

鲍曼不动杆菌耐药机制的研究进展*

黄 梅,李 荣 综述,黎金凤 审校(四川省泸州市人民医院检验科 646000)

【关键词】 鲍曼不动杆菌; 耐药机制; 整合子; 灭活酶; 钝化酶; 膜渗透性
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.23.041 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)23-2987-03

鲍曼不动杆菌是主要引起肺部感染、血流感染、尿路感染和插管相关感染等。由于有多重耐药和泛耐药菌株,所以该菌的致死率高,是重症感染患者的主要致死原因。鲍曼不动杆菌耐药机制复杂且有多种机制并存,主要包括整合子介导的耐药基因的产生,产生多种灭活酶和钝化酶,膜蛋白改变导致外膜通透性下降,药物主动泵出系统。现就以上机制作综述如下。

1 整合子介导的多重耐药机制

整合子-基因盒的概念是由国外学者 Hall 等^[1]于 20 世纪 90 年代提出。认为其是细菌基因组中可以移动的遗传物质,即可以运动的 DNA 分子,是细菌的天然克隆与表达^[2]。通过整合酶整合游离的耐药基因盒,从而造成细菌的多重耐药。鲍曼不动杆菌基因组为 3.98 Mb,有 3 800 多个开放阅读框架^[3],易于接受外源性基因,可容纳大量耐药基因盒。

1.1 整合子的结构和种类 整合子由 5′末端(5′CS),3′末端(3′CS),以及中间可变序列组成。5′CS 携带编码整合酶的基因 int I 和一个启动子基因片段,启动子有 P1 和 P2 两种,大多数整合子都含有 P1 启动子,少部分含有 P2 启动子,3′CS 结构则因整合子类型不同而异。

根据整合酶的不同可将整合子分为 6 类,其中 I、Ⅱ、Ⅲ类整合子与耐药性有明显关系,研究得也较多。I 类整合子 3′CS 包括 3 个 ORFs,季铵盐化合物溴乙锭耐药基因(qacEΔI),磺胺耐药基因(sul I)和功能尚不清楚的 ORFs,是临床分布最广的一类整合子^[4]。临床分离的耐药菌的整合子大多为 I 类

整合子。Ⅱ类整合子以 Tn7 及其家族为代表,其整合酶基因 intI2 被一个终止密码子中断,是缺陷的 intI 基因,表达的 intI2 与 intI1 同源性小于 50%,可以在不动杆菌、志贺菌、沙门菌中检出Ⅱ类整合子^[5-6]。Ⅲ类整合子由 Arakawa 等^[7]在耐亚胺培南的粘质沙雷菌上发现,其整合酶由 320 个氨基酸组成,与 intI1 同源性为 61%,常携带编码 β-内酰胺酶 bla 的基因盒。Ⅳ类整合子是在 20 世纪 90 年代由 Rowe-Magnus 等^[8]在霍乱弧菌的基因组中发现,因其含有 179 个基因盒,故被称为超级整合子(SI),目前尚未发现其直接与多重耐药有关,但可能是多重耐药整合子的祖先。

1.2 基因盒的结构和种类 基因盒是较小的、可以移动的 DNA 分子,常以环状结构独立存在,当被整合子捕获并整合后才可进行转录。不同基因盒的结构和功能不同,长度为 262~1 459 bp,但基本结构是一致的(见图 1)。每个基因盒由 1 个结构基因和 3′CS 毗邻的 1 个不完全反向重复序列(特异性重组位点)attC(又称 59be)组成。attC 的长度为 57~147 bp^[9],并且含有一个被整合酶识别的特异性整合位点^[10]。每个 attC 位点的两端由核心位点和反向核心位点组成,核心位点 GT-TRRRY(R 为嘌呤,Y 为嘧啶)位于 attC 的右侧,而互补的反向核心位点 RYYYAAC 位于 attC 的左侧。基因盒的分类由顾兵和童明庆^[11]根据美国生物技术信息中心资料(截止 2005 年 1 月)结合文献对耐药基因盒的种类及耐药情况作了归纳(见表 1)。

