

CLSI M38-A2 肉汤稀释法对蝙蝠蛾拟青霉 (*Paecilomyces hepiali*) 的药敏检测

赵婷¹ 姚粟¹ 李辉¹ 薛强伟² 程池^{1*}

(1. 中国食品发酵工业研究院 中国工业微生物菌种保藏管理中心 北京 100027)

(2. 山东优福虫草素生物科技有限公司 山东 泰安 271000)

摘 要: 【目的】对保健食品生产菌株蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomyces hepiali*)进行 6 种常见抗真菌药物: 伊曲康唑、酮康唑、伏立康唑、环吡酮胺、5-氟胞嘧啶、氟康唑的药敏检测。

【方法】参考美国国家临床实验室标准化委员会 CLSI M38-A2 《肉汤稀释法抗真菌药敏试验参考方案》。【结果】质控菌株 MIC 值均在参考范围之内, 蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)对以上 6 种药物的 MIC 值分别为 1 mg/L、0.5 mg/L、0.25 mg/L、≥ 128 mg/L、64 mg/L、2 mg/L。【结论】M38-A2 方案适合用来测定蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)对抗真菌药物的敏感性, 但获得菌株耐药敏感性的判别标准, 仍需进一步的试验数据。

关键词: 蝙蝠蛾拟青霉, 药敏试验, CLSI M38-A2

Antifungal susceptibility test of *Paecilomyces hepiali* by CLSI M38-A2 broth dilution method

ZHAO Ting¹ YAO Su¹ LI Hui¹ XUE Qiang-Wei² CHENG Chi^{1*}

(1. China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, China Center of Industrial Culture Collection, Beijing 100027, China)

(2. Shandong UF Cordycepin Biotechnology Co., Ltd., Taian, Shandong 271000, China)

Abstract: [Objective] To test filamentous fungi antifungal susceptibility, this study determined the minimal inhibitory concentration (MIC) values of 6 antifungal agents: Itraconazole

基金项目: 北京市国际科技合作项目 (No. Z111105054611011)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-10-64616613; 邮箱: cheng100027@163.com

收稿日期: 2011-11-14; 接受日期: 2012-02-16

(ITC), Ketoconazole (KET), Voriconazole (VRC), Ciclopirox (CIC), 5-Fluorocytosine (5FC), Fluconazole (FLU) to the strain *Paecilomyces hepiali* which usually used in health food industry. [Methods] Method of Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A2 <Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition> was referred. [Results] The results showed that the quality control strain *Candida parapsilosis* ATCC 22019^T MIC values were within the reference range, the strain *P. hepiali* MIC values for the 6 antifungal agents were 1 mg/L, 0.5 mg/L, 0.25 mg/L, ≥ 128 mg/L, 64 mg/L, 2 mg/L respectively. [Conclusion] M38-A2 method could be applied to determine the susceptibility of *P. hepiali* to antifungal agents. But, more tests needed to acquire the standard interpretation of the strains susceptibility.

Keywords: *Paecilomyces hepiali*, Susceptibility test, CLSI M38-A2

蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomyces hepiali*)为天然冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)中分离到的内寄生菌,其菌丝体发酵物具有广泛的药理活性,如降血脂、止咳祛痰、镇静、解痉等^[1]。蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)已列入卫生部(2001)84号文件《可用于保健食品的真菌菌种名单》。目前,已实现蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)发酵法生产菌丝体作为冬虫夏草药材的替代药品或保健品^[2]。

2010 年新版 GMP 实施后,为加强保健食品生产管理,国家食品药品监督管理局(SFDA)于 2011 年 9 月发布了《保健食品良好生产规范(修订稿)》征求意见稿,生产企业进行保健食品产品申报时,应遵循:“菌丝体原料、益生菌类原料和藻类原料采购应当索取菌株或品种鉴定报告、稳定性报告和不含耐药因子的证明材料。”其中,药敏试验的要求是从微生物菌种或其代谢产物的食用安全方面考虑,以避免外源耐药因子带入体内而引起耐药性。然而,对于产孢丝状真菌的药敏检测,尤其是应用于保健食品产业的产孢丝状真菌,目前国内缺乏相关的检测方法、标准及检测机构,本文参照美国国家临床实验室标准化委员会(CLSI) M38-A2 《肉汤稀释法抗真菌药敏试验参考方案》^[3]对蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)进

