



专家简介:

时东彦,1997年毕业于河北医科大学临床医学专业,取得学士学位,1999—2002年河北医科大学临床检验诊断学取得硕士学位,2006—2009年河北医科大学临床医学专业取得博士学位。2002—2022年工作于河北医科大学第二医院检验科,2022—2024年工作于河北医科大学第二医院感染性疾病实验诊断中心。河北医科大学第二医院主任检验师,医学博士,硕士生导师,主要从事病原微生物的实验室检测。中国微生物学会临床微生物专业委员会委员,河北省微生物学会理事,河北省微生物学会临床微生物专业委员会副主任委员,河北省预防医学会微生物检验学会副主任委员。发表文章100多篇,以第一作者和通信作者发表50多篇,其中SCI收录5篇。获得河北省科技进步三等奖1项,河北医学科技一等奖5项,二等奖2项,河北省自然科学基金2项,河北省卫生厅重点科技计划2项。2023年获优秀中青年临床微生物学者称号。

比较3种微量肉汤稀释法检测念珠菌对氟康唑的敏感度

柳熠鑫¹,张志清¹,时东彦^{2*}

(1.河北医科大学第二医院药学部,河北石家庄 050000;2.河北医科大学第二医院感染性疾病实验诊断中心,河北石家庄 050000)

[摘要] 目的 比较3种肉汤稀释药敏检测方法检测念珠菌对氟康唑敏感度的检测能力。方法 收集河北医科大学第二医院临床分离的念珠菌84株,采取经典微量肉汤稀释法、ATB FUNGUS 3方法和Yeast One真菌药敏板方法检测念珠菌对氟康唑的敏感度。结果 84株念珠菌中,白念珠菌26株,热带念珠菌34株,光滑念珠菌22株以及近平滑念珠菌2株。以经典微量肉汤稀释法为参考方法,ATB FUNGUS 3方法的敏感度为87.5%,特异度为100.0%;基本一致性为95.2%,分类一致性为92.9%;假耐药率为7.1%,假敏感率为0。Yeast One方法的敏感度为100.0%,特异度为94.4%;基本一致性和分类一致性均为97.6%,假敏感率和假耐药率均为0。结论 Yeast One真菌药敏板方法检测氟康唑对念珠菌活性优于ATB FUNGUS 3方法。

[关键词] 念珠菌属;氟康唑;微量肉汤稀释法 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2024.10.006

[中图分类号] R379.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2024)10-1163-05

Comparison of three broth microdilution methods for the detection of fluconazole susceptibility of Candida

LIU Yi-xin¹, ZHANG Zhi-qing¹, SHI Dong-yan^{2*}

(1. Department of Pharmacy, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

[Abstract] **Objective** To compare three broth dilution methods in drug sensitivity detection for detecting the sensitivity of Candida to fluconazole. **Methods** A total of 84 clinical isolates of Candida were collected in the Second Hospital of Hebei Medical University, and the sensitivity of Candida to fluconazole was detected by classical broth microdilution method, ATB

[收稿日期]2024-02-07

[基金项目]河北省自然科学基金资助项目(H202206277)

[作者简介]柳熠鑫(1997-),女,河北石家庄人,河北医科大学第二医院理学硕士研究生,从事临床药学研究。

* 通信作者。E-mail:shidongyan73@126.com

FUNGUS 3 and Sensititre Yeast One method. **Results** Among the 84 strains of *Candida*, there were 26 isolates of *Candida albicans*, 34 isolates of *Candida tropicalis*, 22 isolates of *Candida glabrata* and 2 isolates of *Candida parapsilosi*. The classical broth microdilution method was used as a reference method, the sensitivity of ATB FUNGUS method was 87.5%, with a specificity of 100.0%. The essential agreement was 95.2%, and the categorical agreement was 92.9%; The false resistance rate was 7.1%, while there was no false sensitivity rate. The sensitivity and specificity of Sensititre Yeast One method were 100.0% and 94.4% respectively. Both the essential agreement and the categorical agreement were 97.6%, and the false sensitivity rate and the false resistance rate were 0. **Conclusion** Sensititre Yeast One method to detect the effect of fluconazole on *Candida* activity is superior to that of ATB FUNGUS 3.