表 1 耐药基因盒及耐药情况

耐抗菌药物种类	基因盒	编码蛋白质
β-内酰胺类	blaP1;blaCEF-1;blaGES-1,2,3;bla-IBC1,2blaVEB-1,2,3;blaVIM-4;blaIMP-1,2,4,6,7,8,9,13,16;blaOXA-1,2,5,10,13,15,19,20,28,30,31,32,35;blaCTX-M-2,9	超广谱 β-内酰胺酶;碳青霉烯酶
氨基糖苷类	aadA1~13;aadB;aacA,A1,A4,A7,(3)-Ib,(6′)-Ib;aphA15	氨基糖苷腺苷转移酶;乙酰基转移酶;磷酸转移酶
甲氧苄啶	dfrA1,5,6,7,10,12,13,15,16,17;dfrB1,2,3;dfr13,17	二氢叶酸还原酶
氯霉素	catB2,3,4,6,7,9;cmlA,A2,4,5,6,7;cmlB	氯霉素乙酰转移酶;外排酶
利福平	arr2,3	ADP-核糖基转移酶
喹诺酮	Qnr	未知
链丝霉素	Sat	链丝霉素乙酰转移酶
季胺盐化合物	qacE,F,F′,G,H,I	外排酶
红霉素	ereA,A2	红霉素酯化酶

1.3 基因盒的捕获和表达 整合子捕获基因盒是靠整合酶催化反应完成的。整合酶的识别位点有 2 个,一个是整合子中整合酶基因相邻的 intI 部位,另一个是位于基因盒的 intC 位点。游离的基因盒以闭环状结构存在于细胞中,通过整合酶的催化以线性结构结合于特异性位点,进行位点特异性重组,精确

插入整合子中。整合酶催化的重组反应不仅可发生在 intI 和 intC 之间,也可发生在 2 个 intC 和 intT 之间,但以 intI 和 intC 之间的重组效率最高^[12]。通常整合过程为特异的可逆过程,整合的线性基因盒可被重新切下,恢复环状结构,并可能整合于其他整合子中。通过 intI 和 intC 之间的位点特异性重组,

* 基金项目:四川省泸州市重点科技资助项目[项目编号:2011-S-45(3/3)]。

使得耐药基因从一个整合子向另一个整合子传递,完成整合子中耐药基因的累积重排和流动。

1.4 整合子-基因盒对鲍曼不动杆菌耐药性的作用 整合子可捕获一个或多个基因盒,因此表现出对抗菌药物的多重耐药性,临床上出现的多重耐药的鲍曼不动杆菌和泛耐药鲍曼不动杆菌与整合子对耐药基因的累积是分不开的。Johannes 等^[13]对 48 株鲍曼不动杆菌进行整合酶基因聚合酶链反应(PCR)发现有 50% 测试菌携带有 I 类整合子,并且发现这些菌株表现的多重耐药性要比整合子阴性的菌株更为严重,由此推测整合子对鲍曼不动杆菌耐药性的作用。Gomac 等^[14]检测意大利 6 家医院分离的在流行病学上无相关的多重耐药鲍曼不动杆菌 36 株,发现 44% (16 株)测试菌存在 I 类整合子,其中 13 株携带的基因盒中基因排列一致,即 *aacC1-orfX-orfX*, *-aadAla*,在 PCR 产物 2.2 Kb 中还发现携带有 *blaOXA-20* 基因。Ruiz 等^[15]从西班牙 6 家医院分离的鲍曼不动杆菌含有 I 类整合子,并且发现携带有不同基因盒的 4 种 I 类整合子。这些基因盒包括 *aacC1*、*aacA4*、*aadA1*、*aadB*、*OXA-21*、*OXA-27*、*OXA-37*,这些耐药基因盒已由欧洲其他国家检出,并且有很高的阳性率,提示了耐药基因的水平传播。Zarrilli 等^[16]对重症监护病房中暴发流行的鲍曼不动杆菌进行脉冲场凝胶电泳,发现 *cloneB* 和 *cloneI* 为其暴发株,并检出 I 类整合子。其中 *cloneB* 耐药基因为 *aacC1-ORFs-ORFs-aadAla*, *cloneI* 为 *aacA4-ORF-blaOXA-20*,另外还检出 *blaIMP* 基因,由此可以看出造成这些菌株在 ICU 中暴发流行主要是过度使用头孢菌素、碳青霉烯类、氨基糖苷类抗菌药物造成的。

