

基于全基因组重测序技术的浙江近岸海域耐盐金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)耐药机制解析*

张旨轩¹ 王子言¹ 王泽¹ 刘岩¹ 刘松怡¹ 钱鹏宇²
叶欢² 韩姣姣¹ 周君¹ 苏秀榕¹

(1. 宁波大学海洋学院 浙江宁波 315211; 2. 浙江正合谷生物科技有限公司 浙江宁波 315048)

摘要 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是近岸海域海水中的主要病原菌, 严重威胁接触者的安全。抗生素处理是治疗金黄色葡萄球菌感染的重要手段, 其耐药性的发生受到了高度重视。采用全基因组重测序与 KEGG 富集分析结合的方法, 对红霉素(erythromycin)、氯霉素(chloramphenicol)和万古霉素(vancomycin)处理后的耐盐金黄色葡萄球菌(*S. aureus* ZS01)和不耐盐金黄色葡萄球菌(*S. aureus* 502A)进行耐药机制研究。结果表明, *S. aureus* 502A 经抗生素处理后发生突变的程度大于 *S. aureus* ZS01, 二者在经过氯霉素处理发生了更大程度的突变。红霉素、氯霉素和万古霉素处理主要影响了金黄色葡萄球菌的致病能力; 红霉素和氯霉素可能通过影响金黄色葡萄球菌脂类的代谢引起其耐药性的变化。除此之外, 三种抗生素处理均出现了较多 TIGR01741 家族蛋白和假设蛋白基因的突变, 推测与菌株的耐药性和致病性相关。耐盐金黄色葡萄球菌可通过外排系统作用产生红霉素耐药性, 不耐盐菌株因细胞壁成分相关基因的突变提高了对万古霉素的耐受性。研究结果可为耐盐和不耐盐金黄色葡萄球菌的耐药机制及抗生素对金黄色葡萄球菌致病性影响的研究提供基础数据。

关键词 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*); 全基因组重测序; KEGG 富集分析; 耐药机制; 致病性

中图分类号 Q933; Q938.8; X55 doi: 10.11693/hyhz20210900218

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是葡萄球菌科(Staphylococcaceae)最具侵袭性的物种, 近年来成为近岸海域的主要病原菌之一。研究显示近岸海域中的各项指标受到人类活动的影响(王小静等, 2015), 金黄色葡萄球菌可能经由污水排放、地表径流和粪便、表皮脱落等途径进入海域(何艺科, 2018)。海水中的金黄色葡萄球菌被认为是皮肤、眼睛和耳朵疾病的风险指标(Cheung *et al.*, 1990), 体表伤口接触被金黄色葡萄球菌污染的海水可能引起皮肤感染、败血症等疾病的发生(Tong *et al.*, 2015), 还可能通过吞咽等方式感染浴场游客, 因此一直被推荐作为一个新的参数添加到海

水质评估体系中(Ramcharitar *et al.*, 2006)。

金黄色葡萄球菌能够在选择压力下快速适应并传播, 除盐度适应外, 包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)在内的越来越多的耐药型金黄色葡萄球菌被分离出来(Obaidat *et al.*, 2015; Vaiyapuri *et al.*, 2019)。MRSA 是当前最常见的耐药病原体之一, 染色体上的 *mecA* 基因可产生一种与 β -内酰胺类抗生素低结合力的青霉素结合蛋白 PBP2 α , 因此 MRSA 在 β -内酰胺类抗生素存在的情况下能够继续生长, 从而表现出耐药性(Ibrahim *et al.*, 2021); 有些则是质粒介导获得的耐药性, 通过耐药

* 国家重点研发计划资助项目, 2017YFC1404505 号; 海洋经济创新发展区域示范专项, 甬海办[2016]71 号。张旨轩, 硕士研究生, E-mail: 363141184@qq.com; 同等贡献第一作者: 王子言, 博士研究生, E-mail: ziyang_wang2021@163.com

通信作者: 苏秀榕, 博士生导师, 教授, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

收稿日期: 2021-09-24, 收修改稿日期: 2021-10-25

基因 *blaZ* 等产生大量 β -内酰胺酶, 使青霉素缓慢失活。耐药性的出现给金黄色葡萄球菌的治疗带来了重大阻碍, 因此深入探究金黄色葡萄球菌的耐药机制和致病机制并找到准确的治疗靶位, 寻找除抗生素之外的治疗手段具有重要意义。

细菌耐药性常采用纸片扩散法、稀释法、E-test 法、PCR 技术、质谱技术等手段进行研究, 但以上方法均存在一定的局限性, 本研究采用全基因组重测序的方法, 对耐盐和标准金黄色葡萄球菌耐药性相关位点进行检测, 既可以掌握已知的耐药基因还能够预测到耐药性相关的潜在基因, 从而解析耐盐菌株与标准菌株耐药机制的异同(Zankari *et al*, 2013)。

1 材料与方法

1.1 材料

耐盐菌株 *S. aureus* ZS01 和不耐盐菌株 *S. aureus* 502A 为实验室保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的菌种, 牛肉膏培养基购自青岛海博生物技术有限公司, 细菌 DNA 提取试剂盒购于北京全氏金生物技术有限公司, 红霉素、氯霉素和万古霉素购买于上海源叶生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株复苏及鉴定 冷冻保存的 *S. aureus* ZS01 和 *S. aureus* 502A 菌株接种于海水牛肉膏液体培养基 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行复苏, $10\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 $5\ \text{min}$ 收集对数生长前期的菌沉淀, 用等量生理盐水稀释后取 $200\ \mu\text{L}$ 菌悬液加入 $5\ \text{mL}$ 的海水牛肉膏培养基中。取沉淀用细菌 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 16S rRNA 通用引物 (27F: $5\text{'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'}$; 1492R: $5\text{'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'}$) 用于菌株鉴定, 测序结果在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行比对, 并采用基因芯片检测试剂盒进一步验证。

1.2.2 抗生素处理 分别用 $400\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的红霉素、氯霉素和万古霉素对两株菌的转接菌液进行胁迫处理, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\ \text{h}$ 。根据菌株生长状况以 10 倍为梯度调整抗生素处理浓度, 最终找到菌株对各抗生素的最高耐受浓度。收集 *S. aureus* ZS01 和 *S. aureus* 502A 最高耐受抗生素浓度胁迫下的菌沉淀作为重测序样品。

1.2.3 重测序及生物信息学分析 将上述样品进行基因组 DNA 的提取, 利用超声法打断基因组 DNA, 然后修复 DNA 片段末端, 将 A 碱基添加到 DNA 片段的 3' 末端, 完成测序接头拼接, 选择合适的片段进行 PCR 扩增完成建库, 对文库进行质检。基因组重测

