

调查研究

石家庄市售新鲜金针菇中单核细胞增生李斯特菌的分离鉴定及全基因组测序分析

王一诺^{1,2,4}, 魏茂琳^{1,2,4}, 王金凤², 姜彦芬², 孙晓霞², 韩钦³, 徐向东^{1,4}, 王建昌^{1,2,4}

(1. 河北医科大学公共卫生学院, 河北 石家庄 050017; 2. 石家庄海关技术中心, 河北 石家庄 050051; 3. 河北国际旅行卫生保健中心, 河北 石家庄 050091; 4. 河北省环境与人群健康重点实验室, 河北 石家庄 050017)

摘要:目的 调查石家庄市市售新鲜金针菇中单核细胞增生李斯特菌的污染情况, 并分析分离株的基因特性。方法 从49份市售新鲜金针菇样本中分离鉴定了18株单核细胞增生李斯特菌菌株, 并对其进行全基因组测序, 利用BIGSdb-Lm数据库确定菌株ST型别、克隆群、谱系及血清型, 并使用VFDB毒力基因数据库和CARD数据库预测菌株毒力基因和耐药基因的携带情况。结果 在49份市售新鲜金针菇中, 共分离出18株单核细胞增生李斯特菌, 检出率为36.7%。全基因组测序结果显示, 18株分离株均属于单核细胞增生李斯特菌的谱系II, 其中11株属于ST8型、CC8群、1/2a血清型, 7株属于ST9型、CC9群、1/2c血清型。所有分离株均携带LIPI-1毒力岛基因和LIPI-2中的部分基因。Lm02携带介导林克酰胺类抗生素耐药的*lnu*基因; Lm05携带介导肽类抗生素耐药的*mprF*基因; 有15株菌同时携带*lnu*、*mprF*基因; 此外有7株菌携带介导氟喹诺酮类抗生素耐药的*norB*基因。结论 石家庄市售新鲜金针菇中存在单核细胞增生李斯特菌污染风险, 有必要加强对金针菇产品中单核细胞增生李斯特菌的检测和监管力度, 保障消费者健康。

关键词: 金针菇; 单核细胞增生李斯特菌; 分离鉴定; 全基因组测序; 毒力基因; 耐药基因

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2025)07-0629-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2025.07.005

Isolation, identification and whole-genome sequencing analysis of *Listeria monocytogenes* from fresh enoki mushrooms sold in Shijiazhuang

WANG Yinuo^{1,2,4}, WEI Maolin^{1,2,4}, WANG Jinfeng², JIANG Yanfen², SUN Xiaoxia², HAN Qin³, XU Xiangdong^{1,4}, WANG Jianchang^{1,2,4}

(1. School of Public Health, Hebei Medical University, Hebei Shijiazhuang 050017, China; 2. Food Microbiology and Animal Quarantine Laboratory, Technology Center of Shijiazhuang Customs, Hebei Shijiazhuang 050051, China; 3. Hebei International Travel Health Care Center, Hebei Shijiazhuang 050091, China; 4. Hebei Key Laboratory of Environment and Human Health, Hebei Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Objective To investigate the contamination of *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) in commercially available fresh enoki mushrooms in Shijiazhuang City, and to analyze the genomic characterization of the strains. **Methods** A total of 49 samples of commercially available fresh enoki mushrooms were tested and characterized for *L. monocytogenes*, among which 18 strains of *L. monocytogenes* were isolated. All isolates were subjected to whole-genome sequencing to determine strain sequence type (ST), clonal complex (CC), lineage, and serogroup, using the BIGSdb-Lm database. The presence of virulence genes and drug resistance genes was predicted using the VFDB virulence gene database and the CARD database. **Results** Eighteen strains of *L. monocytogenes* were isolated from 49 samples, with a

收稿日期: 2025-05-20

基金项目: 河北省省级科技项目(22375504D)

作者简介: 王一诺 女 硕士研究生 研究方向为食源性致病菌的分子生物学检测 E-mail: wangyinuo0618@126.com

通信作者: 徐向东 女 教授 研究方向为食源性致病菌的分子生物学检测 E-mail: xuxd@hebmu.edu.cn

王建昌 男 正高级兽医师 研究方向为食源性致病菌的分子生物学检测 E-mail: jianchangwang1225@126.com

徐向东和王建昌为共同通信作者

detection rate of 36.7%. Whole-genome sequencing results showed that all 18 isolated strains belonged to lineage II. Among them, 11 strains belonged to ST8, CC8 and serogroup 1/2a, while 7 strains belonged to ST9, CC9, and serotype 1/2c. All isolated strains carried the LIPI-1 virulence island genes and some genes in LIPI-2. Strain Lm02 carried the *lnu* gene, which mediates resistance to lincosamide antibiotics; strain Lm05 carried the *mprF* gene, which mediates resistance to peptide antibiotics; 15 strains carried both the *lnu* and *mprF* genes; in addition, 7 strains carried the *norB* gene, which mediates resistance to fluoroquinolone antibiotics. **Conclusion** There is a risk of *L. monocytogenes* contamination in fresh enoki mushrooms sold in Shijiazhuang City. It is essential to strengthen the detection and control of *L. monocytogenes* to ensure consumer health.

