

## 研究报告

## 一株牛源都柏林沙门氏菌的全基因组测序及毒力与耐药性分析

李偲<sup>1</sup>, 郭双<sup>2</sup>, 王永强<sup>1</sup>, 耿超<sup>1</sup>, 吕香玉<sup>1</sup>, 石金川<sup>1</sup>, 王梓<sup>\*1</sup>, 刘锴<sup>\*1</sup>

1 内蒙古民族大学动物科技学院 内蒙古自治区肉牛疾病防控工程技术研究中心, 内蒙古 通辽 028000

2 兴安盟动物疫病预防控制中心, 内蒙古 兴安盟 137400

李偲, 郭双, 王永强, 耿超, 吕香玉, 石金川, 王梓, 刘锴. 一株牛源都柏林沙门氏菌的全基因组测序及毒力与耐药性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2569-2581.

LI Cai, GUO Shuang, WANG Yongqiang, GENG Chao, LÜ Xiangyu, SHI Jinchuan, WANG Zi, LIU Kai. Whole-genome sequencing, virulence, and drug resistance of a bovine-derived strain of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2569-2581.

**摘要:** 【背景】沙门氏菌(*Salmonella* spp.)是重要的人畜共患病原菌, 其毒力和耐药性的不断增强引起广泛关注。【目的】了解从通辽市一犊牛死亡病例中所分离牛源都柏林沙门氏菌的毒力及耐药性情况。【方法】以病死犊牛肺脏为材料, 经细菌分离纯化及 16S rRNA 基因测序, 鉴定病原为沙门氏菌。采用动物试验、药敏试验和 PCR 方法对分离菌进行毒力、耐药性, 以及毒力基因和耐药基因检测, 并对其进行全基因组测序分析。【结果】分离菌具有较强毒力, 对小鼠半数致死量为  $2.8 \times 10^6$  CFU/mL。分离菌为多重耐药菌, 仅对多粘菌素 B 和噻孢霉素敏感, 对强力霉素和恩诺沙星中度敏感。检测 13 种沙门氏菌常见毒力基因, 检出率为 92.3%。对分离菌进行全基因组测序分析, 该菌株为都柏林沙门氏菌, 基因组大小为 4 965 370 bp, GC 含量为 52.12%, 同时携带 2 个质粒, 大小分别为 79 524 bp (pTLS-1)和 45 301 bp (pTLS-2)。分离菌中共携带 996 个毒力基因和 24 个毒力岛; 共携带 42 个耐药基因, 其中 4 个为可水平转移基因, 基因组中存在 9 个可移动遗传元件, 包括插入序列和转座子等。【结论】分离牛源都柏林沙门氏菌菌株具有较强毒力且为多重耐药株, 携带大量毒力基因及耐药基因。

**关键词:** 都柏林沙门氏菌; 毒力基因; 毒力岛; 耐药性; 耐药基因; 全基因组测序

资助项目: 内蒙古自治区自然科学基金(2021LHMS03005, 2021BS03015); 内蒙古科技支撑东北振兴研发项目(2022YFDZ0013); 内蒙古民族大学博士启动基金(BS593); 内蒙古自治区中央引导地方发展基金项目(2022ZY0149); 内蒙古锡林郭勒盟科技计划项目(202213)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2021LHMS03005, 2021BS03015), the Inner Mongolia Science and Technology Support Northeast Revitalization Research and Development Project (2022YFDZ0013), the Inner Mongolia Minzu University Doctoral Start-up Fund (BS593), the Inner Mongolia Autonomous Region Central Guiding Local Development Fund Project (2022ZY0149), and the Inner Mongolia Xilin Gol League Science and Technology Project (202213).

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Zi, wangzixiaoxu@163.com; LIU Kai, liukai721026@163.com

Received: 2023-01-03; Accepted: 2023-01-25; Published online: 2023-02-23

# Whole-genome sequencing, virulence, and drug resistance of a bovine-derived strain of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin

LI Cai<sup>1</sup>, GUO Shuang<sup>2</sup>, WANG Yongqiang<sup>1</sup>, GENG Chao<sup>1</sup>, LÜ Xiangyu<sup>1</sup>, SHI Jinchuan<sup>1</sup>, WANG Zi<sup>\*1</sup>, LIU Kai<sup>\*1</sup>

1 Inner Mongolia Engineering Technology Research Center for Prevention and Control of Beef Cattle Diseases, College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

2 Xing'an League Animal Disease Control Center, Xing'an League 137400, Inner Mongolia, China

**Abstract: [Background]** The virulence and drug resistance of *Salmonella* spp. as a major zoonotic pathogen have attracted widespread attention. **[Objective]** To investigate the virulence and drug resistance of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin isolated from a dead calf in Tongliao City. **[Methods]** Bacterial isolation and 16S rRNA gene sequencing were performed with the lung of a dead calf, and the pathogen was identified as *Salmonella*. Animal tests, drug sensitivity tests, and PCR were employed to examine the virulence gene, drug resistance, virulence, and drug resistance genes of the isolate, and the whole genome was sequenced. **[Results]** The isolate had strong virulence, with the median lethal dose of  $2.8 \times 10^6$  CFU/mL to mice. It was multidrug-resistant, sensitive to only polymyxin B and cephalothin, and moderately sensitive to doxycycline and enrofloxacin. The detection rate of 13 virulence genes was 92.3%. The whole genome of the isolate had the length of 4 965 370 bp and the GC content of 52.12%, and it carried two plasmids with the lengths of 79 524 bp (pTLS-1) and 45 301 bp (pTLS-2), respectively. The isolate carried 996 virulence genes and 24 pathogenicity islands. A total of 42 drug-resistant genes were detected, among which 4 were horizontal transferable genes. In addition, there were 9 mobile genetic elements in the genome, including insertion sequences, transposons, etc. **[Conclusion]** The *Salmonella* Dublin strain isolated from a calf was virulent and multidrug-resistant, carrying a large number of virulence genes and drug-resistant genes.

