

曲霉 IgG 抗体的生物参考区间建立

钟霓 郭建 慎慧 张昊 王莉莉 郭文正 王东江 吴文娟

【摘要】 目的 慢性肺曲霉病发病隐蔽易被其基础疾病掩盖不易诊断, 如不及时积极治疗病死率高。指南建议将曲霉 IgG 抗体检测作为诊断慢性肺曲霉病的关键指标。但是目前大多数曲霉 IgG 抗体临床数据来自欧洲国家, 中国人的曲霉特异性 IgG 抗体的生物参考区间仍有待确定。因此本研究的目的是建立适合本实验室的曲霉 IgG 抗体的生物参考区间。方法 随机选取 2019 年 10 月至 12 月在本院进行健康体检的成年人, 收集血清, 采用丹娜曲霉 IgG 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)进行测定, 测定结果依据美国临床实验室标准化协会(CLSI)EP28-A3c 的方法, 用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 建立本实验室的生物参考区间。结果 最终纳入 291 名患者健康个体, 中位年龄 37 岁(19 岁~82 岁), 其中男 141 名, 中位年龄 38 岁(19 岁~82 岁), 女 150 名, 中位年龄 38 岁(20 岁~78 岁)。男性和女性健康成年人血清曲霉 IgG 抗体水平分别为 20.579(43.618) AU/mL 28.387(48.158) AU/mL, 差异有统计学意义($P=0.011$), 因此依据男女性别差异分别建立参考区间。最终, 曲霉 IgG 抗体水平参考区间为男性 < 111.405 AU/mL, 女性 < 181.888 AU/mL。结论 根据不同性别初步建立了该实验室血清中曲霉 IgG 抗体的生物学参考区间, 为临床的相关疾病诊断提供了参考标准。

【关键词】 生物参考区间; 曲霉 IgG 抗体; 慢性肺曲霉病

The biological reference intervals for Aspergillus IgG antibody Zhong Ni, Guo Jian, Shen Hui, Zhang Min, Wang Lili, Guo Wenzheng, Wang Dongjiang, Wu Wenjuan. Department of Laboratory Medicine, Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200123, China

Corresponding author: Wu Wenjuan, Email: wwj1210@126.com

【Abstract】 Objective Chronic pulmonary aspergillosis (CPA) is easy to be concealed by its underlying diseases and difficult to diagnose, the mortality rate is high if it is not treated in time. It is suggested by clinical guideline that Aspergillus specific antibody IgG is a key index in the diagnosis of CPA. However, most of the current clinical data of Aspergillus specific antibody IgG are from European countries. And the biological reference interval of Aspergillus specific antibody IgG in Chinese remains to be determined. Therefore, the purpose of this study is to establish the biological reference interval of Aspergillus specific antibody IgG in our laboratory. **Methods** The serum of the healthy individuals who had physical examination in our hospital from October to December 2019 was randomly collected. The serum was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with Aspergillus specific antibody IgG test kit from Dynamiker. Statistical analysis software SPSS 25.0 was used to establish a biological reference interval suitable for our laboratory in accordance with the requirements of CLSI-EP28-A3c. **Results** 291 healthy individuals with a median age of 37 (range 19~82 years old) were included, including 141 males, 38 (range 19~82 years old) and 150 females, 38 (range 20~78 years old). The levels of serum Aspergillus specific antibody IgG in male and female healthy adults were 20.579 (43.618) AU/mL and 28.387 (48.158) AU/mL, respectively. The difference was statistically significant ($P=0.011$). Therefore, the reference interval of Aspergillus specific antibody IgG level was established separately between male and female, which was less than 111.405 AU/mL for male and less than 181.888 AU/mL for female. **Conclusions** The biological reference interval of Aspergillus specific antibody IgG in the serum of the laboratory was preliminarily

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-5820.2020.03.003

作者单位: 200123 上海, 同济大学附属东方医院检验科

通信作者: 吴文娟, Email: wwj1210@126.com

established according to different genders, which provided a reference standard for clinical diagnosis of related diseases.

