

儿科多重耐药铜绿假单胞菌外排泵基因表达及其危险因素分析

史桂梅 钟红平 刘世平

摘要 目的 了解多重耐药铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, Pa)多药物外排泵基因表达分子流行趋势及其疾病临床特征和危险因素。**方法** 收集 2008 年 1 月~2010 年 12 月延安大学附属医院儿科和新生儿科 97 例感染多重耐药 Pa 患儿的痰、血、创面等标本,分离 Pa 菌株,分析 9 种外排泵基因表达及相关危险因素。**结果** 97 株 Pa 中, MexAB-OprM、MexEF-OprN、MexCD-OprJ、MexXY-OprM、MexVM-OprM 阳性株数分别为 97 株(100%)、50 株(51.5%)、35 株(36.1%)、12 株(12.4%)、11 株(11.3%),余 4 种外排泵基因表达均较低; Pa 菌 3 种常见外排泵基因(MexAB-OprM、MexEF-OprN、MexCD-OprJ)表达或高表达的危险因素分析表明:碳青霉烯类和糖肽类抗生素的使用是 Pa 菌 MexAB-OprM 外排泵诱导性高表达的危险因素,而碳青霉烯类及大环内酯类抗生素使用是 MexEF-OprN、MexCD-OprJ 诱导性表达的危险因素;侵入性操作、WBC 低、贫血、慢性基础疾病、入住 ICU 病房是 Pa 菌 3 种外排泵传播性表达或高表达的共同危险因素;碳青霉烯类抗生素、侵入性操作、入住 ICU 病房是 Pa 菌 3 种常见外排泵表达或高表达共同的独立危险因素。**结论** 笔者医院儿科病房分离多重耐药 Pa 菌耐药严重,规范使用碳青霉烯类抗生素和糖肽类抗生素,减少不必要的侵入性操作,严格把握 ICU 的准入标准对防止多重耐药 Pa 菌外排泵基因表达或高表达有重要意义。

关键词 铜绿假单胞菌 多重耐药 外排泵 危险因素

Analysis of Gene Expression of The Efflux Pump of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Paediatrics. Shi Guimei, Zhong Hongping, Liu Shiping. Yanan University Affiliated Hospital, Shaanxi 716000, China

Abstract Objective To investigate the molecular epidemiology, clinical feature and risk factor of the expression of the efflux pumps of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). **Methods** From January 2008 to December 2010, Clinical features of 97 child patients infected with multidrug resistant Pa were retrospectively analyzed. **Results** Multidrug resistant Pa strains isolated from the paediatrics ward of our hospital were seriously resistant to frequently used antibiotics of clinical practice. MexAB-OprM was expressed in all multidrug resistant Pa strains (97/97). The expression rates of MexEF-OprN, MexCD-OprJ, MexXY-OprM and MexVM-OprM in the multidrug resistant Pa strains were 51.5% (50/97), 36.1% (35/97), 12.4% (12/97), 11.3% (11/97), respectively. The expression rates of the other four efflux pumps were very low. The risk factor of the three efflux pumps expression or overexpression was analyzed and the results were as follows; the use of carbapenems and glycopeptides antibiotics was the risk factor of MexAB-OprM overexpression which was induced. The use of macrolide and carbapenems antibiotics was the risk factor of the induced MexEF-OprN and MexCD-OprJ expression. Invasive procedures, low WBC, anaemia, chronic fundamental disease and hospitalized in ICU ward were the common risk factors of communicable expression or overexpression of the three efflux pumps. Carbapenems antibiotics, invasive procedures and hospitalized in ICU ward were commonly independent risk factors of expression or overexpression of the three efflux pumps. **Conclusion** Multidrug resistant Pa strains isolated from the paediatrics ward of our hospital were severely resistant to antibiotics. The normalized use of carbapenems and glycopeptides antibiotics, the reduction of unnecessary invasive procedures and the severely grasped standard of hospitalized in ICU ward played important roles in the prevention of the expression or overexpression of the efflux pumps of multidrug resistant Pa.

