

研究报告

1例急性淋巴细胞白血病患者感染单核细胞增生李斯特菌病原学及分子分型特征分析

霍哲¹,王永全¹,徐俊¹,曹伟¹,张晓媛^{2,3}

(1.北京市西城区疾病预防控制中心,北京 100053; 2.北京市疾病预防控制中心 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室,北京 100013; 3.北京市预防医学研究中心,北京 100013)

摘要:目的 对北京市1名急性淋巴细胞白血病患者感染单核细胞增生李斯特菌病例进行病因溯源,对分离到的单核细胞增生李斯特菌进行血清学分型、耐药及分子分型研究。方法 对患者不同时期外周血分离的2株单核细胞增生李斯特菌和1株环境涂抹样品单核细胞增生李斯特菌分离株进行血清学分型、耐药性分析、脉冲场凝胶电泳(PFGE)和多位点序列分析(MLST)。结果 3株单核细胞增生李斯特菌均为1/2a-3a血清型,耐药结果一致,均对青霉素、氨苄西林、复方新诺明、美罗培南及红霉素敏感,3株菌的PFGE带型一致,MLST型别均为ST155。结论 本研究中患者生活环境中存在单核细胞增生李斯特菌的污染情况,高度怀疑患者感染单核细胞增生李斯特菌与其生活环境中分离到的菌株为同一来源。

关键词:单核细胞增生李斯特菌;血清型;脉冲场凝胶电泳;耐药性;多位点序列分析;白血病患者;溯源

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2019)01-0006-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.01.002

An etiological and molecular characteristics analysis of *Listeria monocytogenes* isolated from an acute lymphoblastic leukemia patient

HUO Zhe¹, WANG Yongquan¹, XU Jun¹, CAO Wei¹, ZHANG Xiaoyan^{2,3}

(1. Xicheng Center of Disease Control and Prevention, Beijing 100053, China;

2. Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China; 3. Beijing Center for Disease Preventive Medical Research, Beijing 100013, China)

Abstract: Objective To trace the cause of a *Listeria monocytogenes* (LM) infected patient with acute lymphoblastic leukemia in Beijing, and to study the serotype, antimicrobial resistances and molecular characteristics of the associated strains. **Methods** The two strains isolated from peripheral blood of the patient at different times and the strain isolated from environmentally smeared sample were characterized by serotyping with polymerase chain reaction (PCR), antimicrobial susceptibility testing, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). **Results** Three isolates belonged to 1/2a-3a serotype, also had the same antimicrobial susceptibility result. All the strains were sensitive to penicillin, ampicillin, sulfamethoxazole, meropenem and erythromycin. They had the same PFGE pattern and MLST type ST155. **Conclusion** The living environment of patient was contaminated by LM. It was highly suspected that the strains isolated from lymphoblastic leukemia patient and the environmental smear sample had the same source.

Key words: *Listeria monocytogenes*; serotype; pulsed field gel electrophoresis; drug sensitivity; multilocus sequence typing; leukemia patient; traceability

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是一种人畜共患病的病原菌,在自然环境中广泛存在,最适宜生长温度为30~37℃,可在冰箱贮存的多种食品中繁殖,是典型的耐寒性细菌。1924年Murray发现第1例李斯特菌病^[1],之后世界各地不断有李斯特菌病的报道,如2011年美国LM污染甜瓜事件,导致了33人死亡及1名孕妇流产^[2];2015年美国蓝铃(Blue Bell)冰淇淋事件,引起10人感染,其中

收稿日期:2018-12-05

基金项目:北京市优秀人才培养资助-青年骨干个人项目(2015000021469G186);首都卫生科研发展专项(首发2011-1013-02)

作者简介:霍哲 女 主管检验技师 研究方向为微生物致病菌检测 E-mail:rubyrain121118@hotmail.com

通信作者:张晓媛 女 副研究员 研究方向为食源性致病菌 E-mail:zhangxiaoyan_0922@163.com

3 人死亡^[3]。李斯特菌病的主要临床症状为胃肠炎、脑膜炎、败血症,孕妇感染可导致流产及死胎。各类免疫功能低下人群及新生儿、孕妇为易感者。2018 年 3 月北京市 1 名 15 周岁的女性急性淋巴细胞白血病患者因发热入院,最终诊断为感染 LM。通过对该病例进行流行病学调查,对患者外周血分离的 LM、可疑环境涂抹样品中分离的 LM 进行了血清学分型、耐药性、脉冲场凝胶电泳(PFGE)和多位点序列分析(MLST),从患者的生活环境涂抹样品中检出 LM,提示 LM 在环境中可以存活,增加了 LM 的感染风险,为今后李斯特菌病的调查提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