行了药敏检测,期望为相关检测方法及标准的建立提供部分技术依据,进而更好地服务于广大保健食品生产企业。

1 材料

1.1 试验菌株

蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*),由山东优福虫草素生物科技有限公司提供。

1.2 质控菌株

近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*) AS 2.1846^T=ATCC 22019^T,购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.3 抗真菌药物

试验所用 6 种抗真菌药物,均购自中国食品药品检定研究院,配制成储存液置-20 °C 备用,相关信息见表 1。

1.4 培养基及试剂

RPMI-1640 液体培养基(含谷氨酰胺,不含碳酸氢盐,含酚红作为 pH 值指示剂),购自美国 Thermo Fisher 公司;沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA),马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),购自北京陆桥技术责任有限公司;三氮吗啉丙磺酸(MOPS),购自美国 Amresco 公司;96 孔灭菌酶标板购自美国 Costar 公司。

表 1 本试验涉及的 6 种常用抗真菌药物
Table 1 Six commonly used antifungal agents in this experiment

类别 Type	中文名称 Chinese name	英文名称 English name	缩写 Abbreviation	溶剂 Solvent	储存液终浓度 Final concentration (mg/L)
咪唑类 Imidazole	酮康唑	Ketoconazole	KET	二甲基亚枫(DMSO)	1 600
	伊曲康唑	Itraconazole	ITC	二甲基亚枫(DMSO)	1 600
三唑类 Triazole	氟康唑	Fluconazole	FLU	无菌蒸馏水	5 120
	伏立康唑	Voriconazole	VRC	二甲基亚枫(DMSO)	1 600
嘧啶类 Pyrimidine	5-氟胞嘧啶	5-Fluorocytosine	5FC	无菌蒸馏水	5 120
其他 Others	环吡酮胺	Ciclopirox	CIC	二甲基亚枫(DMSO)	1 600

2 方法

2.1 微量药敏板制备

抗真菌药物按照使用说明操作, 直接或 80 °C 干燥至恒重后, 称量 0.016 0 g 伊曲康唑、酮康唑、伏立康唑、环吡酮胺, 分别溶于 10.0 mL DMSO 中, 配制成 1 600 mg/L 的存储液, 称量 0.051 2 g 5-氟胞嘧啶、氟康唑, 分别溶于 10.0 mL 无菌蒸馏水中, 配制成 5 120 mg/L 的存储液, 置 -20 °C 储存备用。

用 DMSO 将非水溶性药物储存液按 1:50 稀释至 2 倍终浓度, 即伊曲康唑、酮康唑、伏立康唑、环吡酮胺为 32 mg/L, 用 RPMI-1640 液体培养基(以终浓度为 0.165 mol/L 的 MOPS 为缓冲液, 25 °C 调节 pH 7.0)将水溶性药物储存液按 1:40 稀释至 2 倍终浓度, 即 5-氟胞嘧啶、氟康唑为 128 mg/L。取无菌 96 孔酶标板, 在第 1 孔加入稀释后的抗真菌药物 200 μL, 第 2-12 孔加入 RPMI-1640 培养基 100 μL。从第 1 孔吸取 100 μL 药液加入第 2 孔, 充分混匀后吸取 100 μL 加入第 3 孔, 依次做倍比稀释至第 12 孔, 第 12 孔的药液混匀后吸取 100 μL 弃去。配置好的药敏板从第 1 孔至第 12 孔药物浓度由高到底为 32-0.015 6 mg/L 或 128-0.062 5 mg/L。另设空白对照及未加药物

的生长对照, 非水溶性药物对照中加入 1 μL DMSO。

2.2 供试菌株孢子悬液制备

将供试菌株蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上 25 °C 培养 7-10 d, 用 1 mL 无菌 0.85% 生理盐水冲洗孢子, 转入无菌试管, 静置 5 min, 取上部均质孢子悬液于另一无菌试管, 涡旋振荡 15 s, 用分光光度计校正孢子悬液浓度至(0.4-5.0)×10⁴ CFU/mL (波长 530 nm 时, OD 值为 0.09-0.13)。

