

溶解活性出现明显改变,机体处于一定程度的高凝状态。一方面,这是机体的一种生理性保护,特别是血凝纤溶处于动态平衡时,有利于分娩时胎盘剥离的止血及子宫内膜的再生和修复,防止生产时过量出血;另一方面,凝血与纤溶的改变,激活纤溶系统使 D-D 浓度升高。但 D-D 和纤维蛋白原浓度出现明显的增高,会增加妊娠期胎盘血栓形成的风险。胎盘血栓可以引起胎盘灌注不足,血流紊乱,使胎儿供血不足,最终导致孕妇流产或死胎发生^[5]。

本文结果显示,RSA 患者血清 HCY 和 D-D 浓度明显高于对照组($P < 0.05$),说明两者存在一定相关性,提示高水平血清 HCY、D-D 浓度与原因不明的 RSA 密切相关。

参考文献

[1] 李力,乔杰.实用生殖医学[M].北京:人民卫生出版社,• 临床研究 •

2012:265-278.

[2] 任爱国,杨旭辉,李竹.同型半胱氨酸代谢与习惯性流产关系的研究进展[J].中国生育健康杂志,2005,16(6):374-377.
[3] 张宛华,何淑贞.HCY 与复发性流产的关系研究[J].当代医学,2014,2(4):50-51.
[4] 丁振若,于文彬.现代检验医学[M].北京:人民军医出版社,2007:163-164.
[5] 谭燕,陆琳琳,伍达锋,等.早期复发性流产患者 D-二聚体及抗凝血酶 III 活性的检测分析[J].齐齐哈尔医学院学报,2015,36(21):3136-3137.

(收稿日期:2016-01-15 修回日期:2016-03-21)

棘白菌素对念珠菌体外药敏试验产生“矛盾现象”的分析

曾吉¹,金策¹,黄舟莹²,李辰²,王瑞琦²

(1.湖北省武汉市普爱医院检验科 430033;2.华中科技大学同济医学院医学检验系,武汉 430031)

摘要:目的 观察棘白菌素对念珠菌的“矛盾现象”。方法 体外药敏试验中,采用微量稀释法分别观察卡泊芬净和米卡芬净对 180 株念珠菌的最低抑菌浓度(MIC)和“矛盾现象”。结果 卡泊芬净对白色念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌和光滑念珠菌均产生“矛盾现象”,发生率分别为 66.0%、77.5%、55.0%和 35.0%,各菌矛盾现象的起点/终点中位数浓度分别为 8/32、16/32、8/32、4/16 $\mu\text{g/mL}$;米卡芬净只对白色念珠菌和热带念珠菌产生“矛盾现象”,发生率分别为 45%和 67.5%,各菌矛盾现象的起点/终点中位数浓度分别为 4/16、8/32 $\mu\text{g/mL}$ 。结论 “矛盾现象”的产生存在念珠菌种间差异性和棘白菌素类药物特异性。卡泊芬净出现“矛盾现象”的发生率高于米卡芬净。各菌株对卡泊芬净、米卡芬净产生“矛盾现象”的发生率与 MIC 的高低无明显相关性。

关键词:念珠菌; 卡泊芬净; 米卡芬净; 矛盾现象

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.14.046

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)14-2008-02

棘白菌素是一类新型的抗真菌药物,能非竞争性抑制真菌细胞壁 β -1,3-D-葡聚糖合成酶,造成真菌细胞壁中 β -葡聚糖减少,引起细胞结构破坏,有较高的特异性,能迅速杀灭真菌^[1]。因为哺乳类动物的细胞中不存在 β -1,3-D-葡聚糖合成酶,故该类化合物对人体正常细胞影响不大。作为一种新型抗真菌药物,棘白菌素类抗真菌药已在临床逐步推广应用^[2]。目前国内外均有试验发现进行体外药敏试验棘白菌素作用于念珠菌属会出现低浓度时抑制、高浓度时出现菌落生长的“矛盾现象”^[3]。目前此现象和临床关系尚未明确。已有研究通过对不同念珠菌种对卡泊芬净、米卡芬净体外药敏试验出现“矛盾现象”的动态观察,念珠菌属对卡泊芬净、米卡芬净的体外药敏试验有可能出现“矛盾现象”,并具有一定的对应关系^[4]。本研究通过微量稀释法验证了“矛盾现象”的存在,并初步探讨了“矛盾效应”的发生率。

