

239 例外耳道真菌病的真菌菌种分布 及药敏检测结果分析

彭丹¹, 毛承刚¹, 孙毅², 孔梦丹¹, 沈敏¹

(长江大学附属荆州医院 荆州市中心医院 1. 耳鼻咽喉头颈外科; 2. 皮肤科, 湖北 荆州 434020)

摘要: **目的** 研究外耳道真菌病的真菌菌种分布及检测致病菌对抗真菌药物的敏感性。**方法** 本实验收集 2020 年 4 月—2021 年 11 月, 在荆州市中心医院耳鼻咽喉科门诊进行治疗的 239 例临床诊断为外耳道真菌病患者, 对外耳道分离物, 通过真菌形态学检查、沙氏葡萄糖固体培养基 (SDA) 行真菌培养、DNA 提取、ITS 区 PCR 扩增及测序等行真菌菌种确定。行最低抑菌浓度 (MIC) 试验确定联苯苄唑 (PCB)、特比萘芬 (TRB)、克霉唑 (CLO) 和伊曲康唑 (ITR) 4 种常见抗真菌药物的 MIC。**结果** 本地区大部分外耳道真菌病致病菌为曲霉属, 其中最常见的是土曲霉, 其次为黑曲霉、黄曲霉, 少部分为念珠菌。大多数引起外耳道真菌病的致病菌对 PCB 和 CLO 耐药 (MIC > 16 $\mu\text{g/mL}$), 绝大多数致病菌对 TRB 和 ITR 敏感。因此在治疗外耳道真菌病时应首选 ITR 和 TRB 类药物。**结论** 外耳道真菌病最常见的真菌致病菌属是曲霉属和念珠菌。ITR 和 TRB 是治疗外耳道真菌病的首选药物。

关键词: 外耳道真菌病; 菌种分布; 药物敏感性试验; 抗真菌药

中图分类号: R764.1⁺1

Analysis of fungal distribution and drug susceptibility test in 239 cases of otomycosis

PENG Dan¹, MAO Chenggang¹, SUN Yi², KONG Mengdan¹, SHEN Min¹

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Jingzhou Hospital Affiliated to Yangtze University, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434020, China; 2. Department of Dermatology, Jingzhou Hospital Affiliated to Yangtze University, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434020, China)

Abstract: **Objective** To study the distribution of fungal species in otomycosis and detect the drug sensitivity of pathogenic bacteria to antifungal drugs. **Methods** In this study, 239 patients with otomycosis were collected, who were treated in Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Jingzhou Central Hospital from April 2020 to November 2021. Fungal species were identified by morphological examination, sand glucose solid medium (SDA) for fungal culture, DNA extraction, PCR amplification and sequencing in ITS region. Minimum inhibitory concentration (MIC) of bibenbenazole (PCB), terbinafine (TRB), clotrimazole (CLO) and itraconazole (ITR) were determined by minimum inhibitory concentration test. **Results** Most of the pathogenic bacteria was Aspergillus in otomycosis. Aspergillus terreus was the most common pathogen of otomycosis, followed by Aspergillus Niger, Aspergillus flavus and candida. Most of the pathogenic bacteria causing otomycosis were resistant to PCB and CLO (MIC > 16 $\mu\text{g/mL}$), and most of the pathogenic bacteria were sensitive to TRB and ITR. Therefore, ITR and TRB drugs should be the first choice in the treatment of otomycosis. **Conclusions** Aspergillus and Candida are the most common fungal pathogens of otomycosis. ITR and TRB are the first choice drugs for the treatment of otomycosis.

