



# 中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1728—2021/ISO 16256:2012

---

## 临床实验室检测和体外诊断系统 感染性疾病相关酵母样真菌抗菌剂的 体外活性检测参考方法

**Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems—  
Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial  
agents against yeast fungi involved in infectious diseases**

(ISO 16256:2012, IDT)

2021-03-09 发布

2022-04-01 实施

---

国家药品监督管理局      发 布

## 目 次

前言 .....	I
引言 .....	II
1 范围 .....	1
2 术语和定义 .....	1
3 试验程序 .....	3
3.1 概述 .....	3
3.2 培养基 .....	4
3.3 抗真菌剂 .....	4
3.4 微量稀释盘的储存 .....	7
3.5 接种菌液的制备 .....	7
3.6 微量稀释盘的接种 .....	8
3.7 微量稀释盘的孵育 .....	8
3.8 MIC 结果读取 .....	8
3.9 MIC 值的解释 .....	9
4 质量控制(QC) .....	9
附录 A (资料性附录) RPMI-1640 培养基 .....	13
附录 B (资料性附录) 0.5 麦氏硫酸钡浊度标准 .....	16
附录 C (资料性附录) 肉眼 MIC 判读程序 MIC 解释的可接受判读时间 .....	17
参考文献 .....	18

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准使用翻译法等同采用 ISO 16256:2012《临床实验室检测和体外诊断系统 感染性疾病相关酵母样真菌抗菌剂的体外活性检测参考方法》。

本标准做了下列编辑性修改：

——为便于理解条款，增加了部分注释。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会(SAC/TC 136)归口。

本标准主要起草单位：北京市医疗器械检验所、山东省医疗器械产品质量检验中心、赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

本标准主要起草人：毕春雷、杨忠、王文庆、秦冬立、洪梅。

## 引 言

抗菌剂体外敏感性试验通常是针对可能导致疾病的微生物,尤其是那些被认为对频繁使用的抗菌剂可能表现出获得性耐药性的微生物种属。该试验在耐药性监测、敏感性的流行病学研究以及新抗菌剂与现有抗菌剂之间的比较等方面也很重要。

稀释法常被用来测定抗菌剂的最小抑菌浓度(MIC, minimum inhibitory concentration),并代表抗真菌剂敏感性试验的参考方法。MIC法通常用于耐药性监测、为研究和注册目的新抗菌剂的比较性研究、为常规试验产生不明确结果的微生物确立敏感性、常规试验可能不可靠的微生物的试验以及临床需要定量结果的情况。在稀释法测试中,通过检测微生物在含有系列稀释浓度抗菌剂的一系列琼脂平板(琼脂稀释法)上或肉汤(肉汤稀释法)中的能否产生可见生长的情况来确定。

抗菌剂的最小抑菌浓度(MIC值)是指在规定的体外试验条件下,在规定的时间内,能抑制某特定微生物出现肉眼可见或光学可测量生长的抗菌剂的最低浓度(以mg/L为单位)。MIC值指导临床医师了解微生物对抗菌剂的敏感性,从而帮助他们做出治疗决策。由于所用方法可能影响试验结果,为了确保实验室内和室间结果的重现性,实验室需要进行严格的质量控制及标准化。通常认为肉汤稀释法的检测结果(MIC值)在MIC真实终点上下一个倍比稀释度内(即倍比稀释系列的 $\pm 1$ 个孔或管)是具有重现性的。

肉汤稀释法是一种向含浓度递增(通常是两倍)的抗菌剂的相同体积肉汤的一系列容器中接种已知数量微生物的技术。

肉汤微量稀释法指的是在微量稀释盘上进行的肉汤稀释试验。

本标准所描述的参考方法适用于酵母样真菌的纯培养物的检测。本标准所描述的肉汤微量稀释法与临床和实验室标准化研究院(CLSI)<sup>[1]</sup>以及欧洲抗菌剂敏感性试验委员会(EUCAST)<sup>[2]</sup>所用的方法实质上是等同的。这些方法显示给出的氟康唑MIC实际上也是相同的,如果不是完全一致,最大差异在2mg/L内<sup>[3]</sup>。用其他各种抗真菌剂所做的研究已经列入计划或进行中。希望使用本标准来进行新的抗真菌剂研究,或作为与诊断器械给出MIC结果相比较的参考方法的实验室,宜基于确定MIC读数结果是通过肉眼检查(CLSI方法),还是使用光度法(EUCAST方法)来选择使用哪个程序选项,在任何一种情况下所选程序的细节必须严格遵守。



# 临床实验室检测和体外诊断系统

## 感染性疾病相关酵母样真菌抗菌剂的

### 体外活性检测参考方法

**警告**——使用本标准可能涉及危险性材料、操作和设备。本标准无意陈述使用本标准所涉及的所有安全问题。使用本标准前,使用者有责任建立适当的安全和健康措施并确定法规限制的适用性。

## 1 范围

本标准描述了检测酵母样真菌抗真菌药物的敏感性的方法,包括引起感染的念珠菌属和新型隐球菌。这里描述的参考方法还未用于双相型真菌的酵母型菌研究,如皮炎芽生菌和/或荚膜组织胞浆菌荚膜变种。另外在检测丝状真菌(霉菌)标准化中涉及几个未在当前程序阐述的其他问题。丝状真菌肉汤稀释法抗真菌剂药敏试验参考方法已经制定。现在可使用的文件为 CLSI M38 和 EUCAST E.DEF 9.1<sup>[4-8]</sup>。

