·综　　述·

侵袭性真菌的抗原标志物检测

孙　伟 综述，马立艳 审校
（首都医科大学附属北京友谊医院临检中心，北京 100050）

关键词：真菌；　侵袭性真菌感染；　抗原
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.038　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1673-4130(2013)16-2143-03

条件致病性真菌感染，特别是深部真菌病的发病率和病死率呈明显上升趋势，是影响患者预后的重要因素之一。由于深部真菌感染初期临床症状不明显，临床表现缺乏特征性，致使早期诊断十分困难，死前确诊率相当低，已日益受到医学界的关注。真菌感染的诊断依靠常规真菌分离、培养和组织病理鉴定，难以满足临床工作的需要，灵敏、特异、早期、快速的非培养诊断方法已成为深部真菌感染研究领域的焦点。近年来真菌感染的非培养诊断方法包括抗原检测、抗体检测和分子生物学检测等均取得了一定进展，发挥着越来越重要的作用。本文就侵袭性真菌感染的抗原标志物进行综述。

1　念珠菌感染抗原标志物

1.1　1,3-β-D-葡聚糖（BG）　葡聚糖广泛存在于真菌细胞壁中，占其干重的 80%～90%。其中，BG 抗原是酵母菌和丝状真菌细胞壁的多聚糖成分，占真菌胞壁成分 50%以上。BG 仅广泛存在于真菌细胞壁中（除接合菌外，所有真菌细胞壁都含有 BG，以酵母样真菌含量为最高），而其他微生物、动物及人的细胞和细胞外液不含这种成分。当真菌进入血液或系统性组织后，经吞噬细胞的吞噬、消化等处理后，BG 可从胞壁中释放出来，使得血液及其他体液（如尿、脑脊液、腹水、胸水等）中 BG 含量增高。因此，如果在血液或其他无菌体液中检测到 BG，就提示可能存在真菌感染。BG 已经成为真菌感染的有效标志物[1-2]，对于念珠菌血症，G 试验是首选检查。G 试验根据 Levin 等[3]发明的内毒素检测法（鲎实验法）演变而来。试验时首先去除受检标本中可能引起假阳性反应的蛋白酶、内毒素等，然后加入鲎变形细胞溶解物（其中存在 B、C、G 因子），BG 激活鲎变形细胞溶解物中的 G 因子产生蛋白酶，使鲎变形细胞溶解物出现凝固即为阳性结果，整个反应可以通过光谱仪测量其光密度来进行量化。可用于对系统性真菌病的诊断筛查，敏感性达 1 pg/mL[1]，特异度高，试验可在 1 h 左右完成。

目前市场上常用的试剂盒主要有两种，分别为日本开发研制的 Fungitec-G glucan 试剂和美国开发研制的 Gluca-tell 试剂，二者的主要区别在于所用马蹄鲎的品种不同。Fungitec-G 试剂采用东方鲎的细胞裂解产物作为主要原料，其判断标准为 20 μg/L[4]；而 Gluca-tell 试剂则使用美洲鲎的细胞裂解产物，判断标准为 60 ng/L[5-6]。正常体液中 BG 低于 10 pg/mL，感染真菌后大于 20 pg/mL，若以此为诊断界值，临床应用表明 G 试验敏感性为 90%，特异度为 84%～100%。

