



王世发,樊曦雯,王亚平,王佳宁,孔晓佳,陈梦娇,王真.一株牛源都柏林沙门菌的分离鉴定和全基因组序列生物信息学分析[J].中国农业大学学报,2025,30(11):145-159.

WANG Shifa, FAN Xiwen, WANG Yaping, WANG Jianing, KONG Xiaojia, CHEN Mengjiao, WANG Zhen. A bovine-derived *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin strain: isolation, identification and whole-genome sequencing bioinformatics analysis[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(11): 145-159.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.11.12

## 一株牛源都柏林沙门菌的分离鉴定和全基因组序列 生物信息学分析

王世发 樊曦雯 王亚平 王佳宁 孔晓佳 陈梦娇 王真\*  
(北京农学院 动物科学技术学院/兽医学(中兽医)北京市重点实验室,北京 102206)

**摘要** 为了解北京市某牧场奶牛出现腹泻甚至死亡原因,本研究从北京市通州区一因腹泻死亡的犊牛脾脏中分离并纯化细菌,经16S rRNA基因测序、药敏试验、毒力基因检测及全基因组测序(Whole genome sequencing, WGS),对分离菌株的毒力、耐药性等生物学特性进行分析。结果显示:1)分离菌株为都柏林沙门菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin, S. Dublin),命名为SDWW24。2)药敏试验结果表明,分离株SDWW24对头孢菌素类、大环内酯类、氨基糖苷类等8类抗生素具有耐药性,属于多重耐药菌。3)通过PCR方法对12种沙门菌常见毒力基因进行检测,检出率为100%。4)分离株SDWW24全基因组长度为4 736 488 bp,同时携带一个质粒,大小为59 372 bp。预测出4 618个基因,其中包含1 082个毒力基因和168个耐药基因,并且预测基因和菌株表型之间存在高度相关性。综上,本研究分离鉴定了一株牛源都柏林沙门菌,并分析了其基本生物学特性和全基因组特征,为都柏林沙门菌的后续研究提供了参考依据。

**关键词** 都柏林沙门菌;全基因组测序;毒力基因;耐药性;功能分析

中图分类号 S852.61 文章编号 1007-4333(2025)11-0145-15 文献标志码 A

## A bovine-derived *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin strain: Isolation, identification and whole- genome sequencing bioinformatics analysis

WANG Shifa, FAN Xiwen, WANG Yaping, WANG Jianing, KONG Xiaojia,  
CHEN Mengjiao, WANG Zhen\*

(Animal Science and Technology College/Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Beijing  
University of Agriculture, Beijing 102206, China)

**Abstract** To investigate the causes of diarrhea and even death among dairy cows in a farm in Beijing, this study isolated and purified a bacterial strain from the spleen of a diarrheic calf in Tongzhou District, Beijing. The strain was subjected to 16S rRNA gene sequencing, antimicrobial susceptibility testing, virulence gene screening, and whole-genome sequencing (WGS) to analyze its virulence, resistance profile, and genomic features. The results showed that: 1) The isolated strain was identified as *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin (S. Dublin) and designated SDWW24. 2) Antimicrobial susceptibility testing revealed that isolate strain SDWW24

收稿日期: 2025-04-01

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目(6252004)

第一作者: 王世发(ORCID: 0009-0007-1593-9167), 硕士研究生, E-mail: ws168138@163.com

通讯作者: 王真(ORCID: 0000-0003-4002-7892), 副教授, 主要从事病原菌致病机制研究, E-mail: wangzhen3355@163.com

exhibited multidrug resistance (MDR) to eight antibiotic classes, including cephalosporins, macrolides, and aminoglycosides. 3) PCR method screening detected 12 common *Salmonella* virulence genes with a 100% detection rate. 4) The whole genome length of the isolated strain SDWW24 was 4 736 488 bp, carrying a plasmid with a size of 59 372 bp. A total of 4 618 genes were predicted, including 1 082 virulence-associated genes and 168 antimicrobial resistance (AMR) genes, with high concordance between genotypic predictions and phenotypic resistance patterns. In conclusion, this study isolated and identified a strain of *S. Dublin* from cattle, and analyzed its basic biological properties and whole genome characterization, which provides a reference basis for the follow-up research of *S. Dublin*.

**Keywords** *Salmonella* Dublin; whole-genome sequencing; virulence gene; antibiotic resistance; functional analysis

1929年,P. Bruce White 将从爱尔兰一名接受肾脏手术后死于发烧的患者身上分离得到的一株类似肠炎沙门菌的分离株,命名为都柏林沙门菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin, *S. Dublin*)<sup>[1]</sup>。该菌是一种革兰氏阴性、兼性厌氧杆菌<sup>[2]</sup>,主要通过粪-口途径如摄入受污染的粪便或体液等在动物间传播<sup>[3]</sup>,还可通过垂直传播方式导致母牛流产或小牛出生时感染<sup>[4]</sup>。*S. Dublin*是一种宿主适应性病原体,主要引发奶牛肠炎和败血症,在不同国家和地区的流行情况表现出显著的差异。例如在加拿大安大略省,*S. Dublin*的感染率高达25%,英国为38%<sup>[2]</sup>;近几年,其在美国西部州的农场流行率较高,阳性率达到52%,而东部州的阳性率仅为2.8%<sup>[5]</sup>。在中国,*S. Dublin*的感染病例也较多,如从青海-西藏高原圈养牦牛的粪便中分离出的31株沙门菌中,都柏林沙门菌的阳性率约为32.26%<sup>[6]</sup>。*S. Dublin*还可以在其他宿主(如鸡和小鼠)中定植,但其致病性存在物种差异。在鸡群中具有一定的感染能力,却很少引起临床症状<sup>[7-9]</sup>。相反在贵州省贵阳市某规模化鸭场暴发的都柏林沙门氏菌疫情中,感染雏鸭群体( $n=2\ 800$ )表现出异常高的病死率(30%)<sup>[10]</sup>。此外,*S. Dublin*对人类也具有严重的侵袭性,可通过动物性食品传播给人类<sup>[11]</sup>,引起人类腹泻、发热和脑膜炎等症状,甚至导致死亡<sup>[12]</sup>。国内有大量关于人类感染病例的报道,多与学校、乡村庆典以及城镇的食源性疫情暴发有关<sup>[13-15]</sup>。这说明都柏林沙门氏菌中存在许多独立标志物和决定簇在其发病机制中起着至关重要的作用。研究表明,*S. Dublin*被视为在美国最为常见的MDR血清型之一,其典型特征为携带IncA/C2质粒,在我国也同样观察到了具备此类耐药特性的菌株<sup>[16]</sup>,这种质粒的存在,使得*S. Dublin*对多种抗生

素产生耐药性。都柏林沙门菌复杂的致病性和对抗菌药的耐药性不断增加,加剧了治疗动物沙门氏菌病的挑战。

近年来,我国学者对都柏林沙门氏菌的关注主要集中在食源性感染领域,相关文献报道以人类食物中毒事件分析为主<sup>[17]</sup>。在动物宿主研究方面,*S. Dublin*偶尔在猪、鸡、羊、马等动物中存在<sup>[18-22]</sup>,但其适应性宿主牛源的都柏林沙门氏菌毒力基因分布及其与耐药性的关联、全基因组特征等系统性研究仍存在显著的知识空白。因此,本研究以一株从病死犊牛脾脏样本中分离的*S. Dublin*为研究对象,通过经典微生物学方法和全基因组测序技术,对其毒力基因谱和耐药基因分布进行了系统分析,以期明确分离菌SDWW24的毒力基因与耐药基因的携带情况,分析耐药基因表型与耐药表型之间的相关性,为后续开展其致病机制和耐药机制相关研究奠定坚实的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

采集北京市通州区某奶牛养殖场中病死犊牛的外周血液、脾脏组织、肝脏组织、肠内容物及新鲜粪便样本,−80℃超低温环境保存,送至本中心实验室检测分析。阳性对照菌株为鼠伤寒沙门菌(*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028)为本实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂

胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)、麦康凯琼脂、Mueller-Hinton(MH)肉汤和沙门、志贺菌属选择性琼脂培养基(SS),购自(青岛)海博生物技术有限责任公司;2×*San Taq* PCR

Mix(with blue dye)、DL2000 DNA Marker,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;抗生素药敏纸片,购自(常德)比克曼生物科技有限公司;结晶紫染色溶液,购自(北京)索莱宝科技有限公司;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。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细菌的分离纯化及鉴定

