



# 动态分析抗菌作用的新方法

张庆<sup>1</sup>, 胡明<sup>1</sup>, 王杰<sup>1,3</sup>, 杨炜华<sup>2</sup>, 金建玲<sup>3</sup>, 刘玉庆<sup>1,3\*</sup>, 高培基<sup>3</sup>

1. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所山东省动物疫病防治与繁育重点实验室, 济南 250100;

2. 济南市中心医院, 济南 250100;

3. 山东大学生命科学学院, 济南 250100

\* 联系人, E-mail: liuiuqing@163.com

收稿日期: 2016-03-10; 接受日期: 2017-04-03; 网络发表日期: 2017-05-25

国家自然科学基金(批准号: 81271886, 31672609)、山东省农业重大应用技术创新项目(批准号: SDAIT-11-09)和山东省农业科学院农业创新工程(批准号: CXGC2016A10)资助

**摘要** 最低抑菌浓度(MIC)是表征抗菌药物对细菌生长抑制最终效应的常规方法, 不能描述抑菌作用的时间过程, 药敏试验也不适用于高抗药性水平菌株的治疗方案确定. 因此本文提出了一个普适性的新药敏试验方法. 不同接种量的质控菌株*Escherichia coli* ATCC 25922和临床高抗药性水平菌株*E. coli* BBZ在不同系列浓度的6种抗菌药物(环丙沙星、氨苄西林、头孢噻唑、阿米卡星、硫酸黏菌素和多西环素)作用下, 37°C下培养1200 min, 连续检测时间序列点的光密度值 $A_{600}$ 作为反应变量, 以相对抑菌效应( $RIE = ((a-b)/a) \times 100\%$ )表征抑制效应, 进而用等效线图表征药物浓度和时间协同抑制效应的动态过程, 量化了浓度依赖型和时间依赖型, 细化不同菌株对药物敏感性的差别. 由此得到, 达到最大抑制效应时, 需要的最低药物浓度和时间, 以及增大药物浓度或延长反应时间对抑制效应的影响, 这正是临床用药最需要的信息. 此外, 大接种量下最大抑菌效应很低, 表明不适合治疗. 本方法为防治高抗药性菌株感染提供了药敏试验方法, 也有益于促进新药研发药敏检测方法的改进. 最后提出适于临床应用的、快速定性显示药物敏感性的方法的建议.

**关键词** 药敏试验, 抗菌药物, 相对抑菌效应, 等效线图

抗菌药物广泛用于控制细菌感染性疾病, 而细菌对抗菌药物的抗药性或耐药性已成为全球公共卫生难题<sup>[1,2]</sup>. 根据药物敏感性试验(antimicrobial susceptibility testing, AST)的结果判定药物对细菌生长的作用是敏感或抗性, 是解决此难题的重要基础<sup>[3,4]</sup>. 美国临床标准化实验室(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)以大量药物敏感性试验测试结果的概率统计值表征“敏感-中介-抗性”(breakpoint for S-I-R), 并依

据临床经验不断改动测试方法和敏感“中介-抗性”的取值<sup>[5-7]</sup>.

临床用药如何沿用此类规定和建议非常困难, 临床感染发生的菌株种类和数量是由患者的体质及环境条件等因素决定的, 药物的疗效还取决于药代动力学、毒理学及对正常菌群和免疫系统的影响等, 目前广泛应用的药物敏感性试验结果都是体外试验结果, 与感染发生时体内的生理、生态条件不可能一致. 而

引用格式: 张庆, 胡明, 王杰, 等. 动态分析抗菌作用的新方法. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 650-657

Zhang Q, Hu M, Wang J, et al. A novel method for the dynamic analysis of antimicrobial effect. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 650-657, doi: 10.1360/N052017-00049

且面临一个更为严峻的问题是突发性传染的超级细菌<sup>[8]</sup>, 它们的抗药性水平远高于R值, 药敏试验标准已经失去意义.

根据药理学研究, 抗菌药物对细菌生长的作用为动态过程, 必须依据药物浓度和时间过程协同效应的结果, 表征药物对细菌生长的抑制效应(inhibitory efficiency, IE)<sup>[9-11]</sup>. 它是二个变量的过程函数.

