

- 血者初筛中的作用[J]. 甘肃医药, 2014, 33(2): 103-104.
- [11] 贾志远. ELISA 检测试剂的评价方法[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.
- [12] 孙文利, 张献清, 穆士杰, 等. 国产与进口 HBsAg ELISA 试剂盒的质量比较[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(1): 71-72.
- [13] 陈善华, 朱丽莉, 李浩, 等. ELISA 方法检测 HBsAg 设置灰区的必要性探讨[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(10): 1013-1014.
- [14] 王强, 李文郎, 黄国清, 等. 确认试验在乙肝表面抗原弱阳性样本判定中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(5): 619-620.
- [15] 肖勤, 林金明. 化学发光免疫分析新进展[J]. 分析试验室, 2011, 30(1): 111-122.
- [16] Wursthorn K, Jaroszewicz J, Zacher BJ, et al. Correlation between the Elecsys HBsAg II assay and the Architect assay for the quantification of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the serum[J]. J Clin Virol, 2011, 50(4): 292-296.
- [17] 刘冀珑, 乔惠理, 邓泽沛. 化学发光免疫技术[J]. 化学通报, 2000 (7): 49-53.
- [18] 马连学, 李艳菊, 魏巍. 化学发光微粒免疫法和酶联免疫吸附法检测乙肝表面抗原的结果对比分析[J]. 中国实用医药, 2014, 3(9): 89-90.
- [19] 李美忠, 姜庆波. 化学发光微粒子免疫法测定乙型肝炎表面抗原的临床应用评价[J]. 实用医技杂志, 2010, 17(4): 343-344.
- [20] Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CA, et al. A comparison of two assays for quantification of Hepatitis B surface Antigen in patients with chronic hepatitis B[J]. J Clin Virol, 2011, 51(3): 175-178.
- [21] 俞莹卿. 第二代化学发光试剂检测乙肝表面抗原的多中心评估[D]. 上海: 复旦大学, 2011.
- [22] 何宗忠, 裴宇容, 魏东, 等. 电化学发光测定低浓度乙肝病毒表面抗原的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(11): 2056-2058.
- [23] Hsu HY, Chang MH, Ni YH, et al. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan[J]. Gut, 2004, 53(10): 1499-1503.
- [24] Hollinger FB. Hepatitis B virus genetic diversity and its impact on diagnostic assays[J]. J Viral Hepat, 2007, 14(Suppl 1): 11-15.

(收稿日期: 2015-04-25)

· 综述 ·

铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗菌药的耐药机制研究进展

张妍 综述, 张立 审校

(海河医院检验科, 天津 300350)

关键词: 碳青霉烯类抗菌药物; 铜绿假单胞菌; 耐药机制**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.039**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2015)17-2548-03

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)属假单胞菌属, 革兰阴性杆菌, 是医院感染的重要条件致病菌, 能引起人和动物的感染, 也是慢性感染的常见致病菌, 治疗非常困难。美国国家医院感染监测系统(NNIS)报告指出PA在所有院内感染致病菌中检出率居第5位, 在革兰阴性菌中检出率居第2位^[1]。近年来由于大量抗菌药物的广泛使用, PA耐药率在逐年递增, 多药耐药PA的数量和耐药率不断上升^[2], 为临床带来很大困难。PA具有目前已知的细菌耐药的主要机制, 已经成为引起院内获得性肺炎多重耐药的代表性革兰阴性菌^[3-4]。

碳青霉烯类抗菌药物是新型的β-内酰胺类抗菌药物, 具有高效广谱的特点, 是治疗PA感染的关键药物之一, 对大多数β-内酰胺酶稳定, 通过渗透细菌外膜作用进入细菌内, 杀菌活性强大^[5]。近年来, 随着大量抗菌药物的使用, 特别是碳青霉烯类药物的使用, PA耐药率不断上升, 而各种β-内酰胺酶的产生是PA对抗菌药物的各种耐药机制中最主要的机制^[6]。本文就PA的这一耐药机制作一综述。

