

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.10.05

# 全基因组测序技术在猪源沙门氏菌血清分型和耐药性分析中的应用

张璐<sup>1</sup>, 沈青春<sup>1</sup>, 徐锦涛<sup>2</sup>, 赵琪<sup>1</sup>, 李霆<sup>1</sup>, 程敏<sup>1</sup>, 张纯萍<sup>1\*</sup>

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 皇誉宠物食品有限公司, 上海 200000)

[收稿日期] 2022-03-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 10-0025-06 [中图分类号] S852.61

**[摘要]** 为研究全基因组测序技术在猪源沙门氏菌血清型和耐药性检测方面的应用能力。以 60 株猪源沙门氏菌为研究对象, 应用传统玻片凝集法和微量肉汤稀释法对其进行血清分型和耐药性检测, 并提取所有菌株核酸进行全基因组测序组装, 利用 SeqSero2 和 ResFinder4 在线预测每株菌的血清型和耐药基因, 然后与传统方法进行比较分析。血清凝集试验共鉴定出 8 种沙门氏菌血清型, 而全基因组测序鉴定出 9 种血清型, 二者分型结果的符合率为 90.0%; 对 11 种抗菌药物的药敏试验显示: 沙门氏菌对四环素 (73.3%) 的耐药率最高, 其次为氨苄西林 (66.7%)、磺胺异噁唑 (66.7%) 和复方新诺明 (53.3%), 基于全基因组预测的恩诺沙星、美罗培南、头孢噻唑和阿奇霉素的耐药性与药敏试验结果完全一致, 对氨苄西林、磺胺异噁唑、四环素预测的结果符合率也均大于 90.0%。全基因组测序分析的沙门氏菌血清型和耐药性与常规检测方法的符合率较高, 且具有操作简便的优势, 可以作为分析沙门氏菌血清型和耐药性的有效方法。

**[关键词]** 沙门氏菌; 全基因组测序; 血清型; 耐药表型; 耐药基因

## Application of Whole Genome Sequencing Technology in Serotyping and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* from Swine

ZHANG Lu<sup>1</sup>, SHEN Qing-chun<sup>1</sup>, XU Jin-tao<sup>2</sup>, ZHAO Qi<sup>1</sup>, LI Ting<sup>1</sup>, CHENG Min<sup>1</sup>, ZHANG Chun-ping<sup>1\*</sup>

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Royal Canin China, Ltd., Shanghai 200000, China)

Corresponding author: ZHANG Chun-ping, E-mail: Zhangdona@163.com

**Abstract:** To study the application ability of whole genome sequencing technology in *Salmonella* serotype and antimicrobial resistance detection, We used 60 strains of *Salmonella* as research objects, *Salmonella* serotyping and antimicrobial resistance were analyzed by traditional slide agglutination method and Broth microdilution method. The nucleic acids of 60 *Salmonella* strains were extracted for whole-genome sequenced and assembled,

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0501600)

作者简介: 张璐, 硕士, 从事沙门氏菌流行病学研究。

通讯作者: 张纯萍, E-mail: Zhangdona@163.com

and the serotype and antimicrobial resistance genes of each strain were predicted online by seqsero2 and resfinder4, then compared and analyzed with traditional methods. A total of 8 *Salmonella* serotypes were identified by conventional serum agglutination test, while 9 serotypes were identified by whole genome sequencing. The coincidence rate of the results of the two methods was 90.0%. The results of antimicrobial susceptibility test to 11 drugs indicated that the *Salmonella* isolates had the highest resistance rate to tetracycline (73.3%), followed by ampicillin (66.7%), sulfisoxazole (66.7%) and trimethoprim – sulfamethoxazole (53.3%). The antimicrobial resistance of enrofloxacin, meropenem, ceftiofur and azithromycin predicted by the whole genome were completely consistent with the antimicrobial susceptibility test results, and the coincidence rate of the predicted results of ampicillin, sulfisoxazole and tetracycline were all more than 90.0%. The *Salmonella* serotypes and antimicrobial resistance analyzed by genome sequencing have a high coincidence rate with conventional detection methods, and have the advantages of simple operation. It can be used as an efficient method for analyzing *Salmonella* serotypes and antimicrobial resistance