**Keywords:** *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin; virulence genes; pathogenicity island; drug resistance; drug resistance gene; whole genome sequencing

沙门氏菌(*Salmonella* spp.)是世界第二大食源性病原微生物,属于肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)沙门氏菌属(*Salmonella*)的一类无芽孢和荚膜的肠道杆菌,革兰氏染色阴性<sup>[1]</sup>。根据沙门氏菌的菌体抗原(O抗原)和鞭毛抗原(H抗原)可将沙门氏菌分为2 600多种血清型,其中绝大多数属于肠炎沙门氏菌<sup>[2]</sup>。区别于鼠伤寒沙门氏菌

等泛嗜性血清型,都柏林沙门氏菌作为肠炎沙门氏菌的主要血清型之一,其宿主范围较小,在动物中通常只对牛具有致病性,也称为牛适应性血清型,可感染犊牛、架子牛和成年牛引起肠炎或全身性感染<sup>[3]</sup>。都柏林沙门氏菌也可导致人的感染,常因人摄入被污染的食物造成细菌性食物中毒,引起人感染的菌株通常具有

较强毒力,甚至可以导致人的死亡<sup>[4]</sup>。因此,都柏林沙门氏菌的传播具有较强的公共卫生意义。

目前,国内有关都柏林沙门氏菌的报道均为人食物中毒病例<sup>[5]</sup>,未见有关牛源都柏林沙门氏菌的研究报道。在欧美国家,养牛业对都柏林沙门氏菌重视程度较高,对该病原进行了持续性监测。加拿大相关研究收集了2003–2015年都柏林沙门氏菌菌株,对分离菌株进行基因组测序并完成了菌株溯源和耐药性监测<sup>[6]</sup>。类似监测工作在德国、丹麦、美国等发达国家均已开展了广泛研究<sup>[7–8]</sup>。在近期一例犊牛死亡病例中,作者所在实验室首次分离得到一株牛源都柏林沙门氏菌菌株,由于国内缺乏相关研究,所以对该菌株进行毒力及耐药性检测,并对菌株进行全基因组测序分析,以期获得完整的基因组信息并确定毒力基因及耐药基因的携带情况,为国内牛源都柏林沙门氏菌的流行病学调查和后续研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

病料样本(血液、肺脏、肝脏、肠道、粪便)采自内蒙古自治区通辽市一肉牛养殖场,病死牛为4月龄西门塔尔公犊牛。昆明鼠30只,雌雄各半,体重为20–25 g,购自吉林大学实验动物中心。沙门氏菌显色培养基,青岛海博生物技术有限公司;16S rRNA基因及毒力基因引物(表1),由吉林省库美生物科技有限公司合成;细菌基因组DNA提取试剂盒、PCR相关试剂和DL2000 DNA Marker,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;药敏试验所用药物,上海源叶生物科技股份有限公司;革兰氏染色液,珠海贝索生物技术有限公司。PCR仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;电泳仪,北京六一仪器有限公司;冷冻高速离心机,艾本德股份公司。

### 1.2 细菌的分离鉴定

无菌采集病死犊牛脏器样本作为细菌分离材料,接种于沙门氏菌显色固体培养基,37℃培养24 h,挑取显色菌落继续划线,37℃培养过夜,挑取显色单个菌落进行后续试验。按细菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取菌株全基因组DNA。利用16S rRNA基因通用引物(表1)进行PCR。PCR反应体系(50 μL):10×Taq buffer 5 μL, dNTPs (10 mmol/mL) 2 μL, MgCl<sub>2</sub> 2.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各1 μL, 模板6 μL, ddH<sub>2</sub>O补足50 μL。PCR反应条件:95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共30个循环; 72℃ 10 min。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测并测序。

### 1.3 小鼠致病性试验

将1.2中纯化的分离菌挑取单菌落接入LB液体培养基,37℃、160 r/min培养12–16 h获得菌液。将30只小鼠随机分为5组,每组雌雄各半,第1组小鼠接种菌液剂量为 $2.18 \times 10^8$  CFU/mL,第2组为 $2.18 \times 10^7$  CFU/mL,第3组为 $2.18 \times 10^6$  CFU/mL,第4组为 $2.18 \times 10^5$  CFU/mL,对照组小鼠腹腔注射等量培养基,观察小鼠发病及死亡情况,并计算分离菌半数致死量( $LD_{50}$ )<sup>[9]</sup>。动物实验过程符合动物伦理要求,通过内蒙古民族大学动物伦理委员会审批,审批号为M2021007。

### 1.4 药物敏感性检测

采用微量肉汤稀释法对14种药物进行最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)检测,每种药物进行3次重复。参照美国临床实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)和国家耐抗菌素监测系统(National Antimicrobial Resistance Monitoring System, NARMS)推荐标准进行试验操作和结果判断<sup>[10]</sup>,结果分为敏感、中度敏感及耐药。

表 1 引物信息

Table 1 Primers information

引物名称	引物序列	扩增长度
Primer name	Primer sequence (5'→3')	The length of the amplification (bp)
<i>16S</i> -F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 429
<i>16S</i> -R	GGTACCTTGTTACGACTT	
<i>invA</i> -F	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT	243
<i>invA</i> -R	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	
<i>hilA</i> -F	CGTGAAGGGATTATCGCAGT	296
<i>hilA</i> -R	GTCCGGGAATACATCTGAGC	
<i>spvC</i> -F	ACTCCTTGACACAACCAATGCGGA	571
<i>spvC</i> -R	TGTCTCTGCATTTGCCACCATCA	
<i>sipA</i> -F	CCATTGACTAACAGCAGCA	449
<i>sipA</i> -R	CGGTCGTACCGGCTTTATTA	
<i>sopE</i> -F	CGAGTAAAGACCCCGCATAC	362
<i>sopE</i> -R	GAGTCGGCATAGCACACTCA	
<i>pefA</i> -F	ACGCTGCCAATGAAGTGA	225
<i>pefA</i> -R	CAGAAGCCCAGGTGATAGTG	
<i>sipC</i> -F	AGACAGCTTCGCAATCCGTT	446
<i>sipC</i> -R	ATTCATCCCTTCGCGCATCA	
<i>ssrA</i> -F	CTTACGATTACGCCATTTACGG	706
<i>ssrA</i> -R	ATTTGGTGGAGCTGGCGGGACT	
<i>sopB</i> -F	CCTCAAGACTCAAGATG	1 987
<i>sopB</i> -R	TACGCAGGAGTAAATCGGTG	
<i>sefA</i> -F	GCAGCGGTTACTATTGCAGC	321
<i>sefA</i> -R	TGTGACAGGGACATTTAGCG	
<i>rck</i> -F	AACGGACGGAACACAGAGTC	189
<i>rck</i> -R	TGTCCTGACGAAAGTGCATC	
<i>stn</i> -F	TTGTCTCGCTATCACTGGCAACC	617
<i>stn</i> -R	ATTCGTAACCCGCTCTCGTCC	
<i>ssaR</i> -F	GTTCGGATTGCTTCGG	251
<i>ssaR</i> -R	TCTCCAGTGACTAACCTAACCAA	

