

中国八省市食品来源单核细胞增生李斯特菌的脉冲场凝胶电泳分析

祝仁发 官照龙 叶长芸 崔志刚 金东 冉陆 许珂 王连秀 陈伟伟

【摘要】 目的 采用国际标准化的脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析方法对单核细胞增生李斯特菌(Lm)进行基因分型,初步建立中国 Lm 的基因分型数据库。方法 按照标准化的 Lm-PFGE 方法对来自国内 8 个省市、多种食品来源的 118 株 Lm 进行了 PFGE 分型。结果 118 株 Lm 分成了 39 种带型,其中 GX6A160004 型有 37 株菌,占分析菌株的 31.36%,是主要型别。结论 初步建立了中国单核细胞增生李斯特菌用于网络监测分析(PulseNet China)的基础数据库,发现同型菌株在全国多个地区广泛存在。

【关键词】 单核细胞增生李斯特菌;脉冲场凝胶电泳分型

Study on molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of food *Listeria monocytogenes* isolates from eight province(municipalities) of China ZHU Ren-fa*, GONG Zhao-long, YE Chang-yun, CUI Zhi-gang, JIN Dong, RAN Lu, XU Ke, WANG Lian-xiu, CHEN Wei-wei. *State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: YE Chang-yun, Email: yechangyun@icdc.cn

【Abstract】 Objective To analyse the molecular types of *Listeria (L.) monocytogenes*, and to construct the standard China *L. monocytogenes* pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) subtyping database, using the international standardized *L. monocytogenes*-PFGE protocol. **Methods** 118 *L. monocytogenes* strains isolated from 8 provinces or municipalities of China were subtyped according to *L. monocytogenes*-PFGE protocol. **Results** 118 strains of *L. monocytogenes* were divided into 39 subtypes. In the 39 subtypes, 37 strains(31.36%) were GX6A160004 pattern, showing it was the predominant Lm subtype in China. **Conclusion** Data from molecular typing suggested that the predominant Lm strains were distributed in different regions of China. PulseNet China-Lm database was constructed which was valuable for the molecular subtyping-based surveillance of *L. monocytogenes*.

【Key words】 *Listeria monocytogenes*; Pulsed-field gel electrophoresis

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)是一种重要的食源性致病菌,能引起人和动物的李斯特菌病,临床表现为人和动物脑膜炎、败血症及孕妇流产、热性胃肠炎等。Lm 广泛存在于土壤、动物、水产品等中,主要通过食物(如奶及奶制品、蔬菜、水产品、肉制品等)传播。20 世纪 80 年代以来,Lm

在美国、加拿大、德国、瑞士、意大利等国曾多次发生流行或暴发流行,其食源性患者日渐增多^[1]。我国各地均有食品污染 Lm 的报道,云南和福建等省还曾报道 Lm 在畜禽和人间引起暴发^[2,3]。对 Lm 的基因分型方法主要包括脉冲场凝胶电泳(PFGE)、核糖体分型(ribotyping)、随机 DNA 片段多态性分析(RAPD)、扩增片段长度多态性(AFLP)、多位点序列分型(MLST)等。不同基因分型方法各有优缺点,其中 PFGE 方法因其实验结果稳定、可重复性好、易于标准化、不同实验室的数据结果可以比较等方面的突出优点,而被认为是基因分型的“金标准”^[4]。本研究采用 PFGE 对来自于国内 8 个省市、多种食品来源的 118 株 Lm 进行分析,了解我国 Lm 基因型分布情况,为病原学监测和预防提供基础资料。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470095)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室(祝仁发、官照龙、叶长芸、崔志刚、金东);中国疾病预防控制中心营养与食品安全所(冉陆);杭州市疾病预防控制中心(许珂);北京市昌平区疾病预防控制中心(王连秀);福建省疾病预防控制中心(陈伟伟)

第一作者现工作单位:518000 深圳市计量质量检测研究院

官照龙、叶长芸同为第一作者

通讯作者:叶长芸,Email:yechangyun@icdc.cn

材料与方 法

1. 菌株:菌株 001、103 购自中国药品生物制品 检定所,其余 116 株来自国内 8 个省市(北京、浙江、 河南、福建、重庆、吉林、江苏、山西),除山西省 1 株 菌为患者来源外,其余菌株分离自生肉、肉制品、蔬 菜、冷饮、水产品等,分离年份从 2000 年到 2005 年 (表 1)。全部经生化鉴定证实为 Lm。Marker 菌株 H9812 为本室保存。

表 1 实验 Lm 菌株的分离年份及地区

分离年份	北京	福建	河南	吉林	江苏	浙江	重庆	山西	合计
2000	-	-	5	-	-	-	4	-	9
2001	3	15	23	2	4	4	6	-	57
2002	20	-	-	-	-	4	-	-	24
2003	-	-	-	-	-	-	-	1	1
2004	5	-	-	-	-	-	-	-	5
2005	-	-	-	-	-	20	-	-	20
合计	28	15	28	2	4	28	10	1	116

