

非艾滋病病毒感染临床病例肺孢子菌肺炎的流行病学研究

孙岚 黄敏君 安亦军 郭增柱

【摘要】 目的 了解非 HIV 感染临床病例肺孢子菌肺炎(PCP)的流行现状。方法 用六亚甲基四胺银(GMS)染色镜检和 PCR 对 851 例非 HIV 感染肺炎患者进行检测,从患者痰液或支气管肺泡灌洗液中查到肺孢子菌包囊或 DNA 为确诊 PCP 的依据。结果 851 例肺炎患者中,肺孢子菌 GMS 阳性 123 例(14.5%),PCR 阳性 202 例(23.7%);有免疫功能低下表现的肺炎患者肺孢子菌检出率最高,GMS 和 PCR 阳性率分别高达 28.2% 和 39.4%;在高龄慢性病患者和无明确免疫受损史、肺感染原因待查患者中亦检出 PCP 患者,GMS 阳性率分别为 8.7% 和 10.9%,PCR 阳性率分别为 17.5% 和 19.6%。结论 非 HIV 感染临床病例发生 PCP 的风险较高,临床医师应注意鉴别有无 PCP 的可能。

【关键词】 肺孢子菌肺炎; 艾滋病病毒感染; 临床病例; 流行病学研究

An epidemiologic study on *Pneumocystis pneumonia* in non-HIV infected patients in China SUN Lan, HUANG Min-jun, AN Yi-jun, GUO Zeng-zhu. Beijing Tropical Medicine Research Institute, Beijing 100050, China

Corresponding author: GUO Zeng-zhu, Email: zengzhug@sohu.com

【Abstract】 Objective To analyze the epidemiologic features of *Pneumocystis pneumonia* (PCP) among non-HIV infected patients in China. **Methods** Sputum or bronchoalveolar lavage fluid (BALF) specimens obtained from 851 pneumonia patients without HIV infection from Jan. 2006 to Oct. 2008 were detected, using PCR and Gomori's methenamine silver (GMS) stain for *Pneumocystis jirovecii*. **Results** Of the 615 sputum specimens, *P. jirovecii* positive rates of PCR and GMS stain were 20.3% and 10.2% respectively ($P < 0.05$). Of 236 BALF specimens, *P. jirovecii* positive rates of PCR and GMS stain were 32.6% and 25.5% respectively ($P > 0.05$). Of the total 851 pneumonia cases, 123 (14.5%) were GMS positive for *P. jirovecii* cyst and 202 cases (23.7%) were PCR positive for *P. jirovecii* DNA. In those immuno-suppressed patient group including patients with connective tissue diseases, organ transplant recipients, nephrotic, hematologic diseases and malignant tumor, *P. jirovecii* positive rate appeared the highest, 28.2% for GMS stain and 39.4% for PCR. There were also PCP patients in the immuno-competent pneumonia patient groups including senile patients with chronic diseases and patients without clear predisposing immuno-deficiencies. The positive rates of *P. jirovecii* GMS were 8.7% and 10.9%, respectively and 17.5% and 19.6% for *P. jirovecii* under PCR. **Conclusion** PCR assay seemed sensitive for the detection of *P. jirovecii* in the sputum specimens and could be used for screening PCP patients without HIV infection. Our data showed that there was high risk of PCP in non-HIV infected patients in China.

【Key words】 *Pneumocystis pneumonia*; Human immunodeficiency virus, infection; Clinical patients; Epidemiologic study

耶氏肺孢子菌(*Pneumocystis jirovecii*)是一种机会性致病真菌,能引起免疫功能受损者致死性间质肺炎,即肺孢子菌肺炎(*Pneumocystis pneumonia*,

PCP)^[1]。PCP 在 20 世纪 40—50 年代主要见于二战后欧洲严重营养不良的婴幼儿,80—90 年代则主要流行于 HIV 感染人群,曾被视为 AIDS 的“标志病”。近年来由于采用高效抗反转录病毒治疗 HIV 感染,AIDS 患者 PCP 发病率已显著下降^[2],但随着肿瘤放化疗患者、接受免疫抑制剂治疗的器官移植者、自身免疫性疾病患者等非 HIV 感染免疫功能低下或缺陷人群的扩大,PCP 患者日益增多^[3]。本课题

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.04.010

基金项目:北京市自然科学基金(7052009)

