

• 论 著 •

胶体金免疫层析法检测隐球菌荚膜抗原的诊断价值及隐球菌病患者的临床特征分析*

张晓慧, 陆燕飞, 许雨乔, 倪 芳, 刘根焰, 夏文颖[△]

南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏南京 210029

摘要:目的 探讨胶体金免疫层析法(CrAg-LFA)检测隐球菌荚膜抗原在隐球菌病中的诊断价值,并分析隐球菌病患者的临床特征。方法 回顾性分析 2018 年 6 月至 2020 年 6 月于南京医科大学第一附属医院进行 CrAg-LFA 检测的住院患者共 1 623 例。计算 CrAg-LFA 对隐球菌病诊断的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值。同时,分析隐球菌病患者的一般资料、临床表现、实验室检查及治疗。结果 1 623 例研究对象中最终诊断为隐球菌病的患者共 46 例,其中 41 例为肺隐球菌病,隐球菌脑膜炎 2 例,播散性隐球菌病、隐球菌败血症及髂骨隐球菌感染各 1 例。CrAg-LFA 对隐球菌病诊断的灵敏度为 84.8%,特异度为 99.4%。其中,血清 CrAg-LFA 在肺隐球菌病诊断中的灵敏度为 85.4%,特异度为 100.0%,阳性预测值为 100.0%,阴性预测值为 99.6%;脑脊液 CrAg-LFA 检测在隐球菌脑膜炎诊断中的灵敏度和特异度均为 100.0%。46 例隐球菌病患者中有基础疾病的共 30 例(65.2%)。有 55.6% 的肺隐球菌病患者出现了总 IgE 的升高。结论 CrAg-LFA 检测在隐球菌病的诊断中具有重要的临床价值,对隐球菌病患者的临床特征进行分析可指导用药并评估预后。

关键词:隐球菌病; 新生隐球菌; 隐球菌荚膜抗原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.22.006

中图法分类号:R519.4

文章编号:1673-4130(2021)22-2714-04

文献标志码:A

Diagnostic value of colloidal gold immunochromatography for detecting cryptococcal capsule antigen and clinical characteristics in cryptococcal disease patients*

ZHANG Xiaohui, LU Yanfei, XU Yuqiao, NI Fang, LIU Genyan, XIA Wenying[△]

Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China

Abstract: Objective To investigate the diagnostic value of capsule antigen with colloidal gold immunochromatography (CrAg-LFA) for cryptococcal disease, and to analyze the clinical characteristics of patients with cryptococcal disease. **Methods** A retrospective analysis was performed on 1 623 inpatients who underwent CrAg-LFA test from June 2018 to June 2020 in the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of CrAg-LFA in the diagnosis of cryptococcal disease were calculated. Meanwhile, the general data, clinical performance, laboratory examination and treatment of patients with cryptococcal disease were analyzed. **Results** A total of 46 patients with cryptococcal disease were diagnosed in 1 623 subjects, including 41 patients with pulmonary cryptococcosis, 2 with cryptococcal meningitis, 1 with disseminated cryptococcosis, sepsis and iliac bone lesions caused by cryptococcal infection. The sensitivity of CrAg-LFA in the diagnosis of cryptococcal disease was 84.8%, and the specificity was 99.4%. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of serum CrAg-LFA in the diagnosis of pulmonary cryptococcosis were respectively 85.4%, 100.0%, 100.0% and 99.6%, while the sensitivity and specificity of cerebrospinal fluid CrAg-LFA was 100.0% in the diagnosis of cryptococcal meningitis. Among 46 patients with cryptococcal disease, 30 patients (65.2%) had underlying diseases. Total IgE was increased in 55.6% of patients with pulmonary cryptococcosis. **Conclusion** The detection of CrAg-LFA has important clinical value in the diagnosis of cryptococcal disease. Analysis of clinical characteristics of cryptococcal disease patients can guide the use of drugs and evaluate the prognosis.

