

# 实时荧光 PCR 在艾滋病合并肺孢子菌肺炎诊断中的应用

田敬华 周淳 张伟 华文浩 万钢 张亮 陈志海

**【摘要】 目的** 应用实时荧光 PCR 技术与六甲基胺银(GMS)染色法对艾滋病合并肺孢子菌肺炎(PCP)患者支气管肺泡灌洗液(BALF)中的肺孢子菌进行检测,比较两种检测方法的性能。**方法** 应用实时荧光 PCR 技术与 GMS 染色对 57 例艾滋病合并肺部感染患者的 BALF 标本进行肺孢子菌检测,比较两种方法的检测效果。**结果** 收集本院 18 例艾滋病合并肺部感染患者的支气管灌洗液标本,采用实时荧光 PCR 技术检测肺孢子菌 DNA,结果显示 13 例为阳性,阳性率为 72.3% (13/18)。阳性标本肺孢子菌 DNA 定量为  $1.35 \times 10^3 \sim 8.24 \times 10^5$  拷贝/ml,平均  $(1.2 \pm 2.13) \times 10^5$  拷贝/ml;而 GMS 染色镜下检测,阳性率为 72.3% (13/18),二者具有极高的一致性。收集广州市第八人民医院 39 例艾滋病合并肺部感染患者的支气管灌洗液标本,实时荧光 PCR 检测肺孢子菌 DNA 结果显示 21 例为阳性,阳性率为 53.8% (21/39);而用 GMS 染色镜下检测,阳性率仅为 2.5% (1/18)。在标本量少的情况下,实时荧光肺孢子菌方法检测肺孢子菌的敏感性远高于 GMS 染色法。**结论** 对艾滋病合并肺孢子菌感染患者支气管灌洗液的肺孢子菌检测中,荧光肺孢子菌与 GMS 染色有极高的一致性,且敏感性明显高于后者。实时荧光肺孢子菌方法可快速、灵敏、特异性、定量地检测肺孢子菌 DNA,在 PCP 的诊断、治疗方案选择和疗效观察方面有重要的临床意义。

**【关键词】** 获得性免疫缺陷综合征;肺孢子菌;聚合酶链反应;六甲基胺银染色;支气管肺泡灌洗液

**Application of real-time fluorescence PCR in the diagnosis of pneumocystis pneumonia in AIDS patients** TIAN Jing-hua, ZHOU Chun, ZHANG Wei, HUA Wen-hao, WAN Gang, ZHANG Liang, CHEN Zhi-hai. Clinical Laboratory, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China  
Corresponding author: CHEN Zhi-hai, Email: chenzhihai0001@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To evaluate and compare real-time fluorescence PCR and Gomori's methenamine-silver (GMS) staining technique in detecting pneumocystis pneumonia (PCP) from bronchoalveolar lavage (BALF) specimens. **Methods** Total of 57 BALF specimens of AIDS patients with pulmonary infection were detected with *Pneumocystis* DNA by real-time fluorescence PCR and GMS staining. And test results of two kinds of methods were compared. **Results** Among 18 BALF specimens from our hospital, *Pneumocystis* DNA of 13 specimens were positively identified by real-time fluorescence PCR. The concentration of fluorescence *Pneumocystis* DNA was  $1.35 \times 10^3 \sim 8.24 \times 10^5$  copies/ml, with an average of  $(1.2 \pm 2.13) \times 10^5$  copies/ml. The positive rate was 72.32% (13/18), which was with the conventional GMS staining. There were 21 among 39 BALF specimens with *Pneumocystis* DNA positive from the hospital in Guangzhou. The positive rate of *Pneumocystis* DNA identified by real-time fluorescence PCR was 53.8% (21/39), while the positive rate of *Pneumocystis* DNA identified by GMS staining was only 2.5% (1/18). real-time fluorescence PCR was more sensitive than GMS staining, especially in less volume of samples. **Conclusions** Real-time fluorescence PCR and GMS staining have significantly consistency in detecting *Pneumocystis* DNA from BALF in AIDS patients. Real-time PCR is rapid, sensitive and specific, quantitative in detecting of PCP DNA, and would have broad application prospects in PCP diagnosis, treatment options and efficacy observation.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.03.006

基金项目:“十一五”国家科技重大专项《艾滋病机会性感染和减少 HAART 毒副作用中医药治疗方案/方法研究》(No. 2008ZX10005-003G),《中医药防治艾滋病临床科研基地建设》(No. 2009ZX10005-014)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院

