

环孢素 A 联合抗真菌药物体外抗茄病镰刀菌效果研究

陈晓莲, 杨镇朵, 丁辉, 何宏, 吴娇婵, 胡献铝, 钟兴武

引用: 陈晓莲, 杨镇朵, 丁辉, 等. 环孢素 A 联合抗真菌药物体外抗茄病镰刀菌效果研究. 国际眼科杂志 2020;20(9):1567-1572

基金项目: 海南省自然科学基金团队项目 (No.2017CXTD011); 海南省卫生计生行业科研项目 (No.1601032037A2002)

作者单位: (570311) 中国海南省海口市, 中山大学中山眼科中心海南眼科医院 (海南省眼科医院) 海南省眼科学重点实验室

作者简介: 陈晓莲, 毕业于广州医学院, 医学学士, 副主任技师, 检验科主任, 研究方向: 医学检验临床微生物学。

通讯作者: 钟兴武, 毕业于中山大学, 医学博士, 主任医师, 教授, 海南省眼科医院常务副院长, 研究方向: 眼表与角膜病、眼视光学. zhongxwu@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2020-03-13 修回日期: 2020-08-10

摘要

目的: 研究免疫抑制剂环孢素 A 联合使用抗真菌药物对镰刀菌体外抗真菌药物敏感性的影响。

方法: 采用美国临床实验室标准化委员会 (CLSI) M27-Ed4 及 M38-A3 方法测定伏立康唑 (voriconazole)、那他霉素 (NAT) 和两性霉素 B (Amphotericin B) 及氟康唑 (FLU) 对 22 株镰刀菌的最低抑菌浓度 (MIC), 棋盘法测定四种抗真菌药物单独及联合环孢素 A 使用抗真菌作用。

结果: 那他霉素、伏立康唑、两性霉素 B 和氟康唑对镰刀菌 (22 株) MIC 范围分别是 2~8、1~8、1~8 和 8~512 μg/mL。体外联合用药时, 环孢素 A 与氟康唑对 64% 菌株 (14/22) 有协同效应, 与两性霉素 B 对 41% 菌株 (9/22) 有协同效应, 对所有菌株无拮抗效应。联合使用环孢素 A 后, 镰刀菌对两性霉素 B 药物敏感性由 4.5% 提升至 68.2% ($P < 0.001$)。

结论: 镰刀菌在体外对他那霉素敏感, 对伏立康唑部分敏感。与环孢素 A 联合应用时, 可与氟康唑及两性霉素 B 产生协同效应, 并显著提高镰刀菌对两性霉素 B 药物敏感性。

关键词: 真菌性角膜溃疡; 抗真菌药物; 微生物敏感试验; 镰刀菌; 环孢素 A

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.9.20

In vitro interactions between antifungals and Cyclosporin A against Fusarium solani

Xiao-Lian Chen, Zhen-Duo Yang, Hui Ding, Hong He, Jiao-Chan Wu, Xian-Lyu Hu, Xing-Wu Zhong

Foundation items: Hainan Provincial Natural Science Foundation Team Project (No.2017CXTD011); Research Projects of Hainan Health and Family Planning Commission (No.1601032037A2002) Hainan Eye Hospital and Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Haikou 570311, Hainan Province, China

Correspondence to: Xing-Wu Zhong. Hainan Eye Hospital and Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Haikou 570311, Hainan Province, China. zhongxwu@mail.sysu.edu.cn

Received: 2020-03-13 Accepted: 2020-08-10

Abstract

• **AIM:** To investigate the *in vitro* interaction between antifungals and tacrolimus acting alone or in combination against *Fusarium solani*.

• **METHODS:** According to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-Ed4 and M38-A3, 22 strains of *Fusarium solani* were used to perform drug sensitivity tests with chessboard microdilution method by cyclosporin A combined with 4 kinds of antifungal drugs *in vitro*.

• **RESULTS:** The MIC ranges of natamycin, voriconazole, amphotericin B and fluconazole against 22 strains of *Fusarium solani* were 2-8, 1-8, 1-8 and 8-512 μg/mL respectively. When combined with tacrolimus *in vitro*, the synergistic effects of fluconazole and Amphotericin B were observed in 64% and 41% strains respectively. There were no antagonistic effects observed in all combined drug tests. With the combination, the sensitivity of *Fusarium* to amphotericin B was significantly increased from 4.5% to 68.2% ($P < 0.001$).

