



47株空肠弯曲菌湖北禽源株的多位点序列分型

董俊^{1,2}, 韩梅¹, 周康², 罗青平¹, 邵华斌¹, 张腾飞^{1*}

¹ 湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430064

² 长江大学动物科学学院, 湖北 荆州 434025

摘要: 【目的】为了解湖北地区家禽空肠弯曲菌的流行状况及其分子特征, 应用多位点序列分型方法对2013–2014年的47株禽源空肠弯曲菌湖北分离株进行分子分型研究。【方法】以空肠弯曲菌的7个管家基因*aspA*、*glnA*、*gltA*、*glyA*、*pgm*、*tki*和*uncA*为目的基因, 提取样本基因组后PCR扩增, 测序和分析。将测序结果上传数据库进行比对, 制作成多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST)遗传进化树。【结果】分离株共有38个ST型, 10个克隆群, 其中最多的克隆群为ST-353CC和ST-464CC, 发现2个新的等位基因编号和25个新的ST型。遗传进化树显示, 不同家禽宿主中空肠弯曲菌序列型存在一定的差异, 不同地区和来源的空肠弯曲菌呈现出遗传多样性。【结论】本研究对湖北分离的47株禽源空肠弯曲菌进行了MLST分析, 其结果显示菌株多样性较为丰富, 将为我国家禽空肠弯曲菌的流行病学调查提供科学的数据。

关键词: 空肠弯曲菌, 多位点序列分型

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*, *C. jejuni*)是一种全球范围内主要的食源性人兽共患病病原菌, 可引起禽类的腹泻、肝炎等, 且禽类是其主要的自然宿主之一。该菌也可引起人类腹泻, 是格林巴利综合征的前趋因子^[1]。自二十世纪70年代起, 空肠弯曲菌就是引起肠道感染的主要原因之一, 由此引发的食品卫生安全问题日益突出, 严重影响人畜健康, 成为全球公共卫生的焦点^[2-3]。Boes等研究表明, 家禽是空肠弯曲菌最主要的传

染源之一, 消费禽肉与空肠弯曲菌的流行密切相关^[4-5]。因此对家禽空肠弯曲菌流行情况的调查和分子特征研究是有必要的。

多位点序列分型是近年来发展很快的分子生物学分析方法, 具有很高的分辨能力, 既适于分子流行病学研究, 也可用于分子进化学的研究。Dingle等在2001年最早提出使用MLST方法进行空肠弯曲菌的研究^[6]。2003年Manning等运用MLST对动物源和人源空肠弯曲菌进行了分子分型研究, 从

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303044); 国家现代农业产业技术体系专项资金(CARS-42-G11); 湖北省动物胚胎与分子育种重点实验室(2012ZD151)

*通信作者: Tel/Fax: +86-27-87380193; E-mail: kobe2071@tom.com

收稿日期: 2015-04-13; 修回日期: 2015-06-23; 网络出版时间: 2015-07-05

分子水平上阐述了两者的联系^[7]。国内相关研究相对较少,薛峰等^[8]和张毛军等^[9]分别用MLST方法对华东地区和华北地区空肠弯曲菌分离株进行分子分型,而华中地区暂无相关数据。

本研究使用MLST方法对湖北地区2013–2014年分离的47株禽源空肠弯曲菌进行分子分型研究,为分析我国空肠弯曲菌的流行和分子遗传特征提供科学数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株: 2013–2014年湖北地区分离的47株禽源空肠弯曲菌(表1),均经过PCR鉴定和生化鉴定。武汉的样品来源于武汉市某大型活禽交易市场,活禽来源于武汉市周边多个养鸡场,而大冶样品来源于2个养鸡场和1个养鸭场、监利样品来源于1个养鸭场、仙桃的样品来源于3个养鸡场。

1.1.2 培养基及试剂: (1) 炭头孢哌酮去氧胆酸(mCCDA)培养基、抗生素添加剂及厌氧罐购自OXOID公司;微需氧产气袋购自日本MGC公司;布氏肉汤购自北京陆桥生物科技公司; (2) 细菌基因组提取试剂盒和DNA Marker购自宝生物工程(大连)有限公司, 2×Taq Plus Master Mix (Dye Plus)购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

