

# 中国北京地区犬真菌监测与药敏分析\*

高正琴 (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**摘要:**目的 鉴定犬真菌微生物群(真菌区系),并进行药敏分析,为犬致病性真菌防控提供科学依据。方法 在中国的北京地区,共有55只没有疾病史的犬被取样。用真菌培养、PCR,基因克隆和测序技术,进行犬的真菌检测和鉴定。对所有真菌分离株进行药敏分析。结果 分离获得29株真菌,形态和分子鉴定确证这些真菌为黄曲霉、杂色曲霉、日本曲霉、卷枝毛霉、总状毛霉、多变根毛霉、壳青霉、产黄青霉、厚皮马拉塞霉菌、球毛壳霉、黄色蠕形霉、多喙茎点霉、尖孢镰刀菌、枝状枝孢菌、尖孢枝孢、极细枝孢霉、类星形毛孢子菌、阿萨希毛孢子菌、光滑念珠菌、库德里阿兹威毕赤酵母和东方伊萨酵母。结果表明,犬真菌种类比较丰富,获得真菌12属21种,曲霉属、毛霉属和枝孢菌属真菌在这些致病真菌中占主导地位。药敏分析结果显示:这些真菌对制霉菌素、咪康唑、沃尔康唑、特比萘芬和氟胞嘧啶等已经产生了耐药性。结论 联合使用真菌培养、PCR,基因克隆和测序技术能有效分析犬真菌。犬的真菌大多为人兽共患病原体。研究结果为我国犬真菌监测提供参考数据,为致病性真菌的侵袭防控提供有效工具。

**关键词:**犬;真菌;监测;药敏分析

中图分类号:R379;R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)04-025-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.04.007

## Monitoring and Antifungal Susceptibility of Canine Fungi in Beijing Region of China

GAO Zheng-qin (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Objective To identify the fungal microbiota (mycobiota) in dogs, analyze the antifungal susceptibility of canine fungi and provide scientific basis for the prevention and control of pathogenic fungal infection in dogs. **Methods** A total of fifty-five dogs with no history of disease in Beijing Region of China were sampled. The canine fungi were detected and identified by means of fungal culture, polymerase chain reaction (PCR), gene cloning and sequencing techniques. Antifungal drug susceptibility test were done on all fungi isolates. **Results** 29 fungi were isolated and characterized. Morphological and molecular identification confirmed these fungi as *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus japonicus*, *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus*, *Rhizomucor variabilis*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Malassezia pachydermatis*, *Chaetomium globosum*, *Talaromyces flavus*, *Phoma multirostrata*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium oxysporum*, *Cladosporium tenuissimum*, *Trichosporon asteroides*, *Trichosporon asahii*, *Candida glabrata*, *Pichia kudriavzevii* and *Issatchenkia orientalis*. The results showed that the species of dog fungi were abundant. 21 species of fungi which belong to 12 genera were got. The genus *Aspergillus*, *Mucor* and *Cladosporium* were dominant in these pathogenic fungi. The determination of the antifungal sensitivity test showed that these fungal strains were resistant to nystatin, miconazole, voriconazole, terbinafine and fluorocytosine. **Conclusion** Combined use of fungal culture, PCR, gene cloning and sequencing technology can effectively analyze the dog fungi. Most of dog fungi were zoonotic pathogens. The results provide reference data for dog fungus monitoring in China and provide effective tool for the prevention and control of pathogenic fungi.

**Keywords:** dog; fungi; monitor; antifungal susceptibility

真菌疾病威胁着人类和动物的健康。在全球范围内,每年至少有150万人死于危及生命的侵袭性真菌病(invasive fungal disease, IFD) (<http://www.gaffi.org/>)<sup>[1]</sup>。犬被广泛用于生物化学、微生物学、病理学、病毒学、药理学、肿瘤学等的研究中。犬群体饲养,容易感染真菌引发疾病,特别是人兽共患真菌病,会影响到实验动物生产和动物实验结果,还会对饲养人员和实验人员造成健康危害。因此,全面了解犬真菌种类和致病性真菌的分布,做好真菌监测分析工作具有重要意义。分离

