

# 荧光染色法和 KOH 湿片法在头癣诊断中的应用

叶文正, 方木平

武汉科技大学附属孝感医院皮肤科, 湖北 孝感 432000

**【摘要】** 目的 比较真菌荧光染色法、KOH 湿片法在头癣诊断中的应用价值。方法 收集 2017 年 2 月至 2019 年 1 月在武汉科技大学附属孝感医院皮肤科门诊 82 例拟诊为头癣患者断发和鳞屑标本, 每例同时行荧光染色、KOH 湿片法以及真菌培养进行检测并记录阅片时间, 对检测结果进行比较。结果 荧光染色法背景相对干净, 真菌清晰可辨, KOH 湿片法背景杂乱, 真菌较难辨认, 82 例患者中, 荧光染色阳性 66 例, KOH 湿片法阳性 52 例, 真菌培养阳性 61 例, 荧光染色法阳性率为 80.49%, 明显高于 KOH 湿片法的 63.41%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 荧光染色法的阅片时间为  $(69.61 \pm 9.28)$  s, 明显短于 KOH 湿片法的  $(88.76 \pm 7.79)$  s, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 荧光染色法灵敏度 90.16%, 特异度 47.62%; KOH 湿片法灵敏度 72.13%, 特异度 61.90%。结论 在头癣诊断中, 荧光染色法较 KOH 湿片法更加快捷和准确, 值得广泛应用。

**【关键词】** 真菌; 头癣; 荧光染色法; KOH 湿片法; 真菌培养

**【中图分类号】** R756.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2020)03-0351-03

**Comparison of fluorescence staining method and KOH wet method in the diagnosis of tinea capitis.** YE Wen-zheng, FANG Mu-ping. Department of Dermatology, Xiaogan Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Xiaogan 432000, Hubei, CHINA

**【Abstract】 Objective** To compare the value of fungal fluorescence staining and KOH wet method in the diagnosis of tinea capitis. **Methods** A total of 82 cases of broken hair and scales of patients with suspected tinea capitis, who admitted to Department of Dermatology, Xiaogan Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology from February 2017 to January 2019, were selected as the research subjects. The samples were simultaneously detected by fluorescence staining, KOH wet method and fungal culturing, the reading time was recorded, and the test results were compared. **Results** The background of the fluorescent staining method was relatively clean, and the fungi was clearly identifiable, the background of the KOH wet method was messy and the fungi were difficult to identify. There were 66 positive cases with fluorescence staining, 52 positive cases with KOH wet method, and 61 positive cases with fungal culture. The positive rate of fluorescence staining was 80.49% versus 63.41% of KOH wet method ( $P < 0.05$ ); the reading time of fluorescent staining method was  $(69.61 \pm 9.28)$  s versus  $(88.76 \pm 7.79)$  s of KOH wet method ( $P < 0.05$ ); the sensitivity and specificity of fluorescence staining method were respectively 90.16% and 47.62% versus corresponding 72.13% and 61.90% of KOH wet method. **Conclusion** The fluorescence staining method is more rapid and accurate than KOH wet method in the diagnosis of tinea capitis.

**【Key words】** Fungi; Tinea capitis; Fluorescence staining; KOH wet method; Fungal culturing

头癣是由皮肤癣菌感染头皮和毛发所引起的疾病, 头癣多累及儿童, 成人较少见<sup>[1-2]</sup>, 致病菌只见于毛癣菌属和小孢子菌属, 头癣根据致病菌种类和宿主反应不同可以分为黄癣、白癣、黑点癣及脓癣<sup>[3]</sup>, 对于所有侵及毛发的皮肤癣菌来说, 其入侵形式不同可分为发内型和发外型感染<sup>[4]</sup>。准确可靠的病原学检查是诊断头癣的重要依据<sup>[5]</sup>, 有利于及时治疗且减少永久性瘢痕性脱发的发生, 常规的真菌镜检采用的是 10% 的 KOH 湿片法, 但因背景杂乱, 杂质及气泡干扰等导致发内孢子及菌丝鉴别困难, 且标本溶解需要一定时间, 易出现假阳性和假阴性结果。本研究旨在通过对比荧光染色法、KOH 湿片法检出头癣的阳性率和阅片