基于以上原因并结合本实验室对此已进行的研究<sup>[12-15]</sup>, 提出相对抑菌效应(relative inhibitory efficient, RIE)和等效线相结合, 判定抗菌药物对细菌生长抑制作用的一个普适性的新方法:

药物对细菌生长的抑制效应, 应与无药物时菌株的生长过程相比较来表征. 它是在一定浓度的药物作用下, 菌株的生长能力较无药物时菌株的生长能力减低的百分数,  $RIE = ((a-b)/a) \times 100\%$  ( $a$ 为无药物时菌株的生长曲线;  $b$ 为在一定浓度的药物作用下菌株的生长曲线). RIE是条件函数, 取决于菌群的接种量以及培养温度、pH等条件. 因此在相同试验条件下进行药敏试验, 可以“达到最大RIE时需要的药浓及最短时间”来比较不同药物的抑菌能力, 并给用药提供了多种浓度和时间的组合选择方案.

RIE以等效线图的方法显示和分析, 等效线图是把这一连续动态过程的三维图形投影转变为二维图形, 以等效线图的x轴为反应时间(min), y为药物浓度( $\mu\text{g/mL}$ ), z轴为药物浓度与时间协同作用的响应变量.

本文以不同菌株、不同接种量, 测试抗菌药物浓度与时间对RIE的影响规律.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌株: 药敏试验质控菌株*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* BBZ, 后者由患病肉鸡(*Gallus domesticus*)分离纯化所得病原菌. 均由山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室保存.

试剂: 环丙沙星、氨苄西林、硫酸黏菌素、丁胺卡那、多西环素和头孢噻唑, 6种抗菌药物购自中国药品生物制品检定所(北京); LB培养基购自北京陆桥技术有限责任公司.

软件: 应用Graph-Pad Prism 5.0 software制抑菌动力学曲线图, 用Sigma plot software制等效线图.

### 1.2 方法

接种物: 接种物是 $A_{600}$ 分别为0.25, 1.5, 2.25的LB肉汤培养物. LB培养基以氨基酸作为碳源, 避免了葡萄糖对抑制反应的干扰.

培养过程与检测: 用质控菌株*E. coli* ATCC 25922和*E. coli* BBZ分别对系列浓度的6种抗菌药物(分属于喹诺酮类的环丙沙星, 青霉素类的氨苄西林, 多肽类的硫酸黏菌素, 氨基糖苷类的丁胺卡那, 四环素类的多西环素和内酰胺类的头孢噻唑)进行药物抑制生长的药物敏感性试验. 药物对细菌的抑制作用在96孔板中进行, 每孔的作用体积为200  $\mu\text{L}$  (接种物和培养基各加100  $\mu\text{L}$ ), 在岛津2500 UV-VIS光谱仪(Island ferry 2500 UV-VIS Absorption spectroscopy, 日本)37°C培养至1200 min, 在线连续测量 $A_{600}$ 作为反应变量. 以每15 min的取样为据进行分析(3次均值).

分析策略: 用等值线方法分析药物浓度和反应时间协同效应的连续变化过程, 可以给出精确的数值解. 本文中等效线图的x轴为反应时间, y轴为药物浓度, z轴为药物浓度和反应时间的协同效应RIE, 数值标示在等效线上. 若等值线平行于x轴, 则表示反应时间的变化对RIE无影响; 若等值线平行于y轴, 则表示为药浓度的变化对RIE无影响; 等效线弯曲指向哪一个轴, 则表示哪一个变量影响程度更重. 等效线间的间距密集则表示改变变量对RIE有显著的影响<sup>[16,17]</sup>. 达到最大RIE时, 需要的最低药物浓度和最短时间以及提高药物浓度或延长作用时间对RIE的影响都可得以量化表征.

## 2 结果与分析

### 2.1 环丙沙星对*E. coli* 25922的抑制效应的不同表述方法

图1A为在37°C条件下不同浓度环丙沙星抑制*E. coli* 25922生长的动力学曲线, 测试的时间间隔为15 min, 接种物是 $A_{600}$ 为0.25, 过程曲线由各测试点的 $A_{600}$ 光密度值表征的细菌密度, 反映了在不同药物浓度作用下菌群生长受抑制的程度.

