

• 综 述 •

(1,3)- β -D-葡聚糖在 COPD 合并真菌感染中的应用研究进展*

张 乐 综述,尹 宁[△]审校

(新疆医科大学第六附属医院,乌鲁木齐 830000)

关键词:慢性阻塞性肺疾病; 真菌感染; (1,3)- β -D-葡聚糖

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)17-2343-03

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种以不完全可逆的气流受限为特点的肺部疾病^[1]。随着广谱抗菌药物及糖皮质激素的大量使用、呼吸机辅助通气等侵入性操作机会增加的影响,COPD 合并侵袭性肺部真菌感染(IPFI)的发病率明显上升,且因为其诊断较困难,误诊、误治率高,病死率也居高不下^[2-3]。因而,早期诊断及治疗显得尤为重要。高分辨 CT、真菌抗原及核酸检测等一些快速非介入性诊断技术的应用,为早期诊断提供了可靠依据,也为早期治疗赢得了时间。其中,存在于绝大多数真菌细胞壁的抗原物质——(1,3)- β -D-葡聚糖(BG)成为 COPD 合并 IPFI 患者的一项重要重要的早期诊断指标^[4],基于其早期、快速、无创性的特点,现已广泛应用于临床。本文将对 BG 的实验室检测及其在 COPD 合并 IPFI 诊断中的应用作一综述。

1 COPD 合并真菌感染的研究现状

真菌为肺部感染常见的病原体,在侵袭性真菌病中,侵袭性肺部真菌感染更是占首位,感染的病原菌以白色念珠菌及曲霉菌最为多见^[5]。COPD 合并真菌感染大多为医源性感染,其临床表现通常会被基础疾病所掩盖,因而在应用抗菌药物治疗时,若出现治疗无效或症状加重、反复发热或体温持续不降的情况,则要怀疑真菌感染。IPFI 诊断由宿主因素、临床特征、微生物学检查和组织病理学组成,而诊断 IPFI 又分为确诊、临床诊断和拟诊。我国于 2006 年制订了 IPFI 的诊断标准^[6]:确诊 IPFI 要至少符合 1 项宿主因素,肺部感染的 1 项主要或 2 项次要临床特征及 1 项微生物学或组织病理学依据。在实际工作中,组织病理学和深部组织培养仍然为诊断 IPFI 的金标准^[7],但由于其侵袭性操作,患者及家属很难接受,危重患者也不适用,故病例的早期诊断很困难,其发生率和病死率也呈持续上升趋势^[8-9],如何早期诊断的问题越来越受到关注。

2 BG 的原理及检测试剂

BG 广泛存在于真菌(除接合菌外)、酵母、细菌、海藻和谷类等的细胞壁中,原核生物、病毒及人体细胞中不存在这种多糖,但健康人血清中会有少量存在^[10]。G 试验由革兰阴性菌内毒素的检测方法(鲎试验)演变而来。内毒素主要激活马蹄鳖的凝血酶原 C 因子,BG 抗原主要激活马蹄鳖的凝血酶原 G 因子,G 因子上的 α 亚基特异性的识别 BG 后,激活凝血酶原上的 β 亚基,形成凝固酶继而参与凝血酶原级联反应,将凝固蛋白原转化为凝胶状的凝固蛋白,整个反应应用光谱仪测量光密度实现量化,BG 检测值可精确至 1 ng/L。当前市场上检测 BG 的商业化试剂盒不多,其中以美国 Cape Code 协会研制的 Fungitell 试剂和日本 Seikagaku kogyo 公司研制的 Fungitec-G

