

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240326007

沙门氏菌耐药与毒力杂合质粒的分子特征与转移风险研究进展

郑利亚[#], 刘力媛[#], 曲春波, 那立欣, 李雪玲, 周秀娟^{*}

(上海健康医学院健康与公共卫生学院, 上海 201318)

摘 要: 沙门氏菌是引发食物中毒的首要致病细菌, 其高毒耐药流行株在食品安全研究领域受到广泛关注。这些高毒耐药株中常携带耐药与毒力基因杂合质粒及大量可移动元件, 它们可通过整个食品产业链进行水平转移, 给民众的餐桌安全和身体健康带来巨大危害。深入解析这些质粒中耐药与毒力基因杂合转移的分子特征及其转移风险, 是研究食源性致病菌危害因子传播规律领域的一个重要问题。伴随着测序技术的进步, 耐药与毒力基因在质粒中的聚集与重组等演化过程逐渐被揭示, 可移动元件在质粒的稳定和转移过程中的作用也得到初步验证。基于此, 本文从杂合方式与转移风险、重要可移动元件的功能以及杂合质粒中耐药与毒力基因的演化特征等角度, 简述沙门氏菌耐药与毒力杂合质粒的研究进展, 以期揭示高毒耐药株的传播特征和风险评估提供数据支持。

关键词: 沙门氏菌; 杂合型质粒; 耐药; 毒力; 可移动元件

Research progress on molecular characteristics and transfer risks of hybrid resistance and virulence plasmids in *Salmonella*

ZHENG Li-Ya[#], LIU Li-Yuan[#], QU Chun-Bo, NA Li-Xin, LI Xue-Ling, ZHOU Xiu-Juan^{*}

(Shanghai University of Medicine & Health Sciences, College of Public Health, Shanghai 201318, China)

ABSTRACT: *Salmonella* is the leading pathogenic bacteria causing food poisoning, and its high virulent resistant strains have received widespread attention in researches on food safety. These high virulent resistant strains often carry hybrid plasmids of resistance and virulence genes, as well as a large number of mobile elements, which can be horizontally transferred through the entire food chain, posing a huge threat to the safety and health of the public's dining tables. The in-depth analysis of the molecular characteristics and transfer risks of heterologous resistance and virulence genes in these hybrid plasmids will be an important issue to studying the transmission patterns of harmful factors of foodborne pathogens. With the advancement of sequencing technology, the aggregation and recombination of resistance and virulence genes in plasmids and their evolutionary law have gradually been revealed, and the role of

基金项目: 国家自然科学基金项目(32072320)、上海健康医学院优秀青年教师“攀登计划”项目

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (32072320), and the “Climbing Plan” for Excellent Young Staffs at Shanghai University of Medicine & Health Sciences

[#]郑利亚、刘力媛为共同第一作者

[#] ZHENG Li-Ya and LIU Li-Yuan are Co-first Authors

***通信作者:** 周秀娟, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全与卫生。E-mail: zhouxj554@163.com

***Corresponding author:** ZHOU Xiu-Juan, Ph.D, Associate Professor, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, College of Public Health, No 500 Hupo Road, Shanghai 201318, China. E-mail: zhouxj554@163.com

mobile elements in the stability and transfer of plasmids has also been preliminarily verified. Based on these researches, this article briefly described the research progress of hybrid resistance and virulence plasmids in *Salmonella* from the perspectives of hybrid modes and transfer risks, the functions of important mobile genetic elements, and the evolutionary characteristics of resistance and virulence genes in hybrid plasmids. The aim is to provide data support for revealing the transmission characteristics and risk assessment of high virulent resistant epidemic strains.

KEY WORDS: *Salmonella*; hybrid plasmids; resistance; virulence; mobile genetic elements

0 引言

沙门氏菌(*Salmonella*)是一种人畜共患的致病细菌,由它引发的食物中毒占世界细菌性食物中毒病例的第一或第二位^[1-2],是我国感染人数最多且导致经济损失最大的食源性致病菌^[3-4],沙门氏菌病已成为持续的健康威胁^[5]。抗生素是治疗沙门氏菌病的重要方法,然而,抗生素的不科学使用不可避免地导致耐药菌株的出现与扩散,已有的监测数据表明,沙门氏菌的总体耐药率已上升到80%以上^[6-8]。伴随着全球化的进程,耐药优势菌型的传播规律及其耐药基因的转移过程已成为全世界关注的热点问题。其中,质粒是肠杆菌科细菌中耐药基因转移的重要载体,它们还为插入序列(insertion sequence, IS)、转座子(transposable element, TE)、整合子(integron, Int)等较小且能活跃地获取多种抗性基因的可移动元件提供了一个很好的平台^[9]。在多重耐药的沙门氏菌中常检测到大片段耐药质粒,大量耐药基因常聚集在 Int 的基因盒和 TE 区域内^[10-11],解析耐药基因的聚集与重组过程是目前耐药质粒测序和进化分析的重要工作。

在肠炎、鼠伤寒等重要的沙门氏菌血清型中,含有血清型特异的毒力质粒(*Salmonella* virulence plasmid, pSV)^[12],大量与宿主致病相关毒力基因聚集在 pSV 的毒力决定簇上^[13],通过抑制或调节宿主先天免疫,提升细菌在宿主体内的增殖和侵染能力^[14],以及引发严重肠炎和菌血症等方式使菌株表现出更高的毒性^[12]。近几年来,在肠炎沙门氏菌等多个常见血清型中不断鉴定到同时携带耐药与毒力基因的杂合型质粒^[15-20],这些携带杂合型质粒的菌株包含大量的可移动元件,具有通过整个食品产业链进行水平转移的能力^[21-22],将成为更具危害性的高毒耐药流行株,给食品安全带来了极大的风险。本文将从杂合方式、重要的可移动元件以及耐药与毒力风险等角度,简述沙门氏菌耐药与毒力杂合质粒的研究进展,以期为揭示高毒耐药株的传播特征和风险评估提供数据支持。

1 耐药与毒力基因的杂合方式

目前在沙门氏菌的高毒耐药质粒中已分析鉴定到 4 种耐药与毒力基因的杂合方式(表 1)。

表 1 沙门氏菌耐药与毒力基因杂合质粒的信息
Table 1 Information of hybrid resistance and virulence plasmids in *Salmonella*

