

实验动物皮肤病原真菌多重 PCR 检测方法的建立与初步应用

邢 进, 冯育芳, 岳秉飞, 贺争鸣

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 100050)

【摘要】 目的 建立石膏样毛癣菌(Tm)、石膏样小孢子菌(Mg)、犬小孢子菌(Mc)和猴类毛癣菌(As)的多重 PCR 检测方法,用于实验动物皮肤病原真菌的快速检测。**方法** 根据 Genbank 公布的四种皮肤病原真菌的 18S-28S rRNA 序列设计特异性引物,通过引物、dNTP、TaqDNA 聚合酶浓度及退火温度 and 时间的优化,建立四种皮肤病原真菌的多重 PCR 体系。经特异性和敏感性检验后,对 15 份人工感染真菌大鼠毛和 260 份实验动物毛发样本进行检测。**结果** 所建多重 PCR 方法能够有效区分四种皮肤病原真菌,产生 192 bp(Tm)、460 bp(Mg)、290 bp(Mc)和 602 bp(As)的目的片段,最低检测限分别为 5.9 pg/μL、6.6 pg/μL、9.5 pg/μL 和 5.1 pg/μL。被检的 15 份人工感染样本扩增结果准确,260 份毛发样本中未检测出四种真菌。**结论** 所建立的多重 PCR 方法能够同时对实验动物中的四种皮肤病原真菌进行快速的检测,具有较高的应用价值。

【关键词】 皮肤病原真菌;多重 PCR;检测方法;实验动物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 12-0065-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.12.013

Development and application of a multiplex PCR assay for pathogenic dermatophytes in laboratory animals

XING Jin, FENG Yu-fang, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming

(National Institute of Food and Drug Control, Institute of Laboratory Animal Resources, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To develop a multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay for detection of four pathogenic dermatophytes [*Trichophyton mentagrophytes* (Tm), *Microsporum gypseum* (Mg), *Microsporum canis* (Mc), and *Arthroderma simii* (As)] in laboratory animals, which could be used rapidly and simultaneously for direct detection of those four pathogens. **Methods** We designed 5 specific primers according to 18S-28S rRNA sequences of the four pathogenic dermatophytes reported in Genbank. The four mPCR assays were established through optimizing the concentration of primers, dNTP, TaqDNA polymerase and the annealing temperature. After verifying the specificity and sensibility, this method was used to detect 15 hair samples with artificial infection and 260 samples taken from laboratory animals. **Results** This mPCR technique can distinguish the four dermatophytes by producing 192 bp(Tm), 460 bp(Mg), 290 bp(Mc) and 602 bp(As) fragments. The sensibility for detection of the four dermatophytes was 5.9 pg/μL, 6.6 pg/μL, 9.5 pg/μL and 5.1 pg/μL, respectively. The results of 15 artificial infection samples were accurate, and the results of 260 hairs samples were negative for the four fungi. **Conclusions** Our results suggest that the mPCR assay developed in

[基金项目] 国家科技支撑计划项目:实验动物新品种的种群建立与质量标准化研究(编号:2011BAI15B01)。

[作者简介] 邢进(1979-),男,副研究员。研究方向:实验动物微生物学。Email: xjvet@nifdc.org.cn。

[通讯作者] 岳秉飞(1960-),男,博士,研究员,研究方向:动物遗传学。Email: yue-bingfei@nicbpb.org.cn。

this study can efficiently detect the four dermatophytes, is a useful and rapid technique for rapid detection of the pathogenic dermatophytes in laboratory animals.

【Key words】 Dermatophytes; Multiplex PCR; Detection method; Laboratory animals

皮肤真菌主要包括三个属,表皮癣菌属(*Epidermophyton spp.*)、毛癣菌属(*Trichophyton spp.*)和小孢子菌属(*Microsporum spp.*)^[1]。其中毛癣菌属和小孢子菌属中的石膏样(须癣)毛癣菌(*Trichophyton mentagrophytes, Tm*)、石膏样小孢子菌(*Microsporum gypseum, Mg*)、犬小孢子菌(*Microsporum canis, Mc*)、猴类毛癣菌(*Arthroderma simii, As*)是实验动物中需要排除四种皮肤真菌^[2],均为人兽共患病原,能够引起动物和人的各种皮肤癣病^[3]。严重时污染动物设施和环境,饲养和实验人员也会受到感染的风险。

