

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190013

# PCR检测痰曲霉菌在慢性阻塞性肺疾病合并侵袭性肺曲霉菌病中的诊断价值

王 琴, 严梦楠, 宋一祎, 李华茵\*

复旦大学附属中山医院呼吸内科, 上海 200032

**[摘要]** **目的:**探讨荧光定量PCR检测痰曲霉菌在慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者侵袭性肺曲霉菌病(invasive pulmonary aspergillosis, IPA)中的诊断价值。**方法:**采用前瞻性观察性研究,入组2015年4月至2017年3月因COPD急性加重入住复旦大学附属中山医院的49例患者。收集患者常规痰液真菌培养后剩余的痰液,采用荧光定量PCR检测曲霉菌。同时分析患者的一般资料,包括临床症状、影像学资料、实验室检查结果。**结果:**49例患者中18例诊断为IPA,多见于全身应用糖皮质激素及广谱抗生素的患者。该病确诊较困难,多依赖临床诊断,荧光定量PCR检测痰液中曲霉菌在COPD患者合并IPA诊断中的敏感性和特异性分别为72.2%、87.1%。**结论:**COPD患者发生IPA并不少见,荧光定量PCR检测痰中曲霉菌对其具有早期诊断价值。

**[关键词]** 侵袭性肺曲霉菌病;慢性阻塞性肺病;诊断

**[中图分类号]** R 563 **[文献标志码]** A

## Diagnostic value of PCR detection of phlegm aspergillus in chronic obstructive pulmonary disease combined with invasive pulmonary aspergillosis

WANG Qin, YAN Meng-nan, SONG Yi-yi, LI Hua-yin\*

Department of Respiratory, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the diagnostic value of fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) combined with invasive pulmonary aspergillosis (IPA). **Methods:** A prospective observational study was conducted. From April 2015 to March 2017, 49 patients admitted to the Zhongshan Hospital, Fudan University due to the acute exacerbation of COPD were enrolled. The remaining sputum from patients after conventional sputum fungal culture was collected and aspergillus was detected by fluorescence quantitative PCR. The clinical data was analyzed, including clinical symptom, imaging, and laboratorial results. **Results:** In the 49 patients, 18 patients were diagnosed with IPA, most of them were prescribed with steroids and broad spectrum antibiotics. The diagnosis of the disease was difficult and depended mostly on clinical diagnosis. The sensitivity and specificity of PCR detection of aspergillus in sputum in the diagnosis of COPD patients combined with IPA was 72.2% and 87.1%, respectively. **Conclusions:** IPA is not uncommon in COPD patients. Detection of aspergillus in sputum by fluorescence quantitative PCR is of early diagnostic value.

**[Key Words]** invasive pulmonary aspergillosis; chronic obstructive pulmonary disease; diagnosis

侵袭性肺曲霉菌病(invasive pulmonary aspergillosis, IPA)是严重的机会性感染性疾病,多见于免疫抑制宿主,如血液系统恶性肿瘤、器官移植患者。尽管广谱抗真菌药物不断发展,IPA患者死亡率还是居高不下<sup>[1]</sup>。近年来,非粒细胞缺乏患者中IPA的报道越来越多,如慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)患者<sup>[2-3]</sup>。Guinea等<sup>[4]</sup>发现,约1.63%的住院COPD

患者下呼吸道分泌物中可分离出曲霉菌,其中约22.1%拟诊IPA。COPD住院患者继发IPA多与系统性应用糖皮质激素、广谱抗生素及机械通气相关。

2007年,Bulpa等<sup>[3]</sup>提出COPD患者IPA的诊断标准,分为确诊、拟诊、疑诊和定植。其中,确诊有赖于组织病理学检查;拟诊患者要求临床依据(COPD患者近期因急性加重住院,胸部影像学提示

**[收稿日期]** 2019-01-03 **[接受日期]** 2019-04-29

**[基金项目]** 上海市科学技术委员会项目(16411964300)。Supported by Shanghai Science and Technology Committee Program(16411964300)。

**[作者简介]** 王 琴,博士。E-mail: wangqin19851125@126.com

\*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-64041990; E-mail: li.huayin@zs-hospital.sh.cn

