

实验技术与方法

2019—2022年聊城市食品和病例分离单增李斯特菌基于全基因组测序的分子特征及耐药性分析

钱璐¹,张然²,梁胜楠¹,崔方元¹,程利红¹,张香媛¹

(1. 山东省聊城市疾病预防控制中心,山东聊城 252000;2. 山东省聊城市人民医院,山东聊城 252000)

摘要:目的 基于全基因组测序(WGS)比较分析2019—2022年聊城市单核细胞增生李斯特菌(*Lm*)食品和病例分离株基因组特征、毒力性、耐药性以及遗传多样性。方法 对聊城市33株市售食品和临床病例中*Lm*分离株开展抗生素敏感性试验和WGS。利用MGAP对WGS数据进行拼接组装,对组装基因组进行基因预测和功能注释、MLST,制作cg MLST最小生成树图,并与美国国家生物信息中心(NCBI)上获取的18株国内外*Lm*构建wg-SNP进化树。结果 33株*Lm*分离株的基因组大小为2.89~3.41 Mb,CG含量为37.81%~37.97%,可分为6个ST型(ST9、ST121、ST8、ST87、ST155、ST101),分别属于6个克隆复合群(CC9、CC121、CC8、CC87、CC155、CC101);分离株均携带*fosX*和*mprF*耐药基因,此外还携带*lplA1*、*prsA2*等其他18个毒力基因,有不同程度的毒力基因缺失情况。2株菌对四环素耐药,1株菌对林可霉素耐药。均携带毒力岛LIPI-1和LIPI-2,未检测到毒力岛LIPI-3和LIPI-4。wg-SNPs、cgMLST和基于单拷贝核心蛋白序列的系统发育树遗传进化分析显示,33株*Lm*分子分型呈现高度多样性,病例来源菌株与食品分离株亲缘关系密切,食品分离株与国外暴发分离株在进化关系上密切相关。结论 山东省聊城市食品和病例中分离的单增李斯特菌均携带毒力基因,具有一定的潜在致病能力,耐药情况尚不严重。分子型别呈现出多样性,食品来源菌株和病例分离株具有较近的亲缘关系,提示市售食品有食源性感染的潜在风险。

关键词:单核细胞增生李斯特菌;全基因组测序;毒力;耐药性;食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)03-0292-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.03.009

Molecular characterization and drug resistance analysis based on whole-genome sequencing of *Listeria monocytogenes* isolated from food and patients in Liaocheng City from 2019 to 2022

QIAN Lu¹, ZHANG Ran², LIANG Shengnan¹, CUI Fangyuan¹, CHENG Lihong¹, ZHANG Xiangyuan¹

(1. Liaocheng Center for Disease Control and Prevention, Bacterial Infectious Disease Control and Prevention, Shandong Liaocheng 252000, China; 2. Liaocheng People's Hospital, Shandong Liaocheng 252000, China)

Abstract: Objective The genomic characteristics, toxicity, drug resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* (*Lm*) isolated from food and patients based on whole genome sequencing (WGS) in Liaocheng City from 2019 to 2022 were investigated. **Methods** The *Lm* strains isolated from food and patients were detected by the drug sensitivity test and WGS. The whole genome sequencing data was spliced and assembled by MGAP to carry out gene prediction and functional annotation on the assembled genome, MLST, production of cg MLST minimum spanning tree. The genetic evolution of 18 domestic and foreign foodborne *Lm* isolated strains obtained from NCBI were analyzed by wg-SNP method. **Results** The genome size of 33 *Lm* isolates was 2.89-3.41 Mb, and the CG content ranged from 37.81% to 37.97%. The strains could be divided into 6 ST types (ST9, ST121, ST8, ST87, ST155, ST101), corresponding to 6 clonal complex groups (CC9, CC121, CC8, CC87, CC155, CC101). The strains carried *fosX* and *mprF* resistance gene, 18 other virulence genes such as *lplA1* and *prsA2*, with varying degrees of deletion of virulence genes. 2 strains were resistant to tetracycline and 1 strain was resistant to lincomycin. The stains carried virulence islands LIPI-1 and LIPI-2 without virulence islands LIPI-3 and LIPI-4. The genetic evolution analysis of wg-SNPs, cgMLST and phylogenetic tree

收稿日期:2023-04-19

作者简介:钱璐 女 主管技师 研究方向为微生物检验检测与耐药 E-mail:lccdcql@126.com

通信作者:梁胜楠 女 副主任技师 研究方向为食源性病原菌溯源与耐药 E-mail:lccdcsls@126.com

based on single-copy core protein sequence showed that the molecular typing of 33 *Lm* strains was with high diversity in molecular typing. Patient derived strains were closely related to food isolates, and food isolates were closely related to foreign outbreak isolates in evolutionary relationships. **Conclusion** The strains of *Lm* isolated from food and patients both carry virulence genes with certain potential pathogenic ability. The drug resistance of the isolated strains is not serious. Molecular types exhibit diversity. The close genetic relationship between strains from food sources and patient isolates suggests that the potential risks of foodborne infections in commercially available food.