**Key words:** *Salmonella*; whole genome sequencing; serotype; antimicrobial resistance phenotype; resistance genotypes

沙门氏菌是自然界中最常见的人畜共患病原菌,能够引起仔猪的副伤寒、败血症等疾病,而且猪感染后常成为隐性带菌者,不定期排毒,从而感染其他畜禽。更为重要的是,猪所携带的沙门氏菌也是一种重要的食源性病原菌,在我国沙门氏菌食物中毒事件中,90%以上的是由肉类食品引起的,其中猪肉及其产品是主要污染源之一<sup>[1]</sup>。血清分型是实现病原体溯源分析的主要方法,但沙门氏菌的血清型众多,常规血清分型方法较为繁琐、耗时长,且对于出现交叉凝集或凝集现象不明显的菌株,结果较难判断<sup>[2]</sup>。沙门氏菌的预防和治疗主要依赖于抗菌药物,但抗菌药物的频繁使用,产生了大量的耐药菌株。目前细菌耐药性已经成为全球共同关注的问题,尤其是在畜牧养殖行业,严重威胁着动物的健康,造成了巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。随着生物信息技术的发展,测序成本的大幅降低和多种公共数据库的创建简便了沙门氏菌血清分型方法和耐药性的检测<sup>[4]</sup>。国外研究表明,通过全基因组测序,可以简单、快速和高效的检测沙门氏菌的血清型和耐药基因,且具有较好的敏感性和特异性<sup>[5-7]</sup>,但目前国内相关文章较少。因此,本文选取了我国 2011 – 2015 年不同地区分离的 60 株猪沙门氏菌,利用全基因组测序技术分析沙门氏菌的血清型和耐药

性,并与常规检验结果进行了比较,从而分析全基因组测序技术(Whole genome sequencing, WGS)在沙门氏菌血清分型和耐药性分析方面的应用能力。

## 1 材料和方法

1.1 菌株来源 猪源沙门氏菌共 60 株,分离时间为 2011 – 2015 年,其中上海 14 株、四川 10 株、广东 36 株。质控菌株为大肠杆菌 ATCC 25922 和 ATCC 35218,均由中国兽医药品监察所安全评价室保存。

1.2 主要试剂和仪器 沙门氏菌诊断血清购自丹麦国家血清研究院,革兰氏阴性细菌鉴定板由本实验室设计、上海星佰生物技术有限公司生产,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,沙门氏菌全基因组测序分析由奥维森基因科技有限公司完成。

1.3 血清凝集试验 参照沙门氏菌检验标准 GBT4789.4 – 2016<sup>[8]</sup>,采用传统玻片凝集法对沙门氏菌进行血清型鉴定。O 抗原的鉴定需要先在洁净的玻片上滴加 1 滴诊断血清,然后用洁净的枪头挑取营养琼脂上培养的单菌落与 O 抗原多价血清充分混匀,晃动 30 ~ 60 s,出现凝聚现象为阳性反应。如果是由于 Vi 抗原的存在而阻止了 O 凝集反

应时,可挑取菌落在 1 mL 生理盐水中做成浓菌液,在酒精灯火焰上煮沸后,若凝集则具有 Vi 抗原,同时设置无菌生理盐水为对照,在生理盐水中自凝者为粗糙形菌株,不能分型。H 抗原的鉴定则需挑取 swarm 半固体琼脂培养的周边菌落与 H 抗原多价血清充分混匀,观察凝集现象。最后根据 O 相与 H 相的凝集结果,查阅 WHO 的 White - Kauffmann - Le Minor 抗原表<sup>[9]</sup>确定血清型。

