

研究报告

2000—2018年福建省单核细胞增生李斯特菌分离株血清型
及脉冲场凝胶电泳分型陈伟伟¹,郑盈翔¹,叶玲清¹,陈泽辉²,陈惠龙³,叶素贞⁴(1.福建省疾病预防控制中心,福建福州 350001; 2.厦门市疾病预防控制中心,
福建厦门 361021; 3.三明市疾病预防控制中心,福建三明 365000;
4.南平市疾病预防控制中心,福建南平 353000)

摘要:目的 分析福建省食品、临床病例和环境单核细胞增生李斯特菌分离株的血清型和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型,为食源性疾病的暴发识别和溯源提供参考依据。方法 采用多重聚合酶链式反应(PCR)血清学分型、免疫血清凝集和PFGE方法对2000—2018年分离的单核细胞增生李斯特菌进行分型。结果 117株单核细胞增生李斯特菌分为4组血清型,包括1/2a(3a)、1/2b(3b)、1/2c(3c)和4b(4d,4e),占比分别为67.5%(79/117)、23.1%(27/117)、5.1%(6/117)和4.3%(5/117)。9株病例分离株血清型为1/2a(6株)、4b(2株)和1/2b(1株)。采用Asc I限制性内切酶将117株单核细胞增生李斯特菌分为83种不同PFGE型别,其中10株具有独特单一的型别。9株病例分离株分为8种不同PFGE型别。结论 福建省食品和病例中分离的单核细胞增生李斯特菌,1/2a血清型占主导地位,4b血清型应引起关注。

关键词:单核细胞增生李斯特菌;多重聚合酶链式反应;分子血清分型;脉冲场凝胶电泳

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)06-0615-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.06.005

Analysis of serotypes and pulsed field gel electrophoresis molecular type of *Listeria monocytogenes* in Fujian Province from 2000 to 2018

CHEN Weiwei¹, ZHENG Yingxiang¹, YE Lingqing¹, CHEN Zehui², CHEN Huilong³, YE Suzhen⁴(1. Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention, Fujian Fuzhou 350001, China;
2. Xiamen Center for Disease Control and Prevention, Fujian Xiamen 361021, China;
3. Sanming Center for Disease Control and Prevention, Fujian Sanming 365000, China;
4. Nanping Center for Disease Control and Prevention, Fujian Nanping 353000, China)

Abstract: Objective To analyze the serotypes and molecular type of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, clinical case and environment in Fujian Province, so as to provide reference for the outbreak identification and traceability of foodborne diseases. **Methods** Using multiplex polymerase chain reaction (PCR) serotyping, immune serum agglutination and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) to classify the strains. **Results** The 117 strains of *Listeria monocytogenes* strains were divided into 4 PCR serotypes, 67.5% (79/117) of which were 1/2a (3a), 23.1% (27/117) were 1/2b (3b), 5.1% (6/117) were 1/2c (3c) and 4.3% (5/117) were 4b (4d, 4e). Among the 9 strains isolated from cases, 6 strains were 1/2a, 2 strains were 4b and 1 strain was 1/2b. 117 *Listeria monocytogenes* strains were divided into 83 different PFGE types by Asc I restriction endonucleases, and 10 strains of which had unique and single types. Nine clinical case isolates were divided into 8 different PFGE types. **Conclusion** 1/2a serotype was dominant in *Listeria monocytogenes* isolated from food and clinical specimens in Fujian Province, and 4b serotype should be concerned.

Key words: *Listeria monocytogenes*; multiplex polymerase chain reaction; molecular serotyping; pulsed field gel electrophoresis

收稿日期:2020-09-04

基金项目:福建省科技计划项目(2018Y0008);福建省科技创新平台
建设项目(2019Y2001)

作者简介:陈伟伟 女 主任技师 研究方向为食源性疾病预防

E-mail:chenww10160@163.com

李斯特菌病是一种病死率极高的食源性疾病,2013—2017年,我国64家哨点医院共报告211例李斯特菌病病例,围产期病例的平均病死率为31.2%^[1]。单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)存活能力强,4℃仍能繁殖,自然

