

风险监测

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

郝民, 阮明捷, 王恒伟, 田甜, 邵希凤, 宋衍燕

(北京市朝阳区疾病预防控制中心, 北京 100021)

摘要:目的 了解北京市朝阳区2016—2018年81株单核细胞增生李斯特菌(单增李斯特菌)关键毒力基因缺失与菌株致病性和血清型的关联性。方法 聚合酶链反应(PCR)结合血清凝集法进行血清学分型;PCR法检测11种毒力基因;微量肉汤稀释法进行药敏实验;结合流行病学调查数据,研究单增李斯特菌关键毒力基因缺失与致病性、血清型的关联。结果 81株单增李斯特菌分为4种血清型:1/2a型占50.62%(41/81)、1/2b型占29.63%(24/81)、1/2c型占11.11%(9/81)、4b型占8.64%(7/81);食源性菌株与病例分离株优势血清型均为1/2a。毒力基因*inlA*、*inlC*、*inlJ*、*plcB*、*prfA*、*mpl*携带率为100%;*iap*、*hly*、*actA*、*inlB*、*plcA*携带率分别为98.77%、98.77%、97.53%、80.25%、38.27%;携带7种、8种、9种、10种、11种毒力基因的菌株比例分别为1.23%(1/81)、2.47%(2/81)、7.41%(6/81)、59.26%(48/81)、29.63%(24/81)。*hly*在1/2c型低于其他血清型,*plcA*仅在1/2b和4b型中100%携带。70.37%(57/81)的单增李斯特菌株存在毒力基因缺失,1/2a型为主(41/57,71.93%);1/2b型(6/24,25.00%)与4b型(1/7,14.29%)仅缺失*inlB*。病例分离株中的16株(16/28,57.14%)毒力基因缺失株,性别、年龄、临床菌株来源以及是否妊娠相关的分布差异均无统计学意义($P>0.05$)。81株单增李斯特菌对青霉素、红霉素、氨苄西林的耐药率均为4.94%,对其他抗生素最低抑菌浓度(MIC)值较小,但有57株单增李斯特菌对氯霉素MIC值达16 $\mu\text{g}/\text{mL}$;毒力基因缺失株存在3株耐药菌株,一株为*inlB*缺失株,对青霉素、红霉素、氨苄西林均耐药;另一株为*inlB*缺失株仅对青霉素耐药;第三株*plcA*缺失株对红霉素耐药。结论 北京市朝阳区单增李斯特菌食源性菌株与病例分离株血清型以1/2a型为主,存在毒力基因缺失现象,但部分毒力基因缺失对菌株致病性影响有限,食品和临床分离单增李斯特菌的耐药率偏低,但应加强单增李斯特菌毒力基因和耐药性的监测与防控。

关键词:单核细胞增生李斯特菌;血清学分型;毒力基因;耐药性

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)01-0075-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.01.015

Study of association between deletion of key virulence genes and pathogenicity
of *Listeria monocytogenes* in Chaoyang District of BeijingHAO Min, RUAN Mingjie, WANG Hengwei, TIAN Tian, SHAO Xifeng, SONG Yanyan
(Chaoyang District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To investigate the association between deletion of key virulence genes and pathogenicity and serotype of 81 strains of *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) isolates in Chaoyang district of Beijing from 2016-2018.

Methods Serotyping was performed on 81 strains of *L. monocytogenes* by polymerase chain reaction (PCR) and serum agglutination assay, and 11 virulence genes (*inlA*, *inlC*, *inlJ*, *plcB*, *prfA*, *mpl*, *iap*, *hly*, *actA*, *inlB*, *plcA*) were detected by PCR. The susceptibility of these strains to 9 antibiotics were tested by broth dilution. Based on the epidemiological survey data, the relationship between the deletion of key virulence genes, pathogenicity and serotype of *L. monocytogenes* was studied. **Results** The 81 strains of *L. monocytogenes* were classified into 4 serotypes: 1/2a serotype 50.62% (41/81), 1/2b serotype 29.63% (24/81), 1/2c serotype 11.11% (9/81) and 4b serotype 8.64% (7/81). The predominant serotype of food isolates and patient isolates were 1/2a. The positive rates of virulence genes *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *plcB*, *prfA* and *mpl* were 100%. The positive rates of *iap*, *hly*, *actA*, *inlB* and *plcA* were 98.77%, 98.77%, 97.53%, 80.25% and 38.27% respectively. The proportions of the 81 strains of *L. monocytogenes* carrying 7, 8, 9, 10 and 11

