

• 论 著 •

金黄色葡萄球菌在人工关节感染中的分子型别与耐药基因特征*

梁玉龙,程 翔,魏 莹,刘 颖,郭 宇[△]

首都医科大学附属北京积水潭医院医学检验中心,北京 100035

摘要:目的 探讨导致人工关节假体周围感染(PJI)的金黄色葡萄球菌的抗菌药物耐药率、耐药基因和分子型别,为抗感染治疗提供依据和流行病学信息。**方法** 收集 2017 年 1 月至 2022 年 1 月该院 80 例髋膝 PJI 患者关节液及假体周围组织中分离的金黄色葡萄球菌,进行抗菌药敏试验,分析其对骨科常用抗菌药物的耐药率;对菌株进行全基因组测序和生物信息学分析,研究其耐药基因携带情况;采用多位点序列分型(MLST)进行菌株分型和系统发育分析,比较主要流行分子型别对抗菌药物的耐药差异。**结果** 该研究共收集 80 株金黄色葡萄球菌,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)检出率为 26.25%,甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)检出率为 73.75%。耐药性分析结果显示,MRSA 对红霉素、克林霉素、氟喹诺酮类药物和四环素的耐药率较高,未发现对万古霉素、利奈唑胺和替加环素耐药菌株。95%的金黄色葡萄球菌携带耐药基因,其中 β-内酰胺类耐药基因检出率最高(92.50%)。MRSA 平均携带 4.3 种耐药基因,MSSA 平均携带 2.2 种。金黄色葡萄球菌小菌落变异体(SCVs)检出率为 23.75%。MLST 结果显示,PJI 中金黄色葡萄球菌主要流行克隆复合物型别为 ST-398 型(22.50%)、ST-5 型(13.75%)和 ST-59 型(11.25%)。ST-59 型金黄色葡萄球菌的万古霉素最低抑菌浓度相对较高。**结论** 万古霉素、利奈唑胺可作为 PJI 中抗 MRSA 感染的主要选择;PJI 中金黄色葡萄球菌 SCVs 检出率较高;ST-398、ST-5、ST-59 型是该院 PJI 金黄色葡萄球菌的主要流行克隆菌株,应针对不同金黄色葡萄球菌克隆类型采取个性化抗感染治疗策略。

关键词:人工关节假体周围感染; 金黄色葡萄球菌; 多位点序列分型; 耐药基因; 小菌落变异体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.23.014 **中图法分类号:**R446.5

文章编号:1673-4130(2023)23-2886-07 **文献标志码:**A

Molecular types and drug resistance gene characteristics of *Staphylococcus aureus* in periprosthetic joint infection*

LIANG Yulong, CHENG Xiang, WEI Ying, LIU Ying, GUO Yu[△]

Department of Clinical Laboratory, Beijing Jishuitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100035, China

Abstract: Objective To investigate the antimicrobial resistance rate, drug resistance genes and molecular types of *Staphylococcus aureus* in periprosthetic joint infection (PJI), and to provide evidence and epidemiological information for anti-infection treatment. **Methods** The *Staphylococcus aureus* isolated from the synovial fluid and periprosthetic tissues of 80 patients with hip and knee PJI in the hospital from January 2017 to January 2022 were collected for antimicrobial sensitivity test, and the drug resistance rate of *Staphylococcus aureus* to commonly used antibiotics in orthopedics was analyzed. Whole genome sequencing and bioinformatics analysis were performed to investigate the prevalence of drug resistance genes. Multipoint sequence typing (MLST) was used for typing and phylogenetic analysis, and the differences in antimicrobial resistance among the main molecular types were compared. **Results** A total of 80 strains of *Staphylococcus aureus* were collected in this study. The detection rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was 26.25%, and the detection rate of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) was 73.75%. The results of drug resistance analysis showed that MRSA had high resistance rates to erythromycin, clindamycin, fluoroquinolones and tetracycline, and no strains resistant to vancomycin, linezolid, and tigecycline were found. 95% of *Staphylococcus aureus* carried drug resistance genes, and the detection rate of β-lactam resistance genes was the highest (92.50%). MRSA and MSSA carried 4.3 and 2.2 drug resistance genes on average. The detection rate

* 基金项目:首都医科大学附属北京积水潭医院自然基金培育计划(ZR-202117)。
作者简介:梁玉龙,男,技师,主要从事临床微生物学相关研究。 △ 通信作者, E-mail: guoyu_jst@163.com。
网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20231127.1719.012.html\(2023-11-29\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20231127.1719.012.html(2023-11-29))

of small colony variants (SCVs) in *Staphylococcus aureus* was 23.75%. MLST results showed that the main clonal complex types of *Staphylococcus aureus* in PJI were ST-398 (22.50%), ST-5 (13.75%) and ST-59 (11.25%). The minimal inhibitory concentration of vancomycin in ST-59 *Staphylococcus aureus* was relatively high. **Conclusion** Vancomycin and linezolid can be used as the main choice for anti-MRSA infection in PJI. The detection rate of *Staphylococcus aureus* SCVs in PJI is high. ST-398, ST-5 and ST-59 were the main epidemic clones of *Staphylococcus aureus* in PJI in this hospital. Individualized anti-infection treatment strategies should be taken according to different *Staphylococcus aureus* clones.

