

DOI:10.13350/j.cjpb.240726

• 综述 •

急性脑血管疾病铜绿假单胞菌感染现状及相关疫苗研究进展*

张菁¹, 武剑^{1,2,3*}

(1. 清华大学附属北京清华长庚医院神经内科, 清华大学临床医学院, 北京 102218;

2. 清华大学/IDG-麦戈文脑科学研究院; 3. 清华大学精准医学研究院)

【摘要】 铜绿假单胞菌是院内感染的主要病原菌, 其易发展成多重耐药菌和泛耐药菌。而急性脑血管疾病患者身体虚弱, 一旦感染铜绿假单胞菌将会导致治疗棘手。铜绿假单胞菌的耐药机制较复杂, 包括抗生素作用靶点改变、质粒介导、生物膜形成、外排机制和膜通透性改变等。研究铜绿假单胞菌的耐药机制, 有利于铜绿假单胞菌感染的治疗。铜绿假单胞菌有多种毒力因子, 其中的III型分泌系统和VI型分泌系统在铜绿假单胞菌感染中发挥着重要作用。铜绿假单胞菌的疫苗研究一直备受关注, 为预防铜绿假单胞菌感染提供了新的手段。

【关键词】 铜绿假单胞菌, 耐药机制, 分泌系统, 疫苗研究; 综述

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)07-0867-03

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jul.; 19(7): 867-868, inside back cover.]

Current status of *Pseudomonas aeruginosa* infection in acute cerebrovascular diseases and research progress on related vaccines

ZHANG Jing¹, WU Jian^{1,2,3} (1. Department of Neurology, Beijing Tsinghua Changgung Hospital, Tsinghua University, Beijing 102218, China; 2. IDG/McGovern Institute for Brain Research at Tsinghua University; 3. Institute for Precision Medicine, Tsinghua University, Changping District)

【Abstract】 *Pseudomonas aeruginosa* is the main pathogen of hospital infections, which is prone to develop into multidrug-resistant and pan resistant bacteria. Patients with acute cerebrovascular disease are physically weak, and once infected with *P. aeruginosa*, treatment can be challenging. The drug resistance mechanism of *P. aeruginosa* is complex, including changes in antibiotic targets, plasmid mediated, biofilm formation, efflux mechanism, and membrane permeability changes. Studying the drug resistance mechanism of *P. aeruginosa* is beneficial for the treatment of *P. aeruginosa* infection. *P. aeruginosa* has multiple virulence factors, among which the Type III and Type VI secretion systems play important roles in *P. aeruginosa* infection. The research on vaccines against *P. aeruginosa* has always been of great concern, providing new means for preventing *P. aeruginosa* infection.

【Keywords】 *Pseudomonas aeruginosa*; drug resistance mechanism; secretion systems; research on vaccines; review

***铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)又称绿脓杆菌, 属于假单胞菌科的革兰阴性菌, 1882年于伤口脓液中首次分离得到^[1]。菌体有1-3根鞭毛, 无芽胞, 能形成荚膜。PA具有较强的生存能力, 它能够在4~50℃条件下存活, 广泛存在于自然界, 如土壤、水、动物和植物等, 尤其适应于潮湿的环境^[2]。PA可以摄取有机物质作为食物, 不需要特殊的培养条件。它能够感染导致莴苣等导致软腐病, 也能使果蝇等致病。PA是人类重要的条件致病菌, 也是医院内感染的重要病原体之一, 它能够存活在医院的环境中, 如器械表面、人体组织、病房设施中等^[3]。2021年CHINET中国细菌耐药监测显示PA占总检出菌株数量的7.96%, 其中PA占不发酵革兰阴性杆菌的34.9%^[4]。免疫力低下患者、术后患者、烧伤患者、长期卧床患者、囊性纤维化患者、机械通气患者易由PA引发感染^[5]。PA具有多种毒力因子和胞毒素, 这些毒力因子可以帮助PA在人体定植和引发持续性感染。分泌系统是PA的重要组成部分, PA可以通过分泌系统获取所需的营养, 并且向外分泌毒素发挥其致病性。其中有研究显示III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)与临床严重感染有关, VI型分泌系统

