

携带 vanA 基因万古霉素耐药金黄色葡萄球菌研究进展*

王敬华 综述, 虞培娟 审校

(苏州大学附属第二医院检验科, 江苏 215004)

关键词: 万古霉素; 抗药性; 细菌; 葡萄球菌, 金黄色; 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.06.020

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)06-0658-03

1988 年首次报道肠球菌对糖肽类高水平耐药, 此后, VRE 逐渐在世界范围内播散。1993 年, vanA 基因在体外和动物模型从 VRE 成功转移到金黄色葡萄球菌^[1-3]。迄今, 在世界范围内已经检出 13 株 VRSA 临床分离株, 至少有 11 株携带含有编码糖肽类耐药性的 Tn1546 转座子, 其中 10 株分离自美国^[4-5], 1 株分离自印度加尔各答^[6]。王敬华等^[7]报道于 2007 年从临床检出 1 株携带 vanA 基因的万古霉素耐药溶血葡萄球菌 (vancomycin resistant staphylococcus hemolyticus, VRSH), 对万古霉素和替考拉宁均高水平耐药 (万古霉素 MIC = 128 $\mu\text{g/mL}$, 替考拉宁 MIC = 256 $\mu\text{g/mL}$)。令人惊奇的是, 将一种糖肽类与一种 β -内酰胺类抗生素联合应用, 在体外和动物模型中均对 VRSA 产生很强的协同抗菌效应^[8]。1 株由于突变而携带 D-Ala:D-Ala 连接酶的 VRSA, 其生长在一定程度上要依赖万古霉素; 在体外缺乏诱导剂 (万古霉素) 的情况下, MRSA 与含有 vanA 转移接合子的同源性 VRSA 竞争性生长显示, 含有转移接合子菌株处于不利情况^[9]。VRSH 的检出, 实际上证实了凝固酶阴性葡萄球菌也可以获得 vanA 基因而表达对万古霉素高水平耐药^[7]。VRSA 在美国, 尤其是密执安那州地区反复出现不是偶然的, 有关 VRSA 耐药基因的获得和耐药性表达还有许多期待进一步研究。

1 van 基因存在是 VRSA 对糖肽类抗生素耐药性的主要机制

在革兰阳性细菌中, 糖肽类通过结合肽聚糖五肽前体 C 端的 D-Ala-D-Ala, 阻断转糖基作用和转肽作用, 从而抑制细胞壁的合成。迄今为止, 已经报道了肠球菌对糖肽类的 7 种耐药模式 (vanA、B、C、D、E、G、L) 和相对应的操纵子 (vanA、B、C、D、E、G、L)^[10]。其主要机制为: (1) 合成新的靶位 (vanA、B、D, 肽聚糖前体末端为 D-Ala-D-Lac; vanC、E、G、L 肽聚糖前体末端为 D-Ala-D-Ser, 对糖肽类亲和力降低)。 (2) 去除了正常的以 D-Ala-D-Ala 为末端的肽聚糖前体。

vanA 型耐药, 是最早被阐明, 也最常见, 编码对糖肽类高水平耐药性, 由 Tn1546 转座子介导^[2]。这个 11 kb 可移动基因片段属于 Tn3 转座子家族, 编码 9 种多肽, 负责转位 ORF1 和 ORF2 产物, 调节耐药性表达 (vanR、vanS), 以 D-Lac 末端修饰肽聚糖前体的合成 (vanH、vanA), 正常前体的水解作用 (vanX、vanY), 以及另一种未知功能 (vanZ)。ORF1 和 ORF2 分别编码转位酶和游离酶, 负责转座子的移动。

糖肽诱导 vanA 耐药性的表达是由 VANR/VANS 系统调控的^[11], 这两种蛋白控制培养基中糖肽类诱导耐药基因的表达水平。VANS 是一种膜相关元件, 含有组氨酸残基, 当培养基中含有糖肽类时这种细胞质中的组氨酸残基被磷酸化。VANR 是一种转录活化剂, 它接受活化的 VANS 产生的天冬

氨酸残基上的磷酸基, 这样, VANS 控制 VANR 的磷酸化水平。磷酸化的 VANR 通过结合 PRES 启动子活化 vanH、vanA、vanX 和 vanY 基因共转录, 通过结合到 PREG 启动子活化 vanR 和 vanS 基因。

