

血浆(1,3)- β -D 葡聚糖检测对深部真菌感染诊断的临床评价

黄云昆, 史玉芹, 朱雯梅, 王 佳, 姚 瑶 (昆明医科大学附属延安医院检验科, 昆明 650051)

【摘要】 目的 探讨血浆中(1,3)- β -D 葡聚糖检测(G 试验)对深部真菌感染诊断的临床应用价值。**方法** 通过查阅住院患者病历的回顾性调查分析,对昆明市延安医院 2011 年 3 月至 2012 年 2 月长期使用广谱抗菌药物、免疫抑制剂或糖皮质激素等,且临床出现感染症状的 120 例怀疑真菌感染的住院患者所做血浆(1,3)- β -D 葡聚糖的检测结果,结合临床最终诊断结果进行评价,并分析不同的阳性预测值时 G 试验的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值。**结果** 120 例住院患者中按临床诊断标准诊断为深部真菌感染 37 例,临床资料不明确的 8 例(剔除),实际有效病例 112 例。血浆(1,3)- β -D 葡聚糖检测试验分别以 10、20、50 pg/mL 为临界值时,其敏感度分别为 73.0%(27/37)、67.6%(25/37)、56.8%(21/37);特异度分别为 66.7%(50/75)、76.0%(57/75)、86.7%(65/75);阳性预测值分别为 51.9%(27/52)、58.1%(25/43)、67.7%(21/31);阴性预测值分别为 83.3%(50/60)、82.6%(57/69)、80.2%(65/81)。**结论** 血浆(1,3)- β -D 葡聚糖用于深部真菌感染的诊断具有简便、快速、阳性率高的优点,可用于深部真菌感染的早期诊断以弥补传统方法的不足,但影响因素也较多,实际应用中需密切结合临床情况和动态监测以排除假阳性。

【关键词】 (1,3)- β -D 葡聚糖; 真菌感染; G 试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.05.004 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)05-0520-02

Clinical evaluation of plasma(1,3)- β -D-glucan in diagnosis of deep fungal infection HUANG Yun-kun, SHI Yu-qin, ZHU Wen-mei, WANG Jia, YAO Yao (Department of Clinical Laboratory, Affiliated Yan'an Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650051, China)

【Abstract】 Objective To study the clinical application value of plasma(1,3)- β -D-glucan in the diagnosis of deep fungal infection. **Methods** Through referring to the medical records of hospitalized patients, the retrospective investigation analysis was performed on 120 inpatients with suspicious deep fungal infection, clinical infectious symptoms, long term use of wide spectrum antibacterials, immunosuppressant or corticosteroids in this hospital from March 2011 to February 2012. The evaluation was conducted on the plasma(1,3)- β -D-glucan detection results in combination with the clinical final diagnosis. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of G-test were analyzed according to different positive judgment values. **Results** Among 120 hospitalized patients, 37 cases were infected with deep fungi according to the clinical diagnosis standard, 8 cases(exclusion) had undetermined clinical data and 112 cases were valid. With 10, 20, 50 pg/mL as the critical value, the sensitivities were 73.0%(27/37), 67.6%(25/37) and 56.8%(21/37) respectively; the specificities were 66.7%(50/75), 76.0%(57/75) and 86.7%(65/75) respectively; the positive predictive values were 51.9%(27/52), 58.1%(25/43) and 67.7%(21/31) respectively; the negative predictive values were 83.3%(50/60), 82.6%(57/69) and 80.2%(65/81). **Conclusion** Plasma(1,3)- β -D-glucan detection has the advantages of simplicity, rapidity and high positive rate in diagnosing deep fungal infection and can be used in early diagnosis of deep fungal infection for making up the deficiency of the traditional method. But there are more influencing factors. In the practical application, plasma(1,3)- β -D-glucan detection needs to be combined with the clinical condition and dynamic monitoring for removing the false positive.