依据 GB 4789.4—2024《食品安全国家标准 食品微生物学检验沙门菌检验》<sup>[23]</sup>的技术规范对病料样本进行分离。首先在Ⅱ级生物安全柜内,取病料样本接种至含 10 mL 的 TSB 液体培养基的试管中,于 37 ℃、180 r/min 恒温振荡器中培养 16 h 完成增菌;随后采用三区划线法将增菌液接种于 TSA 平板培养基,倒置于 37 ℃恒温培养箱中培养 18 h,观察菌落形态并挑取形

态一致的单一菌落进行连续纯化。将纯化后的培养物分别接种于麦康凯琼脂培养基和 SS 培养基,同时对纯化后的单菌落进行革兰氏染色镜检,并观察细菌形态学特征及染色特性。

挑取单克隆分离菌落接种于 TSB 液体培养基,37 ℃、180 r/min 恒温振荡培养 16~24 h,随后使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒处理菌液,所得 DNA 样本保存于-20 ℃环境中备用。根据 Gen Bank 收录的沙门菌 16S rRNA 保守序列设计特异性引物(表 1),进行 16S rRNA 基因扩增。PCR 反应体系(50 μL):2×San Taq PCR Mix 25 μL,模板 DNA 5 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 16 μL。PCR 反应程序:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,50 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,34 次循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳验证

表 1 引物信息  
Table 1 Primer information

| 基因<br>Gene    | 引物序列(5'→3')<br>Primer sequences (5'→3')                          | 扩增片段/bp<br>Amplified fragment | 退火温度/℃<br>Annealing temperature |
|---------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 16S rRNA      | F: GGTTACCTTGTTACGACTT<br>R: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG                | 1 500                         | 52                              |
| <i>invA</i>   | F: GTGCTGCTTTCTCTACTTAACAG<br>R: TGTCTGAGCACTTCTTTAAGTAAATC      | 1 568                         | 52                              |
| <i>pipD</i>   | F: CGGCTGACGGCTCCTTCATTATC<br>R: CTGGCAGGATCACGGACTCAATG         | 339                           | 63                              |
| <i>fimA</i>   | F: CTAATTTGCTGGCGGTCTCCTCTG<br>R: ATAAAGGTGGCGTCGGCATTAGC        | 223                           | 57                              |
| <i>fliC</i>   | F: GTGCTGCTGCATCAGTCACTACA<br>R: GCGTGTCGTGAGTTGTCTGT            | 395                           | 59                              |
| <i>virK</i>   | F: AGACGCCTTATCGCCATAAACGC<br>R: ATAGCCACAGGGACCGCAGTAG          | 362                           | 57                              |
| <i>stn</i>    | F: GCTTTGGGCATCCTGACTGACC<br>R: TCCATCAAAGGGCTGGCGAAATAC         | 219                           | 55                              |
| <i>sopA</i>   | F: ATACTGCCTGTGTTGCTGGATTTCG<br>R: TGCCGTCATAATTGCCGAAGAGTC      | 214                           | 56                              |
| <i>spvB</i>   | F: TTGGCGGAGAACGGTGACAATG<br>R: CATCAGGACTTGGCGGCACAG            | 315                           | 56                              |
| <i>spvC</i>   | F: ATATGGAGAAGGTCGTTCAACAAGCC<br>R: CACCACCATCACGCCCACTTC        | 255                           | 55                              |
| <i>sifA</i>   | F: TGGCCGTCATTTGTGGATGCG<br>R: GCGGACCGTTGTCTACATGAGATG          | 304                           | 63                              |
| <i>spiC</i>   | F: TTACCTAAGCCTTGTCTTGCCTATGTG<br>R: ACCCGAATAAAGTTTATGGTGATTGCG | 219                           | 55                              |
| <i>orf319</i> | F: GATGTTCCGCCAGATAGTGCTTCAG<br>R: AGCTTCTCGCCCACCACCAG          | 303                           | 63                              |

后,委托北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。最后,将16S rRNA基因序列在GenBank中进行BLAST核苷酸同源性比对分析。

### 1.2.2 药敏试验

本研究采用美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的琼脂扩散法(Kirby-Bauer)进行抗菌药物敏感性检测<sup>[24]</sup>。试验选取13类24种临床常用抗生素,包括氨苄西林(AMP)、阿莫西林(AMX)、头孢噻肟(CTX)等。取对数生长期菌悬液(约 $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) 100  $\mu$ L,用无菌涂布棒均匀接种于MH琼脂平板表面,待菌液吸收后,用无菌镊子对称放置药敏纸片,置于37  $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养24 h后,测量各药物抑菌圈直径。参照CLSI折点标准判定分离株的耐药表型。

### 1.2.3 毒力基因检测

本研究基于文献报道的沙门菌毒力因子谱系<sup>[25]</sup>,结合NCBI数据库收录的保守序列,筛选出12个与侵袭(*pipD*、*fimA*和*fliC*)、胞内存活(*virK*、*stn*和*sopA*)、质粒毒力(*spvB*和*spvC*)及分泌系统(*sifA*、*spiC*和*orf319*、*invA*)相关的关键毒力基因,并设计相应的特异性引物(表1),委托北京擎科生物科技股份有限公司合成。采用常规PCR方法对毒力基因进行检测,以分离株DNA为模板,PCR反应体系25  $\mu$ L:2 $\times$ San Taq PCR Mix 12.5  $\mu$ L,模板DNA 1  $\mu$ L,上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L。PCR反应程序:95  $^{\circ}$ C 5 min;95  $^{\circ}$ C 30 s,52  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,35次循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.2.4 全基因组测序及生物信息学分析

将分离株SDWW24采用平板划线法在TSA培养基上培养24 h后,挑取单菌落接种于5 mL TSB培养基中,37  $^{\circ}$ C、180 r/min过夜培养。随后,扩大培养至50 mL TSB培养基,待菌液生长至对数生长期,6 000 r/min离心10 min收集菌体,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行全基因组测序。公司采用NucleoBond<sup>®</sup> HMW DNA试剂盒制备沙门菌纯净基因组DNA,对基因组DNA浓度、纯度以及完整性进行相关检验,结果符合要求后,在Illumina NovaSeq测序平台进行全基因组测序。通过Prokka(v1.10)流程进行基因预测,并整合Cluster of Orthologous Groups of Proteins(COG)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)、Virulence Factors of Pathogenic

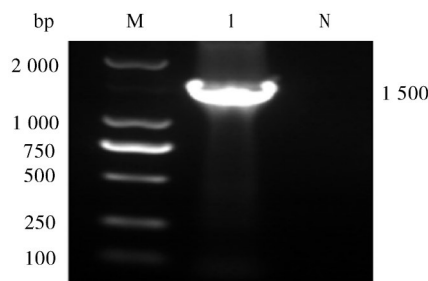
Bacteria(VFDB)和Antibiotic Resistance Genes Database(CARD)等11个数据库进行功能注释,最终完成菌株基因组特征的全面解析。

## 2 结果与分析

### 2.1 牛源都柏林沙门菌的分离及鉴定

从病料样品中成功分离得到1株特征性菌株,其不同培养基上呈现典型的形态学特征:在TSA培养基上形成直径约1~2 mm的圆形菌落,表面湿润呈半透明状,色泽为均匀的乳白色;麦康凯培养基上菌落形态表现为光滑湿润的圆形、直径约1.3 mm,呈无色或淡黄色;SS培养基上菌落直径约1.5 mm,圆形半透明,部分菌落中心可见黑色沉淀物。革兰氏染色镜检显示,该菌为革兰氏阴性短杆菌、中等大小、两端钝圆、在显微镜下可见散在分布或成对排列。

将分离株的16S rRNA基因PCR产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳验证,获得大小为1 500 bp的特异性条带,片段大小与预期相符(图1)。



M, DL2000 DNA Marker; 1, 分离菌; N, 阴性对照。

M, DL2000 DNA Marker; 1, Isolated strain; N, Negative control.

