

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.01.008

· 论 著 ·

## GM 试验联合 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞诊断艾滋病患者侵袭性曲霉病的研究

柳明波, 方 霞, 梁 欣, 李锡燕

(广西医科大学第十附属医院/钦州市第一人民医院, 广西 钦州 535000)

**[摘要]** **目的** 探讨半乳甘露聚糖(GM)试验联合 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞检测对艾滋病(AIDS)患者合并侵袭性曲霉菌病(IA)的早期诊断价值。**方法** 回顾性分析 2014 年 1 月—2016 年 12 月某院住院怀疑 IA 的 AIDS 患者 197 例, 分为确诊 IA 组(35 例)、临床诊断 IA 组(疑似病例, 96 例)和非 IA 组(66 例), 比较 GM 试验、GM 试验联合 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞计数检测诊断 IA 的灵敏度和特异度。**结果** 确诊 IA 组、临床诊断 IA 组、非 IA 组患者 GM 值中位数(最小值, 最大值)分别为 1.29(0.65, 1.84)、0.91(0.36, 1.23)、0.11(0.28, 0.72) pg/mL, CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞计数分别为 45(29, 69)、79(35, 99)、89(59, 158) cell/ $\mu$ L, 三组患者 GM 值和 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞计数比较, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。单独 GM 试验诊断 AIDS 患者 IA 的灵敏度为 64.9%, 特异度为 72.7%; 1 周内连续 2 次 GM 试验诊断 AIDS 患者 IA 的灵敏度为 72.5%, 特异度为 95.5%; GM 试验和 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞联合检测的灵敏度为 86.3%, 特异度为 90.9%。**结论** GM 试验对 AIDS 患者 IA 有较好的诊断价值, 且连续行 GM 试验、GM 试验联合 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞计数检测将进一步提高 IA 临床诊断价值。

**[关键词]** 半乳甘露聚糖; CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞; 艾滋病; 侵袭性曲霉菌病

**[中图分类号]** R519 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)01-0036-05

## Galactomannan test combined with CD4<sup>+</sup>T lymphocytes for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with AIDS

LIU Ming-bo, FANG Xia, LIANG Xin, LI Xi-yan (Qinzhou First People's Hospital and the Tenth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Qinzhou 535000, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the effect of galactomannan(GM) test combined with CD4<sup>+</sup>T lymphocyte detection on early diagnosis of invasive aspergillosis (IA) in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Methods** 197 AIDS patients who were suspected with IA in a hospital from January 2014 to December 2016 were analyzed retrospectively, they were divided into confirmed IA group ( $n = 35$ ), clinically diagnosed IA group ( $n = 96$ , suspected cases), and non-IA group ( $n = 66$ ), sensitivity and specificity of GM test and GM test combined CD4<sup>+</sup>T lymphocyte counting for diagnosing IA were compared. **Results** In confirmed IA group, clinically diagnosed IA group, and non-IA group, the medium values of GM (minimum, maximum) were 1.29(0.65, 1.84) pg/mL, 0.91(0.36, 1.23) pg/mL, and 0.11(0.28, 0.72) pg/mL respectively, CD4<sup>+</sup>T lymphocyte counting were 45(29, 69) cells/ $\mu$ L, 79(35, 99) cells/ $\mu$ L, and 89(59, 158) cells/ $\mu$ L respectively, GM value and CD4<sup>+</sup>T lymphocyte counting among three groups were significantly different(all  $P < 0.05$ ). The sensitivity and specificity of single GM test for diagnosing IA in AIDS patients were 64.9% and 72.7% respectively; sensitivity and specificity of two consecutive GM test within one week for diagnosing IA were 72.5% and 95.5% respectively; sensitivity and specificity of GM test combined CD4<sup>+</sup>T lymphocyte counting were 86.3% and 90.9% respectively. **Conclusion** GM test has better diagnostic value for IA in AIDS patients, continuous GM test and GM test combined CD4<sup>+</sup>T lymphocyte counting will further improve the clinical diagnostic value for IA.

