

新抗菌药物临床试验折点制定方案专家共识

Chinese experts' consensus on protocol of breakpoints setting of new antibacterial agents for clinical trial

李耘^{1a}, 郑波^{1a}, 吕媛^{1a}, 魏敏吉^{1a}, 单爱莲^{1a}, 曹照龙², (以下按拼音排序) 李若瑜^{1b}, 廖秦平³, 林明贵⁴, 吕晓菊⁵, 马小军^{6a}, 倪语星⁷, 童明庆⁸, 王睿⁹, 徐英春^{6b}, 游学甫¹⁰, 张菁¹¹, 张琼¹², 张睢阳¹³, 赵明¹⁴, 郑青山¹⁵, 卓超¹⁶

(1. 北京大学第一医院, a. 临床药理研究所; b. 皮肤性病科, 北京 100034; 2. 北京大学人民医院呼吸科, 北京 100044; 3. 北京清华长庚医院妇产科, 北京 102218; 4. 解放军第309医院结核一科, 北京 100091; 5. 四川大学华西医院感染性疾病中心, 成都 610041; 6. 北京协和医院, a. 感染内科; b. 检验科, 北京 100730; 7. 上海交通大学医学院附属瑞金医院临床微生物科, 上海 200025; 8. 南京医科大学第一附属医院检验科, 南京 210029; 9. 中国人民解放军总医院药物临床研究中心, 北京 100853; 10. 中国医学科学院中国协和医科大学医药生物技术研究所以, 北京 100050; 11. 复旦大学附属华山医院抗生素研究所, 上海 200040; 12. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091; 13. 中国人民解放军第二炮兵总医院呼吸及重症医学科, 北京 100088; 14. 国家食品药品监督管理总局药品审评中心, 北京 100038; 15. 上海中医药大学药物临床研究中心, 上海 201203; 16. 广州医科大学附属第一医院呼吸疾病研究所, 广州 510120)

LI Yun^{1a}, ZHENG Bo^{1a}, LV Yuan^{1a}, WEI Min - ji^{1a}, SHAN Ai - lian^{1a}, (The following sort by pinyin) CAO Zhao - long², LI Ru - yu^{1b}, LIAO Qin - ping³, LIN Ming - gui⁴, LV Xiao - ju⁵, MA Xiao - jun^{6a}, NI Yun - xing⁷, TONG Ming - qing⁸, WANG Rui⁹, XU Ying - chun^{6b}, YOU Xue - fu¹⁰, ZHANG Jing¹¹, ZHANG Qiong¹², ZHANG Sui - yang¹³, ZHAO Ming¹⁴, ZHENG Qing - shan¹⁵, ZHUO Chao¹⁶

(1. a. Institute of Clinical Pharmacology; b. Department of Dermatology & Venereology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China; 2. Department of Respiratory, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China; 3. Department of Gynecology and Obstetrics, Beijing Tsinghua Changgung Hospital, Beijing 102218, China; 4. Department First of Tuberculosis, the 309th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100090, China; 5. Center of Infections Diseases, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 6. a. Department of Infectious Diseases; b. Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China; 7. Department of Clinical Microbiology, Ruijin Hospital Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 8. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 9. Center of Medicine Clinical Research, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China; 10. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 11. Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 12. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100091, China; 13. Department of Respiratory and Intensive Care Unit, the Second Artillery General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100088, China; 14. Center for Drug Evaluation, China Food and Drug Administration, Beijing 100038, China; 15. Center for Drug Clinical Research, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 16. Guangzhou Institute of Respiratory Disease, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China)

收稿日期: 2015 - 05 - 04

修回日期: 2015 - 05 - 05

作者简介: 李耘(1970 -), 女, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事抗菌药物临床前药效及细菌耐药研究

通信作者: 吕媛, 研究员, 博士生导师

MP: 13910332958

E - mail: lyzx5857@163.com

摘要: 首次进入有效性评价临床试验的新抗菌药物,需根据其体外抗菌活性、药代动力学特性等,提出临床试验用敏感折点,以便临床试验时筛选对该药物敏感致病菌感染患者入组,同时对此折点合理性进行再评价。

关键词: 敏感折点; 抗菌药物; 最低抑菌浓度; 药代动力学; 药效学

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2015.11.040

中图分类号: R978.1; R969.1; R969.3

文献标志码: B

文章编号: 1001-6821(2015)11-1069-08

Abstract: Clinical breakpoints are used in phase II or III clinical trials to categorize microorganisms if susceptibility to new tested antibacterial agents that means the patient infected by the pathogen will be enrolled the study or not. The role of this consensus is to define procedure and required data to setting breakpoints and how to reevaluate it in clinical trials.

