

· 论著 ·

血浆 (1,3)- β -D-葡聚糖对深部真菌感染诊断的临床意义

杨惠琴¹ 梅亚宁²

(1. 江苏省东台市人民医院检验科, 东台 224200; 2. 南京医科大学第一附属医院检验科, 南京 210029)

【摘要】 目的 研究血浆中 (1,3)- β -D-葡聚糖检测和真菌培养对诊断深部真菌感染的临床应用价值。方法 对我院 2009 年 8 月~2010 年 7 月长期使用广谱抗菌药物、免疫抑制剂以及皮质类固醇激素等,且临床出现感染症状的 1 868 例住院患者,在其抽静脉血做 (1,3)- β -D-葡聚糖检测的同时留取血液或痰、中段尿、脓等分泌物标本做真菌培养。通过回顾性调查,了解使用抗真菌药后患者临床症状是否缓解作为临床诊断标准,并以此为标准比较两种检测方法的差异。结果 1 868 例患者中使用抗真菌药物后症状缓解 757 例,使用抗真菌药物后症状未缓解和临床未使用抗真菌药物症状缓解 1 082 例,无临床资料 29 例(剔除);实际有效病例 1 839 例。其中以 20 pg/mL 为临界值时 (1,3)- β -D-葡聚糖含量检测阳性 778 例,阴性 1 061 例,以 50 pg/mL 为临界值时 (1,3)- β -D-葡聚糖含量检测阳性 623 例,阴性 1 216 例;真菌培养阳性 457 例,阴性 1 382 例。血浆 (1,3)- β -D-葡聚糖检测试验分别以 20 pg/mL 和 50 pg/mL 为临界值时,均得到较好的敏感度(分别为 89.3%, 74.9%)和特异度(分别为 90.6%, 94.8%),阳性预测值(86.9%和 91.0%)和阴性预测值(92.4%和 84.4%)均较高,无显著性差别($P > 0.05$);真菌培养的敏感度(49.0%)较低但特异度较高(92.1%)阳性预测值和阴性预测值分别为 81.2%和 72.1%;两种方法联合检测后敏感度提高至 93.0%,特异度为 88.9%。结论 G 试验的方法检测血浆 (1,3)- β -D-葡聚糖较传统的真菌分离、培养与鉴定方法简便,快速,阳性率高,但有时发生假阳性。传统的真菌培养方法虽敏感性低,但特异性高,建议临床在诊断深部真菌感染时,同时行血浆 (1,3)- β -D-葡聚糖检测及真菌镜检和培养等检查以提高侵袭性真菌感染诊断的敏感性和特异性。

【关键词】 (1,3)- β -D-葡聚糖;深部真菌感染;真菌培养**【中图分类号】** R 446.53 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2011)03-0136-05

Clinical value of (1,3)- β -D-glucan in plasma on the diagnosis of deep fungal infection

YANG Hui-qing¹, MEI Ya-ning²

(1. Dongtai City People's Hospital, Dongtai 224200; 2. Department of Clinical Microbiology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

【Abstract】 Objective To study the value of plasma (1,3)- β -D-glucan and fungal culture on the diagnosis of deep fungal infection. **Methods** Retrospective investigation were performed on 1 868 patients with fever and treatment of immunosuppressant, corticosteroid or wide-spectrum antibiotics for a long time from August 2009 to July 2010. (1,3)- β -D-glucan concentration in plasma and culture results of peripheral blood, respiratory tract, urinary tract and intestinal canal were analysed. **Results** Symptoms of 757 cases in 1 868 patients were relieved after antifungal treatment. Other 1 082 cases, showed no improvement or received no antifungal drugs. Another 29 cases (eliminate) had no clinical data. In the 1 839 valuable cases, the detection ratio of (1,3)- β -D-glucan was 778/1 061 with 20 pg/mL as critical value, and 623/1 216 with 50 pg/mL as critical value respectively. Positive to negative rate in fungal culture was 457/1 382. Sensitivity (89.3%, 74.9%), specificity (90.6%, 94.8%), positive predictive value (PPV, 86.9%, 91.0%) and negative predictive value (NPV, 92.4%, 84.4%) obtained by different critical value showed no significant differences ($P > 0.05$). The sensitivity, specificity, PPV and NPV of fungal culture were 49.0%, 92.1%, 81.2% and 72.1% respectively. The sensitivity and specificity raised to 93.0% and 88.9% after combination of the two methods. **Conclusions** G-test for (1,3)- β -D-glucan detection is simple, rapid with high positive rate of fungi detection. It is suggested that G-test, fungal determination