Key words: *Listeria monocytogenes*; whole genome sequencing; toxicity; drug resistance; foodborne pathogenic

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, *Lm*)是李斯特菌病的病原体,革兰氏阳性胞内菌,普遍存在于自然环境中,被世界卫生组织列为五大食源性致病菌之一^[1]。*Lm* 主要引起子宫和中枢神经系统(Central nervous system, CNS)感染,子宫感染会导致新生儿晚期流产或败血症, CNS 感染主要引发脑炎,此外还可引起眼部感染和角膜炎等^[2]。研究表明,李斯特菌病散发和暴发的主要原因是食入被 *Lm* 污染的食品,如冷冻饮品、金针菇、水产品、熟肉制品等^[3-4]。近年来, *Lm* 食物中毒事件频发,如 2022 年 Big Olaf Creamery 品牌冰淇淋产品污染事件、2022 年多品牌包装金针菇污染事件、2021 年韩国都乐包装沙拉产品污染事件等。2013 年我国国家食品安全风险评估中心针对单增李斯特菌开展专项监测,山东省聊城市自 2014 年开展监测以来,每年持续监测到孕妇、新生儿和免疫低下人群的散发病例报告几十余例。目前尚未见聊城市食品和病例中单增李斯特菌相关报道,对于单增李斯特菌感染的危害认识还多有不足,因此,开展聊城市 *Lm* 食品和病例分离株基因组特征本底调查十分具有必要性。

多年来,脉冲场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)一直是 *Lm* 爆发调查的黄金标准。然而,PFGE 不提供系统发育相关性的衡量标准,因此高度相关的 *Lm* 分离株可能表现出不同的 PFGE 模式,而不相关的分离株可能无法通过 PFGE 区分^[5]。相比之下,全基因组测序(Whole genome sequencing, WGS)充分利用细菌整体的遗传信息来加以分析,更具系统发育相关性,测序数据还

可以进行基因功能学分析和基因组学比较研究,已逐渐成为疫情调查、食品加工设施环境监测的主要流行病学监测工具^[6-8]。基于此,本研究对 2019—2022 年山东省聊城市 33 株单增李斯特菌分离株(24 株 *Lm* 食品分离株和 9 株 *Lm* 病例分离株)进行 WGS 和药物敏感性试验,并基于 WGS 数据进行生物信息学分析和流行病学研究,以提升食品和病例分离株间同源性分辨力,定位具有潜在风险的食物,为防控单增李斯特菌病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 分离株

共计 33 株 *Lm* 纳入本研究,其中 9 名临床患者病例信息如表 1 所示。9 名患者的临床症状如发热、腹泻、流产等均符合李斯特菌发病特征,男女比例为 5:4,且部分患者为老人、孕妇、新生儿及免疫力低下等易感人群。24 株食品株分离于 2019—2022 年聊城市食品安全风险监测样品,菌株按照国标 GB 4789.30—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》进行分离、培养和鉴定^[9]。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922 和单增李斯特菌 CMCC 54004。

1.2 主要仪器与试剂

李斯特菌显色培养基(法国科玛嘉)、LB1 增菌液(广东环凯)、LB2 增菌液(广东环凯)、基质液(法国生物梅里埃公司)、QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司)、96 孔药敏板(美国赛默飞世尔科技公司)、建库试剂盒(中国深圳华大智造科技股份有限公司)、测序试剂盒(中国深圳华大智造科技

表 1 9 名临床患者病例信息详情表

Table 1 Detailed table of case information for 9 clinical patients

| 菌株编号 | 年龄/岁 | 性别 | 症状 |
|------|------|----|-------------------|
| DZ03 | 40 | 男 | 发热,稀便腹泻 |
| DZ12 | 28 | 女 | 高热,40℃ |
| DZ15 | 71 | 女 | 发热,水样便腹泻 |
| DZ16 | 30 | 男 | 发热,稀便腹泻 |
| DZ21 | 39 | 女 | 发热,鲜血样便腹泻、呕吐、意识不清 |
| DZ27 | 24 | 女 | 中孕,发热,B超宫内死胎 |
| DZ34 | 66 | 男 | 发热,腹痛,败血症 |
| DZ35 | 10 d | 男 | 发热,败血症 |
| DZ36 | 42 | 男 | 高热,腹痛 |

股份有限公司),所有试剂均在有效期内使用。

全自动微生物质谱分析仪(法国生物梅里埃公司)、全自动药敏试验菌液接种及判读系统(美国赛默飞世尔科技公司)、NanoDrop ONE 超微量紫外-可见光分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司)、Invitrogen Qubit 4 荧光计(美国赛默飞世尔科技公司)、全基因组测序仪(中国深圳华大智造科技股份有限公司)。标准菌株:CMCC 54004、ATCC 25922、ATCC 9812。

1.3 试验方法

1.3.1 药物敏感性试验

采用微量肉汤稀释法,按照说明书使用革兰氏阳性菌药敏板进行检测,以金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 作为质控菌株。共检测 8 种抗生素,分别为红霉素(Erythromycin, ERY)、林可霉素(lincomycin, CLI)、四环素(Tetracycline, TET)、万古霉素(Vancomycin, VAN)、复方新诺明(Sulfamethoxazole-trimethoprim, SXT)、氨苄西林(Ampicillin, AMP)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、青霉素(Penicillin, PEN)。AMP、PEN 和 SXT 的药敏判定参照了美国临床实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI)标准^[10], ERY 的药敏判定标准参照了欧洲抗菌药物敏感性测试委员会(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)标准, TET 和 CLI 的药敏判定参考 CLSI M100 Table2G 肺炎链球菌, VAN 和 CIP 的药敏判定参考 CLSI M100 Table2C 金黄色葡萄球菌^[11-12]。

1.3.2 全基因组测序

Lm 食品和病例分离株按照 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒操作手册进行基因组 DNA 提取,使用超微量紫外-可见光分光光度计测定基因组 DNA 纯度,使用 Invitrogen Qubit 4 测定基因组 DNA 浓度。使用仪器 MGISP-100 和 MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂套装进行 DNA 文库自动化构建;使用 MGISEQ-200RS 基因测序仪完成全基因组 PE100 测序。利用微生物基因组分析系统(MGAP 软件)对下机数据进行质控,使用 De Bruijn graph 算法对质控合格的测序数据进行基因组组装,并且利用测序数据对组装长度进行延伸,获得基因组组装报告表。

