

渠凤甜,周海健,薛佳琦,等. 虾源达卡气单胞菌全基因组分析和致病性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(3): 24-36.
Qu FT, Zhou HJ, Xue JQ, et al. Whole-genome analysis and pathogenicity of *Aeromonas dhakensis* isolated from shrimps [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 24-36.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.03.004

虾源达卡气单胞菌全基因组分析和致病性研究

渠凤甜^{1,2},周海健¹,薛佳琦³,杜小莉¹,胡锦涛瑞¹,崔志刚¹,谢桂林²,
刘辰庚^{4*},孟双^{1*}

(1.中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,北京 102206;2.东北农业大学生命科学学院,哈尔滨 150000;
3.华北理工大学临床医学院,河北 唐山 063000;4.首都医科大学附属北京安定医院检验科,北京 102206)

【摘要】 目的 了解虾源达卡气单胞菌的毒力、耐药基因分布和全基因组信息,并初步评估达卡气单胞菌的致病性。方法 对虾源分离株进行分子鉴定和多位点序列分型;利用 β -溶血和胞外蛋白酶实验、秀丽隐杆线虫液体毒性实验、细胞毒实验、小鼠实验及毒力基因检测研究其致病性;通过药敏实验及耐药基因检测分析其耐药特征;利用 eggnog、Prophage Hunter 工具对全基因组序列进行分析。结果 菌株 18FX22 鉴定为达卡气单胞菌。该菌的致病性主要表现为:有 β -溶血能力和胞外蛋白酶活性;对秀丽隐杆线虫、小鼠成纤维细胞和小鼠均有致病性。经检测,该菌携带 7 种毒力基因和 12 种耐药基因,发现其对阿莫西林/克拉维酸、头孢唑林和多粘菌素 3 种药物有耐药性。全基因组测序结果发现:18FX22 的全基因组大小为 4 811 079 bp,GC 含量为 61.33%。COG 注释发现 18FX22 共有 3850 个基因,具有 20 类功能。前噬菌体预测结果发现 18FX22 的基因组中含有 2 个前噬菌体序列。全球达卡气单胞菌的聚类结果显示该菌与 GCA016729585 的进化关系更近。结论 本研究从商品虾分离出达卡气单胞菌,发现该菌株的毒性较强,指示应加强海鲜食品安全的管控,并为达卡气单胞菌的防治提供参考。

【关键词】 达卡气单胞菌;致病性;全基因组测序;前噬菌体;COG 功能分析

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2023) 03-0024-13

Whole-genome analysis and pathogenicity of *Aeromonas dhakensis* isolated from shrimps

QU Fengtian^{1,2}, ZHOU Haijian¹, XUE Jiaqi³, DU Xiaoli¹, HU Jinrui¹, CUI Zhigang¹, XIE Guilin², LIU Chengeng^{4*},
MENG Shuang^{1*}

(1. Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China. 2. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Haerbin 150000. 3. Clinic Medical College, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000. 4. Department of Clinical Laboratory, Capital Medical University Beijing Anding Hospital, Beijing 102206)

【Abstract】 Objective To investigate the virulence, drug resistance genes, and whole genome information of *Aeromonas dhakensis* from shrimp and preliminarily evaluate the pathogenicity of *Aeromonas dhakensis*. Methods Molecular identification and MLST typing of shrimp isolates were performed. The pathogenicity of this strain was examined

【基金项目】北京市属医院科研培育计划(PX2022077)。

【作者简介】渠凤甜(1995—),女,硕士研究生,研究方向:动物源食品致病性研究。E-mail: 2300706031@qq.com

【通信作者】孟双(1981—),女,副研究员,研究方向:气单胞菌的分子流行病学及致病性研究。E-mail: mengshuang@icdc.cn

刘辰庚(1980—),男,主任技师,研究方向:临床生物化学和微生物学检验。E-mail: brown117@163.com

* 共同通信作者

by β -hemolysis, extracellular protease, liquid toxicity test, cytotoxicity, and mouse tests, and virulence gene detection. The characteristics of drug resistance were analyzed by a drug sensitivity test and drug resistance gene detection. Eggnog and Prophage Hunter tools were used to analyze the whole genome sequence. **Results** The 18FX22 strain was identified as *Aeromonas dhakensis*. The pathogenicity of this strain was characterized by β -hemolysis and extracellular protease activity. It was pathogenic to *Caenorhabditis elegans*, mouse fibroblasts, and mice. The strain was resistant to amoxicillin/clavulanic acid, cefazolin, and polymyxin, which carried 10 virulence genes and 12 drug resistance genes. Whole genome sequencing showed that the whole genome size of 18FX22 was 4 811 079 bp and GC content was 61.33%. COG annotation indicated that 18FX22 had 3850 genes with 20 classes of functions. Prophage prediction revealed that the 18FX22 genome contained two prophage sequences. Cluster analysis of *Aeromonas dhakensis* worldwide showed that this strain was more closely related to GCA016729585. **Conclusions** *Aeromonas dhakensis* was isolated from commercial shrimp and found to be highly toxic, indicating that the control of seafood food safety should be strengthened. This study provides a reference to prevent and control *Aeromonas dhakensis* infection.

[Keywords] *Aeromonas dhakensis*; pathogenicity; whole-genome sequencing; Prophage; COG function analysis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

2002 年, Huys 等^[1]首次在腹泻儿童的粪便中发现了达卡气单胞菌, 因其与嗜水气单胞菌具有相似的特征, 故被称为嗜水气单胞菌亚种。达卡气单胞菌是一类新发现的气单胞菌种, 它曾多次在临床中因生化鉴定被误认为是嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌和豚鼠气单胞菌^[1]。但有学者依据分子手段鉴定该菌种与 MartinezMurcia 在葡萄牙波尔图水族馆水源和鱼中分离的水族馆气单胞菌是同一个分类单元, 因此将这两个菌种定义为达卡气单胞菌^[2]。达卡气单胞菌分布在温度较高的环境中, 环境耐受性较强, 对多种水生生物, 家禽、家畜均有感染^[3-4]。受感染的鱼虾类、家禽和家畜肉类可能会引起人体感染气单胞菌, 致使人出现急性肠胃炎、菌血症等一系列临床现象。有研究指出在临床气单胞菌株中, 与嗜水气单胞菌相比, 达卡气单胞菌的毒性更强^[5]。

气单胞菌是一种人、兽、鱼共患的条件致病菌, 能形成以严重组织损害为特征的临床表现, 其携带的毒力基因众多^[6]。气单胞菌致病机制可能是通过多种毒力基因的单独或联合作用来克服宿主的免疫反应, 从而引发感染^[7]。气单胞菌在宿主细胞中的粘附、定植是感染的初始阶段, 其定植过程中最常见的结构是侧鞭毛 (*laf*)、极性鞭毛 (*fla*)、菌毛、荚膜、外膜蛋白 (Outer membrane proteins omp)、黏附素 (Adhesin)、S 层蛋白和脂多糖 (LPS)^[8]。此外, 气单胞菌的多种胞外酶和分泌毒素, 会加剧宿主细胞感染, 如蛋白酶、脂肪酶、肠毒素、溶血素、志贺毒素、热稳定细胞毒性肠毒素 (*alt*)、热不稳定毒素 (*ast*)、细胞毒性肠毒素 (*act*)、溶血素 (*hlyA*) 和

气溶素 (*aerA*)^[9-10]。毒力基因在气单胞菌中的分布情况, 能够反映气单胞菌有潜在致病性。全基因组序列正迅速成为预测一些致病菌毒力基因的有利工具, 尤其是对于了解菌株基因特征和进化关系具有重要意义^[11]。

近年来, 临床频繁使用抗生素治疗气单胞菌感染, 使得气单胞菌的耐药趋势日益严重。由于耐药基因和表型间没有明确的关联性, 因此需要对更多气单胞菌进行鉴定, 分析气单胞菌耐药性与菌种差异和抗生素使用的相关性, 才能最大限度地预防和治疗流行病的暴发。

