

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.22.044

Sysmex HISCL-5000 全自动血凝仪检测 TAT、TM、PIC、tPAIC 项目的性能验证

李 雯,张 磊,雷 娜,张 雯,魏 伟,徐 阳
西安交通大学第二附属医院检验科,陕西西安 710004

摘 要:目的 评价 Sysmex HISCL-5000 全自动血凝仪检测凝血酶-抗凝血酶复合物(TAT)、纤溶酶-α2 纤溶酶抑制物复合物(PIC)、血栓调节蛋白(TM)、组织纤溶酶原激活物/纤溶酶原激活物抑制剂-1 复合物(tPAIC)项目的性能。方法 参照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)系列指南文件和仪器厂家标准对 Sysmex HISCL 全自动血凝仪检测的不精密度、线性、检出限、参考区间、携带污染率性能进行验证。结果 Sysmex HISCL 检测 TAT、TM、PIC、tPAIC 项目的批内不精密度和日间精密度的 CV 均小于 15%。TAT 线性验证试验理论值和实测值的回归方程为 $Y=0.9947X+0.2916$, $r^2=0.9999$; TM 线性验证试验理论值和实测值的回归方程为 $Y=0.9991X-0.1458$, $r^2=0.9997$; PIC 线性验证试验理论值和实测值的回归方程为 $Y=1.0285X-0.0531$, $r^2=0.9968$; tPAIC 线性验证试验理论值和实测值的回归方程为 $Y=1.0242X+0.3233$, $r^2=0.9959$ 。TAT 最低检出限 0.0068 ng/mL, TM 最低检出限 0.0671 TU/mL, PIC 最低检出限 0.0012 μg/mL, tPAIC 最低检出限 0.0265 ng/mL。携带污染率各参数 CV<10%, 参考值范围验证结果显示各项检测指标 R(R=结果落在参考范围内的样本数/总的实验样本数)≥0.9。结论 Sysmex HISCL-5000 血凝仪检测 TAT、TM、PIC、tPAIC 项目的精密度、线性、检出限、携带污染率结果均符合质量控制的要求, 能够保证检验准确性。

关键词:全自动血凝仪; 性能验证; 血栓; 凝血

中图法分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)22-3360-04

凝血酶-抗凝血酶复合物(TAT)、纤溶酶-α2 纤溶酶抑制物复合物(PIC)、血栓调节蛋白(TM)、组织纤溶酶原激活物/纤溶酶原激活物抑制剂-1 复合物(tPAIC)是目前新型的止血与血栓系统早期标志物。TAT 是凝血酶与其主要抑制剂抗凝血酶按 1:1 比例结合形成的复合物,可用于评估体内凝血系统的激活情况。TM 是主要存在于血管内皮细胞上的高亲和性凝血酶受体,通过与凝血酶结合,形成凝血酶-TM 复合物,进而活化蛋白 C,发挥抗凝作用。t-PAIC 是血管内皮细胞释放到血液中的组织纤溶酶原激活物 t-PA 与其生理性抑制因子纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)1:1 结合形成的复合物。PIC 是活化的纤溶酶与 α2-抗纤溶酶抑制物 1:1 结合形成的复合物^[1]。因此,TAT 和 TM 是凝血系统标志物。t-PAIC 和 PIC 是纤溶系统标志物。t-PAIC 和 TM 是血管内皮系统标志物。检测 TAT、TM、PIC、tPAIC 对于血栓性疾病、心肌梗死、脑血管疾病、弥散性血管内凝血的早期诊断、溶栓治疗、外科手术以及抗凝药物的监测都具有指导意义。本次试验根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)系列指南文件对使用 Sysmex HISCL-5000 全自动凝血仪及配套试剂对 TAT、TM、PIC、tPAIC 检测的性能进行了验证,内容包括批内精密度、日间精密度、线性、检出限、携带污染率、参考值范围验证。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选择健康体检者,参照 CLSI H21-

A5 文件处理血浆^[2],用 0.109 mmol/L 柠檬酸钠抗凝管采集患者的静脉血 1.8 mL,1 500×g 离心 10 min,分离出乏血小板血浆,要求标本无溶血、凝固、乳糜现象,红细胞比容<55%。

1.2 仪器与试剂 全自动血凝仪(型号:Sysmex HISCL-5000)及配套试剂。

1.3 验证方法

1.3.1 不精密度验证 批内不精密度:参照 CLSIEP15-A^[3]文件要求,分别对 2 个浓度水平的混合血浆进行 TAT、TM、PIC、tPAIC 项目测定,每个浓度连续测定 20 次。计算各检测项目的均值($\bar{x}$)和标准差(s),根据公式变异系数(CV)= $s/\bar{x}$,计算 CV。日间不精密度:同样取 2 个浓度水平的混合血浆,各分装成 5 份样本,每个浓度重复测定 4 次,连续 5 d。记录每次 TAT、TM、PIC、tPAIC 的测定结果,根据公式计算 CV。按照厂家标准,TAT、TM、PIC、tPAIC 批内不精密度和日间不精密度的 CV<15%。

