

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240930012

引用格式: 王君, 马鑫鑫, 陈晓草, 等. 食品和临床来源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分离株表型及分子特征研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(1): 187–194.

WANG J, MA XX, CHEN XC, *et al.* Phenotypic and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from food and clinical samples [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(1): 187–194. (in Chinese with English abstract).

食品和临床来源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 分离株表型及分子特征研究

王 君^{1,2}, 马鑫鑫¹, 陈晓草², 胡豫杰³, 陈雅丽⁴, 纪建军⁵,
贺金明², 刘新利², 韩 蓓^{1*}

(1. 西安交通大学医学部公共卫生学院, 西安 710061; 2. 铜川市疾病预防控制中心, 铜川 727030;

3. 国家食品安全风险评估中心国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021;

4. 汉中市疾病预防控制中心, 汉中 723000; 5. 延安市疾病预防控制中心, 延安 716000)

摘 要: **目的** 研究耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)食品和临床样本分离株的耐药性、菌膜形成能力及分子特征。**方法** 对 2019—2020 年陕西地区市售食品中分离的 21 株 MRSA 和某三甲医院临床感染病例中分离的 30 株 MRSA 进行药物药敏性试验, 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)、葡萄球菌蛋白 A (*Staphylococcal protein A, spa*)分型、葡萄球菌染色体盒 *mec* (*Staphylococcal cassette chromosome mec*, *SCCmec*)分型, 生物膜形成能力测定; 通过全基因组测序基于单核苷酸多态性(single nucleotide-polymorphism, SNP)对不同来源菌株进行系统进化分析。**结果** 51 株食品和临床分离的 MRSA 菌株对青霉素、苯唑西林、红霉素、克林霉素、四环素等抗菌药物耐药率均超过 50%, 其中青霉素、苯唑西林的耐药率最高, 为 100%, 其余依次为红霉素、克林霉素、四环素, 耐药率分别为 98.04%、96.08%、52.94%。21 株食品和 30 株临床分离 MRSA 菌株分子型别均以 ST59-t437-IVa(2B)型为主, 分别占比为 52.38% (11/21)和 36.67% (11/30)。21 株食品分离 MRSA 菌株中 38.09% (8/21)具有生物膜形成能力, 30 株临床分离 MRSA 菌株 100.00%具有生物膜形成能力。种系进化树分析结果显示 ST59-t437-IVa(2B)型为食品和临床分离 MRSA 主要进化分支, 且两种来源菌株部分位于同一进化分支。**结论** 本研究中食品和临床分离 MRSA 菌株耐药种类及其耐药率呈现高度一致; 临床较食品分离 MRSA 菌株生物膜形成能力强; 食品和临床分离的 MRSA 中一部分菌株具有较近的亲缘关系, 提示食源性 MRSA 风险不容忽视, 值得进一步研究与关注。

关键词: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 耐药性; 生物膜; 分子特征; 进化分析

收稿日期: 2024-09-30

基金项目: 陕西省卫生科研基金项目(2018E007)

第一作者: 王君(1987—), 女, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向为细菌耐药与食源性疾病。E-mail: wangjun0725@outlook.com

*通信作者: 韩蓓(1980—), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为细菌代谢与食品安全。E-mail: hanbei@mail.xjtu.edu.cn

Phenotypic and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from food and clinical samples

WANG Jun^{1,2}, MA Xin-Xin¹, CHEN Xiao-Cao², HU Yu-Jie³, CHEN Ya-Li⁴,
JI Jian-Jun⁵, HE Jin-Ming², LIU Xin-Li², HAN Bei^{1*}

(1. School of Public Health, Health Science Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. Center for Disease Control and Prevention of Tongchuan, Tongchuan 727030, China; 3. National Health Commission Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China;

4. Center for Disease Control and Prevention of Hanzhong, Hanzhong 723000, China;

5. Center for Disease Control and Prevention of Yan'an, Yan'an 716000, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the drug resistance, biofilm formation ability, and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from food and clinical samples. **Methods** A total of 21 MRSA strains isolated from commercial food and 30 MRSA strains isolated from clinical cases in a Class 3 Grade A hospital in Shaanxi from 2019 to 2020 were tested for drug susceptibility, MLST, *spa*, *SCCmec* typing, and biofilm formation ability. The phylogenetic analysis of strains from different sources was performed based on SNP by whole genome sequencing. **Results** The resistance rates of 51 MRSA strains to penicillin, oxacillin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, and other antibiotics exceeded 50%. Penicillin and oxacillin exhibited the highest resistance rates (100%), followed by erythromycin, clindamycin, and tetracycline with resistance rates of 98.04%, 96.08%, and 52.94% respectively. The ST59-t437-IVa(2B) molecular type was predominant among 21 food MRSA strains and 30 clinical MRSA strains, accounting for 52.38% (11/21) and 36.67% (11/30), respectively. Among the 21 food-borne MRSA strains, 38.09% (8/21) exhibited the capacity for biofilm formation, while all 30 clinical MRSA strains demonstrated biofilm-forming ability. The phylogenetic analysis revealed that ST59-t437-IVa(2B) constituted the primary evolutionary lineage of MRSA strains isolated from both food and clinical samples, with some strains from these two sources falling within the same evolutionary branch. **Conclusion** The drug-resistant types and rates of drug resistance in MRSA strains isolated from both food and clinical sources exhibited a high degree of consistency in this study. Moreover, the biofilm formation ability was found to be stronger in clinical MRSA isolates compared to those derived from food-borne sources. Additionally, close genetic relationships were observed between certain MRSA strains obtained from both food and clinical samples, highlighting the significance of further research and attention towards the risk posed by food-borne MRSA.

