

广州市第一人民医院新生儿病区金黄色葡萄球菌 毒力基因分布分析

王 蓉, 陈紫茹, 唐露丹, 杨 潇 (广州市第一人民医院检验科, 广州 510180)

摘要: **目的** 了解广州市第一人民医院新生儿病区的金黄色葡萄球菌毒力基因的分布情况, 揭示其分子流行特征, 为进一步建立有效防控措施奠定基础。**方法** 选取2018年6月~2019年4月新生儿病区分离出金黄色葡萄球菌22株, PCR方法检测金黄色葡萄球菌纤维蛋白原结合蛋白(*clfa*)、胶原蛋白结合蛋白(*cna*)、纤维蛋白连接蛋白A(*fnbpA*)、溶血素A, B(*hlaA*, *hlaB*)基因、金黄色葡萄球菌A蛋白(*spa*)基因、*mecA*基因、表皮剥脱素(*eta*)基因和中毒性休克综合征毒素(*tsst-1*)基因。使用四格表资料和 $R \times C$ 表的 χ^2 检验进行统计学分析。**结果** 22株金黄色葡萄球菌中, 有6株未检测到所选择的9个基因。9个毒力基因中 *hlaB*, *eta* 和 *tsst-1* 基因检出率低于10% (分别为9.09%, 9.09%和4.55%), 随后依次为 *fnbpA* 基因(13.64%), *mecA* 基因(27.27%)和 *cna* 基因(45.45%)。*clfa*, *hlaA* 和 *spa* 基因检出率最高 (分别为68.18%, 63.64%和59.09%) 不同基因检出率差异具有统计学意义 ($\chi^2=240.21$, $P=0.000$)。*clfa+hlaA+spa+cna* 毒力基因模式检出率最高, 占25%, 差异具有统计学意义 ($\chi^2=69.607$, $P=0.000$)。**结论** 广州市第一人民医院新生儿病区金黄色葡萄球菌大都携带多个毒力基因, 毒力基因检出率较低。

关键词: 新生儿; 金黄色葡萄球菌; 毒力基因

中图分类号: R378.11; R446.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2019) 06-063-04

doi:10.3969 / j.issn.1671-7414.2019.06.015

Analysis of Virulence Gene Distribution of *Staphylococcus Aureus* in Neonatal Disease Area from the First People's Hospital of Guangzhou

WANG Rong, CHEN Zi-ru, TANG Lu-dan, YANG Xiao

(Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, China)

Abstract: Objective To understand the distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* in neonatal areas of the First People's Hospital of Guangzhou, reveal the molecular epidemic characteristics, and lay a foundation for the further establishment of effective prevention and control measures. **Methods** From June 2018 to April 2019, 22 strains of *Staphylococcus aureus* were isolated from neonatal disease area. The adhesion toxin gene (*clfa*, *cna*, *fnbpA*) and hemolysin gene (*hlaA*, *hlaB*), *spa* gene, *mecA* gene, epiderin gene (*eta*), and toxic shock syndrome toxin gene (*tsst-1*), a total of 9 genes of *Staphylococcus aureus* were detected by PCR. Four-lattice and the $R \times C$ table's χ^2 tests were adopted to statistical analysis. **Results** Out of 22 strains staphylococci aureus, 9 genes were not detected in 6 of the 22 strains. Among the 22 strains, the positive rates of *hlaB*, *eta* and *tsst-1* gene were below 10% (9.09%, 9.09% and 4.55%, respectively), followed by *cna* gene (45.45%), *mecA* gene (27.27%), *fnbpA* gene (13.64%). The positive rates of *clfa*, *hlaA* and *spa* genes were about 60% (68.18%, 63.64% and 59.09% respectively), the detection rates of different genes were statistically significant ($\chi^2=240.21$, $P=0.000$). The highest detection rate of virulence gene mode was *clfa+hlaA+spa+cna*, accounting for 25%, the different was statistically significant ($\chi^2=49.607$, $P=0.000$). **Conclusion** Most of the strains of *Staphylococcus aureus* in neonatal areas carried many virulence genes, but the positive rate of virulence genes was lower than that other researches.

