

铜绿假单胞菌 QS 系统调控基因和毒力基因的携带、表达及与耐药的相关性

周 凯¹, 时翠娟¹, 宋国滨², 黄 颖¹, 徐元宏¹

摘要 **目的** 探究临床分离铜绿假单胞菌常见群体感应(QS)系统调控基因和毒力基因的携带和表达情况及与耐药的相关性。**方法** 收集检验科各类临床标本中分离出的铜绿假单胞菌 97 株,应用 vitek2-compact 仪器法及标准纸片扩散法检测抗菌药物的耐药性,运用聚合酶链式反应(PCR)方法检测 4 种 QS 系统调控基因及 7 种毒力基因的携带情况,对结果做统计学分析;荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测调控基因 LasI、RhIR 和毒力基因 exoS、PCN 的表达情况,对两类基因的相对表达量进行线性分析。**结果** 97 株分离株对 11 种抗菌药物的耐药率:妥布霉素、庆大霉素、阿米卡星的耐药率小于 10% 且阿米卡星最低为 2.06%,对其余药物耐药率均在 11% 以上,最高的为亚胺培南 25.77%,43 株为多重耐药菌株,且呼吸系统来源的菌株对抗菌药物耐药性更高。PCR 基因检测结果显示:4 种 QS 系统调控基因 LasI、LasR、RhIR、RhIR 检出率均为 100%;7 种毒力基因检出率最高的为 exoT 98.97% (96/97),最低的为 exoU 13.40% (13/97),PCN 43.30% (42/97),其余毒力基因检出率皆在 86% 以上。未携带毒力基因的菌株对头孢他啶等 6 种抗菌药物耐药,携带有 7 种毒力基因的菌株对头孢他啶耐药。PCN、exoS、exoU 阳性菌株中,非多重耐药铜绿假单胞菌(NMDR-PA)所占比例更高;PCN+菌株对哌拉西林/他唑巴坦耐药率更高且差异有统计学意义;与 exoS+/exoU-菌株相比,exoS-/exoU+菌株耐药的抗菌药物种类明显下降。NMDR-PA 中调控基因 rhIR、LasI 的相对表达量更高且 LasI 的差异有统计学意义;调控基因 rhIR 与毒力基因 exoS、调控基因 LasI 与毒力基因 PCN 之间的表达呈正向线性关系。**结论** 铜绿假单胞菌耐药现象仍较严重且表现多重耐药,调控基因稳定存在于菌株中,除 exoU、PCN 外,其余毒力基因 exoS、exoT、exoY、ToxA、LasB 携带率均较高,调控基因 rhIR、LasI 能正向调节毒力基因的表达,QS 系统调控基因与毒力基因均会影响铜绿假单胞菌的耐药性。

关键词 铜绿假单胞菌;耐药性;群体感应系统;毒力基因

中图分类号 R 446.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)05-0748-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.014

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)因产绿脓素而旧称绿脓杆菌,是一种无孢子、专性需氧、运动和氧化酶阳性的革兰阴性杆菌,被认为是最重要的机会致病菌之一,极易在免疫功能低下患者体内滋生^[1]。研究^[2]表明,PA 可以分泌外毒素、弹性蛋白酶、胞外酶等多种毒力因子,在感染中起重要作用,同时对不同抗生素产生抵抗性也是毒力因子的一个属性。而群体感应(quorum sensing, QS)系统是 PA 通过产生小的可扩散分子来增加其毒力的机制,可以调节毒力和营养获取相关的一系列基因^[3],也会影响抗菌药物的敏感性。且伴随着当前 PA 耐药情况的加剧,新型药物如毒力因子抑制剂、群体感应系统抑制剂的研发已成为治疗 PA 的新方向。该研究着重分析了 PA 对 11 种临床常用抗菌药物的耐药性,对 PA 常见的 QS 系统调控基因和毒力基因的携带、表达情况进行检测,分析两者与耐药的相关性,并验证了 QS 系统与毒力基因之间的调控关系,为临床更有效地治疗 PA 感染提供思路与依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集安徽医科大学第一附属医院检验科 2020 年 6 月—12 月 PA 97 株,其中呼吸系统来源的 46 株(痰液 39 株、纤支镜灌洗液 7 株),其他系统来源的 51 株(创面 9 株、分泌物 15 株、尿液 15 株、血液 6 株、导管 3 株、引流液 2 株、组织 1 株),同一患者相同部位分离株已剔除。对照菌株为本实验室保存的 PA 标准菌株;质控菌株为大肠埃希菌 ATCC8739、PA ATCC27853,均来自本科室。

