

多种皮损取材处理方式在诊断浅表皮肤真菌病的比较研究

胡记妹, 谢志连, 蔡浩川, 叶爱君, 吴丹婷

(南方医科大学第五附属医院检验科, 广东广州 510900)

摘要:目的 通过探讨 3 种不同的取材处理方式对浅表皮肤真菌病直接镜检结果的影响, 探索寻找不同的浅表皮肤真菌病最佳的取材处理方式。方法 对 161 例临床拟诊为花斑癣、马拉色菌毛囊炎、体表皮肤癣病包括体股癣、手足癣、头癣等皮肤科常见的皮肤病和多发病患者皮损处的皮屑, 分别用钝刀刮取 10% KOH 封片直接镜检、透明胶带粘贴法 10% KOH 湿片直接镜检及钝刀刮取革兰染色法直接镜检。结果 标本的不同取材处理方式大大影响了直接镜检的结果。45 例疑似花斑癣病例中, 钝刀刮取法 10% KOH 封片直接镜检的阳性率为 93.3%, 胶布粘贴法 10% KOH 湿片直接镜检的阳性率为 88.9%, 钝刀刮取革兰染色法直接镜检的阳性率为 97.8%; 52 例疑似马拉色菌毛囊炎病例中, 钝刀刮取法 10% KOH 封片直接镜检的阳性率为 86.5%, 胶布粘贴法 10% KOH 湿片直接镜检的阳性率为 80.8%, 钝刀刮取革兰染色法直接镜检的阳性率为 100.0%; 64 例体表皮肤癣病病例中, 钝刀刮取法 10% KOH 封片直接镜检的阳性率为 84.4%, 胶布粘贴法 10% KOH 湿片直接镜检的阳性率为 68.8%, 钝刀刮取革兰染色法直接镜检的阳性率为 51.6%。结论 不同的取材处理方式对浅表皮肤真菌病直接镜检的检出率不同, 选择快速、简便、可靠的取材处理方式, 能在一定程度上减少真菌病直接镜检的误诊、漏诊, 提高结果的准确性及诊断报告的可信度。

关键词: 皮肤; 真菌; 浅部真菌病; 直接镜检

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.24.028

中图法分类号: R756

文章编号: 1673-4130(2019)24-3057-04

文献标识码: A

A comparative study of different skin lesion sampling methods in the diagnosis of superficial epidermal mycosis

HU Jimei, XIE Zhilian, CAI Haochuan, YE Aijun, WU Danting

(Department of Clinical Laboratory, the Fifth Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510900, China)

Abstract: Objective To discuss the best sampling method for superficial epidermal mycosis through analyzing the influence of three different sampling methods on the results of direct microscopic examination. **Methods** Skin scurfs in the 161 patient's skin lesion who were clinically suspected tinea versicolor, malassezia Folliculitis and epidermal dermatosis, were observed under microscope directly after blunt knife scraping and sealed by 10% KOH, transparent tape adhesive method and sealed by 10% KOH and gram stain after blunt knife scraping, respectively. **Results** Different sampling methods influence the results of direct microscopic examination greatly. For 45 suspected tinea versicolor patients, positive rate direct of microscopic examination after blunt knife scraping and sealed by 10% KOH, transparent tape adhesive method and sealed by 10% KOH and gram stain after blunt knife scraping were 93.3%, 88.9% and 97.8% respectively. For 52 suspected malassezia folliculitis patients, positive rate direct of microscopic examination after blunt knife scraping and sealed by 10% KOH, transparent tape adhesive method and sealed by 10% KOH and gram stain after blunt knife scraping were 80.8%, 88.9% and 100.0% respectively. For 64 epidermal dermatosis patients, positive rate direct of microscopic examination after blunt knife scraping and sealed by 10% KOH, transparent tape adhesive method and sealed by 10% KOH and gram stain after blunt knife scraping were 84.4%, 68.8% and 51.6% respectively. **Conclusion** The detection rates of direct microscopic examination for superficial epidermal mycosis are different with different sampling methods. Choosing a fast, simple and reliable sample processing

作者简介: 胡记妹, 女, 副主任技师, 主要从事皮肤性病与男性生殖研究。

本文引用格式: 胡记妹, 谢志连, 蔡浩川, 等. 多种皮损取材处理方式在诊断浅表皮肤真菌病的比较研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(24): 3057-3060.

method can decrease the misdiagnosis and missed diagnosis and increase the accuracy of the results and the reliability of the diagnosis report.

