

研究报告

基于全基因组测序的鼠伤寒沙门菌食源性
疾病暴发事件
分离株分子特征研究王君^{1,2}, 韩蓓¹, 刘东立³, 陈晓草², 贺金明², 刘新利², 宋海清²(1. 西安交通大学医学部公共卫生学院, 陕西 西安 710061; 2. 铜川市疾病预防控制中心,
陕西 铜川 727031; 3. 陕西省疾病预防控制中心, 陕西 西安 710054)

摘要:目的 分析一起鼠伤寒沙门菌引起的食源性疾病暴发事件, 通过实验室检测和相似性分析研究病原菌的分子特征, 为临床诊疗、事件溯源和防控提供科学依据。方法 对采集样本采用 FilmArray 多重 PCR 系统筛查检测, 利用质谱鉴定、血清分型鉴定病原菌; 对分离菌株进行抗生素药敏试验、脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分析、全基因组测序; 比对沙门菌 MLST 获得序列型别 (ST)、cgMLST、rMLST 并进行聚类分析; 分析分离株的耐药基因和毒力因子。结果 共分离沙门菌 15 株, 其中可疑食物来源 3 株, 病人粪便来源 12 株, 血清型鉴定结果均为鼠伤寒沙门菌; PFGE 指纹图谱呈两种带型, 病人粪便来源 12 株与可疑食物来源株 2 株为同一带型, 相似度为 100%, 另 1 株可疑食物来源株带型与其他带型相似度为 88.89%; 15 株分离株 MLST 均为 ST19 型, rST-138396(new) 型, cgMLST 核心基因组位点差异为 1~15 个, wgMLST 核心基因组位点差异为 1~395 个; 15 株分离菌耐药谱为: 氨苄西林-氨苄西林/舒巴坦-头孢唑啉-头孢替坦-阿米卡星-庆大霉素-妥布霉素-左氧氟沙星-喹诺酮类-链霉素-茶啶酸-四环素-氯霉素; 菌株基因组携带 13 种相关耐药基因、271 种已知的毒力基因。结论 本次食源性疾病暴发事件由共同来源的、具有相同分子分型特征的鼠伤寒沙门菌污染食物引起。该事件分离的菌株能够产生超广谱 β -内酰胺酶, 对 13 种抗菌药物耐药, 为严重的多重耐药鼠伤寒沙门菌。

关键词:鼠伤寒沙门菌; 食源性疾病; 同源性分析; 耐药表型; 全基因组测序; 毒力基因; 耐药基因

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2024)10-1108-09

DOI: 10.13590/j.cjfh.2024.10.002

Whole genome sequencing was used for the pathogen molecular characterization of *Salmonella* typhimurium during a foodborne disease outbreak

WANG Jun^{1,2}, HAN Bei¹, LIU Dongli³, CHEN Xiaocao², HE Jinming², LIU Xinli², SONG Haiqing²

(1. School of Public Health, Health Science Center, Xi'an Jiaotong University, Shaanxi Xi'an 710061, China; 2. Center for Disease Control and Prevention of Tongchuan, Shaanxi Tongchuan 727031, China; 3. Shaanxi Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shaanxi Xi'an 710054, China)

Abstract: Objective To analyze an outbreak of foodborne disease caused by *Salmonella* typhimurium, and to study the molecular characteristics of the pathogen through laboratory detection and similarity analysis, so as to provide scientific basis for clinical diagnosis and treatment, incident traceability, prevention and control. **Methods** The collected samples were screened and detected by the FilmArray multiplex PCR system, and the pathogens were identified by mass spectrometry and serotyping. Antibiotic susceptibility tests, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), and whole genome sequencing were performed on the isolated strains. Sequence type (ST), cgMLST, and rMLST were obtained by comparing the MLST of *Salmonella* and performing cluster analysis. The isolates were studied for genes that are related to drug resistance and virulence. **Results** A total of 15 *Salmonella* strains were isolated, including 3 from suspected food sources and 12 from the patient's feces, and all of them were *Salmonella* typhimurium. The PFGE pattern showed two patterns, 12 strains from stool and 2 strains from suspected food had the same pattern, the similarity was 100%, and the similarity of the other one strain from suspected food was 88.89%. The 15 isolates were categorized into either ST19 or

收稿日期: 2024-04-02

基金项目: 陕西省卫生科研基金项目 (2018E007)

作者简介: 王君 女 副主任技师 研究方向为病原微生物检验与食源性疾病 E-mail: wangjun0725@outlook.com

通信作者: 韩蓓 女 教授 研究方向为细菌代谢与食品安全 E-mail: hanbei@mail.xjtu.edu.cn

rST-138396 (new) type. The cgMLST and wgMLST core genome loci varied from 1 to 15 and 1 to 395, respectively. The drug resistance spectrum of 15 isolates was as follows: Ampicillin-Ampicillin/Sulbactam-Cefazolin-Cefotetan-Amikacin-Gentamicin-Tobramycin-Levofloxacin-Furazolidone-Streptomycin-Nalidixic Acid-Tetracycline-Chloramphenicol; The genome of the strains contained 13 related drug resistance genes and 271 known virulence genes. **Conclusion** This foodborne disease outbreak was caused by *Salmonella* typhimurium from the same source and with the same molecular typing characteristics. The isolated *Salmonella* typhimurium was capable of producing extended-spectrum β -lactamases and was resistant to 13 antimicrobials, indicating that it was a severe multi-drug resistant strain.

Key words: *Salmonella* typhimurium; foodborne diseases; homology testing; drug resistance phenotype; whole genome sequencing; virulence gene; drug resistance gene

沙门菌是引起腹泻病的四大病因之一,造成的食源性疾病负担重,据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)估计,沙门菌每年导致 9 400 万例肠胃炎病例,造成 3 300 万人死亡^[1]。在我国,由沙门菌引起食物中毒人数居食源性疾病病例数首位^[2]。人感染沙门菌一般是由于食用被污染的动物源食品,或通过粪口途径出现人际传播。迄今已发现 2 600 余种沙门菌血清型,其中最常引起人类疾病的是肠炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌^[3]。鼠伤寒沙门菌致病性与其毒力密切相关,感染发病机制复杂,涉及多种毒力因子,主要有脂多糖、肠毒素、菌毛、毒力岛、质粒等^[4]。