患者于 2018 年 3 月 3 日发病,采集 3 月 3 日和 7 日外周血分离出 2 株 LM,菌株编号为 LM2018001、LM2018002。在患者家中采集 28 份环境涂抹样品,包括大饭盒涂抹样品 3 份,小饭盒、圆饭盒、水杯、筷子涂抹样品各 2 份以及勺子、菜刀、汤勺、炒菜铲、擀面杖、砂锅、蒸锅、蒸屉、砧板切菜面、砧板和面面、冷藏室下层抽屉、冷藏室下层侧壁、冷藏室中上层隔板、汤勺放置墙面、菜刀放置墙面、砧板放置墙面、蒸屉放置墙面涂抹样品各 1 份。其中菜刀放置墙

面涂抹样品分离到 1 株 LM,菌株编号为 LM2018001-23。沙门菌标准菌株(H9812)由中国疾病预防控制中心提供,金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)为质控菌株,购自北京陆桥技术股份有限公司。

1.1.2 主要仪器与试剂

PFGE 仪及配套设备、凝胶成像系统、T100 Thermal Cycler 梯度 PCR 仪均购自美国 Bio-Rad,7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI)、QIAxcel Advanced 全自动核酸分析仪(德国 Qiagen)。

Seakem Gold Agarose(美国 Lonza),蛋白酶 K(德国 Merck),溶菌酶(美国 Sigma),限制性内切酶 *Xba* I、*Asc* I 均购自美国 NEB,QIAamp DNA Mini Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen),革兰阳性需氧菌药敏检测板(上海星佰有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 血清学分型

PCR 扩增 LM 基因为 *lmo0737*、*lmo1118*、*ORF2819*、*ORF2110*,对 LM 进行血清学分型,同时扩增李斯特菌属特异性基因 *prs* 作为内部扩增质控^[4]。PCR 反应条件:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 24 s,53 °C 退火 69 s,72 °C 延长 69 s,35 个循环;72 °C 延长 7 min。取 5 μl 扩增产物在 2% 琼脂糖中电泳,胶块在 GelRed 中染色,观察电泳结果,并对其进行分析。目的基因、引物序列及产物片段大小见表 1。

表 1 LM 血清学分型引物
Table 1 Primers for LM serotyping

目的基因	引物序列(5'-3')	片段大小/bp	血清型特异性
<i>lmo0737</i>	F:AGGGCTTCAAGGACTTACCC R:ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691	1/2a,1/2c,3a,3c
<i>lmo1118</i>	F:AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R:CGGCTTGTTCGGCATACTTA	906	1/2c,3c
<i>ORF2819</i>	F:AGCAAATGCCAAAACCTCGT R:CATCACTAAAGCCTCCATTG	471	1/2b,3b,4b,4d,4e
<i>ORF2110</i>	F:AGTGGACAATTGATTGCTGAA R:CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	4b,4d,4e
<i>prs</i>	F:GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R:CAAAGAAACCTTGGATTTGCCG	370	所有血清型

1.2.2 抗生素敏感试验

采用微量肉汤法测定菌株的最小抑菌浓度(MIC)。测试抗生素包括青霉素类:青霉素(PEN)、氨苄西林(AMP);糖肽类:万古霉素(VAN);大环内酯类:红霉素(ERY);氟喹诺酮类:环丙沙星(CIP);碳青霉烯类:美罗培南(MER);四环素类:四环素(TET);磺胺类:复方新诺明(SXT)。质控菌株为金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)。参照 2015 年美国临床和实验室标准协会(CLSI)药敏标准(M45-A2)对 PEN、AMP、IMP 和 MER 四种抗生素进行结果判读,参照 2015 年欧洲药敏试验委员会(EUCAST)药敏

标准对 ERY 进行结果判读,其他三种抗生素无耐药折点的判定标准^[5-6]。

1.2.3 PFGE 分型

参照美国疾病预防控制中心(CDC)PulseNet 的 PFGE 标准操作程序^[7]进行,细菌菌悬液浓度用麦氏比浊仪调至 5.0~6.0,使用限制性内切酶 *Asc* I (50 U),37 °C 酶切 3 h。电泳参数为 4~40 s,电泳时间为 19 h,胶块电泳后使用 GelRed 染色,纯水脱色,读取电泳图谱。沙门菌标准菌株(H9812)作为分子量标准,使用限制性内切酶 *Xba* I (50 U)酶切。用 BioNumerics 软件对 PFGE 电泳图像进行数据分

析,构建聚类树状图。聚类图类型根据非加权配对算术平均法(UPGMA)构建,条带位置差异容许度设为1.0%。

1.2.4 MLST分型

将LM菌株接种于脑心浸液琼脂培养基中,置于37℃恒温箱中过夜培养。按DNA提取试剂盒说明书提取DNA作为模板。PCR扩增LM的7对管家基因(*abcZ*、*bglA*、*cat*、*dapE*、*dat*、*idh*和*ihkA*),管家基因引物序列、PCR反应条件均来自Institut Pasteur在线数据库^[8]。将获得的7对管家基因的序列提交至Institut Pasteur上,获得7个等位基因,查询等位基因谱获得菌株的ST型。