表1. 实验中使用的菌株
Table 1. The strains used in the study

Isolate area	Source	Number of isolates	Samples
Wuhan	Chicken	30	JSJ(1-14, 16-25, 27-28), XZJ1, XZJ2, CDJ1, H3-7
	Pigeon	1	G2-14
Daye	Chicken	5	DYJ3-6, DYJ8
	Duck	1	DYY1
Jianli	Duck	2	JLY1-2
Xiantao	Chicken	8	XTJ1-8

1.2 方法

1.2.1 细菌总DNA的提取: –80 ℃保存的分离菌种复苏后接种单菌落于含10%小牛血清的布氏肉汤中微需氧条件(42 ℃, 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂)培养48 h, 使用细菌基因组提取试剂盒提取菌株的总DNA, –20 ℃保存备用。

1.2.2 PCR引物及目的片段扩增: 参考MLST网站(<http://www.mlst.net/>)针对*C. jejuni*提供的7对PCR扩增引物序列和7对PCR测序引物序列^[6], 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应体系为2×Taq Plus Master Mix (Dye Plus) 12.5 μL, 模板DNA 2 μL (10 ng), 上下游引物各1 μL (10 μmol/L), 补水至25 μL。反应条件: (1) *aspA*、*gltA*、*pgm*和*uncA*基因反应条件为: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 50 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35个循环; 72 ℃ 7 min; (2) *glyA*和*glnA*基因的反应条件为: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35个循环; 72 ℃ 7 min; (3) *tkt*基因的反应条件为: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35个循环; 72 ℃ 7 min。

1.2.3 DNA序列测定及结果处理: 将PCR产物送往生工生物工程股份有限公司, 使用7对测序引物进行测序。将测序结果上传到MLST数据库进行在线数据分析。获取每个菌株7个管家基因的等位基因编号(Allelic profile), 根据等位基因数得出序列型(Sequence type, ST)及克隆群(The clonal complex, CC)。与数据库比对后数据库中没的Allelic profile和ST, 则为新发现的Allelic profile和ST。根据获得的Allelic profile和ST使用START Version 2软件进行聚类分析构建系统进化树^[10-12]。

2 结果和分析

2.1 管家基因PCR扩增及测序

提取47株空肠弯曲菌分离株的基因组后, 采用MLST网站提供的7对PCR扩增引物对*C. jejuni*基

因组进行扩增,分别扩增出47株空肠弯曲菌分离株的7个管家基因,其中*gltA*为1012 bp, *pgm*为1150 bp, *uncA*为1120 bp, *gly A*为816 bp, *tkl*为1102 bp, *aspA*为899 bp, *glnA*为1262 bp。对PCR产物进行纯化后,使用MLST网站提供的7对测序引物对PCR产物进行双向测序。

2.2 MLST数据比对结果及分析

将拼接好的序列上传MLST网站(<http://www.mlst.net/>)进行分析,获取相应等位基因编号和ST型及克隆群。如表2所示,本研究中共获得38个ST型,其中含25个新的ST型,2个新的等位基因编号(*aspA*384和*glnA*526)。其中32株属于以下克隆群:ST-1150 CC (4株), ST-353 CC (8株), ST-354 CC (3株), ST-45 CC (2株), ST-460 CC (1株), ST-464 CC (9株), ST-828 CC (2株), ST-52 CC、ST-574 CC、ST-607 CC (各1株),共有15株由于数据库数据有限未被分配(表2)。

2.3 进化关系分析

47株*C. jejuni*多位点序列分型结果使用START Version 2软件聚类分析,制作遗传系统进化树(图1)。样本中出现的克隆群主要为ST-353 CC和ST-464 CC,大部分新发现的ST型未被分配克隆群,但与数据库已有的ST型1121、4258、2842、354和464亲缘关系上相近。本研究包括了3株鸭源菌株(JLY1、JLY2、DYY1)和1株鸽源菌株(G2-14),与2株鸡源菌株一起,均位于单独的一个进化分支上,与大部分鸡源菌株亲缘关系稍远。从地域来看,武汉大型活禽交易市场分离的30株空肠弯曲菌有27个不同的ST型,分布在不同的分支上,呈现较好的分子多样性。仙桃分离的8株空肠弯曲菌只有4个不同的ST型,7株处于同一分支上。而大冶分离的6株空肠弯曲菌为6个不同的ST型,无规律地分布在不同分支上。

