

一株猪葡萄球菌的分离鉴定、生物学特性研究及全基因组测序分析

曹嫚嫚¹, 翟怡梦², 邱军², 张云增², 焦新安^{*2}, 郑成坤^{*2}

1 广东茂名农林科技职业学院动物科学系, 广东 茂名 525000

2 扬州大学生物科学与技术学院 江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏 扬州 225009

曹嫚嫚, 翟怡梦, 邱军, 张云增, 焦新安, 郑成坤. 一株猪葡萄球菌的分离鉴定、生物学特性研究及全基因组测序分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5058-5071

Cao Manman, Zhai Yimeng, Qiu Jun, Zhang Yunzeng, Jiao Xin'an, Zheng Chengkun. Isolation, identification, biological characterization, and whole genome sequencing analysis of a *Staphylococcus hyicus* strain[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5058-5071

摘要:【背景】2021年6月,广东省茂名市某散养户送检了一头发病仔猪,猪身上长有脓疱,四肢关节肿大,关节内可见脓液。【目的】确定引起仔猪发病的病原菌,分析其药物敏感性,为临床用药提供指导;对分离菌株进行全基因组序列分析,挖掘其毒力因子和耐药基因,揭示该菌致病和耐药的分子机制。【方法】取关节脓液分离细菌;通过革兰氏染色、16S rRNA基因和全基因组测序分析,鉴定细菌种类;通过溶血试验、血浆凝固酶试验和生长曲线测定,确定分离菌株的溶血活性、血浆凝固酶活性和生长特性;用小鼠感染模型评估分离菌株的致病性;用纸片扩散法测定分离菌株的药物敏感性;通过全基因组序列分析挖掘分离菌株的毒力因子和耐药基因。【结果】分离菌株被鉴定为猪葡萄球菌(*Staphylococcus hyicus*);该菌不溶血,无血浆凝固酶活性,在胰蛋白胨大豆肉汤培养基中于37℃、120 r/min条件下生长良好;小鼠感染试验结果显示,该菌具有高致病性;药敏试验结果显示,该菌对苯唑西林、大观霉素等7种药物敏感,对青霉素G、红霉素等9种药物耐药;全基因组序列分析结果显示,该菌携带多个毒力因子和耐药基因。【结论】从发病仔猪的关节脓液中分离到一株猪葡萄球菌,可用苯唑西林、大观霉素等药物防控该菌感染;解析了该菌的基因组信息,为后续深入研究该菌致病和耐药的分子机制奠定了基础。

关键词: 猪葡萄球菌; 分离鉴定; 致病性; 药物敏感性; 全基因组测序

基金项目: 国家自然科学基金(31802210); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31802210); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

*Corresponding authors: E-mail: JIAO Xin'an: jiao@yzu.edu.cn; ZHENG Chengkun: zhengchengkun@yzu.edu.cn

Received: 2022-06-19; Accepted: 2022-08-15; Published online: 2022-10-08

Isolation, identification, biological characterization, and whole genome sequencing analysis of a *Staphylococcus hyicus* strain

CAO Manman¹, ZHAI Yimeng², QIU Jun², ZHANG Yunzeng², JIAO Xin'an^{*2}, ZHENG Chengkun^{*2}

¹ Department of Animal Science, Guangdong Maoming Agriculture & Forestry Technical College, Maoming 525000, Guangdong, China

² Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: [Background] In June 2021, a sick piglet in Maoming, Guangdong, which had pustules, swollen joints of limbs, and pus in the joints, was detected. [Objective] To identify the pathogen for the piglet, analyze its antimicrobial susceptibility, and thus to guide the clinical medication. Moreover, to analyze the whole genome sequence of the isolated strain, explore its virulence factors and antimicrobial resistance genes, thereby revealing its molecular mechanism of pathogenicity and antimicrobial resistance. [Methods] Bacteria were isolated from the joint pus. The bacterial species was identified by Gram staining, 16S rRNA gene and whole genome sequencing. The hemolysis activity, coagulase activity, and growth characteristics of the isolated strain were determined based on hemolysis test, coagulase test, and growth curve, respectively. The pathogenicity of the strain was evaluated with a mouse model. The antimicrobial susceptibility of the strain was determined by disk diffusion test. Whole genome sequence analysis was performed to explore virulence factors and antimicrobial resistance genes of the strain. [Results] The isolated strain was identified as *Staphylococcus hyicus*. The strain was non-hemolytic, displayed no coagulase activity, and grew well in Tryptic Soy Broth at 37 °C under shaking conditions (120 r/min). The strain exhibited high pathogenicity, and was sensitive to seven antimicrobials including oxacillin and spectinomycin and resistant to nine antimicrobials including penicillin G and erythromycin. It carried a number of virulence factors and antimicrobial resistance genes. [Conclusion] A *S. hyicus* strain was isolated from the joint pus of a diseased piglet. Antimicrobials such as oxacillin and spectinomycin can be used for the prevention and control of the infection caused by this strain. Furthermore, whole genome sequencing analysis was performed for this strain, which laid a foundation for further research on its molecular mechanism of pathogenicity and antimicrobial resistance.

Keywords: *Staphylococcus hyicus*; isolation and identification; pathogenicity; antimicrobial susceptibility; whole genome sequencing

葡萄球菌属(*Staphylococcus*)属于厚壁菌门(*Firmicutes*)杆菌纲(*Bacilli*)芽孢杆菌目(*Bacillales*)葡萄球菌科(*Staphylococcaceae*), 目前有68个种(截至2022年9月)。葡萄球菌是人类及多种动物皮肤和黏膜的共生细菌^[1]。根据能

否凝固兔血浆, 葡萄球菌被划分为血浆凝固酶阳性和血浆凝固酶阴性两种。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是人们熟知的血浆凝固酶阳性葡萄球菌, 尽管也存在一些血浆凝固酶阴性的变异株^[2]。金黄色葡萄球菌是一种人兽

共患病原菌，可以引起人和动物的局部或全身感染，如牛的乳腺炎、人的菌血症和感染性心内膜炎等^[1-3]。此外，该菌产生的肠毒素也常与食物中毒事件有关^[4]。

除了金黄色葡萄球菌，其他一些葡萄球菌种类也会引起人和动物的感染。例如，金黄色葡萄球菌是牛乳腺炎的主要病原菌，其他葡萄球菌则被统称为次要病原菌^[2]。猪葡萄球菌(*Staphylococcus hyicus*)是猪渗出性皮炎的主要病原菌，主要感染哺乳仔猪和刚断奶仔猪^[5]。猪渗出性皮炎俗称“猪油皮病”；在非免疫猪群，猪渗出性皮炎的致死率高达70%–100%^[6]。此外，猪葡萄球菌还可以引起猪的子宫内膜炎和化脓性肺炎^[7-9]，牛和骆驼的乳腺炎^[10-12]，人的椎间盘炎、菌血症和感染性心内膜炎等^[13-15]。猪葡萄球菌不仅给养猪业造成重大的经济损失，还带来一定的公共卫生问题。