序采用 HiSeq 4000 平台进行, 测序模式为 PE 150。对原始数据进行预处理获得有效数据, 利用 BWA 软件 (Li *et al*, 2009) 将读长 (reads) 比对到参考基因组 (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/016/805/GCF_000016805.1_ASM1680v1/GCF_000016805.1_ASM1680v1_genomic.fna.gz), 用 SnpEff 软件 (Cingolani *et al*, 2012) 对检测到的 SNPs (单核苷酸多态性)、InDels (插入缺失) 以及 SVs (结构变异) 进行功能注释, 并进行相关基因的 KEGG 富集分析 (<https://www.kegg.jp/>)。

2 结果

2.1 菌株鉴定及样品制备

NCBI 数据库比对结果显示两菌株均为金黄色葡萄球菌, 基因芯片检测验证了此结果。*S. aureus* ZS01 和 *S. aureus* 502A 在海水牛肉膏固体培养基上生长状态良好, 表面光滑凸起, 颜色为金黄或者白色, 符合金黄色葡萄球菌的生长特征。最终选定 $320\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 红霉素、 $40\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素和 $3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 万古霉素处理 *S. aureus* ZS01 和 *S. aureus* 502A, 所得样本分别记为 E1、C1、V1 和 E2、C2、V2。

2.2 重测序

2.2.1 重测序数据统计 对 *S. aureus* ZS01 及经特定浓度抗生素处理后的 *S. aureus* ZS01 DNA 基因组重测序并进行质量控制后, 获得了总长度为 $7.59\ \text{G}$ 的数据, 共 $50\ 320\ 502$ 个 reads。对 *S. aureus* 502A 及经特定浓度抗生素处理后的 *S. aureus* 502A DNA 基因组重测序并进行质量控制后, 获得了总长度为 $7.52\ \text{G}$ 的数据, 共 $50\ 009\ 758$ 个 reads。预处理后, 各样本获得的有效数据占原始数据的比值均大于 98.53% , 数据质量 $\geq Q30$ 的部分均在 96.65% 以上, 测序数据质量良好。通过 BWA (Burrows-Wheeler Aligner) 软件 (v0.7.0) 将有效数据与参考基因组进行比对, 比对到参考基因组上的总 reads 平均比例为 71.91% , 覆盖深度不低于 $30\times$ 的碱基所占比例均高于 89.22% , 样品有效目标区域的测序平均覆盖度超过 435 倍。

2.2.2 SNPs 的检测及注释 *S. aureus* ZS01 和 E1、C1、V1 与参考基因组进行比较, 分别得到 19 203、19 235、19 198、19 233 个 SNPs 位点, *S. aureus* 502A 和 E2、C2、V2 与参考基因组进行比较, 分别得到 19 256、19 173、20 270、20 177 个 SNPs 位点, 所有样本约 83% 的 SNPs 突变分布于外显子区域; 13% 的 SNPs 位点位于转录起始位点上游 $500\ \text{bp}$; 位于转录终止位点下游 $500\ \text{bp}$ 的 SNPs 位点约占 $3.4\%\sim 3.6\%$,

所有 SNPs 共导致 2 403 个基因的突变。每个样品检测到的 SNPs 位点约有 55% 是同义突变, 发生起始密码子丢失的 SNPs 均为 6 个左右, 终止密码子区域检测到的 SNPs 数目为 71~75。

基于各组的 SNPs 数据进行主成分分析评估抗生素处理前后菌株的突变程度(图 1)。从 PCA 图中可以看出, 在经三种抗生素处理后, 不耐盐菌株 *S. aureus* 502A 和耐盐菌株 *S. aureus* ZS01 均发生了一定程度的突变, 其中 *S. aureus* 502A 发生的突变更加显著。经红霉素和万古霉素处理的 *S. aureus* ZS01 接近于原始菌株, 经氯霉素处理后则产生了较大程度的突变; 不耐盐菌株 *S. aureus* 502A 同样是经氯霉素处理之后发生了较大程度的突变; 且经万古霉素处理后 *S. aureus* ZS01 与 *S. aureus* 502A 发生的突变有较大差异。

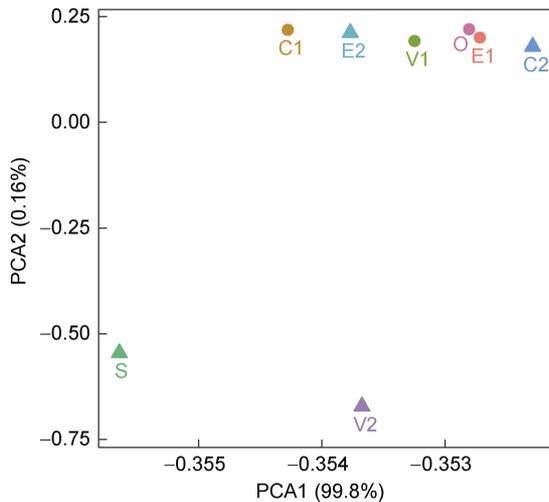


图 1 基于 SNPs 的主成分分析图

Fig.1 Diagram of the principal component analysis based on SNPs

注: O 表示耐盐菌株 *S. aureus* ZS01; S 表示不耐盐菌株 *S. aureus* 502A; E1, C1, V1, E2, C2, V2 依次表示经红霉素、氯霉素、万古霉素处理后的 *S. aureus* ZS01 和 *S. aureus* 502A

S. aureus ZS01 经抗生素处理后, 检测到 E1 发生了 53 个非同义 SNPs, 涉及 35 个基因, 独有的突变基因 6 个。C1 检测到非同义 SNPs 位点 62 个, 涉及 43 个突变基因, 独有的突变基因有 15 个。V1 处理组发生的非同义 SNPs 突变位点 61 个, 涉及 36 个突变基因, 其中独有突变基因 8 个。三种抗生素处理后都发生了非同义 SNPs 突变的基因有 19 个(图 2), 其中有 3 个 TIGR01741 家族蛋白和 2 个假设蛋白的编码基因, 另外包含了串联型脂蛋白(7 个)、聚集因子 B、膜蛋白和凝固酶等与金黄色葡萄球菌感染宿主相关蛋白的编码基因以及编码青霉素水解 A 类 β -内酰胺酶的

耐药基因 *BlaZ* 等。

S. aureus 502A 经抗生素处理后, 检测到 E2 发生了 50 个非同义 SNPs, 涉及 33 个基因, 独有的突变基因 18 个。C2 检测到非同义 SNPs 位点 43 个, 涉及 31 个突变基因, 独有的突变基因有 13 个。V2 处理组发生的非同义 SNPs 突变位点 92 个, 涉及 63 个突变基因, 独有的突变基因 43 个。三种抗生素处理后都发生了非同义 SNPs 突变的基因有 11 个(图 3), 其中有 1 个 TIGR01741 家族蛋白和 3 个假设蛋白的编码基因, 另外包含了串联型脂蛋白、聚集因子 A、聚集因子 B 和 β -溶血素等与金黄色葡萄球菌感染宿主相关蛋白的编码基因以及编码葡萄球菌蛋白 A、DNA 指导的 RNA 聚合酶亚基 β 的耐药基因 *rpoB*。

