

• 综 述 •

临床常见真菌及实验室诊断

詹先林, 管松晖, 朱爱英 综述, 闫 伟[△] 审校

(中国人民解放军第四五五医院检验科, 上海 200052)

摘 要: 临床常见的真菌主要包括念珠菌、曲霉菌、隐球菌, 临床上可以引起人类感染性疾病、中毒性、超敏反应性疾病、侵袭性真菌感染等, 已严重威胁到人类健康。真菌的实验室诊断方法主要包括直接涂片镜检、培养、血清学检测、组织病理检测、分子生物学等。诊断方法的进步将使真菌疾病诊断更加快速、特异, 也给患者的诊治带来了福音。

关键词: 真菌; 镜检; 培养; 血清学; 分子生物学; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.10.027

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2018)10-1255-03

文献标识码: A

真菌是一种真核生物, 是生物界中很大的一个类群, 真菌没有质体, 不含叶绿体, 属于异养生物。它们是通过其他动物、植物、土壤等来获取营养。真菌的异养方式分为寄生、腐生。真菌是个有机体, 大多数是多细胞的, 多为丝状。真菌一般都具有细胞壁, 不能够运动, 繁殖方式通常以孢子的形式, 分为有性生殖和无性生殖, 通过营腐生、寄生、共生和超寄生等生活。估计在世界上真菌有 100 万至 150 万种^[1]。只有少数对人类有害, 与医学有关真菌达 400 多种, 常见的有 50~100 种, 可引起人类感染性、中毒性、超敏反应性疾病, 室内真菌与过敏性呼吸道疾病的发生、发展和加重有关^[2]。侵袭性真菌感染 (IFI) 的发病率及病死率在全球范围内也显著上升^[3]。

1 临床常见真菌概述

临床上常见的真菌感染主要是念珠菌感染、曲霉菌感染和隐球菌感染^[4]。

念珠菌是真菌中较为常见的条件致病菌。它常寄生于人的表皮、口腔黏膜等地方, 当人体抵抗力下降或正常菌群失调时, 容易引发念珠菌病。念珠菌孢子呈圆形、椭圆形, 有时是不规则形, 通过发芽方式繁殖, 所有菌种和变种全部或大多会出现假菌丝, 一小部分变成后壁孢子或真菌丝, 不形成子囊孢子、冬孢子等。念珠菌为酵母菌, 在特定条件下转为菌丝相后致病性增强。目前感染的主要病原菌仍是念珠菌^[5], 自然界常见的念珠菌很多, 但能够对人类和动物致病者仅少数, 临床上以白色念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌、光滑念珠菌为常见。

念珠菌感染的临床表现主要有 (1) 黏膜念珠菌病, 如口咽念珠菌病、食管念珠菌病、念珠菌口角炎、女性阴道念珠菌病等, (2) 皮肤念珠菌病, 如念珠菌间擦症、念珠菌性肉芽肿、慢性皮肤黏膜念珠菌病、念珠菌引起的甲沟炎等, (3) 播散性念珠菌病, 如念珠菌菌

血症等, (4) 深部器官念珠菌病, 如泌尿系统念珠菌病、肺部的念珠菌感染、念珠菌引起的关节炎、心内膜念珠菌感染、念珠菌性脑膜炎等。

曲霉菌广泛分布于自然界, 具有特征性的结构, 分生孢子头。分生孢子头包括分生孢梗、顶囊、瓶梗、梗基和分生孢子链。已知自然界至少有 600 多种曲霉菌, 超过 20 个种已被发现能够感染人和动物, 而最常见的约有 8 个种, 临床常见的致病曲霉有烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉、土曲霉、构巢曲霉等。引起的临床表现主要是肺曲霉病、曲霉肉芽肿、播散性曲霉病、皮肤曲霉病、外耳道曲霉病、眼曲霉病等^[4]。如果不加以控制, 可以造成巨大的发病率和病死率^[6]。

