

论著

7株侵袭性非伤寒沙门菌(iNTS)基因组和毒力特征分析

胡豫杰¹,王伟¹,许学斌²,王艳³,崔鑫楠⁴,徐进¹,李凤琴¹

(1. 国家食品安全风险评估中心国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021; 2. 上海市疾病预防控制中心病原微生物所, 上海 200336;
3. 北京积水潭医院检验科, 北京 100035; 4. 北京农学院食品科学与工程学院, 北京 102206)

摘要:目的 探究侵袭性非伤寒沙门菌(iNTS)的基因组和毒力特征。方法 针对收集的7株iNTS菌株开展全基因组测序,通过与相关数据库进行比对检索,对菌株的血清型和基因组信息以及毒力因子进行鉴定、注释和分析。结果 7株iNTS菌株中有6株单相菌,包括1株鼠伤寒血清型、2株I 4,[5],12:i:-(ST34型)、2株肠炎血清型、1株科瓦利斯血清型和1株未知血清型I 4,[5],12:d:-(ST279型)。基因组组分未发现较一致规律,不同血清型菌株间差别大于同种血清型不同来源菌株。不同血清型沙门菌之间毒力因子分布差异较明显,尚未发现iNTS菌株共有的毒力因子分布特征,荚膜/免疫逃逸、毒素、周生鞭毛、肠菌素 Salmochelin 可能与菌株高侵袭性相关。所有测试菌株均含有III型和VI型分泌系统,且科瓦利斯沙门菌和I 4,[5],12:d:-沙门菌的III型和VI型分泌系统蛋白数量分别高于其他菌株。分泌系统效应蛋白 SseI 在部分沙门菌基因组中可能存在与侵袭性增强相关的假基因化。结论 暂未在毒力基因水平观察到与iNTS菌株高侵袭性相关的共性致病机制,仍需从功能转录组和蛋白质组层面进行进一步的分析和研究,以确定iNTS发生和传播的遗传基础。

关键词:侵袭性非伤寒沙门菌;血清型;毒力因子;基因组

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)03-0249-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.03.001

Analysis of genome and virulence characteristics of seven invasive non-typhoidal *Salmonella* (iNTS)

HU Yujie¹, WANG Wei¹, XU Xuebin², WANG Yan³, CUI Xinnan⁴, XU Jin¹, LI Fengqin¹

(1. Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China; 2. Institute of Pathogen Microbiology, Shanghai Municipal Center for Disease Control & Prevention, Shanghai 200336, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China; 4. Food Science and Engineering College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: Objective To investigate the genomic and virulence characteristics of seven invasive non-typhoidal *Salmonella* (iNTS) isolates. **Methods** Based on the collection of seven iNTS strains, whole genome sequencing were performed. The serotypes, genomes and virulence factors were identified, annotated and analyzed according to the comparison of genome data and relevant databases. **Results** Among the seven tested iNTS isolates, six were monophasic, including one *Salmonella* Typhimurium and two *Salmonella* I 4, [5], 12:i:-(ST34 type), two *Salmonella* Enteritidis, one *Salmonella* Corvallis and one unknown serotype with the antigenic formulae of I 4, [5], 12:d:-(ST279 type). No consistent rule was found in genomic components and relevant parameter differences varies much between different serotypes than those of the same serotype from different sources. The distribution of virulence factors (VF) was significantly different among different *Salmonella* serotypes, but the common VF characteristics in iNTS strains were not found, though Capsule/Immune evasion, toxin, peritrichous flagella and Salmochelin may be associated with high invasiveness. All tested isolates contained type III and type VI secretion systems. The number of secretion protein, type

收稿日期:2021-03-29

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1603900)

作者简介:胡豫杰 男 助理研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: huyujie@cfsa.net.cn

通信作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: lifengqin@cfsa.net.cn

III for *S. Corvallis* and type VI for *Salmonella* 14, [5], 12 : d : -was the highest among the seven isolates. Pseudogenization of the secreted effector SseI may exist among some *Salmonella* serotypes which may contribute to the enhancement of *Salmonella* invasiveness. **Conclusion** The common characteristic differences of virulence factor between iNTS and gastroenteritis NTS were not observed at the moment, and highly invasive pathogenic mechanisms still require further analysis and research at the functional transcriptome and proteomic levels to determine the genetic basis of iNTS occurrence and transmission.

Key words: Invasive non-typhoidal *Salmonella*; serotype; virulence factor; genome

