DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.012
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 10
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 200

文章编号:1000-5404(2003)10-0867-03

论著

血浆beta-葡聚糖检测用于大鼠系统性念珠菌感染诊断的评价

廖 军,郝 飞,钟白玉,王 莉,王 鲁 (第三军医大学附属西南医院皮肤科,重庆 400038)

提 要:目的 评价血浆beta-葡聚糖定量检测方法诊断系统性念珠菌感染的价值。方法 建立G试验方法定量检测血浆beta-葡聚糖浓度。结果 在40只系统性念珠菌感染动物模型(经内脏组织真菌培养证实为白念珠菌感染)中,血浆beta-葡聚糖浓度随病程延长而逐渐增高,感染组与对照组相比有显著性差异($P<0.001$)。敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为80%、100%、100%和55.6%。血浆beta-葡聚糖阳性结果明显早于组织病理。结论 利用G试验定量检测血浆beta-葡聚糖,方法简便,结果稳定,可用于系统性念珠菌感染的早期辅助诊断。

关键词:系统性念珠菌感染;G试验;beta-葡聚糖
中图法分类号:R446.1;R519.3 文献标识码:A

Evaluation of the plasma beta-glucan detection in the diagnosis of systemic candidiasis

LIAO Jun, HAO Fei, ZHONG Bai-yu, WANG Li, WANG Lu (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical value of the quantitative detection of plasma beta-glucan in systemic candidiasis. Methods The beta-glucan concentrations were detected by using a G test. Results In 40 Wistar rats with deep mycosis (confirmed by fungus culture), the levels of (1→3)-beta-D-glucan were positively correlated with infectious severity. The sensitivity, specificity, positive predictive rate and negative predictive rate were 80%, 100%, 100% and 55.6% respectively, which were significantly higher than those of the control group ($P<0.001$). Conclusion The quantitative method for the detection of beta-glucan in plasma is simple, sensitive and reliable, and can be used as the assisting diagnosis of systemic candidiasis at early stage.

Key words: systemic candidiasis; G test; Beta-glucan

近年来,由于抗生素及免疫抑制剂的广泛应用,系统性真菌感染发病率越来越高[1]。系统性真菌感染临床无特征性表现,传统的检测手段难以满足临床需要。故建立早期快速诊断方法对于患者的及时治疗及改善预后显得尤为重要。(1→3)-beta-D-葡聚糖是真菌的重要组成成分之一,国外作者通过对血清/血浆中(1→3)-beta-D-葡聚糖的检测,发现其对系统性真菌感染的诊断有重要价值[2],目前国内尚未见文献报道。我们在制备系统性念珠菌感染模型的基础上,首次在国内建立了G试验方法检测血浆(1→3)-beta-D-葡聚糖的水平并评价其在系统性念珠菌感染中的诊断价值,为其在临床推广应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 实验用白念珠菌为本科临床分离菌株白17,实验前经培养,多次分离,经血清芽管试验、米粉Tween-80产生厚壁孢子试验、糖发酵及同化试验鉴定后,转种于沙堡固体培养基37 ℃孵育3 d,用生理盐水制备为约1×10^8/ml的孢子悬浊液,置4 ℃冰箱保存备用。

1.1.2 实验动物 Wistar大鼠,约10周龄,体质量约150 g,雌雄各半。由本校实验动物中心提供。

1.1.3 实验分组 取Wistar大白鼠40只,分为4组,每组各10只。每只大白鼠尾静脉各注射白念珠菌悬浊液0.2 ml,于注射后3、6、12 h和24 h自腔静脉取血,3 000 r/min离心10 min,取上清于-80 ℃冻存待检,并无菌操作取部分肝、肾及肺等组织行真菌培养,余组织于10%福尔马林溶液中固定、石蜡包埋待检。另取健康10只Wistar大鼠,未做处理,标本收集及处理方法同上。

1.2 研究方法

1.2.1 G试验检测

1.2.1.1 原理 鲎试验是一种用于检测内毒素的试验[3]。当机体发生革兰阴性杆菌感染时,体内产生大量内毒素,后者在体外可特异性激活C因子和B因子,最终使硝基产色反应底物呈显色反应,即鲎试验阳性。(1→3)-beta-D-葡聚糖可特异性激活G因子(一种自日本马蹄蟹提取的协同凝集酶),从而旁路激活鲎试验,这一过程称为G试验,其原理[4]见图1。

