

念珠菌血流感染诊断方法的研究进展

张梦怡^{1,2} 郭彦言²

(1.华北理工大学 河北 063210; 2.唐山工人医院 河北唐山 063000)

摘要:念珠菌是引起血流感染的常见致病菌,近年来念珠菌血流感染发病率呈上升的趋势。念珠菌血流感染检测手段方面取得了很大进展,目前实验室用于检测念珠菌血流感染的手段有非分子生物学方法和分子生物学方法,非分子生物学方法如血培养作为金标准对于念珠菌血流感染有着重要意义,但缺乏足够的灵敏度。分子生物学方法在检测念珠菌中灵敏度高,特异性强。这些方法在临床中有不同的适用价值,本篇综述介绍了不同方法在检测血流感染中念珠菌的优缺点,为临床选择适用的检测方法提供参考价值。

关键词:念珠菌血流感染;非分子生物学方法;分子生物学方法

念珠菌是机会性致病菌,当人体抵抗力下降或者正常菌群失调时,念珠菌可由非致病菌转变为致病菌,并且可侵犯人体多个器官^[1]。国内一项研究指出,院内常见侵袭性念珠菌感染的病原体种类分别有白念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌等^[2]。常见念珠菌可占真菌血流感染的90%^[3],白色念珠菌是念珠菌所致的血流感染中最常见原因且占菌血症病死率首位^[4]。热带念珠菌在非白色念珠菌血症中也占有相当比例,可达血培养中分离的非白色念珠菌血症比例的20-40%,近年来耐药性逐渐增加^[5]。当前,关于念珠菌血症的实验室检测方法包括非分子生物学方法和分子生物学方法检测。下文对念珠菌的检测方法进行综述,对各方法的利弊进行讨论。

1 非分子生物学方法检查

1.1 念珠菌的镜下直接检查

念珠菌直接镜下检查是最直接有效地检出病原体的方法,这种方法简单快速,目前在皮肤浅表组织、阴道分泌物的检查手段中应用广泛,尤其在血液中本身菌量少且有血液各种成分的干扰,影响检测效果,很少在念珠菌血症中应用。

1.2 念珠菌的分离培养及鉴定

念珠菌的分离培养及鉴定常作为临床上对于念珠菌血症的检测“金标准”方法。标本在经过培养过后,可对培养基上的菌落进行鉴定。目前,科玛嘉念珠菌培养基作为念珠菌分离培养的显色培养基,白色念珠菌菌落颜色呈绿色,热带念珠菌菌落呈中心深蓝边缘灰紫色,光滑念珠菌菌落呈暗粉色,克柔念珠菌菌落颜色呈褐紫色,边缘模糊毛糙,近平滑念珠菌菌落呈乳白色等^[6]。念珠菌血症因其菌量低,还需进行增菌培养,可利用自动化血培养系统将血液注入到血培养瓶中。血液培养和科玛嘉的结合为菌落的形成和各种念珠菌亚型的检测提供了一种更好的技术^[7]。这种方法培养时间长,并且在分离培养后鉴定也需要有经验的专业技术人员进行,在标本的采集上也有较高要求。

1.3 念珠菌的血清学检测

念珠菌血清学检测具有很高的临床诊断价值,当念珠菌感染时,可以通过非培养的手段,对临床患者进行早期、快速的诊断。目前念珠菌的常见血清学检测有血清1,3-β-D-葡聚糖检测(G试验)、念珠菌的抗原抗体检测等。

1.3.1 血清1,3-β-D-葡聚糖检测

1,3-β-D-葡聚糖在真菌细胞壁的成分中可达50%以上,当真菌进入机体血液时,会被吞噬细胞吞噬并处理,随后再被释放到血液、组织液中。1,3-β-D-葡聚糖在酵母菌中含量很高,因此对于检测念珠菌的感染具有良好的价值^[8]。杨玉琪等人对侵袭性念珠菌的检测中检测质量浓度在10.18pg/mL时,灵敏度可达87.0%,特异度为85.5%^[9]。因此G试验在临床上有较为广泛应用。

