

泛基因组学在食源性致病菌检测及其 耐药监测中的应用

黎梓怡, 施春雷*

(上海交通大学农业与生物学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240)

摘要: 食源性致病菌引起的食源性疾病在全球范围内时有暴发, 对致病菌的调查和监测是预防和控制疾病大范围发生的有效手段。然而菌株的遗传变异给监测工作带来了挑战, 同时罕见的、未知的菌株信息用传统鉴定方法难以实现。泛基因组学作为新发展的基因组分析方法, 提供了更完整的基因组信息, 在分离株鉴别、菌株遗传差异研究等方面具有重要贡献。结合数据库与分析软件, 泛基因组分析在揭示致病菌的毒力及耐药基因、寻找新的抑菌靶点、监测基因水平转移情况等方面具有很大的应用潜力。本文简要介绍了泛基因组概念和分析方法, 综述了其在致病菌快速检测、风险溯源以及风险预警方面的应用, 深入阐述了泛基因组分析在耐药性监测和防控领域的发展状况, 以期为基于基因组层面的食源性致病菌风险评估提供参考。

关键词: 泛基因组学; 食源性致病菌; 致病性; 抗生素耐药性; 风险防控

Application of pan-genomic on the monitoring of foodborne pathogens and antimicrobial resistance

LI Zi-Yi, SHI Chun-Lei*

(School of Agriculture and Biology, and State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

ABSTRACT: Foodborne diseases caused by foodborne pathogens break out all over the world. The investigation and monitoring of foodborne pathogens is an effective method to prevent and control the widespread occurrence of the disease. However, genetic variation of strains has brought challenges to surveillance. Moreover, the information on rare and unknown pathogens is difficult to be acquired by traditional identification methods. As a newly developed method of genome analysis, pan-genomics provides more complete genome information, and has important contributions to the identification of isolates and the study of genetic differences of strains. Combined with database and analysis software, pan-genome analysis has significant potential of application in revealing virulence and antimicrobial resistance genes of pathogens, finding new antibacterial targets and monitoring horizontal gene transfer. This paper briefly introduced the concept and analysis methods of pan-genome, summarized its application in

基金项目: 上海市科技兴农技术创新项目(2020-02-08-00-08-F01487)、国家自然科学基金项目(31972169)、上海市“科技创新行动计划”农业科技领域项目(21N31900200)

Fund: Supported by the Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (2020-02-08-00-08-F01487), the National Natural Science Foundation of China (31972169), and the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (21N31900200)

***通信作者:** 施春雷, 研究员, 主要研究方向为食源性致病菌快速检测分型与风险评估、食源性致病菌菌膜形成分子机制、食源性致病菌耐药形成传播机制。E-mail: clshi@sjtu.edu.cn

***Corresponding author:** SHI Chun-Lei, Professor, School of Agriculture and Biology, and State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China. E-mail: clshi@sjtu.edu.cn

pathogen rapid detection, risk traceability, and risk early warning, meanwhile, deeply expounded the development of pan-genome analysis in the field of antimicrobial resistance surveillance and control, in order to provide references for risk assessment of foodborne pathogens based on genome level.

KEY WORDS: pan-genomics; foodborne pathogens; pathogenicity; antimicrobial resistance; risk prevention

0 引言

食源性致病菌造成的食品安全事件是发达国家和发展中国家需共同面对的公共卫生问题。食源性致病菌包括金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、大肠杆菌、沙门氏菌、铜绿假单胞菌等,其引发的食源性疾病往往具有短时暴发、范围广的特点。世界卫生组织估计,全世界每年有 6 亿人因食用受污染的食物而患病,导致 42 万人死亡^[1]。我国一项全国性的急性胃肠道疾病调查估计,中国每月患病率为 4.2%^[2]。对食源性致病菌进行有效监测是预防和控制食源性疾病暴发的关键手段,然而食源性致病菌往往存在多种血清型,不同血清型的致病性存在差异。此外,毒力、耐药相关基因在食源性致病菌种属间的传播与变异现象时有发生,这给预防和管理带来了挑战^[3-4]。为了解掌握致病菌感染和发病的机制,基因组层面的研究和分析是必不可少的。

近年来,下一代测序技术(next generation sequencing, NGS),即高通量测序技术飞速发展,包括全基因组测序、转录组测序等。测序技术与蛋白组学、代谢组学等先进组学技术的结合,对分析食品质量、把握食品安全、保障消费者健康具有重要的现实意义,目前在细菌耐药性及毒力基因检测、病毒传播调查、微生物诊断等多个领域均有广泛应用^[5-6]。随着技术的成熟,测序质量不断提高,成本不断降低,数量庞大的基因组测序结果的产生对食源性致病菌的研究产生了重大影响^[7]。其中,全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)和宏基因组测序(metagenomics)在快速、准确鉴别细菌分型、预测耐药和毒力相关基因,以及难培养微生物等方面具有巨大的潜力。

