

# 消毒剂耐药机制的研究进展

侯佳惠 邢宇航<sup>通讯作者</sup>

浙江省疾病预防控制中心 浙江 杭州 310051

**【摘要】** 细菌对抗生素的耐药性是一个后抗生素时代的全球问题,细菌的耐药问题已经严重威胁人类健康。由细菌多重耐药造成的死亡已成为人类死亡的主要原因之一。防止医疗环境中细菌意外感染的最佳可行措施包括对消毒剂的使用和生物安全措施进行改进和优化。消毒剂因其良好的抑菌作用常用于细菌性感染的预防和治疗。新冠疫情发生以来,抗生素的滥用和消毒剂的大量使用导致细菌对其产生了严重的耐药性,但目前国内外对细菌抗性的研究大多关于对抗生素的耐药,关于消毒剂耐药机制的研究较少。本文就常用消毒剂耐药机制的研究进展进行概述,为后续研究细菌消毒剂耐药的分子机制提供理论支持。

**【关键词】** 消毒剂; 分子机制; 耐药

**【中图分类号】** R187+.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 2096-1685(2022)08-0196-03

## 1 消毒剂的耐药机制

细菌对消毒剂的耐药性主要是通过细菌自身所固有的遗传特性或体外获得耐药基因的方式产生,主要表现在膜通透性的改变、生物膜的形成、靶位的突变、外排泵的外排、消毒剂的灭活、水平转移等方面<sup>[1]</sup>。

### 1.1 膜通透性的改变

外膜是消毒剂耐药的一个重要参与者。消毒剂以膜孔蛋白途径进入细菌的外膜,当膜孔蛋白的表达量发生改变后,细胞膜通透性降低能减少或阻止消毒剂进入细菌内部,对消毒剂的耐药性就会增强。有研究显示,铜绿假单胞菌对苯扎氯铵的适应性耐药主要发生在细菌外膜,主要是由于铜绿假单胞菌 OprF 和 OprG 蛋白与维持细胞形状、流动性的脂蛋白(OprL 和 OprI) 的表达降低所导致<sup>[2]</sup>。

### 1.2 生物膜的形成

在细菌的耐药机制中,生物膜的形成发挥着重要作用。目前生物膜参与的耐药机制尚不明确,主要有以下几种观点:(1) 生物膜是一种复杂、高度组织化的三维网状结构且具有一定厚度,结构稳定不易被破坏,能包裹细菌形成物理屏障;三维网状结构内部为迂回通道,能阻止大分子物质的渗入,使消毒剂等物质无法作用于细菌。(2) 细菌产生的胞外物质能与生物膜上的消毒剂水解酶相互作用,使消毒剂失去活性;多糖包被是细菌分泌的一种粘附在细菌表面的缓冲物质,能够限制抗菌药物的扩散。当多糖物质跟氧化型消毒剂(含氯消毒剂)相互作用时,它们能中和消毒剂部分甚至全部的杀菌作用。当消毒剂跟非氧化型的中小分子消毒剂作用时,多糖包被能通过吸附降低消毒剂的效力。(3) 形成生物膜的细菌会诱导宿主

体内的补体转化,降低宿主体内中性粒细胞和巨噬细胞的吞噬作用,以降低宿主的免疫功能。(4) 当消毒剂渗入细胞膜进入细胞内时,生物膜聚合物能发挥分子筛的作用,从而增加消毒剂的最低抑菌浓度,提高致病菌的耐药性。已有研究报道,在工作浓度为 2000mg/kg 的过氧乙酸(PAA) 处理下,内窥镜腔内积聚的铜绿假单胞菌生物膜可存活 96min,导致正常消毒过程的失败<sup>[3]</sup>。生物膜的形成还具有协同作用,具有优势生长的细菌能保护其他细菌免于消毒剂的作用。生物膜对消毒剂的抗性与生物膜的年龄和环境中的营养成分相关。有研究表明,沙门氏菌和金黄色葡萄球菌对苯扎氯铵、次氯酸盐和过氧乙酸的耐受性要高于浮游细菌,成熟的生物膜对消毒剂的耐受性比浮游细菌或早期的生物膜要高。生物膜状态下细菌的质粒转移率也高于浮游细菌,其主要原因是生物膜为其提供了紧密的转移环境<sup>[4]</sup>。

