

Current Research Status of Whole Genome Sequencing of *Aeromonas Aeruginosa*

Hongyu Huang Xiaobing Zhang*

Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

Abstract

The *Aeromonas* genus, encompassing 36 species of Gram-negative bacilli, notably includes key species such as *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas dhakensis*, and *Aeromonas veronii*, which are recognized as potential human pathogens. There has been a notable increase in reports of carbapenem-resistant *Aeromonas* strains in recent years, presenting a significant threat to human health. The advancement of whole-genome sequencing technology has greatly bolstered the field of microbial genomics. Whole-genome sequencing of *Aeromonas* strains offers a comprehensive insight into their classification, resistance profiles, and virulence factors, allowing for more targeted interventions against these pathogens. Distinctively, routine biochemical assays, 16S rRNA sequencing, and MALDI-TOF MS often misidentify members of the *Aeromonas* genus, underscoring the necessity of whole-genome sequencing in *Aeromonas* research. The precision and rapidity of whole-genome sequencing are crucial in accurately diagnosing *Aeromonas* infections, ultimately aiding effective treatment strategies.

Keywords

aeromonas; infection; carbapenem resistance; whole-genome sequencing

气单胞菌全基因组测序的研究现状

黄红玉 张晓兵*

重庆医科大学附属第一医院检验科, 中国·重庆 400016

摘要

气单胞菌属包含36种革兰阴性杆菌, 其中被视为潜在人类病原体的通常是嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、达卡气单胞菌和维氏气单胞菌。近年来, 临床分离出耐碳青霉烯类气单胞菌的报道不断增多, 对人类健康构成严重威胁。不断发展的全基因组测序技术为微生物基因组学的发展提供了强有力的技术支持。通过对气单胞菌菌株的全基因组测序, 能够更全面地了解其分型、耐药性、毒力因子等特征, 从而采取更有针对性的措施应对这一威胁。与其他属不同, 常规生化测试、16SrRNA测序、质谱均会错误地区分气单胞菌属, 因此全基因组测序在气单胞菌的相关研究中是有必要的。快速和准确的全基因组测序有助于对气单胞菌感染进行准确和具体的诊断, 从而有助于治疗。

关键词

气单胞菌; 感染; 碳青霉烯类耐药; 全基因组测序

1 引言

气单胞菌是一种革兰氏阴性杆菌, 兼性厌氧, 氧化酶和过氧化氢酶阳性, 还原硝酸盐, 发酵葡萄糖。根据最新版本的伯杰氏系统细菌学手册, 气单胞菌属属于 γ 变形菌纲、气单胞菌目、气单胞菌科。该属包括 36 种, 是导致水生动物感染的主要病原体, 其中一些菌种可以导致人类感染。通常与人类感染相关的气单胞菌是嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、达卡气单胞菌和维氏气单胞菌^[1]。碳青霉烯类耐药革兰

阴性杆菌的全球性传播现已成为公共卫生领域的一大挑战。特别是, 作为新兴病原体之一的产碳青霉烯酶气单胞菌的持续出现, 对人类健康构成了严重威胁。

过去的几十年里, 测序技术的不断发展对临床微生物学产生了巨大的影响, 细菌全基因组测序 (Whole-Genome Sequencing, WGS) 成为临床微生物学的一项变革性技术。相比使用传统的实验方法, WGS 对病原微生物全部基因进行测序, 然后通过基因组组装、注释, 可以获得相关微生物更加详细更加全面的特征信息, 使对致病性细菌基因组的深入研究成为可能。因此, WGS 在气单胞菌的研究中扮演了重要的角色。

2 气单胞菌感染

2.1 临床表现

气单胞菌在淡水、半咸水和海水等水生环境中普遍存在,

【作者简介】黄红玉 (1993-), 女, 中国重庆人, 硕士, 初级检验师, 从事细菌耐药研究。

【通讯作者】张晓兵 (1973-), 男, 中国四川人, 硕士, 副主任检验师, 从事细菌耐药研究。

人类摄入被致病性气单胞菌污染的食物或水而致病，其作为新出现的肠道感染病原体引起越来越多的关注。肠道感染是由气单胞菌引起的最常见类型的感染，但它也可导致人体其他部位的感染，包括皮肤、软组织和伤口感染、菌血症、脓毒症、肝胆胰系统感染，甚至肺炎、尿路感染、眼部感染和骨髓炎等少见感染。尽管气单胞菌引起的感染具有机会性，但它们对免疫功能低下或免疫功能正常的人类都能造成感染。

