

• 论 著 •

血浆 1,3- β -D 葡聚糖的检测在深部真菌感染诊断中的应用价值*

冉宝才, 胡仁静, 胡锡池

(南京医科大学附属无锡市第二人民医院检验科, 江苏无锡 214002)

摘要:目的 探讨血浆 1,3- β -D 葡聚糖的检测(G 试验)对深部真菌感染的诊断价值。方法 收集 2014 年 1—12 月该院的共 420 例受试者血浆,其中深部真菌感染者 226 例,非真菌感染者 88 例,健康体检者(对照组)106 例。采用 MB-80 微生物动态快速检测系统及 GKT-5M Set 动态真菌检测试剂盒定量检测血浆 1,3- β -D 葡聚糖的水平,应用受试者工作特征曲线(ROC)对 G 试验进行评估。结果 深部真菌感染组的葡聚糖水平明显高于对照组,而非真菌感染者与对照组间比较葡聚糖水平差异无统计学意义($P>0.05$)。结合 ROC 曲线分析,G 试验的最佳临界值为 25.33 pg/mL,其敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 84.90%、70.83%、72.0%、84.10%($P<0.05$)。结论 血浆 1,3- β -D 葡聚糖检测是一种实用且有效的深部真菌感染的诊断方法。

关键词:深部真菌感染; 1,3- β -D 葡聚糖; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.13.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)13-1770-04

Detection of plasma 1,3- β -D glucan in the diagnosis of deep fungal infection*

RAN Baocai, HU Renjing, HU Xichi

(Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Wuxi Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu 214002, China)

Abstract: Objective To evaluate the early diagnostic value of the detection of plasma 1,3- β -D glucan(G test) for deep mycobacterium infection and assess the difference of the G test and fungal culture. **Methods** We collected test plasma from 420 subjects from January to November 2014, including 226 cases of deep mycobacterium infection, 88 cases of non-fungal infection and 106 cases of healthy controls. G-test was used to measure the concentration of 1,3- β -D glucan in the plasma. The cut-off points for 1,3- β -D glucan were determined by using receiver operator characteristics curves(ROC). **Results** The concentration of 1,3- β -D in plasma of patients with deep mycobacterium infection was significantly higher than that of patients with non-fungal infection and healthy controls. There was no difference between the control groups. With the analysis of ROC curve, the best cut-off value was 25.33 pg/mL. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of G test were 84.9%, 70.83%, 72.0%, 84.1% ($P<0.05$). **Conclusion** G Test is a practical and effective method in early diagnosis of deep fungal infection.

Key words: deep mycobacterium infection; 1,3- β -D glucan; diagnosis

目前,由于临床一线大量使用抗菌药物、抗肿瘤药物以及免疫抑制剂。随着医疗新技术的发展,器官移植、介入治疗及导管插管等普遍应用于临床,导致侵袭性真菌感染发生率越来越高^[1]。侵袭性真菌感染者临床表现特异性差,很难通过症状和体征发现和诊断,病情易被原发病掩盖,从而导致误诊、漏诊,因此侵袭性真菌感染的诊断对患者的治疗有关键作用。传统的真菌培养检测方法时间长,采集标本易污染,真阳性率不高,已不能满足临床一线的需要。近年来侵袭性真菌的实验室诊断新方法层出不穷。除结合菌和新型隐球菌外,所有真菌的细胞膜上都含有 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,是诊断侵袭性真菌感染的有效证据。本研究对深部真菌感染者、非真菌感染者以及健康体检者血浆 1,3- β -D 葡聚糖水平进行了检测,旨在探讨其在深部真菌感染诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2014 年 1—12 月于本院治疗的 314 例感染性疾病患者纳入研究,其中深部真菌感染患者 226 例(深部

真菌感染组),非真菌感染患者 88 例(非真菌感染组,均为细菌感染)。依据《血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌感染及诊断标准与治疗原则(草案)》^[2]标准诊断,感染部位包括呼吸道、消化道、泌尿道、血液等,所有纳入研究者同时进行相应的真菌培养和细菌培养。对照组 106 例,为来自本院的同期健康体检者。

