

mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting [J]. Blood, 2006, 108(6): 2114-2120.

- [34] Amé-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid

organs support tumor B-cell growth; role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis[J]. Blood, 2007, 109(2): 693-702.

(收稿日期:2013-04-08)

· 综述 ·

鲍曼不动杆菌的耐药机制及感染防治的研究进展^{*}

邢丽丹 综述, 苏兆亮[△], 许化溪[▲] 审校

(江苏大学检验医学研究所, 江苏镇江 212013)

关键词: 鲍曼不动杆菌; 多重耐药; 抗菌药

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)18-2422-03

鲍曼不动杆菌是一类革兰阴性、非发酵、氧化酶阴性的不动杆菌, 在自然界分布广泛, 在人类主要存在于皮肤表面及呼吸道, 是条件致病菌, 由于其环境特殊在医院尤其是ICU常呈流行性爆发, 是引起医院感染的主要致病菌。近年来, 随着鲍曼不动杆菌的分离率和耐药率的不断上升, 且呈现多重耐药趋势, 研究者及临床医师对该菌的关注越来越密切, 对其感染患者的治疗及防治也越来越迫切。因此, 了解鲍曼不动杆菌的感染特征, 临床分布和耐药性, 有效控制其在临床的感染非常重要。本文就鲍曼不动杆菌流行病学、耐药机制及防治措施进行综述。

1 鲍曼不动杆菌的流行现状

随着抗菌药物的大量使用和广泛使用, 多重耐药鲍曼不动杆菌的分离率越来越高, 就鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物而言早在2000年其耐药率已从2%上升至46%~54%^[1], 而据2010年我国卫生部耐药监测协作组的年度报告, 鲍曼不动杆菌在ICU病房分离得到的最多^[2]。近几年很多国家报道了各地区鲍曼不动杆菌的耐药和流行情况。目前对于多重耐药鲍曼不动杆菌的治疗多为联合治疗。近期报道的感染极度耐药鲍曼不动杆菌而死于菌血症的患者^[3]更加引起了科研人员和医务工作者对鲍曼不动杆菌的预防和治疗的密切关注。

2 鲍曼不动杆菌耐药机制

鲍曼不动杆菌在医院是主要的条件致病菌, 在非发酵菌属仅次于铜绿假单胞杆菌。鲍曼不动杆菌因对环境具有较强的适应能力而散播广泛, 这种适应主要通过内源性耐药机制的上调和外源性耐药基因的获得而实现^[4], 其耐药性正在逐年的升高, 而且临床感染多以多重耐药菌株为主, 被称为革兰阴性杆菌中的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)^[5], 给临床的防治带来了很大的困难。目前用于治疗鲍曼不动杆菌的抗菌药物主要有5大类, 包括β-内酰胺类抗菌药物, 氨基糖苷类, 氟喹诺酮类, 四环素类和多粘菌素类。其所对应的耐药机制也有所不同。

2.1 β-内酰胺类抗菌药物 2000年以来, 国内外报道了大量革兰阴性杆菌β-内酰胺类抗菌药物的耐药机制。β-内酰胺类抗菌药物在临床最为常见, 包括青霉素类、头孢菌素类、单环类及碳青霉烯类等化学结构中含有β-内酰胺环的抗菌药物。鲍

曼不动杆菌主要通过以下机制对β-内酰胺类抗菌药物耐药: (1)产生各种β-内酰胺酶^[6]; (2)细菌外膜孔蛋白缺陷, 细菌发生突变失去某种特异孔蛋白(常见的是CarO和OprD)后, β-内酰胺类等药物无法进入或进入减少^[7]; (3)外排泵的外排作用增强^[8], 可以将进入细菌体内的药物泵出膜外; (4)青霉素结合蛋白(PBPs)编码基因突变导致PBPs构象改变, 与β-内酰胺类药物结合力下降^[9], β-内酰胺类抗菌药物是通过与细菌细胞内膜上的PBPs结合, 导致其构象改变而产生耐药。

