

分类号: Q93-3
学 号: 20222506001

密 级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



鸡源沙门氏菌噬菌体分离鉴定、生物学特性及 全基因组分析

学 位 申 请 人	郝天运
指 导 教 师	胡圣伟 教授
申 请 学 位 类 别	专 业 硕 士
专 业 名 称	生物与医药
研 究 领 域	生物技术与工程
所 在 学 院	生命科学学院

中国·新疆·石河子
2025年5月

分类号: Q93-3
学号: 20222506001

密级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



鸡源沙门氏菌噬菌体分离鉴定、生物学特性及 全基因组分析

学位申请人	郝天运
指导教师	胡圣伟 教授
申请学位类别	专业硕士
专业名称	生物与医药
研究领域	生物技术与工程
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子
2025年5月

**Isolation, identification, biological characteristics, and whole genome
analysis of bacteriophages against *Salmonella* from chicken**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Profession

By

Hao Tian-yun

Dissertation Supervisor: Prof. Hu Sheng-wei

May, 2025

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：赤天运

时间：2025年5月19日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：赤天运

时间：2025年5月19日

导师签名：[Signature]

时间：2025年5月19日

摘要

目的：沙门氏菌是集约化养鸡业的主要病原菌，严重危害到鸡场的健康养殖和动物性食品安全。目前沙门氏菌主要以抗生素进行治疗，但耐药性菌株和药物残留限制了其发展，需要研究新的防治方法。噬菌体是一种天然的裂解细菌的病毒粒子，具有高效专一、环境友好、不影响宿主菌群的特点，被看作解决耐药性问题的方法。本研究分离鉴定鸡源沙门氏菌及其噬菌体，研究鸡源沙门氏菌的耐药性和噬菌体的生物学特性、基因组特征和宿主菌范围，为耐药性沙门氏菌的噬菌体防控提供科学依据。

方法：（1）鸡源沙门氏菌分离鉴定及耐药性检测：从鸡养殖场采集 22 份样品，通过沙门氏菌选择性培养基得到疑似沙门氏菌菌落，利用 PCR 分子生物学方法确定沙门氏菌血清型，并检测沙门氏菌耐药性。

（2）噬菌体分离鉴定、生物学特性分析和宿主裂解谱的测定：以分离菌株为宿主，采用双层琼脂平板法从污水中分离噬菌体，透射电镜观察其形态学特征。测定噬菌体的温度、pH 稳定性、最佳感染复数（MOI）和一步生长曲线（裂解周期、裂解量）。从实验室中随机选择保存的菌株，滴定法测定噬菌体的裂解谱。

（3）全基因组测序与功能注释：利用 Illumina 平台完成噬菌体全基因组测序，使用 VIBRANT、VFDB 和 CARD 数据库进行基因注释及毒力/耐药基因筛查，对基因组编码蛋白功能模块进行注释，结合系统发育树分析噬菌体分类地位，通过基因组多重线性比较不同菌株的基因组结构和功能模块的相似性与差异性。使用 CRISPRCasFinder 预测分离的噬菌体的宿主菌，揭示噬菌体的宿主特异性。

结果：（1）沙门氏菌耐药性特征：本研究获得五种血清型沙门氏菌，分别为 *S. Pullorum* strain、*S. Typhimurium* strain、*S. Enteritidis* strain、*S. Agona* strain、*S. Anatum* strain。耐药性检测发现，分离菌株对克林霉素、克拉霉素和青霉素等常用抗生素耐药严重。

（2）噬菌体分类与生物学特性：从污水中成功分离三株噬菌体，分别为 *vB_SalP_SH1*、*vB_SalP_SH2* 和 *vB_SalT_SH1*，三株噬菌体均为烈性噬菌体。透射电镜和生物信息学分类，*vB_SalP_SH1* 属于 Caudoviricetes 纲下的长尾状噬菌体，*vB_SalP_SH2* 属于 Schitoviridae 科的短尾状噬菌体，而 *vB_SalT_SH1* 属于 Demereviridae 科的肌尾状噬菌体。三株噬菌体在常规养殖环境条件下（温度 $\leq 60^{\circ}\text{C}$ 、pH=5.0-10.0）能保持高效价活性，生物学特性稳定，对裂解宿主菌的潜伏期短，高效快速裂解沙门氏菌，具有潜在应用价值。