本研究基于 2022 年 6 月发生在陕西省铜川市一起鼠伤寒沙门菌引起的食源性疾病暴发事件,通过血清分型、脉冲场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)分子分型进行相似性分析;通过药敏试验鉴定病原菌耐药表型,为临床诊疗提供依据;通过细菌全基因组测序(Whole genome sequencing, WGS),分析病原菌耐药、毒力相关基因携带情况及分子特征,在基因水平探究物种的进化规律,为更精准地进行传染病防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基本情况

2022 年 6 月 11 日,陕西省铜川市某职工食堂多名就餐人员出现发热并伴有消化道症状,主要表现为发热(38.1℃~39.5℃)、腹痛、腹泻,24 h 内腹泻次数 ≥ 3 次,且多为水样便。铜川市疾病预防控制中心组织流调人员对现场进行流行病学调查,通过查阅食源性疾病监测系统网报患者等方式开展病例搜索,对该职工食堂后厨进行现场勘查,对可疑食物及储存、加工用具、后厨环境等开展卫生学调查。采集患者粪便标本、可疑食物剩余物样本和环境样本检测。

1.1.2 主要仪器

多重 PCR 分析仪(法国梅里埃 BioFire FilmArray™);微生物质谱鉴定系统(重庆中元 EXS3000);全自动微生物鉴定及药敏分析系统(法国梅里埃 VITEK2 Compact);脉冲场凝胶电泳仪(美国 BIO-RAD CHEF-MAPPER-XA);凝胶成像系统(美国 BIO-RAD GelDoc XR+)。

1.2 主要试剂和材料

FilmArray Gastrointestinal (GI) Panel 购自 BioFire Diagnostics, LLC;缓冲蛋白胨水、营养琼脂培养基分别购自北京陆桥技术股份有限公司和广东环凯微生物科技有限公司;沙门显色培养基购自法国科玛嘉公司;沙门菌诊断血清为丹麦 SSI 产品;质谱系统试剂购自重庆中元汇吉公司;AST-GN13 药敏鉴定卡购自法国梅里埃公司;革兰阴性需氧菌药敏检测板 A-5 购自上海复兴诊断生物技术有限公司;蛋白酶 K、限制性内切酶 *Xba* I 购自日本 Takara 公司。沙门菌标准株 H9812 由陕西省疾病预防控制中心生物所赠予。

1.3 方法

1.3.1 病原菌分离鉴定:应用 FilmArray 多重 PCR 系统 GI Panel 对 22 种常见的胃肠道病原体(包括病毒、细菌和寄生虫)进行快速筛查检测。根据筛查结果,参照 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》对采集的样本进行增菌分离培养,随后进行菌种鉴定及血清分型。

1.3.2 PFGE 分型分析:按照《国家致病菌识别网技术手册(细菌分子分型实验篇)(2020 版)》对分离的菌株使用 PFGE 进行分子分型,标准株 H9812 作为分子量标准。用 BioNumerics 7.6 软件进行聚类分析。

1.3.3 菌株药敏试验:根据全自动微生物鉴定及药敏分析系统标准操作程序,采用 AST-GN13 药敏卡对分离的菌株进行药敏试验。根据革兰阴性需氧菌药敏检测板 A-5 说明书对分离株进行药敏检测和结果判定。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。

1.3.4 全基因组测序及数据分析:对分离的病原菌提取基因组 DNA 后送生工生物工程(上海)股份

有限公司进行全基因组序列测定;利用基因组流行病学中心(Center for Genomic Epidemiology, <http://www.genomicepidemiology.org/>)的 ResFinder 4.6.0 工具进行耐药基因的预测及注释,过滤标准:准确性>95%,覆盖度>60%。通过细菌基因组分析平台 fDBAC (<http://fbac.dmicrobe.cn/>),取 Identity≥90%,参考毒力因子数据库 VFDB (<http://www.mgc.ac.cn>) 分析毒力基因;利用基因组流行病学中心(Center for Genomic Epidemiology, <http://www.genomicepidemiology.org/>)的 SPIFinder2.0 工具和 PlasmidFinder2.1 分析沙门菌毒力岛和质粒, MGEFinder1.0.3 分析可移动元件;在 Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>) 沙门菌数据库进行多位点序列分型 (Multilocus sequence typing, MLST)、核心基因组多位点序列分型 (Core-genome multilocus sequence typing, cgMLST)、核糖体蛋白基因多位点序列分型 (Ribosomal protein gene multilocus sequence typing, rMLST)、全基因组多位点序列分型 (Whole-genome multilocus sequence typing, wgMLST), 用 Ridom SeqSphere+ 进行 cgMLST 分型及最小生成树 (Minimum spanning tree, MST) 构建^[5]。利用基于单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 聚类工具, 以鼠伤寒沙门菌 LT2 (ATCC700720) 为参考, 构建 SNP 进化树。

2 结果

2.1 流行病学调查结果

该职工食堂位于铜川市新区, 6月11日中午 385 人就餐后, 多人因腹痛、腹泻、发热等症就诊, 截

至 6 月 20 日, 食源性疾病监测系统网报病例 151 例, 住院 7 例, 门诊 144 例, 罹患率 39.22%。报告的 151 例病例中, 男性 64 例, 女性 87 例, 男女比例 1:1.36; 最大年龄 60 岁, 最小年龄 12 岁, 多数为青壮年。现场卫生学调查结果为: 该职工食堂后厨卫生良好, 厨房用水为市政自来水, 餐具为公共消毒餐具, 单位职工统一饮用净化水。

2.2 病原体分离鉴定结果

应用多重 PCR 系统对采集的可疑食物剩余物、后厨环境、病例粪便共 62 份样本进行筛查检测, 共检出沙门菌核酸阳性样本 23 份。培养分离后得到 15 株沙门菌, 12 株来自病例粪便 (SN22TC0075SAL、SN22TC0076SAL、SN22TC0077SAL、SN22TC0078SAL、SN22TC0079SAL、SN22TC0080SAL、SN22TC0081SAL、SN22TC0082SAL、SN22TC0083SAL、SN22TC0084SAL、SN22TC0085SAL、SN22TC0101SAL); 3 株来自可疑食物, 为三色鸡蛋干 (SN22TC0102SAL)、豇豆拌鸡胗 (SN22TC0103SAL)、青笋炒木耳 (SN22TC0104SAL), 经血清学鉴定均为鼠伤寒沙门菌。

