

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 411—2013

抗丝状真菌药物敏感性试验 肉汤稀释法

Antifungal susceptibility testing of filamentous fungi—Broth dilution ethod

2013-06-03 发布

2013-12-01 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	I
1 范围	1
2 术语和定义	1
3 抗真菌药物	2
4 培养基	5
5 微量肉汤稀释法操作步骤	6
6 宏量肉汤稀释法操作步骤	8
7 质量控制	9
附录 A (规范性附录) RPMI-1640 肉汤培养基配方表	13
附录 B (规范性附录) 燕麦培养基制备步骤	14
参考文献	15

前 言

本标准依据 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：卫生部临床检验中心、北京大学人民医院、北京大学第一医院、中国医学科学院北京协和医院、首都医科大学附属北京友谊医院、卫生部北京医院、华中科技大学同济医学院附属同济医院。

本标准主要起草人：胡继红、张楠、王辉、李若瑜、徐英春、苏建荣、胡云建、孙自镛。

抗丝状真菌药物敏感性试验 肉汤稀释法

1 范围

本标准规定了微量肉汤稀释法和宏量肉汤稀释法检测抗丝状真菌药物最小抑菌浓度 Minimal Inhibitory Concentration(MIC)的参考方法。

本标准适用于引起深部真菌感染的产孢丝状真菌的药物敏感性试验,包括曲霉属 *Aspergillus species*、镰刀菌属 *Fusarium species*、根霉属 *Rhizopus arrhizus*、波氏假性阿利什霉 *Pseudallescheria boydii*、尖端赛多孢子菌 *Scedosporium apiospermum*、申克孢子丝菌 *Sporothrix schenckii* 和其他引起感染的丝状真菌,以及引起皮肤真菌感染的毛癣菌 *Trichophyton*、小孢子菌 *Microsporum*、表皮癣菌 *Epidermophyton. spp.*

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

抗真菌药物 antifungal agents

一种可用于人体内对真菌具有抑制生长或杀灭作用的生物物质、半合成或合成物质,不包括消毒剂、灭菌剂和防腐剂。

2.2

最小抑菌浓度 minimal inhibitory concentration; MIC

在琼脂或肉汤稀释法中,抗菌药物能抑制微生物生长的最低浓度。

2.3

折点 breakpoint

临床上能将真菌分为敏感、中介和耐药的特定 MIC 值。

折点系综合体外 MIC 值、PK/PD 数据及临床疗效而得出,还可随环境改变而变化(如感染部位、常规药物剂量的改变、使用途径及次数的改变)。丝状真菌工作折点仅以研究为目的,临床折点尚未建立。

2.4

敏感 susceptible; S

此浓度在体外检测中能抑制真菌生长,当使用推荐剂量时在临床治疗中有可能取得成功。

2.5

中介 intermediate; I

菌株对常规用药时体液和组织中能达到的药物浓度反应率低于敏感株,和(或)不能被清楚地划分为“敏感”或“耐药”。在体外真菌可被抑制生长,此浓度临床治疗效果不肯定。如为药物聚集部位或高

剂量使用,则临床治疗有效。该范围可作为一缓冲区,避免由于微小、不可控的技术因素导致结果解释的严重偏差。

2.6

耐药 resistant; R

当使用推荐剂量时在临床治疗中很有可能失败。

2.7

效价 potency

抗菌药物中具有抗菌活性的部分,通过同类标准物质测定得出。单位表示为 mg/g、IU/g,或用百分比表示。

2.8

质量控制 quality control; QC

为保证检测的准确性和可重复性而采取的方法或技术。

3 抗真菌药物

3.1 抗真菌药物

抗真菌药物的标准品或参考品可购自药物生产厂家。使用有效期内的标准品,在厂家推荐的条件下或在-20℃下贮存,推荐真空干燥贮存。当从低温下取出药物时,需恢复到室温后再开瓶。

3.2 称量药物

可使用式(1)、式(2)计算药物重量及稀释液体积:

$$m = \rho \times V / \tau \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$V = m \times \tau / \rho \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

m —— 药物的质量,单位为毫克(mg);

ρ —— 药物的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

τ —— 药物的效价,单位为微克每毫克($\mu\text{g/mg}$);

V —— 药物的体积,单位为毫升(mL)。

3.3 配制药物贮存液(母液)

