

综述：细菌内毒素检测试剂盒（显色基质法）真菌葡聚糖检测试剂盒（显色基质法）在临床的应用

福州新北生化工业有限公司 丁友玲 陈晓佳

一、细菌内毒素感染

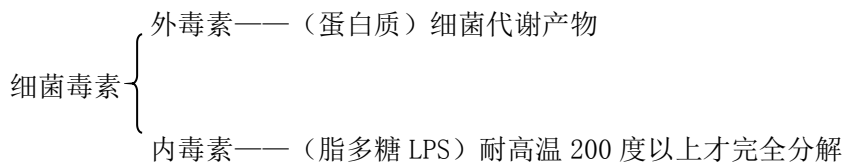
（一）临床上细菌感染种类：

- 1、革兰氏阴性菌感染；
- 2、真菌感染；
- 3、阳性菌感染（肽聚糖 peptidoglycan: PG）；
- 4、病毒感染。

全国每年感染患者 2 亿人次。革兰氏阴性菌感染占 60%，特别革兰氏阴性菌感染引起内毒素血症及脓毒血症是目前临床上主要死亡原因之一。而革兰氏阴性菌致死的原因主要是它的细菌内毒素引起。

（二）内毒素定义

1、内毒素（endotoxin）是革兰氏阴性细胞壁外膜主要成份，主要结构是脂多糖（Lipopolysaccharide: LPS）。



2、细菌内毒素进入人体的机体生理反应：

内毒素进入体内的引起发热的原因：

激活

LPS → 中性粒细胞 → 释放内热肽 → 作用体温中枢 → 发热

除发热外还有血管扩张、血管通透性增加、中性粒细胞增多、补体激活、血压下降、弥漫性血管内凝血（DIC），因组织供血不足缺氧，导致代谢性酸中毒、器官功能衰竭、休克死亡。

（三）内毒素检测临床意义

1、可以快速判定是否革兰氏阴性细菌感染和是否内毒素血症

在临床上各种感染致病菌大多为革兰氏阴性细菌。以往为了判断患者是否致病菌感染，大多检测患者血液中白血球等指标可并进行血液细菌培养。细菌培养时间较长。

本方法主要检测血液中细菌内毒素指标，是否超过基准值（0.03Eu/ml）。

细菌内毒素是细菌尸体的主要成份。因此临床上感染革兰氏阴性细菌时，当使用抗生素治疗时，可能会产生如下情况：

①感染细菌一部分被杀死（产生细菌内毒素），但由于肝脏廓清内毒素能力血液中内毒素并未升高达到内毒素血症水平（低于 0.03Eu/ml），但细菌培养是阳性。（因仅一部分被杀死）

②感染细菌一部分被杀死，内毒素进入血液，血液中内毒素水平升高（高于 0.03Eu/ml）达到内毒素血症水平，细菌培养也为阳性。

③感染细菌大部分被杀死，内毒素大量进入血液，血液中内毒素水平很高（高于 0.03Eu/ml）；但细菌培养为阴性。

④现在更多的报道已阐明内毒素血症可存在于无菌血症的各种情况，如网状内皮系统功能障碍；肠道粘膜损伤；局部阴性细菌感染；污染大量内毒素的注射药品、输液及输血等。

另外判断尿路感染方面，一般病人做尿常规检验，如果检查其尿液中是否存在细菌内毒素也可更直接判断患者尿路是否有革兰氏阴性细菌感染，将它与肾脏器质性病变（非细菌性）区别分开。但采尿必须用无菌无内毒素采尿杯。

不完全统计临床上据，白血病人内毒素阳性占 67%；肺炎占 68%；肺癌占 100%；肝炎占 33%；肝癌占 57%。

2、诊断内毒素休克

当患者严重感染革兰氏阴性致病菌时，在临床上往往使用大量抗生素。由于细菌内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁的成份。因此大量抗生素将病菌杀死时，造成血液中细菌大量死亡崩裂，进而促使大量内毒素一次性释放，造成内毒素血症和产生内毒素休克加速了患者死亡。治疗中 β 内酰胺抗生素可诱导革兰氏阴性杆菌产生内毒素，且头孢派酮诱导产生的 LPS 量大于伊米配能诱导产生的 LPS。因此对这类治疗严重烧伤感染患者可检测血液中细菌内毒素量，后慎重选用抗生素。若有大量细菌内毒素存在时，一方面仍然要用大剂量的有效抗菌素去治疗，同时要加用激素类药物，以保护对内毒素敏感的细胞不对内毒素诱生的细胞因子发生反应，从而度过“休克”难关。犹如外科手术时，采用麻醉药使病人丧失痛觉一样。

