

不同反应条件的半乳甘露聚糖检测的研究*

何静¹ 熊永芬¹ 周强¹ 李鹏程¹ 王顺¹

[摘要] 目的:半乳甘露聚糖(GM)试验是一种诊断侵袭性曲霉感染(IA)的早期抗原指标,本实验旨在探索孵育方式与显色时间对 GM 试验结果的影响。方法:采集武汉市第一医院 137 例住院患者的血清或肺泡灌洗液样本进行实验,按不同的孵育方式和显色时间分别将实验进行分组,计算不同组的阳性率,再用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。结果:取待测样本与标准血清的吸收度的比值(I 值) ≥ 0.5 为阳性,不同实验组的阳性率均差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:孵育方式和显色时间对 GM 试验的结果有显著影响。

[关键词] 侵袭性真菌感染;侵袭性曲霉感染;GM 试验;孵育方式;显色时间

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2018.08.014

[中图分类号] R446.5 **[文献标志码]** A

Analyses of different methods of GM test

HE Jing XIONG Yongfen ZHOU Qiang LI Pengcheng WANG Shun

(Department of Transfusion Medicine, Wuhan Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital/Wuhan NO. 1 Hospital, Wuhan, 430022, China)

Corresponding author: WANG Shun, E-mail: wang_shun6688@sina.com

Abstract Objective: Galactomannan(GM) test is an early antigen index for diagnosis of invasive aspergillus infection(IA). The aim of this experiment is to investigate the effects of different incubation conditions and coloration time on GM test. **Method:** A total of 137 inpatients with serum or alveolar lavage fluid were enrolled in our hospital as the test sample. The positive rate of different groups was calculated by grouping the experiment according to different incubation conditions and different coloration time. Statistical analysis was taken using SPS S13.0 software. **Result:** The ratio of the absorbance of the test sample to the standard serum(I value) was greater than 0.5, and both of the differences of incubation conditions and coloration time had statistical significant($P < 0.05$). **Conclusion:** Incubation conditions and coloration time may both have significant effect on the results of the GM test.

Key words invasive fungal infections; invasive aspergillosis; galactomannan test; incubation conditions; coloration time

侵袭性真菌感染(invasive fungal infections, IFI)是指真菌侵入人体血液和组织生长繁殖并致其损害,导致人体病理改变的病理生理过程。近几年各地研究数据显示,IFI 的发病率和病死率逐年

升高^[1]。IFI 难与其他感染性疾病鉴别诊断,故常在尸检时才被确诊。非培养的实验室诊断方法有(1,3)- β -D 葡聚糖检测(G 试验)、半乳甘露聚糖检测(galactomannan test, GM 试验)和 PCR。其中 GM 试验被普遍认为是不会增加患者感染风险的诊断侵袭性曲霉感染非侵入性的检测方法,也被欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组(EORTC/MSG)^[2] 认可为真菌学标准诊断指标之

* 基金项目:国家自然科学基金项目(No:81301507)

¹ 武汉市中西医结合医院/武汉市第一医院输血科(武汉, 430022)

通信作者:王顺, E-mail: wang_shun6688@sina.com

及 37℃ 有活性,故仅考虑 ABO 同型往往不能解决血液配合问题,需要多中心,多区域协作解决同型血液。对于符合自体输血指征的患者,应积极开展自体输血。无法找到同型供者需紧急输血时,在可用最小剂量的 ABO 同型红细胞,同时使用激素,缓慢输注,输注过程密切观察,做好输血不良反应的应对对策^[6]。

参考文献

- [1] 胡永红,高小华. 1 例 4 次误定为 O 型的 O^{AH}m 型分析报告[J]. 中国输血杂志, 1994, 7(1): 32.
- [2] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2015: 118-139.

- [3] Chen Q, Xiao J, Wang S, et al. ABO sequence analysis in an AB type with anti-B patient[J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127: 971-972.
- [4] 颜祺东,张万忠,田力,等. 1 例类孟买型家系的分子遗传学研究[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(5): 448-449.
- [5] 夏爱军,穆士杰,张献清,等. 类孟买血型 Am^b1 例[J]. 临床血液学杂志(输血与检验), 2011, 24(4): 253-254.
- [6] 陈萍,沈雨青,张水木. 类孟买血型的鉴定及输血对策探讨[J]. 临床血液学杂志(输血与检验), 2016, 29(6): 508-509.