1.2 仪器与试剂 主要仪器包括北京金山川科技发展有限公司的 MB-80 型快速动态检测仪检测 1,3- β -D 葡聚糖、T01 加热恒温仪、旋涡混合器、冷却冰浴槽。检测试剂包括真菌(1-3)- β -D 葡聚糖检测试剂盒(光度法,购买于北京金山川科技发展有限公司)、全自动微生物鉴定及药敏分析系统和相关试剂(均购买于法国梅里埃公司)。

1.3 方法

1.3.1 检测原理 1,3- β -D 葡聚糖大量存在于真菌细胞壁中,占真菌细胞壁成分 50%以上。1,3- β -D 葡聚糖是真菌(新型隐球菌和接合菌除外)特有的细胞壁成分,作为真菌特有的抗原具有很高的特异性。因此,若它在血液及无菌体液中检测到可以视为深部真菌感染的标志。真菌 1,3- β -D 葡聚糖能特异性地激活反应主剂中的 G 因子、凝固酶原等,发生凝固蛋白原

* 基金项目:无锡市科技支撑项目(CSE31N1602)。

作者简介:冉宝才,男,主管技师,主要从事临床微生物学与检验的研究。

转变的级联反应从而引起吸光度的变化,根据检测其溶液吸光度变化从而对真菌 1,3-β-D 葡聚糖浓度进行定量检测。

1.3.2 操作步骤 (1)用无菌、无热原真空采血管采集静脉血 3~4 mL,以 3 000 r/min 离心 10~15 min,分离得到血浆,2 h 内检测。若不能及时检测,全血离心后可在 2~8 ℃ 保存 24 h;血浆转移至无热原转移管内,在-20 ℃ 冷冻保存,可保存 1 周。(2)取上述血浆 0.1 mL,加入装有 0.9 mL 样品处理液中,混匀后 70 ℃ 孵育 10 min,取出后立刻放入冷却槽中冷却 5 min,即为待测血浆样品。(3)使用微量加样器取待测血浆 0.1 mL,加入至标准无热原平底试管中,然后再加入 0.1 mL 反应主剂溶液,溶解混匀,插入 MB-80 型微生物动态快速检测仪中进行反应。(4)反应结束后检测系统自动计算出待测血浆中 1,3-β-D 葡聚糖水平。

1.3.3 真菌和细菌培养鉴定 314 例感染性疾病患者相应标本的真菌和细菌培养鉴定按照《全国临床操作规程(第三版)》进行,并登记记录鉴定结果。

1.4 统计学处理 数据均采用 SPSS19.0 软件进行处理,多样本均数比较采用单因素方差分析,两样本均数比较采用 *t* 检验;用 ROC 曲线来确定本实验室 G 试验的最佳临界值,并评定检验效果;通过 Kappa 值来评估不同方法间的一致性;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 真菌培养 226 例深部真菌感染者的标本来源于痰液 66 份,肺泡灌洗液 25 份,血液 16 份,中段尿 65 份,胆汁 15 份,胸腹水和引流液 39 份。分布情况及各种标本真菌培养阳性率见表 1。226 例深部真菌感染者标本真菌培养阳性 106 例,阳性率为 46.9%,其中假丝酵母菌 188 例,丝状真菌 5 例,烟曲霉菌 3 例,所占比例和阳性率见表 2。

表 1 226 例深部真菌感染者标本分布情况				
标本来源	<i>n</i>	所占比例(%)	阳性标本(<i>n</i>)	阳性率(%)
痰液	66	29.20	49	74.24
肺泡灌洗液	25	11.06	10	40.00
血液	16	7.07	2	12.50
中段尿	65	28.76	40	61.54
胆汁	15	6.63	1	6.67
胸腹水	25	11.06	3	6.67
引流液	14	6.19	1	7.14
合计	226	100.00	106	46.90