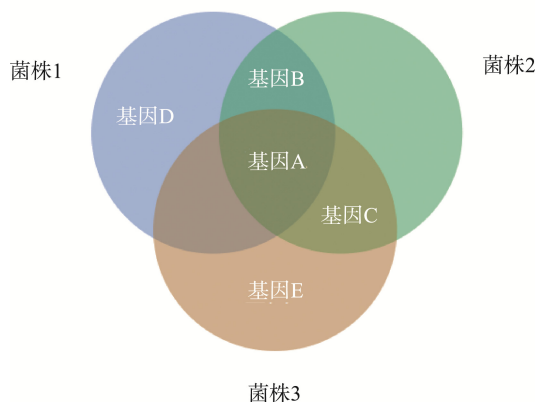
随着测序技术的发展,研究者们认识到在同种间的分离株中也存在非共享基因。为了进一步完善基因组学的框架,深入研究分析这种差异性,建立更好的基因型和表型之间的联系,泛基因组学(pan-genomics)的概念被提出,并在原生生物、真菌、植物和动物在内的研究领域得到实践^[8]。本文综述了泛基因组学的发展历史和研究方法,以及其在食源性致病菌监测方面的应用进展,并对未来发展方向/前景进行展望,旨在为食源性疾病的防控和风险评估相关研究提供参考依据。

1 泛基因组学概述

1.1 泛基因组学的出现

1987 年,曾有学者提出如果菌株与菌株 DNA 之间的

亲缘关系大于等于 70%,并且拥有相同的表型,则可以考虑属于同一个物种^[9]。但随着研究者们对于基因组认知的逐渐深入,这一理论受到越来越多的挑战。2005 年,属于单个菌株的特殊基因在测序结果中被发现,为更好地描述细菌种类信息,泛基因组学概念被首次提出^[10]。泛基因组学关注于物种内的核心基因(core genes)、附属基因(accessory genes)和特殊基因(specific genes)。核心基因存在于所有的分离株中。附属基因存在于部分分离株中,包括可有可无基因、可变基因以及适应基因。特殊基因是一种独特的附属基因,为某个菌株所独有(图 1)^[11]。泛基因组具有开放和封闭两种概念,常与其他微生物处于同一生态位的细菌通常表现为开放的泛基因组,如大肠杆菌。与之相对的,生活在受限环境中的物种呈现出封闭的泛基因组,有限菌株数量就可以完成泛基因组分析,如炭疽杆菌^[12]。总体来说,泛基因组学是物种内基因多样性的研究,代表了一个物种的完整基因库,在抗菌靶点的筛选、重要耐药及毒力基因的分析以及疫苗的研发等方面均有较大的应用潜力^[8]。



注: 这个泛基因组假设模型共有 5 个基因 A、B、C、D、E。基因 A 代表存在于所有菌株中的核心基因; 基因 B 和 C 是附属基因,仅存在于部分菌株中; 基因 D、E 是菌株 1、3 分别持有的特殊基因^[11]。

图 1 泛基因组组成示例

Fig.1 Examples of pan-genomic composition

1.2 泛基因组学研究方法

泛基因组分析通常包括基因组数据的收集、基于多序列比对的同源聚类以及核心基因组、附属基因组和特殊基因的分析等。具体来说分为 4 步: (1)读长(reads)的质量控

制、预处理和过滤; (2)基因组组装和注释, 方法包括从头组装和迭代组装等; (3)泛基因组的构建, 主要分为基于序列和基于基因的构建方法; (4)泛基因组下游分析, 如多序列比对、系统发育树的构建等^[12]。研究者可以基于分析结果得到具有代表性的生物信息, 包括系统发育距离、目标分支中目标基因的存在与否、以及基因的功能注释等^[13]。在这个过程中, 一些基于计算生物学的工具与共享数据库不断地被开发与补充出来, 用于更便捷、更全面的分析, 实现泛基因组可视化, 如 MUMmer、BLASTn、KEGG、COG 等, 一些算法也在实践中得到应用, 如 PathogenFinder 等^[14-15]。为了更好的揭示假定抗性基因的功能、扩展致病菌耐药性基因库的认识, HER 等^[16]开发了一种从泛基因组构建协同功能网络 (PangenomeNet) 的注释工具, 以大肠杆菌为研究对象, 成功对应激反应基因和药物特异性耐药基因等进行功能推理。

2 在食源性致病菌监测上的应用

2.1 快速检测

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 在过去二十年里飞速发展, 实时荧光定量 PCR、数字 PCR 等检测方法在食源性致病菌检测领域被广泛使用^[17-18]。沙门氏菌 (*Salmonella*) 是最常见的食源性致病菌之一, 目前确定的血清型已超过 2600 种^[19]。然而, 不同沙门氏菌血清型的毒力、宿主范围和流行病学存在巨大的差异, 例如只有伤寒、副伤寒等特定血清型才会引起肠热, 其他大部分只能引起肠炎^[20]。因此对沙门氏菌血清型的鉴定是十分重要的, 特别是一些新兴的或罕见的血清型。在以往研究中, 比较基因组学常用于挖掘高特异性引物, 针对特定基因建立高灵敏度、快速准确的多重 PCR 鉴定方法, 这些基因在菌种内高度保守, 是鉴定和血清型预测的重要来源^[21-22]。