【Key words】 (1,3)- β -D-glucan; deep fungal infection; G test

近年来由于广谱抗菌药物、免疫抑制剂和抗肿瘤药物的广泛应用,以及各种导管的体内介入、留置、创伤性检查手段的逐步开展,自身免疫性疾病、艾滋病、糖尿病等基础疾病的发病率增加,免疫受损人群不断增加,深部真菌感染的发病率急剧上升^[1]。据我国医院感染监测网分析,院内深部真菌感染率至 20 世纪 90 年代末期已上升至 24.4%^[2],已成为医院感染的主要病原体之一。深部真菌感染可侵及到皮肤深层、肺、黏膜、肌肉、脑、消化道等多种组织和器官,如不及时、准确诊断和治疗,有较高的病死率,危害性较大,已越来越严重地威胁着人们的健康与生命。由于深部真菌感染的早期诊断困难,治疗药物有限,因此深部真菌的诊断尤其是快速诊断日益受到临床的重视。传统的微生物学检测方法如直接涂片镜检的检出率低,而

分离培养需要时间较长、阳性率低,不能满足临床早期、快速诊断的需要,其他方法如聚合酶链反应(PCR)、组织病理检查等也存在不同程度的局限性。近年来建立了多种通过检测真菌特异性抗原成分或特异性酶的非传统微生物学检测方法,其中通过检测真菌细胞壁特异性成分(1,3)- β -D 葡聚糖的 G 试验已广泛用于深部真菌感染的临床早期快速诊断中。在本研究中,通过回顾性分析对 G 试验的临床应用价值进行了评价,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 3 月至 2012 年 2 月昆明市延安医院住院并怀疑真菌感染的患者共 120 例,其中男 82 例,女 38 例,年龄 24~82 岁。

1.2 仪器与试剂 MB-80 微生物快速动态检测系统,TO2 智能恒温仪、无热源肝素抗凝采血管、无热源专用平底试管以及真菌(1,3)-β-D 葡聚糖检测试剂盒均由北京金山川科技发展有限公司提供。

1.3 G 试验方法 专用无热源肝素抗凝采血管采集静脉血 4 mL,3 000 r/min 离心 1 min,取富含血小板的上清液 0.1 mL,加入 0.9 mL 的试剂盒样品处理液中,混匀后置于恒温仪加热区 70 ℃ 恒温 10~15 min,取出后立刻放入恒温仪冷却区中 3~5 min,为待测血浆样品(切忌震荡)。取待测血浆样品 0.2 mL 直接加入酶反应主剂中,溶解后移液至无热源专用平底试管中(不要产生气泡),插入 MB-80 微生物快速动态检测系统中进行反应,反应结束后由标准曲线自动计算出待测血浆中(1,3)-β-D 葡聚糖含量。

1.4 数据分析 分别计算 G 试验临界值为 10、20、50 pg/mL 时的敏感度(G 试验阳性患者数/患者总数×100%)、特异度(G 试验阴性的非患者数/非患者总数×100%)、阳性预测值(真阳性结果数/G 试验阳性结果总数×100%)和阴性预测值(真阴性结果数/G 试验阴性结果总数×100%)。深部真菌感染的临床诊断标准参照中国内科杂志编辑委员会制定的侵袭性肺部真菌感染的诊断标准。此标准分为拟诊、临床诊断和确诊 3 个层次,本次试验以临床诊断标准作为评价标准。

2 结 果

2.1 临床诊断情况 通过查阅住院患者病历,120 例住院患者中经临床诊断为深部真菌感染的 37 例,未诊断深部真菌感染的 75 例,临床资料不明确的 8 例(剔除);实际有效病例 112 例。G 试验以仪器厂商推荐的 10 pg/mL 为临界值时阳性 52 例,阴性 60 例;以 20 pg/mL 为临界值时阳性 43 例,阴性 69 例;以 50 pg/mL 为临界值时阳性 31 例,阴性 81 例。

2.2 G 试验的敏感度、特异度 分别以 10、20、50 pg/mL 为临界值时,G 试验的敏感度、特异度、阳性预测值(PPV)和阴性预测值(NPV)见表 1。

表 1 (1,3)-β-D 葡聚糖检测不同阈值的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值(%,n=120)

