

• 论 著 •

# 微柱凝胶法检测血液中两种抗菌药物诱导形成药物性抗体的研究<sup>\*</sup>

董 林,包 进,赵昕亚,徐 菲<sup>△</sup>

(南京医科大学附属南京医院/南京市第一医院输血科,江苏南京 210006)

**摘 要:****目的** 探讨微柱凝胶法检测头孢哌酮钠舒巴坦钠和哌拉西林钠舒巴坦钠诱导患者体内形成药物性抗体的可能性。**方法** 应用微柱凝胶法对 112 例头孢哌酮钠舒巴坦钠和 76 例哌拉西林钠舒巴坦钠使用者的血液标本进行抗人球蛋白试验和相应药物性抗体的检测。**结果** 使用药物之前所有患者标本中不规则抗体、直接抗人球蛋白试验、药物性抗体检测结果均为阴性。112 例头孢哌酮钠舒巴坦钠患者血浆中药物性抗体阳性有 35 例(31.25%),76 例哌拉西林钠舒巴坦钠患者血浆中药物性抗体阳性有 14 例(18.42%),差异有统计学意义( $P<0.05$ )。直接抗人球蛋白试验阳性的标本中,两种药物性抗体的阳性率分别为 47.82%和 46.15%,但差异无统计学意义( $P>0.05$ );直接抗人球蛋白试验阴性的标本中,头孢哌酮钠舒巴坦钠药物性抗体的阳性率(26.97%)明显高于哌拉西林钠舒巴坦钠药物性抗体的阳性率(12.70%),差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 临床使用头孢哌酮钠舒巴坦钠和哌拉西林钠舒巴坦钠对患者进行治疗,无论直接抗人球蛋白试验结果是否为阳性,都可能产生相应的药物性抗体;而头孢哌酮钠舒巴坦钠抗体形成的可能性高于哌拉西林钠舒巴坦钠。

**关键词:**头孢哌酮钠舒巴坦钠; 哌拉西林钠舒巴坦钠; 药物性抗体; 微柱凝胶法

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2020.20.011

**中图法分类号:**R457

**文章编号:**1673-4130(2020)20-2477-04

**文献标识码:**A

## Study on detection of drug antibodies induced by two antibiotics in plasma by micro-column gel testing method<sup>\*</sup>

DONG Lin,BAO Jin,ZHAO Xinya,XU Fei<sup>△</sup>

(Department of Blood Transfusion,Nanjing First Hospital,Nanjing Medical University,  
Nanjing,Jiangsu 210006,China)

**Abstract: Objective** To investigate the possibility of drug antibody formation in patients using cefoperazone sodium sulbactam sodium and piperacillin sodium sulbactam sodium by micro-column gel testing method. **Methods** The blood samples of 112 cefoperazone sodium and sulbactam sodium and 76 piperacillin sodium and sulbactam sodium users were analyzed by micro-column gel testing method to test the drug antibodies induced by two antibiotics. **Results** All tested results of irregular antibody,direct anti-human globulin test,and drug antibody tests were negative before the usage of drug. Among the 112 patients used cefoperazone sodium sulbactam sodium,35 cases (31.25%) had positive drug antibody in plasma. And in 76 patients used piperacillin sodium sulbactam sodium,14 cases (18.42%) had positive drug antibody in plasma,differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). In the positive samples of direct anti-human globulin test,the positive rates of the antibody production of two drugs were 47.82% and 46.15%,respectively,but differences were not statistically significant ( $P>0.05$ ). In the negative samples of direct anti-human globulin test,the positive rate of cefoperazone sodium sulbactam sodium drug antibody (26.97%) was significantly higher than that of piperacillin sodium and sulbactam sodium drug antibody (12.70%),and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** When cefoperazone sodium sulbactam sodium and piperacillin sodium sulbactam sodium has been used in clinic,no matter the results of direct anti-human globulin test is positive or not,drug antibodies may produce. While,the possibility of cefoperazone sodium sulbactam sodium antibody formation is higher than that of piperacillin sodium sulbactam sodium.