2.3 PFGE 相似性分析结果

15 株鼠伤寒沙门菌经 *Xba* I 酶切进行脉冲场凝胶电泳, DNA 片段得到较好地分离, 12 株病人粪便来源分离株与可疑食物三色鸡蛋干、豇豆拌鸡胗分株呈现同一带型, 相似度 100%, 认为是同一来源的克隆株; 青笋炒木耳分离株与其他菌株带型相似性为 88.89%。同时选取近两年本地区散发病例分离的 4 株鼠伤寒沙门菌进行聚类, 与本次事件菌株相似度从 17.99% 至 79.31% 不等, 为不同克隆株。见图 1。

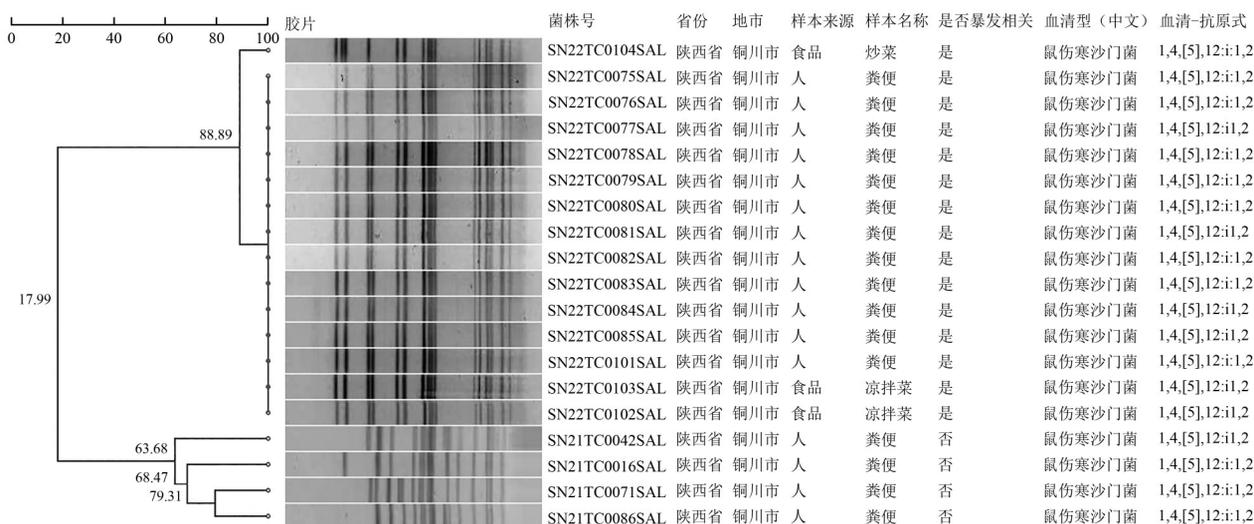


图1 本次事件15株鼠伤寒沙门菌和本地区4例散发病例分离株PFGE聚类分析图

Figure 1 PFGE clustering analysis of 15 *Salmonella* Typhimurium isolates in this incident and 4 sporadic cases isolated locally

2.4 药敏试验结果

AST-GN13 药敏鉴定卡结果显示, 对所测试的

18 种抗菌药物, 15 株分离菌株均对 9 种抗菌药物耐药 (氨基苄西林、氨基苄西林/舒巴坦、头孢唑啉、头孢

替坦、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、左氧氟沙星、呋喃妥英),通过 VITEK2 Compact 高级专家系统判定表型包括获得型头孢菌素酶(ACC-1 除外),超广谱 β-内酰胺酶、氨基糖苷类野生型、喹诺酮类耐药、呋喃类野生型耐药和甲氧苄氨嘧啶耐药野生型。药敏检测板的 17 种抗菌药物检测结果显示,15 株分离菌株均对 7 种抗菌药物耐药(氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、四环素、氯霉素、萘啶酸、链霉素、阿米卡星)。两种药敏检测方法相同药物的药敏结果一致,分离的 15 株菌株耐药结果相同。综合 AST-GN13 药敏鉴定卡和 A-5 药敏检测板两种检

测结果,本次事件分离菌株对 13 种抗菌药物均耐药,耐药谱为“氨苄西林-氨苄西林/舒巴坦-头孢唑林-头孢替坦-阿米卡星-庆大霉素-妥布霉素-左氧氟沙星-呋喃妥英-链霉素-萘啶酸-四环素-氯霉素”。

2.5 全基因组基本特征

本次分离的 15 株菌株基因组含有基因数量 4 706~4 768 个不等,基因组总长度在 4 299 476~4 335 031 bp 之间,平均基因长度约为 909.56 bp,平均 GC 含量为 53.27%,平均编码基因在基因组全长占比为 87.83%,详见表 1。

表 1 15 株鼠伤寒沙门菌基因组特征

Table 1 Genomic characterization of 15 strains of *Salmonella typhimurium*

菌株编号	来源	基因数量	基因总长度/bp	基因平均长度/bp	基因区 GC 含量/%	基因/基因组/%	基因间区长度/bp	基因间区 GC 含量	基因间区/基因组/%
SN22TC0075SAL	人	4 764	4 332 599	909.25	53.26	87.82	600 374	43.95	12.16
SN22TC0076SAL	人	4 767	4 333 254	909.01	53.26	87.81	601 467	43.96	12.19
SN22TC0076SAL	人	4 763	4 332 374	909.24	53.27	87.83	601 017	43.95	12.17
SN22TC0078SAL	人	4 766	4 335 031	909.57	53.27	87.87	598 541	43.90	12.13
SN22TC0079SAL	人	4 764	4 331 377	909.19	53.27	87.81	601 367	43.95	12.19
SN22TC0080SAL	人	4 763	4 332 604	909.64	53.27	87.83	600 537	43.93	12.17
SN22TC0081SAL	人	4 764	4 334 528	909.85	53.26	87.84	600 273	43.95	12.16
SN22TC0082SAL	人	4 761	4 333 026	910.11	53.27	87.84	599 865	43.92	12.16
SN22TC0083SAL	人	4 765	4 329 450	908.59	53.26	87.79	602 003	43.95	12.21
SN22TC0084SAL	人	4 765	4 330 330	908.78	53.26	87.81	601 345	43.95	12.19
SN22TC0085SAL	人	4 768	4 334 719	909.13	53.27	87.84	599 970	43.92	12.16
SN22TC0101SAL	人	4 764	4 331 464	909.21	53.26	87.82	600 485	43.95	12.18
SN22TC0102SAL	食品	4 767	4 333 552	909.07	53.26	87.83	600 484	43.94	12.17
SN22TC0103SAL	食品	4 766	4 333 181	909.19	53.26	87.83	600 187	43.92	12.17
SN22TC0104SAL	食品	4 706	4 299 476	913.62	53.31	87.86	594 288	43.93	12.14