(type VI secretion system, T6SS)其分泌的效应蛋白, 有较强的毒力效应^[6]。随着抗生素的广泛使用, PA对多种抗生素产生了不同程度的耐药性, 出现了多耐药和反耐药PA菌株, 这使得治疗更加棘手。本文对急性脑血管疾病PA感染现状, PA的耐药机制、分泌系统和疫苗研发进行概述。

1 急性脑血管疾病PA感染

急性脑血管疾病由脑血栓形成、血栓栓塞、脑实质血管破裂等多种原因造成的一类发病急骤的脑部血液循环障碍疾病。因而, 它大致可以分为梗塞性和出血性两大类。急性脑血管疾病临床体现为起病急骤, 出现失语、共济失调、瘫痪、眩晕和意识障碍等临床症状, 流行病学调查显示它已成为三大人类致死原因之一^[7]。随着生活质量和人均寿命的提高, 高血压、高血

* **【基金项目】** 首都卫生发展科研专项基金(No. 2020-1-2241)。

** **【通讯作者】** 武剑, E-mail: wujianxuanwu@126.com

【作者简介】 张菁(1993-), 女, 河北唐山人, 博士, 医师, 研究方向: 脑血管病。E-mail: fenxubanmu09ha@163.com

脂、动脉粥样硬化和心房颤动的发病率呈上升趋势,从而导致心脑血管疾病发病率随之上升。急性脑血管疾病可引起院内感染、误吸、心律失常、压疮和消化道出血等并发症。其中院内感染是急性心脑血管疾病患者住院期间的常见并发症,进一步加大了患者死亡风险,也影响了患者的康复。而肺部和呼吸道感染在急性脑血管疾病患者感染中占比较高,其次是泌尿系感染和消化道感染等。冯社军等^[8-9]研究显示青少年急性脑血管疾病患者医院获得性肺炎中以革兰阳性菌为主,中老年以革兰阴性菌为主,而其中铜绿假单胞菌是主要致病菌,这也国内其他研究相一致。

2 PA 耐药机制

病原菌引发的感染在治疗上以抗生素为主要手段,但是随着抗生素的广泛应用,出现了多耐药和反耐药 PA 菌株。PA 的耐药机制较为复杂,常见的有天然耐药,抗生素作用靶点改变、质粒介导、生物膜形成、外排机制和膜通透性改变等。PA 对氨基苄西林,阿莫西林、青霉素类、一代头孢菌素(头孢噻吩,头孢唑啉),二代头孢菌素(头孢呋辛),头孢霉素类(头孢西丁、头孢替坦),克林霉素,达托霉素,夫西地酸,糖肽类(万古霉素、替考拉宁),利奈唑胺,大环内酯类(红霉素、阿奇霉素、克拉霉素),奎奴普汀-达福普汀,利福平存在天然耐药^[10]。氨基糖苷类抗生素曾对 PA 具有较高的治疗效果,在治疗 PA 感染中发挥着重要作用,并曾作为一线用药广泛使用。近年来 PA 对氨基糖苷类抗生素产生耐药的现象不断被报道。氨基糖苷类抗生素因其分子结构都有一个氨基环醇类和一个或多个氨基糖分子。它们能够作用于细菌体内的核糖体,抑制蛋白质的合成,并破坏细菌细胞膜的完整性。PA 对氨基糖苷类抗生素产生耐药性,主要机制是钝化酶的产生。氨基糖苷修饰酶通过作用于特定的羟基或氨基,使氨基糖苷类抗菌药物发生钝化。如氨基糖苷乙酰基转移酶(AAC)、氨基糖苷磷酸化转移酶(APH)和氨基糖苷核苷酸转移酶(ANT)。它们广泛存在于 PA 多重耐药菌和泛耐药菌中。AAC 有 4 种同工酶,乙酰辅酶 A 是它们乙酰基的供体,分别为: AAC(1)、AAC(3)、AAC(2') 和 AAC(6')。它们作用位点分别为:氨基糖苷类抗生素的 2-脱氧链霉胺环的 1 位和 3 位,氨基己糖环的 2' 位和 6' 位上游离的氨基^[11]。APH 由多个具有不同功能的亚基组成,它能够使磷酸基团从腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)或其他磷酸供体转移出来,并与氨基糖苷类抗生素相结合,改变药物结构,从而使得抗生素失效。ANT 是一种能够将氨基糖苷类抗生素从细菌细胞中排出的酶,从而降低细菌对氨基糖苷类抗生素的敏感性。氨基糖苷类药物结合在细菌 30S 核糖体亚基位的 16S rRNA 的 A 位点中的基因,从而影响核糖体功能使得蛋白质合成过程移位抑制和转录错误,从而实现对细菌灭活。16S rRNA 甲基化酶可以使药物作用靶位甲基化,从而与氨基糖苷类药物亲和力下降,导致 PA 对临床常用氨基糖苷类抗生素高度耐药^[12]。 β -内酰胺酶能够使 β -内酰胺环裂解从而使 β -内酰胺抗生素失效。其中金属 β -内酰胺酶的活性部分是由金属离子构成,它可以水解包括碳青霉烯类的所有 β -内酰胺酶抗生素。金属 β -内酰胺酶可以借助在质粒、转座子和整合子在不通 PA 菌株间传播。PA 菌株常见的金属 β -内酰胺酶有: VIM 型、IMP 型、AIM 型、GIM 型和 SPM 型等。整合子是 DNA 结构组织,位于细菌细胞膜、细胞质或细胞核上的遗传物质。它是一种细菌耐药基因

