

- 155, XpertMTB/RIF 水平在结核性脑膜炎诊断中的价值[J]. 河北医药, 2020, 42(16): 2467-2470.
- [4] 陈文, 姚利, 陈康, 等. 宏基因组二代测序技术检测脑脊液在结核性脑膜炎诊断中的应用价值的 Meta 分析[J]. 中国防痨杂志, 2021, 43(10): 1066-1072.
- [5] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 156-160.
- [6] 国福云, 仵倩红, 潘建萍, 等. IL-23, ADA, LTB4 在结核性脑膜炎患者脑脊液中的表达及临床意义[J]. 临床误诊误治, 2020, 33(1): 4.
- [7] 杨泽伟, 冯飞, 杨颖, 等. 脑脊液 ESAT-6、ADA、INF- γ 、MMP-9 检测在结核性脑膜炎诊断及转归中的应用价值[J]. 山东医药, 2018, 58(18): 56-58.
- [8] 杨元利, 张永峰, 李爱芳, 等. 脑脊液腺苷脱氨酶水平检测在结核性脑膜炎早期诊断中的价值[J]. 陕西医学杂志, 2022, 51(3): 363-365.
- [9] CHAN T, CHEN S, MAK C M, et al. Determination of cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity cut-off for the diagnosis of tuberculous meningitis in Hong Kong [J]. J Clin Pathol, 2020, 73(12): 800-802.
- [10] 魏连存, 郭建英, 韩启福. 全血 γ -干扰素释放试验和脑脊液 ADA 含量联合诊断结核性脑膜炎的临床价值[J]. 青海医药杂志, 2019, 49(5): 64-65.
- [11] WEN P, WEI M, GUO X, et al. Mycoplasma pneumoniae infection mimicking tuberculous pleurisy in a young woman: a case report and literature review[J]. J Int Med Res, 2020, 48(4): 030006052091870.
- [12] 刘荣, 王丹, 李忠梅, 等. 脑脊液腺苷脱氨酶水平对结核性脑膜炎的诊断价值[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(1): 73-76.
- [13] CRESSWELL F V, TUGUME L, BAHR N C, et al. Xpert MTB/RIF Ultra for the diagnosis of HIV-associated tuberculous meningitis: a prospective validation study[J]. Lancet Infect Dis, 2020, 20(3): 308-317.
- [14] 钱乔乔, 刘婷, 孙丹, 等. 脑脊液二代测序对 5 例结核性脑膜炎患儿精准诊断价值研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2021, 36(1): 53-56.
- [15] 牛焕红, 范芳, 韩焱. 脑脊液细胞学在结核性脑膜炎病程中的动态变化及其诊断价值分析[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(6): 872-875.

(收稿日期: 2022-04-07 修回日期: 2022-09-11)

• 临床探讨 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.04.028

痰涂片荧光染色法在老年患者呼吸道感染中的应用

王艳平, 郑 鹏, 田 敏, 石雪艳, 王静波[△]

航天中心医院血液科, 北京 100049

摘要:目的 通过比较痰涂片革兰染色法、痰涂片荧光染色法与真菌培养法检测真菌的结果, 评价痰涂片荧光染色法在老年患者呼吸道感染中的应用价值。方法 选取该院 2021 年 1—12 月拟诊为肺部真菌感染的 479 例老年患者为研究对象, 收集患者痰液标本, 同时采用痰涂片革兰染色法、痰涂片荧光染色法、真菌培养法检测真菌, 对 3 种检测方法结果进行统计学分析。以真菌培养法作为金标准, 比较痰涂片革兰染色法和痰涂片荧光染色法的灵敏度和特异度。结果 痰涂片革兰染色法、痰涂片荧光染色法、痰真菌培养法检出率分别为 13.6%、36.5%、34.2%, 3 种检测方法真菌检出率比较, 差异有统计学意义($\chi^2=75.828, P<0.001$); 痰涂片荧光染色法真菌检出率略高于真菌培养法, 但差异无统计学意义($\chi^2=0.552, P=0.457$); 痰涂片荧光染色法真菌检出率高于痰涂片革兰染色法, 差异有统计学意义($\chi^2=67.269, P<0.001$)。痰涂片革兰染色法和痰涂片荧光染色法的灵敏度分别为 26.2% 和 76.2%, 特异度分别为 93.0% 和 84.1%, 差异均有统计学意义($P<0.001$)。结论 痰涂片荧光染色法能够快速、准确地判断真菌, 在老年患者呼吸道感染诊断中具有重要的临床意义。

