



论文

构建大肠杆菌药敏试验新方法的探索

张怀强[†], 赵越[†], 何秀丽, 高培基^{*}

山东大学生命科学学院, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

[†] 同等贡献^{*} 联系人, E-mail: gaopj@sdu.edu.cn

收稿日期: 2010-06-29; 接受日期: 2010-08-26

国家自然科学基金(批准号: 30870080)和山东省自然科学基金(批准号: Y2007D35)资助项目

摘要 基于对大肠杆菌 CVCC249 菌株生长动力学过程的分析表明, 导致药敏试验结果不确定性的原因主要是由于不能测计“药物浓度与菌群数量的比值”及“药物浓度及其作用时间的复合作用”对菌群生长动力学过程的影响所致. 依据菌群在一系列不同浓度的庆大霉素及其作用时间下生长受到抑制的动力学过程分析和基于差分方法, 即用简单的差分计算代替复杂的微分方程的数值解法的应用, 提出了一个药敏试验的新方法: 用菌群浊度值的净增量以消除休止细胞存在的影响后, 以菌群浊度数列递推系数数值的变化, 表征药物对菌群增殖的影响, 并结合用等值线图直观显示和分析药物浓度及其作用时间复合作用的方法. 抗菌药物的抑菌率可表征为药物浓度及其作用时间的复合函数的动态变化, 表明一类抗菌药物对某一菌株抑菌率的时间或浓度依赖性, 取决于其浓度和存在时间的复合效应. 用属于不同抑菌作用机理类型的恩诺沙星、左氧氟沙星和头孢曲松钠进行对比测试, 检验了这一新方法的有效性.

关键词药敏试验
大肠杆菌
抗菌药物
递推系数

抗生素敏感试验(antibiotic susceptibility test, AST)是医学微生物检验的重要工作, 通常是通过由稀释法(琼脂或肉汤稀释法)和纸片扩散法测定的药物完全抑制细菌生长所需的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)两个参数来表征, 是合理使用抗菌药物及细菌耐药/抗药性监测的重要依据.

目前, 被普遍应用的临床药敏试验方法和“耐药”或“敏感”的分界点(Breakpoint)判定标准, 是由美国临床标准化实验室(the clinical and laboratory standards institute, CLSI)在1971年提出的^[1], 其他国家也提出了与 CLSI 不尽相同的药敏试验方法和判断标准^[2,3]. 近

年来, 中国也对此做出了规定^[4], 并开始进行主要致病菌药敏变化趋势的监测研究^[5]. 从临床治疗的需要来看, 药敏试验只需给出药物对被测菌株是“耐药”或“敏感”的判定, 并不需要了解抑菌和耐药的机理^[1-3]. 但是, 临床药敏试验(特别是广泛应用的纸片扩散法)取得的结果, 常具有明显的不确定性. 而且, 由于方法本身的误差, 以及对给出“抗药”或“敏感”的“Breakpoint”判断标准的分歧, 导致对药敏测定结果的判定相差甚大^[6,7], 为此 CLSI 不断对其药敏试验方法的操作规程和“抗药”或“敏感”的判断标准进行补充修正, 这给 AST 测试特别是给临床抗菌药物的选择造成困扰. 尽管 CLSI 几乎每年都对其药敏试验方法和“Breakpoint”的判断标准做出改进^[1], 但对 AST

试验方法和“Breakpoint”判断标准的质疑却一直不断。所以, 建立一个对临床合理用药具有指导意义的普适性的 AST 试验方法至关重要^[8]。

细菌菌群即使在无药物时的限制性培养条件下的生长过程, 也表现为正切双曲线型或 sigmoid 型动力学曲线^[9]。药物浓度的效应常用 Logistic 曲线拟合求解。药物的抑菌效应应与在“无药与药物存在下”两类生长动力学过程的比较来解析^[10]。药代动力学(pharmacokinetics, PK)及药效动力学(pharmacodynamics, PD)的研究都表明, 药物有效作用时间是其与治疗效果密切对应的因素^[11~13]。而稀释法和纸片扩散法都是依据“终点浓度判断法”为基准的“过夜培养”的结果, 被选定为药物作用时间的唯一依据^[1~4]。很显然, 这一由状态函数替代呈动态变化的过程函数的简化策略而得到的结果是错误的, 这是仅靠经验性的改进试验操作规程难以解决的。与此相关的另一问题是, 纸片扩散法等药敏试验的药物浓度效应通常表现为不同曲率的曲线^[1~4,6,7]。为得到定量分析结果, 需要把药物浓度转化成对数值后, 回归为一条直线, 并由线性回归建立抑菌率与对数浓度的经验公式而得到抑菌率^[1~4], 此数据转化方法不仅改变了药物浓度与抑菌率之间的函数关系, 而且药物作用时间的影响也无法在此分析方法中体现^[3,6,7,11,12]。近年来, 时间-剂量死亡率模型(time-dose mortality model), “time above MIC”及“ratio of AUC/MIC”^[14~16]等分析药物浓度与时间复合作用的新的生物测定方法的提出, 为此难题的解决奠定了统计分析基础, 但还未能形成一个可操作的普适性方法。另外, 处于增殖状态菌群中的细胞, 具有一定的生存周期, 而分裂是以一定概率发生的, 菌群中总存在着一定数量的不能继续生长增殖的细胞, 而毒素的产生则来源于正在增殖细胞的毒素基因的表达^[10~13,17]。表明药敏试验应以增殖细胞群作为目标函数, 但如何在药敏试验时对上述两类菌群给予区分, 也是一直未被认识的问题。

针对上述难题, 本实验室进行过多种改进药敏试验方法的探索^[18~24], 在 Fibonacci 数列分析方法的启示下^[25~27], 提出了由细菌菌群浊度数列的递推系数(recurrent coefficient for sequence, RC)为目标函数的药敏试验方法, 这样细菌菌群组成异质性对药敏试验的影响将会得以表征。该方法可望发展成为普适性的药效动力学药敏试验方法^[28]。本文以浊度数

列的递推系数的值, 来准确估算庆大霉素对鸡致病性大肠杆菌(*E. coli*)CVCC249 菌株药敏试验结果的影响, 并以大肠杆菌标准质控菌株 *E. coli* ATCC 25922 和属于不同抑菌作用机理类型的恩诺沙星、左氧氟沙星及头孢曲松钠进行对比测试, 来检验该方法的有效性。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

