

- skin delivery of genistein and other two isoflavones by microemulsion and prevention against UV irradiation-induced erythema formation [J]. Chem Pharm Bull(Tokyo), 2010, 58(3): 398-401.
- [48] KOGAN A, GARTI N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles [J]. Adv Colloid Interface Sci, 2006, 123-126, 369-385.
- [49] CAO F H, OUYANG W Q, WANG Y P, et al. A combination of a microemulsion and a phospholipid complex for topical delivery of oxymatrine [J]. Arch Pharm Res, 2011, 34(4): 551-562.
- [50] SCHNEIDER A, GARLICK J A, EGLES C. Self-assembling peptide nanofiber scaffolds accelerate wound healing [J]. PLoS One, 2008, 3(1): e1410.
- [51] YU P J, WANG L P, GUO Y. Repair of skin defect with collagen-chitosan compound nanofiber membrane [J]. Chin J Tissue Eng Res(中国组织工程研究与临床康复), 2011, 15(51): 9561-9564.
- [52] DEAN J R. Weighted collagen microsphere for immobilizing bioactive material [P]. U S: 4997753, 1991-03-05.
- [53] AMRUTIYA N, BAJAJ A, MADAN M. Development of microspheres for topical delivery of mupirocin [J]. AAPS PharmSciTech, 2009, 10(2): 402-409.
- [54] YANG J, NI B, LIU J, et al. Application of liposome-encapsulated hydroxycamptothecin in the prevention of epidural scar formation in New Zealand white rabbits [J]. Spine J, 2011, 11(3): 218-223.
- [55] GHOSH V, SARANYA S, MUKHERJEE A, et al. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013(105): 152-157.

收稿日期: 2013-08-30

临床常见病原菌对替加环素耐药机制研究进展

陈子晞, 陈方慧(杭州市第一人民医院, 杭州 310006)

摘要: 目的 探讨临床常见耐药菌对替加环素产生耐药的机制, 对相关研究进展进行综述。方法 综述了近年来国内外相关报道, 根据细菌产生耐药的机制进行分类阐述, 并对替加环素耐药菌的流行情况进行分析。结果 细菌对替加环素产生耐药的机制主要与主动外排系统有关, 另外还包括药物作用靶位的改变、耐药酶的产生 2 个方面。在主动外排机制中, RND 家族外排泵起着关键作用。替加环素耐药菌在许多国家已经成为临床抗感染难题。结论 替加环素耐药机制还需要进一步研究, 从而指导临床合理使用替加环素。

关键词: 细菌; 替加环素; 耐药; 外排泵

中图分类号: R978.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)11-1423-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.11.031

Advances in Resistant Mechanisms of Clinical Isolated Bacteria to Tigecycline

CHEN Zixi, CHEN Fanghui(*The First People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310006, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To review the research progress on the resistant mechanisms of tigecycline-resistant bacterias in clinic. **METHODS** Base on the correlative reports in recent years, the resistant mechanisms of tigecycline-resistant bacterias were illustrated respectively. Also, the epidemiology of tigecycline-resistant bacterias were analyzed subsequently. **RESULTS** The resistant mechanisms of tigecycline-resistant bacterias mainly involved the efflux pump system and alteration of the drug targets, as well as the occurrence of resistant enzymes. The RND efflux pump plays a key role in the efflux pump system. Tigecycline-resistant bacterias has become a tough problem in clinical anti-infection therapy. **CONCLUSION** The definite mechanism of tigecycline resistant remains elusive. Further study are needed so as to guide rational use of tigecycline in clinic.

KEY WORDS: bacteria; tigecycline; drug resistance; efflux pump

近年来, 由于抗生素的广泛应用, 细菌耐药问题日趋严重, 多重耐药菌的阵容不断扩大, 临床抗感染形势日趋严峻。细菌主要通过以下 5 种方式对抗菌药物产生耐药^[1]: ①产生灭活酶或钝化酶, 将抗菌药物转化为无活性的代谢物; ②改变

