

• 综述 •

侵袭性曲霉菌病的实验室诊断

申晓敏 综述, 李顺天 审校

(天津市第二人民医院检验科, 天津 300192)

关键词: 侵袭性曲霉菌病; 实验室诊断; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.044

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2015)09-1270-03

曲霉菌属于条件致病菌, 繁殖能力很强, 最适生长温度为 25~30 ℃, 形成丝状菌落, 导致人类疾病的主要霉菌是烟曲霉、黄曲霉、土曲霉和黑曲霉等, 人类曲霉菌病 95% 以上由烟曲霉引起^[1]。近年来, 曲霉菌病发病率和死亡率不断上升。人类通过吸入空气中的曲霉孢子致病, 肺部是曲霉感染的最常见部位, 其他组织包括肺实质, 胸膜, 气管和支气管, 鼻窦等也是曲霉菌的重要侵袭部位^[2]。也有报道病菌能够侵袭脑、肝、肾、皮肤等组织^[3], 更为严重的是国内外均有报道曲霉菌侵入中枢神经系统的病例^[4-5], 虽较少见, 但防治很困难。曲霉菌感染危险人群包括: 中性粒细胞减少者; 免疫抑制剂治疗者; 艾滋病患者; 存在移植物抗宿主病患者; 有慢性基础疾病者; 创伤、大手术、长期住 ICU 和急救的患者; 长时间使用机械通气、体内留置导管、全胃肠外营养者和长期使用广谱抗菌药物糖皮质激素的患者等, 其中中性粒细胞减少或缺乏是最重要的危险因素^[1]。近年来非中性粒细胞缺乏人群如慢性阻塞性肺疾病、肺结核、糖尿病、严重肝病患者中发生曲霉菌病的报道越来越多, 其临床表现无特异性, 病情重, 病死率高, 治疗方案不统一, 极易误诊、漏诊。因此早期诊断是改善曲霉菌感染患者的预后, 降低病死率的关键^[6]。

1 直接镜检

镜检不能准确区别真菌的种类, 缺乏特异性, 检出的敏感度差异很大^[5]。在组织中发现真菌是确诊的金标准。病理表现为真菌菌丝侵入和定植于组织或者血管造成炎症改变。镜下可见真菌分枝菌丝, 菌丝由多细胞组成, 有分隔, 并且可以形成菌丝体, 部分低等真菌菌丝没有分隔, 必要时进一步做染色镜检, 以提高分辨率。菌丝常规苏木素-伊红染色显蓝色, 当组织切片中菌丝量少、残缺或分布有大量坏死组织时, 菌丝着色浅, 不易分辨, 容易漏检, 可联合特异性六胺银染色或过碘酸-雪夫染色提高检出率, 其中过碘酸-雪夫染色菌丝呈红色, 特异性六胺银染色菌丝显黑色。病理学检查均为有创性操作, 由于艾滋病患者逐渐增多, 患者感染真菌多见, 能否早期确诊成为关键, 但是如果对于这些患者进行组织活检, 操作医师将冒很大的职业暴露危险, 因此难以开展。造血干细胞移植后的血液肿瘤患者或者严重肝病患者常因血小板极低、凝血功能障碍、病情危重、免疫低下、病灶位置不适合等不能接受检查, 因此组织病理学诊断只能适用于部分患者。另一方面, 阳性结果对诊断有意义, 而阴性结果却不能排除感染。临幊上可以采集的检测标本包括痰、肺活检组织标本、支气管灌洗液、肺泡灌洗液、胸腔积液等, 甚至脑脊液、尿液也可检测。采用 10% KOH 涂片压片镜检, 能够破坏细胞成分, 提高检出率。

2 培养

目前, 真菌培养仍然是临床确诊侵袭性曲霉菌病的主要方法。25~30 ℃ 环境和大多数培养基均适合曲霉菌生长。通过对真菌菌落形态和分生孢子进行表型鉴定, 然后根据表型特征

