

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 497—2017

侵袭性真菌病临床实验室诊断操作指南

Performance guideline for clinical laboratory diagnosis of invasive fungal diseases

2017-01-15 发布

2017-07-01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 术语和定义	1
3 标本采集及处理	1
4 标本形态检查	4
5 真菌培养	4
6 培养诊断	5
7 非培养诊断	8
8 药物敏感试验	9
参考文献	14

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：中国医学科学院北京协和医院、北京大学第一医院、复旦大学附属华山医院。

本标准起草人：徐英春、李若瑜、章强强、王瑶、王贺、余进、郭莉娜、张丽、范欣。

侵袭性真菌病临床实验室诊断操作指南

1 范围

本标准规定了侵袭性真菌病临床实验室诊断操作指南,包括标本采集处理、形态检查、真菌培养、培养诊断、非培养诊断和药物敏感试验。

本标准适用于具有Ⅱ级生物安全防护能力的临床实验室。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

侵袭性真菌病 **invasive fungal disease; IFD**

真菌侵入人体组织、血液,并在其中生长繁殖所致组织损害、器官功能障碍、炎症反应的病理改变及病理生理过程。根据患者宿主因素、临床特征和微生物学检查,将 IFD 诊断分为确诊、拟诊和疑似。

2.2

最小抑菌浓度 **minimum inhibitory concentration; MIC**

按照标准操作规程进行体外真菌稀释法或连续浓度梯度稀释法药物敏感试验时,在特定培养时间及温度的条件下,能导致特定程度肉眼可见真菌生长抑制的最低药物浓度。

2.3

剂量依赖敏感 **susceptible dose dependent; SDD**

MIC 为剂量依赖敏感时,给予高于常规给药剂量且达到最大血药浓度时,临床治疗有效。

2.4

最低有效浓度 **minimum effective concentration; MEC**

曲霉在含系列浓度的棘白菌素类药物的培养基中培养时,与生长对照孔中的菌丝形态相比,菌丝变短、变圆、变粗的最低药物浓度。

2.5

折点 **breakpoint**

临床上将抗菌药物对真菌分为敏感、耐药、中介或剂量依赖敏感的特定 MIC 值。折点系综合体外的 MIC 值、耐药机制、抗菌药物 PK/PD 参数及临床疗效而得出,还可能随环境改变而改变(如感染部位、常规给药剂量的改变、给药途径及频次的改变)。

2.6

消化液 **lysis solution**

用于呼吸道标本等的前处理的化学试剂,起粘液溶解作用,常用 N-乙酰-L-半胱氨酸、5%草酸或二巯基苏糖醇等。

3 标本采集及处理

3.1 血液标本采集和处理

3.1.1 采集部位消毒

3.1.1.1 一步法:葡萄糖酸氯己定作用 30 s,或 70%异丙醇消毒后自然干燥。

3.1.1.2 三步法:

- a) 70%乙醇擦拭静脉穿刺部位,作用 30 s 以上、待干;
- b) 1%~2%碘酊从穿刺点向外画圈消毒至消毒区域直径 >3 cm,作用 30 s 或 10%碘伏作用 60 s;
- c) 70%乙醇脱碘:对碘过敏者,用 70%乙醇消毒 60 s,待乙醇挥发干燥、采集标本。

3.1.2 标本采集

宜在抗真菌药物使用前,发热初期或寒颤期采静脉血。采集后立即注入血培养瓶内并轻轻摇匀。至少采集 2 套。标本与培养基比例为 1/10~1/5(成人每瓶 8 mL~10 mL),应包括需氧瓶或真菌瓶。

3.1.3 标本处理

2 h 内常温送检。若不能及时送检,则常温保存。评估导管相关性血流感染(CRBSI)时,如患者已拔管,应采集 2 套外周血进行培养,同时做导管尖 Maki 法半定量培养(导管尖长 5 cm),如 1 套及以上外周血培养阳性,导管尖培养阳性(≥ 15 CFU),且血培养与导管尖培养菌种相同,即为 CRBSI。如患者尚未拔管,应至少采集 1 套外周血培养,同时尽快采集等量的导管血进行培养,如导管血与外周血培养均阳性,导管血阳性时间比外周血早 2 h,或导管血中菌量为外周血中菌量 5 倍以上,且没有其他明确感染源,即为 CRBSI;如导管血培养阴性,外周血培养阳性且为念珠菌属,且没有其他明确感染源,也可能为 CRBSI。