无药情况下RIE显示为平行于x轴的零值线, 药物的抑制效应显示为在不同药物浓度作用下的RIE(图1B).

由图1C的等效线图可见, RIE曲线在等效线图上

显示为二维的动态变量. 等效线的RIE数值显示为持续增加时, 表明抑菌效应持续增加. 达到抑菌最大程度时需要的最低药物浓度和最短时间分别是0.225  $\mu\text{g/mL}$  和800min, 可达到的最大RIE为70%. 提高药物浓度和延长反应时间对抑菌效应的响应则较复杂, 会因浓度、时间的不同区间而有变化, 但也都可在等效线图上显示出来. 表1综合列出了此结果.

药物学上依据药代动力学(pharmacokinetics, PK)和药效动力学(pharmacodynamics, PD)的比值PK/PD

表1 不同浓度的环丙沙星抑制*E. coli* 25922生长的主要动力学参数(数据来源于图1C)

| 主要动力学参数      | 结果与描述                    |
|--------------|--------------------------|
| 抑菌最大RIE      | 70%                      |
| 最低药物浓度       | 0.25 $\mu\text{g/mL}$    |
| 最短作用时间       | 800 min                  |
| 提高药物浓度RIE的影响 | 100 min前无效, 此后持续增加至最大RIE |
| 延长对RIE的影响    | 达到最大RIE前持续增加, 此后不变       |

区分药物为时间依赖型抗菌药物和浓度依赖型抗菌药物, 反映时间依赖性抗菌药物的PK/PD参数为t-MIC(minimum inhibitory concentration), 反映浓度依赖性抗菌药物的PK/PD参数为 $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ 或AUC/MIC. 时间依赖性与浓度依赖性抗菌药物都与抗菌药物后效应和半衰期密切相关. 但由本测试等效线图显示结果看, 药效依赖于浓度或时间是依浓度和时间的进程而变化的.

2.2 接种量对环丙沙星抑菌效应的影响

由图2A和B的等效线图显示, 随着接种量增加, 当接种物 $A_{600}$ 分别为1.5及2.25时, 响应变量的动态学过程都与接种物 $A_{600}$ 为0.25时不同. 达到最大抑菌效应显著降低, 所需要的药物浓度显著增加, 需要的时间则差别不大.

表2结果表明, 菌群接种量对药敏试验的结果具有重要影响, 达到最大抑菌效应需要的药物浓度是由菌群数量确定的. 高接种量的抑菌效应非常弱.