Keywords: neonatal; *Staphylococcus aureus*; virulence gene

新生儿感染是造成新生儿院内死亡的主要原因。新生儿免疫系统发育不够成熟、皮肤屏障作用较弱使其易受细菌的侵袭。加之某些基础疾病如早产、窒息等的影响, 使新生儿对微生物感染的易感性更高。众多病原菌中, 金黄色葡萄球菌是引起新

生儿感染最常见的致病菌^[1-2]。

金黄色葡萄球菌产生多种毒力因子, 在病原体侵入并抵抗宿主的防御机制过程中发挥重要作用, 是引起疾病、导致器官损伤的重要因素^[3]。然而, 目前的研究多集中于细菌的耐药性研究, 对毒力基

基金项目: 广东省自然科学基金(2014A030313677); 广东省中医药局建设中医药强省科研课题(20111006); 广东省科技计划项目(2012B040304015); 广东省自然科学基金(2018A0303130168); 广州市卫生健康科技项目(20191A011013)。

作者简介: 王蓉(1970—), 女, 大专, 主管技师, 研究方向: 感染性疾病的致病机理, E-mail: banglaoxu@163.com。

通讯作者: 杨潇(1985—), 男, 博士研究生, 主管技师, 研究方向: 感染性疾病的致病机理, E-mail: 155128281@qq.com。

因,尤其是新生儿分离的金黄色葡萄球菌的研究进行的较少。因此,本研究旨在了解广州市第一人民医院新生儿病区的金黄色葡萄球菌的毒力基因的分布情况,揭示其分子流行特征,为建立有效防控措施奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2018年6月~2019年4月从广州市第一人民医院新生儿病区分离到的金黄色葡萄球菌22株。其中10株分离自伤口分泌物,6株分离自结膜分泌物,5株分离自痰液,1株分离自皮肤分泌物。标本收集严格按照广州市第一人民医院伦理委员会要求进行。

1.2 试剂和仪器 革兰染液为江门凯琳公司产品。DNA提取试剂为QIAGEN公司产品。细菌鉴定和药敏分析仪Vitek II COMPACT为法国生物梅里埃公司产品。PCR仪为美国伯乐公司产品。

1.3 方法

1.3.1 引物合成:本研究选取金黄色葡萄球菌重要的9个毒力基因,即黏附素[纤维蛋白原结合蛋白(clfa),胶原蛋白结合蛋白(cna),纤连蛋白连接蛋白A(fnbpA)、溶血素A、B(hlaA, hlaB)基因、金黄色葡萄球菌A蛋白(spa)基因、mecA基因、表皮剥脱素(eta)基因和中毒性休克综合征毒素(tsst-1)基因。引物序列参照文献^[4]合成。

1.3.2 DNA提取:将收集的金黄色葡萄球菌接种到血平板37℃过夜培养,挑取菌落至裂解液中制成菌悬液。将菌悬液置于100℃干式恒温器上加热10min,然后冰浴5min,12 000r/min离心10min,取离心后的上清液作为PCR扩增的模板。

1.3.3 毒力基因的检测:采用PCR法检测毒力基因的表达情况。反应程序为预变性95℃ 5min,变性95℃ 1min,复性49℃ 30s,延伸72℃ 1min,共30个循环,最后延伸72℃ 10min。同时设置蒸馏水为阴性对照,加入金黄色葡萄球菌16sDNA作内参。取PCR产物与上样缓冲液混合,点入1mg/dl琼脂糖凝胶,用水平式电泳槽5v/cm电泳20min,凝胶成像系统成像并记录。

1.4 统计学分析 应用SPSS18.0统计软件处理数据,计数资料用百分数表示,毒力基因间比较用四格表资料的 χ^2 检验和R×C表的 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 新生儿病区金黄色葡萄球菌毒力基因检测结果 见表1。22株新生儿病区金黄色葡萄球菌9个毒力基因中,clfa, hlaA检出率较高,分别为68.18%和63.64%,其后依次为spa基因, cna基因, mecA基因和fnbpA基因, eta基因, hlaB基因和tsst-1基因

的检出率低于10%,不同基因检出率差异具有统计学意义($\chi^2=240.21$, $P=0.000$)。

表1 新生儿病区金黄色葡萄球菌毒力基因分布情况($n=22$)

毒力基因	检出例数(n)	检出率(%)
clfa	15	68.18
hlaA	14	63.64
spa	13	59.09
cna	10	45.45
mecA	6	27.27
fnbpA	3	13.64
eta	2	9.09
hlaB	2	9.09
tsst-1	1	4.55