本标准描述的肉汤微量稀释参考法可通过两种途径之一实现,第一种途径通过肉眼确定 MIC (CLSI 方法)<sup>[1]</sup>,第二种途径通过光度法确定 MIC (EUCAST 方法)<sup>[2]</sup>。MIC 反映了在规定试验条件下药物的活性,并在考虑到其他因素下对临床管理目的进行解释,如药物的药理学或抗真菌耐药机制。MIC 结果解释可被分为“敏感”(S)、“剂量依赖性敏感”(S-DD)、“中介”(I)、“非敏感”(NS)或“耐药”(R)。另外 MIC 分布可用于确定野生型或非野生型真菌群落。MIC 值的临床解释不在本标准的范围。对应于 CLSI 方法和 EUCAST 衍生方法的解释性分类折点可查询相应机构提供的最新解释表<sup>[2,9]</sup>。推荐常规敏感性试验方法或诊断检验器械与此参考方法进行比较,以保证验证或注册时结果的可比性和可靠性。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 2.1

#### **抗真菌剂 antifungal agent**

一类可以抑制或杀死真菌,可用于抗感染治疗的生物来源的、半合成的或合成的物质。

注:消毒剂、灭菌剂和防腐剂不在此定义范围内。

### 2.2

#### **抗真菌剂-属性 antifungal agents-properties**

#### 2.2.1

##### **效价 potency**

受试物活性部分所占比例,通过生物分析方法与相同物质的参考品比较而确定。

注:效价可表达为受试物中组分以毫克每克(mg/g)的质量分数,或以国际单位每克(IU/g)的活性含量,或以体积分数或质量分数的百分含量或摩尔数每升的物质的量浓度。

#### 2.2.2

##### **浓度 concentration**

抗真菌剂在规定体积液体中的量。

注 1: 该浓度以毫克每升(mg/L)来表示。

注 2: 虽然  $\text{mg/L} = \mu\text{g/mL}$ , 但不推荐使用  $\mu\text{g/mL}$  作为单位。

## 2.3

### 原液 stock solutions

用于进一步稀释的初始溶液。

## 2.4

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

在规定的体外试验条件下、在规定的时间内, 能降低一定数量生长的最低浓度。

注: 最小抑菌浓度(MIC) 以  $\text{mg/L}$  表示。

## 2.5

### 折点 break points; BP

用于界定真菌临床类别是“敏感”“剂量依赖性敏感”“中介”“非敏感”和“耐药”的特定的 MIC 值。

注: 关于当前解释性折点值, 可参考制定本参考方法的机构的最新出版物(如 CLSI 和 EUCAST)<sup>[1,2,9]</sup>。

### 2.5.1

#### 肉眼判读法

#### 2.5.1.1

##### 敏感 susceptible; S

真菌菌株在体外可被某浓度抗真菌剂抑制, 该抗真菌剂的浓度治疗成功的可能性很高。

注 1: 真菌菌株在规定的表型测试系统中基于适当的折点被归类为敏感。

注 2: 该折点在特定情况下(例如药物常规使用剂量的改变、新的耐药机制的出现)可有改变。

#### 2.5.1.2

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

真菌菌株在体外可被某浓度抗真菌剂抑制, 通过使用超常规剂量, 该抗真菌剂的剂量方案可以安全使用情况下, 在体内达到该浓度时可以获得疗效。

注 1: 真菌菌株在规定的表型测试系统中基于适当的折点被归类为剂量依赖性敏感。

注 2: 此类别的敏感指的是受试菌株引起的感染能够通过该药物在患处的生理富集或可以使用更高剂量药物时, 可获得适当治疗。

注 3: 该折点在特定情况下(例如药物常规使用剂量的改变、新的耐药机制的出现)可有改变。

#### 2.5.1.3

##### 中介 intermediate; I

微生物的抗菌剂活性水平疗效不明确。

注: 这意味着由受试菌株导致的感染有可能通过该抗菌剂在患处的生理富集或使用更高剂量的该抗菌剂来获得适当的治疗, 该级别还提供了一个“缓冲区”, 从而避免了小的、不可控的技术因素所导致的重大的结果解释偏差。

#### 2.5.1.4

##### 非敏感 nonsusceptible; NS

用于目前只有敏感性解释类别, 但无剂量依赖性敏感、中介, 或耐药解释类别(即只有敏感性解释类别)的酵母样真菌的类别。

注: 此类别通常用于还没有遇到耐药分离株的新抗真菌剂。

#### 2.5.1.5

##### 耐药 resistance; R

真菌菌株在体外可被某浓度抗真菌剂抑制, 该抗真菌剂的浓度很可能治疗失败。

注 1: 真菌菌株在规定的表型测试系统中基于适当的折点被判定为耐药。

注 2: 该折点在特定情况下(例如药物常规使用剂量的改变、新的耐药机制的出现)可有改变。

## 2.5.2

**光度判读法**

## 2.5.2.1

**敏感 susceptible; S**

微生物的抗菌剂活性水平治疗成功可能性高。

## 2.5.2.2

**中介 intermediate; I**

微生物的抗菌剂活性水平的疗效不明确。

注：这意味着由受试菌株导致的感染有可能通过该抗菌剂在患处的生理富集或使用更高剂量的该抗菌剂来获得适当的治疗，该级别还提供了一个“缓冲区”，从而避免了小的、不可控的技术因素所导致的重大的结果解释偏差。

