

沙门氏菌耐药机制研究进展

邓树轩, 程安春^{1,2*}, 汪铭书^{1,2}, 曹平¹

(1. 四川农业大学动物科技学院禽病防治研究中心, 四川雅安 625014; 2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川雅安 625014)

摘要 综述了沙门氏菌耐药机制的研究进展。

关键词 沙门氏菌; 耐药机制; 抗生素

中图分类号 S858.28 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)23-07205-03

Research Progress of Drug Resistant Mechanism of Salmonellas

DENG Shu-xuan et al (Research Center of Poultry Diseases, Collage of Animal Sciences, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014)

Abstract Drug resistant of Salmonellas became more and more serious due to the unscientific use of antibiotics, which brought great threat to the health of human and animals. With the development of molecular biology, the research on drug resistant mechanism of Salmonellas became deeper, which was mainly in five aspects at present including drug resistant mediated plasmid, changes of cell permeability, epimembranal efflux pump, changes of target site and inactive enzyme. Drug resistant mechanism of Salmonellas was not independent and the drug resistant level was determined by the cooperation of two or more mechanisms.

Key words Salmonella; Drug resistant mechanism; Antibiotics

沙门氏菌病是一种重要的人畜共患病,自1885年Salmon和Smith分离到猪霍乱沙门氏菌以来,对沙门氏菌的研究历史已有100余年。目前,已发现的沙门氏菌的血清型有2000多种^[1-2]。抗生素的应用对控制和预防沙门氏菌病发挥了巨大的作用,然而随着抗生药物的滥用和不当使用,沙门氏菌病的耐药性日趋严重,加强对该菌耐药性的监测力度和耐药机制的研究迫在眉睫。为此,笔者对沙门氏菌耐药机制的研究进展进行了综述。

1 沙门氏菌的耐药研究状况

1.1 质粒介导的耐药性

质粒是最早被发现的细菌染色体外遗传DNA,带有各种各样的决定簇(determinants),使得宿主菌能在不利环境中更易生存,其中对抗生素耐药性编码的R质粒最常见,可对1种或多种抗生素耐药性编码。转座子(transposon)是一种比质粒更小的DNA片段,能够随意地在质粒或染色体上的DNA分子中插入或跃出,将耐药性的遗传信息在细菌质粒、染色体和噬菌体间传递,造成耐药性在不同菌株、甚至不同的菌属间传播。沙门氏菌产生耐药性主要是通过质粒携带的耐药基因扩散,耐药质粒通过结合、转化、转导等使携带的R质粒在细菌间传递、扩散。研究发现,在伤寒、副伤寒多重耐药菌株中有73%的菌株可检出140 Mdal的耐药质粒,而所有的敏感株均未检出质粒,因此认为菌株的耐药性与携带大分子质粒有关^[3]。孙宪锋等以氯霉素乙酰转移酶活性(CAT)和药敏试验作为耐药标志,用Slot blot、Southern blot法检测沙门氏菌耐药基因的位置,结果发现,伤寒沙门氏菌耐氯霉素基因大部份位于质粒上,少数位于染色体或二者兼有^[4]。沙门氏菌耐药质粒除以接合和转化进行转移外,还可通过转导进行散播,已知具普遍转导能力的温和型噬菌体ES18和PDT17 λ 噬菌体的P22类群)在沙门氏菌里普遍存在。Horst Schmieger等研究还发现,以前噬菌体(prophage)形式广泛存在于鼠伤寒沙门氏菌DT104菌株的PDT104噬菌体亦可介导转导过程^[5],这意味

着所有DT104菌株在它们的基因组内均携带有一个可进行水平转移扩散耐药基因的载体。虽然这些噬菌体的转导率很低,但这种基因转移模式足以解释环境中观察到的沙门氏菌耐药性的广泛扩散现象。

