

呼吸道与非呼吸道标本分离MRSA临床株耐药性比较及其分子流行病学特征

额尔德木图^{1,2}, 王艳艳³, 李喻瞳⁴, 陈贵林¹, 王俊瑞³

(1. 内蒙古大学生命科学学院生物系, 内蒙古 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古医科大学民族医药创新中心 蒙医药协同创新中心, 内蒙古 呼和浩特 010110; 3. 内蒙古医科大学附属医院检验科, 内蒙古 呼和浩特 010050; 4. 内蒙古医科大学第一临床医学院检验科, 内蒙古 呼和浩特 010050)

[摘要] **目的:** 探讨呼吸道与非呼吸道标本分离耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的耐药性、分子分型和生物膜形成能力的差异。**方法:** 选取住院患者送检标本中分离出的100株MRSA, 其中50株MRSA分离自呼吸道标本, 50株MRSA分离自非呼吸道标本。对100株MRSA进行14种抗菌药物的体外药敏试验, 采用多位点序列分型(MLST)和金黄色葡萄球菌A蛋白(Spa)分型方法进行分子分型, 结晶紫染色实验检测MRSA菌株生物膜形成能力。**结果:** 体外药敏试验, 100株MRSA对青霉素、红霉素、克林霉素、左氧氟沙星、环丙沙星、莫西沙星和四环素的总体耐药率较高, 均大于60.0%, 对复方新诺明耐药率仅为9.0%, 且所有菌株均对万古霉素、利奈唑胺、替加环素和奎奴普汀/达福普汀敏感。呼吸道标本分离的MRSA对莫西沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、四环素和庆大霉素的耐药率明显高于非呼吸道标本分离株($P < 0.05$)。100株MRSA中共检出17种基因型, 其中优势型别为ST5-t2460型(26.0%)、ST239-t030型(23.0%)和ST59-t437型(20.0%)。呼吸道标本分离MRSA中优势型别为ST5-t2460型(20.0%)和ST239-t030型(13.0%), 其次为ST59-t437型(7.0%); 非呼吸道标本分离MRSA中共检出13种基因型, 优势型别为ST59-t437型(13.0%)和ST239-t030型(10.0%)。100株MRSA全部为产膜菌株, 强产膜菌株、中产膜菌株和弱产膜菌株比例分别为2.0%(2/100)、24.0%(24/100)和74.0%(74/100)。ST59-t437型克隆株整体产膜能力较强, 60.0%(12/20)为中产膜株和强产膜株。**结论:** 呼吸道标本分离MRSA菌株整体耐药率明显高于非呼吸道标本分离MRSA株。ST59-t437基因型和ST239-t030基因型为2类标本共有优势克隆株, ST59-t437型菌株呈现较强的生物膜形成能力, 而ST239-t030型菌株整体耐药性最强。

[关键词] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 耐药性; 分子分型; 生物膜

[中图分类号] R378.1 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2022-03-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660352); 内蒙古自治区科技厅自然科学基金面上项目(2020MS08110); 内蒙古医科大学大学生科技创新“英才培育”项目(YCPY2021068); 内蒙古医科大学大学生创新创业训练计划项目(202110132038)

[作者简介] 额尔德木图(1979—), 男, 内蒙古自治区呼和浩特市人, 讲师, 理学博士, 主要从事药用植物化学方面的研究。

[通信作者] 陈贵林, 教授, 博士研究生导师(E-mail: guilinchen61@163.com); 王俊瑞, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师(E-mail: wangjunrui123@yeah.net)

Comparison of drug resistance of MRSA clinical strains from respiratory tract and non-respiratory tract specimens and their molecular epidemiological characteristics

ERDEMUTU^{1,2}, WANG Yanyan³, LI Yutong⁴, CHEN Guilin¹, WANG Junrui³

(1. Department of Biology, School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010050, China;

2. Department of Collaborative Innovation Center of Mongolian Medicine, Medical Innovation Center for Nationalities, Inner Mongolian Medical University, Hohhot 010110, China; 3. Department of Laboratory

Medicine, Affiliated Hospital, Inner Mongolian Medical University, Hohhot 010050, China;

4. Department of Laboratory Medicine, School of First Clinical Medical Sciences, Inner Mongolian Medical University, Hohhot 010050, china)