血清型	菌株来源	质粒名称	质粒类型	转移元件*	杂合方式#	参考文献
肠炎	临床	pUO-SeVR1	IncFIC	IS26	方式 1	[23]
肠炎	临床	pUO-SeVR1-like	IncFIC	IS26	方式 1	[15]
肠炎	临床	pSE380T	IncHI2/IncFIA	IS26	方式 2	[16]
肠炎	临床	PS13D/PS13F	IncF/IncX1	IS26/Tn6952	方式 2	[24]
肠炎	临床	pS045A	IncHI2	IS26	方式 2	[21]
鼠伤寒	临床	pUO-StVR2	IncF	I型 Int	方式 1	[25-27]
鼠伤寒	肉类食品	pUO-StVR2-like	IncFIIA/repA	I型 Int	方式 1	[28]
鼠伤寒	实验室条件	p9134dT/p9134dAT	IncI1	IS26/TE	方式 3	[29]
鼠伤寒	食品动物	pSTM32-108/pSTM37-118	IncZ/IncI1	IS26/TE	方式 4	[18]
都柏林	牛粪	pN13-01125	IncX1/IncA/C	IS26	方式 2	[30]
猪霍乱	临床	Larger pSCV	-	-	方式 1	[31]
猪霍乱	临床	pOU7519	IncF/IncRep_3	TE	方式 2	[20]

注: *参考文献中推测可能发挥重要作用的主要可移动元件,并未列出杂合质粒上实际包含的所有可转移元件类型。-表明参考文献中未明确说明。#方式 1 指的是 1.1 中提到的杂合方式;方式 2 指的是 1.2 中提到的杂合方式;方式 3 指的是 1.3 中提到的杂合方式;方式 4 指的是 1.4 中提到的杂合方式。

1.1 在特异的毒力质粒上插入了大片段的耐药模块

这是目前在沙门氏菌质粒中鉴定到的耐药与毒力基因杂合的主要方式。沙门氏菌毒力质粒丢失部分毒力基因(如 *spvR* 和 *spvA*)^[24]或其他基因, 缺失片段由耐药基因取代, 如 RODRIGUEZ 等^[23]首次在临床肠炎沙门氏菌中鉴定的耐药与毒力杂合型质粒 pUO-SeVR1, 它是由 *bla*_{TEM-1} 等耐药基因插入 FIC 型毒力质粒骨架中。IS26 等 IS^[15]和 I 型 Int^[28]在多个耐药基因整合到毒力质粒上的过程中起了关键作用。pUO-SeVR1 被认为是由肠炎沙门氏菌特有的毒力质粒(pSEV)进化而来, 保留了 pSEV 大部分的序列, 少量的缺失被两个大的耐药抗性区段所替代, 在这些抗性区段内含有多达 14 个不同类型 IS26 参与抗性区段的杂合^[15]。在另一个较早发现的杂合质粒 pUO-StVR2 中, 一个 47.6 kb 的耐药抗性区段取代了鼠伤寒沙门氏菌有毒力质粒(pSLV)中 12 kb 的质粒复制相关区段。新插入的耐药抗性区段位于 pSLV 的两个重要毒力基因(*ccdAB*、*pefT*)之间, 其中 28.8 kb 的耐药岛是由 I 型 Int 介导的^[28]。因此, 由第一种方式形成的耐药与毒力杂合质粒的分子量常常与毒力质粒相似并保留毒力质粒的骨架, 在耐药基因的逐步插入或取代过程中, 同样引入了大量的 TE、IS 和其他类型不稳定的可移动元件, 表明它们存在巨大的变异与转移可能。

1.2 多重耐药质粒与完整毒力质粒的整合

在肠杆菌科细菌中常鉴定到大分子量的质粒, 它们中有一些是由耐药质粒和毒力质粒直接融合而成^[32-35], 一般同时具备两种质粒类型的骨架和相应的复制子, 这一类质粒具有罕见的大片段杂合区段, 菌株同时具备耐药和毒力特性, 它们大多是由两个完整质粒组成。如由~260 kb 的多重耐药的 HI2 型质粒和~132 kb 的毒力质粒融合形成了大肠杆菌中的~390 kb 的 pP2-3T 质粒^[36]。在沙门氏菌中也有这样的报道, 如 WONG 等^[16]从临床肠炎沙门氏菌中鉴定到一个~200 kb 的耐药与毒力杂合质粒, 它由~130 kb 的多重耐药的 HI2 质粒整合到完整的 FIA 型毒力质粒上。pSC138 是猪霍乱沙门氏菌内一个常见的 Rep_3 型耐药质粒, 它与猪霍乱沙门氏菌特有的 F 型毒力质粒 pSCV50 相互整合, 就形成了~127 kb 的猪霍乱沙门氏菌耐药与毒力杂合质粒 pOU7519^[37]。ZHAO 等^[21]在分析最近鉴定到~318 kb 的肠炎沙门氏菌 pS045A 质粒时发现, 它是由完整的 HI2 型耐药质粒在 IS26 的介导下, 与整个肠炎沙门氏菌特异的毒力质粒相融合而成。对这类大片段的杂合质粒的进一步共结合实验表明, 它们的转移效率相对较低^[17,20]。然而, 在猪霍乱沙门氏菌和肺炎克雷伯菌最新的研究中发现, 毒力质粒在与耐药质粒的杂合过程中共转移效率得到提高^[20,37], 换言之, 与毒力质粒相比, 杂合质粒的转移能力还是显著提高的。此外, 与第一种类型的杂合质粒相比, 这种由两个不同类型独立质粒直接融合的形式拓宽了其中毒力质粒的宿