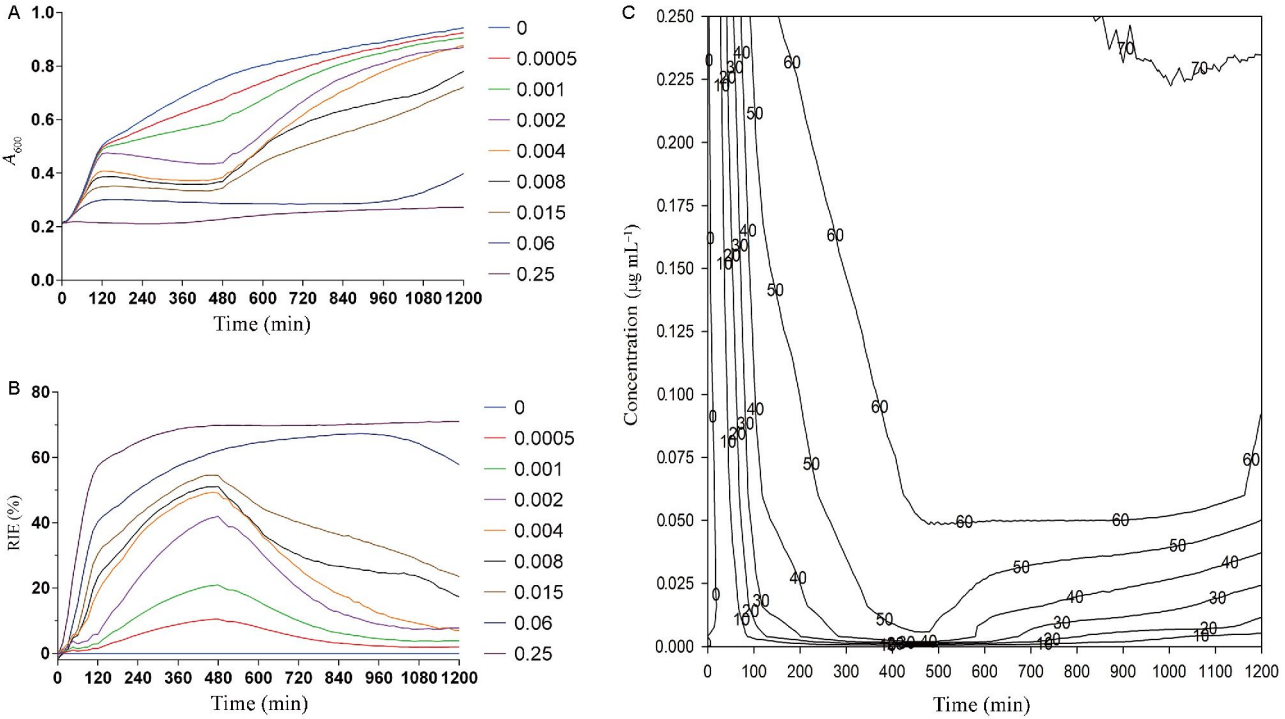


图1 环丙沙星对*E. coli* 25922的抑制效应的不同表述

A: 不同浓度的环丙沙星抑制*E. coli* 25922生长的动力学过程, 环丙沙星浓度单位为 $\mu\text{g/mL}$ ; B: 用RIE表示环丙沙星抑制*E. coli* 25922生长的动力学过程, 环丙沙星浓度与图A相同; C: 用等效线图表示不同浓度环丙沙星抑制*E. coli* 25922生长的RIE(数据来源于图B)

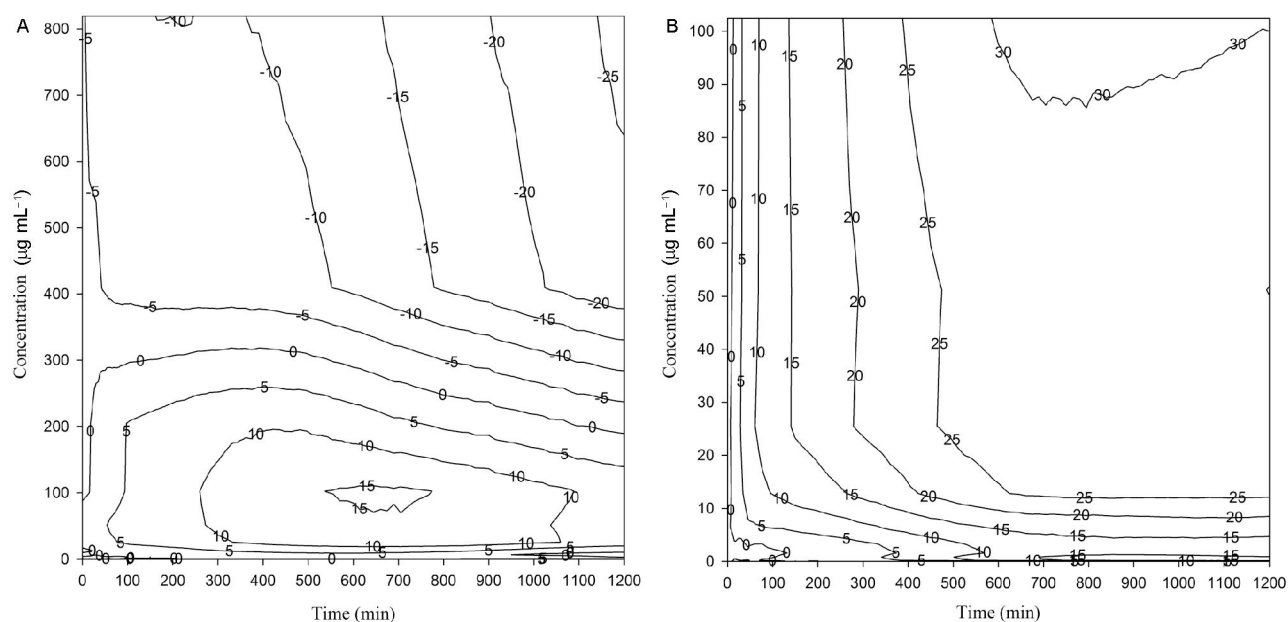


图2 用等效线图表示环丙沙星抑制*E. coli* 25922生长的RIE  
A: 接种物 $A_{600}=1.5$ ; B: 接种物 $A_{600}=2.25$

