

- [24] Kita Y, Okada M, Nakajima T, et al. Development of therapeutic and prophylactic vaccine against Tuberculosis using monkey and transgenic mice models[J]. Hum Vaccin, 2011, 7: 108-114.
- [25] Okada M. The development of novel vaccines against tuberculosis [J]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2008, 31(5): 356-368.
- [26] Okada M, Kita Y. Anti-tuberculosis immunity by cytotoxic T cells * granulysin and the development of novel vaccines (HSP-65 DNA+IL-12 DNA) [J]. Kekaku, 2010, 85(6): 531-538.

(收稿日期: 2013-09-02)

• 综 述 •

空肠弯曲杆菌对大环内酯类抗菌药物耐药机制的研究进展*

陈云鹏, 林 雯 综述, 邓建平[△] 审校
(湖北省黄石市爱康医院, 湖北黄石 435000)

关键词: 大环内酯类; 耐药性; 空肠弯曲杆菌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.03.023

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)03-0309-03

空肠弯曲杆菌是全球食源性急性细菌胃肠炎的主要致病因素之一, 比沙门菌、志贺菌、大肠埃希菌 O157:H7 引发的感染更为频繁。虽然该菌引发疾病的病死率低, 但其感染后后遗症则较为严重, 如格林-巴利综合征、瑞特综合征、反应性关节炎、肠易激综合征等^[1]。通常而言, 大多数空肠弯曲杆菌感染可通过抗生素治疗。其中, 大环内酯类抗菌药物中的红霉素是治疗空肠弯曲杆菌引发疾病的首选药物^[2]。但是, 在人类使用大环内酯类药物的治疗期间, 发现了耐红霉素空肠弯曲杆菌。此外, 大环内酯类抗菌药物在兽药中的广泛应用更是加速了这一趋势^[3-4]。耐药性的出现是当今抗菌药物应用的主要问题, 研究耐药机制有助于指导临床用药、控制耐药菌产生和发现新型抗菌药物。因此, 研究空肠弯曲杆菌对大环内酯类抗菌药物的耐药机制显得尤为重要。以下将从目前已知的主要 3 个方面来阐述空肠弯曲杆菌对大环内酯类药物耐药的机制。

1 靶位改变

目前出现的大环内酯高水平耐药空肠弯曲杆菌主要是由 23S rRNA V 域的第 2074 和 2075 位碱基突变所致^[5-13]。细菌核糖体由 30S 小亚基和 50S 大亚基组成; 其中, 大亚基又由 23S rRNA 和核糖体蛋白组成。23S rRNA 分为 I~VI 个域, 根据碱基互补配对原则折叠成二级结构, 并与核糖体蛋白相互作用维持其立体构象。红霉素等十四元环大环内酯类药物的脱氧氨基糖侧链能与 23S rRNA V 域的第 2074 和 2075 位碱基分子上的氮原子形成氢键。这些位点的突变可改变大环内酯类药物的主要结合位点, 影响药物与核糖体作用位点的结合, 从而导致耐药性的发生^[14]。

相关研究证实 A2075G 突变是空肠弯曲杆菌主要的突变类型; 该突变与高水平红霉素耐药有关。空肠弯曲杆菌的生物学特性使得 A2075G 具有较高的突变频率; 因此, 空肠弯曲杆菌 A2075G 突变比其他突变更具有生存优势。

目前, 只在一株红霉素耐药空肠弯曲杆菌上发现了 A2074G 突变, 该突变对宿主的生长有抑制作用; 同时, 观察到这种突变在红霉素存在的情况下相对不稳定, 因此空肠弯曲杆菌菌株很少发生这种突变。另一种与大环内酯类耐药性相关的突变, A2074C 突变在空肠弯曲菌的出现频率也比较低。因为 A2074C 突变可能导致核糖体结构发生细微的变化, 对耐药株的生长具有一定影响。

