

• 综 述 •

# 革兰阴性杆菌对碳青霉烯类药物耐药机制研究进展\*

杨 刚 综述,尹 宁<sup>△</sup>审校  
(新疆医科大学第六附属医院,新疆乌鲁木齐 830002)

关键词:革兰氏阴性菌; 抗菌药; 药物耐受性; 碳青霉烯类  
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 02. 034 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2016)02-0226-04

革兰阴性杆菌是感染性疾病特别是住院患者医院感染的主要病原菌,临床分离的致病性多重耐药的革兰阴性杆菌中大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌占据前几位。随着临床抗生素的滥用,该类细菌不仅对常用抗生素耐药,而且对碳青霉烯类药物的耐药率也逐年上升。现将耐碳青霉烯类药物耐药机制研究进展综述如下。

## 1 碳青霉烯酶对碳青霉烯类抗生素的耐药机制

碳青霉烯酶是指能明显水解亚胺培南或美罗培南的一类β-内酰胺酶,是β-内酰胺酶家族中最多变的成员,但碳青霉烯类药物并非其唯一水解底物。碳青霉烯酶根据活性部位水解机制分为两种主要的分子家族:一种来源于革兰阳性杆菌,可被乙二胺四乙酸(EDTA)抑制,称为金属酶(MBLs),其活性部位含有Zn<sup>2+</sup>有助于水解β-内酰胺的双环;另一种最初发现于肠杆菌科细菌,其活性部位含有丝氨酸,该类碳青霉烯酶能被克拉维酸和他唑巴坦抑制,但不能被EDTA抑制。按照分子类型可将碳青霉烯酶分为Ambler A、B、D类<sup>[1]</sup>,A、D类活性中心有丝氨酸,又称为丝氨酸酶,属于Bush分群中的第2f、2d亚组。B类活性中心含有Zn<sup>2+</sup>,称为MBLs。属于Bush分群中的第3组,可由染色体、质粒或转座子介导。

**1.1 A类碳青霉烯酶** 最主要的A类丝氨酸碳青霉烯酶有3个家族即SME(*serratia marcescens* enzyme)、KPC(*klebsiella pneumoniae* carbapenemases)和NMC(non-metallo carbapenemases)/IMI(imipenemase),均由染色体编码,其水解机制是在活性中心70号位含有丝氨酸。SME家族包括SME-1、SME-2、SME-3。SME-1是在1982年发现于英格兰的2株黏质沙雷菌。NMC、IMI酶有97%氨基酸是相同的,其均含有相同的活性部位保守序列S-X-X-K、S-D-N和K-T-G,且在其氨基酸残基的69、238号位形成二硫键。这种二硫键普遍存在于A类碳青霉烯酶,不仅对其水解活性十分必要,而且能够稳定酶的结构<sup>[2]</sup>。在NMC-A、IMI-1和SME-1基因编码区的上游存在与LysR家族有关的DNA结合转录调控基因,当删除nmcR调控基因时就可消除NMC-A的诱导表达并可降低碳青霉烯类药物对其的最低抑菌浓度(MIC)。

KPC、GES(*guiana extended-spectrum β-lactamase*)均由质粒编码,KPC-1于1996年发现于北卡罗来纳,2003年在美国东海岸发现了KPC-1的变体KPC-2,其由单个氨基酸突变所致,随后KPC在苏格兰、哥伦比亚、以色列<sup>[3]</sup>、中国等国家均有报道。KPC含有活性部位保守序列S-X-X-K、S-D-N和K-T-G。有研究显示,对碳青霉烯类药物敏感率下降的肺炎克雷伯

菌均产KPC-2,KPC基因位于可移动的质粒上,可以通过质粒、整合子、插入序列的基因元件进行水平传播,造成暴发流行。有研究发现,blaOXA(编码OXA的基因)基因位于耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌质粒上,较位于染色体上更容易发生播散。GES/IBC(integron-borne cephalosporinase)家族并不常见,IBC-1在2000年发现于希腊,GES-1则分离于法属圭亚那的1株肺炎克雷伯菌,该2种酶在活性序列的69、38号位含有半胱氨酸残基。编码GES家族的基因位于质粒的整合子上,该类酶具有很广的水解谱,目前该家族成员众多,GES-2、GES-3、GES-4、GES-5、GES-6、GES-7、GES-8、GES-9相继被鉴定出来。

