

综述

克罗诺杆菌基因组学研究进展

熊棚^{1,2},张慧娜^{1,2},陆志^{1,2},王磊^{1,2},汪露^{1,2}

(1. 三峡大学基础医学院,肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室,湖北宜昌 443002;2. 三峡大学基础医学院,宜昌市炎症与损伤研究重点实验室,湖北宜昌 443002)

摘要: 克罗诺杆菌(*Cronobacter* spp.)是一类环境适应能力强、分布广泛的食源性条件致病菌,可通过污染婴幼儿配方奶粉等食品导致新生儿感染,并引发坏死性结肠炎、败血症以及脑膜炎等疾病,严重威胁着新生儿和早产儿生命健康。近年来,高通量测序技术和细菌基因组学领域的迅猛发展,极大促进了克罗诺杆菌基因组学分析、分子进化和变异机制、毒力基因、鉴定基因和耐药基因挖掘等方面的研究,这对防治克罗诺杆菌感染具有重要的科学意义。本文旨在对克罗诺杆菌基因组学的最新研究现状和发展趋势予以综述,为应用于预防和治疗克罗诺杆菌感染性疾病以及鉴定克罗诺杆菌新方法的建立提供重要的理论依据。

关键词: 克罗诺杆菌;食源性条件致病菌;基因组学;全基因组测序

中图分类号: R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2024)09-1083-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2024.09.014

Research progress in genomic analysis of *Cronobacter* spp.XIONG Peng^{1,2}, ZHANG Huina^{1,2}, LU Zhi^{1,2}, WANG Lei^{1,2}, WANG Lu^{1,2}

(1. China Three Gorges University, College of Basic Medical Sciences, Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, Hubei Yichang 443002, China; 2. China Three Gorges University, College of Basic Medical Sciences, Yichang Key Laboratory of Infection and Inflammation, Hubei Yichang 443002, China)

Abstract: *Cronobacter* spp. are foodborne opportunistic pathogens known for their significant environmental adaptability and wide-ranging distribution. These organisms have the potential to cause neonatal infections through the contamination of infant powdered formula, resulting in serious diseases, such as necrotizing enterocolitis, sepsis or meningitis, thereby posing a serious threat to the health and life of newborns and premature infants. The recent rapid progress in high-throughput sequencing technology and bacterial genomics has greatly promoted research in areas such as the genomic analysis of *Cronobacter*, molecular evolution and mechanisms of variation, virulence genes, identification genes, and drug resistance gene mining. These advancements have significant scientific implications for the prevention and treatment of *Cronobacter* infections. This review aims to offer a thorough analysis of the present status and forthcoming directions in *Cronobacter* genomics research, providing essential theoretical groundwork for the development of novel approaches in identification, prevention, and treatment of *Cronobacter* infections.

Key words: *Cronobacter* spp.; foodborne opportunistic pathogens; genomics; whole genome sequencing

克罗诺杆菌(*Cronobacter*)为肠杆菌科的革兰氏阴性菌,是一类重要的食源性条件致病菌,在自然界中分布范围广,环境适应能力强,可从土壤、植物叶面、水果、谷物、奶粉等多种样品中分离得到^[1-6]。

新生儿、早产儿为其易感人群,该菌感染后可导致脑膜炎、败血症以及坏死性结肠炎等疾病的发生,同时也可能引发严重的神经系统损伤和发育障碍等后遗症^[7-9]。在1961年URMENYI和FRANKLIN^[10]首次报道了克罗诺杆菌属的感染病例,随后此菌逐渐受到了全球范围的广泛关注。克罗诺杆菌属已被确认的物种目前有7个:阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)、丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonicus*)、莫金斯克罗诺杆菌(*C. muytjensii*)、苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)、尤尼沃斯克罗诺杆菌(*C. universalis*)、都柏林克罗

收稿日期:2024-05-16

基金项目:湖北省自然科学基金项目(2022CFB743);国家自然科学基金资助项目(32201986)

作者简介:熊棚 男 在读研究生 研究方向为肠道致病菌

E-mail:837938197@qq.com

通信作者:汪露 男 副教授 研究方向为病原菌致病机制、分子分型及快速检测技术 E-mail:wanglou@ctgu.edu.cn

诺杆菌(*C. dublinensis*)及康帝蒙提克罗诺杆菌(*C. condiment*)。

研究显示,克罗诺杆菌感染病例在全球范围内时有发生,如中国、日本、巴西、美国都曾报道过新生儿或早产儿感染克罗诺杆菌甚至导致死亡的病例^[11-13]。但目前克罗诺杆菌的进化、穿越肠道屏障、引发全身感染、毒力因子分泌等机制尚未完全阐明,导致治疗药物和疫苗的研发陷入停滞。一系列基于基因的分子生物学方法,例如 *16S rDNA*、*23S rDNA*、*MMS*、*ompA*、*fusA*、*rpoB*、*cgcA*、*ygrB* 等用于鉴定克罗诺杆菌属,但这些方法中只有少数能够在种水平上同时检测和区分克罗诺杆菌。随着测序技术的不断发展,基于克罗诺杆菌基因组学的分析有望解决这些难题。因此,本文对克罗诺杆菌基因组的特征、进化、毒力基因以及比较基因组等方面的研究予以综述,为开发新的预防和治疗克罗诺杆菌感染性疾病以及鉴定克罗诺杆菌的方法提供了重要的理论支持。

