DOI:10.16016/j.1000-5404.201602030

中国类鼻疽菌的耐药谱调查及耐药机制分析

陈杨久齐[1,2],胡春雨[1,2],方 瑶[1],毛旭虎[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院医学检验系临床微生物及免疫学教研室[1],学员旅3营[2])

[摘要] 类鼻疽是一种由类鼻疽伯克霍尔德菌导致的热带医学疾病,其临床表现多样,也有"似百样病"之称,其病原已被美国CDC列为生物恐怖剂。类鼻疽在中国的海南、广西以及福建等地都有过报道,但由于其误诊率高,也未被列为法定报告的传染病,对类鼻疽的研究并未得以重视。类鼻疽菌对多种抗生素具有天然的耐药性,同时其基因组变异迅速,能产生新的耐药特性,造成的感染极易复发,治疗困难。目前临床上对类鼻疽的耐药检测还未建立统一的检测指标和判断标准,国内也还没有规范的类鼻疽抗生素用药指南。我们总结了中国2006-2014年公开发表文献中的类鼻疽临床用药及耐药结果,结合本室的类鼻疽临床资源库数据,对中国类鼻疽菌的耐药谱进行统计分析,总结用药规律,以期寻找合适的用药方案;同时,还分析了类鼻疽菌的可能耐药机制,探讨了类鼻疽耐药的深层次原因,以期为后续类鼻疽的治疗及用药指南的制定提供理论指导和临床借鉴参考。

[关键词] 类鼻疽伯克霍尔德菌;耐药谱;耐药基因
[中图法分类号] R378.99;R915 [文献标志码] A

Drug resistance spectrum of clinical *Burkholderia pseudomallei* strains in China and related mechanism

Chenyang Jiuqi[1,2], Hu Chunyu[1,2], Fang Yao[1], Mao Xuhu[1] ([1]Department of Clinical Microbiology and Immunity, Faculty of Medical Laboratory Sciences, Southwest Hospital, [2]3rd Battalion, Student brigade, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Melioidosis is a tropical disease caused by *Burkholderia pseudomallei*, and is known as "like a hundred of different diseases" because of its variety of clinical manifestations. It is widely distributed in China, including Hainan, Guangxi and Fujian provinces, with high infectivity, high mortality and high relapse. So far, there is no standard therapeutics for melioidosis in China, and standard drug resistance test has not been established yet. Therefore, we summarize the melioidosis cases and related drug resistance data published in Chinese literatures from 2006 to 2014 and related cases that we collected. The drug resistance spectrum of *Burkholderia pseudomallei* and possible drug resistance mechanisms are further analyzed, which can provide theoretical direction and clinical reference for therapy and medication guide of melioidosis.

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; drug resistance spectrum; drug resistance gene

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81471914). Corresponding author: Mao Xuhu, E-mail: maoxh2012@hotmail.com

类鼻疽是一种由类鼻疽菌感染引起的热带人畜共患病[1],主要发生在北纬20°至南纬20°之间的地区。类鼻疽患者以户外劳作的男性为主,主要临床表现为畏寒、高热,其他依次为咳嗽、咳痰,肝功能损害,局部脓肿和淋巴结、肝脾肿大,多数患者白细胞增加和血培养阳性[2]。大多数类鼻疽菌感染呈隐性感染,一旦机体抵抗力下降,往往就会显现出严重的临床症状[3]。其发病没有明显的季节性,但汇总中国多年临床病例

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81471914)
[通信作者] 毛旭虎,E-mail:maoxh2012@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160408.1356.005.html(2016-04-08)

