

43 株临床铜绿假单胞菌 *exoS*、*exoU* 基因的携带及其耐药性董晨晓¹, 宋诗铎¹, 王悦¹, 门昆²

(1 天津医科大学第二医院感染性疾病研究所, 天津 300211; 2 天津医科大学第二医院, 天津 300211)

[摘要] 目的 研究 43 株临床分离的铜绿假单胞菌 III 型分泌系统毒素基因 *exoS*、*exoU* 携带情况以及细菌的耐药性。方法 采用聚合酶链反应(PCR)法检测毒素基因的分布, K-B 纸片扩散法检测细菌的耐药性。结果 43 株临床铜绿假单胞菌中, 37 株(86.05%) *exoS* 基因阳性, 6 株(13.95%) *exoU* 基因阳性, 无同时携带 2 种基因菌株。携带 *exoU* 的临床株对 9 种抗菌药物的耐药率均高于携带 *exoS* 菌株, 其中对头孢他啶、环丙沙星、左氧氟沙星的耐药率差异有显著性($P < 0.05$)。结论 携带毒素基因 *exoU* 的铜绿假单胞菌临床株所占比例较低, 但耐药率高。

[关键词] 铜绿假单胞菌; III 型分泌系统; 毒素基因; *exoS*; *exoU*; 抗药性; 微生物

[中图分类号] R378.99⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)02-0093-04

Carrying of *exoS* and *exoU* in 43 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and their drug resistance

DONG Chen-xiao¹, SONG Shi-duo¹, WANG Yue¹, MEN Kun² (1 Institute of Infectious Diseases, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 2 the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

[Abstract] **Objective** To study the carrying of type III secretion systems toxin gene *exoS* and *exoU* in 43 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) and drug resistance. **Methods** The distribution of toxin gene was detected by PCR, antimicrobial resistance of clinical strains was detected by Kirby-Bauer method. **Results** Each *P. aeruginosa* isolate contained either *exoS* or *exoU* gene, *exoS* and *exoU* was harbored by 37(86.05%) and 6(13.95%) isolates respectively. Resistant rates of *exoU*-harbouring isolates to 9 kinds of antimicrobial agents were higher than *exoS*-harbouring isolates, and there were significant difference in resistance to ceftazidime, ciprofloxacin and levofloxacin between *exoU*- and *exoS*-harbouring isolates ($P < 0.05$). **Conclusion** *exoU*-harbouring isolates are far less than *exoS*-harbouring isolates, and *exoU*-harbouring isolates appear high drug-resistance.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; type III secretion systems; toxin gene; *exoS*; *exoU*; drug-resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2010, 9(2): 93-96]

细菌分泌系统的发现是近年细菌致病机制研究的重要进展, 目前已知的至少有 6 型: I ~ VI 型, 由一些具有特殊功能的蛋白质、多肽组成。其中 III 型分泌系统(type three secretion system, TTSS)广泛存在于致病菌中。通过 TTSS, 可将细菌毒力蛋白直接注入宿主细胞, 改变宿主细胞的功能, 如改变肌动骨架蛋白动力学、细胞核应答和细胞内物质的运转等^[1]。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)为临床常见的条件致病菌。长期应用免疫抑制剂、

放射治疗和化学治疗、大面积烧伤等患者免疫力低下, 易遭受该菌的侵袭。慢性感染患者较多, 重症感染患者病死率相对较高, 已成为临床治疗的一大难题。铜绿假单胞菌 TTSS 主要分泌 4 种毒素: ExoS、ExoT、ExoY、ExoU。研究发现^[2], ExoS 和 ExoT 高度同源, 编码基因有 80% 相同, 它们有双重酶的活性, 分别是氨基端 Rho 因子-GTP 酶活化蛋白和羧基端 ADP 核糖化酶的活性。ExoU 是一种磷脂酶, 是 4 种毒素中最具破坏性的。一般情况, 每株