Key words: cryptococcal disease; cryptococcus neoformans; cryptococcal capsule antigen

* 基金项目:国家临床检验重点专科建设项目;江苏省实验诊断学重点实验室(ZDXKB2016005)。

作者简介:张晓慧,女,主治医师,主要从事临床微生物检验相关研究。△ 通信作者, E-mail:xiawenying21106891@163.com。

本文引用格式:张晓慧,陆燕飞,许雨乔,等.胶体金免疫层析法检测隐球菌荚膜抗原的诊断价值及隐球菌病患者的临床特征分析[J].国际检验医学杂志,2021,42(22):2714-2717.

隐球菌病是由隐球菌引起的一种亚急性或慢性深部真菌病。隐球菌属中对人致病的主要是新生隐球菌和格特隐球菌。格特隐球菌感染好发于免疫功能正常的人群,且具有明显的地域性,如热带、亚热带地区,我国则以新生隐球菌感染为主^[1]。新生隐球菌为条件致病菌,广泛存在于土壤、干鸽粪、灰尘、人体体表、口腔和肠道中,可经呼吸道侵入人体,随血流播散至脑及脑膜,也可侵犯皮肤、骨和其他脏器^[2]。

新生隐球菌菌体周围有一圈肥厚的荚膜,是其主要致病物质。作为其特有的分泌物,隐球菌荚膜多糖抗原的检测可为隐球菌感染的诊断提供依据。胶体金免疫层析法(CrAg-LFA)是近年新兴的一种辅助诊断隐球菌病的检测方法,具有简单、快速、特异度高、灵敏度高特点^[3]。本研究应用 CrAg-LFA 检测隐球菌荚膜多糖抗原,探讨其在隐球菌病诊断中的应用价值,同时对隐球菌病患者的临床特征进行了分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 6 月至 2020 年 6 月于南京医科大学第一附属医院行隐球菌荚膜抗原检测的住院患者 1 623 例作为研究对象,其中男 968 例,女 655 例,送检血清 1 349 例,脑脊液(CSF)226 例,同时送检血清和 CSF 48 例。隐球菌病诊断标准参照《侵袭性真菌病定义共识的修订和更新(2019 年欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组第三版指南更新)》^[4]《隐球菌病处理临床实践指南(2010 年美国感染病学会更新)》^[5]和《肺隐球菌病诊治浙江省专家共识》^[1]。确诊患者均有病原学证据,包括活组织病理检查、病灶穿刺标本涂片和培养、CSF 墨汁染色、真菌培养及荚膜抗原阳性。结合患者临床表现及典型的影像学检查,血清 CrAg-LFA 检测阳性可临床诊断为肺隐球菌病,并可作为开始抗隐球菌治疗的依据。

1.2 试剂与仪器 隐球菌荚膜多糖抗原检测试剂盒(胶体金法)购自美国 Immuno-Mycologics 公司;BACTEC™ FX400 全自动血液培养仪(美国 BD 公司);法国生物梅里埃公司 VITEK2-COMPACT 全自动微生物分析仪及其配套的 YST 鉴定卡。操作步骤严格按照说明书进行。

1.3 方法

1.3.1 资料收集 收集隐球菌病患者一般资料、临

床表现、实验室检查指标,一般资料包括性别、年龄、吸烟史、动物接触史等;临床表现包括无症状、发热、咳嗽、胸闷/胸痛、头痛、恶心、呕吐等;实验室检查指标包括白细胞计数(WBC)、C 反应蛋白(CRP)、IgE 测定水平、(1,3)-β-D 葡聚糖检测(G 试验)、半乳甘露聚糖抗原检测(GM 试验)以及墨汁染色、培养结果等。

