

[文章编号] 1671-587X(2024)02-0489-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240223

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的基因型分布及在不同遗传基因背景下的耐药谱分析

梁进¹, 付明霞², 李娜¹, 王凤霞¹, 陈宇佳¹, 胡远芳¹, 纪冰¹

(1. 滨州医学院附属医院检验科, 山东 滨州 256600; 2. 山东省滨州市人民医院病理科, 山东 滨州 256600)

[摘要] **目的:** 调查某三甲医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的基因型分布, 探讨菌株各分子分型间的相关性, 并构建不同遗传背景下的耐药谱模型。**方法:** 选取来源于医院25个科室的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)共计204株, 采用全自动VITEK 2 Compact细菌鉴定和药敏分析仪及E-test条检测菌株的抗菌药物敏感性, 以聚合酶链式反应(PCR)法检测*mecA*基因作为确证实验, 比较头孢西丁(FOX)和(或)苯唑西林(OXA)作为表型检测方法筛选MRSA的能力。采用PCR法检测MRSA菌株的分子分型, 包括*S. aureus* A蛋白分型(*spa*)、附属基因调节器分组(*agr*)、多位点序列分型(MLST)和*S. aureus*染色体盒*mec*分型(SCC*mec*)。结合药物敏感实验和分子分型结果, 构建不同遗传背景下的耐药谱。**结果:** 通过检测*mecA*基因共获得39株MRSA。通过检测FOX和OXA共获得51株表型MRSA。*spa*分型中, 共鉴定出包括5种新型(t20226、t20227、t20228、t20229和t20230)在内的57种不同型别, 主要为t309(30.9%)、t078(11.8%)和t437(11.8%)。*agr*分型, 94.9%的MRSA属于*agr* I。MLST分析MRSA种群, ST59克隆(61.5%)最流行, 其次为ST72(20.5%)。87.2%的MRSA携带IV型SCC*mec*, 其中亚型IV a 24株, 亚型IV F 10株。**结论:** MRSA的主要基因型为ST59-t437-*agr* I-IV a, 其耐药谱主要表现为FOX-OXA-青霉素(PEN)-红霉素(ERY)-克林霉素(CLI)。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 头孢西丁; 苯唑西林; 抗菌谱

[中图分类号] R446.5 **[文献标志码]** A

Genotype distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and analysis on resistance pattern under different genetic backgrounds

LIANG Jin¹, FU Mingxia², LI Na¹, WANG Fengxia¹, CHEN Yujia¹, HU Yuanfang¹, JI Bing¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou 256600, China; 2. Department of Pathology, People's Hospital, Binzhou City, Shandong Province, Binzhou 256600, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the genotype distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a tertiary hospital and to discuss the correlation among different molecular types of the strains, and to construct the resistance profile model under different genetic backgrounds. **Methods:** A total of

[收稿日期] 2022-10-27

[基金项目] 山东省科技厅自然科学基金项目(ZR2020MH309)

[作者简介] 梁进(1987-), 男, 山东省济宁市人, 检验师, 医学硕士, 主要从事临床微生物方面的研究。

[通信作者] 纪冰, 教授, 硕士研究生导师(E-mail: bingji1218@163.com)

204 strains of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) from 25 departments of the hospital were selected. The automatic VITEK 2 Compact system and E-test strips were used to detect the antimicrobial susceptibility of the strains. The detection of *mecA* gene by the polymerase chain reaction (PCR) method was used as the confirmatory experiment, the abilities of ceftazidime (FOX) and (or) oxacillin (OXA) were compared as phenotypic detection methods to screen MRSA. The molecular typing of MRSA strains was carried out by PCR method, including *Staphylococcal* protein A gene (*spa*) determination, accessory gene regulator (*agr*) typing, multilocus sequence typing (MLST), and staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (*SCCmec*) typing. The resistance profile was constructed combining with antimicrobial susceptibility tests results and molecular typing results. **Results:** A total of 39 MRSA strains were obtained by detecting the *mecA* gene. A total of 51 phenotypic MRSA strains were identified by testing FOX and OXA. In *spa* typing, 57 different types were identified, including 5 new types (t20226, t20227, t20228, t20229, and t20230), with the main types being t309 (30.9%), t078 (11.8%), and t437 (11.8%). In *agr* typing, 94.9% of MRSA belonged to *agr* I. The MLST analysis results of MRSA populations showed that ST59 clone (61.5%) was the most prevalent, followed by ST72 (20.5%). A total of 87.2% of MRSA carried type IV *SCCmec*, with subtypes IV a accounting for 24 strains and subtype IV F accounting for 10 strains. **Conclusion:** The main genotype of MRSA is ST59-t437-*agr* I-IV a and its resistance profile is primarily characterized by resistance to FOX-OXA-penicillin (PEN)-erythromycin (ERY)-clindamycin (CLI).

