

文章编号: 1674-5566(2012)05-0763-08

养殖鱼塘中铜绿假单胞菌致病性及耐药相关基因的研究

于盼^{1,2,3}, 金浩^{1,2,3}, 潘迎捷^{1,2,3}, 李柏林^{1,2,3}, 宋雨泽^{1,2,3}, 靳兰兰^{1,2,3},
陈兰明^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 农业部水产品贮藏保鲜与质量安全风险评估重点实验室, 上海 201306; 3. 上海市水产品质量控制与风险评估工程中心, 上海 201306)

摘要: 旨在分析养殖鱼塘水体中铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 分离菌株的致病性、耐药性及其可能机制, 为保障水产食品的安全提供科学依据。使用美国临床与实验室标准研究所的标准纸片扩散法, 以及聚合酶链反应技术对 PA 分离菌株进行了抗菌素耐药性, 以及毒性、固有和获得性耐药相关基因的检测与分析。结果显示, 受试 PA 分离菌株的 50% 为 *exoS*⁺/*exoU*⁻ 侵袭型分子型, 无临床分离菌株的 *exoS*⁻/*exoU*⁺ 的细胞毒型分子型。PA 菌株对 6 大类 9 种抗菌素的耐药性存在明显差异, 其中甲氧苄啶和利福平的耐药率最高为 100%, 其次是氨苄西林、卡那霉素和四环素, 分别为 90%、90% 和 80%, 庆大霉素的耐药率最低为 10%。多药抗性 PA 菌株均含有 MexAB-OprM、MexXY-OprM 和 MexVW-OprM 外排泵系统, 其中 20% 菌株检测为 β -内酰胺酶基因 (*ampC*) 阳性; 而 MexEF-OprN、MexJK-OprM、MexCD-OprJ 和 MexGHI-OprM 外排泵基因全部或部分缺失。此外, 在 PA 菌株中均未检测到 I ~ III 类整合子的整合酶基因 (*comINT*), 但是整合接合元件 (ICEs) 保守模块功能基因 (*ICEint*, *soj*, *pilS2*, *pilD*) 均检测为阳性, 提示 PA 菌株携带的 ICEs 具有潜在的转移活性, 为进一步探讨 PA 多药抗性的散播奠定了基础。

研究亮点: 本研究首次对养殖鱼塘水体中多药抗性铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 分离菌株进行了致病性及耐药相关基因的检测与分析, 发现其中 50% 为侵袭型毒性分子型; 它们的多药抗性主要与染色体编码的 MexAB-OprM、MexXY-OprM 和 MexVW-OprM 外排泵系统相关; 并首次从铜绿假单胞菌环境分离菌株中发现了可移动整合接合遗传元件。为指导实际水产养殖病害的控制, 养殖环境的有效管理以及保障水产食品的安全提供科学依据。

关键词: 养殖水体; 铜绿假单胞菌; 毒性; 耐药性

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 为革兰氏阴性条件致病菌, 广泛存在于水体、土壤、植物、动物等各种生态环境中^[1], 易引起人类菌血症、肺炎、脑膜炎、创伤感染等疾病^[2]。PA 也是水产养殖动物的致病菌之一, 易引起草鱼赤皮病, 罗氏沼虾黄鳃和黑鳃病等^[3-4]。大量研究表明 PA 的分泌型毒性因子介导其致病性^[5-6], 该菌分泌 ExoS, ExoT, ExoU, ExoY 4 种效应物的 III 型分泌系统 (type III secretion system, T3SS) 在其细胞毒性和侵袭性中起着极其重要的作

用^[6-8]。*exoU* 为细胞毒型基因; 而 *exoS* 则为侵袭型基因^[9]。

PA 具有固有和获得性的高度耐药性, 其耐药性的机制较复杂, 通常是多种机制综合作用的结果^[1]。大量研究表明, PA 染色体编码的 β -内酰胺酶和多药外排泵是介导其自身固有耐药性的重要原因^[10-11]。迄今为止, 已证明 PA 含有 7 种质子驱动型耐药结节分化超家族 (resistance nodulation cell division superfamily, RNCDS) 的多药外排泵, 包括 MexAB-OprM^[12]、MexVW-