**Key words:**cefoperazone sodium sulbactam sodium; piperacillin sodium sulbactam sodium; drug anti-

<sup>\*</sup> 基金项目:江苏省输血协会英科新创科研基金项目(Js2018012)。

作者简介:董林,男,主管技师,从事医学检验与输血方面的研究。 <sup>△</sup> 通信作者,E-mail:1967026469@qq.com。

本文引用格式:董林,包进,赵昕亚,等.微柱凝胶法检测血液中两种抗菌药物诱导形成药物性抗体的研究[J].国际检验医学杂志,2020,41

body; micro-column gel testing method

药物诱导的免疫性溶血性贫血(DIIHA)是一种由 IgG 或者 IgM 介导细胞毒性抗体的Ⅱ型变态反应<sup>[1]</sup>,主要的发病机制是产生相应的抗药物抗体,随着药物再次使用可能导致溶血的发生,患者使用抗菌药物后发生此种不良反应较多<sup>[2]</sup>。目前,有关药物性抗体的研究报道较少,且检验科和输血科未开展对药物性抗体的检测,因此,患者发生溶血后,分析溶血发生的原因具有重要的意义。头孢哌酮钠舒巴坦钠和哌拉西林钠舒巴坦钠是临床上较为常用的β-内酰胺酶抑制剂复合抗菌药物,为了解药物性抗体形成的可能性,本文收集 188 例在本院住院期间使用头孢哌酮钠舒巴坦钠和哌拉西林钠舒巴坦钠治疗的患者血液标本,应用药物包被红细胞的方法,通过微柱凝胶抗人球蛋白检测技术检测药物性抗体存在的可能性,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择本院 2019 年 4—9 月收治的采用注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠和哌拉西林钠舒巴坦钠药物治疗的患者 188 例为研究对象,其中男 102 例,女 86 例;年龄 34~83 岁,平均(65.41±10.28)岁。纳入标准:使用头孢哌酮钠舒巴坦钠和哌拉西林钠舒巴坦钠治疗 3 d 以上;使用药物后标本中血红蛋白水平低于使用药物之前;使用药物之前不规则抗体、直接抗人球蛋白试验(DAT)、药物性抗体均为阴性;住院前均未接受抗菌药物的治疗。188 例患者中使用头孢哌酮钠舒巴坦钠治疗 112 例,使用哌拉西林钠舒巴坦钠治疗 76 例。

### 1.2 仪器与试剂

**1.2.1 试剂** 微柱凝胶抗人球蛋白检测卡、不规则抗体筛检细胞(人红细胞,长春博迅生物生物技术有限责任公司);注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠(辉瑞制药有限公司);注射用哌拉西林钠舒巴坦钠(湘北威尔曼制药股份有限公司);头孢哌酮钠舒巴坦钠抗体阴性和阳性对照检测试剂、哌拉西林钠舒巴坦钠抗体阴性和阳性对照检测试剂(江苏中济万泰生物医药有限公司);O 型红细胞(南京市血液中心健康献血者血源);0.9%氯化钠注射液(安徽双鹤药业有限责任公司);巴比妥缓冲液、磷酸盐(PBS)缓冲液(南京信帆生物技术有限公司)。

**1.2.2 仪器** 标本离心机(北京白洋医疗器械公司);微柱凝胶卡专用离心机、孵育器(长春博研科学仪器有限公司)。

**1.3 方法** 采集所有研究对象的空腹静脉血 3 mL,使用 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝。

**1.3.1 DAT** 浓缩红细胞用 0.9%氯化钠溶液稀释成浓度为 0.8%的红细胞悬液,取 50 μL 加入含有抗球蛋白试剂的微柱凝胶卡中,采用专用离心机离心后

判断 DAT 结果,对 DAT 阴性的标本进行血浆中药物性抗体的检测,对 DAT 阳性的标本检测血浆和放散液中的药物性抗体。

**1.3.2 不规则抗体筛查** 通过间接抗球蛋白试验(IAT)检测不规则抗体:将 50 μL 血浆标本和 50 μL 不规则抗体筛检细胞加入微柱凝胶抗球蛋白检测卡中,37℃孵育 15 min,900 r/min 离心 2 min,1 500 r/min 离心 3 min,读取结果。