1.3.3 统计学分析

将组装完成的 *Lm* 基因组序列上传巴斯德实验室 BIGSdb 单增李斯特菌生物信息学分析平台(<http://bigsdb.pasteur.fr/listeria>)^[13],得到菌株的 ST 分型、clonal complex(CC)群和 Lineage 家系,运用 BioNumerics 7.6 软件进行聚类分析。

将拼接的全基因组序列提交到病原菌抗性基因数据库(Comprehensive antibiotic research database, CARD, <https://card.mcmaster.ca/>)进行耐药基因预测和功能注释,获得耐药性相关基因。将拼接的全基因组序列提交到 CGE 网站(<http://www.genomicepidemiology.org/>)进行毒力基因预测和功能注释,获得毒力性相关基因,数据参考毒力基因数据库(Virulence factor database, VFDB, <http://www.mgc.ac.cn>)对毒力基因,包括毒力岛 LIPI-1(*prfA*、*plcA*、*hly*、*plcB*、*mpl*、*ActA*)、LIPI-2(*inlA*、*inlB*、*inlC*、*inlF*、*inlJ*、*inlK*)、LIPI-3(*llsA*、*llsG*、*llsH*、*llsX*、*llsB*、*llsY*、*llsD*、*llsP*)、LIPI-4(*GlvA*、*Cat_{pr}*、*YdjC*、*CatA*、*CatB*、*CatC*),其他毒力基因位点(*bsh*、*pdgA*、*IntA*、*prsA2*、*Ami*、*gtcA*、*lplA1*、*Aut*、*Lap*、*LapB*、*OatA*、*lpeA*、*fbpA*、*vip*、*clpC*、*clpP*、*lspA*)进行分析^[14]。

根据全基因组测序结果,进行基因组学比较研究。cgMLST 分型利用网站 BacWGSTdb 进行分析^[15]。利用网站 IPGA 和软件 MEGA11 对 33 株 *Lm* 分离株的全基因组与 NCBI 上获得的不同年份、地区和来源的 18 株具有代表性菌株基因组(表 2)构建全基因组单核苷酸多态性(wg-SNP)进化树^[16]。

2 结果

2.1 菌株基因组结构特征和 MLST 分型

33 株单增李斯特菌的基因组大小为 2.89~3.41 Mb, Contig 个数为 13~32 个, Contig N50 在 579 702~255 953 bp 之间,鸟嘌呤和胞嘧啶之比(CG 含量)为 37.81%~37.97%,见表 3。通过 MLST 数据库(<https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/>),对 7 个管家基因(*abcZ*、*bglA*、*cat*、*dapE*、*dat*、*ldh*、*lhkA*)进行对比,运用 BN 软件进行聚类分析,结果如图 1 所示。聊城市 24 株食品分离株可分为 6 个 ST 型,其中 6 株为 ST 9 型,属于 CC 9 群(25.00%);1 株为 ST 121 型,属于 CC 121 群(4.17%);8 株为 ST 8 型,属于 CC 8 群(33.33%);5 株为 ST 87 型,属于 CC 87 群(20.83%);3 株为 ST 155 型,属于 CC 155 群(12.50%);1 株为 ST 101 型,属于 CC 101 群(4.17%)。9 株病例分离株可分为 5 个 ST 型,其中 4 株为 ST 87 型,属于 CC 87 群(44.44%);1 株为 ST 7 型,属于 CC 7 群(11.11%);1 株为 ST 3 型,属于 CC 3 群(11.11%);1 株为 ST 8 型,属于 CC 8 群(11.11%);1 株为 ST 155 型,属于 CC 155 群(11.11%);1 株为新的 ST 型(11.11%),分属 Lineage I 和 Lineage II。

2.2 耐药性、耐药基因、主要毒力基因分析

本研究对 33 株 *Lm* 分离株进行了抗生素敏感性试验,结果如表 4、表 5 所示。9 株病例分离株均

表2 18株来自NCBI的单增李斯特菌菌株信息

Table 2 Information of 18 *Listeria monocytogenes* isolated strains from NCBI

| 菌株编号 | 分离地区 | 分离年份 | 来源 | ST分型 | CC群 | Lineage | Accession号 |
|----------------|------|------|------|-------|-----|---------|-----------------|
| 2016TE4526-1-1 | 意大利 | 2016 | 病例 | 7 | 7 | II | GCA_003045205.1 |
| Lmo2001 | 中国 | 2018 | 病例 | 7 | 7 | II | GCA_009755545.1 |
| CD0086 | 英国 | 2011 | 食品 | 37 | 37 | II | GCA_018034845.1 |
| D76L | 挪威 | 2020 | 动物饲料 | 7 | 7 | II | GCA_021197715.1 |
| HM00113468 | 南非 | 2018 | 食品 | 204 | 204 | II | GCA_013389395.1 |
| N13-2046 | 瑞士 | 2013 | 食品 | 155 | 155 | II | GCA_003587605.1 |
| PNUSAL004217 | 美国 | 2018 | 病例 | 5 | 5 | I | GCA_003681775.1 |
| Lisporto_25421 | 葡萄牙 | 2010 | 病例 | 388 | 388 | I | GCA_900199755.1 |
| MOD1_LS1000 | 美国 | 2014 | 食品 | 382 | 183 | I | GCA_001482155.1 |
| Lmc547 | 俄罗斯 | 2019 | 食品 | 7 | 7 | II | GCA_014304675.1 |
| Lm16 | 巴西 | 2003 | 食品 | 155 | 155 | II | GCA_002966935.1 |
| DPC6895 | 爱尔兰 | 2011 | 食品 | 59 | 59 | I | GCA_000987705.1 |
| H34 | 乌拉圭 | 2016 | 病例 | 489 | 489 | I | GCA_002101275.1 |
| BfR-LI-00752 | 德国 | 2014 | 食品 | 59 | 59 | I | GCA_013363795.1 |
| Lm20 | 韩国 | 2016 | 病例 | 2 035 | 4 | I | GCA_018735785.1 |
| NH1 | 中国 | 2018 | 食品 | 477 | 9 | II | GCA_002969195.1 |
| L51 | 瑞士 | 2020 | 地表水 | 37 | 37 | II | GCA_014269505.1 |
| PNUSAL001911 | 美国 | 2014 | 病例 | 1 038 | 101 | II | GCA_004508785.1 |