目前β-内酰胺酶的研究比较多。A类主要是指广谱β-内酰胺酶(ESBLs), 包括TEM型、SHV型、KPC型、PER型和VEB型等^[6], 一般由质粒介导。B类即金属β-内酰胺酶(BMLs), 因其在参与催化反应时其活性位点为二价金属阳离子(通常为锌离子)^[10], 能够水解除了氨曲南外的大部分临床的β-内酰胺类底物而发挥杀菌作用^[6]。鲍曼不动杆菌中的BMLs主要为IMP、VIM和SIM三型^[11]。绝大多数BMLs基因位于I类整合子中, 包括编码氨基糖苷类耐药酶的基因在内的耐药基因盒^[11]。C类酶即AmpC酶, 是由染色体或质粒介导产生的, 因其优先水解头孢菌素酶又被称为头孢菌素酶, 能水解青霉素类、第一、二、三代头孢菌素和单环酰胺类等许多β-内酰胺类抗菌药物, 但对碳青霉烯类第四代头孢菌素和喹诺酮类敏感, 是鲍曼不动杆菌对第三代头孢菌素耐药的主要原因^[12]。D类酶又称苯唑西林酶(OXA酶), 是鲍曼不动杆菌中研究最多的一类酶, 已经在鲍曼不动杆菌中发现了20多种, 且仍在继续被发现。OXA酶主要由染色体或质粒编码, 可引起对苯唑西林、氯唑西林和亚胺培南的天然低水平耐药^[13]。OXA酶中有4个主要的亚群与鲍曼不动杆菌的耐药有关, 它们分别是: OXA-23、OXA-24、OXA-51和OXA-58^[14]。而在我国常见的OXA酶主要是OXA-23和OXA-51^[15]。插入序列在β-内酰胺类耐药中也发挥作用, 主要是通过其自身携带的启动子来增强其介导的β-内酰胺酶基因的表达, 如在鲍曼不动杆菌中常见的是ISaba1, 位于OXA-23和ADC的上游, 一般与该菌碳青霉烯类和头孢他啶耐药有关^[16]。

2.2 氨基糖苷类抗菌药物 随着鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药性的增加, 对其耐药的机制研究目前也越来越多。鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类抗菌药物的耐药机制主要有:

* 基金项目: 江苏省博士后启动基金资助项目(1102129C); 镇江市国际合作交流项目(GJ2010007); 江苏大学高级人才启动项目(11JDG128); 江苏大学大学生科研立项(12A121)。作者简介: 邢丽丹, 女, 在读研究生, 主要从事感染免疫研究。△ 通讯作者, E-mail: szl30@yeah.net; ▲ 通讯作者, E-mail: xuhx@ujs.edu.cn。

产生氨基糖苷类修饰酶(AMEs)、甲基化修饰、外膜通透性降低、主动外排或靶位突变,其中最主要的是产生 AMEs 和 16S rRNA 甲基化酶^[17]。AMEs 按其功能分为乙酰转移酶(AAC)、核苷转移酶(ANT)和磷酸转移酶(APH)三大类,它们分别修饰乙酰辅酶 A 的 N-乙酰化,依赖于 ATP 的腺苷化和依赖于 ATP 的 O-磷酸化使其共价键发生改变,药物难以进入细菌体内与相应靶位结合而导致耐药^[18]。AMEs 基因大多位于可移动遗传元件上,可在菌株间水平传播,从而使其耐药性的传播更为广泛^[18]。另外药物外排泵参与也可介导氨基糖苷类药物耐药,如药物外排基因 adeB 在鲍曼不动杆菌中可以被扩增出,介导参与了氨基糖苷类抗菌药物耐药机制的形成^[19]。

