

研究报告

新疆地区某奶牛场都柏林与姆班达卡沙门氏菌的致病力与耐药性分析

黎雪勤^{1,2}, 赵文娟², 李劼^{*1}, 吴桐忠², 姜美奇^{1,2}, 徐雪可^{1,2}, 王莉莉², 韩猛立², 张星星², 张倩², 钟发钢^{*2}, 黄新²

1 石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子 832000

2 新疆农垦科学院 省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室, 新疆 石河子 832000

黎雪勤, 赵文娟, 李劼, 吴桐忠, 姜美奇, 徐雪可, 王莉莉, 韩猛立, 张星星, 张倩, 钟发钢, 黄新. 新疆地区某奶牛场都柏林与姆班达卡沙门氏菌的致病力与耐药性分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2721-2732.

LI Xueqin, ZHAO Wenjuan, LI Jie, WU Tongzhong, JIANG Meiqi, XU Xueke, WANG Lili, HAN Mengli, ZHANG Xingxing, ZHANG Qian, ZHONG Fagang, HUANG Xin. Pathogenicity and antibiotic resistance of *Salmonella dublin* and *Salmonella mbandaka* from a dairy farm in Xinjiang[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2721-2732.

摘要:【背景】沙门氏菌(*Salmonella*)是重要的人兽共患病病原菌,也是重要的食源性致病菌,其在新疆地区缺少奶牛源的流行菌株信息,对其耐药情况和危害的研究相对缺乏。【目的】了解石河子地区某犊牛腹泻牛场沙门氏菌感染情况,揭示感染病原分型、致病力和耐药性。【方法】采集了腹泻牛肛拭子、环境拭子 55 份。按照国标方法 GB 4789.4—2016 从样本中分离可疑菌株并进行纯化培养,使用革兰氏染色镜检、全自动生化鉴定系统、*stn* 基因、16S rRNA 基因等方法进行鉴定;分析其血清型及多位点序列分型,使用药敏试验(微量肉汤稀释法)、耐药基因、小鼠致病力试验和毒力基因检测进行耐药性和毒力分析。【结果】分离获得 4 株疑似沙门氏菌的病原菌,在沙门氏菌显色培养基上显紫色,镜检可见革兰氏阴性短杆菌;生化鉴定结果与沙门氏菌的相似性为 98%,*stn* 基因扩增片段大小与预期一致。16S rRNA 基因系统进化分析显示分离株与沙门氏菌参考株的相似性为 99%以上。病死牛组织源分离株命名为 Sal135,肛拭子源分离株命名为 Sal141、Sal142、Sal143。Sal135、Sal143 属于都柏林沙门氏菌(*Salmonella dublin*),ST10 型;Sal141、Sal142 属于

资助项目:兵团农业科技创新工程专项(NCG202225);兵团农业关键核心技术项目(NYHXGG-2023AA205);江苏省人兽共患病学重点实验室开放课题(R2308);新疆生产建设兵团重点领域科技攻关计划(2019AB029);中央级公益性科研院所基本科研业务费院级统筹项目,动物疫病数据中心(Y2024JC09);兵团青年科学基金(2024DB029)

This work was supported by the Agricultural Science and Technology Innovation Project of the Xinjiang Production and Construction Corps (NCG202225), the Key Core Technologies Program in Agriculture of the Xinjiang Production and Construction Corps (NYHXGG-2023AA205), the Open Project Program of Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis (R2308), the Key Scientific and Technological Project of the Xinjiang Production and Construction Corps (2019AB029), the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, National Data Center of Animal Health (Y2024JC09), and the Youth Science Foundation of the Xinjiang Production and Construction Corps (2024DB029).

*Corresponding authors. E-mail: LI Jie, hnmlss@163.com; ZHONG Fagang, zfg125@sh.com

Received: 2024-09-19; Accepted: 2024-11-12; Published online: 2025-01-10

姆班达卡沙门氏菌(*Salmonella mbandaka*), ST413 型; 4 株分离株对头孢呋辛、庆大霉素、链霉素均耐药, 对氨苄西林、替加环素、氟苯尼考、多黏菌素 E 和阿奇霉素耐药率为 25%–50%, 其中菌株 Sal143 为七重耐药菌株。所有菌株均携带 *aac(6')-Iaa* 基因, 此外, 菌株 Sal143 还携带有 *aph(3'')-Ib*、*bla_{CTX-M}*、*floR*、*sul2* 和 *tetA*。以约 2×10^7 CFU/mL 剂量对小鼠腹腔注射后, 菌株 Sal135 组死亡率为 60%, 菌株 Sal143 组死亡率为 40%。16 种毒力基因检测结果显示, *invA*、*sipA*、*avrA*、*mgtCB*、*sipC*、*bcfA*、*fimA*、*sopB* 基因的检出率为 100%, 除 *pefA* 基因外其他毒力基因均被检出。

【结论】发现该牛场 4 头犊牛感染了沙门氏菌, 分离株 Sal143 显示多重耐药, 都柏林沙门氏菌菌株的毒力较强且携带 *spv* 族毒力基因, 推测其为致犊牛腹泻的主要病原。

关键词: 沙门氏菌; 分离鉴定; 耐药基因; 毒力基因

Pathogenicity and antibiotic resistance of *Salmonella dublin* and *Salmonella mbandaka* from a dairy farm in Xinjiang

LI Xueqin^{1,2}, ZHAO Wenjuan², LI Jie^{*1}, WU Tongzhong², JIANG Meiqi^{1,2}, XU Xueke^{1,2}, WANG Lili², HAN Mengli², ZHANG Xingxing², ZHANG Qian², ZHONG Fagang^{*2}, HUANG Xin²

1 College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang, China

2 State Key Laboratory for Sheep Genetic Improvement and Healthy Production, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, Xinjiang, China