曲霉菌感染,对常规抗感染治疗无反应)和病原学依据[下呼吸道分泌物分离出曲霉菌或者连续2次血清半乳甘露聚糖(GM)实验阳性];疑诊患者缺乏病原微生物依据;定植为患者缺乏临床表现但下呼吸道分泌物分离出曲霉菌。2016年美国感染病学会(Infectious Diseases Society of America, IDSA)更新了曲霉菌病诊治指南,强调分子生物学技术的诊断价值<sup>[5]</sup>。

大部分 COPD 住院患者因肺功能差、喘息、机械通气等原因,不能耐受气管镜、经皮肺活检等有创性检查,确诊 IPA 困难。常规的痰液培养方法耗时、阳性率低,不能为快速诊断提供帮助。而分子生物学技术,如荧光定量 PCR,具有灵敏度高、特异性强、快速检测的特点,可为临床快速诊断提供重要帮助。因此,本研究采用前瞻性观察性研究,通过收集住院 COPD 患者的痰液,多重荧光定量 PCR 检测方法检测其中的曲霉菌,探索 PCR 检测痰液曲霉菌在 COPD 患者合并 IPA 中的诊断价值。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 入选标准:入选 2015 年 4 月至 2017 年 3 月因 COPD 急性加重入住复旦大学附属中山医院的患者,其均有常规痰液真菌培养标本。本研究通过复旦大学附属中山医院伦理委员会审批(批件号码:B2016-104)。由于收集患者常规痰曲霉菌培养剩余的痰液为无创伤性,故免签署患者知情同意书。排除标准:COPD 仅作为次要诊断的住院患者。收集患者的一般资料,真菌感染危险因素(糖皮质激素使用情况、广谱抗生素使用情况、机械通气等),临床症状,影像学表现,病原学检查结果,血清半乳甘露聚糖(GM)实验结果,血清 1,3- $\beta$ -D 葡聚糖(G)实验结果。

1.2 PCR 法检测痰液曲霉菌 收集患者常规痰真菌培养后剩余痰液,放置于无菌痰杯中,进行 DNA 提取及多重荧光定量 PCR 检测。检测步骤按照试剂盒说明书(翔琼生物)进行。

1.2.1 DNA 抽提 取 200  $\mu$ L 痰液,置于 1.5 mL 离心管,加入 5 倍体积的试剂 A,振荡 30 s,室温放置 20 min;12 000 r/min( $r=6$  cm)离心 5 min,弃上清,沉淀用 1 000  $\mu$ L 试剂 B 充分悬浮,12 000 r/min( $r=6$  cm),离心 5 min,小心弃除上清,留沉淀;沉淀加 25  $\mu$ L 试剂 C 和 25  $\mu$ L 试剂 D,充分悬浮,振荡 15 s;将离心管置于水浴锅,37 $^{\circ}$ C,60 min;离心管置

于水浴锅,80 $^{\circ}$ C,15 min;取出离心管,6 000 r/min( $r=6$  cm),离心 5 min;取 1  $\mu$ L 上清作为 PCR 模板。

1.2.2 PCR 反应 配制 20  $\mu$ L PCR 反应体系:2 $\times$  Taqman 酶反应液 10  $\mu$ L,3.3 $\times$  烟曲霉检测反应液 6  $\mu$ L,DNA 模板或阴(阳)性对照品 1  $\mu$ L,无菌水 3  $\mu$ L。将反应液混匀,2 000 r/min( $r=6$  cm)离心 15 s,使所加试剂聚集到管底;PCR 扩增。将 PCR 反应板放入荧光定量 PCR 仪器中,反应条件:95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,40 个循环。信号收集:第 2 阶段 60 $^{\circ}$ C 时收集荧光基团 FAM,参比荧光为 ROX。

