

不同 pH 值条件下 3 种大环内酯类抗菌药物的抗菌活性及耐药性

高慧莉¹, 罗光明^{2△} (第三军医大学第一附属医院: 1. 药剂科; 2. 呼吸科, 重庆 400038)

【摘要】 目的 不同 pH 值条件下 3 种大环内酯类药物对金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌的耐药性和最小抑菌浓度(MIC)。 **方法** 在 pH6.0、pH7.0 和 pH8.0 条件下, 采用肉汤稀释法分别检测大环内酯类抗菌药物对临床分离金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌 MIC 及细菌耐药性。 **结果** 随着 pH 值的增加, 大环内酯类抗菌药物对金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌的 MIC 值均有不同程度的降低, 并呈一定的依赖效应, 其中罗红霉素和阿奇霉素的抑菌活性强于红霉素; 体外诱导试验表明, 在所有试验 pH 值条件下, MIC 值均有所增加, 但是随着 pH 值的增加细菌的 MIC 值逐渐降低。 **结论** 大环内酯类抗菌药物的 MIC 随培养基 pH 值升高而逐渐降低, 在一定 pH 值范围内大环内酯类抗菌药物可提高金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌的抗菌作用。

【关键词】 大环内酯类; 抗菌活性; 细菌耐药性; pH 值

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.18.017 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)18-2690-04

Effect of different pH on antibacterial activity and drug resistance of macrolide antibiotics GAO Hui-li¹, LUO Guang-ming^{2△} (1. Department of Pharmacy; 2. Department of Respiration, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of staphylococcus aureus and streptococcus pyogenes on the drug resistance and the minimal inhibition concentration (MIC) of macrolide antibiotics under the different pH value conditions. **Methods** The broth dilution method was used to detect the drug resistance and MIC of macrolide antibiotics to clinically isolated staphylococcus aureus and streptococcus pyogenes. **Results** The drug resistance and MIC of macrolide antibiotics to staphylococcus aureus and streptococcus pyogenes were decreased with enhance of pH value in certainly dose-dependent manner. In addition, the inhibition activity of roxithromycin and azithromycin were stronger than that of erythromycin. The in vitro study indicated that the MIC values were increased in all the experiment pH conditions, but the MIC values gradually were decreased with augment of pH values. **Conclusion** The MIC values of macrolide antibiotics are gradually decreased with augment of pH values in culture medium, and macrolide antibiotics can improve the antibacterial activity of staphylococcus aureus and streptococcus pyogenes in certain pH values condition.

【Key words】 macrolides; antibacterial activity; bacterial resistance; pH values

抗菌药物的体外活性和体内药代动力学对细菌生长培养基或人体体液的 pH 值敏感。生物被膜可以保护细菌抵御抗菌药物的杀伤和逃逸宿主的免疫, 同时膜内的细菌在适宜的条件下又可以从膜内扩散游离, 引起机体的再次感染, 给临床治疗带来困难^[1]。有文献认为, 大环内酯类药物如 14-元环大环内酯类药物红霉素、克拉霉素、罗红霉素及 15-元环大环内酯类药物阿奇霉素, 可抑制生物被膜合成, 促进抗菌药物渗透^[2]。大环内酯类含有 1 个第 3 位可离子化的氨基糖^[3-4]。因此, 在酸性培养基中, 大环内酯分子因被离子化而降低到达细菌细胞内的数量, 从而导致抗菌药物最小抑菌浓度(MIC)的增加^[5]。与红霉素、罗红霉素相反, 阿奇霉素含有 1 个二甲氨基^[6]。这个第 2 位可离子化的基团有一个较高的 pKa, 增加了氨基被离子化的可能性, 从而使阿奇霉素很难进入细胞。因此, 阿奇霉素的活性对 pH 值变化特别敏感。为了进一步探讨不同 pH 值对大环内酯类抗菌药物的影响, 本研究以金黄色葡萄球菌、化脓性链球菌为试验对象, 在不同 pH 值条件下检测抗菌药物的抗菌活性和诱导细菌产生耐药性。