对真菌进行分类。真菌产生的有性结构如子囊菌、担子菌和结合菌也可用于菌种鉴定。郭微媛等^[7]从 1 例曲霉菌肺感染幼儿抽取插管痰液送检培养, 标本接种于血平板及沙保-氯霉素琼脂培养基培养检测到菌落生长, 可见特征性烟曲霉菌菌落, 呈绒毛状, 表面呈烟绿色。乳酸酚棉蓝染色显微镜下可见曲霉菌分生孢子及分生孢子头, 分生孢子呈球形绿色, 分生孢子头短柱状形成顶囊。菌丝呈条状, 有分隔并含有颗粒, 菌丝分枝呈锐角。国外学者也有相应的报道, Mortensen 等^[8]学者报道延长培养时间 2~5 d 能够增加 17% 阳性率。培养法耗时长, 临幊上难以用于早期诊断, 并且培养阳性率不确定, 影响了其在临床诊半乳甘露聚糖(GM)阳性患者肺泡灌洗液的培养结果, 阳性率仅为 10%~58%, 在分析血液患者 PCR 和 GM 阳性病例中, 17 例中仅仅 7 例培养阳性。另外有研究者建立烟曲霉菌感染兔子动物模型, 采用两性霉素 B 治疗后培养全部阴性^[5]。以上研究表明曲霉菌的培养受很多因素影响, 尤其采用预防性药物治疗后往往无法得到阳性结果, 从而影响临幊的诊断和治疗。

3 GM 检测

曲霉菌在生长过程中会向血液中释放细胞壁的组成成分 GM, 分子质量大小为 20×10^3 , 与壳质、 β -1-3 和 β -1-4 葡聚糖构成细胞壁, 霉菌对数生长高峰期也是 GM 释放的高峰期^[5]。GM 侧链上的呋喃半乳糖具有抗原性, 可以采用免疫学的试验方法进行检测, 包括乳胶凝集试验、放射免疫分析法、酶联免疫吸附抑制试验、双抗夹心酶联免疫吸附试验。双抗夹心酶联免疫吸附试验试剂盒-The Platelia TM Aspergillus EIA (WA) 于 2003 年 6 月被美国食品与药品管理局(FDA)批准可以应用于临幊。因研究对象、标本的处理方法以及所应用的酶标仪和滤光片都有一定的差异, 国内外 GM 试验判定标准尚不统一, 欧美的研究者基于大量临幊研究的成果得出结论, 判定 GM 检测阳性的标准为 2 次界值大于 0.5, 这一标准得到欧美研究者的共识。国内对于界值确定为 0.5~1.0。

有很多学者报道, 临幊感染患者在临幊症状和影像学还没有出现明显改变时, GM 试验即可呈现阳性反应, 因此对于侵袭性曲霉菌感染早期诊断具有较高的价值。如果临幊上对侵袭性曲霉菌感染的高危患者进行连续动态监测(每周 2 次), 可以早发现感染, 早干预治疗, 提高疗效^[9]。外周血检测出 GM 的时间比临幊症状早 5~8 d, 比高分辨率 CT 也早 7.2 d, 比开始经验性抗真菌治疗平均时间早 12.5 d^[10]。姜华等^[11]研究者指出 55% 患者 GM 阳性反应出现在发热症状前或与之同时出现。

GM 检测同样存在假阳性及假阴性结果。食物来源的 GM、 β -内酰胺类抗菌药物(哌拉西林/他唑巴坦或阿莫西林/维酸钾)的应用可导致 GM 检测结果出现假阳性。而抗真菌药物的应用可使生长中的真菌释放 GM 量减少, 造成 GM 检测

假阴性结果。Sulahian 等^[12] 分析了接受哌拉西林/他唑巴坦治疗的 37 例患者 GM 检测结果, 其中仅有 4 例可疑被曲霉菌感染。研究发现 β -内酰胺类抗菌药物在发酵过程中可产生 GM 物质, 另外牛奶或高蛋白等食物中含有 GM 成分, 不同来源的 GM 都能使 GM 检测出现假阳性的结果。儿童和新生儿肠道双歧杆菌 EB-1A 单克隆抗体可以产生交叉反应, 因而如果胃肠道存在的双歧杆菌较多, 则可能会出现 GM 检测的假阳性结果。Sulahian 等^[13] 研究表明 19~136 d 新生儿 GM 检测呈阳性反应的占 83%, 但是稍年长儿童特异性大于 90%^[13], 由于对于儿童检测结果的不确定, GM 检测常常不用于儿童检测。Pfeiffer 等^[14] 研究者采用荟萃分析的方法, 分析了在诊断侵袭性曲霉病中 GM 检测的应用价值, 共 27 项研究, 4 000 余例标本。结果表明, 阳性结果确诊感染的准确性较低, 阴性结果准确性较高, 也就是说如果 GM 检测结果阴性, 排除曲霉菌感染的可信度更高。同时 GM 不是曲霉菌特有的, 青霉菌属、镰刀菌属、链格孢菌属、组织胞浆菌属的细胞壁均含有 GM 成分^[3]。有争议的是有部分学者认为与隐球菌抗原有交叉^[15]。此外, GM 检测结果能够作为临床疗效判断的指标之一。GM 值逐渐降低提示抗菌治疗有效。相反, 如果 GM 值水平不下降或持续升高, 常常提示曲霉菌感染没有得到有效的控制, 患者预后不良。