ABSTRACT Objective: To discuss the differences in drug resistance, molecular typing, and biofilm-forming abilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from respiratory and non-respiratory tract specimens. **Methods:** A total of 100 MRSA strains were selected from clinical specimens of the hospitalized patients, and 50 MRSA strains were isolated from the respiratory specimens and another 50 MRSA strains were isolated from non-respiratory tract specimens. These 100 MRSA strains underwent an *in vitro* susceptibility test for 14 kinds of antimicrobial drugs, molecular typing was performed through multilocus sequence typing (MLST) and *Staphylococcus aureus* protein A (*Spa*) typing, and their biofilm-forming abilities were detected by crystal violet staining assay. **Results:** The *in vitro* susceptibility tests results showed that all the 100 MRSA strains had high overall resistance rates of over 60.0% to penicillin, erythromycin, clindamycin, levofloxacin, ciprofloxacin, moxifloxacin, and tetracycline, while only 9.0% exhibited resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole, and all the strains were susceptible to vancomycin, linezolid, tigecycline, and quinupristin/dalfopristin. Compared with those isolated from non-respiratory tract specimens, the MRSA strains isolated from respiratory tract specimens showed significantly higher resistance rates to moxifloxacin, levofloxacin, ciprofloxacin, tetracycline, and gentamicin ($P < 0.05$). Among the 100 MRSA strains, 17 genotypes were identified, and the dominant types were ST5-t2460 (26.0%), ST239-t030 (23.0%), and ST59-t437 (20.0%). In the MRSA from the respiratory tract specimens, the dominant types were ST5-t2460 (20.0%) and ST239-t030 (13.0%), followed by ST59-t437 (7.0%); in the non-respiratory tract specimens, 13 genotypes were found, and the dominant types were ST59-t437 (13.0%) and ST239-t030 (10.0%). All 100 MRSA strains were biofilm producers, among them the strong biofilm formers, moderate biofilm formers, and weak biofilm formers accounted for 2.0% (2/100), 24.0% (24/100), and 74.0% (74/100), respectively. The ST59-t437 clones had overall strong biofilm-forming abilities, and 60.0% (12/20) strains were moderate to strong biofilm formers. **Conclusion:** The MRSA strains isolated from the respiratory tract specimens have a significantly higher overall resistance rate than those isolated from the non-respiratory tract specimens. The ST59-t437 and ST239-t030 genotypes are dominant clones common to both types of specimens, and ST59-t437 strains show strong biofilm-forming abilities, and ST239-t030 strains exhibit the strongest resistance.

KEYWORDS Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Drug resistance; Molecular typing; Biofilm

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 是一类常见的、可导致多种类型侵袭性感染的多重耐药

菌, MRSA 感染是导致住院患者病死率增高的一个重要原因^[1-2]。2019 年, MRSA 的病原体-药物组合造成 10 万多例抗生素耐药性 (anti-microbial

resistance, AMR) 死亡, 造成沉重的社会和经济负担^[3]。2021年MRSA住院患者分离率为30.0%, 是导致社区感染及医院内感染的首位革兰染色阳性球菌^[4]。流行病学研究^[5-7]显示: 特定地区及人群检出MRSA优势克隆株在发生动态改变, 不同基因型(ST239、ST59和ST2460型等)常伴随特定的耐药特征和毒力特征(毒力特征和生物膜形成能力等)。既往研究^[8]显示: 呼吸道分离菌株黏附力高于其他部位分离株, 手术感染部位分离菌株生物膜形成能力更强, CC8型菌株生物膜形成能力强于CC5型菌株。国外相关研究^[9-10]显示: 呼吸道与血液标本分离MRSA在基因型方面也存在一定差异, 呼吸道样本分离MRSA株以t003型和t041型为主, 而血液标本分离MRSA株仅以t003型为主, 脓液标本分离MRSA产膜株比例明显高于痰液标本分离株, 且2类菌株耐药性存在差异。呼吸道与非呼吸道无菌标本分离株在生物膜形成能力和耐药性等方面的差异, 与菌株遗传背景及特定部位宿主环境特征(需氧环境和微需氧环境)有关^[8], 进而影响感染进程及预后。本研究以2012—2021年内蒙古自治区呼和浩特地区住院患者分离的MRSA临床株为研究对象, 探讨呼吸道与非呼吸道标本分离MRSA株的耐药性及分子流行病学特征的差异, 阐明不同部位标本分离MRSA株的耐药性及分子流行病学特征间的差异, 以便更有针对性地指导临床使用抗生素, 有助于MRSA感染性疾病的防控和治疗。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 收集2012年12月—2021年8月内蒙古医科大学附属医院就诊患者临床标本分离的100株MRSA菌株, 剔除同一患者重复分离菌株, 其中50株MRSA分离自呼吸道标本, 50株MRSA分离自非呼吸道标本。药敏质控株粪肠球菌ATCC29212和金黄色葡萄球菌ATCC29213均由内蒙古医科大学附属医院检验科保存。