图1 牛源都柏林沙门菌分离株SDWW24 16S rRNA PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification results of 16S rRNA of bovine-derived S.Dublin isolate SDWW24

### 2.2 菌株16S rRNA基因序列分析

通过测定的16S rRNA序列,在Genebank上进行比对分析,分离株与沙门菌(*Salmonella enterica* CT 02021853 GCA000020925.1)属于同一分支,序列相似度达到99.21%。因此,初步确定该分离株为沙门菌,将其命名为SDWW24。

### 2.3 牛源都柏林沙门菌分离株SDWW24药敏试验

药敏试验结果分析表明,分离株SDWW24呈现多重耐药特征(表2)。该菌株对阿莫西林、头孢噻肟、亚胺培南、阿奇霉素、阿米卡星、四环素、米诺环素、诺氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、氯霉素、氟苯尼考、多粘菌素B均表现敏感。值得注意的是,分离株

| 表 2 分离株药敏试验                                     |                            |                                                                         |                 |              |                     |              |
|-------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------|---------------------|--------------|
| Table 2 Drug susceptibility testing of isolates |                            |                                                                         |                 |              |                     |              |
| 药物类别<br>Drug category                           | 抗菌药物<br>Antibacterial drug | 判定标准(抑菌圈直径折点)/mm<br>Criterion (Diameter breakpoints of inhibition zone) |                 |              | 抑菌圈<br>直径/mm<br>IZD | 结果<br>Result |
|                                                 |                            | 耐药 Resistant                                                            | 中介 Intermediary | 敏感 Sensitive |                     |              |
| 青霉素类 Penicillins                                | 氨苄西林 AMP                   | ≤13                                                                     | 14~16           | ≥17          | 16                  | I            |
|                                                 | 阿西莫林 AMX                   | ≤13                                                                     | 14~17           | ≥18          | 30                  | S            |
| 头孢菌素 Cephalosporins                             | 头孢噻肟 CTX                   | ≤14                                                                     | 15~21           | ≥22          | 30                  | S            |
|                                                 | 头孢唑肟 ZOX                   | ≤14                                                                     | 15~19           | ≥20          | 10                  | R            |
|                                                 | 头孢噻吩 CF                    | ≤14                                                                     | 15~17           | ≥18          | 9                   | R            |
| 碳青霉烯类 Carbapenems                               | 亚胺培南 IPM                   | ≤13                                                                     | 14~15           | ≥16          | 30                  | S            |
| 大环内酯类 Macrolides                                | 红霉素 ERY                    | ≤13                                                                     | 14~22           | ≥23          | 13                  | R            |
|                                                 | 阿奇霉素 AZM                   | ≤13                                                                     | 14~17           | ≥18          | 23                  | S            |
| 氨基糖苷 Aminoglycosides                            | 链霉素 SM                     | ≤11                                                                     | 12~14           | ≥15          | 0                   | R            |
|                                                 | 新霉素 NEO                    | ≤16                                                                     | 17~23           | ≥24          | 17                  | I            |
|                                                 | 阿米卡星 AK                    | ≤14                                                                     | 15~16           | ≥17          | 21                  | S            |
| 四环素类 Tetracyclines                              | 四环素 TE                     | ≤11                                                                     | 12~14           | ≥15          | 24                  | S            |
|                                                 | 强力霉素 DOX                   | ≤12                                                                     | 13~15           | ≥16          | 8                   | R            |
|                                                 | 米诺环素 MI                    | ≤14                                                                     | 15~18           | ≥19          | 24                  | S            |
| 喹诺酮类 Quinolones                                 | 诺氟沙星 NAFX                  | ≤12                                                                     | 13~16           | ≥17          | 21                  | S            |
|                                                 | 环丙沙星 CIP                   | ≤15                                                                     | 16~20           | ≥21          | 27                  | S            |
|                                                 | 左氧氟沙星 LEV                  | ≤13                                                                     | 14~16           | ≥17          | 30                  | S            |
| 糖肽类 Glycopeptide                                | 万古霉素 VA                    | ≤14                                                                     | 15~16           | ≥17          | 7                   | R            |
| 氯霉素类<br>Chloramphenicols                        | 氯霉素 C                      | ≤12                                                                     | 13~17           | ≥18          | 30                  | S            |
|                                                 | 氟苯尼考 FFC                   | ≤12                                                                     | 13~17           | ≥18          | 30                  | S            |
| 磺胺类 Sulfonamides                                | 复方新诺明 SXT                  | ≤10                                                                     | 11~15           | ≥16          | 0                   | R            |
| 利福霉素类 Rifamycin                                 | 利福平 RD                     | ≤16                                                                     | 17~19           | ≥20          | 12                  | R            |
| 林可酰胺类 Lincosamides                              | 克林霉素 CC                    | ≤14                                                                     | 15~20           | ≥21          | 0                   | R            |
| 多肽类 Polypeptides                                | 多粘菌素 B(PB)                 | ≤8                                                                      | 9~11            | ≥12          | 12                  | S            |

注：试验重复 3 次，取平均值；R：耐药；I：中介；S：敏感。

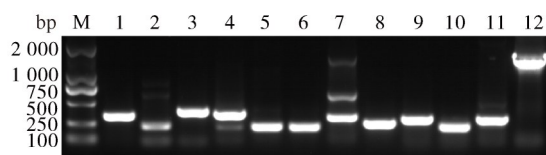
Note: The test was repeated 3 times, and the average value was taken. R: Resistance; I: Intermediary; S: Sensitivity.

SDWW24对氨苄西林和新霉素呈现中介敏感,对头孢噻吩、头孢唑肟、红霉素、链霉素、强力霉素、万古霉素、复方新诺明、利福平、克林霉素这9种抗菌药物均产生耐药性,提示该菌株可能具有多种耐药机制。

#### 2.4 牛源都柏林沙门菌分离株SDWW24毒力基因检测

通过常规PCR对分离株SDWW24进行12个沙

门菌特征性毒力基因检测,其中12个呈现阳性结果(图2),检出率为100%,包括编码菌毛粘附素的*fimA*、鞭毛*fliC*、调控毒力质粒表达的*virK*和*stn*、III型分泌系统相关蛋白*sopA*、*pipD*和*invA*、质粒毒力因子*spvB*和*spvC*,以及参与胞内存活的*sifA*、*spiC*和*orf319*基因。



M: DL2000 DNA Marker; 1~12: 分别为 *pipD*、*fimA*、*fliC*、*virK*、*stn*、*sopA*、*spvB*、*spvC*、*sifA*、*spiC*、*orf319*、*invA*。

M: DL2000 DNA Marker; 1-12: *pipD*、*fimA*、*fliC*、*virK*、*stn*、*sopA*、*spvB*、*spvC*、*sifA*、*spiC*、*orf319*、*invA*, respectively.

图2 分离株SDWW24毒力基因PCR扩增检测

Fig. 2 PCR amplification of virulence genes of the isolate strain SDWW24

#### 2.5 牛源都柏林沙门菌分离株SDWW24全基因组特征分析

##### 2.5.1 基本信息

对分离株SDWW24进行全基因组测序,最终得到基因组大小为4 736 488 bp, G+C含量为52.17%,包含一条染色体和一个质粒,大小分别为4 677 116 bp和59 372 bp。基因组注释共预测到4 618个基因,其中有4 334个编码序列CDS,占基因组总长度的86.87%;含有22个rRNA、86个tRNA、15个ncRNA以及2条CRISPRs序列。Cricos基因组圈图可以更全面、更直观地认识分离株SDWW24基因组的特征(图3)。功能注释结果表明,99.68%的预测基因在至少1个功能数据库中获得注释,其中NR数据库注释最多,为4 320个基因;其次为COG数据库3 327个基因和GO数据库2 719个基因,在KEGG数据库中共注释到1 509个基因,在VFDB数据库中共注释到1 082个基因;在CARD数据库中共注释到168个基因。

##### 2.5.2 基于平均核苷酸一致性(ANI)和单核苷酸多态性(SNP)分析的沙门菌菌种鉴定

根据微生物分类学标准,物种划分的界限为95% ANI值<sup>[26]</sup>。本研究发现,分离株SDWW24与GenBank数据库中不同地理来源和血清型的沙门菌参考菌株的ANI值均超过93%,其中与6株菌的ANI值超过99.5%。特别值得注意的是,分离株SDWW24与都柏林沙门菌(*S. Dublin*, 登录号GCA 015242875.1)的ANI值达到99.52%,为所有比对菌株中的最高值。结果表明,分离株SDWW24在

