DOI:10.16016/j.1000-5404.201511100

乌鲁木齐地区金黄色葡萄球菌分离株的分子分型与耐药性分析

杨延成[1],程 航[1],胡 珍[1],袁文常[2],尚伟龙[1],饶 青[1],胡启文[1],杨 杰[1],刘正祥[2],袁吉振[1],张骁鹏[1],彭华刚[1],刘 慧[1],朱军民[1],伏建峰[2],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];830000 乌鲁木齐,兰州军区乌鲁木齐总医院临床检验中心[2])

[摘要] **目的** 了解乌鲁木齐地区金黄色葡萄球菌临床分离株的分子特征及其对临床常用抗生素的耐药情况。**方法** 收集2010年6月至2012年12月期间乌鲁木齐地区一所大型综合医院临床分离的86株金黄色葡萄球菌,在鉴定区分耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,MRSA)和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*,MSSA)的基础上,应用SCC*mec*分型、*spa*分型、多位点序列分型(multilocus sequence typing,MLST)、脉冲场凝胶电泳分型(pulsed-field gel electrophoresis,PFGE)、*agr*分型等葡萄球菌分子分型方法进行分析,检测*pvl*毒力基因的携带率,检测菌株对苯唑西林、红霉素、四环素等13种临床常用抗生素的耐药性,分析菌株的耐药情况及耐药基因。**结果** 86株金葡菌中31株为MRSA,55株为MSSA。31株MRSA分为8种*spa*型和7种ST型,优势流行克隆为ST239-MRSA-Ⅲ-t030(71%,22/31)。55株MSSA分为23种*spa*型、16种ST型和8个PFGE聚类组,*agr* Ⅰ型占56.4%(31/55)。MSSA菌株的*pvl*毒力基因检出率为49.1%(27/55),MRSA为38.7%(12/31)。药敏结果显示31株MRSA均为多重耐药(multidrug-resistant,MDR)菌株,55株MSSA中有31株为MDR菌株。**结论** 乌鲁木齐地区流行的MRSA以ST239-MRSA-Ⅲ-t030为主,而MSSA表现出较高遗传多样性,发现有t11413,ST121等新的型别流行。

[关键词] 金黄色葡萄球菌;分子分型;耐药谱;多重耐药;乌鲁木齐
[中图法分类号] R181.34,R372,R378.11 [文献标志码] A

Molecular typing and antimicrobial resistances of *Staphylococcus aureus* isolated from a hospital in Urumqi, China

Yang Yancheng[1], Cheng Hang[1], Hu Zhen[1], Yuan Wenchang[2], Shang Weilong[1], Rao Qing[1], Hu Qiwen[1], Yang Jie[1], Liu Zhengxiang[2], Yuan Jizhen[1], Zhang Xiaopeng[1], Peng Huagang[1], Liu Hui[1], Zhu Junmin[1], Fu Jianfeng[2], Rao Xiancai[1]([1]Department of Microbiology, Chongqing Laboratory of Microbiological Engineering, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Clinical Laboratory Diagnostic Center, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Command, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 830000, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the molecular types and resistance of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) strains to commonly used antibiotics isolated in Urumqi, China. **Methods** A total of 86 *S. aureus* isolates were collected from a large-scale general hospital in Urumqi during June 2010 and December 2012. The methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) were determined. The molecular typing, including staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing, staphylococcal protein A (*spa*) gene typing, multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and accessory gene regulator (*agr*) typing were applied for the strains. The carriage of Panton-Valentine Leukocidin (*pvl*) genes and drug susceptibilities of *S. aureus* strains against 13 kinds of antibiotics were determined. **Results** In the 86 *S. aureus* isolates, 31 were MRSA (36.0%) and 55 were MSSA (64.0%). The MRSA strains were divided into 8 *spa* types and 7 ST types, ST239-MRSA-Ⅲ-t030 was the most prevalent clone (71%, 22/31). Among 55 MSSA strains, 23 *spa* types, 16 ST types and 8 PFGE

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81471993)
[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.20160131.1127.013.html(2016-01-31)

groups were found. Most MSSA strains were *agr* Ⅰ types (56.4%, 31/55). The frequency of *pvl* carriage was 49.1% (27/55) in MSSA strains, and was 38.7% (12/31) in MRSA strains. All MRSA strains were multidrug-resistant (MDR), whereas 31 out of the 55 MSSA strains (56.4%) belonged to MDR. **Conclusion** ST239-MRSA-Ⅲ-t030 is still the most predominant MRSA in Urumqi. MSSA isolates show wide genetic diversity. New types t11413 and ST121 are also dominant.