[收稿日期] 2009-09-08

[作者简介] 董晨晓(1978-), 男(汉族), 河北省泊头市人, 医师, 主要从事细菌耐药与致病性研究。

[通讯作者] 宋诗铎 E-mail: shiduosong1@yahoo.com.cn

铜绿假单胞菌只携带 *exoS*、*exoU* 中的一种。ExoY 是一种腺苷酸环化酶,在肺炎动物模型中只有轻微的致病作用。本研究选取在铜绿假单胞菌中具有互斥性和致病机制中更为重要的 *exoS*、*exoU* 基因为研究对象,调查铜绿假单胞菌临床株中携带此 2 种基因的情况,并通过 K-B 纸片扩散法检测 2 种不同类型细菌的耐药情况。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2007 年 1 月—2009 年 3 月天津市某医院细菌室分离 43 株铜绿假单胞菌(31 株分离自痰,5 株分离自尿,4 株分离自伤口分泌物,3 株分离自血标本)。参考菌株铜绿假单胞菌 ATCC 27853 为携带 *exoS* 基因而不携带 *exoU* 基因的对照菌株^[3],为感染性疾病研究所实验室保存。

1.2 DNA 提取 参照文献^[3]提取细菌总 DNA。95℃水浴加热 10 min,以 11 000 r/min 速度离心 10 min,吸取上清液保存,作为聚合酶链反应(PCR)模板。

1.3 PCR 扩增 分别扩增铜绿假单胞菌毒力基因 *exoS*、*exoU* 的片段,引物设计参照文献^[2],扩增片段长度分别为 573 bp 和 428 bp,引物的特征见表 1。引物由上海生工生物工程公司合成,DNA 聚合酶系统购于 TaKaRa 公司。*exoS* 引物设计策略:因为 ExoS 和 ExoT 高度同源,编码基因有 80% 相同,因此为了提高产物的特异性,扩增片段为 *exoS* 下游片段及相邻 *exoS* 外的片段^[2]。见图 1。

表 1 PCR 反应引物的特征

Table 1 Characteristics of PCR primers

基因	引物序列	基因位点
<i>exoS</i>	P1 5'-CCGGCATTCACTACGCGG-3'	+818—+835
	P2 5'-GTTCGTGACGCTTTTCTTTTA-3'	+1370—+1390
<i>exoU</i>	P3 5'-GGGAATACTTTCCGGAAGTT-3'	+141—+161
	P4 5'-CGATCTCGCTGCTAATGTGTT-3'	+548—+568

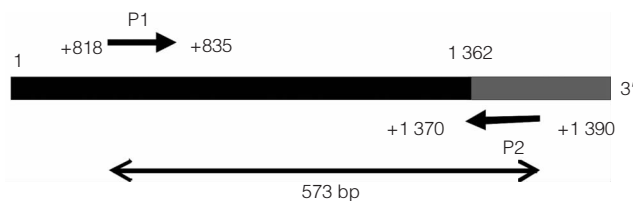


图 1 毒素基因 *exoS* 扩增片段(黑色部分为 *exoS*)

Figure 1 Amplification segments of toxin gene *exoS* (black area was *exoS*)

Premix Taq 25 μ L;引物 1 与引物 2 各 2 μ L;DNA 模板 2 μ L;去离子水 19 μ L),94℃变性 1.5 min;继之 30 个扩增循环:94℃ 0.5 min;*exoS*、*exoU* 退火温度分别为 55℃ 和 59℃,0.5 min;72℃ 延伸 1 min;72℃ 5 min 充分延伸。在含 0.5 mg/L 溴化乙锭的 1%琼脂糖凝胶中电泳 30 min,使用 BIO-RAD 凝胶成像系统观察结果,分析 PCR 产物。

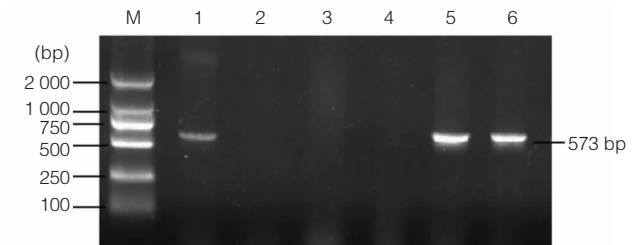
1.4 DNA 序列分析 PCR 扩增产物送上海生工生物工程公司进行正负双向 DNA 序列分析。

1.5 药敏试验 采用 K-B 纸片扩散法测定抗菌药物的敏感性。头孢他啶(CAZ)、左氧氟沙星(LVX)、环丙沙星(CIP)、阿米卡星(AMK)、哌拉西林(PFP)、美罗培南(MEM)购自中国药品生物制品检定所,头孢曲松(CRO)、头孢吡肟(FEP)、头孢哌酮/舒巴坦(CFS)分别购自罗氏公司、施贵宝公司、辉瑞制药有限公司。质控和判断标准依据美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2008 年颁布的准则。