发现,绝大多数类鼻疽病例集中在雨季[4-5]。越来越多的证据显示类鼻疽有扩散的趋势。中国类鼻疽疫源地主要集中在台湾、广东、广西、海南等地区,尤其是海南地区。最新研究数据显示在2007年以后海南省类鼻疽的病例呈增长趋势[6]。类鼻疽菌主要存在于疫区的水和土壤中,可从多种途径进入人体。鉴于类鼻疽菌的易获取、易培养、易传播(可经气溶胶传播),美国CDC及WHO已将其列入国际《禁止生物武器公约》核查清单。类鼻疽极易误诊,其临床表现与结核菌或同属的鼻疽杆菌感染极其相似。其准确诊断依赖血培养和血清学检查,耗时长,部分医院缺乏相应技术和条件。类鼻疽菌对多种抗生素具有天然的耐药性,同时其基因组变异迅速,能产生新的耐药特性,造成的感染极易复发,治疗困难[7]。目前类鼻疽的耐药机制研究仍然很少,亟待加强。我们总结了中国2006-2014年公开发表文献中的类鼻疽临床用药及耐药结果,结合本室的类鼻疽临床资源库数据,对中国类鼻疽菌的耐药谱进行统计分析,总结用药规律,以期寻找合适的用药方案;同时,我们还分析了类鼻疽菌的可能耐药机制,探讨了类鼻疽耐药的深层次原因,以期为后续类鼻疽的治疗及用药指南的制定提供理论指导和临床借鉴参考。

1 我国类鼻疽的耐药谱分析

我国在治疗类鼻疽临床用药上没有统一的方案,治疗类鼻疽患者多是以经验性治疗为主。2002-2014年,本室从海南三亚、海口等地医院检验科收集了156株类鼻疽临床菌株,并对其抗药性进行了检测。同时,我们统计了中国2006-2014年有文献记载的478例临床分离的类鼻疽菌对碳青霉素、头孢他啶、阿莫西林、氨苄西林、复方新诺明、多西环素、氨苄西林/舒巴坦的耐药情况。结果发现类鼻疽细菌对碳青霉素类抗生素(亚胺培南、美罗培南)的耐药率最低,几乎为0,对头孢他啶的耐药率为20%~30%,对最常用的抗生素阿莫西林和氨苄西林的耐药率高达90%,甚至100%,对复方新诺明的耐药率在60%左右,对多西环素的耐药率为0,对氨苄西林/舒巴坦的耐药率为56%左右[8-18],统计分析结果见表1。

2 讨论

2.1 类鼻疽的治疗方案

类鼻疽的治疗与其他细菌性败血症治疗一样,包括溶液的补充,纠正因败血症造成的低血容量性休克,早期给予有效的抗生素治疗及足够的营养补充等。由于类鼻疽菌有天然耐药性,而耐药程度又因菌株不同而异。类鼻疽治疗的总方针是早期诊断,联合用药,长疗程治疗,防止复发。类鼻疽国际上的治疗方案主要分为两步,急性期使用头孢他啶静脉给药至少2周,危重病例推荐碳青霉烯类抗生素,维持期口服复方新诺明或者多西环素至少3个月。

表1 中国类鼻疽菌的耐药性

作者/年份/地址	样本数	方法	抗生素耐药情况			
			碳青霉烯	头孢他啶	氨苄西林	复方新诺明
本室收集并检测(2002-2014)	variable	MIC(VITEK-36)	0/156(0%)(I)0/156(0%)(M)	21/154(13.6%)	N/R	16/154(10.4%)
钟佳芳,2014,海南	40	MIC(VIKT2 Compact)	4(10%)(M)4(10%)(I)	4(10%)	N/R	8(20%)
孙 罡,2013,浙江	34	MIC(VETIK-32)	0(0%)(I) 14(14.71%)(M)	12(35.29%)	34(100%)	20(58.82%)
陈瑞林,2012,茂名	variable	MIC(VITEK-C32)	0/17(0%)(M) 0/17(0%)(I)	0/17(0%)	N/R	2/10(20%)
李天娇,2011,海南	18	MIC(VITEK-32)	0(0%)(I) 3(16.7%)(M)	4(22.2%)	18(100%)	N/R
李天娇,2011,海南	43	MIC(VITEK-32)	0(0%)(I) 3(7%)(M)	7(16.3%)	36(83.7%)	17(39.5%)
林 容,2011,海南	variable	MIC(VITEK-32)	0/83(0%)(I) 0/53(0%)(M)	25/117(21.3%)	N/R	50/122(41%)
蔡笃运,2010,海南	variable	MIC(VITEK-33)	1/120(1%)(I)	31/120(25.8%)	120/120(100%)	77/120(64.2%)
陈宇辉,2010,海南	40	MIC(VITEK-32)	0(0%)(I)0(0%)(M)	8(20%)	26(65%)	17(42.5%)
郭红荔,2010,海南	50	DD(VITEK-33)	0(0%)(I) 0(0%)(M)	9(18%)	50(100%)	29(58%)
蔡笃运,2009,海南	104	MIC(VITEK-34)	0(0%)(I)	25(24%)	104(100%)	67(64.4%)
郭红荔,2009,海南	108	MIC(VITEK-35)	0(0%)(I) 0(0%)(M)	32(29.1%)	108(100%)	60(54.9%)
吴多荣,2009,海南	82	MIC(VITEK-36)	3(3.7%)(I) 2(2.4%)(M)	13(15.9%)	82(100%)	44(57.3%)
杨小敏,2008,海南	15	MIC(AutoScan4)	0(0%)(I)	9(62.85%)	15(100%)	4(75%)
施蓉萍,2007,海南	10	MIC(VITEK-36)	0(0%)(I)	6(60%)	10(100%)	1(10%)
苏林光,2006,海南	variable	MIC(VITEK-36)	0/50(0%)(I)	9/50(18%)	50/50(100%)	32/50(64%)