通讯作者:陈志海,Email: chenzhihai0001@yahoo.com.cn

【Key words】 Acquired immune deficiency syndrome; *Pneumocystis jirovecii*; Polymerase chain reaction; Gomori's methenamine-silver staining; Bronchoalveolar lavage fluid

肺孢子菌(*Pneumocystis*)为条件性致病真菌,具有宿主种特异性<sup>[1]</sup>。引起人肺孢子菌肺炎(pneumocystis pneumonia, PCP)的是伊(耶)氏肺孢子菌(*Pneumocystis jirovecii*)。PCP 是获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)和其他免疫缺陷患者所伴有的常见肺部机会性感染<sup>[2]</sup>。PCP 临床症状严重,病死率高<sup>[3]</sup>,故选择一种敏感、特异的诊断方法对 AIDS 合并 PCP 的早期诊断至关重要。

本研究采用实时荧光 PCR (real-time fluorescence PCR)方法对艾滋病合并肺部感染患者的支气管灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中肺孢子菌 DNA 进行定量检测,同时与六甲基四胺银(Gomori's methenamine-silver, GMS)染色法进行比较,探讨实时荧光 PCR 法对艾滋病合并 PCP 的诊断价值,现报道如下。

### 资料与方法

#### 一、研究对象

2010 年 1 月至 2010 年 12 月首都医科大学附属北京地坛医院与广州市第八人民医院共收治艾滋病合并肺部感染患者 60 例。其中,男性 43 例,女性 17 例,男女比例为 2.5:1;年龄为 18~65 岁,平均年龄( $37.07 \pm 9.5$ )岁。 $CD4^+$  T 淋巴细胞计数为( $52.2 \pm 94.2$ )个/ $\mu$ l。本研究共收集 57 份支气管肺泡灌洗液(BALF),其中,自首都医科大学附属北京地坛医院获取 BALF 标本 18 份,自广州市第八人民医院获取 39 份。

#### 二、艾滋病合并肺部感染的诊断及入选标准

艾滋病诊断标准参照《国家艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准(WS 293-2008)》。艾滋病合并肺部感染诊断标准:(1)艾滋病患者新近出现咳嗽、咳痰,或原有呼吸道疾病症状加重,并出现脓性痰;伴或不伴胸痛;(2)发热;(3)肺实变体征和(或)湿啰音;(4)WBC  $> 10 \times 10^9/L$  或  $< 4 \times 10^9/L$ ,伴或不伴有核左移;(5)胸部 X 线检查显示片状、斑片状浸润性阴影或间质性改变,伴或不伴有胸腔积液。以上 1~4 项中任何 1 项加第 5 项,并除肺结核、肺部肿瘤、非感染性肺间质性疾病、肺水肿、肺不张、肺栓塞、肺嗜酸性粒细胞浸润症、肺血管炎等,即可建立临床诊断。

入选标准:(1)患者抗-HIV 阳性;(2)符合肺部感染诊断;(3)年龄为 18~65 岁;(4)24 h 内胸片检

查不考虑肺结核者;(5)无严重心、肾等重要脏器疾病;(6)受试者均自愿并签署知情同意书。

#### 三、方法

1. 标本收集:支气管肺泡灌洗液的收集:在患者身体情况允许条件下,采用纤维支气管镜方法采集样本。于要灌洗的肺段注入 2%利多卡因 1 ml 局部麻醉后,将纤维支气管镜前端嵌入段或亚段支气管开口。经纤维支气管镜吸引管推注注射用生理盐水至肺段或亚段支气管,每次注入后随即负压吸引。灌洗部通常在肺右中叶或左舌叶(弥漫性肺病)。胸片提示明显异常肺段亦可作为灌洗部位。灌洗液一般为 37℃,有助于预防咳嗽和支气管痉挛,20~50 ml/次,总量 100~250 ml,不应超过 300 ml。负压吸引压力约为 50~80 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa),要防止负压过大、过猛。超过规定的负压吸引会导致远端气道陷闭,减少回收量。中叶或舌叶灌洗液回收量应在 40% 以上,下叶或其他肺叶为 30% 以上。

2. 检查技术:(1)抗-HIV 检测:经治医院初筛抗-HIV-1 阳性,地方疾病预防控制中心确认阳性。

(2)免疫学检查: $CD4^+$  T 淋巴细胞检测采用 BD\_FACSCalibur 流式细胞仪, TriTEST 三色试剂, MultiTEST 四色试剂及 FACS 溶血素。通过绝对计数进行质控。

