

• 综 述 •

多重耐药寡养单胞菌的基因组学研究进展

唐宇航^{1,2}, 方诗琦², 谢琳琳^{1,2}, 孙超², 李珊珊², 周爱萍^{3,4}, 曹广祥⁵, 李骏^{2*}

1 浙江工业大学生物工程学院, 浙江 杭州 310032

2 江西农业大学食品科学与工程学院, 江西 南昌 330045

3 上海市东方医院, 上海 200123

4 上海市东方医院吉安医院, 江西 吉安 343000

5 山东第一医科大学(山东省医学科学院) 生物医学科学学院&山东省医药生物技术研究中心,
山东 济南 250117

唐宇航, 方诗琦, 谢琳琳, 孙超, 李珊珊, 周爱萍, 曹广祥, 李骏. 多重耐药寡养单胞菌的基因组学研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1314-1331.

TANG Yuhang, FANG Shiqi, XIE Linlin, SUN Chao, LI Shanshan, ZHOU Aiping, CAO Guangxiang, LI Jun. Advances in genomics of multi-drug resistant *Stenotrophomonas*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1314-1331.

摘 要: 寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)是一类广泛分布于自然环境中的革兰氏阴性非发酵细菌, 环境适应能力较强, 尤其具备高度耐受抗生素的能力, 被认为是耐药基因(antimicrobial resistance, AMR)传播的“物流转运仓库”。临床上寡养单胞菌检出率逐年提高, 且耐受抗生素能力及其种类呈现增加态势。本文围绕寡养单胞菌基因组编码的多样性耐药因子, 结合基因组学工具开发、抗生素耐药分子机制的研究进展, 针对耐药相关因子所涉及的进化/变异和序列编辑技术展开综述。寡养单胞菌的比较基因组学(comparative genomics)研究, 可推动耐药菌高效监测与扩散风险防控、解析微生物适应环境关键机制和设计靶向药物。

关键词: 寡养单胞菌; 基因组学; 多重抗生素耐药; 传播风险

资助项目: 国家自然科学基金(31800118, 32260032); 江西双千计划(jxsq2019101054); 江西省自然科学基金(20171BAB205110)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31800118, 32260032), the Double Thousand Talent Plan of Jiangxi (jxsq2019101054), and the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20171BAB205110).

*Corresponding author. E-mail: lijunbioinfo@163.com

Received: 2022-07-06; Accepted: 2022-09-13; Published online: 2022-09-20

Advances in genomics of multi-drug resistant *Stenotrophomonas*

TANG Yuhang^{1,2}, FANG Shiqi², XIE Linlin^{1,2}, SUN Chao², LI Shanshan², ZHOU Aiping^{3,4}, CAO Guangxiang⁵, LI Jun^{2*}

1 College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, Zhejiang, China

2 College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

3 Shanghai East Hospital, Shanghai 200123, China

4 Shanghai East Hospital Ji'an Hospital, Ji'an 343000, Jiangxi, China

5 Biomedical Sciences College & Shandong Medicinal Biotechnology Centre, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan 250117, Shandong, China

Abstract: *Stenotrophomonas* species are non-fermentative Gram-negative bacteria that are widely distributed in environment and are highly resistant to numerous antibiotics. Thus, *Stenotrophomonas* serves as a reservoir of genes encoding antimicrobial resistance (AMR). The detection rate of *Stenotrophomonas* is rapidly increasing alongside their strengthening intrinsic ability to tolerate a variety of clinical antibiotics. This review illustrated the current genomics advances of antibiotic resistant *Stenotrophomonas*, highlighting the importance of precise identification and sequence editing. In addition, AMR diversity and transferability have been assessed by the developed bioinformatics tools. However, the working models of AMR in *Stenotrophomonas* are cryptic and urgently required to be determined. Comparative genomics is envisioned to facilitate the prevention and control of AMR, as well as to gain insights into bacterial adaptability and drug development.

Keywords: *Stenotrophomonas*; genomics; multi-drug resistance; transferability risk

寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)是除了肠杆菌科(代表性种属:大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、沙门氏菌、粘质沙雷氏菌)和铜绿假单胞菌等常见抗生素耐药菌外,具备较强内源性耐药能力的革兰阴性菌^[1-2]。寡养单胞菌又称窄食单胞菌,为专性需氧的非发酵型革兰阴性多鞭毛杆菌。寡养单胞菌分布较为广泛,可在水源、土壤、空气、根系、污水生活、养殖和医疗甚至医院透析装置和辅助呼吸系统中分离到。其中,嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)目前已经成为引发全球关注的多重耐药条件性致病菌,耐药性较强且较易与其他致病菌在免疫力低下或长期大量使用抗生素药物的人群中形成复合感染,

虽然致病力不强但可引发败血症、心内膜炎以及消化道和尿路感染等病症。嗜麦芽寡养单胞菌生存能力强、毒力不高,最早分离于口腔肿瘤患者的咽拭子,并被命名为嗜麦芽假单胞菌,后又归类为黄单胞菌。但由于寡养单胞菌生理生化特性和营养物代谢能力与假单胞菌、黄单胞菌存在差异,故寡养单胞菌属自黄单胞菌科单独划出以示区别^[3-4]。

嗜麦芽寡养单胞菌的感染是条件性的,多发生于严重免疫能力受损或低下、患有基础病的群体中。近年由于其生存力强且不易清除的特性,临床上寡养单胞菌的检出率逐渐提高。寡养单胞菌对众多β-内酰胺药物天然耐药,而且编码多

种氨基糖苷修饰酶及外排泵形成对某一抗生素的多样化耐药机制。该菌对常见抗生素高度耐药,故可供选择的临床药物较少,主要为复方新诺明、米诺环素、左氧氟沙星、氯霉素和头孢他啶。值得注意的是,由于寡养单胞菌分布广泛、适应逆境能力强,其对抗生素、杀虫剂、雌激素、羽毛的降解能力已逐渐被发现,有助于实现生态修复^[5-9]。此外,根际、土壤来源的寡养单胞菌在调节植物生长、生物防治、工业酶挖掘与进化等方面也已有相关报道^[10-12]。解析寡养单胞菌致病、耐药、代谢和遗传背景,修饰为具备较好耐受逆境能力的底盘生物,将极具应用转化潜力(图1)。因此,进一步探明其耐药和抗逆机制相关的遗传本质和效应因子尤为迫切,深入认识其耐药基因为代表的环境适应相关因子的变异与进化,有助于在本底清晰、安全可靠的基础上科学合理地开发此类微生物资源。

卫生健康和食品安全部门对医疗和环境来源的病原菌侵染致病和耐药性能的调查与干预,是预防和控制病原菌及其风险因子的传播与扩

散的有效措施。而应对和处理突发状况及疫情,通常是需要在较短时间和有限地域完成决策和部署的。因此,高效和精准地识别病原体流行病学特征并开展风险评估,对确定来源归因及后续防控至关重要。区别于以往经典可靠但敏感性不强、周期较长、效率略低的流行病学统计分析和分子分型,针对病原体开展基因组测序和个性化生物信息学分析是一种更加快速高效、敏感性和特异性均显著强化的技术手段。测序技术和生物信息学历经多年发展,其准确性和可靠性已取得长足进步,不仅可满足快速检测和精准分析需求,还可有效推动区分嗜麦芽寡养单胞菌的粘附定植与混合感染的关键研究^[4,13]。

嗜麦芽寡养单胞菌因其逐渐提升的临床检出率,已成为一类仅次于铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌、挑战药物选择性的临床多重耐药菌^[1,14]。嗜麦芽寡养单胞菌可耐受 β -内酰胺类(如碳青霉烯类)、氨基糖苷类、四环素类及喹诺酮类抗生素。此外,耐受替加环素、多黏菌素等重要临床抗生素的嗜麦芽寡养单胞菌被检测分离到,进

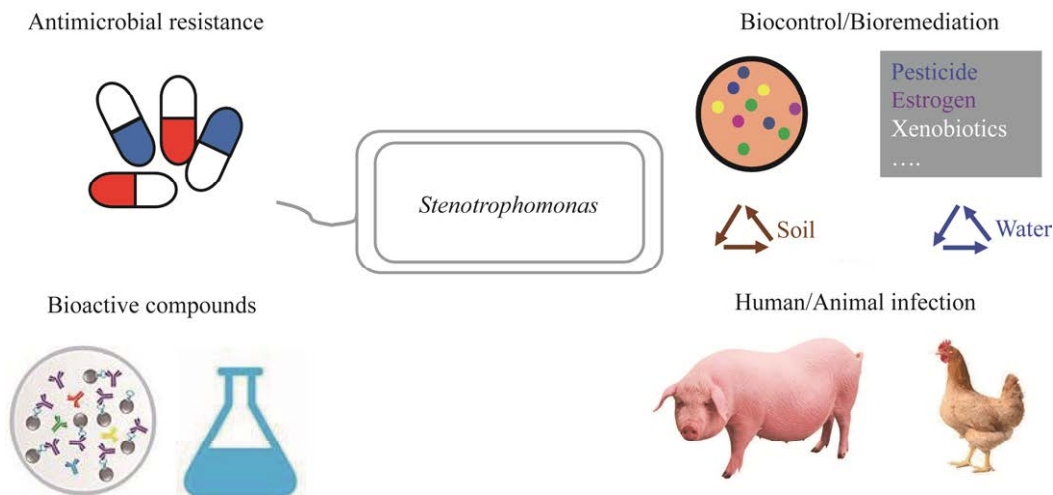


图1 寡养单胞菌在医源环境、生态修复中的功能多样性

Figure 1 Functional diversity of *Stenotrophomonas* in nosocomial environments and bioremediation/biodegradation.

