DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250811006
引用格式: 牟建, 侯轩, 辜依海, 等. 汉中地区猪肉来源 ST59 和 ST398 型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物学特性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 122–129.
MOU J, HOU X, GU YH, *et al*. Study on biological characteristics of ST59 and ST398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pork in Hanzhong [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 122–129. (in Chinese with English abstract).

汉中地区猪肉来源 ST59 和 ST398 型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物学特性研究

牟 建, 侯 轩, 辜依海, 王 辉, 周梦蓉, 张 微*
(三二〇一医院微生物免疫科, 汉中 723000)

摘 要: 目的 阐明汉中地区零售猪肉中 ST59 和 ST398 型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)分子流行特征、耐药及毒力特性的差异, 评估其潜在的公共卫生风险。**方法** 采用全基因组测序技术对分离株进行多位点序列(multilocus sequence typing, MLST)分型、葡萄球菌蛋白 A 基因(staphylococcal protein A gene, *spa*)分型及葡萄球菌染色体盒(staphylococcal chromosomal cassette *mec*, SCC*mec*)分型, 并预测其耐药基因与毒力基因谱。通过微量肉汤稀释法进行抗菌药物敏感性实验; 采用绵羊红细胞溶血实验评估溶血活性, 微孔板结晶紫染色法评估生物被膜形成能力。**结果** 在 43 株 MRSA 分离株中, ST59 (51.16%, 22/43)和 ST398 (46.51%, 20/43)为优势型别。ST59 菌株分子分型呈现高度同质性, 主要集中于 *spa* t437 型(81.82%)和 SCC*mec* IVa(2B)型(90.91%); 而 ST398 菌株则表现出高度遗传多样性, 呈现多种 *spa* 型和 SCC*mec* 型。ST398 菌株对庆大霉素、四环素、左氧氟沙星、克林霉素及复方新诺明的耐药率均显著高于 ST59 菌株(P<0.01)。ST398 菌株携带更丰富的获得性耐药基因, 包括高携带率的 *tet*(*M*) (95.00%)、*lnu*(*B*) (75.00%)、*lsa*(*E*) (90.00%)和 *dfr*G (90.00%), 3 株菌携带 *poxtA* 基因; 而 ST59 菌株的耐药基因谱相对简单。在毒力特性方面, ST398 菌株表现出强的溶血活性; ST59 菌株则具有更强的生物被膜形成能力, 并携带更复杂的毒力基因谱, 其免疫逃逸基因 *sak*、*scn* 及肠毒素基因 *seb*、*sek*、*seq* 的携带率显著高于 ST398 菌株。**结论** 汉中地区零售猪肉制品中 MRSA 的主要流行克隆为 ST59 和 ST398。两者不同的生物学特性对公共卫生构成差异化的挑战, 需实施针对性监测与防控措施。

关键词: 猪肉; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 耐药特性; 毒力特性

收稿日期: 2025-08-11
基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2024SF-YBXM-279)
第一作者: 牟建(1991—), 男, 主管检验师, 主要研究方向为病原微生物耐药及毒力机制。E-mail: 253115043@qq.com
***通信作者:** 张微(1987—), 女, 硕士, 副主任检验师, 主要研究方向为病原微生物耐药及毒力机制。E-mail: xiaoxiong435@126.com

Study on biological characteristics of ST59 and ST398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pork in Hanzhong

MOU Jian, HOU Xuan, GU Yi-Hai, WANG Hui, ZHOU Meng-Rong, ZHANG Wei*

(*Department of Microbiology*, 3201 *Hospital*, *Hanzhong* 723000, *China*)

ABSTRACT: Objective To elucidate the differences in molecular epidemiological characteristics, antibiotic resistance and virulence properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST59 and ST398 in retail pork in the Hanzhong, and assess their potential public health risks. **Methods** Whole-genome sequencing was used to perform multilocus sequence typing (MLST), staphylococcal protein A gene (*spa*) typing, and staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing for the isolates, and their resistance and virulence gene profiles were predicted. Antimicrobial susceptibility testing was conducted using the broth microdilution method; sheep red blood cell hemolysis test was used to evaluate hemolytic activity, and microplate crystal violet staining was employed to assess biofilm-forming ability. **Results** Among the 43 MRSA isolates, ST59 (51.16%, 22/43) and ST398 (46.51%, 20/43) were the dominant types. ST59 strains showed high homogeneity in molecular typing, mainly clustering in *spa* t437 (81.82%) and SCC*mec* IVa(2B) (90.91%); in contrast, ST398 strains exhibited high genetic diversity with various *spa* types and SCC*mec* types. The resistance rates of ST398 strains to gentamicin, tetracycline, levofloxacin, clindamycin and trimethoprim-sulfamethoxazole were significantly higher than those of ST59 strains (P<0.01). ST398 strains carried more abundant acquired resistance genes, including high carriage rates of *tet*(*M*) (95.00%), *lnu*(*B*) (75.00%), *lsa*(*E*) (90.00%) and *dfrG* (90.00%). Additionally, 3 strains carried the *poxtA* gene; while the resistance gene profile of ST59 strains was relatively simple. In terms of virulence characteristics, ST398 strains showed strong hemolytic activity; ST59 strains had stronger biofilm-forming ability and carried a more complex virulence gene profile, with significantly higher carriage rates of immune escape genes *sak*, *scn*, and enterotoxin genes *seb*, *sek*, *seq* compared to ST398 strains. **Conclusion** The main prevalent clones of MRSA in retail pork products in Hanzhong are ST59 and ST398. The different biological characteristics pose differential challenges to public health, requiring targeted monitoring and prevention measures.

