



## 全基因组测序技术对沙门氏菌血清型和耐药性的预测能力分析

张璐, 沈青春, 张纯萍\*, 赵琪, 崔明全, 李霆, 程敏

中国兽医药品监察所, 北京 100081

**摘要:**【目的】评价全基因组测序技术在沙门氏菌血清型和耐药性检测方面的应用能力。【方法】对我国1950–2015年分离的290株鸡源沙门氏菌用常规检测方法进行了血清分型和药敏试验;提取全基因组进行测序,应用SeqSero和ResFinder数据库分析沙门氏菌的血清型和耐药性;对用常规检测方法和全基因组测序分析方法得到的血清型和耐药性结果进行比较,分析两种方法所得结果的符合性情况。【结果】沙门氏菌的主要血清型为肠炎和鸡白痢( $\geq 84.5\%$ ),常规检测方法和全基因组测序分析方法在沙门氏菌血清分型方面的总体符合率为97.6%。对11种抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC)检测结果显示,沙门氏菌对磺胺异噁唑(39.3%)、氨苄西林(39.0%)和粘菌素(39.0%)的耐药率较高,对其他抗菌药物的耐药率较低。全基因组测序分析能够100%预测美罗培南、氟苯尼考、阿奇霉素和阿莫西林/克拉维酸的耐药性,而且对恩诺沙星、四环素、复方新诺明、氨苄西林、头孢噻呋、磺胺异噁唑的预测符合率均超过95.0%。【结论】本研究结果表明,全基因组测序技术对沙门氏菌的血清分型和耐药性的预测具有较高的准确性和敏感性,是分析沙门氏菌血清型和耐药性的有效工具,具备良好的应用前景。

**关键词:** 沙门氏菌, 全基因组测序, 血清型, 耐药表型, 耐药基因型

沙门氏菌是革兰氏阴性菌中一种重要的人畜共患病原菌,其血清型众多,全球已鉴定出2600多种血清型,在我国已经发现300多种<sup>[1]</sup>。不同国家、不同动物来源的沙门氏菌优势血清型不同,美国鸡源沙门氏菌的血清型主要以肯塔基为主<sup>[2]</sup>。伊朗牛源沙门氏菌的优势血清型为鼠伤寒<sup>[3]</sup>。而我国鸡源沙门氏菌的血清型主要为肠炎、鸡白痢和鼠伤寒<sup>[4]</sup>。此外,抗菌药物是兽医临床上防控沙门

氏菌感染的重要手段。不同血清型沙门氏菌对抗菌药物的耐药性不同<sup>[5]</sup>,而且耐药水平的上升给沙门氏菌病的防治也带来严峻挑战<sup>[6]</sup>。因此,准确快速的血清型鉴定和耐药性检测对沙门氏菌病的防控具有重要意义<sup>[7–8]</sup>。

在沙门氏菌的血清分型方面,常规检测方法是通过对玻片凝集法确定O抗原和H抗原,然后根据血清抗原表确定血清型。这种血清分型技术对

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0501600)

\*通信作者: Tel: +86-10-62103678; Fax: +86-10-62103678; E-mail: Zhangdona@163.com

收稿日期: 2021-03-04; 修回日期: 2021-05-11; 网络出版日期: 2021-06-05

于血清质量要求高、花费大、耗时长,而且有些凝集不明显难以进行判别。在沙门氏菌的耐药性检测方面,常用的方法为美国临床实验室标准化委员会(CLSI)推荐的药敏试验法<sup>[9]</sup>。但该方法实验结果的准确性易受实验材料、实验条件和人员操作的影响。在耐药基因检测方面,常用的PCR检测技术无法一次鉴定出所有的耐药基因<sup>[11]</sup>。因此,如何快速、高效地鉴定沙门氏菌的血清型和耐药性就成为急需解决的现实问题。

随着测序技术的日益成熟,快速、低成本、高效益的全基因组测序技术(WGS)已经广泛应用于细菌流行病学的研究中<sup>[12]</sup>。同时,生物信息技术的发展也促进了食源性致病菌血清学分型、耐药基因等多种公共数据库的创建,如SeqSero血清分型数据库、ResFinder耐药基因数据库等。随着数据库的不断更新完善,自动化分析数据的准确率也将越来越高。国外研究表明,WGS在确定沙门氏菌血清型和耐药基因型方面具有广阔的应用前景,未来可能代替常规实验室方法<sup>[13-14]</sup>。而目前国内对这方面的研究较少。因此,本研究选取了我国1950-2015年间分离的290株鸡源沙门氏菌进行了全基因组测序和数据分析,并与常规实验方法进行了比较分析,从而了解全基因组测序技术在沙门氏菌血清型和耐药性方面的预测能力。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株来源