关键词:真菌; 痰涂片荧光染色法; 革兰染色法; 真菌培养**中图分类号:** 446.5**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2023)04-0550-04

近年来, 中国老龄化问题日益突出, 随着各类抗菌药物、免疫抑制剂、激素及抗肿瘤药物的广泛应用, 老年患者呼吸道真菌感染的发病率上升, 已成为临床值得重视的问题, 因此, 快速检测出病原菌, 为临床及时提供治疗依据尤为重要。目前, 实验室检测真菌的方法主要有直接镜检法、血清学实验、培养法、组织病理学检查等。真菌培养法一直被视为诊断真菌感染的“金标准”, 但真菌培养法所需时间长, 临床医生不

能及时获取患者真菌感染的依据。近来又出现了真菌免疫荧光技术, 又称为痰涂片荧光染色法, 此方法简便快速, 但在临床实验室并未推广, 尤其是在呼吸道感染中的应用甚少^[1]。本研究通过对疑似呼吸道感染中的老年患者的痰涂片革兰染色法、痰涂片荧光染色法与真菌培养法检测结果进行比较, 探讨痰涂片荧光染色法在老年患者呼吸道感染中的应用价值, 为临床快速、准确地获得真菌检测结果提

[△] 通信作者, E-mail: wangjingbo29@sohu.com.

供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2021 年 1—12 月拟诊为肺部真菌感染的 479 例老年患者为研究对象,其中男 298 例,女 181 例;年龄 65~103 岁,平均(81.5±9.4)岁。

1.2 方法

1.2.1 痰液标本留取 患者清洁口腔后采集清晨深咳痰于无菌痰盒内,2 h 内送检。

1.2.2 痰液标本合格标准 痰液直接镜检,要求白细胞计数在每个低倍视野中≥25 个,上皮细胞在每个低倍视野中≤10 个,不合格标本重新采集并送检。

1.2.3 痰涂片革兰染色法 混匀痰液标本,涂片,干燥后火焰固定,采用革兰染液染色后镜检,看到形态典型的蓝黑色孢子、菌丝或假菌丝记录为阳性。

1.2.4 痰涂片荧光染色法 混匀痰液标本,涂片,自然干燥后加一滴荧光染色液(诺立清,免疫显色试剂),加盖玻片,轻轻按压,用滤纸把多余的染色液吸净,染色时间 1~2 min,使用荧光显微镜(型号 DM500)观察结果,看到荧光标记的孢子或菌丝即判断为阳性。

1.2.5 真菌培养法 采用常规方法将混匀的痰液标本接种在沙保罗培养基上,35℃培养 1 周,菌株的初次分离采用科玛嘉显色培养基和 YST 酵母菌鉴定卡进行常规鉴定,所有菌株采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)仪复核鉴定,结果不一致的菌株采用核糖体 DNA 内转录间隔区序列分析的方法进行菌种鉴定。标准质控菌株为念珠菌 ATCC8735。

1.3 观察指标 比较痰涂片革兰染色法、痰涂片荧光染色法和真菌培养法检测结果及镜下形态,并以真菌培养法为参考标准,比较痰涂片革兰染色法、痰涂片荧光染色法两种方法的灵敏度、特异度、总符合率、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/(假阳性例数+真阴性例数)×100%;阴性预测值=真阴性例数/(假阴性例数+真阴性例数)×100%;阳性预测值=真阳性例数/(真阳性例数+假阳性例数)×100%;符合率=(真阴性例数+真阳性例数)/总例数×100%。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理及统计分析。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种方法的真菌检测结果比较 痰涂片革兰染色法、痰涂片荧光染色法和真菌培养法检出率分别为 13.6%、36.5%和 34.2%,差异有统计学意义($\chi^2=75.828, P<0.001$);痰涂片荧光染色法真菌检出率略