(收稿日期:2018-04-22)

一。GM 试验属于酶免试验,而影响酶免试验的因素有很多,如孵育条件、加样、显色等,本实验就孵育条件和显色时间进行研究,探索最佳反应条件。

1 材料与方法

1.1 样本来源

临床可疑为 IFI 的 137 例住院患者的血清或肺泡灌洗液样本,来自我院的血液内科、呼吸内科、风湿科、重症医学科、外科等。男 72 例,女 65 例;年龄 27~93 岁。其中肺部疾病如慢性阻塞性肺疾病(COPD)、慢性支气管炎、支气管扩张、肺部感染及肺占位性病变等 80 例;恶性血液病如急性慢性白血病、多发性骨髓瘤、恶性淋巴瘤等及造血干细胞移植术后共 41 例;外科手术后感染 16 例。

GM 检测试剂盒采用 Bio-Rad laboratories Platelia 试剂盒,其对半乳甘露聚糖的检测已经在 2003 年 5 月被美国食品药品监督管理局(FDA)批准可以作为侵袭性曲霉菌病的辅助诊断方法(敏感度 80.7%,特异度 89.2%)^[3]。检测试剂盒的使用严格按照说明书进行操作,其中涉及实验方案(孵育方式和显色时间)参照 1.4 实验方案。

1.2 检测方法

采用酶联免疫双抗体夹心微孔法,检测人血清(或肺泡灌洗液)中的 GM。处理过的样本和酶结合物加入到已经包被过单克隆抗体的微孔板的小孔里反应,经过孵育(空气浴 37℃)洗涤显色,再用设置在 450 nm 和 620 nm 波长的酶标仪测定样本和标准血清的吸收度 A 值。最后计算待测样本吸收度与 cut-off 值的比值(I 值)即可得出结果,cut-off 值为 2 个标准血清吸收度 A 的均值。

1.3 诊断标准

参照试剂盒说明书取 $I \geq 0.5$ 为阳性,37℃ 孵育 90 min 显色(30±5)min,且每次实验 cut-off 对照血清 A 值应在 0.3~0.8,I 阳性对照值应 >2.0 ,I 阴性对照值应 <0.4 。

1.4 实验方案

孵育方式和显色时间对实验结果的影响:80 例肺部疾病患者的样本,将孵育的方式分为普通孵育 90 min(空气浴 37℃)和快速孵育 30 min(空气浴 37℃+震荡混匀)2 种,显色时间分为 20 min 和 30 min 2 种。实验组 1:快速孵育 45 min+显色 20 min;实验组 2:普通孵育 90 min+显色 20 min;实验组 3:普通孵育 90 min+30 min。

显色时间 25 min 和 20 min 对实验结果的影响:41 例恶性血液病患者的样本,分 2 组比较。实验组 4:普通孵育 90 min+显色 20 min;实验组 5:普通孵育 90 min+显色 25 min。

样本前处理混匀与否对实验结果的影响:16 例外科手术后患者的样本,因在本次实验操

作流程中样本前处理混匀充分后整体结果的阳性率较以往未注意混匀步骤的低,在普通孵育 90 min+显色 20 min 的条件下制定实验组来比较混匀的处理对实验结果影响。实验组 6:充分混匀的前处理样本;实验组 7:未充分混匀的前处理样本。

1.5 统计学分析

数据采用 SPSS 13.0 软件处理,计数资料进行 χ^2 检验,计量资料进行非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

孵育方式和显色时间对实验结果的影响见表 1、2。

表 1 孵育方式的比较($n=80$)

实验组 1	实验组 2			合计
	阳性	弱阳性	阴性	
阳性	19	0	2	21
弱阳性	2	1	2	5
阴性	1	1	52	54
合计	22	2	56	80

表 2 显色时间的比较($n=80$)

实验组 3	实验组 2			合计
	阳性	弱阳性	阴性	
阳性	18	0	1	19
弱阳性	2	0	5	7
阴性	2	2	50	54
合计	22	2	56	80

实验组 1 cut-off 值:0.682 9,阳性率 26.25%;实验组 2 cut-off 值:0.524 4,阳性率 27.50%;实验组 3 cut-off 值:0.618 2,阳性率 23.75%。数据分析显示同一批样本 2 种孵育方式的实验结果差异有统计学意义($\chi^2=60.366 6, P < 0.05$),2 种显色时间的实验结果差异有统计学意义($\chi^2=59.974, P < 0.05$)。

