文章编号:1000-5404(2014)08-0735-05

论著

重庆地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌主要流行克隆更替的机制研究

尚伟龙,胡启文,胡 珍,朱军民,杨 杰,袁文常,程 航,袁吉振,张 霞,饶 青,饶贤才 (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)

[摘要] **目的** 探讨重庆地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株ST239-MRSA-Ⅲ-t030替代ST239-MRSA-Ⅲ-t037克隆的机制。**方法** 选择重庆地区分离的ST239-MRSA-Ⅲ-t030和ST239-MRSA-Ⅲ-t037临床株,检测各菌株的生长曲线,观察菌落形态,分析菌株的药物敏感谱;再通过体外、体内竞争实验和交叉抑制实验深入探讨ST239-MRSA-Ⅲ-t030替代ST239-MRSA-Ⅲ-t037的机制。**结果** ST239-MRSA-Ⅲ-t030菌株较ST239-MRSA-Ⅲ-t037有更短的生长迟缓期,后者在固体培养基上生长的菌落相对较小,且都对复方新诺明耐药,对利福平敏感,这与ST239-MRSA-Ⅲ-t030菌株不同(大多数对复方新诺明敏感,对利福平都耐药)。ST239-MRSA-Ⅲ-t030菌株在体外和体内都表现出比ST239-MRSA-Ⅲ-t037菌株更强的生存竞争优势,但两克隆的菌株间并不存在明显的交叉抑制现象。**结论** ST239-MRSA-Ⅲ-t030克隆的生存竞争优势和独特的耐药表型可能是其成功替代ST239-MRSA-Ⅲ-t037而成为第一流行克隆的原因。

[关键词] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;克隆替代;生长曲线;利福平耐药;复方新诺明耐药
[中图法分类号] R373;R378.11;R915 [文献标志码] A

Mechanisms in replacement of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clones in Chongqing

Shang Weilong, Hu Qiwen, Hu Zhen, Zhu Junmin, Yang Jie, Yuan Wenchang, Cheng Hang, Yuan Jizhen, Zhang Xia, Rao Qing, Rao Xiancai (Department of Microbiology, Chongqing Laboratory of Microbial Engineering, College of Basic Medical Science, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the mechanisms underlying the replacement of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) straim ST239-MRSA-Ⅲ-t037 by ST239-MRSA-Ⅲ-t030 in Chongqing, China. **Methods** Eight ST239-MRSA-Ⅲ-t030 and ST239-MRSA-Ⅲ-t037 isolates collected from Chongqing were divided into four t030/t037 pairs. The independent growth rates of all isolates were then determined. The competitive growth rates of the bacterial pairs were detected *in vitro* and *in vivo*, and cross inhibition assays were also performed. **Results** The ST239-MRSA-Ⅲ-t030 isolates were rifampicin-resistant, whereas the ST239-MRSA-Ⅲ-t037 strains were all rifampicin-sensitive and trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant. The ST239-MRSA-Ⅲ-t030 strains had shorter lag phases than the ST239-MRSA-Ⅲ-t037 isolates. The ST239-MRSA-Ⅲ-t030 strains could out-compete their rivals in a competition assay *in vitro* as well as in a mouse model. No significant cross-inhibition effect was observed between ST239-MRSA-Ⅲ-t030 and ST239-MRSA-Ⅲ-t037. The growth of ST239-MRSA-Ⅲ-t037 strains on the BHI nonselective plates had smaller colonies as compared to ST239-MRSA-Ⅲ-t030 strains. **Conclusion** ST239-MRSA-Ⅲ-t030 replacing ST239-MRSA-Ⅲ-t037 as the first predominant clone may result from its higher growth rate and the specific drug resistance profiles.