靶位结构, 使抗菌药物可作用靶位的数量减少; ③降低细胞膜的通透性, 减少抗菌药物的进入; ④产生生物被膜, 抵御抗菌药物的杀伤; ⑤通过主动外排系统向细胞外泵出药物。主动外排系统有 5 种基本类型^[2]: ATP 结合盒超家族(ATP binding

cassette family, ABC); 耐药节结化细胞分化家族(resistance nodulation division family, RND); 主要易化子超家族(major facilitator superfamily, MFS); 小多重耐药家族(small multidrug resistance family, SMR); 多药及毒性化合物外排家族(multidrug and toxic-compound extrusion family, MATE)。替加环素于 2005 年 6 月获得美国 FDA 批准, 成为首个应用于临床的新型甘氨酸环素类抗菌药物, 在耐药菌的治疗方面被寄予了很大的期望, 但随着临床应用, 耐药现象也开始出现。目前国外已有细菌产生替加环素耐药性相关机制的研究, 但尚无综述报道。本文就细菌对替加环素产生耐药机制作一综述。

1 主动外排系统

1.1 耐药节结化细胞分化家族

1.1.1 AcrAB 外排泵 在医院感染中, 肠杆菌科细菌是常见的病原菌之一, 并且出现了碳青霉烯类耐药的菌株, 替加环素和多粘菌素已成为最后的选择。随着替加环素的应用, 对替加环素耐药的肠杆菌科细菌也开始出现。中国台湾地区的一项细菌监测数据显示, 碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌对替加环素敏感率为 62.1%^[3], 而英国的数据显示仅有 46.9%的碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌对替加环素敏感^[4]。比利时的数据显示, 在常见的多重耐药肠杆菌属细菌, 如阴沟肠杆菌、产气肠杆菌, 96%对替加环素不敏感^[5]。另有研究对比发现, 碳青霉烯耐药肠杆菌属细菌对替加环素的不敏感率(51%)要高于碳青霉烯类敏感的肠杆菌属细菌(22%)。对于产超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum beta-lactamase, ESBL)大肠埃希菌^[6], 其对替加环素不敏感率为 35%^[5]。

AcrAB 外排泵常见于肠杆菌科细菌的细胞膜上, 具有典型 RND 家族结构特征, 包括 3 个组成部分: 内膜转运蛋白、膜融合蛋白和外膜蛋白。外排转运蛋白(AcrB)作为内膜转运蛋白在内膜或胞浆中捕获底物, 然后由膜融合蛋白(AcrA)介导, 通过外膜蛋白把底物转运至胞外^[7]。在替加环素仍处于体外试验阶段, 就发现大肠埃希菌细胞膜上的 AcrAB 外排泵可将替加环素泵出胞外, 导致大肠埃希菌对替加环素产生耐药。实验发现, 敲除 *acrAB* 基因后的细菌突变株与敲除前相比, 可显著提高其对抗菌药物的敏感性; 另外, 应用外排泵抑制剂后也可恢复细菌对替加环素的敏感性^[8]。除

了大肠埃希菌, 其余肠杆菌科细菌对替加环素也普遍不敏感, 其中肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌、阴沟肠杆菌及产气肠杆菌对替加环素的耐药性也被认为与 AcrAB 外排泵有关^[9-10]。

在大肠埃希菌细胞膜上还发现了 AcrEF 外排泵, 它与 AcrAB 外排泵有高度的同源性, 并有相似的底物, 其中也包括替加环素^[11]。

1.1.2 AdeABC 外排泵 鲍曼不动杆菌有着广泛的耐药性和较强的环境生存能力, 主要引起医院感染, 尤其是重症监护病房院内感染。广泛耐药鲍曼不动杆菌(extensively drug resistant *A. baumannii*, XDRAB)几乎对所有的抗菌药物耐药, 仅对替加环素和多粘菌素敏感, 然而对替加环素耐药的鲍曼不动杆菌也开始出现, 并呈逐年增多趋势。台湾地区的监测数据显示, 鲍曼不动杆菌对替加环素的不敏感率为 18%~45.5%^[12-13], 而以色列的一项数据显示鲍曼不动杆菌对替加环素的不敏感率高达 78%^[14]。意大利的一项追踪调查数据显示, 2008 年至 2009 年, 鲍曼不动杆菌对替加环素的不敏感率由 27.5%升高至 50%。统计显示鲍曼不动杆菌已经成为最常见的对替加环素产生耐药的细菌^[15]。