3、用抗生素治疗中检测细菌内毒素可追踪治疗效果

抗生素不同于其它药物，长期使用它会产生耐药性。而且抗素素在抗菌同时会造成人体肝、肾功能损害等副作用，还可导致真菌二重感染。因此在临床上感染后已经使用了抗生素患者，何时停药最好，这对医生是个难题。如使用本方法检测各种体液中是否还存在细菌内毒素。如低于基准值就可判定为患者感染一定程度控制住了，可不再使用抗生素。如高于基准值，可以认为患者存在一定的内毒素感染。

4、应用于诊断肝病患者的病情轻重和观察治疗愈后情况

人类的肝很重要的功能是廓清由人体进入血液的细菌内毒素保证血液的净化。而各种肝病的患者肝功能低下减弱或失去廓清细菌内毒素能力而使血中内毒素含量上升引起其它内脏器质性病变，如肝

硬化病人内毒素阳性率占49%。肝硬化时高内毒素血症是肝硬化失代偿期诸多临床表现的共同病理基础。内毒素血症是梗塞性黄疸病人术后出现并发症和死亡的一个重要原因，所以对梗黄病人进行围手术期血浆内毒素检测有助于引导治疗，降低阻黄病人围手术期并发症和死亡的发生率。还有肝癌患者往往血中内毒素上升。因此，用本方法测定肝病患者血中内毒素含量可以作为医生诊断肝病患者病情轻重临床跟踪治疗的一个重要指标。

内毒素的水平与病毒性肝炎的病情程度有很大关系。检测血浆内毒素水平对判断病情轻重和预后有一定临床意义，也为抗内毒素治疗作为病毒性肝炎的辅助治疗提供了理论基础。

（四）细菌内毒素检测试剂盒（显色基质法）在临床的应用

【标本采集及送检要求】

1、标本采集要求：

1) 采集过程要求无菌操作，用不加任何抗凝剂真空采血管采血液、胸腹水、尿液用无菌无内毒素采尿杯。

2) 住院病人早上用药前空腹采血，血透患者透析前采血。

2、标本的送检和保存要求：

标本采集后应在半小时内离心，4小时内检测完。若当日不能及时检测的标本应将离心后的血浆转移至无 β 葡聚糖的容器内2-8℃保存72小时内使用。-20℃以下冷冻保存，6个月使用。

【试剂溶液保存】

复溶后的试剂溶液应在10分钟内使用。若当次试验有剩余，可将剩余的试剂溶液封口后置-20℃以下冷冻保存，一周内使用。不能反复冻融试剂溶液。

具体操作详见使用说明书。

临床参考值： $<0.03\text{Eu/ml}$

【检验结果的解释】

1、 $<0.03\text{Eu/ml}$ 血清中的内毒素值正常，未感染革兰氏阴性细菌。

2、 $\geq 0.03\text{Eu/ml}$ 怀疑革兰氏阴性细菌感染，建议临床结合症进行判断及治疗。

参考国外文献：尿液中细菌内毒素 $>0.15\text{Eu/ml}$ 为感染。

【干扰因素】

a. 静脉注射免疫球蛋白等；血清能呈假阳性；b. 操作环境操作过程中污染会影响实验的可靠性。

二、深部真菌感染

（一）真菌进入人体生理反应

除结合菌外，所有真菌的细胞膜上都含有1-3-- β -D葡聚糖，而其他微生物、动物及人的细胞成分和细胞外液都不含这种成分，因此在机体的体液中检测到1-3- β -D葡聚糖是诊断深部真菌感染的

有效依据。真菌细胞壁成份：(1-3) - β -D-葡聚糖 (D-葡聚糖)。当有深部真菌感染时，真菌进入血液→中性粒细胞及吞噬细胞消化处理真菌→细胞壁释放 D-葡聚糖→血液中可检测出 D-葡聚糖。正常人血液中葡聚糖含量 $<10\text{pg/ml}$ 。

