

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）分子流 行病学特征及其变化趋势

编制单位：浙江大学

目 录

引言	8
1 研究背景.....	8
2 技术方案.....	10
2.1 研究菌株.....	10
2.2 临床信息.....	11
2.3 菌株鉴定.....	12
2.4 纸片法.....	12
2.5 mecA 基因测定.....	13
2.6 药物敏感性测定.....	14
2.7 DNA 提取.....	17
2.8 MLST、spa 分型及 SCCmec 分型的鉴定.....	18
2.9 PVL 基因的鉴定.....	21
2.10 CA-MRSA 以及 HA-MRSA 的判定标准.....	21
2.11 统计分析.....	22
3 研究结果.....	22
3.1 基本特征.....	22
3.2 mecA 基因 PCR 扩增结果.....	23
3.3 分子分型结果.....	24
3.4 PVL 基因的鉴定.....	29
3.5 药物敏感性.....	31
3.6 CA-MRSA 与 HA-MRSA 的比较.....	33
4 讨论.....	35
5 结论.....	38

插图清单

图 1. MRSA 分子流行病学研究的技术路线图.....	12
图 2. 162 株 MRSA 的标本来源分布情况.....	23
图 3. 162 株 MRSA 的科室来源分布情况.....	23
图 4. 部分样本 <i>mecA</i> 基因扩增电泳图.....	24
图 5. 2012-2018 年间 ST 分型多样性变化趋势.....	26

附表清单

表 1. <i>mecA</i> 基因的反应体系.....	14
表 2. <i>mecA</i> 基因 PCR 扩增的反应条件.....	14
表 3. 金黄色葡萄球菌对 12 种抗生素的 MIC 折点.....	16
表 4. MLST 分型的 7 个管家基因引物序列.....	18
表 5. SCCmec 不同类型的引物序列.....	19
表 6. SCCmec 分型多重 PCR 的反应体系.....	20
表 7. SCCmec 分型多重 PCR 的反应条件.....	21
表 8. 162 株 MRSA 菌株的 MLST 分型分布.....	24
表 9. 162 株 MRSA 的 SCCmec 分型分布.....	26
表 10. 162 株 MRSA 的 <i>spa</i> 分型分布.....	27
表 11. 162 株 MRSA 的 ST-SCCmec- <i>spa</i> 分型结果.....	28
表 12. 28 株 PVL 阳性 MRSA 细菌的分子分型.....	31
表 13. 162 株对 12 种抗菌药物的药物敏感性结果.....	32
表 14. 不同 ST 型 MRSA 对 9 种抗生素的耐药率.....	32
表 15. CA-MRSA 和 HA-MRSA 对于抗生素的药物敏感性分布.....	33
表 16. CA-MRSA 和 HA-MRSA 的分子流行病学分布.....	34

引言

细菌耐药是 21 世纪全球公共健康领域面临的一项重大挑战，引起国际社会及我国广泛关注。2014 年世界卫生组织在《抗菌药物耐药：全球监测报告》中明确指出：全球正面临抗菌药物耐药的巨大威胁[1]。我国是细菌耐药情况较为严重的国家之一，因此中国卫计委等 14 部委于 2016 年联合制定了《遏制细菌耐药国家行动计划（2016-2020 年）》，旨在从国家层面多个领域打出组合拳，有效遏制细菌耐药，维护人民群众身体健康，促进经济社会可持续发展。我国许多临床分离重要病原菌仍处于高耐药率水平。2011 年中国一项全国性三甲医院细菌耐药监测显示耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌（MRSA）已经达到 50.5%。抗生素耐药导致缺少有效的抗感染药物、增加医疗费用、延长住院时间、持续加重社会和经济负担等一系列问题。“抗击耐药：今天不采取行动，明天无药可用”是 2011 年世界健康日的主题。世界卫生组织（WHO）建议合理使用抗生素、细菌耐药监测、研究和开发新的诊断和治疗感染性疾病方法等措施为控制耐药的主要策略。

研究背景

金黄色葡萄球菌是临床重要病原菌之一，能够引起广泛的感染，如肺炎、败血症、感染性心内膜炎、中毒性休克综合征和坏死性筋膜炎等[1]。根据我国 CHINET 监测报告，金黄色葡萄球菌检出率位于革兰阳性球菌的首位[2]，是临床上最严重的致病菌之一。近年来，随着抗生素的广泛使用，细菌耐药性的增加在不同程度上影响着抗菌谱的演变。据了解，20 世纪 50 年代后期，半合成抗生素甲氧西林因其对青霉素酶的稳定性，有效控制了耐青霉素金黄色葡萄球菌的流行，然而，随着甲氧西林的广泛使用，金黄色葡萄球菌的耐药性逐渐产生。1960 年，英国学者发现了世界上首株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA）[3]。随后，MRSA 在世界

范围内流行，成为“超级细菌”之一。

MRSA 的耐药机制主要是由葡萄球菌染色体 *mec* 盒（*Staphylococcal chromosome cassette mec*, *SCCmec*）上的 *mecA* 和 *mecC* 基因决定的，以 *mecA* 基因为例，该基因编码产生的一种独特的青霉素结合蛋白（*penicillin-binding proteins*, *PBPs*），称为 *PBP2a*，*PBP2a* 对于 β -内酰胺类抗生素亲和力低，很少或不被 β -内酰胺类抗生素结合，从而产生耐药性[4,5]。同时，在 *sarA* 系统和 *agr* 系统等调节下金黄色葡萄球菌容易聚集形成生物膜，有效阻挡抗生素从而获得耐药性[6]。耐药基因和生物膜作用使 MRSA 的耐药性变得复杂，及时准确地检测和选择抗菌药物进行感染治疗尤为重要。

除耐药性更高外，与甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌（*methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*, *MSSA*）相比，MRSA 更是因为具有更高患病率、致死率、医疗成本等给世界公共卫生安全事业带来了巨大挑战[7,8]。据报道，在许多亚洲国家，医院中 MRSA 的流行率高达 70%-80%[9,10]，而在中国，尽管近年来发现 MRSA 患病率较前呈下降趋势，但根据监测报告，MRSA 每年仍有高达 30%以上的流行率[11]。MRSA 感染占有耐药性细菌归因病死率的第 2 位，且是金黄色葡萄球菌血流感染病死率的独立危险因素[8,12]。不仅如此，由于菌株的不断进化、演变，抗生素的迭代、更新以及不同区域人员之间的迁徙频率增加，MRSA 感染变得更加复杂和多样化，给 MRSA 感染的管理带来了新的挑战。

不同来源、不同区域和不同时间的 MRSA 菌株具有极大差异。社区获得性 MRSA（*community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *CA-MRSA*）和医院获得性 MRSA（*healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *HA-MRSA*）不论是在临床特征或是微生物学方面，都具有很大不同。在过去的十年中，CA-MRSA 的患病率呈上升趋势，而 HA-MRSA 的患病率则呈现下降趋势[13]。在分子流行病学方面，与 HA-MRSA 不同的是，

大多数的 CA-MRSA 分离株的 SCCmec 分型为 SCCmec IV 或 SCCmec V[14,15]。不仅如此, CA-MRSA 被认为具有更强的毒性,因为它们往往具有特定的毒力因子,其中包括有杀白细胞素(Panton-Valentine leucocidin, PVL)以及其他毒力基因[15]。此外, MRSA 的分子特征在不同的地区也具有显著的差异性,并且随着时间而变化。例如,在美国, ST8(USA300)是最流行的优势克隆[16],而在许多亚洲国家, ST5 和 ST239 则是最常见的克隆型[17,18]。自 2000 年以来, 亚洲地区主导的 ST239 HA-MRSA 克隆在医院环境中持续存在并且适应发展了数十年[19], 然而, 上海的一家综合医院进行的研究表明, 主要的 HA-MRSA ST239-t030 和 ST239-t037 在 2017 年被持续增长的 ST5-t2460 克隆所替代[20]。因此, 了解不同地区、不同年份的优势克隆和其耐药性变化具有重要意义。

目前常用的 MRSA 分子分型方法主要包括多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST), 葡萄球菌盒式染色体序列(Staphylococcal chromosome cassette mec, SCCmec)、葡萄球菌 A 蛋白(Staphylococcal protein A, spa)基因多态性, 脉冲电场凝胶电泳(Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE)分型和全基因组测序分型(Whole gene sequencing)[21,22], 这些方法对细菌进行精细化的、分子层面的全面评估。

本研究中,我们收集了 2012 年至 2018 年间我国华东地区一家三甲教学医院的所有无菌体液来源的 MRSA 菌株并进行分子流行病学研究,目的是探讨 MRSA 分离株在本地区的分子特征和变化趋势,从而为预防和治疗 MRSA 感染提供基础。

