

荧光染色法在真菌检测中的应用

赵琳, 乔昀

(上海中医药大学附属曙光医院检验科, 上海 200021)

摘要: 目的 探讨荧光染色法在真菌检测中的应用价值。方法 选取232份临床样本, 采用荧光染色、直接涂片、革兰染色、墨汁染色、真菌培养及KOH湿片法同步检测。结果 在175份痰、咽拭子、白带、尿液和粪便等深部样本中, 荧光染色法真菌阳性检出率(87.43%)高于直接涂片法(78.86%)和革兰染色法(74.29%) ($P<0.05$)。在27份皮屑和甲屑浅表样本中, 荧光染色法真菌阳性检出率(85.19%)高于KOH湿片法(59.26%)和真菌培养法(55.56%), 差异有统计学意义($P<0.05$)。在30份脑脊液样本中, 荧光染色法与墨汁染色法真菌阳性检出率差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 荧光染色法简便、快速、特异性高, 在真菌检测中具有一定的价值。

关键词: 真菌; 荧光染色; 直接涂片; 革兰染色; 真菌培养; KOH湿片法; 墨汁染色

Application of fluorescent staining in fungus detection ZHAO Lin, QIAO Yun. (Department of Clinical Laboratory, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

Abstract: Objective To evaluate the application of fluorescent staining in fungus detection. **Methods** A total of 212 clinical samples were collected. Fluorescent staining, direct smear, Gram staining, ink staining, fungal culturing and KOH wet film were used. **Results** In 175 deep samples, including sputum, pharyngeal swab, leucorrhea, urine and feces, the positive rates of fungi by fluorescent staining, direct smear and Gram staining were 87.43%, 78.86% and 74.29%, respectively. The positive rate of fluorescent staining was higher ($P<0.05$). In 27 superficial samples of dandruff and nail dandruff, the positive rates of fungi were 85.19%, 59.26% and 55.56% by fluorescent staining, KOH wet film and fungal culturing, respectively ($P<0.05$). The positive rates of fungi by fluorescent staining and ink staining in 30 cerebrospinal fluid samples had no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusions** Fluorescent staining is simple, rapid and specific, and it has certain clinical value in the diagnosis and identification of fungi.

Key words: Fungus; Fluorescent staining; Direct smear; Gram staining; Culturing; KOH wet film; Ink staining

目前已发现的对人类有致病性的真菌约有300多个种类。根据侵犯人体部位的不同, 临床上将致病真菌分为浅部真菌和深部真菌^[1]。浅部真菌(癣菌)仅侵犯皮肤、毛发和指(趾)甲, 而深部真菌能侵犯人体皮肤、黏膜、深部组织和内脏, 甚至引起全身播散性感染。目前真菌的常用检测方法包括直接涂片、革兰染色、墨汁染色、真菌培养和KOH湿片法^[2]。培养方法耗时长; 直接涂片检出率相对较低; KOH湿片法对检验人员的技术水平要求较高, 容易漏检^[3]。近年来, 荧光染色法在真菌感染诊断中

的应用越来越广。本研究采用荧光染色、直接涂片、革兰染色、墨汁染色、真菌培养及KOH湿片法对临床样本进行同步检测, 以评估荧光染色法在真菌检测中的价值。

1 材料和方法

1.1 样本

收集2019年上海中医药大学附属曙光医院门诊及住院患者临床样本232份, 样本类型包括痰(75份)、咽拭子(48份)、白带(30份)、皮屑(15份)、甲屑(12份)、尿液(12份)、粪便(10份)、脑脊液(30份)。

作者简介: 赵琳, 男, 1979年生, 主管技师, 主要从事临床微生物检测工作。

通信作者: 乔昀, E-mail: qiaoyun1252@live.cn。

所有临床样本采集后均放置于无菌容器内送检。痰、咽拭子、白带、尿液及粪便等深部样本同时采用荧光染色、直接涂片和革兰染色进行检测^[4]，皮屑和甲屑浅表样本同时采用荧光染色、KOH湿片法及真菌培养进行检测^[5]，脑脊液样本采用荧光染色和墨汁染色进行检测。

1.2 方法

1.2.1 样本收集 (1) 痰样本取自患者第一口晨痰，置于无菌痰盒中。(2) 咽拭子样本采用无菌咽拭子采集管，用棉棒自患者咽喉部取样。(3) 白带样本采用无菌棉签管，用棉棒自患者阴道内部取样。(4) 皮屑样本，用75%乙醇消毒患者皮损部位，使用钝头刀片刮取皮屑。(5) 甲屑样本，用75%乙醇消毒患者病甲后，用消毒刀片刮取甲下碎屑。(6) 尿液样本取自患者第1次晨尿，使用无菌管收集保存，离心后取沉渣镜检。(7) 粪便样本取样后置于无菌容器内。(8) 脑脊液样本离心后取沉淀物镜检。