Key words: susceptibility breakpoint; antibacterial agents; minimal inhibitory concentration; pharmacokinetic; pharmacodynamic

1 概述

抗菌药物折点(breakpoint)用来判断病原菌对药物敏感、中介或耐药,是临床医生选择抗菌药物治疗病原菌感染的一个重要依据。目前国际上公认的制定折点的机构,一个是美国的 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute),另一个是欧洲的 EUCAST(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)。此外,美国在新药批准过程中食品药品监督管理局(FDA)也制定相应的折点。

即便是同类药物,其药代动力学(pharmacokinetic, PK)和药效学(pharmacodynamic, PD)参数并不完全一致,简单套用同类品种折点的方法并不合适;另外,不同地区的细菌耐药情况和耐药机理也不尽相同、人种之间也存在差异,这些因素均可以导致折点不同。

考虑到折点制定的复杂性,需要在国家层面组织协调相关单位,如医药企业、医院、监管机构,通过相关专家团队来建立、规范此项工作。另外,开展这项工作,也有利于我国 I 类新药的开发与推广、临床合理使用新抗菌药物、细菌耐药监测工作的进行以及耐药机制检测标准技术体系的建立。

本共识制定的目的在于建立并规范初次用于有效性评价临床试验的全身用 I 类新抗菌药物的折点制定过程。对过程涉及的具体实验方法,如最低抑菌浓度(MIC)测定方法、动物模型建立方法等,请参照各自标准进行。暂不涉及抗真菌药物的折点制定。

2 基本要求

实验室要求 获得有质量控制和质量保证的微生物学实验结果是确定准确折点的基础。在进行折点相关的微生物实验时,需要在有质量保证的实验室中进行,且全程伴随质量控制。同时,在实验过程中,尽量采用国际通用的研究方法,使不同地区和国家的

数据具有可比性。对于开展药代动力学研究的实验室,包括生物样品分析、药代动力学统计分析等,同样应建立相应的质量保证体系。进行动物 PK/PD 靶值确定的动物实验室应为屏障环境动物实验室。

测试菌株要求 由于临床病原菌存在着耐药的变迁和区域的差异,测试菌株应为近 3~5 年来自 3 个或以上不同城市的临床分离菌株。

实验动物要求 实验动物为 SPF 级动物。

3 建立抗菌药物折点的具体内容与程序

3.1 流行病学界值(Epidemiological Cutoff, Ecoff)的建立

Ecoff,也可称做野生型界值(wild-type cutoff, CO_{WT}),将细菌划分为野生型和非野生型,没有中介范围。由于不考虑临床因素,所以该值相对稳定,在一定时期内,通常不随样本来源及不同地区而异,即 Ecoff 值在全世界范围内通用。

3.1.1 测定或收集 MIC 数据

测定方法 按照 CLSI 和 EUCAST 有关抗菌药物敏感试验稀释法要求,采用微量肉汤二倍稀释法、宏量二倍稀释法或琼脂二倍稀释法进行 MIC 测定。如既往药效学研究已证明,上述这 3 种测定方法的测定结果差异无统计学意义,可任选一种方法。如既往未做方法学比较研究,需在此进行方法学比较。如未进行方法学比较,而只选用了一种测定方法,需在最终给出折点时加以注明,即此折点只适用于该方法。推荐使用微量肉汤二倍稀释法。

药物浓度选择 需要选择较宽的药物浓度范围以涵盖菌株的全部 MIC 分布,建议测定范围 0.002~256 mg·L⁻¹。

菌种与菌株数量 针对该抗菌药物抗菌谱中的临床常见致病菌种,以种为单元进行统计分析。理论

上,同一属或科的不同菌种间,如 MIC 众数相差在 2 倍或以内,可合并统计。考虑到实用性,也可参考 CLSI (<http://www.clsi.org>) 和 EUCAST (<http://www.eucast.org>) 的细菌分组方式,每组为一个统计单元。每单元进入统计的野生型株数不少于 100 株,其中肠杆菌科、葡萄球菌属、肺炎链球菌以及其他链球菌组,测定菌株数最好不少于 300 株。葡萄球菌属应包含金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌,其他链球菌组应包含 α 和 β 溶血菌株。

测定单位数量 MIC 测定需在 3 个或以上不同单位进行。测定前制定统一方案,采用相同的测定方法。

收集 MIC 数据要求 除当前测定外,也可收集以往 MIC 数据加入统计。对于收集的 MIC 数据,其测定方法必须与当前测定方法一致,并剔除其中药物浓度测定不完整的数据。

3.1.2 确定 Ecoff

常规方法 野生型菌株 MIC 呈对数正态分布。为排除潜在耐药基因,取一个完整正态分布的 MIC₉₀ 值为 Ecoff。当分布呈现双峰形态时,说明所测菌株中含非野生型菌株,需剔除后重新作图计算。这种方法简易直观,对于 MIC 具有单峰或明显双峰分布的细菌-药物组合(图 1) 效果较好,而对于野生型和非野生型有部分重合的细菌(图 2) 则效果不好。