M:美罗培南;I:亚胺培南;N/R:没有数据;variable为检测类鼻疽菌对各种抗生素的样本数目各不相同

2.2 类鼻疽菌的耐药概况

类鼻疽菌的耐药包含两类,天然耐药和获得性耐药。类鼻疽天然耐药包括对低浓度的头孢类、青霉素类、利福霉素类、氨基糖苷类抗生素的抗性。对喹诺酮类,大环内酯类的相对抗性也妨碍了这些抗生素的临床应用。获得性耐药也是类鼻疽菌获得抗生素抗性的重要手段。类鼻疽菌通过基因选择性丢失、水平转移和其他抗性质粒介导的方式获得或增强对多种抗生素的抗性[19]。

2.3 类鼻疽的耐药机制分析

细菌的耐药机制一般分为5种:第1种是产生灭活酶,破坏抗菌药物结构或活性成分,比如β-内酰胺酶;第2种是抗菌药物作用靶位改变,使抗生素不能与作用位点结合,导致抗菌的失败,比如肠球菌;第3种是改变细菌外膜通透性,主要使抗菌药物不能进入菌体内,故产生天然耐药,比如铜绿假单胞菌;第4种是影响主动外排泵系统,某些细菌能将进入菌体的药物泵出体外使药物无法起作用,比如金黄色葡萄球菌;第5种是形成细菌生物被膜,使得抗生素不能有效清除菌体,比如大肠埃希菌。类鼻疽的耐药谱广泛,其耐药机制可能与上述5种方式都有关。研究表明,类鼻疽菌的细胞膜可导致类鼻疽耐药,可能是其形成的生物膜能抑制抗生素的侵入。同时,类鼻疽菌也存在外排泵等相关蛋白与其抗性有关[20-22],如BpsOmp38突变(孔道蛋白)与菌体对头孢他啶和碳青霉素的外排有关。也有研究表明,类鼻疽菌的糖被结构可能与抗生素对菌体的渗透有关[23],但具体机制还不清楚。一项基于马来西亚类鼻疽患者的大样本基因检测及数据分析显示,类鼻疽临床耐药可能还与类鼻疽菌的几种基因有关,分别是bpeB、amrB、BPSS1119和penA[24]。基于对类鼻疽菌基因组高通量芯片分析发现,其对头孢他啶的抗性可能与类鼻疽菌在机体内的适应性变异有关,类鼻疽菌能够能通过基因缺失(或丢失)的方式实现原有的青霉素结合蛋白的功能缺失,介导其对头孢类抗生素的耐药[25]。这些耐药机制研究汇总见表2。

表2 与类鼻疽菌耐药相关的基因或蛋白

耐药机制	涉及的基因/蛋白
细胞表面结构	胞外多糖[23]
耐药基因	bpsI、ppk、rpoS[23]
	bpeB、amrB、BPSS1119、penA[24]
膜蛋白结构	外排泵[20]
	BpsOmp38 porin[21]
	BpeEF-OprC[22]
突变基因	青霉素结合蛋白3[25]