在国内，猪葡萄球菌感染以散发为主。李艳等从广东省增城市患渗出性皮炎的病猪中分离了一株猪葡萄球菌强毒株；该菌株对头孢拉定、新生霉素等药物敏感，对青霉素、链霉素、恩诺沙星等药物耐药；毒素基因检测结果显示该菌株携带 *ExhA* 毒素基因^[16]。王明月等从吉林省通化市患化脓性肺炎的病猪体内分离了一株猪葡萄球菌；该菌株为血浆凝固酶阳性，对小鼠具有高致病性；药敏试验结果显示该菌株对先锋必素、头孢肤肟等药物敏感，对卡那霉素、多粘菌素 B 耐药^[8]。李秀丽等从河北省秦皇岛市患渗出性皮炎的仔猪体内分离了一株猪葡萄球菌；该菌株经皮下感染小鼠和仔猪可导致皮肤脱毛、破溃、炎性渗出和结痂等病变；PCR 检测结果显示该菌株携带表皮脱落毒素 *ExhD* 和 *ShetA* 基因；药敏试验结果显示，该菌株对氟苯尼考等药物敏感，对氨苄青霉

素、恩诺沙星、强力霉素等药物耐药^[17]。此外，国内其他地区也有猪葡萄球菌感染导致渗出性皮炎的报道^[18-20]。需要注意的是，虽然猪葡萄球菌感染以散发为主，但许多分离株具有多重耐药性，导致药物治疗的效果较差，给养殖户带来较大的经济损失，其危害不容忽视。

2021年6月，广东省茂名市某散养户送检了一头发病仔猪(*Sus scrofa domestica*)，猪外观消瘦，身上长有脓疱，四肢关节肿大，关节内可见脓液。本研究从该发病仔猪的关节脓液中分离鉴定了一株细菌，初步探究了分离菌株的溶血活性、血浆凝固酶活性、生长特性、致病性和药物敏感性，通过全基因组序列分析挖掘了该菌株的毒力因子和耐药基因。本研究成果为猪场临床用药提供了指导，也为后续深入研究该菌致病和耐药的分子机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料、质控菌株和实验动物

病料为广东省茂名市某散养户送检的病猪。质控菌株金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 (β 溶血、血浆凝固酶阳性)和大肠杆菌 ATCC 25922 (血浆凝固酶阴性)购自青岛海博生物技术有限公司。5 周龄雌性 BALB/c 小鼠(SPF 级)购自扬州大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)和胰蛋白胨大豆肉汤(TSB), BD 公司;革兰氏染色液试剂盒,常德比克曼生物科技有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;DNA 聚合酶 PrimeSTAR Max, 宝日医生物技术(北京)有限公司;DL2000 Plus DNA Marker, 南京诺唯赞生物科技有限公司;无菌

脱纤维绵羊血, 北京索莱宝科技有限公司; 冻干兔血浆, 青岛海博生物技术有限公司; 革兰氏阳性球菌药敏试纸盒及配套 MH 肉汤和 MH 琼脂, 杭州滨和微生物试剂有限公司。

普通光学显微镜 DM750, 徕卡显微系统公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 核酸电泳仪、凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; CMax Plus 酶标仪, 美谷分子仪器(上海)有限公司。

1.1.3 引物

细菌通用 16S rRNA 基因鉴定引物 27F (5'-A GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GG TTACCTTGTTACGACTT-3')来源于文献[21], 引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离与纯化

无菌采集病猪关节脓液, 划线接种于 TSA 平板, 37 °C 培养过夜; 挑取单菌落划线接种于 TSA 平板, 进行纯化; 再挑取单菌落接种于 TSB 培养基, 于 37 °C、220 r/min 摇床培养 5 h, 用终浓度为 20%的甘油保菌, 冻存于-80 °C 冰箱备用。

1.2.2 革兰氏染色及镜检

取分离菌株的纯培养物进行革兰氏染色, 用普通光学显微镜观察。

1.2.3 分离菌株的 16S rRNA 基因测序鉴定

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取分离菌株的基因组 DNA。用 PrimeSTAR Max 和细菌通用 16S rRNA 基因鉴定引物, 以分离菌株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: PrimeSTAR Max 25 μ L, 引物 27F 和 1492R (10 μ mol/L)各 2 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 5 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min; 12 °C 保存。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 送生工生物工程(上海)股份有

限公司测序。测序结果用 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)比对, 初步鉴定细菌种类。

1.2.4 分离菌株的全基因组测序鉴定

取分离菌株的纯培养物接种于 TSB 培养基, 于 37 °C、220 r/min 摇床培养 5 h, 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体后用无菌 PBS 洗 1 次。菌体送上海凌恩生物科技有限公司进行基因组 DNA 提取和全基因组测序。采用三代 PacBio RS II 结合二代 Illumina PE150 的测序策略进行全基因组测序。使用 UniCycler 拼接软件(V0.4.8)进行基因组组装。将组装好的全基因组序列提交到 TrueBac ID (<https://www.ezbiocloud.net/contents/genome>), 进一步鉴定细菌种类。

1.2.5 溶血试验

制备含 6%无菌脱纤维绵羊血的 TSA 平板, 将金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 和分离菌株分别划线接种于该平板; 37 °C 培养过夜, 观察菌落周围是否形成溶血环。

1.2.6 血浆凝固酶试验

挑取金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、大肠杆菌 ATCC 25922 和分离菌株的单菌落, 分别接种于 TSB 培养基, 于 37 °C、220 r/min 摇床培养 20 h。取冻干兔血浆 3 支, 分别加入 0.5 mL 灭菌生理盐水, 完全溶解。然后再分别加入 0.3 mL 各菌株的菌液, 充分混匀后, 37 °C 静置培养。每隔 0.5 h 取出, 轻轻倾斜西林瓶, 观察血浆是否凝固, 连续观察 6 h 并拍照; 加入分离菌株的西林瓶在 24 h 再观察一次, 以进一步确定其血浆凝固酶活性。

1.2.7 细菌生长曲线的绘制

挑取分离菌株的单菌落接种于 TSB 培养基, 于 37 °C、220 r/min 摇床培养 5 h。按照 1:100 的比例将菌液转接到新鲜的 TSB 培养基中, 取 200 μ L 菌液加入 96 孔板中, 设置 3 个重复。将 96 孔板置于 37 °C、120 r/min 摇床培养, 每隔

