

· 实验研究 ·

流式细胞术检测眼部镰刀菌对两性霉素 B 和氟康唑的药物敏感性

胡楠 徐凯 吴玉宇 程争平

Susceptibility of ocular *fusarium* isolates to amphotericin B and fluconazole with flow cytometry analysis

Hu Nan, Xu Kai, Wu Yuyu, Cheng Zhengping. Department of Anatomy, Medical School of Suzhou University, Suzhou 215123, China

Abstract Objective The golden standard of drug sensitivity testing method for anti-fungal drugs was M38-A, but its disadvantages included time-consuming, complex and higher intensity of labor. The goal of present study was to investigate the feasibility of flow cytometry detecting the susceptibility of ocular *fusarium* isolates to anti-fungal drugs. **Methods** *Candida albicans* stain (ATCC22019), *aspergillus fumigatus* strain (ATCC204305), standard *fusarium solani* strain and fungal from the patients with fungal keratitis were cultured in Sabouraud's Agar medium for two weeks. The coupling diluted amphotericin B (AMB) and fluconazole (FCZ) by RPMI-1640 with the working concentration 32 – 0.0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 256 – 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively (0.2 mL) were added into 0.2 mL fungal suspension. The fungal suspension with RPMI-1640 but without drugs was as negative group, and the treated fungal suspension by alcohol containing RPMI-1640 was as positive control. The susceptibilities of 24 strains of ocular *fusarium* isolates (1 laboratory strain and 23 clinical isolates) to AMB and FCZ were detected by flow cytometry susceptibility test (FCST) and broth microdilution method M38-A. The evaluation indexes included the forward scattering light, lateral scattering light and mean fluorescence intensity (MFI). **Results** The MICs of AMB determined by FCST to 24 strains of fungal was from 0.5 – 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and that of FCZ was 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 1 strain, 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 8 strains and $\geq 128 \mu\text{g}/\text{mL}$ for 15 strains. The consistency of MICs values by FCST and M38-A was 83.3% to AMB and 87.5% to FCZ in one coupling dilution and 91.6% to AMB and 100% to FCZ in two coupling dilution, showing a insignificant difference between FCST and M38-A results ($t_{\text{AMB}} = -0.578, P = 0.568; t_{\text{FCZ}} = 1.161, P = 0.257$). **Conclusion** FCST is a rapid, accurate and sensitive method that can be used to determine the drug susceptibilities of ocular *fusarium* isolates to anti-fungal compounds.

Key words *fusarium*; flow cytometry; drug susceptibility; minimal inhibitory concentration

摘要 目的 探讨流式细胞术测定眼部镰刀菌对抗真菌药物敏感性的可行性。**方法** 用流式细胞术药敏试验(FCST)和标准药敏试验(肉汤稀释法M38-A)法检测24株镰刀菌对两性霉素B(AMB)和氟康唑(FCZ)的敏感性,比较2种方法所得结果的一致性。**结果** FCST法检测AMB的最低抑菌质量浓度(MIC)为2~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$,FCZ的MIC除1株为32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 外,其余均 $\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。2种检测方法的一致性在1个稀释度范围内为83.3%(AMB)和87.5%(FCZ),在2个稀释度范围内为91.6%(AMB)及100%(FCZ),差异均无统计学意义($P = 0.568, 0.257$)。**结论** FCST法是一种快速、敏感、准确的药敏试验方法,可用于检测镰刀菌对抗真菌药物的敏感性。

关键词 镰刀菌; 流式细胞术; 药物敏感性; 最低抑菌浓度

分类号 R 772.21 R 988.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)10-0911-04

真菌性角膜炎是常见的致盲性眼病,随着抗生素、糖皮质激素、免疫抑制剂的广泛应用,真菌性角膜炎的

发病率有逐年升高的趋势^[1-2]。选择敏感的抗真菌药物是提高真菌性角膜炎治疗成功率的关键。目前抗真菌药物标准药敏试验方法是美国临床实验室标准化委员会(CLSI)推荐的肉汤稀释法M38-A^[3],存在耗时长、操作复杂、劳动强度大等缺点。流式细胞术(flow cytometry, FCM)具有速度快、精确度高、准确度好、计数细胞量大及多参数分析等特点,已被建议用作实验