**1.2 B类碳青霉烯酶** B类碳青霉烯酶因活性中心含有Zn<sup>2+</sup>,也称为MBLs。MBLs首先在铜绿假单胞菌、不动杆菌中被发现。近年来在肠杆菌科细菌如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌中也有发现。MBLs编码的耐药基因位于细菌染色体、质粒或转座子上。并以基因盒的形式存在于整合子中。整合子属于可移动基因元件。可借助整合子的移动、基因盒的插入、切除而导致细菌间耐药性呈水平传播<sup>[4]</sup>,MBLs有较强水解碳青霉烯类药物的能力且对常见的β-内酰胺酶抑制剂有抵抗作用。常见的MBLs有VIM(*verona integron-encoded metallo-β-lactamase*)、IMP(*imipenemase*)、GIM(*german imipenemase*)和SIM(*seoul imipenemase*),其位于各种整合子结构上,当这些整合子与质粒或转座子结合时就会介导在各细菌间传播。第1例可转移性MBLs基因于1990年发现于日本的1株铜绿假单胞菌,随后各种获得性或转移性MBLs基因相继被发现<sup>[5]</sup>。IMP-1能水解亚胺培南、青霉素和广谱头孢菌素,但不能水解氨基曲南,最早分离于日本的沙雷菌和其他肠杆菌科,在意大利则在鲍曼不动杆菌发现与IMP-1相似的IMP-2<sup>[6]</sup>,随后IMP家族成员在世界各地被陆续发现。目前IMP已多达34种。I类整合子是耐药基因DNA的结构基础,还可整合其他耐药基因如氯霉素、氨基糖苷类基因,但其自身不能传播而是通过识别内部转座子结构来传播。VIM家族的编码基因位于染色体的I类整合子上,1997年VIM-1在意大利维罗纳被发现,随后其变体VIM-2在法国被发现,二者均分离自铜绿假单胞菌。虽然二者氨基酸序列同源性很高(90%),但结构明显不同,这也导致了其酶促动力学的显著差异。目前VIM家族种类多达15种,其耐药基因位于相应的I类整合子内<sup>[7]</sup>。其他MBLs还有SPM(*sao paulo metallo-β-lactamase*)、GIM和SIM,其只在所发现国家局部传播并未造成世界范围的流行。这有别于VIM和IMP。SPM-1分离自圣保罗的铜绿假单胞菌,含有该

\* 基金项目:新疆医科大学科研创新基金资助项目(XJC2012142)。 作者简介:杨刚,男,在读硕士研究生,主要从事病原微生物学的研究。  
<sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:tuguyu@163.com。

酶的铜绿假单胞菌所致的感染有较高的致死率,其与 IMP-1 有 35.5% 氨基酸是相同的,能被 EDTA、吡啶二羧酸、二氮杂菲抑制,能水解大多数广谱抗生素,主要在拉美国家流行。通过对 SPM-1 的编码基因区域分析显示,该区域不是整合子的一部分,而是含有一种新型的转座子结构和启动子序列<sup>[8]</sup>。近年来新型 MBLs 被发现如 TMB-1(tripoli metallo- $\beta$ -lactamase),该酶来自于利比亚的 1 株木糖氧化无色杆菌。TMB-1 与 DIM-1、GIM-1 同源性分别为 62%、51%,blaTMB-1 位于染色体上并可嵌入到 I 类整合子中。2011 年在日本发现了 blaTMB-1 的变体 blaTMB-2,多利培南和美罗培南对产 TMB-2 转化株的 MIC 较 TMB-1 转化株分别高 256、16 倍,有更强的耐药性<sup>[9]</sup>。