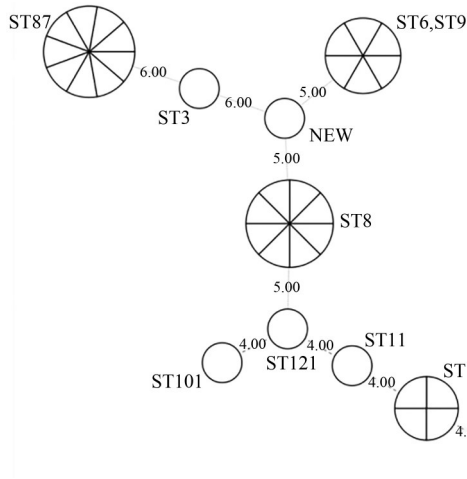
表3 33株单增李斯特菌菌株基本信息和基因组结构特征

Table 3 Basic information and genomic structural characteristics of 33 *Listeria monocytogenes* strains

| 菌株编号 | 分离来源 | 分离时间 | Contig个数 | Contig N50 /bp | GC含量/% | 基因组大小/bp | Lineage | ST分型 | CC群 |
|------|-------|------------|----------|----------------|--------|-----------|---------|------|-----|
| DZ01 | 外卖配送餐 | 2021-06-21 | 22 | 477 575 | 37.83 | 2 986 269 | II | 9 | 9 |
| DZ02 | 金针菇 | 2021-05-24 | 22 | 477 575 | 37.83 | 2 986 894 | II | 9 | 9 |
| DZ03 | 病例 | 2021-08-05 | 18 | 519 539 | 37.87 | 3 016 003 | I | 3 | 3 |
| DZ04 | 生畜肉 | 2021-08-16 | 18 | 477 309 | 37.83 | 2 998 308 | II | 9 | 9 |
| DZ05 | 生畜肉 | 2021-09-06 | 15 | 542 663 | 37.97 | 2 993 011 | II | 121 | 121 |
| DZ06 | 生畜肉 | 2021-11-08 | 18 | 477 547 | 37.84 | 2 979 933 | II | 9 | 9 |
| DZ09 | 金针菇 | 2021-11-08 | 26 | 438 912 | 37.93 | 3 082 056 | II | 8 | 8 |
| DZ10 | 学生午餐 | 2021-10-18 | 13 | 579 702 | 37.83 | 3 012 041 | II | 8 | 8 |
| DZ11 | 学生午餐 | 2021-10-18 | 26 | 477 572 | 37.82 | 3 032 588 | II | 9 | 9 |
| DZ12 | 病例 | 2020-01-07 | 17 | 357 532 | 37.96 | 2 980 777 | I | 87 | 87 |
| DZ13 | 寿司 | 2020-06-01 | 17 | 579 701 | 37.83 | 3 014 885 | II | 8 | 8 |
| DZ14 | 生畜肉 | 2020-08-31 | 32 | 357 400 | 37.91 | 2 979 164 | I | 87 | 87 |
| DZ15 | 病例 | 2020-09-21 | 14 | 450 425 | 37.89 | 2 892 860 | II | NEW | NEW |
| DZ16 | 病例 | 2020-09-26 | 14 | 478 151 | 37.89 | 2 962 764 | I | 87 | 87 |
| DZ17 | 生畜肉 | 2020-09-31 | 15 | 579 702 | 37.84 | 3 012 267 | II | 8 | 8 |
| DZ18 | 生畜肉 | 2020-11-03 | 15 | 408 528 | 37.81 | 3 010 500 | II | 8 | 8 |
| DZ20 | 熟肉制品 | 2020-11-03 | 13 | 503 837 | 37.85 | 2 937 620 | II | 155 | 155 |
| DZ21 | 病例 | 2019-08-19 | 14 | 412 723 | 37.85 | 2 920 407 | II | 7 | 7 |
| DZ22 | 海产品 | 2019-10-21 | 19 | 428 881 | 37.86 | 2 939 150 | II | 155 | 155 |
| DZ23 | 海产品 | 2019-10-21 | 21 | 255 953 | 37.89 | 2 965 393 | I | 87 | 87 |
| DZ24 | 海产品 | 2019-10-21 | 15 | 441 971 | 37.82 | 3 308 815 | II | 155 | 155 |
| DZ25 | 海产品 | 2019-10-21 | 13 | 579 539 | 37.86 | 2 969 974 | II | 8 | 8 |
| DZ26 | 海产品 | 2019-10-21 | 21 | 540 933 | 37.82 | 2 943 172 | II | 11 | 11 |
| DZ27 | 病例 | 2022-04-16 | 27 | 357 399 | 37.88 | 2 973 064 | I | 87 | 87 |
| DZ28 | 海产品 | 2022-04-25 | 24 | 438 910 | 37.81 | 3 042 041 | II | 8 | 8 |
| DZ29 | 生禽肉 | 2022-06-06 | 16 | 439 915 | 37.89 | 3 031 609 | II | 101 | 101 |
| DZ30 | 生禽肉 | 2022-06-06 | 17 | 361 333 | 37.90 | 2 966 553 | I | 87 | 87 |
| DZ31 | 学生午餐 | 2022-06-06 | 15 | 477 158 | 37.88 | 3 096 588 | II | 9 | 9 |
| DZ32 | 生禽肉 | 2022-06-20 | 17 | 357 400 | 37.94 | 3 026 566 | I | 87 | 87 |
| DZ33 | 生禽肉 | 2022-06-20 | 25 | 357 466 | 37.89 | 2 976 345 | I | 87 | 87 |
| DZ34 | 病例 | 2022-07-05 | 22 | 438 912 | 37.87 | 2 972 660 | II | 8 | 8 |
| DZ35 | 病例 | 2022-08-21 | 21 | 510 779 | 37.84 | 3 408 825 | II | 155 | 155 |
| DZ36 | 病例 | 2022-12-30 | 18 | 294 786 | 37.87 | 3 002 815 | I | 87 | 87 |