一步制约了临床药物的可用性。可降解或修饰常用临床治疗药物(磺胺类、头孢他啶等抗生素)的寡养单胞菌也被检出,表明寡养单胞菌处于不断地进化变异和适应环境过程中。寡养单胞菌自身基因组变异与进化导致的异质性,促进了菌体适应医源和环境中的抗生素的高度选择性压力。鉴于寡养单胞菌具备多种类型抗生素的耐受能力,建立可靠高效遗传操作体系对研究其耐药机制显得尤为重要^[15]。解析耐药形成和传播的模式,需剖析分离的寡养单胞菌的基因组,借助生物信息学和大数据分析揭示其变异规律,进而对候选因子开展遗传操作和异源表达等分子生物学实验并结合生理表型和代谢指标比较进而阐明效应机制。

研究寡养单胞菌等条件致病菌耐药机制和环境适应性具有紧迫性和参考价值,本文基于其基因组学和耐药研究现状,重点介绍和探讨:(1)生物信息学工具实现高效精准预测耐药基因及其传播性;(2)寡养单胞菌的多重抗生素耐受机制以及耐药因子的遗传与变异,如多黏菌素耐药的可移动多黏菌素耐药因子(mobile colistin resistance, MCR)的相关研究。借助基因组学和信息学手段开展大数据分析,可进一步认识寡养单胞菌基因组,对阐述多重耐药病原菌进化起源、耐药性形成和传播扩散机制是必需的。本文综述了寡养单胞菌的基因组学和耐药基因相关进展,有助于基于基因组学技术推动寡养单胞菌为代表的多重耐药条件型致病菌的高效精准检测、基因组编辑,为制定针对性防控、合理用药措施提供参考。

1 寡养单胞菌的分布与鉴定

寡养单胞菌生存环境差异较大,分布呈现多样化,该属目前包含 18 个有效种成员,涉及人体条件致病菌和生态修复型环境菌株。寡养单胞菌在自然界中分布广泛,甚至在医疗和农场污水、土壤淤泥、植物根际甚至食物表面也可分离

到。环境来源的寡养单胞菌代谢复杂多样,如菌株 SMSP-1 对有机磷农药具有广谱的降解能力,菌株 C3 可作为拮抗者分泌几丁质酶遏制植物病原菌促进宿主正常生长代谢(图 1)。前期,微生物物种鉴定主要基于选择性培养基上纯培养并鉴定生理特征,寡养单胞菌菌落呈现黄色不透明、圆形光滑、中央突起、边缘整齐且有黏性。其生化检测特征为:氧化酶阴性,强解脂性, DNase 阳性,明胶水解阳性,赖氨酸脱羧酶阳性,形成黄色色素。其菌落形态和部分生理指标与假单胞菌和黄单胞菌类似,然而生理代谢特性又存在显著差异,近期才被独立划分出来,成为一个菌属^[16]。

临床分离:随着超级耐药菌的出现及耐药性扩散,抗生素耐药已成为全球关注的公共卫生问题(表 1)。医源和环境中的寡养单胞菌大多对氨基糖苷类、 β -内酰胺类、四环素类和喹诺酮类等多种抗生素具备内源性耐药能力^[5]。其中,嗜麦芽寡养单胞菌由于对多种临床抗生素耐受,已引发医疗健康、公共卫生领域的广泛关注^[1,17-21]。抗生素化学治疗国际会议(Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, ICAAC)提及的 8 种多重耐药菌,就包括嗜麦芽寡养单胞菌。分子流行病学调查表明介入治疗提高了重症患者生存几率,另外一方面也提高了患者对寡养单胞菌的感染风险。条件型致病菌和多重耐药菌引发的院内感染逐年增加,寡养单胞菌临床分离率也显著升高,且往往伴随着混合感染。多重耐药能力使嗜麦芽寡养单胞菌在复合型感染中难于清除。该菌有一定几率引起呼吸道感染、心内膜炎、脑膜炎、泌尿道感染。寡养单胞菌对健康人体没有致病能力或致病力较低,表现为对免疫能力受损或低下人群易感,具备较强定植能力有一定几率与其他致病、耐药菌形成复合感染。有效控制其感染的临床可供选择药物较少,主要为复方新诺明(磺胺甲恶唑-甲氧苄啶, A 类),左氧

表1 中国细菌耐药监测网(CHINET, China antimicrobial surveillance network, 网址 www.chinets.com) 发布的嗜麦芽寡养单胞菌临床耐药检出率

Table 1 Detection rate of *Stenotrophomonas maltophilia* released by China antimicrobial surveillance network (CHINET, available at www.chinets.com)

Antibiotics	2017 ^[17]		2018 ^[18]		2019 ^[19]		2020 ^[20]		2021 ^[21]	
Strains (number)	5 471		6 465		6 228		7 485		8 406	
Resistance/Susceptibility (%)	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
Minocycline	1.8	95.2	1.5	98.6	1.8	93.8	2.3	93.3	1.7	94.4
Sulfamethoxazole, trimethoprim	5.5	93.9	6.5	93.4	7.9	91.4	6.7	92.6	6.4	92.8
Tigecycline	–	–	3.6	89.7	7.1	89.0	2.7	94.6	1.5	94.6
Levofloxacin	9.3	87.3	11.7	88.4	11.6	83.8	10.8	84.6	9.4	86.0
Cefoperazone	18.0	57.4	12.3	87.7	18.3	55.7	22.6	52.7	28.4	44.0
Chloramphenicol	19.8	50.2	20.1	52.2	19.0	53.2	21.9	43.0	17.5	40.8
Ticarcillin/Clavulanic acid	17.6	70.4	22.6	77.4	12.6	87.4	16.6	70.6	–	–
Ceftazidime	38.1	52.7	37.7	62.2	41.9	50.3	38.5	54.7	36.5	38.0

–: Not available.

氟沙星、米诺环素、头孢他啶(B类)和氯霉素(C类)。嗜麦芽寡养单胞菌通常对复方新诺明较为敏感,但部分菌株展现出对临床用药磺胺类的拮抗和降解能力。近期,检出耐受磺胺类和头孢菌素类的寡养单胞菌频率逐渐升高,表明寡养单胞菌的遗传多样性、防控其致病风险及耐药传播的紧迫性,加强对耐药菌的监测、了解耐药基因传播规律的重要性更为凸显^[22]。传统分型方法主要包括血清分型、表型鉴别、脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)和标签序列 PCR 分子检测。但这些方法处理周期长、操作流程繁杂、专业要求度高并且单次通量较低,限制了上述手段的规模应用,也不适用于快速检测。基于基因组学技术开展分子分型可促进病原体快速检测、耐药性相关流行病学研究,将为耐药菌的筛查与研究提供十分重要的技术支撑。

环境来源:嗜麦芽寡养单胞菌是该属中唯一可发生条件致病的成员,而多个菌株表现出生态修复、促作物植物生长的功能。此外,来源于土壤、植物内生的寡养单胞菌陆续被分离,

尚未检测出对人体的致病能力,其在产特殊酶、污染物代谢、植保特性方面具备应用潜力。如寡养单胞菌 CGMCC 1.1788 可降解新烟碱农药吡虫啉,菌株 DHHJ 和 POA-1 可降解羽毛角蛋白,菌株 DNPA8 可用于污水脱氮除磷, AJH1 可降解多环芳烃^[7-10]。鉴于在农业、工业和医药行业的潜在价值,对其精准分型并开展后续研究的需求非常迫切。基因组分析表明,环境源寡养单胞菌也存在耐药风险,便捷、精确、快速地获得耐药菌的基因组信息有助于规避耐药风险、开发该种属所蕴含的微生物资源。测定细菌基因组的成本日益降低、通量愈发提高,这一特点适应了当下寡养单胞菌的分子鉴定需求。在细菌培养获得纯化单克隆的基础上,经过基因组测序及其注释,可基于保守基因甚至全基因组推测其进化关系。相对生理形态检测和分子生物学实验,基因组学技术假阳性率低、周期显著缩短、分型精度更为可靠。其中,比较基因组学为代表的信息学技术可快速、准确地实现对寡养单胞菌的识别与进一步分型,区别定植菌、致病菌和非致病菌,有助于后期去除其致病性,实现微生物资源的应用转化。

