

[8] Bhalodkar NC, Blum S, Enas EA. Accuracy of the ratio of triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol for predicting low-density lipoprotein cholesterol particle sizes, phenotype B, and particle concentrations among Asian Indians[J]. Am J Cardiol, 2006, 97(7):1007-1009.

[9] Dobiášová M, Fröhlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER)) [J]. Clin Biochem, 2001, 34(7):583-588.

[10] Walldius G, Jungner I. The apoB/apoA-I ratio; a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy—a review of the evidence[J]. J Intern Med, 2006, 259(5):493-519.

[11] 杜敏, 马淑梅. 血脂异常患者单项血脂及血脂比值与心血管疾病的相关性探讨[J]. 岭南心血管病杂志, 2011, 17(5):368-370.

[12] 杨淑敏. 冠心病血脂成份分析[J]. 中华临床医学研究杂志, 2005, 11(2):912-913.

[13] 李丛, 李凌, 赵晓燕. ApoA-I ApoB 及比值与冠状动脉粥样硬化斑块易损研究[J]. 医药论坛杂志, 2013, 7(7):26-27.

[14] 王东琦, 王归真, 李云萍, 等. 单项血脂和血脂比值与冠状动脉病变严重程度的相关性[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2007, 28(3):259-262.

[15] 杨丹. 血脂比值与冠脉病变程度的相关分析[D]. 杭州:浙江大学, 2010.

[16] 曾妍. 冠状动脉造影人群血脂指标及其比值与冠心病风险关系的分析[D]. 长沙:中南大学, 2011.

[17] Zhang XF, Attia J, D'este C, et al. Prevalence and magnitude of classical risk factors for stroke in a cohort of 5092 Chinese steelworkers over 13. 5 years of follow-up[J]. Stroke, 2004, 35(5):1052-1056.

[18] 金意, 鞠忠, 乔大伟, 等. 缺血性与出血性脑卒中危险因素对比分析[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(3):285-286.

[19] 李莹, 陈志红, 周北凡, 等. 我国中年人群血清 TC/HDL-C 比值与缺血性和出血性脑卒中发病危险性[J]. 中华神经科杂志, 2005, 38(5):305-308.

[20] 吴征瑜, 王亮, 张扬, 等. 缺血性脑卒中与血脂水平关系的初步分析[J]. 中华脑血管病杂志:电子版, 2009, 3(2):62-67.

[21] 李佳进, 孙兆青, 郑黎强, 等. 北方农村地区高血压患者血清 TC/HDL-C 比值与缺血性脑卒中的关系[J]. 山西医药杂志, 2008, 37(3):201-203.

[22] 郑育, 王红, 金领微, 等. 血液透析患者脑卒中与血脂水平关系的探讨[J]. 心脑血管病防治, 2008, 8(4):251-253.

[23] 冯俊强. 缺血性脑卒中与血脂水平关系研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2012, 20(4):642-643.

[24] 何文芳, 李志忠, 李江. 低密度脂蛋白胆固醇与高密度脂蛋白胆固醇的比值与脑梗死的关系探讨[J]. 临床和实验医学杂志, 2006, 5(6):755.

[25] 宋川, 郑延松, 王丽凤, 等. 血脂指标比值对颈动脉粥样斑块预测价值的比较[J]. 中国全科医学, 2012, 15(36):4186-4189.

[26] 桂见军, 江东新, 农凤秋, 等. 血脂指标的比值在预测心脑血管病患者颈动脉内-中膜增厚中的作用[J]. 中国脑血管病杂志, 2012, 9(4):179-182.

[27] 李琦. 瑞舒伐他汀干预对急性脑卒中患者 LDL/HDL 及预后的影响[J]. 中国医药导报, 2013, 10(20):69-70.

[28] Jeppesen J, Facchini FS, Reaven GM. Individuals with high total cholesterol/HDL cholesterol ratios are insulin resistant[J]. J Intern Med, 1998, 243(4):293-298.

