

# 食源性致病微生物分型溯源技术及研究进展

赵处敏<sup>1</sup>, 王 骁<sup>1</sup>, 杜 婷<sup>1</sup>, 李 萍<sup>1</sup>, 杜欣军<sup>1\*</sup>, 王 硕<sup>1,2\*</sup>

(1. 天津科技大学食品科学与工程学院, 食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457;  
2. 南开大学医学院, 天津市食品科学与健康重点实验室, 天津 300350)

**摘 要:** 分型溯源技术是研究致病微生物暴发、分析暴发源头的重要方法, 在食品安全监管处置中发挥着重要的作用。传统的分型溯源技术在致病微生物暴发检测中发挥着重要的作用, 并在不断的发展完善当中, 同时以全基因组测序为基础的基因分型溯源技术也因其较高的分辨率也受到了越来越多的关注。本文就近几年国内外快速发展完善的食源性致病微生物分型溯源技术进行综述, 以期为我国食源性致病微生物的精准分型以及溯源网络的建设提供较为全面的参考。

**关键词:** 分型; 溯源; 食源性致病菌; 全基因组测序

## Development of typing and traceability technologies for foodborne pathogens

ZHAO Chu-Min<sup>1</sup>, WANG Xiao<sup>1</sup>, DU Ting<sup>1</sup>, LI Ping<sup>1</sup>, DU Xin-Jun<sup>1\*</sup>, WANG Shuo<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;  
2. Tianjin Key Laboratory of Food Science and Health, School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300350, China)

**ABSTRACT:** Typing and traceability technologies are essential methods to study the outbreak of foodborne pathogens and analyze the source, playing important roles in food safety supervision and disposition. The traditional typing and traceability technologies play important roles in the detection of pathogenic microorganism outbreak, and are developing continuously. At the same time, gene typing and traceability technologies based on whole-genome sequencing have also been more and more studied owing to their higher resolution. This article summarized the rapid development of foodborne pathogen typing methods in recent years, in order to provide a useful reference for more accurate typing of foodborne pathogens and construction traceability network.

**KEY WORDS:** typing; traceability; foodborne pathogens; whole-genome sequencing

## 1 引 言

食品安全问题是困扰着国内外的世界性难题, 食源

性致病微生物的污染是引起食源性疾病的主要原因之一<sup>[1]</sup>。约在 30 年前, 分型溯源技术应运而生, 以解决局部地区的暴发菌株分型<sup>[2]</sup>。分型溯源技术极大地提高了人们

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFC1603800)

**Fund:** Supported by Key Projects of National Key R&D Plan in the 13th Five Year Plan (2018YFC1603800)

\*通讯作者: 杜欣军, 博士, 教授, 主要研究方向为食源性致病菌危害机制、检测技术、预防控制研究。E-mail: xinjundu@163.com

王硕, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: s.wang@tust.edu.cn

\*Corresponding author: DU Xin-Jun, Ph.D, Professor, State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China. E-mail: xinjundu@163.com

WANG Shuo, Ph.D, Professor, Tianjin Key Laboratory of Food Science and Health, School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300350, China. E-mail: s.wang@tust.edu.cn

对微生物流行病学和微生物多样性的认识,并广泛应用于食源性微生物相关的诊断和暴发菌株来源分析。为了更好地开展分型溯源研究,科研人员已经提出了多种表型分型和基因分型方法,可以在局部地区甚至全世界范围内识别并追溯暴发菌株<sup>[3]</sup>。评估分型方法可靠性的标准包括再现性、判别力和流行病学一致性<sup>[4]</sup>。

传统的分型方法主要为基于 PCR 和内切酶的方法,如多位点序列分型和脉冲场凝胶电泳分型等。虽然依据基因组 DNA 带型进行分型的脉冲场凝胶电泳分型技术因其相关性和流行病学调查高效性已成为多种致病菌分型的“金标准”<sup>[4-6]</sup>,但其分辨率是有限的,难以识别具有不规则或非规则特征 DNA 带型的某些种类病原体<sup>[7]</sup>。此外,抗生素耐药性基因分型、毒力因子分型、血清学分型、多位点可变数目串联重复序列分型等方法也都为食源性致病菌常用的分型溯源技术手段<sup>[8-11]</sup>。由于血清学分型等部分分型技术仍然存在分辨率较低、操作繁杂、受人为操作影响较大<sup>[5]</sup>等缺点,因此需要结合更加方便高效的分型方法进行食源性致病菌的分型溯源研究。

