

回顾性地使用全基因组测序更好地了解澳大利亚新南威尔士州的姆班达卡肠道沙门氏菌暴发

Cassia Lindsay,^a James Flint,^a Kim Lilly,^a Kirsty Hope,^b Qinning Wang,^c Peter Howard,^c Vitali Sintchenko,^c David N Durrheim^a

通讯作者：James Flint（电子邮箱：james.flint@hnehealth.nsw.gov.au）

背景：姆班达卡肠道沙门氏菌（*Salmonella enterica* serovar Mbandaka）是新南威尔士州（New South Wales, NSW）沙门氏菌病的罕见病原，平均每年报告17例。本研究分析了在一起非点源暴发的有限传播的姆班达卡肠道沙门氏菌暴发中，使用全基因组测序（whole genome sequencing, WGS）方法发挥的更多价值。

方法：2016年2月，新南威尔士州姆班达卡肠道沙门氏菌病例有所增加并受到关注，于是启动了调查。在最初调查后的三个月开展了全基因组测序研究，对姆班达卡肠道沙门氏菌病暴发疫情的分离菌株及从2010年到2015年期间的17个人类和非人类的参考菌株进行分析。

结果：全基因组测序分析将暴发的病例（n = 29）分为两个主要群：A群（n = 11）和B群（n = 6），还有12例散发病例。在评估关联性时，通过全基因组测序聚类对病例的食物消费史重新进行分析，提供了更多有针对性的分析结果。

讨论：WGS已被广泛认为是一种有前途的高分辨率肠道病原体的分型工具。本研究是澳大利亚最早将WGS技术应用于地理分布有限的沙门氏菌聚集性病例的研究之一。WGS明确地将暴发病例区分为不同的群，证明了实时使用这种技术支持地理分布有限的非点源食源性疾病暴发调查的潜在价值。

姆班达卡肠道沙门氏菌（*Salmonella enterica* serovar Mbandaka）是新南威尔士州（NSW）相对罕见的沙门氏菌血清型，过去10年平均每年报告17例病例¹。澳大利亚报告的姆班达卡沙门氏菌已在澳大利亚当地和国外发现，如印度、非洲、印度尼西亚、墨西哥和中国²。在澳大利亚，姆班达卡沙门氏菌已经从鸡肉、花生酱、火鸡肉和咖喱粉等食品中分离出来²。全基因组测序（Whole genome sequencing, WGS）是一种高分辨率的分型方法，可以帮助食源性疾病暴发的调查人员将暴发病例与非暴发病例区分开来³。WGS已被用于美国、大不列颠及北爱尔兰联合王国和欧盟的公共卫生监测⁴⁻⁶。在澳大利亚，几个辖区的参比实验室正在发展WGS能力并评估其在肠道病原体日常监测中的作用⁷。本研究分析了WGS在协助调查人员确定地理分布有限的姆班达卡沙门氏菌社区暴发的感染来源方面的潜在价值。

方法

2016年2月，新南威尔士州亨特新英格兰和中部海岸地方卫生区发现姆班达卡肠道沙门氏菌病例有所增加。确诊病例被定义为2016年1月1日至2016年4月30日期间

的新南威尔士州的任何居民或来访者中实验室确诊的姆班达卡沙门氏菌感染并发病者。2016年2月22日开始对符合病例定义的个人通过电话进行访谈，使用标准的沙门氏菌假设形成问卷收集人口学、临床和危险因素信息，包括发病前七天的旅行史和食物消费史。为了做参照，使用2016年维多利亚州食品消费调查的数据提供健康人群的预期食物消费频率。该数据库包含2016年1月至4月期间维多利亚州约500名随机选择的健康人群的7天食物消费史，这段时间与姆班达卡沙门氏菌暴发时间一致。使用维多利亚州数据库是因为没有同样的新南威尔士州数据库供使用。使用二项式概率对暴发病例的食物消费频率与维多利亚州食物消费调查的食物消费频率进行比较。

在病例访谈时记录疾病发病日期或根据样本采集日期估算疾病发病日期，对失访病例则使用所有其他病例的平均潜伏期。在最初暴发调查后的三个月，回顾性地进行了WGS研究，分析与本次暴发有关的姆班达卡沙门氏菌分离株，并将其与2010-2015年的10株人类菌株和2012-2015年的6株非人类菌株（主要来自新南威尔士州食品管理局的鸡蛋农场涂抹拭子）进行比较。WGS研究由临床病理和医学研究所的新南威尔士

