

不同实验室环境下 ELISA 法检测血清 GM 结果的可靠性研究*

娄鉴芳,梅亚宁,张世昌,徐华国,王加 (南京医科大学第一附属医院检验学部,南京 210029)

摘要:目的 探讨半乳甘露聚糖(galactomannan, GM)检测的实验室环境影响因素以及如何降低假阳性,提高检测的准确性。**方法** 选择2016年6月~2017年4月在南京医科大学第一附属医院初诊为疑似侵袭性真菌病的住院患者为研究对象,在不同的实验室环境下进行ELISA法检测血清GM。在一般环境下检测3407例样本,进行随机空气培养,观察培养结果并鉴定出菌落种类,并以培养菌落制备混悬液进行处理取上清进行GM检测。在严格控制环境下检测1167例样本,并进行两组之间的比较。**结果** 在一般环境下检测的真阳性率为3.38%,敏感度为63.0%(34/54),特异度为40.9%(56/137),阳性预测值(positive predictive value, PPV)为29.6%;在严格控制环境下真阳性率为3.94%,敏感度和特异度分别为79.4%(27/34)和34.5%(10/29),PPV为58.7%(27/46)。两者之间,后者PPV明显高于前者,差异有统计学意义($\chi^2=11.85, P<0.001$)。空气培养、鉴定结果及GM检测结果表明,随机污染的曲霉属导致较强的假阳性结果,毛霉属导致中度的假阳性结果,而枯草芽孢杆菌导致轻度假阳性结果。**结论** 环境中的枯草芽孢杆菌,曲霉属和毛霉属对检测环境的随机污染是导致GM检测假阳性结果的重要原因,通过对检测环境严格的控制和消毒措施可以降低假阳性,改善检测结果,提高检测结果的敏感性。

关键词:半乳甘露聚糖;假阳性;空气培养

中图分类号:R446.61 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2019)01-101-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.01.026

Reliability Study on Serum GM Results by ELISA Method in Different Laboratory Conditions

LOU Jian-fang, MEI Ya-ning, ZHANG Shi-chang, XU Hua-guo, WANG Jia (Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: Objective To explore the factors in the environment that could affect the accuracy of galactomannan (GM) detection and how to reduce false-positives in order to improve accuracy. **Methods** The hospitalized patients who were initially diagnosed with suspicious invasive fungal diseases in the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University from June 2016 to April 2017 were selected as subjects, and serum GM was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method in different laboratory environmental conditions. Detection of 3407 samples in normal circumstances and random air culture, observation of culture results, identification and treatment of bacterium suspension to take the supernatant for GM detection were done as well. 1167 samples were tested in strict controlled environment. Then comparisons between the two groups were performed. **Results** The true positive rate was 3.38% in the general environment, the sensitivity was 63.0% (34/54), while the specificity was 40.9% (56/137), and the positive predictive value (PPV) was 29.6%. The true positive rate was 3.94% in strict controlled environment, sensitivity and specificity were 79.4% (27/34) and 34.5% (10/29), respectively, and PPV was 58.7% (27/46). Between the two, the latter PPV was significantly higher than the former, the difference was statistically significant ($\chi^2=11.85, P<0.001$). Air culture and microorganism identification showed that random contamination by *Aspergillus spp* contributed to strong false-positive results, *Mucor spp* contributed to moderate false-positive results, and *Bacillus subtilis* contributed to mild false-positive results. **Conclusion** Random contamination of the testing environment by *Bacillus subtilis*, *Aspergillus spp* and *Mucor spp* is an important cause of false-positive results in GM detection which can be improved by using disinfected and sterilized testing environment.

Keywords: galactomannan; false-positive; air culture

半乳甘露聚糖(galactomannan, GM)是一种多糖成分,以稳定的形式存在于包括曲霉属在内的多种真菌细胞壁中。它在真菌感染如侵袭性曲霉病(IA)期间被释放到循环血液中,并且现在被广泛用于高风险患者IA的早期检测和诊断^[1]。GM检

测为疑似真菌感染患者的早期鉴别和指导靶向抗真菌药物给药提供了一种方便的方法,即使在疾病进展之前,也可以降低发病率和死亡率。

酶联免疫吸附试验(ELISA)现在是用于检测血液循环中GM抗原以快速诊断侵袭性真菌感染

* 基金项目:江苏省实验诊断学重点实验室(项目编号:ZDXKB2016005)。

作者简介:娄鉴芳(1985-),女,硕士研究生,主治医师,研究方向:免疫学诊断, E-mail: loujianfang@126.com。

通讯作者:王加,女,主管技师,硕士研究生, E-mail: qaz8405@sohu.com。

的常用检测方法^[2]。然而,各种影响因素可能导致GM检测出现假阳性结果,例如同时使用某些抗生素、饮食因素以及与其他真菌或细菌的交叉反应^[3,4],这些在最终结果解释中都不应被忽视。因此,根据制造商的建议和指示,应该对初检阳性样品进行复检以避免这些假阳性结果^[5]。但由于GM检测缺乏可重复性,并且在不同地区的ELISA灵敏度变化范围较大(范围从30%到100%)^[6,7],本研究我们决定探索影响我院GM检测结果的因素。

