

实时荧光 PCR 和六胺银染色 对肺孢子菌肺炎诊断价值的分析评价^{*}

刘文静^a, 伊洁^a, 窦亚玲^a, 谢秀丽^a, 刘正印^b, 徐英春^a

(北京协和医院 a. 检验科; b. 感染内科, 北京 100730)

摘要:目的 比较实时荧光 PCR 和六胺银染色对肺孢子菌肺炎(PCP)的诊断价值。方法 收集 2014 年 1~12 月北京协和医院疑似 PCP 患者非重复送检标本共 2 525 例, 其中 2 492 例标本用六胺银染色法对肺孢子菌孢囊进行检测, 33 例标本用实时荧光 PCR 法对 PCP-DNA 进行检测, 429 份标本同时用六胺银染色法和实时荧光 PCR 法进行检测, 以临床诊断为标准, 分析两种方法的阳性率、敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值。结果 六胺银染色法的阳性率为 1.2%(30/2 492), 其中痰、气管插管支气管吸出物和肺泡灌洗液的阳性率分别为 0.70%(13/1 845), 4.00%(10/250)和 2.72%(7/257)。实时荧光 PCR 法的阳性率为 34.20%(158/462), 痰和肺泡灌洗液的阳性率分别为 30.61%(105/343)和 44.54%(53/119)。六胺银染色法和实时荧光 PCR 法的敏感度 13.97% vs 72.07% ($\chi^2 = 68.625, P < 0.01$), 特异度 100% vs 94.24% ($\chi^2 = 4.296, P < 0.05$), 阳性预测值 100% vs 92.14% ($\chi^2 = 6.380, P < 0.01$), 阴性预测值 55.36% vs 78.26% ($\chi^2 = 11.873, P < 0.01$), 差异均具有统计学意义。结论 实时荧光 PCR 敏感度高, 相对干扰因素少, 临床诊断价值高, 但标本送检率明显低于六胺银染色, 建议临床提高其送检率, 提高 PCP 的早期诊断。

关键词:实时荧光 PCR; 六胺银染色; 肺孢子菌肺炎

中图分类号: R379.9; Q503 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)05-028-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.008

Evaluation of Real-time PCR and Gomori-Methenamine Silver Stain for Diagnosing of Pneumocystis Pneumonia

LIU Wen-jing^a, YI Jie^a, DOU Ya-ling^a, XIE Xiu-li^a, LIU Zheng-yin^b, XU Ying-chun^a

(a. Department of Clinical Laboratory; b. Department of Infectious Disease,
Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract: Objective To compare real-time PCR and gomori-methenamine silver stain in the diagnosis of pneumocystis pneumonia (PCP). Methods 2 525 unrepeated specimens from suspected PCP patient admitted in Peking Union Medical College Hospital were collected in 2014. 2 492 samples were detected by gomori-methenamine silver stain, 33 samples were detected by real-time PCR, and 429 samples were detected by both methods at the meanwhile. With clinical diagnosis as reference standard, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the two methods were analysed. Results Positive rate of gomori-methenamine silver stain was 1.2% (30/2 492). The first three specimen types were sputum, tracheal intubation suction and bronchoalveolar lavage fluid, the positive rate was 0.70% (13/1 845), 4.00% (10/250) and 2.72% (7/257) respectively. Positive rate of realtime PCR was 34.20% (158/462), and the positive rate of sputum and bronchoalveolar lavage fluid was 30.61% (105/343) and 44.54% (53/119) respectively. The sensitivity were 13.97% vs 72.07%, specificity were 100% vs 94.24%, positive predictive value were 100% vs 92.14% and negative predictive value were 55.36% vs 78.26% for gomori-methenamine silver stain and real-time PCR respectively. All of which were statistically significant analysed by χ^2 test for paired data. The χ^2 value and P value were $\chi^2 = 68.625, P < 0.01$; $\chi^2 = 4.296, P < 0.05$; $\chi^2 = 6.380, P < 0.01$ and $\chi^2 = 11.873, P < 0.01$. Conclusion The real-time PCR had higher sensitivity, fewer interference factors and more clinical diagnostic value, so clinicians should make more use of real-time PCR to diagnose PCP earlier.