本课题为南通市社会发展基金资助(s2006004)

作者单位:215123 苏州大学医学院解剖学教研室(胡楠,博士研究生,现在南通大学附属医院眼科);226001 南通大学附属医院眼科(徐凯、吴玉宇、程争平)

通讯作者:胡楠 (Email:hunaneye@hotmail.com)

室的常规细菌药敏试验方法^[4]。近年来,有研究将FCM应用于真菌药物敏感性检测,并在念珠菌的检测方面取得了满意结果^[5-6]。本研究尝试应用FCM,检测我国真菌性角膜炎最常见的致病菌镰刀菌^[7-8]对两性霉素(amphotericin B, AMB)及氟康唑(fluconazole, FCZ)的敏感性,为临床及时选择适当的抗真菌药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 平滑念珠菌 ATCC22019(解放军301医院惠赠);烟曲霉菌 ATCC204305(购于美国菌种保藏中心);标准茄病镰刀菌(编号3.4489,购于中国菌种保藏中心)。临床菌株取自2006年4月—2007年3月南通大学附属医院确诊的真菌性角膜炎患者,在沙堡氏琼脂培养基中35℃孵育2周,鉴定后保存于4℃备用。

1.1.2 药物 AMB(美国Amresco公司)用二甲基亚砜配制成1600 μg/mL的溶液,置于-70℃备用。FCZ(上海三维制药公司惠赠,纯度99.7%)用ddH₂O配制成1280 μg/mL的溶液,置于-70℃中备用。

1.1.3 主要试剂及仪器 碘化丙啶(美国Sigma公司)用磷酸盐缓冲液配制成质量浓度为1000 μg/mL备用;脱氧胆酸钠(美国Amresco公司)用ddH₂O配制成浓度为0.1%备用;流式细胞仪(美国Decton & Dickinson公司,型号:Facscalibur)。

1.2 方法

1.2.1 标准药敏试验(M38-A) 按CLSI推荐的肉汤稀释法M38-A^[3]操作:在阅读镜的辅助下将每个受试孔中真菌的生长情况与生长对照孔相比较并进行评分。每次试验均进行质控菌株(平滑念珠菌及烟曲霉菌)的检测,MIC均在公布的要求范围内。

1.2.2 流式细胞术药敏试验(flow cytometry susceptibility testing, FCST) 受试真菌在沙氏葡萄糖琼脂培养基上转种2次,以保证其纯度及生长力。在菌落上加入含有0.01 mL吐温20的0.85%盐水1 mL,制备悬液。静置3~5 min后取上层均质液体(含孢囊孢子或分生孢子以及菌丝片段)至无菌小管。振荡15 s,用分光光度计调整菌悬液至孢子浓度为1~6×10⁶ CFU/mL。取0.2 mL菌悬液加入无菌试管中,再加入用RPMI-1640培养液倍比

稀释为10个质量浓度的AMB或FCZ 0.2 mL,AMB工作质量浓度为32~0.0625 μg/mL,FCZ工作质量浓度为256~0.5 μg/mL,阴性对照管加RPMI-1640培养液和菌悬液各0.2 mL,不加药物,阳性对照管加入RPMI-1640培养液和经乙醇处理的菌悬液各0.2 mL(乙醇可使真菌活力减少99.9%以上)。各管置35℃孵育3 h(AMB)或5 h(FCZ)。取上述孵育液0.2 mL,依次加入0.1%脱氧胆酸钠0.2 mL和10 μL PI(1 mg/mL),混匀,35℃避光孵育1 h后上机检测。

