

食源性空肠弯曲菌的分子分型及其遗传多样性分析

汪智^{1,2}, 王涓^{2,3}, 吴清平², 张菊梅², 聂翔^{2,3}, 唐胜君^{2,3}, 刘鸣^{1,2}, 马国祥^{2,3}, 王惠贤², 马宗灏²

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006) (2. 广东省微生物研究所, 广东省科学院, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东广州 510070) (3. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 为了解在 2012~2014 年从中国不同城市分离到的食源性空肠弯曲菌的遗传多样性特征, 本研究采用多序列位点分型 (multilocus sequencing typing, MLST) 的方法对分离到的 33 株食源性空肠弯曲菌进行分子分型。研究中, 对 33 株菌株的管家基因使用 7 对不同的引物进行 PCR 扩增, 并对扩增的产物使用凝胶电泳鉴定后进行测序。将测序结果同 PubMLST 中 *Campylobacter* 数据库进行比对, 以获得对应菌株 ST 型, 并提交新的 ST 型数据。利用其 MLST 数据构建进化树和最小生成树。结果显示 33 株食源性空肠弯曲菌可以分为 27 个 ST 型, 其中有 14 种为新的 ST 型, 可形成 11 种克隆复合体, 优势克隆复合体为 CC22 和 CC45, 部分菌株的 CC 型也曾在临床上发现。共存在 91 种核苷酸多态性位点, 部分等位基因之间存在重组。这表明在 2012-2014 年间分离得到的菌株具有丰富的遗传多样性, 并且有潜在致病风险。

关键词: 食源性空肠弯曲菌; MLST 分型; 遗传多样性; 致病风险

文章编号: 1673-9078(2020)03-133-139

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.3.018

Molecular Typing of Foodborne *Campylobacter jejuni* and Analysis of Its Genetic Diversity

WANG Zhi^{1,2}, WANG Juan^{2,3}, WU Qing-ping², ZHANG Ju-mei², NIE Xiang^{2,3}, TANG Sheng-jun^{2,3}, LIU Ming^{1,2}, MA Guo-xiang^{2,3}, WANG Hui-xian², MA Zong-hao²

(1.School of Bioscience and Bioengineering South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2.Guangdong Institute of Microbiology Guangdong Academy of Sciences, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology Guangzhou 510070, China)

(3.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to understand the genetic diversity of food-borne *Campylobacter jejuni* isolated in 2012~2014 from different cities of China, multilocus sequencing typing (MLST) was used for molecular typing of the 33 isolated strains. In the study, the housekeeping genes of 33 strains were amplified by PCR using 7 different pairs of primers, and the amplified products were identified by gel electrophoresis and sequenced. The sequencing results were compared with the *Campylobacter* database of PubMLST to obtain the corresponding sequence types, and the data of the new sequence type were submitted to the curator. A phylogenetic tree and minimum spanning tree were constructed according to MLST data. The results showed that 33 food-borne *C. jejuni* strains could be divided into 27 STs, of which 14 were new STs. They could

引文格式:

汪智,王涓,吴清平,等.食源性空肠弯曲菌的分子分型及其遗传多样性分析[J].现代食品科技,2020,36(3):133-139

WANG Zhi, WANG Juan, WU Qing-ping, et al. Molecular typing of foodborne *Campylobacter jejuni* and analysis of its genetic diversity [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(3): 133-139

收稿日期: 2019-06-01

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1601200); 国家自然科学基金项目 (31801650); 华南应用微生物国家重点实验室开放基金项目 (SKLAM004-2016); 广东省科技计划项目 (2017B090904004); 广东省科学院实施创新驱动发展能力建设专项 (2017GDASCX-0201)

作者简介: 汪智 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 空肠弯曲菌危害形成机制; 共同第一作者: 王涓 (1986-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物安全检测与监测

通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 中国工程院院士, 研究方向: 食品微生物安全检测与控制技术

form 11 clonal complexes, with the dominant clonal complexes being CC22 and CC45, and some CC-types were found clinically. There were 91 nucleotide polymorphism sites, with some alleles being recombined. These results demonstrate the genetic diversity of the strains isolated between 2012 and 2014 and their potential pathogen risks.