技术方案

研究菌株

收集2012年1月至2018年12月期间浙江省医院来源的无菌体液来源的所有金黄色葡萄球菌共593株,以及来自全国血流感染监测网(BRICS)的749株金黄色葡

萄球菌。通过MALDI-TOF MS质谱仪再次鉴定确认为金黄色葡萄球菌，继而用头孢西丁纸片法初筛确定表型为甲氧西林耐药以及PCR分子鉴定技术明确菌株存在mecA基因。最终筛选得到浙江来源MRSA菌株共162株，包括血流感染来源111株，胸腔积液来源11株，腹腔积液来源19株，脑脊液来源5株以及其他无菌体液来源16株。2012-2018年的菌株数分别为：6株、31株、18株、30株、28株、21株、28株。如果同一患者相同部位有多次（2次及2次以上）分离到MRSA菌株，本研究只选取首次培养结果。另外

临床信息

从医院的电子病历系统中收集菌株的基本信息，包括性别，年龄，住院时间，菌株培养时间，住院科室，基础疾病，医疗机构接触史，相关性侵入性操作（包括机械通气，经皮置管，留置胃管，留置导尿，深静脉穿刺等），血液透析，起搏器等。

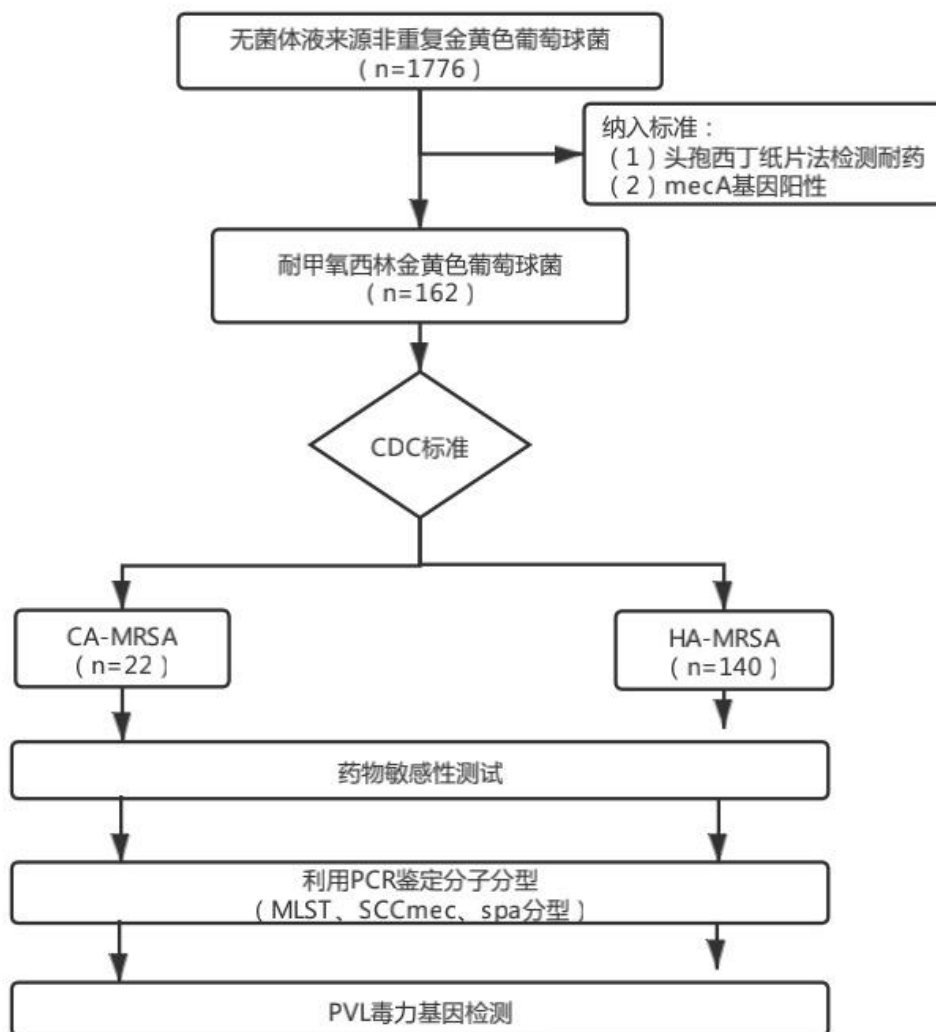


图1. MRSA分子流行病学研究的技术路线图

菌株鉴定

纸片法

根据美国临床实验室标准研究所（Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI）^[23]推荐的头孢西丁纸片法初筛表型耐药的 MRSA 菌株，质控菌株为 ATCC25923，具体步骤如下：

- 1) 配置 MH 琼脂平板：配置 MHA 培养基，加热煮沸之完全溶解后分装至三角瓶中，121℃ 高温灭菌后倒入无菌平皿中，形成 4mm 的琼脂层，冷却至凝固。
- 2) 细菌培养：将冻存的细菌接种到 MH 琼脂平板上，37℃ 培养箱中孵育 18-24 小时。
- 3) 菌悬液配制：从过夜平板上取单菌接种在 0.45% 生理盐水中制成菌悬液，利用麦氏比浊仪将菌悬液调至 0.5 个麦氏浊度。
- 4) 接种平板：用无菌棉签浸入菌悬液中，用棉签划线琼脂表面，从平板顶部到底部，均匀涂布，重复两次此过程（一共三次），每次旋转平板约 60 度，确保每次接种菌液均匀分布，最后在琼脂平板的边缘涂抹一圈，防止有流动的菌悬液，并使菌液涂布于整块平板的每个角落。
- 5) 静置：室温放置 3-5min，保证干燥。
- 6) 放置头孢西丁纸片，利用无菌镊子将头孢西丁纸片贴于已接种细菌的表面，轻轻按压确保纸片与琼脂表面完全接触，放下纸片后不移动纸片且保证各纸片均匀分布。
- 7) 孵育：将放置好纸片的 MH 琼脂平板倒置放入培养箱中，孵育 24 小时。
- 8) 判读结果：头孢西丁抑菌圈 $\leq 21\text{mm}$ 为 MRSA 菌株，头孢西丁抑菌圈直径 $\geq 22\text{mm}$ 为 MSSA 菌株。

mecA 基因测定

- 1) 对表型初筛为 MRSA 的菌株利用 PCR 技术扩增检测 mecA 基因^[24,25]，引物序列为：mecA-F': 5'-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA -3'; mecA-R': 5'-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3'，产物长度为 310bp。
- 2) PCR 反应体系如下：

表 1 mecA 基因的反应体系

反应体系	体积 (μL)
2×Taq PCR MasterMix	25
2μL DNA 模版	2
mecA-F	1
mecA-R	1
ddH ₂ O	21
总体积	50μL

3) PCR 扩增条件如下:

表 2 mecA 基因 PCR 扩增的反应条件

基因	预变性	35 个循环			延伸	保存
		变性	退火	延伸		
mecA	95°C	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
	5min	1min	45s	1min	10min	

4) 产物电泳和成像: 制备 1.5%琼脂糖凝胶, 取 5μL 2000bp DNA marker 和 5μL 的 PCR 扩增产物加入点样孔中, 电压 150V 电泳时间 20min。后将产物在凝胶成像仪上观察结果, 鉴定是否有条带, 并随机挑选 2 份阳性产物送一代测序。

药物敏感性测定

使用微量肉汤法和琼脂稀释法测定 12 种抗生素对 162 株 MRSA 菌株的最小抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC), 从而确定其药物敏感性, 质控菌株为 ATCC29213。抗生素包括: 克林霉素(clindamycin, CLI), 红霉素(erythromycin, ERY), 庆大霉素(gentamicin, GEN), 环丙沙星(ciprofloxacin, CIP), 左氟氧沙星

(levofloxacin,LVX), 莫西沙星(moxifloxacin, MXF), 利福平(rifampin, RIF), 四环素(tetracycline,TCY), 复方新诺明(trimethoprim/sulfamethoxazole,SXT), 利奈唑胺(linezolid,LZD), 替加环素(tigecycline,TGC), 万古霉素(vancomycin ,VAN)。使用琼脂稀释法测定 MIC 值的抗生素有克林霉素, 红霉素, 庆大霉素, 环丙沙星, 左氟氧沙星, 莫西沙星, 利福平, 四环素和复方新诺明。使用微量肉汤法测定 MIC 值的抗生素有万古霉素、利奈唑胺、替加环素。具体方法如下:

琼脂稀释法

- 1) 分离培养菌株和质控菌株: 从分存管中用无菌枪头挑取适量至血培养基分离但菌落
- 2) 配置药物: 根据药物说明书配置抗生素原液, 计算浓度并按照要求将药物以倍比稀释的浓度梯度加入无菌器皿中, 用记号笔在平板底部做好药物名称和浓度标记, 每种抗生素准备 2 只空的无菌培养皿作为点样前和点样后的对照。
- 3) 制备药物琼脂培养基: 将配置好的 MHA 琼脂培养基并高压灭菌后放凉至 50°C 左右, 取 19ml 左右加入到无菌培养皿中, 轻摇摇匀, 冷却至室温, 直至平板凝固。
- 4) 配置均悬液: 从分存管中挑取细菌接种在培养基中, 孵育过夜, 挑取已孵育的菌落利用麦氏比浊仪将菌悬液调至 0.5 个麦氏浊度。
- 5) 接种: 将菌液以 1:10 稀释后按顺序加入到接种仪中的点种板小孔中, 并做好标记, 使用接种仪接种到含有药物的无菌培养皿中
- 6) 孵育: 将平板放入 37°C 孵箱中恒温孵育 24 小时后读取药敏结果, 无细菌生长的平板的药物浓度即为最低抑菌浓度 (MIC)。

微量肉汤法: 测定万古霉素、利奈唑胺、替加环素 MIC

- 1) 调菌悬液: 从分存管中挑取细菌接种在培养基中, 孵育过夜, 挑取已孵育的菌落利用麦氏比浊仪将菌悬液调至 0.5 个麦氏浊度, 将校准为 0.5 个麦氏浊度的菌悬液稀释 10 倍, 得到最终菌悬液, 备用。

- 2) 配置肉汤：按照药物说明书配置 MHB，替加环素调成起始浓度为 32μg/mL 肉汤工作液，同时注意避光操作；将万古霉素、利奈唑胺调成 32μg/mL 的肉汤工作液。
- 3) 加抗生素：在所有无菌 96 孔版中的第 2-11 列孔中加入 100μL 肉汤，取 32μg/mL 的替加环素肉汤 200μL 加入第一列孔；取 32μg/mL 的万古霉素、利奈唑胺肉汤 200μL 加入第一列孔。用移液枪从第一列孔取 100μL 肉汤至第二列孔混匀，后再第二列孔中取 100μL 肉汤至第三列孔混匀，依次类推，第 11 孔时吸入 100μL 时弃去，第 12 孔作为阴性对照，将所有抗生素浓度倍比稀释。
- 4) 加菌悬液：将菌悬液 4ul 分别加入含有不同浓度的抗生素肉汤的 96 孔板中。
- 5) 孵育：将处理好的 96 孔板中放置于 37℃ 敷箱中恒温孵育 24 小时后读取药敏结果，将没有细菌生长的点样孔作为该菌株最终的最低抑菌浓度（MIC）。

表 3 金黄色葡萄球菌对 12 种抗生素的 MIC 折点

药物	敏感(S)	中介 (I)	耐药 (R)
克林霉素, CLI	≤0.5	1-2	≥4
红霉素, ERY	≤0.5	1-4	≥8
庆大霉素, GEN	≤4	8	≥16
环丙沙星, CIP	≤1	2	≥4
左氟氧沙星, LVX	≤1	2	≥4
莫西沙星, MXF	≤0.5	1	≥2
利福平, RIF	≤1	2	≥4
四环素, TCY	≤4	8	≥16
复方新诺明, SXT	≤2/38	-	≥4/76
利奈唑胺, LZD	≤4	-	≥8
替加环素, TGC	≤0.5	-	≥1
万古霉素, VAN	≤2	4-8	≥16

DNA 提取

162 株菌株和标准菌株按照试剂盒制造商要求提取 DNA，步骤如下：

- 1) 取 0.5-2 毫升培养菌液（最多不超过 2×10^9 个细胞），10000rpm，离心 30 秒，弃上清，收集菌体，尽可能的吸净上清。
- 2) 加入 200ul 缓冲液 RB 重悬洗涤细胞，10000rpm，离心 30 秒，弃上清后将细胞振荡或者吹打重悬于 200ul 缓冲液 RB 中。
- 3) 加入 50ul 溶菌酶（10mg/ml）和 10ul 溶葡萄球菌酶（10U/ul）37°C 孵育 30min 确保有效裂解。
- 4) 加入 200ul 结合液 CB，立刻剧烈颠倒轻摇充分混匀，再加入 20ul 蛋白酶 K（20mg/ml）溶液，充分混匀，70°C 放置 10min。
- 5) 冷却后加入 100ul 异丙醇，剧烈颠倒轻摇充分混匀后观察到絮状沉淀。
- 6) 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）10000rpm 离心 30s，倒掉收集管中的废液
- 7) 加入 500ul 抑制物去除液 IR，12000rpm 离心 30s，弃掉废液。
- 8) 加入 700ul 漂洗液 WB（已加入无水乙醇），12000rpm 离心 30s，弃掉废液。
- 9) 加入 500ul 漂洗液 WB，12000rpm 离心 30s，弃掉废液。
- 10) 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13000rpm 离心 2 分钟，尽量去除漂洗液。
- 11) 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 100ul 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65°C-70°C 水浴中预热），室温放置 3-5 分钟，12000 离心 1min，将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min。
- 12) 将提取好的 DNA 储存在-20°C 冰箱内，作为后续 PCR 反应的模板。

MLST、spa 分型及 SCCmec 分型的鉴定

MLST 分型

按照既往文献报道^[26,27], 扩增 7 个管家基因(*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*), 反应体系及反应条件见 2.2.1.2, 并将 PCR 产物送至北京擎科生物进行一代 sanger 测序, 测序结果与 MLST 网站(<http://saureus.mlst.net>)上的现有序列进行比对并获得相应的序列号, 并确定每个菌株的 ST 型。7 个管家基因的引物序列如下:

表 4 MLST 分型的 7 个管家基因引物序列

引物名称		引物序列 (5'→3')	片段长度/bp
<i>arcC</i>	up	TTGATTACACCAGCGCGTATTGTC	456
	down	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
<i>aroE</i>	up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	456
	down	GGTGTTGTATTAATAACGATATC	
<i>glpF</i>	up	CTAGGAAGTCAATCTTAATCC	465
	down	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
<i>gmk</i>	up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	429
	down	TCATTAACACGTAATCGTA	
<i>pta</i>	up	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474
	down	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	
<i>tpi</i>	up	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA	402
	down	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
<i>yqiL</i>	up	GAGCATACAGGACACCTATTGGC	516
	down	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

SCCmec 分型

- (1) 通过多重 PCR 方法确定 SCCmec 类型^[24], 根据盒式染色体重组酶(ccr)和 mec 类的组合来划分 SCCmec 的类型, 所有不能被确认为 I-V 型的 MRSA 定义为

SCCmecNT，基因引物序列如下：

表 5 SCCmec 不同类型的引物序列

引物名称		引物序列 (5'→3')	片段长度/bp
mecA147	F	GTGAAGATATACCAAGTGATT	147
	R	ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT	
SCCmecI	F	GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG	613
	R	GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	
SCCmecII	F	CGTTGAAGATGATGAAGCG	398
	R	CGAAATCAATGGTTAATGGACC	
SCCmecIII	F	CCATATTGTGTACGATGCG	280
	R	CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	
SCCmecIVa	F	GCCTTATTCGAAGAAACCG	776
	R	CTACTCTCTGAAAAGCGTCG	
SCCmecIVb	F	TCTGGAATTACTTCAGCTGC	493
	R	AAACAATATTGCTCTCCCTC	
SCCmecIVc	F	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC	200
	R	TTGGTATGAGGTATTGCTGG	
SCCmecIVd	F	CTCAAAATACGGACCCCAATACA	881
	R	TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	
SCCmecV	F	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG	325
	R	TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	

(2)反应体系如下图:

表 6 SCCmec 分型多重 PCR 的反应体系

反应体系	体积 (μL)
2×Taq PCR MasterMix	25
2μL DNA 模版	2
SCCmecI-F	0.5
SCCmecI-R	0.5
SCCmecII-F	0.5
SCCmecII-R	0.5
SCCmecIII-F	0.5
SCCmecIII-R	0.5
SCCmecIVa-F	0.5
SCCmecIVa-R	0.5
SCCmecIVb-F	0.5
SCCmecIVb-R	0.5
SCCmecIVc-F	0.5
SCCmecIVc-R	0.5
SCCmecIVd-F	0.5
SCCmecIVd-R	0.5
SCCmecV	0.5
SCCmecV	0.5
ddH ₂ O	15
总体积	50μL

(3)多重 PCR 扩增条件:

表 7 SCCmec 分型多重 PCR 的反应条件

产物	预变性	35 个循环			延伸	保存
		变性	退火	延伸		
SCCmec	95°C	95°C	52°C	72°C	72°C	4°C
多重 PCR	5min	30s	45s	1min	10min	
产物						

