

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 421—2013

抗酵母样真菌药物敏感性试验 肉汤稀释法

Antifungal susceptibility testing of yeasts—Broth dilution method

2013-07-16 发布

2013-12-01 实施

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：卫生部临床检验中心、北京大学第一医院、北京大学人民医院、首都医科大学附属北京友谊医院、中国医学科学院北京协和医院、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、李若瑜、张楠、王辉、苏建荣、徐英春、胡云建、孙自镛。

抗酵母样真菌药物敏感性试验

肉汤稀释法

1 范围

本标准规定了用经典的宏量肉汤稀释方法(Broth Macrodilution method)检测抗酵母样真菌的最小抑菌浓度(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)的参考方法,并推荐了与本参考方法的结果具有良好一致性的微量肉汤稀释方法(Broth Microdilution method)。

本标准适用于酵母及酵母样真菌(引起的深部真菌感染)的药物敏感性试验,包括念珠菌属 *Candida spp.* (含光滑念珠菌 *C. glabrata*)和新生隐球菌 *Cryptococcus neoformans*。不适用双相真菌,如皮炎芽生菌 *Blastomyces dermatitidis* 荚膜组织胞浆菌 *Histoplasma capsulatum* 荚膜亚种。

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

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、耐药的特定 MIC 值。

折点系综合体外 MIC 值、PK/PD 数据、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)。

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很有可能取得成功。

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严重解释偏差。

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

剂量依赖性敏感 susceptible-dose dependent; S-DD

当使用比常规用药更高剂量或更高血药浓度时能够取得疗效。

2.8

非敏感 non-susceptible; NS

当前仅有敏感解释,但无中介或耐药解释类型的微生物,多用于仍未遇到耐药菌株的新抗菌药物。

2.9

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。

2.10

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 抗真菌药物标准品或参考品

抗真菌药物标准品或参考品可从药物生产厂家直接购买得到。使用有效期内的标准品,在厂家推荐的条件下贮存。当从低温下取出药物时,需恢复到室温后再开瓶。药物称量按照配制贮存液的浓度计算,浓度为检测时使用浓度的 100 倍。称量应在分析天平上进行,天平应定期校准。

3.2 称量药物

计算药物质量及稀释液体积见式(1)、式(2):

$$m = \frac{\rho \cdot V}{\tau} \dots\dots\dots (1)$$

$$V = \frac{m \cdot \tau}{\rho} \dots\dots\dots (2)$$

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($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- τ ——药物的效价,单位为微克每毫克($\mu\text{g}/\text{mg}$);
- V ——药物的体积,单位为毫升(mL)。

3.3 药物储存液(母液)

3.3.1 溶剂

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

表 1 抗真菌药物储存液使用的溶剂、稀释液和检测范围

抗真菌药物	溶剂 ^a	稀释液	检测范围 $\mu\text{g}/\text{mL}$
两性霉素 B	DMSO ^b	培养基 ^c	0.031 2~16
氟康唑	水	培养基	0.125~64
伊曲康唑	DMSO ^b	培养基	0.015 6~8

表 1 (续)

抗真菌药物	溶剂 ^a	稀释液	检测范围 μg/mL
伏立康唑	DMSO ^b	培养基	0.015 6~8
泊沙康唑	DMSO ^b	培养基	0.015 6~8
氟胞嘧啶	水	培养基	0.125~64
卡泊芬净	水	培养基	0.031 2~16
米卡芬净	水	培养基	0.031 2~16
安尼芬净	DMSO ^b	培养基	0.031 2~16

^a 某些溶剂存在潜在毒性,使用前应咨询制造商。
^b DMSO 表示二甲基亚砷。
^c 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 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 表示 3-(N-吗啡啉)丙磺酸(3-N-morpholino propane sulfonic acid)。

3.3.2 过滤

通常认为储存液是无菌的,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。

3.3.3 保存

储存液应分装在塑料管中密封保存在-60 °C 环境中,保存温度不能高于-20 °C。应在从冰箱中取出的当天使用,现用现取,未用完的应丢弃。大多数药物的储存液在-60 °C 可保存 6 个月。

