

• 实验研究 •

临床分离皮肤癣菌 289 株体外药敏试验分析

In vitro sensitivity analysis of clinically isolated 289 strains of pathogenic dermatophytes

陈丽娜¹, 陈江汉², 徐红², 赖建平³, 陈爱华⁴, 廖万清², 温海²

(1. 湖北省宜昌市第一人民医院皮肤科, 宜昌 443000; 2. 第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200433; 3. 湖北省宜昌市第一人民医院核医学科; 4. 湖北省宜昌市第一人民医院妇产科)

[摘要] 目的: 了解酮康唑、萘替芬、特比萘芬及酮康唑、萘替芬联合应用对临床分离致病皮肤癣菌的体外抗真菌活性。方法: 参照 M38-P 方案并适当调整试验参数, 对 289 株临床分离致病皮肤癣菌进行药物敏感性测定, 其中包括红色毛癣菌 210 株、须癣毛癣菌 51 株、絮状表皮癣菌 10 株、玫瑰色癣菌 6 株、石膏样小孢子菌 5 株、断发癣菌 5 株、疣状癣菌 2 株。结果: 酮康唑、萘替芬联合应用对皮肤癣菌的 MIC 值较低, 单用酮康唑、单用萘替芬对皮肤癣菌的 MIC 值较高。结论: 联合用药优于单用酮康唑、萘替芬, 联合用药与特比萘芬之间的差异无统计学意义。

[关键词] 表皮癣菌属; 酮康唑; 萘替芬; 特比萘芬; 抗生素类, 复合; 抗药性, 真菌

[中图分类号] R 978.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0337-03

近年来随着耐药菌株的出现及各种抗真菌药的相继问世, 正确合理地选用抗真菌药已成为一个突出而亟待解决的问题, 而药物敏感性试验及现有临床分离真菌的药物敏感性情况是指导用药的基础^[1]。我们参照 M38-P 方案对临床分离的 289 株皮肤癣菌作了酮康唑、萘替芬、特比萘芬及酮康唑、萘替芬联合用药的体外敏感性测定, 为临床合理用药提供必要的实验依据。

1 材料和方法

1.1 抗真菌药 酮康唑、萘替芬由福建金山制药有限公司提供, 含量为 99.9%, 联合用药由酮康唑及萘替芬按 2:8 比例混合(依据长征医院皮肤科真菌试验室反复试验后的最佳比例), 特比萘芬由山东齐鲁药厂提供, 含量为 100%。将药物用 40% 的二甲基亚砜(DMSO)配制成 12.8 mg/ml 的贮存液, -20℃ 冰箱贮存备用。

1.2 菌株 289 株临床分离致病菌株分别来自中国医学科学院皮肤病研究所、北京协和医院、第二军医大学长海医院及本科, 均经常规镜检、芽管试验和 API20C AUX 鉴定。质控菌株是由中国医学科学院皮肤病研究所菌种保藏中心提供的红色毛癣菌 ATCC28188。

1.3 培养基 1640 培养液含 BPMI 1640 10.4 g/L(美国 Life Technologies Inc), 三氮吗啡啉丙磺酸(MOPS, Fluka 进口分装)34.53 g/L, 以 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0(恒温 25℃), 用 Millipore 滤过灭菌(滤膜 0.22 μm), 置 4℃ 冰箱备用。改良沙堡固体培养基(含葡萄糖 2%, 蛋白胨 1%, 琼脂 2%, 氯霉素 0.05 mg/ml), 115℃ 高压蒸汽消毒 20 min, 分装试管, 置 4℃ 冰箱保存备用。

1.4 微量药敏板制备 抗真菌药贮存液用配制好的 RPMI1640 培养液做 10 级倍比稀释, 将配制好的药液对应加在无菌 96 孔 U 形底微量板中的孔洞中, 从第 1 孔至第 10 孔浓度由高到低, 每孔 100 μl, 第 11、12 孔加不含药液的 RPMI1640 培养液, 其中第 11 孔为空白对照, 第 12 孔为生

长对照。使酮康唑的终浓度范围为 0.063~32 μg/ml, 萘替芬、特比萘芬、酮康唑及萘替芬联合的终浓度范围均为 0.000 5~0.25 μg/ml^[2]。超过试验浓度范围的菌株, 经提高浓度重新检测。