KEYWORDS *Staphylococcus aureus*; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Ceftazidime; Oxacillin; Resistance profile

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 作为一种重要的病原菌依靠携带的毒力因子 [葡萄球菌肠毒素 (staphylococcal enterotoxins, SEs)、表皮剥脱毒素 (exfoliative toxins, ETs)、溶血素、核酸酶、蛋白水解酶和脂肪酶, 导致许多疾病, 包括皮肤软组织感染、败血症、肺炎、脑膜炎、中毒性休克综合征、食物中毒和烫伤皮肤综合征。 *S. aureus* 中, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 通过耐药基因的水平获得或自身染色体的碱基突变进化出耐药机制, 使其能够在抗生素选择压力下长期生存, 导致多重耐药菌 (multidrug resistant, MDR) 的出现, 使得对 MRSA 的治疗变得更加复杂和困难。为了解来自不同地理分布的菌株的分子流行病学特征, 从而采取高效精准的药物治疗, 研究人员根据菌株的遗传特征, 采用附属基因调节器分组 (accessory gene regulator, *agr*)、金黄色葡萄球菌 A 蛋白分型 (staphylococcal protein A, *spa*)、多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST) 和金黄色葡萄球菌染色体盒 *mec* 分型 (staphylococcal chromosomal cassettes *mec*, *SCCmec*) 等分型方法对其鉴别, 研究结果显示: 同一谱系菌株的抗菌药物敏感性存在地理上的差异^[1-4]。科威特某医院研究结果^[5]显

示: ST22-MRSA 克隆对庆大霉素 (gentamicin, GEN) 和甲氧苄啶-磺胺甲恶唑的耐药率分别为 69.2% 和 84.6%, 而来自中国 18 个省的该克隆的研究结果显示对以上 2 种抗菌药物均敏感^[6]。来自德国和中国的菌株 ST8-IVa-t008 均对克林霉素 (clindamycin, CLI) 敏感, 但对环丙沙星的耐药率却相差显著 (37.5% vs 100.0%)^[7-8]。本研究旨在调查滨州医学院附属医院患者 MRSA 菌株流行情况, 通过耐药表型和分子分型研究, 获得 MRSA 的流行病学特征, 探讨不同遗传背景下的耐药谱, 从而为临床给药提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购于湖南艾科瑞生物工程有限公司, Taq 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) Mix 预混液购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight, MALDI-TOF) 和 VITEK-2 Compact 型全自动细菌分析仪 (法国梅里埃公司)。

1.2 菌株来源

收集 2021 年 1—12 月滨州医学院附属医院住院和门诊患者 *S. aureus* 204 株, 经质谱仪鉴定后

-80℃保存。甲氧西林敏感株 ATCC 25923 (阴性对照) 和甲氧西林耐药株 ATCC 43300 (阳性对照) 为滨州医学院附属医院微生物室留存。SCC_{mec} 各型阳性对照菌株 NCTC10042 (I型)、N315 (II型)、85/2080 (III型)、JCSC4744 (IV型) 和 HS663 (V型) 由温州医科大学附属第一医院临床方友主任惠赠。

1.3 *S. aureus* 的药敏实验

采用全自动 VITEK 2 Compact 细菌鉴定和药敏分析仪检测 *S. aureus* 的抗菌药物敏感性。检测的抗生素包括头孢西丁 (cefoxitin, FOX)、苯唑西林 (oxacillin, OXA)、青霉素 (penicillin, PEN)、头孢洛林 (ceftarolin, CPT)、GEN、左氧氟沙星 (levofloxacin, LVX)、莫西沙星 (moxifloxacin, MFX)、红霉素 (erythromycin, ERY)、CLI、利福平 (rifampin, RIF)、甲氧苄啶-磺胺甲恶唑 (trimethoprim-sulfamethoxazole, SXT)、万古霉素 (vancomycin, VAN)、替考拉宁 (teicoplanin, TEC)、达托霉素 (daptomycin, DAP)、甲氧苄啶-磺胺甲恶唑 (trimethoprim-sulfamethoxazole, SXT) 和利奈唑胺 (linezolid, LZD)。梯度扩散 (epsilometric test, E-test) 法检测阿米卡星 (amikacin, AMK)、氯霉素 (chloramphenicol, CHL) 和米诺环素 (minocycline, MNO) 的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentrations, MICs)。

1.4 MRSA 菌株的鉴定

据美国临床实验室标准委员会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 指南, 表型 MRSA 的诊断标准为 FOX MIC \geq 8 mg·L⁻¹ 和 (或) OXA MIC \geq 4 mg·L⁻¹。PCR 法检测菌株 *mecA* 作为 MRSA 的确认实验。评估 FOX 和 OXA 以及二者结合 (FOX+OXA) 的灵敏度 (sensitivity, Se)、特异度 (specificity, Sp)、阳性预测值 (positive predictive value, PPV)、阴性预测值 (negative predictive value, NPV) 和约登指数 (Youden index, YI)。

