

药物致敏红细胞检测血清中阿莫西林药物抗体的应用

张民军¹, 宋胤², 吴明磊³, 徐丹⁴, 范道旺⁵

¹中国人民解放军第八六医院药剂科, ²病理科, 安徽 马鞍山 243100; ³江苏中济万泰生物医药有限公司, 江苏 江阴 214400; ⁴江苏力博医药生物技术股份有限公司, 江苏 江阴 214434; ⁵北京市红十字血液中心血型血清室, 北京 100088

[摘要] 目的:使用阿莫西林药物致敏红细胞检测血液样本中的阿莫西林药物抗体。方法:采用药物致敏红细胞与微柱凝胶间接抗人球蛋白试验对465例血液样本进行血型不规则抗体及阿莫西林药物抗体筛查。结果:465例血液样本中,血型不规则抗体筛查结果均为阴性;阿莫西林药物抗体阳性例数为25例,阳性率为5.376%(25/465),抗体效价为2~128。结论:药物致敏红细胞与微柱凝胶检测法相结合,建立了针对阿莫西林药物抗体的检测方法,可有效检测出人体血液样本中的药物抗体。

[关键词] 血型不规则抗体;阿莫西林药物抗体;抗体筛查

[中图分类号] R446.6

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2018)11-1651-03

doi:10.7655/NYDXBNS20181139

1953年首次提出,一种治疗癫痫的药物——美山妥因可能是免疫溶血性贫血的病因之一。截至目前,已报道超过130多种药物可导致药物免疫溶血性贫血(drug-induced immune hemolytic anemia, DIHA)^[1]。引起DIHA的机制与抗药物抗体的产生密切相关。传统对患者血样进行血型抗体与自身抗体的检测,并不能反映患者体内的抗药物抗体的水平及种类。

阿莫西林属青霉素类药物,是临床上抗感染的优先选择药物,其可以在泌尿系统、消化道和呼吸道感染疾病中起到良好的治疗效果。随着阿莫西林在临床的大量应用,许多病菌产生了相应耐药性,导致不能快速有效控制感染,随之而来的还有用药后的大量不良反应,例如消化道不适^[2]、皮肤反应^[3]、过敏性休克、损伤肾脏功能以及精神症状等。

目前临床DIHA病例日益增多,但尚无快速灵敏检测患者抗药物抗体的方法。本研究利用药物致敏红细胞结合微柱凝胶检测技术,建立针对阿莫西林药物抗体的检测方法,可有效检出人体内的药物抗体,为临床合理用药提供直接依据,避免DIHA的发生。

1 材料和方法

1.1 材料

样本来源为中国人民解放军第八六医院患者样本,共收集465例血液样本,其中有阿莫西林用

药史患者样本252例,无阿莫西林用药史患者样本123例,健康体检人群样本90例,取血浆进行检测。

注射用阿莫西林钠(批号16071002-2,哈尔滨哈药集团制药总厂),血型不规则抗体筛选红细胞试剂(批号201707003)、抗人球蛋白(抗IgG+C3d)检测卡(柱凝集法)(批号201702002)(江苏力博医药生物技术股份有限公司),阿莫西林药物致敏细胞(批号201707001)、阿莫西林药物抗体检测试剂卡(批号201707002)(江苏中济万泰生物医药有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 血型不规则抗体检测

试验前将患者血液标本和抗人球蛋白卡分别在专用离心机中离心备用。用血型分析用低离子强度盐溶液(low ionic strength salt solution, LISS)将血型不规则抗体筛选红细胞试剂配制成0.8%~1.0%的红细胞悬液。

取抗人球蛋白(抗IgG+C3d)检测卡,每份待检样本设3个孔,分别标记为I、II、III,每孔加入0.8%~1.0%血型不规则抗体筛选红细胞悬液各50 μL,待检者血浆各25 μL,混匀;置于免疫微柱孵育器中37℃孵育15 min;900 r/min 2 min,1 500 r/min离心3 min;离心结束后取出判定结果并记录。

1.2.2 阿莫西林药物抗体检测

阿莫西林药物致敏红细胞制备方法参考AABB实验手册^[4]。药物抗体检测方法采用微柱凝胶间接

抗人球蛋白法。将待检样本 3 000 r/min 离心 1 min, 取上层血浆。取阿莫西林药物抗体检测试剂卡, 每孔加入 2.0%~2.5% 药物致敏红细胞悬液各 25 μ L, 同时用 2.0%~2.5% O 型红细胞替代药物致敏红细胞作对照; 加入待检样本血浆 50 μ L, 混匀, 置试剂卡孵育器 (37 \pm 1) $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 900 r/min 离心 2 min, 1 500 r/min 离心 3 min; 30 min 内观察结果并记录, 每份待检样本设 3 个复孔, 同时对阳性结果做效价测定。另外, 选取 10 人份正常献血员血浆混合, 作为阴性对照。实验结果解释见表 1。