作者单位:100050 北京,首都医科大学附属北京友谊医院 北京热带医学研究所

通信作者:郭增柱, Email: zengzhug@sohu.com

课题组曾比较了在不同虫荷条件下用 PCR 及六亚甲基四胺银 (GMS) 染色法诊断大鼠 PCP 的价值及检测临床 PCP 患者痰标本的诊断价值^[4,5]。在此基础上,本研究用这两种方法对非 HIV 感染肺炎患者进行肺孢子菌感染的流行病学调查,以了解我国此类人群 PCP 的流行现状。

对象及方法

1. 调查对象:从 2006 年 1 月至 2008 年 10 月,共收集来自北京、河北、山东、山西、辽宁、内蒙古等地区 851 例肺炎患者的临床标本进行 PCP 检测,其中 236 例的标本为支气管肺泡灌洗液 (BALF),615 例标本为痰液。851 例患者均有发热、咳嗽、呼吸急促等呼吸道感染症状,胸部 X 线显示炎性病变;其中男性 546 例,女性 305 例,年龄 1~101 岁,平均 (53.9±21.3) 岁。根据病史,851 例肺炎患者按病情可分为 3 组:①因接受免疫抑制剂和细胞毒性药物治疗而有免疫功能低下表现的患者 188 例,其中有肾病患者 (肾小球肾炎、肾病综合征等) 14 例、结缔组织病患者 (系统性红斑狼疮、ANCA 相关性血管炎、肌膜炎、干燥综合征等) 31 例、器官移植患者 (肾移植、骨髓移植、肝脏移植、心脏移植等) 87 例、血液病患者 (白血病、再生障碍性贫血等) 27 例、肿瘤化疗患者 (淋巴瘤、肝癌等) 29 例。②高龄慢性病患者 103 例,年龄 81~101 岁,此组患者虽未接受免疫抑制剂和细胞毒性药物治疗,无明显免疫缺陷,但因某些慢性病而长期卧床。③无明确免疫功能受损史,肺感染原因待查患者 560 例。

对照组为非 PCP 呼吸系统感染者,共 20 例,包括肺结核 3 例,慢性支气管炎合并细菌感染 12 例,细菌性肺炎 5 例。诊断标准为:①无免疫功能低下表现和使用激素、免疫抑制剂史;②有发热、咳嗽、咳痰等临床表现;③相应的病原学检查阳性;④经抗生素或抗结核药物治疗后好转。均采用痰标本。

2. 调查方法:

(1) 病原检测^[5]:采用 GMS 染色镜检法进行病原学检测 BALF、液化后的痰液经离心,取沉淀涂片。将制备好的涂片固定后,5% 过碘酸钠氧化 20℃ 孵育 12 min,流水及蒸馏水冲洗数秒,晾干;置 GMS 染液,60℃ 孵育 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;亮绿复染 2 min,蒸馏水冲洗数次;95%、99%、100%

乙醇逐级脱水各 5 min;二甲苯透明 30 min,树胶封片。涂片经染色后由 2 名技术员镜检读取。

(2) PCR 检测:PCR 引物为肺孢子菌线粒体大亚基 rRNA 中的 2 个片段^[6],其碱基序列为:5' - 有义引物 pAZ102-E: 5' - GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3'; 3' - 反义引物 pAZ102-H: 5' - GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC - 3'。由北京赛百盛生物制剂有限公司合成,并经脱盐纯化。模板的制备,取痰标本或 BALF 1 ml,加等量 1 mol/L NaOH,37℃ 水浴 30 min,6000 r/min 离心 5 min,用生理盐水洗 2 次后,加细胞裂解液 (北京华美生物转导有限公司) 30 μl,最后加无菌去离子水至 300 μl,置 60℃ 水浴 1 h,100℃ 煮沸 15 min,6000 r/min 离心 1 min 后备用。PCR 反应:采用 25 μl 反应体系 (PTC-200,美国 Bio-Rad 公司):10×buffer 2.5 μl,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μl,10 mmol/L 4×dNTPs 2.0 μl,20 μmol/L 引物 pAZ102-E 及 pAZ102-H 各 1.5 μl,3 U/μl Taq 酶 1 μl (购自北京华美生物转导有限公司),模板 2.5 μl,无菌去离子水 11.5 μl。反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1.5 min,72℃ 延伸 1.5 min,35 个循环后 72℃ 延伸 7 min。取 10 μl 扩增产物与 2 μl Loading buffer 混匀后于 DYY-III 2 型稳压稳流电泳仪行琼脂糖凝胶电泳 (AGE),80 mA 电流电泳 40 min,置凝胶分析仪中观察结果,产物片段长 346 bp。以人源肺孢子菌分离株 Pt1 DNA 为阳性对照^[7],同时设立阴性对照和空白对照。

