

- gramin-resistant enterococci[J]. Int J Med Microbiol, 2000, 290(6):543-548.
- [14] Ramadhan AA, Hegedus E. Survivability of vancomycin resistant enterococci and fitness cost of vancomycin resistance acquisition [J]. J Clin Pathol, 2005, 58(7):744-746.
- [15] Rice LB, Hutton-thomas R, Lakticova V, et al. Beta-lactam antibiotics and gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci[J]. J Infect Dis, 2004, 189(6):1113-1118.
- [16] Revel-Vilk S, Tamary H, Broide E, et al. Serum transferrin receptor in children and adolescents with inflammatory bowel disease [J]. Eur J Pediatr, 2000, 159(8):585-589.
- [17] Zirakzadeh A, Patel R. Epidemiology and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci[J]. Curr Opin Infect Dis, 2005, 18(6):507-512.
- [18] Lautenbach E, Gould CV, La Rosa LA, et al. Emergence of resistance to chloramphenicol among vancomycin-resistant enterococcal (VRE) bloodstream isolates[J]. Int J Antimicrob Agent, 2004, 23(2):200-203.
- [19] Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12):5857-5860.
- [20] Ballard SA, Pertile KK, Lim M, et al. Molecular characterization of vanB elements in naturally occurring gut anaerobes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(5):1688-1694.
- [21] Sloan LM, Uhl JR, Vetter EA, et al. Comparison of the Roche LightCycler vanA/vanB detection assay and culture for detection of vancomycin-resistant enterococci from perianal swabs [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(6):2636-2643.
- [22] Abele-Horn M, Voegel U, Klare I, et al. Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(11):4009-4013.
- [23] Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, et al. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance-United States[J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7(3):382-389.
- [24] Nagasawa Z, Manome I, Nagayama A. A rapid antimicrobial susceptibility test based on chemiluminescence assay and its application to screening of genotypes in vancomycin-resistant enterococci [J]. J Infect Chemother, 2004, 10(4):220-226.
- [25] Top J, Schouls LM, Bonten MJ, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(10):4503-4511.
- [26] Wang JL, Hsueh PR. Therapeutic options for infections due to vancomycin-resistant enterococci[J]. Expert Opin Pharmacother, 2009, 10(5):785-796.

(收稿日期:2011-10-09)

• 综 述 •

整合子系统与铜绿假单胞菌多药耐药关系的研究进展

侯舒毅¹综述, 宋秀宇^{1,2△}审校

(1. 福建医科大学第一临床医学院, 福州 350005; 2. 厦门大学附属第一医院, 福建厦门 361003)

关键词: 铜绿假单胞菌; 整合子; 耐药机制; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.053

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)06-0748-03

细菌耐药性是虽备受关注,但抗菌药物滥用仍导致细菌不断产生多药耐药性(MDR)甚至泛耐药性(XDR)。早期研究表明,整合子可以介导耐药基因在细菌中水平传播,是细菌,尤其是革兰阴性菌 MDR 的重要原因。铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)是临床常见的条件致病菌,现就近年来针对整合子与 *P. aeruginosa* 耐药关系的研究进展作简要综述。

1 整合子的分类、结构与功能

1.1 整合子的分类 根据整合子载体的不同,可将整合子分为移动性整合子(MIs)和染色体整合子(CIs)^[1]。MIs 指整合子结合在可移动元件上,例如转座子、质粒,能够捕获、整合外源基因盒,并在同一种属或不同种属细菌间水平转移。MIs 可整合基因盒数相对较少(2~8 个),主要编码耐药基因,覆盖了目前使用的大部分抗菌药物。根据编码整合酶的基因序列不同,通常分为 5 类,其中 I 类整合子传播最广,在革兰阴性菌中的检出率可达 22%~59%,在革兰阳性菌中偶尔也有发现。

CIs 首次发现于霍乱弧菌基因组的小型环形染色体。CIs 可携带很少甚至缺乏基因盒,但部分种类 CIs 可携带大量基因盒(在海洋弧菌中超过 217 个),这类整合子又被称为超级整合子(SI)。2007 年, Boucher 等^[2]分析的弧菌 1 677 个基因盒中, 75%左右的功能未知,说明整合子具有组成和功能多样性,剩