1 克罗诺杆菌基因组一般特征

2007年,EVA KUCEROVA 等^[14]首次对阪崎克罗诺杆菌 BAA-894 菌株进行全基因组测序,至此开启了克罗诺杆菌基因组时代,其基因组包含一条染色体和两个质粒:染色体长度为 4.37 Mb,GC 含量为 57%;质粒 pESA2 长度为 31 kb,GC 含量为 51%;质粒 pESA3 长度为 131 kb,GC 含量为 56%。其中包括编码蛋白基因 4 139 个,平均编码的蛋白长度 317 个氨基酸,编码蛋白质长度范围在 14~2 356 个氨基酸,tRNA 基因 83 个,rRNA 基因 22 个,基因间平均距离 131 bp(RefSeq 登录号:GCF_000017665.1)。

随后,得益于全基因组测序技术的快速发展,公共数据库克罗诺杆菌基因组数量在急剧增加,NCBI 数据库共收录 2 348 株克罗诺杆菌基因组数据(截至 2024 年 3 月 31 日)。如图 1 所示,其中包括 1 906 个阪崎克罗诺杆菌基因组(81.18%)、145 个都柏林克罗诺杆菌基因组(6.18%)、141 个丙二酸盐克罗诺杆菌基因组(6.01%)、117 个苏黎世克罗诺杆菌基因组(4.98%)、21 个莫金斯克罗诺杆菌基因组(0.89%)、9 个尤尼沃斯克罗诺杆菌基因组(0.38%)、3 个康帝蒙提克罗诺杆菌基因组(0.13%)和 6 个属内未归类基因组(0.26%)。2007 年到 2015 年,由于测序技术主要以一代测序技术为主,测序费用昂贵,测序时间比较长,随着二代测序技术的飞跃发展,2016 年后,克罗诺杆菌测序数量逐步增加(图 2),给克罗诺杆菌基因组学的研究带来了巨大的机遇。