2.6 耐药基因注释

通过耐药基因数据库对本次暴发事件菌株基因组信息进行比较,15 株分离菌株均携带氨基糖苷类耐药基因 AAC(6′)-Iaa、β-内酰胺类耐药基因 bla_{TEM-1B}、bla_{CTX-M-14}、四环素类耐药基因 tet(A)、氯霉素类耐药基因 floR 共 5 种耐药基因,染色体突变介导

的抗菌药物耐药包括 8 种基因(acrB、gyrA、gyrB、parC、parE、pmrA、pmrB、rrsD),其中 gyrA 基因发生了点突变(S83Y),导致氨基酸发生了替换,从而介导喹诺酮类药物表型的检测,其余多为外排泵基因,介导多种抗菌药物耐药性,耐药基因预测结果与耐药表型一致性较好,见表 2。

表 2 15 株鼠伤寒沙门菌耐药表型及相关基因携带情况

Table 2 Drug resistance phenotype and related gene carrying status of 15 strains of *Salmonella typhimurium*

抗菌药物种类	抗菌药物名称	耐药基因	染色体突变(点突变)	种类/种
氨基糖苷类	庆大霉素、链霉素、阿米卡星、妥布霉素	AAC(6′)-Iaa		1
喹诺酮类	萘啶酸、左氧氟沙星		gyrA(S83Y)	1
头孢菌素类	头孢唑林、头孢替坦			
四环素类	四环素	tet(A)		1
β-内酰胺类	氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦	bla _{TEM-1B} 、bla _{CTX-M-14}		2
氯霉素类	氯霉素	floR		1
硝基呋喃类	呋喃妥英			
多种抗菌药物			acrB、gyrB、parC、parE、pmrA、pmrB、rrsD	7

2.7 毒力基因、毒力岛、质粒及可移动元件分析

通过毒力基因数据库比对,本次事件分离株的 15 株鼠伤寒沙门菌均携带 21 类 46 种 271 个已知的毒力基因。通过 CGE 数据库比对分析,15 株沙门菌毒力岛谱型一致,均携带 SPI1、SPI2、SPI3、

SPI4、SPI5、SPI6、SPI9、SPI13、SPI14、CS54-island 共 10 种毒力岛,均携带 IncFIB(S)、IncFII(S)两个质粒,可移动元件个数为 5~6 个不等,aac(6′)-Iaa 耐药基因、shiB 和 nlpI 毒力基因、IncFII(S)、IncFIB(S)质粒均位于可移动元件上,详见表 3。

表3 15株鼠伤寒沙门菌毒力基因携带情况
Table 3 Virulence gene carriage of 15 strains of *Salmonella typhimurium*

