

# 支气管肺泡灌洗在肺部真菌感染中的诊断价值

焦洋 白冲

(第二军医大学附属长海医院呼吸内科,上海 200433)

**【摘要】** 近年来,肺部真菌感染的发病率不断增加,尽管培养是真菌诊断的金标准,但其耗时较长,临床应用受限。支气管镜下肺泡灌洗技术方便、快捷、创伤小,通过对应用该技术所获得的支气管肺泡灌洗液行细胞学检查、常规染色、真菌抗原和分子学技术检测已是快速诊断某些真菌感染的重要手段之一。

**【关键词】** 灌洗;真菌;细胞学;抗原检测;肺

**【中图分类号】** R 446.53 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2010)05-0316-05

## Diagnostic value of Bronchoalveolar Lavage in Fungal Infections

JIAO Yang, BAI Chong

(Respiratory Department, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**【Abstract】** The incidence of pulmonary fungal infection increased recently. Fungal culture is gold-standard for diagnosis but restricted for time-consuming. Bronchoscopic lavage is safe, rapid and minimally invasive to obtain bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Cytologic analysis, antigen detection and molecular technique to BALF becoming important for rapid diagnosis of fungal infections.

**【Key words】** lavage; fungus; cytology; antigen detection; lung

[Chin J Mycol, 2010, 5(5):316-320]

可弯曲支气管镜下肺泡灌洗 (bronchoalveolar lavage, BAL) 是用来诊断肺部感染及恶性肿瘤的重要工具。在大多数肺部真菌性疾病中, BAL 的应用仅停留在对支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 的病原菌培养上, 由于支气管镜下的 BAL 检查并非无菌性的操作, 培养的结果常难以区别定植还是感染。近年来, 分子技术、真菌抗原检测等技术的应用, 使真菌感染诊断的准确率有了显著提高, 本文对 BAL 及其他检验技术在诊断肺部真菌感染中的应用进行探讨。

### 1 诊断技术

对于医院获得性或呼吸机相关性肺炎的患者而言, 区别定植还是感染是非常重要的。正确的 BALF 标本收集、运送、细胞学准备的过程能在相当大的程度上影响诊断率。按照我国《支气管肺泡灌洗液细胞学检测技术规范(草案)》<sup>[1]</sup> 中的要求,

BAL 操作技术如下。

**灌洗部位选择** 对弥漫性间质性肺疾病选择右肺中叶 (B1 或 B5) 或左肺舌段, 局限性肺病变则在相应支气管肺段进行 BAL。

**BAL 操作步骤** ① 在要灌洗的肺段经活检孔通过一细硅胶管注入 2% 利多卡因 1~2 mL, 做灌洗肺段局部麻醉。② 将纤支镜顶端紧密楔入段或亚段支气管开口处, 再经活检孔通过硅胶管快速注入 37℃ 灭菌生理盐水, 每次 25~50 mL, 总量 100~250 mL, 一般不超过 300 mL。③ 立即用 50~100 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 负压吸引回收灌洗液, 通常回收率为 40%~60%。④ 将回收液体立即用双层无菌纱布过滤除去黏液, 并记录总量。⑤ 装入硅塑瓶或涂硅灭菌玻璃容器中 (减少细胞黏附) 黏附, 置于含有冰块的保温瓶中, 立即送往实验室检查。

**BALF 标本的合格标准** BALF 中没有大气道分泌物混入; 回收率 > 40%, 存活细胞占 95% 以上; 红细胞 < 10% (除外创伤/出血因素), 上皮细胞 < 3%~5%, 涂片细胞形态完整, 无变形, 分

作者简介:焦洋,男(汉族),硕士,住院医师. E-mail:blazingsun321@hotmail.com

通讯作者:白冲, E-mail:bc7878@sohu.com

布均匀。

近年来,防污染样本毛刷(protected specimen brush, PSB)及保护性支气管肺泡灌洗(protected bronchoalveolar lavage, PBAL)的应用,在很大程度上减少了气道中定植菌的污染。但 Boesrsma 等<sup>[2]</sup>比较了 PSB、PBAL 及 BAL 在粒细胞缺乏的患者中肺部感染诊断的应用,结果表明 PSB-PBAL 的阳性率为 57%, BAL 为 43%,而在这些病例中,经鉴定病原学诊断正确的概率分别为 PSB-PBAL 中的 57% 和 BAL 中的 67%。由此可见应用支气管镜下 PSB 取得的样本对于提高粒细胞缺乏患者中肺部真菌感染的阳性率并没有太大帮助。