3.3.1 药物称量

按照配制贮存液的浓度计算,贮存液浓度为检测时使用浓度的100倍。但有些溶解度低的药物应配制较低浓度的贮存液。称量应在分析天平上进行。天平应定期校准。

3.3.2 溶剂

一些药物需使用非水溶剂溶解,详见表1。溶剂的信息可参考厂家说明书。溶剂(分析级别)包括:二甲基亚砜(DMSO)、乙醇、聚乙二醇和羧甲基纤维素。

表 1 配制抗真菌药物贮存液使用的溶剂、稀释液和检测范围

抗真菌药物	溶剂	稀释液	检测范围 $\mu\text{g/mL}$
两性霉素 B	DMSO ^a	培养基 ^b	0.03~16
氟胞嘧啶	水	培养基 ^b	0.125~64
酮康唑	DMSO ^a	培养基 ^b	0.013~16
氟康唑	水	培养基 ^b	0.125~64
卡泊芬净	水	培养基 ^b	0.03~16
米卡芬净	水	培养基 ^b	0.03~16
伊曲康唑	DMSO ^a	培养基 ^b	0.015~8
泊沙康唑	DMSO ^a	培养基 ^b	0.015~8
伏立康唑	DMSO ^a	培养基 ^b	0.015~8
^a DMSO=二甲基亚砷。			
^b 培养基指 RPMI-1640 肉汤培养基, 配制见表 2。			

表 2 RPMI-1640 肉汤培养基 1 L 制备步骤

步骤	过 程
1	10.4 g RPMI-1640 肉汤干粉, 34.53 g MOPS ^a 缓冲液, 溶解于 900 mL 蒸馏水
2	加入 MOPS (终浓度为 0.165 mol/L), 搅拌至溶解
3	使用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 7.0 (25 °C)
4	补水至 1 L
5	过滤消毒储存在 4 °C 备用
^a MOPS=3-(N-吗啡啉)丙磺酸 3-N-morpholino propane sulfonic acid	

3.3.3 过滤

通常认为贮存液是无菌的。当有特殊要求时应进行膜过滤。但应避免使用纸张、石棉和玻璃滤器等具有吸附抗真菌药物的材质。若使用吸收材质, 应在试验中记录损失量。

3.3.4 保存

贮存液应分装 in 无菌管中密封保存在 -60 °C 环境中, 不得高于 -20 °C。使用时应从冰箱中现用现取, 未用完的应丢弃。保存条件参考厂家说明书, 通常大多数药物的贮存液在 -60 °C 可保存 6 个月。用质控菌株或参考菌株可监测药物的有效性。

3.4 药物稀释液

3.4.1 水溶性药物稀释液

对于溶于水的抗真菌药物, 直接用肉汤 1:50 稀释。当进行小样本量检测时推荐使用表 3 的稀释步骤。

表 3 水溶性抗真菌药物敏感试验稀释步骤(小样本量)

步骤	浓度 $\mu\text{g/mL}$	来源	体积 mL	培养基 mL	中间浓度 $\mu\text{g/mL}$	1:5 稀释后浓度 ^a $\mu\text{g/mL}$
1	5 120	储存液	1 mL	7	640	128
2	640	步骤 1	1.0	1.0	320	64
3	640	步骤 1	1.0	3.0	160	32
4	160	步骤 3	1.0	1.0	80	16
5	160	步骤 3	0.5	1.5	40	8
6	160	步骤 3	0.5	3.5	20	4
7	20	步骤 6	1.0	1.0	10	2
8	20	步骤 6	0.5	1.5	5	1
9	20	步骤 6	0.5	3.5	2.5	0.5
10	2.5	步骤 9	1.0	1.0	1.2	0.2
11	2.5	步骤 9	0.5	1.5	0.6	0.1
12	2.5	步骤 9	0.5	3.5	0.3	0.06
^a 2 倍终浓度。						

3.4.2 非水溶性药物稀释液

对于非水溶性药物需要先用合适的溶剂配制成终浓度 100 倍的储存液,然后再用肉汤 1:50 稀释,针对非皮肤来源真菌标本的药物稀释步骤见表 4,针对皮肤来源真菌标本的药物稀释步骤见表 5。

表 4 非水溶性抗真菌药物敏感试验稀释步骤(非皮肤真菌)

步骤	浓度 $\mu\text{g/mL}$	来源	体积 mL	溶剂 DMSO ^a mL	中间浓度 $\mu\text{g/mL}$	1:50 稀释后浓度 ^b $\mu\text{g/mL}$
1	1 600	贮存液	—	—	1 600	32
2	1 600	贮存液	0.5	0.5	800	16
3	1 600	贮存液	0.5	1.5	400	8
4	1 600	贮存液	0.5	3.5	200	4
5	200	步骤 4	0.5	0.5	100	2
6	200	步骤 4	0.5	1.5	50	1
7	200	步骤 4	0.5	3.5	25	0.5
8	25	步骤 7	0.5	0.5	12.5	0.25
9	25	步骤 7	0.5	1.5	6.25	0.125
10	25	步骤 7	0.5	3.5	3.13	0.06
^a DMSO=二甲基亚砷。						
^b 2 倍终浓度。						

