

## · 论 著 ·

## 培养条件对两性霉素 B 抑制白色念珠菌作用的影响

刘丽英, 董小青, 王丹敏

【摘要】目的 综合考察各种因素(不同的培养基、培养基的 pH 值、真菌接种浓度等)对 AmB 抑制白色念珠菌作用的影响,为临床合理用药提供理论依据。方法 液体稀释法。结果 在不同的培养基中,AmB 对白色念珠菌的 MIC 值不同,随着 pH 的增高及真菌接种菌液浓度增加,其 MIC 值增加。结论 AmB 对白色念珠菌的 MIC 值会受到多种因素的影响,所以,进行药物的抗菌活性研究时应制定并严格执行统一的标准。

【关键词】两性霉素 B;白色念珠菌;抑制

【中图分类号】R446

【文献标识码】A

【文章编号】1680-6115(2009)01-0009-02

Influence of culture conditions on MIC values of amphotericin B against *Candida albicans*

LIU Li - ying, DONG Xiao - qing, WAN Dan - min. Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of various factors, such as the type of medium, Ph of medium, size of inoculum on the activity of amphotericin B (AMB) against *Candida albicans*, so as to provide evidences for rational use of the drug. Methods The broth dilution test was examined. Results The activity of AmB against *Candida albicans* was influenced by the type of medium. The minimum inhibition concentrations (MIC) increased with the increase of pH and inoculum concentration. Conclusion The study of antifungal activity must establish and strictly implement unified standard.

【Key words】amphotericin B; *Candida albicans*; inhibition

药物的抗真菌活性受到多种因素的影响,例如,不同的培养基、培养基的 pH 值、培养时间、培养温度、真菌接种浓度、真菌形态、血清、有氧与厌氧环境等。两性霉素 B 是目前临床上应用的抗真菌药物,本研究是综合考察各种因素对其抑制白色念珠菌作用的影响,为临床合理用药及进一步药用价值的开发奠定基础。

## 1 实验材料

1.1 菌株 白色念珠菌 *Cla*, 购于中国医学真菌保藏中心。

1.2 药品 两性霉素 B(amphotericin B, AmB), 上海先锋药业公司, 上海第二制药厂生产。AmB 溶于蒸馏水中制备成浓度为 1280  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的药物原液, 过滤除菌。临用时用灭菌蒸馏水稀释为 128  $\mu\text{g}/\text{ml}$  最高浓度药液。

1.3 培养基 改良沙氏液体培养基(1% 蛋白胨, 4% 葡萄糖); YEPD 培养基(2% 蛋胨, 2% 葡萄糖, 1% 酵母浸粉)。

1.4 其他 HZQ - X100A 型恒温振荡培养箱(上海一恒科学仪器有限公司产品); 5000  $\mu\text{l}$ 、1000  $\mu\text{l}$  加样枪(法国 GILSON 产品); SN - CS - 2D 单人净化工作台(苏州净化设备厂); 改良沙堡氏液体培养基(北京奥博星生物技术责任有限公司)。血球计数板、显微镜、滤器(水质滤膜)等。

## 2 实验方法

2.1 不同的培养基对 MIC 值的影响 取活化 2 次并处于对数生长期的白色念珠菌, 用血球计数板计数菌浓度使约为  $10^5$  cfu/ml, 以液体稀释法<sup>[1]</sup>测定改良沙氏液体培养基和 YEPD 培养基对最低抑菌浓度的影响: (1) 2 ~10 管加 1ml 培养基; (2) 1 管加 1ml 药液(128  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 2 管加 1ml 药液(128  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 然后用枪尖吹打混匀, 吸取 1ml 到第 3 管, 依次倍比稀

释至第 8 管后弃去; (3) 取上述浓度为  $10^5$  cfu/ml 的 0.1 ml 菌液按 9:1 的顺序加入上述 9 管中, 28℃ 培养 24h, 不搅动情况下, 以培养基清晰的试管为菌株 100% 受抑制, 此管的药物浓度即为最低抑菌浓度 (MIC)。

2.2 培养基 pH 值对 MIC 值的影响 用 0.1 mol/L 甘氨酸 - 盐酸缓冲液 (pH 3~5) 和磷酸盐缓冲液 (pH 6~8) 调整沙氏培养基的 pH 分别为 3、5 和 8, 然后按上述方法测定 MIC 值。

2.3 接种真菌浓度对 MIC 值的影响 将浓度为  $10^2$  cfu/ml,  $10^3$  cfu/ml,  $10^4$  cfu/ml,  $10^5$  cfu/ml,  $10^6$  cfu/ml 的菌液接种于改良沙氏液体培养基, 其余步骤与上法同, 测定其 MIC 值。

