

食源性疾病

咸阳市市售食品中单核细胞增生李斯特菌基因组特征及耐药和致病基因分析

张俊君¹, 张国超², 王莹莹³, 杨因³, 王丽娟³, 刘刚³, 秦龙³

(1. 西安市雁塔区疾病预防控制中心, 陕西 西安 710061; 2. 西安市第九医院, 陕西 西安 710054; 3. 咸阳市疾病预防控制中心, 陕西 咸阳 712000)

摘要:目的 采用全基因组测序技术对从咸阳市市售食品中分离的 64 株单核细胞增生李斯特菌(单增李斯特菌)的基因组特征, 耐药和致病性基因进行分析。方法 收集咸阳市市售食品中分离的 64 株单增李斯特菌, 利用微量肉汤法进行药敏测定, 同时进行全基因组测序, 原始序列经拼接后利用生物信息学软件进行基因组注释、系统发育树构建及基因组特征和遗传原件分析。结果 64 株分离株对于氨苄西林、青霉素、美罗培南、复方新诺明、万古霉素 5 种抗生素结果均为敏感。其中 2 株分离株对 2 种抗生素产生抗性, 分别为四环素和红霉素。全基因组测序分析表明, 64 株分离株分属 3 个谱系, 分为 15 个克隆群(CC), 以谱系 I 和谱系 II 为主; 2 株耐药株基因型与表型一致, 耐药基因上下游遗传环境分析表明, 这些基因的可能来源为猪丹毒杆菌、肠球菌和外源质粒。所有分离株均携带致病基因岛 LIPI-1 和 LIPI-2, 部分谱系 I 菌株携带 LIPI-3 或 LIPI-4, 具有潜在致病风险。携带质粒和抗性相关基因的主要为谱系 II 菌株。inlA 基因提前终止突变均发生在谱系 II, 可能降低菌株毒力。结论 咸阳市市售食品中单增李斯特菌基因组结构相对稳定, 菌株存在获得性耐药, 且因携带更多毒力基因而产生潜在的高致病性菌株。谱系 I 和谱系 II 菌株在毒力基因、抗性相关基因和质粒携带方面均具有差异, 显示不同 CC 型菌株的毒力和环境适应性存在差异, 为咸阳市单增李斯特菌的监测和防控提供了参考数据。

关键词:单核细胞增生李斯特菌; 全基因组测序; 耐药; 毒力

中图分类号: R155

文献标识码: A

文章编号: 1004-8456(2024)03-0331-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2024.03.015

Analysis of genomic characteristics, antimicrobial and pathogenic genes of *Listeria monocytogenes* in commercial food in Xianyang City

ZHANG Junjun¹, ZHANG Guochao², WANG Yingying³, YANG Nan³, WANG Lijuan³,
LIU Gang³, QIN Long³

(1. Yanta District Center for Disease Control and Prevention, Shaanxi Xi'an 710061, China; 2. Ninth Hospital of Xi'an, Shaanxi Xi'an 710054, China; 3. XianYang Center for Disease Control and Prevention, Shaanxi Xianyang 712000, China)

Abstract: Objective To use whole genome sequencing (WGS) to analysis the genomic characteristics, the antimicrobial resistance and virulence genotypes of 64 *Listeria monocytogenes* strains isolated from commercial food in Xianyang City. **Methods** Sixty four *Listeria monocytogenes* were isolated and the susceptibilities were determined by broth microdilution. After the whole genome sequencing, using bioinformatics software for genome annotation, phylogenetic tree construction, genome features and genetic components analysis. **Results** All isolates were found to be susceptible to ampicillin, Penicillin, meropenem, trimethoprim-sulfamethoxazole, vancomycin. 2 isolates were resistant to tetracycline and erythromycin at the same time. All isotates were categorized into three different lineages and 15 CCs, Lineage I and II were the predominant types. The genotypes of 2 resistant isolates correlated well with its resistant phenotype. Up and down stream analysis of the genetic context, in which these resistant genes were found, suggested that they may have been acquired from *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Enterococcus* and plasmid. All the isolates harboured the

收稿日期: 2023-01-12

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2019SF-247); 陕西省自然科学基金基础研究计划(2019JQ-1000)

作者简介: 张俊君 男 主任技师 研究方向为食源性致病菌 E-mail: 8691963@qq.com

通信作者: 秦龙 男 副主任技师 研究方向为食源性致病菌检测 E-mail: 25381757@qq.com

LIPI-1 and LIPI-2, subset of lineage I isotates harboured LIPI-3 or LIPI-4 with potential pathogenicity. Lineage II isotates harboured more plasmids and genes linked to stress adaptation. The premature stop codon (PMSC) mutation in *inlA* more frequently happened in lineage II and may reduce virulence. **Conclusion** The genome of *Listeria monocytogenes* in commercial food in Xianyang City is stable. Acquires resistance existed in this bacterium, and can be a potential public health risk due to its high harboring rate of virulence genes. Lineage I and Lineage II isolates were differ in virulence genes, stress adaptation genes and plasmids harboring, indicating differences among subtypes. This findings would be helpful to the surveillance and control of this foodborne pathogen in Xianyang City.