检测皮肤真菌传统的方法是经过分离培养,根据真菌菌落的表型特征进行鉴定^[4]。由于很多皮肤真菌的菌落特征、生化反应的相似性,特别是青霉菌、黑曲霉菌等多种因素的干扰,易造成实验室污染,也不利于可疑菌的进一步纯化和鉴定。结果判断需要丰富的经验,单纯依靠分离培养法很难对这些病原进行准确鉴别和检测^[5]。因此有了更多皮肤真菌分子检测方法的研究,包括限制片段长度多态性法(RFLP)^[6]、扩增片段长度多态性法(AFLP)^[7]、随机扩增多态性法(RAPD)^[8]、PCR 任意引物 PCR 方法(AP-PCR)^[9]、重复序列 PCR 法(rep-PCR)^[11]和重复寡核苷酸(GACA)4 引物单步 PCR 法^[10]。本实验室曾建立四种实验动物皮肤病原真菌的 AP-PCR 检测方法,利用不同的多态性条带对真菌进行鉴别^[11]。这些方法仍然需要对真菌的初代培养才能加以鉴别,还不能用于小量样品的直接检测。国内有研究将随机引物 PCR 与 AP-PCR 方法相结合直接检测样本中的实验动物皮肤病原真菌,但是几种真菌所产生的相同目的片段不能将几种真菌相区分^[12]。核糖体亚基测序更加准确^[13,14],但操作步骤较繁琐,成本相对较高。此前众多的特异性 PCR 方法已经成功的应用于皮肤真菌的检测中^[15-18],却鲜有应用多重 PCR 方法同时检测上述四种皮肤真菌的报道,因此本研究旨在建立一种多重 PCR 方法实现对临床样本中上述四种皮肤真菌的同时检测,为国内实验动物中皮肤真菌

检测的方法的完善提供参考。

1 材料和方法

1.1 受试菌株

ATCC200101 石膏样毛癣菌、ATCC13994 石膏样小孢子菌、ATCC201851 犬小孢子菌、ATCC16447 猴类毛癣菌、ATCC10231 白色念珠菌(*Candida albicans*)购自美国标准物质保藏中心(ATCC);CMCC98003 黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)由本单位微生物检测室提供;真菌分离株 TSF1 青霉菌(*Penicillium commune*)、TSF2 卷枝毛霉菌(*Mucorcircinelloides*)、TSF3 葡枝根霉菌(*Rhizopusstolonifer*)、TSF4 小孢子菌(*Microsporum sp. KL-1011*)、TSF5 短帚霉菌(*Scopulariopsis brevicaulis*)由本实验室分离保存。

1.2 培养基和试剂

沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)购自北京三药科技开发有限公司,nuclease-free water 购自美国 Promega,PCR 试剂(DR007B)购自 Takara 公司,引物由上海生工合成。

1.3 动物样本

共 260 份动物毛样本,包括野生驯化树鼯毛 60 份,由中国医学科学院医学生物学研究所提供;普通级沙鼠毛 20 份,由浙江省医学科学院提供;SPF 小鼠毛 156 份,SPF 大鼠毛 31 份(含 15 份真菌阴性样本),SPF 豚鼠毛 4 份,SPF 兔毛 4 份,由中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所提供。

1.4 仪器设备

美国 Thermo Fisher A2 生物安全柜,上海安亭 WGP-600 隔水恒温培养箱,美国 ABI VeritiTM96 PCR 仪,美国伯乐 MyCycler PCR 仪,美国 Thermo Nanodrop 2000 微量分光光度计,美国 Kodak GL212 Pro 凝胶成像系统。

1.5 多重引物设计

通过 Vector NTIAlignX 软件对四种皮肤病原真菌的 18S-28SrRNA 区间进行比对,应用 Primer 6.0 软件对每种真菌分别设计特异性引物,见表 1。

表 1 本研究设计的实验动物皮肤病原真菌多重引物
Tab. 1 The mPCR primers of laboratory animal dermatophytes used in this study.