^a 澳大利亚，新南威尔士州，亨特新英格兰卫生系统

^b 澳大利亚，新南威尔士州，新南威尔士卫生防护部门

^c 澳大利亚，新南威尔士州，威斯敏医院，临床病理和医学研究所，传染病和微生物中心

投稿日期：2017年11月9日；发表日期：2018年4月23日

doi: 10.5365/wpsar.2017.8.4.008

州肠道参比实验室开展，该参比实验室属于新南威尔士卫生和病理学机构。对于WGS，使用DNeasy Blood and Tissue 试剂盒 (Qiagen, 希尔登, 德国) 根据产品说明书进行提取和纯化DNA。并按照产品说明书使用Qubit dsDNA HS试剂盒和Qubit荧光计 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 美国) 估计DNA量。对于每个纯化的DNA样品，使用NexteraXT试剂盒 (Illumina, Inc., 圣地亚哥, 加州, 美国) 制备100bp文库，然后汇集并在NextSeq500平台 (Illumina) 上测序。将FastQ文件导入CLC基因组学工作平台 v7.0 (CLC bio, Aarhus, 丹麦)，修剪读数以去除Nextera转座酶接头序列，然后将其定位到参考基因组姆班达卡沙门氏菌株ATCC 51958 (NCBI 基因库登录号: CP019183.1)。

使用单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 分析姆班达卡沙门氏菌之间的基因序列相似性以确定不同的群。使用MEGA7序列分析软件 (<https://www.megasoftware.net>) 通过浓缩的SNP比对产生SNP系统发育树，自展值 (bootstrap value) 为100⁸。

根据WGS确定的群重新分析食物消费史，并与2016年维多利亚州食品消费调查的数据进行比较。在EpiInfo (版本7) 和Microsoft Excel中输入和分析数据。

伦理声明

本项工作是暴发调查的一部分，不需要人类研究伦理委员会的伦理审查和监管。

结果

2016年1月1日至2016年4月30日，共报告29例由姆班达卡沙门氏菌引起的沙门氏菌病例。作为此次暴发调查的一部分，病例的流行曲线如图1所示。疾病发病日期为2016年1月15日至4月14日。7例病例住院，无死亡。病例年龄范围为1至89岁，中位年龄为48岁，其中14例 (48%) 居住在亨特新英格兰地方卫生区，16例 (55%) 为男性，3例 (10%) 为原住民。常见症状包括腹泻 ($n=21$, 95%)，嗜睡 ($n=17$, 85%)，腹痛 ($n=14$, 64%)，发热 ($n=13$, 62%) 和呕吐 ($n=12$, 55%)。症状持续1-10天 (中位数为5天)。

最初的 (在WGS分析之前) 调查未发现病例间有任何共同的饮食场所或购物地点。病例中食用加工奶酪的比例高于预期值；正常人群的预期消费频率为22%，而病例的消费频率为64% (二项式概率 [$P=0.0008$])。然而，经过进一步分析，发现了几种不同品牌的加工奶酪和不同的购买地点，由于没有额外的病例发生，因此未启动食品安全调查。消费频率高于预期的其

它食物包括西瓜 (63%, $P=0.0341$, $P=0.04$)，洋葱 (69%, $P=0.0574$, $P=0.07$) 和青椒 (53%, $P=0.0599$, $P=0.07$)。

WGS分析将最初暴发的病例区分为两个主要群：A群，包括11例SNP距离在12-82之间的病例；B群，包括6例SNP距离在10-25之间的病例 (图2)。除了两个主要的群，WGS还确定了较小的群和几个散发病例。表1显示了用两个主要的群重新分析的食物消费频率。与所有病例相比，A群的病例中食用加工奶酪的比例增加至89% ($P<0.0001$)，而B群中该比例减少至33% ($P=0.5254$) (表1)。

