

(1,3)- β -D 葡聚糖检测对侵袭性真菌感染的诊断意义

李 军^{1,2}, 王浚霖², 陈 伟², 黎 敏², 邓少丽², 陈 鸣² (1. 青海省西宁市解放军第四医院 检验科 810007; 2. 第三军医大学大坪检验科, 重庆 400042)

【摘要】 目的 探讨血浆(1,3)- β -D 葡聚糖检测对侵袭性真菌感染的诊断价值。**方法** 应用 MB-80 微生物动态快速检测系统及 GKT25M Set 动态真菌检测试剂盒定量检测血浆中(1,3)- β -D 葡聚糖的含量,并进行统计学分析。**结果** 血浆(1,3)- β -D 葡聚糖检测法阳性 53 例,阳性率 66.3%;真菌培养法 38 例阳性,阳性率为 47.5%,血浆(1,3)- β -D 葡聚糖检测法阳性率明显高于真菌培养法($\chi^2=31.3313, P<0.05$)。侵袭性真菌感染培养阳性组血浆(1,3)- β -D 葡聚糖含量为(88.85 $\pm$ 25.26)pg/mL,侵袭性真菌感染培养阴性组血浆(1,3)- β -D 葡聚糖含量为(28.69 $\pm$ 12.95)pg/mL,20 例健康对照组两法均为阴性,统计学处理表明侵袭性真菌感染组血浆(1,3)- β -D 葡聚糖浓度明显高于正常对照组($t=4.011, P<0.05$),而且侵袭性真菌感染培养阳性组血浆(1,3)- β -D 葡聚糖浓度亦明显高于侵袭性真菌感染培养阴性组($t=2.349, P<0.05$)。**结论** 血浆(1,3)- β -D 葡聚糖检测较传统的真菌培养法简便、快速、阳性率高,可用于侵袭性真菌感染的早期快速诊断。

【关键词】 (1,3)- β -D 葡聚糖; 真菌; 侵袭性感染

DIO:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.17.006

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)17-1804-02

Diagnostic value of plasma (1,3)- β -D-glucan detection for invasive fungal infection LI Jun^{1,2}, WANG Jun-ji², CHEN Wei², LI Min², DENG Shao-li², CHEN Ming². 1. The 4th Hospital, PLA, Xining, Qinghai, 810007, China; 2. Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

【Abstract】 Objective To explore the diagnostic value of plasma (1,3)- β -D-glucan in the detection of invasive fungal infection. **Methods** The level of (1,3)- β -D glucan was detected by microbiology kinetic rapid detection system MB-80 and kinetic mycetes detection kit GKT-5M set, and the results were statistically analysed. **Results** There were 53 positive patients were identified by the detection of plasma (1,3)- β -D-glucan, with the positive rate of 66.3%; 38 positive samples were identified by fungal culture method, with the positive rate of 46.7%. The positive rate of the former is obviously superior to the latter ($\chi^2=31.3313, P<0.05$). The concentration of plasma (1,3)- β -D-glucan in invasive fungal infection group with positive fungal culture was 88.85 $\pm$ 25.26 pg/mL, while the concentration of plasma (1,3)- β -D-glucan in invasive fungal infection group with negative fungal culture was 28.69 $\pm$ 12.95 pg/mL. All the samples in control group were negative in the comparison by the two methods. The concentration of (1,3)- β -D-glucan in invasive fungal infection group was significantly higher than that of the control group ($t=4.011, P<0.05$), and significant difference was also be found in the concentration of (1,3)- β -D-glucan in invasive fungal with or without positive fungal cultivation results ($t=2.349, P<0.05$). **Conclusion** With more convenient, faster and higher positive rate than fungal culture, the detection of serum (1,3)- β -D-glucan can be used in the early diagnosis of invasive fungal infection.

【Key words】 (1-3)- β -D-glucan; fungal; invasive infection

近年来由于造血干细胞移植、实体器官移植的广泛开展、高强度免疫抑制剂和大剂量化疗药物的应用以及各种导管的体内介入、留置等,临床上侵袭性真菌感染(invasive fungal infections, IFI)的患病率明显上升,IFI 也日益成为导致骨髓及器官移植受者、接受化疗的恶性血液病和恶性肿瘤患者、AIDS 以及其他危重病患者发生严重并发症及重要死亡原因之一^[1]。随着免疫抑制患者的增多,临床中发生侵袭性真菌感染的概率也在升高。一般来说,侵袭性真菌感染通常发生于危重患者,对于这些患者的治疗成功与否很大程度上取决于能否快速识别入侵的病原菌。目前临床上诊断 IFI 的方法主要由宿主因素、临床特征、微生物学检查和组织病理学 4 部分组成。近年来出现了一些快速诊断技术如高分辨 CT(HRCT)、检测真菌抗原和核酸等非培养诊断技术,这些技术与 Prentice 等^[2]提出的侵袭性真菌感染危险分层相结合使得侵袭性真菌感染早期