Keywords: Otomycosis; Species distribution; Drug susceptibility test; Antifungal drugs

外耳道真菌病, 也称为真菌性外耳道炎, 是真菌病原体侵袭浅表皮肤的感染性疾病, 主要累及外耳

道, 占有外耳道炎的 9% ~ 27%^[1], 当患者伴有鼓膜穿孔或合并其他基础性疾病时也可引起中耳腔的

基金项目: 长江大学医学科研联合发展基金 (WJ2019-34)。
第一作者简介: 彭丹, 女, 在读硕士研究生, 住院医师。
通信作者: 毛承刚, Email: 22101163@qq.com

感染^[2]。外耳道真菌病在热带及湿热地区发病率较高,常见诱发因素有气候(湿热环境)、外耳道炎、皮肤真菌病、耳部水接触史、外耳机械性损伤及机体免疫力低下或局部使用类固醇制剂等。临床表现为耳痒、耳痛、耳漏、耳胀满感、听力障碍和耳鸣等^[3]。虽然外耳道真菌病很少危及患者生命,但由于其高复发率和对抗真菌药耐药,因此对于临床工作也是一个极大的挑战。识别真菌病原体 and 易感因素对于治疗此类疾病的成功和预防复发很重要^[4]。本研究针对收集的本地区诊断为外耳道真菌病患者的外耳道分泌物或碎片,进行真菌形态学检测、真菌培养、DNA提取和ITS区PCR扩增DNA测序对菌种进行鉴定,行最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)试验判断常用抗真菌药物的耐药性,以指导临床用药。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本实验收集2020年4月—2021年11月就诊于荆州市中心医院确诊为外耳道真菌病的239例患者的外耳道分泌物或碎屑,经外耳道真菌分离最终检测证实主要为曲霉菌属和念珠菌属。本实验已通过荆州市中心医院伦理委员会批准并获得所有患者的知情同意。

1.2 实验方法

1.2.1 真菌镜检及真菌培养 将分离的外耳道真菌标本取样至于载玻片上,荧光染液染色(江苏莱美时代生物科技公司, I型/200T)后荧光显微镜(广州明美 MF23)观察真菌菌丝及芽生孢子。将另一部分标本通过无菌棉签涂布于添加了含0.05 mg/mL的氨苄青霉素(ampicillin, AMP)的沙氏葡萄糖固体培养基(sand glucose solid medium, SDA),置于35℃温箱中培养3~5 d,观察菌落性状,初步判断真菌菌种。

1.2.2 分子鉴定 取培养好的分离物利用真菌提取试剂盒(Omega D3390-02 Fungal DNA Kit 真菌DNA小量提取试剂盒)提取真菌DNA,通过使用引物ITS1(5-tccgtaggtgaacctgcgg-3)和ITS4(5-tccgtaggtgaacctgcgg-3)对分离的基因进行聚合酶链式反应(PCR),扩增分离物的ITS区。将扩增好的产物进行琼脂糖凝胶电泳。利用紫外线分析仪对电泳后的琼脂糖凝胶进行分析,将有条带的产物送往生工生物工程有限公司(武汉分公司)进行序列测定,鉴定

分离株。获得的序列结果与genbank已知数据(blast; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)进行比对,确定真菌菌种。

1.2.3 体外药物敏感性试验 所有的曲霉分离株依据美国临床实验室标准委员会提出的M38-A3文件^[5]中所述的微量肉汤稀释法进行测试。本实验选用4种临床上常用的抗真菌药物:联苯苄唑(bibenbenzazole, PCB)、克霉唑(clotrimazole, CLO)、特比奈芬(terbinafine, TRB)和伊曲康唑(itraconazole, ITR)进行体外药物敏感性试验。

将4种药物使用分析纯二甲基亚砷溶解成浓度为6 400 mg/L的药液。4种药物均购买自美国sell-eck公司。随后按照M38-A3文件^[5],利用标准RIMP1640液体培养基,配置4种药物的单药96孔药敏板。其中PCB、CLO配置成抗菌剂浓度为0.125~16 μg/mL,8个浓度梯度药敏板^[5];TRB、ITR配置成抗菌剂浓度为0.062 5~8 μg/mL,8个浓度梯度药敏板^[5]。每个药敏板设置1组空白对照。

将培养好的外耳道真菌分离菌株,在无菌生理盐水中稀释,通过血细胞计数板对稀释过的菌液中的分生孢子进行定量测定。随后在RPMI1460液体培养基中将悬浮液最终接种浓度调整为(0.4~5)×CFU/mL。向配置好的4种药物的药敏板中加入定量的菌液,放置于35℃恒温培养箱中培养46~50 h。MIC判断方法参照M38-A3文件^[5],即在视觉上确定为抑制可识别生长的药物的最低浓度(100%抑制)。每种分离菌株进行两次相同的药物敏感性实验,以减少实验误差。C. parapsilosis ATCC 22019作为质量控制和参考菌株,用以保证药敏板质量^[5]。