Key words: *Listeria monocytogenes*; Whole genome sequencing; antimicrobial; virulence

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌)是一种机会致病菌,在外界环境耐受力强,可在高盐、低温等不利的环境条件下生长繁殖^[1],可引起一系列疾病,从轻度发热性胃肠炎到更严重的侵袭性感染,包括菌血症和脑膜炎^[2],婴幼儿病死率较高,疾病的负担重^[3]。近年来由单增李斯特菌引起的食物中毒事件在国内外常有发生,大多数病例是散发的,主要是通过食用被污染的食物进行传播^[3-4],引起的食源性疾病通常需要抗生素治疗,临床治疗李斯特菌病的首选抗生素为青霉素或氨苄青霉素,备选复方新诺明^[5],单增李斯特菌在抗生素的压力下会产生耐药性^[6-7]。目前单增李斯特菌耐药水平正在不断上升,已经出现复方新诺明耐药株和多重耐药株^[8]。

大多数的单增李斯特菌株属于谱系 I 和谱系 II,只有少数菌株属于谱系 III 和谱系 IV^[9-10]。按照多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST)可将单增李斯特菌分为不同序列性(Sequence types, STs),仅相差一个等位基因的归为同一克隆群(Clonal complexes, CCs)。单增李斯特菌基于 PCR 可分 5 个血清型 II a、II b、II c、IV a 和 IV b^[19],对该菌的血清型和基因型的分布分析是进行单增李斯特菌监测和溯源的重要手段。

单增李斯特菌的致病能力与其毒力和抗性有关,菌株的毒力和抗性与其携带的相关基因有关,抗性强的菌株在不利环境条件下的存活能力强,具有相对较高的存活水平;毒力强的菌株能够在进入宿主体内后侵袭宿主细胞,更易导致宿主患病。大量研究发现不同型别单增李斯特菌因为其携带的毒力和抗性基因不同,在不同环境中的分布有所差异。一些克隆群菌株携带单增李斯特菌毒力岛(*Listeria pathogenicity island*, LIPI) 1、2、3 和 4^[11-12],而一些克隆群携带抗性基因,如应激生存岛(*Stress survival islet*, SSI) 1 和 2^[13],李斯特菌基因组岛(*Listeria genomic island*, LGI) 1、2 和生物杀灭剂抗性基因。

我国于 2001 年建立了包括单增李斯特菌在内

的全国食源性致病菌监测网,在全国范围内开展不同种类食品中单增李斯特菌污染状况监测。本研究对分离自咸阳市市售食品中的 64 株单增李斯特菌进行抗生素敏感性分析,并利用全基因组测序技术分析菌株的耐药基因和致病基因,以期为咸阳市单增李斯特菌的预防控制提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

按照国家食品安全风险监测工作手册^[14],2010—2019 年在咸阳市 12 类市售食品中分离到 64 株单增李斯特菌。质控菌株为肺炎链球菌 ATCC29196、金黄色葡萄球菌 ATCC29213。

1.1.2 试剂及设备

药敏板(上海星佰公司),LB 增菌液、脑心浸液肉汤、脑心浸液琼脂(广州环凯公司),木糖、鼠李糖、PALCAM 琼脂(北京陆桥公司),单增李斯特氏菌显色平板(青岛海博公司),全基因组 DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司),全自动微生物鉴定仪(法国梅里埃公司),全自动微生物药敏分析仪(上海星佰公司),微生物质谱仪(青岛融智生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 耐药谱分析

按照美国临床实验室标准研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的推荐选择药敏抗生素,采用微量肉汤稀释法检测实验菌株对氨苄西林(Ampicillin, AMP)、青霉素(Penicillin, PEN)、复方新诺明(Sulfamethoxazole-trimethoprim, SXT)、美罗培南(MEM)、四环素(Tetracycline, TET)、红霉素(Erythromycin, ERY)、万古霉素(Vancomycin, VAN)和环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)8 种抗生素的敏感性。根据 CLSI M45-A3 和国家食品安全风险评估中心风险监测工作手册进行结果判读。

1.2.2 全基因组测序和分析

将单增李斯特菌接种脑心浸液肉汤培养,使用全基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,送至上海伯

杰医疗科技股份有限公司进行全基因组测序(Whole genome sequencing, WGS),采用 Illumina NovaSeq 平台进行双末端测序,使用 AppliedMaths 公司 BioNumerics7.6 软件对测序原始序列进行拼接和分析。使用国家微生物科学数据中心在线基因组注释分析工具 Prokka 1.14.5 对 64 株菌的基因组进行注释,使用 Roary v3.11.233 对 64 株菌核心基因进行分析,使用 FastTree v2.1 采用最大似然法构建进化树,参数设定为“-gtr -nt”,采用 Figtree v1.4.4 进行作图展示。

1.2.3 谱系、血清群和多位点序列分析

利用巴斯德单增李斯特菌数据库(<https://bigsd.b.pasteur.fr/listeria/listeria.html>)分析 64 株菌全基因组序列,得到谱系、血清群、ST 型和克隆群(CC)型。

1.2.4 耐药基因和质粒分析

利用 ABRicate(<https://github.com/tseemann/abricate>)软件中的 ResFinder v2.1 数据库、Plasmidfinder v2.0 数据库,将基因组序列与数据库中的耐药基因和质粒基因进行比对完成耐药基因和质粒基因的筛选,参数设置中核苷酸最小一致性和最小覆盖设定为 80%。对携带有耐药基因的分离株,选取耐药基因上游和下游各 5 kb,上传至 NCBI 数据库进行 BLAST 在线比对,将遗传相近序列下载后进行注释和比对,使用 Easyfigv 2.2.5 软件进行作图和展示。