收稿日期: 2012-04-24 修回日期: 2012-05-24

基金项目: 上海市科学技术委员会项目 (10PJ1404900, 09320503600); 上海市教育委员会项目 (B-9500-10-0004)

作者简介: 于盼 (1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品科学与工程。E-mail: 1159337482@qq.com

通讯作者: 陈兰明, E-mail: lmchen@shou.edu.cn

OprM^[13]、MexXY-OprM^[12]、MexJK-OprM^[14]、MexCD-OprJ^[15]、MexEF-OprN^[16]、MexGHI-OpmD^[16]。此外,PA 还能通过整合子^[17]、整合接合元件 (integrating conjugative elements, ICEs)^[18]等可移动遗传元件 (mobile genetic element, MGE) 获得耐药性^[19-20]。

PA 的致病性及高度耐药性给临床治疗和病害防治带来很大困难。国内外对 PA 临床分离株的毒性及耐药性已开展了大量研究,但是,对于养殖环境中 PA 的相关报道甚少。本研究首次对养殖鱼塘水体中 PA 分离菌株进行了 6 大类药物 9 种抗菌素的敏感性测定,进一步对 MDR 菌株进行了外毒素基因 (*exoS*, *exoU*, *toxA*)、 β -内酰胺酶基因 (*ampC*)、7 种外排泵基因 (*mexAB-oprM*、*mexVW-oprM*、*mexXY-oprM*、*mexJK-oprM*、*mexCD-oprJ*、*mexEF-oprN*、*opmD-mexGHI*) 以及可移动遗传元件保守功能基因 (*comINT*、*int*、*soj*、*pilS2*、*pilD*、*cupD*、*rcsC*、*pvrR*、*pvrS*)^[20-23] 的检测与分析,以分析养殖鱼塘 PA 分离菌株毒性,以及固有和获得性耐药性的可能机制。

1 材料与方法

1.1 菌株

受试 PA 分离菌株来源于上海某河豚鱼 (*Takifugu obscurus*) 养殖鱼塘水体样品,经 16S rDNA 基因扩增和序列测定鉴定。质控菌株:金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ATCC25922 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 27853 购自上海工业微生物研究所。

1.2 主要仪器及试剂

主要仪器有 PCR 仪 (Eppendorf 6325, 德国)、高速冷冻离心机 (Eppendorf 5424, 德国)、电泳仪 (BioRad, 美国)、凝胶成像系统 (BioRad, 美国)。MiniBEST 细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 Premix Ex Taq DNA 聚合酶均购自大连宝生物工程有限公司。采用 Primer 5.0 (Premier, 加拿大) 设计寡核苷酸引物,由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 抗菌素药物敏感性测定

采用美国临床与实验室标准研究所 (clinical and laboratory standards institute, CLSI) 2010 版标准纸片扩散法 (Kirby-Bauer disc diffusion test), 测

定铜绿假单胞菌的抗菌素敏感性。链霉素 (10 μ g)、甲氧苄苄嘧啶 (5 μ g)、利福平 (5 μ g)、氨苄西林 (10 μ g)、庆大霉素 (10 μ g)、氯霉素 (30 μ g)、四环素 (30 μ g)、复方新诺明 (25 μ g)、卡那霉素 (30 μ g) 抗菌素试纸片以及 Muller-Hinton Broth 培养基均购自英国 OXOID 公司。

1.4 毒性相关基因的检测

exoS、*exoU* 和 *toxA* 基因的 PCR 扩增引物为: *exoS*-F (5'-TCACTCCCTGCTCATCG-3'), *exoS*-R (5'-GCGTTTGGGACAGATTG-3'); *exoU*-F (5'-GGGGTTGCCCTAAAGA-3'), *exoU*-R (5'-CCATCTCAACGGTAGTCG-3'); *toxA*-F (5'-GAAGACGATGCTTTGCG-3'), *toxA*-R (5'-AGATGGCGACGAGTTG-3')^[16]。PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.5 β -内酰胺酶类基因的检测

ampC 基因的 PCR 扩增引物为: *ampC*-F (5'-CAGAAGGACCAGGCACA-3'), *ampC*-R (5'-TCGGCATTGGGATAGTT-3'); PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.6 EPs 相关基因的检测