Key words: Enoki mushrooms; *Listeria monocytogenes*; isolation; identification; whole genome sequencing; virulence gene; drug resistance gene

李斯特菌属是一类革兰氏阳性短杆状细菌,主要包括单核细胞增生李斯特菌(以下简称单增李斯特菌)、英诺克李斯特菌、格氏李斯特菌等21种^[1]。其中单增李斯特菌是引起人类感染的主要病原体,对环境具有较强的适应能力^[2]。根据基因组进化研究,单增李斯特菌分为4个谱系(I~IV),多数分离株属于谱系I(包括4b、1/2b、3b、4d、4e和7血清型菌株)和谱系II(包括1/2a、1/2c、3a、3c和4h血清型菌株)。其中谱系I在临床分离菌中所占比例较谱系II高,这可能与携带单增李斯特菌毒力岛(*Listeria pathogenicity islands*, LIPI)-3和LIPI-4导致菌株毒力增强有关^[3],而谱系II菌株中广泛存在与环境适应相关的基因,有助于其在食品环境中生长繁殖,因此在食物中检出较多。单增李斯特菌的毒力基因大多聚集于LIPI-1~4中,LIPI-1较为保守,在不同谱系菌株中稳定存在^[4],LIPI-2编码内化素家族蛋白,与肠道感染有关,LIPI-3编码李斯特菌溶血素S的表达^[5],LIPI-4与神经系统和母婴感染有关,具有高毒性^[3],而LIPI-3、LIPI-4一般只存在于谱系I菌株中。

单增李斯特菌广泛存在于自然界,常在肉制品、即食食品、番茄及蘑菇等新鲜农产品中检出^[6],特别是在进出口商业种植的蘑菇中,因单增李斯特菌污染而导致的召回事件屡有发生。2016—2020年间,韩国出口的金针菇因受到单增李斯特菌污染,在美国、法国和加拿大等多个国家引发了以ST121型别为主的疫情暴发,导致多例严重疾病病例的发生^[7]。2023年1~11月期间,因从我国出口的新鲜金针菇中检出单增李斯特菌,美国、加拿大和澳大利亚等国家先后28次发布扣留和召回通告^[8-10],同时中国多家出口企业的金针菇被列入美国食品药品监督管理局红名单。这些因单增李斯特菌污染所引发的食品召回事件,不仅导致巨大的经济损失,也对食品工业和公共卫生领域构成严重威胁^[11]。因此,加强对金针菇中单增李斯特菌的监测,对于保护公众健康和推动我国金针菇等农产品的高质量

对外贸易发展具有重要意义。

本研究对石家庄市部分超市和农贸市场中销售的新鲜金针菇进行了单增李斯特菌的分离和鉴定,分析了金针菇中单增李斯特菌的污染情况。此外,通过对18株单增李斯特菌分离株进行全基因组测序,得到其谱系、克隆群和序列分型,进一步分析了单增李斯特菌分离株的血清型、耐药基因和毒力基因携带情况,并进行系统发育分析,对控制市售新鲜金针菇中单增李斯特菌污染及预防食源性疾病等具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

2023年6月至2024年5月,在石家庄市购买49份新鲜金针菇(10个不同品牌):26份购自超市,23份购自农贸市场。李斯特菌显色培养基、营养琼脂培养基、李氏增菌肉汤LB、革兰氏染色液试剂盒(北京陆桥技术股份有限公司);0.45%的无菌生理盐水、GP鉴定卡(梅里埃诊断产品(上海)有限公司);细菌基因组DNA提取试剂盒(天根生物有限公司)。

1.2 仪器与设备

Hfsafe-900LC型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);LRH-150B型生化培养箱(广东省韶关市鑫腾科普仪器有限公司);CX31型生物显微镜(奥利巴斯(中国)有限公司);浊度仪、VITEK2全自动微生物分析仪、VIDAS全自动免疫分析仪(梅里埃诊断产品(上海)有限公司);T100™梯度PCR仪(美国BIO-RAD公司);Fusion FX5凝胶成像系统(法国Viber Lourmat公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 李斯特菌的分离鉴定

参照国标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菌检验》对金针菇样品进行单增李斯特菌检测。无菌操作称取金针菇25 g,加入225 mL LB₁增菌液,拍击

式均质器拍击 2 min 彻底混匀,30 ℃培养箱中培养 24 h。移取 0.1 mL 于 10 mL LB₂ 增菌液内,30 ℃培养箱中培养 24 h,取 LB₂ 二次增菌液划线接种于李斯特菌显色培养基,36 ℃培养 48 h。挑选符合李斯特菌典型菌落形态特征(蓝绿色菌落或周围有不透明白色晕圈的蓝绿色菌落)的可疑菌落进行分纯,并通过革兰氏染色试验、过氧化氢酶试验鉴定。同时将其接种于 LB 肉汤培养 24 h,取 1 mL 菌液沸水浴 15 min,冷却至室温后取 500 μL 进行 VIDAS 全自动免疫分析鉴定。并将可疑的单菌落划线于营养琼脂培养基培养 48 h,挑取单个纯菌落制成 0.5~0.63 麦氏浊度的均一菌悬液,通过 VITEK2-compact 的 GP 鉴定卡进行全自动微生物鉴定。