类别	毒力因子	相关基因	
Stress adaptation	SodCI	<i>sodCI</i>	
Spv locus	Spv	<i>spvD</i> 、 <i>spvA</i> 、 <i>spvR</i> 、 <i>spvB</i> 、 <i>spvC</i>	
Serum resistance	Rck	<i>rck</i> 、 <i>pagN</i>	
TTSS-2 translocated effectors	TTSS-2 translocated effectors	<i>sseL</i> 、 <i>gogB</i> 、 <i>sopD2</i> 、 <i>spiC/ssaB</i> 、 <i>sseF</i> 、 <i>sseG</i> 、 <i>sifB</i> 、 <i>sseJ</i> 、 <i>sseK2</i> 、 <i>sseK1</i> 、 <i>pipB2</i> 、 <i>sspH2</i> 、 <i>sseK2</i> 、 <i>sifA</i> 、 <i>sseI/stfH</i> 、 <i>pipB</i>	
		<i>sopA</i> 、 <i>sopE2</i> 、 <i>sopD</i> 、 <i>sipB</i> 、 <i>sipC</i> 、 <i>sptP</i> 、 <i>avrA</i> 、 <i>sopB/sigD</i>	
		<i>slrP</i>	
Secretion system	TTSS (SPI-2 encode)	<i>ssaU</i> 、 <i>ssrB</i> 、 <i>ssrA</i> 、 <i>ssaC</i> 、 <i>ssaD</i> 、 <i>ssaE</i> 、 <i>sseA</i> 、 <i>sseB</i> 、 <i>sscA</i> 、 <i>sseC</i> 、 <i>sseD</i> 、 <i>sseE</i> 、 <i>sscB</i> 、 <i>ssaG</i> 、 <i>ssaH</i> 、 <i>ssaI</i> 、 <i>ssaJ</i> 、 <i>ssaK</i> 、 <i>ssaL</i> 、 <i>ssaM</i> 、 <i>ssaV</i> 、 <i>ssaN</i> 、 <i>ssaO</i> 、 <i>ssaP</i> 、 <i>ssaQ</i> 、 <i>ssaR</i> 、 <i>ssaS</i> 、 <i>ssaT</i> 、 <i>sicP</i> 、 <i>invE</i> 、 <i>prgH</i> 、 <i>invH</i> 、 <i>invF</i> 、 <i>invG</i> 、 <i>invA</i> 、 <i>invB</i> 、 <i>invC</i> 、 <i>invI</i> 、 <i>invJ</i> 、 <i>spaO</i> 、 <i>spaP</i> 、 <i>spaQ</i> 、 <i>spaR</i> 、 <i>spaS</i> 、 <i>sicA</i> 、 <i>sipD</i> 、 <i>iacP</i> 、 <i>iagB</i> 、 <i>hilA</i> 、 <i>hilD</i> 、 <i>prgI</i> 、 <i>prgJ</i> 、 <i>prgK</i> 、 <i>orgA</i> 、 <i>orgB</i> 、 <i>orgC</i> 、 <i>hilC</i> 、 <i>sprB</i> 、 <i>sipA/sspA</i>	
		TTSS (SPI-1 encode)	<i>spaQ</i> 、 <i>spaR</i> 、 <i>spaS</i> 、 <i>sicA</i> 、 <i>sipD</i> 、 <i>iacP</i> 、 <i>iagB</i> 、 <i>hilA</i> 、 <i>hilD</i> 、 <i>prgI</i> 、 <i>prgJ</i> 、 <i>prgK</i> 、 <i>orgA</i> 、 <i>orgB</i> 、 <i>orgC</i> 、 <i>hilC</i> 、 <i>sprB</i> 、 <i>sipA/sspA</i>
		T6SS-II	<i>Kox_00005</i>
Effector delivery system	SCI	<i>sciI</i> 、 <i>STM0278</i> 、 <i>sciC</i> 、 <i>sciS</i> 、 <i>icmF-like</i> 、 <i>vgrS</i> 、 <i>sciB</i> 、 <i>sciD</i> 、 <i>sciE</i> 、 <i>sciF</i> 、 <i>clpV</i> 、 <i>sciH</i> 、 <i>sciJ</i> 、 <i>sciK</i> 、 <i>sciL</i> 、 <i>scMi</i> 、 <i>sciN</i> 、 <i>sciO</i> 、 <i>scPi</i> 、 <i>scQi</i> 、 <i>sciR</i> 、 <i>scTi</i> 、 <i>sciU</i> 、 <i>sciV</i> 、 <i>sciW</i> 、 <i>sciA</i>	
		RpoS	<i>rpoS</i>
Regulation	RcsAB	<i>A225_4123</i>	
	PhoPQ	<i>phoP</i>	
	Fur	<i>fur</i>	
Nutritional factor	Allantoin utilization	<i>allB</i>	
Nonfimbrialadherence determinants	SinH	<i>sinH</i>	
	ShdA	<i>shdA</i>	
	RatB	<i>ratB</i>	
	MisL	<i>misL</i>	
Magnesium uptake	Mg ²⁺ transport	<i>mgtC</i> 、 <i>mgtB</i>	
Macrophage inducible genes	Mig-5	<i>mig-5</i>	
	Mig-14	<i>mig-14</i>	
Iron uptake	Enterobactin	<i>fepC</i>	
Immune evasion	LPS glucosylation	<i>gtrB</i>	
	Capsule	<i>galF</i>	
Fimbrialadherence determinants	Stj	<i>SNSL254_A4931</i> 、 <i>SNSL254_A4930</i> 、 <i>stjC</i> 、 <i>stjB</i> 、 <i>SNSL254_A4927</i> 、 <i>stiC</i> 、 <i>stiH</i> 、 <i>stiB</i> 、 <i>stiA</i>	
	Sth	<i>sthC</i> 、 <i>sthA</i> 、 <i>sthB</i> 、 <i>sthD</i> 、 <i>sthE</i>	
	Stf	<i>stfA</i> 、 <i>stfC</i> 、 <i>stfD</i> 、 <i>stfE</i> 、 <i>stfF</i> 、 <i>stfG</i> 、 <i>steA</i> 、 <i>steC</i>	
	Std	<i>stdB</i> 、 <i>stdA</i> 、 <i>stdC</i> 、 <i>stdD</i>	
	Stc	<i>stcB</i> 、 <i>stcA</i> 、 <i>stcC</i> 、 <i>stcD</i>	
	Stb	<i>stbE</i> 、 <i>stbB</i> 、 <i>stbC</i> 、 <i>stbA</i> 、 <i>stbD</i>	
	Saf	<i>safA</i> 、 <i>safB</i> 、 <i>safC</i> 、 <i>safD</i>	
	Pef	<i>pefB</i> 、 <i>pefA</i> 、 <i>pefC</i> 、 <i>pefD</i>	
	Lpf	<i>lpfD</i> 、 <i>lpfB</i> 、 <i>lpfC</i> 、 <i>lpfA</i> 、 <i>lpfE</i>	
	Fim	<i>fimA</i> 、 <i>fimI</i> 、 <i>fimC</i> 、 <i>fimD</i> 、 <i>fimH</i> 、 <i>fimF</i> 、 <i>fimZ</i> 、 <i>fimY</i> 、 <i>fimW</i>	
	Bef	<i>befG</i> 、 <i>befF</i> 、 <i>befE</i> 、 <i>befD</i> 、 <i>befC</i> 、 <i>befB</i> 、 <i>befA</i> 、 <i>befH</i>	
	Agf/Csg	<i>csgG</i> 、 <i>csgF</i> 、 <i>csgE</i> 、 <i>csgD</i> 、 <i>csgB</i> 、 <i>csgA</i> 、 <i>csgC</i>	
	Efflux pump	AcrAB	<i>acrB</i>
Antiphagocytosis	Capsule	<i>A79E_1608</i>	
Salmochelin	Salmochelin	<i>iroC</i> 、 <i>iroN</i> 、 <i>iroE</i> 、 <i>iroD</i> 、 <i>iroB</i>	
Flagella	Peritrichous flagella	<i>flhD</i> 、 <i>flBi</i> 、 <i>fliI</i> 、 <i>flk</i> 、 <i>fliZ</i> 、 <i>fliY</i> 、 <i>fliA</i> 、 <i>flhC</i> 、 <i>motA</i> 、 <i>motB</i> 、 <i>cheA</i> 、 <i>cheW</i> 、 <i>tar/cheM</i> 、 <i>cheR</i> 、 <i>cheB</i> 、 <i>cheY</i> 、 <i>cheZ</i> 、 <i>flhB</i> 、 <i>flhA</i> 、 <i>flhE</i> 、 <i>fliR</i> 、 <i>fliQ</i> 、 <i>fliP</i> 、 <i>fliO</i> 、 <i>fliN</i> 、 <i>fliM</i> 、 <i>fliL</i> 、 <i>fliK</i> 、 <i>fliJ</i> 、 <i>fliH</i> 、 <i>fliG</i> 、 <i>fliE</i> 、 <i>fliT</i> 、 <i>fliS</i> 、 <i>fliD</i> 、 <i>fliC</i> 、 <i>fljB</i> 、 <i>fljA</i> 、 <i>flgN</i> 、 <i>flgM</i> 、 <i>flgA</i> 、 <i>flgB</i> 、 <i>flgC</i> 、 <i>flgD</i> 、 <i>flgE</i> 、 <i>flgF</i> 、 <i>flgG</i> 、 <i>flgH</i> 、 <i>flgI</i> 、 <i>flgJ</i> 、 <i>flgK</i> 、 <i>flgL</i>	
		<i>flgC</i> 、 <i>flgD</i> 、 <i>flgE</i> 、 <i>flgF</i> 、 <i>flgG</i> 、 <i>flgH</i> 、 <i>flgI</i> 、 <i>flgJ</i> 、 <i>flgK</i> 、 <i>flgL</i>	
OmpA	OmpA	<i>Z1307</i> 、 <i>ompD</i>	
Enterobactin	Enterobactin	<i>entS</i>	
ApeE	ApeE	<i>STM0570</i>	
BapA	BapA	<i>siiE</i>	
Total	47	271	