1.2.2 荧光染色 采用南京汉瑞生物科技有限公司真菌荧光染色液进行染色。将样本均匀涂于载玻片上，加1滴荧光染液，覆上盖玻片，轻压盖玻片静待1 min，待染液与样本充分混匀后，在荧光显微镜下观察，查见荧光标记的孢子或菌丝即为阳性。阳性对照白念珠菌(ATCC 14053)购自上海市临床检验中心。

1.2.3 革兰染色 采用珠海贝索生物技术有限公司革兰染色液进行染色。将样本均匀涂于载玻片上，在火焰上快速通过3次固定，加龙胆紫液染色1 min，流水冲洗；加媒染液染色1 min，流水冲洗；加脱色乙醇至无紫色脱落为止，流水冲洗；复染剂(石炭酸复红)染色30 s，流水冲洗。干燥后，用高倍镜查找真菌孢子和菌丝。阳性对照为白念珠菌(ATCC 14053)。

1.2.4 直接涂片 将样本放置于载玻片上，加1滴0.9%氯化钠溶液，盖上盖玻片，在显微镜下观察，查见孢子或菌丝即为阳性。

1.2.5 KOH湿片法 将样本放置于载玻片上，加1滴10% KOH溶液，盖上盖玻片，用酒精灯微加热溶解甲屑，显微镜下查见孢子或菌丝即为阳性。

1.2.6 真菌培养 在超净工作台将皮屑、甲屑样本接种于蛋白胨沙氏琼脂培养基(上海科玛

嘉公司)，置25℃温箱中培养2周后观察，有菌落生长为阳性，无菌生长则为阴性。

1.2.7 墨汁染色 样本离心后，将沉淀物涂于洁净玻片上，然后加1滴墨汁，盖上盖玻片镜检，背景呈黑褐色，菌体无色透明，有多糖荚膜。

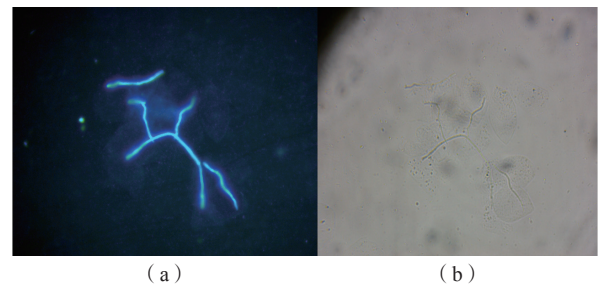
1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。计数资料以例或率表示，比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同类型样本形态学观察结果

232份临床样本荧光染色结果显示，可见菌丝及孢子发出明亮的蓝色荧光，在暗黑的背景下，易于识别。痰样本的荧光染色和直接涂片结果见图1，曲霉菌的荧光染色结果见图2。



注：(a) 荧光染色结果；(b) 直接涂片结果。

图1 痰样本荧光染色和直接涂片结果

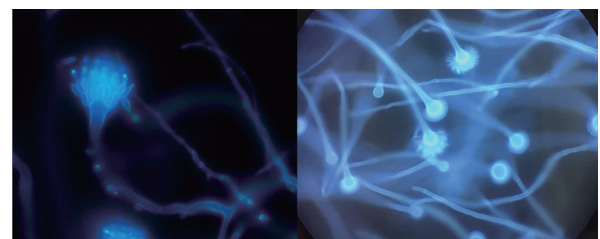


图2 曲霉菌荧光染色结果

2.2 荧光染色、革兰染色、直接涂片真菌阳性检出率比较

荧光染色、革兰染色、直接涂片对除脑脊液样本外的175份深部样本(痰、咽拭子、白带、尿液、粪便)的真菌阳性检出率分别为87.43%、78.86%、74.29%，荧光染色阳性检出率高于革兰染色、直接涂片(χ^2 值分别为4.857、9.765, $P < 0.05$)。见表1。

2.3 荧光染色和KOH湿片法、真菌培养真菌阳性检出率比较

荧光染色和KOH湿片法、真菌培养对27份

表1 荧光染色、革兰染色、直接涂片真菌阳性检出率比较

样本类型	份数	荧光染色	革兰染色	直接涂片
痰	75	71 (94.67)	67 (89.33)	65 (86.67)
咽拭子	48	45 (93.75)	40 (83.33)	38 (79.17)
白带	30	26 (86.67)	24 (80.00)	22 (73.33)
尿液	12	10 (83.33)	8 (66.67)	7 (58.33)
粪便	10	9 (90.00)	8 (80.00)	8 (80.00)
合计	175	153 (87.43)	138 (78.86)	130 (74.29)