1.3.2 隐球菌荚膜抗原检测(胶体金法) 将 1 滴标本稀释液加入小试管内,再加入 40 μL 标本(血清或 CSF),将试纸条的白端没入到标本液中,10 min 后读取结果。结果判读:仅出现 1 个对照条带表明检测结果为阴性,出现 2 个条带(检测条带和对照条带)表明检测结果为阳性,若对照条带未出现说明检测无效,需重新检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以例数或百分率表示。根据四格表资料计算 CrAg-LFA 诊断隐球菌病的灵敏度、特异度、阳性预测值及阴性预测值。灵敏度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数)×100%,特异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数)×100%,阳性预测值=真阳性例数/(真阳性例数+假阳性例数)×100%,阴性预测值=真阴性例数/(真阴性例数+假阴性例数)×100%。

2 结果

2.1 CrAg-LFA 对隐球菌病的检测结果 结果显示,CrAg-LFA 检测总阳性数 48 例,其中 39 例最终诊断为隐球菌病(肺隐球菌病 35 例,隐球菌脑膜炎 2 例,隐球菌败血症 1 例,播散性隐球菌病 1 例),剩余 9 例未行进一步确诊检查,均以“肺部感染”为出院诊断。在 1 575 例 CrAg-LFA 阴性患者中有 7 例确诊为隐球菌病(肺隐球菌病 6 例,髌骨隐球菌感染 1 例),剩余 1 568 例均排除隐球菌感染。CrAg-LFA 对隐球菌病诊断的灵敏度为 84.8%(39/46),特异度为 99.4%(1 568/1 577)。其中,血清 CrAg-LFA 在肺隐球菌病诊断中的灵敏度为 85.4%(35/41),特异度为 100.0%(1 356/1 356),阳性预测值为 100.0%(35/35),阴性预测值为 99.6%(1 356/1 362),而 CSF CrAg-LFA 在隐球菌脑膜炎诊断中的灵敏度(2/2)和特异度(272/272)均为 100.0%。见表 1。

表 1 CrAg-LFA 对隐球菌病患者的检测结果

CrAg-LFA	隐球菌病(n=46)			肺隐球菌病(n=41)			隐球菌脑膜炎(n=2)		
	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计
阳性	39	9*	48	35	0	35	2	0	2
阴性	7	1 568	1 575	6	1 356	1 362	0	272	272
合计	46	1 577	1 623	41	1 356	1 397	2	272	274

注:*代表未进一步确诊。

2.2 隐球菌病患者临床特征分析

2.2.1 一般资料 46 例隐球菌病患者中 65.2%

(30/46)存在基础疾病,有 27 例肺隐球菌病患者有基础病史,按比例依次为高血压病(48.1%)、慢性肝病

(29.6%)、糖尿病(25.9%)、自身免疫性疾病(14.8%)、恶性肿瘤(14.8%)。此外,有 14 例肺隐球菌病患者无基础疾病。41 例肺隐球菌病患者中,33 例患者通过经皮肺穿刺活检病理结果得以确诊,8 例通过 CrAg-LFA 检测、典型影像学特征、临床表现及治疗效果等被临床诊断为肺隐球菌病。41 例肺隐球菌病患者中,男 24 例,女 17 例,年龄 18~80 岁,平均(47.0±12.8)岁。其中有 11 例患者有吸烟史,2 例有明确鸽子接触史。隐球菌脑膜炎患者共 2 例,男、女各 1 例,年龄分别为 29 岁和 63 岁,未有明显的动物接触史。另有播散性隐球菌病、隐球菌败血症、髂骨隐球菌感染各 1 例,年龄分别为 49 岁、30 岁、47 岁,既往均无吸烟史及动物接触史。

2.2.2 临床表现及实验室检查 在 41 例肺隐球菌病患者中,有 23 例患者因出现症状而就诊,常见症状依次为咳嗽、胸闷/胸痛及发热。在 18 例无症状的患者中,有 14 例在体检时发现肺部病变,均以“肺部病灶性质待查”为初步诊断收治入院。78% 的患者就诊时无明显异常的肺部体征,部分患者可出现干湿啰音、呼吸音减低等。2 例隐球菌脑膜炎患者中,其中 1 例因“发热伴头痛”入院,体格检查巴宾斯基征呈阳性,CSF 检查中 WBC、葡萄糖及蛋白升高、氯化物降低。另 1 例因“狼疮性肾炎”在住院期间出现头痛症状,CSF 检查中仅出现蛋白升高及氯化物降低,余正常。2 例患者的 CSF 培养、墨汁染色及 CrAg-LFA 检测均为阳性。见表 2。

