

药理与临床

多黏菌素 B 药敏条在肠杆菌科药敏检测中应用研究

郑业焕¹ 李轶^{2*} 金湘东³ 荆鹏伟⁴

(1 郑州安图生物工程股份有限公司, 郑州 450016; 2 河南省人民医院, 郑州 450003; 3 郑州铁路职业技术学院, 郑州 450052; 4 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450008)

摘要: **目的** 使用微量稀释法和 E-test 法分析肠杆菌科细菌对多黏菌素 B 体外敏感性, 评估 E-test 法多黏菌素 B 药敏条在临床药敏检测中的价值。**方法** 收集了 887 株临床肠杆菌科细菌, 同时采用 E-test 法和微量稀释法进行体外药敏试验, 考察两种方法的一致性, 针对不一致的进行复测, 复测仍不一致者判为不一致, 对两种检测方法进行统计学分析。**结果** 887 株菌的平行检测中, 842 株用药敏条和微量稀释法测定 MIC 值在 $|\pm 1|$ 个稀释倍数的范围内, 有 45 株菌的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 值超出了此范围, 复测有 8 株菌的 MIC 值回到了 $|\pm 1|$ 个稀释倍数的范围内, 即纠正后的 EA (essential agreement) % 为 95.94% (851/887)。肠杆菌科内按照种属分析, EA 值最高的为沙门菌属的 97.09% (100/103), EA 最低的为其他属肠杆菌的 94.03% (126/134), 统计学分析, 不同属间无显著性差异。**结论** 多黏菌素 B 药敏条用于肠杆菌科细菌检测药敏检测所测定的 MIC 值判定结果准确可靠, 与 CLSI 推荐的微量稀释法的符合率在 94% 以上, 能满足临床和实验室药敏检测需求。

关键词 E-test 法; 微量稀释法; 一致率; 肠杆菌

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Application of polymyxin B susceptibility strip in drug sensitivity test of Enterobacteriaceae bacteria

Zheng Ye-huan¹, Li Yi², Jin Xiang-dong³ and Jing Peng-wei⁴

(1 Zhengzhou Autobio Diagnostics Co., Ltd, Zhengzhou 450016; 2 Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003; 3 Zhengzhou Railway Vocational and Technical College, Zhengzhou 450052; 4 First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008)

Abstract Objective To analyze the sensitivity of Enterobacteriaceae bacteria to polymyxin B *in vitro* by the micro-dilution method and the gradient diffusion method, and evaluate the value of polymyxin B susceptibility strip in clinical drug sensitivity test. **Methods** A total of 887 clinical Enterobacteriaceae bacteria were collected. The gradient diffusion method and the micro-dilution methods were used to conduct *in vitro* susceptibility determination. The consistency of the two methods was investigated. The inconsistency was retested, and the retest was still inconsistent. Statistical analysis was performed on the two detection methods. **Results** In the parallel detection of 887 strains, 842 strains were determined by the drug sensitivity strip and the micro-dilution method within $|\pm 1|$ dilution multiple range, and 45 beyond $|\pm 1|$ dilution multiple range. Eight strains returned to within $|\pm 1|$ dilution multiple range, meaning the corrected EA (essential agreement) was 95.94% (851/887). According to the species analysis, the highest EA value was 97.09% (100/103) of *Salmonella*, and the lowest EA was 94.03% (126/134) of other Enterobacteriaceae.

收稿日期: 2018-11-28

基金项目: 河南地区多中心碳青霉烯类耐药肠杆菌中多黏菌素耐药机制研究 (No. SBGJ2018084); 自动化微生物鉴定和药敏分析工作站开发及产业化应用 (No. 181200211900)

作者简介: 郑业焕, 男, 生于 1980 年, 硕士, 高级工程师, 主要从事临床微生物药物敏感性试验研究, E-mail: zhyh43@163.com

* 通讯作者, E-mail: liyi7209@163.com

Statistical analysis showed no significant differences between the different genera. **Conclusion** The results of MIC determination of polymyxin B susceptibility strip for the detection of susceptibility of Enterobacteriaceae bacteria were accurate and reliable, and the coincidence rate with CLSI recommended micro-dilution method was above 94%, which might meet the requirements of clinical and laboratory drug sensitivity tests.