1.2 仪器和试剂 哥伦比亚血平板(合肥天达诊断试剂有限公司);VITEK-MS 质谱仪、Vitek2-Compact 微生物鉴定仪(法国生物梅里埃公司);药敏纸片(英国 Oxoid 公司);Tap PCR Master Mix、扩增引

2022-03-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171606)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

² 同济大学附属东方医院检验科,上海 200123

作者简介:周 凯,男,硕士研究生;

徐元宏,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail:xyhong1964@163.com

物、琼脂糖、DNA 分子量标准、TRIzol 试剂、逆转录试剂盒、qPCR Master mix (上海生工生物工程股份有限公司); LifeECO 基因扩增仪 (杭州博日科技有限公司); 凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD 公司); 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪 cobas z 480 (罗氏分子有限公司)。

1.3 菌株鉴定及药物敏感性实验 选取菌株后在血平板上分区划线接种培养,待长出菌落后用质谱仪进行重新鉴定。鉴定明确后应用 Vitek2-Compact 仪进行药敏试验,缺少的抗菌药物用纸片扩散 (K-B) 法补全,以 2020 年美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) 文件为参照进行药敏结果判读及统计。

1.4 QS 系统调控基因及毒力基因检测

1.4.1 DNA 模板的制备 将鉴定后的菌株再次进行接种、孵育培养留取菌落,采用煮沸法获取基因扩增所需 DNA 模板,整个过程防止污染,避免影响后续操作及结果。

1.4.2 基因扩增及电泳 基因种类及 PCR 引物序列 (表 1) 根据文献^[4-5] 获得,并委托上海生工生物工程股份有限公司合成,目的基因扩增总体系为 25 μ l, 热循环参数:初始变性 95 $^{\circ}$ C、5 min;95 $^{\circ}$ C、30 s, 53 ~ 69 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C、60 s, 循环 35 个周期;最终 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,产物置于 4 $^{\circ}$ C 待电

泳。每株各取 10 μ l PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统观察电泳结果并留存图像。

1.4.3 核苷酸序列测定与分析 将扩增的阳性 PCR 产物委托上海生工生物工程股份有限公司进行测序。将所测序列与 NCBI 数据库收录的基因序列作比对。

1.5 调控基因及毒力基因表达水平检测 根据电泳及测序结果筛选出基因型相同的 28 株 PA (其中 14 株为多重耐药 PA (multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDR-PA)) 于温箱摇菌过夜,运用 TRIzol 法提取 RNA,检测其浓度、纯度后进行逆转录。并对其中两种调控基因 (LasI, rhIR), 两种毒力基因 (exoS, PCN) 进行 qRT-PCR 检测, qRT-PCR 引物序列见表 2。过程中以 16S rRNA 作为内参基因, PA 标准菌株作为对照组。荧光定量完成后采用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各菌株基因的表达水平。

表 2 qRT-PCR 调控基因及毒力基因引物

基因	引物序列 (5'-3')
rhIR	F: TTGAGGATCGCCGATCCAC
	R: TGCAGCCGATCCACGACAGC
LasI	F: AATTGGTCGGCGCGAAGAGTTC
	R: AGGTGTTCTTCAGCATGTAGG
exoS	F: CGAGGTCAGCAGATATCCG
	R: GTAGAGACCAAGCGCCATCA
PCN	F: CCGACAACCTGGAATTGCGT
	R: CCGCTTTCCGTGGTCCAGTT
16S rRNA	F: TCTAAGGAGACTGCCGGTGA
	R: CAGCTGCGATCCGGACTAC