培养与鉴定是研究犬真菌的基础,随着科技的进步和研究方法的不断改进,以分子生物学为基础的多种技术在各领域中得到大量应用,通过形态学与分子手段相配合的方式成为对真菌的分类地位加以确定的重要方法。本研究联合应用真菌培养、PCR,基因克隆和测序技术,进行犬真菌种类、数量及分布情况调查,为致病性真菌感染、真菌毒素引起的疾病的防治提供有益的参考资料。

### 1 材料与方法

1.1 研究对象 55只犬来自北京地区几个不同

\* 作者简介:高正琴(1976—),女,博士,副研究员,主要从事病原生物学和快检新技术研究,E-mail:gaozhengqin@126.com。

厂家,编号 1011E1~1011E55,活体采集毛发皮屑和直肠拭子<sup>[2]</sup>。

1.2 试剂和仪器 真菌培养基、鉴定试剂和抗真菌药敏片分别购自英国 OXOID 公司和丹麦 ROSCO 公司。DNA 提取和 PCR 扩增回收试剂盒等分子生物学试剂购自日本 TaKaRa 公司。生物安全柜 (Thermo Fisher Scientific, 美国); Verity 96 Thermal Cycler 基因扩增仪 (Applied Biosystem, 美国); Gel Logic 凝胶成像分析系统 (东乐自然基因生命科学公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 真菌分离培养鉴定:在负压生物安全柜内,将采集的样本做特定处理后分别接种沙保氏葡萄糖琼脂斜面、改良马丁琼脂斜面、皮肤病原真菌鉴别琼脂平板,分别置 28℃ 和 35℃ 培养 3~14 天。将分离获得的真菌菌株,划线接种改良马丁琼脂平板、皮肤病原真菌鉴别琼脂平板,分别置 28℃ 和 35℃ 培养 3~14 天。挑取单菌落,接种改良马丁琼脂斜面、改良马丁琼脂平板、皮肤病原真菌鉴别琼脂平板、改良马丁液体培养基,分别置 28℃ 和 35℃

培养 3~14 天。通过观察真菌分离株的生长速度、菌落直径、质地、颜色、形态、气味、菌落反面和可溶性色素、培养基中渗出物的有无等进行大体分类。对每一类典型的菌落进行镜检,观察菌丝和分生孢子形态特征、孢子着生部位及排列方式等,实时动态显微视频摄录存档。参照各种真菌形态描述及检索表,进行真菌菌种的初步鉴定和分类<sup>[3~5]</sup>。对形态学特征不能鉴定到种的真菌结合分子生物学方法鉴定和分类。

1.3.2 DNA 提取:使用通用型基因组 DNA 试剂盒提取真菌 DNA。

1.3.3 引物设计:参考文献<sup>[6~9]</sup>,采用真菌核糖体 DNA (nuclear ribosomal DNA, rDNA) 标记进行真菌分类鉴定,针对真菌核糖体 RNA 基因 (ribosomal RNA gene, rRNA) 小亚基 (small subunit, SSU, 18S)、内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS, ITS1+5.8S+ITS2)、大亚基 (large subunit, LSU, 25~28S) 区域设计普通 PCR 检测引物,见表 1。

表 1

真菌 PCR 引物序列

基 因	引 物	序 列
18S rRNA (SSU)	NS1 forward	5'-GTAGTCATATGCTTGCTC-3'
	NS2 reverse	5'-GGCTGCTGGCACCAGACTGC-3'
Internal transcribed spacer (ITS)	ITS1 forward	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	ITS4 reverse	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
28S rRNA (LSU)	NL1 forward	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
	NLA reverse	5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3'

1.3.4 PCR 体系:PCR 总反应体系为 50  $\mu$ l,包括 10 $\times$  Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus) 5.0  $\mu$ l, dNTP Mixture 4.0  $\mu$ l, 正反向引物各 0.5  $\mu$ l, EX Taq 0.25  $\mu$ l, 模板 DNA 3  $\mu$ l, nuclease-free water 36.75  $\mu$ l。循环参数:94℃ 5 min 1 个循环;94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环;72℃ 5 min 1 个循环。

1.3.5 基因克隆测序鉴定:取真菌 PCR 扩增产物 5  $\mu$ l 进行琼脂糖凝胶电泳。回收纯化目的条带,进行基因克隆测序鉴定。将所获得的犬真菌基因测序数据,在线提交美国国家生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI), 通过 BLAST (Basic Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 进行比对分析,确定真菌种属。