Key words: foodborne *Campylobacter jejuni*; MLST; genetic diversity; pathogen risks

空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 是一种常见的食源性致病菌, 可以引起人的腹泻、发热等症状, 是细菌性胃肠炎的常见致病菌之一, 有些菌株能带来严重的后遗症-格林-巴利综合征^[1-3]。国内外该菌对食品的污染状况十分严重, 对社会和经济造成严重负担^[4]。在欧盟地区, 弯曲菌的污染率最高, 2016 年被确诊的病例有 246307 例, 每十万人中约有 66.3 人被感染^[5]。根据美国 CDC 统计的数据表明, 从 2004 年到 2009 年, 每年报告平均暴发次数为 28 次。在国内, 其污染情况也十分严重。郑扬云在 2012~2013 年对华南四省的 558 份不同类型的零售食品进行调查, 总检出率为 2.51% (14/558), 其中肉与肉制品的检出率为 13.20% (14/106)^[6]。钟显在 2013~2014 年对全国不同的城市零售食品进行抽样调查, 总检出率为 3.30% (59/1798), 肉与肉制品的检测率为 14.81% (57/385)^[7]。马慧在 2015~2016 年间对天津市鸡肉样品进行调查, 检出率为 13.7% (31/227)^[8]。

研究空肠弯曲菌的遗传特征是了解其流行性特点和进化关系的重要手段, 并可为其溯源和防控提供理论依据。目前, 各种分子分型方法已被用于空肠弯曲菌的流行病学分析, 以获得其致病性和流行病学的信息。常用分型技术包括脉冲场凝胶电泳、随机扩增多态性 DNA、肠杆菌基因间重复共有序列 PCR 等^[9-12]。这些方法都是建立在凝胶电泳对核酸扩增条带识别的基础上, 它们存在着一定的局限性, 如分辨率不高、部分条带不清晰等缺点。而且, 在不同实验室的结果难以重复。MLST 分型技术是建立在测序的基础上, 将相对保守的管家基因的核苷酸序列作为比较对象, 利用管家基因的等位基因谱作为识别依据。MLST 具有重复性好和分辨率高的特点, 使得该技术被广泛使用^[13]。MLST 分型通过对七个管家基因进行测序, 并对其核苷酸序列比对, 从而进行识别和分型。由于 PubMLST 数据库的数字化和开放性特征, 使得不同实验室之间的结果进行比较和交流非常便利^[14,15]。对食源性空肠弯曲菌的 MLST 分型进行研究, 能给食源性空肠弯曲菌溯源提供理论支撑并对其致病风险作出预警。

本研究对课题组在 2012~2014 年间从食品样品中分离的 33 株空肠弯曲菌进行了 MLST 分型。通过对空肠弯曲菌的 7 个管家基因 (*aspA*、*glnA*、*gltA*、*glyA*、

tkt、*pgm* 和 *uncA*) 进行 PCR 扩增和测序, 以鉴定其 ST 型, 确定其流行性特征, 并以此了解食品中空肠弯曲菌的遗传多样性特征以及其潜在致病风险。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

所有的 33 株空肠弯曲菌均是本课题组在 2012~2014 年间从全国 24 个不同城市 (包括北京、上海、广州、哈尔滨、海口、武汉、西安等城市) 共 2957 份零售食品中分离得到, 样品类型包括水产品、乳制品、熟食、蔬菜、速冻食品、食用菌和肉制品等。通过 GB 4789.9-2008 (食品卫生微生物学检验 空肠弯曲菌检验) 对样品中的空肠弯曲菌进行分离和鉴定, 并最终通过 API Campy 进行确认, 共分离到 33 株空肠弯曲菌^[6,7], 具体菌株信息见表 1。

1.2 主要仪器及试剂

PCR 仪, 德国 Analytik Jena; 电泳仪, 瑞典安玛西亚, ImageQuant 350 凝胶成像系统, 英国 GE Healthcare; 血平板和 Skirrow 血平板, 广东环凯微生物科技有限公司; 细菌 DNA 快速提取试剂盒, 美国 Magen; PrimeSTAR HS DNA Polymerase, TaKaRa 公司; TAE 缓冲溶液 (50×) 和 GoldView 核酸染料, 生工生物工程有限公司; 引物由华大基因合成。

1.3 空肠弯曲菌的培养及基因组 DNA 提取

使用 Skirrow 血平板活化空肠弯曲菌, 挑取单菌落, 再使用血平板进行微需氧培养约 24 h, 收集所有菌体, 按照细菌 DNA 快速提取试剂盒提取基因组 DNA, -20 °C 保存备用。