1.5 *spa* 和 *agr* 分型

提取菌株 DNA 后, 采用 PCR 法检测所有菌株的 *spa* 和 *agr* 型别^[1-2]。*spa* 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳 (120 V, 30 min), 采用凝胶成像仪观测结果后, 切胶回收纯化, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。所得序列与 spaServer 数据库

(<http://spaserver.ridom.de>) 比对, 确定每个菌株的 *spa* 型别。*agr* I~IV 扩增产物片段长度分别为 439、572、321 和 657 bp。

1.6 MLST 分型

提取菌株 DNA 后, 采用 PCR 法扩增 *mecA* 阳性菌株的 7 个管家基因, 分别编码氨基甲酸激酶 (carbamate kinase, *arcC*)、莽草酸脱氢酶 (shikimate dehydrogenase, *aroE*)、甘油激酶 (glycerol kinase, *glpF*)、鸟苷酸激酶 (guanylate kinase, *gmk*)、磷酸乙酰转移酶 (phosphate acetyltransferase, *pta*)、磷酸丙糖异构酶 (triosephosphate isomerase, *tpi*) 和乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 (acetyl coenzyme A acetyltransferase, *yqiL*)^[3]。测序后所得序列与 MLST 数据库 (<https://pubmlst.org/saureus/>) 比对, 确定每个菌株的序列类型 (sequence type, ST)。利用 mega7 软件, 采用邻接法 (neighbor-joining method, N-J) 构建系统发育树, 将具有密切遗传背景的 ST 聚类为 1 个克隆复合体 (clonal complex, CC)。

1.7 SCC_{mec} 分型

采用多重 PCR 方案对 MRSA 菌株进行 SCC_{mec} 分型^[4]。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 29.0 统计软件进行统计学分析。采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确概率法比较 MRSA 组与甲氧西林敏感菌株 (methicillin-susceptible *S. aureus*, MSSA) 组耐药率。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FOX 和 OXA 独立及联合检测表型 MRSA

通过检测 *mecA* 共获得 39 株 MRSA, 剩余 165 株为 MSSA。通过检测 FOX 和 OXA 的 MIC 共获得 51 株表型 MRSA, 其中 FOX 耐药菌株 50 株, OXA 耐药菌株 43 株, FOX 和 OXA 耐药菌株共计 42 株。以 *mecA* 作为确证方法, 3 项诊断指标的检测结果见表 1。FOX 筛选出 38 株 *mecA* 阳性菌株 (Se=97.4%), 155 株 FOX 敏感菌株中鉴定出 154 株 *mecA* 阴性菌株 (NPV=99.4%)。FOX+OXA 筛选出 160 株 *mecA* 阴性菌株 (Sp=97.0%), 42 株表型耐药菌株中鉴定出 37 株 *mecA* 阳性菌株 (PPV=88.1%), 且在正确区分 MRSA 与 MSSA 菌株方面显示出优势 (YI=0.919)。本研究结果

显示: 2株 *mecA* 阳性菌株中, 1株对 FOX 和 OXA 敏感, 1株对 FOX 耐药但对 OXA 敏感; 165株 *mecA* 阴性菌株中, 12株为表型耐药: 6株 FOX 耐药, 1株 OXA 耐药, 5株对二者均耐药。