沙门氏菌共290株。其中,226株由本实验室2008-2015年分离自全国8个省市的育成鸡盲肠或泄殖腔拭子,分别为北京98株、广东36株、江苏30株、山东22株、四川19株、上海12株、

辽宁7株和天津2株;另外64株来自兽医微生物菌株保藏管理中心,分离时间为1950-2015年。

药敏检测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

沙门氏菌分型血清购自丹麦国家血清研究院,沙门氏菌药敏检测板由本实验室设计,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,微量核酸蛋白浓度测定仪NanoDrop购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,沙门氏菌全基因组测序、组装由奥维森基因科技有限公司完成。

### 1.3 常规血清分型

将沙门氏菌接种到营养琼脂和swarm半固体琼脂上,37℃过夜培养。参照沙门氏菌检验标准GBT4789.4-2016<sup>[15]</sup>,用丹麦血清对菌株进行血清型鉴定。首先进行O相血清凝集:先在洁净的玻璃片上滴加1滴诊断血清,然后用洁净的枪头挑取营养琼脂上的菌落与滴加的血清混匀,轻轻摇动玻璃片,1min之内肉眼判断结果。若不凝集,可挑取菌落在1ml生理盐水中做成浓菌液,在酒精灯火焰上煮沸后检查是否存在Vi抗原,同时设无菌生理盐水为对照,观察细菌是否有自凝现象。同法挑取swarm半固体琼脂周边扩散菌苔进行H相检测。最后,根据O相与H相的凝集结果,查阅WHO的White-Kauffmann-LeMinor抗原表<sup>[16]</sup>确定血清型。

### 1.4 药敏试验

根据美国临床实验室标准化委员会(CLSI)标准<sup>[17]</sup>,选择11种代表性抗菌药物(磺胺异噁唑、氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、四环素、头孢噻

味、阿奇霉素、复方新诺明、恩诺沙星、氟苯尼考、美罗培南、粘菌素)设计生产药敏检测板,通过微量肉汤稀释法测定 290 株沙门氏菌的耐药性,同时使用大肠杆菌标准株 ATCC 25922 和 ATCC 35218 做质控对照,最后根据 CLSI 的敏感性判断标准<sup>[18]</sup>进行结果判读。

## 1.5 WGS 测序分析

**1.5.1 测序:**将沙门氏菌接种于 1 mL LB 肉汤中,37 °C、180 r/min 振荡培养过夜。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取沙门氏菌 DNA。使用微量核酸蛋白浓度测定仪 NanoDrop 检测 DNA 浓度,浓度高于 100 ng/μL 的样品送公司进行 Illumina HiSeq 测序和数据组装。

**1.5.2 血清分型和耐药基因型分析:**根据基因组流行病学中心(CGE)网站中 SeqSero2 血清分型数据库和 ResFinder 抗性基因数据库中的基因组信息建库,创建相应的血清分型数据库和耐药基因数据库<sup>[19]</sup>,采用 CentOS 7.8 系统服务器分析 290 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,对基因型与耐药表型进行对比分析<sup>[7]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 沙门氏菌血清型

常规血清分型方法和全基因组分型方法对 290 株沙门氏菌的血清分型结果详见表 1。对两种方法的检测结果进行比较发现,两种分型方法的总体符合率为 97.6%,其中 283 株沙门氏菌的血

清分型结果完全相同,仅有 7 株分型结果出现差异。两种方法所检测出的主要血清型(均为肠炎和鸡白痢)占比基本一致,其中常规血清分型方法中肠炎沙门氏菌占比为 43.1%,鸡白痢沙门氏菌为 41.4%,而全基因组测序分型结果中的占比分别为 44.1%和 41.4%。