**1.3 D 类碳青霉烯酶** D 类酶也称为 OXA 酶(oxacillin-hydrolyzing),主要存在于肠杆菌科和铜绿假单胞菌属,由质粒编码。该类酶很少能被克拉维酸和 EDTA 抑制。由于其氨基酸序列存在大量可变性,导致有很多变体,目前已知有 232 种变体<sup>[10]</sup>。绝大多数 OXA 酶发现于不动杆菌属,根据氨基酸同源性将其分为 9 个亚组。通过对 OXA 酶分子结构的研究发现,催化丝氨酸残基位于 70~73 号位的 S-T-F-K 序列,而 A、D 类酶的丝氨酸和赖氨酸均位于此。其水解机制与其他丝氨酸碳青霉烯酶相同,底物和酶结合,在催化丝氨酸部位形成共价酰基,随后通过脱酰基作用在  $\beta$  内酰胺环的 C-N 结合处而水解抗生素使其失活。某些 D 类酶需要一定浓度的  $\text{CO}_2$ ,因为  $\text{CO}_2$  可影响 Lys70 的羧化作用。2003 年在土耳其 1 株肺炎克雷伯菌中分离的 OXA-48 对亚胺培南的水解效率较分离于不动杆菌属的 OXA 酶高 9 倍,对其分子动力学及晶体结构研究发现,其水解作用依赖于碳青霉烯类药物的  $\alpha$ -羟乙基的旋转,在活性部位脱去酰基并以此酰化氨基酸残基<sup>[11]</sup>。编码 OXA-48 基因 blaOXA-48(编码 OXA-48 的基因)通过可转移的质粒在各菌种间传播<sup>[12]</sup>。鲍曼不动杆菌中的 OXA-23、OXA-58 通过将 OXA 质粒介导入易感碳青霉烯类药物中而具有耐药作用<sup>[13]</sup>。

## 2 外排泵系统耐药机制

细菌外排系统是一种非特异性耐药机制,是通过细菌外排泵将进入菌体内的药物或其他底物排出膜外,已在不同细菌上发现几十种外排泵,依据氨基酸序列的同源性,将与抗菌药物相关的膜外排泵分子分为 5 个主要超家族<sup>[14]</sup>,包括主要易化子超家族(Mrs)、ATP 结合盒(ABC)超家族、耐药节结化细胞分化(RND)超家族、小多重耐药性(SMR)家族,多药和有毒化合物排出(MATE)家族。其中 RND 超家族在革兰阴性杆菌耐药中发挥重要作用如大肠埃希菌中的 AcrAB-TolC 系统和铜绿假单胞菌中的 MexAB-OprM 系统。

**2.1 鲍曼不动杆菌的外排系统** AdeABC 外排系统是鲍曼不动杆菌中认识最早的外排系统。国外有极少数研究提示,AdeABC 外排系统的过度表达可引起菌株对碳青霉烯类抗生素如亚胺培南和美罗培南的高水平耐药。AdeABC 外排泵系统属于 RND 超家族,AdeB 为内膜转运体,AdeC 为外膜蛋白(OMP),AdeA 为膜融合蛋白(MFP),其共同组成三聚体结构,形成一连续通道跨在外膜和周质之间<sup>[15]</sup>。有文献报道,AdeC 对耐药无本质意义,并非必需。AdeAB 共同转录并可利用另一外膜蛋白来形成外排泵通道。AdeFGH 外排泵是近年新发现的由 AdeF、AdeG、AdeH 共同转录编码一个 RND 超家族

的外排系统<sup>[16]</sup>,表现出对氟喹诺酮类、四环素、氯霉素、甲氧苄啶、磺胺甲基异恶唑、十二烷基硫酸钠(SDS)和某些染料外排的增强。有研究显示,AdeFGH 外排系统在鲍曼不动杆菌的亚胺培南耐药中发挥作用。

