

• 论 著 •

中山地区铜绿假单胞菌Ⅲ型分泌系统毒力基因表达差异的检测^{*}

王 娟¹, 梁媛紫², 戴佩坚³, 陈国锋², 欧阳展迪², 蔡佳瑾²

(1. 中山大学附属中山市人民医院检验医学中心, 广东中山 528403; 2. 广东医科大学
东莞校区, 广东东莞 523808; 3. 中山瑞康医学检验有限公司, 广东中山 528403)

摘要:目的 分析中山地区铜绿假单胞菌Ⅲ型分泌系统(TTSS)毒力基因表达及耐药情况,为临床抗感染治疗提供依据。
方法 对中山市人民医院2016年7—11月临床分离的铜绿假单胞菌随机选取76株,采用PCR法检测分离菌株exoU、exoS、exoT、exoY 4种毒力基因;采用Vitek2 Compact全自动微生物鉴定仪测定细菌对抗菌药物的敏感性。**结果** exoS、exoY检出率最高,分别为52.6%(40/76)、63.2%(48/76);主要为exoU(-)exoS(+),exoT(-)exoY(+)基因型,占59.26%;多重耐药及非多重耐药铜绿假单胞菌株4种毒力基因的阳性率无显著性差异;TTSS阳性组对13种药物的耐药率普遍低于TTSS阴性组,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 铜绿假单胞菌毒力基因携带存在一定的地域性差别;多重耐药及非多重耐药铜绿假单胞菌株毒力基因携带情况相似。

关键词:铜绿假单胞菌; 多重耐药; Ⅲ型分泌系统; 耐药性; 毒力基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.06.028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)06-0801-04

Detection of type three secretion system virulence gene expression difference of pseudomonas aeruginosa in Zhongshan area^{*}

WANG Juan¹, LIANG Yuanzi², DAI Peijian³, CHEN Guofeng², OUYANG Zhandi², CAI Jiajing²

(1. Laboratory Medicine Center, Affiliated Zhongshan Municipal People's Hospital of Sun Yat-sen University, Zhongshan, Guangdong 528403, China; 2. Dongguan Campus of Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China; 3. Zhongshan Ruikang Medical Laboratory Co., Ltd, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: **Objective** To analyze the virulence genes expression and drug resistance situation of type three secretion system (TTSS) of pseudomonas aeruginosa in Zhongshan area to provide a basis for clinical anti-infection treatment. **Methods** Seventy-six clinically isolated strains of Pseudomonas aeruginosa were collected from the Zhongshan Municipal People's Hospital from July to September 2016. Four virulence genes exoU, exoS, exoT and exoY were isolated from the strains by PCR. The Vitek2 Compact automatic microbiological identification instrument was used to detect the sensitivity of antibacterial drugs. The enumeration data were processed with chi-square test. **Results** The detection rates of gene exoS and exoY were highest, which were 52.6%(40/76) and 63.2%(48/76) respectively; genotype exoU(-)exoS(+), exoT(-)exoY(+) were predominant and accounted for 59.26%. The positive rates of 4 virulence genes had no statistical difference between the multiple resistant and non-multiple resistant strains of pseudomonas aeruginosa. The resistance rates in the TTSS positive group to 13 kinds of drugs were commonly lower than those in the TTSS negative group, the difference was statistically significant. **Conclusion** The geographic difference exists in virulence genes carrier of pseudomonas aeruginosa. The virulence genes carrying situation in both the multiple resistant and non-multiple resistant strains of pseudomonas aeruginosa is similar.