主范围。

1.3 以耐药质粒为骨架融合毒力基因

第三种方式的融合过程, 是在整合酶和重组酶的作用下, 耐药质粒丢失部分耐药基因或其他基因, 由特异毒力质粒上或者其他同源的毒力基因取代。这种融合或者重组方式比较罕见, 目前的研究多是在实验条件下获得的。如 KUBASOVA 等^[29]在一个实验室变异株中发现了 p9134dT 质粒变体, 它是在耐药质粒 p9134 的基础上发生了两次重组, 分别丢失了四环素耐药区段和质粒复制相关元件, 取而代之的是鼠伤寒沙门氏菌有毒力质粒上 *rck*、*srgB* 等毒力基因和复制元件。进一步的实验表明, 这两次的重组都发生在结合之前, 是在实验室特殊的筛选过程中被检测到的。这种类型的杂合质粒提示我们, 在沙门氏菌中同样存在以耐药质粒为主体, 通过缺失、重组和选择进而形成杂合质粒的可能, 它们即转移了耐药性又增强了毒力, 还可能具备更精简有效的生存优势。课题组前期的研究中也发现, 在 I1 型耐药质粒(pS10584)的 *bla*_{CMY-2} 串联耐药模块中插入了来自大肠杆菌不完整的毒力基因 *cid*^[38]。由此推测, 这种类型的杂合质粒中毒力基因的来源更加广泛, 可能来自于同源或近源的毒力质粒或染色体上的毒力基因簇。在肺炎克雷伯菌临床分离株中也检测到类似的以耐药质粒为骨架融合毒力基因的杂合质粒, 从而获得编码抗菌素耐药性与毒力的双重优势^[39-40]。未来可能会在自然状态下发现更多此种类型的杂合质粒, 那么这些插入的毒力基因以及被取代的耐药基因或其他元件为杂合质粒带了怎样的意义也有待进一步的探究。

1.4 耐药与毒力基因的直接杂合方式

这类杂合质粒虽然不以耐药或者毒力质粒为模板, 但是它们同样携带来源于近缘物种(如大肠杆菌)的毒力基因和大片段的耐药基因以及与转移相关的元件, 灵活性与危害性更大。如在食品动物源的鼠伤寒沙门氏菌中鉴定到鼠伤寒沙门氏菌杂合质粒 pSTM32-108/pSTM37-118^[18], 它们是携带 Z 和 I1 型质粒复制子的耐药与毒力基因杂合质粒, 未检测到典型的耐药质粒或毒力质粒骨架。其中 TE 和 IS 在耐药与毒力基因的杂合过程中都发挥了作用。这种类型的杂合质粒不易被发现或常常被忽略, 然而这种类型的杂合质粒可能代表着耐药与毒力共进化的新方式, 需要更多参考数据来推测它们在耐药与毒力杂合质粒的演化过程中地位。

2 与杂合质粒形成相关的可移动元件

如前所述, 在这些高毒耐药的沙门氏菌杂合质粒中常检测到大量的 IS、TE、Int 等可移动元件, 它们在调动耐药与毒力基因的聚集与重排, 以及促进杂合质粒的稳定性和可转移能力方面发挥着重要作用。

2.1 IS26 调动质粒上耐药与毒力基因的逐步聚集

在沙门氏菌等革兰氏阴性菌中, IS26 在耐药基因的转移中发挥着关键作用, 形成了包含多个耐药基因的区域, 这些区域的两侧常散布着大量的 IS26 元件^[41-43]。大量的研究表明, 与其他插入元件相比, IS26 更倾向于调动质粒上的基因^[44]。例如, 已有报道证实 4 种 *bla*_{SHV} 基因亚型在质粒间的转移都是由 IS26 介导的^[45]。在一株临床源的鼠伤寒沙门氏菌中检测到 Inc L/M 型耐药质粒, 该质粒中的 *aph*、*qnrB19* 和 *bla*_{SHV-12-like} 等耐药基因聚集在 Tn3 内, 并且这些耐药基因的两侧均被 IS26 元件包围。如图 1 所示^[46], 在转座酶的作用下, 由 3 组 IS26 元件依次调动了上述 3 个耐药基因的逐步聚集。尽管目前还不清楚是哪种特殊结构或作用机制来调控 IS26 对质粒上耐药基因的调动作用, 可以肯定的是在耐药区段内, 每个(对)IS26 拷贝均与一个抗性基因的转移聚集相关。

在一株分离于都柏林沙门氏菌的耐药与毒力杂合质

粒(pN13-01125)的形成过程中, 耐药质粒和毒力质粒分别为杂合质粒贡献了 3 个交替的序列块, 在功能基因序列间检测到 11 个 IS26 元件, 并且在 IS26 家族复制时留下 8-bp 的反转靶位点重复序列(inverted-target site duplication, TSD)(图 2), 因此, 此论文大胆推测正是这些倒置序列介导了抗性基因及毒力基因的聚集^[17]。在已鉴定的肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌的杂合质粒(pUO-SeVR 和 pUO-StVR)中, 都检测到大量的 IS26 元件和 TSD 序列, 由他们介导杂合质粒的融合, 因此, 与 IS26 的复制转座相关的 TSD 模式被用作追踪质粒进化的指南^[35]。

IS26 等 IS 作为相对较小的可移动元件, 其灵活性最强且稳定性较差, 它们将成为研究功能基因(如耐药和毒力基因)聚集的重要指示元件。此外, 这些作用通常也是通过改造 Int 和 TE 的结构来实现的, 整合酶和转座酶也对 IS 的转移起到了重要的辅助作用。

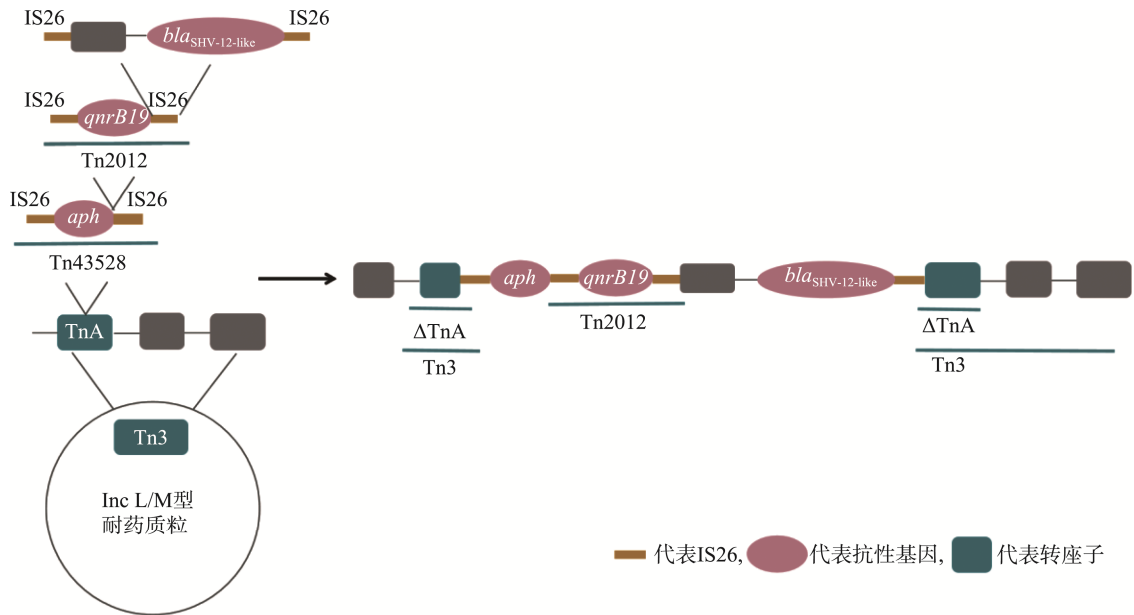


图1 IS26聚集质粒中耐药基因的模式图^[46]