2.2 耐药性

近年来，不断有文献报告从临床样本中分离出耐碳青霉烯气单胞菌菌株^[2]，这意味着气单胞菌感染的治疗面临巨大的挑战。碳青霉烯类抗生素，是目前抗菌谱最广、抗菌活性最强的非典型β-内酰胺类药物，通过抑制胞壁粘肽合成酶，尤其是对超广谱β-内酰胺酶（extended spectrum β lactamases, ESBLs）、头孢菌素酶（AmpC酶）均具有高度稳定性，常常被作为临床治疗革兰阴性耐药菌的最后一道防线。而产β-内酰胺酶是革兰阴性杆菌对碳青霉烯类药物耐药的主要机制。气单胞菌属含有独特的诱导金属-β-内酰胺酶基因（carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase, CphA），可以在大多数气单胞菌分离株中找到。目前使用常规方法检测CphA型碳青霉烯酶可能得到假性碳青霉烯类敏感结果，这会误导临床医生选择错误的抗生素治疗，而使用WGS可以检测更广泛的耐药机制，避免耐多药气单胞菌菌株被遗漏。此外，气单胞菌具有获得不同类型碳青霉烯酶基因的能力。2022年，中国学者发现了两株携带 bla_{NDM} 的豚鼠气单胞临床分离株^[3]。新德里金属β-内酰胺酶（New Delhi metallo-β-lactamase, NDM）属于B类金属β-内酰胺酶，可产生对除氨基曲南以外的所有β-内酰胺类抗生素的耐药性，这对人类健康构成严重威胁。

3 测序技术的发展和应

3.1 测序技术的发展

在短短的数十年里，测序技术不断发展进步，从第一代测序开始，发展到目前的第三代测序。1977年Sanger提出的双脱氧链终止测序技术标志着第一代测序技术的诞生，其优点是速度快、精度高，但其成本高、通量低。第二代测序技术极大地提高了测序通量及速度，包括454测序技术、寡核苷酸连接和检测测序（Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection, SOLiD）技术及Illumina测序技术。但二代测序读长短、数据分析及拼接困难。第三代测序又名实时单分子测序，以PacBio公司的单分子实时测序技术和Oxford Nanopore Technologies的纳米单分子测序技术为代表。与第二代相比，其最大的特点是单分子测序，测序过程无需进行聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR），这有效避免了PCR偏向性导致的系统错误，同时提高了读长。

3.2 WGS在气单胞菌中的应用

飞速发展的测序技术使WGS在细菌研究中得到广泛应

用。通过WGS不仅可获得近乎完整的细菌DNA信息，包括种属、耐药基因、毒力因子、可移动元件等信息，还可对多个细菌间的基因组信息进行比较，研究致病菌株的分子流行病学和传播机制。截止于2023年9月，美国国家生物信息中心（National Center of Biotechnology Information, NCBI）的GenBank数据库中收录气单胞菌基因组1622个，排除非典型基因组，其中有注释的完整基因组序列有273个。这些气单胞菌基因组大小不一，从4.0~5.6Mbp，注释基因总数3786~5416个，注释蛋白质编码基因2496~5083个。2006年，嗜水气单胞菌ATCC 7966成为首个报道的气单胞菌基因组序列，采用了随机鸟枪法测序，基因组大小4.7Mbp，G+C含量为61.5%，有5195个编码基因^[4]。