1.3.2 线性验证 参照 EP6-A^[4]文件,选取 2 个高浓度水平的混合血浆,分别使用 HISCL 标本稀释液稀释 5 个阶段,每个稀释后的标本测定 3 次取均值作为一个点,将 5 对实测值与理论值作直线回归,得到回归方程 $Y=aX+b$ 和相关系数 r^2 验证线性范围。回归方程斜率在 1 ± 0.05 范围内,相关系数 $r^2\geq0.95$ 判定为合格。

1.3.3 检出限验证 参照 EP17-A^[5]文件中的要求,空白检出限(LOB):选稀释液作为空白样品连续测定

10 次;样本检出限(LOD)选择取枸橼酸钠抗凝样本,取出血浆与 HISCL Wash 配制浓度分别为 100%、80%、60%、40%、20%、10%、5%、2. 5%、1. 25%、0. 625%、0 的 11 个系列样本,每一样本连续测定 10 次;分别计算每一样本的均值、标准差、变异系数、百分偏差,然后得出 LOB、LOD。

1.3.4 参考区间验证 参考 C28-A2 文件^[6],随机收取 20 例健康体检者血浆,排除影响血凝检测结果的因素(如服用抗凝药物,避孕药等干扰因素的人群),测定标本并计算 R 值($R = \frac{\text{结果落在参考范围内的样本数}}{\text{总的实验样本数}}$),要求 $R \geq 0.9$,即为验证通过。

1.3.5 携带污染率验证 参照 CLSIH57-A 文件^[7],高值样本污染:将低值样本(N)置 1 和 3 位置,高值样本(A)置于 2 位置,每个样本测 3 次,记录结果:N1、N2、N3、A1、A2、A3、N4、N5、N6。按照公式,携带污染率= $\frac{N4 - \text{均值}}{\text{均值}}$,均值指 N1、N2、N3 平均值。尚未查到对 TAT、TM、PIC、tPAIC 检测携带污染率有要求的指南性文件,仅有相关血凝仪性能验证文献^[8-9]报道各项目 $CV < 10\%$ 。

1.4 统计学处理 采用 Excel2003 进行数据统计

分析。

2 结 果

2.1 精密度验证结果 厂家试剂盒说明书要求:要求 TAT、TM、PIC、tPAIC 批内不精密度和日间不精密度的 $CV < 15\%$,验证结果符合要求,见表 1。

2.2 线性验证结果 TAT 线性验证试验理论值和实测值的回归方程为 $Y = 0.9947X + 0.2916, r^2 = 0.9999$,TM 线性验证试验理论值和实测值的回归方程为 $Y = 0.9991X - 0.1458, r^2 = 0.9997$;PIC 线性验证试验理论值和实测值的回归方程为 $Y = 1.0285X - 0.0531, r^2 = 0.9968$;tPAIC 线性验证试验理论值和实测值的回归方程为 $Y = 1.0242X + 0.3233, r^2 = 0.9959$,均符合线性回归方程的斜率在 1 ± 0.05 范围内及 $r^2 \geq 0.95$ 的要求,验证结果表明 TAT、TM、PIC、tPAIC 实测值和理论值之间线性关系良好。

2.3 检出限验证结果 TAT 最低检出限 0.0068 ng/mL,TM 最低检出限 0.0671 TU/mL,PIC 最低检出限 0.0012 $\mu\text{g/mL}$,tPAIC 最低检出限 0.0265 ng/mL。均小于厂家说明书给出的最低检出限。

表 1 精密度验证结果

参数	批内水平 1			批内水平 2			日间水平 1			日间水平 2		
	$\bar{x}$	<i>s</i>	<i>CV</i> (%)	$\bar{x}$	<i>s</i>	<i>CV</i> (%)	$\bar{x}$	<i>s</i>	<i>CV</i> (%)	$\bar{x}$	<i>s</i>	<i>CV</i> (%)
TAT(ng/mL)	20.00	0.18	0.92	3.00	0.17	5.77	38.51	3.37	8.76	9.91	0.89	9.02
TM(TU/mL)	20.30	0.21	1.04	11.10	0.14	1.26	97.33	4.26	4.38	23.67	1.14	4.82
PIC($\mu\text{g/mL}$)	3.93	0.08	2.08	0.63	0.01	1.84	6.16	0.55	9.01	1.87	0.16	8.50
tPAIC(ng/mL)	12.70	0.27	2.09	9.20	0.10	1.08	16.32	1.08	6.62	4.15	0.21	4.97

2.4 参考区间验证结果 20 例健康人 TAT、TM、PIC、tPAIC 检测结果 100%在厂家说明书提供的参考范围内(TAT 参考范围 $<4.0 \text{ ng/mL}$,TM 参考范围 3.8~13.3 TU/mL,PIC 参考范围 $<0.8 \mu\text{g/mL}$,tPAIC 男性 $<17 \text{ ng/mL}$,tPAIC 女性 $<10.5 \text{ ng/mL}$),符合厂家要求,验证通过,见表 2。

2.5 携带污染试验结果 TAT 高值对低值的污染所引起的相对偏差为 0.75%;TM 高值对低值的污染所引起的相对偏差为-0.64%;PIC 高值对低值的污染所引起的相对偏差为 1.15%,tPAIC 高值对低值的