2.2.3 InDels 的检测及注释 *S. aureus* ZS01 和 E1、C1、V1 分别检测到 622、627、621、625 个 InDels 位点, *S. aureus* 502A 和 E2、C2、V2 分别检测到 630、620、641、658 个 InDels 位点, 主要分布于转录起始位点上游 500 bp、转录终止位点下游 500 bp, 所占比例约 75%, 发生在外显子区域的 InDels 位点占 13%~15%。InDels 突变类型中移码突变占比较大, 破坏性编码删除和插入均各有 14~18 个, 所有 InDels 突变位点共导致 455 个基因的突变。

S. aureus ZS01 经抗生素处理后, 检测到 E1 发生了 5 个基因上的 5 个 InDels 突变, 没有独有的基因; C1 检测到 8 个基因的 8 个 InDels 突变, 独有的 InDels 突变基因分别编码荚膜多糖 5 型生物合成蛋白 *capA*、N-乙酰转移酶、凝集因子 B 和假设蛋白; V1 检测到 8 个基因的 8 个 InDels 突变, 其中 MBL 折叠金属水解酶、包含 CHAP 域蛋白和 2 个假设蛋白基因上的 InDels 突变是万古霉素处理组独有的。三种处理均检测到的 InDels 突变基因有 3 个, 分别编码串联型脂蛋白、膜蛋白和 DNA 结合反应调控因子(图 4)。

S. aureus 502A 经抗生素处理后, 检测到 E2 发生了 5 个基因上的 6 个 InDels 突变, 4 个独有突变基因分别编码 TIGR01741 家族蛋白、假设蛋白、MSCRAMM 家族黏附素 SdrE 和凝集因子 A; C2 检测到 4 个基因的 4 个 InDels 突变, 2 个独有的 InDels 突变基因分别编码荚膜多糖 5 型生物合成蛋白 *cap5A* 和 MBL 折叠金属水解酶; V2 检测到 4 个基因上的 4 个 InDels 突变, 其中 N-乙酰基转移酶和生物膜操纵子 *icaADBC* HTH 型负转录调节因子 *IcaR* 蛋白基因上的 InDels 突变是万古霉素处理组独有的。三种处理均检测到的 1 个 InDels 突变基因编码 TIGR01741 家族蛋白(图 5)。

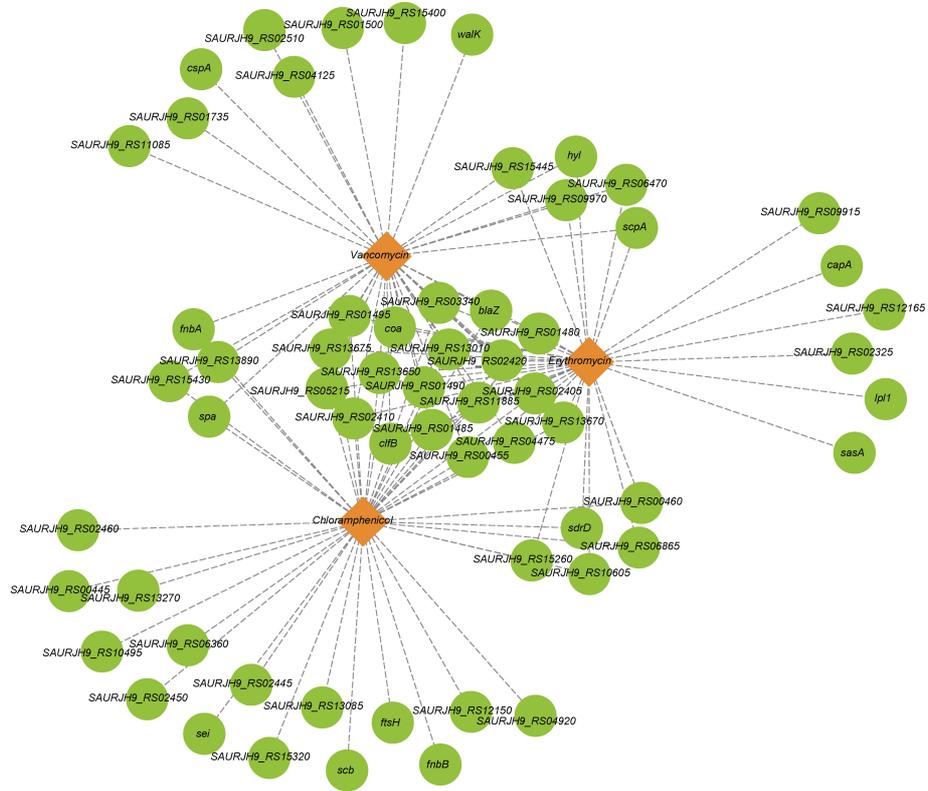


图2 抗生素处理后 *S. aureus* ZS01 发生非同义 SNPs 突变的基因

Fig.2 Genes occurred non-synonymous SNPs in *S. aureus* ZS01 after antibiotic treatment

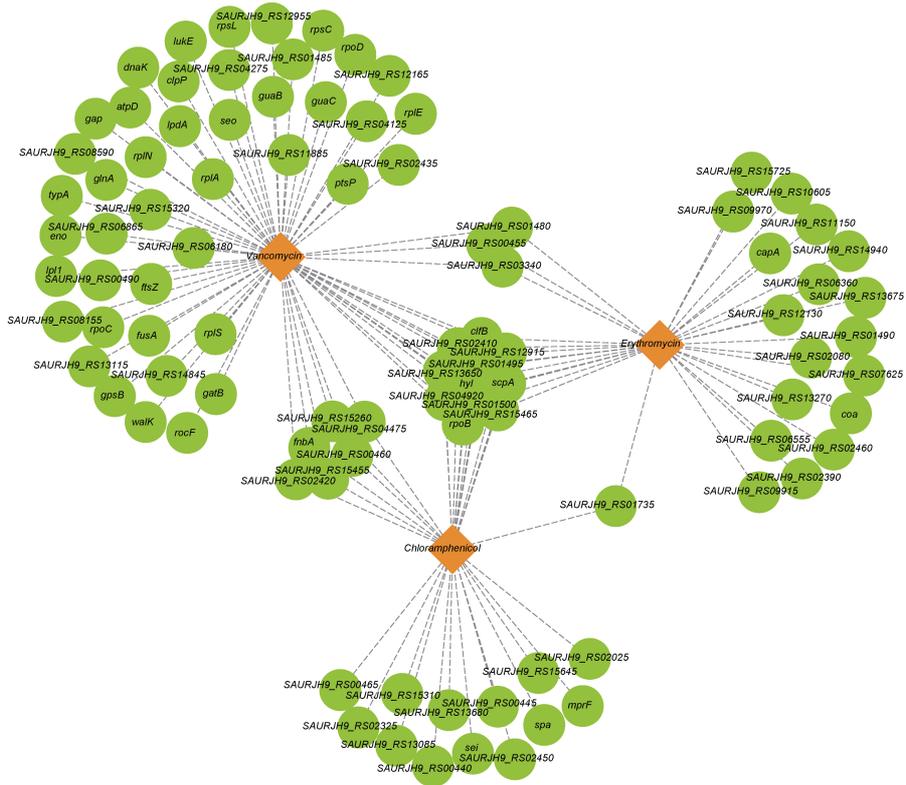


图3 抗生素处理后 *S. aureus* 502A 发生非同义 SNPs 突变的基因

Fig.3 Genes occurred non-synonymous SNPs in *S. aureus* 502A after antibiotic treatment

