

· 实验研究 ·

临床分离角膜致病曲霉菌的生长特性研究

李映昱 张培 黄琛 刘子源 刘丛 张维 董徐贺 王薇

100191 北京大学第三医院眼科 眼部神经损伤的重建保护与康复北京市重点实验室

通信作者:王薇, Email: puh3_ww@bjmu.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.09.006

【摘要】 目的 通过体外培养方法比较眼部临床分离曲霉菌与曲霉菌标准菌株生长特性的异同,研究真菌致病的关键点。**方法** 配制液态和固态形式的 3 种培养基:综合马铃薯葡萄糖(PDA)培养基、沙氏培养基和酵母浸膏(YG)培养基,分别接种临床分离的曲霉菌株 L 和菌株 W 以及曲霉菌标准菌株,在 29℃ 下培养 96 h,分别于培养后 0、4、8、12、24、36、48、60、72 和 96 h 测定液态培养基上的吸光度(OD),绘制生长曲线,并在固态培养基上观察记录真菌生长情况。**结果** 在综合 PDA 液体培养基上,菌株 L 和菌株 W 的生长曲线与标准菌株比较,差异均无统计学意义(均 $P < 0.05$);在 YG 和沙氏液体培养基上,临床分离菌株 L 和菌株 W 生长曲线与标准菌比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),临床分离的 2 株曲霉菌更早进入显著生长期,生长速率明显快于标准菌株。固体培养基上,同一菌株在综合 PDA 培养基上菌落范围大、菌丝密度高;在沙氏培养基上菌落范围小、菌丝密度低;YG 培养基上菌落介于另外 2 种培养基之间,菌落颜色变化最晚。同种固体培养基上,临床分离曲霉菌较标准菌株菌落范围更大、颜色变化更早、颜色变化范围更广。**结论** 较标准菌株而言,临床分离曲霉菌在营养条件较差时表现出更强的环境适应能力,使得临床分离菌株在复杂的临床环境中得以生存,进而致病。

【关键词】 临床分离菌株; 标准菌株; 曲霉; 生长特性**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81670821)

Growth characteristics of *Aspergillus* isolated from clinical infective cornea Li Yingyu, Zhang Pei, Huang Chen, Liu Ziyuan, Liu Cong, Zhang Wei, Dong Xuhe, Wang Wei

Beijing Key Laboratory of Restoration of Damaged Ocular Nerve, Department of Ophthalmology Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Corresponding author: Wang Wei, Email: puh3_ww@bjmu.edu.cn

[Abstract] Objective To analyze the growth characteristics of the clinical isolates of *Aspergillus* compared to standard strains *in vitro*. **Methods** The sabourauds agar medium (SDA), yeast extract medium (YG) and potato dextrose agar medium (PDA) were used to test two clinical isolates and one standard strain. The strains were incubated at 29℃ for 96 hours. In liquid medium, the optical density (OD) values at 0 hour, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 and 96 hours after culture were recorded to generate growth curves for each strain and culture medium. Meanwhile, on solid medium, the features of colony morphology were recorded. **Results** In liquid medium, the growth curves were not significantly different between clinical isolates and standard strain in PDA medium (all at $P < 0.05$), while the differences were obvious in SDA medium and YG medium ($P < 0.05$). The clinical isolates showed shorter lag phase and higher growth rate than standard strain. On solid medium, all strains appeared the best growth state on PDA medium and the poorest state on SDA medium. Color change time was later on YG medium than that on the other medium. The clinical isolates performed better on the aspects of colony sizes and color change than standard strain when grew on the same medium, especially on SDA medium. **Conclusions** Compared with standard strain, the clinical isolates of *Aspergillus* have higher adaptive capacity to poor nutrition condition.

