

研究报告

广州地区创伤弧菌分子生物学特征分析

张晶^{1,2}, 陈惠玲^{1,2}, 和鹏^{1,2}, 侯水平^{1,2}, 白志军^{1,2}, 陶霞^{1,2}, 吴新伟^{1,2}

(1. 广州市疾病预防控制中心微生物学检验部, 广东广州 510440; 2. 广州医科大学公共卫生研究院, 广东广州 510440)

摘要:目的 了解广州地区创伤弧菌的分子生物学特征。方法 对采集自广州地区的38株创伤弧菌进行全基因组测序, 结合从NCBI公共数据库下载的50株序列数据, 利用fineSTRUCTURE软件解析创伤弧菌的种群结构, 并利用CARD、ResFinder和VFDB数据库对其毒力基因和耐药基因进行鉴定。结果 创伤弧菌分为4个系统发育谱系(L1~L4), 广州地区分离株全部聚集于L1(占47%)和L2(占53%)谱系, ST分型主要为ST357、ST157、ST136、ST139、ST345、ST303等, 呈现一定的区域聚集性。创伤弧菌多个基因组鉴定发现 $acrF$ 、 CRP 、 $catB9$ 、 $rpoC$ 、 ugd 等11种耐药基因, 并首次在创伤弧菌中发现与多黏菌素耐药相关的 MCR 基因。该物种还携带5类23种毒力基因, 编码鞭毛蛋白、II型分泌系统蛋白、荚膜多糖、RtxA毒素、铁超载等毒力相关基因。结论 广州地区创伤弧菌高度同源重组, 并且携带多种耐药、毒力相关基因, 应加强对其监测管理。

关键词: 创伤弧菌; 全基因组测序; 种群结构; 多位点序列分型; 耐药基因; 毒力基因

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)12-1710-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.12.003

The molecular biological characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated in GuangzhouZHANG Jing^{1,2}, CHEN Huiling^{1,2}, HE Peng^{1,2}, HOU Shuiping^{1,2}, BAI Zhijun^{1,2}, TAO Xia^{1,2}, WU Xinwei^{1,2}

(1. Department of Microbiology Test, Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Guangzhou 510440, China; 2. Institute of Public Health, Guangzhou Medical University, Guangdong Guangzhou 511436, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular and biological characteristics of *Vibrio vulnificus* (*V. vulnificus*) isolated from Guangzhou. **Methods** Thirty-eight strains of *V. vulnificus* were collected from Guangzhou, and whole-genome sequences were obtained. The population structure of *V. vulnificus* was inferred by utilizing 50 publicly available genome sequences obtained from NCBI. FineSTRUCTURE software was employed for this analysis. Antibiotic resistance and virulence factors were identified using CARD, ResFinder, and VFDB databases. **Results** Four well-supported phylogenetic groups or lineages (L1-L4) were identified, and all genomes of the strains in Guangzhou were classified into L1 (47%) and L2 (53%). The predominant ST were ST357, ST157, ST136, ST139, ST345, ST303, and so on, which showed regional aggregation. Multiple genome identification of *V. vulnificus* revealed 11 drug resistance genes: $acrF$, CRP , $catB9$, $rpoC$, ugd , and others. MCR genes related to polymyxin resistance were identified in *V. vulnificus* for the first time. The species also carries 23 virulence genes in five classes encoding flagellin, type II secretory system protein, capsular polysaccharide, RtxA toxin, iron overload, and other virulence-related genes. **Conclusion** *Vibrio vulnificus* in Guangzhou undergoes highly homologous recombination and carries a variety of antimicrobial resistance genes and virulence-related genes. Therefore, monitoring and management of *Vibrio vulnificus* should be strengthened.