KEY WORDS: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; drug resistance; biofilm; molecular characteristics; evolutionary analysis

0 引言

金黄色葡萄球菌是我国常见的食源性致病菌^[1],也是社区和医院获得性感染的重要病原菌^[2],该菌可产肠毒素和血浆凝固酶,是引起食物中毒和化脓性炎症的主要病原^[3-4]。作为条件致病菌,可通过与动物、食物或环境等密切接触引起人类感染,引起皮肤及软组织感染、菌血症、心内膜炎等^[5-7]。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是金黄色葡萄球菌获得外源性甲氧西林耐药决定子 A (*mecA*)基因而对甲氧西林产生耐药,该基因编码青霉素结合蛋白(penicillin-binding proteins, PBPs) PBP2a,可竞争性抑制 β -内酰胺类抗菌药物与细菌本身固有的亲和力,从而降低其敏感性表现出耐药。

MRSA 的耐药性并不局限于甲氧西林,而是针对所有的 β -内酰胺类抗菌药物均有耐药性,是一类能够引起动物、人类感染性疾病的“超级细菌”^[8],对免疫功能低下的患者可导致死亡^[9],被世界卫生组织列为高优先级多重耐药性病原体,其显著的多重耐药性、高感染率和高致死率等特点为临床治疗带来极大的困难^[10]。MRSA 对外界环境具有较强的适应能力,其宿主特异性低,极易在食用动物体内定植,导致其在食品中具有较高的污染率,从而对食品安全及公众卫生造成严重的威胁^[11]。随着抗生素在临床治疗和养殖产业中的广泛使用,耐药细菌通过基因水平转移等方式完成在动物、环境和人中的传播,进一步增加人类感染耐药细菌的风险,从而导致更加严重的临床感染后果以及死亡率的上升^[12],MRSA 通过食物链的传播成为备受关注

的世界性公共卫生问题^[13]。

本研究以 2019—2020 年间陕西地区市售食品中分离的 21 株 MRSA 和本地区某三甲医院临床感染病例中分离的 30 株 MRSA 为研究对象,探究食品和临床两种来源 MRSA 菌株耐药性及分子特征,以期为食源性疾病溯源和防控提供数据支持和参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

本研究所涉及的 21 株食品来源 MRSA 分离自 2019—2020 年陕西地区市售生肉及其制品、熟肉制品、速冻食品、餐饮食品、现制饮品及乳制品样品; 30 株临床来源 MRSA 分离自陕西地区某三甲医院临床感染病例样本。所有菌株均通过 VITEK2 Compact 全自动微生物分析仪配套的 AST-GP67 药敏卡上的苯唑西林的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和头孢西丁筛选结果判定为 MRSA。判定标准为: 苯唑西林的 MIC ≥ 4 或头孢西丁筛选结果阳性的金黄色葡萄球菌判断为 MRSA, 否则判断为甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA)。药敏试验质控菌株为金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC25923, 购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 仪器及试剂

VITEK2 Compact 全自动微生物鉴别及药敏分析系统(法国梅里埃公司); ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

7.5%氯化钠肉汤、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)、Baird-Parker 琼脂平板、胰酪大豆胨液体培养基(trypticase soy broth, TSB)、血琼脂平板、营养琼脂平板、冻干血浆、革兰染色液(广东环凯微生物科技有限公司); 金黄色葡萄球菌显色培养基(法国科玛嘉公司); GP 鉴定卡、AST-GP67 药敏卡(法国生物梅里埃公司)。

1.3 方法

1.3.1 药物敏感性试验

通过全自动微生物分析仪 AST-GP67 药敏卡, 共检测菌株对 14 种抗菌药物的耐药性。抗菌药物包括: 对青霉素(penicillin, PEN)、苯唑西林(oxacillin, OXC)、庆大霉素(gentamicin, GEN)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、左氧氟沙星(levofloxacin, LEV)、莫西沙星(moxifloxacin, MXF)、红霉素(erythromycin, ERY)、克林霉素(clindamycin, CLI)、利奈唑胺(linezolid, LZD)、万古霉素(vancomycin, VAN)、四环素(tetracycline, TET)、替加环素(tigecycline, TGC)、利福平(rifampicin, RIF)、复方新诺明(cotrimoxazole, SXT)。药敏试验结果参照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) M100 34nd Edition 进行判定。

1.3.2 多位点序列分型

多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是将金黄色葡萄球菌 7 个管家基因(*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*)引物序列进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR), PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测片段后进行测序, 测序结果提交数据库(<http://www.mlst.net/>)获得对应 ST 型别。

1.3.3 葡萄球菌蛋白 A 分型

葡萄球菌蛋白 A (*staphylococcal protein a*, *spa*)分型是基于 *spa* 基因 X 区重复序列的多态性^[14], PCR 扩增 *spa* 目标序列, 将测序序列截取基因 24 bp 重复区域, 登录官方网站(<http://www.ridom.de/spaserver/>), 获得菌株的 *spa* 型别。