國值(pg/mL)	敏感度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
≥ 10	73.0(27/37)	66.7(50/75)	51.9(27/52)	83.3(50/60)
≥ 20	67.6(25/37)	76.0(57/75)	58.1(25/43)	82.6(57/69)
≥ 50	56.8(21/37)	86.7(65/75)	67.7(21/31)	80.2(65/81)

3 讨 论

近年来,深部真菌感染的发病率随着广谱抗生素、糖皮质激素和免疫抑制剂的应用呈逐年上升趋势。(1,3)-β-D 葡聚糖作为真菌细胞壁成分之一,一旦进入机体后,将引起真菌病,严重时将会引起严重的深部真菌感染疾病。因此,深部真菌感染对患者的健康与生命构成严重威胁。由于缺少有效的早期诊断手段,尽管采取了有力的抗真菌治疗,深部真菌感染的死亡率仍然很高,其重要原因之一是深部真菌感染的早期诊断困难,延误了临床抗真菌的治疗,使患者病情恶化,病死率增加。传统检测方法为真菌培养,真菌培养的确可为临床提供最为直接的诊断依据,但培养方法耗时长,阳性率低。而作为金标准的组织病理学和深部组织培养通常由于其创伤性,时常被患者和家属拒绝,导致确诊病例很少。本研究入选的病例只有 1 例组织病理确诊的病例,与既往文献报道结果一致^[3]。因此本次研究采用临床最终诊断结果作为方法学评价标准。

近年通过检测血液中真菌抗原或代谢物来诊断深部真菌感染的研究很多^[4]。(1,3)-β-D 葡聚糖抗原的检测(G 试验),是一种新的真菌抗原检测方法,在深部真菌感染早期诊断上有着重要意义。(1,3)-β-D 葡聚糖广泛存在于多种真菌细胞壁中,是真菌的特有多糖成分,占其干质量的 50% 以上,细菌、人和病毒都不含该成分。当真菌进入人体体液或深部组织后,经吞噬细胞的吞噬、消化等处理后,(1,3)-β-D 葡聚糖可从细胞壁中释放出来,使血液中(1,3)-β-D 葡聚糖含量升高。当真菌在体内含量减少时,机体可迅速清除(1,3)-β-D 葡聚糖,在浅部真菌中(1,3)-β-D 葡聚糖未被释放出来,故在体液中的量不增高^[5]。(1,3)-β-D 葡聚糖在健康人血浆中的浓度很低(常低于 10 pg/mL),而深部真菌感染者却可明显增高(常高于 20 pg/mL)^[6]。因此检测患者血中(1,3)-β-D 葡聚糖可预测深部真菌感染^[7]。从本研究结果可以看出,无论是以 10 pg/mL、20 pg/mL 还是 50 pg/mL 为临界值,其对深部真菌感染诊断的阳性率均明显高于传统的检测方法^[8-9]。有研究显示(1,3)-β-D 葡聚糖在体内的变化与病程呈平行关系,连续监测葡聚糖水平有利于预测抗真菌治疗的效果^[10]。在查阅病历中发现,1 例临床诊断侵袭性肺曲霉菌病患者,抗真菌治疗前两次 G 试验结果分别为 182.4 pg/mL、112.6 pg/mL,经伏立康唑治疗两周后再测 G 试验结果为 36.9 pg/mL。1 例肺泡灌洗液,痰培养均检出曲霉,涂片见真菌孢子,G 试验结果为 79.06 pg/mL,抗真菌治疗后 G 试验结果小于 10 pg/mL。因此连续监测葡聚糖水平对抗真菌治疗的效果有一定的意义。

利用 MB-80 微生物快速动态检测系统对(1,3)-β-D 葡聚糖抗原进行检测的方法,其特异性和敏感性可因设定的阳性临界值不同而不同,各实验室可根据自己实验室的实验条件建立相应的阳性判断值以达到最佳的实验诊断性能。在本研究中还发现,无论阳性临界值为 10 pg/mL、20 pg/mL 还是 50 pg/mL,均有部分与临床诊断不符的病例,其中主要是假阳性问题。调查发现在假阳性中,有 14 例患者检测前使用过入血清蛋白、免疫球蛋白等血液制品及抗肿瘤药物等,有 1 例是血液透析的患者,均为已知的造成假阳性结果的原因^[11],说明在临床实际应用中必须注意排除假阳性影响因素。此外调查中发现有 1 例金黄色葡萄球菌,1 例铜绿假单胞菌感染的患者 G 试验结果为阳性。可能是由于 G 试验的测定原理与内毒素相似,受血中细菌的干扰而造成假阳性。有 6 例不符病例,未能找出具体原因。