表 1 QS 系统调控基因及毒力基因引物序列

基因	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)	退火温度 ($^{\circ}$ C)
LasR	F: AAGTGGAAATGGACTGGAG	130	55
	R: GTAGTTGCCGACGACGATGAAG		
LasI	F: CGTGCTCAAGTGTTCAGG	295	54
	R: TACAGTCGGAAGAGCCAG		
rhIR	F: TGCATTTATCGATCAGGCG	133	53
	R: CACTTCCTTTTCCAGGACG		
rhII	F: TTCATCCTCTTATGCTCTCC	156	53
	R: TTCCAGCGATTACAGAGAGC		
ToxA	F: GGCTGTCCAGCGCACCGCC	336	69
	R: GCCGATCAGCGGTTCCACCTC		
LasB	F: CGCTTGACCTGTTGTTCCGTTG	446	62
	R: AACTGGTGATCCGCTGGGCG		
PCN	F: TGCCGGTACGACTCAGAGTG	231	62
	R: GTTCTGGCTTCTCGAGGGGT		
exoS	F: TCAGGTACCGGCATTCACGCGG	572	64
	R: CACTGCAGGTTCTGACGCTCTTTTA		
exoY	F: TCCAAGCTTATGCGTATCGACGGTATC	730	65
	R: CGTATCGATCCGAGGGGGTGTATCTGACC		
exoT	F: AGAACCCGCTTTCTGCTGGCTAGTT	351	64
	R: CAGCTCGCTCGGCTTGGCAAGT		
exoU	F: CCTTAGCCATCTCAACGGTAGTC	911	61
	R: GAGGCGAAGCTGGGAGCTA		

1.6 统计学处理 使用 SPSS 20.0 软件进行分析,对调控基因及毒力基因与耐药性的相关性分别应用 t 检验、 χ^2 检验进行分析,利用线性相关系数分析调控基因 LasI, rhIR 与毒力基因 exoS, PCN 的关系,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PA 对 11 种常见抗菌药物的耐药率及分析

97 株 PA 对 11 种常见抗菌药物的耐药率最高的为亚胺培南 25.77%, 其次为氨曲南 24.74%, 最低为阿米卡星 2.06%, 见表 3。其中 43 株为 MDR-PA 且多数对四种及以上抗菌药物耐药。根据标本来源不同分为呼吸系统 (痰、纤支镜) 来源和其他部位来源两大类, 呼吸系统来源的菌株对抗菌药物的耐药率相对更高, 且对氨曲南、头孢他啶、哌拉西林/他唑巴坦耐药率的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4。

表3 97株PA对11种抗菌药物的药敏结果[n(%)]

抗菌药物	耐药	中介	敏感
阿米卡星	2(2.06)	1(1.03)	94(96.91)
妥布霉素	9(9.28)	1(1.03)	87(89.69)
庆大霉素	8(8.24)	6(6.19)	83(85.57)
氨曲南	24(24.74)	23(23.71)	50(51.54)
环丙沙星	22(22.68)	21(21.65)	54(55.67)
左氧氟沙星	21(21.65)	23(23.71)	53(54.64)
头孢吡肟	11(11.34)	19(19.59)	67(69.07)
头孢他啶	23(23.71)	11(11.34)	63(64.95)
美洛培南	17(17.52)	6(6.19)	74(76.29)
亚胺培南	25(25.77)	7(7.21)	65(67.01)
哌拉西林/他唑巴坦	15(15.47)	24(24.74)	58(59.79)

表4 不同来源PA对11种抗菌药物耐药性分析[n(%)]

抗菌药物	菌株来源		χ^2 值	P 值
	呼吸系统 来源(n=46)	其他系统 来源(n=51)		
阿米卡星	2(4.34)	0(0)	2.264	0.222
妥布霉素	4(8.70)	5(9.80)	0.035	1.000
庆大霉素	4(8.70)	4(7.84)	0.023	1.000
氨曲南	18(39.13)	5(9.80)	11.499	0.001
亚胺培南	16(34.78)	9(17.65)	3.712	0.054
美洛培南	11(23.91)	6(11.76)	2.469	0.166
头孢他啶	16(34.78)	7(13.73)	5.928	0.015
头孢吡肟	8(17.39)	3(5.88)	3.186	0.074
环丙沙星	13(28.26)	9(17.65)	1.554	0.213
左氧氟沙星	13(28.26)	8(15.69)	2.255	0.133
哌拉西林/他唑巴坦	13(28.26)	2(3.92)	10.960	0.001