隐球菌是一种酵母菌, 存在于自然界中, 在土壤、鸽粪、树皮中存在。也可存在于人体的体表、口腔及粪便中, 在人类宿主免疫受损时, 可以引起隐球菌病。多数引起外源性感染, 也可引起内源性感染。隐球菌病的病原菌主要是新生隐球菌和格特隐球菌两种。它引起人类感染的主要途径是通过呼吸道的吸入, 首先感染肺部, 然后由肺部扩散到身体的其他地方, 比如黏膜、皮肤、骨骼、脑膜、淋巴结等。但是隐球菌更易侵犯脑, 进而引起隐球菌性脑膜炎。

对改善真菌疾病的预后越来越多的证据表明, 早期和适当的抗真菌治疗很重要^[7], 所以就要求临床上真菌的检测要准确、快速。

2 临床实验室检查

2.1 涂片镜检 临床标本的涂片镜检方法简便、成本低廉, 一直是真菌检测的首选步骤。其优势在于检测快速且能为鉴定致病真菌类型提供最初线索, 有时对形态特别的致病真菌甚至可以直接进行判定^[8]。直接镜检法包括生理盐水法、氢氧化钾法等, 涂片染色镜检法分为墨汁负染法、乳酸酚棉兰染色法、革兰染色、吉姆萨染色、六胺银染色、过碘酸-雪夫染色等。

[△] 通信作者, E-mail: 13524678789@163.com。

实际工作中,需要根据不同的标本,不同的真菌选择合适的染色方法。其阳性结果可确定真菌感染,直接染色镜检对有些具有一定特殊形态的致病真菌直接做出判定,比如检查隐球菌可取脑脊液标本将标本离心后用沉渣进行墨汁染色。显微镜涂片镜检法是检查真菌最基本的方法,它相对简单,又比较快速,而且比较便宜。但是涂片镜检结果如果阴性也不能排除是真菌引起的感染;在用涂片镜检法检测真菌时,需要采用多次取材并做多张涂片,以提高检测的阳性率。

2.2 真菌培养 培养也是真菌常规检查的基本方法^[9],培养法可以直接观察到病原菌生长,做到明确致病菌种,提高病原体检出率,验证直接镜检的结果,同时又可以通过做药敏实验,指导临床医生合理使用抗菌药物。科玛嘉有一种念珠菌显色培养基既可用于培养,又可根据菌落颜色鉴别,是目前应用比较广泛的一种真菌培养基。念珠菌和新型隐球菌在普通增菌培养基上就能生长良好。但是曲霉培养时间较长,而且易受到环境的污染,所以判断时一定要结合临床。但是培养一般所需时间都很长,这就有可能延误最佳治疗时机。为了提高培养的阳性率研究人员进行了很多改进,比如显色培养基还有自动监测作用的血培养瓶的应用等,在一定程度上缩短了结果报告的时间。

2.3 血清学检查

2.3.1 血浆 1,3-β-D 葡聚糖检测(G 试验) 1,3-β-D 葡聚糖广泛存在于真菌细胞壁中,血液或无菌体液中如果检出 1,3-β-D 葡聚糖,基本上可以说明感染了念珠菌、酵母菌或曲霉菌等深部真菌^[10]。血浆 1,3-β-D 葡聚糖检测简称 G 试验,目前是使用商品化的试剂盒来检测。但是如果标本受到化疗药物、内毒素等影响,会出现假阳性的结果。

2.3.2 半乳甘露聚糖抗原测定(GM 试验) 半乳甘露聚糖是存在于侵袭性曲霉菌的特异性的多糖抗原,GM 的检测已经被用于侵袭性曲霉病的早期诊断。现多采用 ELISA 法,已证实,ELISA 法检测半乳甘露聚糖对诊断曲霉病具有较高的特异度^[9]。GM 试验和 G 试验联合使用可以提高曲霉检出的阳性率^[11]。于书娴等^[12]的分析研究也表明,两者联合对侵袭性真菌病有较高的诊断效果。

2.3.3 乳胶凝集实验 在临床实验室中,乳胶凝集实验临床上常常用于隐球菌检测,它是通过检测隐球菌中的荚膜多糖类抗原来检测真菌。是一种比较快速简便的检测方法,与常规的墨汁染色检测新生隐球菌荚膜的方法相比较,它具有较高的灵敏度及特异性,测试滴度在 4 倍及以上,被认为具有临床意义。

