

文章编号: 1672-3384(2010)-03-0044-05

念珠菌对唑类药物耐药性及耐药机制的研究进展

【作者】 顾迟 陈功祥 周宏伟

浙江大学医学院附属第二医院检验科 (杭州 310009)

【摘要】 由于广泛性使用抗真菌药预防和治疗真菌病,念珠菌属对抗真菌药尤其是唑类药物的耐药性大量增加。目前研究较多的是白色念珠菌的耐药方面的机制,然而近年来非白色念珠菌的耐药有增加趋势。本文就国内外目前对念珠菌属的耐药方面研究进行综述。

【关键词】 念珠菌;唑类药物;氟康唑;耐药性

【中图分类号】 R978.5;R915

【文献标识码】 A

在过去的20年中,真菌感染的发生显著增加了,尤其是念珠菌引起的感染^[1-2]。自从第一个抗真菌药物两性霉素B问世以来,陆续出现了各类安全有效的抗真菌药物。同时随着临床真菌感染率的上升,抗真菌药物的大量使用,耐药菌株也不断增多,给临床的治疗带来一定困难^[3]。

1 抗真菌药的分类

抗真菌药按作用机制大致可以分为以下几类^[4]。

1.1 多烯类化合物

该类药物与真菌细胞膜上的麦角固醇结合,使膜分解或通透性增加,造成细胞内容物外溢而导致真菌死亡。主要包括三烯类(变曲霉素)、四烯类(制霉菌素)、五烯类、六烯类、七烯类(两性霉素B、两性霉素B脂质体、曲古霉素)。

1.2 唑类药物

作用于细胞膜麦角固醇和它的生物合成途径。包括咪唑类和三唑类,其中三唑类药物应用广泛。

1.3 嘧啶类似物

通过在细胞内转变为氟尿嘧啶,抑制蛋白质合成和DNA复制。以氟胞嘧啶为代表。

1.4 烯丙胺类抗真菌药

特异性地抑制角鲨烯环氧化酶使角鲨烯积聚、麦角固醇的合成受阻,从而引起细胞死亡。其代表药物有萘替芬、特比萘芬、布特萘芬等^[5]。

2 念珠菌分离和对唑类药物的耐药情况

医院深部真菌感染又称终末感染,往往危及患者生命。主要的条件致病真菌为念珠菌属、隐球酵母菌属、曲霉菌属、毛霉菌属。以念珠菌为主,占真菌感染的80%,而白色念珠菌在以往的医院感染中占主要地位,分离率在60%左右^[6-9]。白色念珠菌是最常见的深部念珠菌感染的病原菌;在美国,白色念珠菌感染占所有血液系统念珠菌感染的38.8%~79.4%;在欧洲其所占的比例也>50%^[10]。Correia等^[11]用聚合酶链反应(PCR)指纹技术对临床获得的177份念珠菌进行鉴定,证明白色念珠菌是最常见的深部念珠菌感染的病原菌。余进等^[12]对北京大学第一医院的595份临床标本进行真菌培养和鉴定发现:白色念珠菌432株(72.6%);其余163株非白色念珠菌中热带念珠菌72株(12.1%)、光滑念珠菌34株(5.7%)、近平滑念珠菌34株(5.7%)、克柔念珠菌14株(2.4%)。而刘亚新等研究发现,在ICU念珠菌感染以热带念珠菌最为多见,占44.8%,其次是白色念珠菌和光滑念珠菌,分别占39.8%和8.8%,说明存在有菌种变迁的趋势^[13]。由38个国家99个研究室组成的监测中心监测结果表明:1985-1992年白色念珠菌感染占80%~90%,而1996-2002年,白色念珠菌感染下降为43%~75%,而非白色念珠菌上升为25%~75%。在北美和拉丁美洲,多医学中

