



原著主编

Vicente Crespo Erchiga
Elisabeth Gómez Moyano
Maria Crespo Palomo

皮肤真菌病学

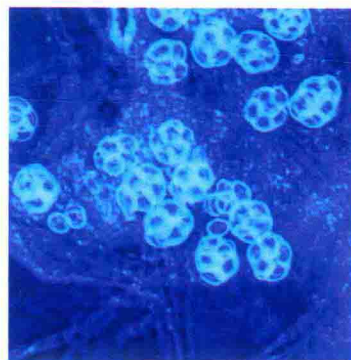
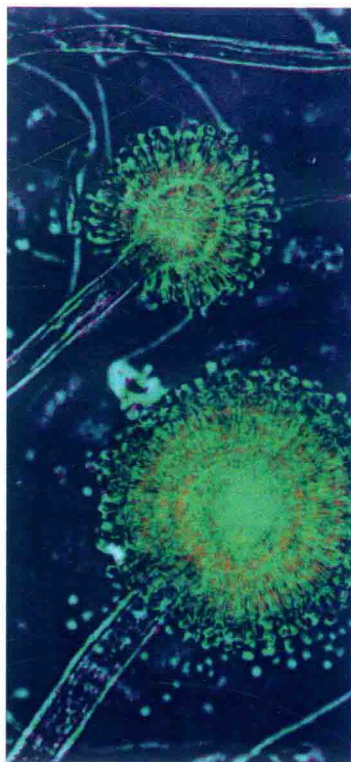
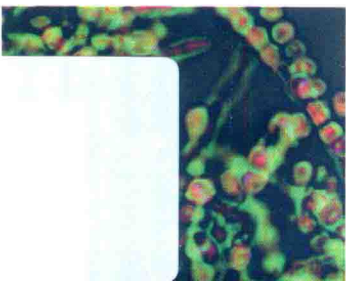
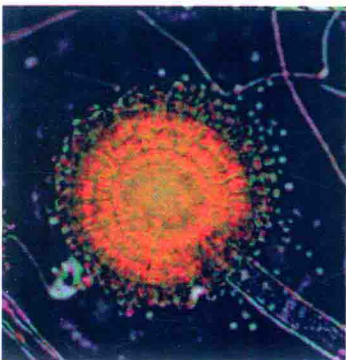
——皮肤科医师实验室实用诊断手册

DERMATOMYCOSIS

The Laboratory Diagnosis within the Reach of the Dermatologists

主译 李东明

审校 姚一建



北京大学医学出版社

皮肤真菌病学

——皮肤科医师实验室实用诊断手册

DERMATOMYCOSIS

**The Laboratory Diagnosis within
the Reach of the Dermatologists**

原 著 Vicente Crespo Erchiga
Elisabeth Gómez Moyano
Maria Crespo Palomo

主 译 李东明
审 校 姚一建

北京大学医学出版社

PIFU ZHENJUN BING XUE——PIFUKE YISHI SHIYANSHI SHIYONG ZHENDU-
AN SHOUC

图书在版编目 (CIP) 数据

皮肤真菌病学：皮肤科医师实验室实用诊断手册/
(西) 文森特·克雷斯波·埃驰加原著；李东明主译. —
北京：北京大学医学出版社，2017.3

书名原文：DERMATOMYCOSIS: The Laboratory
diagnosis within the reach of the dermatologists
ISBN 978-7-5659-1576-5

I. ①皮… II. ①文… ②李… III. ①皮肤真菌病—
诊断—手册 IV. ①R756.04-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 044005 号

北京市版权局著作权合同登记号：图字：01-2017-0581

DERMATOMYCOSIS: The laboratory diagnosis within the reach of the dermatologists
VICENTE CRESPO ERCHIGA, ELISABETH GÓMEZ MOYANO, MARIA CRESPO
PALOMO

ISBN: 978-84-15950-78-3

© 2015 Ergon

This edition of Dermatomycosis is published by arrangement with ERGON CREACION S. A.

Simplified Chinese translation copyright © 2017 by Peking University Medical Press.
All rights reserved.

