论文

表征抗菌药物抑菌动力学的等效线药敏试验方法

刘玉庆^{①②}, 胡明^{①②}, 刘焕奇^③, 王进文^{①②}, 赵敏^{①②}, 李靖冉^{①③}, 付晓杰^{①③},
骆延波^{①②}, 齐静^{①②}, 李璐璐^{①②}, 高培基^②

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 250101;

② 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;

③ 青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266000

E-mail: liuiqing@126.com

收稿日期: 2014-12-29; 接受日期: 2015-04-08

国家自然科学基金(批准号: 81271886)、国家科技重大专项(批准号: 2013ZX10004217003)和公益性行业(农业)科研专项(批准号: 201203040)资助

doi: 10.1360/N052014-00336

摘要 以抗菌药物作用浓度与时间对抑菌率的协同作用, 改进通行的药敏试验方法. 采用 Bioscreen 全自动生长曲线分析仪, 在线测定连续时间、连续固定浓度抗菌药物作用下禽致病性大肠杆菌 BBZ6-3g 在 MHB 中生长量(A_{600}), 建立了抑菌动力学检测体系. 用 Sigma plot 构建以相对抑菌率 $RBR=1-A_{t-i}/A_{t-0}$ 对抗菌药物浓度和作用时间的等效线图. 等效线图全面地反映了药物浓度和时间对抑菌量的影响过程及趋势, 兼具二维曲线的量化和三维曲面的直观特点, 而且 RBR 通过归一化处理, 消除了细菌群体的自然增殖的本底、不同接种量、不同抗菌药物的差异影响, 可以直接比较不同抗菌药物的抑菌率, 专门比较浓度和时间对抑菌率的影响. 抑菌作用本质上是抗菌药物抑制细菌对营养物质的利用效率和程度, 与细菌死亡是不同但是相关的过程. 0.5 RBR 为传统的目测最低抑菌浓度(MIC), 以此为界, 等效线图可以直观地分为 3 部分: 分化区(0.5 纵向等效线以左, 全部浓度)、生长区(0.5 以上的等效线)、抑菌区(0.5 纵向等效线以右延伸且 0.5 以下的等效线). 分化区边界时间在 100~300 min, 因此传统的药敏试验以 8~12 h 的终态来判断抑菌率, 确定 MIC 是可靠的; 抑菌区和生长区之间的等效线疏密, 实际上是浓度依赖性和时间依赖性的依据. 抑菌动力学检测体系和反映 RBR 的等效线图, 改良了传统药敏试验方法, 有望分析不同接种量对抑菌率和菌群变异的影响、不同浓度的抗菌药物后效应(PAE), 比较不同菌种或不同抗药性水平菌株的抑菌动力学.

关键词相对抑菌率(RBR)
等效线
抑菌区
浓度
时间

以往来看, 一种抗菌药物被批准用于临床, 首先它必须能够治愈在其批准的时期大部分目标病原菌感染; 由此确定临床用药剂量(D)和方案; 同时根据

能够治愈的感染菌株的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)频率分布, 原则上选择最高 MIC 作为药敏试验的抗药性临界值(R)^[1~5]. 因

引用格式: 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

Liu Y Q, Hu M, Liu H Q, et al. Antibiotic susceptibility test to characterize the antimicrobial dynamics of antibiotic concentration by isobiogram. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 614~622, doi: 10.1360/N052014-00336

此, D 和 R 是相近的^[6,7].

反过来, 药敏试验由肉汤稀释法测定一定时间内(一般 12 h)药物完全抑制一定数量(约 10^5 cfu)细菌生长所需的 MIC; 以之为基本参数, 对比基于抗菌药物临床剂量制定的折点值(breakpoint)判定敏感(S)、中介(I)或抗性(R), 宏观地禁止 MIC 高于 R 的菌株使用该抗菌药物, 以控制病原菌抗药性提高, 维持抗菌药物在其推荐剂量下持续的疗效^[8]. 这已为(美国)临床标准化实验室(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, Available at: www.clsi.org)^[9]和欧洲药敏试验协会(European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST, Available at: www.eucast.org)^[10]所共识, 是合理使用抗菌药物及细菌耐药/抗药性监测的重要依据. 国际上这两大药敏试验标准体系都不是模拟体内药物作用于病原菌时的环境, 而是力图建立药敏试验与临床疗效的平行关联, 强调药敏试验的标准化, 只要严格执行药敏试验这一标准就可以控制抗药性. 《抗菌药物临床应用指导原则》和药典也都是与之吻合的技术文件^[11].