肠杆菌科细菌是革兰阴性菌中非常重要的一类微生物,是引起临床感染的重要病原菌之一,可致化脓性疾病、肺炎、脑膜炎、菌血症以及伤口、泌尿道和肠道的感染^[1-2]。多黏菌素是从多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)培养液中获得的多肽类抗生素,根据化学结构共分为5型,其中仅B和E应用于临床,主要用于治疗革兰阴性菌所致的全身多位点感染,因其较严重的肾毒性及神经系统毒性曾经一度被弃用。近年来,随着抗生素的广泛应用,肠杆菌科细菌对多种抗菌药物产生了耐药性,多黏菌素类作为治疗的最后选择又被应用于临床^[3-4]。本研究结合最新2018版美国临床实验室标准化研究协会(CLSI)M100-S28标准^[5],收集了2018年上半年河南省人民医院、河南省中医一附院、郑州大学二附院临床分离肠杆菌科菌株887株,同时采用E-test法和微量稀释法进行体外药敏试验,考察两种方法的一致性,为临床肠杆菌科细菌体外多黏菌素药敏试验提供参考,指导临床合理进行体外药敏检测。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

本研究收集了2018年1月—6月河南省人民医院、河南省中医第一附属医院、郑州大学第二附属医院临床常规分离肠杆菌科菌株887份,其中埃希菌属331株,克雷伯菌属207株,沙门菌属103株,志贺菌属112株,其他属肠杆菌134株(肠杆菌属57株,柠檬酸杆菌属48株,耶尔森菌属13株,摩根菌属7株,布丘菌属6株,西地西菌属3株)。质控菌株采用ATCC标准菌株:大肠埃希菌(ATCC25922)、产酸克雷伯菌(ATCC700324)、肺炎克雷伯菌(ATCC700603)、肺炎克雷伯菌肺炎亚种(ATCC13883)、肠炎沙门菌(ATCC13076)、鼠伤寒沙门菌(ATCC14028)、索氏志贺菌(ATCC25931)、霍氏肠杆菌(ATCC700323)、人苍白杆菌(ATCC49687)、人苍白杆菌(ATCCBAA-749)均源于郑州安图生物工程股份有限公司。

1.2 试剂

多黏菌素B药敏条由郑州安图生物工程股份有限公司提供,血琼脂平板、90mm Mueller-Hinton(MH)平板均由郑州安图生物工程股份有限公司提供。多黏菌素B抗菌药物为标准品,购自中国食

品药品检定研究院;MH肉汤购自于BD医疗器械(上海)有限公司。

1.3 方法

按照多黏菌素B药敏条说明书进行操作。待测菌株和质控菌株分纯过夜,挑取纯菌落制备浊度为 1.5×10^8 CFU/mL浓度菌液,用无菌棉签浸蘸菌液涂布于90mm MH平板表面,放置5min后,用真空吸笔吸取药敏条放置于平板上然后放置 $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ 孵育,孵育16~20h后,读取抑菌圈边缘与药敏条相交位置处的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值。微量稀释法的操作和判读参照CLSI标准:在96孔酶标板的2~12孔各加100 μL 肉汤培养基;加100 μL 含64 $\mu\text{g/mL}$ 抗生素的肉汤培养基至第1和第2孔中;从第2~12孔作对倍稀释;加100 μL 含有 10^5 CFU待检细菌新鲜肉汤培养基于每一孔;设立阳性对照孔,阴性对照孔,抗生素对照孔;密封酶标板, $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ 环境下孵育20~24h,当阳性对照孔明显浑浊时,记录MIC值。EA(essential agreement):指待测方法与对比方法(或参考方法)MIC值在 ± 1 个稀释倍数范围内的一致性^[5-7]。药敏条与微量稀释法比对超过 ± 1 个稀释倍数时进行复测,复测仍然超过 ± 1 个稀释倍数判为不一致^[7]。

1.4 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件,计数资料采用 χ^2 检验, $P > 0.05$ 为无显著性差异。

2 结果

2.1 质控菌株检测结果

本次质控选用的9株ATCC标准菌株,均重复3次检测,其中仅大肠埃希菌ATCC25922在CLSI有质控范围为0.5~2 $\mu\text{g/mL}$,采用微量稀释法和药敏测定MIC值均在 ± 1 个稀释倍数范围内,符合性能要求,具体数据见表1所示。

2.2 样本结果分析

共计887株肠杆菌的比对中,873株用药敏条和微量稀释法测定MIC值在 ± 1 个稀释倍数的范围内。其中完全一致的有594株(594/887, 66.97%), ± 0.5 个稀释倍数的有170株(170/887, 19.17%), ± 1 个稀释倍数的有86株(86/887, 9.70%)。有45株菌的MIC值超出了 ± 1 个稀释倍数,EA%为94.93%(842/887),