**[收稿日期]** 2017-04-10

**[基金项目]** 广西壮族自治区卫生计生厅自筹青年基金(Z2013746); 广西医科大学青年科学基金(GXMUYSF201347)

**[作者简介]** 柳明波(1979-), 男(汉族), 湖北省咸宁市人, 主管技师, 主要从事微生物检验及分子生物学研究。

**[通信作者]** 柳明波 E-mail: mingabo@126.com

[Key words] galactomannan; CD4<sup>+</sup> T lymphocyte; acquired immunodeficiency syndrome; invasive aspergillosis

[Chin J Infect Control, 2018, 17(1): 36-40]

侵袭性真菌感染(invasive fungal infection, IFI)是人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者/艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)患者最常见的机会感染,严重时可导致患者死亡<sup>[1-2]</sup>。IFI在 AIDS 患者中的发病率和病死率均较高,分别为 41.2%、22.9%<sup>[3-4]</sup>。HIV 感染可以影响患者的细胞免疫功能使其发生异常,从而使患者免疫功能低下而引起一系列机会性感染和肿瘤的发生<sup>[5-6]</sup>。机会性感染是导致晚期 AIDS 患者死亡的最重要原因,其中 IFI 所导致的机会感染占较高比例<sup>[7]</sup>。研究显示,半乳甘露聚糖(galactomannan, GM)试验有诊断恶性血液病等患者侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA)的价值,但在 AIDS 患者中的相关报道较少;有研究显示 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞检测对诊断 AIDS 患者侵袭性曲霉病有一定价值<sup>[8-9]</sup>。因此,本研究对 GM 试验和 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞检测诊断 IA 的价值进行分析评价,旨在评价 GM 试验联合 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞检测在诊断 AIDS 患者 IA 的应用价值。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 回顾性分析 2014 年 1 月—2016 年 12 月钦州市第一人民医院感染科怀疑 IA 的 AIDS 住院患者 197 例,男性 88 例,女性 109 例,年龄 17~69 岁。研究纳入标准:(1)感染科住院 HIV/AIDS 患者;(2)抗菌药物应用时间>10 d,或伴发热;(3)患者行 GM 试验和 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数检测。根据 IA 的诊断标准将患者分三组,分别为确诊 IA 组(35 例)、临床诊断 IA 组(疑似病例,96 例)和非 IA 组(66 例),且治疗前同时行 GM 试验和 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数。三组患者在性别、年龄方面比较差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。AIDS 诊断标准:依据 1993 年美国疾病控制与预防中心(CDC)发布的 AIDS 诊断标准,抗-HIV 阳性,并由钦州市疾病预防控制中心以免疫印迹法确诊试验阳性。IA 的诊断标准<sup>[10]</sup>:(1)确诊:通过组织病理学检查发现曲霉菌或无菌组织培养发现曲霉菌;(2)临床诊断:有 IA 宿主/环境因素、临床及影像学表现,而无微生物学依据。

## 1.2 方法

1.2.1 真菌培养及鉴定 采用法国生物梅里埃 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统及其配套试剂进行真菌鉴定。将患者血、胸腔积液、深部咳出的痰以及其他深部组织液进行真菌培养,培养阳性标本的菌落接种于沙氏琼脂培养基,然后根据菌落生长、颜色、形态等特征,结合镜检菌丝或孢子的形态确定菌种。

1.2.2 GM 试验检测 采集患者入院后晨起空腹静脉血 3 mL,以 1 000 r/min 离心 10 min,留取上清液 200  $\mu$ L 于 -20 $^{\circ}$ C 保存;然后于一周内再次采集患者静脉血取血清保存后待检测。操作步骤依据曲霉菌 GM 检测试剂盒[丹娜(天津)生物科技有限公司提供]说明书进行,并使用全自动酶联测定仪进行测定。参照美国食品药品监督管理局(FDA)建议 cut-off = 0.5 为界定值,依据曲霉菌阳性判断标准<sup>[11]</sup>:连续两次 GM>0.5 或单次>1.0 均为阳性。

1.2.3 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数检测 抽取抗凝静脉血 3 mL 立即送检,应用 FACSCanto II 流式细胞仪[碧迪医疗器械(上海)有限公司提供]检测 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞绝对数(cell/ $\mu$ L),CD4<sup>+</sup> <50 cell/ $\mu$ L 判定为阳性。6 色 TBNK 试剂盒和 FACS 溶血素均购自美国 BD 公司。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,非正态分布资料以中位数(最小值,最大值)表示,多组非正态分布资料总体比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验或 H 检验,检验统计量为 H,多组两两比较采用 Wilcoxon 秩和检验,检验统计量为 T。采用敏感度、特异度评价 GM 试验相关指标的诊断水平,率的比较采用  $\chi^2$  检验,进行受试者特征工作曲线(ROC 曲线)分析。

## 2 结果

2.1 三组患者基本情况 确诊 IA 组、临床诊断 IA 组发热患者均>80%,100%有咳嗽、咳痰症状,出现影像学改变者分别占 88.57%、96.88%。确诊 IA 组 54.29% 痰涂片阳性,77.15% 痰培养阳性,34.29% 灌洗液培养阳性。各组临床表现及检查结果见表 1。