1.3.6 药敏分析:根据美国临床实验室标准化委员会 (national committee for clinical laboratory standard, NCCLS) 的规定,采用纸片扩散法 (K-B

法)进行药敏试验,白色念珠菌 ATCC 64548 作为试验质控株<sup>[10~12]</sup>。将待测真菌在沙保氏培养基上转种,以保证其纯度和活性。采用丹麦 ROSCO 公司的 Neo-Sensitab 抗真菌药敏片:制霉菌素 (nystatin, NYST; 50  $\mu$ g)、两性霉素 B (amphotericin B, AMPHO; 10  $\mu$ g)、氟康唑 (fluconazole, FLZ; 25  $\mu$ g)、益康唑 (econazole, ECONZ; 10  $\mu$ g)、沃尔康唑 (voriconazole, VOR; 1  $\mu$ g)、咪康唑 (miconazole, MICO; 10  $\mu$ g)、酮康唑 (ketoconazole, KETO; 15  $\mu$ g)、克霉唑 (clotrimazole, CLOTRI; 10  $\mu$ g)、氟胞嘧啶 (fluorocytosine, FLU; 10  $\mu$ g)、特比萘芬 (terbinafine, TEB; 30  $\mu$ g)。在负压生物安全柜内,配制 0.5 麦氏单位真菌悬液,用生理盐水作 1:1 稀释,使接种液浓度为  $5 \times 10^5$  CFU (colony-forming unit, 菌落形成单位)/ml。用移液管吸取 0.5 ml 接种液,倾注于改良 SHADOMY 琼脂平板表面,涂布均匀。用无菌眼科镊将含有定量抗真菌药物

的药片贴在已接种待检真菌的琼脂平板表面,并用镊尖轻压一下药片,使其贴平。每个药片的间距不小于24 mm,药片的中心距平板的边缘不小于15 mm,90 mm直径的平板适宜贴6个药片。将贴好药片的平板置35℃培养18~24 h后,用游标卡尺量取抑菌圈直径。药片中所含的药物吸取琼脂中的水分溶解后会不断地向药片周围区域扩散,形成递减的浓度梯度,在药片周围抑菌浓度范围内待检真菌的生长被抑制,从而产生透明的抑菌圈。抑菌圈的大小反映检测真菌对测定药物的敏感程度。根据抑菌圈的大小(不同抗真菌药物其抑菌圈大小的标准不一致),判断为敏感(susceptible, S)、中介(intermediate, I)、耐药(resistant, R)。试验用抗真菌药物结果判定标准如下:制霉菌素(50 μg)抑菌圈直径≥15 mm,判为敏感;抑菌圈直径在10 mm~14 mm之间,判为中介度;无抑菌圈,判为耐药;两性霉素B(10 μg)≥15 mm, S; 10~14 mm, I; <10 mm, R; 氟康唑(25 μg)≥20 mm, S; 12~19 mm, I; ≤11 mm, R; 益康唑(10 μg)≥20 mm, S; 12~19 mm, I; ≤11 mm, R; 沃尔康唑(1 μg)≥14 mm, S; 咪康唑(10 μg)≥20 mm, S; 12~19 mm, I; ≤11 mm, R; 酮康唑(15 μg)≥30 mm, S; 23~29 mm, I; ≤22 mm, R; 克霉唑(10 μg)≥20 mm, S; 12~19 mm, I; ≤11 mm, R; 氟胞嘧啶(10 μg)≥30 mm, S; 23~29 mm, I; ≤22 mm, R; 特比萘芬(30 μg)≥20 mm, S; 12~19 mm, I; ≤11 mm, R。

## 2 结果

**2.1 真菌分离培养鉴定结果** 本研究利用真菌培养法从中国北京地区55只犬中分离获得存活真菌29株,经形态学鉴定为:黄曲霉(*Aspergillus flavus*)2株(1011-E33, 1011-E34)、杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)2株(1011-E2, 1011-E50)、日本曲霉(*Aspergillus japonicus*)1株(1011-E53)、卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)2株(1011-E31、1011-E32)、总状毛霉(*Mucor racemosus*)2株(1011-E41, 1011-E45-2)、多变根毛霉(*Rhizomucor variabilis*)1株(1011-E42)、壳青霉(*Penicillium crustosum*)1株(1011-E45-1)、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)1株(1011-E51)、厚皮马拉塞霉菌(*Malassezia pachydermatis*)1株(1011-E27)、球毛壳霉(*Chaetomium globosum*)2株(1011-E3, 1011-E4)、黄色蠕形霉(*Talaromyces flavus*)1株(1011-E43)、多喙茎点霉(*Phoma multirostrata*)1株(1011-E25)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)1株(1011-E52)、枝状枝孢菌(*Cladosporium cladosporioides*)1株(1011-E14)、尖孢枝孢(*Cladosporium oxysporum*)1株(1011-E28)、极细枝孢

