



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXX-20XX/ISO 16256:2021

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微生物药物的 体外活性检测微量肉汤稀释参考方法

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

(ISO 16256, IDT)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言..... iii

引言..... iv

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 试验程序..... 3

4.1 概述..... 3

4.1.1 稀释板和方法..... 3

4.1.2 使用一次性微量稀释板的条件..... 3

4.2 培养基..... 3

4.2.1 概述..... 3

4.2.2 肉眼判读法..... 3

4.2.3 光度判读法..... 3

4.3 抗真菌药物..... 3

4.3.1 概述..... 4

4.3.2 原液的配制..... 4

4.3.3 工作液的配制..... 5

4.4 微量肉汤稀释板的制备..... 7

4.4.1 肉眼判读测试制备-肉眼判读法..... 7

4.4.2 光度判读测试的制备-光度判读法..... 7

4.5 微量稀释板的贮存..... 7

4.6 接种物的制备..... 7

4.6.1 概述..... 7

4.6.2 肉眼判读接种物制备..... 7

4.6.3 光度判读接种物制备..... 7

4.7 微量稀释板的接种..... 8

4.8 微量稀释板的孵育..... 8

4.8.1 概述..... 8

4.8.2 肉眼判读法..... 8

4.8.3 光度判读法..... 8

4.9 MIC 结果读取..... 9

4.9.1 概述..... 9

4.9.2 肉眼判读方法..... 9

4.9.3 光度判读方法..... 9

4.10 MIC 值的解释..... 9

5 质量控制(QC)..... 9

附录 A（资料性）RPMI-1640 培养基..... 13

附录 B（资料性）0.5 麦氏硫酸钡浊度标准..... 15

参考文献..... 16

前言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则起草。

为便于使用，本文件做了下列编辑性修改：

- 用小数点“.”代替作为小数点的逗号“,”；
- 删除国际标准原文中的前言；
- 为便于理解条款，增加了部分注释。

本文件代替 YY/T 1728-2021《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微生物药物的体外活性检测参考方法》，与 YY/T 1728-2021 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 在标题中增加了“微量肉汤稀释”；
- 删除了念珠菌属通过肉眼判读法的 48h 读数要求；
- 删除了超出本试验性能文件范围的关于敏感性和耐药性的定义；
- 增加了使用由制造商提供的“处理”的微量稀释板对酵母菌属进行抗真菌测试结果影响的考虑；
- 更改了肉眼判读和光度判读途径的活菌计数试验方法；
- 增加了药敏检测和质量控制范围表中新的抗真菌药物（艾沙康唑、雷扎芬净）；
- 增加了 RPMI-1640 配方成分的详细表征，已知该配方可提供对念珠菌属和新型隐球菌的抗真菌敏感性试验的可重复结果；
- 更改了附录分配；
- 更改了有关酵母样真菌抗真菌药敏试验性能的更多相关信息参考文献。

本文件等同采用 ISO 16256: 2021《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微生物药物的体外活性检测微量肉汤稀释参考方法》

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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件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/TC136）归口。

本文件主要起草单位：

本文件主要起草人：

引言

抗微生物药物体外敏感性试验通常是针对于可能导致疾病的微生物,尤其是那些被认为对常用的抗微生物药物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型抗微生物药物与现有抗微生物药物之间的比较等方面也很重要。

稀释法常被用来测定抗微生物药物的最低抑菌浓度(MIC, minimum inhibitory concentration),是抗真菌药物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微生物药物的比较性研究、对于常规方法所得结果不可靠或临床需要定量结果的微生物试验,确定在常规检测中得出模棱两可结果的微生物的敏感性。在稀释法试验中,通过检测微生物在含有系列稀释浓度抗微生物药物的一系列琼脂平板(琼脂稀释法)上或肉汤(肉汤稀释法)中能否产生可见生长的来确定MIC。

抗微生物药物的最低抑菌浓度(MIC值)是指在规定的体外试验条件下,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微生物药物的最低浓度(以mg/L为单位)。MIC值可提供微生物对抗微生物药物的敏感性信息,并指导临床医师制定相应治疗决策。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 ± 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)的抗微生物药物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。