KEY WORDS: pork; methicillin-resistant *Staphylococcus aureu*; drug resistance characteristics; virulence characteristics

0　引　言

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是一种具有多重耐药性的重要人畜共患病原体, 不仅造成院内感染的高发病率和死亡率[1–2], 还在社区和农业环境中广泛传播[3–4]。近年来, 随着“同一健康”理念的深入, 食源性 MRSA 作为公共卫生风险的重要载体, 日益受到公共卫生领域的关注。食源性传播媒介的隐蔽性与复杂性, 使得动物源性 MRSA 对人类健康的潜在威胁日益凸显[5–6]。在诸多传播媒介中, 猪肉产业链因其规模化养殖密度高、跨区域流通广、人群消费量大等特性, 在屠宰、加工、储存、售卖过程中容易被 MRSA 污染, 使其成为 MRSA 传播的关键媒介[7]。多项研究证实, 零售猪肉中存在 MRSA 的污染, 而屠宰场工人、肉类加工者的鼻腔定植率显著高于普通人群[8–9], 一旦定值者发生感染进入医疗环境, 就会在医疗环境中进行传播, 造成临床疾病。

食源性 MRSA 的流行呈现全球性分布, 且其遗传背景具有多样性。自 2003 年家畜相关 MRSA (livestock-associated MRSA, LA-MRSA)在欧洲首次被确认以来, 该病原体已在包括中国在内的全球众多国家和地区被发现, 凸显了其在动物-人类-环境界面传播的复杂性和潜在公共卫生风险[9–10]。既往研究揭示, 不同 LA-MRSA 菌株具有不同的遗传背景、不同的抗菌药物耐药性, 并且携带不同类型的葡萄球菌染色体 *mec* 盒(staphylococcal chromosomal cassette *mec*, SCC*mec*)和毒力因子[11–12]。在欧美地区, 克隆复合体 CC398(特别是 ST398) 是 LA-MRSA 最主要的流行型别[13], 与之形成对比的是, 在包括中国、马来西亚等在内的大多数亚洲国家, ST9 型 LA-MRSA 则占据主导地位, 常与猪等家畜密切相关[12]。ST59 型 MRSA 是亚太地区占主导地位的社区相关性 MRSA (community-acquired MRSA, CA-MRSA)克隆株, 主要侵袭无明确医疗暴露史的年轻人

群, 可引起从皮肤软组织感染到坏死性肺炎等严重侵袭性疾病[1]。近年来, 传统上被认为是人源性的 ST59 MRSA 克隆株, 已被多次报道从零售肉类及其他食品中检出[14]。然而现有报道显示, 猪肉来源 MRSA 中 ST59 型菌株的分离率相对较低, 对猪肉来源的 ST59 和 ST398 型 MRSA 进行全面、深入的系统性比较研究较少, 本研究通过对汉中地区猪肉来源的 ST59 和 ST398 型 MRSA 菌株进行比较分析, 系统探究其在分子流行特征、耐药特性、毒力特性等关键生物学特性上的差异, 为评估其潜在公共卫生风险及制定针对性防控策略提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实际样品猪肉馅为 2019 年 8 月—2024 年 4 月从汉中农贸市场和超市购买。

牛肉膏(北京奥博星生物技术有限责任公司); 蛋白胨(北京三药科技有限公司); 氯化钠(分析纯, 天津市众联化学试剂有限公司); 金黄色葡萄球菌显色培养基(上海科玛嘉微生物技术有限公司); 水解酪蛋白(mueller-hinton, M-H)琼脂培养基(广州市迪景微生物科技有限公司); 胰酪大豆胨肉汤培养基(tryptic soy broth, TSB)(青岛高科园海博生物科技有限公司); 质谱样品处理基质(德国布鲁克 Bruker 公司); 甲酸(分析纯, 河北百灵威超精细材料有限公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型, 天根生物科技有限公司); 革兰阳性需氧菌药敏检测板[复星诊断科技(长沙)有限公司]; 头孢西丁药敏纸片(英国 OXOID 公司); 0.1% Triton X-100、结晶紫(北京索莱宝科技有限公司); 无菌抗凝绵羊血(郑州诚睿生物科技有限公司); 质控标准菌株 ATCC 25923、ATCC 29213(美国菌种保藏中心)。

1.2 仪器与设备

Hfsafe-1800TE 生物安全柜、HF212 培养箱(上海力申科学仪器有限公司); SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); victorX3 多功能酶标仪(美国 PE 公司); PR224ZH/E 电子天平[分度值为 0.0001 g , 奥豪斯仪(上海)有限公司]; Microflex LT/SH 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(德国布鲁克公司); PhoenixSpec 比浊仪(碧迪医疗器械有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株分离鉴定及 MRSA 筛选

