

· 实验研究 ·

乙酰吉他霉素干混悬剂对肺炎支原体的体外抗菌作用

史大伟,袁青,涂鹏,田秀君,窦海伟,辛德莉

(首都医科大学附属北京友谊医院,北京热带医学研究所,热带病防治研究北京市重点实验室,北京 100050)

[摘要] **目的:**探讨乙酰吉他霉素干混悬剂对肺炎支原体(MP)的体外抗菌作用。**方法:**选择2016—2019年本实验室保存的呼吸系统感染患者的MP临床分离株51株,以阿奇霉素、红霉素对照药物,采用微量倍比稀释法测定乙酰吉他霉素干混悬剂对MP的体外最低抑菌浓度(MIC)。**结果:**51株临床分离株中,43例耐药株,含23S rRNA 2063位点突变,8例敏感株,无耐药相关位点突变。微量倍比稀释法的结果显示:乙酰吉他霉素干混悬剂对MP标准株FH和M129的MIC值均为 $0.125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对MP临床耐药株的MIC值为 $8\sim 32\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,MIC₅₀为 $16\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,MIC₉₀为 $32\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;对MP临床敏感株的MIC值为 $0.063\sim 0.125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,MIC₅₀和MIC₉₀均为 $0.125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。红霉素对MP临床耐药株MIC范围为 $256\sim 1\,024\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,MIC₅₀和MIC₉₀分别为 512 和 $1\,024\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;阿奇霉素对MP临床耐药株MIC范围为 $64\sim 512\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,MIC₅₀和MIC₉₀分别为 256 和 $512\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;红霉素和阿奇霉素对MP临床敏感株的MIC值均 $<0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。**结论:**肺炎支原体对大环内酯类抗生素呈不同程度的耐药,乙酰吉他霉素干混悬剂体外对MP敏感株有较好的抑菌活性,对MP耐药株的MIC值水平较低,临床上对肺炎支原体感染的作用需要进一步研究。

[关键词] 乙酰吉他霉素干混悬剂;肺炎支原体;抗菌;最低抑菌浓度;耐药

[中图分类号] R978.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)06-0625-04

Antibacterial effect of acetylkitasamycin dry suspension on *Mycoplasma pneumoniae* in vitro

SHI Da-wei, YUAN Qing, TU Peng, TIAN Xiu-jun, DOU Hai-wei, XIN De-li

(Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing Tropical Medicine Research Institute,
Beijing Key Laboratory of Tropical Disease Control Research, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antibacterial effect of acetylkitasamycin dry suspension on *Mycoplasma pneumoniae* (MP) in vitro. **Methods:** 51 clinical isolates and 2 standard strains of MP from patients with respiratory tract infection stored in our laboratory from 2016 to 2019 were randomly selected for the research. Taking azithromycin and erythromycin as control drugs, the minimum inhibitory concentration (MIC) of acetylkitasamycin dry suspension against MP was determined using broth microdilution method. **Results:** Of all the 51 clinical isolates, there were 43 drug-resistant strains that contained the point mutations A2063G in V region of 23S rRNA domain, and there were 8 susceptible strains which had no mutations related to drug resistance. The MIC values of the acetylkitasamycin dry suspension were $0.125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for the standard MP strains FH and M129; for the clinically resistant MP strains, the MIC was $8\sim 32\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the MIC₅₀ was $16\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and the MIC₉₀ was $32\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; for clinically sensitive MP strains, the MIC was $0.063\sim 0.125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and both MIC₅₀ and MIC₉₀ were $0.125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Erythromycin had a MIC range of $256\sim 1\,024\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for clinically resistant MP strains, the MIC₅₀ was $512\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and the MIC₉₀ was $1\,024\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; azithromycin had a MIC range of $64\sim 512\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for clinically resistant MP strains, the MIC₅₀ was $256\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and the MIC₉₀ was $512\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The MIC values of erythromycin and azithromycin

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81473214)

[作者简介] 史大伟,男,主治医师,研究方向:儿童呼吸系统疾病。E-mail:sdwwfyxy@163.com。

[通讯作者] 辛德莉,女,主任医师,教授,研究方向:呼吸系统疾病,病原生物学,中西医结合医学。E-mail:xindl48@126.com。

for clinically sensitive MP strains were $<0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** MP showed different degrees of resistance to macrolide antibiotics. Acetylkitasamycin dry suspension had good bacteriostatic activity against sensitive MP strains *in vitro*, and the MIC value against resistant MP strains was low, and the clinical effect on MP infection need to be further studied.