最为多见,前者已在 2004 年被美国食品药品监督管理局(FDA)批准并在欧洲和美国广泛使用^[5,11],但这 2 种试剂主要原料不同,其阈值也有差别,Fungitell 试剂是以美洲鲎的细胞裂解产物为原料,阈值为 60~80 ng/L,而 Fungitec-G 的主要原料为东方鲎的细胞裂解产物,其阈值为 20 ng/L。国内现多用北京金山川科技发展有限公司生产的 GKT25M set 动态真菌检测试剂盒,小于 10 ng/L 为阴性,10~20 ng/L 为观察期弱阳性,大于 20 ng/L 则提示存在深部真菌感染。再者,诊断阈值不同,灵敏度和特异度也随之变化,国外一项研究采用 Fungitec-G 试剂盒,分别计算了诊断阈值为 30、60 和 80 ng/L 时的灵敏度和特异度,结果显示当诊断阈值为 30 ng/L 时,灵敏度和特异度分别为 95.1% 和 85.7%,诊断阈值为 60 ng/L 时分别为 85.4% 和 95.2%,而诊断阈值为 80 ng/L 时,则为 78% 和 98.4%^[12],由此可见,诊断阈值的确定是非常重要的,例如在肺曲霉菌病或其他慢性曲霉菌病时,抗真菌治疗常常是不必要的,通常临床上只给予那些急性发作的患者抗真菌治疗,如果仅依据 BG 的检测结果来确定是否治疗,就会导致假阳性结果的患者接受不必要的抗真菌治疗,因此临床医生需要对 BG 检测值仔细评估(尤其是对慢性曲霉菌病患者),实验室间也迫切需要建立一个国际标准方法来测量 BG^[13]。

3 BG 的临床应用

早在 1995 年,日本 Seikagaku kogyo 公司就建立了 BG 的检测方法用于诊断侵袭性真菌感染(IFI),并很快在日本广泛使用^[13]。现在 BG 检测已成为微生物实验室最常用的真菌检测方法之一。与其他真菌标记物如半乳甘露聚糖(特异性诊断曲霉菌病)或甘露聚糖(特异性诊断侵袭性隐球菌病)相比,BG 检测特异度相似,但灵敏度似乎较低^[14-15]。但在 BG 与其他真菌标志物的比较或者联合检测中,单独的 BG 试验还是联合检测哪个更优越尚无定论^[16]。

BG 是几乎所有真菌均具有的一种特异的细胞壁成分,含量占到近 50%。在真菌感染过程中,BG 可释放入血液及其他体液中增高,故 BG 检测可以成为侵袭性深部真菌感染非常有价值的早期诊断指标,此外,对真菌培养阳性者进行血清 BG 检测,可以区分出感染和定植。由于约 90% 呼吸道标本培养曲霉菌阳性事实上是曲霉菌定植而非感染^[17],故正确区分出定植还是感染在很大程度上可避免不必要的治疗;半乳甘露聚糖(GM)抗原是曲霉菌多糖细胞壁的一种成分,在侵袭性感染过程中释放入血,通过 ELISA 反应对血清 GM 抗原进行定性测定,可提高对曲霉菌感染检测的准确度^[18]。半乳甘露聚糖也可以被用来预知和监测对治疗的反应,在治疗开始时 GM

* 基金项目:新疆医科大学科研创新基金立项项目(XJC2012152)。

作者简介:张乐,女,硕士研究生在读,主要从事病原学诊断的研究。

[△] 通讯作者,E-mail:yinningyyd@126.com。

阳性的患者中,低水平的 GM 比较高水平的 GM 更能预知对治疗的反应^[19]。但需要注意的是为避免血浆中的一些物质对检测的影响,选用血清样本来检测^[20],且诊断阈值只适合于成人^[11]。目前,BG 检测(G 试验)和半乳甘露聚糖检测(GM 试验)作为真菌感染的新技术,已被欧洲癌症研究治疗及真菌研究组织(EORTC/MSG)认定,其中,前者诊断病原谱较广,适用于除接合菌和隐球菌外的大多数真菌感染的诊断,而后者多用于曲霉菌感染特异性诊断^[21-24]。