Key words: skin; fungal; superficial mycoses; direct microscopy

浅表皮肤真菌病是由寄生于皮肤角蛋白组织的致病真菌所引起的皮肤病,包括头癣、须癣、体股癣、手足癣、甲真菌病、花斑癣和马拉色菌毛囊炎等皮肤科的常见病和多发病。病原性浅表真菌的生长喜好潮湿的环境,在此种环境,病菌繁殖迅速,人群易感染。从化地区是亚热带地区,一年中大部分时间气候湿热,特别适合真菌等微生物滋长,有六十多万人口,以农业人口为主,城镇周边有众多民工,人口聚集,极易发生浅表皮肤真菌的感染,到医院皮肤科就诊的患者大幅增多,因此急需快速有效的实验室检测方法。实验室皮肤真菌病的方法有直接镜检、真菌培养、或组织病理检查,必要时进行伍德灯检查、共聚焦激光扫描显微镜检查等,但除真菌镜检外,其他检查方法设备要求过高,且耗时较长,并不适合于门诊皮肤科开展的皮损检查项目,因而直接镜检因其简便、快速易开展而成为应用最为普遍的真菌检查方法。目前对实验室真菌直接镜检取材及处理方法的研究不多,通常着眼于马拉色菌镜检方法的研究,而对浅表皮肤癣病镜检方法的探讨较少,未见文献对钝刀刮取法、胶布粘贴法及革兰染色法 3 种取材处理方法的比较研究,尤其是革兰染色法的研究更是少之又少。现对临床拟诊为花斑癣、马拉色菌毛囊炎、体表皮肤癣病包括头癣、须癣、体股癣、手足癣等的患者采用钝刀刮取法、胶布粘贴法、革兰染色法 3 种取材处理方式直接镜检,并用 SPSS11.5 软件统计分析 3 种取材处理方式之间的差异在浅表性皮肤真菌病有无统计学意义,旨在为不同的浅表皮肤真菌病选择最佳取材处理方法,从而提高直接镜检的阳性率和准确率,为临床诊断和治疗作出肯定依据,高效快速地作出诊断报告^[1-5]。

1 材料与方法

1.1 病例来源 2016 年 3—4 月 161 例到南方医科大学第五附属医院门诊部皮肤科就诊的患者。其中男性 68 例,女性 93 例,年龄 0~77 岁。按临床拟诊病种分为花斑癣组、马拉色菌毛囊炎组、体表皮肤癣病组,包括体股癣、手足癣、头癣等皮肤科常见的皮肤病和多发病。

1.2 材料 10%KOH 水溶液,革兰染色液,钝化的手术刀,酒精灯,75%消毒酒精,透明胶布,显微镜等。

1.3 取材及处理方法 对同一患者同时用钝刀刮取 10%KOH 封片法、透明胶布粘贴 10%KOH 湿片法、钝刀刮取革兰染色法进行直接镜检。

1.3.1 采集标本 采集标本前应对采集部位及采集用具进行消毒,遵循无菌操作的规则,避免污染造成假阳性。采集部位可用清水清洗 1 遍,此举可把皮肤上的药物、护肤品、脂肪滴等杂物清洗干净,以免影响镜下观察,然后用 75%酒精初步消毒取材部位(所选的取材部位病灶面积要足够大,足以提供 3 次的皮屑取材;取材部位要合适,一般来说应选取新生的与完好皮肤相邻的边沿部位;对于花斑癣应选取色淡与色深相间部位的皮屑;对于马拉色菌毛囊炎应选取带有脓性分泌物的脓点,刮破脓点后取其渗液;对于体表皮肤癣病,体股癣应取边沿红色病变部位且有较多鳞屑处,手足癣应取潮湿的白色部位且有较多皮屑处等)。

1.3.2 制片 先把钝刀手术刀用酒精灯灼烧消毒,待冷却后,轻轻在病变部位刮取一定量皮屑,置于已放好一滴 10%KOH 水溶液的载玻片上,盖上盖玻片,注意不要留有气泡,否则影响观察,然后过火固定,注意过火时间不要太长,否则载液沸腾蒸发,易出现太多结晶,也会影响镜下的观察;继续用钝刀手术刀刮取足够量皮屑放于干净的载玻片上,过火固定,干燥后用革兰染色法快速染色,冲洗干净染色液,注意冲洗时间不宜过长,流量要小,否则会把菌丝和孢子冲洗掉而造成假阴性,待风干后,用油镜观察;最后用透明胶布贴于皮损处,用手指按压胶布,使其粘贴足够量的皮屑,然后快速撕下,再把带有皮屑的透明胶布贴于滴有一滴 10%KOH 水溶液的载玻片上,不用过火固定,注意贴平,防止有气泡。