收稿日期: 2022-11-25

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(A2021040); 广州市卫生健康科技一般引导项目(20221A010037); 广州市医学重点学科(2021-2023-11); 广州市重点实验室基础研究计划项目(202102100001)

作者简介: 张晶 女 副主任技师 研究方向为病原微生物学 E-mail: zhangjing9468@yahoo.com.cn

陈惠玲 女 主管技师 研究方向为病原微生物学 E-mail: chenhl020@126.com

张晶和陈惠玲为并列第一作者

通信作者: 和鹏 男 副主任技师 研究方向为病原微生物学 E-mail: 549478426@qq.com

侯水平 男 副主任技师 研究方向为病原微生物学 E-mail: gzcdc367@163.com

和鹏和侯水平为共同通信作者

Key words: *Vibrio vulnificus*; whole-genome sequencing; population structure; multilocus sequence typing; antimicrobial resistance gene; virulence-related genes

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)是河口环境中常见的条件性致病菌^[1]。人类通常通过食用受污染的海鲜或暴露于受污染水源的开放性伤口感染,引起急性肠胃炎、坏死性筋膜炎及脓毒败血症,免疫功能缺陷人群或肝脏疾病患者致死率高达50%^[2]。创伤弧菌是嗜温性细菌,全球气候变暖为创伤弧菌生长繁殖提供了更有利的条件,近年来感染病例有增多的趋势,除了美国、日本、中国台湾、韩国等流行地区,瑞士、德国、丹麦等非流行地区创伤弧菌感染病例数也显著增加,已经成为一个严重的社会公共卫生问题^[2-4]。

近年来全基因组测序作为一种新型技术被广泛应用于监测公共卫生密切关注的病原体^[5],通过全基因组测序可以了解创伤弧菌流行情况,同时可以推测其传播动力学、耐药基因和毒力基因的选择机制。本研究基于全基因组测序技术对广州地区2011年起从水产品和患者中分离到的创伤弧菌菌株的相关数据进行监测挖掘,综合分析创伤弧菌的基因多态性分布、耐药基因和毒力基因特征,为进一步了解和防控创伤弧菌提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

新测序的38株创伤弧菌,其中35株分离自2011—2021年广州市食品监测的市售水产品,包括贝类、蟹类、虾类和鱼类,3株分离自患者脓液中,经VITEK2 Compact全自动微生物鉴定/药敏分析系统鉴定均为创伤弧菌,所有菌株由本实验室保存。50份公共基因组序列下载于NCBI Assembly数据库中的创伤弧菌基因组拼接数据。

1.1.2 主要仪器与试剂

生物安全柜(新加坡ESCO),电热恒温培养箱。脑心浸液肉汤(Brain heart infusion, BHI)(北京陆桥技术股份有限公司),血平板(广东环凯微生物科技有限公司),细菌基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 创伤弧菌全基因组测序及组装

取所有菌株于3 mL BHI液体培养基培养过夜,按照细菌基因组DNA提取试剂盒说明书对38株创伤弧菌基因组DNA进行提取,送广州昊天生物科技有限公司在Illumina HiSeq平台上测序,测序

模式为PE150,使用试剂HiSeq X Ten Reagent Kit v2.5,得到150 bp的双端测序reads,测序深度1G。使用ABYSS v2.0.2软件对原始数据进行组装,使用GapCloser v1.12软件对组装数据的局部进行填充并对碱基进行校正,得到本次测序菌株的全基因组序列。

1.2.2 创伤弧菌全基因组序列分析及注释

使用GeneMarkS软件对全基因组进行预测,同时将预测基因与COG(Cluster of Orthologous Groups of proteins)和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)等蛋白功能数据库进行BLAST比对,获得注释信息。使用PubMLST数据库(<https://pubmlst.org/>)进行序列(Sequence type, ST)分型,使用ResFinder-3.2 Server软件和耐药基因数据库CARD(<http://card.mcmaster.ca/>)搜索及预测耐药基因信息,使用毒力基因数据库VFDB(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)查找毒力基因。

