

## 研究报告

## 安徽部分地区动物源弯曲菌的分离鉴定及多位点序列分型

秦祥 刘茜 刘丹丹 王佳明 王勇 周杰\*

(安徽农业大学动物科技学院 安徽省兽医病理生物学与疫病防控实验室 安徽 合肥 230036)

**摘要:**【背景】弯曲菌是一种重要的食源性人兽共患病原菌,革兰氏阴性、微需氧、弯曲螺旋状。【目的】为了解安徽地区弯曲菌流行状况和分子遗传特征,对安徽6个不同地区动物源的弯曲菌进行分离鉴定,并研究分离株分子分型。【方法】通过形态学及培养特性观察、生化试验、PCR方法对菌株进行鉴定。以弯曲菌7个管家基因 *aspA*、*glnA*、*gltA*、*glyA*、*pgm*、*tkl* 和 *uncA* 为目的基因对分离株进行多位点序列分型,并制成遗传进化树。【结果】共分离到42株弯曲菌菌株,源自6个地区的分离株具有较为一致的形态特性和相似的生化特性。多位点序列分型结果显示,本研究中共获得32种ST型,共发现9种新的ST型(8190、8222、8223、8831、8833、8841、8832、8834和8843)和6个新的等位基因(*glnA*606、*glnA*607、*gltA*518、*glyA*680、*pgm*863和*uncA*541)。进化树结果显示,空肠弯曲菌与结肠弯曲菌遗传关系相差甚远,聚集归为两个大群,分别有5个分支和3个分支。【结论】安徽6个地区不同来源的空肠弯曲菌与结肠弯曲菌均有丰富的基因型,且没有明显优势的基因型。从遗传变异的角度来看,空肠弯曲菌复杂多样,结肠弯曲菌相对保守。

**关键词:** 空肠弯曲菌, 结肠弯曲菌, 分离鉴定, 多位点序列分型

## Isolation, identification and multilocus sequence typing of *Campylobacter* from animal source in Anhui province

QIN Xiang LIU Qian LIU Dan-Dan WANG Jia-Ming WANG Yong ZHOU Jie\*

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Anhui Veterinary Pathobiology and Disease Control Lab, Hefei, Anhui 230036, China)

**Abstract:** [Background] *Campylobacter* is a Gram-negative microaerobic bacterium. It is a major foodborne pathogen and causes human gastroenteritis worldwide. [Objective] This study was to isolate, identify and molecular type *Campylobacter* from animal in six different areas of Anhui province. [Methods] The strains were identified by morphological and culture characteristics, biochemical tests and PCR. Seven *Campylobacter* housekeeping genes including *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkl* and *uncA* were amplified by PCR and sequenced, and then the sequences of genes were

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31602063); University Natural Science Foundation of Anhui Province (kj2016A839)

\*Corresponding author: Tel: 86-551-65786328; E-mail: zhoujie@ahau.edu.cn

**Received:** June 30, 2017; **Accepted:** September 19, 2017; **Published online** (www.cnki.net): September 26, 2017

**基金项目:** 国家自然科学基金(31602063); 安徽省高校自然科学基金重点项目(kj2016A839)

\*通信作者: Tel: 86-551-65786328; E-mail: zhoujie@ahau.edu.cn

**收稿日期:** 2017-06-30; **接受日期:** 2017-09-19; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2017-09-26

analyzed using multilocus sequence typing (MLST) database and evolutionary tree. **[Results]** There were a total of 42 strains of *Campylobacter* were isolated from six areas. The isolates had more consistent morphological characteristics and similar biochemical properties. MLST results show that 32 sequence types, 9 new sequence types (including 8190, 8222, 8223, 8831, 8833, 8841, 8832, 8834 and 8843) and 6 new allelic profiles (including *glnA606*, *glnA607*, *gltA518*, *glyA680*, *pgm863* and *uncA541*) were found. Evolutionary tree results show that *C. jejuni* and *C. coli* genetic relationship is very different and belong to two groups, which have five branches and three branches, respectively. **[Conclusion]** *C. jejuni* and *C. coli* have rich genotypes in Anhui province, and there is no obvious dominant genotype. From the perspective of genetic variation, *C. jejuni* is more complex and diverse, while *C. coli* is relatively conservative.

