论著

文章编号:1000-5404(2013)08-0696-06

广州地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子分型及耐药性分析

程 航[1],曾方银[2],胡启文[1],袁文常[1],周人杰[3],张 霞[1],袁吉振[1],尚伟龙[1],杨 杰[1],胡 珍[1],朱军民[1],饶贤才[1]
(400038 重庆,第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室[1];510515 广州,南方医科大学南方医院检验科[2];400037 重庆,第三军医大学新桥医院急诊科[3])

[摘要] **目的** 了解广州地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,MRSA)分子型别及其对临床常用抗生素的耐药情况,为防控MRSA感染提供依据。**方法** 收集2010年10月至2011年4月广州地区两家教学医院临床分离的MRSA 142株,应用SCC*mec*、*spa*、多位点序列分型(multilocus sequence typing,MLST)、脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis,PFGE)等方法进行分子分型,检测这些菌株对苯唑西林、克林霉素等17种临床常用抗生素的药物敏感性,分析临床MRSA的耐药情况。**结果** 142株MRSA中121株为医院获得型金葡菌(HA-MRSA),20株为社区获得型金葡菌(CA-MRSA),1株未定型MRSA。这些MRSA可分为16种*spa*型,8种ST型及13种PFGE型。HA-MRSA中的ST239-MRSA-Ⅲ-t030、ST239-MRSA-Ⅲ-t037和ST5-MRSA-Ⅱ-t002为主要流行克隆,也发现CA-MRSA中ST59-MRSA-Ⅳ-t437克隆的流行,且这些流行克隆有特定的耐药谱。**结论** 广州地区流行的金葡菌仍以HA-MRSA为主,同时也有一定量的CA-MRSA检出和传播,且CA-MRSA的多重药物敏感性已在下降。

[关键词] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;分子分型;脉冲场凝胶电泳;多位点序列分型;耐药谱
[中图法分类号] R181.34;R372;R378.11 [文献标志码] A

Molecular typing and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Guangzhou, China

Cheng Hang[1], Zeng Fangyin[2], Hu Qiwen[1], Yuan Wenchang[1], Zhou Renjie[3], Zhang Xia[1], Yuan Jizhen[1], Shang Weilong[1], Yang Jie[1], Hu Zhen[1], Zhu Junmin[1], Rao Xiancai[1] ([1]Department of Microbiology, Laboratory of Microbiological Engineering, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Laboratory Medicine, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515; [3]Department of Emergency, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] Objective To determine the molecular types and drug susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) prevailed in Guangzhou, China. Methods A total of 142 MRSA isolates were collected between October 2010 and April 2011 from two teaching hospitals in Guangzhou. The molecular typing methods, such as staphylococcal cassette chromosome mec (SCC*mec*) typing, staphylococcal protein A (*spa*) typing, multilocus sequence typing (MLST), and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), were applied for all MRSA strains, and the drug susceptibilities to 17 kinds of antibiotics were also determined. Results In the 142 MRSA isolates, there were 121 hospital-associated isolates (HA-MRSA), 20 community-associated isolates (CA-MRSA), and 1 non typeable MRSA. Sixteen *spa* types, eight sequence types (ST), and thirteen PFGE types were found. The major predominant clones were ST239-MRSA-Ⅲ-t030, ST239-MRSA-Ⅲ-t037 and ST5-MRSA-Ⅱ-t002 that belong to HA-MRSA. Furthermore, colne ST59-MRSA-Ⅳ-t437 that belongs to CA-MRSA was also found to be prevailed in Guangzhou. The major prevailed clones with specific drug resistant profiles were found. Conclusion HA-MRSA is still the most predominant MRSA in Guangzhou, and CA-MRSA with decreasing drug susceptibility is also found. It is the time to monitor the prevalence of CA-MRSA and drug resistance of MRSA.

[**Key words**] methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; molecular typing; pulsed-field gel electrophoresis; multilocus sequence typing; drug resistant profile

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81171622), the New Drug Development Project of China (2012ZX09103301-038) and the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2012jjA10066). Corresponding author: Rao Xiancai, Tel:86-23-68752240, E-mail: raoxiancai@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81171622);国家重大新药创制课题(2012ZX09103301-038);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10066)
[通信作者] 饶贤才,电话:(023)68752240, E-mail: raoxiancai@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130125.0838.002.html(2013-01-25)