[**Key words**] methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; clonal replacement; growth curve; rifampicin-resistance; sulfamethoxazole-resistant

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270979), the Major Special Project of National Science and Technology of China (2012ZX09103301-038), and the Starting Scientific Fund for the Returned Overseas Scholars of Ministry of Education (2013). 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(31270979);国家科技重大专项(2012ZX09103301-038);教育部留学回国人员科研启动基金(2013)
[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.20140124.1024.013.html(2014-01-24)

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是重要的医院感染病原菌,常引起皮肤、软组织感染、致死性肺炎、菌血症和脓毒血症等[1-2]。1961年耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)被发现,并很快在全球播散。如今,MRSA已进化为对多种抗生素耐药的超级细菌,引起了社会的极大关注[3]。事实上,仅有少数MRSA克隆群在世界各地流行,且存在地区差异。例如,在英国引起人类感染的MRSA克隆群主要为EMRSA-15(CC22, ST22)和EMRSA-16(CC30, ST36)[4],在日本、匈牙利和美国主要为ST5-SCCmec Ⅱ, ST239-SCCmec Ⅲ和ST8-SCCmec Ⅳ[5],而在我国,ST239-MRSA-Ⅲ是医院获得性MRSA感染的主要克隆群[6-7]。

分子流行病学研究表明,MRSA优势克隆群或者群内的克隆之间存在相互替代的现象。如德国的一所大学医院里经过11年的克隆群变迁,CC22-MRSA-Ⅳ和CC5-MRSA-Ⅱ逐步替代了CC45-MRSA-Ⅳ和CC5-MRSA-Ⅰ而成为主要的克隆群[8];在匈牙利,1994-1998年主要流行克隆群为ST239,而从2001-2004年间逐渐被ST228和ST5替代[9];在我国北京地区,2000年之前ST239-MRSA-Ⅲ-t037是最主要的克隆,然而2000年之后迅速被ST239-MRSA-Ⅲ-t030取代[10],其机制不清。我们实验室前期对2009-2012年分离自重庆、北京、上海、广州、沈阳和乌鲁木齐等9所医院的MRSA菌株进行检测表明,ST239-MRSA-Ⅲ-t030仍是最主要的流行克隆,检出率28.2%,ST239-MRSA-Ⅲ-t037检出率为14.9%,这与Liu等[11]的报道一致。探讨MRSA克隆替代的机制,对于制定有效的控制MRAS感染策略有着非常重要的意义。抗生素的使用;MRSA的遗传多样性、耐药性与地理分布;区域经济条件的差异等都可能成为MRSA克隆替代的原因[12],但目前仍无可靠的直接证据。

在前期分子分型研究的基础上,我们选择了分离自重庆地区的医院获得型ST239-MRSA-Ⅲ-t030和ST239-MRSA-Ⅲ-t037菌株共8株,分别进行生长曲线测定、生长形态观察、耐药谱分析,并进一步利用体外竞争实验、体内竞争实验和交叉抑制试验比较了ST239-MRSA-Ⅲ-t030和ST239-MRSA-Ⅲ-t037的适应性,初步的阐明了重庆地区ST239-MRSA-Ⅲ-t030替代ST239-MRSA-Ⅲ-t037克隆的机制,为针对性制定MRSA防控措施提供了重要的实验依据。

1 资料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及实验动物 ST239-MRSA-Ⅲ-t030/ST239-MRSA-Ⅲ-t037菌株分离自重庆市某4所综合性医院,分别来源于腹腔渗出液、血液、呼吸道和伤口分泌物(表1),分为4个实验组。BALB/c小鼠购自本校实验动物中心,雌性,6~8周龄(20 g左右),SPF级。

