

抗黴菌藥物感受性測試法

抗黴菌藥物感受性測試法

楊昫良 1 陳佳君 2 羅秀容 2

1 國立交通大學生物科技學系 2 國家衛生研究院臨床研究組

黴菌不但會造成局部性的表皮感染，還會引起致命的全身性感染。目前國內外由於種種因素導致黴菌感染成爲院內感染嚴重的問題[1-4]。兵法上有『知己知彼，百戰百勝』的致勝策略。在人類對黴菌的抗戰中，首先我們必須快速且正確地鑑定出病原菌；其次是分析台灣黴菌的特性，進而發展出一套能將體外測定之抗黴菌藥物對黴菌最低抑菌濃度(minimum inhibitory concentration; MIC)有效應用於臨床，以利臨床醫師參考，給予患者最適當的處方。

目前主要的抗黴菌藥物可分爲三大類：5-flucytosine、ergosterol biosynthesis inhibitors、和 polyenes。5-flucytosine 是抑制黴菌 DNA 和蛋白質的形成[5,6]，因抗藥性的問題，5-flucytosine 目前已很少單獨被使用來治療黴菌感染。對其他兩類則是對 ergosterol(麥角脂醇)有影響。Ergosterol 是黴菌 plasma membrane(原生質膜)的主要成份。Ergosterol biosynthesis inhibitors 顧名思義是抑制 ergosterol 的合成，其中有 fluconazole、itraconazole、ketoconazole、miconazole 等四種藥[6]。Polyenes 則有 amphotericin B 和 nystatin 兩種藥。此類藥物是攻擊含有 ergosterol 的膜，進而造成細胞膜的損壞。由於人體細胞的 cholesterol(膽脂醇)和黴菌的 ergosterol 成份與結構相似，因此這些抗黴菌藥物對人體會引起副作用。Amphotericin B 副作用有因改良的 lipid amphotericin B 而減低，但是 lipid amphotericin B 的價格比較高。爲了因應黴菌感染逐年增加的趨勢，目前另有 voriconazole, candidas, candins 和 nikkomycons 相繼被發展出來。

不同種的念珠菌對抗黴菌藥物的感受性不同，即使是同一種念珠菌自不同病患分離出來，或同一病患但不同時期所分離的同種念珠菌，其對抗黴菌藥物感受性也有所差別[6-8]。而抗微生物製劑感受性試驗的目的，就在以實驗室的方法來預測臨床治療的效果；也就是偵測致病菌對臨床使用之抗微生物藥劑的感受性，以提供醫師參考。各家所發表抗黴菌藥物感受性試驗相差甚遠(500 到 50,000 倍)，爲了統一抗黴菌藥物感受性試驗，以便不同單位的結果可以互相比較。美國國家臨床實驗室標準委員會(National Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS)在 1982 年成立抗黴菌藥物感受性試驗次委員會(Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing)，希望能發展一個統一且合適的抗黴菌藥物感受性試驗的標準程序。經過十年的研究，次委員會在 1992 年發表有關大量漏湯稀釋法(broth macrodilution method)的初步資料(M27-proposed)以供醫院醫檢部門參考。1995 年，依據相關的研究成果和建議，除了原來的大量稀釋法，又添加了微量漏湯稀釋法(broth microdilution method)，而且也開始對抗黴菌藥物最低抑菌濃度的臨界點(breakpoint)有所制定，此版本爲 M27-tentative。M27-approved 則於 1997 年發表，內容即提供了最低抑菌濃度的判讀[9]。2003 年又相繼發表了 M44-proposed，初步的提供有關紙錠測試的方法[10]。

本篇係針對體外抗黴菌藥物感受性試驗法做進一步的探討。

稀釋法

藥物濃縮液的配製

有些抗黴菌藥物如 amphotericin B、ketoconazole 及 itraconazole 不溶於水，因此在準備藥物濃縮液的時候必須將藥物先溶於有機溶劑。常被使用的溶劑有 dimethyl sulfoxide (DMSO)、ethyl alcohol、polyethylene glycol 及 carboxy methyl cellulose。待藥物溶於溶劑配成藥物濃縮液後，則可用測試用的培養液來稀釋藥物。藥物濃縮液配置量最好以當天用完為原則。若需超量配置，藥物濃縮液需分裝並保存於攝氏負 20 度以下，並且最好在六個月內使用以確保藥效。

培養液的配製與選擇

RPMI 1640(無 bicarbonate 及含 glutamine 與酸鹼指示劑)是最被接受的培養液。此培養液的酸鹼值於使用前，在室溫(25°C)下必須先以 0.165ML 濃度的 MOPS【3-N-Morpholino】propanesulfonic acid 調為 6.9 到 7.1 之間。除基本準則外，專家們針對培養液的種類亦有一些建議。有些建議使用 antibiotic medium 做為測試菌株對 amphotericin B 感受性試驗的培養液，因為它可增加偵測抗 amphotericin B 菌株的比率。但是此培養液的穩定性不佳，會影響測試的再現性，故尚未普遍被使用。另外，yeast nitrogen base 被建議做為測試 Cryptococcus neoformans 抗黴菌藥物感受性試驗的培養液。因為此培養液有助於 C. neoformans 生長，並提高其體外測定之最低抑菌濃度與臨床治療效果的關聯性。有一些研究報告指出在每公升測試用的培養液添加 20 克葡萄糖可簡單化判讀的結果。這些抗黴菌藥粉原則是無菌的，在無菌操作下配置的藥溶液可直接使用。若需再過濾消毒，過濾用的濾紙必須謹慎選擇，避免藥物殘留於濾紙，影響其試驗時應有的濃度。含有藥的培養液需分裝並保存於攝氏負 20 度以下，最好在六個月內使用以確保藥效。