1 材料和方法

1.1 实验样本材料 收集2016年6月~2017年4月在本院初诊为疑似侵袭性真菌病的住院患者3407例,1167份血液样本,排除使用某些抗生素及肠外营养的临床影响因素。全血在3000 r/min离心10 min分离血清,-4℃储存,1周内进行检测。

1.2 试剂和仪器 试剂盒使用Platelia™ Aspergillus Ag试剂盒(美国Bio-Rad公司),仪器使用Thermo scientific MULTISKAN FC酶标仪(上海Thermo Fisher仪器有限公司),BD Phoenix-100全自动细菌鉴定仪(美国BD公司)等。

1.3 方法

1.3.1 GM检测:采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测样本中的GM。首先,将300 μl血清与100 μl处理液混匀,在100℃加热煮沸6 min,处理后的样品10000 r/min离心10 min以获得上清液。将50 μl与酶结合的单克隆抗体(EBA-2)试剂和50 μl上清液依次加入微孔板中,然后混合。37℃孵育90 min后,将板洗涤至少5次,拍干,室温下加200 μl底物溶液黑暗中孵育30 min。加100 μl 1.5 ml/dl硫酸溶液终止反应,450 nm波长下读取A值,其中参考波长为620 nm。其以样品A值/临界值A值的比率计算。ODI>0.5被认为是阳性结果。

1.3.2 空气培养及鉴定:将暴露于空气中的三块血琼脂平板置于该空间对角线上5 min,其中一个在中间,另两个分别在离地面1米高的距离内墙1米的对角线的内侧和外侧距离处。然后关闭这些平板并在温度为37℃,含5 ml/dl CO₂的培养箱里培养48 h。48 h后观察平板菌落生长情况并鉴定菌落。同时,挑取菌落以制备用于GM检测的悬浮液(10³/300 μl生理盐水)。

1.4 统计学分析 使用SPSS 17.0统计软件包进行统计分析。检测结果显示为ODI,ODI值以中位数形式表示。配对t检验分析GM初检和复检吸光度指数(optical density index,ODI)均为阳性

的结果。两组间率的比较采用卡方检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般环境下的GM检测结果 ODI>0.5的所有血清样本被认为是检测结果阳性。在3407例样本中,有191例样本初检为GM阳性,中位ODI为1.066。对191例样本进行复检发现115例样本最终确证为阳性,中位ODI为1.204,这115例样本两次检测的ODI(1.013 vs 1.204)之间差异无统计学意义($t=-0.940$, $P=0.384$)。最终的阳性率为3.38%(115/3407)。然而结合临床症状、影像学检查及最终培养结果,115例阳性病例中只有34例最终确诊为IA,其他81例未确诊为IA。在76例GM阴性病例中,56例未被鉴定为IA,20例确诊为IA,故GM诊断的敏感度为63.0%(34/54),而特异度为40.9%(56/137)。阳性预测值(PPV)为29.6%(34/115)。

2.2 严格控制环境下的GM检测结果 在生物安全柜内进行严格的紫外线灭菌及消毒措施,共检测了1167例样本。结果显示初检和复检阳性率分别为5.40%(63/1167)和3.94%(46/1167)。实际上,在46例阳性病例中有27例被诊断为IA,19例未被诊断为IA。在17例阴性病例中,10例未被诊断为IA,7例被诊断为IA。所以PPV为58.7%(27/46),敏感度和特异度分别为79.4%(27/34)和34.5%(10/29)。

2.3 两种不同实验环境下的诊断参数比较 严格控制环境下GM试验的敏感度高于一般环境下;与此同时特异度稍有下降,但差异不具有统计学意义($P>0.05$)。严格控制环境下,GM试验的PPV明显高于一般环境下(29.6% vs 58.7%),差异具有统计学意义($\chi^2=11.85$, $P<0.001$)。

2.4 由非样本因素引起的检测结果假阳性 空气培养的微生物鉴定结果显示,环境中出现的随机空气污染主要以枯草芽孢杆菌、曲霉菌、毛霉菌等微生物为主。制备相应的细菌悬浮液进行GM检测时,我们发现曲霉菌属显示强阳性结果,ODI为11.397;毛霉菌属显示中等强度阳性结果,ODI为6.412;枯草芽孢杆菌表现出轻度阳性,ODI为0.734。

3 讨论 在此次的研究中,我们发现GM检测诊断侵袭性曲霉菌感染的敏感度为63.0%,特异度为40.9%,就此次结果来看本院GM检测的敏感度和特异度均低于其他发达国家^[8]。而采用严格控制检测环境的措施后,我们发现敏感度和阳性预测值出现不同程度增高。初检和复检均为阳性的标本显示其两次检测结果并无明显差异且均大于