1.3.2 16S rDNA 序列扩增和测序

将 1.3.1 中鉴定为李斯特菌的菌株接种于 LB 肉汤培养 24 h,取 200 μL 菌液至 1.5 mL 离心管中,通过水煮法提取细菌核酸。使用基于细菌 16S rDNA 序列的通用引物 27F/1492R 对菌株进行 PCR 扩增,上游引物序列为 5'-AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3';下游引物序列为 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'。反应体系为 50 μL: 25 μL 的 Go Taq[®] Green Master Mix,上下游引物(10 μmol/L)各 2 μL,DNA 模板 2 μL,ddH₂O 19 μL,反应条件为:95 ℃预变性 5 min;95 ℃,30 s,54 ℃,30 s,72 ℃,1 min 30 s,35 个循环;72 ℃,10 min。取 5 μL PCR 扩增产物于 1.2% 琼脂糖凝胶进行琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统中观察结果。将出现目的电泳条带的 PCR 产物送至北京擎科生物科技有限公司进行 Sanger 测序,获得的 16S rDNA 序列测序结果在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库使用生物大分子序列比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)进行相似性对比鉴定。

1.3.3 全基因组测序

经鉴定为单增李斯特菌的菌株均置于-80℃保存,活化 3 代后提取细菌基因组 DNA,送至上海探普生物科技有限公司进行基于 Tell-Seq 的全基因组测序,使用 Tell-Link 软件对质控后的数据进行组装。

1.3.4 谱系、多位点序列分型、克隆群分型和血清分型

将 18 株单增李斯特菌的全基因组序列上传至 Pasteur 多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST)数据库,根据其 7 个管家基因(*abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh*, *lhkA*)的编号确定菌株序列型(sequence type, ST)^[12],并获得其克隆群(Clonal complex, CC)群

和谱系等基因组特征。通过分析全基因组序列中五种血清分型相关基因(*lmo0737*, *lmo1118*, *ORF2819*, *ORF2110*, *prs*)的不同组合情况,确定菌株血清型^[13]。

1.3.5 耐药基因和毒力基因检测

将 18 株单增李斯特菌序列上传至综合抗生素耐药性数据库(The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD)^[14],使用在线抗性基因标识符(Resistance Gene Identifier, RGI)根据同源性和 SNP 模型从蛋白质或核苷酸数据中预测抗生素耐药组。核苷酸最小一致性设定为 85%,最小覆盖设定为 90%。

使用毒力因子数据库(Virulence Factor Database, VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi>)的 VFAnalyzer 自动综合分析平台,对 18 株单增李斯特菌的毒力基因进行分析,预测菌株是否包含特定的毒力基因,实验预测的毒力基因包括其 LIPI-1~4 上的全部毒力基因。

1.3.6 系统发育分析

为代表不同的遗传背景和流行特点,从 NCBI 数据库下载 38 株单增李斯特菌各谱系及血清型的参考株序列,所选菌株地理分布多样、来源广泛(包括人源分离株、食物源分离株和环境源分离株),以更好地反映菌株间的遗传关系和迁移动态。使用德国 QIAGEN 公司的 CLC Genomics Workbench 23.0.4 软件对获得的 18 条单增李斯特菌全基因组序列与 38 株参考菌株序列进行比对,利用 N-J 模型(Neighbor-Joining method)构建 56 株单增李斯特菌全基因组序列系统发育树,菌株信息如表 1 所示。

1.3.7 统计学分析

使用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 金针菇中李斯特菌的分离及鉴定

对 49 份金针菇样品进行李斯特菌检验,共在 24 份样品中分离到 30 株可疑李斯特菌,其中 18 株单增李斯特菌可疑菌株(显色培养基上呈现出周围有不透明白色晕圈的蓝绿色菌落),命名为 *Lm01~Lm18*; 12 株其他李斯特菌可疑菌落(显色培养基上呈现出蓝绿色菌落),命名为 *L1~L12*。

对 30 株可疑李斯特菌进行革兰氏染色,均为革兰氏阳性短杆菌,经 VIDAS 全自动免疫分析系统和 VITEK2 全自动微生物分析仪鉴定,其中 18 株(*Lm01~Lm18*)确定为单增李斯特菌,5 株(*L1~L5*)为英诺克李斯特菌,7 株(*L6~L12*)为格氏李斯特菌。

使用引物 27F/1492R 对分离株的 16S rDNA 序列进行 PCR 扩增,将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳

表1 38株单增李斯特菌信息
Table 1 Information of 38 *L. monocytogenes* strains

菌株	登录号	血清型	ST 型	分离国家	来源	谱系
R479a	NZ_HG813247.1	1/2a	ST8	丹麦	食品	Ⅱ
Lm N1546	CP013724.1	1/2a	ST8	瑞士	血液	Ⅱ
Lm_15_17439_A144	CP013919.1	1/2a	ST8	意大利	血液	Ⅱ
18-04415	CP064843.1	1/2a	ST8	德国	患者	Ⅱ
19-05816	CP063240.1	1/2a	ST8	德国	患者	Ⅱ
MKELm8_2022	CP115043.1	1/2a	ST8	丹麦	血液	Ⅱ
N23-3470	CP168818.1	1/2a	ST8	瑞士	食品加工设施	Ⅱ
N24-0276	CP168811.1	1/2a	ST8	瑞士	食品	Ⅱ
12-05460	CP063381.1	1/2a	ST8	德国	患者	Ⅱ
C3	CP050028.1	1/2a	ST8	挪威	环境	Ⅱ
CFIAFB20240043	CP182819.1	1/2a	ST8	加拿大	食品	Ⅱ
NTLM08	CP178349.1	1/2a	ST8	中国	冷冻猪肉	Ⅱ
LM36	CP068599.1	1/2a	ST91	韩国	动物	Ⅱ
PNUSAL000144	CP020831.1	1/2a	ST790	美国	血液	Ⅱ
SLCC2372	FR733648.1	1/2c	ST9	英国	患者	Ⅱ
FSL R2-561	CP002003.1	1/2c	ST9	美国	未知	Ⅱ
10-5026	CP007195.1	1/2c	ST9	加拿大	食品加工设施	Ⅱ
NTLM03	CP178248.1	1/2c	ST9	中国	肉制品	Ⅱ
AT3E	CP023752.1	1/2c	ST9	法国	食品	Ⅱ
P4_LIS	CP139336.1	1/2c	ST9	意大利	血液	Ⅱ
L1812	CP099457.1	1/2c	ST9	德国	未知	Ⅱ
N23-2879	CP168821.1	1/2c	ST9	瑞士	血液	Ⅱ
LM30	CP074104.1	1/2c	ST9	韩国	组织	Ⅱ
PIR00540	CP025568.1	1/2c	ST9	未知	未知	Ⅱ
MF4697	CP025438.1	1/2c	ST9	挪威	食品加工设施	Ⅱ
NH1	CP021325.1	1/2c	ST477	中国	冷冻食品	Ⅱ
10-5027	CP007196.1	3c	ST9	加拿大	食品	Ⅱ
SLCC7179	FR733650.1	3a	ST91	奥地利	奶酪	Ⅱ
FORC_049	CP016629.1	1/2b	ST224	韩国	生菜	I
81-0816	CP006874.1	4b	ST1	加拿大	卷心菜	I
F2365	NC_002973.6	4b	ST1	美国	奶酪	I
1063 LM3	CP019616.1	4b	ST217	加拿大	菠菜	I
ATCC 19117	FR733643.1	4d	ST2	未知	动物	I
SLCC2378	FR733644.1	4e	ST73	未知	动物	I
FSL R9-0915	CP062124.1	7	ST3	美国	未知	I
M7	CP002816.1	4a	ST201	中国	食品	Ⅲ
L99	FM211688.1	4a	ST201	荷兰	奶酪	Ⅲ
SLCC2376	FR733651.1	4c	ST71	未知	食品	Ⅲ

分析,发现 18 株单增李斯特菌可疑菌株和 12 株其他可疑李斯特菌株均出现单一扩增条带,片段大小约为 1 500 bp,符合预期扩增片段长度,说明扩增效果良好。将 30 个 PCR 产物进行 16S rDNA 序列双向测序,并与 NCBI 数据库 BLAST 相似性对比,结果显示,18 株单增李斯特菌可疑菌株(*Lm*01~*Lm*18)均为单增李斯特菌,其余 5 株(*L*1~*L*5)为英诺克李斯特菌,7 株(*L*6~*L*12)为格氏李斯特菌,与 VITEK 鉴定结果一致。

2.2 金针菇中李斯特菌污染情况分析

10 个品牌的 49 份金针菇样品中,5 个不同品牌的 24 份金针菇中检出李斯特菌,18 份样品检出单增李斯特菌,检出率为 36. 7%(18/49);7 份检出格氏李斯特菌,检出率为 14. 3%(7/49);5 份检出英诺克李斯特菌,检出率为 10. 2%(5/49)。进一步分析发现,2 份样品同时检出了单增李斯特菌、英诺克李斯特菌和格氏李斯特菌;1 份样品同时检出了

单增李斯特菌和英诺克李斯特菌;1 份样品同时检出了单增李斯特菌和格氏李斯特菌。

购自超市的 26 份金针菇中 7 份检出单增李斯特菌,阳性率为 26. 9%;购自农贸市场的 23 份金针菇中 11 份检出单增李斯特菌,阳性率为 47. 8%,两个采样地点中单增李斯特菌检出率的差异无统计学意义($\chi^2=2. 29,P>0. 05$)。

2.3 MLST和分子血清分型

18 株单增李斯特菌的基因组大小平均为 2. 9 Mbp,GC 含量约为 37%。根据全基因组测序结果进行 MLST 分析,18 株单增李斯特菌均属于谱系Ⅱ,其中 11 株为 CC8 克隆系、ST8 型,7 株为 CC9 克隆系、ST9 型。通过分析 18 株分离株全基因组序列中 5 种血清分型相关基因进行血清分型,得到 11 株(61. 1%)单增李斯特菌的血清型为 1/2a,7 株(38. 9%)血清型为 1/2c,具体结果见表 2。