[29] Kim-Dorner SJ, Deuster PA, Zeno SA, et al. Should triglycerides and the triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol ratio be used as surrogates for insulin resistance[J]. Metabolism, 2010, 59(2):299-304.

[30] Kawamoto R, Tabara Y, Kohara K, et al. Low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio is the best surrogate marker for insulin resistance in non-obese Japanese adults[J]. Lipids Health Dis, 2010, 9(1):138.

[31] 高璐, 于德民. 糖尿病前期个体血脂比值与胰岛素抵抗相关性的研究[J]. 临床荟萃, 2007, 22(6):393-395.

[32] 张代民, 张莹, 李霆. 糖尿病患者甘油三酯/高密度脂蛋白胆固醇比值水平与胰岛素抵抗的关系[J]. 临床军医杂志, 2006, 34(2):141-142.

[33] 王翠英, 任丽萍, 王战建. 2 型糖尿病血管并发症与血脂和脂质比值的比值的关系[J]. 临床荟萃, 2009, 24(23):2049-2052.

[34] 夏宁, 刘红, 洪兵, 等. 广西老年糖尿病患者血清甘油三酯与高密度脂蛋白胆固醇比值与大血管并发症[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(6):564-566.

[35] 钟东塔, 黄敬泽, 王健. 甘油三酯/高密度脂蛋白胆固醇比值与 2 型糖尿病大血管病变的相关性评估[J]. 福建医药杂志, 2003, 25(6):9-11.

[36] 张春平, 郭晓霞, 钟亚玲. 子痫前期患者血清脂质及血脂比值的比值的变化[J]. 实用医院临床杂志, 2009, 6(1):30-32.

[37] 甘婵芬, 龚仁蓉, 林佳, 等. 高糖低脂膳食对健康青年血脂比值的影响[J]. 四川大学学报:医学版, 2008, 39(2):267-271.

(收稿日期:2015-01-12)

• 综 述 •

肺孢子虫肺炎实验室诊断方法的评估与进展*

陈兆艳¹综述, 刘金凤², 梁 冰²审校

(1. 青岛大学医学院临床检验诊断专业, 山东青岛 266000; 2. 解放军第 401 医院检验科, 山东青岛 266000)

关键词:肺孢子虫肺炎; 肺孢子虫; 诊断方法

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 09. 047

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1276-03

肺孢子虫(PC)最早于 1909 年被 Chagas 发现, 由 PC 引起的肺孢子虫肺炎(PCP)是一种机会感染性疾病, 早期见于早产儿及营养不良的婴幼儿, 被认为是一种间质性浆细胞肺炎。20 世纪 80 年代 HIV 流行, PCP 的发病率增高, 早期预防以及联合抗逆转录病毒疗法(HAART)的广泛应用明显减少了 HIV

患者 PCP 的发病率。近几年, 免疫抑制剂的广泛使用尤其是短期高剂量以及联合使用增加了非 HIV 患者的发病率。PCP 是可以治愈的疾病, 早期诊断对于 PCP 患者的及时治疗 and 预后具有重要的意义。本文通过文献复习从临床应用的角度对 PCP 的实验室诊断方法进行评价和讨论, 使其在选择实验室

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81371870)。 作者简介:陈兆艳, 女, 检验技师, 主要从事临床微生物检验工作。

