

• 论 著 •

5 种快速方法检测真菌孢子的比较

吴瑞民¹, 李朝献², 李好蓉^{1△}

(1. 邢台医学高等专科学校第二附属医院, 河北邢台 054000; 2. 平乡县丰州镇卫生院, 河北邢台 054500)

摘要:目的 推行白带常规检查规范化、标准化, 提高检测阳性率。方法 严格控制白带常规检查如医生申请、患者准备、标本采集、送检、质量控制、实验室检查、报告发放等各环节操作。用亚甲蓝、新亚甲蓝、吕氏碱性美兰、改良革兰氏染色法及改良革兰氏染色法等快速染色法与生理盐水直接涂片法对妇科门诊 216 例疑似阴道炎的患者同时做阴道分泌物常规检测。结果 生理盐水直接涂片法: 念珠菌检出率 24.5%, 滴虫检出率为 10.6%。5 种快速染色法: 念珠菌检出率为 31.5%, 滴虫检出率为 12%, 加德纳菌检出率为 19.4%。生理盐水直接涂片法和 5 种快速染色法对滴虫的检出率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但快速染色法检出率高于生理盐水直接涂片法。生理盐水直接涂片法和快速染色法对念珠菌的检出率经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 快速染色法对念珠菌的检出率明显高于生理盐水直接涂片法。结论 5 种快速染色法均适用于检查阴道分泌物, 提高白带常规检查的阳性率, 对女性阴道炎诊断与鉴别诊断、治疗效果评估有重要价值。

关键词: 阴道分泌物; 真菌染色法; 真菌孢子

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)09-1257-02

Comparison of 5 kinds of rapid method for detecting fungal spores

Wu Ruimin¹, Li Chaoxian², Li Yurong¹

(1. Second Affiliated Hospital, Xingtai Medical College, Xingtai, Hebei 054000, China;

2. Fengzhou Township Health Center, Xingtai, Hebei 054500, China)

Abstract: Objective To carry out the normalization and standardization of leucorrhea routine detection for improving the positive detection rate. **Methods** The each link operating of the leucorrhea routine detection was strictly controlled, including doctor's detection application, patient preparation, specimen collection, submitting for detection, quality control, laboratory examination, report issued. The rapid staining methods of methylene blue, new methylene blue, Lu alkaline methylene blue, modified Gram 1 and modified Gram 2 and the physiological saline direct smear method were adopted to conduct the routine detection of the vaginal secretion in 216 outpatients with suspected vaginitis in the gynecological clinic. **Results** The physiological saline direct smear method: the detection rates of Candida and trichomonas were 24.5% and 10.6% respectively. 5 kinds of rapid staining method: the detection rates of Candida, trichomonas and Gardiner bacterium were 31.5%, 12% and 19.4% respectively. The trichomonas detection rate had no statistically significant difference between the physiological saline direct smear method and 5 kinds of rapid staining method ($P > 0.05$), but the detection rate of the rapid staining method was higher than that of the physiological saline direct smear method. The detection rate of Candida had statistically significant difference between by the physiological saline direct smear method and the rapid staining method by chi square test ($P < 0.05$), the detection rate of Candida in the rapid staining method was significantly higher than that in the physiological saline direct smear method. **Conclusion** Five kinds of rapid staining method all are suitable for the vaginal secretion detection, which can increase the positive rate of the leucorrhea routine detection and has the important value for the diagnosis, differential diagnosis and curative effect evaluation of female vaginitis.

Key words: vaginal secretion; fungal staining; fungal spore

白带又称阴道分泌物, 是由前庭大腺、子宫颈腺体、子宫内膜的分泌物和阴道黏膜渗出液、脱落的阴道上皮细胞混合而成。正常时白带呈白色稀糊状, 无气味, 量多少不等。当患有生殖道疾病时如阴道炎、恶性肿瘤等, 白带性状、镜检均有异常变化。所以, 白带常规检查对确定阴道清洁度、病原体鉴别有意义^[1]。白带常规检查的流程包括医生申请、患者准备、标本采集、送检、质量控制、实验室检查、报告发放。只有规范操作每一环节, 才能保证白带检查的质量, 提高检测阳性率。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本院 2014 年 3 月份妇科门诊 216 例疑似阴道炎的患者。