**表 1** 197 例 AIDS 患者各组临床表现及检查结果[例(%)]

**Table 1** Clinical manifestations and detection results of each groups of 197 AIDS patients(No. of cases[%])

分组	确诊 IA 组 (n = 35)	临床诊断 IA 组 (n = 96)	非 IA 组 (n = 66)
发热	29(82.86)	87(90.63)	16(24.24)
咳嗽、咳痰	35(100.00)	96(100.00)	7(10.61)
支气管扩张	11(31.43)	24(25.00)	0(0.00)
白细胞 <math>3.5 \times 10^9/L</math>	18(51.43)	56(58.33)	2(3.03)
血小板 <math>< 50 \times 10^9/L</math>	15(42.86)	49(51.04)	2(3.03)
CT 影像学改变*	31(88.57)	93(96.88)	0(0.00)
结核感染病史	12(34.29)	25(26.04)	3(4.55)
曲霉菌阳性			
病理学检查	1(2.86)	0(0.00)	0(0.00)
痰涂片	19(54.29)	3(3.13)	0(0.00)
痰培养	27(77.15)	0(0.00)	0(0.00)
灌洗液培养	12(34.29)	0(0.00)	0(0.00)
血培养	6(17.14)	0(0.00)	0(0.00)

\* : 肺部空洞伴或不伴曲霉肿块、浸润、结节和各种程度的肺或胸膜纤维化

2.2 GM 值与 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数比较 三组患者 GM 值和 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。三组数值两两比较,确诊 IA 组的 GM 值高于非 IA 组,CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数低于非 IA 组(均  $P < 0.05$ );临床诊断 IA 组 GM 值高于非 IA 组( $P < 0.05$ ),而 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数两组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );确诊 IA 组与临床诊断 IA 组的 GM 值和 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数比较,差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。见表 2。

**表 3** GM 试验和 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数对 AIDS 患者 IA 的诊断效能

**Table 3** Diagnostic efficacy of GM test and CD4<sup>+</sup> T lymphocyte counting for IA in AIDS patients

指标	真阳性(例)	假阳性(例)	假阴性(例)	真阴性(例)	灵敏度(%)	特异度(%)
单次 GM 试验	85	18	46	48	64.9(85/131)	72.7(48/66)
连续 2 次 GM 试验	95	3	36	63	72.5(95/131)	95.5(63/66)
单次 GM 试验联合 CD4 <sup>+</sup> T 淋巴细胞计数	113	6	18	60	86.3(113/131)	90.9(60/66)

2.3.4 三种检测方法诊断 AIDS 患者 IA 的 ROC 曲线 单次 GM 试验、连续 2 次 GM 试验,以及单次 GM 试验联合 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞检测对 AIDS 患者 IA 的 ROC 曲线下面积(AUC)分别为 0.713(95%CI:0.581~0.844)、0.905(95%CI:0.825~0.985)和 0.930(95%CI:0.895~1.002)。见图 1。

**表 2** 三组 AIDS 患者 GM 值与 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数比较 [中位数(最小值,最大值)]

**Table 2** Comparison of GM value and CD4<sup>+</sup> T lymphocyte counting among three groups of AIDS patients (medium [minimum, maximum])

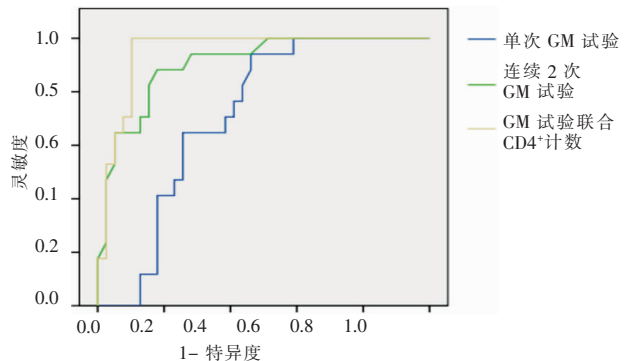
组别	GM 值(pg/mL)	CD4 <sup>+</sup> T 淋巴细胞计数 (cell/ $\mu$ L)
确诊 IA 组(n = 35)	1.29(0.65,1.84)	45(29,69)
临床诊断 IA 组(n = 96)	0.91(0.36,1.23)	79(35,99)
非 IA 组(n = 66)	0.11(0.28,0.72)	89(59,158)
H	53.74	22.67
P	0.00	0.00