1.4 药敏试验 采用微量肉汤稀释法对不同年代沙门氏菌进行耐药性(磺胺异噁唑、氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、四环素、头孢噻吩、阿奇霉素、复方新诺明、粘菌素、恩诺沙星、氟苯尼考、美罗培南)特征分析:挑取 2~3 个单菌落置 5 mL 灭菌生理盐水中,用 0.5 麦氏比浊管进行比浊,调制菌液浓度为  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL 左右;取菌液 60  $\mu$ L 加入 12 mL 的药敏接种培养液中,进行混匀稀释,每孔 100  $\mu$ L,阴性对照孔单独加入 100  $\mu$ L 药敏接种培养液,37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 18~20 h。在阴性对照孔清澈,阳性对照孔浑浊以及质控菌株的最低抑菌浓度符合规定范围的前提下,根据美国临床实验室标准化委员会标准<sup>[10]</sup>判断被检菌株是否耐药。

## 1.5 WGS 测序分析

1.5.1 测序 根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取沙门氏菌 DNA,DNA 浓度高于 100 ng/ $\mu$ L 后,送公司经 Illumina 测序平台测序,然后用 Trimmomatic(v0.36)<sup>[11]</sup>软件进行数据质量控制,使用 SPAdes(v3.13.0)<sup>[12]</sup>软件参考沙门氏菌 PI25109(ACCESSION: AM933172、基因组大小为 4685848 bp)对测序数据进行组装。

1.5.2 生物信息学分析 根据基因组流行病学中心网站中 SeqSero2 血清分型数据库和 ResFinder4 抗性基因数据库中的基因组信息建库,采用 CentOS 7.8 系统服务器创建相应的血清分型数据库和耐药基因数据库,分析 60 株沙门氏菌的 WGS 组装数据,分别得到血清分型和耐药基因携带结果。将 WGS 分型结果与常规血清分型结果进行比较,对结果有差异的进行再次常规血清分型验证。对 WGS 检测的耐药基因,使用 identity > 90.0%,

coverage > 90.0% 的阈值运行命令,进行基因型与耐药表型进行对比分析<sup>[13]</sup>。

## 2 结果及分析

2.1 全基因组测序、组装结果 经 Illumina 测序平台测序和 Trimmomatic 软件质控后,共得到约 77.59 Gb 的原始数据,组装后的 60 株沙门氏菌的基因组大小在 4648280 ~ 13443523 bp 之间,GC 含量为 45.32% ~ 52.24%,具体结果见表 1。

表 1 60 株猪源沙门氏菌全基因组序列基本特征  
Table 1 The basic characteristics of whole genome sequence of 60 Salmonella strains from pigs

	质量参数			
	Total length of gene sequence /bp	GC/%	N50	N90
平均数	5154623	51.83%	400384	113179

2.2 血清凝集分型与全基因组分型结果比较 60 株沙门氏菌通过血清凝集试验共鉴定出 8 种血清型,主要血清型为鼠伤寒和德尔卑;WGS 分型共鉴定出 9 种血清型,优势血清型与常规血清分型结果一致;两种方法共有 54 株分型结果一致,符合率为 90.0%,具体分型结果见表 2。

表 2 常规血清分型与全基因组分型结果

Tab 2 Results of routine serotyping and whole genome typing

常规血清分型	菌株/株	WGS 分型	菌株/株
		鼠伤寒	21
鼠伤寒	24	汤卜逊	1
		14,[5],12:i:- (鼠伤寒变种)	2
德尔卑	21	德尔卑	20
		斯坦利	1
里森	7	里森	7
斯坦利	4	斯坦利	4
肠炎	1	肠炎	1
韦太夫雷登	1	韦太夫雷登	1
奥兰	1	德尔卑	1
奥兹马斯	1	波茨坦	1