1.3 数据分析

所有获得的实验数据通过IBM SPSS 21.0软件进行数据分析。使用描述性统计(平均值、标准差、中位数)分析临床和人口统计数据。所获得耐药株数量占真菌数量的百分比为耐药率。

2 结果

2.1 外耳道真菌病患者临床特点

确诊为外耳道真菌病的患者在耳内镜下可见真菌碎片或附着有白色或黑色、棉状或油脂状碎屑分泌物。239例患者中,男140例,女99例;年龄0.3~79岁,平均年龄(39.72±13.33)岁,其中30~39岁占比最多(26.78%),其次为40~49岁

(24.67%),只有 1 例(0.42%)<10 岁;大部分病程<3 个月(82.43%),平均病程 1.46 个月。见图 1、2。

2.2 真菌培养及鉴定

分离的外耳道真菌菌株通过荧光染色后在荧光显微镜下可观察到大量真菌菌丝及芽生孢子。外耳道分离真菌在 SDA 上培养 3~5 d 后可观察呈现不同表观。具体结果见图 3、4。

239 例患者的分离菌株中 222 例为曲霉菌,其中有 138 例经培养测序确定为土曲霉(57.74%),其次为黄曲霉(20.50%)、黑曲霉(10.88%)。17 例经培养测序确定为念珠菌(7.11%)。具体结果见表 1。

2.3 药物敏感性实验

表 2、3 列出了 239 例(株)分离菌株中 222 例(株)曲霉菌属对 4 种抗真菌药物的药物敏感性实验结果以及各抗真菌药物对实验菌株总的耐药率结果。在 222 例实验菌株中,外耳道真菌病致病菌株对 PCB 和 CLO 耐药(MIC>16 μg/mL)率高,分别为 31.08% 和 31.53%。分别有 1 株实验菌株对 TRB 和 ITR 表现为耐药(MIC>8 μg/mL),耐药率

为 0.45%(表 2)。

在 239 株分离株中,黄曲霉对 PCB 耐药率最高,高达 85.71%,除样本量<10 例的烟曲霉和花斑曲霉外,黄曲霉对 CLO 耐药率(36.75%)最高。仅有 1 例土曲霉表现为对 TRB 耐药(>8 μg/mL),耐药率 0.72%,无黄曲霉、黑曲霉、烟曲霉及花斑曲霉表现为对 TRB 耐药。仅有 1 例黑曲霉表现为对 ITR 耐药(>8 μg/mL),耐药率 3.85%,无土曲霉、黄曲霉、烟曲霉及花斑曲霉表现为对 ITR 耐药。具体数据见表 3。

