

不同荚膜抗原检测方法对隐球菌脑膜脑炎诊断和疗效评估的价值

季淑娟 倪玲红 张俊丽 黄珺 周志慧 俞云松

【摘要】 目的 评价胶体金免疫层析、乳胶凝集试验、酶联免疫分析 3 种隐球菌荚膜抗原检测方法在隐球菌脑膜脑炎患者诊断和疗效评估中的价值。**方法** 采用上述 3 种方法对 2012 年 10 月至 2015 年 3 月在浙江大学附属邵逸夫医院住院确诊的 57 例颅内感染患者的脑脊液标本进行荚膜抗原检测,评估其对隐球菌脑膜脑炎的诊断价值;采用乳胶凝集试验、酶联免疫分析方法分别对 10 例患者脑脊液荚膜抗原进行动态监测,评估治疗期间脑脊液荚膜抗原水平与疗效的相关性。**结果** 胶体金免疫层析法和乳胶凝集试验对隐球菌脑膜脑炎诊断的敏感度均为 95%,特异度均为 100%;酶联免疫分析法诊断的敏感度及特异度均为 100%;隐球菌脑膜脑炎患者脑脊液荚膜抗原水平随着患者疾病好转逐渐下降。**结论** 3 种方法检测隐球菌荚膜抗原对隐球菌脑膜脑炎患者均具有重要诊断价值,其敏感度和特异度均在 95% 以上。胶体金免疫层析法适用于隐球菌脑膜脑炎患者的快速诊断;脑脊液隐球菌荚膜抗原水平的动态监测对其疗效观察有参考价值。

【关键词】 脑膜炎,隐球菌性; 抗原; 乳胶凝集试验; 酶联免疫

Value of three capsular antigen detection methods in diagnosis and efficacy assessment in patients with cryptococcal meningoencephalitis Ji Shujuan, Ni Linghong, Zhang Junli, Huang Jun, Zhou Zhihui, Yu Yunsong. Department of Infectious Diseases, Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China

Corresponding author: Yu Yunsong, Email: yvys119@163.com

【Abstract】 Objective To assess the value of different kinds of cryptococcal capsular antigen detection methods in diagnosis and efficacy assessment in the patients with cryptococcal meningoencephalitis. **Methods** From October 2012 to March 2015, cerebrospinal fluid (CSF) samples were collected from 57 patients with central nervous system infection who hospitalized in Sir Run Run Shaw Hospital. The cryptococcal capsular antigen in CSF was detected by Lateral flow assay (LFA), Latex agglutination test (LA) and Enzyme immunoassay (EIA). Follow-up study was achieved in 10 patients by detecting the samples of their CSF using LA and EIA, so that the dynamic changes of the antigen level could be obtained and observed during the treatment. **Results** The sensitivity of LFA and LA were both 95%, meanwhile the specificity were both 100%; the sensitivity and specificity of EIA were both 100%. The level of cryptococcal capsular polysaccharide antigen decreased gradually with patients recovering. **Conclusions** All the three different methods could be of great importance for the early diagnosis of cryptococcal meningoencephalitis. LFA should be recommended for screening the disease. Follow-up study by detecting the antigen level of CSF is valued in assessing the treatment efficacy of cryptococcal diseases.

【Key words】 Meningitis, cryptococcal; Antigen; Latex agglutination test; Enzyme immunoassay

隐球菌脑膜脑炎(隐脑)是最常见的真菌颅内感染。随着糖皮质激素、免疫抑制剂的广泛应用及艾滋病的流行,其患病率逐年上升^[1]。我国隐脑的

诊治水平近年来已经有了快速提升,但仍存在不少漏诊误诊的情况,影响隐脑疗效。目前临床上采用脑脊液涂片墨汁染色、真菌培养及隐球菌多糖荚膜抗原检测等方法进行确诊。真菌培养和鉴定一般需要 3 d,培养的阳性率为 55%~80%^[2-3]。墨汁染色操作简单,用时短,但灵敏度仅 50%~80%^[4]。隐球菌荚膜多糖抗原的检测,根据现有文献报道,具有高达 90% 以上的敏感度及特异度^[5-6],已经作为隐脑确诊的依据。本研究主要评价 3 种荚膜抗原检测方法(胶体金免疫层析、乳胶凝集试验和酶联免疫

DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2015.46.003

基金项目:浙江省医药卫生一般研究计划(A类)(2015KYA132)

作者单位:310016 杭州,浙江大学医学院附属邵逸夫医院肝病感染科[季淑娟、倪玲红(研究生)、张俊丽、周志慧、俞云松],检验科(黄珺)

通信作者:俞云松,Email:yvys119@163.com

分析)在隐脑患者诊断中的价值,同时评估脑脊液荚膜抗原水平变化能否作为隐脑患者疗效及预后的重要指标。

对象与方法

一、研究对象

选取 2012 年 10 月至 2015 年 3 月在浙江大学附属邵逸夫医院住院确诊的 57 例颅内感染患者,其中隐脑患者 20 例(经脑脊液培养或墨汁染色确诊);非隐脑患者(结核性脑膜炎、化脓性脑膜炎、病毒性脑膜炎经治疗和随访证实)37 例作为对照,在入院时留取上述 57 例患者脑脊液标本;同时留取 10 例在我院住院和随访的隐脑患者系列脑脊液(每周留取 1 份脑脊液标本),离心处理后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。共获脑脊液标本 151 份:隐脑患者 114 份,非隐脑患者 37 份。本研究获得医院伦理委员会的批准和患者(或家属)知情同意。

二、仪器和试剂

隐球菌荚膜多糖定量检测酶联免疫层析法(ELISA 法)试剂盒,由丹娜(天津)生物科技有限公司提供;胶体金免疫层析法试纸条(CrAg Lateral Flow Assay)及隐球菌抗原测定乳胶凝集法试剂盒(Latex-Cryptococcus Antigen Detection System)为美国 Immuno-Mycologics, Inc 公司产品,已由美国食品药品监督管理局(FDA)批准。

三、方法

1. 胶体金免疫层析法检测:将 1 滴样本稀释液加入到无菌试管中,取 $40\text{ }\mu\text{l}$ 脑脊液样本混合,将隐球菌抗原检测试纸条的白端浸入样本液中,10 min 后读取结果。出现两个条带(检测条带和对照条带)为阳性;仅出现对照条带为阴性;若对照条带未出现,说明检测无效应重新检测。

2. 乳胶凝集试验荚膜抗原检测:用标本稀释液倍比稀释脑脊液,取倍比稀释后的脑脊液样本 $100\text{ }\mu\text{l}$, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵浴 5 min 后,分别取 $25\text{ }\mu\text{l}$ 于反应板上,加乳胶试剂 $25\text{ }\mu\text{l}$,室温匀速 5 min 摇匀观察结果。结果判读:(-)无颗粒,均匀的乳浊液;(+)细小颗粒,乳白色背景;(++)小凝块,云雾状不均匀背景;(+++)小及大凝块,背景悬浮液;++++大的絮状凝块,背景清晰。参照乳胶凝集法试剂盒要求,取 $\geq(++)$ 的结果为阳性结果,效价值为此时的稀释倍数。质控:阳性质控品效价 $\geq(++)$,阴性对照效价 $\leq(+)$,其中一项不符,重新检测。

3. ELISA 法荚膜抗原检测:配制工作洗涤液;取

待测脑脊液标本、标准曲线组样本各 $300\text{ }\mu\text{l}$,分别加入 $100\text{ }\mu\text{l}$ 样本处理液混匀,放入水浴锅 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 3 min 后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $10\text{ }000\text{ }g$ 离心 10 min;分别取 $60\text{ }\mu\text{l}$ 加入混合板孔,再加入酶标抗体 $60\text{ }\mu\text{l}$ 混合,封板, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min;然后每孔转移 $100\text{ }\mu\text{l}$ 至酶标板孔,设空白对照 1 孔,加入样本稀释液 $100\text{ }\mu\text{l}$,封板, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min;揭开封板膜,洗涤酶标板,每孔每次加入不少于 $300\text{ }\mu\text{l}$ 的洗液,洗涤 5 次,再每孔加底物溶液 $100\text{ }\mu\text{l}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min 后每孔加 $50\text{ }\mu\text{l}$ 终止液,加样顺序与加底物顺序相同,混匀后在 450 nm 处读吸光度(A)值。各孔 A 值减去空白对照 A 值后分析。以荚膜多糖浓度为横坐标, A 值为纵坐标,作 Logistic 回归分析得到标准曲线方程,计算样本中荚膜抗原浓度。