1 材料与方法

1.1 一般材料

1.1.1 标准菌株 以金黄色葡萄球菌(ATCC29213)和化脓性链球菌(ATCC19615)作为抗菌活性测定的质控菌。临床菌株: 分离于西南医院临床送检标本金黄色葡萄球菌临床菌株 5 株(Sau1~Sau5)和化脓性链球菌临床菌株 5 株(Spy1~Spy5)。

1.1.2 抗菌药物来源及配制 大环内酯类抗菌药物红霉素(ERY)、罗红霉素(ROX)、阿奇霉素(AZI)购自中国食品药品检定研究院。根据美国国家临床实验室标准委员会(NCCLS)2002 年版抗菌药物药敏试验操作标准溶解并制备贮存液浓度为 3 200 mg/L^[7]。上述各药分别经孔径为 0.22 μm 滤膜过滤, 将滤液分装于无菌小瓶中, -80 ℃ 保存, 临用时用液体培养基配成所需应用液。

1.1.3 培养基 采用《中华人民共和国药典》2005 年版 2 部, 附录 XI A 抗菌药物微生物检定法, 培养基用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节 pH 值(pH 值分别为 6.0、7.0、8.0)^[8]。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 药物敏感性试验方法参见文献^[9], 用不同 pH 值(6.0、7.0、8.0)的液体培养基稀释药物, 各管中加入等量经临床分离的金黄色葡萄球菌(Sau1~Sau5)和化脓性链球菌接种菌液(Spy1~Spy5)以及标准菌种(浓度 1 × 10⁵

CFU/mL),置于 37 ℃温箱孵育。每次试验设立阳性对照和阴性对照,每批试验重复 3 次,阳性对照管呈现良好生长即培养基颜色由红变黄,而阴性对照管无生长即颜色不变,药物试验管完全不能生长时的药物最低浓度为该药对金黄色葡萄球菌(Sau1~Sau5)和化脓性链球菌(Spy1~Spy5)的 MIC。按照 NCCLS 2000 年规定的临界浓度判定每株对大环内酯类抗菌药物的敏感性。

1.2.2 自然产生耐药性 细菌以 10⁹~10¹⁰ CFU/mL 接种量涂布在含有 2×MIC 抗菌药物不同 pH 值(6.0、7.0、8.0)的琼脂平板上,37 ℃条件下培养过夜,观察自然产生耐药性的频率。

1.2.3 体外诱导产生耐药性 体外诱导耐药性产生的测定采用连续肉汤稀释法。采用 2 倍稀释法进行抗菌药物的稀释,使其最终浓度范围为 0.01~1 024 mg/mL。细菌接种于含有不同浓度抗菌药物的 pH 值分别为 6.0、7.0、8.0 的 M、H 肉汤

中,培养过夜。然后将肉眼可见细菌生长的最高药物浓度(即 0.5×MIC)培养物以 1:20 稀释后,再次转种到含不同浓度抗菌药物的 pH 值分别为 6.0、7.0、8.0 的 M、H 肉汤中,培养过夜,重复此转种步骤共 7 d。完成连续转种后,取具有最高药物浓度的培养物传代培养在不含药物的 pH 值分别为 6.0、7.0、8.0 的琼脂平板上,以评估对抗菌药物耐药的稳定性。

2 结 果

2.1 大环内酯类药物 pH 的变化对金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌 MIC 的影响 pH 值的变化导致的大环内酯类对金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌的 MIC 结果如表 1、2 所示。结果表明,培养基 pH 值的降低导致大环内酯类 MIC 升高。罗红霉素和阿奇霉素的 MIC 升高超过 10 倍,其对金黄色葡萄球菌、化脓性链球菌的 MIC 达到了 4.00~>64.00 mg/L。所有大环内酯类在碱性 pH 值条件下表现出最大的体外抗菌活性。