收稿日期:2021-07-09

作者简介:郝民 女 主管技师 研究方向为食源性致病菌检测与食品安全 E-mail:shandonghaomin@126.com

阮明捷 男 副主任医师 研究方向为膳食营养与食品安全 E-mail:rmj214@sohu.com

郝民和阮明捷为共同第一作者

通信作者:宋衍燕 女 主任技师 研究方向为食源性致病菌检测与食品安全 E-mail:songyanyancdc@163.com

virulence genes were 1.23% (1/81), 2.47% (2/81), 7.41% (6/81), 59.26% (48/81) and 29.63% (24/81). The positive rate of *hly* in genotype 1/2c was lower than that in other serotypes, and *plcA* was only 100% carried in genotype 1/2b and 4b. 70.37% (57/81) isolates lacked 11 virulence genes and 1/2a (41/57, 71.93%) was the main serotype. Only *inlB* was not detected in 1/2b (6/24, 25.00%) and 4b (1/7, 14.29%) serotype. There was no significant difference in the distribution of gender, age, pregnancy related or not, and the source of strains in 16 virulence gene deletion strains isolated from patients ($P > 0.05$). The resistant rates of 81 strains of *L. monocytogenes* to penicillin, erythromycin and ampicillin were 4.94%. MIC to chloramphenicol of 57 strains was as high as 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and MIC to the other antibiotics was low. There were three drug-resistant strains in the virulence gene deletion strains, and one *inlB* deletion strain was resistant to penicillin, erythromycin and ampicillin. Another *inlB* deletion strain was resistant to penicillin. The *plcA* deletion strain was resistant to erythromycin. **Conclusion** The dominant serotypes of *L. monocytogenes* isolated from food and patients in Chaoyang district of Beijing was 1/2a. There were some virulence gene deletion strains. Deletion of some virulence genes had limited effect on pathogenicity of *L. monocytogenes* strains. The drug resistance rate of *L. monocytogenes* isolated from food and clinic was low, but surveillance and control of virulence genes and drug resistance of *L. monocytogenes* should be strengthened.

Key words: *Listeria monocytogenes*; serotyping; virulence genes; drug resistance

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌) 为革兰阳性无芽孢杆菌, 可引起胃肠炎、脑膜炎、败血症等疾病并导致孕妇流产、死胎, 免疫功能缺陷患者、孕妇、新生儿及 65 岁以上老人更易感^[1-2]。该菌致病性强, 致死率高达 30%^[3]。2017 年 1 月 1 日至 2018 年 7 月 17 日, 南非暴发单增李斯特菌 ST6 引起李斯特菌病疫情, 报告病例 1 060 名, 暴发来源为即食肉食品^[4]。美国疾病控制与预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 报道, 美国每年约 1 600 人感染单增李斯特菌, 造成约 260 人死亡。我国食源性疾病监测显示, 国内感染单增李斯特菌散发病例逐年增高, 2016 年报告 82 例病例, 以孕妇和新生儿为主^[5]。

单增李斯特菌具有 13 种血清型, 分别是 1/2a、1/2b、1/2c、3a、3b、3c、4a、4b、4c、4d、4ab、4e 和 7。1/2a、1/2b、1/2c 和 4b 为常见食源性及病例分离株血清型^[6], 4b 型引起绝大多数单增李斯特菌暴发流行^[7]。单增李斯特菌毒力基因位于毒力岛 1 (LIPI-1: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*) 和毒力岛 2 (LIPI-2)。LIPI-2 为 N 端富含亮氨酸重复序列的蛋白质家族, 又名内化素小岛, 包含 *InlA*、*InlB*、*InlC* 到 *InlH*, 参与单增李斯特菌黏附与侵袭。*iap* 编码细胞壁水解酶 P60, 与细菌侵袭性密切相关^[8-10]。在单增李斯特菌感染宿主细胞的过程中, 毒力因子的表达起到重要的调控作用。毒力基因的缺失是否对单增李斯特菌致病性有影响; 食入毒力基因缺失株污染的食品是否会致病, 值得进一步研究。此外, 青霉素或氨苄西林联合氨基糖苷类抗生素为李斯特菌病临床常用药。由于抗生素在临床治疗中的滥用、过度应用, 单增李斯特菌耐药菌株逐渐增多并有多重耐药趋势^[11]。因此, 了解单增李斯特菌耐

药谱对于指导临床治疗尤其重要。

本研究分析北京市朝阳区 81 株食品源和病例分离单增李斯特菌的血清学分型、毒力基因及耐药特征, 了解不同来源菌株、不同血清型别与致病力和耐药性的关系, 为预防单增李斯特菌流行及临床治疗提供科学数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

北京市朝阳区 2016—2018 年分离的 53 株食品源和 28 株病例分离单增李斯特菌株。标准菌株为单增李斯特菌 ATCCTM 19111、ATCCTM 19115、ATCCTM 51779; 肺炎链球菌 ATCCTM 49619; 金黄色葡萄球菌 ATCCTM 29213。

