

· 论著 ·

伊曲康唑联合特比萘芬治疗孢子丝菌病疗效及其对病原真菌体外抗菌活性研究

王爱平 高那 刘伟 万喆 陈伟 涂平 李若瑜

(北京大学第一医院皮肤性病科, 北京大学真菌和真菌病研究中心, 北京 100034)

【摘要】 目的 初步探讨伊曲康唑和特比萘芬联合治疗孢子丝菌病的疗效, 评价两药体外联合对申克孢子丝菌菌丝相和酵母相的抗菌活性。方法 口服伊曲康唑 200 mg/d 和特比萘芬 250 mg/d 治疗孢子丝菌病; 体外联合药敏试验采用棋盘微量稀释法, 计算分数抑菌浓度 (FIC) 指数判定两药相互作用具有协同、拮抗或无关作用。结果 伊曲康唑和特比萘芬联合成功治愈 3 例经伊曲康唑治疗无效的孢子丝菌病患者。两药体外联合对申克孢子丝菌菌丝相具有 75% 的协同作用, 对酵母相为 70% ($P = 0.50$)。结论 初步研究显示伊曲康唑和特比萘芬联合治疗孢子丝菌病有效安全, 体外联合药敏试验显示两药具有较高的协同作用。

【关键词】 孢子丝菌病; 伊曲康唑; 特比萘芬; 申克孢子丝菌; 菌丝相; 酵母相; 联合药敏; 协同作用

【中图分类号】 R 756.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2011)01-0005-05

Combination of itraconazole and terbinafine in treating sporotrichosis and their *in vitro* antifungal activities against *Sporothrix schenckii*

WANG Ai-ping, GAO Na, LIU Wei, WAN Zhe, CHEN Wei, TU Ping, LI Ruo-yu

(Department of Dermatology and Venereology, Peking University First Hospital, Peking University Research Center for Medical Mycology, Beijing 100034, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the efficacy of the combination of itraconazole and terbinafine in treating sporotrichosis and against *Sporothrix schenckii* growing in both mycelial and yeast phases. **Methods** The combination of itraconazole (200 mg/d) and terbinafine (250 mg/d) was applied in the treatment of sporotrichosis. *In vitro* effects against *Sporothrix schenckii* in two growth phases were evaluated by checker-board method, and fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated to determine whether the interaction was synergistic, indifference, or antagonistic. **Results** Three patients failed in itraconazole therapy were cured with the combination of itraconazole and terbinafine. Synergistic interactions of itraconazole and terbinafine against *Sporothrix schenckii* in mycelial form and in yeast form, were observed to be 75% and 70% respectively ($P = 0.50$). **Conclusions** The combination of itraconazole and terbinafine is efficient and safe in treating sporotrichosis with perfect synergy.

【Key words】 sporotrichosis; itraconazole; terbinafine; *Sporothrix schenckii*; mycelial form; yeast form; combination drug susceptibility testing; synergistic interactions

[Chin J Mycol, 2011, 6(1): 5-9]

孢子丝菌病 (sporotrichosis) 是一种由双相型真菌申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*) 引起的亚急性或慢性真菌感染, 易侵犯皮肤、皮下组织及其附近的淋巴管, 当存在免疫缺陷时, 可能出现播散型感染。伊曲康唑和特比萘芬治疗孢子丝菌病

有效安全, 目前已成为孢子丝菌病治疗指南中的推荐用药^[1-2]。但少数患者单用伊曲康唑或特比萘芬不能有效控制病情, 国内已有伊曲康唑或特比萘芬联合碘化钾溶液治疗皮肤型孢子丝菌病的报道, 结果显示联合用药起效更快, 效果更好^[1]。笔者曾报道 1 例伊曲康唑和特比萘芬联合治愈皮肤淋巴管型孢子丝菌病^[1]。最近, 我们采用伊曲康唑和特比萘芬联合成功治愈了 3 例经伊曲康唑治疗效果不

好的孢子丝菌病患者,初步的临床观察显示伊曲康唑和特比萘芬联合治疗孢子丝菌病具有明显的疗效,在体外两药联合是否具有协同抗真菌作用?对申克孢子丝菌的菌丝相和酵母相的结果是否一致?因此,我们对从临床分离的申克孢子丝菌进行了体外两药的联合药敏试验,为伊曲康唑和特比萘芬联合治疗孢子丝菌病提供实验室依据。

