

# 大熊猫源酵母菌的分离鉴定

马晓平<sup>1</sup>, 向奇<sup>1</sup>, 王承东<sup>2\*</sup>, 曹三杰<sup>1</sup>, 凌珊珊<sup>2</sup>, 古玉<sup>3\*</sup>

(1. 四川农业大学动物医学院, 成都 611130; 2. 中国大熊猫保护研究中心, 雅安 625000;  
3. 四川农业大学 生命科学学院, 成都 611130)

**摘要:** 旨在调查大熊猫体表酵母菌种属及其对小鼠的致病性。通过传统分离培养、形态学观察, 并利用真菌 ITS 序列通用引物 ITS1、ITS4 对分离株进行 PCR 扩增和系统发育学分析, 从而鉴定其种属。利用丹麦 Rosco 纸片扩散法, 用两性霉素 B、制霉菌素、酮康唑、氟康唑、伊曲康唑对 12 种分离株进行药敏试验和耐药性分析, 同时进行动物致病性试验。结果本次共在 37 个熊猫被毛样本中分离到 45 株酵母菌, 分属于 3 个属, 12 个种。酵母分离菌分别为毛孢子菌属 (*Trichosporon*) 40 株, 隐球菌属 (*Cryptococcus*) 4 株, 假丝酵母菌属 (*Candida*) 1 株, 分别鉴定为皮肤毛孢子菌 (*Trichosporon cutaneum*)、串珠毛孢子菌 (*Trichosporon moniliforme*)、指间毛癣菌 (*Trichosporon interdigitale*)、秋吉台毛孢子菌 (*Trichosporon akiyoshidainum*)、星形毛孢子菌 (*Trichosporon asteroides*)、芸苔毛孢子菌 (*Trichosporon brassicae*)、辜氏毛孢子菌 (*Trichosporon guehoae*)、耶氏毛孢子菌 (*Trichosporon jirovecii*)、蒙得维的亚毛孢子菌 (*Trichosporon montevideense*)、毛孢子菌 (*Trichosporon* sp.)、链状假丝酵母菌 (*Candida catenulate*) 和长莓隐球菌 (*Cryptococcus fragicola*), 共 12 种酵母菌。动物致病性试验结果表明: 皮肤毛孢子菌、指间毛癣菌、星形毛孢子菌和长莓隐球菌对小鼠致病, 其余对小鼠条件致病。多数菌种对 5 种抗真菌药物敏感, 其中长莓隐球菌对酮康唑耐药; 链状假丝酵母菌、指间毛癣菌对两性霉素 B 耐药; 链状假丝酵母菌、耶氏毛孢子菌对伊曲康唑耐药; 毛孢子菌 (*Trichosporon* sp.) 对氟康唑耐药; 皮肤毛孢子菌、指间毛癣菌、辜氏毛孢子菌和链状假丝酵母菌对制霉菌素耐药。大熊猫体表酵母菌种类丰富, 各种属对常用抗真菌药物敏感性存在差异。本研究丰富了对大熊猫源酵母菌种群的认识, 为大熊猫酵母菌病的诊治提供参考。

**关键词:** 大熊猫; 酵母菌; 分离鉴定; PCR; 药敏试验

中图分类号: S852.66

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)12-2383-09

## Isolation, Identification and Drug Resisitance Analysis of Yeast from Hair of *Ailuropoda melanoleuca*

MA Xiao-ping<sup>1</sup>, XIANG Qi<sup>1</sup>, WANG Cheng-dong<sup>2\*</sup>, CAO San-jie<sup>1</sup>, LING Shan-shan<sup>2</sup>, GU Yu<sup>3\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;  
2. China Conservation and Research Center for the Giant Panda, Ya'an, 625000, China;  
3. College of Life Sciences, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** In order to investigate species and genus distribution of yeast on hairs of giant panda and their pathogenicity on mice, thirty-seven hair samples of giant panda were collected and 45 isolates of yeast were isolated from the samples with traditional microbial isolation method. PCR amplification on the strains using the universal fungi primer of ITS1 and ITS4 and phylogenetic analysis were performed. And the 45 isolates belonged to 12 species. Drug sensitive qualitative test of 12 species of yeast were researched using 5 kinds of clinical commonly antifungal medicines

收稿日期: 2017-05-22

基金项目: 大熊猫国际资金项目 (AD1415); 圈养大熊猫管理研究项目 (SD1118); 四川省科技厅基础研究计划项目 (2013JY0175)

作者简介: 马晓平 (1976-), 男, 土家族, 重庆石柱人, 博士, 副教授, 主要从事临床兽医学的教学与科研工作, E-mail: mxp886@sina.com.cn;  
向奇 (1991-), 男, 四川德阳人, 硕士生, E-mail: 584878624@qq.com。马晓平和向奇并列共同第一作者

\* 通信作者: 王承东, 博士, 主要从事大熊猫保护研究工作, E-mail: 285934012@qq.com; 古玉, 主要从事生物学相关研究, E-mail: guyu632@sicau.edu.cn。王承东和古玉为并列通信作者

by the Danish Rosco disc diffusion method. The results indicated that 12 species of yeast were isolated, including *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon monilii forme*, *Trichosporon interdigitale*, *Trichosporon akiyoshidainum*, *Trichosporon asteroides*, *Trichosporon brassicae*, *Trichosporon guehoae*, *Trichosporon jirovecii*, *Trichosporon montevidense*, *Trichosporon sp.*, *Candida catenulate* and *Cryptococcus fragicola*. Most of the yeast strains were sensitive to 5 kinds of antifungal drugs. *C. fragicola* was resistant to ketoconazole, *C. catenulate* and *T. interdigitale* were resistant to amphotericin B, *C. catenulate* and *T. jirovecii* were resistant to itraconazole, *Trichosporon sp.* was resistant to fluconazole, *C. catenulate*, *T. interdigitale*, *T. guehoae* and *T. cutaneum* were resistant to nystati. *T. cutaneum*, *T. interdigitale*, *T. asteroides*, *C. fragicola* were pathogenic to mice, and other isolates of yeasts were opportunistic pathogenicity. Various yeast species exist in surface of giant panda, and they have different drug sensitivity to fungicides. These results have greatly enriched the understanding of the yeast on hair of giant panda, will provide a reference for the dermatomycoses diagnosis and treatment of giant panda.