Key words *Pseudomonas aeruginosa*; Multidrug resistant; Efflux pump; Risk factor

铜绿假单胞菌(*psedomonas aeruginas*, Pa)是目前难治性医院感染的主要致病菌,主要原因是 Pa 多

重耐药(multidrug-resistance, MDR)株不断出现^[1]。耐药结节细胞分化家族(resistance nodulation cell division family, RND)是细菌外排泵系统之一,在 Pa 的多重耐药中起着重要作用^[2,3]。本文探讨多药耐药 Pa 的 9 种外排泵系统表达的分布趋势及其感染危险

因素,为临床防治铜绿假单胞菌多重耐药的产生提供理论支持。

材料与方法

1. 菌株来源:收集 2008 年 1 月~2010 年 12 月笔者医院儿科多重耐药 Pa 感染病例 97 例。年龄为出生后 7 天~12 岁,平均年龄 7.8 岁,其中痰标本 37 例,血标本 29 例,创面标本 18 例,导管标本 8 例,其他标本 5 例,菌株均经 VITEK - Am s60 全自动细菌鉴定系统和常规生化检测鉴定。

2. 主要仪器试剂:荧光定量 PCR 仪、电泳仪、核酸蛋白分析仪、低温高速离心机、凝胶成像分析系统。TRIzol RNA 提取液,Prime Script RT reagent Kit Perfect Real time 试剂盒及 Premix Taq Version 2.0,ABI7500 荧光定量专用 96 孔板,琼脂糖,异丙醇,三氯甲烷,无水乙醇等分析纯。

3. 实验方法:(1)细菌处理:收集临床标本培养的多重耐药 Pa 株,先用 LB 培养基摇菌增菌,后加入无菌甘油(20% 终浓度), -80℃ 冰箱保存待用。(2)基因检测:1)引物设计:参考文献进行 PCR 引物设计,所有 PCR 产物(>150bp)进行双向测序,所测各基因序列与 Pubmed 数据库中相关基因进行 Blast 比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)^[4~8]。2)细菌总 RNA 提取、cDNA 的合成及反转录反应:LB 培养基摇菌增菌,后加入无菌甘油, -80℃ 冰箱保存待用。提取总 RNA 之前置于冰上复温,然后接种于 LB 培养基中,240r/min, 37℃ 振摇 16~18h,取菌液 3ml,4000r/min,离心 3min,弃上清,加 1ml TRIzol RNA 提取试剂盒,按说明步骤提细菌总 RNA,然后行凝胶电泳测 RNA 完整性,选择 3 条带清晰, A260/A280 =1.8~2.0 的细菌总 RNA 行反转录反应,按试剂盒说明操作。3)PCR 分析目的基因的表达:Pa 菌株总 cDNA 进行 PCR 反应,每株菌均设 rpsL 为内参,反应产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,100V 5min,然后凝胶电泳成像仪拍照保存。4)real - time - PCR 半定量分析目的基因的表达:反应体系:SYBR Premix Ex Taq™ II(2 ×) 10.0μl,荧光定量 PCR 上下游引物

(10μmol/L)各 1μl,ROX Reference Dye or DyeII(50 ×)0.4μl, RT 反应液(cDNA 溶液)1.0μl,灭菌双蒸水补至 20μl 体系, ABI7500 分析。分析方法采用 2^{-ΔΔCT} 法半定量分析各基因表达量,重复 3 次计算结果。

4. 统计学方法:计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用两独立样本均数 *t* 检验,计数资料采用率表示, 组间比较采用 χ^2 检验,多因素 Logistic 回归分析独立危险因素,计算比值比(OR)及 95% 可信区间,以 *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。统计分析采用 GraphPad Prism 5 统计软件完成。

结 果

1. 多重耐药铜绿假单胞菌耐药情况:具体见表 1。

表 1 多重耐药 Pa 药敏结果[n(%)]

抗生素	多耐 Pa	抗生素	多耐 Pa
阿米卡星	51(52.6)	庆大霉素	97(100.0)
氨苄西林/舒巴坦	97(100.0)	左氧氟沙星	91(93.8)
氨曲南	57(58.8)	美洛培南	12(12.4)
头孢哌酮	90(92.8)	美洛西林	97(100.0)
头孢哌酮/舒巴坦	42(43.3)	哌拉西林/他唑巴坦	71(73.2)
头孢噻肟	72(74.2)	妥布霉素	97(100.0)
头孢他啶	46(47.4)	复方新诺明	95(97.9)
氯霉素	97(100.0)	头孢曲松	82(89.7)
环丙沙星	88(90.7)	头孢吡肟	48(49.5)

2. 各外排基因的表达情况:MexAB - OprM 均表达(97/97),MexEF - Op rN 表达阳性率 51.5% (50/97), MexCD - OprJ 为 36.1% (35/97), MexVM - OprM 为 11.3% (11/97),其他少见外排泵系统表达均较低,详见图 1。