Abstract: [Background] *Salmonella* is a genus of major zoonotic agents and foodborne pathogens. However, there is limited data on cow-derived strains of *Salmonella* in Xinjiang, and studies remain to be carried out for their antibiotic resistance and pathogenicity. [Objective] To investigate *Salmonella* infections in calves from a dairy farm with the outbreak of diarrhea in Shihezi and reveal the types, virulence factors, and antibiotic resistance of the pathogens. [Methods] A total of 55 anal and environmental swabs were subsequently collected. The isolation of suspected strains were obtained from the samples according to the national standard method GB 4789.4—2016, and purified and cultured. The isolates were identified by Gram staining, microscopic examination, an automated biochemical identification system, and molecular techniques including amplification of *stn* and the 16S rRNA gene. Following serotyping and multi-locus sequence typing, the antibiotic susceptibility testing via minimal inhibitory concentration determination, detection of resistance genes, testing of pathogenicity in mice, and virulence gene detection were carried out for the isolates. [Results] Four suspected *Salmonella* strains were isolated, exhibiting purple colonies on *Salmonella* chromogenic media and appearing as Gram-negative short rods in microscopy. Biochemical identification results indicated 98% similarity to *Salmonella*, and the amplified fragment of *stn* matched the expected size. The phylogenetic analysis of the isolates based on the 16S rRNA gene revealed over 99% sequence homology with the reference strains of *Salmonella*. The isolate from the tissue of the deceased calf was designated Sal135, while those from anal swabs were named Sal141, Sal142, and Sal143. Sal135 and Sal143 were identified as *Salmonella dublin*, ST10, while Sal141 and Sal142 were identified as *Salmonella mbandaka*, ST413. The four isolates exhibited resistance

to cefuroxime, gentamicin, and streptomycin, with the resistance rates to ampicillin, tigecycline, florfenicol, colistin, and azithromycin ranging from 25% to 50%. Among the isolates, Sal143 demonstrated the resistance to seven categories of antibiotics. All the strains carried *aac(6')-Iaa*, and Sal143 additionally carried *aph(3'')-Ib*, *bla_{CTX-M}*, *floR*, *sul2*, and *tetA*. Following intraperitoneal injection into mice at a dose of approximately 2×10^7 CFU/mL, Sal135 and Sal143 induced the mortality rates of 60% and 40%, respectively. Detection of 16 virulence genes revealed that *invA*, *sipA*, *avrA*, *mgtCB*, *sipC*, *bcfA*, *fimA*, and *sopB* were present in all strains, and other virulence genes but *pefA* were detected. **[Conclusion]** Four calves in this farm were found to be infected with *Salmonella*. The isolate Sal143 exhibited multidrug resistance, and the strains of *Salmonella dublin* demonstrated strong virulence and carried the virulence gene cluster *spv*, being the primary pathogens responsible for calf diarrhea.

Keywords: *Salmonella*; isolation and identification; antibiotic resistance gene; virulence gene

沙门氏菌(*Salmonella*)是全球重要的人畜共患食源性致病菌^[1], 由其引发的食物中毒病例数量在我国食源性疾病中已位居首位^[2]。近年来, 各国为预防食品中沙门氏菌污染采取了多项措施, 但根据食源性疾病主动监测网络FoodNet (<https://www.cdc.gov/foodnet/about/index.html>)报告, 2009–2019年间沙门氏菌感染率有所上升^[3], 尤其是牛肉导致的感染率呈现上升趋势^[4]。沙门氏菌感染可导致犊牛高死亡率, 并引起成年牛体重减轻和饲料转化率降低, 给畜牧业带来严重的危害和经济损失。国外牛场最常见的沙门氏菌血清型为鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)、蒙得维的亚沙门氏菌(*S. montevideo*)和都柏林沙门氏菌(*S. dublin*)^[5]; 国内主要流行的血清型为鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*)和都柏林沙门氏菌^[6-8]。新疆作为我国牛的主要产区之一, 牛源沙门氏菌的病原分型特征和感染情况研究较少, 可能存在食源性感染的风险。

本研究对一个曾有沙门氏菌发病史的牛场的犊牛及环境进一步开展病原调查, 通过沙门氏菌的分离鉴定、耐药和毒力分析, 获得病原生物学特征信息和可能存在的感染风险, 以期当地牛场沙门氏菌病的治疗与防控提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品

2023年2月4日, 新疆石河子某集约化牛场80日龄犊牛群体出现腹泻、发热及肺炎症状, 其中5头出现神经症状, 死亡率高达20% (16/80)。为进一步确定病原, 找到可能存在的风险环节, 2月22日对该牛场进行回访, 采集42份腹泻犊牛肛拭子及13份舍中垫料样本进行的细菌分离鉴定。6周龄昆明小鼠购自新疆农业大学, 动物实验由新疆农垦科学院动物伦理委员会审批通过, 审批号: A2024-014。

1.2 主要试剂和仪器

沙门氏菌属诊断血清试剂盒, 宁波天润生物药业有限公司; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline), 北京索莱宝科技有限公司。细菌药物最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration)测试板, 珠海美华医疗科技有限公司。全自动微生物鉴定及药敏分析系统, 梅里埃诊断产品有限公司。

1.3 培养基

木糖赖氨酸脱氧胆酸盐(xylose lysine deoxycholate, XLD)琼脂、亚硫酸铋(bismuth sulfite, BS)琼脂、沙门氏菌显色培养基, 北京陆桥技术股份有限公司; 脑心浸出液琼脂(Brain

heart infusion agar), 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

1.4 病原的分离与鉴定

按照参考文献[9]对样本进行预增菌、增菌、选择性培养处理, 取沙门氏菌显色培养基上紫色可疑菌落接种于脑心浸出液琼脂纯化培养, 进行菌落形态观察与革兰氏染色, 显微镜下观察菌体形态。

1.5 生化鉴定

无菌条件下, 挑取纯培养的单菌落, 按照全自动微生物鉴定及药敏分析系统操作规程进行生化鉴定。

1.6 血清型鉴定

按沙门氏菌属诊断血清试剂盒使用说明书, 采用玻片凝集法进行血清学鉴定。

1.7 PCR 鉴定

采用高温裂解法提取菌株 DNA, 利用 PCR 技术检测特异性基因 *stn*, 引物为 *stn*-F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 *stn*-R (5'-CTTTGGTCGTAAAATAAGGCG-3')。PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Master Mix (with Blue Dye) 10 μL, 引物 *stn*-F/R (10 μmol/L) 各 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 补足 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。阳性样本选用 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增, 引物为 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Master Mix (with Blue Dye) 25 μL, 27F/1492R (10 μmol/L) 各 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 补足 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳检测结果, 将扩增后的 PCR 产物送通用生物(安徽)股份有限公司测序, 采用 BLAST 在 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)比对分析, 确定细菌种属。

1.8 多位点序列分型(multi-locus sequence typing, MLST)

根据牛津大学(<https://pubmlst.org/>)提供的沙门氏菌 7 个管家基因(*aeoC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA*, *thrA*), 以分离株核酸为模板, 参考文献[10]中的引物序列、PCR 反应体系与反应条件进行扩增, 将产物送通用生物(安徽)股份有限公司测序。结果经处理后上传 MLST 官网, 获得单个基因组编号后进入数据库(<https://enterobase.warwick.ac.uk/>)得到相应序列型号(sequence type, ST), 即 ST 型。