Fig.1 Model for the hypothetical evolution of the resistance genes of plasmids mediated by IS26^[46]

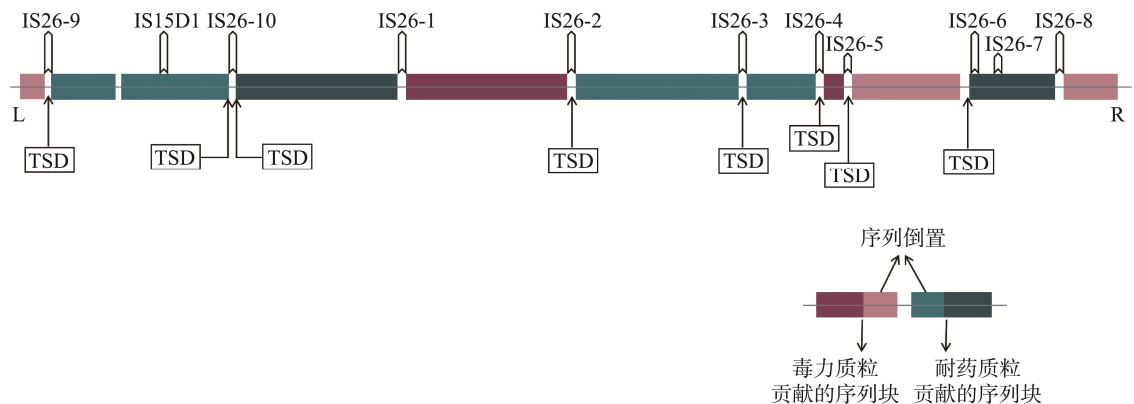


图2 TSD在杂合质粒pN13-01125中的分布示意图^[17]

Fig.2 Distribution diagram of TSD in hybrid plasmid pN13-01125^[17]

2.2 转座子与整合子的部分缺失促进了杂合质粒的稳定和转移

耐药与毒力杂合质粒通常都是较大的质粒,特别是前文提到的耐药质粒与毒力质粒直接融合而成的杂合质粒(见 1.2),通常对于较大的质粒而言,它们的稳定性和可转移能力会变差,从而影响它们进一步造成危害,然而,就目前发现的杂合质粒来看,其稳定性和转移能力并没有因为质粒变大了而变差。

通过对来源于猪霍乱沙门氏菌杂合质粒 pOU7519 中两个独立质粒连接位点的分析发现,杂合质粒中 I 型 Int 的整合酶基因(*int*)及其连接位点(*att*)处均发现了序列缺失,这些缺陷导致杂合质粒中的两个不同类型的质粒不能再分开,换言之这些 Int 上的基因缺失维持了杂合质粒的稳定性^[20]。

早期的研究证实,由于一个 TE (Tn6092)的插入,导致猪霍乱沙门氏菌特有的毒力质粒(pSCV50)不能自主转移。然而,与普通的 pSCV50 毒力质粒不同,由其演化而来的杂合质粒 pOU7519 中缺少了 Tn6092 的插入,这就使得杂合质粒不仅可自主转移,还具备了高于自然转移率的转移能力(转移率为 10^{-6} ~ 10^{-7})。同样的,在鼠伤寒沙门氏菌杂合质粒(如 pUO-StVR)中,由于 Tn10 的缺失而提升杂合质粒的可转移能力,经测试 pUO-StVR 的转移效率由原毒力质粒的 10^{-8} 提升到杂合质粒的 10^{-3} ~ 10^{-5} ^[47]。

此外,杂合质粒通常伴随着一个或多个大小可变的其他质粒,它们不仅为菌株提供了额外的抗性(耐药性、重金属抗性、消毒剂抗性等)^[48],在同步转移过程中还提升了自身和杂合质粒的转移效率。如耐药质粒 pStR12 常与杂合质粒 pUO-StVR2 共存,在前者的辅助下,杂合质粒转移到大肠杆菌的效率提升了 10^3 ~ 10^5 倍^[47]。因此,与杂合质粒相容的其他质粒提升了转移风险。

由此可见,杂合质粒的稳定性为其同时储存耐药和毒力属性提供了保障;并且伴随着 TE 和 Int 的改变,以及其他相容质粒的辅助,杂合质粒同时转移耐药和毒力的风险也得到了提高。

3 杂合质粒上携带的耐药与毒力基因的特征

在杂合质粒的形成过程中,不仅有大量可移动元件的参与,还伴随着毒力基因、耐药基因以及一些特殊基因簇的缺失、重组或者插入,这些演化过程也会影响质粒的稳定性与传播能力。

3.1 杂合质粒是毒力质粒的演化新形式

前期的序列比对和进化分析结果表明,目前已知的沙门氏菌毒力质粒(pSV)大致分为两个谱系:谱系I包括 pSCV、pSEV 和 pSLV。其中, pSCV 和 pSEV 可能是通过