诊断方法时更具针对性、有效性和可靠性。

1 病原学诊断

1.1 标本种类 主要包括痰液、支气管肺泡灌洗液(BALF)和活检肺组织。正确选择和留取标本对于检测结果的可靠性十分重要。应当根据检测目的来选择标本的种类。痰液是最常用的检测样本,取样简单并且无损伤,包括自然咳痰和诱导痰。PCP 患者临床上常常表现少痰和无痰,自然留取痰标本较困难,目前多采用吸入 3%~5% 的高渗盐水诱导痰液法留取标本^[1]。据报道高渗盐诱导的痰液有 50%~90% 的诊断率,是诊断 PCP 的首选标本,特别是艾滋病患者^[2]。诱导痰液法检测 PCP 的敏感性和特异性较高,对于免疫功能低下甚至呼吸衰竭的患者可以开展。支气管肺泡灌洗液(BALF)被广泛应用于许多肺部疾病的病原体、细胞学和其他病因的检查。研究表明非 HIV 感染的 PCP 患者 BALF 检测的敏感性和特异性均高于痰液^[3]。支气管肺泡灌洗可以采集到肺内深处的标本,检出率较高,因此若患者能耐受纤维支气管镜,BAL 宜作为首选^[4]。肺组织活检即经皮肺活体组织检查,可以制作肺印片以及肺组织切片,能够直接查到 PC 及观察到肺组织的特异性改变,无疑对于 PC 感染具有确诊性。但是组织活检创伤大,对于临床的患者作肺活检,容易造成大出血及气胸,风险较大。标本采集应该结合患者的临床综合评估,根据患者的耐受情况选择不同的方法采集。应该在使用抗菌药物之前,以提高诊断率。

1.2 传统方法——染色镜检 直接涂片镜检查见 PC 包囊或者滋养体即可确诊 PCP,染色方法主要包括吉姆萨染色法、瑞一姬氏染液复染法、六亚甲基四胺银染色法(GMS)、亚甲胺染色法以及免疫荧光染色。目前多采用瑞一姬氏染液复染法,操作简便,染色时间短。镜下可见圆形或椭圆形的 PC 包囊,呈淡蓝色,内含紫红色块状或新月状的囊内小体。吉姆萨染色是由吉氏染粉、甲醇和甘油配成原液,再经磷酸二氢钾与磷酸氢二钠配成的缓冲液进行 1:20 稀释成为应用染液。标本需要甲醇固定,而且需要较长的染色时间。GMS 对包囊有特异的染色特性,目前多用于肺印片的染色,其配制较复杂,反应需要维持一定的温度,而且反应时间较长。免疫荧光抗体染色是比较先进的染色方法,染色时抗体与 PC 特异结合,利用荧光显微镜能够观察到视野中荧光物体,从而证明 PC 的存在。由于价格昂贵,要求比较高,目前国内还没有开展使用。对于肺组织切片主要使用苏木精伊(HE)染色,镜检查见 PC 即可确诊。同时可见肺部实变、炎症以及渗出等改变。由于目前还没有建立一套完整的体外培养 PC 的方法体系^[5],直接涂片镜检依然是诊断 PCP 最可靠的方法。染色镜检法的关键就是要找到 PC 虫体,由于患者体内 PC 的负荷、标本种类、染色方法以及技术人员经验的不同,其敏感度很低。因此新的检测技术对于诊断 PC 肺炎显得尤为重要。

1.3 检测新技术——1,3 β -D 葡聚糖检测和 PCR 技术

1.3.1 1,3 β -D 葡聚糖检测 1,3 β -D 葡聚糖是存在于大多数真菌细胞壁的一种多糖,亦存在于 PC 的包囊壁中,它可以触发先天性的免疫反应,在炎症反应中扮演着重要角色。可以通过检测 BALF 或者患者血清中 1,3 β -D 葡聚糖的含量来诊断 PCP。这种微创性的检测近年来引起学者的广泛关注,而且在临床中应用也越来越多。Desmet 等^[6]对 28 名 HIV 及血管恶性肿瘤的 PC 肺炎患者血清中的 1,3 β -D 葡聚糖进行了研究,与健康人相比,临界值为 100 pg/ml 时,诊断 PCP 的特异度与敏感度分别可达到 96.4% 和 100%。一项对于 1,3 β -D 葡聚糖诊断 PCP 的荟萃分析显示(95%CI)其敏感度和特异度平均可达 94.8%(90.8~97.1%)和 97.1%(81.7~89.9%)^[7]。1,3 β -