虽然 G 试验可提示是否有侵袭性真菌感染,但却不能鉴别出种属^[25]。通过对 PCR 产物测序可以鉴定出真菌的种属,将 PCR 法与其他检测方法联合应用,同时结合患者临床症状及影像学特征可提高 IFI 的确诊率,减少经验性用药或非必要的预防性用药^[26]。已有许多文章报道应用 PCR 检测真菌 DNA,但至今,还未提供标准化规程和实验室内确认,也没有成熟的可用的商业化分子诊断试验,且 PCR 检测无法鉴别真菌定植与感染,因而还未被批准用于 IFI 的临床诊断^[9]。欧洲做这类的试验比较多,现在正试图标准化试验规程^[27]。

BG 试验在临床应用中也存在一定的局限性。一些含有 BG 类似物的物质的影响,如纱布、棉球的污染,血液透析、 β 内酰胺类药物使用,细菌感染(特别是革兰阳性菌感染者)等均可造成假阳性结果^[28]。此外,对于临床抗真菌治疗的预防性用药、BG 试验不能检测的致病性真菌(如接合菌和隐球菌)和浅部真菌感染,BG 的结果则可能为假阴性。为尽可能避免假阳性和假阴性的出现,关于试验技术的复杂性及其成本效益成为本实验能实时实现临床指导的 2 大关键问题。

关于 G 试验的几点建议^[5]:(1)G 试验应该与其他诊断 IFI 的方法共同使用;(2)BG 的检测应该先于抗真菌治疗;(3)对于高危患者,应每周检测 2 次以监测感染。关于 BG 水平与侵袭性念珠菌病相关性的一项研究称,相对于 BG 减少的百分比和 BG 最终水平而言,BG 的斜率与临床疗效更具相关性,因而连续监测是非常必要的;(4)每周检测 1 次以评估对治疗的反应;(5)在接受真阳性结果前,阳性的结果应该用另一份标本或重复初始标本确认;(6)关于用血清以外的标本(如胸腔积液、脑脊液等)检测的有用性还有待进一步研究^[11]。

受长期住院治疗 and 侵袭性操作等因素的影响,老年 COPD 合并真菌感染者越来越多,已对老年 COPD 患者死亡构成严重威胁。IFI 的高病死率(尤其是侵袭性曲霉菌病)很大程度上是由于诊断的延迟。近来,非培养诊断方法有了飞速发展,包括更加敏感和快速的方法如循环抗原、特异性抗体、真菌代谢产物和真菌 DNA 的测定。尽管如此,传统的培养方法对于真菌感染的明确诊断、抗真菌的敏感性试验及流行病学研究仍然是必不可少的。目前的证据表明一个阴性结果不能完全排除 IFI 的诊断,单独一个阳性结果也缺乏充分的灵敏度和特异度以确定诊断,因而快速易操作的真菌感染标志物检测的有效性对高危患者尤其重要,对检测最佳范围及频率也需要更多大样本多中心的试验以确定并最终推荐使用。

参考文献

[1] Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, et al. On behalf of the Gold scientific committee, global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease NHLBI/WHO global initiative for chronic obstructive lung disease(Gold)workshop summary[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001,163(7):1256-1276.

[2] Valle JM, Gonzdlez-Barcala FJ, Alvarez-Dobafio JM, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in chronic obstructive pul-monay disease [J]. Rev Med Chil, 2010, 138(5):612-620.

[3] Samarakoon P, Soubani AO. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with COPD: a report of five cases and systematic review of the literature[J]. Chron Respir Dis, 2008, 5(1):19-27.

[4] Ellis M, Bamadi B, Finkelman M, et al. Assessment of the clinical utility of serial B-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever[J]. J Med Microbiol, 2008, 57(2):287-295.

[5] Wright WF, Overman SB, Ribes JA. (1-3)-beta-D-Glucan assay: a review of its laboratory and clinical application[J]. Lab Medicine, 2011, 42(11):679-685.

[6] 中华内科杂志编辑委员会. 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.

[7] 陈峰, 陶晓勤, 刁文晶, 等. 国产血浆(1-3)- β -D 葡聚糖检测试剂对侵袭性真菌病诊断价值评估[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2012, 32(3):348-351.

[8] Guinea J, Torres-Narbona M, Gijón P, et al. Pulmonary aspergillo-sis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(7):870-877.