霉(*Cladosporium oxysporum*)1株(1011-E29)、类星形毛孢子菌(*Trichosporon asteroides*)1株(1011-E6)、阿萨希毛孢子菌(*Trichosporon asahii*)1株(1011-E55)、光滑念珠菌(*Candida glabrata*)4株(1011-E44-2, 1011-E46, 1011-E48, 1011-E49)、库德里阿兹威毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)1株(1011-E35)和东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)1株(1011-E44-1)。获得的29株经纯化转种存活的真菌中有8株分离自犬直肠样本27.6%(8/29),21株分离自毛发皮肤样本72.4%(21/29)。犬直肠部位优势真菌(advantage fungi genera)主要为毛孢子菌属和酵母属真菌,毛发皮肤处优势真菌主要为曲霉菌属、毛霉菌属和枝孢菌属真菌。图1显示的是部分真菌菌落生长形态和菌丝孢子的典型特征:杂色曲霉(A, B)、日本曲霉(C, D)、黄曲霉(E, F)、黄色蠕形霉(G, H)、球毛壳霉(I, J)、厚皮马拉塞霉菌(K, L)、卷枝毛霉(M, N)、总状毛霉(O, P)、枝状枝孢菌(Q, R)、尖孢枝孢(S, T)、尖孢镰刀菌(U, V)、光滑念珠菌(W, X)。

