

北京地区肉类中沙门氏菌全基因组分型 及耐药分析

畅晓晖¹, 张捷¹, 亓合媛², 石嵩¹, 杨向莹¹, 杨磊³, 赵琢^{3*}, 李小林¹,
史文聿², 孙清岚², 马俊才², 陈广全¹

(1. 北京海关技术中心, 北京 100026; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101;
3. 天津海关工业产品安全技术中心, 天津 300000)

摘要: 目的 对我国北京地区肉类产品中沙门氏菌进行分离鉴定, 基于全基因组测序结果, 分析其耐药基因分布情况及亲缘关系。**方法** 以 38 株沙门氏菌为研究对象, 对不同来源的沙门氏菌进行全基因组分析, 然后通过测定菌株对 15 种抗生素的最小抑菌浓度, 结合全基因组测序结果分析不同来源的沙门氏菌的耐药特性及多重耐药状况。**结果** 对 38 株沙门氏菌进行 15 种抗生素耐药性检测, 其中 34.2% 为多重耐药株, 68.4% 的沙门氏菌对喹诺酮萘啶酸耐药, 42.1% 分离株对氨苄西林耐药。基于全基因组测序结果, 对 38 株沙门氏菌进行分型为 12 种型别, 其中 88.2% 的肠炎沙门氏菌与标准菌株 ATCC9184 亲缘关系较近。**结论** 全基因组耐药基因和毒力基因与耐药表型有一定的关联, 为监控北京地区的沙门氏菌耐药基因和毒力基因的传播方式提供理论基础。

关键词: 沙门氏菌; 全基因组测序; 耐药基因; 耐药表型

Genotyping and drug resistance analysis of *Salmonella* in meat in Beijing

CHANG Xiao-Hui¹, ZHANG Jie¹, QI He-Yuan², SHI Song¹, YANG Xiang-Ying¹, YANG Lei³,
ZHAO Zhuo^{3*}, LI Xiao-Lin¹, SHI Wen-Yu², SUN Qing-Lan², MA Jun-Cai², CHEN Guang-Quan¹

(1. Technical center of Beijing Customs District People's Republic of China, Beijing 100026, China; 2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. Tianjin Customs Industrial Product Safety Technology Center, Tianjin 300000, China)

ABSTRACT: Objective To isolate and identify *Salmonella* in meat products in Beijing, China. Based on the results of genome-wide sequencing, the distribution of drug resistance genes and genetic relationship were analyzed. **Methods** We used 38 strains of *Salmonella* to study genome-wide analysis of *Salmonella* from different sources. Then, by measuring the minimum inhibitory concentration of the strains against 15 antibiotics, combined with the results of genome-wide sequencing, the drug resistance characteristics and multidrug resistance of *Salmonella* from different sources were analyzed. **Results** Thirty eight *Salmonella* strains were tested for resistance to 15 antibiotic, of which 34.2% were multidrug resistant strains, 68.4% of which were resistant to quinolone nalidixic acid, and

基金项目: 国家重点研发计划重点专项(2018YFC1603800)、海关总署科技计划项目(2017IK157)

Fund: Supported by the National Key R&D Program of China (2018YFC1603800), Science and Technology Project of General Administration of Customs (2017IK157)

*通讯作者: 赵琢, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。Email: zhaozhuo@customs.gov.cn

*Corresponding author: ZHAO Zhuo, Professor, Tianjin Customs Industrial Product Safety Technology Center, Tianjin 300042, China. Email: zhaozhuo@customs.gov.cn

42.1% of isolates were resistant to ampicillin. Based on the results of genome-wide sequencing, 38 strains of *Salmonella* were classified into 12 types, 88.2% of which were closely related to the standard strain ATCC9184.

Conclusion The genome-wide resistance genes and virulence genes are related to the drug resistance phenotype, which provides a theoretical basis for monitoring the transmission of *Salmonella* resistance genes and virulence genes in Beijing.

KEY WORDS: *Salmonella*; genome-wide sequencing; drug resistance gene; drug resistance phenotype

1 引言

沙门氏菌是一类常见的食源性致病菌,目前国际上已经发现约 3500 个血清型,我国约有 200 多种,是许多国家发生食源性细菌肠炎的主要原因之一^[1]。美国疾控中心发现沙门氏菌是美国最致命的食源性致病菌。近年来,人类临床综合症多由沙门氏菌引起,可分为伤寒沙门菌、非伤寒沙门菌(*Nontyphoidal Salmonella*, NTS)。NTS 主要引起胃肠炎,但也可造成肠道外感染^[2]。NTS 包括很多种血清型,2014 年 Leekitcharoenphon 等^[3]研究发现肠道沙门氏菌是导致轻微或大型食物爆发的常见原因。与其他常规流行病学分型工具相比,全基因组测序 (genome-wide sequencing, WGS) 表现出极大优越性,甚至可以实现实时监测和识别爆发。全基因组测序以特异性基因的差异来表征菌株之间的差异。