（3）基因组特征：三株噬菌体是双链环状 DNA 噬菌体，都含有裂解酶，不含有抗生素抗性基因和毒力因子的相关基因，三株噬菌体都属于可以安全使用的噬菌体。但三株噬菌体的基因组大小差异很大、亲缘关系较远。在宿主裂解模块中，*vB_SalP_SH1* 只含有 Endolysin 蛋白，*vB_SalP_SH2* 含有 spanin 外膜脂蛋白和 Endolysin 蛋白，噬菌体 *vB_SalT_SH1* 含有 Holin 蛋白、spanin 外膜脂蛋白和

Endolysin 蛋白。噬菌体 *vB_SalT_SH1* 对宿主沙门氏菌的裂解能力最强，裂解速度最快，*vB_SalP_SH2* 次之，最后是 *vB_SalP_SH1*。

(4) 噬菌体的宿主预测结果：*vB_SalP_SH1* 感染五种沙门氏菌血清型，又能有效侵染肺炎克雷伯菌和福氏志贺氏菌，具有广泛的宿主适应性；噬菌体 *vB_SalP_SH2* 仅对两种沙门氏菌血清型显示作用，对沙门氏菌呈现出更高的靶向性；噬菌体 *vB_SalT_SH1* 感染四种沙门氏菌血清型，具有防治不同血清型的沙门氏菌感染的潜力。沙门氏菌噬菌体裂解谱的测定实验中三株噬菌体的宿主裂解谱符合宿主预测结果。

(5) 噬菌体基因组多重线性比对结果：*vB_SalP_SH1* 与 *VB_ST_SPNIS2* 有一定的同源性，*vB_SalP_SH1* 的内溶酶基因尚未见报道。*vB_SalP_SH2* 蛋白功能与 *Shigella phage B2* 和 *Salmonella phage S5* 相互补充验证。*vB_SalT_SH1*、*vB_SalS_ABTNLsp9* 和 *vB_Sen-E22* 之间有紧密的亲缘关系。

结论：本研究成功分离鉴定了五种血清型鸡源多重耐药沙门氏菌，并以此为宿主从污水中分离获得三株沙门氏菌噬菌体，对噬菌体的生物学特性和基因组开展了系统分析。结果表明，三株噬菌体均具有良好的环境稳定性和不同范围的宿主裂解能力，且基因组整体较为保守，未检测到已知的毒力基因和耐药基因，具备较高的生物安全性和应用开发价值。

关键词：鸡源沙门氏菌；噬菌体；分离鉴定；生物学特性；全基因组分析

Abstract

Objective: Salmonella is a major pathogen in intensive chicken farming, seriously endangering the health of chicken farms and animal food safety. Currently, Salmonella is mainly treated with antibiotics, but drug-resistant strains and drug residues limit its development, and new control methods need to be studied. Phage, a natural viral particle that lyses bacteria, is highly efficient and specific, environmentally friendly, and does not affect the host flora, and is seen as a solution to the drug resistance problem. In this study, we isolated and identified chicken-origin Salmonella and its phage, and investigated the drug resistance of chicken-origin Salmonella and the biological characteristics, genomic features and host bacterial range of the phage, so as to provide a scientific basis for phage prevention and control of drug-resistant Salmonella.

Methods: (1) Isolation and identification of Salmonella of chicken origin and detection of drug resistance: 22 samples were collected from chicken farms, and suspected Salmonella colonies were obtained by Salmonella selective medium, Salmonella serotypes were determined by PCR molecular biology methods, and Salmonella drug resistance was detected.

(2) Phage isolation and identification, biological characterisation and determination of host lysis profiles: Phages were isolated from sewage using a double-layer agar plate method with the isolate strain as the host, and their morphological characteristics were observed by transmission electron microscopy. The temperature, pH stability, optimal multiplicity of infection (MOI) and one-step growth curve (lysis cycle, lysis volume) of phages were determined. The lysis profiles of phages were determined titrimetrically from randomly selected preserved strains from the laboratory.

(3) Whole genome sequencing and functional annotation: complete phage whole genome sequencing using Illumina platform, use VIBRANT, VFDB and CARD databases for gene annotation and virulence/resistance genes screening, annotate the genome-encoded protein functional modules, analyse phage taxonomic status combined with the phylogenetic tree, and compare the genome structure and functional module similarities and differences of different strains through genome multicollinearity and functional module similarities and differences. The host bacteria of the isolated phages were predicted using CRISPRCasFinder to reveal the host specificity of the phages.