**Keywords:** *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, Isolation and identification, Multilocus sequence typing (MLST)

弯曲菌(*Campylobacter*)是微需氧、弯曲螺旋状、革兰氏阴性小杆菌[(0.2–0.8)  $\mu\text{m}$  × (0.5–5.0)  $\mu\text{m}$ ], 常作为一种共生菌存活在各种鸟类以及哺乳动物消化道内, 是一种食源性的人兽共患病原菌。弯曲菌属共有 20 个种和亚种, 其中最为常见的是空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*, *C. jejuni*)和结肠弯曲菌(*Campylobacter coli*, *C. coli*)<sup>[1]</sup>。*C. jejuni* 不仅可以引起人类腹泻, 它还被证实是一种人类神经系统瘫痪疾病吉兰巴雷氏综合征(Guillain-Barre syndrome, GBS)重要的前驱因子<sup>[2]</sup>, 此外, 它还能导致人类 Millere-Fisher 综合征(MFS)和反应性关节炎(Reactive arthritis, RA)等疾病<sup>[3–4]</sup>。弯曲菌致病 93.4% 都是由空肠弯曲菌引起的, 也有 2.3% 是结肠弯曲菌引起的。弯曲菌自 1972 年从人的粪便样品中被分离得到, 几十年来对其研究热度一直不减, 而且有学者报道弯曲菌已超过沙门氏菌成为导致人类腹泻的主要致病菌<sup>[5]</sup>, 但其致病机制仍不明确<sup>[6]</sup>。虽然关于空肠弯曲菌在动物致病方面的研究较少, 但绝大多数禽类肠道中都存在弯曲菌的定殖<sup>[7]</sup>, 可达  $10^8$  CFU/g, 如此高的带菌浓度虽然不会引起禽类发病<sup>[8]</sup>, 但欧洲食品安全局已经证实人类 80% 的弯曲菌感染是由禽类广泛带菌引起的<sup>[9]</sup>, 足以说明带菌动物可对人类构成严重威胁。

多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST)是近年来发展很快的分子生物学分型方法, 具有很高的分辨能力和重复性。MLST 不仅用于分子流行病学研究, 也可用于遗传进化关系等相关研

究。2009 年 Nielsen 等<sup>[10]</sup>应用 MLST 检测丹麦 GI (Gastroenteritis, 胃肠炎)、GBS 及 RA 患者空肠弯曲菌分离株的多样性和种群结构。2016 年 Mughini-Gras 等<sup>[11]</sup>运用 MLST 分型方法调查了卢森堡和荷兰的地表水中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的起源。目前国内相关研究较少, 仅见薛峰等<sup>[12]</sup>、Zhang 等<sup>[13]</sup>和董俊等<sup>[14]</sup>用 MLST 方法分别对华东地区、华北地区及湖北地区空肠弯曲菌分离株进行分子分型。

由于安徽地区空肠弯曲菌及结肠弯曲菌暂无相关数据, 本研究遂以空肠弯曲菌 *hipO* 基因和结肠弯曲菌 *ceuE* 基因分别设计一对特异性引物对安徽部分地区分离获得的弯曲菌可疑菌株进行 PCR 鉴定<sup>[15–16]</sup>, 并使用 MLST 方法对这些菌株进行分子分型研究, 为分析安徽地区弯曲菌流行状况和分子遗传特征提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

选择安徽省合肥、六安、阜阳、滁州、安庆、铜陵 6 个地区多家畜禽养殖场, 用无菌棉签采集盲肠内容或肛拭子, 插入制备好的 Cary-Blair 氏运送培养基 4 °C 暂时保存, 12 h 内带回实验室并接种到选择平板培养。菌株信息见表 1。

### 1.2 质控菌株

空肠弯曲菌标准株 ATCC33291 由上海慧耘生物科技有限公司代购自美国菌种保存中心。

表 1 实验中使用的菌株

Table 1 The strains used in the study

Isolate area	Sources	Number of isolates	Samples
Hefei	Chicken	11	HFJ (62–65, 80, 81, 91, 94, 95, 97, 98)
	Duck	5	HFY (15, 41, 42, 48, 67)
	Goose	1	HFE 29
Tongling	Chicken	1	TLJ 71
	Duck	4	TLY (6, 8, 9, 72)
LuAn	Chicken	5	LAJ (53, 77–79, 90)
	Goose	2	LAE (74, 93)
	Pig	6	LAZ (82–87)
Chuzhou	Chicken	2	CZJ (75, 76)
Anqing	Chicken	2	AQJ (60, 61)
Fuyang	Chicken	1	FYJ 96
	Duck	2	FYY (68, 70)

1.3 培养基、主要试剂和仪器

Bolton 肉汤及添加剂、布氏肉汤、改良的 CCD 琼脂基础培养基(mCCDA)及添加剂、哥伦比亚血琼脂基础、Cary-Blair 氏运送培养基、改良的 Skirrow 氏琼脂基础培养基及添加剂、氧化酶试纸、1%马尿酸钠细菌微量生化鉴定管购自青岛海博生物科技公司; 无菌脱纤维绵羊血、革兰氏染色液购自北京索莱宝公司; 水和茚三酮购自天津光复科技发展有限公司; 2.5 L 厌氧罐和微需氧产气袋购自英国 Oxoid 公司; 2×EasyTaq PCR SuperMix 购自北京全式金生物公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA Marker 购自美国 Biomiga 公司。PCR 仪、凝胶成像仪购自美国伯乐公司。