基金项目:江苏省实验诊断学重点实验室重大课题(XK2007317).**作者简介:**杨惠琴,女(汉族),检验师.E-mail:So447@sohu.com**通讯作者:**梅亚宁,E-mail:myn303@163.com

tion should be combine in the diagnosis of deep fungal infection for satisfied sensitivity and specificity.

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

[Chin J Mycol, 2011, 6(3):136-140]

近年来随着广谱抗菌药物, 高强度免疫抑制剂和抗肿瘤药物的广泛应用, 以及造血干细胞、实体器官移植的广泛开展, 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。在医院感染中占重要地位, 引起临床极大重视, 深部真菌病的疗效与转归, 很大程度上取决于能否早期诊断。传统的微生物分离培养与鉴定需要时间较长。研究表明, 除接合菌外, 所有真菌细胞膜上都含有 (1,3)- β -D-葡聚糖, 而其他微生物、动物及人的细胞成分和细胞外液都不含这种成分, 因此在机体的体液中检测到 (1,3)- β -D-葡聚糖是诊断深部真菌感染的有效依据^[1]。我们应用 MB-80 微生物动态快速检测系统, 对临床疑似深部真菌感染患者血浆中 (1,3)- β -D-葡聚糖的检测, 并与传统真菌培养方法加以对比, 探讨血浆 (1,3)- β -D-葡聚糖检测对深部真菌感染患者的临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选择 2009 年 8 月 ~ 2010 年 7 月, 我院住院疑似深部真菌感染的患者共 1 868 例 (其中男 1 177 例, 女 691 例, 年龄在 17 ~ 90 岁)。

1.2 方法

在 1 868 例患者抽取静脉血做 (1,3)- β -D-葡聚糖检测和真菌培养的同时留取痰、中段尿、脓等分泌物标本做真菌培养, 特殊患者留取腹水和脑脊液进行真菌培养。采用回顾性调查方法查阅患者住院病历, 了解临床诊断 (患者的影像学, 使用抗真菌药物症状是否缓解等), 并以临床诊断为标准对其进行统计学分析。

1.3 真菌分离培养及鉴定

标本的留取和真菌分离培养均按“全国临床检验操作规程”第三版进行操作。真菌鉴定, 酵母菌采用 CHRO Magar Candida 显色培养基 30℃ 培养 48 h, 根据菌落颜色鉴定白念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌和克柔念珠菌。不能用显色培养基鉴定的菌株, 用沙氏培养基 35℃ 培养 48 h, 分离纯化,

用 API 20C AUX 鉴定到种, 仍不能鉴定到种的为其他念珠菌; 丝状真菌接种于察氏琼脂根据菌落形态、色素及镜下结构作出菌种鉴定。

1.4 (1,3)- β -D-葡聚糖检测

应用北京金山川科技有限公司 MB-微生物动态快速检测系统及 KT-5M Set 动态真菌检测试剂盒定量检测血浆中 (1,3)- β -D-葡聚糖含量。

1.5 数据分析

分别计算 G 试验临界值为 20 pg/mL 和 50 pg/mL 时的敏感度 (诊断试验阳性患者/患者总数 \times 100%)、特异度 (诊断试验阴性的非患者/患者总数 \times 100%)、阳性预测值 (真阳性结果数/阳性试验结果总数 \times 100%) 和阴性预测值 (真阴性结果数/阴性试验结果总数 \times 100%); 真菌培养的敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值; 以及两试验联合应用后敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值。