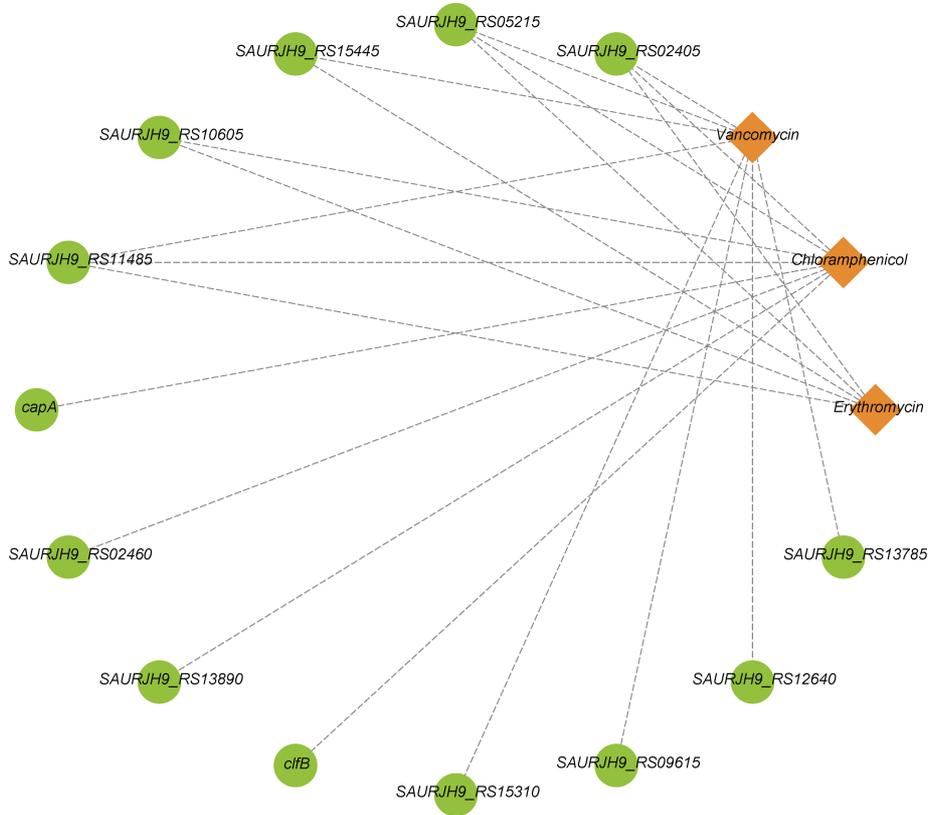


图 4 抗生素处理后 *S. aureus* ZS01 发生 InDels 突变的基因
Fig.4 Genes occurred InDels in *S. aureus* ZS01 after antibiotic treatment

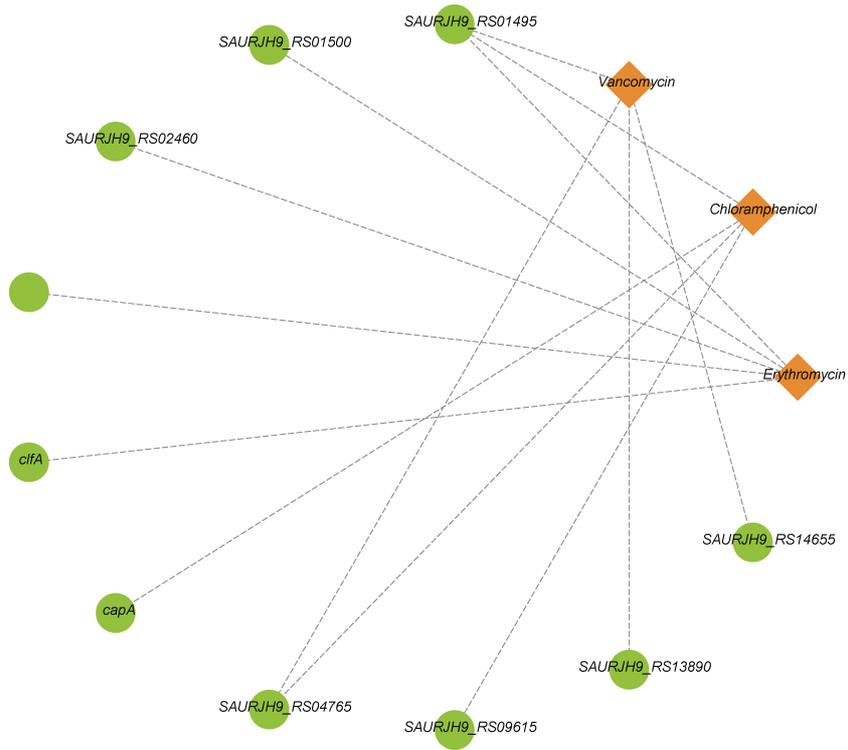


图 5 抗生素处理后 *S. aureus* 502A 发生 InDels 突变的基因
Fig.5 Genes occurred InDels in *S. aureus* 502A after antibiotic treatment

2.2.4 SVs 的检测及注释 *S. aureus* ZS01 和 E1、C1、V1 分别检测到 153、154、152、154 个 SVs 位点, *S. aureus* 502A 和 E2、C2、V2 分别检测到 157、152、150、158 个 SVs 位点, 其中缺失类型的结构变异占比范围在 53%~58%, 插入类型占 21%~24%, 另外各样品分别存在 21%~24% 的易位类型。所有 SVs 位点共导致了 144 个基因的突变。

S. aureus ZS01 经抗生素处理后, E1 检测到的 13 个 SVs 突变涉及 11 个基因, 其中 3 个独有突变基因分别编码 HPr 激酶/磷酸化酶、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶和假设蛋白; C1 检测到 12 个基因上发生了 13 个 SVs 突变, 其中独有的 5 个突变基因编码 6-磷酸- β -葡糖苷酶、过氧化物酶抑制剂、糖结合转录调节因子、二酰甘油激酶和假设蛋白。V1 检测到 10 个基因上的 11 个 SVs 突变, 其中 2 个独有 SVs 突变基因编码 ISL3 家族转座酶和拓扑异构酶。三种抗生素处理都发生 SVs 突变的基因有 5 个, 分别编码黄酮素家族蛋白、酰基载体蛋白、DNA 结合反应调控因子和 2 个假设蛋白(图 6)。