2.2 QS 系统调控基因及毒力基因检测结果 QS 系统调控基因 *LasI*、*LasR*、*RhlI*、*RhlR* 均检出且检出率为 100%；7 种毒力基因也均被检出，检出率由高到低依次为 *exoT* 98.97% (96/97)，*exoY* 97.94% (95/97)，*ToxA* 97.94% (95/97)，*LasB* 96.91% (94/97)，*exoS* 86.60% (84/97)，*PCN* 43.30% (42/97)，*exoU* 13.40% (13/97)，PCR 阳性条带见图 1。

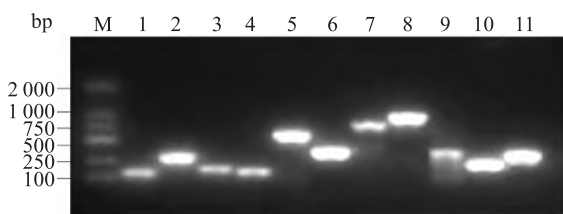


图1 QS 系统调控基因、毒力基因阳性条带图

M: marker; 1~11: *LasR*、*LasI*、*rhlI*、*rhlR*、*exoS*、*exoT*、*exoY*、*exoU*、*LasB*、*PCN*、*ToxA* 基因阳性条带

2.3 QS 系统调控基因及毒力基因测序分析 测

得的基因序列与 NCBI 基因库比对，一致率在 98% 以上。部分基因测序结果，见图 2~4。

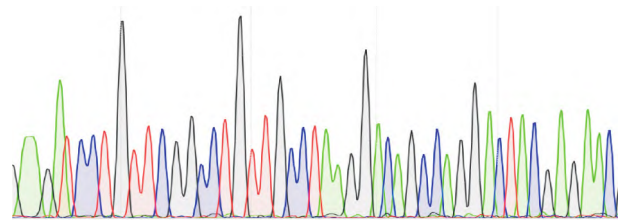


图2 LasR 基因测序图

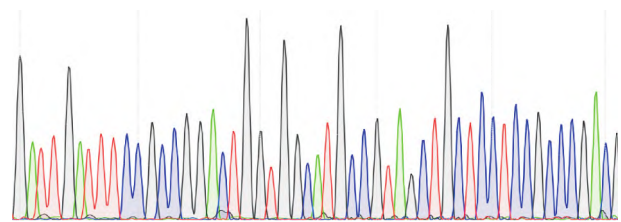


图3 exoU 基因测序图

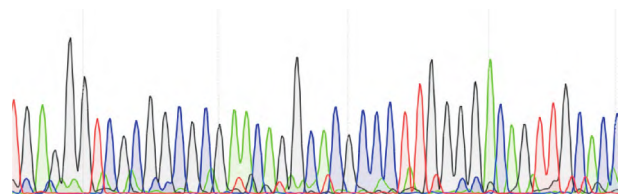


图4 PCN 基因测序图

2.4 毒力基因与耐药性的关系 携带不同毒力基因菌株的耐药性有所不同，其中未携带毒力基因的菌株对头孢他啶等 6 种抗菌药物耐药，携带有 7 种毒力基因的菌株对头孢他啶耐药；*PCN*、*exoS*、*exoU* 阳性菌株中，非多重耐药 *PA* (non-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, NMDR-*PA*) 所占比例更高；与 *PCN* - 菌株之相比，*PCN* + 菌株对头孢他啶、哌拉西林/他唑巴坦等药物的耐药率相对较高，且对哌拉西林/他唑巴坦的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；*exoS* + / *exoU* - 菌株对阿米卡星等大部分药物较 *exoS* - / *exoU* + 菌株耐药率相对更高，其中对头孢他啶、妥布霉素、庆大霉素的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；*PCN* - / *exoS* + / *exoU* - 与 *PCN* + / *exoS* + / *exoU* - 之间的耐药率也有所差异，其中 *PCN* + / *exoS* + / *exoU* - 对抗菌药物的耐药率更高，且对哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢吡肟、美洛培南耐药率的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 5。