表 2 18株单增李斯特菌分型结果
Table 2 Typing results of 18 strains of *L. monocytogenes*

菌株编号	管家基因							ST 型	CC 群	谱系	血清型
	<i>abcZ</i>	<i>bglA</i>	<i>cat</i>	<i>dapE</i>	<i>dat</i>	<i>Idh</i>	<i>lhkA</i>				
Lm01	5	6	2	9	5	3	1	ST8	CC8	II	1/2a
Lm02	5	6	2	9	5	3	1	ST8	CC8	II	1/2a
Lm03	5	6	2	9	5	3	1	ST8	CC8	II	1/2a
Lm04	5	6	2	9	5	3	1	ST8	CC8	II	1/2a
Lm05	5	6	2	9	5	3	1	ST8	CC8	II	1/2a
Lm06	5	6	2	9	5	3	1	ST8	CC8	II	1/2a
Lm07	5	6	2	9	5	3	1	ST8	CC8	II	1/2a
Lm08	6	5	6	4	1	4	1	ST9	CC9	II	1/2c
Lm09	6	5	6	4	1	4	1	ST9	CC9	II	1/2c
Lm10	5	6	2	9	5	3	1	ST8	CC8	II	1/2a
Lm11	6	5	6	4	1	4	1	ST9	CC9	II	1/2c
Lm12	5	6	2	9	5	3	1	ST8	CC8	II	1/2a
Lm13	6	5	6	4	1	4	1	ST9	CC9	II	1/2c
Lm14	6	5	6	4	1	4	1	ST9	CC9	II	1/2c
Lm15	5	6	2	9	5	3	1	ST8	CC8	II	1/2a
Lm16	6	5	6	4	1	4	1	ST9	CC9	II	1/2c
Lm17	6	5	6	4	1	4	1	ST9	CC9	II	1/2c
Lm18	5	6	2	9	5	3	1	ST8	CC8	II	1/2a

2.4 耐药基因分析

通过 CARD 数据库注释,18 株单增李斯特菌均携带介导磷霉素耐药的 *fosX* 基因,Lm04 未携带其他耐药基因。此外 Lm02 携带介导林克酰胺类抗生素耐药的 *lnu* 基因,Lm05 携带介导肽抗生素耐药的 *mprF* 基因,有 15 株单增李斯特菌(Lm01、Lm03、Lm06~Lm18)同时携带 *lnu*、*mprF* 基因,其中 Lm08、Lm09、Lm11、Lm13、Lm14、Lm16、Lm17 还携带介导氟喹诺酮类抗生素耐药的 *norB* 基因。

2.5 毒力基因分析

18 株单增李斯特菌共检出 12 类 48 种不同的毒力基因,所有菌株均携带 LIPI-1,其中 6 个毒力基因 *hly*、*prfA*、*plcA*、*plcB*、*mpl*、*actA* 均存在,均携带 LIPI-2 中的 *inlA*、*inlB*、*inlC*、*inlF*、*inlJ*、*inlK* 基因,其余 3 个内化素家族基因 *inlE*、*inlG*、*inlH* 缺失。所有菌株均不携带 LIPI-3、LIPI-4 上的毒力基因。以 Lm02 为例,通过 CGView 绘制单增李斯特菌的相关基因组圈图,见图 1。

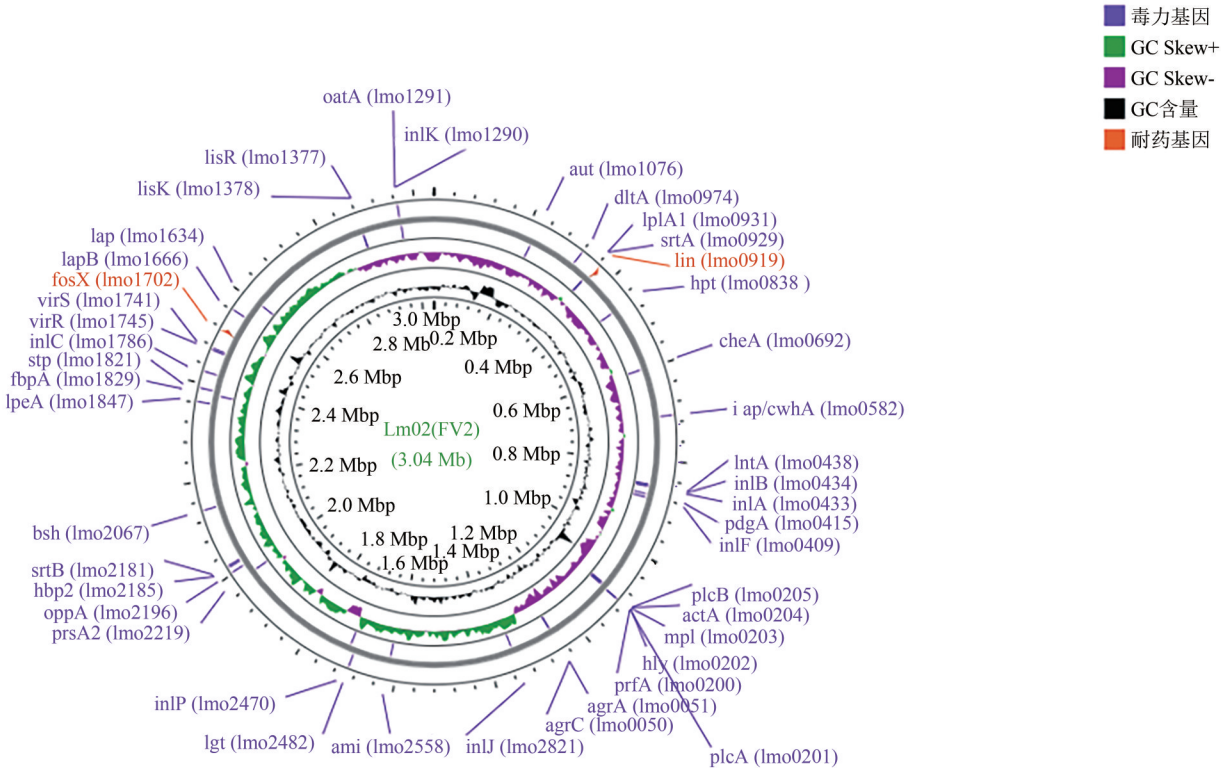


图 1 Lm02 基因组圈图
Figure 1 Circular map of Lm02

2.6 系统发育分析

通过 CLC Genomics Workbench 23.0.4 软件构建 56 株单增李斯特菌的系统发育树,得到菌株之间的进化关系如图 2,结果显示:11 株(*Lm*01~*Lm*07、*Lm*10、*Lm*12、*Lm*15、*Lm*18)属于 1/2a 血清型,其中 *Lm*02 与 2 株德国人源参考株 19-05816、18-04415 具有较近的亲缘关系;*Lm*04 和 *Lm*05 位于同一分支,与 1 株德国人源参考株 12-05460 和 1 株瑞士分离自食品加工设施的 N23-3470 亲缘关系较近;其