表 2 主要隐球菌病患者临床表现及实验室检查[n/n(%)]

项目	肺隐球菌病	项目	隐球菌脑膜炎
临床特征		临床特征	
发热	7/41(17.1)	发热	1/2(50.0)
咳嗽	19/41(46.3)	头痛	2/2(100.0)
胸闷/胸痛	8/41(19.5)	恶心、呕吐	0/2(0.0)
无症状	18/41(43.9)	脑膜刺激征	0/2(0.0)
体检肺部病变	14/41(34.1)	巴宾斯基征	1/2(50.0)
肺部听诊异常	9/41(22.0)		
实验室检查		实验室检查	
WBC 升高	5/41(12.2)	CSF 细胞数升高	1/2(50.0)
CRP 升高	13/41(31.7)	CSF 葡萄糖升高	1/2(50.0)
G 试验阳性	1/17(5.9)	CSF 蛋白升高	2/2(100.0)
GM 试验阳性	0/21(0.0)	CSF 氯化物降低	2/2(100.0)
总 IgE 升高	10/18(55.6)	墨汁染色阳性	2/2(100.0)
痰涂片/培养阳性	0/41(0.0)	培养阳性	2/2(100.0)

除以上 41 例肺隐球菌病和 2 例隐球菌脑膜炎外,本研究另观察到 3 例隐球菌特殊感染患者。1 例播散性隐球菌病患者仅有头痛症状,脑膜刺激征为阴性,CSF 培养及墨汁染色均未见到隐球菌,但其血清和 CSF CrAg-LFA 检测呈阳性,且肺穿刺组织病理检查见到隐球菌;1 例患者因隐球菌感染发生败血症,外周血、CSF 及骨髓中均培养出新生隐球菌,且 CSF 墨汁染色及血清 CrAg-LFA 检测均为阳性;1 例患者因“右下肢疼痛伴活动受限”入院,血清 CrAg-LFA 检测呈阴性,经外科手术后病理活检结果提示为隐球菌感染。

2.2.3 治疗 46 例隐球菌病患者中,43 例接受了抗

真菌治疗。肺隐球菌病患者中 35 例使用氟康唑,2 例服用伏立康唑,病情均好转,出院后予以序贯治疗;余 2 例因病情危重采用了联合治疗(氟康唑+两性霉素 B),1 例患者主动放弃治疗,另 1 例患者回当地医院治疗,后随访患者死亡。2 例隐球菌脑膜炎患者中 1 例因强烈要求出院未用药,另 1 例采用了联合治疗(氟康唑+两性霉素 B 脂质体),症状好转,出院后续用氟康唑。3 例隐球菌特殊感染患者均采用联合治疗,播散性隐球菌病患者予以两性霉素 B 脂质体联合氟胞嘧啶治疗,出院后继续口服氟康唑,预后良好;隐球菌败血症患者经氟康唑联合两性霉素 B 脂质体治疗不久后死亡;髂骨隐球菌感染患者手术后予以两性霉素 B 脂质体联合伏立康唑治疗,病情好转。