1.3.2 抗原抗体检测

临床上对念珠菌常用的抗原检测的成分有分泌性天冬氨酸蛋白酶(SAP)、烯醇化酶等。SAP是白色念珠菌的毒力因子,在菌丝的形成过程中起到了重要的作用,可作为侵袭性白色念珠菌诊断的重要标志物^[10]。Christine J. Morrison等人对于感染白色念珠菌的尿液进行检测,灵敏度为83%,特异度为92%,阳性预测值为84%,阴性预测值为91%,诊断效率为89%^[11]。该方法能灵敏、特异地帮助区分侵袭性疾病和定植性疾病,反映疾病的进展和严重程度。烯醇化酶是念珠菌菌丝表达的优势抗原,在念珠菌侵袭生长时可大量释放,可刺激机体出现抗体,在浅表皮肤定植一般不会出现。因此对烯醇化酶进行抗原抗体检测,可协助诊断深部念珠菌感染^[12]。陈笑等对于抗念珠菌烯醇化酶抗体建立了IC血清双抗原夹心法检测,阳性率为81.6%(93/114),特异性为94.4%(356/377),总符合率为

93.0%,阳性符合率为98.1%,阴性符合率为76.5%^[13]。此方法可作为念珠菌血症的有用的辅助检查手段,灵敏度和特异度都较高。

念珠菌的血清学检查均为念珠菌感染的早期实验室诊断的重要检测手段,对念珠菌血症早期诊断、早期治疗提供实验室支持。但这些检测手段都只能辅助念珠菌感染的诊断,均为非特异性检测手段,仍需更精准的手段来进行确认。

2 念珠菌的分子生物学检测

目前念珠菌血症的诊断的金标准是建立在常规血培养基础上的,高度怀疑为血液感染,足够的血样品量,严格规范的操作流程下,常规的血培养阳性率只有30-40%^[14]。近十年来分子诊断技术的发展,为快速检测念珠菌血症的病原体提供了工具。

2.1 质谱技术

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术是近些年来不断发展并普及的新型微生物鉴定手段,原理是菌体蛋白质通过电离后被授予不同的能量,使带电离子通过电压作用加速飞行,各离子的质荷比不同因此而在检测器上形成不同的信号,使得病原菌的蛋白质谱峰图各不同,通过与数据库中不同菌体的蛋白质谱峰图进行比较来鉴定微生物^[15],是临床上快速可靠的检测手段,在念珠菌的菌种鉴定方面具有准确、简捷、经济等诸多优点,并且可在复合菌群鉴定中占据优势^[16]。Morgenthaler等人在3320份血培养阳性的样本中可检测到真菌阳性124株(65.9%)^[17]。但这种技术手段通常需要建立在菌株分离培养后的基础上^[18],并且受念珠菌培养基、培养条件不同的影响较大,导致菌种蛋白表达的差异较大,可能会影响鉴定的结果。此外,临床常见真菌的质谱数据库多为商业化自建数据库,数据库的数据不够完善,且并非为公开数据库,临床菌株的质谱和商业数据库中的质谱可能存在差异,MALDI-TOF MS检测技术还有一些局限性而不能替代常规检测手段^[19]。

2.2 聚合酶链式反应

聚合酶链式反应(PCR)在临床病原微生物检测中运用日益广泛,可利用多重PCR技术从未经培养的患者全血中直接鉴定念珠菌种类^[20],而且PCR技术可以从阳性血培养液中检测到相关耐药基因。国内外大量的研究中通过对念珠菌保守重复区段rRNA基因操纵子,即内转录间隔区1(ITS1)、ITS2和ITS4的扩增,真菌中rDNA序列的ITS区散布在高度保守的区域之间,异质性强,用于物种或属的鉴定^[21]。但PCR技术反应时间较长,且更多的情况是应用在血培养初步长成菌落后进行,使用起来仍有一定的限制。

2.3 荧光原位杂交技术

荧光原位杂交技术是携带荧光基团的寡核苷酸探针与病原体目的基因杂交,可快速鉴定念珠菌至种属水平,省去扩增的步骤,操作简便,检测效率提升,可以为快速诊断提供依据。王沛等对血培养中白色念珠菌进行快速鉴定,特异性高,可在较短时间内对结果进行临床报告^[22]。但该方法的特异性探针选择较少,在临床上应用有一定的局限性。

2.4 实时荧光PCR技术

实时荧光PCR技术是通过在反应体系中加入能够被探测到的荧光基团,从而实时监控反应过程中的荧光信号对反应过程的监测^[23],荧光基团所发射的信号强度与DNA扩增量成正比,可以通过对应的软件自动算出DNA的拷贝数从而达到定量的目的,灵敏度高、特异性强,可以指导临床有效治疗^[24]。该技术的应用常在对疑似念珠菌血症的培养后进行,血中菌量低,时间也会延长。

