

• 临床研究 •

mNGS 技术联合 GM 试验、血清烟曲霉特异性抗体检测对 COPD 合并侵袭性肺曲霉菌病的诊断价值

王卓萍, 胡小燕, 胡慧佳, 张焱超, 金军

【摘要】目的 观察宏基因组二代测序(mNGS)联合半乳甘露聚糖(GM)试验、血清烟曲霉特异性抗体检测对慢性阻塞性肺疾病(COPD)合并侵袭性肺曲霉菌病(IPA)的诊断价值。**方法** 收集 2020 年 8 月至 2023 年 8 月杭州市第九人民医院收治的疑似合并 IPA 的 96 例 COPD 患者,均行 mNGS、GM 试验和血清烟曲霉特异性抗体检测,根据“金标准”诊断标准,将患者分为 IPA 组($n=40$)和非 IPA 组($n=56$),比较各检测结果,分析血清 GM 值及烟曲霉 IgG 抗体水平单独及联合检测对 IPA 的诊断价值,分析三者联合诊断 IPA 与最终诊断结果的一致性。**结果** mNGS 检出阳性 44 例,其中真阳性 36 例,阴性 52 例,其中真阴性 48 例。IPA 组血清 GM 值及烟曲霉 IgG 抗体水平平均高于非 IPA 组(均 $P < 0.05$)。ROC 曲线显示血清 GM 值、烟曲霉 IgG 抗体水平诊断 IPA 的最佳截断值分别为 0.64、77.32 kAU/L,对应的 AUC 分别为 0.804、0.807,联合诊断 AUC 为 0.865。mNGS 联合 GM 试验、血清烟曲霉 IgG 抗体检测诊断 IPA 的敏感度、特异度、准确度分别为 96.88%、92.19%、93.75%,与最终诊断结果的一致性检验 Kappa 值为 0.86。**结论** mNGS 联合 GM 试验和血清烟曲霉 IgG 抗体检测对 COPD 合并 IPA 具有较高的诊断价值,与最终诊断结果一致性良好。

【关键词】 肺疾病,慢性阻塞性;侵袭性肺曲霉菌病;mNGS;GM 试验;烟曲霉特异性抗体

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.02.011

【中图分类号】 R563 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)02-0186-03

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种常见的呼吸系统疾病,随着疾病进展,患者肺功能逐渐下降,导致呼吸困难、持续咳嗽和反复急性加重^[1]。由于 COPD 患者的肺部环境易于细菌和真菌定植,因此更容易发生各种呼吸道感染。侵袭性肺曲霉菌病(invasive pulmonary aspergillus, IPA)是一种由曲霉菌引起的严重肺部感染,在 COPD 患者中的发生率逐年上升,其临床表现与其他呼吸道感染相似,但进展迅速,若不及时诊断和治疗,可能导致患者死亡^[2]。目前,IPA 的诊断主要依赖临床表现、影像学检查和微生物学检测等,传统的微生物学检测方法,如直接镜检和培养,虽然诊断准确率较高,但耗时较久^[3]。近年来,宏基因组二代测序(mNGS)技术逐渐应用于各种感染性疾病的诊断,可快速、准确地检测出样本中的微生物 DNA,为临床诊断提供高效的工具^[4]。半乳甘露聚糖(galactomannan, GM)试验和血清烟曲霉特异性抗体检测也是诊断 IPA 的常用工具,本研究旨在探讨 mNGS

技术联合 GM 试验、血清烟曲霉特异性抗体检测对 COPD 合并 IPA 的诊断价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用前瞻性研究,纳入 2020 年 8 月至 2023 年 8 月杭州市第九人民医院收治的 96 例 COPD 患者。纳入标准:(1)符合 COPD 诊断标准^[5];(2)存在疑似 IPA 的临床表现(如发热、持续咳嗽、胸痛、血痰等);(3)胸部影像学检查显示肺部浸润、空洞形成等可能与 IPA 相符的表现;(4)临床资料完整。排除标准:(1)已明确诊断为肺结核、肺癌等其他呼吸系统疾病;(2)有严重肝肾功能障碍、已知其他真菌感染。本研究获得杭州市第九人民医院伦理委员会批准,所有研究对象均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 mNGS 检测 从患者的支气管肺泡灌洗液中提取总 DNA,采用 QIAamp DNA Mini Kit 进行 DNA 提取;使用专门针对微生物的 16S rRNA 引物进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:94℃预变性 5min,94℃变性 30s,35 个周期,55℃退火 30s、72℃延伸 1min,最后 72℃延伸 7min。使用 Illumina MiSeq 平台进行测序,使用 QIIME 2 软件进行数据分析,与 NCBI 微生物数据库