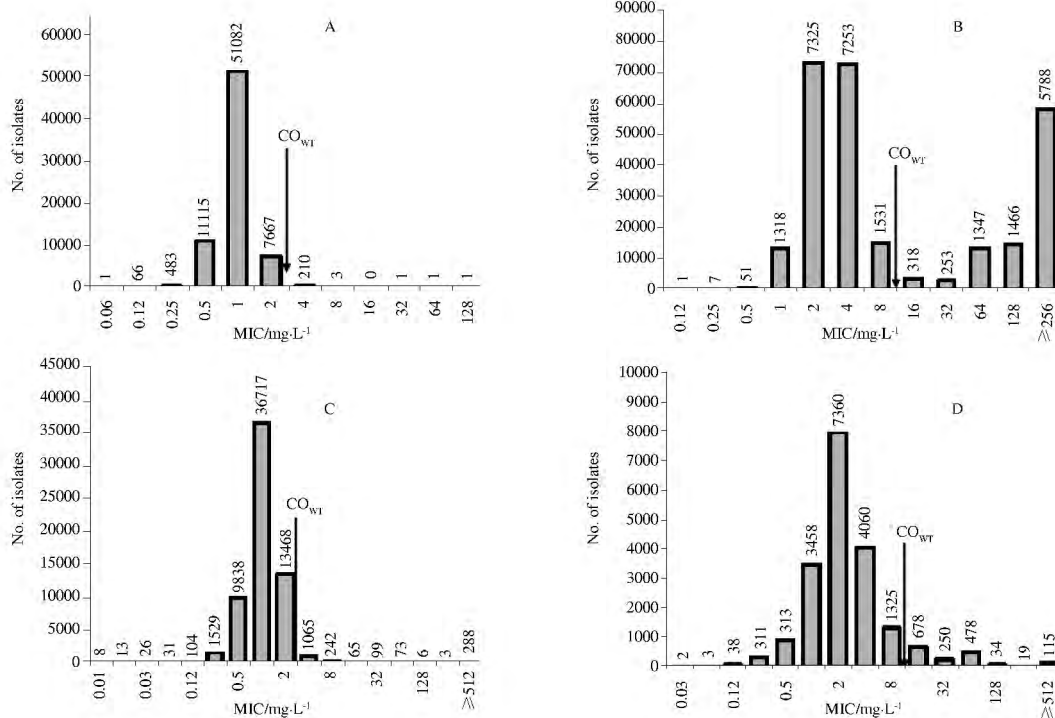


图 1 最低抑菌浓度(MIC) 分布与流行病学界值(Ecoff) 确定[□]

Figure 1 Minimal inhibitory concentration (MIC) distribution and epidemiological cutoff (Ecoff) values[□]

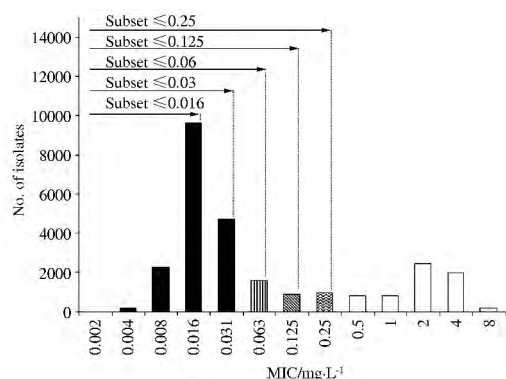
A: *Staphylococcus aureus* - Vancomycin; B: *Escherichia coli* - Ampicillin; C: *Streptococcus pneumoniae* - Ciprofloxacin; D: *Pseudomonas aeruginosa* - Gentamicin

统计学方法 基于对数正态分布可选择非线性最小二乘回归等统计学方法,对不同范围实测值进行拟合(如图 2,分别对 MIC 值 0.002 ~ 0.016, 0.002 ~ 0.031, ..., 0.002 ~ 0.25 的不同亚区间进行拟合)。以拟合值与实测值相差最小的点为 Ecoff。选用不同的统计方法可能得到不同的结果,有时甚至得不到结果。因此,在选用统计学方法时,还需与常规方法相结合。

3.2 PK/PD 界值(PK/PD Cutoff) 的建立

PK 数据反映了药物在体内循环中的变化过程,

PD 数据反映了抗菌药物对病原菌的作用效果(抑制或杀灭程度)。由于感染的细菌一般处于细胞外液,而细胞外液的抗菌药物游离浓度被认为与体循环中的游离浓度具有一致性,因此,PK/PD 的关联可反映抗菌药物在作用部位的浓度和维持时间与其抑菌/杀菌程度间的关系,这为 PK/PD 界值的制定奠定了基础。需要注意的是体循环中的药物浓度变化不是总能反映组织的浓度变化,如中枢神经系统、肺和皮肤等。在这些组织中,抗菌药物浓度变化与体循环中浓度的变化往往会存在较大差异。

图2 统计学方法确定 E_{coff} Figure 2 Calculated E_{coff} by statistical techniques

PK/PD 指数的值即 PK/PD 靶值 [国外文献中也通常称作 PD 靶值 (pharmacodynamic target, PDT)]^[4] 是确定 PK/PD 折点的关键指标,即使同类药物,该值也存在差异,如对于头孢菌素类抗菌药物,其 $fT > MIC\%$ 一般为 40% ~ 50%,对于青霉素类抗菌药物,一般为 30% ~ 40%;而对于喹诺酮类药物,其 $fAUC/MIC$ 对于革兰阳性菌一般为 30,对于革兰阴性菌需要达到 100 以上^[4]。因此,新抗菌药物需进行自身 PK/PD 靶值的相关性研究。

