

• 临床医学 •

文章编号: 1002 - 0217(2016) 01 - 0051 - 03

脑脊液细胞学检查在隐球菌性脑膜炎诊断中的应用

柳晓金 张 志 许 怡 梅志勤 叶立红 张海丛

(石家庄市第五医院 检验科 河北 石家庄 050000)

【摘要】目的: 探讨脑脊液细胞学检查在隐球菌性脑膜炎早期诊断中的应用价值。方法: 对 25 例经病原学确诊的隐球菌性脑膜炎患者进行回顾性分析。结果: 25 例隐球菌性脑膜炎患者入院前有 20 例被误诊, 其中误诊为结核性脑膜炎 15 例。采用脑脊液细胞学瑞吉染色法、直接涂片墨汁染色法、离心涂片墨汁染色法和培养法 4 种方法首次的阳性率分别为 88%、48%、72% 和 40%; 治疗后 18 例好转 3 例恶化 4 例死亡。经统计学比较 4 组阳性率不完全相同($\chi^2 = 15.45$, $P = 0.001$)。其中, 脑脊液细胞学瑞吉染色法与直接涂片墨汁染色法比较有统计学意义, 与离心涂片墨汁染色法比较无统计学意义。结论: 隐球菌性脑膜炎的误诊率高, 脑脊液细胞学技术首次病原学检测阳性率最高。另外, 该技术还可评估患者的免疫反应状态, 值得临床推广应用。

【关键词】隐球菌性脑膜炎; 脑脊液细胞学; 墨汁染色

【中图分类号】R 519.4 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2016.01.015

Significance of cytological examination in detecting *Cryptococcus neoformans* meningitis

LIU Xiaojin ZHANG Zhi XU Yi MEI Zhiqin YE Lihong ZHANG Haicong

Clinical Laboratory Shijiazhuang No.5 Hospital Shijiazhuang 050000, China

【Abstract】Objective: To assess the value of cerebrospinal fluid cytological examination in early diagnosis of *Cryptococcus neoformans* meningitis. **Methods:** Clinical presentations and positive rates by different four techniques in detecting *Cryptococcus neoformans* meningitis were retrospectively analyzed in 25 cases. **Results:** Of the 25 cases, 20 were misdiagnosed prior to admission, in which 15 were misdiagnosed as tuberculous meningitis. The positive rates of Wright-Giemsa staining of the cerebrospinal fluid, direct India-ink capsule staining of the smear and centrifugation of the smear as well as fungal culture of the cerebrospinal fluid were 88%, 48%, 72% and 40%, respectively, which were statistically different ($\chi^2 = 15.45$, $P = 0.001$). The difference was significant between Wright-Giemsa staining of the cerebrospinal fluid and direct India-ink capsule staining of the smear, yet was not as compared to centrifugal smear. In 25 cases, 18 improved, 3 worsened and 4 died. **Conclusion:** Misdiagnosis commonly exist in *Cryptococcus neoformans* meningitis. However, cerebrospinal fluid cytology may demonstrate higher positive rate for *Cryptococcus neoformans* in initial examination, and be also used to estimate immune state for the patients, suggesting that this technique be worthy of wider clinical recommendations.

【Keywords】 *Cryptococcus neoformans* meningitis; cerebrospinal fluid cytology; India-ink staining

隐球菌性脑膜炎是由新型隐球菌及其变种引起的中枢神经系统感染性疾病, 临床表现、脑脊液常规检查及影像学检查缺乏特异性, 诊断困难, 预后差, 即使经过正规治疗其病死率仍在 20% ~ 30%^[1]。为了提高其诊断水平, 现将 25 例隐球菌性脑膜炎患者应用脑脊液细胞学及其他实验技术的情况进行回顾性分析, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 25 个病例均来自 2010 年 1 月 ~ 2014 年 12 月本院住院患者, 男 15 例, 女 10 例, 年龄 23 ~ 79 岁, 确诊时间 18 天 ~ 1 年不等。有养鸽史 3 例; 合并其他免疫低下基础疾病或长期应用激素等情况 19 例: 耐药肺结核 3 例, 干燥综合征 2 例, 系统性红斑狼疮 3 例, 慢性肝病 5 例, 糖尿病 4 例, 慢性肾炎 1 例, 慢性支气管炎 1 例; 其余 3 例无特殊接触

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划 (20150894)

收稿日期: 2015-07-24

作者简介: 柳晓金 (1983-), 女, 主治医师 (电话) 18031263235 (电子信箱) liu_kimxiaojin@sina.com;

张海丛, 女, 主治医师 (电子信箱) 63688873@qq.com, 通讯作者。

史和病史。

1.2 临床表现 亚急性起病 21 例,急性起病 4 例;头痛、恶心、呕吐 20 例;视乳头水肿 10 例;视力下降 8 例;视神经萎缩 2 例;意识障碍 7 例;听力下降 3 例;双下肢无力 3 例; Babinski 征阳性 2 例;脑膜刺激征阳性 22 例。

