

荧光染色法在真菌镜检中的应用*

李艳君^{1,2}, 钱扬会¹, 丁毅伟¹, 丁赔赔¹, 王姣贤¹, 董 蓉¹, 赵强元^{1△}

1. 解放军总医院第六医学中心检验科, 北京 100048; 2. 南方医科大学第二临床学院, 广东广州 510515

摘要:目的 探讨荧光染色法在真菌镜检中的应用价值。方法 收集 350 例不同来源的临床标本, 直接涂片后分别进行革兰染色和荧光染色镜检, 同时接种沙保罗培养基进行真菌培养鉴定, 3 种方法任意一种为阳性, 则认为该标本为真菌检测阳性, 并以此为标准来计算 3 种方法的检出率、灵敏度和阴性预测值, 应用 χ^2 检验评价 3 种方法的差异。结果 350 例临床标本应用荧光染色法、革兰染色法和真菌培养鉴定法的检出率分别为 53.4%、11.4% 和 43.4%, 灵敏度分别为 86.6%、18.5% 和 70.4%, 阴性预测值分别为 82.2%、43.2% 和 67.7%, 各组数据比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 荧光染色法在真菌检测中显示出一定的优势, 值得推广应用。

关键词: 荧光染色; 革兰染色; 真菌培养鉴定

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)20-2918-03

Application of fluorescence staining in microscopic examination of fungi*

LI Yanjun^{1,2}, QIAN Yanghui¹, DING Yiwei¹, DING Peipei¹, WANG Jiaoxian¹,
DONG Rong¹, ZHAO Qiangyuan^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Sixth Medicine Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China; 2. Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China

Abstract: Objective To explore the application value of fluorescent staining method in fungal microscopic examination. **Methods** A total of 350 clinical samples from different sources were collected and conducted the Gram staining and fluorescence staining microscopic examination after direct smear. At the same time, inoculating Sabouraud medium to identify fungi. The fungi detection was defined as positive if the results in any method among 3 kinds of method presented positive. With this criterion, the detection rate, sensitivity and negative predictive value were calculated and the Chi-square test was used to evaluate the difference among these three methods. **Results** In 350 clinical samples, the fungal detection rates of fluorescent staining, Gram staining and fungal culture were 53.4%, 11.4% and 43.4% respectively, the sensitivities were 86.6%, 18.5% and 70.4% respectively, the negative predictive values were 82.2%, 43.2% and 67.7%, respectively, the data differences among various groups were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The fluorescent staining method presents a certain superiority in the fungal detection and is worth to be promoted and applied.

Key words: fluorescent staining; Gram staining; fungal culture identification

近年来,随着肿瘤、艾滋病等免疫功能受损患者的增多,以及免疫抑制剂及广谱抗菌药物的长期使用,真菌感染发病率呈上升趋势。侵袭性真菌感染(IFD)是感染性疾病死亡的主要原因之一^[1-2]。真菌感染的快速诊断对于临床抢先实施抗真菌治疗,降低病死率至关重要。真菌感染的实验室检查中直接涂片染色镜检可快速为临床提供直观的病原学证据。目前,大部分实验室常规采用革兰染色法进行深部真菌感染的染色镜检,但真菌孢子及菌丝不易着色,与

背景颜色不易区分,检出率低。近年来,荧光染色法在真菌染色镜检中的应用越来越广泛,尤其是在浅部真菌病诊断中广泛应用^[3-4],而用于深部真菌感染标本的镜检诊断鲜有报道。本文通过与革兰染色法比较,评价荧光染色法用于可疑深部真菌感染标本镜检的临床应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 1 月至 2019 年 6 月可疑深部真菌感染患者的临床标本共 350 例,标本类型

* 基金项目: 国家科技重大专项子任务(2018ZX10101003-001-006); 军队后勤科研重点项目(BHJ13J002)。

作者简介: 李艳君, 女, 副主任医师, 主要从事临床感染病原体检测及耐药性分析相关研究。 △ 通信作者, E-mail: zhaoliangyuan001@

包括痰液(228/350, 65.1%)、肺泡灌洗液(35/350, 10.0%)、气管刷片(16/350, 4.6%)、尿液(58/350, 16.6%)、肺组织(3/350, 0.8%)、深部伤口拭子(10/350, 2.9%)。

1.2 仪器与试剂 法国梅里埃 PREVI Color Gram 自动染片仪, 奥林巴斯 CX23 荧光显微镜和 CX41 普通光学显微镜, 德国布鲁克公司 MALDI-TOF MS 鉴定仪, 法国梅里埃沙保罗培养基, 法国梅里埃革兰染色液, 南京汉瑞生物真菌荧光染色液。

1.3 方法 标本采集后同时进行真菌培养鉴定、涂片后革兰染色镜检和荧光染色镜检等操作, 质控菌株为白色念珠菌 ATCC90028。

1.3.1 真功培养鉴定 标本以三区划线方式接种沙保罗培养基, 置于 28 °C 真菌培养箱 2~3 周。每日观察, 待长出菌落后应用 MALDI-TOF MS 鉴定仪进行菌种鉴定, 如鉴定为真菌, 记录为培养阳性。

