

常見的院內黴菌感染—— 侵襲性麴菌感染的診斷

陳柏齡^{1,2} 李南瑤^{1,2}

國立成功大學醫學院附設醫院 ¹感染管制中心 ²內科部感染科

麴菌普遍存在於環境中，但侵襲性麴菌感染通常只發生於免疫功能不全的病人，而且這個問題近來越來越棘手，主要原因為目前癌症病人接受化學治療和免疫療法的人數持續增加，這群病人因長期免疫低下更容易受到感染。臨床診斷麴菌感染非常困難，組織切片和黴菌培養是目前的診斷的標準，然而培養法敏感性不足，並且無法區分是麴菌移生或感染。切片檢查又常受限於病人因容易出血而無法施行。其他的檢驗方法，例如半乳甘露聚醣檢驗、連鎖聚合酶反應、次世代總體基因體定序，近來於臨床的應用日益普及，這些檢驗方法合併電腦斷層影像檢查，再加上考量病人是否具有麴菌感染的危險因子，可以增加病人提早被診斷出侵襲性麴菌感染，並且增加及早使用抗黴菌藥物治療的機會。在本篇文章中，我們介紹目前臨床常用於侵襲性黴菌感染的診斷工具，和討論這些診斷的敏感性和專一性。（**感控雜誌 2022:32:99-106**）

關鍵詞： 侵襲性黴菌感染、半乳甘露聚醣、連鎖聚合酶反應、次世代總體基因體定序

前言

麴菌 (aspergillus) 是普遍存在於環境中的黴菌 (mold)，對於免疫功能健全的人不會造成危害，但是會在免疫功能不全者造成嚴重的侵襲性麴菌

(invasive aspergillosis, IA) 感染。由於近年來醫療的進步，因為治療而造成免疫功能低下的存活着增加，所以侵襲性黴菌造成的感染有逐年增加的趨勢。但因 IA 診斷困難，需要借助微生物學、病理切片、影像學、血清學

民國 110 年 12 月 6 日受理
民國 110 年 12 月 29 日修正
民國 111 年 2 月 22 日接受刊載

通訊作者：李南瑤
通訊地址：704 台南市勝利路 138 號
連絡電話：06-2353535#3596

DOI: 10.6526/ICJ.202204_32(2).0004

中華民國 111 年 4 月第三十二卷二期

或分子生物診斷工具，縱使如此，IA 診斷率仍然偏低，因此在本篇文章中，回顧侵襲性黴菌感染的臨床表現、致病機轉與診斷工具的最新發展。

流行病學

根據 2020 年歐洲癌症治療及研究組織 (European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTC 2020) 相關侵襲性肺部感染的風險因子條件所列，包括最近中性球低下 [$500 \text{ neutrophils/mm}^3$] 超過 10 天、血液惡性疾病、接受異體血液幹細胞移植、器官移植病人、長期使用皮質類固醇 (過去 60 天內接受治療劑量超過每天超過 0.3 mg/kg ，持續超過三週)、過去 90 天內接受 T 細胞免疫抑制劑 (例如、calcineurin inhibitors、tumor necrosis factor- α blockers、lymphocyte specific monoclonal antibodies、immunosuppressive nucleoside analogues)、接受 B 細胞免疫抑制劑治療 (如 Bruton's tyrosine kinase inhibitors, ibrutinib)、遺傳性嚴重免疫缺陷 (如 chronic granulomatous disease、STAT 3 deficiency、severe combined immunodeficiency)、第三或第四級急性器官排斥，影響到腸胃道、肺部或肝臟，並且對於第一線類固醇治療反應不佳[1]。但近年來也發現，嚴重流感病毒感染後，IA 的

感染風險上升，不但如此，一旦發生 IA，死亡率也會上升。2020 年底開始的 COVID-19 疫情，迅速蔓延至全球，目前還無停歇的跡象，研究也顯示，COVID-19 也是 IA 的風險因子[2]。由於具有 IA 高風險的病人，大多是必須要在醫療機構或是加護病房治療的病人，因此 IA 也是醫療機構內常見的感染，根據美國的統計，麴菌感染是僅次於念珠菌感染 (candidiasis) 的常見院內黴菌感染 [3]。