1.2.5 毒力基因分析

以单增李斯特菌标准菌株 *Listeria*

*monocytogenes*EGD-e(NC_003210.1)作为参考筛选单增李斯特菌毒力岛 LIPI-1 及 LIPI-2 中的 internalin A(*inlA*)和 internalinB(*inlB*),以 *Listeria monocytogenes* F2365 作为参考筛选 LIPI-3,*Listeria monocytogenes* LM900558 作为参考筛选 LIPI-4,Blast 参数设置中序列一致性>85%,序列最小覆盖度>80%。以参考菌株 EGD-e(NC_003210)的内化素蛋白 A(*inlA*)氨基酸序列建立本地数据库,使用 BLASTP 软件将 Prokka 注释后的 64 株菌 *faa* 序列与本地数据库进行比对,若 *inlA* 长度变短,则表示基因组中 *inlA* 蛋白发生了提前终止(premature stop codon,PMSC)。

1.2.6 抗性相关基因分析

使用本地 BLASTN 软件,将应激生存岛 SSI-1(NC_003210)、SSI-2(HG813249)、李斯特菌基因组岛 LGI1(CP001602)、LGI2(NZ_CM001159)分别与 64 株菌基因组进行比对,参数设置中基因覆盖度及一致性阈值均为大于 85%。季铵盐类消毒剂(*bcrABC*、*emrE*、*emrC*、*qacA*、*qacH*)和重金属抗性基因(*cadA*、*cadC*、*arsD1A1R1D2R2A2B1B2*)通过与 BIGSdb-Lm 数据库比对进行筛选,设定核苷酸最小一致性为 80%。

2 结果

2.1 药敏试验结果

64 株单增李斯特菌分离株对 AMP、PEN、MEM、SXT、VAN 等 5 种抗生素敏感,其中 2 株分离株对 ERY 和 TET 抗性(Lm002 和 Lm049),1 株分离株对 CIP 中介,见表 1。

表 1 64 株单增李斯特菌对 8 种抗生素的耐药 MIC 值

Table 1 MIC distribution of 64 *Listeria monocytogenes* against 8 antibiotics

抗生素	不同最小抑菌浓度 MIC 值($\mu\text{g}/\text{mL}$)菌株数量(株)													
	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	0.0075	
AMP	8				3	2	5	30	24	3				
PEN	8				3	4	7	20	28	2				
ERY	2*				2	3	13	44						
VAN	2				62									
CIP	1				9	54								
TET	2*		1	4	55	2								
MEM	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	0.0075			
	2 22 40													
SXT	8/152	4/76	2/38	1/19	0.5/9.5	0.25/4.8	0.12/2.4	0.06/1.2	0.03/0.6	0.015/0.3	0.007/0.15			
注:	耐药				中介		敏感						*菌株编号 Lm002 和 Lm049	

2.2 菌株谱系、血清型、序列型、CC 型和基因组特征分析结果

64 株单增李斯特菌分离株分属 3 个谱系(I、II 和 III),谱系 II 为优势谱系(64.06%,41/64);分为 5 个血清型,优势血清型为 II a(48.44%,31/41);分属 15 种 CC 型和 16 种序列型,CC8、CC9、CC87 和 CC2 为

优势 CC 型(53.13%,34/64),ST8 型、ST9 型、ST87 和 ST2 型为优势 ST 型。除 CC19 包括 ST378 和 ST19,其余 CC 型只包含一种 ST 型(表 2,图 1)。基于核心基因(core gene)构建系统发育树,相同谱系、血清群和克隆群的菌株聚集在一起,菌株之间无明显食品种类聚集性(图 1)。

表2 64株单核细胞增生李斯特菌谱系、血清型、序列型和CC分布

Table 2 Composition of the lineage, serogroup and CC of 64 *L.monocytogenes* strains

谱系	血清型	序列型	CC	菌株数量(株)	构成比(%)
I	II b	ST224	CC224	5	7.81
		ST87	CC87	7	10.94
		ST3	CC3	1	1.56
	IV b	ST619	CC619	1	1.56
		ST2	CC2	6	9.38
		ST8	CC8	11	17.19
II	II a	ST121	CC121	5	7.81
		ST101	CC101	5	7.81
		ST91	CC14	4	6.25
	II c	ST7	CC7	3	4.69
		ST19、ST378	CC19	2	3.13
		ST37	CC37	1	1.56
III	IV a	ST9	CC9	10	15.63
		ST201	CC69	1	1.56
		ST299	CC131	2	3.13

2.3 携带质粒情况

64株分离株中有29株携带质粒(图1)。谱系II

(96.55%, 28/29)明显高于谱系I (3.45%, 1/29), 差异具有统计学意义($\chi^2=31.1, P<0.001$)(表3)。

2.4 耐药基因分布情况

64株分离株均携带耐药 *fosX* 基因,对磷霉素天然耐药,2株耐药株 Lm049 携带 *fosX*、*mef(A)*、*msr(D)* 和 *tet(M)*, Lm002 携带 *fosX*、*mef(A)*、*msr(D)*、*tet(M)* 和 *tet(L)*, 耐药基因型与耐药表型一致。Lm049 为 ST87 型, Lm002 为 ST8 型, 食品来源为冻三黄鸡和冻墨鱼仔。分析2株菌3个耐药基因上下游序列, Lm049 的3个耐药基因均位于菌株基因组同一段序列, 与猪丹毒杆菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)中相应序列同源性较高(98.98%), Lm002 的 *tet(M)* 和 *tet(L)* 基因与 *mef(A)* 和 *msr(D)* 基因位于基因组不同序列上, *tet(M)* 和 *tet(L)* 基因与肠球菌(*Enterococcus*)中相应序列同源性较高(一致性99%以上), *mef(A)* 和 *msr(D)* 基因与乳球菌(*Lactococcus raffinolactis*)的质粒 *pLraf_19_5_1* 中相应序列同源性较高(95.17%)(图2~图4)。