皮肤真菌病学——皮肤科医师实验室实用诊断手册

主 译：李东明

出版发行：北京大学医学出版社

地 址：(100191) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

电 话：发行部 010-82802230；图书邮购 010-82802495

网 址：<http://www.pumpress.com.cn>

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷：北京强华印刷厂

经 销：新华书店

责任编辑：王智敏 责任校对：金彤文 责任印制：李 啸

开 本：710mm×1000mm 1/16 印张：6.25 字数：110 千字

版 次：2017 年 3 月第 1 版 2017 年 3 月第 1 次印刷

书 号：ISBN 978-7-5659-1576-5

定 价：68.00 元

版权所有，违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

原 著

Vicente Crespo Erchiga M.D., Ph.D.

Former Head of Dermatology Department. Hospital Regional Carlos Haya.
Associated Professor. University of Málaga (Spain).

Elisabeth Gómez Moyano M.D., Ph.D.

Dermatology Department. Hospital Regional Carlos Haya. Málaga (Spain).

Maria Crespo Palomo BSc., Ph.D.

Microbiology Department. Faculty of Sciences. University of Málaga (Spain)

译者名单

主译 李东明

北京大学博士，荷兰皇家科学院 CBS 真菌生物多样性中心博士后
北京大学第三医院皮肤科教授

审校 姚一建

英国伦敦大学英皇学院博士
中国科学院微生物研究所研究员、菌物标本馆馆长

译者

葛 杰 周亚彬 陈 萍
北京大学第三医院皮肤科

吴 婧 吴红梅

中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室

中文版序

各位皮肤科同道：

我怀着十分兴奋的心情向大家推荐这部专门为我们皮肤科医生准备的《皮肤真菌病学》手册。当我初次看到这本书时，就有一种特别的亲切感和赞同感。本书作者特别强调了这是一部能够为皮肤科医生提供实用的真菌病诊断方法的专著。借助书中所介绍的普通真菌学知识和技能，皮肤科医生仅仅需要一些简单的设施，就可以对常见的皮肤真菌病做出精确的病原学诊断，避免漏诊和误诊；在确定真菌病原体后，可以为准确选择药物并为患者个体化治疗提供依据。

本书的文字精炼，图文并茂，对于临床标本的正确收集、显微镜下检查特点以及包括皮肤癣菌、酵母菌和条件致病性丝状真菌等几大类临床常见病原真菌的培养和鉴定都进行了详尽的描述。特别适合于皮肤科临床医师和真菌实验室检验人员使用，是一部十分简明而实用的工具书。

医学真菌学是一门古老的学科，但也在伴随着其他学科的进步而不断发展，譬如分子生物学手段的应用给她带来了根本性的变化。必须强调的是，真菌学基础知识和基本操作对于当今皮肤病的规范化诊疗依然十分重要，标准而娴熟的真菌学检查能够为临床上难以辨认的真菌感染做出准确诊断，从而使患者得到合适的治疗，其作用是不言而喻的。因此，这些技术不仅不该被人们淡忘，而且应该得到充分的重视，应该进一步得到普及和发展。

最后，我要特别感谢北京大学第三医院的李东明教授带领她的团队将这部专著译成了中文，正是她们的辛勤劳动，使得该书能够被我国更多的皮肤科同道所认识和珍藏。我相信，该书一定能够为提高我国皮肤真菌病的诊断水平而发挥出其应有的作用。

李若瑜

2017年春

于北京大学第一医院皮肤科真菌室

译者前言

形态学鉴定一直是真菌病诊断的基础，是医学真菌学家必备的知识。随着分子生物学技术的发展，特别是 DNA 序列鉴定和质谱鉴定技术迅速应用于临床，形态学似乎淡出了人们的视野。不过，确定所分离的真菌是否为致病菌，其生长是否对人体产生了病理损害，仅仅依靠分子生物学诊断是远远不够的，这也是 Erchiga 博士撰写该书的初衷。