3.2 骨髓标本采集和处理

3.2.1 标本采集

使用肝素化的注射器或溶解离心管采集骨髓液 0.5 mL(儿童)至 3 mL(成人)后送检。

3.2.2 标本处理

15 min 内常温送检。若不能及时送检,则常温保存。不宜常规做骨髓液培养,如需培养可将骨髓液接种于培养瓶,但易出现假阳性。骨髓液需同时做吉姆萨染色镜检。

3.3 静脉导管标本采集和处理

3.3.1 标本采集

剪取导管尖端 5 cm 置于无菌容器中送检。

3.3.2 标本处理

15 min 内常温送检。若不能及时送检,则 4°C 保存。将导管置于血平板上,使用无菌镊子将其从平板一端滚动至另一端,滚动 4 次,做导管尖 Maki 法半定量培养。不应使用含放线菌酮的培养基。

3.4 无菌体液(脑脊液、心包液、腹水和关节液)标本采集和处理

3.4.1 标本采集

脑脊液使用脊髓穿刺针采取后送检。其余的无菌体液使用含肝素的无菌真空采血管采集。

3.4.2 标本处理

15 min 内常温送检。若不能及时送检,则常温保存(不能冷藏)。标本大于 2 mL,则 2 000 g 离心

10 min,取沉渣接种。若标本量少于 2 mL,则将标本直接接种于培养基。宜使用细胞离心机对无菌体液进行涂片镜检。脑脊液可直接接种于血培养瓶。

3.5 脓液、引流液、创面分泌物及窦道

3.5.1 标本采集

3.5.1.1 开放性创口:用无菌生理盐水冲洗创面后,应采集病灶活动性边缘组织标本。

3.5.1.2 封闭性脓肿:局部皮肤消毒后用注射器抽取脓血性液体送检。

3.5.2 标本处理

2 h 内常温送检。将标本直接接种于培养基。较浓稠的标本应使用消化液处理。

3.6 下呼吸道标本(深部痰液、支气管吸取物、肺泡灌洗液)采集和处理

3.6.1 标本采集

清洁口腔后采集清晨第一口痰液。采用外科方法进行支气管毛刷取样和采集肺泡灌洗液。唾液或 24 h 痰液都不能用于真菌培养。

3.6.2 标本处理

2 h 内室温送检;若不能及时送检,则 4 ℃ 保存。将标本接种至含抗生素的选择培养基中。较黏稠的下呼吸道标本应使用消化液处理,并 2 000 g 离心 10 min 后取沉渣接种。

3.7 眼(角膜刮片、玻璃体液等)标本采集和处理

3.7.1 标本采集

角膜刮片或针吸玻璃体液。

3.7.2 标本处理

15 min 内常温送检。若不能及时送检,则常温保存。角膜刮取标本直接接种至不含抑制剂的培养皿中,采用 X 或 C 型涂菌方式,玻璃体液离心后取沉淀物接种。

3.8 组织标本采集和处理

3.8.1 标本采集

采集标本后使用无菌容器转运,如标本量较少,应滴数滴无菌盐水保湿。

3.8.2 标本处理

及时送检,否则应室温保存。采用灭菌眼科剪将组织标本剪成米粒大小后接种培养;若可疑组织胞浆菌感染、研磨组织并培养,或采用裂解离心技术处理。若可疑接合菌感染、不研磨组织直接接种。直接镜检应研磨组织,但会影响丝状真菌培养阳性率。建议病理科与检验科联合检查组织标本。