基金项目: 杭州市医药卫生科技项目(B20200292)

作者单位: 311225 杭州,杭州市第九人民医院

通信作者: 王卓萍, Email: wangzhuoping2018@163.com

进行比对,在样本中检测到曲霉菌DNA序列,且其在所有微生物中的相对丰度超过1%,判定为阳性。

1.2.2 GM 试验 从患者血液中提取血清,存储于一20℃;采用Platelia Aspergillus GM试剂盒,按照厂家说明书进行操作,通过酶标仪读取450nm的吸光度值。

1.2.3 血清烟曲霉特异性抗体检测 从患者血液中提取血清,存储于一20℃;使用烟曲霉IgG ELISA试剂盒,将样本加入预先包被有烟曲霉抗原的酶标板孔中,孵育1h;采用洗涤缓冲液洗涤3次,去除未结合的物质,加入与IgG抗体结合的酶标记二抗,孵育30min,重复洗涤步骤,加入TMB底物,孵育20min,然后加入停止液;通过酶标仪读取450nm的吸光度值,使用标准曲线来确定抗体浓度。

1.3 COPD合并IPA的诊断标准 参照欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组(EORTC/MSG)的共识标准^[6], (1)临床表现:持续发热且广谱抗生素治疗无反应,存在呼吸困难、持续咳嗽、胸痛及血痰; (2)影像学检查:胸部CT显示“新月体”征、“空洞”形成、“卫星病灶”; (3)微生物学证据:从呼吸道分泌物或肺组织中直接观察到曲霉菌的分枝菌丝,从肺组织或支气管肺泡灌洗液中分离出曲霉菌; (4)组织病理学证据:肺组织活检发现曲霉菌侵袭性生长,如曲霉菌的菌丝穿透肺泡壁、出现组织坏死。

1.4 统计方法 采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差表示,采用独立样本*t*检验;计数资料采用χ²检验;联合检测中一项阳性则结果为阳性,绘制ROC曲线分析各检测方法的诊断价值。*P* < 0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较 根据诊断标准,最终96例患者中合并IPA组40例,非IPA组56例,IPA组男24例,女16例;年龄45~78岁,平均(62.3±8.5)岁;COPD病程3~15年,平均(9.45±3.58)年。非IPA组男34例,女22例;年龄43~77岁,平均(60.1±7.9)岁;COPD病程2~14年,平均(8.76±3.37)年。两组一般资料差异无统计学意义(均*P* > 0.05)。

2.2 mNGS 检测结果 mNGS 检出阳性44例,其

中真阳性36例,阴性52例,其中真阴性48例,见表1。

2.3 两组血清GM值及烟曲霉IgG抗体水平比较

IPA组血清GM值及烟曲霉IgG抗体水平均高于非IPA组(均*P* < 0.05),见表2。

2.4 血清GM值及烟曲霉IgG抗体水平对IPA的诊断价值分析 ROC曲线显示,血清GM值、烟曲霉IgG抗体水平诊断TPE的最佳截断值分别为0.64、77.32kAU/L,对应的*AUC*分别为0.804、0.807,联合诊断*AUC*为0.865,见表3。

2.5 mNGS联合GM试验、血清烟曲霉IgG抗体检测对IPA的诊断效能 mNGS联合GM试验、血清烟曲霉IgG抗体检测诊断IPA的敏感度、特异度、准确度分别为96.88%、92.19%、93.75%,与最终诊断结果的一致性检验*Kappa*值为0.86,见表4。