下的 25%基因盒参与编码与细菌代谢、毒力及耐药相关蛋白。与耐药基因相关的药物曾应用于弧菌感染治疗,而药物选择压力导致耐药基因整合进入 CIs,且无法从染色体中被清除,成为耐药基因储存库,可被 MIs 重新剪切、整合,再次介导高水平耐药。大部分编码 TA 系统的基因存在于 CIs,特别是大的 SI 上,推测 TA 在保持 SI 基因盒序列稳定中起作用,可避免大规模基因丢失^[3]。

1.2 整合子的结构 整合子一般包括分别位于 5'端和 3'端两个保守末端(CS),以及多个基因盒成串排列于 5'-CS 和 3'-CS 之间构成的可变区。5'-CS 是高度保守的核心区,包含编码 DNA 整合酶的基因序列(IntI)、基因重组位点(attI、attC)和整合子可变区启动子 Pc。3'-CS 含有 3 个开放阅读框(ORF):季铵盐化合物和溴乙锭耐药基因(qacEΔ1)、磺胺耐药基因(sulI)以及 1 个未知功能的短的 ORF(ORF5)。3'-CS 在重排、组合或结合转导过程中易出现丢失现象,其序列存在一定的差异^[4]。基因盒是较小的可独立移动的 DNA 片断,通常包括 1 个 ORF 和位于其下游的 attC 位点,基因盒的整合方式包括特异性整合和非特异性整合,非特异性整合因其周围只有 1 个重组位点而不能被切除,能使细菌永久性获得新基因;有些整合子在 5'-CS 和 3'-CS 之间没有基因盒插入。

△ 通讯作者, E-mail: songxyxm@hotmail.com。

1.3 整合子的表达和功能

1.3.1 启动子的结构与特性 除了少数耐药基因,如 *qac*、*cmlA*、*ereA* 和 *TA* 基因,大多数基因盒不含启动子,转录水平随基因盒与启动子的距离增加而逐步降低,多数情况下只有第 1 个或前几个基因盒能够高水平表达。除整合酶自身携带有的启动子 *P_{int}*,I 类整合子还含有两种启动子:*PC* 和 *P₂*。*PC* 位于 *IntI1* 编码框内,*P₂* 位于 *PC* 下游 119 bp 处,但常因-35 与-10 间隔序列距离改变而导致无活性。Wei 等^[5]对 4 种常见 *PC* 及 *PC*+*P₂* 组合的启动强度水平进行了观察,发现 *PC strong* 的强度是最弱的启动子 *PC weak* 的 32 倍,当 *P₂* 存在时,除了 *PC strong*,其余启动子 *aadA2* 转录水平都有明显提高。

由于 *PC* 位于 *IntI1* 编码框内,在 *PC* 基因多态性影响下导致 3 种整合酶等位基因的出现,其整合能力没有区别,但剪切能力有明显不同,启动子越弱,整合酶能力越强^[6]。含有启动子的基因盒也可影响下游基因的表达。少数基因盒,如 *CML1*,自身含有启动子翻译衰减弱化信号,表达时不受 5'-CS 启动子影响^[7]。*P. aeruginosa* *VEB-1* 基因盒上游存在 *IS1999* 或 *IS1999/IS2000* 插入序列。*IS1999*(*IS10-like*)的左反向重复序列附近存在启动子 *P_{out}*,在 *P_{out}* 作用下,能够提高 *blaVEB-1* 基因表达水平^[8]。陈晓耘^[9]的研究发现,含有 *IS1999* 片段的整合子捕获基因盒插入到 *blaVEB-1* 基因盒之前的能力与普通整合子结构相比大大下降,推测 *IS1999* 可阻断有效整合途径,阻止整合子捕获其他基因盒,从而保持 *blaVEB-1* 在整合子的优势位置。目前对 II 类和 III 类整合子启动子研究较少。