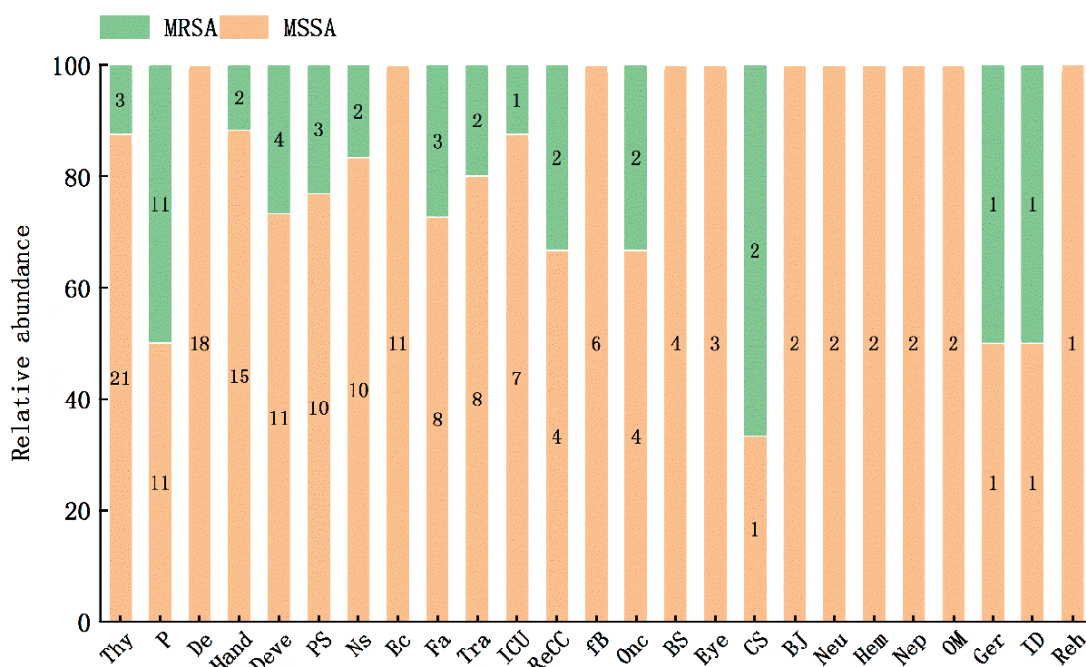
2.2 菌株的临床特征分析

菌株来源于甲状腺外科、儿科和皮肤科等科室(图1)。来自甲状腺外科的 *S. aureus* 最多 ($n=24$, 11.8%), 但仅3株为 MRSA。来自儿科的 MRSA 比例最高 (11/22, 50.0%)。标本来源于脓液、痰液和分泌物等(图2)。MRSA 的主要来

表1 FOX 和 OXA 独立及联合检测表型 MRSA 的诊断指标
Tab. 1 Diagnostic indexes of FOX and OXA independently and in combination for detection of MRSA phenotype

Method	Sensitivity ($\eta/\%$)	Specificity ($\eta/\%$)	PPV ($\eta/\%$)	NPV ($\eta/\%$)	YI
FOX	97.4	93.3	77.6	99.4	0.907
OXA	94.9	96.4	86.0	98.8	0.913
FOX+OXA	94.9	97.0	88.1	98.8	0.919

源为脓液 (12/39, 30.8%) 和痰标本 (12/39, 30.8%)。



Thy: Thyroid surgery; P: Pediatric department; De: Dermatology; Hand: Hand microsurgery; Deve: Dermatology and venereology; PS: Pediatric surgery; Ns: Neurosurgery; Ec: Endocrinology department; Fa: Foot and ankle surgery; Tra: Department of traumatic orthopaedics; ICU: Intensive care unit; ReCC: Respiratory and critical care department; FB: Burn and plastic surgery department; Onc: Oncology department; BS: Breast surgery; Eye: Eye clinic; CS: Cardiac surgery; BJ: Bone and Joint surgery; Neu: Neurology; Hem: Hematology department; Nep: Nephrology; OM: Oral and maxillofacial surgery; Ger: Geriatric department; ID: Department of infectious diseases; Reh: Rehabilitation department.

图1 *S. aureus* 菌株科室分布直方图

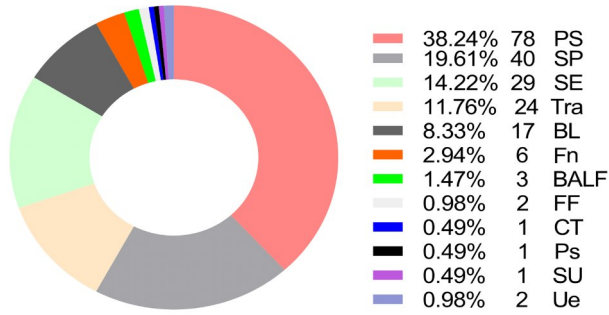
Fig. 1 Histogram of departmental distributions of *S. aureus* strains

2.3 *S. aureus* 菌株的分子分型

2.3.1 *agr* 和 *spa* 分型 80.9% 的菌株属于 *agr* I ($n=165$), 其次为 *agr* II (17/204, 8.3%) 和 *agr* IV (16/204, 7.8%), *agr* III 含量最少 (6/204, 2.9%)。MRSA 种群中未发现 *agr* III 和 *agr* IV, 94.9% 的菌株属于 *agr* I ($n=37$) (表2)。 *S. aureus* 中共鉴定出 57 种 *spa* 型别, 包括 5 种新型型别 (t20226、t20227、t20228、t20229 和 t20230),

最常见的 *spa* 型别是 t309 (63/204, 30.9%), 其次是 t437 (24/204, 11.8%) 和 t078 (24/204, 11.8%) (表2)。

2.3.2 MRSA 菌株的 MLST 分型 MRSA 种群中含有 8 种不同的 ST, 包括新型型别 ST7196 和 ST7437。其中, ST59 克隆 (24/39, 61.5%) 最流行, 其次是 ST72 (8/39, 20.5%) 和 ST22 (2/39, 5.1%)。基于 MRSA 菌株的 MLST 分型分



PS: Pus; SP: Sputum; SE: Secretions; Tra: Transudation; BL: Blood; Fn: Fine needle aspiration; BALF: Bronchoal-veolar lavage fluid; FF: Flushing fluid; CT: Catheter tips; Ps: Pharyngeal swabs; SU: Shunt fluid; Ue: Urine.