1.9 药物敏感性试验

参考美国临床和实验室标准协会抗生素药敏试验标准^[11]并结合临床常用药物(表 1), 利用 MIC 法(微量肉汤稀释法)测定细菌的耐药性。

1.10 毒力基因与耐药基因检测

参考文献[12-13]以细菌基因组为模板, 进行 16 种沙门氏菌常见毒力基因的 PCR 检测, 引物序列见表 2。PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Master Mix (with Blue Dye) 12.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 补足 25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。参考文献[14-15], 以细菌基因组为模板, 进行 12 种沙门氏菌常见耐药基因的 PCR 检测, 引物序列见表 3。PCR 反应体系与 1.7 中 *stn* 基因一致。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.11 致病力试验

取 25 只约 22 g 的近 6 周龄雌性昆明小鼠, 随机分成实验组和对照组, 每组 5 只。实验组分别腹腔注射接种剂量约为 2×10^7 CFU/只的 Sal135、Sal141、Sal142、Sal143 分离株菌液; 对照组小鼠则注射等体积的 PBS。每天观察、记录小鼠的症状、发病和死亡情况, 对对照组和临床症状明显或死亡小鼠进行解剖, 并取病死小鼠肝脏、肺脏、脾脏与血液进行致病菌分离培养。

表 1 药物信息

Table 1 Drug information

药物种类 Drug category	抗菌药物(缩写) Antibacterial drug (abbreviation)	浓度梯度范围 Concentration gradient range ($\mu\text{g/mL}$)	敏感 Sensitive	中介 Intermediary	耐药 Resistant
四环素类 Tetracyclines	四环素 Tetracycline (TET)	1–16	≤ 4	8	≥ 16
	替加环素 Tigecycline (TIG)	0.25–8.00	/	2	≥ 4
头孢烯类 Cephalosporins	头孢呋辛 Cefuroxime (CXM)	4–64	≤ 8	16	≥ 32
	头孢噻肟 Cefotaxime (CTX)	0.25–16.00	≤ 1	2	≥ 4
	头孢他啶 Ceftazidime (CAZ)	0.25–16.00	≤ 4	8	≥ 16
碳青霉烯类 Carbapenems	美罗培南 Meropenem (MEM)	0.125–2.000	≤ 1	2	≥ 4
青霉素类 Penicillins	氨苄西林 Ampicillin (AMP)	2–32	≤ 8	16	≥ 32
	阿莫西林/克拉维酸 Amoxicillin/Clavulanic acid (AMC)	8/4–128/64	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$
大环内酯类 Macrolides	阿奇霉素 Azithromycin (AZM)	2–64	≤ 16	/	≥ 32
氨基糖苷类 Aminoglycosides	链霉素 Streptomycin (STR)	4–32	≤ 8	/	≥ 16
	庆大霉素 Gentamicin (GM)	2–32	≤ 2	4	≥ 8
喹诺酮类 Quinolones	萘啶酸 Nalidixic acid (NAL)	4–32	≤ 16	/	≥ 32
氟喹诺酮类 Fluoroquinolones	恩诺沙星 Enrofloxacin (ENR)	0.12–4.00	≤ 0.25	0.5–1.0	≥ 2
	环丙沙星 Ciprofloxacin (CIP)	0.015–2.000	≤ 0.06	0.12–0.50	≥ 1
磺胺类 Sulfonamides	复方新诺明 Sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT)	0.5–8.0	$\leq 2/38$	/	$\geq 4/76$
多肽类 Polypeptides	多黏菌素 E Colistin (CT)	0.25–8.00	/	2	≥ 4
氯霉素类 Chloramphenicols	氟苯尼考 Florfenicol (FFC)	2–64	≤ 4	8	≥ 16

表 2 毒力基因引物信息

Table 2 Primer information of virulence genes

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)
<i>invA</i> -F	ATTTACCACTCGCATCAA	243	<i>spvA</i> -F	GCTAACTGTCGGGCAAAG	432
<i>invA</i> -R	AAGAAGGGTCGTCGTTAG		<i>spvA</i> -R	GGACAATGGCACGAACCT	
<i>sipA</i> -F	ATAAACTGCCTGACCCTAA	449	<i>spvB</i> -F	CCTGATGTTCCACCACTTTC	590
<i>sipA</i> -R	ACGTGACCACCTTTCCAT		<i>spvB</i> -R	ATGCCTTATCTGGCGATGT	
<i>sseA</i> -F	AAAAGGCTGCGTTTAGTG	300	<i>bcfA</i> -F	CTTTGGCGGAATGTTGTC	235
<i>sseA</i> -R	TTCCTGACGGTATCTCCA		<i>bcfA</i> -R	CTGGCTGGTCTGAGTATCG	
<i>avrA</i> -F	AATGGAAGGCGTTGAATCTG	173	<i>fimA</i> -F	AGACCGCCAGCAAATTAGTGT	321
<i>avrA</i> -R	GAGCTGCTTTGGTCCTCAAC		<i>fimA</i> -R	TGACCTCTACTATTGCGAGTCTG	
<i>mgtCB</i> -F	ACGACATCGCCAGACAGC	165	<i>spvC</i> -F	ACTCCTTGCACAACCAAATGCGGA	571
<i>mgtCB</i> -R	GCCCTAAGCCGCATAACA		<i>spvC</i> -R	TGTCTCTGCATTTCGCCACCATCA	
<i>sipC</i> -F	AGACAGCTTCGCAATCCGTT	446	<i>spvD</i> -F	CCCCTGATGATGAGAAGT	316
<i>sipC</i> -R	ATTATCCCTTCGCGCATCA		<i>spvD</i> -R	ACAGTGGGATTAGACAGC	
<i>sefA</i> -F	GCAGCGTTACTATTGCAGC	321	<i>sopB</i> -F	CATCAGAAGGCGTCTAACC	223
<i>sefA</i> -R	TGTGACAGGGACATTTAGCG		<i>sopB</i> -R	GTGCGTGCTGCAATAAGT	
<i>pefA</i> -F	ACGCTGCCAATGAAGTGA	225	<i>sopE</i> -F	CGAGTAAAGACCCCGCATAC	362
<i>pefA</i> -R	CAGAAGCCCAGGTGATAGTG		<i>sopE</i> -R	GAGTCGGCATAGCACACTCA	

