

3 种方法检测白假丝酵母菌对氟康唑、伏立康唑的敏感性对比

陈文伟 黄良珍 彭钢文

作者单位: 528400 广东中山, 中山市古镇人民医院检验科

通讯作者: 陈文伟, Email: 401753338@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.04.004

【摘要】 目的 比较抗真菌药敏试验纸片扩散法、ATB FUNGUS3(ATB F3)微量稀释法和E-试验(Epsilon meter test)检测白假丝酵母菌对氟康唑、伏立康唑的结果,探讨3种方法的可比性和一致性。方法 使用纸片扩散法和ATB F3法对中山市古镇人民医院住院患者分离的58株白假丝酵母菌进行药敏试验,同时用E-试验作为对照。结果 纸片扩散法与E-试验的符合率在氟康唑为69.0%(40/58),在伏立康唑为98.2%(57/58);ATB F3法与E-试验的符合率在:氟康唑为89.7%(52/58),在伏立康唑为96.6%(56/58)。结论 纸片扩散法检测白假丝酵母菌对氟康唑敏感性与E-试验符合率不甚理想,ATB F3法比较理想;而伏立康唑无论纸片法还是ATB F3法与E-试验结果符合率非常一致。ATB F3法检测白假丝酵母菌敏感性操作简便,使用成本低,大多数医院特别是基层医院应该推广普及。

【关键词】 ATB FUNGUS3; E-试验; 抗真菌药敏试验

Comparative evaluation of three methods in susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against candida albicans

CHEN Wen-wei, HUANG Liang-zhen, PENG Gang-wen. Department of Clinical Laboratory, Guzhen People's Hospital of Zhongshan, Zhongshan 528400, Guangdong, China

【Abstract】 Objective To compare white candida yeast susceptibility detection to fluconazole, voriconazole by Disc Diffusion and ATB FUNGUS3 (ATB F3) Micro-diffusion and Epsilon meter test (E-test) method, discuss comparability and consistency of three methods. **Methods** 58 strains white candida yeast isolated from hospitalized patients in Guzhen people's hospital were tested for drug sensitive by Disc Diffusion, ATB F3 method and as a control by the E-test method. **Results** The accuracy of disc diffusion method and E-test method for fluconazole and voriconazole were 69.0% (40/58) and 98.2% (57/58), respectively. The accuracy of ATB F3 method and E-test method for fluconazole and voriconazole were 89.7% (52/58) and 96.6% (56/58), respectively. **Conclusions** There was not higher coincidence rate of Disc Diffusion method with E-test method for candida albicans susceptibility to fluconazole, the ATB F3 method was more ideal. There was higher coincidence rate with E-test method for voriconazole, no metter Disc Diffusion method or ATB F3 method. ATB F3 method promises to be easier and cheaper, ATB F3 method can be chosen as a primary hospital in widespread use testing method.

【Key words】 ATB FUNGUS3. Epsilon meter test. antifungal susceptibility

虽然真菌感染是机会性感染性疾病,但威胁人类生命的真菌感染每年都在不断地增多,其中念珠菌感染占了很大一部分比例^[1],并已成为医院重症加强治疗病房(ICU)最严重的感染源之一^[2]。由于广谱抗菌药物的长期和大量使用、血液透析及肿瘤化疗药物的使用,静脉导管的介入治疗及细胞免疫低下的人群不断增多,导致真菌败血症的发病率

逐渐增高^[3],国外有报道器官移植的患者念珠菌感染达到了3.5%^[4],对肝移植术后患者应注意预防真菌感染^[5]。氟康唑、伏立康唑均为临床上应用的比较多的抗真菌药物,随着抗真菌药物的使用增多,耐药率也在不断地上升^[6-7],其中白假丝酵母菌在人体分离的念珠菌中占的比例达到了55.9%^[8],因此,其药敏测试也显得十分重要。本研究将纸