表 1 标准菌株重复 3 次检测结果
Tab. 1 Test results for standard strains repeated three times

标准菌株	药敏条检测结果 /($\mu\text{g/mL}$)	微量稀释法检测结果 /($\mu\text{g/mL}$)	种属分类
大肠埃希菌 (ATCC25922)	1/1/1	1/1/1	埃希菌属
产酸克雷伯菌 (ATCC700324)	0.25/0.25/0.25	0.25/0.25/0.25	克雷伯菌属
肺炎克雷伯菌 (ATCC700603)	0.38/0.38/0.5	0.5/0.5/0.5	克雷伯菌属
肺炎克雷伯菌肺炎亚种 (ATCC13883)	0.38/0.38/0.38	0.5/0.5/0.5	克雷伯菌属
肠炎沙门菌 (ATCC13076)	0.38/0.38/0.38	0.5/0.5/0.5	沙门菌属
鼠伤寒沙门菌 (ATCC14028)	0.38/0.38/0.5	0.25/0.25/0.25	沙门菌属
索氏志贺菌 (ATCC25931)	0.38/0.38/0.38	0.25/0.25/0.25	志贺菌属
霍氏肠杆菌 (ATCC700323)	0.25/0.25/0.25	0.25/0.25/0.25	其他肠杆菌 (肠杆菌属)
人苍白杆菌 (ATCC49687)	0.38/0.38/0.38	0.5/0.5/0.5	其他肠杆菌 (苍白杆菌属)

针对第一次测定不符合的经复测确认, 有 36 株菌测定结果仍然不符合, 即纠正后的 EA% 为 95.94%(851/887), 结果见表 2 所示。

2.3 不一致结果分析

两种方法 MIC 值超过 $|\pm 1|$ 个稀释倍数的 36 株, 测定 MIC 值见表 3 所示, 相关性分析: $P=0.012<0.05$, 说明药敏条检测结果与微量稀释法

表 2 两种方法所测 MIC 值 EA 结果

Tab. 2 EA results of MIC values measured by two methods

两种方法 MIC 值比较	菌株数量 / 株	所占比例 /%
完全一致	594	66.97
± 0.5 个稀释倍数	170	19.17
± 1 个稀释倍数	86	9.70
$>\pm 1$ 个稀释倍数	36	4.17
合计	887	100

检测结果具有显著的线性相关。配对检验结果中的 $P>0.05$, 说明两者结果差异不明显。

2.4 不同类间分析

针对 887 株肠杆菌科细菌按照不同种属分类, 计算其 EA 一致性, 埃希菌属的 EA 为 95.77%(317/331), 克雷伯菌属的 EA 为 96.14%(199/207), 沙门菌属的 EA 为 97.09%(100/103), 志贺菌属的 EA 为 96.43%(108/112), 其他属肠杆菌的 EA 为 94.03%(126/134), 并对这 5 种进行显著性差异分析, 结果见表 4 所示。

3 讨论

目前, 体外抗菌药物敏感性试验技术主要包括纸片扩散法、微量肉汤稀释法、商品化全自动微生物分析系统 (如 Vitek-Compact, BD Phoenix) 和 E-test 法等。其中, 纸片扩散法操作简单、对实验室要求

表 3 超过 $|\pm 1|$ 个稀释倍数 36 株临床菌株检测 MIC 值
Tab. 3 The MIC outside $|\pm 1|$ dilution ration of 36 clinical strains

菌株编号	组 1		组 2			组 3		
	药敏条检测结果 / (μg/mL)	微量稀释法检测 结果/(μg/mL)	菌株编号	药敏条检测结 果/(μg/mL)	微量稀释法检测 结果/(μg/mL)	菌株编号	药敏条检测 结果/(μg/mL)	微量稀释法检测 结果/(μg/mL)
LCJZ0001	0.096	0.032	LCJZ0016	1	0.25	LCJZ0031	0.5	2
LCJZ0002	0.25	0.064	LCJZ0017	0.125	0.5	LCJZ0032	0.5	2
LCJZ0003	0.5	0.125	LCJZ0018	0.125	0.5	LCJZ0033	6	2
LCJZ0004	0.5	0.125	LCJZ0019	0.19	0.5	LCJZ0034	6	2
LCJZ0005	0.5	0.125	LCJZ0020	0.19	0.5	LCJZ0035	1.5	4
LCJZ0006	0.064	0.25	LCJZ0021	0.19	0.5	LCJZ0036	16	4
LCJZ0007	0.064	0.25	LCJZ0022	1.5	0.5	LCJZ0037	3	8
LCJZ0008	0.096	0.25	LCJZ0023	1.5	0.5	LCJZ0038	24	8
LCJZ0009	0.096	0.25	LCJZ0024	1.5	0.5	LCJZ0039	24	8
LCJZ0010	0.75	0.25	LCJZ0025	1.5	0.5	LCJZ0040	32	8
LCJZ0011	0.75	0.25	LCJZ0026	2	0.5	LCJZ0041	32	8
LCJZ0012	0.75	0.25	LCJZ0027	2	0.5	LCJZ0042	4	16
LCJZ0013	0.75	0.25	LCJZ0028	0.25	1	LCJZ0043	8	32
LCJZ0014	1	0.25	LCJZ0029	0.38	1	LCJZ0044	12	32
LCJZ0015	1	0.25	LCJZ0030	0.5	2	LCJZ0045	12	32

表 4 肠杆菌科不同属检测 EA 一致性分析
Tab. 4 EA consistency analysis of different genus of Enterobacteriaceae