**Key words:** giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*); yeast; isolation and identification; PCR; drug sensitivity test

大熊猫已在地球上生存了至少 800 万年,据我国 2015 年调查,野生大熊猫仅有 1 864 只,80% 以上分布于四川境内<sup>[1]</sup>,至 2015 年底全世界共圈养熊猫 425 只<sup>[2]</sup>。其被誉为“活化石”和“中国国宝”,是世界生物多样性保护的旗舰物种,在我国外交上发挥重要作用<sup>[3]</sup>。

随着部分大熊猫由于老年化等各种原因导致的身体抵抗力下降,以及广谱抗生素、糖皮质激素等药物的使用,使得大熊猫真菌性皮肤病逐年高发<sup>[4-5]</sup>。酵母菌属于真菌,主要是因机体免疫力低下导致体表或深部组织感染,可以用克霉唑、咪康唑等抗菌药物对症治疗。由酵母菌引起的侵袭性感染是导致癌症化疗、器官移植及免疫抑制患者死亡的主要原因之一<sup>[6]</sup>。毕赤酵母属、红酵母属、毛孢子菌属、白念珠菌等酵母菌引起感染的报道逐渐增加<sup>[7]</sup>。近年来在大熊猫阴道分泌物中<sup>[8]</sup>和老年死亡大熊猫褥疮和部分脏器中分离出多株酵母菌<sup>[5]</sup>,表明大熊猫在一定条件下,特别是抵抗力降低后存在感染酵母菌的风险。

不同种属的酵母菌对抗真菌药物的敏感性不同<sup>[9]</sup>,为了及早预防和合理用药,本试验采用丹麦 Rosco 真菌药敏纸片扩散法,对从大熊猫被毛分离到的酵母菌进行药敏试验研究,为大熊猫因酵母菌引起的疾病治疗提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

对中国保护大熊猫研究中心某基地的 37 只大熊猫体表(四肢上部、腋窝、腹股沟、耳内、头部、背部

等)进行毛发采集。按参考文献[10]方法采集适量毛发,将样本装入黑纸袋中<sup>[10]</sup>,送实验室分离培养。

### 1.2 主要试剂

酵母基因组 DNA 提取试剂盒、溶壁酶 Lyticase、Green View、D2000 Marker 和 2×Taq PCR Master Mix 均购自北京天根生化科技有限公司;Hy Agarose™ LE 琼脂糖购自厦门太阳马生物工程有限公司;氯霉素和放线菌酮购自 BIOSHARP 生物科技公司;抗真菌药敏纸片:制霉菌素(NYSTA, 50 μg·片<sup>-1</sup>)、两性霉素 B(AMPHO, 10 μg·片<sup>-1</sup>)、氟康唑(FLUCZ, 25 μg·片<sup>-1</sup>)、伊曲康唑(ITRAC, 8 μg·片<sup>-1</sup>)、酮康唑(KETOC, 15 μg·片<sup>-1</sup>)及改良 SHADOMY 琼脂培养基,均购自广州迪景微生物科技有限公司。

### 1.3 主要仪器

霉菌培养箱(MJ-400B),上海跃进医疗器械有限公司;荧光显微镜(BX51),日本 Olympus 公司;PCR 仪(DNA Engine 2000),凝胶成像系统(Gel-Doc XR+),BIO-RAD 公司;电泳仪(JY600C),北京君意东方电泳设备有限公司。

### 1.4 培养基

试验所用培养基主要为加抗生素沙氏葡萄糖蛋白胨培养基(SDA),其中氯霉素质量浓度为 200 mg·L<sup>-1</sup>、放线菌酮质量浓度为 250 mg·L<sup>-1</sup><sup>[10]</sup>。Shadomy 琼脂培养基购自丹麦 Rosco 公司。

### 1.5 酵母菌的分离及纯化培养

超净工作台内,将样本按文献[11]方法处理后分散接种到 SDA 培养基中 25 °C 培养 1~4 周<sup>[11]</sup>。

每长出新的真菌菌落时,将其转接种于新的同种真菌培养基,经纯化后对其进行形态学观察。

### 1.6 真菌 DNA 的提取与 PCR 扩增

对纯菌株按照 TIANGEN 酵母基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作。以提取真菌基因组 DNA 为模板。以 *ITS1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 *ITS4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')<sup>[12-13]</sup> 为引物(引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成)进行扩增。PCR 反应体系和 PCR 反应条件均按参考文献[3]进行。取 5  $\mu$ L PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测有无。最后将含有目的条带的 PCR 产物送成都擎科梓熙生物技术有限公司测序。

### 1.7 系统发育学分析

将测序结果通过 DNASTar 软件的 Seqedit 程序去除接头,并输入 NCBI GenBank 数据库进行同源性检索,获得近似序列。用 Clustal X 软件进行核苷酸序列多序列比对分析,通过 Mega 6.0 软件构建系统发育树。同时,将序列提交到 NCBI,并获得登录号。