飞速发展的全基因组测序技术不仅可以使细菌基因组的测序速度大大加快,而且测序的成本也较以往有大幅度的降低。近些年许多关于暴发疾病的研究已经证明全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)和细菌菌株系统发生学方法可以更好地应用于暴发菌株的分型溯源研究<sup>[12,13]</sup>,通过高度保守基因或核心基因组便可以较高的分辨识别暴发菌株并追溯来源。以 WGS 为基础的分型溯源方法所具备的标准化实验方法与标准化结果使各科研单位之间的信息交流共享更加便捷,更可以对全球性的暴发菌株进行及时准确的分型溯源判断,找出暴发源头并降低可能造成的危害。得益于此,医院和科研院所能够更好地开展细菌分型溯源的研究,为保障世界各国食品安全做出更大的贡献<sup>[7,14]</sup>。不断发展完善的分型溯源技术有望彻底改变人们对病原体传播和诊断治疗的认识,使人们更加清晰地了解病原体的传播方式和发展动态,以便更好地调查和控制疾病暴发<sup>[15]</sup>。

本文综述了一些食源性致病菌的表型分型溯源技术、蛋白分型溯源技术及基因分型溯源技术,使科研人员能够更好地了解各技术的研究动态及发展方向,对不同食源性致病菌选择更合适的分型溯源技术进行研究,以期为我国食源性致病微生物的精准分型以及溯源网络的建设提供较为全面的参考。

## 2 表型分型和蛋白分型

传统的表型分型溯源技术主要包括生化分型、抗生素耐药性分型和血清学分型等,蛋白分型常见的为基质辅助

激光解吸电离飞行时间质谱分型。

### 2.1 生化分型

传统生化分型主要使用 API 20E 系统、VITEK 2 AES 系统等生化鉴定系统,是根据致病菌的生理生化特征进行的一种分型方法<sup>[11,16]</sup>。该方法在公共卫生领域和临床上对常见致病菌的分型准确性较高,但是由于多数暴发食源性疾病的致病菌变异程度低、进化距离较短,使用此方法进行的分型可信度较低。不仅如此,生化分型的实验操作复杂,综合成本也较高<sup>[17]</sup>,不利于大量菌株的分型以及全球性数据的共享。

### 2.2 抗生素耐药性分型

抗生素的大量不规范使用导致了抗生素耐药致病细菌株在全球范围内的大规模流行。人类会通过食物链的传播从动物、动物源性食品或蔬菜中摄入耐药性菌株而引发各种疾病<sup>[18]</sup>,是细菌性疾病治疗的重大难题之一。传统的抗生素耐药性分型通常使用纸片扩散法和自动生化鉴定系统分析致病菌对不同抗生素的敏感程度,从而进行系统的分型,并将菌株分为耐药、中等耐药和敏感 3 种类型。由于一些致病菌不仅仅对单一抗生素敏感,因此可以根据致病菌的多重耐药性特征进行菌株分型和进化的分析研究,达到溯源的目的。Habib 等<sup>[19]</sup>发现乳腺炎奶牛中分离的金黄色葡萄球菌大多对青霉素敏感,其次是红霉素;并且 25.4%的分离株对 3 种以上的抗生素耐药,菌株显示出了较高的地域相似性,对地域性的预防措施具有指导意义。Li 等<sup>[20]</sup>研究了阪崎克罗诺杆菌对 14 种抗生素的敏感性,研究发现大多数菌株对所有评估的抗生素敏感或仅表现出中等耐药性,对氯霉素具有耐药性或中等耐药性。通过长期的调查开展了风险评估,为控制阪崎克罗诺杆菌相关疾病提出了重要的指导。由于单纯的抗生素耐药性特征难以准确表明菌株之间的亲缘关系特征,因此需结合其它分型方法进行联合分析<sup>[9]</sup>。此外,基于全基因组序列的耐药基因分型也已逐渐成为耐药基因分型的新途径:将相关耐药基因序列比对到全基因组序列上,通过分析各分离株基因组中的耐药基因序列差异实现分型。

### 2.3 血清学分型

血清学分型是一种常见的分型溯源手段。传统的血清学分型技术需要针对致病菌的特异性抗原制备相应的抗血清,通过凝集实验进行分型的一种分型方法<sup>[21]</sup>。Chen 等<sup>[8]</sup>用特异性抗 O 和抗 H 血清从我国新鲜鸭肉中分离得到 151 株沙门氏菌,并检测到了 26 种不同的血清型。不仅血清型的分布与其它地区不同,同时在零售鸭肉中检测到的沙门氏菌血清型也与世界范围内报道的鸡肉中的沙门氏菌血清型不同,表明沙门氏菌血清型的分布在很大程度上与

地理位置、采样季节和处理方法有关。传统血清学分型依赖于致病菌的表型进行分析,但根据凝集试验表明结果无法对大量致病菌进行精准的分型研究。随着测序技术的发展,越来越多的血清学分型开始基于全基因组测序进行分型溯源的研究,以提高血清学分型的分辨率。