表 1 在不同 pH 值条件下大环内酯类抗菌药物对金黄色葡萄球菌的 MIC(mg/L)

菌株	红霉素			罗红霉素			阿奇霉素		
	pH6.0	pH7.0	pH8.0	pH6.0	pH7.0	pH8.0	pH6.0	pH7.0	pH8.0
ATCC29213	8.00	0.50	0.06	8.00	0.50	0.12	>64.00	1.00	0.25
Sau1	4.00	0.50	0.06	4.00	0.25	0.06	64.00	2.00	0.06
Sau2	4.00	0.25	0.03	8.00	0.50	0.12	16.00	1.00	0.25
Sau3	8.00	0.50	0.06	6.00	0.25	0.03	32.00	2.00	0.50
Sau4	2.00	0.25	0.03	4.00	0.25	0.06	64.00	2.00	0.25
Sau5	4.00	0.50	0.06	8.00	0.50	0.06	>64.00	1.00	0.25

表 2 在不同 pH 值条件下大环内酯类抗菌药物对化脓性链球菌的 MIC(mg/L)

菌株	红霉素			罗红霉素			阿奇霉素		
	pH6.0	pH7.0	pH8.0	pH6.0	pH7.0	pH8.0	pH6.0	pH7.0	pH8.0
ATCC19615	0.50	0.06	0.03	8.00	0.25	0.12	8.00	0.25	0.06
Spy1	0.25	0.06	0.03	8.00	0.25	0.03	4.00	0.12	0.06
Spy2	0.50	0.06	0.03	8.00	0.50	0.03	32.00	1.00	0.25
Spy3	0.25	0.03	0.03	16.00	0.50	0.06	64.00	4.00	1.00
Spy4	1.00	0.12	0.03	8.00	0.50	0.03	16.00	1.00	0.50
Spy5	0.50	0.12	0.03	4.00	0.25	0.03	>64.00	1.00	0.25

表 3 在不同 pH 值条件下金黄色葡萄球菌自然产生耐药性频率

菌株	红霉素			罗红霉素			阿奇霉素		
	pH6.0	pH7.0	pH8.0	pH6.0	pH7.0	pH8.0	pH6.0	pH7.0	pH8.0
ATCC29213	1	4.1×10 ⁻⁷	5.8×10 ⁻⁷	1	8.7×10 ⁻⁷	5.3×10 ⁻⁸	1	4.5×10 ⁻⁶	5.3×10 ⁻⁷
Sau1	1	7.8×10 ⁻⁶	9.0×10 ⁻⁷	1	6.7×10 ⁻⁶	2.4×10 ⁻⁷	1	6.8×10 ⁻⁶	5.4×10 ⁻⁷
Sau2	1	9.7×10 ⁻⁶	3.5×10 ⁻⁷	1	7.2×10 ⁻⁶	5.3×10 ⁻⁷	1	8.6×10 ⁻⁶	2.6×10 ⁻⁷
Sau3	1	6.9×10 ⁻⁷	8.7×10 ⁻⁸	1	4.7×10 ⁻⁶	6.8×10 ⁻⁷	1	5.5×10 ⁻⁶	6.9×10 ⁻⁷
Sau4	1	8.3×10 ⁻⁷	9.3×10 ⁻⁸	1	5.7×10 ⁻⁷	6.1×10 ⁻⁸	1	3.5×10 ⁻⁷	5.8×10 ⁻⁸
Sau5	1	4.6×10 ⁻⁶	9.5×10 ⁻⁷	1	7.8×10 ⁻⁶	8.9×10 ⁻⁷	1	5.4×10 ⁻⁶	6.7×10 ⁻⁷

2.2 金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌对大环内酯类抗菌药物的自然耐药频率 金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌对大环内

酯类抗菌药物的自然耐药频率如表 3、4 所示。结果表明,金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌对大环内酯类抗菌药物的耐药频

