

Advances in Research on Drug Resistance Mechanism of *Acinetobacter Baumannii*

Guihua Dai Yihai Jiang Yun Peng

People's Hospital Newspaper of Wugang, Shaoyang, Hunan, 422400, China

Abstract

Acinetobacter baumannii (AB) is the most common bacterium in the genus *Acinetobacter*, which is commonly found in water, soil, hospital environments and systems where the human body communicates with the outside world. It is one of the important pathogenic bacteria in hospitals. In recent years, the infection of *Acinetobacter baumannii* has been increasing, and its drug resistance is also increasing. The carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* has developed rapidly in China. Recently, "fully drug resistant" *Acinetobacter baumannii* has been found. At present, *Acinetobacter baumannii* is regarded as the most important "superbug" in China.

Keywords

acinetobacter baumannii; metalloenzyme; integrase; efflux pumps

鲍曼不动杆菌耐药机制的研究进展

戴桂花 姜贻海 彭云

武冈市人民医院, 中国·湖南邵阳 422400

摘要

鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, AB) 为不动杆菌属中最常见的, 在水、土壤、医院环境及人体与外界相通的系统普遍存在, 为医院的重要致病菌之一。近年来此菌感染在增加, 且其耐药性也与日俱增, 耐碳青霉烯类的鲍曼不动杆菌在中国发展很快, 近来又发现“全耐药”鲍曼不动杆菌, 目前鲍曼不动杆菌被中国定为最重要的“超级细菌”^[1]。因此, 本文将对鲍曼不动杆菌的耐药机制进行概述。鲍曼不动杆菌耐药机制较复杂, 主要包括产抗菌药物灭活酶、外排系统的高表达、膜孔蛋白的缺失、药物作用靶位的变化、整合子、质粒、转座子、形成细菌生物膜和亚致死剂量的抗病原微生物药物诱导等。

关键词

鲍曼不动杆菌; 金属酶; 整合酶; 外排泵

1 产生抗菌药物灭活酶

鲍曼不动杆菌耐药的机制之一为产 β -内酰胺酶, 按照 Ambler 分子分类法, 该酶可分成 A、B、C、D 类, 其中 B 类及 D 类因具备碳青霉烯类水解活性更加引起人们的关注。

1.1 A 类 β -内酰胺酶

能被克拉维酸抑制的超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 是 A 类 β -内酰胺酶, 通常由质粒介导, 对青霉素类及 1~3 代头孢类抗菌药物耐药, 却对碳青霉烯类、头霉素及酶抑制剂类药物敏感^[2]。PER-1、VEB-1、GES 和 KPC 型 ESBLs 在鲍曼不动杆菌中较易见, 中国多见 PRE-1、TEM 型 ESBLs。上游插入 ISABa1 序列可增加 A 类酶表达, 产酶株都呈现出对氨基糖苷类、喹诺酮类和 β -内酰胺类的耐药。

1.2 B 类 β -内酰胺酶

B 类 β -内酰胺酶的活性主要依赖锌离子, 因此命名为金属酶, 可经转座子、质粒或染色体转移。因水解碳青霉烯类抗生素的活性强, 所以它是导致耐药率最高的 β -内酰胺酶, 主要分为四类, 即 IMP、VIM、SIM 及 NDM^[2,3]。金属酶具备很强的 β -内酰胺类药物降解作用, 能降解碳青霉烯类、青霉素类及头孢菌素类等, 金属螯合剂依地酸能抑制其活性, 但 β -内酰胺酶抑制剂不能降低其活性^[4]。

1.3 C 类 β -内酰胺酶

AmpC 酶基因在革兰阴性菌中广泛存在, 为鲍曼不动杆菌自然带有的, 通过染色体介导, *bla*_{ADC-like} 基因编码。通常情况下, 此酶极少表达, 上游插入序列 ISABa1 后, 启动 *bla*_{ADC}, 高水平表达 AmpC 酶, 致使细菌对头孢菌素类耐药^[2]。

研究发现,在酶数量和结构方面,鲍曼不动杆菌中的 *ampC* 与其他 *ampC* 不同,形成了新的家族,称之为不动杆菌衍生头孢菌素酶 (Acinetobacter-derived cephalosporinases, ADCs)。ADCs 能够水解青霉素类、广谱和窄谱的头孢类药物,但对碳青霉烯类药物和头孢吡肟无效^[5-7]。中国可见 ADC-65、ADC-66、ADC-68 的报道^[8]。