Key words: prosthetic joint infection; *Staphylococcus aureus*; multipoint sequence typing; drug resistance genes; small colony variants

人工关节置换术是治疗髌膝关节退行性病变、关节畸形等晚期骨关节疾病的有效手段,然而人工关节假体周围感染(PJI)是置换术后的最严重并发症,造成患者产生极大痛苦和生活质量的降低。尽管髌关节置换术后 PJI 发生率仅为 1%,膝关节置换术后发生率在 1%~2%,但由于人工关节置换术的基数较大,PJI 患者总数仍较大^[1-3]。PJI 一旦发生,诊断与治疗过程复杂,给患者和临床医师都带来重大挑战,且研究显示 PJI 复发率在 15%~30%,因感染而进行的翻修手术失败率高达 40%^[4],这进一步凸显出 PJI 带来的灾难性后果。导致 PJI 的主要病原体包括葡萄球菌、肠杆菌和链球菌等^[5],其中金黄色葡萄球菌是最常见的致病菌^[6-7]。目前关于 PJI 中金黄色葡萄球菌的分子病原学研究较少。因此了解 PJI 中金黄色葡萄球菌的药物敏感性和分子病原学特征对临床预防和控制感染具有重要意义。本研究对 2017 年 1 月至 2022 年 1 月首都医科大学附属北京积水潭医院矫形骨科人工关节置换术后金黄色葡萄球菌的分离情况、耐药性和分子分型进行了分析调查,旨在为临床预防和治疗 PJI 提供更多参考信息。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究所用菌株来源于 2017 年 1 月至 2022 年 1 月首都医科大学附属北京积水潭医院矫形骨科收治的 80 例髌膝关节 PJI 患者的关节液标本。在两个或更多标本中检出同一菌株时视为病原菌。对 80 例患者病历资料进行了回顾性分析,包括 48 例男性和 32 例女性,平均年龄(53±16)岁。所有患者均符合肌肉与骨骼感染协会关于 PJI 的诊断标准^[8],其中 34 例为髌关节 PJI,56 例为膝关节 PJI。本研究排除了重复菌株,对于同一患者多次分离出相同菌株的情况,选择首次分离的菌株作为研究对象。参考菌株采用金黄色葡萄球菌 ATCC29213。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养及鉴定 在无菌条件下,抽取 PJI 患者关节穿刺液并注入血培养瓶中(美国 BD 公司)。将血培养瓶置于全自动体液及血液培养仪(BACTEC FX100,美国 BD 公司)进行培养。当培养仪检测到阳性血培养瓶时,取 1 mL 培养液接种于哥伦比亚血琼

脂平皿(中国郑州安图公司),并将平皿放入 35℃ 温箱中进行培养。对分纯后的菌落使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS,德国布鲁克公司)进行鉴定,结果为金黄色葡萄球菌。通过观察菌落形态筛选金黄色葡萄球菌小菌落变异体(SCVs)^[9]。具体方法为在 24、48 h 分别观察菌落形态,挑选直径明显小于正常菌落的菌株(直径约为金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的 1/10),并通过质谱鉴定为金黄色葡萄球菌。所有菌株均存储于-80℃ 冰箱中备用。

1.2.2 抗菌药敏试验 利用全自动微生物药敏分析系统(VITEK 2 Compact,法国生物梅里埃公司)和梅里埃革兰阳性菌药敏卡(GP-67,法国生物梅里埃公司)对菌株进行抗菌药敏试验,以测定抗菌药物对细菌的最低抑菌浓度(MIC)。依据美国临床和实验室标准协会 2021 版 M100-31 折点判读标准^[10],将药敏结果分为耐药、中介和敏感,以金黄色葡萄球菌 ATCC29213、铜绿假单胞菌 ATCC27853 和大肠埃希菌 ATCC25922 作为药敏试验质控菌株。