## 1.5 毒力基因检测

参考文献[11],使用细菌基因组作为模板进行 13 种沙门氏菌常见毒力基因 PCR 检测。PCR 反应体系及条件与 1.2 一致,PCR 产物送至吉林省库美生物科技有限公司进行测序。

## 1.6 全基因组测序

测序流程按照 Oxford Nanopore Technologies (ONT)公司的标准操作流程执行,主要步骤包括:提取高质量细菌基因组 DNA,进行纯度、浓度及

完整性质检;BluePippin 全自动核酸回收系统回收大片段 DNA;文库构建(SQK-LSK109 连接试剂盒)<sup>[12-13]</sup>;上机测序。使用 Canu V1.5 软件对过滤后 subreads 进行组装,通过 Racon V3.4.3 软件利用三代 subreads 对组装结果进行矫正,运用 Pilon V1.22 软件利用二代数据进一步进行纠错,得到准确度更高的基因组后进行后续分析。

## 1.7 测序信息分析

通过软件 Prodigal V2.6.3<sup>[14]</sup>进行基因预测;

使用 SeqSero 1.2 数据库<sup>[15]</sup>对菌株进行血清型分析; 通过将基因序列与非冗余蛋白序列(non-redundant protein sequence, Nr)数据库、基因本体论(gene ontology, GO)数据库、京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)功能数据库、毒力基因数据库(virulence factor database, VFDB)和抗生素抗性数据库(the comprehensive antibiotic research database, CARD)等进行比对得到注释信息<sup>[16-17]</sup>。使用 SPIFinder 2.0 数据库对沙门氏菌毒力岛(SPI)进行分析<sup>[18]</sup>; 使用 Mobile Element Finder 数据库对基因组中移动元件(mobile genetic element, MGE)进行分析<sup>[19]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离菌株形态观察

分离菌株在沙门氏菌显色培养基上呈紫色, 菌落光滑, 形态较小(图 1A), 镜检可见两端钝圆且散在或成对存在的革兰氏阴性无芽孢杆菌(图 1B)。

### 2.2 16S rRNA 基因序列鉴定结果

在肺脏和肠道中均分离到形态相似的菌株, 分离菌 16S rRNA 基因的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后获得单一条带。PCR 产物测

序结果经 NCBI 比对, 与已登录的沙门氏菌序列一致性均在 98%以上, 证实分离菌株为沙门氏菌, 将其命名为菌株 S-1-1。

### 2.3 小鼠致病性试验结果

在接种分离菌 24 h 内,  $2.18 \times 10^8$  CFU/mL 和  $2.18 \times 10^7$  CFU/mL 剂量组小鼠全部死亡,  $2.18 \times 10^6$  CFU/mL 剂量组小鼠死亡 1 只, 对照组状态良好。使用改良 Karber 法计算分离菌的  $LD_{50}$  为  $2.8 \times 10^6$  CFU/mL。

### 2.4 毒力基因检测结果

对分离菌株 S-1-1 进行 13 种沙门氏菌常见毒力基因的 PCR 检测, 结果显示, 在菌株 S-1-1 中检出 12 种毒力基因, 检出率为 92.3%, 检测结果如图 2 所示。

### 2.5 药物敏感性检测结果

14 种药物对分离菌株 S-1-1 的 MIC 值如表 2 所示, 其中, 菌株 S-1-1 对 10 种药物耐药, 分别为环丙沙星、四环素、土霉素、卡那霉素、庆大霉素、头孢唑林钠、新霉素、替米考星、氟苯尼考和磺胺嘧啶钠; 对 2 种药物中度敏感, 分别为恩诺沙星和强力霉素; 对 2 种药物敏感, 分别为多粘菌素 B 和噻孢霉素。证明 S-1-1 菌株具有多重耐药性。

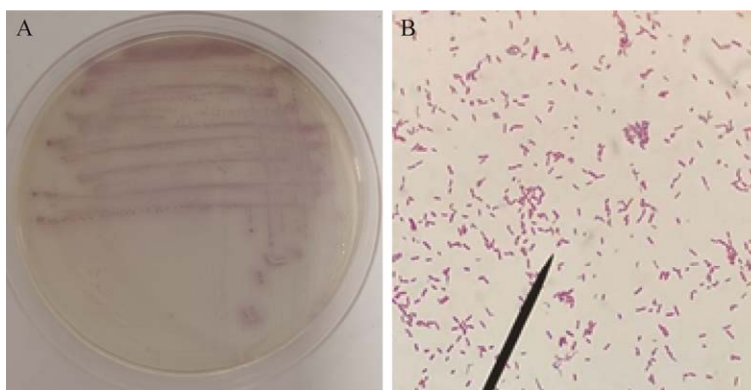


图 1 分离菌株形态学结果 A: 沙门氏菌显色培养基培养结果. B: 革兰氏染色镜检结果

Figure 1 Morphological results of isolated strains. A: Culture result of *Salmonella* chromogenic medium. B: Gram stain microscopy result.

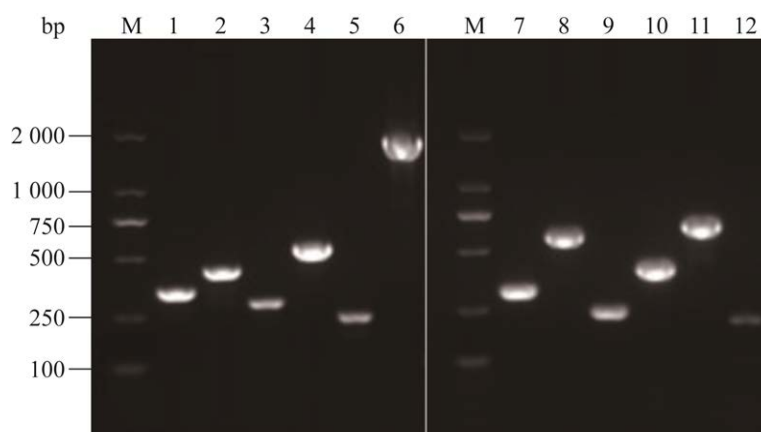


图 2 12 种毒力基因 PCR 扩增结果 M: DL2000 DNA Marker; 1-12: 分别为 *sopE*、*sipA*、*hilA*、*spvC*、*invA*、*sopB*、*sefA*、*stn*、*ssaR*、*sipC*、*ssrA*、*pefA* 毒力基因

Figure 2 PCR amplification results of 12 virulence genes. M: DL2000 DNA Marker; 1-12: *sopE*, *sipA*, *hilA*, *spvC*, *invA*, *sopB*, *sefA*, *stn*, *ssaR*, *sipC*, *ssrA*, *pefA* virulence genes, respectively.