表 3 耐药基因引物信息

Table 3 Primer information of antibacterial resistance genes

基因类别	引物名称	引物序列	产物长度
Gene type	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product length (bp)
氨基糖苷类 Aminoglycosides	<i>aph(3'')-Ib-F</i>	ATGGGCTCGCGATAATGTC	600
	<i>aph(3'')-Ib-R</i>	CTCACCGAGGCAGTTCCAT	
	<i>aac(6')-Iaa-F</i>	TGAATAAAAACCGATCTGGAGCA	422
	<i>aac(6')-Iaa-R</i>	TCAACAACGCCTCCGGTAG	
磺胺类 Sulfonamides	<i>sul1-F</i>	TGGCGTCGCGACTGCGAAAT	813
	<i>sul1-R</i>	TGGTGACGGTGTTTCGGCATTCT	
	<i>sul2-F</i>	CATCATTTTCGGCATCGTC	793
	<i>sul2-R</i>	TCTTGCGGTTTCTTTTCAGC	
	<i>sul3-F</i>	GATAGTTTTTCCGATGGAGG	495
	<i>sul3-R</i>	GAAGCCCATACCCGGATCAAG	
氯霉素类 Chloramphenicols	<i>floR-F</i>	ATGACCACCACACGCCCCG	1 213
	<i>floR-R</i>	AGACGACTGGCGACTTCTCG	
四环素类 Tetracyclines	<i>tetA-F</i>	GCTACATCCTGCTTGCCCTTC	210
	<i>tetA-R</i>	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	
	<i>tetB-F</i>	TCATTGCCGATAACCACTC	247
	<i>tetB-R</i>	GATTGCGTCTCAACCCCTAC	
β-内酰胺类 β-lactam	<i>bla_{TEM}-F</i>	TTGGGTGCACGAGTGGGT	504
	<i>bla_{TEM}-R</i>	TAATTGTTGCCGGAAGC	
	<i>bla_{CTX-M}-F</i>	AGTGAAAGCGAACCGAATC	365
	<i>bla_{CTX-M}-R</i>	CTGTCACCAATGCTTTACC	
多肽类 Polypeptides	<i>mcr-1-F</i>	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	309
	<i>mcr-1-R</i>	CTTGGTCGGTCTGTAGGG	
大环内酯类 Macrolides	<i>mph(A)-F</i>	GCTCGACTATAGGATCGTGATCGC	508
	<i>mph(A)-R</i>	CGTAGAGATCGCCATGCACCAC	

2 结果与分析

2.1 细菌分离鉴定结果

在 55 份样本中分离出 4 株可疑菌株, 在 XLD 培养基上均长出边缘整齐、圆形、中心为黑色的粉红色半透明菌落(图 1A); 在 BS 培养基上长出有棕色晕圈带金属光泽的黑色菌落(图 1B); 在沙门氏菌显色培养基上均长出边缘整齐、圆形、紫色菌落(图 1C)。镜检观察到两端钝圆的革兰阴性无芽孢短杆菌(图 1D)。初步鉴定 4 株分离菌属于沙门氏菌。同时从病死牛肺脏、肝脏、脾脏、淋巴组织中分离到同一特性菌株, 命名为 Sal135; 从肛拭子样本中分离出 3 株菌株, 命名为 Sal141、Sal142、Sal143。

2.2 生化鉴定结果

经全自动微生物鉴定及药敏分析系统鉴定为沙门氏菌属, 结合细菌形态观察判定该分离菌为沙门氏菌。

2.3 血清型鉴定结果

血清型鉴定结果显示 Sal135、Sal141 抗原结构式为 1,9,12,Vi:g,p-, 血清型为都柏林沙门氏菌; Sal142、Sal143 抗原结构式为 6,7,14;z10,e,n,z15,[z37,z45], 血清型为姆班达卡沙门氏菌(*Salmonella mbandaka*)。

2.4 PCR 鉴定及 MLST 结果

沙门氏菌特异性引物 *stn* 基因经 PCR 扩增得到一条 260 bp 的目的条带(图 2), 16S rRNA 基因经 PCR 扩增得到测序结果在 NCBI 数据库中

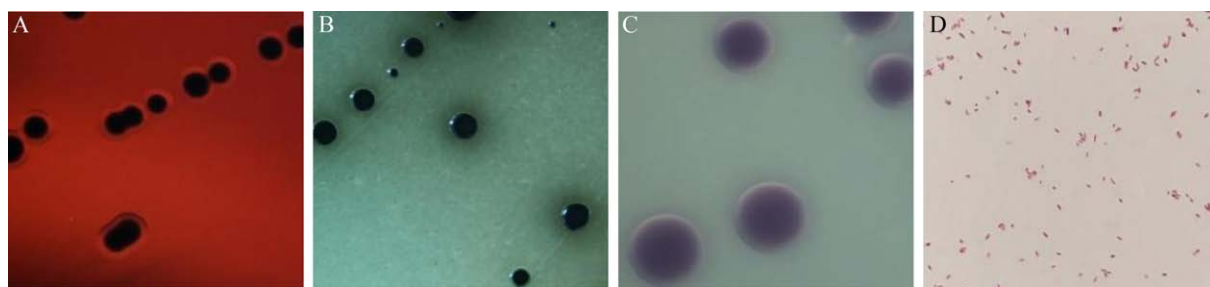


图 1 菌落形态及革兰氏染色结果 A: 沙门氏菌在木糖赖氨酸脱氧胆酸盐培养基上菌落形态(10×); B: 沙门氏菌在亚硫酸铋培养基上菌落形态(10×); C: 沙门氏菌在沙门氏菌显色培养基上菌落形态(20×); D: 革兰氏染色镜检结果(1 000×)。

Figure 1 Colony morphology and gram staining result. A: Colony morphology of *Salmonella* on xylose lysine deoxycholate medium (10×); B: Colony morphology of *Salmonella* on bismuth sulfite medium (10×); C: Colony morphology of *Salmonella* on chromogenic medium (20×); D: Gram staining microscopy results (1 000×).

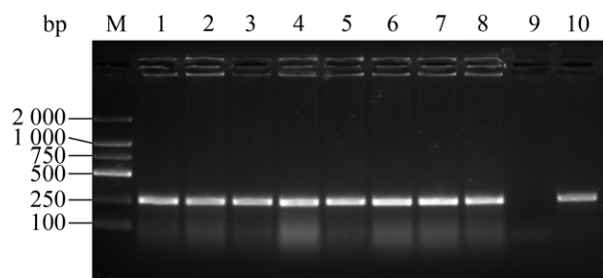


图 2 *stn* 特异性基因扩增结果 M: DL2000 DNA marker; 1: 肺脏; 2: 肝脏; 3: 脾脏; 4: 肺淋巴; 5: 肠淋巴; 6: Sal141; 7: Sal142; 8: Sal143; 9: 阴性对照; 10: 阳性对照。

Figure 2 Amplification results of *stn* specific gene. M: DL2000 DNA marker; 1: Lung; 2: Liver; 3: Spleen; 4: Pulmonary lymph; 5: Intestinal lymph; 6: Sal141; 7: Sal142; 8: Sal143; 9: Negative control; 10: Positive control.