3.2.1 WGS在气单胞菌菌种鉴定中的应用

由于气单胞菌表型和基因型的异质性使得该属的物种鉴定非常复杂，准确的实验室鉴定仍然是一个巨大的挑战。传统的生化测试，16S rRNA测序和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱（Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS）通常可以正确识别到属的水平（气单胞菌），但在物种水平上的鉴定是不可靠的。某研究显示气单胞菌生化鉴定结果的准确性为46.77%（29/62），质谱鉴定结果的准确性为83.87%（52/62）^[5]。WGS可通过比较细菌的全基因组序列来准确识别细菌种类，该技术已成为细菌物种鉴定的参考方法。平均核苷酸相似度（Average Nucleotide Identity, ANI）是基于该技术的菌种鉴定方法。使用ANI计算器进行两个基因组亲缘关系比较，ANI值≥95%的基因组被认为属于同一细菌种类^[6]。2015年，国外的一项研究^[6]使用多位点系统发育分析（Multilocus Phylogenetic Analysis, MLPA）和ANI重新鉴定了存放在GenBank中的44个气单胞菌基因组，其中14个基因组是被错误识别的。这项研究表明，在基因组序列提交给NCBI或其他数据库之前，使用上述方法验证基因组分类位置是十分重要的。

3.2.2 WGS在气单胞菌耐药性研究中的应用

WGS不仅可以提供微生物的鉴定，还可以提供微生物完整的基因型抗生素耐药性图谱，从而可以更全面地报告微生物中存在的潜在抗生素耐药机制。常用的抗生素耐药性数据库有ResFinder数据库和综合抗生素耐药性数据库（Comprehensive Antibiotic Research Database, CARD）。ResFinder数据库中所有序列均从NCBI核苷酸数据库中收集，只包含通过水平转移获得的耐药基因，不涵盖由突变介导的抗生素耐药基因。CARD是以抗生素耐药本体（Antibiotic Resistance Ontology, ARO）为分类单位的形式所构建，将分子生物学、生物化学和生物信息学整合到一个框架中，提供了更广泛的基因信息，不仅包括抗生素耐药基因，还包括其他与耐药性相关的基因，如外排泵或抗生素耐药性靶点的修饰。

浙江某医院^[7]从重症监护室的两位患者中分离出两株

嗜水气单胞菌, WGS 揭示出这两株菌属于同一克隆并同时携带编码高水平碳青霉烯类耐药性的 *bla*_{KPC-2} 和 *imiH* 基因。每株分离株都含有两个明显不同的质粒, 这两个质粒都携带 *bla*_{KPC-2} 基因, 但是 *bla*_{KPC-2} 位于结构相同的遗传元件上, 即 ISKpn27- Δ *bla*_{TEM-1}-*bla*_{KPC-2}-ISKpn6, 该遗传元件在肠杆菌目中常见。某研究对携带 *bla*_{RSA-1} 和 *bla*_{NDM-1} 的豚鼠气单胞菌菌株进行了全基因组测序, 详细分析了其详细的基因组特征。该菌具有一条 4.78Mb 的染色体 (G+C 含量为 61.8%), 不含质粒, 但检测到了 15 种不同类型的抗性基因。其中, *bla*_{RSA-1} 位于 Tn7413a 整合移动元件上, *bla*_{NDM-1} 位于整合元件上。这些可移动基因元件可以促进 *bla*_{RSA-1}、*bla*_{NDM-1} 等耐药基因的传播。

3.2.3 WGS 在气单胞菌毒力因子研究中的应用

毒力因子的存在使得细菌能够定殖、侵入并克服宿主的免疫反应机制, 从而导致感染并产生疾病。检测毒力表型的遗传决定因素将提高我们对气单胞菌如何引起疾病的理解, 全基因组测序具有快速并同时检测已知和新型毒力决定因素的独特能力。毒力因子数据库 (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria, VFDB) 是一个致力于提供全面的细菌毒力因子的数据库, 并辅以数据提取和分析工具, 以帮助进一步分析测序结果中细菌的毒力因子, 目前该数据库涵盖了包括气单胞菌属在内的 32 个经过充分研究的细菌病原体属。