2.5 微阵列技术

微阵列技术即基因芯片技术原理是将基因组核酸片段的探针固定在芯片上,通过与患者样本中的待测DNA标本杂交,从而可

以识别样本中的病原体生物学信息,这种方法可在芯片上固定多种病原体探针,达到同时鉴别多种病原体的作用^[23]。微阵列技术可在鉴别基础上对病原体的抗生素耐药基因和毒力的识别,速度快,特异性强且效率高。但目前由于探针制备成本高,灵敏度不足从而制约了该技术的临床应用。

2.6 恒温扩增技术

恒温扩增技术是近年发展的分子诊断技术手段,大都不需要复杂的仪器设备、操作过程简单、反应时间短,且具有较高的灵敏度和特异性。恒温扩增技术主要包括滚环扩增技术、环介导等温扩增、依赖重组酶的等温核酸扩增技术 RPA 和 RAA 等。RPA 可结合测流层析试纸条技术进行念珠菌的检测,已经在白色念珠菌的检测中进行验证^[26]。蒙玉丹等人成功在白色念珠菌中采用 RPA 技术在 1×10^4 CFU/mL 中阳性检出率为 78%,而扩增时间仅需 35min^[27]。RAA 技术作为我国一项具有自主知识产权的扩增技术,其中重组酶是从大肠杆菌中获得的,可在 37 ~ 42℃ 恒温的条件下进行扩增,整个反应可在 30min 内完成扩增,并可在探针上加入荧光基团实时监控。RAA 技术反应时间短、扩增效率高、灵敏度高、特异性强,反应所需酶被制成干粉存于单元管易于储存和运输且不需变温的复杂热循环仪器和专业的操作人员,利于这项技术的展开。目前这项技术已经在多种病原体检测中成功应用^[28]。等温扩增技术也有相应的一些不足,比如其荧光探针极其复杂,待于进一步的优化和改进。

念珠菌血症的实验室诊断技术需要对病原体快速准确地进行鉴定,培养手段的检测方法需较长的时间,导致临床诊断的延迟,增加患者并发症的发生风险,延长患者的住院时间,对患者的经济造成损失,因此早期快速的鉴别手段可帮助临床诊断,分子诊断技术的快速发展对临床实验室检测病原体是巨大的优势,对念珠菌血症的检测中有较好的灵敏度和特异性,更便捷精准,结果比传统的培养法要快,可在病原体载量较低的早期做出初步诊断,而等温技术在分子诊断技术中耗时更短,可在 30min 内完成检测,并且不需要大型的变温热循环仪器,在即时检测中占据更好的优势,在临床的应用将会更加广泛,发挥更重要的作用。

参考文献:

- [1] Martins N, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Henriques M. Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment[J]. Mycopathologia, 2014 Jun; 177(5-6):223-40.
- [2] 王瞳,于淑颖,肖盟,张戈,张京家,段思蒙,康巍,张延海,赵颖,张丽,王贺,徐英春. 2013 年中国侵袭性酵母菌感染流行病学和唑类药物耐药性分析[J]. 中国真菌学杂志, 2022, 17(1):32-37.
- [3] Kämmer P, McNamara S, Wolf T, Conrad T, Allert S, Gerwien F, Hünigler K, Kurzai O, Guthke R, Hube B, Linde J, Brunke S. Survival Strategies of Pathogenic Candida Species in Human Blood Show Independent and Specific Adaptations[J]. mBio, 2020 Oct 6; 11(5):e02435-20.
- [4] 曹彬,王辉,巫琳,孙闻嘉,栗方,刘颖梅. 侵袭性念珠菌院内感染的流行病学调查[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(28):1970-1973.
- [5] Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans Candida spp. causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance[J]. J Hosp Infect, 2002 Apr; 50(4):243-60.
- [6] Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species[J]. J Clin Microbiol, 1994 Aug; 32(8):1923-9.
- [7] Safavi H, Coarsey C, Esiobu N, Memic A, Vyas JM, Shafiee H, Asghar W. Advances in Candida detection platforms for clinical and point-of-care applications. Crit Rev Biotechnol[J], 2017 Jun; 37(4): 441-458.
- [8] 冯浩,李颖,顾兵,张颖. (1-3)- β -D 葡聚糖联合半乳糖甘露聚糖抗原检测在侵袭性真菌感染中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(1):71-73.
- [9] 杨平. (1,3)- β -D 葡聚糖检测在重症肺炎患者真菌感染中的诊断价值[J]. 中国民康医学, 2021, 33(12):86-87.
- [10] 杨玉琪,雷玲玲,周磊,周柯,刘昊,郑浩,孔美娟,刘家云. G 试验和 GM 试验联合无菌体液真菌培养检测对侵袭性念珠菌病的诊断效果评估[J]. 中南药学, 2022, 20(5):1048-1052.
- [11] Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. Candida albicans secreted

aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2003 Sep; 67(3):400-28, table of contents.