全基因组测序可以对暴发的菌株进行高分辨率跟踪,对未知基因组序列的物种进行个体基因组测序。即确定其碱基顺序,通过生物信息学技术对序列特征进行分析,以在全基因组水平探究物种的进化规律和筛选功能基因。2018 年,与家禽养殖及禽类产品有关的沙门氏菌感染事件在全球持续发生。美国疾病控制和预防中心 (centers for disease control, CDC) 数据显示,近年来每年沙门氏菌在全美引起约 120 万人患病。目前国内有报道显示肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌在人类沙门菌感染病例数达 75% 以上。因此,监测沙门氏菌耐药性、研究其耐药形成主要机制,对沙门氏菌的预防和控制具有重要意义。沙门氏菌耐药性一般分为天然耐药性和获得性耐药。天然耐药是细菌的固有特性和赖以生存的基本条件;获得性耐药主要是由于长期药物使用而逐渐形成,主要由可以转移的 DNA (转座子或者质粒) 介导,可以水平传播。本研究通过对 38 株沙门氏菌进行全基因组测序分析,比较了这些沙门氏菌菌株携带的耐药基因,通过软件计算其相似度和遗传距离,以期进一步揭示菌株间的亲缘关系和基因传播方式。

2 材料和方法

2.1 样品来源

根据 GB 4789.4-2016 样品的采样规则^[4],2017 年 4 月

~6 月对北京地区进行采样,共采集 285 份样品。在技术中心实验室进行分离鉴定并保存菌株。2 株参考菌株标准菌株为肠炎沙门氏菌 ATCC9184、伤寒沙门氏菌 ATCC50071 (美国 ATCC 菌种保藏中心)

2.2 培养基和试剂

四硫磺酸钠煌绿 (tetrathionate broth base, TTB) 增菌液、亚硒酸盐胱氨酸 (selenite cystine, SC) 增菌液、木糖赖氨酸脱氧胆盐 (xylose lysine desoxycholate agar, XLD) 琼脂 (英国 Oxoid) (Thermofisher Scientific)、显色培养基 (法国科马嘉公司); DNA 提取试剂盒 (TaKaRa 公司); 革兰阴性需氧菌药敏检测板 (上海星佰生物技术有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 沙门氏菌的鉴定

从营养琼脂平板上挑取可疑菌落,用生理盐水制成菌悬液,采用全自动微生物鉴定系统 VITEK 进行鉴定。

2.3.2 DNA 含量检测

按照 DNA 提取试剂盒的提取步骤,把 40 个样品提取好的 DNA 放在冰上融化后,吹打混匀离心待检测。采用琼脂糖凝胶电泳 (胶浓度 1%; 电压 150 V, 电泳时间 40 min) 检测样品的完整性,用于构建 DNA 文库。

2.3.3 全基因组测序、组装、预测、分型

测序: 用 1.3 检测合格的样品构建文库^[5,6]; 细菌基因组 de novo 测序,对 illumina 测序平台的数据进行低质量过滤,从而获得高质量的有效数据 (Clean Data) 进行后续分析。

组装: 基于测序平台获得的有效数据,有效数据 Clean Data 的组装使用 SOAP denovo 软件,经过多次调整获得最优组装结果。

预测: 蛋白编码基因使用 Prokka 软件进行基因预测。

分型: (1) 将原始测序数据拼接组装,获得 draft 基因组序列; (2) 构建沙门氏菌 wgMLST 所有基因数据库以及 reference 基因参考库; (3) 利用参考基因序列对 draft 基因组序列进行分型分析和聚类分析; (4) 将所有样本的基因组序列与沙门氏菌参考菌株基因组序列进行比对分析,获得 SNP。 (5) 比较核心基因的 SNP 差异。

2.3.4 耐药性分析

耐药性分析采用革兰阴性需氧菌药敏检测板。根据美国临床实验室标准协会 (clinical and laboratory standards institute, CLSI) 推荐文件,实验选择 15 种抗生素进行实验,

氨基西林、头孢他啶、氨基舒、亚胺培南、四环素、萘啶酸、红霉素、头孢西丁、氯霉素、头孢噻肟、头孢唑林、庆大霉素、复方磺胺、阿奇霉素、环丙沙星。药敏板读数采用微生物鉴定药敏分析系统或肉眼进行判读。

2.3.5 耐药基因分析

基于 38 株沙门氏菌的全基因组测序结果, 耐药基因分析使用抗性基因数据库 (comprehensive antibiotic research database, CARD) 分析。包括氨基糖苷类、 β -Lactam 内酰胺类、四环素类、氯霉素类、大环内酯类、喹诺酮类等耐药基因。

2.3.6 进化树分析

基于全基因组序列构建系统进化树。系统发生树 (phylogenetic tree) 是表明被认为具有共同祖先的各物种相互间演化关系的树。用来表示系统发生研究的结果, 描述物种之间的进化关系。基于 SNP 结果进行进化分析并构建 ML tree。用 MEGA7.0 软件制作系统进化树。