[**Key words**] *Staphylococcus aureus*; molecular characterization; drug susceptibility testing; multidrug-resistance; Urumqi

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81471993). Corresponding author: Rao Xiancai, E-mail: raoxiancai@126.com

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),简称金葡菌,是一种重要的人类机会致病菌,常引起皮肤、软组织感染,关节、骨感染,心内膜炎、败血症以及中毒性休克等多种疾病,病死率高[1]。明确特定区域的金葡菌主要流行克隆、切断其传播途径、终止耐药菌株在人群中传播是控制金葡菌流行的重要策略,故检测金葡菌流行菌株的分子特征及耐药谱对控制金葡菌感染有重要意义。

按菌株耐药性的差异,金葡菌通常被分为耐甲氧西林金葡菌(methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)和甲氧西林敏感金葡菌(methicillin-susceptible *S. aureus*, MSSA),其区别在于前者染色体中携带一葡萄球菌盒式染色体(staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*),其中的耐药基因 *mecA* 可编码对甲氧西林等β-内酰胺类抗生素耐药的决定簇,介导 MRSA 的耐药性。多种分子分型技术,如脉冲场凝胶电泳(PFGE),多位点序列分析(MLST),葡萄球菌 A 蛋白(*spa*)基因分型以及附属基因调节子(*agr*)分型等已被广泛应用于 MRSA 的进化和流行病学研究[2-5]。研究证实,ST5,ST239 和 ST8 是世界范围内流行的主要 MRSA 克隆群[6]。在我国,MRSA 分离率虽因地区不同而有较大差异,总体上约占金葡菌感染的 60% 左右,ST239 和 ST5 也是我国 MRSA 优势流行克隆[7-8];MSSA 在我国占金葡菌感染的 40% 左右,但目前对 MSSA 的研究报道非常有限,相对于 MRSA 而言,通常认为 MSSA 不存在优势克隆,而表现出更高的遗传多样性及更高的毒力因子表达[9-10],并且与菌血症、心内膜炎以及败血症关联更密切[11]。葡萄球菌杀白细胞毒素(Panton-Valentine leucocidin, PVL)是由 *lukS*、*lukF* 两个基因编码的双组份细胞成孔毒素,可破坏中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞等免疫细胞,在金葡菌感染过程中起重要作用,也是评价金葡菌毒力的常用指标之一[12-14]。

自 1961 年发现 MRSA 以来,耐药金葡菌感染一直倍受关注[3,5]。分子流行病学研究表明,MRSA 菌通常携带较多的耐药基因,毒力较弱,常引起医院内感染;而 MSSA 菌携带的耐药基因较少,毒力较强,常引起社区人群感染[6-7]。在本研究中,我们运用多种金葡菌分子分型方法,结合 *pvl* 毒力基因检测和耐药谱分析,对 2010 年 6 月至 2012 年 12 月从乌鲁木齐地区分离的 86 株金葡菌进行了分析研究,不仅从一定程度上揭示了我国西北地区金葡菌的流行特征,而且可为我国其他地区金葡菌感染和流行的检测提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 86 株金葡菌分离自乌鲁木齐地区的一所综合教学医院,主要源自 2010 年 6 月至 2012 年 12 月期间 86 位住院患者的分泌物、痰液、血液、脓等标本。其分离的标本类型和科室来源见表 1。

表 1 金葡菌临床分离株的科室来源和标本类型

科室	菌株总数(MRSA 菌株数/MSSA 菌株数)	标本类型及标本数			
		分泌物标本数	痰液标本数	血液标本数	其他标本数
骨科	12(5/7)	12	0	0	0
烧伤整形科	10(10/0)	9	0	0	1
神经外科	3(2/1)	0	3	0	0
耳鼻喉科	5(1/4)	5	0	0	0
颌面外科	5(0/5)	4	0	0	1
创伤科	4(1/3)	2	1	0	1
泌尿外科	1(0/1)	0	0	1	0
普外科	2(1/1)	1	0	0	1
急诊科	2(1/1)	0	2	0	0
ICU	3(2/1)	0	2	0	1
血液科	3(0/3)	1	2	0	0
肿瘤科	3(0/3)	0	2	1	0
呼吸内科	4(2/2)	0	3	1	0
消化内科	1(0/1)	0	0	0	1
神经内科	2(1/1)	1	0	0	1
心血管内科	1(0/1)	0	0	0	1
中医科	2(0/2)	1	1	0	0
肾病科	1(0/1)	0	1	0	0
干部科	6(2/4)	2	2	1	1
儿科	4(0/4)	0	4	0	0
综合科	1(0/1)	1	0	0	0
门诊	11(3/8)	8	3	0	0
合计	86(31/55)	47	26	4	9

1.1.2 仪器与试剂 Bio-Rad PCR 仪,Bio-Rad 垂直电泳仪,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);OXOID Tryptone Soya Broth(TSB)培养基。