2.4 展望

随着全球恶劣气候(如暴雨、台风、海啸)的日益肆虐,类鼻疽菌的微生态平衡被破坏,凡亚比台风、澳大利亚洪水等极端环境事件对类鼻疽的播散、暴发推波助澜,加上国内外的人员交流及贸易往来的增加,进一步增加了类鼻疽蔓延的可能。但人们通过对类鼻疽认识的不断深入,对类鼻疽菌的诊断和检出会有一个质的提升。而真正的问题在于临床治疗,类鼻疽的急性期死亡率很高,即使规范的临床用药死亡率都在20%~50%。虽然中国并没有制定出类鼻疽的临床治疗指南,但可从泰国的临床试验结果借鉴经验。而最令临床医生棘手的是类鼻疽菌的严重耐药情况,但具体中国临床分离的类鼻疽菌的耐药谱又并不清楚。也正是由于这些问题尚未解决,医生只能通过经验用药对患者进行治疗,而类鼻疽基因组的快速变异反而促进其耐药谱的扩展,给临床类鼻疽的治疗带来了新的问题。

汇总分析有文献报道的478株和本室收集的156株临床类鼻疽菌的药敏结果,类鼻疽菌对碳青霉素类抗生素的耐药性最低,对头孢他啶的耐药性在20%~30%,对临床最常用的抗生素阿莫西林和氨苄西林的耐药率高达90%,甚至100%,对复方新诺明的耐药率在60%左右,对氨苄西林/舒巴坦的耐药率为56%左右。由于统计样本的容量较小无法确定对多西环素的耐药性,但结合国外的研究报道提示类鼻疽对其的耐药性在10%左右。所以我们建议在治疗类鼻疽患者时可以首先考虑碳青霉素类抗生素,多西环素和头孢他啶。研究显示,在类鼻疽菌的清除和对一些轻微感染的治疗中,复方新诺明作为单方制剂表现出很好的应用前景[26]。虽然复方新诺明在药敏分析中的耐药性为20%,但实际耐药性可能低于此,推荐用更精准的Etest方法对其耐药性进行验证。有报道用Etest方法检测类鼻疽菌对复方新诺明的耐药性,没有发现耐药株。并且,复方新诺明与碳青霉素相比副作用小得多,可作为治疗类鼻疽的重要一线抗生素。

目前,类鼻疽菌的耐药机制还不清楚,初步研究表明类鼻疽菌耐药可能与其生物膜形成、膜相关蛋白和转运体有关,有多种基因参与其中,也与类鼻疽菌的环境和宿主适应性密切相关。完善的临床资料收集和规范化的类鼻疽临床治疗都有利于该菌的耐药分析和表型筛选。类鼻疽菌的全基因测序已经完成,多数据比对和分析也有助于我们发现新的耐药基因靶位。相信在不远的将来,基于类鼻疽的流行病学研究和耐药谱分析将帮助我们进行更加准确有效的临床诊断和治疗。

参考文献:

[1] 毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1315 – 1317. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.13.013

[2] 郭红荔, 董文, 陈海, 等. 海南地区类鼻疽病流行病学调查和耐药性研究[J]. 山东医药, 2009, 49(48): 61 – 62. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2009.48.029

[3] 蔡笃运, 施理, 林锋, 等. 类鼻疽伯克霍尔德菌耐药性变迁临床研究[J]. 现代预防医学, 2010, 37(6): 1134 – 1135.

[4] 方静, 方瑶. 类鼻疽的研究进展及诊疗现状[J]. 微生物与感染, 2013, 8(2): 115 – 118.

[5] 李天娇, 符惠群, 黄涛, 等. 类鼻疽伯克霍尔德菌感染的临床特点与耐药性分析[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(5): 888 – 890. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2011.05.044

[6] Fang Y, Chen H, Li Y L, *et al*. Melioidosis in Hainan, China: a restrospective study[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2015, 109(10): 636 – 642. DOI: 10.1093/trstmh/trv065

[7] 施蓉萍, 李华, 陈海. 人类鼻疽病 10 例临床分析[J]. 临床荟萃, 2007, 22(2): 120 – 121. DOI: 10.3969/j.issn.1004-583X.2007.02.025

[8] 林容, 谢灿茂, 陈海, 等. 类鼻疽病 122 例临床特征及耐药性分析[J]. 广东医学, 2011, 32(17): 2303 – 2304. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9448.2011.17.035

[9] 陈瑞林, 张达衡, 刘发河. 59 株伯克霍尔德菌感染的分布特点及耐药性分析[J]. 中国医药指南, 2012, 10(17): 36 – 37. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8194.2012.17.023

[10] 李天娇, 谷海瀛, 莫成锦, 等. 18 例类鼻疽伯克霍尔德菌的分离与耐药性分析[J]. 中国热带医学, 2011, 11(3): 355 – 356.