综上所述,G 试验作为一种深部真菌感染的早期、快速筛查方法有重要的临床应用价值。使用时需紧密结合患者的临床表现、影像学、病原学等其他检查方法,加强动态监测,排除影响因素的影响,就可发挥其快速、灵敏和准确的优点,给临床提供早期诊断治疗的实验依据,有效降低真菌感染病死率。

参考文献

[1] 张婴元. 侵袭性真菌感染的正确诊断和合理治疗是当前值得重视的问题[J]. 中国感染与化疗杂志,2007,7(1):1-3.
[2] 钟南山,叶枫. 深部真菌感染:新的挑战与展望[J]. 中华结核和呼吸杂志,2006,29(5):289-290.
[3] 赵勇,王红. 血浆(1,3)-β-D 葡聚糖对深部真菌感染诊断的研究[J]. 中国真菌学杂志,2007,2(4):202-206.
[4] 金欣,陈建魁,尹秀云. 侵袭性真菌感染实验室诊断研究进展[J]. 中国公共卫生,2007,23(8):1401-1403.
[5] 杨惠琴,梅亚宁. 血浆(1,3)-β-D 葡聚糖(下转第 523 页)

2.2 EV、CA-16 双阳性与 EV、EV-71 双阳性的年龄分布 3 岁以下患儿诊断为手足口病者 157 例,占 75.85%,表明手足口病的易感人群为 3 岁以下的婴幼儿。但各年龄段患儿 EV+CA-16 双阳性率与 EV+EV-71 双阳性率差异无统计学意义($\chi^2=2.60, P>0.05$)。见表 3。

肠道病毒类型	<i>n</i>	双阳性例数	非双阳性例数	阳性率(%)
EV+EV-71	433	66	367	15.24
EV+CA-16	433	141	292	32.56

表 3 EV、CA-16 双阳性与 EV、EV-71 双阳性的年龄分布[n(%)]

年龄(岁)	<i>n</i>	EV+CA-16 双阳性	EV+EV-71 双阳性
0.1~3	157	109(69.43)	48(30.57)
>3~5	42	27(64.29)	15(35.71)
>5	8	5(62.5)	3(37.5)

注:各年龄段患儿 EV+CA-16 双阳性率与 EV+EV-71 双阳性率的差异无统计学意义($\chi^2=2.60, P>0.05$)。

3 讨 论

手足口病是一种常见的肠道传染病,其常见病原体主要为 EV-71 和 CA-16,部分由肠道病毒 EV-71 型感染者的症状较严重,甚至出现少数患儿因中枢神经系统、循环系统、呼吸系统损害而导致死亡,引起社会广泛关注^[4]。然而此病是可预防、可控制、可治疗的,如果能够早期诊断、早期隔离、早期治疗,是可以治愈的,或者可以避免严重后果的发生。因此,如果能对手足口病病原学进行快速检测对该病的诊断、治疗以及预后极其重要。目前手足口病诊断以临床表现为主要手段,传统的实验室诊断方法有病毒分离、中和试验和 ELISA 等^[5]。病毒分离为诊断的金标准,但病毒分离时间长,要求高,需要特殊设备,而且操作繁琐,不利于快速诊断。血清中和试验和 ELISA 检测的是患者体内的抗体,然而抗体的产生较慢,并且其诊断灵敏度不高,故不适用于早期诊断。实时荧光 PCR 技术对手足口病的病原诊断具有重要价值,它操作简便,稳定性良好,重现性好^[6],可以在 3~4 h 内获得检测结果,可以作为手足口病肠道病毒的快速检测方法,为临床及时采取救治方案提供一种早期诊断依据^[7-8]。