表 5 非水溶性抗真菌药物敏感试验稀释步骤(皮肤真菌)

步骤	浓度 $\mu\text{g/mL}$	来源	体积 mL	溶剂 DMSO ^a mL	中间浓度 $\mu\text{g/mL}$	1 : 50 稀释后浓度 ^b $\mu\text{g/mL}$
1	6 400	储存液	—	—	6 400	128
2	6 400	储存液	0.5	0.5	3 200	64
3	6 400	储存液	0.5	1.5	1 600	32
4	6 400	储存液	0.5	3.5	800	16
5	800	步骤 4	0.5	0.5	400	8
6	800	步骤 4	0.5	1.5	200	4
7	800	步骤 4	0.5	3.5	100	2
8	100	步骤 7	0.5	0.5	50	1
9	100	步骤 7	0.5	1.5	25	0.5
10	100	步骤 7	0.5	3.5	12.5	0.25
11	12.5	步骤 10	0.5	0.5	6.25	0.125
12	12.5	步骤 10	0.5	1.5	3.125	0.06
13	12.5	步骤 10	0.5	3.5	1.56	0.03
14	1.56	步骤 13	0.5	0.5	0.8	0.015
15	1.56	步骤 13	0.5	1.5	0.4	0.007
16	1.56	步骤 13	0.5	3.5	0.2	0.004
17	0.195	步骤 16	0.5	0.5	0.1	0.002
^a DMSO=二甲基亚砷。						
^b 2 倍终浓度。						

4 培养基

4.1 微量肉汤稀释法培养基

微量肉汤稀释法培养基推荐使用含 2% 葡萄糖的改良 RPMI-1640 肉汤, 见表 6。

4.2 宏量肉汤稀释法培养基

宏量肉汤稀释法培养基推荐使用 RPMI-1640 肉汤, 若无 RPMI-1640 肉汤干粉, RPMI-1640 肉汤配方见附录 A。

表 6 改良 RPMI-1640 肉汤培养基配方表(含 2% 葡萄糖)

组分	1 倍浓度	2 倍浓度
蒸馏水	900 mL	900 mL
RPMI-1640 干粉	10.40 g	20.80 g
MOPS	34.53 g	69.06 g
葡萄糖	18.00 g	36.00 g

5 微量肉汤稀释法操作步骤

5.1 丝状真菌培养及菌悬液的制备

5.1.1 非皮肤真菌

应在ⅡA或ⅡB生物安全柜中完成接种和菌悬液的配制等操作。

大多数真菌可在马铃薯葡萄糖培养基(PDA)上,经35℃培养7d后接种或直至获得生长良好的孢子;接合菌、曲霉属经48h培养后可获得孢子;镰刀菌属在35℃培养48h~72h后,再转入25℃~28℃培养至7d。

挑选曲霉菌落。在1mL 0.85%无菌盐水中加入1滴(约0.01mL)吐温20后混匀,若有沉淀物应静置3min~5min。将上清液转移至无菌管中,密封后混匀15s。

采用比浊法测定菌悬液浓度,曲霉属、淡紫拟青霉 *Paecilomyces lilacinus*、宛氏拟青霉 *P. variotti*、皮炎外瓶霉(*Exophiala dermatitidis*)、申克孢子丝菌的吸光度(OD)值应在0.09~0.13;镰刀菌属、尖端赛多孢子菌、奔马赭霉菌 *Ochroconis gallopava*、斑替枝孢瓶霉 *Cladophialophora bantiana*、根霉属及其他接合菌 *zygomycetous species* 的OD值应在0.15~0.17;双极菌属 *Bipolaris* spp. 和链格孢霉属 *Alternaria* spp. 的OD值为0.25~0.3。

然后用肉汤进行1:50稀释,其中申克孢子丝菌稀释度更低(为1:2稀释)。接种物稀释液浓度为终浓度(0.4×10^4 CFU/mL~ 5×10^4 CFU/mL)的2倍。最后将0.1mL菌悬液加入微孔中。

5.1.2 皮肤真菌

大多数皮肤真菌在马铃薯葡萄糖培养基上生长良好。但红色毛癣菌需使用燕麦琼脂(见附录B),于35℃培养4d~5d或直至获得生长良好的孢子。

用1mL 0.85%盐水制备菌悬液,使用血细胞计数器计数,得到菌悬液浓度为2倍接种终浓度(1×10^3 CFU/mL~ 3×10^3 CFU/mL)。

5.2 接种物稀释液的定量

5.2.1 非皮肤真菌

将0.01mL 1:10稀释的菌悬液接种在沙氏培养基(SDA)上,计数菌落形成单位(CFU/mL)。在28℃~30℃培养并每日观察计数。培养时间从不足24h(根霉)到5d(尖端赛多孢子菌)不等。