2.3 药敏试验结果 沙门氏菌对 11 种抗菌药物

的耐药性情况详见表 3。结果表明,猪源沙门氏菌对不同抗菌药物的耐药情况差异较大,其中对美罗培南、头孢噻唑、阿奇霉素和粘菌素均为敏感,而对四环素、氨苄西林等 7 种抗菌药物均产生了不同程度的耐药性,尤其是对四环素(73.3%)的耐药水平明显高于其他抗菌药物。

表 3 60 株沙门氏菌对 11 种抗菌药物的耐药情况

Tab 3 Antimicrobial resistance of 60 *Salmonella* strains to 11 antimicrobial agents

药物名称	耐药菌株数	耐药率
四环素	44	73.3%
氨苄西林	40	66.7%
磺胺异噁唑	40	66.7%
复方新诺明	32	53.3%
氟苯尼考	23	38.3%
恩诺沙星	8	13.3%
阿莫西林/克拉维酸	8	13.3%
美罗培南	0	0%
头孢噻唑	0	0%
阿奇霉素	0	0%
粘菌素	0	0%

#### 2.4 全基因组测序预测沙门氏菌的耐药基因型 基于 60 株沙门氏菌的 WGS 测序结果,使用抗性基

因数据库 ResFinder4 分析获得的耐药基因包括 $\beta$ -内酰胺类(*bla*<sub>TEM-1</sub>、*bla*<sub>OXA-1</sub>)、四环素类(*tetA* 和 *tetB*)、磺胺类(*sul1*、*sul2* 和 *sul3*)、喹诺酮类(*oqxA*、*oqxB* 和 *qnrS2*)和酰胺醇类(*floR*)。

通过比较,WGS 预测的沙门氏菌耐药性与药敏试验结果的符合率较高,其中对恩诺沙星、美罗培南、头孢噻唑和阿奇霉素预测的结果完全一致;对氨苄西林、磺胺异噁唑、四环素预测的结果符合率均高于 90.0%,对复方新诺明、氟苯尼考、阿莫西林/克拉维酸预测符合率也大于 75%,具体结果详见表 4。

### 3 讨论与结论

随着全基因组测序技术和生物信息分析方法的不断进步,测序时间与成本的不断降低,使得公共数据库中存储了大量的病原菌基因组序列,极大提升了细菌基因组测序数据的准确性与可用性。与此同时,简便易用的在线数据分析与可视化工具也在不断问世,如血清分型数据库 SeqSero2 和耐药基因数据库 ResFinder4,二者均可通过 CGE 网站直接上传 WGS 组装序列,即可预测相应的血清型和耐药基因,简便了操作流程<sup>[14-15]</sup>。

表 4 沙门氏菌药敏试验结果与全基因组测序结果的比较

Tab 4 Comparison of antimicrobial sensitivity test results and whole genome sequencing results of *Salmonella*

抗菌药物	表型耐药/株	WGS 预测基因型	基因型耐药/株	符合率/%
恩诺沙星	8	<i>oqxA</i> 、 <i>oqxB</i> 、 <i>qnrS2</i>	8	100
美罗培南	0	0	0	100
头孢噻唑	0	0	0	100
阿奇霉素	0	0	0	100
氨苄西林	44	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> 、 <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	41	97.5
磺胺异噁唑	40	<i>sul1</i> 、 <i>sul2</i> 、 <i>sul3</i>	39	95.0
四环素	40	<i>tetA</i> 、 <i>tetB</i>	38	93.2
复方新诺明	32	<i>dfrA12</i> 、 <i>sul1</i> 、 <i>sul2</i> 、 <i>sul3</i>	28	87.5
氟苯尼考	23	<i>floR</i>	20	87.0
阿莫西林/克拉维酸	8	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> 、 <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	6	75.0