鸡致病性大肠杆菌(*E. coli*) CVCC249 敏感菌株, 由中国兽医微生物菌种管理保存中心提供; 大肠杆菌标准质控菌株(*E. coli*) ATCC 25922 由国家疾病预防控制中心提供。

1.2 实验方法

(1) 用菌群增殖过程中序列比值即递推系数的值 RC 的变化表征药物抑菌力。此试验设计策略源于经典的分析兔子增殖规律的 Fabonacci 等比序列研究。在固定的增殖周期内, 其逐次增长率即递推系数为恒定值 $F_{n+1}/F_n=1.619$, 可表征为增殖率的百分比^[25]。已证实众多生物的增殖都具有类似的规律。递推系数为终值(F_{n+1})对初值(F_n)比值, 是具高敏感性的参量, F_{n+1} 的微小改变都能被表征出来。但是菌群中细胞分裂的发生是随机过程, 即在任何时间区间内都会有一定比例的细胞发生分裂, 它不同于确定性的 Fabonacci 序列^[25]。近来, Viswanath^[26], Embree 和 Trefethen^[27]等人的研究表明, 当 F_n 为随机增长的 Fabonacci 序列时, 递推系数(RC)逼近于 1.133^[26,27]。本研究组用数学模拟的方法, 也证实了其符合菌群中细胞分裂随机发生的规律^[20]。但浊度法反映的是培养液中存在的总细胞量, 不能区分正在进行增殖的细胞和已经进入休止期的细胞, 而通常认为药敏试验应以进行增殖的活菌为目标函数^[10~13]。研究发现, 休止细胞的存在可用计算浊度净增量的办法以消除, 即 A 的净增量($A_{net}=(A_{i+1}-A_i)/(t_{i+1}-t_i)$)不受休止细胞的存在的影响。这样, 由 A 的净增量计算得到的递推系数值($RC=(A_{i+1}-A_i)/A_i$), 即可表征为实测时间间隔内菌群中细胞发生分裂的百分率的改变量^[25]。无药物时初始值与药物作用下终点值的递推系数即可表征为菌群受药物作用后的抑菌率 IH(inhibitory%), $IH\%=(A_{end}-A_{initial})/(t_{end}-t_{initial})$ 。本实验中取样间隔(Δt)为 1 h,

这样, 由菌群在“无药物与药物存在下”两类生长过程的浊度数列的递推系数的比较, 即可作为目标函数进行药敏试验结果的分析。

(2) CFU(Colony forming unit)法与浊度法(turbidity)测定菌群生长量. 菌株 *E. coli* CVCC249 接种于含 5 L LB 液体培养基的 10 L 发酵罐中, 37°C 条件下培养, 间隔 1 h 取样^[28]. 以悬滴培养法和浊度法分别测定形成的菌落数(CFU)^[29]和 A_{600} 浊度值^[30]. 抗生素敏感试验是在 37°C 下摇瓶培养的实验结果. 样品测试至少进行 3 次重复, 均值的变异系数(coefficient of variation, CV)约为 1.0%.

(3) 用等值线图直观显示药物浓度及其作用时间对逐次增长率的影响. 等值线图是基于非线性多元回归建立的非模型化分析法, 可适合于二变量复杂性分析^[31,32]. 本研究组在对糖苷酶的研究中, 已用等值线图有效分析了浓度和过程时间对酶催化的复合作用^[33]. 等值线图的绘制采用软件包 Table Curve 2D software (Graph 5.0, AISN software Inc.ronb@presys.com).

(4) 用曲线下的面积 AUC(area under curve)表征菌群在“无药物与药物存在下”两类生长过程的总体增长量^[34,35]. AUC 方法是药代动力学和色谱分析中常用的方法. 尽管光谱曲线上单一波长位点上的光吸收值能够反应一个被测系统内几乎所有因素的影响, 但测试的误差在很大程度上受波长取值间隔的影响. 总体来说, 间隔愈大则误差愈小. 这样, 当用光谱曲线下的面积, 即 AUC 作为计算指标时, 其计算误差将会更小. AUC 的数值可通过定积分法计算光吸收曲线下的面积而得到, 其计算积分公式为:

$$AUC = \int_0^i A_i(\lambda) \cdot d\lambda_i, \text{ 式中的 } \lambda_i \text{ 是波长}(i=1, \dots, n); A_i \text{ 表示某组分在波长 } \lambda_i \text{ 值时的吸收值.}$$

与经典的光吸收法相比, 该方法较为灵敏, 且在光谱分析中的应用可以反映整个光谱的变化趋势, 降低由于选择单个波长作为目标函数引起的试验误差.

(5) 用样条插值法光滑观测实测数据以逼近生长过程的真值. 由于递推系数是一个比值, 所以它与瞬时生长速率 $v_{inst} = \frac{dN}{dt} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta N}{\Delta t}$ 相类似, 对样品测试误差也敏感, 递推曲线也易表现出“振荡”现象(oscillation), 从而干扰统计分析. 为排除此干扰, 实测数据应首先进行光滑, 然后再进行递推系数计算, 实测数据光滑主要用 3 次样条插值算法(Savitzky-

Golay spline 软件包)进行.

2 结果

2.1 细菌菌群在限制性培养条件下生长过程的递推系数分析

CFU (colony forming unity)法与浊度法(turbidity)都是药敏试验中表征菌群增殖常用的方法. 但它们在药敏试验中表征能力的差异还未被认识. 以含不同菌数的 *E. coli* CVCC249 培养物为接种物, 接种于含 5 L LB 液体培养基的 10 L 发酵罐中, 37°C 条件下培养, 间隔 1 h 取样^[28]. 分别以悬滴培养法和浊度法测定形成的菌落数 CFU^[29]和 A_{600} 浊度值的变化^[30](图 1 和 2).

