

体外诊断试剂IVD

真菌荧光染色液(一步法)

Fungal Fluorescence Staining Solution (one step)

汇报人：华晶试剂研发部 路雅丽
青岛华晶生物技术有限公司

Qingdao Huajing Biotechnology Co.,Ltd

目录

1

• [研发背景](#)

2

• [疾病介绍](#)

3

• [诊断方法](#)

4

• [产品介绍](#)

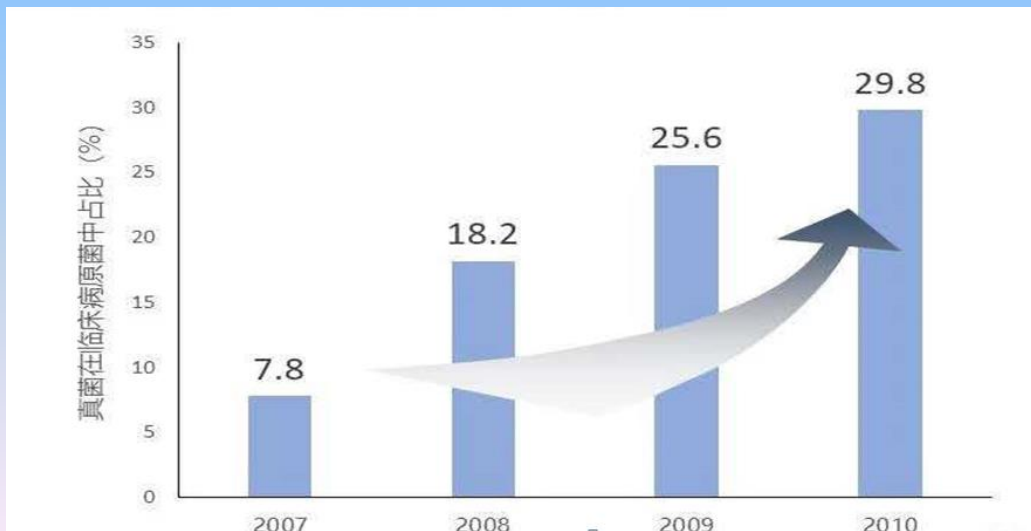
5

• [专家评价](#)

