

## · 专题报道 ·

## 红色毛癣菌对抗真菌药物的敏感性与种株特异性的关系

朱红梅, 温海\*, 廖万清(第二军医大学长征医院皮肤性病科, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:**探讨红色毛癣菌对抗真菌药物的敏感性与其种株特异性之间的关系。**方法:**采用微量稀释法,检测红色毛癣菌对7种临床常用抗真菌药物的敏感性,并对红色毛癣菌的基因型、表型、分离部位等与对抗真菌药物的敏感性进行相关性研究。**结果:**不同基因型、表型及不同部位分离的红色毛癣菌菌株对特比萘芬、萘替芬、伊曲康唑的MIC值范围较集中(分别为0.016~0.032、0.032~0.063、0.25~1 μg/ml),且前两者的MIC值更小(众数均为0.032 μg/ml),而对酮康唑和氟康唑的MIC值范围则相差较大(分别为0.25~2、1~32 μg/ml)。Wilcoxon秩和检验显示,红色毛癣菌对特比萘芬、萘替芬、伊曲康唑、两性霉素B等4种抗真菌药物的MIC与基因型、表型、分离部位的不同无显著相关。**结论:**红色毛癣菌对抗真菌药物的敏感性可能与基因型、表型或分离部位无关。

**[关键词]** 红色毛癣菌;基因型;表型;敏感性;抗真菌药

**[中图分类号]** R 379.2; R 978.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0136-04

*Trichophyton rubrum*: relationship between susceptibilities to antifungal agents and species specificities

ZHU Hong-mei, WEN Hai\*, LIAO Wan-qing (Department of Dermatology and Venereology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the relationship between susceptibilities of *Trichophyton rubrum* strains to antifungal agents and their species specificities. **Methods:** The susceptibilities of *Trichophyton rubrum* strains to itraconazole, ketoconazole, fluconazole, terbinafine, naftifine, 5-flucytosine and amphotericin B were evaluated using a modified microdilution method. The relationship between susceptibilities and genotypes and phenotypes of *Trichophyton rubrum* strains with different origins was analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Results:** The *Trichophyton rubrum* strains showed narrow minimum inhibitory concentration (MIC) ranges to terbinafine (0.016-0.032 μg/ml), naftifine (0.032-0.063 μg/ml) and itraconazole (0.25-1 μg/ml), whereas they showed broader MIC ranges to ketoconazole (0.25-2 μg/ml) and fluconazole (1-32 μg/ml). MICs of *Trichophyton rubrum* strains to terbinafine ( $M_0=0.032$  μg/ml) and naftifine ( $M_0=0.032$  μg/ml) were the lowest among 7 antifungal agents. Wilcoxon test (Kruskal-Wallis test) suggested that there was no significant relationship of MICs to terbinafine, naftifine, itraconazole and amphotericin B with the genotypes, phenotypes and origins of the *Trichophyton rubrum* strains. **Conclusion:** The antifungal susceptibility of *Trichophyton rubrum* strains may not be related to their genotypes, phenotypes or from which part of the body they are isolated.

**[KEY WORDS]** *Trichophyton rubrum*; genotype; phenotype; susceptibility; antifungal agent

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 136-139]

浅部真菌病是皮肤科的常见病、多发病,皮肤癣菌是浅部真菌病的主要致病菌。目前虽已开发了很多新的口服和外用抗真菌药物,而合理选择使用抗真菌药物,特别是对甲真菌病等一些周期长、费用高的浅部真菌病的治疗,具有重要意义。我们采用微量稀释法,对最重要的浅部病原真菌,也是最大的一类皮肤癣菌——红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)进行了种内基因分型,并就菌株的基因型、表型、分离部位等与对抗真菌药物敏感性的关系进行了相关研究。

## 1 材料和方法

1.1 实验菌株 红色毛癣菌临床分离株 20 株,来自上海华山医院真菌室,标准株 1 株,来自本院真

菌室。菌株分离部位:R3、17(面部);R12、16、25(颈部);R20(耳垂部);R4、15(上肢);R11(下肢);R10、13、18、19、27(股部);R1、2、9、24(足趾、足缝);R14、21(腰部等其他部位)。将菌株进行初步鉴定,并分表型:羊毛型(6株,R13、15、17、20、24及标准株)或绒毛型(4株,R18、19、25、27),粉末型(6株,R3、4、10、11、12、21)或沟纹型(2株,R1、2),颗粒型(2株,R9、16),混合型(1株,R14)。