**1.3.3 放散试验** 收集所有 DAT 阳性患者的标本,吸取 100 μL 浓缩红细胞,采用生理盐水洗涤 3 次,加入等体积的生理盐水,放入 56℃震荡水浴箱 10 min,迅速离心分离放散液。

**1.3.4 两种舒巴坦类抗菌药物包被红细胞的制备** 将药物 0.1 g 溶于 0.25 mL pH 为 9.6~9.8 的巴比妥缓冲液中,同时加入洗涤后的 O 型红细胞 170 μL;另取试管加入同样的洗涤后 O 型红细胞和巴比妥缓冲液。室温孵育 1 h,其间反复混匀数次,之后用 PBS 缓冲液洗涤红细胞 3 次,并配置成 5%的溶液,4℃冰箱保存 1 周。使用前用生理盐水洗涤 PBS 缓冲液中的 O 型红细胞后,并用生理盐水稀释成细胞浓度为 2%。

**1.3.5 药物包被红细胞检测** 抗体检测试剂盒阴性、阳性对照试剂各 50 μL 与 2%的红细胞(药物包被和无药物包被)25 μL 混合后加入微柱凝胶卡,37℃孵育 60 min,900 r/min 离心 2 min,1 500 r/min 离心 3 min。用头孢哌酮钠舒巴坦钠抗体以及哌拉西林钠舒巴坦钠抗体阴性和阳性对照检测试剂对药物包被的红细胞进行检测,从而判断包被成功与否。

**1.3.6 药物性抗体检测** 用生理盐水洗涤药物包被后的红细胞,并稀释成浓度为 2%的溶液。取微柱凝胶抗人球蛋白卡,从左到右标记 4 个孔,孔中加入相应的血浆/放散液和药物包被红细胞,见表 1。37℃孵育 60 min,900 r/min 离心 2 min,1 500 r/min 离心 3 min,判断结果。仅有第 1 孔加入患者血浆/放散液和药物包被 O 型红细胞中出现凝集现象,为药物性抗体阳性。

表 1 药物性抗体检测的微柱凝胶卡孔中所加入的血浆和红细胞

| 微柱凝胶抗人球蛋白卡 | 血浆/放散液(50 μL)  | 红细胞(25 μL)   |
|------------|----------------|--------------|
| 第 1 孔      | 患者血浆/放散液       | 药物包被 O 型红细胞  |
| 第 2 孔      | 患者血浆/放散液       | 无药物包被 O 型红细胞 |
| 第 3 孔      | 混合的 O 型红细胞对应血浆 | 药物包被 O 型红细胞  |
| 第 4 孔      | 混合的 O 型红细胞对应血浆 | 无药物包被 O 型红细胞 |

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件对数据进行分析。计数资料采用百分数表示,组间比较采用χ<sup>2</sup>

检验或 Fisher 精确检验;以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不规则抗体筛查 188 例血浆标本不规则抗体筛查结果均为阴性。

2.2 DAT 检测 188 例标本中 DAT 阳性有 36 例,其中头孢哌酮钠舒巴坦钠药物使用者 23 例阳性,哌拉西林钠舒巴坦钠药物使用者 13 例阳性。

2.3 药物包被红细胞检测 仅有第 3 孔加入阳性对照和药物包被红细胞出现凝集现象,为阳性,表示药物包被红细胞成功。其余 3 孔均无凝集现象,为阴性。见表 2。

| 表 2 药物包被红细胞的结果 |        |          |     |
|----------------|--------|----------|-----|
| 微柱凝胶抗人球蛋白卡     | 对照     | 红细胞      | 结果  |
| 第 1 孔          | 阴性对照试剂 | 药物包被红细胞  | 无凝集 |
| 第 2 孔          |        | 无药物包被红细胞 | 无凝集 |
| 第 3 孔          | 阳性对照试剂 | 药物包被红细胞  | 凝集  |
| 第 4 孔          |        | 无药物包被红细胞 | 无凝集 |