5.2.2 皮肤真菌

将0.01mL 1:10稀释的菌悬液接种在沙氏培养基(SDA)上,计数菌落形成单位(CFU/mL)。在28℃~30℃培养并每日观察计数。

5.3 接种

检测当日,将0.1mL 2倍终浓度的接种物加入微孔中,并加入0.1mL 2倍终浓度的药物稀释液。对照管中加入0.1mL接种物和0.1mL 2倍浓度的药物稀释溶剂。

5.4 培养

应在35℃培养,但培养时间不同:根霉属为21h~26h,曲霉属、镰刀菌属和申克孢子丝菌为46h~50h,假性阿什利霉为70h~74h。

对于棘白菌素类抗真菌药物,曲霉属和宛氏拟青霉为21h~26h,假性阿什利霉为46h~72h。如

果第一天对照孔生长良好,即在孔底部呈融合生长,亦可确定 MEC 值。

5.5 结果判读 MIC 和 MEC 值

5.5.1 一般情况

判读结果时通过与生长对照孔比较,观察生长抑制情况确定 MIC 值。对于棘白菌素类抗真菌药物,使用 MEC。

5.5.2 两性霉素 B

两性霉素 B(Amphotericin B)生长终点定义明确,为 100% 抑制任何可见的生长,但拖尾现象不常见,拖尾现象可能反映与临床相关的耐药。

5.5.3 氟胞嘧啶、氟康唑、酮康唑

氟胞嘧啶(Flucytosine)和吡咯类,例如:氟康唑(Fluconazole)、酮康唑(Ketoconazole)不像两性霉素 B 生长终点定义那样严格,与生长对照相孔比较,非皮肤真菌生长抑制 50%以上、皮肤真菌生长抑制 80%以上判断为终点。

5.5.4 伊曲康唑、泊沙康唑、里氟康唑、伏立康唑

对于伊曲康唑(Itraconazole)以及其他吡咯类药物,例如:泊沙康唑(Posaconazole)、里氟康唑(Ravuconazole)和伏立康唑(Voriconazole)终点定义为 100%抑制生长。曲霉及其他条件致病性丝状真菌生长终点拖尾现象很少见,拖尾现象可能反映临床相关耐药。

当检测皮肤真菌对伊曲康唑、泊沙康唑、伏立康唑的 MIC 时,终点定义为抑制生长 80%以上。

5.5.5 棘白菌素类

虽然对棘白菌素类药物(Echinocandins),例如:安尼芬净(Anidulafungin)、卡泊芬净(Caspofungin)和米卡芬净(Micafungin)生长终点判定不如两性霉素 B 明确,但是应用 MEC 生长终点的概念,提高了试验的可重复性。

5.5.6 环吡酮

环吡酮(Ciclopirox)终点判定不像两性霉素 B 定义那样严格,为抑制生长 80%以上。

5.5.7 灰黄霉素

灰黄霉素(Griseofulvin)终点判定不像两性霉素 B 定义那样严格,为抑制生长 80%以上。

5.5.8 特比萘芬

特比萘芬(Terbinafine)终点判定不像两性霉素 B 定义那样严格,为抑制生长 80%以上。

5.6 结果解释

5.6.1 一般情况

丝状真菌的临床折点尚未建立,但对于伊曲康唑、泊沙康唑、伏立康唑、两性霉素 B 和卡泊芬净 5 种药物已建立了以研究为目的的鉴定耐药株的工作折点(working breakpoint)。研究显示曲霉属对 5 种药物、尖端赛多孢子菌和淡紫拟青霉对泊沙康唑和卡泊芬净、双极菌属和链格孢霉属对吡咯类、接合菌对泊沙康唑和两性霉素 B 的 MIC 都低于 1 $\mu\text{g/mL}$ 。对于上述 5 种药物的工作折点:敏感为 MIC 或

$MEC \leq 1 \mu\text{g/mL}$, 中介为 MIC 或 $MEC = 2 \mu\text{g/mL}$, 耐药为 MIC 或 $MEC \geq 4 \mu\text{g/mL}$ 。

5.6.2 两性霉素 B

大多数丝状真菌的 MIC 在 $0.5 \mu\text{g/mL} \sim 2 \mu\text{g/mL}$ 之间。但土曲霉、局限枝顶孢霉、淡紫拟青霉、尖端赛多孢子菌、多育赛多孢的 MIC 可高于 $2 \mu\text{g/mL}$ (分布范围为 $2 \mu\text{g/mL} \sim 16 \mu\text{g/mL}$)。尽管研究数据显示两性霉素 B 的 MIC 值和疗效无相关性,但 MIC 高于 $2 \mu\text{g/mL}$ 治疗失败可能性较大,而 MIC 低于 $2 \mu\text{g/mL}$ 可提示治疗成功。