率具有较强的 pH 依赖性。随着 pH 值的增加,金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌对大环内酯类抗菌药物的耐药频率逐渐降低,在中性 pH 值条件下,耐药频率范围大约为 $1.1\times 10^{-7}\sim 9.7\times 10^{-6}$;但是在酸性条件下所有细菌都表现出耐药性。此外,与中性 pH 值相比,碱性培养基中生长的细菌其耐药频率降低了约 10 倍。

2.3 体外诱导金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌对大环内酯类抗菌药物的耐药性 体外诱导金黄色葡萄球菌对大环内酯类

抗菌药物的耐药性如表 5 所示(化脓性链球菌对大环内酯类抗菌药物的耐药性的结果与金黄色葡萄球菌相似,结果未显示)。金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌对大环内酯类药物都表现出高水平的耐药性。大环内酯类在 6 d 试验研究阶段中其 MIC 升高了 16~133 倍。MIC 在所有试验 pH 条件下均有所增加,然而在酸性条件下 MIC 增加趋势比较明显。此外,在 pH6.0 时,阿奇霉素对金黄色葡萄球菌具有较高的 MIC(>64.00 mg/L)。

表 4 在不同 pH 值条件下化脓性链球菌自然产生耐药性频率

菌株	红霉素			罗红霉素			阿奇霉素		
	pH6.0	pH7.0	pH8.0	pH6.0	pH7.0	pH8.0	pH6.0	pH7.0	pH8.0
ATCC19615	1	8.0×10^{-7}	7.5×10^{-8}	1	1.1×10^{-7}	3.3×10^{-8}	1	3.7×10^{-6}	8.9×10^{-7}
Spy1	1	7.0×10^{-7}	8.9×10^{-8}	1	3.5×10^{-7}	8.3×10^{-8}	1	3.6×10^{-6}	5.7×10^{-8}
Spy2	1	2.5×10^{-7}	4.7×10^{-8}	1	3.8×10^{-7}	4.6×10^{-8}	1	6.9×10^{-6}	8.1×10^{-7}
Spy3	1	4.7×10^{-6}	8.4×10^{-7}	1	3.6×10^{-7}	7.4×10^{-8}	1	5.1×10^{-6}	2.7×10^{-7}
Spy4	1	6.5×10^{-6}	7.4×10^{-7}	1	7.9×10^{-7}	3.8×10^{-8}	1	4.7×10^{-7}	4.0×10^{-8}
Spy5	1	5.5×10^{-7}	3.2×10^{-8}	1	5.6×10^{-7}	8.4×10^{-8}	1	3.8×10^{-6}	6.9×10^{-7}

表 5 两种细菌在不同 pH 值条件下体外诱导产生耐药性(mg/L)

菌株	pH 值	红霉素			罗红霉素			阿奇霉素		
		0 d	3 d	6 d	0 d	3 d	6 d	0 d	3 d	6 d
ATCC29213	pH6.0	4.00	16.00	>64.00	8.00	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00
Sau1		1.00	16.00	>64.00	4.00	8.00	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00
Sau2		4.00	16.00	>64.00	2.00	8.00	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00
Sau3		1.00	8.00	>64.00	2.00	16.00	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00
Sau4		4.00	16.00	>64.00	1.00	16.00	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00
Sau5	pH7.0	2.00	16.00	>64.00	4.00	16.00	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00
ATCC29213		0.50	2.00	16.00	0.50	1.00	16.00	2.00	4.00	32.00
Sau1		0.25	2.00	16.00	0.25	2.00	8.00	1.00	4.00	32.00
Sau2		0.50	1.00	8.00	0.50	2.00	16.00	0.50	2.00	16.00
Sau3		0.25	1.00	16.00	0.25	1.00	8.00	0.25	4.00	16.00
Sau4	pH8.0	1.00	4.00	16.00	1.00	4.00	16.00	1.00	4.00	32.00
Sau5		2.00	8.00	32.00	0.50	2.00	32.00	0.50	2.00	16.00
ATCC29213		0.12	0.50	4.00	0.06	0.50	2.00	0.50	1.00	8.00
Sau1		0.06	0.25	2.00	0.03	0.25	4.00	0.03	0.12	0.50
Sau2		0.25	1.00	8.00	0.06	0.25	2.00	0.03	0.25	1.00
Sau3	pH8.0	0.06	0.50	2.00	0.03	0.25	2.00	0.06	0.50	2.00
Sau4		0.12	1.00	4.00	0.25	1.00	4.00	0.12	0.50	2.00
Sau5		0.25	2.00	4.00	0.06	1.00	2.00	0.06	0.24	1.00