(3) PCP 的诊断标准:患者有发热、干咳,逐渐加重的呼吸困难等临床表现、肺部体征时,胸部 X 线显示典型碟形毛玻璃状或迷雾状阴影,为疑似 PCP。从患者的痰液、BALF 查到肺孢子菌包囊或 DNA 为确诊的依据。

3. 统计学分析:采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。应用配对资料或行×列表 χ^2 检验比较各组患者 BALF 和痰液标本 GMS 镜检及 PCR 的检测结果。

结 果

1. PCP 检测结果:表 1 显示,GMS 镜检阳性 123 例 (14.5%),PCR 阳性 202 例 (23.7%)。经配对资料 χ^2 检验: BALF GMS 镜检阳性率 (25.4%) 与痰液 GMS 镜检阳性率 (10.2%) 相比,差异具有统计学意义 ($\chi^2=39.577, P<0.01$);而 BALF 标本和痰液标本的 PCR 阳性率分别为 32.6% 和 20.3%,二者之间差异也有统计学意义 ($\chi^2=154.123, P<0.01$)。

2. PCP 的分布特点:

表1 851例肺炎患者PCP检查的结果

标本种类	检查例数	GMS		PCR	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
痰液	615	63	10.2	125	20.3
BALF	236	60	25.4	77	32.6
合计	851	123	14.5	202	23.7

(1) 性别分布: 851 例肺炎患者中, 肺孢子菌 GMS 镜检和 PCR 检查, 男性 546 例, 阳性率分别为 13.9% 和 23.3%; 女性 305 例, 阳性率分别为 15.4% 和 24.6%; 男女性间差异无统计学意义(χ^2 分别为 0.352 和 0.191, P 值均 >0.05)。

(2) 年龄分布: 表 2 显示, 非 HIV 感染的临床患者 PCP 的检出率随着年龄组的增长, 检出率变小, 呈负相关关系。

表2 851例肺炎患者中PCP的年龄分布

年龄(岁)	检查例数	GMS		PCR	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
0~	41	7	17.1	12	29.3
21~	207	35	16.9	58	28.0
41~	274	46	16.8	69	25.2
61~	226	26	11.5	45	19.9
81~	103	9	8.7	18	17.5
合计	851	123	14.5	202	23.7

(3) PCP 在非 HIV 感染肺炎患者中的分布: 表 3 显示, 在 188 例因接受免疫抑制剂和细胞毒性药物治疗而有免疫功能低下表现的肺炎患者①组中, 肺孢子菌 GMS 镜检和 PCR 检查阳性率分别高达 28.2% 和 39.4%; 其中肾病患者并发肺炎时 PCP 所占比率最高, 肺孢子菌 GMS 和 PCR 阳性率分别高达 64.3% 和 78.6%; 其次为结缔组织疾病患者(分别为 35.5% 和 48.4%)、器官移植患者(分别为 27.6% 和 40.2%)、血液病患者(分别为 25.9% 和 29.6%) 及肿瘤化疗患者(分别为 6.9% 和 17.2%)。在 188 例因接受免疫抑制剂和细胞毒性药物治疗而有免疫功能低下表现的肺炎患者②组和 236 例患者的 BALF 标本的检出率则高达 25.4%; 二者差异有统计学意义。由于用染色镜检的方法检查痰标本的敏感性较低, 痰镜检阴性不能作为临床排除诊断的指标, 而应该改用 BALF 标本或采用更敏感的 PCR 方法进一步除外肺孢子菌感染的可能^[9]。本组 PCR 检测应用敏感特异的肺孢子菌线粒体大亚基 rRNA 基因引物, 以基因释放剂制备模板 DNA, 为防止可能含有的抑制物对结果的影响, 对临床高度疑似 PCP 而 PCR 检测阴性的标本设立内对照以保证实验的准确性。结果显示, 615 例患者的痰标本 PCR 阳性率为 20.3%, 与 10.2% 的 GMS 检出率差异有统计学意义($P < 0.05$); 而 236 例患者的 BALF PCR 阳性率与 GMS 检出率差异无统计学意义($P > 0.05$)。上述结果提示用 PCR 检测痰标本的方法筛查非 HIV 感染临床病例中的 PCP 患者具有较高的应用价值。