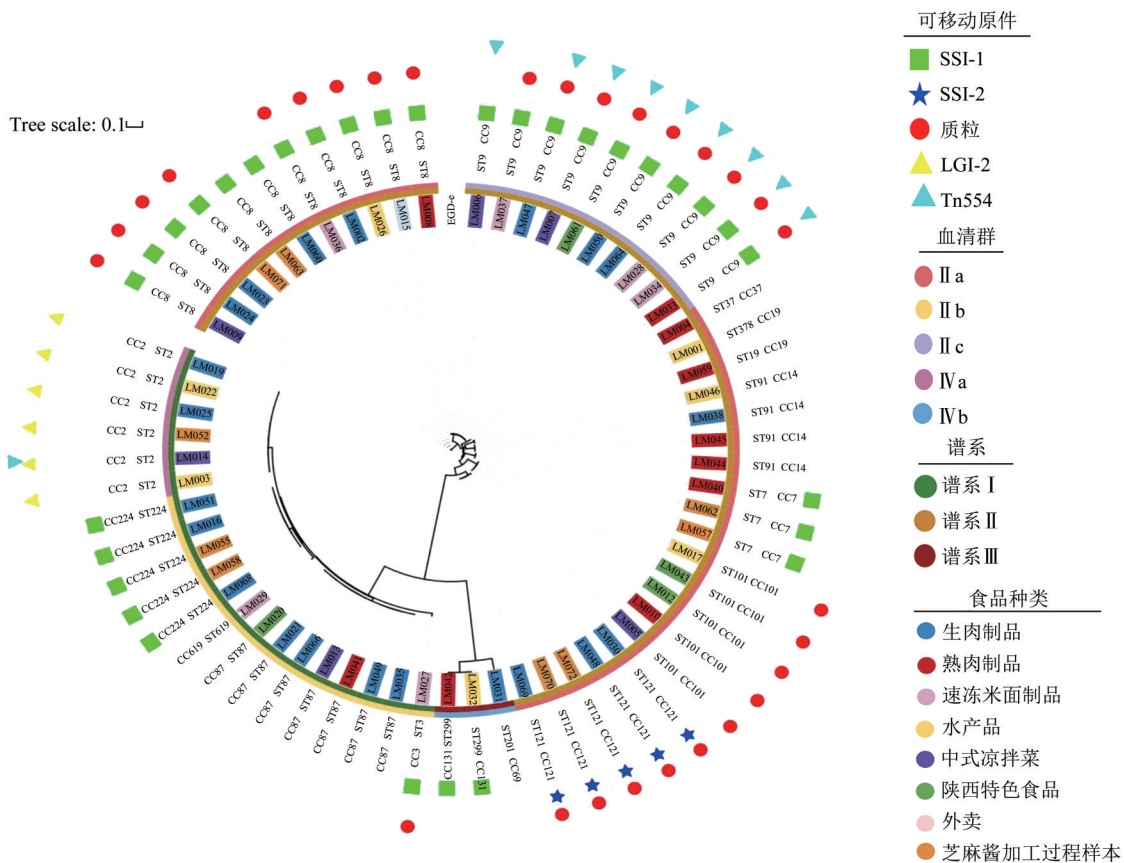


图1 64株单核李斯特菌基于核心基因系统进化树
Figure 1 Phylogenetic tree of 64 *Listeria monocytogenes*

表3 谱系I、谱系II和谱系III菌株的质粒和应激生存岛(SS1-1)携带情况

Table 3 The distribution of the plasmids and stress survival islet 1 in strains of lineage I, II and III

	应激生存岛(SS1-1)		χ^2	P	质粒		χ^2	P
	携带(%)	不携带(%)			携带(%)	不携带(%)		
谱系 I	6(30.0)	14(70.0)			1(3.6)	27(96.4)		
谱系 II	24(58.5)	17(41.5)	34.3	0.03	28(68.3)	13(31.7)	31.1	0.001
谱系 III	2(66.7)	1(33.3)			0(0.0)	3(100.0)		