皮屑和甲屑浅表样本的真菌阳性检出率分别为 85.19%、74.07%和 62.96%，荧光染色阳性检出率高于 KOH 湿片法、真菌培养 (χ^2 值分别为 4.523、5.684, $P < 0.05$)。见表 2。

表2 荧光染色和 KOH 湿片法、真菌培养真菌阳性检出率比较

样本类型	例数	荧光染色	KOH 湿片法	真菌培养
皮屑	15	13 (86.67)	9 (60.00)	9 (60.00)
甲屑	12	10 (83.33)	7 (58.33)	6 (50.00)
合计	27	23 (85.19)	16 (59.26)	15 (55.56)

2.4 荧光染色和墨汁染色的真菌阳性检出率比较

荧光染色和墨汁染色对 30 例脑脊液样本的真菌的阳性检出率分别为 10.00% 和 20.00%，差异无统计学意义 ($P = 0.531$)。

3 讨论

目前，真菌感染常用的实验室检测方法有直接涂片、革兰染色、真菌培养、KOH 湿片法、墨汁染色、真菌培养以及聚合酶链反应。真菌培养由于时间较长，易延误患者病情和治疗；聚合酶链反应虽然有灵敏度高、特异性强、快速等优势，但是对实验环境和人员要求较高；革兰染色操作繁琐、耗时长，易受染液质量、检验人员水平等多种因素的影响，且不能对甲屑等样本进行检测；KOH 湿片法因真菌孢子易与脂肪滴、红白细胞混淆，不易区分，需要工作人员有一定的经验，且操作较繁琐，显白色背景，不易区分孢子、菌丝的形态。荧光染色是根据染料中带有荧光素的抗体能与真菌细胞壁中葡聚糖层和几丁质层中的 β -糖苷键特异性结合的特性，间接将荧光素标记到真菌细胞壁上，在荧光显微镜下可观察到真菌轮廓，其利用的是抗体特异性结合和形态学观察的原理，能有效降低背景干扰，孢子及菌丝能

发出明亮的蓝色荧光，在荧光显微镜下与黑色背景形成明显反差，易于在镜下寻找和识别。本研究对 175 份痰、咽拭子、白带、尿液、粪便深部临床样本，采用荧光染色、直接涂片、革兰染色进行检测，阳性检出率分别为 87.43%、78.86% 和 74.29%，荧光染色的阳性检出率显著高于其他 2 种检测方法 ($P < 0.05$)；对 27 份皮屑和甲屑浅表样本采用荧光染色与 KOH 湿片法、真菌培养进行检测，真菌阳性检出率分别为 85.19%、59.26% 和 55.56%，荧光染色的阳性检出率也高于其他 2 种检测方法 ($P < 0.05$)；对 30 份脑脊液样本，荧光染色和墨汁染色的真菌阳性检出率分别为 10.00% 和 20.00%，差异无统计学意义 ($P = 0.531$)。提示荧光染色在真菌检测方面，针对各种样本均可进行检测，同时能通过形态初步鉴定浅部真菌，是一种快速、有效的新方法^[6]。荧光染色操作简便，只需要在载有样本的玻片上，加 1 滴荧光液即可在荧光显微镜下观察，且荧光液对脂肪滴不产生标记，易与真菌孢子鉴别^[7]。

综上所述，荧光染色检测真菌具有特异性高、灵敏度高、操作简便的优势，在真菌快速检测中有很好的临床应用价值。

参考文献

- [1] 李辉桃, 林冰纯, 黄智峰, 等. 应用微滴式数字 PCR 技术快速诊断新生儿侵袭性真菌病[J]. 中国当代儿科杂志, 2019, 21 (1): 45-51.
- [2] 潘冰婷, 瞿跃, 朱敏丽, 等. 新生儿侵袭性真菌感染 90 例的临床分析[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38 (11): 735-739.
- [3] 陈峰, 陶晓勤, 刁文晶, 等. 国产血浆 (1-3)- β -D 葡聚糖检测试剂对侵袭性真菌病诊断价值评估[J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2012, 32 (3): 348-351.
- [4] 陈卉. 荧光染色法和 KOH 湿片法在诊断浅部真菌感染中的效果比较[J]. 中国卫生标准管理, 2018, 9 (14): 108-109.
- [5] 王丽赞, 王玫, 李雪, 等. 荧光染色在鼻窦真菌快速诊断中的应用评价[J]. 临床检验杂志, 2018, 36 (10): 751-755.
- [6] 赵锋, 乔赛, 张俊丽, 等. 荧光染色技术在临床少见侵袭性真菌病中的快速诊断价值[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2019, 39 (7): 538-543.
- [7] 刘晓雨, 梁官钊, 郭健, 等. 改良荧光染色法在皮下真菌病组织病理诊断中的应用分析[J]. 中华皮肤科杂志, 2019, 52 (5): 319-322.

(收稿日期: 2020-11-06)

(本文编辑: 李欣)