3 讨论

多位点序列分型自1998年问世以来,以其高

分辨率,可重复性好,可积累等优势而得到广泛应用^[13-15]。随着高通量测序技术以及分析软件的发展,数据库积累的加快,MLST在病原微生物分类方面的优势更加突出。传统分子分型方法有RAPD、RFLP、AFLP、PFGE等,这些分子分型方法一般采用电泳带型图谱作为分型的依据,图谱的识别需要专门的分析软件,而且研究结果在不同的实验室之间难以相互比对及共享,而MLST是一种可积累的方法,伴随着数据库的建立和使用,其结果可以在不同时间全球范围内进行数据共享^[16]。MLST数据库信息的准确性是建立在共享者正确使用的前提下,数据库要求实验者将新的型别上传,提供细菌进化相关信息,而已有型别的数据提交在分子流行病学统计上具有重要的意义^[8]。

据相关文献报道,我国华北地区分离的空肠弯曲菌克隆群有ST-353CC、ST-354CC、ST-45CC、ST-460CC、ST-52CC、ST-607CC、ST-49CC、ST-1034CC、ST-206CC、ST-257CC、ST-362CC、ST-21CC和ST-443CC,华东地区有ST-21CC、ST-49CC、ST-42CC和ST-45CC^[8-9]。本研究共获得10个克隆群,与华北地区存在6个相同的克隆群,即ST-353 CC、ST-354 CC、ST-45 CC、ST-460 CC、ST-52 CC、ST-607 CC,与华东地区存在ST-45 CC相同,说明湖北地区空肠弯曲菌的流行与华东、华北地区空肠弯曲菌流行存在交叉性,这可能与武汉交通发达,人员及畜禽产品流动频繁密切相关;此外,本研究中出现的最多的克隆群ST-464CC在华东、华北地区都没出现过,而华东、华北均有的ST-21CC和ST-49CC在湖北地区没有出现过,说明我国空肠弯曲菌的流行存在地域特征性。

Manning等从人腹泻等疾病病人中分离到ST-21 CC、ST-45 CC、ST-283CC、ST-206 CC、ST-257 CC、ST-353 CC、ST-354 CC、ST-52 CC和ST-443 CC等克隆群,其中ST-21 CC和ST-45

表2. MLST数据分型结果
Table 2. 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>tkf</i>	<i>uncA</i>	Remarks
JSJ2	ST-1150	1121	1	103	110	30	140	188	164	79	
H3-7		2637	1	103	110	30	140	188	164	120	
JSJ17		7471	1	384	110	30	140	188	164	79	New
JSJ18		7477	1	103	84	30	140	188	164	79	New
JSJ4	ST-353	2132	1	7	2	5	2	2	3	6	
XZJ2、XTJ1-5		2842	6	9	2	5	2	11	3	6	
XTJ6		7452	1	7	114	12	2	2	3	6	New
JSJ21、JSJ22	ST-354	354	2	8	10	2	2	11	12	6	
JSJ23		7466	1	8	10	2	2	11	253	6	New
G2-14	ST-45	137	1	4	7	10	4	42	7	1	
JLY-1		7462	1	4	7	10	4	1	7	421	New
XTJ8	ST-460	4264	1	9	30	2	15	89	59	6	
JSJ28	ST-464	464	1	24	2	2	2	10	3	1	
JSJ1		3140	1	33	2	2	2	10	3	1	
DYJ5		7464	1	14	2	2	2	153	3	1	New
JSJ5、6、16		7469	3	24	526	2	2	10	3	1	New
JSJ27		7473	1	24	526	2	82	10	3	1	New
JSJ8		7482	1	33	176	30	2	10	3	1	New
JSJ14		7484	1	24	526	2	2	86	3	1	New
JSJ9	ST-52	7453	1	33	176	30	10	10	3	6	New
CDJ1	ST-574	2145	1	9	53	5	10	2	3	3	
DYJ6	ST-607	7465	1	33	2	5	173	11	3	6	New
JSJ12	ST-828	7461	1	32	39	30	82	113	3	17	New
JSJ20		7472	1	32	39	30	82	169	12	17	New
XZJ1、XTJ7	UA	4240	2	67	4	5	68	11	3	6	
JSJ10		4258	1	2	2	2	10	10	59	5	
DYJ8		4324	1	24	2	288	72	22	405	6	
JSJ13		7454	1	67	4	5	68	86	3	6	New
JSJ24		7455	1	9	2	6	4	11	3	6	New
JSJ25		7456	1	8	2	2	2	153	253	147	New
DYJ4		7463	1	8	364	292	54	126	34	421	New
DYJ3		7470	1	8	364	292	64	126	34	421	New
DYY1		7478	1	363	500	292	48	485	24	147	New
JLY2		7476	1	37	476	4	28	682	25	147	New
JSJ31		7480	1	67	21	2	10	153	253	147	New
JSJ7		7481	1	103	17	255	2	86	3	1	New
JSJ11		7483	1	67	481	2	407	153	307	147	New
JSJ15		7485	1	14	2	6	15	22	3	6	New