1.2 试剂和主要仪器 细菌基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技北京有限公司), MasterMix和DNA Marker(大连TaKaRa生物工程有限公司), VITEK-II全自动微生物分析系统及配套AST-GP67药敏卡(法国梅里埃公司); PCR扩增仪(型号: Efficiency 96, 北京领宇科技有限公司), 电泳仪(型号: Powerpac™ Basic, 美国Bio-Rad公司), 凝胶成像分析系统(型号: Gel DocXR+,

美国Bio-Rad公司), 培养箱(型号: IMH750-S, 美国ThermoFisher Scientific公司)。

1.3 体外药敏试验 所有菌株均由VITEK-II全自动微生物分析仪进行菌种鉴定, 利用AST-GP67药敏卡检测菌株抗菌药物敏感性, 结果参照CLSIM100-S31文件^[11]规定判读标准进行抗菌药物敏感性判读。

1.4 DNA提取 将菌株接种于营养琼脂, 37℃培养16~18 h, 挑取足量的菌落重悬于无菌的生理盐水中, 按照细菌DNA提取试剂盒说明书进行DNA提取, -20℃保存备用。

1.5 多位点序列分型(multifocus sequence typing, MLST) DNA提取流程如“1.4”所述。7个管家基因(arcC、aroE、glpF、gmk、pta、tpi和yqiL)引物由北京中美泰和生物技术有限公司合成, 引物序列参照金黄色葡萄球菌MLST数据库(<https://pubmlst.org/s aureus>)。PCR扩增产物送北京中美泰和生物技术有限公司进行测序。将测序结果上传到金黄色葡萄球菌MLST数据库进行在线分析, 获取每个菌株7个管家基因的等位基因编号, 根据等位基因编号得出序列型(sequence type, ST)。

1.6 金黄色葡萄球菌A蛋白(Staphylococcal protein A, Spa)分型 根据参考文献[4]合成引物, PCR产物纯化后由北京中美泰和生物技术有限公司完成测序, 测序结果通过Spa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得到Spa分型。

1.7 结晶紫染色实验检测100株MRSA菌株的生物膜形成能力 待测菌株在含0.25%葡萄糖的TSB液中37℃过夜培养, 调整菌液浓度为McFarland等级0.5浓度(约 1.5×10^8 CFU·mL⁻¹), 并在含0.25%葡萄糖的TSB中稀释至最终浓度为 1×10^6 CFU·mL⁻¹, 置于96孔细胞培养板中37℃培养48 h。弃去培养液并用0.9%氯化钠轻轻洗涤3次, 并用甲醇固定15 min。风干后, 将孔用0.1%结晶紫染色5 min, 再用无菌PBS缓冲液洗涤3次, 自然风干, 随后于33%冰乙酸中作用30 min, 590 nm波长处测定培养孔中溶液的吸光度(A)值, 重复3次, 计算其平均值。以未接种菌的培养液作为阴性对照, A值反映生物膜与接触表面黏附的牢固程度, 依据临界Ac值(Ac值是由空

白孔的平均值加上其3倍的标准差), 可将生物被膜分成4类: $A \leq Ac$ 为不产膜 (0), $Ac < A \leq 2Ac$ 为弱产膜 (+), $2Ac < A \leq 4Ac$ 为中等产膜 (++) , $A > 4Ac$ 为强产膜 (+++)。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。呼吸道和非呼吸道标本分离的 MRSA 株耐药率以百分率 (%) 表示, 2 组间耐药率比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 呼吸道和非呼吸道标本分离 MRSA 菌株对常用抗菌药物的耐药率 呼吸道和非呼吸道标本分离

的 MRSA 除了对利奈唑胺、万古霉素、替加环素、奎奴普汀/达福普汀和青霉素耐药率一致外, 对其他抗菌药物的耐药率均存在不同程度的差异, 呼吸道标本分离的 MRSA 株对莫西沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、四环素和庆大霉素的耐药率明显高于非呼吸道标本分离 MRSA 株 ($P < 0.05$); 呼吸道标本分离的 MRSA 菌株对红霉素、克林霉素和利福平的耐药率略高于非呼吸道标本分离 MRSA 株, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 呼吸道标本分离的 MRSA 菌株对复方新诺明的耐药率略低于非呼吸道标本分离的 MRSA 株, 但差异无统计意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 呼吸道和非呼吸道标本分离 MRSA 菌株对常用抗菌药物的耐药率