本研究在商品虾中分离出一株达卡气单胞菌 18FX22, 拟对其进行种属鉴定和分型分析, 并对其进行秀丽隐杆线虫液体毒性实验、细胞毒实验、动物毒理实验和药物敏感实验来明确分离株的致病性和耐药性, 进一步对其进行全基因组分析, 了解该菌株的遗传结构和流行性, 为达卡气单胞菌的遗传进化提供参考, 同时为临床防治该菌引发的疾病提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株

菌株采集自安徽省马鞍山市商品虾样本, 采集时间为 2018 年 9 月。秀丽隐杆线虫和大肠杆菌 OP50 由北京市疾病预防控制中心传染病所赠送。

1.1.2 实验动物

SPF 级、BALB/c 品系、24 只、体重 20 g 左右、6~8 周龄、雌鼠, 购自北京维通利华实验动物技术

有限公司[SCXK(京)2021-0006]。实验动物由中国疾病预防控制中心动物实验中心饲养[SYXK(京)2017-0021]。饲养所需设备有:生物安全换笼台、生物安全柜、负压解剖台、IVC(负压隔离)等;实验动物分别在 20~25℃ IVC 环境下饲养。为保障实验动物的福利伦理,本研究经由实验动物使用与管理委员会批准(IACUC2022-001)。在实验动物饲养和实验过程中,按实验动物使用的 3R 原则对实验小鼠给予了人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

Aeromonas Medium Base(英国 OXOID 公司,批号:2438051);BHI 琼脂(英国 OXOID 公司,批号:2547663);LB 肉汤(英国 OXOID 公司,批号:2495802);QIA amp DNA Mini Kit 试剂盒(凯杰企业管理(上海)有限公司,批号:160044981);5%羊血琼脂平板(北京顺义天竺空港工业,批号:XW02200787);0.2%脱脂奶粉琼脂平板(上海科马嘉微生物技术有限公司,批号:20210303);DMEM 细胞培养基(上海语纯生物科技有限公司,批号:2186868);CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity assay(USA Promega Corporation,批号:0000452280);PBS 溶液(北京百泰克生物技术有限公司,批号:8119421);Phoenix NMIC-413 药敏板(北京百泰克生物技术有限公司,批号:0294495);Bacto™ Agar 试剂(美国 BD 公司,批号:0063472);Bacto™ Peptone 试剂(赛默飞世尔科技公司,批号:0175364);NaCl 试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20201104);MgSO₄ 试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20201019);CaCl₂ 试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20190612);Cholesterol solution(赛默飞世尔科技公司,批号:20191207);K₂HPO₄ 试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20200925);Na₂HPO₄ 试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20201014);KH₂PO₄ 试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20201023);Citric acid monohydrate(柠檬酸一水合物)(国药集团化学试剂有限公司,批号:20200521);Tri-potassium citrate monohydrate(三钾一水柠檬酸)(国药集团化学试剂有限公司,批号:20190815);EDTA 二钠试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20201219);FeSO₄·7H₂O 试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20191212);MnCl₂·4H₂O 试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20200610);ZnSO₄·7H₂O 试剂(国药集团化学试剂

有限公司,批号:20200611);CuSO₄·5H₂O 试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20210208);NaClO 试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20200601);NaOH 试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20190106)

小型台式冷冻离心机(TY2012000052,德国-Eppendorf);高速冷冻离心机(Sigma 3-16PK,德国 Sigma);Agilent 2100 微流控生物(G2938C,德国/Agilent);多功能显微镜(TS100,日本尼康株式会社);生化培养箱(ICP600,德国 Memmert);生物安全柜(HR1200-ITA2,中国青岛海尔特种电器有限公司);涡旋振荡器(HYQ-3110,美国精骐有限公司);震荡恒温金属浴(MB102,杭州博日科技有限公司);紫外分光光度计(CARY-50,美国瓦里安中国有限公司);微生物药敏分析仪(BD phoenix™ M50, Becton Dickinson and Company);台式恒温摇床(ZWY-200D,上海智诚分析仪器制造有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 分种分型

(1)分离纯化

取 25 g 商品虾样本,放入 225 mL 灭菌后的 BHI 液体培养基中,180 r/min,37℃ 过夜培养。用 10 μL 接菌环,取 1 环增菌液,在选择性培养基上(Aeromonas medium base)三区划线,37℃ 培养 16~20 h。培养基上生长出来的菌,进一步纯化为单菌落,并命名为 18FX22。

(2)种属鉴定

将纯化的菌株 18FX22 接种到 BHI 固体培养基中,37℃ 培养 18~24 h,利用细菌 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA 后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。依据 NCBI 中串联的 *gyrB/cpn60* 序列,与获得的基因组 DNA 序列进行比对,对分离株进行种属鉴定。

(3)多位点序列分型

将菌株的基因组 DNA 与 6 种管家基因 *gluA*、*groL*、*gyrB*、*metG*、*ppsA*、*recA* 序列进行比对,并在 MLST(Multilocus Sequence Typing) Database 获取 ST 型别。

1.3.2 菌株 18FX22 全基因组信息及功能注释

(1)全基因组信息及 COG 功能注释

将获取的基因组 DNA 用(qubit)核酸浓度检测仪检测纯度,确保 DNA 检测合格后,构建基因组小片段文库(350 bp),然后利用 Illumina 公司的

HiSeq2500 测序平台进行双末端测序,测序深度 200X。获得的原始数据去除引物、接头和筛除低质量数据之后,利用短序列组装软件 SOAPdenov02 对二代测序后的优化序列拼接,得到最优的 contigs 组装结果。Contigs 之间的拼接组装由 PCR 扩增及测序的方式完成。

得到完整的基因组序列后,利用 prokka 将全基因组 DNA 分析为注释好的蛋白序列,再将蛋白序列上传到 <http://eggno5.embl.de/#/app/emapper>,得到功能蛋白分组数据,并使用 R 软件中的 ggplot2 软件绘制 COG 功能分类图。

(2) 前噬菌体研究

利用 Prophage Hunter 在线网站预测菌株 18FX22 的前噬菌体序列。

(3) 全球 SNP 聚类研究

将 18FX22 与 NCBI 中的达卡气单胞菌进行 SNP 聚类分析。

1.3.3 致病性研究

(1) 毒力基因检测

筛选 36 种毒力基因 (*ast*、*lip*、*ela*、*act*、*alt*、*aerA*、*hlyA*、*fla*、*laf*、*ascV*、*aexT*、*Exu*、*GcaT*、*AhyB*、*Epr*、*Ser*、*AexU*、*algR*、*algZ*、*WaaF*、*pscT*、*pscS*、*pscR*、*pscN*、*pilT*、*pilU*、*flgG*、*flgI*、*flaQ*、*fliG*、*fliM*、*fliN*、*flhA*、*fliC*、*fliI*、*luxS*),在 NCBI 中下载上述基因的编码序列,分别与分离株 18FX22 及 NCBI 中现存的 54 株达卡气单胞菌的全基因组序列进行比对,将比对后的数据结果,用 R 软件的 ph heatmap 绘图。

(2) β -溶血和胞外蛋白酶实验

将 18FX22 菌株分别接种于含 5% 的羊血平板和 0.2% 的脱脂奶粉平板内,37℃ 培养 18~24 h,观察是否有透明或水解圈的产生。

(3) 秀丽隐杆线虫液体毒性实验

在 NGM 平板内铺上 200 μ L OP50 活菌液,静置 2 h 备用。用 S-basal 试剂把长有秀丽隐杆线虫的平板洗 2~3 遍,并将洗液转入 15 mL 离心管内,静置 7~8 min,待虫体沉淀,弃上清。在虫体沉淀的离心管中,加入 10 mL 裂解液,在震荡仪上震荡 7~8 min,3300 r/min 离心 5 min,弃上清;将沉淀下来的虫卵转移至含 OP50 活菌的 NGM 平板内,20℃ 培养 40 h 即可得到 L₄ 时期蠕虫。将 L₄ 时期蠕虫洗至 15 mL 离心管内,把实验所需的蠕虫 (40~50 只/孔) 置于 12 孔板内,并加入 10 μ L 2×S-Medium 试剂和 190 μ L 气单胞菌液 (气单胞菌过夜摇 24 h 左右,

