

- [20] FOKKINK WR, WALGAARD C, KUITWAARD K, et al. Association of albumin levels with out-come in intravenous immunoglobulin-treated Guillain-Barré syndrome [J]. JAMA Neurology, 2017, 74(2):189.
- [21] 江波, 时鹏, 刘东亮, 等. 血清白蛋白和球蛋白及肌酐评估吉兰-巴雷综合征严重程度的价值[J]. 中华全科医学, 2021, 19(4):561-563.
- [22] HEGEN H, LADSTÄTTER F, BSTEH G, et al. Cerebrospinal fluid protein in Guillain-Barré syndrome: need for age-dependent interpretation [J]. European Journal of Neurology, 2021, 28(3):965-973.
- [23] BOURQUE PR, BROOKS J, WARMAN-CHARDON J, et al. Cerebrospinal fluid total protein in Guillain-Barré syndrome variants: correlations with clinical category, severity, and electrophysiology [J]. J Neurol, 2020, 267(3):746-751.
- (收稿日期:2021-12-02, 修回日期:2022-02-03)

引用本文:王捷敏,龙宾曼,刘琼,等. 荧光染色法与复方氢氧化钾湿片法在1 025例皮肤浅部真菌感染检测中的比较[J]. 安徽医药, 2023, 27(4):808-810. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2023.04.040.

◇临床医学◇



荧光染色法与复方氢氧化钾湿片法在1 025例皮肤浅部真菌感染检测中的比较

王捷敏, 龙宾曼, 刘琼, 许贵霞, 张思平

作者单位: 中国科学技术大学附属第一医院皮肤科, 安徽 合肥 230001

通信作者: 张思平, 男, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为真菌性皮肤病, Email: zh_siping@126.com

摘要: **目的** 比较荧光染色法与复方氢氧化钾(KOH)湿片法在浅部真菌感染中的应用效果。**方法** 对2019年9月至2020年9月就诊于中国科学技术大学附属第一医院的1 025例拟诊为浅表皮肤真菌感染的病人, 分别进行荧光染色和KOH湿片镜检查, 比较两种检测方法阳性率有无差异。**结果** 荧光染色法与KOH湿片法检测1 025例浅部真菌感染病人的阳性率分别为82.93%和68.88%, 差异有统计学意义($\chi^2=55.30, P<0.001$)。**结论** 荧光染色法相比于KOH湿片法更敏感、准确, 是临床浅部真菌感染快速有效的辅助诊断方法。

关键词: 真菌病; 荧光染色; 氢氧化钾湿片法; 浅部真菌感染; 皮肤; 诊断

Comparison of fluorescent staining and KOH wet-mount in detecting superficial fungal infection from 1 025 patients

WANG Jiemin, LONG Binman, LIU Qiong, XU Guixia, ZHANG Siping

Author Affiliation: Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of USTC, Hefei, Anhui 230001, China

Abstract: **Objective** To compare the application of fluorescent staining and KOH wet-mount in superficial fungal infection. **Methods** A total of 1 025 samples from suspected superficial fungal infection patients who were treated in The First Affiliated Hospital of USTC from September 2019 to September 2020 were simultaneously detected by fluorescence staining and KOH wet-mount, then the positive rate of the two methods were compared. **Results** The total positive rate of 1 025 samples by the fluorescent staining, KOH wet-mount were 82.93% and 68.88%, respectively. There was a significant difference between the two methods ($\chi^2=55.30, P<0.001$). **Conclusion** Fluorescent staining is more sensitive and accurate than KOH wet-mount, which can be used in detecting of superficial fungal infection.