1.1.2 仪器与试剂 全波长酶标仪,Bio-Rad垂直电泳仪,Bio-Rad凝胶成像仪,台式离心机。24孔板购自美国Corning公司;BHI(Brain heart infusion)细菌培养基购自英国Oxiod公司;Triton X-100购自上海生工生物工程技术服务有限公司;丙酮购自成都科龙化工试剂公司;5×SDS-PAGE上样缓冲液,蛋白质Marker购自Thermo Scientific公司;利福平(RIF)购自上海生工生物工程技术服务有限公司;三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MRSA生长曲线的测定 为保证相同浓度的初始菌接种量,将每株菌的过夜培养物1∶500稀释于新鲜的BHI液体培养基中,按每孔1 mL接种于24孔板中,置全波长酶标仪上,37 ℃震荡培养24 h,每小时检测1次$D(600)$吸光度值。实验重复3次,用GraphPad Prisem 5.0绘制生长曲线[13]。

1.2.2 体外竞争实验 将每对实验组ST239-MRSA-Ⅲ-t030/ST239-MRSA-Ⅲ-t037过夜菌按1∶1混合,接种于新鲜的BHI培养基中,37 ℃震荡培养24 h。取10 μL培养菌液,1∶(1×10^7)稀释,取100 μL分别涂布于含4 μg/mL利福平的BHI固体平板和普通BHI平板(无抗性),各3块,37 ℃培养过夜,观察两种细菌在普通平板上的菌落形态[14],分别对抗性平板和普通平板上的菌落数进行计数。根据t030、t037菌株对抗生素敏感性不同,在抗性平板上生长的为ST239-MRSA-Ⅲ-t030菌落数,普通平板上的菌落数与抗性平板上的菌落数之差即为ST239-MRSA-Ⅲ-t037菌落数。

表1 实验菌株及其对抗生素敏感性

菌株对		样本类型	spa	抗生素敏感性						
				LIN	TEI	VAN	OXA	CLI	RIF	SXT
Pair 1	CQ29	腹腔渗出液	t030	S	S	S	R	R	R	S
	CQ40	腹腔渗出液	t037	S	S	S	R	R	S	R
Pair 2	CQ98	血液	t030	S	S	S	R	R	R	R
	CQ65	血液	t037	S	S	S	R	R	S	R
Pair 3	CQ08	呼吸道分泌物	t030	S	S	S	R	S	R	S
	CQ66	呼吸道分泌物	t037	S	S	S	R	R	S	R
Pair 4	CQ18	伤口分泌物	t030	S	S	S	R	R	R	S
	CQ41	伤口分泌物	t037	S	S	S	R	R	S	R

LIN:利奈唑胺;TEI:替考拉宁;VAN:万古霉素;OXA:苯唑西林;CLI:克林霉素;RIF:利福平;SXT:复方新诺明;R:耐药;S:敏感

1.2.3 细菌培养上清蛋白质 SDS-PAGE 电泳 细菌培养于 BHI 液体培养基中至 $D(600)$ 为 0.8，取 1 mL 菌液 10 000 × g，离心 1 min，吸取上清 1 mL 加入 100 μL 预冷的饱和 TCA 溶液，置于冰上 1 h。4 ℃ 10 000 × g，离心 10 min，弃上清。沉淀中加入1 mL 预冷的丙酮重悬，4 ℃ 10 000 × g，离心 10 min，弃上清，重复 1 次。沉淀用 60 μL PBS 缓冲液重悬，加入 16 μL 5 × SDS-PAGE 上样缓冲液，90 ℃水浴 10 min，2 000 × g，离心 1 min。取 30 μL 加入 SDS-PAGE 凝胶中电泳[15]。考马斯亮蓝染色过夜，脱色，成像。

