

侵袭性肺曲霉病实验室诊断研究进展

曹文

湖北中医学院药大学医学检验与技术学院 湖北武汉

【摘要】侵袭性肺曲霉病 (Invasive pulmonary aspergillosis, IPA) 是指曲霉菌侵入肺组织而引起的感染性疾病, 治疗困难, 发病率、死亡率和治疗费用均较高。且临床表现与其他病原感染较为相似, 早期诊断和及时治疗是病人预后良好的关键。本文对侵袭性肺曲霉病的相关实验诊断技术的研究进展从曲霉菌的培养和鉴定、相关生物标志物、分子生物学检测技术三个方面进行了总结。

【关键词】侵袭性肺曲霉病; 感染; 念珠菌; 检测方法

【收稿日期】2023 年 7 月 13 日 **【出刊日期】**2023 年 8 月 18 日 **【DOI】**10.12208/j.ijcr.20230292

Advance in laboratory diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis

Wen Cao

College of Laboratory Medicine and Technology, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei

【Abstract】Invasive pulmonary aspergillosis (IPA) is an infectious disease caused by Aspergillus invading lung tissue, which is difficult to treat and has high morbidity, mortality and treatment cost. The clinical manifestations are similar to other pathogenic infections. Early diagnosis and timely treatment are the key to a good prognosis. In this paper, the research progress of experimental diagnosis of invasive pulmonary aspergillus disease was summarized from three aspects: culture and identification of aspergillus, related biomarkers and molecular biological detection techniques.

【Keywords】Invasive pulmonary aspergillosis; Infection; Candida; Detection method

侵袭性肺曲霉病 (invasive pulmonary aspergillosis, IPA) 是由曲霉菌侵入感染引起的一种肺部真菌感染性疾病, 肺部病灶呈凝固型坏死、局限性的肉芽肿, 伴有坏死性血栓, 严重者可累及胸膜^[1]。近年来, 随着免疫抑制人群的增长, 如恶性肿瘤患者、慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、长期接收放、化疗治疗, 器官移植的广泛开展, 肿瘤化疗药物的使用, 临床上被曲霉菌感染导致患上肺部侵袭性曲霉病 (invasive pulmonary Aspergillus infection, IPAI) 患者的比例逐年升高, 约占院内真菌感染的 50%~60%^[2], 然而 IPA 临床表现并不是十分典型, 其诊断需要宿主因素, 如胸部的影像学检查、临床证据、微生物学证据^[3]。如正常部位的真菌培养阳性的结果、半乳糖甘露聚糖的 GM 检测、肺组织活检, 确定诊断的过程比较困难, 且如果诊断延误, 对临床治疗的效果有负面影响, 且愈后效果较差, 改善患者的愈后效果则只有进行早期的、准确的诊断才可以可能。

目前临床上主要采用欧洲癌症研究治疗组织及真

菌研究组 (EORTC/MSG) 推荐的侵袭性真菌病的分级诊断标准^[4]: 确诊 IPA 有赖于组织病理学依据或正常无菌部位标本曲霉菌培养阳性或直接镜检阳性。目前临床诊断该病包括询问病史、实验室检查、肺部 CT、痰液培养及真菌培养等。其中根据是否有真菌培养学证据划分为 probable (很可能 IPA 和 possible (可能) IPA。曲霉菌培养阳性在在 IPA 的诊断中非常重要, 目前, 目前侵袭性肺曲霉病的实验室检测方法非常多, 本文将从曲霉菌的形态学检测和培养、曲霉菌相关生物标志物检测以及以 PCR 为代表的分子诊断新技术等方面进行相关介绍。

1 曲霉菌的病原学检查

1.1 形态学检查

通过显微镜直接对临床标本 (如痰液、支气管肺泡灌洗液) 进行镜检, 是最简单的病原学诊断方法。通过显微镜发现曲霉菌、毛霉菌、酵母菌、肺孢子菌, 以及某些地方性真菌病原体, 是侵袭性真菌感染确诊的依据^[5]。有研究证明高危患者诊疗期间平均反复