携带 *mprF*、*FosX* 耐药基因,对 AMP、PEN 等 8 种抗生素均敏感。食品分离株 DZ24 携带林可胺类耐药基因 *LlmA 23S ribosomal RNA methyltransferase* 和四环素类耐药基因 *tet(45)*,对四环素和林可霉素耐药;菌株 DZ32 携带四环素类耐药基因 *tet(M)*,对四

环素耐药,其余 22 株食品分离株均携带 *mprF*、*FosX* 耐药基因,对 AMP、PEN 等 8 种抗生素均敏感。33 株 *Lm* 均检测到毒力岛 LIPI-1 和 LIPI-2,均未检测到毒力岛 LIPI-3 和 LIPI-4,此外还携带 *lplA1*、*prsA2* 和 *vip* 等其他 17 个毒力基因。部分菌株有不同程度的



注:圆的直径与数量成正比,ST型之间的数量代表不同ST型之间等位基因的数量差异

图1 33株单增李斯特菌MLST聚类分析图

Figure 1 Cluster analysis of 33 *Listeria monocytogenes* based on MLST

毒力基因缺失情况,9株病例分离株和14株食品分离株均出现毒力基因缺失,10株食品分离株未出现毒力基因缺失情况。

2.3 cgMLST分型

cgMLST聚类分析显示,33株 *Lm* 分离株存在等位基因位点差异,数量在1~1 898个之间,见图2。病例分离株DZ36分别与中国食品分离株DZ14、DZ23、DZ32和DZ33存在等位基因位点差异,分别为36、34、38和32个;病例分离株DZ36分别和病例分离株DZ12、DZ16、DZ27存在等位基因位点差异,分别为43、8和27个;病例分离株DZ27和食品分离株DZ30等位基因位点差异个数为25;病例分离株DZ34和食品分离株DZ17等位基因位点差异个数为16;同一年份的食品分离株DZ13和DZ17等位基因位点差异个数为1,DZ01和DZ02等位基因位点差异个数为4。

表4 9株病人分离单增李斯特菌携带耐药基因类型、耐药性和毒力基因缺失状况

Table 4 Type, resistance and virulence gene deletions of drug-resistant *Listeria monocytogenes* isolated from 9 patients

| 菌株编号 | 耐药基因 | 耐药性 | 毒力基因缺失状况 |
|------|---------------------------|------------------------------------|---|
| DZ03 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>ActA</i> 、 <i>inlF</i> 、 <i>inlK</i> 、 <i>Ami</i> 、 <i>lpeA</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ12 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>ActA</i> 、 <i>inlF</i> 、 <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ15 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ16 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>ActA</i> 、 <i>inlF</i> 、 <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ21 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ27 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>ActA</i> 、 <i>inlF</i> 、 <i>inlK</i> 、 <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ34 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ35 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | — |
| DZ36 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>ActA</i> 、 <i>inlF</i> 、 <i>inlK</i> 、 <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |

表5 24株食品分离单增李斯特菌携带耐药基因类型、耐药性和毒力基因缺失状况

Table 5 Twenty-four strains of food isolated *Listeria monocytogenes* carrying resistance gene types, resistance and virulence gene deletions

| 菌株编号 | 耐药基因 | 耐药性 | 毒力基因缺失状况 |
|------|--|---------------------------------------|---|
| DZ01 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | — |
| DZ02 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | — |
| DZ04 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | — |
| DZ05 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>ActA</i> 、 <i>inlF</i> 、 <i>inlJ</i> 、 <i>Ami</i> |
| DZ06 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | — |
| DZ09 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ10 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ11 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | — |
| DZ13 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ14 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>ActA</i> 、 <i>inlF</i> 、 <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ17 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ18 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>vip</i> |
| DZ20 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | — |
| DZ22 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | — |
| DZ23 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>inlF</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ24 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> 、 <i>tet(45)</i> 、 <i>LlmA 23S ribosomal RNA methyltransferase</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、VAN和CIP敏感,对TET、CLI耐药 | — |
| DZ25 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ26 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ28 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ29 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | — |
| DZ30 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>ActA</i> 、 <i>inlF</i> 、 <i>inlK</i> 、 <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ31 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | — |
| DZ32 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> 、 <i>tet(M)</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、CLI、VAN和CIP敏感,对TET耐药 | <i>ActA</i> 、 <i>inlF</i> 、 <i>inlK</i> 、 <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |
| DZ33 | <i>mprF</i> 、 <i>FosX</i> | 对AMP、PEN、SXT、ERY、TET、CLI、VAN和CIP敏感 | <i>ActA</i> 、 <i>inlF</i> 、 <i>inlK</i> 、 <i>Ami</i> 、 <i>vip</i> |