G 试验虽然能对侵袭性真菌感染进行早期诊断和疗效评估，但也有其局限性。所有试验用品均不得受内毒素污染，否则检测结果容易出现假阳性或者假阴性。（1）假阳性：使用纤维素膜进行血液透析，标本或患者暴露于纱布或其他含有葡聚糖的材料；静脉输注免疫球蛋白、清蛋白、凝血因子或血制品；链球菌血症；操作者处理标本时存在污染；标本溶血；另外，使用多糖类抗癌药物、放化疗造成的黏膜损伤导致食物中的葡聚糖或定植的念珠菌经胃肠道进入血液等也可能造成假阳性[7]。Marty 等[8]研究认为头孢西丁、头孢唑林、甲氧苄啶、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[9]研究发现 1 例大肠埃希菌感染者 G 试验为阳性，其测定值大于 120 pg/mL。（2）假阴性：有文献提示，检测葡聚糖含量不能用于诊断隐球菌感染，可能是由于隐球菌在免疫缺陷患者体内生长缓慢，并形成厚壁胞膜，不利于吞噬细胞的吞噬，导致实验呈假阴性[10]；G 试验也不能用于检测接合菌（根霉/毛霉）感染。临床常见的肺曲霉病，由于有厚壁空洞的包绕，真菌胞壁的残余结构难以被释放入血，因而血中 BG 浓度也不会增高。另外，G 试验结果阳性只表明存在深部真菌感染，包括念珠菌感染或其他真菌感染，不能提示为何种真菌。因此在临床工作中建议：与 GM 试验联合以提高阳性率；2 次或 2 次以上阳性结果可降低假阳性率；高危患者建议每周检测 1～2 次；并对高危人群进行动态监测。

G 试验临床价值包括以下几点。（1）早期诊断：侵袭性真菌感染增多且复杂，早期症状无特异度，往往被原发病掩盖，发现较晚，病死率高，早期诊断是深部真菌感染治疗成败的关键。（2）指导用药：快速确定真菌感染，为临床选用适宜药物提供准确的依据。（3）评价效果：应用抗真菌药物后，定期检测血浆葡聚糖浓度变化，评价药物的有效性。（4）监护病程：监护深部真菌感染人群的疾病状态。（5）动态观察：监测易感人群临床疗效。

1.2　甘露聚糖　是目前研究最为广泛的一种抗原，广泛存在于真菌细胞壁中，是真菌细胞壁的重要组成成分，主要结构为 D-甘露糖，对热稳定。不同真菌中的含量和作用存在一定差异，其在真菌致病过程中参与免疫调节和防御且抗甘露糖抗体，具有保护性作用。用免疫学方法检测血液中甘露聚糖抗原诊断深部念珠菌感染的研究资料显示，阳性检测结果与念珠菌深部感染有很好的相关性，并且一过性或静脉插管相关性念珠菌血症基本检测不到甘露聚糖抗原。但是由于血清中甘露糖的清除较快，以及反应模式的局限，导致该法敏感性较低，限制了其临床应用。通过不断改进方法，如检测前加热血清使免疫复合物解离、采用单克隆抗体检测特定靶位、用更敏感的 ELISA 方法等使检测甘露聚糖诊断深部念珠菌感染成为可能。目前已有商品化试剂盒，如 Bio-Rad 生产的采用单克隆抗体检测的 Pastorex 念珠菌乳胶凝集试验和 Platelia 念珠菌抗原试验（双夹心酶联免疫吸附试验），反复多次检测可提高阳性率。

1.3　烯醇化酶　一种胞浆抗原，又称 2-磷酸-D-甘油盐水解

作者简介：孙伟，女，检验技师，主要从事临床微生物学与检验研究。

酶，是糖酵解所必需的胞内酶，广泛存在于念珠菌细胞中，近年来已被纯化[11]。在深部念珠菌感染时可大量释放入血，而寄生在浅表部位的念珠菌不会释放该酶，故具有很高的临床应用价值。用斑点免疫结合试验和双夹心微脂粒免疫法对肿瘤、深部组织感染及菌血症患者检测，灵敏度在 64%～85%，特异性为 96%。但目前尚无检测烯醇化酶抗原的商品化试剂。Zöller 等[12]根据血清中是否含有抗烯醇化酶抗体来诊断深部念珠菌病，该法在免疫健全和免疫缺陷的混合人群中的特异性和灵敏度分别是 96.4%和 81.5%，并且通过监测患者血清中抗烯醇化酶抗体及抗体滴度的动态变化来提高检出率及临床应用价值。