5.6.3 氟胞嘧啶

大多数丝状真菌对氟胞嘧啶均不敏感, MIC 值均 $> 64 \mu\text{g/mL}$ 。但曲霉属和暗色真菌例外。

5.6.4 氟康唑

大多数丝状真菌对氟康唑均不敏感, MIC 值均 $> 64 \mu\text{g/mL}$ 。但双相真菌和皮肤真菌例外。

5.6.5 酮康唑

大多数丝状真菌的 MIC 在 $0.03 \mu\text{g/mL} \sim 16 \mu\text{g/mL}$ 之间。但研究数据未显示 MIC 值和疗效的相关性。

5.6.6 伊曲康唑、泊沙康唑、里氟康唑、伏立康唑

应使用适当的溶剂溶解伊曲康唑。与酮康唑不同,对于非皮肤真菌,伊曲康唑 MIC 值 $> 8 \mu\text{g/mL}$ 与耐药相关,但研究数据未显示 MIC 值和疗效的相关性。而对于皮肤真菌,伊曲康唑、泊沙康唑、里氟康唑、伏立康唑的 MIC 值都较低,但氟康唑的 $MIC > 16 \mu\text{g/mL}$ 。

5.6.7 棘白菌素类

安尼芬净、卡泊芬净和米卡芬净对曲霉属的 $MECs \leq 1 \mu\text{g/mL}$, 但 MEC 值和疗效的相关性尚未确定。

5.6.8 环吡酮

环吡酮的 $MIC \leq 1 \mu\text{g/mL}$, 但 MIC 值和疗效的相关性尚未确定。

5.6.9 灰黄霉素

灰黄霉素的 $MIC \leq 1 \mu\text{g/mL}$ 。但 MIC 值和疗效的相关性尚未确定。

5.6.10 特比萘芬

特比萘芬对大多数皮肤真菌的 $MIC \leq 0.25 \mu\text{g/mL}$, 但已有报道红色毛癣菌的 $MIC \geq 0.5 \mu\text{g/mL}$ 。 MIC 值和疗效的相关性尚未确定。

6 宏量肉汤稀释法操作步骤

6.1 药物稀释液

按照 3.3 配制药物贮存液。然后用 RPMI-1640 肉汤将贮存液 1 : 10 稀释, 得到 10 倍终浓度的稀释液。

6.2 菌悬液制备

按照 5.1 制备菌悬液。涡旋震荡混匀 15 s 后,用 RPMI-1640 肉汤按 1:100 稀释得到终浓度 0.4×10^4 CFU/mL $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL 的接种物。

6.3 接种和培养

将 0.1 mL 10 倍终浓度的药物稀释液分装在无菌管中,然后加入 0.9 mL 菌悬液,35 ℃ 培养。注意:培养过程中避免震荡试管。

6.4 结果判读和解释

结果判读同 5.5,结果解释同 5.6。

7 质量控制

7.1 目的

应对试剂、环境、仪器、人员操作和结果判读等进行质量控制,以保证试验的准确性。

7.2 参考菌株的保存

7.2.1 长期保存和短期保存方法

在菌种的保存过程中,应尽可能保持其稳定性,减少突变。应将丝状真菌在马铃薯葡萄糖培养基生长后,于 -70 ℃冻存。用 10%甘油制成菌悬液或保存在真菌冻存管中, -70 ℃或使用液氮冻存。若短期使用也可在沙氏培养基培养后 2 ℃ ~ 8 ℃保存。

7.2.2 来源

质控菌株可从美国典型菌种保藏库 American Type Culture Collection(ATCC)、英国致病真菌保藏库 National Collection for Pathogenic Fungi(NCPF)、芬兰菌种保藏库 Central Bureau for Schimmelcultures(CBS) 或参考实验室以及商业机构获得。

7.2.3 长期保存质控菌株的方法

丝状真菌在马铃薯葡萄糖培养基、皮肤真菌在沙氏培养基、红色毛癣菌在燕麦培养基上 28 ℃ 生长 7 d。挑选菌落进行药敏试验。若 MIC 值在质控范围之内(见表 7),继续传代培养直至生长良好(通常 1 d ~ 7 d)。检查菌株是否为纯培养,然后制备菌悬液。将菌悬液分装在冻存管内, -70 ℃ 或使用液氮冻存。

7.3 日常使用质控菌株

将长期保存的菌株复苏,念珠菌属在沙氏培养基上 35 ℃ 培养 24 h;丝状真菌用马铃薯葡萄糖培养基、红色毛癣菌用燕麦培养基 35 ℃ 培养 4 d ~ 5 d 或至分生孢子生长良好;非皮肤真菌 35 ℃ 培养 7 d。