污染所引起的相对偏差为 1.22%。携带污染率可接受,见表 3。

表 2 参考值验证

项目	最小值	最大值	厂家说明书范围	<i>r</i>
TAT (ng/mL)	1.11	3.52	<4.0	1
TM(TU/mL)	4.15	11.31	3.8~13.3	1
PIC($\mu\text{g/mL}$)	0.18	0.69	<0.8	1
tPAIC(ng/mL)	男 4.2,女 3.8	男 15.6,女 8.3	男 <17.0 ,女 <10.5	1

表 3 高值样本对低值样本的携带污染率(%)

项目	N1	N2	N3	N1、N2、N3 均值	A1	A2	A3	N4	N5	N6	携带污染率	要求
TAT	42.6	42.2	41.9	42.2	118.5	119.0	117.6	42.5	42.4	41.3	0.75	10
TM	31.2	31.7	31.5	31.5	89.2	89.8	89.5	31.3	31.9	31.9	-0.64	10
PIC	35.2	35.8	36.8	35.9	70.8	71.3	72.1	36.3	37.3	36.1	1.15	10
tPAIC	32.3	33.1	32.5	33.5	25.3	25.6	25.8	35.6	35.2	35.1	1.22	10

3 讨 论

作为新型止血血栓系统标志物, TAT、TM、PIC、tPAIC 涵盖了止血与血栓系统中的三大方面。TAT 是凝血酶生成标志物, 正常血浆中半衰期较短, 一旦 TAT 持续呈现出高值, 则意味着血液中有凝血酶生成, 提示血栓形成倾向, 可以作为血栓前状态的早期标志物。TM 稳定表达分布在膜表面和血浆中, 当人体正常的内皮细胞发生病变或受损时, 常引起 TM 的表达分泌异常, 因此 TM 被视为内皮细胞损伤的标志物。而 PIC 是反映体内纤溶系统激活的标志物, 预示血栓正在形成。tPAIC 是最重要的纤溶和凝血系统平衡的调节者, 提示血栓进行时, 导致血栓原发病因未去除。因此, 在凝血紊乱引起血栓性疾病甚至 DIC 时, 新型标志物的联合检测具有极其重要的价值。血栓性疾病是一种起病隐匿, 发病突然致死致残率较高的疾病, 目前我国血栓性疾病发病率高达 1%, 病死率可达 5% ~ 10%^[10]。造成血栓性疾病的高漏诊率和高误诊率的原因如下, 一是大多数静脉血栓没有症状, 二是缺乏早期的实验室指标。新型标志物的出现弥补了血栓性疾病早期实验室诊断的空白。一项应用凝血标志物诊断创伤骨科术后静脉血栓形成的病例对照研究表明, TAT、TM、PIC、tPAIC 检测有助于早期预测创伤骨科术后静脉血栓形成, 且优于 D-二聚体^[11]。也有文献报道 PIC 和与 tPAIC 许多心血管疾病密切相关^[12], PIC 和与 tPAIC 是心血管疾病相关标志物之一。同时对于危重症凝血紊乱合并弥散性血管内凝血 DIC 患者, 新型标志物可以更早的提示前 DIC 状态。有研究表明, 在前 DIC 期, TAT、PIC 等在前 DIC 发生显著变化^[13]。目前, 日本已经将 TAT 的增加添加进了 DIC 诊断标准中作为辅助检查的项目, 国际血栓止血学会、标准化委员会 (ISTH/SSC) 的诊断标准 (2001 年) 中也将其作为“non-overt DIC”的特异性诊断项目进行了评分^[14]。

不仅对于血栓性疾病的诊断, 在血栓性疾病的治疗与监测方面, 新型标志物也有极为重要的意义。有文献报道急性心肌梗死冠状动脉内 t-PA 溶栓同时行肝素抗凝的患者, 溶栓后 120 min 血浆 TAT 水平大于 6 ng/L 可预测溶栓失败和血栓再闭塞; 血浆 TAT 小于 6 μg/L 时, 对鉴别血管持续开通和未成功溶栓治疗的灵敏度和特异度分别为 92.5% 和 93.3%, 故 TAT 也可作为观察溶栓治疗疗效的指标^[15]。

因此, 本院引进 Sysmex HISCL-5000 开展 TAT、TM、PIC、tPAIC 新型标志物检测, 能更好地辅助临床对于血栓性疾病、心肌梗死、脑血管疾病、DIC 的早期诊断, 以及对外科手术、抗凝药物、溶栓治疗的监测。Sysmex HISCL-5000 是目前世界上唯一使用高敏化学发光检测凝血项目的仪器。与传统 ELISA 方法耗时长, 干扰因素多, 批间差异大相比, Sysmex HISCL-5000 以化学发光酶免疫测定法为原理, 采用碱性磷酸酶作为催化剂, 以显示出很强发光强度