• **CONCLUSION:** *Fusarium solani* is sensitive to natamycin *in vitro* and is partially sensitive to voriconazole. When combined with cyclosporine A, it can produce synergistic effects with fluconazole and amphotericin B, and significantly increase the sensitivity of *Fusarium solani* to amphotericin B drugs.

• **KEYWORDS:** fungal keratitis; antifungal agents; microbial sensitivity tests; *Fusarium solani*; cyclosporin A

Citation: Chen XL, Yang ZD, Ding H, et al. *In vitro* interactions between antifungals and Cyclosporin A against *Fusarium solani*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(9):1567-1572

0 引言

真菌性角膜炎在以农业为主的发展中国家是重要的致盲性眼病, 因缺乏有效的治疗药物而增加其严重性与危险性。在我国真菌性角膜炎的主要致病菌是镰刀菌^[1-2], 海南省地处热带地区, 气候常年潮湿温热, 真菌性角膜炎的发生率高, 主要致病菌以镰刀菌为主^[3-4]。镰刀菌的体外抗真菌研究显示其对临床常用的传统唑类药物耐药^[1], 使真菌性角膜溃疡的治疗难度增加。

抗真菌药物的创新成为真菌性角膜炎治疗的关键, 联合用药提高现有抗真菌药物的治疗价值将为真菌性角膜炎的治疗带来曙光。临床上, 器官移植患者在接受免疫抑

制剂治疗的同时为避免真菌感染常同时联合使用抗真菌药物,取得良好治疗作用的同时亦观察到其间存在相互作用^[5]。免疫抑制剂环孢素 A 在眼科已广泛应用于角膜移植术后抗排斥和干眼症的治疗,而环孢素 A 联合抗真菌药物对真菌性角膜炎分离菌株的药物敏感性影响鲜见报道。本文对环孢素 A 与多种抗真菌药物联合应用的体外抗真菌效果进行报道。

1 对象和方法

1.1 对象 实验菌株培养与鉴定:本研究 22 株茄病镰刀菌均取自海南省眼科医院确诊真菌性角膜溃疡患者角膜刮片取材分离菌株。所用菌株均通过检验科真菌实验室的真菌学标准鉴定为茄病镰刀菌菌种。实验前所有菌株均在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)斜面 35℃ 培养 48~72h,其后在 28℃ 继续培养至 7d。本研究所使用抗真菌药物为伏立康唑(货号:Y0001395),那他霉素(货号:P9703),两性霉素 B(货号:V900919),氟康唑(货号:F8929)和环孢素 A(货号:239835)均购自 Sigma 公司。除氟康唑用蒸馏水溶解外其余所有药物均以分析纯级 DMSO 溶解成储存液,浓度为氟康唑 5120μg/mL,其余 4 种药物均为 1600μg/mL。培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)、RPMI1640 液体培养基。

1.2 方法

1.2.1 微量肉汤稀释法评价抗真菌药物单独使用药物敏感性 参考 CLSI M27-Ed4^[6]及 M38-Ed3^[7]方案在 96 孔微型滴定板上进行微量肉汤稀释法。为选择每种药物对菌株不同敏感性的合适浓度范围,对每个菌株进行探索性研究并确定个体药物的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations, MIC)。以 RPMI1640 液体培养基稀释药液使其成为 2 倍工作浓度,筛选伏立康唑、那他霉素、两性霉素 B、氟康唑和环孢素 A 的浓度应用范围,即最终浓度分别是伏立康唑 32~0.06μg/mL,两性霉素 B 32~0.06μg/mL,那他霉素 128~0.25μg/mL,氟康唑 256~0.5μg/mL,环孢素 A 256~0.5μg/mL。将各个药物分别加在 96 孔板的 A~D 行每行的 1~10 列按照浓度从高到低加入稀释好的药液各 100μL,同时设立生长对照(无药物孔)和阴性对照(无菌孔)。