进行痰涂片镜检真菌为 3.5 次时, 检测敏感性可达 87.7%、特异性达到 72.1%^[6]。目前, 临床检测常用的染色方法中钙荧光白染色方法操作快速简便, 性价比和灵敏度高, 阳性检出率高于其他染色方法。直接镜检优点在于操作简单, 成本低, 缺点在于无法准确判断真菌种类, 且特异度不高, 和操作人员的技术水平密切相关, 比较适合基层实验室和急诊初筛。

1.2 曲霉菌培养

目前, 侵袭性肺曲霉病临床诊断的主要方式之一仍然为真菌培养。肺部组织和支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 曲霉菌培养是诊断 IPA 的金标准, 其阳性结果诊断价值较大。IDSA2023 年新版《曲霉菌病诊治指南》中指出: 在临床实验室推广使用分子生物学诊断技术以前, 推荐采集足量组织和体液标本同时送检组织病理学/细胞学检查与真菌培养。真菌的培养时间较长, 受培养条件的限制, 阳性率不高, 仅约为 50%。且血液标本中肺曲霉菌的阳性结果非常低, 即使病人发生全身性感染, 其血液样本中曲霉菌的培养率仍然很低。所以, 曲霉菌血培养阳性时对其结果的解读应慎重, 需排除外源性污染, 避免导致过度治疗。

1.3 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS 仪主要由两部分组成: 基质辅助激光解吸电离离子源和飞行时间质量分析器。近年来, 这种发新型的软电离生物质谱技术已经成为临床常规鉴定真菌的重要检测方法, 其灵敏性、准确度、分辨率都非常高, 并且具有自动化、高通量及成本低等诸多优点。目前我国许多大型医疗机构临床实验室通过检测标本中特定蛋白指纹图谱, 与相关数据库比对后, 可以轻松对多种曲霉菌进行常规鉴定。但该技术的鉴定质量受多种因素影响: 如标本制备质量、仪器的状态、菌落培养时间、参考光谱特征峰数量、数据库的来源以及操作水平。MARTY 等通过 MALDI-TOF MS 仪鉴定了临床丝状真菌 319 株, 以 DNA 测序为参考标准, 数据显示其中曲霉菌鉴定的准确率高达 93.6%^[7]。目前, 质谱技术仍然存在不少缺点: 如成本高、检测数据缺乏统一标准, 样品制备过程无法实现自动化、专业人员短缺等, 另外鉴定真菌的数据库参考数据不足等, 这些都使得该技术在鉴定丝状真菌方面的应用还存在一定的局限性, 如果用于鉴定的数据库能够包含足够数量的参考株, 物种水平的鉴定是完全可以实

现的。

2 与 IPAI 相关的血清生物标志物检测

除了通过常规的微生物培养鉴定技术, 临床上还可以对血清中与 IPAI 相关生物标志物进行检测。血清检测技术敏感性和特异度高, 且简便高效, 对于临床早期快速诊断 IPAI、帮助临床及时控制病情以及在评估预后等方面非常重要。常见的试验包括 GM 试验、1, 3- β -D-葡聚糖、二甲硫基胶霉素 (bis-methylthio gliotoxin, bmGT)、曲霉菌特异性抗体检测等。这些检测新技术发展潜力大, 对于 IPAI 实验室诊断有不可替代的作用^[8]。