1.1.2 主要仪器与试剂

S1000TM 伯乐 PCR 仪 (美国伯乐公司); 毛细管电泳仪 (德国 QIAGEN 公司); 生物安全柜 (美国 Beckman 公司); 低温高速离心机 (德国 Sigma 公司); 血平板 (北京陆桥技术股份有限公司); Taq PCR Master Mix Kit (德国 QIAGEN 公司); 李斯特菌血清分型试剂盒 (日本生研会社); 引物合成 [英潍捷基 (上海) 贸易有限公司]; 革兰阳性菌药敏检测板 (赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA

提取菌株接种血平板培养后, 挑取单菌落溶于 500 μL 无菌纯水, 13 000 r/min 离心 5 min 弃上清, 加入 50 μL 无菌纯水, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清备用。

1.2.2 血清学分型

聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction,

PCR)结合血清凝集实验确定血清型别。PCR引物序列参考 DOUMITH 等^[12]建立的方法(表1)。PCR反应体系(25 μ L):Taq PCR Master Mix 12.5 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各1 μ L,模板1 μ L,灭菌水9.5 μ L。PCR反应参数:预变性94 $^{\circ}$ C,

3 min;变性94 $^{\circ}$ C、0.5 min,退火时间1.15 min(退火温度见表1),延长72 $^{\circ}$ C,1.15 min,35个循环;再延长72 $^{\circ}$ C,7 min。毛细管凝胶电泳检测扩增结果。血清凝集实验参照李斯特菌血清分型试剂盒使用说明书进行。

表1 单增李斯特菌血清学分型引物

Table 1 Primers used for serotypes of *Listeria monocytogenes*

基因	引物序列(5'-3')	退火温度/ $^{\circ}$ C	片段大小/bp	血清特异性
<i>lmo0737</i>	F:AGGGCTTCAAGGACTTACCC R:ACGATTCTGCTTGCCATTC	57	691	1/2a、1/2c、3a、3c
<i>lmo1118</i>	F:AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R:CGGCTTGTTCCGCATACTTA	56	906	1/2c、3c
<i>orf2819</i>	F:AGCAAAATGCCAAAACCTCGT R:CATCACTAAAGCCTCCCATTC	56	471	1/2b、3b、4b、4d、4e
<i>orf2110</i>	F:AGTGGACAATTGATTGGTGAA R:CATCCATCCCTTACTTTGGAC	56	597	4b、4d、4e
<i>prs</i>	F:GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R:CAAAGAAACCTTGGATTGCGG	55	370	李斯特菌属所有菌株

1.2.3 毒力基因检测

针对毒力基因 *inlA*、*inlC*、*inlJ*、*plcB*、*prfA*、*mpl*、*iap*、*hly*、*actA*、*inlB*、*plcA* 进行 PCR 扩增,引物序列参考文献[13-16](表2)。PCR反应体系(25 μ L):Taq PCR Master Mix 12.5 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各1 μ L,模板1 μ L,灭菌水9.5 μ L。PCR反应参数:预变性94 $^{\circ}$ C,4 min;变性94 $^{\circ}$ C、0.5 min,退火时间0.5 min(退火温度见表2),延长72 $^{\circ}$ C,1 min,32个循环;再延长72 $^{\circ}$ C,10 min。毛细管凝胶电泳检测扩增结果。

1.2.4 药物敏感性试验

采用微量肉汤稀释法针对青霉素、氨苄西林、红霉素、万古霉素、氯霉素、利福平、利奈唑啉、替加环素和莫西沙星进行药物敏感性试验。根据欧洲抗菌药物敏感实验委员会(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)推荐方法^[17]判读青霉素、氨苄西林和红霉素结果;其余6种抗生素(万古霉素、氯霉素、利福平、利奈唑啉、替加环素和莫西沙星)因无EUCAST和美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准,不做药物敏感性判定,仅分析最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。

1.2.5 统计学分析

数据分析使用SPSS23.0统计软件, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单增李斯特菌分布情况