2 寡养单胞菌的基因组特征

为研究寡养单胞菌代谢与抗逆能力多样性的遗传基础,寡养单胞菌基因组学相关研究引发关注。NCBI GenBank 收录的完全测序基因组数目随着测序技术的日渐普及逐渐增加。寡养单胞菌大多只由一条 4.4–5.1 Mb 的染色体构成其基因组,只有少数菌株基因组包含质粒(表 2)。

毒力和耐药因子:基因组学注释预测寡养单胞菌编码多种类型毒力因子,如蛋白酶表达并分泌到胞外,StmPr1 和 StmPr2 促进菌体侵染、生长^[23],而另一些成员具备临床溶血栓和产业物质转化的应用价值。寡养单胞菌对 β -内酰胺类药物天然耐受,其中 bla_{L1} 和 bla_{L2} 编码的 β -内酰胺酶可水解碳青霉烯类和头孢类抗生素。寡养单胞菌编码众多转运泵,对多类抗生素耐药。

耐药因子水平转移:L1 和 L2 表达受到 amp^{NG} - amp^{DI} - $nagZ$ - $ampR$ 调控^[24],前期研究推测编码 L1 和 L2 的基因或处于寡养单胞菌中非染色体遗传物质如质粒上。随着基因组数据的丰富,对 bla_{L1} 和 bla_{L2} 的比较分析发现“疑似质粒”或许是接合转移中的“环状 DNA 中间体”(即基因组岛等可移动遗传元件)^[25]。测定耐药基因和剖析基因组可以增强对菌株遗传与进化的认识,也有助于尽早尽快确定感染危险因素和病原体自身,对抗感染治疗具有积极意义^[16]。不同基因型的菌株会呈现多样化耐药模式,甚至同一基因型的不同菌株也能表现出耐药异质性。寡养单胞菌耐药基因多为内源性的,或许由于基因水平转移导致耐药风险的传播与扩散,已经出现了获得性耐药。如 IS1246 插入元件被发现整合于多重耐药泵 SmeDEF 编码基因启动子区域;这

表 2 GenBank 数据库收录的全基因组测序寡养单胞菌(种属水平,截至 2022 年 3 月)

Table 2 Sequenced genomes of *Stenotrophomonas* archived in GenBank as of March, 2022

Species	Assembly	Complete	Plasmid (strain)	Note
<i>S. maltophilia</i>	712	73	–	Multi-drug resistance
<i>S. pictorum</i>	2	–	–	Aromatic degrading
<i>S. lactitubi</i>	10	–	–	Isolated from food
<i>S. geniculata</i>	4	1	–	Plant growth promotion
<i>S. indicatrix</i>	15	1	–	Plant growth promotion
<i>S. bentonitica</i>	2	–	–	Biotransformation
<i>S. panacihumi</i>	2	–	–	Isolated from ginseng field
<i>S. pavanii</i>	7	1	–	Nitrogen-fixing
<i>S. nitritireducens</i>	5	1	–	Nitrogen metabolism
<i>S. acidaminiphila</i>	13	4	2 (T0-18)	Acid tolerance
<i>S. rhizophila</i>	16	5	3 (GA1 & KC1)	Antifungal properties
<i>S. cyclobalanopsidis</i>	1	–	–	Isolated from the leaf spot
<i>S. tumulicola</i>	1	–	–	A major contaminant of the stone chamber interior
<i>S. chelatiphaga</i>	1	–	–	EDTA degrading
<i>S. koreensis</i>	1	–	–	Isolated from compost
<i>S. daejeonensis</i>	1	–	–	Isolated from sewage
<i>S. ginsengisoli</i>	1	–	–	Isolated from ginseng field
<i>S. terrae</i>	1	–	–	Nitrate reducing
<i>S. humi</i>	1	–	–	Nitrate reducing
Others (unclassified)	152	27	–	–

–: Not available.

一整合可影响 SmeT 对 SmeDEF 耐药泵的调控, 暗示基因水平转移介导了寡养单胞菌耐药能力及其扩散传播^[26]。

耐药因子序列变异: 寡养单胞菌通常对多黏菌素敏感, 但近期已检出可耐受多黏菌素的菌株。基因组分析结合异源表达发现, 磷脂酰乙醇胺 PEA-类脂 A 转移酶(lipid A phosphoethanolamine transferase, EptA 或 lipo-oligosaccharide phosphoethanolamine transferase A, LptA) 与 MCR 序列相似, EptA 可使宿主表面电荷发生变化, 不亲和多黏菌素使其获得耐受多黏菌素的能力。寡养单胞菌编码 2 个 EptA, 分别与 MCR-5 和 MCR-8 同源。其中, *SmEptA1* 推测与多黏菌素耐受相关的 MCR-8 更为相似; 而与 MCR-5 相似的 *SmEptA2*, 编码基因临近序列片段包含与 *mcr* 原型常呈现遗传连锁的 *pap2*。上述 *SmEptA2* 编码基因背景的排布与 *mcr-1*、*pap2*、*ISAp11* 形成的基因盒(gene cassette)的结构类似, 进一步暗示 MCR 家族复杂且多样的进化起源^[27-28]。*EptA* 基因的进化和传播机制亟待阐明, 这需要借助基因组测序和比较分析, 从海量基因组数据中定向精准筛选以寻找到更多序列信息阐明其变异和重组方式。

3 寡养单胞菌的耐药机制

3.1 寡养单胞菌的耐药基因及识别

耐药水平鉴定: 寡养单胞菌存在多种耐药机制, 耐药性能检测是抗感染治疗的前提和难点。寡养单胞菌的耐药性评估根据研究目的和抗生素药物, 可选择性采取微量稀释肉汤法(microdilution broth)、K-B (Kirby-Bauer)纸片法、琼脂扩散法(agar diffusion)和 E-test (Epsilometer test)法。这些检测方法评价方式多样, 但存在周期长、操作烦琐、准确性不佳、重复性较差, 以及美国食品药品监督管理局(Food and Drug

Administration, FDA)、美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)和欧洲抗菌药敏试验委员会(European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)推荐标准不统一等缺点, 急需快速、可靠、操作简化的技术举措辅助评估耐药性^[29-30]。测序技术日益普及, 用户可根据技术指标和科研需求, 选择不同的测序平台实现基因组精准解析。测序所获得的海量数据借助生物信息学方法可预测基因组编码的毒力、耐药基因, 还可以实现不同菌株甚至跨物种之间的序列比对和遗传溯源。相较药敏实验, 高通量数据可显著推动和加速联合分析, 在分子生物学和遗传进化层次评估细菌耐药性能和生物安全等级。

耐药基因识别: 针对致病耐药因子及其传播能力可开发特异性的生物信息学方法, 可分析细菌致病、耐药因子及其传播风险的工具主要包括: VRprofile^[31]、ResFinder^[32]、VFDB^[33]和 PlasmidFinder^[34], 可通过分析获取: (1) 细菌种属和血清型; (2) 耐药因子、毒力基因; (3) 插入序列、转座子和质粒; (4) 序列分型和进化关系等关键信息。基因组注释可依据 NCBI GenBank 推荐的 PGAP (prokaryotic genome annotation pipeline, ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok), 也可采用自动化的细菌基因组注释工具 RAST (rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology, rast.nmpdr.org); 并依据耐药基因数据库 CARD^[35]、BacWGSTdb^[36]、BacMet^[37]开展相似序列比对, 实现在单基因水平的注释。基因组学研究揭示了寡养单胞菌编码多种耐药因子, 如 8 套 RND 家族耐药泵、可水解碳青霉烯类抗生素的金属酶 L1 (表 3)。该策略也可移植用于环境来源寡养单胞菌相关的生物降解和生态修复能力分析, 有助于了解本底代谢特征并高效鉴定功能元件和底盘兼容性。