1.5 菌悬液的配制及接种 将受试菌株接种于 SDA 上连续转种 2 次, 以保证其纯度与活力。皮肤癣菌新鲜移种菌株培养 10 d 后加生理盐水用接种钩勾取菌落, 倒入研磨器研磨均匀后经血细胞计数板调整密度为 $(0.4\sim5)\times 10^4$ CFU/ml, 置超净工作台用微量移液器从第 1 孔至第 12 孔的顺序每孔加 100 μl 菌悬液, 第 11 孔不加。此时各孔药液和菌悬液均分别达到应测试浓度。

1.6 培养及结果判定 接种后的药敏板置 28℃ 温箱孵育, 于培养 5 d 观察受试菌结果, 用视觉法判定终点, 按 M38-P 方案要求以 50% 生长抑制所对应的最低药物浓度为 MIC 值。

1.7 联合用药效果评价 计算抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI), 即联合用药时各药的最低抑菌浓度分别除以各药单用时 MIC 值的商的和。当 $FICI\leq 0.5$ 时为协同作用; $0.5 < FICI\leq 1$ 时为相加作用; $1 < FICI\leq 4$ 时为无关作用; $FICI > 4$ 时为拮抗作用^[3]。

1.8 统计学处理 将各药单用及联用时的两组 MIC 值转换为对数后进行 SNK-q 检验(多组均数两两比较)。

2 结果

特比萘芬对皮肤癣菌的 MIC 值, 几何均数最低(0.008 11), 其次为酮康唑、萘替芬联合(0.009 71), 单用酮康唑、单用萘替芬对皮肤癣菌的 MIC 值较高(分别为 0.830 18 和 0.017 67)。药物对临床分离株的 MIC 分布见表 1。不同菌种的数量及其 MIC 值范围见表 2。不同抗真菌药物的 MIC 值转换为对数后经 SNK-q 检验(多组均数两两比较),

[作者简介] 陈丽娜(1966-), 女(汉族), 主治医师。

E-mail: clnxqyxbw@hotmail.com

结果显示在皮肤癣菌中联合用药优于单用酮康唑、单用萘替芬($P < 0.05$),联合用药与特比萘芬之间的差异无统计学意义。对皮肤癣菌的平均 FICI 值为 0.612 882(即两者有相加作用),其中 $FICI \leq 0.5$ (协同作用)的菌株有 165 株(57.094%), $0.5 < FICI \leq 1$ 的有 105 株(36.332%), $1 < FICI \leq 4$ 的有 17 株(5.882%), $FICI > 4$ 的有 2 株(0.692%)。

表 1 药物对临床分离皮肤癣菌的 MIC 测定

MIC 值 ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	株数			
	酮康唑	萘替芬	特比萘芬	酮萘联合
64	13	-	-	-
32	5	-	-	-
16	6	-	-	-
8	8	-	-	-
4	46	-	-	-
2	55	-	-	-
1	27	-	-	-
0.5	30	14*	15*	15*
0.25	30	7	3	3
0.125	11	18	4	8
0.063	40	18	13	9
0.032	18	64	36	31
0.016	-	54	70	57
0.008	-	60	33	67
0.004	-	29	31	44
0.002	-	10	23	21
0.001	-	10	26	16
0.000 5	-	0	11	5
<0.000 5	-	5	24	13
总计	289	289	289	289

* 超过试验浓度范围的菌株,经提高浓度重新检测后得到结果为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

表 2 不同菌种的类别、数量及其 MIC 值范围

菌种	数量	MIC 值范围			
		酮康唑	萘替芬	特比萘芬	酮萘联合
红色毛癣菌	210	0.032~64	<0.000 5~0.5	<0.000 5~0.5	<0.000 5~0.5
须癣毛癣菌	51	0.032~64	<0.000 5~0.5	<0.000 5~0.5	<0.000 5~0.5
絮状表皮癣菌	10	0.032~40.0	32~0.125	<0.000 5~0.032	<0.000 5~0.032
玫瑰色癣菌	6	0.25~64	0.008~0.25	0.004~0.5	0.008~0.5
石膏样小孢子菌	5	0.25~64	0.002~0.5	0.002~0.5	<0.000 5~0.5
断发癣菌	5	0.25~64	0.008~0.5	0.004~0.5	0.004~0.5
疣状癣菌	2	0.25~10.00	2~0.016	0.002~0.032	0.001~0.000 8