### 2.2 沙门氏菌耐药性

290 株沙门氏菌对 11 种抗菌药物的耐药性与耐药基因携带之间的相关性详见表 2。药敏结果显示,所有沙门氏菌均对美罗培南和氟苯尼考敏感,而对其余 9 种抗菌药物具有不同的耐药率。其中耐药率较高的是磺胺异噁唑(39.3%)、氨苄西林(39.0%)、粘菌素(39.0%)、其次为阿莫西林/克拉维酸(15.9%)、四环素(14.8%)、复方新诺明(9.0%)、头孢噻唑(5.5%)、阿奇霉素(3.4%)和恩诺沙星(2.4%)。

表 1. 常规血清分型与全基因组分型结果比较

Table 1. Comparison of results between routine serotyping and whole genome typing

Routine serotyping	Whole genome typing	No. of strains
Enteritidis	Enteritidis	125
Gallinarum	Gallinarum	120
Infantis	Infantis	9
Tennessee	Tennessee	6
Hadar	Hadar	5
Typhimurium	Typhimurium	5
Senftenberg	Senftenberg	5
Indiana	Indiana	3
Derby	Derby	1
Give	Give	1
/	/	3
Gueuletapee	Enteritidis	1
Abortusequi	Enteritidis	1
Pensacola	Enteritidis	1
Benfica	Meleagridis	1
/	Tennessee	3

/: no result.

表 2. 沙门氏菌表型与基因型的符合情况  
Table 2. The coincidence of phenotype and genotype of *Salmonella* isolates

Antibacterials	Sensitive strains		Resistant strains		Overall coincidence	
	No. of strain	Nos. of related resistance gene-free strain	No. of strains	No. of related resistance gene-carrying strains	No. of strains	Coincidence rate/%
Meropenem	290	290	0	0	290/290	100
Florfenicol	290	290	0	0	290/290	100
Amoxicillin/Clavulanic Acid	244	244	46	46	290/290	100
Azithromycin	280	280	10	10	290/290	100
Enrofloxacin	283	281	7	3	284/290	97.9
Tetracycline	247	243	43	40	283/290	97.6
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	264	258	26	23	281/290	96.9
Ampicilin	177	173	113	106	279/290	96.2
Ceftiofur	274	268	16	11	279/290	96.2
Sulfisoxazole	176	171	114	107	278/290	95.9
Colistin	177	177	113	0	177/290	61.0

WGS 分析预测的沙门氏菌耐药基因与耐药表型之间的符合率较高, 其中预测的美罗培南、氟苯尼考、阿奇霉素和阿莫西林/克拉维酸 4 种抗菌药物的耐药基因与耐药表型完全相符, 即敏感菌株中未发现耐药基因, 而耐药菌株中均携带耐药基因。对恩诺沙星、四环素、复方新诺明、氨苄西林、头孢噻唑、磺胺异噁唑 6 种药物的耐药性分析符合率均大于 95.0%。在对粘菌素耐药和敏感的菌株中均未发现耐药基因, 可能与细菌对粘菌素的耐药机制有关。

沙门氏菌耐药菌株携带的耐药基因型详见表 3。其中, 大部分菌株对所检测药物的耐药性由 1-2 种耐药基因型介导。对磺胺异噁唑耐药的 114 株沙门氏菌中, 出现 3 种耐药基因型, 主要的基因型为 *sul2* (76.6%)。对氨苄西林耐药的 113 株沙门氏菌中, 出现 6 种耐药基因型, 主要为 *bla*<sub>TEM-1</sub> (86.8%)。对阿莫西林/克拉维酸和四环素耐药的沙门氏菌中, 均检测出 3 种耐药基因型, 主

要基因型分别为 *bla*<sub>TEM-1</sub> (95.7%)和 *tetA* (92.5%)。对复方新诺明和头孢噻唑耐药的沙门氏菌中, 发现 4 种耐药基因型, 主要基因型分别为 *dfrA12* (43.4%)和 *bla*<sub>TEM-1B</sub>+*bla*<sub>CTX-M-14</sub> (43.8%)。对阿奇霉素耐药的沙门氏菌中, 均携带 *mph(A)*<sub>2</sub> 耐药基因; 对恩诺沙星耐药的沙门氏菌中, 仅 3 株携带 *oqxA*+*oqxB* 或 *qnrA7* 耐药基因。从沙门氏菌携带的耐药基因推断抗菌药物的耐药性来看, WGS 预测的阿奇霉素和阿莫西林/克拉维酸耐药性结果与药敏结果完全一致, 磺胺异噁唑、氨苄西林和四环素耐药性结果的符合率均高于 90.0%, 但是对恩诺沙星和粘菌素的符合率较低, 具体原因有待进一步分析。