2.5 调控基因和毒力基因表达水平及分析 调控基因 *LasI*、*rhlR* 在 28 株 *PA* 菌株中均有表达，表达水平见图 5，其中，与 14 株 MDR-*PA* 相比，NMDR-*PA*

表5 携带不同毒力基因的PA耐药性分析[n(%)]

抗菌药物	PCN 基因		P 值	exoS、exoU 基因		P 值	PCN、exoS、exoU 基因		P 值
	PCN +	PCN -		exoS + /exoU -	exoS - /exoU +		PCN - /exoS + /exoU -	PCN + /exoS + /exoU +	
	(n=42)	(n=55)		(n=83)	(n=12)		(n=51)	(n=32)	
阿米卡星	2(4.8)	0(0)	0.185	2(2.4)	0(0)	0.295	0(0)	2(6.3)	0.071
妥布霉素	4(9.5)	5(9.1)	1.000	7(8.4)	1(8.3)	0	3(5.9)	4(12.5)	0.291
庆大霉素	3(7.1)	5(9.1)	1.000	6(7.2)	1(8.3)	0.019	3(5.9)	3(9.4)	0.550
氨基糖苷	12(28.6)	11(20.0)	0.346	22(26.5)	1(8.3)	0.282	11(21.6)	11(34.4)	0.198
亚胺培南	13(31.0)	12(21.8)	0.354	19(22.9)	5(41.7)	0.284	9(17.6)	10(31.3)	0.151
美洛培南	10(23.8)	7(12.7)	0.184	14(16.9)	2(16.7)	0.986	5(9.8)	9(28.1)	0.030
头孢他啶	14(33.3)	9(16.4)	0.059	21(25.3)	0(0)	0.048	8(15.7)	13(40.7)	0.011
头孢吡肟	8(19.0)	3(5.5)	0.052	10(12.0)	0(0)	0.204	2(3.9)	8(25.0)	0.004
环丙沙星	9(21.4)	13(23.6)	0.813	20(24.1)	2(16.7)	0.568	11(21.6)	9(28.1)	0.497
左氧氟沙星	8(19.0)	13(23.6)	0.587	20(24.1)	1(8.3)	0.219	12(23.5)	8(25.0)	0.879
哌拉西林/他唑巴坦	12(28.6)	3(5.5)	0.002	14(16.9)	0(0)	0.123	4(7.8)	11(34.4)	0.002