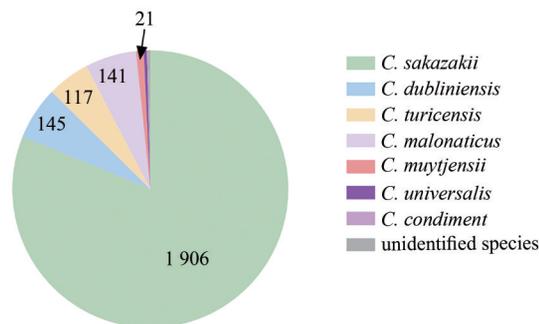


图1 NCBI数据库克罗诺杆菌物种个数统计

Figure 1 Number of species of *Cronobacter* in NCBI database

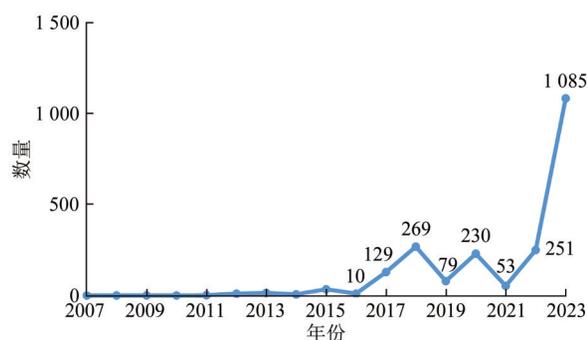


图2 2007—2023年NCBI数据库克罗诺杆菌基因组数据统计

Figure 2 Genomes of *Cronobacter* in NCBI Database from 2007 to 2023

对 NCBI 数据库中所有的克罗诺杆菌基因组下载并进行筛选,从中筛选出 1 843 个克罗诺杆菌的高质量基因组并使用 CheckM2 分析基因组的完整度和污染度(筛选条件:碱基数量 $\geq 4\ 000\ 000$ 、contigs 数量 ≤ 100 、N50 $\geq 500\ 000$ 、L50 ≤ 20 、完整度 $\geq 85\%$ 、污染度 $\leq 10\%$)。克罗诺杆菌属 7 个物种和属内未归类基因组如表 1 所示,其中包含 1 502 个阪崎克罗诺杆菌基因组(22 个完成图和 1 480 个草图)、100 个丙二酸盐克罗诺杆菌基因组(4 个完成图和 96 个草图)、103 个苏黎世克罗诺杆菌基因组(1 个完成图和 102 个草图)、109 个都柏林克罗诺杆菌基因组(4 个完成图和 105 个草图)、17 个莫金斯克罗诺杆菌基因组(2 个完成图和 15 个草图)、6 个尤尼沃斯克罗诺杆菌基因组(1 个完成图和 5 个草图)、2 个康帝蒙提克罗诺杆菌基因组(1 个完成图和 1 个草图)以及 4 个属内未归类基因组(4 个草图)。克罗诺杆菌属基因组 GC 含量范围为 55.71%~57.93%,平均基因数范围为 3 990~4 287 个,基因平均长度为 1 082~1 103 bp。克罗诺杆菌属多位点序列分型(Multi-locus sequence typing, MLST)分型统计结果显示(图 3),克罗诺杆菌属共有 239 个不同的 ST 型,其中主要的 ST 型为 ST4(24.49%)和 ST1(19.94%)。分别统计属内七个物种以及未归类基因组的 ST 型,结果显示阪崎克罗诺杆菌共有 116 个不同的 ST 型,

其中主要的 ST 型为 ST4(28.73%)和 ST1(23.47%)。丙二酸盐克罗诺杆菌共有 29 个不同的 ST 型,其中主要的 ST 型为 ST7(32.63%)。苏黎世克罗诺杆菌共有 42 个不同的 ST 型,其中主要 ST 型为 ST975(9.30%)和 ST32(9.30%)。都柏林克罗诺杆菌共有 47 个不同的 ST 型,其中主要的 ST 型为 ST167

(9.21%)。莫金斯克罗诺杆菌共有 9 个不同的 ST 型,其中主要的 ST 型为 ST765(20%)。尤尼沃斯克罗诺杆菌共有 4 个不同的 ST 型,分别是 ST54、ST622、ST878 和 ST978。康帝蒙提克罗诺杆菌的 ST 型为 ST98(100%)。属内未归类的克罗诺杆菌共有 3 个不同的 ST 型,其中主要的 ST 型为 ST967(50%)。