## 2.4 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分型

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)分型是一种快速、廉价、可靠的蛋白质分型方法,是一种新型的分型技术。MALDI-TOF-MS 可以通过准确识别菌株特异性生物标记物来区分亚种,如多肽标记物等<sup>[22]</sup>。MALDI-TOF-MS 分型方法的主要问题是较难确定质谱峰相对应的蛋白质信息,因此需要大量的研究工作对质谱库及蛋白质库进行扩展。此外,生物标记物的合理选择是分析特定菌株的必要条件,丰富的生物标记物可以极大地提高分型的分辨率。如艰难梭菌的蛋白质分型方案基于 9 种生物标记物,而空肠弯曲杆菌蛋白质分型方案则包含有 19 个生物标记物<sup>[23]</sup>。虽然 MALDI-TOF-MS 分型与多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)方法类似,并且成本更低、速度更快,但它的缺点极大地限制了在分型领域的应用。Jiang 等<sup>[24]</sup>表明 MALDI-TOF-MS 分型与脉冲场凝胶电泳分型等方法相比,分辨率很低,较难与其他分型方法达成一致。因此需要更深入的研究以提高 MALDI-TOF-MS 技术的分型能力。

## 3 基因分型

随着致病性微生物克隆型越来越高,基因交换比以前认知的更为普遍,传统的分型技术无法提供更高的分辨率以满足分型要求。下一代基因组测序技术(next generation sequencing, NGS)正在彻底改变微生物基因组学研究领域,使得鉴定和追踪致病菌系统发育进化更加便捷。全基因组时代的分型溯源技术通过全基因组数据比较基因组之间的差异,更能准确分辨愈加广泛的种群结构<sup>[3]</sup>。比较基因组最常用的方法是评估单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的差异,另一种重要的方法是基于核心基因组的序列分型。此外,一些辅助的分型溯源方法,如多位点序列分型、脉冲场凝胶电泳分型等也常与这些方法结合使用,大大减少了分型溯源过程出现的问题。

### 3.1 MLST 技术

MLST 技术是 1998 年提出的一种基于可移植核酸序列测定的细菌克隆关系鉴定方法<sup>[25]</sup>,已被证明适用于许多细菌物种。如今至少 100 个物种的相关信息已被收录在 MLST 等位基因在线数据库中<sup>[26]</sup>,并且在不断的更新完善

中。菌株在进化过程中会有许多基因产生变异,但仍会有高度保守的基因变异频率保持在很低的水平。对于多数致病菌,都会有 7 个左右高度保守的序列被选定为此致病菌的持家基因,通过 PCR 扩增并比较这些持家基因的等位基因差异进行分型溯源研究。MLST 分型后会为每一种等位基因的变异分配一个 ST 型,并根据菌株中心基因型的相似性分配克隆复合体型(clonal complex, CC),通过遗传距离推断菌株间的进化关系。此外,不断有新的高度保守序列被加入到持家基因家族中,提高了 MLST 的分辨率。Fabio 等<sup>[27]</sup>使用 MLST 技术,发现了白念珠菌显著的基因改变倾向,丰富了对白念珠菌遗传多样性的认识,表明此菌株进化速度在大大加快。Pirolo 等<sup>[28]</sup>经过跟踪调查,表明了 ST398 型耐多药耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(multidrug resistant livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MDR LA-MRSA)在养猪场工人中的高流行率,并提出了相应的指导方针和建议。MLST 方法选择的方案只包含 7 个左右的持家基因,虽然克隆复合体对了解致病菌群具有优势,但由于费用高的原因并不适合大量的菌株分析<sup>[29]</sup>。

### 3.2 核糖体多位点序列分型

核糖体多位点序列分型(ribosomal MLST, rMLST)技术是利用编码细菌核糖体蛋白亚基的 *rps* 基因的 53 个基因变异进行分型溯源的一种方法。这种 *rps* 基因座存在于所有的细菌中并表现出很好的保守稳定性,通过在不同细菌中表现出的变异将细菌分为不同的类群<sup>[12,30]</sup>。尽管价格更高,但 rMLST 可能会提供比标准 MLST 方法更好的分辨率。Stephen 等<sup>[31]</sup>在阪崎克罗诺杆菌的分型研究中表明 rMLST 可通过分析越来越大的基因组片段建立系统发育网络,有助于菌株识别和分型。尽管当今以全基因组数据为基础的分型溯源技术十分火热,但 MLST 和 rMLST 仍然被广泛使用,进行与历史数据的整合分析<sup>[32]</sup>。

### 3.3 脉冲场凝胶电泳分型

脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)分型是进行菌株遗传多样性分析的重要手段之一,以其高分辨率的特点受到了广大科研工作者的信任和青睐。经过多年的发展,美国的 PulseNet 已经成为了重要的食品安全监管和监测网络<sup>[33]</sup>。近年来我国也在积极构建致病菌菌株监管监测网络,如 PulseNet China 等,正不断完善 PFGE 的标准化操作规程,建立更加完整的菌株图谱库。PFGE 分型技术通过合适的内切酶对菌株染色体进行处理,使其分为一些较大的片段。在不断变换方向的电场中,这些片段由于大小不一,在电场中运动的速率也不一,形成了独特的电泳条带。最后根据显示的条带进行非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic mean,