3 结果与分析

3.1 北京地区肉类中沙门氏菌污染情况调查

按照国标 GB4789.4-2016 对 2017 年 4 月到 6 月北京地区采集的 285 份样品进行检测, 共检出阳性样品 38 份, 分别来自鸡源、鸭源和猪源, 平均污染率为 13.3%(13/285)。阳性菌株中鸡源占 65.8%, 鸭源占 28.9%, 猪源占 5.3%。

3.2 DNA 完整性检测

琼脂糖凝胶电泳图谱以 33 号-40 号样品为例。见图 1。

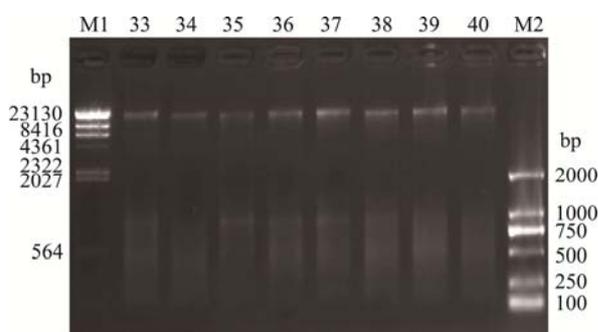


图 1 琼脂糖凝胶电泳图谱检测 DNA
Fig.1 Detection of DNA by agarose gel electrophoresis

40 株样品 DNA 完整性使用琼脂糖凝胶电泳法检测, 采用 DNA Marker(M1 为 λ -Hind III digest DNA Marker(TaKaRa); M2 为商用 Marker: DL2000)作对照, 确定样品的相对分子量。DNA 如果降解或者混有其他杂质如蛋白质、RNA, 在电泳中可以检测的到。如果样品有 RNA 和蛋白质污染, 文库构建前需要 RNaseA 处理。该检测结果 DNA 样品均是单条带, 所有检测条带均位于 23000 bp 左右, 虽有轻微降解, 但不影响构建 DNA 文库。因此, 所有

DNA 样品均合格满足建库测序要求, 可用于构建 DNA 文库。

3.3 全基因组测序分析结果

本研究中, 全基因组测序使用第二代高通量测序技术, 采用 Illumina 测序平台。原始数据经过去除 adapter 污染、去除 duplication 污染等处理后, 菌株的测序 Reads 读长为 150:150 bp, 测序的平均深度为 100 X, 即基因组上的每个位点都有 100 条 reads 支持。

基于全基因组测序结果, 采用 Prokka 软件进行基因预测, 38 株沙门氏菌共获得 12 个基因型(图 3)。全基因组测序分型以肠炎沙门氏菌为优势型, 有 17 株, 占有菌株的 44.73%; 其次是鼠伤寒沙门氏菌, 共 14 株, 丰度达 36.84%(如表 1 所示)。

表 1 38 株沙门氏菌全基因组分型结果
Table 1 38 strains of *Salmonella* genome-wide sequencing typing results

全基因组分型	菌株总数	丰度	菌株来源
肠炎沙门氏菌	17	44.73%	鸡源、鸭源
鼠伤寒沙门氏菌	14	36.84%	鸭源、猪源
德尔卑沙门氏菌	1	2.63%	猪源
肯塔基沙门氏菌	1	2.63%	鸭源
鸭沙门氏菌	1	2.63%	鸭源
胥伐成格隆沙门氏菌	2	5.26%	鸡源
Milwaukee 沙门菌	1	2.63%	鸡源
汤卜逊沙门氏菌	1	2.63%	鸡源

3.4 进化树分析

采用全基因组测序 gMLST 分型方法对 38 株沙门氏菌分离株进行遗传多样性分析, 其中将所有样本的基因组序列与沙门氏菌参考菌株基因组序列进行比对分析, 获得 SNP 即 3005 个基因为核心基因, 共聚成 8 种类别, 如图 2 所示。

由沙门氏菌最小进化树圈图可以看出 16 株沙门氏菌与 ATCC 9184 肠炎沙门氏菌亲缘关系较近, 其中 88.24% 的菌株基因型为肠炎沙门氏菌 EC 2010034。2, 27 菌株聚在一起, 均为胥伐成格隆沙门氏菌。其中肠炎沙门氏菌包括 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* str. EC20100134 (taxid 1412465)、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* (taxid 149539)、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* str. EC20120734 (taxid 1412609) 3 种基因型。鼠伤寒沙门氏菌包括 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. USDA-ARS-USMARC-1810 (taxid 1454647)、*Salmonella*

enterica subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (taxid 90371)、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. T000240 (taxid 718274) 3 种基因型。通过比较发现, 全基因组 gMLST 分型获得的基因型较 MLST 分型更为准确。