2.1 血清半乳甘露聚糖 (galactomannan, GM) 试验

GM 广泛存在于曲霉菌和青霉菌, 是构成其细胞壁特异组分。当细胞壁表面菌丝生长时, GM 被释放到血液和其他体液中, 是最早释放的抗原, 在血清中存在时间较长。通过免疫试验法进行检测, 可用于曲霉菌感染的早期筛查和连续监测。在高风险的血液病和造血干细胞移植患者中, GM 试验敏感性为 76%、特异性为 86%, 有很高的诊断价值^[9]。GM 试验在粒细胞缺乏患者中的诊断价值也被多项研究证实, 文献^[10,11]报道其诊断的灵敏度和特异度分别为 61%-89%和 84%-95%。GM 试验目前也存在的一些缺点: 1) 该试验的特异度和灵敏度不稳定, 对于免疫功能正常的患者和免疫功能异常的患者 GM 实验结果有差异, 免疫功能正常患者如肺泡灌洗液 GM 试验敏感性为 95.6%, 血清 GM 试验敏感度为 88.9%; 免疫功能异常的患者, 血清 GM 试验敏感性为 91.8%, 肺泡灌洗液 GM 试验敏感性为 89.9%^[12]。2) GM 检测会受到药物的干扰, 如使用 β 类抗生素 (头孢哌酮/舒巴坦) 后血清 GM 会出现假阳性; (3) GM 试验阳性结果的最佳临界值目前还尚未确定。文献报道检测肺泡灌洗液样本中的 GM 的敏感性和特异性分别为 75.68%和 80.72%^[13], 相对于血清标本中 GM 检测, 肺泡灌洗液 GM 检测对 IPAI 诊断意义更大一些。

2.2 β -(1, 3)-D-葡聚糖检测 (G 试验)

β -(1, 3)-D-葡聚糖检测又称为 G 试验。通过激活试剂中的 G 因子, 引起反应体系吸光度值的变化, 通过这种变化对 β -(1, 3)-D-葡聚糖浓度进行定量测定。 β -(1, 3)-D-葡聚糖是一种存在于多种真菌中的泛真菌抗原, 占真菌细胞壁组成的 50%以上, 主要由 β -1, 3-糖苷键连接的葡萄糖聚合物组成。除隐球菌属、毛霉目和皮炎芽生菌酵母外, 各类真菌细胞壁中均广

泛存在,包括念珠菌属、曲霉菌属、枝顶孢属及耶氏肺孢子菌属等。G 试验具有较高的特异度,可用于 IPAI 的疗效观察,还可判断其病情的严重程度^[14]。有临床研究的荟萃分析结果显示,G 试验的敏感性为 76.8%,特异性为 85.3%^[15]。G 试验操作简单方便,短时间内就可得到结果。但是对于病人感染的真菌种类无法判断。如果 G 实验连续两次结果均为阳性,对于 IPAI 早期诊断有较高应用价值。也可通过与 GM 联合检测,提高其临床应用价值。

2.3 二甲硫基胶霉素 (bis-methylthio gliotoxin bmGT) 检测

胶霉毒素是烟曲霉产生的一种强力真菌毒素,是使烟曲霉具有致病性的重要原因它通过免疫抑制来削弱哺乳动物免疫防疫系统细胞的活性,同时还可以促进免疫细胞的凋亡。胶霉素甲基化后会产一种更为稳定的代谢产物--二甲硫基胶霉素。有文献报道,bmGT 在健康人中不存在,且可以在曲霉菌感染早期检测到,通过检测疑似 IPAI 患者的 357 份血清,结果显示 bmGT 敏感性为 61.5%、特异性为 93%、阳性预测值为 25.0%、阴性预测值为 98.5%。与 GM 联合检测,阳性预测值可达 100%,阴性预测值为 97.5%^[16]。bmGT 的缺点在于其存在时间短,又易于组织和细胞整合,采用高效液相色谱检测,可以提高其稳定性和灵敏度,但该项技术目前还未能能在临床常规应用。

2.4 曲霉菌抗体检测

曲霉菌感染后,机体会产生相应的特异性抗体,通过检测血清中的特异性抗体,可诊断免疫功能正常患者患慢性或过敏性曲霉菌病。特别是变应性支气管肺曲霉菌病 (allergic broncho pulmonary aspergillosis, ABPA) 和慢性肺曲霉菌病 (chronic pulmonary aspergillosis, CPA) 的诊断,曲霉菌特异性抗体的检测结果十分重要。欧洲临床微生物与感染性疾病学会于 2017 年推荐将曲霉菌特异性 IgG 抗体的检测结果用于 IA 的诊断^[17]。我国针对曲霉菌 IgG 抗体的检测,也已自主研发出相关商品化试剂盒。此试剂盒采用的是 ELISA 检测方法,目前该试剂盒已在临床大部分实验室普及使用。