UPGMA)聚类,对菌株的亲缘性进行分析<sup>[34]</sup>。通常,在带型上有 2~3 条差异的菌株被认为“密切相关”,有 4~6 条差异的菌株之间“可能相关”,7 条或更多条带差异的菌株被认为无关<sup>[35]</sup>。Alejandra 等<sup>[36]</sup>通过对牛奶厂设备和牛奶中分离出的金黄色葡萄球菌进行 PFGE 分型,解释了牛奶中金黄色葡萄球菌的来源,为奶场预防致病菌污染提供了参考。PFGE 技术的分析数据在实验室间进行比较和综合分析是很困难的,需要结合诸如核心基因组多位点序列分型(core genome MLST, cgMLST)等方法进行分型溯源的研究。Ghiwa 等<sup>[37]</sup>结合 PFGE、MLST 和 WGS 的方法准确地识别并追溯了鲍曼不动杆菌在医院的暴发。

### 3.4 核心基因组多位点序列分型

测序技术的发展扩展了 MLST 等方法的应用前景,与局限于 7 个持家基因的标准 MLST 方法相比,新的分型溯源技术主要在数据量、分辨率和成本方面对 MLST 技术进行了升级。在 Sanger 测序时代,MLST 实验的成本很高。而之后的 Illumina 测序和 Pacbio 测序技术,不仅可以直接从基因组中提取持家基因进行 MLST 分型,而且还可以进行其它全基因组为基础的研究。值得注意的是,在进行分析时需要测序原始数据进行高质量的质量检查、组装并获得完整的基因组,这决定了最终分型溯源结果的准确性。

cgMLST 可将菌株分型鉴定的分辨率拓展到克隆级别,因其高精度、高可靠性的分型溯源能力逐渐成为流行病学菌株分型的新标准,主流的 PubMLST 数据库也提供了越来越多的菌株全基因组序列。通过比较参考菌株基因组与分离菌株的全基因组数据,可筛选出成百上千个核心基因(core genes)。这些核心基因稳定的存在于多个基因组中,与染色体的表型和功能有重要的联系。通过设置合理的阈值,依据菌株之间等位基因差异可将菌株分为不同簇,并且可根据不同簇间的距离明确菌株的进化关系与起源分析<sup>[38,39]</sup>。cgMLST 方法最大的一个优点是其可以方便地实现实验室间的数据分享和重复分析,并通过公共数据库与全球的相关菌株一同进行分型溯源研究。Floriana 等<sup>[40]</sup>利用 cgMLST 方法明确了 3 个簇中 13 株肺炎克雷伯菌的亲缘关系,并准确地追溯了它们的传播历史。Birgy 等<sup>[41]</sup>表明 cgMLST 能够很好地分辨出主要传播性群体中的菌株,并能够更好地追踪新集群的出现和传播。

### 3.5 全基因组多位点序列分型

全基因组多位点序列分型(whole genome MLST, wgMLST)技术是在 cgMLST 技术的基础上经过拓展的一种方法,已逐渐成为细菌菌株分型溯源中广泛使用的主要方法之一<sup>[26]</sup>。类似于泛基因组的研究,其分析的数据不仅包括菌株集群中的核心基因组,还包括非必需基因组(variable genes)。这些非必需基因组以往被认为是“不重要”

的基因,但实际却包含了重要的遗传特性。但是出于多种原因, wgMLST 技术并不适合一些分型溯源研究的使用。Nabil-Fareed 等<sup>[12]</sup>不建议将 wgMLST 用于小型流行病学研究。不仅是因为致病菌的泛基因组(即某一物种全部基因)的基因数目在不断增长和更新,分析时需要不断调用所有的基因型,并且这些大量的“不重要”基因是不稳定的,在一定程度上会影响对分型溯源的分析。

### 3.6 核心基因组单核苷酸多态性分型

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)是指在基因组上单个核苷酸的变异,包括转换、颠换、缺失和插入,形成了菌株丰富的遗传标记<sup>[42]</sup>。受菌株的进化和变异的影响,SNP 的数量越来越多,并且多态性十分丰富。有些 SNP 位点会影响基因的功能,导致生物性状的改变甚至致病。核心基因单核苷酸多态性(core genome SNP, cgSNP)可在核心基因的基础上检测各菌株的 SNP 位点,并常与 cgMLST 共同进行致病菌的分型溯源研究。Kelvin 等<sup>[43]</sup>使用 cgMLST 和 cgSNP 方法,表明了耐万古霉素屎肠球菌在医院之间的传播,对疾病的预防和控制具有重要的意义。Akiko 等<sup>[44]</sup>利用 cgMLST 和 cgSNP 对蜡样芽胞杆菌进行系统发育比较,确定了菌株在日本所发生的遗传变异。实际分析中,SNP 的数量取决于参考基因组的选择,以及选择的筛选方式对 SNP 位点的过滤程度。常用的比对过滤软件如 BWA、GATK、VcfTools 等极大地减轻了 SNP 位点筛选和过滤时的工作量,并且在不断的更新完善中<sup>[45]</sup>。Tan 等<sup>[46]</sup>对世界各地采集的布鲁氏菌菌株进行了 cgSNP 分析,揭示了布鲁氏菌的潜在起源和在全球范围内的传播历史。