2019 年 8 月—2024 年 4 月从汉中农贸市场和超市购买的猪肉馅, 称取 25 g 样品, 加入盛有 225 mL 7.5%氯化钠肉汤的无菌均质袋中。手工振荡混匀后, 于 36 ℃培养箱中增菌培养 24 h。增菌结束后, 再次振荡混匀, 挑取 2 个接种环量增菌液划线接种于金黄色葡萄球菌显色培养基。挑取典型或可疑单菌落涂布于质谱仪靶板孔中, 依次加入 1 μL 甲酸并室温晾干, 再加入 1 μL 质谱样品处理基质并室温晾干。处理后的靶板进行菌种鉴定。参照标准药敏实验方法: 无菌棉签蘸取 4~5 个金黄色葡萄球菌菌落, 悬浮于无菌生理盐水中, 制备成 0.5 麦氏单位的菌悬液。将菌悬液均匀涂布于 M-H 琼脂培养基。贴上 30 μg 头孢西丁纸片, 置 35 ℃培养 16~18 h 后观察结果。以金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 为质控菌株, 抑菌圈直径小于等于 21 mm 判为 MRSA。

1.3.2 全基因组测序

依照试剂盒说明书提取 MRSA 菌株基因组 DNA。待 DNA 检测合格后, 将其送往北京诺禾致源生物科技有限公司进行测序。测序采用二代测序平台 Illumina Hiseq 2000, 运用 PE150 测序策略开展全基因组测序分析。测序完成后, 使用 SOAP denovo(版本 2.04)软件对测序结果进行拼接。基于 Center for Genomic Epidemiology (http://www.genomicepidemiology.org/)平台, 分析如下数据: MLST 2.0 确定多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)、spaTyper 1.0 确定葡萄球菌蛋白 A 基因分型(staphylococcal protein A gene, *spa*)、SCCmecFinder 1.2 确定 SCC*mec* 分型、ResFinder 4.6.0 预测耐药基因、VirulenceFinder 2.0 预测毒力基因。

1.3.3 抗菌药物敏感性实验

对 MRSA 菌株, 采用美国临床和实验室标准委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的微量肉汤稀释法进行药敏实验。测试药物(质量浓度单位为 μg/mL)包括: 苯唑西林(oxacillin, OXC, 0.125-8)、红霉素(erythromycin, ERY, 0.25-16)、克林霉素(clindamycin, CLI, 0.125-8)、左氧氟沙星(levofloxacin, LEV, 0.125-8)、四环素(tetracycline, TET, 0.25-16)、庆大霉素(gentamicin, GEN, 0.125-16)、万古霉素(vancomycin, VAN, 0.5-32)、替考拉宁(teicoplanin, TEC, 0.5-32)、利福平(rifampin, RIF, 0.06-4)、复方新诺明(trimethoprim/sulfamethoxazole, SXT, 0.25/4.75-8/152)、达托霉素(daptomycin, DAP, 0.125-4)、青霉素(penicillin, PEN, 0.06-2)、利奈唑胺(linezolid, LZD, 1-8)、头孢西丁(cefoxitin, CFX, 1-8)和呋喃妥因(nitrofurantoin, NIT, 16-128)。以金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 为质控菌株, 结果判读依据 CLSI M100 标准[15]。

1.3.4 溶血能力检测

将 100 μL 细菌过夜培养上清液与等体积 6%绵羊红细胞悬液在 96 孔板中混合, 37 °C 静置孵育 3 h。阳性对照和阴性对照分别为 0.1% Triton X-100 溶液和无菌 TSB 培养基。孵育后, 2500 r/min 离心 5 min。吸取 100 μL 上清至新 96 孔板, 测定 405 nm 吸光度(OD_{405})。每个样本及对照均设 3 个复孔。溶血能力计算如公式(1):

$$溶血率/\%=(A-C)\times 100/(B-C) \quad (1)$$

式中: *A*: 样本 OD 值; *B*: 阳性样本 OD 值; *C*: 阴性样本 OD 值。

1.3.5　生物被膜形成能力检测

结晶紫法检测菌株生物被膜: 取 200 μL 1:100 (*V*:*V*)稀释过夜菌液加入96孔板, 37 ℃静置培养24 h; 弃菌液, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗 3 次, 56 ℃烘干; 每孔加 200 μL 0.1%结晶紫染 10 min, PBS 洗 3 次, 干燥; 加 200 μL 33%冰醋酸溶解 10 min, 使用酶标仪于 570 nm 波长下测定各孔吸光度值(OD_{570}), TSB 溶液为阴性对照, 每个样本重复 4 次。判断标准: $OD_{570\ nm}$≤ODc, 不能形成生物被膜; ODc<$OD_{570\ nm}$≤2ODc, 形成能力较弱; 2ODc<$OD_{570\ nm}$≤4ODc, 形成能力中等; $OD_{570\ nm}$>4ODc, 形成能力较强, ODc 为阴性对照孔 OD 值的平均值加 3 倍标准差。

1.4　数据处理

使用软件 SPSS 22.0 进行统计学分析, 采用 χ^2检验进行计数资料组间分析, 采用 *U* 检验对组间数据进行分析, *P*<0.05 提示差异具有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　MRSA 及其主要流行株 ST59 与 ST398 的检出率