Key words: multiple resistant bacteria; pseudomonas aeruginosa; drug resistance; type three secretion system; virulence genes

铜绿假单胞菌在自然界中广泛存在,如各种水体、土壤以及动物皮肤和黏膜,尤其是环境潮湿的鼻腔、呼吸道和腋下等^[1]。铜绿假单胞菌耐药株不断增多,特别是多重耐药铜绿假单胞菌的增加,给临床抗感染治疗带来了极大的挑战。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(TTSS)广泛存在于致病菌中。TTSS是铜绿假单胞菌重要的致病机制。TTSS将效应蛋白注射到寄主细胞中,这些效应蛋白则影响宿主细胞基因表达,抑制宿主的免疫反应并降低其清除细菌的能力。研究发现,多种毒性因子参与了铜绿假单胞菌的致病过程^[2]。铜绿假单胞菌TTSS常见分泌4种毒力蛋白:exoS、exoT、exoY和exoU。这

些毒力蛋白介导的宿主组织损伤通过蔓延可以导致全身性的感染以及败血症、肺炎、感染性心内膜炎以及泌尿系统感染的发生。研究表明,患者若感染表达TTSS的铜绿假单胞菌会比对照组有更高的病死率及败血症的发生率^[1-2]。毒力因子的启动主要是通过群体感应控制^[3],各种致毒因子是否表达,表达水平及各种毒力因子协同作用共同影响着铜绿假单胞菌的毒性。如果细菌毒力表达和多重耐药同时出现,将使感染更难控制,因此分析耐药性与细菌毒力表达的关系,对患者预后判断、新药开发都有重要的参考价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2016年从临床标本随机分离得到的76株铜绿假单胞菌非重复菌株。其中多重耐药铜绿假单胞菌50

^{*} 基金项目:中山市科技局立项项目(2015B1028) 作者简介:王娟,女,副主任技师,主要从事细菌耐药和毒力分析的研究。

株,非多重耐药铜绿假单胞菌 26 株。菌株来源:痰液标本 50 株、伤口分泌物标本 13 株、咽拭子标本 4 株、血液标本 4 株、尿液标本 3 株、脓液标本 2 株。本研究选用的合格呼吸道痰标本来自不同的临床科室,由护士采集,培养前显微镜镜检均为白细胞大于 25 个/HP,上皮细胞小于 5 个/HP。

1.2 方法

1.2.1 提取菌株 DNA 1.5 mL EP 管加 300 μ L 无菌双蒸水,用接种环取血平板上纯分离的细菌半环到一环,加入 EP 管,沸水浴 5 min,13 000 r/min,离心 10 min,取上清,置于一20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.2.2 PCR 法检测 TTSS 及相关毒力基因 popB 为 TTSS 的特征片段,可作为 TTSS 的生物标记。exoU、exoS、exoY、exoT 分别为毒力效应蛋白 exoU、exoS、exoY、exoT 的编码基因。引物设计见表 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。PCR 体系的总体积为 20 μ L,包括 DNA 模版 1 μ L、2 $\times$ Premix Taq 10 μ L,引物 F(10 μ mol/L)和引物 R(10 μ mol/L)各 0.4 μ L 以及去离子水 8.2 μ L。PCR 条件设置:95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 30 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s 共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物取 2 μ L 经 1% 琼脂糖凝胶电泳,图像经 BIO-RAD 凝胶成像系统保存。

表 1 铜绿假单胞菌 TTSS 部分毒力因子的引物序列

基因	引物序列(5'~3')	目标片段长度(bp)
exo U	F:CCA TCG TTG GGG GCT ACT GCC TCC T	830
	R:TGG GGA ATG TAA GCA CTC AAC CGA T	
exo S	F:TCA GGT ACC CGG CAT TCA CTA CGC GG	550
	R:TCA CTG CAG GTT CGT GAC GTC TTT CTT TTA	
exo T	F:TCA GCA GAA CCC GTC TTT CGT	407
	R:GCC AGG CGC GTG TGA TCC TTC	
exo Y	F:ACC ATG CGT ATC GAC GGT CAT C	323
	R:TTG CTG AGA TGC TGG TCG ACA C	
popB	P1:TTT GGA TCC ATG AAT CCG ATA ACG CTT G	1 200
	P2:TTT GAA TTC TCA GAT CGC TGC CGG TCG	