1.4 管家基因扩增和测序

根据弯曲菌的 MLST 数据库信息, 使用 PCR 对 7 个管家基因进行扩增。扩增引物和测序引物见 MLST 官网 (<https://pubmlst.org/campylobacter/>)。PCR 扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 2 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 再进行 72 °C 延伸 10 min。并对其进行测序, 将测序获得的等位基因序列信息提交给 MLST 数据库, 获取 ST 型。新的

等位基因和 ST 型则需要提交给数据库管理员, 分配新的编号。

1.5 进化树及最小生成树构建

对 MLST 的序列信息构建进化树, 使用 MEGA 7 对所有的序列进行比对和对齐, 并使用 Neighbor-joining 法构建进化树^[16]。使用 SplitsTree V4.0 软件评价管家基因重组事件对系统发育的影响, 使用

Split decomposition 构建重组分解分析图, 并进行 Phi-test 分析, 计算其是否发生显著重组^[17]。将所有 ST 型和等位基因信息使用 BioNumerics 7.6 处理, 构建最小生成树。

2 结果与讨论

2.1 MLST 分型结果

表 1 菌株信息以及其 MLST 分型结果

Table 1 The information of strains and MLST data

菌株	来源	地点	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkl</i>	<i>uncA</i>	ST	clonal complex
1273-2B	鸭肉	太原	7	78	42	4	11	12	8	3930	NA
002-3A	鸭肉	福州	4	680	10	4	1	7	1	9295	45
002-3C	鸭肉	福州	4	7	10	4	1	7	594	9495*	45
786-1B	鸡肉	厦门	9	53	2	10	129	3	3	9561*	574
003-3B	鸭肉	厦门	9	2	5	2	11	3	6	2842	353
004-3B	鸡肠	厦门	9	2	5	2	11	3	6	2842	353
472-2B	鸭肉	河源	3	1	5	17	11	11	6	49	49
23	牛肉	广州	2	61	4	64	351	7	23	9547*	1034
103B	鸭肉	广州	8	2	2	212	11	253	147	7536	NA
105-1c	鸽子	广州	14	679	2	10	86	3	6	9496*	52
109-3B	鸡肉	广州	24	2	2	2	10	3	1	464	464
110-1B	鸭肉	广州	10	2	50	62	91	73	45	468	NA
126-A-单 2	冻鸡翅	从化	7	172	21	49	125	224	51	3573	NA
130B 单 1	鸡肉	增城	8	2	292	212	351	29	57	9720*	NA
148-B	鸭肉	湛江	55	52	57	26	470	29	23	9497*	692
178-2A	鸭肉	西安	172	2	2	2	11	5	6	9498*	354
178-2B	鸭肉	西安	1	3	6	4	3	733	3	9723*	22
178-2c	鸭肉	西安	37	61	4	64	141	3	61	9724*	NA
178-3B	鸭肉	西安	4	7	10	4	42	51	1	583	45
178-3c	鸭肉	西安	4	680	10	4	42	51	1	9499*	45
1924-2c	鲜鸭肉	西安	8	2	2	212	11	253	147	7536	NA
1924-3c	鲜鸭肉	西安	37	61	4	64	141	3	35	9545*	NA
2324B	鸭肉	厦门	24	2	2	2	10	3	1	464	464
CD300	鸡肉	成都	2	4	42	3	2	1	5	3944	21
CD302	鸡肉	成都	7	172	21	49	125	224	51	3573	NA
CDJ2573	鸡肉	成都	4	7	10	4	1	7	1	45	45
CHJC2-3B	鸭肉	从化	8	2	2	212	22	253	147	5869	NA
KM330B	三黄鸡	昆明	1	3	6	4	3	3	3	22	22
LWN1473A	鸭肉	广州	22	172	80	388	470	772	533	9721*	NA
LWN1474B	鸭肉	广州	22	364	80	388	470	772	533	9722*	NA
NCJ2523-2B	鸡肉	南昌	10	2	50	62	91	73	45	468	NA
WH318	白鸽	武汉	172	2	2	2	11	5	6	9498*	354
WHJ2674	鸡肉	武汉	1	39	6	4	3	3	3	9548*	22

