

• 论 著 •

血清及肺泡灌洗液半乳甘露聚糖检测对非粒细胞缺乏患者侵袭性曲霉菌感染的诊断价值

邓 劲, 吴思颖, 康 梅[△]

(四川大学华西医院实验医学科微生物室, 成都 610041)

摘要:目的 评价血清及肺泡灌洗液(BALF)曲霉菌半乳甘露聚糖(GM)试验对非粒细胞缺乏(中性粒细胞绝对数 $>0.5 \times 10^9/L$,简称非粒缺)患者侵袭性曲霉菌病(IA)的诊断价值。方法 应用酶联免疫吸附法对四川大学华西医院临床怀疑 IA 的 206 例非粒缺患者定量检测血清及肺泡灌洗液半乳甘露聚糖水平,将检测结果和临床特征进行分析。参照欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组和美国真菌病研究组标准、美国抗感染学会指南,将临床病例分为确诊、临床诊断、拟诊和非 IA 组;并分析其灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值。结果 临床高危 IA 非粒缺患者 206 例,其中 GM 试验阳性 93 例,灵敏度 89%,特异度 83%,阳性预测值 86%,阴性预测值 91%,约登指数为 0.72,诊断符合率 78%;各组肺泡灌洗液 GM 水平均高于血清 GM 水平,肺泡灌洗液 GM 阳性率亦高于血清 GM 阳性率;确诊组+临床诊断组绘制 ROC 曲线,曲线下面积为 0.82。结论 GM 对 IA 的非粒缺患者的早期诊断同样具有临床意义。

关键词:侵袭性曲霉菌病; 半乳甘露聚糖; 肺泡灌洗液; 粒细胞缺乏

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.12.029 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)12-1762-03

Diagnostic value of galactomannan detection in serum and bronchoalveolar lavage fluid to invasive Aspergillus infection in patients with non-neutropenia

DENG Jin, WU Siying, KANG Mei[△]

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

Abstract: **Objective** To evaluate the diagnostic value of serum and bronchoalveolar lavage fluid(BALF) aspergillus galactomannan(GM) test for invasive aspergillosis (IA) in the patients with non-neutropenia (absolute neutrophil $>0.5 \times 10^9/L$). **Methods** ELISA was used to quantitatively detect serum and BALF GM levels of 206 patients with clinically suspected IA in our hospital. Then the detection results and clinical characteristics were analyzed. According to the clinical medical records and referring to the standards of European Organization for Research and Treatment Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the United States Mycoses Study Group, Anti-infective American Society guidelines, these patients were divided into the diagnosis, clinical diagnosis, suspected diagnosis and non-IA groups. Then the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were analyzed. **Results** Among 206 cases of clinical high risk IA non-neutropenia, 93 cases were positive in GM test, with the sensitivity of 89%, specificity of 83%, positive predictive value of 86%, negative predictive value of 91%, Youden index of 0.72 and diagnosis accordance rate of 78%; the levels of BALF GM in various groups were higher than those of serum, in the aspect of positive rate, the BALF GM positive rate was also higher than serum GM positive rate. The ROC curve in the diagnosis group and clinical diagnosis group was drawn, the area under the curve was 0.82. **Conclusion** GM has clinical significance for the early diagnosis of IA in the patients with non-neutropenia.

Key words: invasive aspergillosis; galactomannan; bronchoalveolar lavage fluid; neutropenia

近年来,侵袭性真菌感染(IFI)的发病率愈来愈高,其中又以侵袭性肺真菌感染(IPFI)的发病率最为频繁,占50%~60%,而在非粒细胞缺乏(中性粒细胞绝对数 $>0.5 \times 10^9/L$,简称非粒缺)的重症患者中侵袭性曲霉菌病(IA)发生率和病死率都逐年递增。IA在免疫功能低下患者所在科室最为常见,如血液科和重症监护病房(ICU)等,且病死率极高,在造血干细胞移植患者中IA的发病率为2%~26%,而病死率却高达70%~90%。IA的临床表现缺乏特异性(如发热、咳嗽、胸痛等)。IA的确诊需要病理组织活检,有创且实施困难,传统的诊断方法如真菌培养等耗时长、敏感度低^[1],影响患者的治疗