2 灭活酶钝化酶耐药机制

2.1 β -内酰胺酶 鲍曼不动杆菌具有获得编码各类 β -内酰胺酶的基因, β -内酰胺酶按结构可分为 A、B、C、D 类酶。(1)A 类酶,鲍曼不动杆菌产生 TEM-1 型为代表的 β -内酰胺酶,该酶可以广泛水解第 1 代头孢菌素类和对酶不稳定的第 1 代青霉素类抗菌药物,尽管该酶在鲍曼不动杆菌的多重耐药中可能不是主要角色,仍是其耐药机制之一。产 SHV 型广谱 β -内酰胺酶的鲍曼不动杆菌在国外报道较少,但已证实其存在于我国浙江地区,且多为 SHV12 型^[17]。(2)B 类酶,主要是耐碳青霉烯类的金属酶,此菌活性依赖锌离子故名金属酶。IMP 类金属酶在此菌中有 IMP-1、IMP-2、IMP-4、IMP-5、IMP-6,此外还发现有 VIM-2 型和 SIM-1 型金属酶等。(3)C 类酶,以染色体介导的高产 AmpC 酶在鲍曼不动杆菌的多重耐药中有重要意义,产 AmpC 酶的鲍曼不动杆菌普遍存在。在西班牙 1 家医院暴发的鲍曼不动杆菌感染中发现染色体上携带有 *ampC* 基因编码的 *pI* 为 9.4 的 AmpC 酶,其氨基酸序列与 C 类头孢菌素酶密切相关^[18]。该酶可被舒巴坦、他唑巴坦适量抑制,被克拉维酸微弱抑制。利用三维试验检测 AmpC 酶有重要的参考价值,表明鲍曼不动杆菌产生的 AmpC 酶不需要诱导剂诱导就可产生大量 AmpC 酶。(4)D 类酶,即苯唑西林酶(OXA 酶),OXA-23 是第 1 个从鲍曼不动杆菌中分离出来的 D 类碳青霉烯酶,OXA-23、OXA-24、OXA-25、OXA-26、OXA-40、OXA-51、OXA-58 具有碳青霉烯酶活性,*blaOXA-23* 基因位于质粒或染色体上,目前在碳青霉烯酶的鲍曼不动杆菌中已发现 20 余种 OXA 酶^[19-20]。主要有位于质粒的 OXA-23、OXA-58,位于染色体的 OXA-24、OXA-25、OXA-26、OXA-40 和可自然出现的类似 OXA51/69 的 OXA-64、OXA-65、OXA-66、OXA-68、OXA-70、OXA-71、OXA-78、OXA-79、OXA-80、OXA-82,并且新的 OXA 酶仍不断被发现。OXA 酶首先与药物底物互相作用形成复合体或一个短暂的酰基酶中间体,继而在 *r-o* 丝氨酸

位点攻击 β -内酰胺环碳酰基的碳原子,随后中间体迅速脱酰基化释放出完整的酶和一个开环的产物。

2.2 钝化酶 钝化酶主要是指氨基糖苷的修饰酶。已知的钝化酶有 3 类:(1)乙酰转移酶(AAC),能使游离的羟基乙酰化;(2)核苷转移酶(ANT),能使游离的羟基核苷化;(3)磷酸转移酶(APH),能使游离的羟基磷酸化;共有 50 余种。该酶可修饰氨基糖苷类的特定基团,降低或丧失对核糖体的亲和力,可借助于整合子、转座子、质粒等在同种或不同种细菌间传播。现已从鲍曼不动杆菌中检出 *aac(3)-I*、*aac(3)-II*、*aac(3)-III*、*aac(3)-IV*、*aac(6')-I*、*aadA1*、*aadB*、*ant(2')-I*、*ant(3')-I*、*aphA1*、*aphA6* 等多种修饰酶基因,多为数种基因同时存在。不同国家和地区的修饰酶基因分布有很大差异,如美国以 *ant(2')*、*aac(3)*、*aac(6')* 最为常见,而日本则以 *aac(6')* 多见。

