

广东省食品中单核细胞增多性李斯特菌脉冲场凝胶电泳技术分子分型的研究

何冬梅 邓峰 王洪敏 柯昌文 严纪文 朱海明 赖蔚琴 宋曼丹 杨冰
王海燕 王建 马聪 柯碧霞 邓小玲 倪汉忠

【摘要】 目的 应用脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)对广东省食品中分离的单核细胞增多性李斯特菌(Lm)进行分子分型,并建立 PFGE 数据库。方法 参照美国 PulseNet 的 Lm PFGE 分子分型标准方法进行检测。应用 BioNumerics 软件对不同食物种类、时间和地点的分离株进行比对,分析菌株之间的相关性。结果 107 株 Lm 分成 41 个 PFGE 型,型别较为分散;从鸡肉中分离的菌株数最多(37 株),PFGE 分型也最多(19 个);冷藏和冷冻食品的分离率较高,其中有 26 株菌株仅存在 1~2 个电泳条带的差异,相似度极高;韶关和惠州地区分离的 Lm 存在着地区特异性;随时间变迁,部分菌株仍存在不同程度的相关性。结论 广东省食品中分离的 Lm 在整体上表现出较大的遗传多样性,但部分菌株有不同程度的相关性。

【关键词】 单核细胞增多性李斯特菌;脉冲场凝胶电泳技术;食品;分子分型

Molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolated from foodstuff in Guangdong province by pulsed-field gel electrophoresis HE Dong-mei, DENG Feng, WANG Hong-min, KE Chang-wen, YAN Ji-wen, ZHU Hai-ming, LAI Wei-dong, SONG Man-dan, YANG Bing, WANG Hai-yan, WANG Jian, MA Cong, KE Bi-xia, DENG Xiao-ling, NI Han-zhong. Institute of Microbiology, Guangdong Province Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510300, China

【Abstract】 Objective To establish molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolates by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for studying the epidemiologic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from foodstuff in Guangdong province and to build up PFGE typing database of *Listeria monocytogenes* isolates for identifying the infectious resource of the outbreaks and other epidemiologic investigation. **Methods** "Standardized Protocol for Molecular Subtyping of *Listeria monocytogenes* by PFGE" was followed. BioNumerics software was applied on image analysis, database establishment, comparative and corresponding analysis. **Results** 107 *Listeria monocytogenes* isolates were typed by PFGE, 41 PFGE types were observed among the isolates. The PFGE types were dispersive among these isolates. *Listeria monocytogenes* isolates were most frequently isolated in raw chicken while the most PFGE types were found in this type of food. The positive rate was relatively high in cold and iced foods. Only 1-2 DNA fragment difference occurred in 26 *Listeria monocytogenes* isolates by PFGE, so high degree of relatedness remained among these isolates. There were unique PFGE patterns in the regions of Shaoguan and Huizhou. From time to time, a number of isolates remained close relationship. **Conclusion** PFGE typing of the 107 Guangdong *Listeria monocytogenes* isolates demonstrated relative genetic diversity but a number of the isolates showed close relatedness.

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

单核细胞增多性李斯特菌(Lm)是一种人畜共患病原菌^[1-3]。Lm 感染已成为全球性食源性疾病,在国际上受到高度重视^[4,5]。传统的实验室检测方法难以揭示菌株之间的相互关系,对食源性疾病的暴发难以溯源;而用脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)进行细菌分型鉴定,可通过限制性内切酶消化菌

株 DNA,经 PFGE 分离,比较染色体的限制性内切酶电泳图谱,可分析菌株间的相关性并可调查暴发的原因。本研究采用 PFGE 方法,对 2002-2005 年分离自广东省食品中的 107 株 Lm 进行分子分型,初步建立了广东省 Lm 的 PFGE 分型数据库,为 Lm 引发的食源性疾病溯源和分子流行病学研究提供基础数据。