1 h 取出, 用酶标仪测定 OD_{595} 值, 连续测 15 h, 绘制细菌生长曲线。

1.2.8 小鼠感染试验

取分离菌株的纯培养物接种于 TSB 培养基, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床培养 5 h。取菌液, 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体; 菌体用无菌 PBS 重悬, 并调整细菌浓度为 4×10^9 CFU/mL 和 1.2×10^{10} CFU/mL。将 60 只 BALB/c 小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只。第 I–III 组小鼠分别通过尾静脉注射 4×10^8 CFU、 1.2×10^9 CFU 的细菌和 100 μL PBS; 第 IV–VI 组小鼠分别通过腹腔注射 4×10^8 CFU、 1.2×10^9 CFU 的细菌和 100 μL PBS。感染后每隔 12 h 观察一次, 连续观察 7 d, 记录小鼠症状和存活情况。

1.2.9 药敏试验

取分离菌株的纯培养物接种于 MH 肉汤培养基, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床培养过夜。用无菌 PBS 将菌液稀释至 0.5 麦氏浊度标准。用无菌棉签蘸取菌液, 均匀地涂布于 MH 琼脂平板。将革兰氏阳性球菌药敏纸片(16 种)贴在涂布细菌的 MH 琼脂平板上, 每个平板上放置 4 片; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 观察并测量抑菌圈的直径。参考药敏试纸

盒说明书判定分离菌株的药物敏感性。

1.2.10 分离菌株的全基因组序列分析

将组装好的全基因组序列提交到 NCBI 的 Genome 数据库(获得登录号: CP103964), 利用 NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline 进行基因组注释。编码的蛋白通过 eggNOG-mapper (<http://eggnog-mapper.embl.de/>)进行 COG (clusters of orthologous groups of proteins)功能分析。利用毒力因子数据库 VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi>)预测 MM2101 的毒力因子。利用耐药分析软件 ResFinder 4.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>)预测 MM2101 的耐药基因。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离鉴定结果

经培养过夜, 分离菌株在 TSA 平板上形成灰白色、圆形、轻微凸起、边缘整齐、表面光滑、不透明、大小均一的菌落(图 1A)。经革兰氏染色, 该菌被染成蓝紫色, 大多数细菌呈球状、短链状或葡萄状排列(图 1B), 初步判定该菌为革兰氏阳性球菌。

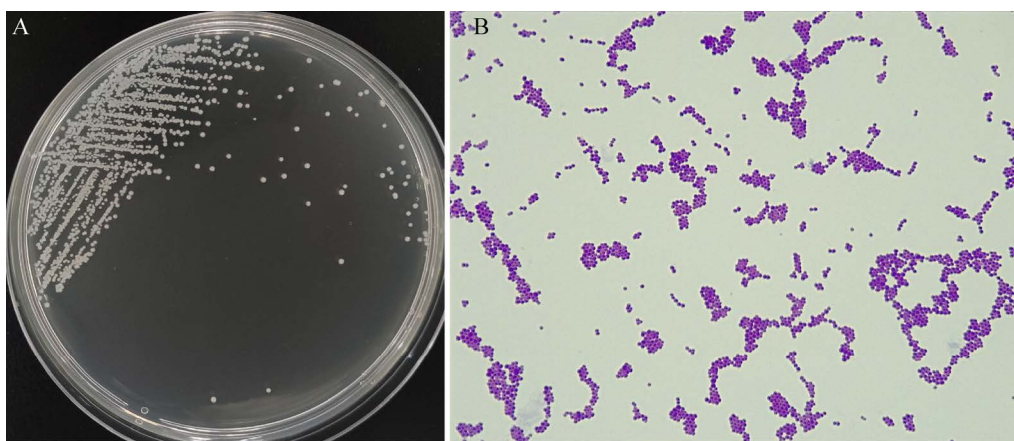


图 1 分离菌株在 TSA 平板上的菌落形态(A)和革兰氏染色镜检(B) (1 000 \times)

Figure 1 Colony morphology on TSA plate (A) and Gram staining microscopic examination (B) (1 000 \times) of the isolated strain.

以分离菌株的基因组 DNA 为模板, 用细菌通用 16S rRNA 基因鉴定引物进行 PCR 扩增, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳可见约 1 500 bp 的条带(图 2)。对 PCR 产物进行测序, 测序结果用 EzBioCloud 比对。结果显示, 该序列与 *Staphylococcus agnetis* 参考菌株 16S rRNA 基因的一致性最高, 达到 99.64% (表 1)。此外, 该序列与猪葡萄球菌、*Staphylococcus cornubiensis* 和 *Staphylococcus ursi* 参考菌株 16S rRNA 基因的一致性也分别达到 99.45%、99.08% 和 98.69% (表 1)。

区分葡萄球菌种类的标准是与参考菌株 16S rRNA 基因序列的一致性达到 98.7% 以上^[22]。因此, 需要进一步确定分离菌株究竟是 *S. agnetis* 还是猪葡萄球菌或 *S. cornubiensis*。对分离菌株进行全基因组测序, 进一步确定分离菌株的种类。TrueBac ID 分析结果显示, 分离菌株与猪葡萄球菌的平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)达到 97.52%, 与 *S. agnetis* 和 *S. intermedius* 的 ANI 值分别为 87.35%

和 84.93% (表 2)。此外, 该分析未命中 *S. cornubiensis*。鉴定细菌是否为同一种类的标准是 ANI 值达到 95% 以上^[23], 因此分离菌株是猪葡萄球菌, 将其命名为 MM2101。

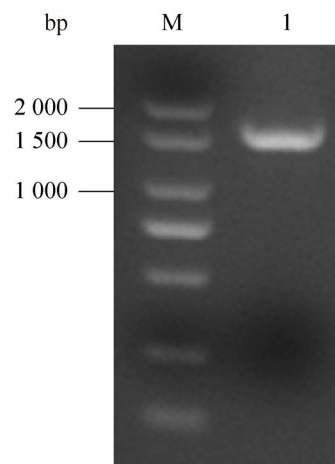


图 2 分离菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增
M: DL2000 Plus DNA Marker; 1: 16S rRNA 基因的 PCR 产物

Figure 2 PCR amplification of 16S rRNA gene of the isolated strain. M: DL2000 Plus DNA Marker; 1: PCR product of 16S rRNA gene.