RESULTS: (1) Characterization of drug resistance of Salmonella: In this study, five serotypes of Salmonella were obtained, namely, *S. Pullorum* strain, *S. Typhimurium* strain, *S. Enteritidis* strain, *S. Agona* strain, and *S. Anatum* strain. drug resistance assay revealed that the isolated strains were severely resistant to commonly used antibiotics such as clindamycin, clarithromycin and penicillin.

(2) Phage classification and biological characterization: Three phage strains, *vB_SalP_SH1*,

vB_SalP_SH2 and *vB_SalT_SH1*, were successfully isolated from sewage water, and all three phage strains were potent phages. Transmission electron microscopy and bioinformatics classified *vB_SalP_SH1* as a long-tailed phage belonging to the family Caudoviricetes, *vB_SalP_SH2* as a short-tailed phage belonging to the family Schitoviridae, and *vB_SalT_SH1* as a mycotoxigenic phage belonging to the family Demereciviridae. The three phage strains can maintain high potency activity under conventional culture environment conditions, with stable biological properties, short incubation period for lysing host bacteria, and high efficiency and rapid lysing of Salmonella, which has potential application value.

(3) Genomic characteristics: The three phages are double-stranded cyclic DNA phages, all of them contain lysinase, and do not contain antibiotic resistance genes or genes related to virulence factors, so all three phages belong to phages that can be used safely. However, the genome size of the three phage strains is very different and distantly related. In the host lysis module, *vB_SalP_SH1* contains only Endolysin protein, *vB_SalP_SH2* contains spanin outer membrane lipoprotein and Endolysin protein, and phage *vB_SalT_SH1* contains Holin protein, spanin outer membrane lipoprotein and Endolysin protein. Phage *vB_SalT_SH1* has the strongest ability to lyse host Salmonella and the fastest lytic rate, followed by *vB_SalP_SH2*, and finally *vB_SalP_SH1*.

(4) The results of host prediction of phage: *vB_SalP_SH1* infected five Salmonella serotypes, and also effectively infected Klebsiella pneumoniae and Shigella fumigatus, with a wide range of host adaptability; phage *vB_SalP_SH2* showed effects on only two Salmonella serotypes, and presented a higher targeting of Salmonella; phage *vB_SalT_SH1* infected four Salmonella serotypes and has the potential to combat Salmonella infections with different serotypes. Determination of Salmonella phage cleavage profiles The host cleavage profiles of the three phages in the experiments were consistent with the host prediction results.

(5) Phage Genome Multiple Linear Comparison Results: *vB_SalP_SH1* has some homology with *VB_ST_SPNIS2*. *vB_SalP_SH1* endolysin gene has not yet been reported. *vB_SalP_SH2* protein function was verified with Shigella phage *B2* and Salmonella phage *S5* complementing each other. *vB_SalT_SH1*, *vB_SalS_ABTNLsp9* and *vB_Sen-E22* are closely related to each other.

Conclusion: In this study, five serotypes of multidrug-resistant Salmonella spp. of chicken origin were successfully isolated and identified, and three Salmonella phages were isolated from sewage as hosts, and the biological properties and genomes of the phages were systematically analysed. The results showed that all three phages had good environmental stability and different ranges of host lysis ability, and the genomes of the three phages were relatively conservative, with no known virulence genes or drug resistance genes detected, which possessed high biosafety and application development value.

Key words: chicken-origin *Salmonella*; phage; isolation and identification; biological properties; genome-wide analysis

目录

摘要.....	I
Abstract	III
英文缩略词表.....	VIII
第一章 绪论.....	1
1.1 沙门氏菌的研究进展.....	1
1.1.1 沙门氏菌的概述.....	1
1.1.2 沙门氏菌血清型分类与抗原结构.....	1
1.1.3 沙门氏菌培养与生化特性.....	2
1.1.4 沙门氏菌分子生物学检测技术中 <i>invA</i> 基因与 16S rRNA 的功能解析及协同应用.....	2
1.1.5 沙门氏菌的危害及防控策略.....	3
1.1.6 沙门氏菌耐药性研究进展.....	4
1.1.7 沙门氏菌的耐药机制.....	5
1.2 噬菌体的研究进展.....	6
1.2.1 噬菌体的概述.....	6
1.2.2 沙门氏菌噬菌体的来源.....	6
1.2.3 沙门氏菌噬菌体的生物学特性及分类.....	7
1.2.4 沙门氏菌噬菌体治疗的应用.....	8
1.2.5 沙门氏菌噬菌体的优势与限制.....	9
1.3 本研究的目的是和意义.....	11
1.4 技术路线图.....	12
第二章 鸡源沙门氏菌的分离鉴定及耐药性检测.....	13
2.1 材料.....	13
2.1.1 实验样品.....	13
2.1.2 主要仪器设备.....	13
2.1.3 实验试剂.....	14
2.1.4 试剂及培养基的配置.....	14
2.2 方法.....	15
2.2.1 鸡源沙门氏菌的分离纯化.....	15
2.2.2 革兰氏染色镜检.....	15
2.2.3 分离菌株生化鉴定.....	16
2.2.4 沙门氏菌特异性 PCR 检测.....	16