片扩散法、ATB FUNGUS3(ATB F3)法和 E- 试验(Epsilon meter test)检测白假丝酵母菌对氟康唑、伏立康唑敏感性结果进行对比分析,报告如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 2015 年 1 月至 8 月,从中山市古镇人民医院各临床科室住院患者的痰液、血液、中段尿及伤口分泌物等标本中分离出的白假丝酵母菌 58 株(剔除同一患者同一部位连续分离的菌株,其中呼吸内科 20 株、骨科 6 株、普外科 5 株、重症监护室 18 株、心肾神经内科 9 株)用于测试药敏试验。

1.2 分离与鉴定 酵母菌分离采用沙保氏琼脂平板 28℃ 培养 48 h;鉴定采用法国生物梅里埃公司生产的 API Candida 鉴定分离菌株。

1.3 抗真菌药敏试剂

1.3.1 药敏纸片 由英国 Oxoid 公司生产。氟康唑每片 25 μg,伏立康唑每片 1 μg。

1.3.2 ATB F3 试剂盒 由法国生物梅里埃公司生产。抗菌药物浓度:氟康唑 1~128 mg/L、伏立康唑 0.06~8 mg/L。

1.3.3 E- 试验试纸条 由瑞典 AB-Biodisk 公司生产,氟康唑 0.016~256 mg/L、伏立康唑 0.016~256 mg/L。药敏培养基成分:RPMI 1640(由广州迪景公司生产),0.165 mol/L MOPS(由美国 sigma 公司生产),1.5% BACTO 琼脂(由美国 DIFCO 公司生产),2% 葡萄糖 121℃、15 min,制成直径 150 mm 的平板。

1.4 方 法

1.4.1 纸片扩散法 将调好的 0.5 mU 白假丝酵母菌纯菌液用棉拭子均匀涂布于改良 SHADOMY 琼脂平板,将相应纸片贴于平板培养 18~24 h 后读结果,若菌落生长不良则再多培养 24 h,在约 80% 抑制区判读氟康唑的抑菌直径,在 100% 抑制区读取伏立康唑的抑菌直径。

1.4.2 ATB F3 法 将调好的 2 mU 白假丝酵母菌纯菌液 20 μL 加入 ATB F3 培养基中混匀,再从每孔吸取 135 μL 混有菌液的培养基加入药敏板中,置 30℃ 孵育 24~48 h。以生长对照孔生长良好,而含药最高稀释孔不生长者为最小抑菌浓度(MIC)的终点。

1.4.3 E- 试验 将试验菌株用沙保氏琼脂平板纯化,挑起菌落溶于生理盐水中,制备成浊度为 0.5 mU 的菌悬液。用无菌棉拭蘸取菌悬液,均匀涂布于药敏专用培养基上,平板干燥 15 min 后将 2 种 E- 试验试纸条紧贴附于培养基上,30℃ 下培养 24 h,在抑菌环与纸条上药物浓度交界处下方读取 MIC 值。

1.5 判断标准

1.5.1 纸片扩散法 参照临床和实验室标准协会(CLSI) M51-A 抗真菌药敏试验标准。氟康唑:培养 18~24 h,抑菌环直径 ≥19 mm 为敏感,15~18 mm 为中介,≤14 mm 为耐药。伏立康唑:培养 18~24 h,抑菌环直径 ≥17 mm 为敏感,14~16 mm 为中介,≤13 mm 为耐药。

1.5.2 ATB F3 法 参照 CLSI M38-A2 抗真菌药敏试验标准:氟康唑 ≤8 mg/L、伏立康唑 ≤1 mg/L 为敏感;氟康唑 MIC ≥64 mg/L、伏立康唑 MIC ≥4 mg/L 为耐药;氟康唑 MIC 在 16~32 mg/L、伏立康唑 MIC 在 =2 mg/L 为剂量依赖敏感或中介。

1.5.3 E- 试验 参照 CLSI M38-A2 抗真菌药敏试验标准:氟康唑 ≤8 mg/L、伏立康唑 ≤1 mg/L 为敏感;氟康唑 MIC ≥64 mg/L、伏立康唑 MIC ≥4 mg/L 为耐药;氟康唑 MIC 在 16~32 mg/L、伏立康唑 MIC 在 =2 mg/L 为剂量依赖敏感或中介。