进行 BLAST 分析比对,与已登录的沙门氏菌序列相似性均在 99%以上,在系统发育树上与沙门氏菌处于同一分支(图 3)。MLST 结果显示分离株 Sal135、Sal143 为 ST10 型,与都柏林沙门氏菌参考菌株 FJ997268、MZ452230 聚为一支。菌株 Sal141、Sal142 为 ST413 型,分别与姆班达卡沙门氏菌参考菌株 MG869131、MK883276 聚为一支(图 3)。证明病死牛组织与肛拭子中分离出 2 株都柏林沙门氏菌与 2 株姆班达卡沙门氏菌。

2.5 分离株耐药性检测结果

分离株的 MIC 试验结果见表 4,结果显示 4 株沙门氏菌对环丙沙星、恩诺沙星、萘啶酸、阿莫西林/克拉维酸、美罗培南、复方新诺明、四环素均敏感;对头孢他啶、头孢噻肟、氨苄西林、替加环素、氟苯尼考的耐药率为 25%;对多黏菌素 E 和阿奇霉素的耐药率为 50%;对头孢呋辛、庆大霉素、链霉素均耐药。其中 Sal143 为七重耐药菌株,对 10 种抗生素耐药,耐药性最强。分离株的多重耐药谱型见表 5。

2.6 耐药基因与毒力基因检测结果

12 种耐药基因检测结果(表 6)显示,4 株菌共携带 6 种耐药基因,对 *aac(6')-Iaa* 的检出率为 100%。16 种毒力基因检测统计结果(表 6)显示, *invA*、*sipA*、*avrA*、*mgtCB*、*sipC*、*bcfA*、*fimA*、*sopB* 基因的检出率为 100%,均未检出 *pefA* 基因,其余基因的检出率为 50%。

2.7 致病性试验结果

致病性试验结果显示,Sal135 组小鼠在第 2 天开始精神沉郁,第 3 天出现被毛杂乱,颤栗现象,第 4 天出现结膜炎症状,第 5 天死亡 1 只,第 6 天死亡 2 只。Sal143 组小鼠症状相同,第 6 天死亡 2 只。Sal141、Sal142 组小鼠第 2 天精神沉郁,被毛杂乱,无小鼠死亡。剖检 Sal135、Sal143 组小鼠,发现心耳发黑,肺

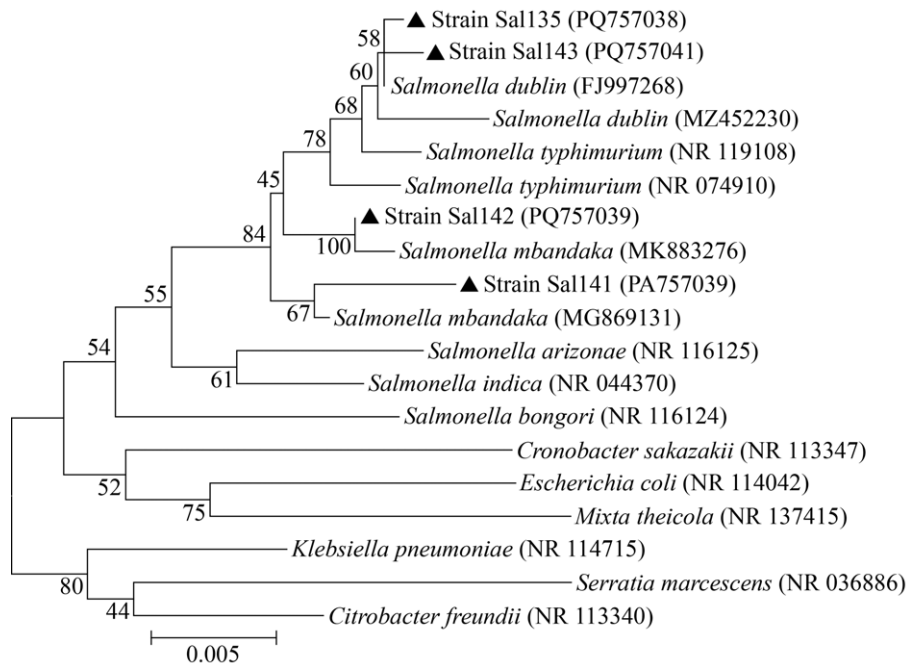


图3 分离株与参考菌株 16S rRNA 基因系统发育树 分支点上的数字表示 1 000 次重复取样 bootstrap 检验置信度值；括号中序号是 GenBank 登录号；标尺刻度 0.005 表示遗传距离的单位；▲：本试验分离株。
Figure 3 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene between isolated strains and reference strains. The numbers in branch points represent the confidence values of bootstrap test with 1 000 repeated samples; Numbers in parentheses are the accession numbers of related strains; Bar=0.005 indicates units of genetic distance; ▲: Isolates from this test.

脏肉变，腹腔积液肝脏肿，肝脏边缘有大量梗死灶黑色，质脆；无菌操作下，从两组死亡小鼠肺脏、肝脏、脾脏及血液中均分离到都柏林沙门氏菌。Sal141 组和 Sal142 组则只有肝脏出现少量出血点，沙门氏菌培养结果为阴性。对照组无组织病变。小鼠 7 d 生存曲线与实验小鼠剖检器官病变见图 4。

3 讨论

沙门氏菌是一类重要的人畜共患传染病病原，牛源沙门氏菌是致犊牛腹泻的重要原因之一^[16]。本研究使用预增菌、增菌、XLD、BS 平板及沙门氏菌显色培养基对可疑菌株进行选择培养与纯化，应用生化试验、*stn* 基因鉴定、血清分型及 16S rRNA 基因测序等多种鉴定方法，获得 4 株沙门氏菌。1 株都柏林沙门氏菌(Sal135，ST10 型，D 群)源于病牛组织，1 株都柏林沙门

氏菌(Sal143，ST10 型，D 群)和 2 株姆班达卡沙门氏菌(Sal141、Sal142，ST413 型，C1 群)源于犊牛肛拭子，分离株血清型对应的 ST 型与大多数研究相同^[17-18]。本研究中 Sal135、Sal143 致病力强于 Sal141、Sal142，携带的毒力基因数量更多。菌株 Sal143 的耐药性最强，为七重耐药，携带 6 种耐药基因。本研究在同一个牛场检出了 2 种不同血清型沙门氏菌。Habing 等在同一个牛场检出了以 C1 血清群流行率较高的 5 种沙门氏菌^[19]，但其未检出都柏林沙门氏菌，说明部分牛场存在沙门菌多种血清型共感染的情况。