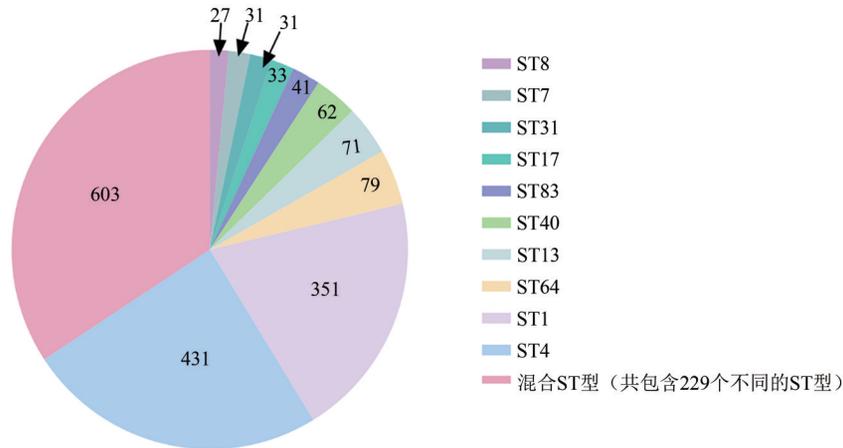


图3 克罗诺杆菌属 MLST 分型统计

Figure 3 Multiple-locus sequence typing of *Cronobacter* spp

表1 克罗诺杆菌属物种基因组组成

Table 1 Genomic characteristics of *Cronobacter* spp

物种	组装水平	完整度/%	污染度/%	基因组大小(Mbp±SD)	基因组平均	平均	基因平	tRNA	rRNA
					GC含量	基因数	均长度	平均数量	平均数量
<i>C. sakazakii</i>	complete	100	0	4.54 ± 0.15	56.79%	4 188	1 084	83	7
	draft	99.98	1.06	4.55 ± 0.13	56.83%	4 180	1 089	72	7
<i>C. malonaticus</i>	complete	100	0	4.52 ± 0.09	56.91%	4 153	1 090	83	7
	draft	99.94	0.74	4.49 ± 0.13	56.91%	4 119	1 091	72	7
<i>C. universalis</i>	complete	100	0	4.44	57.83%	4 044	1 097	84	7
	draft	99.97	0.80	4.40 ± 0.04	57.93%	3 990	1 103	73	7
<i>C. turicensis</i>	complete	100	0	4.60	57.25%	4 195	1 096	85	8
	draft	99.99	0.61	4.59 ± 0.09	57.35%	4 172	1 100	73	7
<i>C. dubliniensis</i>	complete	100	0	4.71 ± 0.05	57.43%	4 287	1 099	84	7
	draft	99.99	0.50	4.57 ± 0.12	57.75%	4 157	1 099	73	7
<i>C. muytjensii</i>	complete	100	0	4.66 ± 0.14	57.54%	4 046	1 103	86	7
	draft	99.29	0.22	4.44 ± 0.11	57.54%	4 028	1 103	73	7
<i>C. condiment</i>	complete	100	0	4.50	55.78%	4 109	1 095	82	7
	draft	100	0.02	4.59	55.71%	4 241	1 082	75	7
unidentified species	draft	100	0.06	4.63 ± 0.16	57.02%	4 252	1 089	78	7

2 克罗诺杆菌泛基因组与核心基因组

泛基因组(pan-genome)最早由 TETTELIN 等^[15]于 2005 年在细菌中提出,指一个物种的全部基因组信息,可分为由所有个体共享的核心基因组和部分个体共享或个体特异性的非必需基因组组成。2013 年, GIRM 等^[16]对 8 个克罗诺杆菌基因组进行泛基因组分析后确定了克罗诺杆菌的核心基因组由 3 160 个基因组成,其中包括编码了一系列有助于增强环境适应性和植物共生性的基因,在泛基因组中发现许多潜在的水平转移基因,如溶原性噬菌体、多种金属抗性基因等。2019 年,LEE 等^[17]对来源于 NCBI

数据库的 237 个阪崎克罗诺杆菌基因组和 48 个不同来源的克罗诺杆菌基因组进行泛基因组分析,该研究发现阪崎克罗诺杆菌核心基因组由 3 345 个基因组成,系统发育分析表明,阪崎克罗诺杆菌由多个不同谱系组成且不同谱系的核心和辅助基因组特征差异大。在构成泛基因组的 17 158 个基因中,共有 2 991 个基因存在重组史,其中重组频率高的基因与营养获取、代谢和毒素产生有关。随着测序技术的发展,大量的克罗诺杆菌基因组数据的产生使得对克罗诺杆菌的泛基因组研究更加全面和深入,有利于了解其物种的起源与进化。

3 克罗诺杆菌基因组学的应用

克罗诺杆菌被国际食品微生物标准委员会(International Commission of Microbiological Specializations on Food, ICMSF)列为对部分人群存在严重危害的致病菌,并于2004年由联合国粮食和农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)和联合国世界卫生组织(World Health Organization, WHO)划分为A类致病菌^[18]。虽然感染率较低,但其致死率却很高。据统计,新生儿感染后的死亡率高达27%~80%^[19-20],已经引起多个国家的广泛关注。文献报道显示,其中阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌和苏黎世克罗诺杆菌为主要致病种,阪崎克罗诺杆菌临床菌株分离率最高,且种内不同ST型致病能力也存在较大差异^[21-22]。因此,对克罗诺杆菌致病种的精准鉴定、分型以及对致病机制的深入探究,在预防疾病传播、降低患病率等方面具有极其重要的价值。

3.1 *ompA* 等位基因分型

外膜蛋白A(OmpA)是一种独特的外膜蛋白,大量存在于革兰氏阴性菌的外膜中,在不同细菌中具有保守的氨基酸序列。克罗诺杆菌属的外膜蛋白OmpA有利于该菌侵入脑微血管内皮细胞并引起新生儿脑膜炎^[23]。2006年,MOHAN等^[24]将克罗诺杆菌(ATCC 51329)的*ompA*基因的核苷酸序列和氨基酸序列与GenBank数据库比对,发现该基因与其他革兰氏阴性菌的*ompA*基因具有高度同源性,于是*ompA*基因靶向PCR开始作为快速检测克罗诺杆菌属的方法。2015年,FEI等^[25]对从中国分离出的70株克罗诺杆菌进行全基因组测序后使用MLST和*ompA*等位基因方法对其分型,研究显示,其中42株菌的*ompA*型别是6,属于9种序列类型:ST4、ST64、ST17、ST21、ST40、ST259、ST260、ST261和ST269。随着克罗诺杆菌基因组学研究的不断深入,对*ompA*等位基因的分析鉴定更加准确,也能够更好地理解*ompA*等位基因的多样性和变异情况。