部分基因的缺失从 pSLV 衍生而来或者反之。谱系II包括 pSDV 和 pSPV,不同之处在于由 *fae* 基因簇组成的 12 kb 的 DNA 替代了谱系 I 中的 *pef* 操纵子,且两个谱系的复制起始类型(*ori*)不同^[40]。具体来说,杂合质粒极有可能是毒力质粒进化的一种新形式,不仅仅是简单的基因缺失,还包括基因的插入和重组过程,目的在于确保沙门氏菌在宿主体内的生存以及质粒本身的稳定性。首先,谱系 I 中的毒力质粒(如 pSCV 和 pSLV),由于耐药基因的插入与重组为沙门氏菌在不利的药物环境中提供了生存优势,耐药性得到提升(如图 3 蓝色虚线框所示)。其次,这些由谱系 I 的毒力质粒变化而来的杂合质粒与原来的血清型特异性的毒力质粒相比,由于耐药质粒的加入而扩大了宿主范围(传播能力)(如图 3 紫色虚线框左边所示)。相似的,谱系II中毒力质粒通过与耐药质粒的重组为其繁殖到新的遗传谱系提供了机会,如由毒力质粒 pSDV 演化而来的杂合质粒 pN13-01125,前者由于复制子的缺陷而不能自我复制,后者由于引入了耐药质粒的复制子而实现了杂合质粒在沙门氏菌内的成功复制^[39](如图 3 紫色虚线框右边所示)。再者,如 2.2 中所述,在两个独立质粒的融合过程中,许多可移动元件结构的改变促进了杂合质粒稳定性和转移能力的提升。总之,这种毒力质粒演化成杂合质粒的过程(图 3)导致毒力质粒的耐药性、传播能力或复制能力增强。

3.2 杂合质粒中毒力基因的变化特征

我们通过分析杂合质粒中的毒力基因发现,这些毒力基因的变化主要表现在 4 个方面,也赋予了杂合质粒不同的功能变化。(1)毒力质粒通常是指携带 *spv* 操纵子的 F 型质粒, *spv* 操纵子由 *spvRABCD* 5 个基因组成,它们提升了细菌在宿主体内的增长速度,是产生细胞毒性的主要原因之一^[49-50]。就目前的研究来看,无论是在特异的毒力质粒上插入了大片的耐药模块还是多重耐药质粒与完整毒力质粒的整合, *spv* 操纵子均能被完整地保留在杂合质粒中^[51],也就是说杂合质粒最大限度地保留了毒力质粒的细胞毒性。(2)前期研究发现,沙门氏菌毒力质粒具有明显的血清型特异性,血清型间的差异变化与毒力质粒上的菌毛操纵子(如 *pef* 和 *fae* 等)有关^[52],这些基因已被证明与宿主上皮细胞的黏附和炎症反应有关^[53]。此类基因在形成的杂合质粒上有很大的序列变异,如杂合质粒 pUO-SeVR1 中缺失了原毒力质粒(pSEV)的 *pefI-orf7-srgA* 区域,为部分耐药基因提供了插入位点。同样的,毒力质粒 pSLV 缺失了 *pef* 和 *sopE1* 基因(编码 SPII(致病岛 I)III 型分泌系统的效应蛋白,与宿主细胞入侵和肠道炎症有关),在此缺失位点处插入了耐药模块,从而形成了杂合质粒 pUO-StVR2。同类型的与菌毛形成和黏附有关的基因(*faeA1* 和 *fedH*)在都别林沙门氏菌的杂合质粒(pN13-01125)

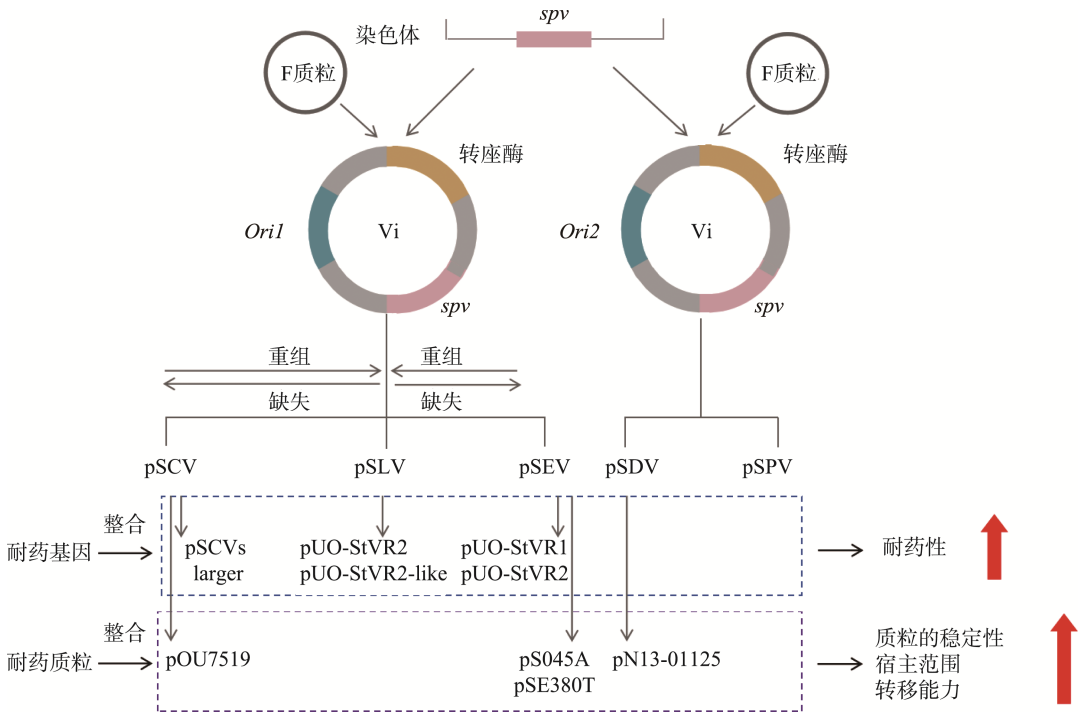


图3 沙门氏菌毒力质粒演化示意图
Fig.3 Schematic diagram of hypothetical evolution for virulence plasmids

中也出现了缺失。因此可以大胆推测,在杂合质粒中被缺失的这一类型的毒力基因不仅是为耐药基因或耐药质粒提供插入位点,更重要的是这些基因的缺失使得杂合质粒的血清型(宿主)特异性不再明显,极大地扩大了宿主范围。(3)调节宿主的免疫反应是沙门氏菌毒力质粒的重要功能之一,位于 *spv* 操纵子附近的 *rck* 和 *rsk* 基因通过补体激活来抑制宿主免疫反应,与宿主特异性有关^[54]。其中 *rsk* 基因在杂合质粒(如 pUO-StVR)中伴随着 InFIB/repA2 复制子的缺失而缺失。这类基因进一步说明了杂合质粒通常会丢掉与宿主特异性相关的毒力基因。(4)除了毒力基因的缺失与变异,毒素-抗毒素系统的重复或新引入进一步确保了质粒的稳定性,如在杂合质粒 pUO-StVR2 中,除了原毒力质粒(pSLT)的 *ccdA/ccdB* 基因,还捕获了 *vagC/vagD* 基因(最早在毒力质粒 pSDV 中),形成了第二个毒素-抗毒素系统,为杂合质粒提供了额外的稳定性。类似的,在杂合质粒 pUO-SeVR1 中引入了由 *pemI* 和 *pemK* 组成的毒素-抗毒素系统,与质粒的稳定遗传有关^[23]。综上,与宿主(血清)特异性相关的毒力基因发生了大的改变或缺失,与质粒稳定性和细菌增殖相关的毒力基因被保留和增多,这些变化使杂合质粒在宿主间的传播更便利,其所赋予的耐药性和毒力功能更持久。

