

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 421—2024

代替 WS/T 421—2013

抗酵母样真菌药物敏感试验标准 肉汤稀释法

Standards for antifungal susceptibility testing of yeasts
—Broth dilution method

2024 - 04 - 02 发布

2024 - 09 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 抗真菌药物的配制	2
5 培养基的配制	4
6 肉汤稀释法操作步骤	4
7 结果判读与解释	5
8 质量控制	8
附录 A（资料性） RPMI-1640 肉汤培养基配制方法	10
附录 B（规范性） 肉汤稀释法质控菌株 MIC 范围	12
附录 C（规范性） 酵母样真菌药敏试验可用的折点和/或 ECV 汇总表	15
附录 D（规范性） 体外微量肉汤稀释法 MIC 折点和 ECV	16
附录 E（规范性） EUCAST 微量肉汤稀释法质控范围、折点和 ECOFF 值	23
参考文献	28

前 言

本标准为你推荐性标准。

本标准代替 WS/T 421—2013《抗酵母样真菌药物敏感性试验—肉汤稀释法》，与 WS/T 421—2013 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了术语和定义中“流行病学界值”、“野生型”、“非野生型”和“拖尾生长”，删除了“非敏感”（见 3.8、3.9、3.10、3.12，2013 年版的 2.8）；
- 抗真菌药物储存液使用的溶剂、稀释液和检测范围表格增加了瑞扎芬净、艾瑞芬净、Manogepix、艾沙康唑、酮康唑、雷夫康唑（见 4.3.2）；
- 更改了结果解释内容：按 CLSI（Clinical and Laboratory Standard Institute）有折点的念珠菌属、无折点的念珠菌属、暂定折点的耳念珠菌、无折点的隐球菌属及有折点和流行病学界值（CLSI 表述：epidemiological cutoff value, ECV）的念珠菌属分别进行说明，并在附录 D 分别列表；增加了对抗真菌药物的具体说明；CLSI 和 EUCAST 的肉汤稀释法步骤基本一致，对有差异部分在文中相应部分给予了说明，包括增加了 EUCAST（The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing）折点和流行病学界值（EUCAST 表述：epidemiological cutoff, ECOFF）结果解释并在附录 E 列出试验条件、质控范围、折点、ECOFF 值等表格（见 7.2，2013 年版的 5.5）；
- 增加了结果报告方式，CLSI 及 EUCAST 两种药敏方法相应的结果报告方式（见 7.4）；
- 删除了质量控制中质控频率和检测频率内容，增加了：按培养基和材料质控、纯度质控、终点判读和质控；日常使用质控菌株的复苏方法（见 2013 年版的 7.3，见 8.2、8.3、8.4、8.5.3）；
- 更改了附录 A 为相关培养基配制表格，附录 B 为质控 MIC 范围，附录 C 为酵母样真菌的折点和 ECV 值汇总等（见附录 A、附录 B、附录 C，见 2013 年版的附录 A、附录 B、附录 C）。

本标准由国家卫生健康标准委员会临床检验标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由国家卫生健康委医疗管理服务指导中心负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委员会医政司负责业务管理、法规司负责统筹管理。

本标准起草单位：北京医院/国家卫生健康委临床检验中心、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、华中科技大学同济医学院附属同济医院、上海市东方医院（同济大学附属东方医院）、北京大学第一医院、解放军总医院第一医学中心。

本标准主要起草人：胡继红、王辉、苏建荣、胡云建、徐英春、孙自镛、吴文娟、李若瑜、沈定霞、骈亚亚。

本标准于 2013 年首次发布，本次为第一次修订。

抗酵母样真菌药物敏感试验标准 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低抑菌浓度（Minimal Inhibitory Concentration, MIC）的参考方法，并推荐了与本参考方法结果具有良好一致性的微量肉汤稀释方法（Broth Microdilution method）。

本标准适用于引起感染的酵母样真菌（包括念珠菌属某些种 *Candida* spp. 和隐球菌属某些种 *Cryptococcus* spp.）的药物敏感性试验，并推荐了某些相关抗真菌药物的肉汤稀释试验的最低抑菌浓度（MIC）质控参考范围、折点、结果解释性分类和流行病学界值。

本标准不适用于双相真菌如皮炎芽生菌 *Blastomyces dermatitidis*、荚膜组织胞浆菌 *Histoplasma capsulatum* 及丝状真菌的检测。

2 规范性引用文件

本标准没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

最低抑菌浓度 minimal inhibitory concentration; MIC

肉汤稀释法中，抗真菌药物能抑制微生物生长的最低浓度。本标准使用评分确定MIC值。

3.2

折点 breakpoint; BP

用于区分菌株为敏感、剂量依赖性敏感、中介、耐药的最低抑菌浓度（MIC）或抑菌圈直径数值。

折点系综合微生物学特征、药代动力学-药效学（Pharmacokinetics-pharmacodynamics, PK/PD）参数、临床疗效数据而得出，还可随特定的感染部位、常规药物剂量、给药途径及频次等的变化而不同。

3.3

解释性分类 interpretive category

结果解释性分类源于可获得的微生物特性、药代动力学-药效学（PK/PD）参数和临床疗效结果数据。根据建立的折点将药敏结果所得的MIC值进行敏感、剂量依赖性敏感、中介、耐药解释分类。

3.4

敏感 susceptible; S

此浓度的抗真菌药物在体外试验中能抑制真菌生长，当使用推荐剂量时，可能获得良好的临床疗效。

3.5

剂量依赖性敏感 susceptible-dose dependent; SDD

指分离株的敏感性依赖于对患者的用药方案，即对于药敏结果在SDD范围内的分离株，为了使血药浓度达到临床疗效，采用较高剂量和/或增加用药频率的给药方案，使药物暴露高于常用敏感折点的剂量。

3.6

中介 intermediate; I

中介菌株的药物浓度通常可达到常规用药时血液和组织中的药物浓度水平，但反应率可能低于敏感株，不能明确划分为“敏感”或“耐药”。在体外可抑制真菌的生长，但不能确定此浓度的临床疗效。如在机体生理浓集部位或高于正常剂量用药可获得临床疗效。此外，还可作为检测方法固有变异的缓冲区间，以防止微小的、不可控的技术因素导致较严重的错误结果，特别是毒性范围窄的药物。

3.7

耐药 resistant; R

当使用推荐剂量时在临床治疗中很有可能失败。

3.8

流行病学界值 epidemiological cutoff value; ECV/ epidemiological cutoff; ECOFF

基于菌株MIC值，将微生物群归类为是否含有获得性耐药和/或突变耐药表型的两个群体（野生型和非野生型）。ECV定义了菌株野生型菌群药物敏感性的上限值（最大MIC值）。

3.9

野生型 wild-type; WT

ECV将分离菌株归类为对某种检测的抗菌药物无获得性耐药机制或无敏感性降低的生物型。

3.10

非野生型 non-wild-type; NWT

ECV将分离菌株归类为对某种检测的抗菌药物具有推测的/已知获得性耐药机制或敏感性降低的生物型。

3.11

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、μg/mg、IU/g，或用百分比表示。

3.12

拖尾生长 trailing growth

在结果读取时间内，随着培养时间的延长，在一定浓度范围内菌量减少但仍有少量菌持续生长的现象。

3.13

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。

4 抗真菌药物的配制**4.1 抗真菌药物标准品或参考品**

抗真菌药物使用标准品或参考品。使用有效期内的标准品，按说明书推荐的条件下储存。当把药物从低温环境中取出时，需恢复到室温后再开瓶。

4.2 称量药物

可使用式（1）、式（2）计算药物重量及稀释液体积：

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

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

式中：

- m ——药物的重量，单位为毫克（mg）；
 ρ ——药物的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；
 τ ——药物的效价，单位为微克每毫克（μg/mg）；
 V ——药物的浓度，单位为毫升（mL）。