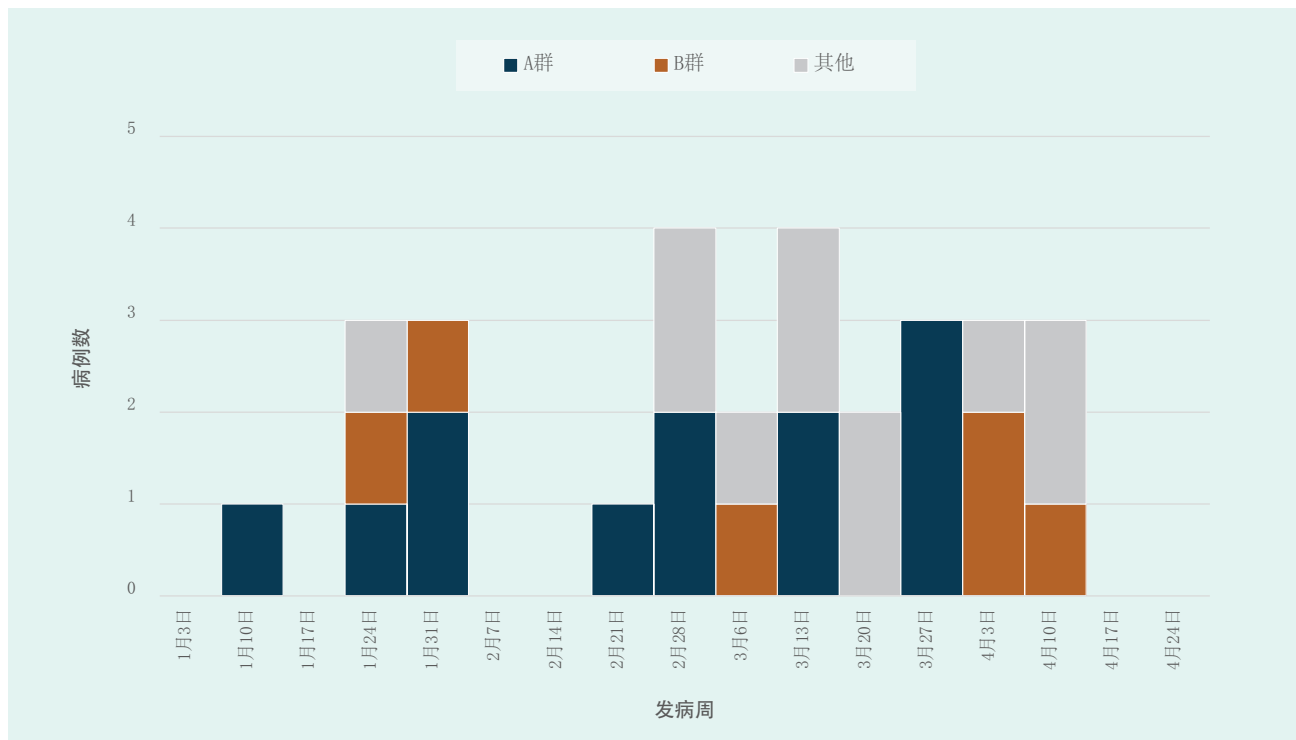
讨论

在国际上，WGS越来越多地被用于加强食源性疾病的监测和应对，因为它能够鉴别病例的分型、追踪感染源，并且与其它实验室技术的周转时间相似^{5,6}。WGS也被用于了解疾病传播途径和确定传播、监测病原体的进化和适应性、以及识别具有潜在在流行可能性的感染并改进控制策略⁹。

在美国的暴发监测中，正在使用WGS技术代替脉冲场凝胶电泳方法对食源性病原体进行亚型分类¹⁰。食源性病原体的WGS技术被美国食品和药物管理局用于监管目的⁵，并且已被证明在暴发调查中区别污染来源很有价值^{11,12}。在欧盟国家和英国，WGS正在被越来越多地用于食源性疾病暴发调查和国家传染病监测^{4,6}。在澳大利亚，WGS被认为是一种很有前途的分型替代方法，然而，由于受到标准化质量控制和数据解释、成本以及设施的限制，这一方法尚未得到广泛使用^{13,14}。WGS正在被澳大利亚卫生部食源性疾病监测和响应网络OzFoodNet试用，并已成功应用于多辖区的食源性疾病暴发和单核细胞增生李斯特菌的常规监测中^{3,15}。