1.4 分离培养

弯曲菌的分离培养方法参照文献[17]。将 Cary-Blair 氏运送培养基内棉签接种于弯曲菌选择培养基 Skirrow 血平板, 四区划线, 置于厌氧罐, 加入微需氧产气袋, 42±1 °C 培养。48 h 后挑取 Skirrow 血平板上可疑单菌落, 再次接种到 Skirrow 血平板进行纯化, 42±1 °C 微需氧培养。48 h 后挑取纯菌落涂片革兰氏染色镜检, 将可疑菌株接种于哥伦比亚血平板, 微需氧 42±1 °C 培养 36 h, 进行生化试验, 同时将可疑菌株接种到 10 mL 布氏肉汤

中, 与哥伦比亚血平板一同置于厌氧罐培养, 36 h 后留种并制备 DNA 模板。

1.5 生理生化试验

氧化酶试验、微需氧条件下 25±1 °C 生长试验、有氧条件下 42±1 °C 生长试验、过氧化氢酶试验、马尿酸钠水解试验参照国标 GB4789.9-2014 进行。

1.6 细菌总 DNA 提取

参照 Biomiga 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书, 制备高纯度 DNA 模板, -20 °C 保存备用。

1.7 引物设计与合成

根据 GenBank 中空肠弯曲菌特有的 *hipO* (马尿酸酶基因)序列与结肠弯曲菌 *ceuE* (一种铁转运蛋白的结合蛋白)序列, 分别设计一对特异性引物(表 2), 用于 PCR 鉴定空肠弯曲菌和结肠弯曲菌。参考 MLST 网站(<http://www.mlst.net/>)中 MLST 分型方案, 分别合成空肠弯曲菌与结肠弯曲菌 7 对管家基因扩增引物及 7 对测序引物(表 2)。所有引物均由上海捷瑞生物公司合成。

1.8 *hipO*、*ceuE* 及管家基因扩增

用于 PCR 鉴定的 *hipO* 引物扩增体系: 2×EasyTaq PCR SuperMix 10 μL, *hipO* 上、下游引物 (10 mmol/L)各 0.75 μL, 模板(50 ng/μL) 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s,

表 2 本实验中用到的引物  
Table 2 All primers in this study

<i>Campylobacter jejuni</i> primers sequence (5'→3')	<i>Campylobacter coli</i> primers sequence (5'→3')	Description
hipO-F: AAATAGGACTTCGTGCAGATATGG	ceuE-F: AAAACTTGCCAAAATACTTACAG	Identification
hipO-R: ACAATCCATCTTCTATCATTTGCCT	ceuE-R: TTCATCCACAGCATTGATTCCTA	
aspA-F: AGTACTAATGATGCTTATCC	Aspcoli-F: CAACTTCAAGATGCAGTACC	Amplification
aspA-R: ATTTTCATCAATTTGTTCTTTGC	Aspcoli-R: ATCTGCTAAAGTATGCATTGC	
glnA-F: TAGGAACTTGGCATCATATTACC	Glncoli-F: TTCATGGATGGCAACCTATTG	
glnA-R: TTGGACGAGCTTCTACTGGC	Glncoli-R: GCTTTGGCATAAAAGTTGCAG	
gltA-F: GGGCTTGACTTCTACAGCTACTTG	Gltcoli-F: GATGTAGTGCATCTTTTACTC	
gltA-R: CCAAATAAAGTTGTCTTGGACGG	Gltcoli-R: AAGCGCTCCAATACCTGCTG	
glyA-F: GAGTTAGAGCGTCAATGTGAAGG	Glycoli-F: TCAAGGCGTTTATGCTGCAC	
glyA-R: AAACCTCTGGCAGTAAGGGC	Glycoli-R: CCATCACTTACAAGCTTATAC	
tkf-F: GCAAACCTCAGGACACCCAGG	Pgmcoli-F: TTATAAGGTAGCTCCGACTG	
tkf-R: AAAGCATTGTTAATGGCTGC	Pgmcoli-R: GTTCCGAATAGCGAAATAACAC	
pgm-F: TACTAATAATATCTTAGTAGG	Tktcoli-F: AGGCTTGTGTTTTTCAGGCGG	
pgm-R: CACAACATTTTTTCATTTCTTTTTC	Tktcoli-R: TGACTTCCTTCAAGCTCTCC	
uncA-F: ATGGACTTAAAGAATATTATGGC	Unccoli-F: AAGCACAGTGGCTCAAGTTG	
uncA-R: ATAAATTCCATCTTCAAATTCC	Unccoli-R: CTACTTGCCTCATCCAATCAC	
aspAS-F: CCAACTGCAAGATGCTGTACC	Aspcoli-F: CAACTTCAAGATGCAGTACC	Sequencing
aspAS-R: TTCATTTGCGGTAATACCATC	Aspcoli-R: ATCTGCTAAAGTATGCATTGC	
glnAS-F: CATGCAATCAATGAAGAAAC	Glncoli-F: TTCATGGATGGCAACCTATTG	
glnAS-R: TTCCATAAGCTCATATGAAC	Glncoli-R: GCTTTGGCATAAAAGTTGCAG	
gltAS-F: CTTATATTGATGGAGAAAATGG	Gltcoli-F: GATGTAGTGCATCTTTTACTC	
gltAS-R: CCAAAGCGCACCAATACCTG	Gltcoli-R: AAGCGCTCCAATACCTGCTG	
glyAS-F: AGCTAATCAAGGTGTTTATGCGG	Glycoli-F: TCAAGGCGTTTATGCTGCAC	
glyAS-R: AGGTGATTATCCGTTCATCGC	Glycoli-R: CCATCACTTACAAGCTTATAC	
tkfS-F: GCTTAGCAGATATTTTAAGTG	Pgmcoli-F: TTATAAGGTAGCTCCGACTG	
tkfS-R: AAGCCTGCTTGTCTTTTGGC	Pgmcoli-R: GTTCCGAATAGCGAAATAACAC	
pgmS-F: GGTTTTAGATGTGGCTCATG	Tktcoli-F: AGGCTTGTGTTTTTCAGGCGG	
pgmS-R: TCCAGAATAGCGAAATAAGG	Tktcoli-R: TGACTTCCTTCAAGCTCTCC	
uncAS-F: AAAGTACAGTGGCACAAGTGG	Unccoli-F: AAGCACAGTGGCTCAAGTTG	
uncAS-R: TGCTCATCTAAATCACTAGC	Unccoli-R: CTACTTGCCTCATCCAATCAC	