挑选 4 个 ~ 5 个菌落进行药敏试验,并在胰酶大豆消化琼脂斜面上上传代,培养后放置在 2 ℃ ~ 8 ℃ 储存。琼脂斜面保存的日常质控菌株应每隔两周从长期保存的菌株复苏、更换一次。

7.4 培养基和材料的质控

当使用新批次的培养基、培养皿或 RPMI-1640 肉汤以及微量稀释 96 孔板、宏量稀释管时应使用

表 7 中列出的质控菌株进行药敏试验,检测 MIC 是否在控。应至少培养 1 支未接种菌悬液稀释管,检测是否无菌。并记录试验使用材料的批号。

表 7 肉汤稀释法质控菌株和参考菌株的 MIC 或 MEC 范围

菌株名称	目的	药物名称	MIC 范围 μg/mL	中位数 ^a	范围 %	培养时间 h
绿色拟青霉 ATCC MYA-3630	质控菌株	两性霉素 B	1~4	2.0	100.0	48
		伊曲康唑	0.06~0.5	0.12	100.0	48
		伏立康唑	0.015~0.12	0.06	100.0	48
		泊沙康唑	0.03~0.25	0.06	99.5	48
	参考菌株(MEC)	安尼芬净	≤0.015	N/A	100.0	24
近平滑念珠菌 ATCC 22019	质控菌株	两性霉素 B	0.5~4	2.0	91.7	48
		5-氟胞嘧啶	0.12~0.5	0.25	97.9	48
		氟康唑	1.0~4.0	2.0	98.1	48
		伊曲康唑	0.12~0.5	0.25	97.5	48
		酮康唑	0.06~0.5	0.12	98.3	48
		伏立康唑	0.03~0.25	0.06	100.0	48
		里氟康唑	0.03~0.25	0.06	98.3	48
		泊沙康唑	0.06~0.25	0.12	98.8	48
		安尼芬净	0.5~2	1.0	95.0	48
		卡泊芬净	0.5~4	1.0	92.9	48
		米卡芬净	0.5~4	1.0	100.0	48
克柔念珠菌 ATCC 6258	质控菌株	两性霉素 B	1.0~4.0	2.0	100.0	48
		5-氟胞嘧啶	8~32	16	99.6	48
		氟康唑	16~128	32	100.0	48
		伊曲康唑	0.25~1.0	0.5	100.0	48
		酮康唑	0.25~1.0	0.5	99.6	48
		伏立康唑	0.12~1.0	0.5	100.0	48
		里氟康唑	0.25~1.0	0.5	100.0	48
		泊沙康唑	0.12~1.0	0.5	99.6	48
		安尼芬净	0.03~0.12	0.06	97.5	48
		卡泊芬净	0.25~1.0	0.5	97.5	48
		米卡芬净	0.12~0.5	0.25	99.0	48
黄曲霉 ATCC 20430 ^b	参考菌株	两性霉素 B	0.5~4	ND	100.0	48
		伊曲康唑	0.25~0.5	ND	100.0	48
		伏立康唑	0.5~4	ND	100.0	48
		里氟康唑	0.5~4	ND	100.0	48
		泊沙康唑	0.06~0.5	ND	100.0	48

表 7 (续)

