

Etest 方法与微量肉汤稀释法检测 念珠菌属对唑类抗真菌药物的敏感性评价*

张丽^{1,2}, 王贺², 肖盟^{1,2}, 徐英春^{1,2} (1. 中国医学科学院北京协和医院检验科, 北京 100730;
2. 侵袭性真菌病机制研究与精准诊断北京市重点实验室, 北京 100730)

摘要:目的 比较分析 Etest 法检测临床常见念珠菌对氟康唑、伏立康唑和伊曲康唑敏感性与微量肉汤稀释法的一致率。方法 针对 220 株临床常见的 5 种念珠菌, 分别采用 CLSI M27 微量肉汤稀释法和 Etest 法进行药物敏感性检测。分别统计 Etest 法与微量肉汤稀释法检测三种唑类药物的基本一致率(EA)和分类一致率(CA)。结果 Etest 方法和微量肉汤稀释法的 EA 分别为氟康唑(96.8%)、伏立康唑(97.3%)和伊曲康唑(81.8%)。对于氟康唑、伏立康唑和伊曲康唑, 白念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌和克柔念珠菌中两种检测方法的 CA 分别为 96.2%, 97.5% 和 —; 92.5%, 82.5% 和 97.5%; 92.5%, 97.5% 和 —; 97.5%, — 和 70%; —, 100% 和 90%。结论 Etest 法检测念珠菌对唑类药物敏感性与微量肉汤稀释法一致率较高, 是念珠菌唑类药物敏感性测定简便并且准确性较高的检测方法, 推荐在真菌实验室常规使用。

关键词:念珠菌; Etest; 微量肉汤稀释法; 唑类药物

中图分类号: R379.4; R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)04-067-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.04.016

Comparison of Etest and Broth Microdilution Method for Antifungal Susceptibility Testing of Candida Species to Azoles

ZHANG Li^{1,2}, WANG He², XIAO Meng^{1,2}, XU Ying-chun^{1,2}

(1. Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China; 2. Beijing Key Laboratory for Mechanisms Research and Precision Diagnosis of Invasive Fungal Diseases, Beijing 100730, China)

Abstract: **Objective** To compare the Etest and reference M27-A broth microdilution (BMD) methods for testing susceptibilities of major clinical *Candida spp.* to fluconazole, voriconazole, and itraconazole. **Methods** 220 isolates of five *Candida species* were collected from patients, and were performed susceptibility test according CLSI M27 and Etest. The essential agreement (EA) and categorical agreement (CA) between two methods was evaluated. **Results** The EA between Etest and BMD for fluconazole, voriconazole, and itraconazole was 96.8%, 97.3% and 81.8%, respectively. The CA between Etest and BMD for *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei* to fluconazole, voriconazole and itraconazole was 96.2%, 97.5% and —, 92.5%, 82.5% and 97.5%, 92.5%, 97.5% and —, 97.5%, — and 70%, —, 100% and 90%, respectively. **Conclusion** This study demonstrated a high agreement between Etest method and broth microdilution method, and it is also very easy to perform and read the results. These findings would support the use of the Etest method in a routine mycology service.

Keywords: Candida; Etest; broth microdilution method; azoles

近年来念珠菌感染的发病率逐渐增加, 成为引起院内感染的重要致病菌^[1-2]。唑类药物是用于治疗念珠菌感染常用药物, 但随着临床抗真菌药物的广泛使用, 开始出现耐药菌株, 因此及时准确的体外药物敏感性检测对于指导临床抗真菌治疗具有重要的意义^[3-4]。美国临床和实验室标准协会 (clinical and laboratory standards institute, CLSI) 推荐的微量肉汤稀释法 (broth microdilution method, BMD) 为金标准, 但操作繁琐, 耗时耗力,