和预后,是导致真菌感染患者死亡的主要原因之一。现在非培养的血清学检测方法在临床上广泛应用,如曲霉菌半乳甘露聚糖(GM)试验、1,3-β-葡聚糖(G)试验,支气管肺泡灌洗液GM试验、曲霉PCR和曲霉免疫层析检测,其中以GM试验和G试验最为受重视。多项研究证实,GM试验在粒细胞缺乏(简称粒缺)患者IA的早期诊断有重要的参考价值^[2-3]。本文为研究GM试验在非粒缺患者中的诊断价值,通过对临床高危感染患者的肺组织局部进行支气管肺泡灌洗术得到肺泡灌洗液及同时采集的血清标本进行GM检测,探讨血清及肺泡灌洗液检测能否有助于提高高危患者感染曲霉菌的诊断能力,为临

作者简介:邓劲,男,技师,主要从事于临床微生物感染与预防研究。

[△] 通信作者, E-mail: kangmei@sina.com.cn.

床提供初步资料。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 8 月至 2016 年 4 月入住四川大学华西医院呼吸内科、ICU、血液科、中西医结合科等临床怀疑 IA 的 206 例患者。其中男 109 例,女 97 例;年龄 15~89 岁,中位年龄 52 岁;患者基础疾病分布如下:慢性阻塞性肺疾病 28.2% (58/206),肺炎 12.6% (26/206),恶性肿瘤 8.7% (18/206),恶性血液病 7.7% (16/206),支气管扩张症 6.8% (14/206),肺间质纤维化 6.8% (14/206),自身免疫性疾病 3.9% (8/206),肝肾移植术后 6.8% (14/206),糖尿病 5.8% (12/206),其他疾病 12.6% (26/206)。

1.2 诊断标准和分组 诊断参考欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组和美国真菌病研究组标准、美国抗感染学会指南,将 206 例患者分为确诊、临床诊断、临床拟诊、非 IA 组。

1.2.1 确诊 组织标本中检出菌丝或球形体(非酵母菌的丝状真菌),并发现有相应的组织损伤。组织标本、胸腔积液或血液真菌培养阳性(排除标本污染)。

1.2.2 临床诊断 符合 1 项宿主因素,1 项微生物学标准(合格痰液或支气管肺泡灌洗液直接镜检发现菌丝,连续 2 次真菌培养阳性)和 1 项主要临床标准(CT 检出晕征、新月征和实变区内的空洞)或 2 项次要标准(肺部感染的症状和体征;影像学出现新的肺部浸润影;持续发热 96 h,经积极的抗细菌治疗无效)。

1.2.3 拟诊 符合 1 项宿主因素和 1 项微生物学标准,而不符合临床标准,或仅符合临床标准而不符合微生物学标准。

1.2.4 非 IA 组 不符合上述标准。

1.3 试剂盒、仪器 酶联免疫吸附法 GM 试剂盒(Platelia Aspergillus)由德国 Bio-Rad 公司产品,自动定量酶标仪(Bio-Rad Model 680)为 Bio-Rad 公司产品。

1.4 方法

1.4.1 血清标本 所有研究对象在抗真菌治疗前采集外周静脉血 2~3 mL,离心留取血清用于 GM 检测。

1.4.2 肺泡灌洗液标本 按照行支气管镜的操作要求进行术前的准备和术中的监测。支气管肺泡灌洗术一般位于支气管镜检查 and 活检刷检之前。首先要在灌洗的肺段经活检孔通过细硅胶管注入 2% 的利多卡因 1~2 mL 用于局部麻醉,然后在 HRCT 定位的病变亚段支气管上嵌顿支气管镜,注入 37 °C 无菌生理盐水 100~250 mL,每次 25~30 mL。以支气管腔不塌陷为条件的负压下(50~100 mm Hg)进行回收灌洗液,回收率一般为 40%~60%。回收液体立即用双层无菌纱布过滤以滤出黏液,取滤出液 5 mL 送检 GM。

1.4.3 检测方法 GM 测定采用 Bio-Rod 公司的曲霉菌抗原检测试剂盒,双抗体酶联免疫吸附(ELISA)检测血清及肺泡灌洗液 GM 值,具体操作方法参照试剂盒说明书。

1.5 统计学处理 按照厂家推荐及参考其他文献,GM 试验以 0.5 为诊断阈值,将 GM 试验 ≥ 0.5 定为阳性。所有资料采用 SPSS21.0 统计软件处理。以确诊和临床诊断者为研究组,非 IA 为对照组进行灵敏度和特异度统计分析,由于拟诊患者不能确定为 IA,因此不纳入统计分析。采用 χ^2 检验四格表概率法比较其敏感度和特异度。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验;对