原则上讲, 只要菌株 MIC 控制在临界值 R 以下, 以临床剂量对症治疗还是比较容易治愈的. 但是影响治愈率的因素往往很多, 仍然要结合药物作用环境制定用药方案^[12]. 临床上首选药物的使用对治疗效果具有关键作用, 当首选药物无效时需做出“增大药物浓度”或“延长用药时间”或“改换药物种类”的判定, 而现在通行的药敏试验方法不能给出有效的信息. 随着抗菌药物的使用, 当大部分菌株对一种或多种药物都表现为耐/抗药时, 就出现无药可用的困境^[13]. 要解除这种困境, 需要重新审视抑菌过程中药物作用时间和浓度存在复杂多样的相互作用, 不应该简单地以“浓度依赖型”、“时间依赖型”来划分, 更不能简化为 MIC 这样一个描述固定的抑菌作用时间的终点值^[14]. 当然, 更大范围的药代动力学也要考虑^[15].

本文以 6 种常用抗菌药物对大肠杆菌的抑菌动力学为例, 研究作用浓度与时间的协同作用, 以期对通行的药敏试验方法作出解释和改进, 对临床医生选定抗菌药物种类、剂量和时间有参考意义.

1 材料与方法

1.1 研究策略

(1) 相对抑菌率. 常规药敏试验测定的 MIC

是标准条件下菌群“过夜培养”的绝对的终点结果, 被选定为药物作用敏感性的唯一依据. 显然, 由这类简化策略必然导致以状态函数(终点与始点的差值)代替应为呈动态变化的过程函数的结果, 其失真度是仅靠经验性的改进试验操作规程而难以解决的. 除了用 A_{600} 直接描述抑菌过程外, 考虑到菌株在此培养条件下本身的生长就呈现 S 型曲线, 这一影响应当消除. 以菌株无药物作用时菌群充分生长曲线(A_{600})为基准, 与不同浓度药物作用下菌群的增长曲线(A_{600}), 在各时间点相减, 得出抑止菌群增长的相对抑菌率(relative bacteriostatic rate, RBR), 即 $RBR = (A_{t-0} - A_{t-i}) / A_{t-0} = 1 - A_{t-i} / A_{t-0}$ ^[16].

同时, RBR 是取决于具体实验条件的相对值, 在相同的实验条件下, 同一菌株对不同药物, 或同一药物对不同菌株的抑菌作用, 相近但不等量菌群对抑菌的动力学过程的影响, 都可归一化为相对比值, 便于等价比较. 不同的实验条件下 RBR 的比较则反映了实验条件对 RBR 的影响.

RBR 图是在单变量离散药物浓度下的反应时间过程曲线图, 可比较性地显示 RBR 随反应时间而波动的状态.

(2) 等效线图. 由于 RBR 随浓度、时间的连续变化过程还不能以一个普适性的方程拟合^[14], 只能以数据的可视化方法表征药物浓度和反应时间对 RBR 的协同效应. 等效线图是把这一连续动态过程的三维图形转变为二维图形, 以等效线图的 X 轴为反应时间(min), Y 轴为药物浓度($\mu\text{g/mL}$), Z 轴 RBR 为药物浓度和反应时间的协同作用下菌群数量(A_{600}). XY 各种组合中 RBR 相等的各点连成平滑曲线, 采用内插法找出各连续整数点绘制成等效线, 并标示相应的 RBR 数值. 一定的 RBR 等效线给出药物浓度和反应时间更多的组合灵活性, 而不是一个单一的浓度值^[17-19].