CDP-Star 作为化学发光基质, 具有灵敏度, 可到达 10~21 mol/L, 检测速度快, 特异度高的特点。为了验证厂家对 Sysmex HISCL-5000 所宣称的性能, 本次试验参考 CLSI 系列指南文件对使用 Sysmex HISCL 全自动凝血仪及配套试剂对 TAT、TM、PIC、tPAIC 检测项目的性能进行了验证。实验室如果使用的检测系统是封闭系统, 则只需做包括: 精密度、线性实验、参考区间、检测限、携带污染率等基本的参数。精密度是指规定条件下所获得独立测量结果的接近程度, 体现检测系统的重复性, 精密度分为批内精密度和日间精密度, 是性能验证的基础。在线性评价验证中, 采用了二元一次直线回归作为分析线性的 EP6-A^[4] 评价方法, 保证了结果的准确性和代表性。检测限是分析测试的重要指标, 指某一分析方法在给定的可靠程度内可以从样品中检测待测物质的最小量, 确定检测限时, 仪器的空白值是重要依据。检测限体现了仪器灵敏度, 可以更好地了解仪器的测量范围。参考区间的验证中, 在体检服务的健康人群总体中抽出 20 个参考个体, 验证了小样本参考值和说明书参考值之间的可比性。携带污染率是确定高浓度样本对低浓度样本的影响。通过本次实验数据分析, Sysmex HISCL-5000 全自动凝血仪及配套试剂对 TAT、TM、PIC、tPAIC 项目检测的性能符合仪器厂家所宣称的性能指标, 能够为临床提供准确的检测报告。

目前对于 TAT、TM、PIC、tPAIC 的性能验证鲜见发表, 对于血栓新型标志物, 希望各级实验室能够参考指南规范化开展, 从而保证检验结果准确、可靠, 更好地为临床提供参考。

参考文献

- [1] 许文荣, 王建中, 王鸿利等. 临床血液学与检验[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays: H21-A5 [S]. Wayne, PA: CLSI, 2008.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. User demonstration of performance for precision and accuracy; approved guideline: EP15-A2 [S]. Wayne, PA: CLSI, 2004.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods: P6-A [S]. Wayne, PA: CLSI, 2003.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation: EP17-A [S]. Wayne, PA: CLSI, 2004.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: C28-A2 [S]. Wayne, PA: CLSI, 2000.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocol for the evaluation, validation and implementation of coagulometers: H57-A [S]. Wayne, PA: CLSI, 2008. (下转第 3373 页)

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.22.045

金黄色葡萄球菌对喹诺酮类药物耐药研究进展*

刘敏¹, 刘秀芬¹, 于慧²综述, 王占黎^{1,2△}审校

1. 内蒙古自治区包头医学院公共卫生学院, 内蒙古包头 014040; 2. 内蒙古自治区疾病相关生物标志物重点实验室, 内蒙古包头 014030

关键词:金黄色葡萄球菌; 喹诺酮类; 耐药

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)22-3363-04

喹诺酮类抗菌药物具有广谱活性和多种临床适应证,口服吸收和组织渗透良好,在人体中的药代动力学参数优良,在治疗多种感染中具有较高的临床效力,成为了世界上应用最广泛的抗菌药物之一。随着喹诺酮类药物在临床上大范围、不规范地使用,金黄色葡萄球菌(以下简称“金葡菌”)耐药问题越来越严重。为有效解决这一问题,本文从金葡菌的耐药现状、耐药机制及应对措施等方面进行综述和展望。

1 耐药现状

金葡菌是临床最常见的革兰阳性菌,具有多种毒力因子,并具有对大多数抗菌药物产生耐药性的能力。近年来,由于抗菌药物的滥用,导致金葡菌耐药情况严峻,有研究发现耐甲氧西林金葡菌(MRSA)不仅对β-内酰胺类抗菌药物耐药,而且对喹诺酮类同样具有耐药性^[1-2]。据中国细菌耐药监测网(CHINET)2018 年对全国 44 所三级甲等医院监测结果显示,MRSA 对喹诺酮类药物中的环丙沙星耐药率为 36.7%,对左氧氟沙星耐药率高达 41.3%,MRSA 平均检出率为 34.0%,同时监测结果显示 MRSA 对喹诺酮类抗菌药物耐药程度远远高于甲氧西林敏感金葡菌(MSSA)。统计调查显示^[3-4],孟加拉国 2004 年至 2018 年期间金葡菌对环丙沙星的耐药率高达 41.4%~68.3%。埃塞俄比亚 2015—2018 年金葡菌对环丙沙星耐药率为 13.5%~23.7%。

2 药物发展史及作用机制

喹诺酮类抗菌药物的开发历史源于 1962 年科学家开发的萘啶酸(NA),由此诞生第 1 代喹诺酮类药物,但由于其仅具有对革兰阴性菌的适度活性且口服吸收率低,所以仅用于治疗单纯性尿路感染^[5]。此后直至 20 世纪 70 年代,一系列第 2 代喹诺酮类药物相继被开发问世,最具代表的是吡哌酸(PPA),PPA 将哌嗪基团引入作为喹诺酮核的 C7 位的碱性部分。与第 1 代相比,药物的活性谱范围广得多,药代动力学得到改善,改善了对革兰阴性菌的活性,使抗菌谱扩大并包括铜绿假单胞菌。此外,PPA 基本的哌嗪环,