Key words: Mycoses; Fluorescent staining; KOH wet-mount; Superficial fungal infection; Skin; Diagnosis

浅部真菌病主要是由皮肤癣菌、马拉色菌、念珠菌等引起的皮肤、毛发、甲等浅表部位感染^[1]。目前氢氧化钾(KOH)湿片法是浅部真菌最常用的检测方法^[2-4], 该法简单便捷、成本低廉, 不需要特殊仪器, 已广泛开展。近年来荧光染色法开始逐渐应用于真菌病的实验室诊断^[5-7]。本研究通过比较荧光染色与KOH湿片法检测阳性率, 探讨两者在浅部真

菌感染中的应用效果差异。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2019年9月至2020年9月就诊于中国科学技术大学附属第一医院并拟诊为浅部真菌感染的病人1 025例。其中男性529例, 女性496例。拟诊为手癣病人58例, 足癣140例, 甲癣405例, 体股癣179例, 头癣29例, 花斑癣123例, 马

拉色菌毛囊炎 46 例, 皮肤念珠菌感染 45 例。病人或其近亲属知情同意, 本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 试剂与材料 荧光染液: 珠海贝索生物技术有限公司生产, 主要成分为荧光增白剂、氢氧化钾; 复方 KOH 溶液: 将 10 g KOH 加入 30 mL 蒸馏水溶解后, 再依次加入 20 mL 二甲亚砜、20 mL 甘油, 摇匀后蒸馏水补足至 100 mL, 充分混匀配制而成; 一次性手术刀片 (杭州华威医疗用品有限公司); 灭菌 3 号手术刀柄; 奥林巴斯显微镜 (型号 CX31) (含荧光模块)。

1.3 标本采集 充足自然光线下, 针对疾病的临床特点采集标本。手癣、足癣、体股癣、花斑癣选择活动性皮炎边缘刮取皮屑; 甲癣采集较深层变厚、变色、变脆的病甲; 头癣拔取失去光泽、松动的病发并刮取附近鳞屑检查; 毛囊炎挤出毛囊角栓; 皮肤念珠菌感染常见婴儿及成人皮肤薄嫩部位 (如肛周、包皮龟头), 使用生理盐水擦拭局部后涂片。所有皮屑、甲屑或毛发标本一式两份, 置于洁净的载玻片中央待检。

1.4 检测方法 KOH 湿片镜检: 上述采集标本其中一份滴加 1 滴 KOH 溶液, 盖上盖玻片, 于酒精灯火焰上方微热。甲屑、毛发等较厚的标本加热时间可适当延长。普通光学显微镜阅片, 找到有无菌丝或孢子, 并采集镜下图片。

荧光染色镜检: 上述采集标本另一份直接滴加 1 滴真菌荧光染色液, 以覆盖整个样本为宜, 盖上盖玻片。荧光显微镜下使用紫外光源 (波长 340~380 nm) 观察有无亮蓝色菌丝或孢子, 并采集镜下图片。

1.5 统计分析 采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析, 检出阳性率用例 (%) 表示。计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种检测方法镜下对比 花斑癣镜下表现为成簇圆形或卵圆形孢子, 伴短弧形菌丝; 体股癣镜下表现为分隔菌丝; 念珠菌呈树枝状且顶端有小孢子; 头癣可见发内链状排列孢子; 马拉色菌毛囊炎镜下有成堆分布的芽生孢子; 纤维杂质形态不规则, 无真菌横隔及出芽结构。

KOH 湿片法镜下的菌丝及孢子呈透明或草绿色, 常伴有脂滴、气泡等杂质, 观片背景相对杂乱。经荧光染色后, 阳性标本可清楚观察到亮蓝色菌丝或孢子形态, 与暗色背景形成强烈反差, 易在镜下寻找和辨别。纤维杂质也可发出荧光, 但其形态不均匀, 大小、荧光亮度都与真菌菌丝不同, 且无真菌横隔及出芽结构, 见图 1。

2.2 两种检测方法阳性率对比 1 025 例标本中, 荧光染色法与 KOH 湿片法分别检测出阳性 850 例 (82.93%) 和 706 例 (68.88%), 荧光染色法的总阳性率高于 KOH 湿片法总阳性率, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 55.30, P < 0.001$), 不同患处标本如足癣、体股癣、甲真菌病等对比也发现荧光染色法阳性率高于 KOH 湿片法。而对 58 例手癣 ($\chi^2 = 3.36, P = 0.067$)、179 例体股癣 ($\chi^2 = 3.48, P = 0.062$)、29 例头癣标本 ($\chi^2 = 2.48, P = 0.115$) 的检测结果显示差异无统计学意义。见表 1。