菌悬液制作:茄病镰刀菌于马铃薯葡萄糖琼脂培养基 35℃ 培养 48~72h,再转入 28℃ 培养至 7d。将菌转入 0.85% 盐水 1mL 中,滴入吐温 20 去除菌丝片段,静置 3~5min 取上清液转移至无菌管,震荡 15s。用光线路径 1cm 比色杯测 530nm 光密度为 0.15~0.17,用经三氮吗啡啉丙磺酸钠(MOPS)缓冲(pH=7.0)的 2% 葡萄糖 RPMI1640 液体培养基进行 1:50 稀释后得到工作菌液,达到最终要求浓度的 2 倍,致接种终浓度为(0.5~5)×10⁴CFU/mL。加好药液的 96 孔板上除阴性对照孔外其余各孔均加入 100μL 的 2 倍终浓度菌悬液,分别于 35℃ 孵育 48h。观察判读结果,根据中华人民共和国卫生行业标准(WS/T411-2013)《抗丝状真菌药物敏感性试验肉汤稀释法》中对于 MIC 结果判读的标准方法要求,对镰刀菌的最低抑菌浓度(MIC)终点判断标准为:观察到的与生长对照相比除氟康唑是 50% 抑制其余药物 100% 抑制的最低药物浓度为各药物的 MIC^[8]。所有药敏试验均重复操作 2 遍。药敏质控菌株为 ATCC22019。

1.2.2 棋盘法评价体外联合药物敏感性 采用棋盘法测试环孢素 A 与抗真菌药物体外联合药物敏感性。在 96 孔

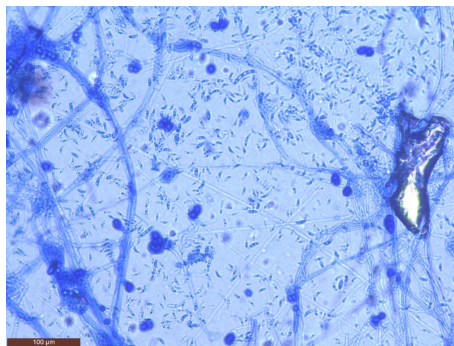


图 1 茄病镰刀菌显微镜下形态特征,乳酸酚棉蓝染色(大、小分生孢子、菌丝,×100)。

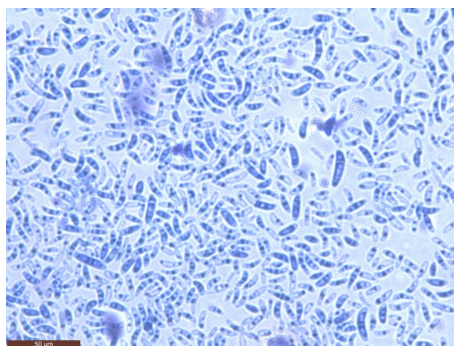


图 2 茄病镰刀菌显微镜下形态特征,乳酸酚棉蓝染色(大、小分生孢子,×400)。

板中分别加入环孢素 A 与不同浓度的 1 种抗真菌药物。自左向右 1~10 列为联合用药区,每孔加入 4 倍终浓度的药物倍比稀释液各 50μL;每板第 1~10 列分别为伏立康唑、那他霉素、两性霉素 B 和氟康唑,药物终浓度为伏立康唑 16~0.03μg/mL,两性霉素 B 16~0.03μg/mL,那他霉素 64~0.125μg/mL,氟康唑 128~0.25μg/mL;第 8~1 行的 1~10 列分别加入环孢素 A 至终浓度为 128~1μg/L,每行浓度一致,同时设立生长对照和空白对照。接种时除阴性对照孔外其余各孔均加入 100μL 的 2 倍终浓度菌悬液。于 35℃ 静置培养 48h 判定 MIC 结果。采用 LA 理论,将药物单独使用或两种药物联合应用时,产生相同药效的浓度(等效位点)进行比较。部分抑菌浓度指数法分数抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI): $FICI = C_A / MIC_A + C_B / MIC_B$,其中 MIC_A 为 A 药单独用时的 MIC, MIC_B 为 B 药单独用时的 MIC, C_A 为两药联用后得到同一抗菌结果时 A 药的 MIC, C_B 为两药联用后得到同一抗菌结果时 B 药的 MIC。FICI 值大于 4 表示两药有拮抗作用,FICI 值介于 0.5 和 4 之间表示两药相互作用为无关,FICI ≤ 0.5 则表示两药有协同作用^[9]。