1.4 D 类 β -内酰胺酶

D 类丝氨酸苯唑西林酶 (OXA 酶) 位于质粒或者染色体上,对半合成青霉素水解活性强,大多数 OXA 型 β -内酰胺酶具备水解碳青霉烯类的特性。与金属酶相比, OXA 类酶水解碳青霉烯类和广谱头孢菌素类的活性较低^[2],但这类酶具有一些共同特征:如结构独特,能减少鲍曼不动杆菌外膜蛋白的表达,对 β -内酰胺类药物耐药率高^[9],有可能与外排泵及膜通透性等其他耐药机制关系紧密,有利于加强细菌内部耐药机制之间的联系。鲍曼不动杆菌最主要的 D 类酶亚型有 OXA-23、27 和 OXA-24、25、40, OXA-23 是最早被关注的鲍曼不动杆菌 OXA 型碳青霉烯酶^[10],并且在全球的流行最为广泛^[11]。

2 药物外排泵的形成

按照氨基酸同源性的不同,鲍曼不动杆菌的外排泵分成 5 个家族,分别是多药及毒性化合物外排家族 (MATE)、ATP 结合盒超家族 (ABC)、主要易化子超家族 (MFS)、小多重耐药性家族 (SMR) 及耐药结节化分化家族 (RND)^[12,12]。RND 家族为研究比较透彻的,主要由外膜通道蛋白、膜融合蛋白及内膜转运蛋白组成,介导多重药物耐药。现已发现的鲍曼不动杆菌主动外排系统有 AdeXYZ、AdeABC、ABeM、AdeIJK、AdeDE 等^[13]。AdeABC 是第 1 个被发现的 RND 外排泵^[1]。AdeABC 一般由染色体编码,由上游的 *adeR* 和 *adeS* 组成其调控系统,*adeR* 或 *adeS* 发生突变或表达变化后引起 AdeABC 表达水平上升,外排能力增加,导致对多种药物耐药^[14]。最新发现,ISABa1 序列插入到 *AdeS* 中也可以使外排泵 AdeABC 过表达^[15]。AdeIJK 是第 2 个被发现的 RND 外排系统^[16],为鲍曼不动杆菌独有^[17],作用底物普遍,造成鲍曼不动杆菌对 β -内酰胺类药物的固有耐药^[16]。

3 外膜孔蛋白的减少或缺失

细菌外膜是一亲水性通道,细菌通过外膜孔蛋白转运许

多亲水小分子物质,同时也转运多种抗病原微生物药物。细菌外膜孔蛋白的改变导致外膜对多种抗病原微生物药物通透性降低,进而导致多重耐药。转运至细菌内的抗病原微生物药物和细菌内膜上的青霉素结合蛋白 (PBPs) 相结合,抑制细菌细胞壁的合成,使细菌失去保护达到杀菌的目的。近来,在不动杆菌中发现多种孔蛋白,如 CarO 蛋白、OprD 样蛋白、外膜蛋白 A (毒力蛋白 OmpA)、外膜蛋白 W (OmpW)、热修饰蛋白 (Heat-modifiable protein, HMP-AB)、33-36kDa 蛋白等。在鲍曼不动杆菌中,主要有 3 类外膜蛋白与亚胺培南耐药有关,分别为 29kDa 的 CarO 蛋白、33-36kDa 蛋白和 43kDa 的 OprD 样蛋白^[18]。近来鲍曼不动杆菌关注较多的外膜蛋白为 CarO,为 2002 年阿根廷学者 Limansky 等发现并命名^[19],主要与碳青霉烯类药物的耐药性有关^[20]。2013 年,和平等随机从 *carO* 基因阳性的鲍曼不动杆菌菌株中选出 16 株,采用 RT-PCR 技术检测 *carO* 的 mRNA 表达水平,发现耐药组与敏感组细菌之间 *carO* 基因表达量有差别,耐药组表达量明显低于敏感组^[21]。