1.2.3 全基因组测序 (1)菌株 DNA 提取:单个菌落接种于 10 mL TSB 培养液,24 h 振荡培养后以 10 000 r/min 离心 5 min,收集菌体沉淀。采用 TI-ANamp DNA 提取试剂盒(中国天根生化科技有限公司)进行 DNA 提取,利用 Qubit 4 荧光定量仪(美国 ThermoFisher 公司)对 DNA 进行定量和质量检测。满足要求的 DNA(A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0, DNA 总量 $\geq 1 \mu\text{g}$,浓度 $\geq 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$)用于文库构建及测序。(2)文库构建及测序:取至少 1 μg 基因组 DNA,使用 Covaris 对其进行片段化处理,应用 NEXTflex Rapid DNA-Seq 试剂盒制备文库,通过 Illumina HiSeq X Ten 仪器(美国 Illumina 公司)进行双端测序。利用 <https://github.com/OpenGene/fastp> 对原始测序数据进行剪切,使用 SOAP denovo2 进行拼接,通过比对工具和美吉生物云平台进行基因功能预测和注释。(3)抗菌药物耐药基因注释:通过 Resistance Gene Identifier (<https://card.mcmaster.ca>) 及 ResFinder 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk>) 对细菌基因组序列进行抗菌药物耐药基因的注释和统计。(4)多点位序列

分型(MLST):利用金黄色葡萄球菌 7 个等位基因(arcC、aroE、glpF、gmk、pta、tpi、yqiL)编码与 MLST 数据库(<https://pubmlst.org>)进行比对,以确定其序列分型及克隆复合物型别(CCs)^[11]。使用 goeBURST(<http://goeburst.phyloviz.net>)构建最小生成树,比较不同分子型别间的耐药率差异。

1.2.4 统计学处理 使用 WHONET5.6 软件对细菌耐药率和 MIC90 进行分析。采用 SPSS25.0 统计学软件对数据进行处理和分析。药敏结果采用 Wilcoxon 秩和检验,不同分子分型组间比较采用 χ^2 检验。当频数小于 5 时,则采用 Fisher 精确检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 药敏试验结果表明,在 80 株金黄色葡萄球菌中,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)检出率为 26.25%(21/80),而甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)检出率为 73.75%(59/80)。对于常用抗菌药物,MRSA 的耐药率从高到低分别为青霉素、甲氧西林和头孢西丁均为 100.00%(21/21)、红霉素 66.7%(14/21)、克林霉素 57.1%(12/21)、环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星和四环素均为 38.1%(8/21)、庆大霉素为 23.8%(5/21)、利福平为 14.3%(3/21)、复方磺胺甲噁唑为 9.5%(2/21)。相较之下,MSSA 对抗菌药物的耐药率普遍较低,除对青霉素 G 的耐药率为 88.1%(52/59),其他抗菌药物的耐药率均低于 62.0%。值得注意的是,本研究未发现对万古霉素、利奈唑胺和替加环素耐药的菌株。对比 MRSA 和 MSSA 的耐药情况,MRSA 对氟喹诺酮类药物如环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星及四环素的耐药率高于 MSSA($P < 0.05$);然而 MSSA 分离菌株对复方磺胺甲噁唑的耐药率明显高于 MRSA 菌株($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 耐药基因检出情况 通过对细菌基因组拼接序列与耐药基因数据库比对,研究发现 95%的菌株携带耐药基因。这些耐药基因包括 6 种氨基糖苷类、5 种大环内酯-林可酰胺-链阳菌素 B 类(MLSB 类)、2 种 β -内酰胺类、2 种四环素类,以及各 1 种甲氧苄啶类、磷霉素类、氯霉素类、消毒剂和夫西地酸相关耐药基因。本研究中 β -内酰胺类耐药基因检出率最高,为 92.50%,其次是 MLSB 类耐药基因(65.00%)、氨基糖苷类耐药基因(42.50%)、四环素类耐药基因(15.00%)、甲氧苄啶类耐药基因(10.00%)、磷霉素类、氯霉素类和消毒剂耐药基因各占 2.50%。所有菌株的耐药基因平均携带数量为 2.7 种,MSSA 平均携带 2.2 种耐药基因,而 MRSA 平均携带 4.3 种。blaZ-mecA 是 MRSA 菌株的主要耐药基因表型,检出率为 28.57%(6/21)。其次是 blaZ-mecA-erm(B)-tet(K)-ant(6)-I a - aph(3')-III 耐药基因表型,检出率为

14.29%(3/21)。在 MSSA 菌株中,blaZ 是主要耐药基因表型,检出率为 28.81%(17/59)。其次是 blaZ-erm(B)-aph(2'')-I a 耐药基因表型,检出率为 25.42%(15/59)。见表 2、3。