[Key words] Clinical isolates; Standard strain; *Aspergillus*; Growth characteristics**Fund Program:** National Natural Science Foundation of China (81670821)

由于药物的毒性和不良反应及眼局部抗真菌药物的局限性,真菌感染性眼部疾患仍然是眼科诊疗中比较棘手的问题,其中角膜是常见的眼部真菌感染部位^[1-2]。多项研究探讨了真菌在角膜的感染方式和生

长方式,临床研究多集中于受累组织临床形态学的特点、检查及诊断的关键步骤等,实验室研究部分涉及真菌在组织中的形态学改变及行为,但真菌在实验组织中的生长方式与在临床分离组织中不尽相同^[3-5];实验

物模型中,茄病镰刀菌标准菌株菌丝平行角膜板层生长,烟曲霉标准菌株斜行生长,白念珠菌标准菌株垂直生长;而在临床病理角膜组织切片中,不同菌种均可见平行、斜行或垂直生长。推测其原因为真菌在感染眼部后,与眼部组织发生相互作用,由于眼部结构与免疫功能特殊性,真菌发生了眼部特异性生物学行为改变。曲霉菌可引起人体组织的感染,是常见的眼部致病真菌,严重者甚至威胁生命^[6-8]。已有大量研究证实曲霉菌的致病性,而对于眼部致病曲霉菌的研究相对较少。本实验选择曲霉菌为主要研究对象,利用体外培养模式,选取 3 种常用的真菌培养基,对临床获得的致病曲霉菌与曲霉菌标准菌株进行形态学特性及生长特性的比较,以期发现致病曲霉菌在经历眼部免疫、炎性因子、药物等作用后,其生物特性、行为特性所发生的改变,为临床治疗真菌感染提供有用的线索。

1 材料与方法

1.1 菌株

临床分离菌株 L 和菌株 W 分离自真菌性角膜溃疡患者角膜,曲霉菌标准菌株(BNC340016, BeNa Culture Collection),3 个菌株均经质谱鉴定为曲霉菌。

1.2 方法

1.2.1 生长曲线检测 参照文献[9]中的方法配制 2 倍浓度的马铃薯葡萄糖(综合 PDA)、沙堡罗(沙氏)和酵母浸膏(YG)3 种液体培养基。将复苏、分离好的 3 株曲霉菌,用质量分数 0.1% Tween80 溶液制成孢子悬液,血细胞计数板计数后,将孢子浓度调整至 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 。将 2 倍浓度的 3 种液体培养基加入 96 孔板中,每孔 50 μl ;再将浓度为 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 的 3 种孢子悬液加入 3 种液体培养基中,每孔 50 μl 。各组均设 6 孔重复。96 孔板放入 29 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 96 h。分别于培养后 0、4、8、12、24、36、48、60、72 和 96 h 用分光光度计(美国 BioTek 公司)在 405 nm 波长下读取吸光度(OD),并绘制生长曲线。根据生长曲线记录最大 OD 值(OD_{max})、OD 值增长量($\Delta\text{OD} = \text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{初始}}$)、曲线整体斜率(S)及最大斜率(S_{max})、达到最大斜率的时间段(T_{max})、曲线斜率明显增长的初始时间(T_0)、曲线斜率明显增长的终止时间(T_{final})。

1.2.2 形态学观察 将 2 倍浓度的液体培养基稀释 1 倍,加入质量分数 2% 琼脂高压灭菌,倒入平皿制成固体培养基。将浓度为 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 的 3 种孢子悬液 40 μl 分别接种于 3 种固体培养基的中心位置。放入 29 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养,培养 96 h。分别于培养后 0、4、8、12、24、36、48、60、72 和 96 h 观察记录菌落直径、菌落生长速度(菌落直径/培养时间)、菌丝密度、菌落颜色出现变化时间、颜色深度及发生变色的范围,颜色深度记录对照 Pantone 标准色卡。在各时间点,挑取少量真菌制成涂片,行 Giemsa 染色,显微镜下观察记录顶囊、孢子等显微形态特征。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究中测量指标数据经 K-S 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同培养基各时间点以及不同菌株各时间点 OD 值比较采用重复测量两因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生长曲线

2.1.1 同一菌株在不同的培养基上的生长曲线比较 同一菌株在不同培养基上生长曲线差异明显(图 1, 表 1)。临床分离菌株 L、菌株 W 和标准菌株在综合 PDA 培养基上 ΔOD 最大,在沙氏培养基上 ΔOD 最小(表 2)。

2.1.2 不同菌株在同一培养基上的生长曲线

在综合 PDA 培养基上,不同菌株各时间点 OD 值总体比较,差异有统计学意义($F_{\text{时间}} = 0.295, P < 0.05$);培养后 0 ~ 72 h 范围内,菌株 L、菌株 W 分别与标准菌株的生长曲线比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。培养后 96 h 时,菌株 W 的 OD 值明显高于标准菌,差异有统计学意义($P = 0.012$)。3 株曲霉菌的 T_0 均为 0 h,均 $T_{\text{final}} > 96$ h(图 2A, 表 2)。

