

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.12.015

❖ 临床研究 ❖

骨科创伤后感染患者金黄色葡萄球菌耐药基因及毒力基因的分布情况

段俊林¹, 陈日寿¹, 陈伟¹, 叶林强², 冯永洪², 黄祖辉², 刘亮洪²

(东莞市中医院, 1. 检验科; 2. 骨科, 广东 东莞 523000)

【摘要】目的: 探讨骨科创伤后感染患者金黄色葡萄球菌耐药基因及毒力基因的分布情况。**方法:** 收集40株骨科创伤后金黄色葡萄球菌感染患者标本, 采用聚合酶链式反应(PCR)法对菌株耐药基因(*mecA*)、黏附素基因(*bbp*、*clfA*、*clfB*、*can*、*ebpS*、*fnbA*、*sdrC*、*sdrD*、*sdrE*、*icaA*、*map*)、溶血毒素基因(*hla*、*hly*、*hld*、*hlg*)、杀白细胞素基因(*lukE*、*lukM*、*pvl*)、侵袭毒素基因(*splB*、*ssp*)进行检测, 比较不同感染程度及不同感染控制情况患者菌株中毒力基因分布情况。**结果:** 40株金黄色葡萄球菌中共检出*mecA*基因耐药株数23株(耐药率57.50%), 即耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)为23株, 对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)为17株。深部感染组患者*sdrC*基因检出率高于浅表感染组(72.73% vs. 33.33%, $P < 0.05$)、*ssp*基因检出率高于浅表感染组(100.00% vs. 66.67%, $P < 0.05$); 浅表感染组与深部感染组患者其余基因检出率比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。无效组患者*sdrD*基因检出率低于有效组(11.11% vs. 61.29%, $P < 0.05$)、*pvl*基因检出率高于有效组(33.33% vs. 3.33%, $P < 0.05$); 有效组与无效组患者其余基因检出率比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:** 毒力基因*sdrC*、*ssp*与骨科创伤后金黄色葡萄球菌感染患者感染程度相关, 毒力基因*sdrD*、*pvl*与骨科创伤后金黄色葡萄球菌感染患者预后转归(感染控制情况)相关。

【关键词】 金黄色葡萄球菌; 耐药基因; 毒力基因; 骨科; 创伤后感染

【中图分类号】 R681.2; R446.5 **【文献标志码】** A

Distribution of drug resistance genes and virulence genes of *Staphylococcus aureus* in patients with orthopaedic post-traumatic infection

DUAN Jun-lin¹, CHEN Ri-shou¹, CHEN Wei¹, YE Lin-qiang², FENG Yong-hong², HUANG Zu-hui², LIU Liang-hong²

(1. Department of Laboratory; 2. Department of Orthopedics, Dongguan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Dongguan 523000, Guangdong, China)

【Abstract】Objective: To investigate the distribution of drug resistance genes and virulence genes of *Staphylococcus aureus* in patients with orthopaedic post-traumatic infection. **Methods:** 40 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from orthopaedic posttraumatic infection patients were selected. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect drug resistance gene (*mecA*), adhesin gene (*bbp*, *clfA*, *clfB*, *can*, *ebpS*, *fnbA*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *icaA*, *map*), hemolytic toxin gene (*hla*, *hly*, *hld*, *hlg*), leukocidin gene (*lukE*, *lukM*, *pvl*), invasive toxin gene (*splB*, *ssp*), and the distribution of virulence genes in patients with different degrees of infection and different infection control conditions were compared. **Results:** A total of 23 MECA gene resistant strains (57.50%) were detected in 40 strains of *Staphylococcus aureus*, 23 strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and 17 strains of methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). The detection rate of *sdrC* gene in deep infection group was higher than that in superficial infection group (72.73% vs. 33.33%, $P < 0.05$), and the detection rate of *ssp* gene was higher than that in superficial infection group (100.00% vs. 66.67%, $P < 0.05$). There was no significant difference in the detection rate of other genes between superficial infection group and deep infection group ($P > 0.05$). The detection rate of *sdrD* gene in the ineffective group was lower than that in the effective group (11.11% vs. 61.29%, $P < 0.05$), and the detection rate of *pvl* gene in the ineffective group was higher than that in the effective group (33.33% vs. 3.33%, $P < 0.05$). There was no significant difference in the detection rate of other genes between ineffective group and effective group ($P > 0.05$). **Conclusion:** The virulence genes *sdrC* and *ssp* are correlated with the infection degree of patients with post-traumatic *Staphylococcus aureus* infection in orthopedics, and the virulence genes *sdrD* and *pvl* are correlated with the prognosis (infection control) of patients with post-traumatic *Staphylococcus aureus* infection in orthopedics.

