

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.01.020

3 种检测方法在肿瘤患者侵袭性真菌病中的应用价值^{*}

黄 刚,刘联斌,刘 弯,林 炜,李远香,刘春霞

江西省赣州市肿瘤医院检验科,江西赣州 341000

摘 要:目的 探讨血清降钙素原(PCT)检测、(1,3)- β -D-葡聚糖检测(G 试验)和实时荧光定量 PCR 技术在肿瘤患者侵袭性真菌病早期诊断中的应用价值。方法 选择 2016 年 6 月至 2018 年 12 月入住该院的合并真菌感染的肿瘤患者 25 例纳入真菌组,细菌感染患者 25 例纳入细菌组,另选择同期 25 例健康体检者作为对照组。按操作规程采集静脉血标本进行 PCT、(1,3)- β -D-葡聚糖检测;真菌组同时进行真菌实时荧光定量 PCR 检测。比较各组 PCT、(1,3)- β -D-葡聚糖水平,以及 3 种方法在真菌组中的阳性率。结果 真菌组、细菌组、对照组的血清 PCT 水平分别为(0.98 $\pm$ 0.15)、(1.17 $\pm$ 0.19)、(0.15 $\pm$ 0.06)ng/mL,真菌组明显高于对照组,差异有统计学意义($t=25.70, P<0.05$)。真菌组、细菌组、对照组的(1,3)- β -D-葡聚糖水平分别为(35.35 $\pm$ 10.26)、(11.86 $\pm$ 3.44)、(3.52 $\pm$ 2.66)pg/mL,真菌组明显高于细菌组及对照组,差异有统计学意义($t=10.85, 15.01, P<0.05$)。在真菌组中,实时荧光定量 PCR 检测的阳性率高于 G 试验和 PCT 检测,差异有统计学意义($\chi^2=4.15, 22.22, P<0.05$)。结论 (1,3)- β -D-葡聚糖可用于辅助侵袭性真菌病的早期诊断,实时荧光定量 PCR 技术在侵袭性真菌病的早期诊断中较(1,3)- β -D-葡聚糖和 PCT 检测价值更高。

关键词:降钙素原; (1,3)- β -D-葡聚糖; 实时荧光定量 PCR; 侵袭性真菌病

中图法分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)01-0077-03

侵袭性真菌病是指真菌入侵人体组织或血液,经生长繁殖对机体组织、器官功能造成损害,并引发炎症反应的一种感染性疾病,其中以念珠菌为主的酵母样真菌和曲霉菌为主的丝状真菌引起的感染最为常见^[1-2]。侵袭性真菌病常见于免疫功能低下人群,近年来,随着肿瘤患者手术和放疗等治疗技术的广泛开展,患者受到真菌感染的发生率呈明显上升趋势,如何及时诊断并有效地治疗侵袭性真菌病受到越来越多的关注。目前,真菌检验技术主要包括传统的真菌涂片镜检和真菌培养、组织病理学检查、血清学检测、分子生物学技术和质谱技术^[3]。在欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组(EORTC/IF-ICG)标准^[4]、美国真菌病研究组(MSG)标准^[5]、美国抗感染学会(IDSA)指南^[6]、我国《血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第四次修订版)》^[7]中都提到(1,3)- β -D-葡聚糖检测(G 试验)是临床诊断侵袭性真菌病的诊断标准之一。本研究对血清降钙素原(PCT)检测、G 试验和荧光定量 PCR 技术在肿瘤患者侵袭性真菌病早期诊断中的价值进行了探讨,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 6 月至 2018 年 12 月入住本院的合并真菌感染的肿瘤患者 25 例纳入真菌组,包括念珠菌感染 13 例,曲霉菌感染 10 例,毛霉菌感染 2 例,真菌感染诊断标准为放射学检查支持存在感染的部位,在无菌术下取得的标本,经培养结果呈