1.4 Cand-Tec 抗原　是指可用念珠菌属检测系统，一种颗粒凝集试验系统）检测的一类念珠菌蛋白抗原，它对热不稳定。Misaki 等[13]报道 Cand-Tec 微滴度法的灵敏度和特异度分别为 100%和 80%，75%的病例随治疗而滴度降低，治疗无效的患者，无降低倾向。因此，Cand-Tec 微滴度法是一种早期诊断深部真菌感染和准确评价效果的有效方法。Cand-Tec 乳胶凝集试验（Ramco Laboratories，美国）是第一个商品化检测念珠菌抗原的试剂盒。该方法用多克隆抗体包被乳胶颗粒检测念珠菌热不稳定抗原，试验的灵敏度和特异度分别为 76.5%和 87.5%。但是由于检测的靶抗原性质和功能目前尚不清楚，且类风湿因子可引起假阳性反应，故仅用 Cand-Tec 试验尚难确诊深部念珠菌感染。

1.5 D-阿拉伯糖醇（D-arabinitol）　D-阿拉伯糖醇是诊断念珠菌感染应用最多的标记物，为五碳多羟基化合物。人感染念珠菌后血清或尿中 D-阿拉伯糖醇浓度明显增高，通过检测其中 D-阿拉伯糖醇含量可帮助临床诊断某些念珠菌如白色念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌、乳酒念珠菌引起的深部感染，但不能检测克柔念珠菌和光滑念珠菌感染[14]。检测血清中 D-阿拉伯糖醇或 D-阿拉伯糖醇与 L-阿拉伯糖醇的比值，可快速诊断念珠菌病。但研究发现肾功能异常患者无论是否感染念珠菌，D-阿拉伯糖醇均会增高。为了与肾功能异常患者区别，采用气相色谱质谱仪或气相色谱仪检测血清 D-阿拉伯糖醇/肌酐比值，灵敏度为 70%，特异度为 86%。Yeo 等[15]用基因重组的 D-阿拉伯糖醇脱氢酶以酶荧光法定量，发现念珠菌感染者血清中来自菌体的 D-阿拉伯糖醇明显升高，此方法可用于快速诊断新生儿的侵袭性念珠菌病。

2　曲霉菌感染抗原标志物

半乳甘露聚糖（GM）：GM 是曲霉菌属细胞壁的重要组成成分之一[16-17]，曲霉菌特有的细胞壁多糖成分是 β-(1-5)呋喃半乳糖残基，菌丝生长时，半乳甘露聚糖从薄弱的菌丝顶端释放，是最早释放的抗原。GM 释放量与菌量呈正比，可以反映感染程度，且在血清中存在时间较短，所以可以作为疗效的评价指标。GM 试验主要适用于侵袭性曲霉菌感染的早期诊断。GM 试验的临床应用：高危人群曲霉菌感染监测，肺曲霉病诊断，抗真菌治疗疗效监测，病情缓解的定量标志物（只包括 GM 试验），其检测值连续两次低于诊断界值提示病情好转。建议对高危人群（血液系统恶性肿瘤，中性粒细胞减少，同种异体干细胞移植等）至少每周两次连续动态监测，若连续两次监测结果均大于或等于 0.5 ng/mL，考虑阳性，但仍应结合临床正确解读试验阳性和阴性。不推荐在实体器官移植患者中常规监测。

国外已利用 ELISA 方法通过检测体液中半乳糖甘露聚糖的含量来辅助诊断系统性曲霉菌的感染，灵敏度可达 1 ng/mL，灵敏度在 50%～90%之间，特异度为 80%～90%，而且阳性结果出现早于临床症状或影像学症状。本法还可用于检测支气管肺泡灌洗液（BAL）和尿标本，是目前国际上一致认可的侵袭性曲霉病的诊断方法之一。其缺点是某些含甘露聚糖的食物（可能含有 GM 的牛奶等高蛋白食物和污染的大米等）、哌拉西林他唑巴坦等药物可导致假阳性结果，假阳性率高达 18%。另外，血液透析、自身免疫性肝炎也可导致 GM 试验假阳性。GM 试验在以下情况可出现假阴性：释放入血的曲霉 GM（包括甘露聚糖）并非持续存在而是会很快清除；测定前使用了抗真菌药物；病情不严重；非粒细胞缺乏的患者等。因为半乳甘露聚糖血症常为一过性，建议对于粒细胞缺乏等高危人群进行动态监测，并结合影像学、微生物学结果综合分析确定是否为曲霉菌感染。