表 3 已报道的寡养单胞菌耐药基因

Table 3 Antibiotics resistance genes reported in *Stenotrophomonas*

Gene	Product classification	The antibiotics resistant	Acquired/Intrinsic
Drug resistance pump			
<i>smeABC</i>	RND efflux pump	Aminoglycosides, β -lactams, quinolones	Acquired
<i>smeDEF</i>	RND efflux pump	Chloramphenicol, tetracycline, quinolones	Intrinsic
<i>smeGH</i>	RND efflux pump	Fluoroquinolone, macrolide, ceftazidime, chloramphenicol, tetracycline	Intrinsic
<i>smeIJK</i>	RND efflux pump	Aminoglycosides, tetracycline, ciprofloxacin	Intrinsic
<i>smeOP</i>	RND efflux pump	Aminoglycosides, nalidixic acid, doxycycline, Macrolides	Intrinsic
<i>smeVWX</i>	RND efflux pump	Chloramphenicol, quinolones	Intrinsic
<i>smeYZ</i>	RND efflux pump	Aminoglycosides	Intrinsic
<i>smrA</i>	ABC multidrug efflux pump	Tetracycline, fluoroquinolones, tetracycline	Intrinsic
<i>macABCsm</i>	ABC multidrug efflux pump	Aminoglycosides, macrolides, polymyxin	Acquired
<i>emrCABsm</i>	MFS efflux pump	Nalidixic acid, erythromycin	Acquired
<i>mfsA</i>	MFS efflux pump	Aminoglycosides, cephalosporins, macrolides, fluoroquinolones, tetracycline, chloramphenicol	Acquired
Inactivation enzyme			
<i>bla_{L1}</i>	β -lactamase	β -lactams, carbapenems	Intrinsic
<i>bla_{L2}</i>	β -lactamase	β -lactams, cephalosporins	Intrinsic
<i>bla_{TEM-2}</i>	β -lactamase	Penicillin, cephalosporins	Acquired
<i>aph(3')-IIc</i>	Aminoglycoside phosphotransferase	Aminoglycosides	Intrinsic
<i>aac(6)-Iz</i>	Aminoglycoside acetyltransferase	Aminoglycosides	Intrinsic
<i>aac(6)-Iak</i>	Aminoglycoside	Neomycin, tobramycin	Acquired
<i>smqnr</i>	Pentapeptide repeat protein	Quinolones	Intrinsic
<i>sul1/sul2</i>	Dihydropteroate synthase	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Acquired

扩散风险预测：但上述分析未涉及细菌致病和耐药传播风险的可移动元件，检测揭示风险因子的传播扩散风险尚需借助特异性工具以及后续人工校验。面对海量繁杂的测序数据，开发分析耐药基因遗传背景及变异的生物信息学工具以满足流行病学和基础理论研究迫在眉睫。生物信息学技术突飞猛进，海量数据的特异化、个性化解析需求也日益突出。可移动元件往往介导耐药基因传播，促进细菌适应特定环境。耐药基因作为可移动元件的附属功能模块，可从预测可移动元件视角揭示耐药基因的传播机制并挖掘新型耐药因子。可供分析耐药基因传播潜力和移动机制的信息学工具主要有：

VRprofile、IslandViewer^[38]、MobilomeDB^[39]和ICEberg^[40]。其中，VRprofile (bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/VRprofile)采用比较基因组学和机器学习模式识别策略探究细菌耐药基因及其扩散机制，已用于精准解析寡养单胞菌 MER1 和 G4 遗传背景和耐药风险^[31]。近期 VRprofile2 (tool2-mml.sjtu.edu.cn/VRprofile)通过搜集整理 ESKAPEE [屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、肠杆菌(*Enterobacter* spp.)和大肠埃希菌(*Escherichia coli*)]耐药基因及

其可移动特征,采用机器学习方法强化了耐药传播风险预测性能。寡养单胞菌 MER1 和 G4 的比较分析发现分离环境差异较大,但抗生素耐药谱和水平相对接近,表明耐药相关基因或许借助可移动元件在不同环境中的寡养单胞菌之间发生了传递。比较基因组可用于识别和比较分析寡养单胞菌耐药基因及遗传背景并评估生物安全(图 2),推动合成生物学功能元件鉴定与模块化整合,有助于微生物资源开发并提高效应元件的可插拔性和可操控性。

3.2 寡养单胞菌的内源性和获得性耐药机制

寡养单胞菌耐药机制复杂多样,包括水解酶、膜渗透屏障、靶位点修饰和外排泵过表达等(表 3)。近年来嗜麦芽寡养单胞菌检出数量和频率逐年提升,目前仅次于 ESKAPEE,其检出率约 3%–4%,已严重威胁临床治疗药物可选择

性。其中,金属酶 L1 和丝氨酸酶 L2 是寡养单胞菌对 β -内酰胺抗生素耐药的主要原因;*aph(3')-IIa* 和 *aac(6')-Iz* 则通过修饰药物结构介导了菌体对氨基糖苷类抗生素的耐药性;*SmeVWX*、*SmeGH* 和 *SmQnr* 促进菌体耐受氟喹诺酮类抗生素(*SmQnr* 编码一种五肽重复蛋白,保护 DNA 拓扑异构酶免受氟喹诺酮类药物的作用);*SmeDEF* 为代表的外排泵是菌体耐受四环素类、氟喹诺酮类抗生素的关键因素。特别值得注意的是,寡养单胞菌通常对四环素表现出耐药性而对重要临床药物替加环素敏感。然而近期已检测出可耐受替加环素的寡养单胞菌,表明寡养单胞菌耐药机制的多样性和异质性。以下列举了寡养单胞菌中几类重要的耐药机制及其变异。

(1) 整合子: 由于环境压力和水平转移,嗜麦芽寡养单胞菌耐药机制一直处于动态变异过

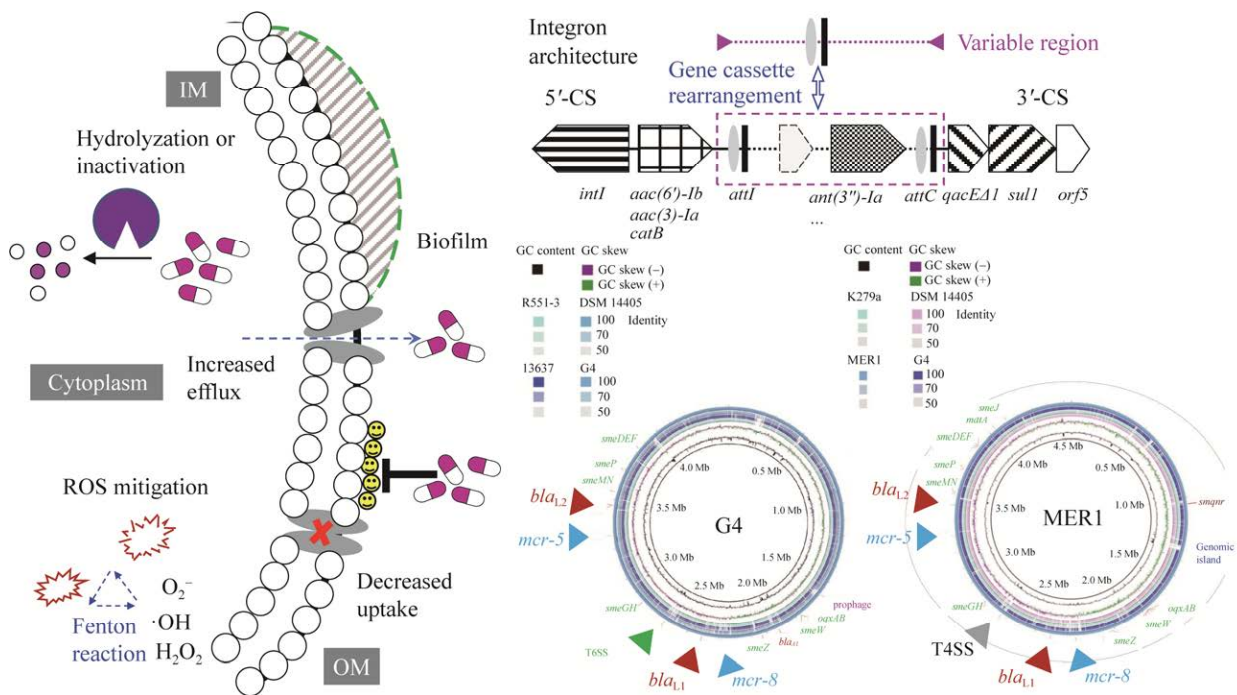


图 2 菌株 G4、MER1 和 K279a 耐药因子的比较基因组学和嗜麦芽寡养单胞菌耐受抗生素机制

Figure 2 Comparative genomics of AMR determinants predicted in strains G4, MER1 and K279a as well as general properties of antibiotics resistance found in *Stenotrophomonas maltophilia*.