统计学分析:利用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计数资料用例数和率[n(%)]表示,两组差异比较采用卡方检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株鉴定结果 本研究培养所得 22 株镰刀菌属菌种镜下可见透明分隔菌丝、分生孢子梗、瓶梗和大小分生孢子,大分生孢子粗壮、壁厚、光滑,呈镰刀形至纺锤形,远端尖,有多个分隔,以 3 隔居多。小型分生孢子假头状着生、光滑、透明,椭圆形、卵圆形、长椭圆形、短腊肠形、逗点形等,通常 0~1 个隔。茄病镰刀菌显微镜下形态特征,见图 1、2。

表 1 那他霉素单独及联合环孢素 A 对镰刀菌体外抗真菌药物敏感性

菌株	MIC _{单独} (μg/mL)		MIC _{联合用药} (μg/mL)		FICI
	那他霉素	环孢素 A	那他霉素	环孢素 A	
FS1	4	32	4	8	1.25
FS6	8	512	4	8	0.52
FS7	4	512	4	8	1.02
FS9	4	512	4	8	1.02
FS10	4	512	4	8	1.02
FS11	4	512	4	8	1.02
FS12	8	512	8	16	1.03
FS13	4	512	4	8	1.02
FS14	4	512	4	8	1.02
FS16	4	512	4	8	1.02
FS17	8	512	4	8	0.52
FS18	8	512	8	16	1.03
FS19	2	512	4	8	2.02
FS20	4	512	4	8	1.02
FS21	4	512	2	4	0.51
FS22	4	512	4	8	1.02
FS23	8	512	8	16	1.03
FS24	2	512	2	4	1.01
FS25	4	512	4	8	1.02
FS26	8	512	8	16	1.03
FS28	4	512	4	8	1.02
FS29	4	512	4	8	1.02

注: 镰刀菌 (*Fusarium solani*, FS); 最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentrations, MIC); 部分抑制浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI); ≤ 0.5 协同, > 0.5 和 ≤ 4.0 无关, > 4 拮抗。

2.2 单独及联合用药药敏结果 四种抗真菌药物那他霉素、伏立康唑、两性霉素 B 和氟康唑对镰刀菌 (22 株) 的 MIC 值范围分别是 2~8、1~8、1~8 和 8~512 μg/mL。那他霉素、伏立康唑与环孢素 A 体外联合用药时, 均对所有菌株均无协同效应, 无拮抗效应 (表 1、2)。两性霉素 B 与环孢素 A 联合应用时, 对 41% 菌株 (9/22) 有协同效应, 对所有菌株无拮抗效应 (表 3)。氟康唑与环孢素 A 联合用药时, 对 64% 菌株 (14/22) 有协同效应, 无拮抗效应 (表 4)。

单用抗真菌药物时对菌株的药物敏感率分别是那他霉素 100%、伏立康唑 31.8%、两性霉素 B 4.5% 及氟康唑 4.5%, 联合使用环孢素 A 后两性霉素 B 的药物敏感率提升至 68.2%。如表 5 结果显示, 单独使用及联合使用环孢素 A 时, 氟康唑、伏立康唑、那他霉素敏感率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。联合使用环孢素 A 后镰刀菌对两性霉素 B 敏感率高于单独使用, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 见图 3。

3 讨论

从我院临床分离镰刀菌株体外培养抗真菌药物敏感性研究显示, 通过微量肉汤稀释法观察到镰刀菌对他那霉素的敏感性最高, 伏立康唑次之, 氟康唑及两性霉素 B 均表现为低敏感性, 与王志昕等^[10]、张阳等^[11-12] 对眼部真菌感染及药物敏感性分析结果一致。抗真菌药物包括唑类及多烯类, 唑类包括咪唑类及三唑类, 前者以咪康唑为代表, 后者包括氟康唑、伏立康唑及伊曲康唑等; 多烯类抗

