

生鲜畜禽肉中沙门氏菌全基因组分析与分子溯源

Whole genome analysis and molecular traceability study of *Salmonella* in fresh livestock and poultry meat

宋 晟^{1,2} 高 晗^{1,2} 严 礼^{1,2}

SONG Sheng^{1,2} GAO Han^{1,2} YAN Li^{1,2}

郭焜鹏^{1,2} 张海韵^{1,2} 王芳斌^{1,2}

GUO Kun-peng^{1,2} ZHANG Hai-yun^{1,2} WANG Fang-bin^{1,2}

(1. 食品安全监测与预警湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410117;

2. 湖南省食品质量监督检验研究院, 湖南 长沙 410117)

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Early Warning, Changsha, Hunan 410117, China; 2. Hunan Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, Changsha, Hunan 410117, China)

摘要:依据 GB 4789.4—2016 对从长沙市生鲜市场随机采集的生鲜猪肉、鸡肉进行检验。结果显示:有 20 份生鲜猪肉样品检出沙门氏菌,检出率为 83.3%;有 20 份生鲜鸡肉样品检出沙门氏菌,检出率为 74.1%;总检出率为 78.4%。通过对其中 40 株沙门氏菌进行全基因组测序与分子溯源研究,结果表明:20 株猪源性沙门氏菌与 20 株鸡源性沙门氏菌按分子溯源分析可分为 5 个明显不同的聚类,清晰反映了沙门氏菌的污染源分布及交叉污染情况,实现了精准溯源;其中发现了 15 个致病基因,从基因层面阐明了沙门氏菌可能存在的致病基因与致病机制,提示了沙门氏菌潜在的致病风险;试验发现了 15 个耐药基因,从基因层面阐明了沙门氏菌可能存在的耐药基因与耐药机制。

关键词:沙门氏菌;全基因组测序;系统进化树;分子溯源研究

Abstract: In order to investigate the contamination status of *Salmonella* in fresh pork and fresh chicken, and research its whole genome characteristics and molecular traceability, the laboratory randomly collected 24 fresh pork and 27 fresh chicken from the fresh market in Changsha, were inspected according to “National Food Safety Standard Food microbiological examination; *Salmo-*

nella” GB 4789.4—2016. The results showed that in 24 randomly selected fresh pork, 20 samples were detected, with the detection rate of 83.3%; in 27 randomly selected fresh chicken, 20 samples were detected, and the detected rate is 74.1%; the total detection rate was 78.4%. The results showed that the fresh pork and fresh chicken sold on the fresh market in Changsha were seriously contaminated by *Salmonella*, which had great risk for food safety. 40 of them were analyzed by whole genome sequencing and molecular traceability analysis. The results showed that 20 kinds of pig-derived *Salmonella* strains and 20 kinds of chicken-derived *Salmonella* strains could be divided into 5 clusters, and clearly reflected the distribution of pollution sources and cross-contamination of *Salmonella*, achieving precise traceability. 15 pathogenic genes were found, which clarified the possible pathogenic genes and pathogenic mechanisms on the genetic level, and suggested the potential risk of *Salmonella*. The research on the pathogenic mechanism of related diseases provided guidance for diseases control. 15 genes involved in drug-resistance were found, which clarified the possible drug-resistant genes and the relative mechanisms on the genetic level, providing important data for the control of highly drug-resistant strains.

Keywords: *Salmonella*; whole-genome sequencing; phylogenetic tree; molecular traceability study

基金项目:湖南省市场监督管理局科技计划项目(编号:2019KJJH52);湖南省科技创新平台与人才计划项目(编号:2019TP1058)

作者简介:宋晟,男,湖南省食品质量监督检验研究院工程师,硕士。

通信作者:高晗(1982—),男,湖南省食品质量监督检验研究院工程师,硕士。E-mail:125069250@qq.com

收稿日期:2020-08-01

沙门氏菌广泛分布于自然界,是一种属于肠杆菌科的革兰氏阴性杆菌,就邦戈尔沙门氏菌和肠道沙门氏菌这两个物种而言,迄今就已发现 2 500 余种血清型。作为一种人畜共患的主要病原菌,沙门氏菌通常会引起发热、呕吐等不良反应,是腹泻病全球四大病因之一^[1-2]。某

种情况下,沙门氏菌甚至可以进入血液,引发脑膜炎。为治疗沙门氏菌病,通常采用抗微生物药物,但大量抗生素的滥用,导致部分菌株产生耐药性,使药物失效^[3-4]。人类患沙门氏菌病有可能是食用了被沙门氏菌污染的动物源性食品,如蛋、肉、禽和奶等。对于沙门氏菌以及其他食源性致病菌的溯源研究,主要有传统的沙门氏菌分离鉴定技术、多位点序列分型(Multi locus sequence typing, MLST)技术以及脉冲场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE),近年来,随着新一代基因组测序技术的发展,基于全基因组测序分子分型技术广泛应用于食源性致病菌溯源中,具有快速精准等技术优势^[5-7]。

实验室对长沙市销售的生鲜鸡肉、生鲜猪肉进行了随机取样调查,依据 GB 4789.4—2016 分离、鉴定样品中的沙门氏菌,以充分了解长沙市销售的生鲜鸡肉、生鲜猪肉的污染状况,为防治沙门氏菌所引起的食源性疾病提供参考依据,并对分离鉴定出的 40 株沙门氏菌,进行全基因组测序与分子溯源分析,研究其溯源关系、致病机理、耐药机理,为沙门氏菌基因层面的深入研究提供一定的试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鼠伤寒沙门氏菌标准菌株 ATCC14028;实验室保存;