1.6.1 *oprN* 和 *opmD* 基因的 PCR 扩增

引物为: *OprN*-F (5'-AAAGCCTGTGGTGGAAAC-3'), *OprN*-R (5'-GCTCCTACCCGAACCTTT-3'); *OpmD*-F (5'-GCTCCTACCCGAACCTTT-3'), *OpmD*-R (5'-ATAGAGTTCGGCGGTGG-3')。PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.6.2 *mexAB* 基因的 PCR 扩增

引物为: *MexAB*-F (5'-CAACCCGAACAACGAG-3'), *MexAB*-R (5'-GACCAGCTTTTCGTACAGG-3')。PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 300 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.6.3 *oprM*、*mexVW*、*mexKJ*、*mexDC*、*mexGHI* 基因的 PCR 扩增

引物为: *OprM*-F (5'-CCTACGGGCAGAACACC-3'), *OprM*-R (5'-GCTGATGCTCGGGAAG-3'); *MexVW*-F (5'-GCCATCAACCCCAAGG-3'), *MexVW*-R (5'-CTGCATGAAGAACAATACCG-3'); *MexKJ*-F (5'-CATAGATGTTGCCGTAGGT-3'), *MexKJ*-R (5'-CCGAGGCCAACTTGCA-3'); *MexDC*-

F(5'-GGATGGCATTGCTCACG-3'), MexDC-R(5'-TGGAGGTCCTGACGGT-3'); MexGHI-F(5'-CCTGCTGCTGACCATCC-3'), MexGHI-R(5'-CGTAGGCGGTATAGGTGAC-3')。PCR 扩增条件为 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.6.4 *oprJ*、*mexXY*、*mexE* 基因的 PCR 扩增

引物为: MexXY-F(5'-AGGAGTAAGGGTAACGAT-3'), MexXY-R(5'-CAACCCAAAGGGCTTG-3'); MexE-F(5'-GAAAGGCGACCTGCTG-3'), MexE-R(5'-TCGGTGGTTCGCTGTC-3'); OprJ-F(5'-GAAAGCGGTCTGGATGG-3'), OprJ-R(5'-TCTTCGGTCGGGTCAA-3')。PCR 扩增条件为 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.7 整合子及 ICEs 保守功能基因的检测

1.7.1 I-III 类整合子整合酶基因(*comINT*) 简并引物的 PCR 扩增

引物为: ComINT-F(5'-TCCGGGTYAARGA TBTKGATTT-3'), ComINT-R(5'-ARCACATGCCG TRTARAT-3')^[21]。PCR 扩增条件为 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.7.2 ICEs 整合酶基因(*int*) 的 PCR 扩增

引物为: Pint-F(5'-TGCGGCAAATGCGATAG-3'), Pint-R(5'-CGATGCCGAAGGAGGT-3')。PCR 扩增条件为 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.7.3 ICEs 切离酶基因(*soj*)、转移菌毛基因(*pilS2*)、转移菌毛分子伴侣基因(*pilD*) 的 PCR 扩增

引物为: Psoj-F(5'-CAGGCAGTTGATGACGA-3'), Psoj-R(5'-AGCGACTTCGGTTGTATC-3'); Pils2-F(5'-GGCGTTTTCTTTCCA-3'), Pils-R(5'-CCGCTGTTGATTTTGGTCT-3'); PilD-F(5'-CGAAGATGATGGAGCC-3'), PilD-R(5'-CAGAGCAAAGCAATCCAC-3')。PCR 扩增条件为 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.7.4 ICEs 毒力相关菌毛基因(*cupD34*) 的 PCR 扩增

引物为: CupD34-F(5'-CGGCAACCTGTATCTGTC-3'), CupD34-R(5'-CCGTTTGGCACTTGAA-

3')^[23]。PCR 扩增条件为 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 180 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.7.5 ICEs 毒力相关菌毛调控基因(*rcsC-pvrR-pvrS*) 的 PCR 扩增