余 8 株(*Lm*01、*Lm*03、*Lm*06、*Lm*07、*Lm*10、*Lm*12、*Lm*15、*Lm*18)位于同一分支,均与分离自挪威环境样本的 C3 亲缘性较近。7 株(*Lm*08、*Lm*09、*Lm*11、*Lm*13、*Lm*14、*Lm*16、*Lm*17)属于 1/2c 血清型,其中 *Lm*08、*Lm*09 与美国的参考株 FSL R2-561 和分离自英国患者的参考株 SLCC2372 具有较近的亲缘关系;*Lm*11、*Lm*13、*Lm*14、*Lm*16、*Lm*17 位于同一分支,均与分离自挪威食品加工设施的 MF4697 和分离自法国食物样本的 AF3E 亲缘关系较近。

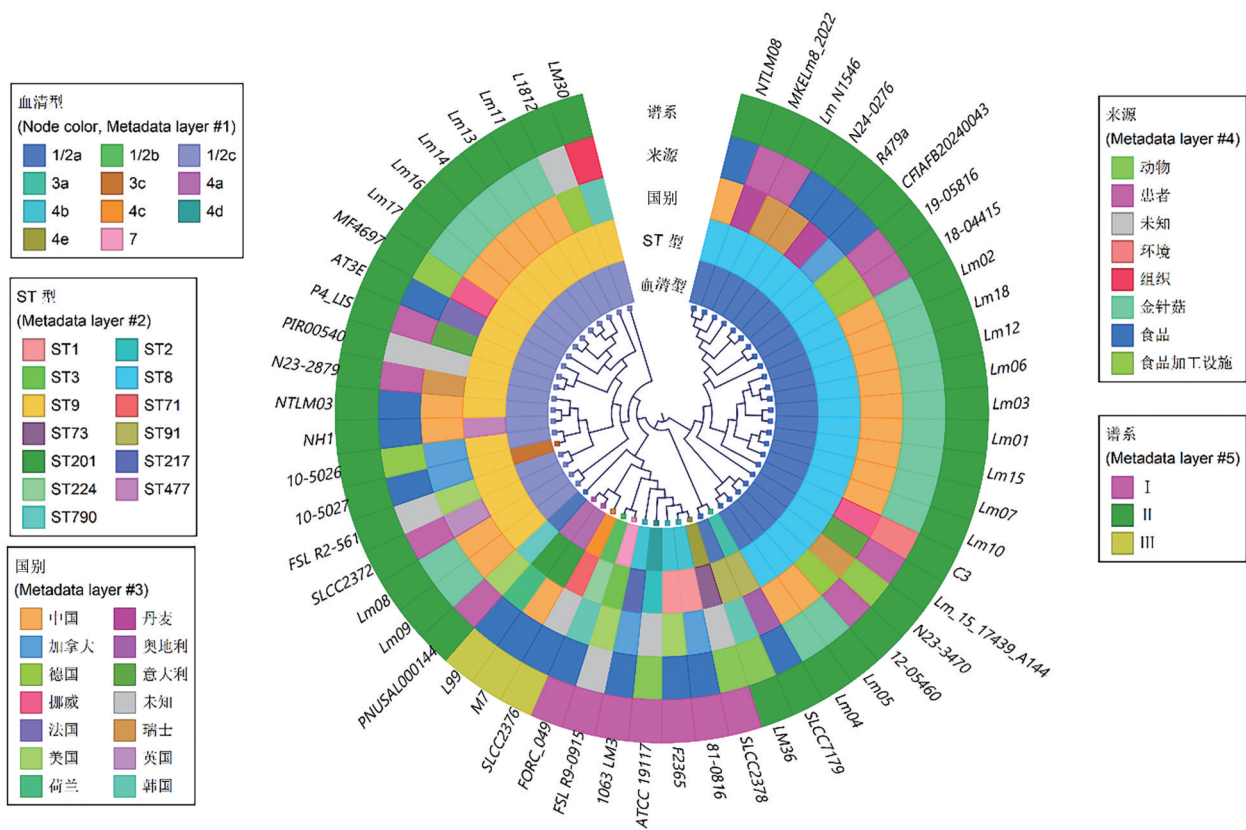


图2 基于56株单增李斯特菌的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 56 strains of *L. monocytogenes*