2.2 金黄色葡萄球菌毒力基因检测组合模式 见表2,图1。22株金黄色葡萄球菌中,有6株未检测出本次实验所选择的9种毒力基因。在检出的16株中,表达3种及以上毒力基因的菌株为14株,占87.50%。clfa+hlaA+spa+cna的毒力基因阳性模式检出率最高,占25.00%,差异有统计学意义($\chi^2=69.607$, $P=0.000$)。

表2 金黄色葡萄球菌毒力基因表达模式及比例($n=16$)

毒力基因模式	检出数(n)	检出率(%)
clfa+hlaA+spa+cna	4	25.00
clfa+hlaA+spa+cna+mecA	2	12.50
clfa+hlaA+spa+cna+eta	1	6.25
clfa+hlaA+spa+cna+tsst-1	1	6.25
clfa+hlaA+spa+cna+fnbpA	1	6.25
clfa+hlaA+spa+hlaB+fnbpA+mecA	1	6.25
clfa+hlaA+spa+fnbpA	1	6.25
clfa+hlaA+spa+mecA	1	6.25
clfa+hlaA+spa+mecA+hlaB	1	6.25
clfa+hlaA+cna	1	6.25
eta+mecA	1	6.25
clfa	1	6.25

2.3 不同标本类型毒力基因分布情况 见表3。新生儿病区22株金黄色葡萄球菌中有4种标本来源。由于仅1株是来自皮肤分泌物,因此未对此标本类型进行分析。对3种主要标本来源分别统计分离得到的金黄色葡萄球菌毒力基因检出率,其中,clfa, hlaA在3种类型标本中的检出率差异无统计学意义($\chi^2=2.436$, $P=0.296$; hlaA: $\chi^2=1.391$, $P=0.499$)。eta基因仅在伤口分泌物中检出, hlaB基因仅在痰标本中检出, tsst-1基因仅在结膜分泌物中检出,提示此3个基因在不同部位致病中发挥作用。

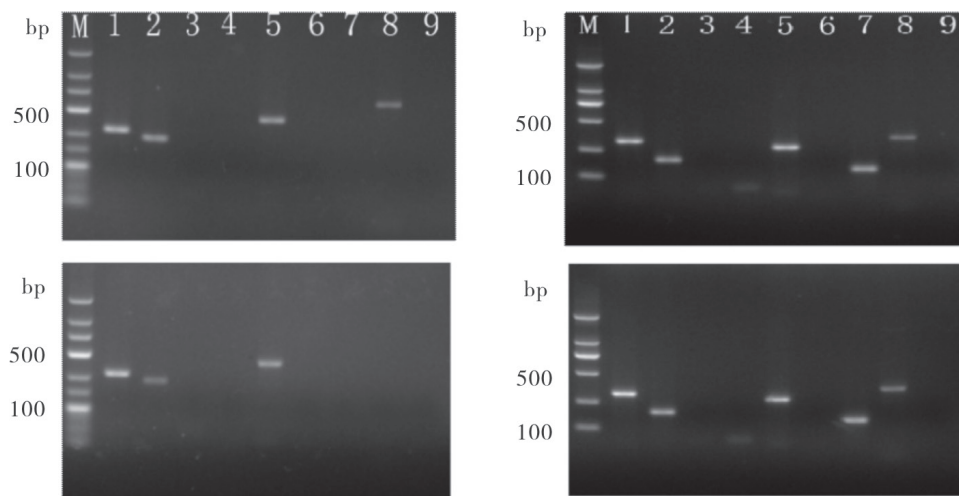


图1 部分分离株毒力基因 PCR 扩增电泳图

M: DNA marker; 1: clfa; 2: cna; 3: eta; 4: fnbpA; 5: hlaA; 6: hlaB; 7: mecA; 8: spa; 9: tsst-1

表3 不同标本来源金黄色葡萄球菌毒力基因检出率分析

毒力基因	伤口分泌物	结膜分泌物	痰	χ^2	P
clfa	70.00	66.67	60.00	2.436	0.296
cna	50.00	66.67	0	103.116	0.000
eta	20.00	0	0	-	-
fnbpA	0	16.67	40.00	-	-
hlaA	60.00	66.67	60.00	1.391	0.499
hlaB	0	0	40.00	-	-
mecA	20.00	33.33	40.00	45.578	0.000
spa	50.00	66.67	60.00	6.039	0.049
tsst-1	0	16.67	0	-	-