2.3 GM 试验和 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数对 AIDS 患者 IA 的诊断能力

2.3.1 单次 GM 试验 单次 GM 试验诊断 AIDS 患者 IA(包括确诊与临床诊断)的灵敏度为 64.9%,特异度为 72.7%。见表 3。

2.3.2 连续 2 次 GM 试验 1 周连续 2 次进行 GM 试验诊断 AIDS 患者 IA 的灵敏度为 72.5%,特异度为 95.5%,高于单次检测 GM 试验的特异度(均  $P < 0.05$ )。见表 3。

2.3.3 单次 GM 试验联合 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞检测 单次 GM 试验联合 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞检测诊断 AIDS 患者 IA 的灵敏度为 86.3%,特异度为 90.9%,高于单次检测 GM 值的灵敏度和特异度(均  $P < 0.05$ )。见表 3。



**图 1** 三种检测方法诊断 AIDS 患者 IA 的 ROC 曲线  
**Figure 1** ROC curve of three detection methods for diagnosing IA in patients with AIDS

### 3 讨论

目前,在 IFI 诊断研究中,非培养诊断方法是国内外学者关注的热点。主要的诊断方法有两种,一种是血清学方法,基于免疫学原理;另一种是分子生物学方法,以聚合酶链式反应(PCR)技术为基础<sup>[12-13]</sup>。两种方法都有各自的优点和缺点,血清学方法具有较高的敏感性和特异性,技术发展相对成熟,但缺点是会产生假阳性、假阴性等问题,这主要是由于免疫学原理的属性所导致的结果。分子生物学方法的优点是特异性高,缺点主要是样本采集及检测过程相对复杂,相关的检测技术尚未完全发展成熟<sup>[14]</sup>。目前,IA 检查诊断方法主要有:(1)影像学检查,通过 CT 检查的特征性改变辅助诊断;(2)光学显微镜下的病原学检查;(3)血清学方法包括 GM 试验和  $\beta$ -1,3-D-葡聚糖试验( $\beta$ -1,3-D-glucan, BDG, G 试验);(4)PCR 检测曲霉菌细胞核物质<sup>[15]</sup>。

GM 试验已经被欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组和美国国立变态反应和传染病研究院真菌病研究共识组(EORTC/MSG)认定为临床诊断 IFI 中 IA 的微生物学诊断标准,并推荐对高危成人患者进行常规检测,每周检测 2 次,诊断标准为成人如果连续 2 次  $>0.5$  判定为阳性;儿童患者连续 2 次  $>0.8$  或单次  $>1.5$  为阳性标准<sup>[16-17]</sup>。本研究结果显示,GM 试验单次检测灵敏度较低(64.9%),而特异性(72.7%)尚可;1 周内连续 2 次行 GM 试验检测可以提高灵敏度和特异度,分别为 72.5%、95.5%。单次 GM 试验假阳性率为 27.3%(18/66),表明 GM 试验在诊断 AIDS 患者 IA 中有较高的假阳性率,可能与患者接受了抗菌药物治疗有关,如  $\beta$ -内酰胺酶、氨苄西林、哌拉西林/他唑巴坦、阿莫西林/克拉维酸等抗菌药物均可导致假阳性,其中有 1 例新生隐球菌感染 GM 试验结果为阳性。因此,进行 GM 试验时要注意避免假阳性或注意分析假阳性相关的影响因素。本组研究结果表明,单次检测假阴性率较高(35.1%),而连续 2 次进行 GM 试验检测可以降低假阴性率(27.5%),可能与曲霉菌细胞壁多糖成分释放和检测灵敏度有关,说明可以通过连续进行 GM 试验,提高诊断的特异性。

目前,尚未见关于 GM 试验联合  $CD4^+$  T 淋巴细胞计数检测对 AIDS 患者合并 IA 诊断价值的相关报道。研究<sup>[18]</sup>报道, $CD4^+$  T 淋巴细胞计数与

AIDS 机会感染出现的频率有一定关系, $CD4^+$  T 淋巴细胞下降时 AIDS 患者也容易发生其他机会感染,因此,需要与 GM 试验联合检测进行诊断。GM 试验联合  $CD4^+$  T 淋巴细胞检测诊断 IA 的灵敏度为 86.3%,特异度为 90.9%,可以明显提高诊断准确率。本研究中 IA 病例包括确诊 IA 病例与临床诊断 IA 病例,对诊断能力的评价可能有一定影响;临床诊断 IA 病例均有曲霉菌 CT 影像学特征改变,并且给予抗真菌治疗后有效,因此,保证了总体评价的准确性。另一方面,本研究如果能进一步分析 GM 试验不同折点对 AIDS 患者 IA 的诊断效能,对 IA 患者的诊断具有重要临床意义。