基金项目: 广东省东莞市社会发展项目(201950715002755)

作者简介: 段俊林(1980-),男,硕士,主管技师。E-mail: duanjunlin5@163.com

[Key words] Staphylococcus aureus; Drug resistance gene; Virulence gene; Orthopedics; Post traumatic infection

金黄色葡萄球菌属于革兰氏阳性致病菌,具有侵袭性,广泛地存在于自然界,能够引起包括人类和牲畜在内的多种脊椎动物体内不同部位的感染^[1]。近几十年来,随着细菌的进化与抗生素的滥用,金黄色葡萄球菌耐药性逐渐增强,特别是重症监护室(ICU)、神经外科及骨科病房^[2-3]。因此,及时了解金黄色葡萄球菌耐药情况有利于促进临床合理用药。金黄色葡萄球菌可产生多种毒力因子,参与病原体侵入与抵抗宿主的防御机制的整个过程,进而引发疾病或器官损伤^[4]。多种毒力基因共同决定了病原菌的毒力,与金黄色葡萄球菌致病性密切相关的毒力基因主要包括有黏附素基因、溶血毒素基因、杀白细胞素基因、侵袭毒素基因,其分别从黏附、细胞裂解、破坏线粒体的内环境、降解宿主细胞中大分子等方面发挥致病作用^[5-6]。本研究拟检测骨科创伤后感染患者体内金黄色葡萄球菌耐药基因及毒力基因,旨在为临床合理用药提供理论依据,并探究不同感染严重程度、不同预后转归情况患者金黄色葡萄球菌毒力基因的分布情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年5月至2021年4月东莞市中医院诊治的骨科创伤后感染患者送检标本中分离的40株金黄色葡萄球菌。40例患者包括男性25例,女性15例;年龄18~75岁,平均(44.27±9.10)岁;住院时间7~21 d,平均(14.15±5.20) d;手术类型包括自四肢手术20例,关节手术7例,腰椎及骨盆手术6例,颈椎手术4例,胸部手术3例。根据感染程度将患者分为浅表感染组($n=18$)和深部感染组($n=22$),浅表感染指仅累计皮肤及皮下组织的感染,并具备下述情况之一:(1)伤口浅层有分泌物;(2)伤口浅层分泌物培养出细菌;(3)疼痛或压痛、肿胀、红热,医生因此将切口开放的。深部感染指累及伤口深部筋膜及肌层的感染,并至少具备下述情况之一:(1)从伤口深部流出脓液;(2)伤口深部自行裂开或由医生打开,且体温 $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、局部疼痛或压痛;(3)经临床、手术、病理组织学或影像学诊断发现切口深部有脓肿。根据患者术后创面愈合情况将患者预后分为有效组($n=31$)和无效组($n=9$),评估标准如下^[7]:优,14 d内创面完全愈合,且表皮基本覆盖,无需更换敷料;良,14 d内创面分泌物较少,可见健康肉芽组织生长,仍更换敷料;差,14 d内创面仍存在较多分泌物、且不可见新生肉芽组织生长。以优、良为有效组,差为无效组。标本搜集严格

按照医院伦理委员会要求进行。

1.2 方法

1.2.1 目的 DNA 提取 无菌条件下,将金黄色葡萄球菌接种于血琼脂平板上(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司),于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温培养24 h,将菌落挑取转移至裂解液中制备菌悬液;充分振荡混匀后置于干式恒温器(杭州瑞诚仪器有限公司)上以 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下加热10 min,随后冰浴5 min,采用离心机以12 000 rpm的转速离心10 min,上清液即扩增模板。

1.2.2 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)法测定耐药基因及毒力基因 T100 梯度 PCR 仪产自美国伯乐公司,25 μL 反应体系:DNA 模板 1.5 μL , Premix Tap 缓冲液 12.5 μL 、上游及下游引物各 1 μL ,其余加入蒸馏水补足。反应条件如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min(预变性), $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min(变性),退火 1 min(退火温度), $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min(延伸),循环 30 次后, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min(延伸)。以人工合成的目标基因片段为阳性对照,以蒸馏水为阴性对照。取 5 μL PCR 扩增产物进行电泳分析。PCR 试剂购自天根生化科技有限公司。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。见表 1。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。计数资料以 $[n(\%)]$ 表示,组间比较采用 χ^2 分析或 Fisher 精确检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨科创伤患者金黄色葡萄球菌耐药基因分布情况