[**Key words**] *candida*; fluconazole; broth microdilution method

近年来,由于广谱抗生素和免疫抑制剂的广泛应用,免疫缺陷病患者和老年慢性病患者的增多以及临床上气管插管等各种侵入性操作等因素,念珠菌感染呈现明显上升趋势,造成感染的病死率增加^[1-7],因此临床上对念珠菌感染进行合理治疗是非常必要的。氟康唑一直被作为治疗念珠菌感染的首选药物^[8],但是近几年耐药监测数据显示其耐药率升高^[9-11],这种耐药率的升高可能与体外药敏试验的检测方法学有关。本研究比较了 ATB FUNGUS 3 方法和 Yeast One 真菌药敏板方法与经典微量肉汤稀释法 3 种肉汤稀释方法检测念珠菌对氟康唑的敏感度,为实验室正确选择抗真菌药敏试验方法提供参考依据,为临床合理应用抗真菌药物敏感度治疗结果提供参考。

1 材料与 方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集 2021 年 11 月—2022 年 10 月河北医科大学第二医院从临床患者的标本中分离出的念珠菌共 84 株,包括白念珠菌 26 株,热带念珠菌 34 株,光滑念珠菌 22 株以及近平滑念珠菌 2 株。

1.1.2 培养与鉴定 菌株于沙保罗琼脂培养基和科玛嘉显色培养基中分纯,用法国梅里埃公司真菌鉴定卡 YST 鉴定到种。

1.1.3 药物与药敏板 氟康唑药粉购自于上海源叶科技有限公司,ATB FUNGUS 3 购自于法国梅里埃公司,Sensititre Yeast One 真菌药敏板购自于赛默飞世尔科技公司。标准菌株白念珠菌 ATCC 90028 为质控菌株。

1.2 方法

1.2.1 经典微量肉汤稀释法 按照临床和实验室标准协会 (Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI) 制定的酵母菌肉汤稀释法抗真菌敏

感度试验参考方法 (M27)^[12] 操作,放入 35 °C 恒温培养箱中,孵育 24~48 h 后,肉眼判断与生长对照相比,生长抑制 50% 对应孔的药物浓度为 MIC 值。

1.2.2 Yeast One 真菌药敏板方法 配制 0.5 mol/L 浓度的菌悬液,按照说明书要求,取 20 μ L 菌悬液稀释至 11 mL 配套肉汤培养基中,混匀后加入药敏板中,每孔 100 μ L,用密封膜密封,放入 35 °C 恒温培养箱中,孵育 24~48 h, Yeast One 药敏板包被有适当稀释浓度的抗真菌药物和显色剂,采用比色法判断念珠菌生长情况:抗真菌药物溶液中念珠菌生长表现为显色生长指示剂从蓝色 (阴性) 变为红色 (阳性)。培养孵育后检查微孔内颜色变化,如果生长微孔呈红色,则第 1 个红色孔对应的浓度可以解释为抗菌终点;如果微孔内蓝色指示剂颜色没有改变,则表示没有生长。第 1 个出现蓝色或紫色微孔中抗真菌药物浓度即为 MIC 值。

1.2.3 ATB FUNGUS 3 方法 按照说明书,配制 2 mol/L 浓度的菌悬液,取 20 μ L 稀释至 10 mL 配套培养基中,混匀;向每个杯状凹中加入 135 μ L 菌悬液,在 35 °C 恒温培养箱中培养 24~48 h 后,通过肉眼判读,从低浓度开始,与生长对照杯状凹比较,记录每一个杯状凹的生长得分。评分标准如下:和生长对照完全一样,4 分;比生长对照有轻微减少,3 分;比生长对照孔明显减少,2 分;非常微弱的生长,1 分;没有生长,0 分。对于氟康唑,鉴于念珠菌的生长可能存在拖尾现象, MIC 对应杯的得分可以是“2”、“1”或“0”分。