**2.2 大肠埃希菌的外排系统** AcrAB-TolC 系统是大肠埃希菌产生多药耐药性最重要的系统之一,属于质子依赖型,能同时产生针对有机溶剂、染料、去污剂及多种抗菌药物(如氯霉素、红霉素、四环素等)的高水平的多重耐药。AcrAB-TolC 系统主要由 3 个部分组成,即膜融合蛋白(AcrA)、外排转运蛋白(AcrB)和外膜通道蛋白(TolC)。这些组分及其类似物是大多数革兰阴性菌产生对多种抗菌药物、染料和去污剂等多重耐药的主要机制。AcrB 主要的功能域为三聚体,且包含 1 个大的细胞周质域为典型特征<sup>[17]</sup>,细胞周质域的每个亚基的构象有细微的差别,均具有 1 个底物识别位点,但在特定的时间只有 1 个位点(binding site)被底物所占据,排出位点紧邻周质但开放于 TolC 对接域,将底物推入 TolC 外排;接入位点(access site)紧邻 TolC 但开放于周质,准备接受底物。该 3 个周质域的构象由上述 3 个位点轮流替换,形成 1 个类似蠕动泵的机制将底物排出细胞外。AcrA 蛋白的作用主要是促进外排体系与细胞膜的融合。AcrB 能识别外排药物并通过构象改变形成质子和药物分子逆向转运的能量转化体<sup>[18]</sup>。AcrAB 的表达受多种调控因子的调节,分为全局和局部 2 个调控层次。

**2.3 铜绿假单胞菌的外排系统** 铜绿假单胞菌中的外排泵主要有 MexAB-OprM、MexCD-OprJ、exEF-OprN 和 MexXY-OprM,每一种外排泵都包括 3 个部分:(1)内膜蛋白如 MexB、MexY,其嵌在细菌细胞内膜,可识别抗菌药物并将其主动转运出去;(2)OMP 如 OprM、OprN,二者均位于细胞外膜具有孔蛋白的作用,可将抗菌药物排出菌体外;(3)膜融合蛋白如 MexA、MexX 等,位于内、外膜之间,可连接内、外膜。3 种蛋白相互连接横贯整个细胞膜并开口于外膜,将抗菌药物排出菌体<sup>[19]</sup>。

## 3 与膜孔蛋白有关的耐药机制

革兰阴性菌被一层具有通透性的外膜包绕,约 60% 表面覆盖膜孔蛋白,其聚合起来形成孔道。大多数抗生素发挥活性的决定性因素并不单纯取决于外膜的通透性或抗生素的失活,而是取决于二者之间的平衡,外膜通透下降可以放大酶失活造成的抗生素耐药效应。

膜孔蛋白是 OMP 中的一类,大肠埃希菌的膜孔蛋白主要有 5 种:OmpF、OmpC、PhoE、LamB 和蛋白 K。大多数  $\beta$ -内酰胺类抗生素可通过的膜孔蛋白主要为 OmpF、OmpC,而 OmpF 的通透性较 OmpC 高 10 倍。膜孔蛋白的变异可引起细菌对抗生素敏感率下降。肺炎克雷伯菌的膜孔蛋白有 OmpK35、OmpK36 和 OmpK37,OmpK35、OmpK36 相当于大肠杆菌中的 OmpF、OmpC。OmpK37 一般情况下不表达或表达量极少。OmpK35 是细菌发生耐药最主要的膜孔蛋白。Yang 等<sup>[20]</sup>研究发现,膜孔蛋白缺失这一单独因素并不能引起对亚胺培南的耐药。对大肠埃希菌来说 OMP 缺失合并 CMY-4、CMY-2、CTX-M-2 等可造成其对碳青霉烯类药物耐药<sup>[21]</sup>。

外膜孔蛋白 D2(OprD2)是亚胺培南通过铜绿假单胞菌的特异性孔道,编码 OprD2 的结构基因位于染色体上,突变可使 OprD2 蛋白表达减少甚至缺失,从而导致菌体外膜通透性改变使得碳青霉烯类药物进入菌体受阻,产生耐药性。此外 OprD2