本研究共采集猪肉馅样本 232 份, 检出 MRSA 43 株, 总体检出率为 18.53%。对 43 株 MRSA 分离株进行 MLST 分析结果显示共有 3 个序列(sequence typing, ST)型别, ST59 22 株, 占比 51.16% (22/43), ST398 20 株, 占比, 46.51% (20/43), *spa* 和 SCC*mec* 分型多样化, ST88 1 株, 占比 2.33% (1/43), ST59 和 ST398 构成猪肉馅中 MRSA 的优势 ST 型别, ST59 型 MRSA 检出率略高于 ST398 型。ST59 型菌株在 *spa* 分型上高度集中于 t437 (81.82%, 18/22), 次要型别 t3401 和 t441 各占 9.09% (2/22); 其 SCC*mec* 分型同样呈现高度同质性, IVa(2B)型占绝对优势(90.91%, 20/22), 仅检出少量 XII(9C2)型(9.09%, 2/22)。相比之下, ST398 型菌株的分型特征更为多样: *spa* 分型以 t571 为主(45.00%, 9/20), 其次为 t11 (30.00%, 6/20)、t34 (20.00%, 4/20)及 t779 (5.00%, 1/20); SCC*mec* 分型中 Vc(5C2&5)占比最高(45.00%, 9/20), 其余依次为 XII(9C2) (25.00%, 5/20)、IX(1C2) (15.00%, 3/20)、IVa(2B) (10.00%, 2/20)及未分型菌株(5.00%, 1/20)。总体而言, ST59 在 *spa* 与 SCC*mec* 分型中均体现高度同质化, 而 ST398 则表现出广泛的多态性特征, 见表 1。

2.2　耐药特性

对 43 株进行抗菌药物敏感实验显示(表 2): 所有菌株(100.00%)均对青霉素、苯唑西林及头孢西丁耐药, 符合 MRSA 典型特征; 而对万古霉素、替考拉宁、呋喃妥因及利奈唑胺均保持完全敏感, 红霉素与克林霉素分别呈现 83.72%和 76.74%的高耐药率。值得注意的是, ST59 型与 ST398 型菌株呈现显著耐药差异: ST398 型对庆大霉素(χ^2=9.240, *P*<0.01)、四环素(χ^2=22.344, *P*<0.001)、左氧氟沙星(χ^2=12.600, *P*<0.001)、克林霉素(χ^2=7.447, *P*<0.01)及复方新诺明(χ^2=7.700, *P*<0.01)的耐药率均高于 ST59 型, 差异具有统计学意义; 而 ST59 型对红霉素耐药率更高(95.45% *vs* 70.00%)。达托霉素在两组中耐药率相近(ST59: 45.45%, ST398: 40.00%), 总体耐药率为 41.86%。

表 1　不同型别 MRSA 检出率

Table 1　Detection rates of different types of MRSA

ST 型	株数	检出率/%	*spa* 分型	株数	检出率/%	SCC*mec* 分型	株数	检出率/%
ST59	22	51.16	t437	18	81.82	IVa(2B)	20	90.91
			t3401	2	9.09	XII(9C2)	2	9.09
			t441	2	9.09	-	-	-
ST398	20	46.51	t571	9	45.00	Vc(5C2&5)	9	45.00
			t11	6	30.00	XII(9C2)	5	25.00
			t34	4	20.00	IX(1C2)	3	15.00
			t779	1	5.00	IVa(2B)	2	10.00
			-	-	-	未分型	1	5.00
ST88	1	2.33	t2393	-	-	XII(9C2)	-	-

注: -为无数据。

表 2　ST59 型和 ST398 型 MRSA 耐药情况分析

Table 2　Analysis of drug resistance of ST59 and ST398 MRSA strains

编号	抗生素	总耐药率/% (*n*=43)	ST59 菌株耐药率/% (*n*=22)	ST398 菌株耐药率/% (*n*=20)
1	青霉素	100.00	100.00	100.00
2	苯唑西林	100.00	100.00	100.00
3	头孢西丁	100.00	100.00	100.00
4	万古霉素	0.00	0.00	0.00
5	替考拉宁	0.00	0.00	0.00
6	达托霉素	41.86	45.45	40.00

表 2(续)

编号	抗生素	总耐药率/% (*n*=43)	ST59 菌株耐药率/% (*n*=22)	ST398 菌株耐药率/% (*n*=20)
7	庆大霉素	18.60	0.00	35.00
8	红霉素	83.72	95.45	70.00
9	四环素	55.81	22.73	95.00
10	左氧氟沙星	20.93	0.00	45.00
11	呋喃妥因	0.00	0.00	0.00
12	克林霉素	76.74	59.09	95.00
13	复方新诺明	16.28	0.00	30.00
14	利福平	2.33	0.00	5.00
15	利奈唑胺	0.00	0.00	0.00

对 ST59 与 ST398 型 MRSA 耐药基因的比对发现二者存在显著差异，与耐药表型一致。ST59 菌株呈现特异性耐药模式：所有菌株均携带 *β*-内酰胺类耐药基因 *mecA* 和 *blaZ*，大环内酯类耐药以 *erm*(*B*) (13/22, 59.09%)为主导，氨基糖苷类耐药基因 *ant*(*6*)-*Ia*-*aph*(*3′*)-*III* 携带率达 50.00% (11/22)，而四环素类仅 *tet*(*K*)低水平携带(5/22, 22.73%)。值得注意的是，*lsa*(*E*)、*dfrG* 在 ST59 中完全缺失。与之相反，ST398 菌株表现出广泛的多重耐药性：除 *mecA* 和 *bla* 外，四环素类 *tet*(*M*)基因携带率高达 95.00% (19/20)，林可酰胺类 *lnu*(*B*)达 75.00% (15/20)，同时检出高频率的截短侧耳素基因 *lsa*(*E*) (18/20, 90.00%)和甲氧苄啶基因 *dfrG* (18/20, 90.00%)。氨基糖苷类耐药机制呈现多基因协同：*ant*(*6*)-*Ia*，45.00% (9/20)；*aac*(*6′*)-*aph*(*2″*)：35.00% (7/20)；*aadD*：30.00% (6/20)，且 45.00% (9/20)携带苯酚耐药基因 *fexA*。少见耐药基因如介导恶唑烷酮类耐药的 *poxtA* (3/20, 15.00%)与介导截短侧耳素类耐药的 *vgaE* (1/20, 5.00%)在 ST398 中被检出。这些结果揭示 ST398 通过获得性耐药元件积累了更复杂的耐药库，其多重耐药风险显著高于 ST59 型菌株，见图 1。