Keywords: real-time PCR; gomori-methenamine silver stain; pneumocystis pneumonia(PCP)

耶氏肺孢子菌是引起人类肺部感染即肺孢子菌肺炎(pneumocystis pneumonia, PCP)的一种真菌。它的致病性很弱, 可以共生或以正常菌群的形式定植于人的呼吸道。PCP 是艾滋病、器官移植

受者、抗肿瘤放化疗等各类继发或原发性免疫功能低下人群最常见的机会感染性疾病。PCP 的临床症状和体征缺乏特异性, 容易造成误诊或漏诊。目前 PCP 的实验室诊断方法包括病原学、免疫学和

^{*} 基金项目: 公益性行业科研专项资助(201402001)。

作者简介: 刘文静(1984—), 女, 硕士, 实习研究员, 主要从事临床微生物及分子检验, E-mail: liuwenjing1220@139.com。

通讯作者: 徐英春(1964—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 临床微生物, E-mail: xycpumch@139.com。

分子生物学三种方法。其中病原学染色法敏感度最低,检出率低;因正常人血清内普遍存在肺孢子菌天然抗体,因此血清抗体检测无临床诊断价值;分子生物学方法敏感度最高,有助于 PCP 的早期诊断。本研究将六胺银染色和实时荧光 PCR 法对 PCP 诊断的价值进行分析比较,结果如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集北京协和医院检验科 2014 年 1~12 月疑似 PCP 患者非重复送检标本 2 525 份。PCP 临床诊断^[1,2]包括拟诊和确诊患者。PCP 拟诊患者:有如咳嗽、发热、呼吸困难和低氧血症(尤其是活动时)的临床体征和症状;影像学表现为胸部 X 线(间质性浸润或肺泡浸润)或 HRCT(斑片状或结节状毛玻璃样衰减)。PCP 确诊患者:送检标本六胺银染色阳性。

1.2 试剂和仪器 根据肺孢子菌线粒体大亚基 rRNA 基因,选用 Totet A 设计的引物和探针序列^[3], PAZ-F (5'-CTTAAAATAAATAATCA GACTATGTGCGATAAG-3'), PAZ-R (5'-GG AGCTTTAATTACTGTTCTGGGC-3'), PAZ-P (5'-FAM-TAGATAGTCGAAAGGGAAA-MGB-3'),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。六胺银染色工作液由本实验室配制,GoldStarTaq-Man Mixture(With ROX)(北京康为世纪生物科技有限公司),DNA 提取液(达安生物科技有限公司),罗氏荧光定量 PCR LightCycler480 II(罗氏公司),离心机(赛默飞世尔科技中国有限公司),加样器(Eppendorf 中国有限公司),振荡器(北京创博生物科技有限公司),引物和探针(上海生物工程技术服务有限公司),恒温金属浴(北京伯乐生命科学发展有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 六胺银染色:按照我科六胺银染色操作规程进行检测。标本类型为痰、气管插管支气管吸取物、肺泡灌洗液、胸腔积液、肺活检、毛刷、咽拭子、脑脊液、其他组织等。镜检中看到菌体包囊壁呈黑色,染色深浅不一,呈括号样或中心点状深染的形态,则报告六胺银染色阳性,可见肺孢子菌包囊。

1.3.2 实时荧光 PCR:DNA 提取:痰或支气管吸取物用 4 g/dl NaOH 液化处理后(肺泡灌洗液无需液化处理),涡旋震荡混匀,12 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液;加入 1 ml 生理盐水,涡旋震荡后,12 000 r/min 离心 3 min,弃去上清;12 000 r/min 离心 1 min,再次弃去微量上清液;加入 50 μ l DNA 提取液,漩涡震荡后,瞬时离心,100℃ 孵育 10 min;12 000 r/min 离心 12 min 后加样扩增。试剂配制:按照 GoldStarTaqMan Mixture 12.5 μ l/