引物名称	序列 (5' - 3')	目的片段大小 (bp)
上游引物	Mc-MF2	TCCGGAAGGATCATTAAACG
下游引物	Tm-MR2	GGTCCAGCGTTTAGCCACTAA
	Mg-MR4	TCCCCTGGAGTAGGGAGG
	Mc-MR2	CTCGCTCAGACGGTATGT
	As-MR2	GAAACAGATTCTGAGGCCAGA

表 2 退火温度循环数优化条件
Tab. 2 Optimization of the annealing cycles

步骤	温度	时间	循环数			
			条件 1	条件 2	条件 3	条件 4
1	95℃	3 min	1	1	1	1
2	95℃	30 sec	/	5	10	20
	55℃	30 sec				
	72℃	40 sec				
3	95℃	30 sec	30	25	20	10
	60℃	30 sec				
	72℃	40 sec				
4	72℃	10 min	1	1	1	1
5	4℃	保温	1	1	1	1

1.6 真菌的培养和 DNA 提取

将冻存的菌种接种于沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基,置 27℃ 培养 7 d。采用酚氯仿法抽提受试真菌的基因组 DNA^[11]。

1.7 多重 PCR 反应条件的优化

1.7.1 四种真菌 PCR 反应体系的优化:在 20 μL 多重 PCR 反应体系中,固定其他组分,分别调整上、下游引物浓度、dNTP 浓度和 TaqDNA 聚合酶浓度,确定多重 PCR 最佳反应体系。将上游引物 Mc-MF2 的浓度调整为 0.2 μmol/L、0.4 μmol/L、0.6 μmol/L 和 0.8 μmol/L 四个梯度,4 条下游引物分别调整为 0.1 μmol/L、0.2 μmol/L、0.3 μmol/L、0.4 μmol/L、0.5 μmol/L 和 0.6 μmol/L 五个梯度。调整 dNTP (各 2.5 mM) 体积为 1.6 μL、2.0 μL 和 2.4 μL 三个梯度,其他反应条件。调整 TaqDNA 聚合酶的加入量为 1U、2U 和 3U 三个梯度,固定其他组分浓度。

其他组分加入量为:10 × buffer (含 Mg²⁺) 2 μL,dNTP (各 2.5 mmol/L) 1.6 μL,TaqDNA 聚合酶 (5U/μL) 0.4 μL,四种真菌 DNA (10 ng/μL) 各 0.5 μL,分别补水至 20 μL。PCR 条件为 95℃ 3 min; 95℃ 30 sec,55℃ 30 min,72℃ 40 sec,共 30 个循环;72℃ 延伸 10 min。

1.7.2 退火温度和循环数的优化:用梯度 PCR 仪对各真菌特异性引物分别进行单独的 PCR,确定单独 PCR 的退火温度,退火温度梯度为 48℃、48.8℃、50.3℃、52.4℃、55.3℃、57.6℃、59.1℃、60℃。确

定的退火温度用于多重 PCR 反应,并在 20 μL 多重 PCR 反应体系中,优化退火温度的最佳循环数。优化条件见表 2。

1.8 特异性和敏感性检测

用所建立的多重 PCR 方法分别扩增 Tm、Mg、Mc 和 As 四株阳性菌株 DNA,同时扩增白色念珠菌、黑曲霉菌、青霉菌、卷枝毛霉菌、葡枝根霉菌、KL-1011 小孢子菌和短帚霉菌等 7 株真菌参考菌株 DNA,验证有无交叉反应。

将四株真菌的模板 DNA 从 10⁻¹ ~ 10⁻⁵ 分别进行 10 倍系列稀释,Tm 模板浓度为 5.9 ng/μL ~ 5.9 × 10⁻⁵ ng/μL;Mg 模板浓度为 6.6 ng/μL ~ 6.6 × 10⁻⁵ ng/μL;Mc 模板浓度为 9.5 ng/μL ~ 9.5 × 10⁻⁵ ng/μL;As 模板浓度为 5.1 ng/μL ~ 5.1 × 10⁻⁵ ng/μL。首先用单引物对各自目标阳性 DNA 进行敏感性扩增,然后用最终确定的方法对上述四种真菌 DNA 10 倍梯度模板进行 4 重 PCR 反应的敏感性扩增。