表 1 MRSA 与 MSSA 对不同抗菌药物的耐药情况

抗菌药物	MRSA(<i>n</i> =21)		MSSA(<i>n</i> =59)		<i>Z</i>	<i>P</i>
	耐药株数	MIC90	耐药株数	MIC90		
	(<i>n</i>)		(<i>n</i>)			
青霉素 G	21	0.5	52	0.5	-1.642	0.101
甲氧西林	21	4	0	2	N/A	N/A
头孢西丁	21	8	0	2	N/A	N/A
庆大霉素	5	16	9	16	-0.043	0.966
利福平	3	32	3	0.5	-1.598	0.11
环丙沙星	8	8	7	8	-2.416	0.016
左氧氟沙星	8	8	7	4	-2.628	0.009
莫西沙星	8	8	4	1	-2.813	0.005
复方磺胺甲噁唑	2	2	22	16	-2.396	0.018
克林霉素	12	8	19	8	-1.925	0.054
红霉素	14	8	36	8	-0.409	0.682
利奈唑胺	0	2	0	2	N/A	N/A
万古霉素	0	1	0	1	N/A	N/A
四环素	8	16	4	1	-3.430	0.001
替加环素	0	0.25	0	0.125	N/A	N/A

注:N/A 表示未做统计学分析。

表 2 金黄色葡萄球菌中各类耐药基因的检出情况

抗菌药物	耐药基因	株数(<i>n</i>)	检出率(%)	总检出率(%)
β -内酰胺类	blaZ	70	87.50	92.50
	mecA	21	26.25	
MLSB 类	erm(B)	27	33.75	65.00
	erm(c)	19	23.75	
	erm(A)	7	8.75	
	Inu(G)	2	2.50	
	Inu(A)	1	1.25	
四环素类	tet(K)	7	8.75	15.00
	tet(M)	5	6.25	
氨基糖苷类	aph(2'')-I a	20	25.00	42.50
	ant(6)-I a	8	10.00	
	aph(3')-III	8	10.00	
	ant(9)-I a	6	7.50	
	aac(6')-aph(2'')	3	3.75	
	aadD	2	2.50	
甲氧苄啶类	df rG	8	10.00	10.00
磷霉素类	fosB	2	2.50	2.50
氯霉素类	qacA	2	2.50	2.50
消毒剂	cat(pC233)	2	2.50	2.50
夫西地酸	fusB	0	0.00	0.00

2.3 SCVs 检出情况 本研究中共检测出 19 株金黄色葡萄球菌 SCVs, 占总菌株的 23.75% (19/80)。在 MRSA 和 MSSA 菌株中, SCVs 的检出率分别为 28.57% (6/21) 和 22.03% (13/59), 差异无统计学意

义($P>0.05$)。然而, 与正常菌落形态的金黄色葡萄球菌菌株(NP)比较, SCVs 对利福平的耐药率升高($P<0.05$), 而对其他抗菌药物的耐药率差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 3 金黄色葡萄球菌耐药基因谱和检出率

耐药基因谱	检出率(%)	耐药基因谱	检出率(%)
MRSA		MSSA	
blaZ-mecA	28.57	blaZ-erm(c)	11.86
blaZ-mecA-erm(B)-tet(K)-ant(6)-Ia-aph(3')-III	14.29	blaZ-dfrG	5.08
blaZ-mecA-erm(c)	9.52	blaZ-erm(c)-dfrG	3.39
blaZ-mecA-tet(K)	4.76	blaZ-Inu(G)	1.69
blaZ-mecA-aadD	4.76	blaZ-erm(c)-Inu(G)-tet(K)	1.69
blaZ-mecA-erm(B)-aph(2'')-Ia	4.76	blaZ-erm(B)-tet(K)	1.69
mecA-erm(A)-erm(B)-ant(6)-Ia-aph(3')-III	4.76	blaZ-erm(A)-ant(9)-Ia	1.69
blaZ-mecA-erm(B)-aph(2'')-Ia-ant(6)-Ia-aph(3')-III	4.76	blaZ-erm(B)-aph(2'')-Ia-ant(6)-Ia	1.69
mecA-erm(A)-erm(c)-tet(M)-ant(9)-Ia-aac(6')-aph(2'')	4.76	blaZ-erm(c)-tet(K)-dfrG	1.69
blaZ-mecA-erm(A)-erm(c)-tet(M)-ant(9)-Ia-aac(6')-aph(2'')	4.76	blaZ-erm(B)-ant(6)-Ia-aph(3')-III-cat(pC233)	1.69
mecA-erm(A)-tet(M)-ant(9)-Ia	4.76	blaZ-erm(B)-aph(2'')-Ia-fosB	1.69
blaZ-mecA-erm(B)-ant(6)-Ia-aph(3')-III-cat(pC233)	4.76	blaZ-Inu(A)-aadD-fosB	1.69
blaZ-mecA-erm(A)-tet(M)-ant(9)-Ia-aac(6')-aph(2'')-aph(3')-III-dfrG-qacA	4.76	erm(B)-aph(2'')-Ia	1.69
MSSA		dfrG	1.69
blaZ	28.81	未检出耐药基因	6.78
blaZ-erm(B)-aph(2'')-Ia	25.42		