1.3.3 显微镜观察 采集完标本并用 3 种方法制成玻片后,直接置于显微镜下观察。先用低倍镜在清晰的视野下找到孢子或菌丝(真菌菌丝和孢子具有折光性,标本的杂质经 10%KOH 溶液溶解后,镜下呈暗绿色荧光;圆筒形细胞沿长轴方向连接,前端边分枝边形成丝状结构的是菌丝,根据有无横隔,菌丝又可分为有隔菌丝和无隔菌丝;孢子常呈圆形、卵圆形,出芽的孢子会形似葫芦,形状突出,也有链状孢子的存在),然后再换高倍镜观察其形态结构,可微调细螺旋,菌丝和孢子会出现一层发光的荚膜;而经革兰染色的标本应用油镜观察,菌丝和孢子被染成红色,而背景中的杂质如细胞器、角质细胞、脂滴、气泡、纤维丝等均不着色,且其他附着力弱的杂质也被冲洗掉,对比明显,易于观察。镜下找到数个孢子或数条菌丝即可确定为阳性,对于疑似孢子或菌丝的归位阴性结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计学软件进行分析,率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 种取材处理方法镜检检测 对 161 例临床疑似为花斑癣、马拉色菌毛囊炎、体表皮肤癣病的患者进行 3 种不同的标本取材处理后,直接镜检结果见表 1。

2.2 疑似花斑癣患者镜检检测 45 例疑似花斑癣的患者钝刀刮取 10%KOH 封片法直接镜检阳性者 42 例,阴性者 3 例,阳性率为 93.3%;透明胶布粘贴法 10%KOH 湿片直接镜检阳性者 40 例,阴性者 5 例,阳性率为 88.9%;钝刀刮取革兰染色法直接镜检阳性者 44 例,阴性者 1 例,阳性率为 97.8%。将 3 种方法直接镜检的阳性率用 χ^2 检验进行两两比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 3 种取材处理方法镜检结果

疑似病种	n	钝刀刮取法			胶布粘贴法			革兰染色法		
		阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)
花斑癣	45	42	3	93.3	40	5	88.9	44	1	97.8
马拉色菌毛囊炎	52	45	7	86.5	42	10	80.8	52	0	100.0
体表皮肤癣病	64	54	10	84.4	44	20	68.8	33	31	51.6
合计	161	141	20	87.6	126	35	78.3	129	32	80.1

2.3 疑似马拉色菌毛囊患者镜检检测 52 例疑似马拉色菌毛囊的患者钝刀刮取 10%KOH 封片法直接镜检阳性者 45 例,阴性者 7 例,阳性率 86.5%;透明胶布粘贴法 10%KOH 湿片直接镜检阳性者 42 例,阴性者 10 例,阳性率 80.8%;钝刀刮取革兰染色法直接镜检阳性者 52 例,阴性者 0 例,阳性率为 100.0%。将 3 种方法直接镜检的阳性率用 χ^2 检验进行两两比较,钝刀刮取 10%KOH 封片法直接镜检阳性率高于透明胶布粘贴法 10%KOH 湿片直接镜检,差异无统计学意义($P > 0.05$);钝刀刮取革兰染色法直接镜检阳性率高于钝刀刮取 10%KOH 封片法直接镜检、透明胶布粘贴法 10%KOH 湿片直接镜检,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 疑似体表皮肤癣病患者镜检检测 64 例疑似体表皮肤癣病的患者钝刀刮取 10%KOH 封片法直接镜检阳性者 54 例,阴性者 10 例,阳性率为 84.4%;透明胶布粘贴法 10%KOH 湿片直接镜检阳性者 44 例,阴性者 20 例,阳性率为 68.8%;钝刀刮取革兰染色法直接镜检阳性者 33 例,阴性者 31 例,阳性率为 51.6%。将 3 种方法直接镜检的阳性率用 χ^2 检验进行两两比较,钝刀刮取 10%KOH 封片法直接镜检阳性率均高于透明胶布粘贴法 10%KOH 湿片直接镜检、钝刀刮取革兰染色法直接镜检,差异有统计学意义($P < 0.05$);透明胶布粘贴法 10%KOH 湿片直接镜检阳性率高于钝刀刮取革兰染色法直接镜检,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