3 讨论

金针菇作为一种在全球范围内广泛种植且商业化程度较高的食用菌,因其营养和口感深受消费者喜爱^[15],但其生产过程中存在不容忽视的污染风险。单增李斯特菌是一种致病性强、耐低温的土壤腐生菌,即使在 4℃ 冷藏条件下也能存活较长时间。研究表明,金针菇生产厂的堆肥、采收器具、传送带等可能是单增李斯特菌的主要污染源,而生产中的常规消毒程序并不能有效地消除该菌,进而导致金针菇产品与设备的交叉污染^[16]。新鲜金针菇在包装后储存于低温条件,为单增李斯特菌的生长和繁殖提供了有利环境。人们在生食或食用加热不充分的金针菇时,容易感染单增李斯特菌,从而引发

潜在的健康风险。

本研究从石家庄市多个超市及农贸市场购买了来自 10 个不同品牌的 49 份金针菇,单增李斯特菌检出率为 36.7%,超市和农贸市场污染率没有显著差异,考虑市面售卖金针菇多为预包装,因此可能与其售卖环境关系较小。根据先前研究显示,中国市场销售的食用菌样品中,单增李斯特菌检出率为 21.2%,其中金针菇样品的检出率高达 55.5%,显著高于其他种类食用菌样品,与本研究金针菇样品中单增李斯特菌的高检出率相似^[17],而美国小型蘑菇加工设施中单增李斯特菌检出率仅为 1.6%^[18],提示石家庄市市售金针菇存在较高的单增李斯特菌污染风险。

单增李斯特菌作为一种重要的食源性病原菌,主要分为4个谱系和13种血清型,其中1/2a(谱系Ⅱ)和1/2b、4b(谱系Ⅰ)被认为是高致病血清型。不同来源的菌株在优势型别上存在差异,在国际范围内,单增李斯特菌的流行CC群包括CC3、CC7、CC8、CC9、CC87、CC121等^[19]。从中国不同省份即食品中分离出的单增李斯特菌主要属于谱系Ⅱ,血清型以1/2a为主,优势CC群为CC8、CC101和CC87^[20],食用菌中分离株主要属于CC8和CC87^[21]。河北省2005—2007年间的监测数据显示,从食品中分离出的90株菌株属于谱系Ⅰ和Ⅱ,且以谱系Ⅱ占优势,体现出其良好的生态适应性,其中主要为1/2a血清型,其次为1/2c^[22]。本研究对18株市售新鲜金针菇中分离出的单增李斯特菌进行了全基因组测序,结果显示18株分离株均属于谱系Ⅱ,其中11株属于1/2a血清型、CC8群、ST8型,7株属于1/2c血清型、CC9群、ST9型,与我国及本研究所在地区食品中单增李斯特菌基因组总体特征报道相一致^[21-22]。通过进一步的系统发育分析显示,本实验中分离的18株金针菇源单增李斯特菌与来自不同国家的食品、食品加工设施及病例生物样本亲缘较近,表明单增李斯特菌可能通过食品及环境等途径传播,从而导致人员感染。同时,单增李斯特菌具有较高的变异性及适应性^[23],这可能促进不同地区菌株之间的基因共享,进而增加其在遗传上的相似性。

大量的流行病学研究表明,不同型别单增李斯特菌在临床和食品中的分布有所差异,这种差异可能归因于菌株携带的毒力基因和环境抗性基因不同^[24]。单增李斯特菌的致病性与其毒力基因密切相关,毒力基因在同一谱系菌株中的差异较小^[25],本研究中分离的18株单增李斯特菌均携带LIPI-1、LIPI-2中部分基因,而不携带LIPI-3、LIPI-4基因,与谱系Ⅱ菌株基因特征一致。LIPI-2中内化素基因*inlE*、*inlG*、*inlH*的缺失对细菌的致病性影响较小,研究表明,内化素基因*inlA*和*inlB*在细菌侵袭宿主细胞的过程中发挥更为重要的作用,尽管部分内化素基因缺失,细菌依然能够通过其他主要内化素基因有效介导其致病性和感染能力^[26]。在抗生素耐药方面,检测到本研究分离株携带可能对林克酰胺类抗生素耐药的*lnu*基因、可能对肽类抗生素耐药的*mprF*基因,还在ST9型菌株中检测到可能对氟喹诺酮类抗生素耐药的*norB*基因。钱璐等^[27]同样在分离出的单增李斯特菌中预测到*mprF*基因,且通过实验发现该菌株对林克酰胺类抗生素耐药,这些耐药基因的发现有助于临床抗菌药物的选择。尽管许

多研究表明单增李斯特菌对四环素类、大环内酯类及 β -内酰胺类等抗生素表现出较高的耐药性^[28],但本研究分离株中未发现携带相关耐药基因,因此,在临床救治过程中应考虑地域性和病菌来源的差异。

目前我国对单增李斯特菌的检测主要集中在肉制品和即食食品^[29],对蔬菜类食品的检测力度相对不足,特别是金针菇,因其消费量大且在烹饪时常因加热不足而难以杀灭单增李斯特菌,其污染情况亟需关注。本研究也存在一定的局限性,例如样品量较少且样品来源地区较单一,后续将增加样品采集数量、扩大采样范围,进一步分析金针菇源单增李斯特菌的基因组特征,以期食品安全提供更全面的科学依据。

4 结论

本研究明确了石家庄市售金针菇存在一定程度的单增李斯特菌污染,解析了金针菇源单增李斯特菌常见的血清型、ST型、CC群及其毒力基因、耐药基因携带情况,为单增李斯特菌的监测、防控和分子流行病学研究提供了参考数据,提示监管部门需加强检测和监管力度,保障消费者健康。

