

· 综述 ·

艾滋病合并侵袭性真菌感染早期检测的研究进展^{*}柳明波 综述, 韦良宏[△] 审校

(广西医科大学第十附属医院/钦州市第一人民医院检验科, 广西钦州 535000)

关键词: HIV 感染; 侵袭性真菌; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.06.026

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)06-0713-03

侵袭性真菌感染是艾滋病感染者(HIV)/艾滋病患者(AIDS)中最常见的机会感染,也是感染艾滋病患者就诊和死亡的主要原因之一。艾滋病合并侵袭性真菌感染发病隐匿、临床表现不典型、治疗手段有限、病死率与致残率高,早期、特异的诊断对于改善预后意义重大。以培养、病理方法诊断侵袭性真菌感染仍然是金标准但是有一定的局限性。近年来,以隐球菌乳胶凝集试验等为代表的早期血清学诊断方法值得在临床大力推广,而应用分子生物学技术检测侵袭性真菌感染以检出率高和特异度好为特点也使其成为研究热点。这些技术也迅速被应用于艾滋病合并侵袭性真菌感染的早期检测,本文就近年来国内外该领域的研究作一综述。

1 艾滋病合并侵袭性真菌感染的研究进展

侵袭性真菌是指能侵袭深部组织和内脏及全身的真菌,主要有假丝酵母菌、隐球菌、曲菌、毛霉菌、组织胞浆菌和卡氏肺孢菌等,组织胞浆菌为二相性真菌,假丝酵母菌、曲霉菌、毛霉菌和卡氏肺孢菌等为条件致病性真菌,只有在一定的条件下才引起机体致病^[1]。侵袭性真菌感染(IFIs)系指病原真菌侵犯心、肝、脾、肺、肾、脑、血液等各系统内脏器官而引起的系统感染性疾病。从全球范围看,侵袭性真菌感染的发病率及死亡率明显上升,这与老年人口、艾滋病患者等易感人群增加,造血干细胞移植与器官移植的广泛开展、各种侵入性医疗技术应用、广谱抗菌药物及免疫抑制剂的使用等有密切关系^[2]。另外,研究显示侵袭性真菌感染的基础疾病主要有 HIV 感染(47.4%)、恶性肿瘤(14.7%)、糖尿病(9.9%)、慢性肺部疾病(9.3%)等,艾滋病感染又居所有真菌感染基础疾病的首位。研究发现在我国住院艾滋病患者中,侵袭性真菌感染的发生率为 41.2%,侵袭性真菌感染的病死率高达 22.9%^[3]。由于侵袭性真菌病具有发病隐匿、临床表现不典型、治疗手段有限、病死率与致残率高的特点,早期、特异的诊断对于改善预后意义重大。

HIV 感染主要导致患者细胞免疫功能异常,临幊上主要表现为因免疫功能低下而发生的一系列机会性感染和肿瘤。机会性感染是晚期 AIDS 患者就诊、入院、致死的最重要原因,而机会感染中侵袭性真菌感染又占有相当高的比例^[4]。随着艾滋病疫情的蔓延,侵袭性真菌感染的患者日益增多,引起侵袭性真菌感染的真菌几乎包含了所有已发现的致病性真菌和某些条件致病性真菌,临幊上以念珠菌、曲霉菌、隐球菌等真菌比较多见,侵袭性真菌感染发生部位以肺、脑等内脏器官和深部组织为主,侵袭性真菌感染对艾滋病患者的危害性极大,这

类患者的病死率极高^[5]。

国外报道 AIDS 侵袭性真菌感染常见感染真菌为念珠菌、曲霉菌和隐球菌。念珠菌是真菌感染中最重要的致病菌之一,有研究报道白色念珠菌感染在 AIDS 真菌感染率最高。曲霉菌感染中又以烟曲霉菌感染为主。近年来,隐球菌感染发病率越来越高,在国外已成为 AIDS 最常见的并发症之一^[6]。粗球孢子菌、荚膜组织胞浆菌和马尔尼菲青霉菌等真菌感染均是常见的 HIV 相关疾病。粗球孢子菌病主要流行于美国西部、墨西哥北部及南美洲部分地区,我国也有病例报道。马尔尼菲青霉菌是青霉菌属中唯一温度双相性真菌,在东南亚(尤其是泰国北部)及中国南部流行。曾常红等^[7]报道的 71 例 HIV/AIDS 患者中,真菌感染率为 53.5%,致病菌以白色念珠菌为主,占 72.8%,其次为马尔尼菲青霉,占 20.6%。