近年来,随着全球气温的上升及个人卫生习惯、环境等因素的影响,浅表皮肤真菌病的发病率逐年升

高,尤其是在亚热带及热带地区,因为潮湿温暖的气候,特别利于病原性真菌的滋长。从化地区是亚热带地区,一年中大部分时间气候湿热,特别适合真菌等微生物滋长,有六十多万人口,以农业人口为主,城镇周边有众多民工,人口聚集,极易发生浅表皮肤真菌的感染,到医院皮肤科就诊的患者大幅增多,因此急需快速有效的实验室检测方法^[6-7]。

在浅表皮肤真菌病的诊断中,最为常用的方法是钝刀刮取皮屑用 10%KOH 封片直接镜检,因为 10%KOH 的水溶液能够溶解角质细胞等杂质而使真菌菌丝与孢子暴露出来,且能保持其自然的形态不被破坏,通过菌丝与孢子的折光性和因光线强弱调节显现的暗绿色荧光即能进行区分,此方法快速简便,设备简单,成本低,操作容易,是大小医院均可开展的检查项目^[7-8]。但此方法真菌与背景对比较弱,且易于其他杂质混淆,尤其在某些浅表皮肤真菌病中此缺点尤为明显,如马拉色菌毛囊炎,因此有必要探讨不同浅表皮肤真菌病的最佳取材处理方式。

从表 1 的结果中可以得出不同的取材处理方式对不同浅表皮肤真菌病的直接镜检结果影响不一。对 45 例临床拟诊为花斑癣的患者同时用 3 种方法直接镜检后,得出的阳性率都较高,且经过 χ^2 检验显示 3 种方法之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),这可能与花斑癣患者的菌丝及孢子量有关,因为花斑癣患者的病变部位菌丝与孢子量非常多,皮损取材比较容易,且极易观察到菌丝,因此漏检率极低。但是对于诊断花斑癣来说,3 种方法也有其优缺点。钝刀刮取 10%KOH 封片法直接镜检,镜下可观察到大量短小杆状的菌丝及散在的孢子,真菌原有的形态被破

坏,菌丝结构不完整,孢子原始的聚集状态也被破坏,而透明胶布粘贴法 10%KOH 湿片直接镜检则保留了真菌附着于皮肤时的自然形态,可观察到完整形态的菌丝及葡萄串状聚集的孢子,而钝刀刮取革兰染色法直接镜检的阳性率虽然是最高的,但是由于其耗时相对于其他两种方法来说较长,且工序相对来说也比较繁琐,所以在 3 种方法比较差异无统计学意义($P > 0.05$)的情况下,钝刀刮取 10%KOH 封片法直接镜检及透明胶布粘贴法 10%KOH 湿片直接镜检是首选的方法。但是钝刀刮取皮屑对于比较好控制的患者或者比较合作的患者来说较易进行,而对于年龄较小的婴幼儿,为消除其恐惧感进而配合检查,则建议使用透明胶布粘贴皮屑进行取材^[8-9]。

对 52 例临床拟诊为马拉色菌毛囊炎的患者同时使用 3 种方法直接镜检后,钝刀刮取 10%KOH 封片法直接镜检与透明胶布粘贴法 10%KOH 湿片直接镜检阳性率比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而钝刀刮取革兰染色法直接镜检的阳性率是最高的,且与另两种方法的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这可能与马拉色菌毛囊炎的病原性菌种有关,其属于孢子菌属,在病变部位一般以孢子的形式存在,且发病的人群都有一个特点,即是皮肤油脂特别多。因此用钝刀刮取的皮屑可能混有血液、脂肪滴、组织液等杂质,特别是脂肪滴,因其也有折光性,用 10%KOH 溶液湿片直接镜检的话与孢子极难区分,容易漏诊、误诊,而经过革兰染色后的标本,因为孢子被染成红色,而其他如脂肪滴、角质细胞等杂质均不着色,且有一部分附着力极弱的杂质被冲洗掉,背景比较干净,对比鲜明,因而极易区分,得出的结果准确性、可信度都较高。因此对于马拉色菌毛囊炎此类浅表皮肤病来说,钝刀刮取革兰染色法直接镜检是首选方法^[9-10]。