1.6 统计方法 以 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 扩增及 DNA 序列分析 以 P1、P2 为引物 PCR 扩增对照株 ATCC 27853 和 43 株临床株 *exoS* 片段,对照株及 Pa3、Pa9 等 37 株铜绿假单胞菌临床株扩增产物为 573 bp 的片段,其余 Pa10、Pa16 和 Pa18 等 6 株临床株阴性,电泳结果见图 2。



M:分子量标准 DL2000;1: ATCC 27853;2: Pa10;3: Pa16;4: Pa18;5: Pa3;6: Pa9

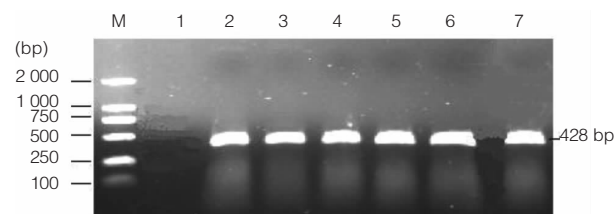
图 2 铜绿假单胞菌临床株 *exoS* PCR 扩增电泳图

Figure 2 PCR fingerprints of *exoS* in *P. aeruginosa*

以 P3、P4 为引物 PCR 扩增临床株 *exoU* 片段,43 株铜绿假单胞菌中的 Pa10、Pa16 和 Pa18 等 6 株菌可见 428 bp 片段,而对照株 ATCC 27853 及其余 37 株 *exoS* 阳性株均未得到 428 bp 片段,结果见图

PCR 反应体系总体积 50 μ L(DNA 聚合酶系统

3. 临床株 Pa16 的 PCR 扩增产物经 DNA 序列分析, 测序结果与 genebank 中 EU239256 比对, 序列 100% 一致, 证实为 *exoU* 片段, 后续实验中以 Pa16 作为携带 *exoU* 基因的阳性对照菌株。



M: 分子量标准 DL2000; 1: ATCC 27853; 2: Pa16; 3: Pa31; 4: Pa29; 5: Pa18; 6: Pa10; 7: Pa37

图 3 铜绿假单胞菌临床株 *exoU* PCR 扩增电泳图

Figure 3 PCR fingerprints of *exoU* in *P. aeruginosa*

2.2 不同标本携带毒素基因 *exoS*、*exoU* 情况 31 份痰标本中, *exoS* 阳性 28 份 (90.32%), *exoU* 阳性 3 份 (9.68%); 而 5 份尿标本、4 份分泌物标本和 3 份血标本中分别有 1 份 *exoU* 阳性, 其余为 *exoS* 阳性。

2.3 细菌药敏结果 依照携带毒素基因的情况, 将铜绿假单胞菌临床株分为 *exoS* 组 (37 株) 和 *exoU* 组 (6 株), 两组铜绿假单胞菌的耐药率见表 2。两组比较, *exoU* 组对 9 种抗菌药物的耐药率普遍高于 *exoS* 组, 对头孢菌素类、喹诺酮类、氨基糖苷类等抗菌药物均表现出较高的耐药性, 其中 CAZ、CIP、LVX 的耐药率差异有统计学意义。

表 2 携带 *exoS* 和 *exoU* 毒素基因的铜绿假单胞菌对不同抗菌药物耐药率 (株, %)

Table 2 Resistant rates of *exoU*- and *exoS*-harbouring *P. aeruginosa* to different antimicrobial agents (strain, %)

抗菌药物	<i>exoS</i> 组 (n=37)	<i>exoU</i> 组 (n=6)	χ^2	P
CAZ	8(21.62)	4(66.67)	5.21	0.02
FEP	15(40.54)	4(66.67)	1.43	0.23
CRO	12(32.43)	3(50.00)	0.70	0.40
CFS	10(27.03)	4(66.67)	3.69	0.06
LVX	14(37.84)	5(83.33)	4.33	0.04
CIP	13(35.14)	5(83.33)	4.93	0.03
AMK	18(48.65)	4(66.67)	0.67	0.41
PFP	19(51.35)	5(83.33)	2.14	0.14
MEM	13(35.14)	4(66.67)	2.15	0.14

3 讨论

铜绿假单胞菌是目前医院感染中最主要的病原

菌之一。抗菌药物的广泛使用及滥用使得细菌的耐药日益严重, 并且临床治疗过程中, 重症感染患者单用敏感抗菌药物往往不能改善病情进展。随着人们对细菌致病机制的研究, 毒力因子将成为抗感染治疗的新靶位^[7]。我们通过毒素基因 PCR 检测、序列分析、细菌药敏试验等方法, 对 43 株铜绿假单胞菌临床株进行了分析。