2.3 孢子悬液浓度质控验证

将蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)孢子悬液梯度稀释后, 取 0.01 mL 涂布于沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)上, 25 °C-28 °C 培养 1-5 d, 菌落计数以验证孢子悬液浓度。

2.4 接种

在 96 孔板的 1-12 列孔每孔加入 100 μL 的孢子悬液, 25 °C 静置培养, 48 h 后观察结果。

2.5 MIC (最低抑菌浓度)值判读

伊曲康唑、伏立康唑 MIC 值为肉眼观察 100% 抑制生长的药物浓度; 环吡酮胺 MIC 值为肉眼观察 80% 及以上抑制生长的药物浓度; 氟康唑、酮康唑 MIC 值为肉眼观察 50% 及以上抑制

生长的药物浓度; 5-氟胞嘧啶没有规定, 暂定 MIC 值为肉眼观察 50%及以上抑制生长的药物浓度^[4-5]。试验菌株均做 2 次重复, 试验结果由至少 2 人共同判读, 以保证结果的准确性。

3 结果

3.1 方法质控

6 种抗真菌药物对质控菌株近平滑假丝酵母 (*C. parapsilosis*) ATCC 22019^T 的 MIC 值检测结果见表 2, 质控菌株 MIC 检测值均在参考范围之内, 表明实验操作及结果可信。

3.2 接种量

经分光光度计测定, 试验菌株蝙蝠蛾拟青霉 (*P. hepiali*)孢子悬液在波长 530 nm 时 OD 值为 0.09, 经平皿菌落计数验证, 孢子悬液浓度为 1.1×10⁴ CFU/mL, 两者结果相互吻合。

表 2 6 种抗真菌药物对质控菌株的 MIC 值 Table 2 MIC values for QC strain susceptibility tests against of six antifungal agents		
抗真菌药物 Antifungal agents	近平滑假丝酵母 (<i>C. parapsilosis</i>) MIC 值 MIC values for QC strain (mg/L)	
	检测值 Test	参考范围
	results	Reference range
伊曲康唑 ITC	0.5	0.12–0.50
酮康唑 KET	0.125	0.06–0.50
伏立康唑 VRC	0.062 5	0.03–0.25
5-氟胞嘧啶 5FC	0.5	0.12–0.50
氟康唑 FLU	2	1.0–4.0
环吡酮胺 CIC	4	-----

3.3 MIC 值判读

6 种抗真菌药物对蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)的 MIC 值检测结果见图 1, 试验菌株除 5-氟胞嘧啶外, 其他药物 MIC 值拐点均落于设定的药物浓度