[Key words] acetylkitasamycin dry suspension; *Mycoplasma pneumoniae*; antibacterial; minimum inhibitory concentration; resistance

肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, MP) 是社区获得性肺炎 (community acquired pneumonia, CAP) 的重要病原体, 大环内酯类药物是治疗 MP 感染的首选药物, 自日本分离到大环内酯类耐药株后, 世界各国不断报道其耐药情况, 总体来说, 欧洲耐药率较低, 亚洲国家的耐药率普遍偏高, 且对 14 元环的红霉素和 15 元环的阿奇霉素均具有较高的最低抑菌浓度 (MIC) 值^[1-2]。鉴于 MP 耐药的现状, 疾病的治疗成为 MP 感染研究的热点。乙酰吉他霉素干混悬剂 (acetylkitasamycin) 是 16 元环的吉他霉素乙酰化后的产物, 对革兰阳性菌和部分革兰阴性菌、钩端螺旋体、立克次体、支原体有较强的抗菌活性, 抗菌机制为抑制蛋白合成, 对核糖体有共同的结合位点, 可抑制核糖体上的蛋白质合成^[3]。本研究通过体外检测乙酰吉他霉素干混悬剂、红霉素和阿奇霉素对 MP 标准株、临床分离株的 MIC, 探讨乙酰吉他霉素干混悬剂对 MP 临床分离株的体外抗菌作用, 为临床合理用药提供依据。

材料与方法

1 鉴定 MP 临床分离株

1.1 实验材料 51 例 MP 临床分离株均为实验室既往保存的呼吸道感染患者的 MP 临床分离株; 对照菌株选用国际标准株 FH (ATCC15531) 和 M129 (ATCC29342)。

1.2 实验步骤 样本 DNA 严格按照通用型柱式基因组提取试剂盒说明书操作 (货号: CW22985, 江苏康为世纪生物科技有限公司), 应用荧光定量 PCR 法扩增呼吸系统标本 MP 的 23S rRNA 基因^[4]。对 PCR 阳性的扩增产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 并与美国国立生物信息中心 (NCBI) 发布的 MP 标准株 M129 基因序列进行比对。

1.3 阳性判定标准 样本扩增的 C_t 值 ≤ 38 且溶解曲线 T_m 值与阳性对照结果相同判定为 MP 阳性^[3]。

2 MIC 测定

2.1 培养基配置 类胸膜肺炎生物 (pleuropneumonia-

like organisms, PPLO) 基础培养基, 加 $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 新生小牛血清、 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲜酵母浸液、 $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酚红指示剂、 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖及 $5 \times 10^4 \text{ IU} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ 青霉素。具体配置步骤见参考文献^[5]。

2.2 菌株准备 各取 0.2 mL 鉴定阳性的 MP 临床分离株的菌液接种于 MP 固体培养基平皿上, 置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% 二氧化碳培养箱中培养, 每日观察菌落, 进行菌落计数 (colony forming units, CFU)。

2.3 药物准备 实验中所用的抗菌药物: 红霉素 (中国食品药品检定研究所, 批号: 130307-202218)、阿奇霉素 (中国食品药品检定研究所, 批号: 130352-201808)、乙酰吉他霉素干混悬剂 (广州一品红制药有限公司, 批号: 011801)。取定量抗生素用培养基进行倍比稀释, 药物浓度范围为 $2.048 \sim 0.0002 (1/4096) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 共 24 个梯度。

2.4 MIC 测定 通过微量稀释法测定实验药物对 MP 临床分离株的 MIC 值。预先将菌液稀释到 $1 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% 二氧化碳培养箱中孵育 2 h。孵育后的菌液取 $175 \mu\text{L}$ 加入 96 孔板中, 随后加入不同质量浓度的药物, 每板均设阳性对照、阴性对照、药物对照, 每个样品均设 2 个复孔, 石蜡密封。放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% 二氧化碳培养箱中培养, 每天观察记录结果。实验步骤依据参考文献^[6], 判断标准参照表 1^[6], 此标准系 2011 年美国临床与微生物标准化委员会 (The Clinical and Laboratory Standards Committee, CLSI) 制定。