4.3 药物储存液（母液）

4.3.1 药物称量

药物称量按照配制储存液的浓度计算，配制储存液浓度至少按检测范围最高浓度的100倍配制储存液。但有些溶解度低的药物应配制较低浓度的储存液。称量应在分析天平上进行，天平应定期校准。

4.3.2 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（分析纯）包括：二甲基亚砜（DMSO）、乙醇、聚乙二醇、羧甲基纤维素。

表1 抗真菌药物的储存液使用的溶剂、稀释液种类及药物浓度检测范围

抗真菌药物	溶剂 ^a	稀释液	药物浓度检测范围 μg/mL
两性霉素 B	DMSO ^b	培养基 ^c	0.0313~16
卡泊芬净	DMSO	培养基	0.015~8
阿尼芬净	DMSO	培养基	0.015~8
米卡芬净	DMSO	培养基	0.015~8
瑞扎芬净	DMSO	培养基	0.008~4
艾瑞芬净	DMSO	培养基	0.015~8
Manogepix	DMSO	培养基	0.004~2
氟康唑	DMSO	培养基	0.125~64
氟胞嘧啶	DMSO	培养基	0.125~64
艾沙康唑	DMSO	培养基	0.0313~16
伊曲康唑	DMSO	培养基	0.0313~16
酮康唑	DMSO	培养基	0.0313~16
泊沙康唑	DMSO	培养基	0.0313~16
雷夫康唑	DMSO	培养基	0.0313~16
伏立康唑	DMSO	培养基	0.0313~16

^a 某些溶剂存在潜在毒性，使用前应咨询厂家。
^b DMSO指二甲基亚砜。
^c 培养基指RPMI-1640肉汤培养基，如使用商品化RPMI-1640肉汤干粉配制，步骤见表A.1。

4.3.3 过滤

储存液通常是无菌的，如需进行除菌操作，应使用无菌滤膜过滤（过滤细菌常用孔径为0.2 μm）。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。

4.3.4 存储

储存液应在无菌塑料管中分装，密封保存于-70℃或更低环境，保存温度不高于-20℃。从冰箱中取出的当天使用，现用现取，未用完的应丢弃。大多数药物储存液在-70℃可保存6个月。

4.4 非水溶性抗真菌药物稀释液

对于不溶于水的抗真菌药物，需先用合适的溶剂配制100倍终浓度的储存液，然后用RPMI-1640肉汤稀释为10倍终浓度的中间浓度（最终要与菌液1:9混合），配制步骤见表2。

5 培养基的配制

5.1 RPMI-1640 肉汤培养基

推荐使用RPMI-1640肉汤培养基（配制方法见表A.1），若无商品化RPMI-1640干粉培养基，配方见表A.2。

5.2 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A.3。

表2 非水溶性抗真菌药物稀释步骤

配制步骤	浓度 (μg/mL)	来源	体积 + (mL)	溶剂 = 如DMSO ^a (mL)	中间浓度 = (μg/mL)	终浓度1:10 (μg/mL)	Log ₂
1 ^b	5120	储存液	1.0	7.0	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	0.0625	-4
12	2.5	步骤9	0.5	3.5	0.313	0.0313	-5

^a DMSO指二甲基亚砜。

^b 配制步骤1举例，取5120 μg/mL的储存液1.0 mL，加入7.0 mL溶剂，得到中间浓度为640 μg/mL，作为步骤2的初始浓度，取1.0 mL，加入1.0 mL溶剂，得到中间浓度320 μg/mL，以此类推；宏量肉汤稀释法取0.1 mL中间浓度液与10倍浓度接种菌悬液充分混合得到最终药物浓度（终浓度）。

6 肉汤稀释法操作步骤

6.1 宏量肉汤稀释法操作步骤

6.1.1 菌悬液的制备

所有酵母样真菌应在沙保罗培养基（SDA）或马铃薯葡萄糖培养基（PDA）上至少传代培养两次，以确保菌株的纯度和活性。念珠菌于35℃培养24 h，新型隐球菌培养48 h。挑选直径约1 mm的5个相似菌落，加入5 mL 0.85%无菌盐水混匀，用浊度仪或0.5麦氏单位硫酸钡浊度标准管（配制见表A.4）配制浓度 1×10^6 CFU/mL~ 5×10^6 CFU/mL菌悬液（0.5麦氏单位），振荡器上持续混匀15 s，再用0.85%无菌盐水进行1:100倍稀释；然后用RPMI-1640肉汤进行1:20倍稀释（两次共稀释菌液浓度2000倍），得到终浓度为 0.5×10^3 CFU/mL~ 2.5×10^3 CFU/mL的菌悬液。

6.1.2 接种

在无菌试管中分别加入表2所示系列中间浓度液0.1 mL，15 min内（4℃下可延长至2 h）将0.9 mL配制好的菌悬液加入试管中，涡旋混匀各试管，得到1:10稀释的药物（终浓度）及10%稀释的接种用菌悬液。阳性生长对照管（无抗真菌药物）中加入0.9 mL菌悬液和0.1 mL RPMI-1640肉汤培养基。无菌对照管，只加1 mL RPMI-1640肉汤培养基，不加菌悬液和药物。

6.1.3 培养

将接种管置于35℃温箱中培养，念珠菌应培养24 h~48 h，对于24 h后生长不良的分离株，最高可达48 h，新型隐球菌应培养70 h~74 h。培养过程中避免震荡试管。

6.2 微量肉汤稀释法操作步骤

6.2.1 菌悬液的制备

按本标准第6.1.1条方法培养和制备0.5麦氏单位浓度为 1×10^6 CFU/mL~ 5×10^6 CFU/mL的菌悬液，震荡混匀15 s，用含2%葡萄糖的RPMI-1640肉汤培养基将菌液1:50稀释后，再做1:20稀释（两次共稀释菌液浓度1000倍），得到浓度 1×10^3 CFU/mL~ 5×10^3 CFU/mL（2倍接种菌液浓度）的菌悬液。

6.2.2 药物稀释液的制备

按本标准第4.3条配制200倍终浓度的药物储存液。使用时按本标准第4.4条将储存液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 μL药物储存液，经100倍稀释得到2倍终浓度的工作液。

6.2.3 接种

在96孔微孔板上，第11列作为菌株的阳性生长对照孔，只加菌悬液和不含药物的肉汤。于生长对照孔中先加100 μL不含药物的2%葡萄糖RPMI-1640肉汤，再加100 μL 2倍接种量的菌悬液。第12列为无菌对照孔，只加2%葡萄糖RPMI-1640肉汤，不加菌悬液和抗真菌药物。

根据药物浓度检测范围（可参考表2）由低浓度到高浓度依次用（多道）加样器，从96孔板的第1列至第10列，每孔分别加入100 μL 2倍终浓度工作液（本标准第6.2.2条制备）。然后每孔加入100 μL 2倍终浓度的菌悬液，最终接种量为 0.5×10^3 CFU/mL~ 2.5×10^3 CFU/mL。

6.2.4 培养

对于微量肉汤稀释法，念珠菌及新型隐球菌培养温度均为35℃，所有抗真菌药物的质控范围基于培养24 h。对于念珠菌，棘白菌素类、两性霉素B、氟康唑、氟胞嘧啶、伊曲康唑、艾沙康唑、泊沙康唑、雷夫康唑和伏立康唑的MIC值应在24 h读取结果。如果24 h生长对照显示生长不足，表D.1中折点也可用于培养48 h结果判读。上述所有抗真菌药物对于隐球菌属的MIC值应在培养72 h读取结果。