参考文献

- [1] MANYI-LOH C. E., LUES R. *Listeria monocytogenes* and Listeriosis: The Global Enigma[J]. *Foods*, 2025, 14(7): 1266.
- [2] QUEREDA J J, MORÓN-GARCÍA A, PALACIOS-GORBA C, et al. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 2509-2545.
- [3] MAURY M M, TSAI Y H, CHARLIER C, et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity[J]. *Nature Genetics*, 2016, 48(3): 308-313.
- [4] KAYODE A J, OKOH A I. Assessment of the molecular epidemiology and genetic multiplicity of *Listeria monocytogenes* recovered from ready-to-eat foods following the South African listeriosis outbreak[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 20129.
- [5] SMITH A, HEARN J, TAYLOR C, et al. *Listeria monocytogenes* isolates from ready to eat plant produce are diverse and have virulence potential[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 299: 23-32.
- [6] MATLE I, MBATHA K R, MADOROB A E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis[J]. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 2020, 87(1): e1-e20.
- [7] PEREIRA E, CONRAD A, TESFAI A, et al. Multinational Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Linked to Enoki Mushrooms Imported from the Republic of Korea 2016—2020[J]. *Journal of Food Protection*, 2023, 86(7): 100101.

- [8] Administration Food and Drug.Import Alert 25-21[Z]. Food and Drug Administration, 2025.
- [9] Agency The Creation of the Canadian Food Inspection.Lian Teng brand “Champignon Énoki” (Enoki Mushrooms) recalled due to *Listeria monocytogenes*[Z]. The creation of the Canadian Food Inspection Agency, 2023.
- [10] Zealand Food Standards Australia New.Natural Mushrooms Enoki Mushrooms[Z]. Food Standards Australia New Zealand.
- [11] MOURA A, TOURDJMAN M, LECLERCQ A, et al. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France[J]. Emerging Infectious Diseases, 2017, 23(9): 1462-1470.
- [12] SALCEDO C, ARREAZA L, ALCAL Á B, et al. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(2): 757-762.
- [13] FENG Y, YAO H, CHEN S, et al. Rapid Detection of Hypervirulent Serovar 4h *Listeria monocytogenes* by Multiplex PCR[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1309.
- [14] ALCOCK B. P, HUYNH W, CHALIL R, et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database [J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D690-D699.
- [15] LIU F, WANG S H, JIA D H, et al. Development of Multiple Nucleotide Polymorphism Molecular Markers for Enoki Mushroom (*Flammulina filiformis*) Cultivars Identification [J]. Journal of Fungi, 2023, 9(3): 330.
- [16] CHEN M, WU Q, ZHANG J, et al. Prevalence and contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in *Flammulina velutipes* plants [J]. Foodborne Pathogens And Disease, 2014, 11(8): 620-627.
- [17] CHEN M, CHENG J, WU Q, et al. Prevalence, Potential Virulence, and Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolates From Edible Mushrooms in Chinese Markets [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1711.
- [18] VISWANATH P, MURUGESAN L, KNABEL S J, et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Listeria spp.* in a small-scale mushroom production facility[J]. Journal of Food Protection, 2013, 76(4): 608-615.
- [19] FAGERLUND A, WAGNER E, MØRETRØ T, et al. Pervasive *Listeria monocytogenes* Is Common in the Norwegian Food System and Is Associated with Increased Prevalence of Stress Survival and Resistance Determinants [J]. Applied And Environmental Microbiology, 2022, 88(18): e0086122.
- [20] 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.
- LI W W, GUO Y C, ZHAN L, et al. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat food in 2017 in China [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2020, 54(2): 175-180.
- [21] LI W, BAI L, FU P, et al. The Epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China[J]. Foodborne Pathogens And Disease, 2018, 15(8): 459-466.
- [22] YAN H, NEOGI S B, MO Z Y, et al. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005—2007 [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 144(2): 310-316.
- [23] 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.
- [24] MAURY M M, BRACQ-DIEYE H, HUANG L, et al. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones’ adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products [J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 2488.
- [25] POIMENIDOU S V, DALMASSO M, PAPADIMITRIOU K, et al. Virulence Gene Sequencing Highlights Similarities and Differences in Sequences in *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains of Clinical and Food Origin From 3 Different Geographic Locations[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1103.
- [26] 张武宏, 孙晓林, 薛慧文, 等. 内化素在产单核细胞李氏杆菌入侵宿主细胞过程中的作用[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(7): 137-140.
- ZHANG W H, SUN X L, XUE H W, et al. The role of endostatin in the invasion of host cells by *Listeria monocytogenes* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 47(7): 137-140.
- [27] 钱璐, 张然, 梁胜楠, 等. 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[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(3): 292-299.
- QIAN L, ZHANG R, LIANG S N, et al. 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 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(3): 292-299.
- [28] SU R Z, WEN Y L, PRABAKUSUMA A S, et al. Prevalence, antibiotic resistance and virulence feature of *Listeria monocytogenes* isolated from bovine milk in Yunnan, Southwest China [J]. International Dairy Journal, 2023, 144: 105703.
- [29] 吴莹莹, 冯贺琪, 邓影妹, 等. 肉制品中单核细胞增生李斯特菌的污染产生分析及风险控制[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(4): 507-516.
- WU Y Y, FENG H Q, DENG Y M, et al. Analysis and risk control of *Listeria monocytogenes* contamination in meat products [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(4): 507-516.