(4) 产物电泳和成像: 制备 1.5%琼脂糖凝胶, 取 5μL 2000bp DNA marker 和 5μL 的 PCR 扩增产物加入点样孔中, 电压 120V 电泳 30min。后将产物在凝胶成像仪上观察结果, 根据片段长度比对得到 SCCmec 型别。

Spa 分型

参考文献设计 spa 分型引物^[28], 引物序列为: spa-F': 5'- AGACGATCCT TCGGTGAGC -3'; spa-R': 5'- GCTTTTGCAATGTCATTACTG-3', 反应条件及循环条件见 2.2.1.2, 将得到的产物送至公司测序, 测序结果统一于网站 <http://spa.ridom.de> 确定 spa 分型。

PVL 基因的鉴定

根据文献报道^[29], 采用 PCR 方法扩增 PVL 独立基因。引物序列为: spa-F': 5'- ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCC -3'; spa-R': 5'- GCATCAAC TGTATTGGATAGCAAAAGC-3', 将产物通过凝胶电泳跑出条带, 将阳性条带送至测序公司确定为 PVL 基因产物。

CA-MRSA 以及 HA-MRSA 的判定标准

根据美国疾病与预防控制中心 (CDC) 的标准区分 CA-MRSA 和 HA-MRSA^[30,31]。CA-MRSA 感染的定义为:

- 1) 门诊或住院 48 小时内培养到细菌
- 2) 既往无 MRSA 感染或定植史
- 3) 感染前一年内无医疗相关机构接触史
- 4) 无透析、手术、留置导管或人工医疗装置。HA-MRSA 感染定义为入院 48 小时后培养到细菌，或既往曾有医疗保健接触史。

统计分析

在分析比较 CA-MRSA 和 HA-MRSA 的特征时，分类变量用数值，百分比表示，并使用卡方检验进行比较。使用 SPSS 23.0 进行统计分析。所有统计检验均为双侧，统计学意义为 $P < 0.05$ 。

研究结果

基本特征

2012 年 1 月至 2018 年 12 月期间共得到非重复无菌体液来源 MRSA 162 株，其中 CA-MRSA 有 22 株 (13.6%)，HA-MRSA 有 140 株 (86.4%)。标本来源分布包括血流感染 (68.52%)，腹腔积液 (11.73%)，胸腔积液 (6.79%)，脑脊液 (3.09%) 以及其他无菌穿刺液 (9.88%) (图 2)。科室分布来源主要包括感染病科 (11.11%)、肝胆胰外科 (11.11%)、急诊重症监护室 (11.11%) 以及重症监护室 (11.11%) 等 (图 3)。

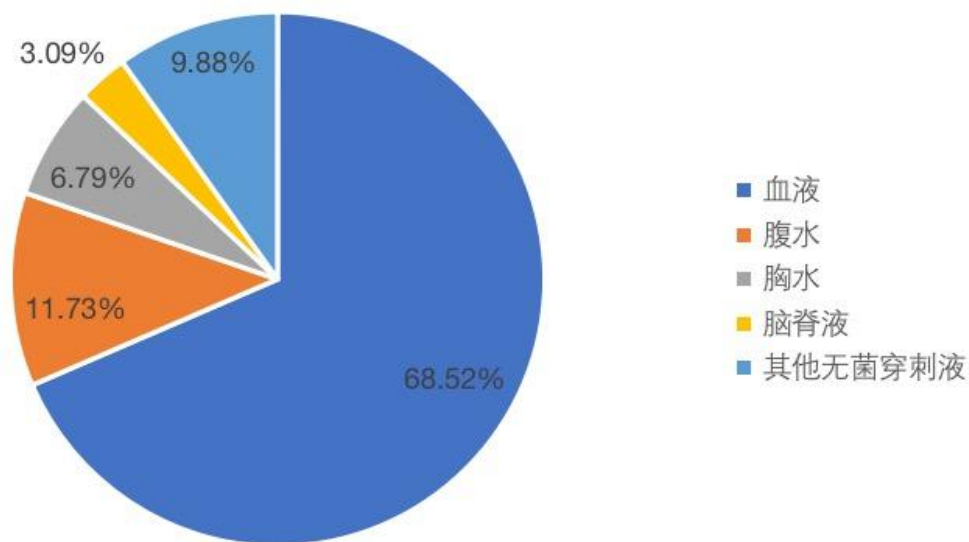


图 2 162 株 MRSA 的标本来源分布情况

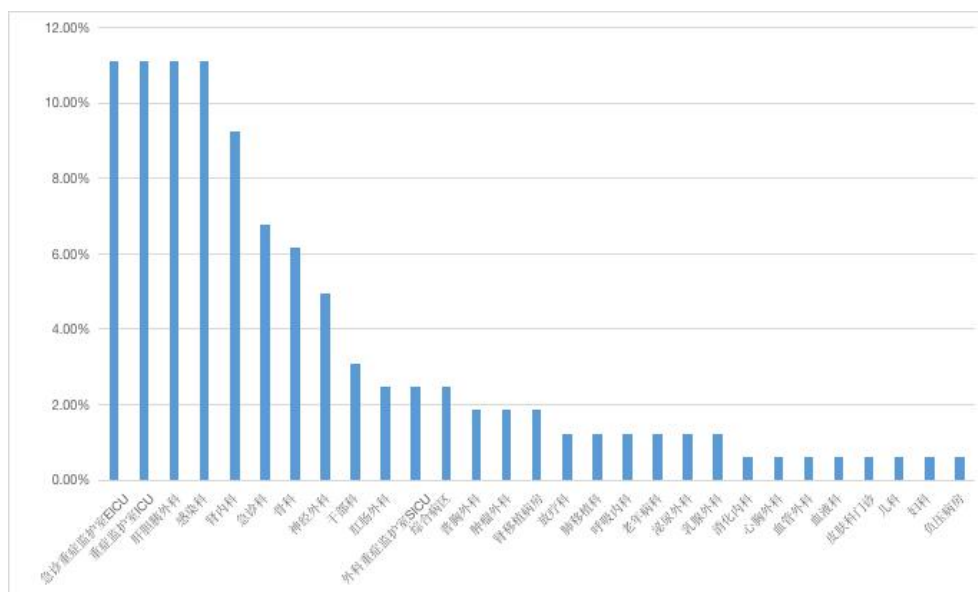


图 3 162 株 MRSA 的科室来源分布情况

mecA 基因 PCR 扩增结果

162 株金黄色葡萄球菌 mecA 基因阳性，基因扩增产物电泳条带如下图，将扩增产物送至北京擎科生物科技有限公司测序，结果证实为 mecA 基因（图 4）。

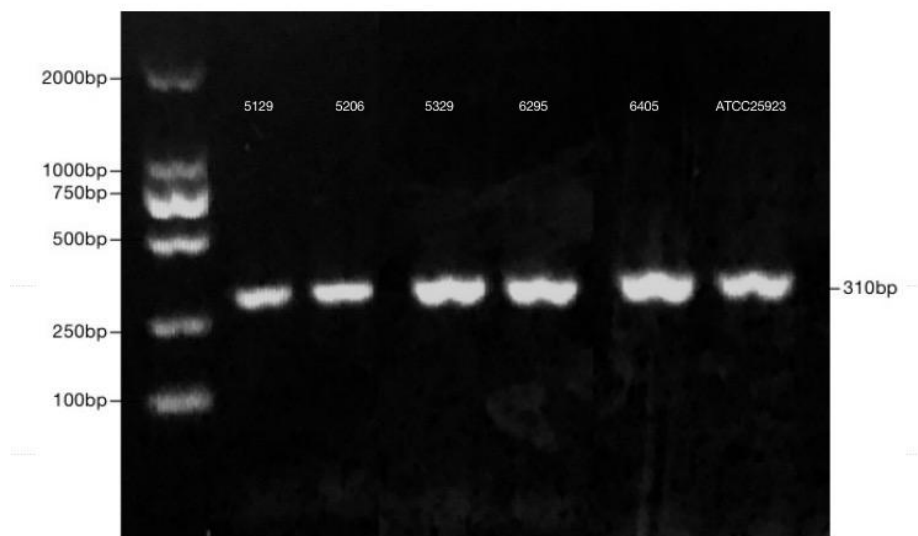


图 4 部分样本 *mecA* 基因扩增电泳图

分子分型结果

MLST 分型

162 株 MRSA 分离株共存在 16 个 ST 型。其中占比最多的 ST 型依次是 ST5(96/162, 59.3%)、ST59(30/162, 18.5%)和 ST398(8/162, 4.9%)。ST88、ST630 各 5 株, 占 3.0%, ST965 有 4 株, 占 2.4%, ST239 有 3 株, 占 1.8%, ST1、ST188 各 2 株, 占 1.2%, ST6、ST7、ST9、ST22、ST573、ST764、ST3193 各 1 株, 占 0.6% (表 8)。

