

# NCCLS M 38-P方案对致病性毛霉菌的体外药敏实验研究

王俊杰<sup>1</sup> 王颖<sup>1</sup> 万喆<sup>2</sup> 李若瑜<sup>2</sup> 王爱平<sup>2</sup> 王晓红<sup>2</sup>

(1 广州军区广州总医院皮肤科, 广州 510010 2 北京大学第一医院皮肤性病科, 北京 100034)

【关键词】 毛霉目; M 38-P; MIC

【中图分类号】 R 379.9 【文献标识码】 B 【文章编号】 1673-3827(2010)04-0230-02

近几年来,毛霉病的感染率明显增加,绝大多数毛霉病都发生在免疫功能异常的情况下,而根霉属、犁头霉属、根毛霉属、毛霉属是最常见的致病属。由于丝状真菌的药敏方法一直没有规范化,临床选择抗真菌药物缺乏有效的指导。随着真菌感染日益增多和新的抗真菌药物的相继问世,临床分离的致病菌对一种或多种抗真菌药物耐药现象时有发生。抗真菌药物敏感性实验的重要性日益凸显。本实验参照 NCCLS M 38-P 对 18 株临床分离的致病性毛霉菌进行 MIC 测定。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验菌株

18株为北大一院真菌中心(BMU)保存菌种,其中包括3株小孢根霉、4株少根根霉、2株伞状犁头霉、2株多变根毛霉、4株冻土毛霉、2株总状毛霉、1株匍枝根霉,质控菌为近平滑念珠菌 ATCC 22019。

### 1.2 测试药物

包括两性霉素 B (AMB)、伊曲康唑 (ICZ)、特比萘芬 (TBF)、阿莫罗芬 (AML)、氟康唑 (FCZ)、5-氟胞嘧啶 (5-FC)均为标准粉剂,AMB、5-FC购自 Sigma 公司,ICZ 由西安杨森公司提供,TBF 由山东齐鲁制药厂提供。FCZ 由上海三维制药有限公司提供,AML 由法国高德美公司提供。AMB、ICZ、TBF、AML 均用二甲基亚砷 (DMSO) 溶解,5-FC、FCZ 用灭菌蒸馏水溶解,AMB、ICZ、TBF、AML 制成 3.2 mg/mL 的储备液,FCZ、5-FC 配成 1.28 mg/mL

的储备液,放 -20℃ 储存备用。

培养基用 RPM F1640 液基,称取 10.35 g MOPS (三氮吗啡啉丙磺酸),3.12 g RPM F1640 加 280 mL 蒸馏水溶解后用 1 mol/L NaOH 调整 pH 至 7.0 定容至 300 mL,用一次性滤菌器滤过灭菌,放 4℃ 备用。

### 1.3 配药板

用 RPM F1640 培养基将 6 种药物倍比稀释后依次加入 96 孔 (12×8) 板,每孔 100 μL,第 1 孔的浓度 AMB、ICZ、TBF、AML 为 16 μg/mL,FCZ、5-FC 为 64 μg/mL。

### 1.4 菌液配置及接种

受试菌株在马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 上 35℃ 培养 7 d 或 35℃ 培养 48~72 h 后,转至 25~28℃ 至 7 d。取 1 mL 无菌 0.85% 盐水加入培养 7 d 的培养皿中,用巴氏吸管轻轻抽吸,将菌悬液吸到无菌试管中静置 10~15 min,取上清液振荡 15 s,用分光光度计调整菌悬液浓度至  $1\sim 5\times 10^6$  CFU/mL,再用 RPM F1640 液体培养基稀释 100 倍,得到  $1\sim 5\times 10^4$  CFU/mL 的 2 倍终浓度的接种菌悬液。用血球计数板调整菌悬液的浓度为  $20\sim 250\times 10^4$  /mL,然后加 0.1 mL 至 96 孔药板的 1~11 列孔中,第 11 孔为生长对照,第 12 孔为阴性对照,30℃ 孵育 24~48 h 后读结果。