表 2 106 例深部真菌感染者真菌分布情况		
真菌名称	<i>n</i>	所占比例(%)
白色假丝酵母菌	71	66.98
克柔假丝酵母菌	6	5.66
热带假丝酵母菌	6	5.66
近平滑假丝酵母菌	4	3.77
平滑假丝酵母菌	9	8.49
角膜假丝酵母菌	2	1.87
丝状真菌	5	4.71
烟曲霉菌	3	2.83

2.2 各组 1,3-β-D 葡聚糖水平的比较 非真菌感染组、对照组与深部真菌感染组比较差异均有统计学意义(*t* = 4.237、4.065, *P* < 0.01),而非真菌感染组与对照组相比较,差异无统计学意义(*t* = 0.731, *P* > 0.05)。

表 3 各组血浆 1,3-β-D 葡聚糖水平的比较 (pg/mL)		
组别	<i>n</i>	1,3-β-D 葡聚糖
深部真菌感染组	226	105.51 ± 43.2
非真菌感染组	88	18.73 ± 9.23 *
对照组	106	10.00 ± 5.93 *

注:与深部真菌感染组比较,**P* < 0.01。

2.3 不同方法用于真菌感染诊断的比较 G 试验用于诊断深部真菌感的 ROC 曲线下面积为 0.83,95% 置信区间为 0.77~0.90;真菌培养阳性的 ROC 曲线下面积为 0.795,95% 置信区间为 0.73~0.86。G 试验与临床诊断的一致性检验 Kappa 值为 0.543,真菌培养阳性与临床诊断的 Kappa 值为 0.343。上述数据展示了 G 试验诊断深部真菌感染比普通培养更为可靠,G 试验与临床诊断之间有较好的一致性,见图 1。

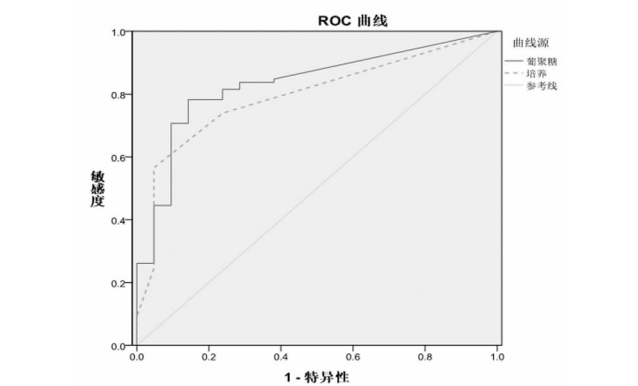


图 1 不同方法的 ROC 曲线下面积比较

2.4 不同血浆 1,3-β-D 葡聚糖水平作为临界值的敏感度和特异度比较 随着 1,3-β-D 葡聚糖诊断临界值水平的逐渐增高,筛查的特异度增加而灵敏度递减。当 1,3-β-D 葡聚糖值提高至 25.33 pg/mL 时,其灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值都达到最佳,分别为 84.90%、70.83%、72.00%、84.10% (*P* < 0.05),由此确定本实验室诊断深部真菌感染的 1,3-β-D 葡聚糖最佳临界值为 25 pg/mL,见表 4。

表 4 不同血浆 1,3-β-D 葡聚糖水平作为临界值的敏感度和特异度比较				
葡聚糖水平 (pg/mL)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
6.74	86.70	61.00	62.70	85.20
16.17	85.40	66.00	67.00	84.20
22.67	85.00	68.20	69.20	85.40
25.33	84.90	70.83	72.00	84.10
30.27	80.50	74.90	74.90	82.20
35.38	72.60	76.55	76.12	77.30

2.5 与真菌培养的对比 226 例患者中真菌培养阳性 106 例,阳性率为 46.90%;1,3-β-D 葡聚糖水平测试阳性 125 例,

阳性率为 55.30%。以真菌培养结果为金标准,血浆(1-3)- β -D-葡聚糖水平检测灵敏度为 84.90%,特异度为 70.83%,阳性预测值为 72.00%,阴性预测值为 84.10%。