1.3.4 生物膜形成能力测定

使用结晶紫半定量法测定生物膜^[15]。设置实验组和空白对照组, 菌株活化后使用 TSB 液体培养基调整 OD₆₀₀=1.0, 以 200 μ L/孔在 96 孔板上加样, 空白对照组为 200 μ L TSB 液体培养基, 加样后置入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱 24 h 后取出 96 孔板, 小心移去上层菌液, 用无菌 PBS 轻柔洗涤 3 次, 室温晾干并加入甲醇固定 15 min, 弃甲醇后再次晾干并加入 1%结晶紫, 静置 15 min, 用灭菌纯水洗涤 3 次至空白对照孔无色, 晾干, 最后加入无水乙醇溶解, 使用酶标仪在 595 nm 处测定吸光度。依据 OD 值测定结果的临界点(OD_临)对菌株生物膜形成能力进行分类, OD_{样品} $\leq$ OD_临, 认为不产生生物膜, 表示为(-); OD_临< OD_{样品} $\leq$ 2OD_临, 认为生物膜形成能力弱, 表示为(+); 2OD_临< OD_{样品} $\leq$ 4OD_临, 认为生物膜形成能力中等, 表示为(++); OD_{样品}> 4OD_临, 认为生物膜形成能力强, 表示为(+++)。OD 值测定结果的临界点(OD_临)计算为公式(1):

$$OD_{临} = OD_{\bar{A}} + OD_{\bar{Y}} \times 3 \quad (1)$$

式中, OD _{$\bar{A}$} : BC 组 3 个重复孔 OD₅₉₅ 的测定值均值; OD _{$\bar{Y}$} : BC 组 3 个重复孔 OD₅₉₅ 的测定值标准差。

1.3.5 全基因组测序及数据分析

菌株提取 DNA 后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行全基因组序列测定; 利用基因组流行病学中心(Center for Genomic Epidemiology, <http://www.genomicpidemiology.org/>) 的 SCCmecFinder 1.2 工具, 取 Identity $\geq 90\%$ 、minimum length $\geq 60\%$, 获得菌株的葡萄球菌染色体盒 *mec* (*Staphylococcal cassette chromosome mec*, SCCmec)型别; 通过网络数据库(<http://bacdb.cn/BacWGSTdb/Tools.php>), 以菌株 SA268_CP006630_ST59 为参考序列, 基于单核苷酸多态性(single nucleotide-polymorphism, SNP)构建种系进化树。

2 结果与分析

2.1 MRSA 菌株来源分布

21 株食品分离 MRSA 样本来源依次为生肉及其制品(80.95%, 17/21), 餐饮食品(14.29%, 3/21), 现制饮品及乳制品(4.76%, 1/21); 30 株临床分离 MRSA 样本来源依次为

分泌物(43.33, 13/30), 痰液(20.00%, 6/30), 尿液(6.67%, 2/30), 脓汁(6.67%, 2/30), 引流液(6.67%, 2/30), 血液(6.67%, 2/30), 皮疹(3.33%, 1/30), 胸水(3.33%, 1/30), 导管(3.33%, 1/30), 详见表 1。

2.2 耐药特征

药敏结果显示, 51 株 MRSA 耐药率超过 50%的药物为 PEN、OXC、ERY、CLI 和 TET, 其中 PEN、OXC 的耐药率最高, 为 100%, 其余依次为 ERY、CLI、TET, 耐药率分

别为 98.04%、96.08%、52.94%; 耐药率小于 30.00%的药物依次为 TGC、CIP、GEN、LEV、SXT、RIF、MXF, 其中 MXF 仅临床分离 MRSA 菌株呈现耐药性(10.00%, 3/30), 食源性 MRSA 均对其敏感; 食品和临床分离的 51 株 MRSA 菌株均对 TGC、LZD、VAN 3 种药物敏感, 详见表 2。药敏结果显示食品和临床分离的 MRSA 为多耐药菌株, 耐药数量 4~10 种不等, 多为青霉素类、大环内酯类及四环素类, 耐药种类及耐药率呈现较高的一致性, 详见表 1。

表 1 21 株食品和 30 株临床分离耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药谱及分子特征
Table 1 Antimicrobial resistance profiles and molecular characteristics of 21 food and 30 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