63 °C 1 min, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。用于 PCR 鉴定的 *ceuE* 引物扩增体系: 2×*EasyTaq* PCR SuperMix 10 μL, *ceuE* 上、下游引物(10 mmol/L) 各 1 μL, 模板(50 ng/μL) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 57 °C 1 min, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。MLST 分型的所有管家基因引物 PCR 反应条件相同, 扩增体系: 2×*EasyTaq* PCR SuperMix 10 μL, 上、下游引物 (10 mmol/L)各 1 μL, 模板(50 ng/μL) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 2 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。以

上所有 PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.9 测序及结果比对

提取分离株的基因组后, 采用 MLST 网站提供的 7 对管家基因 PCR 扩增引物对分离株基因组进行扩增。空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的 7 个管家基因扩增产物分别用各自对应的测序引物进行双向测序, 测序工作交由华大基因公司完成。测序结果按照 MLST 网站规定的每个管家基因标准区间长度的碱基序列, 截取相应长度碱基序列。将整理好的各株弯曲菌测序数据逐个上传至 MLST 数据库比对, 结果会显示 7 个等位基因编号(Allelic profile)和该菌

株的序列型(Sequence type, ST), 同时会显示该 ST 型归属的克隆群(Clonal complex, CC)。对于新发现的等位基因和 ST 型, 需要填写菌株的基本信息(包括来源、分离地区、分离日期等), 提交申请并审核通过后, MLST 数据库会分配一个新的等位基因编号和 ST 型编号。

2 结果与分析

2.1 弯曲菌的分离鉴定及形态学特征

自合肥、六安、阜阳、滁州、安庆、铜陵 6 个地区分离到弯曲菌可疑株 42 株, 这些菌株在 mCCDA 平板上培养 48 h 后, 典型菌落为单个凸起, 有金属光泽, 非典型菌落为半透明水膜状, 连成一片。在 Skirrow 血平板上生长 48 h 为泼水状、有一定粘性的不溶血菌落。镜检为轻度弯曲, 呈 S 状或海鸥展翅状的革兰氏阴性小杆菌。

2.2 生理生化特性

可疑菌株生化试验结果见表 3。42 株可疑菌株有 21 株与空肠弯曲菌生化特性相符, 21 株与结肠弯曲菌生化特性相符。

2.3 PCR 鉴定

利用空肠弯曲菌特异性引物 *hipO* 与结肠弯曲菌特异性引物 *ceuE* 分别对 42 株弯曲菌可疑菌株进行 PCR 扩增, 目的片段长度分别为 237 bp 与

422 bp, 扩增后的产物片段与预期的大小相符。

2.4 MLST 分型结果

按 1.9 操作, 比对出 42 株弯曲菌 MLST 分型数据, 如表 4 所示。本研究中共获得 32 种 ST 型, 共发现 9 种新的 ST 型和 6 个新的等位基因。空肠弯曲菌与结肠弯曲菌各自都有 16 种 ST 型。9 种新的 ST 型中空肠弯曲菌占了 6 个, 分别为 8190、8222、8223、8831、8833、8841, 结肠弯曲菌占了 3 个, 分别为 8832、8834、8843。6 个新的等位基因编号分别为 *glnA606*、*glnA607*、*gltA518*、*glyA680*、*pgm863* 和 *uncA541*。本研究中 21 株 *C. jejuni* 有 14 株属于以下克隆群: ST-21 CC (1 株), ST-45 CC (1 株), ST-354 CC (1 株), ST-443 CC (3 株), ST-464 CC (1 株), ST-574 CC (2 株), ST-692 CC (2 株), ST-1034 CC (3 株), 21 株 *C. coli* 有 17 株属于 ST-828 CC, 另外 7 株 *C. jejuni* 与 3 株 *C. coli* 由于 MLST 数据库目前数据有限未被分配克隆群, 用 UA 标记(表 4)。