3.2.1 建立 PK/PD 界值所需的体外研究

建立 PK/PD 界值所需的体外研究包括确定抗菌药物杀菌模式、后效应 (post-antibiotic effect, PAE) 以及获得人血浆蛋白结合率。

抗菌药物杀菌模式的确定: 目前有多种方法可以用来确定抗菌药物的杀菌特点。常用的方法是在杀菌曲线的实验中进行确定,这部分研究在临床前的药效学研究中应予体现。随药物浓度增加,特别是在大于 4 倍 MIC 药物浓度后,杀菌速率与程度仍相应增加,为浓度依赖型抗菌药物,反之为非浓度依赖型抗菌药物,或时间依赖型抗菌药物。另外,还需要确认新抗菌药物是否具有中等或较长的 PAE。

测定新抗菌药物人血浆蛋白结合率 (f): 抗菌药物入血后,与血浆蛋白呈可逆性结合,只有游离抗菌药物才能到达感染部位抑菌或杀菌。因此 PK/PD 研究中抗菌药物的 PK 参数应基于游离药物浓度得到。除非 PK 研究已采用了直接测定游离药物浓度的方法,否则均需测定人血浆蛋白结合率。目前常用检测血浆蛋白结合率实验方法有平衡透析法、超率法等。检测血浆总浓度与游离药物浓度,两者之差为结合部分,其与总浓度的比值为人血浆蛋白结合率。需要注意的是蛋白结合率的大小除与种属有关外,有时与药

物的浓度大小、疾病状态也有关。

以上 3 个数据可由临床前的药效学试验、I 期临床试验中获得。其中药物杀菌模式和 PAE 作为之后确立与疗效相关 PK/PD 指数的验证。血浆蛋白结合率则直接用于之后的计算中。

3.2.2 确立与疗效相关 PK/PD 指数

PK/PD 指数包括 $fT > MIC\%$, $fAUC/MIC$, fC_{max}/MIC 三个,不同类型抗菌药物与三个指数的相关性也不同,浓度依赖型抗菌药物通常与疗效相关的 PK/PD 指数为 $fAUC/MIC$ 或 fC_{max}/MIC ; 时间依赖型抗菌药物,根据其 PAE 长短,分别对应 $fAUC/MIC$ 和 $fT > MIC\%$ 。

确定与疗效相关的 PK/PD 指数可直接在动物模型中进行,也可先在体外建立药代动力学模型,而后对重要数据结果在动物模型中加以验证。

3.2.2.1 在动物模型中确立相关 PK/PD 指数

动物 PK/PD 模型可以使用来自人体感染的病原菌进行建立,其确定的 PK/PD 指数及靶值与来自感染病人的结果有非常好的一致性,因此,来自动物的 PK/PD 研究所获得的指数和靶值对确定人体的 PK/PD 界值非常有帮助^[4]。

建立感染动物模型 主要有免疫缺陷小/大鼠大腿感染模型、免疫缺陷小/大鼠肺炎模型等。以上 2 种模型为研究最成熟、使用最多的模型,也可根据药物自身特点及预计临床适应证,选择相应其他模型,如血流感染模型、尿路感染模型等。不论哪种模型,都应首先造成免疫缺陷状态以排除不同免疫力对结果的干扰,直接观察药物对细菌的作用。常用腹腔注射环磷酰胺的方法致小/大鼠中性粒细胞减少 ($<100/mm^3$) 来消除免疫状态的影响。

获得感染动物药代动力学参数 参见《化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则》相关内容。注意: ①血浆蛋白结合率可以有种属差异,需要使用感染动物模型中所用动物的血浆蛋白结合率; ②通常情况下,其中的 PK 研究选用体循环中的药代动力学参数即可。对于某些特殊的抗菌药物或适应证,组织细胞外液的浓度和体循环中的药物浓度会存在差异,如果能够测定细胞外液中的药物浓度并验证其与体循环中药物浓度的一致性,可为能否使用体循环 PK 参数进行 PK/PD 界值的确定,提供数据支持。目前已经有一些方法可以测定细胞外液中的药物浓度,如肺泡灌洗法、微透析法等^[4]。

获得感染动物药效学数据 首先选择药效学指标,常用治疗组与阳性对照组 (未给予药物治疗) 每克组织、每毫升液体或每个组织中菌落数差值的对数作

为药效学指标,也可直接通过生存率观察药效。前者可于感染动物 2 h 后开始给药,给药 24 h 后开始菌落计数;后者常需治疗 2 d 以上,再观察数天。给药方式采用剂量解析/分层法(dose fractionation),即将 4~5 种日剂量以多种频率(如 q24 h、q12 h、q8 h、q6 h、q4 h)给药,使 PK/PD 指数与疗效关系图中,不同区间均有合理的点数覆盖,见图 3,4。