3.9 尿液标本采集和处理

3.9.1 标本采集

采集早晨第一次清洁尿液、耻骨上联合穿刺尿液或导管尿液 10 mL~50 mL,不应采用 24 h 尿液。

3.9.2 标本处理

2 h 内常温送检；若不能及时送检，则 4 ℃ 保存。尿液接种前应 2 000 g 离心 10 min，取沉渣进行镜检和接种。尿液真菌培养不宜定量检测。

3.10 不合格标本

下列情况为不合格标本：

- a) 标本标识与申请单不符，标识错误或无标识；
- b) 未采用无菌容器或容器选择不恰当；
- c) 标本采集未按规定消毒或清洁创口；
- d) 标本采集量过少；
- e) 标本保存方式不恰当或保存时间超过规定；
- f) 血培养瓶破碎、渗漏或超过有效期；
- g) 稀薄唾液或低倍镜下上皮细胞数大于 10 个；
- h) 尿液采集未清洗会阴部及尿道口。

4 标本形态检查

4.1 标本处理

阳性血培养标本、呼吸道标本、脓液及创面分泌物可直接涂片；尿液、脑脊液和其他无菌体液等应离心后镜检。处理材料为 10% 氢氧化钾、墨汁、无菌生理盐水。

4.2 操作步骤

标本滴加载浮液后，加盖玻片镜检。先用低倍镜（遮去强光）观察有无菌丝和孢子，然后用高倍镜观察孢子和菌丝的形态、位置、大小和排列、产孢结构等特征。

观察到以下形态提示真菌种属：

- a) 酵母样孢子：提示酵母菌；
- b) 酵母样孢子和假菌丝：提示念珠菌属；
- c) 有荚膜的酵母样孢子：提示隐球菌；
- d) 透明、有隔菌丝，呈 45° 分支鹿角样：提示曲霉属；
- e) 透明、无隔或少隔菌丝，菌丝宽大，呈 90° 分支：提示接合菌纲真菌；
- f) 棕色或黑色菌丝或孢子：提示暗色丝状真菌。

4.3 结果解释

无菌部位取材标本涂片阳性提示真菌感染可能。非无菌部位取材标本涂片阳性时应结合临床其他检查。真菌菌丝、孢子或芽孢有一定折光性，勿将纤维、细胞等判为真菌。

5 真菌培养

5.1 培养基

沙保弱葡萄糖琼脂、马铃薯琼脂、脑心浸膏琼脂等，有条件实验室平行接种显色培养基；培养基中可加入氯霉素或庆大霉素。

5.2 操作步骤

宜采用螺口管斜面培养法:标本处理后接种于培养基斜面中下部,封口,建议平行接种两管。平板培养:三区划线接种,每平板只能接种一份标本。

5.3 培养条件

通常 $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d,如怀疑双相真菌(如马内菲青霉)感染,应同时在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及 $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养。对于组织、脑脊液等标本,或怀疑罕见真菌或慢生长真菌(如荚膜组织胞浆菌、隐球菌)感染时,建议至少培养 1 个月。