在特殊情况下, 空肠弯曲杆菌的大环内酯类耐药株能够同时携带 A2075G 和 A2074C 两种突变。大多数大环内酯类抗菌药物耐药的空肠弯曲杆菌菌株含有 3 个拷贝的碱基突变^[15]。一般大环内酯耐药至少需要 2 个拷贝的碱基突变, 只有单一拷贝的 23S rRNA 突变株未见报道。一些只有两个拷贝的碱基突变株的大环内酯类抗菌药物最低抑菌浓度比 3 个拷贝突变株要低, 表明可能存在一定的基因剂量效应。

酮内酯是最近开发出来的第 3 代大环内酯类药物, 其代表药物-泰利霉素, 被用来克服大环内酯类抗菌药物耐药问题。它们以内酯环 C3 位的克拉定糖被酮基取代为特征。多数酮内酯药物还含有烷芳基侧链及一个 11, 12-氨基甲酸。与结构改造前的大环内酯类药物相比, 酮内酯药物与核糖体之间具有更强的亲和力。泰利霉素的抗菌活性增强, 主要是因为从大环内酯环延伸出来的烷基-芳基对 50S 核糖体亚基具有更高的亲和力。在靶基因突变的情况下, 空肠弯曲杆菌泰利霉素的最低抑菌浓度为 32~128 mg/L; 比红霉素的最低抑菌浓度 1 024~2 048 mg/L 低。因此, 空肠弯曲杆菌 23S rRNA 基因 A2075G 突变对泰利霉素的影响可能比其他大环内酯类药物, 如红霉素、阿奇霉素和泰乐菌素等要小。

2 外排系统

CmeABC 系统作为耐药空肠弯曲杆菌的主要外排系统^[5, 11, 16-19]能够外排喹诺酮类、 β -内酰胺类、大环内酯类抗菌药物。外排泵突变导致对大环内酯类抗菌药物高度敏感的 NCTC11168 菌株的发现, 证实了 CmeABC 系统对大环内酯类抗菌药物具有外排作用。CmeABC 外排泵与革兰阴性菌 RND 超家族中的典型多药物外排泵具有高度的同源性。该外排泵由三部分组成, 分别为周质融合蛋白(CmeA)、内膜药物转运蛋白(CmeB)和外膜蛋白(CmeC)。

这 3 种蛋白共同作用形成膜通道, 能够将一些抗菌药物直接排出空肠弯曲杆菌。位于 CmeA 基因上游的 CmeR 基因编码一种蛋白质(与转录抑制因子 TetR 家族成员的序列和结构相似), 该蛋白质通过直接与外排操纵子的启动子区相结合, 从而抑制 CmeABC 操纵子的转录。空肠弯曲杆菌的 CmeR 蛋白负责协调、维持 CmeABC 外排泵的基本表达水平, 以满足其生理需求。

研究表明, 作用于 CmeABC 外排系统的外排泵抑制剂

* 基金项目: 黄石市医疗卫生科技攻关计划项目(2012A070-19)。
通讯作者, E-mail: 3yue12@sina.com。

作者简介: 陈云鹏, 男, 主管技师, 主要从事微生物检验的研究。 [△]

(EPI) 苯丙氨酸-精氨酸 β -萘胺 (PA β N), 能够改变空肠弯曲杆菌对红霉素的耐药水平。在大环内酯类抗菌药物耐药的空肠弯曲杆菌中, PA β N 所起的作用随抗菌药物及抑制剂的浓度而变化。红霉素耐药空肠弯曲杆菌菌株可分为低水平和高水平耐药菌株两种。研究表明, 无论使用什么浓度的 PA β N 处理低水平耐药菌株, 都能使其对红霉素变得敏感。而使用低浓度 (20 mg/L) 的 PA β N 处理高水平耐药菌株时, 红霉素耐药水平无明显改变。只有使用高浓度 (40 mg/L) 的 PA β N 处理高水平菌株时, 才能使红霉素的耐药水平下降 2~4 倍。

插入失活的 *CmeB* 基因对不同种类大环内酯类抗菌药物的最低抑菌浓度影响不同。当低水平菌株的 *CmeABC* 失活时, 泰乐菌素的最低抑菌浓度由 32 mg/L 下降到 1 mg/L, 泰利霉素的最低抑菌浓度值由 16~32 mg/L 下降到 0.25~0.5 mg/L, 而阿奇霉素的最低抑菌浓度由 1~2 mg/L 下降到 0.25 mg/L。这表明与阿奇霉素相比, 泰乐菌素和泰利霉素是外排泵更好的作用底物。在高水平菌株中也发现了这种差异。