最常造成 IA 的麴菌菌種是 *A. fumigatus*、*A. flavus* 和 *A. niger* 造成的感染，前述這三種菌種對於 polyene 類藥物 (如 amphotericin B) 具有敏感性，值得注意的是對於 polyene 類藥物具有抗藥性的菌種 *A. terreus*，此菌種在美國所引起的 IA 感染僅次於 *A. fumigatus*，而且對於抗黴菌藥物的治療反應較差。

臨床表現

IA 的感染最常發生在肺部和鼻竇，病人經由吸入分生孢子 (conidia) 而感染，少數可見於腸胃道、皮膚、眼睛和中樞神經感染。臨床症狀常依感染部位而有不同表現，由於感染者免疫力不佳，因此臨床表現時常不典型，例如肺部感染，診斷常在影像學檢查時意外發現。

疾病診斷

確診 IA 非常困難，電腦斷層攝

影 (computed tomography, CT) 影像目前仍然是肺部麴菌感染診斷最敏感的影像診斷工具，早期病灶包括 halo sign，晚期的病灶會出現 air-crescent sign，或是在 CT-angiography 下可以看到周邊血管阻塞的病灶，上述典型病灶比較常出現在血液惡性腫瘤病人，但是其他族群病人並不容易出現這些典型病灶。另外麴菌很難從無菌部位檢體培養，病理切片常受限於病人狀況不佳無法接受外科手術或切片診斷，此外，由於麴菌普遍存在環境中，因此非無菌部位培養陽性可能代表移生 (colonization)，尤其是免疫功能正常者要診斷 IA 前需要三思，反之，免疫功能低下者培養出麴菌則要非常謹慎，因為有可能是 IA。

病理切片麴菌可以被 Gomori methenamine silver (GMS) or Periodic acid Schiff (PAS) 染色而方便觀察，IA 的病理組織可以看到分隔 (septate) 且呈現銳角夾角的菌絲 (hyphae) 交錯，並且有合併周圍組織或血管的侵犯，但是很可惜的是，此項特徵不容易與其他黴菌菌絲區分，因此常需要借助其他檢驗工具，例如血清學或聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 檢驗。

根據 EORTC 的診斷原則，可以將 IA 分成確認感染、極可能感染、可能感染 (proven infection、probable infection 以及 possible infection)，proven infection 必須要符合下列條件之一：鏡檢條件、培養條件或是組織

核酸檢驗條件 (表一)，但若無法取得合適檢體進行培養或病理化驗，就必須依賴是否具有宿主因子、臨床表現和微生物證據三條件，做成 probable infection 的診斷 (表二)。若是高度懷疑，但無法滿足 probable infection 的診斷三條件，就屬於 possible infection，嚴重病毒感染後併發的 IA，因為病人常常沒有傳統認知的宿主因子，因此依照診斷原則會歸屬於 possible infection，目前有專家提出依照 EORTC 診斷標準的精神，針對嚴重流感或新冠病毒感染後併發的可能 IA 提出診斷標準[4]，但還需要後續更多的證據驗證。

基質輔助激光解吸電離-飛行時間質譜儀 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF)

MALDI-TOF 質譜儀是目前台灣多家醫院微生物檢驗室都有的配備，它可以快速並且正確地診斷從組織或體液培養出的麴菌，但是麴菌很難培養，因此 MALDI-TOF 可以幫助鑑定分離菌株，但對於培養陰性的 IA 則幫忙有限[5]。

血清學檢驗

一、半乳甘露聚糖抗原 (galactomannan, GM)

目前臨床上診斷非常依靠血清學診斷 IA，利用抗體偵測體液中是否有出現麴菌細胞壁成分一

表一 EORTC 侵襲性麴菌感染確診條件摘錄[2]

無菌部位檢體 鏡檢分析	無菌部位 檢體培養	血液	血清學	組織核酸檢驗
組織學、細胞學或顯 微鏡觀察細針抽吸或 是切片檢體內，出現 菌絲 (hyphae) 並伴 隨周圍組織的破壞	從無菌手術取得的檢體 中培養出黴菌，符合臨 床或影像學感染表現， 但不包括肺泡沖洗液、 鼻竇 (paranasal sinus)、 乳突竇 (mastoid sinus)、 尿液培養	血液培養 分離出黴 菌	不適用	福馬林固定石蠟包埋 (formalin-fixed paraffin- embedded tissue) 檢體出現 黴菌菌體，並以核酸增幅 反應合併 DNA 序列定序 確定