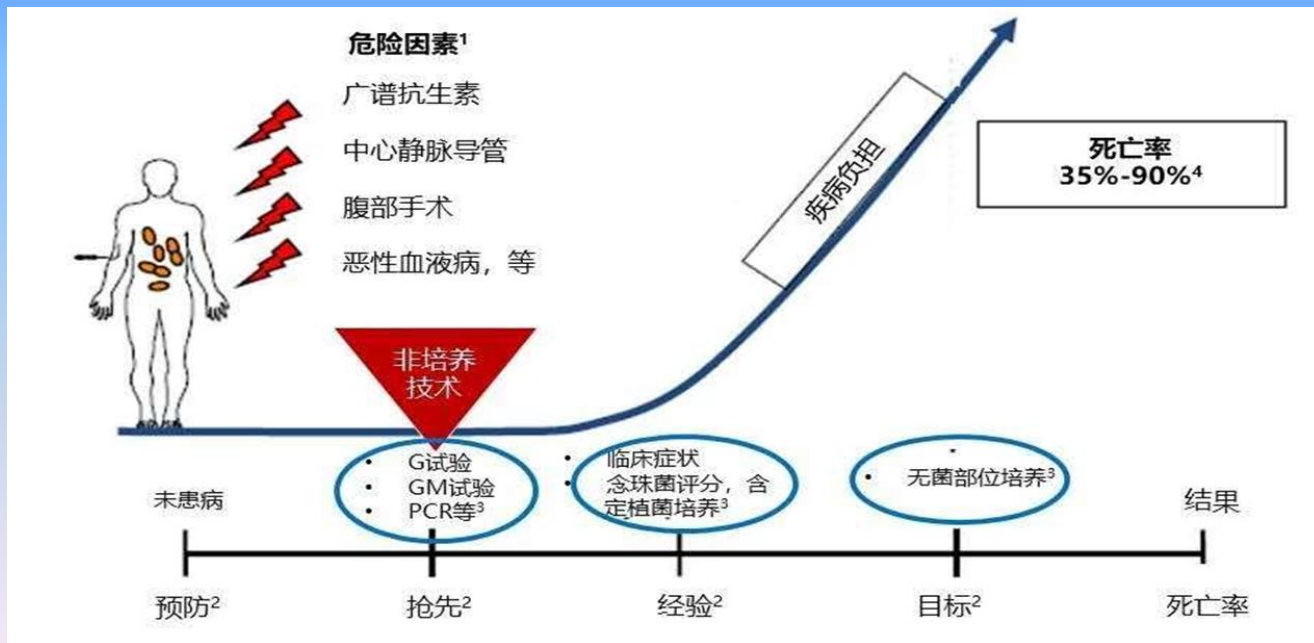
需尽快提高真菌检测能力的原因1： 我国真菌感染呈上升趋势

随着人口老龄化、广谱强效抗菌药物的大量应用，恶性肿瘤的放化疗、导管插管、器官移植、皮质类固醇激素和免疫抑制剂的广泛使用等，深部真菌感染发生率呈上升趋势

国内研究显示，真菌在临床病原菌中的占比逐年升高



需尽快提高真菌检测能力的原因2: 不同侵袭性真菌病治疗策略的开展都离不开真菌检测



真菌疾病介绍

真菌感染介绍

真菌分布种类

- 真菌广泛存在于自然界，而致病性真菌约有400余种。随着器官移植的大量开展及免疫抑制剂、肿瘤患者化疗药物、糖皮质类固醇激素的广泛使用，人类免疫缺陷病毒感染的高流行趋势、体内有创检查的大量开展，人口老龄化和糖尿病等慢性疾病患者的增多，真菌发病率和死亡率逐年增加，对人类健康的危害日趋严重。

真菌感染诊断

- 由于临床对很多真菌感染的微生物特性了解较少，加之真菌感染的临床表现多种多样，通常会出现误诊、漏诊，导致病情加重甚至危及生命。这就需要确实有效快速的早期诊断方法。