1.6 质量控制 试验以白假丝酵母菌 ATCC90028 为对照同时进行测定。

2 结 果

2.1 质控纸片扩散法 白假丝酵母菌 ATCC90028 对氟康唑和伏立康唑的抑菌环直径为 23 mm 和 22 mm 均为敏感,质控范围来源于 Oxoid 公司提供的说明书。ATB F3 法与 E- 试验检测白假丝酵母菌 ATCC90028 对氟康唑的 MIC 分别为 2 mg/L 和 1 mg/L,对伏立康唑的 MIC 分别为 0.125 mg/L 和 0.125 mg/L。

2.2.1 纸片扩散法与 E- 试验检测白假丝酵母菌对氟康唑和伏立康唑的敏感性比较 纸片扩散法检测 58 株白假丝酵母菌,对氟康唑的敏感性敏感(S)为 55.2%、依赖(SDD)为 31.0%、耐药(R)为 13.8%;E- 试验 S 为 86.2%、SDD 为 10.4%、R 为 3.4%;对伏立康唑的敏感性 S 为 91.3%、SDD 为 5.2%、R 为 3.4%;E- 试验 S 为 89.7%、SDD 为 6.9%、R 为 3.4%。纸片扩散法与 E- 试验药敏结果符合率在氟康唑为 69.0%(40/58);在不符合的 18 株中,6 株纸片扩散法为 SDD、E- 试验为 S,6 株纸片扩散法为 R、E- 试验为 SDD。纸片扩散法与 E- 试验药敏结果符合率在伏立康唑 98.2%(57/58);在不符合的 1 株中,纸片扩散法为 S、E- 试验为 SDD。见表 1。

2.2.2 ATB F3 法与 E- 试验检测白假丝酵母菌对氟康唑和伏立康唑的敏感性比较 ATB F3 法检测 58 株白假丝酵母菌对氟康唑的敏感性 S 为 75.9%、SDD 为 17.2%、R 为 6.9%;E- 试验 S 为 86.2%、SDD

表 1 纸片扩散法与 E- 试验检测白假丝酵母菌的耐药性比较

抗真菌药物	菌名	株数 (株)	纸片扩散法 [株 (%)]			E- 试验 [株 (%)]		
			S	SDD	R	S	SDD	R
氟康唑	白假丝酵母菌	58	32(55.2)	18(31.0)	8(13.8)	50(86.2)	6(10.4)	2(3.4)
伏立康唑	白假丝酵母菌	58	53(91.3)	3(5.2)	2(3.4)	52(89.7)	4(6.9)	2(3.4)

表 2 ATB F3 法与 E- 试验检测白假丝酵母菌的耐药性比较

抗真菌药物	菌名	株数 (株)	ATB F3 法 [株 (%)]			E- 试验 [株 (%)]		
			S	SDD	R	S	SDD	R
氟康唑	白假丝酵母菌	58	44(75.9)	10(17.2)	4(6.9)	50(86.2)	6(10.4)	2(3.4)
伏立康唑	白假丝酵母菌	58	54(93.1)	3(5.2)	1(1.7)	52(89.7)	4(6.9)	2(3.4)

为 10.4%、R 为 3.4%；ATB F3 法对伏立康唑的敏感性为 S 为 93.1%、SDD 为 5.2%、R 为 1.7%；ATB F3 法与 E- 试验药敏结果符合率在氟康唑为 89.7% (52/58)；在不符合的 6 株中，2 株 ATB F3 法为 R、E- 试验为 SDD；4 株 ATB F3 法为 SDD、E- 试验为 S。伏立康唑符合率 96.6% (56/58)，在不符合的 2 株中 ATB F3 法为 S、E- 试验为 SDD。见表 2。