3.3 杂合质粒中耐药基因的特征

对杂合质粒中耐药基因的分析发现,这些耐药基因对应的耐药表型与同时期的耐药流行株极为相似,也与当

时主要使用的抗生素有很大的关联。早在 20 年前,学者在研究猪霍乱沙门氏菌的毒力质粒时,就发现许多大片段的 pSCVs。这些大质粒是由 50 kb 的 pSCV 与非毒力质粒杂合而成,最早鉴定到的耐药基因是 *sulII* 和 *sulI-bla_{TEM-1}*, 分别编码对磺酰胺和磺酰胺-氨苄青霉素的耐药性,这两类抗生素是最早使用的抗生素类型。DT104 是鼠伤寒沙门氏菌最常见且近 40 年间全球传播最广泛的耐药型,在 CRUMP 等^[55]和 LEEKITCHAROENPHON 等^[56]的报道均发现,从 1980s 时此类菌株的染色体上插入了一段 13 kb 的耐药岛,使其具备对氨苄青霉素、氯霉素、链霉素、磺酰胺和四环素的 5 重典型耐药性 (AMP-CHL-STR-SUL-TET, ACSSuT),对应的耐药基因是 *bla_{PSEI-floR-aadA2-sulI-tet(G)}*。有趣的是,携带杂合质粒 pUO-StVR2 的鼠伤寒沙门氏菌也呈现出与 DT104 相类似的 5 重耐药性,但是,对应的耐药基因不同 [*bla_{OXA1-catA1-aadA1-sulI-tet(B)}*]^[36-38],且这些耐药基因均位于杂合质粒的 I 型 Int 上。并且,食品源的 pUO-StVR2-like 杂合质粒在原有 5 重耐药表型的基础上添加了对甲氧嘧啶的耐药性(TMP),在 Int 的对应位置中插入了 *dhfrA10* 基因^[25]。然而,鼠伤寒沙门氏菌的这两类耐药型在基因组的多态性、噬菌体类型、质粒图谱以及耐药基因的不同,表明它们不是相同的进化途径。有趣的是,与 pUO-StVR2-like 携带的耐药表型相同,肠炎沙门氏菌杂合质粒 pUO-SeVR1 也呈现 6 重耐药性 (AMP-CHL-STR-SUL-TET-TMP),但对应的耐药基因几乎

完全不同[*bla*_{TEM-1b}-*catA2*-*strAB*-*sul1*-*sul2*-*tet(A)*-*dfrA7*]。可以看出,伴随抗生素的逐步使用,有着不同进化途径的这些杂合质粒与常见的耐药流行株呈现相似的耐药表型,可能为不同型别耐药基因的转移提供了储存库。

杂合质粒所呈现的耐药性不仅限于这些较早使用的抗生素,目前在耐药质粒与毒力质粒直接融合而成的杂合质粒中也出现了对新型或/和一线抗生素的耐药性以及携带较新发现的耐药基因。如由 HI2 型多重耐药质粒与毒力质粒 pSEV 直接融合而成的杂合质粒 pSE380T,具有了第三代头孢抗性和磷霉素的抗性并携带新型的 *bla*_{CTX-M-14} 和 *fosA3* 基因^[16]。最近在肠炎沙门氏菌鉴定到杂合质粒 pS045A 携带了 12 个耐药基因,其中就包括与氟喹诺酮类耐药相关的 *qnrS1* 基因^[21]。相似的,都别林沙门氏菌的杂合质粒 pN13-01125 承担着该菌株所有的 6 类耐药性(链霉素-β-内酰胺类-庆大霉素-氯霉素-硫异恶唑-四环素),其中新型耐药基因 *bla*_{CMY-2} 使其获得了对头孢西丁和头孢曲松等三代头孢类抗生素的耐药性^[39]。在不依赖于耐药或者毒力质粒,仅耐药基因与毒力基因融合的杂合质粒(pSTM32-108/pSTM37-118)中,同样检测到对 6 类一代抗生素的耐药性(氨基青霉素-甲氧苄啶-磺酰胺-链霉素-氨基糖苷类-四环素类)。此外,这些耐药性和对应的耐药基因在一些特殊的压力选择下会出现部分丢失,而引入新的毒力基因或者其他抗性基因。此现象在实验室条件下形成的杂合质粒中已经得到了验证,如杂合质粒 p9134dT 和 p9134dAT 分别丢失了四环素耐药基因和四环素-氨基青霉素耐药基因,而引入了毒力基因和重金属抗性基因等^[32]。这些结果表明,杂合质粒的耐药特征跟抗生素的使用情况有一定的关系,并呈现逐渐积累的趋势,不同的杂合方式为耐药基因的聚集与丢失提供了多种可能。在常规的监测过程中,特别需要关注即对目前一线抗生素有耐受性,又携带毒力基因的那些杂合质粒,它们成为高毒耐药流行株的风险更大。

4 结束语

在杂合质粒上同时存在耐药和毒力的决定因素,同时自身的稳定性和转移能力也有所提升。在抗生素的筛选下存活几率提高,不仅加快了优势菌株的克隆传播,还增加了水平传播风险,这极有可能是耐药和毒力共进化的一种表现,应当引起公共卫生和人类健康的重视。需要在全世界范围内建立基因组流行病学的监测策略,来确定杂合质粒及其携带的遗传因子,并了解其对耐药传播和病原体进化的贡献。一些重要的检测标准或标记物需要被挖掘出来,如肠炎沙门氏菌杂合质粒中的 700 bp/*dfrA7*^[23],猪霍乱沙门氏菌杂合质粒中 782bp/Tn1721-tnpA'以及 IS26 元件相关的 TSD 序列等^[20]。在杂合质粒形成过程中,一些元件的