S. aureus 502A 经抗生素处理后, E2 检测到的 8

个 SVs 突变涉及 8 个基因, 其中 3 个独有突变基因分别编码糖结合转录调节子、MutS 家族 DNA 错配修复蛋白和聚集因子 B; C2 检测到 6 个基因上的 6 个 SVs 突变, 没有独有的 SVs 突变基因。V2 检测到 7 个基因上的 7 个 SVs 突变, 2 个独有 SVs 突变基因编码串联型脂蛋白和假设蛋白。三种抗生素处理都发生 SVs 突变的基因有 2 个, 分别编码二肽酶 PepV 和羧酸酯酶/脂肪酶家族蛋白(图 7)。

2.2.5 抗生素处理后两菌株突变情况对比 对各处理组检测到的 SNPs、InDels 和 SVs 突变涉及的所有基因进行统计, 存在多种类型的突变发生在同一基因上的情况。E1 共涉及 45 个基因的突变, E2 涉及 42 个基因的突变, 其中 17 个基因是二者共有的。其中串联型脂蛋白和 TIGR01741 家族蛋白相关突变基因达 41%, 另外包含了与致病性相关的荚膜多糖合成蛋白、聚集因子、凝固酶和 β -通道形成溶细胞素基因的突变等。与 E2 相比, E1 独有的突变基因中有很多是编码串联型脂蛋白和 MSCRAMM 家族黏附素的, 且有 ABC 转运蛋白相关的蛋白基因突变; 而 E2 独有突变基因中没有用于编码串联型脂蛋白的。C1 发生

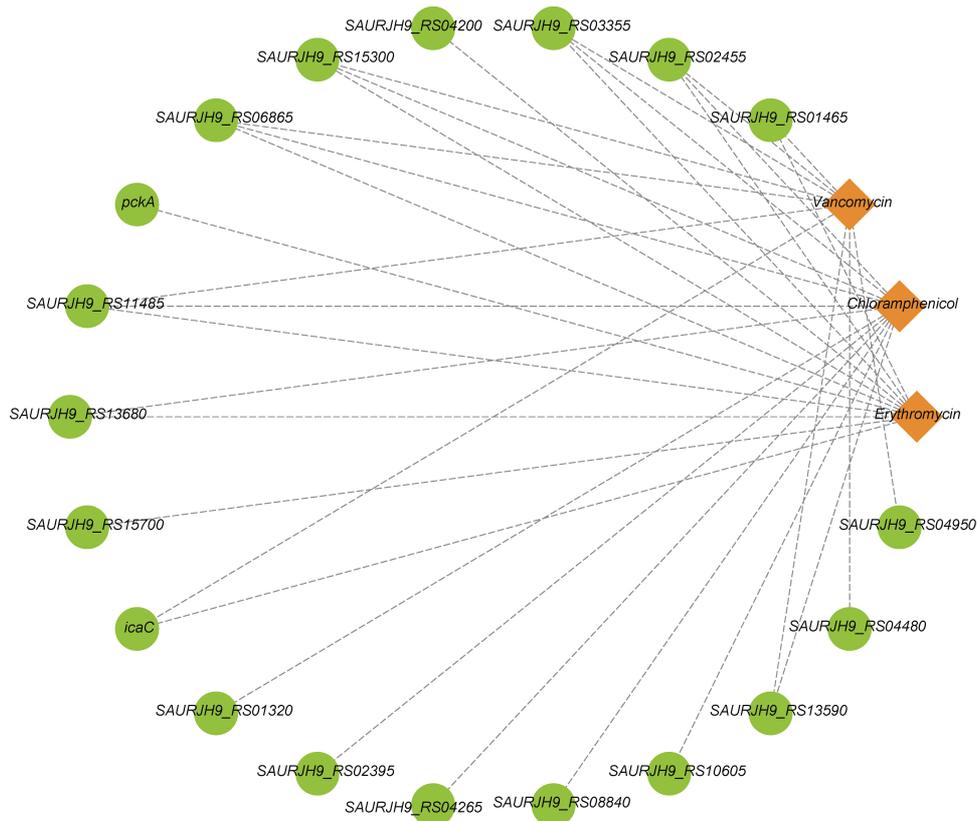


图 6 抗生素处理后 *S. aureus* ZS01 发生 SVs 突变的基因

Fig.6 Genes occurred SVs in *S. aureus* ZS01 after antibiotic treatment

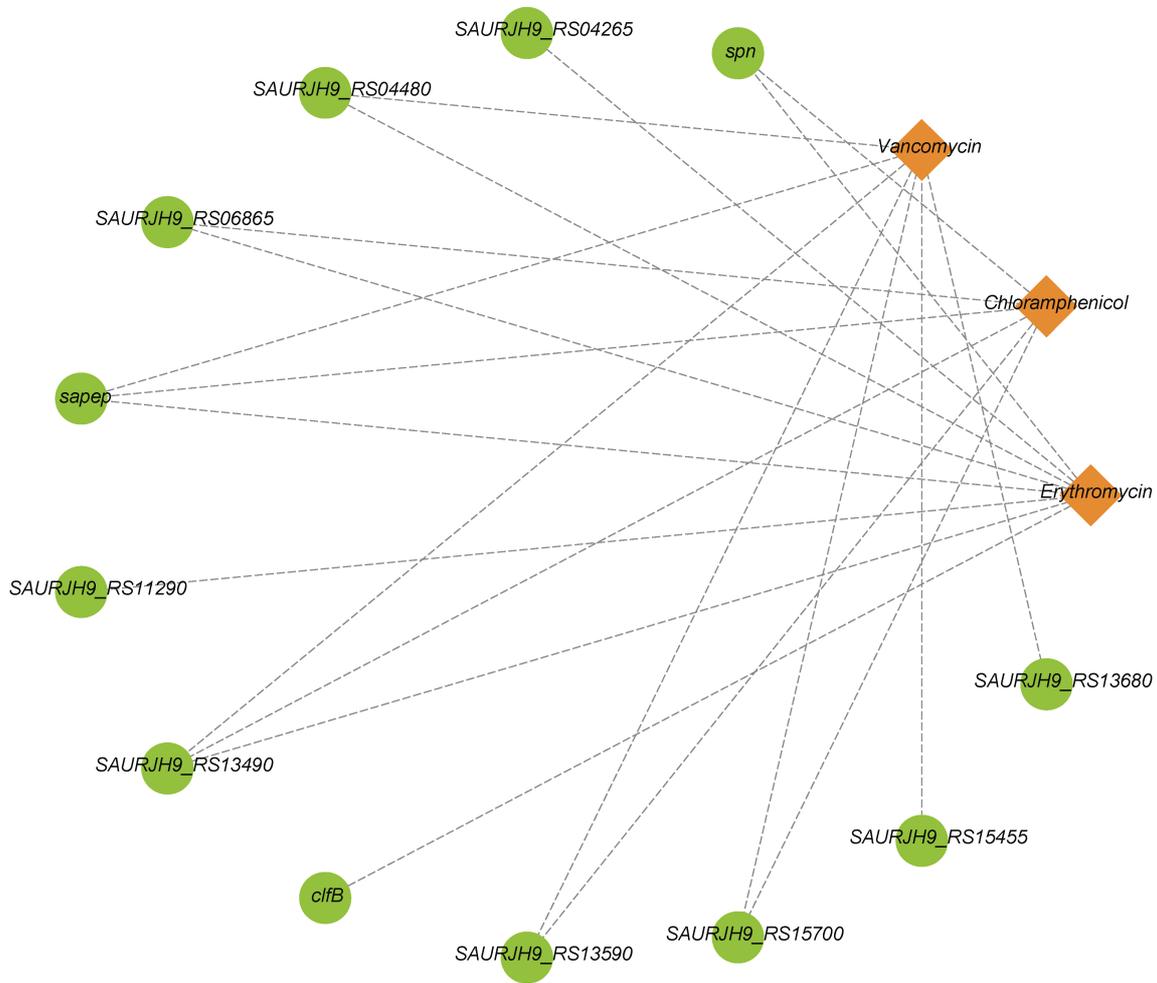


图7 抗生素处理后 *S. aureus* 502A 发生 SVs 突变的基因
Fig.7 Genes occurred SVs in *S. aureus* 502A after antibiotic treatment

