文章编号:1000-5404(2009)13-1299-03

论著

大环内酯类药物对肺炎链球菌的防耐药突变浓度的研究

邢 茂[1],刘同华[1],王 琴[2] ([1]第三军医大学新桥医院药剂科,重庆 400037;[2]重庆市中医研究院药物研究部,重庆 400013)

摘 要:目的 测定大环内酯类药物对肺炎链球菌的防耐药突变浓度(mutant prevention concentration, MPC),扩增突变选择窗(mutant selection window, MSW)内筛选的耐药突变体的耐药基因,以了解肺炎链球菌对大环内酯类药物耐药的发生机制。**方法** 肉汤法富集10^{10}CFU/ml ATCC49619,采用平板二倍稀释法测定罗红霉素和阿奇霉素对ATCC49619的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)、MIC_{99}、初测MPC(Provisional MPC,MPCpr)以及MPC。PCR法扩增不同药物筛选出的耐药突变株的耐药基因ermB和mefA并测序。**结果** 罗红霉素和阿奇霉素对ATCC49619的MPC分别为0.80 μg/ml和0.51 μg/ml,细菌耐药选择指数(MPC/ MIC_{99})为5.0和3.9。筛选出的耐药突变株中扩增出ermB耐药基因。**结论** 通过调整药物剂量,可以限制对大环内酯类耐药的肺炎链球菌突变体的富集。肺炎链球菌对大环内酯类药物耐药机制可能与携带ermB基因有关。

关键词: 防耐药变异浓度; 罗红霉素; 阿奇霉素; 肺炎链球菌
中图法分类号: R378.12; R969; R978.15 **文献标识码:** A

Study of mutant prevention concentrations of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae*

XING Mao[1], LIU Tong-hua[1], WANG Qin[2] ([1] Department of Pharmacy, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Drug Research, Chongqing Institute of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400013, China)

Abstract: Objective To detect the mutant prevention concentration (MPC) of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae*, to amplify the resistance gene of *Streptococcus pneumoniae* mutants selected in the mutant selection window (MSW), and to investigate the mechanism in the resistance of *Streptococcus pneumoniae* to macrolides. **Methods** The *Streptococcus pneumoniae* strain ATCC49619 was enriched in broth, and the bacterial concentrations were adjusted to 10^{10} colony forming units per milliliter. The minimal inhibitory concentration (MIC), MIC for 99 % of input cells (MIC_{99}), provisional MPC (MPCpr), and MPC of roxithromycin and azithromycin for *Streptococcus pneumoniae* were determined by agar plate dilution method. The ermB and mefA of *Streptococcus pneumoniae* mutants selected in the MSW were obtained by PCR method and sequencing. **Results** The MPCs of roxithromycin and azithromycin for ATCC49619 were 0.80 μg/ml and 0.51 μg/ml, and the MPC/MIC_{99} were 5.0 and 3.9. The ermB gene was detected in Streptococcus pneumoniae mutants selected in the MSW. **Conclusion** Adjustment of the drug dose may limit the enrichment of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutant. The mechanism in the resistance of *Streptococcus pneumonia* to macrolides may be associated with ermB genes carried.

Key words: mutant prevention concentration; roxithromycin; azithromycin; *Streptococcus pneumoniae*

肺炎链球菌是社区获得性肺炎的重要病原菌,常引起细菌性肺炎、鼻窦炎和中耳炎,亦可导致败血症、脑膜炎等,是人类感染性疾病的重要致病菌之一[1]。随着大环内酯类抗生素广泛应用于临床,肺炎链球菌对大环内酯类抗生素耐药率不断增高,目前已成为全球性问题。因此如何降低肺炎链球菌对大环内酯类抗生素耐药率,延长药物临床使用寿命是亟需解决的问题。Drlica等[2]在大量实验基础上提出了防突变浓度(mutant prevention concentration ,MPC)理论,为在控制感染的同时降低耐药突变菌株的选择性扩增提供了新的思路。本试验测定罗红霉素和阿奇霉素对肺炎链球菌的MIC和MPC,并用PCR扩增耐药突变株的相关耐药基因,为临床合理用药提供参考。

基金项目: 重庆市自然科学基金(2006BB5069)
Supported by the National Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB5069)

