

· 临床论著 ·

无菌体液感染真菌的分布及耐药性检测

茅国峰 何秋丽 沈少卿

【摘要】目的 回顾性探讨无菌体液感染常见病原性真菌的菌群分布及耐药特点,为临床真菌感染性疾病提供病原学诊断和合理使用抗真菌药物的依据。**方法** 对2012年1月至2013年12月本院临床中从无菌体液中分离的真菌菌株,采用微量稀释法和纸片扩散法检测药物敏感性情况,并对通过血液中分离到的真菌分析,比较两种药敏方法的差异。**结果** 无菌体液标本以血液感染最多见,为92例(占46.5%),198株真菌以白色念珠菌为主(占65.1%),除光滑念珠菌外,分离到的其他主要真菌对抗真菌药物显示了较好的体外活性;微量稀释法和纸片扩散法检测真菌药敏具有较好的一致性,氟康唑和伏立康唑 κ 值分别为0.739和0.792。**结论** 无菌体液中真菌感染以白色念珠菌为主,临床应合理使用抗真菌药物;纸片扩散法可代替微量稀释法检测抗真菌药物的体外活性。

【关键词】 无菌体液; 耐药性; 微量稀释法; 纸片扩散法

Species distribution and drug resistance of sterile body fluid isolates of fungi Mao Guofeng, He Qiuli, Shen Shaoqing. Shaoxing People's Hospital (Shaoxing Hospital of Zhejiang University), Shaoxing 312000, China

Corresponding author: Mao Guofeng, Email: gfmamao@126.com

【Abstract】Objective To investigate the distribution and drug resistance of *fungi* isolated from sterile body fluids infection, and to provide the basis and references for clinical treatment and the rational use of antifungal drugs. **Methods** Fungal strains were isolated from January 2012 to December 2013, antimicrobial susceptibility was determined by microdilution method and disk diffusion method, and the results of the two methods were compared. **Results** Blood infection was the most common source of sterile body fluid specimens (92 cases), accounting for 46.5%; *Candida albicans* was the predominant fungal (65.1%) among the 198 fungal strains. All of the isolates showed good sensitivity to the antifungal drugs except for *Candida glabrata*. The results of microdilution and disk diffusion method showed good consistency, the κ of fluconazole and voriconazole were 0.739 and 0.792, respectively. **Conclusions** *Candida albicans* was the predominant fungal in sterile body fluids infection, the clinical use of antifungal drugs should be reasonable. Disk diffusion method could replace the microdilution to detect the activity of anti-fungal agents in vitro.

【Key words】 Sterile body fluids; Drug resistance; Micro-dilution method; Disk diffusion method

近年来,随着广谱抗菌药物、糖皮质激素以及免疫抑制剂等药物的大量使用,各种介入治疗和侵袭性操作的广泛开展,无菌体液感染真菌的发病率逐年上升,并且也产生了不同的耐药菌株。传统的抗真菌药物因毒副作用大或抗菌谱窄,临床使用受到限制,新型抗真菌药如伏立康唑在抗真菌治疗中发挥了越来越重要的作用。为了更好地指导临床合理使用抗真菌药物,本研究对临床无菌体液中分离的真菌菌群分布及耐药状况作了检测分析,并比较了微量稀释法和纸片扩散法两种药敏试验方法的符

合情况,现报道如下。

资料与方法

一、材料

1. 菌株来源:对本院2011年1月至2013年12月临床送检的各种无菌体液标本,包括血液、胸水、腹水和脑脊液等,共分离到198株真菌(同一患者连续多次分离出相同真菌时,只统计1株)。

2. 仪器:法国生物梅里埃公司 BacT/Alert3D 全自动血培养仪及专用培养瓶;梅里埃 VITEK-2 微生物鉴定分析系统及 YBC 鉴定卡进行鉴定。

3. 培养基及药敏试剂盒:真菌培养采用梅里埃公司的血平板和沙保弱平板;纸片扩散法药敏纸

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.02.029

作者单位:312000 绍兴市,浙江省绍兴市人民医院(浙江大学绍兴医院)

通讯作者:茅国峰, Email: gfmamao@126.com

片购自英国Oxoid公司, 氟康唑25 μg /片, 伏立康唑1 μg /片; 微量稀释法采用法国生物梅里埃公司ATB Fungus 3酵母样真菌药敏试剂盒, 内含不同稀释浓度的氟康唑、伊曲康唑、氟胞嘧啶、两性霉素B和伏立康唑5种抗真菌药物。