AdeABC 外排泵是第一个被发现的与鲍曼不动杆菌多重耐药性密切相关的 RND 家族成员^[16], 其过度表达可导致鲍曼不动杆菌对多种抗菌药物耐药。近期研究发现, AdeABC 外排泵可介导鲍曼不动杆菌对替加环素产生耐药^[17]。AdeABC 外排泵中 AdeA 是膜融合蛋白, AdeB 是内膜转运蛋白, AdeC 是外膜蛋白。编码泵蛋白的 *adeABC* 基因无论在敏感或耐药株中均普遍存在, 但在敏感菌株中却不表达^[18], 提示其可能是细菌产生获得性耐药的原因之一。

在鲍曼不动杆菌细胞膜上还存在 AdeIJK 外排泵和 AdeFGH 外排泵, 它们与 AdeABC 外排泵的结构及功能相似, 底物也相似, 均可外排替加环素^[19-20]。另外在不动杆菌属基因种 3(genomic DNA group 3, GDG3)中还发现 AdeDE 外排泵, 也介导细菌产生替加环素耐药性^[19]。

1.1.3 MexXY 外排泵 铜绿假单胞菌对替加环素天然耐药, 其细胞膜上的主动外排系统是重要因素, 其中 MexXY 外排泵在铜绿假单胞菌对替加环素产生耐药的过程中起关键作用^[21]。MexXY 外排泵中, MexY 是内膜转运蛋白, MexX 是膜融合蛋白, MexXY 可利用其他外排泵的外膜蛋白作为自

己的外膜蛋白。*MexXY* 外排泵在野生株和耐药株中均存在,可介导铜绿假单胞菌的天然耐药与获得性耐药,外排泵中的任一组分失活都将导致铜绿假单胞菌对抗菌药物的敏感性大大提高。

1.1.4 OqxAB 外排泵 *OqxAB* 外排泵是第一个被发现的由质粒介导的 RND 家族外排泵。*OqxAB* 外排泵中 *OqxA* 是膜融合蛋白,*OqxB* 是内膜转运蛋白,*OqxAB* 外排泵可能通过其他非特异性的外膜蛋白排出底物。最近的研究发现,在阴沟肠杆菌对替加环素产生耐药的机制中,*OqxAB* 外排泵起着关键作用^[9],可与 *AcrAB* 外排泵协同排出替加环素。

1.1.5 SdeXY 外排泵 *SdeXY* 外排泵是粘质沙雷菌中第一个被发现的 RND 家族外排泵,其中 *SdeX* 是膜融合蛋白,*SdeY* 为内膜转运蛋白,它们与外膜蛋白共同组成三聚体,协同转运底物。*Hornsey M* 等^[22]的研究发现,*SdeXY* 外排泵可介导粘质沙雷菌对替加环素产生耐药,*SdeXY* 泵失活后可恢复细菌对替加环素的敏感性。

1.2 多药及毒性化合物外排家族

1.2.1 MepA 外排泵 在革兰阳性菌中出现对替加环素耐药的情况较少,墨西哥的一项监测数据显示,金黄色葡萄球菌对替加环素的不敏感率为 9%^[23]。金黄色葡萄球菌对替加环素产生耐药的机制被认为与 MATE 家族中的 *MepA* 外排泵有关^[24]。*MepA* 外排泵为细菌胞膜上的转运蛋白,其结构包含 12 个跨膜螺旋。*MepA* 外排泵的作用底物非常广泛,除了替加环素,还包括染料、杀虫剂、氟喹诺酮类等抗菌药物。

1.2.2 AbeM 外排泵 MATE 家族中的 *AbeM* 外排泵也与细菌产生替加环素耐药性有关。*AbeM* 外排泵由 448 个氨基酸组成,富含疏水氨基酸残基,其利用质子动力势能将抗菌药物排出细胞。*Hou P* 等^[20]的研究发现,替加环素也是其底物,*AbeM* 外排泵可介导鲍曼不动杆菌对替加环素产生耐药。