北京市朝阳区2016—2018年食品污染物和有害因素风险监测工作采集食品961份,检出单增李

表2 单增李斯特菌毒力基因引物

Table 2 Primers used for virulence genes of

Listeria monocytogenes

毒力基因	引物序列(5'-3')	退火温度/ $^{\circ}$ C	扩增片段大小/bp
<i>inlA</i>	F:CGGCACTCACTAAGTCTAGAG R:GTTGTTCTTTGCGGTCCAC	58	580
<i>prfA</i>	F:CTCAAGCAGAAGAATTCA R:TCCCAAGTAGCAGGACA	53	695
<i>inlC</i>	F:AATTCACACAGACACAACC R:CGGGAATGCAATTTTCTACTA	57	517
<i>inlJ</i>	F:TGTAACCCCGTTACACAGTT R:AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	58	238
<i>actA</i>	F:ACCGCCTCCAACAGAAGATG R:GGATTACTGGTAGGCTCGGC	56	644
<i>hly</i>	F:GCCTGCAAGTCTTAAGACGCCAATC R:CTTGCAACTGCTCTTTAGTAACAGC	57	706
<i>inlB</i>	F:AAGCACAACCCAAGAAGGAA R:AAAATTCCTACTGATGCCAC	54	1107
<i>plcA</i>	F:TCCCATAGGTGGAAGGCA R:CGGGAAGTCCATGATTAGA	58	840
<i>plcB</i>	F:CAGCTCCGATGATATTGAC R:CTGCCAAAGTTTGTCTGTGAA	57	723
<i>mpl</i>	F:AAAGGTGGAGAAATTGATTTCG R:AGTGATCGTATTGTAGGCTGCTT	58	450
<i>iap</i>	F:ACTGTTTCGTTAACGGTAAA R:TTTAGTGTAACCAGAGCAATC	56	810

斯特菌53株(5.52%),主要分布于生禽肉与冷冻鱼肉食品(图1)。单增李斯特菌病例分离株28株,其中:女性病例21例(75.00%),18例(64.29%)年龄段为1~60岁,19例(67.86%)为妊娠相关病例;单增李斯特菌病例株分离来源有:血液(13/28,46.43%)、胎盘(8/28,28.57%)、脑脊液(4/28,14.29%)、脐带(2/28,7.14%)和咽拭子(1/28,3.57%)。

2.2 血清型分布特征

81株单增李斯特菌分为4种血清型:1/2a型

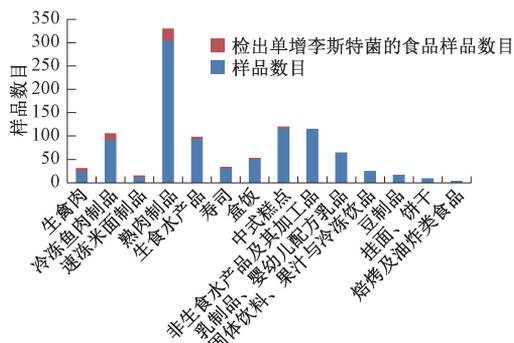


图 1 不同食品来源单增李斯特菌检出情况

Figure 1 Distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from food

50.62% (41/81)、1/2b 型 29.63% (24/81)、1/2c 型 11.11% (9/81)、4b 型 8.64% (7/81)。53 株食源性菌株血清型分布:1/2a 型占 50.94% (27/53)、1/2b 型占 26.42% (14/53)、1/2c 型占 16.98% (9/53)、

4b 型占 5.66% (3/53)。28 株病例分离株血清型分布:1/2a 型占 50.00% (14/28)、1/2b 型占 35.71% (10/28)、4b 型占 14.29% (4/28)。对食源性菌株与病例分离株血清型分布进行统计学分析,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 毒力基因分布

毒力基因 *inlA*、*inlC*、*inlJ*、*plcB*、*prfA*、*mpl* 携带率为 100%; *iap*、*hly*、*actA*、*inlB*、*plcA* 携带率分别为 98.77%、98.77%、97.53%、80.25%、38.27% (表 3)。81 株单增李斯特菌分别携带 7 种、8 种、9 种、10 种、11 种毒力基因的菌株比例为 1.23% (1/81)、2.47% (2/81)、7.41% (6/81)、59.26% (48/81)、29.63% (24/81)。

2.4 不同来源菌株毒力基因分布

食源性菌株和病例分离株毒力基因携带率差异无统计学意义 ($P>0.05$) (表 3)。

表 3 不同来源单增李斯特菌毒力基因分布情况

Table 3 Distribution virulence genes of *Listeria monocytogenes* isolated from food and patient

毒力基因	编码蛋白	食品分离株 (53 株)		病例分离株 (28 株)		χ^2 值	P 值
		阳性菌株数	携带率/%	阳性菌株数	携带率/%		
<i>inlA</i>	内化素 A	53	100.00	28	100.00	—	—
<i>inlC</i>	内化素 C	53	100.00	28	100.00	—	—
<i>inlJ</i>	内化素 J	53	100.00	28	100.00	—	—
<i>plcB</i>	磷脂酰胆碱磷脂酶 C	53	100.00	28	100.00	—	—
<i>prfA</i>	PrfA 蛋白	53	100.00	28	100.00	—	—
<i>mpl</i>	Mpl 蛋白	53	100.00	28	100.00	—	—
<i>actA</i>	ActA 蛋白	52	98.11	27	96.43	—	1.000
<i>hly</i>	李斯特溶血素 O	52	98.11	28	100.00	—	1.000
<i>iap</i>	P60 蛋白	52	98.11	28	100.00	—	1.000
<i>inlB</i>	内化素 B	42	79.25	23	82.14	0.097	0.755
<i>plcA</i>	磷脂酰肌醇磷脂酶	17	32.08	14	50.00	2.492	0.114

