

鲍曼不动杆菌耐药基因及检测技术研究进展

彭 萱

广西壮族自治区江滨医院 广西南宁 530021

【摘要】因为临床广谱抗生素应用普遍,鲍曼不动杆菌的耐药率也随之提升,导致出现越来越多的泛耐药以及全耐药菌。因鲍曼不动杆菌通常感染的是免疫力差的重症患者,若其存在多重耐药性的特点,会大大增加临床治疗难度,这也是临床抗感染工作中的难点。本文,通过阐述鲍曼不动杆菌的常见耐药机制,分析鲍曼不动杆菌耐药基因的检测方法,为临床检测鲍曼不动杆菌提供帮助。

【关键词】鲍曼不动杆菌;耐药基因;检测技术;研究进展

【中图分类号】R372

【文献标识码】A

【文章编号】1002-3763 (2022) 12-158-02

鲍曼不动杆菌属于革兰染色阴性球杆菌,无动力,不会发酵葡萄糖,通过氧化酶实验,结果显示为阴性。鲍曼不动杆菌对于营养的要求简单,可生长在宽泛温度以及 pH 值的环境下,对于消毒剂、防腐剂的耐受性较强,可以存活在非生物、生物表面形成的生物膜,甚至是干燥物体表面上五个月之久^[1]。正因鲍曼不动杆菌具有如此生物学特征,故其在医院广泛传播。同时,又因鲍曼不动杆菌的获得性耐药能力强,所以其成为医疗工作中常见病原体^[2]。鲍曼不动杆菌菌株可以对多种微生物药物产生耐药性,比如:大环内酯类药物、喹诺酮类药物、 β 内酰胺类药物等。

1 鲍曼不动杆菌的耐药机制

鲍曼不动杆菌的耐药机制较多,因其具有较多的耐药机制,故临床中可治疗鲍曼不动杆菌感染的抗生素种类越来越少。

1.1 β -内酰胺酶

β -内酰胺酶可通过水解酶节水,导致抗生素失活,进而使鲍曼不动杆菌产生耐药性。根据研究发现^[3]:鲍曼不动杆菌能够整合外源性 DNA,其基因组具有高频外源性 DNA,说明病原体中基因转移频繁,由此可见,编码 β -内酰胺酶的耐药基因可从不同菌种间传递,进而形成耐药菌株。

1.2 外排泵

外排泵属于细菌中的一种膜蛋白,其能够将有害物质从细菌细胞中泵出至外部环境。编码细胞的外排泵基因序列可存在于细菌本体染色体上,也可以存在于能够移动的遗传元件中。外排泵可以将多种底物进行选择性地排出,主要包括:染料、抗生素、毒素、代谢废物以及消毒剂等,它们既可以作用在单一底物上,也能够作用在结构多样的底物上。外排泵和鲍曼不动杆菌和不同种类的抗生素的耐药性具有密切联系。因外排泵的基因来源具有多样性特点,并且作用的底物也具有多样性,故外排泵种类较多,可以以外排泵的编码基因序列、作用底物以及消耗能量的差异为根据,将外排泵分成几个家族,分别为:蛋白细菌抗菌化合物外排家族、耐药结节细胞分化家族、小多重耐药家族、主要协助转运超家族。每个家族其作用机制各不相同。

1.3 渗透性缺陷

孔蛋白属于外膜蛋白,其能够对细胞渗透性以及包膜渗透性进行调节,包膜渗透性发生改变,能够对抗生素耐药性产生影响。孔蛋白形成通道允许分子跨外膜运输,并在鲍曼不动杆菌的毒力中起到重要作用。因孔蛋白可对膜的渗透性产

生影响,故他们在细菌耐药机制中的作用也是十分明显的。比如:孔蛋白的表达量降低,甚至表达缺失,和鲍曼不动杆菌对碳青霉烯的抗性具有一定联系。相关研究发现^[4]:产生碳青霉烯酶作用的鲍曼不动杆菌中 Omp29 发生缺失,会大大增加亚胺培南的耐药性;孔蛋白的 OmpA 以及 CarO 能够和碳青霉烯酶的 OXA-23 形成互相作用,对抗生素的耐药性产生影响;除此之外,细菌膜蛋白以外的包膜成分发生改变,同样会对鲍曼不动杆菌对部分抗生素的耐药性产生影响。