非伤寒沙门菌(Non-typhoidal *Salmonella*, NTS)引发的肠道感染是全球性公共卫生问题,可人畜共患,临床上多导致胃肠炎,一般无需服用抗生素即可自愈^[1]。少数 NTS 菌株也可经肠道进入血液或淋巴液并感染机体组织器官,引起肠外感染性疾病(如菌血症或脑膜炎等)。由于这部分沙门菌具有与伤寒沙门菌类似的侵袭特性,因此被称为侵袭性非伤寒沙门菌(Invasive NTS, iNTS),其感染临床特征与伤寒相似,患者均具有发热症状,一般不引起腹泻,临床治疗需要使用抗生素^[2-4],出现频率较高的血清型有鼠伤寒、肠炎、都柏林和猪霍乱等^[2-5]。部分易感人群如 5 岁以下儿童、老人和免疫缺陷症患者感染 iNTS 后病死率较高,全球 iNTS 感染病死率为 20%,部分人群高达 50% 以上,远高于普通 NTS 和伤寒沙门菌的致死率,且目前对 iNTS 引发的感染尚无有效药物和治疗措施^[5]。iNTS 流行病学调查和研究目前主要针对非洲地区^[6],其他国家和地区的监测与疾病负担数据均存在较大缺失,且缺乏系统研究。我国几乎每年都有临床 iNTS 感染的病例报道,且每年各地报道的 iNTS 血清型不同。本研究针对我国 7 株 iNTS 菌株的基因组数据进行挖掘,对血清型、基因组分型和基因组特征特别是毒力因子等进行综合分析,以探究 iNTS 菌株相关毒力特征和致病性相关的遗传学基础,为我国开展 iNTS 的检测、监测和风险评估提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

2014 年上海市社区及各级医院的 1 619 株沙门菌分离株中的 7 株 iNTS 菌株(iNTS1~iNTS7,分离自血液和脑脊液)。本研究还包含 5 株非 iNTS 菌株用于基因组比对分析,包括 3 株 ST34 型的食源性鼠伤寒沙门菌二相缺失变种(S1~S3,分别分离自广东的生菜样品、江西省的凉拌猪肉样品和江苏省的鹅蛋样品),1 株 ST34 型的食源性鼠伤寒沙门菌(S4,分离自重庆市的田螺样品),1 株临床血样伤寒沙门菌分离株(Ty1,分离自上海市的患者血液样本)。

1.1.2 主要试剂及仪器

脑心浸液琼脂(Brain heart agar, BHA)和脑心浸液肉汤(Brain heart infusion, BHI)购自北京陆桥技术股份公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;沙门菌诊断血清购自丹麦国家血清研究院(Statens Serum Institut, SSI)。生物安全柜(新加坡 ESCO 公司),恒温培养箱(美国 3M 公司),恒温振荡摇床(德国 IKA 公司),小型高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.1.3 委托测序单位

本研究委托具有高通量大规模基因组测序服务资质的北京诺禾致源科技股份有限公司开展细菌全基因组测序。

1.2 方法

1.2.1 基因组提取、文库构建及全基因组测序

将菌株从冻存管划线接种至 BHA 平板复苏活化,37 °C 恒温培养箱过夜培养,挑取单菌落接种至 5 mL BHI 肉汤培养基,37 °C 恒温摇床振荡过夜培养(200 rpm),随后按照试剂盒说明书提取待测菌株的基因组 DNA,外送进行测序和文库构建,简要流程如下:电泳检测 DNA 纯度和完整性后,利用超声波将 DNA 破碎为 350 bp 短片段,使用 NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina 文库制备试剂盒制备文库,使用 Qubit 2.0 和 Agilent 2100 进行定量和插入片段大小检测,使用 qPCR 进行文库浓度定量后在 Illumina NovaSeq PE150 平台开展全基因组测序。

1.2.2 下机数据处理

使用 readfq 软件过滤原始数据获得有效数据,使用 SOAP denovo、SPAdes、ABYSS 和 CISA 等软件拼接数据获得初步组装结果,使用 GapClose 软件优化、补洞、过滤低测序深度 reads 和同 lane 污染,获得最终基因组数据。

1.2.3 基因注释、预测及功能分析

使用 GeneMarkS 软件预测编码基因;使用 RepeatMasker 预测散在重复序列,使用 Tandem Repeats Finder(TRF)软件预测串联重复序列;使用 tRNAscan-SE、rRNAmmer 和 cmsearch 等软件预测 tRNA、rRNA 和 sRNA;使用 IslandPath-DIOMB 预测基

因岛;使用 phiSpy 预测前噬菌体;使用 CRISPRdigger 预测 CRISPR;使用 SignalP、TMHMM 预测信号肽、跨膜结构蛋白及分泌蛋白;使用 SISTR 和 PubMLST 数据库预测多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST)型别;使用 Seqsero2 软件和 SISTR 数据库预测沙门菌血清型,同时使用抗血清和传统玻片凝集方法对菌株的菌体 O 抗原、鞭毛 H 抗原、血清群和血清型进行血清分型复核;使用 ResFinder-3.2 Server 预测耐药基因;使用致病毒力因子数据库(Virulence Factors Database, VFDB)预测毒力因子;分泌系统蛋白(Diamond 软件和 GO、KEGG、COG、NR、Pfam、TCDB 和 Swiss-Prot 等蛋白功能数据库);使用 EffectiveT3 软件预测 T3SS 效应蛋白。