表 2 分离菌株药物敏感性检测结果

Table 2 Drug sensitivity test results of isolated strains

药物名称	MIC	敏感性	药物名称	MIC	敏感性
Drug name	( $\mu\text{g/mL}$ )	Sensibility	Drug name	( $\mu\text{g/mL}$ )	Sensibility
多粘菌素 B	0.25	S	头孢唑林钠	256	R
Polymyxin B			Cefazolin sodium		
环丙沙星	4	R	强力霉素	8	I
Ciprofloxacin			Doxycycline		
四环素	64	R	新霉素	>512	R
Tetracycline			庆大霉素	1	S
土霉素	32	R	Thiostrepton		
Terramycin			替米考星	512	R
恩诺沙星	4	I	Tilmicosin		
Enrofloxacin			氟苯尼考	256	R
卡那霉素	512	R	Florfenicol		
Kanamycin			磺胺嘧啶钠	>512	R
庆大霉素	>512	R	Sulfadiazine sodium		
Gentamicin					

R: 耐药; I: 中等敏感; S: 敏感. 氨基糖苷类: 卡那霉素  $S \leq 16$ ,  $I = 32$ ,  $R \geq 64$ ; 庆大霉素、新霉素  $S \leq 4$ ,  $I = 8$ ,  $R \geq 16$ ; 四环素类: 四环素、强力霉素、土霉素  $S \leq 4$ ,  $I = 8$ ,  $R \geq 16$ ; 土霉素  $S \leq 0.25$ ,  $I = 0.5$ ,  $R \geq 1$ ; 脂肽类: 多粘菌素 B  $S \leq 2$ ,  $R \geq 4$ ; 磺胺类药: 磺胺嘧啶钠  $S \leq 256$ ,  $R \geq 512$ ; 一代、三代头孢菌素类: 头孢唑林钠、噻孢霉素  $S \leq 16$ ,  $R \geq 32$ ; 氟喹诺酮类: 恩诺沙星  $S \leq 2$ ,  $I = 4$ ,  $R \geq 8$ ; 环丙沙星  $S \leq 0.25$ ,  $I = 0.5$ ,  $R \geq 1$ ; 大环内酯类: 替米考星  $S \leq 16$ ,  $R \geq 32$ ; 氯霉素类: 氟苯尼考  $S \leq 8$ ,  $I = 16$ ,  $R \geq 32$

R: Resistance; I: Moderate; S: Sensitivity. Aminoglycosides: Kanamycin  $S \leq 16$ ,  $I = 32$ ,  $R \geq 64$ ; Gentamicin, neomycin  $S \leq 4$ ,  $I = 8$ ,  $R \geq 16$ ; Tetracyclines: Tetracycline, doxycycline  $S \leq 4$ ,  $I = 8$ ,  $R \geq 16$ ; Terramycin  $S \leq 0.25$ ,  $I = 0.5$ ,  $R \geq 1$ ; Lipopeptide: Polymyxin B  $S \leq 2$ ,  $R \geq 4$ ; Sulfonamide: Sulfadiazine sodium  $S \leq 256$ ,  $R \geq 512$ ; First and third generation cephalosporins: Cefazolin sodium, thiostrepton  $S \leq 16$ ,  $R \geq 32$ ; 4-quinolones: Enrofloxacin  $S \leq 2$ ,  $I = 4$ ,  $R \geq 8$ ; Ciprofloxacin  $S \leq 0.25$ ,  $I = 0.5$ ,  $R \geq 1$ ; Macrolides antibiotics: Tilmicosin  $S \leq 16$ ,  $R \geq 32$ ; Chloramphenicol: Florfenicol  $S \leq 8$ ,  $I = 16$ ,  $R \geq 32$ .

## 2.6 全基因组测序结果

对分离菌株 S-1-1 进行全基因组测序, 获得 S-1-1 菌株全基因组大小为 4 965 370 bp, GC 含量为 52.12%。包括 1 个完整的菌体染色体序列和 2 个完整的质粒序列。其中, 染色体大小为 4 840 545 bp, 质粒 pTLS-1 大小为 79 524 bp, 质粒 pTLS-2 大小为 45 301 bp, 共编码 4 743 个基因, 测序结果已上传至 NCBI 数据库, 登录号为 CP104858–CP104860。质粒 pTLS-1 为 IncN 型质粒, 质粒 pTLS-2 为复合型质粒, 包含 IncFII (S) 和 IncX1 两个复制子。

## 2.7 基因组序列分析结果

### 2.7.1 沙门氏菌血清型分析结果

全基因组测序数据通过 SeqSero 1.2 数据库

分析, S-1-1 菌株 O 抗原为 O-9, H 抗原为 H-g,p, 血清型为都柏林沙门氏菌。

### 2.7.2 毒力基因及毒力岛分析结果

经 VFDB 数据库比对分析, 菌株 S-1-1 共注释到 996 个毒力基因, 这些基因所编码的产物主要参与的功能有黏附、铁摄取、细菌分泌系统、细胞膜形成等。沙门氏菌毒力岛主要编码沙门氏菌的分泌系统、效应蛋白和相关的转录因子, 是决定沙门氏菌毒力的关键因素之一, 通过 SPIFinder 2.0 数据库分析, 在菌株 S-1-1 中存在 24 个毒力岛(salmonella pathogenicity island, SPI), 包括 7 个 SPI-1 和 6 个 SPI-2, 具体结果见表 3。