1.3.2 整合酶的功能 整合子位点特异性重组功能依赖于由 *IntI* 编码的整合酶。整合酶属于酪氨酸家族,主要识别 2 个重组位点:整合子上的 *attI* 和基因盒上的 *attC*。*IntI* 优先识别同源的 *attI* 位点,对其他类型的 *attI* 位点识别概率很低^[10-11]。有研究发现,多数 *IntI* 的表达受阻遏蛋白 *lexA* 调节,这将整合子系统和细菌普遍存在的 SOS 反应联系起来^[12]。*Baharoglu* 等^[13]通过试验证明,细菌接合是诱导整合子系统 SOS 反应的重要机制。SOS 反应提高了细菌在抗菌药物压力下基因盒的交换和捕获能力,同时减少了在不断变化的环境中基因盒重排和丢失的概率,缺乏 *lexA* 调节可能造成整合酶的失活和耐药基因表达的提高^[14]。*Cagle* 等^[15]研究发现,除 *lexA* 以外,*FIS*、*IHF* 和 *H-NS* 也参与整合子的表达调控;*FIS* 直接或者协助 *lexA* 抑制 *P_{int}* 和基因盒表达;当 *P_{int}* 与 *P₂* 启动子(17-bp)同时存在时,*IHF* 促进 *P_{int}* 的表达;*H-NS* 抑制 *P_{int}*,但促进 *P₂* 启动子(17-bp)的表达。

整合酶介导的基因盒剪切主要发生在同一基因盒的 2 个 *attC* 位点之间,由于 *IntI1* 和 *attC* 模板链结合能力强,基因盒的切除是一个半保留的过程,重组过程形成 Holliday 交叉,重组只有单链交换发生。整合酶介导基因的整合优先发生在 *attI* 和 *attC* 之间,也可以发生在 *attC* 与 *attC*、*attI* 与 *attI* 之间,但重组效率很低。新整合的基因由于靠近启动子而得到表达,原先被整合的基因表达减弱甚至不表达,但仍然可以作为基因“储存库”再次被切除和整合而重新激活。

2 *P. aeruginosa* 耐药性与整合子的关系

随着第三代头孢菌素和碳青霉烯类抗菌药物在广泛应用,*P. aeruginosa* 对 β 内酰胺类抗菌药物的耐药性明显上升,甚至形成 MDR。有报道显示,*P. aeruginosa* 是最常见的非发酵革兰阴性杆菌,除多黏菌素 B 外,对其他药物的耐药率为 22%~52%,对亚胺培南不敏感的 *P. aeruginosa* 对绝大多数抗菌药物的耐药率超过 55%^[16]。

MDR-P. aeruginosa 的大量出现与编码抗菌活性酶的基因盒位于整合子上,导致耐药基因盒移动、传播有关^[17]。*P. aeruginosa* 整合子阳性率及其所携带基因盒存在明显地区差异,可能与不同地区使用的抗菌药物种类不同,造成细菌在不同药物选择性压力下产生不同药性有关。国内外不断有文献报道新的基因盒以及基因盒组合形式。*Schneider* 等^[18]在 2 株 *P. aeruginosa* 的 CIs 中检出与 *VIM-2* 具有同源性的新基因型 *VIM-15*、*VIM-16*,与 *VIM-2* 相比,*VIM-15* 编码蛋白的 218 位酪氨酸被苯丙氨酸取代,对头孢噻啶、美罗培南、头孢噻肟和亚胺培南水解效率明显提高。*Hocquet* 等^[19]在 1 株 *P. aeruginosa* 的整合子中检出新的 *oxa-145* 型超广谱 β 内酰胺酶。*oxa-145* 属于 *OXA-10* 群,165 位亮氨酸的缺失导致耐药谱由青霉素类扩大到第三代头孢菌素类。*Garza-Ramos* 等^[20]分析了带有 *MP15* 的 18 株 *P. aeruginosa*,发现 3 种高度类似 *IN95* 的基因盒排列。*Sánchez-Martínez* 等^[21]在 1 株来自 ICU 患者的 *P. aeruginosa* 中发现新的整合子基因盒系统 *In169*。选择性压力下新基因型的不断出现,是药物治疗研究上的一大难题。