缺失对毒力和稳定性是否有影响,还需要进一步的研究。伴随着测序技术的进步,将更好地了解有助于杂合质粒整合及进化的分子机制,以此为基础来开发新的干预措施,从而遏制耐药与毒力基因通过杂合质粒在沙门氏菌和其他肠杆菌科细菌的形成和传播。

参考文献

- [1] AKPABIO U. Epidemiology of poultry salmonellosis: A review [J]. J Vet Int Med, 2015, 5(5): 902-911.
- [2] YANG B, QU D, ZHANG X, *et al.* Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China [J]. Int J Food Microbiol, 2010, 141(1-2): 63-72.
- [3] LIU J, BAI L, LI W, *et al.* Trends of foodborne diseases in China: Lessons from laboratory-based surveillance since 2011 [J]. Front Med, 2018, 12(1): 48-57.
- [4] LIU J, LUO B, ZHOU Y, *et al.* Prevalence and distribution of acute gastrointestinal illness in the community of China: A population-based face-to-face survey, 2014-2015 [J]. BMC Pub Health, 2023, 23(1): 836.
- [5] TEKLEMARIAM AD, AL-HINDI RR, ALBIHEYRI RS, *et al.* Human salmonellosis: A continuous global threat in the farm-to-fork food safety continuum [J]. Foods, 2023, 12(9): 1756.
- [6] XU Z, WANG M, ZHOU C, *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance of retail-meat-borne *Salmonella* in southern China during the years 2009-2016: The diversity of contamination and the resistance evolution of multidrug-resistant isolates [J]. Int J Food Microbiol, 2020, 333: 108790.
- [7] PITTI M, GARCIA-VOZMEDIANO A, TRAMUTA C, *et al.* Monitoring of antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from humans in northwest Italy, 2012-2021 [J]. Pathogens, 2023, 12(1): 89.
- [8] YANG J, ZHANG Z, ZHOU X, *et al.* Prevalence and characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* isolates from retail foods in Shanghai, China [J]. Foodborne Pathog Dis, 2020, 17(1): 35-43.
- [9] PARTRIDGE SR, KWONG SM, FIRTH N, *et al.* Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance [J]. Clin Microbiol Rev, 2018, 31(4): e00088-17.
- [10] MA J, AN N, LI W, *et al.* Antimicrobial resistance and molecular characterization of gene cassettes from class 1 integrons in *Salmonella* strains [J]. J Med Microbiol, 2022. DOI: 10.1089/mdr.2021.0172
- [11] KAUSHIK M, KUMAR S, KAPOOR RK, *et al.* Integrons and antibiotic resistance genes in water-borne pathogens: Threat detection and risk assessment [J]. J Med Microbiol, 2019, 68(5): 679-692.
- [12] SILVA C, PUENTE JL, CALVA E. *Salmonella* virulence plasmid: Pathogenesis and ecology [J]. Pathog Dis, 2017, 75(6): ftx070.
- [13] DERAKHSHANDEH A, FIROUZI R, KHOSHBAKHT R. Association of three plasmid-Encoded *spv* genes among different *Salmonella* serotypes isolated from different origins [J]. Indian J Microbiol, 2013, 53(1): 106-110.
- [14] BHANDARI M, POELSTRA JW, KAUFFMAN M, *et al.* Genomic diversity, antimicrobial resistance, plasmidome, and virulence profiles of *Salmonella* isolated from small specialty crop farms revealed by whole-genome sequencing [J]. Antibiotics (Basel), 2023, 12(11): 1637.
- [15] GARCIA V, GARCIA P, RODRIGUEZ I, *et al.* The role of IS26 in evolution of a derivative of the virulence plasmid of *Salmonella enterica*