微量肉汤稀释法指的是在微量稀释板上进行的肉汤稀释试验。

本文件所描述的参考方法预期用于酵母样真菌的纯培养物的检测。本文件所描述的微量肉汤稀释法与美国临床和实验室标准化协会(CLSI)^{[1][5]}以及欧洲抗微生物药物敏感性试验委员会(EUCAST)^{[2][10]}所用的方法是等同的。这些方法起初显示给出相似的氟康唑MIC,如果不是完全一致,最大差异在2mg/L内^[3]。此外,这些方法显示批准的抗真菌药物两株质控菌株给出的MIC结果相似,如本文件中描述,尽管光度法的质量控制结果可略低于肉眼判读法。希望使用本文件来进行新的抗真菌药物研究,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,可基于MIC结果判读是通过肉眼观察(CLSI方法)^[5]还是使用光度法(EUCAST方法)^{[2][10]}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。在本文件的第一版,即YY/T 1728-2021/ISO 16256: 2012文件中,报告的质量控制测试是使用微量肉汤稀释板进行的,制造商未以某种方式处理用于目视或光度计方法的塑料板。

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微生物药物的体外活性检测微量肉汤稀释参考方法

警告-使用本文件可能涉及危险性材料、操作和设备。本文件无意陈述使用本文件所涉及的所有安全问题。使用本文件前，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

本文件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尚未用于双相型真菌的酵母相菌研究，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。这些方法不在本文件范围内。

本文件描述的微量肉汤稀释参考法可通过两种途径之一实现。一种途径通过肉眼确定 MIC (CLSI 方法)^{[1][15]}；第二种途径通过光度法确定 MIC (EUCAST 方法)^{[2][10]}。MIC 反映了在规定试验条件下药物的活性，并在考虑到其它因素下可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。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文件的范围。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^{[5][15]}。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 规范性引用文件

本文件中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文件。

ISO和IEC维护的用于标准化工作的术语数据库如下：

- ISO在线浏览平台：<https://www.iso.org/obp>
- IEC 电子百科：<https://www.electropedia.org/>

3.1

抗真菌药物 antifungal agent

指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。

3.2 抗真菌药物-属性

3.2.1

效价 potency

指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。

3.2.2

浓度 concentration

抗真菌药物（3.1）在规定体积液体中的量。

注 1：该浓度以毫克/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。

3.3

原液 stock solutions

用于进一步稀释的初始溶液。

3.4

最低抑菌浓度 minimum inhibitory concentration

MIC

在规定的体外试验条件下、规定的时间内，能降低一定数量生长的最低浓度（3.2.2）。

注：最低抑菌浓度（MIC）以 mg/L 表达。

3.5

野生型 wild type

给定真菌菌株对某抗真菌药物（3.1）没有表型可检测到的获得性耐药机制。

3.6

参考菌株 reference strains

有特定分类编号，具有稳定、确定的抗真菌药物敏感性表型和/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并用于质量控制，其通常以贮存培养物的形式进行保存，试验所用工作培养物来源于此。

3.7 敏感性试验方法

3.7.1

肉汤稀释法 broth dilution

是一种容器中加入适当体积抗真菌（3.1）溶液，该抗真菌药物浓度（3.2.2）采用递增（通常两倍）增加，再加入适当体积的含一定接种量（3.9）菌液肉汤（3.8）的技术。

注：该方法的目的是确定最低抑菌浓度（3.4）。

3.7.2

微量肉汤稀释法 broth micro-dilution

指在微量稀释板中进行的肉汤稀释（3.7.1）试验，每孔体积不超过 $300 \mu\text{L}$ 。

注：微量肉汤稀释法也称为肉汤微量稀释法。

3.8

肉汤 broth

用于酵母样真菌体外生长的液体培养基。

3.9

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。

4 试验程序

4.1 概述

4.1.1 稀释板和方法

本试验是在一次性塑料微量稀释板中进行的。该方法基于配制两倍浓度的抗真菌药物工作液，每孔加抗真菌药物工作液体积 100 μ L，接种量也以体积 100 μ L 加入。