2. 仪器及试剂:脉冲场凝胶电泳仪为 CHEF MAPPER System(Bio-Rad USA),凝胶成 像系统为 GEL Doc 2000(Bio-Rad USA)。 核酸内切酶 Asc I 购自 NEB 公司,蛋白酶 K 购自 Merck 公司,SeaKem Gold 琼脂糖 购自 Cambraex Bio Science Rockland 公司。

3. 方法:

(1)按国际标准 Lm-PFGE 操作方 法进行^[5],略有改动。核酸内切酶:Asc I ;电 压梯度:6 V/cm;电场夹角:120°;电泳缓冲 液 0.5×TBE;温度 14℃;缓冲液的流速约 1 L/min;片段大小:30~700 kb;电泳时 间:19 h;脉冲时间:4-40 s。

(2)将不同菌株的 PFGE 图像用 BioNumerics(Version 4.0)数据库软件处 理,读取数据后应用统一的 Marker(国际 标准菌株 H9812)校准后进行聚类分析,选 用 UPGMA 方法进行分析,不同菌株的 PFGE 带型的相似性系数在 52.4%~ 100.0%之间。100%相同的为同一带型, 有任何差异的均分为不同带型。

(3)参照 PulseNet 的标准 PFGE 条带 命名原则进行带型命名。

照 PulseNet 的标准 PFGE 条带命名原则,将 Lm 的 PFGE 带型依次命名为 GX6A160001~0039。其中 GX6A160004 型有 37 株,占总数的 31.36%,提示该 型为我国主要基因型。

与 GX6A160004 型条带差异较小的基因型有 GX6A160003、GX6A160005、GX6A160006、 GX6A160007、GX6A160008、GX6A160009,提示它 们之间亲缘关系非常相近,可能由同一克隆株变异 而来。从模式图可看到基因变异痕迹(图 2)。

北京来源的 28 株 Lm 中,8 株(28.57%)为 GX6A160004 型,包括 2000 年、2004 年的菌株,提 示北京地区 Lm 的流行主型为 GX6A160004 型,与 全国的主型一致。6 株(21.43%)为 GX6A160001 型,为北京地区的次要型别,仅出现于 2001、2002 年,2004 年未出现(图 3)。

河南省来源的 28 株 Lm 中,19 株菌(67.86%) 为 GX6A160004 型,处于绝对优势。分离于 2000 年 的 5 株菌均为 GX6A160004 型,分离于 2001 年的

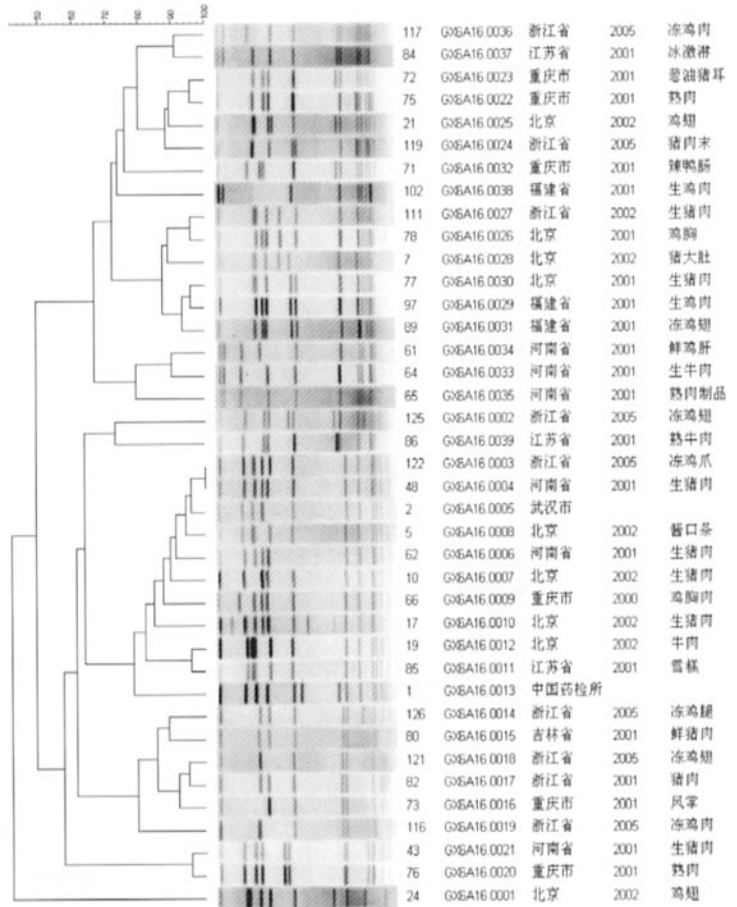


图 1 118 株 Lm 的 39 个带型模式图

结 果

118 株 Lm 分成 39 个带型(图 1)。参

GX6A160003 型包括 3 株菌,均来自浙江省,在其他地区尚未发现。

从地域看,北京地区 Lm 的流行主型为 GX6A160004 型,与全国的主型一致,次要型别为 GX6A160001 型。河南省 Lm 的优势型别也为 GX6A160004 型。浙江省 Lm 分成了 14 个基因型,无明显的优势带型,但相似度较高的 GX6A160003、GX6A160004 和 GX6A160009 三个型别所占比例较大。福建省 Lm 菌株分成了 9 个型,无明显的优势带型,但相似度较高的 GX6A160004、GX6A160011、GX6A160020 三个基因型占有相对优势。