## 2.5.2.3

**耐药 resistance; R**

微生物的抗菌剂活性水平很可能治疗失败。

## 2.6

**野生型 wild type**

对某抗真菌剂没有获得性耐药机制的真菌菌株。

## 2.7

**参考菌株 reference strains**

有特定分类编号，具有稳定、确定的抗真菌剂敏感性表型和(或)基因型的特征明确的真菌菌株。

注：参考菌株是从菌种保藏机构获得可用于质量控制，其通常以储存培养物的形式进行保存，试验所用工作培养物来源于此。

## 2.8

**敏感性试验方法**

## 2.8.1

**肉汤稀释法 broth dilution**

一种容器中加入适当体积抗真菌溶液，该抗真菌剂浓度采用递增(通常两倍)增加，再加入适当体积的含一定接种量菌液肉汤的技术。

注：该方法的目的是确定 MIC 值。

## 2.8.2

**微量稀释法 microdilution**

在微量稀释盘中进行的肉汤稀释试验，每孔体积不超过 300  $\mu\text{L}$ 。

## 2.9

**肉汤 broth**

用于酵母样真菌体外生长的液体培养基。

## 2.10

**接种量 inoculum**

依据终体积计算出的酵母菌在悬液中的数量。

注：接种量以每毫升的菌落形成单位(CFU/mL)来表示。

## 2.11

**接种量效应 inoculum effect**

由接种量的改变所导致的 MIC 值的变化。

## 3 试验程序

## 3.1 概述

本试验是在塑料一次性微量稀释盘中进行的。该方法基于配制两倍浓度的抗真菌剂工作液，每孔

加抗真菌剂工作液体积 100  $\mu\text{L}$ , 接种量也以体积 100  $\mu\text{L}$  加入。

## 3.2 培养基

### 3.2.1 概述

应使用 RPMI-1640 肉汤(两种配方 RPMI-1640 葡萄糖肉汤的制备方法参见附录 A)。

### 3.2.2 肉眼判读法

RPMI-1640 培养基宜含 0.2% 葡萄糖。RPMI-1640 肉汤按一倍浓度配制并分配, 所含抗真菌剂稀释液为两倍浓度, 按相同体积加入含调整好接种量酵母菌悬液的 RPMI-1640 肉汤。

### 3.2.3 光度判读法

RPMI-1640 培养基宜含 2% 葡萄糖。RPMI-1640 肉汤和抗真菌剂均配制成两倍浓度, 随后加入含接种物的等体积灭菌蒸馏水。

## 3.3 抗真菌剂

### 3.3.1 概述

受试抗真菌剂应直接从制造商或通过可靠的商业来源获得, 但不能以临床使用的药物制剂作为受试物。所有抗真菌剂均应有批号、效价、失效日期及推荐的保存条件细节, 除非制造商另有推荐其他的保存条件, 受试物应保存于密闭容器中, 避光、-20  $^{\circ}\text{C}$ 、使用干燥剂。吸湿剂宜分装成小份, 在每次试验情况下使用其中之一。

为避免受试物凝结水分并损失效价, 在打开装有受试物的容器之前, 应将其恢复至室温。

### 3.3.2 原液的配制

抗真菌剂必须用校准过的分析天平称量。配制抗真菌剂标准溶液时, 应根据受试物干粉的效价, 通过式(1)和式(2)计算出所需抗真菌剂受试物的质量或稀释溶剂的体积:

$$m = \frac{V \times \rho}{P} \dots\dots\dots (1)$$

$$V = \frac{m \times P}{\rho} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$\rho$  ——原液的浓度, 单位为毫克每升(mg/L);

$m$  ——抗真菌剂(干粉)的质量, 单位为克(g);

$P$  ——抗真菌剂(干粉)的效价, 单位为毫克每克(mg/g);

$V$  ——稀释剂的体积, 单位为升(L)。

虽然某些抗真菌剂的溶解度是个限制因素, 但抗真菌剂原液的浓度至少应为 1 000 mg/L。原液的实际配制浓度取决于工作液的配制方法(系列稀释)。某些抗真菌剂需要用备选的溶剂来溶解(见表 1)。配好的抗菌剂溶液通常不必进行灭菌。如果必要, 应采用膜过滤除菌, 但除菌前后的样品应通过分析进行比较, 以确保抗真菌剂样品在除菌过程中未发生吸附损失。

除非原液有在特定储存条件下的稳定性信息, 所有每个实验批都应新鲜配制。

表 1 抗真菌剂原液的制备所需的溶剂和稀释剂

抗真菌剂	溶剂 (最高浓度和中间溶液)	稀释剂
两性霉素 B (Amphotericin B)	二甲基亚砷 <sup>a</sup>	培养基
阿尼芬净 (Anidulafungin)	二甲基亚砷 <sup>a</sup>	培养基
卡泊芬净 (Caspofungin)	二甲基亚砷 <sup>a</sup>	培养基
氟胞嘧啶 (Flucytosine)	水	培养基
氟康唑 (Fluconazole)	水或二甲基亚砷,按厂家说明	培养基
伊曲康唑 (Itraconazole)	二甲基亚砷 <sup>a</sup>	培养基
酮康唑 (Ketoconazole)	二甲基亚砷 <sup>a</sup>	培养基
米卡芬净 (Micafungin)	二甲基亚砷 <sup>a</sup>	培养基
泊沙康唑 (Posaconazole)	二甲基亚砷 <sup>a</sup>	培养基
里氟康唑 (Ravuconazole)	二甲基亚砷 <sup>a</sup>	培养基
伏立康唑 (Voriconazole)	二甲基亚砷 <sup>a</sup>	培养基
<sup>a</sup> 二甲基亚砷(DMSO)有潜在毒性。		