1 PA的生物学特性

PA又名绿脓杆菌, 为人体正常菌群, 是临床常见的条件致病菌, 专性需氧菌, 广泛存在于医院环境, 引起院内免疫力低下患者感染。其主要引发的感染有肺部感染、心内膜炎以及败血症等, 由于菌体很难清除, 常引起感染的反复发作^[7-8]。国内有文献报道, 老年患者由于多器官功能衰退, PA也已成为了老年患者感染的主要致病菌, 检出率28.2%, 占致病菌的首位^[9]。此外, 侵入性操作, 如气管插管、留置导尿管、纤维支气

管镜等会引起机械性损伤减低防御功能, 从而导致PA传播及细菌耐药性的发展^[10-11]。烧伤、创伤患者创面为PA的定植感染创造条件。刘树华等^[12]的研究显示迄今为止, 引起烧伤患者医院感染的细菌仍以革兰阴性杆菌为主, 其中PA最常见, 当患者出现皮肤黏膜损坏及免疫功能下降时, 容易导致创面PA感染。

2 碳青霉烯类抗菌药物的抑菌机制

碳青霉烯类抗菌药物是新型β-内酰胺类药物, 其中亚胺培南为世界上第一个碳青霉烯类抗菌药物^[13], 该药物抗菌谱广、活性强, 对β-内酰胺酶稳定。亚胺培南对β-内酰胺酶有耐受作用, 对细菌细胞壁外膜有较好的穿透性, 抑制细胞壁黏肽的合成, 通过阻碍细胞壁合成而起杀菌作用, 它对大肠埃希菌等细菌的杀菌作用与第三代头孢菌素类相似, 而它对PA和厌氧菌有较强的作用。

3 PA的耐药现状

PA对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率在整个世界范围内为逐年上升的趋势。亚太地区耐药监测在2010年有报道显示, PA对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为27.7%和21.6%^[14]。在我国, 各地区的PA对两种药物的耐药性也越来越高, 其中华东地区高达25.7%和22.5%^[15]。武晓敏等^[16]研究报道称, PA对亚胺培南和美罗培南的耐药率高达30%以上。彭超等^[17]研究报道称, 在神经内科检测出的PA菌200例与19中抗菌药物耐药性检测中, 美罗培南的耐药性为25%, 而耐药率最低的为多黏菌素E, 为8%。PA对抗菌药物耐药

率不断的升高正是由于近年来碳青霉烯类抗菌药物的大量广泛使用。

4 PA 的耐药机制

PA 的耐药机制复杂多样,外膜蛋白是许多抗菌药物进入细菌体内的通道,由于 PA 的外膜上有许多微孔通道蛋白,使多种革兰阴性菌的抗菌药物难以通过,从而具有很多种抗菌药物的天然耐药性,同时也会因为基因的突变而获得耐药性,所以产生 β -内酰胺酶,外膜的通透性障碍,形成生物膜,主动外排系统的表达等均是其主要的耐药机制^[18]。

4.1 β -内酰胺酶的产生 PA 对 β -内酰胺类抗菌药物耐药主要是它可以产生多种 β -内酰胺酶^[19],此酶可以通过水解或非水解方式破坏 β -内酰胺环,使抗菌药物相应失活。PA 产生的 β -内酰胺酶主要包括金属 β -内酰胺酶(MBLs)、超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、头孢菌素酶(AmpC 酶)。

4.1.1 MBLs MBLs 又称碳青霉烯酶或金属酶,主要存在于鲍曼不动杆菌和 PA 中,能水解碳青霉烯类抗菌药物在内大多数 β -内酰胺抗菌药物使其失活,此酶有多种,国内外研究发现几种类型:IMP、VIM、SPM、GIM、AIM,其中主要基因型为 IMP 和 VIM^[20]。这两型均有 20 余种亚型分别由相应编码基因的不同位点发生突变产生^[21]。编码金属酶基因位点存在于 PA 的质粒或染色体上。以基因盒存在于整合子之中,大部分的基因位 I 型整合子少数位于 III 型整合子中,通过质粒和整合子的作用,使耐药性在细菌间水平传播。在国外报道中,发现产 MBLs 的 PA 产生与遗传因素相关,说明 MBLs 的基因扩散是由耐药基因在不同菌种之间的传递和克隆引起的^[22]。