1.2 试剂 培养基:沙氏葡萄糖蛋白胨琼脂(SDA)、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)、尿素琼脂培养基、RPMI 1640 培养液(MPOS 缓冲液)。抗真菌药

[作者简介] 朱红梅,博士,讲师。E-mail:hmzhu\_cn@yahoo.com.cn  
\* Corresponding author. E-mail:wenhai98@sohu.com

物:伊曲康唑 (ITRA)、酮康唑 (KCZ)、氟康唑 (FCZ)、特比萘芬 (TBF)、萘替芬 (NTF)、5-氟胞嘧啶 (5-FC)、两性霉素 B (AmB), 均为药厂提供的原粉。其他试剂: *Taq* DNA 聚合酶、PCR 反应缓冲液、dNTPs (日本 TaKaRa)。

1.3 红色毛癣菌的种内基因分型 基因组 DNA 制备采用氯化苜法<sup>[1]</sup>。红色毛癣菌的 PCR 鉴定:引物 (GACA)<sub>4</sub>, 反应条件: 94℃ 起始变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 47℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 38 个循环; 72℃ 延伸 5 min。红色毛癣菌的种内分型: 采用基因组 DNA 的 RAPD 方法。随机引物共 10 条 (P1-10, 上海生工生物工程有限公司合成, 每条 10 个碱基)。PCR 反应条件: 94℃ 起始变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 47 个循环; 72℃ 延伸 7 min。产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, GENE GENIUS Bioimaging System 成像。

1.4 体外抗真菌药物敏感性研究 参考 NCCLS 的 M38-A 方案<sup>[2]</sup>。

1.4.1 抗真菌药物稀释液的准备 将 7 种药物用 100% 二甲基亚砜配制为浓度 12.8 mg/ml 的母液, 用 RPMI 1640 培养液进行 10 级倍比稀释, 使其工作终浓度: 伊曲康唑、酮康唑为 0.018~8 μg/ml, 特比萘芬为 0.001~0.5 μg/ml, 萘替芬 (NTF)、两性霉素 B 为 0.004~2 μg/ml, 氟康唑为 0.063~32 μg/ml, 5-氟胞嘧啶为 0.5~256 μg/ml。

1.4.2 菌悬液的制备 实验菌株接种于 PDA 培养基, 收集孢子和菌丝 (以菌丝分隔处记为 1 个 CFU), 用 RPMI 1640 培养液稀释至 (2~4) × 10<sup>4</sup> CFU/ml。

1.4.3 药敏板的制备 取 96 孔板, 按药物稀释液的浓度由高到低依次加入 100 μl 药液, 第 11 孔作阳性对照, 第 12 孔作空白对照。依次加入 100 μl 已制备好的菌悬液 (双倍终浓度)。

1.4.4 最小抑菌浓度 (MIC) 的判定 30℃ 恒温箱培养 6 d, 进行结果判定。肉眼观察法: 与阳性对照比较, 80% 以上受抑制 (1 级) 为判定终点; 酶标仪测定法: 在 450 nm 波长下, 与阳性对照孔相比, 将光密度值降低 90% 以上的最低药物浓度定义为 MIC 终点。结果判断依据上述两种方法的结合。

1.5 统计学处理 采用多组样本间比较的 Wilcoxon 秩和检验。

## 2 结果

2.1 红色毛癣菌的种内基因分型 (GACA)<sub>4</sub> 作引物扩增下, 不同表型的所有红色毛癣菌菌株均呈现相同的带型。以随机引物扩增不同表型的红色毛癣

菌临床分离株的基因组 DNA, 呈现出不同的带型。如, 以随机引物 P3 扩增时, 在电泳凝胶上, 可观察到红色毛癣菌菌株呈现 5 种不同的带型 (图 1)。I 型的菌株包括 R10、2、15、20, II 型的菌株包括 R21、12、1、9、12、13、16、18, III 型的菌株包括 R14、17, IV 型的菌株包括 R3, V 型的菌株包括 R19、24、25、27。标准菌株为 II 型。



图 1 部分红色毛癣菌临床株基因组 DNA 的 RAPD (随机引物 P3) 结果

Fig 1 PCR fingerprinting of *Trichophyton rubrum* clinical strains generated with random primer P3