真菌感染分类

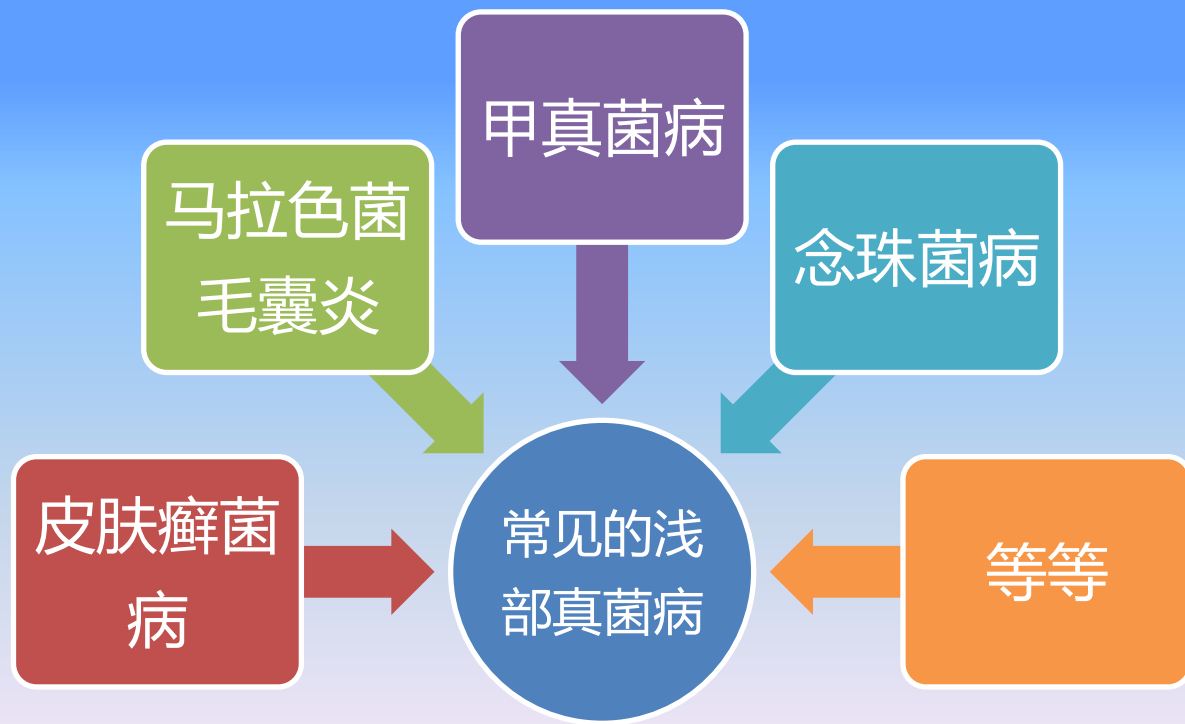
浅部真菌感染

- 主要引起皮肤、黏膜的真菌感染
- 侵犯皮肤、黏膜、毛发、指甲
- 慢性，对治疗有顽固性
- 繁殖能力和传染能力强

深部真菌感染

- 侵害人体内脏、皮下组织，引起全身感染
- 可侵犯全身内脏，严重的可引起死亡，临床上危害很大。
- 侵袭性真菌病

浅部真菌病



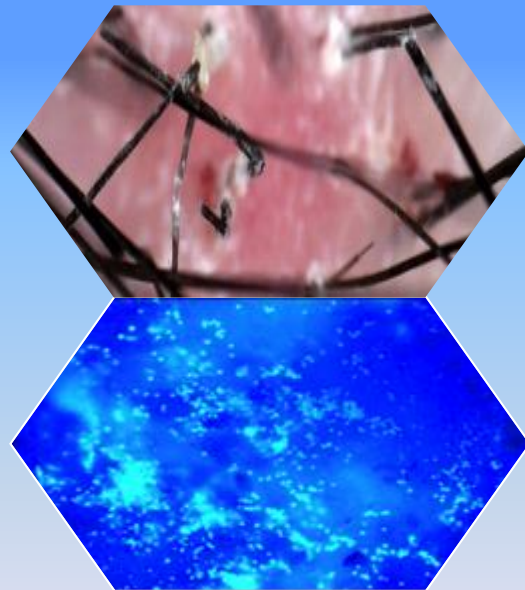
浅部真菌病案例



面癣



体癣 (犬小孢子菌)



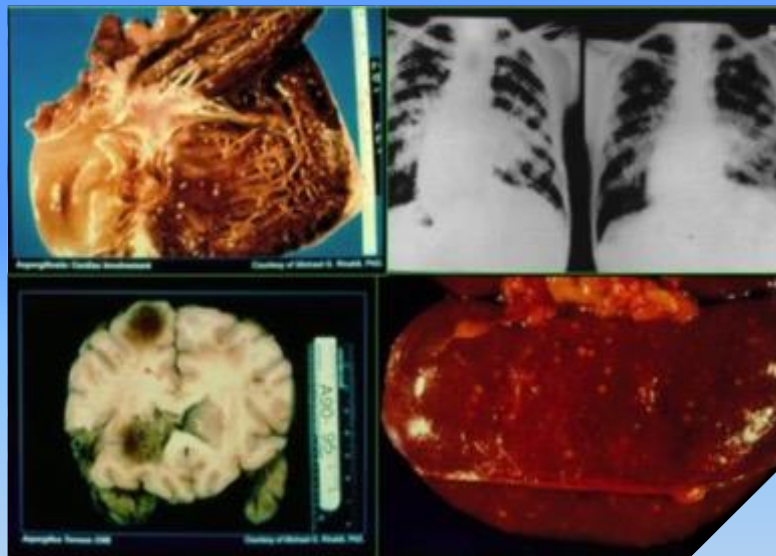
头癣

深部真菌病

- 定义：深部真菌病是指致病性真菌侵犯皮下组织、黏膜和内脏，感染器官所引起的感染性疾病，其中以白色念珠菌为主。
- 致病特点：慢性肉芽肿样炎症、溃疡及坏死。
- 深部感染致病真菌较常见的有念珠菌、曲霉、隐球菌、组织胞浆菌、肺孢子菌、毛霉、马尔尼菲青霉及镰刀菌病。念珠菌属对皮肤、黏膜、指趾甲及内脏均可侵犯。
- 导致条件性真菌感染增高的因素：HIV、肿瘤化疗、干细胞或器官移植、抗生素使用等。

念珠菌：死亡率第一位，院内血源感染第四位。

曲霉：死亡率高达60%-90%，第二位最常见深部真菌病。



深部真菌病

目前临床常用真菌诊断方法

临床常用真菌检测方法对比

检测方法	可操作性	检测速度	检测成本	灵敏度	漏诊率	适用范围
荧光染色	简单	快	一般	高	低	大
革兰氏染色	复杂	较慢	稍低	较高	一般	一般
KOH 湿片法	简单	短	低	低	高	小
血清学方法	一般	较慢	较高	较高	一般	一般
分子生物学法	复杂	慢	高	高	低	大
真菌培养	复杂	慢	高	一般	一般	一般

真菌荧光染色液优势

简便快速

操作简单,只需要检验人员有基本的显微镜操作知识即可完成;检测时间短,只需极短时间即可完成检验

灵敏性高

通过荧光素于真菌细胞壁中几丁质等多糖结合,反应灵敏,与传统的直接镜检法相比,阳性率高,因而降低真菌检测漏

辨识度高

在显微镜下以清晰的荧光表现,图像清楚,辨识度高,易于观察,减少检测者的主观判断带来的误差

适用范围广

传统方法只能检测某些特定的真菌,而不能对所有的真菌进行检测,而该荧光染料能够与各类真菌结合而发出荧光,包含念珠菌,组织胞浆菌,曲霉菌等。此外,该款试剂盒还能检测出卡氏肺孢子虫囊肿,寄生物(例如疟原虫),以及各类地域性变异真菌菌丝。角蛋白,胶原蛋白,弹性纤维也能使用本试剂盒进行检测,可将这些物质的结构边界进行荧光标记从而能够明显区分并检出。