2.2.5 16S rRNA 基因的测序及遗传进化分析	16
2.2.6 沙门氏菌生长曲线	17
2.2.7 药敏试验	17
2.2.8 菌株保存	17
2.3 实验结果	18
2.3.1 细菌分离结果	18
2.3.2 分离菌生化鉴定结果	18
2.3.3 分离菌特异性 PCR 检测结果	18
2.3.4 分离菌 16S rRNA PCR 扩增分析结果	19
2.3.5 绘制沙门氏菌生长曲线	21
2.3.6 药敏试验结果	21
2.4 讨论	22
2.5 小结	23
第三章 沙门氏菌噬菌体分离及生物学特性研究	24
3.1 材料	24
3.1.1 实验材料	24
3.1.2 主要仪器设备	24
3.1.3 实验试剂	25
3.1.4 试剂及培养基的配置	25
3.2 方法	25
3.2.1 沙门氏菌噬菌体的分离培养	25
3.2.2 沙门氏菌噬菌体验证	26
3.2.3 沙门氏菌噬菌体的纯化	26
3.2.4 沙门氏菌噬菌体的浓缩	26
3.2.5 沙门氏菌噬菌体保存	27
3.2.6 沙门氏菌噬菌体形态观察	27
3.2.7 沙门氏菌噬菌体生物学特性研究	27
3.2.8 沙门氏菌噬菌体裂解谱的测定	29
3.3 实验结果	29
3.3.1 沙门氏菌噬菌体分离鉴定结果	29
3.3.2 沙门氏菌噬菌体形态观察	31
3.3.3 沙门氏菌噬菌体生物特性测定结果	31
3.3.4 沙门氏菌噬菌体裂解谱的测定结果	35
3.4 讨论	36

3.5 小结	38
第四章 沙门氏菌噬菌体全基因组分析	39
4.1 材料	39
4.1.1 实验材料	39
4.1.2 生信软件	39
4.2 方法	40
4.2.1 全基因组测序与质量评估	40
4.2.2 基因组组装	40
4.2.3 基因组基因预测及功能注释	41
4.2.4 噬菌体基因组图谱、全基因组系统发育树绘制与基因组比较分析	41
4.2.5 噬菌体的宿主预测	41
4.3 实验结果	42
4.3.1 噬菌体 <i>vB_SaIP_SH1</i> 全基因组分析	42
4.3.2 噬菌体 <i>vB_SaIP_SH2</i> 全基因组分析	44
4.3.3 噬菌体 <i>vB_SaIT_SH1</i> 全基因组分析	47
4.3.4 噬菌体基因组进化分析	51
4.3.5 噬菌体基因组多重线性比较	52
4.3.6 噬菌体的宿主预测结果	54
4.4 讨论	55
4.5 小结	57
全文结论	58
参考文献	59
致谢	66
作者简介	68