引物为: RcPrS-F(5'-GGGAGTGGCGAAAGA A-3'), RcPrS-R(5'-ATAGAGCCCCGCAAAGC-3')^[23]。PCR 扩增条件为 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 300 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

PCR 反应体系均为 20 μL, 其中 Premix Ex Taq 10 μL, 上下游引物(5 μmol/L) 各 1 μL, 基因组 DNA 模板 1 μL。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像分析仪检测分析。

2 结果与讨论

2.1 PA 分离菌株的抗菌素多药敏感性

抗菌素药物敏感性试验结果(表 1) 显示, 养殖鱼塘水体中 PA 分离菌株对 6 大类 9 种抗菌素的耐药率存在明显差异, 其中甲氧苄苄嘧啶和利福平的耐药率最高为 100%, 其次是氨苄西林、卡那霉素和四环素分别为 90%、90% 和 80%, 链霉素中度敏感(60%), 庆大霉素耐药率最低为 10%。甲氧苄苄嘧啶和利福平抗菌谱广, 价格低廉, 在水产养殖业存在盲目大量投放的情况, 诱导环境菌株产生抗性^[24], 本研究结果为此提供了新的证据, 提示这两种抗菌素对 PA 导致病害的防治已失去作用, 应采用新型的抗菌药物或防治措施。鉴于 β-内酰胺类, 氨基糖苷类, 四环素等抗菌素在医疗及生产上的广泛应用, 氨苄西林、卡那霉素、链霉素、四环素的耐药率普遍较高达 50% 以上^[25-26], 与本研究结果一致。庆大霉素为经典的氨基糖苷类药物, PA 临床分离菌株对庆大霉素耐药率均在 50% 以上^[27-29], 然而, 养殖水体中 PA 分离菌株对庆大霉素最敏感, 耐药率为 10%, 其中的原因有待进一步的探讨。

2.2 PA 分离菌株致病性相关基因的分析

以提取到的 PA 基因组 DNA 为模板, PA 外毒素基因(*toxA*、*exoS*、*exoU*) 对应的引物和 PCR 反应条件进行了 PCR 扩增, 结果(表 2) 显示受试 MDR PA 菌株均为 *toxA* 和 *exoU* 基因缺失菌株, 其中 50% 菌株含有 *exoS* 基因。进一步分析发现 *exoS*⁺/*exoU*⁻ 与 *exoS*⁻/*exoU*⁻ 型菌株耐药性无显

表 1 PA 分离菌株的抗菌素药物敏感性

Tab. 1 Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to nine antimicrobial agents belonging to six drug classes

菌株	磺胺类		β-内酰胺类	利福平类	四环素类	氨基糖苷类			氯霉素类
	甲氧氨苄啉	复方新诺明	氨苄西林	利福平	四环素	链霉素	庆大霉素	卡那霉素	氯霉素
<i>P. aeruginosa</i> CN2E5	R	I	R	R	R	R	S	R	R
<i>P. aeruginosa</i> CN2E7	R	I	R	R	R	R	I	R	R
<i>P. aeruginosa</i> CN2E9	R	R	R	R	R	R	S	R	I
<i>P. aeruginosa</i> CN2E12	R	S	R	R	R	I	S	R	I
<i>P. aeruginosa</i> CN2F1	R	R	R	R	R	R	S	R	R
<i>P. aeruginosa</i> CN2F2	R	R	R	R	R	R	S	R	R
<i>P. aeruginosa</i> CN2F3	R	S	R	R	R	R	S	R	I
<i>P. aeruginosa</i> CN2F4	R	S	R	R	R	S	S	R	I
<i>P. aeruginosa</i> CN2F5	R	R	R	R	R	S	I	R	R
<i>P. aeruginosa</i> CN2F6	R	S	R	R	I	S	R	R	S
<i>P. aeruginosa</i> CN2F7	R	I	R	R	R	I	S	R	I
<i>P. aeruginosa</i> CN2F8	R	I	R	R	I	I	S	R	S
<i>P. aeruginosa</i> CN2F9	R	S	R	R	I	R	S	R	S
<i>P. aeruginosa</i> CN2F10	R	R	R	R	R	R	S	R	R
<i>P. aeruginosa</i> CN2F11	R	I	S	R	R	R	S	I	I
<i>P. aeruginosa</i> CN2F12	R	I	R	R	R	R	R	R	I
<i>P. aeruginosa</i> CN2G1	R	S	R	R	I	I	S	R	S
<i>P. aeruginosa</i> CN2G6	R	S	R	R	R	I	S	R	S
<i>P. aeruginosa</i> CN2G7	R	I	R	R	R	R	I	R	I
<i>P. aeruginosa</i> CN2G11	R	R	I	R	R	R	S	S	S
耐药率 100%	100%	30%	90%	100%	80%	60%	10%	90%	30%