1.2.3 药敏试验 采用 Vitek2 Compact 全自动微生物鉴定仪测定细菌对抗菌药物的敏感性。质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853,大肠埃希菌 ATCC 25922。本研究中多重耐药菌株定义为该菌株对具有抗假单胞菌活性的青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、氟喹诺酮类、氨基糖苷类、单环类、 β -内酰胺类复合制剂抗菌药物耐药大于或等于 5 类(每一类抗菌药物中大于或等于 1 种药物耐药,即为该类耐药)。

1.3 统计学处理 以 SPSS21.0 统计软件进行数据处理,计数资料比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 毒力基因检测 76 株临床分离的铜绿假单胞菌株中,TTSS 阳性率为 71.1%(54/76)。exoS、exoY、exoT、exoU 的检出率分别为 52.6%(40/76)、63.2%(48/76)、7.8%(6/76)、10.5%(8/76),PCR 产物的电泳结果见图 1~4。

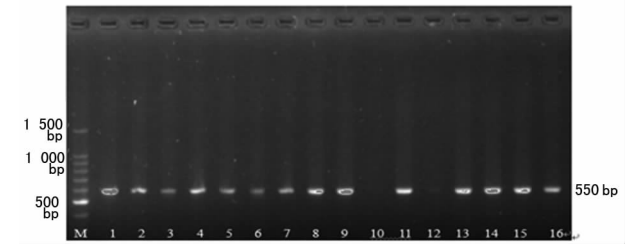


图 1 部分临床分离的铜绿假单胞菌 exoS PCR 产物的电泳图

2.2 TTSS 毒力基因的分布 54 株 TTSS 阳性铜绿假单胞菌株中,38 株菌株同时检出 2 种毒力基因,4 株菌株同时检出 3

种毒力基因。有 9 种类型组合,其中以第一种类型 exoU(-)exoS(+),exoT(-),exoY(+),所占比例最多,高达 59.26%,见表 2。exo U、exo S、exo 7、exo Y 阳性合计分别为 8、41、6、45 株。

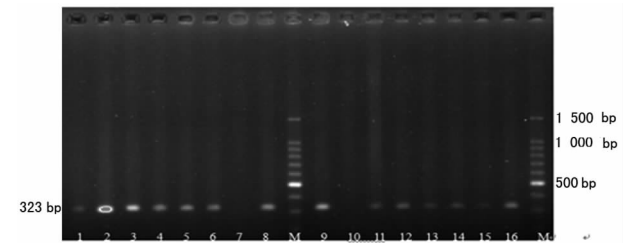


图 2 部分临床分离的铜绿假单胞菌 exoY PCR 产物的电泳图

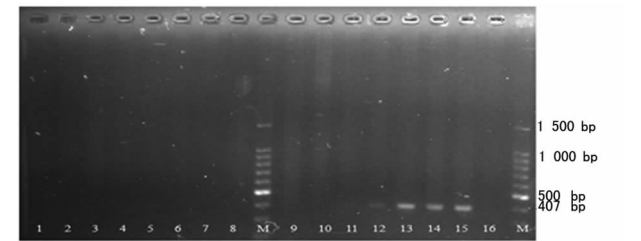


图 3 部分临床分离的铜绿假单胞菌 exoT PCR 产物的电泳图

2.3 多重耐药与非多重耐药铜绿假单胞菌毒力基因分布比较

50 株多重耐药铜绿假单胞菌中,毒力基因总检出率为 66%(33/50),其中有 17 株未检出毒力基因。exoY 的检出率最高,为 62.0%(31/50),其次为 exoS[46%(23/50)]。26 株非多重耐药铜绿假单胞菌中,毒力基因总检出率为 80.77%(21/26),其中有 5 株未检出毒力基因。exoS 和 exoY 的检出率最高,均为 65.4%(17/26)。多重耐药铜绿假单胞菌与非多重耐药铜绿假单胞菌 4 种毒力基因阳性率比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

