

# 临床患者血流真菌感染的实验诊断及治疗研究进展\*

马梦亭, 王凤超 (蚌埠医学院第一附属医院检验科, 安徽蚌埠 233004)

**摘要:**近年来,随着临床广谱抗真菌药物的使用、各种免疫抑制剂、各类导管插管以及介入治疗等新型技术的发展,使得真菌引起的血流感染屡见不鲜,患者的死亡率明显升高,真菌的耐药率也在不断上升。如何对真菌引起的血流感染进行早期快速、准确的诊治是目前临床医生亟待解决的关键问题,现笔者对真菌血流感染的病原学、最新诊断和治疗方法等方面进行陈述。

**关键词:**血流感染;真菌;病原学;诊断

中图分类号:R379;R446 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2019)04-161-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.04.040

## Advances in Experimental Diagnosis and Treatment of Blood Flow Fungal Infection in Clinical Patients

MA Meng-ting, WANG Feng-chao (Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Anhui Bengbu 233004, China)

**Abstract:** In recent years, with the development of clinical broad-spectrum antifungal drugs, various immunosuppressants, various types of catheterization and interventional treatments, bloodstream infections caused by fungi have become commonplace, and the mortality rate of patients has increased significantly. The resistance rate of fungi is also rising. How to conduct early and rapid diagnosis and treatment of bloodstream infection caused by fungi is a key problem that clinicians need to solve urgently. Now I will make the following statement on the etiology, latest diagnosis and treatment methods of fungal bloodstream infection.

**Keywords:** bloodstream infection; fungus; etiology; diagnosis

**1 真菌的定义及病原学** 真菌(fungus)是一类具有细胞壁、细胞核、线粒体和核糖体等完整细胞器的异养生物,又称“真核细胞型微生物”。目前自然界中发现的真菌种类数不低于160万种,其中高达600余种真菌对人类具有致病作用,这些致病性真菌主要通过寄生的方式在人类进行有性生殖或无性繁殖<sup>[1]</sup>。近年来,真菌感染中由念珠菌属引起的血流感染报道不断增多。在国外,据相关文献报道,念珠菌血症在医院相关血流感染中排名第4位,同时也是重症监护病房真菌感染的主要原因,而由念珠菌血症造成的死亡比率高达20%~63%<sup>[2]</sup>。在国内,据2008~2017年我国深部真菌病原谱及流行特征数据显示,在我国真菌感染中仍存在着9种主要病原性真菌,其中感染念珠菌病例数占比高达91%,而念珠菌中又以白色念珠菌比例最大,占总念珠菌数的65%<sup>[3]</sup>。此外,由热带、光滑、克柔等非白色念珠菌造成的血流感染比例近年来也呈现不断上升趋势<sup>[4]</sup>,来自英国的报道表明,在病死率方面,非白色念珠菌血症已有赶超白色念珠菌血症的趋势<sup>[5]</sup>。

### 2 真菌血流感染的早期诊断方法

**2.1 直接镜检与染色法** 临床实验室收到血标本后第一时间应先进行显微镜直接镜检,直接镜检法具有简便、快速、实用等优点,通过镜检对菌体形态的观察可初步判断患者是否感染了真菌,如涂片中发现约45°,分枝且较粗的菌丝,往往提示曲霉菌感染;若见卵圆形芽孢及假菌丝,往往提示念珠菌感染;若见半月形菌体及透明荚膜,往往提示组织胞浆菌感染;若墨汁涂片中见菌体荚膜外厚透亮,则提示隐球菌感染可能<sup>[6]</sup>。但直接镜检法的阳性率低,即使阴性结果也不能排除感染的可能,所以通常真菌涂片的同时需要加用染色法,实验室常用的染色法有革兰染色法、吉姆萨染色法和荧光染色法等,其中荧光染色法是一种高效快速、特异度高、敏感性高且较传统染色法更为精准的一种染色方法<sup>[7]</sup>。

**2.2 真菌培养鉴定法** 目前,真菌血培养仍是临床实验室检测真菌血流感染的“金标准”,无论是对真菌亦或是细菌血流感染的诊断,血培养都可谓是诊断“金标准”<sup>[8]</sup>。其优点在于检测范围广,如敏感性较高的分子诊断法其报阳浓度通常在5~19 CFU/ml,而血培养中真菌含量低于1 CFU/ml