3.2 O抗原分型

脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是克罗诺杆菌重要的毒力因子,对于侵入肠上皮细胞至关重要。O抗原锚定在革兰氏阴性菌的脂多糖外膜上,是细菌与环境的免疫屏障^[26],其多样性源于O抗原基因簇(O-AGC)的遗传变异。O抗原血清分型是克罗诺杆菌菌株分类的基础,也是流行病学调查和监测的重要工具。2011年,SUN等^[27]开发了阪崎克罗诺杆菌O抗原血清分型方案,将阪崎克罗诺杆菌划分为7种O抗原血清型。2015年,BLAŽKOVÁ M^[22]等对82株克罗诺杆菌的O抗原基因簇进行比对分析后确定

了克罗诺杆菌属的24种O抗原血清型。2021年,WANG等^[28]利用全基因组测序对公共数据库所有的克罗诺杆菌基因组进行分析,成功鉴定出11种新的克罗诺杆菌O抗原血清型。研究表明,阪崎克罗诺杆菌所占克罗诺杆菌最常见的致病种的93.62%^[29],临床最常见的血清型为sakO2、sakO1^[22],sakO2和sakO1分别占有阪崎克罗诺杆菌O抗原血清型的41.72%和28.62%^[28]。表明阪崎克罗诺杆菌sakO1和sakO2菌株具有更强的毒力。随着高通量测序技术的成本不断降低,克罗诺杆菌基因组学为分析O抗原提供了有力的工具,能够大规模对克罗诺杆菌进行快速、准确的O抗原血清型鉴定。

3.3 MLST分型

MLST分型是一种基于核酸序列测定的细菌分子分型方法,通过PCR扩增多个管家基因(通常为7个)的内部片段,然后测定这些片段的序列以分析不同菌株的变异程度,从而进行对不同菌株的分型。克罗诺杆菌的MLST分型最早由FORSYTHE团队^[30]提出,是根据*atpD*、*fusA*、*glnS*、*gluB*、*gyrB*、*infB*和*pps*这7个高度保守的管家基因进行分型的。高通量测序技术的发展以及公共数据库中克罗诺杆菌基因组数量急剧增加,使得7个管家基因的等位基因和序列型(Sequence type, ST)数量更加丰富。研究表明,克罗诺杆菌不同的ST型菌株的致病能力是有差异的,ST4型与新生儿和早产儿脑膜炎感染相关^[21,31],ST12型与新生儿和早产儿坏死性结肠炎感染相关^[30,32]。2019年,WANG等^[33]通过对209个阪崎克罗诺杆菌基因组进行比较基因组分析并构建进化树,揭示了8个克隆群(CGs),其中CG1和CG2为主要的与致病相关的分支,CG1和CG2分别主要对应ST4和ST12,CG1与新生儿脑膜炎之间的关联尚不确定,因为在该ST型中尚未确定独特的毒力特征,但是已有研究表明CG1的菌株具有更强的抗干燥能力^[34]。2021年,SULAIMAN等^[35]对环境检测样品中回收的83株克罗诺杆菌进行MLST分析,其中近50%的菌株鉴定为ST4,该研究还揭示了12个不同的CGs,其中CG8包含菌株数量最多(17.43%)。2023年,LI等^[36]对中国不同地区的加工环境中分离出的35株克罗诺杆菌菌株测序并进行MLST分型,结果发现共有35种序列型,其主要序列类型为ST1(14.42%)、ST4(18.27%)和ST64(11.54%)。该研究发现这3种序列类型是中国污染配方奶粉的优势STs。随着克罗诺杆菌测序数据的不断增加,MLST分型对该菌的分析更准确、可重复性更强、分辨率更高,这对未来克罗诺杆菌属物种研究发挥着重要作用。

3.4 核心基因组多位点序列分型

核心基因组多位点序列分型(Core genome multiple-locus sequence typing, cgMLST)核心基因组多位点序列分型是基于全基因组的核心靶基因进行序列分型,在现有的 MLST 数据基础上,以大量菌株中存在的核心基因组作为序列分型标记。2014年, FORSYTHE 等^[37]通过 PubMLST 数据库分析 107 个克罗诺杆菌完成图基因组,使用属于直系同源基因簇(COG)的基因生成具有 1865 个位点的 COG-cgMLST,进化树表明阪崎克罗诺杆菌 CG4 包含与大多数新生儿脑膜炎病例相关的 ST4。2021年, PARRA-FLORES 等^[38]使用全基因组测序对 2017 年从智利配方奶粉中分离出的七株阪崎克罗诺杆菌进行 cgMLST 分析,其中 6 个属于具有 1~3 个等位基因差异的 ST1 菌株,1 个属于具有 3043 个等位基因差异的 ST83 菌株,并揭示了分离株的多种抗生素耐药基因和毒力基因。由于克罗诺杆菌全基因组数据量急剧增多使得 PubMLST 方案最初的七位点拓展至上千位点,这对于菌株之间的细微变异也更为敏感,进一步提高了结果的精确度和准确性。