生鲜猪肉(24 份,每份 2 kg)、生鲜鸡肉(27 份,每份 2 kg);湖南省长沙市各大农贸市场;

缓冲蛋白胨水(BPW)、四硫酸钠煌绿增菌液(TTB)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)、HE 琼脂;青岛海博生物技术有限公司;

亚硫酸铋琼脂(BS)、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(XLD)、革兰氏染色液试剂盒(Gram Stain)、三糖铁琼脂(TSI)、营养琼脂(NA);北京陆桥技术股份有限公司;

革兰氏阴性菌鉴定试剂卡(GN);法国 Chromagar 公司。

1.2 仪器

拍击式均质器:Masticator Silver 型,西班牙 IUL 公司;

低温培养箱:MIR-254L-PC 型,日本松下电器产业株式会社;

全自动微生物鉴定系统:VITEK 2 compact30 型,法国生物梅里埃股份有限公司。

1.3 样品的采集与处理

将采集的新鲜猪肉 24 份与整鸡 27 份放入无菌均质袋中,用 BPW 冲淋后,拍击式均质器拍击猪肉 2 min,用手搓揉整鸡 2 min,BPW 淋洗液培养 18 h。

1.4 增菌与分离培养

吸取 1 mL 培养 18 h 的 BPW 淋洗液,转种至 10 mL

TTB 中,(42±1)℃培养 24 h,同时吸取 1 mL 培养 18 h 的 BPW 淋洗液,转种至 10 mL SC 中,(36±1)℃培养 24 h。从 TTB 与 SC 中各挑 1 环划线至 XLD、BS、HE 平板。BS 平板与 XLD 平板(36±1)℃培养 48 h,HE 平板(36±1)℃培养 24 h。

1.5 生化试验

自选择性琼脂平板上挑取沙门氏菌典型菌落,接种三糖铁,(36±1)℃培养 24 h。

1.6 革兰氏染色

自选择性琼脂平板上挑取沙门氏菌典型菌落,经生理盐水稀释,涂片固定后,革兰氏染色,显微镜观察细菌形态。

1.7 鉴定与菌株保存

自选择性琼脂平板上挑取典型菌落,接种营养琼脂(36±1)℃培养 24 h,得到纯化单菌落,采用全自动微生物生化鉴定系统进行菌种鉴定。单菌落经营养琼脂纯化后用菌种保存管于-70℃保存。

1.8 全基因组测序

对 40 株沙门氏菌进行基因组 DNA 的提取、测序、功能基因预测注释等工作由广州研科生物科技有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 菌株形态、生化鉴定结果

分离获得的 40 株典型菌株,在 BS 琼脂培养基上,形态为棕褐色或黑色且有金属光泽,菌落周围呈黑色;在 HE 琼脂培养基上,形态为蓝绿色,带黑色中心;在 XLD 琼脂培养基上,形态为粉红色,带黑色中心。接种三糖铁琼脂,斜面红色产碱,底层黄色产酸,产 H₂S 琼脂呈黑色,产气,琼脂中有气泡;经革兰氏染色,油镜可观察,两端钝圆的红色杆菌,革兰氏阴性,经全自动微生物生化鉴定系统鉴定为沙门菌属。

24 份生鲜猪肉中有 20 份样品检出沙门氏菌,检出率为 83.3%;27 份生鲜整鸡中有 20 份样品检出沙门氏菌,检出率为 74.1%,说明零售生鲜猪肉与生鲜整鸡沙门氏菌的污染率非常高。

2.2 40 株沙门氏菌基因组基本信息

采用二代测序技术对 40 株沙门氏菌进行全基因组测序,并进行序列组装。由表 1 可知,猪源性沙门氏菌的 scaffold 数目在 24~71,基因组总长度分布为 3 842 688~5 019 323 bp,GC 含量平均为 54.08%。由表 2 可知,基因数在 4 012~4 382,基因平均长度在 932~958 bp。鸡源性沙门氏菌的 scaffold 数目在 23~73,基因组总长度分布为 4 638 420~5 201 462 bp,GC 含量平均为 51.93%。基因数在 4 016~4 476,基因平均长度在 930~959 bp。20 株猪源性沙门氏菌基因组总长度的平均值比 20 株鸡

源性沙门氏菌基因组总长度的平均值小 425 799 bp,而 GC 平均含量却比 20 株鸡源性沙门氏菌多 2.15%,说明猪源性沙门氏菌与鸡源性沙门氏菌在基因组层面存在差异,也暗示两者来源不同,在运输与销售环节的交叉污染可能性小,而饲养、屠宰运输环节猪与猪之间、鸡与鸡之间污染可能性大。

2.3 猪源性、鸡源性沙门氏菌单拷贝直系同源基因分析

直系同源是指不同物种之间的某一部分序列具有同源性,例如蛋白质的同源性,DNA 序列的同源性,而单拷贝直系同源基因是指在不同物种中具有相同序列,相同功能,但基因组中拷贝数为 1 的基因。单拷贝直系同源基因,大部分为管家基因,在分子系统学中起重要的分子标记作用,通常用于构建生命树的主干及主干和末梢之间的分枝^[8]。分别对 20 株鸡源性沙门氏菌与 20 株猪源性沙门氏菌的基因组信息进行分析,统计基因家族、单拷贝直系同源基因、多拷贝直系同源基因、独立旁系同源基因、其他直系同源基因。由表 3、4 可知,20 株猪源性沙门氏菌共有 3 988 个基因家族,单拷贝直系同源基因数在 2 170~2 191,鸡源性沙门氏菌共有 3 919 个基因家族,单