结 果

1. 隐球菌荚膜抗原检测结果:20 例隐脑患者脑脊液标本,胶体金法和乳胶凝集试验检测阳性 19 例,阴性 1 例(该患者外院治疗 2 个月后转至我院);酶联免疫分析法检测 20 例均阳性;37 例非隐脑患者 3 种检测方法检测均为阴性。胶体金法和乳胶凝集试验的敏感度为 95%,特异度为 100%;阳性预测值为 100%,阴性预测值为 97.4%。酶联免疫分析法的敏感性及特异度为 100%;阳性预测值及阴性预测值都为 100%;有 1 例已经在外院治疗 2 个月的隐脑患者,入我院时脑脊液隐球菌荚膜抗原胶体金法和乳胶凝集试验检测阴性,酶联免疫分析法检测其抗原水平为 $200\text{ }\mu\text{g/L}$,其余 19 例患者脑脊液隐球菌荚膜抗原浓度均在 $600\text{ }\mu\text{g/L}$ 以上。

2. 隐脑患者荚膜抗原动态检测结果:按 2010 年美国感染性疾病协会(IDSA)隐球菌病治疗指南^[7]对本院住院和随访的隐脑患者进行治疗。对本院初治的 10 例隐脑患者进行荚膜抗原半定量和定量检测。乳胶凝集试验半定量检测结果表明:随着治疗时间的延长,荚膜抗原滴度总体逐渐下降(图 1)。10 例初治隐脑患者治疗前脑脊液荚膜抗原滴度分布在 $1:128\sim 1:65\ 536$,诱导期治疗结束时抗原滴度分布在 $1:4\sim 1:16\ 384$ 。ELISA 法进行荚膜抗原定量动态检测发现:荚膜抗原原浓度总体也呈下降趋势,与半定量检测结果类似(图 2)。治疗前脑脊液荚膜抗原浓度分布在 $(861\sim 1\ 267)\text{ }\mu\text{g/L}$,诱导期治疗结束时荚膜抗原浓度分布在 $(135\sim 1\ 216)\text{ }\mu\text{g/L}$ 。

3. 10 例隐脑患者脑脊液检测结果:10 例隐脑患

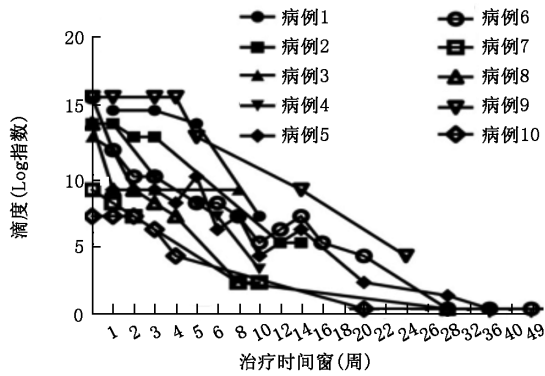


图 1 乳胶凝集试验半定量检测结果

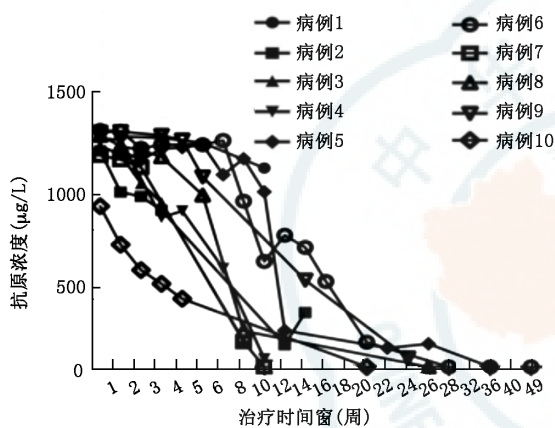


图 2 酶联免疫分析法检测结果

者中仅 1 例患者完成整个疗程的随访,共收集到随访过程中共 15 份脑脊液。通过乳胶凝集试验(图 3)和酶联免疫分析法(图 4)检测其隐球菌荚膜抗原滴度的变化,随着抗真菌治疗,抗原滴度逐步下降,至疗程第 28 周时,2 种方法检测的滴度均下降至 0,该患者接受治疗到 49 周停药。