### 1.8 药敏试验

利用丹麦 Rosco 纸片扩散法,用 5 种抗真菌药物对 12 种酵母菌进行药敏试验。将待测菌株用无菌生理盐水制成菌悬液,采用麦氏比浊法,调整浓度到 0.5 麦氏浊度,约为  $5 \times 10^5$  CFU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,再用生理盐水 1:1 稀释。

吸取 0.5 mL 接种液倾注于 Shadomy 琼脂培养基表面涂抹均匀,35  $^{\circ}$ C 放置 10 min 后贴药敏纸片,置于 25  $^{\circ}$ C 培养 18~24 h 后根据判读标准判读结果<sup>[14-15]</sup>。

### 1.9 动物致病性试验

取 SDA 培养基上 25  $^{\circ}$ C 培养 5 d 的 12 种分离菌株,用无菌生理盐水制成菌悬液浓度为  $1 \times 10^7$  CFU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。将 225 只体况相近的 6~8 周龄健康小鼠(雌雄不限)随机分为 A(108 只)、B(108 只)、C(9 只)三组。A 组为免疫抑制组,B 组为非免疫抑制组,饲养观察一周,临床表现无异常。C 组为空白对照组。A 组腹腔注射环磷酰胺(50 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>)和青霉素钠(15 mg  $\cdot$  只<sup>-1</sup>),隔天注射一次,连续三次,然后按菌株各分为 12 个菌株组。A、B 两组各菌株组再分别分为腹腔注射组、皮下注射组和皮肤涂擦组,每组 3 只。A、B 皮肤涂擦组小鼠试验前剪除背部毛发,约 3 cm  $\times$  2 cm。接种时消毒后,用无菌粗砂纸轻轻磨破小鼠背部皮肤至点状渗血为宜,涂布菌悬液,皮下注射组皮下注射菌悬液 0.1 mL,腹

腔注射组腹腔注射 0.1 mL 菌悬液。C 组再分为皮肤涂擦组、皮下注射组和腹腔注射组,分别皮肤涂擦生理盐水,皮下注射 0.1 mL 生理盐水,腹腔注射 0.1 mL 生理盐水,每组 3 只。观察试验小鼠死亡情况和接种处皮肤红斑、脱屑、结痂和毛发生长变化,观察期为 7 d。

## 2 结果

### 2.1 大熊猫被毛酵母菌的分离与纯化

本次从 37 个大熊猫毛发样本中共分离到 45 株酵母型真菌,不同种酵母菌形态差异较大,部分酵母菌菌落形态与显微形态特征如图 1。

星形毛孢子菌(*Trichosporon asteroides*)菌落生长速度快,米白色,类酵母样,闪光,表面脑回样,背面为淡黄色(图 1-A1)。无明显菌丝,偶见假菌丝,结构复杂,芽生细胞,有侧生分生孢子,透光(图 1-A2)。

秋吉台毛孢子菌(*Trichosporon akiyoshidai-num*)菌落生长速度快,米白色,湿润,菌落中心有泡状突起,外侧呈线性发散,背面为淡灰色(图 1-B1)。芽生细胞多,关节孢子柱状或椭圆形,侧生分生孢子(图 1-B2)。

串珠状毛孢子菌(*Trichosporon moniliforme*)菌落生长快,米白色,酵母样,湿润,闪光,脑回状,边缘不整齐,背面淡黄色(图 1-C1);无菌丝,芽生孢子,孢子圆形,厚壁,大小不一,具有染色特征(图 1-C2)。

蒙得维的亚毛孢子菌(*Trichosporon montevidense*)菌落生长速度快,奶酪样,干燥,闪光,边缘不整齐,有大凹陷,背面为淡黄色(图 1-D1)。有假菌丝,芽生孢子,芽颈呈领圈样结构,孢子呈长柱形、卵圆形或球形,透光(图 1-D2)。

长莓隐球酵母(*Cryptococcus fragicola*)菌落生长速度一般,奶酪样,圆形,脑回状,反光,表面光滑,背面为乳白色(图 1-E1),芽生细胞多,关节孢子柱状至椭圆形(图 1-E2)。

### 2.2 PCR 扩增产物电泳分析

对 45 株酵母菌 *ITS* 区基因进行扩增,菌株 PCR 扩增产物电泳结果如图 2、3 所示。由图 2、3 可知,大部分条带大小在 500 bp 左右,不同菌株条带的亮度不一,但都获得清晰的单一条带,说明提取 DNA 纯度高,结果可信。

