

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20194274

· 论 著 ·

## 云南省艾滋病患者分离新生隐球菌的药物敏感性检测与分析

樊红丽<sup>1</sup>, 高 丽<sup>1</sup>, 毛小琴<sup>2,3</sup>, 张 米<sup>1</sup>, 李正伦<sup>1</sup>, 杨翠先<sup>1</sup>

(1. 云南省传染病专科医院/艾滋病关爱中心检验科, 云南 昆明 650301; 2. 昆明理工大学医学院, 云南 昆明 650500; 3. 云南省第一人民医院检验科, 云南 昆明 650032)

**[摘要]** 目的 了解云南省艾滋病患者分离新生隐球菌的药物敏感性情况。方法 采用比色微量稀释法, 对 2007 年 8 月—2018 年 7 月云南省传染病医院住院艾滋病患者标本分离的 304 株新生隐球菌进行药敏试验, 检测 6 种常用抗隐球菌药物的敏感性。结果 药敏结果显示: 两性霉素 B、5-氟胞嘧啶、氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑及泊沙康唑 MIC<sub>50</sub> 分别为 1、2、4、0.03、0.06、0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MIC<sub>90</sub> 分别为 1、4、8、0.06、0.12、0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 几何均数分别为 0.75、2.32、3.28、0.039、0.053、0.09  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在 6 种抗真菌药物中, 新生隐球菌对伏立康唑和两性霉素 B 的耐药率为 1.32%, 5-氟胞嘧啶的耐药率为 0.33%, 未发现对伊曲康唑和氟康唑产生耐药的菌株。结论 云南省艾滋病患者分离的新生隐球菌对不同药物敏感性有差异, 可为临床选药提供参考。

**[关键词]** 艾滋病; 人类免疫缺陷病毒; 新生隐球菌; 药敏试验

**[中图分类号]** R512.91 R446.5

## Detection and analysis of antimicrobial susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome in Yunnan Province

FAN Hong-li<sup>1</sup>, GAO Li<sup>1</sup>, MAO Xiao-qin<sup>2,3</sup>, ZHANG Mi<sup>1</sup>, LI Zheng-lun<sup>1</sup>, YANG Cui-xian<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, AIDS Care Center, Yunnan Provincial Infectious Disease Hospital, Kunming 650301, China; 2. Medical School of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 3. Department of Clinical Laboratory, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate antimicrobial susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in Yunnan Province. **Methods** 304 strains of *C. neoformans* isolated from AIDS patients in Yunnan Infectious Diseases Hospital between August 2007 and July 2018 were performed antimicrobial susceptibility testing by colorimetric microdilution method, susceptibility to 6 commonly used anti-cryptococcal agents was detected. **Results** Antimicrobial susceptibility testing results showed that MIC<sub>50</sub> of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole, itraconazole, and posaconazole were 1, 2, 4, 0.03, 0.06, and 0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively, and the MIC<sub>90</sub> were 1, 4, 8, 0.06, 0.12, and 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively, with geometric mean values of 0.75, 2.32, 3.28, 0.039, 0.053, and 0.09  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively. Among 6 antifungal agents, resistance rate of *C. neoformans* to voriconazole and amphotericin B was 1.32%, and to 5-fluorocytosine was 0.33%, no strain was found to be resistant to itraconazole and fluconazole. **Conclusion** *C. neoformans* isolated from AIDS patients in Yunnan Province have different susceptibility to different antimicrobial agents, which can provide reference for clinical antimicrobial choice.

**[收稿日期]** 2018-09-20

**[基金项目]** 2017 年度云南省医疗卫生单位内设研究机构科研项目 (2017NS122)

**[作者简介]** 樊红丽 (1983-), 女 (汉族), 云南省昆明市人, 主管检验师, 主要从事艾滋病检测及研究。

**[通信作者]** 杨翠先 E-mail: ycx484@126.com

**[Key words]** acquired immunodeficiency syndrome; human immunodeficiency virus; *Cryptococcus neoformans*; antimicrobial susceptibility testing

截至 2017 年底,云南省累计报告存活人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者和艾滋病患者 98 878 例,居全国前五。隐球菌性脑膜炎常感染免疫力低下人群,尤其是艾滋病患者,其抗真菌治疗效果差,是艾滋病患者死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。在较长的抗真菌治疗过程中(平均周期为 12 个月),隐球菌对抗真菌药物会产生耐药,从而导致治疗失败<sup>[2]</sup>。因此,临床治疗需要实验室的体外药物敏感性报告作为依据。不同地区药敏折点是有差异的<sup>[3]</sup>,目前,云南地区新生隐球菌常用药物药敏折点情况未见报道。对本院 2007 年 8 月—2018 年 7 月艾滋病患者标本中分离的新生隐球菌菌株进行药物敏感性检测,并分析其报告,以期为本地区新生隐球菌的药物敏感性折点建立提供数据。

