

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
51(3):320–325; 4 March 2011  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 广州地区嗜肺军团菌环境分离株的基因序列分型分析

张颖, 屈平华, 张健, 陈守义\*

广州市疾病预防控制中心, 广州 510080

**摘要:**【目的】研究广州市嗜肺军团菌的基因特征, 对来自不同水域环境的嗜肺军团菌进行分子分型研究。【方法】选择嗜肺军团菌的 7 个基因 *flaA*、*asd*、*mip*、*pilE*、*mompS*、*proA* 和 *neuA* 作为目的基因, 对在 2006–2009 年间广州地区分离的 44 株嗜肺军团菌进行 PCR 扩增和测序, 并将核苷酸序列上传至欧洲军团菌病感染工作组 (EWGLI) 数据库进行比对, 得到基因型别 (Sequence type, ST), 对结果进行基因序列分型 (Sequence-Based Typing, SBT) 和系统进化分析。【结果】44 株嗜肺军团菌可分为 20 个 ST 型, ST01 占 30% (13/44), 与数据库比对得到 15 个新 ST 型, 截至发稿, 其中 2 个新 ST 型获 EWGLI 分配序号 (ST887 和 ST888)。通过 BURST 和 SplitsTree 建立的系统发育树得到本地区嗜肺军团菌的遗传关系。【结论】广州市嗜肺军团菌的群体基因型具有地区特异性和遗传多样性, SBT 方法对于研究嗜肺军团菌的基因差异与流行病学具有重要意义。

**关键词:** 嗜肺军团菌, 基于基因序列分型, 分子分型

**中图分类号:** Q933      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 03-0320-06

嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*) 是兼性胞内寄生菌, 普遍存在于天然淡水和人工水域环境中, 通过呼吸道传播, 是引起人类流行性、散发性和医院内获得性肺炎的重要病原体<sup>[1–2]</sup>。近年发现其还可以引起肺外其他器官如心脏、肾脏和中枢神经系统功能障碍<sup>[3–5]</sup>。我国自 1982 年在南京首次证实军团菌病病例以来, 全国已有多起该病散发与暴发流行的报道<sup>[6]</sup>。近年来, 病原菌的分子分型技术成为从基因水平上对传染性疾病进行流行病学调查和溯源的主要方法, 也是判断细菌遗传规律的重要手段。基因序列分型方法 (Sequence-Based Typing, SBT) 以高通量测序为基础的分型方法, 选择一个或多个密切相关基因对微生物进行分型, 多位点序列分型

(Multilocus sequence typing, MLST) 是其中一种。2004 年, 欧洲军团菌病感染工作组 (The European Working Group for Legionella Infections, EWGLI) 的 Gaia 等建立了嗜肺军团菌的 SBT 互联网数据库 ([http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)), 选择 7 个嗜肺军团菌选择压力相关的基因作为目标, 建立与 MLST 方法类似的基因分型系统, 在全球范围和分子水平上阐述嗜肺军团菌的亲缘关系<sup>[7–8]</sup>。加拿大的 Reimer AR 等人对近 30 年分离的环境和临床嗜肺军团菌株进行 SBT 分型, 结合流行病学特征和地理分布研究, 建立的分子特征数据库为当地流行病学调查奠定了良好基础<sup>[9]</sup>。

**基金项目:** 广东省科技计划项目 (2009B060700018); 广州市医药卫生科技项目 (201102A213249)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-83850768; E-mail: shouyi\_chen@163.com

**作者简介:** 张颖 (1980–), 女, 广州人, 硕士, 主管技师, 主要从事呼吸道致病菌研究。E-mail: estelle\_zy@yahoo.com.cn

**收稿日期:** 2010-09-14; **修回日期:** 2010-12-08

本研究使用 SBT 方法对 2006 – 2009 年分离出的 44 株嗜肺军团菌环境菌株进行基因分型,结合血清学和地理分布,分析菌株间的遗传相关性,为建立本地区嗜肺军团菌数据库和掌握其流行情况奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株:菌株选取 2006 – 2009 年广州地区自然环境和公共场所空调冷却塔常规监测获得的嗜肺军团菌分离株 44 株。菌株来源于湖泊 4 株,宾馆 15 株,地铁 17 株,会议中心 5 株和其他公共场所 3 株。