表 2 伏立康唑单独及联合环孢素 A 对镰刀菌体外抗真菌药物敏感性

菌株	MIC _{单独} (μg/mL)		MIC _{联合用药} (μg/mL)		FICI
	伏立康唑	环孢素 A	伏立康唑	环孢素 A	
FS1	2	32	2	16	1.50
FS6	1	512	2	16	2.03
FS7	2	512	4	32	2.06
FS9	1	512	2	16	2.03
FS10	4	512	4	32	1.06
FS11	2	512	2	16	1.03
FS12	4	512	4	32	1.06
FS13	2	512	2	16	1.03
FS14	1	512	1	8	1.02
FS16	2	512	2	16	1.03
FS17	8	512	4	32	0.56
FS18	4	512	4	32	1.06
FS19	4	512	4	32	1.06
FS20	2	512	2	16	1.03
FS21	1	512	0.5	4	0.51
FS22	4	512	4	32	1.06
FS23	2	512	2	16	1.03
FS24	1	512	1	8	1.02
FS25	1	512	1	8	1.02
FS26	8	512	4	32	0.56
FS28	2	512	2	16	1.03
FS29	1	512	2	16	2.03

注: 镰刀菌 (*Fusarium solani*, FS); 最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentrations, MIC); 部分抑制浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI); ≤ 0.5 协同, > 0.5 和 ≤ 4.0 无关, > 4 拮抗。

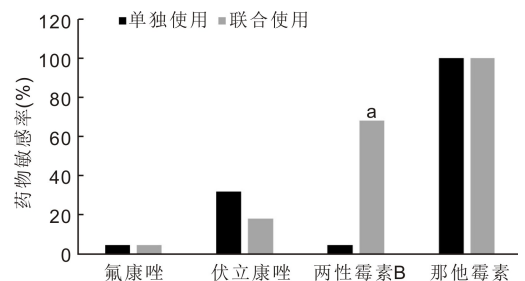


图 3 抗真菌药物单独使用及联合环孢素 A 对镰刀菌药物敏感性比较 $^a P < 0.05$ vs 单独使用抗真菌药物。

真菌药物主要包括那他霉素及两性霉素 B。有研究表明丝状真菌感染所致的真菌性角膜炎对酮康唑、咪康唑、伊曲康唑及氟康唑的治疗不敏感^[13], 且镰刀菌通常对传统唑类药物耐药, 因此在提高药物敏感性的联合用药研究中免疫抑制剂的联合应用成为关注的热点。Onyewu 等^[14] 在白念珠菌感染的角膜炎小鼠模型中, 联合使用氟康唑和环孢素 A 的眼用制剂, 显示出了类似体内药物的协同作用, 能有效地控制白念珠菌感染情况。

环孢素 A 是一种强效免疫抑制剂, 由丝状真菌茄病镰刀菌和柱孢霉菌等霉菌的代谢产物中提取分离而得的, 是一种含有 11 个氨基酸的环状多肽, 能够通过抑制钙调磷酸酶调控细胞信号传导通路从而抑制 T 细胞增殖。在眼科已广泛应用于干眼症及角膜移植术后的治疗, 尤其是在真菌性角膜溃疡角膜移植术后作为替代糖皮质激素的

表3 两性霉素单独和联合环孢素A对镰刀菌体外抗真菌药物敏感性

菌株	MIC _{单独} (μg/mL)		MIC _{联合用药} (μg/mL)		FICI
	两性霉素	环孢素A	两性霉素	环孢素A	
FS1	2	32	0.5	4	0.38
FS6	1	512	1	8	1.02
FS7	2	512	1	8	0.52
FS9	2	512	0.5	4	0.26
FS10	2	512	1	8	0.52
FS11	4	512	2	16	0.53
FS12	2	512	0.5	4	0.26
FS13	2	512	2	16	1.03
FS14	4	512	0.5	4	0.13
FS16	2	512	2	16	1.03
FS17	4	512	4	32	1.06
FS18	2	512	0.25	2	0.13
FS19	2	512	1	8	0.52
FS20	2	512	1	8	0.52
FS21	2	512	0.25	2	0.13
FS22	4	512	2	16	0.53
FS23	4	512	2	16	0.53
FS24	2	512	0.5	4	0.26
FS25	2	512	0.25	2	0.13
FS26	2	512	1	8	0.52
FS28	4	512	1	8	0.27
FS29	8	512	8	64	1.13

注:镰刀菌 (*Fusarium solani*, FS); 最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentrations, MIC); 部分抑制浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI); ≤0.5 协同, >0.5 和 ≤4.0 无关, >4 拮抗。