### 3 讨论

#### 3.1 WGS 对沙门氏菌的血清型分析

血清分型数据库的创建促进了 WGS 在沙门氏菌血清分型中的应用。常用的血清分型数据库

表 3. 沙门氏菌耐药菌株中耐药基因型的分布  
Table 3. Distribution of resistance genotypes in *Salmonella* resistant strains

Antibacterial agent	No. of resistant strains	Genotypes	No. of related gene-carrying strains	Coincidence rate/%
Azithromycin	10	<i>mph(A)</i> <sub>2</sub>	10	100
Amoxicillin/Clavulanic Acid	46	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>	44	100
		<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	1	
		<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	1	
Sulfisoxazole	114	<i>sul2</i>	82	93.9
		<i>sul1</i>	14	
		<i>sul2+sul1</i>	10	
		<i>sul3</i>	1	
Ampicillin	113	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>	92	93.8
		<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	7	
		<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	3	
		<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	2	
		<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	1	
		<i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	1	
Tetracycline	43	<i>tetA</i>	37	93.0
		<i>tetA+tetJ+tetC</i>	2	
		<i>tetB</i>	1	
Trimethoprim-sulfamethoxazole	26	<i>sul+sul2+dfrA12</i>	9	88.5
		<i>sul3+dfrA12</i>	1	
		<i>sul1+dfrA1</i>	7	
		<i>sul1+dfrA17</i>	3	
		<i>sul1+dfrA27</i>	3	
Ceftiofur	16	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	7	75.5
		<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	3	
		<i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	1	
		<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>	1	
Enrofloxacin	7	<i>oqxA+oqxB</i>	2	42.9
		<i>qnrA7</i>	1	
Colistin	113	/	/	0

包括 SeqSero 和 SISIR, 目前 SeqSero 已更新到 SeqSero2, 提高了分型数据库的准确性。与 SISTR 数据库相比, SeqSero2 无需借助全基因组多位点序列分型研究, 简化了操作流程, 应用更加便捷<sup>[20]</sup>。因此本研究依据 SeqSero2 血清分型数据库对 290 株沙门氏菌进行了 WGS 血清型分型。

本研究中常规血清分型方法与 WGS 分型方法的总体符合率为 97.6%, 这与其他研究的结果

基本相同。Xu 等<sup>[21]</sup>从美国沙门氏菌监测系统中挑取了 38 株沙门氏菌, 其 WGS 分型结果与原始结果的符合率为 100%。Zhang 等<sup>[22]</sup>通过 WGS 对 308 株已知的沙门氏菌血清型进行分子分析, 其中 304 株的血清分型结果完全一致, 符合率为 98.7%。Diep 等<sup>[23]</sup>从荷兰地区收集的 100 株沙门氏菌中, WGS 预测的 98 株沙门氏菌的血清型与常规分型结果一致, 符合率为 98.0%。Robertson 等<sup>[24]</sup>从 SPA

公共数据库中提取的沙门氏菌 WGS 数据, 鉴定的血清型与原始结果的符合率为 95.0%。

本研究中两种分型方法也出现了不一致的结果, 主要原因在于 H 抗原鉴定结果的差异。其中, 3 株血清结果为 9,12:g,m,s、9,12:d,m,t、9,12:enx 的菌株, WGS 分型方法均鉴定为 9,12:g,m。这与他人研究的结果相似。Zhang 的研究中, WGS 分型结果中有 2 株沙门氏菌(血清型分别为伦敦和韦太夫雷登)未鉴定出相应的 H 抗原, 因而出现了与常规血清分型方法不一致的结果; Robertson 的研究中, 由于奥兹马森(6,714:g,m,t:-)与奥雷宁堡(6,714:m,t:-)的 H 相抗原的相近性, 导致 WGS 血清分型方法与常规分型方法出现不一致的结果。

总之, WGS 分型方法对于常见血清型的预测具有较高准确性。与常规血清分型方法相比, WGS 分型更加快速, 对于需要不同培养基和抗血清才能确定鞭毛(H1 和 H2)的罕见血清型, WGS 仅需数分钟, 而常规血清分型方法则可能长达数周, 有时还需多次重复。因此, 基于 WGS 的分型方法为沙门氏菌血清型的鉴定打开了新的大门, 在沙门氏菌的血清分型方面具有较大的应用价值, 且随着测序技术的提高和数据库的完善, WGS 分型有望成为沙门氏菌血清分型的新标准<sup>[25-26]</sup>。