1.4 氨基糖苷修饰酶

氨基糖苷修饰酶的修饰作用能够使鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类抗生素产生耐药性。通过 AMEs 对 AGs 产生化学修饰作用,可以分成三个不同亚型,分别为:N-乙酰转移酶、O-核苷酸转移酶、O-磷酸转移酶。N-乙酰转移酶的作用就是催化底物的乙酰化作用;O-核苷酸转移酶可以催化氨基糖苷类抗生素分子上的磷酸盐基团;O-磷酸转移酶可以根据底物氨基糖苷的不同,依靠 ATP 腺苷化修饰酶进行作用。AMEs 基因一般会处于可移动的元件上,其能够和其他耐药基因共同转移到能够移动的元件上,之后通过水平基因转移,传播至致病菌中,导致敏感菌株获得 AMEs 耐药基因,使其耐药性大大提升。根据相关研究发现^[5]:许多 MDR 鲍曼不动杆菌的分离物能够形成氨基糖苷修饰酶组合。

1.5 靶位点改变

抗生素靶位点的修饰能够使鲍曼不动杆菌逐渐形成耐药性。抗生素的不同靶位点的修饰,能够针对不同类型的抗生素,进行对多种抗生素产生耐药性。比如:在无已知抗性机制的前提下,特定 PBPs 的修饰发生改变,能够使其具有亚胺培南低亲和力,这种过表达情况,能够使亚胺培南形成抗性。DNA 促旋酶属于喹诺酮类抗生素,其可以作用在鲍曼不动杆菌上,并形成耐药靶点,该酶属于四聚体,两个 A 亚基和两个 B 亚基结合而成,A 亚基的编码基因 *fyrA* 发生点突变,其能够改变 DNA 促旋酶分子结构以及分子功能,从而降低喹诺酮药物和 DNA 促旋酶的结合能力,最后产生细菌耐药性^[6]。DNA 拓扑异构酶 IV 属能够作用在细菌的次要靶点上,近期有研究发现:该酶的 C 亚基中的 ParC 蛋白分子第 87 位丝氨酸发生突变,能够使鲍曼不动杆菌对喹诺酮类药物形成高度耐药性。还有研究发现:鲍曼不动杆菌 TetM 通过核糖体保护和四环素的耐药性具有一定联系。

2 鲍曼不动杆菌耐药基因检测

因为鲍曼不动杆菌的特点, 导致其成员院内感染的主要病原菌, 严重危害了医院危重症患者的生命, 因此, 对于危重症感染患者, 需要及时检验, 得到准确检验结果, 意义重大。传统耐药机制的检测一般是采用表型检测或者生物化学检测, 要么是需要培养, 延长检测时间, 要么是检测的耐药机制尚不全面, 具有局限性。近些年来, 分子生物学以及基因工程技术快速发展, 临床菌株耐药基因分子的检测技术越发成熟, 分子水平的耐药基因检测方法种类越来越多^[7]。基因检测优势众多, 包括操作简单、获取结果快速, 同时, 还可根据是否存在耐药基因、基因表达量, 对菌株是否存在耐药性进行预测, 可指导重症感染患者合理应用抗感染药物, 若应用合理, 则可以替代目前药敏检测, 可成为临床部分病原菌耐药性检测的金标准。

2.1 聚合酶链反应技术 (PCR)

目前, 聚合酶链反应技术主要包括三种方法, 分别为: 普通 PCD、实时荧光定量 PCR、多重 PCR。多重 PCR 是目前相对前沿的技术, 其能够在同一个反应体系中, 对多种碳青霉烯酶耐药基因分裂进行检测。多重 PCR 分子诊断系统具有快速耐药基因检测的功能, 其中配备的配套试剂, 可以在短期内检测耐药基因, 甚至能够在 60min 内定性检测标本中的纯菌落, 同时, 还可以将常见碳青霉烯酶基因进行区分。和传统的 PCR 技术性比, 多重 PCR 技术能够快速、便捷地检测耐药基因型, 可为临床及时提供检测结果, 指导更精确的抗感染治疗^[8]。

2.2 基因芯片技术

基因芯片技术原理就是在一定固相的支持物表面固定已知序列探针, 通过 PCR 扩增 DNA 样品, 和之前固定在固相上的探针杂交; 通过对标记 DNA 样本和探针杂交形成信号的强弱进行检测, 进而定性或定量分析目标序列。有相关研究发现^[9]: 固相芯片技术对细菌 β -内酰胺类耐药相关基因进行检测, 固相芯片技术结果和传统 PCR 技术的一致性较高。但值得关注的是, 固相芯片技术开发的可检测项目较少, 并且因为需在芯片表面原位合成核酸探针, 故容易出现错误情况, 或者混入杂质, 对杂交特异性产生一定程度的影响; 液相芯片技术能够弥补固相芯片的缺陷, 比如: 在对大分子检测时, 不易受到动力学指标的影响, 但因受到反应体系中 PCR 的多重扩增能力的限制, 再加上检测仪器的造价高, 导致无法有效推广于临床。