还能形成碳青霉烯类药物特异性结合位点,是目前所知的铜绿假单胞菌中唯一有助于抗菌药物通过的孔道蛋白<sup>[22]</sup>。OprD2 缺失引起亚胺培南耐药,而将克隆有 OprD2 基因的质粒转入 OprD2 缺失的亚胺培南耐药株中可使其恢复对亚胺培南的耐药性并在细胞膜上表达 OprD 蛋白<sup>[23]</sup>。在铜绿假单胞菌中存在大、小 2 种孔道蛋白,而大孔通道数量较少或仅有小孔通道,导致铜绿假单胞菌外膜通透性降低,产生耐药性<sup>[24]</sup>。

#### 4 与青霉素结合蛋白(PBPs)有关的耐药机制

PBPs 是一组位于细菌细胞内膜上的具有催化作用的酶,在细菌的细胞壁合成中起关键作用。在 PBPs 中大分子 PBP1a、PBP1b、PBP2、PBP3 为  $\beta$ -内酰胺类药物作用靶位。当  $\beta$ -内酰胺类药物与这些靶位结合后可使转肽酶、转糖苷酶的活性丢失,细菌的细胞壁不能合成,细菌死亡<sup>[25]</sup>。可见当 PBPs 基因发生变异导致蛋白改变, $\beta$ -内酰胺类抗生素无法与之结合或结合能力降低均可能导致耐药。铜绿假单胞菌中有 8 种不同 PBPs,其中 PBP2、PBP3 与碳青霉烯类抗生素耐药性有关,是细菌保持正常形态及生存繁殖必需的<sup>[26]</sup>。Farra 等<sup>[27]</sup>研究结果显示临床分离的对亚胺培南耐药的铜绿假单胞菌耐药性与 PBP 位点改变密切相关。另一方面 PBPs 可参与头孢菌素酶(AmpC 酶)表达从而产生耐药性,这些 PBPs 均是非必需 PBP 如在大肠埃希菌中 PBP4 过表达导致 AmpC 酶高产,而 PBP4 失活使其对 AmpC 酶诱导能力减弱,PBP4 有诱导 AmpC 酶产生的作用<sup>[28]</sup>。

#### 5 其他

细菌对碳青霉烯类药物耐药往往是多种机制共同发挥作用。通过对 1 株耐碳青霉烯类药物的 大肠埃希菌研究显示,其缺少 OmpF、OmpC,并携带有耐药基因 marR 和功能性非翻译基因 yedS<sup>[29]</sup>。其所表达的蛋白 marR 和 yedS 被认为可耐碳青霉烯类药物。在大肠埃希菌中操纵子 marRAB 能编码 marR、marA 和 marB。而 marA 过度表达可正向调节外排泵 AcrAB-TolC,使之表达增加,外排作用增强;另一方面 marA 可通过 MicF 这种小 RNA 来抑制 OmpF,使其对碳青霉烯类药物耐药。

#### 6 结 语

革兰阴性杆菌耐碳青霉烯类药物的耐药机制是复杂的,往往多种机制共同发挥作用。革兰阴性杆菌种类繁多,有些耐药基因可通过质粒在各细菌间相互传播,导致新的变体的出现。另一方面抗生素的滥用也会使细菌产生新的耐药基因,造成耐药率不断升高。有些细菌自身外排泵高表达,孔道蛋白的改变也会对碳青霉烯酶类药物耐药。因此,在临床要加强对该类细菌的监测,根据细菌药物敏感试验结果合理使用抗生素。

#### 参考文献

- [1] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10): 1791-1798.
- [2] Verma D, Jacobs DJ, Livesay DR. Variations within class-A  $\beta$ -lactamase physiochemical properties reflect evolutionary and environmental patterns, but not antibiotic specificity[J]. PLoS Comput Biol, 2013, 9(7): e1003155.
- [3] Viedma E, Juan C, Villa J, et al. VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(8): 1235-1241.