3 讨论

氟康唑属于三唑类抗真菌药物具有广谱的抗菌活性，毒性低，既可口服又可注射，适用于老人和儿童，是治疗深部真菌感染的首选药物。但随着氟康唑使用增多的同时耐药率也上升，新一代三唑类广谱抗真菌药物伏立康唑已经上市。目前在全世界范围的念珠菌耐药的报道也在不断地增多，当中不乏报道有伏立康唑的耐药。我国学者的研究表明，假丝酵母菌对氟康唑的耐药在 3.3%~42.3%^[9]；Cuenca-Estrella 等^[10]在西班牙当地医院分离的 4 226 株白假丝酵母菌对伏立康唑的耐药率为 5%，而伏立康唑在国内耐药则较少报道。本试验结果显示，氟康唑对白假丝酵母菌敏感性纸片扩散法为 55.2%，ATB F3 法 75.9%，参考对照 E- 试验为 86.2%，纸片扩散法与 ATB F3 法差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，伏立康唑纸片扩散法和 ATB F3 法敏感性超过 90%，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

目前，我国纸片扩散法、E- 试验念珠菌的药敏试验所用标准是 CLSI 2010 年的 CLSI M51-A^[11]，微量稀释法采用的标准是 CLSI M38-A2^[12]，其中 CLSI 纸片扩散法操作简便，但本试验显示，纸片扩散法测试氟康唑的敏感性与 E- 试验相比符合率不甚理想，而测试伏立康唑则与 E- 试验非常一致。ATB F3 法操作简单、判读方便，成本相对较低，严格按照操作规程操作即可得到合适浓度范围内的 MIC

值，所以 ATB F3 法目前是我国应用最广的念珠菌药敏测试的方法。但使用 ATB F3 法必须注意两点：① ATB F3 法试剂板上抗菌药物浓度稀释孔数比较少，由此得出的 MIC 值不如 E- 试验准确，因而其检测 MIC 折点值有一定误差，对于区分 SDD 株和 R 株存在不足。② 在机器自动判读白假丝酵母菌的氟康唑和伏立康唑 MIC 折点值，如果存在拖尾现象时会将 S 或 SDD 读成 R，建议用人工肉眼判读^[13]。E- 试验目前是最佳的测试念珠菌药敏的方法，它结合了扩散法的原理和特点，与肉汤稀释法和微量稀释法有良好的符合率^[14]，判断 MIC 折点值较准确，但试纸条价格昂贵，目前临床应用受限而更多地用于科研。综上所述，大多数医院应该普及 ATB F3 法测试白假丝酵母菌敏感性，当实验室得出的药敏结果与临床不符合或治疗效果不佳时，有条件的实验室应用 E- 试验复检，更好地指导临床用药。

4 参考文献

- 1 Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol*, 2007, 45: 1735-45.
- 2 贾磊, 郁慧杰, 陆锦琪, 等. 重症监护病房念珠菌感染情况及药敏分析. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21: 449-452.
- 3 赵俊英, 王毓新, 张文娟. 真菌病诊断与治疗. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- 4 Gavalda J, Meije Y, Fortún J, et al. Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20 Suppl 7: 27-48.
- 5 郑卫萍. 肝移植术后预防性抗真菌治疗的系统性回顾和网状 Meta 分析. *实用器官移植电子杂志*, 2015, 2: 58-58.
- 6 姜小国, 胡森. 抗真菌药氟康唑改善脓毒性休克患者的存活率. *中华危重病急救医学*, 2003, 15: 454.
- 7 王晓玲, 侯佳宜, 高颖, 等. 白假丝酵母菌简便培养方法的建立及临床应用研究. *实用检验医师杂志*, 2014, 6: 133-136.
- 8 王顺, 王永涛, 贾征夫. 感染性标本中检出的假丝酵母菌属种类及药物敏感性分析. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23: 5367-5368.

- 5371.
- 9 Zhang L, Wang H, Xiao M, et al. The widely used ATB FUNGUS 3 automated readings in China and its misleading high MICs of *Candida* spp. to azoles: challenges for developing countries' clinical microbiology labs. *PLoS One*, 2014, 9: e114004.
- 10 Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Cuesta I, et al. Frequency of voriconazole resistance in vitro among Spanish clinical isolates of *Candida* spp. According to breakpoints established by the Antifungal Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55: 1794-1797.
- 11 CLSI. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of non-dermatophyte filamentous fungi; Approved Guideline, CLSI document M51-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
- 12 CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard-Second edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- 13 黄会, 吴多荣, 韩小胜, 等. 1312 株酵母菌的鉴定及其药敏分析. *实用预防医学*, 2012, 19: 1536-1537.
- 14 Gupta P, Khare V, Kumar D, et al. Comparative Evaluation of Disc Diffusion and E-test with Broth Micro-dilution in Susceptibility testing of Amphotericin B, Voriconazole and Caspofungin against Clinical *Aspergillus* isolates. *J Clin Diagn Res*, 2015, 9: DC04-7.

