聚糖抗原、曲霉菌的甘露糖半乳糖抗原等,还可以用真菌抗原做皮肤过敏试验,检测有无该真菌感染<sup>[14]</sup>。

近年来,免疫学检查方法在理论和技术方面已取得很大进展。这种检查方法简便快速,对真菌感染的早期诊断很有帮助,但由于存在免疫交叉反应,导致其特异性不高,可能出现假阳性反应。而当患者长期接受免疫抑制剂、糖皮质类固醇激素治疗或处于疾病早期时,可能造成假阴性反应。

## 3 分子生物学检测

3.1 聚合酶链反应 (PCR) 检测真菌 DNA 近年

来,分子生物学技术已成功地应用于某些深部真菌感染的诊断检测,可以简便、快速地鉴定多种真菌,可应用于病原真菌的分型、鉴定和亲缘关系研究。其中以实时定量 PCR 技术检测真菌的方法最为常见。Carr 等<sup>[15]</sup>应用实时定量 PCR 技术诊断了由假丝酵母菌感染而引起的心内膜炎;Jordanides<sup>[16]</sup>用该法对 78 例血液肿瘤患者的真菌感染进行早期诊断,敏感性为 75%,特异性为 70%;Sanguinetti<sup>[17]</sup>对肺泡灌洗液用实时定量 PCR 法进行检测,诊断侵袭性肺曲霉病,阳性率为 90%;亦有学者用 PCR 技术检测同种异体移植物的真菌污染程度<sup>[18]</sup>。

目前,阻碍 PCR 成为实验室常规检查的最大问题是无法排除假阳性结果。因为真菌广泛存在于自然界中,PCR 检测敏感性较高,阳性结果无法区分是感染,还是标本污染;同时,定植也是产生假阳性结果的主要原因。尽管在实验中采取了各种措施减少污染,但对于同一疾病的敏感性、特异性各文献报道的结果仍不相同<sup>[19]</sup>。近年,RT-PCR 和自动化 DNA 提取技术的发展使检测过程标准化成为可能。RT-PCR 的优点在于可以在封闭状态对扩增产物进行检测,省去了 PCR 的后期处理,避免扩增产物污染而引起的假阳性结果;它还可以对反应开始的靶基因定量,监测血中病原真菌的负荷量,指导临床治疗<sup>[20]</sup>。

另外,标本的处理方法也是影响提高检出率的关键。有的学者认为用全血进行检测的效率高于血清,因为一部分真菌会黏附在人的白细胞上<sup>[21]</sup>;而另一种观点则认为全血中的抗凝剂 EDTA-K<sub>2</sub> 会产生 PCR 反应阻遏物,易产生假阴性结果<sup>[19]</sup>。

**3.2 基因芯片技术** 基因芯片技术是一种高通量检测技术,对微生物检测来说具有很大的吸引力。基因芯片技术即 DNA 微阵列(DNA microarray),是按照预定位置固定在固相载体上很小面积内的很多核酸分子所组成的微点阵列。在一定的条件下,载体上的核酸分子可以与来自样品的序列互补的核酸片段杂交。如果把样品中的核酸分子进行标记,在芯片扫描仪上就可检测到杂交信号。黄爱华等<sup>[22]</sup>以 5.8 SrDNA 与 28 SrDNA 间的内转录间区 2(internal transcribed spacer-2, ITS-2)为靶标,针对待测的临床常见致病真菌设计合成一系列寡核苷酸探针,制成寡核苷酸芯片。待测真菌 DNA 经通用引物扩增标记后,与芯片杂交,对杂交图谱分析归纳,得到一套种特异性的典型杂交图谱。待测样品的菌与基因芯片杂交,得到的杂交结果与典型图谱

对比即可判断出样品的种类。

基因芯片的检测效能是依赖于芯片上所固定的探针来实现的,选择适于芯片检测的靶基因来确定探针的种类、序列和数量就成为制备基因芯片的关键。所以,当检测的样品是未知真菌时,必须做多次或多重 PCR 获得靶基因,增加了实验操作的难度和材料耗费,很难发挥芯片的优势<sup>[22]</sup>。

**3.3 荧光原位杂交(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)** FISH 技术是 20 世纪 80 年代末在已有的放射性原位杂交技术基础上发展起来的一种非放射性分子细胞遗传学技术。通常情况下,对切片或细胞学标本主要依靠形态学证据进行真菌的鉴定。近来有报道<sup>[23]</sup>,在组织标本中,将真菌 rRNA 基因或蛋白酶基因作为靶位基因,应用 FISH 技术来快速鉴定曲霉菌属。

目前,侵袭性真菌感染的实验诊断技术仍不完善,对临床疑似侵袭性真菌感染的患者,应联合应用多种检测技术进行诊断。同时,随着真菌实验诊断技术研究的不断深入,有关侵袭性真菌感染的实验诊断技术将有更大的发展。

#### [参 考 文 献]

- [1] Shao P I, Huang L M, Hsueh P R. Invasive fungal infection laboratory diagnosis and antifungal treatment [J]. *Microbiol Immunol Infect*, 2006, 39(3): 178 - 188.
- [2] 纪宇, 刘代红, 许兰平, 等. 血清半乳甘露聚糖检测对造血干细胞移植后患者侵袭性曲霉菌感染的诊断价值 [J]. *中华血液学杂志*, 2007, 28(2): 83 - 86.
- [3] Hope W W, Walsh T J, Denning D W. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2005, 5(10): 609 - 622.
- [4] Niimi K, Shepherd M G, Cannon R D. Distinguishing *Candida* species by beta-N-acetyl hexosaminidase activity [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(6): 2089 - 2097.
- [5] Aubry A, Porcher R, Bottero J, et al. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with  $\beta$ -lactam antibiotics in patients with hematological disorders [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(2): 389 - 394.
- [6] 祝贺, 杨蓉娅, 王文岭, 等. 真菌组成成分及代谢产物检测在真菌病诊断中的应用进展 [J]. *中国真菌学杂志*, 2007, 22(4): 119 - 121.
- [7] Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al.  $\beta$ -D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 39(2): 199 - 205.