3 分子生物学检测技术

3.1 核酸检测

核酸检测是通过分子生物学技术(如实时荧光定量 PCR、恒温扩增、巢式 PCR、原位杂交、光谱 PCR、DNA 测序、光谱 PCR 电喷雾质谱技术、PCR-限制性片段长度多态性分析技术、特异性等位基因扩增、随

机引物扩增 DNA 多态性技术及基因芯片)等,利用特异性引物在短时间内对微量的曲霉菌 DNA 进行扩增;对扩增产物进行分型和鉴定。核酸检测不受培养条件的影响,缩短了分离和鉴定的时间,大大提高了检测的灵敏度与特异性,对于临床鉴别曲霉菌定植、感染及种属鉴定等都起到了很有效的作用。但是,不同方法的 PCR 的检测结果其敏感性和特异度有较大差异,原因在于方法学、标准和试剂可靠性的不同。朱利平等^[18]推荐采用瑞士 Roche 公司的分子诊断工具--SeptiFast 序列来检测分析标本中的曲霉菌的 DNA 基因序列,可将其结果作为临床鉴定的金标准。PCR 检测方法不受培养条件的影响,大大缩短了分离和鉴定的时间,同时还具备灵敏度高的优点,特别是对于难培养、临床少见和地方性的真菌,极大地提高了快速检测和鉴定的能力,随着标准化操作流程的建立,真菌 PCR 的检测在未来真菌感染性疾病诊断的应用中将会越来越广。

3.2 宏基因组二代测序 (metagenomics nextgeneration sequencing, mNGS)

mNGS 是通过直接从临床样品标本中提取全部微生物的 DNA,通过高通量测序,与已知的微生物基因组数据库进行比对,通过智能化算法筛选出可疑致病性微生物,检测范围广,一次性检测可覆盖 10000 种病原微生物,包括特殊和罕见的病原体^[19]。通过一次性对临床标本进行多种病原体的检测,即避免了漏检,无需培养,大大缩短了检测时间,提高了诊断效率。特别是临床常规手段无法检测的病原体和一些难培养微生物的鉴定,都可以通过 mNGS 一次性解决。

同时,mNGS 检测病原微生物可以精准到种,特别是一些罕见、新发、疑难和共感染的病原体,可以指导临床精准治疗。目前,全球感染性疾病的发病率有所上升,病原体呈现多样化和复杂化,快速、特异且高通量的 mNGS,对于新发、罕见、疑难感染性疾病以及免疫缺陷患者,能显著提高病原体的检出率。未来通过扩大数据量、优化检测流程、减低价格、统一解释标准和提高特异度,随着测序技术的进一步完善和发展,mNGS 有望成为临床诊断真菌感染的常规方法。

4 小结

曲霉菌感染的诊断比较复杂,特别是早期诊断仍然是临床上的一个难题。理想的诊断方法应具备简便快速、灵敏度和特异度高、操作方便等特点。目前曲霉菌感染诊断的金标准仍然是传统的临床微生物培养

和检测。虽然这种方法所需时间长,受培养条件的影响较大,但是可以为临床提供准确的菌种鉴定结果和药敏试验数据,对于临床精准治疗起到了至关重要的作用。目前一些相关生物标志物检测和分子生物学检测方法也应用于临床,这些方法的检测时间短,灵敏度高,可大大提高诊断效率。但是也存在一些问题:如临界值的确定、标准化操作、试剂来源和标准等等,还需进一步完善。在临床实际应用中,为了准确诊断 IPAI,可将传统的微生物培养鉴定方法与血清相关标志物,分子生物诊断技术结合起来,同时联合多种诊断技术,包括临床诊断和病原学诊断技术等,以期满足临床更多需求。