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,MRSA)的感染在全球呈上升趋势,已成为当今医学的一大难题。近年来的研究[1-2]表明MRSA所致感染的流行病学发生了显著的变化,从原来较为局限的院内获得型感染逐渐向社区获得型转化。通常认为,SCC*mec* Ⅰ~Ⅲ型MRSA为院内MRSA,即医院获得型MRSA(hospital-acquired MRSA,HA-MRSA);Ⅳ~Ⅴ型为社区MRSA,即社区获得型MRSA(community-acquired MRSA,CA-MRSA)[3]。前者常呈现多重耐药,后者耐药虽不强,但常分泌多种与致病力相关的毒素,能够引起多种严重及致死性疾病[4]。控制MRSA流行的重要策略在于明确其流行环节、切断传播途径、终止耐药菌株在人群中的传播。因而,检测MRSA流行株的分子特征及耐药谱对于鉴别菌株间的亲缘性、有效控制感染意义重大。目前,研究MRSA分子特征的方法主要有:脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis,PFGE)、金黄色葡萄球菌A蛋白基因(*spa*)分型、葡萄球菌染色体*mec*耐药盒(staphylococcal cassette chromosome *mec*,SCC*mec*)分型、多位点序列分型(multilocus sequence typing,MLST)等[5]。

本研究综合运用上述MRSA分子分型方法,对2010年10月至2011年4月从广州地区两大教学医院收集的MRSA进行检测研究。广州人口众多,来源复杂,流动性大,兼之气候温润,为MRSA的传播提供了便利条件,获得该地区MRSA菌株的分子分型特征和主要流行菌株的型别,可以丰富该地区MRSA的分子流行病学资料,为该地区MRSA感染的监控提供实验依据,并为我国其他地区MRSA感染和流行的检测提供借鉴。同时对该地区MRSA菌株的抗生素耐药谱进行测定和分析,探讨耐药谱与菌株分子分型之间的关系,为研究MRSA的耐药机制提供依据,进一步对指导临床抗生素的合理应用,减少抗生素的浪费,从根本上控制MRSA的感染和暴发流行有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 181株临床金葡菌分离自广州地区的两大综合教学医院,主要源自2010年10月至2011年4月期间住院患者的痰液、脓液、血液、穿刺液、伤口分泌物、咽拭子等标本。

1.1.2 仪器与试剂 Bio-Rad PCR仪,Bio-Rad凝胶成像仪,Bio-Rad凝胶脉冲场电泳仪,Bio-Fosum微生物鉴定药敏分析仪(上海复星佰珞公司);药物敏感性实验测试药物有苯唑西林(OXA)、克林霉素(CLI)、环丙沙星(CIP)、青霉素(PEN)、红霉素(ERY)、庆大霉素(GEN)、利福平(RIF)、四环素(TET)、复方新诺明(SXT)、万古霉素(VAN)、呋喃妥因(NIT)、氨苄西林(AMP)、喹努普汀(QD)、利奈唑胺(LZD)、替考拉宁(TEC)、阿米卡星(AMK)、头孢西丁(FOX);OXOID Tryptone Soya Broth(TSB)培养基;标准质控菌株MRSA NCTC 10442(SCC*mec* Ⅰ),MRSA N315(SCC*mec* Ⅱ),MRSA 85/2082(SCC*mec* Ⅲ),MRSA JCSC 4744(SCC*mec* Ⅳ)和MRSA WZ153(SCC*mec* Ⅴ),由温州医学院余方友教授提供[6]。

1.1.3 引物 MRSA鉴定、SCC*mec*分型、*spa*分型和MLST分型引物参照文献[7-12]设计,引物序列见表1,由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养与鉴定 细菌常规培养按全国临床检验操作规程进行;MRSA的鉴定参照文献[7]所述,在获得的金葡菌分离株中,通过PCR方法检测*mecA*与*femB*基因。若*mecA*与*femB*基因皆为阳性判为MRSA;若*mecA*基因为阴性、*femB*基因为阳性则判断为敏感型金葡菌(MSSA)。

1.2.2 DNA模板的制备 取1 mL菌液,溶菌酶破壁(37 ℃,9~10 h);10% SDS液和蛋白酶K消化(55 ℃,1 h);NaCl溶液和CTAB/NaCl溶液孵育(65 ℃,10 min);氯仿/异戊醇抽提第1次,酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)第2次抽提;NaAc溶液和冰无水乙醇沉淀DNA,70%乙醇清洗,灭菌双蒸水溶解DNA,-20 ℃保存备用。