表4 氟康唑单独和联合环孢素A对镰刀菌体外抗真菌药物敏感性

菌株	MIC _{单独} (μg/mL)		MIC _{联合用药} (μg/mL)		FICI
	氟康唑	环孢素A	氟康唑	环孢素A	
FS1	8	32	8	8	1.25
FS6	512	512	128	128	0.50
FS7	512	512	128	128	0.50
FS9	512	512	128	128	0.50
FS10	512	512	128	128	0.50
FS11	512	512	128	128	0.50
FS12	512	512	128	128	0.50
FS13	512	512	128	128	0.50
FS14	512	512	128	128	0.50
FS16	64	512	128	128	2.25
FS17	512	512	128	128	0.50
FS18	256	512	128	128	0.75
FS19	128	512	128	128	1.25
FS20	512	512	128	128	0.50
FS21	128	512	128	128	1.25
FS22	512	512	128	128	0.50
FS23	512	512	128	128	0.50
FS24	256	512	128	128	0.75
FS25	64	512	64	64	1.13
FS26	512	512	128	128	0.50
FS28	512	512	128	128	0.50
FS29	256	512	128	128	0.75

注:镰刀菌 (*Fusarium solani*, FS); 最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentrations, MIC); 部分抑制浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI); ≤0.5 协同, >0.5 和 ≤4.0 无关, >4 拮抗。

表5 抗真菌药物单独使用及联合环孢素A对镰刀菌药物敏感性比较

组别	n	氟康唑				伏立康唑				两性霉素B				那他霉素			
		敏感	中介	耐药	敏感率(%)	敏感	中介	耐药	敏感率(%)	敏感	中介	耐药	敏感率(%)	敏感	中介	耐药	敏感率(%)
单独使用	22	1	0	21	4.5	7	8	7	31.8	1	20	1	4.5	22	0	0	100
联合使用	22	1	0	21	4.5	4	10	8	18.2	15	6	1	68.2	22	0	0	100
χ ²					0.000				1.091				19.25				0.000
P					1.000				0.296				<0.001				1.000

局部药物治疗^[15]。在抗真菌作用机制中,由于钙调磷酸酶对维持微生物的应激存活具有重要作用,因此环孢素A作为钙调磷酸酶抑制剂,正逐渐被探索应用于真菌感染的联合用药治疗,达到抑制真菌的生长目的^[16-17]。Bell等^[18]在环孢素A的体外抑菌实验中发现,对尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、茄病镰刀菌 (*Fusarium solani*) 的菌落数量和烟曲霉菌 (*Aspergillus fumigatus*) 菌落大小的抑制呈明显的剂量依赖性,表明环孢素A具有对真菌的抑制作用。Shinde等^[19]将氟康唑、伏立康唑、卡泊芬净、两性霉素、制霉菌素等五种抗真菌药物与环孢素A的联合作用,对白念珠菌进行了体外试验,结果不同抗真菌药物与环孢素A联合后对白念珠菌的MIC均降低2~16倍,提示环孢素A能有效提高抗真菌药对白念珠菌的敏感性。除白念珠菌外,环孢素A与抗真菌药物联合应用对曲霉菌、新生隐球菌也可产生协同作用^[20]。Mo等^[21]研究证实环

孢素A与氟康唑联合使用对马尔尼菲青霉菌的抗真菌作用具有协同效应。针对与以往研究中菌株的来源不同及联合用药的差异比较,本研究结果中也显示,对临床标本分离镰刀菌环孢素A与氟康唑联合应用对64%菌株有协同效应,与两性霉素B联合应用对41%菌株有协同效应,且所有菌株无拮抗效应产生,证实在镰刀菌属环孢素A与抗真菌药物的协同作用。

值得关注的是,协同效应的产生与药物敏感性的提升可能并不是同步的。本研究中单独使用抗真菌药物时菌株对氟康唑和两性霉素B的药物敏感率仅为4.5%,伏立康唑的药物敏感率为31.8%,那他霉素的敏感性最高为100%敏感,表明本研究所用菌株即使对同类型的不用药物敏感性也存在很大差异。联合使用环孢素A后,两性霉素B联合用药对41%的菌株产生协同效应并且药物敏感性大幅提升;而伏立康唑、那他霉素与环孢素A的联合