传统真菌镜检与真菌荧光染色对比表

<p>【真菌荧光染色液】一种快速检测真菌的试剂，检测范围广，阳性率高，远优于传统湿片法，临床上毛囊炎糠秕孢子，马拉色菌的检测湿片法基本无效，而荧光法可敏感快速的检测出来，医保收费，需使用荧光显微镜。</p>			
内容	传统真菌镜检	真菌荧光染色	真菌荧光染色的临床优势
操作环节	取样→滴加一定浓度的KOH溶液→经酒精灯加热固定→光学显微镜观察	取样→滴加荧光染色液→加盖盖玻片→荧光显微镜观察	操作同样简洁，需要时间短，适用于临床大样本，快速检测。
检测结果	找到真菌菌丝或者孢子结构，得出结果	根据看到荧光标记的真菌菌丝或者孢子结构，得出结果	可以明确明辨糠皮孢子感染、马拉色菌感染(检查糠皮孢子的派克墨水法敏感度更高，不用加热环节，有利于临床应用)。
浮载液	10%~20%的KOH或者复方氢氧化钾溶液配方	KOH（氢氧化钾）溶解杂质细胞，荧光剂：与真菌细胞壁中成分发生非特异性的结合	1、检测灵明度很高，减少检查结果假阴性的发生，进而降低漏检漏检率，提高了皮屑真菌检测的准确率； 2、视野清，反应为荧光反应，因此其结果在显微镜视野中以清晰的荧光表现，更易于观察； 3、抗干扰强，检测原理是染色液与真菌细胞壁中几丁质等多糖成分反应，因此可排出检测中的其他干扰。
检测器材	光学显微镜	荧光显微镜	荧光显微镜：产生匹配染色液中荧光染色剂的激发光，所需的激发光为紫外光，并在目镜下观察。
辅助材料	载玻片，盖玻片，滤纸	载玻片，盖玻片，滤纸	与传统镜检方式用材一样。

真菌染色液产品介绍

【产品名称】真菌荧光染色液

【包装规格】 20人份/盒、 50人份/盒、100人份/盒、 200人份/盒

【预期用途】用于真菌染色。

【检测原理】荧光染色法是基于荧光增白剂与真菌细胞壁上的多糖结合，而不能结合组织细胞，在特定的激发光波段(波长340~400nm)下，菌丝或孢子发出明亮的蓝绿色荧光。将组织细胞和真菌区分且反差巨大，从而定性检测真菌。

【有效期】：两年

【储存条件】：常温、避光；切勿冷冻

【厂家信息】：

公司名称：青岛华晶生物技术有限公司

公司地址：青岛市城阳区棘洪滩街道南万社区南侧青岛宏臣物流有限公司院内1号楼101室

联系电话：0532-68681762/3

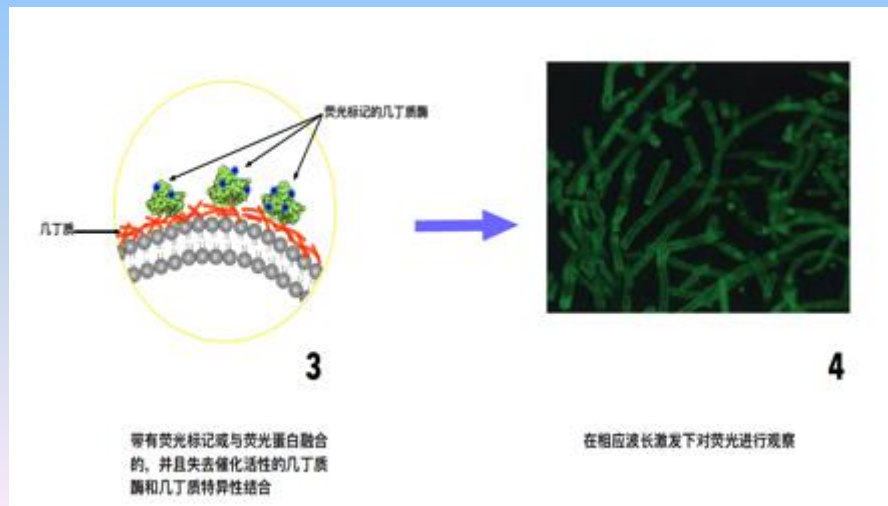
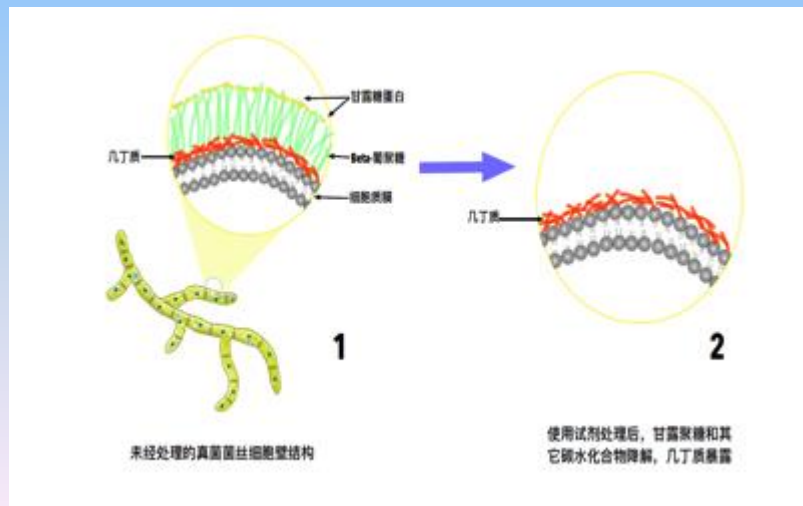
第一类医疗器械备案