1.2.3 基因组比较和基因组系统发育分析

以创伤弧菌菌株GCA_000009745.1基因组完成图为参考序列,用snippy v4.4.5软件分析基因组的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNP)位点^[6],用Phipack去除重组,用FastTree进化树软件使用Neighbor-Joining方法构建基于SNP位点的系统发育树,用iTOL绘制系统发育树^[7]。

2 结果

2.1 基因组功能注释

新测序的38株创伤弧菌菌株数据分析显示,基因组大小为5.1 Mb,GC含量为47.38%,包含基因组4 681个。重复序列数280个,tRNA编码区181个,rRNA编码区28个。经过与COG数据库比对,平均有3 966个得到功能注释的蛋白获得聚集,除了功能未知的基因,参与转录(K, Transcription, 348个)及信号转导机制(T, Signal transduction mechanisms, 306个)的同源蛋白含量最丰富,比例分别为8.8%和7.7%。

2.2 创伤弧菌种群进化分析

以菌株GCA_000009745.1基因组完成图为参考序列,87株创伤弧菌全基因组序列共鉴定得到26 051个SNP位点。基于全基因组SNP构建系统发育树,结果显示创伤弧菌系统发育树内部分支较长,创伤弧菌具有高度同源重组率,和溶藻弧菌、副溶血性弧菌等弧菌类似,菌株间的水平转移信号打

乱了垂直遗传信号^[8-10]。图1显示该发育树可划分为4个系统发育谱系(L1~L4),广州地区分离的创伤弧菌全部聚集于L1(占47%)和L2(占53%)谱系,呈现区域聚集性,临床分离株(GZ1824、GZ1904和GZ1207)全部分布在L1谱系,并和水产品分离

株 vv32、vv23 聚集成1个分支,SNP 分别相差2、1个,具有较近的亲缘关系。从图1中还可以看出,ST分型主要为ST357、ST157、ST136、ST139、ST345、ST303等,提示创伤弧菌在广州地区区域内传播呈现一定的聚集,为未来的防治提供了新的思路。