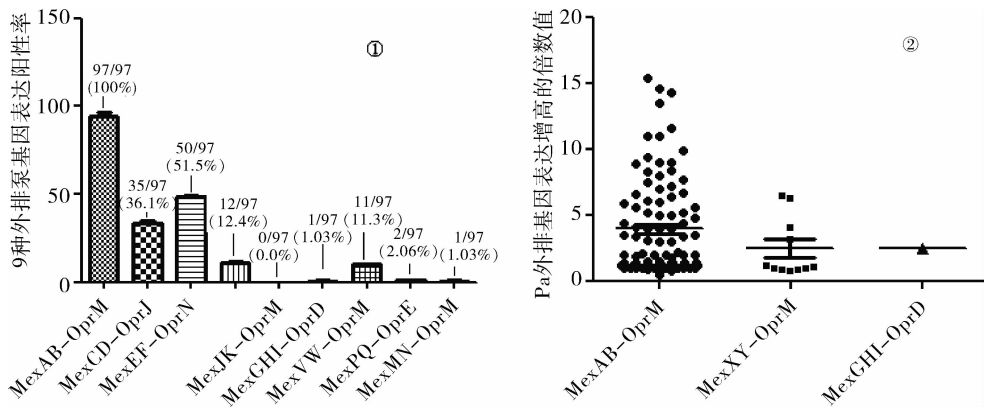


图 1 9 种 Pa 外排泵基因表达阳性率其中 3 种外排泵基因高表达散点图

3. 多重外排泵基因表达分析:同时表达 2 种外排泵的有 23 株,占 23.7%, MexAB - OprM 与 MexEF -

OprN 组合(15 株), MexCD - OprJ 与 MexEF - OprM 组合(7 株), MexXY - OprM 与 MexMN - OprM(1 株)

组合为主,未见其他组合;同时表达 3 种外排泵的有 7 株,占 7.2%,主要以 MexAB - OprM + MexEF - OprN + MexXY - OprM 组合,未见其他组合。

4. 外排泵基因表达或高表达的危险因素分析:具体见表 2、表 3。

表 2 铜绿假单胞菌主要多重耐药外排泵表达的危险因素单因素分析[n(%)]

外排泵达 危险因素		MexAB - OprM 表达		MexCD - OprJ 表达		MexEF - OprN 表达	
		高 (n = 43)	低 (n = 54)	有 (n = 35)	无 (n = 62)	有 (n = 50)	无 (n = 47)
诱导性表达	头孢菌素类	40 (93.0)	48 (88.9)	32 (91.4)	51 (82.3)	32 (64.0)	29 (61.7)
	含酶复方制剂	32 (74.4)	37 (68.5)	27 (77.1)	36 (69.2)	21 (42.0)	17 (36.1)
	碳青霉烯类	31 (72.1)	9 (16.7) *	31 (88.6)	13 (20.9) *	12 (24.0)	2 (4.3) *
	氨基糖苷类	13 (30.2)	17 (31.5)	7 (20.0)	11 (17.4)	7 (14.0)	5 (10.6)
	大环内酯类	29 (67.4)	31 (57.4)	29 (82.9)	17 (27.4) *	23 (46.0)	3 (6.4) *
	糖肽类	14 (32.6)	3 (5.6) *	5 (14.3)	7 (11.3)	11 (22.0)	7 (14.9)
传播性表达	侵入性操作	27 (62.8)	7 (12.9) *	17 (48.6)	2 (3.2) *	11 (22.0)	1 (2.1) *
	使用激素	5 (11.6)	7 (12.9)	7 (20.0)	9 (14.5)	6 (12.0)	6 (12.8)
	WBC 计数低	17 (39.5)	5 (9.3) *	25 (71.4)	16 (25.8) *	17 (34.0)	3 (6.4) *
	贫血	8 (18.6)	2 (3.7) *	11 (31.4)	2 (3.2) *	19 (38.0)	5 (10.6) *
	慢性基础病	27 (62.8)	12 (22.2) *	16 (45.7)	3 (4.8) *	14 (28.0)	1 (2.1) *
	入住 ICU 病房	22 (51.2)	3 (5.6) *	19 (54.3)	1 (1.6) *	21 (42.0)	3 (6.4) *
	抗生素联合使用	40 (93.0)	41 (75.9)	17 (48.6)	30 (48.4)	35 (70.0)	27 (57.4)
	混合感染	19 (44.2)	8 (14.8) *	11 (31.4)	23 (37.1)	13 (26.0)	15 (31.9)