2 结 果

2.1 临床诊断情况

通过回顾性调查, 1 868 例患者中经临床用药、临床体征变化及组织学影像学等诊断标准临床诊断为深部真菌感染 757 例, 非感染 1 082 例。无临床资料的 29 例 (剔除); 实际有效病例 1 839 例。其中 (1,3)- β -D-葡聚糖含量检测阳性 778 例, 阴性 1 061 例, 真菌培养阳性 457 例, 阴性 1 382 例。

2.2 G 试验检测结果

经临床诊断真菌感染的 757 例患者中 (1,3)- β -D-葡聚糖含量最高为 2 056 pg/mL, 最低为 11.626 pg/mL, 均值为 (563.17 \pm 172.53) pg/mL; 非感染 1 082 例中 (1,3)- β -D-葡聚糖含量最高为 156 pg/mL, 最低为 5.0 pg/mL, 均值为 (3.37 \pm 1.03) pg/mL; 两组 (1,3)- β -D-葡聚糖含量差异显著 ($P < 0.01$)。

2.3 G 试验敏感度、特异度

以 20 pg/mL 为临界值时, G 试验阳性 778 例, 敏感度和特异度分别为 89.3% 和 90.6%; 阳性预测值和阴性预测值分别为 86.9% 和 92.4%; 以 50

pg/mL 为临界值时, G 试验阳性 623 例, 敏感度和特异度分别为 74.9% 和 94.8%; 阳性预测值和阴性预测值分别为 91.0% 和 84.4%, G 试验与临床诊断的比较见表 1。

表 1 G 试验与临床诊断比较
Tab.1 Clinical data between groups

试验方法	临床诊断		合计
	阳性	阴性	
G 试验 (20 pg/mL) 阳性	676	102	778
G 试验 (20 pg/mL) 阴性	81	980	1 061
合计	757	1 082	1 839
G 试验 (50 pg/mL) 阳性	567	56	623
G 试验 (50 pg/mL) 阴性	190	1 026	1 216
合计	757	1 082	1 839

2.4 真菌培养结果菌种分布情况

标本来源以呼吸道标本为主, 泌尿道、肠道次之。有的患者多部位分离出同一种真菌, 作 1 例统计 (归到无菌体液部位感染), 详见表 2。

表 2 真菌培养结果菌种分布情况 (株)
Tab.2 Fungi distribution

	痰	血	中段尿	粪	脑脊液	其他	合计
白念珠菌	99	9	46	36	0	11	201
光滑念珠菌	40	6	17	15	0	1	79
克柔念珠菌	12	1	3	9	0	1	26
热带念珠菌	47	3	24	11	0	4	89
近平滑念珠菌	0	0	13	0	0	0	13
其他念珠菌	21	1	9	4	0	0	35
新生隐球菌	0	0	0	0	3	0	3
曲霉菌	11	0	0	0	0	0	11
合计	230	20	112	75	3	17	457

2.5 真菌培养敏感度、特异度

真菌培养的敏感度和特异度分别为 49.0% 和 92.1%; 阳性预测值和阴性预测值分别为 81.2% 和 72.1%。

2.6 联合检测敏感度、特异度

G 试验 (临界值 20 pg/mL) 或真菌培养二者同

时阳性或者其中任一项检测为阳性时即判断为阳性时, 对于侵袭性真菌感染诊断的敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为 93.0%, 88.9%, 45.3% 和 93.7%。两种方法对深部真菌感染的检验结果见表 3。

表 3 两种方法对深部真菌感染的检验结果

Tab.3 Deep fungal infection by two different methods

(1,3)-β-D-葡聚糖检测法	真菌培养法		合计
	阳性	阴性	
阳性	423	355	778
阴性	34	1 027	1 061
合计	457	1 382	1 839

3 讨 论

近年来随着广谱抗菌药物、糖皮质激素和免疫抑制剂的广泛应用深部真菌感染 (invasive fungal infection, IFI) 的发病率呈逐年上升势态, 介入性操作诊疗技术的发展及应用, 器官移植的普及, 使很多危重患者延长了生存时间, 但也是并发 IFI 的主要原因之一, 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, 其重要原因之一就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, 死亡率增加。尽早诊断对深部真菌感染的治疗和预后具有重要作用^[2]。