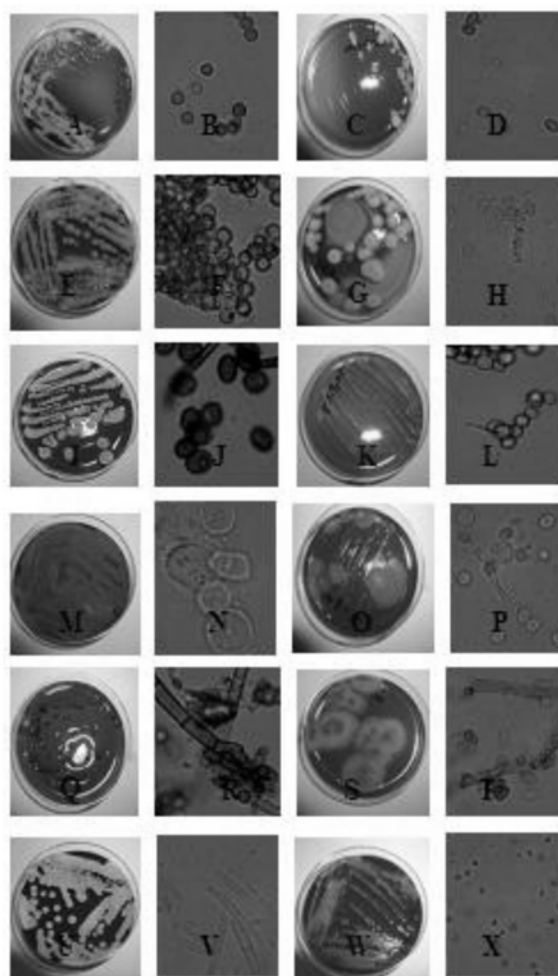


图1 犬真菌培养特性和形态照片

**2.2 真菌PCR、基因克隆及测序鉴定** 采用真菌PCR检测犬真菌,PCR扩增产物经1.5 g/dl琼脂

糖凝胶电泳检测,选取电泳条带单一、明亮的 PCR 产物,回收纯化后进行基因克隆、序列测定。将测得的基因序列采用 Blast 程序与 GenBank 中已公布的相关真菌的基因序列进行同源性比对,找出最相近的序列信息,确定大致分类地位。当序列相似性 $>99\%$ 时,真菌菌株被鉴定到种的水平;相似性 $<99\%$ 时,鉴定到属的水平;而相似性 $<95\%$ 时,则不能被鉴定。部分生长不良及形态特征难以分辨的真菌菌株结合真菌基因克隆测序结果比对分析核实。表 2 结果显示:获得的 29 株犬真菌分离菌株核糖体基因序列与 GenBank 中序列核苷酸同源率为 $99\% \sim 100\%$ 。本研究发现犬真菌分布于 12 属 21 种,其中:念珠菌属(*Candida*)1 种(光滑念珠菌 4 株)、酵母属 2 种(库德里阿兹威毕赤酵母 1 株、东方伊萨酵母 1 株)、毛孢子菌属(*Trichosporon*)2 种(阿萨希毛孢子菌 1 株、类星形毛孢子菌 1 株)、曲霉属(*Aspergillus*)3 种(黄曲霉 2 株、杂色曲霉 2 株、日本曲霉 1 株)、毛霉菌属(*Mucor*)3 种(卷枝毛霉 2 株、总状毛霉 2 株、多变根毛霉 1 株)、青霉菌属(*Penicillium*)2 种(壳青霉 1 株、产黄青霉 1 株)、毛壳属(*Chaetomium*)1 种(球毛壳霉 2 株)、马拉塞霉属(*Malassezia*)1 种(厚皮马拉塞霉菌 1 株)、蓝状菌属(*Talaromyces*)1 种(黄色蠕形霉 1 株)、茎点霉属(*Phoma*)1 种(多喙茎点霉 1 株)、镰刀菌属(*Fusarium*)1 种(尖孢镰刀菌 1 株)、枝孢菌属(*Cladosporium*)3 种(枝状枝孢菌 1 株、尖孢枝孢 1 株、极细枝孢霉 1 株)。分子鉴定结果表明,犬真菌多样性比较丰富,曲霉属、毛霉菌属、枝孢菌属真菌在这些致病真菌中占主导地位。

poron)2 种(阿萨希毛孢子菌 1 株、类星形毛孢子菌 1 株)、曲霉属(*Aspergillus*)3 种(黄曲霉 2 株、杂色曲霉 2 株、日本曲霉 1 株)、毛霉菌属(*Mucor*)3 种(卷枝毛霉 2 株、总状毛霉 2 株、多变根毛霉 1 株)、青霉菌属(*Penicillium*)2 种(壳青霉 1 株、产黄青霉 1 株)、毛壳属(*Chaetomium*)1 种(球毛壳霉 2 株)、马拉塞霉属(*Malassezia*)1 种(厚皮马拉塞霉菌 1 株)、蓝状菌属(*Talaromyces*)1 种(黄色蠕形霉 1 株)、茎点霉属(*Phoma*)1 种(多喙茎点霉 1 株)、镰刀菌属(*Fusarium*)1 种(尖孢镰刀菌 1 株)、枝孢菌属(*Cladosporium*)3 种(枝状枝孢菌 1 株、尖孢枝孢 1 株、极细枝孢霉 1 株)。分子鉴定结果表明,犬真菌多样性比较丰富,曲霉属、毛霉菌属、枝孢菌属真菌在这些致病真菌中占主导地位。