1.3 判读标准 按照 CLSI 颁布的 M60 手册^[13] 判断念珠菌对氟康唑的敏感度:敏感 (susceptible, S)、剂量依赖性敏感 (susceptible-dose dependent, SDD)、耐药 (resistance, R)。折点浓度见表 1。

表1 CLSI M60 规定的念珠菌属 MIC 解释标准

Table 1 MIC interpretation standard of *Candida* by CLSI M60

抗真菌药物	菌种	(mg/L)		
		S	SDD	R
氟康唑	白念珠菌	≤2	4	≥8
	热带念珠菌	≤2	4	≥8
	光滑念珠菌	—	≤32	≥64
	近平滑念珠菌	≤2	4	≥8

1.4 统计学方法 应用 SPSS 25.0 统计软件分析数据。以微量肉汤稀释法为金标准,采用四格表 χ^2 检验计算其余 2 种方法的敏感度和特异度,对 2 种方法与金标准方法分别进行 Kappa 值一致性检验, Kappa 值 ≤ 0.20 表示一致性较差; 0.20 < Kappa 值 ≤ 0.40 表示一致性一般; 0.40 < Kappa 值 ≤ 0.60 表示一致性中等; 0.60 < Kappa 值 ≤ 0.80 表示一致性较强; 0.80 < Kappa 值 ≤ 1 表示一致性很强。基本一致性(essential agreement, EA)指待测 MIC 值与参考方法 MIC 值相差不超过 2 个稀释倍数。分类一致性(categorical agreement, CA)指被评估药敏方法与参考方法判断试验结果为敏感、中介、耐药的一致性。极严重错误(very major error, VME)指将耐药误判为敏感,即假敏感。严重错误(major error, ME)指将敏感误判为耐药,即假耐药。一般错误(minor error, me)指试验方法检测结果为中介,参考方法为耐药或敏感,或者参考方法的结果为中介,试验方法是敏感或耐药,计数资料比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATB FUNGUS 3 方法和 Yeast One 真菌药敏板方法与微量肉汤稀释法的一致性

2.1.1 ATB FUNGUS 3 方法与经典微量肉汤稀释法结果比较, ATB FUNGUS 3 方法检测 84 株念珠菌对氟康唑的敏感度为 87.5% (42/48), 特异度为 100.0% (36/36), Kappa 值为 0.857 (0.748~0.966), 一致性很强, 见表 2。

表4 ATB FUNGUS 3 方法、Yeast One 方法和经典微量肉汤稀释法结果比较

Table 4 Comparison of results of ATB FUNGUS 3 method, Yeast One method and classical broth microdilution method

(n=84, 株数, %)

药敏方法	EA	CA	VME	ME	me
ATB FUNGUS 3 法	80(95.2)	78(92.9)	0(0.0)	6(7.1)	10(11.9)
Yeast One 法	82(97.6)	82(97.6)	0(0.0)	0(0.0)	3(3.6)

2.2 三种方法检测念珠菌对氟康唑敏感度结果对比 对 84 株菌株进行药敏检测, 以经典微量肉汤稀释法为参考, ATB FUNGUS 3 方法的 EA 为 95.2% (80/84), CA 为 92.9% (78/84), 出现 VME 0 例, ME 6 例, me 10 例。Yeast One 方法的 EA 为 97.6% (82/84), CA 为 97.6% (82/84), 未发生 VME 及 ME, me 3 例。以上结果表明 Yeast One 优于 ATB FUNGUS 3。见表 4。

2.1.2 Yeast One 真菌药敏板方法与微量肉汤稀释法结果比较, Yeast One 方法检测 84 株念珠菌对氟康唑的敏感度为 100.0% (48/48), 特异度为 94.4% (34/36), Kappa 值为 0.951 (0.884~1.018), 一致性很强。见表 3。