1.2.4 构建 VFDB 毒力因子数目分析热图

使用 R(version 3.6.1,64-bit)和 heatmap 程序包(1.0.12)绘图,每个基因组中毒力因子的数目使用 Scale 参数进行标准化,使用的参考基因组及其在 NCBI 或 ENA 的 Accession number 如下:*Salmonella* (Typhimurium) str. ST4/74(NC_016857.1、NC_016858.1、NC_017675.1、NC_016859.1)、*Salmonella* (Typhimurium) str. 14028S(NC_016856.1、NC_016855.1)、*Salmonella* Typhi str. CT18(NC_003198.1、NC_003384.1、NC_003385.1)、*Salmonella* (Typhimurium) str. D23580_liv(LS997973.1、LS997974.1、LS997975.1、LS997976.1、LS997977.1)、*Salmonella* (Typhimurium) str. DT104(NC_022570.1、NC_022569.1)、*Salmonella* (Typhimurium) str. LT2(NC_003197.2、NC_003277.2)、*Salmonella* (Typhimurium) str. SL1344(NC_017720.1、NC_017719.1、NC_017718.1、NC_016810.1),其中 D23580_liv 为非洲 iNTS 流行代表株。此外,本实验室前期获得的 8 株临床来源非 iNTS 菌株基因组数据(Illumina NovaSeq PE150 测序平台)一并纳入毒力因子分析:*Salmonella* Typhi str. JST01、*Salmonella* Enteritidis str. JST02、*Salmonella* Rissen str. JST04、*Salmonella* Goldcoast str. JST06、*Salmonella* (Enteritidis) str. JST07、*Salmonella* Enteritidis str. JST09、*Salmonella* Kentucky str. JST10、*Salmonella* (Typhimurium) str. JST11。

2 结果

2.1 血清型及 MLST 分型

基于核心基因组多位点序列分型(Core genome multilocus sequence typing, cgMLST)聚类分析的 SISTR 平台和基于血清因子检测的 Seqsero2 平台对待测菌株所预测的血清型鉴定结果一致,且经传统血清凝集复核正确,结果如下:7 株 iNTS 菌株中包含 1 株鼠伤寒沙门菌(iNTS2),2 株肠炎沙门菌

(iNTS4 和 iNTS5),1 株科瓦利斯沙门菌(iNTS7),2 株 I 4,[5],12:i:-沙门菌(iNTS1 和 iNTS6)和 1 株 I 4,[5],12:d:-沙门菌(iNTS3,基因组数据中未检测到 *fljB* 基因);另外通过 Seqsero2 对 iNTS6 预测出一个可产生 O5 抗原变异的缺失突变;有 4 株 O 抗原为 B 群,2 株 O 抗原为 D1 群,1 株 O 抗原为 C3 群。只有 iNTS2 具有鞭毛二相抗原,其他均为单相菌。SISTR 和 PubMLST 预测的 MLST 型结果一致,I 4,[5],12:i:-和鼠伤寒血清型沙门菌均为 ST34 型(I 4,[5],12:i:-目前被视为鼠伤寒沙门菌单相变种),2 株肠炎沙门菌均为 ST11 型,科瓦利斯沙门菌为 ST1541 型,I 4,[5],12:d:-沙门菌为 ST279 型。

2.2 基因组组分

12 株实验菌株基于测序数据的基因组组分分析结果见表 1。基因组大小 4.7~5.2 Mb;GC 含量 52%左右;编码基因数量 4 400~5 100 个,平均长度约 900 bp,总长度约占基因组的 87%,鼠伤寒(及变种)沙门菌的基因组大小和编码基因数目高于其他血清型菌株;散在重复序列数 110~170 个,总长度 7.7~11 Mb,占基因组的 0.16%~0.2%;串联重复序列、小卫星序列和微卫星序列数目分别为 67~105 个、51~72 个和 1~3 个,肠炎沙门菌数目最少;3 种非编码 RNA 中,rRNA 和 tRNA 数目分别为 8~10 个和 74~82 个,鼠伤寒(及变种)和伤寒沙门菌 sRNA 数目为 105~112 个,其他血清型为 84~87 个。各菌株基因岛 9~16 个,平均长度 12~17 Mb。各个基因组中前噬菌体数目差别较大(6~26 个),CRISPR 位点 3~9 个。信号肽、跨膜结构蛋白和分泌蛋白的数目分别约为 360、1 100 和 280 个。

本研究共涉及 4 类分泌系统(type N secretion systems, TNSS),所有菌株均含 T3SS 和 T6SS,3 株菌涉及 T1SS 和 T2SS,Ty1 含有 14 个 T3SS 和 8 个 T6SS。未检出 T4SS、T5SS 和 T7SS 相关蛋白,T3SS 效应蛋白数目范围 152~187 个。伤寒沙门菌和鼠伤寒(及变种)沙门菌的 T3SS 效应蛋白数目高于其他血清型;iNTS3 和 iNTS7 的 T3SS 效应蛋白数目虽然 ≤160 个,但分别具有 12 个 T6SS 和 12 个 T3SS 相关蛋白,而其他血清型菌株的这两个分泌系统蛋白分别约为 8 个和 2 个。相关结果详见表 2。

2.3 毒力因子

本研究共针对 27 株沙门菌基因组在 VFDB 数据库进行了毒力因子的注释(Identity ≥ 80),包括:7 株 iNTS 菌株、5 株非 iNTS 菌株、NCBI 和 ENA 上 7 个参考菌株及前期获得的 8 株临床来源非 iNTS 菌株,结果见表 3。菌株毒力因子数目为 261~317 个,NCBI 和 ENA 上下载的 7 个基因组的毒力因子均超过

