

真菌(1,3)- β -D-葡聚糖检测在侵袭性真菌感染中临床应用分析

章迪, 黄素明, 唐慧, 袁千钦

中南大学湘雅三医院, 湖南 长沙 410013

摘要: **目的** 探讨真菌(1,3)- β -D-葡聚糖检测(G 试验)在侵袭性真菌感染患者中临床应用情况。 **方法** 回顾性分析湖南省人民医院、中南大学湘雅二医院和中南大学湘雅三医院 2014 年 7 月-2015 年 12 月间进行 G 试验检测的 2 588 例患者血清标本的阳性率、阴性率、阳性似然比及阴性似然比,分析其临床相关因素。 **结果** 2 588 例患者中具有侵袭性真菌感染高危因素者 1 678 例,占 64.84%,无高危因素者 910 例,占 35.16%。在有高危因素患者中 G 试验检测真阳性 169 例,假阳性 420 例,真阴性 904 例,假阴性 185 例。阳性似然比为 1.51,阴性似然比为 0.76。G 试验应用于存在血液系统恶性疾病、移植状态、重症感染、自身免疫病、慢性肾功能不全、恶性肿瘤、糖尿病、肝硬化、慢性呼吸系统疾病等 9 种具有侵袭性真菌感染高危因素的患者检测时阳性似然比分别为 1.23、1.77、1.21、1.55、1.31、0.68、1.8、1.97、2.2;阴性似然比分别为 0.91、0.64、0.86、0.66、0.75、1.18、0.72、0.64、0.76。 **结论** G 试验临床应用价值有待考证,尤其是在患有血液系统恶性疾病、重症感染、恶性肿瘤的患者中,G 试验应用价值较低,需改良其方法。

关键词: G 试验;侵袭性真菌感染;临床应用

中图分类号:R446 文献标识码:B 文章编号:1006-3110(2017)08-0989-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2017.08.029

Clinical application of (1-3)- β -D-glucan assay to invasive fungal infections

ZHANG Di, HUANG Su-ming, TANG Hui, YUAN Qian-qin

The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410013, China

Abstract: **Objective** To investigate the clinical application of (1-3)- β -D-glucan assay to patients with invasive fungal infections. **Methods** We retrospectively analyzed the positive rate, negative rate, positive likelihood ratio, negative likelihood ratio and their clinical related factors in 2,588 serum specimens detected by (1-3)- β -D-glucan assay and collected from patients in Hunan Provincial People's Hospital, the Second Xiangya Hospital of Central South University and the Third Xiangya Hospital of Central South University from July 2014 to December 2015. **Results** Among the 2,588 patients detected, there were 1,678 (64.84%) cases with high risk factors and 910 (35.16%) cases without. Among the 1,678 patients with high risk factors, there were 169 true positive cases, 420 false positive cases, 904 true negative cases and 185 false negative cases. The positive likelihood ratio was 1.51, while the negative likelihood ratio 0.76. When (1-3)- β -D-glucan assay was applied to the patients with hematologic malignancies, transplant status, severe infection, autoimmune disease, chronic renal failure, malignant tumor, diabetes mellitus, cirrhosis and chronic respiratory disease, the positive likelihood ratios were 1.23, 1.77, 1.21, 1.55, 1.31, 0.68, 1.8, 1.97 and 2.2 respectively, and the negative likelihood ratios were 0.91, 0.64, 0.86, 0.66, 0.75, 1.18, 0.72, 0.64 and 0.76 respectively. **Conclusions** The value of (1-3)- β -D-glucan assay still needs to be verified in clinical trials. Its clinical value is lower in patients with hematologic malignancies, severe infection and malignant tumor; and hence, this method needs to be improved.

Key words: (1-3)- β -D-glucan assay; invasive fungal infection; clinical application

近 20 年来,由于大剂量广谱抗生素、抗肿瘤药物的长期应用,器官移植及造血干细胞移植等治疗方法的完善,各种导管在体内的介入以及恶性肿瘤、艾滋病等免疫功能低下患者的不断增加,侵袭性真菌感染的发病率明显上升^[1],日益成为肿瘤、血液系统重症疾病、免疫抑制患者死亡的重要原因之一。侵袭性真菌感染临床