4.1.2 使用一次性微量稀释板的条件

这些测试最初是在没有经制造商进行额外处理的微量肉汤稀释板中进行的。制造商用未经处理的稀释板（本文件最初所依据的是在此稀释板上）的质量控制数据表明，所有测试的抗真菌药物的质量控制结果均符合规范。在一些司法管辖区，有建议使用处理的塑料稀释板能使结果更加一致。通过涂层或电晕放电对塑料进行处理以给塑料带电荷，用于组织培养研究并使得组织细胞粘附到塑料上。尚不清楚该过程是否在所有微量稀释板制造商进行了标准化。已知与未处理的稀释板相比，处理过的稀释板对某些抗真菌药物相比会导致 MIC 升高。这种处理可能会影响这些药物的结果报告^[13]。那些使用“处理过的”微量稀释板并通过光度计读数的实验室宜确保测试使用处理过的稀释板给出与表 5 中所示相同的质量控制结果。这些质量控制范围最初是使用未经处理的稀释板进行的，数据表明对于几乎所有的抗真菌药物，本文件中列出的两株标准菌株（近平滑念珠菌 ATCC®22019 和克柔念珠菌 ATCC®6258）两种测试/读数方法的质量控制范围在 1 个 \log_2 稀释度。除了卡泊芬净（见表 5）外，光度判读法的这些菌株的质量控制范围与最初使用未经处理的稀释板^[10]和处理过的稀释板^[2]报告的质量控制范围相同。宜谨慎解释使用处理过的稀释板^[2]通过肉眼判读方法^[5]提供的结果和光度判读法两种测试方法用于临床分离株比较性 MIC 观察结果。

4.2 培养基

4.2.1 概述

对于两种判读方法都应使用 RPMI-1640 肉汤。（两种完整产品版本的 RPMI-1640 葡萄糖肉汤的制备方法详见表 A.1 和 A.2）。

4.2.2 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，所含抗真菌药物稀释液为两倍浓度，按相同体积加入含调整好接种量酵母菌悬液的 RPMI-1640 肉汤。

4.2.3 光度判读法

RPMI-1640 培养基宜含 2%葡萄糖。RPMI-1640 肉汤和抗真菌药物均配制成两倍浓度，随后加入含在等体积灭菌蒸馏水的接种物。

4.3 抗真菌药物

4.3.1 概述

受试抗真菌药物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。所有抗真菌药物均应有批号、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它的保存条件，否则受试物应保存于密闭容器中，避光、-20℃、使用干燥剂。易吸湿的试剂宜分装成小份，在每次试验情况下使用其中之一。

为避免凝结水而损失效价，在打开装有受试物的容器之前，应将其恢复至室温。

4.3.2 原液的配制

抗真菌药物需要使用校准过的分析天平称量。配制抗真菌药物标准溶液时，应根据受试物干粉的效价，通过公式（1）和公式（2）计算出标准液所需抗真菌药物的质量或所需稀释溶剂的体积。

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

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

式中：

- ρ —— 原液的浓度（mg/L）
- m —— 抗真菌药物（干粉）的质量（g）
- P —— 抗真菌药物（干粉）的效价（mg/g）
- V —— 稀释剂的体积（L）

虽然某些抗真菌药物的溶解度是个限制因素，但抗真菌药物原液的浓度宜为 1000 mg/L 或更高。原液的实际配制浓度取决于工作液的配制方法（系列稀释）。某些抗真菌药物需要用备选的溶剂来溶解（见表 1）。配好的抗微生物药物溶液通常不必进行灭菌。如果必要，宜采用膜过滤除菌，但除菌前后的样品宜通过分析进行比较以确保抗真菌药物样品在除菌过程中未发生吸附损失。

除非原液有在规定贮存条件下的稳定性信息，否则每个实验批均宜新鲜配制。

表 1 抗真菌药物原液的制备所需的溶剂和稀释剂

抗真菌药物	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 ^a	培养基
阿尼芬净 (Anidulafungin)	二甲基亚砷 ^a	培养基
卡泊芬净 (Caspofungin)	二甲基亚砷 ^a	培养基
氟胞嘧啶 (Flucytosine)	二甲基亚砷 ^a	培养基
氟康唑 (Fluconazole)	二甲基亚砷 ^a	培养基
艾沙康唑 (Isavuconazole)	二甲基亚砷 ^a	培养基
伊曲康唑 (Itraconazole)	二甲基亚砷 ^a	培养基
酮康唑(Ketoconazole)	二甲基亚砷 ^a	培养基
米卡芬净 (Micafungin)	二甲基亚砷 ^a	培养基
泊沙康唑 (Posaconazole)	二甲基亚砷 ^a	培养基
里氟康唑 (Ravuconazole)	二甲基亚砷 ^a	培养基
雷扎芬净 (Rezafungin)	二甲基亚砷 ^a	培养基
伏立康唑 (Voriconazole)	二甲基亚砷 ^a	培养基
^a 二甲基亚砷 (DMSO) 有潜在毒性。		