1, 11: 1 kb DNA ladder; 2-10: R10, 2, 15, 21, 20, 11, 1, 9, 12; 12-20: R13, 14, 17, 3, 4, 25, 19, 24, 27; R1-20 represent different origins of the *Trichophyton rubrum* strains

我们观察到同一种 DNA 型可能包括不同表型的菌株。II 型的菌株包括了 5 种表型; IV 型的 2 株菌均为粉末型; V 型的 4 株菌均为羊毛或绒毛表型。从表型方面来看, 羊毛或绒毛型菌株覆盖了 I、II、III、V 型 4 种 DNA 型; 颗粒型的 2 株菌均为 II 型; 沟纹型菌株包括 I、II、IV 等 3 种 DNA 型; 在粉末、沟纹、颗粒型等 3 种表型的菌株均未发现 DNA V 型。而不同部位分离的菌株可以包括不同表型、基因型。

2.2 红色毛癣菌临床分离株对 7 种抗真菌药物的体外敏感性 以进行种内 RAPD 分型的 R1-3、R10、R12-21、R24、R25、R27 及标准菌株等 18 株为例。结果见表 1。不同基因型、表型及不同部位分离的红色毛癣菌菌株对特比萘芬、萘替芬、伊曲康唑的 MIC 值范围较集中 (分别为 0.016~0.032、0.032~0.063、0.25~1 μg/ml), 且前两者的 MIC 值更小 (众数均为 0.032 μg/ml), 而对酮康唑和氟康唑的 MIC 值范围则相差较大 (分别为 0.25~2、1~32 μg/ml)。对红色毛癣菌临床株的基因型、表型、分离部位与菌株的抗真菌药物敏感性采用多组样本间的 Wilcoxon 秩和检验进行比较, 结果发现, 红色毛癣菌对特比萘芬、萘替芬、伊曲康唑、两性霉素 B 等 4 种抗真菌药物的敏感性与基因型、表型、分离部位的不同无显著相关。

表 1 7种抗真菌药物对红色毛癣菌的体外抗真菌活性(MIC<sub>90</sub>)

Tab 1 Susceptibilities of *Trichophyton rubrum* strains to 7 antifungal agents(MIC<sub>90</sub>)

(ρ<sub>B</sub>/μg·ml<sup>-1</sup>)

Strain	Genotype	Phenotype	Infection site	ITRA	KCZ	FCZ	TBF	NTF	5-FC	AmB
R15	I	Woolly	Upper-limb	0.5	1	32	0.032	0.032	128	0.5
R20	I	Woolly	Ear lobe	0.5	0.5	2	0.032	0.032	>256	1
R2	I	Furrowed	Toes	1	1	32	0.032	0.032	256	0.5
R10	I	Powdery	Thigh	0.5	0.5	16	0.032	0.032	256	1
R13	II	Woolly	Thigh	0.5	1	32	0.032	0.063	>256	1
R21	II	Woolly	Other sites	0.5	0.5	2	0.032	0.032	128	0.25
R18	II	Villous	Thigh	0.5	0.5	8	0.032	0.032	256	1
R16	II	Granular	Neck	0.5	1	32	0.032	0.032	256	1
R1	II	Furrowed	Toes	0.5	1	16	0.032	0.032	256	0.5
R12	II	Powdery	Neck	0.5	1	32	0.032	0.032	256	1
R17	III	Woolly	Face	0.5	0.5	8	0.032	0.032	256	1
R14	III	Mixed	Other sites	0.5	1	2	0.032	0.032	256	1
R3	IV	Powdery	Face	0.5	0.5	8	0.032	0.032	256	0.25
R24	V	Woolly	Toes	0.25	0.25	1	0.032	0.032	>256	1
R19	V	Villous	Thigh	0.5	0.25	1	0.016	0.032	128	1
R25	V	Villous	Neck	0.5	0.5	2	0.032	0.032	>256	1
R27	V	Villous	Thigh	0.5	0.5	2	0.032	0.032	256	1
Standard	II	Woolly	-	0.25	2	32	0.032	0.032	256	1

ITRA: Itraconazole; KCZ: Ketoconazole; FCZ: Fluconazole; TBF: Terbinafine; NTF: Naftifine; 5-FC: 5-Flucytosine; AmB: Amphotericin B