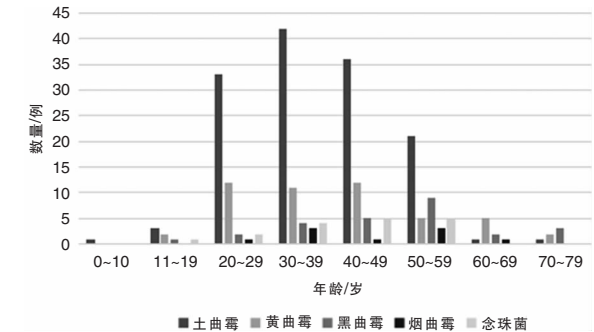


图 1 不同年龄段外耳道真菌病患者菌种分布图

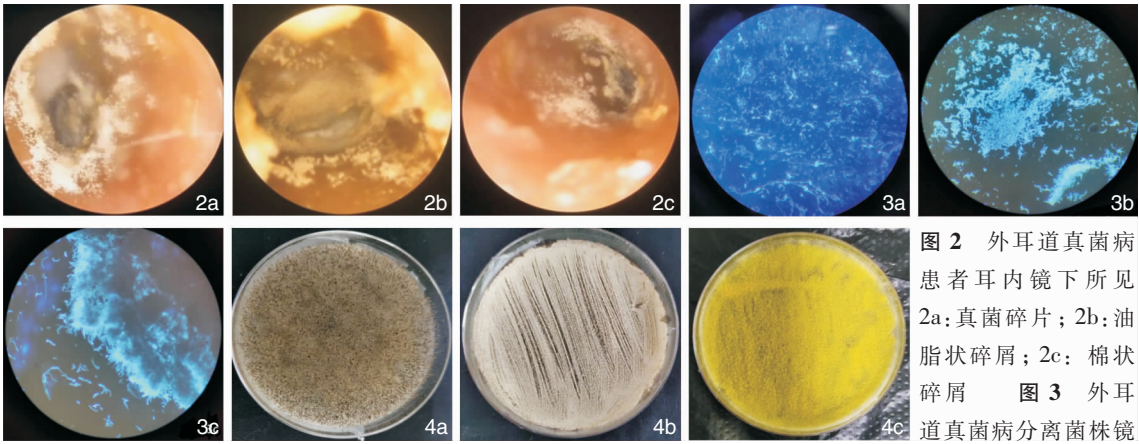


图 2 外耳道真菌病患者耳内镜下所见 2a:真菌碎片;2b:油脂状碎屑;2c:棉状碎屑 图 3 外耳道真菌病分离菌株镜下所见 (免疫荧光×40) 3a:散在菌丝;3b:散在菌丝及孢子;3c:层叠状菌丝 图 4 分离菌株在 SDA 上培养情况 4a:黑曲霉;4b:土曲霉;4c:黄曲霉 注:SDA(沙氏葡萄糖固体培养基)。

表 1 外耳道真菌病患者分离真菌菌种分布 (株,%)

菌种	数量	占比
土曲霉	138	57.74
黄曲霉	49	20.50
黑曲霉	26	10.88
念珠菌	17	7.11
烟曲霉	8	3.35
花斑曲霉	1	0.42
合计	239	100.00

表 2 222 例实验菌株中 4 种抗真菌药物总耐药率 (株,%)

临床因素	PCB	CLO	TRB	ITR
耐药株	69	70	1	1
耐药率	31.08	31.53	0.45	0.45

注:PCB(联苯苄唑);CLO(克霉唑);TRB(特比奈芬);ITR(伊曲康唑)。下同。

表 3 分离菌株对 4 种抗真菌药物 MIC 及耐药率 (株,%)

菌种	药物	MIC($\mu\text{g/mL}$)										合计	耐药率
		0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	>8	16	>16	
土曲霉	PCB		1	18	18	33	18	16	8		6	20	138
	CLO		1	19	51	21	5		1			40	28.99
	TRB	7	58	50	14	6	1			1			0.72
	ITR		4	24	41	39	30						0.00
黄曲霉	PCB			1		5		1				42	49
	CLO			2	5	12	12					18	36.73
	TRB	28	8	5	5	2	1						0.00
	ITR		2	7	11	14	12	2	1				0.00
黑曲霉	PCB				1	7	2	6	5			5	26
	CLO					1	13	3			1	8	30.77
	TRB	5	9	9	3								0.00
	ITR		1		1	10	13			1			3.85
烟曲霉	PCB					5					1	2	8
	CLO			1	4							3	37.50
	TRB				1	4	2	1					0.00
	ITR			4	2	1	1						0.00
花斑曲霉	PCB					1							1
	CLO											1	100.00
	TRB					1							0.00
	ITR			1									0.00

注:MIC(最低抑菌浓度)。

3 讨论

外耳道真菌病属于耳鼻咽喉科的常见疾病,是一种侵袭外耳道皮肤的浅部真菌感染,极易复发^[6]。本课题统计仅发现 1 例小于 10 岁的儿童患者,可能与本次收集的时间段有关,且所有年龄段均有受累。大于 80% 的患者发病年龄为 30 ~ 60 岁,这与之前的发现相似^[1,7]。在有完整临床资料的 180 例患者中仅 2 例伴糖尿病,其余患者均无明显基础疾病,表明外耳道真菌病常累及免疫功能正常的患者。本研究中所涉及到的 2 例糖尿病患者均表现为复发,推测带有基础疾病的患者复发率要高于免疫功能正常的患者,其他研究有类似结果报道^[8-9]。在既往的研究中,女性外耳道真菌病的发病率高于男性^[8],这与本研究的结果不同。