1.9 初步应用

将四种以真菌单独及混合的形式分别加入已知阴性的大鼠毛发样本中,共 15 份样本,用建立的多重 PCR 方法进行检测。另外用酚氯仿抽提法提取 260 份小鼠、大鼠、豚鼠、兔、沙鼠、树鼩的毛样本的基因组 DNA,用所建立多重 PCR 检测方法对其进行检测。同时依据实验动物国家标准中皮肤病原真菌检测方法,采用沙氏斜面培养方法对受试毛发进行分离培养,比对检测结果。

1.10 PCR 产物鉴定

PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中, 120 V 电泳 50 min。目的片段进行序列测定, 在 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 上进行序列比对。

2 结果

2.1 多重 PCR 反应体系

结果表明在 20 μ L 多重 PCR 反应体系中, 上游引物浓度为 0.6 μ mol/L, 4 条下游引物的浓度分别为 0.2 μ mol/L Tm-MR2、0.5 μ mol/L Mg-MR4、0.2 μ mol/L Mc-MR2、0.1 μ mol/L As-MR2。dNTP 的最佳反应浓度为各 250 μ mol/L。TaqDNA 聚合酶的最适反应浓度为 0.1 U/ μ L。

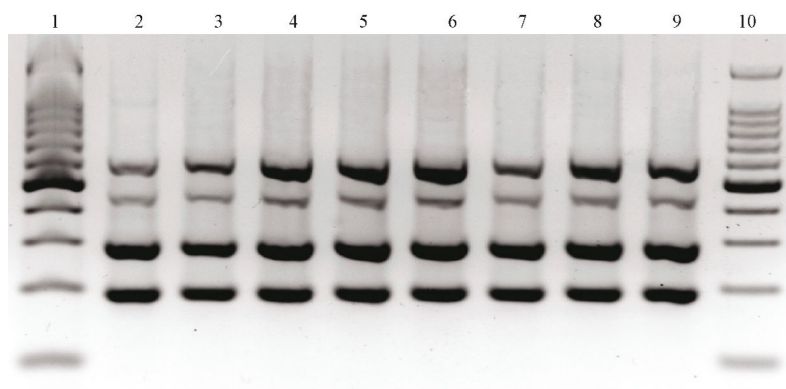
2.2 PCR 反应体系和条件

根据多重 PCR 20 μ L 反应体系优化结果, 10 $\times$ buffer (含 Mg^{2+}) 2 μ L, dNTP (各 2.5 mM) 2 μ L, 上游

引物 Mc-MF2 (10 M) 1.2 μ L, 下游混合引物 (各 10 μ mol/L) (0.4 μ L Tm-MR2 \ 1.0 μ L Mg-MR4 \ 0.4 μ L Mc-MR2 \ 0.2 μ L As-MR2), TaqHS 酶 (5 U/ μ L) 0.4 μ L, 模板 (四种真菌 DNA) 各 0.5 μ L, 水 10.3 μ L。多重 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 sec, 55 $^{\circ}$ C 30 min, 72 $^{\circ}$ C 40 sec, 共 5 个循环; 随后 95 $^{\circ}$ C 30 sec, 55 $^{\circ}$ C 30 min, 72 $^{\circ}$ C 40 sec, 共 25 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min (图 1)。

2.3 特异性检测

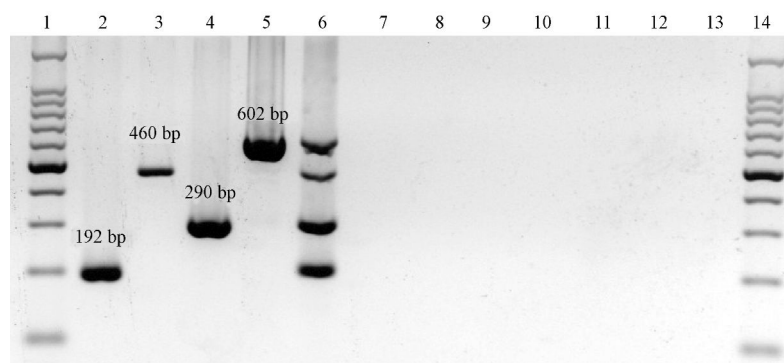
所建多重 PCR 方法对 Tm、Mg、Mc 和 As 进行扩增, 相互间无交叉反应 (图 2)。目的片段序列经 BLAST 比对, 四种真菌扩增片段准确无误, 对应 Genbank 中的基因登录号分别为 KT354632.1、KT354611.1、KF733019.1 和 KJ606091.1。扩增其他 7 种参考真菌均无目的条带产生。