在进行细菌耐药性质粒及转座子的序列比较时,还发现了另一类耐药机制——整合子。整合子可捕获多个基因盒子且能够借助质粒进行转移,因此对细菌的耐药性传播产生了影响。Tosini等在最近分离的37株人源多重耐药鼠伤寒沙门氏菌的质粒上发现了一、二、三类整合子,但在1970年发现的耐药谱相同的鼠伤寒沙门氏菌流行株携带的相同质粒上却没有发现整合子,因而认为整合子是最近才出现的^[6]。Rankin等对肠炎沙门氏菌的耐药性与整合子的关系进行研究,发现46.8%的多重耐药菌有整合子。

1.2 膜通透性引起的耐药性

细菌长期接触药物,可以引起菌体细胞膜孔蛋白丢失,从而导致细胞膜通透性下降,引起低度耐药。沙门氏菌的外膜蛋白改变包括膜孔蛋白缺陷、多向性突变、特异性通道的改变及膜脂质双层的改变。目前在细胞膜通透性引起沙门氏菌耐药的研究还较少,据报道沙门氏菌的耐药性与外膜蛋白质(Outer membrane proteins, Omp),即孔膜蛋白(Porin)密切相关^[7]。Oppezzo等通过试验发现鼠伤寒沙门氏菌envB基因发生突变会导致孔蛋白含量下降,以及超广谱 β -内酰胺酶抗生素的易感性增加;多重耐药基因的过度表达,也会导致细菌OMP结构的改变。细胞膜通透性下降虽不是沙门氏菌的主要耐药机制,但是它与主动外排系统所产生的协同作用能导致沙门氏菌对四环素类等抗菌药产生高度的耐药性。

1.3 外排泵引起的耐药性

外排作用的改变是沙门氏菌产生耐药性的一个重要机制。沙门氏菌的细胞膜上存在一类有泵功能的蛋白,在能量的支持下,能将药物可选择性或非选择性地排出细胞外,降低药物在胞内的积累,从而使沙门氏菌产生低水平的耐药性。目前,一般认为AcrAB是最主要的外排泵,可提供阳离子染料、四环素、氯霉素、新霉素、红霉素、夫西地酸、十二烷基硫酸钠、茶啉酸、氨基苄西林、利复平、吐温X-100等的耐药性。AcrB是由1049个氨基酸编

作者简介 邓树轩(1981-),男,广东东莞人,硕士研究生,研究方向:微生物学。*通讯作者。

收稿日期 2007-04-12

码的跨膜蛋白, AcrA 是由 24 个氨基酸编码在 N 端的信号肽, 且有 397 个氨基酸残基的连接融合蛋白伸至外膜孔道蛋白, 药物可以直接通过外膜障碍外输到菌体外^[9]。研究表明, 沙门氏菌的 AcrAB 系统与大肠希氏菌的相应调节蛋白有较高的同源性, 沙门氏菌的 AcrA 能够介导菌体对胆碱和清洁剂的耐药^[9]。伤寒沙门氏菌 mar 基因中, 操纵基因 marO 两侧有 2 个不同的操纵子, 一侧为 marC 操纵子, 编码一种无明显功能的膜内在蛋白 MarC, 但可能与其他一些菌株的多重耐药表型有关; 另一侧是由多个操纵子组成的调节子 marRAB, 编码多种调节蛋白。MarR 是抑制子, 当面临抗生素等压力应激时, 它介导的抑制减弱, 并刺激激活子 MarA 的合成。当 MarA 与 marO 操纵基因中多重耐药框 (mar-box) 结合后, 能够激活 marRAB 的转录; MarA 与多重耐药框中的其他激活子 (如 SoxS 和 Rob) 一起调控 marRAB 基因的表达。AcrAB 基因由 marRAB 控制, 编码多药物外流泵 AcrAB; 外膜蛋白 TolC 是 AcrAB 的外流通道, 是保持对抗生素耐受所必需的。据报道, 沙门氏菌对四环素、氨基青霉素、氯霉素、头孢、红霉素、三甲氧苄氨嘧啶等的多重耐药性与主动外排系统 AcrAB 有关^[10]。Giraud 等认为沙门氏菌中存在的外输泵蛋白 NorA、MexAB、PmrA 和 Bmr 具有对喹诺酮的外输作用^[11]。