2 目前已经报道的 VRSA 临床分离株

2002 年, 在密执安那州检出世界上第 1 株由于获得 vanA 操纵子而表现为对糖肽类高水平耐药 (万古霉素 MIC = 256 $\mu\text{g/mL}$, 替考拉宁 MIC = 128 $\mu\text{g/mL}$) 的 VRSA 临床分离株 (VRSA-1)。2010 年 3 月, 美国特拉华州刚刚报道检出 1 株高水平万古霉素耐药金黄色葡萄球菌^[12]。迄今, 世界各地已经从临床分离出至少 11 株携带 vanA 基因的万古霉素耐药葡萄球菌, 其中包括 10 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 和 1 株 VRSH-WY05 (菌株编号 WY05)^[7]。VRSH-WY05 分离自中国苏州 1 例 82 岁慢性肾衰竭男性患者腹腔积液标本。该菌株是我国迄今报道的首株万古霉素耐药葡萄球菌, 对糖肽类高水平耐药, 其耐药性由 vanA 基因介导, 该基因已测序并登陆 NCBI, 其耐药质粒全序列测定已经完成, 目前尚没有正式发表。10 株 vanA 型 MRSA 至少有 9 株分离自美国, 其中 7 株来自密执安那州, 1 株来自宾西尼亚州, 1 株来自纽约州 (特拉华州 VRSA 株耐药基因检测资料不详), 1 株分离自印度加尔各答^[13]。美国报道的 10 株 VRSA 大多数为万古霉素高水平耐药, MIC > 256 $\mu\text{g/mL}$ 菌株有 8 株, 只有两株为低水平耐药 (MIC 为 32 $\mu\text{g/mL}$ 和 64 $\mu\text{g/mL}$)。感染者主要为女性 (7 例), 男性患者仅 3 例; 年龄从 40~78 岁均有报道。有报道, 伊朗德黑兰和巴西各检出 1 株 VRSA^[13-14], 但这些菌株均没有携带 vanA 基因, 耐药水平低并且不稳定。NARSA 网报道了美国临床分离株的部分临床资料^[12]。

3 VRSA 临床分离株的生物学特性

3.1 vanA 基因从 VRE 转移到 VRSA 目前检测到的 11 株 VRSA 中, 至少 10 株检出分布于质粒的 vanA 基因决定簇。除了 VRSA-8 外, 多数病例 VRE 与 VRSA 菌株同时从同一患者分离出, 强烈提示 MRSA 菌株从糖肽类耐药肠球菌中获得 Tn1546 转座子^[15]。VRE 首先与金黄色葡萄球菌受体菌株结合, VRE 某些质粒能够在葡萄球菌中有效复制并在新宿主中稳定存在; 一些质粒复制效率很低, 他们在细胞分裂时丢失并在细菌传代过程中被稀释; 而 Tn1546 从载体质粒进入受体菌后, 整合于受体菌固有复制子 (质粒或染色体)。在美国分离 VRSA 中, 3 株 (VRSA-3、VRSA-5 和 VRSA-6) 保存了 VRE 的完整的 vanA 质粒, 而在 VRSA-1、VRSA-7、VRSA-8、VRSA-9、VRSA-10, Tn1546 从侵入的 VRE 质粒分离并转移到葡萄球菌固有质粒^[16]。

* 基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK2006540); 苏州市科教兴卫青年专项基金 (SWQ15)。

3.2 VRSA 对糖肽类抗生素呈不同耐药水平 VRSA-2、VRSA-3 在对糖肽类抗生素耐药水平方面不同于其他 VRSA 菌株,对万古霉素表现出中等耐药(MIC 分别为 32 $\mu\text{g/mL}$ 和 64 $\mu\text{g/mL}$),对替考拉宁表现为低水平耐药(MIC 分别为 4 $\mu\text{g/mL}$ 和 16 $\mu\text{g/mL}$),被称为低水平耐药 VRSA(low-level-resistant VRSA,LLR-VRSA)。对 *vanA* 基因 PCR 图谱和 DNA 序列分析表明,其耐药性相关结构基因存在,并且与在转座子 Tn1546 中的顺序一致。然而,有两个插入序列(IS1216V 和 IS1251)分别插入 ORF1 和 *vanSH* 基因间区域,使编码耐药酶的结构基因受影响,破坏了 Tn1546 转位酶基因^[17]。相反,其余的 VRSA 菌株表现出对两种糖肽类抗生素高水平耐药(万古霉素 MIC >256 $\mu\text{g/mL}$;替考拉宁 MIC > 32 $\mu\text{g/mL}$),被称为高水平耐药 VRSA (high-level-resistant VRSA,HLR-VRSA)。7 株 HLR-VRSA 菌株(特拉华州 VRSA 株资料不详)都携带标准的 Tn1546 成分;VRSH-WY05 是携带标准的 Tn1546 转座子,还是 *vanA* 基因位于染色体上尚没有具体报道;印度分离株同样资料不详^[6]。

