

- 耐药性研究[J]. 实用预防医学, 2011, 18(6): 994-997.
- [8] 吕素玲, 韦程媛, 姚雪婷, 等. 2010年广西食品中沙门菌污染状况和血清型分布及耐药谱的研究[J]. 应用预防医学, 2012, 18(3): 137-140.
- [9] 陈玲, 张菊梅, 杨小鹏, 等. 南方食品中沙门菌污染调查及分型[J]. 微生物学报, 2013, 53(12): 1326-1332.
- [10] 席昭雁, 张阿峰, 吴荣, 等. 陕西省食品中沙门菌监测研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2011, 15(8): 671-673.
- [11] 陈玉贞, 邵坤, 关冰, 等. 2003—2010年山东省食源性沙门菌血清分型及药敏分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(1): 9-12.
- [12] 马妮, 孙葳, 郑洪, 等. 辽宁省食源性沙门菌血清分布及耐药分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 15(23): 3144-3146.
- [13] Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2008 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2011, 60(35): 1197-1202.
- [14] Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: *Salmonella* prevalence estimates [J]. European Food Safety Authority Journal, 2009, 7(12): 1377-1457.
- [15] Boxrud D, Monson T, Stiles T, et al. The role, challenges, and support of PulseNet laboratories in detecting foodborne disease outbreaks [J]. Public Health Reports, 2010, 125(Suppl 2): 57-62.
- [16] 梅玲玲, 罗芸, 叶菊莲, 等. 浙江省209株沙门菌PFGE指纹图谱研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 11(19): 2478-2482.
- [17] 王岚, 贾华云, 张红, 等. 湖南省食源性德乐卑沙门菌耐药谱及PFGE分型研究[J]. 实用预防医学, 2013, 8(20): 915-918.

论著

采用高级微生物基因分型系统对食品中单核细胞增生李斯特菌进行同源性分析

曾静¹, 周雪婷^{1,2}, 张锡全¹, 张琳³, 张西萌¹, 魏海燕¹, 周熙城¹, 马丹¹, 倪元颖²
 (1. 北京出入境检验检疫局, 北京 100026; 2. 中国农业大学, 北京 100193;
 3. 河北出入境检验检疫局, 河北 石家庄 050051)

摘要:目的 采用高级微生物基因分型系统(DiversiLab系统)对食品中单核细胞增生李斯特菌进行基因型分析, 将分型结果与血清型和菌株的耐药性进行比对研究。方法 DiversiLab系统是基于rep-PCR原理对微生物进行分型, 将分型结果与菌株的血清型进行比较研究, 同时对菌株的耐药性与rep-PCR型别进行研究。结果 采用DiversiLab系统将46株单核细胞增生李斯特菌分为9个型别A~I。血清型为1/2a的分离株以A型为主, 所测试的6株血清型为4b的分离株均为H型; 14株喹诺酮耐药菌株9株为A型、1株为B型、3株为C型、1株为F型, 除2株血清型为3a外, 其余均为1/2a。结论 DiversiLab系统分析结果, 揭示了46株从食品中分离的单增细胞增生李斯特菌间的亲缘关系, rep-PCR分型结果与H抗原结合位点存在一定联系, 喹诺酮耐药菌株的DNA指纹图谱相似度高, 与耐药基因有关。

关键词:单核细胞增生李斯特菌; DiversiLab系统; 同源性分析; 食源性致病菌

中图分类号: R155; R378 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)06-0532-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.06.004

Typing *Listeria monocytogenes* isolated from food by DiversiLab system

ZENG Jing, ZHOU Xue-ting, ZHANG Xi-quan, ZHANG Lin, ZHANG Xi-meng,
 WEI Hai-yan, ZHOU Xi-cheng, MA Dan, NI Yuan-ying

(Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

Abstract: Objective *L. monocytogenes* isolates were typed by DiversiLab system. The result was compared with the results of serotype and the antibiotic resistance. **Methods** The DiversiLab system was based on the principle of rep-PCR. **Results** The 46 isolates were classified as nine types, type A to I. The 1/2a serotype isolates mainly belonged to A type. Six 4b serotype isolates belonged to H type. Among 14 nitrofurantoin resistance isolates, nine of them were A type, one isolate was B type, three isolates were C type, and one isolate was F type. Most of the nitrofurantoin resistance isolates

were 1/2a serotype, except two of them were 3a serotype. **Conclusion** DiversiLab system typing results revealed the genetic characters and relationship of 46 foodborne *L. monocytogenes*. The typing results related to the H sites of serotype. The similarity of 14 nitrofurantoin resistance isolates was high, and related to anti-nitrofurantoin resistance genes.

Key words: *Listeria monocytogenes*; DiversiLab system; homologous analysis; foodborne pathogen

单核细胞增生李斯特菌(*L. monocytogenes*)属于李斯特菌属,为革兰氏阳性短杆菌。其在自然界中分布广泛,可以在低温、酸性、高盐的环境中生长^[1-2],抗逆性强,主要引起人类败血症、脑膜炎、肺炎、流产等多种疾病。其易感人群多为60岁以上老人、孕妇、新生儿及患有免疫缺陷症的人群。该菌的致病性强,致死率高达20%~30%^[3]。

细菌基因组重复序列PCR技术(rep-PCR)是一种细菌基因组指纹分析方法,通过扩增细菌基因组中广泛分布的短重复序列,对电泳条带进行比较分析,揭示基因组间的差异^[4-6]。本研究采用基于rep-PCR原理的高级微生物基因分型系统(DiversiLab)对从食品中分离的46株单核细胞增生李斯特菌进行基因分型,并将分型结果与分离株的血清型和耐药性进行比较研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

46株单增细胞增生李斯特菌均分离自食品,是北京出入境检验检疫法国生物梅里埃有限公司的VITEK鉴定卡进行鉴定,菌株详细信息见表1。

表1 46株单增细胞增生李斯特菌菌株来源

Table 1 Origins of 46 *L. monocytogenes* strains

菌株来源	菌株编号	菌株数/株
三文鱼	BJ-LMO-3,6,7,17,19,20,21,24,25,26,30,32,34,36,38,39,40,41,42,43,44,45,50,51,55,56,58,59,60,61,64,65,66	33
蚌	BJ-LMO-5	1
冻牛筋串	BJ-LMO-8	1
鸡肉	BJ-LMO-11,37,46	3
猪肉	BJ-LMO-18	1
冻肋排	BJ-LMO-31	1
金枪鱼头	BJ-LMO-35	1
鳌龙虾	BJ-LMO-47	1
冻牛肉	BJ-LMO-48,54	2
多宝鱼	BJ-LMO-49	1
海鲈鱼	BJ-LMO-62	1

1.1.2 主要仪器与试剂

Agilent Bioanalyzer 2100型DiversiLab分型系统(美国Agilent),PE 9700型PCR仪(美国life)。

VITEK生化鉴定卡、Ultra Clean Microbial DNA提取试剂盒、rep-PCR指纹图谱试剂盒、DNA Chip Reagents and Supplies试剂盒、微流体芯片均购自法

国梅里埃。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

挑选单个菌落于羊血琼脂培养基上37℃过夜培养。用MO BIO Ultra Clean Microbial DNA提取试剂盒提取细菌DNA。按照说明书推荐步骤提取DNA,DNA浓度控制在25~50 ng/μl。

1.2.2 rep-PCR分型

以提取的单增细胞增生李斯特氏菌DNA为模版,使用DiversiLab配套的rep-PCR试剂盒,按照说明书进行PCR扩增,PCR循环参数为:94℃ 2 min;94℃ 30 s,50℃ 30 s,70℃ 90 s,35个循环;72℃ 3 min,反应体积为25 μl。PCR扩增产物注入微流体芯片,放入DiversiLab分型系统进行电泳,其自动生成分析报告。DiversiLab根据Pearson相关系数确定菌株间的距离矩阵,用非加权配对算术平均法(UPGMA)建立树状图。