1.2.3 SCC*mec*分型 参照文献[8]所述,应用5对特异性引物对MRSA进行Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ型的SCC*mec*分型,未检测出特异条带或检出结果不符合判定标准的即为未定型别(non-typeable,NT)。

1.2.4 *spa*分型 用多重PCR方法进行*spa*分型[9-10],PCR扩增产物送上海英俊生物技术服务公司测序,获得的序列参照*spa*基因分型数据库(http://www.ridom.de/*spa*server)已公布的重复序列,根据串联重复序列出现的次数和排列方式确定型别[11]。

1.2.5 MLST分型 根据金葡菌7个看家基因(*arcc*、*aroe*、*glp*、*gmk*、*pta*、*tpi*、*yqil*)序列,采用多重PCR进行扩增、测序和分型[12]。PCR扩增产物测序由上海英俊生物技术服务公司完成。所获序列利用MLST数据库(http://saureus.mlst.net/)进行分析,得到每个看家基因的等位点序号,然后依据每株细菌7个看家基因的等位点序号得出其MLST型别,即序列型(sequence type,ST),再将所有菌株的ST型用eBURST(http://www.eburst.mlst.net)软件[13]进行分析,与目前国际上已有的ST型进行比较,结果以克隆群(clonal complex,CC)表示,如CC5是指在MLST数据库中由一个祖先ST5通过基因突变而演化出的所有ST型的集合。

1.2.6 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析 参照文献[14]所述,将新鲜培养的金葡菌包埋于1%低熔点琼脂中,溶葡萄球菌素及溶菌酶进行破壁(37 ℃,8~9 h),蛋白酶K原位消化(54 ℃,24 h),经限制性内切酶*Sma* Ⅰ酶切(30 ℃,8 h)后制胶电泳。PFGE参数:电场强度6 V/cm,温度14 ℃,角度120°,脉冲时间5~40 s,电泳20 h,EB染色30 min。结果用软件BioNumerics version 6.6(Applied Maths)进行聚类分析,将同源性超过80%(即图谱相差不超过2个条带)定义为同一型,不能被分型的MRSA菌株归为偶发株。

表1 引物序列及扩增长度

方法	基因片段	引物名称	引物序列	片段大小
MRSA 鉴定	*mecA*	MecA 上游	5′-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3′	310 bp
		MecA 下游	5′-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3′	
	femB	FemB 上游	5′-TTACAGAGTTAACTGTTACC-3′	651 bp
		FemB 下游	5′-ATACAAATCCAGCACGCTCT-3′	
SCC*mec* 分型	*ccrA2-B*	β	5′-ATTGCCTTGATAATAGCCYTCT-3′	937 bp
		α3	5′-TAAAGGCATCAATGCACAAACACT-3′	
	ccrC	ccrC 上游	5′-CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT-3′	518 bp
		ccrC 下游	5′-CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT-3′	
	IS1272	1272 上游	5′-GCCACTCATAACATATGGAA-3′	415 bp
		1272 下游	5′-CATCCGAGTGAAACCCAAA-3′	
	MecA-IS431	5RmecA	5′-TATACCAAACCCGACAACTAC-3′	359 bp
		5R431	5′-CGGCTACAGTGATAACATCC-3′	
spa 分型	*spa*	spa 上游	5′-GACGATCCTTCGGTGAGC-3′	300 bp
		spa 下游	5′-CAGCAGTAGTGCCGTTTG-3′	
MLST	*arcc*	arcc 上游	5′-TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC-3′	456 bp
		arcc 下游	5′-AGGTATCTGCTTCAATCAGCG-3′	
	aroe	aroe 上游	5′-ATCGGAAATCCTATTTCACATTC-3′	456 bp
		aroe 下游	5′-GGTGTTGTATTAATAACGATATC-3′	
	glpf	glpf 上游	5′-CTAGGAACTGCAATCTTAATCC-3′	465 bp
		glpf 下游	5′-TGGTAAAATCGCATGTCCAATFC-3′	
	gmk	gmk 上游	5′-ATCGTTTTATCGGGACCATC-3′	429 bp
		gmk 下游	5′-TCATTAACTACAACGTAATCGTA-3′	
	pta	pta 上游	5′-GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG-3′	474 bp
		pta 下游	5′-GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA-3′	
	tpi	tpi 上游	5′-TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA-3′	402 bp
		tpi 下游	5′-TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC-3′	
	yqil	yqil 上游	5′-CAGCATACAGGACACCTATTGGC-3′	516 bp
		yqil 下游	5′-CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC-3′	