译者初识 Erchiga 博士是在一次国际学术会议上，他用简洁的语言、精美的图片，将艺术元素融入皮肤真菌学的讲解之中；他也为译者所提出的毛壳属真菌应为致病菌及其相关患者染菌表皮中栩栩如生的子囊而兴奋，这也就是双方合作的萌芽。

初次阅读到 Erchiga 博士的 *Dermatomycosis* 一书时，颇有一种久违的感觉。在我几乎一口气读完之后，便有了将此书介绍给国内同行的冲动。恰逢时任 LEO 公司经理毛启新先生的热心帮助，便有了此书中译版的诞生。

本书从建立皮肤科真菌实验室所需的器械到制剂、从取材到镜检、从接种到鉴定等角度简洁地介绍了真菌检测的方法和流程；从流行病学、生态学、宿主选择等方面清晰地说明了皮肤真菌所致疾病；从大体菌落特征到镜下的微观形态变化等角度形象地展示了皮肤真菌的鉴定方法。鉴于书中所含的丰富内容和实际操作指导，此书将成为皮肤科医生必备的工具书。

本书中译版经中国科学院微生物所姚一建先生审校，使医学真菌名称采用了与普通真菌学一致的规范译名，如 *Trichophyton rubrum* 译为“红色癣菌”，*Microsporum canis* 译为“狗小孢霉”等。这种译名的统一将有助于学术界的沟通交流。

特别感谢 Luqa pharmaceuticals 公司的慷慨资助，使本书中译版得以问世！在我国皮肤科真菌实验室构建及标准化建设的进程中，相信此书将发挥其应有的作用。

李东明

2017 年春

于北京大学第三医院皮肤科真菌实验室

缩 写

CMA (Corn meal agar) : 玉米琼脂——真菌鉴定培养基

D.M. (Direct microscopic examination) : 直接镜检

LCF (Lactophenol cotton blue) : 乳粉酚棉兰——真菌实验室常用染色剂

PDA (Potato dextrose agar) : 马铃薯葡萄糖琼脂——真菌鉴定培养基

SGA (Sabouraud glucose agar) : 沙氏葡萄糖琼脂——真菌分离培养基

目 录

概论.....	1
第一章 实验室诊断.....	3
第二章 皮肤癣菌.....	11
第三章 酵母菌.....	41
第四章 机会性霉菌.....	57
真菌术语词汇表.....	85

概 论

浅部真菌病的实验室诊断主要有三个步骤：首先从皮损部位正确采集标本；其次应用显微镜观察样本中的真菌结构，即直接镜检（Direct Microscopy）；最后使用适宜的培养基对真菌进行分离和鉴定。

当然，现在实验室诊断也可采用分子生物学技术，而且血清学和组织病理学也可以在某些情况下帮助诊断。此外，新近的研究技术也为诊断提供了一种具有广阔前景的方法。基质辅助激光解吸/电离质谱技术（Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI），是质谱分析中用到的一种软离子化技术，可用来进行生物大分子及有机大分子的测定，而这些有机大分子用传统电离方法电离时脆性增加和碎片化。MALDI/TOF用于鉴定微生物，如细菌和真菌。

所有这些技术和方法都需要在专门的实验室中进行，前述三个经典方法可由皮肤科医生或技师操作，只需借助于一般显微镜和试验材料便可。当然，需要这些医生或技师达到足够的专业水平。

本书旨在向读者介绍或者是帮助他们提高在皮肤真菌病学科方面的知

识和实践能力。这个学科若干年前就广为人知并且蓬勃发展，然而时下却似乎已经被遗忘了。

很多皮肤科医师仅根据临床特征来诊断和治疗浅表真菌病，但是至少在下列 5 种情况下需要借助于实验室工作。

皮肤真菌病的病原鉴定将有助于：

1. 识别临床上不典型的病例，如难辨认癣等疾病，这些病例在大多数情况下是误诊后经不恰当治疗的结果。

2. 找出感染源，通过生态学和皮肤癣菌菌株对宿主的偏好性来明确感染源。在这个基础上就可采取流行病学的防控措施。

3. 为临床的系统性治疗，确定药物剂量、疗程以及出现副作用的可能性和类型提供坚实的基础。

4. 使为每一病例选择特效的治疗成为可能。口服特比萘芬不仅对白念珠菌，而且也对马拉色菌的感染无效，同时对狗小孢霉所致的头癣效果也很差。一些重要的酵母菌，比如克柔念珠菌和光滑念珠菌等则对伏立康唑耐药。