### 3.2 WGS 对沙门氏菌的耐药性预测分析

细菌耐药性的产生与耐药基因的存在密切相关, 耐药基因的表达决定着细菌耐药性。研究表明 ResFinder 抗性基因数据库在预测耐药基因方面可以检出更多的耐药基因, 是耐药性分析的首选工具<sup>[27]</sup>。

本研究将沙门氏菌全基因组测序数据通过 ResFinder 数据库进行了分析预测, 并与肉汤稀释法得到的耐药表型结果进行比较分析。结果表明,

WGS 预测的沙门氏菌耐药性与耐药表型的符合率较高, 这与其他人的研究结果一致。Neuert 等<sup>[28]</sup>研究了 3415 株沙门氏菌对 15 种抗菌药物的耐药性, 并与基因型的携带情况进行了比较分析, 结果表明两者的一致性为 97.8%。Zankari 等<sup>[29]</sup>预测了的 49 株鼠伤寒沙门氏菌对 17 种抗菌药物的耐药性, 与耐药表型的结果完全一致; 在 Zhu 等<sup>[30]</sup>研究的 189 株沙门氏菌中, WGS 对磺胺异噁唑、氨苄西林和四环素的耐药性预测与其耐药表型的符合率分别为 97.8%、94.6%和 85.7%。

本研究中对于磺胺类、 $\beta$ -内酰胺类和四环素类等主要由耐药基因介导而产生耐药性的抗菌药物来说, 耐药表型与耐药基因型符合率较高, 这与其他研究结果基本一致。Zhu 等<sup>[30]</sup>检出的磺胺类耐药基因为 *sul1*、*sul2* 或 *sul3*, 主要以 *sul2* 为主; 氨苄西林的耐药基因为 *bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>CTX-M</sub>, 主要以 *bla*<sub>TEM</sub> 为主; 四环素耐药基因主要为 *tetA*、*tetB*、*tetC*; 畅晓晖等<sup>[31]</sup>检出的  $\beta$ -内酰胺类耐药基因为 *bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>OXA-1</sub>、*bla*<sub>CTX-M-1</sub>, 四环素耐药基因为 *tetA*、*tetB*; 氟苯尼考耐药基因为 *flor*<sup>[32]</sup>; Mcdermott 等<sup>[33]</sup>检出的阿奇霉素耐药基因为 *mph(A)*, 与本研究结果完全一致。在不携带耐药基因的菌株中, 本研究结果与其他研究的结果也基本相似。Day 等<sup>[34]</sup>预测的阿奇霉素基因型与表型结果完全符合, 所有敏感菌株中均不携带相应的基因型; 在粘菌素耐药的菌株中, 也均未检测到相应的耐药基因型。对于耐药基因型尚不明确或者尚在研究中的抗菌药物, WGS 预测的耐药表型与耐药基因型的符合率相对较低。本研究中粘菌素的耐药性主要与二元调控系统的基因改变有关, 如点突变、插入、缺失等, 而且具体的基因改变位点信息尚未研究清楚, 因此表型和基因型

的符合率相对较低<sup>[35-36]</sup>。而对于恩诺沙星、头孢噻唑的耐药机制主要与染色体介导的突变有关，目前 WGS 只检测到了质粒介导的耐药基因，而对于染色体突变产生的耐药基因则未检出，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<sup>[37]</sup>。

综上，基于基因组的分型方法避免了常规血清分型方法的主观判断的影响，在血清分型中具有较高的应用前景，有望替代常规血清分型方法，耐药基因型对耐药性的预测也为明确耐药机制以及耐药性的检测提供了新的视角和方法<sup>[36]</sup>。当出现新的血清型或耐药基因时，可直接通过 WGS 数据进行检索和分析，无需再次进行常规的细菌培养鉴定，为沙门氏菌血清型和耐药性的分析提供了更加简便的方法。此外，WGS 的应用也促进了食源性致病菌遗传与变异特征、耐药机制等其他方向的研究发展<sup>[38]</sup>，对分析研究不同生态系统中细菌的分子生物学特性以及在传统方法的替代方面必将产生越来越大的影响<sup>[10,33]</sup>。