本研究利用 SeqSero2 分析获得的血清型结果与常规分型结果的符合率为 90.0%,这与他人的研

究结果基本一致。如 BANERJI 等<sup>[16]</sup>的研究中,WGS 预测 520 株沙门氏菌血清型结果与原始分型

结果的符合率为 98.0%。DIEP 等<sup>[17]</sup>研究的 98 株沙门氏菌的血清型与常规分型结果的符合率为 98.0%。在两种分型结果不一致的血清型中,大部分是需要特殊培养基培养和多种血清鉴定的罕见血清型,如奥兰、奥兹马斯等。这可能是由于常规血清分型结果的判读会因个人判读标准不同而产生差异,亦或者是由于 H 相抗原基因中的等位基因在相变机制中发生突变而不表达而产生不一致的结果<sup>[18]</sup>。

为评估 WGS 在沙门氏菌抗菌药物耐药性中的鉴定能力,应用 ResFinder4 抗性基因数据库分析沙门氏菌所携带的耐药基因,从耐药基因的携带推断抗菌药物的耐药性来看,应用 WGS 预测的恩诺沙星、美罗培南、头孢噻唑和阿奇霉素的耐药性与药敏试验结果完全一致,对氨苄西林、磺胺异噁唑、四环素预测的结果符合率也均大于 90.0%。ZANKARI 等<sup>[19]</sup>通过 WGS 预测的 49 株鼠伤寒沙门氏菌基因型与表型药敏试验的结果完全一致。ZHU 等<sup>[20]</sup>对 189 株沙门氏菌的耐药性检测中,WGS 预测的磺胺异噁唑、氨苄西林和四环素的耐药性与其耐药表型的符合率分别为 97.8%、94.6% 和 85.7%。NEUERT 等<sup>[20]</sup>研究的 3415 株沙门氏菌对 15 种抗菌药物的表型耐药性与基因型耐药性结果的符合率为 97.8%。目前 WGS 只能检测到质粒介导的耐药基因,而对于染色体突变产生的耐药基因无法检出。在对阿莫西林/克拉维酸耐药基因型检测中,可能由于基因组测序过程中部分区域的覆盖率较低,阻止了突变位点的检测,亦或者出现了新的耐药基因突变,从而出现了表型与基因型的符合率相对较低的结果<sup>[21]</sup>。

基于全基因组数据分析的沙门氏菌血清分型和耐药性方法具有操作简便、效率高的优势,可以在常规血清凝集试验难以开展或沙门氏菌鞭毛基因不表达的情况下,替代血清凝集试验,也可快速识别菌株携带的所有耐药基因。为解决沙门氏菌耐药性问题提供重要参考,在沙门氏菌流行病学的研究中具有较高的应用价值。