4.3.3 工作液的配制

试验用抗真菌药物工作液浓度区间的选择取决于微生物和抗真菌药物。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 1mg/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确认。例如有报道系列稀释更亲水性化合物可给出可接受结果^[6]。除非抗真菌药物溶液有来自厂家在指定贮存条件下的稳定性信息，所有工作液均应当天配制当天使用。

表 2 肉汤稀释法敏感性试验中水溶性抗真菌药物稀释系列的制备方案

抗真菌药物溶液										
步骤	浓度	源	体积	+	培养基	=	中间浓度	=	1:10 终浓度	Log ₂
	mg/L		mL		mL		mg/L		mg/L	
1	5120	原液	1.0		3.0		1280		128	7
2	5120	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		0.0625	-4
13	2.5	步骤 10	0.5		3.5		0.3125		0.03125	-5

表 3 肉汤稀释法敏感性试验中水不溶性抗真菌药物稀释系列的制备方案

抗真菌药物溶液										
步骤	浓度	源	体积	+	溶剂 (DMSO) a	=	中间浓度	=	1:100 终浓度	Log ₂
	mg/L		mL		mL		mg/L		mg/L	
1	1600	原液					1600		16.0	4
2	1600	原液	0.5		0.5		800		8.0	3
3	1600	原液	0.5		1.5		400		4.0	2
4	1600	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		0.0625	-4
10	25	步骤 7	0.5		3.5		3.13		0.0313	-5
a 二甲基亚砷。										

4.4 微量肉汤稀释板的制备

4.4.1 肉眼判读测试制备—肉眼判读法

圆底 96 孔一次性塑料微量稀释板每行 10 孔中每孔加入工作液 100 μ L, 抗真菌药物浓度为最终所需浓度的 2 倍。

至少每行宜保留一个加入 100 μ L 不含抗微生物药物的培养基的孔以作为每株试验菌的生长对照。同样, 每个测试菌株还宜设置一个只加入 200 μ L 无抗真菌药物培养基作为未接种的阴性对照孔。

4.4.2 光度判读测试的制备—光度判读法

平底 96 孔一次性塑料微量稀释板每孔加入工作液 100 μ L, 2 倍浓度培养基的中, 抗真菌药物浓度为最终所需浓度的 2 倍。

至少每行宜保留一个加入 100 μ L 不含抗真菌药物培养基的孔以作为每株试验菌的生长对照。同样, 每个测试菌株还宜设置一个只加入 200 μ L 无抗真菌药物培养基作为未接种的阴性对照孔。

4.5 微量稀释板的贮存

充装好的微量稀释板可以立即使用, 也可以放在密封塑料袋中迅速冷冻贮存(CLSI 法, 肉眼判读: -70°C 最多 6 个月; EUCAST 法, 光度判读: -70°C 或更低最多 6 个月, 或 -20°C 不超过 1 个月)。允许的贮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。稀释板不应存放于可解冻的自动除霜的冰箱里, 抗真菌药物溶液不应被复冻, 因为反复冻融可加速某些抗真菌药物的降解。

4.6 接种物的制备

4.6.1 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重现性是非常关键的。

每个分离菌株都宜转种到非抑制性琼脂培养基以确保纯度和活力。

4.6.2 肉眼判读接种物制备

宜挑取 5 个直径约 1mm 的菌落来制备接种物, 念珠菌属取 (20 ± 2) h 的培养物, 新型隐球菌取 (46 ± 2) h 的培养物。菌落宜悬浮于 5mL 灭菌 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°C 。

所得悬液宜涡旋混匀 15s, 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 530nm 波长 0.5 麦氏标准 (McFarland standard, 见附录 B) 产生的光密度。此过程产生的酵母菌悬液的浓度为 $(10^6 \sim 5 \times 10^6)$ 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, 得到两倍浓度最终测试接种量[$(10^3 \sim 5 \times 10^3)$ CFU/mL]。当各微孔接种 100 μ L 接种量时, 该接种量(两倍浓度) 1:1 稀释, 得到期望的最终接种量为 $(0.5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^3)$ CFU/mL。

4.6.3 光度判读接种物制备

宜挑取 5 个直径约 1mm 的菌落来制备接种物，念珠菌属取(18~24)h 的培养物或新型隐球菌取 (46 ±2) h 的培养物。菌落宜悬浮于 5mL 灭菌蒸馏水。