空肠弯曲杆菌 *CmeABC* 系统过度表达对其获得性耐药的影响需要进一步研究。近期发现, 当 *CmeB* 存在时, PA β N 能够增加泰利霉素的敏感性, 这表明可能活跃着另一种外排系统。这种外排系统不可能是 *CmeDEF* 系统, 因为 Pumbwe 等^[19] 发现空肠弯曲杆菌中 *CmeDEF* 的表达与大环内酯类耐药性无关。这说明存在其他外排系统, 在大环内酯类耐药中发挥作用。如 *CmeG* 插入突变导致红霉素耐药水平与野生型相比降低了 8 倍^[20], 由此推测, 外排泵 *CmeG* 对大环内酯类耐药也起着一定作用。

3 细胞膜通透性的改变

第 3 种大环内酯类抗菌药物耐药机制涉及到 *porA* 染色体编码表达的主要外膜孔蛋白 (MOMP)^[21-23], 其调控着细胞膜通透性的变化。在革兰阴性菌中, 外膜孔蛋白形成跨膜孔, 允许亲水性分子 (包括许多抗菌药物) 以被动扩散的形式通过。外膜孔蛋白在空肠弯曲杆菌中形成的选择性阳离子孔, 比通常在大肠埃希菌中发现的孔要小^[24], 可限制大多数相对分子质量大于 360 道尔顿的物质通过, 因此大环内酯类 (相对分子质量 700×10^3) 抗菌药物难以进入空肠弯曲杆菌中。但是, 大环内酯类药物是已知的针对空肠弯曲杆菌非常有效的药物, 其必定存在能够通过外膜及细胞质膜的通道。孔蛋白只是提供了亲水性分子的运输通道, 对疏水的大环内酯而言, 可通过“疏水通路”进入革兰阴性菌的细胞质中。该途径在大肠埃希菌和沙门菌菌株中均有发现, 由脂多糖 (LPS) 合成基因突变产生的截短 LPS (缺乏亲水性的 O-抗原糖) 构成。这些突变株的外膜比亲本株更疏水, 从而对疏水性抗菌药物包括大环内酯类药物更敏感。由于空肠弯曲杆菌天然表达脂寡糖 (LOS), 在其他的革兰阴性菌中缺乏这种由全长内毒素表达的疏水性糖。从而推测, 这种疏水外膜可促进大环内酯类药物的吸收。LOS 截短物能使空肠弯曲杆菌对红霉素的敏感性增加 8 倍, A2074G 突变空肠弯曲杆菌在此基础上敏感性可再增加一倍^[25]。

4 结 语

虽然上述 3 种耐药机制已得到较为充分的阐述, 但空肠弯曲杆菌大环内酯类抗菌药物耐药机制仍存在许多问题需要进一步研究和探索。例如, 23S rRNA 基因突变和外排系统之间是否存在相互作用, 共同影响大环内酯类抗菌药物耐药水平; 23S rRNA 基因的 A2075G 突变对泰利霉素的影响较小, 但是需要更多的实验来证明; 某些红霉素耐药空肠弯曲杆菌既无靶位改变, 也无外排系统的过度表达和膜通透性的异常改变, 说

明可能存在未知的耐药机制。目前, 虽然已有文献报道, 外排泵抑制剂可通过抑制某些大环内酯类耐药空肠弯曲杆菌菌株对药物的外排作用, 恢复其对药物的敏感性, 但还需要更多的数据以支持外排泵抑制剂在临床上的应用效果。