表 4 SCVs 和 NP 药敏结果比较

抗菌药物	SCVs(<i>n</i> =19)		NP(<i>n</i> =61)		<i>Z</i>	<i>P</i>
	耐药	MIC90	耐药	MIC90		
	株数 (<i>n</i>)		株数 (<i>n</i>)			
青霉素 G	18	0.5	55	0.5	−0.612	0.540
甲氧西林	6	4	15	4	−0.601	0.548
头孢西丁	6	8	15	8	−0.601	0.548
庆大霉素	4	16	10	16	−0.110	0.912
利福平	4	32	2	0.5	−2.717	0.007
环丙沙星	6	8	9	8	−1.573	0.116
左旋氧氟沙星	6	8	9	4	−1.630	0.103
莫西沙星	5	4	7	2	−1.650	0.099
复方磺胺甲噁唑	5	16	19	16	−0.399	0.690
克林霉素	8	8	23	8	−0.265	0.791
红霉素	13	8	37	8	−0.564	0.573
利奈唑胺	0	2	0	2	N/A	N/A
万古霉素	0	1	0	1	N/A	N/A
四环素	5	16	7	16	−1.572	0.116
替加环素	0	0.5	0	0.125	N/A	N/A

注: N/A 表示未做统计学分析。

2.4 菌株分子型别及分析 在本研究中, 检出金黄色葡萄球菌的 8 种 CCs, 包括 CC1、CC22、CC30、CC398、CC45、CC5、CC59 和 CC8, 另有 12 株菌株未分型。通过 MLST 方法, 共鉴定出 22 个 ST 型别, 其中 ST-398 型占主导地位, 检出率为 22.50% (18/80), 其次为 ST-5 型 (13.75%, 11/80) 和 ST-59 型 (11.25%, 9/80)。在对主要流行的 ST 耐药性进行比较后发现, ST-59 型的 MRSA 检出率最高, 为 77.8% (7/9), 而 ST-5 型和 ST-398 型的 MRSA 检出率分别为 18.2% (2/11) 和 16.7% (3/18)。见图 1。

在 ST-59 型金黄色葡萄球菌中, 红霉素和克林霉素的耐药率较高 (77.8%), 同时 ST-59 型对四环素的耐药率高于 ST-398、ST-5 型 ($P<0.05$)。然而 ST-59 型对庆大霉素和复方磺胺甲噁唑的耐药率相对较低 ($P<0.05$), 见表 5。ST-398、ST-5、ST-59 型金黄色葡萄球菌 SCVs 的检出率分别为 11.11%、18.18% 和 44.44%, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。值得关注的是, 尽管 ST-398、ST-5、ST-59 型金黄色葡萄球菌对万古霉素均敏感, 但 ST-59 型金黄色葡萄球菌的万古霉素 MIC 值相对较高, 其 MIC 值为 1 的比例为 66.7%, 高于其他类型 ($P<0.05$), 见表 6。

表 5 ST-398、ST-5、ST-59 型金黄色葡萄球菌药敏结果

抗菌药物	ST-398 型(<i>n</i> =18)		ST-5 型(<i>n</i> =11)		ST-59 型(<i>n</i> =9)		χ^2	<i>P</i>
	耐药率(%)	MIC90	耐药率(%)	MIC90	耐药率(%)	MIC90		
青霉素 G	83.3	0.5	90.9	0.5	88.9	0.5	0.468	1.000
甲氧西林	16.7	4	18.2	4	77.8	4	10.389	0.050
头孢西丁	16.7	8	18.2	8	77.8	8	10.389	0.050
庆大霉素	5.6	8	45.5	16	0.0	0.5	8.122	0.009
利福平	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	2	N/A	N/A
环丙沙星	5.6	0.5	18.2	8	11.1	8	1.430	0.673
左旋氧氟沙星	5.6	0.5	18.2	8	11.1	8	1.430	0.673
莫西沙星	5.6	0.25	18.2	4	11.1	2	1.430	0.673
复方磺胺甲噁唑	33.3	16	54.5	16	0.0	1	7.050	0.026
克林霉素	33.3	8	45.5	8	77.8	8	4.633	0.111
红霉素	55.6	8	90.9	8	77.8	8	4.120	0.136
利奈唑胺	0.0	2	0.0	2	0.0	2	N/A	N/A
万古霉素	0.0	1	0.0	1	0.0	1	N/A	N/A
四环素	5.6	0.25	18.2	0.25	44.4	0.25	5.501	0.043
替加环素	5.6	1	18.2	16	44.4	16	N/A	N/A