心联合监测表明,尽管念珠菌血症致病菌中仍以白色念珠菌为主,但仅占 54.3%,非白色念珠菌中光滑念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌及其他念珠菌分别占 16.4%、8.2%、1.6% 和 4.6%^[14]。近年来随着唑类抗真菌药物特别是氟康唑的应用,非白色念珠菌感染的比例正在逐渐上升特别是在血液系统的感染中。美国医院内感染监测系统监测结果表明,1980-1989 年,教学医院中医院内念珠菌血症的发生率提高了 2.19~4.87 倍,念珠菌在所有血液系统感染的病原菌中居第 4 位,占有血液系统感染 8%,并且这一上升趋势一直延续到 20 世纪 90 年代。欧洲医学真菌组织在 1997 年 9 月至 1999 年 12 月共计 28 个月的调查发现院内念珠菌血症的发生率从 0.20‰ 上升到了 0.38‰^[15]。在美国,败血症中白色念珠菌的检出率已经由 1987 年的 87% 下降到了 1992 年的 31%,与此同时,其他念珠菌检出率在不断增加,光滑念珠菌从 2% 上升为 26%,热带念珠菌也从 2% 上升到 24%。

由于广泛使用抗真菌药预防和治疗真菌病,使得真菌的耐药性大大增加^[20-22]。1980 年 Rosenblatt 首次报道念珠菌对氟康唑耐药,此后有关耐药的报道越来越多,且耐药率正逐步上升。由于给获得性免疫缺陷综合征患者反复使用氟康唑,使得临床上分离到氟康唑耐药的白色念珠菌,并且该类耐药菌株同时对其他唑类药物显示交叉耐药,同时部分对两性霉素 B 耐药。在非 HIV 阳性人群中,念珠菌的耐药率相对偏低。Magaldi 等对一家医院的 137 株分离自 HIV 患者的念珠菌进行药敏试验,发现 10% 的白色念珠菌对氟康唑耐药,30% 的热带念珠菌对氟康唑和伊曲康唑耐药^[19]。1996-2000 年,Doczi 等监测了从 68 例念珠菌血症患者中分离到的 107 株白色念珠菌,显示有 24% 的念珠菌对氟康唑的敏感性下降^[20],但是耐氟康唑白色念珠菌仍然较少见。一项国际真菌耐药监测报告显示^[9],白色念珠菌对氟康唑和沃尔康唑的耐药率分别为 1.5% 和 1.2%。对于非白色念珠菌,例如光滑念珠

菌和热带念珠菌,氟康唑的耐药率高于白色念珠菌,分别为 15.8% 和 4.4%。陈桂山等 2 年间对 4 家医疗机构的 1037 株念珠菌对抗真菌药物敏感性结果调查显示,伊曲康唑的耐药率最高(26.5%),其次为酮康唑(22.5%)和氟康唑(10.7%),并出现多重耐药情况,有 66 株白色念珠菌同时对氟康唑和伊曲康唑耐药^[21]。徐晓峰等的研究显示,氟康唑对白色念珠菌的敏感性可达 91.5%,对近平滑和光滑念珠菌的敏感性分别是 84.2% 和 62.5%^[22]。国内的一些真菌耐药监测显示,白色念珠菌对氟康唑的耐药率与国外报道的相似,在 1% 左右^[6-8]。

2 念珠菌对唑类药物的耐药机制

念珠菌对唑类抗真菌药物的耐药机制主要有以下 2 种。

2.1 药物靶酶的变化

C-14-去甲基酶是麦角固醇生物合成途径不可缺少的中间合成酶。此酶的活性中心结合有血红蛋白,以羊毛类固醇为底物,催化产生 C-14 去甲基羊毛类固醇,其催化反应须细胞色素 P450 传递电子。14-去甲基化酶(由 *erg11* 基因编码,14-DM)是唑类药物作用于真菌靶酶,能竞争抑制酶的催化活性中心。与 *erg11* 基因相关的耐药机制主要有:*erg11* 基因突变^[23,24]; *erg11* 基因过度表达^[25,26];有丝分裂重组或基因转变^[27];羊毛甾醇生物合成通路中其他酶的改变。Podust 等^[28]将白色念珠菌 *erg11* 点突变在空间分布上总结为 4 个突变热点区:第 1 热点区在血蛋白结合区的 N 末端附近;第 2 热点区与 G 螺旋的 C 末端及 H 螺旋相关,该区距离底物通路及活性中心均较远;第 3 热点区与功能域间的界面相关,其中的突变不会在活性位点影响氟康唑的结合,但可能在进入通路上对其产生影响;第 4 热点区与 B 和 C 螺旋之间的区域相关,该区域表现出高度的热运动,推测可能参与药物诱导的结构改变。在第 3 突变热点区实验证实 S405F 可介导菌株耐药,并且 S405F 对氟康唑、酮康唑亲

