

隐球菌性脑膜炎感染菌株对抗真菌药物的体外敏感性检测

In vitro susceptibility test of *Cryptococcus neoformans* isolated from cryptococcal meningitis to antifungal drugs

朱元杰, 温海*, 黄欣, 徐红, 赵瑾, 顾菊林

(第二军医大学长征医院皮肤性病科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 研究隐球菌性脑膜炎患者在一期治疗过程中对抗真菌药物的体外敏感性。**方法:** 采用 NCCLS 的 M27-A 方案, 对分离自 6 名患者脑脊液中的 18 次培养阳性菌株进行两性霉素 B、5-氟胞嘧啶、氟康唑的体外药敏实验以及两性霉素 B 与 5-氟胞嘧啶、两性霉素 B 与氟康唑的联合药敏实验。**结果:** 治疗期间系列菌株对每种药物的 MIC 变化不超过一个滴度; 系列菌株在两性霉素 B 与 5-氟胞嘧啶联合应用、两性霉素 B 与氟康唑联合应用前后的 MIC 变化均在两个滴度以内, 两性霉素 B 与 5-氟胞嘧啶联合应用大多为协同或相加作用。治疗期间未发现有耐药现象发生。**结论:** 在一期治疗过程中, 感染菌株对 3 种抗真菌药的敏感性无变化。两性霉素 B 联合 5-氟胞嘧啶是对隐球菌性脑膜炎有效的一期治疗方法。

[关键词] 脑膜炎, 隐球菌性; 抗药性, 真菌; 抗真菌药; 药物治疗, 联合

[中图分类号] R 519.4 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-1030-03

隐球菌病目前的发病率呈现逐渐升高的趋势, 脑膜炎是隐球菌病最常见的表现形式。隐球菌性脑膜炎治疗的药物选择仍然很少, 两性霉素 B (AmB) 是目前疗效确定的药物之一, 而且需要长期应用, 一期治疗的持续时间在 6 周以上^[1]。是否会出现隐球菌对抗真菌药物的耐药性上升从而影响疗效? 本课题组发现, 临床中许多患者在治疗后隐球菌的活力受到抑制, 表现为脑脊液涂片阳性而培养长期阴性^[2]。这是否也是由于隐球菌对抗真菌药物的耐药性上升所致? 为此, 本研究通过对临床诊断明确的隐球菌性脑膜炎患者多次脑脊液培养阳性的系列菌株应用美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 的 M27-A 方案^[3]进行了体外抗真菌药物的单独与联合抑菌实验, 对治疗中感染菌株对抗真菌药物的敏感性以及联合用药的选择进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 菌株 所有菌株均来自中国医学真菌保藏中心隐球菌专业实验室。实验菌株为 18 次培养阳性的新生隐球菌临床分离保存株, 分离自 6 名诊断明确的 HIV 阴性的隐球菌性脑膜炎患者, 其中每名患者脑脊液培养阳性为 2~4 次; 培养阳性时间间隔为 3~14 d; 一期治疗方法为 AmB 静脉加鞘内注射联合 5-氟胞嘧啶 (5-FC) 口服, AmB 静脉从 1 mg/d 开始, 根据患者反应逐渐加量至 25 mg/d; 鞘内注射从 0.1 mg 开始, 根据患者反应, 每周 2~3 次。5-FC 为 1 mg/kg 口服; 总时间根据患者脑脊液真菌检查情况确定, 均在 8 周以上。

1.2 培养基 (1) 改良沙堡固体培养基 (SDA); (2) RPMI 1640 液体培养基: 取 RPMI 1640 粉末 (FLUKA) 10.4 g, MOPS 粉 (FLUKA) 34.53 g, 900 ml 双蒸水, 振荡直至溶解, 用 1 mol/L NaOH 调整 pH 值至 7.0, 然后定容至 1 L, 滤过消毒, 分装于无菌瓶中, 置 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 抗真菌药 AmB 原粉由上海新先锋药业提供; 5-FC 原粉由中国药科大学提供; 氟康唑 (FCZ) 原粉由上海三维制药公司提供。纯度均大于 99%。

1.4 联合药敏实验步骤 参考 NCCLS 的 M-27A 方案^[3]。(1) 菌株的活化: 用改良 SDA 平皿转种所有选用的菌株 2 次, 每次 48 h。(2) 药物母液的配制: 将药物用二甲亚砜 (DMSO) 溶解为 12.8 mg/ml 的药物母液, 分装于 1.5 ml 的 Eppendorf 管; 置 -20℃ 冰箱贮存备用。(3) 药敏反应板的制备: 将药物母液用 RPMI 1640 液体培养基做稀释液进行 10 级倍比稀释, 使 5-FC、FCZ 的起始浓度为 128 μg/ml, 终末浓度为 0.25 μg/ml, AmB 的起始浓度为 64 μg/ml, 终末浓度为 0.125 μg/ml。各药物浓度均为 2 倍应测试药物浓度。取 2 块无菌 96 孔微量反应板为 1 组, 第 1 块板为单用药敏板, 即于每排 1~10 孔分别加倍比浓度药液 100 μl, 使每种药物的浓度均为 2 倍应测试药物浓度, 第 11 孔加 100 μl 液体培养基为生长对照; 第 12 孔加 200 μl 液体培养基为空白对照。联合用药时选择 AmB 与 5-FC 以及 AmB 与 FCZ 两组分别联合应用。联用棋盘药敏板分横向 (从左至右 10 排孔) 和纵向 (从上至下 8 排孔) 各加两种药物的倍比浓度药液 50 μl (其中一种药物只用 8 个浓度梯度), 使两种药物在 80 个孔中形成 80 个不同的联用药物浓度, 从左上至右下药物浓度递减, 第 11 孔为生长对照; 12 孔为空白对照。(4) 菌悬液的配制: 用 RPMI 1640 培养基将菌悬液浓度稀释为 (1~5) × 10³ CFU/ml。(5) 将配制好的菌悬液 100 μl 于 15 min 内加入预热的药敏反应板中 (第 1~11 孔), 置于 35℃ 培养。