备案号：鲁青械备 20190231 号

备案人名称	青岛华晶生物技术有限公司
备案人组织机构代码	91370214595253540L
备案人注册地址	青岛市城阳区棘洪滩街道南万社区南侧青岛宏臣物流有限公司院内1号楼101室
生产地址	青岛市城阳区棘洪滩街道南万社区南侧青岛宏臣物流有限公司院内1号楼101室
产品名称	真菌荧光染色液
型号/规格	20 测试/盒, 50 测试/盒, 100 测试/盒, 200 测试/盒
产品描述	本产品由荧光增白剂、无机碱、背景染料、促溶剂、保护剂、表面活性剂等组成
预期用途	用于真菌的染色
备注	
备案单位和日期	 青州市食品药品监督管理局 备案日期：2019年06月14日
变更情况	

荧光染色法原理

荧光染色法是基于荧光增白剂与真菌细胞壁上的多糖结合，而不能结合组织细胞，在特定的激发光波段(波长340~400nm)下，菌丝或孢子发出明亮的蓝绿色荧光。将组织细胞和真菌区分且反差巨大，从而定性检测真菌。

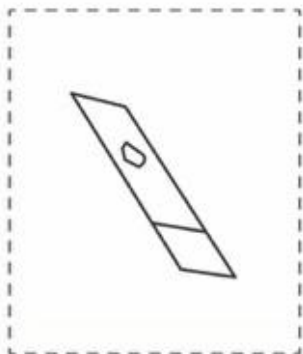


产品适用范围、标本



操作步骤

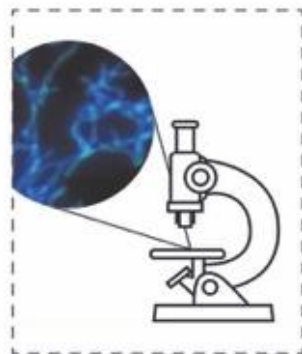
染色液操作步骤：



取样涂片



滴加染色液



加盖玻片, 轻压后显微镜观察

取材方法

01 皮屑

75%乙醇消毒患者皮损部位，使用钝头刀从皮损的边缘向外刮取。
如鳞屑量较少，可使用透明胶带法取材。

02 甲屑

75%乙醇消毒病甲，从甲变色、萎缩或变脆的部位，健甲与病甲交界处取材，保证一定深度。对伴有甲沟炎患者取材，应采用棉拭子，75%乙醇局部消毒后，沾取损害分泌物。

03 毛发

75%乙醇局部消毒，选择无光泽毛发或毛囊口折断的毛发，用镊子将毛发从头皮处拔除，尽量保留毛根部。

04 黏膜

口腔黏膜可用钝刀刮片或拭子取材，阴道黏膜可用拭子取材，一般不用浸湿。

取材方法

05 痰液

痰液标本取自病人清晨漱口后的第一口晨痰，标本存入无菌痰液容器中保存。

06 尿液

尿液标本取自病人的早上的第一次清洁尿，使用无菌容器收集保存，离心后取沉渣作镜检。

07 胸水其他体液

胸水及其他体液标本需要无菌采集于无菌试管中，离心后取沉渣作镜检。

08 白带

白带标本取自病人阴道分泌物，标本存入无菌容器中保存，涂片镜检。

荧光染色法与 KOH 湿片法在真菌直接镜检中的应用比较

韩德志 刘厚志 朱均昊 李莉 姜强强

(复旦大学附属华山医院皮肤科真菌室, 上海 200040)

【摘要】 目的 探索一种结果更可靠的真菌直接镜检方法。方法 对 600 例临床高度疑似真菌感染的标本分别采用荧光染色法和 KOH 湿片法进行真菌直接镜检。结果 荧光染色法和 KOH 湿片法的真菌检出率分别为 97% 和 88.5%。结论 荧光染色法是一种适合临床的、快速有效的真菌镜检方法。

【关键词】 KOH 湿片法; 真菌直接镜检; 真菌荧光染色法; 真菌感染

【中图分类号】 R 446.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2016)11-0240-03

Comparison of novel fluorescent staining and KOH microscopic examination in fungal measured by direct microscopy

HAN De-zhi, LIU Hou-zhi, ZHU Jun-hao, LI Li, ZHANG Qiang-qiang

(The Lab of Medical Mycology, Department of Dermatology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040)

【Abstract】 **Objective** To explore a reliable and rapid method in direct microscopic examination for fungi using novel fungal fluorescent staining. **Methods** Samples from 600 clinically suspected cases of fungal infection were screened by fluorescent staining and KOH microscopic examination. **Results** Fungal elements were detected in 97% of the cases by fluorescent staining and 88.5% by KOH. **Conclusions** Fluorescent staining is a reliable and effective method for fungi microscopic examination.

