

The Discussion of Influencing Factors and Diagnosis Values of 1,3-β-D-Glucan Detection Clinical Significance in the Diagnosis of Fungal Infection

Xin Fan¹, Ju Yang², Xiao Chen¹, Yiqun Sun¹, Xiuli Xu^{1*}

¹Institute of Clinical Laboratory Medicine of People's Liberation Army, Xijing Hospital, Forth Military Medical University, Xi'an

²The Second Student Brigade, Third Military Medical University, Chongqing

Email: *xxlxxl@fmmu.edu.cn

Received: Jul. 10th, 2014; revised: Aug. 11th, 2014; accepted: Aug. 20th, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To discuss (1,3)-β-D-glucan detection (G experimental) clinical significance in the diagnosis of fungal infections and its influence factors. **Methods:** Rapid microbial detection system and GKT150 fungal detection kit were used to test the plasma levels of (1,3)-β-D-glucan. **Results:** A total of 1066 cases were collected, of which 395 cases were positive(37.05%), and 671 cases were negative (62.95%). **Conclusion:** G experiment is a kind of method in the early diagnosis of fungal infection, and also can have a good screening effect for disease which is difficult to diagnose. G experiment could be used for early diagnose of the invasive fungal infection. Reasons for the false positive test might include: Hemolysis or chylemia, medical gauze or some medical items containing glucan ingredient, some patients with bacterial sepsis and inhibitors with antibacterial drugs.

Keywords

(1,3)-β-D-Glucan, Fungi Infection, Detection, Influence Factors

1-3-β-D葡聚糖检测的影响因素及其在真菌感染中的诊断价值探讨

*通讯作者。

樊新¹, 杨聚², 陈潇¹, 孙怡群¹, 徐修礼^{1*}

¹第四军医大学西京医院全军临床检验医学研究所, 西安

²第三军医大学学员旅二营, 重庆

Email: xxlxxl@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2014年7月10日; 修回日期: 2014年8月11日; 录用日期: 2014年8月20日

摘要

目的: 探讨1-3-β-D葡聚糖检测(G实验)在诊断真菌感染性疾病上的临床意义及影响因素。**方法:** 应用MB-80微生物动态快速检测系统及GKT150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。**结果:** 总1066例标本, 阳性395例, 占37.05%, 阴性671例, 占62.95%。**结论:** G实验是一种实用的真菌感染早期诊断方法, 对临床上难以诊断的疾病也能起到一个良好的筛查作用, 同时也能对真菌感染的患者的治疗效果起到一个动态观察的作用。造成G实验假阳性的主要原因可能为: 标本溶血或乳糜血, 医疗纱布或某些医疗物品中含有葡聚糖成分(如白蛋白、凝血因子、免疫球蛋白等), 某些细菌败血症患者(尤其是链球菌败血症), 含酶抑制剂的抗菌药物等。

关键词

1-3-β-D葡聚糖, 真菌感染, 检测, 影响因素

1. 引言

随着抗生素、免疫抑制剂和皮质类固醇激素在临床的广泛使用, 导致临床中发生深部真菌感染(invasive fungal infections, IFI)的机会也越来越多, 而且深部真菌感染患者的死亡率近年来仍是居高不下, 原因之一就是深部真菌感染的早期诊断困难, 而传统的诊断方法通常周期长, 敏感性差, 且组织病理学检查和深部组织培养对于危重患者并不适用。

葡聚糖广泛存在于真菌细胞壁中, 占其干燥重量的80%~90%。其中1-3-β-D葡聚糖占真菌壁成分50%以上, 尤其在酵母样真菌中其含量可更高。其形式以糖苷键连接的葡萄糖残基骨架作为主链, 分支状1-6-β-D葡聚糖残基作为侧链。由于1-3-β-D葡聚糖广泛存在于真菌的细胞壁中, 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, 从而使血液及其他体液(如尿、脑脊液, 腹水, 胸水等)中1-3-β-D葡聚糖含量增高。当真菌在体内含量减少时, 机体免疫可迅速清除1-3-β-D葡聚糖。这为临床真菌感染的实验室诊断提供了一个新的思路。

2. 材料与方法

2.1. 标本来源

2014年1月至6月临床怀疑有真菌感染的住院患者血液标本共1066例, 年龄9岁~95岁, 平均年龄46岁, 男女比例为3:1。

2.2. 试剂及仪器

试剂盒: 北京金山川科技发展有限公司生产的真菌1-3-β-D葡聚糖检测试剂盒GKT-150(光度法)。仪器: 北京金山川科技发展有限公司生产的MB-80微生物快速动态检测系统。试剂盒组成成分: 有反应主