1.2.7 药敏实验 药敏实验在微生物鉴定药敏分析仪上进行,采用上海复星佰珞公司的 BIOFOSUM 葡萄球菌药敏板(Lot 4A076)进行测定,以美国临床实验室标准化协会(CLSI)2009 出版的琼脂稀释法药敏实验解释标准判断 MRSA 菌株对抗生素的耐药状态,以耐药(R)、中介(I)、敏感(S)表示,计算 MRSA 对不同抗生素的耐药率(R% = R 菌株数/受测菌株数 × 100%),中介率(I% = I 菌株数/受测菌株数 × 100%)和敏感率(S% = S 菌株数/受测菌株数 × 100%)。

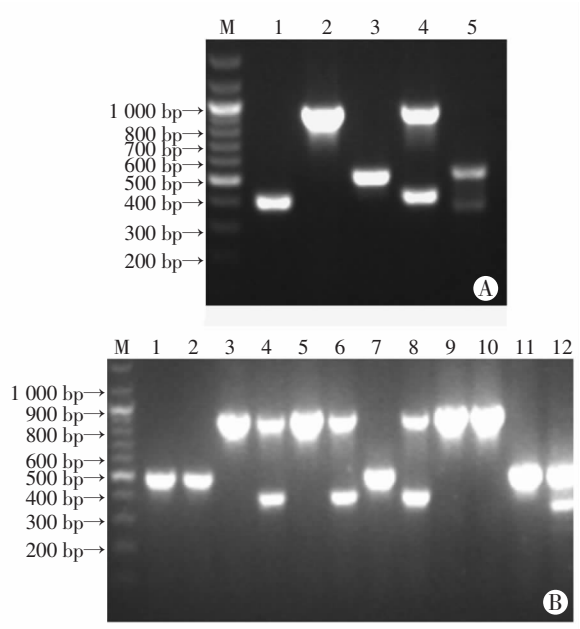
2 结果

2.1 SCC*mec* 分型

181 株临床金葡菌,经多重 PCR 扩增后确认为 MRSA 的有 142 株。MRSA SCC*mec* 分型的多重 PCR 扩增结果见图 1。142 株MRSA 经 SCC*mec* 分型,检出 SCC*mec* Ⅰ型 5 株,占 3.5%(5/142),SCC*mec* Ⅱ型 29 株(20.4%),SCC*mec* Ⅲ型 87 株(61.3%),SCC*mec* Ⅳ型 16 株(11.3%);SCC*mec* Ⅴ型 4 株(2.8%),未分型 1 株(0.7%)。所检测的菌株中,HA-MRSA 占 85.2%(121/142),CA-MRSA 占 14.1%(20/142)。

2.2 *spa* 分型

对测序结果进行比对分析,结果 142 株 MRSA 菌可分为 15 个*spa* 基因型,其中优势型别为 t030 型(42 株,占 29.6%)、t002 型(30 株,占 21.1%)、t037 型(23 株,16.2%)和 t1081 型(13 株,9.2%)。另外,发现新的 spa 基因型 9 株,以及未能分型的 MRSA 2 株。



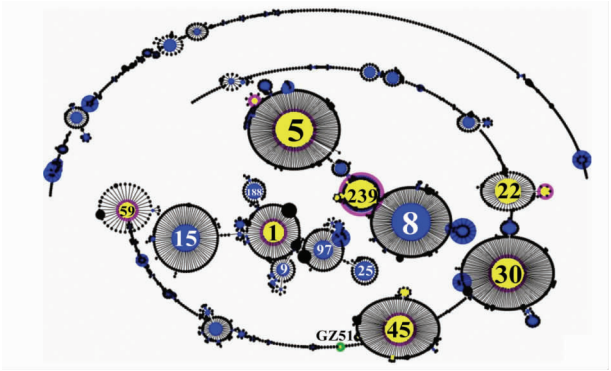
A:质控菌株 SCC*mec* 分型凝胶电泳结果 M:DNA 标准;1~5:分别为 MRSA NCTC 10442(SCC*mec* Ⅰ)、MRSA N315(SCC*mec* Ⅱ)、MRSA 85/2082(SCC*mec* Ⅲ)、MRSA JCSC 4744(SCC*mec* Ⅳ)和 MRSA WZ153(SCC*mec* Ⅴ)标准 SCC*mec* 分型质控菌株

B:临床分离 MRSA 株 SCC*mec* 分型凝胶电泳结果 M:DNA 标准;1~12:分别为 MRSA 临床分离株,其中 1、2、7、11 泳道为Ⅲ型,3、5、9、10 泳道为Ⅱ型,4、6、8 泳道为Ⅳ型,12 泳道为Ⅴ型