本研究中病死犊牛剖检时发现肝脏与淋巴结明显肿大，胆囊、十二指肠及多处浆膜出血，在小鼠致病力实验中出现肝脏、脾脏等组织坏死。都柏林沙门氏菌的致病力结果与李天娇等^[20]对犊牛源都柏林沙门氏菌以 0.368×10^8 CFU/mL 浓度感染小鼠所出现的小鼠

表 4 分离株的药物敏感性试验结果

Table 4 results of drug susceptibility test of isolated strains

抗菌药物 Antibacterial agent	Sal135		Sal141		Sal142		Sal143	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	敏感性 Sensitivity	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	敏感性 Sensitivity	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	敏感性 Sensitivity	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	敏感性 Sensitivity
TET	4	S	4	S	2	S	4	S
TIG	0.5	S	2	S	0.25	S	8	R
CXM	>64	R	64	R	64	R	>64	R
CTX	0.25	S	0.25	S	0.25	S	16	R
CAZ	0.25	S	0.25	S	0.25	S	>16	R
MEM	0.125	S	0.125	S	0.125	S	0.125	S
AMP	4	S	2	S	2	S	64	R
AMC	4/2	S	4/2	S	4/2	S	4/2	S
AZM	8	S	>64	R	16	S	>64	R
STR	16	R	16	R	8	R	32	R
GM	8	R	8	R	8	R	8	R
NAL	4	S	4	S	4	S	8	S
ENR	0.12	S	0.12	S	0.12	S	0.12	S
CIP	0.015	S	0.015	S	0.015	S	0.015	S
SXT	0.5/9.5	S	0.5/9.5	S	0.5/9.5	S	0.5/9.5	S
CT	8	R	0.25	S	0.25	S	8	R
FFC	4	S	8	I	4	S	>32	R

S: 敏感, I: 中介, R: 耐药。

S: Sensitive; I: Intermediate; R: Resistant.

表 5 多重耐药谱型

Table 5 Multiple resistant phenotype

菌株编号 Strain number	耐药谱 Resistant spectrum
Sal135	CXM+STR+GM+CT
Sal141	CXM+AZM+STR+GM
Sal142	CXM+STR+GM
Sal143	CXM+CTX+CAZ+STR+GM+CT+AZM+TET+TIG+AMP+FFC

表 6 分离株耐药基因与毒力基因 PCR 检测结果

Table 6 Results of PCR detection of resistance genes and virulence genes of isolated strains

菌株编号 Strain number	耐药基因 Resistance gene	毒力基因 Virulence gene
Sal135	<i>aac(6')-Iaa</i>	<i>invA</i> , <i>sipA</i> , <i>sseA</i> , <i>avrA</i> , <i>mgtCB</i> , <i>sipC</i> , <i>sefA</i> , <i>spvA</i> , <i>spvB</i> , <i>bcfA</i> , <i>fimA</i> , <i>spvC</i> , <i>spvD</i> , <i>sopB</i> , <i>sopE</i>
Sal141	<i>aac(6')-Iaa</i>	<i>invA</i> , <i>sipA</i> , <i>avrA</i> , <i>mgtCB</i> , <i>sipC</i> , <i>bcfA</i> , <i>fimA</i> , <i>sopB</i>
Sal142	<i>aac(6')-Iaa</i>	<i>invA</i> , <i>sipA</i> , <i>avrA</i> , <i>mgtCB</i> , <i>sipC</i> , <i>bcfA</i> , <i>fimA</i> , <i>sopB</i>
Sal143	<i>aac(6')-Iaa</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	<i>invA</i> , <i>sipA</i> , <i>sseA</i> , <i>avrA</i> , <i>mgtCB</i> , <i>sipC</i> , <i>sefA</i> , <i>spvA</i> , <i>spvB</i> , <i>bcfA</i> , <i>fimA</i> , <i>spvC</i> , <i>spvD</i> , <i>sopB</i> , <i>sopE</i>

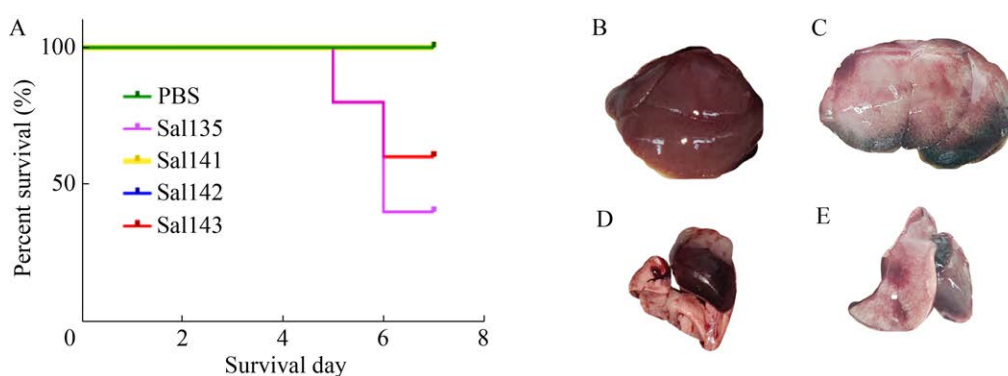


图4 小鼠7d生存曲线与实验小鼠剖检器官病变图 A: 小鼠7d生存曲线; B: 对照组小鼠肝脏; C: Sal135组死亡小鼠肝脏; D: 对照组小鼠心脏与肺脏; E: Sal135组死亡小鼠心脏与肺脏。
Figure 4 Survival curve of mice at 7 days and pictures of dissected organ lesions in laboratory mice. A: Survival curve of mice at 7 days; B: Liver of mice in blank control group; C: Liver of dead mice in Sal135 group; D: Heart and lung of mice in blank control group; E: Heart and lung of mice in Sal135 group.

全身感染症状相近, 而本实验攻毒剂量略低, 表明分离株具有较强致病力。姆班达卡沙门氏菌则仅导致小鼠肝脏出现少量出血点, 没有导致小鼠的死亡, 说明致病力在不同血清型间差异较大。Bolton等^[21]研究说明都柏林沙门氏菌能够穿过M细胞且以微菌落形式侵入肠道并释放大量细胞毒素, 从而对犊牛产生更显著的组织毒性, 这可能是本研究中都柏林沙门氏菌的毒力明显强于姆班达卡沙门氏菌的原因。本研究在4株分离株中同时检出*invA*、*sipA*等8种毒力基因, 此外Sal135、Sal143还检出了毒力岛II (*Salmonella* pathogenicity island 2)的一些典型毒力基因*sseA*^[22], 与菌毛相关基因*pefA*及毒力质粒基因*spv*族基因等, 李偲等^[23]同样在牛源都柏林沙门氏菌检出了这些毒力基因。SPI-2编码的T3SS-2分泌系统可以将20多种效应因子转运到宿主细胞质中, 控制沙门氏菌在上皮细胞和吞噬细胞中的生存和复制^[24]。质粒毒力基因(*spv*)影响沙门氏菌致病过程中黏附、侵入、定殖及宿主的免疫应答^[25], 常引起严重的全身性感染^[26], 可能是都柏林沙门氏菌感染小鼠出现菌血症及病死犊牛出现败血症症状的重要原因。