表 1 分离菌株的 16S rRNA 基因序列分析

Table 1 16S rRNA gene sequence analysis of the isolated strain

命中的细菌种类 Hit bacterial species	命中的菌株 Hit strain	登录号 Accession No.	序列一致性 Sequence identity (%)
<i>Staphylococcus agnetis</i>	6-4	HM484980	99.64
<i>Staphylococcus hyicus</i>	ATCC 11249	CP008747	99.45
<i>Staphylococcus cornubiensis</i>	NW1	FXUZ01000029	99.08
<i>Staphylococcus ursi</i>	MI 10-1553	KY019172	98.69

表 2 分离菌株的全基因组测序鉴定

Table 2 Identification of the isolated strain by whole genome sequencing

命中的细菌种类 Hit bacterial species	平均核苷酸一致性 Average nucleotide identity (ANI) (%)	平均核苷酸一致性覆盖度 ANI coverage (%)
<i>Staphylococcus hyicus</i>	97.52	90.3
<i>Staphylococcus agnetis</i>	87.35	69.0
<i>Staphylococcus intermedius</i>	84.93	8.6

2.2 分离菌株的溶血活性检测结果

将金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 和分离菌株 MM2101 分别划线接种于含 6% 无菌脱纤维绵羊血的 TSA 平板。经培养过夜，ATCC 6538 菌落周围形成较宽的透明溶血环，而 MM2101 菌落周围无溶血环(图 3)。说明分离菌株 MM2101 无溶血活性。

2.3 分离菌株的血浆凝固酶活性检测结果

将金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、大肠杆菌 ATCC 25922 和分离菌株 MM2101 的菌液分别加入兔血浆中，37 °C 反应。结果显示，在 6 h 时，ATCC 6538 可以使兔血浆凝固，而 ATCC 25922 和 MM2101 均不能使兔血浆凝固(图 4)；在 24 h 时，MM2101 仍不能使兔血浆凝固。说明分离菌株 MM2101 无血浆凝固酶活性。

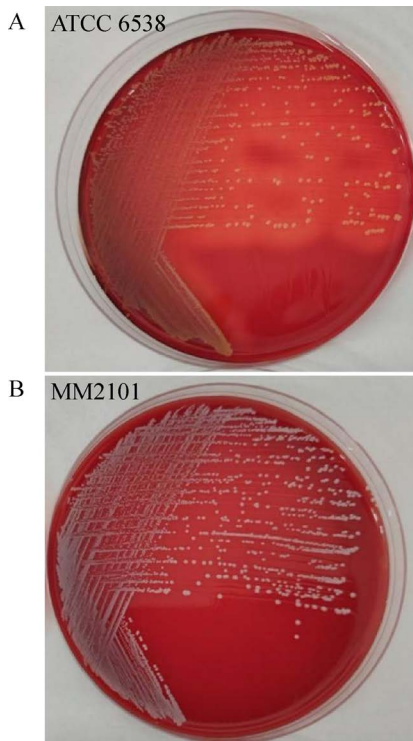


图 3 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 (A)和分离菌株(B)的溶血活性检测

Figure 3 Hemolytic activity detection of *Staphylococcus aureus* (A) and the isolated strain (B).



图 4 菌株的血浆凝固酶活性检测 1: 大肠杆菌 ATCC 25922; 2: MM2101; 3: 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538

Figure 4 Coagulase activity detection of the strain. 1: *Escherichia coli* ATCC 25922; 2: MM2101; 3: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

2.4 分离菌株的生长特性

将分离菌株 MM2101 接种到 TSB 培养基并分装于 96 孔板中，37 °C、120 r/min 摇动培养，每小时取出测定 OD_{595} 值，连续测 15 h 的结果显示，MM2101 在 1 h 左右即进入指数生长期，从 6 h 开始生长逐渐减缓，直到 15 h 时 OD_{595} 值仍有少量增加(图 5)。说明分离菌株 MM2101 在 TSB 培养基中于 37 °C、120 r/min 摇动培养条件下生长良好。

2.5 分离菌株的致病性

用 BALB/c 小鼠感染模型评估分离菌株 MM2101 的致病性，通过 2 种接种方式感染小鼠。第 I–III 组小鼠分别通过尾静脉注射剂量为 4×10^8 CFU (第 I 组)、 1.2×10^9 CFU (第 II 组)的 MM2101 菌株和 PBS (第 III 组)。第 IV–VI 组小鼠分别通过腹腔注射剂量为 4×10^8 CFU (第 IV

组)、 1.2×10^9 CFU (第 V 组)的 MM2101 菌株和 PBS (第 VI 组)。结果显示, 接种 MM2101 菌株的小鼠均表现出被毛粗乱、嗜睡、衰弱等症状; 第 I 组小鼠在接种后 12 h 内无死亡, 在 24 h 内死亡 4 只, 在 36 h 和 48 h 内各死亡 3 只; 第 II 组小鼠在接种后 12 h 内死亡 7 只, 在 24 h 内死亡 3 只; 第 IV 组小鼠在接种后 24 h 内无死亡, 在 36 h 内死亡 2 只, 最终有 8 只小鼠存活; 第 V 组小鼠在接种后 12 h 内无死亡, 在 24 h 内死亡 2 只, 在 36 h 内再死亡 6 只, 最终有 2 只小鼠存活; 而接种 PBS (第 III 和 VI 组)的小鼠未出现症状且无死亡(图 6)。说明分离菌株 MM2101 对 BALB/c 小鼠具有高致病性, 可用 BALB/c 小鼠尾静脉或腹腔感染模型评估猪葡萄球菌的致病性。

2.6 分离菌株的药物敏感性

用纸片扩散法测定分离菌株 MM2101 的药物敏感性。结果显示, MM2101 对苯唑西林、大观霉素、万古霉素、米诺环素、左氟沙星、多粘菌素和呋喃妥因 7 种药物敏感; 对青霉素 G、红霉素、克拉霉素、克林霉素、氯霉素、四环素、诺氟沙星、环丙沙星和复方新诺明 9 种药物耐药(表 3)。以上结果说明分离菌株 MM2101

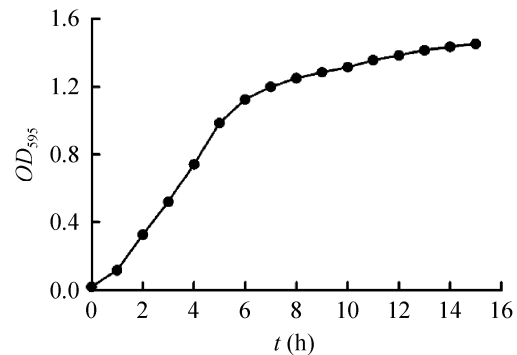


图 5 分离菌株的生长曲线

Figure 5 Growth curve of the isolated strain.