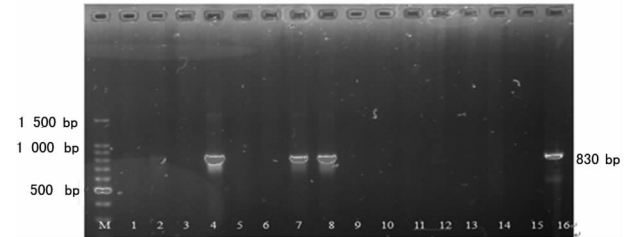


图 4 部分临床分离的铜绿假单胞菌 exoU PCR 产物的电泳图

表 2 54 株 TTSS 阳性铜绿假单胞菌毒力因子分布						
类型	菌株	铜绿假单胞菌毒力因子检测				所占比
编号	(n)	exoU	exoS	exoT	exoY	例(%)
1	32	—	+	—	+	59.26
2	5	+	—	—	+	9.26
3	5	—	+	—	—	9.26
4	4	—	—	—	+	7.41
5	3	—	—	+	—	5.56
6	2	—	+	+	+	3.70
7	1	+	—	+	+	1.85
8	1	+	+	—	—	1.85
9	1	+	+	—	+	1.85

表 3 多重耐药菌株和非多重耐药铜绿假单胞菌菌株的毒力基因分布[n(%)]					
毒力基因	菌株 (n=76)	多重耐药菌株 (n=50)	非多重耐药 菌株(n=26)	χ^2	P
exoS	40(52.6)	23(46.0)	17(65.4)	2.578	0.108
exoY	48(63.2)	31(62.0)	17(65.4)	0.084	0.772
exoT	6(7.9)	2(4.0)	4(15.4)	1.684	0.194
exoU	8(10.5)	5(10.0)	3(11.5)	0.000	1.000

表 4 TTSS 阳性与阴性铜绿假单胞菌菌株对常见抗菌药物的耐药率[n(%)]				
抗菌药物	TTSS 阳性组 (n=54)	TTSS 阴性组 (n=22)	χ^2	P
亚胺培南	32(59.3)	17(77.3)	2.214	0.137
美罗培南	33(61.1)	18(81.8)	3.036	0.081
环丙沙星	30(55.6)	16(72.7)	1.929	0.165

续表 4 TTSS 阳性与阴性铜绿假单胞菌菌株对常见抗菌药物的耐药率[n(%)]				
抗菌药物	TTSS 阳性组 (n=54)	TTSS 阴性组 (n=22)	χ^2	P
左氧氟沙星	31(57.4)	16(72.7)	1.555	0.212
庆大霉素	31(57.4)	16(72.7)	1.555	0.212
阿米卡星	31(57.4)	16(72.7)	1.555	0.212
妥布霉素	31(57.4)	16(72.7)	1.555	0.212
氨基糖苷	17(31.5)	12(54.5)	3.524	0.060
头孢他啶	33(61.1)	14(63.6)	0.042	0.837
头孢吡肟	27(50.0)	15(68.2)	2.090	0.148
头孢曲松	3(5.6)	2(9.1)	0.003	0.957
哌拉西林	29(53.7)	14(63.6)	0.628	0.428
哌拉西林/他唑巴坦	47(87.0)	19(86.4)	0.000	1.000

2.4 药敏试验 按照携带毒力基因的情况,将铜绿假单胞菌临床株分为 TTSS 阳性组(54 株)和 TTSS 阴性组(22 株),两组铜绿假单胞菌的耐药率见表 4。两组比较,TTSS 阴性组对 13 种药物的耐药率普遍高于 TTSS 阳性组,差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