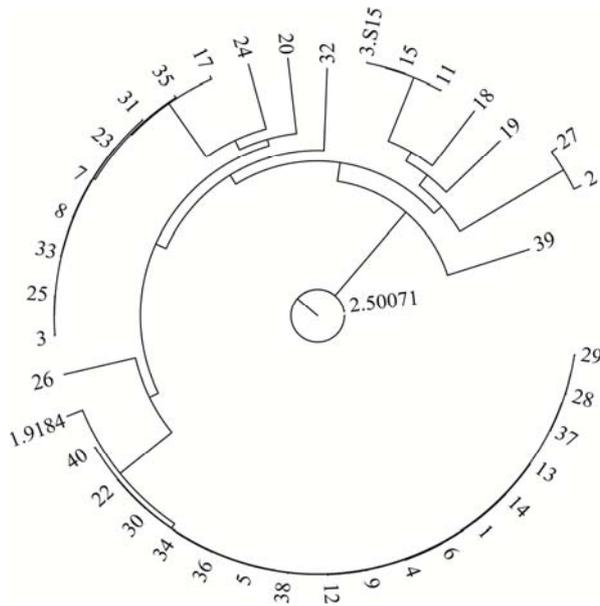


图 2 38 株沙门氏菌最小进化树圈图

Fig.2 38 strains of *Salmonella* minimal evolution circle tree

3.5 沙门氏菌耐药性分析

选取氨基糖苷类、氯霉素类、 β -内酰胺类、大环内酯

类对 38 株分离株进行药敏检测, 其中 13 株对 3 种及 3 种以上抗生素表现出多重耐药(见表 2)。使用抗生素氨苄西林和萘啶酸, 17 株肠炎沙门氏菌产生的耐药性高达 75%和 93.8%; 萘啶酸对于鸡源鼠伤寒沙门氏菌的耐药性甚至达 100%。仅一株鸭源的鼠伤寒沙门氏菌对氨苄西林产生耐药性; 猪源的鼠伤寒沙门氏菌仅对四环素产生耐药性。其中 1 株胥伐成格隆沙门氏菌, 耐药情况很严重, 对 10 种抗生素均产生耐药性。

对 38 株沙门氏菌进行 15 种抗生素耐药性检测, 其中 34.2%为多重耐药株, 68.4%的沙门氏菌对喹诺酮萘啶酸耐药, 42.1%分离株对氨苄西林耐药。肠炎沙门氏菌中 47.1%分离株对 3 种及 3 种以上抗生素耐药, 21.4%鼠伤寒沙门氏菌对 3 种及 3 种以上抗生素耐药(如表 3 所示)。

3.6 耐药基因分析

对 38 株沙门氏菌耐药基因分析见表 4。

通过耐药基因分析发现 38 株沙门氏菌中均携带有 *aaC(6)*、*pbp*、*Acr(A)*、*Acr(B)*、*tet(B)*、*AcrEF*、*EmrAB*、*NorR* 基因。其中 18 株分离菌携带氨基糖苷类 *aacC(3')* 基因, 阳性率为 47.37%; 38 株沙门氏菌有 15 株携带 β -Lactam 内酰胺类 *bla-tem* 耐药基因, 阳性率为 42.1%; 3 株携带 *bla-CTX-M-1*, 阳性率 7.9%; 3 株携带 *bla-oxa-1*, 阳性率 7.9%; 氨基糖苷类 *aacC(3')*、*aaC(6)* 耐药基因主要分布于肠炎沙门氏菌, 分别占 66.7%、和 44.7%; 17 株肠炎沙门氏菌, 其中 9 株携带 β -Lactam 内酰胺类 *Bla_{TEM}* 耐药基因, 高达 56.3%。氯霉素类 *cat* 耐药基因也主要分布于肠炎沙门氏菌 (63.6%, 14/22)。

表 2 38 株沙门菌株名称及耐药表型

Table 2 38 strains of *Salmonella* and resistant phenotypes

菌株名称	耐药谱
1 肠炎沙门菌	不耐药
2 胥伐成格隆沙门菌	CFZ
3 鼠伤寒沙门菌	NAL
4 肠炎沙门菌	AMP-NAL-CFZ
5 肠炎沙门菌	AMP-NAL
6 肠炎沙门菌	AMP-NAL-CFZ
7 鼠伤寒沙门菌	NAL
8 鼠伤寒沙门菌	NAL
9 肠炎沙门菌	NAL
11 肠炎沙门菌	TET-SXT
12 鼠伤寒沙门菌	AMP-NAL

续表 2

菌株名称	耐药谱
13 肠炎沙门菌	AMP-NAL
14 肠炎沙门菌	AMP-NAL-CFZ
15 鼠伤寒沙门菌	AMP-AMS-TET-SXT
3.S15 鼠伤寒沙门菌	AMP-AMS-TET-SXT
17 鼠伤寒沙门菌	TET
18 肯塔基沙门菌	No
19 德尔卑沙门菌	TET-SXT
20 肠炎沙门菌	TET-CHL-SXT
22 肠炎沙门菌	NAL
23 鼠伤寒沙门菌	NAL
24 汤卜逊沙门菌	AMP-AMS-CFX-CTX-CFZ-SXT
25 鼠伤寒沙门菌	NAL
26 鸭沙门菌	TET-NAL
27 胥伐成格隆沙门菌	AMP-AMS-TET-NAL-CHL-CTX-CFZ-GEN-SXT-CIP
28 肠炎沙门菌	AMP-AMS-NAL-CFZ
29 肠炎沙门菌	AMP-NAL
30 肠炎沙门菌	NAL
31 鼠伤寒沙门菌	AMP-NAL
32 Milwaukee 密尔沃基沙门菌	AMP-NAL
33 鼠伤寒沙门菌	NAL
34 肠炎沙门菌	AMP-AMS-TET-NAL-CFZ
35 鼠伤寒沙门菌	NAL
36 肠炎沙门菌	AMP-AMS-TET-NAL-CFZ
37 肠炎沙门菌	AMP-NAL
38 鼠伤寒沙门菌	AMP-NAL
39 鼠伤寒沙门菌	AMP-TET-NAL-CHL-CTX-CFZ-SXT-CIP
40 肠炎沙门菌	AMP-NAL-CHL-CTX-CFZ-SXT-CIP