\* 作者简介:马梦亭(1991—),女,在读硕士研究生,研究方向为临床检验诊断学,E-mail:2524353901@qq.com。

通讯作者:王凤超(1967—),男,副教授,主任技师,主要从事医学临床免疫学工作,E-mail:wangfc2017@qq.com。

时,结果即可报阳<sup>[9]</sup>。真菌血培养鉴定较直接镜检法能够进一步提高病原菌的检出率,并通过观察真菌的菌落形态可以明确病原菌的种类。在临床实践中,直接镜检法的结果可以解释血培养的菌种,而血培养的鉴定又是对直接镜检法结果的一种验证,两者相结合互相取长补短。目前,临床实验室最常用的是科玛嘉念珠菌显色培养基,利用念珠菌代谢产生的酶与培养基中的显色物质发生反应产生不同颜色的菌落,观察菌落颜色即可做出快速判断,如白色念珠菌菌落呈翠绿色、克柔念珠菌菌落呈粉红色、热带念珠菌菌落呈天蓝色、光滑念珠菌菌落呈紫色。但血培养也有其不足之处,首先培养时间长,至少2~3天才可出结果,容易延误诊治;其次,血培养的阳性率并不高,有相关报道血培养的阳性率仅为21%~71%,灵敏度远低于50%<sup>[10]</sup>。

### 2.3 真菌血清学试验

2.3.1 血清(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖检测: $\beta$ -葡聚糖是除细菌、病毒、人体细胞之外的多种真菌细胞壁的特有成分,有1,3- $\beta$ -D-葡聚糖[(1,3)- $\beta$ -D-glucan, BG]和1,6- $\beta$ -D-葡聚糖两种类型,其中以BG为主,占 $\beta$ -葡聚糖80%左右。当发生真菌感染时,机体的吞噬细胞将大量真菌进行吞噬、消化,破坏真菌细胞壁,使BG大量释放入血,通过检测血清中BG含量,即可得知是否感染真菌,此试验又称“G试验”。在2008年,欧洲和美国疾病研究组,对深部真菌感染的标准进行了修订,首次将“G试验”归为微生物学检验标准<sup>[11]</sup>。目前由于市场上检测BG的商品化试剂盒及设定的临界值各不相同,使得文献所报道的检测灵敏度和特异度各有差异。据相关国外文献报道,G试验在临床诊断中的综合检测灵敏度为70%~100%,特异度为80%~100%<sup>[12]</sup>。此外,G试验不能用于具有厚壁荚膜的隐球菌属及细胞壁成分缺少BG的接合菌属等真菌感染的检测。

2.3.2 血清半乳甘露聚糖检测:血清半乳甘露聚糖(galactomannan, GM)同血清BG相似,为曲霉菌丝细胞壁的特有多聚糖成分,当人体感染曲霉菌时,这种多糖成分会随着菌丝的生长而释放入血,菌量越多,GM释放的越多,人体感染程度越重<sup>[13]</sup>。GM试验是曲霉菌感染的早期诊断方法,有相关研究表明患者感染曲霉菌后,临床症状比外周血检出GM的时间要晚7天左右,而后者又比经验性治疗时间早约12天<sup>[14]</sup>。有研究表明,GM检测的敏感度和特异度分别可高达67.9%和72.2%<sup>[15]</sup>。为了提高检测的灵敏度和特异度,应提倡联合BG和GM检测。

2.3.3 隐球菌荚膜多糖抗原检测:新型隐球菌荚膜多糖有 $\alpha$ -1,3连接的线性甘露糖骨架,成分主要是葡萄糖醛酸-木糖-甘露糖(glucuronoxylomannan, GXM),而GXM隐球菌荚膜多糖检测方法主要有以下3种:乳胶凝集试验、胶体金法以及酶联免疫吸附法<sup>[16]</sup>。①乳胶凝集试验是将隐球菌抗体球蛋白标记在乳胶颗粒表面,形成致敏乳胶悬液,加入待测血清,产生肉眼可见的凝集现象,可用于快速诊断。②胶体金法是用胶体金标记单克隆抗体,利用免疫层析技术检测特异性隐球菌抗原的方法,此法已制成商品试纸条,操作简单,检测时间短,约10 min即可出结果。③酶联免疫吸附法是将已知特异性抗体包被在聚氯乙烯板孔内,加入患者血清,经过温育、加酶标记抗体、温育、洗脱等一系列操作后出现肉眼可见的颜色现象。研究表明,三种检测方法有较好的一致性,且操作简单,设备要求低,在多数医院即可开展<sup>[17]</sup>。