阳性。真菌组纳入标准:符合《血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第四次修订版)》^[7]诊断标准。细菌感染患者 25 例纳入细菌组,包括革兰阴性菌感染 16 例,革兰阳性菌感染 9 例。另选择同期 25 例健康体检者纳入对照组。本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 PCT 检测采用飞测 III plus 仪器,试剂购自广州万孚生物技术有限公司;G 试验采用 ELX808 酶标仪检测仪器,试剂购自厦门鹭试生物科技股份有限公司;真菌荧光定量 PCR 检测采用 ABI7500 仪器,试剂购自广州达安有限公司。

1.3 方法 按操作规程采集静脉血标本进行 PCT 检测及 G 试验,真菌组同时进行真菌实时荧光定量 PCR 检测。通过查找曲霉菌属、隐球菌属和真菌通用的基因序列,委托广州达安有限公司进行引物设计,采用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)进行检测。反应程序为 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,10 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,30 个循环。PCR 检测以 Ct 值 <30 ,且有较好的对数增长曲线为阳性标准。血清 PCT 正常参考范围为 <0.5 ng/mL,(1,3)- β -D-葡聚糖正常参考范围为 <10 pg/mL,大于或等于参考值判断为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有

* 基金项目:江西省卫生和人口计划生育委员会科技计划项目(20177278)。

统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组血清 PCT、(1,3)-β-D-葡聚糖水平比较 真菌组血清 PCT 水平稍低于细菌组,差异无统计学意义($t = -3.93, P > 0.05$);真菌组血清 PCT 水平明显高于对照组,差异有统计学意义($t = 25.70, P < 0.05$)。真菌组(1,3)-β-D-葡聚糖水平明显高于细菌组及对照组,差异有统计学意义($t = 10.85、15.01, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组血清 PCT、(1,3)-β-D-葡聚糖水平比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	PCT(ng/mL)	(1,3)-β-D-葡聚糖(pg/mL)
真菌组	25	0.98±0.15	35.35±10.26
细菌组	25	1.17±0.19	11.86±3.44
对照组	25	0.15±0.06	3.52±2.66

2.2 3 种方法在侵袭性真菌病早期诊断中的价值比较 在真菌组中,实时荧光定量 PCR 检测的阳性率高于 G 试验和 PCT 检测,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.15、22.22, P < 0.05$);而 G 试验阳性率高于 PCT 检测,差异有统计学意义($\chi^2 = 9.74, P < 0.05$)。见表 2。

表 2 3 种方法在侵袭性真菌病早期诊断中的价值比较				
方法	阳性(n)	阴性(n)	合计(n)	阳性率(%)
G 试验	19	6	25	76
PCT 检测	8	17	25	32
实时荧光定量 PCR	24	1	25	96

3 讨 论

肿瘤患者在接受化疗后,由于自身免疫力低下容易引起侵袭性真菌病。国内外流行病学研究显示,血液病及恶性肿瘤患者中侵袭性真菌病的发病率呈现上升趋势,且念珠菌和曲霉菌是侵袭性真菌病最主要的两种致病菌^[8-10]。选择合适的检测方法和指标对于早期诊断和治疗侵袭性真菌病有重要价值。

真菌涂片镜检和真菌培养技术是传统的真菌检测方法,仍具有重要价值。但真菌涂片报告需要区分酵母相及菌丝相,并进行具体描述^[11],由于实验室人员识别能力参差不齐,易造成假阴性。相对于真菌培养技术耗时较长,组织病理学检查取材不便,质谱技术检测仪器昂贵等原因,血清学检测和实时 PCR 技术已发展成熟,采集血液标本易于常规实验室开展。本研究发现,真菌组(1,3)-β-D-葡聚糖水平明显高于细菌组和对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。(1,3)-β-D-葡聚糖可用于辅助侵袭性真菌病的早期诊断,这与国内大多文献报道一致^[12-15]。本研究提示,真菌组实时荧光定量 PCR 检测阳性率高于 PCT、(1,3)-β-D-葡聚糖检测。(1,3)-β-D-葡聚糖检测是侵