拷贝直系同源基因数在 2 159~2 183。单拷贝直系同源基因主要包括内肽酶活性基因、水解酶基因、蛋白质分泌调节基因、核糖体结构基因、谷氨酰-tRNA 还原酶基因等。

2.4 基于单拷贝直系同源基因分别构建猪源性、鸡源性沙门氏菌系统进化树

基于单拷贝直系同源基因分别构建猪源性沙门氏菌系统进化树(见图 1),结果显示 20 株猪源性沙门氏菌明显聚集为 5 簇,FC10728、FC11983、FC10743、FC11961、FC11980 5 株聚集为 1 簇,FC10733、FC12045、FC10701、FC10726 4 株聚集为 1 簇,FC10738、FC10718、FC10717 3 株聚集为 1 簇,FC10758、FC11967 2 株聚集为 1 簇,FC10739、FC10745 2 株聚集为 1 簇,另有 4 株 FC10755、FC11958、FC10730、FC10702 无明显聚集。

FC10728、FC11983、FC10743、FC11961、FC11980 5 株猪源性沙门氏菌聚集为 1 簇,但采样点各不相同,说明该菌种在不同销售点均存在污染,而污染源可能是来源于同一个屠宰基地或同一个养殖生产基地。FC10733 与 FC10701 聚集为 1 簇,且来源于同一销售点,说明销售

表 1 20 株猪源性沙门氏菌基因组信息
Table 1 20 strains of pig-derived *Salmonella* genome information

菌株	组装片段数	基因组长度	GC 含量/%	基因数量	基因平均长度/bp
FC10701	63	3 983 709	54.11	4 210	946
FC10702	62	3 964 029	54.13	4 210	942
FC10717	59	4 032 099	53.96	4 291	940
FC10718	68	4 084 758	54.06	4 347	940
FC10726	55	3 996 834	54.11	4 223	946
FC10728	24	3 842 688	54.15	4 012	958
FC10730	38	4 118 772	54.09	4 382	940
FC10733	41	3 947 781	54.13	4 145	952
FC10738	55	4 801 227	54.12	4 163	950
FC10739	43	4 012 233	54.06	4 305	932
FC10743	46	4 892 100	54.03	4 197	947
FC10745	42	5 019 323	53.97	4 355	932
FC10755	45	4 753 312	54.10	4 060	951
FC10758	56	4 940 490	54.07	4 272	940
FC11958	29	4 727 322	54.14	4 112	945
FC11961	40	4 835 698	54.08	4 107	945
FC11967	48	4 847 344	54.06	4 219	937
FC11980	37	4 836 241	54.10	4 119	952
FC11983	41	4 839 301	54.11	4 117	953
FC12045	71	4 944 625	54.09	4 239	947
平均值	48	4 470 994	54.08	4 204	945

表 2 20 株鸡源性沙门氏菌基因组信息
Table 2 20 strains of chicken-derived *Salmonella* genome information

菌株	组装片段数	基因组长度	GC 含量/%	基因数量	平均基因长度/bp
FC10706	47	5 045 964	51.73	4 352	938
FC10707	49	4 949 339	51.81	4 260	941
FC10712	37	4 776 282	52.08	4 100	952
FC10721	46	4 736 766	51.95	4 038	954
FC10727	23	4 638 420	52.22	4 016	959
FC10729	63	4 818 272	52.18	4 157	942
FC10731	47	5 040 319	51.72	4 345	937
FC10735	51	5 029 498	51.91	4 332	939
FC10736	58	5 054 922	51.73	4 352	939
FC10754	43	4 940 696	51.96	4 259	939
FC11951	56	4 680 341	52.16	4 046	948
FC11959	43	5 154 124	51.66	4 394	934
FC11960	52	4 865 770	52.01	4 171	945
FC11964	49	4 841 872	51.93	4 138	947
FC11978	73	5 201 462	51.62	4 476	930
FC11981	60	4 878 762	52.12	4 194	947
FC11982	50	4 791 968	52.01	4 140	943
FC11987	45	4 782 895	51.97	4 094	948
FC11988	56	4 923 301	51.93	4 256	935
FC12043	46	4 784 898	51.97	4 099	947
平均值	50	4 896 794	51.93	4 211	943

表 3 20 株猪源性沙门氏菌直系基因与旁系基因分析
Table 3 Analysis of orthologous gene and paralogous gene of 20 strains of pig-derived *Salmonella*

菌株	单拷贝直系同源基因	多拷贝直系同源基因	旁系同源基因	其他直系同源基因	未聚类基因
FC10701	2 176	1 538	0	489	7
FC10702	2 183	1 520	0	472	35
FC10717	2 170	1 559	0	555	7
FC10718	2 174	1 554	4	541	74
FC10726	2 173	1 543	0	501	6
FC10728	2 190	1 502	0	319	1
FC10730	2 171	1 543	0	578	90
FC10733	2 180	1 528	0	435	2
FC10738	2 172	1 551	0	436	4
FC10739	2 175	1 552	2	544	32
FC10743	2 181	1 533	0	477	6
FC10745	2 172	1 553	0	521	109
FC10755	2 191	1 475	2	331	61
FC10758	2 187	1 512	0	554	19
FC11958	2 185	1 507	6	391	23
FC11961	2 189	1 505	0	408	5
FC11967	2 190	1 500	0	493	36
FC11980	2 189	1 504	0	425	1
FC11983	2 188	1 508	0	419	2
FC12045	2 176	1 541	0	509	13