自然环境中分离的绝大多数铜绿假单胞菌都具有功能性 TTSS,而且分泌的效应蛋白 exoS、exoT、exoU 和 exoY 能有效杀死环境中的变形虫。因此推测,TTSS 可能是菌体为抵御外界捕食者、保护自身生存而形成的保护体系。真核生物中广泛存在 TTSS 作用的保守底物靶位造成了这一系统对人体细胞的广泛损伤[4]。铜绿假单胞菌 TTSS 分泌的效应蛋白质主要是:exoS、exoT、exoU 和 exoY[5]。exoU 是一种具有磷脂酶和腺苷酸环化酶活性的细胞毒素,可以导致不可逆的细胞膜损伤以及快速的坏死,故称 exoU 基因为细胞毒型基因,是危害最大,最具破坏性的;exoS 具有腺苷二磷酸核糖转移酶活性,能抑制宿主细胞吞噬作用、破坏肌动蛋白细胞骨架重排、导致细胞凋亡和抑制细胞分裂等,故称 exoS 为细胞侵袭型基因,破坏性仅次于 exoU。与 exoS(+)比较,exoU(+)铜绿假单胞菌感染后症状更严重,所致患者病死率更高。popB 为 TTSS 的特征片段,可作为 TTSS 的生物标记。exoT 和 exoS 高度同源,编码基因有 80%相同,它们有双重酶活性,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。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,一般认为 exoY 只有轻微的致病作用。

在铜绿假单胞菌 TTSS 毒力蛋白 exoS、exoU、exoT、exoY 中,exoS 和 exoU 的临床意义尤为重要。铜绿假单胞菌常以 exoU(-)exoS(+)侵袭型和 exoU(+)exoS(-)细胞毒型形式存在[5]。国内的调查显示:exoS 和 exoU 的携带率分别为 86.05%和 13.95%及 74.5%和 19.3%[5-6],标本的来源以 60 岁以上的老年患者为主。同时,对国内 0~6 岁儿科患者的研究显示,exoS(+)和 exoU(+)分别占 55.26%和 31.58%[7],与老年患者的研究有差异,这可能是儿科患者的特点。本研究显示,exoS 和 exoU 的携带率分别为 52.6%、10.5%,标本来源者的平均年龄为 68 岁。exoS 的携带率低于国内相关研究,而

exoU 之间的差异不明显^[8],与 Feltman 等^[9]报告的毒力基因阳性率比较,本研究中铜绿假单胞菌分离株 exoU、exoS、exoT 及 exoY 基因的阳性率均较低,提示本组铜绿假单胞菌菌株与国内外同类研究中的临床分离株在环境适应性和致病能力方面存在一定差异,这也体现了铜绿假单胞菌毒力基因存在一定的地域性差别。两地区间由于毒力基因的差别,铜绿假单胞菌感染的临床症状也可能存在差异,这种差异对铜绿假单胞菌致病性的影响尚需要结合患者临床情况作进一步探讨。

有研究报道,没有 1 株菌同时携带毒力基因 exoU 和 exoS^[5]。exoU 和 exoS 基因在多数分离株中相互排斥,具体原因尚未明了,可能是 exoU 和 exoS 占据了相同的染色体位点^[8],当 exoU 存在时,exoS 就无法存在,反之亦然。但在本研究中,发现了 1 株 exoU 和 exoS 基因型同时阳性的多重耐药铜绿假单胞菌,很可能是由于同一地区的铜绿假单胞菌株通过基因转移在菌株间传递所致,进而导致临床分离菌株毒力的改变,同时携带这两种致病基因对铜绿假单胞菌致病性的影响尚需进一步探讨。

Holder 等^[10]用去除 TTSS、未去除 TTSS 的铜绿假单胞菌分别感染烧伤小鼠,去除 TTSS 的铜绿假单胞菌感染小鼠存活率明显较高。表明铜绿假单胞菌的感染,其菌株毒力和 TTSS 密切相关。本研究中结果表明多重耐药铜绿假单胞菌菌株与非多重耐药菌株在由这 4 类主要毒力基因决定的毒力强弱无明显差异,多重耐药及非多重耐药铜绿假单胞菌株毒力基因携带情况相似。TTSS 阴性菌株对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、氟喹诺酮类、氨基糖苷类、单环类、 β -内酰胺类复合制剂抗菌药物的耐药性都强于 TTSS 阳性菌株,与国内同类报道有差异^[6]。其原因之一可能是多重耐药菌株在获得多药耐药基因的同时其很多毒力因子的表达也同时减少^[11],另外,本研究的标本量较少,今后若增加标本量并结合临床背景资料分析细菌毒力与患者临床感染严重程度之间的关系,可能会得到更可靠的结论。

参考文献

[1] 安浩君,陈惠刚,李霞,等. 感染性心内膜炎患者分离株铜绿假单胞菌耐药基因研究[J]. 中国病原生物学杂志, (上接第 800 页)

disease[J]. Arch Virol, 2015, 160(1): 81-90.