在试验中我们观察到,有 3 例多次培养呈阳性的患者的结果显示,在用药的不同阶段所培养出的菌株的药物 MIC 值有升高现象。而在联合用药中此类菌株的 MIC 值升高不明显。从抗生素应用的一般规律来看这也许提示长时间应用单种抗真菌药物可能导致耐药情况的发生。而在联合用药可以减少此类耐药情况的发生。提示在临床治疗方面,适当采取联合用药的方式,还可减少耐药情况发生。但是由于此类资料较少,还有待于更多的资料证实该种倾向的存在。

[参考文献]

[1] Gupta AK, Kohli Y. *In vitro* susceptibility testing of ciclopi-

3 讨论

随着临床上免疫抑制患者的深部及浅部真菌感染日益增多以及抗真菌药物的广泛应用,各种真菌对于抗真菌药物的耐药现象日益严重。在抗真菌药物发展相对缓慢的情况下,本试验通过 3 种药物及其联合应用对皮肤癣菌的 MIC 值的比较,来确定酮康唑及萘替芬联合应用的疗效,为临床联合应用抗真菌药提供体外试验依据。本试验结果显示,在皮肤癣菌组,联合应用酮康唑及萘替芬组优于单用酮康唑、单用萘替芬组,且表现出明显的协同或相加作用。该结果提示联合应用抗真菌药物进行抗真菌治疗的疗效优于单一一种药物, Gupta 等^[1]、Barchiesi 等^[4]研究认为其他抗真菌药联合应用也有协同、相加作用。酮康唑属咪唑类抗真菌药,作用机制是打乱真菌甾醇或脂肪酸的代谢或者影响真菌的氧化系统,引起毒性产物在细胞内聚集,造成代谢障碍等。萘替芬是丙酰胺类抗真菌剂,其作用机制为抑制麦角固醇的生物合成,角鲨烯在菌内的积聚,抑制角鲨烯环化酶及其他作用。酮康唑、萘替芬是作用途径不同的抗真菌药,联合应用疗效优于单一药物。酮康唑、萘替芬联合应用与特比萘芬之间无统计学意义, Jessup 等^[5]曾研究特比萘芬与其他几种抗真菌药对皮肤癣菌的药敏试验,结果显示特比萘芬是对皮肤癣菌最有效的抗真菌药, Barchiesi 等^[4]报道体外联合应用特比萘芬与氟康唑、伊曲康唑是有益的。提示临床在治疗皮肤癣菌感染时可以考虑特比萘芬与唑类药物联用。在目前抗真菌药物发展相对缓慢,真菌对抗真菌药物耐药程度越来越严重的情况下,联合用药进入临床会越来越多。

rox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity[J]. *BJ Dermatol*, 2003,149(2): 296-305.

[2] 王文莉, 郑玮清, 李若瑜, 等. 采用 NCCLS M27-A 方案微量法检测念珠菌对抗真菌药物的敏感性 [J]. *中华检验医学杂志*, 2001,24(2):107-108.

[3] Barchiesi F, Schimizzi AM, Najvar K, et al. Interactions of posaconazole and flucytosine against cryptococcus neoformans [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001(5): 1355-1359.

[4] Barchiesi F, Di Francescol FL, Scalise G. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole and itraconazole a-

against isolates of candida albicans with reduced susceptibility to azoles[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(8): 1812-1814.

[5] Jessup CJ, Warner J, Isham N, *et al*. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing

conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates [J]. *Clin Microbiol*, 2000, 38(1): 341-344.

