

# 异硫氰酸荧光素染色在真菌性角膜炎中的应用

阎艳<sup>1</sup>, 武鹏安<sup>1</sup>, 刘先宁<sup>2</sup>, 王东岳<sup>1</sup>, 张仙娇<sup>1</sup>, 崔家瑞<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(710002) 中国陕西省西安市第一医院病理科;  
<sup>2</sup>(710002) 中国陕西省西安市第一医院 陕西省眼科研究所  
作者简介:阎艳,女,硕士,主治医师,研究方向:常规活检组织的病理诊断。

通讯作者:阎艳. yanyan2005930@sina.com

收稿日期:2015-06-26 修回日期:2015-09-09

## Application of fluorescein isothiocyanate staining in fungal keratitis

Yan Yan<sup>1</sup>, Peng-An Wu<sup>1</sup>, Xian-Ning Liu<sup>2</sup>, Dong-Yue Wang<sup>1</sup>, Xian-Jiao Zhang<sup>1</sup>, Jia-Rui Cui<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>Xi'an No. 1 Hospital, Shaanxi Ophthalmology Institute, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Yan Yan. Department of Pathology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. yanyan2005930@sina.com

Received:2015-06-26 Accepted:2015-09-09

## Abstract

• **AIM:** To find special staining methods which is fast, accurate and easy to operate for fungal keratitis tissue section.

• **METHODS:** Thirty-eight cases with fungal keratitis were diagnosed by positive fungal culture. Corneal specimens of these cases were conventionally fixed, dehydrated and dipped in wax for 4μm paraffin sections, then subject to conventional dewaxing to water. The results of fluorescein isothiocyanate (FITC) and periodic acid-Schiff (PAS) staining were compared.

• **RESULTS:** Positive detection rate of FITC staining was 97.4% (37/38), positive detection rate of PAS staining was 86.8% (33/38), with statistically significant difference ( $P<0.001$ ).

• **CONCLUSION:** FITC staining method is simple, fast, accurate, and has high positive rate. It is superior to PAS staining, and is worth of promoting.

• **KEYWORDS:** fungal keratitis; paraffin sections; fluorescein isothiocyanate staining; periodic acid-Schiff staining

**Citation:** Yan Y, Wu PA, Liu XN, et al. Application of fluorescein isothiocyanate staining in fungal keratitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(10):1800-1801

## 摘要

**目的:**寻找真菌性角膜炎组织切片快速、准确、方便操作的特殊染色方式。

**方法:**采用经真菌培养均为阳性的真菌性角膜炎患者的

角膜标本38例,常规固定脱水透明浸蜡,进行4μm石蜡切片,脱蜡至水,选用异硫氰酸荧光素(FITC)荧光法和过碘酸雪夫氏染色法(PAS)进行染色对比。

**结果:**异硫氰酸荧光素法检测阳性率为97.4%(37/38),过碘酸雪夫氏染色法检测阳性率为86.8%(33/38)。结果比较有统计学差异( $P<0.001$ )。

**结论:**异硫氰酸荧光素法镜检真菌性角膜炎优于过碘酸雪夫氏染色法镜检。

**关键词:**真菌性角膜炎;石蜡切片;异硫氰酸荧光素染色法;过碘酸雪夫氏染色法

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.10.35

**引用:**阎艳,武鹏安,刘先宁,等.异硫氰酸荧光素染色在真菌性角膜炎中的应用.国际眼科杂志2015;15(10):1800-1801

## 0 引言

真菌性角膜溃疡是致盲性眼病之一。该病首先由 Leber 于 1878 年报道,近年来由于抗生素、糖皮质激素、免疫抑制剂等广泛应用;植物枝叶、稻谷、尘土等损伤眼导致角膜病改变了眼局部的微环境,使该病在我国有明显增多趋势。因此,采用快速而有效的实验室方法来确定病因,对指导临床正确与及时的治疗至关重要。我们对 38 例真菌培养阳性的真菌性角膜炎患者的角膜组织切片分别进行异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)荧光染色和过碘酸雪夫氏染色法(periodic acid-Schiff staining, PAS)镜检进行对比,现报告如下。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 角膜标本 38 例均为本院眼科研究所经真菌培养证实的真菌性角膜炎患者的活检组织或角膜移植术后取下的病变组织。