表2 3种接种量条件下不同浓度环丙沙星抑制*E. coli* 25922生长的主要动力学参数

| 主要动力学参数       | 不同接种浓度的结果与描述             |                          |                        |
|---------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
|               | 接种物 $A_{600}$ 为0.25      | 接种物 $A_{600}$ 为1.5       | 接种物 $A_{600}$ 为2.25    |
| 抑菌最大RIE       | 70%                      | 30%                      | 15%                    |
| 最低药物浓度        | 0.25 $\mu\text{g/mL}$    | 90 $\mu\text{g/mL}$      | 100 $\mu\text{g/mL}$   |
| 最短作用时间        | 800 min                  | 600 min                  | 600 min                |
| 提高药物浓度对RIE的影响 | 100 min前无效, 此后持续增加至最大RIE | 300 min前无效, 此后持续增加至最大RIE | 达到最大RIE前持续增加, 此后不变     |
| 延长作用时间对RIE的影响 | 达到最大RIE前持续增加, 此后不变       | 达最大RIE前持续增加后转为持续减低       | 达到最大RIE前持续增加, 此后转为持续减低 |

2.3 不同类型的6种抗菌药物对*E. coli* 25922的抑制效应

依照同样的测试和分析方法, 对6种不同类型抗菌药物与*E. coli* 25922在37℃下反应至 1200min的过程进行处理, 接种物 $A_{600}$ 为0.25.

PK/PD反映在一定的药动学条件下, 某一药剂量相对应的“时间-浓度-效应”过程, 可以反映“药物-人体-致病原”之间的关系. 因为抗菌药物的靶浓度无法测定, 所以用MIC来代替, 由此衍生出来的PK/PD的主要参数有: AUC/MIC(AUIC),  $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ ,  $T>\text{MIC}$ .

AUC/MIC(AUIC)指在血药浓度-时间曲线图中, MIC以上的AUC部分;  $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ 指抗菌药物血药峰浓度( $C_{\text{max}}$ )与MIC的比值;  $T>\text{MIC}$ 指药物的有效时间, 表示在给药后, 血药浓度大于MIC的持续时间.

本试验依据等效线图上RIE的显示给出了在体外条件下药效动力学的结果. 结果表明, 其反应变量的动力学、动态学过程都不相同. 表3列出了由等效线图得出的动态过程的主要参量, 可作为特征性的参数, 表征一种抗菌药物对一菌株在一定反应条件下的抑制效应. 它可为PK/PD分析及进行药物生物化学、分

表3 6种抗菌药物抑制*E. coli* 25922生长主要的动力学参数(接种物 $A_{600}$ 为0.25)

| 抗菌药物  | MIC<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 最大RIE(%) | 最低浓度<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 最短时间<br>(min) | 提高药物浓度RIE<br>的影响             | 延长时间RIE的影响            | 药物对时间或浓度的<br>依赖类型 |
|-------|-----------------------------|----------|------------------------------|---------------|------------------------------|-----------------------|-------------------|
| 环丙沙星  | 0.004~0.016                 | 70       | 0.25                         | 800           | 100 min前无效, 此后<br>持续增加至最大RIE | 达最大RIE前持续<br>增加, 此后不变 | 因反应进程而变           |
| 氨苄西林  | 2~8                         | 90       | 2                            | 200           | 持续增加至最大<br>RIE后不变            | 不变                    | 浓度依赖型             |
| 硫酸黏菌素 | 0.25~2                      | 90       | 1                            | 100           | 持续增加                         | 不变                    | 浓度依赖型             |
| 丁胺卡那  | 0.5~4                       | 90       | 2                            | 200           | 持续增加                         | 达最大RIE前不<br>变, 后减低    | 因反应进程而变           |
| 多西环素  | 0.5~2                       | 90       | 4                            | 100           | 持续增加                         | 不变                    | 浓度依赖型             |
| 头孢噻吩  | 0.25~1                      | 80       | 2                            | 50            | 持续增加                         | 至最大RIE前不<br>变, 后增加    | 因反应进程而变           |

子生物学研究提供信息.