耐药结果显示4株分离株对头孢烯类、氨基糖苷类、四环素类等七类抗生素耐药, 对头

孢呋辛、链霉素和庆大霉素耐药率为100%, 对多黏菌素E、阿奇霉素耐药率为50%, 与刘勃兴等^[27]报道的牛源沙门氏菌对替米考星、土霉素、磺胺间甲氧嘧啶、复方新诺明高度耐药结果差异较大, 这可能与地区、常用治疗药物等方面有关。4株分离株均携带*aac(6')-Iaa*耐药基因, 其中菌株Sal143还携带*aph(3'')-Ib*、*bla_{CTX-M}*、*floR*、*tetA*、*sul2*基因。菌株Sal143携带耐磺胺类*sul2*基因但对复方新诺明敏感, 可能与试验药物种类不全有关。此外, 其对阿奇霉素耐药但不携带*mphA*耐药基因; 对多黏菌素E耐药而不携带*mcr-1*耐药基因, 推测此菌株可能存在AcrAB外排泵或可分泌多黏菌素溶解蛋白而使其表现出多黏菌素耐药性^[28], 这些现象提示其可能存在新的耐药机制, 需进一步展开研究。经回访发现该牛场存在不规范和大量使用头孢烯类、多黏菌素、氟苯尼考等抗生素的现象, 其产生的环境压力是导致分离株对氨基糖苷类以外的药物产生耐药性的主要原因。菌株Sal135分离自七日龄内犊牛组织, 而菌株Sal141、Sal142、Sal143分离自犊牛肛拭子, 牛场对该犊牛的长期治疗可能是其耐药性较强的原因。致病性较强且难以治疗的都柏林沙门氏菌可能对该牛场产生巨大威胁, 亟待解决这一问题。

初次鉴定沙门氏菌后,对该养殖场提出了环境卫生改善建议。牛场增加了每周更换犊牛舍的垫料的频次,加强了圈舍内卫生消毒工作,后期采集的环境样本中未分离出沙门氏菌,说明环境卫生的改善对沙门氏菌的污染有一定防控作用。本试验从采集的肛拭子中检测到了3株沙门氏菌且源自不同月龄犊牛,说明该牛场仍然存在沙门氏菌污染的风险。

4 结论

本研究成功分离出2株都柏林沙门氏菌和2株姆班达卡沙门氏菌,通过药敏试验、毒力试验和毒力基因检测研究发现分离菌均为多重耐药菌且携带大量毒力基因。分离出的都柏林沙门氏菌可能是导致犊牛死亡的原因,并且其在养殖场中存在一定的流行趋势。发病犊牛所在养殖场依据药敏结果及时使用环丙沙星、恩诺沙星、四环素等高敏感药物,发病情况得到有效控制。

作者贡献声明

黎雪勤:样本采集、开展主要实验并进行数据分析、撰写及修改文章;赵文娟:对药物敏感性试验提供指导;李劼:设计和指导本研究、撰写及修改文章;吴桐忠:对药物敏感性试验提供指导;姜美奇、徐雪可、王莉莉:样本采集;韩猛立:对本研究致病力试验提供指导;张星星:对生物信息学的分析提供指导;张倩:对本研究致病力试验提供指导;钟发钢:设计和指导本研究;黄新:设计和指导本研究、撰写及修改文章。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

[1] HAVELAAR AH, KIRK MD, TORGERSON PR, GIBB HJ, HALD T, LAKE RJ, PRAET N, BELLINGER DC, de SILVA NR, GARGOURI N, SPEYBROECK N, CAWTHORNE A, MATHERS C, STEIN C, ANGULO FJ, DEVLEESSCHAUWER B,

World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. World health organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010[J]. *PLoS Medicine*, 2015, 12(12): e1001923.

[2] 吴宪. 我国食品沙门氏菌污染率与引起的发病率统计分析[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2021. WU X. Statistical analysis of the incidence and contamination rate of *Salmonella* in China[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2021 (in Chinese).

[3] LAUFER AS, GRASS J, HOLT K, WHICHARD JM, GRIFFIN PM, GOULD LH. Outbreaks of *Salmonella* infections attributed to beef: United States, 1973–2011[J]. *Epidemiology and Infection*, 2015, 143(9): 2003–2013.

[4] FERRARI RG, ROSARIO DKA, CUNHA-NETO A, MANO SB, FIGUEIREDO EES, CONTE-JUNIOR CA. Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a meta-analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(14): e00591–19.

[5] WANG YN, LIU Y, LYU N, LI ZY, MA SF, CAO DM, PAN YL, HU YF, HUANG H, GAO GF, XU XB, UNION TB, ZHU BL. The temporal dynamics of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* and predominant serovars in China[J]. *National Science Review*, 2023, 10(3): nwac269.

[6] SIEPKER CL, SCHWARTZ KJ, FELDHAUSER TJ, MAGSTADT DR, SAHIN O, ALMEIDA M, LI GW, HAYMAN KP, GORDEN PJ. *Salmonella enterica* serovar Brandenburg abortions in dairy cattle[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2022, 34(5): 864–869.

[7] WANG J, XUE KL, YI P, ZHU XJ, PENG QJ, WANG ZJ, PENG YC, CHEN YY, ROBERTSON ID, LI X, GUO AZ, ALERI JW. An abattoir-based study on the prevalence of *Salmonella* fecal carriage and ESBL related antimicrobial resistance from culled adult dairy cows in Wuhan, China[J]. *Pathogens*, 2020, 9(10): 853.

[8] XU ZH, WANG M, ZHOU CY, GU GM, LIANG JZ, HOU XJ, WANG ML, WEI P. Prevalence and antimicrobial resistance of retail-meat-borne *Salmonella* in Southern China during the years 2009–2016: The diversity of contamination and the resistance evolution of multidrug-resistant isolates[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 333: 108790.

[9] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验: GB 4789.4—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. National Health and Family Planning Commission, State Food and Drug Administration. National Food Safety Standard Food Microbiology Determination *Salmonella* Determination: GB 4789.4—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).

[10] 李伟. 山东省及周边部分地区沙门氏菌在肉鸭养殖场中的流行特征及致病性分析[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2022. LI W. Epidemiological characteristics and pathogenicity analysis of *Salmonella* isolated from meat duck farms in Shandong province and surrounding areas[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2022 (in Chinese).