3.3 *vanA* 基因的有效表达具有可诱导性 LLR-VRSA 具有一个插入序列拷贝破坏了 Tn1546 转位酶基因。在缺乏这种转位酶蛋白的情况下,基因片段不能转位。在选择性压力缺失的过夜培养 LLR-VRSA 菌株中,糖肽类耐药性高频丢失(大约 50%),然而,HLR-VRSA 菌株在相同条件下,耐药性完全稳定^[8]。LLR-VRSA 菌株耐药性的丢失可能是糖肽类耐药质粒在新宿主中不能有效复制,*vanA* 型耐药性具有糖肽类抗生素可诱导性。培养基中缺乏抗生素,耐药性途径不表达;而在诱导剂存在情况下,耐药机制被活化。同 HLR-VRSA 比较,万古霉素诱导 LLR-VRSA 耐药性需要的时间明显延长。在万古霉素存在时,LLR-VRSA 恢复生长需要很长的迟滞期,这可能是微生物自动分析仪造成 LLR-VRSA 漏检的原因。

3.4 VRSA 耐药基因与耐药表型部分分离 在万古霉素存在条件下,青霉素结合蛋白-2(PBP-2)转糖基酶和转肽酶活性对 VRSA 生长至关重要。在万古霉素和苯唑西林存在下,细菌合成以 D-Ala-D-Lac 末端修饰为主的肽聚糖前体,这种前体不是转肽过程中 PBP2 的底物。由于 PBP2 转肽酶活性被甲氧西林灭活,肽聚糖合成无法进行,从而导致细菌死亡。因此,尽管 VRSA 对两种抗生素高水平耐药,万古霉素和 β -内酰胺类抗生素联合应用可以成功治疗 VRSA 感染患者。与单独使用任何一种抗生素相比较,联合用药能够明显降低 VRSA-1 感染家兔模型的细菌载量^[8]。因此,体外和动物模型研究表明,万古霉素与苯唑西林在治疗浓度上有很强抗 VRSA 协同作用。

3.5 VRSA 糖肽类抗生素依赖性 部分 VRE 只有在培养基中加入万古霉素才能生长,这种菌株已经在体外动物模型以及长期使用万古霉素治疗的患者中分离出。这些细菌拥有一种已灭活的编码 D-Ala:D-Ala 连接酶的染色体,必须依赖 *vanA* 编码的 D-Ala:D-Lac 连接酶活性合成细胞壁。与此类 VRE 相似,VRSA-7 菌株在体外显示其生长,部分地依赖糖肽类抗生素。该菌株 *ddl* 基因序列测定,显示一个导致天冬氨酸由赖氨酸替代的点突变,引起 D-Ala:D-Ala 连接酶活性降低 1 000 倍。通过 VANR/VANS 系统,*vanA* 基因低水平表达,以及 *vanA* 基因簇定位于一个多拷贝质粒形成的基因剂量效应,导致该菌株在不含有诱导剂情况下生长缓慢。

3.6 *vanA* 基因介导 VRSA 对糖肽类耐药的生物学成本 生物学成本是决定抗生素耐药性稳定和传播的决定性因素之一。

VRSA-1、VRSA-5、VRSA-6 以及 VRSA-1 同源性 MRSA 受体的对数生长期定量检测揭示:(1)在没有万古霉素情况下,VRSA 生长速度与敏感的 MRSA 是相似的,表明耐药菌株在适应过程中细菌数量下降较少。(2)当耐药性被万古霉素诱导出以后,与同样未被诱导的 VRSA 以及对万古霉素敏感的 MRSA 菌株相比较,VRSA 菌株的生长速率明显下降^[9]。诱导过程中,适应期生长速率下降 20%~38%,与宿主菌的生物学成本密切相关。VRSA-1 同源性转移接合子与 MRSA 受体菌竞争实验表明,当两株细菌在没有诱导剂的相同环境下混合,与受体菌相比较,接合子菌株每 10 代就要有 0.4%~3% 的竞争损失^[18]。在模拟最佳自然条件的竞争实验中,转移接合子比 MRSA 受体更加容易被清除。这些研究结果可以部分解释 VRSA 临床分离株少、耐药性传播慢的原因。