1.3 误诊情况 误诊 20 例,其中误诊为结核性脑膜炎 15 例,化脓性脑膜炎 2 例,病毒性脑膜炎 2 例,神经炎 1 例。

1.4 仪器和试剂 细胞玻片沉淀仪(Thermo Fisher Cytospin-4 型);瑞吉染液(珠海贝索生物技术有限公司);显微镜(奥林巴斯 CX22); BACTEC9120 全自动血培养仪(美国 BD 公司)。

1.5 病原检测方法

1.5.1 脑脊液细胞学瑞吉染色法 取脑脊液 0.5 mL 加入到细胞玻片离心沉淀仪,离心 5 min (500 r/min),待玻片干燥后行瑞吉染色,镜检。结果判读: 隐球菌常成堆,成簇排列,为紫黑色,菌体周围呈针刺样辐射。

1.5.2 直接涂片墨汁染色法 取一滴脑脊液滴于干净玻片上,滴一滴墨汁覆盖脑脊液,缓慢盖上盖玻片后在显微镜下观察。结果判读: 可见黑色背景下透亮的菌体及荚膜,菌体多呈圆形,多散在分布。

1.5.3 离心涂片墨汁染色法 取脑脊液 1 ~ 3 mL 离心 15 min (3000 r/min),弃去上清,取沉淀物一滴于载玻片上,加墨汁与脑脊液的比例为 1 : 3,镜检,在黑色背景下可见到透亮的菌体和宽厚荚膜。结果判读: 可见黑色背景下透亮的菌体及荚膜,菌体呈圆形,多成堆分布。

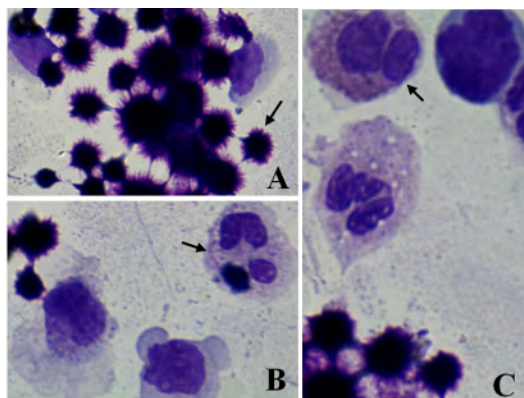
1.5.4 培养法 将无菌脑脊液注入血培养瓶中,在 BACTEC 9120 全自动血培养仪内培养,阳性培养瓶立即转种沙保罗培养基,生长并分纯后用真菌鉴定试剂条 API20C AUX 鉴定。

1.6 统计学方法 所得数据均录入 SPSS 19.0 统计软件,计数资料采用卡方检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 种方法的阳性率及脑脊液细胞学表现 25 例患者脑脊液细胞学瑞吉染色法、直接涂片墨汁染色法、离心涂片墨汁染色法及培养法 4 种方法首次的阳性率分别为 88% (22/25)、48% (12/25)、72% (18/25) 和 40% (10/25)。在隐球菌性脑膜炎早期,脑脊液细胞学瑞吉染色法可以发现成堆的隐球菌(图 1A) 随着疾病的转归,可发现隐球菌的数量逐

渐减少,并且可以看到隐球菌吞噬细胞(图 1B)、嗜酸性粒细胞(图 1C)。



A. 成堆分布的隐球菌; B. 隐球菌吞噬细胞; C. 嗜酸性粒细胞。

图 1 脑脊液细胞学表现(瑞吉染色法 $\times 100$)

2.2 4 种方法阳性率的统计学分析 4 种方法阳性率经统计学比较不全相同(表 1)。其中 3 种快速诊断法中,脑脊液细胞学瑞吉染色法阳性率 88%,明显高于直接涂片墨汁染色法,差异有统计学意义($P < 0.05$);离心涂片墨汁染色法阳性率 72%,与脑脊液细胞学瑞吉染色法阳性率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 4 种方法检测结果比较

检测方法	阳性	阴性	合计	χ^2 值	P 值
脑脊液细胞学瑞吉染色法	22	3	25	15.45	0.001
直接涂片墨汁染色法	12	13	25		
离心涂片墨汁染色法	18	7	25		
培养法	10	15	25		

2.3 治疗及预后 25 例患者全部应用氟康唑静脉注射治疗,其中对于病情较重者加用鞘内注射两性霉素 B 和(或) 氟美松。治疗后好转 18 例,恶化 3 例,死亡 4 例。

3 讨论

隐球菌是具有荚膜的真菌,广泛存在于自然界中,其为条件致病菌,主要经呼吸道传播,当宿主免疫功能低下时经血流播散到中枢神经系统引起隐球菌性脑膜炎。近年来随着广谱抗生素、糖皮质激素、免疫抑制剂、肿瘤放化疗的广泛应用和艾滋病患者的增多,隐球菌性脑膜炎患者随之明显增多。

在脑脊液中找到隐球菌是隐球菌性脑膜炎确诊的依据,隐球菌性脑膜炎的疗效和转归很大程度上取决于早期明确诊断^[2-3]。常用的诊断方法敏感性低,由于不能及时诊断而延误治疗,导致病死率及致