水平传播机制。目前已发现的转座子约有 10 种类型,其中 5 种类型与抗生素耐药性的基因盒,可携带约 70 种耐药基因。外膜通透性与 PA 耐药性具有一定关系,有研究显示亚胺培南与 PA 的青霉素结合蛋白结合需要通过外膜孔蛋白 OprD 特异性介导,否则亚胺培南无法发挥抑菌作用。有研究显示对亚胺培南耐药且无 OprD 蛋白表达的 PA 转导 OprD 的质粒后,PA 再次表达 OprD 蛋白,其对亚胺培南敏感^[13]。因而 OprD 基因的突变、插入和/或缺失都是引起 PA 对碳青霉烯类抗生素耐药。生物被膜是细菌及其分泌胞外多糖等物质形成高度组织化、结构化膜状细菌群体,附着在腔道或上皮细胞表面而形成的一种复合物。它可以保护细菌不被宿主体免疫系统 and 抗生素侵害,它对抗生素的耐受性比其浮游菌显著提高。而由 PA 引起的慢性感染与它的生物膜的形成有关。进一步研究显示由于蛋白质合成主要场所是核糖体,核糖体、氨基酸、蛋白质与铜绿假单胞菌生物被膜形成、发展密切相关^[14]。外排泵系统又可称为又称药物主动转运系统,PA 中被发现的外排泵主要为抗药小结分裂区(Resistance nodulation division, RND)家族和主要促进剂超家族(Major facilitator super, MFS),它们由细菌染色体编码。RND 家族外排泵由三种成分组成分别为: OM 通道形成蛋白(OM 因子/OMF)、内膜药物质子逆向转运载体(RND 成分)和周质连接蛋白。外排泵通过改变外膜(Outer membrane, OM)通透性并能够将抗生素外排一种机制。PA 细胞膜可以将抗生素渗透到 OM 中使抗生素有效外流,从而保护 PA 免受抗生素伤害。若突变体缺乏 OM 蛋白则会使 PA 对抗生素过敏^[15]。mexXY 操纵子有 2 个开放阅读窗分别为 mexX 和 mexY,它们编码膜融合蛋白 MexX 和 RND 转运子 MexY。MexX 位于菌细胞的周浆间隙,诱导或稳定外膜蛋白的开放状态,可以将 MexY 识别的药物直接排出。MexY 位于细菌细胞膜上,能够识别并结合外排底物。MexXY 外排泵能够通过外排胞内药物介导 PA 天然耐药和获得性耐药。诱导 MexXY 高表达,PA 可外排氨基糖苷类、两性离子型头孢菌素、氯霉素、氟喹诺酮类、大环内酯类、四环素类等抗生素。编码基因 mexZ 编码 MexZ 蛋白,位于 mexXY 操纵子上游。MexZ 蛋白能够直接抑制 mexXY 转录或进入启动子结合点阻止 mexXY 转录,因而 mexZ 是 mexXY 的转录抑制因子^[16]。当编码基因 mexZ 突变, MexZ 结合 DNA 能力下降时, MexXY 表达水平增加。有研究显示敲除了 MexZ 的突变株 MexXY 表达水平增加,另一项研究显示 MexXY 高表达的 PA 菌株中缺乏 MexZ^[17]。