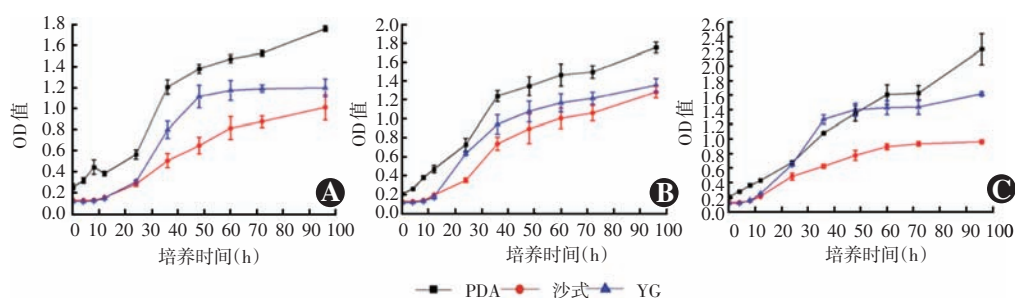


图 1 同一菌株在不同培养基上的生长曲线 A: 标准菌株 BNC340016 $F_{\text{时间}} = 2.763.151, P = 0.000; F_{\text{培养基}} = 986.238, P = 0.000; F_{\text{交互作用}} = 18.986, P = 0.000$ B: 菌株 L $F_{\text{时间}} = 1.713.508, P = 0.000; F_{\text{培养基}} = 170.371, P = 0.000; F_{\text{交互作用}} = 18.000, P = 0.000$ C: 菌株 W $F_{\text{时间}} = 947.092, P = 0.000; F_{\text{培养基}} = 389.006, P = 0.000; F_{\text{交互作用}} = 16.000, P = 0.000$ (重复测量两因素方差分析, $n = 3$) PDA: 马铃薯葡萄糖; YG: 酵母浸膏

表 1 不同培养基上 3 株霉菌生长曲线数据

培养基	菌株	样本量	$A_{\max}(\bar{x}\pm s)$	$\Delta A(\bar{x}\pm s)$	$S(\bar{x}\pm s, 10^{-2})$	$S_{\max}(\bar{x}\pm s, 10^{-2})$	$T_{\max}(h)$	$T_0(h)$	$T_{\text{final}}(h)$
综合	标准菌株	6	1.760±0.030	1.515±0.015	1.578±0.016	5.354±0.266	24-36	0	>96
PDA	菌株 L	6	1.757±0.062	1.547±0.061	1.590±0.018	4.278±0.196	24-36	0	>96
	菌株 W	6	2.134±0.320	1.931±0.313	1.930±0.238	3.694±0.669	24-36	0	>96
沙氏	标准菌株	6	1.055±0.053	0.921±0.053	0.097±0.046	1.861±0.375	24-36	12	>96
	菌株 L	6	1.285±0.067	1.150±0.065	1.188±0.056	3.400±0.269	24-36	8	>96
	菌株 W	6	0.976±0.016	0.835±0.016	0.865±0.006	2.171±0.414	12-24	8	72
YG	标准菌株	6	1.228±0.038	1.105±0.036	1.142±0.026	3.963±0.263	24-36	12	60
	菌株 L	6	1.326±0.107	1.202±0.106	1.227±0.088	3.544±1.053	12-24	8	>96
	菌株 W	6	1.621±0.033	1.495±0.032	1.548±0.021	4.674±0.623	24-36	8	>96

注: $A_{\max}$: 最大 A 值; ΔA : A 值变化; S: 曲线整体斜率; $S_{\max}$: 曲线最大斜率; $T_{\max}$: 达到最大斜率的时间段; T_0 : 曲线斜率明显增长的初始时间; T_{final} : 曲线斜率明显增长的终止时间; PDA: 马铃薯葡萄糖; YG: 酵母浸膏

YG 培养基上, 各菌株不同时间点 OD 值总体比较, 差异有统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 1812.974, P = 0.000$), 不同菌株 OD 值总体比较, 差异有统计学意义 ($F_{\text{菌株}} = 116.233, P = 0.000$)。菌株 L、菌株 W 和标准菌株的 T_0 分别为 8、8 和 12 h, T_{final} 分别为 >96 h、>96 h 和 60 h。(图 2B, 表 1)。