1.3.2 革兰染色镜检 标本涂片后应用革兰染片仪进行革兰染色, 应用普通光学显微镜进行油镜下阅片。见到染成紫色的真菌孢子、真菌丝和假菌丝等真菌结构记录为阳性。

1.3.3 真菌荧光染色镜检 标本涂片后滴加 1 滴真菌荧光染色剂, 盖上盖玻片, 擦去多余染色剂, 置于荧光显微镜下阅片。见到发出绿色荧光的真菌孢子、真菌丝和假菌丝等真菌结构记录为阳性。

1.4 判断标准 因为真菌培养有漏检, 故本研究没有将真菌培养作为金标准来评价, 而是综合 3 种方法, 只要任意一种检测出真菌, 则认为该标本有真菌, 并以此为真阳性, 3 种方法均未检出真菌, 则为实测阴性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理和分析。计数资料以率或例数表示, 3 种方法的真菌检出率以及革兰染色镜检和荧光染色镜检的灵敏度、特异度比较, 采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种方法的真菌检出率比较 革兰染色法、荧光

染色法和真菌培养鉴定法的总检出率分别为 11.4%、53.4% 和 43.4%。3 种方法的真菌检出率比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 174.056, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3 种方法的真菌检出率比较[n(%)]

方法	n	酵母菌	丝状真菌	合计
革兰染色法	350	39(11.1)	1(0.3)	40(11.4)
荧光染色法	350	171(48.9)	16(4.6)	187(53.4)
真菌培养鉴定法	350	126(36.0)	26(7.4)	152(43.4)

2.2 3 种方法的灵敏度和阴性预测值比较 3 种方法中, 任意一种方法检出真菌, 则认为该标本真菌检测阳性。350 例标本中, 实测阳性共 216 例; 3 种方法均未检出真菌, 则为实测阴性, 共 134 例。革兰染色法检出真菌 40 例, 荧光染色法检出真菌 187 例, 真菌培养鉴定法检出真菌 152 例, 3 种方法灵敏度和阴性预测值见表 2~3。3 种方法灵敏度和阴性预测值的差异均有统计学意义($\chi^2 = 224.862, 74.646, P < 0.05$)。

2.3 革兰染色法与荧光染色法镜下分辨能力比较 革兰染色法和荧光染色法下真菌孢子及菌丝镜下形态见图 1。

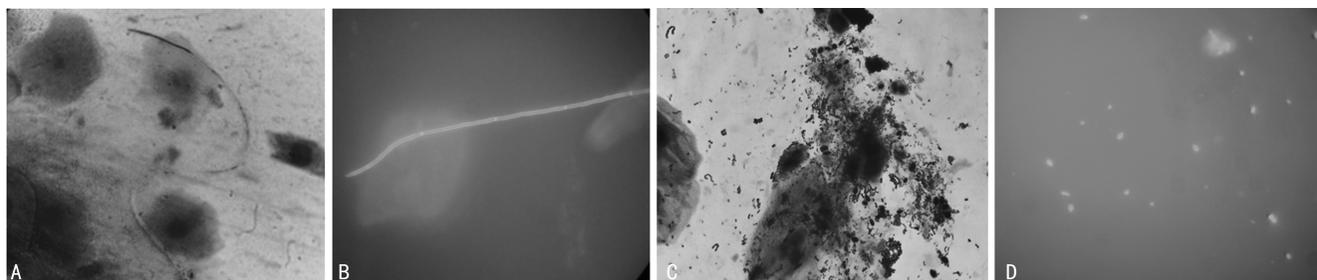
表 2 3 种方法的灵敏度比较

方法	真阳性例数(n)	假阴性例数(n)	实测阳性例数(n)	灵敏度(%)
革兰染色法	40	176	216	18.5
荧光染色法	187	29	216	86.6
真菌培养鉴定法	152	64	216	70.4

注: 实测阳性例数为革兰染色法、荧光染色法和真菌培养鉴定法 3 种方法中任意一种方法检出真菌则认为该标本真菌检测阳性。

表 3 3 种方法的阴性预测值的比较

方法	检测阴性例数(n)	真阴性例数(n)	假阴性例数(n)	阴性预测值(%)
革兰染色法	310	134	176	43.2
荧光染色法	163	134	29	82.2
真菌培养鉴定法	198	134	64	67.7



注: A 为革兰染色菌丝; B 为荧光染色菌丝; C 为革兰染色孢子; D 为荧光染色菌丝。

图 1 两种方法真菌孢子及菌丝镜下表现($\times 100$)

3 讨 论

实验室检查是真菌感染诊断的金标准,在排除污染的前提下,无论是涂片染色镜检还是真菌培养鉴定,只要检出阳性结果就可以明确诊断。相对于真菌培养鉴定,涂片染色镜检操作简便,可快速得到检测结果,为临床治疗提供依据。