基金项目:广东省医学科学技术研究基金资助项目(C2007003)
作者单位:510300 广州,广东省疾病预防控制中心微生物检验所

材料与方法

1. 菌株来源:菌株分离自 2002-2005 年广东省

韶关、湛江、深圳、广州、汕头、海丰、肇庆、惠州、珠海、佛山、中山和揭阳地区的食品。

2. 标准菌株: Lm 标准株 CMCC54004 和 CMCC54007 由中国药品生物制品检定所提供; 选用布伦登卢普 (*Braenderup*) 沙门菌 H9812 为 Marker, 由全国病原细菌实验室监测网络 PulseNet China 提供。

3. 培养基及试剂: 生化培养基(硝酸盐还原、尿素酶、甘露醇、鼠李糖、木糖和七叶苷)、LB1 和 LB2 肉汤、三糖铁(TSI)、SIM 动力培养基和 TSA-YE 斜面(北京陆桥技术有限责任公司); 福格斯-普里斯考尔试验培养基(VP)和甲基红(OXOID 公司); 科玛嘉李斯特显色培养基(郑州博赛生物工程有限责任公司); 血平板(广州市金城医学科技有限公司); API-Listeria 生化鉴定板(bioMerieux 公司); 蛋白酶 K(Merck 公司); 溶菌酶(Amresco 公司); *Xba* I 酶和 buffer H(Promega 公司); *Asc* I 酶和 buffer 4[纽英伦生物技术(北京)有限公司]; SeaKem Gold 琼脂糖(Cambrex 公司)。

4. 仪器设备: CHEF MAPPER 脉冲场电泳仪和 Gel Doc EQ 凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司); Dade Microscan 浊度仪(美国 DADE BEHRING 公司); Memmert 水浴摇床; Grant 水浴箱; MILLIPORE 纯水机; Barnstead Lad-Line 水平脱色摇床。

5. Lm 的鉴定: 食品经 LB1 和 LB2 增菌后, 接种科玛嘉李斯特显色培养基; 挑取可疑菌落接种 TSI、SIM 动力培养基和 TSA-YE 斜面, 将有动力形成伞状并在 TSI 斜面、上层和底层产酸而不产硫化氢的菌株接种国标生化反应培养基进行鉴定; 再用 API-Listeria 生化鉴定板进行鉴定。

6. 小鼠毒力试验: 将鉴定为 Lm 的纯培养物接种于 TSB-YE 肉汤中, 30℃ 培养 24 h, 离心, 取沉淀物用灭菌生理盐水制备成浓度为 10^{10} cfu/ml 的菌悬液; 取此菌悬液进行小鼠腹腔注射, 共 3 只, 每只注射 0.5 ml, 观察 7 d 内小鼠死亡的情况。用已知致病的 Lm 和非致病的英诺克李斯特菌按同法进行对照试验。

7. Lm 的分子分型方法: 参照美国 PulseNet 的 Lm PFGE 分子分型标准方法。

(1) 制备全基因组 DNA: 将 Lm 接种于脑心浸液琼脂平板, 37℃ 培养过夜; 挑取适量细菌放入含 3 ml TE 的 Falcon2057 管中, 调整浊度至 0.85~0.90; 取 240 μ l 菌悬液加入 60 μ l 溶菌酶 (10 mg/ml) 颠倒混匀, 37℃ 孵育 30 min; 然后加入 300 μ l SSP 溶

液 (1.2% SeaKem Gold — 1% SDS — 0.2 mg/ml 蛋白酶 K) 混匀后立即灌注模具, 待其凝固; 把凝固后的胶块转入 4 ml 蛋白酶 K/细胞裂解混合液中, 于 54℃ 水浴至少 3 h; 弃溶液, 用灭菌纯水浸洗胶块 2 次, 每次振荡洗涤 10 min; 最后用 TE 浸洗胶块 4 次, 每次振荡洗涤 15 min。上述振荡洗涤均在 54℃ 水浴摇床中进行。

(2) 胶块内 DNA 的酶切: 切取 2 mm 胶条加入 buffer 4 的稀释液中, 37℃ 水浴 15 min; 然后将胶条转入 *Asc* I 酶切反应体系中进行酶切 (Marker H9812 用 *Xba* I 进行酶切), 37℃ 水浴至少 4 h。