点存在交叉污染,或来源于同一供货渠道。另有 FC10707 与 FC10743,FC11983 与 FC119582 分别来源于 2 个销售点,且并不聚集,说明该销售点所销售的猪肉存在多株猪源性沙门氏菌污染的情况,可能是不同的供货渠道所致。从同源性的程度来看,FC10701、FC10726 与 FC10733 同源性极高,分别来源于 2 个销售点,FC10717 与 FC10738 同源性极高,分别来源于 2 个销售点,FC10728 与 FC10743 同源性极高,分别来源于 2 个销售点,FC11961、FC11980 与 FC11983 同源性极高,分别来源于 3 个销售点,说明其销售的猪肉分别来源于同一供货渠道。

基于单拷贝直系同源基因分别构建鸡源性沙门氏菌系统进化树(见图 2),结果显示 20 株鸡源性沙门氏菌明显聚集为 5 簇,FC10706、FC10707、FC10731、FC10736、FC11978、FC11982 6 株聚集为 1 簇,FC10721、FC11960、FC11964、FC11987、FC12043 5 株聚集为 1 簇,FC10754、FC11959、FC11988 3 株聚集为 1 簇,FC10729、FC11981 2 株聚集为 1 簇,另有 4 株 FC10712、FC10727、FC10735、FC11951 无明显聚集。

FC10706、FC10707、FC10731、FC10736、FC11978、FC11982 6 株鸡源性沙门氏菌聚集为 1 簇,其中 FC10706、

表 4 20 株鸡源性沙门氏菌直系基因与旁系基因分析
Table 4 Analysis of orthologous gene and paralogous gene of 20 strains of chicken-derived *Salmonella*

菌株	单拷贝直系同源基因	多拷贝直系同源基因	旁系同源基因	其他直系同源基因	未聚类基因
FC10706	2 169	1 528	0	654	1
FC10707	2 172	1 522	0	566	0
FC10712	2 173	1 515	2	377	33
FC10721	2 182	1 469	0	387	0
FC10727	2 180	1 504	0	300	32
FC10729	2 173	1 528	2	451	3
FC10731	2 171	1 524	0	646	4
FC10735	2 163	1 546	4	545	74
FC10736	2 170	1 526	0	655	1
FC10754	2 167	1 551	2	525	14
FC11951	2 176	1 496	0	320	54
FC11959	2 159	1 567	2	632	34
FC11960	2 174	1 492	0	489	16
FC11964	2 174	1 492	0	461	11
FC11978	2 160	1 551	3	687	75
FC11981	2 165	1 544	0	471	14
FC11982	2 183	1 495	0	454	8
FC11987	2 177	1 482	0	432	3
FC11988	2 169	1 537	0	467	83
FC12043	2 177	1 483	0	438	1

FC10707 与 FC10731 来源于同一品牌超市的 2 个分店且同源性极高,说明同一品牌超市的供货渠道可能存在污

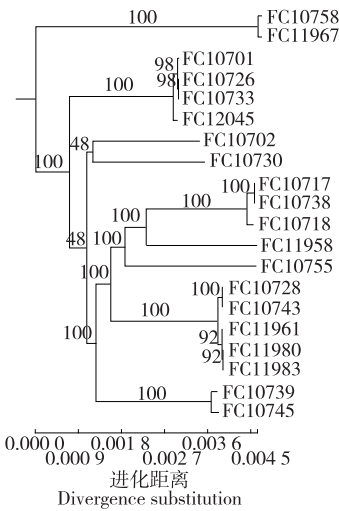


图 1 基于单拷贝直系同源基因构建 20 株猪源性沙门氏菌系统进化树
Figure 1 Phylogenetic tree of 20 pig-derived *Salmonella* strain based on single-copy orthologous genes

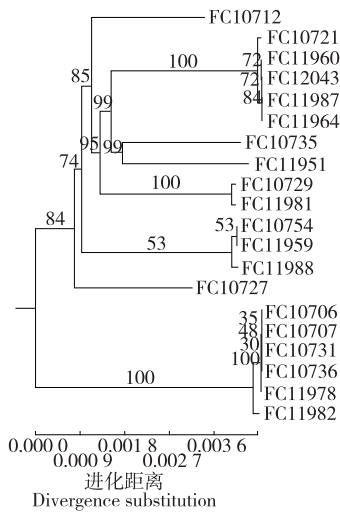


图2 基于单拷贝直系同源基因构建20株鸡源性沙门氏菌系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of 20 chicken-derived *Salmonella* strain based on single-copy orthologous genes

染,导致分店销售的鸡肉污染同一沙门氏菌。FC11982与FC11959、FC11988与FC11960分别聚集成不同簇,但来源于同一销售点,说明该销售点所销售的鸡肉存在多株鸡源性沙门氏菌污染的情况,可能是不同的供货渠道所致,且存在交叉污染的可能。从同源性的程度来看,FC11960、FC12043、FC11987与FC11964同源性极高,分别来源于4个销售点,FC10754与FC11959同源性极高,分别来源于2个销售点,FC10728与FC10743同源性极高,分别来源于2个销售点,FC10706、FC10707、FC10731、FC10736与FC11978同源性极高,分别来源于4个销售点,说明其销售的鸡肉分别来源于同一供货渠道。