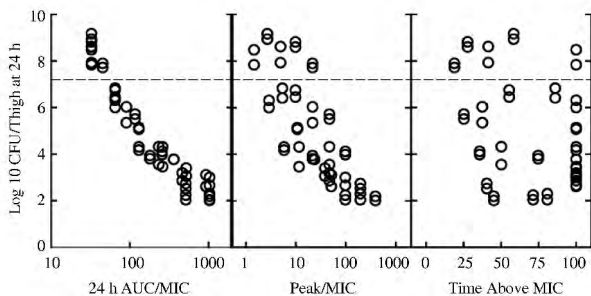


图 3 左氧氟沙星治疗肺炎链球菌小鼠大腿感染药代动力学/药效学(PK/PD)分析^[1]

Figure 3 Relationship among pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indices for levofloxacin and $\log_{10}$ CFU per thigh of *Streptococcus pneumoniae* after 24 h of therapy^[1]

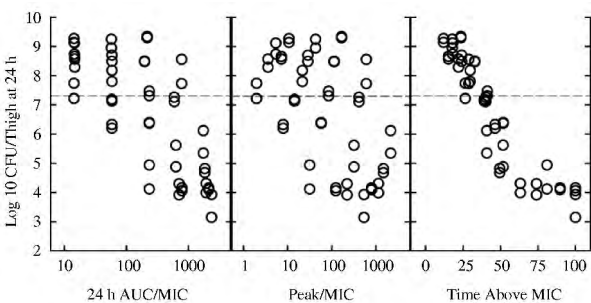


图 4 头孢他啶治疗肺炎克雷伯菌小鼠肺炎 PK/PD 分析^[1]

Figure 4 Relationship among PK/PD indices for ceftazidime and $\log_{10}$ CFU per lung of *Klebsiella pneumoniae* after 24 h of therapy^[1]

确定相关性最好的 PK/PD 指数 分别以 3 个 PK/PD 指数为横坐标,药效学数据为纵坐标作图,拟合度最好的指数即该药物的 PK/PD 指数。如图 3 显示,左氧氟沙星对肺炎链球菌所致小鼠大腿感染的 PK/PD 指数为 AUC_{24h}/MIC ;如图 4 显示,头孢他啶对肺炎克雷伯菌所致小鼠肺炎的 PK/PD 指数为 $T > MIC\%$ 。

需要测定的菌株种类与数量 针对新抗菌药物抗菌谱和预计临床适应证选择菌种,每种测定 1~2 株,菌种中有标准质控菌株的应首选质控菌株。

3.2.2.2 建立体外药代动力学模型,确立 PK/PD 相关指数

所建体外药代动力学模型需满足以下 2 个条件:

①至少可模拟出一级药代动力学的浓度变化,即通过泵速和容器容积的调节,造成药物浓度呈指数型衰减,可以准确模拟人体血药浓度半衰期;②药物浓度动态变化时,保证细菌浓度不被稀释。

通过所建体外药代动力学模型,采用剂量解析法,测定不同菌种的不同菌株在不同给药条件下菌落数的改变,作图得到 PK/PD 相关指数(同动物模型研究方法)。

体外药代动力学模型与动物体内感染模型相比有以下优点:①较易模拟人体血药浓度的变化;②便于采集多点样本;③减少动物的消耗;④对在动物体内不易生长的菌种特别有用。缺点:①完全不包含生物体对感染与药物的应答;②对技术要求高,有些技术问题(如细菌吸附、污染和过滤层阻塞等)如处理不好会影响试验结果。因此,如果采用体外药代动力学模型进行 PK/PD 相关指数研究,还需对重要数据以动物模型加以确认,但可以减少动物实验时的菌株数量、给药剂量以及给药间隔。

3.2.3 确立 PK/PD 靶值

方法基本同于确立 PK/PD 指数。不同之处在于:①根据上述结果适当减少给药频率;②加大剂量范围;③增加菌株种类与数量,覆盖新抗菌药物抗菌谱中主要菌种,且每种细菌含若干不同 MIC 值的菌株,甚至包括超出 E_{coff} 的菌株,以此观察随 PK/PD 指数改变时药效学数据的变化,找到药效学数据变化趋于稳定时的拐点。考虑到研究中的各种变异因素,可略提升拐点值作为 PK/PD 靶值。

确立 PK/PD 靶值同样可以选择直接进行动物实验或先在体外模型中试验,再对重要结果以动物实验验证。

3.2.4 结合 PK 参数和 MIC 分布,通过蒙特卡洛模拟得到 PK/PD 界值

从早期临床试验中获得健康受试者 PK 参数,以推荐临床试验用给药方案所对应药代动力学参数,结合体外大样本细菌 MIC 分布,以动物实验中获得的 PK/PD 靶值作为取得最佳临床和微生物疗效的靶值,通过蒙特卡洛模拟,计算在不同 MIC 浓度下的达标概率(PTA),以 PTA 等于 90% 时的 MIC 值作为 PK/PD 界值。注意:目前血浆或血清药物浓度测定方法中,一般测定的是总活性成分浓度,需通过公式:总浓度 $\times$ (1 - 蛋白结合率%) 计算得到游离药物浓度,除非已经采用了直接测定游离药物浓度的方法。模拟时需使用可靠模拟软件(如 Adapt, Crystal ball 等),药代动力学参数服从对数