界分布范围广,能引起孕妇流产、早产,新生儿败血症、脑膜炎和死胎,老年人脑膜炎和败血症等,高危人群为免疫功能低下者^[1-2]。李斯特菌病流行病学调查和不同来源菌株的分型有助于将人类疾病与特定感染源联系起来,因此,建立快速、准确的分型方法对预防和控制 LM 感染尤为重要。血清型通常被用作食品和临床病例分离株流行病学监测的首选鉴别特征,免疫血清方法被称为血清型鉴定的金标准,但 LM 血清凝集方法受到血清的质量、成本、检测时间以及技术实践等因素的影响,难以在基层实验室推广。由于传统的血清凝集方法效率不高,现国外多采用多重聚合酶链式反应(PCR)技术进行血清学分型^[2-4],其特点是更加高效便捷。脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)普遍用于细菌食源性疾病的源头追踪,是国内外调查李斯特菌病暴发鉴别食品菌株的标准分型方法,是评价 LM 菌株相关性的有价值的工具^[5]。本研究应用多重 PCR 血清学分型和 PFGE 方法对 117 株 LM 分离株进行分型,以了解福建省不同来源菌株的血清型别和 PFGE 分子型别特征。

1 材料与方法

1.1 方法

1.1.1 菌株来源

117 株 LM 分离株来自福建省不同地区的食品、食品加工厂和临床病例,包括 105 株 2000—2018 年食品分离株、3 株 2016—2017 年冷冻饮品厂环境分离株和 9 株 2015—2017 年哨点医院临床病例分离株(来自 4 份新生儿血液,2 份孕妇血液,3 份胎盘)。上述分离株均通过 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》^[6]方法鉴定。LM 标准菌株(CMCC 54004 和 CMCC 54007)均购自中国药品生物制品检定所,沙门菌参考菌株(H9812,中国疾病预防控制中心传染病所)。

1.1.2 主要仪器与试剂

CHEF Mapper XA 及凝胶成像系统(美国伯乐),核酸扩增仪(美国 MJ),超纯水仪(美国 miniPALL),台式离心机。

TBE、Tris-HCL 缓冲液、乙二胺四乙酸(EDTA)均购自北京索莱宝,十二烷基肌氨酸钠、十二烷基硫酸钠、溶菌酶均购自美国 Sigma,蛋白酶 K(德国 Merck),*Xba* I 和 *Asc* I 酶(美国 NEB),SeaKem Gold 琼脂糖(瑞士 Gene),*Taq* DNA 聚合酶(上海生工),100 bp DNA Ladder、琼脂糖均购自日本 TaKaRa,免疫血清购自日本生研,多重 PCR 引物由上海生工公

司合成。

1.2 方法

1.2.1 血清学分型

多重 PCR 血清学分型采用的 5 对引物序列及 LM 血清学分型引物见表 1,方法参照文献[2]。免疫血清分型方法按照产品说明书操作,用玻片凝集法确定 O 抗原,试管法确定 H 抗原。

表 1 LM 血清学分型引物

目标基因	引物序列(5'-3')	片段长度/bp	血清型
<i>lmo0737</i>	F:AGGGCTTCAAGGACTTACCC R:ACGATTCTGCTTGCCATTTC	691	1/2a,1/2c, 3a,3c
<i>lmo1118</i>	F:AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R:CGGCTTGTTCGGCATACTTA	906	1/2c,3c
<i>ORF2819</i>	F:AGCAAAAATGCCAAAACCTCGT R:CATCACTAAAGCCTCCATTG	471	1/2b,3b,4b, 4d,4e
<i>ORF2110</i>	F:AGTGGACAATTGATTGGTGAA R:CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	4b,4d, 4e
<i>prs</i>	F:GCTGAAGAGATTGCGAAAAGAAG R:CAAAGAAAACCTTGATTGCGG	370	李斯特菌属 所有菌株

1.2.2 PFGE 分型与聚类分析

按照 LM 的 PFGE 操作程序^[7]进行,选用 *Asc* I 酶进行 plug 中 DNA 的酶切,PFGE 电泳图谱用 BioNumerics 7.6 软件进行聚类分析。采用非加权配对平均(UPGMA)法和 Dice 系数,条带位置的差异容许度(tolerance)设置 1.5%,优化值(optimization)设置 1.5%,绘制菌株的型别聚类图。

2 结果

2.1 多重 PCR 及免疫血清分型

117 株 LM 被分成 4 组 PCR 血清型,即 1/2a(3a)、1/2b(3b)、1/2c(3c)和 4b(4d,4e),其中 105 株食品分离株中各血清型占比分别为 66.7%(70/105)、24.8%(26/105)、5.7%(6/105)和 2.9%(3/105),结果见表 2。3 株 4b 血清型的食品分离株来自寿司、中式凉拌菜和冻禽肉。