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

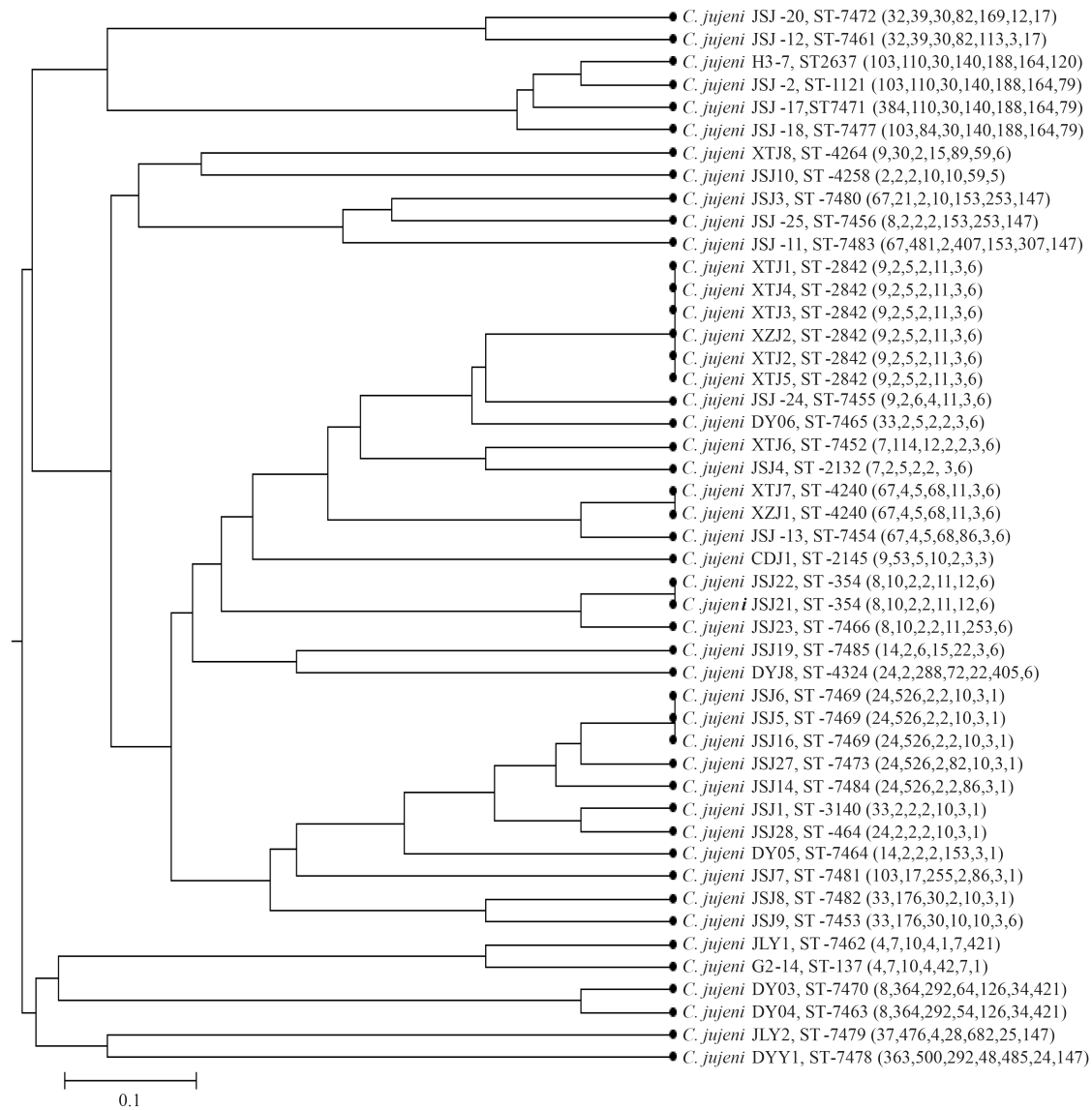


图1. 47株分离菌株的多位点序列系统进化树

Figure 1. Phylogenetic tree composed by means of the seven housekeeping genes of the MLST analysis. The dates show the name of isolates, sequence types and allelic profiles of the seven housekeeping genes (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*), respectively.

CC数量较多，而家禽中报道较多的为ST-45 CC和ST-52 CC，人类与家禽重叠较多的为ST-45 CC^[17-20]。本实验中分离的ST-45 CC、ST-52 CC、ST-353 CC和ST-354 CC菌株与以上研究报道的部分人源菌株具有相同的克隆群，推测可能对人存在潜在的致病性。我们也将进一步开展致病性研究，探讨空肠弯曲菌分子分型与致病性之间的关系。