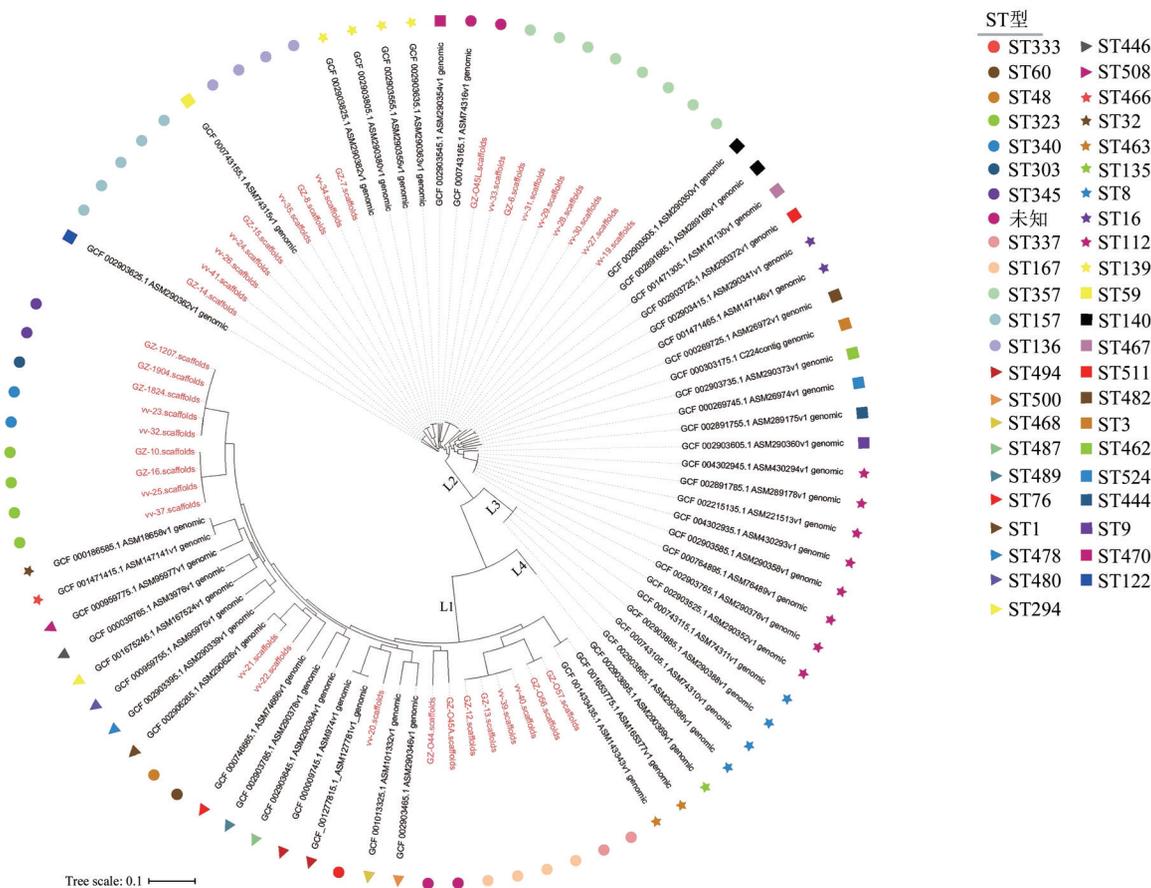


图1 基于全基因组SNP构建的创伤弧菌系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of *Vibrio vulnificus* based on genome-wide SNP

2.3 耐药基因分析

利用 ResFinder 和 CARD 耐药基因数据库,针对 88 株创伤弧菌基因组共鉴定出 11 种耐药基因(图 2),按耐药机制分为抗性结节分化(Resistance nodulation cell division family, RND)抗生素外排泵: *acrF*(88%)、*CRP*(99%), 抗生素灭活: *catB9*(75%), 抗生素靶点改变: *MCR-3.7*(59%)、*MCR-9*(99%)、*rpoC*(88%)、*ugd*(94%), 表型变异调节: *pvrR*(99%), 抗生素靶点保护: *QnrVC1*(94%), ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)抗生素外排泵: *tetB(60)*(95%), ABC 抗生素外排泵、主要易化子超家族(Major facilitator superfamily, MFS)抗生素外排泵、RND 抗生素外排泵: *tolC*(99%)。研究发现绝大部分的菌株(>90%)普遍携带氨基糖苷类 *pvrR*、肽类抗性基因 *ugd*、氟喹诺酮类抗生素 *QnrVC1*、多黏菌素类 *MCR-9*、四环素类 *tetB(60)*等常用抗生素的耐药性基因及耐药调控性基因 *CRP*。

在鉴定出的 11 种耐药基因中,首次在创伤弧菌中发现多黏菌素耐药基因 *MCR-3.7*、*MCR-9*,分别与质粒 IncP1、IncHI2 和 IncHI2A 介导息息相关^[11]。基于目前的研究, *MCR* 基因主要存在于大肠埃希菌、沙门菌、肺炎克雷伯菌等细菌中^[12],本研究在创伤弧菌中发现该基因,携带率分别为 59% 和 99%,提示创伤弧菌在进化过程中,通过水平转移的方式获得了携带多种耐药基因的质粒,为今后创伤弧菌的防控提供了新思路。

2.4 毒力基因分析

通过 VFDB 数据库对 88 株创伤弧菌基因组比对来搜寻毒力基因,最终共检索到 23 个毒力基因(图 2),分为黏附因子包括鞭毛蛋白编码相关基因 *flaC*(47%)、*flaD*(36%),与菌毛黏附性相关的基因 *pilA*(22%)、*pilD*(67%)、*MshA*(36%)、*tadG*(75%); II型分泌系统蛋白编码基因 *GspD*(63%);荚膜多糖相关基因 *rmlA*(40%)、*rmlB*(45%)、*rmlC*(18%)、