标准菌株	EA 结果	χ^2
埃希菌属	95.77%(317/331)	1.645
克雷伯菌属	96.14%(199/207)	
沙门菌属	97.09%(100/103)	
志贺菌属	96.43%(108/112)	
其他肠杆菌	94.03%(126/134)	

较低，且花费较低，适合临床实验室尤其是基层医院使用^[8-9]。微量肉汤稀释法是美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) 推荐的参考方法，但该方法操作繁琐，暂无全自动系统出现，并且板卡抗菌剂种类固定，影响临床推广使用。商品化全自动微生物分析系统使用方便，但价格较昂贵且需要特殊仪器设备、抗菌药物选择相对固定、测定浓度范围较窄^[10]，故在常规应用中存在一定局限性。E-test 法则综合了 MIC 法与纸片扩散法的优点，操作简单、可得到具体的 MIC 值、测定浓度范围宽、可选择的药物较多等，近些年来逐渐受到了实验室的认可。然而多黏菌素在琼脂中不易扩散导致该方法可靠性降低^[3]，2018 版 CLSI M100-S28 中针对黏菌素 (多黏菌素 B) 药敏体外检测新增备注说明，针对铜绿假单胞菌和不动杆菌建议采用的微量肉汤稀释法，删除纸片扩散法和 E-test 法折点范围，备注说明，不建议采用纸片扩散法和 E-test 法药敏条。本研究参考指南，采用 ATCC 标准株进行平行体外药敏试验，ATCC 菌株确保检测的可溯源性，质控菌株检测结果均一致，即 E 符合率为 100%，说明了试验结果的有效性。

本研究对 887 株肠杆菌科细菌，分别采用微量肉汤稀释法、E-test 法进行体外药敏试验，测定抗菌药物的 MIC，并统计分析两种方法检测 MIC 的一致性。共计 887 株肠杆菌的比对中，有 45 株菌的 MIC 值超出了 ± 1 个稀释倍数，经复测确认，有 36 株菌测定结果仍然不符合，即纠正后的 EA% 为 95.94%(851/887)。统计学 χ^2 方检验，采用 $P>0.05$ ，二者无显著性差异，针对复测后 36 株菌株的一致性超过 ± 1 个稀释倍数，推测可能是方法学或菌株的差异所致，也可能与药敏检测所用 MH 培养基的 pH 值、组分差异有关^[3]。针对 887 株肠杆菌科细菌按照不同种属分成 5 类进行分析，EA 值最高的为沙门菌属的 97.09%(100/103)，EA 最低的为其他属肠杆菌的 94.03%(126/134)，并对这 5 种进行显著性差异分析， $P=0.801>0.05$ ，美国食品药品监督管理局 (FDA) 标准^[11]

中对药敏检测试剂性能评价要求与微量肉汤稀释法比对大于 90%，该研究中比对一致性均高于 94%，说明肠杆菌科细菌使用 E-test 法药敏条试剂是性能满足预期要求。针对 36 株临床菌检测 MIC 值，相关性分析： $P=0.012<0.05$ ，说明药敏条检测结果与微量稀释法检测结果具有显著的线性相关，配对检验结果中的 $P>0.05$ ，说明两者结果差异不明显。

体外药敏试验是临床选择抗菌药物治疗的重要参考依据，准确的药敏试验对临床极为重要。目前全世界关于多黏菌素的 E-test 法耐药值折点问题仍无统一认识，而多黏菌素将越来越广泛地应用于临床多重耐药革兰阴性菌感染的治疗。在本研究中，多黏菌素 B 药敏条用于肠杆菌科检测时，E-test 法和微量稀释法具有很高的一致性，说明 E-test 法多黏菌素药敏条可用于临床肠杆菌科体外药敏检测。

参考文献

[1] 吴倩倩, 孙铭艳, 王保强, 等. 微量肉汤稀释法在肠杆菌科细菌药敏试验中的应用研究 [J]. 中国医学装备, 2016, 13(5): 97-99.

[2] 倪文涛, 赵进, 王睿, 等. 联合用药治疗产 KPC 肠杆菌科细菌感染研究进展 [J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(4): 953-956.

[3] 袁喆, 张婷婷, 王纯睿. 多黏菌素 B 治疗多重耐药革兰阴性菌的新策略 [J]. 西部医学, 2017, 29(1): 4-12.

[4] 崔阿龙, 胡辛欣, 高岩, 等. 化学合成多黏菌素 B 和 E 单一组分及其抗菌活性研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(3): 198-202.

[5] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-eighth informational supplement[S]. CLSI document M100-S28, 2018.

[6] CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-tenth edition[S]. CLSI document M7-A10, 2015.

[7] CLSI. Verification of commercial microbial identification and antimicrobial susceptibility testing system[S]. 1st. ed. CLSI guideline M52, 2015.