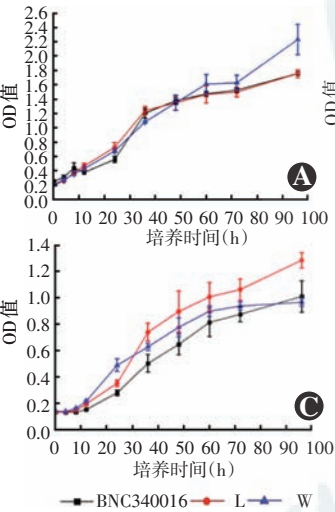


图 2 同一培养基上不同菌株的生长曲线 A: 综合 PDA 培养基 $F_{\text{时间}} = 0.295, P = 0.000; F_{\text{菌株}} = 0.295, P = 0.749; F_{\text{交互作用}} = 6.788, P = 0.000$ B: YG 培养基 $F_{\text{时间}} = 1812.974, P = 0.000; F_{\text{菌株}} = 116.233, P = 0.000; F_{\text{交互作用}} = 68.429, P = 0.000$ C: 沙氏培养基 $F_{\text{时间}} = 944.759, P = 0.000; F_{\text{菌株}} = 34.172, P = 0.000; F_{\text{交互作用}} = 19.935, P = 0.000$ (重复测量两因素方差分析, $n = 3$)

沙氏培养基上, 各菌株不同时间点 OD 值总体比较, 差异有统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 944.759, P = 0.000$), 不同菌株 OD 值总体比较, 差异有统计学意义 ($F_{\text{菌株}} = 34.172, P = 0.000$)。菌株 L 和菌株 W 的 $T_0 = 8$ h, 而标准菌的 $T_0 = 12$ h, 菌株 W 的 $T_{\max}$ 早于标准菌, 菌株 L 的 $T_{\max}$ 与标准菌一致, 但菌株 L 的 $S_{\max}$ 几乎是标准菌的 2 倍(图 2C, 表 1)。

2.2 菌落形态

在固体培养基上, 各菌株在培养 12 h 内均无肉眼可见的菌落生长。培养后 24 h 可观察到菌落不同程度的生长, 随时间延长, 差异逐渐明显。

2.2.1 同一菌株在不同培养基上的生长情况 培养后 96 h, 各菌株在综合 PDA 上菌落范围最大, 菌丝致密; 在 YG 和沙氏培养基上, 菌落范围差别不明显, 但沙氏培养基菌丝明显更稀疏。3 种培养基中, YG 培养基上颜色变化出现最晚(图 3, 表 2)。显微镜下观察, 同一菌株在不同培养基上的菌株形态结构差异不明显(图 4)。

2.2.2 不同菌株在同种培养基上的生长情况 同种培养基上, 培养 24 h 内各菌株间菌落范围无明显差异。从培养后 48 h 开始, 菌株 L 和菌株 W 菌落范围明显大于标准菌株。颜色变化方面, 菌株 L 和菌株 W 颜色变化

表 2 不同培养基三株霉菌培养 96 h 后菌落特点

培养基	菌株	菌落直径 (mm)	平均生长速率 (mm/d)	菌丝密度	出现颜色变化时间 (h)	菌落颜色	有色范围 (mm)
综合	标准菌株	50	12.50	++++	36	343C	38
PDA	菌株 L	75	18.75	++++	36	343C	60
	菌株 W	70	17.50	++++	36	364C	52
沙氏	标准菌株	37	9.25	++	48	338C	28
	菌株 L	65	16.25	+++	36	342C	52
	菌株 W	60	15.00	+++	36	363C	42
YG	标准菌株	43	10.75	++++	60	342C	30
	菌株 L	64	16.00	++++	60	341C	36
	菌株 W	58	14.50	++++	48	360C	43

注: PDA: 马铃薯葡萄糖; YG: 酵母浸膏

早于标准菌株,且培养后 96 h 时颜色变化范围大于标准菌株(图 3,表 2)。显微镜下可见,无论在何种培养基上,菌株 W 的菌丝粗细、顶囊大小、孢子大小均明显大于标准菌株(图 4)。