2.2 三种方法检测念珠菌对氟康唑敏感度结果对比 对 84 株菌株进行药敏检测, 以经典微量肉汤稀释法为参考, ATB FUNGUS 3 方法的 EA 为 95.2% (80/84), CA 为 92.9% (78/84), 出现 VME 0 例, ME 6 例, me 10 例。Yeast One 方法的 EA 为 97.6% (82/84), CA 为 97.6% (82/84), 未发生 VME 及 ME, me 3 例。以上结果表明 Yeast One 优于 ATB FUNGUS 3。见表 4。

表2 ATB FUNGUS 3 与微量肉汤稀释法结果比较

Table 2 Comparison between ATB FUNGUS 3 and broth microdilution method

(n=84, 株数)

ATB FUNGUS 3 法	微量肉汤稀释法		合计
	SDD/S	R	
SDD/S	42	0	42
R	6	36	42
合计	48	36	84
敏感度	87.5%		
特异度	100.0%		
Kappa 值	0.857		
P 值	<0.001		

表3 Yeast One 与微量肉汤稀释法结果比较

Table 3 Comparison of results between Yeast One method and broth microdilution method

(n=84, 株数)

Yeast One 法	微量肉汤稀释法		合计
	SDD/S	R	
SDD/S	48	2	50
R	0	34	34
合计	48	36	84
敏感度	100.0%		
特异度	94.4%		
Kappa 值	0.951		
P 值	<0.001		

FUNGUS 方法检出氟康唑耐药率高于经典微量肉汤稀释法, Yeast One 方法检出氟康唑耐药率与经典微量肉汤稀释法基本一致。光滑念珠菌应用

ATB FUNGUS 3 方法和 Yeast One 方法检出氟康唑耐药率均与经典微量肉汤稀释法一致,见表 5。

表 5 三种方法检测不同种念珠菌对氟康唑的耐药率结果

Table 5 Results of three methods to detect the resistant rate of different candida species to fluconazole

(株数,%)

方法	白念珠菌(n=26)	光滑念珠菌(n=34)	热带念珠菌(n=22)	近平滑念珠菌(n=2)
微量肉汤稀释法	6(23.1)	15(44.1)	13(59.1)	2(100.0)
ATB FUNGUS 3 法	10(38.5)	15(44.1)	15(68.2)	2(100.0)
Yeast One 法	5(19.2)	15(44.1)	12(54.5)	2(100.0)

3 讨 论

念珠菌是一种常见的机会致病菌,最常见的念珠菌为白念珠菌,其次为光滑念珠菌、热带念珠菌及近平滑念珠菌等非白念株菌。近年国内外研究显示,白念珠菌的分离率呈现下降趋势,而光滑念珠菌等非白念珠菌的分离率则呈现不同程度的上升^[14-20]。而且,非白念珠菌对唑类药物,尤其是氟康唑的敏感度呈下降趋势^[19-26]。因此临床实验室应开展抗真菌药敏试验检测不同念珠菌对唑类药物的抗真菌活性。

经典微量肉汤稀释法是真菌药敏试验方法,其优点是有明确操作规范和判读标准,但需要试验人员自行配制肉汤及药物溶液,操作较为复杂,不利于实验室日常应用于抗真菌药敏试验^[12]。ATB FUNGUS 3 和 Yeast One 真菌药敏板均为商品化产品,操作相对简便,实验室应用广泛,商品化药敏试验平板虽然操作简单,但是结果判读各有自己的特色。抗真菌药敏试验的结果判读一直是实验室工作中面对的最大难题,受到人员人为因素影响比较大,因此实验将 ATB FUNGUS 3 和 YEAST ONE 真菌药敏板和标准微量肉汤稀释法进行比较,以期了解目前临床最常用的商品化抗真菌药敏平板的敏感度及特异度,为临床实验室准确检测抗真菌药物的敏感度提供必要的参考。