上机检测选用488 nm波长的氩离子激光,每次检测10 000个真菌孢子,评价指标包括前向散射光、侧向散射光和荧光强度信息,用Cell Quest软件程序进行数据分析,计算不同药物质量浓度作用下各样本管的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)。MIC定义为相对于生长对照管MFI增加50%时最低药物质量浓度,即如果MFI在相邻2个质量浓度之间出现急剧的变化,其中一个质量浓度对应的MFI低于50%生长对照管的MFI而另一相邻质量浓度对应的MFI高于50%生长对照管的MFI,两者当中较高的药物质量浓度为该药的MIC。若某菌株的MFI随质量浓度梯度缓慢增加并且最高质量浓度对应的MFI值较生长对照管增加小于50%,此时该菌株判定为耐药菌

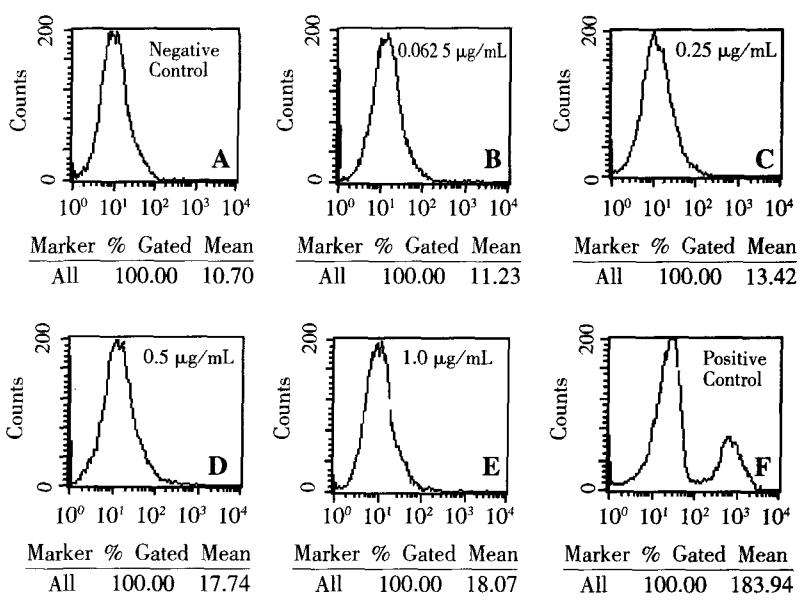


图1 不同活性状态镰刀菌流式细胞仪检测结果 A: 阴性对照为未加抗真菌药物正常生长的真菌孢子, MFI 10.70, 波峰靠左 B~E: 随着抗真菌药物(AMB)质量浓度的增加, 损伤真菌增多, MFI 亦增大, 当药物质量浓度由 0.0625 μg/mL 增加到 1.0 μg/mL 时, MFI 相应的从 11.23 增加到 18.07 F: 阳性对照为经 75% 乙醇灭活 1 h 后的真菌孢子, MFI 183.94, 出现双波峰

Fig. 1 The flow cytometry results. A: MFIs of *fusarium* with different viabilities: untreated *fusarium* cells show a very low MFI B-E: When treated with anti-fungal compounds, the MFIs become higher with the increase of drug concentration F: Ethanol-treated cells show a high MFI

株, MIC 大于检测的最高质量浓度。

1.3 统计学方法

采用 STATA 7.0 统计学软件进行统计分析, 分别比较 2 种方法检测 2 种药物所得结果的一致性, 并对所测结果进行配对 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FCST 结果

本研究采用的荧光染 PI 为膜非渗透性荧光染料, 通过损伤的细胞膜进入死亡细胞体内, 再结合到核酸上, 在一定波长的激发光下发出可测荧光, 根据检测到的 MFI 的变化即可判断真菌经药物处理后的活性状态。图 1A 为药物质量浓度为 0 时的阴性对照, 真菌孢子 MFI 较低, 波峰靠左, 随着抗真菌药物质量浓度的增加 MFI 亦增加, 波峰向右移动(图 1B~E), 图 1F 为阳性对照(用 75% 乙醇处理 1 h 的真菌孢子), MFI 很高, 且出现双波峰。根据 MIC 判定标准, FCST 检测 AMB 对 24 株受试菌的 MIC 为 0.5~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, FCZ 的 MIC 1 株为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 株为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其余均 $\geq 128 \mu\text{g}/\text{mL}$ (图 2)。