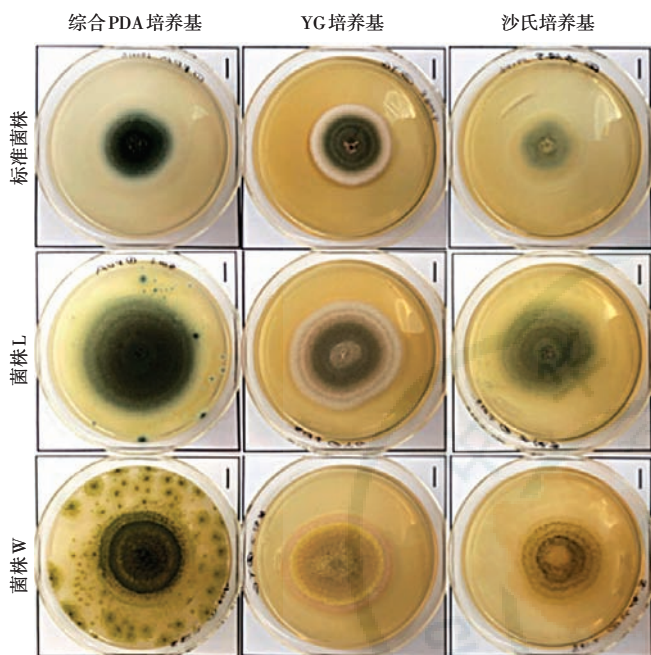


图3 各菌株在不同培养基上培养后 96 h 的菌落形态 各菌株在综合 PDA 上菌落范围最大;在 YG 和沙氏培养基上,菌落范围差别不明显,但沙氏培养基菌丝明显更稀疏.同种培养基上,菌株 L 和菌株 W 菌落范围明显大于标准菌株 PDA:马铃薯葡萄糖;YG:酵母浸膏

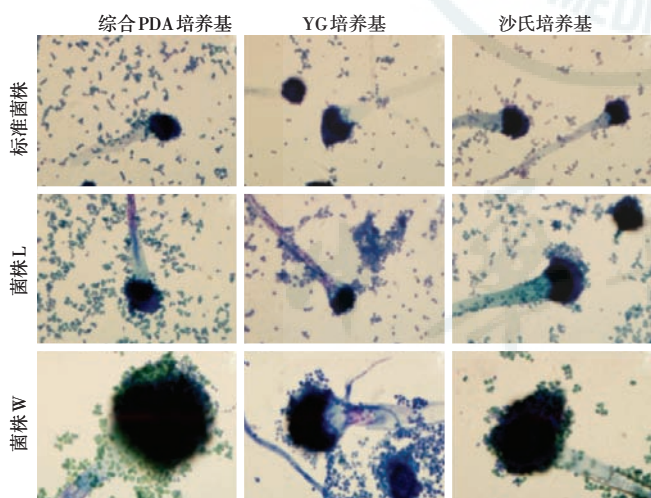


图4 各菌株在不同培养基上培养 96 h 后的显微镜下形态 (Giemsa, $\times 1000$) 同一菌株在不同培养基上的表现差异不明显;菌株 W 与标准菌株相比,呈现菌丝粗、顶囊大、孢子大的显微结构特点 PDA:马铃薯葡萄糖;YG:酵母浸膏

3 讨论

研究表明,生长曲线可良好地描述曲霉菌的静止期、第一过渡期、对数生长期、第二过渡期及稳定期 5

个生长阶段^[10-11]。OD 值的变化可直接反映菌株的生长情况,且较菌落的形态学观察更为精准。形态学观察本身具有直观、具象的优势,将其与生长曲线检测结合可更为全面地揭示菌株的生长特性,从而比较临床分离菌株与标准菌株间的异同。

本研究中选用了 3 种常见的真菌培养基。综合 PDA 培养基常用于鉴定曲霉菌和青霉菌^[9]。因综合 PDA 培养基含有马铃薯提取液,故营养丰富,曲霉菌在此培养基上生长最好,临床分离菌在此培养基上体现出与标准菌相对一致的生长特性,生长曲线较一致。YG 培养基加入的酵母浸膏富含蛋白质及微量元素,使其营养种类丰富,因此其早期曲霉菌的生长较在沙氏培养基上好。YG 培养基各营养成分的总量较少,限制了曲霉菌的生长,使其进入稳定期,从而能在观察期内完整描述曲霉菌的生长周期,与既往研究结果一致^[11]。沙氏培养基多用于真菌的常规培养,其营养成分单一,但糖、蛋白质的总量相对丰富,因此在沙氏培养基上,各菌株均生长缓慢,但观察结束时,致病菌株 L 和标准菌株仍保持生长,甚至有超越 YG 培养基上菌株生长的趋势。沙氏培养基的单一营养成分使临床分离菌和标准菌的生长差异容易显现:菌株 L 在 24 ~ 36 h 阶段生长速度明显快于标准菌株,考虑其对营养条件的适应性强于标准菌;菌株 W 除有早期的快速生长外,在培养后 72 h 进入稳定期,而标准菌株仍在生长,考虑微量元素的匮乏限制了菌株 W 的生长。