本次姆班达卡沙门氏菌研究是澳大利亚最早将WGS技术应用于地理分布有限的沙门氏菌聚集性病例疫情的研究之一。虽然WGS不是实时进行的，但研究结果证明了这种方法具有支持暴发调查的潜力。WGS能够将姆班达卡沙门氏菌的暴发病例区分为不同的群以及散发病例。基于系统发育聚类食物消费史分析表明，新南威尔士州可能同时发生了两起姆班达卡沙门氏菌暴发。如果WGS能够实时进行，病例将被重新访谈来收集有关食品消费的其它详细信息并进一步开展分析。我们的研究结果支持了早期在新南威尔士州进行的一项研究，该研究回顾性地将WGS应用于五起流行病学证实的鼠伤寒沙门氏菌暴发，发现WGS明显提高了调查的破案率。他们的研究还发现，在其中一次暴发中，食物不止被一种鼠伤寒沙门氏菌污染，突

图1. 2016年1月3日至4月30日新南威尔士州按照不同群分组的确诊姆班达卡沙门氏菌病例 (n = 29) 的发病日期



出了在调查期间有必要对实验室和流行病学信息都要进行评价。

维多利亚州食品消费调查的数据允许调查人员估算健康人群的预期食物消费频率，并使用二项式概率将其与暴发病例中的食物消费频率进行比较。这一方法能够快速形成假设以指导进一步的环境和流行病学调查。由于缺乏同样的新南威尔士州食物消费数据库是本研究的一个局限性。我们假设维多利亚和新南威尔士州的居民食物消费习惯和食品供应非常相似，这样才能形成假设。如果两个人群之间的饮食习惯或食品供应存在潜在的差异，那么我们所得到的关联就需要谨慎解释并用于生成假设而非验证假设。先进实验室工具的快速发展也为公共卫生人员带来了挑战。在公共卫生参比实验室不断地采用WGS技术时，临床实验室越来越多地依靠与培养无关的多重分子板来检测粪便样本中的肠道病原体¹⁶。不再培养肠道病原体将减少获得的菌株数量，而使用WGS技术或者其它依靠培养菌株进行分型的方法都需要有菌株才能开展。作为应对，科学家们正在努力开发基于宏基因组测序的工具来判断粪便样本的特征而无需培养^{7,17}。随着这些检测技术的不断发展，卫生人员需要了解它们如何影响监测系统、暴发探测以及应对活动。

总之，本研究强调了WGS在支持流行病学家调查社区中规模较小的非点源食源性疾病暴发方面的潜在价值。如果能够实时开展，WGS可以帮助查找潜在的感染来源，以指导进一步的调查并协助控制工作。继续应用WGS支持澳大利亚的食源性疾病暴发调查将有助于全球了解这种方法的值，以便能更及时、有效地控制暴发。

利益冲突

无

经费资助

无

致谢

感谢Marion Easton（维多利亚健康和人类服务部）分享维多利亚州食品消费调查的数据，感谢Craig Shadbolt（新南威尔士州食品监督局）提供既往姆班达卡非人类沙门氏菌菌株用于WGS技术。