等效线平行于 X 轴, 则表示反应时间的变化对 RBR 无影响; 如等效线平行于 Y 轴, 则表示为药物浓度的变化对 RBR 无影响; 在统一 X-Y 轴单位情况下, 如等效线为 X-Y 的对角线, 则表示反应时间和药物浓度的变化对 RBR 的影响相同. 如等效线弯曲指向 X 轴则表示反应时间变化对 RBR 的影响大于药物浓度的变化对 RBR 的影响; 反之亦然. 等效线间的间距越密集则表示 X 或 Y 的改变对 RBR 的影响越大.

概括讲, 以相对于菌株充分生长的 RBR 过程曲

线, 绘制抗菌药物浓度/时间的等效线图, 分析药物浓度和反应时间的协同抑菌效应, 以预期 RBR 等效线选定药物浓度/时间的组合。

1.2 材料

(1) 供试菌株. “白羽鸡”事件后, 从平度白埠镇病鸡肝脏分离禽致病性大肠杆菌 BBZ6-3g.

(2) 抗菌药物. 环丙沙星(Ciprofloxin)、丁胺卡那霉素(Amikacin), 浓度依赖性; 头孢噻呋(Ceftiofur)、氨苄西林(Ampicillin), 时间依赖性; 硫酸黏杆菌素(Colistin)和多西环素(Doxycycline), 均购自中国药品生物制品检定所。

(3) 培养基. MHB 液体培养基、MHA 固体培养基, 购自北京陆桥技术有限责任公司。

1.3 方法

(1) 接种物. 取上述菌株于 MHA 上划线, 37℃ 培养 16 h 后, 从 MHA 上挑取单菌落, 接种于 200 mL 的 MHB 中, 37℃, 2000 r/min 振荡培养 12 h, 用 MHB 离心(23700×g, 5 min)洗涤 2 次, 浓缩, 用 MHB 稀释至 $A_{600}=0.05\sim0.1$, 菌群数量约为 10^5 cfu/mL。

(2) 分批培养药敏试验. 在 Bioscreen 全自动生长曲线分析仪的检测板中, 每孔体积 300 μ L, 加入 100 μ L 药物培养基, 每种药物设定 10 个药物浓度梯度, 为梯度增加, 每个浓度设置 3 个重复孔; 分别取 BBZ6-3g 按照 100 μ L 接种, 封闭后放置在 Bioscreen 全自动生长曲线分析仪, 37℃ 静置培养 20 h, 每 15 min 自动扫描读取每个孔 A_{600} . 按此方法分别进行 6 种抗菌药物对低接种量菌群的动态药敏试验^[20]。

(3) 统计分析. 所有 A_{600} 扣除本底值 0.07, 3 个重复孔取平均值. 用 Prism 5 5.0 软件包, 对观测数据进行拟合与分析. 用 Sigma plot 2004 for Windows 9.01 构建三维曲面图和等效线图^[21]。

2 结果与分析

2.1 表征抑菌率的 5 种方法

在连续时间、连续固定浓度抗菌药物作用下, 细菌群体的变化可以通过多种方法表征, 如图 1, 原始的抑菌曲线 A, B 在平面内显示了时间延长和抗菌药物浓度逐渐提高对菌群数量的影响, 只能分别从 2 个角度观察吸光度变化, 无法用代数法表述, 不直观;

可以描述有限组合的浓度和时间的吸光度, 但无法描述一定吸光度所有的浓度时间组合。

3D 曲面 C 则明显立体直观, 可以在电脑中旋转曲面观察浓度与时间的组合对吸光值(A)的影响趋势, 但仍然无法量化, 其在顶面投影的等效线图简化了立体结构, 保留了变化趋势; 等效线图 D 则完成了从原始的曲线图向量化的等效线转换, 以几何结合量化的等效线显示了浓度和时间对吸光值的影响趋势(等效线的走向)及影响程度(等效线疏密). 尽管原始数据中浓度并非均匀设置, 但是等效线却把形成该吸光值的所有浓度和时间组合全部串连起来, 表明达到某一抑菌程度的浓度可以随时间而变化, 这是对 MIC 的扩展。