3 讨 论

本研究采用肉汤稀释法检测在不同 pH 值条件下 3 种大环内酯类抗菌药物对金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌的抗菌活性。结果表明,5 株金黄色葡萄球菌和 5 株化脓性链球菌对 3 种大环内酯类抗菌药物的耐药性均表现出 pH 值依赖性,随着含有红霉素、罗红霉素和阿奇霉素的培养基 pH 值的增加,MCI 逐渐降低。此外 pH6.0 升至 pH8.0 时,3 种大环内酯类

药物对细菌的 MIC 范围逐渐降低,其中罗红霉素和阿奇霉素的 MIC 降低至少 10 倍,即大环内酯类药物的抗菌活性随着 pH 的升高而增强,作者的研究结果与文献报道相一致^[9-10]。

对于呼吸道感染病原菌,大环内酯类的 MIC 值随 pH 值的降低而增加,碱性 pH 条件下 MIC 值最低。大环内酯类在酸性环境中其 MIC 值增加了 10 倍。阿奇霉素在化学结构上因第 2 位碱基的存在,使其比其他大环内酯类更容易被离子

化,因此阿奇霉素的 MICs 更易受到 pH 值的影响。由于 pH 值降低导致了 MIC 的显著增加,耐药表型也随之增加。在酸性环境中,所有细菌显示出耐药表型。其可能的作用机制为在酸性 pH 值条件下大环内酯类药物抗菌活性丢失。研究发现,大环内酯类抗菌药物不仅可通过 5 位上的氨基去氧糖与 A2058 靶点结合,其 C-11、C-12 氨基甲酸酯侧链还能与第 2 靶点 A752 结合,且结合力更强,从而发挥抗耐药菌活性^[11]。方向群和刘又宁^[12]研究表明罗红霉素能提高亚胺培南对生物被膜的渗透,从而增强其对生物被膜上铜绿假单胞菌的抑菌活性。体外诱导耐药突变试验表明,在 pH 值为 6.0 时所有细菌都诱导发展为中敏或耐药菌。这一现象与其他学者报道的数据相一致^[13-15]。此外,酸性条件下细菌对大环内酯类的耐药性具有明显增加趋势。本研究表明,如果酸性环境能诱导体外细菌产生耐药性,那么也可能诱导呼吸道感染患者体内细菌的耐药性发展。因此,本研究评价酸性或碱性 pH 值对大环内酯类抗菌活性的影响对临床具有重要的指导意义。

人体血液 pH 为 7.35~7.45,体外金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌生长的最适 pH 值为 7.8~8.0,大环内酯类 MIC 最小的 pH 为 8.0,三者差异较大。而 pH 值对大环内酯类药物抗金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌活性影响较大,所以体外药敏试验选择金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌生长的最适 pH 值时,既要保证肺炎金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌生长又要尽量模仿体内条件以检测到药物真实的抗菌效果,同时还要考虑药物在体内的抗菌活性和代谢产物对酸碱度的影响。故认为金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌体外药敏试验的液体培养基 pH 值 7.5 较为合适,金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌在肉汤中生长不形成浑浊,对营养要求苛刻,难于定量对药敏试验的准确性影响较大。最适 pH 值的确定或许可为金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌体外药敏试验的标准化提供了 1 项参考指标。