1.2.3 结果质控 阴性对照的 Ct 值均应等于 40;阳性对照的 Ct 值应小于或等于 35,并有较好的对数增长曲线。否则,视为此次实验无效。结果判读:被检样品的 Ct 值小于 35 并有对数增长曲线为阳性结果;被检样品的 Ct 值等于 35 时,有对数生长曲线为阳性,无对数生长曲线为阴性结果;被检样品的 Ct 值大于 35 时,无对数生长曲线为阴性,有较好的对数生长曲线时加大样本量重做,重做结果同前,则判为阳性,否则为阴性。

1.3 诊断标准 参照 2008 年欧洲癌症研究和治疗组织(European Organization for Research and Treatment of Cancer, EORTC)/真菌病研究组(Mycoses Study Group, MSG; EORTC/MSG)和 2016 年 IDSA 曲霉病诊断临床实践指南,将曲霉菌病分为确诊、拟诊和疑诊。确诊需要组织病理学依据或正常无菌部位标本曲霉菌培养阳性;拟诊患者需符合 1 项宿主因素、1 项临床依据和 1 项微生物学标准;疑诊患者须符合 1 项宿主因素和 1 项临床依据,而缺乏生物学标准。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,符合正态性和方差齐性的计量资料采用  $t$  检验,计数资料采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切概率法检验。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 一般资料 49 例 COPD 患者中,18 例诊断为 IPA,其中确诊 4 例、临床诊断(拟诊+疑诊)14 例。合并 IPA 的 COPD 组患者系统应用糖皮质激素和广谱抗生素比例高于不合并组(表 1)。

2.2 临床特征对比 结果(表 2)表明:与不合并 IPA 组患者相比,合并 IPA 组 COPD 患者发热更常

见;两组呼吸系统症状差异无统计学意义。合并IPA组患者胸部CT结节、空洞更多见,不合并IPA组患者胸部CT多无特殊阳性发现。

表1 COPD住院患者的一般资料

| 指标           | 合并IPA组<br>(N=18) | 不合并IPA组<br>(N=31) | P值    |
|--------------|------------------|-------------------|-------|
| 男性 n(%)      | 17(94.4)         | 23(74.1)          | 0.167 |
| 女性 n(%)      | 1(0.56)          | 8(25.9)           |       |
| 年龄/岁         | 67.67±8.951      | 66.71±12.846      | 0.782 |
| 糖皮质激素应用 n(%) |                  |                   |       |
| 吸入糖皮质激素      | 8(44.4)          | 7(22.6)           | 0.109 |
| 系统用糖皮质激素     | 16(88.9)         | 8(25.8)           | 0.000 |
| 使用广谱抗生素      | 17(94.4)         | 15(48.4)          | 0.001 |
| 其他合并症 n(%)   |                  |                   |       |
| 糖尿病          | 3(16.7)          | 3(9.7)            | 0.789 |
| 心血管疾病        | 5(27.8)          | 6(19.4)           | 0.744 |
| 低蛋白血症        | 5(27.8)          | 5(16.1)           | 0.543 |
| 机械通气 n(%)    | 3(16.7)          | 3(9.7)            | 0.789 |

表2 两组患者临床特征的对比

| 临床特征 | 合并IPA组<br>(N=18) | 不合并IPA组<br>(N=31) | P值    |
|------|------------------|-------------------|-------|
| 临床表现 |                  |                   |       |
| 发热   | 11(61.1)         | 7(22.6)           | 0.007 |
| 呼吸困难 | 15(83.3)         | 23(74.2)          | 0.701 |
| 咳嗽   | 18(100)          | 30(96.8)          | 1.000 |
| 咳痰   | 17(94.4)         | 30(96.8)          | 1.000 |
| 喘息   | 2(11.1)          | 5(16.1)           | 0.952 |
| 咯血   | 7(38.9)          | 4(12.9)           | 0.081 |
| 胸部CT |                  |                   |       |
| 晕征   | 5(27.8)          | 0(0)              | -     |
| 结节   | 10(55.6)         | 2(6.5)            | -     |
| 空洞   | 12(66.7)         | 1(3.2)            | -     |
| 浸润影  | 6(33.3)          | 2(6.5)            | -     |