4 克罗诺杆菌基因组学在毒力基因挖掘方面的应用

细菌的毒力基因与其造成疾病的严重程度息息相关。因此,对细菌毒力基因的挖掘就显得至关重要。传统挖掘毒力基因的方法费时费力,并且重复性较差,但是通过全基因组测序和比较基因组学分析就可以迅速预测细菌的毒力基因,并且与相关表型相联系,从而推测潜在的致病性,这对于分析和筛选细菌毒力基因提供了有力的帮助。

2019年, CUI 等^[39]对从中国 12 个省疾控预防控制中心分离出的 31 株克罗诺杆菌进行全基因组测序并与 VFDB 数据库进行比对,发现了两个新的与毒力相关的基因簇,编码菌毛的 *sfp* 和编码溶血素的 *hly*,这两个基因簇存在于相同的分离株中,后实验验证了其分析结果;同年, WANG 等^[33]通过对 209 个阪崎克罗诺杆菌基因组进行比较基因组学分析,进化树分支定义了八个不同的 CGs,其中 CG1 和 CG2 与新生儿感染显著相关。通过对这两个 CG 中显著共同存在的基因进行分析,发现了一个新的毒力基因——*cklR*(编码 LysR 家族蛋白),该基因在 CG1 和 CG2 克隆群中占比高达 81.62% 和 87.56%,而在其他克隆群中的占比为 0%,并解析了此种新毒力因子的致病机制;2022年, CARVALHO 等^[40]对从婴儿谷类辅食中分离的 17 株克罗诺杆菌测序并进行泛基因组分析,发现了一些独特的毒力基因,如

fimH、*gtrA* 等,其中 *fimH* 基因编码对于黏附宿主细胞至关重要的 I 型菌毛, *gtrA* 基因编码一种有助于 LPS 合成的蛋白质;2023年, HOLY 等^[41]基于全基因组测序筛选从食物和奶粉中分离出的 15 株克罗诺杆菌中的毒力基因,揭示了许多毒力相关基因,包括 VI 型分泌系统、鞭毛操纵子、外膜蛋白(OmpA)等,其中所有的阪崎克罗诺杆菌菌株均编码 *cpa* 基因,该基因可能与阪崎克罗诺杆菌的血清抵抗力或者全身性传播有关。通过全基因组测序以及比较基因组学分析可将相关基因和表型联系起来,能够实现对细菌毒力基因的快速预测,这为进一步解析克罗诺杆菌的致病机制提供了极大的帮助。

5 克罗诺杆菌基因组学在鉴定基因筛选方面的应用

当今卫生健康领域中,相较于全基因组测序,以特异性的鉴定基因为基础的 PCR 检测技术和芯片检测技术对已知的病原菌进行检测因成本低廉、检测迅速等优点而被广泛应用。2024年2月8日, PCR 扩增管家基因进行克罗诺杆菌种的鉴定的方法已经列为国家标准方法,这对于鉴定基因的筛选就显得至关重要。随着高通量测序技术的不断发展,基于全基因组数据,通过大规模的比较基因组学分析筛选病原菌的特异性鉴定基因已然成为一种重要的筛选方法。

2019年, CHEN 等^[42]以开发针对苏黎世克罗诺杆菌的灵敏且快速的 PCR 检测方法为目的,对苏黎世克罗诺杆菌菌株 LMG 23827 的基因组序列进行分析,使用 BLAST 比对该菌株中所有的 4 232 个基因序列,其中 13 个基因靶标是特异于苏黎世克罗诺杆菌。经过 PCR 验证,发现使用针对其中的 *CTU_19580* 基因所设计的引物能够实现快速、高效地检测苏黎世克罗诺杆菌的目的,并将这一发现用于开发苏黎世克罗诺杆菌的 PCR 检测方法;2022年, WANG 等^[43]通过大规模比较基因组学分析筛选出了 24 个克罗诺杆菌属潜在的特异性鉴定基因,2 个阪崎克罗诺杆菌、7 个丙二酸盐克罗诺杆菌、13 个苏黎世克罗诺杆菌潜在的物种特异性鉴定基因。将其中四对特异性最好的基因作为克罗诺杆菌属和三个致病种的鉴定基因,建立了克罗诺杆菌双重 PCR 和多重 PCR 检测方法,实现了在属、种水平及同时在属和种水平上均能准确检测出克罗诺杆菌的目的。随着基因组数据的不断扩大,利用克罗诺杆菌基因组学筛选特异性鉴定基因无疑是一种低成本、可大量操作并且快速、准确的有效方法。