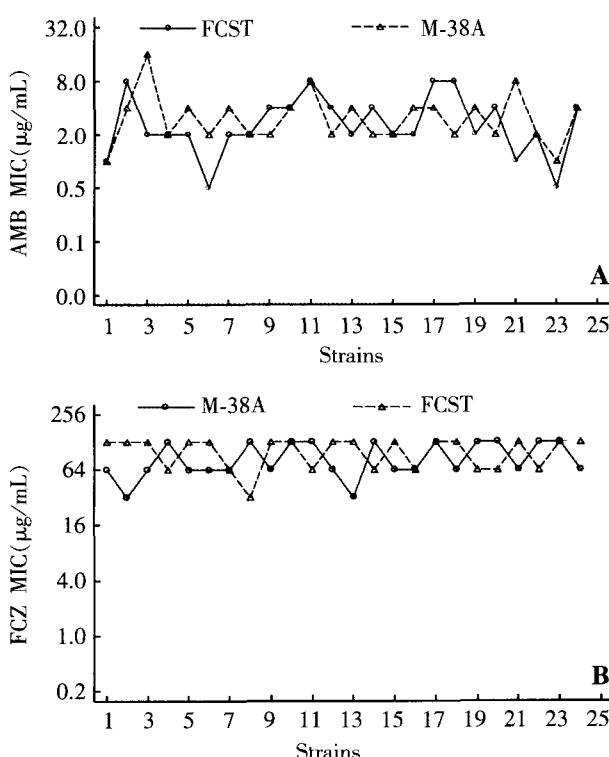


图 2 M-38A 法与 FCST 法检测 AMB 及 FCZ 对 24 株镰刀菌的 MIC 结果 A:AMB MIC B:FCZ MIC

Fig. 2 The MICs of *fusarium* isolates to AMB and FCZ examined by M-38A and FCST A:AMB MIC B:FCZ MIC

2.2 标准药敏试验(肉汤稀释法 M38-A 方案)

根据 M38-A 方案^[3]判读 MIC, AMB 的 MIC 值判定为肉眼观察无真菌生长的最低药物质量浓度; FCZ 的 MIC 值判定为相对于生长对照有 50% 或以上生长抑制时的最低药物质量浓度。24 株受试菌的肉汤微稀释法 MIC 结果见图 2。

2.3 肉汤稀释法与 FCST 法比较

用肉汤稀释法与 FCST 法检测 24 株镰刀菌对 AMB 的敏感性, 有 8 株真菌的 MIC 完全相同, 12 株相差 1 个倍比稀释度, 2 株相差 2 个倍比稀释度, 在 1 个稀释度范围的一致性为 83.3%, 2 个稀释度范围的一致性为 91.6%; 2 种方法检测 FCZ 的敏感性, 5 株 MIC 完全相同, 16 株相差 1 个倍比稀释度, 3 株相差 2 个倍比稀释度, 在 1 个稀释度范围的一致性为 87.5%, 2 个稀释度范围的一致性达 100%。对 2 种方法所测结果进行配对 *t* 检验, 二者之间差异均无统计学意义($t_{\text{AMB}} = -0.578, P = 0.568; t_{\text{FCZ}} = 1.161, P = 0.257$) (表 1)。