## 2 肺孢子菌

在众多真菌性疾病的诊断中, BAL 对于感染卡氏肺孢子菌的 AIDS 患者最为适用。尽管有人主张用经支气管镜肺活检确诊卡氏肺孢子菌肺炎(PCP),但 BAL 诊断对 PCP 的敏感性为 98%<sup>[3]</sup>,并且相对于肺活检来说, BAL 更加安全。与其他真菌不同的是,肺孢子菌无法可靠培养出。因此,肺孢子菌感染主要的确诊方式仍是通过多种染色技术直接观察病原体。确诊 PCP 应该是在 BALF 中找到成簇的肺孢子菌的囊肿、泡沫状的肺泡巨噬细胞、泡沫状肺泡管型和活化的 T 细胞<sup>[4]</sup>。一些研究对比了用于诊断 PCP 的几种染色方法,结果显示 Grocott-Gomori 六胺银染色(GMS)选择性染色肺孢子菌囊壁,诊断的敏感性为 76.9%,但特异性高达 99.2%;瑞氏-吉姆萨染色可染病原体的各阶段,适用于细胞学涂片;巴氏染色(Pap)可染生物体周围被称作“泡沫体”的嗜酸性物质,是一种敏感性和精确度均可靠的诊断方法<sup>[5]</sup>。除常规染色外,在 BALF 涂片中应用荧光或酶标记的单克隆或多克隆抗体能提高诊断敏感性,但耗资费时,特异性相对不高。

因为难以培养出肺孢子菌,许多研究都投向了各种抗原检测和分子测定上。DNA 聚合酶链反应(PCR)检测的敏感性比传统显微镜检查法更高,并且有可能应用于多种无创性采集的标本上,如口咽冲洗标本、痰标本或 BALF。这些方法总的敏感性为 50%~90%,特异性为 73%~96%,其中在 BAL 中的敏感性可达到 89%~98%<sup>[6]</sup>。但 PCR 检测方法的假阳性率较高,而且不能够区分微生物的存活状态。为解决这个问题,Oliveria 等<sup>[7]</sup>研究出以快

速降解的 mRNA 为检测目标的逆转录 PCR 检测法,其敏感性为 67%~100%,特异性达到 100%。

## 3 隐球菌

痰和脑脊液中隐球菌抗原检测(CrAg)是诊断隐球菌感染的首选方法。对于单独的肺内感染、支气管内隐球菌病或二者同时感染又无法通过呼吸道分泌物检测时,支气管镜检查是有价值的, BAL 已经被证实在肺部隐球菌病的诊断中,其敏感性较支气管刷检更高。常规染色,如 Pap 或 GMS 直接观察下,隐球菌很容易被发现,但可能会和念珠菌或组织胞浆菌混淆。使用过碘酸-希夫(PAS)或黏液洋红染料特异性染色荚膜上的脂多糖成分,可以进一步明确诊断。墨汁染色是在脑脊液样本中检验的常用方法,但不适合在黏稠的呼吸道分泌物中应用。一项回顾性的分析指出 BAL 中 CrAg 检测的特异性和敏感性分别为 99% 和 71%<sup>[8]</sup>,然而其假阳性率也十分高,目前只在经由 BAL 或痰标本的直接检查时显示为隐球菌,并且仅在需要快速确认时才推荐使用该方法。PCR 在组织匀浆中的研究较多,但其在 BAL 诊断中价值尚不确切。Takahashi 等<sup>[9]</sup>的研究表明,在 BALF 中可以通过 PCR 检测新生隐球菌,但此方法并不比常规染色、培养或抗原检测更有优势。

## 4 念珠菌

念珠菌是临床标本中分离率最高的真菌,20%~55%的正常人痰中可以分离出念珠菌,其在气管支气管中的定植亦很常见。Wood 等<sup>[10]</sup>的研究表明,62 名创伤后使用机械通气的患者的 BALF 中念珠菌检测为阳性,在大多数没有采取任何抗真菌治疗的条件下,患者并没有发生系统性感染,亦没有过高的死亡率。