### 2.3 大熊猫被毛酵母菌的系统发育分析

从 Neighbour-Joining 法构建的系统进化树(图 4)可知,本次共分离到 45 株酵母型真菌,其中 41 株

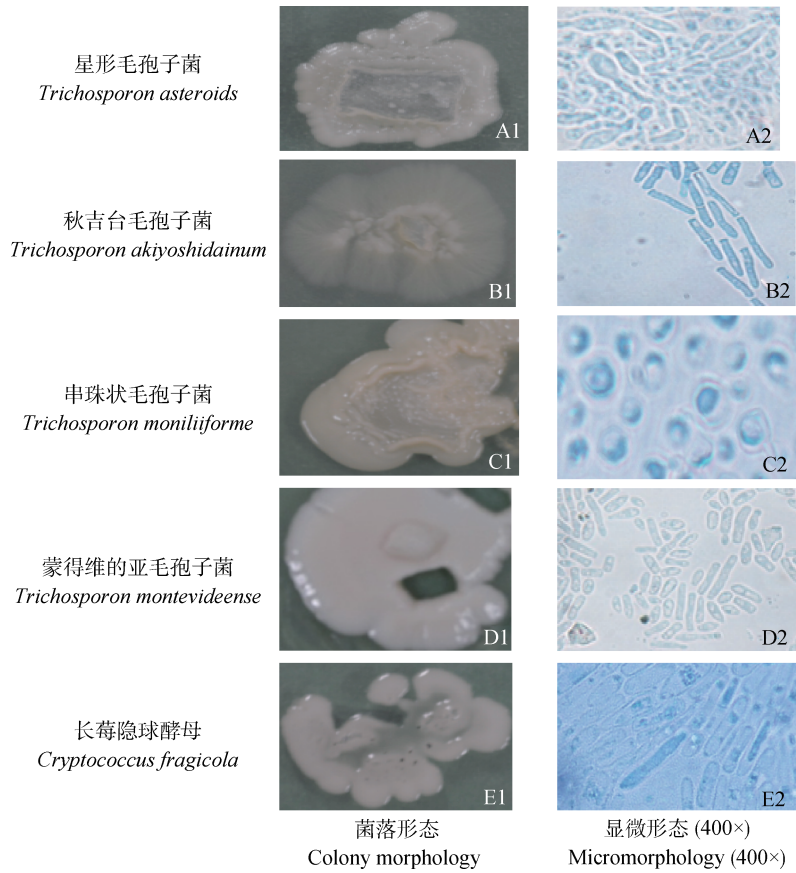


图 1 部分酵母菌菌落形态与显微形态

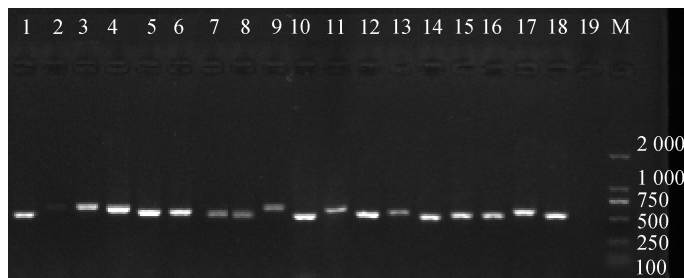
Fig. 1 The colony morphology and micromorphology of partial yeasts



1. J3; 2. J7; 3. J9; 4. J11; 5. J14; 6. J20; 7. J24; 8. J25; 9. J32; 10. J37; 11. S11; 12. S13; 13. S14; 14. S22; 15. S23; 16. S41; 17. M1; 18. M5; 19. M6; 20. M8; 21. M9; 22. M11; 23. M14; 24. M21; 25. M24; 26. S9; 27. S5; 28. 空白对照 (Blank control); M. Marker 2000

图 2 27 株分离菌株 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 2 The electrophoretogram of PCR amplification products about 27 isolated strains



1. D30; 2. D34; 3. D37; 4. D23; 5. D21; 6. D19; 7. D18; 8. D17; 9. D16; 10. D15; 11. D8; 12. D7; 13. D6; 14. D5; 15. D4; 16. D2; 17. M29; 18. M28; 19. 空白对照 (Blank control); M. Marker

图 3 18 株分离菌株 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 3 The electrophoretogram of PCR amplification products about 18 isolated strains