2 结果

2.1 单核细胞增生李斯特氏菌 rep-PCR 分型结果

利用DiversiLab系统,相似度系数为94%时,46株单核细胞增生李斯特菌被分为4个群;相似度系数为97%时,进一步分为9个型别即A~I型。其中,1群包括A型(21株)、B型(3株)和C型(5株),共29株;2群包括D型(1株)、E型(1株)和F型(2株),共4株;3群仅G型,1株;4群包括H型(10株)和I型(2株),共12株,见图1。

2.2 单核细胞增生李斯特菌 rep-PCR 分型结果与血清型

根据鞭毛(H)抗原和菌体(O)抗原,单核细胞增生李斯特菌分为13个血清型,分别是1/2a、1/2b、1/2c、3a、3b、3c、4a、4b、4ab、4c、4d、4e和“7”^[7]。根据我们实验室以前的研究结果,本研究采用的46株单核细胞增生李斯特菌分离株的血清型包括1/2a、4b、1/2b、1/2c、3a和4d^[8]。对比血清分型和分子分型结果显示,血清分型将46株单核细胞增生李斯特菌划分为6个血清型,rep-PCR分子分型以相似度系数97%将其划分为9个基因型,相同血清型可被分为不同的基因型。值得注意的是,主要的血清型中,1/2a以A型为主;4b以H型为主;其他血清型中,不同基因型分布不一,见表2。

