

研究报告

四株ST9型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的全基因组序列分析

陈怡文,王珊珊,石继春,徐颖华,崔生辉
(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

摘要:目的 了解不同来源ST9耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的全基因组特征。方法 对收集的4株分离自猪胴体和屠宰工作人员的ST9 MRSA菌株进行全基因组序列测序,分析ST9 MRSA的基因特征、耐药基因和毒力基因携带情况,利用比较基因组学筛选单核苷酸多态性(SNP),并与NCBI收录的11株不同ST型的MRSA和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌菌株进行核心基因分析,构建系统发育树。结果 4株不同来源ST9 MRSA全基因组序列全长约为2.6 Mbp,共含有2 122~2 494个基因,基因组的平均GC含量为32.8%。不同来源菌株基因组中均含有26~31种耐药基因、44~56种毒力基因。4株ST9 MRSA与欧洲主要流行的ST398代表性菌株比较,核苷酸同源性高,菌株之间SNP数量少于300个。系统进化发育树分析结果显示ST9和ST398 MRSA在分子进化过程中分成了不同独立进化分支,家畜和人来源的MRSA菌株在分子进化中没有明显相关性。结论 本研究获得了不同来源ST9 MRSA全基因组基本特征的背景材料,了解了不同ST型MRSA分子进化溯源关系,为后续ST9 MRSA的分子流行病学和致病性机制研究提供科学指导。

关键词:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;ST9;全基因组测序;系统发育分析;比较基因组学分析

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)06-1135-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.06.002

Whole-genomes sequence analysis of four ST9 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

CHEN Yiwen, WANG Shanshan, SHI Jichun, XU Yinghua, CUI Shenghui

(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To explore the whole-genome characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Methods** Four ST9 MRSA strains isolated from pig carcasses and slaughter workers were collected and sequenced. The genetic characteristics, resistance genes and virulence genes of their genomes were analyzed. Single nucleotide polymorphism(SNPs) were screened by comparative genomics, and the comparisons with the core genes of 11 MRSA and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*(MSSA) with different ST type from NCBI were analyzed to construct a phylogenetic tree. **Results** The results showed that the full-length genomic sequence of the four ST9 MRSA strains from different sources was about 2.6 Mbp, of which contained 2 122-2 494 genes, and the average GC content of the genes in the four genomes was 32.8%. The genomes from different sources contained 26-31 drug resistance genes and 44-56 virulence genes. Compared with ST398 MRSA which was popular in Europe and other countries, the four ST9 MRSA strains had high nucleotide homology, and the numbers of SNPs between strains were less than 300. The phylogenetic tree analysis showed that ST9 and ST398 MRSA had been divided into different independent evolutionary branches in the molecular evolutionary courses. MRSA strains from animal and human origin had no obvious correlation in molecular evolution. **Conclusion** This study obtained background materials on the basic characteristics of the ST9 MRSA genome from different sources, which could help understand the molecular evolutionary traceability of different ST-type MRSA. These data will provide scientific guidance for subsequent studies on the molecular epidemiology and pathogenic mechanism of ST9 MRSA.

Key words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; ST9; whole genome sequencing; phylogenetic analysis; comparative genetic analysis

收稿日期:2022-01-29

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1603900)

作者简介:陈怡文 女 助理研究员 研究方向为食品化妆品微生物检验 E-mail:cyw5437@126.com

通信作者:徐颖华 男 研究员 研究方向为细菌性疫苗质量控制与微生物资源标准化研究 E-mail:xuyh@nifdc.org.cn

崔生辉 男 研究员 研究方向为食品药品微生物检验 E-mail:cuish@nifdc.org.cn

徐颖华和崔生辉为共同通信作者

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的出现和传播是世界性重要的公共问题^[1]。2005年在荷兰报道了第1例与猪相关的ST398 MRSA(MRSA-ST398)^[2]。迄今,很多国家已成功从家禽和牲畜中分离获得MRSA。不同的是,欧洲报道的牲畜MRSA菌株以ST398为主^[1,3-4],而在亚洲,从猪和农场工人分离的MRSA主要ST类型为ST9^[5-6]。且研究发现在养猪场生活或工作的屠宰场工人、兽医及其家人,感染MRSA风险增加,推测动物和人之间的传播途径可能是通过直接或间接地接触受污染的空气和环境^[7-9]。