表1 实验结果解释

药物致敏红细胞		正常 2.0%~2.5% O 型红细胞		结果解释
待检血浆	阴性对照	待检血浆	待检血浆	
+	-	-	-	存在药物抗体
+	+	-	-	非特异性吸附
+	-	+	+	可能含有血型抗体
+	+	+	+	结果无效

2 结果

2.1 血型不规则抗体筛查结果

465 例血样标本检测血型不规则抗体, 筛查结果均为阴性。对 10 例正常献血员混合血浆进行血型不规则抗体检测, 筛查结果也为阴性。

2.2 阿莫西林药物抗体检测结果

465 例血液样本检测阿莫西林药物抗体, 阳性例数 25 例, 阳性率 5.376% (表 2)。其中有阿莫西林用药史血液样本 252 例, 阳性例数 21 例, 凝集强度为 1+~3+; 无阿莫西林用药史血液样本 123 例, 阳性例数 3 例, 凝集强度为 1+~1+^s; 健康体检人群样本 90 例, 阳性例数 1 例, 凝集强度 1+^s。阿莫西林药物致敏红细胞检测阴性对照标本 (10 人份献血员正常血浆混合), 结果为阴性。2.0%~2.5% O 型红细胞与血液样本反应, 结果无凝集, 为阴性。

表2 阿莫西林药物抗体检测结果

组别	总例数	阳性例数	阳性率 (%)
有阿莫西林用药史	252	21	8.333
无阿莫西林用药史	123	3	2.439
健康体检人群	90	1	1.111
总计	465	25	5.376

2.3 阳性结果抗体效价测定

对 25 例阳性结果样本进行抗体效价测定。抗体效价 2~128, 其中抗体效价为 2 的样本 5 例, 效价

为 4 的样本 12 例, 效价为 8 的样本 4 例, 效价为 16 的样本有 2 例, 效价为 64 的样本 1 例, 效价为 128 的样本 1 例。无阿莫西林药物用药史样本及健康体检人群样本抗体效价均为 2。

3 讨论

抗生素滥用已成全球最紧迫的公共卫生问题之一, 我国的形势更为严峻。据研究显示, 我国 2013 年抗生素总使用量约 16.22 万吨, 约占世界总使用量的 50%, 其中人用量 7.81 万吨, 兽用量 8.41 万吨, 千人每天使用量 157 g。同期美国消耗量则仅为 1.8 万吨, 其中人用量 0.34 万吨, 兽用量 1.46 万吨, 千人每天使用量 28.8 g。据统计, 我国每年有 8 万人直接或间接死于滥用抗生素^[4]。

DIHA 是指服用药物之后, 机体内产生相应的药物抗体, 导致机体出现发热、疼痛、血尿、呼吸困难、血压降低甚至昏迷症状。疑似 DIHA 的症状有血色素或血比积下降、网织红细胞上升、间接胆红素升高、直接抗人球蛋白检测阳性等。国外由于抗生素药物滥用引起的 DIHA 时有报道^[5-8]。国内对于药物抗体的关注刚刚起步, 尚缺乏相关系统研究。据文献报道, 181 例标本中, 检出抗青霉素类抗体 8 例, 头孢菌素类抗体 1 例, 其中 4 例有明显溶血反应^[9]; 另外有报道针对使用过抗生素药物的 327 例样本检测数据显示, 13 例 (4.0%) 检出存在抗药物抗体, 4 例有明显溶血反应, 其中阿莫西林占 2.5% (2/80)^[10]。

药物抗体的产生主要有 3 个机制: 药物与红细胞结合后转化为完全抗原, 表达免疫原性, 机体产生抗体破坏细胞; 或者抗体和药物形成免疫复合物, 吸附在细胞上, 产生针对药物或其代谢产物的抗体; 又或是药物仅和细胞松散结合, 不产生药物抗体, 产生自身抗体^[11]。阿莫西林为青霉素类药物, 其诱导药物抗体产生的机制为半抗原机制。阿莫西林药物作为小分子物质半抗原以共价键紧密结合于红细胞膜上, 并刺激机体产生针对药物的 IgG 抗体。肝脾的巨噬细胞系统清除结合抗体的红细胞, 引起血管外溶血。阿莫西林因其抗菌谱广, 在胃肠道吸收好, 且不易受大部分食物影响, 因此被广泛用于临床, 由此引起的 DIHA 也时有发生^[12]。