二、方法

1. 培养方法: 血液标本10 ml注入普通需氧血培养瓶内, 在法国生物梅里埃公司BacT/Alert3D仪器中培养, 报警阳性, 涂片见革兰阳性孢子或菌丝, 立即转种血平板、沙保弱培养基; 其他标本接种于血平板和沙保弱培养基内置35 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱, 培养24~72 h。

2. 纸片扩散法: 根据NCCIS M44-A方法进行。配制500 ml MH琼脂, 加入10 g葡萄糖和50 μl 含5 g/ml美蓝, 分装后当日使用。常规法涂布接种, 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育24 h观察结果。以氟康唑抑菌环 ≤ 14 mm为耐药, 15~18 mm为剂量依赖敏感, ≥ 19 mm为敏感。伏立康唑 ≤ 13 mm为耐药, 14~16 mm为剂量依赖敏感, ≥ 17 mm为敏感。

3. ATB Fungus 3方法: 严格按生产厂家说明书操作和判定结果。

4. 质量控制: 标准菌株白念珠菌(ATCC 90028)和近平滑念珠菌(ATCC 22019)均由我国卫生部临床检验中心提供。

三、统计学处理

采用WHONET 5.4软件进行数据分析。SPSS 19.0软件进行统计学处理, 计算符合率时, 以ATB Fungus 3法和纸片扩散法比较, 结果完全一致(即两种方法所测结果同为敏感、剂量依赖敏感或耐药)时判为符合。判断 $kappa$ 值的意义时, 以 $kappa$ 值0.4~0.75提示有中度至高度一致性; $kappa >$

0.75时, 提示一致性好。

结 果

一、真菌感染在各病区的分布

198株分离真菌来自医院住院及门急诊患者, 科室分布依次为重症监护病房(intensive care unit, ICU)65例(32.8%)、肝胆外科35例(17.7%)、胃肠外科30例(15.2%)、心胸外科25例(12.6%)、肾脏内科18例(9.1%)和肿瘤放疗科11例(5.6%), 其余病例分布在急诊病房、泌尿外科、肛肠外科和呼吸内科等。

二、样本种类

198株分离自无菌体液的真菌主要来自血液标本(92株), 占46.5%; 其次为胸水和腹水, 各占20.2%和16.7%, 标本的构成情况详见表1。

三、真菌种类

所有自无菌体液中分离的198株真菌中, 以白念珠菌所占比例最高, 为65.1%, 其次为热带念珠菌和光滑念珠菌各占11.1%和7.1%。另外, 发现罗伦特隐球菌2株, 季也蒙念珠菌2株, 阿萨希毛孢子菌1株, 土生隐球菌1株等较为少见的菌株感染, 详见表2。

四、ATB法检测真菌的耐药率

检出率最高的3种真菌中, 大部分抗真菌药物对病原菌具有较好的体外活性, 敏感性可达80%以上, 而光滑念珠菌对氟康唑的敏感性仅为57.1%, 详见表3。

五、两种方法测定氟康唑和伏立康唑对血液中92株真菌的药敏试验结果

ATB Fungus法和纸片扩散法检测氟康唑药敏

表1 临床真菌标本来源与构成比

样本种类	真菌株数	构成比(%)
血液	92	46.5
胸水	40	20.2
腹水	33	16.7
胆汁	18	9.1
伤口渗出液	10	5.0
脑脊液	3	1.5
其他	2	1.0

表2 真菌菌种分布与构成比

种类	真菌株数	构成比(%)
白色念珠菌	129	65.1
热带念珠菌	22	11.1
光滑念珠菌	14	7.1
近平滑念珠菌	10	5.1
无名念珠菌	7	3.5
克柔念珠菌	6	3.0
其他	10	5.1

表3 5种抗真菌药物对165株常见念珠菌的ATB测定结果(%)

抗真菌药物	白色念珠菌 ($n=129$)			热带念珠菌 ($n=22$)			光滑念珠菌 ($n=14$)		
	S	I/SDD	R	S	I/SDD	R	S	I/SDD	R
氟康唑	99.2	0.8	0.0	81.8	13.6	4.6	57.1	35.8	7.1
伏立康唑	100.0	0.0	0.0	86.3	9.1	4.6	85.7	14.3	0.0
伊曲康唑	99.2	0.8	0.0	81.8	9.1	9.1	50.0	42.9	7.1
5-氟胞嘧啶	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100	0.0	0.0
两性霉素B	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100	0.0	0.0