调整菌浓度在 OD₆₀₀ = 2.5 左右),对照组添加 190 μ L 2×S-Medium 试剂。为防止秀丽隐杆线虫繁殖影响实验,每孔均添加 5 μ L 氟脱氧尿苷。

(4) 细胞毒实验

利用小鼠 C₂C₁₂ 成纤维细胞进行细胞毒实验,该细胞培养在含有 10% 胎牛血清 (FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) 的 Dulbecco's modified Eagle's 培养基 (DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA) 中,37℃,5% CO₂ 孵育 24 h。待细胞状态良好时,用 DMEM 溶液重复洗涤 3 次,最后加入处理好的气单胞菌液,37℃,5% CO₂ 反应 3 h。气单胞菌与细胞的感染倍数 (MOI) 为 100。用 CytoTox 96[®] (Promega, Madison, USA) 来检测 3 h 后反应液中乳酸脱氢酶的含量。以 10×裂解液处理组 (Promega, Madison, WI) 为阳性对照,DMEM 处理组 (Gibco, Grand Island, NY, USA) 为阴性对照。细胞毒实验的具体流程参见文献^[12]。细胞毒性测定是通过测定气单胞菌菌株与 10×裂解液 (定义为 100% 细胞毒性) 诱导的 LDH 水平进行比较,来评估气单胞菌的毒性强弱。

(5) 小鼠致病性实验

将 *A. dhakensis* (18FX22) 划线培养,挑取单菌落于 BHI 液体培养基中,37℃,220 r/min 培养过夜。以 1:100 比例将菌液接种至新的 BHI 液体培养基中,37℃,220 r/min 培养 3 h。待菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.6 时,10 000 r/min 离心 2 min, PBS 洗涤菌体 3 次。BALB/c 小鼠适应 1 周后,对 6~8 周雌鼠采取腹腔注射,一次性注射稀释浓度分别为 1×10⁵、1×10⁶、1×10⁷、1×10⁸ 和 1×10⁹ CFU/mL 的气单胞菌液 200 μ L。注射后记录小鼠的死亡情况,分别使用寇氏改良公式和 SPSS 软件概率 (probit) 回归计算小鼠 24 h 半数致死量 LD₅₀。实验分组:1 个对照组,5 个气单胞菌处理组,每组 4 只小鼠,共 24 只小鼠 (6 笼)。

1.3.4 耐药性研究

(1) 耐药基因检测

筛选 63 种耐药基因 (*blaTEM*、*blaSHV*、*blaCTX-M*、*blaKPC*、*blaOXA*、*blaCMY*、*blaAXC*、*blaFOX*、*blaAQU*、*blaAQU-1*、*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetM*、*tetR*、*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*qnrVC4*、*armA*、*aphAI-IAB*、*aac* (3')、*Ila*、*aac* (6')、*Ib*、*gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE*、*QepA*、*mcr-1*、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4*、*sul1*、*sul2*、(AGly) *aadA1*、(AGly) *strA*、*aac* (6')、*Ia*、*aac* (6')、*Ib-cr*、*ant* (3'')-

li-aac6')-*Ild*、*CRP*、*MexB*、*aac* (3)-*Ild*、*aadA1*、*aadA2*、*aadA4*、*ampH*、*aph* (3')-*Ia*、*aph* (6)-*Id*、*arnA*、*catB8*、*cepS*、*cmlA5*、*cphA1*、*cphA2*、*cphA7*、*cphA8*、*floR*、*imiH*、*imiS*、*mph* (A)、*smeE*),在 NCBI 中下载耐药基因的编码序列,分别与分离株 18FX22 及 NCBI 中现存的 54 株达卡气单胞菌的全基因组序列进行比对,将比对后的数据结果,用 R 软件的 pheatmap 绘图。

(2) 药物敏感实验

采用美国临床实验室标准化协会 (clinical and laboratory standards institute, CLSI) 推荐的微量肉汤稀释法。以 *Escherichia coli* ATCC25922 为质控菌株,选择 21 种抗生素对气单胞菌进行药敏实验。具体步骤参照文献^[13]。

1.4 统计学方法

秀丽隐杆线虫液体毒性实验和细胞毒实验的数据均以平均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,分别采用 *T* 检验和 Graphpad 8.0 进行分析、绘图, $P<0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 分种分型

2.1.1 分离纯化

纯化后的分离株在 *Aeromonas medium base* 上培养,其菌落呈圆形,边缘整齐,绿色,表面光滑湿润,中央微凸。达卡气单胞菌在选择性培养基中的纯化情况如图 1 所示。

2.1.2 种属鉴定

获得全基因组序列,与 NCBI 中的 *gyrB/cpn60* 参考序列进行 blast 比对,并用 MEGA7.0 分析菌株 18FX22 的进化关系,系统进化树如图 2 所示,18FX22 同其他达卡气单胞菌序列聚为一支,具有较近的亲缘关系,说明分离株 18FX22 在分类上属于达卡气单胞菌。

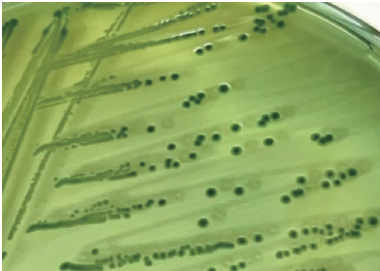


图 1 达卡气单胞菌在选择性培养基中的生长情况
Figure 1 Growth of *Aeromonas dhakensis* in selective medium

2.1.3 多位点序列分型

为进一步了解 18FX22 的分型特征,本研究利用气单胞菌的 6 种管家基因 (*gltA*、*groL*、*gyrB*、*metG*、*ppsA* 和 *recA*) 对 18FX22 进行了多位点序列分型。将上述 6 种管家基因的核酸序列提交至 pubmlst.org 网站,以获得序列编号,如果提交的序列未在网站发表,需要重新提交来获得新的编号,如表 1 所示。菌株 18FX22 属于新的序列类型,为 ST946。

2.2 全基因组研究

2.2.1 菌株 18FX22 全基因组信息及功能注释

菌株 18FX22 进行全基因组测序,其结果显示:基因组大小为 4 811 079 bp,GC 含量为 61.33%,共检测出 4267 个编码序列 (CDS)。COG 注释发现 18FX22 中共有 3850 个基因具有 20 类功能,如图 3 所示。主要为氨基酸转运和代谢、转录、能量生产转换和细胞壁/膜/包膜生物形成。此外,19.8% 的基因 COG 分类不明确,功能未知。

2.2.2 菌株 18FX22 的前噬菌体序列信息

利用 Prophage Hunter 分析菌株 18FX22 的前噬菌体携带情况。表 2 展示菌株 18FX22 携带 2 个前噬菌体序列,长度分别为 10.7 kb 和 12.6 kb,蛋白编码序列分别有 15 和 8 个,GC 含量分别为 43.84% 和 38.57%。

2.2.3 与全球达卡气单胞菌的聚类分析

将达卡气单胞菌 18FX22 和 NCBI 中的 54 株达卡气单胞菌进行 SNP 聚类分析,如图 4 所示。发现该菌株与 GCA016729585 的进化关系更近。其中,有多数达卡气单胞菌株携带有前噬菌体序列。

表 1 分离株 18FX22 的 6 种管家基因和序列型

Table 1 The six housekeeping genes and sequence types of 18FX22 isolate

菌株 Strain	<i>gltA</i>	<i>groL</i>	<i>gyrB</i>	<i>metG</i>	<i>ppsA</i>	<i>recA</i>	序列类型 Sequence types
18FX22	507	164	415	267	541	160	946