整合子介导的水平转移可在同种和不同种菌属间传播耐药基因,是耐药扩散极其重要的途径。*Koratzanis* 等^[22]在分离自 ICU 标本的肺炎克雷伯菌、大肠埃希氏菌和 *P. aeruginosa* 中检测到相同的整合子结构。体外质粒接合试验可证实整合子的可转移性。*Jeong* 等^[23]用携带 *P. aeruginosa* 整合子的质粒转染大肠杆菌 *JM109*,在受体菌中可检出 I 类整合子和 *VIM-2* 基因,且亚胺培南的 MIC 明显提高。*P. aeruginosa* 在生长过程中常以生物被膜形式存在,而生物被膜中的菌体间连接紧密,使质粒间的结合、转移更加容易,有利于耐药基因播散^[24]。整合子携带的耐药基因赋予细菌更强的生存能力。*Corich* 等^[25]对 1999~2002 年引起意大利医院感染暴发流行的 *P. aeruginosa* 分离株 *TS-832035* (缺乏 *OprD* 蛋白,携带 *IN70.2* 整合子)与分离株 *TS-103* (仅缺乏 *OprD* 蛋白)进行了生长动力学试验,发现 *TS-832035* 分离株具有显著的生长优势。*陈丹华* 等^[26]发现整合子摄取并表达特殊类型基因盒可导致外排泵增强和外膜通透性降低。研究显示,整合子阳性菌株更易产生 MDR,且耐药率明显高于阴性菌株^[27]。MDR 菌株分布广、传播快、致死率较高,给临床治疗带来极大困难。

整合子携带、传播耐药基因常引起耐药菌株感染暴发流行,尤易导致抵抗力低下或长期接受侵入性治疗患者的感染,以及容易引起 ICU 和呼吸内科患者的交叉感染。肯尼亚某大型医院分离出的 57 株产金属酶 *P. aeruginosa* 中,67% 含有 *VIM-2* 基因盒的整合子;所有菌株的同源性分析显示,具有某种特殊基因型的 MDR 菌株是造成 ICU 感染暴发流行的原因^[28]。尤其值得注意的是,整合子不但会引起院内暴发流行,还可能导致社区暴发流行,说明耐药菌株传播范围在不断扩大,可能引起跨区域流行传播^[29]。*Libisch* 等^[30]对 2005~2007 年收集的,来自匈牙利 11 个城镇的 14 株 *MDR-P. aeruginosa* 进行了整合子检测及同源性分析,发现均携带 I 类整合子,属于 *ST175* 和 *ST395* 序列型,比较前期研究结果,发现这两种序列型的菌株不只在匈牙利流行。MDR 菌株一旦暴发流行,其感染难以控制,是公共卫生防治的重点。同源性分析有助于揭示有关细菌进化与传播的信息,并为流行病学调查提供依据。

3 小 结

自 1989 年 *Strokes* 首次提出整合子概念以来,整合子在细菌耐药性传播和扩散中的重要作用逐渐受到重视。整合子作

为一种古老的结构,是细菌进化的产物,在抗菌药物应用领域不断扩大的现代医疗环境下,抗菌药物选择性压力引起整合子不断整合不同类型的耐药基因,介导细菌耐药,导致 MDR 甚至 MDR 菌株的出现和播散。深入研究整合子的结构特性以及调控机制,特别是阻遏蛋白 *lexA* 在整合酶表达中的调节作用,有利于进一步阐明细菌耐药机制,促进新的治疗手段的发展。