Tab. 1 Antimicrobial resistance rates of MRSA isolates from respiratory tract samples and non-respiratory tract samples

Antimicrobial drug	MRSA (n=100)	MRSA from respiratory tract specimen(n=50)		MRSA from non-respiratory tract specimen(n=50)		χ^2	P
		No.of drug-resistant strain(n)	Resistant rate(η /%)	No.of drug-resistant strain(n)	Resistant rate(η /%)		
Vancomycin	0	0	0.0	0	0	—	—
Tetracycline	0	0	0	0	0	—	—
Rifampicin	25	15	30.0	10	20.0	0.853	0.356
Penicillin	100	50	100.0	50	100.0	—	—
Erythromycin	87	44	88.0	43	86.0	—	—
Clindamycin	73	38	76.0	34	68.0	0.446	0.504
Quinuptin / dafuptin	0	0	0	0	0	—	—
Tigecycline	0	0	0	0	0	—	—
Trimethoprim and sulphame-thoxazole	9	2	4.0	7	14.0	1.954	0.162
Moxifloxacin	62	40	80.0	22	44.0	12.270	0.001
Levofloxacin	70	43	86.0	27	54.0	10.710	0.001
Ciprofloxacin	70	43	86.0	27	54.0	10.710	0.001
Gentamycin	46	29	58.0	17	34.0	4.871	0.027
Tetracycline	70	44	88.0	26	52.0	13.760	<0.01

“—”: No data.

2.2 呼吸道与非呼吸道标本分离 MRSA 菌株 MLST 分型 在 100 株 MRSA 中发现了 10 种 ST 型, 优势型别为 ST5 型、ST59 型和 ST239 型, 占比为 26.0%、25.0% 和 25.0%, 其余依次为 ST22 型 (12.0%)、ST25 型 (6.0%)、ST5939 型 (2.0%)、ST398 型 (1.0%)、ST5637 型 (1.0%)、ST5662 型 (1.0%) 和 ST1 型 (1.0%)。呼吸道标本分离的 MRSA 中发现 8 种 ST 型, 优势型别为 ST5 型和 ST239 型, 占比分别为 20.0% 和 15.0%, 其次为 ST59 型 (8.0%)、

ST25 型 (2.0%)、ST5939 型 (2.0%)、ST22 型 (1.0%)、ST398 型 (1.0%) 和 ST1 型 (1.0%); 非呼吸道标本分离的 MRSA 中发现 7 种 ST 型, 优势型别为 ST59, 占比为 17.0%, 其次为 ST22 型 (11.0%)、ST239 型 (10.0%)、ST5 型 (6.0%)、ST25 型 (4.0%)、ST5637 型 (1.0%) 和 ST5662 型 (1.0%)。见表 2。

2.3 呼吸道和非呼吸道标本分离 MRSA 菌株 Spa 分型 在 100 株 MRSA 中共检出 16 种 Spa 基因型, 其中优势型别为 t2460 型、t030 型和 t437 型, 占比

分别为42.0%、23.0%和20.0%。呼吸道标本分离的MRSA中共检出9种Spa基因型,优势型别为t2460型,占比为23.0%,其次为t030型(13.0%)、t437型(7.0%)、t078型(2.0%)、t1493型(1.0%)、t034型(1.0%)、t4239型(1.0%)、t005型(1.0%)和t127型(1.0%);非呼吸道标本分离的MRSA中共检出11种Spa基因型,分布较分散,优势型别为t437型和t030型,占比分别为13.0%和10.0%,其次为t2460型(9.0%)、t005型(8.0%)、t078型(3.0%)、t309型(2.0%)、t3590型(1.0%)、t441型(1.0%)、t7496型(1.0%)、t258型(1.0%)和t3622型(1.0%)。见表2。

2.4 呼吸道与非呼吸道标本分离MRSA菌株不同基因型的联合分析 100株MRSA中有17种型别,其中优势型别为ST5-t2460型、ST239-t030型和ST59-t437型,占比分别为26.0%、23.0%和20.0%,其次为ST22-t005型(9.0%)和ST25-t078型(5.0%)。呼吸道标本分离的MRSA中共检出10种型别,优势型别为ST5-t2460型和ST239-t030型,占比分别为20.0%和13.0%,其次为ST59-t437型(7.0%);非呼吸道标本分离的MRSA中共检出13种型别,分布较分散,优势型别为ST59-t437型和ST239-t030型,占比分别为13.0%和10.0%,其次为ST22-t005型(8.0%)和ST5-t2460型(6.0%)。见表2。