1.1.3 引物 分子分型及毒力、耐药基因检测引物均参照文献设计[15-22],由华大基因合成。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养、基因组制备及菌株鉴定 细菌的分离培养按《全国临床检验操作规程》进行,按照文献所述方法提取基因组 DNA[23]。金葡菌及 MRSA、MSSA 的鉴定参照文献[24]所述,通过 PCR 方法检测金葡菌分离菌株的 *mecA* 与 *femB* 基因。若 *femB* 基因为阳性,*mecA* 基因为阴性则判断为 MSSA 菌株;若 *mecA* 与 *femB* 基因皆为阳性,则判断为 MRSA 菌株。

1.2.2 MRSA 菌株的 SCC*mec* 分型 根据文献[16]所述方法,应用 5 对特异性引物通过 PCR 方法扩增 MRSA 菌株基因组,对菌株进行Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ型的 SCC*mec* 分型,未扩增出特异性条带或者扩增出条带不符合判定标准的判定为未定型别(non-typable,NT)。

1.2.3 *spa* 分型 用特异性引物通过 PCR 扩增出金葡菌 *spa* 基因的 X 区[17,25],PCR 产物送上海英俊生物技术服务公司测序,将获得的序列提交 *spa* 基因分型数据库(http://www.ridom.de/spaserver),参照已公布的重复序列,根据重复序列出现的次数和排列方式确定 *spa* 型别[26]。

1.2.4 MLST 分型 采用 PCR 的方法分别扩增金葡菌 7 个看家基因(*arcc*、*aroe*、*glp*、*gmk*、*pta*、*tpi*、*yqil*)序列,产物送上海英俊生物技术服务公司测序,所获序列提交 MLST 数据库(http://saureus.mlst.net/)进行分析得出其 MLST 型别,即序列型(sequence type,ST)[15]。因 MSSA 菌株存在遗传多样性,定义所占比例 5% 以上的 ST 型为主要流行型别,*spa* 主要流行型别同样如此定义。

1.2.5 MSSA 菌株的 *agr* 分型 参照文献[19]所述方法,通过多重 PCR 扩增 MSSA 菌株基因组,PCR 产物进行电泳,441、575、323 和 659 bp 大小的条带分别代表 *agr* Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型、和Ⅳ型。

1.2.6 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析 按照文献[27]所述,将新鲜培养的金葡菌包埋于 1% 低熔点琼脂中,然后用溶葡萄球菌素及溶菌酶进行破壁,蛋白酶 K 消化,最后经限制性内切酶 *Sma* Ⅰ酶切后制胶电泳。结果用软件 BioNumerics version 6.6 (Applied Maths) 进行聚类分析,将同源性超过 90% 者定义为同一型。

1.2.7 *pvl* 毒力基因及耐药基因检测 通过 PCR 方法,分别用特异性引物扩增所有金葡菌的 *pvl* 基因[21],以及 MSSA 菌株的青霉素耐药基因 *blaZ* 和红霉素、克林霉素耐药基因 *ermA*、*ermC*[20,22],PCR 产物经电泳进行判断。

1.2.8 药敏实验 菌株的耐药情况用 Bio-Fosum 微生物鉴定药敏分析仪(上海复星佰珞公司)进行测定,按照美国临床实验室标准化协会(CLSI) 2011 出版的琼脂稀释法药敏实验解释标准判断菌株对抗生素的耐药状态[28],以耐药(R)和敏感(S)表示。按照文献[29],某株金葡菌如果对至少三类抗生素耐药(每类抗生素中至少有一种代表药物耐药),则定义该菌株为多重耐药(multidrug-resistant,MDR)菌株。

2 结果

2.1 MRSA 与 MSSA 鉴定

86 株临床金葡菌经 PCR 扩增 *mecA* 和 *femB* 基因检出 MRSA 菌株 31 株,占 36.0%,MSSA 菌株 55 株,占 64.0%。

2.2 分子分型

2.2.1 MRSA 菌株的 SCC*mec* 分型 31 株 MRSA 菌株经多重 PCR 扩增,检出 SCC*mec* Ⅲ型 25 株(80.6%),SCC*mec* Ⅴ型 4 株(12.9%),SCC*mec* Ⅰ型 1 株(3.2%),未分型 1 株(3.2%)。见表 2。

2.2.2 *spa* 分型 对扩增产物的测序结果进行分析,86 株金葡菌株可分为 31 种 *spa* 基因型(表 2)。其中 31 株 MRSA 分为 8 种 *spa* 基因型,优势型别为 t030(71.0%,22/31);55 株 MSSA 分为 23 种 *spa* 基因型,主要型别有 t11413(18.2%,10/55),t571(9.1%,5/55),t030(9.1%,5/55),t2592(9.1%,5/55),t284(7.3%,4/55),t002(5.5%,3/55)。另外有两株 MSSA 菌株未能分型,可能为新的 *spa* 型别。