2.5 猪源性、鸡源性沙门氏菌致病基因分析

通过数据比对与分析,发现20株猪源性沙门氏菌,20株鸡源性沙门氏菌,共涉及15种致病基因,如表5和表6所示。整体比较而言,鸡源性沙门氏菌致病基因较猪源性沙门氏菌多,20株鸡源性沙门氏菌共有277个致病基因,而20株猪源性沙门氏菌共有271个致病基因。*fimA*、*fimD*、*ipaH9.8*、*ipgD* & *sopB*、*K08303*、*ptrB*、*sipA* & *ipaA*、*sipB* & *ipaB* & *bipB*、*sipC* & *ipaC* & *bipC*、*sipD* & *ipaD* & *bipD*、*yeeJ* 11个基因为20株猪源性沙门氏菌所共有;*fimA*、*fimD*、*ipaH9.8*、*ipgD* & *sopB*、*K08303*、*ptrB*、*sipA* & *ipaA*、*sipB* & *ipaB* & *bipB*、*sipC* & *ipaC* & *bipC*、*sipD* & *ipaD* & *bipD*、*sptP*、*yeeJ* 12个基因为20株鸡源性沙门氏菌所共有。关于*sopE*基因,猪源性沙门氏菌中只有FC10730拥有,但鸡源性沙门氏菌中有FC10706、FC10707、FC10712、FC10731、FC10736、FC11978 6株拥有该基因。

15种致病基因涉及多种致病机理。*fimA*,基因注释为菌毛蛋白,特异性介导细菌对于骨髓源树突状细胞的粘附和侵袭作用^[9]。*fimD*,基因注释为外膜引入蛋白,位于菌毛顶端的蛋白,是所有血清型的共有蛋白,介导沙门氏菌直接粘附宿主细胞。*yeeJ*,基因注释为黏附素,介导沙门氏菌对宿主细胞的粘附,对沙门氏菌的定植起重要作用,化学性质方面,黏附素可能为沙门氏菌表面某种特定的蛋白质结构或糖脂成分^[10]。*sipA* & *ipaA*、*sipB* & *ipaB* & *bipB*、*sipC* & *ipaC* & *bipC*、*sipD* & *ipaD* & *bipD*,基因注释分别为侵袭素A、侵袭素B、侵袭素C、侵袭素D,4个基因均位于致病岛SPI-1,细菌进入宿主上皮细胞的关键因子,是沙门氏菌的关键毒力因子。*ipaH9.8*,基因注释为侵袭质粒抗原,可抑制血小板的正常凝集,促使水肿^[11-12]。*sopB*,基因注释为磷脂酰肌醇-4,5-双磷酸4-磷酸酶,是一种肌醇磷酸酶,在发病机理中起重要作用,当沙门氏菌侵入人肠道上皮细胞并分泌*sopB*蛋白后,将激活3-磷酸肌醇激酶依赖性的信号传导,从而使肠上皮细胞Cl⁻水平提高,打乱宿主的多种信号传导途径。*K08303*,基因注释为蛋白酶,在上皮细胞起信号传导作用。*ptrB*,基因注释为寡肽酶B^[13-14]。另有4个致病基因为个别沙门氏菌所有,其中*sopE*,只有7株沙门氏菌具有,该基因注释为效应蛋白,可介导肌动蛋白集合,起细菌内化作用;能刺激肠道上皮细胞导致炎症和腹泻,促进炎症细胞的趋化和增殖;破坏宿主细胞的肌动蛋白,进而使得细菌侵入;引起迟发性细胞毒作用,引起黏膜炎症反应。*sopD*,基因注释为效应蛋白,在入侵真核细胞中起协同作用。*sptP*,基因注释为效应蛋白,能引起至少两种蛋白的去磷酸化,抑制肥大细胞的脱颗粒,导致抑制嗜中性粒细胞的聚集,阻止血管内容物流如感染部位,从而引起细菌的全身性感染^[15]。*TROVE2* & *SSA2*,基因注释为SS-A/Ro核糖核蛋白,是一种RNA-蛋白质复合体,功能上属于一种红斑狼疮抗原,SS-A/Ro抗体可作为新生儿红斑狼疮(NLE)的血清学标志^[16]。

2.6 猪源性、鸡源性沙门氏菌耐药基因分析

通过数据比对与分析,发现20株猪源性沙门氏菌,20株鸡源性沙门氏菌,共涉及15种耐药基因,如表7和表8所示。整体比较而言,鸡源性沙门氏菌与猪源性沙门氏菌的耐药基因分布情况基本类似,20株猪源性沙门氏菌共有294个耐药基因,20株鸡源性沙门氏菌共有293个耐药基因。*acrA*、*ampG*、*ampC* & *penP*、*norR*、*norV*、*norW*、*nsrR*、*ompC*、*ompF*、*tolC*、*YHB1* & *hmp*、*lepA*、*pagP*、*SIG2* & *rpoS* 14个耐药基因为20株猪源性沙门氏菌所共有;*acrA*、*ampG*、*ampC* & *penP*、*norR*、*norV*、*norW*、*nsrR*、*ompC*、*ompF*、*tolC*、*YHB1* & *hmp*、*lepA*、*pagP*、*SIG2* & *rpoS* 14个耐药基因为20株鸡源性沙门氏菌所共有,关于*vanX*基因,分别有14株猪源性沙门氏