2.4 两种药物性抗体阳性率的比较 头孢哌酮钠舒巴坦钠药物性抗体的阳性率(31.245%)高于哌拉西林钠舒巴坦钠药物性抗体的阳性率(18.42%),差异有统计学意义( $P<0.05$ )。而 DAT 阳性的标本中,头孢哌酮钠舒巴坦钠药物性抗体阳性率(47.82%)略高于哌拉西林钠舒巴坦钠药物性抗体的阳性率(46.15%),但差异无统计学意义( $P>0.05$ );DAT 阴性标本中,头孢哌酮钠舒巴坦钠药物性抗体的阳性率(26.97%)高于哌拉西林钠舒巴坦钠药物性抗体的阳性率(12.70%),差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 3。

| 表 3 两种药物性抗体的阳性率对比 |          |                     |        |          |
|-------------------|----------|---------------------|--------|----------|
| 患者用药情况            | <i>n</i> | 药物性抗体阳性( <i>n</i> ) | 阳性率(%) | <i>P</i> |
| 头孢哌酮钠舒巴坦钠         | 112      | 35                  | 31.25  | 0.049    |
| 哌拉西林钠舒巴坦钠         | 76       | 14                  | 18.42  |          |
| DAT 阳性的头孢哌酮钠舒巴坦钠  | 23       | 11                  | 47.82  | 0.923    |
| DAT 阳性的哌拉西林钠舒巴坦钠  | 13       | 6                   | 46.15  |          |
| DAT 阴性的头孢哌酮钠舒巴坦钠  | 89       | 24                  | 26.97  | 0.034    |
| DAT 阴性的哌拉西林钠舒巴坦钠  | 63       | 8                   | 12.70  |          |

2.5 DAT 阳性放散液中不规则抗体、药物性抗体检测 36 例 DAT 阳性标本的放散液中不规则抗体检查结果均为阴性,11 例头孢哌酮钠舒巴坦钠药物性抗体阳性的放散液中药物性抗体检测结果也为阳性,6 例哌拉西林钠舒巴坦钠药物抗体阳性的放散液中药物性抗体检测结果也为阳性。

3 讨 论

DIHA 是一种较为罕见的药物不良反应<sup>[3]</sup>,它与

药物活性无关,主要是由于长时间或者与大量的药物接触造成的<sup>[1]</sup>。头孢菌素类抗菌药物是临床应用较为广泛的药物之一,约有 80%会导致药物性溶血性贫血<sup>[4]</sup>,其中最为明显的是第 2 代或者第 3 代头孢菌素<sup>[5]</sup>。头孢哌酮是第 3 代头孢菌素类抗菌药物,通过抑制细菌细胞壁合成发挥抗菌作用,一直以来被广泛应用于临床,其对造血系统的毒性较为明确,主要表现为血小板减少和凝血功能障碍,贫血的报道较为少见<sup>[6-7]</sup>。王晴<sup>[8]</sup>认为第 3 代头孢菌素造成血红蛋白减少的原因为其可能引起骨髓造血功能停滞,马春娅等<sup>[9]</sup>研究发现患者使用头孢哌酮钠舒巴坦钠后,出现血红蛋白下降、血小板降低、DAT 阳性、溶血指标上升等情况,认为其血浆中存在头孢菌素类药物的抗体。TASCH 等<sup>[10]</sup>研究指出,头孢菌素类抗菌药物引起药物性溶血主要是体内存在药物抗体。哌拉西林钠舒巴坦钠是一种青霉素和酶抑制剂的复合制剂,对各种细菌都有较好的抗菌活性,广泛用于重症感染患者的治疗。LEGER 等<sup>[11]</sup>研究发现,73 例 DIHA 患者中有 13 例使用了哌拉西林,这 13 例患者均出现了急性溶血反应,DAT 结果也为阳性。LOHIYA 等<sup>[12]</sup>认为哌拉西林诱导贫血的机制可能是由于抗体/半抗原与红细胞膜表面蛋白共价结合后形成半抗原/蛋白复合物,从而导致体内抗体的产生,破坏红细胞从而超过骨髓的代偿能力。LEGER 等<sup>[11]</sup>报道,美国近 50%使用哌拉西林的随机住院患者体内可产生哌拉西林药物性抗体,阳子骥等<sup>[13]</sup>也报道哌拉西林比较容易产生相应的药物性抗体。