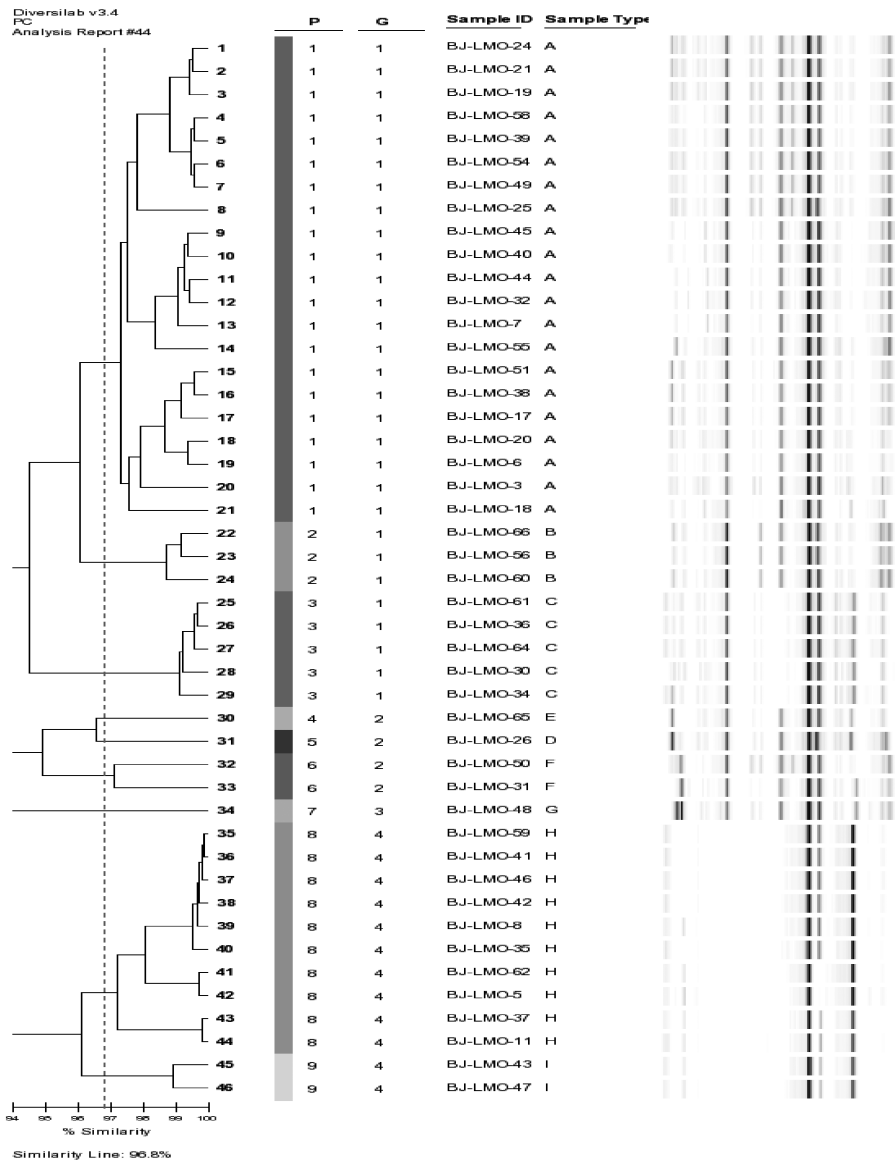


图1 46株单核细胞增生李斯特菌 rep-PCR 分子分型树状图及虚拟凝胶图

Figure 1 Rep-PCR dendrogram and gel images for 46 *L. monocytogenes* strains

2.3 单核细胞增生李斯特菌耐药性和 rep-PCR 分子分型

根据本实验室以前的研究结果,本研究采用的菌株中有 14 株对呋喃妥因存在耐药性^[9]。rep-PCR 分子分型结果显示,其相似度在 91.0% ~ 99.6% 之间。以相似度 94% 为分割线,13 株(92.9%)呋喃妥因耐受菌株属于 1 群;以相似度 97% 为分割线,9 株(64.3%)呋喃妥因耐受菌株属于 A 型,1 株 B 型,3 株(21.4%) C 型,另有 1 株为 F 型,见图 2。

通过对比 14 株呋喃妥因耐受菌株 DNA 指纹图谱发现,rep-PCR DNA 扩增片段间只有少数(1 ~ 2 条)条带存在细微差异,见图 3、4。

3 讨论

DiversiLab 系统基因组重复序列 PCR(repetitive

sequence-based PCR, rep-PCR),是在随机引物 PCR 基础上发展的 DNA 指纹图谱分析的一种新方法。利用细菌基因组中广泛分布的、小的、高度保守的特点且重复的寡核苷酸序列为引物扩增 DNA,并通过电泳条带比较分析,揭示基因组间的差异和判定细菌间的亲缘关系^[10]。DiversiLab 系统是基于 rep-PCR 技术发展出的一种新的分子分型方法。通过 rep-PCR 扩增细菌基因组的非编码重复序列后根据扩增片段长度差异,形成由多条带组成的、强弱不一的 rep-PCR DNA 指纹图谱,从而比较菌株间的相似性。该系统已被逐渐应用于分子流行病学研究,目前国内的相关报道尚不多见。可重复性强,数据标准化是 DiversiLab 系统最大的优势。由于采用了标准化的操作、高分辨率的微流体芯片和荧光检测系统及统一的数据处理软件,克服了重复性