1.1.1 患者准备

白带常规检查前 3 d, 患者应免阴道灌洗和

盆浴, 前 24 h 应禁止性生活, 避免阴道局部用药; 但在检查的前 1 d 应用温水清洗一下外阴部, 保持阴部清洁干爽。白带常规检查为防止经血干扰白带镜检, 一般情况下, 白带常规检查的最佳时间是在月经干净 3 d 之后。应尽量避免食用一些油腻、不易消化的食物, 此外, 还应禁酒, 避免一些对肝、肾功能有损害的药物。

1.1.2 标本的采集与送检

阴道毛滴虫主要寄生在女性阴道, 以阴道后穹窿多见。因此取材时需要用清洁、不粘有任何化学药品或润滑剂的扩阴器, 用生理盐水浸湿的无菌棉拭子自阴道后穹窿、子宫颈或阴道壁上多部位向一个方向刮擦取材, 将带有标本的棉拭子置入无菌管中。采集标本后应在 1~2 h 内 25~42 °C 温度下送检^[2], 可免标本变质污染且能保持滴虫

的活动^[3]。

1.2 仪器与试剂 10 g/L 亚甲蓝液(亚甲蓝注射液),新亚甲蓝染液,吕氏美蓝染色液,革兰氏染色龙胆紫液、媒染液,革兰氏染色龙胆紫液、媒染液、脱色酒精均由珠海贝索生物技术有限公司提供。CX31 奥林巴斯显微镜由日本奥林巴斯株式会社提供。

1.3 方法

1.3.1 美兰(亚甲蓝)染色法 将带有阴道分泌物的棉签在洁净的载玻片上向一个方向滚动涂片,使整个棉签儿和玻片接触^[4],制成透过铅字厚的薄膜,加 10 g/L 亚甲蓝液 1 滴,加盖玻片,2 min 后高倍镜查找真菌孢子及假菌丝。

1.3.2 新亚甲蓝染色法 将带有阴道分泌物的棉签在洁净的载玻片上向一个方向滚动涂片,使整个棉签儿和玻片接触^[4],制成透过铅字厚的薄膜,加网织红细胞染色液 1 滴,加盖玻片,立即用高倍镜查找真菌孢子及假菌丝。

1.3.3 碱性吕氏美蓝染色法 与 1.3.2 方法相同。

1.3.4 改良革兰氏染色法 1 将带有阴道分泌物的棉签在洁净的载玻片上向一个方向滚动涂片,使整个棉签儿和玻片接触^[4],制成透过铅字厚的薄膜,自然干燥,固定,加龙胆紫液 1 滴染 10 s,加媒染液 1 滴,流水冲洗,用高倍镜查找孢子及假菌丝。

1.3.5 改良革兰氏染色法 2 将带有阴道分泌物的棉签在洁净的载玻片上向一个方向滚动涂片,使整个棉签儿和玻片接触^[4],制成透过铅字厚的薄膜,自然干燥,固定,加龙胆紫液 1 滴染 10 s,加媒染液 1 滴,流水冲洗;加脱色酒精,流水冲洗;用高倍镜查找真菌孢子及假菌丝。

1.3.6 盐水直接涂片法 将带有阴道分泌物的棉签在洁净的载玻片上向一个方向滚动涂片,加 1 滴生理盐水,再加盖玻片直接镜检。

2 结 果

用 5 种试剂染色后,40×镜下观察孢子、菌丝均呈蓝色,菌丝着色不均匀;细胞核呈深蓝色,胞浆呈淡蓝色;细菌呈蓝色。生理盐水直接涂片法:在 40×镜检下,孢子呈卵圆形折光小体,菌丝成丝团或分枝状,蓝绿色折光。念珠菌检出率为 24.5%,滴虫检出率为 10.6%。阴道分泌物涂片 5 种快速染色法:念珠菌检出率为 31.5%,滴虫检出率为 12%,加德纳菌检出率为 19.4%。生理盐水直接涂片法和 5 种快速染色法对滴虫的检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$),但 5 种快速染色法检出率高于生理盐水直接涂片法。生理盐水直接涂片法和 5 种快速染色法对念珠菌的检出率经 χ^2 检验,差异有统计学意义($P<0.05$),5 种快速染色法:对念珠菌的检出率明显高于生理盐水直接涂片法。6 种方法对滴虫、念珠菌、加德纳菌的检出率详见表 1。