6 培养诊断

6.1 培养鉴定流程

6.1.1 真菌培养鉴定流程见图 1。

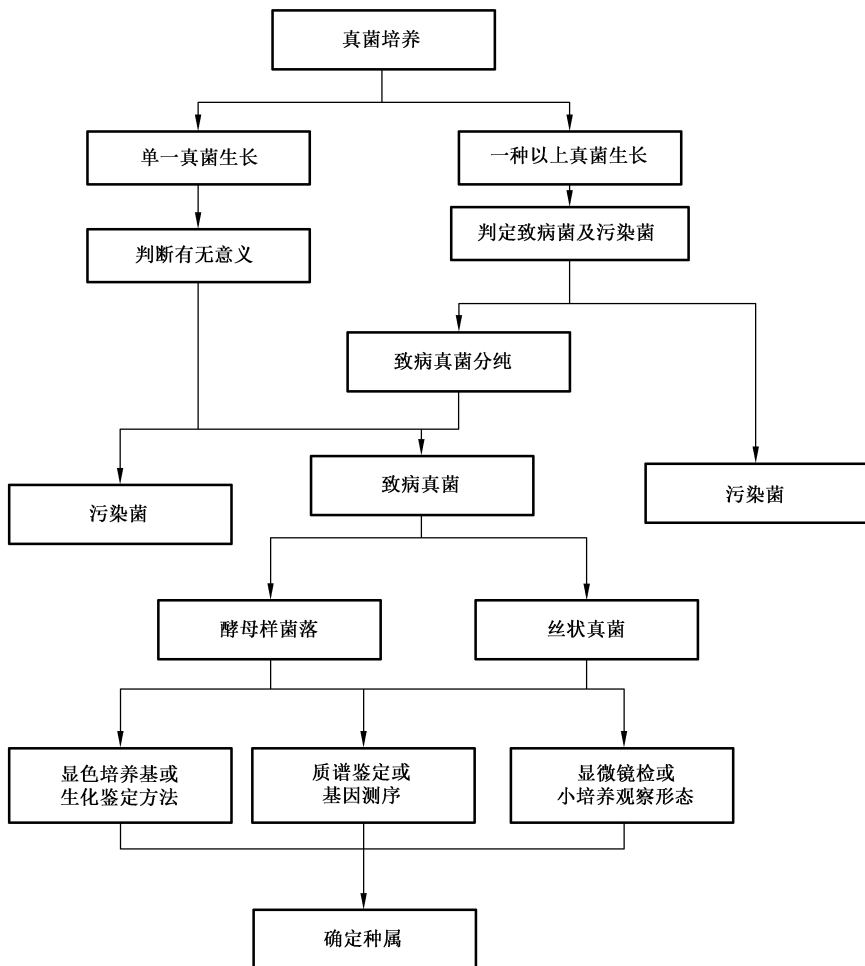


图 1 真菌培养鉴定流程

6.1.2 判断有无临床意义:在严格的防污染下,组织标本及无菌体液标本中有任何真菌生长都有意义。非无菌标本,两个试管有同一形态真菌生长,真菌镜检同时阳性者提示可能有临床意义;仅一管生长,生

长部位为非接种部位,菌落为霉菌样则可能是污染。

6.1.3 菌株是否为致病菌应结合标本直接镜检结果、患者临床症状体征、影像学及其他检查结果综合分析。

6.2 真菌培养物形态学鉴定

6.2.1 原理

通过菌落形态以及显微镜下真菌孢子、菌丝、产孢等特征性结构进行初步判断真菌种属。

6.2.2 材料

光学显微镜、透明胶带、载玻片、乳酸酚棉蓝、无菌生理盐水、盖玻片等。

6.2.3 操作步骤

观察菌落形态及镜下形态。丝状真菌镜下形态观察通常采用透明胶带法。利用胶带粘一定量菌丝,再粘在预先滴加乳酸酚棉蓝的载玻片上,显微镜下观察孢子和菌丝的形态、特征、大小和排列等。酵母菌镜下观察采用生理盐水涂片法。

6.3 芽管形成试验

6.3.1 原理

白念珠菌可形成芽管,其他念珠菌一般不形成芽管,因此用于白念珠菌的鉴定。

6.3.2 材料

血清、盖玻片、平皿、光学显微镜等。

6.3.3 操作步骤

将念珠菌接种于0.2 mL~0.5 mL人或动物血清中,37℃孵育1.5 h~4 h,镜检观察有无芽管形成。需设立阳性对照(白念珠菌)和阴性对照(热带念珠菌),注意热带念珠菌在血清中孵育6 h或更久也可形成芽管。

6.4 小培养形态学鉴定

6.4.1 原理

显微镜下观察菌落的自然生长和产孢状态,利于发现真菌特征性表现,一般用于丝状真菌鉴定。

6.4.2 标本

真菌分纯培养菌株。

6.4.3 材料

载玻片、盖玻片、灭菌器、镊子、V型或U型玻璃棒、无菌空平皿、马铃薯琼脂培养基、纱布或棉花、刀片等。

6.4.4 操作步骤(琼脂块法)

将刀片消毒,在马铃薯琼脂培养基上切一小块约0.5 cm²的琼脂块,放在灭菌载玻片上;用接种针

挑取待测菌株的少量菌丝(肉眼可见即可),分别接种在琼脂块的四角位置;将灭菌后的盖玻片置于琼脂块表面;在无菌平皿中放入无菌的玻璃棒(或其他支持物),加适量无菌水或含水棉球、纱布,将载玻片放入无菌平皿的支持物上,盖上盖玻片;28℃±1℃培养,每天观察至产孢良好或菌丝丰富时,提起盖玻片,移去琼脂块,分别将盖玻片和载玻片制片,显微镜观察。