铜绿假单胞菌 TTSS 主要分泌 4 种毒素, 即 ExoS、ExoT、ExoY、ExoU。研究表明^[1], ExoS 促进了细菌的侵袭和内化, 减弱了细菌在肺中的清除, 使得细菌更容易播散至周围的器官, 与肺囊性纤维化慢性感染有关; ExoU 具有磷脂酶 A₂ 的活性, 可以导致不可逆的细胞膜损伤以及快速的坏死, 其在急性肺炎小鼠模型中是主要的毒力因子。在机械通气相关肺炎患者中, 被携带 *exoU* 铜绿假单胞菌感染的患者重症肺炎比例明显高于携带 *exoS* 细菌感染患者^[6]。ExoY 是一种腺苷酸环化酶, 尽管 89% 铜绿假单胞菌拥有 *exoY*, 但人们对这一效应蛋白的作用所知甚少。几乎所有菌株编码和分泌 ExoT, 其在铜绿假单胞菌致病作用中可能具有更加保守的作用。

本研究分析了天津市某医院感染科 43 例铜绿假单胞菌感染患者分离的临床株中 TTSS 主要毒力因子 *exoS*、*exoU* 的基因携带情况, 发现有 86.05% (37/43) 的铜绿假单胞菌携带 *exoS* 基因, 13.95% (6/43) 携带 *exoU* 基因, 没有一株菌同时携带 2 种基因, 与相关报道结果^[2] 相近。不同的标本来源, 两种基因所占比例也不相同。痰标本中铜绿假单胞菌 *exoU* 的携带率相对较低, 这可能是由于携带 *exoU* 基因的细菌毒力较强, 更容易被免疫系统识别, 诱导机体产生清除反应。铜绿假单胞菌为常见的条件致病菌, 临床多见于肺囊性纤维化患者, 病情多呈慢性化, 造成了痰标本中携带 *exoU* 基因的细菌比率相对较低。

铜绿假单胞菌常为天然耐药菌株, 对大多数抗菌药物耐药, 耐药机制复杂, 通常是几种机制协同作用的结果, 主要与外膜通透性降低, 外排泵表达及细菌产生活性酶有关。本研究中携带 *exoU* 的铜绿假单胞菌均为多重耐药株, 与 *exoS* 组对比, 呈现出更高的耐药性。Wong-Beringer 等^[8] 也曾报道过携带 *exoU* 的菌株较携带 *exoS* 的菌株对氟喹诺酮类药物耐药率更高, 可能由于 DNA 解旋酶 *gyrA* 的突变和编码外排泵的基因突变导致细胞膜上的外排泵过量表达 (the efflux pump over-expressed, EPO)。因

此,应高度重视携带 *exoU* 毒素的铜绿假单胞菌,其较强的致病性和耐药性导致患者治疗时间更长,预后往往不良。在临床治疗过程中应及时根据药敏结果选取敏感有效的抗菌药物,并注意抗菌药物的合理联合应用;此外,更应加强感染控制措施,实施必要的隔离和标准预防,避免医院感染的发生。

[参 考 文 献]

- [1] Coburn B, Sekirvo I, Finlay B B. Type III secretion systems and disease[J]. Clin Microbiol Rev, 2007,20(4): 535 - 549.
- [2] Feltman H, Schulert G, Khan S, et al. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology, 2001, 147(8):2659 - 2669.
- [3] Pitout J, Thmoson K S, Hanson N D, et al. Plasmid-mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains[J]. Antimicrob Agent Chemother, 1998,42(3):596 - 600.
- [4] Ferguson M W, Maxwell J A, Vincent T S, et al. Comparison of the *exoS* gene and protein expression in soil and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Infect Immun, 2001, 69 (4):2198 - 2210.
- [5] Escaich S. Antivirulence as a new antibacterial approach for chemotherapy[J]. Curr Opin in Chemical Biol, 2008, 12(4): 400 - 408.
- [6] Hauser A R, Cobb E, Bodi M, et al. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Crit Care Med, 2002, 30(3):521 - 528.
- [7] Clatworthy A E, Pierson E, Hung D T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy[J]. Nature Chem Biol, 2007,3(9):541 - 548.
- [8] Wong-Beringer A, Wiener-Kronish J, Lynch S, et al. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone-susceptible and -resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Clin Microbiol Infect, 2008,14(4):330 - 336.