2.2.3 MLST 分型 86 株金葡菌可分为 23 种 ST 型(表 2)。在 31 株 MRSA 中,优势型别为 ST239(71.0%,22/31),且均为 *spa* t030 型,另外发现 6 种 ST 型和 1 种新的 ST 型;55 株 MSSA 分为 16 种 ST 型,主要型别有 ST22(21.8%,12/55),ST121(18.2%,10/55),ST88(9.1%,5/55),ST15(9.1%,5/55),ST398(7.3%,4/55)和 ST1920(5.5%,3/55)。

2.2.4 *agr* 分型 将 55 株 MSSA 菌株进行 *agr* 分型,*agr* Ⅰ占 56.4%(31/55),*agr* Ⅱ占 12.7%(7/55),*agr* Ⅲ占 16.4%(9/55),*agr* Ⅳ为 14.5%(8/55)。7 株 *agr* Ⅱ型菌株有 5 株为 ST15 型,2 株为 ST5 型;8 株 *agr* Ⅳ菌株均为 ST121 型。

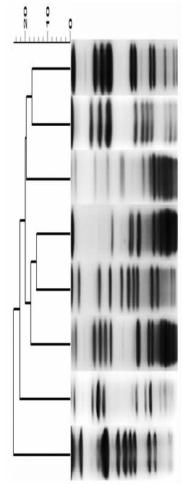
2.2.5 PFGE 分型 MSSA 菌株基因组 DNA 经 *Sma* Ⅰ酶切后,DNA 大片段可得到很好的分离,聚类分析表明 55 株 MSSA 菌株可分为 8 个聚类组,依次命名为 A~H 型,见图 1。其中 F 型,B 型,A 型为优势型

别,分别占 34.5%(19/55),18.2%(10/55),和 16.4%(9/55)。此外,4 株 ST398 菌株未能分型,可能因为这些菌株的基因组存在 DNA 甲基化而导致不能被 *Sma* Ⅰ酶切和分离[30]。

2.2.6 *pvl* 基因检测 31 株 MRSA 菌株中,*pvl* 毒力基因检出率为 38.7%(12/31),12 株 *pvl* 阳性菌株中有 10 株为 ST239 型,表明乌鲁木齐地区主要流行克隆 ST239 有较高的 *pvl* 毒力基因携带率(45.5%,10/22);55 株 MSSA 菌株中有 27 株为 *pvl* 阳性(49.1%),其中 ST121 型有 8 株,ST22 型有 10 株(表 2),可见 MSSA 菌株中,ST121(80.0%,8/10)和 ST22(83.3%,10/12)有较高的 *pvl* 毒力基因携带率。

表 2 MRSA/MSSA 的分子分型

菌株类型(菌株数)	MLST 型别(菌株数)	*spa* 型别(菌株数)	SCC*mec* 型别(菌株数)	*agr* 型别(菌株数)	*pvl* + 菌株数
MRSA(31)	ST239(22)	t030(22)	Ⅲ(22)	—	10
	ST5(2)	t002(2)	Ⅲ(2)	—	0
	ST188(2)	t189(2)	Ⅴ(2)	—	1
	ST22(1)	t11413(1)	Ⅴ(1)	—	1
	ST59(1)	t437(1)	Ⅴ(1)	—	0
	ST217(1)	t3668(1)	Ⅰ(1)	—	0
	ST398(1)	t034(1)	Ⅲ(1)	—	0
	new(1)	t2592(1)	未分型	—	0
MSSA(55)	ST22(12)	t11413(9),t571(1),t284(1),new(1)	—	Ⅰ(12)	10
	ST121(10)	t284(3),t030(2),t159(2),t435(2),t850(1)	—	Ⅳ(8),Ⅰ(2)	8
	ST88(5)	t2592(5)	—	Ⅲ(5)	3
	ST15(5)	t002(1),t571(1),t2325(1),t11518(1),new(1)	—	Ⅱ(5)	0
	ST398(4)	t571(2),t030(1),t2876(1)	—	Ⅰ(4)	1
	ST1920(3)	t5356(2),t030(1)	—	Ⅲ(2),Ⅰ(1)	0
	ST217(2)	t571(1),t11413(1)	—	Ⅰ(2)	0
	ST5(2)	t002(2)	—	Ⅱ(2)	1
	ST59(2)	t163(1),t172(1)	—	Ⅰ(2)	0
	ST630(2)	t377(2)	—	Ⅰ(2)	0
	ST7(2)	t2663(1),t6193(1)	—	Ⅰ(2)	1
	ST97(2)	t267(1),t359(1)	—	Ⅰ(2)	1
	ST1(1)	t127(1)	—	Ⅲ(1)	1
	ST188(1)	t030(1)	—	Ⅰ(1)	0
	ST30(1)	t1130(1)	—	Ⅲ(1)	1
	ST943(1)	t2617(1)	—	Ⅰ(1)	0