[8] 王艳侠, 周战修, 蔡辉, 等. 纸片扩散法对 OXA 型耐碳青霉烯类鲍氏不动杆菌的鉴定作用 [J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(6): 1219-1222.

[9] 朱柏珍, 张艳玲, 方容. 常见革兰阳性菌接种浓度对替考拉宁纸片扩散法药敏结果分析 [J]. 中国现代医药杂志, 2017, 19(11): 94-96.

[10] 周铁丽, 戴美杰, 池胜英, 等. 仪器法与纸片协同法检测超广谱 β -内酰胺酶的结果比较 [J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(6): 357-359.

[11] FDA. Class II special controls guidance document: antimicrobial susceptibility test (AST) systems; guidance for industry and FDA[S]. US Department of Health and Human

MDR1 基因多态性与美罗培南血药浓度及临床疗效的相关性研究

许建文 黄品芳 吴京南 柯蒙 刘亦伟 林翠鸿*
(福建医科大学附属第一医院药学部, 福州 350001)

摘要: **目的** 考察多药耐药基因 1(MDR1) 的基因多态性在中国南方人群中的分布, 明确其对美罗培南稳态血药浓度的影响及临床疗效的相关性。**方法** 纳入 101 例美罗培南治疗的患者, 用高效液相色谱法测定美罗培南稳态血药浓度, 聚合酶链式反应 (PCR) 和 DNA 测序技术检测基因分型。比较 MDR1 C3435T(rs1045642) 不同基因型对美罗培南稳态血药浓度及临床疗效的影响。**结果** 101 例患者中, 浓度达到 5~20 µg/mL 的比例为 34.9%, 5~10 µg/mL 与 10~20 µg/mL 浓度范围美罗培南的临床有效率 (83.3%, 91.7%) 显著高于 5 µg/mL 以下浓度范围 (44%) ($P < 0.05$), 同时 5~10 µg/mL 与 10~20 µg/mL 浓度范围美罗培南的临床有效率无显著差异 ($P > 0.05$)。MDR1 C3435T 突变型和野生型患者的美罗培南浓度、浓度 / 剂量比及临床疗效无显著差异 ($P > 0.05$)。**结论** MDR1 C3435T 基因突变可能与患者美罗培南稳态血药浓度及临床疗效无关。

关键词: 美罗培南; 基因多态性; 血药浓度; MDR1; 药物转运体

中图分类号: R446.5 **文献标志码:** A

Effects of MDR1 gene polymorphisms on meropenem concentration and clinical efficacy

Xu Jian-wen, Huang Pin-fang, Wu Jing-nan, Ke Meng, Liu Yi-wei and Lin Cui-hong
(Department of Pharmacy, Affiliated First Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001)

Abstract Objective To investigate the distribution of MDR1 in South China population, and also clarify its effects on concentrations and clinical efficacy of meropenem. **Methods** 101 unrelated southern China patients receiving meropenem as monotherapy were included. The concentration of meropenem was measured by a high-performance liquid chromatography method. The genotypes of MDR1 C3435T (rs1045642) was determined by polymerase chain reaction followed by direct sequencing. The association between different genotypes and the concentrations and clinical efficacy of meropenem were analyzed. **Results** There were 34.9% patients whose meropenem concentration reached 5~20 µg/mL. The curative effect of 5~10 µg/mL (83.3%) and 10~20 µg/mL (91.7%) were significant higher than that of 5 µg/mL; and the curative effect of 5~10 µg/mL and 10~20 µg/mL were similar. However, the concentration and clinical efficacy of meropenem in patients with mutant type and wild type of MDR1 C3435T were similar ($P > 0.05$). **Conclusion** MDR1 C3435T polymorphism may be uncorrelated with the plasma concentrations and clinical efficacy of meropenem.

Key words Meropenem; Gene polymorphisms; Concentration; MDR1; Drug transporter

美罗培南 (meropenem) 属碳青霉烯类抗生素, 为强效广谱抗生素, 对需氧菌、厌氧菌及多数革兰阴性菌和革兰阳性菌均具有良好的抗菌作用, 主要

用于多重耐药菌感染以及重症感染的治疗。美罗培南是治疗严重细菌感染所致的肺炎、脓毒血症、化脓性脑膜炎的常用药物, 其主要以原型经肾脏消除,

收稿日期: 2018-12-20

基金项目: 福建医科大学教授基金 (No. JS10012)

作者简介: 许建文, 男, 生于 1989 年, 硕士, 药师。研究方向为临床药学, E-mail: 409550585@qq.com

* 通讯作者, E-mail: lincuihong1@163.com

体内药动学过程复杂, 导致血药浓度个体差异, 进而影响其抗菌疗效^[1-2]。当 $T > MIC$ 超过 40% 时, 可有较好的杀菌效果, 剂量不足易导致耐药及治疗失败, 而剂量过大易导致毒性反应^[3]。