基因组水平上与*S. Dublin*具有高度同源性。

根据关于单核苷酸多态性在细菌分型方面的研究发现<sup>[27]</sup>,基于SNP分析可以作为一项分辨率高且稳定性好的分型技术,同时能够用于系统发育及进化相关分析<sup>[28]</sup>。通过分析基于分离株全基因组的SNP位点为多序列比对结果构建的系统发育树(图4),发现分离株与都柏林沙门菌 *Salmonella enterica* CT 02021853 (登录号GCA 000020925.1)亲缘关系最近。综合SNP分析结果、16S rRNA序列比对结果和ANI分析结果一致,分离株和都柏林沙门菌具有较高的遗传关系,都柏林沙门菌特异性诊断血清检测结果呈阳性,最终鉴定分离株SDWW24为一株都柏林沙门菌。

##### 2.5.3 分离株SDWW24基因组功能注释

分离株SDWW24的4 320个编码基因在NR数据库中獲得注释,通过与NR数据库的比对,可以查看菌株SDWW24转录序列与相近物种的近似情况,以及同源序列的功能信息(图5(a)),其中3 614个基因注释为 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. AG3。

COG数据库的功能分类显示,3 327个基因可划分为26个功能类别,包括328个功能未知的基因。功能分布分析发现,一般功能预测相关基因(General function prediction only)居首位有381个;氨基酸运输和代谢(Amino acid transport and metabolism)相关功能基因有338个;碳水化合物的运输和代谢(Carbohydrate transport and metabolism)相关功能基因有306个;转录(Transcription)相关功



圈图从外向内依次展示 G+C 含量, 测序深度, 基因元件展示, COG 功能展示。  
From outer to inner: GC%, depth, Gene category and COG category respectively.

(a)基因组圈图;(b)质粒圈图。

(a) Genome circular diagram; (b) Plasmid circular diagram.

图 3 分离株 SDWW24 基因组和质粒圈图

Fig. 3 Genome and plasmid circular diagram of isolate strain SDWW24

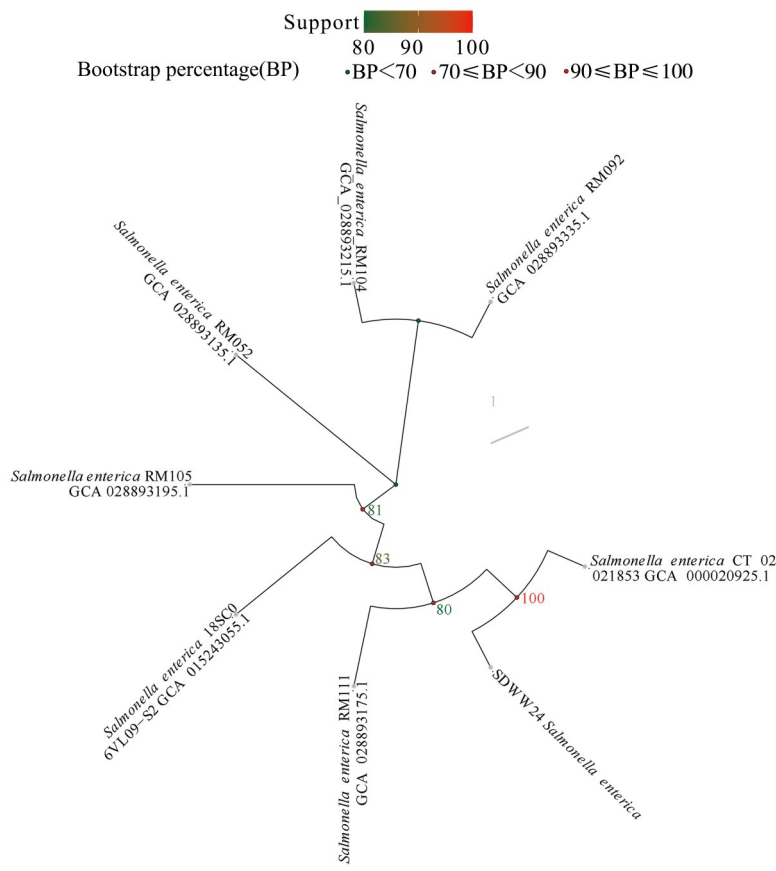


图4 基于SNP的系统进化树环形图

Fig. 4 Ring diagram of phylogenetic tree based on SNP

能基因有288个;编码能量产生和转化(Energy production and conversion)相关功能基因有286个,这些高表达功能类别共同构成了细菌生命活动的基础代谢网络(图5(b))。

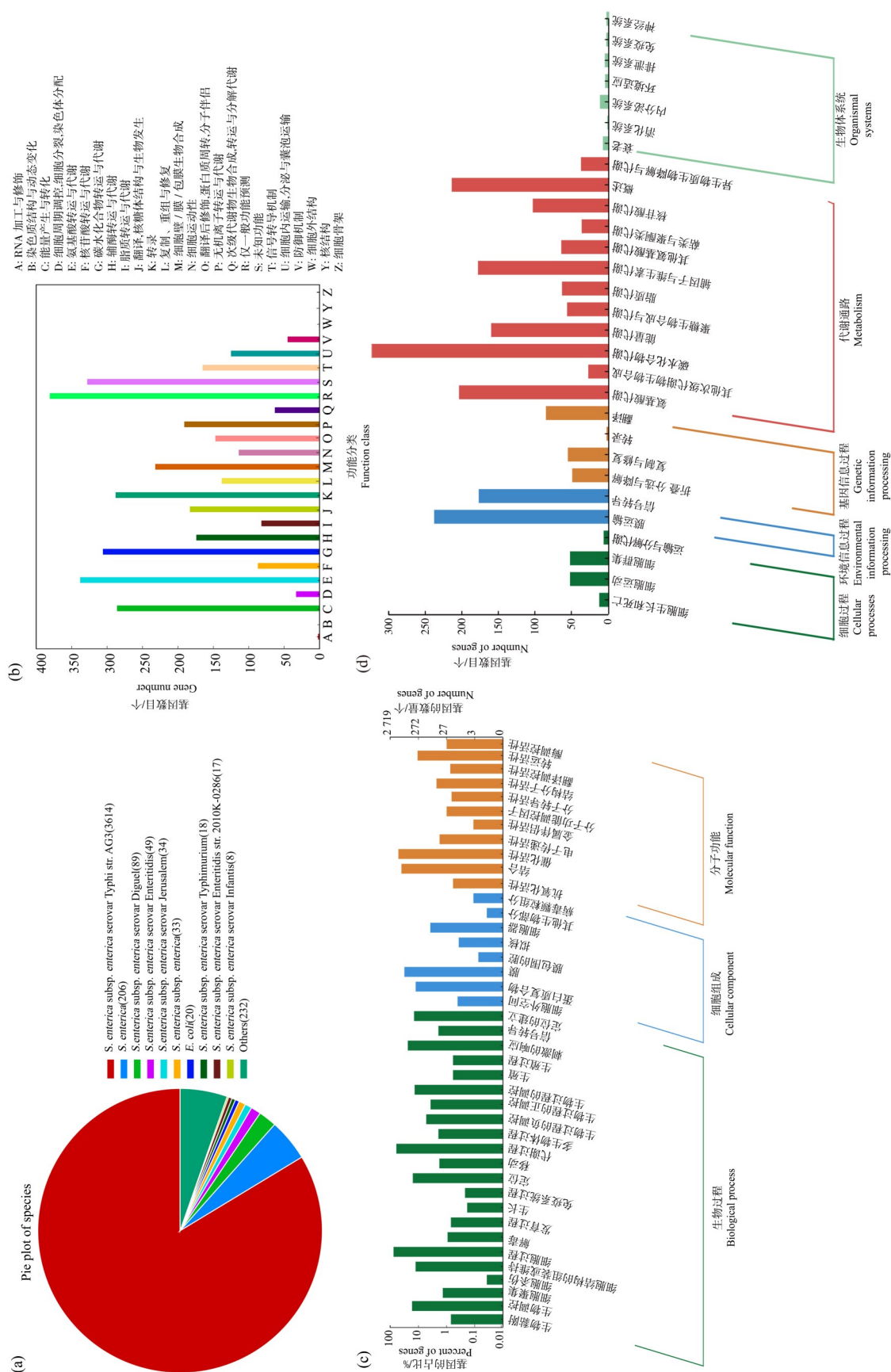
GO数据库的功能注释分析表明,分离株SDWW24的2719个编码基因主要参与三大功能范畴(图5(c))。在生物学过程层面,细胞过程(Cellular process)和代谢过程(Metabolic process)的基因富集程度最高;细胞组成分析显示,膜(Membrane)相关蛋白和蛋白质复合物(Protein-containing complex)最为富集;分子功能注释则以催化活性(Catalytic activity)和结合(Binding)功能为主。这些结果表明分离株SDWW24具有典型的原核生物代谢特征。