表 2 达卡气单胞菌 18FX22 的前噬菌体检出情况

Table 2 Prophage detection of *Aeromonas dhakensis* 18FX22

前噬菌体序列 Prophage sequence	序列长度 (kb) Sequence length	CDS 数量 CDS amount	GC 含量 GC content	前噬菌体在全基因组的位置 Prophage in genome-wide position
1	10 706	15	43.84%	550-11 255
2	12 668	8	38.57%	49 935-62 602

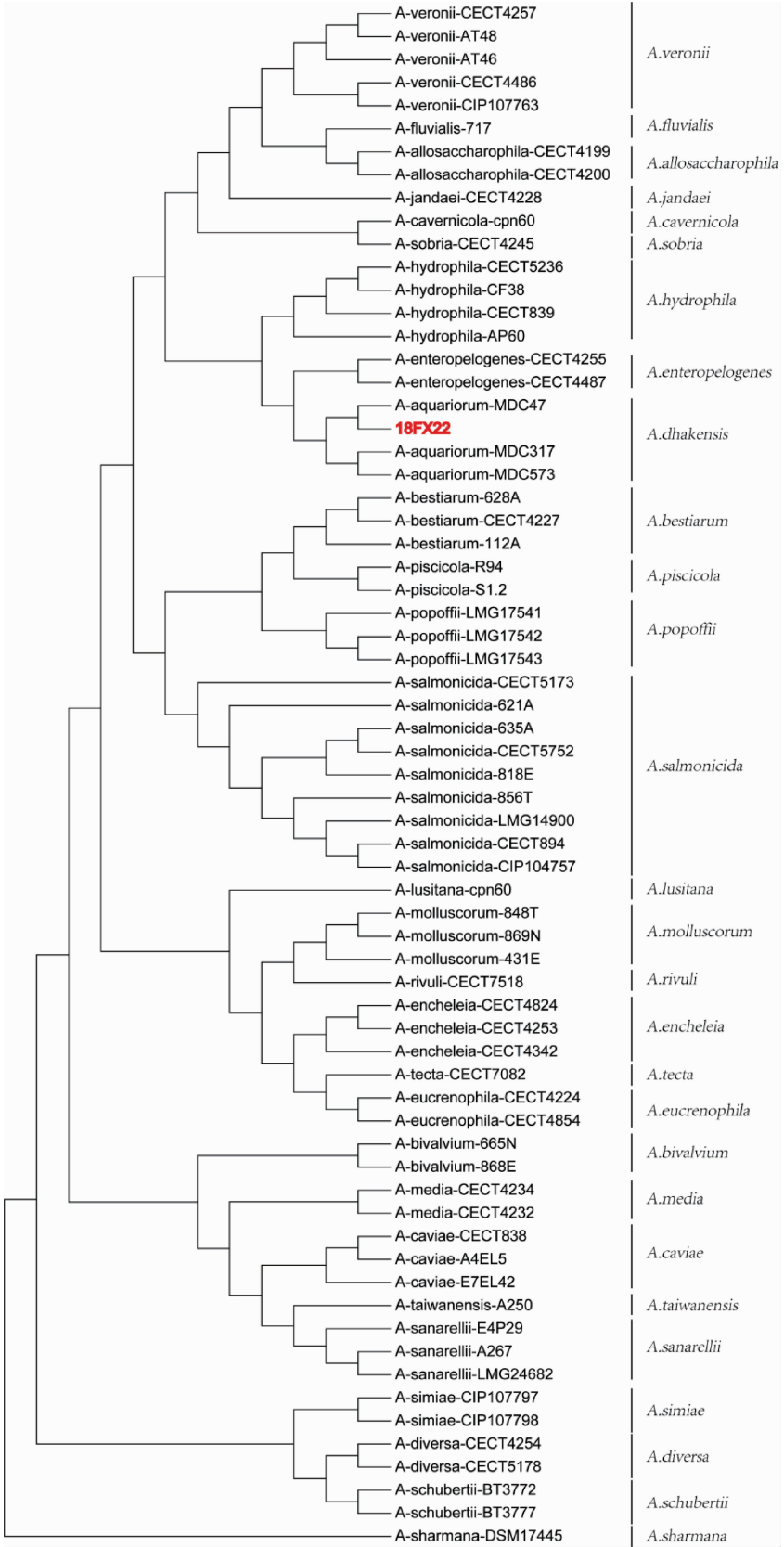


图 2 菌株 18FX22 的系统进化树
Figure 2 Phylogenetic tree of strain 18FX22

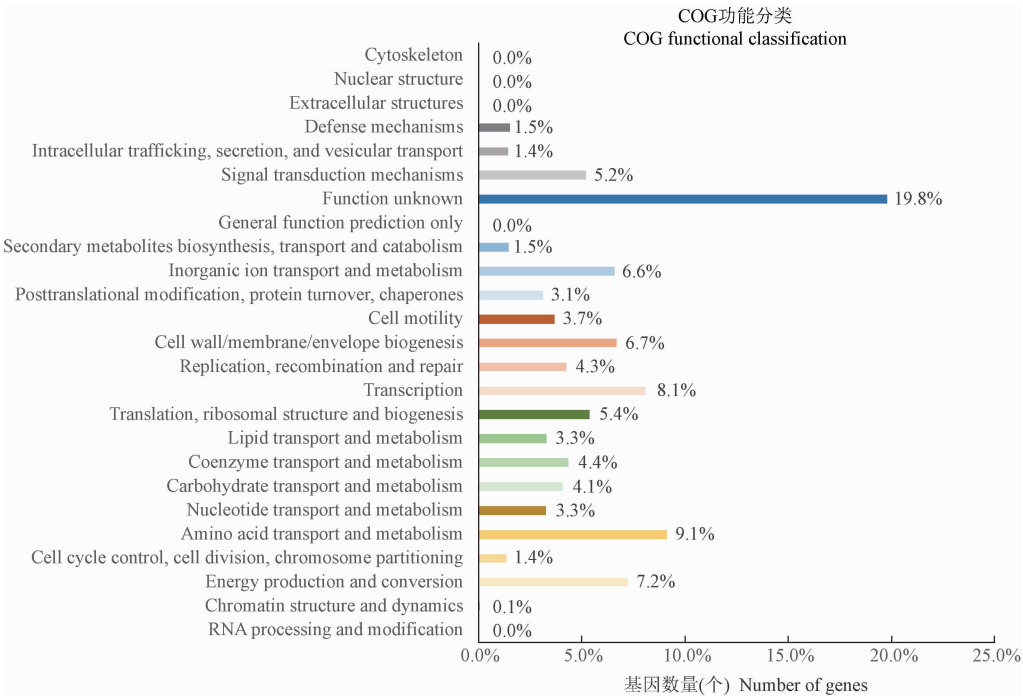


图 3 菌株 18FX22 的 COG 功能分类

Figure 3 COG functional classification of strain 18FX22

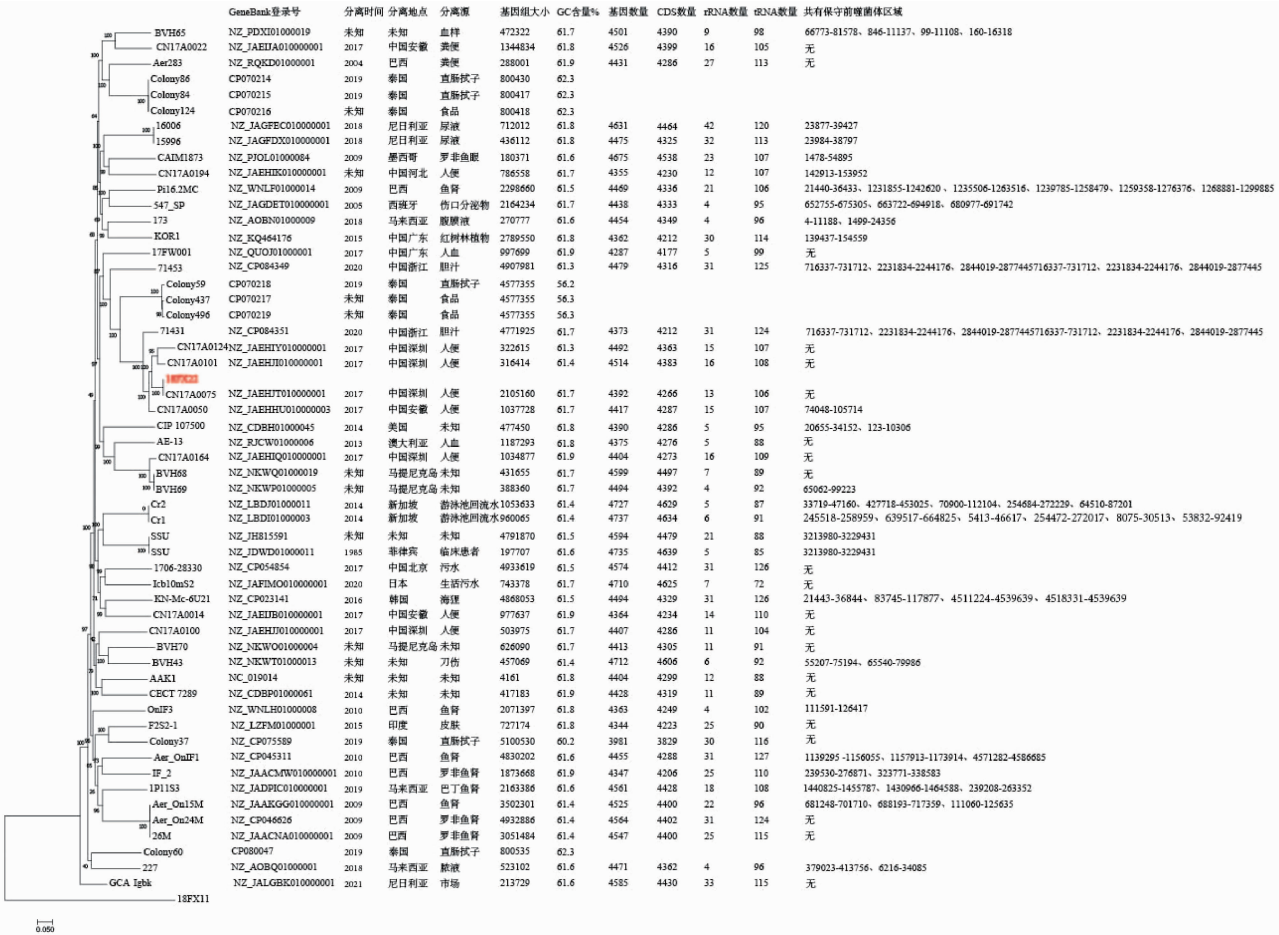


图 4 55 株达卡气单胞菌的聚类分析

Figure 4 Cluster analysis of 55 strains of *Aeromonas dhakensis*

2.3 致病性研究

2.3.1 毒力基因预测

28 种毒力基因在 55 种达卡气单胞菌的分布情况如图 5 所示,7 种基因 *fliN*、*ast*、*alt*、*gcat*、*lip*、*aerA*、*hlyA* 在达卡气单胞菌中普遍存在。其中,基因 *fliN*、*ast*、*alt*、*aerA*、*hlyA* 的存在预测达卡气单胞菌可能具有分泌鞭毛马达开关蛋白、耐热性细胞毒性肠毒素、不耐热性细胞毒性肠毒素、溶气蛋白、溶血素的潜能;同时,基因 *lip*、*gcat* 也指示达卡气单胞菌可能具有脂肪酶活性和甘油磷脂胆固醇酰基转移酶活性。此外,菌株 18FX22 和 GCA016729585 携带的毒力基因大体一致,都携带有 *fliN*、*ast*、*alt*、*gcat*、*lip*、*aerA*、*hlyA*。