基金项目:重庆市科技计划资助项目(2000-8-185)
作者简介:廖 军(1972-),女,贵州省习水县人,博士研究生,医师,主要从事医学真菌学方面的研究。电话:(023)68754773
收稿日期:2002-08-06;修回日期:2002-12-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

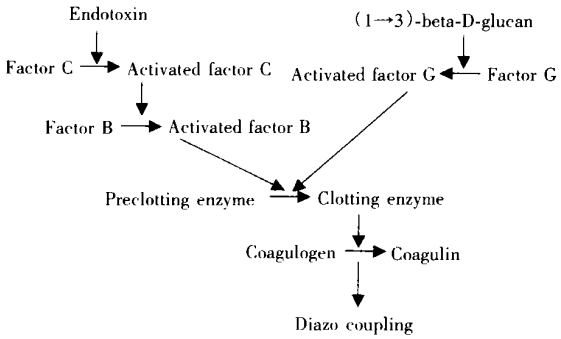


图1 内毒素和(1→3)-beta-D-葡聚糖激活鲎变形细胞溶解物反应原理

Fig 1 Principle of G test and conventional limulus test

1.2.1.2 操作步骤 ①以无菌管抗凝收集血标本后立即于3 000 r/min 离心 10 min，取上清于－80 ℃冻存待检；②待检上清标本各取 100 μl，加入高氯酸 200 μl 后，于 37 ℃孵育 20 min 后，离心取上清 25 μl，加入 96 孔微孔板中(预先每孔加入 KOH 溶液25 μl 预防交叉污染)；③在微孔板中加入主要反应试剂 G 因子50 μl，于37 ℃孵育30 min；④加入终止反应的重氮偶联试剂，混匀后于波长 545～630 nm(主波 545 nm，次波 630 nm)下测定其 *A* 值，每次均同时做空白及阳性对照；⑤ 按试剂盒说明公式将 *A* 值换算为相应的血浆(1→3)-beta-D-葡聚糖浓度。

注意事项：全部玻璃试管及不锈钢镊子经 250 ℃，干烤 2 h 去热原；塑料制品如移液枪头、96 孔微孔板及 1 ml EP 管均经30%过氧化氢密闭浸泡 4 h 后，置 37 ℃烤箱中烘干。

1.2.1.3 结果判断 (1→3)-beta-D-葡聚糖浓度高于 20 pg/ml 为阳性，否则为阴性(试剂盒推荐诊断界值)。

1.2.2 真菌组织学检查 所有实验动物内脏组织于沙堡琼脂培养基中行真菌培养并鉴定。

1.2.3 组织病理和组织中真菌观察 每份石蜡标本连续切片5张，分别行HE和PAS染色。

1.3 统计学处理

各组样本均数比较采用方差分析。

2 结果

10 例健康对照血浆(1→3)-beta-D-葡聚糖浓度为(4.809±0.332)pg/ml，均低于 10 pg/ml 呈阴性。40 只实验动物经内脏真菌培养证实为白念珠菌感染，血浆(1→3)-beta-D-葡聚糖浓度随病程延长而逐渐增高，见图2，其中有32只血浆(1→3)-beta-D-葡聚糖浓度高于 20 pg/ml，8 只低于 20 pg/ml。敏感性为 80%，特异性为 100%，阳性预测值为 100%，阴性预测值为55.6%。

经统计学处理，结果发现实验组血浆(1→3)-beta-D-葡聚糖浓度值明显高于健康对照组，呈非常显著性差异($P<0.001$)。各实验组之间比较，呈显著性差异($P<0.01$)。

组织病理阳性出现于感染 24 h 后，40 只实验组标本组织病理中有 8 只感染组织中可见多灶性脓肿或微脓疡，内含分枝分叉的假菌丝、芽孢和大量的中性粒细胞，形态学上诊断为念珠菌病，32 只感染组织中仅见大量的中性粒细胞浸润，未见明显菌丝或假菌丝结构诊断为真菌感染阴性；10 只健康对照组织中未见明显异常诊断为阴性。组织病理的敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为 20%、100%、100%和 23.8%。