注: NA 表示无法形成克隆复合体; *表示为新的 ST 型。

将所有等位基因的测序结果提交到 MLST 数据库进行比对, 具体结果如表 1 所示。所有的 33 株空肠弯曲菌可以分为 27 个 ST 型, 其中 14 个为新 ST 型, 共有 15 株菌 (15/33, 45.45%)。所有新的 ST 型菌株在表 1 中加“*”表示。ST3573、ST468、ST2642、ST464、ST7536 和 ST9498 都包含两株菌, 其他类的 ST 型都只有一株菌。有 20 株菌可形成克隆复合体 (clonal complex, CC), 13 株菌不能形成克隆复合体。从弯曲菌的 MLST 数据库中比较可知, 国际上优势的 ST 型为 ST21、ST45、ST50、ST22 等, 而本次分离的菌株多样性较高, 33 株菌可以分为 27 个 ST 型, 没有显著优势的 ST 型, 但有部分国际上常见的 ST 型也能在本研究中找到。

2.2 等位基因序列重组分析

所有的菌株共形成了 91 种核苷酸多态性位点, 具体结果见表 1。基因 *aspA*、*glnA*、*pgm* 和 *uncA* 都含有 14 种等位基因, *tkl* 为 13 种, *gltA* 和 *glyA* 各具有 11 种等位基因, 其多样性相对较高。7 种管家基因的优

势等位基因编号分别为 *aspA*~4(5/33, 15.15%)、*glnA*~2 (12/33, 36.36%)、*gltA*~2 (9/33, 27.27%)、*glyA*~4 (9/33, 27.27%)、*pgm*~11 (8/33, 24.24%) 和 *tkl*~3 (10/33, 30.30%), *uncA* 则为 *uncA*~1 (6/33, 18.18%) 和 *uncA*~6 (6/33, 18.18%) 两种。

为了解管家基因的重组情况, 使用 SplitsTree v 4.0 分别对 7 个管家基因的序列处理, 并利用 Split decomposition 构建重组分解分析图, 进行 Phi-test 计算, 其结果如表 2 和图 1 所示。从表 2 中 Phi-test 可知, 基因 *aspA*、*tkl* 和 *uncA* 没有发生显著的重组 ($p>0.05$), 而基因 *glnA*、*gltA*、*glyA* 和 *pgm* 则发生了显著的重组 ($p<0.05$)。从图 1 中也可知, 基因 *aspA* 形成了清晰的树状结构, 没有形成交联结构, 其重组发生率较低; 基因 *tkl* 和 *uncA* 各个分支之间连接较少, 仅 *tkl*~73 和 *uncA*~533 和其他的基因有交联, 这与表格 2 中 Phi-test 值较低相对应, 其发生重组发生率也较低。而 *gltA*、*glyA* 和 *pgm* 都形成了网格状的结构, 有较为复杂的关系, 其重组发生频率较高, 与表 2 的数据相符合。