2.3.2 毒性检测

经 β-溶血和胞外蛋白酶活性实验,其结果如图 6 所示,菌株 18FX22 在羊血平板和脱脂奶粉平板中均出现了水解圈,说明该菌既具有 β-溶血活性,又具有胞外蛋白酶活性。秀丽隐杆线虫液体毒性实验的结果如图 7A 所示,达卡气单胞菌对线虫的 3 d 致死率呈上升趋势,分别为 75%、81%和 87%。与对照组相比,达卡气单胞菌对秀丽隐杆线虫致死率有显著性差异 ($P<0.001$)。10×裂解液(定义为 100% 细胞毒性,阳性对照组)、达卡气单胞菌、DMEM 处理组(阴性对照组)三者诱导的 LDH 释放量如图 7B

所示,分别为 2.15、1.69 和 0.11,占比为 100%、78.6%和 5.1%。与阴性对照组相比,达卡气单胞菌对小鼠成纤维细胞 C₂C₁₂ 的致死性有显著性差异。菌株 18FX22 高剂量 (10⁸、10⁹) 处理下的小鼠不到 24 h 全部死亡;低剂量组 (10⁷、10⁶、10⁵) 处理下的小鼠,都存活了 8 d,无死亡现象,具体情况如表 3 所示。同时利用 SPSS 软件概率 (probit) 回归和寇氏改良公式计算达卡气单胞菌 18FX22 24 h 的 LD₅₀,其结果为 3×10⁷ CFU、3.1×10⁷ CFU。

表 3 小鼠感染达卡气单胞菌 24 h 的存活情况
Table 3 Survival of mice infected with *Aeromonas dhakensis* for 24 h

<i>A. dhakensis</i> 浓度 (CFU/mL) Concentration of <i>A. dhakensis</i>	感染数 (只) Infections number (n)	死亡数 (24 h) Number of deaths (24 h)	死亡率 Mortality rate
1×10 ⁹	4	4	100%
1×10 ⁸	4	4	100%
1×10 ⁷	4	0	0
1×10 ⁶	4	0	0
1×10 ⁵	4	0	0
对照 Contrast	4	0	0

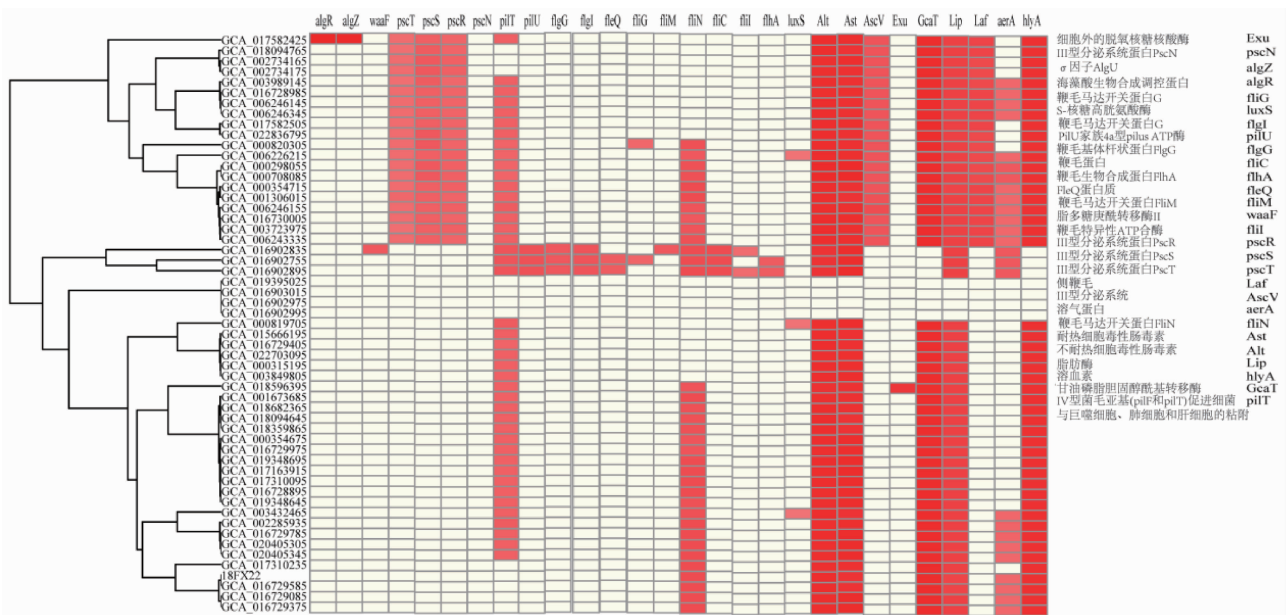
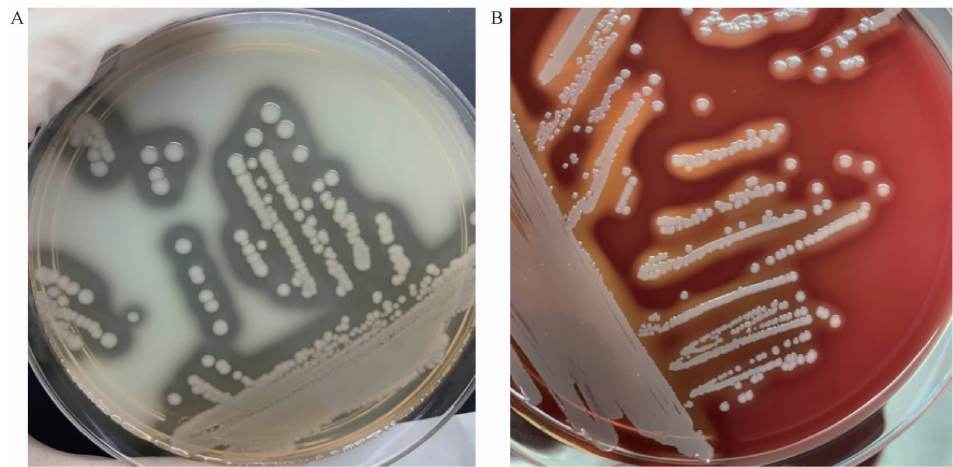