表二 EORTC 侵襲性麴菌可能感染條件摘錄[2]

宿主條件	臨床特徵	微生物證據
<ul style="list-style-type: none"> • 中性球低下 $500 \text{ neutrophils/mm}^3$ 超過 10 天 • 血液惡性疾病 • 接受異體血液幹細胞移植 • 器官移植病人 • 長期使用皮質類固醇 (過去 60 天內接受治療劑量超過每天超過 0.3 mg/kg，持續超過三週) • 過去 90 天內接受 T 細胞免疫抑制劑 (例如、calcineurin inhibitors、tumor necrosis factor-α blockers、lymphocyte specific monoclonal antibodies、immunosuppressive nucleoside analogues) • 接受 B 細胞免疫抑制劑治療 (如 Bruton's tyrosine kinase inhibitors, ibrutinib) • 遺傳性嚴重免疫缺陷 (如 chronic granulomatous disease、STAT 3 deficiency、severe combined immunodeficiency) • 第三或第四級急性器官排斥，影響到腸胃道、肺部或肝臟，並且對於第一線類固醇治療反應不佳 	<ul style="list-style-type: none"> • 肺部麴菌感染 <ul style="list-style-type: none"> ■ CT 出現下列四種型態之一： ■ 出現實心病灶，周邊界線完整，出現/或 halo sign ■ Air crescent sign ■ 開動 ■ 楔型、局部或大葉肺部實質化 • 氣管支氣管炎 <ul style="list-style-type: none"> ■ 支氣管鏡檢查發現氣管支氣管潰瘍、結節、偽膜 (pseudomembrane)、斑塊 (plaque) 或是焦痂 (eschar) • 鼻-鼻竇病變 <ul style="list-style-type: none"> ■ 急性局部疼痛 (包括輻射到眼部的疼痛) ■ 鼻部潰瘍合併焦痂 ■ 病灶從鼻竇侵犯骨骼並且擴散，包括侵犯至眼眶 • 中樞神經感染 (出現下列任一條件) <ul style="list-style-type: none"> ■ 影像學出現局部病變 ■ MRI 或 CT 顯示腦膜顯影 	<ul style="list-style-type: none"> • 麴菌從痰液、肺泡沖洗液、支氣管刷 (bronchial brush) 或抽吸檢體 • GM 抗原檢驗陽性 (符合下列任一條件) • 一次血漿或血清 ODI ≥ 1.0 • 肺泡沖洗液 ODI ≥ 1.0 • 一次血漿或血清 ODI ≥ 0.7 和肺泡沖洗液 ODI ≥ 0.8 • 腦脊髓液 ODI ≥ 1.0 • 麴菌 PCR • 血漿、血清或全血檢體檢驗 ≥ 2 次陽性 • 肺泡沖洗液 PCR 檢驗 ≥ 2 次陽性 • 至少血漿、血清或全血檢體檢驗 1 次陽性再加上肺泡沖洗液 PCR 檢驗 1 次陽性

半乳甘露聚糖抗原，例如上市的 Platelia Aspergillus EIA/Ag (Bio-Rad, Redmond, WA, USA)，若檢驗結果光密度 (optical density index, ODI) 超過 0.5，診斷確診或疑似 IA 的敏感性及專一性為 78% 和 85% [6]，若提高 ODI 診斷標準，則診斷 IA 的敏感性會下降，但專一性會提升，目前 EORCT 建議的診斷標準是符合下列任一條件：1. 一次血漿或血清 ODI ≥ 1.0 ；2. 肺泡沖洗液 ODI ≥ 1.0 ；3. 一次血漿或血清 ODI ≥ 0.7 和肺泡沖洗液 ODI ≥ 0.8 ；4. 腦脊髓液 ODI ≥ 1.0 。GM 檢驗可以用於追蹤黴菌藥物治療效果和預測預後，若連續監測結果 ODI 值比基礎值上升，病人的預後較差。連續其他黴菌感染也可能 GM 檢驗陽性，例如 Histoplasmaosis (組織孢漿菌感染)、Fusariosis (鐮孢菌感染) 或是 Talaromycosis (青黴菌感染)。由於此項檢查必須在標準實驗室進行，檢驗時間花費較長，無法成為定點照護檢驗 (point of care testing, POCT)。