菌株名称	目的	药物名称	MIC 范围 $\mu\text{g/mL}$	中位数 ^a	范围 %	培养时间 h
烟曲霉 ATCC MYA-3626	参考菌株	两性霉素 B	0.5~4	2.0	98.7	48
		伊曲康唑	0.25~2.0	1.0	95.7	48
		伏立康唑	0.25~1.0	0.5	100.0	48
	参考菌株(MEC)	安尼芬净 ^c	≤ 0.015	N/A	100.0	24
烟曲霉 ATCC MYA-3627	参考菌株	两性霉素 B	0.5~4	2.0	99.2	48
		伊曲康唑	≥ 16	≥ 16	95.0	48
		伏立康唑	0.25~1.0	0.5	99.2	48
黄曲霉 ATCC MYA-3631	参考菌株	两性霉素 B	1.0~8.0	2.0	98.8	48
		伏立康唑	0.5~2.0	1.0	98.3	48
		泊沙康唑	0.12~1.0	0.5	97.1	48
土曲霉 ATCC MYA-3633	参考菌株	两性霉素 B	2.0~8.0	4.0	98.3	48
		伏立康唑	0.25~1.0	0.5	99.2	48
	参考菌株(MEC)	安尼芬净 ^c	≤ 0.015	N/A	99.6	24
串珠镰刀菌 ATCC MYA-3629	参考菌株	两性霉素 B	2.0~8.0	4.0	99.6	48
		伊曲康唑	> 16	> 16	97.9	48
		伏立康唑	1.0~4.0	2.0	100.0	48
		泊沙康唑	0.5~2.0	1.0	98.1	48
	参考菌株(MIC)	安尼芬净 ^c	> 8	N/A	97.5	48
腐皮镰刀菌 ATCC 3636	参考菌株(MIC)	安尼芬净 ^c	> 8	N/A	96.7	48
尖端赛多孢子菌 ATCC MYA-3635	参考菌株	两性霉素 B	4.0~16	8.0	98.8	72
		伏立康唑	0.5~2.0	1.0	100.0	72
		泊沙康唑	1.0~4.0	2.0	98.3	72
尖端赛多孢子菌 ATCC MYA-3634	参考菌株(MEC)	安尼芬净 ^c	1~4	2	96.7	48~72
须癣毛癣菌 MRL 1957 ATCC MYA-4439 ^d	参考菌株	环吡酮	0.5~2	1.0	97.5	4 d
		灰黄霉素	0.12~0.5	0.25	96.3	4 d
		伊曲康唑	0.03~0.25	0.06	96.2	4 d
		泊沙康唑	0.03~0.25	0.06	95.2	4 d
		特比萘芬	0.002~0.008	0.004	97.9	4 d
		伏立康唑	0.03~0.25	0.06	95.2	4 d

表 7 (续)

菌株名称	目的	药物名称	MIC 范围 μg/mL	中位数 ^a	范围 %	培养时间 h
红色毛癣菌 MRL 666 ATCC MYA-4438 ^d	参考菌株	环吡酮	0.5~2	1.0	97.5	4 d
		氟康唑	0.5~4	1.0	95.2	4 d
		伏立康唑	0.008~0.06	0.015	96.1	4 d
注 1: ND=未确定;N/A=不适用。 注 2: MIC 范围在规定的培养时间内的得出。有时候宏量肉汤稀释法为 48 h,微量肉汤稀释法为 24 h。						
^a 中位数在这里指 MIC 或 MEC 的最佳质控值。 ^b 黄曲霉 ATCC 204304 的 MIC 范围并非来自于本标准推荐的试验方法,但这是目前仅有的此株丝状真菌对里氟康唑可重复的 MIC 范围。 ^c 安尼芬净对丝状真菌的 MEC 和镰刀菌≥50% 生长抑制的 MIC 质控范围为一开区间(off-scale,如≤0.015 或 >8),这有助于检出潜在的耐药株或确定新 MEC。 ^d 生长对照孔应培养 4 d 或直至生长良好(孔底部呈融合生长)。						

7.5 质控的频率

7.5.1 MIC 或 MEC 范围

质控(参考)菌株对相应抗真菌药物的 MIC 可接受范围见表 7,最佳质控值最好处于质控范围的中位数水平。

由于随机误差连续 20 次检测可能有 1 次超出参考范围,这是可接受的。但连续 2 次或 20 次中超过 2 次结果超出参考范围则需要纠正。

7.5.2 质控频率

7.5.2.1 每日质控和每周质控

若所有参考菌株连续检测 30 d,每种药的 30 个 MIC 或 MEC 值超出参考范围≤3 个,则实验室可减少为每周质控。有些药物由于半衰期短,检测周期要相应缩短。

7.5.2.2 重新评价检测系统

当更换试剂或使用新批次药物储存液或使用新批次质控菌株时,应重新评价检测系统(连续检测 30 d)。

7.5.2.3 失控后的纠正方法

运行稳定后(30 个 MIC 值超出参考范围≤3 个)应每周进行质控。但当发现 MIC 值不在控时,应进行每日质控直到找到失控原因并进行纠正。判断已纠正的标准为连续 5 d 得到的质控结果(5 个 MIC 值)都在控。

若无法找到失控原因(5 个 MIC 值超过 1 个不在控)应进行每日质控。连续检测 30 d 运行稳定(30 个 MIC 值超出参考范围≤3 个)后再改为每周质控。

附 录 A
(规范性附录)

RPMI-1640 肉汤培养基配方表

RPMI-1640 肉汤培养基配方表见表 A.1。

表 A.1 RPMI-1640 肉汤培养基配方表(含谷氨酰胺和酚红,不含碳酸氢盐)