和力的影响大于伊曲康唑。而在第4热点区中, Y132突变较常见。Kakeya等^[23-24]进一步指出具有双复制的Y132H(等位基因纯合)才可致耐药。Y132H常与其他突变同时出现,当Y132H与S405F或R467K同时出现时,菌株的MIC比单独表达上升更多。这种协同作用在研究I471T时也得到证实:I471T单独表达时可产生耐药,Y132H与之同时表达可加强这一作用^[29-30]。Marr等比较了唑类药物敏感株及药物诱导的耐药株,发现靶酶基因存在等位基因的多态性。提出唑类药物耐药的快速发展是由于涉及对靶酶突变敏感区基因杂合子向纯合子突变的选择机制。但是,这种耐药表型并不稳定。经实验证实,敏感株*erg11*多为杂合基因。另外Perea比较了白色念珠菌耐药株与敏感株的*erg11*基因,结果发现耐药株*erg11*有13处突变导致14-DM酶氨基酸改变。将耐药株*erg11*基因在酿酒酵母中表达,证实11处氨基酸突变与耐药表型相关,并且多数氨基酸突变发生在2个高度保守区。靶酶基因调控区和(或)相应的调节基因发生改变,靶酶基因过度表达,产生大量的靶酶,从而导致细胞内药物浓度不能完全抑制酶的活性而耐药^[25-26]。Marichal等发现,光滑念珠菌对唑类药物耐药菌株*erg11*基因拷贝数比敏感菌株多3.7倍,*erg11*mRNA水平比敏感株高8倍。体外实验显示在无氟康唑的培养基中连续培养耐药株,其耐药表型不稳定,并最终转变为敏感株。因此,光滑念珠菌耐药是*erg11*基因过度表达的结果,且耐药表型可由体外及体内药物诱导。Henry等研究发现念珠菌暴露于氟康唑可激活*erg11*启动子上调靶酶基因表达。当加入氟康唑后共同孵育2~3h后,*erg11*基因mRNA表达水平提高了2~4倍。其他唑类药物也可使*erg11*基因表达上升。当去除药物1h内即可观察到*erg11*基因表达量下降。同时Nakayama等的研究也证实了*erg11*基因过度表达与念珠菌耐药相关。而White对分离的耐药株进行研究发现*erg11*基因表达增高,但是增高水平和耐药程

度不一致。在对临床分离的耐药株进行研究时,可以观察到*cdr1*和*cdr2*的表达增强与耐药性密切相关,但是*erg11*基因的过度表达与耐药无关,并且*erg11*出现2个与耐药性无关的点突变。因此,推测*erg11*的过度表达不是唑类耐药的首要原因。近期有研究表明*erg11*的过度表达只是白色念珠菌的一种可逆的适应状态,与耐药无关^[31]。*erg3*基因编码C-5甾醇脱氢酶,如果此酶失活,将会导致唑类耐药。将*erg3*突变体导入酿酒酵母中表达,发现单独的*erg3*突变会导致唑类耐药。Kelly等在中也发现至少有两株白色念珠菌由于*erg3*突变而产生耐药。

2.2 外排泵基因的过度表达

对耐药念珠菌基因转录的连续性分析发现,mRNA的增加主要源于基因表达的增加^[32],而对启动子区上游500bp的碱基序列分析,未发现能增加基因表达的突变。进一步的研究发现,基因表达的增加源于反式调节因子对启动子的激活。念珠菌与唑类药物相关的外排泵基因主要有2大类:一类为ATP结合盒转运子家族(ATP binding cassette transporter),如*cdr*、*pdh*等基因,念珠菌*cdr*基因编码的ATP结合盒转运子蛋白。目前,至少有7个*cdr*基因已完成鉴定、测序。但只有*cdr1*和*cdr2*基因与唑类药物耐药有关^[33,34]。Sanglard等比较了光滑念珠菌氟康唑耐药株与敏感株对氟康唑的积聚效应,发现耐药株对氟康唑积聚减少。同时将耐药株相关的不同基因片段分别转入已敲除ATP结合盒转运子基因的酿酒酵母细胞中,耐药性得到重建,但只有*cdr1*基因将耐药性上调了5~8倍。证明了*cdr1*基因对光滑念珠菌获得性唑类药物耐药起决定作用。Nakamura等研究发现白色念珠菌*cdr1*在缺失膜ATP结合盒转运子的酿酒酵母中高水平表达,可使携带该基因的酿酒酵母由唑类药物高度敏感转变为耐药,并且对多种结构不相关的化合物也耐药。另一类是主要易化超家族(major superfamiliter)的多重耐药基因*mdr1*,该蛋白的功能