菌株编号	菌株来源	样本名称	耐药谱	MLST 型	spa 型	SCCmec 型	生物膜形成能力
MRSA01	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-ERY-CLI	ST59	t437	V(5C2)	-
MRSA02	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-ERY-CLI-TET	ST59	t437	IVa(2B)	-
MRSA03	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-ERY-CLI*	ST5	t13845	IVa(2B)	-
MRSA04	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-ERY-CLI-TET-RIF	ST398	t11729	IVa(2B)	++
MRSA05	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-ERY-CLI-TET	ST59	t437	IVa(2B)	-
MRSA06	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-ERY-CLI-TET	ST59	t437	IVa(2B)	+
MRSA07	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-GEN-CIP-LEV*-ERY-CLI-TET-SXT	ST9	t1939	XII(9C2)	-
MRSA08	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-CIP*-ERY-CLI	ST4513	t437	IVa(2B)	++
MRSA09	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-ERY-CLI-TET	ST1232	t034	V(5C2)	-
MRSA10	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-ERY-CLI-TET	ST59	t437	IVa(2B)	+
MRSA11	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-CIP*-ERY-CLI	ST4513	t437	IVa(2B)	++
MRSA12	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-GEN-CIP-LEV*-ERY-CLI-TET-SXT	ST9	t899	XII(9C2)	-
MRSA13	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-ERY-CLI	ST59	t437	IVa(2B)	-
MRSA14	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-GEN-CIP-LEV-ERY-CLI-TET-SXT	ST9	t899	XII(9C2)	+
MRSA15	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-ERY-CLI	ST59	t437	IVa(2B)	+
MRSA16	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-ERY-CLI	ST59	t437	IVa(2B)	-
MRSA17	食品	生肉及其制品	PEN-OXC-GEN-CIP-LEV-ERY-CLI-TET-SXT	ST9	t899	XII(9C2)	-
MRSA18	食品	餐饮食品	PEN-OXC-TET	ST59	t437	IVa(2B)	-
MRSA19	食品	餐饮食品	PEN-OXC-ERY-CLI	ST59	t437	IVa(2B)	+
MRSA20	食品	现制饮品	PEN-OXC-ERY-CLI	ST59	t437	IVa(2B)	-
MRSA21	食品	餐饮食品	PEN-OXC-ERY-CLI	ST59	t437	IVa(2B)	-
S7	临床	痰液	PEN-OXC-ERY-CLI	ST398	t034	V(5C2)	++
S8	临床	引流液	PEN-OXC-ERY-CLI-CIP-LEV*	ST59	t172	IVa(2B)	++
S12	临床	引流液	PEN-OXC-ERY-CLI	ST1	t114	IVg(2B)	++
S15	临床	痰液	PEN-OXC-GEN-CIP-LEV-ERY-CLI-TET-RIF-MXF*	ST239	t030	III(3A)	+++
S16	临床	血液	PEN-OXC-ERY-CLI-TET	ST59	t437	IVa(2B)	++
S17	临床	痰液	PEN-OXC-ERY-CLI-CIP-TET-LEV-MXF*	ST5	t301	II(2A)	++
S18	临床	分泌物	PEN-OXC-ERY-CLI-CIP-SXT-LEV*	ST1409	t301	II(2A)	++
S21	临床	尿液	PEN-OXC-ERY-CLI-TET	ST59	t437	IVa(2B)	+++
S22	临床	脓汁	PEN-OXC-ERY-CLI	ST1	t114	IVg(2B)	++
S24	临床	分泌物	PEN-OXC-ERY-CLI-SXT	ST59	t437	IVa(2B)	++
S25	临床	痰液	PEN-OXC-GEN-CIP-LEV-ERY-CLI-TET-RIF-MXF	ST239	t030	III(3A)	++
S26	临床	分泌物	PEN-OXC-ERY-CLI	ST59	t437	IVa(2B)	++
S28	临床	痰液	PEN-OXC-CIP-LEV-ERY-CLI-TET-MXF*	ST950	t2460	II(2A)	++

							表 1(续)
菌株编号	菌株来源	样本名称	耐药谱	MLST 型	spa 型	SCCmec 型	生物膜形成能力
S47	临床	血液	PEN-OXC-ERY-CLI	ST59	t437	IVa(2B)	++
S48	临床	导管	PEN-OXC-ERY-CLI	ST59	t437	IVa(2B)	++
S60	临床	分泌物	PEN-OXC-ERY-CLI-GEN*-TET-SXT	ST398	t3275	IVc(2B)	++
S61	临床	分泌物	PEN-OXC-GEN-CIP-LEV*-ERY-CLI-TET-RIF-SXT	ST239	t037	III(3A)	++
S63	临床	皮疹	PEN-OXC-ERY-CLI	ST59	t441	V(5C2)	++
S66	临床	痰液	PEN-OXC-ERY-CLI	ST338	t437	V(5C2&5)	++
S69	临床	分泌物	PEN-OXC-GEN-CIP-LEV-ERY-CLI-TET-RIF	ST239	t030	III(3A)	++
S72	临床	分泌物	PEN-OXC-ERY-CLI	ST59	t437	IVa(2B)	++
S78	临床	分泌物	PEN-OXC-ERY-CLI-TET	ST3091	t437	Vb(5C2&5)	+
S82	临床	分泌物	PEN-OXC-ERY-CLI-TET	ST59	t437	IVa(2B)	++
S84	临床	分泌物	PEN-OXC-ERY-CLI	ST72	t2461	IVa(2B)	++
S88	临床	脓汁	PEN-OXC-ERY-CLI	ST59	t437	IVa(2B)	++
S90	临床	分泌物	PEN-OXC-GEN-CIP-LEV-ERY-CLI-TET-RIF	ST239	t030	III(3A)	++
S91	临床	分泌物	PEN-OXC-GEN-CIP-LEV-ERY-CLI-TET-MXF	ST5	t2460	II(2A)	+++
S94	临床	尿液	PEN-OXC-ERY-CLI-TET	ST59	t437	IVa(2B)	++
S95	临床	分泌物	PEN-OXC-ERY-CLI-TET	ST59	t437	IVa(2B)	++
S100	临床	胸水	PEN-OXC-GEN-CIP-LEV-ERY-CLI-TET-RIF-MXF	ST239	t030	III(3A)	+

注: *表示该药物药敏试验结果为中介 I。

表 2 不同来源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对 14 种抗菌药物的耐药情况
Table 2 Resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from different sources to 14 kinds of antimicrobial agents

抗菌药物类别	抗菌药物名称	耐药率/%(耐药菌株数/菌株总数)		
		食品样本(n=21)	临床样本(n=30)	合计(n=51)
青霉素类	PEN	100.00 (21/21)	100.00 (30/30)	100.00 (51/51)
	OXC	100.00 (21/21)	100.00 (30/30)	100.00 (51/51)
大环内酯类	ERY	95.23 (20/21)	100.00 (30/30)	98.04 (50/51)
	CLI	90.48 (19/21)	100.00 (30/30)	96.08 (49/51)
四环素类	TET	52.38 (11/21)	53.33 (16/30)	52.94 (27/51)
	TGC	0.00 (0/21)	0.00 (0/21)	0.00 (0/51)
喹诺酮类	CIP	19.04 (4/21)	36.67 (11/30)	29.41 (15/51)
	LEV	4.76 (1/21)	26.67 (8/30)	17.65 (9/51)
	MXF	0.00 (0/21)	10.00 (3/30)	5.88 (3/51)
氨基糖苷类	GEN	19.04 (4/21)	23.33 (7/30)	21.57 (11/51)
磺胺类	SXT	19.04 (4/21)	13.33 (4/30)	15.69 (8/51)
其他抗菌类	RIF	4.76 (1/21)	20.00 (6/30)	13.73 (7/51)
噁唑烷酮类	LZD	0.00 (0/21)	0.00 (0/30)	0.00 (0/51)
糖肽类	VAN	0.00 (0/21)	0.00 (0/30)	0.00 (0/51)