泛基因组学提供了更广泛的基因检索范围。SHANG 等^[23]利用泛基因组分析和 BLAST 程序, 获得了在特定血清型韦太夫雷登沙门氏菌、伦敦沙门氏菌、火鸡沙门氏菌以及桑夫顿堡沙门氏菌的特殊基因, 将它们作为 PCR 检测的新特异性靶点, 在食品样本的致病菌检测中得到成功应用。金黄色葡萄球菌也是食源性疾病暴发的重要原因之一。KIM 等^[24]基于泛基因组分析寻找到了鉴定金黄色葡萄球菌新的分子靶点 (GntR 家族转录调控因子), 针对靶标基因设计的引物具有特异性高、灵敏度好的优势。与此同时, LI 等^[25]从 NCBI 数据库获取李斯特菌基因组序列, 通过 Prokka 软件进行基因注释以及 Roary 软件构建泛基因组分析, 发现了 5 个新的李斯特菌特异性靶点, 可用于鉴别单核增生李斯特菌和其他非致病李斯特菌。泛基因组测序从基因层面展开研究, 可应用于多个属种的致病菌分析中, 以提供高分辨方法来识别、比较和分类致病菌。

2.2 调查溯源

表型是基因与环境因素共同作用的结果, 食源性致病菌的流行情况可以从基因层面得到挖掘^[26]。SONG 等^[27]曾对上海地区不同来源的 142 株金黄色葡萄球菌的遗传多样性和毒力基因分布情况进行深入研究。检测结果显示, 毒力基因在不同来源的菌株间有明显差异, 生奶和生肉是含有多种毒力基因的金黄色葡萄球菌的主要来源。水平基因转移 (horizontal gene transfer, HGT) 在分离株毒力的出现和进化过程中发挥了重要作用, 耐药等抗性基因也可通过 HGT 在菌群中传播, 这使得细菌能够适应不断变化的环境, 如改变与宿主间的关系、获得更高的竞争优势^[28]。与之相应的, 这种基因转移现象也增加了菌株的致病风险。在监测 HGT 方面, 泛基因组分析可以提供对致病菌物种遗传变异和动态的分析。GOMEZ-SANZ 等^[29]通过比较基因组学和泛基因组学分析对耐甲氧苄胺嘧啶 (trimethoprim, TMP) 的松鼠葡萄球菌分析发现了一个可移动的 TMP 抗性基因 *dfrE*, 该基因位于一个新的多重耐药嵌合质粒 (pUR2865-34) 上, 可赋予金黄色葡萄球菌和大肠杆菌高水平的 TMP 抗性。

在流行病学调查方面, 泛基因组学也有较大的应用潜力。菌株分型是流行病学分析的基础, 相较于应用最广泛的多位点序列分型, 泛基因组学具有更高的分辨率。在国内外研究中, 提取核心基因组并结合聚类分析软件构建系统发育树是常见的方法^[30-31]。泛基因组数据库和数据分析工具是方法实现过程中的两个重要元素, 已有研究验证聚类分析结果与实际疾病聚集的一致性^[32]。在实验前期研究中, CHEN 等^[33]通过聚类分析得到的遗传图谱显示, 来自海鲜及其环境的菌株在潜在致病性上存在差异, 而在不同地区分离的各血清型菌株之间的关系尚未被阐明。菌株间的遗传变异可能是差异形成的原因, 通过特殊基因可能实现副溶血性弧菌血清型 O4:K12 美洲分离菌株与亚洲分离株的区分^[34]。在沙门氏菌的相关研究中, WANG 等^[35]研究发现, 即使两株分离菌拥有相似的遗传背景, 在蛋清中的生存能力仍存在较大差异, 这可能是由于差异基因对多个功能的综合影响导致的。基因的重组、突变以及转移在菌群内时有发生, 并且关于差异基因与在表型变异之间的联系尚未明晰, 这带来了致病菌的高度多样性, 泛基因组研究进一步提供了对致病菌种群结构和流行病学的深入认识。

2.3 风险预警

面对不断突发的食源性致病菌流行现象, 仅依靠对食品终端产品进行检测的保障体系已经不能完全满足食品安全监管的需要, 运用先进技术对潜在风险进行预估和监测预警具有重要意义。风险预警体系的构建主要分为 3 个步骤: 致病菌筛查、基因挖掘、风险评估^[36]。其中及时可