4 1,3 β -D-葡聚糖(BDG)

BDG 占真菌细胞壁成分的 50% 以上, 广泛存在于各类真菌细胞壁中。是除隐球菌、结核菌外所有酵母菌及丝状真菌的细胞壁的特有成分, 而正常人体各个组织细胞、体液、其他微生物和动植物均不含 BDG 成分^[3]。在人体的血液或深部组织中, 经吞噬细胞的吞噬和消化, 真菌可以将细胞壁中的 BDG 成分释放并且进入机体的血液循环, 因此造成人体血液、尿液、脑脊液、腹胸水等体液中的 BDG 水平增高。BDG 实验也称 G 实验, 检测原理是通过 BDG 肽链中的葡萄糖残基与马蹄蟹(东方鲎和美洲鲎)中的凝血酶原 G 结合, 经级联反应形成凝固蛋白, 采用比浊法定量检测凝固蛋白水平, 从而计算出 BDG 的水平。阳性可以作为侵袭性曲霉病的诊断指标之一。研究表明, G 实验具有较高的灵敏度和特异度^[13], 可作为早期诊断手段之一, 但不能区分菌种^[16]。患者影像学改变之前 5~10 d 即可出现阳性结果。

以真菌为原料制成的抗菌药物以及某些食物中含有 BDG 类似物质, 如果待检标本被这些物质污染, 可造成 G 实验假阳性结果。此外, 待检血样为黄疸、溶血、脂血标本都会对检测结果造成影响^[17]。Ostrosky-Zeichner 等^[18] 研究者所做的研究结果显示 G 实验的检测特异度为 87.1%, 敏感度为 69.9%, 阴性预测值为 75.1%, 阳性预测值为 83.5%。当 G 实验阳性时提示可能为真菌感染。如果患者的免疫功能极度低下, 无法对感染的真菌及时吞噬消化处理, BDG 就无法释放至血液中, 则导致检测出现假阴性, 此时显然不能表明患者未受感染。有研究表明曲霉菌感染时葡聚糖上升的程度与宿主免疫力和病原菌数量有关。如果患者在 G 实验检测前已经接受了抗真菌经验性治疗, 则直接导致机体 BDG 水平降低从而造成假阴性结果。BDG 水平下降或转为阴性提示抗真菌治疗有效。在临床实践中可以将 G 实验联合 GM 实验检测, 能够更加有效的排除假阳性结果, 那么检测的结果对于临床诊断侵袭性曲霉病的意义更大。

5 分子生物学检测

分子诊断具有灵敏度及特异度高、快速等优点。近年来, 许多研究者选择曲霉菌的 18SrRNA、5.8rRNA、28SrRNA 片段作为靶基因, 利用 PCR 技术检测患者的痰液、胸腹腔积液、血液、尿液、脑脊液和 BAL 等多种标本, 从而对侵袭性曲霉菌

感染作出早期诊断^[19]。然而, 如何将致病真菌鉴定到种或属仍然是当前很多检测技术的难题。

1996 年, 美国 Applied Biosystems 公司向社会推出了自动化程度很高的实时荧光定量 PCR 技术。实现了定性检测到定量检测的飞跃, 后来该技术得到广泛应用。实时荧光定量 PCR 实验中没有扩增之后的检测过程, 能够有效解决实验中的污染问题, 缩短了检测时间, 同时该技术具有较高的特异度和灵敏度^[20]。在侵袭性曲霉菌感染的早期诊断中已经显示出重要的应用价值。王立朋等^[21] 以曲霉菌 18S rRNA 保守序列区作为靶序列, 采用核酸序列依赖扩增联合分子信标技术, 建立当累积荧光量达到设定阈值时所需循环数与孢子数的对数线性模拟曲线, 用于临床侵袭性曲霉菌病的诊断。目前国内很少见以此原理为检测方法的报道。有报道的国外研究者多采用昂贵的专利试剂盒, 在中国难以推广。毛晓露等^[22] 研究者建立双重定量 PCR 方法, 可于 3 h 内对同一反应管中的烟曲霉菌和黑曲霉菌同时进行检测。研究针对烟曲霉菌和黑曲霉菌 18sRNA 高度保守的 ITSII 基因序列设计引物和杂交探针, 特异性达 100%。毛璞等^[23] 研究者选用 ITS1 为烟曲霉菌检测的靶基因, 不仅可以将真菌检测鉴定到种的水平, 且能充分发挥核糖体基因作为多拷贝基因在检测中的优势。栗方等^[24] 研究者提出形态学难以鉴定的曲霉菌属可通过 ITS 序列分析、 β -微管蛋白基因序列分析和钙调蛋白基因序列分析进行鉴定, 将 37 株烟曲霉菌分成 3 个种群。高分辨熔解曲线分析技术的检测原理是通过实时监测升温过程中特殊的双链 DNA 饱和荧光染料与 PCR 扩增产物的结合, 分析核酸的熔解曲线变化, 曲线的变化能反应不同核酸的差异, 从而能够进行基因分型、甲基化检测、重复序列分析、突变扫描等目的, 从而鉴别不同的真菌菌属。国内学者曹楠楠等^[25] 采用此项技术鉴别不同真菌菌属。国外学者 Mandviwala 等^[26] 应用该技术准确地鉴定了念珠菌属样本中的全部 8 种念珠菌, 准确率达 100%。