2.3 MLST、spa、SCCmec 分子分型特征

对 21 株食品分离 MRSA 进行 MLST 分型, 结果显示共有 6 个 ST 型, 其中 ST59 型为主要型别, 占 57.14% (12/21); spa 分型结果显示共有 6 种型别, 其中 t437 为主要型别, 占 66.67% (14/21); SCCmec 型别预测结果显示共有 3 种型别, 其中 IVa(2B)为主要型别, 占 71.43% (15/21)。21 株食品分离 MRSA 共呈现 7 种型别模式, 其中以 ST59-t437-IVa(2B)型为主, 占 52.38% (11/21), 其次为

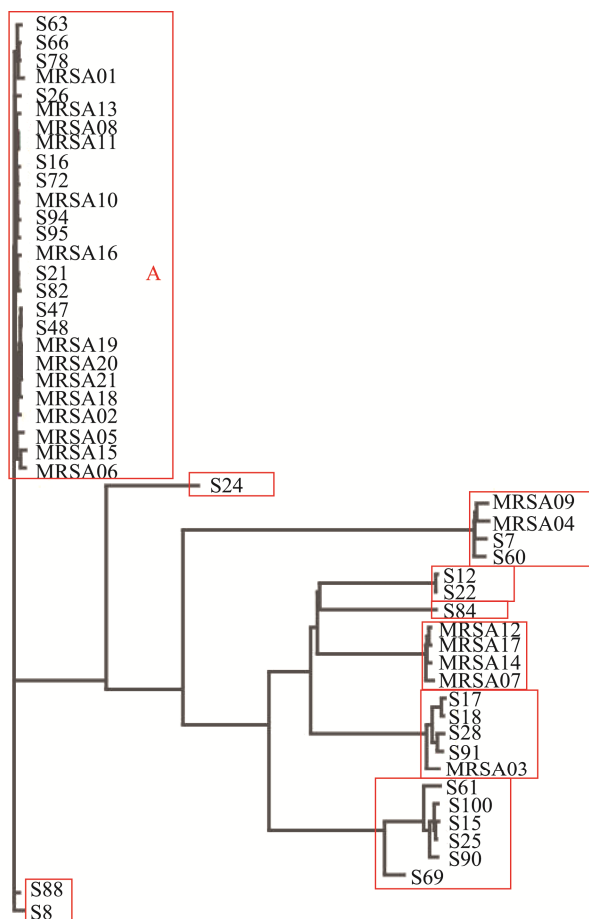
ST9-t899-XII(9C2), 占 14.29% (3/21)。对 30 株医院分离 MRSA 进行 MLST 分型, 结果显示共有 10 个 ST 型, 其中 ST59 型为主要型别, 占 43.33% (13/30); spa 分型结果显示共有 12 种型别, 其中 t437 为主要型别, 占 43.33% (13/30); SCCmec 型别预测结果显示共有 8 种型别, 其中 IVa(2B)为主要型别, 占 43.33% (13/30)。30 株临床分离 MRSA 共呈现 15 种型别模式, 其中以 ST59-t437-IVa(2B)型为主, 占 36.67% (11/30), 其次为 ST239-t037-III(3A), 占 16.67% (5/30)。见表 2。

2.4 生物膜形成能力情况

21 株食品分离 MRSA 菌株中, 具有生物膜形成能力菌株 8 株, 占比为 38.09%, 其中中等成膜能力菌株 3 株 (14.29%, 3/21), 低等成膜能力菌株 5 株 (23.81%, 5/21); 具有成膜能力的菌株以 ST59-t437-IVa(2B)型别为主 (50.00%, 4/8); 30 株临床分离 MRSA 菌株均具有生物膜形成能力 (100.00%, 30/30), 其中高成膜能力菌株 3 株 (10.00%, 3/30), 中等成膜能力菌株 25 株 (83.33%, 25/30), 低成膜能力菌株 2 株 (6.67%, 2/30); 具有成膜能力菌株分子型别以 ST59-t437-IVa(2B)为主, 占比 (36.67%, 11/30)。食品和临床分离 MRSA 具有成膜能力菌株分子型别均以 ST59-t437-IVa(2B)为主, 但临床较食品分离的 MRSA 菌株生物膜形成能力强且菌株占比大, 见表 2。

2.5 同源进化分析结果

基于 SNP 构建的种系进化树结果显示, 51 株食品和临床分离 MRSA 分属于 9 个进化分支, 主要进化分支 A 中共有菌株 26 株, 其中 14 株来源于食品样本, 12 株来源于临床样本, 同一进化分支 MRSA 菌株具有较近的亲缘关系, 见图 1。



注: 方框标注内菌株位于同一进化分支。

图 1 21 株食品和 30 株临床分离 MRSA 菌株基于 SNP 构建的进化树
Fig.1 Phylogenetic tree of 21 food and 30 clinical isolates of MRSA strains constructed based on SNP