限制了其在临床中的应用^[5]。Etest 药敏试验方法是改良的琼脂扩散法, 又称为浓度梯度法, 是使用预先制备的含梯度抗生素药物浓度的试纸条, 贴在已涂布真菌的平板后, 经过一段时间孵育, 根据抑菌环大小可以读出相应药物的最小抑菌浓度 (minimal inhibit concentration, MIC) 值。目前国内针对唑类药物 Etest 药敏方法评价数据较少, 因此本试验将以微量肉汤稀释法作为标准, 评价研究 Etest 法检测常见念珠菌氟康唑、伏立康唑和伊曲康

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81572057 和 81802049), 中央高校基本科研业务费 (3332018035)。

作者简介: 张丽 (1987—), 女, 博士, 主管技师, 研究方向: 真菌实验室诊断和耐药机制研究, E-mail: zhanglipumchlab@163.com。

通讯作者: 徐英春 (1964—), 男, 本科, 研究员, 研究方向: 真菌实验室诊断和耐药机制研究, E-mail: xycpumch@139.com。

唑的准确性。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 测试5种念珠菌均来源于侵袭性真菌耐药监测网(CHIF-NET),其中白念珠菌80株,热带念珠菌40株,光滑念珠菌40株,近平滑念珠菌40株和克柔念珠菌20株。质控菌株包括ATCC22019近平滑念珠菌,ATCC90028白念珠菌和ATCC6528克柔念珠菌。

1.2 试剂和仪器 氟康唑、伏立康唑和伊曲康唑标准物质(中国食品药品检定研究院);氟康唑、伏立康唑和伊曲康唑Etest条(法国梅里埃公司);沙氏培养基(英国OXOID公司);RPMI1640培养基,含谷氨酰胺不含碳酸氢盐并以酚红为指示剂,使用0.165 mol/L MOPS缓冲液调pH 7.0±0.1(德国sigma-aldrich公司);全自动加样仪器Sensititre AIM®(赛默飞世尔科技公司)。

1.3 方法

1.3.1 微量肉汤稀释法:微量肉汤稀释法操作严格按CLSI M27文件操作^[5]。抗真菌药物检测浓度范围:氟康唑0.125~64 μg/ml,伏立康唑0.03~16 μg/ml,伊曲康唑0.03~16 μg/ml。35℃孵育24 h后读取药敏结果。

1.3.2 Etest方法:检测方法主要参考厂家说明。用生理盐水制成0.5 MCF浓度的菌悬液;用无菌拭子沾菌液后挤干,轻轻在RPMI1640琼脂表面均匀密涂;将Etest条贴在琼脂表面;35℃孵育24 h后读取药敏结果。抗真菌药物检测浓度范围:氟康唑0.016~256 μg/ml,伏立康唑0.002~32 μg/ml,伊曲康唑0.002~32 μg/ml。

1.3.3 药敏结果判定:根据CLSI M60^[6]对氟康唑和伏立康唑的敏感性进行判定。对于白念珠菌、热带念珠菌和近平滑念珠菌,氟康唑:敏感(sus-

ceptible, S)≤2 μg/ml;剂量依赖性敏感(susceptible-dose dependent, SDD)4 μg/ml;耐药(resistant, R)≥8 μg/ml;伏立康唑:S≤0.12 μg/ml;中介(intermediate, I)0.25~0.5 μg/ml;R≥1 μg/ml。光滑念珠菌,氟康唑:SDD≤32 μg/ml, R≥64 μg/ml;伏立康唑无折点。克柔念珠菌,无氟康唑折点;伏立康唑:S≤0.5 μg/ml, I 1 μg/ml, R≥2 μg/ml。

CLSI M60^[6]未规定伊曲康唑的临床折点,本研究参考CLSI M59^[7]文件中伊曲康唑的流行病学折点(epidemiological cutoff value, ECV)对菌株界定为野生株(wide-type, WT)或非野生株(non-wide-type, NWT)。光滑念珠菌、克柔念珠菌和热带念珠菌的伊曲康唑ECV分别为4, 1和0.5 μg/ml。