程中,新型耐药表型及机制接连被发现。寡养单胞菌通常对磺胺类药物较为敏感,磺胺类药物复方新诺明是治疗寡养单胞菌感染的首选药物。但近年基因组学和流行病学调查显示,寡养单胞菌可能通过整合子(integron)捕获或 *ISCR* 元件传递外源耐药基因形成对抗生素耐受能力。其中I型整合子包括 5'-保守区域(5'-CS),包含整合酶I编码基因(*intI*)及重组位点 *attI*; 3'-CS 包括 *qacEΔ1* 和 *sulI*, 相对可变区域由基因盒(gene cassette)和 *attC* 位点组成。*SulI* 可介导菌体耐受磺胺类药物,表明磺胺类药物用于治疗寡养单胞菌未来在临床方面将受到一定制约^[1-2]。

(2) 噬菌体:此外,近期已有报道表明嗜麦芽寡养单胞菌的噬菌体 *AXL1* 和 *DLP3* 分别编码 *FolA* (dihydrofolate reductase, 二氢叶酸还原酶, 促进耐受复方新诺明等磺胺类药物)^[41]、*Erm* (erythromycin ribosome methylase, 核糖体甲基化酶, 促进耐受红霉素)^[42]等耐药因子,暗示其遗传物质整合至宿主基因组发生噬菌体溶原现象将介导获得性耐药。噬菌体抗感染是临床治疗多重耐药寡养单胞菌的新型手段^[42-44]。近期研究表明携带耐药基因的噬菌体整合至宿主基因组并伴随稳定遗传的可能性较低^[45],但是上述发现暗示分离对应耐药菌的噬菌体还需要对其宿主范围、裂解效果、遗传特性以及耐药潜力开展综合评估^[43],这就要求对寡养单胞菌及对应(原)噬菌体基因组比较分析以揭示其遗传变异和应用潜力。

(3) 基因序列变异:临床上已经分离出耐受多黏菌素的寡养单胞菌,且检出率日益提高。耐受多黏菌素机制非常复杂,现在一般认为二元调控元件、MCR 家族、耐药泵和氧化还原酶等多样化方式影响磷酸乙醇胺合成和修饰,共同参与菌体对多黏菌素的耐药。比较分析发现细菌基因组中与 MCR 家族序列相似的因子很多,但并不

一定能借助 MCR 类似的“乒乓机制”催化乙醇胺(lipid A phosphoethanolamine, PEtN)修饰脂多糖(LPS)的脂质 A (lipid A)导致菌体表面电荷改变不亲和多黏菌素。近期 MCR 家族的相关研究表明, MCR 的关键氨基酸密码子变异以及 N 端跨膜区、C 端催化结构域间 linker 区域对 LPS 修饰功能至关重要^[46]。结合笔者前期研究进展,推测寡养单胞菌 G4 和 MER1 耐受多黏菌素差异可能是由 *SmEptA* 序列变异介导,致使其具备修饰 LPS 中 lipid A 的活性,进而改变表面电荷影响菌体对多黏菌素的亲和性产生耐药^[13]。

(4) 非染色体遗传物质:寡养单胞菌可作为耐药基因的“物流仓库”及“运载媒介”,将耐药基因传播至其他菌,实现耐药基因的横向传播。一般来说,寡养单胞菌对众多 β-内酰胺类抗生素是内源性天然耐药的。寡养单胞菌细胞膜和细胞壁通透性较差与耐药相关,而且其基因组通常编码 L1 型 β-内酰胺酶能水解青霉素、头孢菌素和碳青霉烯类,具备金属离子结合位点; L2 型水解酶具备丝氨酸活性位点,可水解头孢菌素和单环类抗生素。早期研究推测,上述 *bla_{L1}* 和 *bla_{L2}* 可能由疑似质粒所携带。但 NCBI 中收录的寡养单胞菌基因组信息并没有支持这一假设,表明携带上述基因的“非染色体遗传物质”可能是类似“基因岛(genomic island, GI)”或“整合型接合元件(integrative conjugative element, ICE)”的水平转移元件,而并非质粒。

(5) 插入序列调控与耐药泵过表达:寡养单胞菌基因组是动态变化和持续进化的。寡养单胞菌对氨基糖苷类的高度耐药可能与染色体上的 *aac(6')-Iz*, 该基因所处背景具备可转移特征的插入序列,可介导耐药因子转移进入大肠杆菌。此外,寡养单胞菌编码为数众多的耐药泵,如 *SmeDEF*、*SmeABC* 和 *SmeJK* 可介导其对四环素类、氟喹诺酮类等抗生素的耐药性。*SmeT* 可

调控 SmeDEF 的表达,有序强化外排泵的转运能力增强菌体耐药性能。这些耐药泵已被发现与多种抗生素耐药相关,而且新的耐药表型与已知转运泵相关性逐渐被揭示,表明相应基因的变异或促进耐药泵获得新型耐药能力^[47]。

(6) 其他:寡养单胞菌会对同一类型抗生素具备多重耐药机制,被喻为抗生素“耐药基因仓库”,其获得性耐药特性是抗细菌感染治疗的重大挑战。复杂性状通常由多个基因与环境因素共同决定(即多基因性),与细菌稳态和基础代谢相关的分子机制可共同作用最终形成耐药。如表 3 所示,寡养单胞菌耐受多黏菌素被推测具有多基因性,耐药泵和修饰酶相关的多重调控或效应机制参与菌体耐受多黏菌素。膜转运装置参与抗生素耐药和环境适应过程已有报道,推测耐药与菌体本底代谢和内部稳态的调控过程相关,但这一假设尚需更多研究阐明。比如,寡养单胞菌模式株 K279a 中 IV 型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)研究表明, T4SS 不仅具备介导 DNA 接合转移的能力,而且还可以行使杀菌抑菌功能维持菌株在特殊菌群架构中的竞争优势^[22,48-49]。在寡养单胞菌 G4 基因组中对应区域编码的是 VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)(图 2)^[27]。前期研究表明 T6SS 可发挥杀菌抑菌功能,还可外排效应蛋白借助特殊机制调控生命过程促进菌体耐受氧化胁迫^[50-51]。与此对应,我们发现在医疗和养殖污水中分离的 MER1 和 G4 耐药谱高度相似,但是二者对多黏菌素 E 的耐药能力存在显著差异。基因组测序后比较分析进一步揭示,二者与 K279a 基因组及编码的耐药因子高度相似,但是 MER1 和 G4 在各自基因组的对应位置分别编码 T4SS 和 T6SS^[52]。这或许是因为 G4 分离自养殖场污水而 MER1 分离自医疗排放废水,二者所处环境差异或导致 2 株菌分别持有 T6SS 和 T4SS 发挥不同功能。我们推测二者可

能的传播与进化机制,来自养殖场的寡养单胞菌对临床医疗常见的抗感染药物具备抗性,若饲养人员定植或感染了寡养单胞菌并表现为发病时,菌株会在治疗过程中历经“驯化”,即在较强抗生素压力下表现出更高的耐药能力。然而,这些耐药基因的遗传进化和水平转移当下还没有合理的假说或确切的模型阐释其传播扩散机制。换言之,这些基因或许作为其他菌株中耐药基因“祖先”或“前体”,这需要更多的基因组学信息和耐药因子被揭示。

4 寡养单胞菌的基因组编辑

寡养单胞菌对多种抗生素高度耐药,解析耐药机制的遗传操作过程筛选标记受到显著制约。寡养单胞菌对氯霉素的药敏实验一般表现为敏感(S)或者中度抗性(I),故氯霉素是寡养单胞菌遗传操作中为数不多、行之有效的抗性标记。但需要注意的是,近期已陆续分离出耐受氯霉素的菌株,基因组学研究表明菌株通过水平转移获得了 *catB* 基因^[53]。这对借助抗性标签筛选重组转化子的基因组编辑增加了技术难度和操作复杂度,后续分子生物学研究中可采用双抗生物素抗性筛选标记以确保获取正确的突变子。自杀质粒介导双交换重组是对细菌基因组编辑的有效方式,主要涉及 pK18*mobsacB* (复制子类型 pUC, 抗生素筛选标签为 Km^r:硫酸卡纳霉素)、pDS132 (复制子类型 R6K, 抗生素筛选标签为 Cm^r:氯霉素)、pEX18Tc (复制子类型 pBR322, 抗生素筛选标签为 Tet^r:四环素)等^[54-56]。针对寡养单胞菌基因组编辑,多基于 pEX18Tc 载体再分子改造添加或替换抗生素耐药基因后获得敲除所需载体,进而借助氯霉素抗性基因 *cat* 连接同源臂依据双交换重组机制和正向、反向筛选的方式,最终实现基因“有痕”敲除(基因组残留耐药标签 Cm^r)^[26,49,57]。此外, *cat* 两侧如加入 FRT 标签序

列可改进此方法,这一优化可借助辅助质粒编码的 Flp 重组酶介导环出 Cm^r 标签,去除抗生素抗性实现基因“无痕”敲除,确保生物安全和基因缺失可靠性(图 3)。

采用 pEX18Tc 实现对寡养单胞菌的基因组编辑,具备如下特点:(1) 单侧同源臂设计较长,长度为 600–900 bp;(2) 同源臂上携带有 Cm^r (氯霉素抗性)与 Tc^r (四环素抗性)组成双抗系统强化一筛转化子阳性率;(3) 载体可采取电转和大肠杆菌 S17- λ pir 亲本接合方式,导入感受态细胞并整合至目标基因组;(4) 无痕敲除相对插入失活或移码突变较难获得突变子,阳性率较低。但这一方式有利于在同源臂介导的两次交换过程中,基于氯霉素筛选标签和 *sacB* 反筛标记定向获得目标转化子;而且该策略也有利于避免第一次交换后抗生素平板压力筛选后,在第二次蔗糖无抗生素平板筛选过程中出现转化子大多回复为野生型的问题,提高二次交换后蔗糖反筛平板