参考文献

- [1] 王艳玲. 空肠弯曲菌检测方法研究进展[J]. 职业与健康, 2010, 26(14): 1638-1639.
- [2] Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Infectious diseases society of America: practice guidelines for the management of infectious diarrhea[J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(1): 331-351.
- [3] Kittl S, Kuhnert P, Hchler H, et al. Comparison of genotypes and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and slaughtered chickens in Switzerland[J]. J Appl Microbiol, 2011, 110(2): 513-520.
- [4] Haruna M, Sasaki Y, Murakami M, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* in broiler flocks in Japan[J]. Zoonoses Public Health, 2012, 59(4): 241-245.
- [5] Lin J, Yan M, Sahin O, et al. Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(5): 1678-1686.
- [6] Payot S, Bolla JM, Corcoran D, et al. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp[J]. Microbes Infect, 2006, 8(7): 1967-1971.
- [7] Egger R, Korczak BM, Niederer L, et al. Genotypes and antibiotic resistance of *Campylobacter coli* in fattening pigs[J]. Vet Microbiol, 2012, 155(2/4): 272-278.
- [8] Gibreel A, Taylor DE. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*[J]. Antimicrob Chemother, 2006, 58(1): 243-255.
- [9] Lachance N, Gaudreau C, Lamothe F, et al. Role of the beta-lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to beta-lactam agents[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35(5): 813-818.
- [10] Lehtopolku M, Kotilainen P, Haanper-Heikkinen M, et al. Ribosomal mutations as the main cause of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(12): 5939-5941.
- [11] Mamelli L, Prouzet-Mauléon V, Pagès JM, et al. Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: role of efflux pumps and target mutations[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 56(3): 491-497.
- [12] Pérez-Boto D, López-Portolés JA, Simón C, et al. Study of the molecular mechanisms involved in high-level macrolide resistance of Spanish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(10): 2083-2088.
- [13] Ren GW, Wang Y, Shen Z, et al. Rapid detection of point mutations in domain V of the 23S rRNA gene in erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates by pyrosequencing[J]. Foodborne Pathog Dis, 2011, 8(3): 375-379.
- [14] Cagliero C, Mouline C, Cloeckaert A, et al. Synergy between efflux pump *CmeABC* and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(11): 3893-3896.
- [15] Fouts DE, Mongodin EF, Mandrell RE, et al. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *campylobacter* species[J]. PLoS Biol, 2005, 3(1): e15.

[16] Lin J, Michel LO, Zhang Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(7): 2124-2131.

[17] Oh E, Zhang Q, Jeon B. Target optimization for peptide nucleic acid (PNA)-mediated antisense inhibition of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(2): 375-380.

[18] Payot S, Avrain L, Magras C, et al. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli* [J]. Int J Antimicrob Agents, 2004, 23(5): 468-472.

[19] Pumbwe L, Randall LP, Woodward MJ, et al. Evidence for multiple-antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* not mediated by CmeB or CmeF[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(4): 1289-1293.

[20] Jeon B, Wang Y, Hao H, et al. Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(1): 79-85.

[21] Gibreel A, Kos VN, Keelan M, et al. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mecha-

nism and stability of the resistance phenotype[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(7): 2753-2759.

[22] Pumbwe L, Randall LP, Woodward MJ, et al. Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni* [J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 54(2): 341-347.

[23] Page WJ, Huyer G, Huyer M, et al. Characterization of the porins of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and implications for antibiotic susceptibility[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1989, 33(3): 297-303.

[24] Jay-Russell MT, Mandrell RE, Yuan J, et al. Using major outer membrane protein typing as an epidemiological tool to investigate outbreaks caused by milk-borne *Campylobacter jejuni* isolates in California[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(1): 195-201.

[25] Jeon B, Muraoka W, Scupham A, et al. Roles of lipooligosaccharide and capsular polysaccharide in antimicrobial resistance and natural transformation of *Campylobacter jejuni*[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(3): 462-268.