3.4 药物稀释液

3.4.1 水溶性抗真菌药物

对于溶于水的抗真菌药物,用稀释液(RPMI-1640 肉汤)将 100 倍终浓度储存液 10 倍稀释,最后与菌液 1:9 混合,步骤见表 3。

表 3 水溶性抗真菌药物稀释步骤

步骤	浓度 μg/mL	来源	体积 mL	培养基 mL	中间浓度 μg/mL	终浓度 1:10 μg/mL	log ₂
1	5 120	储存液	1.0	7	640	64	6
2	640	步骤 1	1.0	1.0	320	32	5
3	640	步骤 1	1.0	3.0	160	16	4
4	160	步骤 3	1.0	1.0	80	8	3
5	160	步骤 3	0.5	1.5	40	4	2
6	160	步骤 3	0.5	3.5	20	2	1
7	20	步骤 6	1.0	1.0	10	1	0
8	20	步骤 6	0.5	1.5	5	0.5	-1
9	20	步骤 6	0.5	3.5	2.5	0.25	-2
10	2.5	步骤 9	1.0	1.0	1.25	0.125	-3
11	2.5	步骤 9	0.5	1.5	0.625	0.062 5	-4
12	2.5	步骤 9	0.5	3.5	0.312 5	0.031 25	-5

3.4.2 非水溶性抗真菌药物

对于不溶于水的抗真菌药物(如两性霉素 B、伊曲康唑、伏立康唑、泊沙康唑、阿尼芬净),需先用合适的溶剂配制终浓度 100 倍的储存液,再用 RPMI-1640 肉汤 10 倍稀释成终浓度的 10 倍后,最后与菌液 1:9 混合,步骤见表 4。

表 4 非水溶性抗真菌药物稀释步骤

步骤	浓度 μg/mL	来源	体积 mL	溶剂 (如 DMSO ^a) mL	中间浓度 μg/mL	终浓度 1:100 μg/mL	log ₂
1	1 600	储存液			1600 μg/mL	16	4
2	1 600	储存液	0.5	0.5	800	8	3
3	1 600	储存液	0.5	1.5	400	4	2
4	1 600	储存液	0.5	3.5	200	2	1
5	200	步骤 4	0.5	0.5	100	1	0
6	200	步骤 4	0.5	1.5	50	0.5	-1
7	200	步骤 4	0.5	3.5	25	0.25	-2
8	25	步骤 7	0.5	0.5	12.5	0.125	-3
9	25	步骤 7	0.5	1.5	6.25	0.062 5	-4
10	25	步骤 7	0.5	3.5	3.13	0.031 3	-5

^a DMSO 表示二甲基亚砷。

4 培养基

4.1 RPMI-1640 肉汤培养基

推荐使用 RPMI-1640 肉汤培养基,若无 RPMI-1640 干粉,配方见附录 A。

4.2 含 2%葡萄糖的 RPMI-1640 肉汤培养基

微量肉汤稀释法推荐使用葡萄糖含量为 2%的 RPMI-1640 肉汤培养基,配方见表 5。

表 5 含 2%葡萄糖改良 RPMI-1640 肉汤培养基配方表

组 分	1 倍浓度	2 倍浓度
蒸馏水	900 mL	900 mL
RPMI-1640 干粉	10.4 g	20.8 g
MOPS	34.53 g	69.06 g
葡萄糖	18 g	36 g

4.3 特殊改良培养基

两性霉素 B 可使用 Antibiotic Medium 3 (AM3) 培养基,并补充葡萄糖终浓度至 2%,可提高耐药检出率,但此培养基未经标准化并存在批间差异。新生隐球菌使用 Yeast Nitrogen Base 可促进新生隐球菌生长,并提高抗菌药物的 MIC 值。