1.1.2 主要试剂和仪器:嗜肺军团菌血清群 1-14 型乳胶凝集试剂盒 (PRO-LAB® Prolex™);炭粉酵母

浸出物培养基:BCYE (Oxide); *Pyrobtest* DNA Polymerase PCR 试剂盒 (TaKaRa); PTC220 常规 PCR 仪 (Bio-Rad)。

1.2 血清学乳胶凝集试验

菌株复苏后接种于 BCYE 培养基,置于 37℃ 在 2.5% CO<sub>2</sub> 环境下培养 48 h。挑取典型菌落进行血清学鉴定分型。

1.3 DNA 模板制备

挑取 BCYE 平板上单克隆于 0.5 mL 灭菌水中,100℃ 煮沸 8 min,冰浴后离心取上清 5 – 10 μL 做 PCR 模板。

1.4 SBT 等位基因选择

选择嗜肺军团菌的 7 个基因 *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* 和 *neuA* 作为本研究的目的基因 (表 1)。

表 1 嗜肺军团菌目的基因的选择  
Table 1 Selection of the specific genes of *Legionella pneumophila*

Gene	PCR product size/bp	GenBank accession No. of reference sequence	Size of target region/nt	Gene products
<i>flaA</i>	245	X83232	182	flagellin
<i>pilE</i>	459	AF048690	333	competence and adherence associated pilin
<i>asd</i>	575	AF034213	473	aspartate-B-semialdehyde dehydrogenase
<i>mip</i>	558	AJ496269	402	macrophage infectivity potentiator
<i>mompS</i>	648	AF078136	352	major outer membrane protein precursor
<i>proA</i>	480	M32884	405	zinc metalloprotease precursor
<i>neuA</i>	459	AJ007311	354	N-acetylneuraminic acid condensing enzyme

1.5 靶基因片段扩增

扩增和测序引物参考欧洲军团病感染工作组提供的序列由上海生工生物技术公司合成<sup>[10]</sup>。引物在使用前按照相应分子量进行稀释到 10 μmol/L。在 –20℃ 保存备用。PCR 扩增采用 50 μL PCR 反应体系。反应条件为:95℃ 2 min;98℃ 25 s,56℃ 30 s,72℃ 35 s,35 个循环;72℃ 5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳后 EB 染色观察。

1.6 测序及结果处理

PCR 样品送至生物公司测序。把双向测序结果上传至 SBT 数据库进行在线数据分析,得到等位基因图谱 (allelic profile) 和基因型别 (Sequence type,ST)。没有测出 *neuA* 基因型别的菌株在本地数据库标记为 ST0N (N 代表序号,如 ST01)。对测序结果使用 Lasergene 5.0 SegMan 分析,上下游序列整合后得到完整序列,上传至 SBT 数据库比对找出核苷酸序列的碱基差异。

1.7 方法重现性研究

对同一菌株进行两次基因组 DNA 模板提取,对同一批次模板进行 2 次重复性 PCR 实验并测序,比较测序结果的一致性。

1.8 SBT 数据分析方法

运用 BURST 算法 (<http://linux.mlst.net/burst.htm>) 对所得嗜肺军团菌 ST 型别的 7 个基因位点序列进行聚类分析<sup>[11]</sup>。运用 SplitsTree 对 44 株菌的多位点基因序列构建径向系统进化树,结合 BURST 算法分析其遗传关系<sup>[12]</sup>。

2 结果和分析

2.1 目的基因的 PCR 结果

PCR 扩增结果显示,大部分血清 1 型和部分非血清 1 型 (LP4, LP6 和 LP14) 嗜肺军团菌的 7 个目的基因均可以扩增出特异性产物,部分血清 1 型和部分非血清 1 型 (LP5, LP7, LP8, LP9, LP11, LP13)

的嗜肺军团菌只能扩增出除了 *nueA* 基因以外的 6 个目的基因特异性产物(图 1)。血清 LP14 型的 ST752 型菌株可以扩增出 *nueA* 基因,ST013 型则不

