

• 论 著 •

深部酵母菌感染分布及耐药性分析*

熊志刚¹, 曹文², 陈中举¹, 孙自镛^{1△}

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科, 武汉 430030; 2. 湖北中医药大学检验学院, 武汉 430065)

摘要:目的 了解深部酵母菌的感染分布特征及对常见抗真菌药物的耐药性, 为临床合理使用抗真菌药物和有效控制院内感染的发生提供参考依据。方法 收集同济医院 2010—2015 年临床分离的 764 株深部感染的酵母菌, 研究不同酵母菌菌种感染部位的分布规律, 并使用酵母菌药敏试验试剂盒 ATB-fungus 3 检测 764 株酵母菌对常用抗真菌药物的耐药性。结果 764 株酵母菌中以白色念珠菌为主, 占 47.0%。764 株酵母菌主要分离自血液标本 184 株(24.1%), 腹水标本 151 株(19.8%)和纤支镜冲洗液标本 146 株(19.1%); 764 株酵母菌对氟康唑、伊曲康唑、两性霉素 B、5-氟胞嘧啶和伏立康唑的敏感率分别为 91.3%、73.4%、96.6%、97.7% 和 95.4%; 白色念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌和新型隐球菌对 5 种抗真菌药物的耐药率均低于 10%。结论 深部感染酵母菌中白色念珠菌的分离率最高。酵母菌对氟康唑、伏立康唑、5-氟胞嘧啶和两性霉素 B 的敏感率较高, 对伊曲康唑的敏感率较低。白色念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌和新型隐球菌对 3 种唑类抗真菌药物较为敏感。

关键词: 酵母菌; 抗真菌药物; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.09.006 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)09-1218-02

Distribution and drug resistance of deeper infection caused by yeasts*

XIONG Zhigang¹, CAO Wen², CHEN Zhongju¹, SUN Ziyong^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China; 2. School of Laboratory Medicine, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430065, China)

Abstract: **Objective** To investigate distribution and drug resistance of deeper infection caused by yeasts, and to provide reference of using antifungal drugs in clinical and control of nosocomial infection. **Methods** A total of 764 strains of yeasts were isolated from Tongji Hospital during 2010—2015 and infected distributions of the pathogens were investigated. ATB FUNGUS 3 kit was used to detect drug resistance of the 764 strains of yeasts which was commonly used. **Results** The number of strains of yeasts which isolated from blood, abdominal dropsy and bronchoscopy lavage were 184 (24.1%), 151 (19.8%) and 146 (19.1%) respectively. The sensitivity of 764 yeast strains to fluconazole, amphotericin B, itraconazole, 5-fluorocytosine and voriconazole were 91.3%, 73.4%, 96.6%, 97.7% and 95.4%, respectively. The resistance rates of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans* to five kinds of antifungal agents were all below 10%. **Conclusion** Deeper infection caused by *Candida albicans* is the most common. The sensitivity of yeasts in vitro susceptibility test to fluconazole, voriconazole, 5-fluorocytosine and amphotericin B are higher, but lower to itraconazole. *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans* are sensitive to triazole antifungal drugs.

Key words: yeast; antifungus drugs; drug resistance

近年来, 由于广谱抗菌药物的应用, 器官移植、骨髓移植、造血干细胞移植、插管等侵入性治疗, 免疫抑制剂和激素的广泛使用, 使临床深部真菌感染的发病率和病死率急剧上升, 在国内目前已知引起侵袭性真菌感染最常见的致病真菌包括曲霉属和白色念珠菌, 然而非白色念珠菌呈逐渐增多的趋势。本文对同济医院 2010—2015 年临床分离的 764 株深部感染的酵母菌进行了研究, 并主要使用 ATB-fungus3 对临床分离的常见酵母菌对氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、两性霉素 B 及 5-氟胞嘧啶的敏感性进行测定并分析, 给临床经验性用药提供参考和依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2010—2015 年华东科技大学同济医学院附属同济医院临床患者深部分离的 764 株酵母菌(排除同一患者同一部位重复菌株)。经过复苏传代, 将初代菌挑取单菌落在沙保罗培养基上划线分离纯化, 培养 24~48 h 新鲜的菌