KEGG通路分析进一步揭示,在1509个注释基因中,新陈代谢(Metabolism)层次相关基因占比最高。其中碳水化合物代谢(Carbohydrate metabolism)通路的相关基因最多的,有325个相关

基因;其次是环境信息处理(Environmental information processing)层次中的膜转运(Membrane transport)相关编码基因,有240个相关基因(图5(d))。这一分布模式与GO分析结果相互印证,共同反映了该菌株在营养获取和环境适应方面的分子基础。

2.5.4 毒力基因注释

基于VFDB数据库的毒力基因分析,分离株SDWW24基因组携带了多样化的致病相关因子。在核心基因中鉴定出436个毒力基因,约占总基因数的10.06%。主要涉及以下功能类别:铁获取系统包括6个水溶性荧光素铁载体基因,11个肠菌素基因24个螯铁蛋白基因;抗吞噬机制包括12个藻酸盐合成与调控基因;分泌系统包括75个III型分泌系统相关基因,可以提高细菌对环境的适应能力。此外,该菌株还携带防御性毒力因子KatAB、毒力相关的调节基因phop、双组分调控系统基因bfmrs等关键致病相关元件(表3)。



(a) 同源物种分布图; (b) COG 功能分类图; (c) GO 功能分类图; (d) KEGG 代谢通路分类图。

图5 细菌基因组基本功能数据库注释图

Fig. 5 Annotation diagram of the basic function database of the bacterial genome

表3 菌株SDWW24中的毒力因子  
Table 3 Virulence factors in strain SDWW24

| 毒力因子种类<br>Virulence factors class | 毒力因子<br>Virulence factor | 相关基因<br>Related gene                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 毒素                                | 溶血                       | <i>hlyA</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                   | III型分泌系统效应物 Spv          | <i>spvB</i> 、 <i>spvR</i> 、 <i>spvC</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 应激蛋白                              | 过氧化氢酶                    | <i>kata</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                   | 蛋氨酸亚砷还原酶 A/B             | <i>msrA/B</i> ( <i>pilB</i> )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                                   | 超氧化物歧化酶                  | <i>sodB</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                   | 铜锌超氧化物歧化酶前体              | <i>sodCI</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 血清抗性                              | 抗补体杀伤                    | <i>rck</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 分泌系统                              | IV型分泌系统效应器               | <i>lpg2936</i><br><br><i>orgB</i> 、 <i>invI</i> 、 <i>invG</i> 、 <i>invF</i> 、 <i>ipgF</i> 、 <i>invB</i> 、 <i>invH</i> 、 <i>prgH</i> 、 <i>invJ</i> 、 <i>prgI</i> 、 <i>spaR</i> 、 <i>spaQ</i> 、 <i>spaP</i> 、 <i>invA</i> 、 <i>prgJ</i> 、 <i>prgK</i> 、 <i>sipC</i> 、 <i>sspC</i> 、 <i>sipB</i> 、 <i>sspB</i> 、 <i>sipD</i> 、 <i>invE</i> 、 <i>spaS</i> 、 <i>sptP</i> 、 <i>sopE2</i> 、 <i>sopD</i> 、 <i>sopB</i> 、 <i>sigD</i> 、 <i>sopA</i> 、 <i>sipA</i> 、 <i>sspA</i> 、 <i>avrA</i> 、 <i>spaO</i> 、 <i>invC</i> 、 <i>orgA</i> 、 <i>etgA</i>                                                                                                      |
|                                   | III型分泌系统 (SPI-1 encode)  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|                                   | III型分泌系统 (SPI-2 encode)  | <i>ssaK</i> 、 <i>ssaO</i> 、 <i>ssaC</i> 、 <i>ssaM</i> 、 <i>ssaH</i> 、 <i>sipC</i> 、 <i>ssaB</i> 、 <i>ssaD</i> 、 <i>ssaP</i> 、 <i>ssaG</i> 、 <i>ssaT</i> 、 <i>ssaS</i> 、 <i>ssaR</i> 、 <i>ssaV</i> 、 <i>ssaI</i> 、 <i>ssaJ</i> 、 <i>sseD</i> 、 <i>sseC</i> 、 <i>ssaL</i> 、 <i>ssaU</i> 、 <i>sspH2</i> 、 <i>sseJ</i> 、 <i>sseG</i> 、 <i>sseF</i> 、 <i>sseE</i> 、 <i>sseB</i> 、 <i>sifA</i> 、 <i>ssaQ</i> 、 <i>cdsN</i> 、 <i>sseA</i> 、 <i>ssaE</i>                                                                                                                                                                                                  |
| 侵袭和运动                             | 鞭毛                       | <i>flgM</i> 、 <i>fliI</i> 、 <i>fliC</i> 、 <i>flhD</i> 、 <i>flgJ</i> 、 <i>fliS</i> 、 <i>fliO</i> 、 <i>fliJ</i> 、 <i>flgI</i> 、 <i>fliF</i> 、 <i>fliG</i> 、 <i>fliN</i> 、 <i>fliM</i> 、 <i>flgH</i> 、 <i>fliE</i> 、 <i>flgL</i> 、 <i>flgK</i> 、 <i>flgE</i> 、 <i>fliD</i> 、 <i>fliR</i> 、 <i>fliQ</i> 、 <i>fliP</i> 、 <i>flhB</i> 、 <i>flhC</i> 、 <i>fliA</i> 、 <i>flhA</i> 、 <i>flgF</i> 、 <i>flgC</i> 、 <i>flgB</i> 、 <i>flgD</i> 、 <i>fliL</i> 、 <i>flgA</i> 、 <i>fliH</i> 、 <i>flgN</i> 、 <i>fliZ</i> 、 <i>ompA</i> 、 <i>ail</i> 、 <i>aslA</i> 、 <i>tsr</i> 、 <i>lpeA</i> 、 <i>flgG</i> 、 <i>lafK</i> 、 <i>fleR</i> 、 <i>fliC</i> 、 <i>cheW</i> |
| 对抗菌肽的耐药性                          | 抗菌肽抗性蛋白                  | <i>mig-14</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 调控                                | 信号转导组氨酸激酶                | <i>bfmS</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 镁离子吸收                             | Mg <sup>2+</sup> 转运蛋白    | <i>mgtB</i> 、 <i>mgtC</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                   | 双组分系统调节因子                | <i>phoP</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 铁摄取                               | 铁载体                      | <i>ptxR</i> 、 <i>pvcC</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                   | 肠杆菌                      | <i>fepG</i> 、 <i>fepD</i> 、 <i>fepB</i> 、 <i>entD</i> 、 <i>entC</i> 、 <i>entB</i> 、 <i>bauE</i> 、 <i>entF</i> 、                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|                                   | 血红素渗透酶                   | <i>chuU</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                   | 亚铁转运蛋白                   | <i>feoB</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                   | 细胞色素 c 型生物发生蛋白           | <i>ccmC</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 免疫逃逸                              | 磷酸甘露糖变位酶                 | <i>pmm</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                   | 营养摄取                     | <i>hpt</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 酶                                 | 巨噬细胞感染增强因子               | <i>mip</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 内毒素                               | 脂多糖合成相关酶                 | <i>kdtB</i> 、 <i>gtrA</i> 、 <i>waaP</i> 、 <i>waaG</i> 、 <i>waaC</i> 、 <i>lpxK</i> 、 <i>gmhA</i> 、 <i>lpcA</i> 、 <i>eptC</i> 、 <i>kdta</i> 、 <i>rfaE</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 外排泵                               | 通道蛋白                     | <i>mtrE</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                   | 脂肪酸外排系统蛋白                | <i>farA/B</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 细胞代谢                              | 异柠檬酸裂解酶                  | <i>icl</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 抗吞噬                               | 藻酸盐                      | <i>algU</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

| 表 3（续）                            |                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 毒力因子种类<br>Virulence factors class | 毒力因子<br>Virulence factor | 相关基因<br>Related gene                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 黏附                                | 菌毛                       | <i>pilR</i> 、 <i>pilT</i> 、 <i>pefC</i> 、 <i>pefB</i> 、 <i>pefA</i> 、 <i>pefD</i> 、 <i>fimH</i> 、 <i>fimF</i> 、 <i>csgB</i> 、 <i>lpfC</i> 、 <i>lpfD</i> 、 <i>lpfE</i> 、 <i>lpfB</i> 、 <i>lpfA</i> 、 <i>fimI</i> 、 <i>csgA</i> 、 <i>csgG</i> 、 <i>csgF</i> 、 <i>csgE</i> 、 <i>csgC</i> 、 <i>fimC</i> 、 <i>papC</i> 、 <i>pilB</i> |
|                                   | 纤溶酶原激活剂                  | <i>pla</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                                   | 黏附                       | <i>misL</i> 、 <i>sinH</i> 、 <i>fdeC</i> 、 <i>cseA</i>                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                   | 自转运样蛋白                   | <i>shdA</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                                   | 外膜蛋白                     | <i>ratB</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                                   | 热休克蛋白                    | <i>htpB</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