分子技术诊断侵袭性曲霉菌感染具有一定的优势, 但是还无法取代传统诊断技术。曹国君等^[27] 研究者指出 PCR 应用受限的原因包括: 真菌的细胞壁坚固, 破壁困难, 从复杂的临床标本中提取真菌 DNA 的效率已成为阻碍提高诊断水平的重要因素。当前没有设计出合适的质控对照, 标本的选择和制备、DNA 分子的提取、扩增靶基因的选择以及引物的设计等多个步骤影响分子诊断技术的特异度和灵敏度。检测结果的可重复性与标本类型以及患者基本情况等因素有关, 操作难以实现标准化。相对其他病原菌, 曲霉菌污染更加难以控制, 易出现假阳性。

综上所述, 临床实验室应采用多种技术方法联合检测提高曲霉病诊断的敏感度和准确度, 做到优势互补, 可以大大提高曲霉菌病的实验诊断水平, 从而为早诊断曲霉菌提供可靠的依据。

参考文献

- 吴昊, 黄晓婕. AIDS 相关肺部疾病研究进展[J]. 传染病信息, 2012, 25(6): 332~335.
- Chen CY, Sheng WH, Cheng A, et al. Invasive fungal sinusitis in patients with hematological malignancy: 15 years experience in a single university hospital in Taiwan[Z]. 2011.
- 吕小林, 章登珊, 曹先伟. 医院环境中曲霉菌监测及同源性分析[J]. 现代预防医学, 2012, 39(21): 5620~5622.
- 程卫, 魏俊吉, 王任直, 等. 中枢神经系统真菌感染诊断治疗进展[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(3): 358~361.
- Barton RC. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome[J]. Scientifica (Cairo), 2013(3):

459405.

[6] Bergeron A, Porcher R, Sulahian A, et al. The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leukocyte count of patients with hematologic malignancies[J]. Blood, 2012, 119(8): 1831-1837.

[7] 郭微媛, 孙琪, 李桂玲, 等. 1岁幼儿肺部感染检出烟曲霉菌一例[J]. 临床检验杂志: 电子版, 2012, 1(3): 155-156.

[8] Mortensen KL, Johansen HK, Fuerst K, et al. A prospective survey of Aspergillus spp[J]. in respiratory tract samples: prevalence, clinical impact and antifungal susceptibility. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2011, 30(2): 1355-1363.

[9] Mikulska M, Furfar E, Del Bono V, et al. Galactomannan testing might be useful for early diagnosis of fusariosis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 72(4): 367-369.

[10] 王四海. 检测血清半乳甘露聚糖对诊断侵袭性肺曲霉菌病的临床研究[J]. 医药论坛杂志, 2012, 33(3): 12-14.

[11] 姜华, 贺兆斌, 袁代, 等. 血清半乳甘露聚糖检测对血液肿瘤患者侵袭性曲霉病诊断价值的评估[J]. 临床血液学杂志, 2012, 25(2): 163-168.

[12] Sulahian A, Touratier S, Ribaud P. False positive test for aspergilus antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam[J]. N Engl J Med, 2003, 349(24): 2366-2367.

[13] Sulahian A, Porcher R, Bergeron A, et al. Use and limits of (1-3)- β -D-glucan assay (Fungitell), compared to galactomannan determination (Platelia Aspergillus), for diagnosis of invasive aspergillosis[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(7): 2328-2333.