## 4 结论

本研究用常规检验方法和 WGS 分析方法对我国 290 株鸡源沙门氏菌进行了血清分型和耐药性的研究。相比于常规血清分型、药敏试验，WGS 方法可批量分析沙门氏菌的血清型和耐药性，具有效率高、准确率高和操作简便的优势，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] 朱超, 许学斌. 沙门菌属血清型诊断. 上海: 同济大学出版社, 2009.
- [2] Shah DH, Paul NC, Sischo WC, Crespo R, Guard J. Population dynamics and antimicrobial resistance of the most prevalent poultry-associated *Salmonella* serotypes. *Poultry Science*, 2017, 96(3): 687–702.
- [3] Ghoddusi A, Nayeri Fasaei B, Zahraei Salehi T, Akbarein H. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates in human, chicken, and cattle in Iran. *Archives of Razi Institute*, 2019, 74(3): 259–266.
- [4] Zhang CP, Song L, Cui MQ, Zhao Q, Xu SX. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility to colistin of *Salmonella* spp. from chicken in China. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2018, 52(1): 13–18. (in Chinese)  
张纯萍, 宋立, 崔明全, 赵琪, 徐士新. 我国鸡源沙门氏菌的血清型分布和对黏菌素耐药性的研究. *中国兽药杂志*, 2018, 52(1): 13–18.
- [5] Michael GB, Schwarz S. Antimicrobial resistance in zoonotic nontyphoidal *Salmonella*: an alarming trend? *Clinical Microbiology and Infection*, 2016, 22(12): 968–974.
- [6] Dong MM, Wang XF, Xu YZ, Wang Q, Sun YW, Hang BL, Hu JH. Isolation, identification and analysis of drug resistance of *Salmonella pullorum*. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(9): 2637–2644. (in Chinese)  
董萌萌, 王晓斐, 徐彦召, 王青, 孙亚伟, 杭柏林, 胡建和. 1 例鸡白痢沙门氏菌的分离鉴定与耐药性分析. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(9): 2637–2644.
- [7] Gupta SK, Sharma P, McMillan EA, Jackson CR, Hiott LM, Woodley T, Humayoun SB, Barrett JB, Frye JG, McClelland M. Genomic comparison of diverse *Salmonella* serovars isolated from swine. *PLoS ONE*, 2019, 14(11): e0224518.
- [8] Zhong SH, Feng SW, Li J, Zhou QA, Chen ZX, Xu LS, Liu F, Ma CX, Hu S, Pan Y. Investigation on serotype, drug resistance and drug resistance gene of *Salmonella* in livestock and poultry products of Guangxi. *China animal husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(3): 770–780. (in Chinese)  
钟舒红, 冯世文, 李军, 周庆安, 陈泽祥, 许力士, 柳锋, 马春霞, 胡帅, 潘艳. 广西畜禽产品中沙门氏菌血清型、耐药性及耐药基因调查. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(3): 770–780.
- [9] Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2015.