剂和样品处理液组成，反应主剂内含 G 因子、凝固酶原及凝固蛋白原的冷冻干燥品；样品处理液含表面活性剂、K⁺、Mg²⁺组成的溶液。

2.3. 检测原理

真菌 1-3-β-D 葡聚糖能特异性激活反应主剂中的 G 因子、凝固酶原等，引起凝固蛋白原转变成凝固蛋白从而引起吸光度变化，根据检测其溶液吸光度变化对真菌 1-3-β-D 葡聚糖浓度进行定量；试剂中添加的两性电解质甘氨酸、氨基糖苷类抗生素(Paromycin)及表面活性剂可抑制脂多糖对 B、C 因子的激活，对革兰阴性菌脂多糖有特异性屏蔽作用。

2.4. 样品要求

2.4.1. 血浆的制备

用含有少许无菌抗凝剂(肝素类)的一次性无菌无热源真空采血管采取静脉血 4 ml, 进行 3000 rpm/min 离心 1 分钟，分离得富血小板血浆。

2.4.2. 待测样品制备

取上述富血小板血浆 0.1 ml, 加入 0.9 ml 样品处理液中，混匀后 70℃ 孵育 10 分钟，取出后立刻放入冷却槽中冷却 5 分钟，即为待测血浆样品。

2.4.3. 检验方法

取待测血浆 0.2 ml 直接加入酶反应主剂中，溶解后使用微量加样器转移至标准无热原平底试管中(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，反应结束后检测系统自动计算出待测血浆中 1-3-β-D 葡聚糖含量。

3. 结果

1) 1066 例血液标本，阳性标本 395 例，按各个临床科室分出现的阳性例数，见表 1。

2) 此次统计的结果标准为：BG 值 < 60 pg/ml 为正常，BG 值 60~100 pg/ml 为窗口期，BG 值 > 100 pg/ml 为阳性，每次试验前质控均在可控范围内。

Table 1. Detected results of clinical department

表 1. 临床科室检测结果

临床科室	检测例数	阳性例数	阳性率(%)
肾脏内科	80	42	52.5
呼吸内科	165	65	39.4
麻醉科	31	12	38.7
临床免疫科	102	38	37.3
老年病区	115	42	36.5
消化科	281	96	34.2
神经内科	71	24	33.8
血液内科	81	27	33.3
皮肤科	17	4	23.5
其他	123	45	36.6
合计	1066	395	37.05

3) 根据 G 实验检测结果, 结合患者临床资料情况分析, 肾脏内科 G 实验检测阳性率最高, 达 52.5%, 呼吸内科、临床免疫科、血液科其检测阳性率也相对较高。通过分析临床资料了解到, 肾脏内科 G 实验阳性患者所患疾病主要为: 慢性肾功能不全尿毒症期、肾病综合征、慢性肾功能不全肾功能衰竭期等; 检测肾脏内科 80 例血液标本, 共计 61 名患者, 其中 2 名考虑假阳性: a) 患者为 57 岁女性, 临床诊断为慢性肾功能不全尿毒症期、肾性贫血, 治疗期间曾行血液透析治疗, 该患者三次血液标本 G 实验结果为: >1000 pg/ml、>1000 pg/ml、641.60 pg/ml, 但其临床上并没有出现真菌感染的相应的症状和体征, 考虑假阳性; b) 患者男 61 岁, 首次 G 试验检测结果>1000 pg/ml, 为强阳性, 复查结果为: 89.54 pg/ml、92.14 pg/ml, 考虑为假阳性。在检测的临床免疫科 102 例血液标本中, 共计 93 名患者其中一名考虑为假阳性: 患者为 11 岁男性, 临床诊断为脊柱关节炎、右髌关节炎, 在治疗过程中服用过免疫抑制剂, 该患者在服用免疫抑制剂前后两次 G 实验检测结果分别为: 15.43 pg/ml、298.50 pg/ml, 其临床并没有出现真菌感染相应的症状和体征。对于上诉两例病例通过结合患者临床资料, 均怀疑为 G 实验假阳性。

4. 讨论

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。其中, 血清真菌细胞壁成分曲霉半乳糖抗原(GM)和 1-3- β -D 葡聚糖抗原的检测, 血液、支气管肺泡灌洗液中的各种真菌 PCR 测定, 是诊断 IFI 的微生物学检测方法, 其灵敏度和特异度均达到 80% 以上 [1]。在临床上能够帮助快速、准确诊断疾病的有效方法。