### 1.3 外排泵

外排泵是一种存在于细胞膜上,具有外排功能的膜转运蛋白,通过利用质子驱动力、钠离子电化学梯度或 ATP 水解产生的能量进行细胞内外物质运输和代谢。细菌中的某些外排泵可将抗生素、消毒剂等物质排出体外,使菌体内的抗生素或消毒剂浓度始终维持在较低水平,从而导致细菌产生耐药性。根据氨基酸序列的同源性的差异可将其外排泵分为 5 大类:ATP 结合盒超家族(ATP-Binding Cassette, ABC),主要易化子超家族(Major Facilitator Super family, MFS),小多重耐药性家族(Small Multi-drug Resistance, SMR),耐药-结节化细胞分化家族(Resistance Nodulation cell Division, RND),多药及毒性化合物外排家族(Multidrug And Toxic

作者简介:侯佳惠(1988.8—),女,安徽潜山人,硕士研究生,主管技师,现主要从事细菌耐药及实验室质量管理工作。  
通讯作者:邢宇航。

compound Extrusion, MATE)<sup>[5]</sup>。

ABC 家族主要由两个疏水跨膜结构域 (TMD) 和两个亲水细胞质 ATP 结合域 (NBD) 组成;其作用机制:首先 TMD 与底物特异性结合形成中间产物, NBD 水解 ATP 为中间产物转移提供能量,通过改变构象将底物转运至膜外。只有少数 ABC 转运蛋白成员被证实参与了由染色体编码基因控制的消毒剂外排,如 PatA、PatB 和 AbcA。

MFS 家族由两种不同跨膜结构的蛋白结构域构成,即 12 碳和 14 碳跨膜结构;通过利用细菌胞内外的质子浓度梯度,将化学势能转化为跨膜转运的动能,实现底物在胞内外的跨膜转运。促进消毒剂外排的 MFS 家族外排泵主要为 LmrS、MdeA、MdrL、NorA、NorB、QacA 和 QacB。MdeA 和 MdrL 外排泵主要位于金黄色葡萄球菌中<sup>[6]</sup>。

SMR 家族转运蛋白较小,只有 4 个跨膜区,是质子驱动供能型的转运蛋白;其作用机制是前三个跨膜区中保守的氨基酸残基侧链与底物的疏水结构结合,底物与带电荷残基的质子交换导致特异性底物排出。已被报道的 SMR 家族消毒剂外排泵有 Smr<sup>[7]</sup>、QacG、QacH 和 QacJ<sup>[8]</sup>。

RND 家族由 36 个跨膜的  $\alpha$  螺旋构成,三个单体分别是内膜蛋白、外膜蛋白和周质膜融合蛋白;其作用机制:外膜蛋白和内膜蛋白作为物质的转运通道,两者与周质融合蛋白相互作用后,共同形成外排泵系统的稳定结构,通过进入、结合和外排实现底物的转运。RND 家族外排底物较多,主要为亲脂性物质和两性分子。与消毒剂相关的外排泵主要有 AcrAB-TolC、Mex-AB-OprM、TriABC-OpmH、TtgABC、和 RaeE-RaeF-RopN<sup>[1]</sup>。AcrAB-TolC 和 Mex-AB-OprM 主要参与固有耐药,作用底物主要有三氯生 (TCS) 和十二烷基硫酸钠 (SDS)。RND 转运体 TtgB 与外膜通道 TtgC 和周质转接器 TtgA 相互作用,介导三氯苯、甲苯、异丙苯和对二甲苯等从 TtgABC 外排泵排出<sup>[9]</sup>。介导弯曲菌对消毒剂耐药的外排系统主要是 RND 家族中的 cmeABC 和 cmeDEF 外排系统<sup>[10]</sup>。cmeB、cmeF 和 cmeR 基因的失活和外排抑制剂的添加均可影响弯曲菌对消毒剂的耐药性。

MATE 家族具有 12 个穿膜结构域,其作用机制是将质子势能和钠离子浓度梯度提供的能量共同实现特异性底物的泵出。MATE 家族参与消毒剂外排的主要集中在 MepA。MepA 外排泵存在于金黄色葡萄球菌中,可直接被底物诱导,由染色体编码,受 MarR 家族阻遏物 MepR 调节, MepA 能介导消毒剂低水平的耐药<sup>[11]</sup>。