可以与 C3 位的羧酸形成两性离子,增加药物渗透细菌细胞的能力,从而提高对革兰阳性菌的活性。20 世纪 80 年代初,通过支架药物设计和基本侧链突破的第一个氟喹诺酮类药物诺氟沙星(NFLX)成为第 3 代喹诺酮类药物的代表,NFLX 是一种六氟化喹诺酮,在 C7 位具有哌嗪基,与以往喹诺酮类药物有显著的差异,其抗菌谱更广且具有更强的杀菌及细胞穿透能力^[6],在治疗多种感染方面具有很高的临床疗效。20 世纪 90 年代至今,以莫西沙星、氨氟沙星等为代表的第 4 代喹诺酮类药物在原有基础上,提高了抗厌氧菌活性以及对光的耐受性,其抗菌效果及抗菌谱均有所增加。目前,奥泽沙星、非那沙星等新开发的喹诺酮类药物被证实,在 pH 值降低的环境下对包括耐喹诺酮类药物的 MRSA 在内的 7 类菌株具有较强的抗菌活性^[7]。

研究表明喹诺酮类药物通过破坏细菌 DNA 合成过程中具有解旋作用的拓扑异构酶 II 型酶(即 DNA 促旋酶和拓扑异构酶 IV)的活性来阻断 DNA 复制以达到抑菌的效果。前者有 A、B 两个亚单位,A-亚单位在合成过程中切开染色体 DNA 一条后链从而形成切口,B-亚单位催化产生 ATP 使 DNA 前链后移,A-亚单位再将切口封闭形成负超螺旋结构。喹诺酮类药物通过非碱基配对的方式与 A-亚单位结合,使 DNA 超螺旋结构不能封口,单链暴露,细菌染色体出现不可逆损伤,进而致使细菌死亡^[8]。后者为解链酶,是喹诺酮类药物作用于金葡菌的主要细胞毒性靶标,药物与之结合形成喹诺酮类药物-DNA-拓扑异构酶三元复合物,阻断细菌 DNA 复制,从而起到杀菌作用。

3 耐药机制

3.1 药物靶酶及编码基因的突变 两种药物靶酶分别由 gyr A、gyr B 和 grl A、grl B 基因编码。通常由于靶酶中的 gyr A 和 grl A 基因局部结构域中产生一种或两种的抗性突变,致使药物与酶-DNA 复合物的结合能力降低,不能有效切断金葡菌 DNA 的复制和

* 基金项目:国家自然科学基金(81660048)。

△ 通信作者,E-mail:Wang.zhanli@hotmail.com。

转录过程,进而导致耐药的产生。SANFILIPPO 等^[9]研究显示突变主要位于酶的 *gyrA* 或 *grlA* 的氨基末端结构域上。徐洁等^[10]关于金葡菌对环丙沙星耐药与 *gyrA*、*grlA* 基因突变相关性的研究显示 *gyrA* 和 *grlA* 突变是金葡菌对环丙沙星耐药的重要原因,同时研究表明当 *gyrA* 和 *grlA* 同时发生多点突变时,则会导致菌株高水平耐药。有研究显示喹诺酮类药物对金葡菌作用的首要靶酶是拓扑异构酶 IV^[11],其 *grlA* 基因最为常见的突变位点是 Ser-80→Phe 和 Glu-84→Lys。也有研究发现一些对喹诺酮类药物耐药的金葡菌株中存在 *grlB* 和 *gyrB* 基因突变,但仅在 *gyrA* 和 *grlA* 发生突变的情况下出现^[12],故这些突变与菌株耐药性的关系尚不明确。

3.2 外排泵基因的过度表达 金葡菌无外膜及膜孔蛋白,其摄入喹诺酮类药物的主要方式是脂质膜的简单扩散,因此有效的外向转运蛋白是降低细胞药物浓度的主要手段。研究显示 Nor A、Nor B 和 Nor C 外排泵的过表达是导致药物在菌体内累积浓度过低的主要原因^[13-14]。Nor A 外排泵是由 Nor A 蛋白介导,其编码基因 *norA* 普遍存在于金葡菌染色体中,属于内源性结构基因。研究显示^[13]当细胞环境中喹诺酮类药物长期反复存在时,可使 *norA* 基因表达过度,进而致使 Nor A 蛋白表达明显增强,外排功能增加,导致如诺氟沙星、环丙沙星等亲水性喹诺酮类药物在菌体内蓄积量过少而产生耐药性。Nor B 外排泵是由 *norB* 基因编码的一个分子质量约为 49 ku 的蛋白质,当 Nor B 过表达时可将诺氟沙星和环丙沙星泵出,除此之外,它还可以识别莫西沙星和司帕沙星导致这两种抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC)值增加。Nor C 外排泵与 NorB 具有基本同源性,其外排作用由 Nor C 蛋白介导。研究证实^[14]*norC* 基因过度表达可使诺氟沙星和莫西沙星的 MIC 值增加四倍,环丙沙星和司帕沙星的 MIC 值增加两倍,从而导致菌体对喹诺酮类药物产生一定程度耐药。