PFGE 型别	MLST 型别	*spa* 型别	*agr* 型别	*pvl* + 菌株数	MDR 菌株数
A(9)	ST22(4),ST1(1),ST5(1),ST7(1),ST188(1),ST1920(1)	t11413(2),t030(2),t002(1),t127(1),t571(1),t6193(1),未分(1)	Ⅰ(7),Ⅱ(1),Ⅲ(1)	5	3
B(10)	ST15(3),ST88(2),ST630(2),ST5(1),ST22(1),ST59(1)	t377(2),t2592(2),t002(1),t163(1),t571(1),t2325(1),t11413(1),未分(1)	Ⅰ(4),Ⅱ(4),Ⅲ(2)	1	5
C(3)	ST15(1),ST88(1),ST1920(1)	t002(1),t2592(1),t5356(1)	Ⅲ(2),Ⅱ(1)	1	2
D(3)	ST59(1),ST97(1),ST121(1)	t172(1),t267(1),t435(1)	Ⅰ(2),Ⅳ(1)	2	0
E(1)	ST88(1)	t2592(1)	Ⅲ(1)	1	1
F(19)	ST121(9),ST22(5),ST217(2),ST15(1),ST30(1),ST943(1)	t11413(6),t284(3),t030(2),t159(2),t435(1),t571(1),t850(1),t1130(1),t2617(1),t11518(1)	Ⅰ(10),Ⅳ(7),Ⅱ(1),Ⅲ(1)	12	16
G(3)	ST22(1),ST97(1),ST1920(1)	t359(1),t5356(1),t11413(1)	Ⅰ(2),Ⅲ(1)	1	0
H(3)	ST7(1),ST22(1),ST88(1)	t284(1),t2663(1),t2592(1)	Ⅰ(2),Ⅲ(1)	3	2

图 1 51 株 MSSA 菌株的分子分型结果及其多重耐药菌检出情况 (除去 4 株 PFGE 未分型菌株,括号内数字为菌株数)

2.3 药敏实验分析

86株金葡菌对13种抗生素的药敏实验结果见表3。MRSA对糖肽类抗生素(万古霉素、替考拉宁)全部敏感,仅有1株菌株对利奈唑胺耐药,2株对复方新诺明耐药,但是对其余被检抗生素的耐药率则较高(表3)。相对于MRSA菌株而言,MSSA菌株对大多数抗生素敏感,但是对复方新诺明的耐药率(18.2%,10/55)高于MRSA菌株(6.5%,2/31)。此外,MSSA菌株主要对青霉素、红霉素、克林霉素3种抗生素耐药,耐药率分别为89.1%(49/55),67.3%(37/55)和63.6%(35/55)(表3)。

表3 金葡菌临床分离株抗生素药敏实验结果

(耐药菌株数/菌株数)

抗生素类别	抗生素	MRSA耐药率	MSSA耐药率
β-内酰胺类	苯唑西林(OXA)	90.3(28/31)	0
	青霉素(PEN)	100(31/31)	89.1(49/55)
氨基糖苷类	庆大霉素(GEN)	87.1(27/31)	5.5(3/55)
糖肽类	万古霉素(VAN)	0	0
	替考拉宁(TEC)	0	0
利福霉素类	利福平(RIF)	83.9(26/31)	0
四环素类	四环素(TET)	87.1(27/31)	12.7(7/55)
喹诺酮类	环丙沙星(CIP)	87.1(27/31)	5.5(3/55)
	左氧佛沙星(LEV)	83.9(26/31)	1.8(1/55)
林可胺类	克林霉素(CLI)	71.0(22/31)	63.6(35/55)
大环内酯类	红霉素(ERY)	74.2(23/31)	67.3(37/55)
磺胺类	复方新诺明(SXT)	6.5(2/31)	18.2(10/55)
唑烷酮类	利奈唑胺(LZD)	3.2(1/31)	0