[12] Morrison CJ, Hurst SF, Reiss E. Competitive binding inhibition enzyme-linked immunosorbent assay that uses the secreted aspartyl proteinase of *Candida albicans* as an antigenic marker for diagnosis of disseminated candidiasis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003 Sep; 10(5):835-48.

[13] 汪俊,吴福珍,焦继光. 双抗原夹心 ELISA 法检测抗念珠菌烯醇化酶抗体[J]. 海南医学, 2018, 29(13):1830-1833.

[14] 陈笑,王颖,黄梅,胡毓安,史利宁,李芳秋. 双抗原夹心 ELISA 法检测抗念珠菌烯醇化酶抗体[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(12):924-926.

[15] Burillo A, Bouza E. Use of rapid diagnostic techniques in ICU patients with infections[J]. BMC Infect Dis, 2014 Nov 28; 14:593.

[16] 曹庆美,王鑫,伊茂礼,王文娟,陈敏,马文汝,张玉梅. MALDI-TOF MS 检测临床复合群菌种及常规方法难鉴定菌种的应用性探讨[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(05):509-513+519.

[17] Morgenthaler NG, Kostrzewa M. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and meta-analysis of the performance of the sepsityper kit[J]. Int J Microbiol, 2015; 2015:827416.

[18] Wieser A, Schneider L, Jung J. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review) [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(3): 965-974.

[19] 姜长宏,龙军,华夏. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪在侵袭性真菌感染病原真菌鉴定中的应用[J]. 实用医学杂志, 2015, 17(17):2902-2904.

[20] Avolio M, Diamante P, Zamparo S, Modolo ML, Grosso S, Zigante P, Tosoni N, De Rosa R, Stano P, Camporese A. Molecular identification of bloodstream pathogens in patients presenting to the emergency department with suspected sepsis[J]. Shock, 2010.

[21] Meason-Smith C, Edwards EE, Older CE, et al. Panfungal polymerase chain reaction for identification of fungal pathogens in formalin-fixed animal tissues[J]. Vet Pathol, 2017, 54(4):640-648.

[22] 王沛,何永贵,Wellington GW. 荧光原位杂交法快速鉴定血培养中白念珠菌的方法学评价[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2004, 4(6):353-355.

[23] McMullan R, Metwally L, Coyle PV, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, Patterson CC, Thompson G, Webb CH, Hay RJ. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults[J]. Clin Infect Dis, 2008 Mar 15; 46(6):890-6.

[24] 鲁巧云,余进,高露娟,郑罡,李若瑜. 实时荧光定量 PCR 诊断侵袭性真菌病方法的建立及应用[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(12): 822-826.

[25] Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, Bachmann TT. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses[J]. J Clin Microbiol, 2005 Oct; 43(10):4943-53.

[26] Wang F, Ge D, Wang L, Li N, Chen H, Zhang Z, Zhu W, Wang S, Liang W. Rapid and sensitive recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strips for detecting *Candida albicans*[J]. Anal Biochem, 2021 Nov 15; 633:114428.

[27] 蒙雨丹,刘爽,赵军宁,彭毅志,苏丹,金晓君,李晓鲁. 实时荧光重组酶聚合酶扩增在白色念珠菌检测中的初步应用[J]. 中华烧伤杂志, 2019, 35(8):587-594.

[28] Yan T F, Li X N, Wang L, et al. Development of a reverse transcription recombinase-aided amplification assay for the detection of coxsackievirus A10 and coxsackievirus A6 RNA[J]. Archives of Virology, 2018.

作者简介: 姓名: 张梦怡, 性别: 女, 民族: 汉族, 出生年月: 1995 年 6 月, 籍贯: 河北石家庄, 学历: 研究生, 专业: 临床检验诊断