分析 3 株曲霉菌的来源背景可知,标准菌株 BNC340016 无复杂环境经历;2 株临床分离曲霉菌均分离自真菌性角膜溃疡患者的角膜,具有复杂的临床背景。菌株 L 分离自感染的角膜植片,患者外伤后发生眼内炎、角膜穿孔,行角膜移植,角膜植片真菌感染,期间曾局部及全身使用抗生素、糖皮质激素、抗真菌药物,患者无全身疾病。菌株 W 分离自无明确诱因发生角膜溃疡的患者角膜,局部用药,具体不详,患者有糖尿病史。菌株 L 和菌株 W 都经历了感染角膜、药物刺激的临床阶段,应对了复杂的环境变化,生物学行为发生了相应的变化,表现出区别于标准菌株的生物学特性。首先,临床分离菌株能更好地适应营养环境变化。在营养物质总量较少的 YG 培养基上,菌株 W 的生长明显好于标准菌株;而在营养物质相对单一的沙氏培养基上,菌株 L 的生长明显好于标准菌株。其次,在培养早期,临床分离菌出现不同于标准菌的快速生长,这也是临床分离菌环境适应性强的一种体现。在培养 0 ~ 12 h 阶段,无论在何种培养基上,无论是否有明显的静止期,临床分离真菌和标准菌的差异均不明显,但

在 12~36 h 阶段,临床分离真菌生长速率明显超越标准菌株,这一生长特性的差异是其致病性的重要影响因素。这提示我们,临床对于真菌性眼部组织的感染,早发现、早治疗具有重要意义。另外,需要注意的是,菌株 W 分离自糖尿病患者角膜。据统计,糖尿病继发真菌感染的发病率比无糖尿病人群高 3~4 倍^[12]。研究表明,糖尿病患者若出现角膜真菌感染,往往呈现起病急、病情重、预后差、易复发的特点^[13-14]。菌株 W 在培养基上的生长状况也印证了这一点:在沙氏和 YG 培养基上,菌株 W 早期生长快于其他 2 个菌株;在综合 PDA 和 YG 培养基上,培养后 96 h,其 OD 值、菌落范围明显大于其他 2 个菌株。角膜基质由胶原纤维组成,相当于蛋白质丰富的培养基,其葡萄糖供应主要来源于角膜缘血管和房水,而糖尿病患者的血糖和房水糖浓度均明显高于非糖尿病者^[15]。感染糖尿病患者角膜的曲霉菌是否对糖的有更高的利用度,尚需进一步实验证实。

另有 2 个结果值得我们特别注意:(1)培养后 96 h,在综合 PDA 和 YG 上生长均好于其他 2 个菌株的菌株 W,在沙氏培养基上生长状态却较差,沙氏培养基中微量元素的匮乏可能是造成这样结果的原因。(2)在 YG 培养基上各菌株生长情况好于沙氏培养基,但菌落颜色变化却最晚。菌落颜色变化代表分生孢子的成熟,而分生孢子是曲霉菌的无性繁殖方式。YG 培养基中酵母浸膏使用量的不同会对孢子产生影响^[9]。这 2 个结果均提示我们,通过改变角膜的微环境或许可以达到抑制真菌生长或抑制真菌繁殖的目的,从而找到辅助治疗眼部真菌感染的新途径。

综上所述,眼部致病曲霉菌和曲霉菌标准菌株的体外培养表明,在营养条件相对单一的情况下,临床分离曲霉菌的生长明显优于标准菌株,在培养早期即表现出良好的环境适应性。这种环境适应性使得临床分离菌株在复杂的临床环境中得以生存,进而致病。