的所有类型突变共涉及 54 个基因, C2 涉及 40 个基因, 其中二者共有的基因 20 个, 包含了串联型脂蛋白、膜蛋白、纤连蛋白结合蛋白、聚集因子和荚膜多糖等多个与金黄色葡萄球菌致病性相关的基因; 与 C2 相比, C1 突变中包含了更多编码膜蛋白、纤连蛋白结合蛋白、凝固酶以及 MSCRAMM 家族黏附素等与金黄色葡萄球菌侵染宿主有关的独有基因。V1 发生的突变涉及 50 个基因, V2 涉及 72 个基因, 其中 21 个基因是二者共有的, 包含了细胞壁代谢传感器组氨酸激酶 WalK 以及串联型脂蛋白、纤连蛋白结合蛋白、凝集因子、 β -通道形成溶细胞素等致病相关蛋白的编码基因。相比于 V1, V2 独有的突变基因更多, 且有谷氨酰胺合成酶、RNA 聚合酶 sigma 因子 SigA 等与细胞壁成分相关的蛋白和多个核糖体结合蛋白编码基因上的突变(图 8)。

2.2.6 KEGG 富集分析 对 E1、C1、V1 和 E2、C2、

V2 的 SNPs、InDels、SVs 突变基因进行 KEGG 富集分析, 分别注释了 11、18、11、12、14、37 个突变基因, 存在多种突变发生在同一基因上的情况, V2 统计到最多的 KEGG 注释突变基因。分析结果显示突变基因富集于人类疾病, 代谢, 细胞过程, 环境信息处理和基因信息处理 5 个一级分类, 其中人类疾病和代谢相关通路占有较大比例; 在二级分类中, 6 个处理组都有很多突变基因富集在疾病感染通路上, 红霉素和氯霉素处理组有较多突变基因与脂代谢相关(图 9)。

红霉素处理组中的 β -通道形成溶细胞素 *hyl*、MSCRAMM 家族黏附素 *SdrD* 突变使金黄色葡萄球菌更具有感染性; 氯霉素处理组的纤连蛋白结合蛋白 *fnbA*、*fnbB* 等富集在细菌入侵上皮细胞的通路上, 葡萄球菌蛋白 A *spa*、凝集因子 *clfA*、*clfB* 等也与金黄色葡萄球菌感染相关。万古霉素处理后 MBL 折叠金属水解酶、*spa*、凝集因子 *clfB* 等基因富集在金黄色葡萄球菌感染通路上。

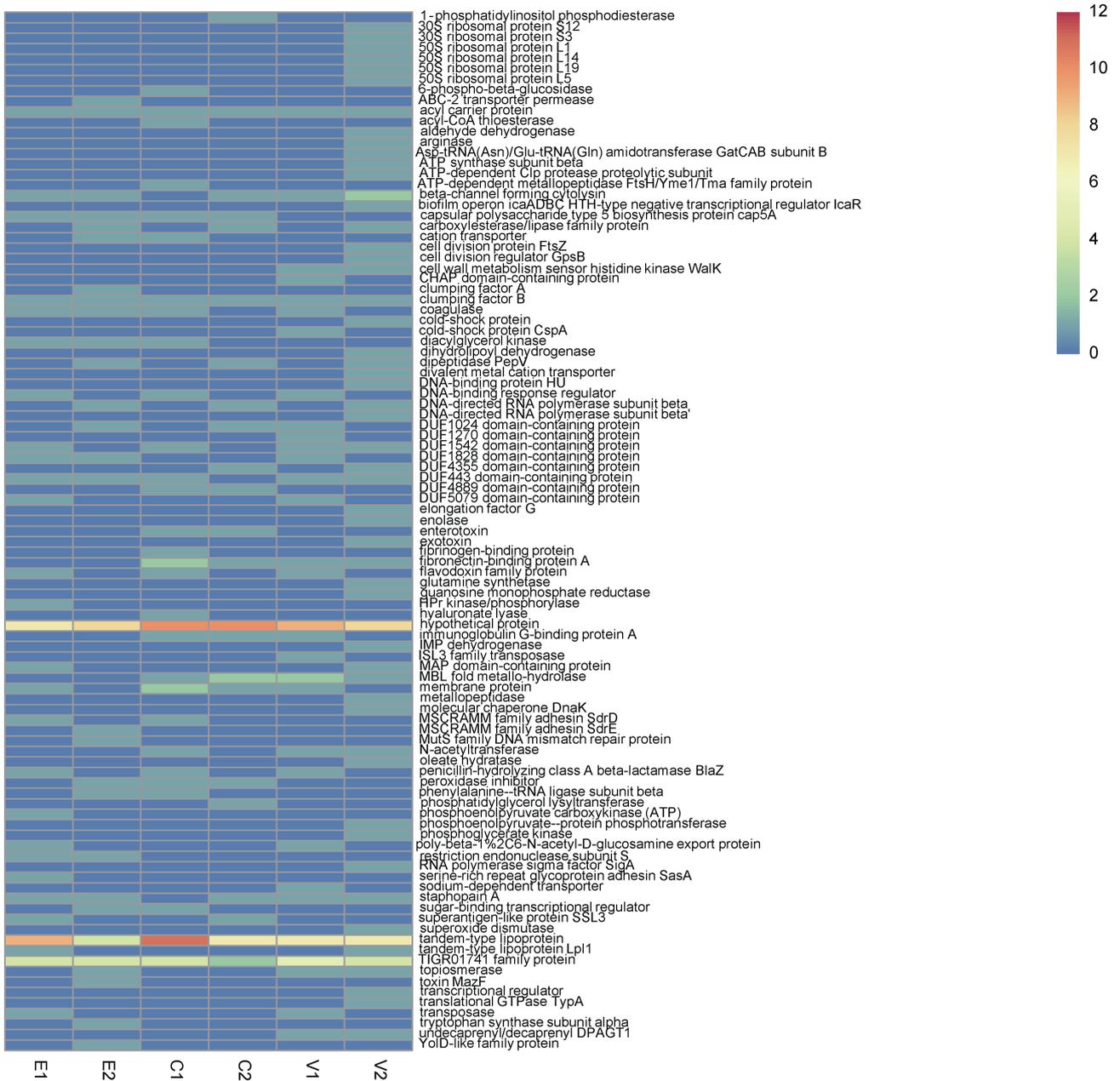


图 8 编码不同蛋白的突变基因发生突变频次的统计

Fig.8 Statistics on the frequency of mutations in mutant genes encoding different proteins