5 宏量肉汤稀释法操作步骤

5.1 菌悬液的制备

酵母样真菌应在沙氏培养基(SDA),或马铃薯葡萄糖培养基(PDA)35℃培养 24 h,新生隐球菌应培养 48 h。挑选直径 1 mm 左右的几个相似菌落,用 5 mL 0.85% 盐水制成 0.5 麦氏单位菌悬液(用于对照的 0.5 麦氏单位硫酸钡浊度标准管配制见附录 B),或使用浊度仪配制浓度为 1×10^6 CFU/mL ~ 5×10^6 CFU/mL 菌悬液,振荡器上持续混匀 15 s,再用 0.85% 生理盐水进行 1:100 倍稀释,然后用 RPMI-1640 肉汤进行 1:20 倍稀释,得到终浓度为 5×10^2 CFU/mL ~ 2.5×10^3 CFU/mL。

5.2 接种

在 15 min 内(在 4℃可延长至 2 h)将 0.9 mL 配制好的菌悬液和 0.1 mL 稀释药液加入管中。对照管加入 0.9 mL 菌悬液和 0.1 mL 使用的稀释液(RPMI-1640 肉汤培养基)。

5.3 培养

将培养管置于 35℃温箱中培养,酵母样真菌应培养 24 h~48 h,新生隐球菌则应 70 h~74 h。注意培养过程中避免震荡试管。

5.4 结果判读

5.4.1 评分标准

判读结果时,将各浓度管内的真菌生长情况与对照管比较,通过评分得出 MIC 值,评分标准:

- 0 完全清亮；
- 1 轻微模糊；
- 2 浊度显著降低；
- 3 浊度轻微降低；
- 4 浊度没有变化。

5.4.2 两性霉素 B

生长终点判断标准为 100%抑制(评分为 0,完全清亮)。

5.4.3 氟胞嘧啶和吡咯类

氟胞嘧啶 5-Flucytosine 和吡咯类 azoles 抗真菌药物的生长终点判读标准为抑制 50%的生长(评分为 2,浊度显著降低)。

5.4.4 棘白菌素类

棘白素类 Echinocandin 抗真菌药物的生长终点判读标准为 50%抑制(评分为 2,浊度显著降低)。

5.5 结果解释

氟康唑 Fluconazole、伏立康唑 Voriconazole、两性霉素 B、伊曲康唑、氟胞嘧啶、安尼芬净、卡泊芬净 Caspofungin 以及米卡芬净 Micafungin 结果解释见附录 C。

6 微量肉汤稀释法操作步骤

6.1 菌悬液的制备

按 5.1 方法培养和制备 0.5 麦氏单位菌悬液,得到浓度为 1×10^6 CFU/mL~ 5×10^6 CFU/mL。之后震荡混匀 15 s,用含 2%葡萄糖的 RPMI-1640 肉汤按 1:10 倍稀释得到 1×10^5 CFU/mL~ 5×10^5 CFU/mL(2 倍终浓度)菌悬液。菌悬液应在配制后 30 min 内完成接种。

6.2 药物稀释液

按 3.3 配制 200 倍终浓度的药物储存液。使用时按 3.4 将储存液 1:100 倍稀释。

示例:在 9.9 mL 2 倍终浓度的含 2%葡萄糖的 RPMI-1640 肉汤中加入 100 μ L 药物储存液,经 100 倍稀释得到 2 倍终浓度的工作液,详见表 6。

表 6 微量肉汤稀释法抗真菌药物稀释步骤(0.125 μ g/mL~64 μ g/mL)

步骤	浓度 μ g/mL	来源	药物溶液体积 μ L	溶剂体积 ^a μ L	中间浓度 μ g/mL	使用 2 倍含 2%葡萄糖 RPMI-1640 肉汤 1:100 稀释后终浓度 μ g/mL
1	12 800	储存液	200	0	12 800	128
2	12 800	储存液	100	100	6 400	64
3	12 800	储存液	50	150	3 200	32
4	12 800	储存液	50	350	1 600	16
5	1 600	步骤 4	100	100	800	8

表 6 (续)

