论著。

卡泊芬净、米卡芬净对念珠菌体外药物敏感性的动态研究

曾荣¹ 李岷¹ 陈青² 王乐¹ 吕桂霞¹ 沈永年¹ 蔡晴¹ 李彩霞¹ 唐荣才² 刘维达¹ (1. 中国医学科学院北京协和医学院皮肤病研究所,南京 210042;2. 江苏省血液中心,南京 210042)

【摘要】 目的 动态研究卡泊芬净、米卡芬净体外对念珠菌的药物敏感性。方法 参照 CLSI 公布的 M-27A 方案微量液体稀释法分别测定卡泊芬净、米卡芬净、氟康唑对 85 株念珠菌的体外敏感性,并连续 7 d 观测结果。结果 48 h 卡泊芬净对白念珠菌、光滑念珠菌及其他念珠菌 MIC $_{50}$ 、MIC $_{90}$ 中位数分别为 0.030 μ g/mL、0.030 μ g/mL、0.060 μ g/mL、0.125 μ g/mL、0.125 μ g/mL、0.500 μ g/mL、0.500 μ g/mL。48 h 米卡芬净对白念珠菌、光滑念珠菌及其他念珠菌 MIC $_{50}$ 、MIC $_{90}$ 中位数分别为 0.030 μ g/mL。0.030 μ g/mL。0.060 μ g/mL、0.060 μ g/mL、0.060 μ g/mL、0.060 μ g/mL、0.060 μ g/mL、0.060 μ g/mL、0.250 μ g/mL、0.500 μ g/mL。48 h 氟康唑对白念珠菌、光滑念珠菌及其他念珠菌 MIC $_{80}$ 、MIC $_{100}$ 中位数分别为 2 μ g/mL、128 μ g/mL、64 μ g/mL、128 μ g/mL、2 μ g/mL。85 株念珠菌中未见对 3 种药物同时耐药的菌株。卡泊芬净组白念珠菌 MIC $_{50}$ 、MIC $_{90}$ 24 h 后不再升高;光滑念珠菌 MIC $_{50}$ 72 h 后不再升高,MIC $_{90}$ 120 h 后不再升高;其他念珠菌组 MIC $_{50}$ 168 h、MIC $_{90}$ 96 h 后不再升高。米卡芬净组白念珠菌、光滑念珠菌 MIC $_{50}$ 、MIC $_{90}$ 24 h 后不再升高,统计分为、米卡芬净对念珠菌属有较好的抗菌作用,其中对白念珠菌、光滑念珠菌作用更强,且 MICs 随着作用时间延长而升高并存在药物特异性和念珠菌种属特异性。

【关键词】 动态:卡泊芬净:米卡芬净:氟康唑:念珠菌:体外药敏

【中图分类号】 R 379.4 【文献标识码】 A 【文章编号】 1673-3827(2011)05-0276-05

Dynamic study on the susceptibilities of caspofungin and micafungin to Candida species in vitro

ZENG Rong¹, LI Min¹, CHEN Qing², WANG Le¹, LV Gui-xia¹, SHEN Yong-nian¹, CAI qing¹, LI Cai-xia¹, TANG Rong-cai², LIU Wei-da¹ (1. Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Nanjing 210042; 2. Jiangsu Province Blood Center, Nanjing 210042)

[Abstract] Objective To assess the susceptibilities of Candida species to caspofungin and micafungin. Methods Susceptibilities of Candida isolates to caspofungin, micafungin and fluconazole were determined by microdilution method based on CLSI M27-A2 for consecutive seven days. Results After 48 hours, the medians of MIC₅₀ and MIC₅₀ of C. albicans, C. glabrata, and other Candida spp. to caspofungin were 0.03 and 0.03 μg/mL,0.06 and 0.125 μg/mL,0.125 and 0.5 μg/mL, respectively. The medians of MIC₅₀ and MIC₅₀ of C. albicans, C. glabrata, and other Candida species to micafungin were 0.03 μg/mL and 0.03 μg/mL,0.06 μg/mL and 0.06 μg/mL,0.06 μg/mL and 0.5 μg/mL and 0.5 μg/mL and 0.5 μg/mL and 128 μg/mL,64 μg/mL and 128 μg/mL,2 μg/mL and 32 μg/mL, respectively. None of the 85 isolates of Candida species showed cross-resistance to caspofungin, micafungin or fluconazole. To caspofungin, there was no change on MIC₅₀ or MIC₅₀ or MIC₅₀ and MIC₅₀ a

[Key words] dynamic; caspofungin; micafungin; fluconazole; Candida species; in vitro susceptibility