2.8 MLST分型、MST构建及系统进化分析结果

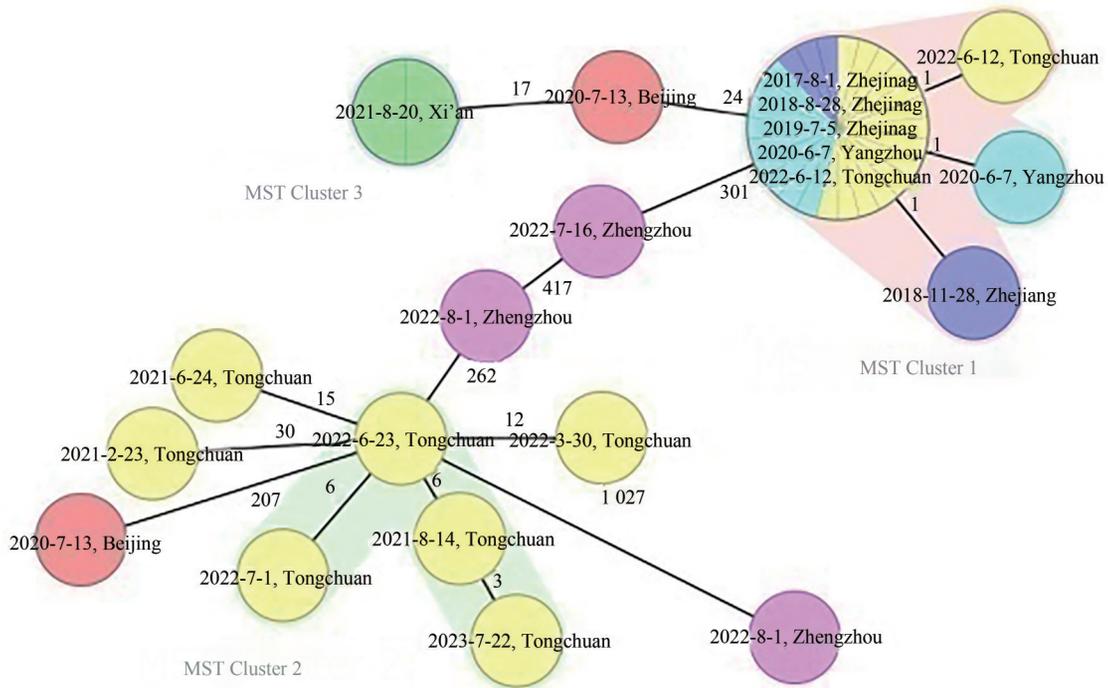
15株沙门菌基因组数据上传 EnteroBase 数据库得到 MLST 分型,均为 ST19 型。rMLST 型为

138369(new)。cgMLST 分型结果显示,352015 型 11 株,其中 9 株来源为病人,2 株来源为食品;352019 型 2 株均来源病人,菌株编号为 SN22TC007

6SAL、SN22TC0081SAL ; 352030 型 1 株来源为病人,菌株编号为 SN22TC0083SAL; 352016 型 1 株来源为食品,菌株编号为 SN22TC0104SAL,该菌株 PFGE 带型也与其他菌株不同。核心基因组位点相差 1~15 个不等;wgMLST 位点相差 1~395 个不等。

在 Enterobase 沙门菌数据库比对中发现本次事件菌株 rMLST 型别与浙江 4 株和扬州 10 株来源为家禽(鸭)和野生绿头鸭的鼠伤寒沙门菌完全一致,均为 rMLST 138396(new)型;选取数据库中国内

45 株 ST19 型鼠伤寒沙门菌(郑州 3 株、北京 2 株、西安 4 株、rMLST 型别与本次事件分离株一致的浙江 4 株和扬州 10 株、铜川本地散发病例 7 株、本次事件分离株 15 株)基于 cgMLST 靶位基因的序列比对生成等位基因谱,发现本次事件菌株 cgMLST 聚为一类,且与上述 rMLST 型别一致的浙江和扬州 14 株分离菌株聚拢为一簇,由粉色阴影覆盖,等位基因差异数 1 个以内,具有相近的亲缘性关系,见图 2。



注:基于 3002 个 cgMLST 靶位基因的序列比对生成等位基因谱,圈内代表菌株分离时间及地区,圆圈的颜色指示菌株来源地区,亲缘性关系相近的基因型(7 个等位基因差异阈值)聚拢为一簇,由粉色阴影覆盖。本次事件菌株为黄色(蓝色箭头所指),与近两年本地区散发病例菌株(黄色)进化关系较远

图 2 45 株鼠伤寒沙门菌的最小生成树

Figure 2 Minimum spanning tree of 45 *Salmonella typhimurium* isolates

选取数据库中国内外 50 株 ST19 型鼠伤寒沙门菌(本次事件分离株、与本次事件分离株 rMLST 型别完全一致的浙江 4 株和扬州 10 株、中国西安 3 株、加拿大 3 株、美国 3 株、澳大利亚 2 株、德国 2 株、黎巴嫩 2 株、新西兰 2 株、南非 2 株、英国 2 株、新西兰 1 株),以菌株 LT2 基因组序列为参考,构建 SNP 进化树,发现本次事件分离菌株与国外分离株差异较大,与上述 rMLST 型别一致的 14 株浙江和扬州分离菌株中编号为 SAL03566 菌株亲缘关系最近,Enterobase 数据库的信息显示该菌株由浙江大学在 2018 年 11 月 28 日于家禽中分离,见图 3。

3 讨论

沙门菌是导致食源性疾病的重要微生物,主要

存在于动物性食品中,特别是生家禽、生肉、蛋及其制品为其传播与暴发感染的主要来源^[6]。在我国,沙门菌引起的食源性疾病一直位于感染性腹泻和食物中毒的前列^[7]。我国近 10 年来沙门菌引起的食源性疾病的流行病学特征表明,沙门菌感染主要发生在温暖季节,5~10 月为主,尤其是夏季 6~8 月,感染主要来源为肉类产品,包括受污染禽肉及其制品,感染呈现出明显的年龄分布模式,幼儿和老年人尤其容易受到感染,最常见的血清型是鼠伤寒沙门菌^[8]。本次事件基本确定为一起食用被沙门菌污染的餐饮食品引起的食源性疾病暴发事件,暴发于 6 月中下旬,为夏季高温时节,与国内研究的感染阳性率最高时间区间一致,污染食物来源为鸡蛋干、鸡胗制品,即沙门菌主要的易污染食物,与 2021 年