表 8 162 株 MRSA 菌株的 MLST 分型分布

ST 型	MLST 管家基因							菌 株 占比,	
	arcC	aroE	glpF	gmk	pta	tpi	yqiL	数, n	%
ST5	1	4	1	4	12	1	10	96	59.2%
ST59	19	23	15	2	19	20	15	30	18.5%
ST398	3	35	19	2	20	26	39	8	4.9%
ST88	22	1	14	23	12	4	31	5	3.0%
ST630	12	3	1	1	4	4	3	5	3.0%

ST965	1	4	1	4	119	1	10	4	2.4%
ST239	2	3	1	1	4	4	3	3	1.8%
ST1	1	1	1	1	1	1	1	2	1.2%
ST188	3	1	1	8	1	1	1	2	1.2%
ST6	12	4	1	4	12	1	3	1	0.6%
ST7	5	4	1	4	4	6	3	1	0.6%
ST9	3	3	1	1	1	1	10	1	0.6%
ST22	7	6	1	5	8	8	6	1	0.6%
ST573	1	1	1	1	12	1	1	1	0.6%
ST764	1	136	1	4	12	1	10	1	0.6%
ST3193	19	457	15	2	19	20	15	1	0.6%
合计								162	100%

随着时间的推移，ST 分型多样性逐渐丰富，2012-2018 年的 ST 分型种类依次为 4 种、4 种、5 种、6 种、6 种、6 种、10 种（图 5），主要的 ST 型的占比在 2014-2018 年也有明显改变，ST5 的从 2014 年(72.2%)逐渐下降至 2018 年(32.1%)，而 ST59 的患病率从 2014 年(5.6%)明显上升至 2018 年(28.6%)。ST398 型从 2015 年开始出现，2015-2018 年的菌株数量分别为 3，1，3，1 株，ST9 出现在 2013 年。

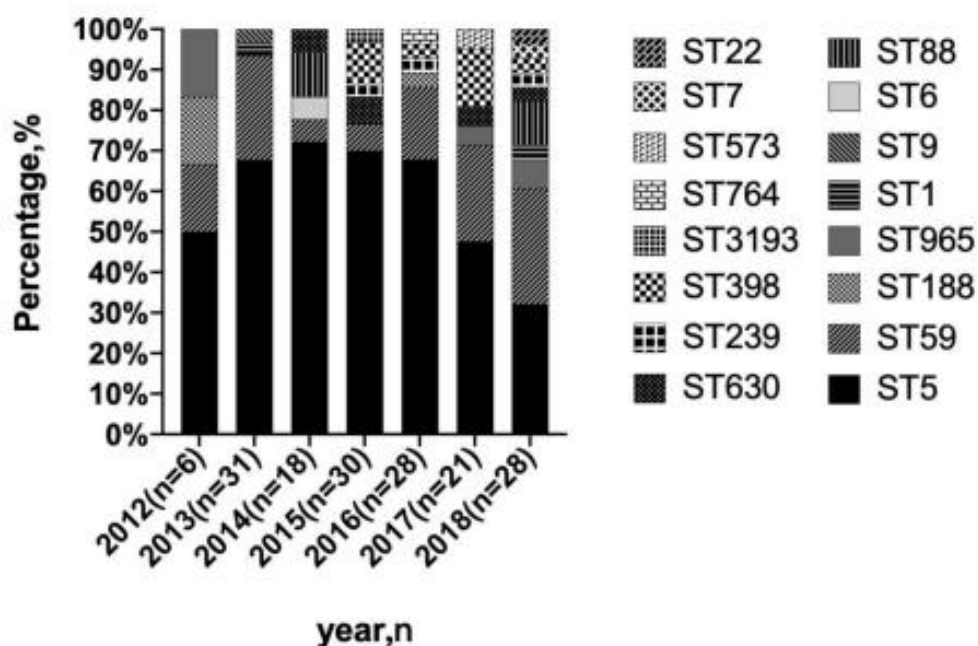


图 5 2012-2018 年间 ST 分型多样性变化趋势

SCCmec 分型

共发现 5 种 SCCmec 类型，分别为 I 型(1/162,0.6%)、II 型(100/162,61.7%)、III 型(3/162,1.9%)、IVa 型(32/ 162,19.6%)和 V 型(5/162,3.1%)。最常见的是 SCCmec II 型，其次是 SCCmec IVa 型。有 22 株菌株未能被归类，定义 SCCmec NT 型别 (21/162;13.0%)（表 9）。

表 9 162 株 MRSA 的 SCCmec 分型分布

SCCmec 分型	菌株数，n	百分比，%
SCCmecI	1	0.6%
SCCmecII	100	61.7%
SCCmecIII	3	1.9%
SCCmecIVa	32	19.6%
SCCmecV	5	3.1%
SCCmecNT	21	13.0%

spa 分型

将 PCR 产物送至公司测序，将测序结果与网站数据库中比对后得到相应 spa 型别。结果显示，162 株细菌共得到 30 个 spa 型别，其中 t311(83/162, 51.2%)是主要型别，其次是 t437(22/162, 13.6%)和 t034(8/162, 4.9%)，3 种 spa 型别 t002、t172、t4549 各检出 5 株，t062 检出 4 株，t127、t2460 各检出 3 株，t030、t441、t7637 各检出 2 株，其余 spa 型 t045、t091、t15074、t163、t189、t2310、t2526、t2731、t309、t319、t3235、t3887、t4135、t421、t494、t693、t701、t899 各检出 1 株（表 10）。

表 10 162 株 MRSA 的 spa 分型分布

spa 分型	菌株数, n	百分比, %
t311	83	51.2%
t437	22	13.6%
t034	8	4.9%
t002	5	3.1%
t172	5	3.1%
t4547	5	3.1%
t062	4	2.5%
t127	3	1.9%
t2460	3	1.9%
t030	2	1.2%
t441	2	1.2%
t7637	2	1.2%
其他	18	11.1%

MLST、SCCmec、spa 分型之间的联系

结合 ST 型和 SCCmec 分型发现，ST5 MRSA 最常存在 SCCmec II 型（92/96，

95.8%), ST59 MRSA 最常存在 SCCmec IVa 型 (25/30, 83.3%), 结合 ST 型和 spa 分型发现, ST5-t311(83/162,51.2%)、ST59-t437(22/162,13.6%)和 ST398-t034(8/162, 4.9%)为前三的优势组合。分析 ST-SCCmec-spa 分型结果, 共发现 41 种 ST-SCCmec-spa 型别组合 MRSA, 最常见的基因型是 ST5-II-t311(81/162, 50.0%), 其次是 ST59-IVa-t437(18/162, 11.1%), 第三是 ST398-NT-t034(7/162, 4.3%)。

表 11 162 株 MRSA 的 ST-SCCmec-spa 分型结果

ST 分型	SCCmec	spa	菌株数, n	百分比, %
ST5	II	t311	81	50.0%
ST5	II	t002	5	3.1%
ST5	II	t2460	3	1.9%
ST5	II	t494	1	0.6%
ST5	II	t2731	1	0.6%
ST5	II	t3235	1	0.6%
ST5	NT	t311	2	1.2%
ST5	IVa	t693	1	0.6%
ST5	V	t319	1	0.6%
ST59	IVa	t437	18	11.1%
ST59	IVa	t172	4	2.5%
ST59	IVa	t441	2	1.2%
ST59	IVa	t163	1	0.6%
ST59	NT	t437	3	1.8%
ST59	V	t437	1	0.6%
ST59	V	t4135	1	0.6%
ST398	NT	t034	7	4.3%
ST398	II	t034	1	0.6%
ST88	NT	t2310	1	0.6%
ST88	NT	t7637	1	0.6%
ST88	II	t15047	1	0.6%
ST88	III	t7637	1	0.6%

ST88	V	t2526	1	0.6%
ST630	II	t4549	4	2.5%
ST630	V	t4549	1	0.6%
ST965	NT	t062	2	1.2%
ST965	IVa	t062	1	1.2%
ST965	II	t062	1	0.6%

(续) 表 13

ST 分型	SCCmec	spa	菌株数, n	百分比, %
ST239	III	t030	2	1.2%
ST239	NT	t421	1	0.6%
ST1	IVa	t127	1	0.6%
ST1	NT	t127	1	0.6%
ST188	I	t189	1	0.6%
ST188	IVa	t3887	1	0.6%
ST6	NT	t701	1	0.6%
ST7	IVa	t091	1	0.6%
ST9	NT	t899	1	0.6%
ST22	NT	t309	1	0.6%
ST573	IVa	t127	1	0.6%
ST764	II	t045	1	0.6%
ST3193	IVa	t172	1	0.6%