图 5 全球 55 株达卡气单胞菌的毒力基因分析
Figure 5 Virulence gene analysis of 55 *Aeromonas dhakensis* strains worldwide

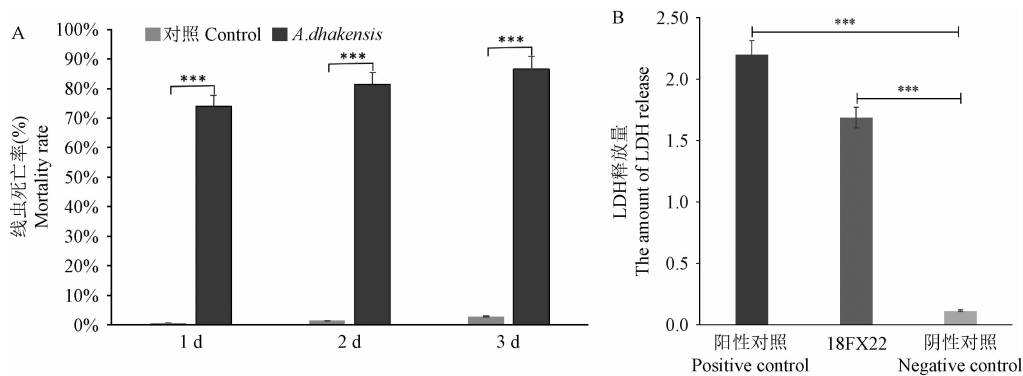


注:A:含 5%羊血平板;B:含 0.2%脱脂奶粉平板。

图 6 达卡气单胞菌在不同平板中的生长情况

Note. A, 5% sheep blood plate. B, A plate containing 0.2% skim milk powder.

Figure 6 Growth of *Aeromonas dhakensis* in different plates



注:A:秀丽隐杆线虫液体毒性实验;B:细胞毒性实验。与阳性对照组相比,*** $P<0.001$ 。

图 7 达卡气单胞菌对秀丽隐杆线虫、小鼠成纤维细胞 C_2C_{12} 的致死情况

Note. A, Liquid toxicity assay of *C. elegans*. B, Cytotoxicity assay. Compared with positive control group, *** $P<0.001$.

Figure 7 The lethal effect of *Aeromonas dhakensis* on *Caenorhabditis elegans* and mouse fibroblast C_2C_{12}

2.4 耐药性研究

2.4.1 耐药基因预测

43 种耐药基因在 55 种达卡气单胞菌的分布情况如图 8 所示。*blaOXA*. 726 基因的分布较为普遍,其次是 *blaAQU* 和 *blaOXA*. 10 基因,说明菌株 18FX22 可能对 β -内酰胺类抗生素有抗性。此外,该菌还携带有黏菌素抗性基因 *mcr*. 3. 7、*mcr*. 3. 3;四环素抗性基因 *tetE*;喹诺酮类抗生素基因 *qnrVC4*;氨基糖苷类抗生素基因 *aph* (3')-Ia、(*AGly*) *aadA1-pm*;大环内酯类抗性基因 *mph*. A;氯霉素抗性基因 *cmlA5*、碳青霉烯类抗性基因 *cphA2*。该菌和 GCA016729585 携带的耐药基因基本相似。

2.4.2 耐药表型鉴定

达卡气单胞菌 18FX22 对 β -内酰胺类抗生素(阿莫西林/克拉维酸、头孢唑林)和多肽类抗生素(多粘菌素)两类 3 种药物有耐药性;对 β -内酰胺类抑制剂(氨苄西林/舒巴坦)、二三代头孢(头孢曲松、头孢西丁)和四环素类(四环素)三类 4 种药物中度耐药;而对 β -内酰胺类中碳青霉烯类(厄他培南、亚胺培南、美罗培南)、 β -内酰胺类中青霉素类(哌拉西林-他唑巴坦)、单环 β -内酰胺酶类(氨曲南)、氨基糖苷类(阿米卡星、庆大霉素)、喹诺酮类(环丙沙星、左氧氟沙星)、磺胺类(复方新诺明)、氯霉素类(氯霉素)、二、三、四代头孢(头孢呋辛、头孢他啶、头孢吡肟)等 14 种抗生素均表现敏感。详细的耐药情况如表 4 所示。

表 4 达卡气单胞菌药物敏感性实验结果
Table 4 Results of drug sensitivity test for *Aeromonas dhakensis*

抗生素 Antibiotic	抗生素缩写 Antibiotic abbreviation	折点值 Crease value			耐药结果 Resistance result
		敏感 (S) Sensitivity	中介 (I) Intermediary	耐药 (R) Resistance	
阿莫西林-克拉维酸 Amoxycillin-clavulanic acid	AMC	≤8/4	8/16	≥32/16	R
氨苄西林-舒巴坦 Ampicillin-salbactam	SAM	≤8/4	8/16	≥32/16	I
哌拉西林-他唑巴坦 Piperacillin-tazobactam	TZP	≤16/4	32/4~64/4	≥128/16	S
头孢唑林 Cefazolin	CZ	≤1	2	≥4	R
头孢他啶 Ceftazidime	CAZ	≤4	8	≥16	S
头孢曲松 Ceftriaxone	CRO	≤1	2	≥4	I
头孢西丁 Cefoxitin	FOX	≤8	16	≥32	I
头孢吡肟 Cefepime	FEP	≤8	16	≥32	S
头孢呋辛 Cefuroxime	CXM	≤8	16	≥32	S
厄他培南 Ertapenem	ETP	≤2	4	≥8	S
亚胺培南 Imipenem	IPM	≤4	8	≥16	S
美罗培南 Meropene	MEM	≤4	8	≥16	S
氨曲南 Aztreonam	ATM	≤4	8	≥16	S
阿米卡星 Amikacin	AN	≤16	32	≥64	S
庆大霉素 Gentamicin	GM	≤4	8	≥16	S
四环素 Tetracycline	TE	≤4	8	≥16	I
环丙沙星 Ciprofloxacin	CIP	≤1	2	≥4	S
左氧氟沙星 Levofloxacin	LVX	≤2	4	≥8	S
复方新诺明 Sulfamethoxazole	SXT	≤2/38	—	≥4/76	S
氯霉素 Chloramphenicol	CL	≤8	16	≥32	S
多粘菌素 Colistin	CT	≤4	8	≥16	R