### 3 结果

3.1 不同的培养基对 MIC 值的影响 AmB 在两种培养基中的最低抑菌浓度不同, 在改良沙氏液体培养基 (pH 5~6) 中的 MIC 为 8  $\mu$ g/ml, 在 YEPD 液体培养基 (pH 5~6) 中的 MIC 为 16  $\mu$ g/ml。

3.2 培养基 pH 对 MIC 值的影响 结果发现在沙氏培养基中, pH 为 3 时其 MIC 值为 32  $\mu$ g/ml, pH 为 5 时其 MIC 值为 8  $\mu$ g/ml, pH 为 8 时在最高药物浓度的条件下白色念珠菌也能很好的生长。

3.3 接种真菌浓度对 MIC 值的影响结果 见表 1。

表 1 接种真菌浓度对 MIC 值的影响结果

接种菌液浓度 (cfu/ml)	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$
MIC 值 ( $\mu$ g/ml)	2	4	8	8	32

### 4 讨论

培养基的种类及其 pH、接种真菌浓度对抗真菌药物在试管内的抗真菌活性影响很大<sup>[2]</sup>。如氟康唑在低 pH 时活性可降低 1000 倍。甚至同一种培养基, 由于 pH 不同, 其抗菌活性也不一样<sup>[3]</sup>。因此, 国外在研究抗生素和化学合成药物的抗真菌活性时, 对使用的培养基种类及其 pH 非常重视, 常选用不同的培养基和把同一种培养基调整成不同的 pH 进行研究。国内绝大多数研究者只用沙氏培养基, 对培养基的 pH 也没有进行调整, 所以可能影响某些药物的抗真菌效果。pH 的不同可能是药物在两种不同培养基中的 MIC 不同的原因之一。

在不同的实验中, 实验条件不尽相同, 需要接种

与积累的菌量不同。所以需要考察接种真菌菌液浓度对药物敏感性的影响。如表 1 所见接种真菌量在  $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  cfu/ml 时, PLAB 对白色念珠菌的 MIC 分别为 2、4、8、8、32  $\mu$ g/ml。随着接种菌量的增加, 最低抑菌浓度也增加, 这可能与药物需作用于真菌细胞的数量有关, 接种菌量的大小直接影响抗真菌药物的抗菌效果。在一般情况下, 在一定范围内, 接种的菌量越大, 药物的抗菌效果往往就越差。如很多研究者在做中药抗丝状真菌实验时, 直接从菌种中取一小块菌块接种到含药培养基中。这样, 不同研究者取的菌块大小差别较大, 甚至同一研究者在同一批实验中, 在不同的试管中接种的菌量也不一样, 这就会影响中药抗真菌实验结果的准确性。这也可能是对同一种药物, 不同研究者所得的结果不一致的主要原因<sup>[4]</sup>。

AmB 具有较强的抗白色念珠菌的作用, 其抗白色念珠菌的活性依赖于所选择的实验条件, 体外 MIC 决定于培养基的种类、培养基的 pH 值、接种菌量、血清的加入量、培养时间、氧气的含量等。在改良沙氏培养基的 MIC 低于在 YEPD 培养基中的 MIC; 接种浓度增加, 抑菌效果降低; 抑菌活性有 pH 依赖性, 在低 pH 时, 药物的 MIC 较低, 在高 pH 时, 药物的 MIC 显著升高。多年来, 抗真菌药物敏感试验方法不统一, 与体内药效不完全一致, 以致发展缓慢。美国国家临床实验室标准委员会的抗真菌药物敏感性试验专门委员会于 1992 年公布了世界第一个试验标准 M27 - P (NCCLS), 酵母菌液体培养基稀释法抗真菌药物敏感性实验的参考方法, 用于规范药物敏感性实验的方法, 以使得所得的实验结果更加可信, 更加有利于指导临床用药。

#### 【参考文献】

- 1 刘运德. 微生物学检验. 北京: 人民卫生出版社, 2004, 150 - 151.
- 2 刘伟, 李若瑜. 抗真菌药物敏感性试验在真菌感染防治中的作用. 中华检验医学杂志, 2005, 28(4): 349 - 351.
- 3 关洪全. 抗真菌中药研究方法学的几点思考. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(6): 404 - 406.
- 4 Kazuo Iwata, Yoshinori Yamamoto, Hideyo Yamaguchi, et al. In vitro studies of Aculeacin A, a new antifungal antibiotic. J Antibiotics. 1982, 35(2): 203 - 209.

(编辑: 李 木)