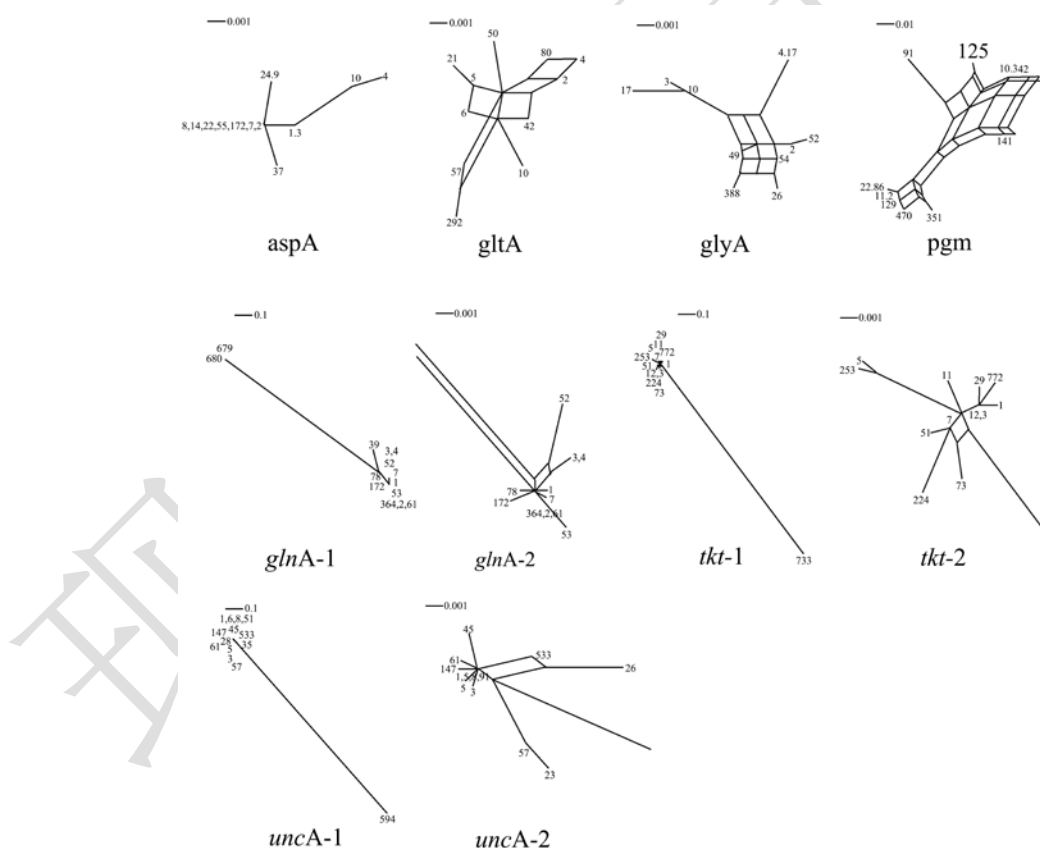


图 1 空肠弯曲菌等位基因重组分裂分解图

Fig.1 Recombination splitting decomposition map of *Campylobacter jejuni* alleles

注: 上图由 SplitsTree 使用 Split decomposition 构建, 图中的线条之间的复杂程度表示其基因之间的重组率, 其线条之间交联越多表明重组的可能性越高, 反之亦然。*glnA*、*tkl* 和 *uncA* 有部分等位基因大幅度偏离, 图 *glnA*-1、*tkl*-1 和 *uncA*-1 为全景图, *glnA*-2、*tkl*-2 和 *uncA*-2 为对应的局部放大图形。

表 2 MLST 等位基因信息及其核苷酸位点多态性

Table 2 MLST allelic information and nucleotide polymorphism

polymorphism		
locus	No. of locus	Phi-test
<i>aspA</i>	14	0.98323
<i>glnA</i>	14	0.00319
<i>gltA</i>	11	0.01773
<i>glyA</i>	11	0.00003
<i>pgm</i>	14	0.02217
<i>tkf</i>	13	0.30061
<i>uncA</i>	14	0.44364

注:Phi-test 由 SplitsTree 根据其核苷酸序列比对计算得到, 其值小于 0.05 时, 表明该基因发生显著重组。

2.3 菌株之间进化关系

为进一步了解食源性空肠弯曲菌分离株的种群结构, 利用 BioNumerics 7.6 对 33 株菌的 MLST 数据构建最小生成树 (图 2)。从图 2a 可知, 所有的菌株可大致分为 5 簇: 第一簇包含有 6 株菌, 6 个 ST 型, 除

ST3930 不能形成克隆复合体外, 其他菌株均为 CC45; 第二簇包括 3 株菌, 3 个 ST 型; 第三簇包含 15 株菌, 10 种 ST 型; 第四簇包含 6 株菌, 6 种 ST 型, 主要克隆复合体为 CC22 (3/6, 50%); 第五簇包含 3 簇菌, 2 种 ST 型。图 2b 和 2c 分别以不同的颜色表示对应的每个的 ST 型节点的分离源和分离地点。从图 2b 可知, 样品主要分离自鸭肉和鸡肉, 其他类型样品则相对分散, 被污染的样品 96.97% (32/33) 来自于禽类, 只有一个样品源自牛肉 (ST9547)。这一点也和前人研究类似, 禽类是空肠弯曲菌的天然宿主, 也是最容易被污染的食品。从图 2c 可知, 分离株的地域相对分散, 没有出现某一个城市分离到大量分离株现象。结合图 2a、2b 和 2c 可知, 其 ST 型和地域以及食品来源没有明显的关联。MLST 分型的最小生成树表明此次分离株的遗传多样性很丰富, 几乎都是不同 ST 型的菌株, 这可能与样品分布较广且来自不同的城市有关。分离株的生存环境不同, 基因型也不同。但不同城市之间菌株也存在着亲缘关系较近的菌株, 可能是由于其他原因导致菌株的转移, 使得地域差异不明显。