二、1,3-B-D-glucan (BDG) assay

BDG (Fungitell, East Falmouth, MA, USA) 是一種利用 enzyme-linked immunosorbent assay (EIA) 分析偵測真菌細胞壁成分 (1-3)- β -d-glucan polysaccharide，在 2004 年獲得美國 FDA 的核准上市，另外 Wako β -glucan (Fujifilm Wako Chemicals) 是在歐洲上市的 BDG 檢驗。此一

成分在念珠菌、麴菌和人類肺囊蟲 (*Pneumocystitis jirovecii*) 的細胞壁都有此種成分，因此 BDG 檢驗在診斷 IA 的專一性較低，但是和 GM 檢驗相比，它的敏感性較高 [5]。

三、側向流體免疫層析試紙分析法 (lateral flow immunochromatography)

側向流體免疫層析試紙分析法是現代快速生物感測的重要方法之一，目前已有在歐洲上市的快篩試劑 (AspLFD, OLM Diagnostics, Newcastle upon Tyne, UK 和 sona *Aspergillus* Lateral Flow Assay, Norman, OK, USA) 可用於定點照護檢驗，檢驗時間只需 15~45 分鐘。在血液惡性腫瘤病人，這兩種檢驗工具診斷 IA 的敏感性可達 78~89%，專一性 88~100%，但是對於非血液惡性腫瘤病人，診斷的正確率則下降 [5]。

四、Aspergillus-specific immunoglobulin G or E (IgG or IgE)

慢性肺部麴菌感染 (chronic pulmonary aspergillosis, CPA) 或是過敏性麴菌感染 (allergic aspergillosis, AA) 是屬於慢性疾病，臨床表現迥異於發生在免疫功能低下病人的 IA，但這類病人由於長期有麴菌移生在氣管/支氣管內，所以 CPA 病人體內會有上升的麴菌專一 IgG 抗體濃度，而 AA 病人體內會有上升的麴菌專一 IgE 抗體濃度，但在急性 IA 病人體

內這類抗體濃度鮮少上升，因此對於診斷 IA 的幫助有限[7]。

分生檢測

一、Aspergillus PCR-Based Testing

利用 PCR 診斷 IA 的研究報告很多，但是各個研究的敏感性和專一性差異很大，由於 PCR 檢驗極其敏感，若環境中的麴菌污染了檢體，則會產生偽陽性檢驗結果。若我們採用 2020 年 EORTC 的建議，必須連續兩次血漿/血清或肺泡沖洗液 PCR 結果呈現陽性，整體的敏感性和專一性會提高。造成此種差異的原因可能是每個實驗室的操作步驟缺乏一致的標準所導致的，European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI) 小組建議檢驗的流程採取一致性的標準，PCR 的敏感性可以從 85% 提高至 98%，專一性從 82% 提升至 87% [8]。目前已有上市的麴菌 PCR 套組，AsperGenius® (Pathonostics, Maastricht, The Netherlands) 可以偵測常見的麴菌菌種 (如 *A. fumigatus*、*A. terreus*)，並且可以偵測對於 azole 類藥物產生抗藥性的基因位點 *cyp51A*，利用肺泡沖洗液檢驗 IA 的敏感性和特異性分別為 77% 和 94%，血清檢體的敏感性和特異性分別為 60~79% 和 80~95% [5]。