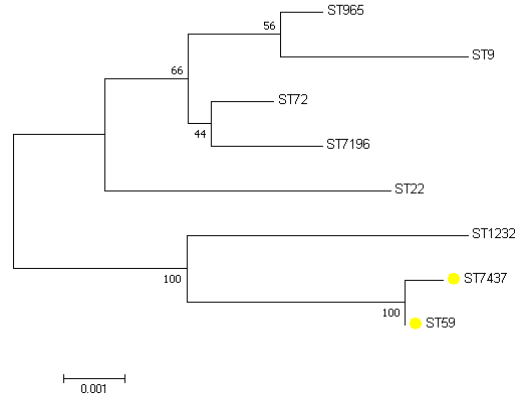
图2 *S. aureus* 菌株标本来源环状图

Fig. 2 Circular map of specimen sources of *S. aureus* stains

析, 采用邻接法构建的系统发育树, 结果显示: 8个ST分为1个克隆复合体CC59 (ST59和ST7437) 和6个单体克隆 (图3)。

2.3.3 MRSA 菌株的 SCCmec 分型 87.2% 的 MRSA 为 IV 型 SCCmec ($n=34$), 包含亚型 IV a ($n=24$) 和亚型 IV F ($n=10$)。剩余的菌株中, 3株携带 SCCmec III, 1株属于 V 型, 1株为未分型。

2.3.4 分子分型间的关联 *agr-spa* 联合分析、57种不同的 *spa* 型别, 属于4个不重复的 *agr* 组



Confidence levels of constructed branches were marked by bootstrap values at node; yellow dots: ST59 and ST7437 were from same clonal complex.

图3 N-J法构建的MRSA菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of MRSA stains constructed by N-J method

(表2)。其中, *agr* I 组含有最多种类的 *spa* 型, 为37种, *agr* III 组含有的 *spa* 型最少, 仅为3种。属于 t078 的24株菌和 t002 的6株菌均为 MSSA, 标记 t2431 的6株菌均为 MRSA。STs-*spa* 联合分析, CC59 包括的 t172、t1751、t3527、t3736 和 t437 未在其他 CCs 或 STs 中。t2431 只在克隆 ST72 中被鉴别。STs-*agr* 联合分析, 除 ST9 和 ST965 属于 *agr* II 外, 其余 ST 均属于 *agr* I。ST-SCCmec 组合

表2 *S. aureus* 菌株中分子分型间的关联

Tab. 2 Correlation between molecular types of *S. aureus* strains

Group	<i>n</i>	CC/ST	<i>Spa</i>	SCCmec	<i>Agr</i>
MRSA	39	CC59/ST59	t437, t172, t3736	IV a	I
			t3527	III	I
		CC59/ST7437	t437	IV a	I
			ST965	t062	IV F
		ST9	t899	—	II
		ST22	t309	III	I
		ST72	t2431, t20226	IV F	I
		ST1232	t034	V	I
		ST7196	t5155	IV F	I
MSSA	165		t309, t078, t571, t701, t034, t437, t081, t148, t163, t258, t287, t796, t1751, t091, t167, t280, t349, t377, t385, t441, t1350, t1451, t2257, t2883, t5335, t8099, t8100, t13300, t15234, t19224, t20227		I
			t002, t084, t14014, t062, t085, t105, t954		II
			t127, t1504, t20228		III
			t2092, t1425, t2019, t159, t2086, t6832, t7320, t20229, t20230		IV

“—”: No data.

分析, 除1株ST59被鉴定为Ⅲ型SCC_{mec}外, CC59均为Ⅳa型SCC_{mec}。ST72均为ⅣF型SCC_{mec}。

2.3.5 MRSA菌株的流行基因型 综合分子分型数据分析结果显示: MRSA菌株的流行基因型为ST59-t437-*agr* I-Ⅳa (21/39, 53.8%), 其次为ST72-t2431-*agr* I-ⅣF (6/39, 15.4%); 儿科MRSA基因型多为ST72-t2431-*agr* I-ⅣF (6/11, 54.5%), 其次为ST59-Ⅳa-t437 (4/11, 36.4%)。

2.4 S. aureus 菌株的药敏试验

所有菌株对CPT、LZD、DAP、TEC、VAN

和MNO敏感。菌株对PEN耐药率为96.6% (197/204), 对ERY (162/204, 79.4%) 和CLI (160/204, 78.4%) 耐药率均大于75%。

MRSA组患者对FOX、OXA、AMK和CHL的耐药率高于MSSA组, 对SXT的耐药率则低于MSSA组(表3)。MRSA组菌株的MDR率(34/39, 87.2%)明显高于MSSA组(50/165, 30.3%)菌株($P < 0.01$)。MRSA流行基因型ST59-t437-*agr* I-Ⅳa (15/21, 71.4%) 和第二流行基因型ST72-t2431-*agr* I-IVF (4/6, 66.7%) 的耐药谱均为FOX-OXA-PEN-ERY-CLI(表4)。