讨论

本研究显示病原学检查是诊断 PCP 最可靠的方法, 其敏感性与所用染色方法、标本种类及技术人员的经验有关。肺孢子菌在不同的生活史阶段、不同的生存环境下其形态会发生较大的变化, 其滋养体与包囊的比例约为 10:1, 应用只能使包囊着色的 GMS 染色方法进行病原学检查的漏诊率很高。所

表3 851例肺炎患者及对照组PCP的检查结果

组别	原发疾病	例数	GMS		PCR	
			阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
1	肾病	14	9	64.3	11	78.6
	结缔组织病	31	11	35.5	15	48.4
	器官移植	87	24	27.6	35	40.2
	血液病	27	7	25.9	8	29.6
	肿瘤化疗	29	2	6.9	5	17.2
	合计	188	53	28.2	74	39.4
2	高龄慢性病	103	9	8.7	18	17.5
3	肺感染原因待查	560	61	10.9	110	19.6
	合计	851	123	14.5	202	23.7
	对照组	20	0	0.0	0	0.0

注: * 1 与 2: $\chi^2 = 32.604, P < 0.05$; 1 与 3: $\chi^2 = 15.020, P < 0.05$; 2 与 3: $\chi^2 = 0.428, P > 0.05$ 。† 1 与 2: $\chi^2 = 14.743, P < 0.05$; 1 与 3: $\chi^2 = 29.506, P < 0.05$; 2 与 3: $\chi^2 = 0.262, P > 0.05$

检标本主要为痰液和 BALF。痰液检查虽简便、安全、无损伤, 但咳痰标本的病原体检出率很低(6% ~ 30%); 导痰方法可提高检出率(60% ~ 72%); 而 BALF 标本的病原体检出率则高达 98% ~ 100%^[8]。本课题组曾用动物实验证实, 用 PCR 及 GMS 检测肺荷菌量高的 PCP 大鼠 BALF 标本的敏感性分别为 100% 和 92.6%, 治疗后肺荷菌量明显降低后其敏感性分别为 88.1% 和 30.5%; 而用 PCR 及 GMS 检测临床 PCP 患者的痰标本, 敏感性分别为 100% 和 35.0%; 而相应的对照实验表明这两种方法特异性均很好(100%)^[4,5]。本组用 GMS 染色法检测 615 例患者痰标本中的肺孢子菌包囊, 检出率为 10.2%, 而 236 例患者的 BALF 标本的检出率则高达 25.4%; 二者差异有统计学意义。由于用染色镜检的方法检查痰标本的敏感性较低, 痰镜检阴性不能作为临床排除诊断的指标, 而应该改用 BALF 标本或采用更敏感的 PCR 方法进一步除外肺孢子菌感染的可能^[9]。本组 PCR 检测应用敏感特异的肺孢子菌线粒体大亚基 rRNA 基因引物, 以基因释放剂制备模板 DNA, 为防止可能含有的抑制物对结果的影响, 对临床高度疑似 PCP 而 PCR 检测阴性的标本设立内对照以保证实验的准确性。结果显示, 615 例患者的痰标本 PCR 阳性率为 20.3%, 与 10.2% 的 GMS 检出率差异有统计学意义($P < 0.05$); 而 236 例患者的 BALF PCR 阳性率与 GMS 检出率差异无统计学意义($P > 0.05$)。上述结果提示用 PCR 检测痰标本的方法筛查非 HIV 感染临床病例中的 PCP 患者具有较高的应用价值。

PCP 常见于 HIV 感染的患者, 在非 HIV 感染的其他患者中, PCP 的发病率约为 0.001% ~ 10.1% 之

间。有资料显示,在接受 ICU 治疗的 PCP 患者中,非 HIV 感染患者的比例已由 1993 年的 0 上升到 2006 年的 75%^[10]。这些非 HIV 感染的临床病例主要为白血病、淋巴瘤、器官移植、结缔组织病等患者,因使用激素和免疫抑制剂治疗而继发免疫功能受损;结缔组织病患者更易发生 PCP^[11-13]。有些老年患者虽然没有明显免疫缺陷,但因长期吸烟或患有某些慢性病,如帕金森病、营养不良、冠心病、脑血管疾病和慢性肾功能衰竭时,也容易发生 PCP^[14,15]。依据本组诊断标准,凡从痰液或 BALF 标本中检出肺孢子菌包囊或 DNA 的患者,即确诊为 PCP 病例,结果表明,851 例非 HIV 感染的免疫功能受损患者并发肺炎时易发生 PCP,其中尤以肾小球肾炎、肾病综合征等肾病患者并发肺炎时肺孢子菌 GMS 和 PCR 检出率最高,其次为结缔组织疾病患者、器官移植患者及血液病患者。高龄慢性病并发肺炎的患者以及无明确免疫功能受损、肺感染原因待查患者中亦有 PCP 发病者,其发病率低。