表 2

犬真菌测序分析

真 菌	分离点	种	同源性	基因库登记号
1011-E2	Fur	<i>Aspergillus versicolor</i>	498/498(100%)	MF576084.1
1011-E3	Fur	<i>Chaetomium globosum</i>	500/500(100%)	MG649257.1
1011-E4	Fur	<i>Chaetomium globosum</i>	500/500(100%)	KY283796.1
1011-E6	Rectum	<i>Trichosporon asteroides</i>	452/452(100%)	KJ531962.1
1011-E14	Fur	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	473/473(100%)	MG873079.1
1011-E25	Fur	<i>Phoma multirostrata</i>	473/473(100%)	KR709058.1
1011-E27	Fur	<i>Malassezia pachydermatis</i>	697/697(100%)	KU313713.1
1011-E28	Fur	<i>Cladosporium oxysporum</i>	473/473(100%)	MF135506.1
1011-E29	Fur	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	473/473(100%)	MG873079.1
1011-E31	Fur	<i>Mucor circinelloides</i>	560/562(99%)	MG519711.1
1011-E32	Fur	<i>Mucor circinelloides</i>	562/562(100%)	JN315009.1
1011-E33	Fur	<i>Aspergillus flavus</i>	485/485(100%)	MG647837.1
1011-E34	Fur	<i>Aspergillus flavus</i>	525/526(99%)	MF167358.1
1011-E35	Rectum	<i>Pichia kudriavzevii</i>	471/471(100%)	MG857635.1
1011-E41	Fur	<i>Mucor racemosus</i>	562/562(100%)	MF521958.1
1011-E42	Fur	<i>Rhizomucor variabilis</i>	557/562(99%)	KM205636.1
1011-E43	Fur	<i>Talaromyces flavus</i>	471/471(100%)	KM063208.1
1011-E44-1	Rectum	<i>Issatchenkia orientalis</i>	471/471(100%)	FM199965.1
1011-E44-2	Rectum	<i>Candida glabrata</i>	693/693(100%)	KX450837.1
1011-E45-1	Fur	<i>Penicillium crustosum</i>	562/562(100%)	JN226961.1
1011-E45-2	Fur	<i>Mucor racemosus</i>	562/562(100%)	KX349462.1
1011-E46	Rectum	<i>Candida glabrata</i>	693/693(100%)	KY963096.1
1011-E48	Rectum	<i>Candida glabrata</i>	693/693(100%)	KP765019.1
1011-E49	Rectum	<i>Candida glabrata</i>	693/693(100%)	KM065474.1
1011-E50	Fur	<i>Aspergillus versicolor</i>	550/550(100%)	MG589600.1
1011-E51	Fur	<i>Penicillium chrysogenum</i>	515/517(99%)	KY352035.1
1011-E52	Fur	<i>Fusarium oxysporum</i>	484/484(100%)	KY305290.1
1011-E53	Fur	<i>Aspergillus japonicus</i>	516/516(100%)	MF073328.1
1011-E55	Rectum	<i>Trichosporon asahii</i>	452/452(100%)	KY963115.1

### 2.3 药敏分析结果 部分真菌抗真菌药物敏感性

试验结果见表 3。类星形毛孢子菌(1011-E6)、厚

皮马拉塞霉菌(1011-E27)、卷枝毛霉(1011-E31)、黄曲霉(1011-E33, 1011-E34)、库德里阿兹威毕赤酵母(1011-E35)、多变根毛霉(1011-E42)、黄色蠕形霉(1011-E43)、阿萨希毛孢子菌(1011-E55), 结

果显示, 这些真菌对制霉菌素、咪康唑、沃尔康唑、特比萘芬、氟胞嘧啶等抗真菌药物已经产生了耐药性。

表 3 犬真菌药敏试验

Item	AMPHO	NYST	KETO	MICO	CLOTRI	ECONZ	FLZ	VOR	TEB	FLU
1011-E6	25,S	0,R	0,R	0,R	25,S	32,S	25,S	12,R	20,S	20,R
1011-E27	20,S	10,I	60,S	20,S	30,S	30,S	30,S	30,S	65,S	14,R
1011-E31	30,S	0,R	60,S	0,R	20,S	30,S	30,S	12,R	0,R	20,R
1011-E33	30,S	0,R	50,S	15,I	25,S	25,S	20,I	20,S	0,R	20,R
1011-E34	20,S	15,S	65,S	25,S	30,S	30,S	30,S	30,S	60,S	20,R
1011-E35	30,S	0,R	0,R	15,I	30,S	40,S	40,S	0,R	30,S	30,S
1011-E42	0,R	0,R	0,R	17,I	0,R	0,R	0,R	20,S	0,R	0,R
1011-E43	0,R	0,R	0,R	15,I	0,R	0,R	0,R	20,S	0,R	0,R
1011-E55	20,S	0,R	20,R	0,R	20,S	40,S	30,S	20,S	35,S	30,S

注: S 指敏感("S" means susceptible); R 指耐药("R" means resistant); I 指中介("I" means intermediate)。