(1,3)-β-D-葡聚糖抗原 [(1,3)-β-D-glucan, BG] 的检测, 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, 近年来备受关注。(1,3)-β-D-葡聚糖是除接合菌属外真菌细胞壁上的一种特征性的多糖成分, 其他微生物如细菌、病毒及动物的细胞外液则缺乏此种多糖, 具有真菌特异性。(1,3)-β-D-葡聚糖在真菌生长时释放入血, 对数生长期释放量最大, 在真菌生长 1 d 后开始下降。其在正常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)^[3,4]。但对定植的念珠菌显示阴性^[5]。故检测患者血中 (1,3)-β-D-葡聚糖可预测深部真菌感染。

市场上现在常用的试剂盒主要有两种, 一种是日本 Seikagaku Kogyo 公司研制的 Fungitec. G glu-

can 试剂,一种是美国 Cape Code 协会研制的 Glucatell 试剂。两种试剂的主要区别在于使用不同品种的马蹄蚶为原材料,Fungitec. G 试剂主要成分是东方蚶的细胞裂解产物,其判断标准为 20 pg/mL,而 Glucatell 试剂则使用美洲蚶的细胞裂解产物作为主要原料,推荐使用的判断标准为 60 pg/mL^[6]。目前 (1,3)- β -D-葡聚糖的检测国内报道较多的是采取 G 试验的方法,国产试剂有北京金山科技发展有限公司生产的 GKT-5M Set 动态真菌检测试剂盒(定量),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。此方法特异性和敏感性可因设定的阳性临界值不同而不同,对阳性界值的设定也一直在讨论中,国内文献报道较多的 BG 阳性界值设定分别在 50 pg/mL 或 20 pg/mL。本实验以 50 pg/mL 为阳性界值时,BG 检测的敏感性为 74.9%,特异性 94.8%,阳性预测值和阴性预测值分别为 91.0% 和 84.4%;以 20 pg/mL 为临界值,BG 检测的敏感性和特异性分别为 89.3% 和 90.6%,阳性预测值和阴性预测值分别为 86.9% 和 92.4%;与文献报道一致^[7,8]。本研究显示无论以 50 pg/mL 为阳性界值还是以 20 pg/mL 为阳性界值时均有较好的敏感性和特异性,在 3 例脑脊液培养为隐球菌的病例中有一例 BG 值为 40.3 pg/mL,2 例 < 20 pg/mL,同时对其他临床病例跟踪观察以 50 pg/mL 为临界值时与深部真菌感染有较好的一致性且本试验的假阳性较高,若降低临界值会增加试验的假阳性,我们建议临床采用以 50 pg/mL 为临界值。

病原学检查(特别是真菌培养),目前在临床上,对于深部真菌感染仍然是一种常规诊断标准,它能明确引起感染的真菌种类,并可根据相应真菌进行体外药敏试验,为临床合理使用抗真菌药物提供有效依据。但此方法费时,通常需 3~5 d;阳性率也不高,且易将正常带菌者误诊为深部真菌感染,不适宜作早期诊断。本试验中真菌培养阳性率为 24.81%,培养阳性标本主要来源呼吸道、泌尿道和肠道,约占 91.25%,这些部位是菌群失调的好发部位,同时导管的体内介入、留置、广谱抗菌药物及免疫抑制剂的大量使用,给真菌定植创造了条件。本试验中靠病原学(真菌培养)诊断为深部真菌感染的患者共 457 例,其中 86 例缺乏临床拟诊的有效佐证;34 例真菌培养阳性,(1,3)- β -D-葡聚糖检测 < 20 pg/mL 病例中,

17 例一次痰培养为念珠菌,8 例一次粪培养为念珠菌,3 例(均为插导尿管的老年患者)中段尿二次培养为同一种念珠菌,2 例脑脊液培养为隐球菌,4 例痰培养二次为烟曲霉。