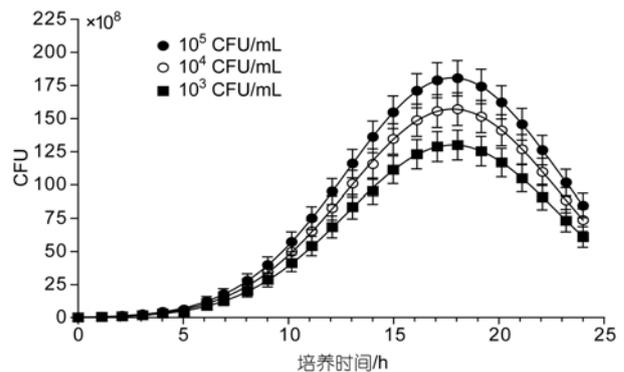


图 1 不同接种量时 *E. coli* CVCC249 菌群活菌数变化过程曲线

曲线以 Gaussian 分布函数光滑, $R^2 > 0.98$

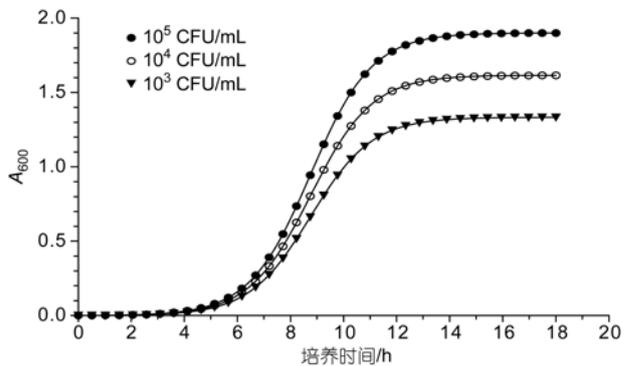


图 2 不同接种量时 *E. coli* CVCC249 菌群浊度值变化过程曲线

曲线以 Boltzman sigmoid 分布函数拟合, $R^2 > 0.98$

由图示不难看出, 对同一生长过程的培养物, CFU 法测得的结果显示为正态分布型曲线, 而当培养时间低于 20 h, 浊度法测得的浊度值则显示为 Boltzman sigmoid 分布型曲线. 这是由于 CFU 法基于有分裂能力的活细菌形成的菌落, 是净增殖结果的表征, 而浊度值所表征的则是细胞总存在量. 不能区分正在进行增殖的活菌和不能进行分裂的休止细胞^[27-29]. 而浊度值的净增/减量的递推($A_{i+1}-A_i$)则显示为正态分布型曲线(图 3), 表明此表征方法可以消除休止细胞存在的影响.

对图 1 和 3 进行递推系数计算的结果表明, 浊度法的结果与 CFU 法的结果十分接近. 序列递推系数变动在 0.95~1.2 之间, 可信限处于随机增长的 Fabonacci 序列递推系数的理论值(1.133)范围之内^[26,27], 前文对此也给出了多方面的分析^[18-24]. 因此预测, 在菌群生长增殖被药物抑制时, 递推系数必然应小于 1.0. 纸片扩散法以目测无细菌生长透明圈直径为依据, 相当于 CFU 法; 稀释法以目测培养试管中无细菌生长为据, 相当于浊度法. MIC/MBC 的判定, 既不能估量活菌/休止期细胞的不同影响, 而又依据因人而异的目测结果, 导致对不同实验室的 AST 报告不可能进行等价比较. “敏感”与“耐药”的判定标准是建立在统计基础上的推断, 推断的准确度(accuracy)很大程度上取决于对抑菌环直径与稀释法药敏试验 MIC 相关程度的把握上. 因此, 对这种推断结果解释的误差, 也是不可避免的.

本文提出的以浊度净增量来计算递推系数的方法, 可消除休止细胞存在的影响, 可与 CFU 法取得的结果等价, 又不受接种量和不同生长阶段的影响,

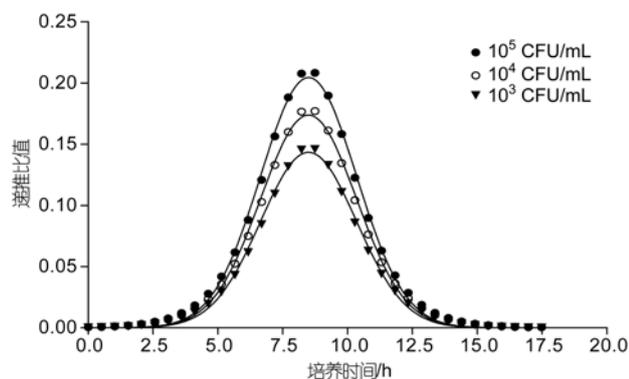


图 3 不同接种量时, *E. coli* CVCC249 菌群浊度值净增量变化过程曲线

这为 AST 检测方法的建立提供了必要条件.

2.2 用菌群增殖过程中浊度序列比值净 RC(递推系数的值)为目标函数, 表征庆大霉素对 *E. coli* CVCC249 的抑菌率(IH, inhibitory%)

图 4(A)和(B)为在不同浓度庆大霉素存在下, 接种量为 1×10^7 CFU/mL 和 3.5×10^5 CFU/mL 时, *E. coli* CVCC249 菌群生长过程浊度的实测值变化曲线, 由于它们呈现为不同的动力学曲线, 曲线的形状和曲率各异, 难以依据一个普适性的方程进行拟合^[36-41].

图 4(C)和(D)是以递推系数值构成的过程曲线, 可表征经不同浓度庆大霉素作用后的药物效应. 但是, 由于在分批培养条件下, 不含庆大霉素的对照组生长也会受限, 生长曲线也表现为一定程度的衰减, 因此, 需要由药物组减去此效应, 以得到净递推系数值($\text{Net RC} = \text{RC}_t - \text{RC}_{\text{zero}}$), 结果见图 4(E)和(F).

上述结果表明, 不同接种量时, 递推系数值的动力学变化相似. 以浊度法的测定为依据并以净递推系数值定量表征药物效应时, 可消除休止细胞和不含药物对照组的影响, 为等价基础上表征药物抑菌力提供了必要条件.

以药物作用下细菌生长曲线下的面积(AUC)定量表征药物效应——抑菌力(IH%, inhibitory capacity)/杀菌力(killing capacity), 是药效动力学(pharmacodynamics)表征药物积累效应常应用的方法^[11,12]. 从数学分析角度, 曲线下的面积(AUC, area under curve)是面积的积分值, 它是动力学过程的通解, 不受限于某一特定的方程^[34,35]. 但是, 如果直接以浊度法的测定为依据计算 AUC 时, 它既不能消除休止细胞的干扰, 又要受到接种量显著影响, 是在不等价基础上的比较. 如图 5(A)所示, 直接以浊度法测定结果(数据来源于图 4(A)和(B))得到的曲线下的面积定量表征药物效应时, 接种量为 1×10^7 CFU/mL 和 3.5×10^5 CFU/mL 的抑菌动力学过程和抑菌常数显著不同. 但以净递推系数值得到的曲线下的面积定量表征药物效应时, 得到的抑菌动力学过程和抑菌常数则相同(图 5(B)), 表明以净递推系数(Net RC)表征药物效应时, 休止细胞和接种量的影响都可被等值化. 细胞的动力学过程曲线相同, 药物效应可在等价基础上进行比较. 但图 5(B)仍然是基于单变量分析的结果, 即药物的效应限定为固定时间点的单一浓度的作用, 不能表征浓度

与时间2个自变量的复合效应^[10-13]. 等值线图是基于非线性多元回归建立的非模型分析法. 可适合于二

变量复杂性分析^[31,32], 此分析法已被有效地应用于酶动力学过程研究^[33].