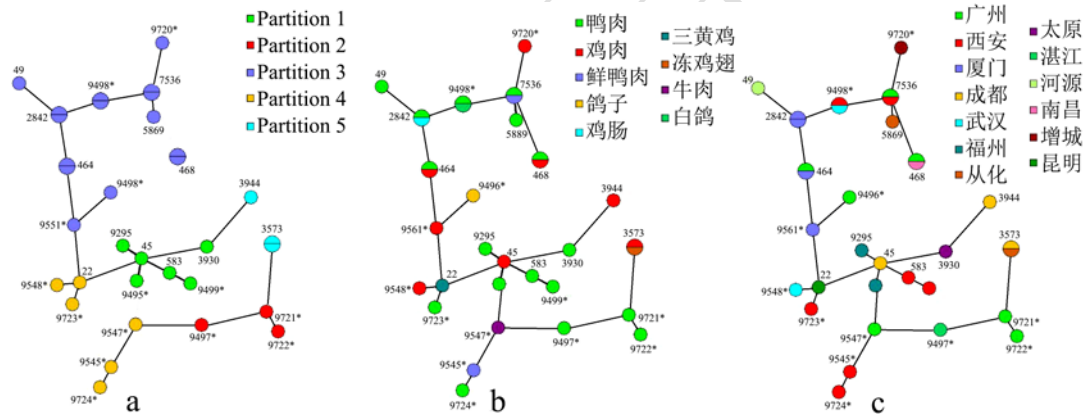


图 2 MLST 分型构建的最小生成树

Fig.2 Minimum spanning tree constructed by MLST data

注: 本图使用 BioNumerics 软件利用 MLST 数据构建的最小生成树, 每个圆圈均表示不同的 ST 型, 圆圈大小代表包含菌株数量多少, 而每个圆圈之间连线的远近以及虚实则表示菌株之间亲缘关系的远近。三幅图可对照看, 三个图中相同的位置表示为相同的 ST 型, 但其所表示信息不同。a 为使用 UPGMA 进行聚类后, 根据聚类进行分组, b 为利用样品来源进行分组, c 为利用样品的取城市地点进行分组, 不同的分组以不同的颜色显示。从 a、b、c 三个图中, 我们可以看到不同的 ST 型聚类以及其对应样品来源和采样地点信息, 以便直观的看出其中的关联。

为进一步了解分离株不同菌株之间的进化关系, 利用所有菌株的 MLST 基因核苷酸序列信息, 使用 MEGA 7 对其序列进行比对, 并利用 Neighbor-joining 对其构建系统发育树, 自展法 (bootstrap) 重复抽样次数 1000 次, 结果如图 3 所示。从图 3 进化树分析可知, 总体可以分为 4 簇, 第 I 簇和第 II 簇分别包含 10 种和 9 种 ST 型, 第 III 簇和第 IV 簇分别含有 5 种和 3 种 ST 型。第 III 簇和第 IV 簇含有的克隆复合体分别为 CC45 和 CC22, 其他簇中菌株之间进化距离较远,

ST 型和 CC 型分布相对较为分散, 没有发现显著优势的 CC 型。

MLST 分型是一种较为成熟且稳定的分型方式, 被广泛的应用于食源性致病菌的溯源和流行性分析。Weinberger 等^[18]对 2003-2012 年间自以色列分离的临床分离株和兽医分离株进行 MLST 分型, 并结合人口统计元数据, 调查空肠弯曲菌的分子流行病学特征发现, 空肠弯曲菌分离株多样性高, 新的 ST 型比例也很高。这些菌株的系统发育分析显示, 临床感染菌株

具有的优势 CC 型, 并且大多数人类临床株和家禽以及牛的分株的 ST 型聚集在相同的优势 CC 型中, 分析出牛肉等食物是其感染源。由此可见, MLST 可以作为了解空肠弯曲菌流行性和进化特点的手段, 并且可以做出风险预警。在本研究中, 我们的分离株中新的 ST 型占比很高, 其中 14 种 (14/27, 51.58%) 为新的 ST 型。CC22 和 CC45 为优势克隆复合体, 它们也是世界上流行的克隆复合体, 其中 CC22 具有极高的致病风险, 该克隆复合体以及其来源食品需要被重点关注。综合图 2 和图 3 的信息可知, 第 I 簇含有的 9 个不同的城市, 包含 6 种食品类型, 第 II 簇含有 6 个不同的城市, 包含有 5 种食品类型, 第 III 和 IV 簇分别含有 4 和 5 个不同的城市, 2 和 3 种不同的食品类型。每一簇中对应城市相对分散, 结合其分子分型结果, 也未能发现明显的聚类关系。这可能是本研究样品采样的地区和类型都较多、其遗传多样性也较高有关, 但菌株数量较少, 因此未能找到其 ST 型、CC 型和地域以及样品类型之间的显著关联。

