

361 例疑似肺孢子菌肺炎患者核酸检测结果分析*

宋兴勃, 彭 武, 王旻晋, 赵珍珍, 唐思诗, 应斌武[△]

(四川大学华西医院实验医学科, 四川成都 610041)

摘 要:目的 对四川大学华西医院 361 例疑似肺孢子菌肺炎(PCP)患者核酸检测结果进行统计分析, 分析 PCP 发病率以及 PCP 患者年龄、科室和病种分布情况。方法 采用实时荧光定量 PCR(qPCR)技术对 PCP 疑似病例进行核酸检测和诊断, 通过实验室信息系统(LIS)和医院信息系统(HIS)收集患者耶氏肺孢子菌(PJ)核酸检测结果和患者临床信息。使用 SPSS22.0 和 EXCLE2007 软件对数据进行统计分析。结果 361 例疑似 PCP 病例的总体患病率为 31.02%(112/361), 总体病死率为 8.93%(10/112); 年龄为 31~40 岁的疑似病例 PCP 发病率最高, 达 46.51%(20/43), 41~50 岁年龄段 PJ 核酸检测阳性病例 32 例(28.75%), 占比最高; HIV 患者和肾脏病患者的 PCP 发病率最高。结论 PCP 发病呈现年轻化趋势, 肾脏疾病正成为 PCP 的高发基础病种。

关键词:肺孢子菌肺炎; 耶氏肺孢子菌; 荧光定量 PCR; 肺孢子菌核酸检测; 发病率
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.18.011 **中图法分类号:**R446.5
文章编号:1673-4130(2018)18-2242-04 **文献标识码:**A

Analysis of nucleic acid detection results in 361 suspected Pneumocystis pneumonia patients*

SONG Xingbo, PENG Wu, WANG Minjin, ZHAO Zhenzhen, TANG Sishi, YING Binwu[△]

(Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To analyze the results of 361 cases of suspected Pneumocystis pneumonia (PCP) in West China Hospital of Sichuan University, and analyze the incidence of PCP and the age, department and disease distribution of PCP patients. **Methods** Nucleic acid detection and diagnosis of suspected PCP cases were detected by fluorescence quantitative PCR (qPCR), and the results of nucleic acid detection and clinical information of patients with Pneumocystis (PJ) were collected through laboratory information system (LIS) and hospital information system (HIS). The data were statistically analyzed using SPSS22.0 and EXCLE2007 software. **Results** The overall prevalence of 361 suspected PCP cases was 31.02% (112/361), and the overall case fatality rate was 8.93% (10/112). The incidence of PCP in suspected cases aged 31—40 was the highest, up to 46.51% (20/43), and 32 cases (28.75%) of PJ nucleic acid detection in 41—50 age group were the highest. The incidence of PCP in patients with HIV and kidney disease was the highest. **Conclusion** The incidence of PCP showed a younger trend, kidney disease is becoming a high incidence of PCP underlying diseases.

Key words: Pneumocystis pneumonia; Pneumocystis jiroveci; fluorescent quantitative PCR; Pneumocystis nucleic acid detection; incidence rate

肺孢子虫肺炎是由耶氏肺孢子菌(PJ)引起的一种机会感染性真菌肺病。PJ 过去称卡氏肺孢子菌, 是一种引起呼吸系统严重肺孢子菌肺炎(PCP)的机会性致病菌, 同时, PJ 具有传染性和宿主特异性, 只有感染人类时才会致病^[1-2]。主要见于合并获得性免疫缺陷综合征、器官移植及肿瘤化疗患者等。1942 年在荷兰报道了 3 例由 PJ 引起婴儿肺炎之后, 研究者发现 PJ 是二战期间营养不良婴儿间质性浆细胞肺炎的