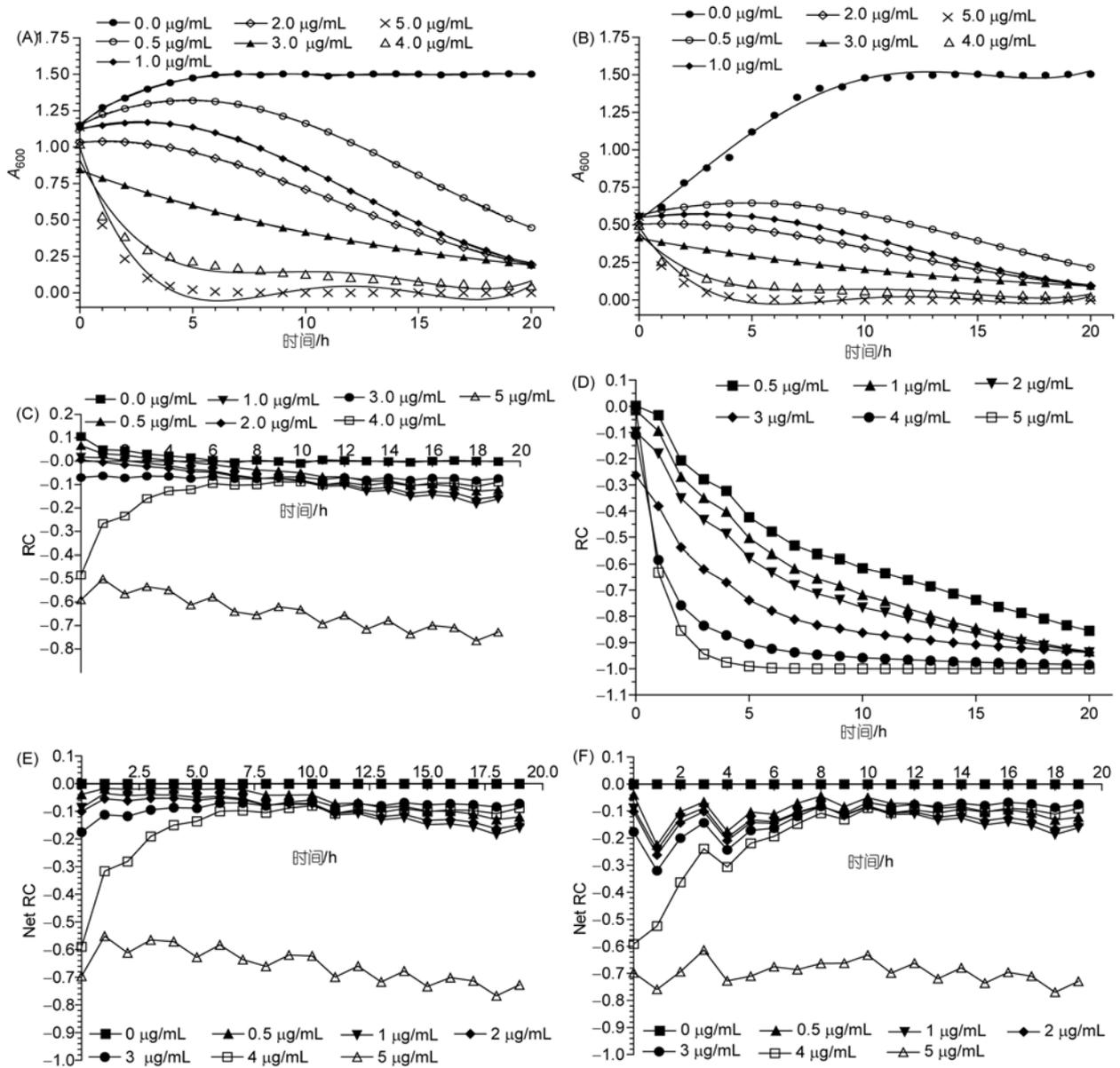


图4 不同接种量, *E. coli* CVCC249 在不同浓度庆大霉素存在下菌液浊度值与递推系数值的变化

(A) 接种量为 1×10^7 CFU/mL 时, *E. coli* CVCC249 在不同浓度庆大霉素存在下菌液浊度值的变化; (B) 接种量为 3.5×10^5 CFU/mL 时, *E. coli* CVCC249 在不同浓度庆大霉素存在下菌群浊度变化; (C) 接种量为 1×10^7 CFU/mL 时, *E. coli* CVCC249 在不同浓度庆大霉素存在下递推系数值的变化; (D) 接种量为 3.5×10^5 CFU/mL 时, *E. coli* CVCC249 在不同浓度庆大霉素存在下递推系数值的变化; (E) 接种量为 1×10^7 CFU/mL 时, *E. coli* CVCC249 在不同浓度庆大霉素存在下净递推系数值的变化; (F) 接种量为 3.5×10^5 CFU/mL 时, *E. coli* CVCC249 在不同浓度庆大霉素存在下净递推系数值的变化

2.3 用净递推系数值表征抑菌率(%)的等值线图, 分析不同浓度庆大霉素、恩诺沙星、左氧氟沙星和头孢曲松钠及其存在时间对 *E. coli* CVCC249 抑菌率(%)的复合影响

图 6(A)用等值线图显示不同浓度庆大霉素及其存在时间的药物对 *E. coli* CVCC249 抑菌率(%) (等值线标示值 $\times 100$)的复合影响, 接种量为 1×10^7 CFU/mL. 图 6(B)接种量为 3.5×10^5 CFU/mL.