落作为试验菌株。经 API 20C AUX 鉴定, 使用 ATB-fungus3 对临床分离的常见酵母菌对氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、两性霉素 B 及 5-氟胞嘧啶的敏感性进行测定并分析。两性霉素 B 判断标准参考 EUCAST 判断标准^[1], 其他药物的判断标准参考 CLSI M27-A^[2]。

1.2 质控菌株 采用标准菌株近平滑念珠菌 ATCC22019, 克柔念珠 ATCC6258 作为质控菌株。每周进行 1 次质控。

1.3 统计学处理 所有实验结果输入 WHONET 5.6 软件, 用 WHONET5.6 进行统计分析酵母菌分布及敏感性分析。

2 结果

2.1 分离菌株标本分布 分离自血液标本为 184 株(24.1%), 腹水标本 151 株(19.8%), 纤支镜冲洗液标本 146 株(19.1%), 胸水标本 117 株(15.3%), 脑脊液标本 83 株(10.9%), 脓肿标本 38 株(5.0%), 导管 20 株(2.6%), 胆汁标本 18 株(2.4%), 组织标本 7 株(0.9%)。

* 基金项目: 国家“十二五”科技重大专项子课题(2012ZX10004207-004)。

作者简介: 熊志刚, 男, 主管技师, 主要从事微生物学检验方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: tjszyong@163.com。

2.2 菌种分布 菌株经 API 20C AUX 鉴定有白色念珠菌 359 株(47.0%),热带念珠菌 125 株(16.4%),光滑念珠菌 104 株(13.6%),近平滑念珠菌 87 株(11.4%),新型隐球菌 64 株(8.4%),克柔念珠菌 18 株(2.4%),7 株其他酵母菌(0.9%)包括 3 株阿萨希毛孢子菌,毕赤酵母、季也蒙念珠菌、无名念珠菌、葡萄牙念珠菌各 1 株。

2.3 主要标本分离出的前 3 位酵母菌 血液标本分离出的前

3 位酵母菌依次为白色念珠菌、近平滑念珠菌和热带念珠菌,脑脊液标本分离的前 3 位依次为新型隐球菌、白色念珠菌和热带念珠菌,见表 1。

2.4 764 株酵母菌对常见抗真菌药物的敏感性 764 株酵母菌对氟康唑、伊曲康唑、两性霉素 B、5-氟胞嘧啶和伏立康唑的敏感率分别为 91.3%、73.4%、96.6%、97.7% 和 95.4%,见表 2。

表 1 主要标本分离的前 3 位酵母菌(n)

标本种类	第 1 位		第 2 位		第 3 位	
	菌种	株数	菌种	株数	菌种	株数
血液标本	白色念珠菌	64	近平滑念珠菌	52	热带念珠菌	30
腹水标本	白色念珠菌	83	热带念珠菌	32	光滑念珠菌	27
纤支镜冲洗液	白色念珠菌	72	热带念珠菌	27	光滑念珠菌	26
胸水	白色念珠菌	61	热带念珠菌	21	光滑念珠菌	18
脑脊液	新型隐球菌	59	白色念珠菌	13	热带念珠菌	8

表 2 764 株酵母菌对常见抗真菌药物的敏感性(%)

抗菌药物名称	所有酵母菌		白色念珠菌		热带念珠菌		光滑念珠菌		近平滑念珠菌		新型隐球菌		克柔念珠菌	
	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感
两性霉素 B	3.4	96.6	1.4	98.6	2.4	97.6	4.0	96.2	0.0	100.0	4.7	95.3	22.2	77.8
5-氟胞嘧啶	0.4	97.7	1.3	97.4	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	98.4	0.0	38.9
氟康唑	3.7	91.3	0.8	98.3	1.6	93.6	9.6	73.1	0.0	97.7	1.6	96.8	66.7	5.6
伊曲康唑	11.4	73.4	7.5	87.4	8.1	84.0	25.0	50.0	3.4	93.1	6.3	57.8	55.6	0.0
伏立康唑	3.9	95.4	1.1	97.5	1.6	94.4	4.8	95.2	0.0	100.0	0.0	98.4	16.7	83.3