4 药物作用靶点修饰及改变

4.1 喹诺酮类药物作用靶点

鲍曼不动杆菌药物作用靶点的修饰及变化也是耐药的重要机制之一,其中对喹诺酮类药物耐药机制的研究比较透彻。该类药物的作用靶点主要是细菌 DNA 螺旋酶 (GyrA2B2) 与拓扑异构酶 IV (ParC2E2)^[2]。DNA 螺旋酶由 *gyrA* 和 *gyrB* 基因编码的两个亚单位组成,拓扑异构酶 IV 结构与 DNA 螺旋酶相似,也由 *parC* 和 *parE* 基因编码的两个亚单位组成^[22]。不动杆菌中主要是 *gyrA* 和 *parC* 基因发生突变,修饰 DNA 螺旋酶及拓扑异构酶结构,使抗病原微生物药物和 DNA 酶复合体的亲和性下降,从而导致耐药^[2]。

4.2 氨基糖苷类药物作用靶点

另外,鲍曼不动杆菌还生成 16SrRNA 甲基化酶 (ArmA),其可以甲基化全部氨基糖苷类药物的作用靶点 (16SrRNA),从而导致对氨基糖苷类药物耐药^[23]。

4.3 β -内酰胺类药物作用靶点

β -内酰胺类抗菌药物的作用位点是青霉素结合蛋白 (PBPs), PBPs 结构和性能变化可导致与 β -内酰胺类药物的亲和性下降,从而产生耐药。研究指示 PBP-2 表达降低与

鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类药物有关^[24]。

5 整合子的参与

整合子的基本结构由5'保守末端、3'cs及二者之间的可变序列组成^[25]，而可变区存在数目不一的基因盒，且大都是耐药基因。其可以存在于质粒、转座子等中，是一种可运动的遗传单位，利用捕捉外源基因的方法，在各种属之间进行基因的水平移动，将其转变为功能基因的DNA片段，从而导致细菌耐药性的传播^[25,26]。在无抗菌药物的自然环境中，整合子检出率仅为3.6%，且半数以上不带有耐药基因盒^[27]，说明其捕捉耐药基因盒和抗菌药物选择压力相关。在细菌的生存受到抗菌药物威胁时，整合酶捕捉外来基因盒，或除去与重排自己的基因盒，以适应外部环境的改变，即产生耐药性^[28]。目前，整合子共分为9类，而和鲍曼不动杆菌耐药相关的为I~III类，检出率最高的是I类。王睿等^[29]研究发现I类整合子阳性菌株对磺胺类、氨基糖苷类药物的耐药率高于没有整合子的菌株，说明整合子对细菌耐药性的散播有重要作用。

6 质粒

1994年，研究者分离出一种具有多重耐药表型的质粒pMG252，它能介导细菌对多种抗病原微生物药物的耐药，且通过接合转移pMG252可以在宿主菌中传播^[28]，致使细菌对喹诺酮类药物的耐药性显著升高。其喹诺酮耐药基因为Qnr，编码产物为Qnr蛋白，第一次证实质粒可引起喹诺酮类药物耐药。pMG252能引起细菌对喹诺酮类、头孢菌素类、氨基糖苷类和碳青霉烯类药物的耐药，最终致使多重耐药的发生。

7 转座子

转座子(Transposon, Tn)是细菌基因组中可在不同位点移动的DNA片段。转座子移动时能随带外源性的耐药基因，使细菌获得耐药性。最简单的转座子为插入序列(Insertion sequence, S)，大小在0.6~2kb之间，位于耐药基因两侧，IS能编码一种转座酶^[28-30]。目前已发现20多个插入序列家族，最常见的是IS3、IS256、IS5和IS4家族，这4个家族的成员超过总插入序列的52%^[15]。中国学者在鲍曼不动杆菌中测到插入序列IS26、ISABa1^[31]。

8 形成细菌生物膜

细菌生物膜是鲍曼不动杆菌在患者体内植入物中长期存活的主要方式，因此有体内植入物病人的感染率非常高^[32]。另外，鲍曼不动杆菌通过生物膜的形式在医院病房环境长时间存在。生物膜能引起AB耐药的原因有二：一方面将抗菌药物隔绝在膜外；另一方面生物膜内部新陈代谢减慢，以致细菌各反应减慢包括抗菌药物的作用^[8,33,34]。鲍曼不动杆菌产生细菌生物膜与以下多种因素有关：早些年研究表明，生物膜形成与菌毛关系密切^[35]；葡萄球菌同源性生物膜相关蛋白Bap和外膜蛋白OmpA与鲍曼不动杆菌生物膜产生有关，其中外膜蛋白OmpA是必需的；在静态环境中，鲍曼不动杆菌胞外多糖与细菌产生生物膜不相关，而在动态与压力环境下对保持生物膜的完整性相当重要^[36]；鲍曼不动杆菌形成生物膜群体感应分子，而不存在群体感应分子的ABa I突变株最终不可使细菌产生生物膜^[37]。