3 讨论 目前, 国内外尚未见有关犬真菌监测分析的报道, 犬致病性真菌的研究信息更少。因此, 本研究调查分析了犬携带的真菌, 识别了致病性真菌, 填补了这一研究空白。本次调查中, 犬真菌总的感染率(至少检出一种真菌的百分比)为 52.7% (29/55)。共发现了 12 属 21 种不同的真菌, 其中: 曲霉属、毛霉属、枝孢菌属出现频率较高, 为优势属, 它们大多为人兽共患病病原体<sup>[13~15]</sup>。犬曲霉属、毛霉属、枝孢菌属感染率很高(分别为 9.09%, 9.09% 和 5.45%), 主要为黄曲霉、杂色曲霉、日本曲霉、卷枝毛霉、总状毛霉、多变根毛霉、枝状枝孢菌、尖孢枝孢和极细枝孢霉。黄曲霉毒素的靶器官是肝脏, 产生肝细胞毒和免疫抑制<sup>[16]</sup>。杂色曲霉导致犬播散性感染的致死罕见病例表现为脊椎炎、骨髓炎和肾盂肾炎<sup>[17]</sup>。多变根毛霉感染引起毛霉病, 造成局部皮肤黏膜严重破坏, 可深达骨组织, 病程漫长可达十余年<sup>[18]</sup>。本研究犬光滑念珠菌感染率较高(7.27%), 光滑念珠菌是人类最常见的致病真菌之一, 可导致严重的复发性念珠菌病<sup>[19]</sup>。本研究犬毛孢子菌感染率为 3.63%。毛孢子菌是人类的新机会性病原体。在免疫功能低下的患者中, 阿萨希毛孢子菌和类星形毛孢子菌是引起播散性疾病的最重要的物种, 而对阿萨希毛孢子菌的吸入是健康个体中夏季型高敏性肺炎的最重要原因<sup>[20]</sup>。球毛壳霉可引起甲真菌病<sup>[21]</sup>。厚皮马拉塞霉菌感染犬可引起皮炎、中耳炎, 对人类早产儿和免疫缺陷成年人易导致系统性血源性感染<sup>[22]</sup>。尖孢镰刀菌导致癌症儿童导管相关感染<sup>[23]</sup>。

诊断侵袭性真菌感染的最高确定性是由活检或针吸活检的组织中存在的真菌确定<sup>[24]</sup>。传统的

真菌鉴定主要是以形态学为根据, 而形态特征受营养基质和温、湿、光、时间、pH 等条件的影响, 易发生变异(形态、菌落、色素、毒力), 有些真菌因环境条件改变, 可由一种形态转变为另一种形态, 难以准确鉴定到种。仅从形态学上难以区分阿萨希毛孢子菌与类星形毛孢子菌, 而杂色曲霉、日本曲霉等在真菌培养基上生长状态欠佳, 本研究通过提取这些真菌 DNA 后进行 PCR 扩增、基因克隆、测序鉴定, 经在线序列比对分析, 能够快速准确将真菌区分为属和种, 提示形态学方法结合分子生物学技术相互补充, 可简单快速精准做好真菌物种的鉴定。本研究真菌药物敏感性试验结果显示, 这些真菌已经对制霉菌素、咪康唑、沃尔康唑、特比萘芬、氟胞嘧啶等抗真菌药物产生了耐药性。由此可见, 及时进行真菌培养和药敏试验, 及早明确病原学诊断和对抗真菌药物的敏感性, 正确选用抗真菌药物是防制致病性真菌感染成功的关键。

综上所述, 本研究联合应用真菌培养、PCR, 基因克隆和测序技术, 以形态学特征为基本分类依据, 通过靶基因序列测定、比较和分析, 准确鉴定犬真菌, 研究犬真菌多样性丰富性, 获得了较为全面的结果, 充实了犬真菌种子库。通过对真菌 rDNA 进行分析, 为纯/混合培养、复合样本中在形态学的基础上很难分离的毛孢子菌属、曲霉属真菌的区分提供了一种简便快速工具。今后, 我们还将进一步应用宏基因组和高通量测序分析技术, 对犬中可能存在但用现行培养方法无法获得的真菌(主要为深部真菌)展开深入调查研究, 获得更多更全面的关于犬真菌多样性的数据, 为真菌致病性研究和相关疫病防制提供科学参考依据。