英文缩略词表

缩写	英文名称	中文名称
mL	milliter	毫升
mm	millimeter	毫米
nm	nanometre	纳米
μL	microliter	微升
μm	micrometer	微米
pH	potential of hydrogen	酸碱度
OD	optical density	光密度
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
PFU	plaque-forming unit	噬菌斑形成单位
CFU	clonal formation unit	菌落
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
bp	base paris	碱基对
LB	lysogeny broth	溶菌肉汤
16 S rRNA	16S ribosomal RNA	16S 核糖体核糖核苷酸
SS	salmonella-shigella agar	沙门氏菌-志贺氏杆菌琼脂
MH	Mueller-Hinton Agar	穆勒-欣顿琼脂
BPW	buffered peptone water	缓冲蛋白胨水
SC	Selenite Cystine Broth	硒酸盐半胱氨酸增菌液
SM	Sodium-Magnesium Buffer	钠镁缓冲液
CLSL	Clinical and Laboratory Standards Institute	临床与实验室标准协会
BLAST	basic local alignment search tool	序列比对工具
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
SPI	<i>salmonella</i> pathogen icity island	沙门氏菌毒力岛
CRISPR	clustered regularly interspaced shortp alindromic repeats	规律间隔成簇短回文重复序列
T3SS	type III secretion system	三型分泌系统
WGS	whole genome sequencing	全基因组测序
ESBL	extended-spectrum beta-lactamase	超广谱β-内酰胺酶
FDA	U.S. Food and Drug Administration	美国食品药品监督管理局
TEM	transmission electron microscopy	透射电子显微镜
CDS	Coding sequence	编码序列
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
COG	Clusters of Orthologous Groups of proteins	同源蛋白簇
AMX	Amoxicillin	阿莫西林
CXM	Cefuroxime	头孢呋辛
CIP	Ciprofloxacin	环丙沙星
CLR	Clarithromycin	克拉霉素
CC	Clindamycin	克林霉素
TET	Tetracycline	四环素

英文缩略词表（续表）

缩写	英文名称	中文名称
LEV	Levofloxacin	左氧氟沙星
GEN	Gentamicin	庆大霉素
FOX	Cefoxitin	头孢噻肟
PEN	Penicillin	青霉素
SXT	Trimethoprim-Sulfamethoxazole	复方新诺明
RA	Rifampicin	利福平
NOR	Norfloxacin	诺氟沙星
AMP	Ampicillin	氨苄青霉素
DO	Doxycycline	多西环素
CTR	Ceftriaxone	头孢曲松
S	Streptomycin	链霉素
KAN	Kanamycin	卡那霉素
PB	Polymyxin B	多粘菌素 B
CF	Cephalothin	头孢噻肟
C	Chloramphenicol	氯霉素

第一章 绪论

1.1 沙门氏菌的研究进展

1.1.1 沙门氏菌的概述

沙门氏菌 (*Salmonella*) 隶属于肠杆菌科 (Enterobacteriaceae), 作为全球食源性疾病的重要致病菌, 其公共卫生意义备受关注^[1]。该属微生物的发现可追溯至 1885 年, 由微生物学家 Daniel E. Salmon 和 Theobald Smith 首次从猪霍乱病例中成功分离并确立分类地位^[2]。沙门氏菌属目前包括两个有效物种: 肠道沙门氏菌 (*S. enterica*) 与邦戈尔沙门氏菌 (*S. bongori*), 其中 *S. enterica* 占据了 95% 以上的人类致病菌株, 并进一步细分为六个亚种 (subspecies I -VI) 及超过 2600 个血清型 (serovars)^[3], 常见的致病性沙门氏菌主要来源于肠道沙门氏菌亚种 I 中的血清型, 包括鸡白痢沙门氏菌 (*S. Pullorum*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*S. Typhimurium*) 和肠炎沙门氏菌 (*S. Enteritidis*) 等。

沙门氏菌为革兰氏阴性短杆菌, 菌体呈直杆状, 大小为 (0.6~0.9) $\mu\text{m} \times (1\sim3) \mu\text{m}$, 两端钝圆, 无芽孢结构。其细胞壁外膜由脂多糖 (LPS)、磷脂及外膜蛋白构成, 形成典型的三层膜结构^[4]。多数菌株具有周身鞭毛 (peritrichous flagella), 运动活跃, 但鸡白痢沙门氏菌和鸡伤寒沙门氏菌因鞭毛基因缺失而表现为非运动型^[5]。菌体表面分布的 I 型菌毛 (由 *fim* 基因簇编码) 和质粒介导的毒力相关菌毛 (如 *pef* 菌毛) 在宿主粘附过程中发挥重要作用^[6]。

1.1.2 沙门氏菌血清型分类与抗原结构

沙门氏菌血清分型是基于沙门氏菌细胞表面抗原与血清产生免疫反应进行识别和分类, 主要是依据血清分型系统 (Kauffmann-White 分类方案)。该系统核心抗原结构包括菌体 O 抗原 (脂多糖特异性表位)、鞭毛 H 抗原 (*fliC* 和 *fljB* 基因编码) 和荚膜 Vi 抗原 (聚-N-乙酰半乳糖胺酸), 这些抗原构成了全球公认的沙门氏菌血清型命名系统^[7]。