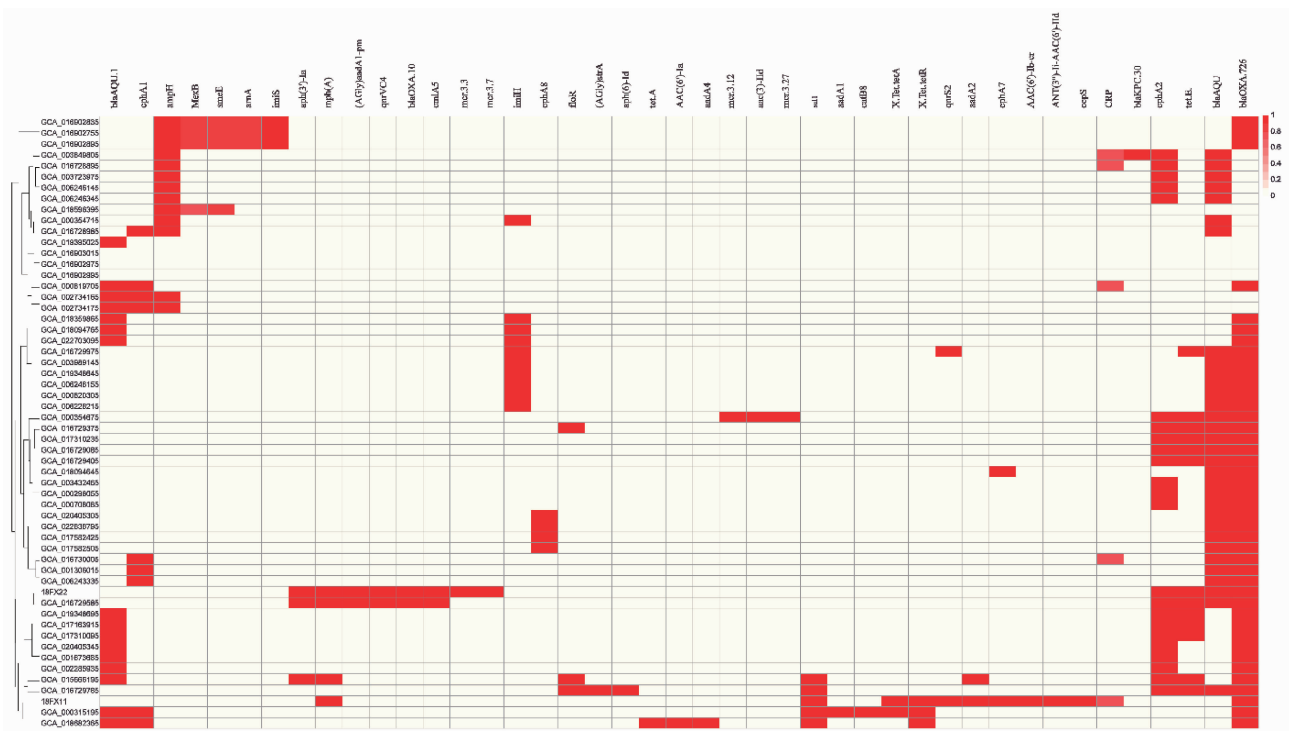


图 8 菌株 18FX22 与全球达卡气单胞菌的耐药基因分析

Figure 8 Analysis of drug resistance genes between strain 18FX22 and Global *Aeromonas dhakensis*

3 讨论

依据气单胞菌的生长表型及生化特征,将其大致分为两大类,一类是嗜温气单胞菌群,由在 35~37℃ 时生长良好的运动菌株组成,与多种人类感染相关;一类为嗜冷气单胞菌株,最适生长温度为 22~25℃,不活动,常致使鱼类发病^[14]。一些运动型气单胞菌已被认为是食源和水源性病原体,当人们在接触或食用受污染的水或食物后可能会引发感染^[14]。多项研究表明气单胞菌属可引起一系列肠道和肠外感染,如肠胃炎、菌血症、肌肉感染、皮肤和软组织感染及致命的败血症等症^[15-16]。

本研究毒力基因检测发现 18FX22 基因组中携带有丰富的毒力基因,主要是菌毛基因、鞭毛马达开关蛋白基因、编码细胞毒性肠毒素、气溶素、溶血素基因及脂肪酶活性和甘油磷脂胆固醇酰基转移酶活性基因,这些基因表明该菌有较强的毒性潜力,可能会致使人体感染。有研究表明 *fliN* 是许多细菌鞭毛基底体 C 环的主要结构基因^[17]。鞭毛由约 25 种不同的蛋白质组成,其中大部分能形成鞭毛基体、钩状体和丝状体,少数蛋白有旋转和转换的功能。鞭毛从膜离子梯度获得能量,通过旋转推动细菌运动。膜蛋白 MotA 和 MotB 形成离子导电复合物,起定子作用,而 *fliN*、*fliM* 和 *fliC* 蛋白组成安装在转子上的开关复合体,在鞭毛组装、旋转和顺时针/逆时针 (CW/CCW) 方向起控制作用^[18-19]。*Gcat*、*fliN* 和 *ela* 是编码气单胞菌吸附宿主中重要酶类和相关蛋白的基因^[20-21];而 *act*、*alt*、*aerA*、*hlyA* 能编码一系列毒素,如:裂解细胞的肠毒素,改变细胞通透性的气溶素,有溶血活性的溶血毒素等,去感染宿主,引发病症^[20],这可能是感染的关键。

近年来达卡气单胞菌普遍从人类感染中分离出来,相较于其它气单胞菌,其危害更致命^[22]。据秀丽隐杆线虫液体毒性实验和细胞毒实验结果可知,达卡气单胞菌对秀丽隐杆线虫有强致死性,且对小鼠成纤维细胞有很高的杀伤力;同时由小鼠实验数据也推测该菌对小鼠作用 24 h 的 LD₅₀ 范围在 3.0×10⁷~3.1×10⁷CFU,略高于牛蛙源达卡气单胞菌对牛蛙感染 72 h 的 LD₅₀(4.68×10⁶ CFU)^[23],这可能与感染时间和受试动物有关。

药物敏感性实验结果显示,18FX22 菌株对阿莫西林/克拉维酸、头孢唑林和多粘菌素 3 种药物耐药,对其他抗生素敏感。本研究结果与潘纪汶等^[23]研究的牛蛙源达卡气单胞菌对头孢氨苄、头孢拉定、磺胺异噁唑、青霉素、阿莫西林、头孢噻吩、头孢唑林等药物耐药的結果略有不同,这可能与菌株来

源有关;与 Soto-Rodriguez 等^[24]报道的达卡气单胞菌对红霉素、阿莫西林、氨苄西林耐药均稍有差异,这可能与抗生素使用的种类和频率有关。同时在达卡气单胞菌中检出了多粘菌素耐药基因(*mcr-3*)和氨基糖苷修饰酶基因(*aac(6')-Ib*),发现多粘菌素表型与基因基本一致,也有研究报道 3 株(分别来自猪肉、自来水、临床样本)多粘菌素耐药的菌株中含有 *mcr-3* 基因^[13],这与本研究的结果类似。氨基糖苷修饰酶基因(*aac(6')-Ib*)的存在,表明菌体有对氨基糖苷类药物耐药的潜力,没有表型可能与基因的表达情况有关。与本研究结果相似的是 Dahanayake 等^[25]发现所有分离株中均含有 *aac(6')-Ib* 基因,却没有表现出氨基糖苷类药物耐药,说明该类药物的表型与其基因型存在差异。提示在今后使用抗生素时,要注意使用的种类和频率,避免出现气单胞菌株的多重耐药现象。