### 3.3.3 工作液的配制

试验用抗真菌剂工作液浓度区间的选择取决于微生物和抗真菌剂。所选浓度区间对于相应的参考菌株来说,应能够确定所有可能得出的终点 MIC 值。倍比稀释系列以 1 mg/L 为中心浓度,用 RPMI-1640 葡萄糖肉汤配制,宜遵从表 2 和表 3 所述程序,已知其能够可靠地形成满意的稀释系列,除非替代方法经过仔细验证,例如某小组工作已报道系列稀释更亲水性化合物可给出可接受结果<sup>[10]</sup>。除非抗真菌剂溶液有来自厂家在指定储存条件下的稳定性信息,所有工作液均宜当天配制,当天使用。

表 2 肉汤稀释法敏感性试验中水溶性抗真菌剂稀释系列的制备方案

抗真菌剂溶液										
步骤	浓度 mg/L	源	体积 mL	+	培养基 mL	=	中间浓度 mg/L	=	1 : 10 终浓度 mg/L	Log <sub>2</sub>
1	5 120	原液	1.0		3.0		1 280		128	7
2	5 120	原液	1.0		7.0		640		64	6
3	640	步骤 2	1.0		1.0		320		32	5
4	640	步骤 2	1.0		3.0		160		16	4
5	160	步骤 4	1.0		1.0		80		8	3
6	160	步骤 4	0.5		1.5		40		4	2
7	160	步骤 4	0.5		3.5		20		2	1
8	20	步骤 7	1.0		1.0		10		1	0
9	20	步骤 7	0.5		1.5		5		0.5	-1
10	20	步骤 7	0.5		3.5		2.5		0.25	-2
11	2.5	步骤 10	1.0		1.0		1.25		0.125	-3
12	2.5	步骤 10	0.5		1.5		0.625		0.062 5	-4
13	2.5	步骤 10	0.5		3.5		0.312 5		0.031 25	-5

表 3 肉汤稀释法敏感性试验中水不溶性抗真菌剂稀释系列的制备方案

抗真菌剂溶液										
步骤	浓度 mg/L	源	体积 mL	+	溶剂(如 DMSO)* mL	=	中间浓度 mg/L	=	1 : 100 终浓度 mg/L	Log <sub>2</sub>
1	1 600	原液					1 600		16.0	4
2	1 600	原液	0.5		0.5		800		8.0	3
3	1 600	原液	0.5		1.5		400		4.0	2
4	1 600	原液	0.5		3.5		200		2.0	1
5	200	步骤 4	0.5		0.5		100		1.0	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

\* 二甲基亚砷。

### 3.3.4 肉眼判读测试肉汤微量稀释盘的制备

圆底 96 孔一次性塑料微量稀释盘每行 10 孔中每孔加入工作液 100  $\mu\text{L}$ , 抗真菌剂浓度为最终所需浓度的 2 倍。

至少每行应保留一个加入 100  $\mu\text{L}$  不含抗菌剂的培养基的孔以作为每株试验菌的生长对照。同样, 每个测试菌株还应设置一个只加入 200  $\mu\text{L}$  无抗真菌剂培养基作为未接种的阴性对照孔。

### 3.3.5 光度判读测试微量稀释盘的制备

平底 96 孔一次性塑料微量稀释盘每孔加入工作液 100  $\mu\text{L}$ , 在此 2 倍浓度培养基中, 抗真菌剂浓度也是最终所需浓度的 2 倍。

至少每行应保留一个加入 100  $\mu\text{L}$  不含抗真菌剂培养基的孔以作为每株试验菌的生长对照。同样, 每个测试菌株还应设置一个只加入 200  $\mu\text{L}$  无抗真菌剂培养基作为未接种的阴性对照孔。

## 3.4 微量稀释盘的储存

充装好的微量稀释盘可以立即使用, 也可以放在密封塑料袋中迅速冷冻储存 (CLSI 法, 肉眼判读:  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  最多 6 个月; EUCAST 法, 光度判读:  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  或更低最多 6 个月, 或  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  不超过 1 个月)。允许的储存期取决于药物制造商对每个化合物的说明以及可接受质控范围的符合性。稀释盘不应存放于可自动除霜的冰箱里, 融化的抗真菌剂溶液不应被再复冻, 因为反复冻融可加速某些抗真菌剂的降解。

## 3.5 接种菌液的制备

### 3.5.1 概述

接种量的标准化对于肉汤稀释法敏感性试验结果的准确性和可重现性是非常关键的, 因此, 每个分离菌株都应转种到非抑制性琼脂培养基以确保纯度和活力。

### 3.5.2 肉眼判读接种物制备

挑取 5 个约 1 mm 直径的菌落来制备接种物, 念珠菌属取 20 h $\pm$ 2 h 的培养物或新型隐球菌取 46 h $\pm$ 2 h 的培养物。菌落应悬浮于 5 mL 0.85% 生理盐水或灭菌水。注意新型隐球菌生长速率慢, 新型隐球菌最适生长温度为 30  $^{\circ}\text{C}$ 。

所得悬液应涡旋混匀 15 s, 通过加足够的灭菌生理盐水或灭菌水用光度计调整细胞密度达到相当于 530 nm 波长 0.5 麦氏标准 (McFarland standard, 参见附录 B) 产生的光密度, 此过程产生的酵母菌悬液的最终浓度为  $10^6\text{ CFU/mL}$ ~ $5\times 10^6\text{ CFU/mL}$ 。