7 结果判读与解释

7.1 结果判读

7.1.1 评分标准

宏量肉汤稀释法质控菌株的参考范围见表B.1，微量肉汤稀释法质控菌株的参考范围见表B.2。

质控结果合格再进行检测菌株的结果判读。判读结果时，将各浓度管内的真菌生长情况与生长对照管（无抗真菌药物）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（ $\approx 50\%$ ）；
- 3 浊度轻微降低；
- 4 浊度没有变化。

7.1.2 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）。MIC值为抑制生长最低抗菌浓度，终点拖尾生长不常见。

7.1.3 氟胞嘧啶和吡咯类

氟胞嘧啶和吡咯类抗真菌药物有拖尾生长现象，生长终点判断标准为50%抑制（评分为2，浊度显著降低）。

白念珠菌和热带念珠菌对吡咯类特别是氟康唑和伏立康唑存在显著的拖尾生长现象，这些分离株对通常用于治疗敏感分离株的低剂量氟康唑有反应。

7.1.4 棘白菌素类

棘白菌素类抗真菌药物有拖尾生长，生长终点判读标准为50%抑制（评分为2，浊度显著降低）。

7.2 结果解释

7.2.1 折点/ECV 解释结果

折点/ECV解释结果汇总见表C.1。与折点不同，ECV不能预测治疗的临床反应。当评估的真菌种类和抗真菌药物存在折点时，不应在临床实践中使用ECV。

7.2.2 有折点的念珠菌属

仅有一些真菌-药物组合建立了折点，念珠菌属折点见表D.1。

7.2.3 有折点和 ECV 的念珠菌属

与折点不同，ECV值不能预测临床治疗效果。对于既有折点又有ECV的念珠菌属（见表D.2），ECV不能预测治疗的临床反应。当评估的真菌种类和抗真菌药物存在折点时，不应在临床实践中使用ECV。

7.2.4 暂定折点的耳念珠菌

耳念珠菌通常具有耐多药性，但各分离株的耐药性差异很大。目前尚无确定耳念珠菌的特异性药敏折点，只有根据专家意见的暂定折点，折点和临床结果之间的相关性目前尚不清楚，暂定折点和说明（见表D.3）作为参考而非明确的耐药折点。患者使用其他抗真菌药物无效的情况下，即使某抗真菌药物的MIC值升高，临床也可能会使用。

7.2.5 无折点的念珠菌属

其他真菌-药物组合的检测临床相关性仍不确定，对于无折点的念珠菌属，ECV定义了常见念珠菌野生型的分布界值，两性霉素B可能对区分野生型和非野生型的分离株有用。无折点的念珠菌属ECV值见表D.4。

7.2.6 无折点的隐球菌属

无折点的隐球菌属 ECV 值是针对不同分子类型确定的，隐球菌分类目前处于过渡阶段。VGI 和 VGII

分别是格特隐球菌和 *Deuterogattii* 隐球菌（以前称格特隐球菌）的分子基因型，只有通过聚合酶链式反应或基于 DNA 测序等分子分型方法进行识别。VNI 是全球范围新型隐球菌最常见的分子基因型。隐球菌属分子分型 ECV 值见表 D. 5。

7.3 抗真菌药物结果解释

7.3.1 两性霉素 B

肉汤稀释参考方法检测念珠菌属分离株对两性霉素B的MIC值在0.25 $\mu\text{g/mL}$ ~1 $\mu\text{g/mL}$ 处显示有紧凑的聚集，使用商品化方法可能会提供更准确的体外MIC结果解读。

无折点念珠菌属的两性霉素B的ECV值见表D. 2。

7.3.2 氟胞嘧啶

之前的CLSI折点不再使用。无折点念珠菌属的氟胞嘧啶ECV值见表D. 2。

7.3.3 氟康唑

已建立氟康唑对白念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌和热带念珠菌的种特异性折点见表D. 1，但这些新折点不适用于克柔念珠菌。菌株应鉴定到种水平，才能准确解释和报告MIC结果。当分离株鉴定为光滑念珠菌且MIC $\leq$ 32 $\mu\text{g/mL}$ ，患者应接受最大剂量的氟康唑治疗，具体用药咨询临床用药专家。

新型隐球菌分离株的检测应用尚不清楚，研究表明升高的MIC与临床治疗失败呈相关性。

7.3.4 伊曲康唑

CLSI过去发布的伊曲康唑折点是基于较少的临床数据，这些折点不再使用。

无折点念珠菌属的伊曲康唑ECV值，见表D. 2。

7.3.5 伏立康唑

已建立伏立康唑对白念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌和克柔念珠菌的折点见表D. 1。这些数据主要来自念珠菌血症（非中性粒细胞减少症）患者的临床试验，其他情况下的临床相关折点尚不确定。

7.3.6 泊沙康唑、雷夫康唑、艾沙康唑

泊沙康唑和雷夫康唑肉汤稀释参考方法检测念珠菌属和隐球菌属的MIC从0.03 $\mu\text{g/mL}$ ~16 $\mu\text{g/mL}$ ，大部分菌株可被MIC $\leq$ 1 $\mu\text{g/mL}$ 的抗真菌药物抑制。艾沙康唑对酵母样真菌的MIC范围在0.008 $\mu\text{g/mL}$ ~8 $\mu\text{g/mL}$ ，90%菌株MIC $\leq$ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。ECV值参考见表D. 2。数据不能提示MIC和这些药物治疗的相关性。

7.3.7 棘白菌素（阿尼芬净、卡泊芬净和米卡芬净）

棘白菌素肉汤稀释法参考方法检测>2500例念珠菌属MIC范围0.008 $\mu\text{g/mL}$ ~8 $\mu\text{g/mL}$ ，99%菌株的MIC $\leq$ 2 $\mu\text{g/mL}$ 。念珠菌属对棘白菌素的耐药机制为*fkp*突变，在MIC<2 $\mu\text{g/mL}$ 敏感范围内存在分离株隐含*fkp*突变。已建立不同种的念珠菌的折点，见表D. 1，可区分潜在的耐药突变菌株和敏感性菌株。

已建立无折点的念珠菌属对阿尼芬净和米卡芬净的ECV值（表D. 2），可用于区分WT和NWT分离株。卡泊芬净药敏试验结果在实验室间存在显著差异，可导致报告假耐药，造成这种差异的原因不明，尚无ECV发布。

7.3.8 EUCAST 折点/ECOFF 结果解释

EUCAST微量肉汤稀释法24 h质控菌株MIC范围见表E. 1；念珠菌体外微量肉汤稀释法24 h MIC折点见表E. 2；有折点的念珠菌属的ECOFF值见表E. 3；有折点的隐球菌属的ECOFF值见表E. 4。EUCAST折点/ECOFF普遍稍低于CLSI的折点/ECV，仅供参考。

7.4 结果报告

7.4.1 按 CLSI 药敏方法检测的结果报告

CLSI药敏方法检测酵母样真菌包括3种类型：

- a) 有MIC判断折点（念珠菌MIC折点见表D.1），报告MIC值及敏感度；
- b) 无MIC判断折点但有ECV值，见表D.2和表D.4，报告MIC值；如果MIC值低于或等于ECV值报告为野生型，并说明该菌株无获得性耐药机制或无敏感性降低；如果MIC值高于ECV值报告为非野生型，并说明该菌株具有推测的/已知获得性耐药机制或敏感性降低；并明确ECV不是折点，不能预测临床治疗效果；
- c) 无MIC判断折点且无ECV值：只报告MIC值并说明目前该酵母样真菌的临床折点尚未建立。

7.4.2 按 EUCAST 药敏方法检测的结果报告

按附录E的试验条件进行微量肉汤稀释试验并同时做质控，结果报告包括2种类型：

- a) 有MIC判断折点（含念珠菌对两性霉素B、伊曲康唑和泊沙康唑折点）见表E.2，报告MIC值及敏感度；
- b) 无MIC判断折点但有ECOFF值，见表E.3和表E.4，报告MIC值；如果MIC值低于或等于ECOFF值报告为野生型，并说明该菌株无获得性耐药机制或无敏感性降低；如果MIC值高于ECOFF值报告为非野生型，并说明该菌株具有推测的/已知获得性耐药机制或敏感性降低；并明确ECOFF值不是折点，不能预测临床治疗效果。