2.5.5 耐药功能注释

基因组耐药性分析显示,分离株 SDWW24 具有复杂的耐药基因谱系。该菌株基因组中鉴定出 10 类

抗菌药物的靶向抗性基因,包括四环素类、磺胺类、大环内酯类、氟喹诺酮类、头孢菌素类、氨基糖苷类等临床常用抗生素,显著增强菌株的多重耐药表型(表 4)。

| 表 4 菌株 SDWW24 的耐药基因预测                                              |                                                                                                                                                                                                  |  |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Table 4 Prediction of antibiotic resistance genes in strain SDWW24 |                                                                                                                                                                                                  |  |
| 药物分类<br>Drug class                                                 | 相关基因<br>Related gene                                                                                                                                                                             |  |
| 四环素类 Tetracycline                                                  | <i>mdfA</i> 、 <i>leuO</i> 、 <i>mdtP</i> 、 <i>amvA</i> 、 <i>hmrM</i> 、 <i>arlR</i>                                                                                                                |  |
| 磺胺类 Sulfonamide                                                    | <i>sul4</i>                                                                                                                                                                                      |  |
| 利福霉素类 Rifamycin                                                    | <i>rpoB</i> 、 <i>nfar</i> 、 <i>rox</i>                                                                                                                                                           |  |
| 氯霉素类 Phenicol                                                      | <i>yojI</i> 、 <i>eptA</i> 、 <i>eptB</i> 、 <i>arnA</i> 、 <i>rosB</i> 、 <i>arnT</i> 、 <i>ugd</i> 、 <i>ompA</i> 、 <i>pmrF</i> 、 <i>rosA</i> 、 <i>bacA</i> 、 <i>pmrF</i> 、 <i>arnA</i> 、 <i>basS</i> |  |
| 大环内酯类 Macrolide                                                    | <i>emrE</i>                                                                                                                                                                                      |  |
| 氟喹诺酮类 Fluoroquinolone                                              | <i>crp</i> 、 <i>mdtK</i> 、 <i>mdtM</i> 、 <i>mdtH</i> 、 <i>emrA</i> 、 <i>emrR</i> 、 <i>abaQ</i> 、 <i>hns</i>                                                                                      |  |
| 头孢菌素类 Cephalosporin                                                | <i>sdiA</i> 、 <i>acrA</i> 、 <i>acrB</i> 、 <i>acrS</i> 、 <i>yajC</i> 、 <i>acrF</i> 、 <i>soxR</i>                                                                                                  |  |
| 碳青霉烯类 Carbapenem                                                   | <i>ramA</i> 、 <i>marA</i> 、 <i>golS</i> 、 <i>mdsB</i> 、 <i>mdsC</i> 、 <i>mdsA</i> 、 <i>ompK37</i> 、 <i>spr-1</i>                                                                                 |  |
| 氨基糖苷类 Aminoglycoside                                               | <i>ykkC</i> 、 <i>kpnF</i> 、 <i>kpnE</i> 、 <i>smeR</i> 、 <i>kpnH</i> 、 <i>parR</i> 、 <i>acrD</i> 、 <i>aac</i> (6')-Iy                                                                             |  |
| 氨基香豆素类 Aminocoumarin                                               | <i>cpxA</i> 、 <i>lptD</i> 、 <i>tolC</i> 、 <i>cpxR</i> 、 <i>baeS</i> 、 <i>baeR</i> 、 <i>mdtB</i> 、 <i>mdtC</i> 、 <i>mdtA</i>                                                                      |  |

3 讨论与结论

都柏林沙门菌一旦感染牛便可对其健康造成严重损害,引发流产、肠道和呼吸道疾病,甚至导致高致病性流行病的爆发<sup>[29-30]</sup>。S. Dublin 通过多种机制感染宿主,包括外膜蛋白、鞭毛以及分泌系统等<sup>[31-32]</sup>。这些机制中的毒力因子共同作用,破坏宿主的防御机制,从而增强 S. Dublin 的致病能力<sup>[33]</sup>。近年来,抗生素耐药性问题日益严重,更加使得沙门氏菌病的治疗难度和由此导致的经济损失逐步上升<sup>[34-35]</sup>。研究发现,S. Dublin 分离株的多重耐药

性呈现增长趋势,尤其对喹诺酮类和第三代头孢菌素类抗生素的敏感性有所降低,这进一步扩大了治疗沙门氏菌病的复杂性<sup>[36]</sup>。全基因组测序作为一种强有力的技术手段,已被广泛应用于细菌遗传信息和流行病学研究<sup>[37-38]</sup>。本研究通过 WGS 技术对分离株 SDWW24 的基因组进行了深入分析,成功挖掘出其潜在的毒力基因和耐药基因,这为探究 S. Dublin 的感染机制提供理论依据。

都柏林沙门菌的致病力与其在肠道组织的细胞内增殖能力的增强有关,研究表明,S. Dublin 能引发奶牛严重腹泻,甚至导致死亡<sup>[39]</sup>。本研究对部

分常见毒力基因进行了PCR检测,最终检出率达100%,与其他类似研究相比检出率偏高<sup>[40]</sup>。通过WGS分析,本研究发现分离株SDWW24共携带多达1 082个毒力基因。在VFDB数据库的核心基因中,有424个基因位于染色体上,而12个基因位于质粒上,这表明存在与毒力相关的质粒,与Sekhwal等<sup>[5]</sup>的研究结果相吻合。这些质粒可以介导毒力基因的水平传播,进而可能增强了S. Dublin的致病性。分离株SDWW24能够编码SPI-1和SPI-2 2种III型分泌系统,这2种系统分别有助于细菌侵入肠道和扩散到全身。分离株SDWW24富含与SPI-1 T3SS相关的基因(如*sopE2*、*rck*和*invF*),这些基因在其致病过程中发挥着多种关键作用。例如*sopE2*毒力基因编码的蛋白质具有鸟苷酸交换因子活性,分离株SDWW24可以通过该蛋白将至少13种效应蛋白传递到宿主细胞的细胞质膜,促进细菌对宿主细胞的侵袭。*rck*基因在分离株SDWW24染色体和质粒上均存在,该基因编码的蛋白质参与细菌免疫逃逸,这可能增强了S. Dublin的适应性和致病性。然而,李偲等<sup>[17]</sup>从一头西门塔尔病死公犊牛的肺脏中所分离到的一株都柏林沙门菌中未能检测出*rck*基因,可能是该菌株在进化过程中丢失了*rck*基因。Thornbrough等<sup>[41]</sup>研究发现都柏林沙门菌SPI-2 T3SS效应子SrfH/SseI中的单核苷酸多态性能够影响其早期的肠外传播。本研究中的分离株SDWW24同样携带SPI-2 T3SS效应子SpiC和SifA,这些效应子有助于细菌在免疫细胞(如巨噬细胞)内的生存和增殖,这可能增强其致病性。此外,S. Dublin的pSDV质粒存在spv操作子,能编码与宿主细胞凋亡相关的毒素。Mohammed等<sup>[32]</sup>研究的61株S. Dublin的质粒中,仅3株临床分离株的质粒含有编码Spv的基因。然而,本研究的分离株SDWW24的质粒携带了*spvB*、*spvC*和*spvR* 3种操纵子基因,表明S. Dublin携带的毒力基因可能是其在宿主体内生存能力和致病性增强的原因,S. Dublin对牛和人类的致病机制,仍有待进一步深入研究。

本研究针对北京地区分离的一株都柏林沙门菌SDWW24进行了药敏试验,结果显示其对8类抗生素耐药,属于多重耐药菌。美国国家抗生素耐药性监测系统报告指出,都柏林沙门菌分离株中,84%的菌株对五类或以上的抗菌药耐药,57%的菌