具有多重耐药性, 可用苯唑西林、大观霉素等药物防控该菌感染。

2.7 分离菌株的全基因组序列分析结果

分离菌株 MM2101 的全基因组大小为 2 517 760 bp, GC 含量为 35.7%, 共编码 2 474 个基因, 其中编码蛋白的基因有 2 353 个; 有 81 个基因编码 RNA, 其中 5S rRNA 7 个, 16S rRNA 6 个, 23S rRNA 6 个, tRNA 58 个, ncRNA 4 个。COG 功能分析结果显示, 共有 1 978 个基因得到注释, 其中功能最集中的 5 个类别包括: 氨基酸运输及代谢([E] amino acid transport and metabolism), 202 个基因; 无机离子运输和代谢([P] inorganic ion transport and metabolism), 168 个

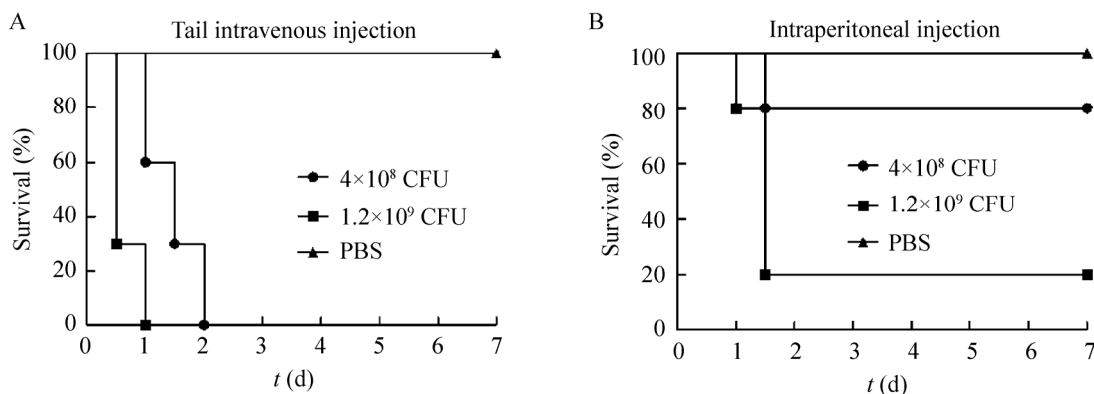


图 6 感染分离菌株小鼠的存活曲线 A: 尾静脉注射; B: 腹腔注射

Figure 6 Survival curves of mice infected with the isolated strain. A: Tail intravenous injection; B: Intraperitoneal injection.

表 3 药物敏感性试验结果

Table 3 Antimicrobial susceptibility testing results

药物 Antibacterial	抑菌圈直径 Diameter of antibacterial circle (mm)	药物敏感性判定标准 The criterion for antimicrobial susceptibility (mm)			敏感性 Susceptibility
		R	I	S	
苯唑西林 Oxacillin	27	≤17		≥18	S
青霉素 G Penicillin G	23	≤28		≥29	R
红霉素 Erythromycin	0	≤13	14-22	≥23	R
大观霉素 Spectinomycin	27	≤14	15-17	≥18	S
克拉霉素 Clarithromycin	0	≤13	14-17	≥18	R
万古霉素 Vancomycin	23	≤14		≥15	S
克林霉素 Clindamycin	0	≤14	15-20	≥21	R
氯霉素 Chloramphenicol	12	≤12	13-17	≥18	R
四环素 Acheomycin	10	≤14	15-18	≥19	R
米诺环素 Minocycline	26	≤14	15-18	≥19	S
诺氟沙星 Norfloxacin	10	≤12	13-16	≥17	R
环丙沙星 Ciprofloxacin	15	≤15	16-20	≥21	R
左氟沙星 Levofloxacin	20	≤13	14-16	≥17	S
多粘菌素 B Polymyxin B	17	≤8	9-11	≥12	S
复方新诺明 Cotrimoxazole	0	≤10	11-15	≥16	R
呋喃妥因 Nitrofurantoin	28	≤14	15-16	≥17	S

注：试验重复 3 次，抑菌圈直径为 3 次试验的平均值；R：耐药；I：中介；S：敏感

Note: The experiment was repeated three times, and the data shown are mean values from three tests; R: Resistance; I: Intermediate; S: Sensitive.

基因；翻译、核糖体结构和生物合成([J] translation, ribosomal structure and biogenesis), 168 个基因；复制、重组和修复([L] replication, recombination and repair), 165 个基因；转录([K] transcription), 161 个基因。MM2101 的基因组圈图见图 7。

VFDB 预测 MM2101 基因组中编码 21 个毒力因子，可以分为 6 类，其中黏附素 6 个，酶类 4 个，免疫逃逸因子 4 个，分泌系统组分 5 个，毒素 1 个，表面锚定蛋白 1 个。预测的毒力因子详细信息见表 4。

ResFinder 4.1 预测 MM2101 基因组中编码 11 个耐药基因，包括四环素抗性基因 *tet(M)* 和 *tet(L)*，甲氧苄氨嘧啶抗性基因 *dfpG*，大环内酯类抗性基因 *erm(B)*，苯丙醇抗性基因 *fexA*，氨基糖苷类抗性基因 *aadD*、*ant(6)-Ia* 和 *aac(6)-aph(2'')*，β-内酰胺类抗性基因 *blaZ* 和 *mecA*，以及介导林可胺类、链阳霉素 A、截短

侧耳素类 3 类药物耐药的基因 *vga(A)_V*。预测的耐药基因详细信息见表 5。

3 讨论与结论

猪葡萄球菌不仅给养猪业带来较大危害，还给公众健康带来一定威胁。本研究从发病仔猪的关节脓液中分离到一株猪葡萄球菌，并将其命名为 MM2101。革兰氏染色结果显示该菌具有葡萄球菌的形态特征。16S rRNA 基因测序是广泛使用的进行细菌分类鉴定的方法。用于区分葡萄球菌种类的标准是与参考菌株 16S rRNA 基因序列的一致性达到 98.7% 以上^[22]。16S rRNA 基因测序结果显示分离菌株与 *S. agentis*、猪葡萄球菌和 *S. cornubiensis* 参考菌株的 16S rRNA 基因序列一致性均超过 98.7%。因此，本研究通过全基因组测序进一步鉴定分离菌株的种类，结果显示分离菌株为猪葡萄球菌。