靠的数据共享和高质量的基础数据集对于预警防控至关重要,尤其是跨区域乃至全球性的预警系统的建立^[37]。例如,ZHOU 等^[38]曾对上海市市售鸡肉制品以及零售食品中的沙门氏菌进行的耐药性、致病潜能和分子分型特征分析,不同来源的分离株显示出了相似的脉冲场凝胶电泳图谱,推测在加工、零售过程中可能存在交叉污染的情况。这为上海市零售鸡源沙门氏菌的食品安全风险评估提供了重要的基础数据。基于 DNA 或 RNA 的监测方法由于具有快速、人力消耗少、成本低等优点,在致病菌监测中得到了广泛应用^[39]。在水体环境致病菌监测中,常用粪便指示菌如大肠杆菌来代表病原菌,或是通过纯培养或聚合酶链式反应的方法直接检测各种病原体^[40]。现有的数据库中存放着大量的单个分离株全基因组测序结果,对这些结果进行比较分析也有利于人们更深入地理解基因组信息以及进化过程。

泛基因组学可以为监测预警方法提供更全面的基础数据分析,帮助研究者提供更准确的致病性评估。类白喉杆菌在早期被认为是棒状杆菌属下的非致病物种,但已有临床分离株样本显示该物种直接参与了感染和致病过程^[41]。NASIM 等^[42]获得的开放性泛基因组图谱表明,类白喉杆菌在进化过程中有可能纳入新的基因,可能是菌株致病性改变的原因。同样的,泛基因组分析可以提供更多有关致病菌菌株的遗传信息,对维护公众健康有促进作用。BURGUENO-ROMAN 等^[43]发现非伤寒沙门氏菌核心基因组与沙门氏菌的致病性密切相关,并且存在大量的毒力和抗性因子。ESTRADA 等^[44]结合泛基因组学与聚类分析,在多个猪生产企业发现了相同的致病基因型,并且发现与传统的毒力相关基因相比,*ofs* 和 *srtF* 基因能更好地区分致病型和共生型猪链球菌,这为预警防控提供了有价值的信息。以上研究可知,泛基因组分析可以通过追踪基因在菌群内的动态变化,准确识别致病菌种,帮助实现食品安全风险的监控。

3 在耐药监测和防控方面的应用

3.1 致病菌耐药现状

抗生素耐药性使细菌对抗生素的敏感性降低甚至消失,是农牧业生产、临床医疗等领域需要共同面对的难题。由于抗生素无法在人或动物体内在被完全代谢吸收,随粪便尿液排出的抗生素母体或其活性代谢产物在水体、土壤等自然环境中积累,在养殖过程中又会迁移至动物体内,蓄积至人体^[45-46]。同时,环境中的抗生素残留可能促进抗生素耐药基因在致病菌中的水平转移,耐药致病菌乃至多重耐药菌株的出现为食品安全带来了艰巨的挑战^[47]。迄今为止,在国内外生羊牛奶、畜禽样本,以及零售、养殖环境等样本鉴定结果中,均发现单一或多种耐药菌株^[48-51]。

可移动基因元件携带耐药基因的传播是致病菌产生抗生素耐药性的重要原因。实验室前期研究表明 IncHI2 是导致沙门氏菌耐药基因传播的主要质粒谱系。由于质粒上携带耐药以及完整的转移相关基因,是抗生素耐药性传播的潜在威胁^[52]。持留菌的发现使情况更为复杂,它们暂时性地表现出高耐药性,在抗生素压力下存活,引发慢性持续感染^[53]。因此,对食源性致病菌耐药情况进行完善有效的早期识别、监测和预警,这有利于帮助预判特定疾病的发展趋势、风险因素和疾病负担,以改善食源性疾病流行情况。

3.2 基于泛基因组分析的耐药监测方法

预测特定致病菌出现耐药菌株的能力对于预防和治疗细菌感染至关重要。确定最小抑菌浓度 (minimal inhibition concentration, MIC) 的实验分析手段被标准化地用作量化培养细菌菌株的耐药性水平^[54]。然而,该方法耗时较长,不能满足快速诊断的需求,并且依赖于致病菌分离株的成功培养,在“不可培养”细菌的耐药研究方面具有局限性^[55]。泛基因组测序可以通过监测基础数据中的耐药基因,来实现耐药表型及其潜在耐药机制的初步预测。机器学习和数据挖掘技术可以很好地分析基因组监测产生的多样化和碎片化耐药数据集,在视觉任务、时间序列问题和高维度数据聚类的精准预测方面处于领先地位^[56-57]。WANG 等^[58]运用 K-mer 分析,结合机器学习方法对待测菌株的抗生素耐药情况进行预测,包括敏感、中度敏感和耐药分类,与实际耐药情况符合率达 80%。除了单一耐药性预测外,机器学习在多重耐药预测方面也表现突出。REN 等^[59]成功通过多标签分类方法模拟大肠杆菌的多重耐药情况,提高了致病菌耐药性识别的速度和准确性。泛基因组学提供了更加丰富多样的基因组数据,由此相较于传统的表型检测方法,基于泛基因组学研究的耐药监测具有广阔的发展前景。