RBR 图 E 把菌群自然生长的本底减去, 再除以生长曲线, 这样 RBR 把原始抑菌率曲线整体反转, 等效线图 F 与 E 就有一定的互补性和等效性, 突出地显示了相对抑菌率; RBR 图把起始吸光值、浓度、时间都归零, 消除了接种量的影响, 且吸光值转化为 0~1 的小数, 便于比较, 但无法显示各种浓度时间组合作用下绝对菌量, 如最初 30 min 的生长与抑制的差异. 药敏试验一般容易控制接种量, 且临床感染部位菌量较低, 因此, 下面采用 RBR 抑菌曲线及其等效线比较 6 种抗菌药物的抑菌动力学过程, 分析浓度和时间的协同作用。

2.2 抗菌药物抑菌率的比较

如图 1, 在无药培养基中, 活化的菌群自然生长, 符合生长曲线, 有一个对数生长期(0~300 min), 进入稳定期. 随着药物浓度提高, 菌群生长受到抑制, 但稳定期最低菌量仍基本保持在初始接种量附近, 表明抗菌药物对菌群是抑制作用, 而非杀菌作用。

E 曲线则把无药培养菌群归零, 因此抑菌率由抑菌曲线和等效线都很容易读出. 从红色抑菌区最大等效线数值看, 最大抑菌率依次为: 氨苄西林、头孢噻呋、硫酸黏杆菌素、丁胺卡那霉素、多西环素、环丙沙星(表 1)。

如果以 0.5 RBR 为界, 则达到 0.5 需要时间大致相近, 为 100~300 min, 这是由大肠杆菌菌群生长周期决定的(表 1). 可以将等效线图分为 3 部分: 分化区(0.5 纵向等效线以左, 全部浓度)、生长区(0.5 以上的等效线)、抑菌区(0.5 纵向等效线以右延伸且 0.5 以下的等效线). 只是因为菌株的抗药性水平不同, 生长区和抑菌区之间的 0.5 等效线位置不同。

图1 氨苄西林对大肠杆菌 BBZ6-3g 抑菌曲线(A: 基于时间; B: 基于浓度)、3D 曲面(C)及其等效线图(D)与相对抑菌率曲线(E)及其等效线图(F)的比较

2.3 时间对抑菌率的影响

在分化区, 由于不同浓度抗菌药物和时间组合形成抑菌率的差异, 菌群在一定药物浓度条件下生长形成以 0.5 RBR 为界的稳定的不同生长曲线. 这期

间, 抑菌作用都是时间依赖性的, 在抑菌区和生长区, 时间几乎不起作用, 抗菌药物的浓度决定了等效线的数值和疏密. 氨苄西林和头孢噻吩在最初十几分钟有一段无反应期, 这期间尽管吸光值很低, 但不是

表 1 各种抗菌药物的最大 RBR 和达到 0.5 RBR 的浓度及时间

药物	最大 RBR	0.5 RBR 最低浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	0.5 RBR 最短时间 (min)
氨苄西林	0.8	80	80
头孢噻唑	0.7	16	200
硫酸黏杆菌素	0.7	3	80
丁胺卡那霉素	0.6	6	100
多西环素	0.5	10	350
环丙沙星	0.4	>6	>1200

抑菌作用, 仍然以生长为主, 之后才是持续的抑菌作用, 在时间轴上等效线升高依赖于时间. 而且此类型抗生素抗菌药物后效应(postantibiotic effect, PAE)较短, 一旦抗生素浓度降低或消除, 菌群很容易重新生长(图 1A). 从这 3 方面看, 时间对于 β -内酰胺类抗生素确实是敏感的因素. 硫酸黏杆菌素与之类似(图 3).