1) 内源性原因

如白血病、癌症、结核、肺脓肿、糖尿病、肝脏疾病及维生素缺乏等都可以诱导真菌感染；

2) 外源性原因

长期使用广谱抗生素抗肿瘤菌物和免疫抑制剂插管治疗，骨髓和实体器官移植。免疫缺陷综合症等；

深部真菌感染的发病率随着广谱抗生素和免疫抑制剂的应用呈逐年上升态势，由于缺少有效的早期诊断手段，其病死率也居高不下。

(二) 真菌检测临床意义：

临床主要致病真菌感染，如念珠菌、曲霉菌、肺孢子菌、镰刀菌、地霉、组织胞浆菌、毛孢子菌等。毛霉、根霉、隐球菌检测不敏感。

呼吸系统多见感染多为侵袭性真菌感染 (Invasive fungal infection, IFI)

血液肿瘤常会导致——慢性播散性念珠菌病 (CDC)

ICU 危重病人明显具有真菌感染的多种易感因素，如原发病对身体严重打击致身体抵抗力下降，慢性消耗、营养不良，大量使用肾上腺皮质激素，应用广谱抗生素，医院感染，糖尿病、酸中毒，完全胃肠外营养，大手术后，留置导管等也使患者抵抗力进一步下降，同时发生菌群失调导致真菌感染。这些患者深部真菌感染的发生率较普通患者高。ICU 病人在治疗期间并发真菌感染后，由于原发病的特点，诊断较为困难，特别是早期诊断，因为真菌感染多为继发性感染，感染的表现往往被原已存在的细菌感染所掩盖，而且真菌感染的临床表现缺乏特异性，通常最可靠的诊断是受累组织局部活检，但这在临床工作中是难以实现的。因此检测血液中 D-葡聚糖含量是早期诊断真菌感染快速有效办法。

以下情况需进行真菌检测：①中枢性发热、创伤吸收热等，不明原因发热 5 天以上，广谱抗生素治疗无效；②临床大量使用抗生素、肾上腺皮质激素的患者，发热控制后又重新发热，且抗生素治疗后仍继续发热；③使用广谱或多联抗生素超过 7 天以上的老年或有严重基础疾病的患者；④肾病综合征 (nephrotic syndrome, NS) 患儿由于自身免疫功能低下，加上长期应用激素和免疫抑制剂容易合并各种感染；⑤内脏移植使用免疫抑制剂患者；⑥由于免疫缺陷和中性粒细胞减少的恶性血液病患者 (易产生系统性真菌感染是致病致死的重要原因)。这一实验并不能检出不同的菌种，但是能让大家判断是否是真菌感染。

在如下情况，(1, 3) - β - D-葡聚糖检测会出现假阳性的结果：透析、手术后纱布填充、使用球蛋白、使用多聚糖类药物（即使在 3 年前使用）、高球蛋白血症、以真菌为原料制成的抗生素及放疗引起的粘膜炎症使食物中的 (1, 3) - β - D-葡聚糖通过受损的胃粘膜进入到血中。

深部真菌感染发生率：以呼吸系统真菌病最常见，其次是中枢神经系统和消化系统，播散性真菌居第四位。

(三) 真菌败血症

念珠菌、隐球菌、曲霉菌、毛霉菌均可引起败血症。真菌性败血症一般有如下特点：

- 1、有明确诱因或白细胞 ($1.5 \times 10^9/L$ 者)；
- 2、感染中毒症状不明显，但有难以解释的病情恶化；
- 3、多个部位栓塞、出血或多个脏器受损，无其他原因可解释。

(四) 真菌检测试剂盒（显色基质法）在临床上的应用

【标本采集及送检要求】 详见细菌内毒素

【试剂溶液保存】 详见细菌内毒素

具体操作方法详见说明书。

【临床参考值】 $< 20\text{pg/ml}$

【检验结果的解释】

- 1、 $< 20\text{pg/ml}$ 血清中真菌 (1-3) - β - D-葡聚糖值正常，未感染真菌。
- 2、 $\geq 20\text{pg/ml}$ 怀疑感染真菌，建议临床结合症状进行判断和治疗。