G 实验为临床前瞻性实验, 目的是分析血浆葡聚糖水平对深部真菌感染诊断实验的准确性。确定其是否可以用于早期诊断深部真菌感染。1-3- β -D 葡聚糖是一种多聚糖成分, 特异的存在于除结合菌和隐球菌外的其他真菌。原核生物、病毒和人类的细胞都没有葡聚糖, 如果其出现在血和其他无菌体液中就提示深部真菌感染, 常见的病原为曲霉菌和念珠菌, 通过葡聚糖水平测定都可以检测出来。

1) G 实验是早期诊断 IFI 的手段之一: 在此次 G 实验检测统计中, 患者血液标本涉及各个科室, 数种疾病, 可见 G 实验在临床诊断应用十分广泛。此次统计的标本中, 阳性病例中, 特别是首次入院患者中, 其阳性体征并不是很明显, 但其 BG 值却出现了明显的异常。

在多项研究中均有表明, 真菌感染患者在其出现临床表现之前其体内 1-3- β -D 葡聚糖水平就已经高于正常值。国外相关文献中也有报道, 如 Pazos 等[2]报道 5 例确诊 IFI 及 3 例临床诊断的 IFI 患者中, 发现 BG 值升高出现在发热、咳嗽、胸痛等症状和肺部高分辨率 CT(HRCT)检查发现真菌感染征象之前。其中 BG 值升高平均早于发热 5 d, 早于呼吸道症状平均 10.7 d, 早于 HRCT 检查平均 9.3 d。Pazos 等[2]使用抗真菌药物的指征是 HRCT 检查发现肺部有真菌感染征象且 BAL 发现真菌感染, 结果 BG 值升高平均使用药物提前 14 d。Odabasi 等[3]对确诊为粒细胞缺乏人群进行为期 3 周每周 2 次采血检测及临床观察, 发现 BG 值开始高于 60 pg/mL 的时间比最后确诊为 IFI 或临床诊断 IFI 平均提前了 10 d。

因此, BG 值被认为是早期诊断 IFI 无创检测手段之一。如果能有效利用 BG 值, 将大幅度提前抗真菌治疗的时间, 从而尽早控制疾病的发展, 当检测到标本中葡聚糖含量较高时, 即刻给予系统治疗, 不必等鉴定出种属, 这样则不会会贻误最佳治疗时机, 从而提高治愈率, 减少药物的过度使用。

2) BG 检测可用于动态随访疾病的变化: BG 水平高低能够提示疾病的发展和预后。在此次 G 实验统计结果中, 对于麻醉监护室的一例患者: 患者为 74 岁男性, 临床诊断为重度颅脑损伤、开颅去骨瓣减压术后、肺部感染、脓毒症、怀疑真菌感染, 其入院治疗过程中四次 G 实验检测结果分别为 678.10 pg/ml, >1000 pg/ml, 441.50 pg/ml, 228.70 pg/ml, 在其治疗过程中, 患者临床症状得到改善, 与其 BG 值水平降低相一致。

相关文献中也有报道[4]-[7]: Pazos 等[1]研究发现在临床表现及微生物学证据出现之前, BG 水平在

确诊 IFI 患者的血清中出现持续升高,而随着药物的使用,对药物敏感者可很快出现 BG 水平下降及转阴,而药物治疗无效人群 BG 值无明显改变。对于出院的病人也可将 G 实验用作于随访,看是否患者有疾病复发的可能。因此, BG 可以用来判断药物的疗效,以协助临床医师及时进行药物种类及剂量的调整,动态观察病人的情况,协助临床医师及时调整治疗方案。

3) G 实验的影响因素: 目前为止,在很多文献中均有报道,某些物质中存在 BG 类似物,会造成检测结果的假阳性[6] [7]如: a) 中空纤维滤膜洗涤液; b) 肾透析仪(人工肾,血液透析仪)洗涤液; c) 纱布棉球等实验室污染; d) 抗肿瘤药物中蘑菇聚糖, K 多聚糖等成分也含有 BG 类似物; e) 化疗或放疗引起的黏膜炎症,使得食物中 BG 可以通过受损的胃肠道黏膜进入到血液中; f) 以真菌作为原料制成的抗生素等均会造成假阳性结果。另外使用污染的无热源的试管、枪头等实验器材;某些细菌败血病患者(尤其是链球菌败血症)等情况也会造成检阳性结果;临床上采血过程中导致的污染也可能引起假阳性结果。对于检测结果中报告阳性的标本均应与病人临床上的资料、历史检查结果进行对比,或者直接向临床医师进行沟通,了解病人近期是否有使用有可能会引起 1-3-β-D 葡聚糖水平的药物,如果检测结果明显高于异常,因重复试验,有必要者甚至应当多次重复动态检测,动态检测可以有效排除这种假阳性。