2.3.4 曲霉菌抗体(IgM或IgG抗体)检测:目前国际上有一种新的检测方法:通过酶联免疫吸附试验(ELISA)检测曲霉菌IgM, IgG抗体。其原理为ELISA间接法:将患者血清(含有曲霉菌IgM或IgG抗体)加入包被有曲霉菌抗原的酶标板中,血清中抗体与固相抗原结合,再加入抗人IgM或IgG酶标抗体,形成抗原-抗体-酶标抗体复合物,加入底物产生显色反应,通过酶标仪测定其吸光度,与标准曲线对比分析抗体含量。基于抗体的产生需要一定时间而且要求机体免疫功能正常或基本正常,所以抗体检测的临床价值并没有抗原检测的临床价值大<sup>[18]</sup>。目前,国内对曲霉菌抗体的研究也不多,但在国外IgG抗体实验已开始应用于临床。

2.4 分子生物学诊断法 目前,在真菌感染的诊断及耐药基因的检测方面聚合酶链式反应技术(polymerase chain reaction, PCR)是临床应用最多,研究最热的技术。此技术通过真菌通用引物和种属特异性引物分别对待测样本进行两次扩增,将目的DNA放大数百万倍后再进行检测的技术。该技术较经典的镜检法、培养法等具有快速、高敏感度、高特异度等优点,通常用于真菌的分型、鉴定以及耐药基因的检测<sup>[19]</sup>。依赖核酸序列的扩增技术(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)是在PCR的基础发展起来的一种新型扩增RNA的技术,它是一个恒温(42℃)扩增RNA的酶促反应过程,可短时间内将模板RNA扩增到 $10^{10}$ 左右。NASBA已广泛应用于细菌、真菌、病毒等多种病原微生物的检测,相对于传统的PCR技术更为稳定和准确<sup>[20]</sup>。此外还有基因探针技术、

质谱技术、焦磷酸测序技术等多种分子生物学检测方法可用于真菌的检测。但分子生物学检测技术也存在着其不足之处,如成本较高、操作复杂、感染因素较多易产生假阳性、假阴性等,所以其应用价值还有待于进一步考究。

3 血流真菌感染的治疗 按照药物的作用机制可将经典的抗真菌药物分为以下几类:①作用于真菌细胞壁:棘白菌素类:此类药物非竞争性作用于真菌细胞壁中的葡聚糖合成酶,抑制葡聚糖的合成,产生杀灭真菌的作用,这类药物主要有卡泊芬净、米卡芬净等。在2014年的《米卡芬净临床应用多学科专家评价》新闻发布会上,来自7个学科的近40位专家一致认为,米卡芬净应作为有效治疗真菌感染的首选药物。②作用于真菌的细胞膜:多烯类:此类药物通过结合真菌细胞膜上的麦角甾醇,形成一种能使胞内容物外漏的跨膜通道,从而造成细胞死亡。目前以两性霉素B为代表药多用于临床,但由于其具有严重的肾毒性、神经毒性等毒副作用,而较少用于临床,取而代之的是毒副作用较小的两性霉素B剂型之一的两性霉素脂质体B。三唑类:此类药物可抑制真菌细胞中能催化羊毛甾醇合成麦角甾醇的细胞色素P-450的合成,导致真菌细胞壁上麦角甾醇的缺失,起到杀菌作用。临床常用的三唑类药物有氟康唑、咪康唑及伊曲康唑等,其中以氟康唑和伊曲康唑作为首选。③抑制真菌核酸合成:如氟胞嘧啶。此类药物抗菌谱较窄,仅限于念珠菌、曲霉菌、隐球菌的敏感菌属,此外,单独用氟胞嘧啶时,易引起真菌的耐药性增强。④其它:中药具有不良反应小、毒副作用小、抗菌谱广、耐药率低等特点而成为目前许多研究者关注的对象<sup>[21]</sup>。