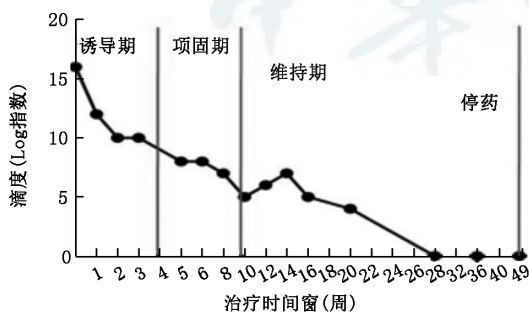


图 3 乳胶凝集试验检测结果

讨 论

脑脊液标本**荚膜多糖抗原检测**已被推荐为确诊隐脑的常用方法,其明显**优于脑脊液涂片墨汁染色及脑脊液真菌培养**^[8]。本研究结果显示:胶体金免

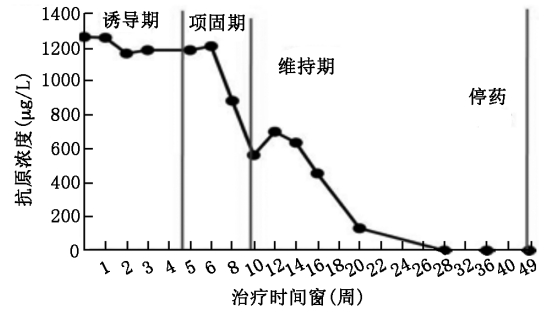


图 4 酶联免疫分析法检测结果

疫层析法和乳胶凝集试验的敏感度为 95%,特异度为 100%,酶联免疫分析法的敏感度及特异度均为 100%。其敏感度明显优于脑脊液墨汁染色找隐球菌和脑脊液隐球菌培养结果^[8]。尽管有研究认为胶体金免疫层析法结果具有比乳胶凝集试验和酶联免疫分析方法具有更高的可信度^[9-10],但本研究结果表明:**3 种方法检测结果的敏感度和特异度差异无统计学意义**。因此,通过上述 3 种方法对颅内感染患者脑脊液标本进行隐球菌荚膜抗原检测对隐脑患者的及时诊治,具有重要价值和临床应用前景,尤其是胶体金免疫层析法同时具有快速(10 min)、便捷、操作简单的特点,可以作为疑似隐脑患者诊断的常用方法。其中有 1 例在外院已经治疗 2 个月的隐脑患者胶体金免疫层析法和乳胶凝集试验检测阴性,酶联免疫分析方法测得其抗原水平为 200 μg/L,可能是胶体金免疫层析法和乳胶凝集试验检测的敏感性不够。

10 例在我院住院和随访的初治隐脑患者脑脊液荚膜定量随访结果显示:在治疗过程中随着隐脑患者临床症状的改善,脑脊液炎症指标的逐渐好转,其抗原水平也逐渐下降,乳胶凝集试验及酶联免疫分析法的检测结果与临床改善均具有较高的符合度。监测荚膜抗原水平有助于判定患者病情变化及药物的疗效,隐球菌荚膜抗原的随访检测对疗效观察有重要价值^[11]。在诱导期治疗结束时,两种方法检测的抗原水平都有明显的下降。两种方法定量检测治疗前荚膜抗原水平最高的是同一患者,该患者起病时病情重,颅内压很高,在药物治疗的同时使用 ommaya 泵穿刺降颅压。随着治疗的进展,荚膜抗原水平逐渐下降。患者在治疗第 13 周拔除 ommaya 泵,在图 3 及图 4 中可见抗原水平都呈现轻度的反跳现象,可能存在少量隐球菌黏附于 ommaya 泵有关。该患者在治疗的 28 周其抗原检测转阴,第 49 周停药。是否可以根