## 1 对象与方法

**1.1 菌株来源** 304 株新生隐球菌全部分离自云南省传染病医院住院艾滋病患者标本,患者来自云南省的 16 个地州市。同一患者相同标本分离的新生隐球菌均进行药敏检测,经比较检测结果相同,仅纳入一次检测结果进行统计分析,同一患者不同标本分离的新生隐球菌均纳入研究。质控菌株为克柔假丝酵母菌 ATCC 6258 和近平滑假丝酵母菌 ATCC 22019。

**1.2 菌株培养及复核鉴定** 将 -80℃ 保存的临床分离的新生隐球菌菌株置于 20℃ 复苏 24 h,使其恢复繁殖活力。在无菌条件下,将其转种至沙保罗(SGC)培养基上,25℃ 孵育培养 48~72 h,形成肉眼可见的菌落,然后进行菌种复核鉴定。复核鉴定由本院微生物室工作人员参照全国临床检验操作规程第四版要求<sup>[4]</sup>,即根据菌落生长特征、镜下形态以及生化反应,结合 VITEK 2 YST 卡进行菌种鉴定。

**1.3 药敏试验** 采用 Thermo Fisher 公司的真菌药敏板进行药敏试验,即比色微量稀释法,每块药敏板都包被有适当稀释浓度的抗真菌药物和显色剂。在药敏板中,各抗真菌药物及浓度范围分别为 5-氟胞嘧啶 0.06~64 μg/mL,泊沙康唑 0.008~8 μg/mL,伏立康唑 0.008~8 μg/mL,伊曲康唑 0.015~16 μg/mL,氟康唑 0.012~256 μg/mL,两性霉素 B 0.12~8 μg/mL。实验严格按照试剂盒说明书加样

后,在非 CO<sub>2</sub> 培养箱培养 72 h 读取结果。根据颜色改变目视观察抑制微生物生长的抗真菌药物的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。实验同时检测克柔假丝酵母菌 ATCC 6258 和近平滑假丝酵母菌 ATCC 22019 进行质量控制。**1.4 结果判读** 药物敏感性判断参照全国临床检验操作规程第四版<sup>[4]</sup>推荐的假丝酵母菌药物敏感性判断标准。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS 19.0 统计软件对 6 种抗真菌药物的 MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub> 和 MIC 几何均数进行分析。

## 2 结果

**2.1 标本来源** 共收集 2007 年 8 月—2018 年 7 月云南省传染病医院住院艾滋病患者标本分离的新生隐球菌 304 株,标本来源见表 1。骨髓中检出隐球菌的 11 例患者中,在治疗的不同时期,有 5 例曾在患者血液中检出,2 例曾在患者脑脊液中检出,4 例仅在骨髓中检出。

表 1 304 株新生隐球菌标本来源分布

Table 1 Distribution of specimen sources of 304 strains of *C. neoformans*

标本类型	分离株数	构成比(%)
脑脊液	192	63.16
血	96	31.58
骨髓	11	3.62
胸腔积液	3	0.98
痰	1	0.33
组织	1	0.33

### 2.2 抗真菌药物的敏感性

**2.2.1 6 种常用抗真菌药物对新生隐球菌的 MIC 值** 药敏试验结果显示,304 株新生隐球菌对唑类抗真菌药物(除氟康唑外)MIC 均 < 1 μg/mL,多烯类的两性霉素 B MIC ≤ 4 μg/mL,氟康唑及 5-氟胞嘧啶的 MIC ≤ 32 μg/mL。见表 2。

**2.2.2 5 种抗真菌药物对新生隐球菌的敏感性分析** 未发现对伊曲康唑和氟康唑耐药的菌株。详见表 3。

**表 2** 6 种抗真菌药物对新生隐球菌的 MIC 值( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

**Table 2** MIC values of 6 kinds of antifungal agents against *C. neoformans*( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