步骤	浓度 μg/mL	来源	药物溶液体积 μL	溶剂体积 ^a μL	中间浓度 μg/mL	使用 2 倍含 2% 葡萄糖 RPMI-1640 肉汤 1:100 稀释后终浓度 μg/mL
6	1 600	步骤 4	50	150	400	4
7	1 600	步骤 4	50	350	200	2
8	200	步骤 7	100	100	100	1
9	200	步骤 7	50	150	50	0.5
10	200	步骤 7	25	175	25	0.25

^a 参照表 1 使用适合的溶剂。

6.3 接种

在 96 孔微孔板上,第 11 列作为菌株的阳性生长对照孔,只加肉汤和菌液不加药物。生长对照孔中先加 100 μL 不含药的 2% 葡萄糖 RPMI-1640 肉汤,之后再加 100 μL 2 倍接种量的菌悬液。第 12 列为无菌对照孔,只加肉汤,不加菌液和药物。

从 96 孔板的第 1 列至第 10 列,每孔分别加入 100 μL 来自表 6 步骤 1 至 10 的 2 倍终浓度药物稀释液。第 1 列为最高浓度(64 μg/mL 或 16 μg/mL),第 10 列为最低浓度(0.12 μg/mL 或 0.03 μg/mL)。然后每孔加入 100 μL 2 倍终浓度的菌悬液,最终接种量为 5×10^4 CFU/mL ~ 2.5×10^5 CFU/mL。

6.4 培养

将 96 孔微孔板在 $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ 。若近平滑念珠菌和季也蒙念珠菌生长不充分,继续培养 12 h ~ 24 h 再观察结果。

6.5 结果判读

6.5.1 评分标准

判读结果时通过与生长对照孔比较观察生长抑制情况。通过 0-4 的评分区分孔内生长抑制情况的程度:同 5.4.1。

6.5.2 生长终点的判断标准

两性霉素 B 为 100% 抑制(评分为 0,完全清亮),氟胞嘧啶和吡咯类为 50% 抑制(评分为 2,浊度显著降低)。

6.6 结果解释

氟康唑、伏立康唑结果解释见附录 C。

6.7 伊曲康唑、氟胞嘧啶、安尼芬净、卡泊芬净、米卡芬净肉汤稀释法

伊曲康唑、氟胞嘧啶、安尼芬净、卡泊芬净、米卡芬净培养基推荐使用 RPMI-1640 肉汤,接种过程按照 5.1 操作,得到 1×10^3 CFU/mL ~ 5×10^3 CFU/mL (2 倍终浓度菌悬液)。接种过程按 6.3 操作,但最终接种量为 5×10^2 CFU/mL ~ 2.5×10^3 CFU/mL,结果解释见附录 C。

7 质量控制

7.1 目的

为了保证实验人员操作和读取结果的正确性,应对试剂、环境和仪器进行质量控制。

7.2 质控菌株的保存

7.2.1 保存

保存时应尽可能保持菌株的稳定性,减少突变。酵母菌可在沙氏培养基或马铃薯葡萄糖培养基生长后进行药敏试验。若 MIC 值在质控范围内,进行传代培养后用 10% 甘油制成菌悬液,滴 1~2 滴到冻存管中 -70 °C 冻存。若短期内使用也可在沙氏培养基或蛋白胨斜面培养后 2 °C~8 °C 保存。

每次使用时,酵母菌在马铃薯葡萄糖培养基上 35 °C 培养 24 h,新生隐球菌培养 48 h 后使用,同时进行传代过夜培养保存在 2 °C~8 °C 备用。

当使用新批次的 RPMI-1640 肉汤、稀释管或培养皿时,需用质控菌株进行药敏试验,检测 MIC 是否在控。

7.2.2 来源

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

7.3 质控的频率

7.3.1 质控(参考)菌株的 MIC 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、表 8 和表 9,最佳质控值最好处于可接受范围的中位数水平。

表 7 宏量肉汤稀释法质控菌株 MIC 范围($\mu\text{g}/\text{mL}$, 48 h)