(3)GMS 染色:将支气管肺泡灌洗液 BALF 行细胞涂片制片,固定后经 5% 过碘酸钠氧化,20℃ 温育 12 min,流水及蒸馏水冲洗数秒,晾干;置于 GMS 染液中,60℃ 温育 90 min 至标本转为黄褐色,流水冲洗 5 min,蒸馏水冲洗 3~4 次;0.1% 氯化金褪色 2~5 min,蒸馏水冲洗 4~5 次;2% 硫代硫酸钠分化 5 min,流水冲洗 10 min 以上,蒸馏水洗 2~3 次;伊红复染 2 min,蒸馏水冲洗数次;分别以 95%、99% 和 100% 乙醇逐级脱水各 5 min;二甲苯透明 30 min,树胶封片后在油镜下(1000×)进行逐个视野检查。

(4)实时荧光 PCR 法:引物和试剂均由上海之江生物科技有限公司提供;采用 ABI 7300 荧光 PCR 仪检测。样本 DNA 的提取按照试剂盒说明书进行:取 400  $\mu$ l BALF 样本,13 000 rpm 离心 2 min,弃上清。沉淀直接加入 100  $\mu$ l 核酸提取液充分混匀,沸水浴 10 min,然后 13 000 rpm 离心 10 min,取上清 4  $\mu$ l 作为 PCR 反应模板。扩增条件为 37℃ 2 min; 94℃ 2 min 预变性;循环 1 次,再按 93℃ 15 s, 60℃ 60 s 循环 40 次;单点荧光检测:60℃,反应体系为

40  $\mu$ l。荧光通道检测选用 FAM 和 HEX (或 VIC/JOE) 通道。所有实验均按试剂盒提供的定量阳性质控校准品做质控和标准曲线,同时设置内部对照并以  $H_2O$  作为阴性对照。反应结束后,由电脑自动分析计算定量结果。阈值设定原则为阈值线刚好超过  $H_2O$  阴性对照的最高点。检测系统检测下限为  $10^3$  拷贝/ml,线性检测范围为  $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$  拷贝/ml。

#### 四、统计学处理

实验数据采用 SAS 9.2 统计学软件进行分析,两组间一致性检验用 McNemar 检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 结 果

#### 一、GMS 染色法结果

镜下背景为粉红色,PCP 包囊内有 4~8 个囊内小体,细胞核呈黑色,囊壁不着色,但可见明显的轮廓,见图 1。首都医科大学附属北京地坛医院所分离的 18 份支气管肺泡灌洗液标本中有 13 份 GMS 染色镜检肺孢子菌阳性,阳性率为 72.2%。广州市第八人民医院所分离的 39 例标本中,GMS 染色肺孢子菌阳性者 1 例,阳性率为 2.5%。两家医院 GMS 染色检测肺孢子菌阳性率差异较大,GMS 染色结果阳性率极低,原因是标本仅 2 ml,量较少而不能满足 GMS 染色实验所需。临床常规 GMS 染色是将 20~50 ml BALF 离心后进行细胞计数并进一步进行 GMS 染色。故北京方医院 BALF 标本 GMS 染色结果参考临床常规留标本检测结果报告,即用 20~50 ml BALF 标本所得的结果,较为精准。

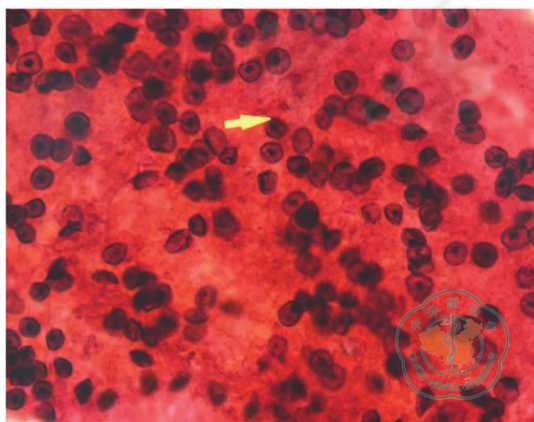


图1 支气管肺泡灌洗液 GMS 染色(伊红复染)

#### 二、Real-time PCR 法结果

PCP 的定量阳性质控校准品经 real-time PCR,以起始拷贝数的对数为横坐标,以  $C_t$  值为纵坐标,

制作标准曲线,线性相关系数  $r = 0.9977$ ,肺孢子菌 DNA  $> 10^3$  拷贝/ml 为阳性。根据此标准,首都医科大学附属北京地坛医院 18 例标本中 13 例肺孢子菌 DNA 阳性,阳性率为 72.2% (13/18)。阳性标本肺孢子菌 DNA 为  $1.35 \times 10^3 \sim 8.24 \times 10^5$  拷贝/ml,平均  $(1.20 \pm 2.13) \times 10^5$  拷贝/ml。广州市第八人民医院标本肺孢子菌 PCR 阳性为 21 例,阳性率为 53.8% (1/39)。