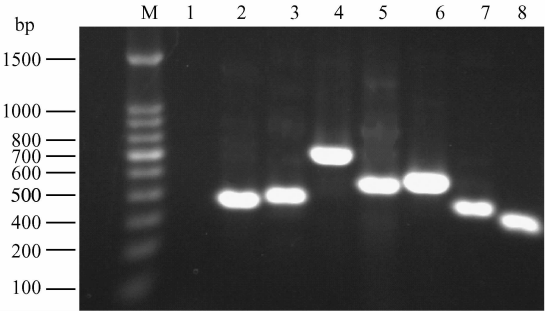


图 1 7 个目的基因的 PCR 电泳结果

Fig.1 Result of 7 target gene fragments PCR. M;100bp ladder, line 1-7;negtive control, *neuA*, *proA*, *mip*, *asd*, *pilE*, *mompS*, *flaA*.

可以;血清 LP4 型的 ST014 型菌株可以扩增出 *nueA* 基因,ST013 型则不可以。

2.2 核苷酸序列比较结果

对不同来源的嗜肺军团菌的 7 个目的基因的序列分别进行比较,得到 44 个不同样品的每个基因的碱基差异情况。

2.3 SBT 数据库比对分析结果

将整理好的序列上传至 SBT 数据库进行比对,确定菌株的 ST 型。15 株菌得到已知的 ST 型,其中 ST1 型 7 株,ST187 型 3 株,ST752 型 3 株,ST154 型 1 株和 ST159 型 1 株。其余 29 株菌为新 ST 型,其中 26 株的 *nueA* 基因不能被扩增,3 株可以扩增 *nueA* 基因并获得 *nueA* 基因型别。截止发稿时,ST887 和 ST888 为该数据库分配的新 ST 编号(表 2)。

表 2 嗜肺军团菌 SBT 分型结果

Table 2 SBT type of *Legionella pneumophila* isolates

SBT type	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	Serotype( no. of isolates)	No. of isolates
1	1	4	3	1	1	1	1	LP1 (6) ,LP14(1)	7
154	11	14	16	16	15	13	2	LP1	1
159	11	14	16	1	15	13	2	LP14	1
187	3	10	1	28	14	9	3	LP6	3
752	22	4	3	1	1	1	1	LP1 (1) ,LP14(2)	3
01	1	4	3	1	1	1	f	Lp7	13
02	2	6	17	11	48	15	f	Lp5	1
03	12	4	11	10	5	12	f	Lp11	1
04	8	6	34	9	2	8	f	Lp13	1
05	8	10	34	9	6	8	f	NA	1
07	6	10	3	13	19	4	f	Lp8	1
08	3	6	17	3	48	11	f	Lp5	2
09	28	17	33	19	31	1	f	Lp9	1
010	2	6	17	11	48	8	f	Lp5	1
011	8	6	34	9	53	8	f	Lp5	1
012	2	10	15	10	4	4	3	Lp1	1
013	11	14	16	25	15	13	f	Lp14(1) ,LP4(2)	2
014	11	14	16	25	7	13	1	Lp4	1
887 <sup>*</sup>	21	16	16	16	15	13	9	Lp1	1
888 <sup>*</sup>	5	14	22	26	2	10	12	Lp1	1

<sup>\*</sup> New ST type assigned by SBT database of EWGIL. NA means unknown serotype of *Legionella pneumophila*. ‘f’ represents the *neuA* allele which failed to amplify.

2.4 不同来源嗜肺军团菌 SBT 进化关系分析

已知 ST 型别的 15 株菌的 BURST 算法聚类结果表明没有核心 ST 型,即核心克隆系;ST752 和 ST1 仅有 1 个等位基因差异,是单位点变异株(Single Locus Variants,SLVs),同属一个克隆复合物(Clonal complex);ST154 和 ST159 属于另一克隆复合物,也是 SLVs,只有 1 个基因位点差异;两组克隆复合物均不存在双位点变异株(Double Locus

Variants,DLVs)和卫星克隆(Satellites,SATs)。ST187,ST887 和 ST888 分别属于单态群(Singleton)。

运用 SplitsTree 对 44 株不同来源的嗜肺军团菌的多位点基因序列构建径向系统进化树,结合 BURST 算法分析,结果显示新发现的 ST01 可划分入 ST1 和 ST752 组成的克隆复合物,为 SLVs;ST014 和 ST013 属于 ST154 和 ST159 组成的克隆复合体