菌与 13 株鸡源性沙门氏菌有该基因。

15 种耐药基因涉及多种耐药机制。*acrA*, 基因注释为膜融合蛋白; *TolC*, 基因注释为外膜通道蛋白, 两者相互配合, 形成主动外排系统, 由膜融合蛋白 *acrA* 捕获抗菌药物后, 通过外膜通道蛋白 *TolC*, 将抗菌药物运转至外界。*ompC*、*ompF*, 基因注释为外膜孔蛋白, 细菌接触抗菌药物后, 发生外膜孔蛋白 *ompC*、*ompF* 的表达基因失活, 造成孔蛋白丢失或严重减少, 最终导致 β -内酰胺类药物进入菌体内减少, 切断 β -内酰胺类药物输入细菌体内的途径, 以产生耐药性。*ampC* & *penP*, 基因注释为 β -内酰胺酶, 可使使易感抗生素水解而灭活^[17]。*ampG*, 基因注释为 β -内酰胺酶感应信号传感器, 编码一种依赖质子动力势能的单要素渗透酶, 起到向胞浆内传递诱导信号的作用。*AmpG* 蛋白是细胞黏黏循环中的关键蛋白。若 *ampG* 基因缺失, 细菌会完全丧失 *AmpC* β -内酰胺酶的诱导性或只表达低水平诱导^[18]。*YHB1* & *hmp*、*norR*、*norV*、*norW*、*nsrR*, 基因注释分别为 一氧化氮双加氧酶、厌氧型一氧化氮还原酶转录调节因子、厌氧型一氧化氮

还原酶、一氧化氮还原酶 *FoRd-AND(+)*、*Rrf2* 家族转录调节因子 & 一氧化氮敏感的转录阻遏物, 沙门氏菌通过还原一氧化氮, 实现对一氧化氮的脱毒, 导致吞噬细胞无法杀死沙门氏菌, 从而提高沙门氏菌对宿主的抗性^[19]。*PagP*, 基因注释为酰基转移酶, 沙门氏菌细胞外膜的酰基转移酶 *PagP*, 能将磷脂的 C_{16} 碳脂肪酸链转移到内毒素分子的脂肪酸链上, 形成次级脂肪酸链, *PagP* 产生的内毒素可以干扰 *TLR4* 的识别, 使沙门氏菌对阳离子抗菌肽产生抗性^[20]。*SIG2* & *rpoS* 是 RNA 聚合酶的主要识别因子, 当沙门氏菌处于逆境条件下 *sigma* 因子启动调控网, 改变其对不同环境压力的应答, 以克服胁迫环境。*lepA*, 基因注释为 GTP 结合蛋白, 能识别错误转位的核糖体, 使其有机会正确转位。另有 *vanX* 为 27 株沙门氏菌具有, 该基因注释为 *D*-丙氨酰-*D*-丙氨酸二肽酶, 可将细胞胞壁中合成的 *D*-丙氨酰-*D*-丙氨酸水解, 导致细胞壁前质末端的二肽发生结构化变化, 从而降低万古霉素药物分子跟细菌细胞壁前质的结合力, 以获得对万古霉素的耐药性^[21]。

表 5 20 株猪源性沙门氏菌致病基因分析[†]

Table 5 Analysis of pathogenic genes of 20 strains of pig-derived *Salmonella*

菌株	<i>fimA</i>	<i>fimD</i>	<i>ipaH9.8</i>	<i>ipgD</i> & <i>sopB</i>	<i>K08303</i>	<i>ptrB</i>	<i>sipA</i> & <i>ipaA</i>	<i>sipB</i> & & <i>bipB</i>	<i>ipaB</i>	<i>sipC</i> & & <i>bipC</i>	<i>ipaC</i>	<i>sipD</i> & & <i>bipD</i>	<i>ipaD</i>	<i>yejJ</i>	<i>sptP</i>	<i>TROVE2</i> & <i>SSA2</i>	<i>sopD</i>	<i>sopE</i>	总计
FC10730	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●	●	●	15
FC10702	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●	●		14
FC10728	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●	●		14
FC10739	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●	●		14
FC10743	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●	●		14
FC10745	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●	●		14
FC10758	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●	●		14
FC11961	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●	●		14
FC11967	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●	●		14
FC11980	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●	●		14
FC11983	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●	●		14
FC10717	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●			13
FC10718	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●			13
FC10726	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●			13
FC10733	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●			13
FC10738	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●			13
FC10755	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●		●		13
FC11958	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●		●		13
FC12045	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●	●			13
FC10701	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●		●			12
总计	20	20	20	20	20	20	20	20		20		20		20	19	18	13	1	271

† ●表示携带该基因。

表 6 20 株鸡源性沙门氏菌致病基因分析[†]

Table 6 Analysis of pathogenic genes of 20 strains of chicken-derived *Salmonella*

菌株	<i>fimA</i>	<i>fimD</i>	<i>ipaH9.8</i>	<i>ipgD</i> & <i>sopB</i>	<i>K08303</i>	<i>ptrB</i>	<i>sipA</i> & <i>ipaA</i>	<i>sipB</i> & & <i>bipB</i>	<i>sipC</i> & & <i>bipC</i>	<i>sipD</i> & & <i>bipD</i>	<i>yeeJ</i>	<i>sptP</i>	<i>TROVE2</i> & <i>SSA2</i>	<i>sopD</i>	<i>sopE</i>	总计
FC10706	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10707	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10712	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10731	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10736	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC11978	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10727	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC10735	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC10754	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC11959	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC11988	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC10721	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●		13
FC10729	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			13
FC11951	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●		13
FC11960	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●		13
FC11964	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●		13
FC11981	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			13
FC11982	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			13
FC11987	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●		13
FC12043	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●		13
总计	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	14	17	6	277