表 3 沙门氏菌多重耐药情况统计表
Table 3 *Salmonella* multi-drug resistance statistics

菌株名称	多重耐药菌株编号	丰度
肠炎沙门氏菌	4、6、14、20、28、34、36、40	47.1%
鼠伤寒沙门氏菌	15、16、39	21.4%
汤卜逊沙门氏菌	24	100%
胥伐成格隆沙门氏菌	27	50%

表4 38株沙门氏菌耐药基因分析
Table 4 Analysis of 38 strains of *Salmonella* resistance genes

耐药种类	耐药基因	肠炎沙门菌 (n=17)	鼠伤寒沙门菌 (n=14)	胥伐成格隆沙门菌 (n=2)	青塔基沙门菌 (n=1)	德尔卑沙门菌 (n=1)	汤卜逊沙门菌 (n=1)	鸭沙门菌 (n=1)	Milwaukee 密尔沃基沙门菌 (n=1)	总计
氨基糖苷类	<i>aacC(3)</i>	12(66.7%)	6(33.3%)	0	0	0	0	0	0	18
	<i>aacC(6)</i>	17(44.7%)	14(36.8%)	2(5.3%)	1	1	1	1	1	38
	<i>aadA1</i>	17(48.6%)	14(40%)	1	1	1	0	0	0	35
β-Lactam 内酰胺类	<i>pbp</i>	17(44.7%)	14(36.8%)	1	1	1	1	1	1	38
	<i>bla_{TEM}</i>	9(56.3%)	5(31.3%)	1	0	0	1	0	0	16
	<i>bla_{CTX-M-1}</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	2
四环素类	<i>bla_{Bln-1}</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	<i>bla_{cat-1}</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	3
	<i>cat</i>	14(63.6%)	6(27.3%)	2	0	0	1	0	0	22
氯霉素类	<i>Acr(A)</i>	17(44.7%)	14(36.8%)	2	1	1	1	1	1	38
	<i>Acr(B)</i>	17(44.7%)	14(36.8%)	2	1	1	1	1	1	38
	<i>CmlA1</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	2
大环内酯类	<i>tet(B)</i>	17(44.7%)	14(36.8%)	2	1	1	1	1	1	38
	<i>tet(C)</i>	16(43.2%)	14(37.8%)	2	1	1	1	1	1	37
	<i>MacA/MacB</i>	17(45.9%)	13(35.1%)	2	1	1	1	1	1	37
其他外排基因	<i>OqxBI5</i>	17(45.9%)	13(35.1%)	2	1	1	1	1	1	37
	<i>OqxBI3</i>	1(33.3%)	1(33.3%)	1(33.3%)	0	0	0	0	0	3
	<i>OqxBI9</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1
喹诺酮	<i>OqxBI7</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	<i>AcrEF</i>	17(44.7%)	14(36.8%)	2	1	1	1	1	1	38
	<i>EmrAB</i>	17(44.7%)	14(36.8%)	2	1	1	1	1	1	38
磺胺类	<i>NorR</i>	17(44.7%)	14(36.8%)	2	1	1	1	1	1	38
	<i>NorB</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	<i>Sul2</i>	3	3	2	1	1	1	0	0	10
	<i>Sul3</i>	3	3	2	1	1	1	0	0	10

全基因组耐药基因分析表明 *AadA1*、*bla_{CTX-M-1}*、*bla_{Toho-1}*、*CmlA1* 是胥伐成格隆沙门菌特有的耐药基因,与其多重耐药性有关,同时它携带 *aac(6)*、*pbp*、*tet(B)*、*tet(C)*、*Bla_{TEM}*、*Sul2*、*Sul3*, 这些耐药基因分别与 β -内酰胺类药物、喹诺酮类药物、氨基糖苷类药物和四环素类药物的耐药性形成有关。该胥伐成格隆沙门菌分别对氨苄西林、舒巴坦、四环素类、 β -内酰胺类、喹诺酮、氯霉素类、头孢西丁、头孢唑林、磺胺、环丙沙星 10 种抗生素耐药。因此我们推测全基因组基因分析与耐药表型具有一定的关联性。