3.7 VRSA 菌株耐药性传播受限制 通过加入甲基到特定靶 DNA 序列末端而保护宿主基因组,限制进入细胞未修饰的外源性 DNA。研究表明,这种限制性修饰系统阻断可移动基因成分从其他细菌对金黄色葡萄球菌转移并限制耐药基因在不同的菌谱系间传播。7 株美国 VRSA 菌株脉冲场凝胶电泳资料显示,5 株为 USA100 谱系,为美国最常见菌株。这个谱系的菌株通常为多药耐药,而且因额外获得对糖肽类的耐药性而对治疗产生很大的影响。至少在 5 株细菌中存在一种广宿主的接合型 Inc18 样肠球菌 *vanA* 质粒^[19],提示这种质粒具有耐药性传递作用。与其他地区分离株的 VRE 比较,在密执安那州分离的 VRE 所携带 Inc18 样质粒频率更高。而且,这些质粒出现在粪肠球菌中比出现在其他肠球菌中更普遍。美国 10 株 VRSA 其中 7 株出现在密执安那州,而且 5 株与 *vanA* 型粪肠球菌有关。同时,体外实验中 *vanA* 质粒从肠球菌接合转导到金黄色葡萄球菌的频率为 10^{-7} ,这种质粒可以存留在新宿主中^[20]。但是,在经过几次传代后,大部分转移接合子丢失对万古霉素的耐药性,证明这种质粒相对不稳定。这些发现和上述生物成本实验也有助于解释 VRSA 临床分离株少、耐药性传播慢的原因。

4 结 语

由于对包括糖肽类在内的多种抗生素耐药,VRSA 感染是临床面临的一个迫切需要解决的问题,也是一个可能引起严重院内感染的危险因素。毫无疑问,VRSA 临床感染已经被高度关注,而且由于多种生物学限制,目前看起来 VRSA 的传播是很有限的。然而,由于 LLR-VRSA 菌株表现为低水平耐药,在万古霉素存在时,恢复生长存在很长的迟滞期,自动化仪器可能检测不出而漏检;同时,临床分离株具有的潜在传播能力也不应当被低估。另外,有关 VRSA 生物学特性和药代动力学等基础研究,对开发新型抗生素,及时、高效检出 VRSA 和成功治愈 VRSA 感染以及预防 VRSA 引起的医院内感染均具有重要指导意义。作为当前微生物学研究领域的前沿性课题之一,有关 VRSA 的基础理论与临床实践研究在我国也应该得到足够重视。

参考文献

- [1] 王敬华,马筱玲.耐万古霉素金黄色葡萄球菌的耐药机制和检测方法[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2004,25(3):269-271.
- [2] Arthur M,Molinas C,Depardieu F,et al.Characterization of Tn1546,a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in enterococcus faecium

BM4147[J]. Bacteriol, 1993, 175(1): 117-127.

[3] Noble WC, Virani Z, Cree R. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from enterococcus faecalis NCTC 12201 to staphylococcus aureus FEMS[J]. Microbiol Letters, 1992, 93(19): 195-198.

[4] Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, et al. Vancomycin-resistant staphylococcus aureus in the United States, 2002-2006 [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(26): 668-674.

[5] Weigel L, Donlan R, Shin D, et al. High-level vancomycin-resistant staphylococcus aureus isolates associated with a polymicrobial bio-film[J]. Antimicrob Agent Chemother, 2007, 51(1): 231-238.

[6] Saha B, Singh AK, Ghosh A, et al. Identification and characterization of a vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolated from Kolkata (south Asia) [J]. Med Microbiol, 2008, 57(21): 72-79.

[7] 王敬华, 王守立, 姚辉华, 等. 检出携带 vanA 基因万古霉素耐药溶血葡萄球菌[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(11): 867-872.