- [11] WEINSTEIN MP, LEWIS JS 2nd. The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: background, organization, functions, and processes[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2020, 58(3): e01864-19.
- [12] FARDSANEI F, SOLTAN DALLAL MM, DOURAGHI M, ZAHRAEI SALEHI T, MAHMOODI M, MEMARIANI H, NIKKHAHI F. Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies enterica serotype Enteritidis isolated from meats and eggs[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 107: 451-456.
- [13] 张启龙, 栗云鹏, 傅彩霞, 刘海莹, 张玮, 王林, 吴迪, 刘晓冬, 周德刚. 1 株信鸽源鼠伤寒沙门氏菌的分离鉴定及其耐药性和毒力分析[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(1): 338-347.
- ZHANG QL, LI YP, FU CX, LIU HY, ZHANG W, WANG L, WU D, LIU XD, ZHOU DG. Isolation, identification, drug resistance and virulence analysis of one *Salmonella typhimurium* strain from racing pigeons[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(1): 338-347 (in Chinese).
- [14] 王思敏, 杨江峰, 赵晓锐, 张雷, 郭晶晶, 兰金苹, 于小杰, 王净. 羊源沙门氏菌的分离鉴定及致病性和耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(6): 2385-2396.
- WANG SM, YANG JF, ZHAO XK, ZHANG L, GUO JJ, LAN JP, YU XJ, WANG J. Isolation, identification and analysis of pathogenicity and drug resistance of *Salmonella* from sheep[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(6): 2385-2396 (in Chinese).
- [15] 靳浩展, 李亮, 魏琦麟, 韩依辛, 徐志宏, 康桦华, 向蓉. 屠宰场沙门氏菌耐药性分析和毒力基因检测[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(10): 3943-3952.
- JIN HZ, LI L, WEI QL, HAN YX, XU ZH, KANG HH, XIANG R. Drug resistance analysis and virulence gene detection of *Salmonella* in slaughterhouses[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(10): 3943-3952 (in Chinese).
- [16] ENG SK, PUSPARAJAH P, MUTALIB NA, SER HL, CHAN KG, LEE LH. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance[J]. Frontiers in Life Science, 2015, 8(3): 284-293.
- [17] SREDNIK ME, LANTZ K, HICKS JA, MORNINGSTAR-SHAW BR, MACKIE TA, SCHLATER LK. Antimicrobial resistance and genomic characterization of *Salmonella dublin* isolates in cattle from the United States[J]. PLoS One, 2021, 16(9): e0249617.
- [18] BENEVIDES VP, SARAIVA MMS, NASCIMENTO CF, DELGADO-SUÁREZ EJ, OLIVEIRA CJB, SILVA SR, MIRANDA VFO, CHRISTENSEN H, OLSEN JE, BERCHIERI JUNIOR A. Genomic features and phylogenetic analysis of antimicrobial-resistant *Salmonella mbandaka* ST413 strains[J]. Microorganisms, 2024, 12(2): 312.
- [19] HABING GG, MANNING S, BOLIN C, CUI YH, RUDRIK J, DIETRICH S, KANEENE JB. Within-farm changes in dairy farm-associated *Salmonella* subtypes and comparison to human clinical isolates in Michigan, 2000-2001 and 2009[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(17): 5724-5735.
- [20] 李天娇, 班马泽郎, 李登宇, 张开琴, 赵晓慧, 王保宁, 索朗斯珠. 西藏地区牦牛源沙门菌分离鉴定、血清分型及致病性研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2022, 59(4): 170-177.
- LI TJ, BAN M, LI DY, ZHANG KQ, ZHAO XH, WANG BN, SUO L. Isolation, identification, serotyping and pathogenicity of *Salmonella* from yaks in Xizang[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2022, 59(4): 170-177 (in Chinese).
- [21] BOLTON AJ, OSBORNE MP, WALLIS TS, STEPHEN J. Interaction of *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium* with porcine and bovine terminal ileum *in vivo*[J]. Microbiology, 1999, 145 (Pt 9): 2431-2441.
- [22] CROUSE A, SCHRAMM C, EMOND-RHEAULT JG, HEROD A, KERHOAS M, ROHDE J, GRUENHEID S, KUKAVICA-IBRULJ I, BOYLE B, GREENWOOD CMT, GOODRIDGE LD, GARDUNO R, LEVESQUE RC, MALO D, DAIGLE F. Combining whole-genome sequencing and multimodel phenotyping to identify genetic predictors of *Salmonella* virulence[J]. mSphere, 2020, 5(3): e00293-20.
- [23] 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 YQ, GENG C, LÜ XY, SHI JC, 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).
- [24] HENSEL M, SHEA JE, WATERMAN SR, MUNDY R, NIKOLAUS T, BANKS G, VAZQUEZ-TORRES A, GLEESON C, FANG FC, HOLDEN DW. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella pathogenicity* island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages[J]. Molecular Microbiology, 1998, 30(1): 163-174.
- [25] 侯悦, 刘洁. 肠炎沙门氏菌中侵袭相关毒力基因研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(10): 3867-3873.
- HOU Y, LIU J. Research progress of invasion-related virulence genes in *Salmonella enteritidis*[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(10): 3867-3873 (in Chinese).
- [26] PILLA G, TANG CM. Going around in circles: virulence plasmids in enteric pathogens[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(8): 484-495.
- [27] 刘勃兴, 赵安奇, 柳翠翠, 康圆圆, 马金换, 高桂生, 吴同奎, 史秋梅, 张志强. 犍牛腹泻沙门菌抗菌药敏感性试验与中药体外抑菌试验[J]. 中国兽医杂志, 2021, 57(3): 26-30.
- LIU BX, ZHAO AQ, LIU CC, KANG YY, MA JH, GAO GS, WU TL, SHI QM, ZHANG ZQ. Antibiotic susceptibility test of *Salmonella diarrhea* in calves and *in vitro* bacteriostasis test of traditional Chinese medicine[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2021, 57(3): 26-30 (in Chinese).
- [28] 崔云昊, 刘志诚, 张启迪, 刘德俊, 宋士凯, 衣云鹏, 李秋, 刘志海, 张亚茹, 李道稳. 2022 年青岛地区鸡源和鸭源多黏菌素耐药大肠杆菌流行情况[J]. 中国兽医杂志, 2024, 60(5): 30-38.
- CUI YH, LIU ZC, ZHANG QD, LIU DJ, SONG SK, YI YP, LI Q, LIU ZH, ZHANG YR, LI DW. Epidemiology of colistin-resistant *Escherichia coli* from chicken and duck sources in Qingdao in 2022[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2024, 60(5): 30-38 (in Chinese).