对于假阴性结果, BG 虽然存在于绝大多数真菌的细胞壁,但是仍有部分真菌感染无法通过 BG 检测诊断,如的隐球菌属和接合菌属,研究发现[8],接合菌(毛霉、根霉)细胞壁不产 BG,感染接合菌的患者血清 BG 值为 0;隐球菌细胞壁外有荚膜包裹,因此不易检测到细胞壁上的抗原,但是在一定条件下荚膜自身可释放出极微量的 BG 到血清中,所以检测值可大于 0,但仍小于阳性判断标准。而对于口腔和其他器官的真菌定植患者, BG 值也较低,一般不超过 20 pg/mL[1]。BG 试验检测这 2 种真菌会造成假阴性。因此,对于这两大类真菌感染的诊断不能完全依靠 BG 试验,还必须依赖其他实验室手段(如隐球菌抗原检测或真菌培养等)及临床表现来进一步明确。

4) 国内外研究进展: 现 BG 检查在临床上主要用于确定病人是否有真菌感染的可能性,其并不能确定病人真菌感染的种类,临床上主要将 G 实验用于一个初步的筛查,并不能确定病人的感染菌种。但在国外已有报道 G 实验中 1-3-β-D 葡聚糖水平高低能一定程度上反应患者感染真菌的种类。在美国 6 所临床试验中心选取确诊 IFI 及临床诊断 IFI 患者共 163 例、志愿者 170 例(确定无真菌感染者)进行 BG 试验[8],结果发现,确诊和临床诊断 IFI 患者血清 BG 水平明显高于非真菌感染者,其中,不同的真菌, BG 水平也不同。如念珠菌感染者血清平均 BG 值为 755 pg/ mL; 曲霉感染者平均 BG 值为 1103 pg/mL; 镰刀霉感染者平均 BG 值为 1652 pg/mL; 接合菌(毛霉、根霉)细胞壁不产 BG,感染接合菌的患者血清 BG 值为 0;隐球菌细胞壁外有荚膜包裹,因此不易检测到细胞壁上的抗原,但是在一定条件下荚膜自身可释放出极微量的 BG 到血清中,所以检测值可大于 0,但仍小于阳性判断标准。而对于口腔和其他器官的真菌定植患者, BG 值也较低,一般不超过 20 pg/mL[1]。因此,进一步深入探讨不同真菌感染时血清中 BG 含量将有可能对判断某种具体真菌菌种有参考意义。

BG 试验作为一种新的诊断 IFI 的无创检测手段,有着灵敏度和特异度高的优点。BG 试验能够作为高度怀疑深部真菌感染患者的初筛诊断方法,能在临床上鉴别诊断某些疾病作出诊断,又能作为评价患者疾病进展情况、药物使用效果、临床疗效的指标,同时也能对出院患者起到一个随访动态观察的作用,评价患者预后以及复发可能等。对真菌培养阳性患者进行检测,可以区分出定植和感染。与 GM 试验联合使用可以提高对曲霉感染的诊断,对于肺孢菌肺炎感染也具有一定诊断参考价值[9]。对于其检测结果水平是否能某种程度的反应真菌感染的种类还需做进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] Verweij PE, Figueroa J, van Burik J, et al. (2000) Clinical applications of non-culture based methods for the diagnosis

and management of opportunistic and endemic mycoses. *Medical Mycology*, **38**, 161-171.

- [2] Pazos C, Ponton J, Del Palacio A. (2005) Contribution of (1,3)-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: A comparison with serial screening for circulating galactomannan. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**, 299-305.
- [3] Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al. (2004) (1,3)-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clinical Infectious Diseases*, **39**, 199-205.
- [4] 谭惠明, 徐韞健, 廖伟娇等 (2010) 血浆 1-3-β-D 葡聚糖对深部真菌感染诊断作用的探讨. *中国热带医学*, **2**, 229-230.
- [5] 钱扬会, 郭建巍, 郝秀红, 刘丽娟, 李艳君, 马聪 (2011) 1-3-β-D 葡聚糖检测深部真菌感染的应用研究. *临床误诊误治*, **8**, 91-92.
- [6] 高蕾, 周新 (2008) 1-3-β-D 葡聚糖检测在侵袭性真菌感染中的诊断意义. *中国感染与化疗*, **2**, 123-125.
- [7] 刘佳庆, 张丽霞, 刘雅等 (2010) 1-3-β-D 葡聚糖在侵袭性肺部真菌感染的诊断值. *中国医学检验杂志*, **1**, 10-12.
- [8] Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, et al. (2005) Multicenter clinical evaluation of the (1,3)-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clinical Infectious Diseases*, **41**, 654-659.
- [9] 朱小敏, 周新 (2005) 侵袭性肺曲霉病的诊断与治疗. *中国呼吸与危重监护杂志*, **4**, 316-320.