2.5 进化关系分析

42 株弯曲菌(21 株空肠弯曲菌、21 株结肠弯曲菌)多位点序列分型结果使用 MEGA 7 软件进行聚类分析, 分别连接各菌株的 7 个等位基因序列, 应用非加权组平均法(Unweighted pair group method analysis, UPGMA)制作遗传系统进化树(图 1)。进化

表 3 弯曲菌生理生化菌鉴定  
Table 3 Physiological and biochemical test of *Campylobacter*

项目 Items	空肠弯曲菌 <i>C. jejuni</i>	结肠弯曲菌 <i>C. coli</i>
形态观察 Morphological observation	革兰氏阴性, 菌体弯曲如逗点状, 海鸥展翅状或呈 S 型 Gram-negative, Curved, Comma-like, Gull-winged or S-shaped	
氧化酶试验 Oxidase test	+	+
微需氧条件下 25±1 °C 生长试验 Growth test under 25±1 °C micro-aerobic conditions	不生长 Not growing	不生长 Not growing
有氧条件下 42±1 °C 生长试验 Growth test under 42±1 °C aerobic conditions	不生长 Not growing	不生长 Not growing
过氧化氢酶试验 Catalase test	+	+
马尿酸钠水解试验 Hippuricase test	+	-

注: +: 阳性; -: 阴性。  
Note: +: Positive; -: Negative.

表 4 MLST 数据分型结果

Table 4 The results of data querying

Samples	Clonal complex	ST	Number	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkt</i>	<i>uncA</i>	Remarks
TLY6	ST-692	<b>8222</b>	1	37	<b>606</b>	57	26	127	29	23	New
TLY8	ST-692	<b>8223</b>	1	37	<b>607</b>	57	26	127	29	23	New
TLY9	ST-45	45	1	4	7	10	4	1	7	1	
HFY15	ST-828	<b>8843</b>	1	33	39	30	<b>680</b>	113	35	17	New
HFE29	UA	4268	1	60	69	52	10	90	3	6	
HFY41-42, FYY70	ST-1034	<b>8190</b>	3	363	455	4	64	74	25	23	New
HFY48	ST-828	8733	1	33	39	30	544	113	35	17	
LAJ53	ST-443	<b>8831</b>	1	7	17	<b>518</b>	15	23	3	12	New
AQJ60	ST-464	464	1	24	2	2	2	10	3	1	
AQJ61	ST-828	<b>8832</b>	1	33	39	30	544	<b>863</b>	3	17	New
HFJ62, LAJ79	ST-828	872	2	33	39	30	82	113	44	17	
HFJ63-64	ST-443	51	2	7	17	2	15	23	3	12	
HFJ65	UA	6962	1	37	490	292	64	694	25	412	
HFY67	UA	<b>8833</b>	1	2	52	291	368	127	25	<b>541</b>	New
FYY68, HFJ97-98	UA	8089	3	8	455	291	668	127	24	19	
TLJ71, LAJ90	ST-828	3753	2	33	176	30	82	104	43	17	
TLY72	UA	1243	1	81	155	30	163	231	43	93	
LAE74	ST-828	825	1	33	39	30	82	113	47	17	
CZJ75-76	ST-828	830	2	33	39	30	79	104	47	17	
LAJ77	ST-828	860	1	33	39	30	79	113	47	17	
LAJ78	ST-828	1586	1	33	176	30	82	113	47	17	
HFJ80	ST-21	298	1	9	1	12	3	2	1	5	
HFJ81	ST-354	4530	1	8	10	2	2	11	12	12	
LAZ82	ST-828	7233	1	33	543	30	82	104	43	17	
LAZ83, LAZ85	UA	<b>8834</b>	2	53	153	44	82	118	35	36	New
LAZ84, LAZ87	ST-828	1556	2	33	38	30	82	104	43	17	
LAZ86	ST-828	890	1	33	38	30	82	104	43	36	
HFJ91	ST-574	2031	1	9	17	5	10	11	3	3	
LAE93	UA	<b>8841</b>	1	8	376	292	26	470	25	57	New
HFJ94	ST-828	5191	1	33	176	30	82	113	47	17	
HFJ95	ST-828	829	1	33	39	30	82	113	43	17	
FYJ96	ST-574	305	1	9	53	2	10	11	3	3	

注：UA 为数据库未分配的克隆群；新的等位基因用了加粗显示；新的 ST 型在备注中标出。

Note: UA, isolates that were unassigned to any clonal complex so far. Remarks, new sequence types are found. New allelic profiles are shown in bold.