4.1.2 ESBLs ESBLs 编码基因有多种,包括:TEM 型、SHV 型、OXA 型、VEB 型、GES 型、CARB 型、PER 型、CTX 型、LCR 型、BEL 型等。其中以 TEM 型、OXA 型研究最多。这些主要是由基因位点衍生突变而来,ESBLs 的基因大多位于质粒和染色体 DNA 上,PA 能够通过转化、传导、结合的方式使 ESBLs 基因在质粒和染色体中转移、传播,并进行特异性整合和重组从而引起耐药产生。ESBLs 降低与碳青霉烯类抗菌药物的亲和力,引起青霉素类、氨曲南和碳青霉烯类耐药。

4.1.3 AmpC 酶 AmpC 酶属 Bush1 群,按 Ambler 分子结构分类为 C 类,其优先选择的底物为头孢菌素类。其表现为对头霉素类抗菌药物高度耐药且不被克拉维酸抑制,但可被氯唑西林抑制。PA 中的 AmpC 酶分诱导性和非诱导型两种,正常情况下 PA 在没有诱导剂作用,只有少量 AmpC 的产生,但当有诱导作用时,如使用大量三代头孢菌素后可使其表达水平大大增加^[23]。有研究报道,在抗菌药物的诱导和选择性压力下,AmpC 酶菌株阳性率由实验开始的 20% 增长到 90%。从而进一步说明了临床的不合理使用抗菌药物会使 AmpC 酶菌株广泛传播。而产 AmpC 酶的 PA 能水解一至三代头孢菌素类药物和头霉素类药物,对大多数 β -内酰胺类抗菌药物耐药从而使耐药性更加的突出和严重。在研究 PA 对碳青霉烯类耐药机制中发现,产 AmpC 酶菌的 13 株 PA 菌都对厄他培南耐药,这表明 AmpC 的产生也是 PA 对碳青霉烯耐药的重要机制^[24]。PA 的一些 DNA 结合蛋白如 ampR、ampD 及其同源基因,通过与 AmpC 诱导的辅因子结合转化为 AmpC 活化因子,从而调节 AmpC 的表达。但并不是 PA 的 AmpC 酶的表达都完全依赖于 ampR、ampD 等的染色体突变^[25]。

4.2 外膜的通透性障碍 外膜蛋白是许多抗菌药物进入细菌体内的通道。PA 外膜上有许多微孔通道蛋白,如 OprC、

OprD、OprE,均属小孔道蛋白。只有部分抗菌药物能通过。其中外膜孔通道 OprD 是一种狭窄的孔道蛋白,是以亚胺培南为代表的碳青霉烯类抗菌药物进入 PA 唯一通道^[26]。其 OprD 的基因突变或者缺失造成细胞外膜对抗菌药物通透性下降,抗菌药物不能通过,是 PA 对亚胺培南等耐药的重要机制。如 OprD 基因突变,表达减少或缺失均导致 OprD 蛋白减少或缺失,从而阻碍亚胺培南进入菌体,是造成 PA 对碳青霉烯类药物亚胺培南耐药的主要机制。OprD2 作为亚胺培南特异性通道,OprD2 基因缺失也存在缺失突变,编码区的一段片段缺失导致移码的突变,形成新的密码子从而引起肽链异常,导致 PA 对亚胺培南耐药。PA 的 OprD 基因插入 IS 失活后,基因编码将会提前终止,OprD 表达缺失导致 PA 耐药,同时 OprD 同样也是一些氨基酸及多肽进入 PA 的通道,与碳青霉烯类竞争也会产生耐药^[27-28]。