【Key words】 KOH; fungal direct microscopy; fungal fluorescent staining; fungal infections

[Chin J Mycol. 2016, 11(4): 240-242]

直接镜检法旨在通过显微镜和简单的试剂(通常 1 种)的帮助观察标本中的真菌结构。在真菌实验室中常规采用 KOH 湿片法观察标本中有无真菌有形成分, 本实验采用荧光染色法与 KOH 湿片法分别对同一标本同时作镜检, 比较两种方法在镜下的真菌形态的辨别清晰度与敏感性。

1 材料和方法

1.1 荧光染色液的成分与染色原理

荧光染色液的成分 我们采用的莱茵特敏真菌荧光染色液配有荧光染色 A 液及染色 B 液。其中荧光染色 A 液是一种含有特殊荧光素标联的几

丁质酶的复合溶液, 其中添加了浓度为 10% 的氢氧化钾有助于溶解皮屑及甲屑标本中的角质细胞。染色 B 液是一种含有伊文思蓝染料的溶液, 用于去除视野中杂质荧光的干扰。

染色原理 一般细胞荧光素会与各类标本中真菌细胞壁的 (1,3)- β -D 葡聚糖结合, 从而通过荧光标记进行真菌检测。本法利用一种重组几丁质酶来检测人体组织内是否存在真菌感染的方法。几丁质存在于绝大多数真菌的细胞壁中, 它是一种 (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖均聚物。真菌荧光染色液中的重组几丁质酶克隆自副溶血性弧菌, 该重组酶可特异性地紧密结合到几丁质上。特殊荧光素标联的真菌酶可以作为组织化学标记物, 在荧光显微镜下用来检测各种组织样本中的真菌细胞壁。特殊荧光素标联的几丁质酶可以高亲和力与真菌细胞壁上的几丁质结合, 在一般的实验条件下, 不

基金项目: 国家自然科学基金 (81573054)

作者简介: 韩德志, 男, (汉族), 大专, 技师, E-mail: aazhao@126.com

通信作者: 姜强强, E-mail: shangqq@163.com

《荧光染色法与 KOH 湿片法在真菌直接镜检中的应用比较》

相关论文

仇萌 邹先彪

(解放军总医院第一附属医院皮肤科,北京 100048)

【摘要】 2014年英国甲真菌病管理指南详细地阐述了甲真菌病的流行病学、病原、分类、治疗及特殊人群的管理等方面的进展,尤其对甲念珠菌感染和霉菌感染进行更为深入的诠释,对临床工作具有重要的指导意义,该文简要解读了指南精髓。

【关键词】 甲真菌病;管理;指南

【中图分类号】 R 756.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2015)10-0171-04

The apprehension of British association of dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014

QIU Meng, ZOU Xian-biao

(Department of Dermatology, First Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

【Abstract】 British association of dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014 states epidemiology, aetiology, classification, treatment, and special individuals' administration of onychomycosis in detail. Above all, *Candida* and mould nail infection is interpreted more in-depth. The guideline plays an important role to clinical work. The paper summarized the essence of guideline.

【Key words】 onychomycosis; management; guidelines

[*Chin J Mycol*, 2015, 10(3): 171-174]

2014年 英国甲真菌病管理指南

甲癣通常指指甲或趾甲的皮肤真菌感染。甲真菌病是一个用于描述甲真菌感染性疾病的非特定术语,除了皮肤真菌外,还可由一部分霉菌和念珠菌感染引起,较影响美观,病情严重可影响生活质量。英国皮肤科医师协会(the British association of dermatologists, BAD) 2014年制定了甲真菌病管理指南^[1],指南阐述详细,但限于篇幅,本文综合指南精髓分以下专题进行简要分述。

1 甲真菌病流行病学及病因学

甲真菌病是成人最常见的甲病,占有甲疾病的15%~40%^[2]。据统计英国成人甲真菌病发病率为3%^[3],约1/3的甲癣患者与足癣相关。甲真菌病最易发生于老年人和男性。甲真菌病的病因有较广泛的地域和种族差异,在英国85%~90%的甲真菌感染是由皮肤真菌引起,5%由非皮肤真菌性霉菌引起。最常见的致病菌是红色毛癣菌和趾