3.3 基于泛基因组分析的耐药防控手段

3.3.1 多种分析方法联用

比较基因组学策略常被用于分析泛基因组研究获得的数据集,以识别致病菌基因组中潜在的耐药基因或抑制靶点^[60]。FU 等^[61]通过泛基因组学分析捕捉在副溶血性弧菌分离株抗性基因组岛中的基因水平转移情况,其中大部分与抗生素耐药性、毒力和新陈代谢适应性相关。

值得关注的是部分致病菌,如气单胞菌属,由于种间存在杂交重叠的情况,分类较为复杂。在传统的生理生化鉴定实验中多个菌株常被错误地分类,这为特定种耐药情况的深入研究造成不便。泛基因组学分析用于实现分离株的精确分型,同时也用于识别基因中的突变和微进化^[62]。AWAN 等^[63]通过构建核心基因组、泛基因组系统发育树,结合数字 DNA 杂交、多位点序列分型、平均核

苷酸一致性的方法进一步验证,排除 13 株非目标菌株,重新鉴定 49 株目标菌株。泛基因组研究可以更加细化细菌物种的种群结构,为定义物种边界以及耐药性进化轨迹提供新的见解^[64]。致病菌通常可以获得某些有利的基因,使自身能够适应快速变化的生态位,基因水平转移是一种重要的方式^[65]。同时,从不同环境生态位分离的同种致病菌株之间的遗传差异仍未得到清晰阐明。泛基因组分析结合 COG 分类研究,帮助明确不同环境来源致病菌的总体遗传相似性和差异性,包括耐药性和致病性,并在相关潜在生物标志物的发现方面具有应用潜力^[66]。

3.3.2 新型分析工具开发

基因组挖掘与分析工具的发展为复杂的耐药监测提供了有力支撑。HE 等^[67]开发了一种泛基因组学分析与耐药基因鉴定相结合的软件工具 PRAP,提供可视化结果,并以 26 株肠炎沙门氏菌为试验对象进行验证,证明了 PRAP 的有效性。VERAS 等^[68]提出了一种名为 Pan4Draft 的分析工具,可以实现公共数据库中大量非完整基因组的泛基因组学分析,且允许非完整基因组和完整基因组之间的比较分析。同时,CHAUDHARI 等^[69]开发出新泛基因组学分析平台——PanGFR-HM (<http://www.bioinfo.iicb.res.in/pangfr-hm/>),涵盖了 KEGG/COG 分析、系统发育分析、比较分析等多个种分析方法。此外,为解决庞大的基因组数据收集问题,基因组收集模型 SOPanG 可以实现 400 MB/s 的模式匹配速度^[70]。基于基础数据,包括抗性基因、可移动基因元件、生物合成基因簇等的发现有利于研究者们掌握更多信息,为致病菌研究提供帮助。

4 结论与展望

食源性致病菌引发的食源性疾病持续危害着人民的生命健康,发展更精准、高效的检测、防控方法是必要的。泛基因组学作为近十几年提出的新概念,深入研究菌种间的差异基因。相较于传统的生理生化鉴定实验,泛基因组测序具有广泛性、高效性、准确性的特点。结合生物信息分析方法及软件,泛基因组学从基因层面挖掘致病菌新靶点,监测毒力、耐药等功能基因在菌株间的转移,结合现有的菌株基因组数据库,有望实现跨地域乃至全球的食源性致病菌监测系统。

目前,针对食源性致病菌国内外已展开多项泛基因组学研究,但仍存在局限性。首先,分析结果依赖于实际可观察到的与耐药毒力表型相关的先验知识;其次,对于耐药机制相对复杂的菌株,往往需要更多的基础数据来保证结果的准确性。在未来,基于致病菌的泛基因组基础数据逐渐补充扩大,可开展以下几个方面的研究:(1)通过泛基因组分析软件,完善菌种内核心基因、附属基因和特殊基因的信息。(2)结合比较基因组学、系统发育树等分析方法,进行更精准的菌株溯源、差异分析。(3)合作搭建食源