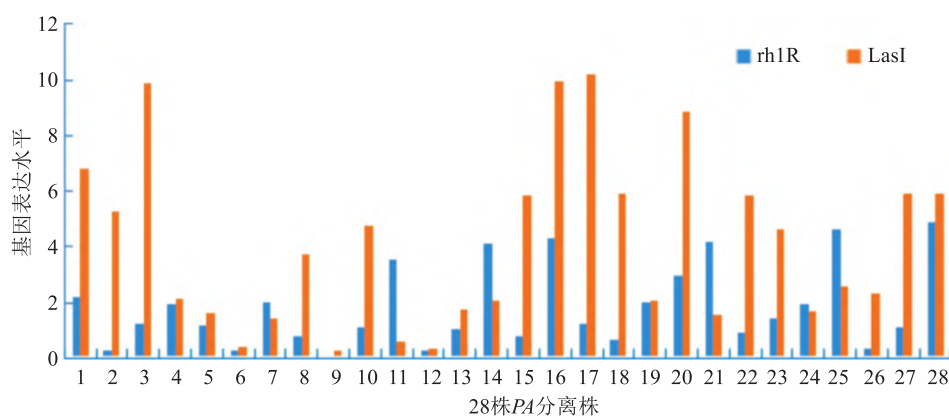


图5 28株PA调控基因rhIR、LasI表达水平

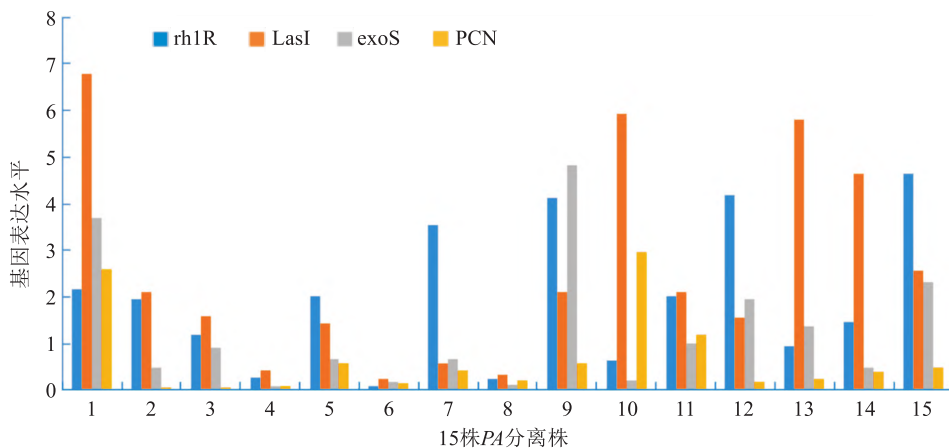


图6 15株PA调控基因rhIR、LasI及毒力基因exoS、PCN的表达水平

调控基因 rhIR、LasI 的相对表达量更高,且 LasI 的差异有统计学意义($P < 0.05$)。毒力基因 exoS 均有表达,而 PCN 表达不完全,随机挑选 15 株四种基因全部表达的菌株,分别分析两种调控基因与两种毒力基因相对表达量的关系,调控基因 rhIR 与毒力基因 exoS 之间的表达呈正向线性关系($P < 0.05$),相

关系数 $r = 0.685$;调控基因 LasI 与毒力基因 PCN 之间的表达呈正向线性关系($P < 0.05$),相关系数 $r = 0.692$ 。见图 6。

3 讨论

PA 是院内感染中最常见的病原菌之一,而且致

病及耐药机制复杂,对其防治是医务工作中的巨大挑战,因此对临床标本分离 *PA* 的研究具有重要价值。本文较国内其他相关分析报道,扩大了毒力因子范围并加入了对 QS 系统调控基因及 *PA* 耐药情况的监测。本研究中 97 株 *PA* 的耐药率与李国强^[6]监测的 *PA* 临床重点药物敏感率有所不同,其中对碳青霉烯类药物(亚胺培南、美洛培南)耐药率较头孢类药物(头孢他啶、头孢吡肟)高,考虑可能是不同地区对 *PA* 的耐药性产生影响。其中近 1/2 为 MDR-*PA*,且多数对四种及以上抗菌药物耐药,因此,重视药敏结果,选择有效的药物联合来抑制或杀灭 MDR-*PA* 是临床治疗其感染的有效方案^[7]。同时,该研究提示呼吸系统来源菌株的耐药性相对更高,与全国细菌耐药检测网的结果^[8]一致。

本研究选取了 *LasI*、*LasR*、*RhlI*、*RhlR* 四种调控基因进行检测,且检出率均为 100%,说明调控基因在 *PA* 中是稳定存在的,一般不会发生缺失。挑选两种调控基因 *LasI*、*RhlR* 进行表达量的检测,结果显示两者在 NMDR-*PA* 中表达量相对更高,且 *LasI* 的差异有统计学意义。同时结果显示调控基因能正向调控毒力基因的表达,由此可以看出 QS 系统在 *PA* 耐药及其毒力表达方面具有重要作用。目前已有研究^[9]提出抑制 QS 系统作为治疗 *PA* 的靶点,如近来 Abbas et al^[10]研究表明西格列汀作为一种新型的抗群体感应药物,可用于由 *PA* 造成感染的糖尿病或非糖尿病患者的预防和治疗,所以在治疗过程中应注意必要时抗群体感应药物的使用。