3 讨论

细菌毒力在细菌所致的感染性疾病中发挥关键作用。病原菌的毒力是由多种毒力基因共同决定的。这一现象在金黄色葡萄球菌的致病中更为典型,其有包括黏附素、溶血素、*mecA*等多种毒力基因,分别在其黏附、抗吞噬、诱导细菌耐药方面发挥重要作用。本研究发现黏附素基因和溶血素基因检出率均超过60%。这一结果提示,本院新生儿病区分离到的金黄色葡萄球菌主要以这两类毒力基因表达为主,但与王冬梅等^[6-8]研究结果相比检出率较低。本次研究,*spa*基因的检出率为59.09%,低于JAHANSHAH等^[4-5]的研究结果。表皮剥脱毒素基因(*eta*)和中毒性休克综合征毒素基因(*tsst-1*)的检出率最低,均小于10%,与王冬梅等^[6,9]的研究基本一致,但比JAHANSHAH等^[4]较低。这些毒力基因检出率的差异,可能与样本量、患者年龄、标本来源等因素有关。新生儿的免疫功能低,易于感染,故毒力较低即可以致病,而成人免疫功能完善,需要较高的致病性才能引起宿主疾病,从

而使成年人感染的金黄色葡萄球菌毒力基因检出率较高。

本研究中,检测出3个及以上毒力基因的菌株占87.50%。因此,提示本院新生儿病区金黄色葡萄球菌流行株大都携带多个毒力基因。在毒力基因表达模式方面,本研究发现*clfa*+*hlaA*+*spa*+*cna*模式检出率最高,与王冬梅等^[6]研究不同,可能与病人的年龄、标本来源构成等因素有关。同时,本研究发现不同的标本来源的金黄色葡萄球菌,其毒力基因模式却并不完全一致(表3),这也提示与不同毒力基因在金黄色葡萄球菌致不同部位的损伤有关,尚需进一步研究确认。

本研究发现了一个耐药性基因型和表型的差异现象。本次研究检测出6株金黄色葡萄球菌含有*mecA*基因,但药敏结果仅报告了1株MRSA。提示基因的携带不是与表型简单的一一对应,在某些情况下可能是多个基因联合作用的结果。在MRSA的检测中,可能需要通过PCR扩增*mecA*,*femB*等多个耐药相关基因,或使用乳胶凝集法检测PBP2a表达情况确定是否为MRSA。

综上所述,本研究对广州市第一人民医院新生儿病区金黄色葡萄球菌毒力基因分布情况进行了分析,得到了第一手数据。后续还需进一步增加样本量,并将毒力基因表达模式与临床病理相联系,为进一步提高本院新生儿感染性疾病的诊治奠定基础。

参考文献:

- [1] 刘青,樊冰.儿童呼吸道感染患者金黄色葡萄球菌的分离与耐药性分析[J].现代检验医学杂志,2016,31(3):150-152,155.
LIU Qing,FAN Bing.Separation and analysis of drug resistance of *Staphylococcus aureus* in patients with

- respiratory infection of children[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(3): 150-152, 155.
- [2] 李敏, 王亚亭, 金丹群, 等. 金黄色葡萄球菌感染致新生儿急性骨髓炎的临床分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(19): 4526-4528.
- LI Min, WANG Yating, JIN Danqun, et al. Clinical analysis of 14 cases of neonatal acute osteomyelitis induced by *Staphylococcus aureus* infection[J]. Chin J Nosocomiol, 2016, 26(19): 4526-4528.
- [3] 段宝生. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的SPA基因分型研究与耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(2): 80-82.
- DUAN Baosheng. Resistance drug analysis and the detection of PVL gene of methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(2): 80-82.
- [4] JAHANSAHI A, ZEIGHAMI H, HAGHI F. Molecular characterization of methicillin and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospitalized patients[J]. Microb Drug Resist, DOI:10.1089/mdr.2018.0069.
- [5] 黄支密, 糜家睿, 罗雪平, 等. 创伤患者医院内感染耐甲氧西林金黄色葡萄球菌毒力基因分析[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(2): 108-112.
- HUANG Zhimi, MI Jiarui, LUO Xueping, et al. Investigation of virulence gene in nosocomial-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from trauma patients [J]. J Med Res, 2016, 45(2): 108-112.
- [6] 王冬梅, 刘传桂, 梁晓静, 等. 91株金黄色葡萄球菌毒力基因和耐药基因分布研究[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(14): 2143-2146.
- WANG Dongmei, LIU Chuangui, LIANG Xiaojing, et al. Investigation of virulence genes and drug resistance genes of *Staphylococcus aureus* (91 strains)[J]. Lab Med Clin, 2017, 14(14): 2143-2146.
- [7] 王振勇, 许小敏, 李刚, 等. 泌乳期乳腺炎患者金黄色葡萄球菌感染毒素及荚膜抗原基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(24): 5984-5986.
- WANG Zhenyong, XU Xiaomin, LI Gang, et al. Investigation of encoding genes of cytotoxins, invasive toxins and capsular antigens in *Staphylococcus aureus* isolated from lactation mastitis patients [J]. Chin J Nosocomiol, 2014, 24(24): 5984-5986.
- [8] 汪英俊, 白永凤, 程颖, 等. 皮肤软组织感染患者分离的金黄色葡萄球菌毒力基因分布研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(2): 169-172, 176.
- WANG Yingjun, BAI Yongfeng, CHENG Ying, et al. Distribution of virulence genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with skin soft tissue infections [J]. Chin J Nosocomiol, 2018, 28(2): 169-172, 176.
- [9] 刘鹏, 陈琳, 许兆军, 等. ICU和EICU高频接触物表分离的金黄色葡萄球菌耐药性及毒力基因检测[J]. 现代实用医学, 2016, 28(1): 25-26.
- LIU Peng, CHEN Lin, XU Zhaojun, et al. Detection of drug resistance and virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from high frequency contact area of ICU and EICU [J]. Modern Practical Medicine, 2016, 28(1): 25-26.