本研究采用药物致敏红细胞结合微柱凝胶法, 检测血浆中是否有药物抗体的存在。25 例药物抗体阳性样本血型不规则抗体筛查结果均为阴性, 说明样本中均不存在血型不规则抗体, 存在阿莫西林

药物抗体,在这种情况下,如果继续大量使用阿莫西林药物,会导致DIHA产生。药物抗体的产生与用药量、用药时间以及个体免疫功能密切相关,也有可能首次用药仅致敏,大量多次用药会激活免疫细胞产生大量药物抗体导致严重溶血,引起DIHA。因此,不同个体药物抗体效价存在差异。无阿莫西林药物用药史样本及健康体检人群样本抗体效价均为2,抗体效价较低。其原因可能是食用了含有抗生素的动物肉制品,动物产品残留抗生素的量一般极低,对机体的直接毒性也很小,但长期食用后,可在体内蓄积,导致人体菌群失调,刺激药物抗体的产生。所以抗药物抗体的产生不仅仅是长期、大量使用药物的结果,长期食用含有抗生素的肉制品也会影响抗药物抗体的产生。本研究尝试用微柱凝胶抗人球蛋白法检测抗药物抗体,该方法方便快捷,结果判断准确、客观,易于在临床上推广使用。

本研究所选取的阿莫西林为注射用药,相对胶囊、片剂等来说辅助成分较少,与刺激机体产生抗体的药物成分接近,因此检测结果具有参考价值。微柱凝胶抗人球蛋白法已广泛应用于检测血型不规则抗体,药物致敏红细胞技术与微柱凝胶检测体系相结合,建立针对阿莫西林药物抗体的检测方法,可有效检测出人体内的药物抗体,为临床治疗与安全用药提供判断依据。

目前对于药物抗体的研究,仅仅停留在对使用药物后出现了DIHA的患者进行检测,是一种补救措施。如果能建立一种稳定的药物抗体检测方法,则可以降低DIHA的发生率。另外,药物致敏红细胞不能够长时间保存,只能短时间内制备并进行检测,所以需要寻找一种能长期保存药物致敏红细胞的方法,以达到长期保存且能随时用于检测的目的。

[参考文献]

- [1] Garratty G. Immune hemolytic anemia caused by drugs [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2012, 11(4):635-642
- [2] 王德胜,钟秋明,钟星明. 阿莫西林的不良反应问题 [J]. *临床合理用药*, 2016, 9(2):80
- [3] 周伦,杨静,宋薇,等. 阿莫西林克拉维酸钾分散片的人体生物等效性研究 [J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(21):2530-2535
- [4] Wallace ME, Levitt JS. Current applications and interpretation of the direct antiglobulin test [M]. Arlington, VA: AABB, 1988:47-103
- [5] 王磊. 国家治理“抗生素滥用”究竟触动了谁的利益? [N]. *中国青年报*, 2004-04-29(2)
- [6] Kathiresan B, Wayne D, Derry D. The effect of intravenous antibiotics on anaemia in cystic fibrosis [J]. *J Cyst Fibros*, 2013, 12(6):828-829
- [7] Thiessen K, Kraleti S. Cephalexin - induced haemolytic anaemia: A case report [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2017, 42(5):615-617
- [8] Camara-Lemarroy CR, Flores-Cantu H, Calderon-Hernandez HJ, et al. Drug - induced haemolysis, renal failure, thrombocytopenia and lactic acidosis in patients with HIV and cryptococcal meningitis: a diagnostic challenge [J]. *Int J STD AIDS*, 2015, 26(14):1052-1054
- [9] Chen F, Zhan Z. Severe drug-induced immune haemolytic anaemia due to ceftazidime [J]. *Blood Transfusion*, 2014, 12(3):435-437
- [10] 杨启修,朱自严. 药物包被的红细胞检测血液中抗抗生素抗体 [J]. *现代免疫学*, 2010, 30(3):243-247
- [11] 曹盛. 微柱凝胶免疫实验检测患者血液中抗抗生素抗体 [J]. *中国社区医师*, 2012, 14(25):256-257
- [12] Garratty G. Target antigens for red-cell bound autoantibodies [M]. VA: American Association of Blood Banks, 1991:33-72

[收稿日期] 2018-04-20