位于 MRSA 主要进化分支 A 的 26 株菌株型别以 ST59-t437-IVa(2B)型为主, 占比为 76.92% (20/26), 其中食品来源 11 株, 临床来源 9 株; 其余 6 株菌株型别为: 2 株 ST4513-t437-IVa(2B)型 (菌株编号为 MRSA08、MRSA11), 1 株 ST59-t473-V(5C2)型 (菌株编号为 MRSA01), 均来源于食品; 1 株 ST338-t437-V(5C2&5)型 (菌株编号为 S66)、1 株 ST3091-t437-Vb(5C2&5)型 (菌株编号为 S78)、1 株 ST59-t441-V(5C2)型 (菌株编号为 S63), 均来源于临床。

对比位于主要进化分支 A 的 11 株食品来源 MRSA 和 9 株临床来源 MRSA 菌株发现, 两种来源的 MRSA 菌株分子型别、耐药表型及生物膜形成能力高度一致; 与临床分离 MRSA 菌株位于同一进化分支 (即主要进化分支 A) 的食源性 MRSA 菌株中具有成膜能力菌株 6 株, 占本研究中具有成膜能力的食源性菌株的 75% (6/8)。综上, 需高度关注食品来源的具有生物膜形成能力、分子型别为 ST59-t437-IVa(2B)的 MRSA 菌株, 进一步研究其与临床同型别菌株的潜在遗传进化关系。详见表 2、图 1。

3 讨论与结论

MRSA 被世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 列为对人类健康构成最大威胁的 12 种致病菌之一^[16], 是引起院内感染的多重耐药菌, 几乎对所有 β -内酰胺类抗生素耐药, 以及其他非 β -内酰胺类抗生素如红霉素、环丙沙星和庆大霉素等。近年来食品中 MRSA 的日益增多, 随着抗生素在养殖业中的广泛使用, 食源性 MRSA 在食品、环境及人类之间的传播的公共卫生安全问题引起人们的广泛关注^[17]。作为一种人兽共患的食源性致病菌, 金黄色葡萄球菌在不同的宿主间具有较为广泛的遗传适应性, 能够在不同的宿主范围内进行传播^[18-20]。食品可能是导致金黄色葡萄球菌在医院、社区与动物中传播的潜在重要载体^[13], 大量研究通过耐药元件的同源性分析推测 *mec* 基因在同环境中具有明显的水平转移和传播特性, 表明细菌间的基因交流特别是携带耐药基因和毒力基因的移动元件对 MRSA 和高毒力克隆的形成具有重要作用^[21-22]。本研究中, 食品和临床分离 MRSA 均为多重耐药 (multi drug resistance, MDR) 菌株, 对 4~10 种抗菌药物存在耐药, 耐药程度较为严重, 耐药种类及耐药率呈现高度一致性, 耐药结果与赵英芳等^[23]及殷国民等^[24]研究结果基本一致。环丙沙星是临床人类细菌性感染经验用药, 因此一旦人类感染这类耐药菌株, 很可能造成临床治疗失败。本研究中食源性 MRSA 对环丙沙星的耐药率达到 19.04%, 远高于李孟寒等^[25]研究报道的我国食源性金黄色葡萄球菌对环丙沙星 8.1% 的耐药率, 食源性 MRSA 对环丙沙星这类抗生素耐受趋势有所增加, 基于本人之前相关研究, 食源性 MRSA 携带的耐药基因大多位于可移动遗传元件或质粒上, 提示食源性 MRSA 耐药潜在传播风险值得进一步关注。

生物膜又名生物被膜,是细菌黏附在介质,比如固体管道、医疗器械、人和动物的皮肤表面等,通过增殖分泌胞外蛋白形成的单一或者混合多种的微生物群体。在食品加工过程和加工设备中滋生或残存的金黄色葡萄球菌常形成生物膜,难以清除,甚至产生生物毒素,易造成食品污染^[26]。临床中金黄色葡萄球菌极易黏附在导管(如静脉导管、导尿管、透析导管等)和植入式医疗设备(如人工关节和起搏器等)表面形成生物膜,对抗生素具有高度耐药性并能抵御宿主防御机制的攻击,其附着在异物或者坏死的组织表面难以清除,导致感染的疾病久治不愈反复发作,极大地增加了临床治疗难度^[27]。金黄色葡萄球菌的生物膜混合含有很多外毒素,胞外蛋白和多细胞组织复合物,被认为是金黄色葡萄球菌巨大的毒因子^[28]。本研究分离 MRSA 菌株具有生物膜形成能力菌株占比 38.10% (8/21),低于张鹏飞等^[29]研究的食源性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜能力菌株占比 95.45%,高于唐子云等^[30]研究的动物源金黄色葡萄球菌生物被膜形成能力的 23.47%。本研究中食源性 MRSA 菌株生物膜形成能力虽较临床分离菌株占比小且程度弱,但食源性 MRSA 菌株中具有成膜能力菌株来源包括即食餐饮食品及现制饮品,具有较高的食品安全风险,同时具有成膜能力的食源性 MRSA 菌株中 75% (6/8)菌株与部分高致病性临床菌株位于同一进化分支,具有一定的相关性,加大了病原菌的潜在感染风险。