该研究根据毒力基因检出率及组合分析,未检测到毒力基因的菌株对头孢他啶等 6 种抗菌药物耐药,而含有 7 种毒力基因的菌株仅对头孢他啶耐药;前者耐药性明显高于后者,同时在 PCN、*exoS*、*exoU* 阳性菌株中,NMDR-*PA* 所占比例更高,这与调控基因 *RhlR*、*LasI* 在 NMDR-*PA* 中相对表达量更高较一致;因此推测 *PA* 可能存在高毒力低耐药的现象。*ToxA* 检出率为 97.94%,与相关报道^[4]类似。*lasB* 检出率为 96.91%,明显高于内蒙古地区^[11]检出率,这可能与菌株选择或地区分布有关;因此应重视对 *LasB* 的研究,探讨本地区有高检出率的原因,或许有利于对 *PA* 的监测与治疗。PCN 检出率为 43.30%,其中 PCN + 菌株对哌拉西林/他唑巴坦耐药率更高且差异有统计学意义。而 Dietrich et al^[12]已研究表明绿脓菌素可以上调外排泵 *mexGHI-opmD* 基因的表达,而外排泵系统是 *PA* 重要的耐药机制之一,同时有哌拉西林/他唑巴坦能够对 *PA* 外排泵系

统 *MexAB - OprM*、*MexXY - OprM* 影响的报道^[13],因此进行 PCN 阳性菌株对哌拉西林/他唑巴坦耐药性研究有一定的价值。

同时有研究^[14]表明 *PA* 致病的毒力因子主要来自 III 型分泌系统(T3SS),分泌 *exoT*、*exoY*、*exoS* 和 *exoU* 四种细胞毒素,*exoY*、*exoT* 在大多数菌株中都会表达,且毒性相对较弱;*PA* 一般只表达 *exoS* 或 *exoU* 其中的一种,且绝大多数以 *exoS* + /*exoU* - 的形式存在^[15],本研究结果与之也较为一致。且本研究表明 *exoS* + /*exoU* - 相比于 *exoS* - /*exoU* + 对多数抗菌药物的耐药性更强,与张秀彩等^[16]的研究结果不同,推测可能由两种毒力因子效应不同引起;*exoU* 毒性是 *exoS* 的 100 倍,因此 *exoS* + /*exoU* - 可以让宿主细胞维持更长的存活时间,让其获得更多接触抗菌药物的时间与机会,从而产生较强的耐药性。这也与前文推测的高毒力低耐药现象相吻合。同时,本研究将 PCN 联合 *exoS*、*exoU* 进行分析,与单独分析两者时的结果相比,*PA* 耐药率发生改变且有统计学意义的药物数量增加;说明各系统间不是彼此独立的,而是一个相互影响的整体,这也提示对 *PA* 的探索研究应努力做到全面细致。

参考文献

- [1] Elnegery A A, Mowafy W K, Zahra T A, et al. Study of quorum-sensing *LasR* and *RhlR* genes and their dependent virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from infected burn wounds [J]. Access microbiol, 2021,3(3):211.
- [2] Wang H, Tu F, Gui Z, et al. Antibiotic resistance profiles and quorum sensing-dependent virulence factors in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Indian J Microbiol, 2013,53(2):163-7.
- [3] Xiang Y, Ding Y, Cao J, et al. Non-antibiotic methods against *Pseudomonas aeruginosa* include QS inhibitors: a narrative review [J]. Ann Palliat Med, 2021,10(6):6926-35.
- [4] 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(9):672-7.
- [5] Jabalameli F, Mirsalehian A, Khoramian B, et al. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients [J]. Burns, 2012,38(8):1192-7.
- [6] 李国强.铜绿假单胞菌感染的临床分布特征及耐药情况分析[J].基层医学论坛,2018,22(20):2840-1.
- [7] 刘春都,朱叶飞.多重耐药铜绿假单胞菌联合药敏分析[J].医学综述,2019,25(22):4568-72.
- [8] 2019 年全国细菌耐药监测报告 [J]. 中国合理用药探索, 2021,18(3):1-11.
- [9] Jensen P Ø, Bjarnsholt T, Phipps R, et al. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* [J].