本实验室采用实时荧光 RT-PCR 对本院 433 份疑似手足口病患儿粪便标本进行了检测,其中 EV 阳性 366 例,阳性率为 84.53%,CA-16 检出率为 34.87%,EV-71 的检出率为 15.24%;EV、CA-16 双阳性 141 例,阳性率 32.57%;EV、EV-

71 双阳性 66 例,阳性率为 15.24%,表明本地区 2011 年手足口病患者中 CA-16 和 EV-71 均有感染,但 CA-16 阳性率明显高于 EV-71,表明本地区今年以 CA-16 感染为主($P<0.01$)。然而有相当部分标本(约 40.71%)检出了 EV 病毒通用型,而 EV-71 和 CA-16 却均未检出,表明还存在除 EV-71 和 CA-16 以外的其他型别的肠道病毒所致的感染,究竟为何种肠道病毒感染还有待于进一步确认。

综上所述,作者认为实时荧光 RT-PCR 在手足口病的诊断应用中,因其检测标本类型范围广,既可采用大便或肛拭子标本,也可采用咽拭子、疱疹液等标本等进行检测,标本采集方便,家长易于接受;而且能够在 3~4 h 内获得检测结果,结果快速、准确,操作简便,可以作为手足口病肠道病毒的常规检测方法。并且还可以对手足口病病原学进行初步分型,对该病的早期诊断、治疗以及预后均有极其重要的作用。

参考文献

[1] 张畅斌,尹爱华,何天文,等.一种经济便捷的手足口病原 RNA 提取方法[J].中国现代药物应用,2010,4(21):81-82.

[2] Chen SC,Chang HL,Yan TR,et al. An eight-year study of epidemiologic features of enterovirus 71 infection in Taiwan[J]. Am J Trop Med Hyg,2007,77(1):188-191.

[3] 中华人民共和国卫生部.手足口病诊疗指南(2011 年版)[S].北京:中华人民共和国卫生部,2011.

[4] 田玲,汪楠,张宏梁,等.手足口病(EV71)防治[J].首都医科大学学报,2008,29(3):253-256.

[5] 吴海波,郭潮潭.肠道病毒 71 型检测方法研究概况[J].国际流行病学传染病学杂志,2008,35(3):188-190.

[6] 陈禄彪,张广铮,施巧素,等.手足口病病原的荧光 PCR 法检测及其临床特点——附 20 例分析[J].新医学,2009,40(7):464-466.

[7] 何雅青,何丽芸,姚相杰,等.荧光定量 RT-PCR 快速检测手足口病病原研究[J].中国热带医学,2008,8(10):1675-1677.

[8] 王七生,秦金勇,蒋立立.实时荧光 PCR 技术在手足口病原学检查中的应用[J].中国医药导报,2011,8(17):90-91.

(收稿日期:2012-08-28 修回日期:2012-11-07)

(上接第 521 页)

对深部真菌感染诊断的临床意义[J].中国真菌学杂志,2011,6(3):136-138.

[6] Hachem RY,Gontoyalli DP,Chemaly RF,et al. Utility of galac-tomannan enzyme inmunoassay and(1,3)- β -D-glucan in diagnosis of invasive fungal infection low sensitivity for Aspergillus fumigatus infection in hematologic malignancy patients [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(1): 129-133.

[7] 金欣,陈建魁,于农,等.真菌 D 葡聚糖检测对侵袭性肺部真菌感染的临床意义[J].河北医药,2011,33(3):378-379.

[8] 孟祥红,王冬,董梅,等.血浆 1,3- β -D 葡聚糖检测的临床意义[J].中国实验诊断学,2010,14(8):1298-1299.

[9] 闻平.血清内毒素和(1,3)- β -D 葡聚糖检测方法的探讨[J].上海医学检验杂志,2001,16(2):96-97.

[10] 李世荣,王红,文艳.血浆(1,3)- β -D 葡聚糖与抗深部白色念珠菌感染药物疗效关系的实验研究[J].临床和实验医学杂志,2007,6(6):20-22.

[11] 杨洁琼.深部真菌感染患者血浆(1,3)- β -D 葡聚糖检测的临床价值[J].现代检验医学杂志,2009,24(2):12-13.

(收稿日期:2012-08-23 修回日期:2012-11-17)