PVL 基因的鉴定

结果共发现 28 株 MRSA pvl 基因阳性(28/162,17.3%), 最常见标本类型为血液 (20/28,71.4%), 其余标本来源分别为腹腔穿刺液 (3/28, 10.7%), 其余无菌穿刺液 (3, 10.7%), 脑脊液 (1/28, 3.6%) 和胸腔穿刺液 (1/28, 3.6%)。28 株 pvl 阳性菌株中以 ST59-IVa-t437 型 MRSA(8/28,28.6%) 最为普遍, 其次是 ST5-II-t311 (4/28,14.3%) 和 ST59-NT-t437 (2, 7.1%), ST5-II-t2460、ST59-IVa-t172、

ST59-IVa-t441、ST59-V-437、ST59-V-t4135、ST398-II-t034、ST88-NT-t2310、
ST88-NT-t7637、ST88-V-2526、ST965-IVa-t062、ST6-NT-t701、ST22-NT-t309、
ST3193-IVa-t172 型别各有 1 株。

表 12 28 株 PVL 阳性 MRSA 细菌的分子分型

PVL 阳性的分子分型	菌株数量, n	百分比, %
ST59-IVa-t437	8	28.6%
ST5-II-t311	4	14.3%
ST59-NT-t437	2	7.1%
ST5-II-t2460	1	3.6%
ST59-IVa-t172	1	3.6%
ST59-IVa-t441	1	3.6%
ST59-V-437	1	3.6%
ST59-V-t4135	1	3.6%
ST398-II-t034	1	3.6%
ST88-NT-t2310	1	3.6%
ST88-NT-t7637	1	3.6%
ST88-III-t7637	1	3.6%
ST88-V-2526	1	3.6%
ST965-IVa-t062	1	3.6%
ST6-NT-t701	1	3.6%
ST22-NT-t309	1	3.6%
ST3193-IVa-t172	1	3.6%

药物敏感性

共对 162 株 MRSA 进行药物敏感性测试,结果显示,所有分离株对万古霉素、替加环素、利奈唑胺敏感,对红霉素(85.2%)、喹诺酮类(环丙沙星(66.0%)、左氟氧沙星(64.2%)、莫西沙星(63.0%))、四环素(42.6%)、克林霉素(30.9%)耐药率较高,对庆大霉素(5.6%)、利福平(3.1%)、复方新诺明(3.1%)耐药率较低(表 15)。162 株 MRSA 菌株中有 118 株(72.8%)对 ≥ 3 种抗生素耐药,74 株(45.7%)对 >5 种抗生素耐药,11 株(6.8%)对 ≥ 7 种抗生素耐药。

结合菌株的分子分型，ST5 MRSA 对于红霉素、喹诺酮类（环丙沙星、左氟氧沙星、莫西沙星）耐药率较高（耐药率>70%），而对于复方新诺明 100%敏感。ST59 MRSA 对于克林霉素、红霉素耐药率较高（耐药率>70%），对于庆大霉素、利福平、复方新诺明 100%敏感。ST239 MRSA 对于红霉素 100%耐药，对于克林霉素、庆大霉素、环丙沙星、左氟氧沙星、莫西沙、利福平、四环素耐药率均为 66.7%，对于复方新诺明耐药率为 33.3%克林霉素，ST6 MRSA 和 ST22 MRSA 对所有检测的抗生素均敏感。此外，ST5 MRSA 有 67.7% (65/96) 耐多药，即对 3 类以上抗生素耐药，ST59 菌株中仅 8 株(8/30,26.7%)为耐多药菌株。

表 13 162 株对 12 种抗菌药物的药物敏感性结果

抗菌药物	耐药 n, %	中介 n, %	敏感 n, %
克林霉素, CLI	50 (30.9%)	1 (0.6%)	111 (68.5%)
红霉素, ERY	138 (85.2%)	5 (3.1%)	19 (11.7%)
庆大霉素, GEN	9 (5.6%)	14 (8.6%)	139 (85.8%)
环丙沙星, CIP	107 (66.0%)	6 (3.7%)	49 (30.2%)
左氟氧沙星, LVX	104 (64.2%)	3 (1.9%)	55 (34.0%)
莫西沙星, MXF	102 (63.0%)	6 (3.7%)	54 (33.3%)
利福平, RIF	5 (3.1%)	1 (0.6%)	156 (96.3%)
四环素, TCY	69 (42.6%)	-	93 (57.4%)
复方新诺明, SXT	5 (3.1%)	-	157 (96.9%)
利奈唑胺, LZD	-	-	162 (100%)
替加环素, TGC	-	-	162 (100%)
万古霉素, VAN	-	-	162 (100%)

表 14 不同 ST 型 MRSA 对 9 种抗生素的耐药率

ST 菌株数 分型 (n)	耐药率 (%)									
	CLI	ERY	GEN	CIP	LVX	MXF	RIF	TCY	SXT	

ST5	96	20.8	100.0	16.7	99.0	99.0	99.0	3.1	54.2	0.0
ST59	30	73.3	76.7	0.0	20.0	6.7	6.7	0.0	30.0	0.0
ST398	8	25.0	50.0	0.0	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	0.0
ST630	5	0.0	40.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ST965	4	25.0	100.0	25.0	50.0	25.0	50.0	0.0	25.0	25.0
ST239	3	66.7	100.0	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	33.3
ST1	2	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ST188	2	50.0	100.0	50.0	100.0	100.0	100.0	0.0	50.0	50.0
ST6	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ST7	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0
ST9	1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	100.0	100.0
ST22	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ST573	1	0.0	100.0	0.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	0.0
ST764	1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	100.0	0.0
ST3193	1	100.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total	162	31.5	88.3	14.2	69.8	66.0	66.7	3.7	42.6	3.1

4.5 CA-MRSA 与 HA-MRSA 的比较

CA-MRSA 和 HA-MRSA 在本研究中表现出不同的分子流行病学和耐药性分布。耐药性方面，我们发现，54.3% (76/140) HA-MRSA 菌株被鉴定为 MDR，而只有 27.3% (6/22) CA-MRSA 菌株被鉴定为 MDR。CA-MRSA 对克林霉素、复方新诺明的耐药性高于 HA-MRSA，HA-MRSA 对于红霉素、庆大霉素、环丙沙星、左氟氧沙星、莫西沙星、利福平、四环素的耐药性高于 CA-MRSA（表 15）。

表 15 CA-MRSA 和 HA-MRSA 对于抗生素的药物敏感性分布

类型	菌株 数目	耐药比例 (%)								
	(n)	CLI	ERY	GEN	CIP	LVX	MXF	RIF	TCY	SXT
CA-MRSA	22	63.6	72.7	4.5	13.6	13.6	13.6	0	27.3	9.1
HA-MRSA	140	25.7	87.1	5.7	74.3	72.1	70.7	3.6	45	2.1

其次，分子分型方面，本研究中 HA-MRSA 以 SCCmec II 型(98/140,70%)居多而 CA-MRSA 以 SCCmec IVa 型(14/22,63.6%)居多。与 HA-MRSA 菌株相比，CA-MRSA 携带 ST5 的概率较低(9.1% vs. 67.1%， P=0.000)，携带 ST59 的概率较高(63.6% vs. 11.4%， P=0.000)。CA-MRSA 患者携带 PVL 基因的概率明显高于 HA-MRSA 患者(36.4% vs. 14.3%， P=0.028)（表 16）。

表 16 CA-MRSA和HA-MRSA的分子流行病学分布

	HA-MRSA (n = 140)	CA-MRSA (n = 22)	P-值
ST5, n (%)	94 (67.1%)	2 (9.1%)	0.000
ST59, n (%)	16 (11.4%)	14 (63.6%)	0.000
PVL-阳性, n(%)	20 (14.3%)	8 (36.4%)	0.028
血流感染, n(%)	93 (66.4%)	18 (81.8%)	0.217

讨论

MRSA 是一种重要的病原体, MRSA 会导致许多危及生命的感染, 如败血症, 呼吸机相关性肺炎和感染性休克等, 是严重的公共卫生问题。既往研究曾表明 MRSA 感染主要是由几种特殊的克隆型别引起的, 这些克隆导致了 MRSA 在医院的爆发^[32], 目前, 几种特定的医院获得性 MRSA 和社区获得性 MRSA 克隆在国际上传播且相互适应, 导致了医院和社区环境中的高发病率^[33]。此外, MRSA 克隆的分布是动态的, 随时间变化的, 且具有区域性特征^[20,34]。我国 2011 年的一项多中心的研究发现, ST239-III-t030、ST239-III-t037 和 ST5-II-t002 是我国 HA-MRSA 的优势克隆, 但这些主要克隆在不同行政区域的患病率存在显著差异^[35]。因此, 了解特定区域内 MRSA 的流行分子病学及其随时间的变化趋势, 对于明确该区域优势克隆以及对 MRSA 的控制和治疗具有重要意义。