2 结果

2.1 血清学分型

患者分离株LM2018001、LM2018002与环境涂抹样品分离株(菜刀放置墙面涂抹)LM2018001-23的特异型基因*lmo0737*和李斯特菌属特异型基因*prs*扩增为阳性,*lmo1118*、*ORF2819*、*ORF2110*基因扩增为阴性,3株菌同属于1/2a-3a血清型,见图1。

2.2 耐药性分析

3株LM对测试的8种抗生素MIC值完全一致,对PEN、AMP、ERY、MER和SXT五种抗生素均敏感,对其他3种抗生素均耐药,见表2。

2.3 PFGE和MLST分型

3株LM经Asc I酶切后进行PFGE,3株菌的

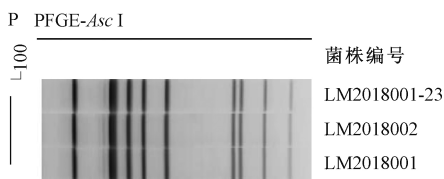
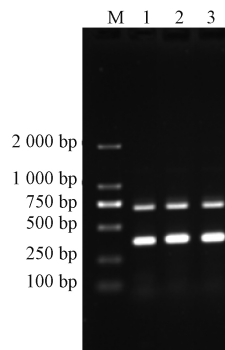


图2 3株LM的PFGE聚类图

Figure 2 PFGE clusters of 3 LM strains

3 讨论

LM和其他食源性致病菌相比,感染的潜伏期较长,一般为4~21 d,最长可达3个月,因此LM的溯源十分困难。2018年美国8名患者确诊感染LM,其中2人死亡,最后成功溯源到某品牌的软奶酪受到了LM污染,全美召回问题奶酪。近期世界卫生组织(WHO)发布南非暴发全球史上规模最大的李斯特菌病疫情通报,2017年1月—2018年4月,南非境内接到各省上报病例共1 024例,其中死亡200例,大多数感染者是新生儿、孕妇、老年人以及免疫缺陷人员。南非卫生部发现一种即食型加工肉类制品为引发疫情的源头,随即南非卫生部



注:M为marker,DL2000;1~3分别为LM2018001,LM2018002,LM2018001-23

图1 3株LM血清学PCR结果

Figure 1 PCR results for 3 LM strains of serological

表2 3株LM及标准菌株对8种抗生素的MIC值(μg/ml)

Table 2 MIC values of 3 LM strains and standard strains

抗生素名称	against 8 antibiotics			
	LM2018001	LM2018002	LM2018001-23	ATCC 29213
PEN	0.25	0.25	0.25	2
AMP	0.125	0.125	0.125	0.5
VAN	1	1	1	0.5
ERY	0.06	0.06	0.06	0.25
CIP	1	1	1	0.125
MER	0.06	0.06	0.06	0.03
TET	32	32	32	0.5
SXT	0.015/0.3	0.015/0.3	0.015/0.3	0.03/0.6

PFGE带型完全一致,提示来自同一克隆群,结果见图2。MLST分型结果显示,这3株LM经查询等位基因图谱均为ST155型。

启动了全国性的所有涉及产品召回活动。高效的溯源机制可以有效地减少患者的数量。北京市从2013年开始LM的专项监测工作,期间对散发病例进行溯源,并且成功溯源到了可疑食品。本研究发现患者外周血分离到的LM与其家庭环境涂抹样品分离到的LM在血清型、PFGE带型、MLST型别和耐药性均完全一致,结合流行病学调查,高度怀疑该患者感染LM与其家庭环境中分离到的菌株为同一来源,提示LM在环境中可以存活,增加了LM的感染风险。

LM血清型有13种,人类和动物李斯特菌病90%的病例由其中3种(1/2a、1/2b和4b)引发^[9]。本次病例是白血病患者,属于免疫功能缺陷者,患

者 LM 分离株与环境涂抹样品(菜刀放置墙面涂抹)分离株均为 1/2a-3a 血清型,与国内外报道^[10]的常见致病血清型相符。

抗生素能够有效治疗李斯特菌病,但是近年来不断出现临床耐药菌株。本研究对患者 LM 分离株和环境涂抹样品 LM 分离株进行了 8 种抗生素的耐药性分析。关于 LM 的耐药性判断标准,CLSI 中只有四种抗生素(PEN、AMP、IMP 和 MER),结合 EUCAST 中关于 ERY 的判定标准,结果提示,3 株 LM 全部对临床治疗李斯特菌病的一线药物 AMP 和 PEN 及二线治疗药物 SXT、ERY 敏感。有文献^[11]报道 LM 对 ERY 和 CIP 出现了耐药性,北京市也出现过 LM 对 TET 的 MIC 值异常增高,提示可能出现耐药倾向^[12],北京市西城区也曾检出过 ERY 和 CIP 的耐药菌株^[13],因此对治疗李斯特菌病的常用抗生素进行长期监测 MIC 值,有助于研究 LM 的耐药趋势,识别耐药风险。