菌株名称	目的	药物名称	MIC 范围 $\mu\text{g}/\text{mL}$	MIC 在范围内的比例 %
近平滑念珠菌 ATCC 22019	质控菌株	两性霉素 B	0.25~1	99.1
		氟康唑	2.8~8.0	99.1
		伊曲康唑	0.06~0.25	99.0
		酮康唑	0.06~0.25	99.0
		5 氟胞嘧啶	0.12~0.5	98.6
克柔念珠菌 ATCC6258	质控菌株	两性霉素 B	0.25~2.0	99.5
		氟康唑	16~64	99.1
		伊曲康唑	0.12~0.5	94.0
		酮康唑	0.12~0.5	100
		5 氟胞嘧啶	4.0~16	96.8

表 7 (续)

菌株名称	目的	药物名称	MIC 范围 μg/mL	MIC 在范围内的比例 %
白念珠菌 ATCC 90028	参考菌株	两性霉素 B	0.5~2.0	91.9
		氟康唑	0.25~1.0	97.3
		5 氟胞嘧啶	0.5~2.0	95.0
白念珠菌 ATCC 24433	参考菌株	两性霉素 B	0.25~1.0	99.5
		氟康唑	0.25~1.0	95.9
		5 氟胞嘧啶	1.0~4.0	91.9
近平滑念珠菌 ATCC90018	参考菌株	两性霉素 B	0.5~2.0	96.4
		氟康唑	0.25~1.0	98.2
		5 氟胞嘧啶	≤0.12~0.25	99.5
热带念珠菌 ATCC 750	参考菌株	两性霉素 B	0.5~2.0	93.7
		氟康唑	1.0~4.0	95.5
		5 氟胞嘧啶	≤0.12~0.25	99.5

表 8 微量肉汤稀释法质控菌株 MIC 范围(一)

单位为微克每毫升

抗菌药物	克柔念珠菌 ATCC 6258	近平滑念珠菌 ATCC 22019	白色念珠菌 F 8555	克柔念珠菌 CL3403
氟康唑	16.0~64.0	0.5~2.0	32.0~128.0	16.0~64.0
伏立康唑	0.03~0.25	0.015~0.06	0.5~2.0	0.12~0.5

表 9 微量肉汤稀释法质控菌株 MIC 范围(二)(24 h 和 48 h)

单位为微克每毫升

菌株名称	药物名称	MIC 范围	24 h	在范围内比例 %	MIC 范围	48 h	在范围内的比例 %
近平滑念珠菌 ATCC 22019	两性霉素 B	0.25~2.0	0.5	97	0.5~4.0	2.0	92
	5-氟胞嘧啶	0.06~0.25	0.12	99	0.12~0.5	0.25	98
	伊曲康唑	0.12~0.5	0.25	96	0.12~0.5	0.25	98
	酮康唑	0.03~0.25	0.06/0.12	98	0.06~0.5	0.12	98
	里氟康唑	0.016~0.12	0.06	96	0.03~0.25	0.06	98
	泊沙康唑	0.06~0.25	0.12	97	0.06~0.25	0.12	99
	米卡芬净	0.5~2	1	100	0.5~4	1	100
	安尼芬净	0.25~2.0	1.0	95.0	0.5~2.0	1.0	95.0
	卡泊芬净	0.25~1.0	0.5	96.7	0.5~4.0	1.0	92.9

表 9 (续)

单位为微克每毫升

菌株名称	药物名称	MIC 范围	24 h	在范围内比例 %	MIC 范围	48 h	在范围内的比例 %
克柔念珠菌 ATCC 6258	两性霉素 B	0.5~2.0	1.0	100	1.0~4.0	2.0	100
	5-氟胞嘧啶	4.0~16	8.0	98	8.0~32	16	99
	伊曲康唑	0.12~1.0	0.5	96	0.25~1.0	0.5	100
	酮康唑	0.12~1.0	0.5	96	0.25~1.0	0.5	99
	里氟康唑	0.06~0.5	0.25	93	0.25~1.0	0.5	100
	泊沙康唑	0.06~0.5	0.25	100	0.12~1.0	0.5	99.6
	米卡芬净	0.12~0.5	0.25	99.6	0.12~0.5	0.25	99.0
	安尼芬净	0.03~0.12	0.06	97.9	0.03~0.12	0.06	97.5
	卡泊芬净	0.12~1.0	0.5	98.8	0.25~1.0	0.5	97.5