2 CD4⁺ T 淋巴细胞计数与 AIDS 患者中侵袭性真菌感染率的关系

CD4⁺ T 淋巴细胞能直接反映 AIDS 患者的免疫功能状态,能帮助预测患者可能出现机会性感染,并予以提前预防的可能性。经过多年研究发现,外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞小于 $200 \times 10^6 / L$ 时,预示着机体即将发展成 AIDS。并且 CD4⁺ 在不同水平时,机会性感染种类、出现的时间和频率均不一样^[8]。据报道,当 CD4⁺ T 淋巴细胞计数小于 $200 \times 10^6 / L$,真菌感染率达 71.05%;而 CD4⁺ T 淋巴细胞计数大于 $200 \times 10^6 / L$ 时,感染率为 33.33%,可见 CD4⁺ T 淋巴细胞计数越低,真菌感染可能性越大。HIV 感染者 CD4⁺ T 淋巴细胞计数小于 $200 \times 10^6 / L$ 时易发生念珠菌感染,而当 CD4⁺ T 淋巴细胞计数小于 $100 \times 10^6 / L$ 时易感染曲霉菌。播散型组织胞浆菌及球孢子菌病主要发生于 CD4⁺ T 淋巴细胞计数小于 $50 \times 10^6 / L$ 的患者中,CD4⁺ T 淋巴细胞计数小于 $50 \times 10^6 / L$ 时也应注意马尔尼菲青霉菌感染^[9]。陈媛媛等^[10]研究表明 CD4⁺ T 淋巴细胞计数小于或等于 $50 \times 10^6 / L$ 的患者血清隐球菌抗原阳性率为 72.73%,CD4⁺ T 淋巴细胞计数越低 HIV/AIDS 患者血清隐球菌抗原阳性率越高。最新研究报道艾滋病合并念珠菌食管炎的食管受累范围及程度与患者外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞计数具有相关性,即随着 CD4⁺ T 淋巴细胞计数水平的降低,受累食管由下向上进展,程度也进一步加重^[11]。

3 侵袭性真菌感染早期检测的研究进展

侵袭性真菌感染的早期诊断及能在早期给予恰当的治疗成为目前临床真菌诊断与治疗最迫切的问题。组织病理学检

* 基金项目: 广西壮族自治区卫生厅青年基金(Z2013746)。 作者简介: 柳明波,男,主管技师,主要从事临床检验工作研究。 △ 通讯作者: E-mail: mingabo@126.com。

查和病原真菌培养,仍然是 IFIs 诊断的金标准。然而要获得病原真菌和组织病理学阳性标本在临幊上仍然是非常困难的。大量的研究表明基于真菌细胞壁特异性成分的血清学检测或其他体液的检测,已经应用于恶性血液病或造血干细胞移植合并侵袭性真菌感染的患者,并获得了良好的诊断价值评价。其中 1,3- β -D-葡聚糖(1,3- β -D-glucan, BDG),半乳甘露聚糖(GM)的诊断价值已经得到了公认^[12]。