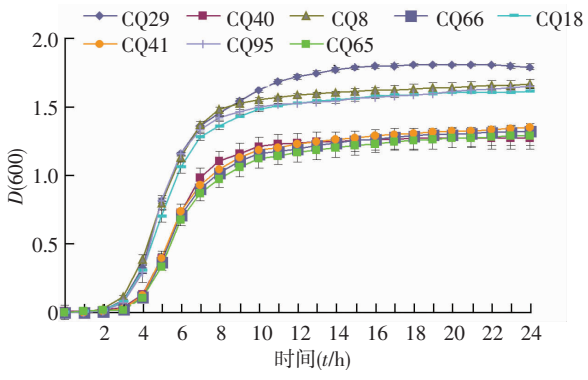
1.2.4 交叉抑制实验 将细菌 1∶500 分别接种于 20 mL 的 BHI 新鲜培养基中，37 ℃震荡培养 4 h 和 7 h，收集菌液，5 000 × g，离心 10 min，收集上清，用 0.22 μm 的除菌滤器过滤除菌。用 t030 7 h 培养上清培养 t037 菌株；用 t037 7 h 培养上清培养 t030 菌株；用 t030 4 h 培养上清分别培养 t030、t037 菌株；用 t037 4 h 培养上清培养 t030、t037 菌株；t030 7 h 培养上清加入 1/2 新鲜 BHI 培养基分别培养 t030、t037 菌株；新鲜的 BHI 培养基作为对照。全波长酶标仪上，37 ℃ 震荡培养 24 h，每小时检测 1 次 $D(600)$ 吸光度值。实验重复 3 次，用 GraphPad Prisem 5.0 绘制生长曲线。

1.2.5 动物体内竞争实验 37 ℃过夜培养 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 和 ST239-MRSA-Ⅲ-t037，按 1∶500 分别接种于新鲜 BHI 液体培养基中，37 ℃震荡培养至 D_{600} 吸光度值 0.8，各取 1 mL 菌液，10 000 × g，离心 1 min，弃上清。菌体用 1 mL PBS 重悬，10 000 × g，离心 1 min，再加 1mL PBS 重悬菌体，各取 500 μL 菌液混合均匀。经尾静脉感染 6 ~ 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠，100 μL/只，共 10 只。3 d 后断颈处死小鼠，无菌条件下取出肾脏，加入 1 mL 含 1% Triton X-100 PBS 缓冲液后充分研磨[15]，研磨液经 1∶(1×10^5) 稀释，取 100 μL 涂布于含 4 μg/mL 利福平的 BHI 固体平板和普通 BHI 平板，各 5 块，37 ℃培养过夜，分别对抗性平板和普通平板上的菌落数进行计数，计算每只肾脏的菌落形成单位(CFU/kidney)。

2 结果

2.1 菌株生长曲线

从图 1 可见，4 个实验组中 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 的生长速度快于 ST239-MRSA-Ⅲ-t037，且表现出更短的迟缓期，培养 24 h 后，ST239-MRSA-Ⅲ-t030 的细菌浓度也更高。