研究表明, 经肾脏排泄的药物, 其血药浓度与相应药物转运体的基因多态性密切相关^[4-5]。多重耐药基因 1(MDR1) 编码的 P-糖蛋白 (P-gp) 作为药物流出转运子, 参与中性及阳离子药物的转运^[6-7]。P-gp 在肾近曲小管表达, 其外排转运作用可提高药物从肾脏排泄^[8]。MDR1 基因型的不同可影响 P-gp 的功能, 在已发现 MDR1 的 SNPs 中, C3435T 的多态性与 P-gp 的转运功能密切相关^[9-11]。

本研究旨在探讨 MDR1 的基因多态性与美罗培南血药浓度及临床疗效的相关性, 考察美罗培南血药浓度个体差异的遗传学特征, 以期为临床的精准用药提供理论支持。

1 材料、对象与方法

1.1 病例选择

入选 2018 年 1 月—2018 年 11 月就诊于福建医科大学附属第一医院诊断为感染性疾病, 接受美罗培南治疗的 101 例住院患者。本研究经福建医科大学附属第一医院伦理委员会批准。所有患者均签署知情同意书。

1.2 入选标准

病原学诊断为细菌性感染的患者, 药敏试验结果显示病原菌对美罗培南敏感或依据经验治疗应用美罗培南; 年龄 18~65 岁, 性别不限, 美罗培南血药浓度已达稳态。排除重要脏器功能衰竭, 发生严重感染等药物不良反应, 合并用药影响肾排泄的患者。疗效判定: 依据《抗菌药物临床试验技术指导原则》分为有效和无效。

1.3 试剂与仪器

注射用美罗培南 (规格: 0.5g/瓶, Dainippon Sumitomo Pharma Co.,Ltd. 生产), 美罗培南对照品 (批号: 130506-200702, 含量: 100%)(中国食品药品检定研究院)。Waters 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司产品), PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), PCR 引物 (上海生工生物工程有限公司合成)。

1.4 血药浓度检测

患者静脉滴注美罗培南达稳态后, 给药前 30min 采集外周静脉血 2mL, 离心之后取上层血浆 100μL, 用蛋白沉淀法处理血浆样品, 采用 HPLC 法测定血

药浓度。

1.5 基因型检测

采用血液、细胞、组织基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司), 提取患者血液中基因组 DNA, 微量核酸测定仪测定 DNA 的浓度, -20℃ 保存。PCR 扩增 MDR1, 引物序列为上游 (P1): 5'-ACTCTTGTTTTCAGCTGCTTG-3', 下游 (P2): 5'-AGAGACTTACATTAGGCAGTGACTC-3', 扩增片段为 231bp, 酶切后产生 163 和 68bp。PCR 反应体系 25μL, DNA 模板 4μL, Taq PCR Master Mix 12.5μL, 正反向引物都是 0.3μL, 灭菌注射用水 7.9μL。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5min, 以下步骤进行 35 个循环: 94℃ 变性 30s, 54℃ 退火 30s, 最后 72℃ 再延伸 1min。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料采用 Shapiro-Wilk 法进行正态性检验, 采用 Levene 检验对正态分布的变量进行方差齐性检验。符合正态分布且方差齐的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 计数资料用率表示。非正态分布资料用中位数 P25 以及四分位数 P75 表示, 组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验或 MANN-Whitney U 检验。 χ^2 检验等位基因频率是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

本研究共纳入 101 例患者中, 性别、年龄、体质量的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 美罗培南剂量和血药浓度等方面的一般资料见表 1。

2.2 患者血药浓度

101 例患者中, 若首次测得的血药浓度小于 5μg/mL 及大于 20μg/mL 且临床疗效不佳的患者, 则重复监测其浓度。共测得稳态血药浓度 172 例, 其中 68.0% 的浓度小于 10μg/mL; 54.0% 的浓度小于 5μg/mL (表 2)。

表 1 患者一般资料

Tab. 1 Patient demographic and baseline characteristics ($\bar{x} \pm s$)	
项目	值 (范围)
性别 (男/女)	55/46
年龄 / 岁	58.35±18.15
体重 / kg	63.50±9.85
美罗培南剂量 / g	3.56±1.40
血药浓度 / (μg/mL)	8.92±11.05

表 2 患者血药浓度

Tab. 2 Distribution of concentration of meropenem

血药浓度 / ($\mu\text{g/mL}$)	例数 / <i>n</i>	占比 / %
<5	93	54.1
5~10	24	14.0
10~20	36	20.9
>20	19	11.0

2.3 血药浓度与临床疗效的关联性

5~10 $\mu\text{g/mL}$ 与 10~20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围美罗培南的临床有效率 (83.3%, 91.7%) 显著高于 5 $\mu\text{g/mL}$ 以下浓度范围 (44%)($P < 0.05$), 5~10 $\mu\text{g/mL}$ 与 10~20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围美罗培南的临床有效率相近 ($P > 0.05$, 表 3)。