6.5 显色培养基鉴定

6.5.1 原理

念珠菌自身代谢产生的酶与相应显色底物反应,释放出显色基团,从而使菌落呈现不同颜色。

6.5.2 标本

可疑念珠菌属的菌株或怀疑念珠菌属感染的临床标本。

6.5.3 材料

念珠菌显色培养基。

6.5.4 操作步骤

将可疑菌株或临床标本接种于显色琼脂,30℃~37℃培养48h,观察菌落颜色变化。

6.5.5 质控

白念珠菌标准菌株或参考菌株。

6.5.6 结果解释

以科玛嘉显色培养基为例,绿色菌落提示白念珠菌;蓝灰色或者铁蓝色菌落提示热带念珠菌;粉红色,边缘模糊有微毛刺菌落提示克柔念珠菌;中央为紫色的菌落提示光滑念珠菌;白色菌落提示其他念珠菌。其他显色培养基参考生产厂家说明。

6.5.7 注意

对于显色不典型及临床少见念珠菌鉴定不准确。显色培养基鉴定结果仅供参考,应以质谱、分子生物学等鉴定方法为准。

6.6 生化方法鉴定

根据不同种属微生物理化性质不同,利用不同生化反应鉴别或鉴定微生物种属。常用方法包括手工生化鉴定法和全自动生化鉴定法。

6.7 基于核酸分子生物学鉴定

基因测序应用较多,常用基因为真菌内转录间隔区(ITS区)、28S rDNA、延长因子, β 微管蛋白,钙调蛋白等,不同种属所选基因不同。所得序列需要与两个或两个以上真菌基因数据库比对,得到可靠鉴定结果。

6.8 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)鉴定

通过检测获得微生物的蛋白质谱图,并将所得的谱图与数据库中的真菌参考谱图比对后得出鉴定结果。

6.9 报告解释

6.9.1 培养阳性

无菌部位标本报告实际培养结果。非无菌部位标本培养如阳性,菌株是否为致病菌应结合标本直接镜检结果和患者临床症状体征、影像学及其他检查结果综合分析,并以此为依据判断是否需要对该菌株进行药敏试验。

6.9.2 培养阴性

6.9.2.1 初步报告

培养 7 d 无真菌生长,可发初步阴性报告“培养 7 d 无真菌生长”。

6.9.2.2 终报告

初步阴性报告后,每周观察,根据最终培养时间发出终报告“培养××周无真菌生长”。

7 非培养诊断

7.1 1,3-β-D-葡聚糖检测(G 试验)

7.1.1 原理

侵袭性真菌感染时真菌生长释放出可溶性细胞壁成分 1,3-β-D-葡聚糖,可与鲎试验中 G 因子发生级联反应,从而通过动态比浊法或动态比色法,检测标本中葡聚糖含量。

7.1.2 标本

血浆或血清。

7.1.3 注意

可检测除隐球菌、接合菌之外,临床绝大多数的侵袭性真菌感染,包括念珠菌、曲霉、肺孢子菌等。结果解读时应注意患者是否存在导致假阳性的因素,如血液透析、腹膜透析、乳糜血、棉花制品、免疫球蛋白、蘑菇多糖、胆固醇过高或内毒素等多种原因均会出现假阳性。推荐每周检测两次或依病情而定。

7.2 半乳甘露聚糖检测(GM 试验)

7.2.1 原理

半乳甘露聚糖是曲霉特异性细胞壁成分,由菌丝在组织中生长时释放出来,GM 试验利用双抗体夹心法或竞争法,与半乳甘露聚糖的 1,5-β-D-呋喃半乳糖苷侧链结合,检测标本中半乳甘露聚糖含量。