2.5 呼吸道与非呼吸道标本分离MRSA菌株生物膜形成能力检测 100株MRSA全部为产膜株,生物膜形成能力通过结晶紫染色结果进行鉴别,分为强产膜(卅)、中产膜(++)和弱产膜(+)3个等级,见图1。强产膜菌株、中产膜菌株和弱产膜菌株分别有2株(2.0%)、24株(24.0%)和74株(74.0%)。50株生物膜阳性分离自呼吸道标本的MRSA菌株中1株(2.0%)为强产膜菌株,10株(20.0%)为中产膜菌株,39株(78.0%)为弱产膜菌株。50株分离自非呼吸道标本的MRSA菌株中,强产膜菌株、中产膜菌株和弱产膜菌株分别为1株(2.0%)、14株(28.0%)和35株(70.0%)。呼吸道与非呼吸道标本分离MRSA株的3种产膜株分布比例差异无统计学意义($P>0.05$)。不同基因型的联合分析结果显示:20株ST59-t437克隆菌株中有2株为强产膜株,10株为中产膜株,60.0%(12/20)为中等以上产

膜株,产膜能力较强。见表2。

2.6 优势基因型MRSA菌株耐药特征 100株MRSA株中共筛选出3种优势基因型,分别是ST5-t2460型(占比26.0%)、ST239-t030型(占比23.0%)和ST59-t437型(占比20.0%)。对3种优势基因型菌株进行8种抗生素耐药特征分析,结果显示:ST239-t030型菌株耐药最为严重,对左氧氟沙星、环丙沙星、莫西沙星、红霉素、克林霉素、四环素、庆大霉素和利福平耐药率均在69.0%以上;ST5-t2460型菌株对左氧氟沙星、环丙沙星、莫西沙星、红霉素、克林霉素、四环素和庆大霉素耐药率均在53.0%以上,仅对利福平敏感性较好。以上2种基因型于呼吸道与非呼吸道分离标本的MRSA中的分布比例差异无统计学意义($P>0.05$)。ST59-t437型菌株总体耐药性较低,仅有约50.0%菌株对红霉素、克林霉素和四环素表现为耐药,其他5种抗生素耐药率较低,呼吸道标本分离MRSA菌株整体耐药率高于非呼吸道标本分离株。见表3。

3 讨论

本研究结果显示:MRSA菌株对利奈唑胺、万古霉素、替加环素和奎奴普丁/达福普汀均敏感,对红霉素和克林霉素等9种抗生素的耐药率均高于全国平均水平^[4],MRSA菌株耐药情况存在明显的地区差异,应当引起重视。呼吸道标本分离的MRSA株对红霉素、克林霉素、利福平、莫西沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、四环素和庆大霉素耐药率均高于非呼吸道标本分离的MRSA,这与陈江华等^[7]报道一致,但复方新诺明耐药率呈相反趋势,可能与地域差异有关。MRSA所致下呼吸道感染时,有效抗生素选择范围更小;在进行抗生素治疗时,应优先选择利奈唑胺、万古霉素、替加环素和奎奴普丁/达福普汀等敏感抗生素。

MRSA菌株的分子分型特征因地理区域而异,并且分子分型与致病性、疾病严重程度和患者病死率有关^[12-13]。除韩国和日本地区外,亚洲大部分地区最主要的流行克隆株曾是ST239型^[14-19],进而演变为ST59型占据优势型别^[20-21]。日本和韩国地区主要流行克隆型是ST5型,其是亚洲多个地区的优势克隆株^[18, 21]。本研究发现MRSA株中,优势克隆株为ST5型(26.0%)、ST59型(25.0%)和ST239型(25.0%),与中国武汉和石家庄地区报道的MRSA分子流行病学特征一致^[22-23]。与该

表2 MRSA 分子特征和生物膜形成能力
Tab. 2 Molecular characteristics and biofilm-forming abilities of MRSA