1 材料与方 法

1.1 材料 菌株:收集武汉地区从临床患者分离的念珠菌共 180 株,包括白色念珠菌 100 株、热带念珠菌 40 株、近平滑念珠菌 20 株、光滑念珠菌 20 株。使用近平滑念珠菌 ATCC22019 作为质控菌株。

1.2 仪器与试剂 卡泊芬净(美国 Merck 公司),米卡芬净(日本 Fujisawa 公司)。RPMI1640(干粉装,Sigma),MOPS 缓冲液(干粉装,Sangon)。

1.3 方 法

1.3.1 真菌接种液制备 各受试念珠菌株先在沙氏培养基上转种 2 次,再经 24 h 培养后,选择直径大于 1 mm 的菌落 5 个,将其用 0.85% 的无菌盐水制成悬液。用牛鲍计数板计数孢子,调整含菌量,使集落形成单位(CFU)为 $(1 \sim 5) \times 10^6/\text{mL}$,待用。

1.3.2 最低抑菌浓度(MIC)和“矛盾效应”的测量 参考 CLSI M27-A3 文件推荐的微量液基稀释法的规范^[5],本研究依据实际情况作出修改,药物浓度梯度设计为 0.03~64.00 $\mu\text{g/mL}$,共 12 组浓度梯度。往已稀释好的含有不同药液的微孔中加入待测菌液,使真菌接种液最终 CFU 调至 $(0.5 \sim 2.5) \times 10^3/\text{mL}$ 。最终 96 孔板每孔体积为 200 μL ,35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。

1.3.3 结果判定 48 h 后肉眼观察结果,肉眼判读 MIC 和“矛盾效应”的起始浓度和终止浓度。在高于 MIC 2 倍稀释浓度以上出现菌落生长的情况判定为“矛盾现象”。

2 结 果

卡泊芬净和米卡芬净白色念珠菌、热带念珠菌和光滑念珠菌的 MIC₉₀ 都比较低,没有发现耐药株,对近平滑念珠菌的 MIC 较高,MIC₅₀、MIC₉₀ 分别为 1.00、2.00 $\mu\text{g/mL}$ 。卡泊芬净对这 4 种念珠菌均有“矛盾现象”出现,米卡芬净只对白色念珠菌和热带念珠菌有“矛盾现象”出现。卡泊芬净对念珠菌“矛盾现象”起点浓度中位数较米卡芬净高,见表 1。

表 1 念珠菌对卡泊芬净、米卡芬净出现“矛盾现象”

菌株	MIC ₉₀ /MIC ₅₀ (μg/mL)		“矛盾现象”发生率 (%)		起点浓度/终点浓度 (μg/mL)	
	卡泊芬净	米卡芬净	卡泊芬净	米卡芬净	卡泊芬净	米卡芬净
白色念珠菌	0.25/0.13	0.03/0.03	68.0	45.0	8/32	4/16
热带念珠菌	0.25/0.13	0.03/0.03	77.5	67.5	16/32	8/32
近平滑念珠菌	1.00/0.50	2.00/1.00	55.0	0.0	8/32	—
光滑念珠菌	0.03/0.03	0.25/0.03	35.0	0.0	4/16	—