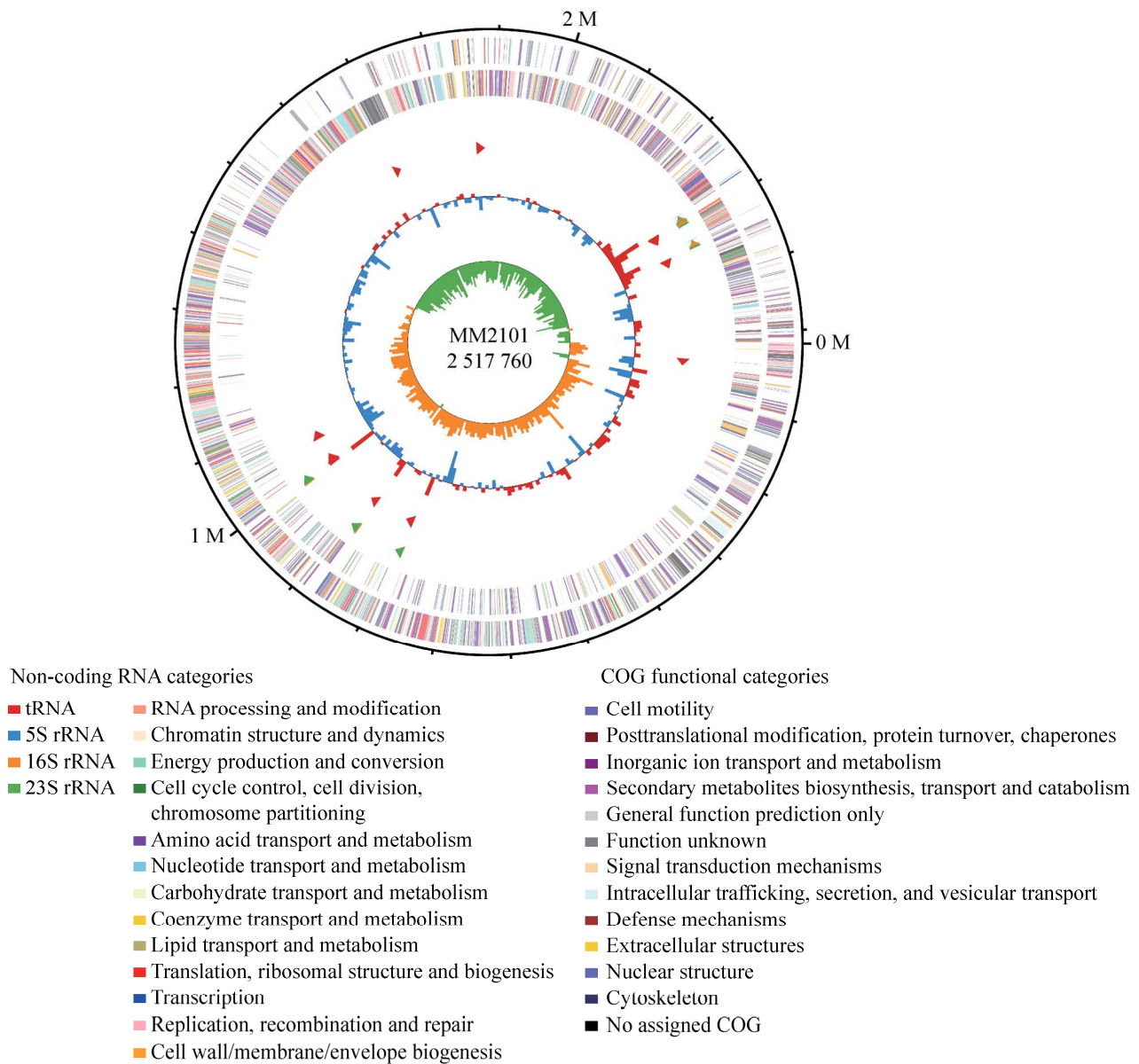


图7 分离菌株的基因组圈图 最外面1圈表示基因组位置信息;第2圈和第3圈分别表示正链、负链上的CDS(编码序列),不同颜色的CDS表示不同的COG功能类别;第4圈为rRNA和tRNA;第5圈为GC含量,向外的红色部分表示该区域GC含量高于全基因组平均GC含量,向内的蓝色部分表示该区域GC含量低于全基因组平均GC含量,峰值越高表示与平均GC含量差值越大;最内一圈为GC skew值,具体算法为 $(G-C)/(G+C)$

Figure 7 Genome circle map of the isolated strain. From the outside to the inside: circle 1 indicates genome location information; circle 2 and 3 are CDSs (coding sequences) on positive and negative chains, respectively; different colors of CDSs represent different COG categories; circle 4 is rRNA and tRNA; circle 5 indicates GC content information; the outward red part indicates that the GC content of the region is higher than the average GC content of the whole genome, while the inward blue part is the opposite; the higher the peak value is, the greater the difference from the average GC content is; the innermost circle is the GC skew value, whose specific algorithm is $(G-C)/(G+C)$.

表 4 MM2101 菌株的毒力因子预测

Table 4 Prediction of virulence factors in MM2101 strain

毒力因子分类	基因名称	基因座标签	产物
Category of virulence factors	Gene name	Locus tag	Product
Adherence	<i>clfA</i>	NZD48_01210	Clumping factor A
	<i>cna</i>	NZD48_06590	Collagen adhesion
	<i>fnbA</i>	NZD48_04920	Fibronectin binding protein
	<i>sdrE</i>	NZD48_00645	Ser-Asp rich fibrinogen-binding protein
	–	NZD48_00650	Ser-Asp rich fibrinogen-binding protein
	<i>spa</i>	NZD48_00870	Staphylococcal protein A
Enzyme	<i>sspB</i>	NZD48_09875	Cysteine protease
	<i>hysA</i>	NZD48_11850	Hyaluronate lyase
	<i>geh</i>	NZD48_01995	Lipase
	<i>nuc</i>	NZD48_07300	Thermonuclease
Immune evasion	<i>adsA</i>	NZD48_02520	5'-nucleotidase
	–	NZD48_02950	LCP family protein
	<i>wecB</i>	NZD48_03875	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase
	–	NZD48_08910	Nucleotide sugar dehydrogenase
Secretion system	<i>esaA</i>	NZD48_11690	Type VII secretion protein EsaA
	<i>esaB</i>	NZD48_11680	Type VII secretion protein EsaB
	<i>essB</i>	NZD48_11675	Type VII secretion protein EssB
	<i>essC</i>	NZD48_11670	Type VII secretion protein EssC
	<i>esxA</i>	NZD48_11695	WXG100 family type VII secretion target
Toxin	–	NZD48_00675	Superantigen-like protein
Surface protein anchoring	<i>lgt</i>	NZD48_09795	Prolipoprotein diacylglyceryl transferase

注：–：基因暂未命名

Note: –: The gene has not been named.

表 5 MM2101 菌株的耐药基因预测

Table 5 Prediction of antimicrobial resistance genes in MM2101 strain

耐药基因	基因座标签	表型	登录号
Resistance gene	Locus tag	Phenotype	Accession No.
<i>tet(M)</i>	NZD48_00360	Tetracycline resistance	X92947
<i>tet(L)</i>	NZD48_12040	Tetracycline resistance	M29725
<i>dfpG</i>	NZD48_00905	Trimethoprim resistance	AB205645
<i>erm(B)</i>	NZD48_10790	Macrolide resistance	U18931
<i>fexA</i>	NZD48_05815	Phenicol resistance	AJ549214
<i>aadD</i>	NZD48_12035	Aminoglycoside resistance	M19465
<i>ant(6)-Ia</i>	NZD48_10820	Aminoglycoside resistance	KF421157
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	NZD48_03440	Aminoglycoside resistance	M13771
<i>blaZ</i>	NZD48_10740	β -lactam resistance	JBTH01000015
<i>mecA</i>	NZD48_00300	β -lactam resistance	BX571856
<i>vga(A)_V</i>	NZD48_04950	Lincosamides, streptogramin A, and pleuromutilins resistance	AF186237