等值线图 X 轴和 Y 轴分别为庆大霉素的存在时间和不同浓度, 二者协同作用的结果则表征为等值线的动态变化^[31-33], 等值线上标示的数值则为基于非线性多元回归得到的二变量(浓度和时间)复合效应的结果, 等值线上标示的数值为杀菌率(%) (标示值 $\times 100$). 由图 6(A)可见, 在庆大霉素浓度低于 $2.0 \mu\text{g/mL}$ 时, 10 h 前无抑菌作用. 庆大霉素浓度大于 $2.0 \mu\text{g/mL}$ 时, 抑菌率随浓度增长而提高. 要达到大于 60% 的抑菌率, 浓度需大于 $4.0 \mu\text{g/mL}$ 和 20 h 以上的存在时间. 由图 6(B)可见, 接种量为 3.5×10^5 CFU/mL 时, 庆大霉素浓度及其作用时间的复合作用对抑菌率(%)的影响与接种量为 1×10^7 CFU/mL 时的结果相同.

判断抗菌药物是时间依赖性或浓度依赖性, 是药效学研究与应用的重要问题. 通常认为, 这属于一类抗菌药物对某一菌株的专一性效应^[11-13]. 图 6(A)和(B)的结果则表明, 一类抗菌药物对某一菌株抑菌率的时间依赖性或浓度依赖性, 取决于其浓度和存在时间的复合效应, 而上述判断不可能仅依据单变量分析给出结果(图 4(E)和(F)). 等值线图表征杀菌率(%)的方法, 则为此提供了一个有力的工具. 等

值线图属于非模型化分析^[31,32], 它表征的结果只限于实测数据范围内, 而不能作外推和预测, 欲得到 $\approx 100\%$ 的抑菌率的结果, 则通常需要扩大庆大霉素的浓度再进行测试. 图 6(C)是在高浓度庆大霉素作用下的抑制率(%)的等值线图, 表明要达到 100% 的抑制效果, 需要 $15 \mu\text{g/mL}$ 的浓度和 10 h 的作用时间.

不同类型的抗生素, 抗菌作用机理也各有不同. 如氨基糖苷类的庆大霉素, 其作用机制是直接 30S 核糖体 16rRNA 亚单位的解码区的 A 部位相结合, 从而阻止蛋白质合成^[42]; 喹诺酮类的恩诺沙星(Enrofloxacin)和左氧氟沙星(Levofloxacin), 其作用机制是干扰细菌 DNA 的复制和转录, 诱发细菌启动了 SOS 应答机制抑制 DNA 复制^[43]; 对头孢类的头孢曲松钠(ceftriaxone sodium)其抗菌作用机制是结合细胞外膜的青霉素结合蛋白^[44]. 那么, 基于庆大霉素对菌群生长抑制过程的分析而提出的药敏试验新方法, 是否也适用于其他类型抗生素呢? 为了进一步验证新方法的有效性, 采用与庆大霉素相同的试验方法, 测定了恩诺沙星、左氧氟沙星和头孢曲松钠对 *E. coli* CVCC249 生长的抑制作用. 图 6(D)~(F)给出了等值线图的分析结果, 图 6(G)则为庆大霉素对标准质控菌株作用的结果. 由等值线图 6 可见, 相同的抑菌率(%)可由药物浓度和作用时间的不同组合得到, 这是 CLSI 等药敏测试方法不能提供的, 而这正是临床治疗所需要的信息. 由上述系列等值线图的比较还可看出, *E. coli* CVCC249 菌株对 4 种不同类型的抗菌药物等值线图的变化趋势各不相同, 即药物的特异性可由此得以表征. 而与质控菌株(图 6(G))的比较表明, 药物(庆大霉素)对不同菌株的抑制作用的不同动