2.3 氟喹诺酮类抗菌药物 近期报道表明鲍曼不动杆菌对喹诺酮类抗菌药物耐药率达 70% 以上^[20], 喹诺酮类药物是细菌 DNA 旋转酶的抑制剂, 对鲍曼不动杆菌的作用位点是 DNA 旋转酶和拓扑异构酶。DNA 旋转酶由 gyrA 亚基和 gyrB 亚基组成, 拓扑异构酶由 parC 亚基(与 gyrA 同源)和 parE 亚基(与 gyrB 同源)组成。耐药机制主要是 DNA 旋转酶 gyrA 亚基及拓扑异构酶 IV 的 parC 亚基发生了突变。常见的是 gyrA(Ser-83-Leu), 与喹诺酮中度耐药相关; 而 parC 突变主要发生在 Ser-80-Leu, 并且还有新的突变位点 Ala88→Thr^[21]。这些突变可导致喹诺酮类药物与酶-DNA 复合物的亲和力下降, 从而导致对喹诺酮类药物的耐药。另外研究发现当鲍曼不动杆菌外膜蛋白表达下调而引起外膜蛋白通透性改变时, 可导致其对喹诺酮类药物的吸收减少而对其耐药^[22]。鲍曼不动杆菌对喹诺酮类药物的耐药还与药物的外排作用如主动外排泵的 adeB mRNA 基因的过度表达导致细胞内药物浓度的降低有关^[23]。

2.4 四环素类抗菌药物 鲍曼不动杆菌对四环素类抗菌药物耐药一方面是由 TetA 和 TetB 转座子介导的外排泵, TetA 仅作用于四环素, 而 TetB 作用于四环素和米诺环素^[24]; 另一方面则是 tetM 和 tetO 基因介导的保护核糖体免受四环素、多西环素和米诺环素的作用。但这两中机制对替加环素均不起作用。但有报道外排泵 AdeABC 通过抑制 adeB 基因降低了鲍曼不动杆菌替吉环素的敏感性^[25]。

2.5 多粘菌素类抗菌药物 目前被越来越多的作为治疗多药耐药鲍曼不动杆菌感染的“最后一道防线”, 但由于存在一些不良反应如肾毒性等, 应严格掌握适应证和剂量等。最近有报道出现了对粘菌素耐药的极度耐药鲍曼不动杆菌感染的患者^[3]。有研究表明, 鲍曼不动杆菌对多粘菌素的耐药是由于对细菌外膜脂多糖脂质的修饰而使外膜阴离子减少所致^[26]。

3 防治措施

3.1 普及相关医疗知识 首先作为医务工作者, 应对鲍曼不动杆菌的生物学特性, 分布情况, 传播途径, 流行病学, 耐药性及相关研究进展等有充分的认识和了解。临床医师应重视获得性鲍曼不动杆菌感染, 与临床微生物实验室密切协作, 加强耐药性的监测, 预防和控制感染。

3.2 医院要加强内部卫生管理 由于鲍曼不动杆菌对湿热紫外线及化学消毒剂有较强抵抗力, 可能从医务人员的手或消毒不彻底的医疗器械感染抵抗力弱或有创伤的患者。所以, 应对医疗器械进行严格彻底的消毒及对鲍曼不动杆菌进行规范的连续监测, 及时监测其耐药情况。

3.3 合理使用抗菌药物加强药政管理 细菌耐药性的出现主要是在临幊上滥用抗菌药物的结果。用药时要严格掌握适应症、适合剂量和疗程, 既要避免剂量过大造成的药物浪费和毒性反应的出现, 又要注意剂量不足而导致疾病的复发及耐药性

的产生。严格掌握抗菌药物的局部用药、预防用药和联合用药, 避免滥用。

4 小结

综上所述, 鲍曼不动杆菌的高感染率和高耐药率的问题使得医院对感染的控制越来越感到棘手, 给临床治疗带来了极大的困难和挑战。临床和实验室应高度关注细菌耐药机制的研究, 指导临床合理地使用抗菌药物并做好预防措施。