作者简介:章迪,主管技师,主要从事检验工作。

常无特异性,且病情常被基础疾病所掩盖,诊断困难。真菌实验室诊断方法包括镜检、培养、血清学诊断、组织病理学检查和分子生物学方法。镜检的检出率较低,取材困难且需要操作人员有丰富临床经验;培养所需时间较长,不适用于早期诊断^[2];组织病理学检查多为有创检查,相对不敏感而耗时长不易被接受^[3-4];而分子生物学检查所需成本较高尚未普及。真菌裂解产物(1,3)- β -D-葡聚糖可特异性激活鲎变形细胞裂解物中的 G 因

子,引起裂解物凝固,再通过测定其浊度衡量(1,3)- β -D-葡聚糖含量从而反映真菌感染状态,此方法又称为 G 试验,因为其为非侵入手段在临床上广受关注,有统计数据表明 G 试验在合理正确应用的前提下敏感度达 76.8%,特异性达 85.3%,ROC 曲线下面积 0.89,其临床应用价值较高^[5]。然而也有研究表明 G 试验不适用于血液系统恶性疾病患者的检测^[6];肺移植术后真菌感染的检测阳性预测值很低(14%),其应用价值有待商榷^[7]。本次研究的目的是评估 G 试验检测对于有着侵袭性真菌感染高危因素的患者的实用性。

1 资料与方法

1.1 资料来源 通过选取 2014 年 7 月-2015 年 12 月期间湖南省人民医院、中南大学湘雅二医院及中南大学湘雅三医院等三所医院进行 G 试验检测的 2 625 例血清标本结果进行统计,收集所有进行 G 试验检测患者临床资料,包括性别、年龄、基础疾病、进行 G 试验检测前的细菌真菌培养结果(即其病原学检测结果)、培养所用标本、中性粒细胞计数、G 试验结果。

1.2 检测方法 三所医院均采用动态浊度分析法,试剂盒均采用湛江安度斯生物有限公司生产的真菌(1-3)- β -D 葡聚糖检测试剂盒(光度法),标本均为血清,采血管采用 BD 公司的无致热源普通采血管,仪器均采用湛江安度斯生物有限公司生产的 LKM 动态试管检测仪,阳性标准界值均为 100.5 pg/ml。

1.3 侵袭性真菌感染高危因素与侵袭性真菌感染患者定义

1.3.1 侵袭性真菌感染高危因素 根据重症患者侵袭性真菌感染诊疗指南^[8],将恶性肿瘤,器官移植及血液移植状态,患有慢性肺部疾病、慢性肾脏疾病、肝硬化、糖尿病等慢性基础疾病,接受侵入性治疗,长期应用广谱抗生素及免疫抑制等确定为具有侵袭性真菌感染高危因素。

1.3.2 侵袭性真菌感染患者 将微生物或组织病理学检查发现真菌确定为具有病原学证据。若存在真菌感染临床症状且具有高危因素和病原学证据则确定为侵袭性真菌感染。

1.4 统计分析 将具有 G 试验数据但缺乏临床数据者视为无效数据,数据统计分析使用 Office2010 版进行分类统计,Excel 软件、IBM SPSS19.0 软件包做受试者工作曲线(ROC)分析。

2 结果

2.1 G 试验检测数据 2014 年 7 月-2015 年 12 湖南

省人民医院、中南大学湘雅二医院、中南大学湘雅三医院三所医院 G 试验检测数据 2 625 例,其中有效数据 2 588 例,无效数据 37 例。检测结果阳性者 865 例,阴性者 1 723 例;有高危因素者 1 678 例,无高危因素者 910 例;在有高危因素患者中真阳性 169 例,假阳性 420 例,真阴性 904 性,假阴性 185 例,见表 1。总体敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、阳性似然比、阴性似然比分别为 45.3%、69.6%、27.5%、83.3%、1.49、0.79。在有高危因素患者中敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、阳性似然比、阴性似然比分别为 47.7%、68.3%、28.7%、83%、1.51、0.76。

表 1 2 588 例 G 试验检测数据

病原学检测结果		G 试验结果		总计
		阳性	阴性	
有高危因素	病原学(+)	169	185	354
	病原学(-)	420	904	1 324
无高危因素	病原学(+)	69	102	171
	病原学(-)	207	532	739