用涡旋混合器混合已调整好的酵母菌悬液, 用合适配方的 RPMI-1640 肉汤培养基 1:50 稀释, 然后再用培养基 1:20 稀释, 得到 2 倍浓度最终测试接种量 ( $10^3\text{ CFU/mL}$ ~ $5\times 10^3\text{ CFU/mL}$ )。当各微孔接种 100  $\mu\text{L}$  接种量时, 该接种量 (2 倍浓度) 1:1 稀释, 最终得到期望的最终接种量为  $0.5\times 10^3\text{ CFU/mL}$ ~ $2.5\times 10^3\text{ CFU/mL}$ 。

### 3.5.3 光度判读接种物制备

挑取 5 个约 1 mm 直径的菌落来制备接种物, 念珠菌属取 18 h~24 h 的培养物或新型隐球菌取 46 h $\pm$ 2 h 的培养物。菌落应悬浮于 5 mL 灭菌蒸馏水。

所得悬液应涡旋混匀 15 s, 通过加足够的灭菌生理盐水或灭菌水用光度计调整细胞密度达到相当于 530 nm 波长 0.5 麦氏标准 (McFarland standard, 参见附录 B) 产生的光密度, 此过程产生的酵母菌悬

液的最最终浓度为  $10^6$  CFU/mL $\sim 5 \times 10^6$  CFU/mL。

用涡旋混合器混合已调整好的酵母菌悬液,用灭菌蒸馏水 1:10 稀释,得到 2 倍浓度测试接种量 ( $10^5$  CFU/mL $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL)。当各微孔接种该 100  $\mu$ L 接种量时,该接种量(2 倍浓度) 1:1 稀释,最终得到期望的最终接种浓度  $0.5 \times 10^5$  CFU/mL $\sim 2.5 \times 10^5$  CFU/mL。

### 3.6 微量稀释盘的接种

为了保持活细胞数浓度,接种菌悬液标准化后应在 30 min 内接种至微量稀释盘上。对于肉汤中含稀释抗真菌剂 100  $\mu$ L 的各孔(见 3.5.2 和 3.5.3),每孔加入 100  $\mu$ L 酵母菌悬液。

应定期对微量稀释盘的阳性对照孔进行活菌计数,以确保测试孔包含基于方法所用 MIC 读数的适当 CFU。具体即:稀释盘接种完成后迅速从生长对照孔中取 10  $\mu$ L,并用 1 mL 的肉汤或生理盐水稀释(对于肉眼判读方法)或 2 mL 灭菌蒸馏水稀释(对于光度判读方法),再取此稀释悬液 100  $\mu$ L 涂布到适宜的琼脂平板表面,过夜孵育后进行菌落计数,可接受菌悬液菌落数量应在 5 $\sim 125$ \*。

### 3.7 微量稀释盘的孵育

#### 3.7.1 概述

接种好的微量稀释盘在孵育之前应密封于聚乙烯袋中或用密封盖盖好,或用其他方法防止失水浓缩。为防止孵育不均匀,稀释盘叠放时高度不宜超过 5 块。

对于多数抗真菌剂-酵母菌组合,微量稀释盘应在  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  的大气环境中孵育  $22\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。某些隐球菌分离株可能生长不充分除非孵育温度降低到  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

#### 3.7.2 肉眼判读法

基于酵母菌属和测试的抗真菌剂,孵育时间会有变化。很多测试在 24 h 孵育后可以读数,具体孵育时间参见附录 C。这些信息的最新更新请参考 CLSI 文件 M27 的当前版本。

#### 3.7.3 光度判读法

如果阳性质控孔吸光度 $\geq 0.2$ ,应在  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$  读数后进行 MIC 判定。如果阳性质控吸光度 $< 0.2$ ,试验应再孵育 12 h $\sim 24\text{ h}$ ,48 h 后吸光度不能达到 0.2 表明试验失败。

### 3.8 MIC 结果读取

#### 3.8.1 概述

只有当受试微生物有充分生长(即阳性生长对照孔底部出现明显沉淀或可接受浊度/吸光度)、未接种的或阴性生长对照孔(如有)没有生长、接种菌液纯度已确立,才可进行结果判读。

#### 3.8.2 肉眼判读方法

某些抗真菌药和某些分离株,可能发生拖尾生长(在一定范围的抗真菌剂浓度下部分抑制)。据估计在氟康唑对 5%左右的分离株会发生此现象<sup>[11]</sup>。这种拖尾生长使得一个分离株 24 h 后看起来敏感,如果做了 48 h,读数则看起来完全耐药,由于此原因,最好进行 24 h 读数。

对于肉眼判定 MIC,应使用反光镜读取装置从底部一面检查微量板的各孔。可以证实读取终点前

---

\* 对于肉眼判读方法,从生长对照孔中取 100  $\mu$ L 直接涂布到适宜的琼脂平板表面孵育后计数可能是比较合理的。100  $\mu$ L 的理论菌落数量为 50 $\sim 250$ 。光度判读方法中按照上述试验方法取样计数的理论菌落数量为 25 $\sim 125$ 。



轻轻摇动微量盘中的生长物有所帮助。对于氟胞嘧啶、唑类药物、棘白菌素类药物,将孔中生长量和阳性生长对照比较,MIC 记录为该药物相比于对照显著抑制(至少 50%)生长的最低浓度。对于两性霉素 B,MIC 是能够完全抑制生长的浓度。