表1 7株 iNTS 和 5 株非 iNTS 沙门菌基因组组分预测

Table 1 Prediction of the genome components for 7 iNTS and 5 non-iNTS isolates

菌株编号	基因组大小		GC含量/%	编码基因			基因岛			散在重复序列			串联重复序列			小卫星			大卫星			前噬菌体			CRISPR			信号肽			跨膜蛋白			分泌蛋白			
	小/bp	大/bp		数目/个	总长/bp	均长/bp	占比/%	数目/个	总长/bp	均长/bp	占比/%	数目/个	总长/bp	均长/bp	占比/%	数目/个	总长/bp	均长/bp	占比/%	序列/个	序列/个	序列/个	数目/个	rRNA/个	rRNA/个	sRNA/个	数目/个	数目/个	数目/个	数目/个	数目/个	数目/个	数目/个	数目/个	数目/个		
iNTS1	4 974 011	4 974 011	52.16	4 351 407	905	87.48	12	185 412	15 451	10 240	0.205 9	97	70	3	76	9	108	12	4	364	1 136	293	364	1 136	293	364	1 136	293	364	1 136	293	364	1 136	293	364	1 136	293
iNTS2	5 117 580	5 117 580	51.92	4 454 943	901	87.05	14	188 290	13 449	10 408	0.203 4	104	69	3	81	9	106	22	8	373	1 173	300	373	1 173	300	373	1 173	300	373	1 173	300	373	1 173	300	373	1 173	300
iNTS3	4 722 703	4 722 703	52.13	4 084 260	914	86.48	11	143 201	13 018	7 766	0.164 4	87	55	3	78	10	86	7	5	371	1 094	297	371	1 094	297	371	1 094	297	371	1 094	297	371	1 094	297	371	1 094	297
iNTS4	4 702 145	4 702 145	52.13	4 099 920	903	87.19	16	237 598	14 850	8 486	0.180 5	67	51	1	74	8	87	6	3	353	1 121	274	353	1 121	274	353	1 121	274	353	1 121	274	353	1 121	274	353	1 121	274
iNTS5	4 730 765	4 730 765	52.10	4 120 992	902	87.11	16	264 387	16 524	8 748	0.184 9	70	53	1	75	8	87	8	5	354	1 121	276	354	1 121	276	354	1 121	276	354	1 121	276	354	1 121	276	354	1 121	276
iNTS6	5 094 576	5 094 576	51.92	4 438 071	901	87.11	14	231 910	16 565	9 423	0.185 0	97	65	3	81	9	105	21	9	370	1 171	297	370	1 171	297	370	1 171	297	370	1 171	297	370	1 171	297	370	1 171	297
iNTS7	4 881 464	4 881 464	52.02	4 242 945	900	86.92	15	211 375	12 498	9 074	0.185 9	93	68	1	79	10	84	14	6	370	1 125	296	370	1 125	296	370	1 125	296	370	1 125	296	370	1 125	296	370	1 125	296
S1	5 023 194	5 023 194	51.95	4 372 011	899	87.04	13	162 476	14 498	10 149	0.202 0	105	72	3	82	9	105	20	8	364	1 156	293	364	1 156	293	364	1 156	293	364	1 156	293	364	1 156	293	364	1 156	293
S2	5 158 990	5 158 990	51.84	4 484 184	898	86.92	13	203 189	15 630	11 262	0.218 3	99	65	3	79	10	110	24	7	379	1 174	306	379	1 174	306	379	1 174	306	379	1 174	306	379	1 174	306	379	1 174	306
S3	5 181 732	5 181 732	51.90	4 500 990	894	86.86	9	118 183	13 131	10 761	0.207 7	102	65	3	79	9	108	26	5	374	1 182	302	374	1 182	302	374	1 182	302	374	1 182	302	374	1 182	302	374	1 182	302
S4	5 092 438	5 092 438	51.87	4 424 616	901	86.89	12	176 126	14 677	10 454	0.205 3	100	67	3	82	10	108	20	7	370	1 172	298	370	1 172	298	370	1 172	298	370	1 172	298	370	1 172	298	370	1 172	298
Ty1	4 875 317	4 875 317	52.03	4 228 797	862	86.74	14	163 739	11 696	8 197	0.168 1	90	65	5	70	10	112	9	3	353	1 137	281	353	1 137	281	353	1 137	281	353	1 137	281	353	1 137	281	353	1 137	281

表2 分泌系统(TNSS)和 T3SS 效应蛋白相关基因数

Table 2 Relevant gene number of TNSS and T3SS effector protein

菌株编号	T1SS	T2SS	T3SS	T4SS	T5SS	T6SS	T7SS	T3SS 效应蛋白
iNTS1	0	0	8	0	0	2	0	175
iNTS2	0	0	7	0	0	3	0	180
iNTS3	0	0	9	0	0	12	0	152
iNTS4	1	1	9	0	0	1	0	154
iNTS5	0	1	8	0	0	2	0	157
iNTS6	0	0	7	0	0	2	0	179
iNTS7	1	1	12	0	0	3	0	160
S1	0	0	7	0	0	2	0	180
S2	0	0	8	0	0	2	0	187
S3	0	0	7	0	0	3	0	185
S4	0	0	7	0	0	2	0	177
Ty1	0	0	14	0	0	8	0	175