其他外排基因 *OqxB9* 是汤卜逊沙门菌特有的外排基因,可能与其多重耐药性有关,同时它携带 *aac(6)*、*pbp*、*Bla_{TEM}*、*Sul2*、*Sul3*、*cat* 等耐药性基因,对氨苄西林、舒巴坦、头孢噻肟、头孢西丁、头孢唑林、磺胺 6 种抗生素耐药与耐药基因分析结果相一致。与全基因组分型相比,耐药表型分布较为分散,多重耐药菌株聚类于肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌、胥伐成格隆沙门菌、汤卜逊沙门菌。

综上,结果表明全基因组耐药基因分析结果与耐药表型相关,其中 β -Lactamase 耐药基因与其耐药表型的相关性较高。 β -Lactamase 内酰胺酶基因和氨基糖苷类耐药基因多数存在于基因岛 SGI, 可以导致耐药基因在不同种属之间传播^[6]。肠炎沙门菌主要携带 *bla_{TEM}* 耐药基因,而胥伐成格隆沙门菌同时携带 *bla_{CTX-M-1}*、*bla_{Toho-1}*、*bla_{oxa-1}*, 它们都编码 β -内酰胺酶,可使 β -Lactamase 内酰胺酶类开环灭活,导致多重耐药的产生。与表型结果类似,不同血清型携带的耐药基因不同,可能由于不同菌株的耐药压力不同,而导致耐药基因的产生及传播方式不同。

4 讨论与结论

本次研究中,2017 年 4 月至 6 月调查北京地区肉类中沙门氏菌的污染分布情况,污染率达 13.3%。近年来国内外由沙门氏菌导致人体感染并爆发感染病例逐年上升,因此进一步加强监控食品显得尤为重要。

在北京地区,我们调查发现分离的阳性菌株中肠炎沙门菌大多属于鸡源,鼠伤寒沙门菌大多属于鸭源,德尔卑沙门菌主要来源于猪。研究结果与国内外一些报告相似。全基因组测序分型在流行病学分子溯源中表明,相同的分型表明来源于同一始祖菌。全基因组分型结果表明,88.2%的肠炎沙门菌与标准菌株 ATCC9184 亲缘关系较近,可能来源于同一始祖菌。38 株沙门菌中,不同来源的沙门菌中优势菌株为鼠伤寒沙门菌和肠炎沙门菌。它们是急性肠胃炎的主要病原菌之一^[7],其宿主范围十分广泛,监管部门应加强对这两类沙门菌的控制,降低其污染程度。

研究表明沙门菌的耐药表型、致病性都与毒力基因相关。全基因组测序已经鉴定出多个毒力基因,包括菌毛

粘附因子、调节因子、毒力岛、质粒上的毒性基因、毒素等^[8,9]。

在沙门菌感染最初阶段是由毒力岛 SPI-1 控制的,可使病原菌入侵肠上皮细胞,引发炎症反应。一旦病原菌进入宿主巨噬细胞并在细胞内扩散增殖,毒力岛 SPI-2 上的相应基因可以表达。SPI-2III型分泌系统编码 *sseL*, 可阻止宿主细胞中的免疫细胞迁移,减弱宿主清除细菌的能力,从而使细菌在体内持续慢性感染^[10-12]。SPI-3 和 SPI-4 对沙门菌在膜性结构内存活和黏附在极化细胞的表面发挥重要作用。SPI-3 编码 10 个开放式阅读框,其中 *mgtC* 与宿主的吞噬细胞的毒力相关^[13]。SPI-5 为 SPI-1 和 SPI-2 分泌效应蛋白。*SopB* 位于 SPI-5,至感染后期,*SopB* 控制 SCV 的运输,抑制其被溶酶体水解^[14]。侵袭基因和菌毛粘附决定子类毒性因子等在沙门氏菌中普遍存在。

除了染色体上的毒力基因,毒力质粒上的代表基因主要是 *spvB* 和 *pefA*, 对沙门菌的致病力也很重要^[15]。沙门氏菌质粒编码的毒力基因 (*Salmonella plasmid virulence, Spv*) 主要含有 5 个相关基因 *spvA*、*spvB*、*spvC*、*spvD*、*spvR*, 它们促进宿主细胞中沙门氏菌的存活和快速生长。*SpvB* 表达依赖于 *SpvR*, 它是 *LysR* 转录激活因子家族的成员。*SpvA* 是操纵子的负调节物。*spvB* 编码 ADP-核糖基化毒素,导致其肌动蛋白被直接修饰,细胞骨架被完全破坏^[16-19]。*pefA* 与沙门氏菌的菌毛形成有关。其可促进细菌吸附与肠上皮细胞上。*prot6E* 一般位于肠炎沙门氏菌质粒中。