残率居高不下。直接涂片墨汁染色是传统的检测方法,其操作简单、迅速,但在发病的早期,镜检常无异常,误诊率在90%左右^[4],常需反复多次送检才能得到阳性结果。其原因主要是疾病早期隐球菌密度低;直接涂片墨汁染色不均匀,整个视野漆黑,杂质、气泡等也呈透光现象,若检验人员对隐球菌识别经验不足,可能把白细胞误认为是隐球菌;这些原因使得墨汁染色法检出隐球菌的效率很低。本研究直接涂片墨汁染色阳性率为48%,与文献报道^[5]的43.4%比较一致。离心涂片墨汁染色可以起到浓缩隐球菌的作用,提高了阳性率,但所用标本量大,离心后转移沉淀过程中会造成菌的部分丢失,上述的墨汁染色法的缺点仍然存在,若脑脊液中含隐球菌含量较少,高倍镜检测也易导致菌的漏检。隐球菌培养方法所需时间长,不能做到及时诊断,阳性率也不高。Antionori等^[6]报道脑脊液中隐球菌抗原检测的阳性率为94.1%,但是高浓度隐球菌抗原所致的钩带现象和体内未知非特异性蛋白对隐球菌抗原的掩盖效应,可引起假阴性,结核患者血清可引起隐球菌荚膜多糖抗原乳胶凝集试验假阳性^[7],假阴性、假阳性的问题无法解决。

脑脊液细胞学瑞吉染色法利用玻片离心沉淀法收集隐球菌,所用标本只需0.5 mL,隐球菌一次性沉淀在玻片上,几乎没有任何损失,染色后在油镜下十分清晰地观察到隐球菌的特殊形态,特异性极高。有研究显示,脑脊液细胞学首次发现隐球菌的检出率95.8%^[8]。本研究脑脊液细胞学瑞吉染色法首次检出率为88%,与常用的直接墨汁染色法比较,差异有统计学意义,与文献报道^[5]也较一致。脑脊液细胞学瑞吉染色法与离心涂片墨汁染色法首次检查率没有统计学意义,其原因可能是标本例数较少,需扩大样本量进行深入研究,但从其他方面来看,细胞学技术更具优势:经有效治疗后,随着疾病的转归,细胞学可以观察到中性粒细胞比例减少,淋巴细胞所占比例增多,白细胞对隐球菌的吞噬情况^[9],以及象征慢性炎症反应的嗜酸性粒细胞,隐球菌数目减少直至消失。此技术可以详细评估患者的免疫反应状态和治疗效果,而离心涂片墨汁染色对于病情的评估只能看到隐球菌的多少,在非染色的情况

下用高倍镜观察不能分辨白细胞的类别,更不能观察到吞噬等情况,随着病情转归隐球菌数量越来越少,其检出效率也会降低。

由于医生对隐球菌性脑膜炎认识不足,其起病和其他脑膜炎没有绝对的特异性,脑脊液生化检查和结核性脑膜炎十分相似,误诊误治为结核性脑膜炎的情况时有发生。本组患者整体误诊率为80%,大多数误诊为结核性脑膜炎。有1例患者起病时以视力受损为主要表现,一直被误诊为视神经炎,直至患者失明、昏迷才考虑到神经系统感染。对于原有基础疾病,体质差、长期应用激素和抗生素的患者,一旦出现颅压高、头痛、视力减退等情况要警惕隐球菌性脑膜炎可能,及时进行多次的病原学检查。隐球菌性脑膜炎早期诊断困难,敏感而特异的病原学检测手段可提高其诊断率,有利于及时治疗,从而降低病死率和致残率。总之,脑脊液细胞学检查在隐球菌性脑膜炎的诊断和治疗评估方面意义重大,值得临床推广应用。

【参考文献】

- [1] 万均成,文芳.在细胞计数板中直接识别脑脊液隐球菌的方法及临床意义[J].检验医学,2006,21(5):504-508.
- [2] 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.
- [3] 王冯滨,欧强,励峰,等.新生隐球菌性脑膜炎25例临床分析[J].中国感染与化疗杂志,2010,10(1):41-43.
- [4] 何俊瑛,卜晖,金便芬,等.隐球菌脑膜炎12例临床分析[J].脑与神经疾病杂志,1998,6(1):60.
- [5] 辜程遥,范振毅.隐球菌性脑膜炎23例脑脊液细胞学分析[J].中国临床神经科学,2014,22(4):393-395,401.
- [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] 王露霞,刘海英,石凌波,等.隐球菌荚膜多糖抗原乳胶凝集试验干扰因素的探讨[J].临床检验杂志,2010,28(2):159.
- [8] 樊新红,冯国栋,杨毅宁,等.脑脊液细胞学迈-格-姬染色在隐球菌脑膜炎诊断中的价值[J].国际神经病学神经外科学杂志,2013,40(3):220-222.
- [9] 何俊瑛,孔繁元,郭力.临床脑脊液细胞学诊断[M].石家庄:河北科学技术出版社,2007:147-149.