1, 10. 100 bp DNA marker; 2, 3. 退火循环次数 60 $^{\circ}$ C 30 个循环; 4, 5. 退火循环次数 55 $^{\circ}$ C 5 个循环, 然后退火温度 60 $^{\circ}$ C 25 个循环; 6, 7. 退火循环次数 55 $^{\circ}$ C 10 个循环, 然后退火温度 60 $^{\circ}$ C 20 个循环; 8, 9. 退火循环次数 55 $^{\circ}$ C 20 个循环, 然后退火温度 60 $^{\circ}$ C 10 个循环。

图 1 20 μ L 多重体系中退火循环次数的优化

Fig. 1 Optimization of annealing cycles in 20 μ L multiplex PCR system



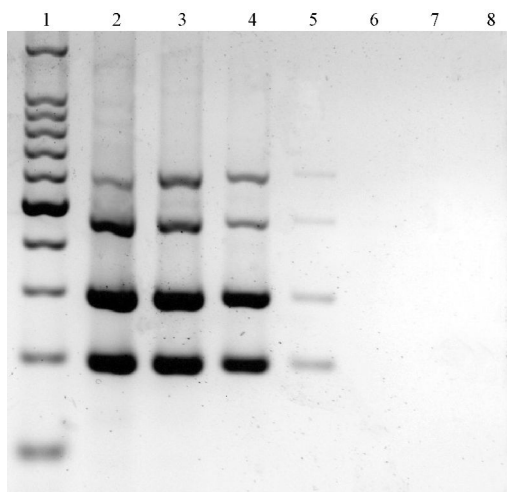
1, 14. 100 bp DNA marker; 2. Tm 192 bp 阳性片段; 3. Mg 460 bp 阳性片段; 4. Mc 290 bp 阳性片段; 5. As 602 bp 阳性片段; 6. 四种真菌多重 PCR 阳性片段; 7 ~ 12. 真菌多重体系扩增白色念珠菌、黑曲霉菌和树鼩真菌分离株 TSF1 ~ TSF5 结果; 13. 空白对照。

图 2 四种皮肤病原真菌引物特异性检测

Fig. 2 Results of specificity test for Tm, Mg, Mc and As by mPCR

2.4 敏感性检测

提取的基因组 DNA 用微量分光光度计测定浓度。提取的 Tm、Mg、Mc 和 As 的 DNA 浓度分别为 66 ng/ μ L、59 ng/ μ L、95 ng/ μ L 和 51 ng/ μ L。将混合标准菌株 DNA 分别做 10 倍稀释,稀释成 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 。所建立的多重 PCR 扩增 Tm 引物的检测限可检测到 5.9 pg/ μ L, Mg 的检测限为 6.6 pg/ μ L, Mc 的检测限为 9.5 pg/ μ L, As 的检测限为 5.1 pg/ μ L。对 Tm、Mg、Mc 和 As 四种真菌的敏感性引物的检测限均小于 10 pg/ μ L, 与单独扩增时的敏感性相同 (图 3)。