### 3.7 成簇的规律间隔的短回文重复序列分型

成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)分型是一种新型分型技术,能够追溯暴发疾病中的致病菌来源。Zeng 等<sup>[29]</sup>的研究结果表明,CRISPR 的多样性可以揭示菌株完整的分化史,在克隆谱系研究中具有更高的分辨率,从而与其它基因分型方法相比具有独特的优势。CRISPR-Cas 系统是细菌抵抗外来噬菌体和质粒入侵的一种获得性免疫系统。一般来说,CRISPR-Cas 系统由 3 个部分构成:cas 基因簇,富含 AT 的先导序列和 CRISPR 位点<sup>[47]</sup>,其中 CRISPR 位点由本身的重复序列和插入的间隔序列构成。根据 cas 基因、间隔序列自身的核苷酸差异以及其在 CRISPR 位点中的排列顺序差异可以实现致病菌的分型和溯源研究<sup>[48]</sup>。与 MLST 方法类似,CRISPR 分型的一种方法是使用定向识别重复序列的标记引物对 CRISPR 位点进行 PCR 扩增,另一种为使用 CRISPRFinder 等工具识别 CRISPR 位点进行分型。Zeng 等<sup>[49]</sup>在全基因组序列的基

础上对实验室分离的以及 NCBI 基因组数据库中的阪崎克罗诺杆菌进行了 CRISPR 分型, 并构建了用于跟踪物种进化的 CRISPR 间隔序列库。研究还发现 CRISPR-Cas 系统可能在维持物种基因组内的平衡起着重要作用。

### 3.8 多位点可变数目串联重复序列分型

多位点可变数目串联重复序列(multiple locus variable-number tandem repeat analysis, MLVA)分型技术是基于 PCR 技术, 使用 MLVA 重复序列特异性引物扩增 DNA 的一种分型方法<sup>[50,51]</sup>。其中, 可变数串联重复序列(variable number of tandem repeats, VNTRs)是基因组上小的 DNA 重复序列, MLVA 即是根据此重复序列在基因组中的位点、变异程度和重复数差异进行分型研究<sup>[52]</sup>。它方便快捷, 分型时具有通量较高的优点。这种分型方法有几个不足, 它既与 VNTRs 的长度等性质紧密关联, 其技术本身也对实验室操作有一定的要求<sup>[53]</sup>。因此, 在实验室之间进行数据比较分析具有较高的难度。Janowicz 等<sup>[54]</sup>比较了 cgMLST、cgSNP 和 MLVA 方法对布鲁氏菌病中流行病学相关菌株和流行病学情况不明的菌株的分型能力。尽管 cgSNP 的分辨率最高, 但 MLVA 的分型能力也具有较高的分辨率, 建议尽量与 cgSNP 等分型方法共同进行分析。Wei<sup>[10]</sup>等也表明 MLVA 与 PFGE 联合分型是分型溯源的有效方法。

### 3.9 毒力因子分型

毒力因子分型技术根据致病菌特有的毒力因子进行分型。其可以通过 PCR 扩增相关的毒力因子, 也可以在全基因组测序的基础上提取相关毒力因子进行分型溯源研究。Amaretti 等<sup>[55]</sup>采用 PCR 扩增技术对人类粪便中肺炎克雷伯菌的 17 个与尿囊素代谢相关的毒力因子进行分型研究, 阐述了肺炎克雷伯菌在肠道中的定植与感染。Xiang 等<sup>[56]</sup>在全基因组测序的基础上对暴发疾病中的耐药药沙门氏菌进行毒力因子分型溯源研究。结果表明暴发菌株含有大量的毒力因子, 并与本地菌株密切相关, 为政府预防和控制相关疾病提供了参考。

## 4 结论与展望

在过去的几十年间, 传统的分型溯源技术发挥了重要的作用。近年来, 随着分型溯源技术的不断发展, 各国对食源性致病菌的研究越来越深入, 对各种疾病的预防 and 处置措施也更加完善。WGS 技术使得分型溯源技术更加高效准确, 其规范的数据结果、较短的分析时间和不断降低的测序成本将为建立全球的食源性致病菌分型溯源网络做出重大的贡献。虽然 WGS 增加了可用于比较细菌菌株差异的各种信息, 大大提高了细菌分型的辨别能力<sup>[4]</sup>, 但在数据分析方面仍然存在一定的难度。在进行分型溯源之前,