[14] Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis[J]. Clin Infect Dis, 2006, 42(10): 1417-1427.

[15] Bonini A, Capatti C, Parmeggiani M, et al. Galactomannan detection in Geotrichum capitatum invasive infections: report of 2 new cases and review of diagnostic options[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008, 62(4): 450-452.

[16] 卢洪洲, 沈银忠. 艾滋病患者侵袭性真菌感染的诊断[J]. 诊断学理论与实践, 2010, 9(6): 545-548.

• 综 述 •

[17] 许英, 陈友华. 肺部侵袭性曲霉菌感染的实验室检查[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(1): 108-109.

[18] Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1- \rightarrow 3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans[J]. Clin Infect Dis, 2005, 41(5): 654-659.

[19] Avni T, Levy I, Sprecher H, et al. Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(11): 3652-3658.

[20] Rogers TR, Morton CO, Springer J, et al. Combined real-time PCR and galactomannan surveillance improves diagnosis of invasive aspergillosis in high risk patients with haematological malignancies[J]. Br J Haematol, 2013, 161(4): 517-524.

[21] 王立朋, 何云燕, 夏云, 等. 核酸序列依赖扩增联合分子信标对曲霉菌感染的检测效果[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(15): 1583-1586.

[22] 毛晓露, 卢忠心, 石小燕, 等. 双重荧光定量聚合酶链反应检测烟曲霉菌与黑曲霉菌的临床应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(19): 4847-4849.

[23] 毛璞, 余志辉, 黄红川, 等. 荧光定量 PCR 法检测烟曲霉 DNA[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(3): 165-167.

[24] 栗方, 王龙, 曹彬, 等. 侵袭性肺曲霉菌体外药敏试验与分子鉴定及基因分型研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(6): 1301-1303.

[25] 曹楠楠, 平宝红, 司徒博, 等. 真菌通用引物结合高分辨率熔解曲线分析检测鉴定常见曲霉菌[J]. 热带医学杂志, 2012, 12(5): 589-592.

[26] Mandviwala T, Shinde R, Kalra A, et al. High-throughput identification and quantification of Candida species using high resolution derivative melt analysis of panfungal amplicons[J]. J Mol Diagn, 2010, 12(1): 91-101.

[27] 曹国君, 邢志芳, 华丽, 等. 烟曲霉实时 PCR 检测方法的建立[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(6): 731-732.

(收稿日期: 2015-01-15)

手足口病并发症及其实验室诊断研究进展

世淑兰, 周百灵 综述, 樊茂 审校

(昆明医科大学附属儿童医院检验科, 云南昆明 650034)

关键词: 手足口病; 并发症; 实验室诊断**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.045**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2015)09-1272-03

手足口病(HFMD)是婴幼儿及学龄前儿童常见的急性传染病。其病原体主要是柯萨奇病毒 A 组 16 型(CoxA16)和肠道病毒 71 型(HEV71)。多数患儿感染后症状轻, 主要表现为发热和手、足、口腔及臀部等部位出现皮疹或疱疹, 预后良好。但少数重症患儿可引起心肌炎、脑炎、无菌性脑膜炎、神经系统性肺水肿或肺出血、呼吸衰竭等严重并发症, 个别重症患儿起病急, 病情进展快, 病死率和残死率较高, 尤其是 EV71 型重型 HFMD, 严重危害儿童身体健康和生命安全。因此, 了解 HFMD 的并发症及其诊断方法尤其重要。

1 HFMD 严重并发症

1.1 心肌炎 HFMD 病毒可侵入心肌细胞导致心肌细胞受损或变性坏死, 临床出现心率失常, 表现为窦性心动过速、早

搏、房室传导阻滞、室性心动过速等, 严重者出现爆发性心肌炎死亡^[1]。心肌炎是手足病严重的并发症, 也是造成患儿死亡的主要原因。

1.2 神经系统损害 HEV71 具有嗜神经性, 当病毒侵犯到中枢神经系统时, 可引起广泛的血管周围性炎症和脑实质细胞炎症。表现为急性无菌性脑炎、脑干脑炎, 脊髓灰质炎样麻痹等严重并发症^[2]。

1.3 急性肺损伤(ALI) HFMD 病毒直接入侵中枢神经系统引起自主神经功能紊乱, 交感神经过度兴奋或(和)细胞因子过度释放引起全身炎症反应, 肺血管通透性增加引起急性肺损伤^[3]。HFMD 引起的肺损伤主要是神经系统性肺水肿和肺出血, 重症 HFMD 病毒源性肺水肿起病急, 病情进展快, 死亡率