### 2.7.3 耐药基因及移动元件分析结果

经 CARD 数据库比对分析, 菌株 S-1-1 共

表 3 毒力岛分析结果

Table 3 Virulence island analysis results

名称 Name	基因位点 Gene position	基因来源 Gene origin	序列一致性 Sequence identity (%)
SPI-1	736 521–736 990	<i>Salmonella-enterica</i> -Gallinarum-SGB_4	100.00
	748 308–748 722	<i>Salmonella-enterica</i> -Gallinarum-SGB_8	100.00
	725 703–726 142	<i>Salmonella-enterica</i> -Gallinarum-SGB_1	99.77
	727 813–728 242	<i>Salmonella-enterica</i> -Gallinarum-SGE_2	99.77
	720 350–723 053	<i>Salmonella-enterica</i> -Typhimurium-SL1344	99.67
	759 536–762 688	<i>Salmonella-enterica</i> -Typhimurium-SL1344	98.92
	749 602–749 860	<i>Salmonella-enterica</i> -Typhimurium-J4STEHO	98.07
SPI-2	4 372 849–4 373 490	<i>Salmonella-enterica</i> -Gallinarum-SGC_2	100.00
	4 368 463–4 368 857	<i>Salmonella-enterica</i> -Gallinarum-SGC_9	100.00
	4 375 091–4 375 515	<i>Salmonella-enterica</i> -Gallinarum-SGH_1	100.00
	4 382 747–4 383 130	<i>Salmonella-enterica</i> -Paratyphi_A-Spa11	100.00
	4 365 544–4 366 180	<i>Salmonella-enterica</i> -Gallinarum-SGB_10	99.22
	4 398 917–4 403 544	<i>Salmonella-enterica</i> -Typhimurium-LT2	98.96
SPI-3	1 669 677–1 670 414	<i>Salmonella-enterica</i> -Typhimurium-14028s	99.05
	1 652 207–1 653 720	<i>Salmonella-enterica</i> -Typhimurium-14028s	98.88
SPI-4	2 158 316–2 185 014	<i>Salmonella-enterica</i> -Choleraesuis-SC_B67	98.88
SPI-5	3 663 131–3 672 877	<i>Salmonella-enterica</i> -Dublin-2229	99.43
SPI-9	575 172–587 813	<i>Salmonella</i> -Typhi-CT18	98.43
SPI-10	2 397 670–2 398 222	<i>Salmonella-enterica</i> -Gallinarum-SGE_3	99.28
SPI-12	127 545–136 883	<i>Salmonella-enterica</i> -Choleraesuis-SC_B67	97.97
SPI-13	989 509–989 849	<i>Salmonella-enterica</i> -Gallinarum-SGA_10	100.00
	991 928–992 265	<i>Salmonella-enterica</i> -Gallinarum-SGD_3	99.41
SPI-14	3 460 163–3 460 663	<i>Salmonella-enterica</i> -Gallinarum-SGA_8	99.80
	3 465 750–3 466 190	<i>Salmonella-enterica</i> -Gallinarum-SGC_8	99.77

携带 42 个耐药基因,其中多数为染色体携带的多药外排系统相关基因。在染色体中携带 1 个可水平转移的氨基糖苷类耐药基因 *aac(6')-Iaa*; 在质粒 pTLS-1 中携带 2 个可水平转移的耐药基因,分别为介导  $\beta$ -内酰胺类耐药的 *TEM-1* 基因和介导四环素类耐药的 *tet(A)* 基因; 质粒 pTLS-2 中携带 1 个  $\beta$ -内酰胺类耐药的 *TEM-1* 基因,具体结果见表 4。细菌移动元件可以在不同菌间水平转移,包括插入序列(insert sequence, IS)和转座子(Transposon, Tn)等,常可携带耐药基因,导致耐药性的快速传递。通过 Mobile Element Finder 数据库分析,菌株 S-1-1 中存在 9 个 MGE,具体结果见表 5。

#### 2.7.4 Nr 数据库注释分析结果

通过与 Nr 数据库比对,可以分析基因组序列与相近物种的相似情况及同源序列的功能信息。菌株 S-1-1 中注释到 Nr 数据库的序列共有

4 729 条,注释结果如图 3 所示,其中有 3 120 条序列与肠道沙门氏菌基因组具有同源性,是总注释的 65.98%,其次占总注释 29.06%和 1.50%的是沙门氏菌(1 374)和肠杆菌科(71)。

#### 2.7.5 GO 数据库注释分析结果

对菌株 S-1-1 全基因组序列进行 GO 注释后,结果如图 4 所示,其中共有 3 801 条序列在 GO 数据库中得到注释,共涉及三大类,分别为细胞组分(cellular component)、分子功能(molecular function)和生物过程(biological process)。菌株 S-1-1 涉及 44 个二级功能条目,其中细胞组分注释条目约占总功能条目的 33.12%,主要包括细胞、拟核和细胞膜部分。分子功能注释约占总注释条目的 25.99%,主要包括催化活性、运输活动等。生物过程注释条目约占总功能注释的 40.87%,主要与代谢过程和单有机体过程有关。

表 4 可水平转移耐药基因分析结果

Table 4 Results of horizontal transferable drug resistance gene analysis

耐药基因 Drug resistance gene	基因位点 Gene position	位置 Location	耐药基因种类 Type of drug resistance gene	相似性 Similarity (%)
<i>aac(6')-Iaa</i>	4 170 193–4 170 630	染色体 Chromosome	氨基糖苷类 Aminoglycosides	98.63
<i>TEM-1</i>	69 482–70 342	Plasmid pTLS-2	$\beta$ -内酰胺类 Beta-lactams	100.00
	1 716–2 576	Plasmid pTLS-1	$\beta$ -内酰胺类 Beta-lactams	100.00
<i>tet(A)</i>	10 724–11 923	Plasmid pTLS-1	四环素类 Tetracyclines	100.00

表 5 可移动遗传元件分析结果

Table 5 Results of a mobile genetic element

移动元件名称 Mobile element name	家族 Family	种类 Species	基因位点 Position	相似性 Similarity (%)
Tn801 (TnA)	Tn3	转座子 Unit transposon	1 569–6 516	98.16
ISSty2	IS3	插入序列 Insertion sequence	3 745 457–3 746 700	96.58
ISKpn2	IS110	插入序列 Insertion sequence	4 648 405–4 649 698	96.18
ISECL10	IS3	插入序列 Insertion sequence	624 162–625 368	93.21
			2 402 178–2 403 383	94.03
MITEEC1	IS630	微型反向重复序列 Miniature Inverted Repeat	638 015–638 137	93.50
			427 097–427 219	94.31
TN801 (TnA)	Tn3	转座子 Unit transposon	69 335–74 282	98.16
ISSEN7	ISNCY	插入序列 Insertion sequence	37 750–38 993	99.92



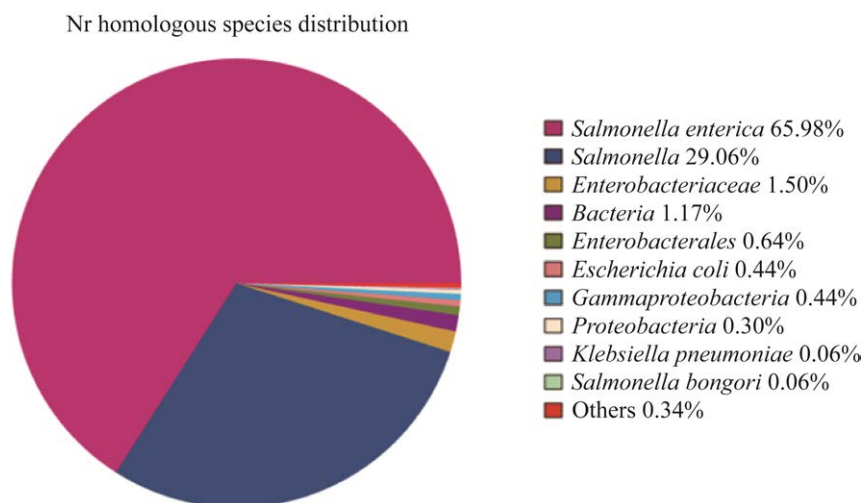


图3 Nr数据库的注释结果统计

Figure 3 Statistics of annotation results in Nr database.