用药并未产生协同效应,药物敏感性也未产生变化;值得注意的是氟康唑在与环孢素 A 联合使用后对 64% 的菌株产生了协同效应,然而药物敏感性却并未发生改变,仍表现出很高的耐药率,即环孢素 A 的协同效应主要发生在单独用药时敏感率低的抗菌药物及氟康唑和两性霉素 B,但是环孢素 A 可能一定程度的提高了氟康唑对菌株的抑菌作用但并不能显著提高其对药物的敏感性,从而降低了氟康唑联合用药的有效性。对于协同效应与药物敏感性改变的不同步性进行分析,可能的原因如下:首先,菌株的耐药性不同可能与种属差异相关。镰刀菌属有多种基因型,根据传统的形态学鉴定将其分为 16 个组、65 个种、55 个变种和 22 个型,不同基因型的镰刀菌对于抗真菌药物的敏感性不同^[22]。Rosa 等^[23]将患有恶性白血病并发镰刀菌感染的菌株进行分离并进行了抗真菌药敏感性研究,结果发现在这种情况下存在着抗真菌药物敏感性的物种及菌株特异性差异。其中以茄病镰刀菌复合体(*Fusarium solani* species complex, FSSC)更为常见,其次为尖孢镰刀菌复合体(*Fusarium oxysporum* species complex, FOSC),然而临床分离的茄病镰刀菌复合体(FSSC)相较于尖孢镰刀菌复合体(FOSC)对两性霉素 B 和伏立康唑的耐药性明显增加。本研究中所用菌株为临床病例标本分离菌株,未对其进行明确的基因分型,因此在药物敏感性分析中可能存在针对不同基因型的药物敏感性差异表现。针对此结果可在进一步的研究中分析基因型特异性的药物敏感性差异表现。此外,菌株的耐药性差异可能也同时导致了同类型不同药物、不同类型药物间存在着协同效应与药物敏感性的差异。Li 等^[24]对环孢素 A 联合三种唑类抗真菌药氟康唑、伊曲康唑和伏立康唑对唑类敏感白念珠菌及唑类耐药白念珠菌的药物敏感性作用进行了研究,结果表明环孢素 A 与唑类药物联合使用可表现出协同效应,尤其是对唑类耐药的白念珠菌菌株协同效应更显著。同时,就唑类药物的自身属性而言,药物活性与多烯类药物存在明显差异。相较于在高浓度时具有杀菌属性的咪唑类(imidazoles)抗真菌药物,同属于三唑类(triazoles)的氟康唑及伏立康唑在抗真菌作用上则更多的表现为抑菌属性^[25]。唑类抗真菌药物对 14- α -去甲基化酶亲和力的区别决定了在此类药物中不同药物间不同的抗真菌能力和活性谱^[26]。伏立康唑作为第二代合成三唑类抗真菌药物,与传统的唑类药物相比抗菌谱广、活性强,但研究显示药物活性仍为抑菌属性为主。而抑菌属性的发挥可能较杀菌性能在临床治疗效应中存在一定的限制,本研究结果显示单独使用抗真菌药物时伏立康唑相较于氟康唑表现出明显高的药物敏感性,然而均不能产生有效的治疗价值,对临床效益价值的评估有重要意义。

综上所述,对镰刀菌感染所致的真菌性角膜炎首选那他霉素治疗。环孢素 A 联合应用抗真菌药物时,可与氟康唑和两性霉素 B 对镰刀菌产生协同作用,并且显著提升两性霉素 B 的药物敏感性,具有重要的临床意义。本研究进一步丰富了环孢素 A 在抗真菌治疗中的研究结果,能更好的为临床治疗提供参考,但因药物作用的效果受诸多因素影响,体外实验不能完全模拟体内环境,加上临床个体之间的差异,关于环孢素 A 的联合用药实际应