3.8.3 光度判读方法

对于光度法测定 MIC,微量稀释板通过微量稀释板读数仪,用 405 nm~530 nm 的波长读取。培养基对照孔的背景读数宜从其他各孔读数中减掉。对于氟胞嘧啶、唑类药物、棘白菌素类药物,MIC 记录为该药物相比于对照显著抑制(至少 50%)生长的最低浓度。对于两性霉素 B,MIC 是相比于对照能够抑制 90%以上生长的浓度。

3.9 MIC 值的解释

本标准任何一种途径给出 MIC 结果的临床解释应依据相应标准机构对该试验方法形成基础的最新认可的折点。因此抗真菌剂 MIC 通过肉眼确定 MIC 的途径宜基于 CLSI 最新出版指南(www.CLSI.org)<sup>[1,7]</sup>,通过光度法确定 MIC 途径宜使用来自 EUCAST 最新折点解释(www.EUCAST.org)<sup>[2]</sup>。

4 质量控制(QC)

试验结果的质量应通过伴随使用的质控菌株(见表 4 和表 5)来监测。储存质控菌株应冻干或冷冻保存(肉眼判读法-70 ℃保存,光度判断法-60 ℃保存)。质控菌株的工作培养物可通过储存菌株在非抑制性琼脂培养基上转种培养获得。工作培养物只能从第一代工作培养物传代,定期用从冷冻供应中制备新的斜面培养,至少每两周进行一次。如可能,每个测定日宜至少选取两株相关类型的质控菌株和日常标本按同样方式试验,且各质控菌株对各抗真菌剂的 MIC 检测结果应在表 4 和表 5 规定的范围内<sup>[2,7]</sup>。如果遇到超出质控值,宜首先重复试验以确定程序的关键步骤是否很好控制。如果还继续观察到失控值,应认真检查程序的所有方面,并且下一步的参考测试应暂停,直到质控值再回到正确的范围。

表 4 肉眼判读肉汤微量稀释试验两个质控菌株的 24 h 和 48 hMIC 推荐限值<sup>[12,13]</sup>

微量稀释法试验肉眼判读 MIC 范围/(mg/L)							
微生物	抗真菌剂	24 h 范围方式		在范围内 百分数/%	48 h 范围方式		在范围内 百分数/%
近平滑念珠菌 ATCC 22019	两性霉素 B (Amphotericin B)	0.25~2.0	0.5	97.1	0.5~4.0	2.0	91.7
	阿尼芬净 (Anidulafungin)	0.25~2.0	1.0	95.0	0.5~2.0	1.0	95.0
	卡泊芬净 (Caspofungin)	0.25~1.0	0.5	96.7	0.5~4.0	1.0	92.9
	氟胞嘧啶 (Flucytosine) (5-FC)	0.06~0.25	0.12	99.2	0.12~0.5	0.25	97.9
	氟康唑 (Fluconazole)	0.5~4.0	2.0	98.2	1.0~4.0	2.0	98.1

表 4 (续)

微量稀释法试验肉眼判读 MIC 范围/(mg/L)							
微生物	抗真菌剂	24 h 范围方式		在范围内 百分数/%	48 h 范围方式		在范围内 百分数/%
近平滑念珠菌 ATCC 22019	伊曲康唑 (Itraconazole)	0.12~0.5	0.25	95.8	0.12~0.5	0.25	97.5
	酮康唑 (Ketoconazole)	0.03~0.25	0.06/0.12	97.5	0.06~0.5	0.12	98.3
	米卡芬净 (Micafungin)	0.5~2	1	100.0	0.5~4.0	1	100.0
	泊沙康唑 (Posaconazole)	0.06~0.25	0.12	96.7	0.06~0.25	0.12	98.8
	里氟康唑 (Ravuconazole)	0.016~0.12	0.06	95.8	0.03~0.25	0.06	98.3
	伏立康唑 (Voriconazole)	0.016~0.12	0.06	100.0	0.03~0.25	0.06	100.0
东方伊萨酵母 (克柔念珠菌) ATCC 6258	两性霉素 B (Amphotericin B)	0.5~2.0	1.0	100.0	1.0~4.0	2.0	100.0
	阿尼芬净 (Anidulafungin)	0.03~0.12	0.06	97.9	0.03~0.12	0.06	97.5
	卡泊芬净 (Caspofungin)	0.12~1.0	0.5	98.8	0.25~1.0	0.5	97.5
	氟胞嘧啶 (Flucytosine)(5-FC)	4.0~16	8.0	97.5	8.0~32	16	99.6
	氟康唑 (Fluconazole)	8.0~64	16	100.0	16~128	32	100.0
	伊曲康唑 (Itraconazole)	0.12~1.0	0.5	95.8	0.25~1.0	0.5	100.0
	酮康唑 (Ketoconazole)	0.12~1.0	0.5	95.4	0.25~1.0	0.5	99.6
	米卡芬净 (Micafungin)	0.12~0.5	0.25	99.6	0.12~0.5	0.25	99.0
	泊沙康唑 (Posaconazole)	0.06~0.5	0.25	100.0	0.12~1.0	0.5	99.6
	里氟康唑 (Ravuconazole)	0.06~0.5	0.25	93.3	0.25~1.0	0.5	100.0

表 4 (续)

微量稀释法试验肉眼判读 MIC 范围/(mg/L)							
微生物	抗真菌剂	24 h 范围方式		在范围内 百分数/%	48 h 范围方式		在范围内 百分数/%
东方伊萨酵母 (克柔念珠菌) ATCC 6258	伏立康唑 (Voriconazole)	0.06~0.5	0.25	98.3	0.12~1.0	0.5	100.0
注 1: ATCC 是 American Type Culture Collection(美国典型菌种保藏中心)注册商标。 注 2: 数据复印得到美国微生物学会及作者许可。							