8 质量控制

8.1 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、试验条件等同时进行质量控制。质量控制的监控：药敏试验的精度（可重复性）及准确性，试验中使用试剂的性能、条件及说明，测试和读取结果人员的表现。

8.2 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肉汤培养基以及微量稀释96孔板、宏量稀释管时应使用表B中列出质控菌株进行药敏试验，检测MIC是否在控。应至少培养一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。

8.3 纯度质控

药敏试验后将待测菌的接种液转种于相应平板并分区划线，确认接种菌液的纯度。

8.4 终点判读质控

应定期进行终点判读质控，以尽量减少实验人员之间的MIC判读差异。

伊曲康唑和其他三唑类药物适合用于比对试验，并用已确定MIC的质控菌株和参考菌株进行终点判读质控。

实验人员应在相同条件下独立判读结果，并与操作熟练人员的结果比对。

8.5 参考菌株的保存

8.5.1 菌种的保存方法

在菌种的保存过程中，应尽可能保持其稳定性，减少突变。应将酵母样真菌在马铃薯葡萄糖培养基生长后，于-70℃冻存。用15%甘油制成菌悬液或保存在真菌冻存管中-70℃冻存。

若长期保存，应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。

复苏长期保存的酵母样真菌质控菌株，在沙保罗培养基或马铃薯葡萄糖培养基上35℃生长1d~3d，挑选菌落进行药敏试验。若MIC值在质控范围之内（见表B），继续传代培养直至生长良好。

若短期使用，可在沙保罗培养基或马铃薯葡萄糖培养基培养后2℃~8℃保存，每两周进行一次传代，保证菌的活性和纯度。

8.5.3 日常使用质控菌株的复苏

从-70℃或液氮中取出冻存管，待室温融化后，转种于马铃薯葡萄糖培养基，于35℃培养（念珠菌属24 h，新型隐球菌48 h）。挑选菌落于马铃薯葡萄糖培养基传代培养两次，培养物于斜面2℃~8℃保存，用于日常质控。

附 录 A

(资料性)

RPMI-1640 肉汤培养基配制方法

用商品化RPMI-1640肉汤干粉配制1 L RPMI-1640肉汤培养基步骤见表A. 1, 若无肉汤干粉, 配制RPMI-1640肉汤培养基配方见表A. 2, 含2%葡萄糖改良RPMI-1640肉汤培养基配方见表A. 3, 0.5麦氏单位硫酸钡浊度标准管制备见表A. 4。

表A. 1 RPMI-1640 肉汤培养基配制过程 (1 L)

步骤	过程
1	10.4 g RPMI-1640 肉汤干粉, 34.53 g MOPS ^a , 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表示3-(N-吗啡啉)丙磺酸(3-N-morpholino propane sulfonic acid)。

表A. 2 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	g/L 水	组分	g/L 水	组分	g/L 水
L-精氨酸 (游离碱)	0.200	L-苯丙氨酸	0.015	核黄素	0.0002
无水 L-天冬酰胺	0.050	L-脯氨酸	0.020	盐酸硫胺素	0.001
L-天冬氨酸	0.020	L-丝氨酸	0.030	维生素 B12	0.000005
L-胱氨酸二盐酸	0.0652	L-苏氨酸	0.020	硝酸钙·H ₂ O	0.100
L-谷氨酸	0.020	L-色氨酸	0.005	氯化钾	0.400
L-谷氨酰胺	0.300	L-酪氨酸二钠盐	0.02883	无水硫酸镁	0.04884
甘氨酸	0.010	L-缬氨酸	0.020	氯化钠	6.000
L-组氨酸 (游离碱)	0.015	生物素	0.0002	无水磷酸氢二钠	0.800
L-羟脯氨酸	0.020	D-泛酸钙	0.00025	D-葡萄糖	2.000
L-异亮氨酸	0.050	氯化胆碱	0.003	谷胱甘肽	0.001
L-亮氨酸	0.050	叶酸	0.001	酚红钠盐	0.0053
L-赖氨酸盐酸盐	0.040	肌醇	0.035	对氨基苯甲酸	0.001
L-蛋氨酸	0.015	烟酰胺	0.001	盐酸吡哆醇	0.001

表A.3 含2%葡萄糖改良 RPMI-1640 肉汤培养基配制表

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

表A.4 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% v/v) 中加入 0.5 mL 0.048 mol/L 氯化钡
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 mL~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 B
(规范性)
肉汤稀释法质控菌株 MIC 范围

宏量肉汤稀释法质控菌株MIC范围见表B. 1，微量肉汤稀释法质控菌株MIC范围见表B. 2。

表B. 1 宏量肉汤稀释法质控菌株 MIC 范围（ $\mu\text{g/mL}$ ，48 h）

标准菌株 ^a 名称	目的	药物名称	MICs 范围	MICs 在范围内比例%
克柔念珠菌 ATCC 6258	质控菌株 ^b	两性霉素 B	0.25~2.0	99.5
		氟康唑	16~64	99.1
		氟胞嘧啶	4.0~16	96.8
		伊曲康唑	0.12~0.5	94.0
		酮康唑	0.12~0.5	100
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	2.0~8.0	99.1
		氟胞嘧啶	0.12~0.5	98.6
		伊曲康唑	0.06~0.25	99.0
		酮康唑	0.06~0.25	99.0
白念珠菌 ATCC 90028	参考菌株 ^c	两性霉素 B	0.5~2.0	91.9
		氟康唑	0.25~1.0	97.3
		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
		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
		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
		氟胞嘧啶	≤0.12~0.25	99.5
注1：ATCC，美国菌种保藏中心。				
^a 标准菌株：由菌种保藏机构保藏的、有且仅有永久保藏号、遗传学特性得到确认和保证并可追溯的菌株。				
^b 质控菌株：用于质控目的的标准菌株或参考菌株。				
^c 参考菌株：经参考实验室或权威机构鉴定的菌株，或由能力验证/室间质评发放的菌株，可用于仪器、试剂和方法学性能验证或部分质控对照的菌株。				

表B.2 微量肉汤稀释法质控菌株 MIC 范围 (μg/mL, 24 h 和 48h)

菌株名称	抗真菌药物	MIC 范围	24 h 中位数	在范围内 比例%	MIC范围	48 h 中位数	在范围内 比例%
克柔念珠菌 ATCC 6258	两性霉素 B	0.5~2	1	100	1~4	2	100
	阿尼芬净	0.03~0.12	0.06	97.9	0.03~0.12	0.06	97.5
	卡泊芬净 ^a	0.12~1	0.5	98.8	0.25~1	0.5	97.5
	氟康唑	8~64	16	100	16~128	32	100
	氟胞嘧啶	4~16	8	97.5	8~32	16	99.6
	艾瑞芬净	0.25~1	0.5	100	-	-	-
	艾沙康唑	0.06~0.5	0.25	95.2	0.12~0.5	0.12	94.2
	伊曲康唑	0.12~1	0.5	95.8	0.25~1	0.5	100
	酮康唑	0.12~1	0.5	95.4	0.25~1	0.5	99.6
	米卡芬净	0.06~0.25	0.12~0.25	99.6	0.12~0.5	0.25	99.0
	泊沙康唑	0.06~0.5	0.25	100	0.12~1	0.5	99.6
	瑞扎芬净	0.016~0.12	0.03	100	0.016~0.12	0.03	100
	伏立康唑	0.06~0.5	0.12	98.3	0.12~1	0.5	100
近平滑念珠菌 ATCC 22019	两性霉素 B	0.25~2	0.5	97.1	0.5~4	2	91.7
	阿尼芬净	0.25~2	1	95	0.5~2	1	95
	卡泊芬净 ^a	0.25~1	0.5	96.7	0.5~4	1	92.9
	氟康唑	0.5~4	2	98.2	1~4	2	98.1
	氟胞嘧啶	0.06~0.25	0.12	99.2	0.12~0.5	0.25	97.9
	艾瑞芬净	0.06~0.25	0.12	99.0	-	-	-
	艾沙康唑	0.016~0.06	0.06	90.5	0.03~0.12	0.03	98.3
	伊曲康唑	0.06~0.5	0.25	95.8	0.12~0.5	0.25	97.5
	酮康唑	0.03~0.25	0.06/0.12	97.5	0.06~0.5	0.12	98.3
	Manogepix	0.008~0.03	0.015	100	0.008~0.03	0.016	94.3
	米卡芬净	0.5~2	0.5~1	100	0.5~4	1	100
	泊沙康唑	0.03~0.25	0.12	96.7	0.06~0.25	0.12	98.8
	瑞扎芬净	0.25~2	0.5	99.2	0.25~2	1	100
	伏立康唑	0.016~0.12	0.016~0.03	100	0.03~0.25	0.06	100

