维普资讯 http://www.cqvip.com

临床研究 文章编号:0253-3626(2007)04-0425-03

110 株念珠菌的菌种鉴定及药敏试验

周 汛,李桂明

(重庆医科大学附属第一医院皮肤性病科,重庆 400016)

【摘 要】目的:了解我院皮肤、粘膜念珠菌感染的菌种分布及其对两性霉素 B、酮康唑、咪康唑、伊曲康唑、氟康唑、5-氟胞嘧啶及特比奈芬的体外敏感性。方法:收集临床 110 株念珠菌标本,采用科玛嘉显色培养基及 API20C 鉴定菌种,微量稀释念珠菌药敏试剂板检测其药物敏感性。结果:110 株真菌中白色念珠菌 94 株,热带念珠菌 6 株,克柔念珠菌 4 株,光滑念珠菌 4 株,近平滑念珠菌 2 株。对酮康唑、咪康唑、伊曲康唑、氟康唑、5-氟胞嘧啶及特比奈芬的耐药率分别为 0%、18.28%、1.81%、5.45%、3.63% 及 94.55%。结论:我院念珠菌感染仍以白念珠菌为主,对常用抗真菌药物呈不同程度的耐药,应建立真菌常规菌种鉴定及药敏试验,指导临床合理用药。

【关键词】念珠菌;菌种鉴定;药敏试验

【中国图书分类法分类号】R379.4;R372 【文献标识码】B 【收稿日期】2006-09-30

Susceptibility testing and strain identification of Candida species

ZHOU Xun, et al

(*Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To identify the strain and to study the in-vitro susceptibilities of Candida species collected from clinical samples of skin and mucosa to Amphotericin B, Ketoconazole, Miconazole, Itraconazole, Fluconazole, 5-Flucytosine and Terbinafin. *Methods*: 110 clinical isolates of yeasts were identified by CHROMAGAR and API20C, meanwhile, the susceptibility to six antifungal drugs was examined by microdilution method using Sensititre Yeast One panels. *Results*: There were 94 C.albicans, 6 C.tropicalis, 4 C.krusei, 4 C.glabrata, and 2 C.parapsilosis among 110 isolates of yeasts. There were 0.91%, 1.81%, 18.28%, 1.81%, 5.45%, 3.63% and 94.55% of isolates displaying resistance to Amphotericin B, Ketoconazole, Miconazole, Itraconazole, Fluconazole, 5-Flucytosine and Terbinafin, respectively. *Conclusions*: C.albicans is the main infection strain in our hospital, and candida species display different resistance to six antifungal drugs. It is necessary to test strain identification and susceptibility of candida species to guild the rational clinical drug use.

【Key words】Candida species; Strain identification; Susceptibility testing

念珠菌是条件致病菌,一般健康者可携带但无临床症状。在某些情况下,如机体抵抗力降低,可导致机体菌群失调引起念珠菌大量繁殖而致病。随着抗真菌药物的大量应用,念珠菌耐药株日益增多,且不同菌型的念珠菌对常用抗真菌药物的敏感性存在差异。因此,有必要对临床分离的念珠菌做菌型分型和药物敏感性分析,以指导临床合理用药,同时监测我院皮肤、粘膜念珠菌感染的菌种变迁情况。

1 材料和方法

1.1 病例资料

收集 2006 年 4 月~2006 年 8 月在我院皮肤性病科及妇产科门诊就诊的念珠菌性龟头炎、阴道炎和口腔炎患者,取真菌镜检阳性的标本于沙堡氏培养基 37℃培养 24~48h,传代分离纯化,收集到纯种念珠菌 110 株,其中,念珠菌性龟头炎 35 例,念珠菌性阴道炎 60 例,念珠菌性口腔炎 15 例。分布年龄 19~86 岁。

1.2 试剂来源

科玛嘉(CHROMAGAR)念珠菌显色培养基、冻干型酵母样真菌定量(MIC)药敏测试盒购自天津金章科技发展有限公司。细菌菌液浓度比浊仪购自湖南天地人生物科技发展有限公司。

1.3 念珠菌分型

取沙堡氏培养基上已纯化的菌落在科玛嘉(CHROMAGAR)念珠菌显色培养基平板上画线接种,37℃培养 16~24h,观察结果。根据念珠菌生长菌落在显色培养基上的颜色进行菌种鉴定,绿色—白念珠菌;蓝灰色—热带念珠菌;粉红、白

作者介绍:周 汛(1970-),女,硕士,
主要研究方向:病原微生物感染性皮肤病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