图2. 新南威尔士州姆班达卡沙门氏菌暴发和非暴发病例的全基因组SNPs产生的系统发育树

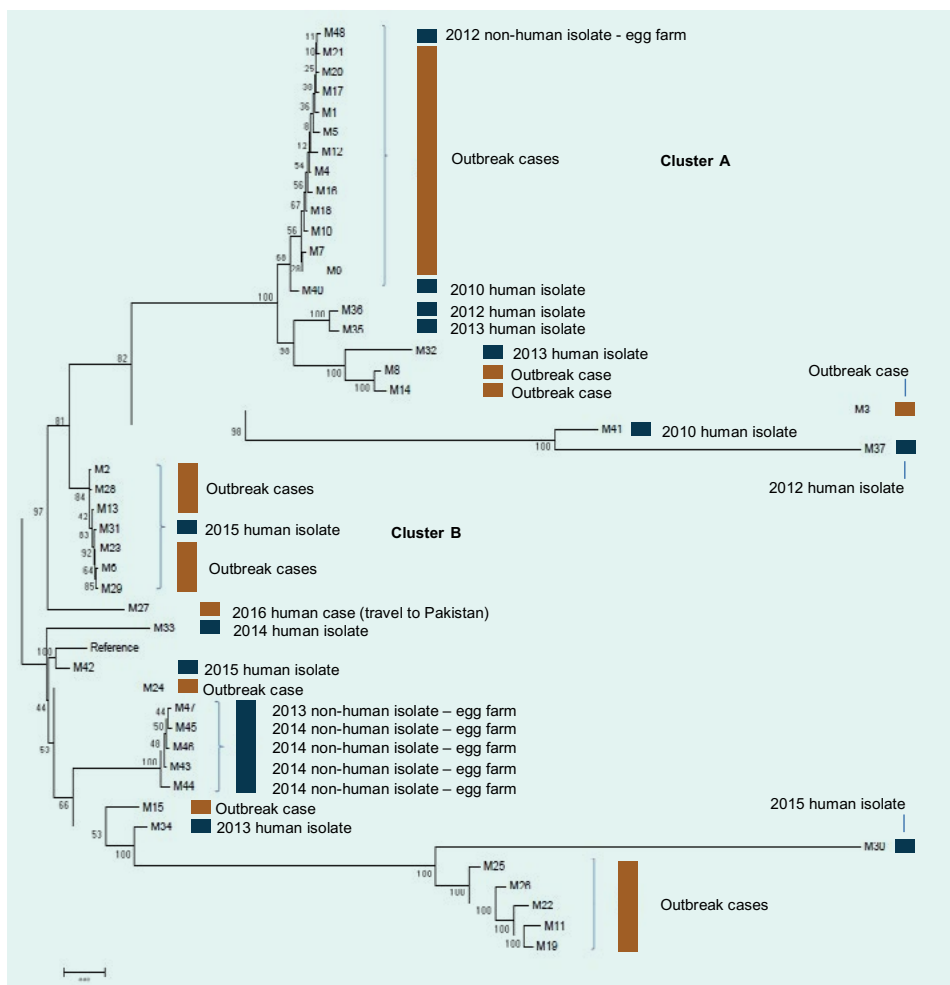


表1. 所有病例以及按照WGS确定的主要群病例的食物消费频率

食物种类	所有病例			WGS-A群			WGS-B群			参照组*		
	食用者	总数	%	食用者	总数	%	食用者	总数	%	食用者	总数	%
西红柿	11	13	85%	9	9	100%	2	3	67%	497	665	75%
胡萝卜	12	16	75%	9	10	90%	3	4	75%	534	662	81%
土豆	10	14	71%	9	9	100%	1	3	33%**	546	667	82%
洋葱	11	16	69%	8	10	80%**	3	4	75%	307	666	46%
鸡肉片	11	16	69%	6	10	60%	3	4	75%	406	664	61%
黑胡椒	11	16	69%	8	10	80%	3	4	75%	427	666	64%
加工奶酪	9	14	64%**	8	9	89%**	1	3	33%	149	665	22%
土鸡蛋	7	11	64%	4	6	67%	2	3	67%	291	446	65%
鸡蛋(任何)	7	11	64%	7	9	78%	3	4	75%	446	665	67%
西瓜	10	16	63%**	8	10	80%**	2	4	50%	245	667	37%
苹果	10	16	63%	6	10	60%	3	4	75%	446	667	67%
香蕉	10	16	63%	6	10	60%	3	4	75%	464	667	70%
牛肉馅	8	14	57%	7	8	88%**	1	4	25%	332	663	50%
青椒	8	15	53%	6	9	66%**	2	4	50%	209	667	31%
葡萄	8	15	53%	4	9	44%	3	4	75%	375	666	56%
红椒	8	15	53%	6	9	67%	2	4	50%	304	667	46%
西兰花	8	15	53%	6	9	67%	2	4	50%	348	665	52%
黄瓜	8	15	53%	5	9	56%	3	4	75%	383	665	58%

