

- [22] Nishi H, Nii KT, Nakanishi S, et al. Intravenous calcitriol therapy increases serum concentrations of broblast growth factor 23 in dialysis patients with secondary hyperparathyroidism[J]. *Nephron Clin Pract*, 2005, 101(2):94-99.
- [23] Gaasbeek A, Meinders AE. Hypophosphatemia: an update on its etiology and treatment[J]. *Am J Med*, 2005, 118(10):1094-1101.
- [24] Adhr C. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23[J]. *Nat Genet*, 2000, 26(3):345-348.
- [25] Lorenz DB, Bastepe M, Benet PA, et al. DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis[J]. *Nat Genet*, 2006, 8(11):1248-1250.
- [26] Roetzer KM, Varga F, Zwettler E, et al. Novel PHEX mutation associated with hypophosphatemic rickets[J]. *Nephron Phusiol*, 2007, 106(1):8-12.
- [27] Shimada T, Mizutani S, Muto T, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98(11):6500-6505.
- [28] Garringer HJ, Malekpour M, Esteghamat F, et al. Molecular genetic and biochemical analyses of FGF23 mutations in familial tumoral calcinosis[J]. *AM J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295(4):929-937.
- [29] Imanishi Y, Inaba M, Nakatsuka K, et al. FGF23 in patients with end stage renal disease on hemodialysis[J]. *Kideny Int*, 2004, 65(5):1943-1946.
- [30] Shigematsu T, Kazama JJ, Yamashita T, et al. Possible involvement of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism associated with renal insufficiency[J]. *Am J Kideny Dis*, 2004, 44(2):250-256.
- [31] Gupata A, Winer K, Econs MJ, et al. FGF23 is elevated by chronic hyperphosphatemia[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(9):4489-4492.
- [32] Juppner H, Wolf M, Salusky IB. FGF23: more than a regulator of renal phosphate handling[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 30(11):3392-3399.
- [33] Westerberg PA, Linde T. Regulation of fibroblast growth factor 2-3 in chronic kidney disease[J]. *Nephrol Dial Trans*, 2007, 22(11):3202-3207.
- [34] Nagano N, Miyata S, Abe M. Effect of manipulating serum phosphorus with phosphate binder on circulating PTH and FGF23 in renal failure rats[J]. *Kidney Int*, 2006, 69(3):531-537.
- [35] Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, et al. Increased circulatory level of biologically active full length FGF23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(11):4957-4960.
- [36] Lavi MV, Wassemann G, Meir T, et al. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 8(6):235-237.
- [37] Nakai K, Komaba H, Fukagawa M. New insights into the role of fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease[J]. *J Nephrol*, 2010, 22(36):458-461.
- [38] Nielsen SS, Pedersen SM, Kassem M, et al. Fibroblast growth factor 23 a phosphate regulating hormone[J]. *Ugeskr Laeger*, 2010, 172(20):1521-1527.

(收稿日期:2010-12-01)

• 综 述 •

侵袭性真菌感染实验室早期诊断方法的现状与展望

曹楠楠 综述, 郑 磊, 王 前[△] 审校

(南方医科大学南方医院检验医学中心, 广州 510515)

关键词: 真菌; 实验室; 诊断

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 07. 026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)07-0781-03

随着化疗药物、免疫抑制剂等的广泛应用及器官移植学的发展,侵袭性真菌感染(invasive fungal infection, IFI)发生率显著上升。尽管不断有新的抗真菌药物问世,但 IFI 的死亡率仍然很高。

IFI 的病原真菌多为念珠菌、曲霉菌属,常发生于恶性肿瘤、移植后免疫力低下及危重症患者。近些年,还常常伴随一些过去较为少见的毛霉菌、根霉菌等真菌感染^[1]。尽早诊断感染,确定病原真菌,成为临床的迫切需求。

现有检测 IFI 的方法可分为培养法和非培养法。培养法是检测真菌感染的金标准,但培养时间长,特异性和敏感性低,也不能区分是非致病性定植,还是侵袭性感染。非培养法包括血清学方法和分子生物学方法。与培养法相比,非培养方法具有检测时间短、敏感性和特异性相对较高的特点,逐渐成为快速检测 IFI 的首要之选。现就侵袭性真菌感染的非培养检测方法作一阐述。