目前常用的分型方法主要有 MLST 分型、SCCmec 分型、spa 分型、脉冲场凝胶电泳 (PEGF) 以及全基因组测序等。多位点序列分型 (MLST) 分析了 7 个对生物体细胞功能至关重要且存在于每个生物体中的管家基因, 其主要优势在于可以与世界各地的数据进行共享, 因为 MLST 由等位基因图谱定义且具有明确性, 利于世界范围内的传播和交流^[26]。SCCmec 是一种可移动的遗传原件, 也是广谱 β -内酰胺类耐药的決定因素, 目前已经发现 13 种不同类型的 SCCmec 元素, 根据其连接区域的差异将它们进一步分成亚型, 目前多重 PCR 是较好的区分 SCCmec 分型的方法^[24], 然而其限制性在于利用多重 PCR 进行 SCCmec 分型, 分出的型别是有限的。Spa 分型是基于 SPA 基因 X 区重复序列的多态性的分型方式, 可用于分子进化和医院爆发的调查^[28], 其优势在于具有成本效益, 快速且具有重复性。PFGE 曾是 MRSA 分型的常用手段, 但因为该技术需要完整的基因组 DNA 且分型标准无法在全世界范围内统一, 因此目前不作为首选的分型手段。而全基因组测序是生物 DNA 多样性的最终鉴定, 能够全面分析菌株的基因组学, 可能成为临床实践中的常规调查技术, 然而目前该技术仍然不在价格上占有优势。

本研究收集 2012 年 1 月至 2018 年 12 月所有的无菌体液来源的 MRSA 菌株, 通过 PCR 技术分析探究 6 年内的经过鉴定的 MRSA 菌株的 MLST 分型、SCCmec

分型以及 spa 分型, 结合所有菌株对代表抗生素的药物敏感性结果以及典型毒力基因 PVL 的鉴定结果, 分析比较本地区在 2012 年至 2018 年内的优势流行 MRSA 克隆的分子流行病学及耐药性和毒力基因变化。本研究还通过收集所有 MRSA 菌株的临床信息, 包括性别, 年龄, 住院时间, 菌株培养时间, 住院科室, 基础疾病, 医疗机构接触史, 相关性侵入性操作, 血液透析等, 根据 CDC 对于 CA-MRSA 和 HA-MRSA 的鉴定标准^[30,31]区分 MRSA 的来源, 从而比较 CA-MRSA 与 HA-MRSA 在分子分型、耐药性以及毒力基因上的差异。

第一方面, 本研究对 MRSA 菌株的分子分型进行了探索。研究发现 MRSA 菌株在 2012 至 2018 年间发生了变化, 首先体现在分子分型多样性的变化, 据研究发现, 2012 年共有 4 种 ST 型被发现, 而 2018 年有 10 种 ST 型被发现, 这表明了随着时间的推进, 分型分子逐渐变得更加丰富。其次, 我们还发现, 6 年中最常见的 MRSA 克隆是 ST5-II-t311(81/162, 50.0%), 其次是 ST59-IVa-t437(18/162, 11.1%), 第三是 ST398-NT-t034(7/162, 4.3%)。ST5 MRSA 的占比正在下降, 而 ST59 作为第二优势的 ST 型正在增加。

不仅如此, 本研究发现 ST5 MRSA 是目前本地区最常见的 ST 型别, 既往报道发现^[36,37]ST5-II MRSA(纽约/日本)克隆是许多国家最主要的基因型之一。在我国, 也已有研究表明^[38], ST5 是 2012-2013 年中国浙江省 HA-MRSA 的优势克隆。然而, 一些研究者对于 ST5 MRSA 最主要存在的 spa 类型发现了不同的结果。有部分学者认为 ST5 MRSA 中, t002 是主要的 spa 型别^[39], 而另一部分学者发现了不同的研究结果^[40]。一项 2012 -2013 年的研究表明^[40]ST5- II-t311 已成为浙江省杭州市 HA-MRSA 的主要克隆, 即 t311 为该时间段内 ST MRSA 最主要的 spa 型别。而在我们的研究中, ST5-t311 MRSA 相较于 ST5-t002 MRSA 更加流行, ST5 克隆菌株中 t311 是第一优势 spa 型, t002 是第二优势 spa 型。此外, 变化趋势方面, 本研究中 ST5-II-t311 的占比由 2014 年的 66.7% (12/18) 下降至 2018 年的 21.4% (6/28), 而 ST5-II-t2460 的占比则略有上升。既往文献^[41]甚至发现 ST5-t2460 是引起血液感染金黄色葡萄球菌中最常见的克隆, 这在中国以前从未被报道过。因此, ST5-II-t2460 是否被赋予了更多的竞争优势仍然令人困惑且值得进一步的探索。

众所周知, ST59 是主要的 CA-MRSA 型别, 在我们的研究结果中 ST59 是除 ST5 外最常见的 ST 型。我们的发现证实 CA-MRSA 和 HA-MRSA 之间的区别

已经变得模糊，且它们可能是相互融合的^[38]。既往的研究曾表明 ST59 MRSA 可能从社区传播到医院^[38,42]。同样，在本研究中，ST59 克隆表现出逐渐增加取代 ST5 的趋势，较高的 SCCmec IV/V 和 PVL 阳性率高则证实了这一观点^[35]。种种现象均提醒着我们需要更多地注意 ST59 在医院的传播。值得注意的是，之前的研究表明 ST239-III-t030 和 ST239-III-t037 是中国最普遍的 MRSA 克隆^[35]。然而在我们的研究中，我们只发现了 3 株 ST239 MRSA。这说明 ST239 在中国的发病率可能正在逐渐降低，也有学者曾在既往文献中发现了类似现象^[40]。进一步探究 ST239 MRSA 发生率较前减少的原因，有可能是因为 ST239-t030 MRSA 较 ST59-t437 MRSA 具有较低的生长速度和竞争优势，即便 ST239 MRSA 常被认为是高耐药性菌株。另外，一些特殊的 ST 型也在本研究中被发现。

ST398 MRSA 常被定义为 LA-MRSA，多在欧洲^[43]和北美洲^[44]的猪、农民及相关环境^[45]中被发现。有趣的是，本研究发现了 8 株 ST398 MRSA(4.9%)，在所有 ST 型 MRSA 中排名第三。除 ST398 外，ST9 也是 LA-MRSA 常见的 ST 型别之一，ST9 MRSA 在猪中报道较多而在人类中很少报道。然而，我们的研究通过分子分型鉴定出了一株 ST9 MRSA，这可能表明 ST9 出现了动物与人之间跨种传播。

在耐药性方法，不同 MRSA 谱系在耐药性方面具有较大不同^[46]。我们的研究发现，CA-MRSA 保留了对大多数非 β -内酰胺类抗生素的敏感性，除对克林霉素、复方新诺明的耐药性高于 HA-MRSA 外，对红霉素、庆大霉素、环丙沙星、左氟氧沙星、莫西沙星、利福平、四环素的耐药性均低于 HA-MRSA。此外，ST5 MRSA 对于红霉素、喹诺酮类耐药率较高，对于复方新诺明 100%敏感，而 ST59 MRSA 对于克林霉素、红霉素耐药率较高，对于庆大霉素、利福平、复方新诺明 100%敏感。一些特有的 ST 型也有特征的耐药谱系，既往研究曾发现 LA-MRSA 通常对四环素具有耐药性，因为四环素是农业中最常用的抗生素^[47]，而在本文中 ST398 MRSA 对四环素的耐药率为 12.5%，ST9 MRSA 的耐药率为 100%。此外，ST22 被认为对喹诺酮类和大环内酯类耐药，对庆大霉素敏感^[48]，而在本文中，ST22 仅有 1 株，且对所有检测的抗生素敏感，包括喹诺酮类和大环内酯类，这可能与菌株数量较少不具有代表性有关。总之，临床上选择抗生素治疗 MRSA 感染时，可以根据不同菌株不同的分子分型选择不同类型的抗生素，这对于更加精准、有效的治疗具有意义的。