头孢菌素类主要包括头孢他啶、头孢吡肟、头孢匹罗、头孢替安、头孢孟多、头孢哌酮、头孢呋辛等,含酶抑制剂复方制剂包括头孢哌酮舒巴坦、哌拉西林舒巴坦,氨基糖苷类包括庆大霉素和阿米卡星,碳青霉烯类主要包括亚胺培南、美罗培南,大环内酯类包括阿奇霉素和克拉霉素,糖肽类包括万古霉素和替考拉宁。经卡方检验,* $P < 0.05$

表 3 铜绿假单胞菌 3 种常见多重耐药外排泵表达或高表达的危险因素多因素 Logistic 回归分析

独立危险因素	MexAB - OprM 高表达		MexCD - OprJ 表达		MexEF - OprN 表达	
	OR	P	OR	P	OR	P
侵入性操作	11.79	0.000	6.451	0.001	7.713	0.000
碳青霉烯类抗生素使用	6.137	0.001	7.137	0.000	4.157	0.003
入住 ICU 病房	2.218	0.037	1.769	0.032	2.771	0.043

讨 论

铜绿假单胞菌隶属非发酵菌假单胞菌属,是一种重要的条件致病菌,也是引起院内感染的重要病原菌^[9]。Pa 耐药机制复杂,耐药结节细胞分化家族的主动外排泵系统在 Pa 多重耐药机制中起主导作用^[10]。目前已经发现 9 种 Pa 的外排泵系统,不同外排泵的表达导致细菌耐药谱各异。因此,研究各种外排泵表达的分布,对临床抗感染治疗有重要指导作用。本研究发现,MexAB - OprM 在所有多重耐药 Pa 菌株中均表达,其高表达也达到 44.3%,其次是 MexEF - OprN (51.5%),MexCD - OprJ (36.1%),MexVM - OprM (11.3%),除 MexJK - OprM 未发现之外,其他外排泵表达均较低,此外还存在多种外排泵系统组合表达的情况。而临床分离的敏感菌株中,除 MexAB - OprM 均低水平表达外(资料未显示),未见其他外排泵系统的表达,说明各种外排泵的表达与菌株对

抗生素的耐药存在相关性,与国内报道一致^[11]。由于存在不同外排泵系统的组合表达,导致耐药的复杂和广泛化,使得临床治疗药物选择受限。

Pa 外排泵系统的表达,部分是由于抗生素诱导而产生的。Kolayli 等研究发现碳青霉烯类抗生素亚胺培南可以诱导 Pa 表达 MexAB - OprM 增高,但丁兆勇等^[12]研究发现亚胺培南、环丙沙星对 Pa 浮游菌及生物膜菌的 MexAB - OprM 无诱导作用,因此需进行更大样本的研究。本研究通过单因素危险分析发现,糖肽类抗生素的使用可能导致 MexAB - OprM 的表达增高,机制不明。而碳青霉烯类抗生素及大环内酯类抗生素是 MexEF - OprN、MexCD - OprJ 诱导表达的危险因素,考虑这些抗生素是其合适的底物,过度使用使得耐药突变株被筛选出来而成为优势菌株。因此,严格规范这些抗生素的使用,可能会减轻 Pa MexAB - OprM 高表达和 MexEF - OprN、MexCD -

OprJ 表达,从而减轻细菌耐药。

多重耐药 Pa 外排泵基因表达的危险因素分析,发现碳青霉烯类和糖肽类抗生素的使用是 Pa MexAB - OprM 外排泵诱导性高表达的危险因素,碳青霉烯类和大环内酯类抗生素的使用是 Pa MexEF - OprN、MexCD - OprJ 外排泵诱导性表达的危险因素,提示不合理的抗生素滥用可能是诱导多重耐药 Pa 外排泵基因表达的危险因素。在 Pa 外排泵基因表达的传播性危险因素分析中,侵入性操作如气管插管机械通气、深静脉置管和留置导尿管等、低 WBC、贫血、慢性基础疾病、入住 ICU 病房是 Pa MexAB - OprM、MexEF - OprN、MexCD - OprJ 3 种外排泵传播性表达或高表达的共同危险因素,可能是因为侵入性操作,破坏了机体的自然免疫屏障,增加了细菌接触机会,从而增加了耐药菌株在不同个体之间的传播。ICU 病房环境中存在多数耐药菌株^[13],加之患儿免疫力低下及实施各种侵入性操作,极易导致周围耐药菌株的定植并感染。多因素 Logistic 回归分析发现,碳青霉烯类抗生素的使用、侵入性操作(包括气管插管呼吸机辅助通气和深静脉置管、留置尿管)、入住 ICU 病房是 Pa 3 种常见外排泵表达或高表达共同的独立危险因素。