2.4 C3435T 基因多态性分布

CC 基因型患者 39 例 (38.6.0%), CT 基因型患者 48 例 (44.8%), TT 基因型患者 14 例 (16.3%)。这 3 个位点的基因型分布频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$)。

2.5 C3435T 基因多态性与浓度和浓度 / 剂量比的关联性

不同 *MDR1* C3435T 基因型患者的浓度和浓度 / 剂量比结果相近 ($P > 0.05$, 表 4)。

2.6 C3435T 基因多态性与临床疗效的关联性

不同 *MDR1* C3435T 基因型患者的临床有效率相近 ($P > 0.05$, 表 5)。

3 讨论

美罗培南具有强大的杀菌活性, 因其诱导癫痫

表 3 美罗培南血药浓度与临床疗效的关联性

Tab. 3 Relationship between the curative effect and concentration of meropenem

项目	<5(<i>n</i> =93)	5~10(<i>n</i> =24)	10~20(<i>n</i> =36)	>20(<i>n</i> =19)
有效	41(44%)	20(83.3%) ^b	33(91.7%) ^b	19(100%) ^b
无效	52(56%)	4(16.7%)	3(8.3%)	0

注: “b”: 表示与 <5 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)

表 4 C3435T 基因多态性与美罗培南浓度和浓度 / 剂量比的关联性

Tab. 4 Relationship between gene polymorphisms of *MDR1* and the plasma concentration of meropenem

	CC(<i>n</i> =39)	CT(<i>n</i> =48)	TT(<i>n</i> =14)	<i>P</i>
血药浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	5.78(2.49~14.18)	4.28(0.98~13.2)	2.81(0.92~12.34)	0.127
日剂量 (g/d)	3(3~4)	3(3~3)	3(3~5.5)	0.346
血药浓度 / 日剂量	1.55(0.89~11.37)	1.37(0.30~7.90)	0.93(0.29~3.43)	0.112

表 5 C3435T 基因多态性与美罗培南临床疗效的关联性

Tab. 5 Relationship between gene polymorphisms of *MDR1* and the clinical efficacy of meropenem

项目	CC(<i>n</i> =39)	CT(<i>n</i> =48)	TT(<i>n</i> =14)
有效	31(79.5%)	35(72.9%) ^b	11(78.6%) ^b
无效	8(20.5%)	13(27.1%)	3(21.4%)

注: “b”: 表示与 CC 组比较无显著差异 ($P > 0.05$)

发作的概率低, 是唯一适用于治疗细菌性脑膜炎的碳青霉烯类抗生素。如何合理应用抗菌药物, 提高疗效, 降低毒副作用, 延缓细菌耐药, 是当今临床的迫切任务。治疗药物浓度监测 (TDM) 及基因检测理论有助于临床制定抗菌药物给药方案, 减缓耐药菌株的产生。本研究结果显示, 美罗培南的浓度 5~10 $\mu\text{g/mL}$ 与 10~20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围美罗培南的临床有效率 (83.3%, 91.7%) 显著高于 5 $\mu\text{g/mL}$ 以下浓度范围 (44%)($P < 0.05$), 然而 5~10 $\mu\text{g/mL}$ 与 10~20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围美罗培南的临床有效率无显著差异 ($P > 0.05$)。因此, 加强美罗培南血药浓度监测, 结合患者病情优化用药方案, 可提高临床治疗效果, 降低不良反应及耐药性的产生, 同时减轻患者的经济负担, 具有一定的临床指导意义。

美罗培南进入体内后, 54%~79% 以原型经肾脏排泄, 因此其血药浓度可能与肾脏药物转运体密切相关。单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与一些疾病的发生及药效的变化具有密切相关性 [5-6,12]。已发现的 *MDR1* 基因 29 个单核苷酸多态性中, 26 外显子 C3435T 基因多态性与 *MDR1* 及 P-糖蛋白 (p-glycoprotein, P-gp) 的功能和表达密切相关 [13-14]。P-gp 参与许多药物的肾小管分泌或再吸收过程, 近端肾小管刷状缘膜是肾小管分泌药物的主要部位, 该部位 P-gp 高度表达。P-gp 对肾小管分泌具有重要作用 [12,15], P-gp 是药物流出转运子, 能够影响药物吸收。*MDR1* C3435T 某基因型的差异可导致 P-gp 功能的改变, 影响血药浓度水平 [16-18]。本研究检测得到 *MDR1* C3435T 各基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 提示具有群体代表性。测得 *MDR1* C3435T 突变率 (37.6%) 与先前研究 [19-20] 报道的的突变率 (36.61%) 基本一致。然而, 可能受到