2.4 组织病理学检查 组织病理学的方法需要取到真菌感染部位的组织,它可了解真菌在组织及血管内寄生状况及机体对真菌侵袭的反应。在实际操作为

了更清楚地辨别真菌的形态,常常会借助各种染色,如苏木素伊红(HE)染色、嗜银染色、荧光染色等。免疫组化因为抗原抗体的相对特异性,可以做出相对特异性的诊断,通过对病理组织标本进行特殊染色加上常用的 HE 染色能够提高深部真菌感染的检出率。如病变组织内可见不同类型的炎性细胞,并可见有隔菌丝及分叉结构和分生孢子头,就很容易判断出是哪一种曲霉菌。研究表明,免疫组化方法很容易对白色念珠菌、曲霉菌还有新生隐球菌等进行鉴定^[13]。

2.5 分子生物学检测 主要包括核酸检测技术,直接测序和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测技术(MALDI-TOF MS)^[14]。近年来,分子生物学已成功应用于某些真菌感染的诊断和耐药基因的检测^[15],目前国内外实验室常规分子诊断方法主要是传统的 PCR 技术、实时 PCR 技术等,实时 PCR 当前被认为是检测临床样本病原体低丰度 DNA 最灵敏的方法,即在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析,可对临床重要曲霉菌和念珠菌进行区分。分子生物学的方法能在较短的时间内测到含量很低的真菌 DNA,所以它有利于真菌感染的早期诊断。在曲霉菌感染的分子生物学诊断方面,以其特异性强、灵敏度高等特点在曲霉菌病的诊断及分型中发挥着日趋重要的作用。有研究表明,实时 PCR 技术在诊断侵袭性曲霉中,有较高的灵敏度和特异度(分别为 79%和 92%)^[16]。序列分析技术已慢慢成为精确诊断的重要手段,但因为检测时间较长而且检测费用很高,所以其应用有一定局限性^[17]。MALDI-TOF MS 是一种可以对多种微生物其中包括细菌、丝状真菌等进行鉴定的很好的工具^[18]。微生物物种都由自己特别的蛋白质构成,进而具有特定的蛋白质指纹图谱。通过仪器软件图谱的分析比对,找出自身特异图谱,以达到对待测物质的鉴别。在丝状真菌的鉴定中,传统的方法以形态学为基础,但形态学操作复杂,且周期长,不利于及早准确地诊治^[19]。MALDI-TOF MS 的应用在丝状真菌的研究中就显得很重要,它大大缩短了丝状真菌的鉴定时间,也取得了良好的鉴定效果^[20]。它是一种新兴的鉴定技术,近年来已开始广泛应用于真菌的检测,它可通过测定菌种蛋白来鉴定真菌^[21]。最近研究表明,MALDI-TOF MS 除了可以准确鉴定丝状真菌之外,还具有对丝状真菌进行分型的潜力^[22]。

3 实验室检查方法的不足

真菌检测最基础的方法包括涂片镜检、培养,它主要是形态学的观察,它会受到标本本身取材的影响,还与检验人员专业技术水平等息息相关。培养需要时间较长,不能为临床提供早期的诊断证据。血清学方法的主要缺点是特异度、敏感度不是特别好,而且会存在假阳性、假阴性的情况。如 GM 试验会受到

药物、食物等影响而出现假阳性^[23],假阴性可能与病情、体内代谢情况、标本采集时间等有关系。组织病理学方法的取材相对困难,如组织标本的获取对患者有一定侵入性,患者很可能不易接受。近几年来,分子生物学方法发展迅速,对真菌的诊断有很好的前景,但所使用的引物等的特异性还需要进一步验证^[24]。