(收稿日期: 2016-06-27)

(本文编辑: 李银平)

读者·作者·编者

本刊常用不需要标注中文的缩略语 (一)

- | | |
|-------------------------------------|---|
| 敏感 (sensitive, S) | 类风湿因子 (rheumatoid factor, RF) |
| 耐药 (resistance, R) | 类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) |
| 中介 (intermediate, I) | 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) |
| 红细胞 (red blood cell, RBC) | 天冬氨酸转氨酶 (aspartate transaminase, AST) |
| 红细胞比容 (hematocrit, HCT) | 丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) |
| 血红蛋白 (hemoglobin, Hb) | 肌酸激酶同工酶 (creatinase-myocardial isoenzyme, CK-MB) |
| 血小板计数 (platelet, PLT) | 血清腺苷脱氨酶 (serum adenylyate deaminase, ADA) |
| 白细胞计数 (white blood cell count, WBC) | 肿瘤坏死因子- β (tumor necrosis factor β , TNF- β) |
| 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) | 红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR) |
| 血糖 (glucose, Glu) | 红细胞平均体积 (mean corpuscular volume, MCV) |
| 变异系数 (coefficient of variation, CV) | 红细胞平均血红蛋白含量 (mean corpuscular hemoglobin, MCH) |
| 呼吸频率 (respiratory rate, RR) | α -羟丁酸脱氢酶 (α -hydroxybutyrate dehydrogenase, α -HBDH) |
| 白蛋白 (albumin, ALB) | α -突触核蛋白 (α -synaptic nuclear protein, α -synuclein) |
| 肌红蛋白 (myoglobin, MYO) | γ -谷氨酰转肽酶 (γ -glutamyl transpeptidase, γ -GGT) |
| 免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) | X 连锁凋亡抑制蛋白 (X linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP) |
| 免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM) | 超广谱 β -内酰胺酶 (extended spectrum β -lactamases, ESBLs) |
| 心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) | 超敏 C-反应蛋白 (high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP) |
| 上皮细胞钙粘蛋白 (E-cadherin, EC) | 平均血红蛋白浓度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) |
| C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) | 低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) |
| 肌酸激酶 (creatinase, CK) | 低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) |
| 胆碱酯酶 (cholinesterase, CHE) | 高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) |
| 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) | 肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶 (<i>klebsiella pneumoniae</i> carbapenem, KPC) |
| 岩藻糖苷酶 (fucosidase, AFU) | 粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) |
| 脱枝酶 (debranching enzyme, DBE) | 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) |
| 头孢菌素酶 (ampicillin, AmpC) | 胰岛素样生长因子-1 受体 (insulin like-growth factor-1 receptor, IGF1R) |
| 熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic Acid, UDCA) | 转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β) |
| 血肌酐 (serum creatinine, SCR) | 质粒介导的耐四环素淋球菌 (<i>tetracycline-resistant Neisseria gonorrhoeae</i> , TRNG) |
| 血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) | 产青霉素酶的淋球菌 (<i>penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae</i> , PPNG) |
| 血尿酸 (blood uric acid, BUA) | 最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) |
| 血清铁含量 (serum iron content, SI) | 乙二醇四乙酸二钾 (dipotassium ethylene diamine tetraacetate, EDTA-2K) |
| 铁调素 (hepcidin, Hpcp) | 上皮间质化转换 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) |
| 缺铁性贫血 (iron deficiency anemia, IDA) | 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) |
| 血栓素 (thromboxane, TBX) | 美国甲状腺学会 (American Thyroid Association, ATA) |
| 多发性心肌炎 (polymyositis, PM) | 临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) |