3 PA 分泌系统

PA 的致病力与其分泌系统分泌的多种毒力因子有关,这些毒力因子在 PA 定植和感染过程中发挥着至关重要的作用。T3SS 分泌效应蛋白可以向宿主内部输入毒性效应蛋白,它们可以破坏细胞信号通路,引起肌动蛋白细胞骨架重排、从而细胞凋亡,是导致宿主损伤的重要因素。T3SS 分泌效应蛋白能够进入细胞,降低宿主免疫力并引起细胞凋亡。它包含 exoS、exoT、exoU 和 exoY 等毒力基因,这些毒力基因可以编码 ExoS、ExoT、ExoU 和 ExoY 等效应蛋白。ExoS 能够参与宿主免疫调节抑制宿主细胞吞噬作用,而 ExoU 则是主要毒性蛋白能够引起细胞凋亡。当 ExoS 表达增加时,其他菌减少,PA 成为主要致病菌。ExoU 的早期表达与 PA 的感染严重程度有

关,当 ExoU 表达上调,则感染更加严重。因而,exoU 基因阳性的 PA 菌株感染患者一般情况下,PA 感染比较严重。有研究显示 PA 感染者分离出的菌株与环境中的 exoU 的基因携带情况具有显著差异^[18]。曾有研究认为 exoS 基因与 exoU 基因不能存在于同一菌株中,观点是位于细菌染色体同一位点;而另有研究认为 exoU 基因位于染色体基因岛上,exoS 基因则位于其他位置。越来越多研究表明,exoU 基因和 exoS 基因与 PA 菌株耐药存在一定关系。exoU 基因和 exoS 基因的 PA 菌株有:exoU+/exoS+,exoU+/exoS-,exoU-/exoS+和 exoU-/exoS-四种组合形式。其不同组合形式 PA 耐药情况存在一定差异^[19]。PA 的 T6SS 分泌效应蛋白能够向邻近的细菌传递毒素和蛋白效应因子,使它在细菌间竞争中起主要作用。它还能促进其生物被膜的形成,从而使 PA 在耐药性上发挥着重要作用。有研究显示 T6SS 基因群中的 pldA 基因编码的磷脂酶 A (PldA)能够向宿主细胞传递毒素^[20]。

4 PA 疫苗

PA 多耐药菌和泛耐药菌的出现使得治疗越来越棘手,因而研发 PA 疫苗是解决这一治疗困境有效手段^[21-24]。截至目前约有 60 种疫苗处于研发中,疫苗靶点包括胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、鞭毛、外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)、细菌毒素、外膜囊泡(outer membrane vesicle, OMV)等,根据技术路线不同可分为组分疫苗、全菌体灭活疫苗、减毒活疫苗、亚单位疫苗、载体疫苗^[25]。PA 的 EPS 结构简单且分子结构相对保守,感染者能够产生特异性抗体。将 PA 藻酸盐与一些载体蛋白连接制成的 EPS 疫苗在兔体内产生更高水平的抗藻酸盐抗体。LPS 是 PA 细胞膜外的主要成分脂质 A(lipid A)、核心寡糖(core oligosaccharide)和 O-抗原(O-antigen)构成。O-抗原是区分细菌血清型的主要结构成分,依据 O-抗原将分为 20 个血清型。而单一血清型疫苗只能预防该血清型的 PA 感染。鞭毛是 PA 运动的主要器官,可作为抗原。在小鼠实验中,大肠埃希菌表达纯化重组鞭毛蛋白 FliC 与 ETA 后制备的重组蛋白可提高体液免疫及细胞免疫水平。T3SS 分泌效应蛋白中的 PopB/PopD 能够在宿主细胞上形成孔道,向宿主释放毒力因子,而将 OMP 与 T3SS 分泌效应蛋白的靶点蛋白联用设计疫苗,可获得较高的保护力。

【参考文献】

[1] Hoggarth A, Weaver A, Pu Q, et al. Mechanistic research holds promise for bacterial vaccines and phage therapies for *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 909-924.

[2] Bicking Kinsey C, Koirala S, Solomon B, et al. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a neonatal intensive care unit attribute to hospital tap water [J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2017, 38 (7): 801-808.