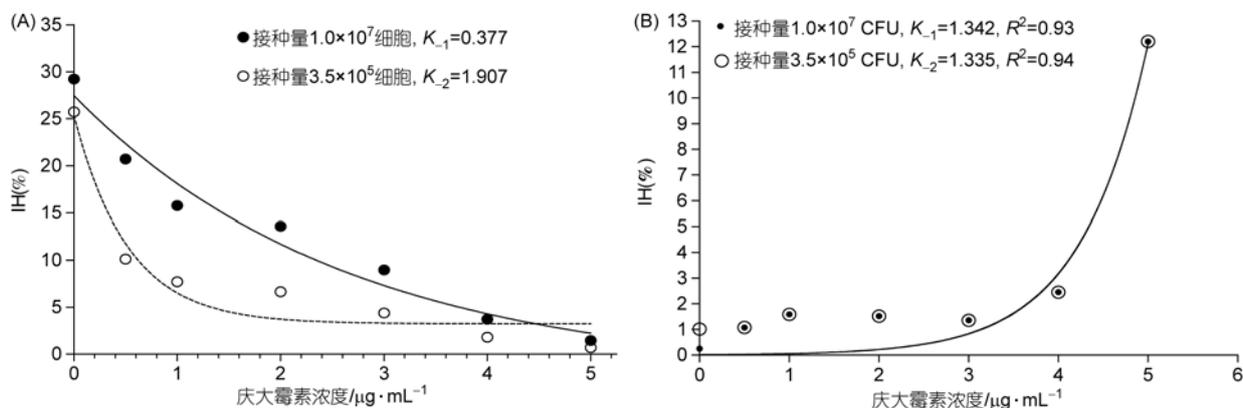


图 5 以曲线下的面积定量与净增量表征药物效应时抑菌动力学常数比较
(A) 定量; (B) 净增量. K_1 和 K_2 表示曲线的衰减常数

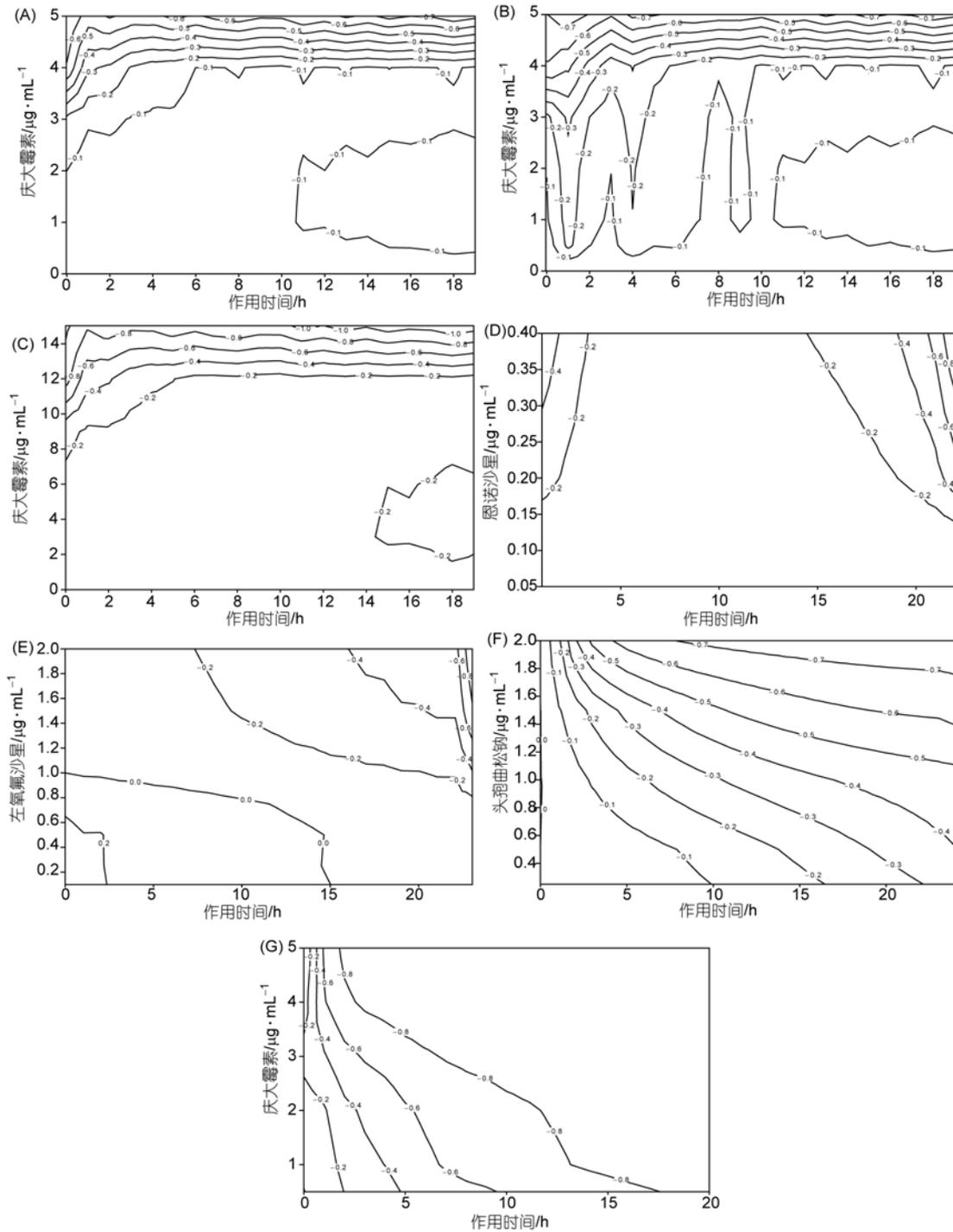


图 6 不同浓度庆大霉素、恩诺沙星、左氧氟沙星和头孢曲松钠及其作用时间对 *E. coli* CVCC249 抑菌率(%)的复合影响
 (A) 不同浓度庆大霉素和作用时间对 *E. coli* CVCC249 菌株抑菌率(%)的复合影响. 接种量为 1×10^7 CFU/mL; (B) 不同浓度庆大霉素和作用时间对 *E. coli* CVCC249 菌株抑菌率(%)的复合影响. 接种量为 3.5×10^5 CFU/mL; (C) 不同浓度庆大霉素(高浓度时)和作用时间对 *E. coli* CVCC249 菌株抑菌率(%)的复合影响. 接种量为 1×10^7 CFU/mL; (D) 不同浓度恩诺沙星及作用时间对 *E. coli* CVCC249 菌株抑菌率(%)的复合影响. 接种量为 1×10^7 CFU/mL; (E) 不同浓度左氧氟沙星和作用时间对 *E. coli* CVCC249 菌株抑菌率(%)的复合影响. 接种量为 1×10^7 CFU/mL; (F) 不同浓度头孢曲松钠和作用时间对 *E. coli* CVCC249 菌株抑菌率(%)的复合影响. 接种量为 1×10^7 CFU/mL; (G) 不同浓度庆大霉素和作用时间对标准质控菌株 *E. coli* ATCC 25922 抑菌率(%)的复合影响. 接种量为 1×10^7 CFU/mL

态过程也可表征出来。

3 讨论

多年来, 药物对微生物生长抑制机理的研究, 主要集中于药物分子与菌体细胞特异性靶位的作用, 并从生物大分子水平上报道了抗菌作用的机理。但其只是感染发生的必要条件, 而不是充分条件。感染对宿主的影响则体现于亿万细胞在一定环境条件下不断增殖的结果。药敏试验应针对药物对菌群毒效功能得以充分表达这一层次上, 对药物与菌群的相互作用的机理来进行分析。药敏试验的结果应对临床药物的选择使用有指导作用, 作为细菌耐药/抗药性监测和开发新药的依据应当准确稳定, 应具等价可比性。但是, 体外(*in vitro*)进行的药敏试验测试条件与在体内(*in vivo*)药物与感染菌群(病原菌)相互作用时的环境和动态过程有很大差别, 在体外, 全方位模拟体内药物与感染菌群相互作用时的处境和动态过程, 以获得两个不同生态系统的等价比较是难以达到的, 但也不应忽略这一起主导作用的因素。而通常的稀释法(琼脂或肉汤稀释法)和纸片扩散法都只研究药物浓度的影响, 而未能包含时间和药物浓度与菌群数量的比值这两个重要影响因素。CLSI 和 BSAC 等临床标准实验室对质控菌株药敏试验结果“抗药”或“敏感”的判定也是脱离药物的存在时间, 而单独评估药物浓度的作用^[1-4]。CLSI 提出的对“R, I, S”的区分标准, 变动于数个质控浓度之间, 是一个“弹性尺度”, 人们期望一个普适性的药敏试验方法和清楚区分“耐药”或“敏感”的判断标准。

通常对 MIC 所维持时间的量度, 只限于药效动力学研究。药物浓度与菌群数量比值的量度只限于以 CFU 方法进行 MBC 研究。时间和药物浓度与菌群数量的比值这两个重要影响因素的作用, 并未体现于临床药敏试验及细菌耐药趋势监测研究中^[11-13], 这可能是通行的临床药敏试验结果总是呈现不确定性的重要原因。CLSI 不断对其药敏试验方法和结果的判断标准进行补充和修改, 表明评价 AST 测试结果非常困难。如黄素丹等人^[45]报道了 MIC 法测验不同厂家生产的同一种抗菌药物(左氧氟沙星注射液和环丙沙星注射液)的结果, 高低相差 60 倍以上(~6 个质控浓度)。近年来, 新的 MIC/MBC 方法不断出现, 如 E 试验法、放射性核素法、荧光法、气体压力法、