1 血清学方法

血清学方法是一种重要的诊断 IFI 的方法。通过检测真菌抗原抗体、代谢产物等,提供诊断线索及疾病进程的有关信息。

目前 IFI 检测抗原主要包括两种:(1,3)- β -D 葡聚糖[(1,3)- β -D glucan, BG]和半乳甘露聚糖(galactomannan, GM)。BG 是除接合菌和新型隐球菌外所有真菌细胞壁组分。人体细胞壁上不存在这种多糖,这一特点使其成为检测侵袭性真菌感染的一种理想标志物。但在接受血液透析、免疫球蛋白治疗以及其他包含葡聚糖的药物治疗的患者中可见假阳性结果。且此抗原与阿莫西林、革兰染色阳性的微生物细胞壁组分有交叉反应。因此 BG 检测的结果应结合临床症状进行解释,监测血清 BG 水平可评估治疗效果。GM 是曲霉菌特异性抗原,存在于曲霉菌细胞壁上,在菌丝生长时被释放到周围组织中。Meta 分析显示,半乳甘露聚糖-酶联免疫分析(galactomannan-

[△] 通讯作者, E-mail: wangqian@fimmu. com。

enzyme immunoassay, GM-EIA) 对于监测恶性血液病患者的侵袭性曲霉病 (invasive aspergillosis, IA) 有一定的作用, 但对于实体器官移植的受者这种作用却不明显^[2]。对于 IA 高度疑似患者, GM-EIA 方法敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值分别可达 61%~71%、89%~93%、26%~53%、95%~98%^[2]; IA 高度疑似患者 GM 抗原水平降低, 预后较好; GM 水平无变化或升高, 可能预示治疗效果不佳^[3]。患者血清 GM 水平与存活率、活检证据和治疗效果有关^[4]。抗真菌治疗后, 抗原量减少, GM-EIA 的敏感性下降^[5]。

检测真菌抗体的方法临床很少应用, 主要原因在于此方法检测免疫低下患者的真菌抗体, 敏感性和特异性均不高, 且常见假阴性。检测定植但未感染时也可能出现假阳性结果。念珠菌属是人体正常的定植菌。念珠菌属的多种抗原组分 (如释放的产物、细胞壁组分、膜以及细胞浆组分等) 均可产生念珠菌抗体。因此检测到念珠菌抗体并不能确定是侵袭性念珠菌感染还是正常定植。曲霉菌抗体检测也富有争议。对于粒细胞减少患者, 循环血液中抗曲霉菌抗体水平与侵袭性曲霉病相关性不大。但同时有研究显示肺移植患者血清中特异的 IgG 抗体水平增高与烟曲霉感染的影像学、细胞学和微生物学证据一致, 且早于它们出现。

2 分子生物学方法

2.1 DNA 序列比对 DNA 序列比对是通过比较两个序列间的相似区域和保守性位点, 寻找两者可能的分子进化关系。这种方法可在种或亚种水平上准确分类, 鉴定生长缓慢和认识不足的病原真菌。由于病原真菌种类越来越多, 序列比对方法最适合用于鉴定新的病原真菌。有研究对新鲜组织、石蜡包埋组织及体液中的真菌进行了鉴定, 特异性很高。但 DNA 序列比对也有局限性。新鲜组织标本或全血标本检测时间至少需 48 h, 石蜡包埋组织更长, 敏感性也因标本类型、体积以及 DNA 提取方法而异, 而且此方法无法排除环境真菌污染, 公共数据库中序列的正确性也会影响鉴定结果^[6]。

2.2 非序列分析分子生物学方法

2.2.1 PCR 产物电泳 此方法利用内部转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 片段长度的种属特异性, 将 DNA 扩增产物电泳。但当不同种微生物存在大小相同的片段或不能被种群特异性长度标志所识别时, 凝胶电泳的鉴定结果就可能出错。毛细管电泳和微芯片电泳使用荧光分析器分析扩增产物, 灵敏度可精确到 1 个碱基, 30 min 内可同时检测 96 个样本。但此方法不适合检测种内变异性高的病原真菌。

2.2.2 PCR-限制性片段长度多态性分析 (PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, PCR-RFLP) DNA 在限制性内切酶切后形成特定的 DNA 片段。因此, 能引起酶切位点变化的突变等, 均可产生 RFLP。不同种群生物体 DNA 序列存在差别。若差别发生在内切酶酶切位点, 使内切酶识别序列无法识别或是使非内切酶识别位点变成识别位点, 就导致用同一种限制性内切酶切割不同种群 DNA, 产生大小、数量不同的酶切片段。用标记探针与酶切片段进行杂交, 即可分析多态性结果。PCR-RFLP 敏感性比血培养法高, 而且简单、便宜、快速。但若酶切位点发生序列突变 (如获得、丢失、插入识别位点等) 可能导致重要片段长度变化。