300 个,1 株粪便分离株肯塔基沙门菌为 317 个,其他分离株数目范围 261~297 个。分泌系统、菌毛型黏附因子类别的毒力因子数最多,平均数分别为 84 个和 72 个,前者中沙门菌毒力岛 SPI-1 和 SPI-2 编码 T3SS 的毒力因子个数最多,平均数分别为 36 个和 35 个。部分毒力因子在所有菌株中均存在且数目相同,如 Stb、Sth、SinH、Mg2+_transport、RpoS、Invasion、Iron/managanease_transport、LOS、NlpI 等。由于 VFDB 数据库沙门菌数据集中有相当一部分毒力因子暂未归类,本研究中除已归类的毒力因子外统一归为“未归类”,该类别毒力因子中平均数目排名前 3 位的分别为周生菌毛(52 个)、中心岛(20 个)和肠菌素(15 个)。

不同血清型菌株之间毒力因子数目存在差异,黄金海岸沙门菌、鼠伤寒沙门菌及变种的菌毛黏附因子数低于其他血清型沙门菌;14 株鼠伤寒沙门菌及变种和黄金海岸沙门菌中有 10 株携带 2 个或 4 个荚膜/免疫逃避毒力因子,伤寒沙门菌可携带 10 个或 14 个;所有肠炎沙门菌和 9 株鼠伤寒沙门菌中的 7 株携带 Spv 毒力因子;只有鼠伤寒(及变种)和肠炎血清型携带应激蛋白 SodCI;只有 3 株伤寒沙门菌和 1 株黄金海岸沙门菌携带伤寒毒素因子——细胞致死性膨胀毒素 B(cdtB);在未归类的毒力因子中,伤寒沙门菌的侵袭因子和黄金海岸沙门菌的周生鞭毛远高于其他血清型,肠炎沙门菌的中心岛因子远低于其他血清型。所有肠炎沙门菌的各类毒力因子数目差异为 0~1 个。相较于其他血清型沙门菌,黄金海岸沙门菌 JST10 携带了两倍的铁载体肠菌素,而两株食源性鼠伤寒沙门菌(S1 和 S3)缺少糖基化铁载体肠菌素 Salmochelins。基于对国际上 ST313 型 iNTS 流行株 D23580 的认识,本研究关注了 SseI 毒力因子的携带情况,除 D23580_liv 之外所有的鼠伤寒(及变种)沙门菌和

表3 27株不同沙门菌基因组VFDB数据库毒力因子注释数目

Table 3 Number of the genome annotation of virulence factors in VFDB for 27 different *Salmonella* isolates

血清型	菌株编号	具有侵袭性	菌株/基因组来源	sse/基因	菌毛型黏附因子	非菌毛型黏附因子	非菌毛型黏附因子	巨噬细胞诱导	镁摄入	荚膜/免疫逃避	分泌系统	调控	血清抗性	Svp/毒力位点	应激蛋白	伤寒毒素	周生鞭毛	中心岛	肠菌素	未归类			总计
																				侵袭素	侵袭素	其他	
鼠伤寒	D23580_liv	+	ENA	-	70	4	2	2	2	4	85	4	2	5	1	0	53	24	15	8	23	123	302
鼠伤寒	14028S	-	NCBI	+	70	4	2	2	2	4	87	4	2	5	1	0	53	24	15	10	25	127	308
鼠伤寒	4_74	-	NCBI	+	70	4	2	2	2	4	87	4	1	5	1	0	53	24	15	7	27	126	306
鼠伤寒	DT104	-	NCBI	+	71	4	2	2	2	4	85	4	2	5	1	0	53	24	15	12	23	127	307
鼠伤寒	L72	-	NCBI	+	70	4	2	2	2	4	85	4	2	5	1	0	53	24	15	6	25	123	302
鼠伤寒	SL1344	-	NCBI	+	70	4	2	2	2	4	87	4	1	5	1	0	53	24	15	7	28	127	307
鼠伤寒	iNTS2	+	脑脊液分离株	+	66	4	1	2	2	2	84	4	1	0	1	0	53	24	15	0	16	108	273
鼠伤寒	JST11	-	粪便分离株	+	70	4	2	2	2	0	85	4	1	5	1	0	53	24	15	0	15	107	281
鼠伤寒	S4	N/A	食品分离株	+	66	3	1	2	2	2	84	4	2	0	1	0	53	24	15	0	16	108	273
I4,[5],12:;-	iNTS1	+	血液分离株	+	66	3	1	2	2	0	84	4	2	0	1	0	51	24	15	0	15	105	268
I4,[5],12:;-	iNTS6	+	血液分离株	+	67	4	1	2	2	2	84	4	1	0	1	0	51	24	15	0	16	106	272
I4,[5],12:;-	S1	N/A	食品分离株	+	66	3	0	2	2	0	83	4	1	0	1	0	51	24	10	0	16	101	261
I4,[5],12:;-	S2	N/A	食品分离株	+	66	3	1	2	2	0	85	4	1	0	1	0	51	25	15	0	15	106	269
I4,[5],12:;-	S3	N/A	食品分离株	+	66	3	1	2	2	2	84	4	2	0	1	0	51	24	10	0	16	101	266
肠炎	iNTS4	+	脑脊液分离株	+	75	4	2	2	2	0	88	4	1	5	1	0	49	4	15	1	14	83	265
肠炎	iNTS5	+	血液分离株	+	75	4	2	2	2	0	88	4	1	5	1	0	49	4	15	1	14	83	265
肠炎	JST02	-	粪便分离株	+	75	4	2	2	2	0	88	4	2	5	1	0	49	4	15	1	15	84	267
肠炎	JST07	-	粪便分离株	+	75	4	2	2	2	0	88	4	2	5	1	0	49	4	15	1	14	83	266
肠炎	JST09	-	粪便分离株	+	75	4	2	2	2	0	88	4	1	5	1	0	49	4	15	1	14	83	265
伤寒	CT18	+	NCBI	-	79	3	1	2	2	14	80	4	2	0	0	1	50	21	15	22	23	131	317
伤寒	Ty1	+	血液分离株	-	79	3	1	2	2	10	79	4	2	0	0	1	50	21	15	17	13	116	297
伤寒	JST01	+	血液分离株	-	79	3	1	2	2	10	78	4	1	0	0	1	50	21	15	12	13	111	290
I4,[5],12:d:;-	iNTS3	+	血液分离株	-	78	4	1	2	2	0	86	4	1	0	0	0	50	23	15	1	14	103	279
科瓦利斯	iNTS7	+	血液分离株	-	77	3	1	2	2	0	82	4	1	0	0	0	49	23	14	1	14	101	271
里森	JST04	-	粪便分离株	-	77	4	1	2	2	0	81	4	1	0	0	0	49	23	15	0	15	102	272
黄金海岸	JST06	-	粪便分离株	-	67	2	1	2	2	2	80	4	1	0	0	1	52	24	15	1	15	107	267
肯塔基	JST10	-	粪便分离株	-	85	3	1	2	2	0	82	7	2	0	0	0	67	25	25	0	18	135	317
合计					1950	96	38	54	68	2277	111	39	60	19	4	1394	538	404	109	472	2917	7633	