表3 S. aureus的抗菌药物的耐药率

Tab. 3 Antimicrobial resistance rates of S. aureus

Antibiotic	MRSA (n=39)		MSSA (n=165)		χ^2	P
	Number	Rate ($\eta/\%$)	Number	Rate ($\eta/\%$)		
FOX	38	97.44	11	6.67	142.406	<0.01
PEN	38	97.44	159	96.36	0	1
OXA	37	94.87	6	3.64	157.838	<0.01
CPT	0	0	0	0	—	—
GEN	1	2.56	12	7.27	0.516	0.473
LVX	3	7.69	7	4.24	0.235	0.628
MFX	2	5.13	5	3.03	0.025	0.874
ERY	35	89.74	127	76.97	3.148	0.076
CLI	34	87.18	126	76.36	2.181	0.140
LZD	0	0	0	0	—	—
DAP	0	0	0	0	—	—
TEC	0	0	0	0	—	—
VAN	0	0	0	0	—	—
RIF	0	0	2	1.21	—	1
SXT	1	2.56	43	26.06	10.295	<0.01
AMK	2	5.13	0	0	—	0.036
MNO	0	0	0	0	—	—
CHL	3	7.69	2	1.21	—	0.049

“—”: No data.

3 讨论

本研究中14株菌表型筛查与*mecA*结果显示“矛盾”。基因型为ST965-t062-*agr* II-IVF的菌株MRSA-33对OXA和FOX敏感, 基因型为ST72-t2431-*agr* I-IVF的菌株MRSA-6539对FOX耐药, 而对OXA敏感。推测上述OXA敏感的甲氧西林耐药(oxacillin sensitive MRSA, OS-MRSA)菌株,*mecA*序列中存在碱基插入或缺失, 致其提前终止, 编码的PBP2a不能执行正常功能, 或是*mecA*启动

子序列发生异常导致*mecA*不能进行正常的转录和翻译^[9-10]。GOERING等^[11]研究显示: 当暴露于抗生素时, *mecA*阳性菌株有逆转为表型耐药的能力, 同时, 调节*blaZ*基因转录的*blaR1*的截断或缺失也可导致OXA和(或)FOX敏感^[12]。小菌落变异(small-colony variants, SCVs)使细菌对外界感知下降, 从而对抗菌药物不敏感。对剩余菌株的研究^[13]表明: 菌株改良的OXA耐药金黄色葡萄球菌(modified S. aureus, MODSA)的*pbp* (*pbp1*~3)

表4 不同分子遗传背景下 MRSA 菌株的耐药图谱

Tab. 4 Drug resistance profiles of MRSA strains under different molecular genetic backgrounds

Genotype	Percentage of genotype ($\eta/\%$)	Resistance profile (Number of strain)
ST59-t437- <i>agr</i> I -IV a	53.8	FOX-OXA-PEN (1)
		FOX-OXA-PEN-ERY (1)
		FOX-OXA-PEN-ERY-CLI-AMK (1)
		FOX-OXA-PEN-ERY-CLI (15)
		FOX-OXA-PEN-ERY-CLI-CHL (2)
		FOX-OXA-PEN-LVX-MFX-ERY-CLI (1)
ST72-t2431- <i>agr</i> I -IV F	15.4	FOX-OXA-PEN-AMK (1)
		FOX-OXA-PEN-ERY-CLI (4)
		FOX-PEN-ERY-CLI-CHL (1)
ST72-t20226- <i>agr</i> I -IV F	5.1	FOX-OXA-PEN-ERY-CLI (2)
ST22-t309- <i>agr</i> I -III	5.1	FOX-OXA-PEN-ERY-CLI (2)
ST59-t172- <i>agr</i> I IV a	2.6	FOX-OXA-PEN-ERY-CLI (1)
ST59-t3736- <i>agr</i> I -IV a	2.6	FOX-OXA-PEN-ERY-CLI (1)
ST59-t3527- <i>agr</i> I -III	2.6	FOX-OXA-PEN-ERY-CLI (1)
ST1232-t034- <i>agr</i> I -V	2.6	FOX-OXA-PEN-ERY-CLI (1)
ST7196-t5155- <i>agr</i> I -IV F	2.6	FOX-OXA-PEN-ERY-CLI (1)
ST7437-t437- <i>agr</i> I -IV a	2.6	FOX-OXA-PEN (1)
ST965-t062- <i>agr</i> II -IV F	2.6	LVX-MFX (1)
^a ST9-t899- <i>agr</i> II -NT	2.6	^b FOX-OXA-PEN-GEN-LVX-ERY-CLI-SXT (1)

a: SCC*mec* not typeable; b: Strain MRSA-6221 intermediate resistance to moxifloxacin and chloramphenicol.