【Key words】 Biological reference interval; Aspergillus specific antibody IgG; Chronic pulmonary aspergillosis

慢性肺曲霉病 (Chronic Pulmonary Aspergillosis, CPA) 是由烟曲霉等曲霉菌引起的一种进展缓慢的肺部真菌感染性疾病。全世界约有 300 万人患有 CPA^[1], 1 年、5 年和 10 年生存率分别为 86%、62% 和 47%^[2]。CPA 漏诊或延迟诊断几乎 100% 致命, 但早期诊断和治疗使 CPA 的病死率明显降低。目前 CPA 的明确诊断并不容易, 仍具有挑战性。CPA 诊断需要结合宿主情况、临床和影像学表现, 以及微生物学证据和血清学证据。由于患者个体的复杂性, 临床症状和影像学表现往往不具有特异性, 真菌培养阳性率低, 同时金标准肺活检为侵入性检测, 患者耐受性差。因此, 一种新的有效的血清学标志物对早期诊断具有重要意义。曲霉 IgG 抗体是针对曲霉感染引起机体产生特异性抗体, 血清曲霉 IgG 抗体水平升高, 提示曲霉菌感染。研究指出, CPA 患者只有 26% 患者曲霉培养阳性, 但 99% 的 CPA 患者存在曲霉菌特异性 IgG 升高^[3]。2016 年, 美国传染病学会 (IDSA) 和欧洲临床微生物学及传染病学会 (ESCMID) 与欧洲呼吸学会 (ERS) 合作, 发布了 CPA 诊断指南^[4,5]。这两项指南均建议将曲霉 IgG 抗体检测作为诊断 CPA 关键指标。然而, 目前大多数曲霉 IgG 抗体临床数据来自欧洲国家, 中国人的曲霉特异性 IgG 抗体的生物参考区间仍有待确定, 而且不同厂家试剂的参考范围均不相同。在临床实践中, 实验室给临床提供曲霉 IgG 抗体可靠的生物参考区间, 方能使临床对患者的诊断做出明确的判断, 因此建立适合本实验室曲霉 IgG 抗体的生物学参考区间具有重要的意义。本研究依据美国临床实验室标准化协会 (CLSI)EP28-A3c 文件^[6] 推荐方法, 收集不同性别、年龄的健康个体血液标本, 采用双抗体夹心法测定血清中曲霉 IgG 抗体水平, 旨在建立本实验室血清曲霉 IgG 抗体生物学参考区间, 现将结果报道如下。

资料与方法

1. 研究对象: 随机选取 2019 年 10 月至 12 月在本院进行健康体检的成年人。纳入标准: 白细胞计数正常, 肝肾功能正常, 肺部 CT 无结节、

无曲霉影像学表现的健康体检人群。最终纳入 291 名患者健康个体, 中位年龄 37 岁 (19 岁~82 岁), 其中男 141 名, 中位年龄 38 岁 (19 岁~82 岁), 女 150 名, 中位年龄 38 岁 (20 岁~78 岁)。

2. 标本收集: 用红色普管真空采血管采集健康体检者的空腹静脉血标本 4 mL~5 mL, 3000 r/min 离心 10 min, 收集上层血清。储存于 -80°C 冰箱后统一检测。

3. 仪器与试剂: ADC ELISA 200 全自动酶联免疫工作站及原装配套试剂, 试剂为曲霉 IgG 抗体检测试剂盒 (酶联免疫法), 内含酶标板、标准品、样本稀释液、底物、终止液和阴阳性质控物。厂家: 丹娜 (天津) 生物科技有限公司。检验原理: 将稀释后的患者血清样本加到包被有曲霉特异性抗原的酶标板中, 血清中的曲霉 IgG 抗体便与抗原结合。再加入抗人 IgG 酶标抗体和 TMB 底物产生显色反应, 用酶标仪在 450 nm 波长下测定其吸光度。通过标准曲线计算样本中曲霉 IgG 抗体浓度, 实现对曲霉 IgG 抗体的检测。

4. 剔除离群值: 根据美国临床实验室标准化协会 (CLSI)EP28-A3c 文件, 建立生物参考区间。首先, 将上述收集 291 例健康参考个体进行曲霉 IgG 抗体浓度测定后, 将检测结果先做离群点的判断, 剔除离群值。数据中的疑似离群点的判断: 将疑似离群点和其相邻点的差值 (D) 和数据全距 (R) 相除, 若某个观测点的 D 值 $\geq 1/3R$ 值, 考虑为离群点。若有 2 个或以上疑似离群点, 将最小的疑似离群点如上作处理, 若 $1/3R$ 值, 则所有点都剔除; 若 $< 1/3R$ 值, 则保留所有数据。若有离群点被剔除后, 应即将其他数据补上^[6]。