5. 提高患者的依从性。这对儿童头癣及甲真菌病等需要长期治疗的患者尤为重要。

实验室诊断

1. 标本采集 (Specimen collection)

采集适当的标本是皮肤真菌病和其他真菌感染实验室诊断的基础，是事关整个真菌学诊断正确性的非常重要的一步。不恰当的取材可导致直接显微镜镜检和培养的错误报告。

对于光滑皮肤的皮肤真菌病，应使用刀片刮取皮损的活动边缘来采集标本，使用采血针 (blood lancet) 的钝头更好 (图 1-1)。对于头癣，应当更加用力地刮取皮损的表面，以便获得病发的碎片 (长约 2 ~ 3 mm)。

对于甲真菌病，应当使用小刮匙刮取甲床来采集标本。为此我们采用了一种在牙科医师中广为人知的工具，称为“雕刻刀” (Le Cron knife)。

标本应收集在无菌的载玻片上，

标本量应该足以进行直接镜检和在两个不同培养基上进行培养。

对于花斑癣，通常可以用透明胶带粘取标本，无需培养，因为直接镜检明确诊断，培养只用于研究目的。对于黏膜和间擦部位的念珠菌病，大多数情况下标本应通过无菌棉拭子采集，这些拭子可转接在培养基上，经氢氧化钾 (KOH) 或染色剂涂片后直接镜检。拭子采集的标本应尽快进行转接，避免变干，否则需要在拭子上加上运载液 (图 1-2)。

2. 直接镜检 (Direct Microscopic examination, DM)

皮肤真菌病的明确诊断需要对致病真菌进行分离培养和鉴定，但这通常需要数天乃至数周的时间。



图 1-1 在面癣上刮取皮屑来采集标本



图 1-2 收集标本的材料。箭头指示 Le Cron 刀

不过，在患者初次就诊时可以用部分标本来进行直接镜检，并依此做出初步诊断。而训练有素的皮肤科医生则可以依此得到明确的诊断，在培养确认之前就可以开始适当的治疗。

直接镜检的目的是通过显微镜和简单试剂（通常是一种特定试剂）来观察标本中存在的真菌结构。同组织病理相比，这种方法可以即刻（“直接”）进行，而不需要经过固定、切片、染色等复杂的程序。

直接镜检方法非常简便。在显微载玻片上加一滴试剂（通常是 KOH 溶液），取少许标本与之混合，盖上盖玻片（我们通常使用 24 mm×60 mm 型号）后，在本生灯或酒精灯的低焰下缓慢加热。在进行此操作时，必须小心并反复地把盖玻片往下轻压，直到标本均一地溶解（分离），否则对于头癣和甲真菌病等稍致密的标本，难以进行准确观察。

先用低倍镜（10 倍），然后再用高倍镜（20 倍和 40 倍）观察。通常不需要使用油镜来观察（图 1-3、1-4）。

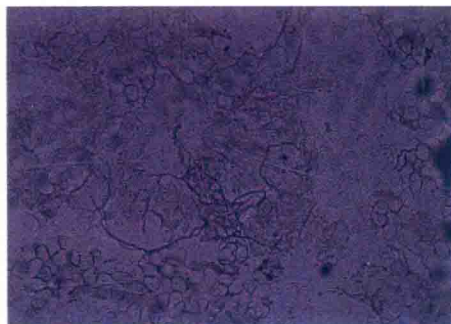


图 1-3 股癣折光性菌丝。KOH×100

染料和试剂

到目前为止最常用的制剂是 10%～20% 的氢氧化钾（KOH）溶液。可以加入 10% 的甘油并混以同等份的黑色派克墨汁来提高其效果。这就是我们日常检验中使用的氢氧化钾墨汁（Swartz-Lamkins）溶液（表 1-1）。