表 5 光度判读肉汤微量稀释试验质控菌株的 MIC 推荐限值<sup>[2,14]</sup>

微生物	抗真菌剂	MIC 范围/(mg/L)
近平滑念珠菌 ATCC 22019	两性霉素 B (Amphotericin B)	0.12~1.0
	阿尼芬净 (Anidulafungin)	0.25~1.0
	卡泊芬净 (Caspofungin)	NA
	氟胞嘧啶 (Flucytosine) (5-FC)	0.12~0.5
	氟康唑 (Fluconazole)	0.5~2.0
	伊曲康唑 (Itraconazole)	0.03~0.12
	米卡芬净 (Micafungin)	NA
	泊沙康唑 (Posaconazole)	0.015~0.06
	伏立康唑 (Voriconazole)	0.015~0.06
东方伊萨酵母 (克柔念珠菌) ATCC 6258	两性霉素 B (Amphotericin B)	0.12~1.0
	阿尼芬净 (Anidulafungin)	≤0.06
	卡泊芬净 (Caspofungin)	NA
	氟胞嘧啶 (Flucytosine) (5-FC)	1.0~4.0
	氟康唑 (Fluconazole)	16.0~64.0
	伊曲康唑 (Itraconazole)	0.03~0.12
	米卡芬净 (Micafungin)	NA
	泊沙康唑 (Posaconazole)	0.015~0.06
	伏立康唑 (Voriconazole)	0.03~0.25
白色念珠菌 CL-CNM* F 8555	两性霉素 B (Amphotericin B)	0.06~0.5
	阿尼芬净 (Anidulafungin)	NA
	卡泊芬净 (Caspofungin)	NA
	氟胞嘧啶 (Flucytosine) (5-FC)	0.06~0.25
	氟康唑 (Fluconazole)	32.0~128.0

表 5 (续)

微生物	抗真菌剂	MIC 范围/(mg/L)
白色念珠菌 CL-CNM <sup>a</sup> F 8555	伊曲康唑(Itraconazole)	0.25~1.0
	米卡芬净(Micafungin)	NA
	泊沙康唑(Posaconazole)	0.12~0.5
	伏立康唑(Voriconazole)	0.5~2.0
东方伊萨酵母(克柔念珠菌) CL-CNM <sup>a</sup> CL3403	两性霉素 B (Amphotericin B)	0.25~1.0
	阿尼芬净(Anidulafungin)	NA
	卡泊芬净(Caspofungin)	NA
	氟胞嘧啶(Flucytosine)(5-FC)	2.0~8.0
	氟康唑(Fluconazole)	16.0~64.0
	伊曲康唑(Itraconazole)	0.12~0.5
	米卡芬净(Micafungin)	NA
	泊沙康唑(Posaconazole)	0.06~0.25
	伏立康唑(Voriconazole)	0.12~0.5
注 1: ATCC 是 American Type Culture Collection(美国典型菌种保藏中心)注册商标。		
注 2: NA 表示“不能获得”。		
<sup>a</sup> 西班牙国家微生物中心酵母菌菌种。		

附 录 A  
(资料性附录)  
RPMI-1640 培养基

A.1 概述

以 0.165 mol/L MOPS 缓冲的 RPMI-1640 培养基, 1 L。  
10.4 g RPMI-1640 干粉培养基 (含谷氨酰胺和酚红, 无碳酸氢盐)。  
34.53 g MOPS [3-N-3-(N-吗啡啉)丙磺酸]缓冲剂。  
溶解干粉培养基于 900 mL 蒸馏水, 加 MOPS (终浓度 0.165 mol/L) 并搅拌至溶解。边搅拌, 边用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 到 7.0(25 ℃)。加水使培养基终体积至 1 L。过滤除菌并贮存于 4 ℃至使用。

表 A.1 RPMI-1640 培养基 (含谷氨酰胺和酚红, 无碳酸氢盐)成分

成分	g/L 水
L-精氨酸(游离碱)	0.200
L-天冬酰胺(无水)	0.050
L-天冬氨酸	0.020
L-胱氨酸·2HCl	0.065 2
L-谷氨酸	0.020
L-谷氨酰胺	0.300
甘氨酸	0.010
L-组氨酸(游离碱)	0.015
L-羟脯氨酸	0.020
L-异亮氨酸	0.050
L-亮氨酸	0.050
L-赖氨酸·HCl	0.040
L-甲硫氨酸	0.015
L-苯丙氨酸	0.015
L-脯氨酸	0.020
L-丝氨酸	0.030
L-苏氨酸	0.020
L-色氨酸	0.005
L-酪氨酸·2Na	0.028 83
L-缬氨酸	0.020
生物素	0.000 2
D-泛酸	0.000 25

表 A.1 (续)

成分	g/L 水
氯化胆碱	0.003
叶酸	0.001
肌醇	0.035
烟酰胺	0.001
PABA(对氨基苯甲酸)	0.001
盐酸吡哆辛	0.001
核黄素	0.000 2
盐酸硫胺	0.001
维生素 B <sub>12</sub>	0.000 005
硝酸钙 $xH_2O$	0.100
氯化钾	0.400
硫酸镁(无水)	0.048 84
氯化钠	6.000
磷酸氢二钠(无水)	0.800
D-葡萄糖(CLSI 法-肉眼判读)	2.000
D-葡萄糖(EUCAST 法-光度判读)	20.00
还原型谷胱甘肽	0.001
酚红钠	0.005 3

表 A.2 含 2%葡萄糖 RPMI-1640 培养基成分

成分	1×浓度	2×浓度
蒸馏水	900 mL	900 mL
RPMI-1640 <sup>a</sup>	10.4 g	20.8 g
MOPS <sup>b</sup>	34.53 g	69.06 g
葡萄糖	18 g	36 g
<sup>a</sup> 见表 1。 <sup>b</sup> 3-N-3-(N-吗啡啉)丙磺酸。		

## A.2 附录 A 参考文献

- a) Clinical and Laboratory Standards Institute (2008).Reference Method for Broth Dilution An-

- tifungal Susceptibility Testing of Yeasts;3rd Informational Supplement.M27-S3.Wayne,PA.
- b) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2007), EUCAST Definitive Document EDef 7.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts.Clinl Microbiol Infect;14;398-405,2008.