注:表中各毒力因子类别及其包含的具体毒力因子分布如下:菌毛型黏附因子(Fimbrial_adherence_determinants);Agf/Csg_Bef、Fim_Lpf、Pef、Peg_pili、Saf、Sef、Sta、Sfb、Stc、Std、Ste、Stf、Stg、Sti、Stj、Stk、Tef和Type_1_fimbriae;非菌毛型黏附因子(Nonfimbrial_adherence_determinants);Misl、RatB、SinH和ShdA;巨噬细胞诱导(Macrophage_inducible_genes);Mig-5和Mig-14;荚膜/免疫逃避(Capsule/Immune_evasion);Capsule和Vi_antigen;分泌系统(Secretion_system);TTSS(SPI-1_encode)、TTSS-1_translocated_effectors、TTSS-2_translocated_effectors、TTSS-1_translocated_effectors、Mxi-Spa_TTSS_effectors和T6SS;调控(Regulation);Fur和PhoPQ;血清抗性(Serum_resistance);Rck;Svp位点/毒力(Svp_locus/Toxin);SodCl;毒素(Toxin);未归类(2019版VFDB数据库中沙门菌数据集未归类的毒力因子);周生鞭毛(peritrichous_flagella);中心岛(*Salmonella*_centrisome_island、SCI)、肠菌素(Enterobactin)、侵袭素(Invasin)和其他(LPS、AcrAB、Allantoin_utilization、ApeE、BapA、ClyA、colicin[colicin Ib和colicin EI]、CS[CS13/PCF09和CS31 A capsule-like antigen]、EF-Tu、EhaB_AIDA-1_type、Hek、Heme_biosynthesis、OmpA、RcsAB);N/A:食品分离株,无法确定是否具有侵袭性。

肠炎沙门菌均保留 *SseI* 因子,而 I 4, [5], 12:d:-沙门菌、科瓦利斯沙门菌、里森沙门菌、黄金海岸沙门菌、肯塔基沙门菌和伤寒沙门菌基因组中均未发现该毒力因子。

不同沙门菌毒力因子注释结果的热图(图 1)显示,所有菌株基因组基于毒力因子的分布被分成与沙门菌血清型相关的 4 个簇,伤寒、鼠伤寒和肠炎血清型因菌株数较多单独成簇,其他血清型成为一

簇。伤寒和肠炎沙门菌的毒力因子分布相似度较高,而鼠伤寒沙门菌不同 ST 型之间及其他血清型之间的毒力因子差异度较大。鼠伤寒沙门菌的 T3SS 效应蛋白低于其他血清型,伤寒沙门菌的侵袭因子 (*Invasin*) 高于其他血清型,肠炎沙门菌中心岛毒力因子数目低于其他血清型。具有较高侵袭性的伤寒沙门菌和 iNTS 菌株,整体上并未存在较为共性的毒力因子分布特征。