- Microbiology (Reading), 2007, 153 (Pt 5): 1329–38.
- [10] Abbas H A, Shaldam M A, Eldamasi D. Curtailing quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by sitagliptin[J]. Curr Microbiol, 2020, 77(6): 1051–60.
- [11] 张建忠, 赵子玲, 王俊瑞. 铜绿假单胞菌耐药基因及毒力因子分布特征分析[J]. 内蒙古医科大学学报, 2015, 37(S1): 321–4.
- [12] Dietrich L E, Price-Whelan A, Petersen A, et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Mol Microbiol, 2006, 61(5): 1308–21.
- [13] 杨祚明, 谭孟源, 符春花, 等. 哌拉西林他唑巴坦对多重耐药铜绿假单胞菌外排泵表达的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(17): 1572–6.
- [14] Ngo T D, Perdu C, Jneid B, et al. The PopN gate-keeper complex acts on the ATPase PscN to regulate the T3SS secretion switch from early to middle substrates in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Mol Biol, 2020, 432(24): 166690.
- [15] 杨君洋, 卢洪洲. 铜绿假单胞菌的致病性及耐药性研究近况[J]. 内科理论与实践, 2016, 11(2): 125–8.
- [16] 张秀彩, 张肖肖, 王忠永, 等. 铜绿假单胞菌中 T3SS 毒力基因分布、表达及与抗菌药物耐药相关性研究[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(1): 14–8.

Correlation of carriage and expression of QS regulatory genes and virulence genes with drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*

Zhou Kai¹, Shi Cuixiao¹, Song Guobin², Huang Ying¹, Xu Yuanhong¹

(¹Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical

University, Hefei 230022; ²Dept of Clinical Laboratory, East Hospital

Affiliated to Tongji University, Shanghai 200123)

Abstract Objective To investigate the correlation of carriage and expression of quorum sensing (QS) system regulatory genes and virulence genes with drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical sources. **Methods** A total of 97 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various clinical specimens in the laboratory were collected. Firstly, Drug-resistance were detected by the vitek2-compact instrument method and the standard disc diffusion method, 4 QS system-regulated genes and 7 virulence genes were detected by polymerase chain reaction (PCR). After that, the expression of regulatory genes LasI, RhIR and virulence genes exoS and PCN were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and moreover linearly analysis was used to analyze the correlation of the two types of genes. **Results** The resistance rates of 97 strains to 11 antibacterial drugs. The resistance rate of tobramycin, gentamicin, and amikacin was less than 10%, and the minimum amikacin was 2.06%. The resistance rate to the remaining drugs was all above 11%, and the highest was imipenem 25.77%, and 43 strains were multi-drug resistant bacteria, and the respiratory-derived strains were more resistant to antimicrobials. The results of PCR gene detection showed; the detection rates of the four QS system-regulated genes LasI, LasR, RhIR and RhIR were all 100%; the highest detection rate of 7 virulence genes was exoT 98.97% (96/97), and the lowest was exoU 13.40% (13/97), PCN 43.30% (42/97), and the rest were above 86%. The strains without virulence genes were resistant to 6 antibiotics including ceftazidime, and the strains with 7 virulence genes were only resistant to ceftazidime; among the PCN, exoS, and exoU positive strains, the proportion of non-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (NMDR-PA) was higher; PCN + strains were more resistant to piperacillin/tazobactam and the difference was statistically significant; compared with exoS + /exoU – strains, the types of antibiotics resistant to exoS – /exoU + strains decreased significantly. The relative expression levels of regulatory genes rhIR and LasI in NMDR-PA were higher and the difference of LasI was statistically significant; the expression of the regulatory gene rhIR and the virulence gene exoS and the regulatory gene LasI and the virulence gene PCN showed a positive linear relationship. **Conclusion** The drug-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* is still serious and multi-drug resistance. QS system regulatory genes exist in the strain stably, except for exoU and PCN, the other virulence genes exoS, exoT, exoY, ToxA and LasB have higher carrying rates, the regulatory genes rhIR and LasI positively regulate the expression of virulence genes, both QS system regulatory genes and virulence genes affect drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words *Pseudomonas aeruginosa*; drug resistance; quorum sensing system; virulence genes