3.3 质粒介导的耐药 质粒介导的喹诺酮耐药性(PMQR)发现相对较晚。目前已经发现的 PMQR 机制有三种:第一种是喹诺酮抗性蛋白基因家族(*qnr*)。*qnr* 基因编码的 Qnr 蛋白可优先结合到靶酶上,使药物结合位点构象改变从而不能有效地与之结合,保护细菌免受药物的攻击。同时还通过减少染色体靶酶数量来避免细菌被药物抑制^[15]。第二种是氨基糖苷乙酰转移酶[*aac(6')-Ib-cr*]。它是由 Trp-102→Arg 和 Asp-179→Tyr 突变产生的衍生物,对卡那霉素、妥布霉素等氨基糖苷有活性,同时也能够在哌嗪基环上用氨基氮将氟喹诺酮类药物乙酰化^[16]。第三种是质粒介导外排泵(Qep A 和 OqxAB)。QepA 可降低亲水性氟喹诺酮类药物的易感性,特别是环丙沙星和诺氟沙星。OqxAB 可介导低水平的喹诺酮耐药,同时

还可帮助细菌在低浓度的喹诺酮下存活,进而促进细菌向高水平耐药发展^[17]。据目前检测报道显示携带 OqxAB 基因主要是肠杆菌科,尚未在革兰阳性菌株中发现该基因。王丽华等^[18]在动物源金葡菌中首次发现质粒介导的喹诺酮类耐药基因 *qnrS1*、*qnrD*、*aac(6')-Ib-cr* 和 *oqxA*,同时说明耐药基因可在不同菌种之间传播,加大控制菌株耐药传播的难度。

4 应对措施

喹诺酮类药物作为继头孢菌素类药物之后临床使用最广泛的抗菌药物之一,在治疗感染性疾病中发挥了巨大的作用。据统计,目前全球使用过喹诺酮疗法的患者超 10 亿人次。但过量使用抗菌药物是耐药性的主要驱动力,随着喹诺酮类药物的大量使用,金葡菌对喹诺酮类药物的耐药情况严重,因此寻求有效途径控制细菌耐药性是我们一直在解决的全球问题。

4.1 合理使用抗菌药物 合理使用抗菌药物无疑是最根本的解决途径,可通过制订和落实抗菌药物临床管理规范及相关政策来控制抗菌药物的使用量进而遏制细菌耐药性的产生。2011 年卫生部在全国范围内发起合理使用抗菌药物运动,并于 2012 年颁布实施了包括抗菌药物选择、采购、使用及监测等在内的综合性法规《抗菌药物临床应用管理办法》,同时更新了公立医院临床实践中抗菌药物使用的国家指南,有效地降低了公立医院的抗菌药物使用量及患者的医疗负担,但在基层医疗机构和县级医院并未产生明确的效果。在对全国抗菌药物管理行动的评估结果显示 65 家公立医院住院和门诊患者的抗菌药物处方率分别从 62.9%和 26.4%降低至 35.3%和 12.9%^[19],抗菌药物的使用密度从 76.6 DDD/100 床日降低至 35.9 DDD/100 床日,患者的抗菌药物费用显著降低。此外有研究显示^[20]我国某三级医院总抗菌药物使用密度由 2014 年的 50.66 DDD/100 床下降到 2018 年的 44.28 DDD/100 床,同时表明抗菌药物使用率与耐药性存在正相关关系。

4.2 研发新药 研发新型药物亦是控制金葡菌的有效途径之一。近年来,大批新型喹诺酮类药物相继问世,如德拉沙星作为新型氟喹诺酮类药物对金葡菌具有较强的抗菌活性,已于 2017 年 6 月批准上市^[21];苹果酸奈诺沙星是 TaiGen 生物技术公司研发的新型不含氟的喹诺酮类药物,研究显示对金葡菌具有抗菌活性,已于 2016 年 6 月批准上市^[22];新型非氟化喹诺酮类药物奥泽沙星被证实对耐那地沙星或左氧氟沙星的 MRSA 保持有效的抗菌活性,于 2017 年 12 月获得美国 FDA 批准上市。除此之外,中药治疗由于安全性高、成本低成为对抗耐药菌株的新思路,复方黄连制剂对耐药金葡菌的 *gyrA* 基因突变具有回复突变作用。实验证明黄芩提取物、香青兰乙酸乙酯提取物对多重耐药金葡菌具有良好的抑菌作用^[23-24]。REU-