高于真菌培养法,但差异无统计学意义($\chi^2=0.552, P=0.457$);痰涂片荧光染色法真菌检出率高于痰涂片革兰染色法,差异有统计学意义($\chi^2=67.269, P<0.001$)。痰涂片革兰染色法真菌检出率低于真菌培养法,差异有统计学意义($\chi^2=56.244, P<0.001$)。见表 1。

表 1 3 种方法的真菌检测结果比较($n=479$)

| 方法 | 阳性(n) | 阴性(n) | 阳性率(%) |
|----------|-----------|-----------|--------|
| 痰涂片革兰染色法 | 65 | 414 | 13.6 |
| 痰涂片荧光染色法 | 175 | 304 | 36.5 |
| 真菌培养法 | 164 | 315 | 34.2 |

2.2 痰涂片荧光染色法与痰涂片革兰染色法对真菌感染的诊断效能比较 以真菌培养法为金标准,痰涂片荧光染色法、痰涂片革兰染色法分别与真菌培养法结果比较见表 2、3。痰涂片荧光染色法的灵敏度明显高于痰涂片革兰染色法,而特异度却略低于痰涂片革兰染色法,差异有统计学意义($P<0.05$);痰涂片荧光染色法的约登指数、总符合率、阳性预测值和阴性预测值明显高于痰涂片革兰染色法,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

表 2 痰涂片荧光染色法与真菌培养法结果比较(n)

| 痰涂片荧光染色法 | 真菌培养法(金标准) | | 合计 |
|----------|------------|-----|-----|
| | 阳性 | 阴性 | |
| 阳性 | 125 | 50 | 175 |
| 阴性 | 39 | 265 | 304 |
| 合计 | 164 | 315 | 479 |

表 3 痰涂片革兰染色法与真菌培养法结果比较(n)

| 痰涂片革兰染色法 | 真菌培养法(金标准) | | 合计 |
|----------|------------|-----|-----|
| | 阳性 | 阴性 | |
| 阳性 | 43 | 22 | 65 |
| 阴性 | 121 | 293 | 414 |
| 合计 | 164 | 315 | 479 |

表 4 痰涂片荧光染色法与痰涂片革兰染色法诊断效能比较

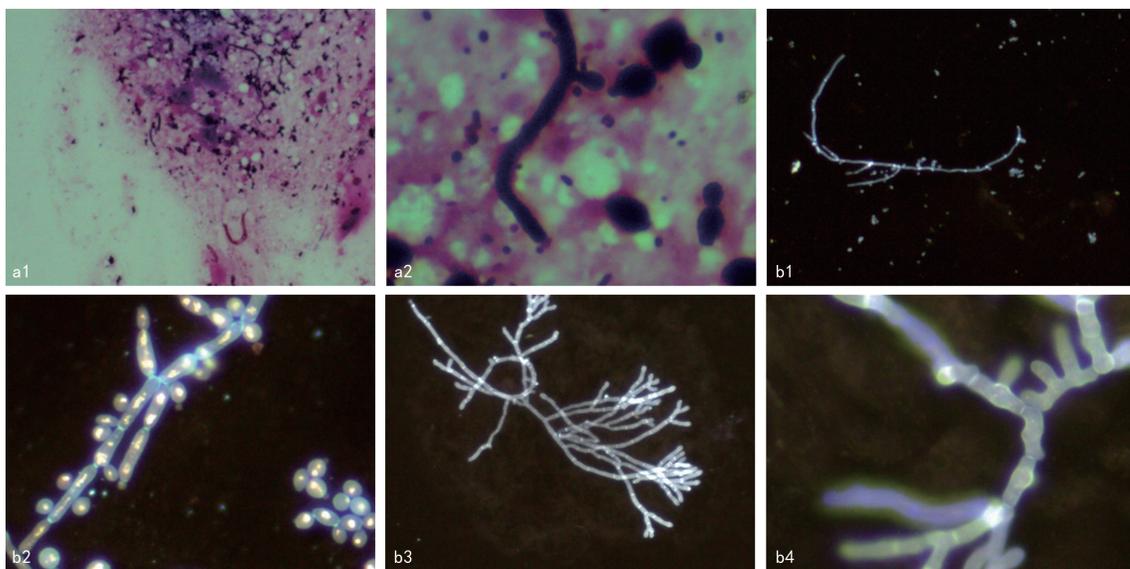
| 方法 | 灵敏度(%) | 特异度(%) | 总符合率(%) | 阳性预测值(%) | 阴性预测值(%) | 约登指数 |
|----------|--------|--------|---------|----------|----------|-------|
| 痰涂片荧光染色法 | 76.2 | 84.1 | 81.4 | 71.4 | 87.2 | 0.603 |
| 痰涂片革兰染色法 | 26.2 | 93.0 | 70.1 | 66.2 | 70.8 | 0.192 |