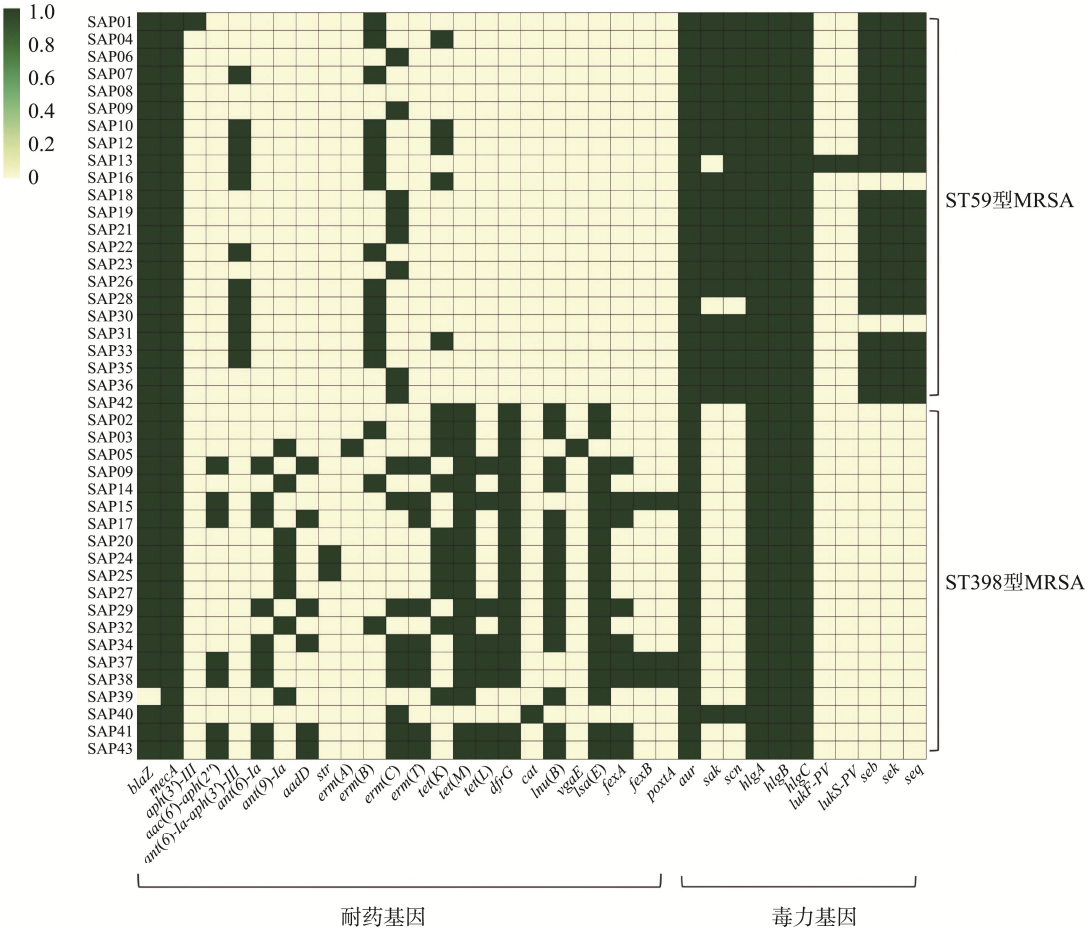

图 1 不同 ST MRSA 携带的耐药基因和毒力基因

Fig.1 Drug resistance genes and virulence genes carried by different ST MRSA strains

2.3　溶血能力

通过绵羊红细胞溶血实验评估 42 株 MRSA 毒力特征, 研究结果显示, ST398 型 MRSA 的溶血活性显著高于 ST59 型(P=0.001)。ST398 菌株(n=20)溶血率中位数为 0.96, 四分位距: 0.08 (0.97~0.89), 75.00% (15/20)的菌株呈现高溶血表型, 溶血率≥0.92, 仅 4 株表现为弱溶血(≤0.23); 而 ST59 菌株(n=22)溶血率中位数较低, 为 0.83, 四分位距: 0.34 (0.87~0.53), 仅 1 株菌溶血率大于 0.90, 9 株菌(40.91%)≥0.85, 且 4 株显著低溶血株(≤0.08), 两型别内部均存在溶血表型异质性, 见图 2A。