时间, 比较两种方法的检测在头癣诊断中的优越性。

## 1 材料与方法

1.1 检测标本 选取 2017 年 2 月至 2019 年 1 月在武汉科技大学附属孝感医院皮肤科门诊就诊拟诊头癣患者 82 例, 其中儿童 69 例, 成人 13 例; 男性 45 例, 女性 37 例。取材标本同时采用荧光染色法、KOH 湿片法和真菌培养法进行检测。

1.2 试剂及检测仪器 10% KOH (江苏永华化学科技有限公司) 溶液自配, 立特晰真菌荧光染色液 (安徽德莱康生物医疗科技有限公司生产), 沙氏培养基 (上海博微生物科技有限公司), 仪器采用奥林巴斯显微镜和徕卡荧光显微镜。

基金项目: 湖北省自然科学基金 (编号: 2017CFC812)

通讯作者: 方木平, E-mail: fmpfk@sina.com

### 1.3 取材及染色方法

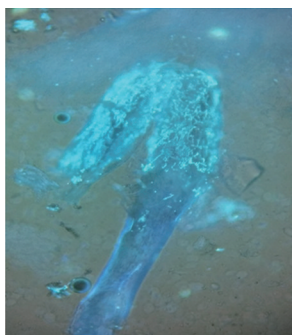
1.3.1 取材 先用75%的酒精消毒患者头部皮疹,用镊子拔取断发置于载玻片上,如有鳞屑并用钝头刀片刮取鳞屑一起置于载玻片上,所有标本平均分为3份。

1.3.2 KOH湿片法 随机选取一份标本置于载玻片上,加10% KOH溶液一滴,盖上盖玻片,在酒精灯火焰上方快速通过2~3次,注意不要沸腾,然后轻压盖玻片,用吸水纸吸去多余的溶液,置奥林巴斯显微镜下观察并拍照。

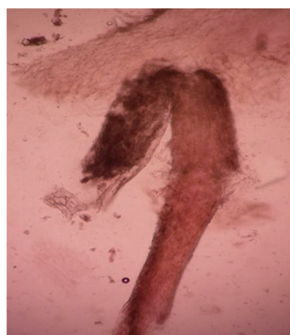
1.3.3 荧光染色法 随机选取第二份标本滴加一滴荧光染色液,盖上盖玻片,轻压,用吸水纸吸去多余的染色液,置徕卡荧光显微镜下观察,并采集图像。

1.3.4 真菌培养 将第三份标本接种在沙堡培养基上,置26℃培养箱培养1~2周,观察菌落形态特征以及生化反应,鉴定菌种。

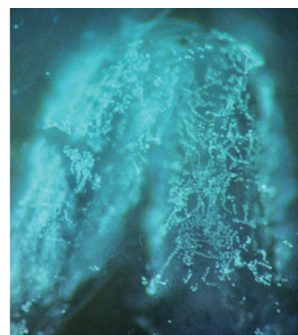
### 1.4 观察指标 对比荧光染色法和KOH湿片法



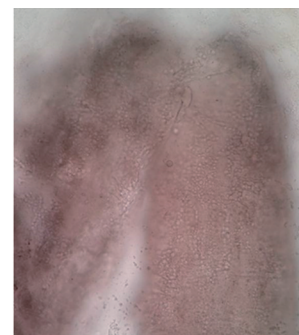
A



B



C



D

图1 低倍和高倍显微镜下发内孢子分别在荧光染色和KOH湿片法中的特点

注:A,图中标本荧光染色后发内孢子在低倍镜下( $\times 10$ )显示清晰轮廓;B,图中标本通过KOH湿片法在低倍镜下( $\times 10$ )无法辨别菌体;C,图中标本荧光染色后发内孢子在高倍镜下( $\times 40$ )清晰可见;D,图中标本通过KOH湿片法在高倍镜下( $\times 40$ )发内孢子呈现无色透明或淡绿色折光小球体,与杂质、气泡等不易区分。