206 例肺泡灌洗液的 GM 值绘制受试者工作特征(ROC)曲线;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GM 试验血清测定结果 参照临床病历及以上分组标准将临床高危 IA 的非粒缺患者 206 例分为确诊组、临床诊断组、拟诊组和非 IA 组。其中确诊为 IA 的 8 例患者中 6 例 GM 试验阳性,临床诊断组 68 例患者中阳性 62 例,拟诊组 39 例患者中阳性 11 例,在非 IA 患者中 11 例发现 GM 试验阳性。参照 GM 试验说明书,当 $GMI \geq 0.5$ 时为阳性,其灵敏度为 89%、特异度为 83%、阳性预测值为 86%、阴性预测值为 91%、约登指数为 0.72,诊断符合率为 78%。

2.2 肺泡灌洗液与血清 GM 检测的比较 对确诊组、临床诊断组、拟诊组患者的肺泡灌洗液和血清进行 GM 检测,结果显示确诊组、临床诊断组和拟诊组肺泡灌洗液的 GM 检测水平平均值均高于血清 GM;阳性率方面,确诊组、临床诊断组和拟诊组肺泡灌洗液的 GM 阳性率亦高于血清 GM 阳性率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组患者 GM 检测值

组别	n	肺泡灌洗液		血清	
		GM ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)	阳性率 (%)	GM ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)	阳性率 (%)
确诊组	8	2.32 ± 2.28	100.0	0.85 ± 0.24	71.4
临床诊断组	68	0.65 ± 0.49	55.6	0.64 ± 0.22	49.5
拟诊组	39	0.50 ± 0.36	66.7	0.48 ± 0.12	36.7
非 IA 组	11	0.46 ± 0.24	8.3	0.36 ± 0.26	16.1

2.3 ROC 曲线分析 对 206 例肺泡灌洗液的 GM 值绘制 ROC 曲线,确诊组+临床诊断组曲线下最大面积为 0.82,见图 1。对于确诊组+临床诊断组患者,肺泡灌洗液 GM 的灵敏度、特异性、阳性预测值及阴性预测值分别为 92%、83%、95% 和 88%。

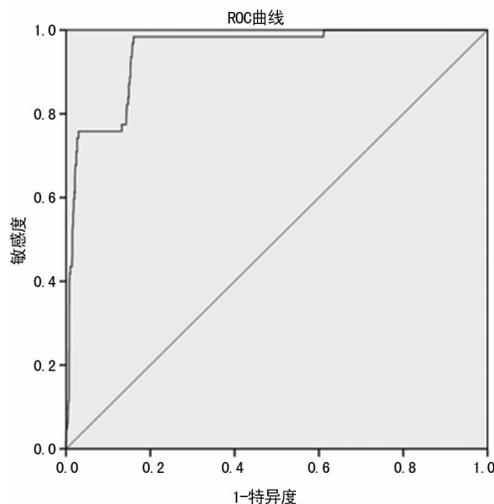


图 1 肺泡灌洗液 GM 检测非粒缺伴 IA 患者及非 IA 患者的 ROC 曲线

3 讨论

随着免疫抑制剂的使用,IA 的发病率不断上升,并且病死率往往很高,可达 50% 以上^[4]。IA 及早诊断,及早的抗真菌治

疗至关重要。由于种种原因,传统诊断 IA 的方法受到很多的局限。近年来在多种指南的研究中,已经把非培养的血清学和影像学检查作为诊断 IA 和抢先治疗的一种重要方法。

曲霉菌是自然界广泛存在的真菌,通常寄生在人体皮肤黏膜和周围环境中,是一种条件致病菌,一般的健康者很少发生曲霉菌感染。但当宿主细胞免疫功能受到损伤或抑制时,患者通过吸入曲霉菌孢子,并在肺部大量生长,其菌丝也对肺血管造成损害,导致肺部的局部侵袭和血液传播。