用UPGMA方法对本实验得到的空肠弯曲菌ST型进行聚类分析，进化树显示新的ST型与数据库已有ST型在同一个分支。从物种上来看，鸭源JLY1、JLY2、DYY1菌株和鸽源G2-14菌株与其他大部分鸡源菌株亲缘关系稍远，显示不同家禽中空肠弯曲菌序列型存在一定的差异。从地域上来看，武汉大型活禽交易市场分离的空肠弯曲菌

共占有多达27个不同的ST型, 且分布在不同的分支上, 呈现较好的分子多样性, 可能与武汉菌株来自于不同的养殖场、不同的交易地有关。其中7株在同一分支上, 类型相对比较单一, 可能起源于共同的菌株。大冶分离株DYY1与武汉分离株G2-14在同一分支上, 显示不同地域、不同宿主来源的菌株也存在亲缘关系很近的情况。

在本研究中出现了新的等位基因编号aspA384和glnA526以及25种新的ST型, 可能是由于MLST数据库中空肠弯曲菌的数据库数据量不够大造成的。此前MLST数据库中的空肠弯曲菌样本来源主要是欧美和大洋州国家, 亚洲国家的数据量相对较少。本实验的结果, 不仅分析了湖北地区空肠弯曲菌的分子遗传特征, 是对MLST数据库的进一步完善, 也为研究不同区域不同来源的空肠弯曲菌的流行病学提供了科学数据。