#### 三、GMS 染色与 real-time PCR 技术检测方法一致性检验

首都医科大学附属北京地坛医院所收集标本的肺孢子菌检测中 GMS 染色与 real-time PCR 行一致性检验,结果显示两种方法一致性极高,见表 1。

表1 Real-time PCR 和 GMS 染色法在肺孢子菌检测中一致性的检验

方法	GSM 染色[例(%)]		合计(例)
	阳性	阴性	
荧光 PCR			
阳性	12 (66.7%)	1 (5.6%)	13
阴性	1 (5.6%)	4 (22.2%)	5
合计	13 (72.2%)	5 (27.8%)	18

注: McNemar 检验:  $S = 0.0000$ ,  $P = 1.000$ ,  $Kappar: 0.7231$  (0.3643, 1.000)

### 讨 论

肺孢子菌肺炎是一种由子囊菌类的真菌耶氏肺孢子菌引起的机会性感染<sup>[4]</sup>。此菌发现至今已有 100 余年的历史。1909 年,Chagas 在豚鼠肺组织中首次发现了含有 8 个孢子包囊的寄生虫,于 1912 年由 Delanoe 夫妇将其命名为卡氏肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii*)。1952 年, Vanek 和 Jirovec 从肺炎死亡患者的肺渗出液中检测到肺孢子虫,证实该虫对人类有致病性,可引起肺孢子虫肺炎 (PCP)。肺孢子虫过去被认为属于原虫,直至 1988 年后依据其超微结构和其核糖体 RNA 的分子种系发育分析认为肺孢子菌属真菌类。Hibbett 将其归为真菌界,子囊菌门,外囊菌亚门,肺孢子菌纲,肺孢子菌目,肺孢子菌科,肺孢子菌属。肺孢子菌发育上有 4 种形态:滋养体、包囊、前包囊和子孢子。2001 年,在美国俄亥俄州召开的关于机会性原生生物国际研讨会上,肺孢子菌才正式得以命名。由肺孢子虫代替卡氏肺孢子虫成为属,按照国际植物学命名法规,将感染人的肺孢子虫命名为伊氏肺孢子虫 (*P. jiroveci*),借以纪念首次发现人体感染肺孢子虫肺炎的捷克寄生虫病学家伊诺维奇 (Otto Jirovec)。同时,肺孢子



虫肺炎的英文缩写仍旧为 PCP (pneumocystis pneumonia)<sup>[5]</sup>。

PCP 自发现后一直为少见疾病,直至 1981 年被发现是艾滋病患者的标志性疾病后,PCP 才得到广泛关注。资料证实,人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数目越低,感染 PCP 的几率越高。目前国外研究认为当 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数  $\leq 200/\mu\text{l}$  时,PCP 发病率极高,但该标准对小儿尤其 1 岁以内的婴儿并不适用。复方新诺明的广泛应用使得 HIV 感染者合并感染的控制有了显著进步,但免疫重建使 PCP 仍是艾滋病患者最常见的机会性感染之一<sup>[6]</sup>。有研究发现,HIV 感染者肺部感染中 85% 病原是肺孢子菌,75% 的 HIV 感染者一生中会发生 PCP<sup>[7]</sup>。本研究中两家医院 AIDS 合并肺部肺孢子菌感染率分别为 72.3% 和 53.8%,与国外文献报道接近,但略低。我国相关文献也同样报道 PCP 发病率较国外低,但不能说明我国 PCP 发病率低,而是与该疾病诊断检测手段存在不足有关<sup>[8]</sup>。