- serovar enteritidis which confers multiple drug resistance [J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 45: 246–249.
- [16] WONG MH, CHAN EW, CHEN S. IS26-mediated formation of a virulence and resistance plasmid in *Salmonella* enteritidis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2017, 72(10): 2750–2754.
- [17] MANGAT CS, BEKAL S, IRWIN RJ, *et al.* A novel hybrid plasmid carrying multiple antimicrobial resistance and virulence genes in *Salmonella enterica* serovar Dublin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(6): e02601–e02616.
- [18] WYRSCH ER, HAWKEY J, JUDD LM, *et al.* Z/II hybrid virulence plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *S. typhimurium* from Australian food animal production [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(9): E299.
- [19] KALDHONE PR, CARLTON A, ALJAHDALI N, *et al.* Evaluation of incompatibility group II (IncII) plasmid-containing *Salmonella enterica* and assessment of the plasmids in bacteriocin production and biofilm development [J]. *Front Vet Sci*, 2019, 6: 298.
- [20] CHEN CL, SU LH, JANAPATLA RP, *et al.* Genetic analysis of virulence and antimicrobial-resistant plasmid pOU7519 in *Salmonella enterica* serovar choleraesuis [J]. *J Microbiol Immunol*, 2020, 53(1): 49–59.
- [21] ZHAO W, ZHAO Y, LU X, *et al.* Characterization of a multidrug-resistant *Salmonella* enteritidis clinical strain carrying a novel hybrid plasmid [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2022, 19(4): 293–296.
- [22] KRUGER GI, PARDO-ESTE C, ZEPEDA P, *et al.* Mobile genetic elements drive the multidrug resistance and spread of *Salmonella* serotypes along a poultry meat production line [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1072793.
- [23] RODRIGUEZ I, GUERRA B, MENDOZ MC, *et al.* pUO-SeVR1 is an emergent virulence-resistance complex plasmid of *Salmonella enterica* serovar enteritidis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66(1): 218–220.
- [24] LIU YY, HE DD, ZHANG MK, *et al.* The formation of two hybrid plasmids mediated by IS 26 and Tn 6952 in *Salmonella enterica* serotype enteritidis [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 676574.
- [25] HERRERO A, RODICIO MR, GONZÁLEZ-HEVIA MA, *et al.* Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2 [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 57(1): 39–45.
- [26] HERRERO A, RODICIO MR, ECHEITA MA, *et al.* *Salmonella enterica* serotype typhimurium carrying hybrid virulence-resistance plasmids (pUO-StVR): A new multidrug-resistant group endemic in Spain [J]. *Int J Med Microbiol*, 2008, 298(3–4): 253–261.
- [27] HERRERO A, MENDOZA MC, RODICIO R, *et al.* Characterization of pUO-StVR2, a virulence-resistance plasmid evolved from the pSLT virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar typhimurium [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(12): 4514–4517.
- [28] MONTERO I, HERRERO A, MENDOZA MC, *et al.* Virulence-resistance plasmids (pUO-StVR2-like) in meat isolates of *Salmonella enterica* serovar typhimurium [J]. *Food Res Int*, 2012, 45: 1025–1029.
- [29] KUBASOVA T, MATIASOVICOVA J, RYCHLIK I, *et al.* Complete sequence of multidrug resistance p9134 plasmid and its variants including natural recombinant with the virulence plasmid of *Salmonella* serovar typhimurium [J]. *Plasmid*, 2014, 76: 8–14.
- [30] MANGAT CS, BEKAL S, AVERY BP, *et al.* Genomic investigation of the emergence of invasive multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar dublin in humans and animals in Canada [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(6): e00108–e00119.
- [31] CHU C, CHIU CH. Evolution of the virulence plasmids of non-typhoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance [J]. *Microbes Infect*, 2006, 8(7): 1931–1936.
- [32] LIAO WJ, HUANG QS, WEI DD, *et al.* Nosocomial transmission and rearrangement of large resistance-virulence hybrid plasmids between two bacteremic ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains with low fitness cost [J]. *Microb Pathog*, 2022, 168: 105593.
- [33] DONG N, YANG X, ZHANG R, *et al.* Tracking microevolution events among ST11 carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* outbreak strains [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 146.
- [34] LI RC, CHENG J, DONG HY, *et al.* Emergence of a novel conjugative hybrid virulence multidrug-resistant plasmid in extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST15 [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 55(6): 105952.
- [35] ZHANG F, LI L, ZHAO Y, *et al.* Molecular characterization of hybrid virulence plasmids in ST11-KL64 KPC-2-producing multidrug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from China [J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1353849.
- [36] FANG LX, LI XP, DENG GH, *et al.* High genetic plasticity in multidrug-resistant sequence type 3-IncHI2 plasmids revealed by sequence comparison and phylogenetic analysis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(4): e02068–17.
- [37] XIE MM, CHEN KC, YE LW, *et al.* Conjugation of virulence plasmid in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains through formation of a fusion plasmid [J]. *Adv Biosyst*, 2020, 4(4): e1900239.
- [38] CHEN WY, FANG TZ, ZHOU XJ, *et al.* IncHI2 plasmids are predominant in antibiotic-resistant *Salmonella* isolates [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1566.
- [39] SHANKAR C, VASUDEVAN K, JACOB JJ, *et al.* Hybrid plasmids encoding antimicrobial resistance and virulence traits among hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST2096 in India [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 875116.
- [40] CHU C, CHIU CH. Evolution of the virulence plasmids of non-typhoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance [J]. *Microbes Infect*, 2006, 8(7): 1931–1936.
- [41] HARMER CJ, HAN HM. IS 26 and the IS 26 family: Versatile resistance gene movers and genome reorganizers [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2024, 4: e0011922.
- [42] WANG XL, ZHANG HH, YU SB, *et al.* Inter-plasmid transfer of antibiotic resistance genes accelerates antibiotic resistance in bacterial pathogens [J]. *Isme J*, 2024, 18(1): wrad032.
- [43] ZHANG Y, LEI CW, CHEN X, *et al.* Characterization of IncC plasmids in enterobacterales of food-producing animals originating from China [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 580960.
- [44] CHE Y, YANG Y, XU X, *et al.* Conjugative plasmids interact with insertion sequences to shape the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(6): e2008731118.
- [45] LIAKOPOULOS A, MEVIUS D, CECCARELLI D. A review of SHV extended-spectrum β -lactamases: Neglected yet ubiquitous [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1374.

- [46] DIONISI AM, LUCARELLI C, OWCZAREK S, *et al.* Characterization of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrB19* in *Salmonella enterica* serovar typhimurium [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(9): 4019–4021.
- [47] MONTERO I, HERRERO-FRESNO A, RODICIO R, *et al.* Efficient mobilization of a resistance derivative of pSLT, the virulence plasmid specific of *Salmonella enterica* serovar typhimurium, by an IncI1 plasmid [J]. Plasmid, 2013, 70(1): 104–109.
- [48] LI C, TYSON GH, HSU CH, *et al.* Long-read sequencing reveals evolution and acquisition of antimicrobial resistance and virulence genes in *Salmonella enterica* [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 777817.
- [49] KANG L, YOU J, LI Y, *et al.* Effects and mechanisms of *Salmonella* plasmid virulence gene *spv* on host-regulated cell death [J]. Curr Microbiol, 2024, 81(3): 86.
- [50] GUINEY DG, FIERER J. The role of the *spv* genes in *Salmonella* pathogenesis [J]. Front Microbiol, 2011, 2: 129.
- [51] WU SY, WANG LD, LI JL, *et al.* *Salmonella spv* locus suppresses host innate immune responses to bacterial infection [J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, 58: 387–396.
- [52] LI Y, KANG X, ED-DRA A, *et al.* Genome-based assessment of antimicrobial resistance and virulence potential of isolates of non-pullorum/gallinarum *Salmonella serovars* recovered from dead poultry in China [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(4): e0096522.
- [53] CHESSA D, DORSEY CW, WINTER M, *et al.* Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics [J]. J Biol Chem, 2008, 283(13): 8118–8124.
- [54] 侯悦, 刘洁. 肠炎沙门氏菌中侵袭相关毒力基因研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(10): 3867–3873.
- HOU Y, LIU J. Research progress of invasion-related virulence genes in *Salmonella enteritidis* [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(10): 3867–3873.
- [55] CRUMP JA, SJÖLUND-KARLSSON M, GORDON MA, *et al.* Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(4): 901–937.
- [56] LEEKITCHAROENPHON P, HENDRIKSEN RS, LE HS, *et al.* Global genomic epidemiology of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 [J]. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(8): 2516–2526.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



郑利亚, 主要研究方向为食品卫生与营养。

E-mail: zhengliya2022@163.com



刘力媛, 主要研究方向为食品卫生与营养。

E-mail: bnnxnd123698745@163.com



周秀娟, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全与卫生。

E-mail: zhouxj554@163.com