间毛癣菌,亲动物性皮肤真菌通常仅见于指甲感染中。研究表明甲癣易感性有其遗传学基础,家族性远端侧位甲真菌病由红色毛癣菌感染引起,与家人内部间传染无关。

甲真菌病诱发因素包括年龄的增加、外周血管疾病、多汗或不透气的鞋袜,反复的甲外伤,遗传倾向性、糖尿病,伴有如银屑病等其他甲病的人群、HIV感染等免疫缺陷和使用免疫抑制剂的人群等。甲真菌病值得关注的特殊人群主要有:①运动员中具有高发率,是普通人的1.5~3倍,这与运动强度、频繁甲损伤、出汗多及无防护鞋体育训练增加接触皮肤真菌的机会等因素有关。②约20%年龄大于60岁及50%年龄大于70岁的老年人群患有甲真菌病。这可能与外周循环差、活动少、免疫状态欠佳、糖尿病、较大和弯曲的甲板、甲生长较慢、修剪指甲困难及足部卫生差、频繁的甲损伤和接触致病性真菌机会增加等因素相关。③儿童甲真菌病常伴发其他部位的皮肤真菌病,多由红色毛癣菌、断发毛癣菌、石膏样毛癣菌趾间变种(*T. mentagrophytes var. interdigitale*)、须癣毛癣菌原变种(*T.*

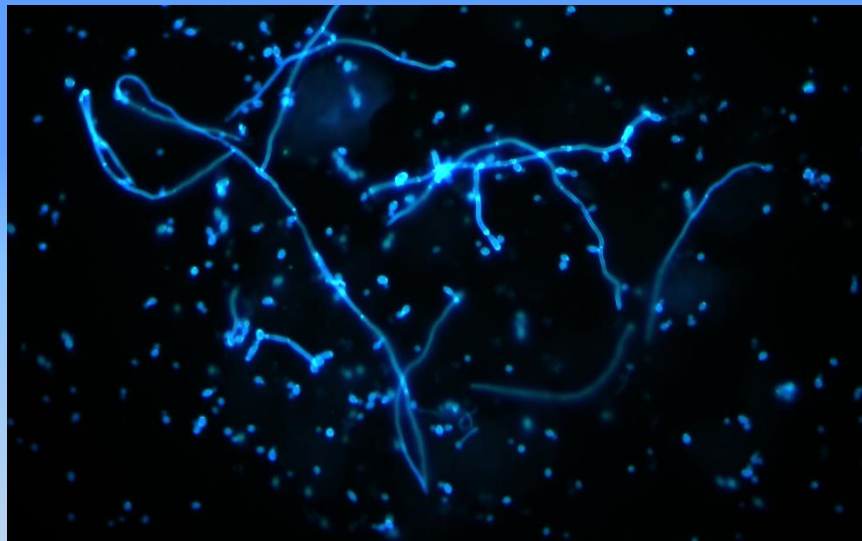
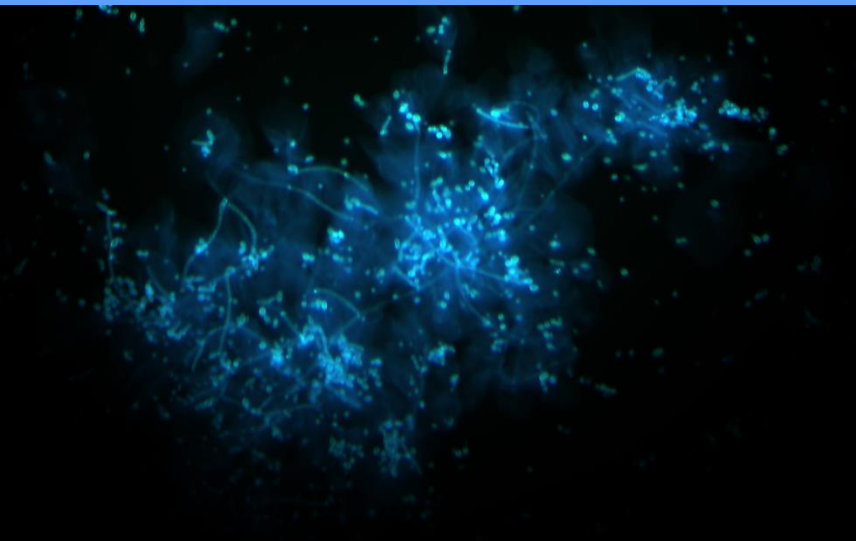
基金项目:国家自然科学基金(30671892)
作者简介:仇萌,女(汉族),硕士,主治医师.E-mail:qi6384@china.com
通讯作者:邹先彪,E-mail:zhoubiao@126.com