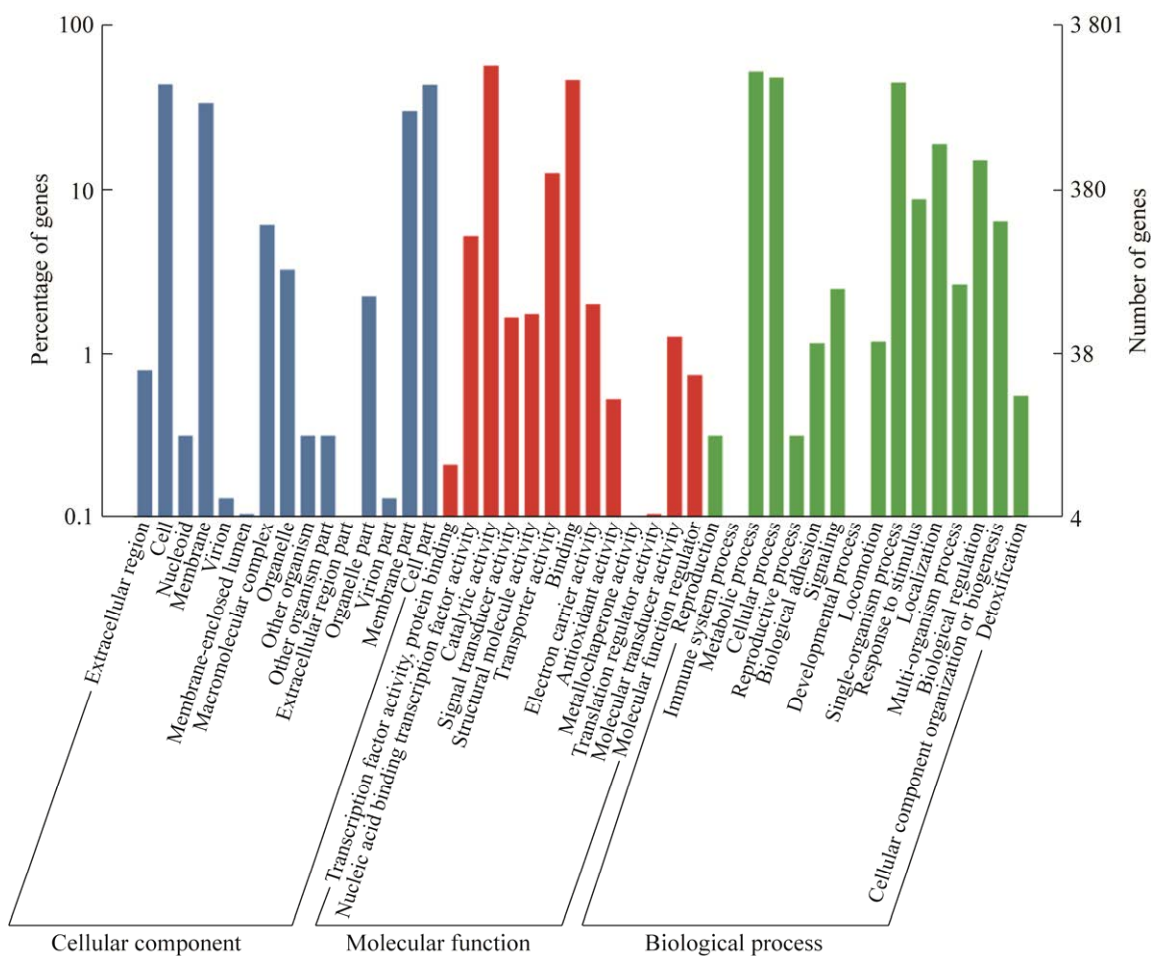


图4 GO功能分类图

Figure 4 GO functional classification.

### 2.7.6 KEGG 功能分析结果

KEGG 注释表明共有 2 082 条序列得到注释, 而且共参与了 49 条通路。对于这 49 条通路进行归类后, 共分为新陈代谢(metabolism)、环境信息处理(environmental information processing)、细胞加工(cellular processes)和遗传信息处理(genetic information processing)这 4 大类, 如图 5 所示。

注释到“新陈代谢”这一类的序列数量最多, 共 1 410 条序列, 共涉及 38 个次级条目。注释到“环境信息处理”这一类的序列数有 464 条, 涉及了 4 个次级条目。注释到“遗传信息处理”这一类的序列数有 148 条, 其中涉及了 5 个次级条目。注释到“细胞加工”的这类的序列数有 60 条, 涉及了 2 个次级条目。