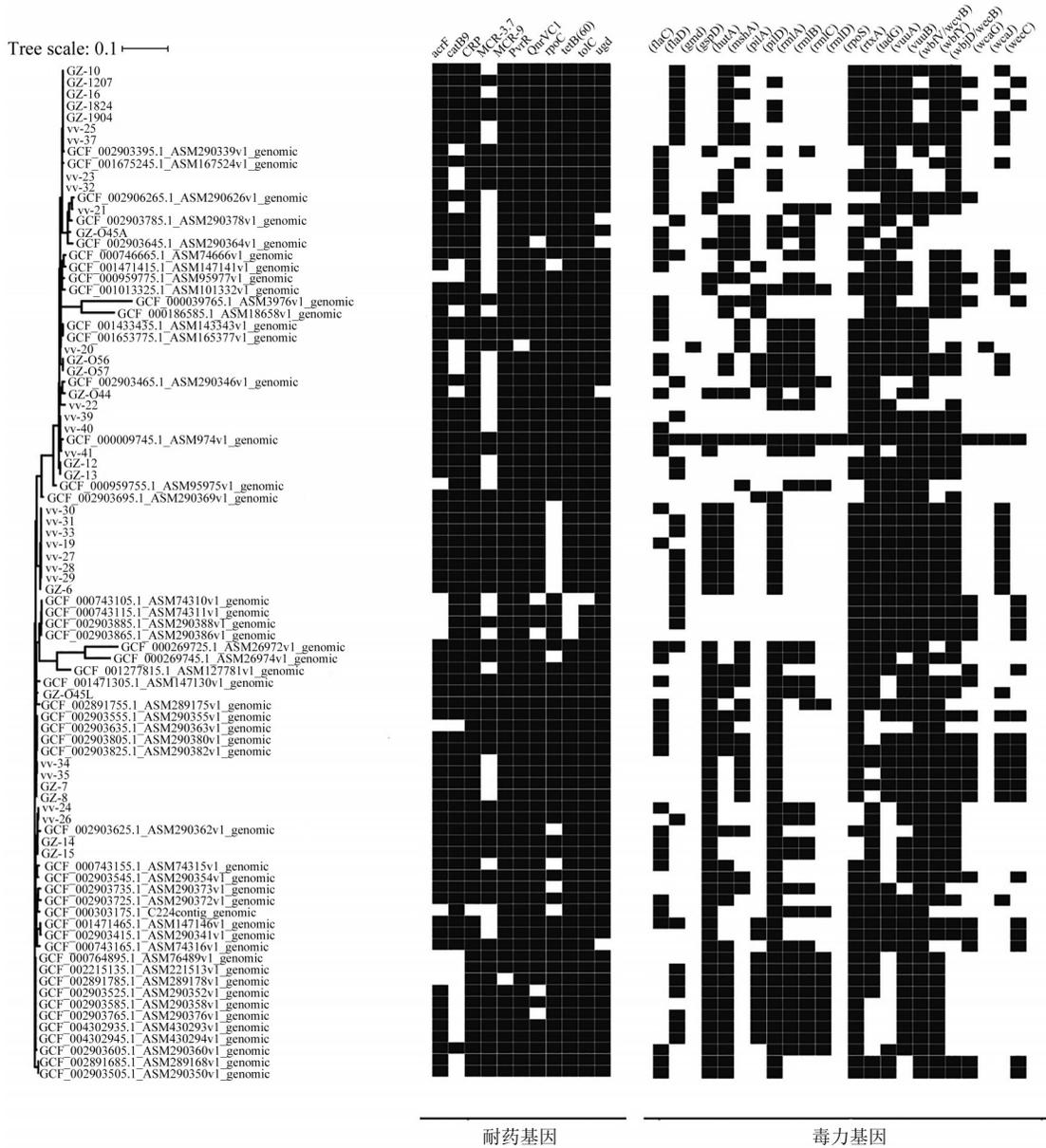


图2 创伤弧菌耐药基因与毒力基因注释热图

Figure 2 Heatmap of virulence and antibiotic resistance factors in *Vibrio vulnificus*