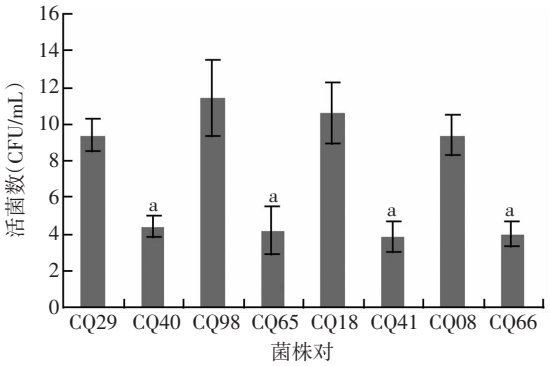


CQ29、CQ98、CQ08、CQ18：ST239-MRSA-Ⅲ-t030 菌株；CQ40、CQ65、CQ66、CQ41：ST239-MRSA-Ⅲ-t037 菌株

图 1 MRSA 菌株的生长曲线

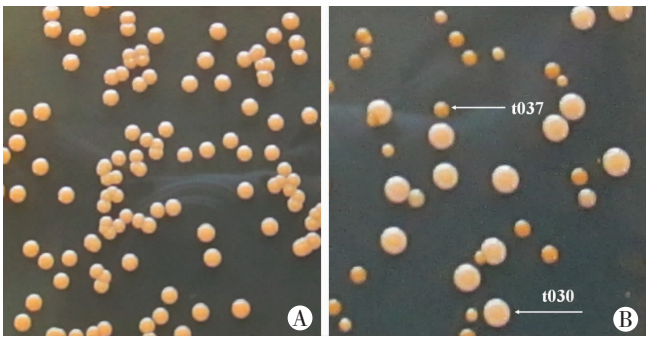
2.2 体外竞争实验

在竞争实验中，接种初始菌量一致，但 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 在共培养 24 h 后有更多的细菌存活，显著高于 ST239-MRSA-Ⅲ-t037($P < 0.05$)(图 2)。ST239-MRSA-Ⅲ-t030 在 4 μg/mL 利福平固体培养基上生长的菌落形态(图 3A)，ST239-MRSA-Ⅲ-t037 在固体培养基上生长的菌落相对较小(图 3B)，且对复方新诺明均耐药，对利福平均敏感，这与 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 菌株不同，后者对利福平均耐药，大多数对复方新诺明敏感(表 1)，1 株 ST239-MRSA-Ⅲ-t030(CQ98)对复方新诺明耐药，但在固体培养基上生长的菌落不变小，表明 t030 和 t037 对复方新诺明耐药的机制可能存在差异。



a：$P < 0.05$，同一组体外竞争实验中 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 和 ST239-MRSA-Ⅲ-t037 的活菌数比较

图 2 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 与 ST239-MRSA-Ⅲ-t037 菌株的体外竞争实验结果

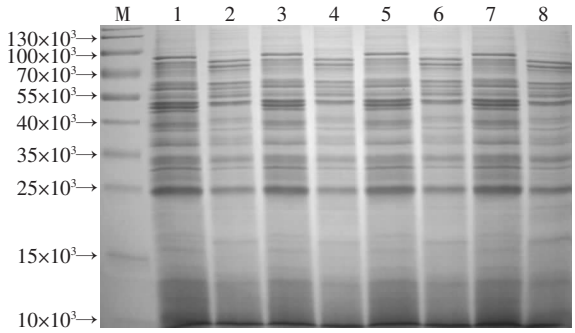


A：ST239-MRSA-Ⅲ-t030 生长在含 4 μg/mL 利福平的 BHI 固体平板上；B：ST239-MRSA-Ⅲ-t030 和 ST239-MRSA-Ⅲ-t037 在普通 BHI 平板(无抗性)的形态，白色箭头示 t030、t037 的菌落形态

图 3 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 和 ST239-MRSA-Ⅲ-t037 菌株的菌落形态观察