的 DLVs, ST887 则属于该克隆复合物的 SATs; ST02、ST010 和 ST08 同属一个克隆复合物 DLVs; ST04、ST05 和 ST011 同属一个克隆复合物的 DLVs; ST187 和 ST012 有 2 个基因位点一致, 为相关分离株; 其余的 4 个 ST 型别属于单态群。结果显示广州市嗜肺军团菌的环境分离株在亲缘关系上与 EWGLI 的 SBT 数据库已知的菌株既有密切关系, 也存在明显区别, 即具有种的地区特异性和遗传多样性(图 2)。

在 2006–2009 每年均检出多种 ST 型别嗜肺军团菌, 没有明显优势克隆株。ST1 和 ST01 型菌株在 2006–2009 年多个地点均有检出。ST1 型占 16% (7/44), 主要分布在宾馆; ST01 型占 30% (13/44), 主要分布在地铁和会议中心。ST887 和 ST888 在 2007 年湖泊中检出, 均为 LP1 型。ST187 型菌株分别在 2008 和 2009 年同一宾馆检出, 说明某些克隆系可以在同一地点跨年份存在; ST1 和 ST01 菌株在同一公司同时检出, 说明不同的克隆系的菌株可以在同一地点并存。在同一地铁站 2006 年检出 ST01 型, 2008 年检出 ST012 型, 两者有 7 个基因位点差异, 说明同一地点不同时间的克隆系会改变, 或者该地区一直存在 2 个亲缘关系较远的克隆系。

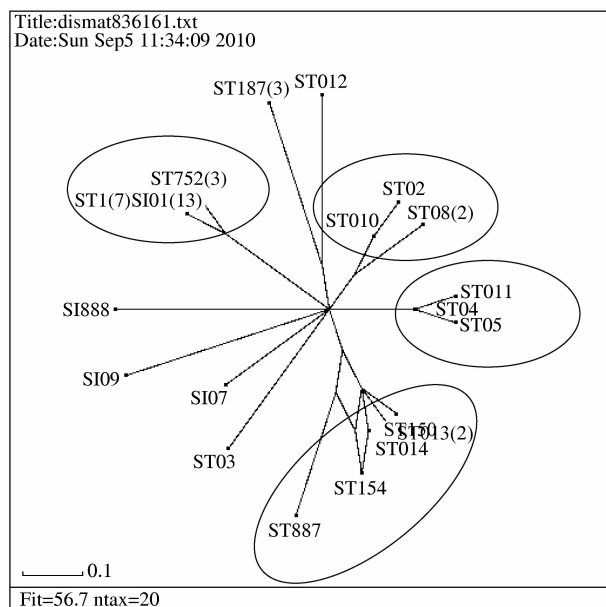


图 2 多位点序列系统进化树

Fig. 2 SBT Phylogenetic tree. Web tools SplitsTree was used. (<http://pubmlst.org/analysis/>). It shows that STs are divided into 4 groups and 4 singletons. Parentheses show the number of isolates of each ST type.

### 3 讨论

据 WHO 估计, 军团菌病在西欧国家的发病率接近于每年 10 万例。在我国的大中城市, 随着集中空调系统、供水系统的广泛应用, 军团菌病暴发或流行的危险性也越来越大。实验室分型方法成为追溯传染源和调查传播途径的重要手段, 利用分子生物学方法对病原菌进行分子分型已得到广泛应用<sup>[5]</sup>。