Adkins 等基于 *S. agnetis*、猪葡萄球菌和金黄色葡萄球菌 *aroD* 基因(编码 3-脱氢奎尼酸脱水酶)序列的不同,建立了多重 PCR 方法鉴别这 3 种细菌^[24]。*S. agnetis* 的 *aroD* 基因高度保守,不同分离株中该基因的相似性超过 99%;由于只收集到 1 株猪葡萄球菌,Adkins 等未能评估猪葡萄球菌中 *aroD* 基因的保守性^[24]。本研究发现猪葡萄球菌 MM2101 菌株与参考菌株 *aroD* 基因的相似性约为 96%,而且鉴别引物的位置有多个碱基不同。因此,该方法不适用于对猪葡萄球菌的鉴别。

本研究初步探讨了分离菌株 MM2101 的一些生物学特性。MM2101 在绵羊血平板上不形成溶血环,说明该菌株无溶血活性,这与前期的研究结果^[8,16-18]一致。猪葡萄球菌既有血浆凝固酶阳性,也有血浆凝固酶阴性^[7-8,24-25]。前期研究表明,猪葡萄球菌的血浆凝固酶活性较弱,通常需要反应 18-24 h 才能检测到^[24]。本研究发现 MM2101 在反应 24 h 时仍不能使兔血浆凝固。值得注意的是,基因组注释显示该菌株含有编码血浆凝固酶的基因 *coa* (NZD48_11815)。我们推测,该菌株的 *coa* 基因不表达,或者表达的血浆凝固酶无活性。本研究还发现 MM2101 在 TSA 平板和 TSB 培养基中生长良好,后续可以用这 2 种培养基培养该菌株。

小鼠感染模型被广泛用于病原菌致病性的评估。王明月等将 1×10^8 CFU 的猪葡萄球菌通过腹腔接种昆明小鼠,感染后 24 h 内小鼠死亡率为 60%,36 h 内为 100%^[8]。李秀丽等用猪葡萄球菌感染 BALB/c 小鼠,当接种剂量为 5×10^8 CFU 时,小鼠发病率为 100%^[17]。本研究用 BALB/c 小鼠感染模型评估猪葡萄球菌的致病性,通过两种接种方式感染小鼠。当用尾静脉注射的方式感染小鼠时,接种 4×10^8 CFU 的 MM2101 即可使小鼠全部死亡,当接种剂量为 1.2×10^9 CFU 时小

鼠死亡时间进一步提前。当用腹腔注射的方式感染相同剂量的 MM2101 时,小鼠死亡时间延迟,死亡率降低。该结果并不意外,因为用尾静脉注射接种时细菌更容易进入血液循环,进而通过血液扩散并致病。以上结果表明,分离菌株 MM2101 具有高致病性,BALB/c 小鼠尾静脉或腹腔感染模型适用于评估猪葡萄球菌的致病性。

猪葡萄球菌分离株的药物敏感性已经被广泛研究过,许多分离株具有多重耐药性,而且不同分离株的药物敏感性不一致^[8,16-20,26]。本研究发现,MM2101 对苯唑西林、大观霉素等 7 种药物敏感,对青霉素 G、红霉素等 9 种药物耐药。因此,该散养户可以用苯唑西林、大观霉素等药物防控猪葡萄球菌感染。药敏试验结果也说明分离菌株 MM2101 具有多重耐药性,这与前期的研究结果^[8,16-20,26]相似。

VFDB 预测 MM2101 菌株的基因组中编码 21 个毒力因子,包括黏附素、酶类、免疫逃逸因子、分泌系统组分、毒素和表面锚定蛋白。需要注意的是,还有一些毒力因子未被 VFDB 预测到,如丝氨酸蛋白酶和双组分调控系统。MM2101 菌株的高致病性可能与其携带的多个毒力因子有关。此外,MM2101 菌株的基因组中编码 11 个耐药基因,推测这些耐药基因通过多种机制协同介导 MM2101 菌株的多重耐药性。后续我们将建立猪葡萄球菌基因敲除和回补技术,对预测的毒力因子和耐药基因进行实验验证,并挖掘新的毒力因子和耐药基因。

在分离关节脓液中的细菌时,得到的菌落形状、大小、颜色等特征较一致,我们随机挑取了 5 个单菌落进行后续的纯化和革兰氏染色,结果显示,这 5 个菌镜检特征一致,应为同一种菌。16S rRNA 基因和全基因组测序结果显示分离菌株为猪葡萄球菌。猪葡萄球菌主要导致

猪渗出性皮炎^[5]；此外，也有少量该菌感染导致猪关节炎的病例报道^[27-28]。根据发病猪的临床症状和病理变化，可以排除病毒感染；此外，在关节脓液中只分离到了猪葡萄球菌，而且小鼠实验结果显示，分离菌株具有高致病性。因此，可以推断猪葡萄球菌是导致仔猪关节发病的唯一或主要病原。在条件允许时，我们将根据科赫法则，用 MM2101 菌株感染仔猪，观察是否导致关节发病，以进一步确定猪葡萄球菌感染与仔猪关节发病的关系。后续可以对广东省茂名市的猪关节炎病例进行病原学和流行病学调查，明确猪葡萄球菌的感染情况。此外，结合比较基因组学、转录组学和蛋白组学探究猪葡萄球菌导致关节炎的分子机制也具有重要意义。