2.3 真菌培养结果 479 例患者的痰液标本真菌培养共检出 164 株真菌,分别是白色念珠菌 107 株(65.2%),光滑念珠菌 19 株(11.6%),热带念珠菌 15

株(9.1%),曲霉菌 11 株(6.7%),耳念珠菌 5 株(3.0%),葡萄牙念珠菌 3 株(1.8%),克柔念珠菌、特纳里夫念珠菌、星状丝孢酵母、毛霉各 1 株,共 4 株(2.4%)。

2.4 痰涂片革兰染色法和痰涂片荧光染色法镜下形态 痰涂片革兰染色背景呈紫红色或粉红色,菌丝孢子被染成蓝黑色,低倍镜($\times 10$)下背景杂乱,孢子菌丝形态与痰液标本中脂滴、细胞碎片、植物纤维杂质的形态不好区分(图 a1),疑似的菌丝孢子形态需在油

镜下确认,油镜下可见菌丝孢子形态(图 a2)。痰涂片荧光染色法中的菌丝孢子在荧光显微镜下发出明亮的蓝色荧光,背景黑色,真菌形态清晰可见(图 b1~b4),低倍镜($\times 10$)下即可大致确认阴、阳性,特异性非常强(图 b1、b3),高倍镜($\times 40$)下观察菌丝孢子形态(图 b2、b4),根据孢子和菌丝的形态、大小和排列等特征可初步判断真菌种属,例如念珠菌具有酵母样孢子和藕节样假菌丝(图 b2);曲霉菌有有隔菌丝,约 45 度角分枝,呈鹿角样(图 b4)。



注:a1、a2 为革兰染色菌丝孢子;b1~b4 为荧光染色菌丝孢子;b1、b2 为念珠菌;b3、b4 为曲霉菌;a1、b1、b3 为低倍镜($\times 10$),b2、b4 为高倍镜($\times 40$),a2 为油镜($\times 100$)。

图 1 痰涂片革兰染色法和痰涂片荧光染色法显微镜下形态

3 讨 论

老年患者常伴有严重的基础疾病、免疫力低下,长期使用抗菌药物、激素及免疫抑制剂导致身体免疫功能低下,菌群失调,容易继发真菌感染,感染部位以呼吸道占首位。患者只要存在易感因素都应进行真菌的反复检测,如有真菌感染史应定期跟踪监测,以便及时诊断和治疗。由于病原学检查可以为临床诊治提供有力依据,建议将真菌检测列为常规项目^[2]。本研究中痰液标本真菌检出率为 34.2%(真菌培养法),表明真菌感染率较高,早期快速、准确检出真菌是治疗的关键。应用痰涂片革兰染色法、痰涂片荧光染色法分别对 479 份痰涂片检测真菌,并以真菌培养法为标准,对检测结果进行比较,结果显示痰涂片荧光染色法真菌检出率略高于真菌培养法,但差异无统计学意义($P=0.457$)。痰涂片革兰染色法真菌检出率明显低于真菌培养法和痰涂片荧光染色法,差异有统计学意义($P<0.001$)。以上结果表明痰涂片荧光染色法较痰涂片革兰染色法的检出率更高,可以减少漏诊,痰涂片荧光染色法检出率与真菌培养法接近,有利于患者及早诊断和治疗。