3 讨论

既往流行病学统计发现,新生隐球菌最常见的感染部位是中枢神经系统,但近年来肺隐球菌病的发病率呈逐年上升趋势^[6]。肺隐球菌病成为继肺曲霉病之后最常见的肺部真菌病变,占 20% 左右。由于隐球菌病患者的临床表现及影像学检查无特异性,故实验室病原学检测和组织学检查尤为重要。目前临床开展的实验室检测方法主要有墨汁染色、真菌培养、荚膜抗原血清学检测,如胶乳凝集试验、酶联免疫吸附试验(ELISA)等。本研究中肺隐球菌病患者痰涂片及培养均未检出隐球菌,考虑可能是病灶多分布在外周,送检标本菌量少及标本采集时间错过最佳培养时间等原因。有研究将传统的镜检及培养法与抗原检测进行了比较,结果显示前者对隐球菌的检出率极低^[7]。近年研究发现 CrAg-LFA 对隐球菌病检测的灵敏度和特异度均高于胶乳凝集试验和 ELISA,其对实验室设备的要求不高,操作简便、快速,10 min 即可出结果,逐渐应用于临床^[8]。

本研究对 1 623 例行 CrAg-LFA 检测的住院患者进行统计,发现共有 48 例为阳性,其中 39 例完善检查后最终诊断为隐球菌病。本研究有 7 例血清 CrAg-LFA 检测出现假阴性(6 例肺隐球菌病,1 例髂骨隐球菌感染),考虑原因有肺外隐球菌负荷量较低、隐球菌荚膜缺失或感染处于早期等^[9-10]。此外,日本一项研究发现在免疫功能正常的肺隐球菌病患者中,血清 CrAg-LFA 检测的阳性率较低^[11],本研究中 6 例假阴性肺隐球菌病患者中有 4 例免疫功能正常。因此,对于免疫功能正常的肺隐球菌病患者需结合临床表现、影像学及病理学检查综合诊断,以防漏诊。

本研究发现 CrAg-LFA 检测 CSF 标本的灵敏度和特异度均为 100.0%。1 例播散性隐球菌病患者 CSF 培养及墨汁染色均未见到隐球菌,但 CSF CrAg-LFA 检测为阳性,给予抗真菌治疗后患者的病情有明显好转,考虑原因为 CSF 中隐球菌量较少,传统实验室检查方法无法检出。欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组和世界卫生组织已推荐将 CSF CrAg-LFA 检测作为隐球菌脑膜炎的首选检查^[12],且其阳性结果作为隐球菌脑膜炎的确诊标准^[4]。同时,

有研究表明 CrAg-LFA 滴度的检测可用于评估预后以及监测疗效^[7,13]。本研究中有 1 例隐球菌脑膜炎患者入院时 CSF 墨汁染色、培养及 CrAg-LFA 检测均阳性,进行抗真菌治疗后,随着临床症状好转,墨汁染色及培养菌量减少直至转阴,CrAg-LFA 滴度持续下降,直至完全治愈转阴。

G 试验和 GM 试验作为临床真菌感染的重要实验室检测指标,其诊断范围并不包括隐球菌感染。对于怀疑肺部真菌感染的患者,当出现 G 试验和 GM 试验均阴性时,应高度怀疑是否存在隐球菌的感染,但本研究中有 1 例患者出现 G 试验阳性,考虑可能是因隐球菌荚膜丢失导致细胞壁中少量(1,3)- β -D 葡聚糖成分暴露。此外,本研究发现 55.6% 的肺隐球菌病患者出现了总 IgE 的升高,国外一项研究发现 IgE 除了在对寄生虫方面的经典作用外,还具有潜在的防御真菌的作用(如隐球菌)^[14]。故 IgE 水平的升高可作为隐球菌病诊断的辅助检查。

隐球菌感染可出现在各年龄阶段,本研究中肺隐球菌病患者年龄主要集中在 40~50 岁,且男性较女性多见,提示中年男性是肺隐球菌病的高发人群。隐球菌病起病多隐匿,临床表现及体征均无特异性。2010 年美国感染病学学会更新的《隐球菌病处理临床实践指南》^[5]中指出,隐球菌病的易感人群主要包括:人类免疫缺陷病毒感染者,器官移植患者,接受大剂量激素和/或免疫抑制剂治疗的患者,其他有基础疾病的患者。同时研究发现,对于免疫功能低下的患者,隐球菌更易播散至 CSF、血液甚至骨髓中。