性致病菌风险监测平台,实现食源性疾病风险预警。总体来看,全球性的、泛基因组的方法分析对于食源性致病菌的补充认识具有深远的现实意义。

参考文献

- [1] HAVELAAR AH, KIRK MD, TORGERSON PR, *et al.* World health organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010 [J]. *PLoS Med*, 2015, 12(12): e1001923.
- [2] CHEN Y, YAN W, ZHOU Y, *et al.* Burden of self-reported acute gastrointestinal illness in China: A population-based survey [J]. *BMC Public Health*, 2013, 13(1): 456.
- [3] ESTRADA AA, GOTTSCHALK M, RENDAHL A, *et al.* Proposed virulence-associated genes of *Streptococcus suis* isolates from the United States serve as predictors of pathogenicity [J]. *Porc Health Manag*, 2021, 7(1): 22.
- [4] CHEN Z, BAI J, ZHANG X, *et al.* Highly prevalent multidrug resistance and QRDR mutations in *Salmonella* isolated from chicken, pork and duck meat in Southern China, 2018-2019 [J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 340: 109055.
- [5] BALKIR P, KEMAHLIOGLU K, YUCEL U. Foodomics: A new approach in food quality and safety [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2020, 108(3): 49-57.
- [6] 刘云哲,王琳,张喜悦,等.下一代测序技术在食源性致微生物风险识别和溯源中的应用[J]. *中国动物检疫*, 2021, 38(10): 37-44.
LIU YZ, WANG L, ZHANG XY, *et al.* Application of next-generation sequencing in risk identification and traceability of foodborne pathogenic microorganisms [J]. *China Anim Health Inspect*, 2021, 38(10): 37-44.
- [7] BARAJAS HR, ROMERO MF, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ S, *et al.* Global genomic similarity and core genome sequence diversity of the *Streptococcus* genus as a toolkit to identify closely related bacterial species in complex environments [J]. *Peer J*, 2019, 6: e6233.
- [8] GOLICZ AA, BAYER PE, BHALLA PL, *et al.* Pangenomics comes of age: From bacteria to plant and animal applications [J]. *Trends Genet*, 2020, 36(2): 132-145.
- [9] MOORE WEC, STACKEBRANDT E, KANDLER O, *et al.* Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics [J]. *Int J Syst Evol Micr*, 1987, 37(4): 463-464.
- [10] TETTELIN H, MASIGNANI V, CIESLEWICZ MJ, *et al.* Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome" [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(39): 13950-13955.
- [11] IRANZADEH A, MULDER NJ. Bacterial pan-genomics [Z]. 2019.
- [12] ANANI H, ZGHEIB R, HASNI I, *et al.* Interest of bacterial pangenome analyses in clinical microbiology [J]. *Microb Pathog*, 2020, 149: 104275.
- [13] 赵永兵.泛基因组学分析方法开发及应用[D].北京:中国科学院北京基因组研究所,2014.
ZHANG YB. Development and application of pan-genomics analytical method [D]. Beijing: Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, 2014
- [14] LUAN NT, THI HHP. Chapter 8-pan-genomics of aquatic animal pathogens and its applications [Z]. 2020.
- [15] MAGUVU TE, BEZUIDENHOUT CC. Whole genome sequencing based