PCP 的临床症状和体征并不明显,临床上诊断较困难。肺孢子菌目前尚不能体外培养,诊断通常依赖呼吸道标本经特殊染色后在显微镜下镜检确诊。标本可以为 BALF、诱导痰标本或肺活检组织,其中痰液标本易取,但检出率较低。本研究选择了进行支气管镜操作的患者留取支气管肺泡灌洗液(BALF),大大提高了 PCP 的阳性检出率。标本制成涂片干燥后,可进行六甲基四胺银(GMS)染色或甲苯胺蓝 O 染色或甲醇-吉姆萨染色,可以将肺孢子菌包囊或孢母细胞着色。前者是目前公认确认肺孢子菌的染色方法<sup>[9]</sup>。但病原学诊断的敏感性受肺孢子虫形态和生活时期的限定,且与染色、镜检技术和标本来源密切相关,染色方法检出率较低。商品化的荧光或酶标记肺孢子菌的单克隆或多克隆抗体检测可以提高检出灵敏度,但血清抗体检测因健康人群抗肺孢子菌抗体阳性率较高而无临床意义<sup>[10]</sup>。普通定性 PCR 可以检测低水平的 PCP DNA,但无法区分活动性肺炎还是定植菌。PCR 诊断 PCP 的应用价值虽然得到积极评价,但其难以区分隐性和显性感染<sup>[11]</sup>。

实时荧光 PCR 是在常规 PCR 技术基础上发展起来的一种新型定量检测法。荧光 PCR 引入荧光分子,通过荧光信号按比例增加来反映 DNA 载量的增加,能敏感地检测初始模板浓度及基因变异等情况。该技术采用的引物与探针双重保证了检测系统的特异性,而且探针与模板结合所要求的特异性更

强,故克服了传统 PCR 技术普遍存在的假阳性和不能定量等缺点。该技术将基因扩增、分子杂交及荧光化学合为一体,使 PCR 扩增和产物分析的全过程在单管封闭条件下进行,解决了 PCR 扩增产物污染的问题。本研究结果提示,实时荧光 PCR 与传统的六胺银染色(GMS)法检测结果一致性极高。系统检测下限为  $10^3$  拷贝/ml,确保了实时荧光 PCR 较好的特异性,对鉴别 PCP 患者和肺孢子菌携带者具有重要的临床意义<sup>[12]</sup>。肺孢子菌 DNA  $< 10^3$  拷贝/ml 的病例可能为慢性携带肺孢子菌状态,但需给予定期随访以确保该类患者肺孢子菌非 PCP 的早期感染。此外,实时荧光 PCR 具有非六胺银染色(GMS)方法所不能比拟的高敏感性,尤其在极少的标本量下即可完成试验。

实时荧光 PCR 方法可快速、灵敏、特异性、定量检测肺孢子菌 DNA,在肺孢子菌感染的诊断、治疗方案选择和疗效观察方面具有广泛的应用前景。

#### 参 考 文 献

- 1 Edman JC, Kovacs JA, Masur H, et al. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature*, 1988, 334(6182):519-522.
- 2 Kovacs JA, Masur H. Evolving health effects of *Pneumocystis*: one hundred years of progress in diagnosis and treatment. *JAMA*, 2009, 301(24):2578-2585.
- 3 李凌华,唐小平,邓西龙,等. 艾滋病合并肺孢子菌肺炎 69 例临床分析. *中华传染病杂志*, 2008, 26(12):739-743.
- 4 Thomas CF Jr, Limper AH. *Pneumocystis pneumonia*. *N Engl J Med*, 2004, 350(24):2487-2498.
- 5 翁心华. 卡氏肺孢子虫的重新命名与分类. *中华内科杂志*, 2005, 44(9):717.
- 6 Sepkowitz KA. Opportunistic infections in patients with and patients without acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis*, 2002, 34(9):1098-1107.
- 7 Lu JJ, Lee CH. *Pneumocystis pneumonia*. *J Formos Med Assoc*, 2008, 107(11):830-842.
- 8 汪习成,黄晓婕,张彤,等. HIV/AIDS 患者机会性感染特点分析. *中华内科杂志*, 2007, 46(5):379-382.
- 9 陈锡慰. 改良银染色法鉴定卡氏肺孢子虫的研究. *动物学杂志*, 1995, 30(1):40-42.
- 10 Lautenschlager I, Lyytikäinen O, Jokipii L, et al. Immunodetection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens compared with methenamine silver stain. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(3):728-730.
- 11 安亦军,黄敏君,郭增柱. PCR 及 GMS 染色法对肺孢子菌肺炎的临床诊断价值. *中国寄生虫病防治杂志*, 2005, 18(4):262-264.
- 12 王建成,黄敏君,安亦军,等. 实时荧光 PCR 检测非 HIV 感染人群肺孢子菌核酸载量. *中华检验医学杂志*, 2010, 33(2):157-160.

(收稿日期:2011-12-28)

(本文编辑:孙荣华)

田敬华,周淳,张伟,等. 实时荧光 PCR 在艾滋病合并肺孢子菌肺炎诊断中的应用[J/CD]. *中华实验和临床感染杂志:电子版*, 2012, 6(3):198-201.