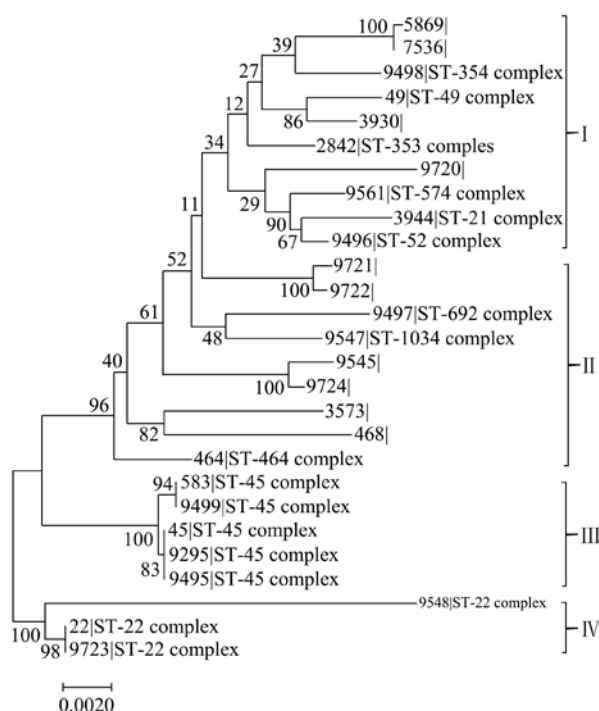


图 3 MLST 序列分型构建进化树

Fig.3 Phylogenetic tree constructed by MLST data

Sheppard 等^[19]利用 MLST 对空肠弯曲菌和结肠弯曲菌进行种群结构分析, 发现其具有高度的变异性, 且存在着基因重组。对其进行深入分析发现, 空肠弯曲菌存在着大量的水平或垂直方式的基因转移。这一点与我们的研究结果类似, MLST 分型结果显示 33 株菌株的 7 个管家基因具有 91 种核苷酸多态性, 部分等位基因存在着重组。从图 1 中我们也发现了一个很有趣的现象, 在 *glnA* (*glnA*~679, *glnA*~680)、*tkt*

(*tkt*~733) 和 *uncA* (*uncA*~594) 中有部分基因偏离整体较远, 这些基因对应的 ST 型分别为 ST9496*、ST9295、ST9495* 和 ST9723*, 其中三个为新的 ST 型, ST9496* 为 CC52, 其他三个均为 CC22。结合图 2 可知, 这 4 株菌中有 3 株菌株分离自鸭肉, 1 株分离自鸽子。从取样区域来看, 有两株菌株来自福州, 另外两株来自广州和西安。这 4 株菌没有发现明显的区域和样品类型特异性。这些基因的变异可能是由于和其他的菌株发生了重组, 导致其基因偏离整体较远。空肠弯曲菌是一种微需氧的苛性营养菌, 对生长条件要求苛刻, 基因组的高度变异性保障了其对复杂环境的适应性, 使其能在不利环境下通过基因重组或转移进而快速适应环境。

截至 2019 年, 空肠弯曲菌已经有 9763 个 ST 型, 中国地区有 1070 个分离株信息, 包括 804 个 ST 型 (<https://pubmlst.org/campylobacter/>)。将本次分离菌株的所有的 ST 型和 CC 型数据与中国地区提交的数据对比发现, 只有 ST45、ST49、ST464 和 ST7536 这 4 种 ST 型是目前中国地区已经发现的 ST 型, 其他的 23 种 ST 型均为本研究在中国地区首次发现, 其原因可能是由于本研究的菌株是源自全国 24 个不同城市的 7 大类共 2957 份食品样品中分离得到的, 且在中国是属于首次全国范围内的采样调查, 其覆盖城市范围广, 样品种类多且新, 因此, 能分离到前人未发现的菌株。由于空肠弯曲菌污染的食品大多为肉制品, 且其分离较难, 因此有部分城市只能分离到一株菌或者未能分离到菌株, 所以, 本研究中的样品多样性相比其他文献中在一个城市或者固定的几个养殖场中分离到空肠弯曲菌, 其多样性会较高, 其 ST 型多样性相对也会较高。且中国有些城市的空肠弯曲菌在此之前并未有被研究报道过, 因此, 也会出现许多国内外首次报道的 ST 型。本研究中优势的优势 CC 型为 CC22 (3/33) 和 CC45 (5/33), 根据弯曲菌 MLST 数据可知, 而国际上优势的克隆复合体为 CC21、CC828 和 CC45 等。本研究中的 CC45 为国际上流行性相一致, CC22 虽然未列出, 但其仍是较为常见的克隆复合体, 且在数据库中该克隆复合体包含大量临床分离株, 包括肠胃炎、格林-巴利综合征患者的分离株, 该 CC 型菌株具有较高的致病风险, 其对应的食品源和分离地区需要被重点关注。由此可见, 本研究的分离菌株虽然来自于食品, 但是其具有较强的潜在致病性。