3　隐球菌感染抗原标志物

荚膜多糖抗原：隐球菌感染后在体内可形成大量荚膜多糖并释放进入血液和脑脊液，通过检测荚膜多糖抗原可早期诊断隐球菌感染。乳胶凝集试验：乳胶凝集试验检测隐球菌荚膜抗原是最有诊断价值的快速血清学方法之一[18]。早期试剂主要以多克隆抗体 IgG 为基础，敏感性可达 99%。但存在的问题主要是需要主观判断结果，且与某些物质如类风湿因子存在交叉反应造成假阳性，故标本需要经过加热或用蛋白酶破坏结合在多糖抗原上或影响抗原抗体反应的蛋白，但容易造成标本变性。另外，以鼠单克隆抗体 IgM 为基础的乳胶试剂虽不与类风湿等自身免疫性疾病患者的血清发生交叉反应，但敏感性不如多克隆抗体试剂盒。某些菌种如丝孢酵母菌感染可引起假阳性结果。假阴性结果主要由前带效应引起，为避免前带效应的影响，除多次送样检测外，可对标本进行一定稀释后再检测。

酶免试验（EIA）目前有隐球菌抗原检测商品化试剂盒。该方法采用多克隆抗体捕获抗原，再用单克隆抗体检测。优点是敏感性、特异性更高且可大批量检测，标本不需前处理。另外，定量检测可用于对患者的疗效评价，但在免疫功能低下患者（如 HIV 患者）中应用时应注意结果的解释。因为这类患者很难将抗原清除，即使培养已经阴性，EIA 检测结果也可能阳性。

4　荚膜组织胞浆菌感染抗原标志物

荚膜组织胞浆菌多糖抗原（HPA）播散性荚膜组织胞浆菌病和有严重肺部感染症状的患者的血、尿、支气管肺泡灌洗液、脑脊液中均可检出 HPA。用于 HPA 检测的放射免疫法（RIA）较为确定，可用于荚膜组织胞浆菌的诊断和治疗效果监测，但是由于检测试剂具有放射性，不适合普通实验室应用，影响了其在临床的常规应用。目前，已经建立了 ELISA 用于抗原检测，与 RIA 法在检测灵敏度和特异度方面具有可比性，具有开发为商品化试剂盒的潜质。

5　其他双相真菌抗原标志物

其他双相真菌的抗原检测仅用于感染高发区域的尿液、血清和脑脊液标本的检测，应用受限是由于其交叉反应[19]。例如抗皮炎芽生菌的 IgG 抗体的灵敏度和特异度分别为 92.9%和 79.3%，但是其与组织胞浆菌、副球孢子菌和马尔尼菲青霉菌的交叉反应可达 96.3%、100%、70%[19]。新一代检测方法通过优化抗体来降低检测的假阳性，例如靶向球孢子菌属 GM 的酶联免疫吸附测定法灵敏度可达 70.8%；利用 P1B 单抗检测巴西副球孢子菌 87-kDa 抗原的抑制性 ELISA 试验的灵敏度可达 80.4%[20]。马内菲青霉的早期抗原诊断不敏感（58.8%～76.5%），但抗原捕获 ELISA 试验提高了检测的灵敏度（97.3%）[21]。

侵袭性真菌感染的危险性评价对于感染的治疗及预后至

关重要。理想状态下，侵袭性真菌感染抗原标志物应符合以下条件：存在时间不能太短；与感染而非定植的相关性更大；在疾病早期出现；不同真菌种属间标志物具有保守性；不与人类或其他微生物抗原发生交叉反应。另外，抗原检测应当易于操作且经济有效，不同抗原联合检测可以提高检测的准确性。临床工作中应将各项检测指标与传统的培养、染色方法、特异性抗体检测、分子生物学方法及患者自身临床症状相结合而作出综合的判断。

参考文献

[1] 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.