## 参考文献:

- [1] Brown GD, Denning DW, Gow NA, et al. Hidden killers: human fungal infections [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(165):165rv113.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T14926. 4-2001 实验动物·皮肤病病原真菌检测方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2001.  
General Administration of Quality Supervision Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T14926. 4-2001 Laboratory animal. Method for examination of pathogenic dermal fungi[S]. Beijing: China Standard Press, 2001.
- [3] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1979.  
Wei JC. Handbook of Fungi Identification[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1979.
- [4] 王端礼. 医学真菌学:实验室检验指南[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005.  
Wang DL. Medical Mycology-Guide to Laboratory Examination[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2005.
- [5] 高正琴, 岳秉飞. 中国新疆灰仓鼠真菌多样性[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(7):709-717.  
Gao ZQ, Yue BF. Diversity of fungi derived from the cricetus migratorius from the Xinjiang region of China[J]. *Chin J Zoonoses*, 2014, 30(7):709-717.
- [6] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al, editors. PCR Protocols: a guide to methods and application. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [7] Fliegerová K, Mrázek J, Voigt K. Differentiation of anaerobic polycentric fungi by rDNA PCR-RFLP[J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2006, 51(4):273-277.
- [8] O'Donnell K. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*) [J]. *Curr Genet*, 1992, 22(3):213-220.
- [9] Dagar SS, Kumar S, Mudgil P, et al. D1/D2 domain of large subunit ribosomal DNA for differentiation of *Orpinomyces* spp[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(18):6722-6725.
- [10] National Committee for Clinical Laboratory Standards. M44-A Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline [S]. Wayne, PA: NCCLS M44-A, 2004.
- [11] Espinel-Ingroff A, Canton E, Fothergill A, et al. Quality control guidelines for amphotericin B, itraconazole, posaconazole, and voriconazole disk diffusion susceptibility tests with nonsupplemented Mueller-Hinton Agar (CLSI M51-A document) for nondermatophyte filamentous fungi[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(7):2568-2571.
- [12] 高正琴, 岳秉飞. 白色念珠菌 TaqMan-小沟结合物探针实时荧光定量聚合酶链式反应快速检测及抗真菌药物敏感性分析[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 1071-1080.
- [13] Gao ZQ, Yue BF. Rapid detection of *Candida albicans* by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction using TaqMan-minor groove binder probe and analysis of antifungal susceptibility [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(6):1071-1080.
- [14] Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2001, 356(1411):983-989.
- [15] Woolhouse ME, Gowtage-Sequeria S. Host range and emerging and reemerging pathogens[J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(12):1842-1847.
- [16] 于恩庶, 黄丰, 潘亮, 等. 当今人兽共患病病原体分类[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(6):485-492.
- [17] Yu ES, Huang F, Pan L, et al. Zoonotic pathogens species[J]. *Chin J Zoonotic*, 2006, 22(6):485-492.
- [18] Egbuta MA, Mwanza M, Babalola OO. Health risks associated with exposure to filamentous fungi[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14(7):719-736.
- [19] Zhang S, Corapi W, Quist E, et al. *Aspergillus versicolor*, a new causative agent of canine disseminated aspergillosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(1):187-191.
- [20] Abuali MM, Posada R, Del Toro G, et al. *Rhizomucor variabilis* var. *regularior* and *Hormographiella aspergillata* infections in a leukemic bone marrow transplant recipient with refractory neutropenia[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(12):4176-4179.
- [21] Rodrigues CF, Henriques M. Oral mucositis caused by *Candida albicans* biofilms: failure of the concomitant use of fluconazole and ascorbic acid[J]. *Ther Adv Infect Dis*, 2017, 4(1):10-17.
- [22] Davies GE, Thornton CR. Differentiation of the emerging human pathogens *Trichosporon asahii* and *Trichosporon asteroides* from other pathogenic yeasts and moulds by using species-specific monoclonal antibodies[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e84789.
- [23] Kim DM, Lee MH, Suh MK, et al. Onychomycosis caused by *Chaetomium globosum* [J]. *Ann Dermatol*, 2013, 25(2):232-236.
- [24] Morris DO, Shea KO, Shofer FS, et al. *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners[J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(1):83-88.
- [25] Carlesse F, Amaral AC, Goncalves SS, et al. Outbreak of *Fusarium oxysporum* infections in children with cancer: an experience with 7 episodes of catheter-related fungemia[J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2017, 6:93.
- [26] Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: An international consensus [J]. *Clin Infect Dis*, 2002, 34(1):7-14.