## 附 录 B

### (资料性附录)

#### 0.5 麦氏硫酸钡浊度标准

为了标准化接种密度,使用  $\text{BaSO}_4$  浊度标准[0.5 麦氏(McFarland)标准]。

程序步骤如下:

- a) 通过加 0.5 mL 0.048 mol/L  $\text{BaCl}_2$  [1.175% (质量浓度)  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ] 到 99.5 mL 0.18 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (体积分数 1%) 中制备此浊度标准。
- b) 用分光光度计、用 1 cm 光径和匹配的比色杯测定浊度标准吸光度来验证其光密度正确性。0.5 麦氏标准在 625 nm 吸光度宜在 0.08~0.13。
- c) 分装 4 mL~6 mL 到用于生长或稀释肉汤培养接种物的相同规格螺口管中。
- d) 密封这些管子并室温下暗处储存。
- e) 临用前在机械涡旋混合器上强力摇匀此浊度标准。
- f) 制备后 3 个月替换或检查其光密度。



**附 录 C**  
**(资料性附录)**

**肉眼 MIC 判读程序 MIC 解释的可接受判读时间**

成分	如生长充分 MIC 判读可接受时间	
	24 h	48 h
两性霉素 B (Amphotericin B)	是	是
棘白菌素 (Echinocandins)	是	否
氟康唑 (Fluconazole)	是	是 <sup>a</sup>
氟胞嘧啶 (Flucytosine)	是	是
伊曲康唑 (Itraconazole)	否	是
泊沙康唑 (Posaconazole)	否	是
里氟康唑 (Ravuconazole)	否	是
伏立康唑 (Voriconazole)	否	是
<sup>a</sup> 关于 24 h 和 48 h 判读差异的讨论见 3.8.1。		

## 参 考 文 献

- [1] CLSI M27-A3, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Third Edition; Approved Standard. CLSI; Wayne, PA., 2008.
- [2] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2007), EUCAST Definitive Document EDef 7.1; Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Clin Microbiol Infect; 14: 398-405, 2008.
- [3] Rodriguez-Tudella J.L., Donnelly J.P., Pfaller M.A., Chryssantou E., Warn P., Denning D.W. et al. Statistical analysis of correlation between fluconazole MICs for *Candida* spp. assessed by standard methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E. Dis 7.1) and CLSI (M27-A2). J. Clin. Microbiol. 2007, 45 (1) pp. 109-111.
- [4] CLSI M38-A2, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, Second Edition; Approved Standard. CLSI; Wayne, PA., 2008.
- [5] Espinel-Ingroff A., Dawson K., Pfaller M. et al. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. Antimicrob. Agents Chemother. 1995, 39 pp. 314-319.
- [6] Espinel-Ingroff A., Bartlett M., Bowden R. et al. Multicenter evaluation of proposed standardization procedure for antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. J. Clin. Microbiol. 1997, 35 pp. 139-143.
- [7] Rodriguez Tudela J.L., Donnelly J.P., Arendrup M.C., Arikian S., Barcenas F., Bille J. et al. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. Clin. Microbiol. Infect. 2008 Oct, 14 (10) pp. 982-984.
- [8] Cuenca-Estrella M., Arendrup M.C., Chryssanthou E., Dannaoui E., Lass-Flörl C., Sandven P. et al. the AFST Subcommittee of EUCAST. Multicenter Determination of Quality Control Strains and Quality Control Ranges for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and Filamentous Fungi Using the Methods of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). Clin. Microbiol. Infect. 2007, 13 (10) pp. 1018-1022.
- [9] CLSI M27-S3, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Third Informational Supplement. CLSI; Wayne, PA., 2008.
- [10] Lopez A.G., Arendrup M.C., Lass-Flörl C., Rodriguez-Tudela J.-L., Cuenca-Estrella M. Multicenter Comparison of the ISO Standard 20776-1 and the Serial 2-Fold Dilution Procedures to Dilute Hydrophilic and Hydrophobic Antifungal Agents for Susceptibility Testing. J. Clin. Microbiol. 2010 May, 48 (5) pp. 1918-1920.
- [11] Arthington-Skaggs B.A., Warnock D.W., Morrison C.J. Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between in vitro antifungal susceptibility test results and in vivo outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. Antimicrob. Agents Chemother. 2000, 44 pp. 2081-2085.
- [12] Al B. et al. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests for ten antifungal agents. J. Clin. Microbiol. 2000, 38 pp. 3457-3459.
- [13] Krisher K. et al. Quality control parameters for broth microdilution tests of anidulafungin. J.

Clin. Microbiol. 2004, 42 p. 490.

[14] Arendrup MC, & Cuenca-Estrella M Hope W and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Definitive Document E. DEF 7.2: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. February 2012.

---