本研究结果显示, $CD4^+$  T 淋巴细胞联合 GM 试验的诊断灵敏度相对较高,而连续 2 次 GM 试验的诊断特异度更高,临床医生应该根据临床情况采取相应的诊断策略,早期诊断 IA。

综上所述,GM 试验对 AIDS 患者 IA 具有较好的诊断价值,且连续监测及联合  $CD4^+$  T 淋巴细胞计数可以提高临床诊断价值。

### [参考文献]

- [1] Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health[J]. *Nature*, 2012, 484(7393): 186-194.
- [2] Brown GD, Denning DW, Gow NA, et al. Hidden killers: human fungal infections[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(165): 165rv13.
- [3] Armstrong-James D, Meintjes G, Brown GD. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS[J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22(3): 120-127.
- [4] Moreira J, Varon A, Galhardo MC, et al. The burden of mucormycosis in HIV-infected patients: A systematic review[J]. *J Infect*, 2016, 73(3): 181-188.
- [5] 李泰阶,李萌,郭世辉,等. G 试验和 GM 试验对儿童恶性血液病侵袭性真菌感染的诊断价值[J]. *山东医药*, 2015, 55(5): 4-6.
- [6] 黄素钦,林城,吴秋芳. (1,3)- $\beta$ -D 葡聚糖、半乳甘露聚糖、隐球菌荚膜多糖抗原联合检测对晚期艾滋病感染患者的临床意义[J]. *实验与检验医学*, 2016, 34(4): 488-490.
- [7] 梁欣,柳明波,李春玫. 获得性免疫缺陷综合征合并血流感染 143 例临床及病原菌分析[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2016, 16(3): 252-256.
- [8] 郑罡,余进,李雪迎,等. (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖检测和半乳甘露聚糖抗原检测在侵袭性真菌病诊断中的价值探讨[J]. *中国真菌学杂志*, 2012, 7(3): 132-135.
- [9] Darras-Joly C, Lucet JC, Laissy JP, et al. Invasive aspergillosis in AIDS[J]. *Pathol Biol (Paris)*, 1998, 46(6): 416-417.

- [10] 王立朋, 鲍翠霞, 于丽梅, 等. 核酸序列依赖性扩增、Real-time PCR 及 GM 试验诊断侵袭性曲霉菌感染的临床应用评价[J]. 中国真菌学杂志, 2015, 10(5): 283 - 287.
- [11] 张涛, 高坤, 郑玉荣. 血浆 1,3- $\beta$ -D 葡聚糖检测联合曲霉半乳糖聚糖检测在恶性血液病侵袭性真菌感染中的诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(7): 1328 - 1330.
- [12] 李方义, 邹子俊, 李伟超, 等. 1,3- $\beta$ -D-葡聚糖和半乳糖聚糖检测在侵袭性真菌病诊治中的临床意义研究[J]. 转化医学电子杂志, 2016, 3(6): 64 - 66.
- [13] Frias-de León MG, Acosta-Altamirano G, Duarte-Escalante E, et al. Molecular markers: an important tool in the diagnosis, treatment and epidemiology of invasive aspergillosis[J]. Cir Cir, 2013, 82(1): 109 - 118.
- [14] Kourkoumpetis TK, Fuchs BB, Coleman JJ, et al. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections[J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(9): 1322 - 1331.
- [15] Lehrnbecher T, Robinson PD, Fisher BT, et al. Galactomanan,  $\beta$ -D-Glucan, and polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal disease in pediatric cancer and hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis[J]. Clin Infect Dis, 2016, 63(10): 1340 - 1348.
- [16] 李尔然, 姜艳霞, 王昆, 等. 血清半乳糖聚糖试验对侵袭性肺曲霉菌感染的诊断价值[J]. 中国医科大学学报, 2015, 44(10): 865 - 869.
- [17] 姜华, 贺兆斌, 袁代, 等. 血清半乳糖聚糖检测对血液肿瘤患者侵袭性曲霉病诊断价值的评估[J]. 临床血液学杂志, 2012, 25(3): 163 - 168.
- [18] 王珏, 杨艺, 王瑾, 等. 血清半乳糖聚糖试验在血液病合并侵袭性曲霉菌感染诊疗中的意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(19): 4419 - 4421.

(本文编辑: 孟秀娟、左双燕)