40 株金黄色葡萄球菌中共检出 mecA 基因耐药株数 23 株(耐药率 57.50%),即耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin resistant Staphylococcus aureus, MRSA)为 23 株,对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(Methicillin sensitive Staphylococcus aureus, MSSA)为 17 株。

2.2 不同严重程度骨科创伤后感染患者金黄色葡萄球菌毒力基因分布情况比较

深部感染组患者 sdrC 基因检出率高于浅表感染组(72.73% vs. 33.33%), ssp 基因检出率高于浅表感染组(100.00% vs. 66.67%),差异均有统计学意义($P<0.05$);浅表感染组与深部感染组患者其余基因检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 1 靶基因引物序列目的产物长度

靶基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	退火温度(℃)	片段大小(bp)
耐药基因				
mecA	CTGCTACAGGTATCCGTGAATA	TTGTATTGACTGTATCTCTTTGGA	60	595
毒力基因				
bbp	CAACTACTACTGATGCGCTCGGGTAA	TTTAACCGTTGGCGTGAACC	58	104
clfA	TTTAGCGGCAGTAGCTGCAG	TGCGGATACACAGTGGTACCAG	58	105
clfB	AACGATTTCGAATGCGCAAG	AGCAGATTACTACCGGTTCA	60	93
cna	ATTAAGTGGCATGGCCGAC	CTGCTTGACCCACTGTTC	55	96
ebpS	AAGACGCCGTGATTTAGCAAC	CGATCATCTATGTGCCAGCC	55	102
fnbA	CAAACCCAGGTGGTGTCTCAG	TGTATGATCGCTCACTGCGC	56	101
sdrC	AAATGAAAGACAGCCCCAAG	TCACTTTAGGCTGATCTGCAGTTG	58	104
sdrD	GGTAGATGCCAAAATGAATCAACT	TGATGATGGCTGACTGCTGC	58	190
sdrE	AGAAAAGCCAATGGCAAACGT	CAGCTGGCGTTTCAATTTAAC	60	146
icaA	AGACACTTGCTGGCGCAGT	CCTCCCAATGTTTCTGGAAC	60	202
map	TTGATGTGCCATTTACTGCAATT	AGTTCATGCGAAAGATGTTAAGAGAAT	60	107
hla	AGGAAAATTTGGCGGCCTTA	AGTTGGCTCTCTAAAATGTTTTG	55	97
hlyB	TGGTGGCGTAGCGATTGTAA	TCCAGCACCACAACGTGAAT	52	187
hlyD	AATTTGTTCACTGTGTCGATAATCCA	AATTAAGGAAGGAGTGATTTCAATGG	53	90
hlyG	TTCGCCACTGAATCAGGTCA	TGTCGCTGAACCTTTTTCGT	55	181
lukE	CCAAATGGTCCGTCAGGTTT	CCAGTTCTAGGGAATAAAGTCGCA	55	197
lukM	TCCGCTTTTTATCGCGACAGT	TTCGGACGTTTCCAATTCAC	58	190
pvl	TGTGCCAGACAATGAATTACCC	AGTAACATCCATATTTCTGCCATACG	57	136
spIB	GAATTTCTTGATCTCGGGTGTGA	TCACCTCTGGGTCTTTAGCAACA	60	122
ssp	AAGATTGCAGATCCATCGGC	TCACCTCTGGGTCTTTAGCAACA	57	181

表 2 不同严重程度骨科创伤后感染患者金黄色葡萄球菌毒力基因分布情况比较 [n(%)]

基因	总菌株(株)	浅表感染组 (n=18)	深部感染组 (n=22)	χ^2 值	P 值
黏附素基因					
bbp	39	17(94.44)	22(100.00)	1.254	0.263
clfA	37	16(88.89)	21(95.45)	0.615	0.433
clfB	38	16(88.89)	22(100.00)	2.573	0.109
cna	33	16(88.89)	17(77.27)	0.925	0.336
ebpS	38	16(88.89)	22(100.00)	2.573	0.109
fnbA	40	18(100.00)	22(100.00)	-	-
sdrC	22	6(33.33)	16(72.73)	6.208	0.013
sdrD	20	9(50.00)	11(50.00)	0	1.000
sdrE	38	16(88.89)	22(100.00)	2.573	0.109
icaA	39	17(94.44)	22(100.00)	1.254	0.263
map	37	16(88.89)	21(95.45)	0.615	0.433
溶血毒素基因					
hla	40	18(100.00)	22(100.00)	-	-
hlyB	39	17(94.44)	22(100.00)	1.254	0.263
hlyD	38	16(88.89)	22(100.00)	2.573	0.109
hlyG	36	15(83.33)	21(95.45)	1.616	0.204
杀白细胞素基因					
lukE	35	14(77.78)	21(95.45)	2.828	0.093
lukM	3	1(5.56)	2(9.09)	0.178	0.673
pvl	4	1(5.56)	3(13.64)	0.718	0.397
侵袭毒素基因					
spIB	1	0(0.00)	1(4.55)	0.839	0.360
ssp	34	12(66.67)	22(100.00)	8.627	0.003