为依赖跨膜的质子梯度向细胞外泵出有害物质。*mdr1* 基因过度表达与氟康唑耐药有关,但与酮康唑无关^[35]。Wirsching 等通过 MPAR - Flipping 方法连续敲除了临床分离的氟康唑耐药株的 *mdr1* 的 2 个等位基因,同时与原始菌株比较发现 *mdr1* 基因过度表达与氟康唑耐药有关,但与酮康唑无关。

综上所述,及时准确的诊断、准确的真菌药敏结果、减少临床盲目的经验用药及合理联合用药等均有助于减少真菌耐药菌株的出现。同时念珠菌对唑类药物耐药机制的研究目前仍存在不少疑问,有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Nissapatorn V, Lee QK, Abdullah A. AIDS - related opportunistic infections in Hospital Kuala Lumpur. *Jpn. J. Infect. Dis*[J]. 2003, 56(5 - 6): 187 - 192.
- [2] Singh A, Bairy I, Shivananda PG. Spectrum of opportunistic infections in AIDS cases[J]. *Indian J. Med. Sci*, 2003, 57(1): 16 - 21.
- [3] 曾翰翔, 席丽艳. 国外深部真菌病流行病原和耐药情况分析[J]. *中国真菌学杂志*, 2006, 1(2): 117 - 120.
- [4] 刘又宁, 方向群. 抗真菌药物及其临床应用[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2006, 29(5): 298 - 299.
- [5] Johnson MD, Perfect JR. Caspofungin; first approved agent in a new class of antifungals. *Expert Opin. Pharmacother*[J]. 2003, 4(5): 807 - 823.
- [6] 宋欣, 金志刚, 王琴, 等. 临床深部真菌感染及耐药状况分析[J]. *浙江临床医学*. 2008, 10(7): 986.
- [7] 王建奎, 毕建英, 张梅, 等. 187 例院内真菌感染及耐药分析[J]. *传染病信息*, 2006, 19(2): 91.
- [8] 张建平, 张春盛, 辛德清, 等. 对 10 种抗真菌药物的耐药监测及分析[J]. *华北国防医药*, 2003, 15(5): 315 - 317.
- [9] Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al; Global Antifungal Surveillance Study. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5 - year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(6): 1735 - 1745.
- [10] Sandven P. Epidemiology of candidemia[J]. *Rev Iberiann Mirol*, 2000, 17: 73 - 81.
- [11] Correia A, Sampaio P, Almeida J, et al. Study of molecular epidemiology of candidiasis in Portugal by PCR fingerprinting of *Candida* clinical isolates[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(12): 5899 - 5903.
- [12] 余进, 李若瑜, 王丹, 等. 院内深部念珠菌感染的菌种类型调查及危险因素分析[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2000, 16(4): 211 - 215.
- [13] 刘亚新, 王亚霞, 魏琴. 重症监护病房获得性念珠菌感染的临床分布及耐药分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2005, 15(12): 1417 - 1419.
- [14] Pfaller MA, Jones RN, Doern CV, et al. Oral transmission of *Candida albicans* between partners in HIV - infected couples could contribute to dissemination of fluconazole resistant isolates[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(3): 747 - 751.
- [15] Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, et al; ECMM Working Group on Candidaemia. Epidemiology of Candidaemia in Europe: results of 28 - month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital - based surveillance study[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004, 23: 317 - 322.
- [16] Haueh PR, Lau YJ, Chuang YC, et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003[J]. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2005, 49(2): 512 - 517.
- [17] Loeffler J, Stevens DA. Antifungal drug resistance[J]. *Clin. Infect. Dis*, 2003, 36(Suppl): S31 - S41.
- [18] Perfect J R. Antifungal resistance: the clinical front[J]. *Oncology*, 2004, 18: 15 - 22.
- [19] Magaldi S, Mata S, Haitung C, et al. In vitro susceptibility of 137 *Candida* SPP. isolates from HIV positive patients to several anti - fungal drugs[J]. *Mycopathologia*, 2001, 149(2): 63 - 68.
- [20] Dóczy I, Dósa E, Hajdú E, et al. Aetiology and antifungal susceptibility of yeast bloodstream infections in a Hungarian university hospital between 1996 and 2000[J]. *J Med Microbiol*, 2002, 51(8): 677 - 681.
- [21] 陈桂山, 黄福达, 吴秀娟. 念珠菌感染的菌种分布及耐药性监测[J]. *医学检验与临床*, 2006, 17(5): 25 - 27.
- [22] 徐晓峰, 张艳艳, 刘双, 等. 念珠菌感染的菌种类型及对氟康唑的药敏情况的监测[J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16(15): 2368 - 2370.
- [23] Marr KA, Lyons CN, Ha K, et al. Inducible azole resistance associated with a heterogeneous phenotype in *Candida albicans*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001, 45(1): 52 - 59.
- [24] Perea S, López - Ribot JL, Kirkpatrick WR, et al. Prevalence of

- molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high - level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus - infected patients [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(10): 2676-2684.
- [25] Henry KW, Nickels JT, Edlind TD. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(10): 2693-2700.
- [26] Nakayama H, Nakayama N, Arisawa M, et al. In vitro and in vivo effects of 14 α - demethylase (ERG11) depletion in *Candida glabrata* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(11): 3037-3045.
- [27] 苏逸丹, 汪师贞, 翁心华, 等. 白念珠菌 ERG11 基因突变与氟康唑耐药性的关系 [J]. *抗生素杂志*, 2000, 25(6): 467-470.
- [28] Podust LM, Poulos TL, Waterman MR. Crystal structure of cytochrome P450 14 α - sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(6): 3068-3073.
- [29] Kakeya H, Miyazaki Y, Miyazaki H, et al. Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(11): 2985-2990.
- [30] Kakeya H, Miyazaki Y, Miyazaki H, et al. Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(11): 2985-2990.
- [31] Ribeiro MA, Paula CR. Up - regulation of ERG11 gene among fluconazole - resistant *Candida albicans* generated in vitro: is there any clinical implication [J]? *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, 57(1): 71-75.
- [32] Lyons CN, White TC. Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44: 2296.
- [33] Nakamura K, Niimi M, Niimi K, et al. Functional expression of *Candida albicans* drug efflux pump *Cdr1p* in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters [J]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001, 45(12): 3366-3374.
- [34] Sanglard D, Ischer F, Bille J. Role of ATP - binding - cassette transporter genes in high - frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(4): 1174-1183.
- [35] Wirsching S, Moran GP, Sullivan DJ, et al. user J. MDR1 - mediated drug resistance in *Candida dubliniensis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(12): 3416-3421.

文章编号: 1672-3384(2010)-03-0048-03

关于建立我国罕见药物管理制度的思考

【作者】 郭冬梅* 赵静

北京中医药大学管理学院 (北京 100029)

【摘要】 本文通过对国际罕见药物管理现状的研究, 结合罕见药物的市场特点以及我国的实际情况, 明确在我国建立罕见药物制度的必要性, 并提出建立我国罕见药物制度的策略立足点。

【关键词】 罕见药物; 管理制度; 立法

【中图分类号】 R951

【文献标识码】 A

1 国际罕见药物的管理现状

罕见病是世界公共卫生领域的一项重要议题。所谓罕见病是指患病人数少、发生概率低的疾病。世界不同国家和地区对罕见病的界定和划分没有一个统一标准。世界卫生组织(WHO)对罕见病的

定义为患病人数占总人口比例的 0.65% ~ 1% 的疾病。按照这一评价标准, 全球已经确认的罕见病有 5000 ~ 6000 种, 占人类疾病总数的 10% 左右。

罕见药物也称孤儿药, 是以罕见病的治疗、预防、诊断为目标药物。美国是世界上第一个实施

* 通讯作者: E-mail: domayg@sina.com。