表 4 两种真菌检测方法的比较(n)

1,3- β -D 葡聚糖	真菌培养		合计
	阳性	阴性	
阳性	90	35	125
阴性	16	85	101
合计	106	120	226

3 讨 论

近年来,随着医疗新技术的发展,器官移植、介入治疗及导管插管等治疗方式被普遍应用于临床。免疫抑制剂和高强度化疗药物的使用、大剂量的抗菌药物滥用、造血干细胞移植的广泛开展,侵袭性真菌感染发生率越来越高。传统的微生物培养所需时间较长,阳性率低(约 50.0%),而且不能区分定植菌、感染菌或污染菌等^[3]。由于传统的诊断方法灵敏度低且多为有创性,从而导致深部真菌感染的诊断十分困难^[4]。近年来出现了一些新的诊断技术包括影像学高分辨 CT(HRCT)^[5],检测真菌抗原和核酸等的非真菌培养诊断技术^[6-7],如血浆 1,3- β -D 葡聚糖检测、血清半乳甘露聚糖检测等。这些检测方法大多通过检测体液中真菌抗原或代谢物来诊断深部真菌感染。目前关于 1,3- β -D 葡聚糖检测诊断肺部真菌感染的研究较多^[8-9]。1,3- β -D 葡聚糖广泛存在于真菌细胞壁中,当真菌进入人体血液或深部组织后,经吞噬细胞的吞噬、消化等处理后,1,3- β -D 葡聚糖可从胞壁中释放出来,进入血液及其他体液中,它可特异性激活自噬变形细胞溶解产物提取的 G 因子,从而旁路激活鲎试验,根据其引起的浊度变化对于 1,3- β -D 葡聚糖的水平进行定量检测^[10]。

本研究显示深部真菌感染患者血浆的葡聚糖水平明显高于对照组($P<0.01$)。而对照组与非真菌感染组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$),表明深部真菌感染患者血浆 1,3- β -D 葡聚糖水平明显升高。深部真菌感染患者用药后,1,3- β -D 葡聚糖会迅速降解,因此,1,3- β -D 葡聚糖试验既能够作为疑似深部真菌感染患者的诊断方法,为临床提供了抗真菌抢险治疗的依据^[11],又能用于深部真菌感染患者的疗效评价和预后监测。

使用 ROC 曲线确定 1,3- β -D 的最佳临界值为 25 pg/mL,这与 Odabasi 等^[12]按葡聚糖高于 60 pg/mL 为最佳临界值有差异。这一差异可能与研究对象的不同有关,国外研究的方法通常是选取深部真菌感染的确诊患者而非疑似患者作为研究对象,将血浆 1,3- β -D 葡聚糖检测结果和金标准确诊结果相对照^[13],而本研究采用的为国内诊断标准,以疑似或确诊深部真菌感染患者为研究对象。

G 试验与培养进行比较,发现血浆 1,3- β -D 葡聚糖检测用于诊断深部真菌感染的 ROC 曲线下面积为 0.83,也充分说明了该试验对深部真菌感染的诊断价值。当把 25 pg/mL 作为临界值时,灵敏度和特异度分别为 84.9%和 70.83%,有较好的诊断效能。G 试验的灵敏度(84.9%)高于真菌培养的灵敏度(72.0%),虽然真菌培养的特异度(84.1%)高于 G 试验特异度(70.83%)。但是在患者的初步筛查中,血浆 1,3- β -D 葡

聚糖水平检测更加快速、方便。普通培养不能区分真菌定植或真菌感染,普通培养时间较长,而 G 试验不但能区分定植的真菌,而且出检测报告的时间比普通培养早 4 d,所以 G 试验为诊断深部真菌感染的理想方法。但是 G 试验无种属特异性,不能鉴别酵母菌和曲霉菌,这为其局限性;另一方面,G 试验无法检测出隐球菌属和接合菌属的感染,造成假阴性^[14]。另有文献^[15]显示细菌感染亦可能导致血浆 1,3- β -D 葡聚糖水平轻度升高,因此对 G 试验的结果临床应结合患者情况进行诊断和治疗。

参考文献

[1] 单笑梅,刘德梦.肺部真菌感染的诊断和治疗[J].中国抗感染化疗杂志,2004,4(5):317-320.