参考文献

- [1] Gales AC, Jones RN, Forward KR, et al. Emerging importance of Multidrug resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as Pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program(1997-1999) [J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(Suppl2): S104-113.
- [2] 沈萍, 魏泽庆, 陈云波, 等. Mohnarin 2010 年度报告: ICU 细菌耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(3): 481-485.
- [3] Doi Y, Husain S, Potoski BA, et al. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(6): 980-982.
- [4] Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities [J]. J Infect Dev Ctries, 2009, 3(5): 335-341.
- [5] Iskandar SB, Guha B, Rishnaswamy G, et al. *Acinetobacter baumannii* pneumonia: a case report and review of the literature [J]. Tenn Med, 2003, 96(9): 419-422.
- [6] 张琼. 泛耐药鲍曼不动杆菌耐药机制研究进展[J]. 中国医药导报, 2012, 9(8): 13-17.
- [7] Coyne S, Courvalin P, Perichon. Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(3): 947-953.
- [8] 马真, 蔡绍曦, 佟万成, 等. 碳青霉烯类鲍曼不动杆菌外排泵 AdeABC 的研究[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(8): 1378-1381.
- [9] Vashist J, Tiwari V, Das R, et al. Analysis of penicillin-binding proteins(PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. [J]. Indian J Med Res, 2011, 133(3): 332-338.
- [10] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al. Metallo-lactamases: the quiet before the storm[J]. Clin. Microbiol. Rev, 2005, 18(2): 306-325.
- [11] 马序竹, 吕媛. 鲍曼不动杆菌对主要抗菌药物耐药机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2009, 25(1): 90-94.
- [12] 宋彩虹, 陈维贤. 鲍曼不动杆菌耐药机制研究进展[J]. 国际检验医学研究杂志, 2012, 33(15): 1856-1858.
- [13] 陈鹏, 丁进亚. 鲍曼不动杆菌耐药机制研究进展[J]. 检验医学, 2012, 18(15): 2463-2466.
- [14] Mendes RE, Spanu T, Deshpande L, et al. Clone dissemination of two clusters of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 or OXA-58 in Rome, Italy[J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(6): 588-592.
- [15] Zhou H, Yang Q, Yu YS, et al. Clonal spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* among different cities of China [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(12): 4054-4057.
- [16] Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, et al. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a Tertiary Medical Center in Pennsylvania[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(11): 3837-3843.
- [17] Shakil S, Khan R, Zarrilli R, et al. Aminoglycosides versus bacte-

- ria—a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground[J]. J Biomed Sci, 2008, 15(1):5-14.
- [18] 韩丽娟,邵海枫,王卫萍,等.鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物的耐药机制研究[J].医学研究生学报,2010,23(10):1038-1041.
- [19] 蒋守刚,黄利华,裴豪,等.鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物耐药机制研究[J].检验医学,2012,27(8):619-623.
- [20] 刘家玉.关于抗生素使用情况的调查[J].现代医药卫生,2001,17(9):725.
- [21] 顾丽芳.鲍曼不动杆菌的菌种分布和耐药性分析[J].现代医药卫生,2009,25(23):3657-3658.
- [22] 王凌伟,陈升汶.不动杆菌微生物学耐药研究进展[J].国外医药抗生素分册,2004,25(3):135-136.
- [23] 王艳丽,黄茂,梅亚宁,等.鲍曼不动杆菌对喹诺酮类药物的耐药机制研究[J].中国感染与化疗杂志,2008,8(4):266-270.

• 综述 •

循环 DNA 的研究进展*

彭亮 综述, 娄晓丽, 侯彦强[△] 审校

(上海交通大学附属第一人民医院松江分院检验科, 上海 201600)

关键词:循环 DNA; 分子标志物; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)18-2424-03

循环 DNA 又称游离 DNA(cf-DNA)是一种存在于动、植物和人的体液中的无细胞状态的胞外 DNA。1977 年 Leon 等^[1]首先发现肿瘤患者血浆 DNA 含量明显增高,提出了监测外周血游离 DNA 水平在观察疗效、预测复发方面的作用。有研究表明^[2]健康人循环 DNA 含量极微,约在 5 μg/L 左右。当机体处于肿瘤、自身免疫性疾病和炎性反应等情况下,体内循环 DNA 的含量会相应的增加,但其产生的机制至今仍不十分明确。目前循环 DNA 的血清学检测还不能直接用于疾病的早期诊断和疗效判断,但它与一些疾病的产生与发展有着密切的联系,因此,检测循环 DNA 并对某些已知病种的特异性基因进行确定具有重要的临床意义,循环 DNA 将有可能成为颇具前景的疾病早期诊断和疗效判断的新型分子标志物。本文就循环 DNA 最新研究进展作一综述。