6 结论与展望

克罗诺杆菌是一类重要的食源性条件致病菌,在进化过程中适应不同的环境显示出丰富的遗传多样性。自克罗诺杆菌基因组时代开启以来,克罗诺杆菌基因组特征、核心基因组和泛基因组的了解也更加深入,这对于研究该菌种内遗传多样性以及探究不同个体间的进化关系具有重要的应用价值。与传统方法相比,基于全基因组测序的基因组学研究方法对克罗诺杆菌进行分型能够提高分型的分辨率和准确性,有助于该菌的定性和溯源,这对于预防和控制病原菌的感染具有重要意义。利用比较基因组学分析筛选重要的毒力基因以及鉴定基因,为探究克罗诺杆菌的致病机制等方面提供见解,为其物种的鉴定提供更多选择。虽然已经对克罗诺杆菌的基因组进行了广泛的研究,但克罗诺杆菌的研究仍面临着许多挑战,包括揭示其与宿主相互作用的机制、深入了解其功能和代谢途径、研究群落的结构和动态变化、理解其抗生素耐药性以及克服基因组组装和注释的挑战等。克罗诺杆菌基因组的应用也将促进微生物治疗、精准医学和抗菌药物研发的进展,为人类健康带来更大的益处。

参考文献

- [1] FORSYTHE S J. Updates on the *Cronobacter* genus[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2018, 9: 23-44.
- [2] YONG W, GUO B, SHI X, et al. An investigation of an acute gastroenteritis outbreak: *Cronobacter sakazakii*, a potential cause of food-borne illness[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2549.
- [3] ALY M A, DOMIG K J, KNEIFEL W, et al. Whole genome sequencing-based comparison of food Isolates of *Cronobacter sakazakii* [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1464.
- [4] KILLER J, SKŘIVANOVÁ E, HOCHÉ I, et al. Multilocus sequence typing of *Cronobacter* strains isolated from retail foods and environmental samples[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2015, 12(6): 514-521.
- [5] SIQUEIRA S R, DA S N, AMSTALDEN J V, et al. Screening for *Cronobacter* species in powdered and reconstituted infant formulas and from equipment used in formula preparation in maternity hospitals [J]. Annals Of Nutrition And Metabolism, 2013, 63(1-2): 62-68.
- [6] SINGH N, GOEL G, RAGHAV M. Prevalence and characterization of *Cronobacter* spp. from various foods, medicinal plants, and environmental samples[J]. Current Microbiology, 2015, 71(1): 31-38.
- [7] FRIEDEMANN M. Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections[J]. European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2009, 28(11): 1297-1304.
- [8] CORTI G, PANUNZI I, LOSCO M, et al. Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man [J]. Journal of chemotherapy, 2007, 19(1): 94-96.
- [9] LAI K K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature[J]. Medicine (Baltimore), 2001, 80(2): 113-122.
- [10] URMENYI A M, FRANKLIN A W. Neonatal death from pigmented coliform infection[J]. Lancet, 1961, 1(7172): 313-315.
- [11] HASTON J C, MIKO S, COPE J R, et al. *Cronobacter sakazakii* infections in two infants linked to powdered infant formula and breast pump equipment - United States, 2021 and 2022 [J]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2023, 72(9): 223-226.
- [12] TERAMOTO S, TANABE Y, OKANO E, et al. A first fatal neonatal case of *Enterobacter sakazakii* infection in Japan [J]. Pediatrics International, 2010, 52(2): 312-313.
- [13] CHAVES C, BRANDÃO M, LACERDA M, et al. Fatal *Cronobacter sakazakii* sequence type 494 meningitis in a newborn, Brazil [J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24(10): 1948-1950.
- [14] KUCEROVA E, CLIFTON S W, XIA X Q, et al. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species [J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9556.
- [15] TETTELIN H, MASIGNANI V, CIESLEWICZ M J, et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome" [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A, 2005, 102(39): 13950-13955.
- [16] GRIM C J, KOTEWICZ M L, POWER K A, et al. Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Cronobacter* spp. suggests a species-level bidirectional divergence driven by niche adaptation [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 366.
- [17] LEE I, ANDAM C P. Pan-genome diversification and recombination in *Cronobacter sakazakii*, an opportunistic pathogen in neonates, and insights to its xerotolerant lifestyle [J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 306.
- [18] FINKELSTEIN S, NEGRETE F, JANG H, et al. Prevalence, distribution, and phylogeny of type two toxin-antitoxin genes possessed by *Cronobacter* Species where *C. sakazakii* homologs follow sequence type lineages [J]. Microorganisms, 2019, 7(11): 554.
- [19] HUNTER C J, BEAN J F. *Cronobacter*: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis [J]. Journal of Perinatology, 2013, 33(8): 581-585.
- [20] NAZAROWEC W M, FARBER J M. *Enterobacter sakazakii*: a review [J]. Int J Food Microbiol, 1997, 34(2): 103-113.
- [21] HARIRI S, JOSEPH S, FORSYTHE S J, Hariri S, Joseph S, Forsythe S J. *Cronobacter sakazakii* ST4 strains and neonatal meningitis, United States [J]. Emerging Infectious Diseases, 2013, 19(1): 175-177.
- [22] BLAŽKOVÁ M, JAVŮRKOVÁ B, VLACH J, et al. Diversity of O antigens within the genus *Cronobacter*: from disorder to order [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(16): 5574-5582.
- [23] NAIR M K, VENKITANARAYANAN K, SILBART L K, et al. Outer membrane protein A (OmpA) of *Cronobacter sakazakii* binds fibronectin and contributes to invasion of human brain microvascular endothelial cells [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2009, 6(4): 495-501.