致病原因^[3]。在 20 世纪 80 年代发生艾滋病疫情之前, 这种 PCP 并不常见。近年来, 因免疫缺陷人群扩大, PCP 发病率亦呈升高趋势^[4]。该病进展迅速, 需终生治疗, 加重时可导致患者死亡, 其致死率可达 30%~50%^[5]。患者诊断的早晚对预后影响大^[6], 然而, PCP 临床表现多样化, 早期亦缺乏一定特异性表现, 故给临床诊断造成一定困难。因此, 及时诊断并且开展有效的治疗手段十分重要。PJ 无法在实验室

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81672095、81472026)。
作者简介: 宋兴勃, 男, 主管技师, 主要从事肿瘤及感染相关研究。 △ 通信作者, E-mail: binwuying@126.com。
本文引用格式: 宋兴勃, 彭武, 王旻晋, 等. 361 例疑似肺孢子菌肺炎患者核酸检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(18): 2242-2245.

中行体外培养,目前,认为 PCP 诊断金标准为呼吸道标本检出 PJ^[7],一般临床上通过纤维支气管镜进行标本取材,但该方法常因部分患者无法耐受而导致无法全面开展。

传统镜检作为 PCP 的诊断手段,其阳性率低。而乳酸脱氢酶(LDH)、1-3- β -D 葡聚糖(BDG)、主要表面糖蛋白(Msg)抗体等无创性指标对 PCP 具有一定的辅助诊断价值,但特异度不够高,需结合其他检查加以鉴别。以 PCR 为核心的分子生物学技术以其取材方便、检测简便、敏感度和特异度高的特点,正被广泛应用于 PCP 的检测。目前 PCR 技术检测 PJ 的方法一般分为普通 PCR、巢式 PCR 以及实时荧光定量 PCR(qPCR)。通常检测引物为线粒体大亚基 RNA、主要表面糖蛋白、二氢叶酸合成酶、二氢叶酸还原酶等^[8]。qPCR 与普通 PCR、巢式 PCR 相比具有更高的灵敏度和特异度。qPCR 克服了普通 PCR 和巢式 PCR 普遍存在的不能定量、假阳性或产物污染问题等缺点,又可用于区分感染和定植的不同状态^[9]。故 qPCR 技术对于 PCP 的实验室诊断具有独特价值。

本研究对四川大学华西医院实验医学科从 2015 年 12 月 26 日建立 PJ 核酸检测项目起,到 2017 年 10 月 28 日所有送检病例进行横断面调查分析,对 PJ 核酸检测阳性率及了明患者年龄、科室和病种分布情况,分析 PCP 发病率与年龄、科室及病种之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2015 年 12 月 26 日至 2017 年 10 月 28 日在四川大学华西医院实验医学科进行耶氏 PJ 核酸检测的患者 361 例纳入研究,剔除重复数据。

1.2 仪器与试剂 采用仪器为 LightCycler R480 qPCR 仪(配套使用 LightCycler R480 Software release 1.5.0 SP4 分析软件)。试剂为耶氏 PJ 核酸测定试剂盒(荧光 PCR 法,试剂厂家:上海之江生物科技股份有限公司;货号:QD-0082-02;批号:P20170901)。

1.3 实验方法

1.3.1 样本采集与处理 (1) 支气管肺泡灌洗物:用无菌棉拭子拭取支气管肺泡灌洗物,置入无菌玻璃管(含 0.4 mL 灭菌生理盐水),用无菌棉球将试管塞紧后,密闭送检。取 400 μ L 样本,13 000 r/min 离心 2 min,弃去上清。沉淀直接加入 100 μ L 核酸提取液充分混匀,沸水浴 10 min,然后 13 000 r/min 离心 10 min,取上清 4 μ L 作为 PCR 反应模板。(2) 肺活检标本:取可疑组织适量置无菌玻璃管,密闭送检。用适量灭菌生理盐水清洗送检组织沾带的血液;取约 50 mg 组织,加 1 mL 灭菌生理盐水用匀浆机研磨成组织匀浆,转移至 1.5 mL 离心管中,13 000 r/min 离心 5 min;沉淀直接加入 100 μ L 核酸提取液充分混匀,沸水浴 10 min,然后 13 000 r/min 离心 5 min,取上清 4 μ L 作为 PCR 反应模板。H₂O 作为阴性对照。将阳性对照品进行 10、100、1 000 倍梯度稀释,以用于定量