参考文献

- [1] 刘娟娟,宋毅斐,刘健.生物被膜在临床感染性疾病中的研究进展[J].中华医院感染学杂志,2010,20(4):598-600.
- [2] 王睿.细菌生物被膜的产生与临床意义[J].中华医学杂志,2004,84(22):1915-1918.
- [3] Marea J, Peczuh MW. Positioning and configuration of key atoms influence the topology of [13]-macrolidides [J]. J Org Chem, 2013, 78(15): 7414-7422.
- [4] 尹永芹,孔令义.树脂糖苷-大环内酯类化合物的结构解析研究[J].时珍国医国药,2009,20(3):517-520.

- [5] Mallegol J, Fernandes P, Seah C, et al. Determination of in vitro activity of solithromycin at different pH and its intracellular activity tested against clinical isolates of Neisseria gonorrhoeae from a laboratory collection[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(9): 4322-4328.
- [6] Desmond RT, Magpusao AN, Lorenc C, et al. Denovo macrolide-glycolipid macrolactone hybrids: Synthesis, structure and antibiotic activity of carbohydrate-fused macrocycles[J]. Beilstein J Org Chem, 2014, 10(1): 2215-2221.
- [7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twelfth informational supplement [S]. M100-S12. Pennsylvania: NCCLS, 2002; 1-33.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2 部)[Z]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 XI, 83.
- [9] 李中兴, 郑家齐, 李家宏. 临床细菌学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 364.
- [10] 龙燕, 陈万宁. 不同 pH 值对大环内酯类药物抗肺炎支原体活性的影响[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(1): 63-64.
- [11] 李赞, 徐进宜, 顾觉奋. 酮内酯类抗菌药物的结构修饰研究进展[J]. 今日药学, 2010, 5(20): 1.
- [12] 方向群, 刘又宁. 亚胺培南联合罗红霉素对铜绿假单胞菌生物被膜的作用[J]. 中国抗菌药物杂志, 2009, 34(11): 688-690.
- [13] Batard E, Juvin ME, Jacqueline C, et al. Influence of carbon dioxide on the MIC of telithromycin for Streptococcus pneumoniae: an in vitro-in vivo study[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(1): 464-466.
- [14] Banche G, Roana J, Allizond V, et al. In vitro compared activity of telithromycin and azithromycin against north-west Italian isolates of Streptococcus pyogenes and Streptococcus pneumoniae with different erythromycin susceptibility[J]. Lett Appl Microbiol, 2008, 47(4): 309-314.
- [15] Seral C, Van Bambeke F, Tulkens PM. Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin, and oritavancin (LY333328) activities against intracellular Staphylococcus aureus in mouse J774 macrophages[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(1): 2283-2292.

(收稿日期: 2015-03-25 修回日期: 2015-04-18)

(上接第 2689 页)

- 年手足口病实验室检测结果分析[J]. 检验医学, 2013, 28(9): 796-800.
- [6] 宋建, 都鹏飞, 程邦宁, 等. 合肥市 0~14 岁人群柯萨奇病毒 A 组 16 型和肠道病毒 71 型的感染状况调查[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 21(7): 1013-1015.
- [7] 殷继东, 伍仕敏, 项杰, 等. 2011 年武汉及周边城市手足口病病原学及流行病学研究[J]. 军事医学, 2013, 37(6): 435-438.
- [8] 许国章, 倪红霞, 易波, 等. 浙江省宁波市 2008~2011 年

- 手足口病流行病学及病原学特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(4): 361-365.
- [9] 谭徽, 谢群, 何清懿, 等. 湖南省郴州市 2009~2011 年手足口病流行病学特征研究[J]. 现代预防医学, 2014, 41(2): 329-332.
- [10] 梁勇彪, 屈雅川, 曹荣, 等. 手足口病感染病毒分布及感染趋势评估[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(22): 5485-5487.

(收稿日期: 2015-04-15 修回日期: 2015-05-25)