#### 1.4 酶失活

就酶失活机制而言,细菌对消毒剂和抗生素的耐药性差异在于不同抗菌剂所产生的酶不同。研究表明,细菌可通过酶催化作用使消毒剂如次氯酸 (HOCl)、过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、季铵

盐类 (QACs) 和甲醛失活。大肠杆菌对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的抗性研究表明,高浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可被含有卟啉血红素基团的过氧化氢酶分解<sup>[12]</sup>;低浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可通过氧化两个保守的过氧化物和分解半胱氨酸残基,被烷基过氧化氢还原酶亚基 C (AhpC) 降解<sup>[13]</sup>。大多数季铵盐类 (QACs) 在有氧条件下可被生物降解。已有研究报道季铵盐类消毒剂可在铜绿假单胞菌和恶臭假单胞菌中发生降解<sup>[12,14]</sup>。甲醛的抗性研究表明,铜绿假单胞菌和恶臭假单胞菌中, NAD<sup>+</sup> 氧化还原酶和甲醛脱氢酶具有水解甲醛的作用。

#### 1.5 消毒剂耐药基因

细菌可以通过表达消毒剂抗性基因来产生消毒剂抗性,根据耐药基因的位置可分为两种类型,一类位于染色体的耐药基因,另一类是质粒介导的耐药基因。染色体水平的耐药基因主要有 sugE(c)、emrE、ydgE/ydgF 和 mdfA。质粒介导的消毒剂抗性基因 qac 家族 (qacA、B、C、D、E1、F) 也能表达多种外排泵,双胍类和季铵盐类消毒剂可通过该途径被排出。其中 qac (A、B 和 C) 基因与金黄色葡萄球菌抗性有关<sup>[15]</sup>;而 qacE、qacE $\Delta$ 1、qacF 和 qacG 基因介导革兰阴性菌对季铵盐类的抗性<sup>[16]</sup>。qacZ 仅在粪肠球菌中检测到,并表现出对 BAC 的耐受性<sup>[17]</sup>;而 sugE (p) 经常存在于多重耐药质粒中,在大肠埃希菌和沙门氏菌中已有检出<sup>[18]</sup>。

#### 1.6 靶位的突变

作用靶位的改变在消毒剂耐药中不常见,通过在结合位点,或其附近突变或酶变性改变的靶点,可在物理结构上减少抗菌剂的结合,这种改变能减少抗菌剂对细菌的作用。目前对导致消毒剂耐药性的靶点变化的研究主要集中在三氯生 (TCS) 上,其主要耐药机制为 fabI 基因突变导致靶点的改变。fabI 基因突变通过激活对 TCS 耐药的烯醇化 ACP 还原酶同工酶并表达对 TCS 的抗性,阻止 fabI-NAD-TCS 复合物的产生<sup>[19]</sup>,但该突变只破坏三氯生对生长的抑制作用,而不造成实际的死亡,其中可能存在其他三氯生细胞靶点<sup>[10]</sup>。

## 2 总结

随着消毒剂的频繁使用,耐消毒剂的细菌也就随之出现;能引起微生物产生耐药性的消毒剂种类众多,主要包括季铵盐类、双胍类和氯己定类等。当细菌对抗生素和消毒剂有共同的耐药机制或本身携带某些耐药基因,或消毒剂用量不足、消毒前清洗不足时会显著降低消毒剂的功效,导致细菌连续暴露于亚抑制或亚致死浓度的消毒剂,使其对消毒剂甚至同类的消毒剂的耐药性发生改变,还可能使潜在敏感细菌的生长力、运动性、粘附性和生物膜等发生改变<sup>[10]</sup>。改变后的耐药菌可通过饮水、空气等媒介在人与人之间或动物之间水平传播,进一步增加耐药菌的交叉感染,形成耐药菌在自然界不断循环的生态系统<sup>[20]</sup>。新冠疫情爆发以来,消毒剂和抗生素的大量使用使细菌产生适

应性变化,目前对这种适应性与耐药性之间的关系并未明确,某些耐药机制可同时介导消毒剂和抗生素抗性;另外,消毒剂的不规范使用也容易造成交叉耐药菌的出现。因此,研究了解消毒剂耐药的分子传播机制,通过合理指导使用消毒剂,以减少交叉耐药菌的出现具有重要意义。

参考文献

[1] MC CARLIE S, BOUCHER C E, BRAGG R R. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance[J]. Drug Resist Updat, 2020, 48: 100672.