检测。

1.3.2 配置试剂与加样 取 $n \times 35$ μ L 耶氏肺孢子虫 PJ 核酸荧光 PCR 检测混合液与 $n \times 1$ μ L 内部对照品,以及 $n \times 0.4$ μ L 酶(Taq+UNG)(n 为反应管数),振荡混匀数秒,3 000 r/min 离心数秒。取上述混合液 36 μ L 置于 PCR 管中,然后将样品处理上清液、H₂O 和阳性对照品各加入 PCR 管中,盖好管盖后立即进行 PCR 扩增反应。

1.3.3 PCR 扩增 反应管置于 Lightcycler R480 qPCR 仪上,按以下循环参数进行设置:37 $^{\circ}$ C $\times$ 2 min,94 $^{\circ}$ C $\times$ 2 min,循环 1 次;再按 93 $^{\circ}$ C $\times$ 15 s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C $\times$ 60 s,循环 40 次;单点荧光检测在 60 $^{\circ}$ C,反应体系为 40 μ L。荧光通道检测选择:FAM 和 HEX(或 VIC/JOE)通道。基线调整 6~15 个循环的荧光信号,阈值设定为阈值线刚好超过 H₂O 检测荧光曲线的最高点。

1.3.4 结果处理 FAM 通道的 Ct 值(目的基因),H₂O 为 UNDET 或 40、阳性对照品 ≤ 35 时表示实验有效。对于待检样本,当 FAM 通道 Ct 值为 UNDET 或 40 时结果判读为阴性;当 FAM 通道 Ct ≤ 38 时,结果判读为阳性;当 FAM 通道 Ct 为 $>38 \sim <40$,需复查一次,如仍为 $>38 \sim <40$,则结果判读为阴性。

1.4 数据采集 通过四川大学华西医院实验室信息系统(LIS)采集患者 PJ 核酸检测结果,使用医院信息系统(HIS)收集患者临床信息,包括性别、年龄、民族、所属科室、诊断、治疗等,用于进一步统计分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析,对病例基本资料按 PJ DNA 检测结果分组进行统计分析,计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。同时按 10 岁的年龄间距分层和科室分布进行亚组分析,再对 PJ DNA 检测阳性病例按年龄分层和病种进行单独分析,采用 EXCLE 2007 进行数据的绘图和制表。

2 结果

2.1 疑似 PCP 病例基本资料 初始纳入疑似 PCP 病例 465 例,经剔除重复数据后最终纳入 361 例。患者年龄为 21~93 岁,平均(53.37 $\pm$ 16.46)岁。其中 PJ 核酸检测阳性病例 112 例,阳性率 31.02%,平均年龄为(48.63 $\pm$ 14.28)岁;PJ 核酸检测阴性病例 249 例,平均年龄(55.51 $\pm$ 16.95)岁。PJ 核酸检测阳性病例平均年龄较 PJ 核酸检测阴性病例低 6.88 岁($P = 0.008$,95%CI:3.26~10.50)。PJ 核酸检测阳性病例的男女比例和民族分布(藏族/汉族)分别为 73/39 和 7/105,PJ 核酸检测阴性病例分别为 177/72 和 8/241,差异均无统计学意义($P = 0.269$ 、0.252)。PJ 核酸检测阳性和阴性病例病死率分别为 8.93% 和 0.40%,差异有统计学意义($P < 0.001$,OR = 24.31,95%CI:3.07~192.40),结果见表 1。