表 2 117 株菌株的样品来源、多重 PCR 血清学分型结果

来源	1/2a(3a)	1/2b(3b)	1/2c(3c)	4b(4d,4e)	合计
寿司	18	5	0	1	24
中式凉拌菜及盒饭	8	11	0	1	20
熟肉制品	5	1	2	0	8
水产品	8	3	0	0	11
鲜、冻禽肉	20	4	3	1	28
鲜、冻畜肉	8	2	1	0	11
速冻米面制品	3	0	0	0	3
加工环境	3	0	0	0	3
病例标本	6	1	0	2	9
合计	79	27	6	5	117

40株LM免疫血清凝集结果显示,28株食品分离株(来自寿司8株、中式凉拌菜8株、冻禽肉8株、熟肉制品4株)血清型为16株1/2a、7株1/2b、3株1/2c和2株4b;9株病例分离株的血清型为6株1/2a、2株4b、1株1/2b;3株环境分离株血清型均为1/2a。40株菌株免疫血清型别与多重PCR血清型结果一致。

2.2 PFGE分型及聚类分析

117株LM经Asc I酶切后,每株电泳出7~13个条带,经聚类分析,共获得83种PFGE型别,型别相似度在61.5%~100.0%之间。117株LM的PFGE型别以相似度>85%划分,可分为17簇(每簇含有2~31株),其中较为优势的一簇有31株,血清型以为1/2a为主,菌株来源包括食品、病例和环境。其余每簇各含2~14株菌,10株具有单一独特的型别(无相关性,相似度<85%)。

9株病例分离株分为8个不同的PFGE型别,2株PFGE型别完全相同的病例菌株来自同一事件,是2017年厦门市分离自产妇血液(JDZ08)及其新生儿胎盘面(JDZ09)的菌株,也与多株食品株的PFGE型别相似度>85%;2017年厦门市病例分离株(JDZ06)与2011年泉州市四川泡菜分离株(DZ-C11016)的型别完全一致;2016年福州市病例分离株(JDZ3)与泉州市凉皮分离株(DZ-C11069)PFGE型别相似度为94.1%;2015年福州市病例分离株(JDZ1)与福州市鱼子寿司(DZ-A16114)和漳州市情侣餐饮食品分离株(DZ-E16087)的相似度为87.9%,另外4株病例分离株与105株食品分离株的PFGE型别无相关性。

117株LM中完全相同的PFGE型别有17组(见图1中C1~C17,每组含有2~5株)。其中,相同时间和地点的分离株有:2017年泉州市冷冻饮品厂灌装区传送带与紧邻产品仪器外表面的环境分离株(C15);2018年三明市生食水产品希鲮鱼生鱼和淡水水产品田螺的分离株(C1);2011年南平市同一家超市三份中式凉拌菜的分离菌株(C17),显示可能是厨房或超市销售过程造成的LM交叉污染。还发现一些跨区域、跨年份、跨来源的谱带完全吻合的分离株,如:泉州市工厂地板分离株与福州市帝王蟹柳和希鲮鱼籽分离株(C4);2011年泉州市豆腐干、厦门市凉拌鱼皮和南平市熟肉制品(小翅膀)、2008年泉州市水饺以及2009年福州市生牛肉的分离株(C3);2017年福州市蝴蝶卷寿司、2016年漳州市的寿司船和莆田市的蟹肉手卷(C12);2001年泉州市生猪肉和

龙岩市鸡肉以及2002年泉州市冻鸡爪的分离株(C7);2000年三明市生牛肉、2001年龙岩市冻鸡肉、2015年宁德市猪里脊和三明市凉拌面条以及2018年三明市冻鸡腿的分离株(C9)等。

79株1/2a(3a)、27株1/2b(3b)、6株1/2c(3c)和5株4b(4d,4e)血清型菌株各分离出66、24、6和5种PFGE型别,见图1。

3 讨论

DOUMITH等^[2]建立了多重PCR血清分型方法评价222株LM,发现从食物和病例中分离到的LM至少有95%是属于1/2a、1/2b、1/2c和4b血清型。本研究应用5对引物的多重PCR方法,117株LM均可分在4组PCR血清型内,随机抽取来自食品、环境和病例的40株分离株经免疫血清凝集验证,结果符合PCR血清型,更进一步印证了分子血清分型方法的准确性。多重PCR血清分型相对于传统的免疫凝集血清鉴别方法具有储备方便、经济和快速等特点,可作为LM的首选分型方法用于监测和暴发溯源分析。