表2 46株单核细胞增生李斯特氏菌血清分型和分子分型结果

Table 2 Serotype and genotyping results of 46 *L. monocytogenes* strains

菌株编号	菌株来源	血清型	基因型	菌株编号	菌株来源	血清型	基因型
BJ-LMO-3	三文鱼	1/2a	A	BJ-LMO-40	三文鱼	1/2a	A
BJ-LMO-5	蚌	4b	H	BJ-LMO-41	三文鱼	4b	H
BJ-LMO-6	三文鱼	1/2a	A	BJ-LMO-42	三文鱼	4b	H
BJ-LMO-7	三文鱼	1/2a	A	BJ-LMO-43	三文鱼	1/2b	I
BJ-LMO-8	冻牛筋串	4b	H	BJ-LMO-44	三文鱼	1/2b	A
BJ-LMO-11	鸡肉	1/2a	H	BJ-LMO-45	三文鱼	1/2a	A
BJ-LMO-17	三文鱼	1/2a	A	BJ-LMO-46	鸡肉	4b	H
BJ-LMO-18	猪肉	1/2a	A	BJ-LMO-47	螯龙虾	1/2c	I
BJ-LMO-19	三文鱼	1/2a	A	BJ-LMO-48	冻牛肉	1/2b	G
BJ-LMO-20	三文鱼	1/2a	A	BJ-LMO-49	多宝鱼	1/2a	A
BJ-LMO-21	三文鱼	1/2a	A	BJ-LMO-50	三文鱼	1/2a	F
BJ-LMO-24	三文鱼	1/2a	A	BJ-LMO-51	三文鱼	3a	A
BJ-LMO-25	三文鱼	1/2a	A	BJ-LMO-54	冻牛肉	3a	A
BJ-LMO-26	三文鱼	1/2a	D	BJ-LMO-55	三文鱼	1/2a	A
BJ-LMO-30	三文鱼	1/2a	C	BJ-LMO-56	三文鱼	1/2a	B
BJ-LMO-31	冻肋排	1/2a	F	BJ-LMO-58	三文鱼	1/2a	A
BJ-LMO-32	三文鱼	1/2a	A	BJ-LMO-59	三文鱼	4d	H
BJ-LMO-34	三文鱼	1/2a	C	BJ-LMO-60	三文鱼	3a	B
BJ-LMO-35	金枪鱼块	4b	H	BJ-LMO-61	三文鱼	3a	C
BJ-LMO-36	三文鱼	1/2a	C	BJ-LMO-62	海鲈鱼	1/2a	H
BJ-LMO-37	鸡肉	1/2b	H	BJ-LMO-64	三文鱼	3a	C
BJ-LMO-38	三文鱼	1/2a	A	BJ-LMO-65	三文鱼	1/2b	E
BJ-LMO-39	三文鱼	1/2a	A	BJ-LMO-66	三文鱼	1/2a	B

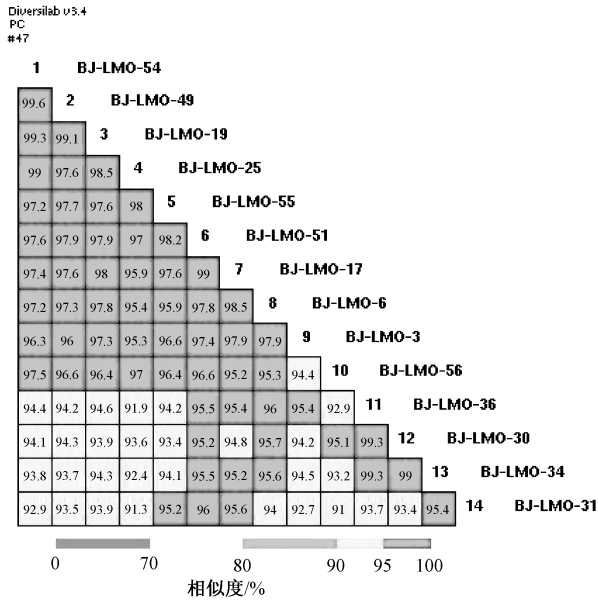


图2 14株吡喃妥因耐受菌株 rep-PCR 相似度矩阵图

Figure 2 Rep-PCR similarity analysis ziggurat of 14

L. monocytogenes resistant strains

差的缺点,且不同操作者对结果分析的差异性小^[11],而且不同地区的数据上传到中心数据库,便于不同实验室间的结果比较。

本实验室采用 Diversilab 系统,对 46 株从不同食品中分离的单核细胞增生李斯特氏菌进行了基因分型。相似度系数为 94% 时,46 株单核细胞增生李斯特菌被分为 4 个群;相似度系数为 97% 时,分为 9 个型别。1 群包括 A、B 和 C 型,包含 29 株分离