图1 SCC*mec* 分子分型凝胶电泳结果

2.3 MLST 分型结果

142 株 MRSA 分为 8 种 ST 型，见图 2。在 142 株 MRSA 中，78 株的等位基因谱是 2-3-1-1-4-4-3，为 ST239 型，占 54.9%，属于 CC239 克隆群；30 株为 ST5 型，占 21.1%，属于 CC5 克隆群；15 株为 ST45 型，占 10.6%，属于 CC45 克隆群；12 株为 ST59 型，占 8.5%，属于 CC59 克隆群；另发现一种新 ST 型别，其等位基因谱为 10-14-8-6-13-3-37，与 CC45 克隆群的关系较近。

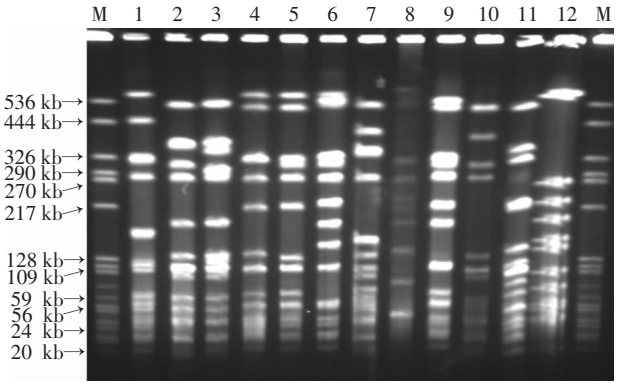


图中每个小点代表 1 个型别的菌株，许多相同型别的菌株聚类成克隆群(CC)，中间标有数字的为全球流行的主要克隆群；本研究检出的 7 个克隆群用黄色底，粉红色圈表示；未检出的克隆群为蓝色底；新型(GZ51)用绿色圈表示

图 2 142 株 MRSA 的 ST 型别及其与全球主要流行克隆群的关系(eBURST 软件)

2.4 PFGE 结果

基因组 DNA 经 *Sma* Ⅰ酶切电泳后，DNA 大片段可得到很好的分离，每株细菌 DNA 电泳条带数目为 16～20 条(图 3)。相对分子质量最大的片段约为 600 kb，绝大部分菌株在 20～80 kb 出现了 10 条左右大小相近的条带，主要不同出现在 100～600 kb 之间。聚类分析表明，142 株金葡菌分为 13 种电泳型，依次命名为 A～M 型。其中 A 型、G 型为主要型别，分别为 25 株和 21 株，另有 26 株偶发株，占 18.3%。



M：标准 MRSA 株 N315；1～12：MRSA 临床分离株，其中 1、4、5 为 G 型，2、3 为 A 型，6、9 为 H 型，7 为 J 型，9、11、12 为偶发株，10 为Ⅰ型

图 3 脉冲场凝胶电泳分型电泳结果

2.5 药敏实验分析

142 株 MRSA 对 17 种抗生素的药敏实验结果见表 2。由表 2 可见，MRSA 对糖肽类抗生素(万古霉素、替考拉宁)、利奈唑胺和呋喃妥因的耐药性最低(R% ≤1.8%)；对复方新诺明(R% =19.4%)和喹努普汀(R% =5.8%)的耐药性也较低；对其余被检抗生素的耐药性则较高。另外，在 HA-和 CA-MRSA 两大类流行株中，对 β-内酰胺类抗生素具有相似的高耐药性，对其他抗生素的耐药性则差别较大。因此，我们将 R% ≥70% 的非 β-内酰胺类抗生素 GEN/AMK/CIP/CLI/ERY 组成 MRSA 的耐药谱，HA-和 CA-MRSA 的耐药谱分别为 GEN/AMK/TET/CIP/ERY 和 CLI/ERY。

2.6 主要流行 MRSA 克隆及其耐药谱

检出的 8 种 ST 归属于 7 个克隆群(图 2)，其中 HA-MRSA 中的 ST239-MRSA-Ⅲ和 ST5-MRSA-Ⅱ为主要流行克隆，也发现 CA-MRSA 中 ST59-MRSA-Ⅳ克隆的流行，且主要的流行克隆拥有各自特定的抗生素耐药谱。如 CC239 群中，主要由 t030 和 t037 两种 *spa* 型的菌株构成，对应的抗生素耐药谱分别是 GEN/AMK/RIF/CIP 和 GEN/AMK/TET/CIP/CLI/ ERY/SXT，有明显的区别。各分子分型方法的结果及主要型别的抗生素耐药谱见表 3。