1,3- β -D-葡聚糖检测即 G 试验。到目前为止,G 试验的血清 BDG 浓度阈值主要来源于以下患者检测值:(1)最主要是急性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤;(2)疑似内源性真菌性眼内炎、重症外科患者、中暑患者;(3)农民肺、肺曲霉菌病、卡氏肺孢子虫肺炎以及其他的确诊或拟诊有侵袭性真菌感染的患者。当患者血清 BDG 浓度大于 20 pg/mL 就可以拟诊为侵袭性真菌感染。尽管在侵袭性真菌感染患者的血液中可以检测到 BDG,但是其对机体的影响仍不清楚^[13]。在确诊侵袭性曲霉菌感染(IA)的患者中,5 d 内血清 BDG 浓度明显升高,因此根据体内抗原释放的动力学规律每周做两次 G 试验检测对于 IFIs 早期诊断是必要的。研究表明,在确诊或拟诊 IA 患者中 G 试验升高要比高分辨率 CT 的影像学改变平均提前 9.3 d。最近有研究报道,血液肿瘤合并侵袭性真菌感染患者中血清 BDG 水平变化与患者对抗真菌治疗如两性霉素 B 和卡泊芬净的反应有关。对 IA 患者血清中 BDG 抗原水平监测表明,血清 BDG 随抗真菌治疗转归而下降,而在耐药患者中则表现为 BDG 持续高水平^[14]。张晓艳等^[15]最近对 G 试验在儿童侵袭性真菌感染中的诊断价值进行了评价,G 试验诊断 IFIs 的敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为 72.1%、86.4%、39.2% 和 96.2%。而黄素钦等^[16]认为 G 试验是诊断 AIDS 患者真菌感染的有效辅助手段。

半乳甘露聚糖检测亦称 GM 试验。血清 GM 抗原水平对诊断 IFIs 具有重要意义^[17]。GM 是具有强免疫原性的抗原,存在于烟曲霉菌或其他的曲霉菌属。GM 是一种细胞壁多糖物质,相对分子质量约 $35 \times 10^3 \sim 100 \times 10^3$,随着真菌在组织中生长而释放入血。GM 可以通过特异性结合半乳甘露聚糖的鼠单克隆抗体 EB-A2 检测。曲霉菌在体外可以释放相对分子质量约为 20×10^3 的多糖,但 GM 的抗原表位随不同种类的曲霉菌而不同。根据欧洲和美国的 IFIs 诊断标准推荐,应用酶联免疫吸附测定法检测 GM 抗原 OD ≥ 0.5 为阳性标本,而小于 0.5 为阴性标本。同时要求发现阳性标本必须重新抽血检测且 OD ≥ 0.5 才能拟诊曲霉菌感染,以排除污染。一些学者提出,在根据临床表现和影像学资料疑似 IFIs 的患者且合并中性粒细胞减少症,可能需要 1 周至少 2 次甚至每天检测 GM,以排除一过性的升高。对于那些真菌感染高风险的患者如:中性粒细胞减少症、移植物抗宿主、长期使用类固醇激素药物的患者等,至少每周两次 GM 试验是必要的^[18]。王彦艳等^[19]对中性粒细胞绝对值小于 $0.5 \times 10^9/L$ 的血液病患者研究显示,单次 GM 值大于或等于 1.0 时,其敏感度为 66%,特异度为 80%,连续 2 次 GM 值大于或等于 1.0 时,其敏感度为 73%,特异度为 93%,连续 2 次血清 GM 值对侵袭性曲霉菌感染具有更大的参考价值。当然 GM 试验需要结合其他的检测方法如高分辨率 CT 才能更准确的诊断侵袭性真菌感染。

以聚合酶链反应(PCR)为基础的分子生物学检测方法,为

真菌检测提供了一种更快,敏感度更高,特异度更好的真菌检测方法。初步的研究表明,基于 PCR 的真菌检测可以指导 IFIs 的治疗,减少一些不必要的抗真菌治疗降低了治疗费用和毒副作用。此外,最新的 PCR 技术可以检测抗真菌耐药基因位点,然而这些位点与临床抗真菌治疗耐药的关系还有待进一步研究。总之,经过 PCR 真菌检测技术的标准化,以及大规模的前瞻性研究验证,才能更好的推广应用该技术^[20]。然而,PCR 反应中非真菌 DNA 污染是限制该技术广泛应用的重要原因,如使用非无菌样本或非特异性引物。自动化 DNA 提取和纯化试剂盒都可能含有少量 DNA 污染物。而且区分所扩增的 DNA 是来源于侵袭性真菌还是真菌菌体成分污染比较困难,如检测曲霉菌需要扩增侵袭性曲霉菌的 DNA 而不是曲霉菌扩散的分生孢子。此外,标本类型也会影响 PCR 真菌检测的敏感度,在检测侵袭性念珠菌感染(IC)中全血标本优于血清,然而在检测 IA 时全血与血清有同样的敏感度。可能原因是念珠菌菌体细胞是可被中性粒细胞吞噬,而曲霉菌菌丝太大需要以细胞外方式清除,因此全血的中性粒细胞包含了更多的念珠菌 DNA^[21]。