流式细胞术法、半自动化药敏测定仪以及 PCR 法等^[46-51], 检测效率及测试的稳定性都能提高。但是, 它们都未能阐述以上三个重要因素的影响, 也未能改变微生物耐药性日趋严重的现状。一方面, 研制开发一种新药的时间更趋长久, 而一种新药耐药性形成的时间则更为短暂, 在有效药物浓度降低或去除后, 休止细胞又回复增殖现象, 它是基于“耐药”还是“抗性突变”? 这都是与药敏试验有关而又未能得以解决的难题。

基于对上述问题的分析, 一个有效的药敏试验方法和结果评估标准必须建立在充分了解药物的抑菌/杀菌机理的基础上, 而不应仅限于操作规程的改进。本文提出的改进策略, 将有助于对临床合理用药具指导意义的普适性的 AST 试验方法的建立^[7]。

本文提出的方法是针对 CLSI 等国际药检标准化实验室提出的 AST 方法存在的问题而构建的。CLSI 的方法对数以千计的质控菌株都给出了具体的测试规定, 而且又不断更新^[1-4], 是一个“个性化”的方法。本文提出测定方法, 从数学分析上看, 是基于差分方法的应用, 即用简单的差分计算代替复杂的微分方程求解, 这一策略在分析复杂的生态系统时非常有效^[52]。恩诺沙星、左氧氟沙星以及头孢曲松钠是广泛应用的抑制革兰氏阴性菌感染的首选抗菌素。因此, 试验结果在此范围内验证了这一新方法的有效性。对革兰氏阳性菌、厌氧菌以及真菌等不同类型微生物的作用, 还在进行中。但是, 本研究仍属于方法学的探索, 它的普适性需要多类型抗菌药物对系列质控菌株来验证。由于测定的工作量大, 数据拟合和等值线图的制备与分析都需要一定的计算数学知识, 它并不能直接作为常规性的临床药敏试验方法应用。但是, 它提出的策略以及由此得到的信息, 可为改建新的临床药敏试验方提供依据。

药敏试验的内涵应当依据不同的需要而定, 常规性的临床药敏试验方法需简易可行, 操作易于标准化, 提出的 MIC 应同时具有时间效应, 并具有较高的检测效率及测试的稳定性, 可作为合理使用抗菌药物及细菌耐药/抗药性监测的重要依据。本实验室正在进行这方面的探索。而对新药开发和药敏试验的研究工作, 则需要进行动力学和分子生物学等多方面的研究, 为临床药敏试验方法提供支持。国家或专业性临床标准化实验室还需要进行药代动力学、药效动态学等方面的研究, 应基于本实验室进行的上述多方面的研究基

基础上, 提出为临床合理使用抗菌药物及细菌耐药/抗药性监测和研发的建议, 而非仅限于基于来源于不同实验室的统计资料而进行的归纳性分析. 本实验室以“抗药性或耐药性+抗菌药物”检索 1999~2010年, 中国期刊, 中国知网(WWW.CNKI.NET)得到的 255 篇论文都是采用 CLSI 标准进行药敏试验, 并通过 WHONET5.4 软件进行分析, 结论都是“某药对某菌耐药率为某某百分数, 耐药谱很广, 耐药性呈上升趋势, 建议加强监测, 合理用药”, 但如何合理用药仍是一个模糊的概念. 而药敏试验方法中存在的问题, 却未能得到反映. 国际上的同类研究多从分子生物学层次提出了作用机理方面的问题, 对药敏试验方法中存在的问题的讨论也未能涉及本文上述提出的问题.

4 结论

被普遍应用的美国 CLSI、英国 BSAC 等临床标

准实验室提出的细菌药敏试验方法, 试验结果具有明显的不确定性, 这是由于方法本身内在缺陷造成, 即都只研究药物浓度的影响, 而未能包含药物浓度与存在时间的复合作用和药物浓度与菌群数量的比值这二个重要的影响因素, 是针对某一菌株对某类药物作用的个性化方法, 不具普适性.

基于 4 种不同类型的抗菌素, 对 *E. coli* CVCC249 菌株生长动力学过程影响的分析, 提出了一个药敏试验的新方法. 用浊度值的净增量消除休止细胞的影响后, 基于庆大霉素等 4 种抗菌药物存在下菌群浊度数列的递推系数值的变化, 进一步用等值线图直观显示药物浓度及其作用时间复合作用的策略, 可使上述限制性因素对药敏试验的影响归一化, 而得以等价表达, 可得到不同抑菌百分率时所需药物浓度及其作用时间的动态变化值, 这正是临床治疗最需要的信息.

参考文献

- Wayne P A. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S16CLSI, 2006, www.clsi.org
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. Clin Microbiol Infect, 2003, 9, ix-xv, www.eucast.org
- Andrews J M. BSAC standardized disc susceptibility testing method(version 7). J Antimicrob Chemother, 2008, 62: 256—278
- 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程. 南京: 东南大学出版社, 2006
- 李家泰, Weinstein A J, 杨敏. 中国细菌耐药监测研究. 中华医学杂志, 2001, 81: 8—16
- Turnidge J, Paterson D L. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. Clin Microbiol Rev, 2007, 20: 391—408
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock R E, et al. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration(MIC) of antimicrobial substances. Nat Protocols, 2008, 3: 163—175
- Gould I M. Towards a common susceptibility testing method? J Antimicrob Chemother, 2000, 45: 757—762
- Carrillo M, Gonzalez J M. A new approach to modeling sigmoidal curves. Technol Forecast Soc Change, 2002, 69: 233—241
- Henson M A. Dynamic modeling of microbial cell populations. Curr Opin Biotechnol, 2003, 14: 460—467
- Li R C. New pharmacodynamic parameters for antimicrobial agents. Int J Antimicrob Agents, 2000, 13: 229—235
- Lehtinen J, Järvinen S, Virta M, et al. Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multiparameter microplate assay. J Microbiol Meth, 2006, 381—389
- Lavric V, Graham D W. Birth, growth and death as structuring operators in bacterial population dynamics. J Theor Biol, 2010, 264: 45—54
- Feng M G, Liu C L, Xu J H, et al. Modeling and biological implication of time-dose-mortality data for the entomophthorean fungus, *Zoophthora anhuiensis*, on the Green Peach Aphid *Myzus persicae*. J Invertebr Pathol, 1998, 72: 246—251
- Firsov A A, Zinner S H, Vostrov S N, et al. MIC-based interspecies prediction of the antimicrobial effects of ciprofloxacin on bacteria of different susceptibilities in an *in vitro* dynamic model. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42: 2848—2852
- Gustafsson I, Lowdin E, Odenholt I, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters for antimicrobial effects of cefotaxime and