多位点序列分型不仅能精确地进行菌株基因分型,也能揭示气单胞菌属类群之间的关系,是疫情溯源、宿主范围扩散和生态学研究的有力工具^[26]。为明确达卡气单胞菌株的遗传结构,本研究对其进行了多位点序列分型,结果发现该菌是一种未报道的序列类型(ST946)。2020 年, Lau 等^[27]在马来西亚 47 株临床达卡气单胞菌中鉴定出 36 种 STs,其中 34 株 STs 是新发现的。同样地,2011 年 Martino 等^[26]在意大利环境样本(病鱼、甲壳类动物、软体动物)中发现了多个单菌型序列,即在 96 株菌株中,得到了 89 种 STs,这都体现了气单胞菌序列遗传多样性的特点。

达卡气单胞菌 18FX22 的 COG 功能分析,有助于预测该菌的生物学功能。2021 年,王超杰等^[28]报道了一株嗜水气单胞菌的功能蛋白特征,主要有氨基酸转运代谢、转录、信号转导机制和能量生产转换等,与本研究结果基本一致。此外,将近 20% 的基因 COG 分类不明确,功能未知,这需要我们对气单胞菌的生物学功能进一步探索。前噬菌体对气单胞菌属的毒性和耐药性有一定的促进作用,能协助菌株在感染过程中免受宿主免疫系统的攻击^[28]。有不少研究发现嗜水气单胞菌有前噬菌体、O-抗原等序列,并在同一型别的菌株中发现了同一前噬菌体^[28-30],这可能是基因水平转移现象,与流行株的进化有关。根据分离株 18FX22 与全球达卡气单胞菌 SNP 聚类分析可知,该菌与 GCA016729585 位于同一分支,说明它们的进化关

系更近,且有相似的毒力和耐药基因体系。

本研究系统地分析了虾源达卡气单胞菌 18FX22 的毒力、耐药基因分布和全基因组信息,且初步评估了达卡气单胞菌的致病性,对达卡气单胞菌的防治具有一定的理论意义和实用价值。后续研究达卡气单胞菌时,我们要对采样的类型和地域有更细致的划分,有研究指出气单胞菌主要分布在水环境和海鲜食品中,因此我们可以多采集一些沿海地区的水样和海鲜食品来评估两者之间气单胞菌的相关性,或者是针对某一地区,采集该地区的水样、食品和临床样本来研究不同种气单胞菌的遗传多样性、耐药性和致病性差异。此外,利用实验动物毒理实验探究气单胞菌的毒性时,需要提前摸索达卡气单胞菌对小鼠的最佳感染浓度;同时在实验过程中需要调整合理的实验周期,使实验结果尽可能展现出达卡气单胞菌对小鼠的致病潜力。

参考文献:

- [1] Huys G, Kämpfer P, Albert MJ, et al. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhoea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943 (approved lists 1980) [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52 (3): 705-712.
- [2] Martínez-Murcia AJ, Saavedra MJ, Mota VR, et al. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58(5): 1169-1175.
- [3] Pérez L, Abarca ML, Latif-Eugenín F, et al. *Aeromonas dhakensis* pneumonia and sepsis in a neonate Risso's dolphin *Grampus griseus* from the Mediterranean Sea [J]. Dis Aquat Organ, 2015, 116(1): 69-74.
- [4] Carriero MM, Mendes Maia AA, Moro Sousa RL, et al. Characterization of a new strain of *Aeromonas dhakensis* isolated from diseased pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) in Brazil [J]. J Fish Dis, 2016, 39(11): 1285-1295.
- [5] Chen PL, Wu CJ, Chen CS, et al. A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan; *A. dhakensis* is more predominant and virulent [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(7): O428-O434.
- [6] 郑珍, 龚妍, 卢乐群, 等. 1 例罕见达卡气单胞菌感染合并大面积皮肤组织缺血患者的护理 [J]. 当代护士(下旬刊), 2022, 29(2): 153-156.
- [7] Tomás JM. The main *Aeromonas* pathogenic factors [J]. ISRN Microbiol, 2012, 2012: 256261.
- [8] Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease [J]. J Fish Dis, 2013, 36(4): 371-388.
- [9] Alperi A, Figueras MJ. Human isolates of *Aeromonas* possess

- Shiga toxin genes (*stx1* and *stx2*) highly similar to the most virulent gene variants of *Escherichia coli* [J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(10): 1563–1567.
- [10] Chopra AK, Houston CW. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis [J]. Microbes Infect, 1999, 1(13): 1129–1137.
- [11] 张国亮, 王浩, 张也, 等. 嗜水气单胞菌 AH10 (CCTCC AB2014155) 的全基因组测序及比较分析 [J]. 中国水产科学, 2016, 23(5): 995–1005.
- [12] Chen PL, Wu CJ, Tsai PJ, et al. Virulence diversity among bacteremic *Aeromonas* isolates: *ex vivo*, animal, and clinical evidences [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e111213.
- [13] Meng S, Wang YL, Liu C, et al. Genetic diversity, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Aeromonas* isolates from clinical patients, tap water systems, and food [J]. Biomed Environ Sci, 2020, 33(6): 385–395.
- [14] Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection [J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(1): 35–73.
- [15] Khajanchi BK, Fadl AA, Borchardt MA, et al. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(7): 2313–2325.
- [16] de Silva BCJ, Hossain S, Dahanayake PS, et al. Frozen white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Korean markets as a source of *Aeromonas* spp. harboring antibiotic and heavy metal resistance genes [J]. Microb Drug Resist, 2018, 24(10): 1587–1598.
- [17] Paul K, Blair DF. Organization of FlhN subunits in the flagellar motor of *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 2006, 188(7): 2502–2511.
- [18] MacNab RM. How bacteria assemble flagella [J]. Annu Rev Microbiol, 2003, 57: 77–100.
- [19] Lowder BJ, Duyvesteyn MD, Blair DF. FlhG subunit arrangement in the flagellar rotor probed by targeted cross-linking [J]. J Bacteriol, 2005, 187(16): 5640–5647.
- [20] Freire NB, Magalhães TC, Nunes Soares RA, et al. Nutritional interference for phenotypic biofilm quantification in *Aeromonas* spp. isolates containing the fla gene [J]. Microb Pathog, 2019, 127: 198–201.
- [21] Ran C, Qin C, Xie M, et al. *Aeromonas veronii* and aerolysin are important for the pathogenesis of motile aeromonad septicemia in cyprinid fish [J]. Environ Microbiol, 2018, 20(9): 3442–3456.
- [22] Sun Y, Zhao Y, Xu W, et al. Taxonomy, virulence determinants and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from bacteremia in southeastern China [J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2021, 10(1): 43.
- [23] 潘纪汶, 王昕, 杨诺, 等. 牛蛙源达卡气单胞菌的分离鉴定及毒力特性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(3): 77–83.
- [24] Soto-Rodriguez SA, Lozano-Olvera R, Garcia-Gasca MT, et al. Virulence of the fish pathogen *Aeromonas dhakensis*: genes involved, characterization and histopathology of experimentally infected hybrid tilapia [J]. Dis Aquat Organ, 2018, 129(2): 107–116.
- [25] Dahanayake PS, Hossain S, Wickramanayake MVKS, et al. Prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Aeromonas* species isolated from marketed cockles (*Tegillarca granosa*) in Korea [J]. Lett Appl Microbiol, 2020, 71(1): 94–101.
- [26] Martino ME, Fasolato L, Montemurro F, et al. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(14): 4986–5000.
- [27] Lau TTV, Tan JMA, Puthucheary SD, et al. Genetic relatedness and novel sequence types of clinical *Aeromonas dhakensis* from Malaysia [J]. Publ Braz Soc Microbiol, 2020, 51(3): 909–918.
- [28] 王超杰, 王至诚, 康兴宇, 等. 一株分离自团头鲂的嗜水气单胞菌病原学及其与 ST251 型菌株的全基因组比较 [J]. 中国水产科学, 2021, 28(4): 503–516.
- [29] Pang M, Jiang J, Xie X, et al. Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics [J]. Sci Rep, 2015, 5: 9833.
- [30] Hossain MJ, Waldbieser GC, Sun D, et al. Implication of lateral genetic transfer in the emergence of *Aeromonas hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80943.

[收稿日期] 2022-07-07