## 参考文献:

- [1] 方忠意,李金磊,董鹏,等. 河南省猪源沙门氏菌分离鉴定、血清分型及药物敏感性分析 [J]. 中国动物检疫, 2019, 36(4): 74-78.  
Fang Z Y, Li J L, Dong P, *et al.* Isolation, Identification and Serotyping of Swine Salmonellain Henan Province and Analysis on Its Drug Sensitivity[J]. China Animal Health Inspection, 2019, 36(4): 74-78.
- [2] Batista D, Freitas N O, Barrow P A, *et al.* Identification and characterization of regions of difference between the Salmonella Gallinarum biovar Gallinarum and the Salmonella Gallinarum biovar Pullorum genomes [J]. Infect Genet Evol. 2015, 30: 74-81.
- [3] 李秀,强斌,徐正中,等. 全基因组测序在细菌耐药性分析中的应用[J]. 中国人兽共患病学报. 2016, 32(8): 696-699.  
Li X, Qiang B, Xu Z Z, *et al.* Application of whole genome sequencing in bacterial antimicrobial resistance. Chinese Journal of Zoonoses, 2016, 32(8): 696-699.
- [4] 陈丹妮,韩莹莹,李杰,等. 基于基因组序列的 3 种沙门菌分子血清分型方法比较研究 [J]. 疾病监测. 2021, 36(5): 468-474.  
Chen D N, Hang Y Y, Li J, *et al.* Comprehensive assessment of three molecular serotyping methods of Salmonella based on genomic sequence [J]. Disease Surveillance, 2021, 36(5): 468-474.
- [5] 贾慧琼,阮陟. 全基因组测序在病原菌分型与溯源中的应用研究进展 [J]. 微生物学报. 2021: 1-23.  
Jiao H Q, Ruan Z, Advances on whole genome sequencing - powered typing and source tracking of bacterial pathogens [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021: 1-23.
- [6] Su M, Satola S W, Read T D. Genome - Based Prediction of Bacterial Antibiotic Resistance [J]. J Clin Microbiol. 2019, 57(3).
- [7] 杨德智,侯冠彧,施力光,等. 全基因组测序在畜禽中应用的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医. 2021, 48(9): 3403-3414.  
Yang D Z, Hou G Y, Shi L G, *et al.* Research Progress on Whole Genome Sequencing in Livestock and Poultry [J]. China Animal Husbandry Veterinary Medicine, 2021, 48(9): 3403-3414.
- [8] Stoesser N, Batty E M, Eyre D W, *et al.* Predicting antimicrobial susceptibilities for Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates using whole genomic sequence data [J]. J Antimicrob Chemother. 2013, 68(10): 2234-2244.

- [9] GBT4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验:沙门氏菌检验. 中华人民共和国卫生部[S].
- GBT4789.4 National food safety standard food microbiological examination: Salmonella. Ministry of Health of the People's Republic of China[S].
- [10] Grimont P, Weill F. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Antigenic Formulae of the Salmonella serovars, (9th ed.) [J]. 2007; 1 - 166.
- [11] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. Bioinformatics. 2014, 30 (15): 2114 - 2120.
- [12] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single - cell sequencing [J]. J Comput Biol. 2012, 19(5): 455 - 477.
- [13] Gupta S K, Sharma P, Mcmillan E A, *et al.* Genomic comparison of diverse Salmonella serovars isolated from swine[J]. PLoS One. 2019, 14(11): e224518.
- [14] Hyeon J, Li S, Mann D A, *et al.* Whole - Genome Sequencing Analysis of Salmonella Enterica Serotype Enteritidis Isolated from Poultry Sources in South Korea, 2010 - 2017 [J]. Pathogens. 2021, 10(1): 45.
- [15] Bortolaia V, Kaas R S, Ruppe E, *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes [J]. J Antimicrob Chemother. 2020, 75(12): 3491 - 3500.
- [16] Banerji S, Simon S, Tille A, *et al.* Genome - based Salmonella serotyping as the new gold standard [J]. Sci Rep. 2020, 10(1): 4333.
- [17] Diep B, Barretto C, Portmann A, *et al.* Salmonella Serotyping; Comparison of the Traditional Method to a Microarray - Based Method and an in silico Platform Using Whole Genome Sequencing Data [J]. Frontiers in Microbiology. 2019, 10.
- [18] Zankari E, Hasman H, Kaas R S, *et al.* Genotyping using whole - genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing [J]. J Antimicrob Chemother. 2013, 68(4): 771 - 777.
- [19] Zhu Y, Lai H, Zou L, *et al.* Antimicrobial resistance and resistance genes in Salmonella strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China [J]. International Journal of Food Microbiology. 2017, 259: 43 - 51.
- [20] Neuert S, Nair S, Day M R, *et al.* Prediction of Phenotypic Antimicrobial Resistance Profiles From Whole Genome Sequences of Non - typhoidal Salmonella enterica [J]. Frontiers in Microbiology. 2018, 9.
- [21] Walker T M D, Kohl T A P, Omar S V M, *et al.* Whole - genome sequencing for prediction of Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study [J]. The Lancet infectious diseases. 2015, 15 ( 10 ): 1193 - 1202.

(编辑:侯向辉)