2.4 浓度对抑菌率的影响

β -内酰胺类抗生素(图2)和硫酸黏杆菌素(图3)一个突出的特征是在 0.5 RBR 附近等效线极为密集、陡

图 2 头孢噻唑的抑菌曲线和等效线图

图 3 硫酸黏杆菌素的抑菌曲线和等效线图

峭, 生长区和抑菌区界线分明, 而 0.5 等效线浓度基本相当于肉眼观测的 MIC. 即此类抗生素低于 MIC 时无抑菌作用, 达到 MIC 并保持相对长时间才达到抑菌作用.

相反, 丁胺卡那霉素(图 4)、多西环素(图 5)、环丙沙星(图 6)则生长区和抑菌区过渡缓慢, 从 0 到 1, 尤其在 0.5 等效线稀疏, 抑菌率渐次增强, 药物浓度低于 MIC(0.5 RBR)也有一定抑菌作用, 高于 MIC 则抑菌率继续增加, 直到最大值. 可以说 0.5 等效线以右的区域抑菌区与分化区融合一体了. 而且此类药物抑制细菌 DNA 和蛋白质合成, 有较强的 PAE, 所

以是浓度依赖性的, 其使用策略是用尽可能高的浓度, 使菌群被高度抑制, 直到诱使细菌自溶.

2.5 浓度与时间的协同作用

显然, 浓度与时间的协同作用应该发挥在无反应期以外的分化区和抑菌区. 原则上包括低于 0.5 等效线的区域中每一个浓度与时间的组合点, 但由于考虑到细菌的变异, 需要抑制状态保持充分的时间, 形成较长的 PAE, 乃至诱导菌群死亡自溶. 抑制状态的时间长短对细菌的命运是不同的.

另外, 值得注意的是, 浓度是可以任意设置的离

图 4 丁胺卡那霉素的抑菌曲线和等效线图

图 5 多西环素的抑菌曲线和等效线图

图6 环丙沙星的抑菌曲线和等效线图

散变量, 而时间是描述抗菌药物分子群与菌群相互作用一系列事件的自然的不可逆的累积变量, 前面省不掉, 无法任意设置. 如 200 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄西林作用于吸光值为 0.2 接种量大肠杆菌, RBR 从 0 一直升高, 至 100 min 左右达到 0.5, 再持续就超过 0.5 了, 那么这一浓度就不能抑制菌群生长.

3 讨论

3.1 抑菌率的概念与表征方法

采用 Bioscreen 全自动生长曲线分析仪, 在线测定连续时间、连续固定浓度抗菌药物作用下 BBZ6-3g 在 MHB 中生长量 (A_{600}), 3 个重复值变异系数 (coefficient of variation, CV) 小于 5%. 计算 $RBR = 1 - A_{t-i}/A_{t-0}$, 用 Prism 5 5.0 软件绘制 RBR 对抗菌药物浓度或作用时间的二维曲线; 用 Sigma plot 构建三维曲面图和等效线图, 建立了抑菌动力学检测体系. 可以看到 RBR 等效线图兼具二维曲线的量化和三维曲面的直观特点, 全面反映了药物浓度和时间这 2 个因子对抑菌量的影响过程及趋势, 由于抑菌和生长的复杂生理生化过程, 以及两因子的相互作用无法用统一的代数方程描述, 因此等效线这种几何图解方法则表现出直观量化的优势(图 1).

另外, 相对抑菌率 RBR 通过归一化处理, 消除了细菌群体的自然增殖的本底、不同接种量、不同抗菌药物的差异影响, 把抑菌曲线的起点都统一到原

点, 可以专门比较浓度和时间的影响(图 1). 就个例来讲有相对便利之处, 但是值得注意的是, 抗菌药物浓度和时间对细菌细胞的函数都是非线性的, 其综合影响更非简单的线性相加; 而且在不同接种量时, RBR 掩盖了绝对菌量的差异, 不同的绝对菌量对临床的意义肯定不同, 免疫系统清除难度不同.

以 0.5 RBR 为界, 等效线图可以直观地分为 3 部分, 即分化区、生长区、抑菌区. 这适用于所有的抗菌药物, 是因为大肠杆菌群体的生长周期决定了 100~300 min 的分界线, 0.5 RBR 是肉眼可见的菌群浑浊与澄清之间的吸光值.