二、總體基因次世代定序 mNGS (metagenomic next-generation

sequencing)

mNGS 是直接從檢體提取生物的 DNA，利用名為「shotgun」的定序技術，並且把人類的基因利用電腦運算後排除，之後微生物的基因序列在和基因庫比對，最後做成鑑定。在一個針對 114 位血液幹細胞移植病人，發生肺部感染的研究，利用 mNGS 診斷 IA，確診/疑似 IA 的敏感性為 31%，特異性為 100%，但是診斷其他非麴菌感染的敏感性可以達到 79%，特異性也是 100% [9]。在中國上海某家醫學中心進行的 mNGS 研究，347 個感染案例中，73.5% 屬於下呼吸道感染，因此送驗的 511 個臨床檢體有 68.6% 屬於下呼吸道檢體，利用 mNGS 可以增加 3.7 倍診斷麴菌感染的機會 (odds ratio = 3.7) [10]，但 mNGS 臨床診斷目前費用還是很貴，時效性也是一個考慮，因為需要送到核心實驗室進行分析，檢驗費時約 24 小時。

結語

侵襲性黴菌感染若無及早診斷並給予有效的治療，死亡率非常高，疑似病人若無禁忌症，應該盡量接受病理切片及組織培養，搭配血清學或分子生物診斷工具，可以提高確診的機會，mNGS 是一種無特定 (untargeted) 檢驗目標的分子生物診斷工具，由於特異性高可用於輔助診斷，但陰性結果不能用於排除侵襲性

麴菌感染。

參考文獻

1. Donnelly JP, et al: Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis* 2020;71:1367-76.
2. White PL, et al: national strategy to diagnose COVID-19 associated invasive fungal disease in the ICU. *Clin Infect Dis* 2021;73:e1634-e1644.
3. Wilson LS, et al: The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value Health* 2002;5:26-34.
4. Verweij PE, et al: Review of influenza-associated pulmonary aspergillosis in ICU patients and proposal for a case definition: an expert opinion. *Intensive Care Med* 2020;46:1524-35.
5. Freeman Weiss Z, Leon A, Koo S: The Evolving Landscape of Fungal Diagnostics, Current and Emerging Microbiological Approaches. *J Fungi (Basel)* 2021:7.
6. Marino C, Rinflerch A, de Lederkremer RM: Galactofuranose antigens, a target for diagnosis of fungal infections in humans. *Future Sci OA* 2017;3:FSO199.
7. Page ID, Richardson M, Denning DW: Antibody testing in aspergillosis--quo vadis? *Med Mycol* 2015;53:417-39.
8. White PL, et al: Aspergillus Polymerase Chain Reaction: Systematic Review of Evidence for Clinical Use in Comparison With Antigen Testing. *Clin Infect Dis* 2015;61:1293-303.
9. Hill JA, et al: Liquid Biopsy for Invasive Mold Infections in Hematopoietic Cell Transplant Recipients With Pneumonia Through Next-Generation Sequencing of Microbial Cell-Free DNA in Plasma. *Clin Infect Dis* 2021;73:3876-83.
10. Miao Q, et al: Microbiological Diagnostic Performance of Metagenomic Next-generation Sequencing When Applied to Clinical Practice. *Clin Infect Dis* 2018;67:231-40.

Diagnosis of Invasive Aspergillus Infection - A Common Infection in Hospitals

Po-Lin Chen^{1,2}, Nan-Yao Lee^{1,2}

Department of Internal Medicine, National Cheng Kung University Hospital, College of Medicine,

National Cheng Kung University ¹Center for Infection Control,

²Division of infectious disease, Tainan, Taiwan

Aspergillus species are universally present in the environment. Invasive Aspergillus infections usually occur in immunocompromised patients. It has become a serious problem largely due to the growing number of cancer patients who receive chemotherapy or immunotherapy, which prolongs the duration of immunocompromise. Diagnosis is the most challenging aspect of dealing with Aspergillus infections. Histology and culture remain the diagnostic gold standards. However, culture is not sensitive and cannot distinguish between colonization and true infections, and an invasive biopsy is usually contraindicated in patients with a bleeding tendency. Other diagnostic methods, such as the galactomannan test, polymerase chain reaction (PCR)-based studies, and metagenomic next-generation sequencing, have been used in clinical settings. These laboratory tests combined with computed tomography and the evaluation of clinical risk factors would promote the early diagnosis and initiation of early antifungal therapy. In this review, we introduce the clinical implications, sensitivity, and specificity of these tests in diagnosing invasive Aspergillus infection.

Key words: Invasive Aspergillus infection, galactomannan, polymerase chain reaction, metagenomic next-generation sequencing