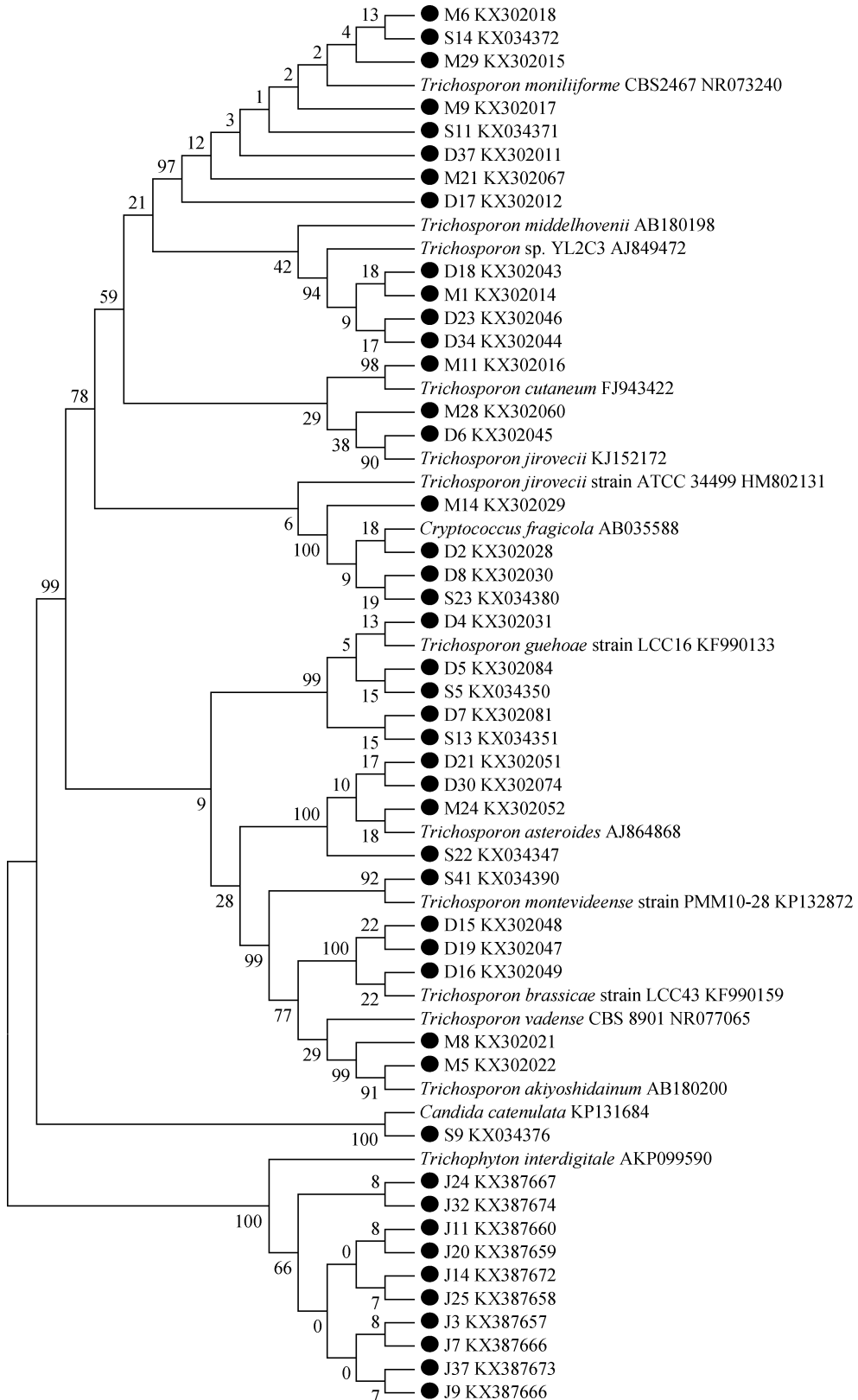


图 4 18S rRNA ITS 序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of 18S rRNA ITS sequence

能够鉴定到种, 4 株只能鉴定到属。40 株为毛孢子菌属, 4 株为隐球菌属, 1 株为链状假丝酵母属。共

得到 12 种酵母菌, 有 10 株菌鉴定为指间毛癣菌 (*Trichosporon interdigitale*), 编号分别为 J3、J7、

J9、J11、J14、J20、J24、J25、J32、J37; 8 株菌鉴定为串珠毛孢子菌(*T. monilii forme*), 编号分别为 D17、D37、M6、M9、M29、M21、S11、S14; 5 株菌鉴定为辜氏毛孢子菌(*Trichosporon guehoae*), 编号分别为 S5、S13、D4、D5、D7。2 株菌鉴定为秋吉台毛孢子菌(*Trichosporon akiyoshidainum*), 编号分别为 M5 和 M8; 3 株菌鉴定为芸苔毛孢子菌(*Trichosporon brassicae*), 编号分别为 D15、D16、D19; 4 株菌鉴定为星形毛孢子菌(*Trichosporon asteroides*), 编号分别为 M24、D21、D30、S22; 1 株菌鉴定为皮肤毛孢子菌(*Trichosporon cutaneum*), 编号为 M11; 2 株菌鉴定为耶氏毛孢子菌(*Trichosporon jirovecii*), 编号为 D6 和 M28; 1 株菌鉴定为蒙得维的亚毛孢子菌(*Trichosporon montevidense*), 编号为 S41; 4 株菌鉴定为长莓隐球酵母(*C. fragicola*), 编号分别为

S23、M14、D2、D8; 1 株菌鉴定为 *C. catenulate*, 编号为 S9。4 株菌仅能鉴定到毛孢子菌属(*Trichosporon* sp.), 编号分别为 M1、D18、D23、D34。

## 2.4 药敏试验

表 1 为 12 种酵母型真菌在 25 °C 培养 24 h, 由 3 人共 3 次分别测量抑菌圈直径, 并将 3 次结果取平均值作为判定的依据。真菌的药物敏感性情况按照丹麦 Rosco 药敏纸片基本判读标准进行判定。

表 1 表明长莓隐球酵母对酮康唑耐药, 芸苔毛孢子菌和耶氏毛孢子菌对酮康唑中度敏感, 其余菌株对酮康唑敏感; 指间毛癣菌和链状假丝酵母菌对两性霉素 B 耐药, 皮肤毛孢子菌和辜氏毛孢子菌对两性霉素 B 中度耐药, 其余菌对两性霉素 B 敏感; 耶氏毛孢子菌和链状假丝酵母菌对伊曲康唑耐药, 其余各菌株对伊曲康唑敏感; 毛孢子菌对氟康唑耐