参考文献

- [1] Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(8): 608-620.
- [2] Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, et al. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria[J]. Trends Microbiol, 2007, 15(7): 301-309.
- [3] Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Biskri L, et al. Comparative analysis of super integrons: engineering extensive genetic diversity in the Vibrionaceae[J]. Genome Res, 2003, 13(3): 428-442.
- [4] 张之文, 王红宁. 整合子结构及在细菌耐药性扩散中的作用[J]. 国外医药抗生素分册, 2003, 24(4): 150-153.
- [5] Wei Q, Jiang X, Li M, et al. Transcription of integron-harboured gene cassette impacts integration efficiency in class 1 integron[J]. Molecul Microbiol, 2011, 80(5): 1326-1336.
- [6] Jové T, Da Re S, Denis F, et al. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons[J]. PLoS Genet, 2010, 6(1): 1-10.
- [7] 魏取好, 蒋晓飞, 吕元. 细菌整合子研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(1): 1-5.
- [8] Aubert D, Naas T, Nordmann P. IS1999 increases expression of the extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Bacteriol, 2003, 185(17): 5314-5319.
- [9] 陈晓耘. 临床多重耐药铜绿假单胞菌中 VEB-1 基因盒结构及其对整合子捕获频率影响的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- [10] Hansson K, Sundstrom L, Pelletier A, et al. IntI2 integron integrase in Tn7[J]. J Bacteriol, 2002, 184(6): 1712-1721.
- [11] Collis CM, Kim MJ, Stokes HW, et al. Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-bp site[J]. Mol Microbiol, 2002, 46(5): 1415-1427.
- [12] Guérin E, Cambray G, Da Re S, et al. The SOS response controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons[J]. Med Sci, 2010, 26(1): 28-30.
- [13] Baharoglu Z, Bikard D, Mazel D. Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation[J]. PLoS Genet, 2010, 6(10): 1-10.
- [14] Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, et al. Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons[J]. Mob DNA, 2011, 2(1): 6-21.
- [15] Cagle CA, Shearer JE, Summers AO. Regulation of the Integrase and Cassette Promoters of the Class 1 Integron by Nucleoid-Associated Proteins[J]. Microbiology, 2011, 157(10): 2841-2853.
- [16] 李耘, 吕媛. Mohnarin 2009 年度报告: 非发酵革兰阴性杆菌耐药性监测[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(5): 348-351.
- [17] 王寰, 范晓磊, 王海燕. I 类整合子介导的铜绿假单胞菌耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(12): 1304-1307.
- [18] Schneider I, Keuleyan E, Rasshofer R, et al. VIM-15 and VIM-16, two new VIM-2-like metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria and Germany[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(8): 2977-2979.
- [19] Hocquet D, Colomb M, Dehecq B, et al. Ceftazidime-hydrolyzing β -lactamase OXA-145 with impaired hydrolysis of penicillins in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(8): 1745-1750.
- [20] Garza-Ramos JU, Sanchez-Martinez G, Barajas JM, et al. Variability of the (blaIMP-15)-containing integrons, highly related to In95, on an endemic clone of *Pseudomonas aeruginosa* in Mexico[J]. Microb Drug Resist, 2010, 16(3): 191-195.
- [21] Sánchez-Martínez G, Garza-Ramos UJ, Reyna-Flores FL. In169, a new class 1 integron that encoded bla(IMP-18) in a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Mexico[J]. Arch Med Res, 2010, 41(4): 235-239.
- [22] Koratzanis E, Souli M, Galani I, et al. Epidemiology and molecular characterisation of metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a university hospital Intensive Care Unit in Greece[J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 38(5): 390-397.
- [23] Jeong JH, Shin KS, Lee JW, et al. Analysis of a novel class 1 integron containing metallo- β -lactamase gene VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Microbiol, 2009, 47(6): 753-759.
- [24] Hendrickx L, Hausner M, Wuertz S. Natural Genetic Transformation in Monoculture *Acinetobacter* sp. Strain BD413 Biofilms[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(3): 1721-1727.
- [25] Corich L, Dolzani L, Tonin EA, et al. Metallo- β -lactamase expression confers an advantage to *Pseudomonas aeruginosa* isolates compared with other β -lactam resistance mechanisms, favoring the prevalence of metallo- β -lactamase producers in a clinical environment[J]. Microb Drug Resist, 2010, 16(3): 223-230.
- [26] 陈丹华, 张如霖, 丁星, 等. 整合子耐药机制的动态检测[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 19-21.
- [27] 何萍, 丁云芳. 铜绿假单胞菌耐药机制的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 850-851.
- [28] Pitout JD, Revathi G, Chow BL, et al. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(8): 755-759.
- [29] Poulou A, Spanakis N, Pournaras S, et al. Recurrent healthcare-associated community-onset infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 metallo- β -lactamase[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(12): 2538-2542.
- [30] Libisch B, Balogh B, Füzi M, et al. Identification of two multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clonal lineages with a country-wide distribution in Hungary[J]. Curr Microbiol, 2009, 58(2): 111-116.

(收稿日期: 2011-12-15)