### 1.5 结果判定

MIC 值为肉眼直接观察到的真菌生长完全被抑制的抗真菌药物浓度。

## 2 结 果

6 种抗真菌药物对不同毛霉病致病种的体外抑菌试验结果见表 1。

作者简介:王俊杰,男(汉族),大学本科,副主任医师。E-mail wangjunjie3@yahoo.com.cn

通讯作者:李若瑜,E-mail lyym@medmail.com.cn

表 1 6种抗真菌药物对不同毛霉病致病种的体外抑菌试验结果

Tab 1 *In vitro* susceptibility tests against the common pathogenic Mucorales by 6 antifungal agents

菌种	特比萘芬	伊曲康唑	阿莫罗芬	两性霉素 B	氟康唑	5-氟胞嘧啶
小孢根霉	0.5~16	4~16	0.5~2	4~16	64	64
少根根霉	16	2~16	1~4	8~16	64	64
伞状犁头霉	8~16	2	0.5~2	16	64	64
多变根毛霉	16	16	2	2~8	64	64
冻土毛霉	0.0625~4	0.125~16	0.5~1	2~8	64	64
总状毛霉	0.5~16	16	1	0.25~4	64	64
匍枝根霉	16	1	0.25	1	64	64
范围	0.0625~16	0.125~16	0.25~4	0.25~16	64	64
几何均数	4.49	4.32	1.12	5.44	64	64

从表可以看出: 6种抗真菌药物对 18株毛霉菌的 MIC 范围及几何均数都较高, 18株毛霉菌对氟康唑、5-氟胞嘧啶最高, MIC > 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 对特比萘芬、伊曲康唑、两性霉素 B 的 MIC 的几何均数稍高, 阿莫罗芬的几何均数最低。

### 3 讨 论

由于丝状真菌产孢条件不好控制、接种量难以精确量化、孵育时间长等, 使其实验方法较难标准化。NCCLS (现称 CLSI) 在 M-27A 的基础上于 1998 年提出了《产孢丝状真菌的液基稀释抗真菌药敏实验参考方案》(M-38P), 为丝状菌的抗真菌药敏实验提供了较规范的方法。Otcenasek<sup>[1]</sup> 采用微量稀释法对 14 株接合菌进行 9 种抗真菌药物的体外药敏试验, 显示: 两性霉素 B 敏感性高, 匹马霉素的敏感性较萘替芬高, 犁头霉属和共头霉属除了 5-FC、萘替芬不敏感外, 其他均有效, 唑类、5-FC、萘替芬对毛霉属和根霉属有非常弱的或无抑制作用。国内孙志坚等<sup>[2]</sup> 参照 M-38-P 方案要求对 14 株接合菌进行 9 种抗真菌药物的药敏检测, 结果显示

13 株菌对 FCZ、5-FC 的 MIC 值的几何均数都较高, 对 TBF 的 MIC 值的几何均数较低。

本试验与孙志坚等<sup>[2]</sup> 结果相比, 5 种抗真菌药物的几何均数较高, 可能与受试菌种不同及来源不同有关, 特比萘芬对冻土毛霉的 MIC 较低。虽然两性霉素 B、特比萘芬、伊曲康唑的几何均数较高, 但目前临床上仍是用于治疗毛霉病的主要抗真菌药物, 阿莫罗芬的几何均数最低, 可试用于局限的、孤立的病变或在系统应用抗真菌药物的同时局部外用, 以提高疗效。

### 参 考 文 献

- [1] Otcenasek M, Budhta V. *In vitro* susceptibility to 9 antifungal agents of 14 strains of zygomycetes isolated from clinical specimens [J]. *Mycopathologia* 1994, 128(3): 135-137
- [2] 孙志坚, 李若瑜, 李东明, 等. 产孢丝状真菌 NCCLS 药敏试验方法的应用 [J]. *中华检验医学杂志*, 2001, 24(1): 43-44

[收稿日期] 2009-10-15

[本文编辑] 王 飞