诊断和及时治疗成为可能。通过检测体液中真菌抗原或代谢物来诊断侵袭性真菌感染的研究很多^[3],其中之一就是关于真菌的细胞壁成分——(1,3)- β -D 葡聚糖。

(1,3)- β -D 葡聚糖是除接合菌属外普遍存在于真菌细胞壁的一种特征性的多糖成分,其在正常人血浆中的浓度很低,而在侵袭性真菌感染者体内却可明显增高,故检测患者血中(1,3)- β -D 葡聚糖,可预测侵袭性真菌感染。本研究的目的是通过对疑似侵袭性真菌感染患者血浆中(1,3)- β -D 葡聚糖的检测,比较这种新的检测方法与传统实验室的培养方法在侵袭性真菌感染诊断方面的准确性,探讨血浆(1,3)- β -D 葡聚糖检测对侵袭性真菌感染的诊断价值,为快速、准确、高效诊断侵袭性真菌感染提供新的思路和方法。

1 对象与方法

1.1 病例选择 疑似侵袭性真菌感染患者 80 例,男 50 例,女

30 例, 年龄 6~95 岁, 平均(55.5±21.3)岁, 来自 2008 年 8 月至 2009 年 8 月在本院 ICU、血液科、呼吸科、小儿科和肾内科的住院患者, 其中经培养证实存在侵袭性真菌感染者 38 例, 感染部位包括呼吸道、泌尿道、血液及静脉插管相关性血流感染, 包括白假丝酵母菌 15 株、光滑念珠菌 6 株、热带念珠菌 4 株、克柔念珠菌 3 株、曲霉菌 3 株。正常对照组 20 例, 均为来自本院的健康体检者。

1.2 标本采集 入选患者进行抗生素治疗 1 周后采血, 分送血浆葡聚糖检测和血真菌培养, 同时送痰液、血液真菌培养及真菌涂片。取样过程监测保持尽量无菌原则以减少污染, 样本接种于本院实验室标准真菌培养基, 真菌的通过 VITEK 2 Compact 全自动微生物系统进行识别。

1.3 仪器与试剂 实验设备: MB-80 微生物快速动态检测系统, 洁净工作台, 低速离心机(4 000 r/min); 实验附件: 200 μL 无热源吸头, 20~200 μL 加样枪, TO1 电加热恒温仪(70 ℃); 采血器具: 无热源真空采血管(肝素钠抗凝); 试剂盒: GKT25M Set 动态真菌检测试剂盒。

1.4 血浆(1,3)-β-D 葡聚糖检测方法 无菌操作, 用无热源真空采血管取静脉血 2 mL, 混匀, 然后使用低速离心机立刻进行 3 000 r/min 离心 1 min 得富含血小板血浆(分离出血浆应在 10 min 内使用完毕); 取上述血小板血浆 0.1 mL 加入装有 0.9 mL 样品处理液中轻轻混匀后, 70 ℃保温 10 min, 取出后立刻放入冷水浴中冷却 30 ℃以下, 即为待测血浆样品; 取待测血浆样品 0.2 mL 加入反应主试剂中, 轻轻混匀约 20 s, 待完全溶解后用加样枪转移至 10 mm×65 mm 无热源平底反应管中, 立刻插入 MB-80 微生物动态检测系统中进行反应, 反应结束后自动计算含量。厂家提供的对照血浆中真菌 β 葡聚糖正常值为小于 20 pg/mL。

1.5 统计学方法 检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较用 *t* 检验, 率的比较用 χ^2 检验, 以 SPSS11.0 统计软件进行, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 正常对照组及侵袭性真菌感染组(1,3)-β-D 葡聚糖检测结果 侵袭性真菌感染培养阳性组血浆(1,3)-β-D 葡聚糖含量为(88.85±25.26)pg/mL, 侵袭性真菌感染培养阴性组血浆(1,3)-β-D 葡聚糖含量为(28.69±12.95)pg/mL, 正常对照组血浆(1,3)-β-D 葡聚糖含量为(5.48±2.11)pg/mL, 经统计学处理, 侵袭性真菌感染培养阳性组及培养阴性组血浆(1,3)-β-D 葡聚糖含量均显著高于正常对照组(*t* = 4.011、6.053, *P* < 0.05), 且侵袭性真菌感染培养阳性组血浆(1,3)-β-D 葡聚糖含量亦显著高于培养阴性组(*t* = 2.349, *P* < 0.05)。