人份+灭菌双蒸水 10 μ l/人份+上游引物 1 μ l/人份+下游引物 1 μ l/人份+探针 1 μ l/人份,配置 PCR 反应混合液 mix;PCR 反应体系为 22.5 μ l mix+2.5 μ l DNA。反应条件:95℃ 10 min,1 个循环(None);95℃ 15 s,60℃ 1 min(SINGLE 信号采集),40 个循环(Quantification);40℃ 1 s(None,机器冷却)。结果判断,参考 Fauchier T 等^[4]的实验结果:阳性:FAM 荧光信号增幅明显,扩增曲线呈典型 S 型扩增曲线,且 Ct 值 \leq 37;阴性:FAM 荧光信号无增长,无 Ct 值,且无典型 S 型扩增曲线;灰区判定:FAM 荧光信号增幅明显,且 Ct 值在 37~40 之间;此类标本需进行复检,若复检结果为阳性或灰区,且两次扩增曲线呈典型 S 型扩增曲线,则判定为弱阳性;若两次扩增曲线非典型 S 型扩增曲线则判定为可疑。

1.3 统计学分析 采用 SPSS17.0 进行统计分析。六胺银染色法和实时荧光 PCR 法敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值进行配对卡方检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 六胺银染色法与实时荧光 PCR 法检测结果

六胺银染色送检标本 2 492 例,阳性 30 例,阳性率 1.2%,实时荧光 PCR 送检标本 462 例,阳性 124 例,弱阳性 24 例,可疑 10 例,所占比率分别为 26.8%,5.2%和 2.2%。六胺银染色送检实时荧光 PCR 未送检的标本为 2058 例;实时荧光 PCR 送检,六胺银染色未送检的标本为 33 例。六胺银染色阴性但实时荧光 PCR 为阳性、弱阳性、可疑的标本分别为 95 例,24 例,10 例,见表 1。

表 1 实时荧光 PCR 和六胺银染色标本送检数及结果(例)

实时荧光 PCR	六胺银染色			合 计
	阳性	阴性	未送检	
阳性	25	95	4	124
弱阳性	0	24	0	24
可疑	0	10	0	10
阴性	0	275	29	304
未送检	5	2 058	0	2 063
合计	30	2 462	33	2 525

2.2 不同标本类型的阳性率 六胺银染色前三位标本痰、气管插管支气管吸取物和肺泡灌洗液的阳性率分别为 0.70%,4.00%和 2.72%,其他标本均为阴性,见表 2。将实时荧光 PCR 阳性、弱阳性和可疑的标本均列为阳性进行统计,肺泡灌洗液的总阳性率大于痰,分别为 30.61%和 44.54%,见表 3。

表2 六胺银染色各标本类型的阳性结果

标本类型	总数(例)	阳性数(例)	阳性率(%)
痰	1 845	13	0.70
气管插管支气管吸取物	250	10	4.00
肺泡灌洗液	257	7	2.72
胸腔积液	84	0	0.00
肺活检	21	0	0.00
毛刷	16	0	0.00
咽拭子	16	0	0.00
脑脊液(CSF)	2	0	0.00
其他组织	1	0	0.00
总计	2 492	30	1.20

2.3 六胺银染色法和实时荧光 PCR 的临床诊断评价 见表4,表5。以PCP临床诊断为标准,分析临床资料完整的370例数据,六胺银染色法和实时荧光PCR法的敏感度13.97% vs 72.07% ($\chi^2 = 68.625, P < 0.01$),特异度100% vs 94.24% ($\chi^2 = 4.296, P < 0.05$),阳性预测值100% vs 92.14% ($\chi^2 = 6.380, P < 0.01$),阴性预测值55.36% vs 78.26% ($\chi^2 = 11.873, P < 0.01$),差异均有统计学意义。

表3 实时荧光PCR各标本类型的阳性率[n(%)]

标本类型	n	阳性率	弱阳性率	可疑比率	总阳性率
痰	343	85(24.78)	12(3.50)	8(2.33)	105(30.61)
肺泡灌洗液	119	39(32.77)	12(10.08)	2(1.68)	53(44.54)
总计	462	124(26.84)	24(5.19)	10(2.16)	158(34.20)

表4 六胺银染色和临床诊断的结果(n)

六胺银染色	临床诊断		合计
	阳性	阴性	
阳性	25	0	25
阴性	154	191	345
合计	179	191	370

表5 实时荧光PCR和临床诊断的结果(n)