[11] 郭红荔, 符惠群, 李天娇. 类鼻疽伯克霍尔德菌败血症 50 例鉴定及其耐药性[J]. 中国热带医学, 2010, 10(3): 294, 330.

[12] 陈宇辉, 郭红荔. 糖尿病合并类鼻疽伯克霍尔德菌感染 40 例[J]. 中国热带医学, 2010, 10(10): 1238 – 1239.

[13] 孙罡. 对类鼻疽病 34 例临床特点及耐药性分析[J]. 中国农村卫生, 2013(10): 69 – 70.

[14] 钟佳芳, 陈如寿. 三亚地区类鼻疽伯克霍德菌血流感染 40 例临床分析[J]. 中国热带医学, 2014, 14(9): 1147 – 1149.

[15] 蔡笃运, 贾杰. 104 例类鼻疽伯克霍尔德菌感染与耐药性分析[J]. 重庆医学, 2009, 38(18): 2362 – 2363. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2009.18.052

[16] 吴多荣, 郭红荔, 陈海. 海南地区类鼻疽伯克霍尔德菌感染特点及其耐药性[J]. 山东医药, 2009, 49(12): 79 – 80.

[17] 杨小敏, 陈海. 耐药类鼻疽伯克霍尔德菌感染的临床分析[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(10): 1933 – 1934.

[18] 苏林光, 蔡笃运. 类鼻疽伯克霍尔德菌的耐药性分析[J]. 中国热带医学, 2006, 6(9): 1661, 1702.

[19] Rholl D A, Papp-Wallace K M, Tomaras A P, *et al*. Molecular Investigations of PenA-mediated beta-lactam Resistance in *Burkholderia pseudomallei*[J]. Front Microbiol, 2011, 2: 139. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00139

[20] Podnecky N L, Rhodes K A, Schweizer H P. Efflux pump-mediated drug resistance in *Burkholderia*[J]. Front Microbiol, 2015, 6: 305. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00305

[21] Aunkham A, Schulte A, Winterhalter M, *et al*. Porin involvement in cephalosporin and carbapenem resistance of *Burkholderia pseudomallei*[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e95918. DOI: 10.1371/journal.pone.0095918

[22] Podnecky N L, Wuthiekanun V, Peacock S J, *et al*. The BpeEF-OprC efflux pump is responsible for widespread trimethoprim resistance in clinical and environmental *Burkholderia pseudomallei* isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(9): 4381 – 4386. DOI: 10.1128/AAC.00660-13

[23] Mongkolrob R, Taweechaisupapong S, Tungpradabkul S. Correlation between biofilm production, antibiotic susceptibility and exopolysaccharide composition in *Burkholderia pseudomallei* bpsI, ppk, and rpoS mutant strains[J]. Microbiol Immunol, 2015, 59(11): 653 – 663. DOI: 10.1111/1348-0421.12331

[24] Khosravi Y, Vellasamy K M, Mariappan V, *et al*. Antimicrobial susceptibility and genetic characterisation of *Burkholderia pseudomallei* isolated from Malaysian patients[J]. ScientificWorldJournal, 2014, 2014: 132971. DOI: 10.1155/2014/132971

[25] Chantratita N, Rholl D A, Sim B, *et al*. Antimicrobial resistance to ceftazidime involving loss of penicillin-binding protein 3 in *Burkholderia pseudomallei*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(41): 17165 – 17170. DOI: 10.1073/pnas.1111020108

[26] Dance D A, Davong V, Soeng S, *et al*. Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Burkholderia pseudomallei*[J]. Int J Antimicrob Agents, 2014, 44(4): 368 – 369. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2014.06.003

(**收稿**:2016-02-12;**修回**:2016-03-14)

(编辑 王 红)