本次调查中,38 株沙门氏菌最常见的抗性基因属于青霉素(青霉素结合蛋白 *pbp* 基因),氨基糖苷类 *aac(6)*, 氯霉素类 *Acr(A)* 和 *Acr(B)*, 四环素类 *tet(A)* 和 *tet(B)* 抗性相关的基因组。国外研究表明动物体分离的沙门氏菌中,最常见的 β -内酰胺酶基因是 *Bla_{TEM-1}* 和 *bla_{PSE-1}* 编码对氨苄青霉素的抗性^[20,21]。目前全球已检测到其他 β -内酰胺酶,包括 *bla_{TEM}*、*bla_{CTX-M}*、*bla_{IMP}*、*bla_{VIM}*、*bla_{KPC}*、*bla_{SHV}* 和 *bla_{OXA}*, 这些基因的变异可编码超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)或碳青霉烯酶活性^[22]。本研究发现 1 株胥伐成格隆沙门菌同时携带 *bla_{CTX-M-1}*、*bla_{Toho-1}*、*bla_{oxa-1}*、*bla_{TEM}*, 推测其编码超广谱 β -内酰胺酶,从而导致多重耐药表型的产生。

胥伐成格隆沙门菌在国内较少出现,仅在台湾地区出现为主要流行的血清型之一^[23,24]。台湾有关研究显示鸡肉、鸡内脏、零售鸡肉以及屠宰场和屠宰用具中胥伐成格隆沙门菌的发现率越来越高。此次胥伐成格隆沙门菌均从鸡大胸中分离产生,来源物种与台湾地区保持一致。其中一株为多重耐药株,耐药情况十分严重。除了对青霉素类和头孢菌素类耐药外,对喹诺酮类药物出现严重的耐药情况。如环丙沙星,兽医在临床上已经大量使用该药物,推测是导致抗生素耐药性不断增强从而导致多重耐药菌株出现的重要因素。抗生素滥用导致细菌选择压力增大,进而导致超级耐药菌的出现,需引起相关部门高度重视,规范抗生素的使用范

围, 避免其多重耐药菌株的产生迫在眉睫。

本研究分离的沙门氏菌对氨苄西林、喹诺酮表现出高耐药率。2010 年王宇等^[25]发现上海市疾控分离的汤卜逊沙门菌对四环素、奥格西丁、氨苄西林、氯霉素、萘啶酸、磺胺异恶唑 6 种抗生素耐药。本次调查发现 1 株汤卜逊沙门菌对氨苄西林、舒巴坦、头孢西丁、头孢噻肟、头孢唑林、磺胺 6 种抗生素耐药。某种程度上几乎超过了超级细菌 DT104 鼠伤寒沙门氏菌的耐药性。分析原因可能是国内外畜禽等养殖者对抗生素的滥用导致某些沙门氏菌型为适应生态环境而改变, 从而获得耐药基因的改造。这种突变的菌株是否可以形成稳定的克隆株急需网络化监控体系 China PulseNet 进行系统深入的研究。