D 葡聚糖存在于血清中,分子质量小,可以用于早期诊断,比显微镜检查到菌体更早一步^[8],由于 1,3 β -D 葡聚糖与在其他真菌如曲霉菌、毛霉菌以及念珠菌同时存在,需要与 PCP 进行鉴别诊断。目前未见关于 1,3 β -D 葡聚糖的水平与机体感染 PC 的严重程度、疗效以及患者的死亡率相关性的实验报道。

1.3.2 聚合酶链反应(PCR) PCR 是检测 PC 最为敏感的方法,具有敏感度高、操作简便并且无创伤性的优点。检测标本可以是痰液、BALF,也可采用口咽部洗漱液以及鼻咽部拭子^[9]。不同的靶基因其检测敏感度不同,常用靶基因主要有二氢叶酸合成酶(DHPS)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、 β -微管蛋白、CDC2 基因、主要表面糖蛋白基因以及线粒体大亚核糖体 RNA 基因(mtLSUrRNA)等^[10-12]。产物及标本引物的分析方法不同,也会使该技术特异度不同。最近的一项研究比较了九种不同的诊断 PCP 的 PCR 方法,发现巢式 PCR 技术、BALF 以及肺组织的 mtLSUrRNA 检测是最敏感和特异的痰液检测方法^[13]。Gotab^[14]采用 mtLSU-巢式 PCR 法对 PCP 大鼠模型的 26 份肺外组织器官标本进行检测,也有较高的检测敏感度。但检测肺外组织 PC 的报道很少,PC 在肺外组织的传播还需要大量实验的进一步验证。PCR 能够直接检测 BALF 以及诱导痰中目标基因,可检测出没有 PCP 临床症状但有 PC 定植的患者^[15-16]。PCR 检测阴性预测值几乎为 100%,尤其对于非 HIV 感染的患者。但是,其阳性预测值还有待评估。定植有 PC 的患者尤其是婴幼儿、慢性阻塞性肺病(COPD)的老年患者以及患有其他疾病的人群,在他们机体免疫力受到抑制时患 PCP 的概率会增高。而且 PC 携带者作为传染源可以引起人与人之间的传播。常规 PCR 技术不能区分定植与感染。研究表明实时定量 PCR 优于传统的 PCR 技术,能区分出 PC 感染和定植^[17]。此外,DNA 序列的针对性和定量 PCR 分析中使用的截点仍有待规范。Damiani 等^[18]发现定量 PCR 和血清 1,3 β -D 葡聚糖分析相结合可以有效区分 PC 感染和定植,两者结合诊断可能会适用于临床实践。但是不同的实验方法不同的血清 β -D 葡聚糖阈值,其诊断的敏感度也不同,因此仍需要进行评估^[18-19]。PCR 检测法诊断 PCP 的敏感度和特异度都较高,可以用于临床 PCP 患者的筛选,还可用于临床治疗效果的评价。鉴于定植的存在,应当把在检测前充分评估患者 PCP 的危险因素作为前提条件。

2 PC 感染宿主免疫反应

宿主对 PC 感染的免疫反应主要包括体液免疫和细胞免疫,以及肺泡巨噬细胞、树突状细胞、细胞因子等的协同作用。国内外已将乳胶凝集试验、斑点酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫荧光法、免疫印迹法等应用于 PC 的诊断。健康人群体内普遍含有 PC 天然抗体,因此,抗体检测对于早期诊断 PCP 无应用价值。而且 PCP 往往发生于 HIV 或各种原因引起的免疫低下疾病情况,对外界抗原免疫应答基本缺失,故针对 PC 包囊壁抗原的血清抗体检测对于诊断 PCP 意义不大。