菌体 O 抗原由重复寡糖单元构成, 化学结构差异决定了 O 抗原的多样性^[8]。O 抗原耐热 (100℃ 2.5 小时不被破坏), 是沙门氏菌血清分型的基础, 目前已知 67 种 O 抗原群, 以阿拉伯数字编号 (如 O:1、O:4、O:9)。例如, O 抗原群 B (O:4,5,12) 对应鼠伤寒沙门氏菌, 而 D1 (O:9,12) 对应肠炎沙门氏菌^[9]。鞭毛 H 抗原: 由鞭毛蛋白 (flagellin) 构成, 具有热不稳定性 (60℃ 30 分钟可被破坏)。H 抗原分为两相: *fliC* 编码第 1 相 (特异性相, 如 i、e、g 等) 和 *fljB* 编码第 2 相 (非特异相, 如 1,2、1,5、1,

7等), 通过位相变异 (phase variation) 实现表达切换^[10]。血清型命名以“H1:H2”形式表示, 例如鼠伤寒沙门氏菌的 H 抗原式为 i:1,2, 而肠炎沙门氏菌为 g,m:- (第 2 相不表达)。Vi 抗原 (荚膜抗原): 仅存在于部分血清型 (如伤寒沙门氏菌 *S. Typhi* 和丙型副伤寒沙门氏菌 *S. Paratyphi C*), 由聚-N-乙酰半乳糖胺酸构成, 覆盖于 O 抗原外侧, 可抑制补体介导的杀菌作用及吞噬细胞识别。Vi 抗原在免疫逃逸中起关键作用, 但其存在可能导致 O 抗原凝集反应被遮蔽, 需通过煮沸处理去除后方可检测^[11]。

具有重要公共卫生意义的血清型包括: 泛宿主型: 鼠伤寒沙门氏菌 (*S. Typhimurium*, O:4,5,12;H:i:1,2) 和肠炎沙门氏菌 (*S. Enteritidis*, O:9,12;H:g,m:-), 主要引发自限性胃肠炎; 宿主适应型: 伤寒沙门氏菌 (*S. Typhi*, O:9,12,Vi+;H:d:-) 专性感染人类, 引发系统性伤寒热; 禽源致病型: 鸡白痢沙门氏菌 (*S. Pullorum*, O:9,12;H:-) 和鸡伤寒沙门氏菌 (*S. Gallinarum*, O:1,9,12;H:-) 可导致禽类高致死率感染^[12]。

1.1.3 沙门氏菌培养与生化特性

沙门氏菌是需氧和兼性厌氧微生物, 最适生长温度为 35–37°C, pH 6.8–7.2, 与其他肠杆菌科细菌相似^[13]。沙门氏菌在普通营养琼脂上培养 24–48h 后, 菌落特征为直径 2–3mm 的圆形、凸起、边缘光滑、半透明灰白色、菌落表面光滑有光泽^[14]。在选择性培养基中, 沙门氏菌在 SS 琼脂中由于不发酵乳糖、还原硫化钠而抑制了革兰氏阳性菌及部分肠杆菌, 沙门氏菌菌落为无色透明菌落, 中央黑色^[15]; 在麦康凯琼脂上由于乳糖发酵较弱或者不发酵, 不能产酸, 菌落一般为无色、半透明或淡粉色、边缘整齐、菌落大小一致, 与大肠杆菌的鲜红或粉红色菌落有明显区别^[16]; 三糖铁 (TSI) 培养基中, 斜面红色 (碱性), 底层黄色 (酸性), 并有黑色硫化氢沉淀产生^[17]。

亚硫酸铋琼脂 (BS 培养基) 是高效选择性鉴别培养基, 主要用于分离沙门氏菌, 尤其是伤寒及副伤寒沙门氏菌^[18]。其核心成分包括亚硫酸铋、煌绿、铁盐及营养物质。亚硫酸铋作为选择剂和指示剂, 与沙门氏菌代谢产生的硫化氢 (H_2S) 反应生成硫化铋 (Bi_2S_3), 形成黑色或墨绿色菌落, 而煌绿 (0.025g/L) 可抑制革兰氏阳性菌及多数非目标菌, 提高选择性。铁盐作为 H_2S 检测的催化剂, 增强显色灵敏度^[19]。与 S S 琼脂和麦康凯琼脂相比, BS 培养基具有高选择性, 高特异性, 高灵敏度, 抗干扰性强, 被 GB 4789.4—2016 列为推荐培养基^[20]。