综上所述, 通过调查研究北京地区肉类中沙门氏菌的污染状况, 本研究基于全基因组测序结果分析其耐药性, 发现耐药基因分析结果与耐药表型相关, 其中 β -Lactamase 耐药基因与其耐药表型的相关性较高, 为监控北京地区的沙门氏菌耐药基因的传播方式提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] Vieira A, Jensen AR, Pires SM, et al. WHO global foodborne infections network country databank—a resource to link human and non-human sources of *Salmonella* [J]. Int Soc Vet Epidemiol Econ, 2009, 643: 512–517.
- [2] 崔志刚, 王爱敏, 王鸣柳, 等. 婴幼儿腹泻感染的非伤寒沙门菌分子分型及耐药情况研究[J]. 疾病监测, 2014, 29(6): 428–431.
Cui ZG, Wang AM, Wang ML, et al. Molecular subtyping and antibiotic resistance of non-Typhi *Salmonella* isolated from infants [J]. Isease Surveillance, 2014, 29(6): 428–431.
- [3] Leekitcharoenphon P, Nielsen EM, Kaas RS, et al. Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica* [J]. PLoS ONE, 2014, 9(2): e87991.
- [4] GB 4789. 4–2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB 4789. 4–2016 National food safety standard-Food microbiological testing--*Salmonella* testing [S].
- [5] 黄应希, 周飞全. 31 例散发婴幼儿沙门氏菌肠炎临床分析及耐药监测. 赣南医学院学报, 2014, 34(2): 271–272.
Huang YX, Zhou FQ. Clinical analysis and drug resistance surveillance of 31 cases of *Salmonella typhoid enteritis* in infant rats [J]. J Gannan Med Coll, 2014, 34(2): 271–272.
- [6] 韩美玉, 张金茹, 郝丽丽, 等. 规模化猪场沙门氏菌分离鉴定及耐药性分析[J]. 贵州畜牧兽医, 2013, 37(2): 10–12.
Han MY, Zhang JR, Hao LL, et al. Isolation and identification of *Salmonella* in large-scale pig farms and analysis of drug resistance [J]. Guizhou Animal Husbandry Vet Med, 2013, 37(2): 10–12.
- [7] Majowicz SE, Musto J, Scallan E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis [J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(6): 882–889.
- [8] Niemann GS, Brown RN, Gustin JK, et al. Discovery of novel secreted virulence factors from *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by proteomic analysis of culture supernatants [J]. Infect Immun, 2011, 79(1): 33–43.
- [9] Lopez-Garrido J, Casadesus J. Crosstalk between Virulence Loci: Regulation of *Salmonella enterica* Pathogenicity Island1 (SPI-1) by products of the *std* fimbrial operon [J]. PLoS ONE, 2012, 7(1): e30499.
- [10] Coombes BK, Brown NF, Valdez Y, et al. Expression and Secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and *ssaL* [J]. J Biol Chem, 2004, 279(48): 49804–49815.
- [11] McLaughlin LM, Govoni GR, Gerke C, et al. The *Salmonella* SPI2 effector SseI mediates long-term systemic infection by modulating host cell migration [J]. Plos Pathogens, 2009, 5(11): e1000671.
- [12] Browne SH, Hasegawa P, Okamoto S, et al. Identification of *Salmonella* SPI-2 secretion system components required for SpvB-mediated cytotoxicity in macrophages and virulence in mice [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008, 52(52): 194–201.
- [13] Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, et al. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica* [J]. J Bacteriol, 1999, 181(3): 998–1004.
- [14] Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, et al. Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands [J]. J Bacteriol, 2003, 185(12): 3624–3635.
- [15] 刘力彰, 卢珊, 赵素莲, 等. 中国非伤寒沙门菌主要血清型临床分离株耐药特征分析[J]. 疾病监测, 2013, 28(6): 459–463.
Liu LZ, Lu S, Zhao SL, et al. Drug resistance of major *Salmonella* of different serotypes other than *Salmonella typhoid* in China [J]. Dis Surveill, 2013, 28(6): 459–463.
- [16] 陈冬平, 罗薇. 沙门氏菌毒力相关因子研究进展[J]. 西南民族大学学报, 2012, 38(5): 770–775.
Chen DP, Luo W. Research progress of *Salmonella* virulence-related factors [J]. J Southwest Univ Nat, 2012, 38(5): 770–775.
- [17] Lahiri A, Iyer N, Das P, et al. Visiting the cell biology of *Salmonella* infection [J]. MicrobesInfection, 2010, 12(11): 809–818.
- [18] Gotoh H, Okada N, Kim YG, et al. Extracellular secretion of the virulence plasmid-encoded ADP-ribosyltransferase SpvB in *Salmonella* [J]. Microb Pathog, 2003, 34(5): 227–238.
- [19] Matsui H, Bacot CM, Garlington WA, et al. Virulence plasmid-borne *spvB* and *spvC* genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in subcutaneously inoculated mice [J]. J Bacteriol, 2001, 183(15): 4652–4658.
- [20] Lindsey RL, Frye JG, Fedorka CPJ, et al. Microarray-based analysis of IncA/C plasmid-associated genes from multidrug-resistant *Salmonella enterica* [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77: 6991–6999.
- [21] Glenn LM, Lindsey RL, Frank JF, et al. Analysis of antimicrobial resistance genes detected in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* isolated from food animals [J]. Microb Drug Resist 2011, 17: 407–418.
- [22] Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms [J]. J Hosp Infect, 2009, 73: 345–354.
- [23] Tsai HJ, Hsiang PH. The prevalence and antimicrobial susceptibilities of

Salmonella and campylobacter in ducks in Taiwan [J]. J Vet Med Sci, 2005, 67(1): 7-12.

[24] Chen TH, Wang YC, Chen YT, *et al.* Serotype occurrence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates recovered from pork carcasses in Taiwan (2000 through 2003) [J]. J Food Prot, 2006, 69(3): 674-678.

[25] 王宇, 华哲云, 张前龙, 等. 上海市汤卜逊沙门菌流行特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(4): 394-396.

Wang Y, Hua ZY, Zhang QL, *et al.* Epidemiological characteristics of *Salmonella thompsonii* in Shanghai [J]. Chin J Zoonoses, 2010, 26(4): 394-396.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

畅晓晖, 硕士, 工程师, 主要研究方向
食品安全检测。

E-mail: changxiaohui82@163.com

赵 琢, 博士, 研究员, 主要研究方向
食品安全检测。

E-mail: zhaozhuo@customs@gov.cn

食品微生物质量控制技术专题征稿函

病原微生物引起的食源性疾病已成为影响食品安全的头号问题, 是食品安全的重大隐患。如何有效控制微生物污染已成为把控行业健康发展的重要因素, 如何提高实验室检测能力, 并科学运用食品微生物控制技术减少食品在生产加工等过程中的微生物危害, 以先进的微生物检验控制技术预防微生物污染, 已成为政府监管部门及食品企业关注的焦点问题之一。

鉴于此, 本刊特别策划“食品微生物质量控制技术”专题。由福建农林大学方婷教授担任专题主编。专题将围绕食品全链条微生物污染、食品微生物快速检测、食品微生物高效控制、食品微生物标准法规、食品微生物耐药性等问题展开讨论, 计划在 2020 年 5 月出版。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 学报主编吴永宁研究员及专题主编方婷教授特别邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 **2020 年 2 月 20 日前**通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题)

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部