[Chin J Mycol, 2011, 6(5):276-280]

基金项目:中国医学科学院皮肤病研究所重点项目基金 (PYSZ200601)

作者简介:曾荣,男(汉族),硕士研究生在读. E-mail:zengrong2010@ hotmail.com

通讯作者:李岷,E-mail:drlimin@sina.cn;陈青,E-mail:qngchen@hotmail.com

近年来,各种因素造成深部真菌感染发病率逐年上升。据报道在美国超过72%的院内真菌感染为念珠菌所致,且在引起院内血液播散感染的病原体中念珠菌排第4位^[1]。新型抗真菌药物棘白菌素类药物(Echinocandins)作为真菌细胞壁结构β-(1→3)-葡聚糖合成酶抑制剂,它能够通过破坏真菌细胞壁结构而杀伤真菌细胞。念珠菌在此类药物长时间作用下能否出现耐药情况尚无报道。本研究旨在初步探索和评价卡泊芬净(caspofungin, CAS)、米卡芬净(micafungin, MI-CA)长时间作用念珠菌时的抗菌作用情况,国内外相关研究尚少见报道。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

85 株念珠菌均来自于中国微生物菌种保藏管理委员会医学真菌中心,其中白念珠菌 20 株 (23.5%),光滑念珠菌 25 株 (29.4%),近平滑念珠菌 12 株 (14.1%),热带念珠菌 8 株 (9.4%),都柏林念珠菌 6 株 (7.1%),乳酒念珠菌 3 株 (3.5%),季也蒙念珠菌 3 株 (3.5%),克柔念珠菌 3 株 (3.5%),该落念珠菌、维斯旺念珠菌、葡萄牙念珠菌、星形念珠菌、C. chiropterorum 各 1 株 (1.2%)。以上包含 2 株药物敏感质控菌株,分别为克柔念珠菌 ATCC6258 和近平滑念珠菌 ATCC22019。

1.2 药物和培养基

卡泊芬净 (Merck,本文缩写为 CAS),米卡芬 净 (Fujisawa,缩写为 MICA),氟康唑 (Ffizer,缩写 为 FLZ),药物均由药厂惠赠。RPMI 1640 培养基 (Gibco,批号 867884)。

1.3 方法

参照 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute,原 NCCLS) 推荐的微量液基稀释法 M27-A2 方案实施^[2]。CAS、MICA 稀释终浓度为 0. 03 ~ 32 μg/mL,FLZ 稀释终浓度为 0. 125 ~ 128 μg/mL,置于药物敏感测试 96 孔板中,每孔 100 μL。

真菌悬液的制备和接种 受试菌株先转种至沙堡弱斜面培养基,35℃培养 24 h。活化后,取菌落于无菌生理盐水中研磨,血球计数板计数,调整菌悬液浓度至 (1~5)×10⁶ CFU/mL。用 RPMI 1640 液体培养基将上述菌液稀释 1 000 倍后加入药物敏感测试板中,每孔 100 μL。实验重复 3 次,每次实验均检测质控株的 MIC 值范围,若在质控

范围内,方可认为本次实验结果可靠。

终点判定 接种后的药物敏感测试板置于35℃恒温培养箱中培养。CAS、MICA 组于24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h 和168 h, FLZ 组于48 h 观察结果, 均采用倒置镜下肉眼判读 MIC 值。药物敏感终点判读参照 M27-A2 中微量液体培养基稀释法的标准, FLZ MICs 按照唑类药物以80%抑制和100%抑制为观察终点; CAS、MICA MICs 结果为便于与国内外同行所得结果进行比较, 故以50%、90%抑制为观察终点。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 18.0 分析处理数据。MICs 值采取取中位数的方法计算。

2 结 果

2.1 48 h 卡泊芬净、米卡芬净、氟康唑体外对念珠菌的作用

CAS、MICA 对 85 株念珠菌的作用结果见表 1 ~2。48 h CAS 对白念珠菌、光滑念珠菌及其他念珠菌 MIC $_{50}$ 、MIC $_{90}$ 分别为 0.03 μ g/mL、0.03 μ g/mL、0.06 μ g/mL、0.125 μ g/mL、0.125 μ g/mL、0.5 μ g/mL。48 h MICA 对白念珠菌、光滑念珠菌及其他念珠菌 MIC $_{50}$ 、MIC $_{90}$ 分别为 0.03 μ g/mL、0.03 μ g/mL、0.06 μ g/mL、0.06 μ g/mL、0.05 μ g/mL、0.48 h FLZ 对白念珠菌、光滑念珠菌及其他念珠菌 MIC $_{80}$ 、MIC $_{100}$ 分别为 2 μ g/mL、128 μ g/mL、64 μ g/mL、128 μ g/mL、64 μ g/mL、128 μ g/mL、22 动态观测卡泊芬净、米卡芬净体外对念珠菌 的作用