1 新型分子标志物循环 DNA

1.1 循环 DNA 检测在肿瘤诊断中的应用 研究显示肿瘤患者血浆中游离 DNA 具有与肿瘤组织中 DNA 相一致的分子遗传学改变(如基因突变、抑癌基因启动子高甲基化、微卫星不稳定和杂合性丢失等)^[2-3],因此对肿瘤患者血浆游离 DNA 的研究一直是热点。通过一系列研究,研究人员认为肿瘤患者循环 DNA 主要来源于以下途径^[4-5]:(1)循环血或微转移灶中肿瘤细胞溶解;(2)肿瘤细胞的坏死或凋亡;(3)肿瘤细胞不断释放 DNA 进入血液循环;(4)肿瘤侵袭致周围细胞、组织变性而释放 DNA 入血;(5)淋巴细胞与肿瘤细胞的相互作用。(6)肿瘤患者血中存在 DNA 酶抑制剂,抑制血浆 DNA 降解,从而使 DNA 在血中富集。由此可见,肿瘤患者循环 DNA 的升高很可能可能是多种途径共同作用的结果。

1989 年 Stroun 等^[6]首先对肿瘤患者体内的游离循环

- [24] Huys G, Cnockaert M, Vaneechoutte M, et al. Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals[J]. Res Microbiol, 2005, 156(3):348-355.
- [25] Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(5):1001-1004.
- [26] Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, et al. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(9):3628-3634.

(收稿日期:2013-04-11)

DNA 的序列进行了检测,随后在肿瘤患者体内的游离循环 DNA 上相继检测到了 K-ras、N-ras、P53、APC 等基因的突变。Mulcahy 等^[7]应用 RFLP-PCR 法检测了 21 例胰腺癌患者的循环 DNA,结果有 17 例患者的循环 DNA 中有 K-ras 基因突变,其中有 4 例循环 DNA 中有 K-ras 基因突变的患者最初诊断为胰腺炎,在此后的 5~14 个月中相继被诊断为胰腺癌。肿瘤抑制基因 p53 是迄今为止在人类癌症中最常突变的基因,研究显示在结直肠癌、肺癌、肝癌、乳腺癌和头颈部癌患者血浆/血清 DNA 中检测到 p53 的点突变^[8]。

循环 DNA 的分子遗传学改变中基因高甲基化在肿瘤发生、发展中属于普遍现象,提示癌基因的甲基化可作为诊断肿瘤的特异性基因标志^[9]。Göbel 等^[10]研究乳腺癌患者血浆/血清中总循环 DNA 的量明显高于正常人,在 428 例乳腺癌患者外周血 cf-DNA 存在 PITX2 和 RASSF1A 基因异常甲基化情况。McNally 等^[11]选择 42 例病理确诊且经介入治疗的肝细胞性癌患者,监测其血清 DNA 中 RASSF1A 甲基化基线水平以及在第 1 周期治疗后第 8 周的水平,结果显示 RASSF1A 甲基化基线水平与病灶直径大小呈正相关($P < 0.01$)。研究表明,循环 DNA 的甲基化现象与肿瘤细胞 DNA 的甲基化现象呈现高度的一致性,并且甲基化异常现象先于肿瘤蛋白标志物的出现,对于恶性肿瘤的早期检测更有优势,有望成为评价肿瘤状态的特异性标志物。

有报道显示大于 50% 肿瘤患者存在循环 DNA 的改变,这使其成为一种普遍的、有意义的临床和流行病学研究的分子标记物^[12]。由于循环 DNA 可在疾病诊断之前就被检测出来,大大增加了其作为诊断肿瘤并用来监测癌症复发工具的可能性。

1.2 循环 DNA 检测在胚胎医学方面的应用 Lo 等^[13]在孕

* 基金项目:上海市松江区科技攻关项目(QK2012)。作者简介:彭亮,男,主管检验师,主要从事病毒、肿瘤实验室诊断研究。[△] 通讯作者, E-mail:houyanqiang@yahoo.com.cn。