作者简介: 邢 茂,男,山西省太原市人,博士,主管药师,主要从事医院药学方面的研究。电话:(023)68774720,E-mail: xingmao1997@sina.com
通信作者: 刘同华,电话:(023)68774633,E-mail:yddxcq2007@163.com

收稿日期: 2009-03-10;**修回日期:** 2009-03-20

1 材料与方法

1.1 细菌与培养基

肺炎链球菌(ATCC49619)由新桥医院检验科惠赠,M-H 肉汤、M-H 琼脂、胰酶大豆肉汤和胰酶大豆琼脂均购自北京路桥技术有限公司,脱纤维马血由重庆庞通医疗有限公司提供。

1.2 抗菌药物

罗红霉素(含量96.7%,批号060204-1)和阿奇霉素(含量95.5%,批号070332-2)由浙江国邦药业有限公司生产。

1.3 仪器与试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化有限公司,*Taq* 酶和 dNTP 购自大连宝生物工程公司,9600 型 PCR 仪购自美国 PE 公司,DYY-ⅢA 型电泳仪购自北京六一仪器厂,凝胶成像系统购自上海天能公司。

1.4 最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)和 MIC99 的测定[3]

采用血琼脂平板稀释法测定各抗菌药物的 MIC。以 MIC 为基准,线性递减(20%)抗菌药物浓度至 1/2 MIC 的含药 M-H 琼脂平板。将生长至稳态的 ATCC49619 菌液先调整为 3.0×10^8 CFU/ml,再 10 倍倍比稀释至 3.0×10^3 CFU/ml。接种不同浓度菌液 10 μl 至含药 M-H 血琼脂平板,37 ℃过夜培养,选择合适菌液浓度的点进行菌落计数,计算 MIC_{99}。

1.5 防耐药突变体选择浓度(mutant prevention concentration, MPC)测定[4]

以各抗菌药物 MIC 为基准,2 倍倍比递增药物浓度,制备不同浓度的含药胰酶大豆琼脂血平板。在含5%马血的胰酶大豆肉汤中富集 ATCC49619 至浓度为 3.0×10^{10} CFU/ml,取 100 μl 菌液接种于含药的胰酶大豆琼脂血平板上,每个浓度4个平板使每个药物浓度平板的细菌总接种量为 1.2×10^{10} CFU。于37 ℃孵育,以72 h 时没有菌落生长的最低药物浓度为初测 MPC(Provisional MPC, MPCpr)。再以 MPCpr 为基准线性增减(20%)抗菌药物浓度重新配制含药胰酶大豆琼脂血平板,以72 h 不出现菌落生长的最低药物浓度为 MPC。MPC 与 MIC_{99} 之比称为选择性指数(selection index, SI),SI 越小,MSW 越窄,抗菌药物抑制耐药突变菌株选择的能力越强

1.6 耐药突变株的选择及基因组 DNA 的提取

按照 1.5 的方法富集细菌之后,接种 100 μl 菌液至 2×MIC,4×MIC,6×MIC…MPC 浓度的含药胰酶大豆琼脂血平板,37 ℃培养72 h,挑选在不同浓度平板上长出的细菌培养2代后,接种于原药物浓度的平板上能继续生长的即为耐药突变株。将筛选出的耐药突变菌用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取细菌 DNA 作为 PCR 的模板。

1.7 耐药突变株 ermB 和 mefA 基因的 PCR 扩增及测序

用于检测 ermB 的上游引物为 5′-CGAGTGAAAAAGTACTCAACC-3′,下游引物为 5′-GGCGTGTTTCATTGCTTGATG-3′,产物大小为 616 bp。mefA 的上游引物为 5′-AGTATCATTAATCACTAGTGC-3′,下游引物为 5′-TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG-3′,产物大小为 348 bp。由上海生工生物工程技术有限公司合成。50 μl 反应体系中,10×buffer(Mg^{2+} Plus)5 μl,2.5 mmol/L dNTP 1 μl,*Taq* DNA 聚合酶 5 U,DNA 模板 2 μl,正反向引物各 1 μl,ddH_2O 补足体积。扩增条件:预变性 94 ℃ 5 min,解链后变性 94 ℃ 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 7 min。扩增产物经含 EB 的 1% 琼脂糖凝胶电泳后照相,PCR 扩增产物送上海生工生物工程技术有限公司纯化后测序。PCR 产物的测序结果在 GeneBank 中(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)进行序列比对分析。