[3] 王雪玉,田芳英,赵明. 全球铜绿假单胞菌医院感染暴发事件的流行特征与应对策略 [J]. *中国感染控制杂志*, 2022, 21 (12): 1171-1178.

[4] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2021 年 CHINET 中国细菌耐药监测 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2022, 22 (5): 521-530.

[5] Mazzotta M, Girolamini L, Pascale MR, et al. The role of sensor-activated faucets in surgical handwashing environment as a reservoir of *Legionella* [J]. *Pathogens*, 2020, 9 (6): 446.

[6] Salih O, He S, Planamente S, et al. Atomic structure of type VI

contractile sheath from *Pseudomonas aeruginosa* Structure. 2018, 26 (2): 329-336.

[7] 周华苏,陈伟丽,李美云. 急性脑血管病患者医院感染相关危险因素分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25 (7): 1576-1578.

[8] 冯社军,王慧娟,李军涛,等. 青少年与中老年急性脑血管病患者医院获得性肺炎的临床特征比较 [J]. *西部医学*, 2015, 27 (4): 501-504.

[9] 阿克拜尔·加马力,关玉华,曹莹莹. 急性脑血管病患者医院感染的病原学分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23 (6): 1319-1320.

[10] Clinical and laboratory standard institute. M100-S30 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Thirtieth informational supplement [M]. Wayne PA: CLSI, 2020: 43-45.

[11] 孔伟伟. 铜绿假单胞菌对氨基糖苷类抗生素的耐药性及相关耐药基因研究 [D]. 安徽医科大学, 2018.

[12] Wachino J, Yamane K, Shibayama K, et al. Novel plasmid-mediated 16srRNA methylase, rmtC, found in a proteus mirabilis isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50 (1): 178-184.

[13] Sherrard LJ, Wee BA, Duplancic C, et al. Emergence and impact of oprD mutations in *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis [J]. *J Cyst Fibros*, 2022, 21 (1): e35-e43.

[14] 廖黎,鲁兰,杨晨,等. 铜绿假单胞菌生物被膜基因表达生物学信息学研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 2022, 47 (10): 1084-1090.

[15] Aghayan SS, Kalalian MH, Fazli M, et al. The effects of berberine and palmatine on efflux pumps inhibition with different gene patterns in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn infections [J]. *Avicenna J Med Biotech*, 2017, 9 (1): 2-7.

[16] 鞠晓红,王月华,孙艳美. 铜绿假单胞菌 MexXY 外排泵调控机制研究进展 [J]. *中国抗生素杂志*, 2019, 44 (1): 40-46.

[17] Prickett MH, Hauser AR, McColley SA, et al. Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis results from convergent evolution in the mexZ gene [J]. *Thorax*, 2017, 72 (1): 40-47.

[18] Hu H, Harmer C, Anuj S, et al. Type 3 secretion system effector genotype and secretion phenotype of longitudinally collected *Pseudomonas aeruginosa* isolates from young children diagnosed with cystic fibrosis following newborn screening [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2013, 19 (3): 266-272.

[19] Ferreira ML, Dantas RC, Faria AL, et al. Molecular epidemiological survey in quinolone and carbapenem resistant genotype and its association with Type II Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Med Microbiol*, 2015, 64 (3): 262-271.

[20] Wettstadt S, Wood TE, Fecht S, et al. Delivery of the *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase effectors PldA and PldB in a VgrG- and H2-T6SS-dependent manner [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1718.

[21] 赵育林,鲍亚玲,于美荣,等. 医院铜绿单胞菌分布及耐药性分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2023, 18 (1): 82-85.

[22] 崔国艳,李壮,崔佳,等. 铜绿假单胞菌丙酸代谢关键酶基因的克隆表达及生物信息学分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2023, 18 (5): 547-551, 556.

[23] 袁果,程苗,杨杰. 铜绿假单胞菌分泌系统毒力基因携带及耐药性研究 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2023, 18 (5): 570-574.

[24] 石锋,李学兆,刘向前,等. 胸外科院内感染铜绿假单胞菌耐药性与耐药机制研究 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17 (10): 1184-1187.

[25] 欧兴坤,李文桂. 粪肠球菌介导的铜绿假单胞菌重组疫苗诱导小鼠的保护力及细胞免疫应答 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17 (4): 430-434.

【收稿日期】 2024-02-24 【修回日期】 2024-05-15