侧流免疫层析检测方法(LFD),即胶体金免疫层析试纸条检测法是目前最新的一种简便、特异、迅速检测侵袭性曲霉菌方法。该方法是利用包被有鼠单克隆抗体 JF5 的胶体金免疫层析试纸条特异性结合 N 端糖基化的糖蛋白抗原,该抗原存在于侵袭性曲霉菌菌丝细胞壁和隔膜上或由菌丝末端不断分泌^[22]。相对于 GM 试验中使用的抗半乳甘露聚糖单克隆抗体 EB-A2 可以与青霉菌或拟青霉菌属发生交叉反应,单克隆抗体 JF5 与宛氏青霉的交叉反应显得非常弱,而与在人际传播常见的马尔尼菲青霉菌几乎没有交叉反应。White 等^[23]最近也比较了实时 PCR、GM 试验及侧流免疫层析 3 种方法检测侵袭性曲霉菌的应用价值,LFD 的检测特异度达 98.0% 和实时 PCR 的 96.6% 差不多,而比 GM 试验 91.5% 要高;其敏感度为 81.8% 虽然低于实时 PCR 95.5%,但明显优于 GM 试验的 77.3%。而当 LFD 与实时 PCR 结合应用时,特异度与敏感度均达 100%。

4 小结

总之,侵袭性真菌感染是艾滋病患者中常见的机会感染,早期、特异诊断艾滋病合并侵袭性真菌感染对于提高 AIDS 患者的生存时间和生存质量具有十分重要的意义。快速真菌抗原血清学检测应用于筛查恶性血液病合并侵袭性真菌感染的价值已得到证实。然而 GM 试验等诊断阈值标准尚存争论,检测的非特异性也是令人困恼的问题,因此,这些方法在艾滋病合并侵袭性真菌感染早期检测中的应用价值仍需要进一步探讨。

参考文献

- [1] 戴玉成,庄剑云. 中国菌物已知种数[J]. 菌物学报, 2010, 29(5): 625-628.
- [2] Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA, et al. British society for medical mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections[J]. Lancet Infect Dis, 2003, 3(4): 230-240.
- [3] Rees JR, Pinner RW, Hajjeh RA, et al. The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay Area.