- [24] MOHAN N M, VENKITANARAYANAN K S. Cloning and sequencing of the ompA gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an ompA-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(4): 2539-2546.
- [25] FEI P, MAN C, LOU B, et al. Genotyping and Source Tracking of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* isolates from powdered infant formula and an infant formula production factory in China [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(16): 5430-5439.
- [26] Essentials of Glycobiology[M]. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.
- [27] SUN Y, WANG M, LIU H, et al. Development of an O-antigen serotyping scheme for *Cronobacter sakazakii* [J]. Applied And Environmental Microbiology, 2011, 77(7): 2209-2214.
- [28] WANG L, ZHU W, LU G, et al. In silico species identification and serotyping for *Cronobacter* isolates by use of whole-genome sequencing data[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 358: 109405.
- [29] MÜLLER A, STEPHAN R, FRICKER-FEER C, et al. Genetic diversity of *Cronobacter sakazakii* isolates collected from a Swiss infant formula production facility[J]. Journal of Food Protection, 2013, 76(5): 883-887.
- [30] BALDWIN A, LOUGHLIN M, CAUBILLA-BARRON J, et al. Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes [J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 223.
- [31] JOSEPH S, FORSYTHE S J. Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections [J]. Emerging Infectious Diseases, 2011, 17(9): 1713-1715.
- [32] OGRODZKI P, FORSYTHE S J. CRISPR-cas loci profiling of *Cronobacter sakazakii* pathovars [J]. Future microbiology, 2016, 11: 1507-1519.
- [33] WANG M, WANG L, WU P, et al. Genomics and dxperimental analysis reveal a novel factor contributing to the virulence of *Cronobacter sakazakii* strains associated with neonate infection [J]. Journal of Infectious Diseases, 2019, 220(2): 306-315.
- [34] FEI P, JIANG Y, FENG J, et al. Antibiotic and desiccation resistance of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* isolates from powdered infant formula and processing environments [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 316.
- [35] SULAIMAN I M, TANG K, SEGARS K, et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry, and DNA sequencing-based SLST and MLST analysis for the identification of *Cronobacter* spp. isolated from environmental surveillance samples [J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(8): 4813-4820.
- [36] LI H, FU S, SONG D, et al. Identification, typing and drug resistance of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula and processing environment [J]. Foods, 2023, 12(5): 1084.
- [37] FORSYTHE S J, DICKINS B, JOLLEY K A. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 1121.
- [38] PARRA-FLORES J, HOLÝ O, RIFFO FPARRA-FLORES J, et al. Profiling the virulence and antibiotic resistance genes of *Cronobacter sakazakii* strains isolated from powdered and dairy formulas by whole-genome sequencing [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 694922.
- [39] CUI J, HU J, DU X, et al. Genomic analysis of putative virulence factors affecting cytotoxicity of *Cronobacter* [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 3104.
- [40] CARVALHO G G, CALARGA A P, ZORGI N E, et al. Virulence and DNA sequence analysis of *Cronobacter* spp. isolated from infant cereals [J]. Intional Journal of Food Microbiology, 2022, 376: 109745.
- [41] HOLÝ O, PARRA-FLORES J, BZDIL J, et al. Screening of antibiotic and virulence genes from whole genome sequenced *Cronobacter sakazakii* Isolated from food and milk-producing environments [J]. Antibiotics (Basel), 2023, 12(5): 851.
- [42] CHEN Q, JUN L, QIU Y, et al. Short communication: Bioinformatics-based mining of novel gene targets for identification of *Cronobacter turicensis* using PCR [J]. Journal Of Dairy Science, 2019, 102(7): 6023-6026.
- [43] WANG L, WU P, SU Y, et al. Detection of genus and three important species of *Cronobacter* using novel genus- and species-specific genes identified by large-scale comparative genomic analysis [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 885543.