VEN 等^[25]证实金缕梅和绿茶提取物具有抗金葡萄菌的作用,且二者组合可增强其抗菌作用。

4.3 联合用药 使用两种或两种以上抗菌药物可以利用多种抗菌机制的相加或协同作用有效抑制细菌对喹诺酮类药物产生耐药性。同时,带有辅助剂的抗菌药物也可以有效抑制耐药菌株,因为辅助剂可以增加抗菌药物对目标物的接触^[26]。NASTARAN 等^[27]经实验证明 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ 纳米复合材料可以作为一种有效的药物耐药抑制剂。 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ 纳米复合材料与抗菌药物在降低 MIC 方面具有协同作用,同时在该纳米复合材料存在的情况下,norA 和 norB 基因的表达较对照降低了两倍以上。PEDRO 等^[28]研究发现噻唑(NJ)16 和 NJ17 联合诺氟沙星能够完全恢复诺氟沙星对耐药金葡萄菌的抗菌活性。ABD EL-BAKY 等^[29]研究发现酮康唑对金葡萄菌无抑菌作用,但与左氧氟沙星联用可通过体外抑制外排泵和生物膜的形成来抑制 norA 基因表达,进而增强氟喹诺酮类药物对多重耐药金葡萄菌的抗菌活性。研究显示菘蓝、黄芩与环丙沙星联合使用可产生协同作用有效对抗金葡萄菌,苋菜提取物具有抑制耐喹诺酮类药物的金葡萄菌 norA 外排泵过表达的作用,可作诺氟沙星的活性增强剂用于对抗耐氟喹诺酮金葡萄菌引起的感染^[30]。

5 展 望

抗菌药物的非理性使用致使金葡萄菌对喹诺酮类药物耐药形势严峻。近年来,随着卫生系统改革的不断深入,我国抗菌药物管理工作取得一定成效,有效地降低了公立医院抗菌药物的使用率,但对于基层医疗机构和县级医院效果甚微,仍应进一步规范抗菌药物的临床使用。此外,探索新型抗菌药物同样至关重要,越来越多的草本植物被证实具有抗菌作用,但对其作用机制尚未明确不能有效地应用于临床,因此,仍需进一步深入研究和探索。

参考文献

- [1] GUO Y Z, CUI X Y, ZHAO J R, et al. Potent anti-MRSA activity and synergism with aminoglycosides by flavonoid derivatives from the root barks of *Morus alba*, a traditional Chinese medicine[J]. Medl Chem Res, 2019, 28(9): 1547-1556.
- [2] OKWU M U, OLLEY M, AKPOKA A O, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and anti-MRSA activities of extracts of some medicinal plants: A brief review[J]. AIMS Microbiol, 2019, 5(2): 117-137.
- [3] IFTEKHAR A, BODIUZZAMAN R, SAKINA S. Antibiotic resistance in Bangladesh: a systematic review[J]. Int J Infect Dis, 2019, 80(1): 54-61.
- [4] MEKONNEN S, FITSUM W, TEWODROS T, et al. Resistance profile of clinically relevant bacterial isolates against fluoroquinolone in Ethiopia: a systematic review

- and meta-analysis[J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2018, 19(1): 86.
- [5] 盛钊君, 陈小乐, 张燕等. 喹诺酮类药物的研究与应用进展[J]. 山东化工, 2018, 47(13): 42-43.
- [6] 汪阿鹏, 冯连顺. 氟喹诺酮类抗菌药的最新研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2019, 40(3): 171-179.
- [7] BELA K, DOMOKOS J, SZABO D. Chemical structure and pharmacokinetics of novel quinolone agents represented by avarofloxacin, delafloxacin, finafloxacin, zabofloxacin and nemonoxacin[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2016, 15(1): 34.
- [8] TAKAHASHI H, HAYAKAWA I, AKIMOTO T. The history of the development and changes of quinolone antibacterial agents[J]. Yakushigaku Zasshi, 2003, 38(2): 161-179.
- [9] SANFILIPPO C M, HESJE C K, HAAS W, et al. Topoisomerase mutations that are associated with high-level resistance to earlier fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus* have less effect on the antibacterial activity of besifloxacin[J]. Chemotherapy, 2011, 57(4): 363-371.
- [10] 徐洁, 施春雷, 许学斌, 等. 上海市食源性金黄色葡萄球菌环丙沙星耐药性的形成与 gyrA, grlA 基因突变的相关性[J]. 中国食品学报, 2015, 15(11): 148-153.
- [11] LEV O, RACHEL F K, JAMES R J, et al. Analysis of mutational patterns in quinolone resistance-determining regions of GyrA and ParC of clinical isolates[J]. Int J Antimicrob Agents, 2019, 53(3): 318-324.
- [12] CORREIA S, POETA P, HEBRAUD M, et al. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? [J]. J Med Microbiol, 2017, 66(5): 551-559.
- [13] MANJUSHA L, PARVATHI A, JONES A, et al. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*[J]. AIMS Microbiol, 2018, 4(1): 1-18.
- [14] 孟圆, 孔德民, 罗红. 金黄色葡萄球菌耐药基因及新型抗菌药物的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(5): 595-600.
- [15] LI X J, ZHANG Y J, ZHOU X T, et al. The plasmid-borne quinolone resistance protein QnrB, a novel DnaA-binding protein, increases the bacterial mutation rate by triggering DNA replication stress[J]. Mol Microbiol, 2019, 111(6): 1529-1543.
- [16] MATTHEW W V, CHI H P, SUBRAY S H, et al. Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant[J]. Biochemistry, 2008, 47(37): 9825-9835.
- [17] 牟豪, 王豪举, 丁红雷. 喹诺酮外排泵耐药基因 oqxAB 的耐药机制及其流行情况[J]. 微生物学通报, 2019, 46(6): 1510-1519.
- [18] 王丽华, 吕殿红, 张芸, 等. 质粒介导的喹诺酮耐药基因在动物源金黄色葡萄球菌的流行分布[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(4): 606-612.