多个时间点动态观测得出图 $1 \sim 3$ 所示现象。 卡泊芬净组白念珠菌 MIC_{50} 、 MIC_{90} 24 h 后不再升高。光滑念珠菌 24 h 和 48 h MIC_{50} 均为 0.06 $\mu g/mL$,而 72 h 升高至 0.125 $\mu g/mL$,之后不再升高; MIC_{90} 在 24 h 和 48 h 均为 0.125 $\mu g/mL$,72 h 和 96 h 均为 0.25 $\mu g/mL$,至 120 h 升高为 0.5 $\mu g/mL$ 后不再升高。其他念珠菌组 24 h 和 48 h MIC_{50} 中位数均为 0.125 $\mu g/mL$,72 h 为 125

表 1 48 h CAS 体外抗 85 株念珠菌 MICs 测定结果 Tab. 1 MICs of 85 isolates of *Candida* to CAS *in vitro* after 48 hours

菌名 (菌株数)	MIC ₉₀ 分布情况 (μg/mL)												MIC ₅₀	MICoo
	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	MIC ₉₀ 范围 (μg/mL)	(μg/mL)	(μg/mL)
白念珠菌 (20)	0	0	0	0	0	1	1	0	0	6	12	0.03 ~1	0.03	0.03
光滑念珠菌 (25)	0	0	0	0	1	3	2	4	7	5	3	0.03 ~2	0.06	0.125
热带念珠菌 (8)	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	3	0.03 ~ 0.5	0.03	0.06
乳酒念珠菌 (3)	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0.5	0.5	0.5
近平滑念珠菌 (12)	0	0	1	0	2	4	3	1	1	0	0	0.125 ~8	0.5	1
季也蒙念珠菌 (3)	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0.5 ~1	0.25	1
克柔念珠菌 (3)	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0.125 ~0.25	0.125	0.25
星形念珠菌 (1)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.25	0.125	0.125
都柏林念珠菌 (6)	0	0	1	1	0	0	0	0	4	0	0	0.125 ~8	0.125	0.125
皱落念珠菌 (1)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0.125	4
维斯旺念珠菌 (1)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8
葡萄牙念珠菌 (1)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	0.5
C. chiropterorum (1)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	0.5

表 2 48 h MICA 体外抗 85 株念珠菌 MICs 测定结果 Tab. 2 MICs of 85 isolates of *Candida* to MICA *in vitro* after 48 hours

菌名 (菌株数)	MIC ₉₀ 分布情况 (μg/mL)												MIC ₅₀	MIC_{90}
	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	_ MIC ₉₀ 范围 (μg/mL)	(μg/mL)	$(\mu g/mL)$
白念珠菌 (20)	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	18	0.03 ~4	0.03	0.03
光滑念珠菌 (25)	0	0	0	0	0	0	1	2	5	8	9	0.03 ~ 0.5	0.06	0.06
热带念珠菌 (8)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	5	0.03 ~ 0.25	0.03	0.03
乳酒念珠菌 (3)	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	1	1
近平滑念珠菌 (12)	0	0	0	0	4	5	2	0	0	1	0	0.06 ~ 2	1	1
季也蒙念珠菌 (3)	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0.5~2	0.5	1
克柔念珠菌 (3)	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0.125 ~0.25	0.125	0.125
星形念珠菌 (1)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
都柏林念珠菌 (6)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	0.03 ~ 0.125	0.06	0.06
皱落念珠菌 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.03	0.03	0.03
维斯旺念珠菌 (1)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.25	0.25	0.25
葡萄牙念珠菌 (1)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.25	0.25	0.25
C. chiropterorum (1)	0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0.03	0.03

再升高。 MIC_{90} 在 24 h 为 0.125 μ g/mL,48 h 为 0.5 μ g/mL,72 h 为 1 μ g/mL,之后不再升高。

2.3 耐药情况分析

参考 CLSI M27-A2 方案判定标准, 氟康唑

 $MIC_{80} \le 8$ μg/mL 为敏感 (S), MIC_{80} 介于 16 ~ 32 μg/mL 之间为剂量依赖敏感 (S-DD), $MIC_{80} \ge 64$ μg/mL 为耐药 (R)。参考相关研究我们设定 CAS、MICA $MIC_{90} \le 2$ μg/mL 为敏感 (S), $MIC_{90} > 2$