本试验发现,无论阳性临界值为 20 pg/mL 还是 50 pg/mL,均有多例(193、246)与临床诊断不符的病例,即假阳性和假阴性的问题,这是该检测方法的不足之处,国内外普遍存在。跟踪调查发现多数病例的患者检测前服用过香菇多糖或使用过免疫球蛋白等血液制品、抗肿瘤药物等,也有数例肾透析及免疫性疾病(1 例红斑狼疮、1 例硬皮病),这可能是造成假阳性结果的原因^[9-11]。但在跟踪调查中我们发现 4 例细菌血症(1 例大肠埃希菌,1 例金黄色葡萄球菌,2 例铜绿假单胞菌)BG 值也 > 150 pg/mL。可能是由于 BG 的测定原理与内毒素十分相似,易受血中细菌的干扰而造成假阳性。其余为数不多的不符病例,未找出明显原因,尚须进一步研究和观察。

总之,G 试验作为一种深部真菌感染的初步筛查方法是非常有意义的;使用时再紧密结合患者的临床表现、病原学检查等,加强动态监测,就一定能发挥其快速、准确的作用,给临床提供早期治疗的依据,降低病死率,改善预后。

参考文献

- [1] 廖军,郝飞.深部真菌感染血清真菌成分检测方法研究进展[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2002,23(2):85-86.
- [2] Eiff V, Roos MN, Schulten R, et al. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival[J]. Respiration, 1995, 62(7):341-347.
- [3] Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al. Plasma(1,3)- β -D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes[J]. Lancet, 1995, 345:17-20.
- [4] Obayashi T, Yoshida M, Tamura H, et al. Determination of plasma(1,3)- β -D-glucan: a new diagnostic aid to deep mycosis[J]. J Med Vet Mycol, 1992, 30:275-280.
- [5] Hachem RY, Gontoyiallli DP, Chemaly RF, et al. Utility of galactomannan enzyme immunoassay and(1,3)- β -D-glucan in diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(1):129-133.
- [6] Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis[J]. Lancet Infect Dis, 2005, 5(10):609-622.
- [7] Koldehoff M, Zaktzewski J. Modern management of respiratory failure due to pulmonary mycoses following allogeneic haemato-

poietic stem cells transplantation [J]. Am J Haematol, 2005, 79 (2): 158.

[8] De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the european organization for research and treatment of cancer/invasive fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) Consensus group [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46: 1813-1821.

[9] Obayashi T, Tamura H, Tanaka S, et al. Endotoxin-inactivating activity in normal and pathological human blood samples [J]. Infect Immun, 1986, 53 (2): 294-297.

[10] Kanda H, Kubo K, Hamasaki K, et al. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1,3)-β-D-glucan level [J]. Kidney Int, 2001, 60 (1): 319-323.

[11] Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60 (3): 258-274.

[收稿日期] 2011-05-09
[本文编辑] 王 飞

· 消息 ·

2012 全国中西医结合皮肤性病学术年会 征文通知

经中国中西医结合学会批准,中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会定于 2012 年 4 月 12 ~ 16 日在南京市钟山宾馆召开 2012 全国中西医结合皮肤性病学术年会。

此次会议将发扬历年年会的优良传统,注重中西医结合治疗皮肤病的新方法及新的研究进展等方面的学术交流,内容密切联系临床,切合皮肤科医师的实际需求,会议将邀请知名专家做特邀演讲,阐述皮肤科相关领域的最新研究进展,创造形式多样、内容充实、紧张热烈、活跃互动的学术交流形式,达到全国皮肤科中医、西医、中西医结合医师共同展现才华、获取知识和信息、增强友谊和情感的目的,共同促进我国皮肤科事业的发展。拟参加本次会议者请仔细阅读本通知并按规定的时间和要求投稿。

一 投稿要求

1 投稿内容

皮肤科各种基础研究论文、皮肤科临床诊断和治疗等方面的论文、典型与疑难病例等。

2 投稿方式

中文全文和 400 字以内的中文摘要。

鼓励通过电子邮件投稿,投稿邮箱:pfkxh@126.com (来稿请注明 2012 会议征文)。

3 截稿日期

2012 年 3 月 8 日。

4 会议交流形式

特邀演讲、大会发言、分会发言、书面交流。

二 联系方式

地址:上海市凤阳路 415 号上海长征医院门诊部皮肤科 200003 E-mail:pfkxh@126.com

联系人:朱和平 电话:021-81885498 手机:13671816152

中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会

2011 年 6 月 28 日