1.4 靶位结构改变引起的耐药性 细菌通过靶位结构的改变, 使抗菌药物失效或活性减弱, 这是导致细菌耐药的一个重要因素。沙门氏菌能够改变抗菌药作用的靶位, 使抗菌药物不能被识别, 从而产生耐药性。DNA 旋转酶由 GyrA 和 GyrB 2 个亚基组成, 在 DNA 复制、重组和转录过程中起重要作用。氟喹诺酮类药物作用于沙门氏菌的最初靶位是 DNA 旋转酶, DNA 旋转酶的改变导致对该类药物产生了耐药性。GyrA 的突变在不同的微生物中有所差异, 在沙门氏菌中, GyrA 的喹诺酮耐药决定区 (Quinolone resistance-determining region, QRDR) 位于相当于 GyrA 蛋白第 67 (Ala) 和 106 (Gln) 氨基酸残基之间 (第 199~318 个碱基), 最常发生突变在 Ser-83, 这位置通常突变为 Phe、Tyr 或 Ala, 在 Asp-87 位置常突变为 Gly、Asn 或 Tyr^[12]。进一步的研究发现, 沙门氏菌 GyrB 蛋白的第 426、447 和 463 氨基酸残基的改变也可以引起对喹诺酮类药物的耐药性^[13]。拓扑异构酶 IV 编码基因 ParC 和 ParE 点突变, 也是引起氟喹诺酮耐药的重要原因之一。ParC 上的突变点通常是 Ser-80 突变成 Arg, ParE 上为 Ser-458 突变成 Pro。GyrA、ParC 突变在产生氟喹诺酮类药物耐药中起到主要作用, 据报道, 在沙门氏菌中 ParC 可能也是喹诺酮的作用靶位, 但并非第一作用靶位^[14]。关于 GyrB、ParE 基因突变的报道较少, 它们的序列可能是相对保守序列, 对氟喹诺酮类药物具有较高的耐受性, 这对新抗生素的研制, 对抗生素作用靶位的选择是十分重要的。

1.5 钝化酶和灭活酶引起的耐药性 钝化酶是指能够将一些基因添加到抗菌素的某个位点上, 从而改变抗菌素的空间结构, 失去与靶位结合能力的一种酶。细菌对氨基糖甙类等药物能由于获得编码钝化酶的基因, 从而产生耐药性。AAD 类基因 (adenylytransferase, 编码腺苷酸转移酶) 普遍存在大肠杆菌、沙门氏菌等肠道杆菌中, 该基因编码腺苷酸转移酶, 对氨基糖甙类的 3、2、4、9-OH 或 NH₂ 进行腺苷酸修

饰, 改变氨基糖甙类药物的结构, 使其失去与核糖体结合的能力, 从而使氨基糖甙类灭活。AAD 主要包括 aadA、aadB、aadD 和 aadK 等, aadA 基因编码 3-羟基腺苷酸转移酶, 对链霉素和壮观霉素的 3-OH 进行修饰, 使链霉素、壮观霉素空间的结构发生变化, 失去与靶位结合能力, 从而产生耐药性; 沙门氏菌的 AadA 分布广泛, 主要存在于质粒上。Beatriz Guerra 等^[15]通过 PCR 检测发现, 76% 的 DT104 伤寒沙门氏菌存在 aadA。AadB 基因编码 2-羟基腺苷酸转移酶, 通过对卡那霉素的 2-OH 进行修饰钝化和灭活, 从而导致耐药性的产生, 这个基因主要存在于革兰氏阴性菌, 尤其是沙门氏菌和大肠杆菌。Fabio 等用 PCR 对 37 株多重耐药沙门氏菌进行了检测, 发现存在 3 种不同类型的整合子, 并对 aadB 基因进行扩增且都扩增出 aadB 基因^[16]。