3 讨论

IPA的临床表现多样且具有非特异性,临床确诊有一定难度,传统诊断方法如微生物培养和组织病理学检查耗时较长,可能导致诊断延迟而延误病情^[7-8]。因此,寻找一种快速、准确的IPA诊断方法,对于改善COPD患者的疗效和预后具有重要意义。

mNGS是近年来迅速发展的一种高通量测序技术,其核心原理是通过对样本中的所有DNA进行测序,然后与已知的微生物数据库进行比对,从而实现病原体的快速、准确鉴定^[9-11]。在IPA的诊断中,mNGS可在短时间内直接从患者样本中检测到曲霉菌DNA,从而为早期诊断提供依据^[12]。本研究结果显示mNGS技术在IPA的诊断中敏感度高达90.0%,这是因为mNGS可在短时间内检测到大量微生物的

表1 mNGS检测结果				例
检测方法	金标准			合计
	IPA		非IPA	
mNGS	IPA	36	8	44
	非IPA	4	48	52
合计		40	56	96

表2 两组血清GM值及烟曲霉IgG抗体水平比较			
组别	例数	血清GM	烟曲霉IgG抗体(kAU/L)
IPA组	40	0.83±0.14	93.47±14.23
非IPA组	56	0.47±0.11	46.32±9.87
<i>t</i> 值		14.099	19.180
<i>P</i> 值		< 0.05	< 0.05

表3 血清GM值及烟曲霉IgG抗体水平对IPA的诊断效能						
指标	最佳截断值	<i>AUC</i>	<i>SE</i> 值	95% <i>CI</i>	敏感度(%)	特异度(%)
血清GM值	0.64	0.804	0.034	0.761~0.895	71.88	93.75
烟曲霉IgG抗体	77.32 kAU/L	0.807	0.033	0.762~0.892	68.75	96.88
联合检测	—	0.865	0.029	0.810~0.924	78.13	95.31

表4 mNGS联合GM试验、烟曲霉IgG抗体检测对IPA的诊断效能

检测方法	敏感度(%)	特异度(%)	准确度(%)	Kappa值
mNGS	90.00	85.71	87.50	0.75
GM试验联合烟曲霉IgG抗体	78.13	95.30	95.31	0.76
mNGS联合GM试验、烟曲霉IgG抗体	96.88	92.19	93.75	0.86

DNA,且与传统微生物培养方法相比,mNGS不受微生物生长速度、培养条件等因素的限制,因此更为敏感。mNGS单独诊断IPA的特异度为85.7%,提示存在一定的假阳性率,可能原因是mNGS检测的是曲霉菌DNA,而不是活菌,因此即使在没有活性感染的情况下也可能检测到曲霉菌的DNA,从而导致假阳性结果。此外,环境中的曲霉菌污染、样本处理过程中的交叉污染等因素也可能导致假阳性结果。

GM是曲霉菌细胞壁的组成部分,在曲霉菌的生长和复制过程中会释放到体内,因此其在血清中的存在与曲霉菌的活性侵袭有关,且血清中的GM水平在感染早期显著升高,因此GM试验常被用作IPA的早期和快速诊断工具^[13]。本研究结果显示IPA组血清GM值高于非IPA组,与文献[14]报道结果一致。ROC曲线分析显示,血清GM值对IPA诊断的最佳截断值为0.64,单独诊断特异度高但敏感度较低,原因是GM试验在感染初期或菌量较低的情况下容易出现假阴性。在免疫系统受到侵袭时,机体会产生特异性抗体来应对病原体感染,因此检测烟曲霉特异性IgG抗体水平可提供患者免疫状态相关信息。本研究结果显示IPA组血清烟曲霉特异性IgG抗体水平高于非IPA组。IPA通常病程较长,烟曲霉IgG抗体水平的升高可能会持续较长时间,而不像一些其他免疫标志物(如C反应蛋白)那样迅速升高和下降,这也导致一些早期或轻度感染可能会漏诊^[15]。本研究结果显示mNGS技术、GM试验及血清烟曲霉IgG抗体检测三者联合诊断,敏感度、特异度、准确度均较高,与最终诊断结果一致性较好,原因是三种诊断方法各自具有其优点和局限,通过联合检测可互相弥补局限性,从而提高诊断敏感性。mNGS技术在早期感染就能检测到病原体,而早期感染可能在其他诊断方法中产生假阴性结果,但mNGS可以更早捕获感染信号,同时也有助于确定治疗后是否存在潜在耐药或其他复杂情况;GM试验和IgG抗体检测早期敏感性较低,但可用于监测治疗效果或复发感染,三者联合诊断可减少漏诊或误诊的可能性。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突
作者贡献声明 王卓萍:实验操作、论文撰写;胡小燕、胡慧佳、张赓