2.2 不同基础疾病 G 试验结果 有高危因素的1 678 例数据中,血液系统恶性疾病累计频次 177 例,其中真阳性 7 例,假阳性 33 例,真阴性 118 例,假阴性 19 例;移植累计频次 224 例,其中真阳性 17 例,假阳性 62 例,真阴性 132 例,假阴性 13 例;重症感染累计频次 274 例,其中真阳性 41 例,假阳性 78 例,真阴性 113 例,假阴性 42 例;自身免疫病累计频次 137 例,其中真阳性 16 例,假阳性 42 例,真阴性 68 例,假阴性 11 例;肾功能不全累计频次 182 例,其中真阳性 27 例,假阳性 61 例,真阴性 75 例,假阴性 17 例。恶性肿瘤累计频次 158 次,其中真阳性 14 例,假阳性 48 例,真阴性 83 例,假阴性 48 例;慢性呼吸系统疾病累计频次 127 次,其中真阳性 7 例,假阳性 18 例,真阴性 90 例,假阴性 12 例,见表 2。G 试验应用于存在上述各基础疾病的患者检测阳性似然比分别为 1.23、1.77、1.21、1.55、1.31、0.68、1.8、1.97、2.2;阴性似然比分别为 0.91、0.64、0.86、0.66、0.75、1.18、0.72、0.64、0.76,见表 3。

表 2 不同基础疾病标本 G 试验结果

基础疾病	真阳性	假阳性	真阴性	假阴性	合计
血液系统恶性疾病	7	33	118	19	177
移植	17	62	132	13	224
重症感染	41	78	113	42	274
自身免疫性疾病	16	42	68	11	137
慢性肾功能不全	27	61	75	17	182
恶性肿瘤	16	48	83	48	158
糖尿病	19	28	81	22	150
肝硬化	9	23	63	8	103
慢性呼吸系统疾病	7	18	90	12	127

表 3 不同基础疾病标本 G 试验评价

基础疾病	敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	阳性 似然比	阴性 似然比
血液系统恶性疾病	26.9	78.1	17.5	86.1	1.23	0.91
移植	56.7	68.0	21.5	91.0	1.77	0.64
重症感染	49.4	59.1	34.5	72.9	1.21	0.86
自身免疫性疾病	59.3	61.8	27.6	86.1	1.55	0.66
慢性肾功能不全	61.4	55.1	30.7	81.5	1.31	0.75
恶性肿瘤	25.0	63.4	25.0	63.4	0.68	1.18
糖尿病	46.3	74.3	40.4	78.6	1.8	0.72
肝硬化	52.9	73.2	28.1	88.7	1.97	0.64
慢性呼吸系统疾病	36.8	83.3	28.0	88.2	2.2	0.76

2.3 ROC 曲线 以 100.5 pg/ml 为临界值,将>100.5 pg/ml 判定为阳性,对中南大学湘雅三医院 621 例 G 实验结果进行 ROC 曲线分析,曲线下面积为 0.65,见图 1。

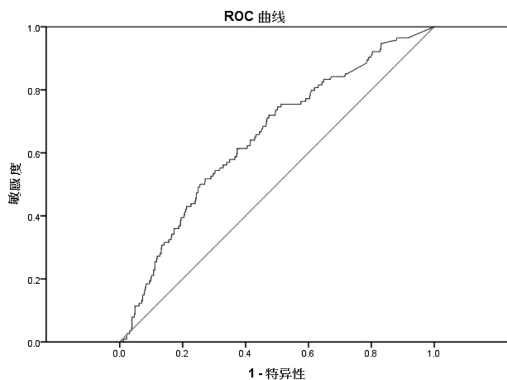


图 1 中南大学湘雅三医院 G 试验受试者工作曲线

3 讨论

3.1 似然比 G 试验在长沙地区三所三甲综合医院临床应用过程中阳性似然比偏低,阴性似然比偏高。且在不同基础疾病情况下其阳性、阴性似然比有较大差别,在血液系统恶性疾病、重症感染及恶性肿瘤患者中,阳性似然比只有 1.23、1.21、0.68;阴性似然比高达 0.91、0.86、1.18,表明其阳性及阴性判断均不够准确可信;而在移植术后、糖尿病、肝硬化、慢性呼吸系统疾病等患者中阳性似然比为 1.77、1.8、1.97、2.2,阴性似然比为 0.64、0.72、0.64、0.76,相比前者,G 试验在后者中的作用更可信。