2.3 探针杂交

2.3.1 Southern blot 杂交 利用放射标记的特异性 DNA 探

针来检测通用真菌 PCR 产物。探针也可用其他标记物标记。有研究利用地高辛标记探针检测血标本中的念珠菌和曲霉菌, 敏感性和特异性均很高。

2.3.2 PCR-酶联免疫方法 通用真菌 PCR 产物与一个标记探针和一个生物素化捕获探针杂交, 形成复合体, 然后将此复合体加入到抗生物素蛋白链菌素包被的微孔板中, 用酶联免疫比浊法来检测捕获的 DNA。早期研究以 rDNA 基因复合体为靶基因, 检测鉴定多种念珠菌病原真菌, 敏感性和特异性均很高。后续研究使用了血清标本, 特异性高, 但敏感性不稳定。PCR-酶联免疫方法简单、快速、敏感性好, 可进行高通量分析, 且微小的交叉反应不会影响结果, 对于筛查和诊断感染都有一定价值。

2.3.3 PCR-反向线点杂交 (PCR-reverse line blot hybridization assays, PCR-RLB hybridization assays) 用通用多重 PCR 和生物素标记的引物或-dNTPs 来标记扩增产物, 产物变性后转载到尼龙膜上, 与固定在膜上的种群特异性探针杂交。通过测定抗生物素蛋白链菌素标记的过氧化物酶和化学发光的底物来获得结果。RLB 杂交法多以 ITS2 区或整个 ITS 区为靶基因, 可利用多个探针分析多个标本。检测临床标本中常见病原真菌, 敏感性高, 鉴定结果与 DNA 测序鉴定结果基本一致, 特异性可达 93.7%~100%, 但近缘的念珠菌种群间有交叉反应^[7-8]。

RLB 杂交法适用于样本量和探针量大的检测, 灵活性好, 可根据需要进行调整。所用的膜可重复利用多次而无信号丢失。但 RLB 杂交法时间较长。

2.3.4 DNA 微阵列 DNA 微阵列能同时分析大量基因。将多个种群特异性 DNA 探针点样在一个微芯片上。扩增产物在 PCR 过程中被 Cy3 荧光标记并在芯片上杂交, 没有杂交的扩增片段则被洗掉。检测微芯片上的荧光, 根据杂交谱解读结果。有的已用于鉴定真菌 DNA 的微芯片技术平台, 均以 ITS 区为目的基因。DNA 微阵列方法还可以进行真菌毒力因子和抗真菌药物抗性基因检测^[9]。

DNA 微阵列方法体积小, 适合自动化, 能进行大批量基因检测, 但目前条件下一次只能检测 1 个标本, 且检测成本昂贵, 使其在临床诊断真菌感染的应用前景不明。

2.4 实时 PCR 方法 实时 PCR 方法目前是分子生物学临床诊断方法的首选。它将 PCR 过程与荧光探针或染料联合, 在单个封闭管中检测扩增产物, 荧光强度与模板 DNA 的含量成比例, 提供实时定量结果。检测形式主要包括 Taqman 探针、荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 探针、熔解曲线分析、双探针杂交及分子信标。

2.4.1 Taqman 探针 Taqman 探针利用了 Taq 聚合酶 5'→3' 外切酶活性。在探针 5' 端标记荧光报告基团, 3' 端标记淬灭基团。空间上的相互接近使探针 5' 端荧光报告基团的荧光被 3' 淬灭基团淬灭, 无荧光发出。退火延伸时, 探针与模板杂交。延伸过程中 Taq 聚合酶 5'→3' 外切酶活性切去探针 5' 端荧光基团, 与 3' 端淬灭基团分离、淬灭作用消失, 发出荧光。检测 5' 端荧光基团即可表征扩增产物含量。已有的检测念珠菌和曲霉菌的 Taqman 探针多以 rDNA 为目的基因, 敏感性和特异性不等。

2.4.2 FRET 探针 FRET 探针又称为双杂交探针, 由两条和模板互补且相邻的特异探针组成 (距离 1~5 bp)。上游供体

探针的 3' 末端标记荧光基团, 下游受体探针 5' 端以 LC-Red 640 或 LC-Red 705 标记。复性时, 两探针同时结合在模板上, 供体荧光基团和受体基团紧密相邻, 激发供体产生的荧光能量被受体基团吸收, 使检测探头检测到受体基团发出的荧光。变性时, 两探针游离, 两基团距离远, 不能检测到受体基团发出的荧光。FRET 探针检测的信号是退火时的实时信号, 检测信号始终严格对应模板数量, 特异性高。两个单标记探针的长短不影响信号的传递。多数 FRET 探针系统都以 rDNA 复合体为靶基因。用此方法检测来自培养物和临床标本的曲霉菌和念珠菌, 检测限可低至 1~5 CFU/mL 全血^[10]。