2.3 不同预后骨科创伤后感染患者金黄色葡萄球菌毒力基因分布情况比较

无效组患者 sdrD 基因检出率低于有效组

(11.11% vs. 61.29%)、pvl 基因检出率高于有效组(33.33% vs. 3.33%), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 有效组与无效组患者其余基因检出率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 不同预后骨科创伤后感染患者金黄色葡萄球菌毒力基因分布情况比较

基因	总菌株(株)	有效组(n=31)	无效组(n=9)	χ^2 值	P 值
黏附素基因					
bbp	39	30(96.77)	9(100.00)	0.298	0.585
clfA	37	29(93.55)	8(88.89)	0.218	0.640
clfB	38	29(93.55)	9(100.00)	0.611	0.434
cna	33	26(83.87)	7(77.78)	0.179	0.672
ebpS	38	29(93.55)	9(100.00)	0.611	0.434
fnbA	40	31(100.00)	9(100.00)	-	-
sdrC	22	16(51.61)	6(66.67)	0.639	0.424
sdrD	20	19(61.29)	1(11.11)	7.025	0.008
sdrE	38	29(93.55)	9(100.00)	0.611	0.434
icaA	39	30(96.77)	9(100.00)	0.298	0.585
map	37	28(90.32)	9(100.00)	0.942	0.332
溶血毒素基因					
hla	40	31(100.00)	9(100.00)	-	-
hlyB	39	30(96.77)	9(100.00)	0.298	0.585
hlyD	38	29(93.55)	9(100.00)	0.611	0.434
hlyG	36	28(90.32)	8(88.89)	0.016	0.900
杀白细胞素基因					
lukE	35	27(87.10)	8(88.89)	0.02	0.886
lukM	3	2(6.45)	1(11.11)	0.218	0.640
pvl	4	1(3.23)	3(33.33)	7.025	0.008
侵袭毒素基因					
spIB	1	0(0.00)	1(11.11)	0.298	0.585
ssp	34	26(83.87)	8(88.89)	0.138	0.711

3 讨论

金黄色葡萄球菌作为一种共生菌,通常无症状地存在于人体的某些部位,如皮肤、皮肤腺体、粘膜、鼻子及内脏等^[2,8]。在引入青霉素后两年内即出现了金黄色葡萄球菌的耐药性,相较于 MSSA 感染患者,MRSA 感染不但增加了住院时间及住院费用,还增加了死亡风险^[9]。本研究中,共检出 *mecA* 基因耐药株数 23 株(耐药率 57.50%),原因可能与骨科患者损伤程度较重、开放性伤口较为常见、伤口深、急诊入院患者多、广谱抗生素应用及侵入性操作等因素有关。该结果提示应加强抗生素药物的管理,在进行经验性抗金黄色葡萄球菌治疗前进行耐药分析、合理选择抗菌策略。

本研究发现,深部感染组患者 *sdrC* 基因及 *ssp* 基因检出率均高于浅表感染组($P < 0.05$),可能与 *sdrC* 编码蛋白的黏附及促进生物膜形成相关。而 *ssp* 基因检出率较高的作用机制可能是由于 *ssp* 基因属于侵袭毒素基因,其编码的侵袭性酶为金黄色葡萄球菌释放的胞外酶,该类酶可降解宿主细胞或细胞与细胞之间的多种大分子,从而使得炎症进一步发展^[10];此外,*ssp* 编码的丝氨酸蛋白酶,可能断裂大分子中的肽键,使之成为小分子蛋白质^[11],此过程可能与促进感染程度增加相关。目前,针对金黄色葡萄球菌感染患者毒力基因与预后的相关研究尚未见报道。在本研究中,无效组患者 *sdrD* 基因检出率低于有效组($P < 0.05$)、*pvl* 基因检出率高于有效组($P < 0.05$),其作用机制可能如下:*sdrD* 基因与上述 *sdrC* 基因同属于黏附毒素基因,*pvl* 基因属于杀白细胞素基因,由位于前噬菌体上的 *LukF-PV* 与 *LukS-PV* 基因共同编码,可通过于细胞膜上形成孔道对白细胞进行杀伤^[12];此外,另有学者^[13]推断,携带 *pvl* 的金黄色葡萄球菌致病力及耐药性更强,可以引起严重的感染,增加治疗难度且复发率高。虽然 *sdrD*、*pvl* 基因与感染控制情况相关的作用机制尚未完全明确,但推测其因素可能与参与金黄色葡萄球菌耐药相关。孙琛等^[14]以金黄色葡萄球菌感染患儿为研究对象,发现 MRSA 的 *sdrD* 携带率显著低于 MSSA($P < 0.05$);夏雯等^[15]对医院获得性肺炎患者痰液中金黄色葡萄球菌进行分离与鉴定,发现 MRSA 的毒力基因 *pvl* 携带率较高。由于 MRSA 致病力强、治疗难度大,从而导致患者感染控制情况不佳。