以往痰涂片革兰染色法以其操作简单、观察方便

等优点被广泛应用于实验室,但其检出率明显低于真菌培养法^[3],痰涂片革兰染色法常规用于痰培养前的镜检,一方面,痰涂片保证了痰液标本的质量,能提高痰培养的阳性率;另一方面,合格痰液标本的细菌革兰染色涂片信息可预测培养结果^[4],本研究同样也验证了上述观点,痰涂片革兰染色法检出率明显低于真菌培养法,但有助于选定合格的标本。痰涂片革兰染色法真菌检出率非常低,笔者总结主要有以下几方面原因:(1)痰涂片太厚,真菌孢子菌丝混杂在标本内部,染色不明显,无法辨认;(2)实验室所用染色仪器的影响,导致染色太浅或太深均不利于镜下观察;(3)低倍镜下孢子菌丝的形态不明显,易与植物纤维、细胞碎片混淆,油镜观察很难做到整片浏览;(4)检测人员镜下观察能力不足。

近些年来,痰涂片荧光染色法逐步在国内被推广,因其具有较高的灵敏度和特异度,越来越受到临床实验室的青睐。痰涂片荧光染色法所使用的免疫显色试剂主要功能成分包括 β -D-葡聚糖结合蛋白和荧光素,能特异性地结合真菌细胞壁 β -D-葡聚糖和几丁质多糖,使真菌细胞壁被双重标记,在荧光显微镜紫外光(波长 340~380 nm)或者蓝紫光(波长 420~

490 nm)特定的激发光波段下,菌丝或者孢子发出明亮的蓝色荧光,在黑色背景下结构清晰、易于分辨,提高真菌的检出率,而且实验过程非常简单,只需滴加一滴试剂,等待 1~2 min 即可镜检。查阅文献发现,国内学者大多将痰涂片荧光染色法用于浅部真菌的检测,标本类型主要为皮屑、甲屑、毛发、皮肤病理组织等,研究结果均显示痰涂片荧光染色法是一种灵敏度高、快捷、可靠的真菌检测方法,阳性检出率高于常规镜检法^[5-11]。刘鸿宇等^[12]提出,痰涂片荧光染色法与痰涂片革兰染色法相比,具有更高的灵敏度、特异度和准确度,可减少假阴性发生,降低对真菌的漏检率,值得临床推广应用。本研究采用 3 种不同的真菌检测方法检测老年患者痰液标本,研究结果与上述文献一致。痰涂片荧光染色法虽然过程简便、快捷,具有较高的灵敏度和特异度,但荧光染色后除了真菌外,细支气管上的弹性纤维、外源性植物纤维、脂肪滴、寄生虫也可以发出亮蓝色的荧光,需结合形态区分^[13]。在荧光镜检实际工作中,笔者总结出一些需要注意的地方,如痰液标本一定要混匀,挑取黏性或含血丝部位,均匀涂抹在玻片上,切勿蘸取唾液或涂得太厚,以免造成假阴性结果;压片后一定要用滤纸按压盖玻片吸去多余的染色剂,这样避免痰液标本悬浮流动,可使镜下观察更清晰,同时也可避免液体溢出造成污染;染色后尽快读片,以免试剂干涸荧光淬灭影响观察;玻片上会有少量纤维杂质,同样也会发出荧光,但没有典型的横隔和出芽结构,形态一般不规则,大小亮度与真菌有很大差异,一定要注意区分,避免出现假阳性结果;试剂常温保存,避免高、低温环境及阳光直射影响试剂效果。