在免疫功能受损的患者中,定植真菌感染的发生率如耐药真菌感染的发病率一样正在上升。念珠菌肺炎的发生率为 0.23%~8%,存在念珠菌血症的免疫抑制患者的死亡率更是高达 40%<sup>[11]</sup>,从痰、气道分泌物、BALF、甚至肺组织中分离出的念珠菌更多的是作为定植菌的存在。尤其是在非中性粒细胞减少患者中,经支气管镜采样分离到的念珠菌,即使是高浓度,也被认为是污染,缺乏临床意义。临床上诊断侵袭性念珠菌肺部感染的标准,通常需要从无菌环境的血培养阳性,或组织学活检阳

性<sup>[12]</sup>。即使对于免疫功能受损的个体,仅仅从 BALF 中分离出念珠菌都并不足以表明有侵袭性念珠菌感染。由此可见,在鉴别感染还是定植的方法中,呼吸道获取的样本的培养结果对诊断并没有明显的帮助。数项以 PCR 和 DNA 微列检测真菌病原体的研究表明,这些方法可以检测出少量的念珠菌和其他真菌的 DNA,但对区分定植还是侵袭性感染同样并无多大帮助。

## 5 曲 菌

尽管曲菌也可能成为定植菌,与感染较难区分。但在有高危因素,如血液系统恶性肿瘤、干细胞移植的患者中,若从呼吸道标本中检测出曲菌,则可能是肺部感染的先兆。在免疫功能受损的患者中,侵袭性曲菌病的死亡率高达 92%<sup>[13]</sup>。近年来的数据表明,ICU 非免疫抑制患者中侵袭性曲菌病的发病率亦在增加。诊断曲菌感染的金标准是感染组织标本的活检—通过 PAS、GM 等染色法在显微镜下观察到细长、锐角二分叉的分隔菌丝。然而曲霉的组织学改变并非特异性,其他真菌(包括镰孢霉菌属、足放射病菌属)都有类似的组织病理表现。尽管培养是确诊的有效办法,但曲菌实验室培养中的相对不敏感性,影响了诊断的及时性;另一方面,在有众多并发症的患者身上获取肺部组织样本存在着较大风险。

BALF 中曲菌培养的阳性率不到 15%,而在 BALF 中应用曲菌酶联免疫荧光法,可提高诊断的敏感性<sup>[14]</sup>,但假阳性率较高,并且在固体标本中的应用价值尚不明确。在血液系统恶性肿瘤或干细胞移植的患者检测痰标本中半乳甘露聚糖试验(GM),可及时明确疑似侵袭性曲菌病的诊断。荟萃分析显示 BALF 中 GM 试验的敏感性和特异性分别为 79% 和 86%<sup>[15]</sup>,但在免疫功能正常的人群,BALF 中行 GM 检测则无意义<sup>[16]</sup>。Meersseman 等<sup>[17]</sup>研究了 BAL 中 GM 检验在危重患者中的应用后认为,BAL 中 GM 检验的敏感性有 88%,特异性 87%,较之痰 GM 检测、BAL 培养及直接染色检查的敏感性都有显著提高。必须注意的是,在使用哌拉西林-他唑巴坦、阿莫西林、阿莫西林-克拉维酸治疗的患者或其他双相型真菌感染(组织胞浆菌、肺炎芽生菌)的患者中,GM 检验可有假阳性结果。目前,尽管 GM 尚未被 FDA 批准用于 BALF 中的检验,但从研究数据表明,此方法在免疫受损患者

BALF 中的应用,能极大地提高诊断肺部曲菌感染的敏感性。

血标本中曲菌 DNA 的 PCR 检测方法也日趋成熟,18SrRNA 基因在曲菌基因序列中高度保守,用 PCR 的方法对 BALF 和血液研究,结果显示特异性达 89%,但此方法的敏感性并不比血抗原检测法更有优势,并且市场尚没有针对曲菌的 PCR 诊断成品试剂供应。实时定量 PCR 在侵袭性肺曲菌感染的免 BALF 中检测的敏感性只有 42%,特异性 100%<sup>[18]</sup>。当使用抗真菌药物后,其敏感性会进一步下降。

## 6 芽生菌病

芽生菌,属双相型真菌,主要流行于北美,近年来南美、非洲和亚洲均有报道,我国也有发现。芽生菌病的诊断需要单独培养出致病菌方能明确。BALF 和痰标本中细胞学的检查能为快速诊断提供帮助。例如,肺炎芽生菌是以体积大(10~15 μm)、广基底为特征的芽生菌,若有浓痰咳出,氢氧化钾湿制剂染色法是一种快速的诊断方法,在氢氧化钾溶液中可以看到特征性的砖格状细胞(也被称为“铜硬币”);在单个痰标本中,该菌的诊断率十分低(36%),而提高诊断率(46%)的唯一方法是多个标本的采集送检<sup>[19]</sup>。最佳的诊断方法是在活检组织或 BAL 样本中采用 Pap 染色,观察其特有的形态学特征。