2.5 不同血清型菌株毒力基因分布情况

75.00% (18/24) 1/2b 型与 85.71% (6/7) 4b 型检出全部毒力基因,其中 2b 型含 10 株食源性菌株、8 株病例分离株,4b 型含 2 株食源性菌株、6 株病例分离株。1/2a 型、1/2b 型、1/2c 型、4b 型

hly、*plcA* 携带率不同 ($P<0.05$), *hly* 携带率 1/2c 型低于其他 3 种血清型, *plcA* 仅在 1/2b 和 4b 型 100% 携带;其余 9 种毒力基因,4 种血清型携带率差异无统计学意义 ($P>0.05$) (表 4)。

表 4 不同血清型单增李斯特菌菌株毒力基因分布情况

Table 4 Distribution virulence genes of *Listeria monocytogenes* with different serotypes

毒力基因	1/2a (41 株)		1/2b (24 株)		1/2c (9 株)		4b (7 株)		χ^2 值	P 值
	阳性菌株数	携带率/%	阳性菌株数	携带率/%	阳性菌株数	携带率/%	阳性菌株数	携带率/%		
<i>inlA</i>	41	100.00	24	100.00	9	100.00	7	100.00	—	—
<i>inlC</i>	41	100.00	24	100.00	9	100.00	7	100.00	—	—
<i>inlJ</i>	41	100.00	24	100.00	9	100.00	7	100.00	—	—
<i>mpl</i>	41	100.00	24	100.00	9	100.00	7	100.00	—	—
<i>plcB</i>	41	100.00	24	100.00	9	100.00	7	100.00	—	—
<i>prfA</i>	41	100.00	24	100.00	9	100.00	7	100.00	—	—
<i>hly</i>	41	100.00	24	100.00	8	88.89	7	100.00	8.1	0.044
<i>iap</i>	40	97.56	24	100.00	9	100.00	7	100.00	0.988	0.804
<i>actA</i>	40	97.56	24	100.00	8	88.89	7	100.00	3.576	0.311
<i>inlB</i>	34	82.93	18	77.78	7	77.78	6	85.71	0.769	0.857
<i>plcA</i>	0	0.00	24	100.00	0	0.00	7	100.00	81	0.000

2.6 毒力基因缺失分析

2.6.1 毒力基因缺失概况

70.37% (57/81) 单增李斯特菌菌株存在毒力基因缺失, 仅涉及 *plcA*、*inlB*、*iap*、*actA* 和 *hly*, 缺失率分别为 44.44% (36/81)、13.58% (11/81)、1.23% (1/81)、1.23% (1/81)、1.23% (1/81)。食源性菌株 (41/53, 77.36%) 和单增李斯特菌病例分离株 (16/28, 57.14%) 毒力基因缺失率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.6.2 毒力基因缺失在病例分离株的分布情况

病例分离株含 16 株毒力基因缺失株, 不同性别、年龄、临床菌株来源以及是否与妊娠相关的分布差异均无统计学意义 ($P>0.05$) (表 5)。

2.6.3 不同血清型毒力基因缺失分布情况

毒力基因缺失株中, 1/2a 型占 71.93% (41/57), 1/2c 型占 15.79% (9/57), 1/2b 型占 10.53% (6/57), 4b 型占 1.75% (1/57)。1/2a 型毒力基因缺失率: *plcA* 100% (41/41)、*inlB* 17.07% (7/41)、*iap* 2.44% (1/41)、*actA* 2.44% (1/41); 1/2b 型仅缺失 *inlB*, 其缺失率为 25.00% (6/24); 1/2c 型毒力基因缺失率: *plcA* 100% (41/41)、*inlB* 17.07% (7/41)、*iap* 2.44% (1/41)、*actA* 2.44% (1/41)、*inlB* 22.22% (2/9)、*hly* 11.11% (1/9)、*actA* 11.11% (1/9); 4b 型仅缺失 *inlB*, 其缺失率为 14.29% (1/7)。

2.7 药物敏感性分析

2.7.1 药物敏感性分析概况

耐药结果参照 EUCAST 标准, 青霉素、红霉素、氨苄西林耐药率均为 4.94% (4/81)。食源性菌株青霉素、红霉素、氨苄西林耐药率为 5.66% (3/53)、

表 5 28 株单增李斯特菌病例分离株中毒力基因缺失株统计分析

Table 5 Statistical analysis of virulent gene deletion strains in 28 strains *Listeriamonocytogenes* isolated from patient