9 亚致死量的抗病原微生物药物致使鲍曼不动杆菌发生耐药

亚致死量的抗病原微生物药物不仅仅存在于医院治疗期的病人体内，也存在于被残留抗病原微生物药物污染的水、土地和食物当中。亚致死剂量抗病原微生物药物于鲍曼不动杆菌是一种选择压力，当这种压力达到一定程度时就能够引起基因的突变，从而导致基因转录和蛋白表达水平上的一系列变化，菌体用此来抵抗环境压力免遭消灭。而治疗量的抗病原微生物药物，极可能未至达细菌感染部位就被稀释为亚致死剂量，这是治疗失败的主要原故。经使用多黏菌素后，AB的35个蛋白发生了不同变化，发生变化的蛋白有分子伴侣蛋白、外膜蛋白、与蛋白合成相关的蛋白、以及与代谢相关的蛋白^[38]。

因AB能在医院内长时间存活，使其能飞快传播而突发流行。危重病人侵入性设备的使用、免疫抑制剂的应用和不合理使用抗病原微生物药物等均使该菌定植和感染的风险升高。AB为院内感染的重要致病菌之一，ICU的检出率越来越高，且感染病人病情一般比较危重。鲍曼不动杆菌耐药机制复杂，而临床分离菌株多半是多种耐药机制并存。而世界频频见耐药菌株的爆发、流行的报道，其耐药性的传播已成为

世界关注的问题,由此致使的感染不仅仅是一个医疗问题,更是一个社会问题,须高度重视。所以,防止流行株散播的措施有:一则合理应用抗病原微生物药物,杀灭病原菌,以阻止耐药基因转移;二则密切监控医院内的耐药流行株;另外,医院环境的管理,医务工作者的无菌操作观念,正确的洗手方法等。

参考文献

- [1] 陈柏义,何礼贤,胡必杰,等.中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识[J].中国医药科学,2012,2(8):3-8.
- [2] 胡超,赵子文.多重耐药鲍曼不动杆菌耐药机制及治疗进展[J].广东医学,2015,36(12):1803-1806.
- [3] Kouyama Y,Harada S,Ishii Y,et al.Molecular characterization of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* spp.in Japan:predominance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 and IMP-type metallo- β -lactamase-producing non-*baumannii* *Acinetobacter* species[J].J Infect Chemother,2012,18(4):522-528.
- [4] 凌保东.鲍曼不动杆菌抗生素多重耐药性:耐药机制与感染治疗对策[J].中国抗生素杂志,2010,35(4):241-254.
- [5] Hujer KM.Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase,ADC-7 β -lactamase:defining a unique family of class C enzymes[J].Antimicrobial Agents & Chemotherapy,2005,49(7):2941-2948.
- [6] Carlson B.Antibody-Drug Conjugates:Where the Action Is:ADCs-The New Frontier[J].Biotechnol Healthc,2012,9(4):28-31.
- [7] 欧倩怡.临床分离鲍曼不动杆菌的耐药性及其耐药机制的研究[D]:[硕士学位论文].重庆:第三军医大学,2013.
- [8] 杨银梅,叶惠芬,张伟红,等.臭鼻克雷伯和鲍曼不动杆菌中检出NDM-1型金属 β 内酰胺酶基因[J].国际检验医学杂志,2011,32(13):1407-1409.
- [9] Bou G,Cerveró G,Domínguez MA,et al.Characterization of nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme:high-level carbapenem resistance in *A.baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases[J].J Clin Microbiol,2000,38(9):3299-3305.
- [10] Donal HM,Scaife W,Amyes SG,et al.Sequence analysis of ARI-1,a novel OXA β -lactamase,responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92[J].Antimicrob Agents Chemother,2000,44(1):196-199.
- [11] Karah N,Sundsford A,Towner K,et al.Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*[J].Drug Resist Updat,2012,15(4):237-247.
- [12] Li XZ,Zhang L,Nikaido H.Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*[J].Antimicrob Agents Chemother,2004,48(7):2415-2423.
- [13] 宋晓萍,刘萍萍,孙明娥,等.鲍曼不动杆菌耐药性监测与外排泵adeB基因表达水平检测[J].国际检验医学杂志,2011,32(12):1297-1298.
- [14] Magnet S,Courvalin P,Lambert T.Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454[J].Antimicrob Agents Chemother,2001,45(12):3375-3380.
- [15] Ruzin A,Keeney D,Bradford P A.Ade ABC 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.
- [16] Damier-Piolle L,Magnet S,Brémond S,et al.Ade1JK,a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*[J].Antimicrob Agents Chemother,2008,52(2):557-562.
- [17] Rajamohan G,Srinivasan VB,Gebreyes WA.Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides[J].Antimicrob Agents Chemother,2010,65(2):228-232.
- [18] 陈鹏,丁进亚.鲍曼不动杆菌耐药机制的研究进展[J].医学综述,2012,18(15):2463-2466.
- [19] Limansky A S,Mussi M A,Viale A M.Loss of a 29 kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance[J].J Clin Microbiol,2002,40(12):4776-4778.
- [20] Lu P L,Doumith M,Livermore DM,et al.Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital:spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase[J].J Antimicrob Chemother,2009,63(4):641-647.