由于传统金黄色葡萄球菌分型方法的分辨率有限,例如多位点序列分型和金黄色葡萄球菌A蛋白序列分型,无法深入了解不同ST型的MRSA分

子进化演变和流行病学特征^[10-11]。为更好地了解我国ST9 MRSA菌株分子进化特征,本研究对4株分离自不同省份家畜和人来源的ST9 MRSA进行全基因组测序,分析不同菌株基因组中的耐药基因和毒力基因,并与欧洲主要流行的ST398,以及其他不同代表性ST型的MRSA和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA)代表性菌株数据进行比较基因组学分析,构建核心基因的系统发育进化树,从而为解析ST9 MRSA基因组多样性和进化等研究提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 菌株

4株MRSA菌株来自于中国食品药品检定研究院,具体信息见表1。

表1 本研究中所用菌株的特征信息

Table 1 Characteristics of strains used in this study

国家	地区	菌株	分离来源	ST型	数据来源	备注
中国	陕西	HB2	屠宰工作人员	ST9	本研究	MRSA
	河北	F90	猪	ST9	本研究	MRSA
	河北	P5-10	猪	ST9	本研究	MRSA
	四川	A49	猪	ST9	本研究	MRSA
	台湾	TSAR02	人	ST9	NCBI登录号:NADB000000000	MRSA
	台湾	QR502	人	ST9	NCBI登录号:NADI000000000	MRSA
		A69	猪	ST9	NCBI登录号:JJOP010000000	MRSA
		BA01611	牛	ST9	NCBI登录号:LIRC000000000	MRSA
	某省	M1	人	ST59	NCBI登录号:LIDQ000000000	MRSA
		CUHK_188	人	ST188	NCBI登录号:JFFV000000000	MSSA
		3503	人	ST5	NCBI登录号:MBTB000000000	MRSA
	T0131	人	ST239	NCBI登录号:CP002643	MRSA	
荷兰	—	11P4	猪	ST398	NCBI登录号:JJDM000000000	MRSA
	—	43P8	猪	ST398	NCBI登录号:JJBB000000000	MRSA
	—	FP_N239	牛	ST398	NCBI登录号:JIYQ000000000	MRSA

注:—表示未给出信息

1.2 主要试剂和仪器

细菌培养箱购自中仪国科(北京)科技有限公司。普通营养琼脂培养基(北京三药公司科技开发公司);DNA提取试剂盒(德国Qiagen公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 细菌培养

将4株MRSA菌株复苏后分别接种至普通营养琼脂平板培养基中,按说明书要求对上述新鲜培养物进行细菌DNA提取,DNA样品放置-80℃保存备用。

1.4 全基因组测序和生物信息学分析

参考文献[12],采用Illumina公司solexa测序技术对上述提取的细菌全基因组DNA进行全基因组测序。应用软件velvet 1.2.03对上述测序菌株的下机的reads数据进行拼装,并应用glimmer 3.02进行基因预测;同时搜寻NCBI的NR库与SEED蛋

白数据库进行基因功能注释,利用CDD数据库进行直系同源簇(COG)分类。应用Virulence finder(<http://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>)和Resistance Gene Identifier(<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>)分别用于基因组中毒力因子和耐药基因的预测分析。以ST398 MRSA菌株11P4(NCBI:JJDM000000000)为参考进行测序的4株ST9菌株单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNPs)分析(表1)。同时与已发表的11株不同来源ST9和ST398 MRSA和MSSA菌株进行核心基因筛选,构建系统进化树。

2 结果

2.1 全基因组基本特征

将全基因组测序获得reads进行拼装,每株细菌获得23~29个数量不等基因组Contig片段。Contig

的 N50 数值从 20~49 kbp 大小不等。4 株 MSRA 的全基因组序列大小均约为 2.6 Mbp,基因组 GC 含量相似,平均 GC 含量为 32.8%。预测分析发现测序菌株基因组含有 2 122~2 494 个数量不等基因,COG 功能注释的每株菌株所包含预测编码蛋白为 1 729~1 986 个(表 2)。