变量	病例数 (n)	毒力基因缺失株病例数 (n)	χ^2 值	P 值
性别				
男	7	4	—	1.000
女	21	12		
年龄			0.165	0.921
0~	5	3		
1~	18	11		
60~	3	2		
不详	2	0		
临床菌株来源			5.688	0.128
血液	13	9		
胎盘	8	2		
脐带	2	2		
脑脊液	4	3		
咽拭子	1	0		
是否与妊娠相关			2.306	0.223
妊娠相关病例	19	9		
非妊娠相关病例	9	7		

5.66% (3/53)、3.77% (2/53); 病例分离株青霉素、红霉素、氨苄西林耐药率为 3.57% (1/28)、3.57% (1/28)、7.14% (2/28), 食源性菌株与病例分离株耐药率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。其余 6 种抗生素: 57 株单增李斯特菌氯霉素 MIC 值高达 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其中 36 株为食源性菌株, 21 株为病例分离株; 单增李斯特菌对其他抗生素 MIC 值均较小; 96.3% 单增李斯特菌万古霉素 MIC 值为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 仅 1 株食源性菌株 MIC 值高达 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 6)。

表 6 81 株单增李斯特菌对 9 种抗生素敏感性结果

Table 6 Antimicrobial susceptibility patterns of 81 strains *Listeriamonocytogenes* to 9 antibiotics

抗生素	不同浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 测试 MIC 值的菌株数量 (株)												MIC 范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64				
青霉素	0	1	0	12	47	17	2	0	2	0	0	0	0	$\leq 0.06\sim 8$	0.5	1
氨苄西林	0	0	6	7	52	12	4	0	0	0	0	0	0	$\leq 0.12\sim 2$	0.5	1
红霉素	0	0	0	69	10	0	1	1	0	0	0	0	0	$\leq 0.25\sim 4$	0.25	0.5
万古霉素	0	0	0	1	0	1	78	0	1	0	0	0	0	$\leq 0.25\sim 8$	2	2
利福平	0	0	0	0	75	3	2	1	0	0	0	0	0	$\leq 0.5\sim 1$	0.5	0.5
氯霉素	0	0	0	0	0	0	0	1	23	57	0	0	0	4~16	16	16
利奈唑烷	0	0	0	0	0	1	12	68	0	0	0	0	0	$\leq 1\sim 4$	4	4
替加环素	3	3	76	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\leq 0.03\sim 0.25$	0.12	0.12
莫西沙星	0	0	0	13	17	51	0	0	0	0	0	0	0	$\leq 0.25\sim 1$	1	1

2.7.2 毒力基因缺失株耐药结果

57 株毒力基因缺失株存在 3 株耐药菌株。一株为 *inlB* 缺失株, 青霉素、红霉素、氨苄西林均耐药; 第二株为 *inlB* 缺失株, 仅青霉素耐药; 第三株为 *plcA* 缺失株, 红霉素耐药。

3 讨论

单增李斯特菌有 13 种血清型, 其中 1/2a 型和 1/2b 型可引起散发病例, 4b 型易引起暴发流行。在加拿大和美国, 绝大多数李斯特菌病由 4b 型引起^[18]。文献报道河北、福建、杭州、温州、银川等

地^[19-24],食源性单增李斯特菌血清型以 1/2a 和 1/2b 为主,主要来自生肉、熟肉制品、动物性水产及速冻米面制品等。本研究中 81 株单增李斯特菌食源性菌株与病例分离株优势血清型均为 1/2a,食源性菌株主要分布于生禽肉和冷冻鱼肉食品,与国内报道相一致。本文中的 4b 型菌株在食品与患者中均有发现,但未见暴发报道,可能与食物中毒相关检测中未将单增李斯特菌列为常规检测项目有关,有必要在之后的工作中将其纳入其中,加强单增李斯特菌相关食源性疾病监测。单增李斯特菌病例株主要分离自妊娠相关病例,分离标本以血液和胎盘为主,非妊娠相关病例分离标本为血液和脑脊液。北京市朝阳区自开展单增李斯特菌专项监测后,单增李斯特菌病例分离株数量明显上升,优势血清型与食源性菌株相一致,推测患者感染原因为食入被污染食品导致。