表 2 MRSA 临床分离株抗生素药敏实验结果

类别	抗生素	HA-MRSA(n=121)			CA-MRSA(n=20)			MRSA(n=142)		
		R%	I%	S%	R%	I%	S%	R%	I%	S%
β-内酰胺类	苯唑西林(OXA)	98.3	0.8	0.8	100.0	0.0	0.0	98.6	0.7	0.7
	青霉素(PEN)	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
	氨苄西林(AMP)	100.0	0.0	0.0	94.7	0.0	5.3	99.1	0.0	0.9
	头孢西丁(FOX)	100.0	0.0	0.0	94.7	0.0	5.3	99.1	0.0	0.9
氨基糖苷类	庆大霉素(GEN)	90.7	2.5	6.8	15.0	0.0	85.0	79.9	2.2	17.9
	阿米卡星(AMK)	92.5	1.1	6.4	5.3	5.3	89.4	77.7	1.8	20.5
糖肽类	万古霉素(VAN)	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0
	替考拉宁(TEC)	2.2	1.1	96.7	0.0	0.0	100.0	1.8	0.9	97.3
利福霉素类	利福平(RIF)	59.8	1.7	38.5	10.0	0.0	90.0	52.2	1.4	46.4
四环素类	四环素(TET)	70.4	7.0	22.6	30.0	20.0	50.0	64.7	8.8	26.5
喹诺酮类	环丙沙星(CIP)	94.1	2.5	3.4	25.0	0.0	75.0	83.5	2.2	14.3
林可胺类	克林霉素(CLI)	69.2	0.0	30.8	73.3	0.0	26.7	70.0	0.0	30.0
大环内酯类	红霉素(ERY)	79.5	1.7	18.8	75.0	0.0	25.0	79.0	1.4	19.6
磺胺类	复方新诺明(SXT)	22.1	9.3	68.6	5.0	5.0	90.0	19.4	9.4	71.2
唑烷酮类	利奈唑胺(LZD)	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0
链阳霉素类	喹努普汀(QD)	6.8	3.4	89.8	0.0	0.0	100.0	5.8	2.9	91.3
合成抗菌药	呋喃妥因(NIT)	1.7	0.0	98.3	0.0	0.0	100.0	1.4	0.0	98.6

表3 MRSA各分型结果统计及与药敏结果的对比分析

CC(菌株数)	MLST	*Spa* 型(菌株数)	PFGE 型	SCC*mec* 型别(菌株数)	耐药谱
CC239(68)	ST239	t030(42)	A ~ D	Ⅰ(1)Ⅲ(41)	GEN/AMK/RIF/CIP
		t037(23)	E ~ F	Ⅰ(1)Ⅱ(1)Ⅲ(21)	GEN/AMK/TET/CIP/CLI/ERY/SXT
		t138(1)		Ⅰ(1)	
		t437(1)		Ⅲ(1)	
		t459(1)		Ⅲ(1)	
CC5(31)	ST5	t002(30)	G ~ I	Ⅱ(27)Ⅲ(1)Ⅳ(2)	GEN/AMK/TET/CIP/CLI/ERY
	ST105	t688(1)		Ⅱ(1)	
CC45(15)	ST45	t1081(13)	L	Ⅲ(11)Ⅴ(2)	GEN/TET/CIP/ERY
		t2637(1)		Ⅳ(1)	
		t7825(1)		Ⅳ(1)	
CC59(12)	ST59	t437(8)	J	Ⅰ(1)Ⅲ(1)Ⅳ(4)Ⅴ(2)	CLI/ERY
		t441(3)	K	Ⅰ(1)Ⅳ(2)	CLI/ERY
		t7281(1)		Ⅲ(1)	
CC1(3)	ST1	t114(3)	M	Ⅳ(3)	CLI/ERY
CC30(1)	ST30	t021(1)		Ⅳ(1)	
CC22(1)	ST217	t852(1)		Ⅳ(1)	
CC239(10)	ST239	New(9)		Ⅲ(9)	
		NT(1)		Ⅲ(1)	
CC45(1)	New	NT(1)		NT(1)	