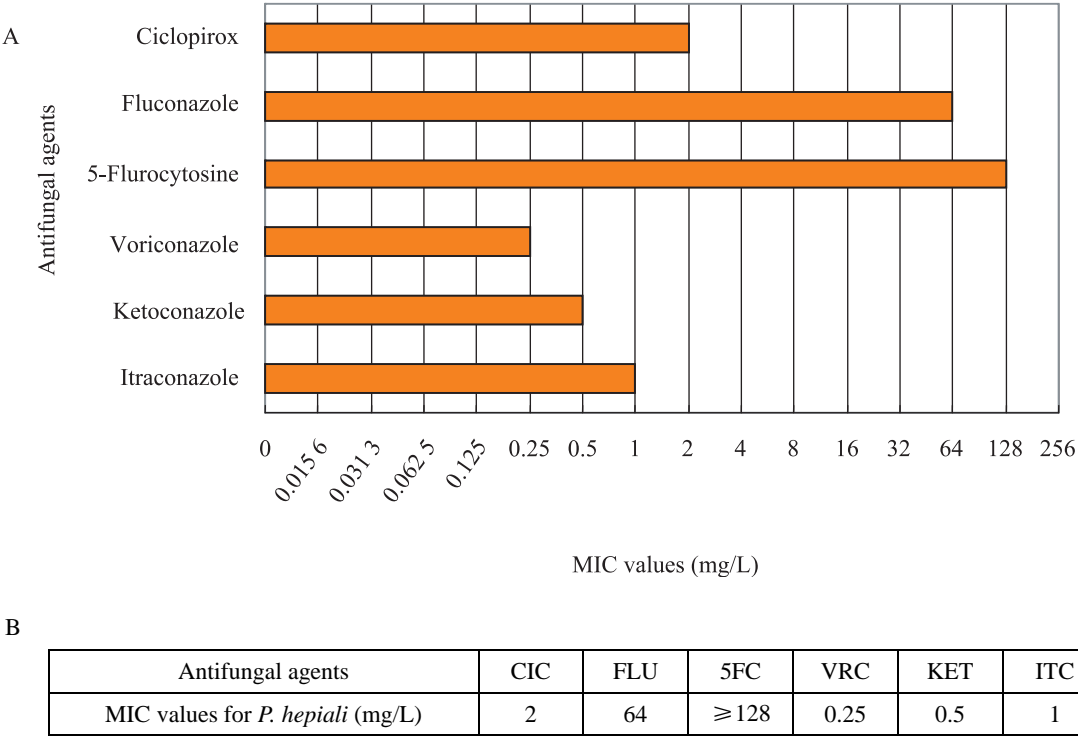


图 1 6 种抗真菌药物对蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)的 MIC 值
Fig. 1 MIC values for *P. hepiali* susceptibility tests against of six antifungal agents

范围之内, 5-氟胞嘧啶根据判读标准 MIC 值为 ≥ 128 mg/L。图 2 给出了蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)在微量药敏板上 25 °C 培养 48 h 后的生长照片, 直观地显示了供试菌株的生长情况, 由于菌株生长代谢产酸, 可以明显看出含酚红作为 pH 值指示剂的生长孔颜色变黄。

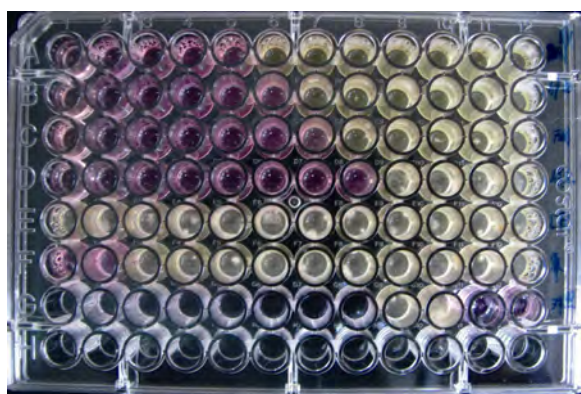


图 2 蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)在微量药敏板上 25 °C 培养 48 h 后的生长情况

Fig. 2 Growth of strain *P. hepiali* on micro-susceptibility plate after 48 h at 25 °C

CLSI M100-S21《抗微生物药敏试验参考方案 21 版》中规定了纸片扩散法及最低抑菌浓度稀释法对各类细菌的敏感(Sensitive)、中介(Intermediate)、抗性(Resistant)药敏判别标准; CLSI M27-A3《酵母的肉汤稀释法抗真菌药敏试验参考方案》中规定了假丝酵母属(*Candida* spp.)及部分真菌的敏感(Sensitive)、剂量依赖型敏感(Sensitive-dose dependent)、中介(Intermediate)、抗性(Resistant)药敏判别标准。对于产孢丝状真菌, 由于研究进展较缓慢, 研究菌株的试验数据量较少, 目前 CLSI 还未提出判别标准, 仅对临床常用的几种药物给出了建议判别标准, 但根据 M38-A2 方法可以得到相关 MIC 值, MIC 值对于菌株的药物敏感性能描述也是重要的指征, 并为今后判别标准的提出积累试验数据。本试验参照 M38-A2 方案步骤对试验菌株进行 2 次重复试验,