1.3.4 结果比较:分别统计两种方法的基本一致率(essential agreement, EA)和分类一致率(categorical agreement, CA)。EA指的是Etest方法和微量肉汤稀释法的MIC值相差在2个梯度以内。CA指的是Etest方法和微量肉汤稀释法的判定结果一致(均为敏感、中介或耐药)的菌株占总测定株数的比率。显著错误(very major error, VME),即微量肉汤稀释法为耐药,Etest方法测试为敏感;大错误(major error, ME),即微量肉汤稀释法为敏感,Etest方法测试为耐药;小错误(minor error, MiE),即其中一种方法为中介(I)或剂量依赖性敏感(SDD),另外一种方法测试结果为敏感(S)或耐药(R)。

2 结果

2.1 Etest方法和微量肉汤稀释法检测念珠菌唑类药物敏感性的基本一致率(EA) 见表1。

表1 Etest方法和微量肉汤稀释法检测念珠菌唑类药物敏感性的基本一致率(EA)

抗真菌药物	药敏试验方法	微量肉汤稀释法(μg/ml)			EA(%)
		范围(μg/ml)	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
氟康唑	BMD	≤0.125~>64	1	16	96.8
	Etest	0.075~>256	0.75	24	
伏立康唑	BMD	≤0.032~>16	0.032	0.5	97.3
	Etest	0.003~>32	0.023	0.38	
伊曲康唑	BMD	0.064~>16	0.25	2	81.8
	Etest	0.006~>32	0.125	6	

注:BMD,微量肉汤稀释法;EA,基本一致率。

分别计算两种检测方法的氟康唑、伏立康唑和伊曲康唑MIC₅₀和MIC₉₀,除伊曲康唑MIC₉₀相差大于1个梯度,其余唑类药物MIC₅₀与MIC₉₀相差

均在1个梯度内。对于氟康唑有7株菌两种方法MIC值相差2个梯度以上,其中5株近平滑念珠菌的Etest结果低于微量肉汤稀释法2个梯度以

上。对于伏立康唑有6株菌两种方法MIC值相差2个梯度以上,其中4株白念珠菌Etest结果低于微量肉汤稀释法2个梯度以上。对于伊曲康唑有40株菌两种方法MIC值相差2个梯度以上,其中13株热带念珠菌和11株近平滑念珠菌Etest结果低于微量肉汤稀释法2个梯度以上,9株光滑念珠菌Etest结果高于微量肉汤稀释法2个梯度以上。

2.2 Etest方法和微量肉汤稀释法检测念珠菌唑类药物敏感性的分类一致率(CA) 见表2。对于氟康唑,白念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌和光

滑念珠菌中两种检测方法的CA一致率均超过90%,Etest检测错误类型均为小错误。对于伏立康唑,白念珠菌、近平滑念珠菌和克柔念珠菌中两种检测方法的CA一致率均大于95%,无显著错误和大错误;而热带念珠菌两种方法CA一致率低于90%,其中3株中介株Etest检测为敏感,4株耐药株Etest检测为中介。对于伊曲康唑基于ECV评价两种检测方法一致率,光滑念珠菌一致率仅为70%,有12株光滑念珠菌野生株Etest检测为非野生株。