2.2 PCP 病例年龄分布 按年龄分层(21~30 岁、

31~40 岁、41~50 岁、51~60 岁、61~<70 岁及≥71 岁)分别统计分析所有疑似肺孢子菌肺炎病例和 PJ 核酸检测阳性病例。年龄为 31~40 岁的疑似病例 PCP 发病率最高,达 46.51%(20/43),其次是 51~60 岁和 41~50 岁年龄段,发病率分别为 37.5%(27/72)和 36.78%(32/87);发病率最低的年龄段为≥71 岁病例,仅 14.75%(9/61),结果见图 1。112 例 PJ 核酸检测阳性患者中,41~50 岁年龄段病例 32 例(28.75%),占比最高,其次为 51~60 岁和 31~40 岁,分别为 27 例(24.11%)和 19 例(16.96%);占比最低仍为≥71 岁年龄段病例,仅 10 例(8.93%),见

图 2。
2.3 PCP 病例科室和病种分布 361 例疑似 PCP 患者不同科室 PJ 核酸检测百分比如图 3 所示,患者数量从高到低的科室依次为呼吸内科(158 例)、肾脏内科(45 例)、传染科(39 例)、急诊科(34 例)、其他(34 例)和 ICU(32 例)。发病率最高来自传染科,达 48.72%(19/39),其次是肾内科 44.44%(20/45)。PJ 核酸检测阳性病例中占比排名前 2 位的病种分别是 HIV 感染和移植患者,分别占 28%和 23%。其他还有自身免疫病(17%)、肾脏疾病(15%)、重症感染(13%)和血液系统肿瘤(4%),见图 4。

表 1 361 例疑似 PCP 患者基本资料

项目	PJ 核酸检测			OR(95%CI)
	阳性(n=112)	阴性(n=249)	P	
年龄(岁,±s)	48.63±14.28	55.51±16.95	0.008	Δ=6.88(3.26~10.50)
男/女(250/111)	73/39	177/72	0.269	0.76(0.47~1.23)
民族(藏/汉)	7/105	8/241	0.252	2.00(0.71~5.68)
病死率(% ,n/n)	8.93(10/112)	0.40(1/249)	<0.001	24.31(3.07~192.40)

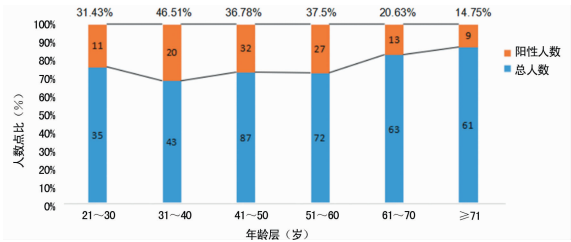


图 1 361 例疑似 PCP 患者不同年龄层 PJ 核酸检测百分比堆积柱形图

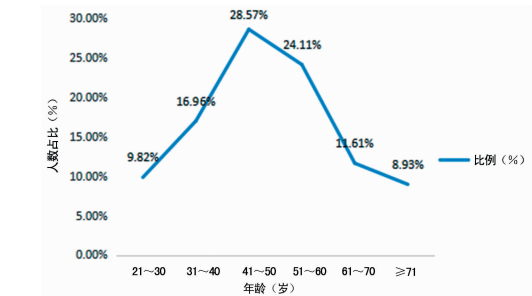


图 2 PJ 核酸阳性患者不同年龄层人数分布折线图(n=112)

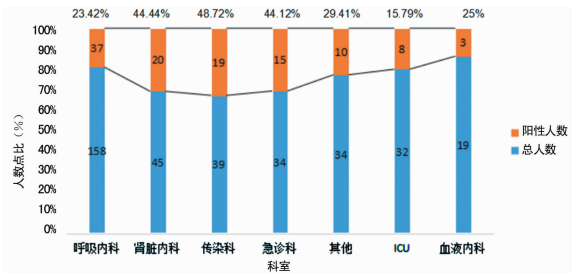


图 3 361 例疑似 PCP 患者不同科室 PJ 核酸检测百分比堆积柱形图

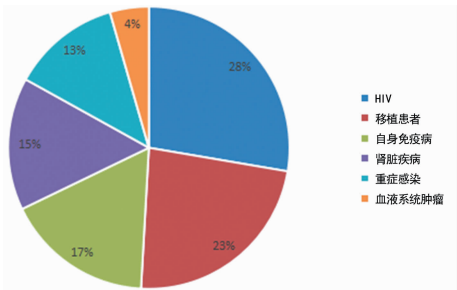


图 4 PJ 核酸阳性患者不同病种人数占比饼图(n=112)