正态分布, f 服从平均分布, MIC 服从独立分布, 模拟次数 5000 ~ 10 000 次。针对不同 PK/PD 指数, 选择相应计算公式。其中 $fT > MIC\%$ 的计算公式中应包含输注时间。健康受试者的 PK 参数变异较小, 临床研究后期, 如果获得目标适应证患者的 PK 数据, 可以该数据再进行蒙特卡洛模拟, 重新确定 PK/PD 界值, 见图 5。

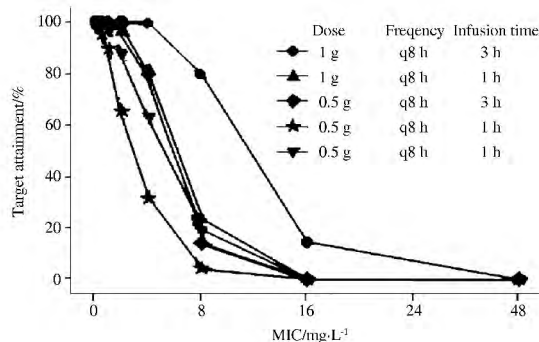


图5 针对铜绿假单胞菌, 美罗培南5种静脉滴注方案的达标概率比较(靶值: $fT > MIC\% > 40\%$)^[8]

Figure 5 Compared probability of target attainment of meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* using five different dosing regimens (target value: $fT > MIC\% > 40\%$)^[8]

3.3 平衡 E_{coff} 与 PK/PD 界值, 确定临床试验用临时敏感折点(susceptibility breakpoint, S)

分别获得 E_{coff} 和 PK/PD 界值, 如 PK/PD 界值低于 E_{coff}, 要看其位于野生型菌株正态分布的何处。如果落在接近正态分布的高 MIC 一端, 即按照 PK/PD 界值, 只有少量野生型敏感菌株被划入“非敏感”范畴, 则选择 PK/PD 界值作为临床试验用临时敏感折点; 如位于正态分布的中间甚至低 MIC 一端, 则认为此种或此组细菌对该药物“非敏感”, 应在抗菌谱中去除。如 PK/PD 界值是 E_{coff} 的 2 倍, 仍取 PK/PD 界值作为临床试验用临时敏感折点。如相差 4 倍或更高, 可参照已知同类药物中化学结构相近药物的敏感折点, 选择与已知药物折点相近的作为临时敏感折点, 同时需分析差距大的原因, 必要时需重复部分试验。

平衡折点时还应考虑到其实用性, 在新药临床试验中, 不宜针对一个药物制定过多折点。

3.4 建立抑菌圈直径与 MIC 间相关性, 确定纸片扩散法的敏感折点^[8]

考虑到对于临床微生物实验室, 纸片扩散法测定药物敏感性更为灵活方便, 因此需完成药敏纸片与 MIC 相关性的建立工作。如果按照以下要求, 未发现药敏纸片抑菌圈与 MIC 的相关性, 则临床试验中仍需使用稀释法测定该药敏感性(如万古霉素对于葡萄球

菌等)。

3.4.1 确定纸片所含药物浓度

可以选择已上市同类药物中化学结构相似品种所使用的药敏纸片浓度作为新抗菌药物的纸片浓度。但对于新类别的抗菌药物、理化性质改变较大的药物、药代动力学参数与同类药物相差较大以及临时 MIC 折点与同类药物不同的药物, 需进行预实验确定纸片药物浓度。

选择 2 ~ 3 种浓度纸片, 按纸片扩散法标准操作规程, 对 100 株不同种类目标细菌测定抑菌圈直径, 选择达到以下要求的浓度作为该药物的纸片浓度。对于复方制剂, 还要调整选择两成分间的配比。对于敏感菌株, 抑菌圈直径应 $> 15 \text{ mm}$, $< 45 \text{ mm}$; 对于耐药菌株, 抑菌圈直径很小或没有; 纸片敏感折点应落在 $15 \sim 25 \text{ mm}$ 之间^[8]。

3.4.2 菌种与菌株数

方案一: 测定各种细菌至少 500 株, 其中大部分为抗菌谱所覆盖菌种。菌株应收集自不同地区。除非是针对特定菌种的药物, 否则同一种细菌所占比例应 $\leq 20\% \sim 30\%$ 。

方案二: 按照 CLSI 和 EUCAST 分组, 对于抗菌谱内细菌, 每组测定 100 株。

抗菌谱较窄的药物可选择方案二。

3.4.3 回归分析

以抑菌圈直径为横坐标, MIC 值为纵坐标做分布散点图。当所测菌株 MIC 值在整个测定浓度范围内呈均匀分布时, 可直接进行线性回归, 计算相关性。但对于新药来说, 通常敏感菌占大多数。这种情况下, 需使用误差分析法(error rate - bounded method)。