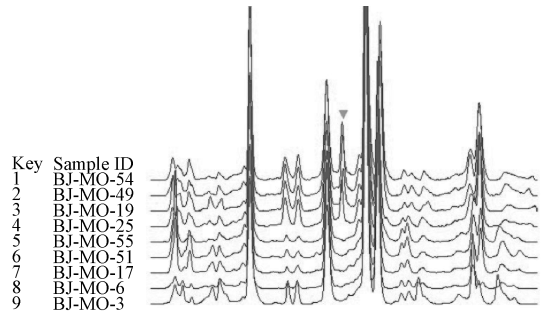


图3 9株A型吡喃妥因耐受菌株 DNA 指纹图谱对比图
Figure 3 Overlay of rep-PCR fingerprints of genomic DNA for 9 out of 9 F300-resistant *L. monocytogenes* strains belonging A type

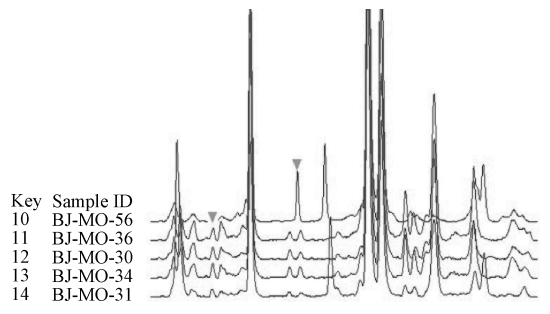


图4 5株B、C和F型吡喃妥因耐受菌株 DNA 指纹图谱对比图
Figure 4 Overlay of rep-PCR fingerprints of genomic DNA for 5 of 14 F300 resistant *L. monocytogenes* strains belonging B, C and F type

株,其中26株从进口三文鱼中分离;2群包括D型(1株)、E型(1株)和F型(2株),共4株;3群仅G型,1株;4群包括H型(10株)和I型(2株),共12株。

本文对 rep-PCR 分型结果与血清型之间的关系进行了分析。对 46 株单核细胞增生李斯特菌进行血清分型,通过比较研究发现 21 株 A 型分离株有 18 株的血清型是 1/2a,另外 3 株分离株的血清型为 3a 和 1/2b,有 16 株分离株为 A 型,且血清型为 1/2a 的菌株来自进口三文鱼。1/2a、1/2b 和 3a 血清型 O 抗原结合位点不尽相同,但它们有相同的 H 抗原结合位点(A 和 B);6 株血清型为 4b 的分离株,rep-PCR 型别为 H 型,其他 4 株分离株的血清型为 1/2a、1/2b 和 4d,血清型 1/2b、4b 和 4d 的 H 抗原的结合位点完全相同。因此,推论 rep-PCR 分型方法和 H 抗原结合位点存在一定联系。Brosch 等^[12]对 176 株单核细胞增生李斯特菌株进行 PFGE 分型和血清型结果之间的分析结果表明,PFGE 分型结果与 H 抗原密切相关。比较分析了 14 株单核细胞增生李斯特氏菌吡喃妥因耐受菌株的 rep-PCR 图谱。9 株 A 型 DNA 指纹图谱及其相似(图 3),5 株其他基因型的 DNA 指纹图谱的相似度也很高(图 4),可能与这些菌株具有相同的耐药基因有关。

综上所述,采用 DiversiLab 分型系统对从食品中分离的 46 株单核细胞增生李斯特菌进行基因分型。共分为 4 个群,9 个基因型;将分型结果与血清型鉴定结果进行了比较,rep-PCR 分型结果与 H 抗原结合位点存在一定联系;吡喃妥因耐受菌株的 DNA 指纹图谱相似度极高,与耐药基因有关。