色—克柔或其它念珠菌。其中非白念珠菌全部辅助以 API20C AUX 生化卡协助鉴定菌种。

1.4 药物敏感试验

挑取纯化后的菌落混匀于 1.5ml 细菌稀释管中,用比浊仪校正至 0.5~1 麦氏浊度菌悬液(相当于血细胞计数 1×10^6~5×10^6CFU/ml 左右),以无菌滴管取比浊好的的菌液 1滴加到细菌 MIC 稀释液瓶中混匀,再用该无菌滴管从细菌 MIC 稀释液瓶中取菌液 2 滴将所有含培养基孔加满,用 96 孔微型震荡器震荡 5min,最终接种浓度为 5×10^2~2.5×10^3CFU/ml 左右。将试剂盒置于保鲜盒里放入 37℃温箱中,孵育 48h 观察结果。

1.5 MIC 值的判读

二性霉素 B MIC 值为生长被完全抑制的药物最低浓度孔;5-FC 和咪唑类药物可能出现拖尾现象,以不含药生长对照孔为准,将不生长(0)或生长不明显(+)或明显少于(++ 80%生长被抑制)的孔定为 MIC 终点;对生长略少于对照孔(+++)或生长等于对照孔(++++)的孔定为不被药物所抑制。

1.6 药物敏感性判定标准

MIC(mg/L)值:二性霉素 B(Amphotericin B)S≤1,I=2,R≥4;酮康唑(Ketoconazole)S≤1,SDD 2-8,R≥16;咪康唑(Miconazole)S≤1,SDD 2-4,R≥8;伊曲康唑(Itraconazole)S≤0.125,SDD 0.25-0.5,R≥1;氟康唑(Fluconazole)S≤8,SDD 16-32,R≥64;5-氟胞嘧啶(5-Flucytosine)S≤4,I 8-16,R≥32;特比奈芬(Terbinafin)S≤0.5,SDD 1,R≥2。判读范围见表 1(S 表示敏感;SDD 表示剂量依赖性敏感;I 表示中介性耐药;R 表示耐药。伊曲康唑、氟康唑、5-氟胞嘧啶药敏制定标准按照 NCCLSM38—P 执行,其余各药按照血药浓度制定相应的药敏判定标准)。

1.7 实验质控

采用 NCCLS 推荐的标准株 ATCC90028 白念珠菌,由第三军医大学西南医院皮肤科真菌实验室惠赠。标准株质控范围依据 NCCLS 提供标准,(见表 1),质控菌的药敏结果符合 NCCLS 标准。

表 1 标准株与试验株 6 种药物的判读标准(mg/L)

菌 株	二性霉素 B	酮康唑	咪康唑	伊曲康唑	氟康唑	5-氟胞嘧啶	特比奈芬
试验株	≤1~≥4	≤1~≥16	≤1~≥8	≤0.125~≥1	≤8~≥64	≤4~≥32	≤0.5~≥2
标准株	0.125~0.25	0.03~0.06	0.125~0.25	0.25~0.5	0.25~0.5	0.5~1	≥8

2 结 果

2.1 110 株白念珠菌鉴定结果

白色念珠菌 94 株(占 85.45%),热带念珠菌 6 株(占 5.45%),克柔念珠菌 4 株(占 3.64%),光滑念珠菌 4 株(占 3.64%),近平滑念珠菌 2 株(占 1.82%)。

2.2 药敏试验结果

念珠菌属对特比奈芬基本耐药,耐药率高达 94.55%;对咪康唑的耐药率为 18.28%;对二性霉素 B、伊曲康唑、氟康唑和 5-氟胞嘧啶较敏感(二性霉素 B MIC50 为 1mg/L,余耐药率分别为 1.81%、5.45%和 3.63%);对酮康唑则是 100%敏感。酮康唑和伊曲康唑的 MIC50 和 MIC90 值相对较低(酮康唑 0.06mg/L 和 0.5mg/L,伊曲康唑 0.125mg/L 和 0.25mg/L)。对非白念珠菌中的光滑念珠菌和克柔念珠菌,氟康唑对这两种念珠菌显示出较高的耐药性(耐药率分别为 50%和 25%)。但对氟康唑耐药的菌株对伊曲康唑依然敏感,未发现二者交叉耐药现象。见表 2,3。

3 讨 论

念珠菌广泛存在于自然界,并寄生于人体皮肤和粘膜,属于条件致病菌。随着大量广谱抗生素的应用,糖皮质激素的广泛应用,糖尿病、性传播疾病等发病率的增加,使条件致病真菌的感染呈上升趋

表 2 7 种抗真菌药物的药物敏感性 [株(%)]和 MIC50、MIC90(mg/L)

抗真菌药物	S	SDD	I	R	MIC_{50}	MIC_{90}
二性霉素 B	81(73.63)	-	28(25.45)	1(0.91)	1	2
酮康唑	110(100)	-	-	-	0.06	0.5
咪康唑	79(71.82)	11(10)	-	20(18.28)	0.25	8
伊曲康唑	100(90.91)	8(7.27)	-	2(1.81)	0.125	0.25
氟康唑	94(85.45)	11(10)	-	6(5.45)	0.25	4
5-氟胞嘧啶	104(94.55)	-	2(1.81)	4(3.63)	1	4
特比奈芬	6(5.45)	-	-	104(94.55)	≥8	≥8