在单独的细胞学检查中,新生隐球菌、未成熟的粗球孢子菌和球孢子菌都可能被误认为是芽生菌,因而芽生菌特异性抗原和特异性 DNA 用于诊断的研究日益兴起。商业化的 DNA 探针可以结合芽生菌独特的 RNA 片段,从而在培养早期快速诊断。但这些技术仅仅是作为实验室研究手段,并未通过前瞻性研究在大规模人群中实践。

## 7 组织胞浆菌病

尿液和痰液样本中组织胞浆菌抗原检测是快速诊断组织胞浆菌病的首选方法。事实上,在播散性感染的患者中,抗原检测法在尿液中的敏感性达到 92%,血液中的为 85%,但在亚急性和慢性肺部感染的患者中却分别只有 34% 和 14%<sup>[20]</sup>。因此 BAL 成为诊断的重要手段。

相对于肺孢子菌,GMS 和吉姆萨染色较 Pap 和 PAS 染色法更有利于组织胞浆菌的检测。组织

胞浆菌是一种卵圆形,直径 2 ~ 5  $\mu\text{m}$ ,有窄基底的芽殖,但这种形态并非组织胞浆菌特有,一些真菌,如新生隐球菌、光滑假丝酵母菌、肺孢子菌、球孢子菌内孢囊破裂产生的内生孢子,都容易被误认为是组织胞浆菌菌体。支气管镜下活检可以提高 BAL 诊断的阳性率。对于播散性疾病,BALF 中组织胞浆菌的细胞学检查通常能在较短的时间内提供诊断。在已公开报道的研究中,BALF 中细胞病理学检测组织胞浆菌的敏感性在 40% ~ 80%<sup>[21]</sup>。

BALF 中组织胞浆菌病抗原检测能提高检测的敏感性,Hage 等<sup>[22]</sup>报道了 BALF 中该方法的假阳性率仅有 1.8%。但需注意的是,芽生菌抗原与组织胞浆菌病抗原存在交叉作用。因此,当考虑存在这两种真菌感染的时候,必需通过组织学上的鉴别。而在慢性组织胞浆菌感染的患者中获取 BALF 送检抗原反应是不推荐的。GM 试验通常在有播散性组织胞浆菌病患者的 BALF 中有阳性表达。多数研究表明,PCR 没有抗原检测的敏感性高,因而制约了该方法的实际应用。

## 8 总 结

培养是真菌诊断的金标准,细胞学和组织学分析同样也有诊断价值。目前,BAL 已成为用于诊断肺部或播散性真菌感染的重要辅助方法。随着更先进的分子和抗原技术在 BALF 中的应用,BAL 在诊断真菌感染中的价值会越来越重要。