Molecular characteristic			Source of sample			Biofilm-forming ability					
STs	<i>n</i>	<i>Spa</i>	<i>n</i>	Respiratory tract	Non-respiratory tract	Respiratory tract			Non-respiratory tract		
						+	++	+++	+	++	+++
ST5	26	t2460	26	20	6	15	5	0	4	2	0
ST239	25	t030	23	13	10	13	0	0	10	0	0
		t1493	1	1	0	1	0	0	0	0	0
		t4239	1	1	0	1	0	0	0	0	0
ST59	25	t437	20	7	13	2	4	1	6	6	1
		t2460	2	1	1	1	0	0	1	0	0
		t3590	1	0	1	0	0	0	1	0	0
		t441	1	0	1	0	0	0	1	0	0
		t7496	1	0	1	0	0	0	1	0	0
ST22	12	t005	9	1	8	0	1	0	6	2	0
		t309	2	0	2	0	0	0	1	1	0
		t2460	1	0	1	0	0	0	0	1	0
ST25	6	t078	5	2	3	2	0	0	2	1	0
		t258	1	0	1	0	0	0	1	0	0
ST5939	2	t2460	2	2	0	2	0	0	0	0	0
ST398	1	t034	1	1	0	1	0	0	0	0	0
ST5637	1	t3622	1	0	1	0	0	0	0	1	0
ST5662	1	t2460	1	0	1	0	0	0	1	0	0
ST1	1	t127	1	1	0	1	0	0	0	0	0
Total	100		100	50	50	39	10	1	35	14	1

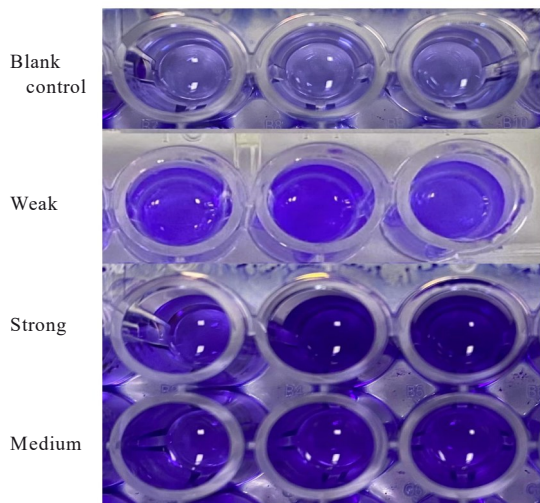


图1 不同MRSA株生物膜形成能力结晶紫染色结果
Fig. 1 Crystal violet staining results of biofilm forming abilities of different MRSA stains

标本分离 MRSA 株中，ST239 型为第 2 位优势克隆株，而非吸道标本分离 MRSA 株中，优势型别为 ST59 型（17.0%）和 ST22 型（11.0%）。这种差异可能与患者感染类型有关，非无菌部位菌株来源患者多为社区获得性感染，而呼吸道标本分离株多来源于医院内感染^[24]。Spa 分型被广泛用于研究不同地区金黄色葡萄球菌的爆发流行。t037 型菌株是中国 MRSA 菌株中最常见的 Spa 型^[25]，但是也有报道显示 t030 型已经在 MRSA 菌株中替代 t037 型菌株^[26]。本研究 Spa 分型结果显示：在 100 株 MRSA 菌株中共检出 16 种 Spa 基因型，其中优势型别为 t2460 型（42.0%），这与 LI 等^[27]的报道一致。呼吸道标本分离的 MRSA 株中共检出 9 种 Spa 基因型，优势型别为 t2460 型（23.0%），非呼吸道标本分离的 MRSA 株中共检出 11 种基因型，优势型别为 t437 型和 t030 型，占比分别为 13.0% 和 10.0%。表明 MRSA 菌株的分子分型特征因时间和地理区域的改变而发生相应改变，应进行动态监测。

地区 2012 年前研究结果比较，MRSA 株的优势克隆株由 ST239 型演变为 ST5 型。呼吸道标本优势克隆株与非呼吸道标本相比也存在差异。在呼吸道

表3 3种优势基因型菌株对抗菌药物的耐药率

Tab. 3 Antibiotic resistance rates of three dominant genotypes strains

(η/%)

Antimicrobial resistance drug	ST5-t2460			ST239-t030			ST59-t437		
	Total MRSA (n=26)	MRSA from respiratory tract (n=20)	MRSA from non-respiratory tract (n=6)	Total MRSA (n=23)	MRSA from respiratory tract (n=13)	MRSA from non-respiratory tract (n=10)	Total MRSA (n=20)	MRSA from respiratory tract (n=7)	MRSA from non-respiratory tract (n=13)
Levofloxacin	100.0	100.0	100.0	95.7	100.0	90.0	10.0	28.6	0
Ciprofloxacin	100.0	100.0	100.0	95.7	100.0	90.0	10.0	28.6	0
Moxifloxacin	100.0	100.0	100.0	95.7	100.0	90.0	10.0	28.6	0
Erythromycin	100.0	100.0	100.0	78.3	69.2	90.0	95.0	100.0	92.3
Clindamycin	88.5	85.0	100.0	69.6	69.2	70.0	90.0	85.7	92.3
Tetracycline	100.0	100.0	100.0	95.7	100.0	90.0	55.0	71.4	46.2
Gentamycin	53.8	55.0	50.0	87.0	100.0	70.0	15.0	28.6	7.7
Rifampicin	3.9	5.0	0	87.0	84.6	90.0	5.0	14.3	0