收稿日期: 2019-05-26

修回日期: 2019-07-19

(上接 62 页) 乙型流感病毒感染的潜在指标。

本研究局限性在于仅探讨了这四项血细胞指标在儿童流感辅助诊断中的应用, 未来可以探索 NLR 与其他流感病毒检测方法联合诊断的临床价值; 而且本研究仅针对儿童患者开展, 下一步可以探索 NLR 在儿童与成人流感病毒感染中诊断价值的差异。综上所述, 本研究认为 NLR 检测方法快捷方便, 在儿童甲、乙流感病毒早期诊断中有潜在应用价值。

参考文献:

- [1] JEON T J, PARK J Y. Clinical significance of the neutrophil-lymphocyte ratio as an early predictive marker for adverse outcomes in patients with acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(21): 3883-3889.
- [2] 梁欢, 苗常青, 吴梦茹, 等. 中性粒细胞与淋巴细胞比值对脓毒性休克患者 28 d 死亡风险的预测价值评估[J]. 临床急诊杂志, 2019, 20(7): 503-508.
- LIANG Huan, MIAO Changqing, WU Mengru, et al. Predictive value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in 28-day mortality of patients with sepsis shock[J]. J Clin Emerg (China), 2019, 20(7): 503-508.
- [3] 周正宇, 高谦, 景丽玲, 等. 中性粒细胞与淋巴细胞比值对初发溃疡性结肠炎鉴别诊断及严重程度判断的临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(1): 145-147, 150.
- ZHOU Zhengyu, GAO Qian, JING Liling, et al. Clinical significance of the ratio of neutrophil to lymphocyte in the differential diagnosis of primary ulcerative colitis and the judgment of its severity[J]. J Mod Lab Med, 2018, 33(1): 145-147, 150.
- [4] BRAMLEY A M, BRESEE J, FINELLI L. Pediatric influenza [J]. Pediatr Nurs. 2009, 35(6): 335-345.
- [5] 秦笙, 练立婷, 王维亮, 等. 广州发热呼吸道症候群成年患者临床特征及病原学检测[J]. 中国热带医学, 2016, 16(5): 495-498.
- QIN Sheng, LIAN Liting, WANG Weiliang, et al. Clinical characteristics and pathogen detection of febrile respiratory syndrome in adults from Guangzhou[J]. China Trop Med, 2016, 16(5): 495-498.
- [6] NAH E H, KIM S, CHO S, et al. Complete blood count reference intervals and patterns of changes across pediatric, adult, and geriatric ages in Korea[J]. Ann Lab Med, 2018, 38(6): 503-511.
- [7] 江载芳, 申昆玲, 沈颖. 褚福棠实用儿科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 1812.
- JING Zaifang, SHEN Kunling, SHEN Ying. ZHU Futang practice of pediatrics [M]. 8th Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015: 1812.

收稿日期: 2019-07-30

修回日期: 2019-09-24