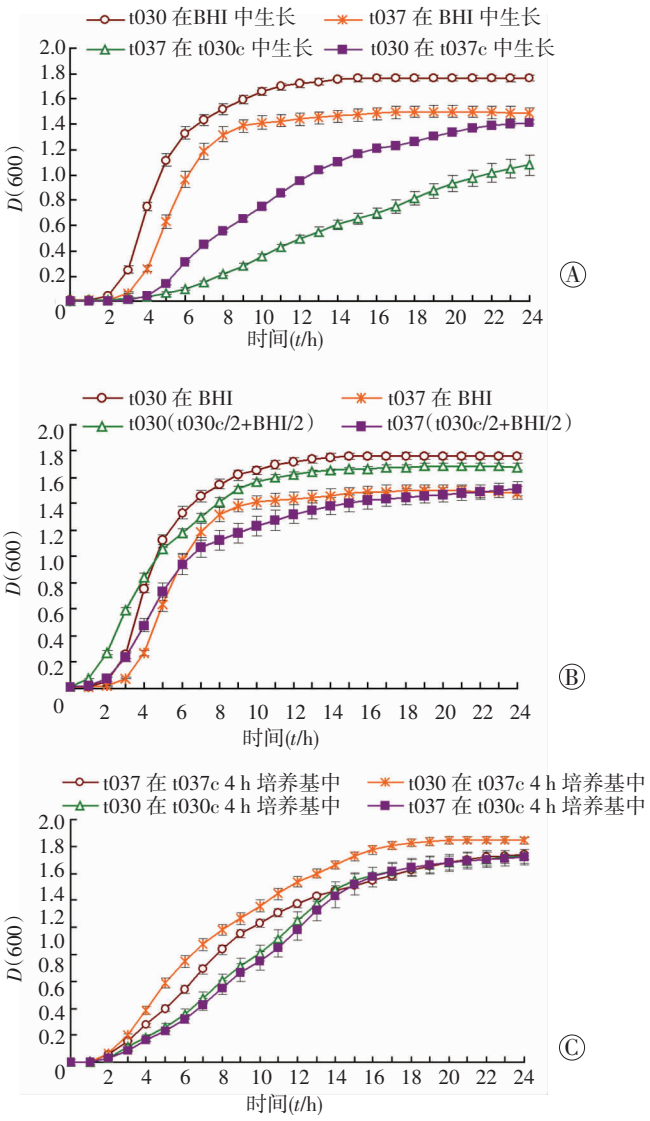
2.3 交叉抑制实验

ST239-MRSA-Ⅲ-t030 和 ST239-MRSA-Ⅲ-t037 菌株的培养上清经 SDS-PAGE 电泳分析，表明 t030、t037 分泌到培养上清中的蛋白存在明显差异，而 t030、t037 克隆内的菌株间分泌蛋白差异不大(图 4)。为证实 t030、t037 菌株培养上清的差异蛋白或者其他非蛋白类分泌因子是否参与细菌生长的抑制，我们分别利用 4、7 h 的细菌培养上清进行了交叉抑制实验，发现 t030、t037 菌株之间并没有存在明显的交叉抑制现象，t037 在 t030 7 h 的培养上清中生长较慢可能由于先前 t030 的快速生长消耗了培养基中的营养成分所致(图 5A)，这种抑制现象在补充了 1/2 新鲜培养基(图 5B)或者使用 4 h 的培养上清(图 5C)实验中得到明显改善。



1:CQ08;2:CQ66;3:CQ18;4:CQ41;5:CQ29;6:CQ40;7:CQ98;8:CQ65;M:标准;1、3、5、7:ST239-MRSA-Ⅲ-t030 菌株;2、4、6、8:ST239-MRSA-Ⅲ-t037 菌株

图4 菌株培养上清的SDS-PAGE电泳结果



A:t030 在 t037 7 h 培养上清(圆黑点实线,$t030_{t037c}$)与新鲜 BHI 培养基(圆红点实线,$t030_{BHI}$)中的生长情况的比较,及 t037 在 t030 7 h 培养上清(方黑点实线,$t037_{t030c}$)与新鲜 BHI 培养基(方红点实线,$t037_{BHI}$)中的生长情况的比较;B:比较 t030、t037 在添加50%新鲜 BHI 的 t030 7 h 培养上清中的生长情况;C:4 h 细菌培养上清培养同种和异种克隆的比较

图5 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 和 ST239-MRSA-Ⅲ-t037 菌株间交叉抑制实验分析

2.4 体内竞争实验

将过夜培养的 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 和 ST239-MRSA-Ⅲ-t037 菌株按1:1制备成感染标本,经尾静脉感染实验动物。3 d 后检测细菌在小鼠肾脏的感染情况,结果表明在每只肾脏中,t030 的平均活菌数为 9.50×10^6 CFU,t037 为 4.10×10^6 CFU,t030 感染小鼠肾脏的活菌数($8.30\times10^6\pm1.40\times10^6$)显著高于 t037($4.10\times10^6\pm0.98\times10^6$)。