真菌的镜检方法有很多,目前大部分实验室对于深部真菌感染的涂片镜检多采用革兰染色法^[5-7],革兰染色法用于细菌镜检可以较好地地区分革兰阳性菌和革兰阴性菌,但对于真菌而言,菌丝和孢子不易与革兰阳性菌、红细胞、白细胞以及上皮细胞区分。如图 1A 所示,真菌菌丝不易着色或着色不均,图 1C 中的真菌孢子不易辨别,故革兰染色法查找真菌容易漏检。荧光染色法是近年来应用于真菌镜检的染色方法,可用于各种疑似真菌感染的检查^[8-10],染色液中的荧光增白剂能够特异地结合真菌细胞壁 β -多糖成分,如几丁质、葡萄糖、纤维素。在荧光显微镜下,真菌孢子及菌丝发出黄绿色或淡蓝色荧光,与暗背景形成鲜明对比。如图 1B 所示,真菌菌丝经荧光染色,清晰可辨;图 1D 所示,经荧光染色的真菌孢子,与背景对比清晰,呈现出明显的立体感。因此,对镜检的镜下分辨能力而言,荧光染色法能够更加清晰地辨识真菌结构,无论在真菌的检出还是菌种的初步鉴定上均具有一定的优势。

鉴于革兰染色法镜下对真菌的观察和鉴别能力有限,本研究进而对 3 种真菌检测方法的检出率、灵敏度和阴性预测值进行评价。本研究所有标本经革兰染色法、荧光染色法和真菌培养鉴定法检测,任意一种方法阳性则认为该标本真菌检测阳性,以此为标准计算各种方法真菌检测的灵敏度和阴性预测值。首先,从 3 种方法的检出率来看,350 例临床标本中,荧光染色法真菌检出率为 53.4%,真菌培养鉴定法为 43.4%,革兰染色法为 11.4%,3 种方法的检出率差异有统计学意义($P < 0.05$)。其次,从 3 种方法的灵敏度来看,荧光染色法的灵敏度为 86.6%,真菌培养鉴定法为 70.4%,而革兰染色法仅为 18.5%,两种染色方法灵敏度差异有统计学意义($P < 0.05$)。本研究部分临床标本真菌培养阴性,但荧光染色法镜下可见真菌结构,其原因可能是某些种类的真菌对营养要求较高,体外培养不易生长,或者临床应用抗真菌药物后导致真菌活性降低或死亡,导致培养阴性,而荧光染色法镜检可以规避上述问题,提高真菌检测的灵敏度。最后,从 3 种方法的阴性预测值来看,荧光染色法的阴性预测值为 82.2%,真菌培养鉴定法为

67.7%,革兰染色法为 43.2%,两种染色方法阴性预测值差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。阴性预测值是评价一种检测方法检测真阴性的能力,也就是说阴性预测值越小,其漏检率越高。从本文数据来看,350 例标本中,革兰染色法报告 310 例阴性,而真阴性仅为 134 例,也就是说该方法漏检 176 例,漏检率高达 56.8%,而荧光染色法则极大降低镜检的漏检率。

综上所述,本研究评价了 3 种真菌检测方法的检测能力:从镜下观察来看,荧光染色法对比度好,具有更好的分辨能力;从检出率、灵敏度和阴性预测值 3 个评价指标来看,荧光染色法均优于革兰染色法;从操作方法来看,与真菌培养鉴定法及革兰染色法相比,荧光染色法操作更为快捷、简便。因此,荧光染色法在真菌镜检中具有较高的应用价值,值得临床推广应用。

参考文献

- [1] DUFRESNE S F, COLE D C, DENNING D W, et al. Serious fungal infections in Canada[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017, 36(6): 987-992.
- [2] 岳磊,朱秀梅,张婷,等.重症监护病房患者深部真菌感染情况分析[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16(19): 2837-2839.
- [3] 何文婧,高志琴,陈健,等. CFW 荧光染色法检测疑似真菌感染的临床应用评价[J]. *检验医学*, 2018, 33(4): 331-334.
- [4] 李椅云,李平,颜景兰. 荧光染色法与 KOH 法在皮肤真菌检查中的效果比较[J]. *中国微生态学杂志*, 2020, 32(1): 87-90.
- [5] TU W T, CHIN S Y, CHOU C L, et al. Utility of Gram staining for diagnosis of Malassezia folliculitis[J]. *Dermatology*, 2018, 45(2): 228-231.
- [6] 詹先林,管松晖,朱爱英,等. 临床常见真菌及实验室诊断[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(10): 1255-1257.
- [7] 董一红,王丽芳,张梦,等. 不同方法对外阴阴道假丝酵母菌病的检出效果[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(23): 2869-2872.
- [8] KIRANI K R, CHANDRIKA V S. Efficacy of in-house fluorescent stain for fungus[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2017, 60(1): 57-60.
- [9] KUMARASWAMY N L R, SHETTY P, KRISHNA P M S, et al. Fluorescence of Candida in diagnosis of oral candidiasis[J]. *Indian J Dent Res*, 2016, 27(6): 618-622.
- [10] 汤鸿,张熔熔,唐威. 荧光染色技术在肺活检组织真菌检测中的应用评价[J]. *诊断病理学杂志*, 2019, 26(11): 780-781.