† ●表示携带该基因。

表 7 20 株猪源性沙门氏菌耐药基因分析[†]

Table 7 Analysis of resistance genes of 20 strains of pig-derived *Salmonella*

菌株	<i>acrA</i>	<i>ampG</i>	<i>ampC</i> & <i>penP</i>	<i>ompC</i>	<i>ompF</i>	<i>tolC</i>	<i>norR</i>	<i>norV</i>	<i>norW</i>	<i>nsrR</i>	<i>YHB1</i> & <i>hmp</i>	<i>lepA</i>	<i>pagP</i>	<i>SIG2</i> & <i>rpoS</i>	<i>vanX</i>	总计
FC10701	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10726	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10728	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10730	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10733	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10739	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10743	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10745	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10758	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC11961	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC11967	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC11980	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC11983	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC12045	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10702	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC10717	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC10718	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC10738	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC10755	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC11958	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
总计	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	14	294

† ●表示携带该基因。

表 8 20 株鸡源性沙门氏菌耐药基因分析[†]
Table 8 Analysis of resistance genes of 20 strains of chicken-derived *Salmonella*

菌株	<i>acrA</i>	<i>ampG</i>	<i>ampC</i> & <i>penP</i>	<i>ompC</i>	<i>ompF</i>	<i>tolC</i>	<i>norR</i>	<i>norV</i>	<i>norW</i>	<i>nsrR</i>	<i>YHB1</i> & <i>hmp</i>	<i>lepA</i>	<i>pagP</i>	<i>SIG2</i> & <i>rpoS</i>	<i>vanX</i>	总计
FC10706	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10707	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10712	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10727	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10729	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10731	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10736	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10754	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC11959	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC11978	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC11981	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC11982	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC11988	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	15
FC10721	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC10735	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC11951	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC11960	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC11964	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC11987	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
FC12043	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		14
总计	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	13	293

[†] ●表示携带该基因。

3 结论

(1) 长沙市零售的生鲜猪肉与生鲜整鸡,沙门氏菌的污染率非常高,如缺乏必要的微生物学知识及防护措施知识,很容易引发交叉污染,发生沙门氏菌食物中毒事件,因此在日常的食品安全监管以及卫生督导工作中,应加强沙门氏菌来源、防护、预防治疗的教育工作,消费者也应增强卫生防范意识。

(2) 通过对 40 株沙门氏菌进行全基因组测序,统计基因家族、单拷贝直系同源基因、多拷贝直系同源基因、独立旁系同源基因、其他直系同源基因相关信息,并以猪源性沙门氏菌 2 170~2 191 个单拷贝直系同源基因,鸡源性沙门氏菌 2 159~2 183 个单拷贝直系同源基因,构建系统进化树,实现了猪源性、鸡源性沙门氏菌的全基因溯源。

(3) 通过对猪源性、鸡源性沙门氏菌致病基因的预测可知,生鲜畜禽肉中筛选出的沙门氏菌含有多种毒力因子,包括侵袭基因、分泌效应蛋白、黏附素、肌醇磷酸酶、菌毛蛋白、外膜引入蛋白、效应分子,通过协同作用,产生综合毒力。在基因层面上阐明了沙门氏菌可能存在的致病基因与致病机制,提示了沙门氏菌潜在的致病风险,为药物研发与疾病治疗提供了分子基础。多个耐药基因,多种耐药机制的发现,说明养殖环节可能存在抗生素滥用的情况,加快高耐药性毒株的产生,因此,农业生产监

管部门应加大抗生素使用危害的宣传力度,加强对养殖户抗生素使用的监管力度,从源头减少抗生素的使用,降低对抗生素的依赖。

参考文献

[1] 韩荣伟,于忠娜,张莉,等.我国鸡肉产品中沙门氏菌风险评估的研究进展[J].食品科学,2015,36(23):372-376.
[2] 赵贵,张华.畜产品中沙门氏菌的危害及检测方法概述[J].贵州畜牧兽医,2004,28(3):21-22.
[3] 尹德凤,张莉,张大文,等.食品中沙门氏菌污染研究现状[J].江西农业学报,2015,27(11):55-60.
[4] BRADLEY L B, SHAWN M D Bearson. Host specific differences alter the requirement for certain *Salmonella* genes during swine colonization [J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 150(3/4): 215-219.
[5] 叶恒平,张雅婷,袁敏,等.2014—2018 年仙桃市伤寒沙门菌分子分型及耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2020,41(9):1 042-1 046.
[6] 施怡茹,赵锦江,徐秋芳,等.沙门菌血清型多态性与 PFGE 分型及其相关性研究[J].检验医学与临床,2020,17(14):2 017-2 019.
[7] 畅晓晖,张捷,陈广全,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.