表 1 五种抗真菌药物对分离株酵母菌的药敏结果

Table 1 The susceptibility results of 5 antifungal drugs for isolates of yeasts

| 菌种<br>Species                                 | 酮康唑 KZC |    | 两性霉素 B AMB |    | 伊曲康唑 ITR |    | 氟康唑 FLU |    | 制霉菌素 NYS |    |
|---|---------|----|------------|----|----------|----|---------|----|----------|----|
|   | D/mm    | 判定 | D/mm       | 判定 | D/mm     | 判定 | D/mm    | 判定 | D/mm     | 判定 |
| 皮肤毛孢子菌<br><i>Trichosporon cutaneum</i>        | 20.3    | S  | 14.3       | I  | 21       | S  | 28.7    | S  | 10       | R  |
| 串珠毛孢子菌<br><i>Trichosporon monilii forme</i>   | 26      | S  | 23.3       | S  | 27       | S  | 27.7    | S  | 23.3     | S  |
| 指间毛癣菌<br><i>Trichosporon interdigitale</i>    | 41.7    | S  | 10         | R  | 44       | S  | 40.3    | S  | 10       | R  |
| 秋吉台毛孢子菌<br><i>Trichosporon akiyoshidainum</i> | 24.7    | S  | 19.7       | S  | 24       | S  | 33.3    | S  | 20       | S  |
| 星形毛孢子菌<br><i>Trichosporon asteroides</i>      | 25      | S  | 24.3       | S  | 24       | S  | 26.3    | S  | 22.3     | S  |
| 芸苔毛孢子菌<br><i>Trichosporon brassicae</i>       | 13      | I  | 25.3       | S  | 20       | S  | 24.7    | S  | 25.7     | S  |
| 辜氏毛孢子菌<br><i>Trichosporon guehoae</i>         | 20.3    | S  | 14.3       | I  | 21       | S  | 28.3    | S  | 10       | R  |
| 耶氏毛孢子菌<br><i>Trichosporon jirovecii</i>       | 18.3    | I  | 24.7       | S  | 10       | R  | 23.7    | S  | 27.7     | S  |
| 蒙得维的亚毛孢子菌<br><i>Trichosporon montevidense</i> | 22.3    | S  | 24         | S  | 27       | S  | 27.7    | S  | 22.3     | S  |
| 毛孢子菌<br><i>Trichosporon</i> sp.               | 24.3    | S  | 20.7       | S  | 31       | S  | 10      | R  | 20       | S  |
| 链状假丝酵母菌<br><i>Candida catenulate</i>          | 25.3    | S  | 10         | R  | 10       | R  | 29      | S  | 10       | R  |
| 长莓隐球菌<br><i>Cryptococcus fragicola</i>        | 11      | R  | 24.3       | S  | 20       | S  | 23      | S  | 22.3     | S  |

D. 抑菌圈直径( $\bar{x}$ ); R. 结果判定(S. 敏感,  $D \geq 20$  mm; I. 中度敏感,  $12 \text{ mm} < D < 19$  mm; R. 耐药,  $D \leq 11$  mm)

D. Antibacterial circle diameter ( $\bar{x}$ ); R. Result decision (S. Susceptible,  $D \geq 20$  mm; I. Intermediate,  $12 \text{ mm} < D < 19$  mm; R. Resistant,  $D \leq 11$  mm). KZC. Ketoconazole; AMB. Amphotericin B; ITR. Itraconazole; FLU. Fluconazole; NYS. Nystatin

药以外,其余菌株对氟康唑均敏感;皮肤毛孢子菌、指间毛癣菌、辜氏毛孢子菌和链状假丝酵母菌对制霉菌素耐药,其余菌株对制霉菌素敏感。综上所述,仅有 1 种酵母菌对氟康唑有强的耐药性,在临床中可优先选择氟康唑用于大熊猫临床酵母菌感染的治疗。

## 2.5 小鼠致病性试验

试验结果表明皮肤毛孢子菌、指间毛癣菌、星形毛孢子菌和长莓隐球菌对 A、B 组试验小鼠均致病,

表现为不同程度的瘙痒、脓肿和精神萎靡。皮下接种与皮肤涂擦组脓肿和瘙痒更明显;腹腔接种组精神萎靡,剖解后可见腹腔粘连。其余菌株接种免疫抑制组小鼠后出现脓肿,但非免疫抑制组小鼠未表现临床症状,处死后剖解发现内脏无明显肉眼变化,表明仅为条件致病。C 组皮肤涂擦伤 3 d 后痊愈,其余无任何肉眼可见病变。所有分离菌株接种均不致死小鼠(表 2)。

表 2 分离株对小鼠的致病性结果

Table 2 The pathogenicity results of isolates of yeasts on mice

| 菌种<br>Species                                 | 临床症状<br>Clinical symptoms   | 发病率情况<br>Morbidity         | 死亡率/%<br>Mortality | 致病性<br>Pathogenicity |
|---|-----------------------------|----------------------------|--------------------|----------------------|
| 皮肤毛孢子菌<br><i>Trichosporon cutaneum</i>        | A、B 组均表现不同程度的瘙痒、<br>脓肿及精神萎靡 | A、B 组 100% 发病              | 0                  | 致病                   |
| 串珠毛孢子菌<br><i>Trichosporon monilii forme</i>   | A 组表现脓肿,B 组未见症状             | A 组 33% 发病                 | 0                  | 条件致病                 |
| 指间毛癣菌<br><i>Trichosporon interdigitale</i>    | A、B 组均表现不同程度的瘙痒、<br>脓肿及精神萎靡 | A 组 100% 致病,<br>B 组 66% 致病 | 0                  | 致病                   |
| 秋吉台毛孢子菌<br><i>Trichosporon akiyoshidainum</i> | A 组表现脓肿,B 组未见症状             | A 组 33% 发病                 | 0                  | 条件致病                 |
| 星形毛孢子菌<br><i>Trichosporon asteroides</i>      | A、B 组均表现不同程度的瘙痒、<br>脓肿及精神萎靡 | A 组 100% 致病,<br>B 组 33% 致病 | 0                  | 致病                   |
| 芸苔毛孢子菌<br><i>Trichosporon brassicae</i>       | A 组表现脓肿,B 组未见症状             | A 组 33% 发病                 | 0                  | 条件致病                 |
| 辜氏毛孢子菌<br><i>Trichosporon guehoae</i>         | A 组表现脓肿,B 组未见症状             | A 组 66% 发病                 | 0                  | 条件致病                 |
| 耶氏毛孢子菌<br><i>Trichosporon jirovecii</i>       | A 组表现脓肿,B 组未见症状             | A 组 33% 发病                 | 0                  | 条件致病                 |
| 蒙得维的亚毛孢子菌<br><i>Trichosporon montevidense</i> | A 组表现脓肿,B 组未见症状             | A 组 33% 发病                 | 0                  | 条件致病                 |
| 毛孢子菌<br><i>Trichosporon sp.</i>               | A 组表现脓肿,B 组未见症状             | A 组 33% 发病                 | 0                  | 条件致病                 |
| 链状假丝酵母菌<br><i>Candida catenulate</i>          | A 组表现脓肿,B 组未见症状             | A 组 33% 发病                 | 0                  | 条件致病                 |
| 长莓隐球菌<br><i>Cryptococcus fragicola</i>        | A、B 组均表现不同程度的瘙痒、<br>脓肿及精神萎靡 | A 组 100% 致病,<br>B 组 33% 致病 | 0                  | 致病                   |