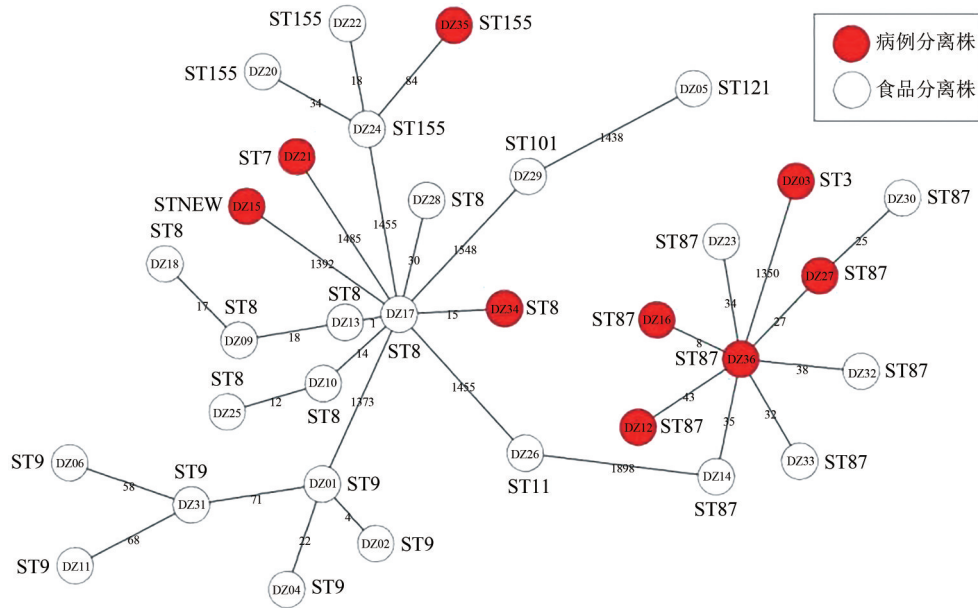


图2 基于33株单增李斯特菌cg MLST最小生成树图

Figure 2 Minimum-spanning tree of 33 *Listeria monocytogenes* isolates showing the genetic relationships based on the cgMLST analysis

2.4 基于wg-SNPs的遗传多样性分析

为了确保食品和病例中 *Lm* 分离株的可靠系统发育相关性,本研究用从 NCBI 中选择不同国家不同来源的、完全测序的 18 株 *Lm* 基因组补充了进化树,见图 3。51 株 *Lm* 可分为 5 个主进化分支,其中 33 株聊城 *Lm* 分离株并不完全聚集在一起,部分无规则地分布在进化枝周围。分支 1a 中,DZ03 与美国食品分离株 MOD1_LS1000 和葡萄牙病例分离株 Lisporto_25421 进化关系较近;分支 2 中,中国生畜肉分离株 DZ29 与美国病例分离株 PNU SAL001911 亲缘关系较近;分支 3 中,DZ21 与中国病例分离株 Lmo2001 亲缘关系密切;分支 4 中,中国病例分离株 DZ15 与英国食品分离株 CD0086 在进化关系上密切相关;分支 5 中,DZ06 与中国食品分离株 NH1 在同一进化分支上。