表 B.2 微量肉汤稀释法质控菌株 MIC 范围 ($\mu\text{g/mL}$, 24 h 和 48h) (续)

菌株名称	抗真菌药物	MIC 范围	24 h 中位数	在范围内 比例%	MIC范围	48 h 中位数	在范围内 比例%
注1：阿尼芬净、卡泊芬净、米卡芬净的MIC值在孵育24 h以后观察评分为2的最低抑菌浓度（与生长对照相比浊度显著降低，或生长的抑制率大于50%）。 注2：当商用检验系统用于敏感性试验时，用户应参考生产厂家的使用说明的质控范围。 注3：ATCC，美国菌种保藏中心。							
^a 质控范围是根据2010年15个参考实验室的数据建立的。从那时起，卡泊芬净的药敏试验与显著的变异相关。因此，尽管根据表中所列的范围质控菌株的性能可以接受，但敏感菌株仍可能发生错误分类。							

附录 C

(规范性)

酵母样真菌药敏试验可用的折点和/或 ECV 汇总表

酵母样真菌可用的折点和/或 ECV 值汇总见表 C.1。

表 C.1 酵母样真菌药敏试验可用的折点和/或 ECV 汇总

菌株名称	抗真菌药物									
	两性霉素 B	阿尼芬净	卡泊芬净	氟康唑	氟胞嘧啶	艾沙康唑	伊曲康唑	米卡芬净	泊沙康唑	伏立康唑
白念珠菌	ECV	BP/ECV	BP	BP/ECV	—	—	—	BP/ECV	ECV	BP/ECV
都柏林念珠菌	ECV	ECV	—	ECV	TR-L	—	ECV	ECV	ECV	—
杜布斯希木龙念珠菌	—	ECV	ECV	ECV	TR-L	ECV	ECV	ECV	ECV	ECV
光滑念珠菌	ECV	BP/ECV	BP	BP/ECV	—	—	ECV	BP/ECV	ECV	BP/ECV
季也蒙念珠菌	ECV	BP/ECV	BP/ECV	ECV	TR-L	—	ECV	BP/ECV	ECV	—
乳酒念珠菌	ECV	ECV	—	ECV	TR-L	—	ECV	ECV	ECV	—
克柔念珠菌	ECV	BP/ECV	BP	IR	—	—	ECV	BP/ECV	ECV	BP/ECV
葡萄牙念珠菌	ECV	ECV	ECV	ECV	TR-L	—	ECV	ECV	ECV	—
似平滑念珠菌	ECV	ECV	ECV	ECV	TR-L	—	ECV	ECV	ECV	ECV
拟平滑念珠菌	ECV	ECV	ECV	ECV	TR-L	—	ECV	ECV	ECV	—
近平滑念珠菌	ECV	BP/ECV	BP/ECV	BP/ECV	TR-L	TR-L	ECV	BP/ECV	ECV	BP
热带念珠菌	ECV	BP/ECV	BP	BP/ECV	—	—	ECV	BP/ECV	ECV	BP/ECV
格特隐球菌 (VGI)	ECV	IR	IR	ECV	ECV	—	ECV	IR	—	ECV
Deuterogattii 隐球菌 (以前的格特隐球菌) (VGII)	ECV	IR	IR	ECV	ECV	—	ECV	IR	—	ECV
新型隐球菌 (VNI)	ECV	IR	IR	ECV	ECV	—	ECV	IR	ECV	ECV
注1：如果24 h生长对照显示生长不足，此折点也可用于培养48 h结果判读，新型隐球菌在72 h读结果。 注2：克柔念珠菌对氟康唑具有天然耐药性，其最低抑菌浓度不应用此表解释。 注3：对于光滑念珠菌和伏立康唑，目前的数据不足以证明体外药敏性试验和临床结果之间的相关性。										
缩写：—，ECV值无定义；BP，临床折点定义；IR，这类菌对此抗真菌药物天然耐药；TR-L，不能对此菌种-抗真菌药物组合定义ECV，因MIC分布低于推荐的试验范围的最低浓度值。										

附 录 D

(规范性)

体外微量肉汤稀释法 MIC 折点和 ECV

念珠菌属体外微量肉汤稀释法MIC折点见表D. 1，无折点的念珠菌属和隐球菌属ECV值分别见表D. 2和表D. 3，有折点的念珠菌属的ECV值见表D. 4，耳念珠菌体外微量肉汤稀释法MIC暂定折点见表D. 5。

表D. 1 念珠菌属体外微量肉汤稀释法 MIC 折点 ($\mu\text{g/mL}$, 24 h)

抗真菌药物 ^a	菌株名称	MIC折点和判读			
		S	I	SDD	R
阿尼芬净	白念珠菌	≤ 0.25	0.5	—	≥ 1
	光滑念珠菌	≤ 0.12	0.25	—	≥ 0.5
	季也蒙念珠菌	≤ 2	4	—	≥ 8
	克柔念珠菌	≤ 0.25	0.5	—	≥ 1
	近平滑念珠菌 ^b	≤ 2	4	—	≥ 8
	热带念珠菌	≤ 0.25	0.5	—	≥ 1
卡泊芬净 ^c	白念珠菌	≤ 0.25	0.5	—	≥ 1
	光滑念珠菌	≤ 0.12	0.25	—	≥ 0.5
	季也蒙念珠菌	≤ 2	4	—	≥ 8
	克柔念珠菌	≤ 0.25	0.5	—	≥ 1
	近平滑念珠菌 ^b	≤ 2	4	—	≥ 8
	热带念珠菌	≤ 0.25	0.5	—	≥ 1
米卡芬净	白念珠菌	≤ 0.25	0.5	—	≥ 1
	光滑念珠菌	≤ 0.06	0.12	—	≥ 0.25
	季也蒙念珠菌	≤ 2	4	—	≥ 8
	克柔念珠菌	≤ 0.25	0.5	—	≥ 1
	近平滑念珠菌 ^b	≤ 2	4	—	≥ 8
	热带念珠菌	≤ 0.25	0.5	—	≥ 1
氟康唑	白念珠菌	≤ 2	—	4	≥ 8
	光滑念珠菌 ^d	—	—	≤ 32	≥ 64
	克柔念珠菌 ^e	—	—	—	—
	近平滑念珠菌 ^b	≤ 2	—	4	≥ 8
	热带念珠菌	≤ 2	—	4	≥ 8

表 D.1 念珠菌属体外微量肉汤稀释法 MIC 折点 (μg/mL, 24 h) (续)