注:N/A 表示未做统计学分析。

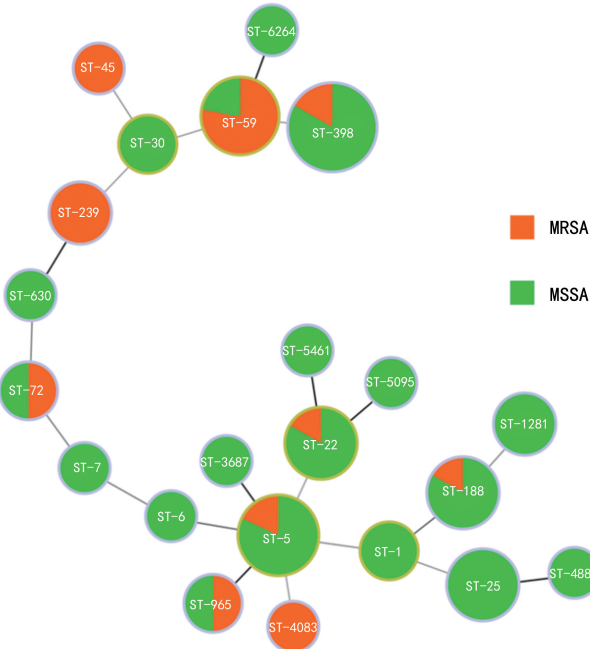


图 1 菌株系统发育树及不同 ST 型别中 MRSA 检出情况

表 6 ST-398、ST-5、ST-59 型金黄色葡萄球菌 SCVs 检出率、万古霉素 MIC 值的比较(%)

项目	ST-398 型	ST-5 型	ST-59 型	χ^2	<i>P</i>
SCVs	11.11	18.18	44.44	3.728	0.173
MIC=0.5	88.90	63.60	33.30	8.459	0.013
MIC=1	11.10	36.40	66.70		

3 讨 论

PJI 作为关节置换术后的严重并发症之一,是导致患者进行关节翻修的主要原因^[12],也是关节外科医

师无法回避的难题。人工关节感染常需进行多次手术和持续抗菌药物治疗,临床表现为并发症多、病程长、治疗费用高^[13]。尽管现代关节置换术中已严格执行无菌操作,但仍难以完全避免感染,且 PJI 发生与多种危险因素相关,如美国麻醉医师协会评分、体重指数(BMI)、肺部疾病、糖尿病等^[14]。有研究表明,金黄色葡萄球菌是 PJI 的主要致病菌,具有较强的毒力和侵袭性,常导致急性 PJI 发生,该菌也可在感染部位形成生物膜,导致感染反复发作和慢性化^[15]。此外金黄色葡萄球菌耐药性已引起广泛关注,由 MRSA 引起的 PJI,会进一步增加治疗难度。因此研究金黄色葡萄球菌在 PJI 中的分子型别和耐药基因分布,有助于精准抗感染治疗。

近年来随着抗菌药物规范化管理与应用,MRSA 检出率呈下降趋势,中国细菌耐药监测网数据显示,2022 年我国 MRSA 总检出率为 28.70%。本研究中 MRSA 和 MSSA 检出率分别为 26.25%和 73.75%。MRSA 检出率与其他类型感染大致相同^[16]。MRSA 对多种骨科常用抗菌药物均表现出较高耐药率,尤其是红霉素、克林霉素和氟喹诺酮类药物,这与此类药物广泛使用形成的抗菌药物选择性压力有关。MRSA 对抗菌药物耐药率普遍高于 MSSA,但对复方磺胺甲噁唑的耐药率明显低于后者($P<0.05$),可能与某些耐药基因的分布特点或耐药机制差异有关^[17],提示复方磺胺甲噁唑对 MRSA 具有良好抗菌活性,或可作为备选用药。本研究未发现对万古霉素、利奈唑胺和替加环素耐药的菌株,表明这些药物仍是为抗 MRSA 感染的主要选择。