3 外膜蛋白改变的耐药机制

细菌细胞膜上有亲水性药物的通过蛋白,称为外膜蛋白,主要有两种,分子较大的为 *ompF* 和分子较小的为 *ompC*。外膜蛋白的缺失可导致细菌耐药的发生。Mussi 等^[21]发现编码 29×10^3 外膜蛋白的 *CarO* 基因由于插入元件的插入而失活,从而 29×10^3 外膜蛋白不能正常表达,出现了对 β -内酰胺类、碳青霉烯类耐药的鲍曼不动杆菌。

4 外排系统的耐药机制

鲍曼不动杆菌可形成药物的外排泵,使进入菌体的药物浓度明显减低而失效。外排系统 AdeABC 就是由不动杆菌发现的,此菌的外排泵以 AdeABC 为主^[22],可排出多种底物,有氨基糖苷类、氟喹诺酮类、四环素类、红霉素、溴乙锭等,所以是这些药物的耐药机制。

5 其他耐药机制

细菌 DNA 旋转酶 A、B 亚单位发生突变可对氟喹诺酮类耐药。青霉素结合蛋白(PBPs)的改变可使细菌对抗菌药物不能结合或亲和力下降从而导致耐药。

综上所述,鲍曼不动杆菌的耐药非常复杂,涉及整合子-基因盒、灭活酶、钝化酶、外膜蛋白、外排系统等。目前还有许多新的耐药机制需进一步研究。了解鲍曼不动杆菌的耐药机制可进一步指导临床用药,减少多重耐药的鲍曼不动杆菌和泛耐药鲍曼不动杆菌的产生和流行。

参考文献

- [1] Hall RM, Brookes DE, Stokes HW. Site-specific insertion of genes into intergrons: role of the 59-base element and determination of the recombine cross-over point[J]. Mol Microbiol, 1991, 5:187; 1941-1953.
- [2] Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 intergrons, gene cassettes, mobility and epidemiology[J]. J Clin Microbiol Infect Dis, 1999, 18(11): 761-770.
- [3] 李新, 王金良. 鲍曼不动杆菌耐药机制的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(11): 1021-1025.
- [4] 应春妹, 翁文浩. 鲍曼不动杆菌多重耐药机制研究进展[J]. 检验医学, 2007, 22(2): 208-212.
- [5] Young HK, Qusich MJ, McIntosh ML. Nucleotide sequence and genetic of the type Ib trimethoprim-resistant, Tn4132-encoded dihydrofolate reductase[J]. J Antimicrob Chemother, 1994, 34(5): 715-725.
- [6] Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super integrons[J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10(4): 272-288.
- [7] Arakawa Y, Murakami M, Suzuki KA. A novel integron-

- like element carrying the metallo beta-lactamase gene bla IMP[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39 (7): 1612-1615.
- [8] Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D. Super-integron [J]. Res Microbial, 1999, 150(9, 10): 641-651.
- [9] Stokes HW, Gorman DB, Recchia GD, et al. Structure and function of 59-base element recombine sites associated with mobile gene cassettes[J]. Mol Microbiol, 1997, 26 (4): 731-745.
- [10] Recchia GD, Hall RM. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons[J]. Trends Microbiol, 1997, 5 (10): 389-394.
- [11] 顾兵, 童明庆. 整合子与细菌耐药[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(3): 226-229.
- [12] Partideg SR, Recchia GD, Scararnuzzi C, et al. Site-sepcific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron-DNA integrase [J]. Microbiol, 2000, 146(11): 2855-2864.
- [13] Johnannes GM, Jeroen S, Madelon WV, et al. Identification of epidemic strains of Acinetobacter baumannii by integrase gene PCR[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1): 8-12.
- [14] Gomac F, Ricco ML, Rossolin GM, et al. Molecular characterization of integrons epidemiologically unrelated clinical isolates of Acinetobacter baumannii from Italian hospitals reaveals of a limited diversity of gene cassette arrays[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(11): 3665-3668.
- [15] Ruiz J, Navia MM, Casals C, et al. integron-mediated antibiotic multiresistance in Acinetobacter, baumannii clinical isolates from Spain[J]. Clin Microbiol Infect, 2003, 9(9): 907-911.
- [16] Zarrilli R, Crispine M, Bagattini M, et al. Molecular epidemiology of sequential outbreaks of Acinetobacter baumannii in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42 (3): 946-953.
- [17] 黄支密, 陈榆, 毛培华, 等. 鲍曼不动杆菌耐药性及 β -内酰胺酶基因型研究[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(11): 683-686.
- [18] Alejandro B, Lourdes D, Anna R, et al. Molecular characterization of the gene encoding a new Amp β Lactamase in Clinical strain of Acinetobacter genomic species[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(6): 1374-1376.
- [19] Cuenca F, Martinez L, Conejo MC, et al. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of Acinetobacter baumannii [J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 51(3): 565-574.
- [20] Jan WR, Niels H. OXA-type carbapenemases[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(3): 373-383.
- [21] Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of Acinetobacter baumannii; natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(4): 1432-1440.
- [22] 王贺, 徐英春, 王辉, 等. 不动杆菌属菌种主动外排系统的研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(11): 1303-1305.