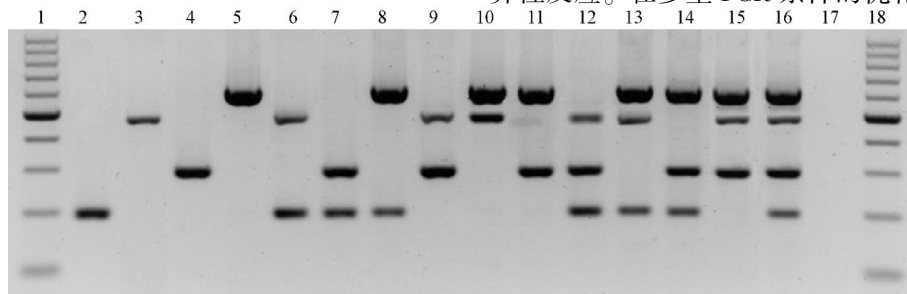
1. 100 bp DNA marker; 2~7. 四种真菌混合 DNA 模板浓度为 $10^{-1} \sim 10^{-6}$; 8. 空白对照。

图 3 四种皮肤真菌多重 PCR 方法的敏感性

Fig. 3 Results of sensitivity test for Tm, Mg, Mc and As by mPCR

2.5 检测应用

用所建立多重 PCR 检测方法对 260 份小鼠、大鼠、豚鼠、兔、沙鼠、树鼩的毛样品的检测结果均为



1, 18. 100 bp DNA marker; 2. 感染 Tm; 3. 感染 Mg; 4. 感染 Mc; 5. 感染 As; 6. 感染 Tm 和 Mg; 7. 感染 Tm 和 Mc; 8. 感染 Tm 和 As; 9. 感染 Mg 和 Mc; 10. 感染 Mg 和 As; 11. 感染 Mc 和 As; 12. 感染 Tm、Mg 和 Mc; 13. 感染 Tm、Mg 和 As; 14. 感染 Tm、Mc 和 As; 15. 感染 Tm、Mg、Mc 和 As; 16. 空白对照。

图 4 多重 PCR 方法检测人工感染毛发样品结果

Fig. 4 Results of mPCR detecting the artificially induced hair infection

阴性,未发现四种真菌的感染,与 SDA 培养方法结果相符 (图 4)。

3 讨论

子囊菌门的真菌大多具有明显的无性和有性繁殖形式,在本研究中的四种真菌, Tm 是以复合形式存在,至少包括 15 种不同的菌株,既有亲动物性菌株,也有亲人性菌株^[9]。菌落形态也会随着感染宿主和培养条件等因素变化^[18]。Tm 的不同有性型菌株可以相互交配而产生新的世代^[19],依靠分子方法才能将其区分。由此可见,随着基因水平研究的不断深入,对实验动物中皮肤病原真菌的检测方法也应及时做出相应的改进。研究表明, ITS 间隔区序列是鉴别皮肤真菌的最佳目标, ITS1 区对 Tm 的鉴别力高,而 ITS2 区对鉴别 Mc 更为有效^[14]。针对 ITS1 区设计引物和探针能直接灵敏的检测临床样本中的 Tm^[15]。Mg 常存在于土壤中,动物和人均可感染^[20]。Mc 则是一种亲动物性皮肤真菌,主要感染猫和犬。其有性型为太田节皮菌,本研究中所用菌株即为有性型。同样针对 ITS1 区所建立的 PCR 方法也能准确检测人和动物临床样本中的 Mc^[16]。经过大量的样本检测证实,根据 ITS 区可以建立多重 PCR 方法对检测 Mg 和 Mc 实现同时检测^[18]。

多重 PCR 方法在病原菌检测方面已经得到了广泛深入的应用,不同于上述方法,本研究根据四种皮肤真菌的 18S-28SrRNA 序列建立的多重 PCR 方法,对不同真菌能够扩增出不同的目的片段,利用此区域的同源序列和保守序列设计相同的上游引物和不同的下游引物,克服了几种真菌间的非特异性反应。在多重 PCR 条件的优化过程中,变性温

度设置为 94℃ 时,扩增效果不佳,只有在 95℃ 下能够获得明亮的扩增条带。退火温度和循环数的优化时,全部设置为 55℃ 时, T_m 会出现一条 550 bp 左右的非特异性扩增带。当退火温度升高到 60℃ 时,杂带完全消失。经过退火温度及其循环次数的优化后,最终确定了两种温度组合的方式,兼顾了扩增效率和特异性,达到了满意的效果。