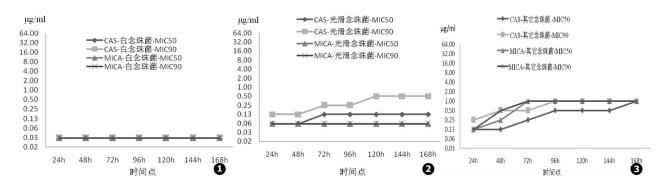


图 1 白念珠菌对 CAS、MICA 的体外药敏实验 MICs 随观测时间的变化 图 2 光滑念珠菌对 CAS、MICA 的体外药敏实验 MICs 随观测时间的变化 图 3 其他念珠菌对 CAS、MICA 的体外药敏实验 MICs 随观测时间的变化

Fig. 1 MIC changes in susceptibility test of C. albicans to CAS, MICA in vitro Fig. 2 MIC changes in susceptibility test of C. glabrata to CAS, MICA in vitro Fig. 3 MIC changes in susceptibility test of other Candida spp. to CAS, MICA in vitro

μg/mL 为耐药 (R)^[3]。

FLZ 组有 19 株耐药菌株,其中光滑念珠菌 14 株,白念珠菌 3 株,克柔念珠菌 2 株。CAS 组共有 5 株耐药菌株,分别为都柏林念珠菌 2 株,近平滑念珠菌、皱落念珠菌、维斯旺念珠菌各 1 株。12 株近平滑念珠菌有 7 株 $MIC_{90} \ge 1$ $\mu g/mL$ 。MICA 组有 1 株耐药菌,为白念珠菌。12 株近平滑念珠菌有 9 株 $MIC_{90} \ge 1$ $\mu g/mL$,明显高于其他类型念珠菌。85 株念珠菌体外药敏实验中对 FLZ 耐药的菌株对 CAS、MICA 均较敏感。未见同时对 CAS、MICA、FLZ 耐药的菌株。各菌株对 CAS、MICA 的敏感性较一致。

3 讨 论

棘白菌素类抗真菌药是一种新型抗真菌药物,能够特异性结合念珠菌细胞壁结构 β-(1→3)-葡聚糖合成酶,引起细胞壁结构破坏,最终导致菌体破坏、死亡。由于其抗真菌作用较强、对人体的毒性低,故此类药物如 CAS、MICA 已逐步应用于临床治疗侵袭性念珠菌病^[4-5]。

Macro 等^[6]利用 CAS 对 400 株念珠菌临床分离株进行体外药敏实验得出 MIC_{50} 、 MIC_{90} 分别为 0.06 μ g/mL、0.25 μ g/mL。本研究 48 h MICs 结果与其结果基本一致。Pfaller^[3]利用 MICA 对 5 346 株念珠菌进行体外药敏实验得出 MIC_{50} 、 MIC_{90} 分别为 0.015 μ g/mL、1 μ g/mL。国内乔建军等^[7]利用米卡芬净对 86 株念珠菌体外药敏实验得出 MIC_{50} 、 MIC_{90} 分别为 0.125 μ g/mL、4 μ g/mL。本研究 48 h 结果 MIC_{50} 、 MIC_{90} 值分别为 0.06 μ g/mL、0.06 μ g/mL, MIC_{50} 与上述结果相近,

而 MIC90结果相对较低。Pfaller[3] 等发现 99%以 上念珠菌菌株在 CAS、MICA 药物浓度 ≤2 μg/mL 内被抑制;而近平滑念珠菌、季也蒙念珠菌在 CAS 作用时仅分别有 92.5%、95.1% 被抑制;而在 MI-CA作用时分别有 100%、100% 被抑制。本研究 中也发现了近平滑念珠菌和季也蒙念珠菌比其他 类型念珠菌 MICs 值高, 耐药情况多, 结果与 Pfaller 基本一致。但是同时还发现在待检的 6 株都柏 林念珠菌中有 2 株 CAS MIC₉₀ > 2 μg/mL, 耐药比 例达33%,这与 Pfaller[3]的研究都柏林念珠菌对 卡泊芬净的敏感株 > 99% 不相符合。出现这种原 因可能与本研究样本量较少,念珠菌种类分布不 同,结果判读不同,或是存在地域差异有关。未出 现同时对 CAS、MICA、FLZ 耐药的菌株,对 FLZ 耐 药的念珠菌对 CAS、MICA 均较敏感,这与我们之 前的研究一致[8]。