痰涂片荧光染色法的特异度和灵敏度均较高,不乏导致定植真菌的检出,因此可能导致检出率高于真菌培养法。在临床工作中,老年住院患者的念珠菌病发病率较高,这明显与口腔真菌的高定植率有关,中老年住院患者口腔真菌定植检出率最高的是白色念珠菌,占 95.5%^[14]。伍海英^[15]在 1 020 份呼吸道标本中共检测出真菌 271 株,主要为白色念珠菌,占检测出的病原菌总株数的 76.0%,与本院培养法检出的白色念珠菌的比例 65.3%接近。本研究中的研究对象均为 65 岁以上的老年人,主要症状以咳嗽、咳痰为主,基础疾病较多,大部分长期使用抗菌药物治疗,很容易发生菌群失调,导致机体免疫功能低下,念珠菌可在局部大量生长繁殖,由酵母相转为菌丝相,毒力增强,导致感染,甚至导致播散性念珠菌病,因此,定植性的真菌检出也很重要,应根据临床病情,结合其他检测结果综合诊断。

综上所述,通过 3 种真菌检测方法结果的比较,

发现痰涂片荧光染色法能够快速、准确地判断真菌,提高了真菌检出率,在老年患者呼吸道真菌感染的诊断中具有重要的价值,有利于患者及早诊断和治疗,值得实验室推广应用。

参考文献

- [1] PRAKASH R, PRASHANTH H V, RAGUNATHA S, et al. Comparative study of efficacy, rapid of detection, and cost-effectiveness of potassium hydroxide, calcofluor white, and Chicago skyblue stains in the diagnosis of dermatophytoses[J]. *Int J Dermatol*, 2016, 55(4):172-175.
- [2] 杨艳秋, 贺丹, 许建成, 等. 老年患者呼吸系统真菌感染的检测及临床研究[J]. *中国老年学杂志*, 2006, 26(7):930-932.
- [3] 李航, 方文捷, 熊林, 等. 侵袭性真菌感染早期诊断技术的研究进展[J]. *菌物学报*, 2019, 38(2):151-158.
- [4] 李恩杰, 田立华. 痰涂片显微镜检查与培养结果的相关性分析[J]. *中国感染控制杂志*, 2010, 9(3):125-127.
- [5] 徐瑾, 何永, 黄玲珍, 等. 荧光染色法、双重荧光染色法与 KOH 湿片法在甲真菌诊断中的比较研究[J]. *中国真菌学杂志*, 2020, 15(6):167-169.
- [6] 齐宝全, 车付彬, 王丽娜, 等. 荧光染色法在浅部真菌检验中的应用[J]. *中国现代医生*, 2019, 57(12):90-92.
- [7] 杜鹏, 黄嘉怡, 沈守星, 等. 荧光染色法和 KOH 湿片法、真菌培养法在皮肤浅部真菌感染诊断中的应用比较[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2018, 34(12):712-714.
- [8] 李翔英, 廉翠红. 荧光染色法与 KOH 湿片法的回顾性研究[J]. *中国真菌学杂志*, 2018, 13(5):297-298.
- [9] 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.
- [10] 余菁, 许辉, 刘芝翠, 等. 荧光染色法和 KOH 湿片法检测浅部真菌感染的效果比较[J]. *中华皮肤科杂志*, 2019, 52(5):314-318.
- [11] 陈学超, 于永翔, 王建文, 等. 免疫荧光技术在皮肤活检组织真菌染色中的应用[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2022, 38(2):101-103.
- [12] 刘鸿宇, 周峻林. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者应用痰真菌涂片与真菌免疫荧光染色检测法进行快速诊断的价值比较[J]. *中国当代医药*, 2021, 28(8):192-194.
- [13] 杨启文, 倪语星, 林丽开, 等. 临床微生物实验室真菌检测能力建设基本要求专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(7):514-528.
- [14] 杨宏军, 孙相华, 王晓斌, 等. 老年住院患者口腔真菌定植状况与药敏研究[J]. *皮肤病与性病*, 2019, 41(2):163-166.
- [15] 伍海英. 呼吸道真菌感染和药敏结果分析[J]. *医学检验与临床*, 2009, 20(5):27-28.