

# 荧光染色法在真菌镜检中的应用研究

王晓霞

前郭县医院 吉林 松原 138000

**[摘要]**目的: 探究分析荧光染色分析方式在真菌镜检中的实际应用效果。方法: 从我院2019年7月--2019年12月之间收治的相关患者中选出180例作为研究对象, 共提取到标本数180份。在对标本直接进行涂片处理后, 然后分别利用10%KOH湿片、荧光染色方式镜检, 并且将标本接种到沙保罗培养基中展开真菌培养工作。利用上述三种方式进行检测, 若是任有一种检测方式的检测结果是阳性, 则都可以将这一标本视为真菌检测阳性, 同时借助于这一概念分别统计三种检测方式的检出率、灵敏度等情况, 并使用卡方检验方式对三种方式检测结果展开评析比较。结果: 针对上述标本分别使用荧光染色法、KOH湿片法和真菌培养鉴定法进行检测, 分析其各自对应的检出率差异性, 两两比较, 差距都较为明显 ( $P < 0.05$ )。另外从灵敏度、阴性预测值等角度分析, 三者之间的差距也是比较显著的 ( $P < 0.05$ )。结论: 在真菌检测领域, 应用荧光染色法开展标本检测工作, 则可以展现出较为突出的优势, 具有较高的推广价值。

**[关键词]** 荧光染色; KOH湿片法; 真菌培养鉴定

**【DOI】** 10.12252/j.issn.2096-6288.2020.04.345

近年来, 由于癌症、艾滋病等疾病导致免疫功能下降的患者数量大幅增加, 再加上免疫抑制剂及其广谱抗菌药的长期应用, 真菌感染发生率呈明显上升态势。IFD是感染性疾病致死的关键原因所在<sup>[1]</sup>。真菌感染的快速检测有助于在临床方面率先展开抗真菌治疗工作, 对于减少死亡率来讲, 显得十分关键。目前, 多数实验室仍常规使用KOH湿片法开展相关的镜检工作, 但是由于真菌孢子和菌丝均难以着色, 和背景颜色混杂在一起也无法高效辨别, 检出率低下。近年来, 荧光染色法在真菌染色镜检中的使用频率日益普遍, 特别是在浅部真菌病检查中的应用较多<sup>[2]</sup>, 但针对深部真菌感染标本的镜检研究资料较少。因此我们将采用与KOH湿片法对比的方式, 评估荧光染色法的临床应用价值, 现报告结果如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

本次实验期间, 从我院2019年7月--2019年12月之间接收的患者中选出180例作为研究对象展开探究工作。这些患者均为疑似深部真菌感染患者, 提取患者标本, 共计180份, 标本类型有所差异, 主要包括痰液、咽拭子、皮屑、甲屑、尿液、深部伤口拭子等。

### 1.2 仪器与试剂

荧光显微镜和CX41普通光学显微镜, MALDI-TOFMS鉴定仪, 沙保罗培养基, 10%KOH, 真菌荧光染色液。

### 1.3 方法

在标本采集工作结束后, 需要利用三种检测方式对标本进行有关操作, 质控菌株为白色念珠菌ATCC90028。

#### 1.3.1 真菌培养鉴定

在利用这一方式检测标本时, 需要利用三区划线的方式, 将对应的标本接种在沙保罗培养基内, 温度条件控制在28℃左右, 培养时间为两到三个星期。每天对标本的变化情况进行观察记录, 在发现真菌培养箱中培养出菌落之后, 在借助专业鉴定仪器对菌种展开鉴定, 若是经过鉴定确定为真菌, 则将培养结果记录为阳性。

#### 1.3.2 KOH湿片法镜检

将一份检验标本放置于载玻片中心位置, 滴一滴10%KOH

溶液, 之后覆盖盖玻片, 并将气泡去除, 应用酒精灯进行微加热处理后, 将溢出溶液用棉签拭去, 然后应用普通光学显微镜进行观察。

#### 1.3.3 真菌荧光染色镜检

在标本涂片操作后, 加入一滴真菌染色荧光剂, 然后在其上部覆盖盖玻片, 将多余的染色剂擦拭干净, 并将标本放在荧光显微镜下进行观察。若是发现真菌孢子、真假菌丝等有绿色荧光, 则视为检测结果为阳性。

#### 1.4 判断标准

由于真菌培养方式可能存在遗漏的情况, 所以本次实验探究中并没有将这一方式所获得的检测结果视作金标准, 而是将三种方式的检测结果进行综合整理, 只要一种方式检测出真菌, 则视为该标本有真菌存在, 并将其视作是真阳性。若是三种方式都没有检测出标本中存在真菌, 则视为实测阴性。

#### 1.5 统计学处理

利用SPSS23.0软件处理实验数据。

## 2 结果

### 2.1 三种方法的真菌检出率比较

根据实验相关数据进行测算, KOH湿片法、荧光染色法和真菌培养鉴定法各自对应的检出率水平为11.11% (20/180)、53.33% (96/180)、43.33% (78/180)。从三种方式的检出率的比较情况来看, 差异十分显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 三种方法的灵敏度和阴性预测值比较

通过下表的计算可知, KOH湿片法、荧光染色法和真菌培养鉴定法各自对应的灵敏度为18.18%、87.27%、70.91%, 此外, 三种方式各自对应的阴性预测值为43.75%、83.33%、68.63%。

表1 三种方式灵敏度对比

方法	真阳性	假阴性	实测阳性	灵敏度
KOH湿片法	20	90	110	18.18%
荧光染色法	96	14	110	87.27%
真菌培养鉴定法	78	32	110	70.91%