注: S为敏感, I为中介, SDD为剂量依赖敏感, R为耐药

结果比较,两种方法总符合率为 94.57%,对所得结果进行 κ 一致性检验,取 95%CI, $\kappa = 0.739$,见表 4。按照同样方法,测得两种方法检测伏立康唑总符合率为 95.65%, $\kappa = 0.792$ 。

讨 论

真菌大多是健康人体表、上呼吸道、胃肠道及阴道的定植菌之一。健康人体对真菌有极强的免疫力,只有在人体免疫功能降低时才能致病,如长期使用广谱抗菌药物、免疫抑制剂、肾上腺皮质激素、放疗、化疗,各种恶性肿瘤、艾滋病、糖尿病及导管插管和器官移植等新技术的开展,可诱发各种真菌感染性疾病^[1]。而无菌体液中真菌感染对临床的诊断和治疗具有非常重要的意义。

本研究中,自无菌体液中分离到的 198 株真菌中,有 65 株 (32.8%) 来自 ICU,显著高于其他病房。长期入住 ICU 的危重症患者多有长期卧床、年龄大且经常接受多种侵袭性操作,特别是中心静脉插管 (central venous catheterization, CVC) 破坏皮肤黏膜屏障防御功能的完整性,致使真菌寄植在 CVC,形成静脉导管相关性真菌败血症^[2]。另外,外科患者真菌感染率也不容忽视,易感因素可能与人工机械通气、使用 ≥ 2 种抗菌药物、留置导尿和全胃肠外营养等有关^[3]。

血流感染包括真菌性血流感染一直为临床所重视,可导致患者住院时间延长、成本上升、病死率增加。真菌菌血症确诊依靠血培养,但基于单菌落的生化特征鉴定耗时长,早期诊断困难。有文献报道,住院患者的真菌血流感染的发病率达 17.2%^[4]。本研究 198 株真菌有近半数 (46.5%) 真菌感染来自血液,这可能与真菌菌血症患者大都存在严重基础疾病如实体恶性肿瘤、脑出血或严重颅脑损伤及多种易患因素有关^[1]。当人体免疫功能降低时,正常菌群被杀灭或抑制,而原处于少数劣势的菌群或外来耐药菌趁机大量繁殖而致病,终致菌群失调,易发生真菌二重感染。

本研究结果显示,无菌体液感染真菌以白色念珠菌为主 (占 65.1%),其次为热带念珠菌和光滑

念珠菌,白色念珠菌的比例远远高于文献^[1]的报道,提示本院无菌体液中真菌感染仍以白色念珠菌占主导地位,而热带念珠菌和光滑念珠菌的构成与文献^[5]的报道存在较大差异。白念珠菌是目前临床常见的条件致病真菌之一,患者在机体免疫力低下时容易感染,其主要原因是白色念珠菌可产生高分子的强毒素或低分子毒素,另外白色念珠菌的菌丝对人体的皮肤和黏膜等部位具有较强的黏附力及对人体免疫功能的抑制作用均增强了白色念珠菌的致病性。

同时,本研究使用微量稀释法对检出率最高的 3 种真菌进行了药物敏感性试验,结果显示,大部分抗真菌药物对常见病原真菌具有较好的体外活性,敏感性达到了 80% 以上。氟康唑最常用于深部真菌感染易感患者的经验性抗真菌治疗,但随着唑类抗真菌药物的不合理使用,临床出现越来越多耐唑类抗真菌药物的菌株^[6],其中唑类抗真菌药物的靶酶编码基因 ERG11 的突变和过度表达是白色念珠菌产生耐药性的重要原因^[7]。本研究唑类抗真菌药物对白色念珠菌的敏感性高达 99% 以上,与文献报道一致^[8];但光滑念珠菌对氟康唑和伊曲康唑的敏感率仅为 57.1% 和 50.0%,敏感率均低于文献^[1]报道。由于光滑念珠菌对唑类抗真菌药物的最低抑菌浓度值较其他念珠菌更高,且某些光滑念珠菌对部分抗真菌药物存在固有的耐药率,给临床治疗造成了很大的困难。导致临床光滑念珠菌对唑类抗真菌药物耐药的机制主要有:①抗真菌药物靶酶的变化,即通过上调 ERG11 mRNA 表达,引起 14a- 去甲基酶表达增多^[9];②药物外排蛋白的高表达,光滑念珠菌对氟康唑耐药性的形成与 CDR1、CDR2 基因的高表达有关^[10];③作用靶标 Fsk1、Fsk2 发生点突变^[11];④生物膜的形成^[12]。但光滑念珠菌耐药的形成是一个多个因素相互作用的复杂过程,单个耐药基因或单一耐药机制均不能完全解释光滑念珠菌的所有耐药现象。