荧光显微镜

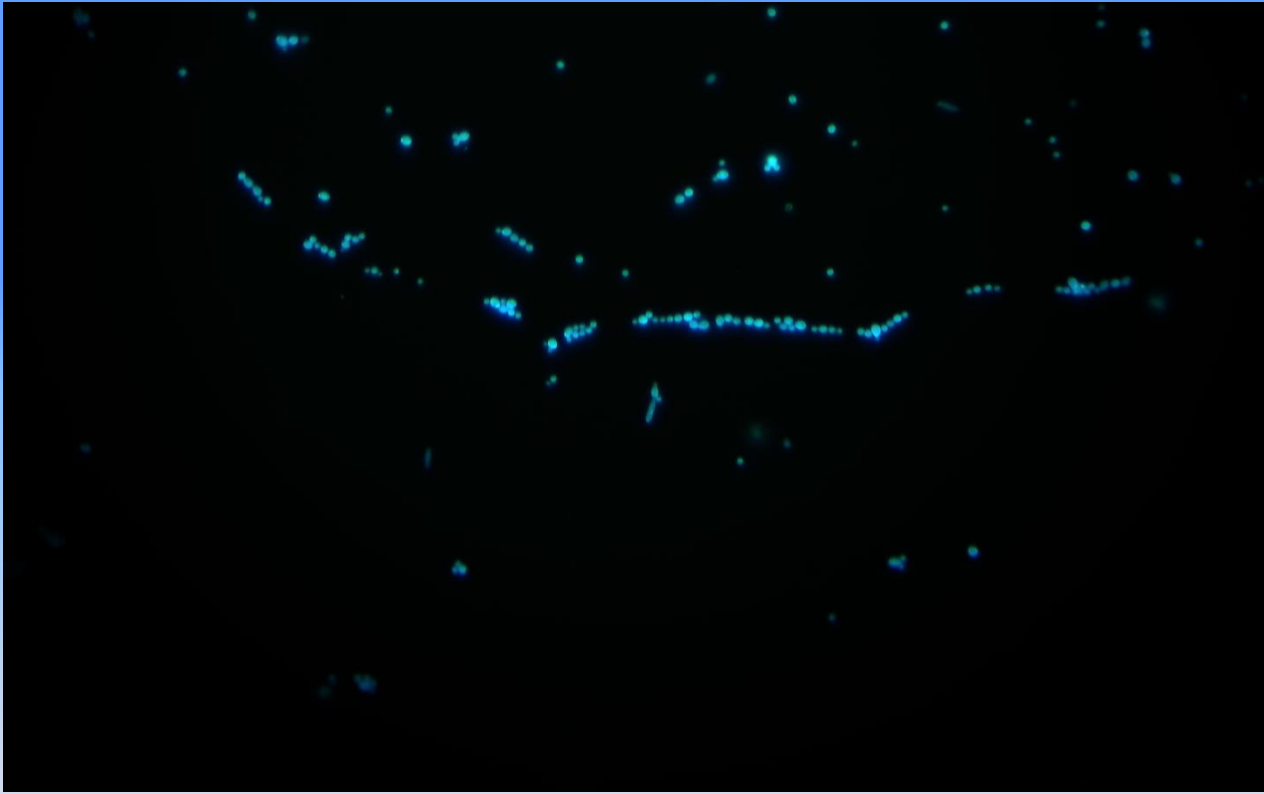
显微镜荧光模块适用于LEICA徕卡生物显微镜DM500，采用LED冷光源作为照明光源，使用寿命可长达10年，普通显微镜增加显微镜荧光模块即变为荧光显微镜。



荧光染色部分图片



白带分泌物念珠菌丝荧光显微镜



白帶分泌物念珠孢子荧光显微镜



百香果灰霉荧光显微镜下

专家评价

皮肤科真菌专家评价——华西医院冉玉平教授

1、真菌镜检的技术瓶颈

- KOH溶解角质需要加热，耗时。
- 受到细胞重叠、纤维等杂质干扰，菌丝难以辨认。
- 孢子与气泡、油滴、水滴相似，不易分辨。
- 美兰、Parker墨水染色不具有特异性。
- 需要长期经验积累，易出现假阳性和假阴性

皮肤科真菌专家评价——华西医院冉玉平教授

2、真菌荧光染色诊断 - 革命性技术

高特异性、高效率、高灵敏度

- 大大提高真菌阳性率，避免假阳性
- 显著缩短真菌镜检时间
- 精准定位“真阳性”，自信确认“真阴性”
- 变不可能为可能：真菌病快速出结果，可查见孢子丝菌病孢子
- 快速查毛囊虫
- 有助于研究真菌学形态
- 利于患者教育和提高依从性

真菌室专家评价——上海华山医院章强强教授

真菌荧光染色液可适用于皮屑、甲屑、毛发、痰液、肺泡灌洗液、尿液胸水等各种标本。在荧光背景下真菌菌丝、孢子清晰可见，检测灵敏度大幅提高。特别是在KOH湿片法中，孢子与脂肪滴有时很难鉴别，而荧光染色法对脂肪滴不产生标记，易于鉴别，且特异性高，其能使少量真菌着染，弥补了传统的KOH湿片法在真菌数量少时检出率不高的不足，并且染色时间短，只需1min，结果直观。根据我们的数据统计与经验，荧光染色法在浅部标本与深部标本的检测中，与KOH湿片法比较有较大优势。

谢谢