5. 生物参考区间的建立: 采用 SPSS 25.0 软件对剔除后的数据进行分析, 绘制频数分布图, 观察曲霉 IgG 数据分布是否呈高斯正态分布。若数据呈高斯正态分布, 用 $(\bar{x} \pm 1.96 s)$ 表示 95% 数据分布范围; 若是数据不呈高斯正态分布, 则单侧采用 P5 的下限或 P95 的上限, 以此确定参考区间。若检验项目是存在性别或年龄上的生物差异, 确定分组后分别计算相应的生物参考区间。

结 果

1. 曲霉 IgG 抗体数据剔除离群值

291 位健康个体血清标本曲霉 IgG 抗体检测结果分布见图 1。采用 SPSS 25.0 软件进行分析，目测数据“622.624”为可疑离群点，用 CLSI-EP28-A3c 文件方法判断离群点：将疑似离群点和其相邻点 D 和 R 相除， $D/R < 1/3$ ，故不属离群点不需剔除。

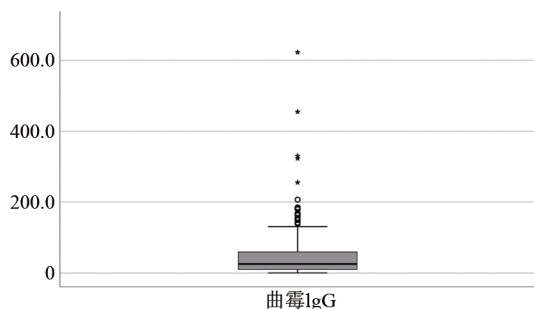


图 1 291 位健康个体曲霉 IgG 抗体测定结果箱图

2. 曲霉 IgG 抗体的生物参考区间

最终 291 名健康个体用于曲霉 IgG 抗体的生物参考区间的建立，其中男性 141 名，女性 150 名，男女年龄（中位数，P75~P25）分别为 38 岁（19 岁）和 38 岁（16）岁，男女个体间年龄无统计学差异（ $P=0.906$ ）。男性和女性健康成年人血清曲霉 IgG 抗体水平（中位数，P75~P25）分别为 20.579(43.618) AU/mL 和 28.387(48.158) AU/mL，差异有统计学意义（ $P=0.011$ ，如表 1），提示需要依据男女性别差异分别建立参考区间。男性和女性曲霉 IgG 抗体水平绘制成直方图（如图 2），可知曲霉 IgG 抗体检测结果不呈高斯正态分布。依据 EP28-A3c 参考方法，生物参考区间不宜采用 $(\bar{x} \pm 1.96 s)$ 表示，应用非参数检验 P95 数据分布范围。以曲霉 IgG 抗体百分位数法确定 95% 位数的参考值确定参考区间。

讨 论

慢性肺曲霉病是一种难治的肺部疾病，好发于

肺部基础疾病患者，如支气管扩张症、慢性阻塞性肺疾病、肺结核和肺结节病等 [7-9]。因此 CPA 隐蔽易被其基础疾病掩盖，不易诊断，易被忽视或误诊，如不及时积极治疗病死率高 [10]。因此需提高临床医师对 CPA 的全面认识，以期尽早明确诊断，并给予恰当治疗，以降低其病死率。

曲霉 IgG 抗体检测是针对曲霉感染引起机体产生特异性抗体的检测方法。早期筛查并对可疑患者及时诊断，进而早发现和早治疗，可以提高慢性肺曲霉病患者的生存率，延长生存时间。美国 IDSA 肺曲霉病管理指南（2016 年版）提出，血清曲霉 IgG 抗体是诊断慢性肺曲霉病的重要指标之一 [4]。血清曲霉 IgG 抗体的增高提示慢性肺曲霉病。此外，曲霉 IgG 抗体检测不仅对肺曲霉病的早期临床诊断具有重要意义，其血清水平的变化能够直观的反映阳性患者抗真菌治疗的疗效 [11]。