单增李斯特菌作为胞内寄生菌,其感染过程的建立,涉及黏附侵入、胞内感染以及胞间扩散 3 个部分,感染过程每一步均涉及毒力因子调控。LIPI-1 与单增李斯特菌的胞内感染有关;LIPI-2 与单增李斯特菌的黏附、侵袭相关^[25-26]。本研究对 11 种毒力基因在 81 株 Lm 中分布情况进行研究,发现约 1/3 单增李斯特菌菌株携带全部毒力基因,仅涉及血清型 1/2b 与 4b。70.37% 的单增李斯特菌菌株存在毒力基因 (*plcA*、*inlB*、*iap*、*actA* 和 *hly*) 缺失现象。优势血清型 1/2a 毒力基因缺失率高,尤其 *plcA* 基因 100% 缺失。*plcA* 编码磷脂酰肌醇依赖的磷脂酶 C (Phosphoinositide-specific phospholipase C, PI-PLC),有助于 Lm 脱离吞噬小体感染临近细胞。亢春雨^[27]使用 *plcA* 缺失株进行小鼠致病力试验发现,*plcA* 对单增李斯特菌致病力影响较小。1/2b 与 4b 仅缺失 *inlB*。*inlB* 编码内化素 B (InlB),介导 Lm 侵入肝细胞和非上皮细胞,缺失 *inlB* 可能因侵袭力受影响导致致病力降低。毒力基因缺失在不同血清型别分布特征,提示可以进一步研究其内在关系。毒力基因缺失在不同性别、年龄、是否与妊娠相关及菌株来源分布的统计分析,提示部分毒力基因的缺失对其致病性影响有限。同时,将食源性菌株与病例分离株毒力基因携带率、缺失率进行比较未发现统计学差异,可通过基因组研究来分析单增李斯特菌在从食品到人的过程中是否发生毒力基因丢失与重组。

耐药菌株会伴随抗生素的广泛应用而出现。本研究针对 81 株单增李斯特菌进行 9 种抗生素耐药研究,分析了食源性与单增李斯特菌病例分离株耐药谱。依据 CLSI 及 EUCAST 标准,临床一线用药

青霉素与氨苄西林及二线治疗药物红霉素耐药率比较低。本研究中其余 6 种抗生素没有国际推荐的抗生素耐药敏感性折点,长期监测 MIC、MIC₅₀ 与 MIC₉₀ 变化,对于研究耐药趋势、指导临床用药至关重要。若某种抗生素大部分菌株 MIC 值均较小,出现较高 MIC 值的菌株极有可能为耐药菌株。本研究中利福平 MIC₉₀ 为 0.5 μg/mL,但有一株菌 MIC 高达 4 μg/mL,提示其可能有耐药倾向。通过耐药检测,可为临床医生提供及时、准确的药物敏感性数据,指导临床合理用药、提高疗效,避免多重耐药菌株出现。

综上所述,单增李斯特菌污染食品,可出现孕妇流产、死胎、早产及老年人脑膜炎、败血症甚至死亡等相关病例,要加强食品单增李斯特菌监测,及时采取控制措施,切断传染源,加强食品卫生生熟分开等教育宣传,有效预防单增李斯特菌病的发生;提高该类疾病的诊断能力,发展早期准确诊断技术,应用有效抗生素开展针对性治疗,防止晚期流产及脑膜炎甚至死亡等严重病症的出现。

参考文献

- [1] THOMAS M K, VRIEZEN R, FARBER J M, et al. Economic cost of a *Listeria monocytogenes* outbreak in Canada, 2008 [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2015, 12(12): 966-971.
- [2] 马彦宁,赵悦,郭云昌,等.即食食品中单核细胞增生李斯特菌的血清学分型和毒力基因分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29(1): 14-18.
- [3] CHEN JQ, HEALEY S, REGAN P, et al. PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2017, 6(2): 39-59.
- [4] Smith A M, TAU N P, Smouse S L, et al. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in south Africa, 2017-2018: Laboratory activities and experiences associated with whole-genome sequencing analysis of isolates [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2019, 16(7): 524-530.
- [5] 陈伟伟,吴晓敏,廖冬冬,等.2016年福建省单核细胞增生李斯特菌临床病例及食品来源菌株的分子特征分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(2): 145-148.
- [6] 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]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(2): 564-571.
- [7] HASEBE R, NAKAO R, OHNUMA A, et al. *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains replicate in monocytes/macrophages more than the other serotypes [J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2017, 79(6): 962-969.
- [8] 赵悦.中国食源性单核细胞增生李斯特菌耐药与毒力特征分析[D].北京:中国疾病预防控制中心,2012.