### 3 讨论

实验室检查是分析真菌感染诊断过程中需要重点参考的黄金标准, 真菌培养法的好处就是可以用来展开菌种鉴定工作或进行药敏实验, 这样对于临床药物的选择性有一定指导的作用, 能精确识别菌株, 更有利于疾病反复发作的患者, 而开展药敏实验也有助于医师更好地给病人选用治疗药品, 从而减少疾病复发率, 并促使病人迅速痊愈。不过弊端也同样显而易见, 比如真菌培养基制备过程复杂, 容易受到各种因素的污染以及真菌繁殖速度较慢, 常需要几天或者几周才会有成果。倘若标本真菌活力不够强, 还会造成培养阳性比例减少的情况发生, 甚至出现假阴性结果, 不利于对病情的早期判断与处理<sup>[3-4]</sup>。若是不考虑污染的情况下, 不管是染色镜检又或者是真菌培养, 只要可以获得阳性检测结果, 便可以达到明确诊断的目的。和真菌培养鉴定的方式进行对比, 染色镜检的操作简便性更为突出, 能够以较快的速度获取到相关检测结果, 这对于临床治疗工作的帮助很大。

对于真菌镜检而言, 其所涉及检查方式较多, 结合对实验室检查的现状调查加以分析, 目前KOH湿片法多会在深部真菌感染涂片的处理中广泛应用, KOH湿片法制作方法简单便捷, 成本低廉, 不需要特殊的仪器设备, 但非常依赖于检验人员的经验与技术水平, 且由于标本中常含有各种杂质导致视野背景较杂乱, 影响真菌的检出, 其中甲屑标本最为明显, KOH湿片法短时间无法溶解标本中的杂质, 一定程度上干扰了真菌检出, 导致阳性率不高<sup>[5]</sup>。荧光染色法在浅部标本与深部标本的检测中, 与KOH湿片法比较具有较大的优势, KOH湿片法因片中杂质多, 背景杂乱, 标本中的散在菌丝或孢子难以寻找辨认, 存在着主观判断的误差, 易漏检的局限性, 而使用荧光染色能快速有效的找到标本中的菌丝或孢子, 并且结构清晰, 明显地提高了标本的阳性率。

近年来, 应用越来越广泛的荧光染色方式在真菌镜检中展现出了较为显著的优势。该方式借助于荧光素标记物, 使得其可以和真菌细胞壁上的相关物质加以结合, 进而便会产生荧光复合物。虽然角蛋白等难以着色, 但是利用特定的荧光显微镜, 在其所具备的激发光波段的照射处理下, 菌丝、孢子等都会发生变色反应, 可以清楚地观察到其散发着亮蓝色荧光, 菌素、孢子等所散发出的光与观察背景之间的对比十分鲜明, 反差强烈, 观察者可以清楚地观察到真菌的形态特征, 这对于提升检出率有着非常明显的效果。经过有关研究验证可知, 该方法可以针对现如今已有的所有致病真菌展开直接性地涂片检测。针对在显微镜下观察到的真菌的形态特征, 还能够对真菌类别展开提示性地诊断, 十分具有参考价值。这一检验方法的操作步骤较为简单, 可以节省不少检测时间, 甚至可以在数十秒内完成相关检测, 即便检验操作人员并不具备丰富的实践经验, 也能够充分掌握这一检查方式的操作要点, 顺利完成检测。

因为利用KOH湿片法开展真菌镜检工作, 该方法所表现出的观察能力以及检测效果都比较差, 所以在此次探究中,

我们重点针对荧光染色法在真菌镜检中的相关应用情况进行了论述分析, 并在此过程中, 将10%KOH湿片法的应用情况与真菌培养法的应用情况视为对比项, 以便于更好地获得荧光染色法的作用实效性。实验探究期间, 主要对比指标有真菌检出率、灵敏度、阴性预测值等。实验探究期间, 无论是哪一方式测得标本呈阳性, 都一律认定为其就是阳性, 在这一标准要求下, 统计三种检测方式的相关指标水平。首先, 先从以上三种方法的检出率水平展开分析, 此次涉及的标本数量为180份, 利用荧光染色法进行检查, 所得到的真菌检出率为53.33% (96/180); 利用KOH湿片法进行检查, 所得到的真菌检出率为11.11% (20/180); 利用真菌培养鉴定法进行检查, 所得到的真菌检出率为43.33% (78/180), 从这一角度分析, 荧光染色法的检出率明显更高 ( $P < 0.05$ )。其次, 从三种方法的敏感性角度加以分析, KOH湿片法、荧光染色法和真菌培养鉴定法各自对应的灵敏度为18.18%、87.27%、70.91%, 此外, 三种方式各自对应的阴性预测值为43.75%、83.33%、68.63%, 对比差异明显 ( $P < 0.05$ )。在实验中部分临床标本真菌培养结果为阴性, 而在荧光染色法镜下发现了真菌组织结构, 导致这一情况出现的原因可能是部分类别的真菌对营养要求较为严格, 若是无法达到相应的要求, 则难以在体外正常生长, 或者在临床使用抗真菌药物之后, 使其呈现失活的状态, 从而会造成培养结果为阴性, 采用荧光染色法就能够避免发生这些现象, 从而大大地提高了真菌检测的敏感性。

综上所述, 本研究共评估了三种真菌检验方式的检出能力, 从镜下观测结果来说, 荧光染色法对比度较好, 具备了良好的生物识别能力; 从检出率、灵敏度, 以及对阴性预测值三个评估指标来分析, 荧光染色法的表现均好于KOH湿片法; 从操作的角度看, 荧光染色法检测更为迅速、简单。所以, 荧光染色法在真菌镜检中的作用十分突出, 值得在临床领域不断研究与推广。

#### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.