注:红色方框内菌株为本次事件分离株及与本次事件分离株 rMLST 型别一致的浙江和扬州的分离株;图右为图左红色方框内放大图,图右蓝色方框内菌株为本次事件分离株,其余为 rMLST 型别一致的浙江和扬州分离株

图3 50株ST19鼠伤寒沙门菌SNP进化树

Figure 3 SNP evolutionary tree of 50 *Salmonella typhimurium* ST19 strains

杭州市一起鼠伤寒沙门菌食源性疾病暴发事件受污染食品鸡蛋干为同类食品,提示鸡蛋干制品为沙门菌污染的高风险食品,特别是预包装即食性鸡蛋干制品应尤为关注^[9]。

近年来,沙门菌的耐药性增强,耐药谱变宽、耐药率逐年上升趋势^[10]。据报道,沙门菌属的多重耐药率已从20世纪90年代的20%~30%增至21世纪初的70%,其中鼠伤寒沙门菌占18.87%~87.5%^[11-15]。本研究中,暴发事件分离株为13种药物严重耐药株,对β内酰胺类、氟/喹诺酮类、氨基糖苷类、四环素类、氯霉素类等均有不同程度耐药,耐药基因与其耐药性表型呈现良好相关性,携带的多种耐药基因提示菌株均有形成所针对抗菌药物抗性的潜力,其中耐药基因 *aac(6′)-Iaa* 位于可移动元件上。由于沙门菌的耐药基因一般位于转座子,移动整合子和插入序列中,即使排除抗菌药物的选择压力,高度耐药沙门菌的耐药基因也会通过基因水平转移来传播耐药性^[16]。因此相关监测预警部门需引起高

度关注,对多重耐药的原因深入探究,为有效遏制耐药性传播提供技术支持。

在沙门菌感染的过程中,其毒力因子发挥了重要的作用^[17]。沙门菌毒力因子主要包括菌毛、肠毒素、毒力岛、毒力质粒等^[18]。沙门菌毒力岛 SPI 主要位于染色体上基因组区域,含有大量的编码毒力因子的基因,基因主要与宿主的致病性有关,可编码产生相关毒力蛋白,这些蛋白作为细菌Ⅲ型分泌系统部分组成物质,与菌体黏附于宿主细胞相关,对引发动物发病起到至关重要的作用。目前,已经有12个毒力岛在沙门菌的各种血清型中发现^[19]。本研究中分离的致病菌株携带20多类271个已知的毒力基因,以分泌系统、黏附、鞭毛等最为常见;携带10个毒力岛,数量较多,且 *shiB*、*nlpI* 毒力基因, *IncFII(S)*、*IncFIB(S)* 质粒位于可移动元件上,成为此次感染暴发的重要因素,且感染人群为青壮年非易感人群,值得进一步关注。

目前常用的细菌溯源分型技术以血清学分型、

PFGE、MLST 为主,本次事件以血清学分型结果为主、参考 PFGE 同源性分析结果,基本确定了事件的感染来源,为疫情防控提供参考依据。PFGE 是一种分子分型方法,由于其极高的分辨力和重复性被誉为细菌分子分型的“金标准”,但无法辨别酶切位点之外的基因序列变异,在分辨度和识别力方面仍有一定的技术局限,不能提供病原菌的进化信息。MLST 是基于 7~9 个管家基因的序列多态性建立的分型技术,重复性好、可比性好,但无法反映基因组其他几千个基因的差异,分辨率仍然不能满足精准溯源的需求^[20]。随着测序技术的快速发展,全基因组测序 WGS 以特异性基因差异来表征菌株之间的差异,具有显著的分型优越性,且可从基因水平对细菌毒力、耐药、分型及进化等进行探究,从而更精细地分析病原菌特征,为疾病监测、暴发疫情处置及科学防控和临床治疗提供参考依据。全基因组分型技术以 cgMLST、wgMLST、wgSNP 等为代表,分辨率高,重复性好,能够实现精准溯源。rMLST 是一种通过对编码细菌核糖体蛋白亚基(*rps* 基因)的 53 个基因的变异进行索引来整合微生物分类和分型的方法^[21]。cgMLST 是基于细菌的核心基因组进行的多位点序列分型技术,cgMLST 分型后,对于等位(核心)基因差异数 ≤ 10 的 2 株菌,判定其具有高度同源性,等位(核心)基因差异数在 10~30 个时,需要结合流行病学调查与菌株背景信息判断菌株间的同源性,通过绘制遗传进化树,分析菌株间的遗传距离和亲缘关系,揭示细菌的遗传进化关系,实现细菌溯源分析^[22]。进化树的种类有邻居加入树、最小生成树、葡萄树等,溯源分析时 MST 的呈现形式更直观。SNP 进化树本次事件菌株基于全基因组测序下进行了分型研究,特别是在 Enterobase 数据库比对中发现与中国浙江和扬州来源为家禽(鸭)和野生绿头鸭的 14 株鼠伤寒沙门菌 rMLST 型别完全一致,基于 cgMLST 靶位基因的序列比对生成等位基因谱聚拢为一簇,等位基因差异数 1 个以内,具有高度同源性;SNP 进化树结果也显示本次事件分离株与浙江和扬州来源为家禽(鸭)和野生绿头鸭的 14 株聚为一簇,与其中编号为 SAL03566 菌株亲缘关系最近,因缺乏流行病学相关资料及菌株具体信息,无法进一步详细分析菌株进化关系,但提示相关部门应高度关注沙门菌动物源与食物源之间的传播链条,传播机制及易受污染的高风险食品的上游源头,进行早期监测控制。

参考文献

[1] WANG L, HUO X, QI W, et al. Rapid and sensitive detection

of *Salmonella* Typhimurium using nickel nanowirebridge for electrochemical impedance amplification[J]. *Talanta*, 2020, 211: 120715.

[2] 林本夫,任欣悦,袁晓琪,等.细菌全基因组测序技术用于沙门氏菌流行病学调查的可行性分析[J].*中国动物检疫*, 2022, 39(6): 125-131.