3 讨 论

目前 PCP 发病率和病死率由于高效抗逆转录病毒疗法(HAART)和 PCP 预防用药的广泛应用有所控制,然而随着 HIV 感染、肿瘤发生、免疫抑制剂使用人群的增长,PCP 的发病率仍居高不下。本研究 PCP 总体发病率为 31.02%(112/361),比美国^[10]、希腊^[11]等西方国家高,也比撒哈拉以南非洲地区一项研究的 PCP 发病率(15.4%)高^[12],前者可能是地理、环境、气候和诊疗水平的差异所致。但本研究 PCP 发病率也比非洲国家高,这种现象可能是因为非洲 PJ 真正的低感染率,也可能是由于缺乏高灵敏度的诊断设施,或由于肺结核、细菌性肺炎等更加恶性的疾病造成的高病死率引起 PCP 易感人群在 PCP 发病之前已死亡。同时,本研究发现,PJ 核酸检测阳性病例平均年龄明显低于阴性结果病例,可能是由于各类免疫缺陷人群的年轻化所致。另外,PCP 患者男性比例高于女性,这与多数研究相符^[3,13-14],但疑似 PCP 病例的发病率在不同性别之间无明显差异。本研究中 PCP 总体病死率为 8.93%,在其他研究中,美国 PCP 患者总体病死率在 10.00%左右^[10],非洲总体病死率为

6.50%^[12], 结论比较接近, 但仍远高于 PJ 核酸检测阴性患者的病死率, 不容小觑。

从年龄分布来看, PCP 发病率最高的是 31~40 岁年龄段, 而 PCP 发病绝对人数最多的是 41~50 岁年龄段。31~60 岁患者构成了 PCP 患病的主力军, 这与上述 PJ 核酸检测阳性患者(48.63±14.28)岁的平均年龄相呼应。本研究结果比英国的 PCP 发病高峰年龄段(60~69 岁)低^[15], 但比非洲国家的高(平均年龄 35 岁)^[12]。从科室和病种分布来看, 位居前 2 位的分别是传染科和肾内科, 以及 HIV 感染和移植患者, 二者分别相对应。艾滋病患者仍然是 PCP 最高发的人群, 在许多研究中, PCP 发病率次于艾滋病患者的人群是血液系统肿瘤^[11,16-17], 而本研究的数据发现, 因肾脏疾病(如急慢性肾小球肾炎、肾病综合征、糖尿病肾病、IgA 肾病、紫癜性肾炎和狼疮性肾炎等)需使用免疫抑制剂(如糖皮质激素、甲氨蝶呤、环磷酰胺和骁悉等)而诱发 PCP 的人群正越来越多, 发病率达 44.44%。对于如此高的发病率, 医生与患者应该引起足够的重视。所以, 当使用免疫抑制剂的肾内科患者肺部出现 PCP 临床表现时, 临床医生应意识到及时进行 PJ 核酸检测, 以早诊断、早治疗, 改善患者预后, 降低病死率。

本研究第一次对中国西南地区 PCP 的流行病学数据进行了统计分析, 为 PCP 病因学的进一步研究打下基础, 为临床医生的诊疗提供一定的指导意义, 也为 PCP 的预防与控制提供数据支持。然而也有一些不足之处: 本研究只收集了四川大学华西医院门诊及住院送检的疑似 PCP 患者的数据, 不能完全反应 PCP 的人群发病情况。且只进行了流行病学数据的分析, 未进一步探讨 PCP 发病机制, 以及影响 PCP 发病率随年龄、病种等变化而产生差异的原因。