2.2 两种方法检测头癣阳性率、灵敏度和特异度比较 荧光染色法和KOH湿片法检测阳性率分别为80.49%(66例)、63.41%(52例),荧光染色法阳性率高于KOH湿片法,阳性率差异有统计学意义( $\chi^2=5.92, P<0.05$ )。82例头癣患者中,培养阳性61例,其中犬小孢子菌38例、紫色毛癣菌10例、须癣毛癣菌5例、断发毛癣菌4例、红色毛癣菌2例、石膏样小孢子菌2例,培养阳性的61例患者中,荧光染色法阳性55例,阴性6例(9.84%);KOH湿片法阳性44例,阴性17例(27.87%),两种检测方法漏诊率比较差异有统计学意义( $\chi^2=6.48, P<0.05$ );荧光染色灵敏度90.16%,特异度47.62%,KOH湿片法灵敏度72.13%,特异度61.90%,见表1。

2.3 两种检测方法和阅片时间比较 荧光染色法和KOH湿片法阅片时间分别为( $69.61\pm 9.28$ )s、( $88.76\pm 7.79$ )s,荧光染色法阅片时间低于KOH湿片法,差异有统计学意义( $t=-14.13, P<0.05$ )。

镜下观测效果,分别比较其检出阳性率以及平均阅片时间,并以培养为参考标准比较两种方法的灵敏度和特异度。

1.5 统计学方法 应用SPSS16.0软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两样本均数比较采用配对设计 $t$ 检验,计数资料使用 $\chi^2$ 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 镜下观察 荧光染色后发内链状孢子清晰可见,在低倍显微镜下即显示出明亮的蓝色轮廓(图1A),KOH湿片法则视野昏暗,背景杂乱且对比度低,在和荧光显微镜相同的倍数下无法有效辨别发内孢子(图1B);在高倍视野下发内链状孢子显示出更加清晰的荧光轮廓,菌体清晰可辨(图1C),在相同高倍显微镜下,KOH湿片法孢子则呈现无色透明或者淡绿色折光,和背景反差小,与杂质、气泡等不易分辨(图1D)。

表1 拟诊头癣患者培养结果及荧光染色法和KOH湿片法检测结果(例)

培养结果	例数	荧光染色法		KOH湿片法	
		阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	61	55	6	44	17
阴性	21	11	10	8	13
合计	82	66	16	52	30

## 3 讨论

头癣是指累及头发和头皮的真菌感染,直接镜检是检查浅部真菌形态学的最基本方法,其中KOH湿片法是临床上直接镜检最早和最广泛的方法<sup>[6]</sup>,该方法不需要特殊仪器,操作简单且方便快捷,但缺点是检测视野背景杂乱,对比度低,特别是在头癣诊断中,由于部分孢子及菌丝寄生在发内,常规KOH湿片法难以短时间溶解毛发,显露发内菌丝及孢子,此外,在制片过程中,产生的小气泡、脂滴和纤维丝等也存在明显干扰,导致检出率偏低或造成假阳性和假阴性结果<sup>[7]</sup>。荧光染色液是一种高纯度荧光素和和特定比例的KOH混合溶液,

荧光素标记下的几丁质重组酶能和真菌细胞壁中的几丁质以及纤维素特异性结合,形成强荧光复合物,在暗视野显微镜下,染色后真菌结构发出亮绿色荧光,和背景反差较大,使菌体的分布位置和数量清晰可见。该方法操作简易,仅需一滴染色液,数秒钟即可完成,操作过程和 KOH 湿片法一致,但无需加热,耗时短且省时省力,结果直观明了,特别是对于发内外的真菌感染诊断,能够迅速区分气泡、脂滴、纤维丝以及菌丝和孢子,短时间内做出确切可靠的诊断,指导临床及时用药,防止误诊漏诊,造成永久性脱发以及危害患者身心健康<sup>[8-10]</sup>。