LIN B F, REN X Y, YUAN X Q, et al. Feasibility analysis on bacterial whole genome sequencing for epidemiological investigation on *Salmonella* [J]. *China Animal Health Inspection*, 2022, 39(6): 125-131.

[3] ENG S K, PUSPARAJAH P, MUTALIB N S A, et al. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance [J]. *Frontiers in Life Science*, 2015, 8(3): 1-10.

[4] 王伟,胡豫杰,徐进,等.鼠伤寒沙门菌婴幼儿分离株耐药基因及毒力基因研究[J].*中国食品卫生杂志*, 2016, 28(5): 567-575.

WANG W, HU Y J, XU J, et al. Analysis of antibiotic resistance genes and virulence genes in *Salmonella* Typhimurium isolated from fecal samples of children under 5-year old by whole genome sequencing [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2016, 28(5): 567-575.

[5] XU L, SUN X, MA X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2017, 1: 18.

[6] 梁丽,石继春,陈驰,等.不同时期分离的鼠伤寒沙门氏菌全基因组学分析研究[J].*中国药事*, 2022, 36(12): 1403-1413.

LING L, SHI J C, CHEN C, et al. Whole-genomic sequence analysis of *Salmonella* typhimurium isolated in different periods [J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2022, 36(12): 1403-1413.

[7] HE Y, WANG J, ZHANG R, et al. Epidemiology of foodborne diseases caused by *Salmonella* in Zhejiang Province, China, between 2010 and 2021 [J]. *Front Public Health*, 2024, 11: 1127925.

[8] 崔海洋,王霄雪,霍哲,等.76株沙门菌耐药谱及耐药基因分析[J].*中国卫生检验杂志*, 2016, 26(1): 136-138.

CUI H Y, WANG X X, HUO Z, et al. Analysis of resistance pattern and resistant genes of 76 strains of *Salmonella* [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2016, 26(1): 136-138.

[9] 李毅,谢爱蓉,谢中必.基于全基因组测序的甲型副伤寒沙门菌暴发疫情分离株分子特征研究[J].*中国人兽共患病学报*, 2022, 38(10): 898-905.

LI Y, XIE A R, XIE Z B. Whole genome sequencing molecular characterization of *Salmonella paratyphi* A isolates from an outbreak [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2022, 38(10): 898-905.

[10] 吴娅芳,王英林,田亚晨,等.鼠伤寒沙门氏菌感染机制及其检测方法研究进展[J].*工业微生物*, 2022, 52(3): 41-48.

WU Y F, WANG Y L, TIAN Y C, et al. Research progress of infection mechanism and detection method of *Salmonella* typhimurium [J]. *Industrial Microbiology*, 2022, 52(3): 41-48.

[11] 王蔚佳.儿童抗生素合理应用分析[J].*临床合理用药杂志*, 2013, 6(34): 76-77.

WANG W J. Analysis on the rational application of antibiotics in

- children [J]. Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use, 2013, 6(34): 76-77.
- [12] 张新, 王全意, 曲梅, 等. 2009~2011年北京市腹泻儿童沙门菌感染流行病学特征和耐药分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(10): 728-730, 742.
- ZHANG X, WANG Q Y, QU M, et al. Analysis of the epidemiological characteristics and drug resistance of *Salmonella* infection among children in Beijing from 2009 to 2011 [J]. Journal of Pathogen Biology, 2012, 7(10): 728-730, 742.
- [13] 李桦, 汪伟山, 周玉球. 2009~2014年珠海市腹泻儿童沙门菌感染的流行病学特征[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(18): 2640-2642.
- LI H, WANG W S, ZHOU Y Q. The epidemiological characteristics of *Salmonella* in children with infectious diarrhea in Zhuhai City from 2009 to 2014 [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2015, 36(18): 2640-2642.
- [14] 陈庆法, 陈强, 余晓君, 等. 腹泻儿童沙门菌的耐药性研究及肠毒素基因与临床关系分析[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(18): 5360-5365.
- CHEN Q F, CHEN Q, YU X J, et al. The study for *Salmonella* resistant and the analysis of enterotoxin gene and clinical relationship in children with diarrhea [J]. Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition), 2011, 5(18): 5360-5365.
- [15] 黄宝兴, 马东礼. 深圳市某儿童医院沙门菌属菌群分布及耐药性分析[J]. 实用预防医学, 2015, 22(7): 880-881+872.
- HUANG B X, MA D L. Distribution and drug resistance of *Salmonella* in a children's hospital in Shenzhen [J]. Practical Preventive Medicine, 2015, 22(7): 880-881+872.
- [16] 贾华云, 王岚, 张红, 等. 食源性沙门菌耐药性研究进展[J]. 实用预防医学, 2017, 24(11): 1401-1404.
- JIA H Y, WANG L, ZHANG H, et al. Progress on antibiotic resistance of foodborne *Salmonella* isolates [J]. Practical Preventive Medicine, 2017, 24(11): 1401-1404.
- [17] MOGHADAM M N, RAHIMI E, SHAKERIAN A, et al. Prevalence of *Salmonella* typhimurium and *Salmonella* enteritidis isolated from poultry meat: virulence and antimicrobial-resistant genes [J]. BMC Microbiol, 2023, 1: 168.
- [18] CHAUDHARI A A, MATSUDA K, LEE J H. Construction of an attenuated *Salmonella* delivery system harboring genes encoding various virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* and its potential as a candidate vaccine for chicken colibacillosis [J]. Avian Diseases, 2013, 57(1): 88-96.
- [19] 畅晓晖, 张捷, 亓合媛, 等. 北京地区肉类中沙门氏菌全基因组分型及耐药分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(3): 783-791.
- CHANG X H, ZHANG J, QI H Y, et al. Genotyping and drug resistance analysis of *Salmonella* in meat in Beijing [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(3): 783-791.
- [20] ZHOU Z, ALIKHAN N F, MOHAMED K, et al. The EnteroBase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny and *Escherichia* core genomic diversity [J]. Genome Research, 2019, 30(1): gr.251678.119.
- [21] JOLLEY K A, BLISS C M, BENNETT J S, et al. Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain [J]. Microbiology, 2012, 158(Pt_4): 1005-1015.
- [22] 朱丽萍, 张文成, 颜世敢, 等. 细菌核心基因组多位点序列分型 (cgMLST) 与溯源评价 [J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(6): 140-146.
- ZHU L P, ZHANG W C, YAN S G, et al. Evaluation of core genome multilocus sequence typing and traceability of bacteria [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(6): 140-146.