1.5 最低抑菌浓度 (MIC) 的判定 隐球菌于 35℃ 培养 72 h 后用视觉法判定终点; 5-FC、FCZ 组与生长对照孔比较 ≥ 80% 生长抑制所对应的最低药物浓度为 MIC, AmB 组与生长对照孔比较生长完全抑制、培养基清亮所对应的最低药物浓度为 MIC。

[基金项目] 国家自然科学基金 (30471566, 30570097). Supported by National Natural Science Foundation of China (30471566, 30570097).

[作者简介] 朱元杰, 博士, 讲师、主治医师。

E-mail: mycology@126.com

* Corresponding author. E-mail: wenhai98@sohu.com

1.6 质控菌 采用 NCCLS 推荐的近平滑念珠菌 ATCC90018,其 MIC 参考值为:FCZ 0.25~1.0 $\mu\text{g/ml}$,AmB 0.5~2 $\mu\text{g/ml}$,5-FC $\leq 0.125\sim 0.25$ $\mu\text{g/ml}$ [3]。质控菌的 MIC 值在参考值范围内可认为实验结果可以接受。

1.7 联合用药效果评价 计算分数抑菌浓度指数(FICI),即联合用药时各药的最低抑菌浓度分别除以各药单用时 MIC 值的商之和。当 $FICI \leq 0.5$ 时为协同作用; $0.5 < FICI \leq 1$ 时为相加作用; $1 < FICI \leq 2$ 时为无关作用;当 $FICI > 2$ 时为拮抗作用。协同与相加作用认为是两种药物联合应用的指标。

2 结果

2.1 菌株对单个药物在治疗前后敏感性变化 6 名患者的

18 次培养阳性的菌株的药敏实验结果显示,在第一期治疗期间,菌株对 AmB、5-FC 和 FCZ 均敏感,未发现有耐药菌株;在治疗期间系列菌株对每种药物的 MIC 变化不超过一个滴度,提示治疗期间对每种药物的敏感性没有发生变化。

2.2 联合用药敏感性 联合药敏实验结果显示,每一患者在治疗过程中的系列菌株之间对比,AmB 与 5-FC 联合应用,AmB 与 FCZ 联合应用的 MIC 变化在两个滴度以内,均显示较好的一致性,未发现联合应用的耐药,提示在治疗期间对联合应用的药物敏感性没有发生变化。AmB 与 5-FC 联合应用效果主要是相加和协同作用(15/18),未发现拮抗作用;AmB 与 FCZ 联合应用出现了拮抗作用(1/18),而且无关作用很多(9/18),详见表 1。

表 1 临床系列株的体外药敏实验结果

菌株	MIC($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)				FICI-AmB/ 5-FC	AmB / 5-FC 作用	FICI-AmB/ FCZ	AmB/ FCZ 作用	
	AmB	5-FC	FCZ	AmB/5-FC					
A1	2	0.5	8	0.5/0.063	1/0.5	0.375	协同	0.563	相加
A2	2	0.5	4	1/0.063	1/0.5	0.626	相加	0.625	相加
A3	1	1	8	0.25/0.5	1/0.5	0.75	相加	1.063	无关
B1	0.5	2	2	0.5/1	0.5/0.5	1.5	无关	1.25	无关
B2	0.5	1	2	0.25/0.5	0.5/2	1	相加	2	无关
C1	1	4	4	0.5/1	0.5/4	0.75	相加	1.5	无关
C2	1	4	4	0.5/1	0.5/4	0.75	相加	1.5	无关
D1	0.5	2	16	0.5/1	1/0.25	1.5	无关	2.016	拮抗
D2	1	2	8	0.25/1	1.0/1.0	0.75	相加	1.125	无关
D3	0.5	1	8	0.25/0.5	0.5/0.5	1	相加	1.063	无关
D4	0.5	2	16	0.25/0.5	0.5/0.25	0.75	相加	1.016	无关
E1	2	1	4	0.5/0.25	0.5/0.125	0.5	协同	0.531	相加
E2	1	2	2	0.5/0.5	0.25/0.25	0.75	相加	0.375	协同
E3	2	1	4	0.5/0.25	1/0.125	0.5	协同	0.563	相加
E4	2	2	4	1/0.5	0.5/0.25	0.75	相加	0.313	协同
F1	1	0.5	8	0.5/0.063	0.5/1	0.626	相加	0.625	相加
F2	0.5	1	8	0.25/0.063	0.5/0.5	0.563	相加	1.063	无关
F3	1	0.5	4	1/0.063	0.5/1	1.063	无关	0.75	相加
ATCC90018	1	0.063	0.5	0.016/0.06	1/0.031	1.016	无关	1.06	无关