2.4.3 溶解曲线分析 溶解曲线分析方法鉴定真菌多以 rDNA 为靶基因, 嵌入染料计算 T_m 值。用此方法鉴定常见病原真菌敏感性和特异性可达 100%^[11]。随意扩增 DNA 多态性分析结合溶解曲线分析方法 (randomly amplified polymorphic DNA analysis combined with melt curve analysis, McRAPD) 可鉴定出 5 种真菌^[12]。

与探针法相比, 溶解曲线分析价格低廉, 可检测多种病原性真菌。但当引物、探针以及 PCR 条件设计不当, 会产生非特异性产物, 影响结果。

2.4.4 双标探针杂交 探针上标记两种荧光染料如 Cy5 和 SYBR green。探针模板杂交后, SYBR green 嵌入杂交 DNA 双链, Cy5 发出荧光, 产生溶解曲线。但检测过程中 SYBR green 与非特异扩增产物及引物/探针二聚体的结合可影响结果。

2.4.5 分子信标 分子信标技术, 常在探针的 5' 端以荧光报告基团标记, 靠近 3' 端以淬灭基团标记。探针末端序列互补配对, 自发地形成茎环结构, 使在低温条件下, 探针 5' 端的荧光报告基团的荧光被 3' 端的淬灭基团淬灭, 无荧光发出。靶基因序列与探针中间部分的序列互补, 退火过程中, 探针中部的序列与模板杂交, 荧光淬灭消失。检测 5' 端荧光基团即可表征 PCR 产物含量。与核酸探针相比, 分子信标能够提高特异性, 降低信噪比。

3 现状与展望

传统的真菌培养方法, 时间长且特异性和敏感性不高。IFI 患者血培养阳性率很低。某些真菌形态学资料的缺乏也限制了培养法对其鉴定。

真菌特异性抗原抗体的血清学方法可进行 IFI 快速诊断和筛查。但是抗体量并不总是与病情相关。抗原检测作为 IFI 的诊断标志之一, 临床应用效果评价良好, 但价格昂贵且需要较大的抗原载量, 敏感性受限。

分子生物学方法的发展使 IFI, 特别是念珠菌和曲霉菌感染的诊断更加快速、准确。传统的基于序列比对的分子生物学方法 (如 ITS 区测序) 能够精确地进行种属鉴定, 对于直接鉴定临床标本中的病原菌具有很好的应用价值。但目前用于序列比对的基因库尚不完整, 一些真菌种属序列信息不明。实时 PCR 方法以及其他探针方法敏感性高, 结果重复性好, 很适合于常规临床应用。但 DNA 提取方案尚未统一, 一些方法敏感性, 特异性尚不稳定。而且选择检测方法时还需综合考虑检测

目的、效能及所具备的条件。如普通荧光定量 PCR 仪荧光通道数量有限使多重荧光 PCR 的应用就受到限制。这些问题尚需人们在研究中解决。

参考文献

- [1] Nucci M, Marr KA. Emerging fungal diseases[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, 41(4): 521-526.
- [2] Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 42(10): 1417-1427.
- [3] Woods G, Miceli MH, Graziutti ML, et al. Serum aspergillus galactomannan antigen values strongly correlate with outcome of invasive aspergillosis: a study of 56 patients with hematologic cancer [J]. *Cancer*, 2007, 110(4): 830-834.
- [4] Maertens J, Buve K, Theunissen K, et al. Galactomannan serves as a surrogate endpoint for outcome of pulmonary invasive aspergillosis in neutropenic hematology patients [J]. *Cancer*, 2009, 115(2): 355-362.
- [5] Francesconi A, Kasai M, Petraitiene R, et al. Characterization and comparison of galactomannan enzyme immunoassay and quantitative real-time PCR assay for detection of aspergillus fumigatus in bronchoalveolar lavage fluid from experimental invasive pulmonary aspergillosis [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(7): 2475-2480.
- [6] Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, et al. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective [J]. *Plos One*, 2006, 1(1): e59.
- [7] Zeng X, Kong F, Halliday C, et al. Reverse line blot hybridization assay for identification of medically important fungi from culture and clinical specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(9): 2872-2880.
- [8] Playford EG, Kong F, Sun Y, et al. Simultaneous detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Cryptococcus* species by reverse line blot hybridization [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(3): 876-880.
- [9] Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, et al. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(10): 4943-4953.
- [10] Faber J, Moritz N, Henninger N, et al. Rapid detection of common pathogenic aspergillus species by a novel real-time PCR approach [J]. *Mycoses*, 2009, 52(3): 228-233.
- [11] Bu R, Sathipalan RK, Ibrahim MM, et al. Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus* [J]. *J Med Microbiol*, 2005, 54(Pt 3): 243-248.
- [12] Plachy R, Hamal P, Raclavsky V. M24cRAPD as a new approach to rapid and accurate identification of pathogenic yeasts [J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 60(1): 107-113.

(收稿日期: 2010-11-10)