误差分析时作为分母的菌株数量: MIC 值在 $S \sim S + 2$ 个稀释度范围内的菌株(即图 6 中阴影部分菌株)或上述全部测定菌株, 推荐使用 $S \sim S + 2$ 个稀释度范围内的菌株。

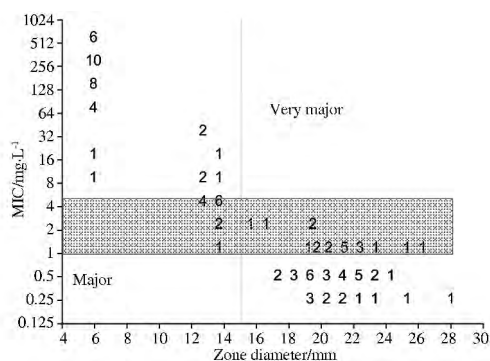


图6 MIC 与抑菌圈直径分布散点图

Figure 6 Scattergram of MICs versus zone diameters

定义不符区域与不符率(图6):由MIC敏感折点和纸片敏感折点(即横竖2条实线)可将图6划分为4个区域。右上方MIC不敏感而抑菌圈敏感的区域为非常重要区(very major);左下方MIC敏感而抑菌圈不敏感的区域为重要区(major)。调整纸片法的折点线以使不符率满足表1。

表1 不同区域可接受不符率

Table 1 Guideline acceptable discrepancy rates

MIC Range	Isolates with MICs in S-S+2 dilution		Unselected isolates	
	Very major	Major	Very major	Major
≥S+2 dilution	<2%	—	<1.5%	—
S-S+1 dilution	<10%	<10%	<1.5%	<3%
≤S-1 dilution	—	<2%	—	<3%

—: Not data

3.5 建立标准菌株质控范围

除制定折点外,新药还需要制定其对标准菌株的质控范围,以便进行药敏试验时以标准菌株为对照,

表2 建立标准菌株质控范围所需数据量

Table 2 Requirements to establish quality control expected range

Test method	Laboratories	Media lots (different manufacturers)	Disk lots (different manufacturers)	Days	Replicates	Total data points
Disk diffusion	7	3	2	10	1	420
Broth dilution MIC	7	3	—	At least 3 days	10(max 4 per day)	210
Agar dilution MIC	7	3	—	2	10	420

—: Not data

表3 标准菌株质控范围选择示例

Table 3 Example for setting quality control ranges of standard strains

MIC (mg · L ⁻¹)	Example 1	Example 2	Example 3
0.03	0	0	0
0.06	5	15	0
0.12	100	73	30
0.25	104	110	170
0.5	1	12	10
1	0	0	0
Range	0.06-0.5	0.06-0.5	0.12-0.5

4 临床验证

通过上述研究给出临床研究所用临时敏感折点,在临床研究中还应对其进行确证。临床确证是一个复杂的过程,应该根据药物的抗菌谱、抗菌强度、体内过程等,在不同感染患者中、针对不同感染部位、不同给药方法,分别评价临时折点的合理性。考虑到这一

了解实验是否失控,进而控制与保证药敏试验结果的质量。我国经常使用的标准菌株是来自美国国家菌种保藏中心(ATCC)的标准菌株。新药抗菌谱中所涉及的MIC测定用所有标准质控菌株均需建立质控范围,见表2。

注意:①每个实验室都需要测定3个不同厂家的培养基;②除试验的新抗菌药物外,还需同时选择同类中相似品种作为对照药。如没有同类药物,则选择具有相似抗菌谱的药物作对照。对照药只需使用1个批号的培养基和纸片,其他同试验药。对照药的结果必须在质控范围内,如果对照药失控,当天的其他数据也需要重复;③对于稀释法,每次接种需使用独立制备的接种液,MIC值低于0.03 mg · L⁻¹的数据应舍去,并且避免出现低于敏感折点5个稀释度的MIC值。

结果分析:统计平均值、标准差、范围及中位数。95%的数据应该落在建议的范围内,对于稀释法,此范围应包含众数±1的稀释度。理想的质控范围包括3个稀释度,但有时可以为4个稀释度,见表3。

过程的复杂性和艰难性,建议在新药上市前临床研究阶段仅在主要适应证中进行细菌药物敏感性折点的确证。需要注意的是,在临床研究阶段,由于受伦理的限制,试验的过程中要剔除不敏感菌感染病例,因此,不敏感菌感染病例的临床结果在临床研究阶段很难得到验证。

4.1 通过群体药代动力学研究验证

在临床研究期间,对入选的患者同时进行群体药代动力学研究(PPK)并与之前体外药效相结合,或直接进行群体药代动力学/药效学(PPK/PD)研究,可在大样本的基础上进行验证。按照稀疏点采样的方法采集不同时间点的血样,同时收集患者的各种信息,建立群体药代动力学模型;收集尽可能多患者的细菌药物敏感性试验结果(血和感染部位),进行PPK/PD研究;综合体外药效结果、药代动力学参数、细菌学疗效和临床转归,评价目前所用折点是否合适。