样本量的限制, 本文未发现 *MDR1* C3435T 多态性与美罗培南血药浓度以及临床疗效间明显的相关性。

综上所述, 本研究可为美罗培南血药浓度个体化差异提供基因组学的解释, 为美罗培南临床抗感染方案中剂量的制定提供理论依据。后续研究可结合药效学指标综合分析, 对以上推测进行考证。

参考文献

- [1] Garval E, Vuiblet V, Durlach A, *et al.* Skin pigmentation induced by meropenem and levofloxacin[J]. *Ann Dermatol Venereol*, 2017, 144(12): 793-798.
- [2] Sueke H, Kaye S, Wilkinson M C, *et al.* Pharmacokinetics of meropenem for use in bacterial keratitis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(10): 5731-5738.
- [3] Burger R, Guidi M, Calpini V, *et al.* Effect of renal clearance and continuous renal replacement therapy on appropriateness of recommended meropenem dosing regimens in critically ill patients with susceptible life-threatening infections[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(12): 3413-3422.
- [4] Hou W, Zhang D, Lu W, *et al.* Polymorphism of organic cation transporter 2 improves glucose-lowering effect of metformin via influencing its pharmacokinetics in Chinese type 2 diabetic patients[J]. *Mol Diagn Ther*, 2015, 19(1): 25-33.
- [5] Choi H Y, Bae K S, Cho S H, *et al.* Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C19, CYP2A6, SLCO1B1, ABCB1, and ABCG2 gene polymorphisms on the pharmacokinetics of simvastatin and simvastatin acid[J]. *Pharmacogenet Genom*, 2015, 25(12): 595-608.
- [6] Amin M L. P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery[J]. *Drug Target Insights*, 2013, 21(5): 727-34.
- [7] Saiz-Rodriguez M, Belmonte C, Roman M, *et al.* Effect of ABCB1 C3435T polymorphism on pharmacokinetics of antipsychotics and antidepressants[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018, 123(4): 474-485.
- [8] Sun H, Frassetto L, Benet L Z. Effects of renal failure on drug transport and metabolism[J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 109(1-2): 1-11.
- [9] Fujii T, Ota M, Hori H, *et al.* Association between the functional polymorphism (C3435T) of the gene encoding P-glycoprotein (ABCB1) and major depressive disorder in the Japanese population[J]. *J Psychiatr Res*, 2012, 46(4): 555-559.
- [10] Li C Y, Zhang J, Chu J H, *et al.* A correlative study of polymorphisms of CYP2C19 and MDR1 C3435T with the pharmacokinetic profiles of lansoprazole and its main metabolites following single oral administration in healthy adult Chinese subjects[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2014, 39(2): 121-128.
- [11] Lee Y H, Bae S C, Song G G. Association of the ABCB1 C3435T polymorphism with responsiveness to and toxicity of DMARDs in rheumatoid arthritis: A meta-analysis[J]. *Z Rheumatol*, 2016, 75(7): 707-715.
- [12] Bienkiewicz J, Romanowicz H, Malinowski A, *et al.* Association of single nucleotide polymorphism -2548 G/A (rs12112075) of leptin gene with endometrial cancer and uterine leiomyomas[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2017, 21(8): 113-118.
- [13] Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3473-3478.
- [14] Sheiner L B, Rosenberg B, Marathe V V. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data[J]. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1977, 5(5): 445-479.
- [15] Lv R J, Shao X Q, Cui T, *et al.* Significance of MDR1 gene C3435T polymorphism in predicting childhood refractory epilepsy[J]. *Epilepsy Res*, 2017, 13(2): 21-28.
- [16] Stokanovic D, Nikolic V N, Konstantinovic S S, *et al.* P-glycoprotein polymorphism C3435T is associated with dose-adjusted clopidogrel and 2-Oxo-clopidogrel concentration[J]. *Pharmacology*, 2016, 97(3-4): 101-106.
- [17] Parsa Nahad M, Makvandi M, Teimoori A, *et al.* MDR1 gene C3435T polymorphism in chronic hepatitis C patients[J]. *Microb Pathog*, 2018, 11(4): 63-67.
- [18] Stasiolek M, Romanowicz H, Polatynska K, *et al.* Association between C3435T polymorphism of MDR1 gene and the incidence of drug-resistant epilepsy in the population of Polish children[J]. *Behav Brain Funct*, 2016, 12(1): 21-26.
- [19] Zhang Y X, Wei S J, Yang X Y, *et al.* Effects of genetic polymorphisms of CYP2C19*2/*3 and MDR1 C3435T on the pharmacokinetics of lansoprazole in healthy Chinese subjects[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2014, 52(10): 850-855.
- [20] Cheng J W, Zhang L J, Hou Y Q, *et al.* Association between MDR1 C3435T polymorphism and refractory epilepsy in the Chinese population: A systematic review and meta-analysis[J]. *Epilepsy Behav*, 2014, 3(6): 173-179.