本实验仅针对曲霉菌的生长特性进行了探讨、对致病菌株和标准菌株进行了对比,今后仍需对其应用进行进一步的研究,为眼部真菌感染的预防、诊断和治疗提供参考。

参考文献

- [1] Garg P. Fungal, Mycobacterial, and Nocardia infections and the eye: an update[J]. Eye (Lond), 2012, 26(2): 245-251. DOI: 10. 1038/eye. 2011. 332.
- [2] Thomas PA, Kalamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management[J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(3): 210-220. DOI: 10. 1111/1469-0691. 12126.
- [3] 刘敬, 谢立信, 史伟云. 主要致病真菌在角膜内生长方式的研究[J]. 眼科研究, 2008, 26(1): 26-29.
Liu J, Xie LX, Shi WY. Experimental study on growth feature of three major fungal keratitis[J]. Chin Ophthal Res, 2008, 26(1): 26-29.
- [4] 白海青, 金梅玲, 赵桂秋, 等. 镰刀菌和曲霉菌性角膜溃疡的组织病理学特点[J]. 中华眼科杂志, 2004, 40(5): 341-343. DOI: 10. 3760/j. issn: 0412-4081. 2004. 05. 014.
- [5] 谢立信. 真菌性角膜炎[J]. 中华眼科杂志, 2003, 39(10): 638-640. DOI: 10. 3760/j. issn: 0412-4081. 2003. 10. 017.
- [6] Binder U, Lass-Flörl C. New insights into invasive aspergillosis—from the pathogen to the disease[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(20): 3679-3688.
- [7] 孙旭光, 王智群, 罗时运, 等. 眼部真菌感染的病原学分析[J]. 中华眼科杂志, 2002, 38(7): 405-407.
Sun XG, Wang ZQ, Luo SY, et al. Etiological analysis on the ocular fungal infection[J]. Chin J Ophthalmol, 2002, 38(7): 405-407.
- [8] 吴伟, 何梅凤, 马淑娟, 等. 广州地区某眼科医院 2004—2008 年眼部真菌感染病原学分析[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2010, 31(6): 852-855, 861.
Wu W, He MF, Ma SM, et al. Etiological analysis on ocular fungal infection of ophthalmologic hospital in guangzhou[J]. J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci), 2010, 31(6): 852-855, 861.
- [9] 朱红梅, 徐红, 温海. 医学真菌常用培养基的制备和应用[J]. 中国真菌学杂志, 2010, 05(5): 296-306. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-3827. 2010. 05. 011.
- [10] Meletiadis J, Meis JF, Mouton JW, et al. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(2): 478-484. DOI: 10. 1128/JCM. 39. 2. 478-484. 2001.
- [11] 张晋卿, 刘伟, 谭静文, 等. 烟曲霉在不同温度和营养条件下的生长特性初探[J]. 中国真菌学杂志, 2013, 8(1): 6-9. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-3827. 2013. 01. 002.
Zhang JQ, Liu W, Tan JW, et al. Analysis of the growth characteristics of Aspergillus fumigatus in different temperature and nutrient media[J]. Chin J Mycology, 2013, 8(1): 6-9. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-3827. 2013. 01. 002.
- [12] 周阳, 李青, 高阳. 糖尿病与侵袭性真菌感染的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(7): 876-878. DOI: 10. 3969/j. issn. 1009-6663. 2008. 07. 030.
- [13] 黄晓明, 赵桂秋, 林静, 等. 糖尿病真菌性角膜炎患者临床特征、病原学特点及预后的回顾性分析[J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(7): 621-626. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 07. 010.
Huang XM, Zhao GQ, Lin J, et al. A retrospective analysis of the clinical characteristics, etiology and prognosis of fungal keratitis with diabetes mellitus[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(7): 621-626. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 07. 010.
- [14] 黎明明, 丘亮辉, 赖江峰, 等. 糖尿病对真菌性角膜炎患者感染程度及预后的影响[J]. 眼科新进展, 2016, 36(8): 763-766. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2016. 0204.
Li MM, Qiu LH, Lai JF, et al. Effects of diabetes mellitus on infection degree and prognosis of fungal keratitis[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2016, 36(8): 763-766. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2016. 0204.
- [15] Davies PD, Duncan G, Pynsent PB, et al. Aqueous humour glucose concentration in cataract patients and its effect on the lens[J]. Exp Eye Res, 1984, 39(5): 605-609.

(收稿日期: 2018-02-15 修回日期: 2018-08-26)

(本文编辑: 张宇)