通过对比荧光染色法和 KOH 湿片法检测门诊拟诊为头癣患者的断发和鳞屑的阳性率,荧光染色法阳性率和敏感度均高于 KOH 湿片法,阅片时间低于 KOH 湿片法,荧光染色漏诊率亦低于 KOH 湿片法,在拟诊头癣的 82 例患者中,培养阴性例数为 21 例,在此 21 例培养阴性患者中, KOH 湿片法检测阴性 13 例,检测阳性 8 例,荧光染色法检测出 11 例阳性患者,阳性检测率高于 KOH 湿片法,显示出荧光检测的优势。对于较少真菌数量的标本,或者普通 KOH 湿片法不易发现发内较少的菌丝和孢子的样本,荧光染色法也能够做出快速有效且可靠的诊断,因此,荧光染色法阳性检出率和灵敏度均高于真菌培养和 KOH 湿片法,阅片时间也低于 KOH 湿片法,而且在培养阴性的患者中检出阳性率也高于 KOH 湿片法,因此荧光染色法在头癣诊断中有着明显的优势。余菁等<sup>[11]</sup>通过门诊收集拟诊为手足癣、体股癣和甲真菌病患者总计 600 例以及马拉色菌感染的 102 例患者,通过荧光染色法和 KOH 湿片法进行比较,得出荧光染色法相比于 KOH 湿片法可以提高检出阳性率,减少漏诊,缩短阅片时间,岳学苹等<sup>[12]</sup>通过运用荧光染色法和 KOH 湿片法对 100 例拟诊甲真菌病患者进行检测比较,结果显示荧光染色法较 KOH 湿片法方便、快速、准确,徐艳等<sup>[13]</sup>也通过荧光染色法和 KOH 湿片法对 105 例疑诊为浅表真菌感染的患者皮损标本进行检测,结果显示荧光染色法较 KOH 湿片法结果更快速、准确,可用于浅部真菌感染的快速诊断。本次研究同样显示在头癣诊断中,相比

于 KOH 湿片法和真菌培养,荧光染色法有更高的阳性检出率以及较高灵敏度,减少漏诊和阅片时间,有较高的应用价值。

综上所述,在头癣患者直接镜检中,荧光染色法检查阳性率和阅片时间均优于 KOH 湿片法,特别是对于菌量少、杂质多且制片质量较低的标本,荧光染色法更为快捷、简便、高效以及有较高的检出率和灵敏度,有较好的检测优势,对于初学者易于掌握,值得临床广泛应用。

#### 参考文献

- [1] 张学军. 皮肤性病学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 188-189.
- [2] 李美荣, 尹颂超, 黄怀球, 等. 广州地区 70 例儿童头癣病原学分析[J]. 中国真菌学杂志, 2014, 9(3): 155-158.
- [3] HAY RJ. Tinea capitis: current status [J]. Mycopathologia, 2017, 182(1-2): 87-93.
- [4] 中国头癣诊疗指南工作组. 中国头癣诊断和治疗指南(2018 修订版)[J]. 中国真菌学杂志, 2019, 14(1): 4-6.
- [5] DASS SM, VINAYARAJ EV, PAVAVNI K, et al. Comparison of KOH, calcofluor white and fungal culture for diagnosing fungal onychomycosis in an urban teaching hospital, Hyderabad [J]. Indian J Microbiol Res, 2015, 2(3): 148-153.
- [6] 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.
- [7] MILLER MA, HODGSON Y. Sensitivity and specificity of potassium hydroxide smears of skin scrapings for the diagnosis of tinea pedis [J]. Arch Dermatol, 1993, 129(4): 510-511.
- [8] 杨通, 谭亚夏. 活检组织中真菌 Calcofluor White 荧光染色法的改良[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(5): 767-771.
- [9] GUPTA MK, CHANDRA A, PRAKASH P, et al. Fungal keratitis in north India; Spectrum and diagnosis by Calcofluor white stain [J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2015, 33(3): 462-463.
- [10] 高宇, 钱桂萍, GAO Y, 等. 儿童头癣 33 例临床分析[J]. 中国真菌学杂志, 2014, 9(4): 237-240.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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): 27-28.

(收稿日期: 2019-09-09)