[收稿日期] 2004-05-12

[修回日期] 2004-10-21

[本文编辑] 孙 岩

• 临床研究 •

56例严重急性呼吸综合征临床治愈患者随访6个月观察

A 6-month followup study on 56 severe acute respiratory syndrome patients

李保森, 辛绍杰, 游绍莉, 王 岩, 赵 军, 荣义辉, 吴贻琛

(解放军第302医院感染科, 北京 100039)

[摘要] 目的: 观察严重急性呼吸综合征(SARS)患者临床治愈后各种并发症的恢复情况, 进一步探讨其康复手段。方法: 对56例临床治愈SARS患者进行6个月的随访及康复情况观察, 主要观察骨坏死、肺纤维化及生化指标的变化。结果: 临床治愈SARS患者在出院后经适当休息及口服药物治疗, 急性期遗留的肝脏、心脏损害及糖代谢紊乱在出院1个月后大部分消失, 但可出现轻微全身酸痛症状, 持续时间稍长, 在康复期出现1例肺纤维化及7例股骨头缺血坏死, 需注意防治。结论: SARS患者并发症于康复期可渐渐消失, 肺纤维化出现较少, 股骨头缺血坏死需予积极的预防及适当治疗。

[关键词] 严重急性呼吸综合征; 并发症; 随访研究

[中图分类号] R 563.19

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2005)03-0339-02

严重急性呼吸综合征(SARS)是急性呼吸道传染病, 急性期可出现多种并发症, 目前治疗上国内外总结了较多经验, 并形成了一定共识, 但临床治愈后并发的肝脏损害、心肌损害、糖代谢紊乱等, 特别是恢复期可能出现的肺纤维化以及股骨头缺血性坏死等发展情况如何, 目前尚较少报道, 这对我们再次反思SARS的急性期治疗及提高对SARS的认识具有重要意义。

1 资料和方法

1.1 患者来源 我院2003年3~7月收治的SARS患者56例, 其中男性28例, 女性28例, 年龄18~74岁, 平均年龄(31.34±10.99)岁。诊断标准均符合国家卫生部办公厅2003年5月3日颁布的标准。

1.2 一般治疗原则 SARS患者临床治愈出院后对于仍存在肝功异常者予口服甘草酸二铵或复方甘草甜素、硫普罗宁保肝治疗。继续适量补钙治疗, 必要时减负运动。

1.3 观察指标 出院后第1、3、6个月分别检测肝功能、血糖、心肌酶1次, 第3、6个月左右复查胸片1次, 必要时行肺CT扫描, 如关节酸痛症状明显则行骨盆X线片, 双髋CT扫描及双髋MRI检查。

2 结果

2.1 症状 患者临床治愈出院后仍存在一些症状, 主要表现为乏力、气促, 出院3个月时7例患者出现步行困难, 步行困难、关节酸痛较急性期增多($P<0.05$), 其余较急性期明显减少($P<0.05$), 少数存留乏力、活动后气促不适, 见表1。

表1 56例SARS患者出院后随访6个月的临床症状

[n(%)]

症状体征	急性期	随访期		
		出院1个月	出院3个月	出院6个月
乏力	46(82.14)	23(41.07)*	5(8.93)*	2(3.57)*
咳嗽	41(73.21)	6(10.71)*	0(0)*	0(0)*
轻度活动气促	29(51.79)	11(19.64)*	3(5.36)*	1(1.79)*
关节酸痛	19(33.93)	40(71.43)*	25(44.64)*	11(19.64)
心慌	16(28.57)	6(10.71)*	2(3.57)*	0(0)*
步行困难	0(0)	4(7.14)*	7(12.50)*	7(12.50)*

* $P<0.05$ 与急性期比较

2.2 实验室检查 SARS患者随访3个月丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、胆红素(BIL)、乳酸脱氢酶

[作者简介] 李保森(1963-), 男(汉族), 副主任医师.
E-mail: liuh@sina.com

(LDH)、 α -羟丁酸脱氢酶(HBDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、血糖(GLU)检测结果见表2。

表2 56例SARS患者随访6个月部分生化检测结果 [n(%)]

指标	出院时 异常数	第1个月 异常数	第3个月 异常数	第6个月 异常数
ALT	20(35.71)	13(23.2)	1(1.8)	1(1.8)
AST	16(28.57)	12(21.4)	1(1.8)	1(1.8)
BIL	8(14.29)	5(8.9)	2(3.6)	0(0)
HBDH	13(23.21)	6(10.7)	2(3.6)	0(0)
CK	11(19.64)	7(12.5)	0(0.0)	0(0)
CK-MB	7(12.50)	2(3.6)	0(0.0)	0(0)
GLU	8(14.29)	5(8.9)	1(1.8)	1(1.8)