3 讨 论

本研究剔除了痰标本,所选择的标本来源均为无菌体液及深部组织标本,更能真实反映出侵袭性真菌感染的菌种分布及耐药性,因呼吸道分泌物分离出的多数酵母菌为念珠菌,很少提示有系统性真菌感染。因肺部对念珠菌感染有天然的防御功能,故念珠菌引起的肺部感染不常见,常规的痰培养培养出念珠菌多数为定植菌,不能确定为肺部感染,临床不推荐使用抗真菌药物进行治疗,只有肺部组织病理学检查才能确定肺部真菌的感染^[3]。

有研究显示,痰标本真菌培养中有 68.0% 以上为白色念珠菌^[4],而本研究中白色念珠菌所占比例仅为 47.0%,这表明呼吸道标本尤其是痰标本中白色念珠菌占的比例比血液及其他无菌体液标本中白色念珠菌所占比例高,可能与白色念珠菌在呼吸道内定植的比例高有关系。本文结果显示非白色念珠菌比白色念珠菌的比例高,但白色念珠菌的分离比例依然排在第 1 位,与 Pfaller 等^[5]研究一致。

表 1 显示血培养中排名前 3 位的酵母菌依次为白色念珠菌、近平滑念珠菌和热带念珠菌,而在其他主要标本中近平滑念珠菌分离数量均不在前 3 位,这提示近平滑念珠菌是侵袭性念珠菌血流感染的主要病原菌,可能与近平滑念珠菌多引起导管相关性血流感染有关,但其导致的真菌血流感染病死率低于他念珠菌引起的真菌血流感染^[6]。脑脊液标本分离出的酵母菌以新型隐球菌数量最多,主要来自新型隐球菌脑膜炎的患者。数据同时显示也有部分患者为白色念珠菌和热带念珠菌引起的中枢神经系统感染。64 株新型隐球菌有 92.2%(59/64)分离自脑脊液标本,主要来自新型隐球菌脑膜炎的患者,这种新型隐球菌引起的中枢神经系统的感染易发于 HIV 感染患者、器官移植患者等免疫功能受损的患者,但近年来有多例免

疫功能正常者感染新型隐球菌的报道^[7],值得临床关注。上述 64 株新型隐球菌对 5 种抗真菌药物的敏感率中除对伊曲康唑低于 60.0% 外,对其他 4 种药物的敏感率均高于 95.0%。虽然新型隐球菌在体外药敏试验中对多种抗真菌药物表现良好的敏感性,但在临床上治疗隐球菌性脑膜炎依然较为棘手,治疗周期较长、病情易复发、病死率高。

从 764 株酵母菌对 5 种抗真菌药物的敏感率来看,总体对氟康唑、两性霉素 B、5-氟胞嘧啶和伏立康唑的敏感率都在 90.0% 以上,但伊曲康唑的敏感率较低,只有 73.4%,而且其对上述检测的 6 种酵母菌的敏感率均为最低。其主要原因可能是体外药敏试验中念珠菌对伊曲康唑的判断标准是参照黏膜感染的标准制订的,而伊曲康唑具有很强的亲脂性,在多种组织中浓度高于血液药物浓度,如在脂肪中的浓度是血液的 17 倍、皮肤的浓度是血液的 10 倍、肝脏浓度更高达血液的 36 倍,而且伊曲康唑在体内尤其是黏膜组织中的代谢产物羟基伊曲康唑同样具有抗真菌的活性^[8],这些原因可能会造成体外药敏试验对伊曲康唑耐药,但使用伊曲康唑治疗却有效的患者,故还需大量数据对伊曲康唑的判断标准进行评估和修订,笔者建议分酵母菌感染部位对伊曲康唑的药敏判断标准分别制订。

参考文献

[1] Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, et al. EUCAST technical note on Candida and micafungin, anidulafungin and fluconazole[J]. Mycoses, 2014, 57(6): 377-379.
 [2] Clinical Laboratory Standard Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition; (下转第 1223 页)

RFP 耐药菌株中 95% 以上是由于 rpoB 基因突变所致^[16], INH 耐药主要是由于 katG 和 inhA 基因突变引起的,前者占 45%~75%,后者占 15%~25%,而在 INH 耐药的菌株中还存在一定比例的 ahpC 和 kasA 等基因突变,也与 INH 的耐药相关^[17-18]。因此,本研究所用试剂盒可能选用的 INH 基因突变的位点不够全面,或者存在其他耐药机制。当然,基因芯片技术不能检测出所有的基因突变位点,这在一定程度上也说明基因芯片技术存在某种局限性,不能完全取代传统药敏试验,今后是否增加检测位点以提高检测敏感度,还有待于进一步研究。