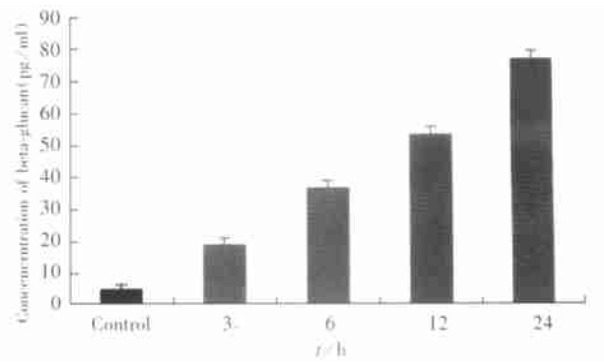


图2 健康对照组与感染组(1→3)-beta-D-葡聚糖浓度含量

Fig 2 Concentration of (1→3)-beta-D-glucan in the plasma of normal control and infections group

3 讨论

临床上诊断系统性真菌感染常常遇到困难，其病情缺乏特异性表现，因而系统性真菌感染的早期快速诊断对于患者的及时治疗显得非常重要。常规的检测方法主要有血培养、组织活检以及 PCR，但血培养和组织活检阳性率很低，PCR 假阳性率又较高，定量程序复杂且价格昂贵，因而，它们在临床上所起的作用都极为有限。目前检测体液中真菌组成成分和代谢产物用于诊断系统性真菌感染已做了较多工作，其中(1→3)-beta-D-葡聚糖备受关注[2]。

G 试验是传统鲎试验的改良，对(1→3)-beta-D-葡聚糖特异性敏感。在我们建立的系统性念珠菌感染动物模型中，我们应用 G 试验检测血浆(1→3)-beta-D-葡聚糖浓度以评价其在系统性真菌感染中的诊断价值。实验结果表明，血浆(1→3)-beta-D-葡聚糖水平在体内的变化与病程呈平行关系，G 试验的敏感性为 80%，特异性为 100%，阳性预测值为 100%，阴性预测值为 55.6%，拥有较好的敏感性和特异性，提示可用于系统性念珠菌感染的检测。由于 G 试验阳性结果明显早于同期组织病理，提示有利于系统性真菌感染的早期诊断，且 G 试验可作为感染严重程度的动态监测指标之一。尽管 G 试验不能鉴定真菌的种属，但由于可提示体内真菌感染的存在。因此，在临床上检测到血清或血浆 beta-葡聚糖浓度增高时，如果在继续寻找病因的同时就立刻进行抗真菌治疗是极为有益的。

(1→3)-beta-D-葡聚糖是真菌细胞壁的重要组成成分之一，仅存在于真菌胞壁中，而细菌及人体细胞无类似结构，从理论上保证其检测方法有良好的特异性。但由于G试验是一敏感性极高的微量实验，一些外在

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

因素如实验条件的不完善, 取血和实验操作过程中造成的污染均可导致实验呈假阳性或实验结果不够稳定。另外, 国外文献提示, G 试验不可用于检测隐球菌感染, 原因可能是因为隐球菌具有厚壁孢膜不利于吞噬细胞的吞噬, 从而导致 G 试验反应呈假阴性[5]。同样地, 由于临床肺曲霉球多有厚壁空洞的包绕, 真菌胞壁的残余结构将难以被释放入血, 因而血中 beta-葡聚糖浓度也不会增高[6]。溶血患者和肾衰透析患者 G 试验可呈假阳性[7], 一些抗肿瘤药物如香菇菌多糖和磺胺类药物的使用也可使 G 试验呈假阳性[8,9]。本研究从实验感染动物中已经显示其有早期诊断和判断病情严重程度的价值, 但需在临床应用中得到证实。

参考文献:

[1] Reiss E, anaka K, Bruker G, *et al*. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infection[J]. Med Mycol, 1998, 36(Suppl 1): 249—257.

[2] Kawayama T and Oizumi K. Clinical features of deep mycosis in critical care center-comparison of serological tests and cultures for mycosis[J]. Kansenshogaku Zasshi, 1999, 73(8): 743—748.

[3] Lehner M D, Hartung T. Endotoxin tolerance-mechanisms and beneficial effects in bacterial infection[J]. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2002, 144(2): 95—141.

[4] Matsumoto T, Haraoka M, Kubo S *et al*. Beta-glucan concentrations detected by Toxicolor and Endospecy tests in the urine of patients with urinary fungal infections[J]. Urol Res, 1993, 21(2): 117—120.

[5] Yoshida M, Roth R I, Grunfeld C, *et al*. Soluble (1→3)-beta-D-glucan purified from Candida albicans: biologic effects and distribution in blood and organs in rabbits[J]. J Lab Clin Med, 1996, 128(1): 103—114.