3.2 敏感度、阳性预测值 在本次研究中,G 试验在各种情况下的敏感度均较低(最高者 61.4%),与蒋伟等[9]实验结果中敏感度高(90.9%)而特异度低(77.4%)有较大差异,存在较高的假阳性率。导致假阳性率高的原因可能有:①此次侵袭性真菌患者的确定金标准为真菌培养,而有相关数据显示,真菌培养在疑诊患者中的阳性率仅为 66.23%[10],这可能导致产生假阳性结果。②同时合并细菌感染,对试验产生干扰,在本次研究中有 631 例细菌感染(细菌培养阳性),而其中假阳性 198 例,阳性预测值仅为 10%,阴性预测值可达

96%。可以发现在合并细菌感染的患者中 G 试验阴性预测价值较高,而阳性预测价值低。此现象对重症感染患者检测影响较大。③标本本身问题:目前临床运用透析技术熟练、纤维素膜纱布菌可能造成假阳性,而在某些科室,静脉制剂(白蛋白、免疫球蛋白、凝血因子)使用广泛,亦可能造成假阳性。④对于长期大量应用抗生素的患者,磺胺类药物可能造成假阳性。

3.3 特异性、阴性预测值 本次研究中,G 试验的阴性预测值较阳性预测值更有意义,移植术后、肝硬化、慢性呼吸系统疾病患者阴性预测值分别为 91%、88.7%、88.2%,这表明 G 试验用于排除真菌感染可信度较高;但部分特异性仍较低,恶性肿瘤患者仅为 63.4%,导致其假阴性的可能原因有:①根据血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第四次修订版)[11],对于具有高危因素的侵袭性真菌病患者,在出现感染症状前可进行预防用药,以及治疗过程中的用药均可能导致假阴性。②化疗所致粒细胞缺乏症患者,由于其免疫系统对真菌破坏减少,血液中释放的(1-3)-β-D 葡聚糖减少,可导致实验假阴性。有研究表明不伴粒细胞缺乏的侵袭性真菌感染患者 G 试验检测的结果平均值为(171.9±29.6)pg/ml,中位值为 95.8 pg/ml,伴粒细胞缺乏的侵袭性真菌感染患者 G 试验检测的平均值为(64.4±17.1)pg/ml,中位值为 32.9 pg/ml,较不伴粒细胞缺乏的患者阳性率明显下降[12]。③部分真菌 G 试验难以检测,在曲霉菌、近平滑念珠菌、毛霉菌、新型隐球菌数据中,其假阴性率较其他真菌检测偏高,由于它们荚膜较厚,菌体难以破坏。

3.4 ROC 曲线 本次研究 ROC 曲线面积为 0.65,与其敏感度、特异度等数据分析相符合,说明 G 试验具有一定临床可用性但准确性较低。

为提高 G 试验的可信度,①必须保证标本的正确采集及运送:应在运用抗菌药前采集标本,已经用药或者输注了静脉制剂由于病情要求又不可停药,需在下次用药或输注前采集,采集中避免接触热敏原如纤维素膜,在尽量短的时间内送至实验室检测,这需要提高工作人员专业素养。②为提高 G 试验检测价值,需对 G 试验进行改良,该实验抗干扰能力较弱,在进行检测前可对血清或者全血标本进行处理,以减少其干扰,其改良方法有待进一步探究。③对于伴有粒细胞缺乏的患者应在粒细胞减少之初进行检测,研究表明相较于中性粒细胞下降 50%时进行检测,在粒细胞下降之初进行检测,患者确诊侵袭性真菌感染的时间可提前 5 d,这对于该病的死亡率产生巨大影响。