[9] Xu H, Li L, Huang WJ, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a case control study from China[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(4):403-408.

[10] Yasemin O, Kiraz N. Diagnostic methods for fungal infections in pediatric patients: microbiological, serological and molecular methods[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011, 9(3):289-298.

[11] Marchetti O, Lamoth F, Mikulska M, et al. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients[J]. Bone Marrow Transplant, 2012, 47(6):846-854.

[12] Obayashi T, Negishi K, Suzuki T, et al. Reappraisal of the serum (1- $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections—A study based on autopsy cases from 6 years[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(12):1864-1870.

[13] Yoshida K, Shoji H, Takuma T, et al. Clinical viability of Fungitell, a new (1- $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan measurement kit, for diagnosis of invasive fungal infection, and comparison with other kits available in Japan[J]. J Infect Chemother, 2011, 17(4):473-477.

[14] Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti MA, et al. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia[J]. Crit Care, 2010, 14(6):R222.

[15] Lamoth F, Cruciani M, Carlo M, et al. β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and Meta-Analysis of cohort studies from the third European conference on infections in leukemia(ECIL-3)[J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(5):633-643.

[16] 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.

[17] Mortensen KL, Johansen HK, Fuursted K, et al. A prospective survey of Aspergillus spp. in respiratory tract samples: prevalence, clinical impact and antifungal susceptibility[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(11):1355-1363.

- [18] 何成禄,何增品,徐从琼,等. 血浆(1,3)-B-D 葡聚糖和血清半乳甘露聚糖检测对重症患者侵袭性真菌感染的早期诊断价值[J]. 现代检验医学杂志,2013,28(2):54-56.
- [19] Koo S, Bryar JM, Baden LR, et al. Prognostic features of galactomannan antigenemia in galactomannan-positive invasive aspergillosis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1255-1260.
- [20] Pickering JW, Howard WS, Catherine AB, et al. Evaluation of a (1,3)-b-D-Glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(15): 5957-5962.
- [21] Wingard JR. Novel serum markers supplanted tissue diagnosis for invasive fungal infections in acute leukemia and transplantation[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2012, 25(3): 487-491.
- [22] Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2008, 10(4): 7394.
- [23] Marty FM, Koo S. Role of (1->3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis[J]. Med Mycol, 2009, 47(Suppl 1): S233-S240.
- [24] Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, et al. beta-D-Glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis[J]. Clinical Infectious Diseases, 2011, 52(6): 750-770.
- [25] 曹国君, 赵芳, 刘璐, 等. 通用 PCR 法在痰标本真菌检测中的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(13): 1635-1636.
- [26] White PL, Mengoli C, Bretagne S, et al. Evaluation of aspergillus PCR protocols for testing serum specimens[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(11): 3842-3848.
- [27] 曹敏华. 菌血症患者血浆(1,3)-β-D-葡聚糖检测意义探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(22): 2802-2803.
- [28] 吴志平, 邵丽霞, 周东升, 等. 侵袭性真菌感染者血浆(1,3)-β-D 葡聚糖检测结果分析[J]. 临床输血与检验, 2012, 14(2): 160-161.

(收稿日期: 2014-04-08)

• 综 述 •

血红蛋白变异体对糖化血红蛋白测定方法的干扰

徐胜男 综述, 温冬梅, 张秀明 审校
(中山市人民医院, 广东中山 528403)

关键词: 血红蛋白变异体; 糖化血红蛋白; 干扰

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)17-2345-03

目前,大部分糖化血红蛋白的检测系统可排除常见的血红蛋白变异体杂合子的干扰,或给出警告提示信息,而一些较为罕见的血红蛋白变异体引起的干扰常被临床医生和患者忽视。因此对于血红蛋白变异体普遍存在的地区,应谨慎选择 HbA1c 的检测系统,对于变异体携带者可选择合适的替代指标用于评估血糖水平。