3 讨论

我国 MRSA 的检出率从 1998 年的 27.5% 快速增长到 2009 年的 60.7%[16]。目前,我国流行的主要 MRSA 为 ST239-MRSA-Ⅲ 克隆群,该群的 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 和 ST239-MRSA-Ⅲ-t037 两个克隆分别占 57% 和 30%[7,11]。流行病学研究发现,在 2000 年之前,ST239-MRSA-Ⅲ-t037 为首要克隆[10],然而,自 2000 年之后 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 迅速替代 ST239-MRSA-Ⅲ-t037 而成为最主要克隆,但这种取代的机制并不明确。在本研究中,随机选择 4 对标本来源相同的 t030、t037 菌株进行克隆替代机制研究,发现 t030 的生长优势在其替代 t037 成为最主要克隆中起到重要的作用,但 t030、t037 菌株间并不存在明显的相互抑制现象。将 t030、t037 菌株按 1:1 混合接种液体 BHI 培养基,经 24 h 培养后,t030 的细菌数是 t037 的 2 倍以上(图 2),小鼠体内实验也得到同样结果,表明 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 菌株在与 ST239-MRSA-Ⅲ-t037 的生存竞争中处于优势地位。

通常,细菌对抗生素的耐药性会增加细菌适应环境的负担(fitness cost),这为细菌克隆替代的发生提供了可能[17]。在法国,对甲氧西林耐药而对庆大霉素敏感的 MRSA(GS-MRSA)取代了同时对甲氧西林和庆大霉素耐药的 MRSA(GR-MRSA),研究者发现GS-MRSA 比 GR-MRSA 更有生存竞争优势[18]。ST239-MRSA-Ⅲ-t030 和 ST239-MRSA-Ⅲ-t037 均属 ST239-MRSA-Ⅲ 克隆群,仅 spa 分型上存在差异,这种同一克隆群内的克隆替代并不常发生。我们前期的研究结果表明 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 克隆普遍对利福平耐药,而对复方新诺明普遍敏感;相反,ST239-MRSA-Ⅲ-t037 克隆则普遍对利福平敏感,而对复方新诺明耐药[7]。利福平是一种广谱抗生素,其通过抑制 DNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNAP)来杀死细菌。利福平耐药性突变发生在细菌 RNAP 的 β 亚单位(RpoB)上,通常医院利福平耐药 MRSA 菌株常发生 RpoB 的 H481N 和 S529L 突变[19]。有研究表明,MRSA RopB 分子 H481Y 的点突变常引起细菌全局转录水平的提高,从而增加其生存能力,即 MRSA 的利福平耐药表型可增加细菌的适应性生存能力[20]。复方新诺明主要通过抑制细菌内四

氢叶酸的合成,而四氢叶酸是细菌合成嘌呤、胸腺嘧啶核苷和脱氧 的必需物质。四氢叶酸的合成受到抑制使得细菌 DNA 的合成受阻,从而抑制细菌的生长繁殖[21]。复方新诺明耐药的 MRSA 可以通过吸收外源的胸腺嘧啶脱氧核苷来完成 DNA 的合成。胸腺嘧啶脱氧核苷依赖的 MRSA 通常表现为较慢的生长速率及小菌落的形成[22]。本研究中,我们也发现 t037 在固体 BHI 培养基上形成的菌落明显小于 t030 形成的菌落。ST239-MRSA-Ⅲ-t037 克隆对复方新诺明耐药的表型以及胸腺嘧啶脱氧核苷依赖的生物学特性,使其在生长繁殖过程中处于不利状态,从而被具有生长竞争优势的 t030 逐渐替代。在本研究中,我们也观察到 1 株 ST239-MRSA-Ⅲ-t030(CQ98)对复方新诺明耐药,但与 t037 不同的是,CQ98 在固体培养基上生长的菌落不变小,表明 CQ98 和 t037 菌株对复方新诺明耐药的机制有所不同,这也是下一步需要探索的课题。

本实验仅对重庆地区的 ST239-MRSA-Ⅲ-t030 替代 ST239-MRSA-Ⅲ-t037 机制进行了初步探讨,发现菌株本身的生存优势和独特的耐药表型有利于特定菌株在实际竞争中处于优势地位,并在克隆的替代中发挥作用,所得结果对于制定针对性的 MRSA 感染防控策略有指导意义。

参考文献:

[1] Chambers H F, Deleo F R. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(9): 629-641.