2.4　生物被膜形成能力

采用 U 检验对 42 株菌生物被膜形成能力分析显示, ST59 型 MRSA 的生物被膜生成能力显著强于 ST398 型(P<0.000)。ST 59 MRSA 菌株的生物被膜形成强度范围为 0.83 至 2.86, 中位数为 1.26, 而 ST 398 MRSA 菌株范围为 0.43 至 1.98, 中位数为 0.65。通过计算, 除过 SAP27 成膜能力中等外, 其余 41 株菌成膜能力均较强。ST59 菌株中 63.64% (14/22)表现为强生物被膜形成表型(OD_{570}≥1.25), 包括 3 株超强形成菌株(OD_{570}≥2.26); 而 ST398 菌株仅 20.00% (4/20) OD_{570}>1.0, 且 65%菌株(13/20) OD_{570}≤0.72, 见图 2B。

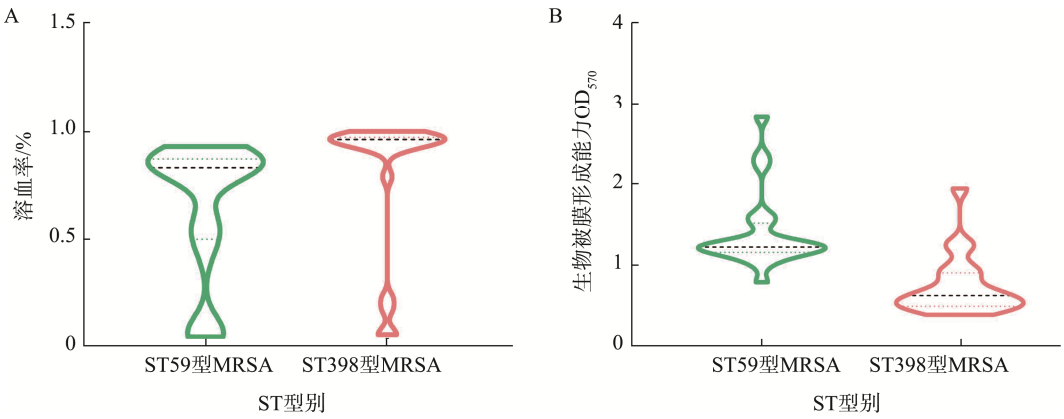

图 2　不同 ST MRSA 绵羊红细胞溶血能力和生物被膜形成能力

Fig.2　Hemolytic activity against sheep red blood cells and biofilm-forming ability of different ST MRSA strains

2.5　毒力基因特征

毒力基因显示, 金属蛋白酶 *aur* 和 γ-溶血素 *hlgA*、*hlgB*、*hlgC* 基因在两组菌株中均普遍存在, 携带率均为 100%, 表明核心毒力因子高度保守。ST59 型 MRSA 表现出更复杂的毒力基因谱, 其免疫逃逸基因 *sak* 基因携带率为 90.91% (20/22), 显著高于 ST398 型的 5.00% (1/20), *scn* 基因在 ST59 中为 95.45% (21/22), 在 ST398 中仅 5.00% (1/20)。肠毒素基因 *seb*、*sek*、*seq* 仅在 ST59 中高频检出(20/22, 90.91%)。编码潘顿-瓦伦丁白细胞毒素(panton-valentine leukocidin, PVL)的 *lukF-PV*、*lukS-PV* 基因仅在 1 株 ST59 菌株中检出(1/22, 4.55%), 而 ST398 菌株中完全缺失, ST398 中唯一携带 *sak*、*scn* 的菌株为 SAP40 (1/20), 且未检出其他毒力基因。总体来看, ST59 型 MRSA 携带的毒力基因种类更丰富, 尤其是肠毒素和免疫逃逸相关基因, 见图 1。

3　讨论与结论

本研究聚焦于汉中地区生鲜猪肉制品中 ST59 与 ST398 型 MRSA 的分布及其综合生物学特性, 涵盖了分型分布、耐药性、毒力基因谱和主要表型特征。结果显示: MRSA 总体检出率 18.53%高于华南地区(6.3%)[16], 与欧洲国家(1.8%~15.8%)[17]相近, 此差异可能与不同地区及实验室检测方法有关。通过 MLST 分型发现, 猪肉馅中 MRSA 菌株以 ST59 和 ST398 为绝对优势型别, 合计占 97.67%, ST59 型占比 51.16%, 本研究结果与 OU 等[18]报道的上海地区动物性食品 MRSA 以 ST7 为主要流行型别且未检出 ST398 不同, 而与王君等[19]报告的陕西地区食品分离 MRSA 中 ST59 型占优势(57.14%)的结果一致, 值得注意的是, 本研究中未检出 ST9 型 MRSA。这些结果表明 MRSA 流行克隆的构成存在显著的地域差异。ST59 型菌株在分子分型上表现出高度同质性, 其 *spa* 型 t437 (81.82%)和 SCC*mec* 型 IVa(2B) (90.91%)占优势, 暗示该克隆可能在特定环境中经历了快速传播和扩张。这种同质性在亚洲地区的人源 MRSA ST59 菌株中亦有报道[20–21], 说明某些人类 MRSA 可能转化为 LA-MRSA, 并在人类与家畜之间实现双向传播, 这凸显了持续监测人类及家畜群体中 MRSA 的重要性。相反, ST398 型菌株在 *spa* 和 SCC*mec* 分型上呈现出高度的多样性, 这种广泛的多态性特征提示 ST398 菌株在猪及猪肉制品相关环境中经历了更长时间的定殖、适应