- [4] 孙红妹,薛冠华. 新发现“NDM-1 超级细菌”的流行情况及耐药机制[J]. 中华儿科杂志, 2011, 49(1): 37-40.
- [5] Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! [J]. Trends Mol Med, 2012, 18(5): 263-272.
- [6] Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, et al. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(5): 1229-1235.
- [7] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(9): 597-602.
- [8] Wachino J, Yoshida H, Yamane K, et al. SMB-1, a novel subclass B3 metallo-beta-lactamase, associated with ISCR1 and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(11): 5143-5149.
- [9] Suzuki S, Matsui M, Suzuki M, et al. Detection of tripoli metallo- $\beta$ -lactamase 2 (TMB-2), a variant of blaTMB-1, in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. in Japan[J]. Antimicrob Chemother, 2013, 68(6): 1441-1442.
- [10] Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm[J]. Trends Mol Med, 2012, 18(5): 263-272.
- [11] Docquier JD, Calderone V, De Luca F, et al. Crystal structure of the OXA-48 beta-lactamase reveals mechanistic diversity among class D carbapenemases[J]. Chem Biol, 2009, 16(5): 540-547.
- [12] Carrère A, Poirel L, Yilmaz M, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(3): 1369-1373.
- [13] Zander E, Nemec A, Seifert H, et al. Association between  $\beta$ -lactamase-encoding bla (OXA)-51 variants and diversiLab rep-PCR-based typing of *Acinetobacter baumannii* isolates[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(6): 1900-1904.
- [14] Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside[J]. World J Clin Cases, 2014, 2(12): 787-814.
- [15] Rumbo C, Gato E, López M, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and  $\beta$ -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(11): 5247-5257.
- [16] 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.
- [17] Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update[J]. Drugs, 2009, 69(12): 1555-1623.
- [18] Eicher T, Brandstatter L, Pos KM. Structural and functional aspects of the multidrug efflux pump AcrB[J]. Biol Chem, 2009, 390(8): 693-699.
- [19] Nikaido H, Pagès JM. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36(2): 340-363.
- [20] Yang D, Guo Y, Zhang Z. Combined porin loss and extended spectrum beta-lactamase production is associated with an increasing

imipenem minimal inhibitory concentration in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains[J]. *Curr Microbiol*, 2009, 58(4): 366-370.

[21] 李轶, 张嵘, 周宏伟, 等. 亚胺培南耐药大肠埃希菌的耐药机制研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2008, 31(10): 1167-1169.

[22] Nusca A, Patti G, Marino F, et al. Prognostic role of preprocedural glucose levels on short-and long-term outcome in patients undergoing percutaneous coronary revascularization[J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2012, 80(3): 377-384.

[23] 衣美英, 刘迎春, 王鹏远, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌外膜孔蛋白与  $\beta$ -内酰胺酶研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2007, 17(10): 1198-1200.

[24] 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.

[25] 翁幸璧, 糜祖煌. 泛耐药鲍曼不动杆菌 PBP1A, CarO 及  $\beta$ -内酰胺酶的编码基因分析[J]. *中华临床感染病杂志*, 2012, 5(4): 215-220.

[26] 梁文, 李博, 董萌萌, 等. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(9): 641-646.

[27] Farra A, Islam S, Stralfors A, et al. Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, 31(5): 427-433.

[28] 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.

[29] Warner DM, Yang Q, Duval V, et al. Involvement of MarR and YedS in Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli* from China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(4): 1935-1937.

(收稿日期: 2015-07-30)

## 疟色素应用于拉曼光谱技术检测疟疾研究进展\*

易 品<sup>1</sup>综述, 邵超鹏<sup>1</sup>, 顾大勇<sup>2</sup>, 董瑞玲<sup>2</sup>审校

(1. 南方医科大学生物工程学院, 广东广州 510515; 2. 深圳国际旅行卫生保健中心, 广东深圳 518033)