微柱凝胶抗人球蛋白检测技术是将间接抗人球蛋白技术和凝胶的分子筛作用结合的一种血清学分析技术,当血清中有 IgG 或 IgM 类药物性抗体存在,可以与相应的药物包被红细胞发生反应,在凝胶中抗人 IgG 抗体的桥连作用下,形成红细胞的凝块,离心后并不能通过凝胶从而沉积在凝胶上端,未凝集的红细胞沉积到凝胶底部<sup>[14]</sup>,从而可以反映药物性抗体的存在。目前输血科通常运用该技术检测与血型系统相关的意外抗体。本研究中所有血浆标本及 DAT 阳性标本的放散液中不规则抗体均为阴性,因此,排除检测过程中由于血型相关意外抗体阳性导致假阳性的可能。一直以来 DAT 阳性的标本被认为和药物性抗体有着较为密切的关系<sup>[15]</sup>,本研究发现,DAT 阳性标本中,头孢哌酮钠舒巴坦钠和哌拉西林钠舒巴坦钠的药物性抗体在血浆和放散液中均有存在;而对于 DAT 阴性的标本,也发现两种药物相应的药物性抗体,可能原因如下:一是 DAT 结果阳性可能并不是药物性抗体导致的;二是由于在既往报道中患者均出现了部分临床症状,此时患者已使用抗菌药物进行治疗,从而导致红细胞表面吸附较多的药物性抗体,引起 DAT 结果阳性。同时,本研究结果显示,头孢哌酮钠舒巴坦钠药物性抗体以及 DAT 阴性标本中头孢哌

酮钠舒巴坦钠药物性抗体阳性率均高于哌拉西林钠舒巴坦钠药物性抗体的阳性率,说明头孢哌酮钠舒巴坦钠药物性抗体形成的可能性较大;而在 DAT 阳性标本中,两者的阳性率相似,均在 50%左右,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。笔者认为当 DAT 出现阳性时,患者已经出现临床症状,或者输血科配血过程中已经出现无法相合的情况,此时药物性抗体的产生可能与所用的药物并无关系。

4 结 论

综上所述,临床使用头孢哌酮钠舒巴坦钠和哌拉西林钠舒巴坦钠过程中,无论 DAT 结果是否为阳性,都可能产生相应的药物性抗体;而头孢哌酮钠舒巴坦钠抗体形成的可能性高于哌拉西林钠舒巴坦钠。

参考文献

[1] RENARD D,ROSSELET A. Drug-induced hemolytic anemia: pharmacological aspects[J]. Transfus Clin Biol, 2017,24(3):110-114.

[2] GARRATTY G, ARNDT P A. An update on drug-induced immune hemolytic anemia[J]. Immunohematology, 2007,23(3):105-119.

[3] MAYER B,BARTOLMAS T,YUREK S,et al. Variability of findings in drug-induced immune haemolytic anaemia: experience over 20 years in a single centre[J]. Transfus Med Hemother, 2015,42(5):333-339.

[4] 王众海,刘贤忠. 头孢唑吩致急性溶血 1 例[J]. 健康研究, 2017,37(4):467-468.

[5] VISHWAKARMA S, CHAURASIA R, SUBRAMANIAN A,et al. Autologous blood transfusion as a Life saving measure for trauma patient with fracture femur and

drug induced hemolytic anemia: a case report[J]. Indian J Hematol Blood Transfus, 2017,33(2):293-297.