本研究结果显示,福建省食品中LM检出率最高的血清型为1/2a(3a),达到67.5%,其次为1/2b(3b)(23.1%),这与北京市、陕西省和浙江省报道的食品分离株血清型以1/2a和1/2b为主一致^[8]。一项1156株食品和环境分离株的研究^[5]显示,LM分离株血清型以1/2a(61%)为主,其次是1/2c、3a、4b和1/2b。福建省病例分离株的血清型为1/2a、4b和1/2b,与国内外报道的人源血清型基本一致,瑞典、匈牙利、美国等^[9-11]病例血清型以1/2a、4b和1/2b为主。王丽丽等^[12]研究北京市2013—2015年32株人源性LM血清型,以1/2b和1/2a型为主,分别占53.1%和37.5%。本研究中105株食品分离株中4b型仅占2.9%(3/105),而9株病例分离株中4b型占22.2%(2/9),这可能与4b血清型引起的疾病发生在孕妇病例中明显较多有关^[13],因此4b血清型LM在食品中的污染应引起关注。

PFGE分型技术是食源性细菌分子分型的“金标准”,具有良好的准确度,在分子溯源及病原传播规律研究等领域被广泛应用。欧洲通过建立各地食品、环境和动物菌株的LM分子数据库,包括菌株分型结果(PFGE和血清分型)和菌株的流行病学信息,与人类菌株数据库结合使用,为病原体的检测和疫情调查提供支持^[14]。本研究结合分子血清分型及PFGE技术,系统比较了2000—2018年福建省不同地区、不同来源LM分离株的PFGE图谱,初步掌握了福建省LM的血清型分布及主流PFGE