不仅如此, CA-MRSA 和 HA-MRSA 在本研究中表现出不同的分子流行病学和耐药性分布。本研究中 HA-MRSA 以 SCCmec II 型(98/140,70%)居多而 CA-MRSA 以 SCCmec IVa 型(14/22,63.6%)居多。有文献认为 SCCmec IV 和 SCCmecV 常与 CA-MRSA 相关, SCCmecIV 和 SCCmecV 型只携带对 β -内酰胺类抗生素耐药的 *mecA* 基因, 因此, 缺乏对非 β -内酰胺类抗生素的耐药基因^[49]。本研究中 HA-MRSA 相较于 CA-MRSA, 耐多药的比例更高, 54.3% (76/140) HA-MRSA 菌株被鉴定为 MDR 而只有 27.3% (6/22) CA-MRSA 菌株被鉴定为 MDR, 也验证了这一观点。

PVL 是由 LukS-PV 基因和 LukF-PV 基因相关的一种毒素, 被认为与 CA-MRSA 存在相关性, 在许多疾病, 尤其是坏死性肺炎中发挥作用。本研究中发现, CA-MRSA 患者携带 PVL 基因的概率明显高于 HA-MRSA 患者(36.4% vs. 14.3%, $P=0.028$)。然而目前 PVL 对于 CA-MRSA 起源和毒力的作用还存在争议, 有观点认为 PVL 既不是 CA-MRSA 克隆出现的关键因素, 也不是 CA-MRSA 菌株毒力的主要决定因素, 因此, PVL 是否影响 CA-MRSA 的临床表现, 疾病严重程度和预后还需要进一步探索。

本研究为回顾性研究, 存在一定的信息偏倚和选择偏倚, 在耐药菌株与临床信息结合时缺乏更加全面的临床信息采集, 包括预后, 疾病严重程度等。同时, 本研究是一个单中心的研究, 不能保证对于所有中心, 所有的结论均具有代表性。

结论

2012 - 2018年间, MRSA分子型别逐渐变化, 型别更加多样化。ST5-II-t311 是本地区MRSA分离株的优势克隆, 但总体呈下降趋势。社区相关ST59 MRSA 呈上升趋势, LA-MRSA已经有较高占比。不同类型MRSA细菌耐药行存在较大差异。应定期监测MRSA的流行情况及耐药情况, 采取有效措施预防和控制医院感染的发生。

参 考 文 献

- [1] Mehraj J, Witte W, Akmatov M K, et al.Epidemiology of Staphylococcus aureus Nasal Carriage Patterns in the Community[J].Curr Top Microbiol Immunol,2016, 398: 55-87.
- [2] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, et al.2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2020, 20 (01): 1-10.
- [3] Eriksen K R.["Celbenin"-resistant staphylococci][J].Ugeskr Laeger,1961, 123: 384-6.
- [4] Miragaia M.Factors Contributing to the Evolution of mecA-Mediated β -lactam Resistance in Staphylococci: Update and New Insights From Whole Genome Sequencing (WGS)[J].Front Microbiol,2018, 9: 2723.
- [5] 许冀陕.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)耐药机制[J].临床药物治疗杂志,2003 (02): 22.
- [6] 武杰, 赵建平.MRSA 的检测、耐药、流行及抗菌药物选择的研究进展[J].中国抗生素杂志: 1-8.
- [7] Lakhundi S, Zhang K.Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology[J].Clin Microbiol Rev,2018, 31 (4).
- [8] Cassini A, Högberg L D, Plachouras D, et al.Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis[J].Lancet Infect Dis,2019, 19 (1): 56-66.
- [9] Boyce J M, Cookson B, Christiansen K, et al.Meticillin-resistant Staphylococcus aureus[J].Lancet Infect Dis,2005, 5 (10): 653-63.
- [10] 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): 1061-9.
- [11] Hu F P, Guo Y, Zhu D M, et al.Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005-2014[J].Clin Microbiol Infect,2016, 22 Suppl 1: S9-14.
- [12] Holland T L, Arnold C, Fowler V G, Jr.Clinical management of Staphylococcus aureus bacteremia: a review[J].Jama,2014, 312 (13): 1330-41.
- [13] David M Z, Daum R S, Bayer A S, et al.Staphylococcus aureus bacteremia at 5 US academic medical centers, 2008-2011: significant geographic variation in community-onset infections[J].Clin Infect Dis,2014, 59 (6): 798-807.
- [14] Matouskova I, Janout V.Current knowledge of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J].Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub,2008, 152 (2): 191-202.
- [15] 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.
- [16] Molton J S, Tambyah P A, Ang B S, et al.The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia[J].Clin Infect Dis,2013, 56 (9): 1310-8.
- [17] 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): 512-8.

- [18] 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): 421-6.
- [19] Baines S L, Holt K E, Schultz M B, et al. Convergent adaptation in the dominant global hospital clone ST239 of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *mBio*, 2015, 6 (2): e00080.
- [20] Dai Y, Liu J, 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.
- [21] Park K H, Greenwood-Quaintance K E, Uhl J R, et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia in a single large Minnesota medical center in 2015 as assessed using MLST, core genome MLST and *spa* typing[J]. *PLoS One*, 2017, 12 (6): e0179003.
- [22] Joseph S J, Read T D. Bacterial population genomics and infectious disease diagnostics[J]. *Trends Biotechnol*, 2010, 28 (12): 611-8.
- [23] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 25th informational supplement. In: CLSI document M100-S25. Wayne: CLSI; 2015
- [24] Kondo Y, Ito T, Ma X X, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51 (1): 264-74.
- [25] Cuny C, Wieler L H, Witte W. Livestock-Associated MRSA: The Impact on Humans[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2015, 4 (4): 521-43.
- [26] Aanensen D M, Spratt B G. The multilocus sequence typing network: *mlst.net*[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33 (Web Server issue): W728-33.
- [27] Maiden M C, Bygraves J A, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95 (6): 3140-5.
- [28] 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): 792-9.
- [29] Larsen A R, Stegger M, Sørnum M. *spa* typing directly from a *mecA*, *spa* and *pvl* multiplex PCR assay-a cost-effective improvement for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* surveillance[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14 (6): 611-4.
- [30] Kale P, Dhawan B. The changing face of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Indian J Med Microbiol*, 2016, 34 (3): 275-85.
- [31] Kallen A J, Mu Y, Bulens S, et al. Health care-associated invasive MRSA infections, 2005-2008[J]. *Jama*, 2010, 304 (6): 641-8.
- [32] Enright M C, Robinson D A, Randle G, et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99 (11): 7687-92.
- [33] Li M, Du X, Villaruz A E, et al. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant[J]. *Nat Med*, 2012, 18 (5): 816-9.
- [34] 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): 616-87.
- [35] Xiao M, Wang H, Zhao Y, et al.National surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in China highlights a still-evolving epidemiology with 15 novel emerging multilocus sequence types[J].J Clin Microbiol,2013, 51 (11): 3638-44.
 - [36] 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): 253-8.
 - [37] Chung M, Dickinson G, De Lencastre H, et al.International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida[J].J Clin Microbiol,2004, 42 (2): 542-7.
 - [38] Wu D, Wang Z, Wang H, et al.Predominance of ST5-II-t311 clone among healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Zhejiang, China[J].Int J Infect Dis,2018, 71: 107-112.
 - [39] Chen C J, Huang Y C, Su L H, et al.Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates in Taiwan, 2010[J].PLoS One,2014, 9 (6): e101184.
 - [40] Kong H, Yu F, Zhang W, et al.Molecular Epidemiology and Antibiotic Resistance Profiles of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains in a Tertiary Hospital in China[J].Front Microbiol,2017, 8: 838.
 - [41] Li X, Fang F, Zhao J, et al.Molecular characteristics and virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infection[J].Braz J Infect Dis,2018, 22 (6): 487-494.
 - [42] Chen X, Sun K, Luo Q, et al.Emergence and spread of pvl-positive genotypic CA-MRSA ST59 with increased adhesion capacity from wounds in hospitals[J].J Infect,2019, 79 (6): 612-625.
 - [43] Molla B, Byrne M, Abley M, et al.Epidemiology and genotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of porcine origin[J].J Clin Microbiol,2012, 50 (11): 3687-93.
 - [44] Khanna T, Friendship R, Dewey C, et al.Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers[J].Vet Microbiol,2008, 128 (3-4): 298-303.
 - [45] Verhegghe M, Pletinckx L J, Crombé F, et al.Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in pig farms and multispecies farms[J].Zoonoses Public Health,2013, 60 (5): 366-74.
 - [46] Monaco M, Pimentel De Araujo F, Cruciani M, et al.Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus*[J].Curr Top Microbiol Immunol,2017, 409: 21-56.
 - [47] Pantosti A.Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health[J].Front Microbiol,2012, 3: 127.
 - [48] Ellington M J, Hope R, Livermore D M, et al.Debate of EMRSA-16 amongst methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteraemias in the UK between 2001 and 2007[J].J Antimicrob Chemother,2010, 65 (3): 446-8.
 - [49] Ma X X, Ito T, Tiensasitorn C, et al.Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*