显色时间的微小改变对实验结果的影响,见表 3。

表 3 显色时间 25 与 20 min 的比较($n=41$)

实验组 5	实验组 4			合计
	阳性	弱阳性	阴性	
阳性	6	1	0	7
弱阳性	0	0	0	0
阴性	0	0	34	34
合计	6	1	34	41

实验组 4 cut-off 值:0.588 6,阳性率 14.63%;实验组 5 cut-off 值:0.511 0,阳性率 17.07%。数

据分析显示同一批样本 2 种显色时间的实验结果比较差异有统计学意义($\chi^2=18.558, P<0.05$)。

样本前处理混匀与否对实验结果的影响见表 4。

表 4 样本混匀处理的比较($n=16$) 例

实验组 7	实验组 6			合计
	阳性	弱阳性	阴性	
阳性	2	0	2	4
弱阳性	0	0	1	1
阴性	1	0	10	11
合计	3	0	13	16

实验组 6 cut-off 值:0.608 8,阳性率 18.75%;实验组 7 cut-off 值:0.436 5,阳性率 25.00%。数据分析显示同一批样本前处理的混匀与否差异无统计学意义($\chi^2=2.757, P=0.097$)。

3 讨论

GM 是霉菌曲菌属细胞壁组成成分之一,是侵袭性曲霉菌感染的早期抗原诊断指标。有文献报道当日采集的全血样本如不能立即实验经离心分离后取血清-80℃冻存再进行实验时会大大降低假阳性率,且连续监测阳性样本比如 1 周 2 次也会降低假阳性率^[4]。

研究认为 2 个连续的血清样本 I 值均 ≥ 0.5 或者在单个血清样本中 I 值 ≥ 0.7 时方可判定 GM 试验阳性。有数据表明对肺泡灌洗液样本的阳性判读应更严谨,其 I 值应更高^[5]。而在本次实验中有 31 例是肺泡灌洗液样本,且只有 22 例有进行重复实验。因此,部分本次实验报告为阳性的结果需要临床医生连续监测和联合患者临床症状再确诊。

本次实验的数据显示孵育条件和显色时间的不同均差异有统计学意义,需要标准品来衡量实验的准确性,然而目前国内外均没有标准品。根据表 1、2 可以看出普通孵育 90 min 较快速孵育 45 min 的弱阳性值(即灰区值)少,且普通孵育 90 min 实验组的 cut-off 值较快速孵育 45 min 低且更接近于 0.5。表 3 的数据显示显色时间 5 min 的改变也对实验结果有显著影响。因此,可以推测普通孵育

90 min 的孵育方式较快速孵育 45 min 更好,这与有些报道的酶免试验孵育条件不同对实验结果的影响一致,显色时间的不同对实验结果的阳性率有显著影响。表 4 的数据从统计学上不能说明混匀与否对实验结果有影响,且实验样本量太少,但改进混匀之后在随后的实验中整体结果阳性率下降。总体分析本实验数据的阳性、弱阳性和阴性值的分布,主要差异体现在弱阳性值上,强阳性的样本不同方法的结果基本是一致的。结合其他报道发现,改变孵育时间和显色时间均影响了弱阳性的结果,强阳性的结果差别甚微。

试剂盒说明书描述临界值血清的吸收度 A 值在 0.3~0.8,范围较宽,因此本实验室内需要连续监测 cut-off 值绘制曲线,根据曲线分布得出本实验室最好的 cut-off 值范围,再依据这个范围进一步研究得出本实验室最佳的反应条件。

参考文献

- [1] Kruger W, Stockschrader M, Sobottka I, et al. Antimycotic therapy with liposomal amphotericin-B for patients undergoing bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation[J]. Leuk Lymphoma, 1997, 24:491-499.
- [2] Denning DW, Marinus A, Cohen J, et al. An EORTC multicentre prospective survey of invasive aspergillosis in haematological patients: diagnosis and therapeutic outcome. EORTC Invasive Fungal Infections Cooperative Group[J]. J Infect, 1998, 37:173-180.
- [3] Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, et al. Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients[J]. J Clin Oncol, 2002, 20:1898-1906.
- [4] Kimpton G, White PL, Barnes RA. The effect of sample storage on the performance and reproducibility of the galactomannan EIA test[J]. Med Mycol, 2014, 52: 618-626.
- [5] Zou M, Tang L, Zhao S, et al. Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis[J]. PLoS One, 2012, 7:e43347.

(收稿日期:2018-00-00)