1 材料与方 法

1.1 病例资料

病例 1:患者女,51 岁,农民,现居河北省唐山市。因右侧面部皮损 2 a 于 2008 年 11 月 17 日就诊我科。2 a 前患者右面颊部外伤后出现 1 个皮损,1 个月后又在其下方又出现 3 个类似皮损,逐渐增大,溢脓血,结痂。在外院诊断为孢子丝菌病,给予患者口服伊曲康唑 200 mg/d 治疗半年,皮损有好转,之后患者曾自行停药后导致皮损加重,再次口服伊曲康唑治疗无效,遂就诊我科。皮肤科情况:右侧面部可见 4 个 1.5~2 cm 的结痂性皮损,基底红斑,境界尚清,挤压有脓液渗出(见图 1a)。实验室检查:皮损脓液 KOH 湿片真菌镜检阴性;皮损组织真菌培养阳性为申克孢子丝菌;皮损组织病理显示为感染肉芽肿改变,PAS 染色未见真菌成分。诊断:皮肤淋巴管型孢子丝菌病。治疗:明确诊断后给予患者口服伊曲康唑 200 mg/d,特比萘芬 250 mg/d 治疗。用药 4 周后皮损无渗出呈结痂性改变。12 周后皮损结痂基本脱落,遗留红色萎缩性瘢痕(见图 1b)。再给予患者口服伊曲康唑 200 mg/d 巩固治疗 4 周痊愈,随访至今无复发。患者在服药期间无不适感,化验肝肾功能和血常规正常。

病例 2:患者女,59 岁,农民,现居河北省唐山市。因左上肢皮损 16 个月于 2010 年 4 月 19 日就诊我科。16 个月前患者左手背部出现一个皮损,之后沿左上肢相继出现 4 个类似皮损,伴疼痛。1 a 前即 2009 年 4 月 7 日就诊我科(见图 2a),皮损组织真菌培养阳性为申克孢子丝菌,诊断为皮肤淋巴管型孢子丝菌病。给予患者口服伊曲康唑 400 mg/d 治疗,8 周后皮损好转,调整伊曲康唑为 200 mg/d 治疗,左前臂结节逐渐消退,但左手背皮损一直未消退。之后患者服药不规范,近半个月左手背皮损扩大,左上臂又出现皮损,遂再次就诊我科。期间发现糖尿病 1 a。皮肤科情况:左手背可见约

2 cm × 3 cm 大小的红色斑块,表面结痂,境界尚清,无脓液外溢;左上臂可见 2 cm × 1 cm 大小的类似皮损,表面结痂,可挤出脓液;左前臂伸侧可见 4 个萎缩性瘢痕(见图 2b)。实验室检查:皮损脓液 KOH 湿片真菌镜检阴性,真菌培养阳性为申克孢子丝菌。诊断:皮肤淋巴管型孢子丝菌病。治疗:给予患者口服伊曲康唑 200 mg/d,特比萘芬 250 mg/d 治疗。患者每 4 周随访一次,皮损逐渐好转,疗程 12 周皮损痊愈,遗留萎缩性瘢痕(见图 2c)。



图 1 a. 伊曲康唑治疗半年后的皮损, b. 伊曲康唑联合特比萘芬治疗 12 周时 图 2 a. 治疗前, b. 伊曲康唑治疗近 1 a 后的皮损, c. 伊曲康唑联合特比萘芬治疗 12 周时

Fig. 1 a. The lesion before treatment, b. The lesion after 12-week treatment with combination of itraconazole and terbinafine Fig. 2 a. The lesion before treatment, b. The lesion after one-year treatment with itraconazole, c. The lesion after 12-week treatment with combination of itraconazole and terbinafine

再口服特比萘芬 250 mg/d 巩固治疗 4 周,随访至今无复发。服药期间患者无不适感,复查肝功能正常,血糖轻度增高。

病例 3:患者女,60 岁,教师,现居吉林省吉林市。因颈前中上部皮损 3 个半月于 2010 年 4 月 30 日就诊我科。3 个半月前颈前中上部出现 1 个黄豆大红色结节,破溃,有渗液。否认外伤史,曾在吉林农村居住过 1 个月。糖尿病史 10 a,胰岛素控制。皮肤科情况:颈前中上部直径 2 cm × 2 cm 大小红色结节,质软,表面有结痂,有少许脓液。实验室检查:皮损 KOH 湿片真菌镜检阴性;皮损组织真菌培养阳性为申克孢子丝菌;皮损组织病理显示感染肉芽肿。诊断:皮肤固定型孢子丝菌病。治疗:给予患者口服伊曲康唑 400 mg/d 治疗,4 周后皮损改善不明显,调整伊曲康唑为 200 mg/d,特比萘芬 250 mg/d 治疗,连续 12 周,皮损治愈。服药期间患者无不适感,复查血常规、肝功能和血糖未见异常。