3 结论

总之, 本研究利用 MLST 分型的方法, 对来自全国不同城市的 33 株食源性空肠弯曲菌进行分子分型,

总共可分为 27 种 ST 型, 其中 23 种为在中国地区首次发现, 并且存在 14 种前人未发现的新型, 极其具有研究价值。同时发现, 本次分离的菌株具有丰富的遗传多样性, 具有 91 种核苷酸多态性, 基因 *glnA*、*gltA*、*glyA* 和 *pgm* 发生了显著的重组。部分 CC 型曾在临床株被发现, 这部分 CC 型具有较大的致病风险, 后续需要对这些菌株进行更深一步的研究。本研究中被污染的食品全部为肉制品, 主要是禽肉, 其对应的 CC 型含有较高的致病风险, 因此对于肉和肉制品的污染状况需要进行重点监控。本研究丰富了空肠弯曲菌的 MLST 分型数据库, 为了解中国地区食源性空肠弯曲菌的遗传特性和分布特点提供了参考依据。

参考文献

- [1] 张明.空肠弯曲菌生物膜形成特性及相关基因的初步探析 [D].扬州: 扬州大学,2012
ZHANG Ming. Biofilm formation and relevant genes of *Campylobacter jejuni* [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2012
- [2] Godschalk P C R, Kuijf M L, Li J, et al. Structural characterization of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide outer cores associated with guillain-barre and miller fisher syndromes [J]. Infection and Immunity, 2007, 75(3): 1245-1254
- [3] Taboada E N, Belkum A V, Yuki N, et al. Comparative genomic analysis of *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barré and Miller Fisher syndromes: neuropathogenic and enteritis-associated isolates can share high levels of genomic similarity [J]. Bmc Genomics, 2007, 8(1): 359-370
- [4] Kirk M D, Pires S M, Black R E, et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis [J]. PLOS Medicine, 2015, 12(12): e1001921
- [5] EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC(European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016 [J]. EFSA Journal, 2017, 15(12): 5077
- [6] 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
ZHENG Yang-yun, WU Qing-ping, WU Kui, 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
- [7] ZHONG X, WU Q, ZHANG J, et al. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolated from retail food in China [J]. Food Control, 2016, 62:10-15
- [8] 马慧.天津市零售鸡肉中空肠弯曲菌分布及特征分析[D].天津:天津科技大学,2017
MA Hui. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* isolated from retail chicken in Tianjin [D]. Tianjin: Tianjin University of Science&Technology, 2017
- [9] AN J U, HO H, KIM J, et al. Dairy Cattle, a potential reservoir of Human Campylobacteriosis: epidemiological and molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from cattle farms [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3136
- [10] Yaidelys I T, Miró Elisenda, Pedro G, et al. Population structure, antimicrobial resistance, and virulence-associated genes in campylobacter jejuni isolated from three ecological niches: gastroenteritis patients, broilers, and wild birds [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1676
- [11] Mouwen D J M, Weijtens M J B M, Capita R, et al. Discrimination of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR types of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4318-4324
- [12] Ghorbanalizadgan M, Bakhshi B, Lili A K, et al. A molecular survey of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* virulence and diversity [J]. Iranian Biomedical Journal, 2014, 18(3): 158-164
- [13] Jolley K A, Bray J E, Maiden M C J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [J]. Wellcome Open Research, 2018, 3:124
- [14] Wei B, Kang M, Jang H K. Genetic characterization and epidemiological implications of *Campylobacter* isolates from wild birds in South Korea [J]. Transbound Emerg Dis, 2019, 66(1): 56-65
- [15] Mohan V, Habib I. Multilocus sequence typing (MLST), porA and flaA typing of *Campylobacter jejuni* isolated from cats attending a veterinary clinic [J]. BMC Research Notes, 2019, 12(1): 76
- [16] Kumar S, Stecher G, Tamur A K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874

(下转第 244 页)