表 1 抗菌药物对 MP 耐药的判定标准

抗菌药物	敏感	中等程度	耐药
红霉素	≤ 0.5	$0.5 < I \leq 1.0$	> 1.0
阿奇霉素	≤ 0.5	$0.5 < I \leq 1.0$	> 1.0

结果

1 MP 临床分离株鉴定

51 株 MP 临床分离株的 C_t 值 ≤ 38 、 T_m 值与阳

性对照一致,鉴定为 MP 阳性菌株。与 NCBI 发布的基因序列对比显示,8 株敏感株,无 23S*rRNA* V 区基因突变;43 株耐药株,存在 23S*rRNA* V 区 A2063 G 的点突变。

2 MIC 测定结果

乙酰吉他霉素对 MP 标准株 FH 和 M129 的 MIC 值均为 0.125 mg·L⁻¹;对 MP 临床分离株 MIC 范围为 0.063 ~ 32 mg·L⁻¹,MIC₅₀ 为 16 mg·L⁻¹,MIC₉₀ 为 32

mg·L⁻¹。对照药物红霉素对 MP 标准株 FH 和 M129 的 MIC 值分别为 0.016 和 0.031 mg·L⁻¹;对 MP 临床分离株 MIC 范围为 0.008 ~ 1 024 mg·L⁻¹,MIC₅₀ 为 512 mg·L⁻¹,MIC₉₀ 为 1 024 mg·L⁻¹。对照药物阿奇霉素对 MP 标准株 FH 和 M129 的 MIC 值分别为 0.002 和 0.004 mg·L⁻¹;对 MP 临床分离株 MIC 范围为 0.001 ~ 512 mg·L⁻¹,MIC₅₀ 为 256 mg·L⁻¹,MIC₉₀ 为 512 mg·L⁻¹,见表 2。

表 2 抗菌药物体外抗 MP 的 MICs

药物名称	MP 临床分离株			MP 标准株	
	范围	MIC ₅₀	MIC ₉₀	FH	M129
红霉素	0.008 ~ 1 024	512	1 024	0.016	0.031
阿奇霉素	0.001 ~ 512	256	512	0.002	0.004
乙酰吉他霉素干混悬剂	0.063 ~ 32	16	32	0.125	0.125

MP: 肺炎支原体;MIC:最小抑菌浓度

乙酰吉他霉素对 MP 耐药株的 MIC 范围为 8 ~ 32 mg·L⁻¹,高于对 MP 敏感株的 MIC 范围为 0.063 ~ 0.125 mg·L⁻¹,MIC₅₀ 为 16 mg·L⁻¹,MIC₉₀ 为 32 mg·L⁻¹,高于对 MP 敏感株的 MIC₅₀ 和 MIC₉₀ 均为 0.125 mg·L⁻¹。红霉素对于 MP 耐药株的 MIC 范围为 256 ~ 1 024 mg·L⁻¹,高于对 MP 敏感株的 MIC 范围为 0.008 ~ 0.031 mg·L⁻¹,MIC₅₀ 为 512 mg·L⁻¹ 和 MIC₉₀ 为 1 024

mg·L⁻¹ 高于对敏感株的 MIC₅₀ 和 MIC₉₀ 均为 0.031 mg·L⁻¹。阿奇霉素对于 MP 耐药株的 MIC 范围为 64 ~ 512 mg·L⁻¹,高于对 MP 敏感株的 MIC 范围为 0.001 ~ 0.004 mg·L⁻¹,MIC₅₀ 为 256 mg·L⁻¹ 和 MIC₉₀ 为 512 mg·L⁻¹ 高于对敏感株的 MIC₅₀ 和 MIC₉₀ 均为 0.004 mg·L⁻¹,见表 3。

表 3 抗菌药物体外对 MP 敏感株和耐药株的 MICs

药物名称	MP 临床分离株						MP 标准株	
	MP 敏感株			MP 耐药株			M129	FH
	范围	MIC ₅₀	MIC ₉₀	范围	MIC ₅₀	MIC ₉₀		
红霉素	0.008 ~ 0.031	0.031	0.031	256 ~ 1 024	512	1 024	0.031	0.016
阿奇霉素	0.001 ~ 0.004	0.004	0.004	64 ~ 512	256	512	0.004	0.001
乙酰吉他霉素干混悬剂	0.063 ~ 0.125	0.125	0.125	8 ~ 32	16	32	0.125	0.125