4.2 患者的经典 PK/PD 研究验证

选择一定例数细菌培养阳性患者,采集完整的药代动力学样本进行药物浓度测定,综合体外药敏结果、药代动力学参数、细菌学疗效和临床转归,对目前所用折点进行评价。但考虑到这种研究所入选患者例数有限,故其结果仅供参考。

在Ⅱ期临床试验阶段如果出现临床转归与药敏结果不符,则应参照临床结果适当调整折点,并将调整后新的临时折点用于下一阶段的试验,且继续验证。

5 本方案涉及基本概念

最低抑菌浓度(Minimal Inhibitory Concentration, MIC):在琼脂和肉汤稀释药物敏感性试验中抑制微生物可见生长的某种抗菌药物的最低浓度。

杀菌曲线(Time-kill Curves):反映抗菌药物随时间变化,对细菌杀灭程度改变的曲线。通常采用菌落计数法进行测定。将一定量细菌与不同浓度抗菌药物(1,2,4,8,16,32,64倍MIC)混合,取0,2,4,6,8,12,24 h培养物,进行菌落计数。以时间为横坐标,log CFU·mL⁻¹为纵坐标绘制杀菌曲线。

抗生素后效应(Post-antibiotic Effects, PAE):细菌暴露于抗菌药物后,在去除抗菌药物的情况下恢复生长,处于对数生长期时菌落数增加1个log值所需要的时间与对照菌相应时间之差≥0.5 h,即该抗菌药物具有PAE。

药代动力学(PK):应用药代动力学原理和计算公式定量描述药物的体内过程及体内药物浓度随时间变化规律的科学,简称药代动力学。**药效学**(PD):研究药物对病原菌作用特性的科学。

群体药代动力学(Population Pharmacokinetics, PPK):将经典的药代动力学模型与群体统计学模型结合,研究药物体内过程的群体规律、药代动力学参数的统计分布及其影响因素的科学。

蒙特卡洛模拟(Monte Carlo Simulation, MCS):将不同给药方案获得的药代动力学参数及特征性分布按照现有规律放大到大量人群,用这些虚拟人群参数,结合抗菌药物对病原菌的MIC值、已建立的PK/PD模型和靶值,计算不同的给药方案针对不同MIC值达到预期靶值的达标概率(Probability of Target Attainment, PTA)或对某种细菌达到靶值的累积反应分数(Cumulative Fraction of Response, CFR)。

野生型细菌(Wild-type Bacterial Strains):对常用的或作用机制相同的抗菌药物不具有任何获得性或选择性耐药的细菌。

流行病学界值(Epidemiological Cutoff, Ecoff):也

可称作野生型界值(Wild-type Cutoff, CO_{WT})或微生物学折点(Microbiological Breakpoint),根据抗菌药物对大量临床感染病例中分离菌株的MIC结果,进行统计分析得到。

PK/PD界值(CO_{PD}):即药代动力学(PK)和药效学(PD)界值,根据与临床疗效最为相关的PK/PD指数及靶值,使用蒙特卡洛模拟得到。

敏感(Susceptible, S):对感染部位使用推荐剂量时,该菌株能被通常可达到的抗菌药物浓度所抑制。

6 结语

即便经过临床试验阶段的验证,折点的最终确立还远未完成。临床折点考察的是推荐剂量、间期和给药途径下药物与病原菌的关系,且和感染部位、患者机体应答等相关。临床试验阶段,给药方案较单一,对进入研究的患者有严格要求,不利于从适合的结果中发现异常,且对于临时折点偏低的问题也不易发现。因此,即便药物上市后,对折点的验证仍需持续进行。由于同时获得相对应的临床和微生物资料较为困难,目前未见CLSI给出标准化方法,如何确定临床折点还需参照欧美、日本等一些实例,探索适合我国的切实可行方案。

参考文献:

- Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20: 391-408.
- Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterization of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off value [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12: 418-425.
- Asín-príeo E, Rodríguez-Gascón A, Isla A. Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents [J]. *J Infect Chemother*, 2015, 21: 319-329.
- Owens RC Jr, Shorr AF. Rational dosing of antimicrobial agents: pharmacokinetic and pharmacodynamics strategies [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2009, 66(Suppl. 4): S23-S30.
- Ambrose PG, Bhavnani SM, Rubino CM, et al. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44: 79-86.
- Amsterdam D. Antibiotics in Laboratory Medicine [M]. 6th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2015: 9-16.
- Andes D, Craig WA. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2002, 19: 261-268.
- 史军. 药代动力学和药效动力学在抗菌药物新药开发和临床治疗上的应用 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2007, 12: 121-133.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008 Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters: approved guideline - 3rd ed. [M]. CLSI document M23-A3 CLSI, Wayne, PA.

(本文编辑 戴荣源)