- amoxicillin in an *in vitro* kinetic model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 2436—2440
- 17 Ramirez Santoyo R M, Moreno Sala A, Almanza Marquez Y. Avian *Escherichia coli* virulence factors associated with coli septicemia in broiler chickens. *Rev Argent Microbiol*, 2001, 33: 52—57
- 18 胡作生, 傅维洁, 高培基. 关于崔-L 单种群增长模型的讨论及其推广. *生物数学学报*, 1990, 5: 94—101
- 19 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
- 20 Liu Y Q, Zhang Y Z, Gao P J, et al. A novel approach to estimate *in vitro* antibacterial potency of Chinese medicine using a concentration-killing curve method. *Am J Chin Med*, 2005, 33: 671—682
- 21 刘玉庆, 张怀强, 高培基, 等. 大肠杆菌群体的生理异质性及对药敏试验的影响. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2007, 37: 524—529
- 22 张怀强, 刘玉庆, 高培基, 等. 分批培养条件下细菌群体生长阶段的区分及生长参数的确定. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35: 502—512
- 23 张怀强, 卢丽丽, 高培基, 等. 细菌群体异质性及对生长动态过程的影响及其表征. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2007, 37: 246—256
- 24 金建玲, 杨维强, 高培基, 等. 突变率计算中细菌群体生长不同步系数的修正. *微生物学通报*, 2009, 36: 446—452
- 25 杨纪柯, 齐翔林, 陈霖. *生物数学概论*. 北京: 科学出版社, 1982
- 26 Viswanath D. Random fibonacci sequences and the number. 1.13198824.... *Math. Comp.*, 2000, 69: 1131—1155
- 27 Embree M, Trefethen L N. Growth and decay of random Fibonacci sequences. *R Soc Lond Proc Ser A, Math Phys Eng Sci*, 1999, 455: 2471—2485
- 28 张怀强. 大肠杆菌 *E.coli* CVCC249 在分批和连续培养条件下的生长动力学和生理特性比较研究. 山东大学博士学位论文. 2008
- 29 Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods*, 2001, 44: 121—129
- 30 Malleter M F. Evaluation of growth by physical and chemical means. *Methods Microbiol*, 1969, 1: 521—566
- 31 Li B, Zha H, Chiaromonte F. Contour regression: a general approach to dimension reduction. *Ann Statist*, 2005, 33: 1580—1616
- 32 Harrington P B, Urbas A, Tandler P J. Two-dimensional correlation analysis. *Chemom Intell Lab Syst*, 2000, 50: 149—174
- 33 Zhang H Q, Wang L S, Gao P J. Use of the contour approach for visualizing the dynamic behavior of intermediates during O-nitrophenyl- β -d-galactoside hydrolysis by β -galactosidase. *Process Biochem*, 2009, 44: 1374—1380
- 34 Rescigno A. Area under the curve and bio-availability. *Pharmacol Res*, 2000, 42: 539—540
- 35 Purves R D. Optimum numerical integration methods for estimation of area-under-the curve (AUC) and area under the-moment-curve (AUMC). *J Pharmacok Biopharm*, 1992, 20: 211—226
- 36 Bronshtein I N, Semendyayev K A. *Handbook of Mathematics*, 4th ed. Springer-verlag: New York, 2004. 153—160
- 37 Siu W Y, Arooz T, Poon R Y. Differential responses of proliferating versus quiescent cells to adriamycin. *Exp Cell Res*, 1999, 250: 131—141
- 38 Chen Q, Stone P R, Chamley L W, et al. Antiphospholipid antibodies bind to activated but not resting endothelial cells: is an independent triggering event required to induce antiphospholipid antibody-mediated disease? *Thromb Res*, 2004, 114: 101—111
- 39 Chernov N, Lesort C, Simanyi N. On the complexity of curve fitting algorithms. *J Complexity*, 2004, 20: 484—492
- 40 Quinn G. P, Keough M J. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002
- 41 Motulsky H, Christopoulos A. *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression*. Graph Pad software Inc, San Diego CA, 2003
- 42 Jakobsen L, Sandvang D, Jensen V F, et al. Gentamicin susceptibility in *Escherichia coli* related to the genetic background: problems with breakpoints. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13: 830—832
- 43 白华, 齐静, 刘玉庆, 等. 恩诺沙星对大肠杆菌全基因组表达谱的影响. *畜牧兽医学报*, 2009, 40: 1537—1544
- 44 Esposito S, Mittelkötter U. Ceftriaxone prophylaxis in abdominal, cardiovascular, thoracic, orthopaedic, neurosurgical and general surgery: a review of practice 1996-2003. *J Chemother*, 2005, 17: 17—32
- 45 黄素丹, 姚吐娟, 温建红, 等. 利用 MIC 法筛选不同厂家生产的同一种抗菌药物. *药物研究*, 2007, 16: 21—23

- 46 刘厚明, 何林, 周克元. 抗生素敏感试验方法学的研究进展. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2005, 26: 628—634
- 47 Schulz J E, Sahm D F. Reliability of the E test for detection of ampicillin, vancomycin, and high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus* spp. JCM, 31: 3336—3339
- 48 Smaill F. Antibiotic susceptibility and resistance testing: an overview. Can J Gastroenterol, 2000, 14: 871—875
- 49 Wheat P F. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. J Antimicrob Chemother, 2001, 48: 1—4
- 50 Cotter G, Adley C C. Comparison and evaluation of antimicrobial susceptibility testing of enterococci performed in accordance with six national committee standardized disk diffusion procedures. JCM, 2001, 39: 3753—3756
- 51 Minshew B H, Pollock H M, Schoenknecht F D F, et al. Emergence in a burn center of populations of bacteria resistant to gentamicin, tobramycin, and amikacin: evidence for the need for changes in zone diameter interpretive standards. Antimicrob Agents Chemother, 1977, 12: 688—696
- 52 May R M. Simple mathematical models with very complicated dynamics. Nature, 1976, 261: 459—467