组分	水 g/L	组分	水 g/L
L-精氨酸	0.200 0	生物素	0.000 200
L-天冬酰胺(无水)	0.050 0	D-泛酸钙	0.000 250
L-天冬氨酸	0.020 0	氯化胆碱	0.003 000
L-胱氨酸·2HCl	0.065 2	叶酸	0.001 000
L-谷氨酸	0.020 0	肌醇	0.035 000
L-谷氨酰胺	0.300 0	烟酰胺	0.001 000
甘氨酸	0.010 0	对氨基苯甲酸	0.001 000
L-组氨酸(自由基)	0.015 0	吡哆醇 HCl	0.001 000
L-羟脯氨酸	0.020 0	核黄素	0.000 200
L-异亮氨酸	0.050 0	硫胺素 HCl	0.001 000
L-亮氨酸	0.050 0	维生素 B ₁₂	0.000 005
L-赖氨酸 HCl	0.040 0	硝酸钙×H ₂ O	0.100 000
L-蛋氨酸	0.015 0	氯化钾	0.400 000
L-苯丙氨酸	0.015 0	硫酸镁(无水)	0.048 840
L-脯氨酸	0.020 0	氯化钠	6.000 000
L-丝氨酸	0.030 0	磷酸钠,二价(无水)	0.800 000
L-苏氨酸	0.020 0	D-葡萄糖	2.000 000
L-色氨酸	0.005 0	谷胱甘肽	0.001 000
L-酪氨酸·2Na	0.028 8	酚红,Na	0.005 300
L-缬氨酸	0.020 0		

附 录 B
(规范性附录)
燕麦培养基制备步骤

燕麦培养基制备步骤见表 B.1。

表 B.1 燕麦培养基制备步骤

步骤	过 程
1	在 1 L 水中加入 100 g 婴儿燕麦粉,15 g 琼脂,0.03 g 庆大霉素
2	混匀
3	121 ℃ 高压灭菌 20 min。分装,储存在 4 ℃~6 ℃ 备用
4	质控: 阳性:红色毛癣菌 形成分生孢子 阴性:无 无菌:无生长

参 考 文 献

- [1] EUCAST. Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Conidia Forming Moulds. EUCAST document E. DEF 9. 1, PA;EUCAST. 2008;7
 - [2] CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. CLSI document M38-A2,PA; CLSI. 2008;4
 - [3] Espinel-Ingroff, A, Montero O, Morrillo D, et al. Viability of Yeasts and Filamentous Fungi Isolates maintained in Liquid Nitrogen and at -70°C by Using Commercially Prepared Cryogenic vials. Inpress
 - [4] Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Chaturvedi V, et al. Optimal Susceptibility Testing Conditions for Detection of Azole Resistance in *Aspergillus* spp. NCCLS Collaborative evaluation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1828-1835
 - [5] Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, et al. Itraconazole Resistance in *Aspergillus Fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:1364-1368
 - [6] Denning DW, Radford SA, Oakley KL, et al. Correlation between in-vitro Susceptibility Testing to Itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus Fumigatus* Infection. *J Antimicrob Chemother.* 1997; 40: 401-414
 - [7] Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, et al. Evaluation of NCCLS Susceptibility Testing Conditions for Established and New Antifungal Agents Against Emerging Monilaceous and Dematiaceous Mould Pathogens. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1288-1292
 - [8] Lass-Flörl C, Kofler G, Kropshofer G, et al. In vitro Testing of Susceptibility to Amphotericin B is a Reliable Predictor of Clinical outcome in Invasive Aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42:497-502
 - [9] Pasarell L, McGinnis MR. Viability of Fungal Cultures Maintained at -70°C . *J Clin Microbiol.* 1992;30:1000-1004
 - [10] Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, et al. Quality Control Limits for Broth Microdilution Susceptibility Tests of Ten Antifungal Agents. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3457-3459
 - [11] Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, et al. Quality Control Guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards Recommended Broth Macrodilution Testing of Amphotericin B, Fluconazole, and Flucytosine. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:1104-1107
 - [12] Rex JH, Pfaller MA, Lancaster M, et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards Recommended Broth Macrodilution Testing of Ketoconazole and Itraconazole. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:816-817
 - [13] Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, et al. Multicenter Evaluation of Proposed Standardization Procedure for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:139-143
 - [14] Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Chaturvedi V, et al. Optimal Susceptibility Testing Conditions for Detection of Azole Resistance in *Aspergillus* spp. : NCCLS collaborative evaluation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 43: 1828-1835
-

中华人民共和国卫生
行业标准
抗丝状真菌药物敏感性试验
肉汤稀释法

WS/T 411—2013

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235

读者服务部:(010)68523946

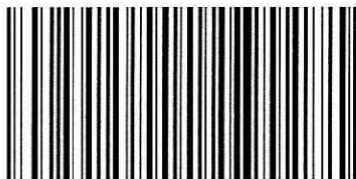
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 31 千字
2013年6月第一版 2013年6月第一次印刷

*

书号: 155066·2-25031 定价 21.00 元



WS/T 411-2013

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107