表 1 真菌感染 1 025 例病人荧光染色法与 KOH 湿片法检测结果对比/例 (%)

标本种类	例数	荧光染色法 阳性率	KOH 湿片法 阳性率	χ^2 值	P 值
手癣	58	50(86.21)	42(72.41)	3.36	0.067
足癣	140	114(81.43)	86(61.43)	13.72	<0.001
甲真菌病	405	327(80.74)	269(66.42)	21.36	<0.001
体股癣	179	151(84.36)	137(76.54)	3.48	0.062
头癣	29	25(86.21)	20(68.97)	2.48	0.115
念珠菌病	45	39(86.67)	31(68.89)	4.11	0.043
花斑糠疹	123	106(86.18)	92(74.80)	5.07	0.024
马拉色菌毛囊炎	46	38(82.61)	29(63.04)	4.45	0.035
合计	1 025	850(82.93)	706(68.88)	55.30	<0.001

3 讨论

KOH 湿片法是浅部真菌病传统的实验室检查方法, 其优点是简便易行, 且成本低廉, 但检测结果非常依赖于检验人员的经验与技术水平^[5,8]。镜检阳性率与标本的含菌量、检查过程中角质溶解程度均有相关性^[9]。标本溶解不充分会干扰视野中菌体成分的检出, 溶解过度时菌体破坏不易被检出。另外, 镜检标本中常包含各种杂质, 如头面部的皮屑富含脂滴, 经验不足时会将其误判为真菌孢子, 尤其在孢子数量增加的炎症性皮炎表面^[6], 二者难以区分。因此, 新的染色方法对于提高真菌感染的检出效率十分必要。荧光染色镜检是经过特殊荧光素标联的重组几丁质酶高亲和力与真菌细胞壁上的几丁质结合并吸收紫外光使菌丝及孢子发出亮蓝色荧光的检测过程^[10], 无须加热即可观察到清晰的菌体形态。在国外, 荧光染色法早已成为检测真菌的常用手段, 其在浅部皮肤真菌病、真菌性角膜炎、侵袭性肺部真菌病及其他冰冻或石蜡包埋切片中的应用均已报道^[10-14], 然而国内荧光染色法在真菌感染中的应用仍处于起步阶段^[15-18]。近年来, 随着普通光学显微镜上加装荧光模块技术的推广^[19], 各实验室也开始探索荧光染色在真菌病领域的应用, 这意味着需要越来越多的大数据研究为其

临床应用提供参考。

本研究中,荧光染色法的总阳性率高于KOH湿片法总阳性率,而手癣、头癣标本等检出阳性率差异无统计学意义,可能与统计标本量过少有关。另外,我们分析KOH湿片法镜检阴性而荧光染色为阳性的病例发现,这类病人病史相对长,就诊时常已外涂药膏,皮疹缺乏真菌感染典型特征,标本中的含菌量低。其中2例体癣病人标本毳毛内存在菌丝及成串孢子,相应地KOH湿片并未检出,提示治疗医师需调整治疗方案以期更好的治疗效果。除此之外,一些头癣、甲真菌病等病人在常规疗程后皮损荧光染色结果显示仍含有断裂、变形的菌体。因此,相比于传统的KOH湿片法,荧光染色不仅能提高医师的诊断水平,而且对于甲癣、头癣等疗程较长的病例进行治疗时,也可选择荧光染色法作为是否需要继续用药依据。另外有意思的是,除浅部真菌感染标本外,笔者对2例疑为孢子丝菌病病人的浅表溃疡采集标本荧光染色后发现了菌丝及孢子,为深部真菌感染提供了诊断思路,不过尚需更多临床标本观察。当然,荧光染色也存在不足。一些纤维杂质在荧光显微镜下也可发出荧光,但纤维一般形态不规则,大小、粗细、亮度与真菌迥异,容易鉴别,研发者可考虑改进。另外,有些皮损表面的腐生菌也可被荧光着色,检验人员需注意区分。综上,真菌荧光染色法以其高效率、高灵敏度、高准确性降低了浅部真菌病漏检、误诊概率。相比传统的KOH湿片法虽检查费用相对较高,仍可广泛应用于皮肤科浅部真菌感染诊断及后续疗效评估。