表2 Etest方法和微量肉汤稀释法检测念珠菌唑类药物敏感性的分类一致率(CA)									
菌种 (数量)	抗真菌 药物	药敏 试验方法	敏感性判定[n(%)]			错误数量(百分率%)			CA(%)
			S/WT	SDD/I	R/NWT	VME	ME	MiE	
白念珠菌(80)	氟康唑	BMD	77(96.2)	0(0)	3(3.8)				
		Etest	76(95.0)	3(3.8)	1(1.2)	0(0)	0(0)	3(3.8)	96.2
	伏立康唑	BMD	76(95.0)	1(1.2)	3(3.8)				
		Etest	76(95.0)	3(3.8)	1(1.2)	0(0)	0(0)	2(2.5)	97.5
热带念珠菌(40)	氟康唑	BMD	32(80.0)	2(5.0)	6(15.0)				
		Etest	34(85.0)	1(2.5)	5(12.5)	0(0)	0(0)	3(7.5)	92.5
	伏立康唑	BMD	31(77.5)	4(10.0)	5(12.5)				
		Etest	34(85.0)	3(7.5)	3(7.5)	0(0)	0(0)	7(17.5)	82.5
	伊曲康唑	BMD	39(97.5)	-	1(2.5)				
		Etest	40(100)	-	0(0)	1(2.5)	0(0)	-	97.5
近平滑念珠菌(40)	氟康唑	BMD	38(95.0)	1(2.5)	1(2.5)				
		Etest	36(90.0)	2(5.0)	2(5.0)	0(0)	0(0)	3(7.5)	92.5
	伏立康唑	BMD	39(97.5)	0(0)	1(2.5)				
		Etest	38(95.0)	1(2.5)	1(2.5)	0(0)	0(0)	1(2.5)	97.5
光滑念珠菌(40)	氟康唑	BMD	-	31(77.5)	9(22.5)				
		Etest	-	32(80.0)	8(20.0)	0(0)	0(0)	1(2.5)	97.5
	伊曲康唑	BMD	32(80.0)	-	8(20.0)				
		Etest	20(50.0)	-	20(50.0)	0(0)	12(30.0)	-	70.0
克柔念珠菌(20)	伏立康唑	BMD	19(95.0)	1(5.0)	0(0)				
		Etest	19(95.0)	1(5.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	100
	伊曲康唑	BMD	20(100)	0(0)	0(0)				
		Etest	18(90.0)	-	2(10.0)	0(0)	2(10.0)	-	90.0

注:BMD.微量肉汤稀释法;S.敏感;SDD.剂量依赖敏感;I.中介;WT.野生型;NWT.非野生型;CA.分类一致率;VME.显著错误;MER.大错误;MiE.错误。

3 讨论 目前真菌体外药物敏感性试验常用方法包括微量肉汤稀释法,ATB Fungus 3,Sensititre YeastOne药敏板、CLSI纸片扩散法、丹麦ROSCO纸片扩散法和Etest方法。CLSI微量肉汤稀释法是目前认可的金标准方法,但是操作比较复杂,耗时耗力,结果不易判读^[5]。ATB Fungus 3和Sensititre YeastOne药敏板为商品化改良微量肉汤稀释法。CLSI纸片扩散法和丹麦ROSCO纸片扩散法,纸片不同但检测原理相似,即通过药敏纸片抑菌环直径大小判断菌株对不同药物的敏感性,操作

相对简便,但不能直接测得最小抑菌浓度^[8]。Etest方法则是将琼脂扩散法与MIC检测相结合的方法,即将已包被不同药物浓度的药敏条贴在涂布了菌液的琼脂平板上,孵育一定时间后能够根据抑菌环大小直接读取MIC值,因此Etest方法结合了纸片扩散法操作方便、结果易读取及可直接获得MIC值的优势。既往有研究评估唑类药物Etest法与微量肉汤稀释法一致率,但不同研究结果存在差异^[9-12]。在PFALLER等^[9]评估的1568株念珠菌研究中,结果显示对于氟康唑,Etest法与CLSI