MLST 检测的序列是较为保守的多个管家基因, 通过 DNA 测序分析存在于同一等位基因位点上的所有变异, 很少几个基因位点就可以满足高分辨率的分型系统要求, 揭示菌株变异<sup>[13]</sup>。EWGLI 根据 MLST 原理建立 SBT 数据库, Gaia 和 Ratzow 等选取与嗜肺军团菌选择压力、毒力和膜蛋白相关的 7 个基因作为目的基因, 分别是嗜肺军团菌鞭毛蛋白基因 *flaA*, 由 2 个亚单位组成的外膜蛋白基因 *mompS*, IV 型菌毛蛋白基因 *pilE*, 天门冬酰胺- $\beta$ -半醛脱氢酶基因 *asd*, 巨噬细胞感染增强蛋白基因 *mip*, 胞外锌金属蛋白酶基因 *proA* 和 N-乙酰神经氨酸胞嘧啶转移酶基因 *neuA*<sup>[7–8,14]</sup>。目前 EWGLI 对 7 个基因的多样性计算分析: *mompS* 0.8857, *mip* 0.8684, *flaA* 0.8523, *asd* 0.8453, *neuA* 0.8138, *proA* 0.80717 和 *pilE* 0.8015<sup>[10]</sup>, 说明这 7 个目的基因的突变位点的数量和种类均可以充分反映嗜肺军团菌的系统遗传关系。虽然目前脉冲场凝胶电泳分型 (Pulsed-field Gel Electrophoresis Typing, PFGE) 是细菌分型普遍使用的方法, 但是在本实验室的前期实验中, PFGE 图谱出现模糊条带, 难以区分不同环境来源的菌株 (数据未显示), 相比之下 SBT 结果的分型信息简单明了, 具有高度的客观性和重复性, 数据可以在各实验室之间传输共享。可见基于 DNA 序列的分子分型方法比基于电泳图谱的传统分子分型方法有更好的效果。Bianchi A 等用 3 种分子分型方法调查米兰一间医院的军团菌病暴发, 认为 SBT 比 PFGE 和 AFLP 具有更好的实用性和重复性, 且方便结果的解释<sup>[15]</sup>。

SBT 数据和信息的累积建立在共享者正确使用的前提下, 新的型别信息上传至数据库中结合已知的型别信息, 对分子流行病学和细菌进化学的分析具有重要意义。截至发稿, EWGLI 的 SBT 数据库所收集的数据已经达到 4625 条, 可以分辨的型别已经超过 909 个, 范围涉及全球多个国家。在本实验中,

大部分菌株的 *neuA* 基因扩增是成功的,然而部分血清 LP1 型和部分非 LP1 型(LP5,7,8,9,11,13)菌株 *neuA* 基因在多次 PCR 重复实验和条件优化的情况下仍不能被扩增出。该结果与 Reimer AR 的实验结果相似,部分血清型为 LP2,4,5,8,10,13 的菌株和部分难以确定血清型的菌株不能被扩增出 *neuA* 基因片段<sup>[10]</sup>。故认为,SBT 方法目前对于扩增部分血清型非 LP1 型的嗜肺军团菌有一定局限性,但是 *neuA* 基因不能被扩增出这个性质也是该等位基因型别的其中一个特征。

对于所有的分子分型方法来讲,各分离株之间的亲缘关系通常是以系统进化树图来标识的。系统树显示基因型密切相关的分离株聚类,但很难显示出细菌克隆在生长或分化过程中发现的事件。BURST 算法综合考虑了细菌克隆的形成以及分化的方式,提供了一种聚类分析的替代方式,用于显示经 MLST 分析的分离株之间的亲缘关系<sup>[14]</sup>。本文运用 SplitsTree 结合 BURST 算法建立径向系统发育树,分析得到本地区新 ST 型的聚类情况。ST1 型是 SBT 数据库中最主要的 ST 组别,其 SLVs ST01 型在本实验数据中占 30% (13/44);新的 ST 型别 ST03, ST07, ST09, ST888 属于单态群,与本地区在 EWGLI 中有记录的 5 个 ST 型至少存在 6 个等位基因位点的差异,具有较远的亲缘关系。本实验中 44 株嗜肺军团菌至少来源于 9 个克隆系,其中 ST887 和 ST888 等位基因谱图提交 SBT 数据库后被 EWGUL 给予新的 ST 编号,充分说明广州市嗜肺军团菌具有明显的地区特异性和遗传多样性。

随着城市现代化的高速发展和人口的频繁流动,我市嗜肺军团菌环境分离株的基因型呈现复杂的多样性。本实验的结果进一步完善了嗜肺军团菌的 SBT 数据库,证实了 SBT 方法对于研究嗜肺军团菌的基因差异与进化趋势具有重要意义,同时也丰富了广州市环境中嗜肺军团菌的遗传多样性资料,为研究广州地区嗜肺军团菌的菌株特性和流行病学提供了重要依据。

## 参考文献

[1] Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, Marchesi I, Bargellini A, Tatò D, Napoli C, Zanetti F, Leoni E, Moro M, Scaltriti S, D'Alcalà GR, Santarpia R, Boccia S. *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. *Applied and*

*Environment Microbiology*, 2005, 71(10):5805-5813.