1.3 主要易化子(MFS)超家族中的 TetA 外排泵

MFS 超家族的 *TetA* 外排泵由 400 多个氨基酸残基组成,包含 12~14 个跨膜 α -螺旋结构,跨膜区存在许多高度保守的氨基酸序列,该区在其结构维持和功能发挥上有重要作用。以往的研究显示,*TetA* 外排泵主要与细菌对四环素耐药有关,而 *TetB* 外排泵则与细菌对四环素和米诺环素耐药有关,但这两个外排泵都无法识别替加环素。而

最近的研究发现,*TetA* 外排泵可介导沙门菌对替加环素产生耐药,携带 *tetA* 基因的沙门菌除了对四环素耐药,同样也对替加环素呈现耐药^[25-26]。

2 抗菌药物作用靶位改变

四环素类药物主要通过细菌核糖体结合,抑制细菌蛋白质合成而发挥抗菌作用,而核糖体保护蛋白与核糖体结合会导致核糖体构型改变,降低四环素与核糖体的结合能力。与四环素类药物耐药相关的核糖体保护蛋白包括 *Tet(M)*、*Tet(O)*、*Tet(S)*、*Tet(T)*、*Tet(Q)*、*TetB(P)*、*Tet(W)*、*Otr(A)*及还未命名的 *Tet* 蛋白共 9 种。由于替加环素与核糖体的结合能力较以往的四环素类药物都强^[27],以往的研究未发现这类保护蛋白对替加环素有效,而最近的研究发现,*Tet(Q)*蛋白在脆弱拟杆菌中广泛存在,并且介导脆弱拟杆菌产生替加环素耐药性^[28]。目前来自加拿大的一项监测数据显示,脆弱拟杆菌对替加环素的不敏感率为 34.1%^[11]。

3 灭活酶

TetX(tetracycline resistance protein X)是一种 44ku 的 NADPH 依赖酶,它是唯一能让四环素失活的酶,在有氧和 NADPH 条件下对四环素进行化学修饰,从而灭活四环素。编码 *TetX* 蛋白的基因 *tetX* 有 2 个同源基因 *tetX1* 与 *tetX2*,它们与 *tetX* 基因序列同源性分别为 66%与 99%^[29]。这些基因与质粒及转座子关系密切,*tetX* 在转座子 *Tn4351* 和 *Tn4400* 中发现,*tetX1* 与 *tetX2* 则在拟杆菌共轭转座子 *CTnDOT* 中发现^[28]。通过 X 光衍射晶体学技术,目前证实替加环素也是 *TetX* 的底物^[30],携带 *tetX* 基因的菌株对替加环素呈现高度耐药。以往 *TetX* 仅在专性厌氧的拟杆菌中发现,而 *TetX* 需要在有氧条件下工作,因此认为携带该基因与临床耐药之间无关联。最近的研究发现,在鲍曼不动杆菌中亦检出 *tetX1* 基因与 *tetX* 基因,并可导致鲍曼不动杆菌对替加环素耐药,其中 *tetX1* 基因仅见于对替加环素不敏感的鲍曼不动杆菌,而在敏感菌中未检出,提示 *tetX1* 基因的存在对细菌产生替加环素耐药性有预测价值^[29]。

细菌对替加环素的耐药机制非常复杂,同一种耐药机制可存在于不同的耐药菌株中,不同的机制可同时存在于同一菌株内协同发挥作用。因此有必要加强细菌及其耐药的监测,合理应用替加环素,同时积极研发外排泵或酶抑制剂,以减缓细菌对替加环素耐药性的产生。