在免疫反应中 CD4⁺T 细胞的作用最明显,当机体免疫功能降低,尤其是 CD4⁺T 细胞明显缺陷时^[20-21],处于潜伏状态的 PC 即开始大量繁殖并在肺部扩散,形成“隐性感染再激活”。对于 HIV 感染的免疫抑制患者,尤其是 CD4⁺T 细胞小于 200 μ L 的患者要考虑 PCP^[22]。免疫力低下是 PC 激活的重要条件,评估和监测非 HIV 患者的免疫状态对于诊断 PC 具有重要的意义,临床上应该重视易导致免疫力低下的危险因素,如长期使用免疫抑制剂患者、器官移植、肿瘤放化疗、恶性血液系统疾病等。

3 其他检查

S-腺苷蛋氨酸(AdoMet)与肺内甲基化反应以及多巴胺合

成密切相关。PC 依赖其宿主的 S-腺苷甲硫氨酸酶,有研究发现,低 AdoMet 水平能够预测诊断 PCP^[23]。但另一个研究却未找到 AdoMet 水平关系与 PCP 有关^[24]。与其他肺部感染的患者相比,在重症 PCP 患者可观察到低水平的血浆 S-腺苷甲氨酸,但这种观测结果的有效性需要大量患者证实。当前不能被推荐用于临床。

高水平的乳酸脱氢酶(LDH)同样是检测 PCP 的一个指标,其敏感度和特异度低于 1,3 β -D 葡聚糖^[25],作为肺损伤的标志物与疾病严重程度有关,尽管已注意到 PCP 患者血清 LDH 升高,但很可能是肺炎症或损伤的一种反应而不是该病特异度标志,不能作为病因诊断。有研究就认为,1,3 β -D 葡聚糖的 LDH 水平与临床数据的有效结合是一个很有前途的诊断 PCP 的有效替代方法^[26]。这些辅助诊断指标的可靠性需要进行大量的临床验证来获得。

4 小 结

诊断及治疗程序的规范化使预防及诊疗 PCP 有了很大的进步,但由于新的免疫疗法的应用,仍有许多未知的情况出现,因此诊断 PCP 仍具有很大的挑战性。新的诊断方法越来越多,但都有一定的局限性,任何一个方法都不能对 PCP 做出一个明确的诊断,诊断仍然依赖于 PC 在呼吸道标本的微观认证。对 PCP 诊断更特异、敏感的标志物的研究开发是必要的,比如感染组织、体液特异度蛋白的发现以及 PCP 多基因的研究,同时,也应该侧重于建立多种测试相结合的诊断方法。

参考文献

- [1] Rosemeri Maurici da Silva¹, Maria luiza bazzo and alessandra Abel borges. Induced sputum versus bronchoalveolar lavage in the diagnosis of pneumocystis jirovecipneumonia in human immunodeficiency virus-positive patients[J]. BJID, 2007, 11(12): 549-553.
- [2] Oliveira GM, Cordeiro AM, Marsico GA, et al. Induced sputum in HIV-infected patients; diagnosis of acute pulmonary diseases[J]. Rev Assoc Med Bras, 2009, 55(5): 617-620.
- [3] Mu XD, Wang GF, Su L. A clinical comparative study of polymerase chain reaction assay for diagnosis of pneumocystis pneumonia in non-AIDS patients[J]. Chin Med J, 2011, 124(17): 2683-2686.
- [4] Gupta R, Iyer VK, Mirdha BR, et al. Role of cytology and polymerase chain reaction based detection of Pneumocystis jirovecii infection in bronchoalveolar lavage fluid[J]. Acta Cytol, 2010, 54(3): 296-302.
- [5] Reid AB, Chen SC, Worth LJ. Pneumocystis jirovecii pneumonia in non-HIV-infected patients; new risks and diagnostic tools[J]. Curr Opin Infect Dis, 2011, 24(6): 534-544.
- [6] Desmet S, Van WE, Maertens J, et al. Serum(1-3)-beta-D-glucan as a tool for diagnosis of pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection or hematological malignancy[J]. Clin-Microbiol, 2009, 47(12): 3871-3874.
- [7] Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, et al. Accuracy of β -D-glucan for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia; a meta-analysis[J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(1): 39-49.
- [8] Pisculli ML, Sax PE. Use of a serum beta-glucan assay for diagnosis of HIV-related Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with negative microscopic examination results[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(12): 1928-1930.
- [9] Carmona EM, Limper AH. Update on the diagnosis and treatment of Pneumocystis pneumonia[J]. Ther Adv Respir Dis, 2011, 5(1): 41-59.
- [10] Varez-Martinez MJ, Miro JM, Valls ME, et al. Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of Pneumo-