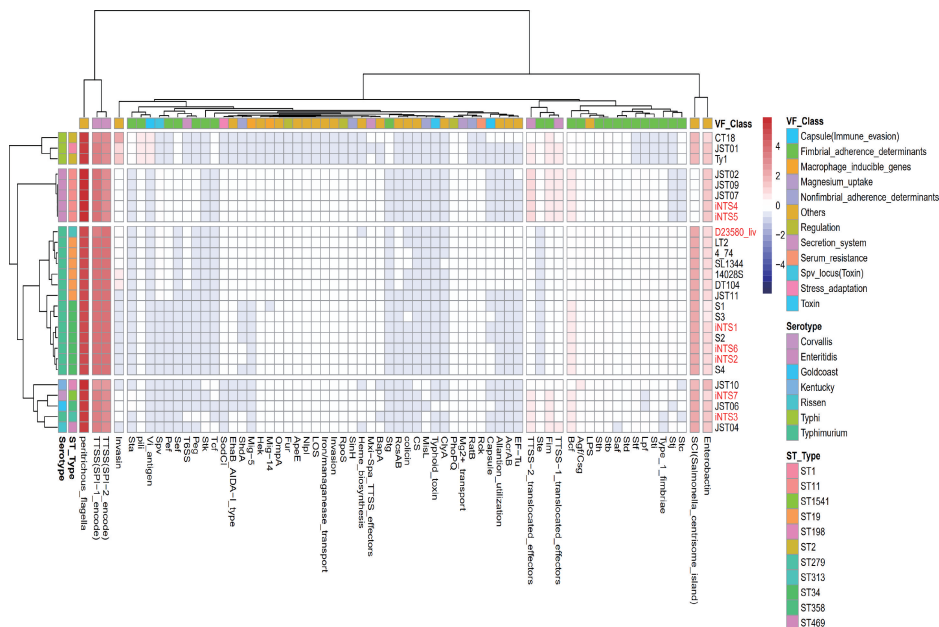


图 1 不同沙门菌株毒力因子注释结果热图

Figure 1 Heatmap of the virulence factors annotation for different *Salmonella* isolates

3 讨论

沙门菌存在五类分泌系统^[7], II 型分泌系统 (T2SS) 仅在沙门菌减毒疫苗中报道过^[8]; 两套 III 型分泌系统 (T3SS-1 和 T3SS-2) 分别由毒力岛 SPI-1 和 SPI-2 进行编码, 对非吞噬细胞侵袭、吞噬细胞内存活增殖以及宿主体内扩散具有重要作用^[9]; VI 型分泌系统的编码涉及 SPI-6 和 SPI-19, 与侵入宿主细胞、菌毛和侵袭素组装合成及全身性感染相关^[10]。本研究所有沙门菌均含有 T3SS 和 T6SS, 表明这两种分泌系统在沙门菌属中的重要性; 同时发现两株非常见血清型 iNTS 分别具有较高数目的 T6SS 和 T3SS 蛋白, 与本研究中的伤寒沙门菌情况类似, 推测这可能是此两株菌成为 iNTS 的重要原因之一。2 株肠炎及 1 株科瓦利斯血清型菌株均有 T2SS 相关基因存在, 但 T2SS 系统是否完整且是否与 iNTS 菌株侵袭性相关有待进一步研究。

本研究中 3 株伤寒沙门菌在部分毒力因子的数目上均远高于其他 NTS 菌株, 毒力因子总数也处于较高水平, 在一定程度上揭示了沙门菌高侵袭性和可引起全身性感染的主要基因组特征。不同血清

型之间的毒力因子分布差异较为明显, 但 iNTS 菌株间并未呈现较为一致的毒力因子分布特征, 鼠伤寒血清型不同 ST 型的毒力因子分布存在差别, 但由于本研究纳入了 NCBI 或 ENA 数据库的几株沙门菌基因组完成图数据, 并非仅开展了二代测序获得的基因组数据, 推测这也是造成鼠伤寒沙门菌之间毒力因子分布不同的可能原因。肠炎沙门菌的毒力因子分布较为固定, 该血清型 iNTS 菌株暂未发现可能影响侵袭性的关键因子。本研究中的黄金海岸沙门菌虽然并非 iNTS 菌株, 但如伤寒沙门菌一样, 携带诸如荚膜/免疫逃避、伤寒毒素、周生鞭毛等多种高于其他血清型沙门菌的毒力因子, 同时具备可促进全身性感染^[11]的铁载体肠菌素等, 并存在如国际 iNTS 流行株中出现的 *sseI* 基因缺失(假基因化)情况, 推测该菌株也可能具有较高的侵袭能力, 需要后续开展致病实验进行进一步验证。目前国际报道对非洲 iNTS 菌株的高侵袭性有以下几种解释: ①基因组假基因化(如 *sseI* 基因)或基因缺失促进从肠道到全身系统的扩散^[12-13]; ②调节感染期间毒力蛋白如 *FliC* 和 *SopE2* 的表达产生免疫逃避^[14]; ③非编码区核苷酸变化引起相关毒力因子如

PgtE 高表达^[15],本研究中 iNTS 菌株的高侵袭性生成机制在基因组层面暂未明了,仍需结合转录组学和 SNP 位点分析进行验证,可作为本研究的下一步研究方向。