表 1 肉汤稀释法与 FCST 法检测镰刀菌对药物敏感性的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of sensitivity of M38-A and FCST testing methods ($\bar{x} \pm s$)

| Method | n | MIC | |
|----------|----|---------------|-----------------|
| | | AMB | FCZ |
| M38-A | 24 | 3.3 ± 0.5 | 142.7 ± 6.9 |
| FCST | 24 | 3.8 ± 0.7 | 88.0 ± 7.3 |
| <i>t</i> | | -0.578 | 1.161 |
| <i>P</i> | | 0.568 | 0.257 |

(Paired *t* test)

3 讨论

真菌性角膜炎药物治疗的效果取决于病原菌对抗真菌药物的敏感性, 目前临床常规使用的方法必须将真菌与药物共同孵育培养至 48 h 以上才能判读结果, 而 FCST 不依赖于真菌的增生, 而是通过检测染料与真菌结合后发出的不同荧光强度, 反映待测菌的活性或功能状态, 从而判断真菌对抗真菌药物的反应性, 具有快速、敏感的优点。如本实验应用的 PI, 是膜非渗透性荧光染料, 不能进入细胞膜完整的真菌体内, 只有当细胞膜完整性在药物作用下被破坏后, 染料方可渗入细胞内并与核酸结合, 在一定波长的激发光下发出可测荧光。通过测定不同药物质量浓度下的 MFI, 即可推断出该药物的 MIC, 实验时间仅为 3~5 h。此外, FCST 采集 10 000 个菌细胞逐个分析检测, 使标准差大大降低, 数据分析由仪器完成, 避免了终点观察判断时的主观误差, 结果更加精确、稳定。本实验用 FCST 分

别检测 24 株镰刀菌(1 株实验室菌株和 23 株临床菌株)对 AMB 和 FCZ 的药物敏感性,其中 AMB 的 MIC 为 $2 \sim 8 \mu\text{g}/\text{mL}$,平均 $3.75 \mu\text{g}/\text{mL}$;FCZ 的 MIC 除 1 株为 $32 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以外,其余均 $\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$,与文献报道的结果相符合^[9-11]。M38-A 标准药敏试验和 FCST 2 种方法检测的结果比较,一致性在 1 个稀释度范围内为 83.3% (AMB) 和 87.5% (FCZ),在 2 个稀释度范围内为 91.6% (AMB) 及 100% (FCZ),差异均无统计学意义,表明 FCST 可以用于镰刀菌的药物敏感性检测。脱氧胆酸钠可促进荧光染料 PI 对真菌孢子壁的渗透,从而加速其渗入损伤的细胞膜内,但不会促进其进入活细胞内。Chaturvedi 等^[5]及 Ramani 等^[12]应用脱氧胆酸钠大大缩短了孵育时间。但以往文献报道应用脱氧胆酸钠的工作浓度为 0.5%^[12],本研究曾采用该浓度,经荧光显微镜及流式细胞仪检测发现,该浓度脱氧胆酸钠对真菌孢子有损伤作用,使活性对照管中真菌孢子内 PI 荧光强度较高,掩盖了药物的作用效果,该差异可能与不同厂家的制剂有关。本研究经过反复测试发现 0.1% 脱氧胆酸钠对真菌孢子无损伤作用,但有促进 PI 渗透的作用。

MIC 判定标准的设定,是 FCST 法的关键问题,受真菌种类、荧光素种类、培养时间等多种因素的影响,各文献报道不一。Green 等^[13]将 PI 的荧光强度达到阴性生长对照管 80% 以上时的最低药物质量浓度判为 MIC。Balajee 等^[14]将染料 FUN-1 的荧光强度降低到阴性生长对照管的 90% 以上时的最低药物质量浓度判为 MIC。Rudensky 等^[6]用 FS/SS 双参数散点图检测药物对真菌的损伤。本研究采用 Ramani 等^[15]所用方法,将 PI 的荧光强度较阴性生长对照管增加 50% 时最小药物质量浓度设定为 MIC 值;据此判定标准所得结果与标准法结果比较有很好的一致性。