综上,毒力基因 *sdrC*、*ssp* 与骨科创伤后金黄色

葡萄球菌感染患者感染程度相关,毒力基因 *sdrD*、*pvl* 与骨科创伤后金黄色葡萄球菌感染患者预后转归(感染控制情况)相关。

参考文献

- [1] Graber H, Bodmer M. Staphylococcus aureus and its genotypes as a mastitis pathogen in dairy cattle—a review[J]. Schweiz Arch Tierheilkd, 2019, 161(10): 611–617.
- [2] Krauss JL, Roper PM, Ballard A, et al. Staphylococcus aureus infects osteoclasts and replicates intracellularly[J]. mBio, 2019, 10(5): 1–15.
- [3] 孙梦媛,汪璐,曲远青,等. 成都地区骨科患者伤口金黄色葡萄球菌感染的分子流行病学及耐药性分析[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2021, 42(1): 33–39.
- [4] Crosby HA, Tiwari N, Kwiecinski JM, et al. The Staphylococcus aureus ArlRS two-component system regulates virulence factor expression through MgrA[J]. Molecular Microbiology, 2020, 113(1): 103–122.
- [5] Le Scornet A, Redder P. Post-transcriptional control of virulence gene expression in Staphylococcus aureus[J]. Biochimica Biophysica Acta (BBA)—Gene Regulatory Mechanisms, 2019, 1862(7): 734–741.
- [6] Tam K, Torres VJ. Staphylococcus aureus secreted toxins and extracellular enzymes[J]. Microbiol Spectr, 2019, 7(2): 1–59.
- [7] 焦钢,张玉发,许晨辉. VSD 负压引流结合有限固定对Ⅲ度开放骨折的感染控制效果分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(14): 3577–3578, 3581.
- [8] Suresh MK, Biswas R, Biswas L. An update on recent developments in the prevention and treatment of Staphylococcus aureus biofilms[J]. Int J Med Microbiol, 2019, 309(1): 1–12.
- [9] 杨莉,陈茜,陈明洁,等. 某医院重症监护病房物体表面耐甲氧西林金黄色葡萄球菌污染状况分析[J]. 中国消毒学杂志, 2021, 38(1): 25–27.
- [10] 许小敏,范友芬,胡素佩,等. 烧伤患者金黄色葡萄球菌分离株细胞毒素、侵袭毒素及荚膜抗原基因研究[J]. 中华全科医学, 2016, 14(1): 12–15.
- [11] 姜如金,朱健铭,翁幸璧,等. 侵袭性感染金黄色葡萄球菌的毒力基因系统研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(7): 1444–1447.
- [12] Balakirski G, Hischebeth G, Altengarten J, et al. Recurrent mucocutaneous infections caused by PVL-positive Staphylococcus aureus strains: a challenge in clinical practice[J]. Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2020, 18(4): 315–322.
- [13] Li X, Huang T, Xu K, et al. Molecular characteristics and virulence gene profiles of Staphylococcus aureus isolates in Hainan, China[J]. BMC Infectious Diseases, 2019, 19(1): 1–12.
- [14] 孙琛,王亚娟,杨鑫,等. 新生儿金黄色葡萄球菌感染致病株分子特征研究[J]. 中国小儿急救医学, 2019, 26(11): 813–819.
- [15] 夏雯,吴亮,阴晴,等. 某院 ICU 医院获得性肺炎患者痰分离 MRSA 耐药基因和 *pvl* 基因携带情况[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(6): 525–530.

(收稿日期:2021-05-19

修回日期:2021-07-03)