2.4 MDR菌株的耐药谱及分子特点

所有的MRSA菌株均为MDR菌株,而55株MSSA菌株中有31株为MDR菌株。22株ST239 MRSA菌株有共同的耐药谱PEN/CIP/GEN/RIF/TET/LEV(表3)。31株MSSA多重耐药菌株中,有23株对三类抗生素耐药,并且耐药谱都为PEN/ERY/CLI(表4),相应的31株MDR菌株青霉素、红霉素、克林霉素耐药基因检出率分别为*blaZ*(100%, 31/31),*ermC*(96.8%, 30/31),*ermA*(12.9%, 4/31),另外有8株MSSA对四类以上的抗生素耐药。10株ST121菌株中有8株为MDR菌株;4株ST398菌株中有2株对四类以上抗生素耐药,其中1株对6类抗生素耐药(PEN/ERY/CLI/SXT/CIP/TET),并且对左氧佛沙星和庆大霉素中介耐药。在19株PFGE聚类组F型菌株中有16株为MDR菌株,远高于其他聚类组。

3 讨论

自20世纪80年代开始,MRSA因其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,在全球范围内迅速传播,成为医院和社区感染的重要病原菌。在我国,临床金葡菌中的MRSA检出率从1980年的20%迅速升高到2008年的约60%[31],且不同地区存在较大差异,引起了国内科技工作者的高度关注。近年来的研究发现ST239-MRSA-Ⅲ-t030/t037、ST5-MRSA-Ⅱ-t002是我国MRSA优势流行型别[7-8]。本研究中,来自乌鲁木齐地区的MRSA检出

表4 MSSA多重耐药菌株株耐药谱及其分子特点(括号内数字为菌株数)

耐药谱(菌株数)	MLST型别(菌株数)	*spa*型别(菌株数)	*agr*型别(菌株数)	PFGE型别(菌株数)	*pvl*+菌株数
PEN/ERY/CLI(23)	ST121(7)	t284(3),t030(1),t159(1),t435(1),t850(1)	Ⅳ(6),Ⅰ(1)	F(7)	6
	ST22(6)	t11413(4),t284(1),new(1)	Ⅰ(6)	A(1),B(1),F(3),J(1)	5
	ST15(2)	t571(1),t11518(1)	Ⅱ(2)	B(1),F(1)	0
	ST88(2)	t2592(2)	Ⅲ(2)	C(1),J(1)	2
	ST217(2)	t571(1),t11413(1)	Ⅰ(2)	F(2)	0
	ST1(1)	t127(1)	Ⅲ(1)	A(1)	1
	ST5(1)	t002(1)	Ⅱ(1)	A(1)	1
	ST630(1)	t377(1)	Ⅰ(1)	B(1)	0
	ST943(1)	t2617(1)	Ⅰ(1)	F(1)	0
PEN/ERY/CLI/SXT(3)	ST88(1),ST59(1),ST398(1)	t163(1),t2592(1),t2876(1)	Ⅰ(2),Ⅲ(1)	B(1),E(1)	1
PEN/ERY/CLI/TET(2)	ST30(1),ST121(1)	t030(1),t1130(1)	Ⅰ(1),Ⅲ(1)	F(2)	2
PEN/ERY/CLI/CIP(1)	ST630(1)	t377(1)	Ⅰ(1)	B(1)	0
PEN/ERY/CLI/SXT/GEN(1)	ST1920(1)	t5356(1)	Ⅲ(1)	C(1)	0
PEN/ERY/CLI/SXT/CIP/TET(1)	ST398(1)	t030(1)	Ⅰ(1)	未分型	0

PEN:青霉素;ERY:红霉素;CLI:克林霉素;SXT:复方新诺明;CIP:环丙沙星;TET:四环素

率为36%(31/86),低于全国平均水平,该地区的MRSA优势流行型别为ST239-MRSA-Ⅲ-t030(71%,22/31),这些结果与文献[32]报道的对乌鲁木齐地区MRSA研究结果相一致。ST239-MRSA-Ⅲ源于Brazili/Hungarian克隆株,首先发现于巴西[33],随后蔓延到邻近的南美和欧洲一些国家,并很快取代了当地流行克隆成为优势克隆,ST239也是大部分亚洲国家的主要流行克隆[34]。在2000年之前,ST239-t037是我国的主要克隆,但是后来逐渐被ST239-t030取代[35],本研究中ST239-t030仍然是最优势克隆,未检出ST239-t037菌株,这可能是因为ST239-t030型菌株在乌鲁木齐地区有更强的适应能力和传播能力。药敏试验结果表明,ST239-MRSA-Ⅲ型金葡菌有共同的耐药谱OXA/PEN/CIP/GEN/RIF/TET/LEV,对红霉素、克林霉素也表现出较高程度的耐药。