(收稿日期: 2013-10-25)

• 综 述 •

蠓缨滴虫感染的诊断和治疗

杨麦贵¹, 杨 铮^{2#}, 杨 阳³, 岳 波⁴, 郑善奎¹, 颜 楠¹综述, 郝晓柯^{1△}审校

(第四军医大学: 1. 西京医院全军临床检验医学研究所; 2. 学员旅; 3. 西京医院全军整形外科研究所;

4. 西京全军耳鼻咽喉头颈外科中心, 陕西西安 710032)

关键词: 蠓缨滴虫; 病原体, 机会致病; 诊断; 治疗

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 03. 024

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)03-0311-03

蠓缨滴虫是一种罕见的机会性致病病原体, 首先被陈树鑫等^[1]于 1993 年在人体呼吸道发现, 国外至今尚未见该类病例的报道。该滴虫主要感染接受器官移植的患者, 以及艾滋病患者、老年人等免疫功能低下者。20 世纪 90 年代前由于检查手段落后检出率极低; 90 年代后期, 随着支气管镜肺泡灌洗这一新型检测手段的应用, 使肺部蠓缨滴虫的检出率明显提高。感染蠓缨滴虫的患者无特别临床表现, 可出现咳嗽、咳痰、胸闷、气急或哮喘并发间质性肺炎等症状, 严重时可发生呼吸衰竭。如常用抗菌药物治疗无效, 改用甲硝唑类药物治疗后使患者肺部感染得以控制, 可高度怀疑患者为蠓缨滴虫感染。由于蠓缨滴虫发现时间短, 在中国的传染源、传播途径等至今还不很清楚。该病是否能在人群中密集爆发, 如何进行防治等一系列问题尚未解决。因此, 笔者认为有必要开展对蠓缨滴虫的生物学特性、致病性、传播途径、临床特点、快速诊断、防治等方面的研究, 提高对该种机会致病寄生原虫的全面认识。

1 蠓缨滴虫的分类、形态及检测

1.1 蠓缨滴虫的分类 蠓缨滴虫属于原生动物门, 鞭毛虫纲, 动鞭亚纲, 超鞭毛目, 缨滴虫亚目, 缨滴虫科, 缨滴虫属的一种昆虫体内的寄生原虫, 主要寄生在白蚁及蟑螂(蜚蠊)的消化道的单细胞原虫^[2]。国内发现人呼吸道中的蠓缨滴虫, 至今未见其在蟑螂体内寄生的报道。目前认为蠓缨滴虫可能随蟑螂的粪便及呕吐物排泄而污染食物或空气, 被人食入或吸入导致感染。

1.2 蠓缨滴虫的形态 肺泡灌洗液涂片镜检, 活蠓缨滴虫多为梨形、圆形或椭圆形, 虫体长 20~30 μm , 宽 7~10 μm (约 2~3 个红细胞), 后端较透明圆滑, 前端顶部布满很多绒鞭毛, 环状束排列长短不一约 5~10 μm 。虫体前端的绒鞭毛左右不停地摆动, 且摆动的方向和幅度都较一致。有为数不少的虫体以自身为中心不停地原地打转, 转速较快, 每分钟约数十次至百余次不等, 多见于虫体呈圆形的蠓缨滴虫, 有的为晃动或泳动。有些还正处于二分裂繁殖期(图 1)或分裂前期的虫体在新鲜涂片中可看到虫体两侧都有鞭毛边缘较多, 中间较少, 上下两端向中心略微凹陷, 包膜仍连成一个整体, 两侧鞭毛摆动幅度较小, 周边还存有明显的外质, 疑为滋养体(图 2)。该虫的另一特点是显微镜下呈聚集状, 肺泡灌洗液中的蠓缨滴虫多与白色黏液絮状物及细胞黏附在一起, 活体形态看不清楚, 只能看见鞭毛活跃的在摆动, 提示该虫可能具有嗜好寄生在黏性液体中的特性。

1.3 蠓缨滴虫的检测 最好于临床行肺泡灌洗取液时及时取材送检, 送检时注意保暖。先作细胞计数分类后取絮状物涂片或将肺泡灌洗液样本于离心机 2 000 r/min 离心 5 min, 取沉淀物涂片或加盖封片于光学显微镜高倍(40×10)镜下查找活动的蠓缨滴虫, 油镜观察虫体形态(图 3)。有时样本盖片后, 虫体 0.5~1.0 h 活力减弱, 前端鞭毛自主摆动和自身旋转的特性都变得不明显, 这将增加蠓缨滴虫与呼吸道脱落的纤毛柱状上皮细胞(图 4)区分的难度。所以要求临床务必及时将肺泡