上目标突变子的检出频率。鉴于构建克隆同源臂构建自杀质粒双重组获取目标突变株的效率较低,开发特异性 CRISPR-Cas 方法提高编辑效率推动未来研究是非常必要的。

5 结语与展望

寡养单胞菌已表现出对多黏菌素、替加环素和碳青霉烯类等“最后一道防线”临床用药抗生素的耐受性,且检出率逐渐提高。仅次于铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌,嗜麦芽寡养单胞菌已排在非发酵型的条件致病菌第 3 位。寡养单胞菌在自然界广泛分布,是研究耐药基因遗传与进化、探究微生物适应环境能力的重要参考模型。由于以往聚焦 ESKAPEE 和检测标准不完善的限制,近年寡养单胞菌才纳入监管体系。分子生物学研究和流行病学调查对防控寡养单胞菌引发的致病、耐药问题提供了重要参考。测序成本日益降低,获取基因组信息对监测病原菌流行特征的作用

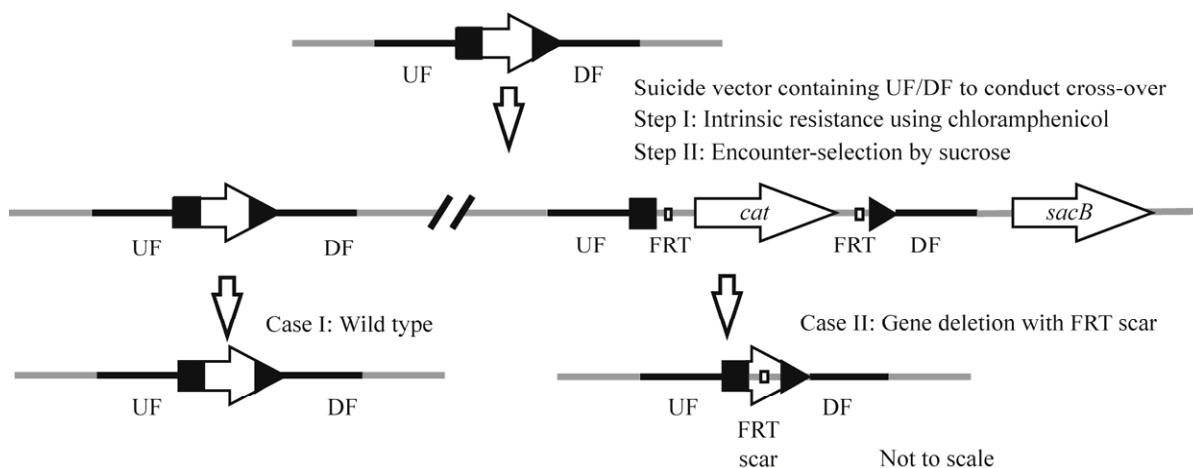


图 3 基于自杀质粒、氯霉素抗性标记和 FRT 技术实现寡养单胞菌的基因组编辑 U/D: 目标基因的上下游同源臂,以实现序列双交换; *cat*: 氯霉素乙酰转移酶编码基因,氯霉素抗性基因(Cm^r); *sacB*: 蔗糖果聚糖酶编码基因; FRT: Flp 重组识别位点

Figure 3 Genome editing for *Stenotrophomonas* based on a suicide plasmid with additional chloramphenicol resistance and FRT recombination. U/D: Up- and down-stream homologous arms of the target gene for double cross-over; *cat*: The gene coding for chloramphenicol acetyltransferase, chloramphenicol resistance (Cm^r); *sacB*: The gene coding for levansucrase; FRT: The site of Flp recombination.

用日益突出,已显现出辅助检测和防控致病、耐药病原体的潜力^[13,30]。测序技术和比较基因组学可显著推动高效检测寡养单胞菌、有利预防其耐药传播风险。基因组学和生物信息学技术有助于揭示寡养单胞菌的遗传多样性,模块化、单元化剖析功能元件,推动解析基因型与耐药性之间的分子机制。

基于基因组学策略和生物信息学方法开展分析,有助于构筑“One health”大健康机制,应对“动物-环境-人体”之间潜在的传播链条风险。寡养单胞菌抗逆能力强、分布广泛,包括耐药性在内的代谢与适应机制具备高度遗传多样性。寡养单胞菌是耐药因子的“物流仓库”,推测其与模式生物同源基因相比序列相似性较差。如寡养单胞菌的MCR与肠杆菌中该家族成员相比,序列一致性较低且传播性尚未明确。这就要求我们采用通量更高、速度更快的分析手段,特异精准分析寡养单胞菌的功能基因、描述其进化趋势^[7,9-11]。寡养单胞菌对抗生素耐药能力与其内源性和获得性耐药因子存在密切关联,但由于方法缺乏集成化、模块化,相应分析还需要借助较多的人员投入和专业经验,亟需:(1)收录并建立面向寡养单胞菌中耐药因子和辅助元件的生物信息数据库;(2)基于枚举并提取功能元件序列理化特征,依托序列分析和机器学习的策略,开发能够鉴别寡养单胞菌编码的风险因子并评价其可移动性的高效方法学。

寡养单胞菌代谢异质性较强,需要基于基因组学揭示其保守和特异因子,规避耐药和致病风险开发并强化其产业应用价值和生态修复潜力^[58-59]。建立生物信息学方法开展大数据分析和遗传特征精准解读,可有效缩短研发周期和降低试错成本,充分发挥生物信息学信息挖掘辅助实验成本低、副作用小的特点,促进生物资源在农业、工业和医疗等领域的实践应用。

除磺胺类药物外,治疗寡养单胞菌感染还可采用氟喹诺酮和四环素类药物,副作用较复方新诺明等磺胺类药物要小,功效却比 β -内酰胺类药物强。但近期已发现对磺胺类药物、替加环素、碳青霉烯类和多黏菌素均耐受的分离株。这一系列发现一方面表明耐受复方磺胺甲恶唑可能会愈发常见,另一方面暗示获得性或者新型耐药机制的出现,这对临床用药选择性和抗感染治疗效果形成了严峻挑战^[47]。生物信息学技术发展、数据共享和精准分析有利于不同背景、需求各异的学者通过联合分析基因组信息,探究耐药基因、特异代谢等关键效应因子的遗传与变异。基于大数据提取的序列特征,采取机器学习和比较分析可识别风险因子及其遗传背景,如预测到基因盒或整合子区域可促进识别“新型”耐药因子。这一模式通过分析可移动元件加速新型耐药基因和代谢模块的挖掘与鉴定,对耐药性及其传播防控、微生物资源挖掘与利用具有积极意义,促进公共卫生和合成生物学持续健康发展。

需要注意的是,寡养单胞菌的较高检出率引发广泛关注的同时,受限于菌体内源多重以及新近获得性耐药,导致基因组编辑技术发展和应用较为困难,阐明抗生素的耐药机制及其多样性缺乏高效实验体系^[16,60]。寡养单胞菌当前已测序基因组数目总量还是偏少、遗传背景因高度多样性,导致基因组编辑技术体系的普适性和分子改造效率有待提高。采用“有痕”基因敲除技术不仅为后续累积敲除制造了困难,而且抗生素抗性基因残留不利于实验室安全^[49,61-64]。在开发特异信息学方法实现精准预测候选因子的同时,构建新型、高效、专门化的遗传操作体系实现对寡养单胞菌的基因组编辑显得非常必要。因可靠的遗传操作体系尚不成熟,可供用于大数据分析的寡养单胞菌的特征功能元件数量总体偏少。围绕基因分子改造甚至大片段编辑的需求,

基于 CRISPR-Cas 系统开发新型遗传操作系统,有助于进一步探明寡养单胞菌的遗传多样性和保守性,揭示其环境适应、代谢特性与遗传变异之间的相关性,阐明寡养单胞菌耐受抗生素、实现生态修复和促进植物生长等特性的分子机制。

综上所述,临床和环境来源的寡养单胞菌普遍对临床抗生素具有多重耐药性,某些菌株对渗透压、重金属,以及农药等异生质污染物具有较好的耐受能力。我们在强化其耐药基因检测阐明其遗传进化并评估其风险扩散同时,需要开发特异性、专一化生物信息学工具和基因组编辑技术开发可推动其产业转化、土壤植保相关特性的研究深入和数据积累,有助于解决合成生物学相关产业所关切的元件标准化和底盘可控性等关键的瓶颈性问题。寡养单胞菌因其环境适应能力强,易于获取和富集,经过遗传修饰可改造为较为可靠的功能底盘。生物滤池、污水污泥、垃圾堆肥和植物内生环境是微生物资源的重要来源,但其理化生境结构未知且复杂多样,迫切需要依托全基因组测序技术开展以寡养单胞菌为代表微生物的功能元件预测。大数据高效挖掘和模块化解读,将为上述目标实现提供必要的技术支持和数据支撑。基因组学挖掘还可以综合转录组学、蛋白质组学和代谢组学考察环境压力胁迫下基因调控的响应及其变化规律,推动更为全面深入地理解寡养单胞菌的遗传和生理。组学筛选关键因子后借助遗传操作等分子生物学技术手段,研究寡养单胞菌特殊代谢分子机制和环境适应功能元件的重组与变异机制,有助于探明抗生素耐受性传播、耐药与本底生理过程关联的调控机制与效应模式。