和进化, 积累了丰富的遗传变异[22]。其中 ST398-t571 占据主导克隆谱系, 达 45.00%, 已有研究多次证实该谱系可导致侵袭性感染[23–24], 这提示需要持续开展人畜金黄色葡萄球菌的基因型监测。

耐药性方面, ST398 菌株展现出比 ST59 菌株复杂的多重耐药表型与基因型, 构成更严峻的公共卫生挑战。耐药表型分析显示, ST398 对庆大霉素、四环素、左氧氟沙星、克林霉素及复方新诺明的耐药率均显著高于 ST59。深入分析耐药基因发现, 这种差异源于 ST398 菌株携带了更为丰富多样的获得性耐药基因元件。ST398 菌株不仅普遍携带 *β*-内酰胺类耐药基因, 同时编码四环素耐药的 *tet*(*M*)基因的携带率也极高(95.0%), 四环素通常是兽医首选的一线抗生素, 由于动物无法完全吸收或代谢四环素, 约 30%的此类药物及其降解产物会通过粪便或尿液排入环境[25], 可能进一步促进耐药基因扩散。值得注意的是, 本研究中检出 3 株携带 *poxtA* 基因的菌株。该基因编码 ABC-F 蛋白, 通过核糖体保护机制介导对苯尼考类与噁唑烷酮类药物的耐药性[26], 数据分析显示: 虽然携带菌株未达到利奈唑胺耐药折点(CLSI 标准: ≥8 μg/mL), 但其最低抑菌浓度较非携带菌株升高(2 μg/mL→4 μg/mL), 逼近敏感-耐药临界浓度。此类耐药性可能通过食物链向人类传播[27]。由于酚类药物在兽用领域的广泛应用, 利奈唑胺耐药基因可能在畜牧生态环境中扩散, 进而威胁公共卫生安全。因此需建立针对动物源食品及养殖环境的持续监测体系。

毒力特性分析揭示了两种流行谱系在致病潜能上的差异。ST398 菌株表现出更强的体外侵袭性特征, 其绵羊红细胞溶血活性显著高于 ST59, 75%的 ST398 菌株呈现高溶血表型(溶血率大于等于 0.92)。这表明 ST398 可能具有更强的直接组织损伤能力, 该谱系以高毒力特性著称, 可导致致死性感染[28]。然而, ST59 菌株则展现出在宿主免疫逃逸和潜在毒素介导致病方面的显著优势。核心毒力基因 *aur*、*hlg* 虽普遍存在于两型菌株, 但关键的免疫逃逸基因簇 *sak* 和 *scn* 在 ST59 中携带率显著高于 ST398。该基因簇常位于噬菌体上, 这些基因通过增强生物膜形成能力、促进细胞侵袭和免疫逃逸而赋予菌株生存优势[29]。90.91% ST59 型菌株携带 *seb* 基因, 且常与 *sek* 和 *seq* 基因同时被检出, 这可能源于 *seb*、*sek* 和 *seq* 基因共同位于同一移动遗传元件 SaPI3 上[30]。此外, ST59 菌株的生物被膜形成能力显著强于 ST398(中位数 OD 值: 1.26 *vs* 0.65, P<0.000), 63.64%的 ST59 菌株为强生物被膜形成菌株。金黄色葡萄球菌产生的生物被膜是一个重要的毒力因子, 使细菌能够忍受温度、pH 和其他不利环境条件的变化[30], 不仅增强菌株在环境或宿主表面的持久存活能力, 还显著提高其对抗生素的耐受性[31]。因此, 尽管 ST398 在直接溶血侵袭上具有优势, 但 ST59 菌株具有给更强的免疫逃逸能力、毒素产生潜力和生物被膜形成能力, 可能具有更高的人际传播潜力和引发多样化感染的风险。本研究的局限性包括缺乏对分离菌株与人源 ST59 型菌株的对比分析。阐明两者在表型如毒力、适应力或基因型上的潜在差异, 是未来研究的重要方向。

综上所述, 本研究发现汉中地区猪肉中 ST59 和 ST398 为优势流行型别, 二者在遗传学及表型特征上呈现显著差异。ST398 型菌株展现出较高的遗传多样性、较强的多重耐药性及溶血侵袭能力, 反映了其在猪养殖环境中的深度适应与进化。该型别复杂的耐药基因谱对临床治疗构成显著挑战。相较而言, ST59 型菌株表现出较高的克隆一致性, 并携带丰富的免疫逃逸基因及毒素基因谱, 同时具有较强的生物被膜形成能力。这些特征提示 ST59 型菌株可能具有更优的人源适应性潜力及潜在的食源性传播风险。因此, 持续监测猪肉制品中 MRSA 的流行趋势、进化动态及其耐药与毒力特征, 对于准确评估其公共卫生风险、制定针对性防控策略至关重要。

参考文献

[1] JIANG JH, CAMERON DR, NETHERCOTT C, *et al*. Virulence attributes of successful methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2023, 36(4): e0014822.

[2] BELLIS KL, DISSANAYAKE OM, HARRISON EM, *et al*. Community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks in areas of low prevalence [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2025, 31(2): 182–189.

[3] WESTGEEST AC, HANSSEN JLJ, DE-BOER MGJ, *et al*. Eradication of community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage: A narrative review [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2025, 31(2): 173–181.

[4] KOBUSCH I, SCHRÖTER I, LINNEMANN S, *et al*. Prevalence of LA-MRSA in pigsties: Analysis of factors influencing the (De)colonization process [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 18000.