本研究根据微量液体稀释法 (M27-A2)方案, 48 h 为结果观测点。为探索和评价卡泊芬净、米卡芬净长时间作用念珠菌时的抗菌作用情况,故将观察结果时间做了适当延长。结果发现 MICs 有不同程度的升高, CAS 组较 MICA 明显, 其他念珠菌组较白念珠菌、光滑念珠菌明显。体外 CAS、MICA 作用于白念珠菌 48 h 后 MIC₅₀、MIC₉₀ 无明显变化。而其他念珠菌组在体外 CAS 处理后 MICs 72 h 后趋于稳定, 在体外 MICA 处理后 MICs 在 96 h 后趋于稳定。Barry^[9]等将卡泊芬净体外作用于近平滑念珠菌和克柔念珠菌,分别于 24 h 和 48 h 观察结果,发现后一时间观测点的 MICs 较前者升高了一个浓度梯度。这与本研究的结果相一致。至于 48 h 后结果,目前尚无相关研究报道,其准确性有待

于更大样本量的检验。出现 48 h 后菌落继续生长的原因可能是菌落并未完全杀伤,残存菌落继续生长所致。

本研究结果表明棘白菌素类药物卡泊芬净、米卡芬净对念珠菌有均有较好的抗菌作用,其中对白念珠菌、光滑念珠菌作用更强。动态观察所得药敏结果可为棘白菌素类药物的体外药敏实验提供参考,也有可能有利于治疗方案的改进。今后的研究中,还将收集更多种类、数量及不同来源的临床菌株进行深入研究。

参考文献

- [1] Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem [J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(1):133-163.
- [2] National committee for Clinical laborataory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts [S]. Approved standard M27-a. 1997.
- [3] Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, et al. In vitro susceptibility of invasive isolates of Candida spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin; six years of global surveillance [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(9); 3184-3185.

- [4] Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, et al. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis [J]. N Engl J Med, 2002, 347 (25):2020-2029.
- [5] Pappas PG, Rotstein CM, Betts RF, et al. Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis [J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(7);883-893.
- [6] Marco F, Pfaller MA, Messer SA, et al. Activity of MK-0991 (L-743,872), a new echinocandin, compared with those of LY303366 and four other antifungal agents tested against blood stream isolates of *Candida* spp. [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 1998,32(1):33-37.
- [7] 乔建军,刘伟,万喆,等. 米卡芬净对分离自中国的念珠菌和曲霉临床株体外抑菌活性的研究[J]. 中国真菌学杂志, 2007,2(1):5-9.
- [8] 李岷,沈永年,吕桂霞,等. 棘白菌素对氟康唑耐药的念珠菌体外药物敏感性的研究[J].中国真菌学杂志,2009,4(2):78-81.
- [9] Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, et al. Quality control limits for broth icrodilution susceptibility tests of ten antifungal agents [J].
 J Clin Microbiol, 2000,38(9):3457-3459.

[收稿日期] 2011-07-15 [本文编辑] 王 飞

·消息 ·

2012 全国中西医结合皮肤性病学术年会 征文通知

经中国中西医结合学会批准,中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会定于2012年4月12~16日在南京市钟山宾馆召开2012全国中西医结合皮肤性病学术年会。

此次会议将发扬历次年会的优良传统,注重中西医结合治疗皮肤病的新方法及新的研究进展等方面的学术交流,内容密切联系临床,切合皮肤科医师的实际需求,会议将邀请知名专家做特邀演讲,阐述皮肤科相关领域的最新研究进展,创造形式多样、内容充实、紧张热烈、活跃互动的学术交流形式,达到全国皮肤科中医、西医、中西医结合医师共同展现才华、获取知识和信息、增强友谊和情感的目的,共同促经我国皮肤科事业的发展。拟参加本次会议者请仔细阅读本通知并按规定的时间和要求投稿。

一 投稿要求

- 1 投稿内容 皮肤科各种基础研究论文、皮肤科临床诊断和治疗等方面的论文、典型与疑难病例等。
- 2 投稿方式 中文全文和400字以内的中文摘要。鼓励通过电子邮件投稿,投稿邮箱:pfkxh@126.com (来稿请注明2012会议征文)。
- 3 截稿日期 2012年3月8日。
- 4 会议交流形式 特邀演讲、大会发言、分会发言、书面交流。

二 联系方式

地址:上海市凤阳路415 号上海长征医院门诊部皮肤科 200003 E-mail:pfkxh@126.com 联系人:朱和平 电话:021-81885498 手机:13671816152

中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会 2011年6月28日