参考文献

- [1] 宋一祎,李华茵.侵袭性肺曲霉病实验室检测方法的研究进展[J].中国临床医学,2018,25(5):804-808.
- [2] NAYMA , AUVET A , MANKIKIAN J , et al. Evaluation of a flexible bronchoscope prototype designed for bronchoscopy during mechanical ventilation: a proof-of-concept study [J]. *Anaesthesia*, 2017,72(6): 719 -723.
- [3] GROLLAH, SHAHP M,MENTZEL C,etal.Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infection at a university hospital[J]. *Infect*, 1996, 33(1):23-32.
- [4] DE PAUWB,WALSH T J, DONNELLY J P,etal.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 Disease Mycoses Study Group(EORTC/MSG) Consensus Group[J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(12):1813-1821.
- [5] DONNELLY J P,CHEN S C,KAUFFMAN C A,et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium[J]. *Clin Infect Dis*, 2020,71(6):1367-1376.
- [6] 刘昶,谢苗荣.肺部真菌感染实验室早期诊断方式研究[J].临床和实验医学杂志,2016, 15(8):821-823.
- [7] MARTY F M,OSTROSKY-ZEICHNER L,CORNELY O A,et al. Isavuconazole treatment for mucormycosis:a single-arm open-label trial and case-control analysis[J]. *The Lancet Infect Dis*,2016,16(7):828-837.
- [8] ARVANITIS M,MYLONAKIS E. Diagnosis of invasive aspergillosis:recent developments and ongoing challenges [J]. *Eur J Clin Invest*,2015,45(6):646-652.
- [9] KAZIANIK,MITRAKOU E,DIMOPOULOS G.Improving diagnostic accuracy for invasive pulmonary aspergillosis in the intensive care unit[J]. *Ann Transl Med*, 2016,4(18): 352.
- [10] VERGIDSP, RAZONABLE R R, WHEAT L J,etal. Reduction in false-positive aspergillus serum galactomannan enzyme immunoassay results associated with use of piperacillin-tazobactam in the United States[J]. *J Clin Microbiol*, 2014,52(6):2199-2201.
- [11] DICHTL K,FORSTER J,ORMANN S,et al. Comparison of β -D-glucan and galactomannan in serum for detection of invasive aspergillosis:retrospective analysis with focus on early diagnosis[J]. *J Fungi (Basel)*,2020, 6(4):253.
- [12] 宋一祎,李华茵.侵袭性肺曲霉病实验室检测方法的研究进展[J].中国临床医学,2018,25(5):804-809.
- [13] PATTERSON T F,THOMPSON G R 3rd,DENNING D W,et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis:2016 update by the infectious diseases society of America[J]. *Clin Infect Dis*,2016,63(4):e1-e60.
- [14] KARAGEORGOPOULOS D E,VOULOUMANOU E K,NTZIORA F,et al. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections:a meta-analysis[J]. *Clin Infect Dis*,2011,52(6):750-770.
- [15] EIGL S,PRATTES J,LACKNER M,et al. Multicenter evaluation of a lateral-flow device test for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in ICU patients[J]. *Crit Care*,2015,19(1):178
- [16] VIDAL-GARCÍA M,DOMINGO M P,DE RUEDA B, et al. Clinical validity of bis(methylthio)gliotoxin for the diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*,2016,100(5):2327-2334.
- [17] ULLMANN A J,AGUADO J M,ARIKAN-AKDAGLI S,et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases:executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM ERS guideline[J]. *Clin Microbiol Infect*,2018,24(Suppl1):

e1-c38.

2020,40(9):641-646.

- [18] 朱利平,翁心华. 侵袭性真菌感染的分子诊断在造血干细胞移植及血液恶性肿瘤患者中的应用[J]. 诊断学理论与实践,2010,9(1):14-18.
- [19] 谢栓栓,李譔,李萍,等. 宏基因二代测序技术对感染性疾病患者的诊断价值及其临床应用[J]. 国际呼吸杂志,

版权声明: ©2023 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

**OPEN ACCESS**