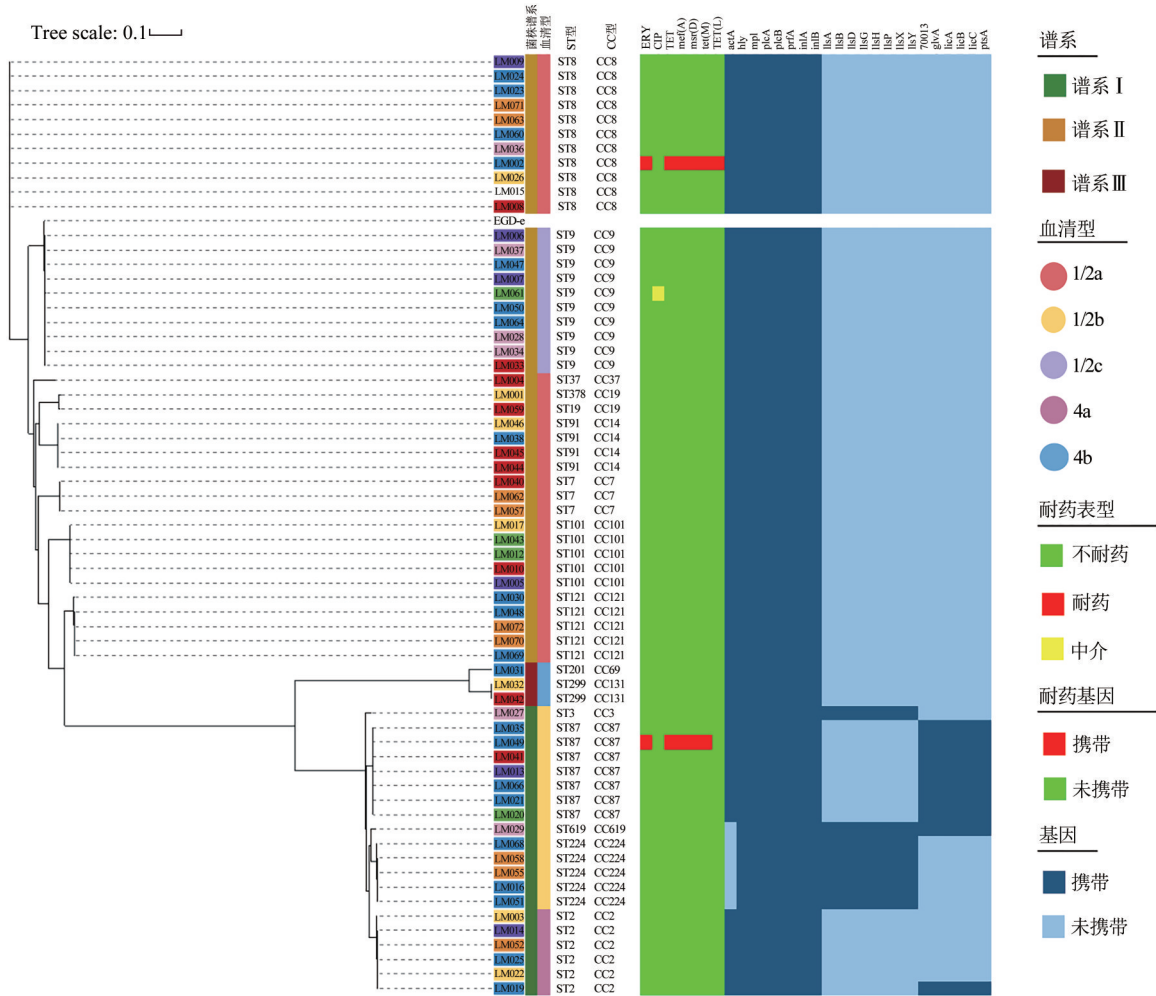


图2 64株单增李斯特分离株耐药表型和基因、毒力相关基因、*inlA*提前终止分布图

Figure 2 Antimicrobial resistance phenotype and genotype, virulence genes and distribution of PMSC in *inlA* gene

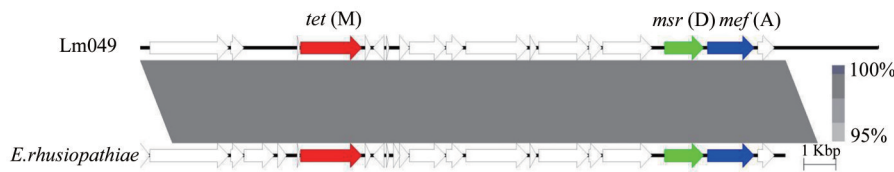


图3 Lm049携带耐药基因与外环境耐药基因序列同源性

Figure 3 Up and down stream homology analysis of the genetic context of resistant genes of isolate

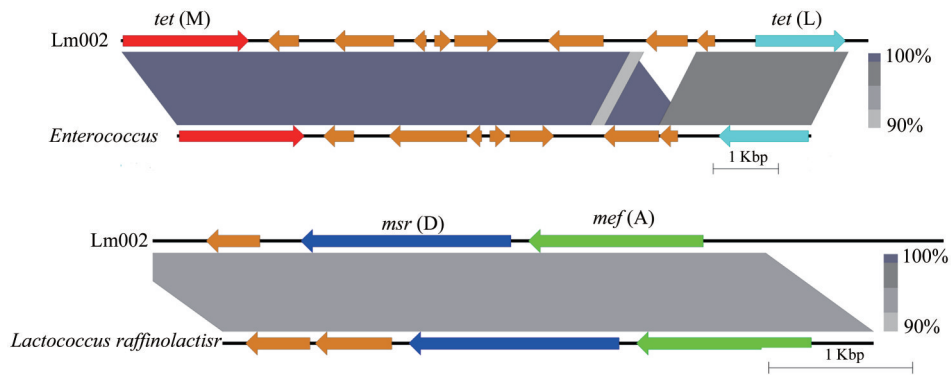


图4 Lm002携带耐药基因与外环境耐药基因序列同源性

Figure 4 Up and down stream homology analysis of the genetic context of resistant genes of isolate