7.2.2 标本

血清、脑脊液、支气管肺泡灌洗液等标本。

7.2.3 注意

无菌密闭容器收集。曲霉菌感染检测特异性较高,但多种原因可导致假阳性。出现假阳性的常见原因:青霉、隐球菌感染;消化道定植或食物中的曲霉污染;大剂量使用激素、透析等。推荐每周检测 2 次或依病情而定。

7.3 隐球菌抗原检测

7.3.1 原理:利用乳胶凝集法和酶联免疫吸附等测定方法检测样本中是否含有隐球菌荚膜多糖抗原。

7.3.2 标本:脑脊液、血清。

7.3.3 注意:乳胶凝集法,血清中含有类风湿因子、标本中含琼脂凝固剂、二氧化碳嗜纤维菌感染、白吉利毛孢子菌感染、羟乙基淀粉、血清中含 $>200\text{ mg}$ 的 Fe^{3+} /dL、HIV感染者非特异性反应、反应玻片的不正确清洗等可导致假阳性;感染早期、荚膜抗原浓度低、血清中含有免疫复合物、荚膜抗原浓度高引起的前带效应、抗原分泌量少等可导致假阴性。ELISA法,其他微生物感染如毛孢子菌属感染可导致假阳性;感染早期、荚膜抗原浓度低、血清中含免疫复合物、抗原分泌量少等可导致假阴性。

7.3.4 血清或脑脊液滴度 $\leq 1:4$ 的阳性反应结果,高度怀疑隐球菌感染;滴度 $\geq 1:8$ 则认为患有隐球菌病。

7.4 标本核酸直接检测

在有资质的临床微生物分子诊断实验室可利用标本直接进行核酸扩增检测病原真菌。其临床报告应遵从国内分子检测相关规程,并进行严格的质量控制。

8 药物敏感试验

8.1 微量肉汤稀释法

8.1.1 原理

将倍比稀释后不同浓度的抗菌药物溶液分别加到无菌微孔板中,与一定量的真菌在特定的培养时间及培养温度下共同孵育,读取能完全或显著抑制真菌生长的最低药物浓度。

8.1.2 培养基

RPMI1640培养基,含谷氨酰胺不含碳酸氢盐并以酚红为指示剂,使用 0.165 mol/L 3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)缓冲液调 $\text{pH } 7.0 \pm 0.1$ (室温)。

8.1.3 适用菌种

酵母菌、丝状真菌。

8.1.4 检测药物

氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、两性霉素B、氟胞嘧啶、卡泊芬净、米卡芬净等。

8.1.5 酵母菌结果判读

8.1.5.1 判读标准

与生长对照孔相比,两性霉素B读取100%抑制时的MIC值;氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、氟胞嘧啶、卡泊芬净、米卡芬净读取50%抑制时的MIC值。

8.1.5.2 判定折点

CLSI M27-S4规定的部分念珠菌微量肉汤稀释法药敏试验判定折点见表1,其他酵母菌尚未建立临床折点。

表 1 念珠菌微量肉汤稀释法药敏试验唑类药物(孵育 24 h)和棘白菌素类药物判定折点

抗菌药物	菌种	S μg/mL	SDD ^a μg/mL	I ^b μg/mL	R μg/mL
氟康唑 ^c	白念珠菌	≤2	4	—	≥8
	光滑念珠菌	—	≤32	—	≥64
	克柔念珠菌	—	—	—	—
	近平滑念珠菌	≤2	4	—	≥8
	热带念珠菌	≤2	4	—	≥8
伏立康唑 ^{d,e}	白念珠菌	≤0.12	0.25~0.5	—	≥1
	光滑念珠菌	—	—	—	—
	克柔念珠菌	≤0.5	1	—	≥2
	近平滑念珠菌	≤0.12	0.25~0.5	—	≥1
	热带念珠菌	≤0.12	0.25~0.5	—	≥1
卡泊芬净 ^{d,f}	白念珠菌	≤0.25	—	0.5	≥1
	光滑念珠菌	≤0.12	—	0.25	≥0.5
	热带念珠菌	≤0.25	—	0.5	≥1
	克柔念珠菌	≤0.25	—	0.5	≥1
	近平滑念珠菌	≤2	—	4	≥8
	季也蒙念珠菌	≤2	—	4	≥8
米卡芬净 ^d	白念珠菌	≤0.25	—	0.5	≥1
	光滑念珠菌 ^g	≤0.06	—	0.12	≥0.25
	热带念珠菌	≤0.25	—	0.5	≥1
	克柔念珠菌	≤0.25	—	0.5	≥1
	近平滑念珠菌	≤2	—	4	≥8
	季也蒙念珠菌	≤2	—	4	≥8