首先需要对测序的原始数据进行质量检查、修剪和重新排序组装, 不当的参数选择可能会导致错误的分析结果。由于全基因组数据量大, 需要通过编程改进数据的分析难度和准确度, 同时便于将大量的数据结果转化为研究人员可以理解的结果<sup>[57]</sup>。不断完善的以 WGS 为主的食源性致病菌分型溯源技术对全世界食品安全体系的建设和发展至关重要。只有全面掌握致病菌的起源和进化信息, 才能最大限度地减轻暴发疾病对人类健康的危害。此外, 还需要所有科研、医务工作者的共同努力, 通过分型溯源技术控制食源性疾病的暴发, 避免其发展成为影响全世界的食源性疾病。

### 参考文献

- [1] 刘宽. 食源性致病菌多重荧光定量 PCR 检测体系的建立[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018.  
Liu K. Establishment of multiple quantitative PCR for detection of food-borne pathogens [D]. Hangzhou: Zhejiang Agriculture & Forestry University, 2018.
- [2] Sophie B, Sara RB, Yann D, *et al.* Tracking carbapenemase-producing bacteria by molecular typing: Population diversity and sampling pitfall [J]. *Infect Genet Evol*, 2018, (65): 104–106.
- [3] Marcos Pérez-Losada, Arenas M, Castro-Nallare E. Microbial sequence typing in the genomic era [J]. *Infect Genet Evol*, 2017, (63): 346–359.
- [4] Floriana G, Francesco C, Simone B, *et al.* Comparison of core-genome MLST, coreSNP and PFGE methods for *Klebsiella pneumoniae* cluster analysis [J]. *Microb Genom*, 2020, 6(4): 000347.
- [5] 李柏生, 柯昌文, 张永慧. 全基因组测序在食源性疾病监控和暴发调查中的应用[J]. *中国食品卫生杂志*, 2016, 28(2): 137–140.  
Li BS, Ke CW, Zhang YH. Application of whole genome sequencing for the foodborne disease surveillance and outbreak investigation [J]. *Chin J Food Hyg*, 2016, 28(2): 137–140.
- [6] 李艳霞, 吴松浩. 食品微生物检测技术的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(7): 270–273.  
Li YX, Wu SH. Development of detection methods for food microorganism [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2008, 29(7): 270–273.
- [7] Dominic L, Arthur P, Emma G, *et al.* Baseline practices for the application of genomic data supporting regulatory food safety [J]. *J AOAC Int*, 2017, 100(3): 721–731.
- [8] Chen Z, Bai J, Wang S, *et al.* Prevalence, antimicrobial resistance, virulence genes and genetic diversity of *salmonella* isolated from retail duck meat in southern China [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(3): 444.
- [9] Gu D, Wang Z, Tian YQ, *et al.* Prevalence of *Salmonella* isolates and their distribution based on whole-genome sequence in a chicken slaughterhouse in Jiangsu, China [J]. *Front Vet Sci*, 2020, (7): 29.
- [10] Wei X, You L, Wang D, *et al.* Antimicrobial resistance and molecular genotyping of *Salmonella enterica* serovar enteritidis clinical isolates from Guizhou province of southwestern China [J]. *PLoS One*, 2019, 14(9): e0221492.