2.5 毒力基因携带情况

所有分离株均携带 LIPI-1 的 *prfA*、*plcA*、*hly*、*mpl*、

plcB 基因,有 6 株不携带 *actA* 基因。所有分离株均携带 LIPI-2 的 *inlA* 和 *inlB*。7 株携带 LIPI-3,8 个基

因 *IlsA*、*IlsB*、*IISD*、*IISG*、*IIsH*、*IISP*、*IIsX*、*IIsY* 均为阳性,均为谱系 I 菌株。8 株携带 LIPI-4,6 个基因 70009、70010、70011、70012、70013 和 70014 均为阳性,其中 1 株 CC619 型同时携带 LIPI-3 和 PILI-4。谱系 II 中 36.59%(15/41)的分离株 *inlA* 蛋白出现了截短,发生了提前终止(PMSC)(图 2)。

2.6 抗性基因携带情况

本研究共有 32 株分离株携带 SSI-1,其中 37.50%(24/64)为谱系 II,9.38%(6/64)为谱系 I,3.13%(2/64)为谱系 III,携带率差异具有统计学意义($\chi^2=34.4, P=0.03$),有 5 株携带 SSI-2,全部为谱系 II 中 CC121(表 3)。

本研究 64 株分离株未携带单增李斯特菌抗季铵盐类消毒剂基因组岛 LGI1 所含的基因 *bcrABC*、*emrE*、*emrC*、*qacA* 和 *qacH*。基因组岛 LGI2 由抗重金属镉基因 *cadA* 和 *cadC* 以及抗重金属砷基因 *arsD2*、*arsA1*、*arsR1*、*arsD2*、*arsR2*、*arsA2*、*arsB1*、*arsB2* 组成,研究发现 6 株谱系 I 中 CC2 型菌(9.38%,6/64)携带 LGI2。另外,所有 9 株谱系 II 中 CC9 型菌均携带转座子 Tn554,其含有砷抗性基因簇 *arsRDABC*(图 2)。

3 讨论

本研究从 2010—2019 年咸阳市市售 12 类食品中分离到 64 株单增李斯特菌,按照 CLSI 选择 8 种抗生素进行微量肉汤实验,仅有 2 个分离株对 ERY 和 TET 有抗性,耐药水平较低,与刘洋等^[15]报道的江西省 32 株食品分离株耐药率一致,与陈培超等^[16]报道的上海市 35 株食品分离株耐药率及 ERY 和 TET 双重耐药的結果具有相似性。对于临床治疗李斯特菌病的首选抗生素青霉素或氨苄青霉素,以及备选抗生素复方新诺明均敏感,提示在临床中可以正常使用常规抗生素进行救治。

耐药菌 Lm049 携带 *mef(A)*、*msr(D)* 和 *tet(M)* 3 个耐药基因,Lm002 多携带了 *tet(L)* 基因,耐药基因型与耐药表型相一致。Plasmidfinder 分析 Lm049 不携带质粒,Lm002 携带有质粒。Lm049 耐药基因与猪丹毒杆菌中相应序列同源性较高,而猪丹毒杆菌常污染火鸡、鸡、鸭子^[17],与 Lm049 的禽肉来源相对应,提示单增李斯特菌可能会在禽类肠道获得耐药基因。Lm002 的 ERY 耐药基因 *mef(A)* 和 *msr(D)* 与肠球菌中相应序列同源性较高,Lm002 的 TET 耐药基因 *tet(M)* 和 *tet(L)* 基因与乳球菌的质粒 *pLraf_19_5_1* 中相应序列同源性较高,而接合性质粒和转座子在李斯特菌耐药性的获得中起到了决定性作用^[18],这些质粒和转座子在肠球菌中普遍存

在,并能在肠球菌、李斯特菌内部及各菌之间传递,因此 Lm002 菌耐药基因分析提示单增李斯特菌的多重耐药性可能来源于肠球菌和质粒。

通过全基因组分析比较,64 株分离株主要属于谱系 II 型和 II a 血清型,优势 CC 型为 CC8、CC9、CC87 和 CC2,谱系、血清群和 CC 型分布与我国食品中单增李斯特菌报道一致^[31,33],相同谱系、血清群和克隆群的菌株在发育树上聚类在一起,与样品种类和来源无关,表明其基因组结构是稳定的,不同来源和时空交叉分布可能与污染的食品在不同区域流通有关。

单增李斯特菌 LIPI-1 中的 *prfA* 为调控基因,与侵袭相关基因的转录表达有关,其缺失或被截短会使菌株毒力降低^[32],本研究未发现有分离株 LIPI-1 缺失 *prfA* 基因。LIPI-3 编码李斯特菌溶血素 S,LIPI-4 包括与神经及胎盘感染有关的磷酸转移酶系统(Phosphotransferase system,PTS)基因^[20-21],有助于单增李斯特菌穿过人的胎盘和血脑屏障^[21],本研究中携带毒力岛 LIPI-3 和 LIPI-4 的分离株均为谱系 I,而谱系 I 菌株在临床分离菌中所占比例高^[19],进一步说明携带毒力岛会导致菌株毒力增强。携带 LIPI-4 的分离株主要为 ST87 型单增李斯特菌,由于 PTS 的存在,具有高毒力,在我国 ST87 也有较高的临床检出率^[22-24],所以对于咸阳市食品中的 ST87 型单增李斯特菌应进行重点监测。另外,1 株 ST619 型菌同时携带 LIPI-3 和 LIPI-4,也应纳入重点监测范围。