所得悬液宜涡旋混匀 15s，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 530nm 波长 0.5 麦氏标准 (McFarland standard，见附录 B) 产生的光密度，此过程产生的酵母菌悬液的终浓度为($10^6 \sim 5 \times 10^6$) 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，得到两倍浓度测试接种量 [$(10^5 \sim 5 \times 10^5)$ CFU/mL]。当各微孔接种该 100 μ L 接种量时，该接种量(两倍浓度)1:1 稀释，得到期望的最终接种浓度($0.5 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$) CFU/mL。

4.7 微量稀释板的接种

为了保持活细胞数量，接种菌悬液标准化后应在 30 min 内接种至微量稀释板上。对于肉汤中含稀释抗真菌药物 100 μ L 的各孔 (见 4.4.1 和 4.4.2)，每孔加入 100 μ L 酵母菌悬液。

应定期对微量稀释板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：对于肉眼判读方法稀释板接种完成后迅速从生长对照孔中取 20 μ L，涂布到适宜的琼脂平板 (如沙保弱葡萄糖琼脂) 表面，($35 \pm 2^\circ\text{C}$) 孵育 24h 后，进行菌落计数并乘以 100*。正确的接种量会产生 10~80 个菌落。对于光度判读方法，接种完成后迅速从生长对照孔中取 10 μ L 并用 2mL 灭菌蒸馏水稀释，再取此稀释悬液 100 μ L 涂布到适宜的琼脂平板表面，(35 ± 2) $^\circ\text{C}$ 孵育 24h 后进行菌落计数，可接受菌悬液菌落数量应该在 5~125 之间。

4.8 微量稀释板的孵育

4.8.1 概述

接种好的微量稀释板在孵育之前宜密封于聚乙烯袋中或用密封盖盖好，或其它方法防止失水浓缩。为防止受热不均匀，稀释板叠放时高度不宜超过 5 块。

对于多数抗真菌药物-酵母菌组合，微量稀释板在(35 ± 2) $^\circ\text{C}$ 的大气环境中孵育 (24 ± 2) h。某些新型隐球菌分离株可能生长不充分除非孵育温度降低到 30°C 。

4.8.2 肉眼判读法

基于酵母菌属和测试的抗真菌药物，孵育时间会有变化。除新型隐球菌需要孵育 48h 外，所有测试在 24h 孵育后可以读数。这些信息的更新见 CLSI 文件 M60 ED2:2020^[5]。

4.8.3 光度判读法

如果阳性对照孔吸光度 ≥ 0.2 ，宜在 (24 ± 2) h 后读数进行 MIC 判定。如果阳性对照吸光度 < 0.2 ，试验应再孵育 (12~24) h。48h 后吸光度不能达到 0.2 表明试验失败。

*注：菌落计数后乘以 100 换算为浓度数值 (CFU/mL)，如仅计数菌落可不乘以 100。(译者注)。

4.9 MIC 结果读取

4.9.1 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。

4.9.2 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（在抗真菌药物浓度一定范围内出现部分生长抑制）。据估计氟康唑对 5% 左右的分离株会发生此现象^{[3][7]}。这种拖尾生长使得一个分离株 24h 后看起来敏感，如果做了 48h 读数则看起来完全耐药。已知白色念珠菌中的麦角固醇含量与 24h 目测结果相关^[7]。由于此原因，24h 读数是标准的，生长较慢的新型隐球菌除外。

对于肉眼判定 MIC，宜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轻轻摇动微量板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。

4.9.3 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 到 530 nm 之间的波长读取。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。

4.10 MIC 值的解释

本文件任何一种途径给出 MIC 结果的临床解释宜依据构成本试验方法基础的相应标准机构最新认可的折点。因此抗真菌药物通过肉眼读取终点确定的 MIC 解释宜基于 CLSI 最新出版指南^[16]；通过光度法读取确定的 MIC 解释宜使用来自 EUCAST 最新指南^[17]

5 质量控制(QC)