相对于MRSA而言,MSSA菌株拥有更高的遗传多样性[36],在我国的研究报道中,主要的MSSA型别因地区不同而差异较大[35,37]。本研究中55株MSSA菌株可分为16种ST型别和23种*spa*型,相对于MRSA菌株(6种ST型别,8种*spa*型)来看,MSSA具有更多的克隆多态性。t11413、t571、t030、t2592、t284和t002是主要的*spa*型别,而ST22、ST121、ST88、ST15、ST398和ST1920是主要的MLST型别。其中t11413、ST121在以前我国的研究中鲜有报道,可能是在乌鲁木齐地区新流行的克隆。t571型MSSA一般与ST398相关联,是欧洲及我国牲畜来源的主要流行克隆群,常引起皮肤和软组织感染[38]。t2592型MSSA主要在我国东北地区流行[39],本研究中有5株此型菌株检出,成为乌鲁木齐地区主要克隆群,并且都为ST88-*agr* Ⅲ型。ST121是在全球广泛分布的社区获得性克隆群,因其高毒力而引起研究者关注[40]。我国对于ST121金葡菌的报道较少,在本研究中,有10株MSSA菌株检测为ST121型(18.2%,10/55),成为主要流行克隆群,并且有8株携带*pvl*毒力基因(80.0%,8/10),高*pvl*携带率可能是ST121型MSSA具有高毒力的重要因素之一。

*agr*系统位于金葡菌基因组的核心区域,因此一般与菌株的MLST型别相关联。本研究中发现,*agr* Ⅰ为MSSA主要型别,并且与ST22、ST398型别相关;*agr* Ⅱ型与ST15、ST5型相对应;*agr* Ⅲ主要为ST88型;8株*agr* Ⅳ型菌株都为ST121型,这些结果与文献[38,41]报道相一致。本研究还发现MSSA的*pvl*携带率(49.1%)高于MRSA(38.7%)菌株,尤其以MSSA菌株ST22(83.3%,10/12)和ST121(80%,8/10)的*pvl*阳性率为突出,提示在乌鲁木齐地区应重点加强对这些菌株所致临床感染的防控。

在欧美地区,临床分离的MSSA对除青霉素之外的大多数常用抗生素敏感[36,42],因此MSSA的耐药情况并未引起足够重视。在我国的报道中,已发现MSSA除对青霉素耐药外,还对红霉素、克林霉素等存在不同程度的耐药[39]。在本研究的55株MSSA菌株中检出了高比例的多重耐药菌株(56.4%,31/55),这些MDR菌有共同的耐药谱PEN/ERY/CLI。31株MDR中有23株对三类抗生素耐药,6株对四类抗生素耐药,1株耐五类抗生素,另外有1株菌株对六类抗生素耐药,提示MSSA的耐药性在乌鲁木齐地区不容乐观。MSSA菌株对复方新诺明的耐药率(18.2%,10/55)高于MRSA菌株(6.5%,2/31);10株ST121型菌株有7株(均为*pvl*阳性)为多重耐药菌株,此型菌株在乌鲁木齐地区的流行可能与其高毒力、多重耐药相关。

综上所述,本研究在一定程度上揭示了乌鲁木齐地区MRSA和MSSA的种群分子特征及耐药情况,其中MRSA以ST239-MRSA-Ⅲ-t030占绝对优势;而MSSA分子型别则呈现出多样性,ST121、ST22成为该地区的优势克隆,并且表现出高毒力、高耐药性。罕见报道的*spa*型别t11413在本研究的MSSA中检出比例最高,对于其来源还需进一步研究。我们的研究提示,在我国金葡菌感染的防控中,除关注MRSA外,MSSA以其较高的毒力以及越来越严峻的耐药形势同样需要给予高度重视。

参考文献:

[1] Lowy F D. *Staphylococcus aureus* infections[J]. N Engl J Med, 1998, 339(8): 520-532. DOI: 10.1056/NEJM199808203390806

[2] Robinson D A, Enright M C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(12): 3926-3934.

[3] Stefani S, Chung D R, Lindsay J A, *et al*. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods[J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 39(4): 273-282. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030

[4] Deurenberg R H, Stobberingh E E. The evolution of *Staphylococcus aureus*[J]. Infect Genet Evol, 2008, 8(6): 747-763. DOI: 10.1016/j.meegid.2008.07.007

[5] Enright M C, Robinson D A, Randle G, *et al*. The evolution-

ary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(11): 7687 – 7692. DOI: 10.1073/pnas.122108599

[6] Chambers H F, Deleo F R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(9): 629 – 641. DOI: 10.1038/nrmicro2200

[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. DOI: 10.1093/jac/dkt213

[8] 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. DOI: 10.1128/AAC.00804-08

[9] Grundmann H, Aanensen D M, van-den-Wijngaard C C, *et al*. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis[J]. PLoS Med, 2010, 7(1): e1000215. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000215