REFERENCES

- [1] SÁNCHEZ MB. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 658.
- [2] FERREIRA MA, PEREIRA ML, DOS SANTOS KV. Drug-induced tolerance: the effects of antibiotic pre-exposure in *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Future Microbiology*, 2020, 15: 497-508.
- [3] ABDA EM, KRYSIAK D, KROHN-MOLT I, MAMAT U, SCHMEISSER C, FÖRSTNER KU, SCHAIBLE UE, KOHL TA, NIEMAN S, STREIT WR. Phenotypic heterogeneity affects *Stenotrophomonas maltophilia* K279a colony morphotypes and β -lactamase expression[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1373.
- [4] BANERJEE R, ROY D. Codon usage and gene expression pattern of *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3 for pathogenic mode of living[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 390(2): 177-181.
- [5] ADAMEK M, LINKE B, SCHWARTZ T. Virulence genes in clinical and environmental *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: a genome sequencing and gene expression approach[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2014, 67/68: 20-30.
- [6] MACDONALD LC, WEILER EB, BERGER BW. Engineering broad-spectrum digestion of polyuronides from an exolytic polysaccharide lyase[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 43.
- [7] LIU ZH, DAI YJ, HUAN Y, LIU ZX, SUN L, ZHOU QW, ZHANG WJ, SANG Q, WEI H, YUAN S. Different utilizable substrates have different effects on cometabolic fate of imidacloprid in *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(14): 6537-6547.
- [8] XIONG WL, YIN C, WANG YQ, LIN SJ, DENG ZX, LIANG RB. Characterization of an efficient estrogen-degrading bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* SJTH1 in saline-, alkaline-, heavy metal-contained environments or solid soil and identification of four 17β -estradiol-oxidizing dehydrogenases[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 385: 121616.
- [9] de TONI CH, RICHTER MF, CHAGAS JR, HENRIQUES JAP, TERMIGNONI C. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48(4): 342-348.
- [10] LI M, YANG LR, XU G, WU JP. Screening, purification and characterization of a novel cold-active

- and organic solvent-tolerant lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 4254[J]. Bioresource Technology, 2013, 148: 114-120.
- [11] WAGHMARE SR, GURAV AA, MALI SA, NADAF NH, JADHAV DB, SONAWANE KD. Purification and characterization of novel organic solvent tolerant 98 kDa alkaline protease from isolated *Stenotrophomonas maltophilia* strain SK[J]. Protein Expression and Purification, 2015, 107: 1-6.
- [12] DUNNE C, MOËNNE-LOCCOZ Y, de BRUIJN FJ, O'GARA F. Overproduction of an inducible extracellular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81[J]. Microbiology, 2000, 146(8): 2069-2078.
- [13] RYAN RP, MONCHY S, CARDINALE M, TAGHAVI S, CROSSMAN L, AVISON MB, BERG G, van der LELIE D, DOW JM. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(7): 514-525.
- [14] KALIDASAN V, JOSEPH N, KUMAR S, AWANG HAMAT R, NEELA VK. Iron and virulence in *Stenotrophomonas maltophilia*: all we know so far[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 401.
- [15] CROSSMAN LC, GOULD VC, DOW JM, VERNIKOS GS, OKAZAKI A, SEBAIHIA M, SAUNDERS D, ARROWSMITH C, CARVER T, PETERS N, ALDEM E, KERHORNOU K, LORD A, MURPHY L, SEEGER K, SQUARES R, RUTTER S, QUAIL MA, RAJANDREAM MA, HARRIS D, et al. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants[J]. Genome Biology, 2008, 9(4): R74.
- [16] BROOKE JS. Advances in the microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2021, 34(3): e0003019.
- [17] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶, 康梅, 王传清, 王爱敏, 徐元宏, 沈继录, 孙自镛, 陈中举, 倪语星, 孙景勇, 褚云卓, 等. 2017年CHINET中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018(3): 241-251.
HU FP, GUO Y, ZHU DM, WANG F, JIANG XF, XU YC, ZHANG XJ, ZHANG ZX, JI P, XIE Y, KANG M, WANG CQ, WANG AM, XU YH, SHEN JL, SUN ZY, CHEN ZJ, NI XY, SUN JY, CHU YZ, et al. Antimicrobial resistance profile of clinical isolates in hospitals across China: report from the CHINET surveillance program, 2017[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2018(3): 241-251 (in Chinese).
- [18] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶, 康梅, 王传清, 王爱敏, 徐元宏, 沈继录, 孙自镛, 陈中举, 倪语星, 孙景勇, 褚云卓, 等. 2018年CHINET中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020(1): 1-10.
HU FP, GUO Y, ZHU DM, WANG F, JIANG XF, XU YC, ZHANG XJ, ZHANG ZX, JI P, XIE Y, KANG M, WANG CQ, WANG AM, XU YH, SHEN JL, SUN ZY, CHEN ZJ, NI YX, SUN JY, CHU YZ, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance in China: 2018 report[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2020(1): 1-10 (in Chinese).
- [19] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶, 康梅, 王传清, 王爱敏, 徐元宏, 黄颖, 孙自镛, 陈中举, 倪语星, 孙景勇, 褚云卓, 等. 2019年CHINET三级医院细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020(3): 233-243.
HU FP, GUO Y, ZHU DM, WANG F, JIANG XF, XU YC, ZHANG XJ, ZHANG ZX, JI P, XIE Y, KANG M, WANG CQ, WANG AM, XU YH, HUANG Y, SUN ZY, CHEN ZJ, NI YX, SUN JY, CHU YZ, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance across tertiary hospitals in 2019[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2020(3): 233-243 (in Chinese).
- [20] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶, 康梅, 王传清, 王爱敏, 徐元宏, 黄颖, 孙自镛, 陈中举, 倪语星, 孙景勇, 褚云卓, 等. 2020年CHINET中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021(4): 377-387.
HU FP, GUO Y, ZHU DM, WANG F, JIANG XF, XU YC, ZHANG XJ, ZHANG ZX, JI P, XIE Y, KANG M, WANG CQ, WANG AM, XU YH, HUANG Y, SUN ZY, CHEN ZJ, NI YX, SUN JY, CHU YZ, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance: results of 2020[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2021(4): 377-387 (in Chinese).
- [21] 胡付品. “CHINET 在线”网站正式上线[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(2): 197.
HU FP. The website “CHINET Online” was officially launched[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2017, 17(2): 197 (in Chinese).
- [22] BAYER-SANTOS E, CENENS W, MATSUYAMA BY,