实时荧光PCR	临床诊断		合计
	阳性	阴性	
阳性	129	11	140
阴性	50	180	230
合计	179	191	370

注:将实时荧光PCR阳性、弱阳性和可疑的标本均列为阳性进行统计。

3 讨论 肺孢子菌过去被认为属于原虫,直至1988年依据其核糖体RNA和其他基因同源性及其细胞壁组成和关键酶等将其划分为真菌类^[5]。但肺孢子菌不是典型的真菌,体外不能在真菌培养基上生长,细胞壁上含胆固醇而不是麦角甾醇^[6]。血清学发现75%人群在4岁以前发生过耶氏肺孢子

菌原发感染^[7]。肺孢子菌是细菌或病毒肺炎住院患者常见的定植菌,并且0%~20%健康成年人有肺孢子菌定植^[8]。当机体抵抗力低下时即可致病。美国CDC报道PCP住院HIV感染和实体器官移植患者的发生率分别为9%和1%,免疫缺陷患者接受治疗后的死亡率为5%~40%,没有接受治疗的死亡率为100%。

从呼吸道标本中检出肺孢子菌的滋养体或包囊是PCP的确定性诊断。已有的研究表明,不同标本PCP检出敏感度不同,HIV患者痰、肺泡灌洗液、肺活检、经支气管(肺)活检的敏感度分别为55%~90%,90%~100%,95%~100%,100%^[6]。但非HIV患者因细菌载量低,痰和肺泡灌洗液相应PCP检出率低^[9,10]。影响准确性的因素包括:染色方法、标本的采集、细菌载量(尤其是预防用药后)、肺孢子菌形态和生活时期、实验人员的经验。

实时荧光PCR克服了传统PCR技术普遍存在的假阳性及敏感度低等问题^[3],尤其适用于非HIV患者PCP的诊断^[11]。检测的标本类型除痰和肺泡灌洗液外,还可检测口腔冲洗液和鼻咽吸取物,敏感度和特异度均接近90%,但定性的实时荧光PCR不能区分感染和定植^[12]。

综合本研究数据可得,六胺银染色和实时荧光PCR均为下呼吸道标本(气管插管支气管吸取物和肺泡灌洗液)阳性率大于上呼吸道标本(痰),可能与痰没有严格按照标本采集要求进行留取有关,但它的标本量居第一位,应引起临床关注。其他标本阳性率均为0%,可能与肺孢子菌较少引起肺外病变有关。以PCP临床诊断为评价标准,六胺银染色的特异度、阳性预测值均高于实时荧光PCR法,对应的 χ^2 值和P值分别为 $\chi^2 = 4.296, P < 0.05$ 和 $\chi^2 = 6.380, P < 0.01$,对于确诊PCP六胺银染色法优于实时荧光PCR,但是其敏感度和阴性预测值低于实时荧光PCR,对应的 χ^2 值和P值分别为 $\chi^2 = 68.625, P < 0.01$ 和 $\chi^2 = 11.873, P < 0.01$ 。实时荧光PCR阳性临床诊断阴性的11例患者,提示由于存在肺孢子菌定植的情况,临床医生应用实时荧光PCR诊断PCP时需要综合分析。实时荧光PCR若向临床回报结果为弱阳性和/或可疑,提示标本中存在肺孢子菌,但菌量较少,亦应引起临床医生的重视。实时荧光PCR是为满足临床PCP快速诊断需求而建立的方法,但是本研究中其送检率仅为传统方法六胺银染色法的18.5%,提示临床医生应重视分子生物学检测对于PCP的诊断价值。

总之,随着分子生物学诊断技术的不断完善,PCR检测技术将对PCP的诊断与预防等方面起

到积极重要的作用。建议临床医生采取病原学检查和分子生物学检测相结合,根据病人的临床表现、胸部X线、血气分析及肺功能测定等多方面资料来早期诊断和治疗PCP。

参考文献:

- [1] Sax PE. Clinical presentation and diagnosis of *Pneumocystis* pulmonary infection in HIV-infected patients [DB]. Up To Date Waltham MA. Accessed on November 09, 2016.
- [2] Charles F Thomas, Andrew H Limper. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-uninfected patients [DB]. Up To Date, Waltham, MA. Accessed on June 15, 2017.
- [3] Totet A, Meliani L, Lacube P, et al. Immunocompetent infants as a human reservoir for *Pneumocystis jirovecii*: rapid screening by non-invasive sampling and real-time PCR at the mitochondrial large subunit rRNA gene [J]. J Eukaryot Microbiol, 2003, 50 (Suppl): 668-669.
- [4] Fauchier T, Hasseine L, Gari-Toussaint M, et al. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by quantitative PCR to differentiate colonization and pneumonia in immunocompromised HIV-positive and HIV-negative patients [J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(6): 1487-1495.
- [5] Edman JC, Kovacs JA, Masur H, et al. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi [J]. Nature, 1988, 334 (6182): 519-522.
- [6] Catherinot E, Lanternier F, Bougnoux ME, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia [J]. Infect Dis Clin North Am, 2010, 24(1): 107-138.
- [7] Pifer LL, Hughes WT, Stagno S, et al. *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children [J]. Pediatrics, 1978, 61(1): 35-41.
- [8] Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia [J]. N Engl J Med, 2004, 350(24): 2487-2498.
- [9] Pagano L, Fianchi L, Mele L, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with malignant haematological diseases: 10 years' experience of infection in GIMEMA centres [J]. Br J Haematol, 2002, 117(2): 379-386.
- [10] Shelhamer JH, Gill VJ, Quinn TC, et al. The laboratory evaluation of opportunistic pulmonary infections [J]. Ann Intern Med, 1996, 124(6): 585-599.
- [11] Azoulay E, Bergeron A, Cheuret S, et al. Polymerase chain reaction for diagnosing *pneumocystis* pneumonia in non-HIV immunocompromised patients with pulmonary infiltrates [J]. Chest, 2009, 135(3): 655-661.
- [12] Huang L, Cattamanchi A, Davis JL, et al. HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia [J]. Proc Am Thorac Soc, 2011, 8(3): 294-300.
- (上接 27 页) experience since 1984 [J]. Neurology, 1989, 39(2Pt 1): 201-207.
- [9] Bryant AE, Dreifuss FE. Valproic acid hepatic fatalities. III. U. S. experience since 1986 [J]. Neurology, 1996, 46(2): 465-469.
- [10] 谢而付, 黄佩珺, 赵中建, 等. HCMV 感染婴儿尿液病毒载量与肝脏损伤指标的相关性分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(1): 25-27.
Xie EF, Huang PJ, Zhao ZJ, et al. Correlation between urine HCMV virus load and liver function indication among HCMV-infected infants [J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(1): 25-27.
- [11] 宋燕, 邵冬华, 何美琳, 等. PNPLA3 基因多态性与非酒精性脂肪性肝病关系的初步探讨 [J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(4): 5-9.
Song Y, Shao DH, He ML, et al. Preliminary discussion of the relationship between PNPLA3 polymorphism and NAFLD [J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(4): 5-9.
- [12] Kutlu O, Cansu A, Karagüzel E, et al. Effect of valproic acid treatment on penile structure in prepubertal rats [J]. Epilepsy Res, 2012, 99(3): 306-311.
- [13] Surendraddoss J, Chang TK, Abbott FS. Assessment of the role of in situ generated (E)-2, 4-diene-valproic acid in the toxicity of valproic acid and (E)-2-ene-valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 264(3): 413-422.
- [14] El-Hattab AW, Scaglia F. Disorders of carnitine biosynthesis and transport [J]. Mol Genet Metab, 2015, 116(3): 107-112.
- [15] Plant N, Barber P, Horner E, et al. Differential gene expression in rats following subacute exposure to the anticonvulsant sodium valproate [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2002, 183(2): 127-134.
- [16] Ponchaut S, van Hoof F, Veitch K. Cytochrome aa3 depletion is the cause of the deficient mitochondrial respiration induced by chronic valproate administration [J]. Biochem Pharmacol, 1992, 43(3): 644-647.
- [17] 史忱, 安卓玲, 李鹏飞, 等. 稳定同位素 iTRAQ 标记联合液相色谱-串联质谱法定量分析药物性肝损伤患者血清氨基酸的变化 [J]. 检验医学与临床, 2016, 13(8): 1009-1011, 1015.
Shi C, An ZL, Li PF, et al. Quantitative analysis of serum amino acids changes in patients with drug induced liver injury by stable isotope iTRAQ labeling-combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2016, 13(8): 1009-1011, 1015.

收稿日期: 2017-06-22

修回日期: 2017-07-14