REFERENCES

- [1] PUTMAN M, VAN VEEN H W, KONINGS W N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(4): 672-693.
- [2] PIDDOCK L J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria [J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(2): 382-402.
- [3] LIAO I C, CHEN H M, WU J J, et al. Metallo-beta-lactamase-producing enterobacteriaceae isolates at a Taiwanese hospital: lack of distinctive phenotypes for screening [J]. Apmis, 2011, 119(8): 543-550.
- [4] LIVERMORE D M, WARNER M, MUSHTAQ S, et al. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline [J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 37(5): 415-419.
- [5] NAESENS R, URSI J P, VAN SCHAEAREN J, et al. *In vitro* activity of tigecycline against multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a Belgian hospital [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(4): 381-384.
- [6] AHEN Y, TU L B, LI X M. Analysis of drug resistance of esbls-product klebsiella pneumoniae and escherichia coli [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(4): 429-433.
- [7] SEEGER M A, SCHIEFNER A, EICHER T, et al. Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism [J]. Science, 2006, 313(5791): 1295-1298.
- [8] RAJENDRAN R, QUINN R F, MURRAY C, et al. Efflux pumps may play a role in tigecycline resistance in Burkholderia species [J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 36(2): 151-154.
- [9] VELEBA M, DE MAJUMDAR S, HORNSEY M, et al. Genetic characterization of tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* [J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(5): 1011-1018.
- [10] SUN Y, CAI Y, LIU X, et al. The emergence of clinical resistance to tigecycline [J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 41(2): 110-116.
- [11] HIRATA T, SAITO A, NISHINO K, et al. Effects of efflux transporter genes on susceptibility of *Escherichia coli* to tigecycline (GAR-936) [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(6): 2179-2184.
- [12] CHANG K C, LIN M F, LIN N T, et al. Clonal spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in eastern Taiwan [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2012, 45(1): 37-42.
- [13] LIU J W, WANG L S, CHENG Y J, et al. *In-vitro* activity of tigecycline against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Taiwan [J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(Suppl 3): S188-S191.
- [14] NAVON-VENEZIA S, LEAVITT A, CARMELI Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(4): 772-774.
- [15] RICCIARDI R, RICCIARDI A M, DANZI G. *In vitro* activity of tigecycline against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates [J]. Infez Med, 2009, 17(4): 236-239.
- [16] HORNSEY M, ELLINGTON M J, DOUMITH M, et al. AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(8): 1589-1593.
- [17] DENG M, ZHU M H, LI J J, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Chinese university hospital [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(1): 297-303.
- [18] COYNE S, COURVALIN P, PERICHON B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter spp* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(3): 947-953.
- [19] COYNE S, ROSENFELD N, LAMBERT T, et al. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(10): 4389-4393.
- [20] HOU P F, CHEN X Y, YAN G F, et al. Study of the correlation of imipenem resistance with efflux pumps AdeABC, AdeIJK, AdeDE and AbeM in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. Chemotherapy, 2012, 58(2): 152-158.
- [21] STEIN G E, BABINCHAK T. Tigecycline: an update [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 75(4): 331-336.
- [22] HORNSEY M, ELLINGTON M J, DOUMITH M, et al. Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and ceftiofime [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(3): 479-482.
- [23] GARZA-GONZALEZ E, LLACA-DIAZ J M, BOSQUES-PADILLA F J, et al. Prevalence of multidrug-resistant bacteria at a tertiary-care teaching hospital in Mexico: special focus on *Acinetobacter baumannii* [J]. Chemotherapy, 2010, 56(4): 275-279.
- [24] MCALEESE F, PETERSEN P, RUZIN A, et al. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(5): 1865-1871.
- [25] HENTSCHKE M, CHRISTNER M, SOBOTKA I, et al. Combined ramR mutation and presence of a Tn1721-associated tet(A) variant in a clinical isolate of *Salmonella enterica* serovar Hadar resistant to tigecycline [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(3): 1319-1322.
- [26] AKIYAMA T, PRESEDO J, KHAN A A. The tetA gene decreases tigecycline sensitivity of *Salmonella enterica* isolates [J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 42(2): 133-140.
- [27] JENNER L, STAROSTA A L, TERRY D S, et al. Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(10): 3812-3816.
- [28] EITEL Z, SOKI J, URBAN E, et al. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries [J]. Anaerobe, 2013, (21): 43-49.
- [29] BARTHA N A, SOKI J, URBAN E, et al. Investigation of the prevalence of tetQ, tetX and tetX1 genes in *Bacteroides* strains with elevated tigecycline minimum inhibitory concentrations [J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 38(6): 522-525.
- [30] VOLKERS G, PALM G J, WEISS M S, et al. Structural basis for a new tetracycline resistance mechanism relying on the TetX monooxygenase [J]. Febs Lett, 2011, 585(7): 1061-1066.

收稿日期: 2013-12-26