微量肉汤稀释法 EA 为 96.4%, 对于伏立康唑两者的 EA 为 98.1%, 与本研究对比结果接近。也有研究比较欧洲 EUCAST 肉汤稀释法与 Etest 法的一致率, 发现伏立康唑一致率最高为 86.6%, 氟康唑 86.6%, 伊曲康唑最低 70.7%^[10], 与本研究结果相符但总体一致率偏低。本研究两种方法检测氟康唑和伏立康唑的一致率较高, EA 和 CA 均超过 90%, 但两种检测方法测得的伊曲康唑 EA 亦较低, 主要原因是部分热带念珠菌和近平滑念珠菌 Etest 检测结果低于微量肉汤稀释法检测结果, 而光滑念珠菌部分菌株 Etest 检测值高于微量肉汤稀释法, 导致一致率偏低。因此对于热带念珠菌、近平滑念珠菌和光滑念珠菌, 伊曲康唑 Etest 结果的判读须谨慎, 但因伊曲康唑并非治疗深部念珠菌感染的首选药物, 因此对于临床治疗侵袭性念珠菌感染疾病影响不大^[13]。另外, 本研究未评估泊沙康唑, 但既往有研究显示泊沙康唑 Etest 结果与微量肉汤稀释法的 CA 为 93%^[14]。本研究存在一定局限性, 首先克柔念珠菌数量偏少, 并且本研究并未覆盖其他少见菌种, 因此研究结论无法代表全部念珠菌属。另外, CLSI M60 仅规定了部分念珠菌对氟康唑和伏立康唑的临床折点, 而伊曲康唑无临床折点, 本研究主要参考 CLSI M59 规定的伊曲康唑流行病学折点进行分析, 因此两种方法统计得出的伊曲康唑 CA 仅供参考。但基于本研究综合考虑, Etest 法与微量肉汤稀释法检测念珠菌唑类药物敏感性一致率较高, 药敏结果易于读取, 是适于在临床实验室检测唑类药物敏感性的方法。

参考文献:

- [1] GUINEA J. Global trends in the distribution of *Candida species* causing candidemia [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(Suppl 6): 5-10.
- [2] WISPLINGHOFF H, EBBERS J, GEURTZ L, et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida spp.* in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities[J]. Int J Antimicrob Agents, 2014, 43(1): 78-81.
- [3] WANG He, XIAO Meng, CHEN Sharon, et al. In vitro susceptibilities of yeast species to fluconazole and voriconazole as determined by the 2010 National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) study[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(12): 3952-3959.
- [4] XIAO Meng, FAN Xin, CHEN Sharon, 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.
- [5] Clinical and Laboratory Standard Institute. CLSI M-27. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts[S]. Approved Standard-Third Edition. CLSI M27A3. Wayne: PA, 2017.
- [6] Clinical and Laboratory Standard Institute. CLSI M-60. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts[S]. Wayne: PA, CLSI M60, 2018.
- [7] Clinical and Laboratory Standard Institute. CLSI M-59. Epidemiological cutoff values for antifungal susceptibility testing, 2nd ed[S]. Wayne: PA, CLSI M59, 2018.
- [8] Clinical and Laboratory Standard Institute. CLSI M-44-A2. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline-second Edition[S]. Wayne: PA, CLSI M44-A2, 2009.
- [9] PFALLER M A, DIEKEMA D J, MESSER S A, et al. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida species* determined by broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001 [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1440-1446.
- [10] DANNAOUI E, PAUGAM A, DEVELOUX M, et al. Comparison of antifungal MICs for yeasts obtained using the EUCAST method in a reference laboratory and the Etest in nine different hospital laboratories[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(7): 863-869.
- [11] KUMAR D, BHATTACHARYYA S, GUPTA P, et al. Comparative analysis of disc diffusion and E-test with broth micro-dilution for susceptibility testing of clinical *Candida* isolates against amphotericin B, fluconazole, voriconazole and caspofungin[J]. J Clin Diagn Res, 2015, 9(11): C1-C4.
- [12] NEGRI M, HENRIQUES M, SVIDZINSKI T I, et al. Correlation between Etest, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of *Candida species* from infection and colonization[J]. J Clin Lab Anal, 2009, 23(5): 324-330.
- [13] ANTINORI S, MILAZZO L, SOLLIMA S, et al. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review[J]. European Journal of Internal Medicine, 2016, 34: 21-28.
- [14] DIEKEMA D J, MESSER S A, HOLLIS R J, et al. Evaluation of Etest and disk diffusion methods compared with broth microdilution antifungal susceptibility testing of clinical isolates of *Candida spp.* against posaconazole[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(6): 1974-1977.