[8] Perichon B, Courvalin P. Synergism between beta-lactams and glycopeptides against VanA-type methicillin-resistant staphylococcus aureus and heterologous expression of the vanA operon[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(7): 3622-3630.

[9] Foucault ML, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. Fitness cost of VanA-type vancomycin resistance in methicillin-resistant staphylococcus aureus [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 2354-2359.

[10] Perichon B, Courvalin P. Update on vancomycin resistance[J]. Int J Clin Pract, 2000(115): 88-93.

[11] Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, et al. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(4): 79-114.

[12] The Network on Antimicrobial Resistance in S. aureus. <http://www.narsa.net>.

[13] Aligholi M, Emaneini M, Jabalameli F, et al. Emergence of high-level vancomycin-resistant staphylococcus aureus in the Imam Khomeini Hospital in Tehran[J]. Med Princ Pract, 2008, 17(9): 432-434.

[14] Palazzo I, Araujo M, Darini A. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil[J]. Clin Microbio, 2005, 43(1): 179-185.

[15] Weigel L, Clewell D, Gill S, et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of staphylococcus aureus [J]. Science, 2003, 302(5650): 1569-1571.

[16] Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, et al. Vancomycin-resistant staphylococcus aureus isolate from a patient in Pennsylvania[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(2): 275-280.

[17] Clark NC, Weigel LM, Patel JB, et al. Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant staphylococcus aureus isolates from Michigan and Pennsylvania [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(9): 470-472.

[18] Noto MJ, Fox PM, Archer GL. Spontaneous deletion of the methicillin resistance determinant, mecA, partially compensates for the fitness cost associated with high-level vancomycin resistance in staphylococcus aureus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(7): 1221-1229.

[19] Zhu W, Clark NC, McDougal LK, et al. Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolates associated with Inc18-like vanA plasmids in Michigan [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(10): 452-457.

[20] Zhu W, Clark NC, Patel JB. Abstr 48th Intersci Conf [J]. Antimicrob Agents Chemother, abstr, C2-269.

(收稿日期: 2011-01-10)

• 综 述 •

2 型糖尿病患者大血管病变基因多态性的研究进展*

朱 沂 综述, 张晓莉, 黄 庆, 府伟灵[△] 审校
(第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038)

关键词: 糖尿病, 2 型; 多态现象, 遗传; 大血管病变
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 06. 021 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2011)06-0660-04

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 严重威胁人类的健康, 影响人们的生活质量。其诸多并发症中, 大血管病变是其致死、致残的主要原因。实践表明, 针对 T2DM 大血管病变传统危险因素 (血糖、血压、血脂及体质量等) 的干预措施对某些易感者益处不大, 血糖、血压、血脂等控制良好的患者也不能完全阻止大血管病变的发生, 提示一些未知的非传统因素 (如遗传多态) 在 T2DM 大血管病变的发生中可能起着重要的作用^[1-4]。与 T2DM 发生、发展密切相关的胰岛素信号转导、脂质代谢、血压、血凝、炎症反应等相关基因的多态性均可能与 T2DM 的大血管病变相关。

1 胰岛素信号转导相关基因

1.1 胰岛素受体样底物-1 (IRS-1) 基因 IRS-1 是一种存在于

许多胰岛素敏感组织细胞的包膜受体蛋白, 在胰岛素的细胞效应中起着重要的作用, 它可以在与胰岛素结合后磷酸化, 磷酸化的 IRS-1 与一些细胞信号蛋白具有高亲和力, 这样一来 IRS-1 就成为了胰岛素作用于细胞的一个桥梁。近年来一些研究表明, IRS-1 在 2 型糖尿病患者早期大血管病变中起着重要的作用, Jansson 等^[5]用腹部脂肪细胞活检的方法测定体内 IRS-1 含量, 把受试者分为低 IRS-1 组和正常组, 发现低 IRS-1 组大都出现胰岛素抵抗, 而且动脉内膜中层的厚度 (intima media thickness, IMT) 比正常组明显增厚, 而 IMT 增厚 (≥ 1.3 mm) 是大血管早期病变的标志, 这说明 IRS-1 蛋白在体内的低表达不仅可以作为胰岛素抵抗的标志也可能是早期大血管病变的标志。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30972816)。[△] 通讯作者, E-mail: weilingfu@yahoo. com。