【干扰因素】

- a. 某些含真菌 (1-3) - β - D-葡聚糖的抗肿瘤药物；
- b. 磺胺类药物；
- c. 某些含有葡聚糖的静脉制剂（如免疫球蛋白等）；
- d. 使用含糖透析膜血液的患者；
- e. 还有一些假阴性因素，某些真菌如接合菌（毛霉菌、根霉菌）细胞壁没有 (1-3) - β - D 葡聚糖成分；隐球菌细胞壁外有荚膜致使 (1-3) - β - D 葡聚糖释放不出，这些真菌 G 试验无法检测。

另外，定植真菌也不引起患者血液的 (1-3) - β - D 葡聚糖升高。

三、本检测试剂盒的特点

本检测试剂是比色法从方法学来讲是第三代鲎试剂

第一代鲎试剂为凝胶法（不能定量）；

第二代鲎试剂为比浊定量法；

第三代鲎试剂为比色定量法。

【优点】:

快速 1 小时检测时间，可当天出报告；

灵敏度高（只对内毒素敏感可达 1pg/ml）；

特异性强（只对内毒素或真菌（1-3）-β-D 葡聚糖敏感）；

可定量；

优于血培养；

比色法，可克服临床血清标本中的颜色干扰对溶血、脂血，黄疸的血清进过特殊处理也可检测。

四、细菌内毒素检测试剂盒和真菌检测试剂盒与 PCT 法（降钙素质测定法）的区别见下表

	PCT 法	鲎试剂法	
		内毒素测定	真菌多糖
特异性	降非特异性 钙素原 PCT 升高原因： 1、严重细菌感染（G ⁺ G ⁻ ） 2、真菌 3、寄生虫 4、脓毒症 5、多脏器功能衰竭 除病毒不能检查外	特异性：只对革兰氏阴性细菌内毒素呈阳性，对其它菌均呈阴性。	特异性：只对真菌多糖敏感
判定标准	正常人小于血中降钙素原 0.5ng/ml	正常人血中细菌内毒素小于 0.03Eu/ml	正常人血中多糖小于 10pg/ml

五、第二代、第三代、第四代检测试剂盒特点比较

序号	比较项目	第二代试剂盒 (动态浊度法)	第三代试剂盒 (动态显色基质法)	第四代试剂盒 (终点显色基质法)
1	包装规格	20 人份，最小单位 2 人份/支, 1 人份/支	96 人份/盒，最小单位 24 人份/支	20 人份，最小单位 2 人份/支
2	检测时间	上机读数时间 60 分钟以上，万一断电及系统故障就得重新操作	根据酶标仪测试 45 分钟检测出 OD 值，手动根据 OD 值计算，另外电脑打印报备	酶标仪自带电脑，上机时间 3 分钟内可出结果，并打印报告
3	上机操作及结果判断	用试管逐支插入机器，受操作人员的手法、速度、样品量影响。稳定性差、重现性差。	动态法也受手法影响	一次性加入样品及 96 孔酶标板，3 分钟内机测 OD 值，不受操作人员的手法、速度、样品量影响。稳定性强，重现性好。

4	抗干扰	反应过程为凝胶为透明或白浊，容易受血清中浊度干扰。不可做溶血、脂血、黄疸样品	颜色为淡黄色，无法克服血清中颜色干扰。不可做溶血、脂血、黄疸样品	颜色是玫红色，克服血清中颜色干扰因素。可做溶血、脂血、黄疸样品
5	血清处理方法	用加热法（75℃），处理血清中的干扰球蛋白、白蛋白、凝血因子、但处理不完全，易出现假阳性结果	用 KOH（配方 2 种）（37℃），处理血清中的干扰球蛋白、白蛋白、凝血因子，但处理不完全，易出现假阳性结果	用独创碱试剂（配方 7 种）（37℃）处理血清球蛋白、白蛋白、凝血因子，降低假阳性与假阴性几率
6	技术先进性			阴性符合率>90%，阳性符合率>90%，国内首创，国际领先

从上表可知 PCT 法对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌、病毒感染均为阳性。无法对它们进行区分，而我们的细菌内毒素检测试剂盒和真菌多糖试剂盒是特异性的试剂盒，可以区分是革兰氏阴性细菌感染或真菌感染，能为临床提供更具体的参考值。