[2] 中华内科杂志编辑委员会.血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌感染的诊断标准与治疗原则(草案)[J].中华内科杂志,2005,44(7):554-556.

[3] 施毅.侵袭性肺真菌病诊治的再认识[J].中华结核和呼吸杂志,2011,34(2):83-85.

[4] 中华内科杂志编委会.侵袭性肺部真菌感染的诊断标准与治疗原则(草案)[J].中国实用内科杂志,2006,45(21):1748-1751.

[5] Dignan FL,Evans SO,Ethell ME,et al. An early CT-diagnosis-based treatment strategy for invasive fungal infection in allogeneic transplant recipients using caspofungin first line: an effective strategy with low mortality[J]. Bone Marrow Transplant,2009,44(1):51-56.

[6] 高峰,陈建魁,尹秀云.真菌感染的非培养诊断方法进展[J].中国卫生检验杂志,2006,16(3):382-384.

[7] Yoshida K. Recent advances of serodiagnosis for systemic fungal infections[J]. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi,2006,47(3):135-142.

[8] 张建芳,徐修礼,樊新,等.深部真菌感染患者血浆 1-3- β -D 葡聚糖检测的临床意义[J].中华医院感染学杂志,2005,15(3):354-355.

[9] 吕沛华,赵蓓蕾,施毅,等.1,3- β -D 葡聚糖检测诊断侵袭性真菌感染的临床价值[J].中华结核和呼吸杂志,2007,30(1):31-34.

[10] Hachem RY,Kontoyiannis DP,Chemaly RF,et al. Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1,3) beta-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.

[11] Fontana C,Gaziano R,Favaro M,et al. (1-3)- β -D-Glucan vs galactomannan antigen in diagnosing invasive fungal infections (IFIs)[J]. Open Microbiol J,2012,6(1):70-73.

[12] Odabasi Z,Mattiuzzi G,Estey E,et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation,cutoff development,and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome[J]. Clin Infect Dis,2004,39(2):199-205.

[13] Ascioğlu S,Rex JH,de Pauw B,et al. (下转第 1775 页)

特异、能广泛应用于临床的诊断指标已成为肺癌研究的共同方向。

自 1993 年 miRNA 被首次发现以来,经过不断研究已有 1500 种 miRNA 被发现。在不同类型的肺癌组织中 miRNA 表达量也各不相同,即使在同一个体中正常组织与癌组织之间 miRNA 的表达水平也存在差异,正是这些差异的存在为 miRNA 作为肺腺癌早期诊断指标奠定了基础。Yanaihara 等^[5]利用基因芯片技术,对 104 例非小细胞肺癌患者的癌组织与正常肺组织进行分析,发现在所有表达的基因中有 28 种 miRNA 下调,同时有 15 种 miRNA 表达上调。随后的研究发现,部分 miRNA 甚至能够准确地区分肺癌的病理类型如腺癌或者鳞癌^[6]。而在对非小细胞肺癌早期患者以及健康对照人群的血清分析中发现,患者血清中 miR-146b、Let-7a、miR-193a、miR-17-5p、miR-27a、miR-21 等表达均存在差异,且差异有统计学意义($P < 0.05$)^[7-8]。将血液中差异性表达的 miR-21、miR-155 和 miR-145 作为组合分析,区分肺癌和吸烟者,其灵敏度为 69.4%,特异度为 78.3%^[9]。上述研究成果均为进一步研究 miRNA 在肺腺癌中的作用奠定了基础。王海兵等^[8]发现,在这些差异性表达的 miRNA 中,miR-193a 的表达低于健康对照组,但并未对其诊断价值做进一步评估。因此,本研究选取了 miR-193a 作为诊断指标,评价其诊断效能,并将其与肺癌诊断常用指标 CEA 进行了比较。