[2] 原薇薇, 杨杰, 王冬梅, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 PBP2a 相互作用蛋白的筛选[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(8): 749-753.

[3] Barber M. Methicillin-resistant staphylococci[J]. J Clin Pathol, 1961, 14: 385-393.

[4] Ellington M J, Hope R, Livermore D M, *et al*. Decline of EMRSA-16 amongst methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteraemias in the UK between 2001 and 2007[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(3): 446-448.

[5] DeLeo F R, Otto M, Kreiswirth B N, *et al*. Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Lancet, 2010, 375(9725): 1557-1568.

[6] 程航, 曾方银, 胡启文, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(8): 696-701.

[7] Cheng H, Yuan W, Zeng F, *et al*. Molecular and phenotypic evidence for the spread of three major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones associated with two characteristic antimicrobial resistance profiles in China[J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(11): 2453-2457.

[8] Albrecht N, Jatzwauk L, Slickers P, *et al*. Clonal replacement of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a German university hospital over a period of eleven years[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e28189.

[9] Conceicao T, Aires-de-Sousa M, Fuzi M, *et al*. Replacement of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Hungary over time: a 10-year surveillance study[J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(10): 971-979.

[10] Chen H, Liu Y, Jiang X, *et al*. Rapid change of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in a Chinese tertiary care hospital over a 15-year period[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(5): 1842-1847.

[11] 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.

[12] Lee S M, Ender M, Adhikari R, *et al*. Fitness cost of staphylococcal cassette chromosome mec in methicillin-resistant Staphylococcus aureus by way of continuous culture[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(4): 1497-1499.

[13] Yuan W, Hu Q, Cheng H, *et al*. Cell wall thickening is associated with adaptive resistance to amikacin in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates[J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(5): 1089-1096.

[14] Knight G M, Budd E L, Whitney L, *et al*. Shift in do minant hospital-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (HA-MRSA) clones over time[J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(10): 2514-2522.

[15] Burts M L, Williams W A, DeBord K, *et al*. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of Staphylococcus aureus infections[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(4): 1169-1174.

[16] Xiao Y H, Giske C G, Wei Z Q, *et al*. Epidemiology and characteristics of antimicrobial resistance in China[J]. Drug Resist Updat, 2011, 14(4/5): 236-250.

[17] Nielsen K L, Pedersen T M, Udekwu K I, *et al*. Fitness cost: a bacteriological explanation for the demise of the first international methicillin-resistant Staphylococcus aureus epidemic[J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(6): 1325-1332.

[18] Laurent F, Lelievre H, Cornu M, *et al*. Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals[J]. J Antimicrob Chemother, 2001, 47(3): 277-283.

[19] O'Neill A J, Huovinen T, Fishwick C W, *et al*. Molecular genetic and structural modeling studies of Staphylococcus aureus RNA polymerase and the fitness of rifampin resistance genotypes in relation to clinical prevalence[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(1): 298-309.

[20] Gao W, Cameron D R, Davies J K, *et al*. The RpoB H481Y rifampicin resistance mutation and an active stringent response reduce virulence and increase resistance to innate immune responses in Staphylococcus aureus[J]. J Infect Dis, 2013, 207(6): 929-939.

[21] Chatterjee I, Kriegeskorte A, Fischer A, *et al*. *In vivo* mutations of thymidylate synthase (encoded by thyA) are responsible for thymidine dependency in clinical small-colony variants of Staphylococcus aureus[J]. J Bacteriol, 2008, 190(3): 834-842.

[22] Proctor R A, von-Eiff C, Kahl B C, *et al*. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(4): 295-305.

(收稿:2013-12-10;修回:2013-12-26)

(编辑 王 红)