- [19] ZENG S S,XU Z J,WANG X,et al. Time series analysis of antibacterial usage and bacterial resistance in China: observations from a tertiary hospital from 2014 to 2018 [J]. Infect Drug Resist,2019,12(20):2683-2691.
- [20] BAO L D,PENG R,WANG Y,et al. Significant reduction of antibiotic consumption and patients costs after an action plan in China, 2010-2014 [J]. PLoS One, 2015, 10 (3):e0118868.
- [21] 李双,王琳,杨君义,等. 抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的新型氟喹诺酮类药物德拉沙星[J]. 中国新药杂志,2018, 27(19):2227-2231.
- [22] 陈静. 新型无氟喹诺酮——苹果酸奈诺沙星[J]. 中华结核和呼吸杂志,2018,41(4):320.
- [23] 王鑫,秦宇宁,曹雪莹等. 黄芩提取物对耐药性金葡菌的抑菌效果[J]. 科技资讯,2018,16(8):204.
- [24] YU H,LIU M,LIU Y,et al. Antimicrobial activity and mechanism of action of dracocephalum moldavica l. extracts against clinical isolates of Staphylococcus aureus [J]. Frontiers in microbiology,2019,10(10):1249-1251.
- [25] REUVEN R,ADEL M,HWANG Y C,et al. In-Vitro inhibition of staphylococcal pathogenesis by witch-hazel and green tea extracts[J]. Antibiotics,2019,8(4):244-246.
- [26] GUPTA V,DATTA P. Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria:antibiotic hybrids[J]. In-
- dian J Med Res,2019,149(2):97-106.
- [27] NASTARAN S,ZEINAB M S,AKRAM S N,et al. Bio-synthesis of Fe₃O₄@Ag nanocomposite and evaluation of its performance on expression of nora and norb efflux pump genes in ciprofloxacin-resistant Staphylococcus aureus[J]. Bio Trace Elem Res ,2019,191(2):522-530.
- [28] PEDRO S P,MARIA C A ,PEDRO P M ,et al. Thiazolidinedione and thiazole derivatives potentiate norfloxacin activity against NorA efflux pump over expression in Staphylococcus aureus 1199B strains[J]. Bio Amp Med Chem,2019,27(17):3797-3804.
- [29] ABD EL-BAKY R M,SANDLE T,JOHN J,et al. A novel mechanism of action of ketoconazole:inhibition of the NorA efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant Staphylococcus aureus [J]. Infect Drug Resist,2019,12(15):1703-1718.
- [30] YANG Z C,WANG B C,YANG X S,et al. The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of Staphylococcus aureus [J]. Colloids Surf B Biointerfaces,2005, 41(2/3):79-81.

(收稿日期:2020-03-07 修回日期:2020-08-27)

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.22.046

儿童重症肌无力血清相关抗体研究进展

范杨谨伊 综述,洪思琦[△]审校

重庆医科大学附属儿童医院神经内科/儿童发育疾病研究教育部重点实验室/

国家儿童健康与疾病临床医学研究中心/儿科发育重大疾病国家国际科技合作基地/认知发育与

学习记忆障碍转化医学重庆市重点实验室,重庆 400014

关键词:重症肌无力; 血清相关抗体; 儿童

中图法分类号:R746.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)22-3366-04

重症肌无力(MG)是累及神经-肌肉接头的自身免疫系统疾病。位于神经-肌肉接头突触后膜中的乙酰胆碱受体是MG产生的关键。MG受到乙酰胆碱受体抗体调节,免疫复合物会影响神经-肌肉接头传递,属于T细胞免疫的多补体、抗体参与的疾病^[1]。流行病学研究发现,我国MG患病人群为100万,每年新增MG患者占千分之八,女性和男性的比例为3:2,发病年龄具有不确定性,MG患者在5岁以下为高发群体,部分MG患者会出现胸腺异常^[2]。多数MG患者发病原因与遗传因素有关,部分患者发病与机体免疫、感染等因素相关。MG临床主要表现为部分或全身骨骼肌群出现无力现象,活动后症状加重,休息后可缓解。最常见的首发症状是由于眼外肌无力引发的上睑下垂或复视,严重时可出现发音困难、

饮水呛咳等,也会引起其他并发疾病出现。目前,临床治疗MG的方法逐渐增多,血清相关抗体的检测在该病的诊治中发挥重要作用,可以作为MG分型的生物学标志物。因此,本文对儿童MG血清相关抗体的研究进行如下综述。

1 儿童MG血清相关抗体

1.1 抗乙酰胆碱受体抗体(AChR-Ab) AChR-Ab主要分布于血清免疫球蛋白(Ig)G1和IgG3亚群,通过与突触后膜中的乙酰胆碱受体(AChR)结合,活化补体瀑布式反应,增加突触后膜损伤,削弱信号传导能力,导致肌无力发生。有研究发现,MG患者血清AChR-Ab阳性率高达82.40%,合并胸腺异常的MG患者AChR-Ab阳性率为96.11%,特异度为100.00%^[3]。作用于AChR-Ab的α亚群抗体与其他

[△] 通信作者,E-mail:siqihong@hotmail.com。