树结果显示，空肠弯曲菌与结肠弯曲菌遗传关系相差甚远，分别聚集归为两个大群。21 株空肠弯曲菌分别位于 5 个分支上：第一分支共有 8 株菌，ST-1034 CC 3 株、ST-692 CC 2 株、UA 3 株，其中 7 株为本次研究新发现的 ST 型。第二分支共有 7 株菌，ST-443 CC 3 株、ST-574 CC 2 株、ST-354 CC、ST-21 CC 各 1 株。第三分支有 3 株均为 UA。第四分支有 2 株菌，ST-464 与 ST-45 各 1 株。第五分支只有 1 株菌来自于合肥鹅，与其他四个分支遗传关系上相差较

远，所以单独成为一个分支，属于 UA。结肠弯曲菌聚类结果就显得简单多了，显示出很强的统一性，一共可以看出 3 个分支，第一、第二分支分别只有 1 株菌，2 株细菌都为本次研究新发现的 ST 型且都属于 ST-828 CC，或许由于新发现的 ST 型中新的等位基因的缘故与第三分支遗传关系较远。第三分支中的菌株遗传关系都很近，共有 19 株菌，其中 16 株为 ST-828 CC，其余 3 株属于 UA，并且有 2 株 ST 型为本次研究新发现，来自于六安猪源。

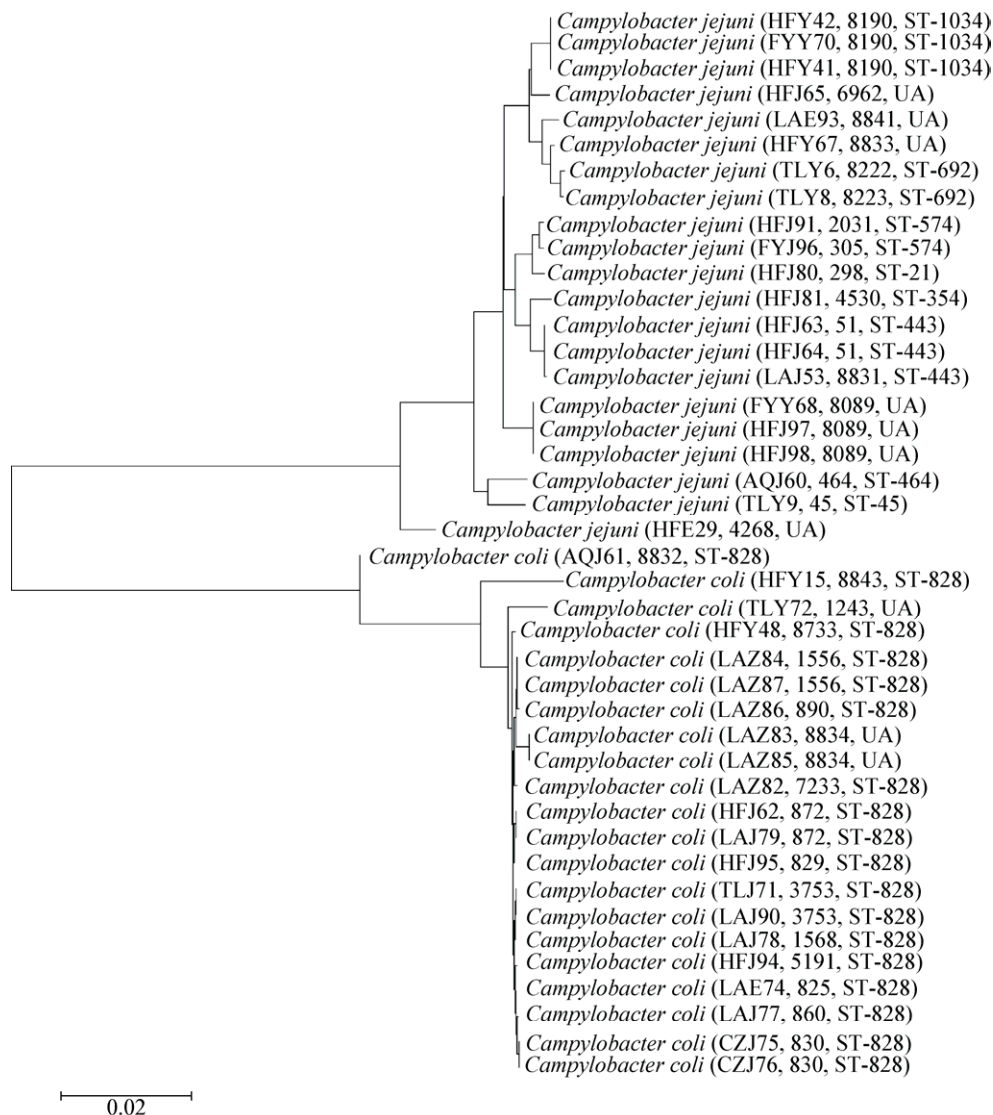


图 1 42 株分离株多位点序列遗传系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree composed by means of the seven housekeeping genes of the MLST analysis

注: 括号内数据分别为菌株名称, 菌株 ST 型, 及其所属克隆群; 标尺长度表示 2% 的核苷酸序列差异。

Note: The datas in brackets show the name of isolates, sequence types and clonal complex, respectively; The ruler length represents a 2% nucleotide sequence difference.