1.0,提示GM以ODI值1.0作为Cut-off值时,阳性标本所受到的影响较小。由于复检后发现39.8%(76/191)初检阳性标本显示为阴性,我们尝试探讨了导致出现这些情况的可能因素。考虑到GM用于检测侵袭性曲霉病,我们怀疑环境中某些微生物的存在可能会影响结果,因此我们决定对检测环境进行空气培养。空气培养的结果表明,GM检测室中随机空气污染主要包括以下三种微生物污染:曲霉菌属孢子、枯草芽孢杆菌和毛霉菌。以三种菌落分别制成细菌悬液进行GM检测,结果表明GM检测中的假阳性结果可能与检测环境中这些微生物随机空气污染有关,这几种微生物或由于与目标检测物相同或由于存在交叉反应的抗原而导致了事实上的假阳性。与Cabana等^[9]的研究结果不同的是,较低浓度即可引起这种阳性结果。

而后为了确定临床上GM检测的假阳性是否为随机空气污染所导致,共1167例样本在严格的无菌条件下进行了初检和复检,用以评估不同检测环境条件下阳性率的变化。我们发现严格环境初检阳性率低于普通环境中的初检阳性率。同时,严格环境下最终的阳性率为3.94%,高于普通环境中的3.38%,这表明在严格环境下的假阳性率可以降低,并且提高最终的真阳性率。两种不同环境条件下的PPV之间的差异有统计学意义(29.6% vs 58.7%),($\chi^2 = 11.85, P < 0.001$),敏感度(63.0% vs 79.4%)也出现不同程度升高。因此,由于污染微生物的存在,检测环境的不彻底消毒灭菌及影响因素控制可能会影响GM的初始结果的判定。

目前临床上报道的绝大多数假阳性结果是由于应用营养补充剂和/或一些血液系统疾病行骨髓移植后出现^[10],仅有一篇报道提示有操作以外的影响因素^[11],尚未出现本篇从操作环境的影响因素进行探讨的类似报道。尽管ELISA实验操作对于环境并没有严格特殊的要求,但考虑到待检物质的特殊性,我们建议GM检测应该尽量在完全消毒灭菌的环境中进行。例如在生物安全柜或一定级别的生物安全室,检测前后采用紫外线照射及相关消毒灭菌措施。而最终为了排除空气中非样品因素的轻微影响,GM结果仍应与其他曲霉菌相关的标志物结合用来对疾病的诊断和病情监测进行判断,这样会协助得出更好更可靠的结论^[12]。

参考文献:

- [1] DESOUBEAUX G, BAILLY E, CHANDENIER J. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: updates and recommendations [J]. *Med Mal Infect*, 2014, 44(3): 89-101.
- [2] ZHANG Li, GUO ZhuSheng, XIE Shujin, et al. The performance of galactomannan in combination with 1, 3- β -D-glucan or aspergillus-lateral flow device for the diagnosis of invasive aspergillosis: Evidences from 13 studies [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2019, 93(1): 44-53.
- [3] CUMMINGS J R, JAMISON G R, BOUDREAUX J W, et al. Cross-reactivity of non-*Aspergillus* fungal species in the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, 59(1): 113-115.
- [4] GIACCHINO M, CHIAPELLO N, BEZZIO S, et al. *Aspergillus* galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay cross-reactivity caused by invasive *Geotrichum capitatum* [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(9): 3432-3434.
- [5] ROIZ M P, GAROCIA M D S, MARTINEZMARTINEZ L. Repeating the Platelia™ *Aspergillus* test in samples positive for serum galactomannan: Is it necessary? [J]. *Rev Iberoam Micol*, 2015, 32(3): 204-207.
- [6] PFEIFFER C D, FINE J P, SAFDAR N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis [J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 42(10): 1417-1427.
- [7] XAVIER M O, ARAUJO J S, AQUINO V R, et al. Variability in galactomannan detection by platelia aspergillus EIA™ according to the *Aspergillus species* [J]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2013, 55(3) pii: s0036-46652013000300145.
- [8] LEEFLANG M M, DEBETS-OSENKOPP Y J, VISSEER C E, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, 4(4): CD007394.
- [9] CABANA A L, MENDES J F, KLAFKE G B, et al. Can *Aspergillus fumigatus* conidia cause false-positive results in the galactomannan enzyme immunoassay test? [J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2018, 51(3): 387-389.
- [10] RACHOW T, DORNAUS S, SAYER H G, et al. Case report: false positive elevated serum-galactomannan levels after autologous hematopoietic stem cell transplantation caused by oral nutritional supplements [J]. *Clin Case Rep*, 2016, 4(5): 505-508.
- [11] GUIGUE N, LARDEUX S, ALANIO A, et al. Importance of operational factors in the reproducibility of *Aspergillus* galactomannan enzyme immune assay [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124044.
- [12] JOHNSON G L, BIBBY D F, WONG S, et al. A MIQE-compliant real-time PCR assay for *Aspergillus* detection [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40022.