正常数值分别为:ALT<40 U/L, ALT<40 U/L, BIL<17.1 μ mol/L, HBDH 95~200 U/L, CK 24~195 U/L, CK-MB<24 U/L, GLU 3.9~5.9 mmol/L

2.3 影像学检查 胸部X线检查中发现有6例肺纹理增加,其中5例考虑有肺间质增生,但尚未达到明确X线肺纤维化诊断标准;1例经CT检查明确发现左侧肺部有轻度局灶性肺纤维化改变。骨盆X片,双髋CT扫描3个月时未见异常,7例双髋MRI检查见异常,表现为T₁W₁低信号改变(图1),T₂W₁高信号表现。6个月时7例双髋CT扫描见异常,表现为不规则低密度影。

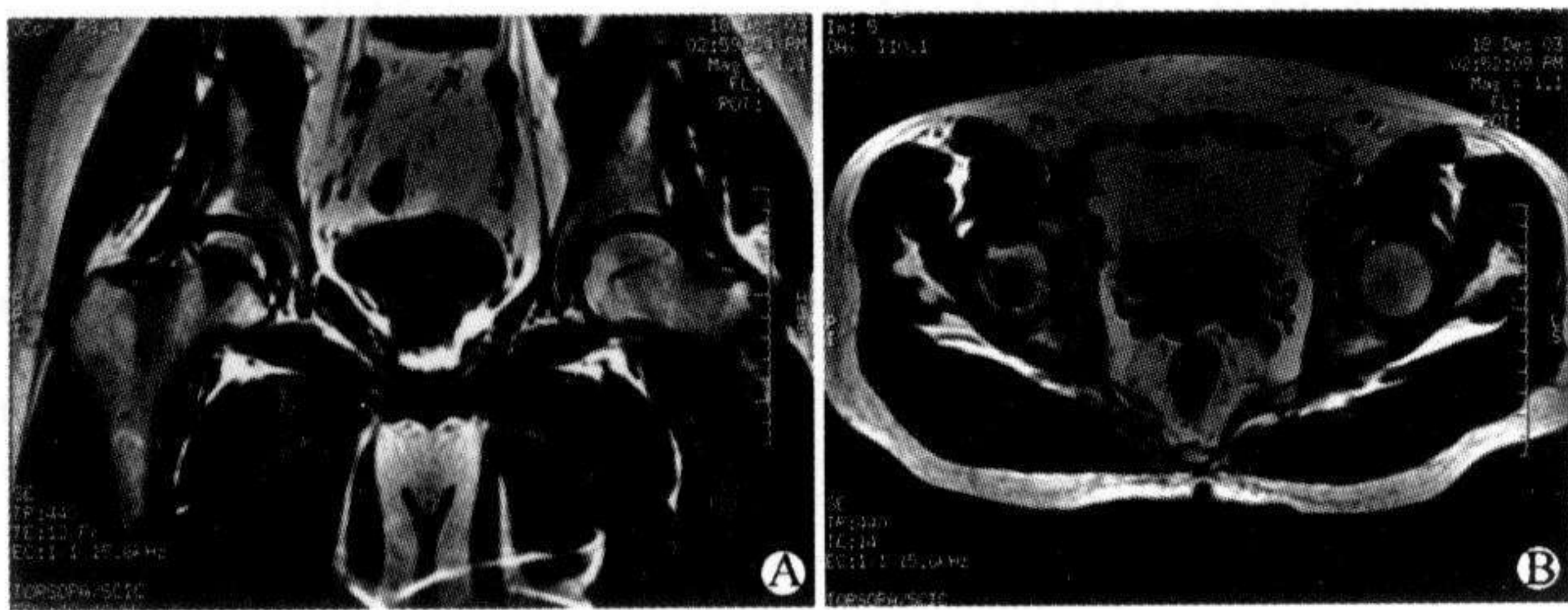


图1 双髋冠状位(A)及横断面(B)MRI检查
右侧股骨头表现为T₁W₁低信号,左侧正常

3 讨论

SARS是一种急性呼吸道传染病,临床表现为严重急性进展性肺损伤,其病死率较高^[1,2],可出现肝脏损害、心肌损害、肾脏功能损害、糖代谢紊乱以及继发感染等并发症,恢复期可出现肺纤维化以及骨质疏松、股骨头坏死^[3~5]等。临床治愈患者出院后以上并发症情况恢复如何不仅是一个医学问题,也是一个社会问题。