[5] 刘丽婷,胡海霞,王桂茹. 小儿手足口病流行病学研究进展[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(34): 5642-5645.

[6] 戴汝均,林冬云,侯燕明. 不同年龄手足口病患儿血清 IL-6、TNF、WBC 和 CRP 水平观察[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(5): 905-906.

[7] 席里,杨薇斯,许柏华. 肠道病毒 71 型感染手足口病重症患儿血清中 IL-6、TNF- α 水平测定的临床意义[J]. 中国现代医生, 2012, 50(24): 159-160.

[8] 李侗曾,姜太一,梁连春. 手足口病患儿血清细胞因子水平变化及免疫球蛋白治疗效果分析[J]. 国际儿科学杂志, 2014, 41(4): 427-430.

[9] 林友青. 重症手足口病患儿血清免疫水平的变化情况及其临床意义研究[J]. 中国临床新医学, 2015, 8(7): 639-641.

2014, 9(12): 1071-1074.

[2] Liang HH, Kong WN, Shen T, et al. The effect of pmpR on the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chinese Science Bulletin, 2012, 57(19): 2413-2418.

[3] 魏磊,吴清平,张菊梅,等. 矿泉水和山泉水中铜绿假单胞菌污染调查及分离菌株毒力基因与耐药性分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 125-132.

[4] 顾玲玲,吴小刚,袁小琛,等. III 型分泌系统抑制剂对铜绿假单胞菌 PAO1 毒性因子的影响[J]. 微生物学通报, 2014, 41(11): 2318-2324.

[5] 董晨晓,宋诗铎,王悦,等. 43 株临床铜绿假单胞菌 exoS、exoU 基因的携带及其耐药性[J]. 中国感染控制杂志, 2010, 9(2): 93-96.

[6] 卓超,王露霞,肖书念,等. 铜绿假单胞菌 III 型分泌系统相关毒力基因的临床意义[J]. 中华烧伤杂志, 2010, 26(5): 354-359.

[7] 赵瑞珍,郑跃杰,陈乾. 铜绿假单胞菌毒力因子的携带状况及其对感染预后的探讨[J]. 中华儿科杂志, 2012, 50(9): 672-677.

[8] 类承斌,晁艳,孙相红,等. 铜绿假单胞菌毒力基因检测及临床意义[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(4): 301-303.

[9] Feltman H, Schultert G, Khan S, et al. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology, 2001, 147(Pt 10): 2659-2669.

[10] Holder IA, Neely AN, Frank DW. Type III secretion/intoxication system important in virulence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in burns[J]. Burns, 2001, 27(2): 129-130.

[11] Deptua A, Gospodarek E. Reduced expression of virulence factors in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains[J]. Arch Microbiol, 2010, 192(1): 79-84.

(收稿日期:2016-08-21 修回日期:2016-10-23)

[10] Bouaziz D, Calbo S, Maho-Vaillant M, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(10): 2686-2691.

[11] 王经纬,孙中运. 手足口病患儿外周血淋巴细胞亚群及血清 IL-6、IL-10 变化的研究[J]. 天津医药, 2012, 40(9): 928-930.

[12] Younger E, Blouin W, Duff C, et al. Subcutaneous immunoglobulin replacement therapy: ensuring success[J]. J Infus Nurs, 2014, 38(1): 70-79.

[13] 乐燕,李树军. 手足口病患儿细胞因子、免疫球蛋白和补体水平的变化及临床意义[J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(28): 171-173.

(收稿日期:2016-10-15 修回日期:2017-01-14)