袭性真菌病的诊断标准之一,但隐球菌、结核分枝杆菌引起的感染 G 试验为阴性或轻度升高^[16]。PCR 技术具有耗时短,污染少,灵敏度、特异度高,以及重复性好的特点^[17-18],阳性率高于血清 PCT 和(1,3)-β-D-葡聚糖检测,在侵袭性真菌病的早期诊断中具有一定价值。

本研究证实了联合检测在侵袭性真菌病早期诊断中的重要价值,但仍需大样本量的研究来进一步证实。随着人工智能的不断发展,侵袭性真菌病早期诊断技术将更加快速、准确。

参考文献

[1] PARAMYTHIOTOU E,FRANTZESKAKI F,FLEVA-RI A,et al. Invasive fungal infections in the ICU:how to approach,how to treat[J]. Molecules,2014,19(1):1085-1119.

[2] 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.

[3] 余进. 真菌检验技术进展[J]. 临床检验杂志,2017,35(10):721-724.

[4] DE-PAUW B,WALSH T J,DONNELLY J P,et al. Re-vised definitions of invasive fungal disease from the Euro-pean Organization for research and treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the Na-tional Institute of Allergy and Infections Diseases Myco-ses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group[J]. Clin Infect Dis,2008,46(12):1813-1821.

[5] PAPPAS P G,KAUFFMAN C A,ANDES D,et al. Clini-cal practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America [J]. Clin Infect Dis,2009,48(5):503-535.

[6] WALSH T J,ANAISIE E J,DENNING D W,et al. Treatment of aspergillosis:clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America[J]. Clin Infect Dis,2008,46(3):327-360.

[7] 中国侵袭性真菌感染工作组. 血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第四次修订版)[J]. 中 华内科杂志,2013,52(8):704-709.

[8] HU R,JIANG X Y,WU Y. Risk factors for invasive pul-monary fungal infection in patients with hematological malignancies not receiving hematopoietic stem cell trans-plant[J]. Neoplasma,2012,59(6):669-675.

[9] ZHANG P,JIANG E L,YANG D L,et al. Risk factors and prognosis of invasive fungal infections in allogeneic stem cell transplantation recipients: a single-institution experience[J]. Transpl Infect Dis,2010,12:316-321.

[10] SUN Y Q,XU L P,LIU D H,et al. The incidence and risk factors of invasive fungal infection after haploidentical haematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion[J]. Clin Microbiol Infect,2012,18(10):997-1003.

[11] 王辉,马筱玲,宁永忠,等. 细菌与真菌涂片镜检和培养结

- 果报告规范专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(1): 17-30.
- [12] 牟娜, 牟佳, 姚新洁, 等. 降钙素原与 1,3-β-D 葡聚糖检测在不同感染性疾病诊断中的应用评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(11): 2453-2455.
- [13] 刘长志, 司徒亚, 陈新胜. 呼吸机相关性肺炎并发假丝酵母菌感染患者 PCT、IL-6 和 CRP 水平分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(14): 3150-3153.
- [14] 肖晓辉, 刘华, 蔡曦光, 等. 52 例肺部真菌感染患者血清降钙素原、1,3-β-D 葡聚糖水平观察[J]. 山东医药, 2015, (19): 75-76.
- [15] 张龙锋, 许康瑞, 夏秋风. 联合曲霉菌半乳甘露聚糖, (1, 3)-β-D 葡聚糖与降钙素原对侵袭性真菌感染的诊断价值 • 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2020. 01. 021
- 评价[J]. 医学检验与临床, 2017, 28(5): 31-34.
- [16] 金金, 孙铁英, 胡云建, 等. 多种抗原检测方法对非粒细胞缺乏宿主真菌感染的诊断作用初探[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(9): 660-664.
- [17] 李红妩, 李桂军, 杨戎威. 实时荧光定量 PCR 与 1,3-β-D 葡聚糖试验在儿童肺部真菌感染中的诊断意义[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(3): 493-494.
- [18] 高露娟, 鲁巧云, 孙毅, 等. 实时 PCR 在侵袭性曲霉病中的诊断价值[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(2): 173-177.
- (收稿日期: 2019-05-07 修回日期: 2019-09-12)