[6] 徐琦. 探讨注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠的不良反应[J]. 中国现代药物应用, 2017,11(20):102-103.

[7] 蒋红,陈井霞,权秦,等. 头孢哌酮/舒巴坦钠对凝血功能的影响及处理[J]. 药学服务与研究, 2016,16(4):300-303.

[8] 王晴. 头孢他啶引起血细胞、血红蛋白、血小板减少 2 例[J]. 当代医学, 2008,14(24):163-164.

[9] 马春娅,张晓娟,罗园园,等. 头孢哌酮钠舒巴坦钠致药物溶血性贫血的分析[J]. 临床输血与检验, 2018,20(1):10-12.

[10] TASCH J, GONZALEZ-ZAYA P. Ceftriaxone-Induced Hemolytic Anemia in a Jehovah's Witness[J]. Am J Case Rep, 2017,21(18):431-435.

[11] LEGER R M, ARNDT P A, GARRATTY G. Serological studies of piperacillin antibodies[J]. Transfusion, 2008,48(11):2429-2434.

[12] LOHIYA G S, TAN-FIGREROA, KRISHNA V. Piperacillin-induce immune hemolysis presenting with tachycardia and cardiac arrest [J]. Case Rep Med, 2011, 2011: 816497-816501.

[13] 阳子骥,莫柱宁,焦伟,等. 哌拉西林他唑巴坦钠诱导免疫性溶血反应的研究[J]. 中国临床新医学, 2018,11(12):1227-1229.

[14] 谢作听,季丽丽,陶志华,等. 血清抗头孢菌素和抗青霉素 IgG 和 IgM 抗体联合检测分析[J]. 临床检验杂志, 2008,26(2):132-134.

[15] 李翠莹,范秀. 药物性抗体引起免疫性溶血反应的探讨[J]. 临床输血与检验, 2018,20(1):4-6.

(收稿日期:2020-01-21 修回日期:2020-04-28)

(上接第 2476 页)

[15] 颜珠苗,鲁衍强,李瑛,等. 琼海市汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性分布研究[J]. 海南医学院学报, 2013,19(1):18-20.

[16] 王敏,鲁衍强,李瑛,等. 建始地区汉族女性叶酸代谢通路关键酶基因 MTHFR、MTRR 单核苷酸多态性分布特征调查[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016,24(7):13-16.

[17] 向长港,鲁衍强,马少杰,等. 眉山市 656 例汉族女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性分析[J]. 山东医药, 2015,55(14):22-25.

[18] 钱碧霞,陈鹏龙,鲁衍强,等. 丽水地区汉族女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019,27(2):136-138.

[19] 王辉,鲁衍强,王宏,等. 贵州六盘水市彝族与汉族女性叶酸代谢关键酶基因多态性特征分布[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2017,37(11):915-917.

[20] WANG X, WEI H, TIAN Y, et al. Genetic variation in folate metabolism is associated with the risk of conotruncal heart defects in a Chinese population[J]. BMC Pediatr, 2018,18(1):287-291.

[21] 辛增莲,代文成,韩锐,等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与精子 DNA 完整性相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018,39(18):2215-2216.

[22] MOHANRAJ P S, RAHAT B, MAHAJAN A, et al. Temporal expression of genes involved in folate metabolism and transport during placental development, pre-eclampsia and neural tube defects[J]. Mol Biol Rep, 2019,46(3):3193-3201.

[23] 冯婉琴,马颖. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与妇科疾病相关性的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2019,35(10):1677-1680.

[24] LIN J, CAO S, WU Y, et al. Genetic polymorphisms in folate metabolism as risk for Down syndrome in the southern China[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2019,32(12):2030-2035.

[25] 周漫,刘欢,李艳. 武汉市汉族女性 MTHFR C677T 基因多态性分布研究[J]. 中国热带医学, 2017,17(11):1063-1066.

(收稿日期:2020-01-02 修回日期:2020-04-15)