参考文献

- [1] Blaser MJ. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 1997, 176(S2): S103-S105.
- [2] Skirrow MB, Blaser MJ, *Campylobacter*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2000: 69-88.
- [3] CDC. <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>. Accessed 2012.
- [4] Boes J, Nersting L, Nielsen EM, Kranker S, Enøe C, Wachmann HC, Baggesen DL. Prevalence and diversity of *Campylobacter jejuni* in pig herds on farms with and without cattle or poultry. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(4): 722-727.
- [5] Hood AM, Pearson AD, Shahamat M. The extent of surface contamination of retailed chickens with *Campylobacter jejuni* serogroups. *Epidemiology & Infection*, 1988, 100(1): 17-25.
- [6] Dingle KE, Colles FM, Wareing DRA, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, Bootsma HJ, Willems RJL, Urwin R, Maiden MCJ. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(1): 14-23.
- [7] Manning G, Dowson CG, Bagnall MC, Ahmed IH, West M, Newell DG. Multilocus sequence typing for comparison of veterinary and human isolates of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6370-6379.
- [8] Xue F, Xu F, Luan J, Li ZZ, Zhu CQ, Jiang Y, Lu CP. Multilocus sequence typing of animal source *Campylobacter jejuni* in east China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(3): 298-303. (in Chinese)
薛峰, 徐飞, 栾军, 李震中, 祝长青, 蒋原, 陆承平. 多位点序列分型分析空肠弯曲菌华东动物源分离株. *微生物学报*, 2010, 50(3): 298-303.
- [9] Zhang MJ, Gu YX, He LH, Ran L, Xia SL, Han XS, Li HX, Zhou HJ, Cui ZG, Zhang JZ. Molecular typing and antimicrobial susceptibility profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from north China. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59(10): 1171-1177.
- [10] Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(S2): W728-W733.
- [11] Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(5): 1518-1530.
- [12] Jolley K A, Feil E J, Chan M S, Maiden M C J. Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics*, 2001, 17(12): 1230-1231.
- [13] Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou JJ, Zurth K, Causant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(6): 3140-3145.
- [14] Spratt BG, Maiden MCJ. Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 1999, 354(1384): 701-710.
- [15] Gogarten JP, Doolittle WF, Lawrence JG. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Molecular Biology and Evolution*, 2002, 19(12): 2226-2238.
- [16] Bihère E, Lucas PM, Claisse O, Lonvaud-Funel A. Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(5): 1291-1300.
- [17] Ragimbeau C, Schneider F, Losch S, Even J, Mossong J.

- Multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and *fla* short variable region typing of clonal complexes of *Campylobacter jejuni* strains of human, bovine, and poultry origins in Luxembourg. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 74(24): 7715-7722.
- [18] Sheppard SK, Dallas JF, Strachan NJC, MacRae M, McCarthy ND, Wilson DJ, Gormley FJ, Falush D, Ogden ID, Maiden MC, Forbes KJ. *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 48(8): 1072-1078.
- [19] Colles FM, Maiden MCJ. *Campylobacter* sequence typing databases: applications and future prospects. *Microbiology*, 2012, 158(11): 2695-2709.
- [20] Ioannidou V, Ioannidis A, Magiorkinis E, Bagos P, Nicolaou C, Legakis N, Chatzipanagiotou S. Multilocus sequence typing (and phylogenetic analysis) of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from clinical cases in Greece. *BMC Research Notes*, 2013, 6: 359-359.

Multilocus sequence typing analysis of 47 *Campylobacter jejuni* strains isolated from poultry in Hubei province

Jun Dong^{1,2}, Mei Han¹, Kang Zhou², Qingping Luo¹, Huabin Shao¹, Tengfei Zhang^{1*}

¹ Animal Husbandry and Veterinary Institute, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, Hubei Province, China

² College of Veterinary, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] To study the epidemiological and molecular characteristics of *Campylobacter jejuni* in poultry in Hubei province, we used multilocus sequence typing method to classify 47 local *C. jejuni* strains. [Methods] Genomic DNA of each isolated strain was extracted, seven housekeeping genes including *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt* and *uncA* were amplified by PCR and sequenced, and then the sequences of genes were analyzed using MLST database. [Results] There were a total of 38 sequence types and 10 clonal complexes, and ST353 and ST464 complexes were the largest amount of the population of *C. jejuni* analyzed, of which 2 new allelic profile and 25 new sequence types were found. Phylogenetic tree shows that sequence types from different types of poultry and different regions were different. [Conclusion] Forty-seven *C. jejuni* strains isolated from poultry in Hubei were analyzed using MLST and showed abundant genetic diversity, it will provide scientific data to the epidemiological investigation of *C. jejuni* in Hubei, China.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, multilocus sequence typing (MLST)

(本文责编: 李磊)

Supported by Chinese Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201303044), by China Agriculture Research System (CARS-42-G11) and by Hubei Key Laboratory of Animal Embryo Engineering and Molecular Breeding (2012ZD151)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-87380193; E-mail: kobe2071@tom.com

Received: 13 April 2015; Revised: 23 June 2015; Published online: 5 July 2015