1 血红蛋白和糖化血红蛋白

血红蛋白是由珠蛋白和血红素构成的一种结合蛋白质,相对分子质量为 64 458。血红素由原卟啉与亚铁原子组成。每一个珠蛋白分子由两对多肽链组成,一对 α 链,由 141 个氨基酸残基构成,含较多组氨酸,其中 α87 位组氨酸与血红素的铁结合,在氧的运输中具重要作用;另一对是非 α 链,包括 β、γ、δ、ξ 及 ε 5 种。β、δ 和 γ 链均由 146 个氨基酸残基组成,但氨基酸组成、排列顺序、等电点不同,电泳时泳动的速度也不同。每一条肽链和一个血红素连接,构成一个血红蛋白单体。人类血红蛋白是由两对(4 条)血红蛋白单体聚合而成的四聚体。不同类型的血红蛋白珠蛋白结构略有不同,但血红素均相同。健康人出生后有 3 种血红蛋白:(1)血红蛋白 A(HbA),由一对 α 链和一对 β 链组成(α₂β₂),占血红蛋白总量的 95% 以上。胚胎 2 个月时 HbA 即有少量出现,初生时占 10%~40%,出生 6 个月后即达成人水平。(2)血红蛋白 A₂(HbA₂),由一对 α 链和一对 δ 链组成(α₂δ₂)。出生 6 个月后可以占血红蛋白的 2%~3%。(3)胎儿血红蛋白(HbF):由一对 α 链和一对 γ 链组成(α₂γ₂),出生时占体内血红蛋白的 70%~90%,以后渐减,至 6 个月,可降至血红蛋白总量的 1% 左右。

糖化血红蛋白 HbA₁ 又可分为 HbA_{1a1}、HbA_{1a2}、HbA_{1b} 和 HbA_{1c}, HbA_{1c} 约占 HbA₁ 的 80%,其 β 链氨基末端具有

特异性六肽结构。随着病情发展,患者的血糖会变得难以控制,从诊断确立开始越早有效控制血糖,越有利于缓解患者长期的疾病发展进程^[1]。HbA_{1c} 目前被很多国家视为诊断和监控 T2DM 发展的指标,在我国其诊断价值和适用性仍被质疑。大量数据表明,糖尿病最终会伴随长期的微血管并发症。围绕 HbA_{1c} 是否适宜作为诊断指标的讨论,其主要内容是,血糖和 HbA_{1c} 作为诊断工具的利与弊,分析前和分析中的变量,检测成本以及可接受程度。首先, HbA_{1c} 反映血糖的平均水平,比任一时间点的血糖值更能体现机体血糖代谢的平均水平,而红细胞 120 d 寿命中,近期血糖水平的波动对 HbA_{1c} 检测值的贡献较大,标本采集前一个月的影响达 50%,而采集前第 2 个月的影响达 25%^[2]。其次,检测过程可对患者提供更多的便利条件。不需空腹采血,一次样本采集即可得到较准确的结果,因此患者的接受度和依从性较高,更有利于隐性 T2DM 患者的筛查。相比之下口服葡萄糖耐量试验(OGTT)需要更复杂的分析前准备,包括检测前至少 3 d 的均衡饮食,空腹 8 h 以上,且检测耗时 2 h 以上。另外,恶心、呕吐、胃排空延迟和建立静脉通道的患者均不适用该项检查,众多变异因素均可能得到不可靠的检测结果。另外,OGTT 需要多次采血,患者依从性较差,而 HbA_{1c} 不受饮食状态和昼夜节律的影响,检测前变异度较血糖小。静脉血收集到抗凝管之后,红细胞还会以每小时 7% 的速度在体外酵解葡萄糖,理想状态下样本应该冰浴保存且在 30~60 min 内检测,而大部分实验室无法严格遵守这一操作。HbA_{1c} 在静脉血中具有较高的分析前稳定性,在 4℃ 可稳定保存 1 周^[3]。

大量的流行病学资料证明, HbA_{1c} 的升高不仅可以作为 2 型糖尿病病情进展的检测指标,也是糖尿病肾病、糖尿病视网