加临床病例进行系统研究。由于本研究的病例数较少,多数还在治疗期,已完成疗程的只有 1 人,同时标本收集处理、实验操作等方面可能存在误差,对于乳胶凝集试验与酶联免疫分析法的优劣,荚膜抗原检测对疾病预后价值的评估以及抗原检测转阴后的停药节点等问题,还有待于进一步扩大临床病例进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis [J]. Infect Dis Clin N Am, 2006, 20(3): 507-544.
- [2] Saha DC, Xess I, Jain N. Evaluation of conventional & serological methods for rapid diagnosis of cryptococcosis [J]. Indian J Med Res, 2008, 127(5): 483-488.
- [3] Yang YL, Chen M, Gu JL, et al. Cryptococcosis in kidney transplant recipients in a Chinese university hospital and a review of publish cases [J]. Int J Infect Dis, 2014, 26: 154-161.
- [4] Dominic RS, Prashanth H, Shenoy S, et al. Diagnostic value of latex agglutination in cryptococcal meningitis [J]. J Lab Physicians, 2009, 1(2): 67-68.
- [5] 王鑫,王冰,张静,等.检测脑脊液抗原抗体对隐球菌性脑膜炎的诊断和疗效评价研究[J].中国全科医学,2012,15(24): 2770-2772.
- [6] Antinori S, Radice A, Galimberti L, et al. The Role of cryptococcal antigen assay in diagnosis and monitoring of cryptococcal meningitis [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(11): 5828-5829.
- [7] Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america [J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(3): 291-322.
- [8] Shah HS, Patel DA, Vegad MM. Evaluation of conventional and serological methods for rapid diagnosis of cryptococcal meningitis in HIV seropositive patients at tertiary care hospital [J]. Natl J Comm Med, 2011, 2(3): 354-357.
- [9] Vijayan T, Chiller T, Klausner JD. Sensitivity and specificity of a new cryptococcal antigen lateral flow assay in serum and cerebrospinal fluid [J]. MLO Med Lab Obs, 2013, 45(3): 16-20.
- [10] Mitchell AP. Updated view of cryptococcus neoformans mating type and virulence [J]. Infect Immun, 2003, 71(9): 4829-4830.
- [11] 卢洪洲,曹天高,周颖杰,等.乳胶凝集试验对新型隐球菌性脑膜炎诊断及治疗的意义[J].中华传染病杂志,2005,23(3): 209-211.

(收稿日期:2015-07-28)

(本文编辑:陈新石)

中华医学会第八届全国肺栓塞与肺血管疾病学术会议 暨第六届国际肺循环研讨会通知

由中华医学会、中华医学会呼吸病学分会主办,国际肺血管病研究院(PVRI)、全国肺栓塞-深静脉血栓形成防治协作组协办、苏州大学附属第一医院承办的“中华医学会第八届全国肺栓塞与肺血管疾病学术会议暨第六届国际肺循环研讨会”定于2016年4月7-10日在苏州市召开。届时将有来自国内外肺血管病和肺循环领域的知名专家针对近年来国内外肺栓塞-深静脉血栓形成、肺动脉高压、肺血管炎等方面的最新进展和指南进行专题报告,介绍国内外在肺循环领域的最新进展,并通过大会发言、专题报告、壁报、书面、热点讨论等形式进行学术交流,以提高我国在此领域的研究和应用水平。大会组委会诚挚地邀请全国各地呼吸科、心脏科、急诊科、风湿免疫科、放射医学、介入医学、超声医学、核医学、血管科、外科、骨科、ICU、妇产科、血液科、肿瘤科、流行病学等与之相关领域的临床医师和基础研究人员积极投稿并会。

征文要求:(1)必须是本次会议前尚未在国内同类学术会议上宣读和交流的科研成果;(2)内容涉及:肺栓塞-深静脉血栓形成、肺动脉高压、高原病、肺血管炎、肺水肿、肺原性

心脏病、肺血管畸形、高压性肺动脉、静脉和毛细血管病变等肺循环领域相关疾病的临床、基础及其他相关研究,包括流行病学、病因和发病机制、影像学诊断技术、诊断策略、治疗规范、预防和康复、最新临床试验、基础研究、研究前景与展望等;(3)为保证质量,请不要将一项研究课题或成果拆分成若干个子课题分别投稿;(4)请以摘要形式投稿,字数不超过320字。请注明作者、单位、邮编。论著摘要须按题目、目的、方法、结果、结论的格式书写;(5)会议只接收在线投稿。为保证投稿后的通讯效率,请第一作者或通信作者本人直接投稿,并尽量避免一个科研单位或科室的稿件通过一个用户名投递。截稿日期:2016年1月31日。

请登录会议网站 <http://www.ctschina.org/pvd2016/cn/> 进行在线注册、投稿、缴费、预定住房及了解会议信息。

会议4月7日全天报到,8-10日学术会议。

联系人:彭勃;电话:010-8929 2552-823;Email:csrd2008@126.com。鞠秀婷;电话:010-85158495;Email:juxiuting@cma.org.cn。