PFGE 是食源性疾病暴发事件分子溯源的有力手段,广泛用于 LM 的溯源调查中。在本研究中,患者血液两次分离到的菌株和患者家里菜刀放置墙面涂抹分离到菌株的 PFGE 带型完全一致,结合流行病学调查结果,推测这 3 株菌来自于同一克隆。

MLST 是一种研究种群结构和长期进化的分型方法。本研究中,3 株菌的 ST 型别均为 ST155。从世界和中国菌株的 MLST 结果看,ST155 不是优势型别,但存在于患者甚至暴发菌株和食品来源菌株中。比如 2015 年 WANG 等^[14]对国内 23 个病例来源的 28 株菌的研究中,有 1 株来自江苏的患者分离株为 ST155;1997 年美国一起 LM 暴发事件菌株的 ST 型为 ST155^[15];中国疾病预防控制中心在 2000—2008 年对中国 11 个省市的 212 株食源性分离株进行的 MLST 研究中表明,最常见的 ST 型是 ST9、ST8 和 ST87,其中有 7 株菌的 ST 型为 ST155^[16]。搜索北京市 LM 的 MLST 数据库发现,ST155 虽然不是北京市 LM 的优势型别,但在北京市历年食品和患者分离菌株中均存在。北京市患者来源菌株的优势型别为 ST8、ST5、ST87,ST155 位居第 5 位。在北京市西城区,2012 年 3 株食品来源菌株、2015 年 3 株食品来源菌株、2016 年 2 株患者来源菌株的 ST 型均为 ST155^[17],说明此型别菌株长期存在于环境中,稳定并具有致病性,需加强对其关注。

参考文献

[1] THIGPEN M C, WHITNEY C G, MESSONNIER N E, et al.

- Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007 [J]. The New England Journal of Medicine, 2011, 364(21): 2016-2025.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado [EB/OL]. (2012-08-27) [2018-10-30]. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis linked to Blue Bell Creameries products [EB/OL]. (2015-06-10) [2018-10-30]. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/>.
- [4] MICHEL D, CARMEN B, PHILIPPE G, et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42 (8) : 3819-3822.
- [5] CLSI. M45-A2: methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline-second edition [S]. 2015.
- [6] EUCAST. *Listeria monocytogenes* calibration of zone diameter breakpoints to MIC values, Version 1.2 [S]. 2015.
- [7] PulseNet USA CDC. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes* [S]. USA: Centers for Disease Control and Prevention, 2008.
- [8] Institut Pasteur. Pour La recherche, pour La santé, pour demain [DB/OL]. (2016-10-10) [2018-10-30]. <http://bigsd.b.pasteur.fr/listeria/listeria.html>.
- [9] PALUMBO J D, BORUCKI M K, MANDRELL R E, et al. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41 (2) : 564-571.
- [10] 牛恒彩, 吴杨, 舒高林, 等. 北京市昌平区食源性单增李斯特菌特征分析 [J]. 疾病监测, 2018, 33(6): 463-468.
- [11] 赵悦, 付萍, 裴晓燕, 等. 中国食源性单核细胞增生李斯特菌耐药特征分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24 (1) : 5-8.
- [12] 王丽丽, 陈倩. 北京市人源性单核细胞增生李斯特菌耐药特征及分子分型研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28 (4) : 426-430.
- [13] 霍哲, 徐俊, 高波. 北京市西城区 2012 年—2013 年食源性单核细胞增生李斯特菌同源性及其耐药状况调查 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25 (23) : 4143-4146.
- [14] WANG Y, JIAO Y, LAN R T, et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from human listeriosis cases in China [J]. Emerging Microbes and Infections, 2015, 4(8): e50.
- [15] YIN Y L, TAN W J, WANG G L, et al. Geographical and longitudinal analysis of *Listeria monocytogenes* genetic diversity reveals its correlation with virulence and unique evolution [J]. Microbiol Res, 2015, 175(4): 84-92.
- [16] WANG Y, ZHAO A L, ZHU R F, et al. Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China [J]. BMC Microbiol, 2012, 12(1): 119.
- [17] 霍哲, 王晨, 徐俊, 等. 2012—2015 年北京市西城区单核细胞增生李斯特菌多位点序列分型及耐药研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29 (3) : 289-293.