基因突变导致编码的PEN结合蛋白对药物的亲和力降低而耐药。BA等^[14]研究显示:编码环状二腺苷磷酸二酯酶的*GdpP*的截短同样介导 β -内酰胺类耐药。缺失*mec*结构的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant lacking *mec*, MRLM)对 β -内酰胺类药物耐药可能是由于细菌体内超产的 β -内酰胺酶,水解抗菌药物中的 β -内酰胺环而耐药。上述研究结果显示表型耐药和相关基因之间的复杂性,也与表型检测的操作过程和菌液浓度等操作误差有关。

本研究结果显示流行的MRSA克隆为ST59,与LI等^[15]和WANG等^[16]研究结果一致。但与其他国家的研究结果不尽相同。日本地区主要的MRSA基因型是ST1-t1784和ST8-t008,ST59仅零星出现^[17-18]。英格兰地区主要的MRSA克隆是ST22,但该型在本研究结果中仅占5.1%^[19]。上述研究结果表明不同地区有其特定的MRSA的基因型。

本实验中,97.4%的MRSA对GEN敏感,92.3%对LVX敏感,均明显高于RICCOBONO等^[20]的结论,而对ERY的敏感性低于RICCOBONO等^[20]

的结论(7.7% vs 29.0%, $P=0.014$)。XIONG等^[21]研究发现MRSA对PEN、ERY、CLI、GEN、LVX、MFX和RIF的耐药率明显高于MSSA组,而在本研究中未发现存在差异。推测不同地理分布的细菌对药物选择性压力不同,造成对同种药物的不同耐药率。

MRSA主要谱系ST59-t437对 β -内酰胺类(100.0%)、大环内酯类(ERY, 95.2%)和林可酰胺类(CLI, 90.5%)耐药,而对其他抗菌药物均较为敏感(>90%),较低的抗性适应成本使该谱系在生长和竞争方面具有优势。本研究中未鉴定出以往的优势克隆ST239,可能的原因是ST239对RIF、LVX、MFX和四环素具有抗性,携带或获得的耐药基因增加其进化负担,导致其失去优势^[15-16]。美国旧金山综合医院的研究^[22]结果显示:72.1%的ST59菌株对ERY耐药,但对CLI的耐药率(11.8%)低于本实验结果。WARD等^[23]研究结果表明:美国ST59克隆多携带*ermA*基因,推测本实验中的ST59克隆可能携带对ERY和CLI耐药的*ermB*基因。本实验中,ST59克隆除携带t437和IV a型SCC*mec*,还携带t172、t3527、t3736和III

型 SCCmec, 但比例较低, 表明该克隆基因结构的多样性。虽然 III 型 SCCmec 元件中存在携带抗性基因的质粒 pT181、转座子 Tn554 和 ϕ Tn554, 复杂的基因结构并未改变该克隆的耐药表型^[24]。

本研究结果显示: 来自儿科的 MRSA, 主要基因型是 ST72-t2431-*agr* I -IV F (50.0%), 其次是 ST59-t437-*agr* I -IV a。2 种不同遗传背景下菌株的耐药谱差异不大, 主要表现为 ERY-CLI- β -内酰胺类。本研究结果显示: 主要儿童 MRSA 谱系与全球流行的 ST5-IV 的结论不同。中国儿童菌株的普遍基因型为 ST59-MRSA-IV/V, 对 ERY 耐药率大于 78.6%, 但对 CLI 耐药率却相差很大^[25-26]。本研究中的 ST72-IVF 对 ERY 和 CLI 的耐药率均为 83.3% (5/6), 高于国内外的研究结果: 中国儿童 MRSA 种群中零星出现的 ST72-IV 对 ERY 和 CLI 敏感^[26], 韩国某儿童医院的研究结果显示对 ERY 和 CLI 均敏感的分离株克隆主要是 ST72-IV^[27]。葡萄牙地区对 2 100 名儿童的研究结果显示: ST72-IVc 对 ERY 和 CLI 耐药^[28]。IV 型 SCCmec 含有很多亚型 (IV a 到 IV n), IV F 和 IV c 等亚型对红霉素和 CLI 耐药的影响还需要大量样本的研究验证。虽有研究^[29]表明: ST72-IV 克隆引起的死亡率明显低于 ST5-II, 但儿科流行的 MRSA 克隆仍应引起临床医生的关注。

综上所述, 本研究中流行的 MRSA 基因型为 ST59-t437-*agr* I -IV a, 主要耐药谱为 FOX-OXA-PEN-ERY-CLI。儿科可能存在 MRSA 流行, 主要基因型为 ST72-t2431-*agr* I -IV F。*spa*、*agr*、MLST 和 SCCmec 分子分型间的关联尚需要大量样本支持。

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:

纪冰负责论文的整体设计, 付明霞、李娜和王凤霞负责数据获取, 胡远芳和陈宇佳负责数据分析, 梁进负责论文撰写, 纪冰和梁进负责论文的统计学分析。

[参考文献]