1.1.4 沙门氏菌分子生物学检测技术中 *invA* 基因与 16S rRNA 的功能解析及协同应用

沙门氏菌分子生物学检测方法由于其高特异性、高灵敏度和快速的特点, 成为目前食品安全监控和临床诊断的主流方法, 其中基于特异性基因靶点 (*invA*) 和通用保

守序列（16S rRNA）的检测体系在不同场景中发挥关键作用。*invA* 基因^[21]（侵袭蛋白 A 基因，*invasion protein A*）是沙门氏菌属所特有的标志物基因，位于毒力岛 SPI-1 (*Salmonella Pathogenicity Island 1*) 内，并编码 III 型分泌系统的跨膜转运蛋白（T S33），沙门氏菌各血清型 *invA* 基因序列保守性高（同源性 >98%）^[22]，其他肠杆菌科细菌（大肠杆菌等）均不含 *invA* 基因，因此 *invA* 基因被 ISO 6579-1:2017 和 FDA 细菌分析手册（BAM）认定为沙门氏菌 PCR 检测的标准靶基因^[23]。以 *invA* 为靶基因，设计正向引物 5'-GTCACCGTGGTCCAGTTT-3'和反向引物 5'-CTCTTTCCAGTACGCT TCG-3'扩增 *invA* 基因的 175bp 片段^[24]，在 3 小时之内即可完成样本中沙门氏菌的定性检测，灵敏度可达 1~10CFU/g，适合食品、排泄物、环境样本的快速筛查，可以避免传统培养法中的假阴性菌株和交叉反应^[25]。相比之下，16S rRNA 是细菌分类学上的通用分子标记，扩增 16S rRNA 的高变区（V3-V4 区）并通过序列比对可以实现到菌属甚至菌种水平的鉴定，16S rRNA 引物（27F:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'，1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'）可覆盖绝大多数细菌种类^[26]，但其对沙门氏菌的检测特异性较差，易与其他近缘菌（柠檬酸杆菌、肠杆菌）产生交叉反应，且不能区分致病性和非致病性沙门氏菌，但在复杂样品（如肠道菌群）的宏基因组研究中具有不可替代的作用，可用于追溯感染源或菌群互作研究^[27]。在检测策略上，*invA* 与 16S rRNA 常形成互补：以 *invA* 特异性 PCR 锁定疑似沙门氏菌阳性样本后，16S rRNA 测序用于确定菌株种属并进行系统发育分析。该组合检测模式结合了 *invA* 靶向检测的高灵敏性与 16S rRNA 基因序列的广谱保守性。通过这一互补策略，不仅提高了检测效率，还有效克服了单一方法容易出现的漏检或假阳性问题。16S rRNA 无法实现种水平的分辨，但 16S rRNA 高通量测序数据可以用来绘制沙门氏菌进化树，反映不同血清型之间的进化关系，如 SNP 分析发现 *S.Enteritidis* 和 *S.Pullorum* 在 16S rRNA 上的差异位点，可以用来分子溯源^[28]。

1.1.5 沙门氏菌的危害及防控策略

沙门氏菌对于鸡养殖的危害有动物健康、生产损失和公共健康三个方面的内容^[29]。动物健康方面，宿主特异性血清型（鸡白痢沙门氏菌和鸡伤寒沙门氏菌）对鸡苗具有致命的伤害。研究表明，1 周龄以内鸡苗感染后病死率达 50%~80%，存活鸡苗多数生长缓慢，成为终生带菌，长大以后产蛋量下降 15%~30%^[30]。非宿主适应性血清型（肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌）虽然不会引起急性死亡，但是可以隐匿式定植在鸡只的肠道、肝和输卵管，造成亚临床感染^[31]。沙门氏菌感染母鸡经卵巢或输卵管污染鸡蛋（垂直传播），蛋内带菌率 10%~30%，孵化后就形成了“带菌鸡苗-污染的环境-更大范围的传染”的恶性循环。生产损失方面，由于沙门氏菌的感染导致饲料转化率下降 10%~20%（因为肠道发炎影响了对营养的吸收），日增重下降 8%~15%，治疗成本提高