3 讨论

MRSA已成为医院和社区感染的常见病原菌,具有较强的外界环境适应能力和定植能力,以及对抗生素的耐受能力。MRSA的感染率和发病率逐年升高,引起了国内外科技工作者的高度关注。Liu等[5]报道2005–2006年广州无CA-MRSA检出,但本研究CA-MRSA检出率达14.1%,表明近年来广州地区MRSA感染有向社区蔓延的趋势。HA-MRSA所携带的SCC*mec*元件因可整合多种附加耐药基因而呈现多重耐药。本研究中的药敏实验结果表明,其对所有β-内酰胺类抗生素都耐药,对其他临床常用抗生素,如氨基糖苷类、环丙沙星、克林霉素、红霉素、四环素也不同程度耐药。CA-MRSA的SCC*mec*元件结构上仅携带对β-内酰胺类抗生素耐药基因,但已有报道CA-MRSA对多重药物敏感率呈逐年下降趋势,也存在因抗生素的选择压力而获得强耐药的可能性[15]。本研究中,CA-MRSA不仅对所有β-内酰胺类抗生素都耐药,对红霉素、克林霉素、环丙沙星及四环素等非β-内酰胺类抗生素也表现出不同程度耐药,由此可见广州地区CA-MRSA的多重药物敏感性已在下降,耐药形势值得重视。

分子分型研究发现,ST239-MRSA-Ⅲ是广州地区院内流行的最具优势MRSA克隆(74/142,52.1%)。本克隆源于Brazili/Hungarian克隆株,首先在巴西发现并且广泛地播散于巴西的各个医院[16]。随后,这个克隆蔓延到邻近的南美和欧洲一些国家,并且此克隆很快取代了当地流行克隆成为优势克隆。随后,ST239也成为大部分亚洲国家的流行克隆[17]。以前的研究证实在2006年之前此克隆是我国大部分城市的主要克隆[5]。在MRSA的进化模式中,ST239代表CC8克隆群一个独特的分支克隆群CC239,来自MRSA的一个重组事件,即ST30和ST8之间邻近基因片段的交换[18]。通过分辨率更高的*spa*分型方法,发现ST239-MRSA-Ⅲ克隆发生了快速变迁,文献[5]证实2006年之前t037是此克隆中的优势型别,但本研究中,t030(55.4%,41/74)替代了t037(28.4%,21/74),成为优势型别。ST239-MRSA-Ⅲ-t030克隆进入医院后很快占据了主导地位,这说明其具有很强的生存优势,并且很容易在医院内传播。PFGE分型结果显示,97.6%(41/42)t030型MRSA具有相同或相似的PFGE型(A ~ D型),这说明自2010年到现在,主要由相同的ST239-MRSA-Ⅲ-t030克隆在广州医院内传播。在耐药表型上,ST239-MRSA-Ⅲ-t037克隆的耐药谱GEN/AMK/TET/ CIP/CLI/ERY/SXT和ST239-MRSA-Ⅲ-t030的耐药谱GEN/AMK/RIF/CIP存在差异,即对利福平、四环素、克林霉素、红霉素、复方新诺明这5种抗生素的耐药性有明显差异。

ST5-MRSA-Ⅱ是广州地区流行的第二优势克隆(27/142, 19.0%),属于由ST5型的MSSA获得SCC*mec*Ⅱ遗传原件后演变的NewYork/Japan国际克隆。该克隆最初在美国[19]和日本[20]流行,随后在欧洲[21]和亚洲[22]其他一些国家流行。以前的研究显示我国一些城市(如沈阳和大连)流行ST5-MRSA-Ⅱ克隆[5]。本研究的结果显示,该克隆在广州开始流行并占据一定优势地位。在MRSA的进化模式中,ST5归属于CC5克隆群,并且文献[5]报道该克隆一直以t002型为主。本研究中,ST5-MRSA-Ⅱ克隆均为t002

型,同时 PFGE 的结果显示 93.3%(28/30) t002 型 MRSA 中具有相同或相似的 PFGE 型(G~Ⅰ型),表明有进化缓慢且相同的 ST5-MRSA-Ⅱ-t002 克隆在广州地区传播。ST5-MRSA-Ⅱ-t002 的耐药谱 GEN/AMK/TET/CIP/CLI/ERY 与 ST239-MRSA-Ⅲ-t037 克隆的耐药谱极为相似,但在对复方新诺明的敏感性上有差异。