应激生存岛 SSI-1 与 SSI-2 有助于单增李斯特菌在高浓度 NaCl、高浓度胆盐、低 pH 值和氧化胁迫下存活^[27],质粒有助于菌株在不利的环境下生存繁殖^[25]。本研究 58.5% 和 68.3% 的谱系 II 型菌株携带有 SSI-1 和质粒,谱系 II 中 ST121 型菌株携带 SSI-2^[26]。另外,ST9 型菌株携带 Tn554 转座子型的抗砷基因簇,有利于菌株在食品中的存活。这些携带应激生存岛、质粒和抗砷基因的菌株多属于谱系 II,其对于环境的适应能力更强。另外,本研究中有 15 株谱系 II 菌株发生突变形成截短的 *inlA* 蛋白而出现 PMSC,PMSC 会将菌株毒力降低,结合毒力基因和抗性基因携带情况,印证谱系 II 的菌株更多于食品中分离^[28]。

本研究未发现有分离株携带抗季铵盐类消毒剂基因组岛 LGI1。有 6 株 CC2 型菌(IVb)携带抗镉和抗砷基因岛组 LGI2,有研究表明 IVb 血清型的 CC2 型菌株携带 LGI2,有助于提高菌株的毒力^[29]。这 6 株菌分离自生肉、水产品、凉拌菜等不同食品中,提示有关部门应加强对这几类食品的监管,我们将进

一步对食品和临床Ⅳb血清型分离株进行监测和关联分析。另外,分离到的1株国外临床的优势克隆群CC3型菌株,携带有质粒、LIPI-3、SSI-1和抗镉基因*cadAC*,这些质粒和移动原件同样有助于其适应复杂的环境。除此之外,此次研究占比较高的CC8、CC9、CC87、CC2、CC121、CC101和CC7等,在我国临床病例中均有出现,体现出我国食品风险评估中心开展食品中单增李斯特菌污染监测的重要性^[30]。

目前,全基因组测序及分析已经成为流行病学调查和分子溯源的重要手段,本研究将64株单增李斯特菌核心基因构建系统发育树,可以将不同谱系和不同CC型的菌株分开,不同时空和种类来源的菌株在进化关系上差异不大,其基因组结构相对稳定,耐药分析显示菌株的耐药情况不多,常规抗生素可以用于临床治疗。相比谱系Ⅰ,谱系Ⅱ在毒力基因、质粒和环境抗性基因的携带率上都较高,增强了菌株在食品及加工环节中的适应能力,但部分携带PMSC的菌株毒力会降低,而部分谱系Ⅰ菌株携带毒力岛LIPI-3和LIPI-4,特别是高毒力菌株ST87型和ST619型,都具有潜在的高致病性。另外,基因岛组LGI2在CC2型菌株中携带,CC3型国外流行克隆群的出现,都应在食品风险监测网中加强监测。通过本研究,为咸阳市今后单增李斯特菌的监测和李斯特菌病的防控提供了参考依据。