近年来,食源性疾病的暴发增多,食品卫生安全日益受到重视,相关国际组织和许多国家卫生当局加强了对食源性疾病的主动监测。目前这种主动监测手段归纳为致病微生物的“危险性分析”(risk analysis),通过对食品中微生物的检测和食源性疾病流行病学的调查分析,对某种疾病可能暴发的风险进行评估。美国疾病预防控制中心所实施的食源性疾病监测网络 PulseNet 被认为是目前食源性疾病监测的最先进体系。该体系利用标准化的 PFGE 技术对监测菌进行分子分型,对图像数据处理后,建立资料数据库。当该种疾病暴发时,把新得到的数据在数据库中对对比即可得到一些具有流行病学意义的提示。

目前我国已开始建立细菌性传染病的实验室监测网络 PulseNet China,通过这项工作的开展,为重要的细菌性传染病的监测提供病原监测的数据交流网络,调查分析传染病的扩散,建立不同地区之间的暴发流行关系,追溯传染源,从而提高监测的目标性和预防控制措施的针对性。本研究对 118 株 Lm 进行 PFGE 分型,了解我国部分 Lm 基因型的分布情况和分子流行特点,建立 PulseNet China 中关于 Lm 的基础数据库,为今后的分子流行病学监测提供参考依据。

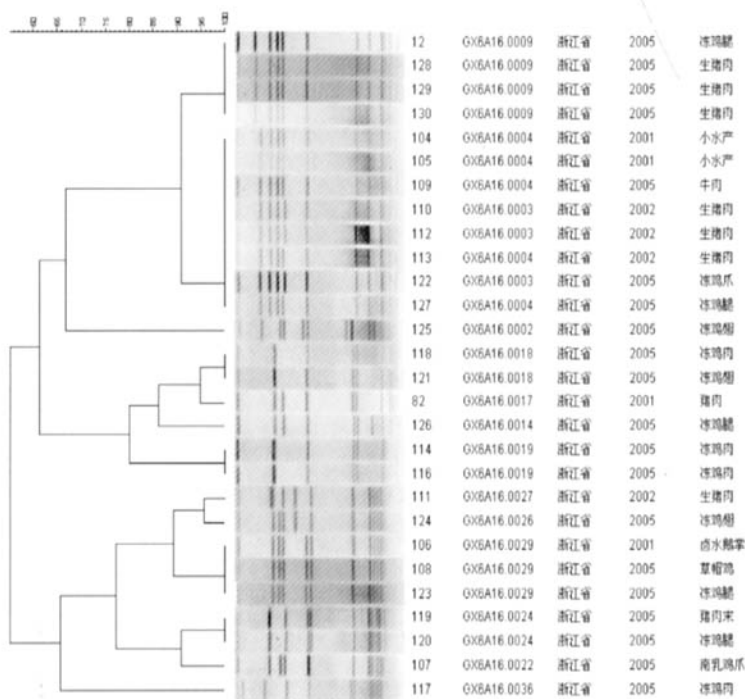


图5 分离自浙江省部分 Lm 菌株的 PFGE 带型模式图

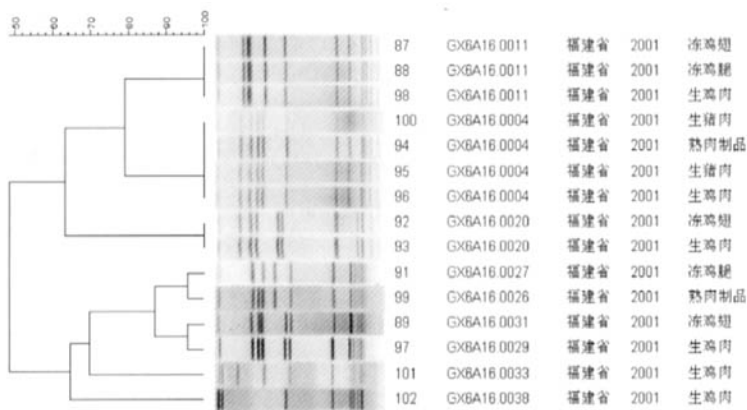


图6 分离自福建省部分 Lm 菌株的 PFGE 带型模式图

参 考 文 献

- [1] Siegman-Igra Y, Levin R, Weinberger M, et al. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of case worldwide. Emer Infect Dis, 2002, 3:305-311.
- [2] 肖义泽,任丽娟,王金玉,等. 云南省首次动物源性李斯特菌暴发的流行病学调查. 中华流行病学杂志, 2000, 21(3):236.
- [3] 郭仰霖,曾凡伟,王培玉,等. 上杭县人畜李斯特菌发病与带菌调查研究. 海峡预防医学杂志, 1999, 5(3):9-10.
- [4] Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol, 1999, 37:1661-1669.
- [5] Lewis MG, Bala S. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. Food Microbiol, 2001, 65:55-62.

(收稿日期:2007-01-10)

(本文编辑:张林东)