4 结语 近年来,真菌感染的发生率不断上升,越来越严重的影响着人类的生命与健康,对高危患者,应早期预防,防止感染的发生,对已感染的患者,应早发现、早诊断、早治疗。真菌感染的诊断方法虽然多种多样,但各有优劣,应尽可能的联合多种检测方法对疾病进行早期、快速、准确的诊断,从而为临床及时有效地治疗提供指导。

#### 参考文献:

- [1] 李航,方文捷,熊林,等.侵袭性真菌感染早期诊断技术的研究进展[J].菌物学报,2019,38(2):151-158.  
LI Hang, FANG Wenjie, XIONG Lin, et al. Research progress in early diagnosis of invasive fungal infections[J]. Mycosystema, 2019, 38(2): 151-158.
- [2] BOAN P, GARDAM D. Epidemiology and antifungal susceptibility patterns of candidemia from a tertiary centre in Western Australia[J]. Journal of Chemotherapy (Florence, Italy), 2019, 31(1): 1-4.
- [3] 何小羊,任秋霞,杨英. 2008~2017年我国深部真菌病原谱及流行特征国内文献系统分析[J]. 中国真菌学杂志, 2018, 13(4): 229-234.  
HE Xiaoyang, REN Qiuxia, YANG Ying. The study of the pathogenic spectrum and epidemiologic features of invasive fungal infection in China during 2008-2017 [J]. Chinese Journal of Mycology, 2018, 13(4): 229-234.
- [4] 丁艳苓,沈宁,周庆涛,等. 非免疫缺陷宿主念珠菌血流感染[J]. 北京大学学报(医学版), 2018, 50(6): 1063-1069.  
DING Yanling, SHEN Ning, ZHOU Qingtao, et al. Clinical analysis of Candida immunocompetent patients[J]. Journal of Peking University (Health Sciences), 2018, 50(6): 1063-1069.
- [5] ULU KILIC A, ALP E, CEVAHIR F, et al. Epidemiology and cost implications of candidemia, a 6-year analysis from a developing country[J]. Mycoses, 2017, 60(3): 198-203.
- [6] 章强强. 我国真菌感染的实验室检查现状[J]. 诊断学理论与实践, 2016, 15(1): 1-4.  
ZHANG Qiangqiang. The status of laboratory examination of fungal infection in China[J]. Journal of Diagnostics Concepts and Practice, 2016, 15(1): 1-4.
- [7] 余进. 真菌检验技术进展[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(10): 721-724.  
YU Jin. Progress in fungal testing technology[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2017, 35(10): 721-724.
- [8] IDELEVICH E A, SEIFERT H, SUNDQVIST M, et al. Microbiological diagnostics of bloodstream infections in Europe-An ESGBIES survey[J]. Clinical Microbiology and Infection; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.024>.
- [9] 宋星澎,郑锐. 念珠菌血流感染的诊治进展[J]. 医学综述, 2019, 25(4): 758-762.  
SONG Xingpeng, ZHENG Rui. Progress in diagnosis and treatment of Candida bloodstream infection[J]. Medical Recapitulate, 2019, 25(4): 758-762.
- [10] YANG Shuangshuang, XU Haofeng, SUN Jide. Shifting trends and age distribution of ESKAPEE resistance in bloodstream infection, Southwest China, 2012-2017[J]. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 2019, 8: 61.
- [11] DE PAUW B E, WALSH T J, DONNELLY J P, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(12): 1813-1821.