以已发表 ST398 MRSA11P4 菌株为参考,在全基因组水平进行核苷酸一致性分析,显示本研究 4 株 ST9 型与 ST398 型间核苷酸序列共线性良好,呈反向镜面结构,核苷酸同源性均超过 95%。表明不同 ST 型的 MRSA 菌株基因组结构高度相似(图 1)。

表 2 4 株 MRSA 基因组特征

菌株	基因组大小/bp	基因数量	N50/bp	GC 含量/%	Contig 数量	COG 分类
HB2	2 729 883	2 491	495 151	32.80	23	1 974
F90	2 726 428	2 494	202 288	32.81	23	1 986
A49	2 600 782	2 384	148 647	32.81	29	1 898
P5-10	2 773 236	2 122	216 910	32.78	23	1 729

2.2 耐药基因分析

通过对基因组耐药基因注释分析,发现每株 MRSA 含有大量的耐药基因,数量在 26~31 种不等

表 3 4 株 MRSA 基因组耐药基因注释分析

Table 3 The drug resistance genes contained in the genomes of four MRSA strains

菌株	耐药基因数量	预测耐药基因产生抗性的抗生素
HB2	30	氨基香豆素类(1)、氨基糖苷类(1)、diaminopyrimidine(2)、elfamycin(1)、氟喹诺酮(7)、磷霉素(4)、褐霉素(2)、四环素类(4)、莫匹罗星(1)和多肽类(7)
F90	31	氨基香豆素类(1)、氨基糖苷类(1)、diaminopyrimidine(2)、elfamycin(1)、氟喹诺酮(6)、磷霉素(4)、褐霉素(2)、四环素类(4)、莫匹罗星(1)、多肽类(7)、penam(1)和氯霉素类(1)
A49	30	氨基香豆素类(1)、氨基糖苷类(1)、diaminopyrimidine(2)、elfamycin(1)、氟喹诺酮(7)、磷霉素(4)、褐霉素(2)、四环素类(4)、多肽类(6)和氯霉素类(1)
P5-10	26	氨基香豆素类(2)、氨基糖苷类(1)、diaminopyrimidine(2)、elfamycin(1)、氟喹诺酮(5)、磷霉素(4)、褐霉素(2)、四环素类(2)和多肽类(7)

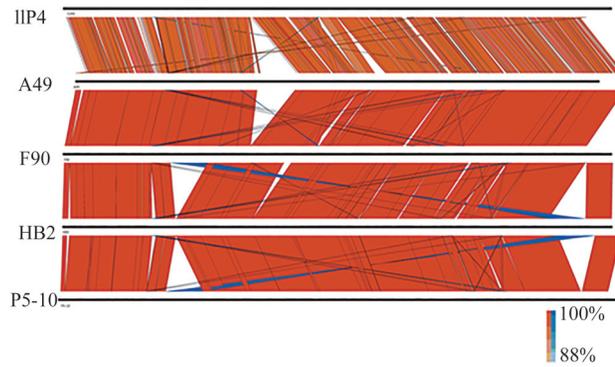
注:括号中数字代表所包含的耐药基因数量

2.3 毒力基因

通过对基因组毒力基因注释分析发现,4 株 MRSA 菌株基因组中含有 44~56 种数量不等的毒力因子(图 2),不同菌株间多数毒力因子相同,主要包括与细菌黏附功能类(如 *icaA*、*icaB*、*icaC* 和 *spa* 等)、胞外酶类(例如 *nuc* 和 *splA* 等)、宿主免疫逃逸相关(如 *capA*、*capB* 和 *capC* 等)及毒素类(如 *hlgB*、*hlgC* 和 *hysA* 等)等毒力因子(图 2)。相比较其他 3 株菌株仅含 1~4 个编码血红素转运蛋白基因(如 *isdC*、*isdE*、*isdF* 和 *isdG*),而 HB2 菌株基因组发现 7 个 *isdC*、*isdE*、*isdF*、*isdA*、*isdB*、*isdG* 和 *isdD* 基因。