1.2 菌株来源

申克孢子丝菌 20 株,均为临床分离株,经形态学和分子生物学鉴定,系北京大学真菌和真菌病研究中心保存菌株。近平滑念珠菌 ATCC22019 为质控株。

1.3 抗真菌药物

伊曲康唑原粉购自寿光富康制药有限公司,批号 20050902,纯度 99.7%。特比萘芬原粉购自寿光富康制药有限公司,批号 200710001,纯度 99.8%。参照美国临床和实验室标准化研究所 (Clinical Laboratory Standard Institute, CLSI) 的微量液基稀释方案 M38-A2 (菌丝相) 及 M27-A3 (酵母相)^[3-4] 配制药物的贮存液及倍比稀释液,即药物均溶解在 100% DMSO 中,获得的贮存液浓度均为 1600 μg/mL,于 -20℃ 储存。实验前用 RPMI 1640 液体培养基将药物稀释成两倍终浓度工作液。

1.4 菌悬液制备

菌丝相菌悬液制备 试验前所有受试菌均接种在马铃薯葡萄糖培养基 (PDA) 上 30℃ 活化 7 d。取 2 mL 生理盐水加入试管内,轻挑黑灰色绒毛样菌落,反复吹吸后,将菌悬液吸到无菌试管中静置 20 min。取上清液振荡 15 s,用比浊仪调整菌悬液浓度至 0.5 麦氏单位。再用血球计数板计数,浓度调至 $1 \sim 5 \times 10^6$ CFU/mL。再用 RPMI 1640 液体培

养基稀释 50 倍,得到 $2 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ CFU/mL 的 2 倍终浓度的接种菌悬液。

酵母相菌悬液制备 试验前所有受试菌均接种在含 5% 葡萄糖的脑心浸汁培养基 (BHI) 上 35℃ 培养,每 7 d 传代 1 次,共 3 次,直至 70% 以上细胞转化为酵母样细胞。挑取灰白色酵母菌落适量,放置于装有 2 mL 生理盐水的无菌玻璃小瓶中制成混悬液,静置 20 min。取上清液振荡 15 s,用比浊仪调整菌悬液浓度至 0.5 麦氏单位。再用血球计数板计数,浓度调至 $1 \sim 5 \times 10^6$ CFU/mL。再用 RPMI 1640 液体培养基稀释 1 000 倍,得到 $1 \sim 5 \times 10^3$ CFU/mL 的 2 倍终浓度的接种菌悬液。

1.5 真菌药敏试验

培养板横向以 1~12 列表示,即有 12 孔;纵向以 A~H 行表示,即有 8 孔。第 1 列及第 H 行为单独药敏试验区,第 2~11 列及 A~G 行为联合药敏试验区。两种药物的储存液分别用 RPMI 1640 培养基进行倍比稀释,取 50 μL 各稀释浓度特比萘芬药液分别加入第 1~11 列各孔,取 50 μL 各稀释浓度伊曲康唑药液加入 A~H 行。第 12 列加入 200 μL 培养基作为阴性对照。特比萘芬药液浓度范围为 0.007 5~8 μg/mL,伊曲康唑为 0.03~16 μg/mL,根据每株菌的结果不同可分别提高或降低 2 个数量级的药物浓度。之后各孔接种制备好的菌悬液 100 μL,将药敏板放置 35℃ 恒温培养箱,72~120 h 观察结果。

1.6 MIC 的判定

菌丝相和酵母相的 MIC 判定一致,伊曲康唑和特比萘芬单独用药和联合用药时的 MIC 值均取与生长对照孔相比生长 100% 受抑制的最低药物浓度。

1.7 FIC (分数抑菌浓度) 的确定

为联合用药时各药的 MIC 值分别除以单独用药时 MIC 值的商的和,表示为 $FIC = MIC_{A联合} / MIC_{A单独} + MIC_{B联合} / MIC_{B单独}$ 。相互作用解释为: $FIC \leq 0.5$ 有协同作用; $FIC > 4$ 有拮抗作用; $0.5 < FIC \leq 4$ 为无关^[2]。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 14.0 统计软件,计算伊曲康唑和特比萘芬在单独用药和联合用药时 MIC 的几何均数值 (GM 值) 及 FIC 值,单独和联合用药组间数据采用秩和检验和 Fisher's exact test, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