近年来, 革兰氏阴性菌由 β -内酰胺酶介导的耐药性问题十分突出。超广谱 β -内酰胺酶 (extended spectrum β -lactamase, ESBLs) 是一类新的 β -内酰胺酶, 它主要由大肠埃希氏菌和肺炎克雷伯菌产生, 能够使抗生素灭活从而形成耐药性。该酶是由质粒介导传播的对头孢菌素类、单酰胺类及青霉素耐药的一类酶。TEM 基因家族是一种产生超广谱-内酰胺酶的耐药基因, 其产物可以水解 β -内酰胺类抗生素。在国内, 宋启发等在一株伤寒沙门氏菌中检出了 TEM-1 耐药基因; 曹春红用 Etese 法对 55 种不同血清型的沙门氏菌进行了检测, 结果发现 9 种血清型的沙门氏菌产超广谱 β -内酰胺酶。

2 结语

综上所述, 沙门氏菌极易获得耐药性, 给预防和治疗带来巨大挑战, 因此, 要制定一系列措施, 防止由于滥用抗生素导致耐药沙门氏菌的快速和广泛出现; 同时, 要对沙门氏菌进行监测、防止其发展与扩散, 要根据其产生的耐药性作用机制, 不断研究开发新的抗菌药物, 有效地控制日趋严重的耐药沙门氏菌感染问题。

参考文献

- [1] JOSHUA F, DONAL G GUINEY. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of Salmonella infection [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2001, 4 (107): 775-780.
- [2] FRANCOIS X W, FRANCOISE G. Multidrug resistance in Salmonella enterica serotype typhimurium from humans in France (1993-2003) [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44 (3): 700-708.
- [3] HASAN Z, RAHMAN K M, ALAN M N, et al. Role of a large plasmid in mediation of multiple drug resistance in Salmonella typhi and paratyphi A in Bangladesh [J]. Bangladesh Med Counc Bull, 1995, 21 (1): 50-52.
- [4] 孙宪锋, 刘晓霞. 伤寒沙门氏菌耐药基因的检测及定位 [J]. 中华传染病杂志, 1998, 16 (4): 35-39.
- [5] HORST S, PETRA S. Transduction of multiple drug resistance of Salmonella enterica serovar typhimurium DT104 [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 170: 251-256.
- [6] TOSINI F, VISCA P, LUZZI I. Class I integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncF and IncL/M plasmids in Salmonella enterica serotype typhimurium [J]. Antimicrobial Agents Chemother, 1998, 42: 3053-3058.
- [7] CONIE E B, PINA M, FRIATAMICO. Molecular Characterization of antibiotic resistance gene cluster of Salmonella typhimurium DT104 [J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 1999, 43 (4): 846-849.
- [8] HARKE O, DZWOKAI M, HIROSHI NIKAIIDO, et al. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotics resistance phenotype of Escherichia coli multiple antibiotic resistance (Mar) mutants [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 179: 306-308.

- [9] GENSBERG K, JIN Y F, PIDDOCK J V. A novel *gyrB* mutation in a fluoroquinolone resistance clinical isolate of *Salmonella typhimurium* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 132: 56-57.
- [10] DAVID B, AXEL C, ELISABETH C, et al. Characterization of variant salmonella genomic island 1 multidrug resistance regions from Serovars typhimurium DT104 and agona [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(6): 1714-1722.
- [11] GIRAUD E, CLOECKAERT A, KERBOEUF D, et al. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar typhimurium [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 47: 341-343.
- [12] WIUFF C, MADSEN M, BAGGESEN D L, et al. Quinolone resistance among *Salmonella enterica* from cattle, broilers, and swine in Denmark [J]. *Microb Drug Resist*, 2000, 6: 11-17.
- [13] HARGRETT B N, PAVIA T, TAUXE R V. *Salmonella* isolates from humans in the United States 1984-1986 [J]. *MMWR Surveill Summ*, 1988, 37: 2531-2536.
- [14] 肖永红, 王其南. 伤寒沙门氏菌 DNA 旋转酶 *gyrA* 及拓扑异构酶 IV *parC* 基因与耐喹诺酮类的关系研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000(3): 196-198.
- [15] BEATRIZ GARA, SARA M S, JOSE M A. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class I integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 4: 1305-1308.
- [16] FABIO T, PAOLO V L, ANNA M D, et al. Class 1 integron-Borne multiple antimicrob resistance carried by IncF1 and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* Serotype typhimurium [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42: 3053-3058.