## 2.3 病原学检查结果

2.3.1 G和GM检测 18例合并IPA的COPD患者中,15例患者进行了血清G实验,其中阳性2例、阴性13例;31例不合并IPA的COPD患者中,18例检测了血清G实验,阳性8例、阴性10例。血清G实验对于COPD患者IPA诊断的敏感性和特异性分别为13.3%(95%CI 2.3~41.6)、55.5%(95%CI 31.3~77.5),阳性预测值和阴性预测值分别为20%(95%CI 3.5~55.7)、43.4%(95%CI 23.8~65.1)。49例患者中仅7例患者进行了血清GM实验,病例数太少,未进一步计算GM实验对COPD患者IPA诊断的敏感性及其特异性。

2.3.2 痰曲霉菌培养 49例患者均进行了痰液曲霉菌培养检测。18例合并IPA的COPD患者中,阳性6例、阴性12例。31例不合并IPA的COPD

患者中,阳性2例、阴性29例。痰液真菌培养诊断COPD患者IPA的敏感性及其特异性分别为33.3%(95%CI 14.3~58.8)和93.5%(95%CI 77.1~98.8),阳性预测值和阴性预测值分别为75%(95%CI 35.5~95.5)和70.7%(95%CI 54.2~83.3)。

2.3.3 荧光定量PCR检测痰曲霉菌 49例患者均进行痰液荧光定量PCR以检测曲霉菌。18例合并IPA的COPD患者中,阳性13例、阴性5例。31例不合并IPA的COPD患者中,阳性4例、阴性27例。荧光定量PCR检测痰液中曲霉菌诊断COPD患者合并IPA的敏感性及其特异性分别为72.2%(95%CI 46.4~89.2)和87.1%(95%CI 69.2~95.7),阳性预测值和阴性预测值分别为76.5%(95%CI 49.8~92.2)和84.4%(95%CI 66.4~94.1)。

## 3 讨论

COPD患者IPA的发生率报道并不一致,为1%~9%<sup>[4,6-7]</sup>。全身应用糖皮质激素在住院COPD患者发生IPA中有促进作用。研究<sup>[5]</sup>发现,应用强的松日剂量大于20mg或累计剂量大于700mg的患者IPA的风险显著增加;亦有研究<sup>[8]</sup>发现,长期吸入糖皮质激素增加COPD患者IPA的风险。本研究得出类似结论,在合并IPA的COPD患者中,88.9%的患者全身应用糖皮质激素;而在不合并IPA的COPD患者,仅25.8%的患者全身应用糖皮质激素。吸入糖皮质激素在两组间差异无统计学意义。其他有意义的危险因素还包括广谱抗生素的应用。而合并其他基础疾病如糖尿病、心血管疾病、低蛋白血症等在两组间差异无统计学意义。与不合并IPA的COPD患者相比,合并IPA的COPD患者临床特征以发热更常见,胸部CT以多发结节伴空洞更多见,而既往研究<sup>[3]</sup>结果提示其以浸润实变影多见,可能与本研究样本量小有关。

COPD患者合并IPA的诊断率低,组织病理学是目前最可靠的诊断方法。但因住院COPD患者肺功能差,气急明显,难以耐受气管镜及肺穿刺等有创检查,从而导致确诊率低,多依赖于临床诊断。本研究中18例诊断为IPA的患者中,仅4例患者接受了气管镜检查,得到临床确诊,其余14例均为临床诊断。病原微生物学依据在COPD患者IPA的诊断中具有至关重要的价值。1,3-β-D葡聚糖是大部分真菌细胞壁组成成分(接合菌、隐球菌除外),故其阳性并不代表一定为曲霉菌感染。G实验

在诊断真菌感染中的敏感性和特异性分别为 77%、85%<sup>[9]</sup>。本研究中 18 例患者检测了血清 G 实验,阳性 8 例、阴性 10 例。血清 G 实验对于 COPD 患者 IPA 诊断的敏感性和特异性分别为 13.3%、55.5%,显著较低,可能与病例数较少、采样时间及多数患者经验性应用抗真菌药物有关。半乳甘露聚糖是曲霉菌细胞壁上的多聚抗原,与 G 实验相比,GM 实验对曲霉菌病的诊断有较高的特异性。文献<sup>[10]</sup>报道,GM 实验的敏感性和特异性分别为 61%~89%和 84%~95%。COPD 患者肺泡灌洗液中 GM 实验的诊断价值与粒细胞缺乏患者血清 GM 实验的诊断价值相似。但本研究仅 7 例患者进行了 GM 实验,故未予进一步探讨 GM 实验的诊断价值。