- [11] Zhong YM, Liu WE, Meng Q, *et al.* *Escherichia coli* O25b-ST131 and O16-ST131 causing urinary tract infection in women in Changsha, China: molecular epidemiology and clinical characteristics [J]. *Infect Drug Resist*, 2019, (12): 2693–2702.
- [12] Nabil-Fareed A, Zhemini Z, Sergeant MJ, *et al.* A genomic overview of the population structure of *Salmonella* [J]. *PLoS Gene*, 2018, 14(4): e1007261.
- [13] Tim D, Thomas I, Thibaut J, *et al.* Phylogenetic structure of European *Salmonella enteritidis* outbreak correlates with national and international egg distribution network [J]. *Microb Geno*, 2016, 2(8): e000070.
- [14] Paramithiotis S, Hadjilouka A, Drosinos EH. Molecular typing of major foodborne pathogens [M]. *Foodborne Diseases*, 2018.
- [15] Gwinn M, Maccannell DR, Khabbaz RF, *et al.* Integrating advanced molecular technologies into public health [J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(3): 703–714.
- [16] 马丽萍, 张素艳, 蒋健. 禽蛋产品沙门氏菌生化型和血清型分析[J]. *宁波农业科技*, 2019, (4): 8–9.  
Ma LP, Zhang SY, Jiang J. Analysis of *Salmonella* biochemical type and serotype of poultry egg products [J]. *Ningbo Agric Sci Technol*, 2019, (4): 8–9.
- [17] 伊廷存, 霍胜楠, 程祥龙, 等. 食源性致病菌溯源分型技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(16): 5293–5298.  
Yi TC, Huo SN, Cheng XL, *et al.* Advances in traceability typing and identification of foodborne pathogens [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(16): 5293–5298.
- [18] Bilel H, Mohamed SA, Laura RR, *et al.* High prevalence of MCR-1 encoding colistin resistance and first identification of bla<sub>CTX-M-55</sub> in ESBL/CMY-2-producing *Escherichia coli* isolated from chicken faeces and retail meat in Tunisia [J]. *Int J Food Microbiol*, 2019, (318): 108478.
- [19] Habib DS, Mitra P. Genotyping and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy ruminants: Differences in the distribution of clonal types between cattle and small ruminants [J]. *Arch Microbiol*, 2021(1): 115–125.
- [20] Li Y, Zhang YJ, Zhang LY, *et al.* Prevalence and genetic characteristics of *Cronobacter* spp. from food and human clinical stool samples in Wenzhou, China 2008–2018 [J]. *Food Microbiol*, 2020, (89): 103432.
- [21] 蒋兵. 单增李斯特菌在猪、鸡肉品加工及销售过程中的污染情况及基因分型研究[D]. 重庆: 西南大学, 2018.  
Jiang B. The pollution analysis and genotyping of *Listeria monocytogenes* in the processing and marketing of pork and chicken [D]. Chongqing: Southwest University, 2018.
- [22] Sébastien B, Frédéric B, Arnaud M, *et al.* Genetic diversity and population structure of *Tenacibaculum maritimum*, a serious bacterial pathogen of marine fish: From genome comparisons to high throughput MALDI-TOF typing [J]. *Vet Res*, 2020, 51(1): 60.
- [23] Matthias FE, Felix MJ, Thomas R, *et al.* Proteotyping of *Clostridioides difficile* as alternate typing method to ribotyping is able to distinguish the ribotypes RT027 and RT176 from other ribotypes [J]. *Front Microbiol*, 2019, (10): 2087.
- [24] Jiang F, Kong Z, Cheng C, *et al.* Overestimated discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones [J]. *Epidemiol Infect*, 2019, (147): e324.
- [25] Maiden MCJ, Van Rensburg MJ, Bray JE, *et al.* MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(10): 728–736.
- [26] Liu YY, Lin JW, Chen CC. cano-wgMLST\_BacCompare: A bacterial genome analysis platform for epidemiological investigation and comparative genomic analysis [J]. *Front Microbiol*, 2019, (10): 1687.
- [27] Fabio S, Letterio G, Maria RF, *et al.* Genetic diversity of *Candida albicans* isolates recovered from hospital environments and patients with severe acquired brain injuries [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, (76): 104068.
- [28] Pirolo M, Visaggio D, Angela G, *et al.* Unidirectional animal-to-human transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pig farming; Evidence from a surveillance study in southern Italy [J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2019, 8(1): 187.
- [29] Zeng HY, Li CS, Ling N, *et al.* Prevalence, genetic analysis and CRISPR typing of *Cronobacter* spp. isolated from meat and meat products in China [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, (321): 108549.
- [30] Keith AJ, Carly MB, Julia SB, *et al.* Ribosomal multilocus sequence typing: Universal characterization of bacteria from domain to strain [J]. *Microbiology*, 2012, 158(4): 1005–1015.
- [31] Stephen JF, Benjamin D, Keith AJ. *Cronobacter* the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis [J]. *BMC Genom*, 2014, 15(1): 1121.
- [32] Keith AJ, Martin CJM. Using multilocus sequence typing to study bacterial variation: Prospects in the genomic era [J]. *Future Microbiol*, 2014, 9(5): 623–630.
- [33] Kubota KA, Wolfgang WJ, Baker DJ, *et al.* PulseNet and the changing paradigm of laboratory-based surveillance for foodborne diseases [J]. *Publ Health Rep*, 2019, 134(sup2): 22S–28S.
- [34] 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]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(16): 5430–5439.
- [35] Neoh HM, Tan XE, Sapri HF, *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, (74): 103935.
- [36] Alejandra AL, Paulina AP, Gerardo GR, *et al.* On-farm surfaces in contact with milk: The role of *Staphylococcus aureus*-containing biofilms for udder health and milk quality [J]. *Foodborne Pathog Dise*, 2020, 17(1): 44–51.
- [37] Ghiwa M, Ibrahim B, Tamara S, *et al.* Whole-genome-sequence-based characterization of extensively drug-resistant *Acinetobacter Baumannii* hospital outbreak [J]. *mSphere*, 2020, 5(1): e00934-19.
- [38] Park KH, Quaintance KE, Uhl JR, *et al.* Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia in a single large Minnesota medical center in 2015 as assessed using MLST, core genome MLST and spa typing [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179003.
- [39] Cabal A, Pietzka A, Huhulescu S, *et al.* Isolate-based surveillance of