## 3 讨论

本次通过对大熊猫毛发样本中酵母菌的常规分离培养,形态学特征结合真菌通用引物对分离株进行 PCR 扩增,以快速鉴定所分离菌株的种属,本次所分离的 45 株酵母菌中,分别属于 3 个属,12 个

种,其中 41 株能鉴定到种,其余 4 株仅鉴定到属。主要以毛孢子菌为优势酵母菌群。

毛孢子菌属(*Trichosporon*)又为丝孢酵母属,常引起毛孢子菌病<sup>[16]</sup>。目前认为可引起人类疾病的菌种有 13 种<sup>[17]</sup>,本次在大熊猫体表分离鉴定到皮肤毛孢子菌(*T. cutaneum*)、星形毛孢子菌(*T.*

*asteroides*)、耶氏毛孢子菌(*T. jirovecii*)和蒙得维的亚毛孢子菌(*T. montevidense*)是引起人毛孢子菌病的病原,在大熊猫和其他动物上未见关于毛孢子菌病的案例报道。毛孢子菌病常常是一种凶险的疾病,其诊断往往很难明确,甚至被忽略,特别是在发展中国家,由于缺乏对病因学抗原显著诊断特征的认识和了解,情况更是如此<sup>[16]</sup>,其他菌株虽然没有感染人的报道,但不排除在一定条件下感染大熊猫。

临床药敏试验中运用最广泛的是纸片扩散法,其能将待检测的菌株对抗真菌药物的敏感性定性分为敏感、中度敏感及耐药。丹麦 Rosco 纸片扩散法是欧洲标准的酵母菌药物敏感试验方法,比美国临床和实验室标准协会(NCCLS)公布的 CLSI 法适用药物范围大<sup>[18]</sup>。丹麦 Rosco 纸片扩散法操作简单,有判断标准,便于临床操作,且具有结果直观、价廉、药物选择种类多、准确性好的优点,在国内被广泛用于临床实验室<sup>[15]</sup>。在人类医学中,对酵母菌的药敏试验有其标准,但在动物医学研究中,还未有一种公认的实验方案标准。因此,在本次试验中借鉴人医学的研究方法及其标准。

本试验中长莓隐球菌对酮康唑耐药;链状假丝酵母菌和指间毛癣菌对两性霉素 B 耐药;链状假丝酵母菌和耶氏毛孢子菌对伊曲康唑耐药;未鉴定到种的毛孢子菌对氟康唑耐药;皮肤毛孢子菌、指间毛癣菌、辜氏毛孢子菌和链状假丝酵母菌对制霉菌素耐药。刘小平等<sup>[19]</sup>利用 Etest 法对念珠菌进行药物敏感试验得出念珠菌对常用抗真菌药物存在不同程度的耐药率,非白色念珠菌较白色念珠菌对抗真菌药物的耐药率高。宋明辉等<sup>[20]</sup>研究表明存在对氟康唑和两性霉素 B 耐药性的隐球菌菌株,与本试验结果一致。韩红燕等<sup>[21]</sup>体外药敏试验结果表明,两性霉素 B 和 5-氟胞嘧啶的敏感性最高,氟康唑对非白色假丝酵母菌耐药性较强,与本试验结果存在差异。指间毛癣菌、链状假丝酵母菌和耶氏毛孢子菌的耐药性研究还未见报道。

#### 4 结 论

本次共在 37 个熊猫被毛样本中分离到 45 株酵母菌,分属于 3 个属,12 个种。分别为毛孢子菌属 40 株,隐球菌属 4 株,假丝酵母菌属 1 株。皮肤毛孢子菌、指间毛癣菌、星形毛孢子菌和长莓隐球菌对小鼠致病,其余对小鼠条件致病。多数菌种对 5 种抗真菌药物敏感。本研究丰富了对大熊猫源酵母菌

种群的认识,为大熊猫酵母菌病的诊治提供参考。

#### 参考文献(References):

- [1] 四川在线. 第四次全国大熊猫调查结果: 中国野生大熊猫 1864 只 川甘陕均有分布[EB/OL]. 2015-02-28. [2017-09-14]. <http://sichuan.scol.com.cn/fffy/201502/10033289.html>.  
Sichuan Online. The fourth national giant panda survey: China has 1864 wild pandas, distribute in Sichuan, Gansu and Shanxi provinces[EB/OL]. 2015-02-28. [2017-09-14]. <http://sichuan.scol.com.cn/fffy/201502/10033289.html>. (in Chinese)
- [2] 央视网. 全球今年繁育成活大熊猫宝宝 40 只 人工圈养量达 425 只[EB/OL]. 2015-11-12. [2017-09-14]. <http://m.news.cntv.cn/2015/11/12/ARTI1447286910344854.shtml>.  
CCTV. The global giant panda breed and survive 40 babies in this year, number of artificial captive up to 425[EB/OL]. 2015-11-12. [2017-09-14]. <http://m.news.cntv.cn/2015/11/12/ARTI1447286910344854.shtml>. (in Chinese)
- [3] 马晓平, 向 奇, 李德生, 等. 大熊猫被毛可培养真菌的分离鉴定与系统发育学分析[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(1): 72-81.  
MA X P, XIANG Q, LI D S, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of culturable fungi in hair of *Ailuropoda melanoleuca*[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2017, 47(1): 72-81. (in Chinese)
- [4] 张悦天, 马晓平, 古 玉, 等. 大熊猫源石膏样小孢子菌的分离鉴定与致病性研究[J]. 中国兽医科学, 2015, 45(6): 551-559.  
ZHANG Y T, MA X P, GU Y, et al. Identification and pathogenicity of *Microsporum gypsum* isolated from *Ailuropoda melanoleuca*[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2015, 45(6): 551-559. (in Chinese)
- [5] 王承东, 叶 娇, 李德生, 等. 一例老龄大熊猫死亡后的实验室检验与体会[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(3): 75-76.  
WANG C D, YE J, LI D S, et al. The experience on laboratory verification of an aged giant panda after-death[J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2015, 47(3): 75-76. (in Chinese)
- [6] HINRIKSON H P, HURST S F, LOTT T J, et al. Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus species* [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(5): 2092-2103.