抗真菌药物	MIC 范围	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC 几何均数
5-氟胞嘧啶	0.5~32	2	4	2.32
泊沙康唑	0.015~0.5	0.12	0.25	0.09
伏立康唑	0.008~0.25	0.03	0.06	0.039
伊曲康唑	<0.015~0.5	0.06	0.12	0.053
氟康唑	0.12~32	4	8	3.28
两性霉素 B	0.12~4	1	1	0.75

**表 3** 304 株新生隐球菌对 5 种抗真菌药物的药敏结果[% (株)]

**Table 3** Antifungal susceptibility of 304 strains of *C. neoformans* to 5 antifungal agents (% [No. of isolates])

抗真菌药物	敏感	剂量依赖性敏感	耐药
5-氟胞嘧啶	95.39(290)	4.28(13)	0.33(1)
伏立康唑	98.68(300)	0.0(0)	1.32(4)
伊曲康唑	99.67(303)	0.33(1)	0.00(0)
氟康唑	97.04(295)	2.96(9)	0.00(0)
两性霉素 B	98.68(300)	0.0(0)	1.32(4)

注:泊沙康唑由于无体外药敏试验解释,在此不进行判断

### 3 讨论

新生隐球菌属条件致病菌,随呼吸经肺部侵入人体,由血液播撒至脑及脑膜,也可侵犯皮肤、骨和关节。该菌的发病与免疫力低下,尤其是 HIV 感染有密切的关系。本研究中,检出新生隐球菌的标本类型以脑脊液和血液为主,占 94.73%,其次为骨髓(11 例,占 3.62%)。据报道,新生隐球菌在广西<sup>[5]</sup>、云南<sup>[6]</sup>以及长沙<sup>[7]</sup>地区艾滋病患者骨髓标本中的检出率为 2%~2.65%,与本研究结果基本一致。而在非艾滋病患者中<sup>[8-10]</sup>尚无骨髓检出新生隐球菌的报道,可能与艾滋病患者免疫力低下,新生隐球菌更易侵犯骨髓所致,提示艾滋病患者可联合采集脑脊液、血液和骨髓标本进行培养,以提高新生隐球菌的检出率。

在艾滋病合并隐球菌性脑膜炎的患者中,治疗初始阶段就使用两性霉素 B 的患者,较初始时不使用此药治疗的患者死亡风险更低<sup>[11]</sup>。因此在艾滋病合并隐球菌感染的临床路径中,治疗首选药物推荐两性霉素 B 和 5-氟胞嘧啶<sup>[2]</sup>。本研究中两性霉素 B 对 304 株新生隐球菌的 MIC 范围为 0.12~

4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MIC<sub>50</sub> 和几何均数(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )均高于国内外的部分小样本文献<sup>[12-15]</sup>报道,如华东地区(96 株, MIC<sub>50</sub> 为 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 几何均数为 0.302  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>[9]</sup>,上海(35 株, MIC<sub>50</sub> 为 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 几何均数为 0.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>[16]</sup>,美国和日本(26 株, MIC<sub>50</sub> 为 0.0625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>[17]</sup>。本研究的结果与国内<sup>[7-8]</sup>和国外<sup>[10,18-19]</sup>等检测样本量均大于 100 株的 MIC<sub>50</sub> 和几何均数结果较一致。Espinel-Ingroff 等<sup>[20]</sup>对全球 3 590 株新生隐球菌进行药敏研究,结果显示,两性霉素 B 的 MIC 为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的菌株占 0.95%(34 株), MIC 为 4 的菌株占 0.084%(3 株),与本次研究结果相近,提示扩大新生隐球菌药敏实验的样本量,能更全面地反映新生隐球菌对抗真菌药物的敏感性。在本研究中,有 4 株新生隐球菌两性霉素 B 的 MIC $\geq$ 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,其中有 1 株为 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,属罕见情况,因此对此 4 株菌抗真菌药物药敏敏感性进行了复检,复检与初检结果一致。出现此种情况可能与艾滋病患者播散性新生隐球菌的复发率高,反复使用两性霉素 B 治疗有关,提示高耐药株出现可能是无药物选择压力下的一种宿主反应<sup>[3]</sup>。

在本研究中,氟康唑、5-氟胞嘧啶、伏立康唑、泊沙康唑和伊曲康唑的 MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub> 和几何均数均稍低于非 HIV 感染性新生隐球菌有关研究<sup>[8-9]</sup>结果,与亚洲多中心的研究<sup>[21]</sup>结果一致,氟康唑、5-氟胞嘧啶、伏立康唑、泊沙康唑和伊曲康唑对艾滋病患者分离的新生隐球菌菌株的 MIC 值与非艾滋病患者分离的菌株差异无统计学意义,但是艾滋病患者 MIC 几何均数均小于非艾滋病患者。