2.4 SNP 分析

以 11P4 菌株为参考进行 4 株测序菌株 SNPs 分析,发现不同的 MRSA 基因组与参考菌株的



注:橘红色:正向;蓝色:反向

图 1 4 株 ST9 和 ST398 MRSA 全基因组核苷酸序列的共线性分析

Figure 1 Collinearity analysis of nucleotide sequences of four ST9 and ST398 MRSA genomes

(表 3),并发现多种耐药基因可针对 1 种抗生素,例如预测 7 种耐药基因均可产生对氟喹诺酮和多肽类抗生素耐药。预测 4 株 MRSA 菌株均含有对氨基香豆素类、氨基糖苷类、diaminopyrimidine、elfamycin、氟喹诺酮、磷霉素、褐霉素、四环素类、莫匹罗星、多肽类产生抗性的耐药基因。此外,F90 和 A49 菌株基因组还有对氯霉素类的耐药基因。

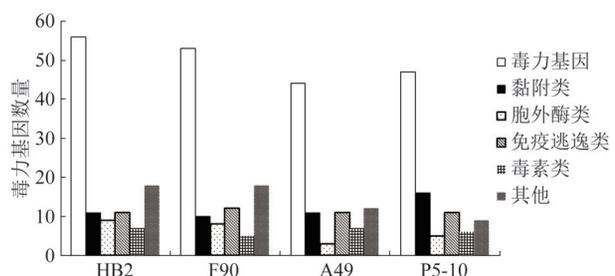


图 2 4 株 MRSA 基因组所含毒力基因

Figure 2 The virulence genes contained in the genomes of four MRSA strains

SNPs 数量不尽相同,其中 HB2 菌株基因组中仅发现 8 个 SNPs,且全都位于非编码区,而其他 F90、A49 和 P5-10 菌株的 SNPs 数量分别为 15、206 和 135 个,分布在编码区的数量占比分别为 40.0%、59.2% 和 74.8%。同义 SNPs 和非同义 SNPs 比例

合理使用抗生素。

MRSA 感染主要与其毒力基因编码的蛋白和活性分子密切相关,基因组中携带毒力基因的功能主要包括参与编码黏附素、毒素、胞外酶及免疫逃逸^[1]。本研究发现 4 株 MRSA 菌株所含有 44~56 种数量不等毒力基因,这些可能与菌株的致病力密切相关。血红素是铁在体内最主要的存在方式,同时也是病原菌生存所需的主要铁离子来源,是致病菌营养竞争的主要目标。在细菌感染过程中包括导致宿主氧化损伤、细胞死亡、扩大炎症反应等发挥重要作用。血红素转运蛋白作为血红素转运系统中主要成分,帮助病原菌从宿主血红素结合蛋白中捕获血红素,提升细菌的生存和传播能力^[19]。HB2 菌株较其他 3 株分离于猪的 MRSA 菌株携带多种血红素转运蛋白基因,可能与该菌株具有特定传播能力、成功在人定植相关。

基于全基因组水平的系统发育进化树分析显示 ST9 和 ST398 MRSA 位于不同独立的进化分支。进一步支持 ST9 MRSA 进化不同 ST398,来源于不同的近祖先。而分离自不同动物和人的 ST9 MRSA 进化距离较近,均位于同一进化分支内,进化关系与分离宿主来源无明显相关性,提示 ST9 分离株可能共享一个共同的核心基因库,并且可以很容易地在不同宿主物种之间传播。事实上,大量研究表明 ST398 MRSA 菌株可以通过贸易、职业接触和牲畜运输等途径传播,有一些 ST398 MRSA 从阳性区域引入阴性区域的成功案例^[8-9]。此外,当前优势克隆群 ST9 和 ST398 MRSA 与其他非优势细菌比较,具有增强的生物膜形成能力和抗干燥性。生物膜的产生可以保护细菌并使它们能够在恶劣或极端环境中生存,提高细菌的适应和生存^[20-21]。这些研究结果进一步表明,猪是人类和牛体内 MRSA 感染的重要储存宿主。

综上,本研究获得 4 株不同分离来源 MRSA 全基因组序列,丰富了国内外对于 ST9 MRSA 研究的数据库信息,并通过比较基因组学分析,进一步证实了 ST9 MRSA 的分子进化不同于 ST398,获得特定的分子遗传特征,这些结果为后续 ST9 MRSA 的分子流行病学和致病性机制研究奠定基础。

参考文献

[1] PARISI A, CARUSO M, NORMANNO G, et al. MRSA in swine, farmers and abattoir workers in Southern Italy [J]. Food Microbiology, 2019, 82: 287-293.