由于传统病原学检测方法的局限性,近年来针对曲霉菌细胞壁抗原的检测成为诊断研究的热点并逐步应用于临床。GM 抗原是曲霉菌细胞壁的一种主要成分^[5],在侵袭性感染机体后释放入血,并可持续 1~8 周。一般在曲霉菌感染患者出现临床特异性症状及影像学异常前,机体内循环中即可检出 GM,并且有较高的敏感度和特异度。多篇文献报道,GM 试验对诊断 IA 具有较高的特异度^[3]。Pfeffer 等^[6]对 GM 进行了 Meta 分析,发现在血液系统恶性肿瘤中 GM 试验的敏感度是 70%,特异度是 92%,对干细胞移植的患者敏感度较低,为 22%。GM 问世以来,多篇文献报道 GM 检测对粒细胞缺乏患者合并 IA 有重要的临床意义,能够改善预后,但 GM 检测是否对于其他的非粒缺疾病有诊断价值尚有争议^[7-8]。有研究认为 GM 检测对非粒缺患者的诊断敏感度偏低,而另一部分人认为对该部分患者同样有诊断意义^[9]。本研究显示 GM 试验诊断 IA 的敏感度是 89%,而特异度 83%,说明 GM 的检测对于非粒缺患者是否伴 IA 同样具有早期诊断和疗效判定的作用。

虽然 GM 试验敏感度和特异度相对较高,但和其他诊断试验一样,同样存在假阳性和假阴性问题。有研究报道,使用哌拉/他唑巴坦或阿莫西林/克拉维甲酸等半合成青霉素可导致 GM 试验假阳性^[10]。由于 GM 能在大多数的食物中检测出来,当发生肠道黏膜屏障受损如腹泻时,其可通过受损部位进入血液造成假阳性。随着 GM 研究的深入,国内外已有多篇假阳性及假阴性病例报道。本文参照厂家试剂说明书以 0.5 作为 GM 阳性阈值,其中 8 例确诊患者中有 2 例假阴性。回顾病历发现这 2 例患者在送检 GM 试验前均使用了抗真菌药物,且疗程>1 周,其中 1 例患者使用的抗真菌药物为两性霉素 B,该药物的使用会抑制菌丝的生长而导致 GM 分泌减少;另一患者使用抗真菌药物伏立康唑。这与文献^[11]报道一致,有效的抗真菌治疗可使 GM 试验出现假阴性。因此临床在怀疑 IA 并在使用抗曲霉菌药物治疗前应该先进行 GM 试验。

综上所述,GM 对非粒缺 IA 患者检测敏感度、特异度均较高,对怀疑 IA 的患者早期诊断有一定的临床意义;并且肺泡灌洗液 GM 试验更优于血清 GM 试验。

参考文献

[1] Patterson TF. Clinical utility and development of biomar-

kers in invasive aspergillosis[J]. Traps Am Clin Climatol Assoc, 2011, 122: 174-183.

[2] Persat F, Ranque S, Deouin F, et al. Contribution of (1-3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infection [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(3): 1009-1013.

[3] Miceli MH, Graziutti ML, Woods G, et al. Strong correlation between serum Asperigillus galactomannan index and outcome of asperillosis in patients with hematological cancer: clinical and research implications [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(9): 1412-1422.

[4] Jarque I, Andeu, Salaver M, et al. Value of asperigillus galactomannan antigen detection in the diagnosis and follow-up of invasive aspergillosis in hematological patients [J]. Rev Iberoam Micol, 2003, 20(1): 116-118.

[5] De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definition of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infection Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) consensus group [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(12): 1913-1821.

[6] Pfeffer D, Fine JP, Safar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis [J]. Clin Infect Dis, 2006, 2(10): 1417-1427.

[7] 纪宇, 刘代红, 许兰平, 等. 血清半乳甘露聚糖检测对造血干细胞移植后患者侵袭性曲霉菌感染的诊断价值[J]. 中华血液学杂志, 2007, 28(2): 83-86.

[8] 姚佳峰, 苏东, 黄勇, 等. 半乳甘露聚糖试验诊断血液病患者并发侵袭性曲霉感染的初步探讨[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(3): 765-769.

[9] 金金, 孙铁英, 胡云建, 等. 多种抗原检测方法对非粒细胞缺乏宿主真菌感染的诊断作用初探[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(9): 660-664.

[10] Alhambra A, Cu6tam MS, Ortiz MC, et al. False positive galactomannan results in adult hematological patients treated with piperacillin-tazobactam [J]. Rev Iberoam Micol, 2007, 24(2): 106-112.

[11] Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, et al. Antifungal therapy decreases sensitivity of the Asperigillus galactomannan enzyme immunoassay [J]. Clin Infect Dis, 2005, 40(12): 1762-1769.

(收稿日期: 2017-02-23 修回日期: 2017-04-05)

欢迎投稿

欢迎订阅