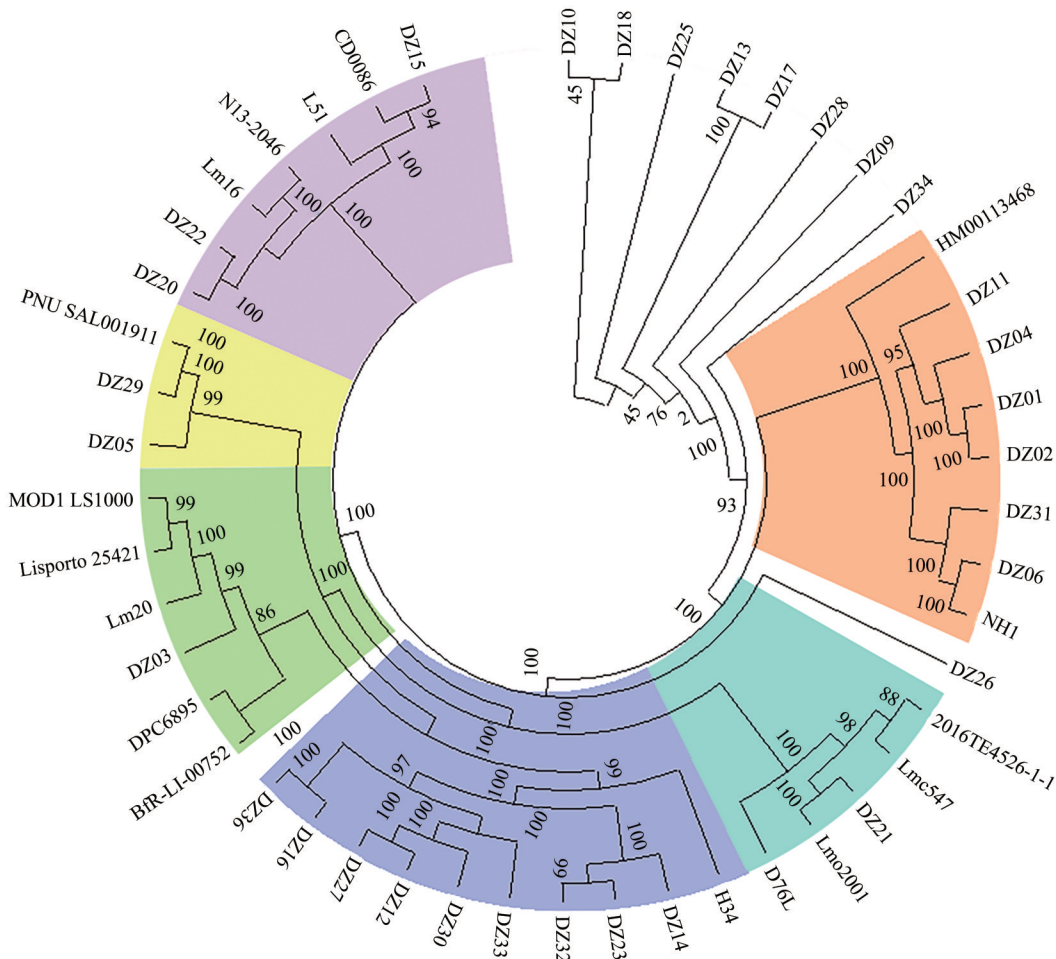
3 讨论

在中国,从食物来源中分离出的 *Lm* 主要流行分型为 ST9(29.1%)、ST8(10.7%)和 ST87(9.2%),其中,ST87 型也是我国临床李斯特病分离株的主要分型,是我国的高毒优势流行株^[9,17]。本研究结果显示,聊城市 *Lm* 分离株主要为 Lineage I 和 II,存在多种 ST 型和 CC 群。其中 ST8 型(33.33%)和 ST9 型(25.00%)为聊城市食品中主要分型,ST87 型(44.44%)为聊城市病例中主要分型,均与我国主要流行分型一致。本研究在生畜肉和海产品中检出 ST87 型(20.83%)流行株,LI 等^[17]报道过由 ST87 型 *Lm* 导致的新生儿院内感染事件、李东迅等^[18]也在

临床中分离到 ST87 型菌株,这提示聊城市食品中存在高毒力的 ST 型流行株,值得相关部门注意。

Lm 对头孢菌素天然耐药,对四环素耐药是最常见的耐药表型^[11]。本研究有 2 株食品分离 *Lm* 对四环素耐药,耐药基因预测结果显示可能与 *tet(45)* 和 *tet(M)* 耐药基因携带有关;有 1 株食品分离 *Lm* 对林可霉素耐药,耐药基因预测结果显示可能与 *LlmA 23S ribosomal RNA methyltransferase* 耐药基因携带有关,病例分离株均未携带耐药基因。整体情况显示聊城市 *Lm* 分离株耐药情况并不严重。虽然全球范围内 *Lm* 临床用药耐药率还较低,但耐药谱逐渐变宽^[11,19-22],本研究也印证了这一观点。马来西亚^[19]、摩洛哥^[20]、伊朗^[21]、中国^[11]等国家 *Lm* 食品分离株均出现对氨苄西林、青霉素等临床一线药物耐受的现象,且出现多重耐药菌株。由于耐药基因可以在不同菌株之间转移,因此聊城地区 *Lm* 分离株耐药情况应持续关注。

毒力基因携带情况研究发现,聊城市 *Lm* 分离株不仅携带 LIPI-1~LIPI-2 所包含的 13 个毒力基因,还携带其他 17 个毒力基因,这些毒力基因在各个侵染阶段进行精密的调控,*prfA* 是毒力调控基因,可转录和调控 *Lm* 的多种毒力基因,*inlA* 为基因编码内化素,介导细菌侵入宿主细胞^[1],毒力基因完整程度直接影响细菌体的致病能力^[23]。本研究 33 株 *Lm* 携带 LIPI-1~LIPI-2 毒力岛全部毒力基因,LIPI-1 与胞内感染有关,LIPI-2 与黏附、侵袭相关^[24],其中 9 株病例分离株和 14 株食品分离株出现毒力基因缺失,10 株食品分离株未出现毒力基因缺失情况,



注:绿色部分为分支1a;蓝色部分为分支1b;黄色部分为分支2;青色部分为分支3;紫色部分为分支4;橙色部分为分支5

图3 51株单增李斯特菌wg-SNPs系统进化树

Figure 3 Wg-SNPs phylogenetic tree of 51 *Listeria monocytogenes* isolated strains

整体毒力缺失情况并不严重,这与毒力基因的保守性有关,同时说明分离菌株具有一定的潜在致病能力。

李斯特菌病病例与食入各种食品有关^[25]。cg MLST 结果显示,部分病例分离株与食品分离株等位基因位点差异个数较小,具有高度同源性,食品多为生禽(畜)肉。该类食品在食用前一般会经过再加工处理,已经在一定程度上降低了 *Lm* 感染的风险,但仍有部分患者感染该菌。wg-SNPs 系统进化树分析显示,聊城生畜肉分离株 DZ29 与美国病例分离株 PNU SAL001911 亲缘较近,该菌株是一株 2014 年与美国华盛顿奶昔有关的 *Lm* 疫情暴发的临床分离株,该疫情导致多人住院,以上分析提示聊城市售食品有感染人群的风险,应引起相关部门的注意。

参考文献

[1] 孟昭倩,段然,吕东月,等. 2014—2019年阜阳市食品和病人分离单增李斯特菌的分子特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(12): 1019-1024.

MENG Z Q, DUAN R, LYU D Y, et al. Molecular characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from food and patients in Fuyang city, 2014-2019 [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2020, 36(12): 1019-1024.

[2] 胡鹏威,刘楚云,王银秋,等. 2009—2019年深圳市南山区食源性单核细胞增多性李斯特菌基因组特征分析[J]. 中华预防医学杂志, 2021, 55(6): 774-779.

HU P W, LIU C Y, WANG Y Q, et al. Genomic characterization of food-borne *Listeria monocytogenes* isolates from Nanshan district of Shenzhen during 2009-2019 [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2021, 55(6): 774-779.