2.3 环介导等温扩增法

环介导等温扩增法属于新型基因检测技术, 其原理是针对靶基因上的六个特异性部位, 设计出四种引物, 在 BsrDNA 聚合酶的链置换活性的作用下, 在恒温条件下催化, 合成新链, 并高效扩增靶基因。环介导等温扩增技术过程包括三个主要阶段, 分别为: 哑铃状模板合成阶段、循环扩增阶段、伸长以及再循环阶段。因为该方法的特异性高、效率高、操作简单, 广泛应用于临床诊断、病原微生物检测、寄生虫鉴定等领域中。

2.4 基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱检测技术

基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱检测技术主要应用于微生物的鉴定中, 其鉴定原理为^[10]: 待测样品和基质共同形成结晶薄膜, 通过激光照射, 电离生物分子, 在电场的作

用下, 能够飞过飞行管道, 因生物分子体积以及电荷数量不同, 飞行时间也不同, 检测到达检测器的飞行时间对离子的质荷比进行测定, 可形成特征性谱图, 之后和数据库谱图对比, 对待测样本进行确认。质谱分析因其准确性高、检测速度快, 有较大的可能被应用在细菌鉴定以及微生物鉴定中。

2.5 第二代测序

第二代测序技术的基本原理就是边合成边测序, 在反应体系中参与 DNA 合成的 dNTP 事先用不同颜色的荧光物质标记, 然后在 DNA 聚合酶的作用下, 形成待测序列的补链, 在互补链上, 因不同 dNTP 结合, 就会释放不同荧光信号, 检测系统可捕捉荧光信号, 经过专用计算机软件进行处理, 获取目标 DNA 碱基对序列信息。和第一代测序技术相比, 其成本更低、通量更高。菌株类型、种属鉴定、耐药基因、毒力基因的基因组数据信息可以通过测序获取。

3 结语

鲍曼不动杆菌的耐药机制较多, 但目前临床中尚未确认其是否具有未知的耐药机制, 再加上鲍曼不动杆菌的生长条件简单, 环境抵抗力强, 给重症感染患者的生命造成严重威胁。随着分子检测技术的发展速度越来越快, 可更好阐明鲍曼不动杆菌的耐药机制, 为临床治疗、用药提供指导作用。

参考文献

- [1] 章志勇, 边奕鑫, 薛万华, 等. 鲍曼不动杆菌耐药基因及检测技术研究进展 [J]. 医学检验与临床, 2021, 032(010):46-52.
- [2] 周玉, 龚美亮, 闫中强, 等. 分离自老年病房的鲍曼不动杆菌耐药机制初步研究 [J]. 现代生物医学进展, 2019(1):99-103+98.
- [3] 刘丽娟. 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶耐药基因检测及临床研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2015, 35(4):252.
- [4] 陈炎添, 熊燕, 苏雪棠, 等. 呼吸重症监护病房多重耐药鲍曼不动杆菌耐药基因检测及耐药性分析 [J]. 临床荟萃, 2012, 27(19):1684-1686+1690.
- [5] 韩莉, 马英杰, 袁文常, 等. 分离自消化内科多重耐药鲍曼不动杆菌耐药基因检测分析 [J]. 华南国防医学杂志, 2017, 31(7):437-441.
- [6] 王卫华, 陈洁, 毛雄英, 等. 泛耐药鲍曼不动杆菌获得性耐药基因, 可移动遗传元件检测及指标聚类分析 [J]. 浙江检验医学, 2012(2):10-14.
- [7] 周鹏鹏, 陈娜, 朱柯慈, 等. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药基因检测及同源性 [J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(6):526-532.
- [8] 徐益, 王佳, 高辉, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药性及耐药基因检测 [J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(8):993-995.
- [9] 徐宝灵, 曾桂芬. 鲍曼不动杆菌耐药机制及感染控制的研究进展 [J]. 华夏医学, 2018, 31(1):204-207.
- [10] 林雪霏, 蒋月婷, 邓颖珊, 等. 不同耐药性鲍曼不动杆菌耐药特征及常见耐药基因检测分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(22):2765-2769.