[2] La-Scola B, Marrie TJ, Auffray JP, Raoult D. Mimivirus in pneumonia patients. *Emerging Infectious Disease*, 2005, 11(3):449-452.

[3] Helbig JH, Uldum SA, Bernander S, Lück PC, Wewalka G, Abraham B, Gaia V, Harrison TG. Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial legionnaires' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 1(2):838-840.

[4] 陆建红, 张旻, 周新, 陈钦, 沈华, 徐耀传. 社区获得性军团菌肺炎 21 例临床分析. *中国感染与化疗杂志 (Chinese Journal of Infection and Chemotherapy)*, 2008, 8(2):132-134.

[5] 屈平华, 尹一兵, 胡朝晖, 朱庆义, 宋亚军, 杨瑞馥, 刘元力, 李朴. 环境中军团菌的分离培养及鉴定方法的探讨. *中华预防医学杂志 (Chinese Journal of Preventive Medicine)*, 2008, 42(9):653-657.

[6] 路凤, 金银龙, 程义斌. 军团菌病的流行概况. *国外医学卫生学分册 (Foreign Medical Sciences: section of hygiene)*. 2008, 35(2):78-83.

[7] Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, Harrison TG. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(5):2047-2052.

[8] Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(6):1965-1968.

[9] Reimer AR, Au S, Schindle S, Bernard KA. *Legionella pneumophila* monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types isolated in Canada between 1981 and 2009: Laboratory Component of National Surveillance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2010, 29:191-205.

[10] Mentasti M, Fry N. European Working Group for *Legionella* Infections Sequence-Based Typing (SBT) protocol for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* Version 4.1. [http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)

[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] Huson DH. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics*, 1998, 14(1): 68-73.
- [13] Persing DH. 分子微生物学诊断原理与实践. 柯昌文, 邓小玲, 王洪敏, 等译. 第一版. 广州: 中山大学出版社, 2008: 299-301.
- [14] 刘元力, 胡朝晖, 朱庆义. 军团菌分子分型及其流行病学调查中应用. *微生物学杂志 (Journal of Microbiology)*, 2007, 27(4): 83-86.
- [15] Bianchi A, Tesaro M, Consonni M, Galli MG. Investigation on strains of *Legionella pneumophila*, isolated from a hospital of Milano, with three genotyping methods. *Annali di igiene; medicina preventiva e di comunità (Annals of care; preventive medicine and community)*, 2009, 21(5): 517-22.

# Sequence-based typing of enviromental *Legionella pneumophila* isolates in Guangzhou

Ying Zhang, Pinghua Qu, Jian Zhang, Shouyi Chen \*

Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510080, China

**Abstract:** [ **Objective** ] To characterize the genes of *Legionella pneumophila* isolated from different water source in Guangzhou from 2006 to 2009. To genotype the strains by using sequence-based typing (SBT) scheme. [ **Methods** ] In total 44 *L. pneumophila* strains were identified by SBT with 7 diversifying genes of *flaA*, *asd*, *mip*, *pilE*, *mompS*, *proA* and *neuA*. Analysis of the amplicons sequence was taken in the European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) international SBT database to obtain the allelic profiles and sequence types (STs). Serogroups were typed by latex agglutination test. [ **Results** ] Data from SBT revealed a high diversity among the strains and ST01 accounts for 30% (13/44). Fifteen new STs were discovered from 20 STs and 2 of them were newly assigned (ST887 and ST888) by EWGLI. SBT Phylogenetic tree was generated by SplitsTree and BURST programs. [ **Conclusion** ] High diversity and specificity were observed of the *L. pneumophila* strains in Guangzhou. SBT is useful for *L. pneumophila* genomic study and epidemiological surveillance.

**Keywords:** *Legionella pneumophila*, Sequence-Based Typing(SBT), genotype

(本文责编:王晋芳)