- taxonomic classification, and comparative genomic analysis of potentially human pathogenic *Enterobacter* spp. Isolated from chlorinated wastewater in the North West Province, South Africa [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1928.
- [16] HER HL, LIN PT, WU YW. PangenomeNet: A pan-genome-based network reveals functional modules on antimicrobial resistome for *Escherichia coli* strains [J]. *BMC Bioinf*, 2021, 22: 548.
- [17] FODDAI ACG, GRANT IR. Methods for detection of viable foodborne pathogens: Current state-of-art and future prospects [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2020, 104(10): 4281–4288.
- [18] LI AY, BAI RL, ZHAO ZY, *et al.* Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(6): BSR20181170.
- [19] ENG SK, PUSPARAJAH P, MUTALIB NSA, *et al.* *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance [J]. *Front Life Sci*, 2015, 8(3): 284–293.
- [20] 尚玉婷. 沙门氏菌全基因组数据库构建及其分子靶标挖掘与应用研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- SHANG YT. Construction of *Salmonella* whole genome database and its molecular targets mining and application research [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [21] LIU B, ZHOU XJ, ZHANG LD, *et al.* Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and Enteritidis [J]. *Food Control*, 2012, 27(1): 87–93.
- [22] ZHOU XJ, ZHANG LD, SHI CL, *et al.* Genome-scale screening and validation of targets for identification of *Salmonella enterica* and serovar prediction [J]. *J Food Protect*, 2016, 79(3): 376–383.
- [23] SHANG Y, YE Q, WU Q, *et al.* PCR identification of *Salmonella* serovars for the E serogroup based on novel specific targets obtained by pan-genome analysis [J]. *LWT*, 2021, 145: 110535.
- [24] KIM E, YANG S, WON J, *et al.* Real-time PCR method for the rapid detection and quantification of pathogenic *Staphylococcus* species based on novel molecular target genes [J]. *Foods*, 2021, 10(11): 2839.
- [25] LI F, YE Q, CHEN M, *et al.* Multiplex PCR for the identification of pathogenic *Listeria* in flammulina velutipes plant based on novel specific targets revealed by pan-genome analysis [J]. *Front Microbiol*, 2021, 11: 634255.
- [26] GANNAMANI R, VEEN SVD, EGMOND MV, *et al.* Challenges in clinicogenetic correlations: One gene-many phenotypes [J]. *Clinical Pract*, 2021, 8(3): 311–321.
- [27] SONG MH, BAI YL, XU J, *et al.* Genetic diversity and virulence potential of *Staphylococcus aureus* isolates from raw and processed food commodities in Shanghai [J]. *int J Food Microbiol*, 2015, 195(16): 1–8.
- [28] BRITO IL. Examining horizontal gene transfer in microbial communities [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(7): 442–453.
- [29] GOMEZ-SANZ E, HARO-MORENO JM, JENSEN SO, *et al.* The resistome and mobilome of multidrug-resistant *Staphylococcus sciuri* C2865 unveil a transferable trimethoprim resistance gene, designated *dfiE*, spread unnoticed [J]. *mSystems*, 2021, 6(4): e51121.
- [30] HALL BG, EHRLICH GD, HU FZ. Pan-genome analysis provides much higher strain typing resolution than multi-locus sequence typing [J]. *Microbiology*, 2010, 156: 1060–1068.
- [31] KUMAR R, BROMS JE, SJOSTEDT A. Exploring the diversity within the genus francisella-an integrated pan-genome and genome-mining approach [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1928.
- [32] LIU YY, CHEN CC, CHIOU CS. Construction of a pan-genome allele database of salmonella enterica serovar Enteritidis for molecular subtyping and disease cluster identification [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 2010.
- [33] CHEN WY, XIE YP, XU JY, *et al.* Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from the middle-east coastline of China [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 153(3): 402–412.
- [34] ZHAO L, CHEN H, DIDELOT X, *et al.* Co-existence of multiple distinct lineages in *Vibrio parahaemolyticus* serotype O4:K12 [J]. *Microb Genom*, 2020, 6(12): mgen000287.
- [35] WANG YY, JIA B, XU XB, *et al.* Comparative genomic analysis and characterization of two *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates from poultry with notably different survival abilities in egg whites [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2111.
- [36] FU SZ, YANG Q, SHENG YJ, *et al.* Metagenomics combined with comprehensive validation as a public health risk assessment tool for urban and agricultural run-off [J]. *Water Res*, 2021, 209: 117941.
- [37] HORIZAN V, NARDI MD, CRESCIO MI, *et al.* Maximising data to optimise animal disease early warning systems and risk assessment tools within Europe [J]. *Microbiol Risk Anal*, 2019, 13: 100072.
- [38] ZHOU XJ, XU L, XU XB, *et al.* Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from retail chicken products in Shanghai, China [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2018, 15(6): 346–352.
- [39] AMARASIRI M, FURUKAWA T, NAKAJIMA, F, *et al.* Pathogens and disease vectors/hosts monitoring in aquatic environments: Potential of using eDNA/eRNA based approach [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 796: 148810.
- [40] YANG YZ, HOU Y, MA M, *et al.* Potential pathogen communities in highly polluted river ecosystems: Geographical distribution and environmental influence [J]. *Ambio*, 2020, 49: 197–207.
- [41] CHANDRAN R, PUTHUKKICAL DR, SUMAN E, *et al.* Diphtheroids-important nosocomial pathogens [J]. *J Clin Diagn Res*, 2016, 10(12): 28–31.
- [42] NASIM F, DEY A, QURESHI IA. Comparative genome analysis of *Corynebacterium* species: The underestimated pathogens with high virulence potential [J]. *Infect Genet Evol*, 2021, 93: 104928.
- [43] BURGUEÑO-ROMAN A, CASTAÑEDA-RUELAS GM, PACHECO-ARJONA R, *et al.* Pathogenic potential of non-typhoidal *Salmonella* serovars isolated from aquatic environments in Mexico [J]. *Genes Genom*, 2019, 41(7): 767–779.
- [44] ESTRADA AA, GOTTSCHALK M, RENDAHL A, *et al.* Proposed virulence-associated genes of *Streptococcus suis* isolates from the United States serve as predictors of pathogenicity [J]. *Porcine Health Manag*, 2021, 7(1): 22.
- [45] 张焕军, 王席席, 李轶. 水体中抗生素污染现状及其对氮转化过程的影响研究进展[J]. *环境化学*, 2022, 41(4): 1168–1181.
- ZHANG HJ, WANG XX, LI Y. Progress in current pollution status of antibiotics and their influences on the nitrogen transformation in water [J]. *Environ Chem*, 2022, 41(4): 1168–1181.
- [46] 包樱钰, 李菲菲, 温东辉. 我国海水养殖业的抗生素污染现状[J]. *海洋环境科学*, 2021, 40(2): 294–302.