抑菌率本质上是抗菌药物抑制细菌对营养物质的利用效率和程度, 和细菌死亡是不同但相关的过程. 抑菌区是抗菌药物作用的目的区域, 抑菌率最低保持吸光值在接种量附近, 包括超过 300 min 且 RBR 高于 0.5 的区域, 但是本区域不同时间点, 菌群的生理状态仍然有差异, 是抑制、死亡还是自溶^[22], 需要进一步研究.

3.2 抗菌药物浓度与时间对抑菌率的影响

在固定培养条件下的药敏试验中, 由菌群接种量(I)、抗菌药物浓度(C)和作用时间(T) 3 个变量决定菌群数量(N)的动态变化, 但长期以来, 4 个变量没有统一分析^[23]. 这存在一定的困难: (i) 生物是复杂和变异的群体, 不同数量的细菌存在不同的生长效应, 因此本文固定接种量, 考察浓度与时间的协同抑菌率; (ii) 时间是描述一系列事件进程的累积的矢量,

本身并不参与事件,但是它具有不停顿性,任何事件都是时间依赖性的.所以,本文的内容就成为研究抗菌药物浓度对菌群的持续抑制力的过程.

抑菌区和生长区之间的等效线疏密,实际上是抗菌药物分为浓度依赖性和时间依赖性的依据: β -内酰胺类、硫酸黏杆菌素直接作用细胞壁、细胞膜,其边界等效线密集陡峭,而 2 个区域内稀疏平坦,故而浓度效应不强,加之这类抗生素容易降解,PAE 弱,因此需要持续的作用时间,在 MIC 浓度以上,持续时间就成为重要指标;环丙沙星、丁胺卡那霉素和多西环素则作用于 DNA 和蛋白质合成,影响范围广,PAE 强,菌群变异频率高,因此浓度效应明显.

另外,在分化区和抑菌区,显然抑菌率都存在浓度依赖性,但是分化区的抑菌率是不稳定的,随着时

间延长至 300 min,可能进入抑菌区或生长区.因此传统的药敏试验以 8~12 h 的终态来判断抑菌率,确定 MIC 是可靠的,可以缩短到 5 h.但是临床上因为抗菌药物代谢,浓度不可能维持这么长的作用时间.这就需要确定在抑菌区的不同时间点,不同浓度抗菌药物作用下的菌群生理状态,是抑制,还是死亡、自溶?消除或降低药物后,是否重新生长^[24,25]?

本研究对等效线图的直观的三区域划分和测定体系有助于对抑菌率的阐述,解释和改良了传统药敏试验方法,有望分析不同接种量对抑菌率和菌群变异的影响、不同浓度的 PAE、不同菌种或不同抗药性水平菌株的等效线图.当然对于实际药代动力学的浓度变化的模拟,结合 OD 在线监测,将可能模拟真实的体内抑菌动力学.

参考文献

- 1 Wheat P F. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemoth*, 2001, 48: 1–4
- 2 Mouton J W. Breakpoints: current practice and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents*, 2002, 19: 323–331
- 3 Turnidge J, Kahlmeter G, Kronval G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microb Infect*, 2006, 12: 418–425
- 4 Turnidge J, Paterson D L. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20: 391–408
- 5 Jorgensen J H. Who defines resistance? The clinical and economic impact of antimicrobial susceptibility testing breakpoints. *Semin Pediatr Infect Dis*, 2004, 15: 105–108
- 6 中华人民共和国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典, 2005
- 7 CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard-Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012
- 8 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
- 9 CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, Second Informational Supplement. CLSI document VET01-S2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013
- 10 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
- 11 中华医学会中华医院管理学会药事管理专业委员会中国药学会医院药学专业委员会. 抗菌药物临床应用指导原则. 中华医学杂志, 2004, 84: 2026–2056
- 12 Levy S B. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemoth*, 2002, 49: 25–30
- 13 Rafael Gómez-Lus. Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades. *Internal Microbiol*, 1998, 1: 279–284
- 14 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 Chem*, 2004, 48: 3884–3891
- 15 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 Chem*, 2001, 45: 2436–2440
- 16 张怀强, 赵越, 何秀丽, 等. 构建大肠杆菌药敏试验新方法的探索. 中国科学: 生命科学, 2010, 40: 1063–1073
- 17 Li B, Zha H Y, Chiaromonte F. Contour regression: a general approach to dimension reduction. *Ann Statist*, 2005, 33: 1580–1616
- 18 Leveland W S, McGill R. Graphical method for analyzing science data. *Science*, 1985, 129: 829–833
- 19 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
- 20 Lehtinen J, Järvinen S, Virta M, et al. Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multiparameter microplate assay. *J Microbiol Meth*, 2006, 66: 381–389