注：S：敏感；SDD：剂量依赖敏感；I：中介；R：耐药。

^a SDD：敏感性取决于最大的血液药物浓度水平。对氟康唑，肾功能和基础情况正常的成人需要给予超过标准剂量(6 mg·kg/d)或更高剂量治疗。

^b 中介：现有数据不能明确的判定为敏感或耐药。

^c 氟康唑折点的制定是根据大量的粘膜及侵袭性念珠菌感染者制定的。对光滑念珠菌，MIC≤32 时应该给予最大剂量的氟康唑治疗。

^d 数据主要来源于非中性粒细胞缺乏的念珠菌血症患者。

^e 目前的数据还不足以说明光滑念珠菌对伏立康唑体外药敏试验结果与临床疗效、预后的关系。

^f 卡泊芬净敏感性试验结果会因不同的试验方法而有较大可变性。

^g 光滑念珠菌对米卡芬净的 MIC 值相比较其他棘白菌素类药物稍低，但并不意味着米卡芬净对光滑念珠菌的活性更强。

8.1.6 丝状真菌结果判读

8.1.6.1 判读标准

与生长对照孔相比,两性霉素 B、伊曲康唑、伏立康唑读取菌株生长 100%抑制时的 MIC 值;氟康唑、氟胞嘧啶读取 50%抑制时的 MIC 值;曲霉对棘白菌素类药敏试验读 MEC 值,即与生长对照孔相比,出现小的、圆的、紧凑的菌丝相时的药物浓度。

8.1.6.2 判定折点

CLSI 尚未确定丝状真菌的药敏试验临床折点。

8.1.7 质控菌株及参考范围

质控菌株的微量肉汤稀释法 24 h 和 48 h MIC 质控范围见表 2。

表 2 质控菌株的微量肉汤稀释法 24 h 和 48 h MIC 质控范围

药物	近平滑念珠菌 ATCC22019		克柔念珠菌 ATCC6528	
	24h MIC 范围 μg/mL	48 h MIC 范围 μg/mL	24 h MIC 范围 μg/mL	48 h MIC 范围 μg/mL
两性霉素 B	0.25~2.0	0.5~4.0	0.5~2.0	1.0~4.0
阿尼芬净	0.25~2.0	0.5~2.0	0.03~0.12	0.03~0.12
卡泊芬净	0.25~1.0	0.5~4.0	0.12~1.0	0.25~1.0
5-氟胞嘧啶	0.06~0.25	0.12~0.5	4.0~16	8.0~32
氟康唑	0.5~4	1.0~4.0	8.0~64	16~128
伊曲康唑	0.12~0.5	0.12~0.5	0.12~1.0	0.25~1.0
酮康唑	0.03~0.25	0.06~0.5	0.12~1.0	0.25~1.0
米卡芬净	0.5~2	0.5~4	0.12~0.5	0.12~0.5
泊沙康唑	0.06~0.25	0.06~0.25	0.06~0.5	0.12~1.0
里氟康唑	0.016~0.12	0.03~0.25	0.06~0.5	0.25~1.0
伏立康唑	0.016~0.12	0.03~0.25	0.06~0.5	0.12~1.0

8.2 改良微量肉汤稀释法

8.2.1 原理

在半固体培养基中检测抗真菌药物敏感性,与生长对照比,通过生长浊度判定 MIC 值。

8.2.2 适用菌种

念珠菌属、新型隐球菌。

8.2.3 检测药物

氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑、氟胞嘧啶、两性霉素 B。

8.2.4 注意

唑类药物存在“拖尾”现象,易将药敏结果判读为假耐药。

8.3 浓度梯度稀释法

8.3.1 培养基

RPMI 1640+MOPS+2%葡萄糖+1.5%琼脂。

8.3.2 适用菌种

酵母菌、曲霉菌、镰刀菌、根霉属。

8.3.3 检测药物

两性霉素 B、氟胞嘧啶、伊曲康唑、氟康唑、伏立康唑、卡泊芬净。

8.4 纸片扩散法

8.4.1 培养基

改良 Shadomy 培养基。

8.4.2 适用菌种

酵母菌。

8.4.3 检测药物

氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、酮康唑、两性霉素 B、氟胞嘧啶、卡泊芬净(直径为 9 mm 药敏纸片)。