- a, 1992-1993; results of population-based laboratory active surveillance[J]. Clin Infect Dis, 1998, 27(5): 1138-1147.
- [4] Denning DW, Hope WW. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities[J]. Trends Microbiol, 2010, 18(5): 195-204.
- [5] Crump JA, Ramadhani HO, Morrissey AB, et al. Invasive bacterial and fungal infections among hospitalized HIV-infected and HIV-uninfected children and infants in northern Tanzania[J]. Trop Med Int Health, 2011, 16(7): 830-837.
- [6] Huang L, Crothers K. HIV-associated opportunistic pneumonias [J]. Respirology, 2009, 14(4): 474-485.
- [7] 曾常红, 谢婷, 李希清, 等. HIV/AIDS 合并真菌感染情况调查与分析[J]. 华南预防医学, 2009, 35(2): 46-47.
- [8] Shen YZ, Qi TK, Ma JX, et al. Invasive fungal infections among inpatients with acquired immune deficiency syndrome at a Chinese university hospital[J]. Mycoses, 2007, 50(6): 475-480.
- [9] 马东, 朱泽平. 5 例组织胞浆菌病的诊断与治疗[J]. 临床医药实践, 2009, 2(8): 1497-1498.
- [10] 陈媛媛, 刘春礼, 赵清霞, 等. 未接受 HAART 的 HIV/AIDS 患者血清隐球菌抗原阳性率调查[J]. 传染病信息, 2012, 25(6): 353-355.
- [11] 杨根东, 陆普选, 黄华, 等. 艾滋病合并念珠菌食管炎的影像学表现与 CD4⁺ T 淋巴细胞计数的关系[J]. 中国中西医结合影像学杂志, 2013, 11(1): 7-8.
- [12] Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, et al. Diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for pneumocystis jiroveci pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(1): 7-15.
- [13] Sendid B, Francois N, Decool V, et al. Strategy for overcoming serum interferences in detection of serum (1,3)-β-D-glucans[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(1): 375-376.
- [14] Kedzierska A, Kochan P, Pietrzyk A, et al. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnostics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1-→3)-
- beta-D-glucan antigens[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007, 26(11): 755-766.
- [15] 张晓艳, 董方, 赵顺英, 等. 血浆 1,3-β-D 葡聚糖检测对儿童侵袭性真菌感染诊断价值[J]. 中国循证儿科杂志, 2012, 7(3): 192-195.
- [16] 黄素钦, 李圣聪, 吴秋芳. (1,3)-β-D 葡聚糖检测对 AIDS 患者真菌感染诊断的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(9): 1169-1170.
- [17] Yin Z, Rice BD, Waight P, et al. Invasive pneumococcal disease among HIV-positive individuals, 2000-2009 [J]. AIDS, 2012, 26(1): 87-94.
- [18] Azie N, Neofytos D, Pfaffer M, et al. The PATH (prospective antifungal therapy) alliance registry and invasive fungal infections: update 2012[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 73(4): 293-300.
- [19] 王彦艳, 萧晨璐, 李军民, 等. 血清半乳甘露聚糖抗原检测在血液病患者侵袭性曲霉菌病诊断中的应用价值[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(6): 498-501.
- [20] Kourkoumpetis TK, Fuchs BB, Coleman JJ, et al. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections[J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(9): 1322-1331.
- [21] Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(2): 665-670.
- [22] Thornton CR. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis[J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15(7): 1095-1105.
- [23] White PL, Parr C, Thornton C, et al. Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(5): 1510-1516.

(收稿日期: 2013-11-17)

• 综述 •

胞外 microRNA 的生成与转运机制研究进展^{*}徐娇阳^{1,2}, 姜婧² 综述, 桂俊豪^{2△}, 余伍忠^{1,2▲} 审校

(1. 石河子大学医学院, 新疆 石河子 832000; 2. 兰州军区乌鲁木齐总医院临床医学研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000)

关键词: microRNAs; 生物学标记; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.06.027

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)06-0715-04

MicroRNA(miRNA)是一类长约 22 bp 的小分子非编码单链 RNA。作为一类基因表达调控分子, 绝大多数 miRNA 存在于细胞内, 通过与靶 mRNA 的 3'-非翻译区(3'-UTR)互补结合而介导抑制 mRNA 的翻译, 从转录后水平参与基因表达调控。除作为胞内基因表达调控分子之外, 近年研究发现,

血清、血浆、唾液和尿液等细胞外体液中也稳定地存在着大量的 miRNA, 是为胞外 miRNA。其中, 血清、血浆中的 miRNA 被称为循环 miRNA, 其异常表达与肿瘤等疾病密切相关, 因此可能成为一类新型的疾病诊断或预警生物标志物。近年来, 人们提出了多种关于胞外 miRNA 生成及转运的可能机制。

* 基金项目: 兰州军区医药卫生科研计划课题(CLZ12JA12); 自治区青年科技人才专项科研课题(2013QK016); 医院博士返院后续课题(2013ZY001)。作者简介: 徐娇阳, 女, 硕士研究生在读, 主要从事分子生物学检验诊断研究。 △ 通讯作者, E-mail: Junhao@ gmail. com;

▲ 通讯作者, E-mail: wuzhong.yu@yahoo. com. cn。