- cystis jirovecii clinical specimens[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2006, 56(2): 153-160.
- [11] Arcenas RC, Uhl JR, Buckwalter SP, et al. A real-time polymerase chain reaction assay for detection of Pneumocystis from bronchoalveolar lavage fluid[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2006, 54(3): 169-175.
- [12] Brancart F, Rodriguez-Villalobos H, Fonteyne PA, et al. Quantitative TaqMan PCR for detection of Pneumocystis jirovecii[J]. J Microbiol Methods, 2005, 61(3): 381-387.
- [13] Robberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Polymerase chain reaction detection of Pneumocystis jirovecii; evaluation of 9 assays[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007, 58(4): 385-392.
- [14] Gotab E. Presence of pneumocystis carinii and pneumocystis wakefieldiae DNA in the extrapulmonary tissues of immunocompromised laboratory rats[J]. Wiad Parazytol, 2009, 55(2): 167-171.
- [15] Ponce CA, Gallo M, Bustamante R, et al. Pneumocystis colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population[J]. Clin Infect Dis, 2010, 10(1): 347-353.
- [16] Morris A, Wei K, Afshar K, et al. Epidemiology and clinical significance of Pneumocystis colonization [J]. J Infect Dis, 2008, 197(1): 10-17.
- [17] Robert-Gangneux R, Belaz S, Revest M, et al. Diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia in immunocompromised patients by real-time PCR; a four-year prospective study[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(9): 3370-3376.
- [18] Damiani C, Le Gal S, Da Costa C, et al. Combined quantification of pulmonary Pneumocystis jirovecii DNA and serum (1->3)- β -D-glucan for differential diagnosis of pneumocystis pneumonia and Pneumocystis colonization [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(10): 3380-3388.
- [19] Tasaka S, Kobayashi S, Yagi K, et al. Serum; 1-3 β -d-glucan assay for discrimination between Pneumocystis jirovecii pneumonia and colonization [J]. NCBI, 2014, 24(6): 241-244.
- [20] Rose CM, Kimzey SL, Green JM. The host response of CD28-deficient mice to Pneumocystis infection[J]. Microb Pathog, 2006, 40(1): 23-28.
- [21] Yang Y, Mildvan D. Lower CD4⁺ T lymphocyte nadirs May indicate limited immune reconstitution in HIV-1 infected individuals on potent antiretroviral therapy; analysis of immunophenotypic marker results of AACTG 5067 [J]. J Clin Immunol, 2005, 25(2): 106-115.
- [22] Singhal R, Mirdha BR, Guleria R. Human pneumocystosis [J]. Indian J Chest Dis Allied Sci, 2005, 47(4): 273-283.
- [23] Skelly MJ, Holzman RS, Merali S. S-adenosylmethionine levels in the diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia in patients with HIV infection [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(3): 467-471.
- [24] Boer MG, Gelinck LB, van Zelst BD, et al. β -D-glucan and s-adenosylmethionine serum levels for the diagnosis of pneumocystis pneumonia in HIV-negative patients; a prospective study [J]. J Infect, 2011, 62(1): 93-100.
- [25] Tasaka S, Hasegawa N, Kobayashi S, et al. Serum indicators for the diagnosis of pneumocystis pneumonia [J]. Chest, 2007, 131(4): 1173-1180.
- [26] Esteves F, Lee CH, Sousa BD, et al. 1-3-beta-D-glucan in association with lactate dehydrogenase as biomarkers of Pneumocystis pneumonia; PcPin HIV-infected patients [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33(7): 1173-1180.