最低抑菌濃度的判讀

目前對於菌液培養 24 小時或 48 小時後再判讀最低抑菌濃度，何者與臨床治療效果比較有關聯性仍有爭議。目前美國國家臨床實驗室標準委員會所發表的標準準則，最低抑菌濃度仍於 48 小時培養後判讀，而菌株在不同藥物濃度的培養液與在沒有藥物存在的培養液的生長情形，肉眼判斷時比較可分為：(1)幾乎清澈(菌液濃度小於沒有藥物的 5%)，(2)明顯減少(菌液濃度是沒有藥物的 5%)，(3)少量減少(菌液濃度是沒有藥物的 50%)，(4)無改變(菌液濃度大於沒有藥物的 80%)。因為 amphotericin B 是殺黴菌劑，因此 amphotericin B 的最低抑菌濃度是定義為能完全抑制菌株生長時(幾乎清澈)的最低藥物濃度。而 azole 類是抑黴菌劑，若以肉眼判斷時其最低抑菌濃度是定義為能明顯抑制菌株生長(菌液濃度是沒有藥物的 25%)的最低藥物的濃度。若是用機器來測菌液濃度時，azole 的最低抑菌濃度亦可為能抑制菌株生長 50%的最低藥物的濃度。

感受性的判讀

對 fluconazole 與 itraconazole 而言，藥物感受性可分為感受性、藥劑依賴型感受性及抗藥性。以 fluconazole 為例，最低抑菌濃度小於或等於每公升有 8 毫克為感受性；在每公升有 16 到 32 毫克

之間為藥劑依賴型感受性；而大於或等於每公升有 64 毫克為抗藥性。而判讀對 itraconazole 感受性的標準與 fluconazole 不同。最低抑菌濃度小於或等於每公升有 0.125 毫克為感受性；在每公升有 0.25 到 0.5 毫克之間為藥劑依賴型感受性；而大於或等於每公升有 1 毫克為抗藥性。

標準菌株

美國國家臨床實驗室標準委員會所發表的準則也建議一些進行抗黴菌感受性測試的標準菌株。其中包括 *Candida albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 及 *Candida tropicalis* ATCC 750。此準則建議菌液的起始濃度為每毫升 0.5×10^3 到 2.5×10^3 個菌體。大量稀釋法(macrodilution)最終體積為 1 毫升，而微量稀釋法(microdilution)則是 0.2 毫升。

紙錠法

黴菌的抗黴菌藥物感受性紙錠測試法與細菌的抗生素感受性紙錠測試法原則相近。因為藥物在紙錠上比較穩定、可進行少數菌株個例的測試及醫檢師對紙錠法操作較熟悉等原因，促使美國國家臨床實驗室標準委員會發表 M44-proposed。此準則提供有關對臨床最常使用的 fluconazole 紙錠測試及判讀的方法。紙錠以含有 25~90 子 g 的 fluconazole 為標準，菌液培養 24 小時後，若抑制環大於或等於 19 毫米就與稀釋法的最低抑菌濃度小於或等於每公升有 8 毫克一樣為感受性；抑制環在 15 到 18 毫米之間也與稀釋法最低抑菌濃度每公升有 16 到 32 毫克一樣為藥劑依賴型感受性；抑制環小於或等於 14 毫米則與稀釋法最低抑菌濃度大於或等於每公升有 64 毫克為抗藥性。紙錠測試法建議的標準菌株則有 *Candida albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 及 *Candida tropicalis* ATCC 750。黴菌的抗黴菌藥物感受性紙錠測試法的發展符合了簡單、快速及低成本的精神。

值得一提的是，最低抑菌濃度是作為參考而不是治療的指標。以伺機型黴菌感染為例，大部分得到黴菌感染的人都有其它潛在的疾病，更何況最低抑菌濃度只能代表黴菌特性之一，另外還有很多的因素可能影響抗黴菌藥物的療效，以病原菌而言就有病原菌的型態、總數和病原菌的種類；以抗黴菌藥物而言，就有藥物的抗黴菌機制、在人體被吸收率、分佈到正確器官的機率和其安定性；最主要影響抗黴菌藥物的功效是寄主的免疫功能、感染部位、外來導管、是否遵照醫師處方適時適量地使用藥物。因為新的抗黴菌藥物陸續發展上市，而且唯有當測出的最低抑菌濃度能和臨床治療反應達到良好的關聯性時，醫院才不會浪費人力、物力去取得一個沒有臨床意義的數值。由以上可明確的知道，抗黴菌藥物感受性測試法仍須再研究與改進。

參考文獻

1.Beck-Sague C, Jarvis WR: Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. J Infect Dis 1993;167:1247-51.

2. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, et al: National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. SCOPE Participant Group. Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic. Diagn Microbiol Infect Dis 1998;30:121-9.
3. Chen YC, Chang SC, Sun CC, et al: Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993. Infect Control Hosp Epidemiol 1997;18:369-75.
4. Hung CC, Chen YC, Chang SC, et al: Nosocomial candidemia in a university hospital in Taiwan. J Formos Med Assoc 1996;95:19-28.
5. Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC: Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. Trends Microbiol 1994;2:393-400.
6. Yang YL, Lo H-J: Mechanisms of antifungal agent resistance. J Microbiol Immunol Infect 2001;34:79-86.
7. Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, et al: Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:2645-9.
8. Hadfield TL, Smith MB, Winn RE, et al: Mycoses caused by *Candida lusitanae*. Rev Infect Dis 1987;9:1006-12.
9. National Committee of Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; M27 approved standard. 1997. Wayne, Pennsylvania NCCLS.
10. National Committee of Clinical Laboratory Standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; proposed guideline. 2003. Wayne, Pennsylvania NCCLS.