MP: 肺炎支原体;MIC:最小抑菌浓度

讨 论

MP 是引起 CAP 的常见病原体,约占 CAP 患者的 10% ~ 40%^[7]。MP 缺乏细胞壁,对作用于细胞壁的抗生素天然耐药,对干扰或抑制蛋白质合成、DNA 复制的抗生素敏感。儿童处于生长发育期,四环素类抗生素、喹诺酮类抗菌药物的使用受到限制,大环内酯类抗生素成为首选抗生素^[7]。2001 年日本从临床分离出对大环内酯类抗生素耐药的 MP 菌株^[8],2003 年辛德莉等^[9]首次报道国内从临床上分离到 MP 耐药株。近年来耐药成为 MP 研究的热点问题。不同国家和地区的耐药率差异很大,呈现一

定的地域差异,总体上亚洲国家的耐药率高于欧美国家的耐药率^[10],欧洲国家的 MP 耐药率普遍很低,亚洲地区的 MP 耐药率普遍较高,我国一直处于较高水平^[11]。目前认为 23S*rRNA* V 区点突变是 MP 对大环内酯类药物耐药的主要机制。Cao 等^[12]对既往大环内酯类抗生素耐药 MP 肺炎的文献进行综述,发现 23S*rRNA* 基因 A2063G 突变最普遍,其次是 A2064G, A2063T, A2063C, A1290G, C2617A 和 A2067G 较少见。Morozumi 等^[13]对突变位点所占比例进行统计,得出 2 063 位点突变占 77% ~ 80%,而 2 064 位点突变约占 10%。Zhao 等^[14]报道 2008—2012 年北京市 MP 耐药检出率分别为 68.9%, 90.0%,

98.4%,95.4%和97.0%,其中97.1%的突变位点为A2063G,2.5%为A2064G,0.4%为A2063T。Zhou等^[15]对2016—2019年上海市CAP患儿中确诊为MP感染的进行耐药检测,56.07%(60/107)患者存在23SrRNA耐药位点突变,均为A2063G位点突变;本次研究对2016—2021年分离培养成功的51株MP菌株进行耐药位点检测,84.31%(43/51)标本中存在23SrRNA耐药位点突变,均为A2063G位点突变。15.69%(8/51)标本未出现23SrRNA耐药位点的突变。大环内酯类抗生素根据其碳环数目分为3类:14元环的红霉素和克拉霉素、15元环的阿奇霉素、16元环的交沙霉素和麦迪霉素及乙酰吉他霉素等。近年来临床出现了对大环内酯类抗生素耐药的MP菌株,临床难治性、重症MP感染患者增多。中国苏州地区^[16]2011—2015年难治性肺炎支原体肺炎(refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia, RMPP)发生率分别为7.77%(47/605),11.39%(105/922),15.37%(154/1002),16.55%(118/713),20.90%(126/603),同期韩国对2010—2015年住院CAP儿童中MP肺炎患儿进行回顾性研究发现, RMPP的发生率也有升高^[17]。如何控制MP耐药并减少耐药的产生,成为目前亟须解决的问题。既往多篇文章^[18-21]报道MP对16元大环内酯类抗生素交沙霉素(4 mg·L⁻¹)、麦迪霉素(8 mg·L⁻¹)的MIC₉₀要低于14元环和15元环的大环内酯类抗生素。与上述结果类似,本研究中乙酰吉他霉素干混悬剂对8株MP敏感株的MIC值范围为0.063~0.125 mg·L⁻¹,MIC₅₀和MIC₉₀均为0.125 mg·L⁻¹,对MP敏感株具有较好的抑菌活性;对43株MP耐药株的MIC值范围为8~32 mg·L⁻¹,MIC₅₀为16 mg·L⁻¹,MIC₉₀为32 mg·L⁻¹,低于其他元环的大环内酯类抗生素,MP感染可以选择乙酰吉他霉素干混悬剂。

综上所述,MP耐药突变位点以A2063G位点为主,乙酰吉他霉素干混悬剂体外对MP有明确的抑菌活性,对MP敏感株具有较好的抑菌活性且乙酰吉他霉素体外对MP耐药菌株的MIC水平较低。此研究为体外抗菌研究,对于MP感染尤其是大环内酯类抗生素耐药的MP感染,建议可进一步开展乙酰吉他霉素干混悬剂的临床研究。

[参 考 文 献]

[1] LEE H, YUN KW, LEE HJ, et al. Antimicrobial therapy of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children

[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2018,16(1):23-34.