在广州,除了上述流行优势克隆外,还发现一些小规模流行克隆。ST45-MRSA-Ⅲ(7.7%, 11/142),属于 CC45 克隆群,*spa* 分型结果显示均属 t1081 型,耐药谱为 GEN/TET/CIP/ERY。近年来,在美国、台湾、香港地区[23]传播流行的 CA-MRSA 克隆,ST59-MRSA-Ⅳ(本研究检出率 5.6%, 8/142),源于 USA 1000 克隆株,属于 CC59 克隆群,包含 t437(6 株)和 t441(2 株)两种型别,也已经通过各种途径传播到广州地区,并且和 CA-MRSA 具有相同的耐药谱 CLI/ERY。同时,偶发菌株中也以 CA-MRSA 为主,并且具有与 CA-MRSA 相似的耐药谱。

综上所述,广州地区 MRSA 并非以单一克隆占优势,HA-MRSA 主要由 3 种克隆菌株(ST239-MRSA-Ⅲ-t030、ST5-MRSA-Ⅱ-t002 和 ST239-MRSA-Ⅲ-t037)构成。另外,近年来流行的 CA-MRSA 也已经通过各种途径传播到广州,以小规模流行克隆 ST59-MRSA-Ⅳ-t437 为主,提示 CA-MRSA 的感染在本地区今后的疾病预防和治疗中应加以重视。同时,通过抗生素药敏实验,发现不同流行克隆的 MRSA 具有特征性耐药谱,提示临床应用抗生素应依据不同的 MRSA 型别进行合理用药,以从根本上控制 MRSA 的感染和暴发流行。

参考文献:

[1] David M Z, Daum R S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(3): 616-687.

[2] Cohen P R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: implications for patients and practitioners[J]. Am J Clin Dermatol, 2007, 8(5): 259-270.

[3] Isobe H, Takano T, Nishiyama A, *et al*. Evolution and virulence of Panton-Valentine leukocidin-positive ST30 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the past 30 years in Japan[J]. Biomed Res, 2012, 33(2): 97-109.

[4] Delaney J A, Schneider-Lindner V, Brassard P, *et al*. Mortality after infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) diagnosed in the community[J]. BMC Med, 2008, 6: 2.

[5] Liu Y, Wang H, Du N, *et al*. Molecular evidence for spread of two major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones with a unique geographic distribution in Chinese hospitals[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(2): 512-518.

[6] Du J, Chen C, Ding B, *et al*. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of nasal *Staphylococcus aureus* isolates from a Chinese medical college campus[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27328.

[7] Kobayashi N, Wu H, Kojima K, *et al*. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction[J]. Epidemiol Infect, 1994, 113(2): 259-266.

[8] Oliveira D C, Milheirico C, de-Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type Ⅵ[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(10): 3457-3459.

[9] Harmsen D, Claus H, Witte W, *et al*. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5442-5448.

[10] Koreen L, Ramaswamy S V, Graviss E A, *et al*. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(2): 792-799.

[11] Ruppitsch W, Indra A, Stoger A, *et al*. Classifying *spa* types in complexes improves interpretation of typing results for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(7): 2442-2448.

[12] Enright M C, Day N P, Davies C E, *et al*. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(3): 1008-1015.

[13] Feil E J, Li B C, Aanensen D M, *et al*. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data[J]. J Bacteriol, 2004, 186(5): 1518-1530.

[14] Bannerman T L, Hancock G A, Tenover F C, *et al*. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(3): 551-555.

[15] Yu F, Chen Z, Liu C, *et al*. Prevalence of *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes among isolates from hospitalised patients in China[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(4): 381-384.

[16] Teixeira L A, Resende C A, Ormonde L R, *et al*. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2400-2404.

[17] Feil E J, Nickerson E K, Chantratita N, *et al*. Rapid detection of the pandemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST 239, a dominant strain in Asian hospitals[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(4): 1520-1522.

[18] Wang W Y, Chiueh T S, Sun J R, *et al*. Molecular typing and phenotype characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from blood in Taiwan[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30394.

[19] Roberts R B, de-Lencastre A, Eisner W, *et al*. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. MRSA Collaborative Study Group[J]. J Infect Dis, 1998, 178(1): 164-171.

[20] Aires-de-Sousa M, de-Lencastre H, Santos-Sanches I, *et al*. Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan[J]. Microb Drug Resist, 2000, 6(3): 253-258.

[21] Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, *et al*. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA[J]. Lancet, 2002, 359(9320): 1819-1827.

[22] Ko K S, Lee J Y, Suh J Y, *et al*. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Asian countries[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(1): 421-426.

[23] Song J H, Hsueh P R, Chung D R, *et al*. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(5): 1061-1069.

(收稿:2012-12-16;修回:2013-01-14)
(编辑 王 红)