(本文图1见插图4-2)

参考文献

- [1] 岳学苹,石秀艳,陈伟,等.CFW荧光染色法在甲真菌病诊断中的应用研究[J].中国真菌学杂志,2018,13(1):8-10,45.
- [2] 张思平,王娟.操作技能直接观察评估方法在皮肤真菌镜检教学中的探索[J].中华医学教育杂志,2017,37(1):94-98.
- [3] 郑才玲,郑文爱.甲真菌病临床疑似病例荧光染色、直接镜检、真菌培养检出率的比较[J].中国皮肤性病杂志,2020,34(7):842-845.
- [4] 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.
- [5] 杨颜龙,张素敏,易松柏,等.荧光染色法和氢氧化钾湿片法在诊断浅部真菌感染中的敏感度比较[J].中国麻风皮肤病杂志,2019,35(7):389-390,393.
- [6] 朱静娜,莫慧慧,梁燕华.真菌荧光染色法检测健康皮肤和炎症性皮损的真菌定植[J].中国麻风皮肤病杂志,2022,38(2):83-88.
- [7] XIAO H, PRADHAN S, RAN X, et al. Tinea capitis: dermoscopy and calcium fluorescent microscopy as highly efficient and precise diagnostic tools [J]. An Bras Dermatol, 2020, 95 (3) : 332-335.
- [8] OVREN E, BERGLUND L, NORDLIND K, et al. Dermatophytosis: fluorostaining enhances speed and sensitivity in direct microscopy of skin, nail and hair specimens from dermatology outpatients[J]. Mycoses, 2016, 59(7):436-441.
- [9] 靳慧平,甄莉.皮肤镜和溶甲涂片镜检在甲真菌病诊断中的应用[J].安徽医药,2020,24(11):2218-2221.
- [10] LEAL SM JR, RODINO KG, FOWLER WC, et al. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: diagnosis of ocular infections [J/OL]. Clin Microbiol Rev, 2021, 34 (3) : e0007019. DOI: 10.1128/CMR.00070-19.
- [11] JOSEPH J, MURTHY S, GARG P, et al. Use of different stains for microscopic evaluation of corneal scrapings for diagnosis of microsporidial keratitis [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44 (2) : 583-585.
- [12] MOTAMED M, SHARIFI LARI M, PAKSHIR K, et al. Comparing real-time PCR and calcofluor-white with conventional methods for rapid detection of dermatophytes: across-sectional study[J]. J Microbiol Methods, 2019, 161:84-86.
- [13] OVREN E, BERGLUND L, NORDLIND K, et al. Dermatophytosis: fluorostaining enhances speed and sensitivity in direct microscopy of skin, nail and hair specimens from dermatology outpatients[J]. Mycoses, 2016, 59(7): 436-441.
- [14] MOURAD B, ISMAIL M, HAWWAM S, et al. Evaluation of the efficacy of fluorescent staining and Chicago sky blue staining as methods for diagnosis of dermatophytosis in hair and nails [J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2019, 12:751-758.
- [15] CHEN B, LI W, PANG Y, et al. Rapid detection of fungi from blood samples of patients with candidemia using modified calcofluor white stain [J]. J Microbiol Methods, 2021, 184: 106202. DOI: 10.1016/j.mimet.2021.106202.
- [16] 徐艳,钟白玉,翟志芳.荧光染色法与KOH湿片法在浅部真菌感染直接镜检中的应用比较[J].实用皮肤病学杂志,2018,11(2):85-86.
- [17] 杨通,何炼图,陈涛,等.荧光染色剂 Calcofluor White 在活检组织中真菌染色的应用[J].分子诊断与治疗杂志,2014,6(5):307-311.
- [18] 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.
- [19] GOENKA C, LEWIS W, CHEVRES-FERNANDEZ LR, et al. Mobile phone-based UV fluorescence microscopy for the identification of fungal pathogens [J]. Lasers Surg Med, 2019, 51(2): 201-207.

(收稿日期:2022-07-28,修回日期:2022-09-22)