念珠菌药敏试验的经典方法是采用 CLSI M27-A 的微量稀释法,但操作比较繁琐,纸片扩散法是一种操作方便适合常规应用的体外实验方法。本研究对血液中分离到的 92 株真菌分别采用 ATB

表 4 两种方法测定氟康唑对血液中 92 株真菌药敏结果的比较 (株)

ATB Fungus 法	纸片扩散法			合计
	S	I/SDD	R	
S	80	1	0	83
I/SDD	1	3	1	5
R	1	0	5	4
合计	82	4	6	92

注: S 为敏感, I 为中介, SDD 为剂量依赖敏感, R 为耐药

微量稀释法和纸片扩散法进行了药敏检测,结果显示这两种方法对氟康唑和伏立康唑的药敏结果具有较好的一致性($kappa$ 值分别为0.739和0.792),该结果和文献^[8]报道相符合,提示这两种抗菌药的体外活性可用纸片扩散法获得可靠结果。

综上所述,无菌体液中真菌感染主要以白色念珠菌为主,并对常用抗真菌药物具有较好的敏感性,但因真菌感染的患者通常病情复杂且免疫功能低下,抗真菌药物可选择范围有限,因此,临床和微生物实验室都应重视真菌耐药性监测。

参考文献

- 1 吴剑涌,杨青.血流感染真菌的分布及耐药性分析[J].中国微生物学杂志,2013,25(10):1188-1191.
- 2 Munoz P, Burillo A, Bouza E. Criteria used when initiating antifungal therapy against *Candida spp.* in the intensive care unit[J]. Int J Antimicrob Agent,2000,15(2):83-90.
- 3 魏荣花,徐芒,李勇杰,等.外科病房深部真菌感染因素控制的临床研究[J].中国当代医药,2012,19(36):54-55, 57.
- 4 Lrpez Moral L,Tiraboschi IN, Schijman M, et al. Fungemia in hospitals of the City of Buenos Aires Argentina[J]. Rev Iberoam Micol,2012,29(4):144-149.
- 5 章磊,杨海飞,梅清,等.临床分离真菌的分布特点及其耐药性分析[J].中国抗生素杂志,2013,38(8):633-635.
- 6 Kremery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida spp.* causing fnngaemia: pathogenicity and antifungal resistance[J]. J Hosp Infect,2002,50(11):243-260.
- 7 章磊,许夕海,胡立芬,等.白念珠菌对唑类抗真菌药物耐药的研究进展[J].中华传染病杂志,2013,31(5):314-316.
- 8 李雪芬,孔海深,杨青,等.六种抗真菌药物对酵母菌体外抗菌活性研究[J].中华检验医学杂志,2009,32(4):426-428.
- 9 Rogers PD, Vermitsky JP, Edlind TD, et al. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*[J]. J Antimicrob Chemother,2006,58(6):434-438.
- 10 Posteraro B, Sanguinetti M, Fiori B, et al. Caspofungin activity against clinical isolates of azole cross-resistant *Candida glabrata* overexpressing efflux pump genes[J]. J Antimicrob Chemother,2006,58(7):458-461.
- 11 姜远英,刘伟,曹永兵.念珠菌的耐药机制及应对策略研究[J].中国真菌学杂志,2011,6(4):193-198.
- 12 Nett JE, Sanchez H, Cain MT, et al. Genetic basis of Candidabiofilm resistance due to Drug-sequestering matrix gluean[J]. J Infect Dis,2010,202(12):171-175.

(收稿日期:2014-08-02)

(本文编辑:孙荣华)

茅国峰,何秋丽,沈少卿.无菌体液感染真菌的分布及耐药性检测[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2015,9(2):265-268.