SARS患者临床治愈后仍存留部分急性期症状,如乏力、气促、心慌、咳嗽,但程度均较急性期明显减轻,这些症状考虑与急性期病变有关,但关节酸痛在出院后1个月较急性期增多(P<0.05),急性期及恢复期关节酸痛程度均不重,但

我们分析急性期此症状与炎症刺激、发热等有关,而恢复期此症状可能主要与激素应用后有关。

SARS在急性期出现的肝损害,在出院后第1、3、6个月ALT异常率分别为23.2%、3.6%、1.8%,AST异常率分别为21.4%、5.4%、1.8%,出院后第3个月仍有1例肝功能轻度异常。SARS引起肝脏损伤的机制尚不清楚,部分患者出院后仍存在肝功能异常,但大多程度较轻,无须处理,随着出院时间的延长,一般均可恢复正常,很少遗留持久性肝功能损害。但我们仍提倡对恢复期患者定期复查肝功能,少数可适当选用常规护肝药物口服治疗。SARS并发心肌损害主要表现为心肌酶LDH、HBDH、CK的升高,我们随访的56例患者,除早期少数遗留心肌酶的升高外,3个月后复查均恢复正常,患者出院后主要予休息、进食易消化和富含维生素和蛋白质的食物,对年纪较大患者注意监测心电图变化,至于个别患者仍存在活动后感心慌、气促的症状,原因可能较复杂。SARS患者出现的糖代谢紊乱主要与激素应用有关,我们随访的56例患者,除1例既往有糖尿病的患者外,其余在恢复3个月后糖代谢紊乱基本消失。

SARS患者恢复期令人关注的问题是肺纤维化及股骨头缺血坏死,因为它们可能存在较长时间,同时较难治愈。肺纤维化主要是在肺内炎症吸收后残存不同程度的肺间质纤维化,其发生机制可能与炎症刺激有关。我们随访的患者,在第3个月,仅有1例经CT检查发现左侧肺部有轻度局灶性肺纤维化改变,5例考虑存在轻微肺间质增生,其他病例未见明确肺纤维化改变。SARS患者股骨头缺血性坏死其发生率尚未见确切报道,在我们的随访观察中,在出院后3个月发现7例(12.5%)股骨头缺血性坏死,都为轻度或中度,都曾在急性期应用不同剂量糖皮质激素治疗,其发生是病毒所致或与激素应用有关,尚需进一步研究。鉴于股骨头缺血性坏死有相当的发病率,同时危害性较大,我们认为激素的治疗还是应慎重,同时对康复期患者应进行积极、周密的预防策划,必要时予药物治疗和医学手段干预。

[参考文献]

- [1] 张复春,尹焯标,唐小平,等.广州市传染性非典型肺炎260例临床分析[J].中华传染病杂志,2003,21(2):84-88.
- [2] 游绍莉,辛绍杰,李保森,等.严重急性呼吸综合征(SARS)的临床分析[J].解放军医学杂志,2003,28(12):1126-1128.
- [3] 屈辉.重视SARS病人激素治疗后的骨坏死[J].中国全科医学,2003,6(7):567.
- [4] 荣义辉,常伟华,刘艳平,等.SARS患者心脏、肾脏等肺外器官损伤及其临床意义——附330例临床分析[J].第二军医大学学报,2003,24(8):813-816.
- [5] 北京市SARS医疗救治中心专家组.关于糖尿病合SARS就治的几点建议[J].基础医学与临床,2003,23(3):229-231.

[收稿日期] 2004-07-12

[修回日期] 2004-10-09

[本文编辑] 孙岩