所得 MIC 值结果基本相同, 验证了 M38-A2 方案对于产孢丝状真菌药敏性能检测的可行性。

CLSI M38-A2 规定的培养温度为 35 °C, 该培养条件可以促进产孢, 但对于少数菌株培养条件可能存在差异, 如供试菌株蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)在 CLSI 标准所述的 35 °C 不生长, 因此本试验采用 25 °C 进行培养及药敏测试。另外, MIC 值拐点的判读应以抑制菌体生长的最低浓度为标准, 不应以 pH 值指示剂颜色的改变为标准, 因为有些菌株伴随着代谢产酸带来的颜色改变, 而另外一些代谢不产酸的菌株就不会发生颜色改变。

4 讨论

对于产孢丝状真菌的液基稀释抗真菌药敏试验参考方案, 美国临床实验室标准化委员会(CLSI)于 1998 年发布了 M38-P, 于 2002 年更新为 M38-A, 于 2008 年更新为 M38-A2。M38-A2 被检测真菌范围为包括临床常见侵袭真菌感染菌种的产孢丝状真菌, 不包括非产孢丝状真菌, 也不适应于双相真菌的酵母相。M38-A2 与上一版比较, 增加了棘白菌素类药物最低有效浓度(MEC, minimal effective concentration)的判别标准, 增加了 4 种药物的结果判读及结果解释, 抗真菌药物更新至 14 种, 质控及参考菌株更新至 13 株^[3]等。本文选取了 14 种抗真菌药物中的 6 种, 该 6 种抗真菌药物国内有标准品提供, 13 株质控菌株中的 1 株, 该株质控菌株国内有保藏, 其他抗真菌药物及质控参考菌株都需要引进, 然而相应的引进费用高昂、程序繁琐, 是目前建立标准化方法亟待解决的问题之一。

目前产孢丝状真菌抗药物敏感性试验研究主要集中在临床上^[6], 目的一般是研究开发具有广谱抗真菌性能的药物, 或对抗真菌药物的抗菌谱进行监测^[4,7-11]。以应用于保健食品的真菌为研究

对象,测定其对不同抗真菌药物的敏感性,国内还未见报道,一方面也显示了国家政策文件与相关检测标准或方法不配套、不同步的矛盾。本研究期望对相关检测方法的建立提供部分技术依据,但由于受试菌株数量少,无法进行统计学分析,未来需要更多试验数据的积累,以获得菌株耐药敏感性的判别标准,最终服务于广大保健食品生产企业及检测机构。

参 考 文 献

- [1] Jiang Y, Yao YJ. Anamorphic fungi related to *Cordyceps sinensis*[J]. *Mycosystema*, 2003, 22(1): 161-176.
- [2] Zhang P. Advances on *Cordyceps* genus fungi research[J]. *Journal of Biology*, 2003, 20(6): 43-45.
- [3] John HR, Barbara DA, Beth AS, et al. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, Approved standard-Second edition M38-A2[S]. Clinical Laboratory Standards Institute, 2008, 28(16):1-35.
- [4] 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.
- [5] 周铁丽,彭婷婷,李玉萍,等. 肺部曲霉菌属感染的临床与耐药性研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2007, 17(10): 1309-1311.
- [6] 刘锦燕,项明洁. 抗真菌药物敏感性试验方法研究进展[J]. *检验医学*, 2009, 24(12): 927-931.
- [7] Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, et al. Wild-type minimum effective concentration distributions and epidemiologic cutoff values for caspofungin and *Aspergillus* spp. as determined by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2010, 67(1): 56-60.
- [8] 陈剑,张静,易金玲,等. 参照 CLSI M38-A 方案测定皮肤癣菌临床株对4种抗真菌药物的敏感性[J]. *中国真菌学杂志*, 2009, 4(4): 214-217.
- [9] 沈金雄,张嵘,王红宇. NCCLS 肉汤稀释法检测产孢丝状真菌药物敏感试验的应用[J]. *中国感染控制杂志*, 2003, 2(1): 11-14.
- [10] 王俊杰,王颖,万喆,等. NCCLS M38-P 方案对致病性毛霉菌的体外药敏实验研究[J]. *中国真菌学杂志*, 2010, 5(4): 230-231.
- [11] 胡小平,万喆,李若瑜. 应用 CLSI M38-A2方案测定须癣毛癣菌对抗真菌药物敏感性[J]. *中国真菌学杂志*, 2011, 6(6): 149-153.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。