抗真菌药物 ^a	菌株名称	MIC折点和判读			
		S	I	SDD	R
伏立康唑	白念珠菌	≤ 0.12	0.25~0.5	-	≥ 1
	光滑念珠菌 ^f	-	-	-	-
	克柔念珠菌	≤ 0.5	1	-	≥ 2
	近平滑念珠菌 ^b	≤ 0.12	0.25~0.5	-	≥ 1
	热带念珠菌	≤ 0.12	0.25~0.5	-	≥ 1
注1：已建立选定的折点用以区分耐药变异株和敏感菌株。折点的差异反映了方法学问题。由于体外方法学的问题，米卡芬净对光滑念珠菌的折点低于其他棘白菌素，并不代表临床疗效有明显差异，棘白菌素类药物之间在抗真菌活性方面的真正差异较为罕见。 注2：念珠菌属的MIC折点与不同药物相对应。如果检测的MICs值介于两个结果解释分类之间，则应归为高的结果分类。例如，氟康唑MIC为3 μg/mL的分离株将归入“剂量依赖性敏感”分类。					
^a 如果24 h生长对照显示生长不足，此折点也可用于培养48 h结果判读。 ^b 对于近平滑念珠菌复合群，由于拟平滑念珠菌和似平滑念珠菌流行率较低，当未进行进一步种属测定时，可采用近平滑念珠菌折点。如果进一步的菌种鉴定确认为复合群中的一种，则不应采用近平滑念珠菌折点。相反，应在实验室报告中指出，尚不存在结果解释的折点，应考虑采用流行病学界值（ECV）。 ^c 体外卡泊芬净药敏试验与实验室间偏差呈显著相关，当使用此参考方法时，有可能报告假耐药，偏差原因尚不清楚。当检测卡泊芬净时，敏感结果可报告“敏感”。但当实验室出现“中介”或“耐药”结果时，应采用以下任一种方法进行确认：1) 米卡芬净或阿尼芬净进行额外的药敏试验；2) 对<i>fks</i>基因进行DNA序列分析，以确定<i>fks1</i>（所有念珠菌属）和<i>fks2</i>（仅光滑念珠菌属）中的耐药热点突变；3) 将分离株送往参考实验室以确认对米卡芬净或阿尼芬净耐药，或具有特征性<i>fks</i>热点突变的念珠菌属应视为对所有棘白菌素耐药，包括对卡泊芬净，并按此报告。 ^d 对于氟康唑，这些折点是基于念珠菌引起的粘膜和侵袭性感染的广泛经验。当分离株被鉴定为光滑念珠菌且MIC ≤ 32 μg/mL，临床医生应确定氟康唑是否适合具体的临床背景。如若此，患者应接受氟康唑的最大剂量方案，具体用药方案应咨询临床用药专家。 ^e 克柔念珠菌对氟康唑天然耐药，不应使用此表格解释其MIC。 ^f 对于光滑念珠菌和伏立康唑，目前的数据不足以证明体外药敏试验与临床结果之间的相关性。					

表D.2 有折点的念珠菌属的 ECV 值^a (μg/mL)

抗真菌药物	菌株名称	ECV ^{b, c, d}
阿尼芬净	白念珠菌	0.12
	光滑念珠菌	0.25
	季也蒙念珠菌	8
	克柔念珠菌	0.25
	近平滑念珠菌	4
	热带念珠菌	0.12
卡泊芬净	季也蒙念珠菌	2
	近平滑念珠菌	1
氟康唑	白念珠菌	0.5
	光滑念珠菌	8
	近平滑念珠菌	2
	热带念珠菌	1
米卡芬净	白念珠菌	0.03
	光滑念珠菌	0.03
	季也蒙念珠菌	2
	克柔念珠菌	0.25
	近平滑念珠菌	2
	热带念珠菌	0.06
伏立康唑	白念珠菌	0.03
	克柔念珠菌	0.5
	热带念珠菌	0.12

注：除非特别说明，所有列出的念珠菌属均为严格意义上的念珠菌。

^a 与折点不同，ECV 值不能预测临床治疗效果。当评估的真菌种类和抗真菌药物存在折点时，不应在临床实践中使用 ECV^[1,22]。

^b ECV 值基于对 97.5% 的建模种群的统计数据。ECV 可能忽略潜在的耐药菌株（非野生型）。

^c 如果 24 h 生长对照显示生长不足，则应孵育至 48 h。

^d 流行病学界值 ECV^[9] 是使用肉汤微量稀释参考方法建立的^[1]。如果使用另一种方法进行敏感试验，在使用 ECV 之前，必须对该方法进行微量肉汤稀释法验证。

表D.3 耳念珠菌体外微量肉汤稀释法 MIC 暂定折点 (μg/mL)

抗真菌药物	MIC暂定折点	说明
氟康唑	≥ 32	MICs ≥ 32 的分离株出现 Erg11 基因耐药突变, 而模式株的 MIC ≥ 256 , 氟康唑疗效不大。
伏立康唑和其他二代三唑类药物	不适用	对氟康唑耐药的菌株可能偶尔对其他三唑类药物有效。需根据具体情况决定是否使用另一种三唑进行治疗。
两性霉素B	≥ 2	动物感染模型 PK/PD 显示在标准剂量下, 两性霉素 B 的折点为 1 或 1.5, 耳念珠菌对两性霉素 B 的 MIC ≥ 2 报告耐药。如果使用 E-test 检测两性霉素 B 并确定 MIC 为 1.5, 则该值应四舍五入为 2。
阿尼芬净	≥ 4	暂定折点基于来自不同地理分布的约 100 株耳念珠菌对棘白菌素 MIC 的模式分布。
卡泊芬净	≥ 2	
米卡芬净	≥ 4	
注1: https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html。 注2: 基于这些MIC暂定折点, 许多分离株对多种药物具有耐药性。已发现一些耳念珠菌对三唑类、多烯类和棘白菌素类抗真菌药物都产生耐药, 在其他国家发现泛耐药性的报告。在美国, 约90%的耳念珠菌分离株对氟康唑耐药, 约30%对两性霉素B耐药, 对棘白菌素耐药低于5%。 注3: 中国分离的耳念珠菌株普遍敏感, 其中对氟康唑MIC为2 μg/mL, 伊曲康唑为0.03 μg/mL, 伏立康唑为0.02 μg/mL, 两性霉素B为0.25 μg/mL, 阿尼芬净为0.12 μg/mL, 卡泊芬净为0.06 μg/mL, 米卡芬净为0.06 μg/mL。应根据药敏试验结果选择适合的药物治疗^[23]。		

表D.4 无折点的念珠菌属 ECV (μg/mL)

抗真菌药物	菌株名称	ECV ^{a, b, c}
两性霉素B	白念珠菌	2
	都柏林念珠菌	0.5
	光滑念珠菌	2
	季也蒙念珠菌	2
	乳酒念珠菌	2
	克柔念珠菌	2
	葡萄牙念珠菌 ^d	2
	似平滑念珠菌	1
	拟平滑念珠菌	2
	近平滑念珠菌	1
	热带念珠菌	2

表 D.4 无折点的念珠菌属 ECV ($\mu\text{g/mL}$) (续)

抗真菌药物	菌株名称	ECV ^{a, b, c}
阿尼芬净	都柏林念珠菌	0.12
	杜布斯希木龙念珠菌	1
	乳酒念珠菌	0.25
	葡萄牙念珠菌	1
	似平滑念珠菌	0.5
	拟平滑念珠菌	2
卡泊芬净	杜布斯希木龙念珠菌	0.25
	葡萄牙念珠菌 ^d	1
	似平滑念珠菌	0.25
	拟平滑念珠菌	1
氟康唑	都柏林念珠菌	0.5
	杜布斯希木龙念珠菌	32
	季也蒙念珠菌	8
	乳酒念珠菌	1
	葡萄牙念珠菌	1
	似平滑念珠菌	4
	拟平滑念珠菌	2
艾沙康唑	杜布斯希木龙念珠菌	0.25
伊曲康唑	都柏林念珠菌	0.25
	杜布斯希木龙念珠菌	1
	光滑念珠菌	4
	季也蒙念珠菌	2
	乳酒念珠菌	0.5
	克柔念珠菌	1
	葡萄牙念珠菌	1
	似平滑念珠菌	1
	拟平滑念珠菌	0.5
	近平滑念珠菌	0.5
	热带念珠菌	0.5