3 例经伊曲康唑治疗无效的孢子丝菌病患者,经过伊曲康唑和特比萘芬联合治疗 12~14 周后痊愈。

2.1 伊曲康唑和特比萘芬对申克孢子丝菌菌丝相与酵母相体外 MIC 值

伊曲康唑对菌丝相的 MIC 值范围为 4~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, GM 值为 14.93 $\mu\text{g}/\text{mL}$;对酵母相分别为 1~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$,菌丝相与酵母相 GM 值比较差异具有显著统计学意义 ($Z=3.925$, $P=0.000$)。特比萘芬对菌丝相的 MIC 值范围为 0.06

~0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, GM 值为 0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$;对酵母相分别为 0.06~0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$,菌丝相与酵母相 GM 值比较差异无统计学意义 ($Z=1.532$, $P=0.125$)。见表 1。

2.2 伊曲康唑与特比萘芬联合时对申克孢子丝菌菌丝相和酵母相体外药物相互作用

伊曲康唑与特比萘芬联合时对菌丝相 75% (15/20) 有协同作用,25% (5/20) 为无关;对酵母相 70% (14/20) 有协同作用,30% (6/20) 为无关;均无拮抗作用。菌丝相和酵母相协同作用率比较差异无统计学意义 ($P=0.500$)。

表 1 伊曲康唑和特比萘芬体外联合抗申克孢子丝菌菌丝相和酵母相的作用

Tab. 1 *In vitro* interaction of itraconazole with terbinafine against *Sporothrix schenckii* growing in both mycelial and yeast phases

药 物	菌丝相 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		酵母相 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	MIC	GM	MIC	GM
伊曲康唑	4~32	14.93	1~8	1.69
特比萘芬	0.06~0.25	0.13	0.06~0.25	0.11
伊曲康唑/特比萘芬	1~16/0.015~0.12	2.64/0.04	0.25~1/0.015~0.06	0.48/0.02

3 讨 论

初步研究显示对于伊曲康唑治疗失败或效果欠佳的患者,采用伊曲康唑 200 mg/d 和特比萘芬 250 mg/d 联合治疗孢子丝菌病 12~14 周有效安全,说明两药在体内具有协同作用。体外初步研究显示伊曲康唑和特比萘芬对申克孢子丝菌菌丝相具有协同作用为 75%,对酵母相为 70%。体内外研究结果相一致,但有待今后大样本量进一步证实。

近年来多数学者采用微量液基稀释法进行申克孢子丝菌体外药敏试验, Gutierrez-Galhardo 等^[5]测定了 91 株的菌丝相和酵母相体外 MIC 值,显示伊曲康唑、特比萘芬等对菌丝相和酵母相均有活性,但对菌丝相的 MIC 值明显高于酵母相。赵景辉等^[6]测定了 4 株申克孢子丝菌菌丝相和酵母相的体外 MIC 值,显示伊曲康唑对酵母相的 MIC 值较低,而特比萘芬对菌丝相和酵母相均有较低的 MIC 值。Kohler 等^[7]研究显示特比萘芬对申克孢

子丝菌的菌丝相及酵母相的 GM 一致,均为 0.062 mg/L。Kohler 等^[8]对 37 株申克孢子丝菌的酵母相进行研究,伊曲康唑 MIC 范围在 0.062~4 mg/L,特比萘芬在 0.007~0.5 mg/L,显示特比萘芬对申克孢子丝菌的酵母相具有更高的活性。Silveira^[9]对 62 株申克孢子丝菌的菌丝相进行体外药敏试验,显示特比萘芬是最具活性的药物, MIC 的 GM 和 MFC 值最低;伊曲康唑和泊沙康唑活性相似。McGinnis 等^[10]对 100 株申克孢子丝菌的酵母相进行 MIC 检测,显示伊曲康唑 MIC 范围为 0.03~8 mg/L, GM 为 1.56 mg/L;伊曲康唑 MFC 范围为 0.125~8 mg/L, GM 为 7.41 mg/L。本研究结果与文献报道相一致,提示对伊曲康唑选择酵母相而对于特比萘芬则可选择菌丝相来进行药敏试验,所得结果可能与临床疗效一致性较好。