7.3.2 检测频率

7.3.2.1 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。对于半衰期短的药物, 检测周期应更短。

7.3.2.2 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)。

7.3.2.3 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。

7.3.2.4 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	组 分	水 g/L
L-精氨酸	0.200	L-脯氨酸	0.020	核黄素	0.000 2
L-天冬酰胺(无水)	0.050	L-丝氨酸	0.030	硫胺素 HCl	0.001
L-天冬氨酸	0.020	L-苏氨酸	0.020	维生素 B ₁₂	0.000 005
L-胱氨酸·2HCl	0.065 2	L-色氨酸	0.005	硝酸钙×H ₂ O	0.100
L-谷氨酸	0.020	L-酪氨酸·2Na	0.028 83	氯化钾	0.400
L-谷氨酰胺	0.300	L-缬氨酸	0.020	硫酸镁(无水)	0.048 84
甘氨酸	0.010	生物素	0.000 2	氯化钠	6.000
L-组氨酸(自由基)	0.015	D-泛酸钙	0.000 25	磷酸钠,二价(无水)	0.800
L-羟脯氨酸	0.020	氯化胆碱	0.003	D-葡萄糖	2.000
L-异亮氨酸	0.050	叶酸	0.001	谷胱甘肽	0.001
L-亮氨酸	0.050	肌醇	0.035	酚红,Na	0.005 3
L-赖氨酸·HCl	0.040	烟酰胺	0.001	维生素 B ₁₂	0.000 005
L-蛋氨酸	0.015	对氨基苯甲酸	0.001	—	—
L-苯丙氨酸	0.015	吡哆醇 HCl	0.001	—	—

附录 B

(规范性附录)

0.5 麦氏单位硫酸钡浊度标准管制备步骤

0.5 麦氏单位硫酸钡浊度标准管制备步骤见表 B.1。

表 B.1 0.5 麦氏单位硫酸钡浊度标准管制备步骤

步骤	过程
1	在 99.5 mL 0.18 mol/L H_2SO_4 (1%, 体积分数) 中加入 0.5 mL 0.048 mol/L $BaCl_2$
2	使用分光光度计调节浊度, 在 625 nm 波长吸光度应在 0.08~0.13 之间
3	将 4~6 mL 液体分装在螺旋管中
4	室温密封避光储存
5	使用前将螺旋管内液体混匀
6	每 3 个月校准一次浊度

附录 C

(规范性附录)

酵母样真菌体外药敏试验结果解释

酵母样真菌体外药敏试验结果解释见表 C.1 和表 C.2。

表 C.1 酵母样真菌体外敏感试验结果解释(一)

抗真菌药物名称	折点(S≤或 R>)				
	白念珠菌	热带念珠菌	近平滑念珠菌	光滑念珠菌	克柔念珠菌
氟康唑	2/4	2/4	2/4	IE ^a	— ^b
伏立康唑	0.125/0.125	0.125/0.125	0.125/0.125	IE ^a	IE ^a

^a 治疗该菌疗效未知。
^b 克柔念珠菌对氟康唑天然耐药,不适用此标准。

表 C.2 酵母样真菌体外药敏试验结果解释(二)

抗菌药物	敏感(S)	剂量依赖性敏感(S-DD)	中介(I)	耐药(R)	非敏感(NS)
伊曲康唑 ^a	≤0.125	0.25~0.5	—	≥1	—
氟胞嘧啶	≤4	—	8~16	≥32	—
安尼芬净	≤2	—	—	—	>2
卡泊芬净	≤2	—	—	—	>2
米卡芬净	≤2	—	—	—	>2