随着全基因组测序技术(whole genome sequencing, WGS)的不断发展, WGS 对于菌株间的亲缘关系相较于 MLST 等分型具有更高的分辨率,且能够获取更为详细的遗传信息,基于 SNP 构建的系统进化树能够准确反映群体内不同个体之间的遗传关系,为进一步深入了解其流行情况和发展变化提供相对可靠的标准^[31]。本研究中,食品和临床分离的 MRSA 主要进化分支均为 ST59-t437-IVa(2B)型,此结果与李辉等^[13]研究的我国食品中金黄色葡萄球菌以及何倩等^[32]研究的金黄色葡萄球菌临床分离株分子流行病学特征基本一致。近几年, ST59 型 MRSA 成为引起 MRSA 社区感染的主要致病型别^[33-34],而 ST59-t437-IVa(2B)型 MRSA 在我国市售食品中广泛分布^[35],该型 MRSA 除了携带可引起食源性疾病的毒力基因,还会携带 *pvl*、*hld*、*psm-α*、*agrA* 等与菌血症和皮肤黏膜感染相关的毒力基因,具有较强的毒性^[36]。据研究表明,金黄色葡萄球菌通过水平基因转移方式获得耐药、定植和感染相关因子,可能是某一克隆株能成功流行的重要原因,细菌遗传背景、外部条件等都会影响克隆群流行传播^[37]。本研究在系统发育树分析中,部分致病性强的临床分离株与食品分离 MRSA 菌株位于同一主要进化分支,菌株间具有一定的亲缘关系,食品和临床分离 MRSA 菌株间是否存在水平传播及其机制还需进一步深入研究,同时,食品中

ST59-t437-IVa(2B)型 MRSA 污染应被高度重视,在警惕其造成临床感染的同时,也应防范菌株随着食品贸易及人员流动造成的进一步扩大传播。

参考文献

- [1] 陈培超,黄强,程芳洲,等.上海市嘉定区腹泻患者中金黄色葡萄球菌及肠毒素基因分析[J/OL].上海预防医学,1-11.[2024-10-10].
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1635.R.20240925.0940.002.html>
CHEN PC, HUANG Q, CHENG FZ, et al. Analysis of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin gene detection in diarrhea patients in Jiading District, Shanghai [J/OL]. Shanghai Journal of Preventive Medicine, 1-11. [2024-10-10].
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1635.R.20240925.0940.002.html>
- [2] 王辉,马筱玲,钱渊,等.临床微生物学手册[M].12版.北京:中华医学电子音像出版社,2021.
WANG H, MA XL, QIAN Y, et al. Manual of clinical microbiology [M]. 12th ed. Beijing: China Medical Electronic Audio and Video Publishing House, 2021.
- [3] 王铜,陶晓霞,郭敏卓,等.金黄色葡萄球菌肠毒素 SEA、SEB、SEC、SED 序列多态性及进化分析[J].疾病监测,2020,35(10):926-933.
WANG T, TAO XX, GUO MZ, et al. Sequence polymorphisms and evolutionary analysis of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A, B, C and D [J]. Disease Surveillance, 2020, 35(10): 926-933.
- [4] CHEUNG GYC, BAE JS, OTTO M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus* [J]. Virulence, 2021, 12(1): 547-569.
- [5] KADARIYA J, SMITH TC, THAPALIYA D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health [J]. Biomed Research International, 2014, 4(1): 1-9.
- [6] ASATI DA, ABDULAI PM, BOATENG KS, et al. Food safety knowledge and practices among raw meat handlers and the microbial content of raw meat sold at Kumasi Abattoir Butchery Shops in Kumasi, Ghana [J]. BMC Public Health, 2024, 24(1): 975-989.
- [7] AHMAD-MANSOUR N, LOUBET P, POUGET C, et al. *Staphylococcus aureus* toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments [J]. Toxins, 2021, 13(10): 136-149.
- [8] PANTOSTI A, VENDITTI M. What is MRSA? [J]. European Respiratory Journal, 2009, 34(5): 1190-1196.
- [9] 肖玉玲,康梅,谢轶,等.2015—2021年CHINET临床分离葡萄球菌属细菌耐药性变迁[J].中国感染与化疗杂志,2024,24(5):570-580.
XIAO YL, KANG M, XIE Y, et al. Changing resistance profiles of *Staphylococcus* isolates in hospitals across China: Results from the CHINET antimicrobial resistance surveillance program, 2015—2021 [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2024, 24(5): 570-580.
- [10] ALGAMMAL A, HETTA H, KELISH AE, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact [J]. Infection and Drug Resistance, 2020, 13: 3255-3265.
- [11] JARADAT Z, ABABNEH Q, SHAABAN S, et al. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and public fomites: A review [J]. Pathogens and Global Health, 2020, 114: 426-450.
- [12] 刘倩宏,马鹏明,顾巧逸,等.吉林地区奶源金黄色葡萄球菌耐药性及遗传特征分析[J].食品安全质量检测学报,2024,15(14):317-324.
LIU QH, MA PM, GU QY, et al. Analysis of antibiotic resistance and genetic characteristics of milk derived *Staphylococcus aureus* in Jilin [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(14): 317-324.
- [13] 李辉,闫琳,陈伟伟,等.我国食源性金黄色葡萄球菌耐药及遗传特征情况研究[J].中国食品卫生杂志,2023,35(6):801-806.
LI H, YAN L, CHEN WW, et al. Resistance and genotype characterization