PCP 为一种间质性肺炎,主要临床表现为突发高热,持续干咳、胸痛、进行性呼吸困难、发绀,最终导致呼吸衰竭。病程进展迅速,如诊治及时,患者可逐渐恢复,否则患者常于 4~7 d 内死亡。有报告接受 ICU 治疗的 59 例 PCP 患者,死亡率为 53%^[16]。PCP 临床表现无特异性,影像学难与狼疮性肺炎、真菌性肺炎、巨细胞病毒性肺炎等鉴别,有时酷似播散性肺结核。我国大多数地区的医生及检验人员对 PCP 的了解甚少,认识水平及诊断水平较低,易误诊为细菌性、病毒性、结核性或真菌性感染。因此临床医师对免疫功能受损患者、高龄慢性病患者出现干咳、呼吸困难和发热,且症状与体征不相符时,应注意有无合并 PCP 的可能,对免疫功能正常的肺感染原因待查患者也应注意鉴别 PCP,及早进行病原学检查(或)DNA 检测。

参 考 文 献

[1] Stringer JR, Beard CB, Miller RF, et al. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(9):891-896.
[2] Egger M, Hirschel B, Francioli P, et al. Impact of new antiretroviral combination therapies in HIV infected patients in

Switzerland: prospective multicentre study. *BMJ*, 1997, 315 (7117):1194-1199.
[3] 刘永光,郭颖,范礼佩,等. 肾移植术后卡氏肺孢子虫肺炎 29 例临床分析. *南方医科大学学报*, 2007, 27(10):1520-1521.
[4] 王建成,安亦军,郭增柱. 用 PCR 诊断不同虫量的大鼠卡氏肺孢子虫肺炎的价值. *中国寄生虫病防治杂志*, 2003, 16:155-157.
[5] 安亦军,黄敏君,郭增柱. PCR 及 GMS 染色法对肺孢子虫肺炎的临床诊断价值. *中国寄生虫病防治杂志*, 2005, 18(4):262-264.
[6] Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet*, 1990, 336 (8137):451-453.
[7] 黄敏君,李淑珍,安亦军,等. 人源肺孢子虫纯培养株的建立及基因鉴定. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27(8):771-774.
[8] Smith DE. Efficient diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Int J STD AIDS*, 1994, 5(1):1-7.
[9] Sing A, Trebesius K, Roggenkamp A, et al. Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. *J Clin Microbiol*, 2000, 38 (4):1461-1467.
[10] Monnet X, Vidal-Petiot E, Osman D, et al. Critical care management and outcome of severe *Pneumocystis* pneumonia in patients with and without HIV infection. *Crit Care*, 2008, 12(1):R28.
[11] 曹彬,王辉,王澎,等. 非 HIV 感染/艾滋病患者人肺孢子菌肺炎的临床和预后研究. *中国真菌学杂志*, 2006, 1(1):31-35.
[12] Ognibene FP, Shellamer JH, Hoffman GS, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a major complication of immunosuppressive therapy in patient with Wegner's granulomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 151(3 Pt 1):795-799.
[13] Tsai HC, Lee SS, Lin HH, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in systemic lupus erythematosus: a report of two cases. *J Formos Med Assoc*, 2001, 100(10):699-702.
[14] 吴雪萍,高文谦,叶平,等. 高龄老人肺孢子虫病治愈一例. *中华老年心脑血管病杂志*, 2004, 6(2):140.
[15] Cano S, Capote F, Pereira A, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients without predisposing illnesses: acute episode and follow up of five cases. *Chest*, 1993, 104(2):376-381.
[16] Miller RF, Allen E, Copas A, et al. Improved survival for HIV infected patients with severe *Pneumocystis jirovecii* pneumonia is independent of highly active antiretroviral therapy. *Thorax*, 2006, 61(8):716-721.

(收稿日期:2008-11-09)

(本文编辑:尹廉)