### 参 考 文 献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会. 支气管肺泡灌洗液细胞学检测技术规范(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2002,25(7): 390-391.
- [2] Boersma WG, Erjavec Z, van der Werf TS, et al. Bronchoscopic diagnosis of pulmonary infiltrates in granulocytopenic patients with hematologic malignancies: BAL versus PSB and PBAL[J]. Respir Med,2007,101(2):317-325.
- [3] Huang L, Morris A, Limper AH, et al. ATS Pneumocystis Workshop P. An official ATS workshop summary: recent advances and future directions in pneumocystis pneumonia (PCP) [J]. Proc Am Thorac Soc,2006,3(8): 655-664.
- [4] Jacobs JA, Dieleman MM, Cornelissen EI, et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytology in patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia[J]. Acta Cytol,2001,45(3): 317-326.
- [5] Procop GW, Hadda S, Quinn J, et al. Detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimens by four staining methods[J]. J Clin Microbiol,2004,42(7):3333-3335.
- [6] Larsen HH, Huang L, Kovacs JA, et al. A prospective, blinded study of quantitative touch-down polymerase chain reaction using oral-wash samples for diagnosis of pneumocystis pneumonia in HIV-infected patients[J]. J Infect Dis,2004,189(9): 1679-1683.
- [7] de Oliveira A, Unnasch TR, Crothers K, et al. Performance of a molecular viability assay for the diagnosis of pneumocystis pneumonia in HIV-infected patients[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2007,57(2):169-176.
- [8] Kralovic SM, Rhodes JC. Utility of routine testing of bronchoalveolar lavage fluid for cryptococcal antigen[J]. J Clin Microbiol,1998,36(10):3088-3089.
- [9] Takahashi T, Goto M, Kanda T, et al. Utility of testing bronchoalveolar lavage fluid for cryptococcal ribosomal DNA[J]. J Int Med Res,2003,31(4):324-329.
- [10] Wood GC, Mueller EW, Croce MA, et al. *Candida* sp. isolated from bronchoalveolar lavage: clinical significance in critically ill trauma patients[J]. Intensive Care Med,2006,32(4):599-603.
- [11] Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem[J]. Clin Microbiol Rev, 2007,20(1):133-163.
- [12] Asciglu S, Rex JH, de Pauw B, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus[J]. Clin Infect Dis,2002,34(1):7-14.
- [13] Verdager V, Walsh TJ, Hope W, et al. Galactomannan antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis[J]. Expert Rev Mol Diagn,2007,7(1): 21-32.
- [14] Musher B, Fredricks D, Leisenring W, et al. Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid [J]. J Clin Microbiol,2004,42(12):5517-5522.
- [15] Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a metaanalysis[J]. Clin Infect Dis,2006,42(10):1417-1427.
- [16] Nguyen MH, Jaber R, Leather HL, et al. Use of bronchoalveolar lavage to detect galactomannan for diagnosis of pulmonary aspergillosis among nonimmunocompromised hosts[J]. J Clin Microbiol,2007,45(9):2787-2792.
- [17] Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008,177(1):27-34.
- [18] Francesconi A, Kasai M, Petraitiene R, et al. Characterization and comparison of galactomannan enzyme immunoassay and quantitative real-time PCR assay for detection of aspergillus fumigatus in bronchoalveolar lavage fluid from experimental invasive pulmonary aspergillosis [J]. J Clin Microbiol,2006,44(7):2475-2480.
- [19] Martynowicz MA, Prakash UB. Pulmonary blastomycosis: an appraisal of diagnostic techniques[J]. Chest,2002,121(3): 768-773.

[20] Wheat LJ, Conces D, Allen SD, et al. Pulmonary histoplasmosis syndromes: recognition, diagnosis and management[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2004, 25(2):129-144.

[21] Gutierrez ME, Canton A, Connolly P, et al. Detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in Panamanian patients with disseminated histoplasmosis and AIDS[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(4):681-683.

[22] Hage CA, Davis TE, Egan L, et al. Diagnosis of pulmonary histoplasmosis and blastomycosis by detection of antigen in bronchoalveolar lavage fluid using an improved second-generation enzymelinked immunoassay [J]. *Respir Med*, 2007, 101(1):43-47.

[收稿日期] 2010-06-03

[本文编辑] 王 飞

(上接第 315 页)

[25] Walenkamp AM, Chaka WS, Verheul AF, et al. *Cryptococcus neoformans* and its cell wall components induce similar cytokine profiles in human peripheral blood mononuclear cells despite differences in structure [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1999, 26(34):309-318.

[26] Cleare W, Mukherjee S, Spitzer ED, et al. Prevalence in *Cryptococcus neoformans* strains of a polysaccharide epitope which can elicit protective antibodies[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1994, 1(6):737-740.

[27] Larsen RA, Pappas PG, Perfect J, et al. Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murine-derived anticryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(3):952-958.

[28] Rivera J, Casadevall A. Mouse genetic background is a major determinant of isotype-related differences for antibody-mediated protective efficacy against *Cryptococcus neoformans* [J]. *J Immunol*, 2005, 174(12):8017-8026.

[29] Beenhouwer DO, Shapiro S, Feldmesser M, et al. Both Th1 and Th2 cytokines affect the ability of monoclonal antibodies to protect mice against *Cryptococcus neoformans* [J]. *Infect Immun*, 2001, 69(10):6445-6455.

[30] Tabora CP, Rivera J, Zaragoza O, et al. More is not necessarily better: prozone-like effects in passive immunization with IgG [J]. *J Immunol*, 2003, 170(7):3621-3630.

[31] Datta K, Lees A, Pirofski L. Therapeutic efficacy of a conjugate vaccine containing a peptide mimotope of cryptococcal capsular polysaccharide glucuronoxylomannan [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(8):1176-1187.

[收稿日期] 2010-05-24

[本文编辑] 卫凤莲