表 1 真菌培养法及血浆(1,3)-β-D 葡聚糖检测对侵袭性真菌感染的阳性检出结果比较(*n*)

(1,3)-β-D 葡聚糖检测法	真菌培养法		合计
	+	-	
+	37	16	53
-	1	26	27
合计	38	42	80

2.2 血浆(1,3)-β-D 葡聚糖含量检测与真菌培养阳性检出结果比较 对 60 例疑似侵袭性真菌感染的患者进行真菌培养及

血浆(1,3)-β-D 葡聚糖含量检测(含量大于 20 pg/mL 判为阳性), 对两种方法的阳性检出结果进行比较, 结果见表 1。经统计学处理, 这两种方法诊断侵袭性真菌感染的阳性结果差异有统计学意义(χ^2 = 31.331 3, *P* < 0.05), 血浆(1,3)-β-D 葡聚糖检测阳性结果显著高于真菌培养法。

3 讨 论

随着医疗技术的发展, 使危重患者生存时间的延长, 广谱抗生素、免疫抑制剂以及皮质类固醇激素的广泛应用导致 IFI 比以前更加常见, 其原因就在于侵袭性真菌感染的早期诊断困难, 因而不能及时对患者进行抗真菌治疗。有一部分侵袭性真菌甚至要到尸检时才能确诊^[4]。(1,3)-β-D 葡聚糖含量检测和真菌培养作为辅助诊断侵袭性真菌感染的两种实验室检测方法, 明确其临床价值就显得相对突出。

真菌培养作为传统的诊断侵袭性真菌感染的方法之一, 它的优点是能明确诊断引起感染的真菌种类, 并可用针对该病原真菌进行抗微生物药物敏感实验, 临床医生可以根据药敏结果选择具有针对性的抗微生物药物; 同时它最大的缺点是真菌培养需要的时间相对较长, 一般要 2 d, 有的需要 4~5 d, 无法进行早期诊断。

(1,3)-β-D 葡聚糖是酵母和丝状真菌细胞壁的多聚糖成分, 占真菌细胞壁成分的 50% 以上, 作为真菌抗原具有较高的特异性, 原核生物、病毒和人体细胞均不存在这种多聚糖^[5]。因此, 它在血液及无菌体液中的存在可以很大程度上视为 IFI 的标志。(1,3)-β-D 葡聚糖可以被 G 因子检测出来, G 因子是马蹄蟹的一种凝血因子^[5]。利用真菌 β 葡聚糖激活酶反应试剂中的相应因子后形成凝固蛋白, 根据其浊度变化对真菌 β 葡聚糖浓度进行定量。常见的病原菌为曲霉菌和念珠菌, 通过葡聚糖水平测定都可以检测出来, 甚至有报道卡氏肺囊虫感染时葡聚糖水平也会出现升高, 可能与其具有真菌的特征有关^[6]。有研究表明新生隐球菌产生葡聚糖少于念珠菌和曲霉菌, 而曲霉菌感染时葡聚糖上升的程度与宿主免疫力和病原的数量有关, 只要霉菌被厚壁的纤维组织包绕, 葡聚糖就很难进入血中^[7]。本实验的病例未包括隐球菌感染, 可能与收集病例数量少有关, 有待于扩大病例数量后进行观察。

本研究中, 侵袭性真菌感染培养阳性组 31 例标本中(1,3)-β-D 葡聚糖含量有 1 例低于 20 pg/mL, 为阴性。作者追踪检测了此患者 1 周前和 1 周后两份血浆标本中(1,3)-β-D 葡聚糖含量, 发现结果仍呈阴性, 并经再次痰标本培养未培养出真菌, 认为此阴性标本首次培养出的白假丝酵母菌可能系污染所致; 在侵袭性真菌感染培养阴性组 32 例标本中发现了 16 例(1,3)-β-D 葡聚糖阳性, 而健康对照组 20 例标本两种方法均显示阴性。经比较真菌培养法与(1,3)-β-D 葡聚糖检测法对侵袭性真菌感染的诊断阳性率, 前者为 47.5%, 后者为 66.3%, 血浆(1,3)-β-D 葡聚糖检出法阳性率明显高于真菌培养法(χ^2 = 31.331 3, *P* < 0.05)。真菌培养法一般需要 5 d 才能发出报告, 而(1,3)-β-D 葡聚糖检测法只需 2 h 左右就能得出实验结果, 大大提高了诊断效率, 为临床治疗赢得了宝贵的时间。

尽管有许多试剂盒可以检测葡聚糖, 但在除日本外的其他国家对其检测的经验有限。国内目前上市的葡聚糖检测手段包括金山川公司的比浊法, 一些国内的研究证明其可以有效的诊断侵袭性真菌感染。本研究侵袭性真菌感(下转第 1807 页)