[5] WANG Y, ZHANG P, WU J, *et al*. Transmission of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between animals, environment, and humans in the farm [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2023, 30(37): 86521–86539.

[6] DONG Q, LIU Y, LI W, *et al*. Cross-species transmission risk of livestock-associated MRSA: A systematic review and Bayesian meta-analysis of global data [J]. Preventive Veterinary Medicine, 2021, 194: 105429.

[7] 张鹏飞, 阮傅倩, 徐旭, 等. 陕西省和上海市市售猪肉中金黄色葡萄球菌分子多样性及耐药性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(10): 3123–3133.
ZHANG PF, RUAN FQ, XU X, *et al*. Molecular diversity and drug resistance of Staphylococcus aureus from retail pork in Shaanxi Province and Shanghai City [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(10): 3123–3133.

[8] QUERO S, SERRAS-PUJOL M, PÁRRAGA-NIÑO N, *et al*. Methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* in pork industry workers, Catalonia, Spain [J]. One Health, 2023, 16:

100538.

[9] ZHU Z, LIU X, CHEN X, *et al*. Prevalence and virulence determinants of *Staphylococcus aureus* in wholesale and retail pork in Wuhan, Central China [J]. Foods, 2022, 11(24): 4114.

[10] SILVA V, ARAÚJO S, MONTEIRO A, *et al*. *Staphylococcus aureus* and MRSA in livestock: Antimicrobial resistance and genetic lineages [J]. Microorganisms, 2023, 11(1): 124.

[11] FOSTER TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(3): 430–449.

[12] CHUANG YY, HUANG YC. Livestock-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia: An emerging issue? [J] International Journal of Antimicrobial Agents, 2015, 45(4): 334–340.

[13] TANG Y, LARSEN J, KJELDGAARD J, *et al*. Methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* from retail meat in Denmark [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 249: 72–76.

[14] LI H, TANG T, STEGGER M, *et al*. Characterization of antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus* from retail foods in Beijing, China [J]. Food Microbiology, 2021, 93: 103603.

[15] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibilitv testing: M100 [Z]. CLSI document M100 Wayne, PA: CLSI, 2024.

[16] ZHOU Y, LI X, YAN H. Genotypic characteristics and correlation of epidemiology of *Staphylococcus aureus* in healthy pigs, diseased pigs, and environment [J]. Antibiotics, 2020, 9(12): 829.

[17] LASSOK B, TENHAGEN BA. From pig to pork: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the pork production chain [J]. Journal of Food Protection, 2013, 76(6): 1095–1108.

[18] OU C, SHANG D, YANG J, *et al*. Prevalence of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with strong biofilm formation ability among animal-based food in Shanghai [J]. Food Control, 2020, 112: 107106.

[19] 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.

[20] ZHAO R, WANG X, WANG X, *et al*. Molecular characterization and virulence gene profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with bloodstream infections in southern China [J]. Frontiers in microbiology, 2022, 13: 1008052.

[21] LIU L, PENG H, ZHANG N, *et al*. Genomic epidemiology and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* from a tertiary hospital in Tianjin Municipality, Northern China [J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(2): e0420922.

[22] PRICE LB, STEGGER M, HASMAN H, *et al*. *Staphylococcus aureus* CC398: Host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock [J]. mBio, 2012, 3(1): e00305–11.

[23] CHEN H, YIN Y, LI X, *et al*. Whole-genome analysis of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398 strains isolated from patients with bacteremia in China [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2020, 221(Suppl 2): S220–S228.

[24] LI X, XIE L, HUANG H, *et al*. Prevalence of livestock-associated MRSA ST398 in a swine slaughterhouse in Guangzhou, China [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 914764.

[25] MACKIE RI, KOIKE S, KRAPAC I, *et al*. Tetracycline residues and tetracycline resistance genes in groundwater impacted by swine production facilities [J]. Animal Biotechnology, 2006, 17(2): 157–176.

[26] COCCITTO SN, CINTHI M, SIMONI S, *et al*. Identification of plasmids co-carrying cfr(D)/optrA and cfr(D2)/poxtA linezolid resistance genes in two *Enterococcus avium* isolates from swine brain [J]. Veterinary Microbiology, 2023, 282: 109749.

[27] COCCITTO SN, CINTHI M, FIORITI S, *et al*. Linezolid-resistant *Enterococcus gallinarum* isolate of swine origin carrying *cfr*, *optrA* and *poxtA* genes [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2022, 77(2): 331–337.

[28] ZHAO N, CHENG D, YANG Z, *et al*. Virulence adaption to environment promotes the age-dependent nasal colonization of *Staphylococcus aureus* [J]. Emerging Microbes & Infections, 2022, 11(1): 1402–1415.

[29] KLEIN S, MORATH B, WEITZ D, *et al*. Comparative genomic reveals clonal heterogeneity in persistent *Staphylococcus aureus* infection [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 817841.

[30] ZHANG P, ZHANG Y, RUAN F, *et al*. Genotypic diversity of staphylococcal enterotoxin B gene (*seb*) and its association with molecular characterization and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* from retail food [J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 408: 110444.

[31] ARCHER NK, MAZAITIS MJ, COSTERTON JW, *et al*. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation, and roles in human disease [J]. Virulence, 2011, 2(5): 445–459.

(责任编辑: 韩晓红　于梦娇)