在本研究中发现金黄色葡萄球菌菌株携带的耐药基因种类繁多,其中 β -内酰胺类耐药基因检出率最高,这与其他研究的结果较一致^[18]。此外 MLSB 类和氨基糖苷类耐药基因的检出率也较高,分别为 65.00%和 42.50%,可能与这些抗菌药物在治疗金黄色葡萄球菌感染中的广泛应用有关^[19]。值得关注的是 MRSA 菌株与 MSSA 菌株在耐药基因的携带数量和种类上存在明显差异,MRSA 平均携带 4.3 种耐药基因,而 MSSA 仅携带 2.2 种,这可能是由于 MRSA 菌株在面临抗菌药物压力时更容易获得和传播耐药基因^[20]。在 MRSA 和 MSSA 菌株中,blaZ、mecA 和 erm 等耐药基因较为常见,这与以往的研究结果一致^[21]。总之,金黄色葡萄球菌的耐药性和耐药基因检出具有一致性,了解耐药基因的分布特点有助于指导临床选择抗菌药物。

本研究中检出 19 株金黄色葡萄球菌 SCVs,检出率为 23.75%,高于其他感染类型^[22]。SCVs 自 1910 年首次在伤寒沙门菌中被发现以来,已在多种细菌中观察到,如金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌等,其显著特点包括生长缓慢和形成小型菌落,特殊环境条件和长期抗菌药物治疗可能导致病原菌生活方式的改变^[9,23]。值得注意的是金黄色葡萄球菌 SCVs 与慢性感染密切相关,它们能通过多种策略实现免疫逃逸,并定植骨骼和人工关节^[24]。本研究发现 SCVs 菌株对利福平的耐药率高于 NP 菌株,利福平作为骨科常用抗菌药物,在细胞内可持续降低细菌活性,常用于抗生物膜感染。为防止其耐药性出现,建议与其他抗菌药物联合使用^[25]。

为进一步了解金黄色葡萄球菌在 PJI 中的流行特征、耐药性及演化情况,本研究对实验菌株进行了 MLST 和系统发育研究。MLST 是作为一种高分辨率分型技术,有助于了解病原菌亲缘关系和种群进化过程^[26]。本研究中 MRSA 菌株中共检出 10 种 ST 型别,其中 ST-59 型为优势型,有流行病学调查显示 ST-59 型是金黄色葡萄球菌 PJI 中的常见表型^[27],本研究结果与此相符。ST-59 型与 MRSA 密切相关,作为一种主要的金黄色葡萄球菌克隆类型,其具有较高的耐药性和传播能力^[28]。MSSA 菌株中共检出 19 种 ST 型别,其中 ST-398 型为优势型。总之 PJI 中金黄色葡萄球菌呈现出多样化的分子型别,ST-398、ST-5 和 ST-59 型是主要流行克隆株。进一步分析以上 3 种主要流行克隆株的特征,发现 ST-398、ST-5、ST-59 型金黄色葡萄球菌在 PJI 中具有不同的 SCVs 检出率,尽管差异无统计学意义($P>0.05$),但 ST-59 型具有较高的 SCVs 检出率,可能与其独特的耐药和生物学特性有关,有待进一步研究。值得注意的是,虽然这 3 种类型的金黄色葡萄球菌对万古霉素均敏感,但 ST-59 型的万古霉素 MIC 值相对较高,提示监测

这些类型金黄色葡萄球菌的万古霉素敏感性和 MIC 值变化具有实际意义^[29],在 PJI 治疗中,针对不同的金黄色葡萄球菌克隆型,可能需要采取更加个性化的抗感染治疗策略。本研究也存在一些局限性,如研究样本量偏小、仪器法测定金黄色葡萄球菌 SCVs 药物敏感性可能存在偏差,并未进行药敏纸片法复核等。

综上所述,本研究发现 MRSA 与 MSSA 在 PJI 中的检出率分别为 26.25%和 73.75%,MRSA 菌株对抗菌药物耐药率普遍较高,MRSA 菌株中耐药基因携带数量和种类也多于 MSSA。万古霉素、利奈唑胺仍可作为抗 MRSA 感染的主要选择。PJI 中金黄色葡萄球菌 SCVs 检出率较高,造成此类感染诊疗困难。金黄色葡萄球菌在 PJI 中的分子分型呈现多样化,ST-398、ST-5、ST-59 型为主要流行克隆株,其中 ST-59 型金黄色葡萄球菌的 SCVs 检出率较高,且万古霉素 MIC 值相对较高,提示对不同金黄色葡萄球菌克隆类型应采取个性化的抗感染治疗策略。