抗真菌药物对申克孢子丝菌体外药物相互作用研究较少, Ruiz-Cendoya 等^[11]对 10 株申克孢子丝菌进行了伊曲康唑与米卡芬净的体外联合药敏试验,具有协同作用 $\geq 50\%$ 。本研究结果显示伊曲

康唑与特比萘芬体外联合对申克孢子丝菌具有较高的协同抗菌作用,提示对单一抗真菌药物治疗孢子丝菌病效果不佳时可以考虑联合用药治疗。

参考文献

- [1] 王爱平,金星姬,陈伟,等.伊曲康唑联合特比萘芬治疗孢子丝菌病 1 例[J].中国真菌学杂志,2008,3(1):26-28.
- [2] 王晓慧,刘伟,李若瑜.申克孢子丝菌体外药敏试验研究近况[J].中国真菌学杂志,2009,4(2):120-123.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi[S]. Approved standard-Second edition M38-A2. CLSI, Wayne, PA, 2008.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts[S]. Approved standard-Third edition M27-A3. CLSI, Wayne, PA, 2008.
- [5] Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Monzón A, et al. Antifungal susceptibility profile *in vitro* of *Sporothrix schenckii* in two growth phases and by two methods: microdilution and E-test[J]. Mycoses, 2010, 53(3):227-231.
- [6] 赵景辉,孙秋宁,严岩,等.申克孢子丝菌双相体外药物敏感试验研究[J].中国麻风皮肤病杂志,2007,23(7):575-578.
- [7] Kohler LM, Hamdan JS, Ferrari TC. Successful treatment of a disseminated *Sporothrix schenckii* infection and *in vitro* analysis for antifungal susceptibility testing[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007, 58(1):117-120.
- [8] Kohler LM, Monteiro PC, Hahn RC, et al. *In vitro* susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to itraconazole and terbinafine[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(9):4319-4320.
- [9] Silveira CP, Torres-Rodríguez JM, Alvarado-Ramírez E, et al. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii* [J]. J Med Microbiol, 2009, 58(Pt 12):1607-1610.
- [10] McGinnis MR, Nordoff N, Li RK, et al. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B[J]. Med Mycol, 2001, 39(4):369-371.
- [11] Ruíz-Cendoya M, Rodríguez MM, Marín M, et al. *In vitro* interactions of itraconazole and micafungin against clinically important filamentous fungi[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(5):418-420.

[收稿日期] 2010-09-19

[本文编辑] 卫凤莲

· 消息 ·

办班消息

由冉玉平教授负责的国家级医学继续教育项目《皮肤真菌病基础和临床研究新进展》[项目编号:2009-04-12-060(国)]将于2011年3月底在成都举行。

培训对象 皮肤性病科临床医师;综合医院临床医师;在读博士、硕士研究生;综合医院检验科实验技术人员。

主要内容 真菌的分类与命名;酵母菌的鉴定、分型、分子生物学及念珠菌病的临床和实验研究进展;浅部真菌病、念珠菌病、隐球菌病、镰刀菌病、孢子丝菌病、着色真菌病、马尔尼菲青霉菌病、组织胞浆菌病、皮炎芽生菌病、球孢子菌病、曲霉病、结合菌病;马拉色菌的研究进展,包括最新的命名、分类及鉴定方法;与马拉色菌有关疾病的临床表现和治疗;甲真菌病的诊断、鉴别诊断、病理学及治疗;真菌与性传播疾病;皮肤癣菌、马拉色菌取材、镜检、染色、培养及鉴定;念珠菌、孢子丝菌、污染菌的小培养及菌落观察;常规及特殊培养基制作;抗真菌药物研究进展及合理应用,真菌病的临床科研思路、论文撰写及中国真菌学杂志投稿规范等。

报到时间及地点 2011年3月30日(星期三)四川大学继续教育学院(成都市人民南路三段16号)。

学习时间及**证书** 2011年3月31日~4月4日;结业颁发国家Ⅰ类学分(10分)证书。

培训费用 700元/人(含资料费);食宿统一安排,费用自理。

联系方式 电话:028-85501663 传真:028-85501565 电子邮件:ranyuping@gmail.com 邮寄:610041 四川大学华西医院皮肤性病科杨翰君博士(13568839039)。