注: R 表示抗性;S 表示敏感;I 表示介于抗性和敏感之间。

表 2 PA 分离菌株致病性相关基因的分析

Tab. 2 Toxic genes involved in pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates

菌株	<i>toxA</i> (950 bp)	<i>exoS</i> (1 142 bp)	<i>exoU</i> (1 912 bp)
<i>P. aeruginosa</i> CN2E5	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2E7	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2E9	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2E12	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F1	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F2	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F3	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F4	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F5	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F6	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F7	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F8	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F9	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F10	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F11	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F12	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2G1	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2G6	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2G7	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2G11	-	-	-

著性差异 ($P > 0.05$), 这与临床分离菌株的报道一致^[27]。然而,本研究 PA 菌株的毒性基因型与临床分离菌株不同,PA 临床分离菌株常以

$exoS^+/exoU^-$ (侵染型) 和 $exoS^-/exoU^+$ (细胞毒型) 形式存在,在 T3SS 阳性菌株中,这两类毒性比例在国内外研究中较为一致,分别约为 75% 和 20%,只有约 5% 的 $exoS^-/exoU^-$ 缺失型菌株^[26-27]。本研究结果显示 $exoS^+/exoU^-$ 型占 50%,而未发现 $exoS^+/exoU^+$ 和 $exoS^-/exoU^+$ 基因型,而 $exoS^-/exoU^-$ 缺失型占 50%,提示 *exoU* 基因的获得与环境野生型转变为临床致病性 PA 可能相关。

2.3 PA 分离菌株固有耐药性相关基因的分析

RNCDS 基因的 PCR 检测结果(表 3)表明,受试 MDR PA 菌株均不含有 MexEF-OprN 外排泵,而其余 6 种外排泵全部或部分被检测出。MexEF-OprN 介导氯霉素、喹诺酮类和甲氧苄啉耐药性^[16],而受试 PA 菌株对甲氧苄啉和氯霉素的耐药率分别为 100% 和 30%,推测本研究从养殖水体环境中分离的 PA 对甲氧苄啉抗性机制与 MexEF-OprN 可能不相关。MexAB-OprM 是最普遍的外排泵,它介导 β-内酰胺类、四环素、氯霉素、喹诺酮类、新生霉素、大环内酯类、磺胺类抗菌素、燃料、清洁剂等的抗性^[30-35];MexXY-OprM 则介导对氨基糖苷类、红霉素、喹诺酮类耐受^[15],而 MexVW-OprM 却介导

氟喹诺酮类,四环素,氯霉素,红霉素,溴化乙锭,吡啶黄的抗性^[13]。本研究检测出 MexAB-OprM, MexXY-OprM 和 MexVW-OprM 外排泵系统,由此可推断,受试 PA 菌株对 β -内酰胺类,氨基糖苷类,四环素,氯霉素的高度耐药性与上述 3 种外排泵相关。MexKJ-OprM 介导三氯生抗性,在自然界中三氯生分解迅速。因此,细菌对其产生抗性的机会较小,本研究在受试 MDR PA 菌株中亦未检测到 MexKJ 基因。在 MexCD-OprJ 外排泵中只检测出 *oprJ* 基因,而 *mexCD* 基因为阴性。MexCD-OprJ 介导喹诺酮类、氯霉素、大环内酯类、四环素和第四代头孢菌素抗性^[12]。有研究指出