rmID (1%)、*wbJ/wcvB* (80%)、*wcaJ* (34%)、*wecC* (26%)、*wbjD/wecB* (28%)、*wbJy* (74%)、*gmd* (2%)、*wcaG* (2%); RtxA 毒素相关基因包括细胞毒素 *rtxA* (86%)、RNA 聚合酶亚基 *RpoS* (84%)；铁超载相关基因 *VuuA* (85%)、*VuuB* (84%)、*hutA* (61%)等 5 类毒力基因。其中荚膜多糖相关基因数目最多,总共 11 个,占毒力基因总数的 48%。荚膜多糖是创伤弧菌必需的致病因子之一,可使细菌逃避宿主的先天免疫反应,并诱导机体产生促炎性细胞因子从而引发败血症^[13]。本研究还在 86% 的创伤弧菌中发现携带的多功能细胞毒素 *rtxA*,它是重要的毒力因子之一,来自具有富含甘氨酸和天冬氨酸的重复九肽序列的大毒素家族,由 I 型分泌系统分泌,能够促进蛋白激活激酶 I 介导的丝裂原激活诱导宿主细胞骨架的

重组和死亡^[14]。此外,研究还发现,相同 ST 菌株之间的毒力基因并不完全一致,有 1~3 个基因的差异,无法解释临床分离株与环境食品分离株之间的区别,需要加大采样量进一步验证相关毒力因子的遗传特征。

3 讨论

随着高通量测序技术的发展,细菌全基因组序列分析可一次性得到细菌病原体的基因型别、耐药基因和毒力基因等,为研究致病菌提供了全新的视角。本研究为明确广州地区创伤弧菌的基因组特征及与其他地区菌株之间的关系,对广州地区近十年来分离自食品监测的水产品和患者共计 38 株创伤弧菌进行高通量测序,同时下载数据库中 50 株

公开发表的全球序列数据进行生物信息学分析,结果显示创伤弧菌广州分离株呈现一定的地域性聚集,可能某些未知原因迁徙者较少或者限制了遗传物质在不同种群菌株间的交换,它们保留了当地种群的遗传特征。将来可进一步通过流行病学调查和实验室更多的菌株序列研究进行验证。

近年来研究发现,大面积流行的弧菌病原体大多来自于水体,水生生态系统是公认的耐药基因和毒力基因的天然储存库,可通过多种途径跨区域跨种群形成耐药基因和毒力基因的水平传播^[15-16]。在本次耐药基因分布研究中,显示有52株菌携带MCR-3.7,87株菌携带MCR-9。MCR-3.7、MCR-9属于多黏菌素耐药基因家族成员,均具有磷酸乙醇胺转移酶活性,通过质粒介导在大肠埃希菌、志贺菌、产气肠杆菌、肺炎克雷伯菌等常见菌中扩散^[12],本研究首次在创伤弧菌中发现MCR基因。与染色体传播比较,质粒更具有广泛的传播性,为避免MCR基因在弧菌中的广泛传播,应当在水产品养殖及临床选药时审慎使用多黏菌素类药物。本次毒力基因分布研究鉴定到了多种毒力基因,88株创伤弧菌分别携带的基因数量不同,表明它们之间毒力存在差异,但是张嘉鑫等^[17]研究表明,创伤弧菌已知的大多数毒力基因无法解释环境食品株与临床分离株之间的差异,并且很难与致病性表型关联,是否携带毒力基因与菌株的临床致病性表型不一定具有相关性,一个基因的表达需要启动子、诱导因子等相关因素的调控,因此携带毒力基因是否具有致病表型还需要结合实验进一步研究。