本次研究以假丝酵母菌临床菌株体外药敏试验解释为药敏折点,对新生隐球菌进行判断,5 种抗隐球菌药物敏感率均达到 95% 以上,伊曲康唑最敏感,敏感率达到 99% 以上,远高于相关文献<sup>[3,7,9,21]</sup>报道。

### [参考文献]

[1] Dash M, Padhi S, Sahu R, et al. Prevalence of cryptococcal meningitis among people living with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome in a tertiary care hospital, Southern Odisha, India[J]. J Nat Sci Biol Med, 2014, 5(2): 324-328.

[2] 卢洪洲. 艾滋病及其相关疾病临床路径(2011 年版)[M]. 上海:上海科学技术出版社,2012:127-129.

[3] Córdoba S, Isla MG, Szusz W, et al. Susceptibility profile and

- epidemiological cut-off values of *Cryptococcus neoformans* species complex from Argentina[J]. *Mycoses*, 2016, 59(6): 351 - 356.
- [4] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2015:627.
- [5] 苏汉珍,韦善求, AIDS 患者新型隐球菌感染的细菌分布特点及其耐药性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 4(34): 470 - 471.
- [6] 张米,雷素云,高丽. 艾滋病患者培养检出新型隐球菌的分布特点及其耐药分析[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, (15)2: 102 - 103.
- [7] 沈琿,郭靖敏. 艾滋病病人血液脑脊液骨髓及胸腹水标本病原菌分布与药物敏感性分析[J]. *中国艾滋病性病*, 2018, 24(3): 227 - 229, 264.
- [8] 范欣,肖盟,王贺,等. 新型隐球菌显色微量肉汤稀释法药敏流行病学折点的建立[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(10): 2215 - 2218.
- [9] 朱均昊,韩德恣,李莉,等. 华东地区新生隐球菌药物敏感性分析[J]. *检验医学*, 2016, 31(9): 761 - 764.
- [10] Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Mora DJ, et al. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil[J]. *Med Mycol*, 2013, 51(6): 635 - 640.
- [11] Niaré K, Paloque L, Ménard S, et al. Multiple phenotypic and genotypic artemisinin sensitivity evaluation of Malian *Plasmodium falciparum* isolates[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2018, 98(4): 1123 - 1131.
- [12] Chong HS, Dagg R, Malik R, et al. In vitro susceptibility of the yeast pathogen *cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype[J]. *Clin Microbiol*, 2010, 11(48): 4115 - 4120.
- [13] Dannaoui E, Abdul M, Arpin M, et al. Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(7): 2464 - 2470.
- [14] Illnait-Zaragozi MT, Martínez GF, Curfs-Breuker I, et al. In vitro activity of the new azole isavuconazole (BAL4815) compared with six other antifungal agents against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuba[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(4): 1580 - 1582.
- [15] Thompson GR 3rd, Wiederhold NP, Fothergill AW, et al. Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(1): 309 - 311.
- [16] 章强强,苏逸丹,李莉,等. 100 株临床分离致病酵母体外药敏试验分析[J]. *中华皮肤科杂志*, 2000, 33(5): 333 - 335.
- [17] 王莉,郑锐,前崎繁文,等. 新型隐球菌临床分离菌株体外抗真菌药物的敏感性[J]. *中国医科大学学报*, 2003, 23(1): 74 - 75.
- [18] Bertout S, Drakulovski P, Kouanfack C, et al. Genotyping and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* isolates from Cameroonian HIV-positive adult patients[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2013, 8(19): 763 - 769.
- [19] Smith KD, Achan B, Hullsiek KH, et al. Increased antifungal drug resistance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(12): 7197 - 7204.
- [20] Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(11): 5898 - 5906.
- [21] Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(6): 3107 - 3113.

(本文编辑:曾翠、左双燕)

**本文引用格式:**樊红丽,高丽,毛小琴,等. 云南省艾滋病患者分离新生隐球菌的药物敏感性检测与分析[J]. *中国感染控制杂志*, 2019, 18(4): 340 - 343. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 - 9638. 20194274.

**Cite this article as:** FAN Hong-li, GAO Li, MAO Xiao-qin, et al. Detection and analysis of antimicrobial susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome in Yunnan Province[J]. *Chin J Infect Control*, 2019, 18(4): 340 - 343. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 - 9638. 20194274.