OprM 可替代 OprJ 形成 MexCD-OprM 系统^[28]。鉴于 MexAB-OprM、MexXY-OprM 和 MexVW-OprM 系统亦能介导此类抗菌素抗性,因此,本研究中 *mexCD* 基因的缺失对于 MexCD-OprJ 系统功能的影响尚无法确定。同样,在 MexGHI-OpmD 外排泵中只检测出 *opmD* 基因,未检测出 *mexGHI* 基因。MexGHI-OpmD 能调控群体感应效应信号分子 N-酰化高丝氨酸内酯合成,影响菌体的群体感应效应,进而影响菌体的抗性^[29],因此,推测 PA 菌株的多药抗性可能与群体感应效应介导的抗性无相关性。

表 3 PA 分离菌株固有耐药性相关基因的分析

Tabl. 3 Genes involved in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates

菌株	β -内酰胺酶	7 种多药外排泵系统						
	ampC (671 bp)	MexAB-OprM (3 039 ~ 1 023 bp)	MexVW-OprM (1 551 ~ 1 023 bp)	MexXY-OprM (437 ~ 1 023 bp)	MexJK-OprM (1 218 ~ 1 023 bp)	MexCD-OprJ (1 680 ~ 719 bp)	MexEF-OprN (935 ~ 424 bp)	MexGHI-OpmD (2 303 ~ 938 bp)
<i>P. aeruginosa</i> CN2E5	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2E7	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2E9	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2E12	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2F1	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2F2	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2F3	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2F4	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2F5	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2F6	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2F7	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2F8	+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2F9	+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2F10	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2F11	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2F12	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2G1	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2G6	+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2G7	+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
<i>P. aeruginosa</i> CN2G11	-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+

AmpC 酶水解第一至第三代头孢菌素、 β -内酰胺类抗菌素等^[30]。本研究检测出 20% PA 菌株为 *ampC* 基因阳性,而受试菌株中氨苄西林抗性率为 90%。鉴于 *ampC* 基因亦能存在于染色体外的质粒上^[31],这可能是 *ampC* 基因阳性菌株明显少于氨苄西林抗性菌株的原因之一。外排泵与 *ampC* 基因、T3SS 系统及整合子之间存在的相互作用影响着菌体的抗性和毒性^[32-35]。因此,外排泵与 PA 抗药性之间的相关性尚需转录组与

调控组的进一步验证。

2.4 PA 分离菌株获得性耐药相关基因的分析

根据整合酶基因序列可将整合子分为 I-IV 类,它们自身不能移动,但可由质粒和转座子介导其携带的耐药基因的转移^[36]。有研究指出 PA 临床分离菌株的耐药和多重耐药性与 I 型整合子密切相关^[18]。本研究利用 I-III 型整合子基因 *comINT* 兼并引物进行 PCR 扩增,结果(表 4)发现受试 PA 菌株均为 *comINT* 基因阴性,提示 PA

的耐药性可能与整合子外的其它 MGEs 相关。

ICEs 在宿主染色体上占有很大比重,携带大量基因信息,使宿主对环境胁迫获得适应性。研究发现所有 ICEs 均由维持,散播和调控 3 个模块构成^[18]。本研究对 ICEs 保守模块功能基因的 PCR 扩增结果(表 4)显示,受试 PA 菌株均含有维持模块的 *int* 和 *soj* 基因,以及散播模块的 *pilS* 和 *pilD* 基因,提示 PA 菌株携带的 ICEs 具有横向基因转移(horizontal gene transfer)的潜力。可是,

从 PA 菌株中均未检测出 ICE PI 所携带的 *cupD* 及其调控基因 *rcsC*, *pvrR*, *pvrS*, 推测 PA 所含有的 ICEs 不携带致病菌,但是否携带抗性基因簇有待进一步验证。迄今为止,国外仅有文献[18]有关 PA 中存在 ICE 元件的报道,国内尚未见报道。本研究首次从养殖水体中的 MDR PA 分离菌株中发现了 ICEs 保守模块的功能基因,为进一步探索 PA 携带的 ICEs 介导 MDR 基因的散播奠定了基础。

表 4 PA 分离菌株携带遗传移动元件的分析

Tab. 4 Mobile genetic elements carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates

菌株	整合子			整合接合元件				
	<i>comINT</i> (491 bp)	<i>int</i> (1 300 bp)	<i>soj</i> (562 bp)	<i>PilS</i> (404 bp)	<i>pilD</i> (715 bp)	<i>cupD</i> (2 015 bp)	<i>rcsBC</i> (2 630 bp)	<i>pvrS</i> (1 249 bp)
<i>P. aeruginosa</i> CN2E5	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2E7	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2E9	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2E12	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F1	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F2	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F3	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F4	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F5	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F6	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F7	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F8	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F9	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F10	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F11	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2F12	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2G1	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2G6	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2G7	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> CN2G11	-	+	+	+	+	-	-	-

参考文献:

- [1] BREIDENSTEIN E, FUENTE-NUNEZ DE LA, HANCOCK C. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance[J]. Trends in Microbiology, 2011,19(8): 419-426.
- [2] CAO B, WANG H, SUN H, et al. Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Hospital Infection, 2004,57(2): 112-118.
- [3] 崔来宾. 铜绿假单胞菌的鉴定及重组外膜蛋白免疫效果的初步研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2010.
- [4] 陶保华,石和荣,黄俊文,等. 假单胞菌引起罗氏沼虾黄鳃、黑鳃病的研究[J]. 中山大学学报:自然科学版, 2000,39(1):255-259.
- [5] HAUSER A R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection [J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(9): 654-665.
- [6] FILLoux A. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an essay on diversity, evolution, and function[J]. Frontier in Microbiology, 2011(2): 155.
- [7] CUNNAC S, LINDEBERG M, COLLMER A. *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions[J]. Current Opinion in Microbiology, 2009,12(1): 53-60.
- [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]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2008, 14(4): 330 – 336.
- [9] GENDRIN C, CONTRERAS-MARTEL C, BOUILLOT S, et al. Structural basis of cytotoxicity mediated by the type III secretion toxin exoU from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(4): e1002637.
- [10] PENA A, DONATO A M, ALVES A F, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase VIM-2 in a central hospital from Portugal [J]. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2008, 27(12): 1269 – 1271.
- [11] OZER B, DURAN N, ONLEN Y, et al. Efflux pump genes and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit [J]. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 2012, 65(1): 9 – 13.
- [12] OKAMOTO K, GOTOH N, NISHINO T. Extrusion of penem antibiotics by multicomponent efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(8): 2696 – 2699.
- [13] LI Y, MIMA T, KOMORI Y, et al. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 52(4): 572 – 575.
- [14] CHUANCHUEN R, NARASAKI C T, SCHWEIZER H P. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan [J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(18): 5036 – 5044.
- [15] MASUDA N, SAKAGAWA E, OHYA S, et al. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(12): 3322 – 3327.
- [16] MASEDA H, YONEYAMA H, NAKAE T. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(3): 658 – 664.
- [17] MARTINEZ E, MARQUEZ C, INGOLD A, et al. Diverse mobilized class 1 integrons are common in the chromosomes of pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(4): 2169 – 2172.
- [18] WOZNIAK R A, WALDOR M K. Integrative and conjugative elements; mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(8): 552 – 563.
- [19] 顾兵,童明庆,宁明哲. 南京地区铜绿假单胞菌的整合子流行性调查 [J]. *临床检验杂志*, 2006, 24(2): 118 – 21.
- [20] QIU X, GURKAR A U, LORY S. Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(52): 19830 – 19835.
- [21] 杨维青,李石. 三类整合酶基因(intI)的简并引物PCR方法建立及应用 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25(2): 156 – 159.
- [22] CARTIER M Q, CHEN J, LORY S. The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred via a novel type IV pilus [J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(13): 3249 – 3258.
- [23] MIKKELSEN H, BALL G, GIRAUD C, et al. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators [J]. *PLoS One*, 2009, 4(6): e6018.
- [24] 胡梦红. 抗生素在水产养殖中的应用、存在的问题及对策 [J]. *水产科技情报*, 2006, 33(5): 217 – 221.
- [25] 李文广,陈海. 391株铜绿假单胞菌感染的耐药性分析 [J]. *中国热带医学*, 2008, 8(12): 2227 – 2228.
- [26] 陈媛媛,孙志,张学英,等. 388株铜绿假单胞菌的耐药性分析 [J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(2): 336 – 337.
- [27] 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.
- [28] GOTOH N, TSUJIMOTO H, NOMURA A, et al. Functional replacement of OprJ by OprM in the MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *FEMS Microbiology Letter*, 1998, 165(1): 21 – 27.
- [29] AENDEKERK S, GHYSELS B, CORNELIS P, et al. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium [J]. *Microbiology*, 2002, 148(8): 2371 – 2381.
- [30] NI M, ZHANG D, QI J. Analysis of AmpC beta-lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Huazhong University Science and Technology Medicine Science*, 2005, 25(1): 17 – 9, 23.
- [31] MOHAMUDHA P R, HARISH B N, PARIJA S C. Molecular description of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among nosocomial isolates of *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* from six different hospitals in India [J]. *Indian Journal of Medical Research*, 2012, 135: 114 – 119.
- [32] TOMAS M, DOUMITH M, WARNER M, et al. Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(5): 2219 – 2224.
- [33] LINARES J F, LOPEZ J A, CAMAFEITA E, et al. Over-expression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(4): 1384 – 1391.
- [34] JIN Y, YANG H, QIAO M, et al. MexT regulates the type