参考文献

- [1] Duche O, Trempelet F, Glaser P, et al. Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(4): 1491-1498.
- [2] Sergelidis D, Abraham A. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety [J]. Food Control, 2009, 20(1): 1-10.
- [3] Mead P S, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States [J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5(5): 607-625.
- [4] 许龙岩,袁慕云,林文丽,等. DiversiLab 系统沙门氏菌分子分型评价[J]. 食品科学, 2012, 33(3): 203-206.
- [5] 劳华均,李如松,孙萍,等. DiversiLab 系统用于食品中单增李斯特菌同源性分析[J]. 食品工业, 2013, 33(8): 154-156.
- [6] 刘静宇,凌莉,陈思强,等. 用 DiversiLab 系统对食品中分离的金黄色葡萄球菌进行分型溯源研究[J]. 食品科技, 2012, 37(12): 310-316.
- [7] Doumith M, Cazalet C, Simoes N, et al. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays [J]. Infect Immun, 2004, 72(2): 1072-1083.
- [8] 周雪婷,张西荫,曾静. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌血清型分析[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(12 增刊 1): 95-97.
- [9] 周雪婷,张西荫,曾静. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌耐药性分析[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(12 增刊 1): 1-3.
- [10] 金莉莉,王秋雨,侯潇. ERIC-PCR 技术在李斯特氏菌种、菌株鉴定中的应用[J]. 遗传, 2003, 25(2): 195-197.
- [11] Wise M G, Siragusa G R, Plumblee J, et al. Predicting *Salmonella enterica* serotypes by repetitive sequence-based PCR [J]. Microbiol Methods, 2009, 76(1): 18-24.
- [12] Brosch R, Brett M, Catimel B, et al. Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 32(3): 343-355.

欢迎订阅 2015 年《肉类研究》杂志

《肉类研究》杂志创刊于 1987 年,主办单位为中国肉类食品综合研究中心。《肉类研究》是经国家新闻出版总署正式批准,面向国内外公开发行的中文科技期刊,国际标准刊号:ISSN1001-8123,国内统一刊号:CN11-2682/TS。月刊。本刊自 2011 年开始由《食品科学》杂志的编辑团队全新打造,2011~2013 年连续入选《中国科技核心期刊》,影响因子持续上升。本刊还被《中国核心期刊(遴选)数据库》《中国期刊全文数据库》《中文科技期刊数据库》《中国期刊网》等数据库全文收录。《肉类研究》融学术研究、产品开发和科技创新为一体,致力于肉类科研和技术推广,构筑学者交流平台,培养科技研发人才,记录行业发展历程,展示国际前沿成果,对推动中国肉类行业健康、快速发展具有重要作用。

本刊主要面向全国各大高等院校、科研院所、各级党政机关、企事业单位的广大专家学者、工程技术人员、硕士博士研究生、管理人员等。

2015 年《肉类研究》杂志继续改版升级:政策法规、国际科技资讯、优质实业、名师论坛、肉类联盟专栏等新创栏目以服务企业、贴近读者为目标,内容更加精彩;基础研究、加工工艺、质量安全、包装贮运、分析检测、专题论述等科研论文将更具权威与实用性,引领肉类行业科技创新发展。

发行部常年办理邮购,月刊,定价:15 元/册,全年定价 180 元

现金订阅:直接通过邮局汇款至北京市西城区禄长街头条 4 号《肉类研究》编辑部收。

邮政编码:100050 手机:013621026321 联系电话:010-83155446/47/48/49/50 转 8010

传真:010-83155436 联系人:李向芳

网址:www.chnfood.cn 电子邮箱:chnfood@chnfood.cn

银行汇款:账户:中国食品杂志社 开户行:工行阜外大街支行 账号:0200049209024922112