A~F 代表 6 名患者,1~4 代表该患者的第 1~4 次培养阳性菌株

3 讨论

隐球菌性脑膜炎的治疗目前采用分期疗法,目前认为,一期治疗首选 AmB 静脉加鞘内注射联合口服 5-FC,为预防复发,推荐时间在 8 周以上;二期治疗选用口服 FCZ,时间在 2 个月以上[4,5]。抗真菌药物长期应用诱导真菌耐药的报道越来越多,主要是一些酵母菌[6]。抗真菌药物的耐药导致了治疗时间的延长以及药物的疗效不佳。在隐球菌性脑膜炎的治疗中,由于应用抗真菌药物治疗的时间比较长,而且由于抗真菌药物的不良反应都比较大,应用剂量都不能过大,因此治疗过程中存在隐球菌对抗真菌药物的耐药性上升的可能性。目前已经确认在体外可以通过低浓度药物培养的方法使隐球菌产生耐药,而且国外已经有临床报道,在 HIV 阳性的隐球菌性脑膜炎患者发生了对抗真菌药物耐药[7]。本研究对隐球菌脑膜炎治疗过程中菌株敏感性的变

化进行了探讨。

我们针对在临床中收集的隐球菌性脑膜炎患者在临床治疗中的 18 次系列菌株进行了体外敏感性实验的结果显示,在第一期治疗的过程中,系列菌株前后对比,AmB、5-FC 和 FCZ 的 MIC 变化幅度没有超过 1 个滴度,没有发现在治疗过程中出现耐药的现象,同时未发现有原发性自身耐药菌株。已经明确,单独应用 5-FC 治疗隐球菌极易产生耐药[1],而在与 AmB 联合应用后我们没有发现耐药的产生,而且联合药敏也显示两者效果主要是相加和协同作用,未发现拮抗作用。这也进一步证实了 5-FC 和 AmB 联合应用可以增强疗效,避免单独应用时出现的耐药。体外实验证实 AmB 与 5-FC 联合应用以相加或协同作用为主,支持二者联合是一期治疗的最佳选择。

隐球菌性脑膜炎的二期治疗主要药物是 FCZ。虽然目前隐球菌对 FCZ 耐药的报道越来越多,但实验中我们发现,

在一期治疗中,菌株对于 FCZ 的敏感性没有变化,也没有发现隐球菌对 FCZ 的耐药株。也就是说,在我们所观察的时间内,一期治疗(AmB+5-FC)不会诱导隐球菌对 FCZ 的耐药发生。二期治疗选用 FCZ 应该是有效的^[1]。

虽然目前报道的新生隐球菌对 AmB 的耐药较少,但是对 5-FC 和 FCZ 的耐药的情况越来越多^[7,8]。由于在隐球菌脑膜炎的治疗过程中,患者的脑脊液真菌培养在开始抗真菌治疗后不久即很快转为阴性,收集到临床系列菌株进行前后对比比较困难,我们收集到的菌株也大部分集中在开始治疗后 2 周内。因此我们的结果只能说明在治疗后的 2 周内未发生耐药。限于目前体外实验的方法,目前还难以对整个治疗期间的敏感性做出完整评价。

[参考文献]

[1] Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, et al. Practice guideline for the management of cryptococcal disease. Infectious Disease Society of America [J]. Clin Infect Dis, 2000, 30:710-718.

[2] 朱元杰,温海,徐红,等. 脑脊液动物接种确诊培养阴性的新生隐球菌性脑膜炎[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25:692.

[3] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing

of yeast; Approved Standard M27-A[S]. USA; Pennsylvania, 1997;1-21.

[4] 吴绍熙,郭宁如,廖万清. 现代真菌病诊断治疗学[M]. 北京:北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社,1997;68-76.

[5] 朱元杰,温海,洪微. 鞘内注射两性霉素 B 联合其他抗真菌药治疗隐球菌性脑膜炎 2 例[J]. 临床皮肤科杂志, 2003, 32:359.

[6] Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, et al. *In vitro* susceptibilities of clinical isolates of *Candida species*, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus species* to itraconazole: global survey of 9 359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43:3807-3810.

[7] Bossche HV, Dromer F, Improvisi I, et al. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi[J]. Med Mycol, 1998, 36 Suppl: 119-128.

[8] Sar B, Monchy D, Vann M. Increasing *in vitro* resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002[J]. Antimicrob Chemother, 2004, 54:563-565.

[收稿日期] 2006-01-12 [修回日期] 2006-04-25

[本文编辑] 孙岩