关于隐球菌病的治疗,《隐球菌感染诊治专家共识》^[15]中指出肺隐球菌病的治疗目标是治愈感染,防止感染播散到中枢神经系统。对于免疫功能正常或症状较轻的肺隐球菌病患者可采用氟康唑,而免疫抑制伴弥散性感染或严重肺炎的患者治疗方案同隐球菌脑膜炎,即联合应用两性霉素 B 和氟康唑。本研究中 35 例肺隐球菌病患者使用氟康唑,另有 6 例隐球菌病患者接受了联合治疗。

综上所述,隐球菌病的发病率不断升高,免疫功能低下的患者易播散至血液或 CSF,因此需要做到早诊断、早治疗。CrAg-LFA 检测具有无创、准确率高、快速简便的特点,在隐球菌病的诊断中具有很高的临床应用价值。G 试验、GM 试验和 IgE 水平可辅助诊断隐球菌病。对于累及不同部位和不同免疫状态的隐球菌病患者,需严格按照指南用药。

参考文献

- [1] 浙江省医学会呼吸病学分会. 肺隐球菌病诊治浙江省专家共识[J]. 中华临床感染病杂志, 2017, 10(5): 321-326.
- [2] 叶健魁, 陈姗姗, 王艳丽, 等. 隐球菌病 69 例临床分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(9): 1200-1204.
- [3] CACERES D H, ZULUAGA A, TABARES A M, et al. Evaluation of a cryptococcal antigen lateral flow assay in serum and cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of cryptococcosis in colombia[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2017, 59: e76.
- [4] DONNELLY J P, CHEN S C, KAUFFMAN C A, 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[J]. Clin Infect Dis, 2020, 71(6): 1367-1376.
- [5] PERFECT J R, DISMUKES W E, 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.
- [6] CHANG C C, SORRELL T C, CHEN S C. Pulmonary cryptococcosis[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2015, 36(5): 681-691.
- [7] 陈栋江, 吴庆, 徐春泉, 等. 血清隐球菌荚膜多糖抗原检测在肺隐球菌病中的早期诊断价值[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(10): 1248-1251.
- [8] RIVET-DANON D, GUITARD J, GRENOUILLET F, et al. Rapid diagnosis of cryptococcosis using an antigen detection immunochromatographic test[J]. J Infect, 2015, 70(5): 499-503.
- [9] SETIANINGRUM F, RAUTEMAA-RICHARDSON R, DENNING D W. Pulmonary cryptococcosis: a review of pathobiology and clinical aspects[J]. Med Mycol, 2019, 57(2): 133-150.
- [10] PERFECT J R, BICANIC T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: what do we know now[J]. Fungal Genet Biol, 2015, 78: 49-54.
- [11] KOHNO S, KAKEYA H, IZUMIKAWA K, et al. Clinical features of pulmonary cryptococcosis in non-HIV patients in Japan[J]. J Infect Chemother, 2015, 21(1): 23-30.
- [12] VIDAL J E, TONIOLO C, PAULINO A, et al. Performance of cryptococcal antigen lateral flow assay in serum, cerebrospinal fluid, whole blood, and urine in HIV-infected patients with culture-proven cryptococcal meningitis admitted at a Brazilian referral center[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2018, 60: e1.
- [13] 魏丹丹, 黄先琪, 李小菊, 等. 隐球菌抗原-胶体金免疫层析法在隐球菌性脑膜炎和隐球菌性肺炎诊断中的应用价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(9): 1281-1283.
- [14] JANDA A, ERYILMAZ E, NAKOUZI A, et al. Variable region identical IgA and IgE to cryptococcus neoformans capsular polysaccharide manifest specificity differences[J]. J Biol Chem, 2015, 290(19): 12090-12100.
- [15] 温海. 隐球菌感染诊治专家共识[J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(2): 65-68.

(收稿日期: 2021-02-21 修回日期: 2021-07-11)