试验结果的质量通过伴随使用的标准质控菌株（见表 4 和表 5）来监测。贮存质控菌株宜冻干或在 -60℃ 或低于 -60℃ 冷冻保存。质控菌株的工作培养物通过贮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。质控菌株培养按常规培养同样方式试验。且各质控菌株对各抗真菌药物的 MIC 检测结果宜在表 4 和表 5 规定的范围内^{[4] [5] [8] [9] [10] [11] [14]}。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，宜认真检查程序的所有方面。并且下一步参考试验宜暂停直到质控值再回到正确的范围。本文件中建立的肉眼判读法质量控制范围是使用未经塑料稀释板制造商处理的微量稀释板进行的。对于光度判读法，使用未经处理的稀释板和处理过的稀释板的质量控制范围已显示为相似，对近平滑念珠菌 ATCC® 22019 和克柔念珠菌 ATCC® 6258 这两株已用于所有国际质量控制指南^{[2] [5] [10]}质量菌株定义相同质控范围。这些范围与肉眼判读产生的范围相似，但往往比目测低一个 \log_2 稀释度。使用经处理的稀释板

测试的任何抗真菌药物的微小质量控制范围差异^[2]如表 5 所示。提醒用户制造商对稀释板的电子处理可能不是完全相同（详见 4.1.2）。

在世界某些地区，某些抗真菌药物-酵母霉菌属使用了额外的质量控制菌株（例如参考文献[2]和[10]）。建议要求查阅适当的参考文献，因为这些菌株尚未针对肉眼判读和光度判读法进行比较。

表 4 肉眼判读微量肉汤稀释试验 2 株质控菌株的 24h MIC 推荐范围^{[1][5][8][9]}

微生物	抗真菌药物	MIC 范围(mg/l)
近平滑念珠菌 ATCC®22019	两性霉素 B (Amphotericin B)	0.25-2.0
	阿尼芬净 (Anidulafungin)	0.25-2.0
	卡泊芬净 (Caspofungin)	0.25-1.0 未处理 N/A 处理
	氟胞嘧啶 (Flucytosine)(5-FC)	0.06-0.25
	氟康唑 (Fluconazole)	0.5-4.0
	艾沙康唑 (Isavuconazole)	0.015-0.06
	伊曲康唑 (Itraconazole)	0.12-0.5
	酮康唑(Ketoconazole)	0.03-0.25
	米卡芬净 (Micafungin)	0.5-2 未处理 N/A 处理
	泊沙康唑 (Posaconazole)	0.06-0.25
	里氟康唑 (Ravuconazole)	0.015-0.12
	雷扎芬净 (Rezafungin)	0.25-2
	伏立康唑 (Voriconazole)	0.015-0.12
克柔念珠菌 ATCC®6258	两性霉素 B (Amphotericin B)	0.5-2.0
	阿尼芬净 (Anidulafungin)	0.03-0.12
	卡泊芬净 (Caspofungin)	0.12-1.0 未处理 N/A 处理
	氟胞嘧啶 (Flucytosine)(5-FC)	4.0-16
	氟康唑 (Fluconazole)	8.0-64
	艾沙康唑 (Isavuconazole)	0.06-0.5
	伊曲康唑 (Itraconazole)	0.12-1.0
	酮康唑(Ketoconazole)	0.12-1.0
	米卡芬净 (Micafungin)	0.12-0.5 未处理 N/A 处理
	泊沙康唑 (Posaconazole)	0.06-0.5
	里氟康唑 (Ravuconazole)	0.06-0.5
	雷扎芬净 (Rezafungin)	0.015-0.12
	伏立康唑 (Voriconazole)	0.06-0.5
注 1: N/A 指表示“无可利用”。这是指质量控制范围		
注 2: 用于目视读数的微量稀释板由制造商提供, 未经处理。给出的卡泊芬净和米卡芬净的质量控制范围为未经处理的稀释板。		

表 5 光度判读微量肉汤稀释试验 2 株质控菌株的推荐 MIC 范围^{[2][10][11][14][12]}

微生物	抗真菌药物	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)	0.25-1.0 未处理 N/A 处理
	氟胞嘧啶(Flucytosine)(5-FC)	0.12-0.5
	氟康唑 (Fluconazole)	0.5-2.0
	艾沙康唑 (Isavuconazole)	0.015-0.06 未处理 0.008-0.03 处理
	伊曲康唑(Itraconazole)	0.03-0.12
	米卡芬净(Micafungin)	0.5-2.0
	泊沙康唑(Posaconazole)	0.015-0.06
	伏立康唑(Voriconazole)	0.015-0.06
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)	0.12-1.0 未处理 N/A 处理
	氟胞嘧啶(Flucytosine)(5-FC)	1.0-4.0
	氟康唑 (Fluconazole)	16.0-64.0
	艾沙康唑 (Isavuconazole)	0.015-0.06
	伊曲康唑(Itraconazole)	0.03-0.12
	米卡芬净 (Micafungin)	0.03-0.12
	泊沙康唑(Posaconazole)	0.015-0.06
	伏立康唑(Voriconazole)	0.03-0.25
注：N/A 表示用处理稀释板的范围“无可利用”。对于未经处理的稀释板，表中给出的光度判读（卡泊芬净）的质量控制范围根据独立的多实验室按适当方法进行的未发表研究，但与肉眼判读稀释板落在相同的范围 ^[12] 。		