4.3 生物膜的形成 生物膜是细菌自身分泌的多糖蛋白混合物,具有一定韧性和厚度,具有极强的耐药性和抵抗免疫系统的作用,对细菌发挥保护作用。随着医学材料广泛应用和病房各种置管操作的增多,从而使 PA 很容易形成生物膜,导致感染。因为 PA 的生物膜可分泌胞外多糖,阻碍了抗菌药物作用于菌体,生物膜具有很强的耐药性和抗击机体免疫系统的作用,不仅使细菌生命力更持久,而且毒力基因和耐药基因能力也大大的增加。Hall-Stoodley 等^[29]的研究表明,生物膜内细菌可分泌 β -内酰胺酶能水解氨基糖苷类,头孢类抗菌药物等抗菌药物可与膜内细菌的外周多糖相互作用。

4.4 主动外排系统的表达 PA 的细胞膜上具有可以将抗菌药物排出体外,并与外膜蛋白的缺失突变起协同作用,从而导致 PA 对多种抗菌药物耐药的作用系统,被称之为细菌的外排系统。根据染色体的不同同源性,可将外排系统分为 MFS、RNA、ABC、MATE 和 SMR,与碳青霉烯类抗菌药物的耐药有关,也是最早发现的 RNA 外排家族,而 PA 中与细菌耐药有关的是 RNA 外排家族^[30]。目前在 PA 中已有报道有 7 种外排泵,包括 MexAB-OprM、MexEF-OprN、MexXY-OprM、Mex-CD-OprJ 等 7 种,其中最常见的是 MexAB-OprM 系统^[31]。各种外排系统的转运底物不完全相同,其中当碳青霉烯类抗菌药物经外膜孔蛋白进入膜间隙,在内膜外侧中会被 MexB 捕获,借膜融合蛋白 MexA 的桥联作用经外膜蛋白 OprM 排出菌体外。有研究发现 MexEF-OprN 外排系统表达上升时可引起亚胺培南和美罗培南两者的 MIC 值都升高,也有研究认为 MexEF-OprN、MexAB-OprM 和 MexXY-OprM 外排系统的过度表达均可引起 PA 对美罗培南的耐药,而对亚胺培南的影响不大。因为 MexAB-OprM 和 MexXY-OprM 在菌株中的低水平表达导致了对大量抗菌药物的耐药,其中 MexAB-OprM 的过度表达最为重要,它将进入菌体的美罗培南转运出胞质引起耐药,是 PA 对美罗培南耐药的主要机制而对 IMP 影响不明显^[32]。随着广谱抗菌药物的大量使用,能够通过细菌的外排泵的底物会不断增加,PA 外排系统也会增加,从而造成它的更严重的耐药问题。

5 小结

PA 感染是目前各级医院中最广泛、最严重的问题之一,其本身具有对多种抗菌药物固有的天然耐药,又极易产生获得性耐药,从而为临床的治疗带来很大的困难和挑战。而 PA 的耐药机制又尤为复杂,天然耐药、获得性耐药、选择性耐药并存。综上所述,PA 作为临床常见的分离菌,其耐药机制需要

更深入的研究,以获得更有效的手段减少耐药发生。合理的使用抗感染药物,加强对PA的监测,采取有效措施控制耐药菌株出现,及时切断多重耐药菌株的水平传播,依据药敏试验结果,合理选用抗菌药物,对提高抗菌药物的治疗效果尤为重要。