表 D.4 无折点的念珠菌属 ECV ($\mu\text{g/mL}$) (续)

抗真菌药物	菌株名称	ECV ^{a, b, c}
米卡芬净	都柏林念珠菌	0.12
	杜布斯希木龙念珠菌	0.5
	乳酒念珠菌	0.125
	葡萄牙念珠菌	0.5
	似平滑念珠菌	1
	拟平滑念珠菌	1
泊沙康唑	白念珠菌	0.06
	都柏林念珠菌	0.125
	杜布斯希木龙念珠菌	1
	光滑念珠菌	1
	季也蒙念珠菌	0.5
	乳酒念珠菌	0.5
	克柔念珠菌	0.5
	葡萄牙念珠菌	0.06
	似平滑念珠菌	0.25
	拟平滑念珠菌	0.25
	近平滑念珠菌	0.25
	热带念珠菌	0.12
伏立康唑	杜布斯希木龙念珠菌	0.5
	光滑念珠菌	0.25
	似平滑念珠菌	0.06
	拟平滑念珠菌	0.125
注：所列出的所有念珠菌除另有说明外均应严格遵守。		
^a 流行病学界值 ECV ^[9] 是使用肉汤微量稀释参考方法建立的 ^[1] 。如果使用另一种方法进行敏感性试验，在使用 ECV 之前，必须对该方法进行微量肉汤稀释法验证。 ^b ECV 值基于对 97.5% 的建模种群的统计数据。ECVs 可能会忽略潜在的耐药菌株(非野生型)。 ^c 如果 24 h 生长质控显示生长不足，则应孵育至 48 h。 ^d 葡萄牙念珠菌对两性霉素 B 非固有耐药，但在治疗过程中，葡萄牙念珠菌在体内可能对两性霉素 B 产生耐药性。此研究中发现的表型耐药只用了琼脂梯度条方法，未检测微量肉汤稀释法。		

表D.5 无折点^a的隐球菌属 ECV 值 (μg/mL)

抗真菌药物	菌株名称 (基因型)	ECV ^{b, c}
两性霉素B	格特隐球菌 (VGI)	0.5
	<i>Deuterogattii</i> 隐球菌 (以前的格特隐球菌) (VGII)	1
	新型隐球菌 (VNI)	0.5
氟康唑	格特隐球菌 (VGI)	16
	<i>Deuterogattii</i> 隐球菌 (以前的格特隐球菌) (VGII)	32
	新型隐球菌 (VNI)	8
氟胞嘧啶	格特隐球菌 (VGI)	4
	<i>Deuterogattii</i> 隐球菌 (以前的格特隐球菌) (VGII)	32
	新型隐球菌 (VNI)	8
伊曲康唑	格特隐球菌 (VGI)	0.5
	<i>Deuterogattii</i> 隐球菌 (以前的格特隐球菌) (VGII)	1
	新型隐球菌 (VNI)	0.25
泊沙康唑	新型隐球菌 (VNI)	0.25
伏立康唑	格特隐球菌 (VGI)	0.5
	<i>Deuterogattii</i> 隐球菌 (以前的格特隐球菌) (VGII)	0.5
	新型隐球菌 (VNI)	0.25
^a 针对不同分子类型确定了隐球菌的流行病学界值 (ECV)。目前, 隐球菌的分类处于过渡阶段。VGI 和 VGII 分别是格特隐球菌和 <i>Deuterogattii</i> 隐球菌 (以前叫格特隐球菌) 的分子基因型, 只有通过聚合酶链式反应或基于 DNA 测序等分子分型方法进行识别, 但不能确定是否为唯一物种, 未来可能有新的分类命名。从全球来看, VNI 是新型隐球菌最常见的分子基因型。 ^b 流行病学界值 ECV ^[9] 是使用肉汤微量稀释参考方法建立的 ^[1] 。如果使用另一种方法进行敏感性试验, 在使用 ECV 之前, 必须对该方法进行微量肉汤稀释法验证。 ^c ECV 值基于对 97.5% 的建模种群的统计数据。ECV 可能忽略潜在的耐药菌株 (非野生型)。		

附录 E

(规范性)

EUCAST 微量肉汤稀释法质控范围、折点和 ECOFF 值

EUCAST标准微量肉汤稀释法条件如下，培养基：含2%葡萄糖的RPMI-1640肉汤培养基，MOPS为缓冲液；接种量：最终浓度 0.5×10^5 CFU/mL~ 2.5×10^5 CFU/mL；培养时间：18 h~24 h；结果判读：生长终点判断标准为对两性霉素B完全抑制(>90%)，其他抗真菌药物为50%抑制；质控菌株：近平滑念珠菌ATCC 22019或克柔念珠菌ATCC 6258。

EUCAST微量肉汤稀释法质控菌株MIC范围见表E. 1, 念珠菌体外微量肉汤稀释法MIC折点见表E. 2, 有折点的念珠菌属的ECOFF值见表E. 3, EUCAST有折点的隐球菌属的ECOFF值见表E. 4。

表E. 1 EUCAST 微量肉汤稀释法质控菌株 MIC 范围 (μg/mL)

菌株名称	抗真菌药物	MIC 值范围	靶值
克柔念珠菌 ATCC 6258	两性霉素 B	0.125~1	0.25~0.5
	阿尼芬净	0.016~0.06	0.03
	氟康唑	16~64	32
	氟胞嘧啶	1~4	2
	艾沙康唑	0.016~0.06	0.03
	伊曲康唑	0.03~0.125	0.06
	米卡芬净	0.03~0.125	0.06
	泊沙康唑	0.016~0.06	0.03
	伏立康唑	0.03~0.25	0.06~0.125
近平滑念珠菌 ATCC 22019	两性霉素 B	0.125~1	0.25~0.5
	阿尼芬净	0.25~1	0.5
	氟康唑	0.5~2	1
	氟胞嘧啶	0.125~0.5	0.25
	艾沙康唑	0.008~0.03	0.016
	伊曲康唑	0.03~0.125	0.06
	米卡芬净	0.5~2	1
	泊沙康唑	0.016~0.06	0.03
	伏立康唑	0.016~0.06	0.03
注： Version 5.0, 2020, http://www.eucast.org			

表E. 2 EUCAST 念珠菌体外微量肉汤稀释法 MIC 折点 (μg/mL)

抗真菌药物	菌株名称	MIC折点和判读		
		S	I	R
两性霉素B	白念珠菌	≤ 1	-	>1
	都柏林念珠菌	≤ 1	-	>1
	光滑念珠菌	≤ 1	-	>1
	克柔念珠菌	≤ 1	-	>1
	近平滑念珠菌	≤ 1	-	>1
	热带念珠菌	≤ 1	-	>1
阿尼芬净	白念珠菌	≤ 0.03	-	>0.03
	光滑念珠菌	≤ 0.06	-	>0.06
	克柔念珠菌	≤ 0.06	-	>0.06
	近平滑念珠菌	≤ 4	-	>4
	热带念珠菌	≤ 0.06	-	>0.06
氟康唑	白念珠菌	≤ 2	4	>4
	都柏林念珠菌	≤ 2	4	>4
	光滑念珠菌	≤ 0.001	≤16	>16
	近平滑念珠菌	≤ 2	4	>4
	热带念珠菌	≤ 2	4	>4
伊曲康唑	白念珠菌	≤ 0.06	-	>0.06
	都柏林念珠菌	≤ 0.06	-	>0.06
	近平滑念珠菌	≤ 0.125	-	>0.125
	热带念珠菌	≤ 0.125	-	>0.125
米卡芬净	白念珠菌*	≤ 0.016	-	>0.016
	光滑念珠菌	≤ 0.03	-	>0.03
	近平滑念珠菌	≤ 2	-	>2
泊沙康唑	白念珠菌	≤ 0.06	-	>0.06
	都柏林念珠菌	≤ 0.06	-	>0.06
	近平滑念珠菌	≤ 0.06	-	>0.06
	热带念珠菌	≤ 0.06	-	>0.06