- [10] Zhao S, Tyson GH, Chen Y, Li C, Mukherjee S, Young S, Lam C, Folster JP, Whichard JM, McDermott PF. Whole-genome sequencing analysis accurately predicts antimicrobial resistance phenotypes in *Campylobacter* spp.. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(2): 459–466.
- [11] Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(11): 2640–2644.
- [12] Tagini F, Greub G. Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2017, 36(11): 2007–2020.
- [13] Gordon NC, Price JR, Cole K, Everitt R, Morgan M, Finney J, Kearns AM, Pichon B, Young B, Wilson DJ, Llewelyn MJ, Paul J, Peto TEA, Crook DW, Walker AS, Golubchik T. Prediction of *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(4): 1182–1191.
- [14] Stoesser N, Batty EM, Eyre DW, Morgan M, Wyllie DH, del Ojo Elias C, Johnson JR, Walker AS, Peto TEA, Crook DW. Predicting antimicrobial susceptibilities for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates using whole genomic sequence data. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(10): 2234–2244.
- [15] 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 2016.
- [16] Grimont P, Weill F. WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella* (9th ed). *Antigenic Formulae of the Salmonella serovars*, 2007: 1–166.
- [17] Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2013.
- [18] Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (version 7.0). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility*. 2017.
- [19] Grüning B, Dale R, Sjödin A, Chapman BA, Rowe J, Tomkins-Tinch CH, Valieris R, Köster J, Team B. Bioconda: sustainable and comprehensive software distribution for the life sciences. *Nature Methods*, 2018, 15(7): 475–476.
- [20] Zhang SK, den Bakker HC, Li ST, Chen J, Dinsmore BA, Lane C, Lauer AC, Fields PI, Deng XY. SeqSero2: rapid and improved *Salmonella* serotype determination using whole-genome sequencing data. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(23): e01746–19. DOI:10.1128/aem.01746-19.
- [21] Xu F, Ge CT, Luo H, Li ST, Wiedmann M, Deng XY, Zhang GT, Stevenson A, Baker RC, Tang SL. Evaluation of real-time nanopore sequencing for *Salmonella* serotype prediction. *Food Microbiology*, 2020, 89: 103452.
- [22] Zhang SK, Yin YL, Jones MB, Zhang ZZ, Deatherage Kaiser BL, Dinsmore BA, Fitzgerald C, Fields PI, Deng XY. *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(5): 1685–1692.
- [23] Diep B, Barretto C, Portmann AC, Fournier C, Karczmarek A, Voets G, Li ST, Deng XY, Klijn A. *Salmonella* serotyping; comparison of the traditional method to a microarray-based method and an *in silico* platform using whole genome sequencing data. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2554.
- [24] Robertson J, Yoshida C, Kruczkiewicz P, Nadon C, Nichani A, Taboada EN, Nash JHE. Comprehensive assessment of the quality of *Salmonella* whole genome sequence data available in public sequence databases using the *Salmonella in silico* typing resource (SISTR). *Microbial Genomics*, 2018, 4(2): e000151. DOI:10.1099/mgen.0.000151.
- [25] Banerji S, Simon S, Tille A, Fruth A, Flieger A. Genome-based *Salmonella* serotyping as the new gold standard. *Scientific Reports*, 2020, 10: 4333.
- [26] Yachison CA, Yoshida C, Robertson J, Nash JHE, Kruczkiewicz P, Taboada EN, Walker M, Reimer A, Christianson S, Nichani A, Committee PCS, Nadon C. The validation and implications of using whole genome sequencing as a replacement for traditional serotyping for a national *Salmonella* reference laboratory. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1044.
- [27] Khezri A, Avershina E, Ahmad R. Plasmid identification and plasmid-mediated antimicrobial gene detection in Norwegian isolates. *Microorganisms*, 2020, 9(1): 52.
- [28] Neuert S, Nair S, Day MR, Doumith M, Ashton PM, Mellor KC, Jenkins C, Hopkins KL, Woodford N, de Pinna E, Godbole G, Dallman TJ. Prediction of phenotypic antimicrobial resistance profiles from whole genome