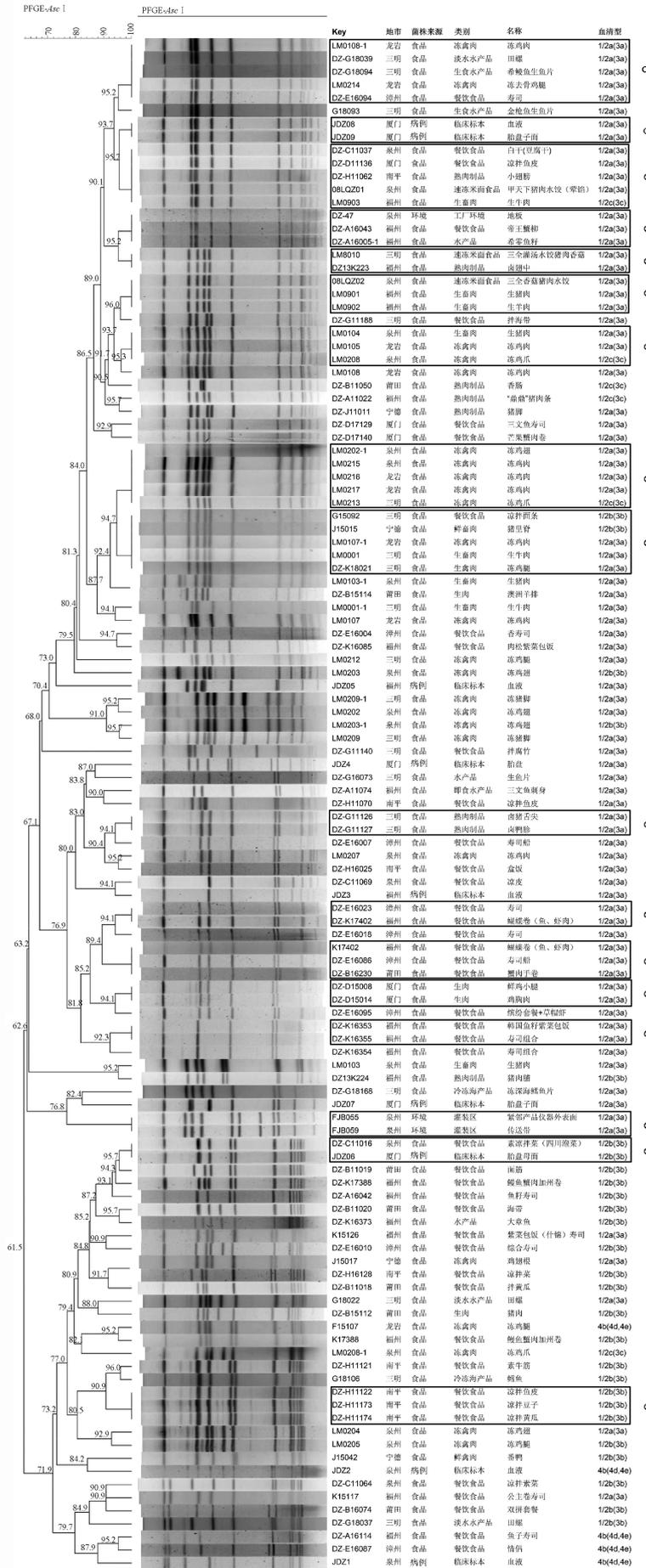


图1 117株单核细胞增生李斯特菌的PFGE聚类图

Figure 1 PFGE dendrogram of 117 *Listeria monocytogenes* strains

谱系,不仅可有效区分相同血清型的LM分离株,亦可用于比较不同来源的历史分离株和新分离株的遗传数据。同一事件、不同分离株间型别的完全吻合,也说明PFGE方法在基因同源性比较上具有良好的准确度。虽然总体而言,2000—2018年福建省收集的LM分离株PFGE型别较为离散,但本研究也从PFGE图谱聚类分析中发现了部分跨区域、跨年度、跨来源菌株间的遗传相关性,部分图谱甚至完全一致,可为福建省LM菌株的传播及流行规律研究、污染事件的溯源奠定良好基础。

传统的分型基于表型特征,而生化特性相同的不同菌株无法确定菌株间的关系,不能满足应对暴发和溯源的需求。血清型和PFGE分型技术结合分析结果,显示了福建省LM菌株的基因型别多态性,对今后福建省LM食源性疾病暴发的识别、食物污染源的溯源及流行病学调查提供了参考依据。

本研究发现1/2a血清型在福建省食品和病例分离的LM中均占主导地位,4b血清型的食品分离株应引起关注。多重PCR方法因快捷简便可作为LM的首选分型方法,与PFGE分型技术结合有益于监测和暴发溯源的分析。2000—2018年福建省不同来源LM分离株的PFGE图谱虽较为多样化,但跨时空的大量菌株分子遗传特征的分析仍可发现部分菌株间存在内在关联性,为识别LM污染事件的源头以及该病原的传播规律提供了一定的线索,值得在后续研究中进一步深入探讨。

参考文献

- [1] LI W W, BAI L, MA X C, et al. Sentinel listeriosis surveillance in selected hospitals, China, 2013-2017 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2019, 25(5) : 2274-2276.
- [2] 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.
- [3] NHO S W, ABDELHAMED H, REDDY S, et al. Identification of high-risk *Listeria monocytogenes* serotypes in lineage I (serotype 1/2a, 1/2c, 3a and 3c) using multiplex PCR [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119(3) : 845-852.
- [4] KÉROUANTON A, MARAULT M, PETIT L, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 80(2) : 134-137.
- [5] DALMASSO M, JORDAN K. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of listeria monocytogenes [M]. *Methods in Molecular Biology*, New York : Springer New York, 2014 : 63-72.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 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 : GB 4789. 30—2016 [S]. 北京 : 中国标准出版社, 2016.
- [7] 国家食品安全风险评估中心. 2016年国家食源性疾病预防工作手册 [Z]. 2016.
- [8] 张丽萍, 张克俭, 高涛, 等. 食源性单增李斯特菌血清分型及耐药性的研究 [J]. *实用预防医学*, 2013, 20(5) : 611-613.
- [9] LOPEZ-VALLADARES G, THAM W, PARIHAR V S, et al. Human isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden during half a century (1958-2010) [J]. *Epidemiology and Infection*, 2014, 142(11) : 2251-2260.
- [10] PÁSZTI J, KIRÁLY J, FÜZI M. Serogrouping and pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from cases of human infection in Hungary 2004-2012 [J]. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2014, 61(1) : 71-78.
- [11] BORUCKI M K, CALL D R. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(12) : 5537-5540.
- [12] 王丽丽, 陈倩. 北京市人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] FORSYTHE J. 食品中微生物风险评估 [M]. 石阶平, 史贤明, 岳田利, 译. 北京 : 中国农业大学出版社, 2007 : 106-114.
- [14] FÉLIX B, DANAN C, VAN WALLE I, et al. Building a molecular *Listeria monocytogenes* database to centralize and share PFGE typing data from food, environmental and animal strains throughout Europe [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 104 : 1-8.