氢氧化钾因其有独特的折射率可以澄清试剂、溶解角蛋白，有助于观察真菌结构，特别是皮肤癣菌的菌丝和节孢子（图 1-5）。需要指出的是，派克墨汁使这些真菌结构着色通常需要数小时，但花斑癣例外，因为马拉色菌的酵母和假菌丝会在第一时间被染上蓝色。

另外，对于缺乏经验的检验人

表 1-1 用于直接镜检的氢氧化钾制剂

Swartz-Lamkins 溶液		KOH-DMSO	
KOH	20 g	KOH	20 g
蒸馏水	70 ml	蒸馏水	100 ml
甘油	10 g	二甲基亚砷	36 ml
		(DMSO)	
同等份的黑色派克墨汁混匀			

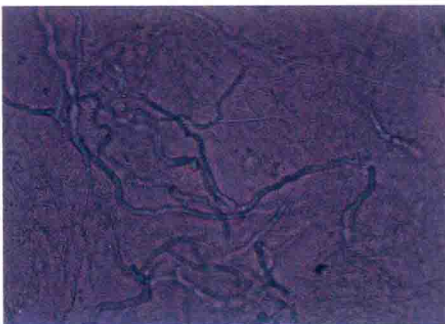


图 1-4 股癣菌丝。KOH×400

员，添加派克墨汁在某些金钱癣和念珠菌病病例中也是有帮助的，因为它可以保存标本，便于在数小时或数天后重新检查，此时真菌已被着色并且易被辨认（图 1-6、1-7）。

另一种改良 KOH 方法是添加 36% 的二甲基亚砜（DMSO）至 20% KOH 中，这有助于澄清甲真菌病中采集的特别坚硬或致密的标本。

在进行真菌镜检时有一些菌丝样的人工制品必须辨认并区分出来。最常见的是药棉或合成纤维，它们快速着色、形态不规则并比真正的菌丝大很多（图 1-8）。小的脂肪滴看起来也很像酵母细胞，但是它们的大小不同

并且不会出芽。有一种被称作“马赛克真菌”的罕见人工制品很难被辨认出，它们由表皮细胞周围的胆固醇结晶构成。

总而言之，对于有经验的医生来说，使用 KOH 进行的直接镜检在浅表真菌病诊断中是最有用、最简单、最经济的诊断方法

第二种广泛用于直接显微镜镜检的试剂是钙荧光白。这是一种在造纸业和纺织业常用的荧光增白剂。这种物质可结合真菌细胞壁的甲壳素，并在长波紫外线下发出荧光。其缺点在于需要荧光显微镜，这种显微镜对大多数实验室来说过于昂贵。