- sequences of non-typhoidal *Salmonella enterica*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 592.
- [29] Zankari E, Hasman H, Kaas RS, Seyfarth AM, Agersø Y, Lund O, Larsen MV, Aarestrup FM. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(4): 771–777.
- [30] Zhu YT, Lai HM, Zou LK, Yin S, Wang CT, Han XF, Xia XL, Hu KD, He L, Zhou K, Chen SJ, Ao XL, Liu SL. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 259: 43–51.
- [31] Chang XH, Zhang J, Qi HY, Shi S, Yang XY, Yang L, Zhao Z, Li XL, Shi WY, Sun QL, Ma JC, Chen GQ. Genotyping and drug resistance analysis of *Salmonella* in meat in Beijing. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(3): 783–791. (in Chinese)  
畅晓晖, 张捷, 亓合媛, 石嵩, 杨向莹, 杨磊, 赵琢, 李小林, 史文聿, 孙清岚, 马俊才, 陈广全. 北京地区肉类中沙门氏菌全基因组分型及耐药分析. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(3): 783–791.
- [32] Vilela FP, Gomes CN, Passaglia J, Rodrigues DP, Costa RG, Tiba Casas MR, Fernandes SA, Falcão JP, Campioni F. Genotypic resistance to quinolone and tetracycline in *Salmonella* Dublin strains isolated from humans and animals in Brazil. *Microbial Drug Resistance: Larchmont, N Y*, 2019, 25(2): 143–151.
- [33] McDermott PF, Tyson GH, Kabera C, Chen YS, Li C, Folster JP, Ayers SL, Lam C, Tate HP, Zhao SH. Whole-genome sequencing for detecting antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(9): 5515–5520.
- [34] Day MR, Doumith M, Do Nascimento V, Nair S, Ashton PM, Jenkins C, Dallman TJ, Stevens FJ, Freedman J, Hopkins KL, Woodford N, de Pinna EM, Godbole G. Comparison of phenotypic and WGS-derived antimicrobial resistance profiles of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018, 73(2): 365–372.
- [35] Aghapour Z, Gholizadeh P, Ganbarov K, Bialvaei AZ, Mahmood SS, Tanomand A, Yousefi M, Asgharzadeh M, Yousefi B, Kafil HS. Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12: 965–975.
- [36] Li XR, Zhang RH, Yang Y, Cui SH, Guo YC. Whole genome sequencing of foodborne pathogens and global data sharing development. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2020, 32(3): 339–344. (in Chinese)  
李晓然, 张若鸿, 杨洋, 崔生辉, 郭云昌. 食源性致病菌全基因组测序及全球数据共享平台发展趋势. *中国食品卫生杂志*, 2020, 32(3): 339–344.
- [37] Walker TM, Kohl TA, Omar SV, Hedge J, del Ojo Elias C, Bradley P, Iqbal Z, Feuerriegel S, Niehaus KE, Wilson DJ, Clifton DA, Kapatai G, Ip CLC, Bowden R, Drobniewski FA, Allix-Béguec C, Gaudin C, Parkhill J, Diel R, Supply P, Crook DW, Smith EG, Walker AS, Ismail N, Niemann S, Peto TEA, Group (MMM)I. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2015, 15(10): 1193–1202.
- [38] Li X, Qiang B, Xu ZZ, Meng C, Chen X, Jiao XA. Application of whole genome sequencing in bacterial antimicrobial resistance. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2016, 32(8): 696–699. (in Chinese)  
李秀, 强斌, 徐正中, 孟闯, 陈祥, 焦新安. 全基因组测序在细菌耐药性分析中的应用. *中国人兽共患病学报*, 2016, 32(8): 696–699.

# Predictive analysis of whole genome sequencing for *Salmonella* serotype and antimicrobial resistance phenotypes

Lu Zhang, Qingchun Shen, Chunping Zhang\*, Qi Zhao, Mingquan Cui, Ting Li, Min Cheng

China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081

**Abstract:** [Objectives] To evaluate the application of whole genome sequencing technology on the detection of *Salmonella* serotype and antimicrobial resistance phenotype. [Methods] Two hundred and ninety strains isolated from chicken from 1950 to 2015 in China were serotyped and tested for antimicrobial sensitivity. The whole genomes were extracted and sequenced, and the serotype and antimicrobial resistance of each *Salmonella* strain were analyzed by submitting the genomic sequences to SeqSero and ResFinder databases, respectively. Results of serotypes and antimicrobial resistances obtained by conventional detection methods and whole genome sequencing analysis were compared, and the compliance status of two detection methods were analyzed. [Results] The results showed that the major serotypes were *S. enteritidis* and *S. gallinarum* ( $\geq 84.5\%$ ). The coincidence rate of *Salmonella* serotype between the results of conventional detection method and whole genome sequencing analysis was 97.6%. The results of minimal inhibitory concentration to 11 drugs indicated that the *Salmonella* isolates had the higher resistance rate to sulfisoxazole (39.3%), tetracycline (39.0%) and colistin (39.0%), but showed lower resistance rates to other antimicrobial agents. The predicted resistance of meropenem, florfenicol, azithromycin and amoxicillin/clavulanic acid was 100% by whole genome sequencing, and the coincidence rate of enrofloxacin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, ceftiofur, and sulfisoxazole exceeded 95.0%. [Conclusions] High accuracy and sensitivity of whole genome sequencing technology in *Salmonella* serotype and antimicrobial resistance was seen in this study. As an effective tool, whole genome sequencing technology has a good application prospects on serotyping and antimicrobial resistance analysis of *Salmonella*.

**Keywords:** *Salmonella*, whole genome sequencing, serotype, antimicrobial resistance phenotype, resistance genotypes

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0501600)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-62103678; Fax: +86-10-62103678; E-mail: Zhangdona@163.com

Received: 4 March 2021; Revised: 11 May 2021; Published online: 5 June 2021