[10] Liu M, Liu J, Guo Y, *et al*. Characterization of virulence factors and genetic background of *Staphylococcus aureus* isolated from Peking University People's Hospital between 2005 and 2009[J]. Curr Microbiol, 2010, 61(5): 435 – 443. DOI: 10.1007/s00284-010-9635-0

[11] David M Z, Boyle-Vavra S, Zychowski D L, *et al*. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* as a predominantly healthcare-associated pathogen: a possible reversal of roles?[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18217. DOI: 10.1371/journal.pone.0018217

[12] Yoong P, Torres V J. The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond[J]. Curr Opin Microbiol, 2013, 16(1): 63 – 69. DOI: 10.1016/j.mib.2013.01.012

[13] Goering R V, Shawar R M, Scangarella N E, *et al*. Molecular epidemiology of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from global clinical trials[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(9): 2842 – 2847. DOI: 10.1128/JCM.00521-08

[14] Sawanobori E, Hung W C, Takano T, *et al*. Emergence of Panton-Valentine leukocidin-positive ST59 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* with high cytolytic peptide expression in association with community-acquired pediatric osteomyelitis complicated by pulmonary embolism[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2015, 48(5): 565 – 573. DOI: 10.1016/j.jmii.2014.04.015

[15] 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.

[16] Oliveira D C, Milheirico C, de-Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type Ⅵ[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(10): 3457 – 3459. DOI: 10.1128/AAC.00629-06

[17] 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.

[18] 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.

[19] Gilot P, Lina G, Cochard T, *et al*. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA Ⅲ-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(11): 4060 – 4067.

[20] Lee S, Kwon K T, Kim H I, *et al*. Clinical implications of cefazolin inoculum effect and β-lactamase type on methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia[J]. Microb Drug Resist, 2014, 20(6): 568 – 574. DOI: 10.1089/mdr.2013.0229

[21] Reischl U, Tuohy M J, Hall G S, *et al*. Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the lukS-PV gene[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007, 26(2): 131 – 135. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z

[22] Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, *et al*. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(9): 4089 – 4094.

[23] Unal S, Hoskins J, Flokowitsch J E, *et al*. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(7): 1685 – 1691.

[24] 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.

[25] 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.

[26] 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. DOI: 10.1128/JCM.00113-06

[27] 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.

[28] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement. CLSI Document M100-S21[M]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.

[29] Magiorakos A P, Srinivasan A, Carey R B, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(3): 268 - 281. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

[30] Li G, Wu C, Wang X, *et al*. Prevalence and characterization of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from retail foods[J]. Int J Food Microbiol, 2015, 196: 94 - 97. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.002

[31] 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. DOI: 10.1016/j.drup.2011.07.001

[32] Chen Y, Liu Z, Duo L, *et al*. Characterization of *Staphylococcus aureus* from distinct geographic locations in China: an increasing prevalence of spa-t030 and SCCmec type Ⅲ[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e96255. DOI: 10.1371/journal.pone.0096255

[33] 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.

[34] 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. DOI: 10.1128/JCM.02238-07

[35] 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. DOI: 10.1128/AAC.01563-09

[36] Miko B A, Hafer C A, Lee C J, *et al*. Molecular characterization of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates in the United States, 2004 to 2010[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(3): 874 - 879. DOI: 10.1128/JCM.00923-12

[37] Liu C, Chen Z J, Sun Z, *et al*. Molecular characteristics and virulence factors in methicillin-susceptible, resistant, and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from central-southern China[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2015, 48(5): 490 - 496. DOI: 10.1016/j.jmii.2014.03.003

[38] Zhao C, Liu Y, Zhao M, *et al*. Characterization of community acquired *Staphylococcus aureus* associated with skin and soft tissue infection in Beijing: high prevalence of PVL + ST398[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38577. DOI: 10.1371/journal.pone.0038577

[39] Sun D D, Ma X X, Hu J, *et al*. Epidemiological and molecular characterization of community and hospital acquired *Staphylococcus aureus* strains prevailing in Shenyang, Northeastern China[J]. Braz J Infect Dis, 2013, 17(6): 682 - 690. DOI: 10.1016/j.bjid.2013.02.007

[40] Rao Q, Shang W, Hu X, *et al*. *Staphylococcus aureus* ST121: a globally disseminated hypervirulent clone[J]. J Med Microbiol, 2015, 64(12): 1462 - 1473. DOI: 10.1099/jmm.0.000185

[41] Holtfreter S, Grumann D, Schmudde M, *et al*. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(8): 2669 - 2680. DOI: 10.1128/JCM.00204-07

[42] Rasmussen G, Monecke S, Brus O, *et al*. Long term molecular epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates in Sweden[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114276. DOI: 10.1371/journal.pone.0114276

(收稿:2015-11-16;修回:2015-12-25)

(编辑 邓强庭)