图 1-5 显示折光性的皮肤癣菌菌丝。
×400

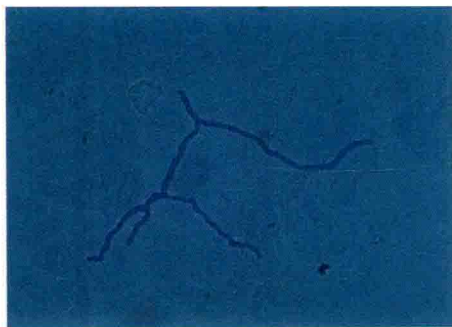


图 1-6 体癣有隔分枝菌丝。KOH + 墨汁
×400

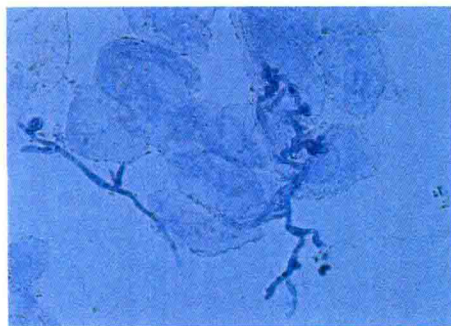


图 1-7 甲真菌病不规则菌丝。KOH + 墨汁 ×400。培养结果为红色癣菌

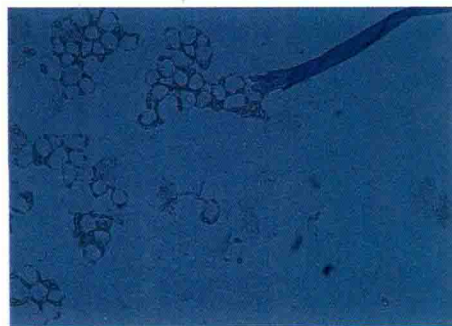


图 1-8 皮肤癣菌菌丝（中央）和棉花纤维（右上方）。KOH + 墨汁 ×100

钙荧光白显色技术简单，一滴钙荧光白、一滴 KOH 溶液同标本在载玻片上混匀，盖上盖玻片即可。真菌菌丝会发出明亮的荧光，即使没有经验的人也很容易辨认（图 1-9）。

第三种技术基于组织学染色，比如过碘酸-希夫染色（Periodic acid-Schiff, PAS），它的主要缺点在于需要更多的时间。改良 PAS 技术能在十分钟完成（表 1-2）。标本必须用氰基丙烯酸酯胶黏剂或双面透明玻璃胶带采集。真菌菌丝会被染成紫红色，并且非常容易辨认（图 1-10）。

结果解读

皮肤癣菌在 KOH 制剂中经常表现为透明、具分隔、高度折光的分枝菌丝和节孢子（图 1-11、1-12 和

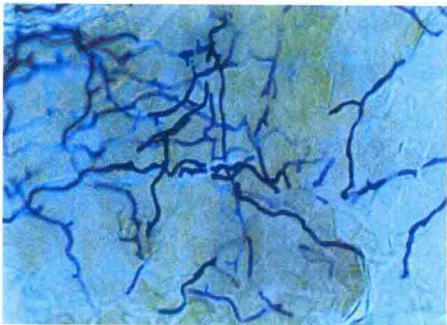


图 1-10 皮肤癣菌菌丝。改良 PAS 染色 ×400



图 1-11 足癣透明菌丝。KOH×100

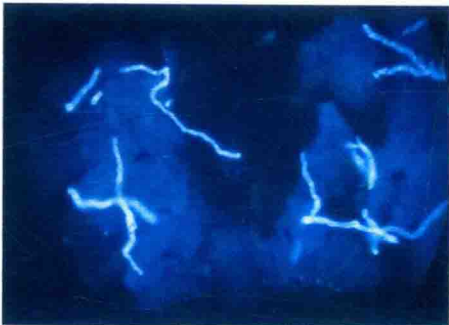


图 1-9 皮肤癣菌菌丝。钙荧光白 ×400

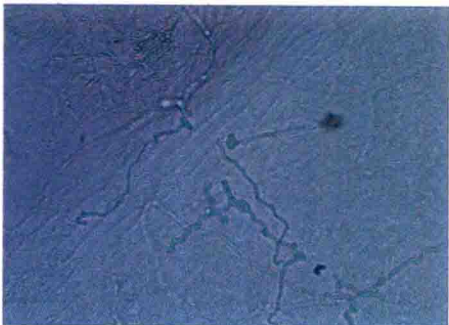


图 1-12 足癣透明菌丝。KOH×400

表 1-2 改良 PAS 技术 (Crespo V, 1996.)

1% 过碘酸	5 分钟
清水冲洗	
希夫试剂	3 分钟
清水冲洗	
96% 乙醇	2 次
二甲苯	2 次
DePeX 封固剂固定	

1-13)

在头癣中，节孢子可出现在感染毛发的内外（毛发内或毛发外侵染），或可见到气泡和隧道（黄癣菌侵染）的菌丝。后者见于黄癣患者，在西班牙从来没有，或至少最近这段时间没有发现这样的病例（图 1-14、1-15）。



图 1-13 图 1-8 中的皮肤癣菌菌丝。KOH×400



图 1-14 头癣发外孢子侵袭。KOH-墨汁×400

毛发感染的类型为培养出来的皮肤癣菌种类及正确的治疗方案提供了重要的信息。在西班牙，几乎所有的头癣都是由狗小孢霉所致的发外感染，特比萘芬对狗小孢霉效果差，因此需要口服灰黄霉素治疗。与之相对应的是，发内感染致病菌多为断发癣菌或紫色癣菌，对口服特比萘芬治疗效果好。