G 试验检测侵袭性真菌感染的临床应用价值并不

AEC II 细胞不同毒力结核分枝杆菌感染后炎症因子及 TLRs 信号通路的表达变化

刘卫国, 崔俊伟, 张静, 王永亮, 李振云

新乡医学院第一附属医院结核内科, 河南 卫辉 453100

摘要: **目的** 研究肺泡 II 型(AEC II)细胞不同毒力结核分枝杆菌感染后炎症因子及 Toll 样受体(TLRs)信号通路的表达变化,为结核分枝杆菌的免疫治疗提供参考。 **方法** 建立结核分枝杆菌强毒力株 H37Rv 与弱毒力株 BCG 菌株感染的 AEC II 细胞模型,在感染 12 h 后采用荧光定量 PCR、Western blot 技术等分析 TLRs 信号通路及炎症因子的表达。 **结果** 强毒力 H37Rv 株感染 12 h 时细胞 TLR2 mRNA、TLR4 mRNA 相对表达量分别为(1.73±0.35)、(1.87±0.52),弱毒力 BCG 株感染分别为(1.18±0.34)、(1.33±0.28),比较差异有统计学意义($P<0.05$);强毒力 H37Rv 株感染 12 h 时 IL-6、IL-8 及 TNF- α 蛋白表达水平(ODI 值)分别为(2.74±0.57)、(2.95±0.43)、(5.12±0.71),弱毒力 BCG 株感染分别为(0.73±0.21)、(0.87±0.22)、(1.85±0.30),比较差异有统计学意义($P<0.05$);两种毒力结核分枝杆菌菌株感染 12 h 后细胞 TLR2 mRNA、TLR4mRNA 表达量与 IL-6、IL-8 及 TNF- α 蛋白表达量之间均存在正相关性($P<0.05$)。 **结论** 强毒力较弱毒力结核分枝杆菌感染更能活化 AEC II 细胞 TLRs 信号通路,促进炎症细胞因子分泌,介导机体炎症反应及影响机体免疫功能。

关键词: 肺泡 II 型细胞; 毒力; 结核分枝杆菌; 感染; 细胞因子; Toll 样受体; 信号通路

中图分类号:R378.91⁺1 文献标识码:B 文章编号:1006-3110(2017)08-0992-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2017.08.030

Changes of expression of inflammatory cytokine and Toil-like receptor signaling pathway in alveolar epithelial type II cells infected with different virulence of *Mycobacterium tuberculosis*

LIU Wei-guo, CUI Jun-wei, ZHANG Jing, WANG Yong-liang, LI Zhen-yun

Department of Tuberculosis Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Weihui, Henan 453100, China

Abstract: **Objective** To study the changes of expression of inflammatory cytokine and Toil-like receptors (TLRs) signaling

作者简介:刘卫国(1968-),男,河南延津人,本科学历,副主任医师,研究方向:结核病的诊治。

理想,这需要不断探究新的检测方法或者对目前方法进行改良,只有尽早且准确地诊断侵袭性真菌感染才能及时挽救更多患者的生命。

参考文献

- [1] 黎新桂. 侵袭性真菌感染实验室诊断研究进展[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(4):395-396.
- [2] 徐承杰, 吕兰凤, 李术惠, 等. G 实验的临床意义[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(4):493-494.
- [3] 蒋燕萍, 余进, 李若瑜, 等. 血浆(1,3)- β -D-葡聚糖检测方法对诊断侵袭性真菌感染的作用[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(10):1171-1172.
- [4] 匡红, 周琳瑶, 刘书荣, 等. G 实验与真菌培养在临床深部真菌感染辅助诊断的价值[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(23):3308-3309.
- [5] Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, et al. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis [J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(6):750-770.
- [6] Badiie P, Alborzi A, Karimi M, et al. Diagnostic potential of nested PCR, galactomannan EIA, and beta-D-glucan for invasive aspergillo-

sis in pediatric patients[J]. J Infect Dev Countr, 2012, 6(4):352-357.

- [7] Alexander BD, Smith PB, Davis RD, et al. The (1,3) β -D-glucan test as an aid to early diagnosis of invasive fungal infections following lung transplantation [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11):4083-4088.
- [8] 于凯江, 方强, 刘大为. 重症患者侵袭性真菌感染诊断与治疗指南(2007)[J]. 中华内科杂志, 2007, 46(11):960-966.
- [9] 蒋伟, 周峥, 李少增, 等. (1,3)- β -D-葡聚糖检测对深部真菌感染的诊断意义[J]. 实用预防医学, 2014, 21(1):89-91.
- [10] 李丽华, 李明友, 林茂锐, 等. 血浆 1-3- β -D 葡聚糖检测联合真菌培养对深部真菌感染诊断的价值[J]. 现代医院, 2014, 14(1):25-27.
- [11] 黄晓军. 血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第四次修订版)[J]. 中华内科杂志, 2013, 52(8):704-709.
- [12] Ellis M, Al-Ramadi B, Finkelman M, et al. Assessment of the clinical utility of serial β -D glucan concentrations inpatients with persistent neutropenic fever[J]. J Med Microbiol, 2008.

收稿日期:2017-04-06