表 1 6 种方法对滴虫、念珠菌、加德纳菌的检出率(%)

检测方法	<i>n</i>	念珠菌 检出率	滴虫 检出率	加德纳菌 检出率
亚甲蓝法	206	31.5	12.0	19.4
新亚甲蓝法	206	31.5	12.0	19.4
吕氏碱性美兰	206	31.5	12.0	19.4
改良革兰氏染色法 1	206	31.5	12.0	19.4
改良革兰氏染色法 2	206	31.5	12.0	19.4
生理盐水直接涂片法	206	24.5	10.6	0.0

3 讨 论

阴道分泌物(白带)真菌孢子及假菌丝检查是诊断真菌性阴道炎的最常用又简便的方法。但生理盐水直接涂片法由于阴道上皮细胞核及上皮细胞膜的卷曲、各种成分的重叠遮掩、涂片背景不清等原因,常使真菌形态难以辨别^[5],而且此法不能检出加德纳菌、线索细胞、革兰阴性双球菌和其他条件致病菌^[6],极易造成念珠菌漏检,为临床做出明确的诊断带来了很大困难。5 种快速染色法能使念珠菌假菌丝以及芽生孢子染成蓝色,在显微镜下观察形态典型,极易辨认^[7],从而提高念珠菌镜检的阳性率。

实验证明用亚甲蓝染色 120 s 时,孢子不着色,随着时间的延长,孢子的一端开始着色并逐渐扩大范围,着色加深,2 min 后孢子全部呈深蓝色。这说明:(1)活孢子细胞壁完整光滑,染色液不易渗透至孢子体内;(2)活孢子体内的新陈代谢物能还原美兰,使美兰变成无色;(3)离体孢子时间越长,新陈代谢减弱,还原性减弱,渗透到孢子壁内的染液增多。因此,亚甲蓝染色真菌孢子的最佳时间为 2 min。同时,用亚甲蓝染色不仅可观察孢子的形态,还可以区分死、活孢子,对评估真菌感染程度和治疗效果有重要作用。

新亚甲蓝与亚甲蓝相比,对孢子、菌丝、细胞染色更快,染色效果更好。5 种快速染色法均能使孢子、菌丝、细菌着色,白细胞和上皮细胞核染呈深蓝色,胞浆呈淡蓝色或无色,阴道毛滴虫核染呈蓝色,胞质染呈淡蓝色或无色,鞭毛染呈蓝色或无色,细菌呈蓝色或深紫色,线索细胞和阴道毛滴虫清晰可辨。因此,这 5 种快速染色法均适用于检查阴道分泌物,提高白带常规检查的阳性率,对女性阴道炎诊断与鉴别诊断、治疗效果评估有重要意义。

规范操作和高水平检验技能是检验质量的保证。因此,实验室要建立标本采集 SOP、白带常规检验 SOP,加强检验技术人员的显微镜检验技能培训,对提高细胞、细菌、寄生虫等有形成分的辨别水平,检验结果的准确性,阴道炎诊断与鉴别诊断、治疗效果评估有更重要的价值。

参考文献

[1] 盛瑞鑫,刘淑文. 白带常规实验室检查及临床意义[J]. 中国性科学,2009,2(2):33.
[2] 叶应妩. 临床检验操作规程[M]. 南京:东南大学出版社,2006:324.
[3] 贾丽. 真菌感染的检验方法分析[J]. 中国现代药物应用,2013,4(4):46-47.
[4] 洪恩博,徐洁红. 白带真菌检验之我见[J]. 现代检验医学杂志,2003,18(5):26.
[5] 苏贻华. 阴道真菌检测方法的比较[J]. 检验医学与临床,2012,9(4):475-476.
[6] 张妮. 206 例阴道分泌物生理盐水直接涂片法和染色法的结果比较分析[J]. 实用医技杂志,2005,5(12):1119.
[7] 李慧群,洪英,马玉玲. 两种方法检测阴道念珠菌的临床应用及对比[J]. 医学信息,2011,8(1):4101.