- [1] HARMSSEN 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.
- [2] WANG W Y, LEE S Y, CHIUEH T S, et al. Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *staphylococcus aureus* isolates from patients with septic arthritis[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(11): 3617-3623.
- [3] 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.
- [4] MCCLURE-WARNIER J A, CONLY J M, ZHANG K Y. Multiplex PCR assay for typing of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. J Vis Exp, 2013(79): 50779.
- [5] BOSWIHI S S, UDO E E, MONECKE S, et al. Emerging variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotypes in Kuwait hospitals[J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0195933.
- [6] ZHOU W X, JIN Y, LIU X, et al. Comparison of genetic features and evolution of global and Chinese strains of community-associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus* ST22 [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(1): e0203721.
- [7] KLEIN S, HANNESEN J, ZANGER P, et al. Entry of panton-valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into the hospital: prevalence and population structure in Heidelberg, Germany 2015—2018[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 13243.
- [8] WANG X Y, ZHAO H L, Wang B J, et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST8 isolates in China with potential high virulence [J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 507-518.
- [9] GARGIS A S, YOO B B, LONSWAY D R, et al. Difficult-to-detect *staphylococcus aureus*: *mecA*-positive isolates associated with oxacillin and cefoxitin false-susceptible results [J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(4): e02038-e02019.
- [10] LIANG B S, XIONG Z L, LIANG Z W, et al. Genomic basis of occurrence of cryptic resistance among oxacillin-and cefoxitin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(3): e0029122.
- [11] GOERING R V, SWARTZENDRUBER E A, OBRADOVICH A E, et al. Emergence of oxacillin resistance in stealth methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* due to *mecA* sequence instability [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(8): e00558-e00519.

- [12] JIAN Y, LI T M, ZHAO L, et al. Regulation of bla system in ST59-related oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* [J]. J Antimicrob Chemother, 2022, 77(3): 604-614.
- [13] BA X L, HARRISON E M, EDWARDS G F, et al. Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are methicillin resistant on susceptibility testing, but lack the mec gene[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(3): 594-597.
- [14] BA X L, KALMAR L, HADJIRIN N F, et al. Truncation of GdpP mediates β -lactam resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*[J]. J Antimicrob Chemother, 2019, 74(5): 1182-1191.
- [15] LI S G, SUN S J, YANG C T, et al. The changing pattern of population structure of *Staphylococcus aureus* from bacteremia in China from 2013 to 2016: ST239-030-MRSA replaced by ST59-t437 [J]. Front Microbiol, 2018, 9:332.
- [16] WANG B J, XU Y L, ZHAO H L, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in China: a multicentre longitudinal study and whole-genome sequencing [J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 532-542.
- [17] YAMAGUCHI T, NAKAMURA I, SATO T, et al. Changes in the genotypic characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* collected in 244 medical facilities in Japan between 2010 and 2018: a nationwide surveillance [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(4): e0227221.
- [18] 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.
- [19] HOLDEN M T, HSU L Y, KURT K, et al. A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic[J]. Genome Res, 2013, 23(4): 653-664.
- [20] RICCOBONO E, GIANI T, BALDI G, et al. Update on activity of dalbavancin and comparators against clinical isolates of Gram-positive pathogens from Europe and Russia (2017—2018), and on clonal distribution of MRSA [J]. Int J Antimicrob Agents, 2022, 59(2): 106503.
- [21] XIONG M Y, ZHAO J, HUANG T, et al. Molecular characteristics, virulence gene and wall teichoic acid glycosyltransferase profiles of *Staphylococcus aureus*: a multicenter study in China [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 2013.
- [22] DIEP B A, CARLETON H A, CHANG R F, et al. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. J Infect Dis, 2006, 193(11): 1495-1503.
- [23] WARD M J, GONCHEVA M, RICHARDSON E, et al. Identification of source and sink populations for the emergence and global spread of the East-Asia clone of community-associated MRSA [J]. Genome Biol, 2016, 17(1): 160.
- [24] MLYNARCZYK-BONIKOWSKA B, KOWALEWSKI C, KROLAK-ULINSKA A, et al. Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(15): 8088.
- [25] WANG X, LIU Q, ZHANG H, et al. Molecular characteristics of community-associated *Staphylococcus aureus* isolates from pediatric patients with bloodstream infections between 2012 and 2017 in Shanghai, China [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1211.
- [26] ZHAO R, WANG X, WANG X H, et al. Molecular characterization and virulence gene profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with bloodstream infections in Southern China [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 1008052.
- [27] SUNG J Y, LEE J, CHOI E H, et al. Changes in molecular epidemiology of community-associated and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korean children [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 74(1): 28-33.
- [28] TAVARES D A, SA-LEAO R, MIRAGAIA M, et al. Large screening of CA-MRSA among *Staphylococcus aureus* colonizing healthy young children living in two areas (urban and rural) of Portugal [J]. BMC Infect Dis, 2010, 10: 110.
- [29] PARK K H, CHONG Y P, KIM S H, et al. Community-associated MRSA strain ST72-SCCmec IV causing bloodstream infections: clinical outcomes and bacterial virulence factors [J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(4): 1185-1192.