8.4.4 结果判读

8.4.4.1 判读标准

两性霉素 B:生长完全抑制的最小药物浓度;三唑类、咪唑类、卡泊芬净:量取至有正常大小菌落生长的抑菌环直径的大小。

8.4.4.2 注意

不能随意更改培养基、纸片大小、含量等,否则将导致假耐药。

8.4.4.3 判定折点

参考 CLSI M44-A2 制定的折点,见表 3。

表 3 酵母菌纸片扩散法药敏试验判定折点

抗菌药物	含量 μg	S mm	SDD mm	I mm	R mm
氟康唑	25	≥ 22	21~15	—	≤ 14
伏立康唑	1	≥ 17	16~14	—	≤ 13

表 3 (续)

抗菌药物	含量 μg	S mm	SDD mm	I mm	R mm
伊曲康唑	8	≥ 23	22~14	—	≤ 13
酮康唑	15	≥ 30	—	29~23	≤ 22
两性霉素 B	10	≥ 15	—	14~10	≤ 9
氟胞嘧啶	1	≥ 20	—	19~12	≤ 11
卡泊芬净	5	≥ 11	—	—	≤ 10

注：SDD:剂量依赖敏感；S:敏感；I:中介；R:耐药。

8.4.5 纸片扩散法质控菌株及允许范围

纸片扩散法质控菌株及允许范围见表 4。

表 4 纸片扩散法质控菌株及允许范围(仅限于改良 Shadomy 培养基)

抗菌药物	白念珠菌 ATCC 64548 mm	近平滑念珠菌 ATCC 22019 mm	克柔念珠菌 ATCC 6258 mm
氟康唑	36~42	30~36	10~16
伏立康唑	31~42	28~37	16~25
伊曲康唑	25~31	28~35	16~22
酮康唑	36~44	41~49	20~26
两性霉素 B	18~23	20~26	17~23
氟胞嘧啶	34~40	35~43	9
卡泊芬净	15~22	13~23	15~22

参 考 文 献

- [1] 秦启贤.临床真菌学.上海:复旦大学出版社,2001
- [2] 王端礼.医学真菌学—实验室检验规范.北京:人民卫生出版社,2005
- [3] 吴绍熙.现代医学真菌检验手册.(2版).北京:中国协和医科大学出版社,2005
- [4] 周庭银,倪语星.临床微生物检验标准化操作.上海:上海科学技术出版社,2009
- [5] 周庭银.临床微生物学诊断与图解.(3版).上海:上海科学技术出版社,2012
- [6] WS/T 421—2013 抗酵母样真菌药物敏感性试验肉汤稀释法
- [7] WS/T 411—2013 抗丝状真菌药物敏感性试验肉汤稀释法
- [8] James V. Manual of Clinical Microbiology [M].10th ed. Washington,DC: ASM Press,2011.
- [9] Sybren de Hoog, Guarro J, Gene J, et al. Atlas of clinical fungi [M]. CBS, Electronic Version 3.1,2011.
- [10] CLSI.Clinical and Laboratory Standards Institute,Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts,2009,M27-A3,vol.28,No14.
- [11] CLSI.Clinical and Laboratory Standards Institute,Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts,2012,M27-S4,vol.28,No15.
- [12] CLSI.Clinical and Laboratory Standards Institute,Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi,2009,M38-A2,vol.28,No16.
- [13] CLSI.Clinical and Laboratory Standards Institute,principles and procedures for blood cultures; approved guideline,2009,M47-A2,vol.28,No16.
- [14] EUCAST.The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 6.1,2013.<http://www.eucast.org>
-