有学者研究发现,在我国北方地区外耳道真菌病常见的致病菌种依次为黑曲霉、土曲霉、黄曲霉和烟曲霉^[10];我国西部地区最常见的致病菌种则为土曲霉、烟曲霉、黑曲霉和黄曲霉^[11];我国南方地区最常见的致病菌则为黑曲霉、土曲霉、黄曲霉以及少量念珠菌^[12]。国外的学者研究表明,伊朗地区常见的致病菌依次为黑曲霉、白色念珠菌以及烟曲霉^[13];西班牙常见致病菌则为烟曲霉、土曲霉、黄曲霉以及

黑曲霉^[14]。本实验鉴定出本地区常见致病菌依次为土曲霉、黄曲霉、黑曲霉、烟曲霉以及念珠菌。不同地区主要致病菌略有差异,考虑与不同地区地理环境、气候条件以及风土习俗相关。

抗真菌药物体外药物敏感性试验表明曲霉对 PCB 和 CLO 均呈现较高的耐药率,尤其是黄曲霉。在本地区常见致病菌中,黄曲霉对 PCB 和 CLO 的耐药率均为最高的。我们考虑与黄曲霉在自然界中分布最为普遍、接触抗真菌药物可能性最高有关。实验中所涉及的曲霉对 TRB 和 ITR 耐药率极低,239 例中,只有 1 例对两种药物表现为耐药。这与其他研究结果相似^[10-13]。

在本课题中我们发现外耳道真菌病患者常合并鼓膜穿孔。有文献报道^[15],大多数穿孔位于锤骨柄附近,其原因考虑是毗邻血管中真菌性血栓形成,导致鼓膜缺血性坏死。另有研究表明^[8],外耳道真菌病患者中鼓膜穿孔发生率约为 10%,并不属于罕见的并发症。考虑可能和以下原因相关:外耳道真菌病继发鼓膜穿孔的发现主要基于临床诊疗,由于外耳道真菌病患者外耳道有大量分泌物及碎屑,需要在耳内镜下清除干净后才能完全窥清鼓膜;其次,并发的鼓膜穿孔通常很小,难以检测;最后,通常认为鼓膜穿孔与外伤和化脓性中耳炎相关性较大,而外耳道真菌病并发鼓膜穿孔患者的表现又与化脓性中

耳炎类似^[16]。根据以上原因,需要我们在临床诊疗过程中更多关注,否则容易出现误诊。

外耳道分泌物或碎屑真菌培养阳性是诊断外耳道真菌病的金标准^[10-13]。确定真菌菌种以及进行体外药物敏感性试验,针对性选用抗真菌药物是治疗外耳道真菌病、防止抗真菌药物滥用和防止耐药菌产生最好的办法。但由于培养时间长、检测手段匮乏,以上方案在临床中应用比较困难。临床目前对于外耳道真菌病的诊断和治疗主要依靠临床医生的经验。因此有相关研究提出^[17],利用多重PCR技术,不需行外耳道分泌物、碎屑培养而直接对相关标本进行分子测序,判断菌种,可以准确快速诊断外耳道真菌病。其次,有报道提出^[18],利用计算机深度学习软件在分析和学习大量耳内镜图片的前提下可以对外耳道相关疾病进行较高准确率和客观的诊断。因此不同地区进行外耳道真菌病致病菌种检测以及体外药物敏感性试验,对于当地外耳道真菌病的诊疗、抗真菌药物的选择具有较强的指导意义。

综上所述,准确诊断外耳道真菌病,选用合适的抗真菌药物,对于外耳道真菌病的治疗至关重要。在本地区,外耳道真菌病最常见的致病菌种为土曲霉,其次为黄曲霉、黑曲霉等。致病菌株对PCB和CLO耐药率高,对TRB、ITR耐药率极低。因此,在临床诊疗过程中,可首选含有TRB及ITR类的药物。