基于国内外对于 miRNA 的研究,本课题组利用 qRT-PCR 技术分析了 12 例肺腺癌患者 miRNA-193a 在不同组织中的表达量,同时检测了 40 例肺腺癌患者及其匹配的对照人群中血清 miRNA-193a 的表达差异。研究发现,在肺腺癌患者中,癌组织 miRNA-193a 表达量显著下降($P < 0.05$),而癌旁组织与正常组织相比差异并无统计学意义。肺腺癌患者血清 miRNA-193a 水平下降,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。其作为诊断肺腺癌的指标灵敏度为 62.5%,特异度为 92.5%。

有文献报道 miRNA-193a 与抑制乳腺癌细胞周期以及抑制增殖有关^[10]。另外,有学者用 miRNA-193a 在急性骨髓性白血病中抑制了 c-kit 的表达,证实了 miRNA-193a 可发挥重要的抑癌作用^[11]。在对胃间质瘤进行的基因芯片分析中发现,miRNA-193a 表达下调,可作为抑癌 miRNA 成为胃间质瘤诊断的新靶点^[12],上述报道均与本研究的结果是一致的。

miRNA 在肺癌形成过程中起着重要的作用,不同 miRNA 表达水平与肺癌的诊断、治疗、进展、预后及患者生存率等方面均有密切联系。近年来,以 miRNA 作为不同类型的肺癌早期诊断指标的研究进展迅速,miRNA 在检测标本中性质稳定,可增加检测的敏感度和特异度。其检测具有操作简单,快速,花费低等优点,因此随着对 miRNA 研究的不断深入,其有望成

为早期肺腺癌诊断的重要指标。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer[J]. Annu Rev Med, 2009, 60: 167-179.
- [3] 马丽萍, 李娜, 何湘君, 等. miR-449b 和 miR-34c 对卵巢癌细胞 SKOV3-ipl 周期相关蛋白的下调及细胞周期阻滞作用[J]. 北京大学学报(医学版), 2011, 43(1): 129-133.
- [4] 钟方才. 血清肿瘤标志物联合检测对肺癌的诊断价值研究[J]. 内蒙古中医药, 2011, 29(23): 75-76.
- [5] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis[J]. Cancer Cell, 2006, 9(3): 189-198.
- [6] Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, et al. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(2): 430-441.
- [7] Heegaard NH, Schetter AJ, Welsh JA, et al. Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer[J]. Int J Cancer, 2012, 130(6): 1378-1386.
- [8] 王海兵, 张慧君, 苏晋梅, 等. 肺癌 A549 细胞上皮-间质转化及其对微小 RNA 表达的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(8): 590-593.
- [9] Tang D, Shen Y, Wang M, et al. Identification of plasma microRNAs as novel noninvasive biomarkers for early detection of lung cancer[J]. Eur J Cancer Prev, 2013, 22(6): 540-548.
- [10] Uhlmann S, Mannsperger H, Zhang JD, et al. Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer[J]. Mol Syst Biol, 2012, 8(1): 570.
- [11] Gao XN, Lin J, Li YH, et al. MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia[J]. Oncogene, 2011, 30(31): 3416-3428.
- [12] 魏伟, 王智, 汪玲, 等. miRNA-193a-5p 和 miR-3178 在胃间质瘤中的表达意义[J]. 医学新知杂志, 2015, 25(5): 321-325.

(收稿日期: 2017-02-06 修回日期: 2017-04-08)

(上接第 1772 页)

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.

- [14] 李岷. 一种深部真菌早期诊断的新方法--测定真菌细胞壁成分(1→3)-β-D-葡聚糖[J]. 国外医学皮肤性病学分

册, 1998, 24(6): 343-345.

- [15] 胡仁静, 严子禾, 胡锡池. 血浆 1, 3-β-D 葡聚糖检测在侵袭性真菌感染中的诊断价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(17): 3920-3922.

(收稿日期: 2017-02-04 修回日期: 2017-04-06)