虽然研究表明鼠伤寒沙门菌的 iNTS 代表株和普通胃肠炎代表株在核心基因组水平仅存在 856 个 SNP^[16],但目前普遍认为在致病性表型尤其是宿主细胞入侵和炎症小体活化等过程,ST313 型鼠伤寒 iNTS 菌株已经处于胃肠炎 ST19 型鼠伤寒沙门菌与伤寒沙门菌的中间状态,而且与后者越来越接近^[13-14]。值得注意的是,巴西出现 ST313 型新克隆株系的同时,还发现巴西 ST19 型 iNTS 与非洲 ST313 型 iNTS 存在相似的进化路径^[17],这意味着不同国家和地区的鼠伤寒 iNTS 菌株可能会在不同 ST 型别上出现相似的进化与流行。另外有评估研究认为都柏林、猪霍乱、伊德堡、海德堡和维尔肖为最具侵袭性的沙门菌^[18],而非鼠伤寒和肠炎等血清型,这一定程度上提示其他国家和地区的其他血清型沙门菌,也同样可能具有高侵袭性和引起大规模流行的潜力和进化途径,上述报道均支持了 Kingsley 等^[12]的观点:ST313 型鼠伤寒沙门菌并不是唯一可引起人类全身性感染疾病的 iNTS,这类菌株可能正在成为人类沙门菌病的重要克隆并且继续进化和微进化。我国 ST34 型鼠伤寒沙门菌在多种来源的沙门菌分离株中均具较大占比,出现高侵袭性、高流行性甚至同时高耐药性 iNTS 菌株的风险较高,亟待引起注意并开展相应监测研究。

综上所述,iNTS 疾病已成为全球性公共卫生问题,尽管已开展多项研究,但人们对 iNTS 疾病负担、流行分布、遗传背景、生物学特征、发病机制、传播途径、储库来源及侵袭性差异等多方面的了解还相当不完整,甚至知之甚少。我国也需要针对这一状况开展监测和研究,从主要型别如 ST34 型鼠伤寒 iNTS 入手,开展流行病学调查,并进一步研究其致病性和进化机制,以确定其在不同人群中发生和传播的遗传基础。本研究也将会在后续工作中持续监测以获得更多菌株数目并针对致病机制开展深入分析。

参考文献

[1] MAJOWICZ S E, MUSTO J, SCALLAN E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella gastroenteritis* [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2010, 50(6): 882-889.

[2] MANDAL B K, BRENNAND J. Bacteraemia in salmonellosis; a 15 year retrospective study from a regional infectious diseases unit [J]. *British Medical Journal*, 1988, 297: 1242-1243.

[3] UCHE I V, MACLENNAN C A, SAUL A. A systematic review of the incidence, risk factors and case fatality rates of invasive nontyphoidal *Salmonella* (iNTS) disease in Africa (1966 to

2014) [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2017, 11 (1): e0005118.

[4] CRUMP J A, HEYDERMAN R S. A perspective on invasive *Salmonella* disease in Africa [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2015, 61 (Suppl_4): S235-S240.

[5] AO T T, FEASEY N A, GORDON M A, et al. Global burden of invasive Nontyphoidal *Salmonella* Disease, 2010 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21 (6): 941-949.

[6] BALASUBRAMANIAN R, IM J, LEE J S, et al. The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal *Salmonella* infections [J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2019, 15 (6): 1421-1426.

[7] 安树敏, 郭荣显, 耿士忠, 等. 沙门菌分泌系统研究进展 [J]. *中国兽医学报*, 2016, 36 (12): 2176-2182.

[8] KONJUFCA V, JENKINS M, WANG S F, et al. 3rd. Immunogenicity of recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains carrying a gene that encodes *Eimeria tenella* antigen SO₇ [J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76 (12): 5745-5753.

[9] 薛颖, 郭荣显, 钱珊珊, 等. 沙门菌毒力岛的研究进展 [J]. *微生物与感染*, 2015, 10 (6): 381-389.

[10] 卢鹏, 邹清华. 细菌 VI 型分泌系统及其致病机制的研究进展 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2016, 44 (5): 64-68.

[11] CROUCH M L V, CASTOR M, KARLINSEY J E, et al. Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 67 (5): 971-983.

[12] KINGSLEY R A, MSEFULA C L, THOMSON N R, et al. Epidemic multiple drug resistant *Salmonella typhimurium* causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype [J]. *Genome Research*, 2009, 19 (12): 2279-2287.

[13] CARDEN S E, WALKER G T, HONEYCUTT J, et al. Pseudogenization of the secreted effector gene *ssel* confers rapid systemic dissemination of *S. typhimurium* ST313 within migratory dendritic cells [J]. *Cell Host & Microbe*, 2017, 21 (2): 182-194.

[14] CARDEN S, OKORO C, DOUGAN G, et al. Non-typhoidal *Salmonella typhimurium* ST313 isolates that cause bacteremia in humans stimulate less inflammasome activation than ST19 isolates associated with gastroenteritis [J]. *Pathogens and Disease*, 2015, 73 (4): ftu023.

[15] HAMMARLÖF D L, KRÖGER C, OWEN S V, et al. Role of a single noncoding nucleotide in the evolution of an epidemic African clade of *Salmonella* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115 (11): E2614-E2623.

[16] CANALS R, HAMMARLÖF D L, KRÖGER C, et al. Adding function to the genome of African *Salmonella typhimurium* ST313 strain D23580 [J]. *PLoS Biology*, 2019, 17 (1): e3000059. DOI:10.1371/journal.pbio.3000059.

[17] PANZENHAGEN P H N, PAUL N C, CONTE C A JUNIOR, et al. Genetically distinct lineages of *Salmonella typhimurium* ST313 and ST19 are present in Brazil [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2018, 308 (2): 306-316.

[18] PARISI A, STANAWAY J D, SARKAR K, et al. The global burden of non-typhoidal *Salmonella* invasive disease: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2020, 101: 341.