- [21] 和平, 刘原, 潘双, 等. 耐亚胺培南鲍氏不动杆菌 *carO* 基因表达的研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(14): 3301–3304.
- [22] 张樱, 陈亚岗, 杨青. 不动杆菌感染及耐药机制的研究进展 [J]. 国外医学·流行病学传染病学分册, 2005, 2: 109–112.
- [23] 陈琳, 蔡挺, 张顺, 等. 鲍曼不动杆菌氨基糖苷类修饰酶和 I 类整合酶基因研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(1): 34–36, 40.
- [24] Fernandez–Cuenca F, Martinez–Martinez L, Conejo M C, et al. Relationship between β -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.
- [25] 唐吉斌, 宋有良. 整合子与鲍曼不动杆菌多重耐药机制研究进展 [J]. 医学综述, 2009, 15(7): 984–987.
- [26] 杨刚. 鲍曼不动杆菌耐药性分析及产碳青霉烯酶状况的研究 [D]: [硕士学位论文]. 新疆乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2016.
- [27] Rosser SJ, Young HK. Identification and characterization of class I integrons in bacteria from an aquatic environment [J]. Journal of antimicrobial chemotherapy, 1999, 44(1): 11–18.
- [28] 黄帆. 鲍曼不动杆菌的耐药性与整合子的关系研究 [D]: [硕士学位论文]. 广西南宁: 广西医科大学, 2014.
- [29] 王睿, 童卫杭, 尚雯, 等. 鲍曼不动杆菌整合子阳性与多重耐药的相关性研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2007(06): 424–429.
- [30] Urschitz J, Kawasumi M, Owens J, et al. Helper–independent piggy Bac plasmids for gene delivery approaches: strategies for avoiding potential genotoxic effects [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(18): 8117–8122.
- [31] 苏兆亮, 糜祖煌, 孙光明, 等. 多药耐药鲍氏不动杆菌耐药性与转座子及插入序列遗传标记研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2010, (20): 3085–3087.
- [32] Djeribi R, Bouchloukh w, Jouenne T, et al. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters [J]. Am J Infect Control, 2012, 40(9): 854–859.
- [33] Espinal P, Marti S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces [J]. J Hosp Infect, 2012, 80(1): 56–60.
- [34] Yeom J. HNMR–based metABolite profiling of planktonic and biofilm cells in *Acinetobacter baumannii* [J]. PLo S One, 2013, 8(3): e57730.
- [35] 陈代杰, 郭蓓宁, 杨信怡, 等. 鲍曼不动杆菌耐药机制 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(03): 286–288.
- [36] Choi AH, Slamti L, Avci FY, et al. The *pga* ABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly–bact–1–6–N–acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation [J]. J bacterial, 2009, 191(19): 5953–5963.
- [37] Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA, et al. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii* [J]. J bacteriol, 2008, 190(9): 3386–3392.
- [38] Fernández–Reyes M, Rodríguez–Falón M, Chiva C, et al. The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* a proteomic perspective [J]. Proteomics, 2009, 9(6): 1632–1645.