[3] WANG Y, ZHAO A L, ZHU R F, et al. Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China [J]. BMC Microbiology, 2012, 12(1): 1-9.

[4] 俞骅,董华丽,汪皓秋,等. 杭州地区相同分子型别的单核细胞增生李斯特菌临床和食品分离株基因组分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(8): 699-705.

YU H, DONG H L, WANG H Q, et al. Genomic analysis of *Listeria monocytogenes* of clinical and food isolates of same molecular type in Hangzhou, China [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2019, 35(8): 699-705.

[5] 周海健,阙颀. 细菌基因组分型方法的应用研究进展[J]. 疾病监测, 2016, 31(8): 668-675.

- ZHOU H J, KAN B. Progress in application research of bacterium genome-based subtyping [J]. Disease Surveillance, 2016, 31(8): 668-675.
- [6] ALLARD M W, STRAIN E, RAND H, et al. Whole genome sequencing uses for foodborne contamination and compliance: Discovery of an emerging contamination event in an ice cream facility using whole genome sequencing [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2019, 73: 214-220.
- [7] LI Z, PÉREZ-OSORIO A, WANG Y, et al. Whole genome sequencing analyses of *Listeria monocytogenes* that persisted in a milkshake machine for a year and caused illnesses in Washington State [J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 1-11.
- [8] CHEN Y, LUO Y, CARLETON H, et al. Whole genome and core genome multilocus sequence typing and single nucleotide polymorphism analyses of *Listeria monocytogenes* isolates associated with an outbreak linked to cheese, United States, 2013 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(15): e00633-17.
- [9] 苏乐斌, 李柏生, 谭海芳, 等. 基于全基因组测序的单核细胞增生李斯特菌食品分离株分子特征分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(6): 522-527.
- SU L B, LI B S, TAN H F, et al. Molecular characterization analysis of foodborne *Listeria monocytogenes* strains based on whole-genome sequencing [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(6): 522-527.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: CLSI M45-Ed3 [M]. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [11] 张晓媛, 刘玉竹, 张鹏航, 等. 2019年北京市食源性单增李斯特菌的分子特征和耐药性研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9343-9348.
- ZHANG X A, LIU Y Z, ZHANG P H, et al. Molecular characteristics and drug resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* in Beijing in 2019 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(24): 9343-9348.
- [12] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [DB/OL]. Version 10.0, 2020. https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents.
- [13] PARADISO R, RICCARDI M G, CECERE B, et al. Whole-genome sequencing-based characterization of a *Listeria monocytogenes* strain from an aborted water buffalo in southern Italy [J]. Microorganisms, 2021, 9(9): 1875.
- [14] 畅晓晖, 万晓楠, 张捷, 等. 北京地区食源性单增李斯特菌基因分型分析 [J]. 中国公共卫生, 2022, 38(1): 105-109.
- CHANG X H, WAN X N, ZHANG J, et al. Genotyping analysis on foodborne *Listeria monocytogenes* strains isolated in Beijing region [J]. Chinese Journal of Public Health, 2022, 38(1): 105-109.
- [15] FENG Y, ZOU S M, CHEN H F, et al. BacWGSTdb 2.0: A one-stop repository for bacterial whole-genome sequence typing and source tracking [J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): D644-D650.
- [16] LIU D M, ZHANG Y F, FAN G M, et al. IPGA: A handy integrated prokaryotes genome and pan-genome analysis web service [J]. iMeta, 2022, 1(4): e55.
- [17] LI X P, WANG S F, HOU P B, et al. Nosocomial cross-infection of hypervirulent *Listeria monocytogenes* sequence type 87 in China [J]. Annals of Translational Medicine, 2020, 8(9): 603.
- [18] 李东迅, 舒高林, 王维钧, 等. 1株分离于肿物积液的单增李斯特菌的病原学特点及分子特征 [J]. 江苏预防医学, 2018, 29(2): 128-130.
- LI D X, SHU G L, WANG W J, et al. Etiological characteristics and molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolated from tumor effusion [J]. Jiangsu Journal of Preventive Medicine, 2018, 29(2): 128-130.
- [19] CHIN P S, ANG G Y, YU C Y, et al. Prevalence, antimicrobial resistance, and genetic diversity of *Listeria* spp. isolated from raw chicken meat and chicken-related products in Malaysia [J]. Journal of Food Protection, 2018, 81(2): 284-289.
- [20] ENNAJI H, TIMINOUNI M, ENNAJI M M, et al. Characterization and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry and red meat in Morocco [J]. Infection and Drug Resistance, 2008, 1: 45-50.
- [21] NEMATI V, KHOMEIRI M, SADEGHI MAHOONAK A, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat meat products in gorgan, Iran [J]. Nutrition and Food Sciences Research, 2020, 7(1): 41-46.
- [22] ŞANLIBABA P, TEZEL B, ÇAKMAK G A. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat foods in Turkey [J]. Journal of Food Quality, 2018, 2018: 7693782.
- [23] 闫军. 北京市售食品中单增李斯特菌致病力及比较基因组学研究 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2018.
- YAN J. Study on pathogenicity and comparative genomics of *Listeria monocytogenes* in food sold in Beijing [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2018.
- [24] 郝民, 阮明捷, 王恒伟, 等. 北京市朝阳区单核细胞增生李斯特菌关键毒力基因缺失与致病性关联性研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(1): 75-81.
- HAO M, RUAN M J, WANG H W, et al. Study of association between deletion of key virulence genes and pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in Chaoyang district of Beijing [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(1): 75-81.
- [25] ZHANG H Z, CHEN W J, WANG J, et al. 10-year molecular surveillance of *Listeria monocytogenes* using whole-genome sequencing in Shanghai, China, 2009-2019 [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 551020.