- tomy in patients with malignant non-Hodgkin's lymphoma [J]. Eur J Haematol, 2000, 64(3):145-150.
- [10] Walsh R M, Heniford B T. Laparoscopic splenectomy for non-Hodgkin's lymphoma[J]. J Surg Oncol, 1999, 70(2):116-121.
- [11] O'Doherty M J, Barrington S F, Campbell M, et al. PET scanning and the human immunodeficiency virus-positive patient [J]. J Nucl Med, 1997, 38(10):1575-1583.
- [12] 华逢春,刘永昌,赵军,等. <sup>18</sup>F-FDG PET 显像在发热待查患者中筛查淋巴瘤的价值[J]. 中华核医学杂志, 2004, 24(1):11-13.
- [13] Sato T, Terui T, Kogawa K, et al. A case of true malignant histiocytosis: identification of histiocytic origin with use of immunohistochemical and immunocytogenetic methods [J]. Ann Hematol, 2002, 81(5):285-288.
- [14] Mongkongsritragoon W, Licy, Philyky R L. True malignant histiocytosis [J]. Mayo Clin Proc, 1998, 73(6):520-528.
- [15] Henter J I, Home A, Arico M, et al. HLH-2004 diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. Pediatr Blood Cancer, 2007, 18(2):124-131.
- [16] Bryceon Y T, Rudd E, Zheng C, et al. Defective cytotoxic lymphocyte degranulation in syntaxin-11 deficient familial hemophagocytic lymphohistiocytosis 4 (FHL4) patients [J]. Blood, 2007, 110(6):1906-1915.
- [17] Kawada J, Kimura H, Shibata Y, et al. Evaluation of apoptosis in Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. J Med virol, 2006, 78(3):400-407.
- [18] Imashuku S, Hibi S, Ohara T, et al. Effective control of Epstein-Barr virus-related hemophagocytic lymphohistiocytosis with immunochemotherapy [J]. Blood, 1999, 93(6):1869-1874.
- [19] Janka G, Imashuku S, Elinder G, et al. Infection and malignancy-associated hemophagocytic syndromes [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 1998, 12(2):435-444.
- [20] Shunichi K, Hiroto I, Shingo Y, et al. Autoimmune-associated hemophagocytic syndrome [J]. Am J Med, 1997, 102:113-115.

(上接第 69 页)

- [8] Pazos C, Ponton J, Del Palacio A. Contribution of (1,3)- $\beta$ -D glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(1):299-305.
- [9] Marty F M, Lowry C M, Lempitski S J, et al. Reactivity of (1,3)- $\beta$ -D-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(10):3450-3453.
- [10] Pontón J, del Palacio A. Advances and limitations in the early diagnosis of invasive yeast infections [J]. Rev Iberoam Micol, 2007, 24(3):181-186.
- [11] 宋秋荷,王鲁. 单克隆抗体技术在深部真菌病诊断和治疗中的应用[J]. 中国真菌学杂志, 2007, 22(4):126-128.
- [12] Marot-Leblond A, Grimaud L, Nail S, et al. New monoclonal antibody specific for *Candida albicans* germ tube [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(1):61-67.
- [13] Casadevall A, Feldmesser M, Pirofski L A. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens [J]. Curr Opin Microbiol, 2002, 5(4):386-391.
- [14] 李若瑜,王瑞礼. 密切结合临床 提高真菌学检验水平[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(9):521-523.
- [15] Carr M J, Clarke S, O'Connell F, et al. First reported case of endocarditis caused by *Candida dubliniensis* [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(6):3023-3026.
- [16] Jordanides N E, Allan E K, McIntock L A, et al. A prospective study of real-time panfungal PCR for the early diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients [J]. Bone Marrow Transplant, 2005, 35(4):389-395.
- [17] Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, et al. Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(8):3922-3925.
- [18] Gupta V, Cobb R R, Brown L, et al. A quantitative polymerase chain reaction assay for detecting and identifying fungal contamination in human allograft tissue [J]. Cell Tissue Bank, 2008, 9(2):75-82.
- [19] Buchheidt D, Hummel M. *Aspergillus* polymerase chain reaction (PCR) diagnosis [J]. Med Mycol, 2005, 43(S1):S139-45.
- [20] Pryce T M, Kay I D, Palladino S, et al. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003, 47(3):487-496.
- [21] Buchheidt D, Hummel M, Schleiermacher D, et al. Current molecular diagnostic approaches to systemic infections with as species in patients with hematological malignancies [J]. Leuk Lymphoma, 2004, 45(3):463-468.
- [22] 黄爱华,李君文. 基因芯片技术检测鉴定临床常见致病菌的初步研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(2):180-185.
- [23] 王沛,彭少华. 荧光原位杂交法诊断细菌及真菌进展[J]. 中国实验诊断学杂志, 2005, 9(1):149-151.