* 参照组 = 2016年维多利亚州食物消费调查数据

** 与参照组有统计学学差异 (< 0.05)

参考文献

1. Secure Analytics for Population Health Research and Intelligence (SAPHaRI). Centre for Epidemiology and Evidence. North Sydney: NSW Ministry of Health; 2017.
2. Bates J. Australian Salmonella sources - by serotype: Foodborne Disease Outbreak Toolkit; 2017 (<https://sites.google.com/site/outbreaktoolkit/products-services/salmonella-sources>, accessed 15 March 2018).
3. Phillips A, Sotomayor C, Wang Q, Holmes N, Furlong C, Ward K, et al. Whole genome sequencing of Salmonella Typhimurium illuminates distinct outbreaks caused by an endemic multi-locus variable number tandem repeat analysis type in Australia, 2014. *BMC Microbiol.* 2016 Sep 15;16(1):211. doi:10.1186/s12866-016-0831-3 pmid:27629541
4. Expert opinion on whole genome sequencing for public health surveillance. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2016 (<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/whole-genome-sequencing-for-public-health-surveillance.pdf>, accessed 15 March 2018).
5. Examples of how FDA has used whole genome sequencing of foodborne pathogens for regulatory purposes. Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration, 2017 (<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/WholeGenomeSequencingProgramWGS/ucm422075.htm>, accessed 15 March 2018).
6. Ashton PM, Nair S, Peters TM, Bale JA, Powell DG, Painset A, et al.; Salmonella Whole Genome Sequencing Implementation Group. Identification of Salmonella for public health surveillance using whole genome sequencing. *PeerJ.* 2016 Apr 5;4(4):e1752. doi:10.7717/peerj.1752 pmid:27069781
7. Octavia S, Wang Q, Tanaka MM, Kaur S, Sintchenko V, Lan R. Delineating community outbreaks of Salmonella enterica serovar Typhimurium by use of whole-genome sequencing: insights into genomic variability within an outbreak. *J Clin Microbiol.* 2015 Apr;53(4):1063–71. doi:10.1128/JCM.03235-14 pmid:25609719
8. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016 Jul;33(7):1870–4. doi:10.1093/molbev/msw054 pmid:27004904
9. Sintchenko V, Holmes EC. The role of pathogen genomics in assessing disease transmission. *BMJ.* 2015 May 11;350(may111):h1314. doi:10.1136/bmj.h1314 pmid:25964672
10. Carleton HA, Gerner-Smidt P. Whole-genome sequencing is taking over foodborne disease surveillance. *Microbe.* 2016;11(7):311–7.
11. Allard MW, Luo Y, Strain E, Pettengill J, Timme R, Wang C, et al. On the evolutionary history, population genetics and diversity among isolates of Salmonella Enteritidis PFGE pattern JEGX01.0004. *PLoS One.* 2013;8(1):e55254. doi:10.1371/journal.pone.0055254 pmid:23383127
12. Lienau EK, Strain E, Wang C, Zheng J, Ottesen AR, Keys CE, et al. Identification of a salmonellosis outbreak by means of molecular sequencing. *N Engl J Med.* 2011 Mar 10;364(10):981–2. doi:10.1056/NEJMc1100443 pmid:21345093
13. Ensuring national capacity in genomics-guided public health laboratory surveillance. Canberra: Department of Health, 2015 (<http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/ohp-phln-pubs-genome-sequencing-report.htm>, accessed 15 March 2018).
14. Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology.* 2015 Apr;47(3):199–210. doi:10.1097/PAT.000000000000235 pmid:25730631
15. Marder EP, Cieslak PR, Cronquist AB, Dunn J, Lathrop S, Rabatky-Ehr T, et al. Incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food and the effect of increasing use of culture-independent diagnostic tests on surveillance - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. sites, 2013–2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2017 Apr 21;66(15):397–403. doi:10.15585/mmwr.mm6615a1 pmid:28426643
16. Wang Q, Holmes N, Martinez E, Howard P, Hill-Cawthorne G, Sintchenko V. It is not all about SNPs: Comparison of mobile genetic elements and deletions in *Listeria monocytogenes* genomes links cases of hospital-acquired listeriosis to the environmental source. *J Clin Microbiol.* 2015;53(11):3492–500. doi:10.1128/JCM.00202-15 pmid:26311854
17. Cronquist AB, Mody RK, Atkinson R, Besser J, D'Angelo MT, Hurd S, et al. Impacts of culture-independent diagnostic practices on public health surveillance for bacterial enteric pathogens. *Clin Infect Dis.* 2012 Jun;54(5) Suppl 5:S432–9. doi:10.1093/cid/cis267 pmid:22572666