2 结果

2.1 2 种大环内酯类药物对 ATCC49619 的 MIC、MIC99、MPC、MPCpr

罗红霉素和阿奇霉素对 ATCC49619 的 MIC_{99} 值:罗红霉素(0.16 μg/ml) > 阿奇霉素(0.13 μg/ml)。MPC 值:罗红霉素(0.80 μg/ml) >阿奇霉素(0.51 μg/ml)。见表1。

2.2 2 种大环内酯类药物对 ATCC49619 的 SI

罗红霉素和阿奇霉素对 ATCC49619 的 SI 值:罗红霉素(5.0) >阿齐霉素(3.9)。见表1。

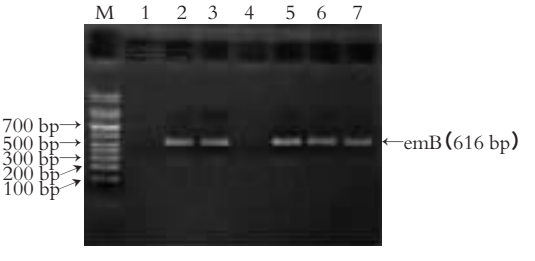
表1 两种大环内酯类药物对 ATCC49619 的 MIC 和 MPC 的测定结果

抗菌药物	MIC(μg/ml)	MIC_{99}(μg/ml)	MPCpr(μg/ml)	MPC(μg/ml)	SI
罗红霉素	0.16	0.12	1.0	0.80	5.0
阿奇霉素	0.13	0.10	0.64	0.51	3.9

2.3 PCR 检测结果

高、中药物浓度(0.64、0.51 μg/ml)的罗红霉素筛选出的耐药突变菌株扩增出 ermB 基因。低药物浓度(0.41 μg/ml)的罗红霉素筛选出的耐药突变菌未扩增出 ermB 基因。高、中、低浓度(0.41、0.33、0.26 μg/ml)阿奇霉素筛选出的耐药突变菌株均扩增出 ermB 基因。琼脂糖电泳结果见图1。

ermB 基因产物测序结果显示所测序列全长 616 bp,经过在 NCBI 上进行同源性比较,耐药突变株发现与注册号为 NC_011072.1 的 ermB 核苷酸序列一致。不同浓度罗红霉素和阿奇霉素筛选出的突变株均未扩增出 mefA 基因。



M:标准;1:未经药物处理的肺炎链球菌 ATCC49619;2~4:高、中、低浓度罗红霉素筛选的耐药突变体的 ermB 基因扩增片段;5~7:高、中、低浓度阿奇霉素筛选的耐药突变体的 ermB 基因扩增片段

图1 ermB 基因扩增产物的电泳图

3 讨论

MPC 是指抑制细菌耐药突变体被选择性富集所

需的最低抗菌药物浓度,它是严格限制耐药突变株选择性扩增的抗菌药物浓度阈值。细菌发生耐药突变并在菌群中获得选择性优势生长,是细菌产生耐药的必需条件,药物浓度高于 MPC 时,细菌必须经历第 2 次突变才能耐药。然而细菌自发突变的频率很低,平均仅为 10^{-7}(10^{-8} ~ 10^{-6})。因此要发生 2 次突变,细菌数量需达到 10^{14} CFU/ml,但是人体感染部位细菌数最大为 10^{10} CFU/ml,所以不会出现 2 次突变菌株,将没有双重突变菌株可供选择从而限制细菌耐药发生。MIC 与 MPC 之间的浓度范围定义为 MSW,只有抗菌药物浓度在病原菌的 MSW 内时,耐药突变株才会被选择性富集扩增。抗菌药物 SI 越小,意味着 MSW 越窄,抑制耐药突变株选择的能力越强。本研究中罗红霉素和阿奇霉素对 ATCC49619 的 MIC 值较小,表明其对肺炎链球菌的抗菌活性较强。将 MPC 结果结合药代动力学参数可见,罗红霉素的 MPC > C_{max}[单剂量口服 300 mg 的 C_{max}为(8.54 ± 1.95) μg/ml][5],阿奇霉素的 MPC 与 C_{max}近似[单剂量口服 500 mg 的 C_{max}后(0.56 ± 0.13) μg/ml][6],表明临床常用剂量可使血药浓度在大部分治疗时间内高于或接近 MPC。由于两种药物对 ATCC49416 的 MIC 有差异,单独用 MPC 不能直接反映其防耐药突变的能力,采用 SI 则可直接反映其防耐药突变能力。结果可见罗红霉素和阿奇霉素对 ATCC49619 的 SI 值较小,表明两者的突变选择窗较窄。因此通过调整药物剂量可防止药物血药浓度落在 MSW 内从而限制耐药突变株富集。