株则对七类或以上的抗菌药耐药<sup>[12]</sup>,此研究表明美国流行的都柏林沙门菌耐药情况非常严重。本研究所分离的SDWW24菌株耐药水平也较严重,应给予重视并持续监测。通过全基因组测序,本研究检测到除与耐药表型相对应的耐药基因,同时还发现3类与表型耐药性相关性不大的基因,分别是氯霉素类、氟喹诺酮类和碳青霉烯类基因。这表明WGS在预测细菌抗生素耐药性方面具有较高的准确性与可靠性。然而,本研究发现基因型数据与表型数据之间的关联存在一定的不一致性,这与其他研究结果相吻合<sup>[16]</sup>。AMR现象的产生不仅仅与耐药基因的存在与否有关,还受到其他多种机制的影响,例如酶激活、目标修饰/保护以及AMR基因的表达调控等<sup>[33]</sup>。在分离株SDWW24基因组中,含有21种与药物作用靶位改变相关的基因。例如基因*arnA*能够编码一种关键酶,用于修饰脂质A,从而使得革兰氏阴性菌能够抵御抗生素的抗菌活性。这种基因在大肠杆菌(*E. coli*)和铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)中均有发现<sup>[42-43]</sup>,其存在可能与这些分离株所获得的移动遗传元件有关<sup>[44]</sup>。本研究还发现了6种使抗生素失活相关的基因,如基因*rox*编码的蛋白是一种利福平单加氧酶,能够使利福平失去活性。在皮疽诺卡氏菌中,*rox*基因编码的蛋白能够将利福平转化为一种新的化合物“2'-N-羟基-4-氧代-利福平”,这种转化显著降低了利福平的抗菌效果<sup>[45]</sup>。在临床应用方面,国内有研究表明,动物分离株中的MDR高于人类的分离株<sup>[46]</sup>,这表明对牛源都柏林沙门菌引起的临床症状,应实施更为严格的抗菌药使用管理措施,预防因抗生素误用和滥用而导致病原菌耐药性的提升。此外,其基因组中存在众多可移动的遗传元件,这进一步加剧了该菌株的耐药性和传播风险。由于本研究的临床分离样本有限,未能充分展现本地区都柏林沙门氏菌耐药基因的流行全貌,因此后续还需要进一步扩大监测与研究范围。

综上,本研究为理解S. Dublin的毒力致病机制、耐药传播机制以及后续深入开展选择性药物对其耐药性的逆转和牛源沙门菌病的疫苗研发提供了参考价值。

## 参考文献 References

- [1] Bruce White P. Notes on organisms serologically related to *S. enteritidis*

- gärtner: I. The Dublin and Tokyo types of *Salmonella*[J]. *Epidemiology and Infection*, 1930, 29(4): 443-445
- [2] Velasquez-Munoz A, Castro-Vargas R, Cullens-Nobis F M, Mani R, Abuelo A. Review: *Salmonella* Dublin in dairy cattle[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2024, 10: 1331767
- [3] Nielsen L R. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(1): 1-9
- [4] Castro-Vargas R E, Cullens-Nobis F M, Mani R, Roberts J N, Abuelo A. Effect of dry period immunization of *Salmonella* Dublin latent carriers with a commercial live culture vaccine on intrauterine transmission based on the presence of precolostral antibodies in offspring[J]. *Journal of Dairy Science*, 2024, 107(12): 11436-11445
- [5] Sekhwal M K, Li L L, Pierre T, Matthews T, Luley E, Tewari D, Kuchipudi S V, Jayarao B, Byukusenge M. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Dublin isolated from 2011 to 2022 from veal and dairy cattle in Pennsylvania[J]. *Microorganisms*, 2025, 13(2): 400
- [6] Yue H, Zhu X X, Zhang B, Zhang H R, Tang C. Emergence of the virulence plasmid in *Salmonella* onarimon and *Salmonella* blegdam from yak[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(1): 296-297
- [7] Fei X, Schroll C, Huang K S, Christensen J P, Christensen H, Lemire S, Kilstrup M, Thomsen L E, Jelsbak L, Olsen J E. The global transcriptomes of *Salmonella enterica* serovars Gallinarum, Dublin and Enteritidis in the avian host[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2023, 182: 106236
- [8] Casaux M L, Neto W S, Schild C O, Costa R A, Macias-Rioseco M, Caffarena R D, Silveira C S, Araújo V, Diaz B D, Giannitti F, Fraga M. Epidemiological and clinicopathological findings in 15 fatal outbreaks of salmonellosis in dairy calves and virulence genes in the causative *Salmonella enterica* Typhimurium and Dublin strains [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2023, 54(1): 475-490
- [9] 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
- [10] 文明, 王松林, 黄梅粤, 孟艳, 冉启芹. 都柏林沙门氏菌(*S. dublin*)的分离与鉴定[J]. *中国动物检疫*, 2000, 17(7): 38-39
- Wen M, Wang S L, Huang M Y, Meng Y, Ran Q Q. Isolation and identification of *S. dublin*[J]. *China Animal Quarantine*, 2000, 17(7): 38-39 (in Chinese)
- [11] Aarø N S, Torpdahl M, Rasmussen T, Jensen M, Nielsen H L; Danish Study Group for Enteric Infection has the following members. *Salmonella* infections in Denmark from 2013 – 2022 with focus on serotype distribution, invasiveness, age, sex, and travel exposition[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2024, 43(5): 947-957
- [12] Harvey R R, Friedman C R, Crim S M, Judd M, Barrett K A, Tolar B, Folster J P, Griffin P M, Brown A C. Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Dublin infections among humans, United States, 1968-2013[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2017, 23(9): 1493-1501
- [13] 吴仙阳, 国译丹, 杨菁, 杨祖顺, 苏梅惠, 范璐. 一起家庭自办宴席引起的都柏林沙门氏菌食物中毒调查研究报告[J]. *实用预防医学*, 2023, 30(8): 981-984
- Wu X Y, Guo Y D, Yang J, Yang Z S, Su M H, Fan L. Survey on a food poisoning outbreak due to *Salmonella* dublin contamination in a self-catering family banquet[J]. *Practical Preventive Medicine*, 2023, 30(8): 981-984 (in Chinese)
- [14] 杨进举. 一起都柏林沙门氏菌食源性疾病暴发事件的调查分析[J]. *中国初级卫生保健*, 2025, 39(3): 70-73
- Yang J J. Investigation and analysis of a *Salmonella* Dublin foodborne disease outbreak event [J]. *Chinese Primary Health Care*, 2025, 39(3): 70-73 (in Chinese)
- [15] 肖林. 某校一起都柏林沙门氏菌食源性疾病暴发调查[J]. *中国校医*, 2022, 36(4): 280-282
- Xiao L. Investigation on an outbreak of *Salmonella* Dublin foodborne disease in aschool [J]. *Chinese Journal of School Doctor*, 2022, 36(4): 280-282 (in Chinese)
- [16] Paudyal N, Pan H, Elbediwi M, Zhou X, Peng X Q, Li X L, Fang W H, Yue M. Characterization of *Salmonella* *Dublin* isolated from bovine and human hosts[J]. *BMC Microbiol*, 2019, 19(1): 226
- [17] 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 C, Guo S, Wang Y Q, Geng C, Lü X Y, Shi J C, Wang Z, Liu K. 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 (in Chinese)
- [18] Blackburn B O, Sutch K, Harrington R, Jr. The changing distribution of *Salmonella* dublin in the United States [J]. *Proceedings, annual meeting of the United States Animal Health Association*, 1980, 84: 445-451
- [19] Ferris K E, Andrews R E Jr, Thoen C O, Blackburn B O. Plasmid profile analysis, phage typing, and antibiotic sensitivity of *Salmonella* dublin from clinical isolates in the United States [J]. *Veterinary microbiology*, 1992, 32(1): 51-62
- [20] Walker R L. *Salmonella* dublin infections in cattle in California; proceedings of the American association of bovine practitioners conference proceedings [C]. In: *Proceedings of the Twenty—Seventh Annual Conference*. American Association of Bovine Practitioner, 1994(27):8-9
- [21] Bulgin M S. *Salmonella* dublin: what veterinarians should know [J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1983, 182(2): 116-118
- [22] Klose C, Scuda N, Ziegler T, Eisenberger D, Hanczaruk M, Riehlm J M. Whole-genome investigation of *Salmonella* Dublin considering mountain pastures as reservoirs in Southern Bavaria, Germany [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(5):885
- [23] GB 4789.4—2024. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2024
- GB 4789.4—2024. National food safety standard—food microbiological examination — *Salmonella* examination[S]. Beijing: China Standard Press,