最后直接镜检可以诊断光滑皮肤的金钱癣。金钱癣患者毳毛的感染与头癣类似，这就是所谓的毳毛癣，通常也需要口服抗真菌药物治疗（图 1-16）。

念珠菌感染中，直接镜检可以显示常聚集成群出芽的酵母菌和假菌



图 1-15 头癣发内孢子。KOH-墨汁×400

丝。一个有经验的检验人员可以轻易地将这两者与皮肤癣菌的真菌丝和节孢子区分开（图 1-17、1-18）。

花斑癣直接镜检下的图片极具特色，由突出瘢痕的单极出芽酵母菌聚集成团，其同假菌丝分枝共同组成所谓的“意面肉丸”（图 1-19）。

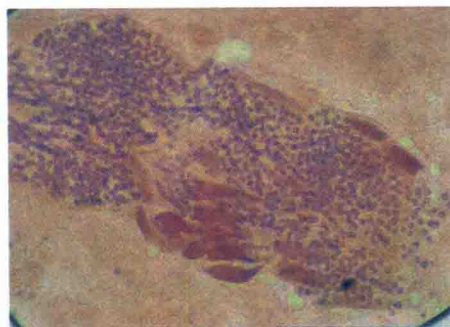


图 1-16 毳毛癣。KOH-墨汁×400



图 1-17 皮肤念珠菌病出芽分生孢子和假菌丝。KOH-墨汁×400

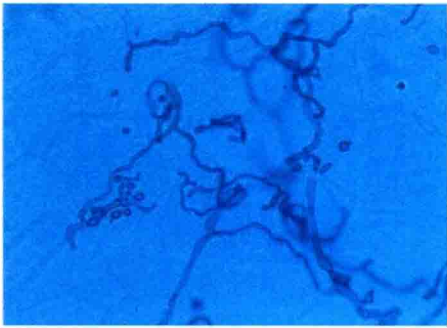


图 1-18 黏膜念珠菌病出芽分生孢子和假菌丝。KOH-墨汁 ×400

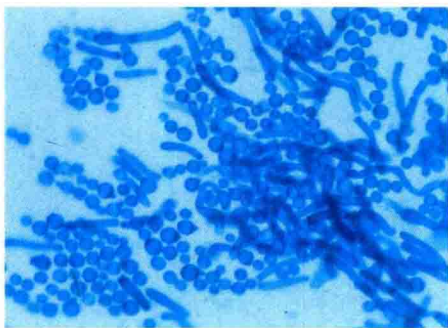


图 1-19 花斑癣芽孢和假菌丝。KOH-墨汁 ×400。培养结果为球形马拉色菌

对于机会致病菌所致的甲真菌病，尽管在某些情况下特殊的结构提示特定的菌（短柄帚霉）或可见到某些真菌（曲霉、暗色真菌等），但是直接镜检下的菌丝和表皮癣菌的菌丝非常相像（图 1-20、1-21）。

3. 培养

最终和确定的真菌病原学诊断要通过培养的方法分离和鉴定致病真菌来获得。一般应用无菌的镍合金或铂丝可将部分采集的标本接种到培养基中，也可以用拭子涂擦在培养基表面来接种。尽管培养管和培养皿都可

以使用，但更推荐使用培养皿，因其可以使真菌菌落生长得更好以便于鉴定。

一旦接种好培养基，培养管或培养皿就要放在 25℃ 的孵箱里孵育。这是皮肤癣菌属最好的培养温度（疣状癣菌例外），也可以使酵母菌和真菌生长。主要例外的是马拉色菌属的亲脂性酵母菌，其适宜的温度为 30 ~ 32℃。但对于花斑癣来说直接镜检就可以明确诊断，马拉色菌属的分离鉴定并不是必需的。