本研究选择临床常见的白色念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌,近平滑念珠菌为实验菌株,选择临床常用肉汤稀释方法经典微量肉汤稀释法、ATB FUNGUS 3 和 Yeast One 法作为目标方法,比较 3 种肉汤稀释法检测念珠菌对氟康唑的敏感度。以经典微量肉汤稀释法为参考标准,氟康唑的药敏试验结果显示,ATB FUNGUS 3 方法敏感度和为特异度分别为 87.5% 和 100.0%,但是会出现假耐药现象,发生率为 7.1%。应用不同肉汤稀释法检测不同种念珠菌的耐药性结果显示,白念珠菌和热带念珠菌应用 ATB FUNGUS 方法检出氟康唑耐药率高于经典微量肉汤稀释法。造成此现象的可能因为这两种念珠菌容易出现拖尾现象^[27],受人为因素影

响致判读终点偏大。因此在临床实际操作中,为减少此种情况出现的概率,应严格掌握抗真菌药敏试验的判读标准,为了避免阅读误差,可以多人对结果进行判读,并让经验丰富的工作者参与其中。

Yeast One 方法的敏感度和特异度为 100.0% 和 94.4%,无假耐药和假敏感的情况出现。应用不同肉汤稀释法检测不同种念珠菌的耐药性结果显示,Yeast One 方法检出氟康唑耐药率与经典微量肉汤稀释法基本一致。由于 Yeast One 方法是根据颜色变化判读结果,因此颜色的变化受到菌液纯度,培养时间的影响较大,应注意生长微孔颜色变化,准确判断抗菌终点,避免过早判读。已经报道的抗真菌药敏试验方法学比较研究报道较少,此研究结果与其他研究结果一致^[28],说明 Yeast One 方法有较好的一致性。

综上所述,ATB FUNGUS 3 方法和 Yeast One 方法与经典微量肉汤稀释法均表现出了较好的一致性,其中白念珠菌和热带念珠菌生长的拖尾现象可能对肉眼判读浊度确定终点的 ATB FUNGUS 3 方法产生影响,导致假耐药结果的出现。相比之下 Yeast One 方法表现出了更好的敏感度和特异度。实验室在选择不同的抗真菌药敏试验方法时应严格按照说明书操作,仔细研读结果,以免造成假敏感或假耐药,更好地为临床提供准确的结果。本研究的不足之处是研究菌株较少,可能存在一定偏差。

[参考文献]

- [1] Wang B, He X, Lu F, et al. Candida isolates from blood and other normally sterile foci from ICU patients; Determination of epidemiology, antifungal susceptibility profile and evaluation of associated risk factors[J]. Front Public Health, 2021, 9: 779590.
- [2] McCarty TP, White CM, Pappas PG. Candidemia and invasive Candidiasis[J]. Infect Dis Clin North Am, 2021, 35(2): 389-413.
- [3] Koehler P, Stecher M, Cornely OA, et al. Morbidity and mortality of candidaemia in Europe; an epidemiologic meta-analysis[J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(10): 1200-1212.
- [4] Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, et al. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: Results for