肺炎链球菌对大环内酯类抗生素耐药主要的机制为 ermB 基因编码甲基化酶的核糖体甲基化作用和 mefA 基因编码的红霉素外排泵构成的外排系统,ermB 基因编码的核糖体甲基化酶可使肺炎链球菌 23SrRNA 的 2058 位的腺嘌呤残基 N-6 位二甲基化,从而使大环内酯类抗生素与核糖体作用位点的亲和力下降为 1/10 万。可引起大环内酯类抗生素高水平耐药。由 mefA 基因编码的外排泵膜相关蛋白构成外排泵可将进入细胞内的大环内酯类药物泵出细胞外而产生低水平耐药[7,8]。本试验不同药物浓度的罗红霉素和阿奇霉素筛选出的耐药突变株携带的耐药基因为 ermB 基因,没有扩增出 mefA 耐药基因,说明体外试验在 MSW 内筛选出的耐药株与核糖体靶位改变有关而与细菌主动外排系统机制无关。

参考文献:

[1] 张　巧, 马千里, 李　琦, 等. 肺炎链球菌黏附素 A 基因疫苗的构建及对小鼠鼻咽部肺炎链球菌携带的防御作用[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(8): 739 - 742.

[2] Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis updated[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(5): 681 - 688.

[3] Firsov A A, Smirnova M V, Strukova E N, *et al*. Enrichment of resistant Staphylococcus aureus at ciprofloxacin concentrations simulated within the mutant selection window: bolus versus continuous infusion [J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(6): 488 - 493.

[4] Firsov A A, Lubenko I Y, Smirnova M V, *et al*. Enrichment of fluoroquinolone - resistant Staphylococcus aureus: oscillating ciprofloxacin concentrations simulated at the upper and lower portions of the mutant selection window[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(6): 1924 - 1928.

[5] 陈瑞玲, 赵志刚, 李东梅. 阿奇霉素片在健康人体的相对生物利用度和药代动力学[J]. 中国临床药理学杂志, 2007, 23(2): 130 - 132.

[6] 尤海生, 董亚琳, 王茂义, 等. 罗红霉素胶囊在人体的药代动力学及生物等效性[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2007, 28(4): 392 - 394,401.

[7] Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in Streptococcus pneumoniae[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(9): 2727 - 2734.

[8] 冯羡菊,罗　予. 红霉素耐药葡萄球菌的克林霉素耐药表型和基因型检测[J]. 郑州大学学报:医学版,2008,43(3):591 - 594.

(编辑　龙　亮)

《军医大学学报》(英文版)欢迎投稿

Journal of Medical Colleges of PLA 是由 3 所军医大学和南方医科大学共同主办的、国内外公开发行的综合性医学学术类英文期刊,是中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库、重庆维普数据库。从 2007 年开始,本刊电子版由全球著名的科技出版集团爱思唯尔(Elsevier)负责海外发行,全文已进入 ScienceDirect 全文数据库,期刊网址 http://www.elsevier.com/locate/jmcpla。国内统一刊号:CN31 - 1002/R,国际标准刊号:ISSN 1000 - 1948。双月刊。设有论著、技术与方法、个案报道、交流等栏目。若无彩图,无需缴纳版面费;亦不收取审稿费;无稿酬。投稿要求:中(或大摘要)、英文稿各 1 份,照片提供 3 份。电子投稿 E-mail:gangela@mail.tmmu.com.cn。照片需以附件形式单独提供 JPG 或 TIF 格式。电子投稿请注明英文版。

联系地址:重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部(400038)　　**电话**:(023)68752782