- III secretion system through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(2): 399–410.
- [35] PENA C, SUAREZ C, TUBAU F, et al. Nosocomial outbreak of a non-cefepime-susceptible ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain overexpressing MexXY-OprM and producing an integron-borne PSE-1 beta-lactamase [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(8): 2381–2387.
- [36] STOKES H W, MARTINEZ E, CHOWDHURY P R, et al. Class 1 integron-associated spread of resistance regions in *Pseudomonas aeruginosa*: plasmid or chromosomal platforms [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(7): 1799–1800.

Pathogenicity and multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from fishery pond

YU Pan^{1,2,3}, JIN Hao^{1,2,3}, PAN Ying-jie^{1,2,3}, LI Bai-lin^{1,2,3}, SONG Yu-ze^{1,2,3}, JIN Lan-lan^{1,2,3}, CHEN Lan-ming^{1,2,3}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Preservation, Quality Control and Risk Assessment of Aquatic Products, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China; 3. Engineering Centre for Quality Control and Risk Assessment of Aquatic Products, Shanghai 201306, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate virulence and drug resistant mechanism of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (PA) isolated from water sample of fishery pond, in order to provide scientific support for practical aquaculture disease treatment, effective management of aquaculture environment and aquatic food safety control. Antimicrobial susceptibility of PA isolates under this study were examined by using standard Kirby Bauer disk diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (USA, 2010 Edition), showing distinct susceptibility to nine antimicrobial agents belonging to six drug classes tested. All PA isolates were resistant to trimethoprim and rifampin, of which, 90% were to ampicillin and kanamycin, and 10% were to gentamycin. The genes involved in pathogenicity, intrinsic and transferred antibiotic resistance were detected by polymerase chain reaction (PCR). The *toxA* and *exoU* genes were absent from the PA isolates tested, 50% of which were *exoS*⁺/*exoU*⁻ infectious genotype, and none of which were *exoS*⁻/*exoU*⁺ cell toxic genotype that usually existed in clinical PA isolates. Subsequent analysis revealed that the multidrug efflux pumps including MexAB-OprM, MexXY-OprM and MexVW-OprM were present in all PA isolates, 20% of which were positive for ampC gene, whereas the other four efflux pumps including MexEF-OprN, MexJK-OprM, MexCD-OprJ and MexGHI-OpmD were fully or partially deficient. In addition, the comINT gene of class I-III integrons was negative in the PA isolates, however, the functional genes (*int*, *soj*, *pilS2*, *pilD*) of conserved module structures of integrative conjugative elements (ICEs) were detected positive, suggesting possible transfer activity of the ICEs detected in the PA isolates. This study revealed the major mechanism under multidrug resistance of the PA isolates mediated by efflux pumps encoded by chromosome genes, and constituted the first evidence for mobile genetic element ICEs in PA isolates of environmental origin.

Key words: fishery pond; *Pseudomonas aeruginosa*; pathogenicity; multidrug resistance