**1.2 方法** 角膜标本 38 例经 10% 中性福尔马林固定,脱水、石蜡包埋,4μm 厚切片各切 2 张,常规脱蜡至水。分别进行异硫氰酸荧光素荧光染色和过碘酸雪夫氏试剂染色。

**1.2.1 异硫氰酸荧光素荧光染色** 操作步骤:(1)角膜组织切片脱蜡至水后蒸馏水洗;(2)加 FITC 荧光试剂 20μL,放入湿盒中,密盖,置 37℃ 温箱孵育 30min;(3)用试剂盒提供的缓冲液冲洗,待干;(4)加一滴缓冲甘油封片,于荧光显微镜下检查。结果观察,真菌显示为亮绿色。

**1.2.2 过碘酸雪夫氏染色法** 操作步骤:(1)角膜组织切片脱蜡至水后蒸馏水洗;(2)0.5% 过碘酸浸染 10min,蒸馏水洗;(3)雪夫氏液避光浸染 20min,蒸馏水洗;(4)0.5% 偏亚硫酸钠液洗 1min×2 次,自来水冲洗 10min;(5)常规脱水透明,中性树脂封片。结果观察,真菌显示为紫红色。

统计学分析:采用 SPSS 19.0 统计软件对相关数据进行 Fisher 确切概率法检验, $P<0.001$  为差异有统计学意义。

表1 真菌性角膜炎患者38例行FITC染色及PAS染色的结果比较

PAS	FITC		合计
	+	-	
+	33	0	33
-	4	1	5
合计	37	1	38

## 2 结果

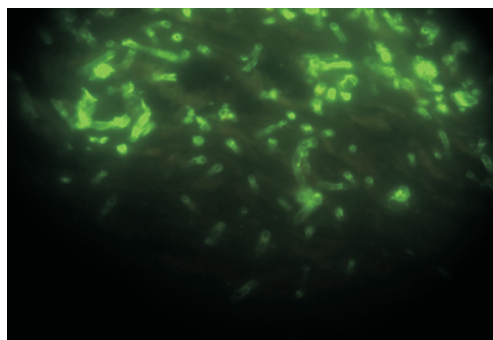
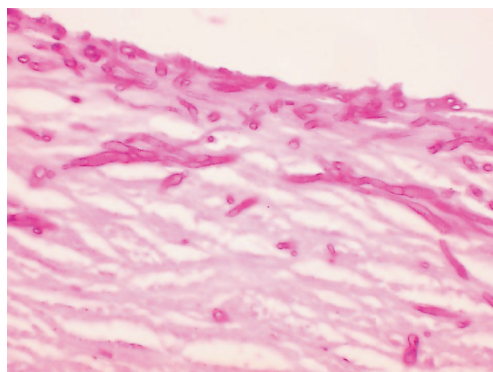
异硫氰酸荧光素荧光染色后真菌菌丝壁、孢子壁及隔染成亮绿色,菌丝内细胞成分不着色,角膜坏死组织及基质层胶原纤维为暗红色(图1)。PAS法染色后真菌菌丝壁、孢子壁及隔染成紫红色,菌丝内细胞成分不着色,角膜坏死组织及基质层胶原纤维为淡红色(图2)。38例真菌性角膜炎FITC荧光染色及PAS染色结果见表1,异硫氰酸荧光素荧光染色的检测阳性率为97.4%,PAS法检测阳性率为86.8%,两者比较,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。

## 3 讨论

角膜炎是一种由致病真菌引起的、致盲率极高的感染性角膜病。真菌性角膜炎在临床上容易漏诊、误诊,常因治疗不当而造成失明。因此,真菌感染已成为一个日益严峻的问题。根据角膜植物损伤史,结合角膜病灶的特征,可作出初步诊断。