本研究中 ST5-t2460 型 (26.0%)、ST239-t030 型 (23.0%) 和 ST59-t437 型 (20%) 是主要流行克隆株, 这与以往的研究报道^[18]一致。MRSA 菌株的分子分型标本不同来源存在相应差异, 本研究中呼吸道标本来源的 MRSA 株, 优势型别为 ST5-t2460 型和 ST239-t030 型, 其次为 ST59-t437 型; 非呼吸道标本来源的 MRSA 株, 优势型别为 ST59-t437 型和 ST239-t030 型, 其次为 ST5-t2460 型和 ST22-t005 型。优势基因型菌株进行耐药性分析结果显示: ST239-t030 型菌株对 8 种抗生素耐药最为严重, ST5-t2460 型菌株对 7 种抗生素耐药最为严重, 但对利福平敏感性较好, 与 WANG 等^[21]的相关报道一致。考虑到单独使用利福平治疗 MRSA 感染容易产生耐药性, 建议在常规抗生素治疗 ST5-t2460 型菌株感染无效时, 应考虑利福平联合其他抗生素。ST59-t437 型菌株的耐药性较差, 其特征耐药谱为红霉素、克林霉素和四环素, 这与李文婷等^[28]的相关报道一致。对红霉素、克林霉素、左氧氟沙星、四环素、莫西沙星和环丙沙星的多重耐药可能是 ST5-t2460 型及 ST239-t030 型成为优势型别的原因之一。ST5-t2460 优势克隆株的多重耐药性、产生物膜能力及致死率高的特性, 使其在医院环境中更具竞争力^[20]。

生物膜是一种具有独特三维立体构造的细菌聚集群, 该三维立体膜样结构的独特形态形成一道屏障, 使得临床上所用的抗菌药物难以穿透^[29], 致使产膜菌株可有效逃避抗菌药物和机体防御系统的杀伤, 导致慢性迁徙性感染^[30]。本研究中 MRSA 株均可产生生物膜, 但呼吸道与非呼吸道标本分离

的 MRSA 的生物膜形成能力无明显差异, 且强产膜株和中产膜株占比较小。但强产膜菌株和中产膜菌株主要集中分布在 ST59-t437 克隆株中, 这与 CHEN 等^[26]相关报道一致。生物被膜的阻挡作用导致抗生素的穿透性降低, 造成生物被膜内的有效抗菌浓度明显降低^[29]。ST59-t437 型菌株的强生物膜形成能力可能是其成为优势菌株且与抗生素耐药特征存在关联的原因之一。

综上所述, 本研究中 MRSA 株对多种抗菌药物呈现较高耐药率, 且均具有不同程度的生物膜形成能力。分离自不同部位的菌株在耐药性和分子分型特征存在一定差异, 对于重症病例的临床防控和治疗, 有必要结合其分子流行病学特点, 制订针对性的策略, 防范其广泛传播和出现高致死率。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

额尔德木图负责体外药敏试验、生物膜实验和实验数据的整理、统计分析及论文撰写, 王艳艳负责各项分子分型实验, 李喻瞳辅助完成体外药敏试验, 陈贵林负责论文的撰写和修改, 王俊瑞负责实验设计和指导。

[参考文献]

- CHALMERS S J, WYLAM M E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection and treatment options[J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2069: 229-251.
- CANTY E, CARNAHAN B, CURLEY T, et al. Reduced vancomycin susceptibility, MRSA and treatment failure in pediatric *staphylococcus aureus*