### 3 讨论与结论

以往的研究中为了解弯曲菌的分子分型情况应用过多种方法, 如 RAPD<sup>[18]</sup>、PFGE<sup>[19]</sup>、ERIC<sup>[20]</sup>、AFLP<sup>[21]</sup>等, 这些方法均有一定的局限性。其中 PFGE 分型也一度被认为是细菌分型金标准<sup>[22]</sup>, 但因其周期过长、成本较高等缺点不能被广泛且快速应用。而多位点序列分型方法基于 PCR 扩增与 DNA 测序技术从核酸水平揭示细菌的基因型, 自问世以

来, 因其高分辨率、良好的重复性和数据全球共享等优势备受关注。由于有全世界各地研究者数据不断提交, MLST 数据库可以不断积累更新, 越来越丰富的数据库使得 MLST 在微生物分类方式的优势凸显。

本研究共获得 32 种 ST 型, 共被分配 10 个克隆群, 与华东地区<sup>[12]</sup>存在 2 个相同的克隆群, 分别为 ST-21 CC、ST-45 CC; 与华北地区<sup>[13]</sup>存在 5 个相同的克隆群, 分别为 ST-21 CC、ST-45 CC、ST-354

CC、ST-443 CC、ST-1034 CC; 与湖北地区<sup>[14]</sup>存在 5 个相同的克隆群, 分别为 ST-45 CC、ST-354 CC、ST-464 CC、ST-574 CC、ST-828 CC, 说明安徽地区与华东、华北和湖北地区弯曲菌流行存在交叉性。由于国内大多数地区弯曲菌 MLST 分型数据还是空白, 不足以看出各地区的差异与流行性。本研究中空肠弯曲菌 ST 型是散在分布于各个克隆群, 而结肠弯曲菌 ST 型绝大多数属于 ST-828 CC 这一克隆群, 小部分属于 UA, 这与 Wei 等<sup>[23]</sup>的研究结果一致。一些特定 ST 型的 *C. jejuni* 菌株已经被认为与人类神经系统疾病(GBS)有关, 如 22 ST 型(ST-22 CC)、45 ST 型(ST-45 CC)、51 ST 型(ST-443 CC)等<sup>[4,13]</sup>。然而 45 ST 型与 51 ST 型两种菌株均在本研究被分离到, 意味着携带这些 ST 型的动物群对人类来说会是一个巨大的隐患。

用 MEGA 7 软件对本研究中的 42 株弯曲菌进行聚类分析, 进化树显示有些新的 ST 型位于已有的 ST 型分支上, 也有些是位于单独的分支上, 如 8832 ST 型和 8843 ST 型。从地域上看, 合肥 17 株菌株显示出 13 种 ST 型, 六安 13 株菌株显示出 10 种 ST 型, 铜陵 5 株菌株显示出 5 种 ST 型, 阜阳 3 株菌株显示出 3 种 ST 型, 安庆 2 株菌株显示出 2 种 ST 型, 滁州 2 株菌株显示出 1 种 ST 型, 说明了安徽地区弯曲菌 ST 型是散在分布且丰富多样的。阜阳地区 FYY70 菌株与合肥地区 HFY41、HFY42 菌株同为 8190 ST 型, 阜阳地区 FYY68 菌株与合肥地区 HFJ97、HFJ98 菌株同为 8089 ST 型, 这或许能推断合肥与阜阳两个地区在弯曲菌遗传关系上存在一定的同源性。样本中空肠弯曲菌在遗传变异上显示为丰富多样, 结肠弯曲菌表现得相对保守, 说明在复杂的环境中空肠弯曲菌更容易发生变异, 这或许意味着空肠弯曲菌比结肠弯曲菌能更容易存活和导致严重的人类疾病。