- BAO YY, LI FF, WEN DH. Antibiotic contamination in mariculture in China [J]. *Marine Environ Sci*, 2021, 40(2): 294–302.
- [47] GUO Y, XIAO X, ZHAO Y, *et al.* Antibiotic resistance genes in manure-amended paddy soils across eastern China: Occurrence and influencing factors [J]. *Front Environ Sci Eng*, 2021, 16(7): 91.
- [48] ARTEMYEVA O, NIKANOVA DA, KOLODINA E, *et al.* PSVIII-12 Estimations of treatment schemes efficiency of bacterial mastitis in dairy cow and antibiotic resistance of identified pathogens [J]. *J Anim Sci*, 2020, 98(S4): 256–257.
- [49] JUNIOR AES, VASCONCELOS PC, SARAIVA MMS, *et al.* Antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus* spp. contaminating raw goat milk [J]. *Vet World*, 2021, 14(5): 1074–1079.
- [50] CHA MH, KIM SH, KIN S, *et al.* Antimicrobial resistance profile of *acinetobacter* spp. isolates from retail meat samples under *campylobacter*-selective conditions [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2021, 31(5): 733–739.
- [51] TOMOHIRO Y, JUNJI M. Mutation frequency of *Escherichia coli* isolated from river water: Potential role in the development of antimicrobial resistance [J]. *Can J Microbiol*, 2021, 67(9): 651–656.
- [52] CHEN WY, FANG TZ, ZHOU XJ, *et al.* IncHI2 plasmids are predominant in antibiotic-resistant *Salmonella* isolates [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1566.
- [53] GRANT SS, HUNG DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response [J]. *Virulence*, 2013, 4(4): 273–283.
- [54] JENNIFER M. ANDREW S. Determination of minimum inhibitory concentrations [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48(S1): 5–16.
- [55] ONIA R, VARTOUKIAN RM, PALMER WG. Wade. Strategies for culture of “unculturable” bacteria [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 309(1): 1–7.
- [56] LI X, ZHANG Z, LIANG B, *et al.* A review: Antimicrobial resistance data mining models and prediction methods study for pathogenic bacteria [J]. *J Antibiot*, 2021, 74(12): 838–849.
- [57] NAIDENOV B, LIM A, WILLYERD K, *et al.* Pan-genomic and polymorphic driven prediction of antibiotic resistance in *Elizabethkingia* [J]. *Front Microbiol*, 2019. DOI: 10.1101/613877
- [58] WANG S, ZHAO C, YIN Y, *et al.* A practical approach for predicting antimicrobial phenotype resistance in *staphylococcus aureus* through machine learning analysis of genome data [J]. *Front Microbiol*, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.841289
- [59] REN Y, CHAKRABORTY T, DOJAD S, *et al.* Multi-label classification for multi-drug resistance prediction of *Escherichia coli* [J]. *Comput Struct Biotechnol*, 2022, 20: 1264–1270.
- [60] WILLIAMS AN, SOROUT N, CAMERON AJ, *et al.* The integration of genome mining, comparative genomics, and functional genetics for biosynthetic gene cluster identification [J]. *Front Genet*, 2020. DOI: 10.3389/fgene.2020.600116
- [61] FU S, WANG Q, WANG R, *et al.* Horizontal transfer of antibiotic resistance genes within the bacterial communities in aquacultural environment [J]. *Sci Total Environ*, 2022, 820: 153286.
- [62] BREUREC S, CRISCUOLO A, DIANCOURT L, *et al.* Genomic epidemiology and global diversity of the emerging bacterial pathogen *Elizabethkingia anopheles* [J]. *Sci Rep-UK*, 2016, 6(1): 30379.
- [63] AWAN F, DONG Y, LIU J, *et al.* Comparative genome analysis provides deep insights into *Aeromonas hydrophila* taxonomy and virulence-related factors [J]. *BMC Genom*, 2018. DOI: 10.1186/s12864-018-5100-4
- [64] FRESCHI L, VINCENT AT, JEUKENS J, *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity [J]. *Genome Biol Evol*, 2019, 11(1): 109–120.
- [65] YANG Z, LUO H, ZHANG Y, *et al.* Pan-genomic analysis provides novel insights into the association of *E. coli* with human host and its minimal genome [J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(12): 1987–1991.
- [66] LIN S, SUN B, SHI X, *et al.* Comparative genomic and pan-genomic characterization of *Staphylococcus epidermidis* from different sources unveils the molecular basis and potential biomarkers of pathogenic strains [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 770191.
- [67] HE Y, ZHOU X, CHEN Z, *et al.* PRAP: Pan resistome analysis pipeline [J]. *BMC Bioinformatics*, 2020. DOI: 10.1186/s12859-019-3335-y
- [68] VERAS A, ARAUJO F, PINHEIRO K, *et al.* Pan4Draft: A computational tool to improve the accuracy of pan-genomic analysis using draft genomes [J]. *Sci Rep-UK*, 2018, 8(1): 9670.
- [69] CHAUDHARI NM, GAUTAM A, GUPTA VK, *et al.* PanGFR-HM: A dynamic web resource for pan-genomic and functional profiling of human microbiome with comparative features [J]. *Front Microbiol*, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02322.
- [70] CISŁAK A, GRABOWSKI S, HOLUB J. SOPanG: Online text searching over a pan-genome [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(12): 4290–4292.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介



黎梓怡, 硕士研究生, 主要研究方向为食源性致病菌防控研究。

E-mail: Liziyi_0091@sjtu.edu.cn



施春雷, 研究员, 主要研究方向为食源性致病菌快速检测分型与风险评估、食源性致病菌菌膜形成分子机制、食源性致病菌耐药形成传播机制。

E-mail: clshi@sjtu.edu.cn