- OKA GU, di SESSA G, MININEL I, ALVES TL, FARAH CS. The opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* utilizes a type IV secretion system for interbacterial killing[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(9): e1007651.
- [23] DUMONT AL, KARABA SM, CIANCOTTO NP. Type II secretion-dependent degradative and cytotoxic activities mediated by *Stenotrophomonas maltophilia* serine proteases StmPr1 and StmPr2[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(10): 3825-3837.
- [24] YANG TC, HUANG YW, HU RM, HUANG SC, LIN YT. AmpDI is involved in expression of the chromosomal L1 and L2 β -lactamases of *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(7): 2902-2907.
- [25] ADEGOKE AA, STENSTRÖM TA, OKOH AI. *Stenotrophomonas maltophilia* as an emerging ubiquitous pathogen: looking beyond contemporary antibiotic therapy[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2276.
- [26] GOULD VC, AVISON MB. SmeDEF-mediated antimicrobial drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates having defined phylogenetic relationships[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 57(6): 1070-1076.
- [27] LI J, LIU SY, FU JF, YIN JH, ZHAO J, ZHONG CQ, CAO GX. Co-occurrence of colistin and meropenem resistance determinants in a *Stenotrophomonas* strain isolated from sewage water[J]. *Microbial Drug Resistance: Larchmont, N Y*, 2019, 25(3): 317-325.
- [28] ULLAH S, JI K, LI J, XU YC, JIANG CJ, ZHANG HM, HUANG M, FENG YJ. Characterization of NMCR-2, a new non-mobile colistin resistance enzyme: implications for an MCR-8 ancestor[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(2): 844-860.
- [29] KHAN A, PETTAWAY C, DIEN BARD J, ARIAS CA, BHATTI MM, HUMPHRIES RM. Evaluation of the performance of manual antimicrobial susceptibility testing methods and disk breakpoints for *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021, 65(5): e02631-20.
- [30] KHAN A, ARIAS CA, ABBOTT A, DIEN BARD J, BHATTI MM, HUMPHRIES RM. Evaluation of the vitek 2, phoenix, and MicroScan for antimicrobial susceptibility testing of *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(9): e0065421.
- [31] LI J, TAI C, DENG ZX, ZHONG WH, HE YQ, OU HY. VRprofile: gene-cluster-detection-based profiling of virulence and antibiotic resistance traits encoded within genome sequences of pathogenic bacteria[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2018, 19(4): 566-574.
- [32] BORTOLAIA V, KAAS RS, RUPPE E, ROBERTS MC, SCHWARZ S, CATTOIR V, PHILIPPON A, ALLESOE RL, REBELO AR, FLORENSA AF, FAGELHAUER L, CHAKRABORTY T, NEUMANN B, WERNER G, BENDER JK, STINGL K, NGUYEN M, COPPENS J, XAVIER BB, MALHOTRA-KUMAR S, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, 75(12): 3491-3500.
- [33] LIU B, ZHENG DD, ZHOU SY, CHEN LH, YANG J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D912-D917.
- [34] CARATTOLI A, ZANKARI E, GARCÍA-FERNÁNDEZ A, VOLDBY LARSEN M, LUND O, VILLA L, MØLLER AARESTRUP F, HASMAN H. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(7): 3895-3903.
- [35] ALCOCK BP, RAPHENYA AR, LAU TTY, TSANG KK, BOUCHARD M, EDALATMAND A, HUYNH W, NGUYEN ALV, CHENG AA, LIU SH, MIN SY, MIROSHNICHENKO A, TRAN HK, WERFALLI RE, NASIR JA, OLONI M, SPEICHER DJ, FLORESCU A, SINGH B, FALTYN M, et al. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D517-D525.
- [36] FENG Y, ZOU SM, CHEN HF, YU YS, RUAN Z. BacWGSTdb 2.0: a one-stop repository for bacterial whole-genome sequence typing and source tracking[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 49(D1): D644-D650.
- [37] PAL C, BENGTTSSON-PALME J, RENSING C, KRISTIANSSON E, LARSSON DGJ. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(Database issue): D737-D743.
- [38] BERTELLI C, LAIRD MR, WILLIAMS KP, Simon Fraser University Research Computing Group, LAU BY, HOAD G, WINSOR GL, BRINKMAN FS. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic

- islands for larger-scale datasets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W30-W35.
- [39] WANG M, GOH YX, TAI C, WANG H, DENG ZX, OU HY. VRprofile2: detection of antibiotic resistance-associated mobilome in bacterial pathogens[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(W1): W768-W773.
- [40] LIU M, LI XB, XIE YZ, BI DX, SUN JY, LI J, TAI C, DENG ZX, OU HY. ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D660-D665.
- [41] MCCUTCHEON JG, LIN A, DENNIS JJ. Isolation and characterization of the novel bacteriophage AXL3 against *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6338.
- [42] PETERS DL, MCCUTCHEON JG, DENNIS JJ. Characterization of novel broad-host-range bacteriophage DLP3 specific to *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential therapeutic agent[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1358.
- [43] MCCUTCHEON JG, DENNIS JJ. The potential of phage therapy against the emerging opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Viruses*, 2021, 13(6): 1057.
- [44] DAMNJANOVIĆ D, VÁZQUEZ-CAMPOS X, ELLIOTT L, WILLCOX M, BRIDGE WJ. Characterisation of bacteriophage vB_SmaM_Ps15 infective to *Stenotrophomonas maltophilia* clinical ocular isolates[J]. *Viruses*, 2022, 14(4): 709.
- [45] ENAULT F, BRIET A, BOUTEILLE L, ROUX S, SULLIVAN MB, PETIT MA. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(1): 237-247.
- [46] XU YC, CHEN HY, ZHANG HM, ULLAH S, HOU TJ, FENG YJ. The MCR-3 inside linker appears as a facilitator of colistin resistance[J]. *Cell Reports*, 2021, 35(7): 109135.
- [47] MOJICA MF, HUMPHRIES R, LIPUMA JJ, MATHERS AJ, RAO GG, SHELBURNE SA, FOUTS DE, VAN DUIN D, BONOMO RA. Clinical challenges treating *Stenotrophomonas maltophilia* infections: an update[J]. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 2022, 4(3): dlac040.
- [48] NAS MY, WHITE RC, DUMONT AL, LOPEZ AE, CIANCOTTO NP. *Stenotrophomonas maltophilia* encodes a VirB/VirD4 type IV secretion system that modulates apoptosis in human cells and promotes competition against heterologous bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Infection and Immunity*, 2019, 87(9): e00457-19.
- [49] NAS MY, GABELL J, CIANCOTTO NP. Effectors of the *Stenotrophomonas maltophilia* type IV secretion system mediate killing of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *mBio*, 2021, 12(3): e0150221.
- [50] LI J, YAO YF, XU HH, HAO LM, DENG ZX, RAJAKUMAR K, OU HY. SecReT6: a web-based resource for type VI secretion systems found in bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(7): 2196-2202.
- [51] AHMAD S, WANG BY, WALKER MD, TRAN HKR, STOGIOS PJ, SAVCHENKO A, GRANT RA, MCARTHUR AG, LAUB MT, WHITNEY JC. An interbacterial toxin inhibits target cell growth by synthesizing (p)ppApp[J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 674-678.
- [52] XIE LL, ZHOU AP, ZHAO J, TANG YH, ZHAO R, ZHOU YP, CAO GX, ZHONG CQ, LI J. Comparative insights into multiple drug resistance determinants in *Stenotrophomonas maltophilia* MER1[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2021, 27: 20-25.
- [53] GRÖSCHEL MI, MEEHAN CJ, BARILAR I, DIRICKS M, GONZAGA A, STEGLICH M, CONCHILLO-SOLÉ O, SCHERER IC, MAMAT U, LUZ CF, de BRUYNE K, UTPATEL C, YERO D, GIBERT I, DAURA X, KAMPMEIER S, RAHMAN NA, KRESKEN M, van der WERF TS, ALIO I, et al. The phylogenetic landscape and nosocomial spread of the multidrug-resistant opportunist *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2044.
- [54] PEI TT, LI H, LIANG XY, WANG ZH, LIU GF, WU LL, KIM H, XIE ZP, YU M, LIN SJ, XU P, DONG TG. Intramolecular chaperone-mediated secretion of an Rhs effector toxin by a type VI secretion system[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1865.
- [55] LI J, XIE LL, QIAN SL, TANG YH, SHEN MJ, LI SS, WANG J, XIONG L, LU J, ZHONG WH. A type VI secretion system facilitates fitness, homeostasis, and competitive advantages for environmental adaptability and efficient nicotine biodegradation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(9): e03113-20.
- [56] WANG TT, DU X, JI LX, HAN YY, DANG J, WEN J, WANG YR, PU QQ, WU M, LIANG HH. *Pseudomonas aeruginosa* T6SS-mediated molybdate

- transport contributes to bacterial competition during anaerobiosis[J]. *Cell Reports*, 2021, 35(2): 108957.
- [57] KARABA SM, WHITE RC, CIANCOTTO NP. *Stenotrophomonas maltophilia* encodes a type II protein secretion system that promotes detrimental effects on lung epithelial cells[J]. *Infection and Immunity*, 2013, 81(9): 3210-3219.
- [58] LIRA F, BERG G, MARTÍNEZ JL. Double-face meets the bacterial world: the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2190.
- [59] BERG G, MARTINEZ JL. Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex?[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 241.
- [60] KUMAR S, BANSAL K, PATIL PP, KAUR A, KAUR S, JASWAL V, GAUTAM V, PATIL PB. Genomic insights into evolution of extensive drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* complex[J]. *Genomics*, 2020, 112(6): 4171-4178.
- [61] WU CJ, CHEN Y, LI LH, WU CM, LIN YT, MA CH, YANG TC. Roles of SmeYZ, SbiAB, and SmeDEF efflux systems in iron homeostasis of *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(3): e0244821.
- [62] SHIH YL, WU CM, LU HF, LI LH, LIN YT, YANG TC. Involvement of the *hemP-hemA-smlt0796-smlt0797* operon in hemin acquisition by *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(3): e0032122.
- [63] LU HF, TSAI YC, LI LH, LIN YT, YANG TC. Role of AzoR, a LysR-type transcriptional regulator, in SmeVWX pump-mediated antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2021, 76(9): 2285-2293.
- [64] LI LH, LU HF, LIU YF, LIN YT, YANG TC. *FadACB* and *smeUIVWU2X* contribute to oxidative stress-mediated fluoroquinolone resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2022, 66(4): e0204321.

(本文责编 陈宏宇)