用疗效分析以及机制研究还需进一步研究并通过在体动物实验等获得更好的治疗方法。

参考文献

- 1 Li L, Wang Z, Li R, et al. *In vitro* evaluation of combination antifungal activity against *Fusarium* species isolated from ocular tissues of keratomycosis patients. *Am J Ophthalmol* 2008;146(5): 724-728
- 2 Sun X, Wang Z, Wang Z, et al. Ocular fungal isolates and antifungal susceptibility in northern China. *Am J Ophthalmol* 2007; 143(1): 131-133
- 3 陈晓莲,刘红山,何宏,等. 中国热带地区真菌性角膜溃疡致病菌种类及药物敏感性分析. *中华实验眼科杂志* 2017;35(2):156-160
- 4 何宏,刘红山,陈晓莲,等. 海南省 81 例真菌性角膜溃疡病原学分析. *国际眼科杂志* 2017;17(7):1330-1333
- 5 王美婷,余爱荣,辛华雯. 环孢素与唑类抗真菌药物相互作用的研究进展. *中国药师* 2018;21(7): 1266-1269
- 6 CLSI. Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 4th Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2017
- 7 CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2017
- 8 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 中华人民共和国卫生行业标准.WS/T 411-2013. 抗丝状真菌药物敏感性试验肉汤稀释法. 北京: 中国标准出版社 2013: 1-15
- 9 Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, et al. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(1): 163-194
- 10 王志昕,王智群,罗时运,等. 眼部真菌感染的病原学及体外药物敏感性分析. *眼科研究* 2007; 25(2):145-148
- 11 张阳,王智群,孙旭光. 2007 至 2016 年我国北方地区真菌性角膜炎病原学及药物敏感性分析. *中华眼科杂志* 2018;54(6): 432-436
- 12 张阳,王智群,孙旭光. 2009 至 2010 年眼部真菌感染的病原学及药物敏感性分析. *中华眼科杂志* 2013;49(4):345-349
- 13 Xie L, Zhai H, Zhao J, et al. Antifungal susceptibility for common pathogens of fungal keratitis in Shandong Province, China. *Am J Ophthalmol* 2008;146(2): 260-265
- 14 Onyewu C, Afshari N, Heitman J. Calcineurin promotes infection of the cornea by *Candida albicans* and can be targeted to enhance fluconazole therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(11): 3963-3965
- 15 谢立信. 真菌性角膜炎. *中华眼科杂志* 2003; 39(10):638-640
- 16 Zhang M, Yang X, Wang D, et al. Antifungal activity of immunosuppressants used alone or in combination with fluconazole. *J Applied Microbiol* 2019; 126(5): 1304-1317
- 17 Córdova-Alcántara IM, Venegas-Cortés DL, Martínez-Rivera MÁ, et al. Biofilm characterization of *Fusarium solani* keratitis isolate: increased resistance to antifungals and UV light. *J Microbiol* 2019;7(6): 485-497
- 18 Bell NP, Karp CL, Alfonso EC, et al. Effects of methylprednisolone and cyclosporine A on fungal growth *in vitro*. *Cornea* 1999; 18(3): 306-313
- 19 Shinde RB, Chauhan NM, Raut JS, et al. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2012;11(1): 27
- 20 Cao C, Liu W, Li R, et al. *In vitro* interactions of micafungin with amphotericin B, itraconazole or fluconazole against the pathogenic phase of *Penicillium marneffeii*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(2): 340-342

21 Mo D, Li X, Wei L, *et al.* *In vitro* interactions of calcineurin inhibitors with conventional antifungal agents against the yeast form of *Penicillium marneffei*. *Mycopathologia* 2014; 178:217-220
22 孙声桃, 吕奇学, 韩雷, 等. 我国中原地区 653 株真菌性角膜炎分离镰刀菌的基因型及药物敏感性. *中华眼科杂志* 2015; 51(9):660-667
23 Rosa P, Ramirez - Castrillon M, Borges R, *et al.* *Fusarium* Epidemiological aspects and characterization of the resistance profile of spp. in patients with invasive fusariosis. *J Med Microbiol* 2019;68(10): 1489-1496

24 Li Y, Sun S, Guo Q, *et al.* *In vitro* interaction between azoles and cyclosporin A against clinical isolates of *Candida albicans* determined by the checkerboard method and time - kill curves. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(3): 577-585
25 Mazu TK, Bricker BA, Flores - Rozas H, *et al.* The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. *Mini Rev Med Chem* 2016; 16(7): 555-578
26 Thompson GR, Lewis JS. Pharmacology and clinical use of voriconazole. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010; 6(1): 83-94

国际眼科杂志中文版(IES)近5年影响因子趋势图