注: 以上为酵母样真菌折点,若检测的 MIC 值处在两个浓度之间时,应报告高浓度。举例氟胞嘧啶 MIC 为 12.5 μg/mL,则应报告为 16 μg/mL,判为剂量依赖性敏感(S-DD)。

^a 对伊曲康唑,折点适用粘膜感染,对酵母样真菌引起的深部真菌感染不适用。体外结果的敏感依赖体内应达到的血药峰浓度。伊曲康唑血浆浓度应>0.5 μg/mL。

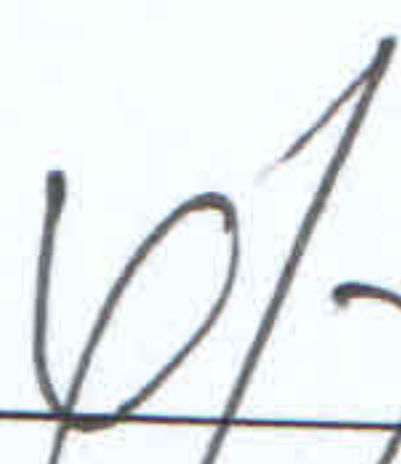
参 考 文 献

- [1] EUCAST. Method for the Determination of Broth Dilution MICs of Antifungal Agents for Fermentative Yeasts, EUCAST document EDef 7.1, *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:398-405
- [2] CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. CLSI document M27-A3, PA; CLSI. 2008;4
- [3] CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. CLSI document M27-S3, PA; CLSI. 2008;4
- [4] Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, et al. Collaborative Investigation of Variables in Susceptibility Testing of Yeasts. *Antimicrob Agents.* 1990;34:1648-1654
- [5] Pfaller MA, Buschelman B, Bale MJ, et al. Multicenter Comparison of a Colorimetric Microdilution Broth Method with the Reference Macrodilution Method for in vitro Susceptibility Testing of Yeast Isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1994;19:9-13
- [6] Pfaller MA, Grant C, Morthland V, et al. Comparative Evaluation of Alternative Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Fluconazole Against *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 1994;32:506-509
- [7] Pfaller MA, Messer SA, Coffman S, et al. Comparison of Visual and Spectrophotometric Methods of MIC End Point Determinations using Broth Microdilution Methods to Test Five Antifungal Agents Including the New Triazole. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1094-1097
- [8] Lozano—Chiu M, Nelson PW, Lancaster M, et al. Variability of Antibiotic Medium 3 When Used for Susceptibility Testing of *Candida* Isolates to Amphotericin B. *J Clin Microbiol.* 1997;35:270-272
- [9] Ghannoum MA, Ibrahim AS, Fu Y, et al. Susceptibility Testing of *Cryptococcus neoformans*: a Microdilution Technique. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2881-2886
- [10] 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
- [11] 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
- [12] 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
-


卫生计生委收文处理专用纸

收文 字第 号

2013年7月2日

来文机关	来文 字第 号 年 月 日
事由 会签《干扰实验指南》等6项 推荐性卫生行业标准	附件: 

局领导:

 2.4

法制司来文请我局会签《干扰实验指南》等6项推荐性卫生行业标准（该标准曾经征求原医政司意见）。经研究，我处无不同意见，建议会签。

妥否，请示。

医疗与护理处



2013年7月2日

12. 4. 批办地均清

中华人民共和国卫生部收文处理专用纸

收文 字第 3485 号

2012 年 11 月 19 日

来文机关：政法司	来文 字第 号
事由：就《干扰实验指南》 等 7 项临床检查标准征求 审查意见事	附件：
拟办和批示：	

政法司：

就《干扰实验指南》、《临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证》、《临床化学设备线性^(E570)评价指南》、《参考物质中酶活性浓度的赋值》、《受委托临床实验室选择指南》、《γ-谷氨酰基转移酶催化活性浓度测量参考方法》、《抗酵母样真菌药物敏感试验 肉汤稀释法》，我司无不同意见。

3/12

医政司 清可长书记 赵明

2012 年 11 月 19 日

清可长书记 11/11
 11/11
 19/11