应用所建立的多重 PCR 检测方法,在受试的实验动物毛发样本中未检出四种皮肤病原真菌,与长期的真菌监测结果相符。证明在实验动物中的皮肤真菌感染率始终保持在极低水平。对人工感染的 15 份大鼠毛样本检测,准确的检测出不同的菌株组合。本法具有良好的可重复性,操作简便,成本较低,可以在实验动物皮肤病原真菌的检测和筛查中进一步应用。

参考文献:

- [1] Pounder JI, Williams S, Hansen D, et al. Repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the Diversilab system for identification of commonly encountered dermatophytes [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5): 2141–2147.
- [2] GB/T 14922.2–2010, 实验动物微生物学等级及监测 [S]. 中华人民共和国国家标准, 2010.
- [3] Verrier J, Krähenbühl L, Bontems O, et al. Dermatophyte identification in skin and hair samples using a simple and reliable nested polymerase chain reaction assay [J]. Br J Dermatol, 2013, 168(2): 295–301.
- [4] GB/T 14926.4–2001. 实验动物微生物学检测方法 [S]. 中华人民共和国国家标准, 2001.
- [5] Faggi E, Pini G, Campisi E, et al. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(9): 3382–3385.
- [6] Kanbe T, Suzuki Y, Kamiya A, et al. Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes [J]. J Dermatol Sci, 2003, 33(1): 41–54.
- [7] Leibner-Ciszak J, Dobrowolska A, Krawczyk B, et al. Evaluation of a PCR melting profile method for intraspecies differentiation of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale* [J]. J Med Microbiol, 2010, 59 (Pt 2): 185–192.
- [8] Shafiee S, Khosravi AR, Ashrafi Tamai I. Comparative study of *Microsporum canis* isolates by DNA fingerprinting [J]. Mycoses, 2014, 57(8): 507–512.
- [9] Liu D, Coloe S, Baird R, et al. PCR identification of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* dermatophytes with a random primer [J]. J Med Microbiol, 1997, 46(12): 1043–1046.
- [10] Shehata AS, Mukherjee PK, Aboulatta HN, et al. Single-step PCR using (GACA)₄ primer: utility for rapid identification of dermatophyte species and strains [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(8): 2641–2645.
- [11] 邢进, 王春玲, 贺争鸣, 等. AP-PCR 检测实验动物病原真菌试验方法研究 [J]. 实验动物科学与管理, 2005, 22(3): 21–23.
- [12] 龚巧玲, 郑龙, 张焕铃, 等. PCR 方法检测实验动物皮肤病原真菌 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(3): 131–135.
- [13] Li HC, Bouchara JP, Hsu MM, et al. Identification of dermatophytes by an oligonucleotide array [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(10): 3160–3166.
- [14] Li HC, Bouchara JP, Hsu MM, et al. Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions [J]. J Med Microbiol, 2008, 57 (Pt 5): 592–600.
- [15] Miyajima Y, Satoh K, Uchida T, et al. Rapid real-time diagnostic PCR for *trichophyton rubrum* and *trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes [J]. J Dermatol Sci, 2013, 69(3): 229–235.
- [16] Brillowska-Dabrowska A, Michałek E, Saunte DM, et al. PCR test for *Microsporum canis* identification [J]. Med Mycol, 2013, 51(6): 576–579.
- [17] Verrier J, Krähenbühl L, Bontems O, et al. Dermatophyte identification in skin and hair samples using a simple and reliable nested polymerase chain reaction assay [J]. Br J Dermatol, 2013, 168(2): 295–301.
- [18] Brillowska-Dabrowska A, Swierkowska A, LindhardtSaunte DM, et al. Diagnostic PCR tests for *Microsporum audouinii*, *M. canis* and *Trichophyton* infections [J]. Med Mycol, 2010, 48(3): 486–490.
- [19] Kawasaki M, Anzawa K, Wakasa A, et al. Matings among three teleomorphs of *Trichophyton mentagrophytes* [J]. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi, 2010, 51(3): 143–152.
- [20] Nardoni S, Mugnaini L, Papini R, et al. Canine and feline dermatophytosis due to *Microsporum gypseum*: a retrospective study of clinical data and therapy outcome with griseofulvin [J]. J Mycol Med, 2013, 23(3): 164–167.

[修回日期]2015-10-08