- Candida species from 1997 – 2016 [J]. *Open Forum Infect Dis*, 2019, 6(Suppl 1):S79-S94.
- [5] Dalla Lana DF, Falci DR, Sanha V, et al. Candidaemia mortality has not changed over the last 2 decades in Brazil [J]. *Mycopathologia*, 2020, 185(4):685-690.
- [6] Kim JH, Suh JW, Kim MJ. Epidemiological trends of candidemia and the impact of adherence to the candidemia guideline: Six-year single-center experience [J]. *J Fungi (Basel)*, 2021, 7(4):275.
- [7] Tsay SV, Mu Y, Williams S, et al. Burden of candidemia in the United States, 2017 [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(9):e449-e453.
- [8] 中国成人念珠菌病诊断与治疗专家共识组. 中国成人念珠菌病诊断与治疗专家共识 [J]. *中华内科杂志*, 2020, 59(1):5-17.
- [9] Badiie P, Boekhout T, Haddadi P, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of Candida species isolated from 10 tertiary care hospitals in Iran [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(6):e0245322.
- [10] Falces-Romero I, Romero-Gómez MP, Moreno-Ramos F, et al. Epidemiology of bloodstream Candida species in a Spanish tertiary care hospital as a guide for implementation of T2MR(T2CANDIDA) for rapid diagnosis of candidemia [J]. *Med Mycol*, 2021, 59(4):350-354.
- [11] Arastehfar A, Daneshnia F, Hafez A, et al. Antifungal susceptibility, genotyping, resistance mechanism, and clinical profile of Candida tropicalis blood isolates [J]. *Med Mycol*, 2020, 58(6):766-773.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts [M]. 4th ed. Wayne, PA: CLSI, 2017:27.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. M60. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts [M]. 1st ed. Wayne, PA: CLSI, 2017:60.
- [14] Zeng Z, Ding Y, Tian G, et al. A seven-year surveillance study of the epidemiology, antifungal susceptibility, risk factors and mortality of candidaemia among paediatric and adult inpatients in a tertiary teaching hospital in China [J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2020, 9(1):133.
- [15] Oliva A, De Rosa FG, Mikulska M, et al. Invasive Candida infection: epidemiology, clinical and therapeutic aspects of an evolving disease and the role of rezafungin [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2023, 21(9):957-975.
- [16] Lass-Flörl C, Steixner S. The changing epidemiology of fungal infections [J]. *Mol Aspects Med*, 2023, 94:101215.
- [17] 徐灵玲, 曾章锐, 丁银环, 等. 川南地区侵袭性念珠菌感染流行病学及耐药性分析 [J]. *中国真菌学杂志*, 2021, 16(5):319-325.
- [18] Lamoth F, Lockhart SR, Berkow EL, et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(Suppl 1):i4-i13.
- [19] Xiao M, Sun ZY, Kang M, et al. Five-year national surveillance of invasive candidiasis: species distribution and azole susceptibility from the China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) Study [J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(7):e00577-18.
- [20] Xiao M, Chen S, Kong F, et al. Distribution and antifungal susceptibility of candida species causing candidemia in China: an update from the CHIF-NET study [J]. *J Infectious Diseases*, 2020, 221(S2):S139-S147.
- [21] Xiao M, Fan X, Chen SC, et al. Antifungal susceptibilities of Candida glabrata species complex, Candida krusei, Candida parapsilosis species complex and Candida tropicalis causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(3):802-810.
- [22] Wang Y, Fan X, Wang H, et al. Continual decline in azole susceptibility rates in candida tropicalis over a 9-year period in China [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12:702839.
- [23] Diaz-García J, Machado M, Alcalá L, et al. Trends in antifungal resistance in Candida from a multicenter study conducted in Madrid (CANDIMAD study): fluconazole-resistant C. parapsilosis spreading has gained traction in 2022 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2023, 67(11):e0098623.
- [24] Favarello LM, Nucci M, Queiroz-Telles F, et al. Trends towards lower azole susceptibility among 200 Candida tropicalis bloodstream isolates from Brazilian medical centres [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2021, 25:199-201.
- [25] Kajihara T, Yahara K, Nagi M, et al. Distribution, trends, and antifungal susceptibility of Candida species causing candidemia in Japan, 2010 – 2019: A retrospective observational study based on national surveillance data [J]. *Med Mycol*, 2022, 60(9):myac071.
- [26] Song Y, Chen X, Yan Y, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of pathogenic yeasts in china: A 10-year retrospective study in a teaching hospital [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:1401.
- [27] Dornelas-Ribeiro M, Pinheiro EO, Guerra C, et al. Cellular characterisation of Candida tropicalis presenting fluconazole-related trailing growth [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2012, 107(1):31-38.
- [28] 郭莉娜, 徐英春, 范欣, 等. Sensititre Yeast One 显色药敏板检测念珠菌属体外药物敏感性临床应用研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(10):2211-2214.