## REFERENCES

- [1] Fitzgerald C. *Campylobacter*[J]. Clinics in Laboratory Medicine, 2015, 35(2): 289-298
- [2] Winer JB. Guillain barré syndrome[J]. Molecular Pathology, 2001, 54(6): 381-385
- [3] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain[J]. EFSA Journal, 2011, 9(4): 2105
- [4] Endtz HP, Ang CW, Braak NVD, et al. Molecular Characterization of *Campylobacter jejuni* from Patients, with Guillain-Barré and Miller Fisher Syndromes[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(6): 2297-2301
- [5] Sahin O, Kobalka P, Zhang Q. Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(5): 1070-1079
- [6] Bolton DJ. *Campylobacter* virulence and survival factors[J]. Food Microbiology, 2015, 48: 99-108
- [7] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU[J]. EFSA Journal, 2010, 8(1): 1437
- [8] Meade KG, Narciandi F, Cahalane S, et al. Comparative *in vivo* infection models yield insights on early host immune response to *Campylobacter* in chickens[J]. Immunogenetics, 2009, 61(2): 101-110
- [9] European Food Safety Authority. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008-Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates[J]. EFSA Journal, 2010, 8(3): 1503
- [10] Nielsen LN, Sheppard SK, McCarthy ND, et al. MLST clustering of *Campylobacter jejuni* isolates from patients with gastroenteritis, reactive arthritis and Guillain-Barré syndrome[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(2): 591-599
- [11] Mughini-Gras L, Penny C, Ragimbeau C, et al. Quantifying potential sources of surface water contamination with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*[J]. Water Research, 2016, 101: 36-45
- [12] Xue F, Xu F, Luan J, et al. Multilocus sequence typing of animal source *Campylobacter jejuni* in east China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(3): 298-303 (in Chinese)  
薛峰, 徐飞, 栾军, 等. 多位点序列分型分析空肠弯曲菌华东动物源分离株[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 298-303
- [13] Zhang MJ, Gu YX, He LH, et al. Molecular typing and antimicrobial susceptibility profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from North China[J]. Journal of Medical Microbiology, 2010, 59(Pt 10): 1171-1177
- [14] Dong J, Han M, Zhou K, et al. Multilocus sequence typing analysis of 47 *Campylobacter jejuni* strains isolated from poultry in Hubei province[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(1): 150-156 (in Chinese)  
董俊, 韩梅, 周康, 等. 47 株空肠弯曲菌湖北禽源株的多位点序列分型[J]. 微生物学报, 2016, 56(1): 150-156
- [15] Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, et al. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(10): 2568-2572
- [16] Gonzalez I, Grant KA, Richardson PT, et al. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene



- encoding a putative virulence determinant[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(3): 759-763
- [17] Ma LC, Wang Y, Shen JZ, et al. Tracking *Campylobacter* contamination along a broiler chicken production chain from the farm level to retail in China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 181: 77-84
- [18] Xue F, Xu F, Zhang XR, et al. PCR-RAPD molecular Sub-typing and virulence genes detection of *Campylobacter jejuni* isolated from eastern China[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18(3): 586-591 (in Chinese)  
薛峰, 徐飞, 张小荣, 等. 空肠弯曲菌 PCR-RAPD 分子亚型及其毒力相关基因分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(3): 586-591
- [19] Huang JL, Xu HY, Jiang F, et al. Pulsed field gel electrophoresis for determining the molecular homology of *Campylobacter jejuni* isolates[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(4): 531-535 (in Chinese)  
黄金林, 许海燕, 姜丰, 等. 空肠弯曲菌脉冲场凝胶电泳分子检测方法的建立及应用[J]. 微生物学报, 2009, 49(4): 531-535
- [20] Zheng YY, Wu QP, Wu K, et al. Virulence-associated gene detection and ERIC-PCR typing of *Campylobacter jejuni* strains isolated from foods in four Southern Chinese provinces[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(1): 14-23 (in Chinese)  
郑扬云, 吴清平, 吴葵, 等. 华南四省食品中空肠弯曲菌分离株的毒力相关基因分析和 ERIC-PCR 分型[J]. 微生物学报, 2014, 54(1): 14-23
- [21] Lévesque S, St-Pierre K, Frost E, et al. Use of amplified-fragment length polymorphism to study the ecology of *Campylobacter jejuni* in environmental water and to predict multilocus sequence typing clonal complexes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(7): 2470-2473
- [22] Souza AV, Moreira CR, Pasternak J, et al. Characterizing uncommon *Burkholderia cepacia* complex isolates from an outbreak in a haemodialysis unit[J]. Journal of Medical Microbiology, 2004, 53(Pt 10): 999-1005
- [23] Wei B, Cha SY, Kang M, et al. Antimicrobial susceptibility profiles and molecular typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from ducks in South Korea[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7604-7610

### 2018 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(3-3)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
31	2018 工业生物过程控制研讨会	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	10 月	200	浙江杭州	夏建业 13761030390
32	第三届全国病毒学青年学者学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	11 月	300	福建福州	吴莹
33	第三届合成微生物学与生物制造学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	11 月	300	上海	张立新 021-64252575
34	第十三届全国芽胞杆菌青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	11 月	200	天津	蔡峻 caijun@nankai.edu.cn
35	第一届全国根际微生物学学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	11 月	200	山东泰安	杜秉海 du_binghai@163.com
36	第二十一次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11 月	600	广东汕头	胡忠 hzh@stu.edu.cn
37	2018 年酿造分会学术年会	中国微生物学会酿造分会	11 月 15-16 日	150	湖北武汉	高洁
38	中国微生物与白酒酿造技术研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	12 月	150	待定	010-53218310
39	幽门螺杆菌谷氏快速分离培养、鉴定、药敏试验试剂盒应用培训班	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	12 月	50	浙江宁波	曾雯琪 0574-87035856
40	第七届全国微生物基因组学学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12 月	200 人	江西南昌	龙中儿, 杨慧林 0791-88121571
41	2018 年生物制品年会	中国微生物学会生物制品专业委员会	待定	1000	待定	毛群颖 18810054059