(收稿日期: 2012-05-03)

肺炎链球菌重组蛋白 ELISA 检测方法的研究进展*

卢杰¹, 卢珍², 何颖¹, 姜世君¹, 吕文涛¹, 吕茂利¹ (1. 黑龙江省大庆医学高等专科学校药检系, 大庆 163312; 2. 黑龙江省海林市中医院妇产科 157100)

【关键词】肺炎链球菌; 疫苗; 重组蛋白; 酶联免疫吸附试验

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 23. 042 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)23-2989-02

肺炎是一种常见的呼吸道疾病, 3 岁以下的婴幼儿在冬、春季节患肺炎较多, 肺炎的发病可急可缓, 一般多在上呼吸道感染数天后发病^[1]。肺炎主要是由细菌和病毒引起, 其中最主要的病原菌是肺炎球菌, 也称肺炎链球菌。它是社区获得性呼吸道感染的一种重要病原微生物, 也是引起细菌感染性疾病的主要致病菌, 通过咳嗽、打喷嚏、说话时释放的飞沫传染给其他人。研究表明疫苗免疫是预防肺炎链球菌的有效方法^[2]。

1 肺炎链球菌疫苗研究进展

1.1 传统疫苗 目前使用的肺炎链球菌疫苗主要有多糖荚膜疫苗、荚膜-蛋白质结合疫苗等。因为造成侵袭性肺炎链球菌感染的病原 90% 具有荚膜多糖, 所以多糖荚膜疫苗对所覆盖血清型的肺炎链球菌感染具有一定的保护作用。但多糖疫苗覆盖的血清型有限而且不是 T 淋巴细胞依赖性, 对免疫系统发育不完善的 2 岁以下幼儿和老年人的保护性弱; 荚膜-蛋白

质结合疫苗 PCV7, 对 2 岁以下幼儿的免疫效能明显增强, 使结合疫苗覆盖血清型肺炎链球菌在鼻咽部的携带率下降, 但结合疫苗存在荚膜血清型转换和载体携带的荚膜多糖血清型数量有限, 生产成本很高, 且在肺炎高发人群中的保护作用小^[3]。

1.2 基因工程疫苗 传统的疫苗没有为抵抗链球菌导致的肺炎提供显著的保护力^[4]。基因工程疫苗是分子生物学发展的产物, 被称为是一种理想、纯净的疫苗, 与传统疫苗相比, 更安全可靠。研究人员也在积极地研制肺炎链球菌基因工程疫苗。

1.2.1 蛋白质疫苗 蛋白质疫苗又称肽疫苗, 是类似于抗原决定簇的小肽(约 20~40 个氨基酸), 将其连在一个蛋白载体上, 以增加稳定性, 同时也可提高免疫原性^[5]。一般来说单独的抗原决定簇的免疫原性较弱, 所以通常要与载体偶联, 或以融合蛋白的形式进行免疫, 还可以与细胞因子一起作用, 以提高免疫原性。蛋白质疫苗生产成本低, 能够大规模使用, 而且

* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目资助(编号: 12515110)。