在真菌学实验室使用的培养基主要有两种：分离和鉴定培养基。

分离培养基是各种类型的沙氏

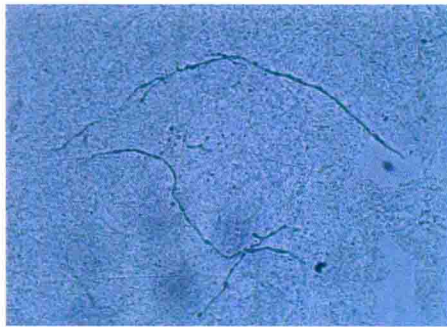


图 1-20 甲真菌病不规则菌丝。KOH-墨汁 ×400。培养结果为双间柱顶孢

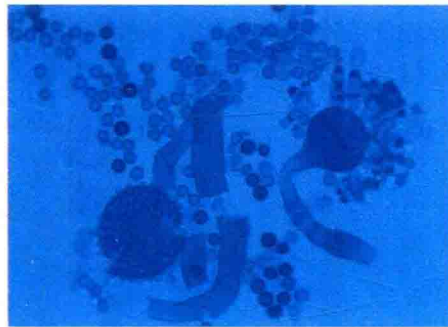


图 1-21 甲真菌病曲霉头和分生孢子。KOH-墨汁 ×400。培养结果为黑曲霉

培养基。第一种是沙氏葡萄糖琼脂 (SGA), 它几乎能分离所有的重要的医学真菌。第二种是含有抗生素 (氯霉素或庆大霉素) 和放线菌酮的沙氏葡萄糖琼脂。其中抗生素可以抑制标本中污染细菌的生长, 而放线菌酮可允许皮肤癣菌和白念珠菌的生长, 但抑制其他种的念珠菌和绝大多数常见的污染真菌的生长。

每个标本都应使用两种培养基。因为在某些情况下, 比如甲和足这样易被污染的部位, 加有氯霉素和放线菌酮的培养基避免了大多数污染真菌, 更容易分离得到致病真菌。然而机会致病性真菌和酵母菌也是可以致病的, 所以也应该使用沙氏葡萄糖琼脂 (SGA)。

真菌学实验室使用的鉴定培养基多种多样, 有些适合研究特定属的真菌, 例如马铃薯葡萄糖琼脂对于镰刀菌属, 察氏琼脂对于曲霉属, 牛脑心浸出液琼脂对于双相真菌都是适合的。

但是如果只考虑皮肤真菌病, 真正有用的培养基则可以减少, 或至三种: 用于鉴定皮肤癣菌属的马铃薯葡

萄糖琼脂, 用于鉴定酵母菌的玉米琼脂和科玛嘉琼脂。而在后两种培养基之中, 科玛嘉琼脂在临床工作中已足矣。这些培养基都很经济并容易获得 (表 1-3)。

这些鉴定培养基的特殊用法及在某些特殊情况下可能需要的生理或生化试验会在接下来的章节中阐述。

真菌菌种鉴定的标准方法是研究它们的形态学特征, 包括肉眼可见的菌落形态和显微镜下形态。通常情况下菌落形态的研究在分离培养基中进行, 在某些情况下需要特殊的培养基。这些情况将在相应的章节中更精确地描述。

菌落大体形态的研究需要观察它们的生长速度、正面和背面的颜色、表面形态 (平坦、有皱纹、圆顶状等)、质地 (光滑、羊毛状、绒毛状等)。

显微镜下的形态鉴别主要依靠分生孢子的大小、形状和排列。为了研究显微镜形态, 需要用一条透明的玻璃纸胶带从菌落表面取出一小部分样本, 然后用一滴染液固定在显微镜载玻片上。不需要使用盖玻片。在真

表 1-3 用于皮肤真菌病的真菌培养基

• 分离	用途
-沙氏葡萄糖琼脂 (SGA)	
- SGA + 氯霉素 + 放线菌酮	酵母菌、皮肤癣菌和机会致病真菌 (亲脂性酵母菌例外) 的分离 / 鉴定
• 鉴定	
-马铃薯葡萄糖琼脂	红色癣菌、须发癣菌、狗小孢霉、头癣小孢霉
-科玛嘉琼脂	念珠菌属的分离 / 鉴定