参考文献

- [1] Martone WJ, Gaynes RP, Horan TC, et al. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) semiannual report, May 1995: A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System[J]. Am J Infect Control, 1995, 23(6): 377-385.
- [2] 李梅,潘发愤,周铁丽.多药耐药铜绿假单胞菌感染的危险因素分析[J].中华医院感染学杂志,2011,21(8):1593-1595.
- [3] Parker CM, Kutsogiannis J, Muscedere J, et al. Ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant organisms or *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence, incidence, risk factors, and outcomes[J]. J Crit Care, 2008, 23(1): 18-26.
- [4] El Solh AA, Alhajhusain A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(2): 229-238.
- [5] 闫玉兰,郭世辉,李萌,等.耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药机制研究[J].中华医院感染学杂志,2014,40(15):3650-3652.
- [6] 王军,张建菊,刘华,等.铜绿假单胞菌致慢性阻塞性肺疾病患者肺部感染的危险因素及耐药性调查[J].中华医院感染学杂志,2011,21(3):457-458.
- [7] 董颖.关节镜手术治疗急性膝关节损伤的围手术期护理[J].中国医药指南,2013,32(30):246-246.
- [8] 徐辉.磁共振成像对膝关节损伤的临床价值[J].中国卫生产业,2012,30(30):95.
- [9] 朱会英,王艳,张海燕,等.2010年老年科患者常见病原菌分布及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2011,21(21):4600-4602.
- [10] Kirschke DL, Jones TF, Craig AS, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* contamination associated with a manufacturing defect in bronchoscopes[J]. N Engl J Med, 2003, 348(3): 214-220.
- [11] Zavascki AP, Cruz RP, Goldani LZ. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies in hospitalized patients[J]. J Hosp Infect, 2005, 59(2): 96-101.
- [12] 刘树华,刘平洪,薛晓东,等.烧伤病房亚胺培南耐药铜绿假单胞菌的耐药性及耐药基因分析[J].中华烧伤杂志,2014,30(1):25-29.
- [13] 胡艳文.铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究进展[J].山西医药杂志,2013,42(11):637-639.
- [14] Kiratisin P, Chongthaleong A, Tan TY, et al. Comparative in vitro activity of carbapenems against major Gram-negative pathogens: results of Asia-Pacific surveillance from the COMPACT II study [J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 39(4): 311-316.
- [15] 孔海深,张伟丽,杨青,等. Mohnarin2011年度报告:华东地区细菌耐药监测[J].中华医院感染学杂志,2012,22(22):4971-4976.
- [16] 武晓敏,张丽媛,郭瑞娟,等.711株铜绿假单胞菌医院感染分布及耐药性研究[J].中国实用医药,2014(15):143-144.
- [17] 彭超,罗祎敏.神经内科铜绿假单胞菌的耐药性分析[J].中外健康文摘,2014,11(22):296.
- [18] 林冬玲,陈茶,曾建明.铜绿假单胞菌耐药机制研究进展[J].现代检验医学杂志,2011,26(3):91-95.
- [19] Bonfiglio G, Laksai Y, Franchino L, et al. Mechanisms of beta-lactam resistance amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolated in an Italian survey[J]. J Antimicrob Chemother, 1998, 42(6): 697-702.
- [20] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458.
- [21] Giakkoupi P, Petrikos G, Tzouvelekis LS, et al. Spread of integron-associated VIM-type metallo-beta-lactamase genes among imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(2): 822-825.
- [22] Mansour W, Poirel L, Bettahieb D, et al. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tunisia[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 64(4): 458-461.
- [23] Langae TY, Dsisi M, Huletsky A. An amp D gene in *Pseudomonas aeruginosa* encodes a negative regulator of Amp C beta-lactamase expression[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(12): 3296-3300.
- [24] Quale J, Bratu S, Gupta J, et al. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(5): 1633-1641.
- [25] Moya B, Dötsch A, Juan C, et al. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein[J]. PLoS Pathog, 2009, 5(3): e1000353.
- [26] 艾效曼,陶凤蓉,许宏涛,等.卫生部全国细菌耐药监测网2010年华北地区细菌耐药监测[J].中国临床药理学杂志,2011,27(12):932-939.
- [27] Ruiz-Martinez LL, d'ostuni V, Fusté E, et al. A mechanism of carbapenem resistance due to a new insertion element (ISPa133) in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Int Microbiol, 2011, 14(1): 51-58.
- [28] Li H, Luo YF, Williams BJ, et al. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies[J]. Int J Med Microbiol, 2012, 302(2): 63-68.
- [29] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(2): 95-108.
- [30] Lee JY, Ko KS. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo-β-lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea[J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 40(2): 168-172.
- [31] Chuanchuen R, Narasaki CT, Schweizer HP. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan[J]. J Bacteriol, 2002, 184(18): 5036-5044.
- [32] Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(11): 4783-4788.

(收稿日期:2015-04-28)