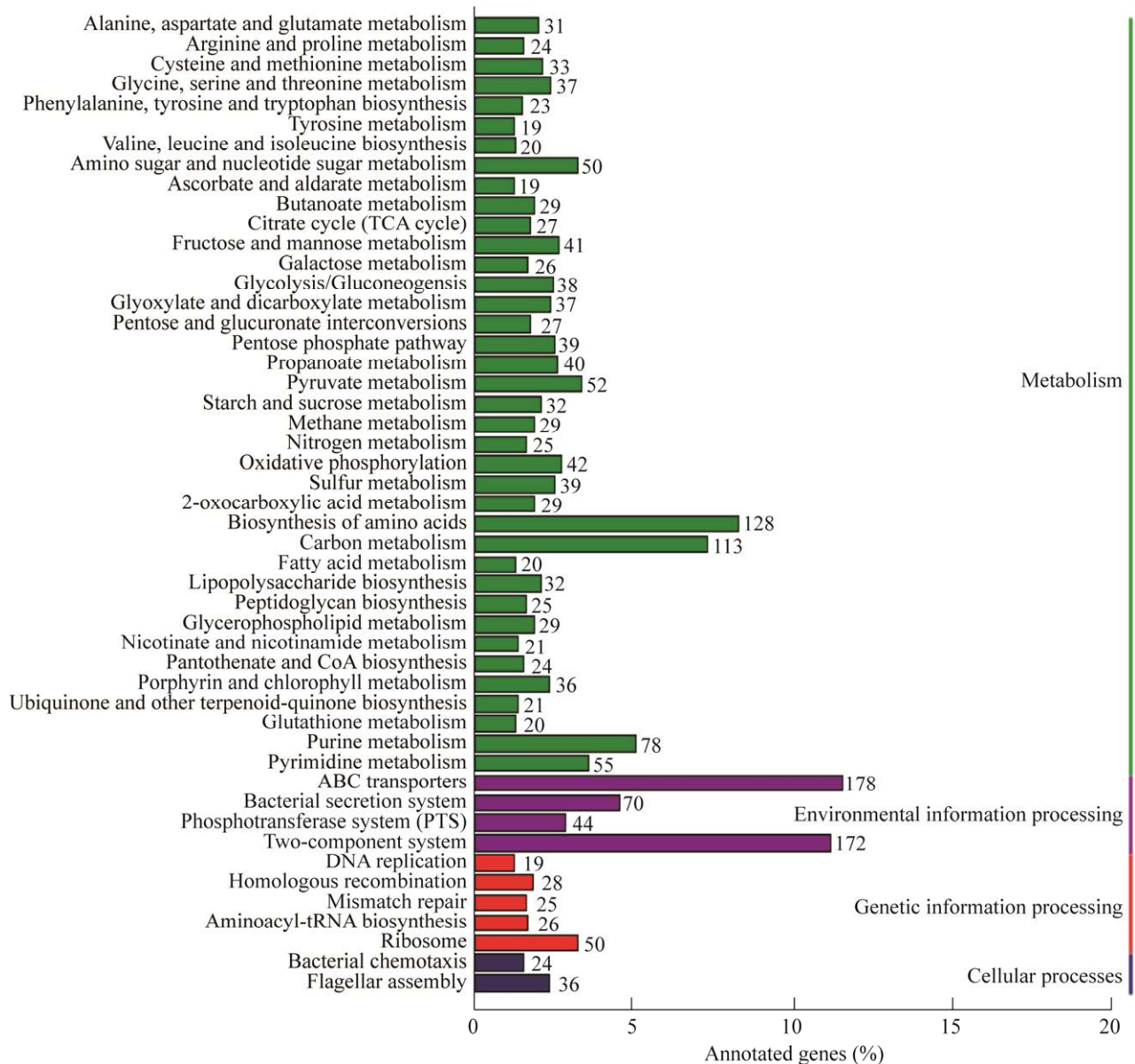


图 5 KEGG 分类

Figure 5 KEGG classification.

### 3 讨论

牛沙门氏菌病主要发生于犊牛,可引起犊牛腹泻、发热、呼吸道症状等。因其具有胞内寄生能力,可形成潜伏感染,所以外表健康的牛也可以携带并向环境中排菌<sup>[8]</sup>。因此,沙门氏菌的持续监测对于牛的健康养殖非常重要,但相较于大肠杆菌、致贺氏菌、魏氏梭菌等肠道常见病原菌,沙门氏菌培养时间较长、菌落生长速度慢、存在其他细菌时不易进行分离。王小立<sup>[20]</sup>对河北地区牛源大肠杆菌和沙门氏菌进行分离鉴定,获得196株大肠杆菌,沙门氏菌仅分离到3株,为甲型副伤寒沙门氏菌。因沙门氏菌具有2 500种以上血清型,除常见如鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌等血清型外,商品化诊断血清通常不能准确鉴定。因此,本研究利用全基因组测序获得分离菌全部序列,使用SeqSero 1.2数据库进行了准确分型。

对分离菌S-1-1进行小鼠致病性试验发现该菌具有较强的毒力,因此,参考其他研究对部分常见毒力基因进行了PCR检测,包括质粒携带的毒力基因、菌毛基因和肠毒素基因等,最终检出率达到92.3%,只有*rck*基因未检出,与其他类似研究相比检出率偏高<sup>[21]</sup>。经过全基因组测序,菌株S-1-1中共携带有996个毒力基因。沙门氏菌发挥毒力作用的关键因素是SPI, SPI中通常携带多个毒力基因及调控基因簇<sup>[22]</sup>。因此,我们对菌株S-1-1进行了SPI分析,结果显示菌株S-1-1中共有24个SPI,包括多个SPI-1、SPI-2、SPI-3、SPI-13、SPI-14、SPI-4、SPI-5、SPI-9、SPI-10和SPI-12。结合小鼠致病性试验和毒力基因、毒力岛分析结果,均可证实所分离的都柏林沙门氏菌S-1-1具有较强毒力。

分离菌株S-1-1为多重耐药株, MIC结果显示仅对多粘菌素B和噻孢霉素敏感,对恩诺沙星和强力霉素中度敏感,对其余10种受试药物均呈耐药。Srednik等<sup>[23]</sup>对140株牛源都柏林沙门氏菌进行耐药性检测,其中98%的菌株对4种以上药物具有耐药性,对磺胺类药物的耐药性为96%,对四环素类药物的耐药性为97%,对氨基糖苷类药物的耐药性为95%,对 $\beta$ -内酰胺类药物的耐药性为85%。此研究表明,美国所流行的都柏林沙门氏菌均具有较强的耐药性。本研究所分离的S-1-1菌株耐药情况也较严重,应给予重视并持续监测。此外,美国分离株共鉴定出10种质粒类型,以IncA/C2、IncX1和IncFII(S)最为常见<sup>[23]</sup>,与本研究结果相符。然而在Mangat等<sup>[6,24]</sup>的研究中分离的都柏林沙门氏菌耐药性较弱,多重耐药菌株比例和携带的可移动耐药基因数量也较美国分离株少。本研究中,菌株S-1-1中携带的可水平转移耐药基因只有4种,相较于Mangat等<sup>[6,24]</sup>的报道数量更少,但由于本研究样本量不足,不能全面反映本地区都柏林沙门氏菌的耐药基因流行现状,所以仍需加大监测和研究范围。此外,菌株S-1-1中携带的可水平转移耐药基因型与该菌株耐药表型并不相符,推测其耐药性主要通过基因组中多药外排泵系统介导产生。

### 4 结论

本研究在通辽地区分离得到一株牛源都柏林沙门氏菌S-1-1,对其进行全基因组测序分析,该菌株为多重耐药菌且携带大量毒力基因,基因组中存在较多毒力岛和插入序列,本研究为监测牛源沙门氏菌流行、毒力、耐药性发展及后续深入研究提供了参考。