- bloodstream infections [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2021, 40(5): 429-433.
- [3] RANJBAR R, ALAM M. Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. *Evid Based Nurs*, 2023; ebnurs-eb2022-103540.
- [4] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2021年CHINET中国细菌耐药监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2022, 22(5): 521-530.
- [5] 申恩华, 王立红, 王辉, 等. 中国15个地区分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌基因分型研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2010(3): 308-311.
- [6] 陈泰尧, 葛忆琳, 刘雪薇, 等. 2017—2018年上海某医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分子生物学特征研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2020, 54(8): 849-853.
- [7] 陈江华, 顾向明, 邓冲, 等. 伤口与呼吸道医院感染金黄色葡萄球菌的耐药情况对比研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2012, 37(4): 3.
- [8] BONAVENTURA G D, POMPILIO A, MONACO M, et al. Adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates under conditions relevant to the host: relationship with macrolide resistance and clonal lineages[J]. *J Med Microbiol*, 2019, 68(2): 148-160.
- [9] POMORSKA-WESOŁOWSKA M, CHMIELARCZYK A, CHLEBOWICZ M, et al. Virulence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bloodstream infections and pneumonia in Southern Poland [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2017, 11: 100-104.
- [10] 李方去, 杨锦红, 王慧燕, 等. 两种临床标本中耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌生物膜形成能力的检测与其耐药特征的研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2012, 24(6): 531-533.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S32 [S]. Wayne, PA: CLSI, 2022.
- [12] LAWAL O U, AYOBAMIY O, ABOUELFETOUH A, et al. A 6-year update on the diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in africa: A systematic review [J]. *Front Microbiol*, 2022, 3(13): 860436.
- [13] RAO Q, SHANG W L, HU X M, et al. *Staphylococcus aureus* ST121: a globally disseminated hypervirulent clone[J]. *J Med Microbiol*, 2015, 64(12): 1462-1473.
- [14] OGURA K, KAJI D, SASAKI M, et al. Predominance of ST8 and CC1/spa-t1784 methicillin-resistant *staphylococcus aureus* isolates in Japan and their genomic characteristics[J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2022, 28: 195-202.
- [15] KIM Y K, EOM Y, KIM E, et al. Molecular characteristics and prevalence of rifampin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with bacteremia in South Korea[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2023, 12(10): 1511.
- [16] CHONGTRAKOOL P, ITO T, MA X X, et al. *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(3): 1001-1012.
- [17] IP M, YUNG R W, NG T K, et al. Contemporary methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Hong Kong[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(10): 5069-5073.
- [18] 李文青, 程锦娥, 吴伟元, 等. 深圳地区甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌耐药性及分子流行病学特征[J]. *中国人兽共患病学报*, 2017, 33(12): 1098-1102.
- [19] DAI Y X, LIU J L, GUO W, et al. Decreasing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections is attributable to the disappearance of predominant MRSA ST239 clones, Shanghai, 2008-2017[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1): 471-478.
- [20] LI X, ZHANG J, ZHANG Y, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of the clonal lineage ST5-SCCmec II-t2460 was associated with high mortality in a Wuhan hospital [J]. *Braz J Microbiol*, 2021, 52(4): 1929-1936.
- [21] WANG X, LI X, LIU W, et al. Molecular characteristic and virulence gene profiles of community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from pediatric patients in Shanghai, China [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1818.
- [22] LI X H, ZHANG J, ZHANG Y F, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of the clonal lineage ST5-SCCmec II-t2460 was associated with high mortality in a Wuhan hospital [J]. *Braz J Microbiol*, 2021, 52(4): 1929-1936.
- [23] ZHANG H, QIN L, JIN C, et al. Molecular Characteristics and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from patient and food samples in Shijiazhuang, China [J]. *Pathogens*, 2022, 11(11): 1333.
- [24] OMUSE G, VAN ZYL K N, HOEK K, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from various healthcare institutions in Nairobi,

- Kenya: a cross sectional study [J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2016, 15(1): 51.
- [25] 陆军, 祝进, 徐礼锋, 等. 社区与医院获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性分析与比较 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(2): 380-382.
- [26] CHEN Y, LIU Z X, DUO L B, 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.
- [27] LI Y M, ZHAO R K, ZHANG X F, et al. Prevalence of enterotoxin genes and spa genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a tertiary care hospital in China [J]. *J Clin Diagn Res*, 2015, 9(5): DC11-DC14.
- [28] 李文婷, 耿文静, 姚开虎, 等. 新生儿重症监护室金黄色葡萄球菌定植菌株的耐药性及生物膜形成能力研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 2022, 47(3): 289-294.
- [29] ZHANG C, LI Z, PAN Q, et al. Berberine at sub-inhibitory concentration inhibits biofilm dispersal in *Staphylococcus aureus* [J]. *Microbiology (Reading)*, 2022, 168(9). DOI: 10.1099/mic.0.001243.
- [30] BHATTACHARYA S, BIR R, MAJUMDAR T. Evaluation of multidrug resistant *staphylococcus aureus* and their association with biofilm production in a tertiary care hospital, Tripura, northeast India [J]. *J Clin Diagn Res*, 2015, 9(9): DC01-DC04.