参考文献:

- [1] Alarid-Coronel J, Celis-Aguilar E, Escobar-Aispuro L, et al. Otomycosis in immunocompetent patients: Clinical and mycological features. Our experience with 40 cases [J]. Clin Otolaryngol, 2018, 43(1): 373–377.
- [2] Abastabar M, Haghani I, Ahangarkani F, et al. Candida auris otomycosis in Iran and review of recent literature [J]. Mycoses, 2019, 62(2): 101–105.
- [3] 方秀玲, 林功标, 林伟, 等. 103例外耳道真菌病的诊疗分析 [J]. 中华耳科学杂志, 2019, 17(5): 727–731.
- [4] Jimenez-Garcia L, Celis-Aguilar E, Díaz-Pavón G, et al. Efficacy of topical clotrimazole vs. topical tolnaftate in the treatment of otomycosis. A randomized controlled clinical trial [J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2020, 86(3): 300–307.
- [5] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.
- [6] 马新军, 汪晓静. 曲安奈德益康唑乳膏联合莫匹罗星软膏治疗外耳道真菌病的临床分析 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志 2022, 28(1): 103–105.

- [7] Chen YC, Kuo SF, Wang HC, et al. Azole resistance in Aspergillus species in Southern Taiwan: An epidemiological surveillance study [J]. Mycoses, 2019, 62(12): 1174–1181.
- [8] Jia X, Liang Q, Chi F, et al. Otomycosis in Shanghai: aetiology, clinical features and therapy [J]. Mycoses, 2012, 55(5): 404–409.
- [9] Nicolle A, de la Blanchardière A, Bonhomme J, et al. Aspergillus vertebral osteomyelitis in immunocompetent subjects: case report and review of the literature [J]. Infection, 2013, 41(4): 833–840.
- [10] Jing R, Yang WH, Xiao M, et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of Aspergillus strains isolated from patients with otomycosis in northern China [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2022, 55(2): 282–290.
- [11] Zhang L, Wang X, Houbraken J, et al. Molecular identification and in vitro antifungal susceptibility of aspergillus isolates recovered from otomycosis patients in Western China [J]. Mycopathologia, 2020, 185(3): 527–535.
- [12] Li Y, He L. Diagnosis and treatment of otomycosis in Southern China [J]. Mycoses, 2019, 62(11): 1064–1068.
- [13] Nemati S, Hassanzadeh R, Khajeh Jahromi S, et al. Otomycosis in the north of Iran: common pathogens and resistance to antifungal agents [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2014, 271(5): 953–957.
- [14] Rivero-Menendez O, Soto-Debran JC, Medina N, et al. Molecular identification, antifungal susceptibility testing, and mechanisms of azole resistance in aspergillus species received within a surveillance program on antifungal resistance in Spain [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(9): e00865.
- [15] Anwar K, Gohar MS. Otomycosis; clinical features, predisposing factors and treatment implications [J]. Pak J Med Sci, 2014, 30(3): 564–567.
- [16] Koltsidopoulos P, Skoulakis C. Otomycosis with tympanic membrane perforation: A review of the literature [J]. Ear Nose Throat J, 2020, 99(8): 518–521.
- [17] Aboutalebian S, Ahmadikia K, Fakhim H, et al. Direct detection and identification of the most common bacteria and fungi causing otitis externa by a stepwise multiplex PCR [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 25(11): 644–646.
- [18] Viscaino M, Maass JC, Delano PH, et al. Computer-aided diagnosis of external and middle ear conditions: A machine learning approach [J]. PLoS One, 2020, 15(3): e0229226.

(收稿日期: 2022-05-21)

本文引用格式: 彭丹, 毛承刚, 孙毅, 等. 239例外耳道真菌病的真菌菌种分布及药敏检测结果分析 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2023, 29(3): 94–98. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202322217

Cite this article as: PENG Dan, MAO Chenggang, SUN Yi, et al. Analysis of fungal distribution and drug susceptibility test in 239 cases of otomycosis [J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2023, 29(3): 94–98. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202322217