2.4 不同类型的6种抗菌药物对*E. coli* BBZ的抑制效应

*E. coli* BBZ是由感染细菌患病肉鸡肝内取样, 以MIC方法检测时, 表明对氨苄西林显示抗性. 依照同样的测试和分析分析方法, 用6种不同类型的抗菌药物在37℃下作用于*E. coli* BBZ至1200min. 接种物 $A_{600}$ 为0.25(表4).

结果表明, 其反应变量的动力学、动态学过程与*E. coli* 25922都不相同, 达到抑菌最大程度时需要的最低药物浓度都较*E. coli* 25922有不同程度的提高, 对氨苄西林提高近100倍, 对其他药物提高了近4~5倍. 此结果可为研究抗性突变发生后不同类型药物对菌株代谢调控影响提供线索.

3 讨论

药物学研究用ED50(effective dose, ED)或EC50(effective concentration, EC)表征药物的抑菌效率, 是依据 Boltzmann-sigmoid 方程:  $y = \text{bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + \exp(V50 - x / \text{slope}))$  或 Sigmoidal 剂量效应 (variable slope):  $y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10(\log \text{EC}50 - x)^{\text{Hill slope}})$ , 拟合不同药物浓度下菌群残余菌数得到的曲线的斜率以表征药物的抑菌能力. 但实际上抑菌曲线并不是那么规整, 它不能反映药物浓度与时间进程的协同作用, 相同浓度药物的抑菌能力对不同接种量的结果必然不同, 而且, 药物的抑菌能力也

未与无药物浓度下菌群生长的过程曲线进行比较. 这都是未能解决的矛盾. 同时, 习惯以判定系数 $R^2$ 值为选定方程的唯一判据.  $R^2$ 值是基于方程理论曲线与反应变量曲线整体光滑的结果, 由数学定义反映了二个变量的近似性, 但它是否具生物学意义, 还需进一步检验. 这些都是CLSI建议的药敏检验方法未能解决的难题<sup>[18~20]</sup>.

本试验以6种抗菌药物对质控菌株*E. coli* 25922抑制效应的研究结果可以改进现在通用的药敏测试方法: (i) 以相对抑菌效应RIE构建等效线图可以反映由药物浓度和时间共同控制的抑菌过程. 由等效线显示的数值和弯曲指向直观地得到了达到抑菌最大程度时需要的最低药物浓度和最短时间, 以及提高药物浓度和延长对时间对抑菌效应的影响. (ii) 细化浓度依赖型和时间依赖型的划分, 实际上任何抑菌过程都包含这两类因素, 只是影响程度不同而已. (iii) 高接种量时抗菌药物抑菌效应急剧下降, 这解释了通用药敏试验接种量规定的原因, 表明当感染严重时, 治疗是没有意义的, 即使抗药性水平很低. (iv) 不同抗药性水平菌株的药物敏感性显著不同, 对于高抗菌株需要选择相应的药物浓度和时间组合, 而不能囿于药敏试验的判定标准.

导致感染发生时的菌株及菌体数量等都是特异性的, 是不能预测的. 因此, 本文提出的研究方法不能直接作为临床处方的依据. 基于本文的研究结果, 对药敏测试方法提出以下建议:

(1) 建议国家卫生监管部门在以超耐药菌MIC,

表 4 6种抗菌药物抑制*E. coli* BBZ生长主要的动力学参数(接种物 $A_{600}$ 为0.25)

| 抗菌药物  | MIC<br>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 最大<br>RIE(%) | 最低浓度<br>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 最短时间<br>(min) | 提高药物浓度对<br>RIE的影响           | 延长对时间对RIE<br>的影响 | 药物对时间或浓<br>度的依赖类型 |
|-------|------------------------------------|--------------|-------------------------------------|---------------|-----------------------------|------------------|-------------------|
| 环丙沙星  | >6                                 | 70           | 12.5                                | 300           | 100 min前无效,此后<br>持续增加至最大RIE | 持续减低             | 因反应进程而变           |
| 氨苄西林  | 80                                 | 50           | 240                                 | 300           | 持续增加                        | 持续增加             | 依赖浓度和时间           |
| 硫酸黏菌素 | 3                                  | 70           | 4                                   | 300           | 持续增加                        | 最大RIE前不变         | 因反应进程而变           |
| 丁胺卡那  | 6                                  | 70           | 17                                  | 400           | 持续增加                        | 不变               | 浓度依赖型             |
| 多西环素  | 10                                 | 50           | 15                                  | 600           | 持续增加                        | 不变               | 浓度依赖型             |
| 头孢噻呋  | 16                                 | 70           | 28                                  | 600           | 持续增加                        | 不变               | 浓度依赖型             |

MBC大量结果的基础上, 依照本文提出的改进的药物敏感性测试方法, 进行系统的药物敏感性测试, 并结合药代动力学、毒理学的研究结果, 推荐临床处方备选药物和治疗方案.

(2) 建议新药研发单位, 以临床分离到的抗性菌株为测试菌, 依照本文提出的改进药物敏感性测试方法, 进行系统的药物敏感性测试, 并结合药代动力学、毒理学的研究结果, 测试新药的有效性.

(3) 药敏测试不可能对不同浓度的多种药物进行反应过程的测试和动态学过程分析, 临床药敏测试需要快速得知药物对导致感染发生的菌株是敏感或抗性的定性判断. 但文献报导的快速检测方法都需要复杂的设备<sup>[21]</sup>, 临床药敏测试条件下难以进行. 基于上述分析, 提出一个适于快速定性方法药敏测试方法:

临床医生依据血象检验及生化检验等结果和临床经验, 参照《抗菌药物临床应用指导原则》对可能导致此类感染发生的菌株提出4~5种抗菌药物为备选药物. 以药代动力学报导的药物血液峰浓度( $C_{\text{max}}$ -24 h)为测试浓度(多数可在药典中可查到), 由感染发生部位取样, 密集均匀涂布在LB平板表面, 在牛津杯中加入200  $\mu\text{L}$ 该浓度的药物溶液, 37℃培养24h<sup>[22]</sup>. 牛津杯外周不出现抑菌环, 则为导致感染发生的菌株对此药物具抗性; 有清晰的抑菌环为敏感. 抑菌环内出现小菌落则表明存在对此药的抗药性菌. 此方法简便易行, 可及时得到用药“敏感/抗性”定性的结果. 此方法是依据点值而给出“敏感/抗性”的估计, 不可能都准确无误. 但临床医生沿用此法, 积累了大量经验性数据后, 即可总结成为处置某类感染的有效的依据. 可为解决临床医生处置感染的难题提供新思路.

参考文献

1 Turnidge J, Paterson D L. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20: 391–408

2 Jorgensen J H. Who defines resistance? the clinical and economic impact of antimicrobial susceptibility testing breakpoints. *Semin Pediatr Infect Dis*, 2004, 15: 105–108

3 Mitchell C L. The design and analysis of experiments for the assessment of drug interactions. *Ann NY Acad Sci*, 1976, 281: 118–135

4 Jannasch H W, Egli T. Microbial growth kinetics: a historical perspective. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1993, 63: 213–224

5 Wayne P A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S16CLSI, 2006, Available at: [www.clsi.org](http://www.clsi.org), Andrews J M. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 8). *J Antimicrob Chemoth*, 2009, 64: 454–489

6 Mouton J W. Breakpoints: current practice and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents*, 2002, 19: 323–331

7 CLSI M02-A1. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standard-eleventh edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012

8 Kumarasamy K K, Toleman M A, Walsh T R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10: 597–602

9 Pérez-Urizar J, Granados-Soto V, Flores-Murrieta F J, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling. *Arch Med Res*, 2000, 31: 539–545