### 3 讨论

近年来抗真菌药物的研究和发展令人瞩目,很多新开发的药物各自呈现出不同的抗菌谱。而另一方面,浅部致病真菌的种类和比例也处于一个较大的动态变迁过程中。因此,治疗方案要求以特定的病原菌为目标。红色毛癣菌作为最重要的浅部真菌病致病菌,一直是临床诊治及流行病学研究的重点。为此,我们对红色毛癣菌进行了种内基因分型,并对基因型、表型、分离部位与菌株的抗真菌药物敏感性作了相关研究。

本研究中的 RAPD 结果将红色毛癣菌分为 5 个 DNA 型,同一种 DNA 型可能包括不同表型的菌株,而 DNA 型与菌株分离部位无明显相关。虽观察到 IV 型的 2 株菌均为粉末型,颗粒型的 2 株菌均为 II 型, V 型的 4 株菌均为羊毛或绒毛表型,在粉末、沟纹、颗粒型等 3 种表型的菌株均未发现 DNA V 型,但由于菌株数量的局限性, DNA 型与表型的关系仍有待于扩大标本数量后的进一步研究。

我们采用微量稀释法,研究红色毛癣菌临床株对目前临床常用的 7 种抗真菌药物的敏感性,发现这些菌株对 7 种抗真菌药物呈现出不同的 MIC 范围。不同基因型、表型及不同部位分离的菌株对特比萘芬、萘替芬、伊曲康唑的 MIC 值范围均较集中(分别为 0.016~0.032 μg/ml、0.032~0.063 μg/ml、0.25~1 μg/ml),且前二者的 MIC 值更小(众数

均为 0.032 μg/ml),而对酮康唑和氟康唑的 MIC 值范围则相差较大(分别为 0.25~2 μg/ml、1~32 μg/ml)。现有的数据不能表明,红色毛癣菌对抗真菌药物的敏感性与基因型、表型、分离部位的不同相关。

目前,特比萘芬、萘替芬、伊曲康唑一直是临床治疗浅部真菌病的主流药物。大量临床研究也揭示它们对于皮肤癣菌感染,尤其是甲真菌病的治疗,均具有较好的疗效和性价比<sup>[3,4]</sup>。我们在检测不同基因型、表型及来自不同部位的红色毛癣菌临床分离株对上述 3 种药物 MIC 值的同时发现,对于同一种药物,临床分离株间的测定结果几乎无明显差异,其变动范围很小。我们的结果提示,红色毛癣菌感染的患者均可采用以上 3 种药物治疗,之前无需进行烦琐的药敏试验。

两性霉素 B 虽然在不同菌株中 MIC 值范围较集中(众数为 1 μg/ml),但由于其毒性和不能被皮肤、黏膜有效吸收,一般不用于浅部真菌病的治疗。

酮康唑和氟康唑也是治疗浅部真菌病的常用药物,临床上也具有较好的疗效。有文献表明,尽管氟康唑的血浆浓度-剂量呈极好的线性关系,但真菌学、临床疗效与剂量并没有很好的相关性<sup>[5]</sup>。因此,体内疗效与体外试验间的差异提示,理论上药敏试验结果能可靠、准确地预测抗真菌药物对真菌感染者的治疗效果,但机体作为一个动态系统,宿主因素(如免疫因素,药物在体内的代谢及在感染部位的渗透性等)可能比药物本身对疗效影响更大。

[参考文献]

- [1] Zhu H, Qu F, Zhu LH. Isolation of genomic DNA from plant fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. Nucl Acid Res, 1993, 21:5279-5280.
- [2] NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard[S]. NCCLS document M38-A, NCCLS, Wayne, Pennsylvania, 2002, 22(16).
- [3] Gupta AK. Treatment of dermatophyte toenail onychomycosis in the United States. A pharmaco-economic analysis[J]. J Am Podiatr Med Assoc, 2002, 92:272-286.
- [4] Arca E, Tastan HB, Akar A, et al. An open, randomized, comparative study of oral fluconazole, itraconazole and terbinafine therapy in onychomycosis[J]. J Dermatolog Treat, 2002, 13:3-9.
- [5] Debruyne D. Clinical pharmacokinetics of fluconazole in superficial and systemic mycoses[J]. Clin Pharmacokinet, 1997, 33: 52-77.

[收稿日期] 2005-09-09

[修回日期] 2005-12-22

[本文编辑] 孙岩