痰液曲霉菌培养简便,易获取。在 COPD 患者痰液中分离出曲霉菌,尤其是反复分离获得时,需要进一步完善胸部 CT 检查,评估 IPA 的可能性。本研究所有病例均进行了痰液曲霉菌培养,痰液真菌培养对 COPD 患者 IPA 诊断的敏感性及其特异性分别为 33.3%、93.5%,特异性较高,但敏感性低,且痰曲霉菌培养耗时长,至少需要 3 d,不利于 IPA 早期诊断。

荧光定量 PCR 检测曲霉菌方法快速、敏感性高,多在粒细胞缺乏患者中开展研究,肺泡灌洗液 PCR 检测的敏感性高于血清中 PCR 检测<sup>[11]</sup>。由于不同文献中描述的方法各不相同,缺乏统一标准,IDSAs 2016 年指南尚未推荐 PCR 检测方法常规用于临床诊断<sup>[6]</sup>。IDSAs 2016 指南建议临床医师根据个体情况谨慎选择 PCR 作为 IPA 的诊断。临床医师须根据 PCR 试剂盒的方法学和检测特点,对结果进行解读。使用 PCR 方法诊断 IPA,应结合其他诊断方法和临床情况。目前,关于痰液 PCR 检测的研究较少。本研究荧光定量 PCR 检测痰液中的曲霉菌诊断 COPD 患者合并 IPA 的敏感性及其特异性分别为 72.2%、87.1%,阳性预测值和阴性预测值分别为 76.5%、84.4%。敏感性显著高于常规培养方法,但特异性较痰曲霉菌培养略低,可能与检测敏感性高有关。

综上所述,COPD 患者中发生 IPA 并不少见,多见于全身应用糖皮质激素及广谱抗生素的患者。该病确诊困难,多依赖于临床诊断,荧光定量 PCR 检测痰液中的曲霉菌在 COPD 合并 IPA 的诊断中的敏感性和特异性均较高,能为临床早期诊断提供

重要的价值。但本研究选择的痰液标本易污染,无法区分定植与感染,且未同时检测血清及肺泡灌洗液,有待在后续研究中加以补充。

## 参考文献

- [1] LORTHOLARY O, GANGNEUX J P, SITBON K, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007)[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17(12): 1882-1889.
- [2] TACCONE F S, VAN DEN ABEELE A M, BULPA P, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes[J]. *Crit Care*, 2015, 19:7.
- [3] BULPA P, DIVE A, SIBILLE Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Eur Respir J*, 2007, 30(4):782-800.
- [4] GUINEA J, TORRES-NARBONA M, GIJÓN P, et al. Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16(7):870-877.
- [5] DE PAUW B, WALSH T J, DONNELLY J P, et al. 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 Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group[J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(12):1813-1821.
- [6] ADER F, NSEIR S, LE BERRE R, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in chronic obstructive pulmonary disease: an emerging fungal pathogen[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11(6):427-429.
- [7] XU H, LI L, HUANG W J, 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.
- [8] BAROUKY R, BADET M, DENIS M S, et al. Inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease and disseminated aspergillosis[J]. *Eur J Intern Med*, 2003, 14(6):380-382.
- [9] KARAGEORGOPOULOS D E, VOULOUMANOU E K, NTZIORA F, et al.  $\beta$ -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis[J]. *Clin Infect Dis*, 2011, 52(6):750-770.
- [10] MARR K A, LEISENRING W. Design issues in studies evaluating diagnostic tests for aspergillosis[J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 41 Suppl 6:S381-S386.
- [11] AMBASTA A, CARSON J, CHURCH D L. The use of biomarkers and molecular methods for the earlier diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised patients[J]. *Med Mycol*, 2015, 53(6):531-557.