超、金军:数据整理、统计学分析

参 考 文 献

[1] 丁静,魏希强.血清和支气管肺泡灌洗液半乳甘露聚糖检测诊断COPD合并侵袭性肺曲霉病价值比较[J].中华保健医学杂志,2022,24(3):176-178.

[2] 张英芳,黄琳娜,詹庆元.重症监护室中侵袭性肺曲霉病的诊断标准:因人而异[J].内科急危重症杂志,2022,28(5):361-367.

[3] 张莹,张军昌,牟劲松.支气管肺泡灌洗液或血清半乳甘露聚糖诊断肝衰竭合并侵袭性肺曲霉病的价值[J].郑州大学学报(医学版),2023,58(3):429-432.

[4] 林俊杰,李嘉琪,罗素云,等.胸部CT结合床旁气管镜对侵袭性肺曲霉病的早期诊断价值研究[J].中国CT和MRI杂志,2023,21(4):73-75.

[5] 中华人民共和国卫生部.慢性阻塞性肺疾病诊断标准[J].国际呼吸杂志,2011,31(1):1-2.

[6] 曹江红,李光辉.侵袭性真菌病修订定义——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组(EORTC/MSG)共识组[J].中国感染与化疗杂志,2008,8(5):321-324.

[7] 李正莉,朱春梅,黄贵民,等.血清及支气管肺泡灌洗液半乳甘露聚糖试验联合检测对非中性粒细胞减少儿童侵袭性肺曲霉病的临床诊断价值[J].中华微生物学和免疫学杂志,2022,42(5):409-414.

[8] 熊忠林,李新胜,禹阳明.慢阻肺患者侵袭性肺曲霉病发生的列线图风险预测模型的建立[J].心脑血管病杂志,2022,41(5):502-506,527.

[9] 黄宛虹,磨立达,罗晓璐,等.不同免疫状态侵袭性肺曲霉病患者治疗前后GM和BG水平变化[J].检验医学,2022,37(5):443-446.

[10] 胡小燕,李森华,胡志明,等.血清半乳甘露聚糖和曲霉IgG对肺曲霉病感染的诊断价值[J].中华医院感染学杂志,2022,32(14):2090-2093.

[11] 王正煜,吴蕾,白燕,等.BALF与血清GM检测用于侵袭性肺曲霉病诊断临床效能分析[J].国际呼吸杂志,2021,41(15):1144-1148.

[12] MOLDOVEANU B, GEARHART A M, JALIL B A, et al. Pulmonary Aspergillosis: Spectrum of Disease[J]. Am J Med Sci, 2021,361(4):411-419.

[13] AHMED J, SINGH G, MOHAN A, et al. Invasive pulmonary aspergillosis infection in severely ill COPD patients in pulmonary ward and ICU[J]. Indian J Med Microbiol, 2022,40(2):223-227.

[14] OTU A, KOSMIDIS C, MATHIOUDAKIS A G, et al. The clinical spectrum of aspergillosis in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Infection, 2023,51(4):813-829.

[15] LIU F, ZHANG X, DU W, et al. Diagnosis values of IL-6 and IL-8 levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid for invasive pulmonary aspergillosis in chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Investig Med, 2021,69(7):1344-1349.

收稿日期:2023-11-05
(本文编辑:陈志翔)