3 讨论

本研究对耐盐菌株 *S. aureus* ZS01 和不耐盐菌株 *S. aureus* 502A 分别进行红霉素、氯霉素和万古霉素的胁迫处理, 获得最高耐受浓度下的菌沉淀进行重测序, 从而得到耐盐菌株与不耐盐菌株在抗生素耐药机制方面的相似和差异之处。结果表明, *S. aureus* 502A 经抗生素处理后发生突变的程度大于 *S. aureus* ZS01, 说明耐盐菌株本身耐受抗生素的能力可能强于不耐盐菌株; 且相较于红霉素和万古霉素, 在经过

氯霉素处理后两株菌发生了较大程度的突变, 出现这种现象的原因可能是氯霉素的使用多于其余两种抗生素, 在氯霉素长期使用过程中, 金黄色葡萄球菌容易发生适应性变化; 万古霉素处理后的两株菌发生突变差异较大。6 个处理组都出现了较多串联型脂蛋白基因相关的突变, 引起菌株致病性的变化, 与尚伟龙的研究中阐述的抗生素诱导串联型脂蛋白表达从而增强 MRSA 的致病性(尚伟龙, 2019)类似。已有研究表明 MRSA 的耐药性与生物膜的形成能力可能存在相关性(张伟松, 2014), 本研究 6 个处理组的突

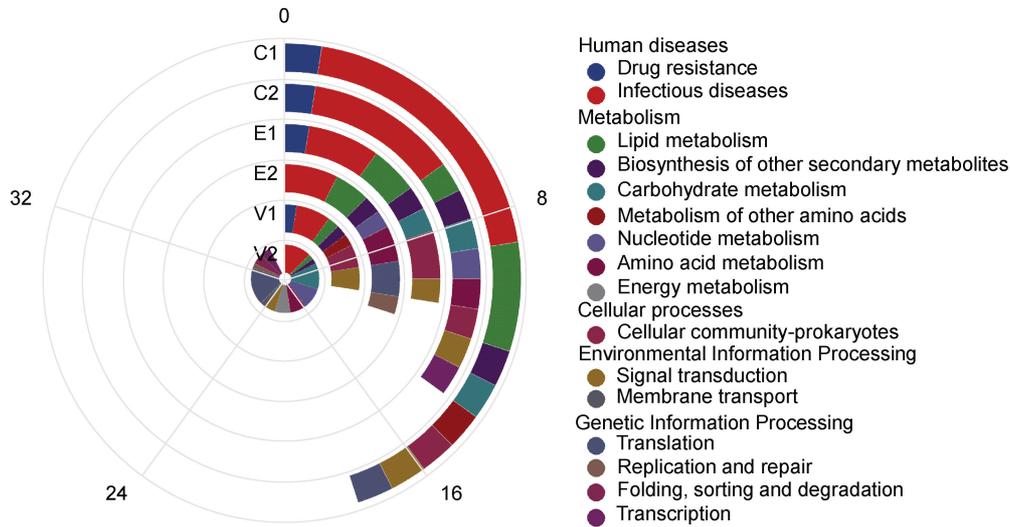


图9 E1、E2、C1、C2、V1、V2 突变基因的 KEGG 富集分析

Fig.9 KEGG enrichment analysis of mutant genes in E1, E2, C1, C2, V1, and V2

变基因中均有部分与脂代谢通路相关,尤其在红霉素和氯霉素处理组中占比更大,表明红霉素和氯霉素可能通过影响金黄色葡萄球菌脂类的代谢引起其耐药性的变化,且处理组都出现了 TIGR01741 家族蛋白和假设蛋白基因的突变,因此推测二者与金黄色葡萄球菌的致病性和耐药性相关,其准确功能有待进一步研究。除此之外,凝集因子 B、纤连结合蛋

白结合蛋白、凝固酶、膜蛋白等与金黄色葡萄球菌感染细胞相关蛋白的基因突变在 *S. aureus* ZS01 抗生素处理后均有检出(Liu *et al*, 2017; Lacey *et al*, 2019; Li *et al*, 2019), 这些突变导致了金黄色葡萄球菌毒力状态的改变(图 10), *S. aureus* 502A 经过几种抗生素处理后均检测到 DNA 依赖性 RNA 聚合酶 *rpoB* 基因上的突变,这种突变可以抑制一系列抗生素的活性。

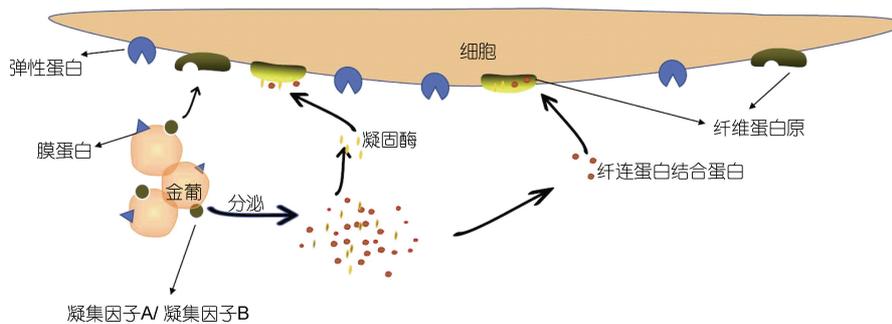


图 10 金黄色葡萄球菌感染细胞重要途径

Fig.10 Important ways of *S. aureus* infecting cells

注: 聚集体 A、B 可与宿主细胞表面的纤维蛋白原特异性结合; 凝固酶等分泌蛋白与细胞表面的纤维蛋白原有较弱的结合能力; 膜蛋白则可与宿主细胞表面的弹性蛋白特异性结合

红霉素处理后,耐盐菌株检测到编码 ABC 转运蛋白的突变基因,ABC 转运蛋白是一种外排系统,可将抗生素排出体外,从而产生耐药性(丁兆凤, 2010),不耐盐菌株则没有检测到相关突变。氯霉素处理后,耐盐菌株检测到更多编码膜蛋白、纤连蛋白结合蛋白、凝固酶以及 MSCRAMM 家族黏附素等与金黄色葡萄球菌感染宿主有关的独有基因,可能说明氯霉素胁迫后,耐盐菌株的致病性受到了更大程度的影

响。万古霉素处理后,除毒力因子编码基因的突变外,还出现了细胞壁代谢传感器组氨酸激酶 WalK 的突变,该突变可能导致金黄色葡萄球菌对万古霉素敏感性的降低,从而增强菌株对万古霉素的耐受能力(Zhu *et al*, 2021)。V2 还检测到谷氨酰胺合成酶、RNA 聚合酶 sigma 因子 SigA 等与细胞壁成分相关的编码基因突变,已有研究表明二者在万古霉素耐药性中起着重要作用(代洪等, 2003),V1 未检测到相关突变,