综上所述,应用基因芯片快速检出 rpoB、katG、inhA 基因突变可以作为耐多药结核病的诊断指标^[19],该技术是一种快速、安全、高效检测耐多药结核病的方法,具有较好的应用前景。但基因芯片技术对结核分枝杆菌的耐药性测定也存在着不足,对操作人员的专业技能和检测环境有着较高的要求,而且该技术检测成本较高,均会限制基因芯片技术在基层结核病实验室的推广。建议临床医师和结核病规划管理人员可将基因芯片技术作为快速诊断、治疗耐多药结核病的手段,指导临床开展早期、有效的药物治疗,并和传统药敏试验互为补充,以弥补其不足。

致谢:重庆医科大学附属永川医院结核病实验室。

参考文献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2015[R]. Geneva:WHO, 2015.
 [2] 胡忠义. 应重视结核病耐药性检测新技术的研究和应用[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(23): 3801-3802.
 [3] World Health Organization. WHO report 2012: Global tuberculosis control[R]. Switzerland: WHO, 2012.
 [4] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 30-68.
 [5] 中华人民共和国卫生部. 全国结核病耐药性基线调查报告(2007-2008 年)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 2-5.
 [6] 唐神结, 高文. 临床结核病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 571-575.
 [7] 赵冰, 时金艳, 逢宇, 等. 基因芯片结核分枝杆菌耐多药检测在地市级实验室的应用性评估[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(9): 718-722.
 [8] 李晓非, 梁桂亮, 普冬, 等. 基因芯片技术在分枝杆菌菌种

鉴定和结核耐药性检测中的应用及评价[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(2): 204-207.

[9] 胡晓红, 向启云, 庄倩, 等. 基因芯片法检测结核分枝杆菌耐药性的可行性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(23): 3421-3422, 3425.
 [10] Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, et al. Evaluation of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(7): 2338-2342.
 [11] Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(8): 2635-2640.
 [12] 李立明. 流行病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
 [13] 刘英, 刘洁, 靖宽和, 等. 重庆市结核病药物耐药监测结果分析[J]. 现代预防医学, 2012, 39(3): 692-694.
 [14] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[M]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 494-495.
 [15] 李卫彬, 李新旭, 张彤群, 等. 基因芯片检测技术检测结核分枝杆菌异烟肼和利福平耐药的实际应用效果评价[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(16): 4666-4670.
 [16] Pham M, Lemberg DA, Day AS. Probiotics: sorting the evidence from the Myths[J]. Med J Aust, 2008, 188(5): 304-308.
 [17] 康丽菲, 朱桂云, 李秀武, 等. 基因芯片技术检测结核分枝杆菌对利福平和异烟肼耐药性研究[J]. 河北医药, 2012, 34(16): 2412-2414.
 [18] 周江, 张万江. 结核分枝杆菌对异烟肼和利福平耐药的研究进展[J]. 中国现代医药杂志, 2011, 13(1): 111-114.
 [19] 张俊仙, 吴雪琼, 阳幼荣. 应用基因芯片方法检测结核分枝杆菌利福平和异烟肼的耐药性[J]. 中国防痨杂志, 2011, 33(10): 680-685.

(收稿日期: 2016-11-26 修回日期: 2017-01-08)

(上接第 1219 页)

M27-A3 [S]. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2008.
 [3] Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the infectious diseases society of America[J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(5): 503-535.
 [4] 魏莉. 呼吸系统疾病发生真菌感染相关因素分析[J]. 中外医学研究, 2015, 13(15): 13-14.
 [5] Pfaller M, Nofyots D, Diekema D, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance?) registry, 2004-2008[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 74(4): 323-331.

[6] Ortega M, Marco F, Soriano A, et al. Candida species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008[J]. J Hosp Infect, 2011, 77(2): 157-161.
 [7] Desalermos A, Kourkoumpetis TK, Mylonakis E. Update on the epidemiology and management of cryptococcal meningitis[J]. Expert Opin Pharmacother, 2012, 13(6): 783-789.
 [8] Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, et al. Guidelines for Management of Cryptococcosis[J]. Clin Infect Dis, 2010, 50: 291-322.

(收稿日期: 2016-12-25 修回日期: 2017-02-19)