- [7] LINTON C J, BORMAN A M, CHEUNG G, et al. Molecular identification of unusual pathogenic yeast isolates by large ribosomal subunit gene sequencing: 2 years of experience at the United Kingdom mycology reference laboratory[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(4): 1152-1158.
- [8] 马晓平, 杨秋霞, 李长城, 等. 发情期大熊猫阴道真菌的分离鉴定及酵母菌药敏试验[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(10): 1233-1240.  
MA X P, YANG Q X, LI C C, et al. Isolation and identification of fungi from the vagina of estrus giant panda and drug sensitive tests of the isolated yeasts [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(10): 1233-1240. (in Chinese)
- [9] PFALLER M A, DIEKEMA D J, MESSER S A, et al. *In vitro* activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates [J]. *Antimicrob Agents Chem other*, 2003, 47(3): 1068-1071.
- [10] 王端礼. 医学真菌: 实验室检验指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.  
WANG D L. Medical mycology: Guide to laboratory examination[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005. (in Chinese)
- [11] 马晓平, 古玉, 刘小敏, 等. 大熊猫源枝孢样枝孢霉的分离鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2013, 43(12): 1217-1223.  
MA X P, GU Y, LIU X M, et al. Isolation and identification of *Cladosporium cladosporioides* from *Ailuropoda melanoleuca* [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2013, 43(12): 1217-1223. (in Chinese)
- [12] 曹永军, 程萍, 喻国辉, 等. 利用 ITS1 和 ITS4 通用引物扩增香蕉枯萎病菌核酸片段鉴定其生理小种[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(7): 1098-1102.  
CAO Y J, CHENG P, YU G H, et al. Utility of universal primers, ITS1 and ITS4, to amplify sequences for race identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2010, 31(7): 1098-1102. (in Chinese)
- [13] SELIGER H. PCR protocols—A guide to methods and applications[M]. New York: Academic Press, 1990.
- [14] 陶仲为. 隐球菌感染[J]. *医师进修杂志*, 2002, 25(1): 9-10.  
TAO Z W. Cryptococcal pneumonia[J]. *Journal of Postgraduates of Medicine*, 2002, 25(1): 9-10. (in Chinese)
- [15] 苏丹虹, 邬全会, 王华成. Rosco 真菌药敏试验与其他方法的比较研究[J]. *检验医学*, 2004, 19(4): 291-294.  
SU D H, WU Q H, WANG H C. Comparative study on Rosco antifungal susceptibility test with other methods[J]. *Laboratory Medicine*, 2004, 19(4): 291-294. (in Chinese)
- [16] 张德全, 夏志宽, 敖俊红, 等. 阿萨希毛孢子菌感染治疗新进展[J]. *中国皮肤性病学期刊*, 2015, 29(8): 861-863.  
ZHANG D Q, XIA Z K, AO J H, et al. Recent progress in anti-infective therapy of *Trichosporon asahii* [J]. *The Chinese Journal of Dermatovenereology*, 2015, 29(8): 861-863. (in Chinese)
- [17] CHAGAS-NETO T C, CHAVES G M, MELO A S A, et al. Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(4): 1074-1081.
- [18] 徐英春, 李若瑜, 倪语星, 等. 如何正确理解抗真菌药物体外敏感试验结果对临床用药的指导价值[J]. *中华检验医学杂志*, 2008, 31(2): 128-132.  
XU Y C, LI R Y, NI Y X, et al. How to interpret the guidance value of *in vitro* susceptibility test of anti-fungal drugs on clinical practice[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2008, 31(2): 128-132. (in Chinese)
- [19] 刘小平, 李建武, 樊尚荣, 等. 临床常见念珠菌对 5 种抗真菌药物的敏感性[J]. *中华医院感染学杂志*, 2005, 15(6): 671-674.  
LIU X P, LI J W, FAN S R, et al. A test method for antifungal susceptibility of 173 strains of candidas [J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2005, 15(6): 671-674. (in Chinese)
- [20] 宋明辉, 崔征, 刘齐歌, 等. 新型隐球菌对氟康唑和两性霉素 B 的耐药性[J]. *医学研究生学报*, 2003, 16(11): 880.  
SONG M H, CUI Z, LIU Q G, et al. Resistance of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole and amphotericin B[J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2003, 16(11): 880. (in Chinese)
- [21] 韩红燕, 钱小毛. 假丝酵母菌感染的临床分布及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(17): 2705-2706.  
HAN H Y, QIAN X M. Clinical distribution and drug resistance of *Candida* spp.[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2010, 20(17): 2705-2706. (in Chinese)