生物参考区间是临床判断健康与否的标准，实验室必须保证给临床提供的生物参考区间正确适用，否则会导致误诊，甚至错误的治疗，实验室建立生物参考区间工作意义重大。本研究结果显示，男性和女性健康成年人血清曲霉 IgG 抗体水平差异有统计学意义，且男性和女性健康个体的年龄无统计学差异，提示本研究中男女性血清曲霉 IgG 抗体水平的别差异不是由入组个体年龄所致。最终，本实验室依据健康人群建立的血清曲霉 IgG 抗体参考区间为男性曲霉 IgG 抗体水平 < 111.405 AU/mL，女性曲霉 IgG 抗体水平 < 181.888 AU/mL。该参考范围与既往研究的参考范围相比较有差异。首先，本研究首次提出曲霉 IgG 抗体参考水平男女存在差异。男性血清曲霉 IgG 抗体水平参考上限低于女性血清曲霉 IgG 抗体水平参考上限，原因尚不清楚。猜测可能与男性睾丸素高于女性睾丸素有关，女性体内的睾丸素仅有男性的 1/10。睾丸素可减少 B 细胞的数量，B 细胞是脾脏产生的会释放抗体的淋巴细胞 [12]。其次，曲霉 IgG 抗体正常参考范围数值与既往研究存在一定差异。北京一项研究指出，诊断 CPA 的曲霉特异性 IgG(丹娜)的 CUT-OFF 值为

表 1 291 例健康个体曲霉 IgG 抗体测定结果

	全部	男	女	P 值
例数 (n)	291	141	150	
年龄 (岁)	37(18)	38(20)	38(16)	0.906
曲霉 IgG(AU/mL)	25.493(50.061)	20.579(43.618)	28.387(48.158)	0.011
P95	151.829	111.405	181.888	

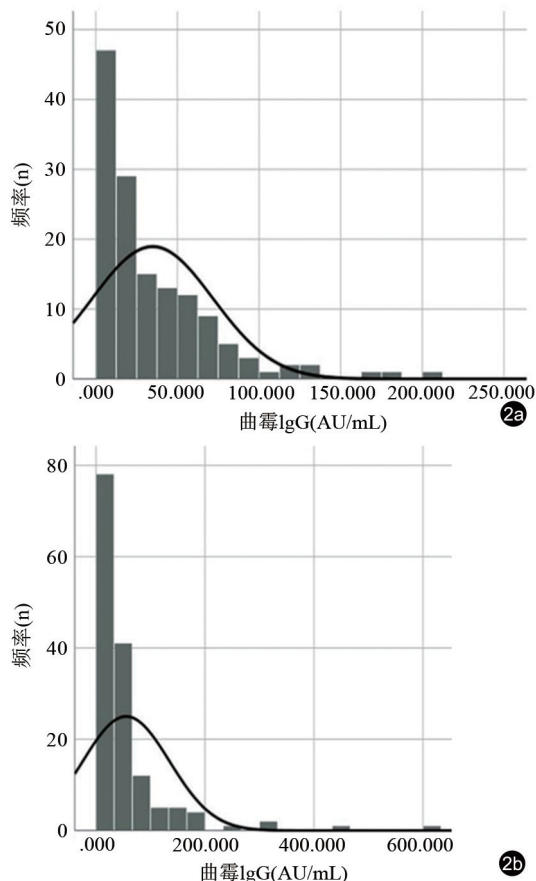


图 2 A: 141 例男性健康个体曲霉 IgG 抗体检测结果频数分布; B: 150 例女性健康个体曲霉 IgG 抗体检测结果频数分布; 均呈非正态分布

89.3 AU/mL 时, 敏感性和特异性分别为 78.6% 和 94.4%^[13]。其临界值与本研究有明显差异, 可能原因为该研究不仅纳入其他肺部基础疾病患者和健康人同时作为对照组, 还纳入 CPA 病例组进行 CUT-OFF 值确定, 而本研究仅针对健康个体。阿曼一项纳入 121 名阿曼成年健康个体的研究指出, 运用瑞典赛默飞自动荧光酶免疫分析系统检测曲霉 IgG 抗体的正常参考范围为 2.0 mgA/L~68.7 mgA/L^[14]。同时另一项纳入 137 例 CPA 患者和 50 例健康对照的研究显示, 曲霉特异性 IgG(瑞典赛默飞)的 CUT-OFF 值为 27.3 mgA/L 时, 敏感性和特异性分别为 95.6% 和 100%^[15]。一项英国研究发现, IMMULITE 2000(西门子, 德国)全自动化学发光免疫分析仪检测曲霉特异性 IgG 抗体的 cut-off 值为 20 mgA/L 时诊断 CPA 为最佳临界值^[16], 这项研究也包括了健康的对照组和 CPA 疾病对照组。因此, 本研究曲霉 IgG 抗体生物参考区间与既往其他研究不一致, 可能与不同地理环境、不同人群、