## REFERENCES

- [1] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). The European Union one health 2018 zoonoses report[J]. EFSA Journal European Food Safety Authority, 2019, 17(12): e05926.
- [2] GAL-MOR O. Persistent infection and long-term carriage of typhoidal and nontyphoidal salmonellae[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2019, 32(1): e00088-18.
- [3] UZZAU S, BROWN DJ, WALLIS T, RUBINO S, LEORI G, BERNARD S, CASADESÚS J, PLATT DJ, OLSEN JE. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*[J]. Epidemiology and Infection, 2000, 125(2): 229-255.
- [4] HARVEY RR, FRIEDMAN CR, CRIM SM, JUDD M, BARRETT KA, TOLAR B, FOLSTER JP, GRIFFIN PM, BROWN AC. Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Dublin infections among humans, United States, 1968-2013[J]. Emerging Infectious Diseases, 2017, 23(9): 1493-1501.
- [5] NARAYAN P. 针对食源性病原菌流行性的 Meta 分析和都柏林沙门氏菌的比较基因组分析[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2019.  
NARAYAN P. Meta-analysis on the prevalence of food-borne pathogens and comparative genome analysis of *Salmonella* Dublin[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2019 (in Chinese).
- [6] MANGAT CS, BEKAL S, AVERY BP, CÔTÉ G, DAIGNAULT D, DOUALLA-BELL F, FINLEY R, LEFEBVRE B, BHARAT A, REID-SMITH RJ, LONGTIN J, IRWIN RJ, MULVEY MR. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance Public Health Partnership. Genomic investigation of the emergence of invasive multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Dublin in humans and animals in Canada[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2019, 63(6): e00108-e00119.
- [7] FRITZ HM, PEREIRA RV, TOOHEY-KURTH K, MARSHALL E, TUCKER J, CLOTHIER KA. *Salmonella enterica* serovar Dublin from cattle in California from 1993-2019: antimicrobial resistance trends of clinical relevance[J]. Antibiotics, 2022, 11(8): 1110.
- [8] KENT E, OKAFOR C, CALDWELL M, WALKER T, WHITLOCK B, LEAR A. Control of *Salmonella* Dublin in a bovine dairy herd[J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2021, 35(4): 2075-2080.
- [9] 贺健, 邢小勇, 武小椿, 温峰琴, 张阳阳, 张生英, 刘佳, 包世俊. 一株林麝源绿脓杆菌的分离鉴定及全基因组序列分析[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(9): 2569-2578.  
HE J, XING XY, WU XC, WEN FQ, ZHANG YY, ZHANG SY, LIU J, BAO SJ. Isolation and identification of a strain of *Pseudomonas aeruginosa* from forest musk and analysis of the whole genome sequence[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2021, 52(9): 2569-2578 (in Chinese).
- [10] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Clinical Laboratory Standard Institution[Z]. CLSI: Wayne, PA, USA, 2015.
- [11] FARDSANEI F, SOLTAN DALLAL MM, DOURAGHI M, ZAHRAEI SALEHI T, MAHMOODI M, MEMARIANI H, NIKKHAHI F. Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Enteritidis isolated from meats and eggs[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 107: 451-456.
- [12] DEAMER D, AKESON M, BRANTON D. Three decades of nanopore sequencing[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(5): 518-524.
- [13] JAIN M, OLSEN HE, PATEN B, AKESON M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community[J]. Genome Biology, 2016, 17(1): 239.
- [14] HYATT D, CHEN GL, LOCASCIO PF, LAND ML, LARIMER FW, HAUSER LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11: 119.
- [15] ZHANG SK, YIN YL, JONES MB, ZHANG ZZ, DEATHERAGE KAISER BL, DINSMORE BA, FITZGERALD C, FIELDS PI, DENG XY. *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(5): 1685-1692.
- [16] JIA BF, RAPHENYA AR, ALCOCK B, WAGLECHNER N, GUO PY, TSANG KK, LAGO BA, DAVE BM, PEREIRA S, SHARMA AN, DOSHI S, COURTOT M, LO R, WILLIAMS LE, FRYE JG, ELSAYEGH T, SARDAR D, WESTMAN EL, PAWLOWSKI AC, JOHNSON TA, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1): D566-D573.
- [17] CHEN LH, YANG J, YU J, YAO ZJ, SUN LL, SHEN Y, JIN Q. VFDB: a reference database for bacterial

- virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(suppl\_1): D325-D328.
- [18] ROER L, HENDRIKSEN RS, LEEKITCHAROENPHON P, LUKJANCENKO O, KAAS RS, HASMAN H, AARESTRUP FM. Is the evolution of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* linked to restriction-modification systems?[J]. *mSystems*, 2016, 1(3): 00009-16.
- [19] JOHANSSON MHK, BORTOLAIA V, TANSIRICHAIIYA S, AARESTRUP FM, ROBERTS AP, PETERSEN TN. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2021, 76(1): 101-109.
- [20] 王小立. 河北地区牛源大肠杆菌和沙门氏菌的分离鉴定及耐药性分析[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院硕士学位论文, 2022.
- WANG XL. Isolation, identification and drug resistance analysis of bovine *Escherichia coli* and *Salmonella* in Hebei[D]. Qinhuangdao: Master's Thesis of Hebei Normal University of Science & Technology, 2022 (in Chinese).
- [21] 刘青霄. 芦花鸡鸡胚源沙门氏菌的分离鉴定及其耐药与毒力相关基因分析[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2020.
- LIU QX. Isolation and identification of *Salmonella* in embryo source of barred chicken and analysis of genes related to drug resistance and virulence[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [22] CROUSE A, SCHRAMM C, EMOND-RHEAULT JG, HEROD A, KERHOAS M, ROHDE J, GRUENHEID S, KUKAVICA-IBRULJ I, BOYLE B, GREENWOOD CMT, GOODRIDGE LD, GARDUNO R, LEVESQUE RC, MALO D, DAIGLE F. Combining whole-genome sequencing and multimodel phenotyping to identify genetic predictors of *Salmonella* virulence[J]. *mSphere*, 2020, 5(3): e00293-e00220.
- [23] SREDNIK ME, LANTZ K, HICKS JA, MORNINGSTAR-SHAW BR, MACKIE TA, SCHLATER LK. Antimicrobial resistance and genomic characterization of *Salmonella* Dublin isolates in cattle from the United States[J]. *PLoS One*, 2021, 16(9): e0249617.
- [24] GARCÍA-SOTO S, TOMASO H, LINDE J, METHNER U. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin in German cattle herds using whole-genome sequencing[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(2): e0033221.