- [12] KUMAR J, SINGH A, SETH R, et al. Galactomannan antigen test for early diagnosis of invasive aspergillus infection in pediatric febrile neutropenia[J]. Indian Pediatr, 2018, 55(3): 257-258.
- [13] 吴真, 徐晓刚. 深部真菌病的实验诊断进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(1): 82-85.  
WU Zhen, XU Xiaogang. current status and evolution of laboratory diagnosis for deep fungal diseases[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2014, 14(1): 82-85.
- [14] 焦二莉, 李跃宇, 马文慧. 侵袭性真菌感染的3种免疫学检测方法的应用研究[J]. 卫生检验, 2016, 13(20): 117-119.  
JIAO Erli, LI Yueyu, MA Wenhui. Application research on three immunologic test methods of invasive infections with fungi[J]. China Health Industry, 2016, 13(20): 117-119.
- [15] ZHANG Shuzhen, WANG Sibin, WAN Zhe, et al. The diagnosis of invasive and noninvasive pulmonary aspergillosis by serum and bronchoalveolar lavage fluid galactomannan assay[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 943691.
- [16] 曹林, 沈记录. 隐球菌检验方法的应用[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(1): 113-117.  
CAO Lin, SHEN Jilu. Application of laboratory tests for identifying *Cryptococcus*[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2018, 18(1): 113-117.
- [17] PERFECT J R, BICANIC T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: what do we know now[J]. Fungal Genet & Biol, 2015(78): 49-54.
- [18] 任增花, 徐凌. 侵袭性肺曲霉病诊断方法的研究进展[J]. 中国临床医学, 2018, 25(6): 1009-1015.  
REN Zenghua, XU Ling. Research progress in diagnostic methods of invasive pulmonary aspergillosis[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2018, 25(6): 1009-1015.
- [19] ARVANITIS M, ZIAKAS P D, ZACHARIOUDAKIS I M, et al. PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(10): 3731-3742.
- [20] ZHAO Yanan, PADERU P, RAILKAR R A, et al. Blood aspergillus RNA is a promising alternative biomarker for invasive aspergillosis[J]. Med Mycol, 2016, 54(8): 801-807.
- [21] 王玉连, 吴建华. 中药抗真菌作用研究进展[J]. 世界临床药物, 2018, 39(9): 638-642.  
WANG Yulian, WU Jianhua. Advances on antifungal treatment through Chinese herbal medicine[J]. World Clinical Drugs, 2018, 39(9): 638-642.

收稿日期: 2019-03-23

修回日期: 2019-04-26

(上接 160 页)

- [4] 陈洪卫, 彭亮, 侯彦强. 上海市松江区区域临床检验中心建设的探索与实践[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(18): 2569-2570.  
CHEN Hongwei, PENG Liang, HOU Yanqiang. Exploration and practice of the construction of shanghai songjiang district regional clinical laboratory center[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2014, 35(18): 2569-2570.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS/T496-2017 临床实验室质量指标[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.  
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. WS/T496-2017 Quality indicators in clinical laboratories[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2017.
- [6] CARRARO P, PLEBANI M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later[J]. Clin Chem, 2007, 53(7): 1338-1342.
- [7] 唐亮, 陈洪卫, 赵静静, 等. 区域医疗集中检测运营模式分析前质量控制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(17): 2477-2479.  
TANG Liang, CHEN Hongwei, ZHAO Jingjing, et al. Pre-analysis quality control study on operation mode of regional centralized medical testing[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2016, 37(17): 2477-2479.
- [8] 马善源, 陈洪卫, 侯彦强. 区域临床检验中心信息化进程中的问题与对策[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(21): 3063-3064.  
MA Shanyuan, CHEN Hongwei, HOU Yanqiang. Problems and countermeasures in the informationization process of regional clinical laboratory centers[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2017, 38(21): 3063-3064.
- [9] 贾立川, 张娟, 张小敏, 等. PDCA 循环用于临床检验质量控制效果研究[J]. 大家健康(学术版), 2016, 10(15): 50.  
JIA Lichuan, ZHANG Juan, ZHANG Xiaomin, et al. PDCA cycle for clinical laboratory quality control effect research[J]. For All Health (Academic Edition), 2016, 10(15): 50.
- [10] 李广莹. PDCA 循环用于临床检验质量控制效果分析[J]. 中国卫生产业, 2017, 14(15): 34-35.  
LI Guangying. PDCA cycle for quality control of clinical laboratory[J]. China Health Industry, 2017, 14(15): 34-35.

收稿日期: 2019-03-18

修回日期: 2019-05-13