[2] VOSS A, LOEFFEN F, BAKKER J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming [J]. Emerging Infectious Diseases, 2005, 11(12): 1965-1966.

[3] LIENEN T, SCHNITT A, HAMMERL J A, et al. Genomic distinctions of LA-MRSA ST398 on dairy farms from different German federal states with a low risk of severe human infections [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 575321.

[4] COOMBS G W, PANG S, DALEY D A, et al. Severe disease caused by community-associated MRSA ST398 type V, Australia, 2017 [J]. Emerging Infectious Diseases, 2019, 25(1): 190-192.

[5] CUI S H, LI J Y, HU C Q, et al. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009, 64(4): 680-683.

[6] YU F Y, CIENFUEGOS-GALLET A V, CUNNINGHAM M H, et al. Molecular evolution and adaptation of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) sequence type 9 [J]. mSystems, 2021, 6(3): e0049221.

[7] GRAVELAND H, WAGENAAR J A, BERGS K, et al. Persistence of livestock associated MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animal contact [J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16830.

[8] PIROLO M, SIEBER R N, MOODLEY A, et al. Local and transboundary transmissions of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398 through pig trading [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(13): e00430-e00420.

[9] GRØNTVEDT C A, ELSTRØM P, STEGGER M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in humans and pigs in Norway: A “one health” perspective on introduction and transmission [J]. Clinical Infectious Diseases, 2016, 63(11): 1431-1438.

[10] LAKHUNDI S, ZHANG K Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2018, 31(4): e00020-e00018.

[11] OGIHARA S, SAITO R, SAWABE E, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of PCR-based open reading frame typing, multilocus sequence typing, and *Staphylococcus* protein A gene typing [J]. Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy, 2018, 24(4): 312-314.

[12] XU Y, ZHU Y, WANG Y, et al. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira* [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 20020.

[13] BESSER J, CARLETON H A, GERNER-SMIDT P, et al. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2018, 24(4): 335-341.

[14] DAVEY L, VALDIVIA R H. Bacterial genetics and molecular pathogenesis in the age of high throughput DNA sequencing [J]. Current Opinion in Microbiology, 2020, 54: 59-66.

[15] JI X, KRÜGER H, TAO J, et al. Comparative analysis of genomic characteristics, fitness and virulence of MRSA ST398 and ST9 isolated from China and Germany [J]. Emerging Microbes & Infections, 2021, 10(1): 1481-1494.

[16] KRISHNASAMY V, OTTE J, SILBERGELD E. Antimicrobial use in Chinese swine and broiler poultry production [J]. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 2015, 4: 17.

- [17] ZHANG Q Q, YING G G, PAN C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(11): 6772-6782.
- [18] LARSEN J, CLASEN J, HANSEN J E, et al. Copresence of Tet (K) and Tet (M) in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 is associated with increased fitness during exposure to sublethal concentrations of tetracycline [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(7): 4401-4403.
- [19] 义玉思, 严杰, 林旭瑗. 亚铁血红素在细菌生存及感染过程中的作用研究进展[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2018, 38(3): 226-231.
- [20] YI Y S, YAN J, LIN X A. Heme in the process of bacterial survival and infection [J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2018, 38(3): 226-231.
- [21] TAHIR S, CHOWDHURY D, LEGGE M, et al. Transmission of *Staphylococcus aureus* from dry surface biofilm (DSB) via different types of gloves [J]. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2019, 40(1): 60-64.
- [22] MOORMEIER D E, BAYLES K W. *Staphylococcus aureus* biofilm: A complex developmental organism [J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 104(3): 365-376.