综上所述,本研究对广州地区创伤弧菌菌株的全基因组分析为了解本地菌株的遗传特征,明确本地菌株与国内外其他地区菌株之间的关系提供了基础数据,对创伤弧菌的流行病学溯源调查和科学防控有着良好的应用价值。

参考文献

- [1] BAKER-AUSTIN C, OLIVER J D. *Vibrio vulnificus*: New insights into a deadly opportunistic pathogen[J]. Environmental Microbiology, 2018, 20(2): 423-430.
- [2] OLIVER J D. The biology of *Vibrio vulnificus*[J]. Microbiology Spectrum, 2015, 3(3): 3.3.01.
- [3] HENG S P, LETCHUMANAN V, DENG C Y, et al. *Vibrio vulnificus*: An environmental and clinical burden[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 997.
- [4] ELMAHDI S, DASILVA L V, PARVEEN S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review[J]. Food Microbiology, 2016, 57: 128-134.
- [5] JAGADEESAN B, GERNER-SMIDT P, ALLARD M W, et al. The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice[J]. Food Microbiology, 2019, 79: 96-115.
- [6] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. Bioinformatics, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [7] LETUNIC I, BORK P. Interactive tree of life (iTOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees [J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44 (W1) : W242-W245.
- [8] 郑宏源, 闫琳, 杨超, 等. 溶藻弧菌群体基因组学研究[J]. 遗传, 2021, 43(4): 350-361.
- [9] ZHENG H Y, YAN L, YANG C, et al. Population genomics study of *Vibrio alginolyticus*[J]. Hereditas, 2021, 43(4): 350-361.
- [10] YANG C, PEI X Y, WU Y R, et al. Recent mixing of *Vibrio parahaemolyticus* populations[J]. The ISME Journal, 2019, 13 (10): 2578-2588.
- [11] CUI Y J, YANG C, QIU H L, et al. The landscape of coadaptation in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. eLife, 2020, 9: e54136.
- [12] DU C T, FENG Y Y, WANG G Z, et al. Co-occurrence of the *mcr-1.1* and *mcr-3.7* genes in a multidrug-resistant *Escherichia coli* isolate from China [J]. Infection and Drug Resistance, 2020, 13: 3649-3655.
- [13] 宗劲, 徐凯进, 黄莹, 等. 质粒介导黏菌素耐药机制研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(1): 120-125.
- [14] ZONG J, XU K J, HUANG Y, et al. Progress in research on plasmid-mediated colistin resistance [J]. Chinese Journal of Microecology, 2021, 33(1): 120-125.
- [15] PETTIS G S, MUKERJI A S. Structure, function, and regulation of the essential virulence factor capsular polysaccharide of *Vibrio vulnificus* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(9): 3259.
- [16] GUO R H, IM Y J, SHIN S I, et al. *Vibrio vulnificus* RtxA1 cytotoxin targets filamin A to regulate PAK1- and MAPK-dependent cytoskeleton reorganization and cell death [J]. Emerging Microbes & Infections, 2019, 8(1): 934-945.
- [17] MARTI E, VARIATZA E, BALCAZAR J L. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance [J]. Trends in Microbiology, 2014, 22(1): 36-41.
- [18] 张晶, 张欣强, 周勇, 等. 广州地区海产品中创伤弧菌病原学特征分型[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(4): 422-425.
- [19] ZHANG J, ZHANG X Q, ZHOU Y, et al. Pathogenic biological characteristics of *Vibrio vulnificus* isolates from seafood in Guangzhou[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2016, 28(4) : 422-425.
- [20] 张嘉鑫, 武雅蓉, 杨超, 等. 创伤弧菌毒力相关因子的全基因组关联分析研究[J]. 微生物学报, 2020, 60(7): 1488-1495.
- [21] ZHANG J X, WU Y R, YANG C, et al. Genome-wide association study on virulence factors of *Vibrio vulnificus* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(7): 1488-1495.