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 不同念珠菌对抗真菌药物的敏感性(mg/L)

真菌	株数	二性霉素 B	酮康唑	咪康唑	伊曲康唑	伊曲康唑	氟康唑	5-氟胞嘧啶	特比奈芬
白念珠菌	94	0.03~4	0.015~0.5	0.03~8	0.015~4	0.015~4	0.06~≥64	0.03~≥32	0.25~≥8
热带念珠菌	6	0.03~2	0.03~0.5	0.015~8	0.015~0.25	0.015~0.25	0.25~≥64	0.125~≥32	≥8
克柔念珠菌	4	0.125~2	0.06~0.5	0.25~2	0.25~4	0.25~4	0.25~≥64	0.25~0.5	≥8
光滑念珠菌	4	0.25~2	0.03~0.5	0.06~8	0.03~0.5	0.03~0.5	8~≥64	0.125~1	≥8
近平滑念珠菌	2	1	0.06~0.125	0.25~0.5	0.03~0.25	0.03~0.25	0.5~4	1~2	≥8

势。同时,新的抗真菌药物的相继问世和抗真菌药物的大量不合理应用,使临床分离的致病真菌对或多种抗真菌药物耐药现象不断增加。因此,应加强真菌耐药性监测,指导临床合理用药。

本文鉴定分析 110 株来自念珠菌性龟头炎、阴道炎和口腔炎的菌株,共检出 5 个菌种,其中依然以白念珠菌检出率最高占 85.45%,与国内报道接近[1,2],而美国流行病学研究发现,白念珠菌过去是最常见的念珠菌病的病原菌,但近来检测结果提示白念珠菌仅为 55%,非白念珠菌为 45%[3],与我们的结果差别较大,可能与标本来源于不同人群、地区及不同时间有关。

各种抗真菌药物中,二性霉素 B、酮康唑、伊曲康唑、氟康唑和 5-氟胞嘧啶对念珠菌均有良好的抗菌活性,其中酮康唑和伊曲康唑的 MIC_{50} 和 MIC_{90} 值相对较低,但伊曲康唑的 MIC_{50} 和 MIC_{90} 值最接近,提示其抑菌力更强。对氟康唑耐药的菌株对伊曲康唑依然敏感,未发现二者交叉耐药现象。咪康唑的耐药率较高,且多为念珠菌性阴道炎的患者,可能与长期不正规使用咪康唑栓剂有关。特比奈芬基本耐药,故不主张用特比奈芬治疗念珠菌病。

本试验的药敏结果与文献报道不尽相同[4],可能与不同人群、地区、时间以及抗真菌药物的使用情况有关,因此强调常规开展真菌菌种鉴定和药敏试验的重要性,以指导临床合理用药。

参 考 文 献

[1] 刘 方,李春阳.四种抗真菌药对 106 株院内感染念珠菌的药敏试验[J].中华皮肤科杂志,2001;34:450-451.

[2] 陈求刚,陈冬梅,建 美,等.727 株真菌的分布与药敏分析[J].中国微生态杂志,2001;13:99-100.

[3] Rangel-Frausto MS, Wiblin T,Blumberg HM,et al.National Epidemiology of Mycoses Survey. Variations in rates of Candida Bloodstream Infections due to candida species in Seven surgical I-CUs and six Neonatal ICUs[J].Clin Infect Dis,1999;29:253-258.

[4] 徐英春,王 澎,陈民钧.辉瑞公司全球多中心酵母菌敏感性监测结果[J].中国抗感染化疗杂志,2003;3(3):187-190.

(上接第 424 页)

chromogranin A concentrations in prostatic carcinoma[J].J Urol,1991;146:358-361.

[2] Abrahamsson PA,Wadstrom LB,Alumets J,et al.Peptide-hormone and 5-HT immunoreactive tumor cell in carcinoma of prostate [J].Pathol Res Pract,1987;182:298-232.

[3] Isshiki Shinzou,Akakura.Chronogranin A concentration as aserum marker to predict prognosis after endocrine therapy for prostate cancer[J].J Urol,2002;167(2,Part 1 of 2):512-515.

[4] Isshiki S,Akakura K,Komiya A,et al.chromogranin a concentration as a serum marker to predict pognosis after endocrine therapy fot prostate cancer[J].J Urol,2003;169(6):2305.

[5] Schmid K,Helpap B,Totsch M,et al.Immnohistochemical locatization of chromogranin A and B and secretogranin Ⅱ in normal hyperplastic and neoplastic prostate[J].Histopathology,1994;24:233.

[6] Cussenot D,Villette JM,Cariou F,et al.Prognostic value of neuroendocrine,Markers in prostatic carcinoma [J].J Urol,1995;153:291-193.

[7] Alfre B,Luigi D,Alessandra M,et al.Circulating neuroendocrine marks in patient with prostate carcinoma [J].Cancer,2000;88:2591-2597.