总之,多重耐药铜绿假单胞菌对临床常用抗生素耐药严重,其耐药部分是由于 Pa 多重耐药外排泵表达或高表达所致。严格规范碳青霉烯类抗生素,大环内酯类及糖肽类抗生素的使用、防止患儿出现各种导致免疫力低下的因素以及严格把握入住 ICU 病房的准入标准,减少不必要的侵入性操作对于防止 Pa 多药外排泵系统诱导或传播性表达的产生具有重要意义。

参考文献

1 宁明哲,张之烽,沈瀚,等. 2005 ~ 2008 年铜绿假单胞菌耐药

(接第 168 页)

- 6 Barnes LL, Wilson RS, Schneider JA, *et al.* Gender, cognitive decline, and risk of AD in older persons [J]. *Neurology*, 2003, 60 (11):1777 - 1781
- 7 Singh M. Mechanisms of progesterone - induced neuroprotection [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1052(1):145 - 151
- 8 Culhane NS. Estrogen plus progestin may increase incidence of dementia [J]. *J Fam Pract*, 2003, 52(10):754 - 755
- 9 Yoon BK. Effects of estrogen plus progestin on risk of dementia. [J] *JAMA*, 2003, 290(13): 1707 - 1708
- 10 Shumaker SA, Legault C, Kuller L, *et al.* Women's Health Initiative Memory Study. Conjugated equine estrogens and incidence of probable dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study [J]. *JAMA*, 2004, 291 (24):2947 - 2958

情况变迁分析[J]. *医学研究杂志*, 2010, 39(1):91 - 93

- 2 Bay DC, Turner RJ. Diversity and evolution of the small multidrug resistance protein family[J]. *BMC Evol Biol*, 2009, 9:140
- 3 汪复,朱德妹. 2007 年 CHINET 细菌耐药性检测[J]. *中国感染与化疗志*, 2008, 8(5):325 - 333
- 4 Juan F, Linares, JA. *et al.* Overexpression of the Multidrug Efflux Pumps MexCD - OprJ and MexEF - OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa* [J] *J Bacteriol*, 2005, 187(4):1384 - 1391
- 5 Narcisa M, Youri G, *et al.* A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 59(3):378 - 386
- 6 Li Y, Mima T, Komori Y, Morita Y, *et al.* A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW - OprM, in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrob Chemother*, 2003, 52(4):572 - 575
- 7 Li XZ, Nikaido H. Efflux - mediated drug resistance in bacteria [J]. *Drugs*, 2004, 64(2):159 - 204
- 8 Mima T, Sekiya H, Mizushima T, *et al.* Gene cloning and properties of the RND - type multidrug efflux pumps MexPQ - OpmE and MexMN - OprM from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Microbiol Immunol*. 2005, 49(11): 999 - 1002
- 9 许黔宁,王伟平,张仙森. 铜绿假单胞菌感染分布及耐药分析 [J]. *中华志*, 2005, 5(2):213 - 214
- 10 Piddock LJ. Multidrug - resistance efflux pumps - not just for resistance [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(8):629 - 636
- 11 蔡兴东,胡成平,李玮等. 湖南省铜绿假单胞菌四种外排泵在多重耐药菌株中表达的分布及作用 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30(2):130 - 134
- 12 丁兆勇,赵京明,成炜,等. 生物膜铜绿假单胞菌多药外排泵的表达研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(13):1825 - 1827
- 13 朱德全. 重症监护病房感染患者细菌分布及耐药性分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(2):389 - 391

(收稿:2011 - 12 - 09)

(修回:2011 - 12 - 19)

- 11 Wojtal K, Trojnar MK, Czuczwar SJ. Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids [J]. *Pharmacol Rep*, 2006, 58(3):335 - 340
- 12 Maki PM, Zonderman AB, Resnick SM. Enhanced verbal memory in nondemented elderly women receiving hormone - replacement therapy [J]. *Am J Psychiatry*, 2001, 158(2):227 - 233
- 13 何璐,李云生. 孕酮对神经系统作用机制的研究进展 [J]. *解剖与临床*, 2006, 11(4):291 - 293
- 14 Singh M, Sumien N, Kyser C, *et al.* Estrogens and progesterone as neuroprotectants: what animal models teach us [J]. *Front Biosci*, 2008, 13(5):1083 - 1089
- 15 Wise PM. Estrogen therapy: does it help or hurt the adult and aging brain? Insights derived from animal models [J]. *Neuroscience*, 2006, 138(3):831 - 835

(收稿:2011 - 10 - 24)

(修回:2011 - 11 - 11)