[2] MACHADO I, COQUET L, JOUENNE T, et al. Proteomic approach to *Pseudomonas aeruginosa* adaptive resistance to benzalkonium chloride[J]. J Proteomics, 2013, 89: 273–279.

[3] 何荣攀. 内镜铜绿假单胞菌生物膜对高水平消毒剂抗性及与 *qacE Δ 1-sul1* 基因相关性研究 [D]. 南昌大学, 2020.

[4] TONG C, HU H, CHEN G, et al. Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies[J]. Environ Res, 2021, 195: 110897.

[5] 顾觉奋. 外排泵抑制剂研究进展 [J]. 国外医药 ( 抗生素分册 ), 2020(1): 1–10.

[6] HASSANZADEH S, GANJLOO S, POURMAND M R, et al. Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review[J]. Microb Pathog, 2020, 139: 103850.

[7] JIANG X, REN S, GENG Y, et al. The *sug* operon involves in resistance to quaternary ammonium compounds in *Listeria monocytogenes* EGD-e[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(16): 7093–7104.

[8] IGNAK S, NAKIPOGLU Y, GURLER B. Frequency of antiseptic resistance genes in clinical staphylococci and enterococci isolates in Turkey[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2017, 6: 88.

[9] PUTRINS M, ILVES H, LILJE L, et al. The impact of ColRS two-component system and TtgABC efflux pump on phenol tolerance of *Pseudomonas putida* becomes evident only in growing bacteria[J]. BMC Microbiol, 2010, 10: 110.

[10] 郭金丽, 周忠新, 程古月, et al. 弯曲菌对抗菌药和生物消杀剂耐药和适应机制的研究进展 [J]. 疾病监测, 2020(7): 656–663.

[11] COSTA S S, VIVEIROS M, AMARAL L, et al. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update[J].

Open Microbiol J, 2013, 7: 59–71.

[12] TEZEL U, PAVLOSTATHIS S G. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology[J]. Curr Opin Biotechnol, 2015, 33: 296–304.

[13] CHAROENLAP N, JIRAMONAI L, CHITTRAKANWONG J, et al. Inactivation of *ahpC* renders *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to the disinfectant hydrogen peroxide[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2019, 112(5): 809–814.

[14] OH S, TANDUKAR M, PAVLOSTATHIS S G, et al. Microbial community adaptation to quaternary ammonium biocides as revealed by metagenomics[J]. Environ Microbiol, 2013, 15(10): 2850–2864.

[15] GAHONGAYIRE S, ALMUSTAPHA A A, DRAGO K C, et al. Prevalence and Detection of *qac* Genes from Disinfectant-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Salon Tools in Ishaka Town, Bushenyi District of Uganda[J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2020: 1470915.

[16] SLIPSKI C J, JAMIESON-DATZKIWI T R, ZHANEL G G, et al. Characterization of Proteobacterial Plasmid Integron-Encoded *qac* Efflux Pump Sequence Diversity and Quaternary Ammonium Compound Antiseptic Selection in *Escherichia coli* Grown Planktonically and as Biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2021, 65(10): e0106921.

[17] BRAGA T M, MARUJO P E, POMBA C, et al. Involvement, and dissemination, of the enterococcal small multidrug resistance transporter *QacZ* in resistance to quaternary ammonium compounds[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(2): 283–286.

[18] SINWAT N, WITOONSATIAN K, CHUMSING S, et al. Antimicrobial Resistance Phenotypes and Genotypes of *Salmonella* spp. Isolated from Commercial Duck Meat Production in Thailand and Their Minimal Inhibitory Concentration of Disinfectants[J]. Microb Drug Resist, 2021, 27(12): 1733–1741.

[19] YU K, ZHANG Y, XU W, et al. Hyper-expression of the efflux pump gene *adeB* was found in *Acinetobacter baumannii* with decreased triclosan susceptibility[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 22: 367–373.

[20] 迟小惠, 冯友军, 郑培文. 耐药菌在人-动物-环境中的传播和遗传机制 [J]. 微生物学通报, 2019, 46(2): 311–318.