- 10 Lehtinen J, Järvinen S, Virta M, et al. Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multiparameter microplate assay. *J Microbiol Methods*, 2006, 66: 381–389
- 11 Levy S B. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 49: 25–30
- 12 Liu Y Q, Zhang Y Z, Gao P J. Novel concentration-killing curve method for estimation of bactericidal potency of antibiotics in an *in vitro* dynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 3884–3891
- 13 Zhang H Q, Zhao Y, He X L, et al. A novel approach for assessing the susceptibility of *Escherichia coli* to antibiotics. *Sci China Life Sci*, 2010, 53: 1346–1355
- 14 Liu Y Q, Li J R, Du J F, et al. Accurate assessment of antibiotic susceptibility and screening resistant strains of a bacterial population by linear gradient plate. *Sci China Life Sci*, 2011, 54: 953–960
- 15 刘玉庆, 胡明, 刘焕奇, 等. 表征抗菌药物抑菌动力学的等效线药敏试验方法. *中国科学: 生命科学*, 2015, 45: 614–622
- 16 Li B, Zha H, Chiaromonte F. Contour regression: a general approach to dimension reduction. *Ann Statist*, 2005, 33: 1580–1616
- 17 Cleveland W S, McGill R. Graphical perception and graphical methods for analyzing scientific data. *Science*, 1985, 229: 828–833
- 18 Chernov N, Lesort C, Simányi N. On the complexity of curve fitting algorithms. *J Compl*, 2004, 20: 484–492
- 19 Quinn G P, Keough M J. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002
- 20 Motulsky H, Christopoulos A. *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*. London: Oxford University Press, 2004
- 21 Pulido M R, García-Quintanilla M, Martín-Peña R, et al. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68: 2710–2717
- 22 Wiegand I, Hilpert K, Hancock R E W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*, 2008, 3: 163–175

# A novel method for the dynamic analysis of antimicrobial effect

ZHANG Qing<sup>1</sup>, HU Ming<sup>1</sup>, WANG Jie<sup>1,2</sup>, YANG WeiHua<sup>3</sup>, JIN JianLing<sup>2</sup>,  
LIU YuQing<sup>1,2\*</sup> & GAO PeiJi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Key laboratory of animal disease prevention and control and breeding in Shandong province, Animal Husbandry and Veterinary Institute, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China;

<sup>2</sup> Jinan Central Hospital, Jinan 250100, China;

<sup>3</sup> Life Science Academy of Shandong University, Jinan 250100, China

The minimum inhibitory concentration (MIC) method is conventionally used to characterize the final inhibitory effect of antimicrobial agents on bacterial growth. However, this method cannot describe the process of bacteriostasis, whereas the antibiotic susceptibility test (AST) is not suitable for high resistant strains. Therefore, a general AST method is proposed herein: different inoculum sizes of the quality-control strain *E. coli* ATCC 25922 or high resistant clinical strain *E. coli* BBZ were exposed to a series of concentrations of six different antimicrobial agents (Ciprofloxacin, Ampicillin, Ceftiofur, Amikacin, Colistin sulphate, and Doxycycline) at 37°C for 1200 min.  $A_{600}$ , a response variable, was detected at the “at regular intervals of time”, and the inhibitory effect was expressed by relative inhibitory efficiency ( $RIE = [(a-b)/a] \times 100\%$ ). Furthermore, the dynamics of synergistic effect of antibiotic concentration and time on the inhibition was characterized by the RIE contour map, which quantifies the concentration-dependent or time-dependent types of inhibition and refines the difference between various resistant strains. Clinically relevant information can be revealed, such as the maximum inhibitory effect, the lowest drug concentration and time required to achieve it, and the changes in inhibitory effect with an increase in drug concentration or reaction time. In addition, the maximum inhibitory effect of a large inoculum size on the bacteriostatic process is low, resulting in ineffective treatment. This synergistic method is suitable for the prevention and control of infections caused by high resistant strains, and is beneficial to promote the AST method for the development of new antibiotics. At last, a rapid qualitative AST method has been proposed for clinical application.

**antibiotic susceptibility test, antimicrobial agents, relative inhibitory efficiency, contour**

doi: [10.1360/N052017-00049](https://doi.org/10.1360/N052017-00049)