参考文献

- [1] 程颖,董庆利,刘阳泰,等.单核细胞增生李斯特菌菌株分型与其致病潜力基因相关性研究进展[J].食品科学,2021,42(21):194-201.
CHENG Y, DONG Q L, LIU Y T, et al. Advances in the Correlation between the Subtyping of *Listeria monocytogenes* and Its Pathogenic Potential Genes[J]. Food Science, 2021, 42(21): 194-201.
- [2] 张胜利.李斯特氏杆菌病的研究进展[J].中国人兽共患病杂志,1993,9(4):49-51.
ZHANG S L. Research progress on *Listeria monocytogenes* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 1993, 9(4): 49-51.
- [3] SCALLAN E, HOEKSTRA R M, GRIFFIN P M, et al. Foodborne illness acquired in the United States major pathogens [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(1): 7-15.
- [4] 吴蜀豫,李迎惠.中国2001年11省(市)食品中李斯特菌污染状况的主动监测[J].中华流行病学杂志,2003,24(8):657-600.
WU S Y, LI Y H. Active surveillance on *Listeria monocytogenes* in seven kinds of food in 11 provinces of China in 2001 [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2003, 24(8): 657-600.
- [5] KIM Y S, SOHN K M, KANG S J, et al. Epidemiology and treatment of the commonest form of listeriosis: Meningitis and bacteraemia[J]. Infection, 2017, 25(3): 210-216.
- [6] DENNY J, MCLAUCHLIN J. Human *Listeria monocytogenes* infections in European opportunity for improved European surveillance[J]. Euro Surveill, 2008, 13(13): 8082-8086.
- [7] LUNGU B, O' BRYAN C A, MUTHAIYAN A, et al. *Listeria monocytogenes*: antibiotic resistance in food production [J]. Foodborne Pathog Dis, 2011, 8(5): 569-578.
- [8] YAN S, LI M, LUQUE-SASTRE L, et al. Susceptibility (re)-testing of a large collection of *Listeria monocytogenes* from foods in China from 2012 to 2015 and WGS characterization of resistant isolates [J]. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2019, 74(7): 1786-1794.
- [9] FENG Y, YAO H, CHEN S, et al. Rapid detection of hypervirulent serovar 4h *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1309.
- [10] LEE B H, GARMYN D, GAL L, et al. Exploring *Listeria monocytogenes* transcriptomes in correlation with divergence of lineages and virulence as measured in *Galleria mellonella* [J]. Appl Environ Microbiol, 2019, 85(21).
- [11] COTTER P D, DRAPER L A, LAWTON E M, et al. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes* [J]. PLoS Pathog, 2008, 4(9): e1000144.
- [12] WANG Y, LUO L, LI Q, et al. Genomic dissection of the most prevalent *Listeria monocytogenes* clone, sequence type ST87, in China [J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 1014.
- [13] RYAN S, BEGLEY M, HILL C, et al. A five-gene stress survival islet (SSI-1) that contributes to the growth of *Listeria monocytogenes* in suboptimal condition [J]. J Appl Microbiol, 2010, 109(3): 984-995.
- [14] 梁春穗,罗建波.食品安全风险监测工作手册[M].中国标准出版社,2012:50-143.
LIANG C H, LUO J B. Food Safety Risk Monitoring Work Manual [M]. Standard Press of China, 2012: 50-143.
- [15] 刘洋,周厚德,游兴勇,等.2016—2020年江西省市售熟肉制品中单增李斯特菌污染情况调查及耐药研究[J].现代预防医学,2022,49(2):236-240.
LIU Y, ZHOU H D, YOU X Y, et al. Investigation on contamination and drug resistance of *Listeria monocytogenes* levels from bulk cooked meats in Jiangxi Province from 2016 to 2020 [J]. Modern Preventive Medicine, 2022, 49(2): 236-240.
- [16] 陈培超,黄强,孙攀,等.2019年—2021年上海市嘉定区市售禽肉中单核细胞增生李斯特菌的污染状况及耐药性分析[J].中国卫生检验杂志,2022,32(13):1635-1638.
CHEN P C, HUANG Q, SUN P, et al. *Listeria monocytogenes* contamination and drug resistance analysis in poultry sold in Jiading District, Shanghai from 2019 to 2021 [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2022, 32(13): 1635-1638.
- [17] WANG Q, CHANG B J, RILEY T V. Erysipelothrix rhusiopathiae [J]. Veterinary microbiology, 2010, 140(3-4): 405-417.
- [18] 李迎慧,冉陆.李斯特菌的耐药性及耐药基因[J].环境卫生学杂志,2004,31(2):120-124.
LI Y H, RAN L. Resistance and resistance genes of *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Environmental Hygiene, 2004, 31(2): 120-124.

- [19] ORSI R H, DEN BAKKER H C, WIEDMANN M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics[J]. Int J Med Microbiol, 2011, 301(2): 79-96.
- [20] HILLIARD A, LEONG D, O'CALLAGHAN A, et al. Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates associated with clinical listeriosis and the food production environment in Ireland[J]. Genes, 2018, 9(3): 171.
- [21] MAURY M M, TSAI Y H, CHARLIER C, et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity[J]. Nat Genet, 2016, 48(3): 308-313.
- [22] FANG C, SHAN Y, CAO T, et al. Prevalence and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* in chilled pork in Zhejiang province, China[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2016, 13(1): 8-12.
- [23] 张玲, 陈曦, 罗丽娟, 等. 一起单增李斯特菌引起新生儿败血症的溯源研究[J]. 疾病监测, 2018, 33(11): 936-939.
- [24] CHEN M T, CHENG JIANHENG, WU QINGPING, et al. Occurrence, antibiotic resistance, and population diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh aquatic products in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2215.
- [25] NADITZ A L, DZIECIOL M, WAGNER M, et al. Plasmids contribute to food processing environment-associated stress survival in three *Listeria monocytogenes* ST121, ST8 and ST5 strains[J]. Int J Food Microbiol, 2019, 299: 39-46.
- [26] PAINSET A, BJORKMAN J T, KIIL K, et al. LiSEQ: whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe[J]. Microbial Genomics, 2019, 5(2): e000257.
- [27] HEIN I, KLINGER S, DOOMS M, et al. Stress survival islet 1 (SSI-1) survey in *Listeria monocytogenes* reveals an insert common to *Listeria innocua* in sequence type 121 *L. monocytogenes* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(6): 2169-2173.
- [28] MOURA A, CRISCUOLO A, POUSEELE H, et al. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes* [J]. Nature Microbiology, 2016, 2: 16185.
- [29] LEE S, WARD T J, JIMA D D, et al. The arsenic resistance-associated *Listeria* genomic island LGI2 exhibits sequence and integration site diversity and a propensity for three *Listeria monocytogenes* clones with enhanced virulence[J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83(21): e01189-17.
- [30] 宋泽萱, 纪顺师, 王艳, 等. 中国单增李斯特菌的基因组特征研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(5): 379-385.
- SONG Z X, JI S S, WANG Y, et al. Genomic characterization analysis of *Listeria monocytogenes* strains in China[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2021, 37(5): 379-385.
- [31] WANG Y, ZHAO A, ZHU R, et al. Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China [J]. BMC Microbiol, 2012, 12(1): 119.
- [32] CAMARGO A C, MOURA A, AVILLAN J, et al. Whole-genome sequencing reveals *Listeria monocytogenes* diversity and allows identification of long-term persistent strains in Brazil[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(12): 4478-4487.
- [33] 李薇薇, 郭云昌, 占利, 等. 2017年中国即食食品中单核细胞增生李斯特菌的分子流行病学特征[J]. 中华预防医学杂志, 2020, 54(2): 175-180.