- Listeria monocytogenes* by whole genome sequencing in Austria [J]. Front Microbiol, 2019, (10): 2282.
- [40] Floriana G, Dafne B, Ausilia A, *et al.* Emergence of two novel sequence types (3366 and 3367) NDM-1- and OXA-48-co-producing *K. pneumoniae* in Italy [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2019, 38(9): 1687–1691.
- [41] Birgy A, Fouad M, Camille J, *et al.* Diversity and trends in population structure of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in febrile urinary tract infections in children in France from 2014 to 2017 [J]. J Antimicrob Chemother, 2020, 75(1): 96–105.
- [42] 聂燕钗. 等位基因特异性 PCR 技术及其法医学应用[J]. 法医学杂志, 2014, 30(4): 282–287.
- Nie YC. Allele-specific PCR and its application in forensic science [J]. J Forensic Med, 2014, 30(4): 282–287.
- [43] Kelvin WCL, Ranmini K, Louise AC, *et al.* State-wide genomic and epidemiological analyses of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Tasmania's public hospitals [J]. Front Microbiol, 2020, (10): 2940.
- [44] Akiko O, Satoshi I, Akira N, *et al.* Whole-genome sequence-based comparison and profiling of virulence-associated genes of *Bacillus cereus* group isolates from diverse sources in Japan [J]. BMC Microbiol, 2019, 19(1): 296.
- [45] Nicolas R, Sabrina CS, Emeline C, *et al.* A simple and robust statistical method to define genetic relatedness of samples related to outbreaks at the genomic scale-application to retrospective *Salmonella* foodborne outbreak investigations [J]. Front Microbiol, 2019, (10): 2413.
- [46] Tan KK, Tan YC, Chang LY, *et al.* Full genome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of *Brucella melitensis* [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 93.
- [47] Ogrodzki P, Forsythe SJ. CRISPR-Cas loci profiling of *Cronobacter sakazakii* pathovars [J]. Future Microbiol, 2016, 11(12): 1507–1519.
- [48] 龙金照. 基于 CRISPR 的大肠杆菌分子分型方法的建立[D]. 郑州: 郑州大学, 2017.
- Long JZ. Establishment of molecular type method based on CRISPR in *Escherichia coli* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017.
- [49] Zeng HY, Zhang JM, Wu QP, *et al.* Reconstituting the history of *Cronobacter* evolution driven by differentiated CRISPR activity [J]. Appl Environ Microbiol, 2018, 84(10): e00267.
- [50] 任晓莉, 王慧, 陈创夫, 等. MLVA-16 对新疆分离布鲁氏菌 80/23 株的鉴定与分析[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2013, 31(3): 313–317.
- Ren XL, Wang H, Chen CF, *et al.* Identification and analysis of *Brucella* 80/23 strain isolated in Xinjiang with MLVA-16 typing [J]. J Shihezi Univ (Nat Sci Ed), 2013, 31(3): 313–317.
- [51] Goodarzi NN, Pourmand MR, Arfaatabar M, *et al.* First detection and characterization of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* from people with community-acquired pneumonia in Iran [J]. Microb Drug Resist, 2019, 26(3): 245–250.
- [52] 叶倩. 肺炎支原体 MLVA 分型及其临床意义[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- Ye Q. The Clinical Significance of multilocus variable-number tandem-repeat analysis in genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* from clinical samples [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [53] Giuliano G, Massimo A, Elisabetta DG. MLVA-16 loci panel on *Brucella* spp. using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis [J]. J Microbiol Method, 2013, 92(2): 103–107.
- [54] Janowicz A, Massis FD, Ancora M, *et al.* Core genome multi locus sequence typing and single nucleotide polymorphism analyses in the epidemiology of *Brucella melitensis* infections [J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(9): 517–518.
- [55] Amaretti A, Righini L, Candelieri F, *et al.* Antibiotic resistance, virulence factors, phenotyping, and genotyping of non-*Escherichia coli* Enterobacterales from the gut microbiota of healthy subjects [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1847.
- [56] Xiang Y, Li FX, Dong N, *et al.* Investigation of a salmonellosis outbreak caused by multidrug resistant *Salmonella typhimurium* in China [J]. Front Microbiol, 2020, (11): 801.
- [57] Carol AG, Stephen DT, Margaret FR, *et al.* Whole-genome sequencing in outbreak analysis [J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(3): 541–563.

(责任编辑: 李磅礴)

## 作者简介



赵处敏, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全。  
E-mail: zcm3278@163.com



杜欣军, 博士, 教授, 主要研究方向为食源性致病菌危害机制、检测技术、预防控制研究。  
E-mail: xinjundu@163.com

王 硕, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全检测  
E-mail: s.wang@tust.edu.cn