参考文献

- [1] DALE H, HALLAN G, ESPEHAUG B, et al. Increasing risk of revision due to deep infection after hip arthroplasty [J]. *Acta Orthop*, 2009, 80(6): 639-645.
- [2] KOH C K, ZENG I, RAVI S, et al. Periprosthetic joint infection is the main cause of failure for modern knee arthroplasty: an analysis of 11 134 knees [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2017, 475(9): 2194-2201.
- [3] KURTZ S, ONG K, LAU E, et al. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030 [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2007, 89(4): 780-785.
- [4] BASSETTI M, PEGHIN M, CARNELUTTI A, et al. Prosthetic joint infections: prevention and management in clinical practice [J]. *J Chem*, 2021, 33(1): 1-14.
- [5] 周历程, 李国庆, 胥伯勇, 等. 急性、迟发性和慢性假体周围感染的病原菌分布及耐药性分析 [J]. *中华外科杂志*, 2021, 59(6): 484-490.
- [6] HOLMBERG A, THÓRHALLSDÓTTIR V G, ROBERTSSON O, et al. 75% success rate after open debridement, exchange of tibial insert, and antibiotics in knee prosthetic joint infections [J]. *Acta Orthopaedica*, 2015, 86(4): 457-462.
- [7] 陈志, 周宗科, 沈彬, 等. 急性、迟发性、慢性假体周围感染的病原学特征及疗效分析 [J]. *实用骨科杂志*, 2019, 25(4): 313-316.
- [8] PARVIZI J, ZMISTOWSKI B, BERBARI E F, et al. New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2011, 469(11): 2992-2994.
- [9] PROCTOR R, VON EIFF C, KAHL B, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections [J]. *Nat Rev Microbi-*

- ol, 2006, 4(4):295-305.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-31[S]. Wayne, PA, USA; CLSI, 2021.
- [11] 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.
- [12] DELANOIS R E, MISTRY J B, GWAM C U, et al. Current epidemiology of revision total knee arthroplasty in the United States[J]. J Arthroplasty, 2017, 32(9):2663-2668.
- [13] NAMBA R S, INACIO M C, PAXTON E W, et al. Risk factors associated with deep surgical site infections after primary total knee arthroplasty: an analysis of 56, 216 knees[J]. J Bone Joint Surg Am, 2013, 95(9):775-782.
- [14] ZHONG J N, WANG B, CHEN Y F, et al. Relationship between body mass index and the risk of periprosthetic joint infection after primary total hip arthroplasty and total knee arthroplasty[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(7):464.
- [15] TSAI J C, SHENG W H, LO W Y, et al. Clinical characteristics, microbiology, and outcomes of prosthetic joint infection in Taiwan [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2015, 48(2):198-204.
- [16] 田本顺, 凌勇, 吕婧雯, 等. 152 例金黄色葡萄球菌血流感染的临床特征及预后分析[J]. 中华预防医学杂志, 2023, 57(2):241-246.
- [17] SATO T, ITO R, KAWAMURA M, et al. The risk of emerging resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole in *Staphylococcus aureus*[J]. Infect Drug Resist, 2022, 15:4779-4784.
- [18] 隋新霞, 冯霞, 邵春红, 等. 血流感染金黄色葡萄球菌分子生物学特征[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(10):1459-1463.
- [19] SARROU S, MALLI E, TSILIPOUNIDAKI K, et al. MLSB-resistant *Staphylococcus aureus* in central Greece: rate of resistance and molecular characterization [J]. Microb Drug Resist, 2019, 25(4):543-550.
- [20] YANG S, LIU J, SHAO F, et al. Analysis of the features of 45 identified CRISPR loci in 32 *Staphylococcus aureus* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(3):894-900.
- [21] SOGUT M U, BAS B, BILGIN M, et al. Molecular analysis and genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from different clinical sources[J]. Niger J Clin Pract, 2020, 23(7):912-918.
- [22] YAGCI S, HASCELIK G, DOGRU D, et al. Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients[J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(1):77-84.
- [23] TUCHSCHERR L, KREIS C A, HOERR V, et al. *Staphylococcus aureus* develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis[J]. J Antimicrob Chemother, 2016, 71(2):438-448.
- [24] ZHOU S Z, RAO Y F, LI J, et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants: formation, infection, and treatment [J]. Microbiol Res, 2022, 260:127040.
- [25] ZIMMERLI W, SENDI P. Role of rifampin against staphylococcal biofilm infections in vitro, in animal models, and in orthopedic-device-related infections[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(2):e01746-18.
- [26] 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):3140-3145.
- [27] CHEN J L, HUANG T Y, HSU W B, et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from periprosthetic joint infections[J]. Pathogens, 2022, 11(7):719.
- [28] WANG H P, ZHUANG H M, JI S J, ET al. Distribution of *erm* genes among MRSA isolates with resistance to clindamycin in a Chinese teaching hospital[J]. Infect Genet Evol, 2021, 96:105127.
- [29] ALJOHANI S, LAYQAH L, MASUADI E, et al. Occurrence of vancomycin MIC creep in methicillin resistant isolates in Saudi Arabia[J]. J Infect Public Health, 2020, 13(10):1576-1579.

(收稿日期:2023-04-03 修回日期:2023-10-12)