2013 年, 美国学者通过对伤口感染的气单胞菌菌株进行全基因组测序^[8], 然后进行毒力相关基因的比较基因组和功能分析, 证明了嗜水单胞菌 E1 菌株含有许多在 ATCC 7966 和 E2 基因组中没有发现的毒力因子编码基因, 如细胞毒性肠毒素、3 型分泌系统、鞭毛、溶血素以及类似铜绿假单胞菌中发现的外毒素 A 的同源编码序列。此外, 小鼠感染模型也显示了 E1 菌株具有更强的毒力, 从而证实了比较基因组学可用于鉴定嗜水气单胞菌的毒力亚型。2023 年, 郑州的一项研究^[9]从胆道感染患者中分离出豚鼠气单胞菌菌株 FAHZZU2447, 并通过全基因组测序获得完整的基因序列, 使用 VFDB 2022 数据库鉴定了该菌株的毒力基因。结果显示, FAHZZU2447 含有编码各种功能的毒力基因, 特别是携带了多种与生物膜形成相关的毒力基因, 包括 *fla*、*laf*、*fli*、*flg*、*che* 和 *Tap* 基因, 并通过实验验证比较了生物膜形成的能力。同年, 北京的一项研究^[10]使用 VFDB 对肠外感染的豚鼠气单胞菌基因组序列上的毒力基因进行了鉴定。结果显示, 大多数菌株 (98%, 46/47) 携带至少一种毒力基因。在这些菌株中, 94% (44/47) 携带溶血素 (Hemolysin, *hlyA*), 其次是鞭毛蛋白 (flagellin, *fla*) (26%, 12/47), 侧鞭毛 (lateral flagella, *laf*) (23%, 11/47), III 型分泌系统成分 (*ascV*) (21%, 10/47), III 型分泌系统成分 (*ascF-G*) (21%, 10/47)。此外, 在 21% (10/47) 的临床分离株中检测到 13 个或更多毒力基因。

4 结语

作为新兴病原体, 气单胞菌与其他细菌病原体一样常见, 可引起多种临床感染, 且更容易获得碳青霉烯类耐药性, 对人类健康构成严重威胁, 临床医生不应低估这种细菌。测序技术尤其是长片段测序技术的发展, 极大地推动了 WGS 在细菌研究中的应用。该方法正迅速成为研究气单胞菌携带抗生素耐药性和致病潜力的强大工具, 尤其是对于监测气单胞菌耐药情况和了解气单胞菌分子特征具有重要意义。尽管 WGS 具有这些优势, 但它要求研究人员需要具有数据处理和生物信息学方面的特定知识, 这在一定程度上限制了其应用。

参考文献

- [1] Zhang D, Li W, Hu X, et al. Requiring Reconsideration of Differences of *Aeromonas* Infections Between Extra-Intestinal and Intestinal in Hospitalized Patients[J]. *Infect Drug Resist*, 2023(16): 487-497.
- [2] Pourmohsen M, Shakib P, Zolfaghari M R. The Prevalence of *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, and class I and II integrons Genes in *Aeromonas hydrophila* Isolated from Clinical Specimens of Qom, Iran[J]. *Clin Lab*, 2023, 69(1).
- [3] Xu S, Tu J, Zhang L, et al. Detection of NDM-1-Positive *Aeromonas caviae* from Bacteremia by Using Whole-Genome Sequencing [J]. *Infect Drug Resist*, 2022(15): 2835-2841.
- [4] Seshadri R, Joseph S W, Chopra A K, et al. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades[J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(23): 8272-8282.
- [5] Du X, Wang M, Zhou H, et al. Comparison of the Multiple Platforms to Identify Various *Aeromonas* Species[J]. *Front Microbiol*, 2020(11): 625961.
- [6] Beaz-Hidalgo R, Hossain M J, Liles M R, et al. Strategies to avoid wrongly labelled genomes using as example the detected wrong taxonomic affiliation for aeromonas genomes in the GenBank database[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0115813.
- [7] Xu Z, Shen W, Zhang R, et al. Clonal Dissemination of *Aeromonas hydrophila* With Binary Carriage of *bla* (KPC-2)-Bearing Plasmids in a Chinese Hospital[J]. *Front Microbiol*, 2022(13): 918561.
- [8] Grim C J, Kozlova E V, Sha J, et al. Characterization of *Aeromonas hydrophila* wound pathotypes by comparative genomic and functional analyses of virulence genes[J]. *mBio*, 2013,4(2): e00064-13.
- [9] Hu X, Zhang H, Liu Y, et al. Genetic characterization and virulence determinants of multidrug-resistant NDM-1-producing *Aeromonas caviae*[J]. *Front Microbiol*, 2022(13):1055654.
- [10] Song Y, Wang L F, Zhou K, et al. Epidemiological characteristics, virulence potential, antimicrobial resistance profiles, and phylogenetic analysis of *Aeromonas caviae* isolated from extra-intestinal infections[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023(13): 1084352.