4 小 结

综上所述,真菌现在是临床上感染性疾病的常见致病菌,不仅可以引起如皮肤、黏膜的感染,也能引起身体内部各器官的感染,是目前临床上很严重的问题,所以在临床工作中需要尽早做出准确诊断。诊断仍是一个复杂而且很重要的问题,到目前为止,已有很多快速检测方法应用于真菌感染的诊断,包括对临床标本抗原的检测、快速培养检测法及分子检测法等。随着技术的快速发展,对不同检测方法优缺点的比较也在不断探讨中,争取找出能准确诊断的方法。在真菌感染的诊治中,需要将常规的一些检测方法和现在新兴技术相结合,以达到快速准确地诊断。诊断技术方法的进步将使疾病的诊断更加快速、特异,也给患者带来了福音。最近几年真菌感染的病例也在不断增加^[25],病死率也很高,为达到早期诊断的目的,有时候需要联合应用多种检测技术来进行诊断。同时结合临床病史、患者接触史,尽可能早诊断、早治疗。

参考文献

- [1] 王瑞礼. 医学真菌学——实验室检验指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:132.
- [2] OSBORNE N J, THORNTON C R, SHARPE R A. Indoor Fungal Exposure and Allergic Respiratory Disease [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015, 15(12):71.
- [3] DENNING D W, KIBBLER C C, BARNES R A, 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.
- [4] 张宏, 廖万清, 郭宁如. 实用临床真菌学[M]. 北京:人民军医出版社,2009:107.
- [5] 黄虑, 张永信, 孙小丰, 等. 老年危重患者深部真菌感染临床调查[J]. *中国抗生素杂志*, 2004, 29(3):163-165.
- [6] GHOSH S, HOSELTON S A, SCHUH J M. Allergic Inflammation in *Aspergillus fumigatus*-Induced Fungal Asthma[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015, 15(10):59.
- [7] KULLBERG B J, ARENDRUP M C. Invasive Candidiasis [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(15):1445-1456.
- [8] 钱琴芳, KIRBY J, 周南. 真菌感染的实验室诊断研究进展[J]. *微生物与感染*, 2010, 5(1):2-25.
- [9] 廖万清. 侵袭性真菌感染的实验室诊断[J]. *检验医学*, 2010, 25(7):503-506.
- [10] MONTAGNA T M. The role of the laboratory in the di-

- agnosis of invasive candidiasis[J]. *Druqs*, 2009, 69(1):59-63.
- [11] 章强强. 深部真菌感染的实验室诊断[J]. *世界临床药物*, 2010, 31(12):725-729.
- [12] 于书娴, 崔学范, 马婷, 等. G 试验和 GM 试验对侵袭性真菌病诊断价值的 Meta 分析[J]. *中华肺部疾病杂志*, 2016, 9(2):164-170.
- [13] 狄梅, 涂平, 李若瑜. 重要条件致病真菌感染组织免疫组化研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2000, 33(5):324.
- [14] 杨启文, 徐英春. 侵袭性真菌病的非培养实验室诊断方法[J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(10):721-724.
- [15] 李皇, 卢平宣. 真菌感染实验室诊断技术进展[J]. *河北联合大学学报(医学版)*, 2014(1):36-38.
- [16] KAMI M, FUKUI T, OGAWA S, et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 33(9):1504-1512.
- [17] CLARRIDGE J E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(4):840-862.
- [18] 周龙荣, 徐元宏. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)分析在丝状真菌实验诊断中的应用[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(1):5-8.
- [19] 史英, 柳志宝, 高敬华, 等. 肿瘤异常蛋白对消化道恶性肿瘤的表达及化疗疗效评价[J]. *中国综合临床*, 2015, 31(12):1125-1127.
- [20] SANGUINETTI M, POSTERARO O. MALDI-TOF mass spectrometry: any use for *Aspergilli* [J]. *Mycopathologia*, 2014, 178(5/6):417-426.
- [21] POSTERARO B, DE CAROLIS E, VELLA A A. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2013, 10(2):151-164.
- [22] LAU A F, DRAKE S K, CALHOUN L B, et al. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(3):828-834.
- [23] MAERTENS J, VERHAEGEN J, LAGROU K, et al. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation [J]. *Blood*, 2001, 97(6):1604-1610.
- [24] MENGOLI C, CRUCIANI M, BARNES R A, et al. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9(2):89-96.
- [25] 桑军军, 潘炜华, 廖万清. 深部真菌感染早期诊断的现状与策略[J]. *上海医药*, 2014, 35(9):4-7.