- of foodborne *Staphylococcus aureus* in China [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(6): 801–806.
- [14] ZHANG F, JIANG M, WAN C, *et al.* Screening probiotic strains for safety: Evaluation of virulence and antimicrobial susceptibility of *enterococci* from healthy Chinese infants [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(6): 4282–4290.
- [15] 林茂锐, 周旋, 李明友, 等. 84 株沙门菌耐药特征及分子分型结果分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(6): 553–557.
- LIN MR, ZHOU X, LI MY, *et al.* Characterization of antimicrobial resistances and molecular characteristics of 84 strains of *Salmonella* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2016, 32(6): 553–557.
- [16] GOVINDARAJ AV, VANITHA A. WHO global priority pathogens list on antibiotic resistance: An urgent need for action to integrate one health data [J]. Perspectives in Public Health, 2018, 138: 87–88.
- [17] 周文渊. 猪源 SCCmecXII型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性、分子分型及全基因组序列分析[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- ZHOU WY. The antibiotic resistance, molecular typing and whole-genome sequencing of pig associated SCCmec typeXII methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [18] PRICE L, STEGGER M, HASMAN H, *et al.* *Staphylococcus aureus* CC398: Host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock [J]. mBio, 2013, 4(1): e00520–e00512.
- [19] GUINANE CM, BEN ZNL, TORMO-MAS MA, *et al.* Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation [J]. Genome Biology and Evolution, 2010, 2: 454–466.
- [20] SPOOR LE, MCADAM PR, WEINERT LA, *et al.* Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. mBio, 2013, 4(4): e00356–13.
- [21] SCHELIN J, WALLIN-CARLQUIST N, THORUP CM, *et al.* The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment [J]. Virulence, 2011, 6: 580–592.
- [22] SONG M, BAI Y, XU J, *et al.* Genetic diversity and virulence potential of *Staphylococcus aureus* isolates from raw and processed food commodities in Shanghai [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 195: 1–8.
- [23] 赵英芳, 乔玫, 宋晓红, 等. 金黄色葡萄球菌食品分离株与临床分离株耐药谱的相关性分析[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(5): 830–831.
- ZHAO YF, QIAO M, SONG XH, *et al.* Correlation analysis of drug resistance profiles of *Staphylococcus aureus* between food isolates and clinical isolates [J]. Chinese Remedies & Clinics, 2019, 19(5): 830–831.
- [24] 殷国民, 陶佳, 杨丹, 等. 宁夏某三甲医院 2017 年—2022 年金黄色葡萄球菌临床分布及耐药性变迁[J]. 国外医药(抗生素分册), 2024(5): 319–325.
- YIN GM, TAO J, YANG D, *et al.* Trends of clinical distribution and drug resistance of *Staphylococcus aureus* from a hospital in Ningxia from 2017 to 2022 [J]. World Notes on Antibiotics, 2024(5): 319–325.
- [25] 李孟寒, 李莹, 闫琳, 等. 中国食源性金黄色葡萄球菌耐药及肠毒素特征[J]. 中国公共卫生, 2019, 35(5): 574–578.
- LI MH, LI Y, YAN L, *et al.* Antimicrobial resistance and enterotoxigenicity characteristics of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates in China [J]. Chinese Journal of Public Health, 2019, 35(5): 574–578.
- [26] HERNÁNDEZ-CUELLAR E, TSUCHIYA K, VALLE-RÍOS R, *et al.* Differences in biofilm formation by methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* strains [J]. Diseases, 2023, 11(4): 160.
- [27] 陈瑶, 刘张玲, 汤荣睿. 金黄色葡萄球菌生物膜预防和治疗的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(1): 20–26.
- CHEN Y, LIU ZL, TANG RR. New advances in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2021, 46(1): 20–26.
- [28] 张伟松. 食源性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性及生物膜形成能力的研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2014.
- ZHANG WS. Investigation on antimicrobial resistance and biofilm formation of foodborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [D]. Xianyang: Northwest Agriculture & Forestry University, 2014.
- [29] 张鹏飞, 王婷, 钟楠, 等. 食源性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜的形成及相关基因的检测[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 41–49.
- ZHANG PF, WANG T, ZHONG N, *et al.* Detection of biofilm formation and biofilm-related genes of food-borne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 41–49.
- [30] 唐子云, 胡健欣, 陈进, 等. 动物源金黄色葡萄球菌生物被膜形成能力与分子分型关系研究[J]. 中国农业科学, 2022, 55(3): 602–612.
- TANG ZY, HU JX, CHEN J, *et al.* Relationship between biofilm formation and molecular typing of *Staphylococcus aureus* from animal origin [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(3): 602–612.
- [31] LAABEI M, RECKER M, RUDKIN JK, *et al.* Predicting the virulence of MRSA from its genome sequence [J]. Genome Research, 2014, 24(5): 839–849.
- [32] 何倩, 常文娇, 黄开泉, 等. 121 株金黄色葡萄球菌临床分离株的分子流行病学及遗传学特征[J]. 中华医院感染学杂志, 2024, 34(3): 321–326.
- HE Q, CHANG WJ, HUANG KQ, *et al.* Molecular epidemiological and genetic characteristics of 121 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2024, 34(3): 321–326.
- [33] CHEN H, YIN Y, VAN DORPL, *et al.* Drivers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) lineage replacement in China [J]. Genome Medicine, 2021, 13(1): 171.
- [34] LI S, SUN S, YANG C, *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]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 332.
- [35] WANG X, LI G, XIA X, *et al.* Antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail foods in Shaanxi, China [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(4): 281–286.
- [36] 阚浩鹏, 温红玲, 胡豫杰. 我国市售食品中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌污染情况研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(14): 4463–4471.
- KAN HP, WEN HL, HU YJ. Research progress on the contamination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail foods in China [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(14): 4463–4471.
- [37] 韩国全, 吴任之, 张翼, 等. 猪肉源金黄色葡萄球菌生物膜能力与 MLST 分型检测[J]. 中国食品学报, 2023, 23(7): 353–362.
- HAN GQ, WU RZ, ZHANG Y, *et al.* Detection of biofilm capacity and MLST typing of *Staphylococcus aureus* from pork [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(7): 353–362.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)