[2] Mokaddas E, Khan ZU, Ahmad S, et al. Value of(1-3)-β-d-glucan, Candida mannan and Candida DNA detection in the diagnosis of candidaemia[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(10): 1549-1553.

[3] Levin J, Poore TE, Zauber NP, et al. Detection of endotoxin in the blood of patients with sepsis due to Gram-negative bacteria[J]. N Engl J Med, 1970, 283(24): 1313-1316.

[4] Shimizu A, Oka H, Matsuda T, et al. (1－>3)-beta-D glucan is a diagnostic and negative prognostic marker for Pneumocystis carinii pneumonia in patients with connective tissue disease[J]. Clin Exp Rheumatol, 2005, 23(5): 678-680.

[5] Persat F, Ranque S, Derouin F, et al. Contribution of the(1－>3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(3): 1009-1013.

[6] Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, et al. Evaluation of a(1－>3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(12): 5957-5962.

[7] 刘春玉，王红. 侵袭性真菌感染非培养诊断方法的研究进展[J]. 中国真菌学杂志，2011，6(1)：57-60.

[8] Marty FM, Lowry CM, Lempitski SJ, et al. Reactivity of (1－>3)-beta-D-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(10): 3450-3453.

[9] Pazos C, Pontón 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.

[10] Yoshida M, Roth RI, Grunfeld C, et al. Soluble(1－>3)-beta-D-glucan purified from Candida albicans: biologic effects and distribution in blood and organs in rabbits[J]. J Lab Clin Med, 1996, 128(1): 103-114.

[11] Martin C, Roberts D, van Der Weide M, et al. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(10): 3735-3742.

[12] Zäller L, Krämer I, Kappe R, et al. Enzyme immunoassays for invasive Candida infections: reactivity of somatic antigens of Candida albicans[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(9): 1860-1867.

[13] 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): MT1-MT7.

[14] Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(3): 465-484.

[15] Yeo SF, Zhang Y, Schafer D, et al. A rapid, automated enzymatic fluorometric assay for determination of D-arabinitol in serum[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(4): 1439-1443.

[16] Chambon-Pautas C, Costa JM, Chaumette MT, et al. Galactomannan and polymerase chain reaction for the diagnosis of primary digestive aspergillosis in a patient with acute myeloid leukaemia[J]. J Infect, 2001, 43(3): 213-214.

[17] Boutboul F, Alberti C, Leblanc T, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease[J]. Clin Infect Dis, 2002, 34(7): 939-943.

[18] Antinori S, Radice A, Galimberti L, et al. The role of cryptococcal antigen assay in diagnosis and monitoring of cryptococcal meningitis[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(11): 5828-5829.

[19] Durkin M, Witt J, Lemonte A, et al. Antigen assay with the potential to aid in diagnosis of blastomycosis[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(10): 4873-4875.

[20] Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, et al. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(12): 3278-3283.

[21] Chaiyaroj SC, Chawengkirttikul R, Sirisinha S, et al. Antigen detection assay for identification of Penicillium marneffei infection [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(1): 432-434.

(收稿日期：2013-02-28)

·综　　述·

肠杆菌科细菌中耐药质粒分型技术的研究进展*

曹小利，张之烽 综述，张　葵 审校

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科，江苏南京 210008)

关键词：研究进展；　耐药性；　质粒；　分型；　肠杆菌科

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.039　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1673-4130(2013)16-2145-03

质粒是染色体外能够自主复制的环状 DNA 分子，可以编码抗菌药物耐药基因、毒力基因等遗传信息，导致其宿主菌的

* 基金项目：南京市医学科技发展资金资助(QRX11191)。　作者简介：曹小利，女，医师，主要从事临床微生物学与检验研究。