注：—表示未检测。

3 讨 论

本研究测定了卡泊芬净和米卡芬净对念珠菌的 MIC, 结果显示卡泊芬净和米卡芬净对白色念珠菌和热带念珠菌的 MIC₉₀/MIC₅₀ 均分别为 0.13/0.25 μg/mL 和 0.03/0.03 μg/mL, 对光滑念珠菌分别为 0.03/0.03 μg/mL 和 0.03/0.25 μg/mL, 与 Macro 等^[6]、Pfaller 等^[7]、曾荣等^[8]报道相似。卡泊芬净和米卡芬净对近平滑念珠菌的 MIC₉₀/MIC₅₀ 为 1.00/0.50 μg/mL 和 2.00/1.00 μg/mL。本研究结果表明, 棘白菌素类药物卡泊芬净、米卡芬净对念珠菌总体有较好的抗菌作用, 其中对白念珠菌、热带念珠菌和光滑念珠菌的 MIC 值较低, 对近平滑念珠菌的 MIC 值相对其他 3 种念珠菌高。

本研究证实了棘白菌素对念珠菌“矛盾现象”的存在, 卡泊芬净较米卡芬净更易出现“矛盾现象”。本研究中, 所有念珠菌在卡泊芬净作用下均出现该现象, 且发生率远高于米卡芬净。对比 MIC 浓度和“矛盾现象”起点/终点浓度发现两者无明显相关性。本研究中, “矛盾现象”的发生率与曾荣等^[8]研究结果相似, 但显著高于 Fleischhacker 等^[9]报道的结果, 出现差异可能与实验的样本量较小、菌种来源不同等多种因素有关。

本研究发现, “矛盾现象”发生率的变化存在念珠菌种属差异性和棘白菌素类药物特异性, 而且与药物作用时间有一定的关系。卡泊芬净“矛盾现象”发生率的变化情况较米卡芬净更加明显, 且发生率更高。一定时间内“矛盾现象”的发生率会随药物作用时间增加而有所增加。目前, “矛盾现象”的原因尚无定论。有观点认为“矛盾现象”是念珠菌在高浓度棘白菌素类药物作用时产生的一种自身保护性代偿机制, 其通过改变细胞壁组分而免受药物杀伤。其产生机制目前还未完全阐明, 可能的机制有念珠菌细胞壁几丁质含量升高、细胞壁蛋白激酶 C (PKC) 途径等^[10-12]。

本研究结果表明, 念珠菌属对卡泊芬净、米卡芬净的体外药敏试验有可能出现“矛盾现象”, 其与药物特异性有关, 并和药物作用时间有一定的对应关系, 但其发生率无确定参考范围。不同念珠菌种的“矛盾现象”出现的时间、起点/终点不一, 同一菌种不同菌株之间也存在差异。

参考文献

[1] Denning DW. Echinocandin antifungal drugs [J]. Lancet, 2003, 362(9390):1142-1151.
 [2] Hatano K, Morishita Y, Nakai T, et al. Antifungal mechanism of FK463 against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* [J]. J Antibiot, 2002, 55(2):219-222.
 [3] Stevens DA, Espiritu M, Parmar R. Paradoxical effect of caspofungin; reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations [J]. Antimicrob Agent Chemother, 2004, 48(9):3407-3411.

[4] 曾荣, 李岷, 陈青, 等. 念珠菌对棘白菌素类药物体外药敏实验产生“矛盾现象”的动态研究 [J]. 中国皮肤科杂志, 2012, 45(4):243-245.
 [5] CLSI. M27-A3 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts [S]. Wayne, PA: CLSI, 1997.
 [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] 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.
 [8] 曾荣, 李岷, 陈青, 等. 卡泊芬净、米卡芬净对念珠菌体外药物敏感性的动态研究 [J]. 中国真菌学杂志, 2011, 6(5):276-280.
 [9] Fleischhacker M, Radecke C, Schulz B, et al. Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C dubliniensis* [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008, 27(2):127-131.
 [10] Stevens DA, Iehinomiya M, Kashi Y, et al. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(9):3160-3161.
 [11] Wiederhold NP, Kontoyiannis DP, Prince RA, et al. Attenuation of the activity of caspofungin at high concentrations against *Candida albicans*; possible role of cell wall integrity and calcineurin pathways [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(12):5146-5148.
 [12] Rueda C, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(2):1071-1083.