**关键词:** 光谱分析, 拉曼; 疟疾; 实验室技术和方法; 疟色素; 特征峰

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 02. 035

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2016)02-0229-04

疟疾是一种由疟原虫感染引起的威胁生命的疾病, 据世界卫生组织发布的最新情况, 2013 年仍有共计约 1. 98 亿疟疾患者, 其中 58. 4 万人死亡。疟原虫侵入人体后早期寄生在肝细胞中, 后期主要寄生在红细胞内。疟原虫在宿主红细胞内以血红蛋白中的珠蛋白部分为营养来源, 而血红蛋白的血红素部分则被释放出来成为游离血红素, 为避免游离血红素对疟原虫自身的杀伤作用, 疟原虫将游离血红素转化成不可溶的高铁血红素结晶, 即疟色素<sup>[1-2]</sup>。目前针对疟色素检测的研究取得许多进展, 尤其是拉曼光谱技术。拉曼光谱技术的基本原理是利用激光照射介质后会产生与入射波长不同的光谱, 从而获得分子振动的相关信息, 进而获得物质的结构信息。疟色素具有特殊的二聚体分子结构<sup>[3]</sup>, 拉曼激光照射疟色素会产生不同于血红蛋白的拉曼光谱, 即特征峰, 这为早期诊断疟疾带来希望。

### 1 拉曼光谱技术检测疟色素的优势

**1. 1 样本处理** 拉曼光谱技术所需样品量非常少, 样本无需进行染色或去除杂质等处理, 液体、固体均可, 甚至活细胞原位也能进行检测, 而且检测后对样本无影响<sup>[4-5]</sup>, 可避免常规检测手段样本处理过程中待检物的损失和待检物理化性质的改变。国内外学者将拉曼光谱技术应用于疟疾患者血清<sup>[5]</sup>、疟疾感染红细胞裂解液等的检测, 通过分析拉曼光谱技术, 可深入了解血清中疟色素是否存在, 进而判断是否感染疟疾。此外活细胞原位拉曼光谱技术检测可以准确反应体内细胞和物质的实时信息如 Frosch 等<sup>[6]</sup>将显微共聚焦拉曼光谱技术应用于疟原虫感染红细胞原位检测, 获得分辨率较高的疟色素在红细胞的分

布图。在疟疾的检测方面, 活细胞原位检测虽然直观高效但耗时长, 而血清检测既简便、快速又准确。此外拉曼光谱技术具有无需标记且无波坏性的特点, 对临床应用具有极重要的意义。

**1. 2 检测灵敏度** 目前疟原虫感染的检测方法主要分为 3 种: (1) 血涂片镜检, 血涂片镜检仍然是目前临床疟疾诊断的“金标准”, 虽然准确度高, 但其有对检测者的要求高、耗时长和灵敏度差等缺点; (2) 核酸检测, 以 PCR 为代表的分子生物学技术检测疟原虫的特异性核苷酸片段来判断是否有疟原虫感染<sup>[7-8]</sup>, 其灵敏度虽然有所提高(在疟原虫大于或等于 5 个/ $\mu$ L 时其检测阳性率可达 100%), 但对实验条件要求高且达不到快速检测的要求<sup>[9]</sup>; (3) 抗原抗体反应, 检测疟原虫的特异抗原如 ELISA、免疫胶体金技术等<sup>[9]</sup>, 虽然具有操作简便、快速等特点, 但灵敏度不高(阳性率为 77%~98%, 且是在疟原虫大于 100 个/ $\mu$ L 条件下)<sup>[10]</sup>。总之, 目前已有的检测手段存在灵敏度不够及实验条件要求高等缺点, 而临床亟须一种灵敏度高又快速的检测手段。近年来随着拉曼光谱技术不断发展, 市场上出现如显微共聚焦拉曼、激光共振拉曼、表面增强拉曼、便携式拉曼仪等新技术, 这些新技术大大提高了拉曼光谱技术检测的灵敏度。显微共聚焦拉曼光谱仪测量样品可以小到 1  $\mu$ mol 的量, 激光共振拉曼产生的信号强度可达到正常拉曼谱带的  $10^4 \sim 10^6$  倍, 表面增强拉曼产生的拉曼信号较普通拉曼强  $10^4 \sim 10^7$  倍。便携式拉曼仪的应用使疟疾检测仪器小型化, 便于开展疟疾的筛查。有文献报道, 将疟原虫的检测浓度下限

\* 基金项目: 国家质检总局科研项目(2014IK054)。 作者简介: 易品, 男, 在读硕士研究生, 主要从事光谱学方法在疟疾的诊断中的应用及血液免疫分子生物学的研究。