[6] Yoshida K, Niki Y, Ohno M *et al*. Clinical significance of (1→3)-beta-D-glucan in pleural effusion and liquor[J]. Kansenshogaku Zasshi, 1997, 71(12): 1210—1215.

[7] Mahanty S, Greenfield R A, Joyes W A, *et al*. Inoculation candidiasis in a murine model of severe combined immunodeficiency syndrome[J]. Infect Immun, 1993, 123(1): 9—17.

[8] Kawagoe T, Nakao A, Kanbe T, *et al*. Measurement of (1→3)-beta-D-glucan in an experimental model of systemic candidiasis[J]. Eur Surg Res, 1998, 30(2): 290—296.

[9] Miyazaki T, Kohno S, Misutake K, *et al*. Plasma (1→3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis and cryptococcosis[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(12): 3115—3118.

(编辑　张大春)

(上接 861 页)

2.2　实验室检查结果, 见表 2

表 2　实验室检查结果($\bar{x} \pm s$)

测量指标	治疗前	治疗后
血红蛋白(g/L)	125.6 ±20.4	125.4 ±21.30
TLC(10^9/L)	1.56±0.21	1.63±0.31
总蛋白(g/L)	70.20±5.40	68.90±4.80
白蛋白(g/L)	40.10±1.80	39.5 ±6.30
血清钠(mmol/L)	142.23±21.00	144.3 ±28.50
血清钾(mmol/L)	4.75±0.50	4.65±0.42
血清氯(mmol/L)	103.10±12.40	100.40±9.40
血　糖(mmol/L)	4.59±0.32	4.89±0.75
Tch　(mmol/L)	4.91±2.61	4.85±2.54
TG　(mmol/L)	1.54±0.41	1.48±0.32

3　讨论

肠内营养治疗是危重病人临床综合治疗中极为重要的组成部分, 营养治疗是否及时合理, 对于昏迷病人的苏醒及减少并发症有极为重要的作用[1]。昏迷病人由于病情危重不能进食, 加之液体量的限制、能量及营养素供给不足病人体重减轻明显, 随着病程的延长往往出现营养不良。TSF 是最常用的评价脂肪储备及消耗的良好指标、MAMC 是评价肌肉消耗程度的简便和快速的指标, 正常值应>90%。本组病人营养支持前后测定 TSF、MAMC 的值都在 80% ~90% 之间提示有轻度体脂消耗及肌蛋白消耗, 但支持前后相比测量值无明显变化; 实验室各项检测指标在营养支持前后测定都在正常范围, 提示营养支持有效。体重评价是了解病人营养状况最常用最简单的方法, 也是评价营养状况重要和可信的指标, 因本组病人均为昏迷卧床病人, 未测定体重和身高, 故未作为营养状况评价的指标。

目前的观点认为危重病人总能量可按其基础能量需要的 1.2~1.5 倍供给。总热量中蛋白质提供的能量应占 20% ~25%, 碳水化合物应占 50% ~60%。本组病人每天肠内供能为 6 280kJ, 加之静脉输入的葡萄糖等液体, 平均全天总能量供给约为 7 536 kJ。考虑老年人肾功能逐渐减退[2], 体内代谢过程以分解代谢为主, 需要优质蛋白质来补充组织蛋白的消耗, 故蛋白质供给量仅占总热能的 16%, 优质蛋白占总蛋白质的 69.3%。

一般认为, 使用大分子的非要素饮食类营养制剂进行营养治疗时, 不会引起谷氨酰胺不足或缺乏所致的肠功能障碍。本组病人所用的匀浆膳是用新鲜天然食物加工制作而成, 是一种能量充足, 营养素种类齐全的平衡膳食, 并且可以根据病情任意调整能量及营养素比例, 可以长期使用。渗透压低对胃肠道无刺激, 易于消化吸收, 尤其适合胃肠功能差的重症老龄患者。还因其富含粗纤维, 可以预防便秘[3]。

关键词: 老年; 管饲; 营养
中图法分类号: R459.3　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 蔡东联. 实用营养师手册[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 1998. 316—340.

[2] 陈仁淳. 现代临床营养学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 316—317.

[3] Deitch E A. Bacterial translocation of the gut flora[J]. J Trauma, 1990, 30(12 Suppl): S184—189.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net