所以推测万古霉素处理影响了耐盐菌株和不耐盐菌株侵染宿主的能力, 不耐盐菌株还因细胞壁成分的相关突变提高了万古霉素耐受能力。

4 结论

耐盐菌株 *S. aureus* 502A 经抗生素处理后发生突变的程度大于标准菌株 *S. aureus* ZS01; 相较于红霉素和万古霉素, 在经过氯霉素处理后两菌株发生了更大程度的突变。红霉素、氯霉素和万古霉素主要影响了金黄色葡萄球菌侵染细胞的能力, 红霉素和氯霉素可能通过影响金黄色葡萄球菌脂类的代谢引起其耐药性的变化。另外, 三种抗生素处理均出现了较多 TIGR01741 家族蛋白和假设蛋白基因的突变, 推测与菌株的耐药性和致病性相关。耐盐金黄色葡萄球菌可通过外排系统产生红霉素耐药性; 不耐盐菌株还会因为细胞壁成分相关基因的突变提高万古霉素耐受性。

参 考 文 献

- 丁兆凤, 2010. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌红霉素耐药机制分析[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学: 2-4.
- 王小静, 李力, 高晶晶, 等, 2015. 渤海西南部近岸功能区表层沉积物重金属形态分析及环境评价[J]. 海洋与湖沼, 46(3): 517-525.
- 代洪, 范学工, 2003. 金黄色葡萄球菌对万古霉素耐药现状及耐药机制[J]. 国外医学·流行病学传染病学分册, 30(5): 301-304.
- 何艺科, 2018. 秦皇岛海滨浴场病原菌分布及其风险评估[D]. 天津: 天津大学: 1.
- 张伟松, 2014. 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]. 杨凌: 西北农林科技大学: 31-34.
- 尚伟龙, 2019. β -内酰胺类抗生素通过 SarA 促进串联脂蛋白表达的分子机制及对 MRSA 致病性的影响[D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学: 9.
- CHEUNG W H S, CHANG K C K, HUNG R P S, *et al*, 1990. Health effects of beach water pollution in Hong Kong [J]. *Epidemiology & Infection*, 105(1): 139-162.
- CINGOLANI P, PLATTS A, WANG L L, *et al*, 2012. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain W¹¹¹⁸; iso-2; iso-3 [J]. *Fly*, 6(2): 80-92.
- IBRAHIM M A A, ABDELJAWAAD K A A, ABDELRAHMAN A H M, *et al*, 2021. Non- β -lactam allosteric inhibitors target methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an *in silico* drug discovery study [J]. *Antibiotics*, 10(8): 934, doi: 10.3390/antibiotics10080934.
- LACEY K A, MULCAHY M E, TOWELL A M, *et al*, 2019. Clumping factor B is an important virulence factor during *Staphylococcus aureus* skin infection and a promising vaccine target [J]. *PLoS Pathogens*, 15(4): e1007713, doi: 10.1371/journal.ppat.1007713.
- LI H, DURBIN R, 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 25(14): 1754-1760.
- LI J N, WANG H, HAN Y X, *et al*, 2019. Novel peptides screened by phage display peptide library can mimic epitopes of the FnBPA-A protein and induce protective immunity against *Staphylococcus aureus* in mice [J]. *MicrobiologyOpen*, 8(10): e910, doi: 10.1002/mbo3.910.
- LIU B, PARK S, THOMPSON C D, *et al*, 2017. Antibodies to *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides 5 and 8 perform similarly *in vitro* but are functionally distinct *in vivo* [J]. *Virulence*, 8(6): 859-874.
- OBAIDAT M M, SALMAN A E B, LAFI S Q, 2015. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in imported fish and correlations between antibiotic resistance and enterotoxigenicity [J]. *Journal of Food Protection*, 78(11): 1999-2005.
- Ramcharitar J, Gannon D P, Popper A N, 2006. Bioacoustics of fishes of the family Sciaenidae (Croakers and Drums). *Transactions of the American Fisheries Society*, 135(5): 1409-1431.
- TONG S Y C, DAVIS J S, EICHENBERGER E, *et al*, 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3): 603-661.
- VAIYAPURI M, JOSEPH T C, RAO B M, *et al*, 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in seafood: prevalence, laboratory detection, clonal nature, and control in seafood chain [J]. *Journal of Food Science*, 84(12): 3341-3351.
- ZANKARI E, HASMAN H, KAAS R S, *et al*, 2013. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(4): 771-777.
- ZHU J D, LIU B H, SHU X Q, *et al*, 2021. A novel mutation of *walk* confers vancomycin-intermediate resistance in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 311(2): 151473, doi: 10.1016/j.ijmm.2021.151473.

ANALYSIS OF THE DRUG RESISTANCE MECHANISM OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BASED ON WHOLE-GENOME RESEQUENCING TECHNOLOGY

ZHANG Zhi-Xuan¹, WANG Zi-Yan¹, WANG Ze¹, LIU Yan¹, LIU Song-Yi¹,
QIAN Peng-Yu², YE Huan², HAN Jiao-Jiao¹, ZHOU Jun¹, SU Xiu-Rong¹

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China; Zhejiang Zhenghegu Biotechnology Co., Ltd, Ningbo 315048, China)

Abstract *Staphylococcus aureus* is the main common pathogen in coastal waters, and could seriously threatens the safety of the contactees. Antibiotic treatment is an important method for the treatment of *S. aureus* infection; and however, the occurrence of its drug resistance has been highly concerned. In this paper, a combination of whole-genome resequencing and KEGG enrichment analysis was combined used to analyze the resistance mechanism of salt-tolerant *S. aureus* ZS01 and salt-intolerant *S. aureus* 502A treated with erythromycin, chloramphenicol, and vancomycin. Results showed that compared with *S. aureus* ZS01, *S. aureus* 502A had showed more mutations after antibiotic treatment, and both of them had more variation after treated with chloramphenicol. Erythromycin, chloramphenicol and vancomycin treatments affected mainly the pathogenicity of *S. aureus*. Erythromycin and chloramphenicol may affect the lipid metabolism of *S. aureus* and make caused changes in drug resistance. In addition, there were many mutations of TIGR01741 family proteins and hypothetical protein genes in the three antibiotic treatments, which are speculated to be related to the drug resistance and pathogenicity of the strains. Salt-tolerant *S. aureus* could develop erythromycin resistance through efflux system, and salt-intolerant strain also could increase their tolerance to vancomycin due to mutations in genes related to cell wall components. The results of this study can provide basic data for understanding the study of the resistance mechanism of salt-tolerant and salt-intolerant *S. aureus* and the effect of antibiotics on the pathogenicity of *S. aureus*.

Key words *Staphylococcus aureus*; whole-genome resequencing; KEGG enrichment analysis; drug resistance mechanism; pathogenicity