- [9] 方春. 单核细胞增生李斯特菌谱系Ⅲ强毒株与弱毒菌株比较基因组及致病力差异机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [10] 王彬, 倪宏波. 单核细胞增生李斯特菌毒力因子研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2008, 20(2): 62-67.
- [11] Arslan S, Baytur S. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species and subtyping and virulence factors of *Listeria monocytogenes* from retail meat[J]. Journal of Food Safety, 2019, 39(1): e12578.
- [12] DOUMITH M, BUCHRIESER C, GLASER P, et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(8): 3819-3822.
- [13] CAOXL, WANG Y, WANG Y, et al. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from the black-headed gull feces in Kunming, China[J]. Journal of Infection and Public Health, 2018, 11(1): 59-63.
- [14] SIAMAK H, MOHAMMAD SD, MOHAMMAD RP, et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility, serotyping and virulence genes screening of *Listeria monocytogenes* strains at a tertiary care hospital in Tehran, Iran[J]. Iranian Journal of Microbiology, 2018, 10(5): 307-313.
- [15] DE ALMEIDA R M, BARBOSA AV, LISBÔA R D C, et al. Virulence genes and genetic relationship of *L. monocytogenes* isolated from human and food sources in Brazil[J]. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2017, 21(3): 282-289.
- [16] YOSHIKAWA Y, OCHIAI Y, MOCHIZUKI M, et al. Genetic subtyping of *Listeria monocytogenes* via multiple-locus sequence typing using *giap*, *sigB* and *actA*[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2017, 78(12): 1831-1839.
- [17] 刘玉庆, 李璐璐, 骆延波, 等. EUCAST 欧盟药敏试验标准[M]. 北京: 中国质检出版社, 2016: 109.
- [18] 梅玲玲, 骆丽巧, 朱敏, 等. 食品中单增李斯特菌血清型及耐药性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(10): 1165-1166.
- [19] 乌日娜, 郭邦成, 杜小莉, 等. 银川市食源性单增李斯特菌分子流行病学特征研究[J]. 医学美学美容(中旬刊), 2014(5): 89-90.
- [20] 于丰宇. 食品中单核细胞增生李斯特菌的毒力研究[D]. 重庆: 西南大学, 2011: 1-56.
- [21] 俞骅. 杭州地区单核细胞增生李斯特菌食品分离株血清与分子型别特征的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017: 1-58.
- [22] 闫鹤, 王彬, 师宝忠, 等. 单核细胞增生李斯特菌血清型、耐药性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(10): 774-778.
- [23] 章乐怡, 林梅芬, 李毅, 等. 温州市单核细胞增生李斯特菌的毒力基因及血清学分型和分子分型研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(5): 468-472.
- [24] 陈伟伟, 吴晓敏, 廖冬冬, 等. 2016年福建省单核细胞增生李斯特菌临床病例及食品来源菌株的分子特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(2): 145-148.
- [25] 蔡雪薛. 单核细胞增生李斯特菌毒力相关基因的筛选鉴定及其功能研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2017: 1-86.
- [26] 廖兴广, 张秀丽, 刘辰, 等. 河南省食源性单增李斯特菌毒力基因的变化研究[J]. 现代预防医学, 2011, 38(20): 4248-4250+4255.
- [27] 亢春雨. 食源性单核增生性李斯特氏菌的分布、遗传多态性及其毒理机制研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2015: 1-132.

风险监测

辽宁省食品中产气荚膜梭菌的污染状况与基因特征

耿英芝, 于淼, 张铭琰, 张眉眉

(辽宁省疾病预防控制中心, 辽宁 沈阳 110005)

摘要:目的 了解辽宁省食品中产气荚膜梭菌污染状况、血清型及毒素基因携带特征。方法 在辽宁省6个市采集生畜肉和冷冻鱼糜制品样品260份,依据GB 4789.13—2012方法进行产气荚膜梭菌检测,同时采用生化和荧光定量聚合酶链式反应(PCR)方法进行菌种鉴定;提取菌体DNA,采用PCR方法进行毒素基因分型检测;并针对16S rRNA基因序列进行进化树分析。结果 260份不同食品样品中检出15株产气荚膜梭菌,总检出率为5.8%,其中生羊肉检出率最高,为29.0%(9/31)。所有菌株均检出 α 毒素,其中仅检出 α 毒素的菌株占66.7%(10/15),为A型产气荚膜梭菌;同时检出 α 毒素和 β 毒素菌株占33.3%(5/15),为C型菌株。总计6株菌检出 β_2 毒素,包括4株A型菌和2株C型菌;肠毒素CPE基因的检出率为6.7%(1/15);16S rRNA进化分析得出携带同一毒素基因的菌株遗传关系较近。结论 辽宁省生畜肉和冷冻鱼糜制品中均检出产气荚膜梭菌,其中生畜肉污染较严重,且主要为A型菌和C型菌,引起食物中毒风险高,对食品安全构成潜在的威胁,应加强监测与防控。

关键词:产气荚膜梭菌;基因分型; α 毒素

中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2022)01-0081-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.01.016

收稿日期:2021-07-06

基金项目:辽宁省自然科学基金指导计划(2019-ZD-1089)

作者简介:耿英芝 女 副主任技师 研究方向为食品微生物 E-mail:genggeng911@aliyun.com

通信作者:张眉眉 女 主任技师 研究方向为食品微生物 E-mail:zangmeimei@126.com