附录 A

(资料性)

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）。

34.53g MOPS [3-(N-吗啡啉)丙磺酸] 缓冲剂。

所使用的RPMI粉末具有除MOPS缓冲液，氢氧化钠（NaOH）和葡萄糖以外的所有成分。验证培养基不含碳酸氢钠。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（NaOH）调节pH到7.0（25℃）。添加葡萄糖（取决于判读方法）。加蒸馏水使培养基终体积至1L。过滤除菌并贮存于4℃至使用。

表A.1 RPMI-1640培养基成分

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	0.0652
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	0.02883
L-缬氨酸	0.020
生物素	0.0002
D-泛酸	0.00025
氯化胆碱	0.003
叶酸	0.001

表 A.1(续)

成分	g/L 水
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	0.0002
盐酸硫胺	0.001
维生素 B ₁₂	0.000005
硝酸钙 xH ₂ O	0.100
氯化钾	0.400
硫酸镁(无水)	0.04884
氯化钠	6.000
磷酸氢二钠(无水)	0.800
葡萄糖	2.000
还原型谷胱甘肽	0.001
酚红钠	0.0053
(含谷氨酰胺和酚红, 但不含碳酸氢盐) 用户宜检查 供应商提供的 RPMI 成分的浓度如上表所述。	

表A.2 含0.2%葡萄糖和含2%葡萄糖RPMI-1640培养基成分（完整培养基）^{[2][5]}

成分	1×浓度 肉眼判读法最终 0.2% 葡萄糖	2×浓度 光度判读法最终 2% 葡萄糖
蒸馏水	900ml	900ml
RPMI-1640 ^a	10.4g	20.8g
MOPS ^b	34.53g	69.06g
葡萄糖	无额外葡萄糖 (见 4.2.2)	36g 最终 2% (见 4.2.3)
添加蒸馏水	至 1.0L	至 1.0L
a 见表 A.1		
b 3-(N-吗啡啉)丙磺酸, 0.165 mol/L 终浓度。		

附录 B**（资料性）****0.5 麦氏硫酸钡浊度标准**

为了标准化接种密度，使用 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 BaCl_2 (1.175 % w/v $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)到99.5 ml 0.18 mol/L H_2SO_4 (体积分数 1 %)中制备此浊度标准。
- b) 用分光光度计用1cm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贮存。
- 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 个月替换或复查其光密度。

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, (2017), EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3.1 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts
- [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] 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
- [5] CLSI, M60 -ED1: 2017 Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Wayne, PA., (M27-S4 and M44-S3)
- [6] 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
- [7] 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
- [8] Al B. et al. , Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests for ten antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38** pp. 3457–3459
- [9] Krisher K. et al. , Quality control parameters for broth microdilution tests of anidulafungin. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42** p. 490
- [10] Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Hope W 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
- [11] Arendrup MC, Jørgensen KM, Hare RK, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O, EUCAST Reference testing of Rezafungin Susceptibility and Impact of Choice of Plastic Plates. *Antimicrob Agents Chemother* 2019
- [12] ThermoFisher (Trek Diagnostics) multi-site standardized quality control studies of visual and spectrophotometric methods for caspofungin and five other antifungal agents (unpublished studies). ThermoFisher Scientific (Trek Diagnostic Systems). 2015
- [13] Fothergill AW, McCarthy DI, Albataineh MT, Sanders C, McElmeel M, Wiederhold NP, Effects of treated versus untreated polystyrene on caspofungin in vitro activity against *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2016. **54**: 734-738

- [14] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Routine and extended internal quality control for antifungal susceptibility testing as recommended by EUCAST. Version 1.0, 2015
 - [15] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, version 10.0, 2020. [http:// www .eucast .org/astoffungi/ clinic](http://www.eucast.org/astoffungi/clinic)
 - [16] CLSI www.CLSI.org
 - [17] EUCAST www.EUCAST.org
-