感染模式对 HBV 感染者精液质量和精子 DNA 碎片化指数的影响*

武新梅¹, 陈 华², 陈允国¹, 刘文芹³

温州医科大学附属第二医院: 1. 检验科; 2. 生殖中心; 3. 急诊科, 浙江温州 325027

摘 要:目的 根据乙型肝炎 5 项标志物检测结果, 分析不同感染模式对乙型肝炎病毒(HBV)男性感染者精液常规参数和精子 DNA 碎片化指数(DFI)的影响。方法 经筛选后共纳入 236 例男性 HBV 感染者为研究对象, 将 HBsAg+/HBcAb+、HBsAg+/HBeAb+/HBcAb+ 和 HBsAg+/HBeAg+/HBcAb+ 3 种感染模式患者分别纳入 A 组(58 例)、B 组(112 例)、C 组(66 例)。结果 C 组年龄明显低于 A 组、B 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。A 组体质量指数明显低于 B 组、C 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。C 组的精子密度和精子形态正常率稍低于 A 组、B 组, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); C 组 DFI 明显高于 A 组、B 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。A 组、B 组间 DFI 比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 不同 HBV 感染模式患者存在精液常规参数和 DFI 差异, 尤其是 HBV“大三阳”感染模式患者精子活力参数和 DFI 明显受到影响。

关键词:乙型肝炎; 感染模式; 精液质量; 精子 DNA 碎片化指数

中图法分类号:R446.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)01-0079-04

乙型肝炎病毒(HBV)感染对人类的健康和生命造成了严重威胁, 我国属乙型肝炎高发区。不孕不育人群中也有相当比例的 HBV 感染者^[1]。研究发现, HBV 为非单一的嗜肝病毒, 除感染肝细胞成为导致慢性肝炎、肝硬化及肝癌的重要潜在因素外, 还可以穿透人血睾屏障, 侵入生殖细胞, 影响精子质量, 降低男性生育潜能^[2-3]。本研究分析了 236 例男性 HBV 感染者的精液常规参数和精子 DNA 碎片化指数(DFI), 研究不同 HBV 感染模式男性这些指标的情况, 旨在探讨 HBV 感染者不同的感染状态是否影响男性生育能力, 从而为 HBV 感染影响男性生殖细胞的机制研究提供相关依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2018 年 12 月在本院就诊的 236 例男性 HBV 感染者为研究对象, 排除标准: 无精子症患者; 肝功能异常者; 近半年有持续

高热者; 精液白细胞密度 $> 1 \times 10^6/\text{mL}$ 者; 染色体异常者; 禁欲时间不符合要求者。

1.2 方法 收集乙型肝炎 5 项标志物检测结果, 根据患者的 3 种主要感染模式分为 3 组, HBsAg+/HBcAb+、HBsAg+/HBeAb+/HBcAb+ 和 HBsAg+/HBeAg+/HBcAb+ 患者分别纳入 A 组(58 例)、B 组(112 例)、C 组(66 例)。HBV 标志物采用 ELISA 检测, 试剂盒由上海科华生物技术公司提供。

1.2.1 精液标本收集 所有入组的男性均禁欲 2~7 d, 手淫取精, 37℃ 静置 30 min 待其液化, 2 h 内用计算机辅助精液分析系统(CASAS)进行精液常规分析, 检测指标包括精液体积、精子密度、精子存活率、精子活力和精子畸形率。具体参照 WHO 第 5 版《人类精液及精子-宫颈黏液相互作用实验室检验手册》^[4]。精子形态学分析参照 WHO 推荐的巴氏染色法。

1.2.2 DFI 检测 采用染色质扩散法(SCD)进行

* 基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LQ15H040006); 浙江省温州市科技局项目(Y20140615)。