- 21 Motulsky H, Christopoulos A. Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression. San Diego: Graph Pad software Inc, 2003
- 22 Michael A K, Daniel J D, Boris H, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 2007, 130: 797–810
- 23 Gould I M. Towards a common susceptibility testing method? *J Antimicrob Chemoth*, 2000, 45: 757–762
- 24 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
- 25 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 Chem*, 1998, 42: 2848–2852

Antibiotic Susceptibility Test to Characterize the Antimicrobial Dynamics of Antibiotic Concentration by Isobiologram

LIU YuQing^{1,2}, HU Ming^{1,2}, LIU HuanQi³, WANG JinWen^{1,2}, ZHAO Min^{1,2}, LI JingRan^{1,3},
FU XiaoJie^{1,3}, LUO YanBo^{1,2}, QI Jing^{1,2}, LI LuLu^{1,2} & GAO PeiJi²

1 Key laboratory of animal disease prevention and control and breeding in Shandong province, Institute of animal science and veterinary, Shandong academy of agricultural sciences, Jinan 250101, China;

2 State key laboratory of microbial technology, Shandong university, Jinan 250100, China;

3 Qingdao Agriculture University, Qingdao 266000, China

The antibiotic susceptibility test (AST) method was improved by evaluating the synergy of antimicrobial concentration and time to antimicrobial rate. The concentration of *E. coli* BBZ6-3 suspension in the MHB was detected with turbidity (A_{600}) by automatic growth curve analyzer (Bioscreen) in continuous time while exposed to various concentrations of antibiotics. Based on this testing system of antibacterial dynamics, isobiologram was built by Sigma plot through relative bacteriostatic rate ($RBR=1-A_{t-i}/A_{t-0}$) to antibiotic concentration and treating time. It could perfectly suggest that the process and trend of bacteriostatic action was affected with the two factors, which possessed compatible advantage of both quantitative character of two-dimensional curve and visual character of three-dimensional curve. With the normalized processing, RBR could eliminate the influence of some factors, such as the background effect of bacteria growth, inoculums concentration and variety of antibiotics. So the bacteriostatic rate of different antibiotics, specially the effect of concentration and time, could directly be compared through it. The essence of bacteriostatic action was that the nutrient utilization efficiency and degree were inhibited by antibiotics when bacteria grew in media, which was different from direct sterilization but was a correlative course. Isobiologram was divided into three parts by 0.5 RBR (traditional visual MIC by the naked eye): differentiation area (left area of lengthways isobiologram 0.5 RBR, all concentrations), growth area (above isobiologram 0.5 RBR), bacteriostasis area (right area of lengthways isobiologram 0.5 RBR and below isobiologram 0.5 RBR). The periphery of differentiation area was 100–300 min, so it was credible to determine the MIC at 8–12 h in traditional AST. In fact, the isobiologram density of growth area and bacteriostasis area was the evidence of concentration dependence and time dependence. Bacteriostatic dynamics testing system and RBR isobiologram, which reformed the traditional AST method, would be used to analysis the effect of different inoculation quantity on antibacterial rate and the bacterial population variation, post antibiotic effect (PAE) of different concentrations of antibiotics, and compare bacteriostatic dynamics of different strains with different level of resistance.

relative bacteriostatic rate (RBR), isobiologram, bacteriostasis area, concentration, time

doi: 10.1360/N052014-00336