试剂厂家不一致相关。不同地理区域对曲霉的环境暴露有所不同, 其抗体水平也可能不同。不同人群如年龄、人种不一致, 或纳入的疾病组与健康对照不一致, 可能是导致抗体参考范围不同的原因之一。此外, 本研究采用中国国家食品药品监督管理局批准的天津丹娜公司最新版本的曲霉特异性 IgG 检测试剂盒。丹娜曲霉特异性 IgG 抗体以纯化的半乳糖甘露糖作为其唯一抗原, 而其他试剂盒则使用真菌提取物或重组抗原, 也可能是原因之一。

本研究首次提出为中国健康成年人建立适于中国人群的曲霉特异性 IgG 水平生物参考范围, 同时也首次提出男性和女性成年人应分别建立曲霉 IgG 抗体的正常参考范围。与其他研究相比, 样本量是足够的, 符合 CLSI 的建议。同时, 本研究也存在自身的不足。本研究收集的标本量虽满足参考区间所要求的至少 120 例, 但样本量仍有限, 日后可增加更多样本量, 提高对参考区间估计的精密密度。此外生物参考区间验证可以列入定期评审的内容, 因为验证能科学识别生物参考区间的适用性, 保证检验科提供临床可靠的生物参考区间。

综上所述, 本研究检测了健康成年人血清中曲霉 IgG 水平, 建立了本实验室男女性血清中曲霉 IgG 抗体水平生物学参考区间, 为今后该指标的检测和判断提供参考。引用生物参考区间时要注意双方的实验方法和试剂必须一致, 不同的实验方法以及检测仪器检测结果有不同的参考区间。

参 考 文 献

- 1 Brown GD, Denning DW, Gow NA, et al. Hidden killers: human fungal infections[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(165):165.
- 2 Lowes D, Al-Shair K, Newton PJ, et al. Predictors of mortality in chronic pulmonary aspergillosis [J]. *Eur Respir J*, 2017, 49(2): 1601062.
- 3 Jhun BW, Jeon K, Eom JS, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic pulmonary aspergillosis[J]. *Med Mycol*, 2013, 51(8):811-817.
- 4 Patterson TF, Thompson GR 3rd, Denning DW, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America[J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63(4):e1-e60.
- 5 Denning DW, Cadranet J, Beigelman-Aubry C, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management[J]. *Eur Respir J*, 2016, 47(1):45-68.
- 6 Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approve guideline-Third Edition CLSI document EP28-A3c[S]. Wayne USA, 2010.
- 7 Everaerts S, Lagrou K, Dubbeldam A, et al. Sensitization to

- Aspergillus fumigatus as a risk factor for bronchiectasis in COPD[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2017, 12:2629-2638.
- 8 Hedayati MT, Azimi Y, Drouinia A, et al. Prevalence of chronic pulmonary aspergillosis in patients with tuberculosis from Iran[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34(9):1759-1765.
- 9 Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis[J]. Eur Respir J, 2013, 41(3):621-626.
- 10 Nam HS, Jeon K, Um SW, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a review of 43 cases[J]. Int J Infect Dis, 2010, 14(6):479-482.
- 11 Li H, Rui Y, Zhou W, et al. Role of the Aspergillus-Specific IgG and IgM Test in the Diagnosis and Follow-Up of Chronic Pulmonary Aspergillosis[J]. Front Microbiol, 2019, 10:1438.
- 12 Wilhelmson AS, Lantero Rodriguez M, Stubelius A, et al. Testosterone is an endogenous regulator of BAFF and splenic B cell number[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):2067.
- 13 Ma X, Wang K, Zhao X, et al. Prospective study of the serum Aspergillus-specific IgG, IgA and IgM assays for chronic pulmonary aspergillosis diagnosis[J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1):694.
- 14 Al-Rahman M, Al Kindi M, Kutty I, et al. Determination of an aspergillus fumigatus-specific immunoglobulin G reference range in an adult omani population[J]. Sultan Qaboos Univ Med J, 2018, 18(1):e43-e46.
- 15 Sehgal IS, Choudhary H, Dhooria S, et al. Diagnostic cut-off of Aspergillus fumigatus-specific IgG in the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis[J]. Mycoses, 2018, 61(10):770-776.
- 16 Page ID, Richardson MD, Denning DW. Comparison of six Aspergillus-specific IgG assays for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA) [J]. J Infect, 2016, 72(2):240-249.
- (收稿日期: 2020-03-06)
(本文编辑: 黄雪秋)

钟霓, 郭建, 慎慧, 等. 曲霉 IgG 抗体的生物参考区间建立 [J/CD]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2020, 8(3): 140-144.