近年来,由于免疫缺陷病毒感染者的不断出现,使原来轻微致病的真菌转化为致病真菌。实验室检查找到真菌菌丝和孢子可以确诊。常用方法有角膜刮片Gram和Giemsa染色、10%~20%氢氧化钾湿片刮片及真菌培养,若以上方法均为阴性,而临床又高度怀疑者,可考虑做角膜组织活检<sup>[1]</sup>。角膜共焦显微镜作为非侵入性检查,可直接发现病灶内的真菌病原体。但是随着疾病的发生,病变过程有时不是很明显,在涉及到医疗纠纷和法律纠纷时通常通过病理诊断才能得出较正确的结论,所以病理诊断也是最后的宣判性诊断<sup>[2]</sup>。在病理活检中,真菌性角膜炎标本病变区角膜上皮细胞缺损,大量中性粒细胞及淋巴细胞环绕溃疡部位浸润分布,距病灶较远处的基质层细胞浸润明显减少,并将病灶与正常角膜组织相隔离,部分标本浅基质层为坏死组织覆盖而不易找到菌丝<sup>[3]</sup>。真菌在角膜基质内可平行于板层纤维,也可逐步向深部实质层扩散或垂直于角膜板层纤维生长,穿透角膜后弹力膜导致角膜穿孔和真菌性眼内炎,角膜呈现全层炎细胞浸润和组织坏死病理改变<sup>[4]</sup>。真菌用HE染色一般着色不佳,因此需用特殊染色方法来显示<sup>[5]</sup>。PAS用高碘酸氧化真菌菌壁的多糖游离出醛基,后者与无色品红结合生成新的品红色复合物而被显色,定位于胞膜上。这种方法可显示大多数真菌<sup>[6]</sup>,但是部分真菌局部着色不良,与角膜基质层的胶原纤维容易混淆,存在主观误差。

异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)为黄色或橙黄色结晶粉末,易溶于水或酒精等溶剂。分子量为389.4,最大吸收光波长为490~495nm,最大发射光波长520~530nm,呈现明亮的黄绿色荧光, FITC是较之其他荧光素应用最广泛的荧光素。其主要优点是人眼对

图1 FITC荧光染色法( $\times 400$ )。图2 PAS染色法( $\times 400$ )。

黄绿色较为敏感,通常切片标本中的绿色荧光少于红色。我们通过对38例真菌性角膜炎组织切片分别进行PAS染色和FITC荧光染色镜检后,对比发现FITC荧光法阳性率高于PAS染色法。FITC与真菌细胞壁的纤维素和几丁质发生结合,形成复合物在荧光显微镜特定波段激发光照射下发出亮绿色荧光使菌丝及孢子出现亮绿色。这种染色敏感性高,能使少量真菌着色,容易辨别,与背景对比鲜明,利于诊断。弥补了真菌检查染色法(PAS染色)在真菌数量少时检出率不高方面的不足,可使染色时间缩短至1min,其检出率比PAS染色法要高,且其操作简单,所需试剂少,结果直观可靠。

综上所述, FITC荧光法具有特异性强,结果判断直观,操作简便、快速<sup>[7]</sup>等优点,它不但可用于组织切片,也可用于分泌物病原体的快速诊断。在荧光显微镜日益普及的今天,该方法可成为真菌性角膜炎明确诊断的首选方法。

### 参考文献

- 李鹏,李良毛,潘世锦. 真菌性角膜炎诊断及治疗的新进展. 国际眼科杂志 2008;8(10):2097
- 和瑞芝,王家富,陈命家,等. 病理学. 北京:人民卫生出版社 2006:2
- 王华,林锦镛. 真菌性角膜炎病原及病理学检查结果分析. 中国实用眼科杂志 2009;27(6):659-661
- 杨广英,姜黄,郭艳萍,等. 真菌性角膜溃疡29例临床病理分析. 眼科新进展 2008;28(8):610-611
- 王伯运,李玉松,黄高昇,等. 病理学技术. 北京:人民卫生出版社 2000:997
- Zheng J, Zhang W, Lin J. The advantages and disadvantages of GMS and PAS Staining in fungal keratitis. *Yan Ke Xue Bao* 2010;25(2):67-69
- 刘先宁,朱秀萍. 眼部白色念珠菌感染的快速诊断方法. 现代检验医学杂志 2006;21(2):43