对 64 例临床拟诊为体表皮肤癣病的患者同时使用 3 种方法直接镜检后,3 种方法两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),且阳性率从高到低依次为钝刀刮取 10%KOH 封片法直接镜检、透明胶布粘贴法 10%KOH 湿片直接镜检、钝刀刮取革兰染色法直接镜检。体表皮肤癣病的患者,病变部位会出现红肿瘙痒、鳞屑,严重者会出现溃烂,且皮肤角质化程度较高,皮屑也较多,但菌丝及孢子量相对较少。透明胶布粘贴法虽然能够保持真菌的原有形态,但同时也使得粘贴的皮屑处于一种聚集状态,这对于皮屑较多真菌量较少的皮损检查极为不利,因为胶带粘贴的皮屑聚集在一块很有可能把菌丝及孢子覆盖住,且因皮肤角质化程度高,10%KOH 水溶液病不能完全把角质细胞溶解,所以隐藏在皮屑中的菌丝及孢子并未暴露出来,极易造成漏诊。而钝刀刮取皮屑经革兰染色后

直接镜检阳性率最低,可能是因为菌丝及孢子量少,且在革兰染色时,因冲洗染液而把菌丝及孢子冲走造成假阴性而使阳性率变低。综上,在体表皮肤癣病的检查中,钝刀刮取 10%KOH 封片法直接镜检是首选方法,但也要因人而异,对于皮肤溃烂或者皮肤稚嫩的患者,为减少患者的痛苦,建议选取透明胶带粘取皮屑,而对于用药过度不能完全清洗干净的皮损部位建议用钝刀刮取皮屑经革兰染色后直接镜检,因为经革兰染色后,菌丝与孢子均着色,而包括药物等杂物也会被冲洗去部分,真菌与背景对比鲜明,相对另两种方法来说较易观察到^[11-12]。

4 结 论

综上所述,不同的取材处理方法对不同的浅表皮肤真菌病直接镜检结果的检出率不同,应该针对患者的实际情况选择最佳的取材处理方式,在更好地服务于患者的同时,极大提高检验结果的准确性和可信度,为临床诊断和治疗作出肯定依据,高效快速地作出诊断报告。

参 考 文 献

- [1] 张强强,李莉,王家俊. 马拉色菌相关研究[J]. 中国真菌学杂志,2007,2(3):166-168.
- [2] 贾杰主编. 真菌病学[M]. 郑州:河南大学出版社,2001:105-113.
- [3] 董兴军. KOH 和乳酸酚棉蓝染色法在浅部真菌病直接镜检中的应用比较[J]. 中国真菌学杂志,2014,20(3):170-171.
- [4] 帅丽华,宋秋荷,孙晓红,等. 两种浮载液真菌直接镜检效果比较[J]. 中国真菌学杂志,2008,22(6):343-345.
- [5] 赵卫红,郑宝勇. 346 例股癣患者临床特征和病原菌种类分析[J]. 医学理论与实践,2016,20(8):1084-1085.
- [6] 席丽艳,鲁长明. 皮肤性病直接镜检图谱[M]. 广州:广东科技出版社,2002:4-5.
- [7] 董兴军,张春亭,胡爱萍. 糠秕马拉色菌直接镜检的方法学选择[J]. 皮肤性病诊疗学杂志,2014,32(6):473-474.
- [8] 王耀荣,赵欣,苏春霞. 拟浅部真菌病直接镜检真菌 1200 例情况分析[J]. 包头医学,2007,22(1):4-5.
- [9] 冉玉平. 检测糠秕马拉色菌的几种取材染色和培养方法介绍[J]. 中国皮肤性病杂志,1999,20(3):56-57.
- [10] DIFONZO E M, FAGGI E. Skin diseases associated with *Malassezia* species in humans: Clinical features and diagnostic criteria[J]. *Parassitol*, 2008, 50(1/2): 60-71.
- [11] 王有为,罗才会,李红霞,等. 47 766 例拟诊皮肤真菌病患者病原菌分离培养结果分析[J]. 中国真菌学杂志,2016,11(1):37-40.
- [12] 徐明,张弘,邓劲松,等. 马拉色菌显微镜检查的方法学比较[J]. 福建医药杂志,2011,33(1):70-72.