真菌和药物的作用时间是影响实验结果的又一重要因素,由于药物不同的作用机制,不同菌种、不同生长周期及菌种孢子物理特征的不同以及其他影响因素的不同,所需要的培养时间也不尽相同。多数学者认为孵育时间最好不要少于真菌的一个生长周期^[16]。目前尚无有关镰刀菌生长周期的报道,本实验也未能测定其生长周期,但经反复实验,本研究发现若孵育时间 AMB 少于 2 h、FCZ 少于 4 h,虽然可出现荧光染色差异,但不同质量浓度梯度药物的作用效果显示不出来,故将孵育时间分别定为 3 h (AMB) 和 5 h (FCZ)。从本研究结果看,上述培养时间是基本合理的。FCZ 所需孵育时间比 AMB 长,可能与 AMB 与三唑类药物作用机制不同有关,AMB 直接与真菌细胞膜上的麦角固醇

结合,而三唑类药物是通过间接作用影响细胞膜麦角固醇的合成。Ramani 等^[12]用 PI 检测了 AMB、伊曲康唑及伏立康唑对烟曲霉菌的作用,孵育时间 AMB 为 2 h,伊曲康唑及伏立康唑为 3 h,与本研究略有差异,虽然无直接资料证实,推测可能与镰刀菌分生孢子壁较厚有关。

总之,FCST 法具有快速、敏感、准确的优势,是临床检测眼部真菌药物敏感性较具发展潜力的一种新方法。但目前该方法尚处于实验研究阶段,仪器型号、染料、孵育时间、药物等因素均会影响结果的判定,不同实验室 FCST 法结果的可重复性问题及 FCST 法所获结果与临床结果一致性的问题尚未很好地解决,在临床推广应用以前尚需在此方面做进一步的研究。

参考文献

- 宋书华,林跃生,黎明,等.真菌性角膜炎的病原学分析[J].实用眼科杂志,2005,23: 506-508
- Sun XG, Zhang Y, Li R, et al. Etiological analysis on ocular fungal infection in the period of 1989-2000 [J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117: 598-600
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard [S]. NCCLS Document M27-A2. USA: Wayne, 2002
- Steen HB. Flow cytometry of bacteria: glimpses from the past with a view to the future [J]. J Microbiol Method, 2000, 42: 65-74
- Chaturvedi V, Ramani R, Pfaller MA. Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42: 2249-2251
- Rudensky B, Brodine E, Yinnon AM, et al. Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida* species [J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 55: 106-109
- 张嵘,张正良,金亚平.角膜溃疡致病性真菌的检测及体外药敏试验[J].临床检验杂志,2002,20: 380-382
- 钟文贤,谢立信,史伟云,等.真菌性角膜炎 654 例感染谱分析[J].中华医学杂志,2006,86: 1681-1685
- 窦红涛,李若瑜,万哲,等.致病性镰刀菌的体外药敏实验研究[J].中国麻风皮肤病杂志,2006,22: 565-566
- Lalitha P, Shapiro BL, Srinivasan M, et al. Antimicrobial susceptibility of *Fusarium*, *Aspergillus*, and other filamentous fungi isolated from keratitis [J]. Arch Ophthalmol, 2007, 125: 789-793
- 王毓新,耿素英,王智群,等.致病性镰刀菌体外药敏试验研究[J].中华检验医学杂志,2001,24: 217-219
- Ramani R, Gangwar M, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of *Aspergillus fumigatus* and comparison of mode of action of voriconazole vis-à-vis amphotericin B and itraconazole [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47: 3627-3629
- Green L, Petersen B, Steimel L, et al. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry [J]. J Clin Microbiol, 1994, 32: 1088-1091
- Balajee SA, Marr KA. Conidial viability assay for rapid susceptibility testing of *Aspergillus* species [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40: 2741-2745
- Ramani R, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44: 2752-2758
- Pore RS. Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry [J]. J Antimicrob Chemother, 1994, 34: 613-627

(收稿:2008-12-05 修回:2009-08-29)

(本文编辑:王莉红)