- 2024 (in Chinese)
- [24] Humphries R M, Ambler J, Mitchell S L, Castanheira M, Dingle T, Hindler J A, Koeth L, Sei K, on behalf of the CLSI Methods Development and Standardization Working Group of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing. "CLSI methods development and standardization working group best practices for evaluation of antimicrobial susceptibility tests" [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2018, 56(4): e01934-17
- [25] Kawasaki M, McConnel C S, Burbick C R, Ambrosini Y M. Pathogen-epithelium interactions and inflammatory responses in *Salmonella* Dublin infections using ileal monolayer models derived from adult bovine organoids [J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 11479
- [26] Rodriguez-R L M, Conrad R E, Viver T, Feistel D J, Lindner B G, Venter S N, Orellana L H, Amann R, Rossello-Mora R, Konstantinidis K T. An ANI gap within bacterial species that advances the definitions of intra-species units [J]. *mBio*, 2024, 15(1): e0269623
- [27] Rahman M M, Lim S J, Park Y C. Development of single nucleotide polymorphism (SNP)-based triplex PCR marker for serotype-specific *Escherichia coli* detection[J]. *Pathogens*, 2022, 11(2):115
- [28] Wilson M R, Brown E, Keys C, Strain E, Luo Y, Muruvanda T, Grim C, Jean-Gilles Beaubrun J, Jarvis K, Ewing L, Gopinath G, Hanes D, Allard M W, Musser S. Whole genome DNA sequence analysis of *Salmonella* subspecies *enterica* serotype tennessee obtained from related peanut butter foodborne outbreaks[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0146929
- [29] Guizelini C C, Tutija J F, Moraes D R, Bacha F B, Ramos C A N, Leal C R B, Zaquetti M E, Lemos R A A. Outbreak investigation of septicemic salmonellosis in calves[J]. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2020, 14(1): 104-108
- [30] Hezil D, Zaidi S, Benseghir H, Zineddine R, Benamrouche N, Ghalmi F. *Salmonella* Dublin associated with abortion in dairy cattle in Algiers and comparison of different diagnostic methods[J]. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 2021, 22(2): 211-222
- [31] Sia C M, Ambrose R L, Valcanis M, Andersson P, Ballard S A, Howden B P, Williamson D A, Pearson J S, Ingle D J. Distinct adaptation and epidemiological success of different genotypes within *Salmonella enterica* serovar Dublin[J]. *Elife*, 2025, 13: RP102253
- [32] Mohammed M, Le Hello S, Leekitcharoenphon P, Hendriksen R. The invasome of *Salmonella* Dublin as revealed by whole genome sequencing[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2017, 17(1): 544
- [33] Srednik M E, Lantz K, Hicks J A, Morningstar-Shaw B R, Mackie T A, Schlater L K. Antimicrobial resistance and genomic characterization of *Salmonella* Dublin isolates in cattle from the United States[J]. *PLoS One*, 2021, 16(9): e0249617
- [34] Poudel A N, Zhu S H, Cooper N, Little P, Tarrant C, Hickman M, Yao G Q. The economic burden of antibiotic resistance: A systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2023, 18(5): e0285170
- [35] Williamson D A, Lane C R, Easton M, Valcanis M, Strachan J, Veitch M G, Kirk M D, Howden B P. Increasing antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* isolates in Australia from 1979 to 2015 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(2): e02012-17
- [36] FDA. The national antimicrobial resistance monitoring system: NARMS integrated report [R]. Laurel, MD, US: Department of health and Human Services, 2017
- [37] Fenske G J, Thachil A, McDonough P L, Glaser A, Scaria J. Geography shapes the population genomics of *Salmonella enterica* Dublin[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2019, 11(8): 2220-2231
- [38] Vilela F P, Dos Prazeres Rodrigues D, Costa R G, Casas M R T, Falcão J P, Campioni F. High similarity and high frequency of virulence genes among *Salmonella* Dublin strains isolated over a 33-year period in Brazil[J]. *Braz J Microbiol*, 2020, 51(2): 497-509
- [39] Libby S J, Adams L G, Ficht T A, Allen C, Whitford H A, Buchmeier N A, Bossie S, Guiney D G. The *spv* genes on the *Salmonella* dublin virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host[J]. *Infection and Immunity*, 1997, 65(5): 1786-1792
- [40] Hsu C H, Li C, Hoffmann M, McDermott P, Abbott J, Ayers S, Tyson G H, Tate H, Yao K, Allard M, Zhao S H. Comparative genomic analysis of virulence, antimicrobial resistance, and plasmid profiles of *Salmonella* dublin isolated from sick cattle, retail beef, and humans in the United States[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2019, 25(8): 1238-1249
- [41] Thornbrough J M, Worley M J. A naturally occurring single nucleotide polymorphism in the *Salmonella* SPI-2 type III effector *srfH/ssel* controls early extraintestinal dissemination[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45245
- [42] Ahmed O B. Detection of antibiotic resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* by whole genome sequencing[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2022, 15: 6703-6709
- [43] Daruka L, Czikkely M S, Szili P, Farkas Z, Balogh D, Grézal G, Maharramov E, Vu T H, Sipos L, Juhász S, Dunai A, Daraba A, Számel M, Sári T, Stirling T, Vászárhelyi B M, Ari E, Christodoulou C, Manezinger M, Enyedi M Z, Jaksa G, Kovács K, van Houte S, Pursey E, Pintér L, Haracska L, Kintsés B, Papp B, Pál C. ESKAPE pathogens rapidly develop resistance against antibiotics in development *in vitro* [J]. *Nature Microbiology*, 2025, 10(2): 313-331
- [44] Aslam B, Khurshid M, Arshad M I, Muzammil S, Rasool M, Yasmeen N, Shah T, Chaudhry T H, Rasool M H, Shahid A, Xia X S, Baloch Z. Antibiotic resistance: One health one world outlook[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 771510
- [45] Abdelwahab H, Martin Del Campo J S, Dai Y M, Adly C, El-Sohaimy S, Sobrado P. Mechanism of rifampicin inactivation in *Nocardia farcinica*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0162578
- [46] Liao Y S, Hong Y P, Chen B H, Wang Y W, Teng R H, Chien Y C, Liang S Y, Wei H L, Chang J H, Yang M H, Tsao C S, Chiou C S. Clonal expansion of chromosome-borne CTX-M-55 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Agona, Taiwan [J]. *Microbiology spectrum*, 2025, 13(5): e0297924

责任编辑: 秦梅



**第一作者简介:**王世发,农学学士学位,北京农学院动物医学院在读硕士研究生,主要研究方向为中药在耐药病原菌防控中的多靶点作用机制,在这个领域深入研究中药对多重耐药菌的耐药性逆转,并探索其中的作用机制,响应国家“减抗替抗”策略的号召。在读期间学习刻苦努力,获得一次三等学业奖学金。我始终对科研工作保持着浓厚的兴趣和强烈的求知欲,怀揣着对未知领域的探索热情。我深知团队协作的力量,积极与伙伴们携手共进,共同攻克科研难题。在面对挑战时,我从不轻言放弃,始终保持着坚韧不拔的毅力和积极向上的态度。我勤奋学习专业知识,不断提升自己的技能水平,坚信通过科研可以拓展人类的知识边界,为实际问题提供创新的解决方案。我始终保持着对科研的敬畏之心,明确自己的研究方向,致力于在细菌防控领域深入探索,希望能够在在这个过程中实现自己的价值,为科研事业贡献自己的一份力量。



**通讯作者简介:**王真,博士,北京农学院动物科学技术学院副教授,硕士研究生导师;2018年入选北京市高层次创新创业人才支持计划青年拔尖人才,2019年入选北京市属高校高水平教师队伍建设支持计划青年拔尖人才培养计划。指导学生在中国国际“互联网+”大学生创新创业大赛、首都“挑战杯”、全国大学生生命科学竞赛、北京市大学生生物学竞赛等赛事中,获得国家铜奖、北京赛区一等奖和三等奖多项。长期从事动物疫病防控技术开发和病原菌致病机制研究。主持完成国家自然科学基金青年基金、大北农青年基金、北京市教委科技项目等,现主持北京市自然科学基金面上项目,以第一作者和通讯作者发表研究论文40余篇,其中SCI论文18篇,单篇影响因子最高10.08,授权国家发明专利4项,编著《动物病原菌检测技术指南》1部。