4 结 论

本研究采用 qPCR 技术对四川大学华西医院疑似 PCP 病例进行诊断, 发现 PCP 总体患病率为 31.02%, 总体病死率为 8.93%, 31~60 岁是 PCP 发病的高峰年龄段, 肾脏疾病正成为 PCP 的高发基础病种, 建议肾脏疾病相关医生形成发现患者肺部 PCP 临床表现及时送检 PJ 核酸检测的意识。PCP 仍然是免疫缺陷和免疫抑制剂长期使用患者的高发疾病, 也是主要死因之一, PCP 的诊治和防控还有很长的路要走。

参考文献

- [1] CATHERINOT E, LANTERNIER F, BOUGNOUX M E, et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia[J]. Infect Dis Clin North Am, 2010, 24(1): 107-138.
- [2] CUSHION M T. Are members of the fungal genus pneumocystis (a) commensals; (b) opportunists; (c) pathogens; or (d) all of the above[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(9): e1001009.
- [3] MORRIS A, NORRIS K A. Colonization by pneumocystis

- jirovecii and its role in disease[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(2): 297-317.
- [4] ROSTVED A A, SASSI M, KURTZHALS J A, et al. Outbreak of pneumocystis pneumonia in renal and liver transplant patients caused by genotypically distinct strains of Pneumocystis jirovecii[J]. Transplantation, 2013, 96(9): 834-842.
- [5] KOVACS J A, MASUR H. Evolving health effects of pneumocystis one hundred years of progress in diagnosis and treatment[J]. JAMA, 2009, 301(24): 2578-2585.
- [6] 曲丹, 马跃, 徐小曼, 等. 非 HIV 感染肺孢子菌肺炎患者临床特点及诊治分析[J]. 中国全科医学, 2014, 17(30): 3599-3601.
- [7] BENITO N, MORENO A, MIRO J M, et al. Pulmonary infections in HIV-infected patients: an update in the 21st century[J]. Eur Respir J, 2012, 39(3): 730-745.
- [8] 陈涛, 蒋忠胜. 肺孢子菌肺炎诊治的研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(22): 4489-4494.
- [9] 叶宁, 朱明利, 李茜茜, 等. 肺孢子菌肺炎实验室诊断研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(4): 604-605.
- [10] ENOCH D A, YANG H, ALIYU S H, et al. The changing epidemiology of invasive fungal infections[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1508 (Suppl 1): 17-65.
- [11] GAMALETSSOU M N, DROGARI-APIRANTHITOU M, DENNING D. An estimate of the burden of serious fungal diseases in Greece[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(7): 1115-1120.
- [12] WASSERMAN S A, ENGEL M, GRIESEL R, et al. Burden of pneumocystis pneumonia in HIV-infected adults in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Infect Dis, 2016, 45(1): 318-319.
- [13] CHEN M, TIAN X, QIN F, et al. Pneumocystis pneumonia in patients with autoimmune diseases: a retrospective study focused on clinical characteristics and prognostic factors related to death[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0139144.
- [14] WHITE P L, BACKX M, BARNES R A. Diagnosis and management of Pneumocystis jirovecii infection[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2017, 15(5): 1.
- [15] MAINI R, HENDERSON K L, SHERIDAN E A, Phin N et al. Increasing pneumocystis pneumonia[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(3): 386-392.
- [16] MESSIAEN P E, CUYX S, DEJAGERE T, et al. The role of CD4 cell count as discriminatory measure to guide chemoprophylaxis against Pneumocystis jirovecii pneumonia in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients: a systematic review[J]. Transpl Int, 2017, 19(2): 731-735.
- [17] LIU Y, SU L, JIANG S, et al. Risk factors for mortality from pneumocystis carinii pneumonia (PCP) in non-HIV patients: a meta-analysis[J]. Oncotarget, 2017, 8(35): 59729-59739.