本研究从发病仔猪的关节脓液中分离到一株猪葡萄球菌，分离菌株不溶血，无血浆凝固酶活性，在 TSB 培养基中于 37 °C、120 r/min 摇动培养条件下生长良好。分离菌株具有高致病性和多重耐药性，可用苯唑西林、大观霉素等药物防控该菌感染。此外，解析了分离菌株的基因组信息，发现其携带多个毒力因子和耐药基因，为后续深入研究该菌致病和耐药的分子机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Lee SI, Kim SD, Park JH, Yang SJ. Species distribution, antimicrobial resistance, and enterotoxigenicity of non-*aureus* staphylococci in retail chicken meat[J]. *Antibiotics: Basel, Switzerland*, 2020, 9(11): 809
- [2] De Buck J, Ha V, Naushad S, Nobrega DB, Luby C, Middleton JR, De Vlieghe S, Barkema HW. Non-*aureus* staphylococci and bovine udder health: current understanding and knowledge gaps[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 658031
- [3] Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(3): 603-661
- [4] Fisher EL, Otto M, Cheung GYC. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 436
- [5] Li Y, Gou H, Chu P, Zhang K, Jiang Z, Cai R, Song S, Bian Z, Li C. Comparison of host cytokine response in piglets infected with toxigenic and non-toxigenic *Staphylococcus hyicus*[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 639141
- [6] Wang L, Wu ZW, Li Y, Dong JG, Zhang LY, Liang PS, Liu YL, Zhao YH, Song CX. Profiling and identification of novel immunogenic proteins of *Staphylococcus hyicus* ZC-4 by immunoproteomic assay[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0167686
- [7] 刘金凤, 陈冰, 谢江, 白安斌, 马玲, 梁兆强, 李辉, 吴健敏. 凝固酶阴性猪葡萄球菌的分离鉴定及耐药性研究[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(9): 29-34
Liu JF, Chen B, Xie J, Bai AB, Ma L, Liang ZQ, Li H, Wu JM. Isolation and identification of coagulase negative *Staphylococcus hyicus* and analysis of its drug resistance[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(9): 29-34 (in Chinese)
- [8] 王明月, 王新平, 郭昌明, 邢泽黎, 朱利塞, 鲁海冰, 盖小春, 王方. 吉林省某猪场新发猪葡萄球菌引起的化脓性肺炎[J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(9): 1577-1581
Wang MY, Wang XP, Guo CM, Xing ZL, Zhu LS, Lu HB, Gai XC, Wang F. Rare infection characterized with suppurative pneumonia by *Staphylococcus hyicus*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(9): 1577-1581 (in Chinese)
- [9] Wang M, Hu J, Zhu L, Guo CG, Lu H, Guo CM, Li X, Wang X. A fatal suppurative pneumonia in piglets caused by a pathogenic coagulase-positive strain of *Staphylococcus hyicus*[J]. *Veterinary Research Communications*, 2017, 41(2): 139-146
- [10] Alebie A, Molla A, Adugna W, Tesfaye A, Ejo M. Prevalence, isolation, identification, and risk factors of major bacterial cause of camel subclinical mastitis[J]. *BioMed Research International*, 2021, 2021: 5522331
- [11] Fesseha H, Mathewos M, Aliye S, Wolde A. Study on prevalence of bovine mastitis and associated risk factors in dairy farms of modjo town and suburbs, central oromia, ethiopia[J]. *Veterinary Medicine (Auckland, NZ)*, 2021, 12: 271-283
- [12] Kasa G, Tegegne B, Tadesse B. Isolation and identification of major pathogenic bacteria from clinical mastitic cows in Asella Town, Ethiopia[J]. *Veterinary*

- Medicine International, 2020, 2020: 6656755
- [13] Casanova C, Iselin L, Steiger NV, Sendi P. *Staphylococcus hyicus* bacteremia in a farmer[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(12): 4377-4378
- [14] Foissac M, Lekaditi M, Loutfi B, Ehrhart A, Dauchy FA. Spondylodiscitis and bacteremia due to *Staphylococcus hyicus* in an immunocompetent man[J]. Germs, 2016, 6(3): 106-110
- [15] Kirk F, Mashicharan M, Braddick M, Saxena P. *Staphylococcus hyicus*, a novel pathogen causing destructive infective endocarditis requiring mitral annular reconstruction[J]. JTCVS Techniques, 2022, 13: 70-73
- [16] 李艳, 张乐宜, 宋长绪. 1株猪葡萄球菌强毒株的分离鉴定及致病性试验[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(9): 1456-1462
- Li Y, Zhang LY, Song CX. Isolation and identification of a high virulent *Staphylococcus hyicus* and its pathogenic to piglets[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2015, 35(9): 1456-1462 (in Chinese)
- [17] 李秀丽, 董志民, 田向学, 任卫科, 燕晓翠, 李富强, 张莉, 鄢明华. 猪葡萄球菌 437-2 株的分离鉴定及生物学特性[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(2): 246-252
- LI XL, Dong ZM, Tian XX, Ren WK, Yan XC, Li FQ, Zhang L, Yan MH. Isolation, identification and biological characteristics of *Staphylococcus hyicus* 437-2 strain[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2021, 41(2): 246-252 (in Chinese)
- [18] 沈莉萍, 王建. 一例猪渗出性皮炎的诊治[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2015(4): 114, 116
- Shen LP, Wang J. Diagnosis and treatment of a case of pig exudative dermatitis[J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2015(4): 114, 116 (in Chinese)
- [19] 徐国, 胡玲玲, 梁海英, 曾智勇, 王彬, 叶百川, 张爱琼, 咸文, 何小莉. 一例仔猪渗出性皮炎的诊断与防治[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(12): 127-128, 246
- Xu G, Hu LL, Liang HY, Zhen ZY, Wang B, Ye BC, Zhang AQ, Xian W, He XL. Diagnosis and prevention of a case of piglet exudative epidermitis[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018(12): 127-128, 246 (in Chinese)
- [20] 陈亚强, 彭津津. 一例仔猪渗出性皮炎的诊治[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019(4): 103-104, 106, 181
- Chen YQ, Peng JJ. Diagnosis and treatment of a case of exudative dermatitis in piglets[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2019(4): 103-104, 106, 181 (in Chinese)
- [21] Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, Mackichan J, Maeda MK, Miller S, Nadarajan R, Bridie EL, Lynch SV. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117617
- [22] Jousson O, Bello DD, Vanni M, Cardini G, Soldani G, Pretti C, Lntorre L. Genotypic versus phenotypic identification of staphylococcal species of canine origin with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 123(1-3): 238-244
- [23] Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 5114
- [24] Adkins PRF, Middleton JR, Calcutt MJ, Stewart GC, Fox LK. Species identification and strain typing of *Staphylococcus agnetis* and *Staphylococcus hyicus* isolates from bovine milk by use of a novel multiplex PCR assay and pulsed-field gel electrophoresis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2017, 55(6): 1778-1788
- [25] Jenkins SN, Okello E, Rossitto PV, Lehenbauer TW, Champagne J, Penedo MCT, Arruda AG, Godden S, Rapnicki P, Gorden PJ, Timms LL, Aly SS. Molecular epidemiology of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated at different lactation stages from dairy cattle in the United States[J]. PeerJ, 2019, 7: e6749
- [26] Moreno AM, Moreno LZ, Poor AP, Matajira CEC, Moreno M, Gomes VTDM, Silva GFRD, Takeuti KL, Barcellos DE. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus hyicus* strains isolated from Brazilian swine herds[J]. Antibiotics: Basel, Switzerland, 2022, 11(2): 205
- [27] 李云岗. 猪葡萄球菌亚种是幼猪关节炎的重要病因[J]. 动物医学进展, 1997(4): 43-44
- Li YG. *Staphylococcus hyicus* ssp *hyicus* is an important cause of arthritis in piglets[J]. Progress in Veterinary Medicine, 1997(4): 43-44 (in Chinese)
- [28] Hill BD, Corney BG, Wagner TM. Importance of *Staphylococcus hyicus* ssp *hyicus* as a cause of arthritis in pigs up to 12 weeks of age[J]. Australian Veterinary Journal, 1996, 73(5): 179-181