(下转第 169 页)

- al. Using survival analysis to investigate the effect of UV-C and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 73(2/3): 187-196.
- [13] GAILLARD S, LEGUERINEL I, MAFART P. Modelling combined effects of temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*[J]. Food Microbiology, 1998, 15(6): 625-630.
- [14] GRAY J I. Measurement of lipid oxidation: A review[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1978, 55(6): 539-546.
- [15] BATIFOULIER F, MERCIER Y, GATELLIER P. Influence of vitamin E on lipid and protein oxidation induced by H₂O₂-activated MetMb in microsomal membranes from turkey muscle[J]. Meat Science, 2002, 61(4): 389-395.
- [16] HAN Y, GUENTERT A M, SMITH R S, et al. Efficacy of chlorine dioxide gas as a sanitizer for tanks used for aseptic juice storage[J]. Food Microbiology, 1999, 16(1): 53-61.
- [17] REINA L D, FLEMING H P, HUMPHRIES E G. Microbiological control of cucumber hydrocooling water with chlorine dioxide[J]. Journal of Food Protection, 1995, 58(5): 541-546.
- [18] 诸爱士, 蒋家新, 苏晓霞. 亚氯酸钠制备二氧化氯及其杀菌效果研究[J]. 食品工业科技, 2006(1): 174-177.
- [19] 田卫, 李军, 李新华. 二氧化氯(ClO₂)对苹果表面金黄色葡萄球菌杀菌规律的研究[J]. 食品研究与开发, 2006(1): 145-149.
- [20] 安丽娜, 廖春. 二氧化氯发生器对饮用水的消毒效果的试验观察[J]. 医学动物防制, 2011, 27(2): 162-163.
- [21] 张仲阳, 张向超, 俞龙泉, 等. 超声波协同 ClO₂ 对西瓜汁灭菌效果的影响[J]. 食品工业科技, 2014(7): 172-177.
- [22] 曹凡, 高贵田, 王铎, 等. ClO₂ 对猕猴桃表面溃疡病菌的杀菌作用及果实货架期品质的影响[J]. 核农学报, 2017, 33(1): 88-95.
- [23] 李志富, 邵伟, 任少红, 等. ClO₂ 消毒粉剂杀菌效果及毒性试验研究[J]. 泰山医学院学报, 2005(4): 77-80.
- [24] OGATA N. Denaturation of protein by chlorine dioxide: Oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues[J]. Biochemistry, 2007, 46(16): 4 898-4 911.

(上接第 62 页)

- [8] 杨晓雯. 布鲁氏菌等三种兼性胞内寄生菌比较基因组分析及应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2018: 12-24.
- [9] 厚华艳. 肠炎沙门氏菌菌毛编码基因 *sefA* 和 *fimA* 的功能探析[D]. 扬州: 扬州大学, 2013: 2-6.
- [10] 何华, 斐洁, 吴斌, 等. 猪支气管败血波氏杆菌菌毛 *fimD* 基因的克隆表达及间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(1): 98-102.
- [11] 曹恬雪, 蒋文灿, 何文成, 等. 沙门氏菌毒力因子的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(4): 331-334.
- [12] 黄冠军, 刘天强, 杨晓玲, 等. 沙门氏菌入侵基因研究进展[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(11): 65-67.
- [13] 王小元, 宋鸿军. 细菌内毒素的生物合成途径及分子结构多样性[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(10): 1 009-1 015.
- [14] 董方. 沙门氏菌外膜蛋白的研究[D]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2013: 8-11.
- [15] 汤佩佩. 肠炎沙门菌 *sopE2* 与 *sptP* 基因缺失株的构建及其免疫生物学研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2016: 9-21.
- [16] 李隽. 系统性红斑狼疮生物标志物的筛选及致病机制的研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2017: 42-72.
- [17] 徐婷, 金顺鑫, 王潇, 等. 细菌外排泵系统 *acrAB-tolC* 的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(9): 92-95.
- [18] 钟慧芬. 三种菌 *ampG* 基因的结构及遗传互补功能研究[D]. 温州: 温州医学院, 2013: 1-8.
- [19] 许泽仰. 甲型副伤寒沙门氏菌 *norRVW* 操纵子的功能研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2016: 15-22.
- [20] 朱培, 李鑫强, 李振轮. 磷酸酶在病原菌感染宿主中的作用[J]. 生物工程学报, 2012, 28(2): 154-163.
- [21] 程序. 万古霉素耐药靶酶 VanX 抑制剂及金属-β-内酰胺酶检测试剂 Nitrocefin 的合成与表征[D]. 西安: 西北大学, 2011: 7-22.

(上接第 126 页)

- [5] LI T, SCICOLONE J V, SANCHEZ E, et al. Identifying a loss-in-weight feeder design space based on performance and material properties [J]. Journal of Pharmaceutical Innovation, 2019(8): 1-14.
- [6] 赵冬梅, 余书豪. 变螺距螺旋输送机的螺距设计与性能分析[J]. 机械设计与制造, 2018(6): 52-55.
- [7] BATES L. Entrainment patterns of screw hopper dischargers[J]. Journal of Engineering for Industry, 1969, 91(2): 295-302.
- [8] FERNANDEZ J W, CLEARY P W, MCBRIDE W. Effect of screw design on hopper drawdown of spherical particles in a horizontal screw feeder[J]. Chemical Engineering Science, 2011, 66(22): 5 585-5 601.
- [9] 龚志明. 螺旋式配料器取料螺旋结构参数初探[J]. 粮油加工与食品机械, 1984(7): 5-7.
- [10] 李永祥, 李飞翔, 徐雪萌, 等. 基于颗粒缩放的小麦粉离散元参数标定[J]. 农业工程学报, 2019, 35(16): 320-327.
- [11] MOYSEY P A, THOMPSON M R. Modelling the solids inflow and solids conveying of single-screw extruders using the discrete element method [J]. Powder Technology, 2005, 153: 95-107.
- [12] 刘威, 唐倩, 刘宗敏, 等. 水平式螺旋输送机运动模型搭建和参数化设计[J]. 食品与机械, 2019, 35(6): 96-99.
- [13] GAN J Q, ZHOU Z Y, YU A B. A GPU-based DEM approach for modelling of particulate systems[J]. Powder Technology, 2016, 301: 1 172-1 182.