[2] TSAI TA, TSAI CK, KUO KC, et al. Rational stepwise approach for *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2021,54(4):557-565.

[3] OMURA S, NAKAGAWA A. Chemical and biological studies on 16-membered macrolide antibiotics[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1975,28(6):401-433.

[4] 郭东星,胡文娟,李丹,等. 荧光定量聚合酶链反应检测肺炎支原体方法的建立[J]. 传染病信息, 2016,29(2):30-56.

[5] BEL F, BOURGUIGNON L, TOD M, et al. Mechanisms of drug-drug interaction between rifampicin and fusidic acid[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2017,83(8):1862-1864.

[6] WAITES KB, BADE DJ, BEBEAR C, et al. Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas; approved guideline[C]. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2011.

[7] 中华医学会儿科学分会呼吸学组.《中华实用儿科临床杂志》编辑委员会. 儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015年版)[J]. 中华实用儿科临床杂志,2015,30(17):1304-1308.

[8] OKAZAKI N, NARITA M, YAMADA S, et al. Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*[J]. *Microbiol Immunol*, 2001,45(8):617-620.

[9] 辛德莉,侯安存,魏田力,等. 肺炎支原体对大环内酯类抗生素耐药的分析[J]. 中华儿科杂志,2005,43(3):212.

[10] PEREYRE S, GORET J, BEBEAR C. *Mycoplasma pneumoniae*: current knowledge on macrolide resistance and treatment[J]. *Frontiers Microbiol*, 2016,7:974.

[11] 辛德莉,王良玉. 肺炎支原体肺炎流行病学特点及耐药现状[J]. 医学与哲学,2018,39(2):8-11.

[12] CAO B, QU JX, YIN YD, et al. Overview of antimicrobial options for *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: focus on macrolide resistance[J]. *Clin Respir J*, 2017,11(4):419-429.

[13] MOROZUMI M, TAKAHASHI T, UBUKATA K. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: characteristics of isolates and clinical aspects of community-acquired pneumonia[J]. *J Infect Chemother*, 2010,16(2):78-86.

[14] ZHAO F, LIU G, WU J, et al. Surveillance of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Beijing, China, from 2008 to 2012[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013,57(3):1521-1523.

[15] ZHOU Y, WANG J, CHEN W, et al. Impact of viral coinfection and macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. *BMC Infect Dis*, 2020,20(1):633.

[16] 张新星,顾文婧,陈正荣,等. 2011—2015年苏州地区儿童难治性肺炎支原体肺炎流行病学分析[J]. 儿科药学杂志,2019,25(8):7-10.

[17] LEE E, KIM CH, LEE YJ, et al. Annual and seasonal patterns in etiologies of pediatric community-acquired pneumonia due to respiratory viruses and *Mycoplasma pneumoniae* requiring hospitalization in South Korea[J]. *BMC Infect Dis*, 2020,20(1):132.

[18] WANG N, ZHOU Y, ZHANG H, et al. *In vitro* activities of acetylmidcamycin and other antimicrobials against human macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* isolates[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020,75(6):1513-1517.

[19] WANG N, LIU W, ZHOU Y, et al. *In vitro* Activities of nemonoxacin and other antimicrobial agents against human mycoplasma and ureaplasmas isolates and their defined resistance mechanisms[J]. *Front Microbiol*, 2019,10:1890.

[20] 毛心瑜,孙超,李三妮,等. 1例肺炎合并横纹肌溶解症并发多脏器损害患儿的药学监护[J]. 今日药学,2021,31(8):627-630,634.

[21] ZHOU Z, LI X, CHEN X, et al. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in adults in Zhejiang, China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015,59(2):1048-1051.