表 E.2 EUCAST 念珠菌体外微量肉汤稀释法 MIC 折点 ($\mu\text{g/mL}$) (续)

抗真菌药物	菌株名称	MIC折点和判读		
		S	I	R
伏立康唑	白念珠菌	≤ 0.06	0.125~0.25	>0.25
	都柏林念珠菌	≤ 0.06	0.125~0.25	>0.25
	近平滑念珠菌	≤ 0.125	0.25	>0.25
	热带念珠菌	≤ 0.125	0.25	>0.25
注1: Version 2.0, 2020, http://www.eucast.org . 注2: EUCAST标准的S, I, R定义: S-标准给药剂量敏感: 当使用标准给药方案治疗成功的可能性很高时, 微生物被归类为敏感; I-增加药物暴露敏感: 通过调整剂量或增加感染部位的浓度治疗成功的可能性很高时, 微生物被归类为“增加药物暴露敏感”; R-耐药: 当治疗失败的可能性很高时, 即使暴露增加, 微生物也被归类为耐药微生物。 注3: *代表ATU: 技术不确定性区域, 白念珠菌对米卡芬净的ATU值是0.03 mg/L, 如果对阿尼芬净敏感, 则报告为敏感, 并加以下注释: 菌株对阿尼芬净敏感, 对米卡芬净的MIC值为0.03 mg/L没有 <i>fks</i> 突变; 如果对阿尼芬净不敏感, 则报告为耐药并且对 <i>fks</i> 基因测序确证其MIC值。				

表E.3 EUCAST 有折点的念珠菌属的 ECOFF 值 ($\mu\text{g/mL}$)

抗真菌药物	菌株名称	ECOFF, WT $\leq$
两性霉素B	白念珠菌	1
	都柏林念珠菌	0.25
	光滑念珠菌	1
	季也蒙念珠菌*	[0.5]
	克柔念珠菌	1
	近平滑念珠菌	1
	热带念珠菌	1
	葡萄牙念珠菌*	[0.5]
	酿酒念珠菌*	[0.5]
	乳酒念珠菌*	[1]
阿尼芬净	白念珠菌	0.03
	光滑念珠菌	0.06
	克柔念珠菌	0.06
	近平滑念珠菌	4
	热带念珠菌	0.06

表 E.3 EUCAST 有折点念珠菌属的 ECOFF 值 (μg/mL) (续)

抗真菌药物	菌株名称	ECOFF, WT≤
米卡芬净	白念珠菌	0.016
	光滑念珠菌	0.03
	近平滑念珠菌	2
	热带念珠菌*	0.06
氟康唑	白念珠菌	0.5
	都柏林念珠菌	[0.5]
	光滑念珠菌	16
	克柔念珠菌*	128
	近平滑念珠菌	2
	热带念珠菌	1
	季也蒙念珠菌*	[16]
	乳酒念珠菌*	[1]
伊曲康唑	白念珠菌	0.06
	都柏林念珠菌	0.06
	光滑念珠菌*	2
	克柔念珠菌*	1
	近平滑念珠菌	0.125
	热带念珠菌	0.125
	季也蒙念珠菌*	2
	葡萄牙念珠菌*	0.125
泊沙康唑	白念珠菌	0.06
	都柏林念珠菌	0.06
	光滑念珠菌*	1
	克柔念珠菌*	0.5
	近平滑念珠菌	0.06
	热带念珠菌	0.06
	季也蒙念珠菌*	0.25

表 E.3 EUCAST 有折点念珠菌属的 ECOFF 值 (μg/mL) (续)

抗真菌药物	菌株名称	ECOFF, WT≤
伏立康唑	白念珠菌	0.03
	都柏林念珠菌	0.03
	光滑念珠菌*	1
	克柔念珠菌*	1
	近平滑念珠菌	0.06
	热带念珠菌	0.125
注1: Version 2.0, 2020, http://www.eucast.org . 注2: *代表无折点念珠菌属的 ECOFF 值。 注3: 括号[]中的 ECOFFs 值暂定。		

表 E.4 EUCAST 有折点的隐球菌属的 ECV 值 (μg/mL)

抗真菌药物	菌株名称	ECOFF, WT≤
两性霉素 B	新型隐球菌	[1]
	格特隐球菌*	[0.5]
泊沙康唑	新型隐球菌*	0.5
	格特隐球菌*	1
伏立康唑	新型隐球菌*	0.5
注1: Version 2.0, 2020, http://www.eucast.org . 注2: *代表无折点隐球菌属的 ECOFF 值。 注3: 括号[]中的 ECOFFs 值暂定。		

参 考 文 献

- [1] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th Edition, M27, 2017.
- [2] Dalhoff A, Ambrose PG, Mouton JW. A long journey from minimum inhibitory concentration testing to clinically predictive breakpoints: deterministic and probabilistic approaches in deriving breakpoints. *Infection*. 2009, 37(4):296-305.
- [3] Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect*. 2006, 12(5):418-425.
- [4] Peyron F, Favel A, Michel-Nguyen A, et al. Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitanae* by Etest. *J Clin Microbiol*. 2001, 39(1):339-342.
- [5] 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(9):3457-3459.
- [6] Shields RK, Nguyen MH, Press EG, et al. The presence of an FKS mutation rather than MIC is an independent risk factor for failure of echinocandin therapy among patients with invasive candidiasis due to *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012, 56(9):4862-4869.
- [7] Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, et al. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011, 70(3):330-343.
- [8] Maria S, Barnwal G, Kumar A, et al. Species distribution and antifungal susceptibility among clinical isolates of *Candida parapsilosis* complex from India. *Rev Iberoam Micol*. 2018, 35(3):147-150.
- [9] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing. 3rd Edition, M59, 2020.
- [10] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 2nd Edition, M61, 2020.
- [11] Hagen F, Khayhan K, Theelen B, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*. 2015, 78:16-48.
- [12] Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect*. 2006, 12(5):418-425.
- [13] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Principles and Procedures for the Development of Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing. 1st Edition, M57, 2016.
- [14] Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012, 56(11):5898-5906.
- [15] 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(9):3457-3459.
- [16] Krisher K, Brown SD, Traczewski MM. Quality control parameters for broth microdilution tests of anidulafungin. *J Clin Microbiol*. 2004, 42(1):490.
- [17] Arendrup MC, Pfaller MA; Danish Fungaemia Study Group. Caspofungin Etest susceptibility testing of *Candida* species: risk of misclassification of susceptible isolates

of *C. glabrata* and *C. krusei* when adopting the revised CLSI caspofungin breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012, 56(7):3965–3968.

[18] Pfaller MA, Diekema DJ, Ostrosky-Zeichner L, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2620–2629.

[19] Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, et al. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011, 70(3):330–343.

[20] Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol.* 2012, 50(6):2040–2046.

[21] Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect.* 2006, 12(5):418–425.

[22] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. 2nd Edition, M60, 2020.

[23] Wang X, Bing J, Zheng Q, et al. The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. *Emerg Microbes Infect.* 2018, 7(1):93.

[24] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 侵袭性真菌病临床实验室诊断操作指南: WS/T 497—2017. 2017.

[25] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*. 3rd Edition, M38M51S, 2022.