(3) 电泳: 将经过上述处理的胶条置于梳齿上, 其中标准菌株 H9812 加在 1、8、15 号梳齿上; 缓慢倒入 1% SeaKem Gold 琼脂糖, 待凝固后, 放入盛有 0.5 × TBE 缓冲液的电泳槽中, 在温度 14℃、脉冲时间 4~40 s 条件下, 电泳 20 h; 电泳完毕后, 用 EB 染色 30 min, 脱色 90 min, 最后用 Gel Doc EQ 拍摄图像。

(4) 图像处理 and 聚类分析: 实验获取的图像采用 BioNumerics (Version 4.0) 数据库软件进行处理, 识别图像条带; 聚类分析选择 UPGAM (unweighted pair-group method using an arithmetic average) 方法, 采用 Dice 系数来衡量 PFGE 带型之间的相似度。

结 果

1. Lm 的国标生化鉴定: 动力、触酶、溶血反应、甲基红、VP、鼠李糖和七叶苷阳性; 硝酸盐还原试验、尿素酶、甘露醇和木糖阴性 (表 1)。但个别菌株出现异常情况: 菌株 03LM087 溶血反应阴性; 04LM232 甘露醇阳性; 02LM088、02LM089、04LM122 VP 试验阴性; 标准菌株 CMCC54004 甲基红试验阴性, CMCC54007 甲基红和 VP 试验均阴性。

2. API-Listeria 生化鉴定: 手册编码为 6510 (98 株)、2510 (7 株) 和 6550 (2 株), 均被鉴定为 Lm (表 2)。

表 1 广东省食品中分离的 107 株 Lm 国标生化鉴定结果

菌株	动力	触酶	溶血反应	硝酸盐还原	尿素酶	甲基红	VP	甘露醇	鼠李糖	木糖	七叶苷
分离菌株											
102 株	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
1 株	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
1 株	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
3 株	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
标准菌株											
CMCC54004	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
CMCC54007	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+

注: + 代表阳性; - 代表阴性

表2 广东省食品中分离的 107 株 Lm 的 API-Listeria 生化鉴定结果

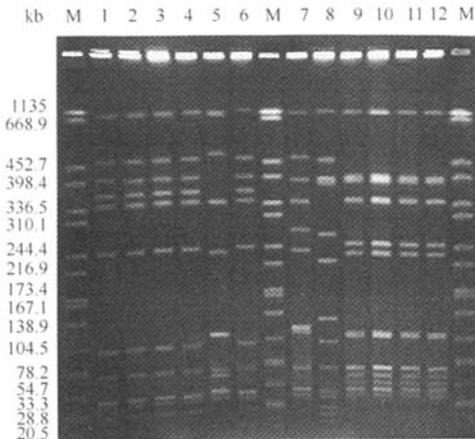
菌株	DIM	ESC	DARL	RHA	RIB	TAG	手册
		α MAN	XYL	MDG	GIP		编码
分离菌株							
98 株	-	+	+	-	+	-	6510
7 株	-	+	-	-	+	-	2510
2 株	-	+	+	-	+	-	6550
标准菌株	-	+	+	-	+	-	6510

3. 小鼠毒力试验: 阴性对照组小鼠活动自如, 健康存活; 阳性对照组与大部分实验组小鼠腹腔注射菌悬液 6 h 后开始发病, 先后出现精神萎靡、厌食、抽搐、瘫痪, 72 h 内死亡。只要有一只小鼠死亡, 小鼠毒力试验均判为阳性, 其中菌株 03LM087、04LM031 和 04LM032 出现异常情况, 3 只小鼠均无死亡, 小鼠毒力试验总阳性率为 97.2% (表 3)。

表3 广东省不同年份食品中分离 107 株 Lm 的小鼠毒力试验结果

小鼠死亡 只数	Lm 株数				合计
	2002 年	2003 年	2004 年	2005 年	
3	6	14	41	22	83
2	1	2	4	9	16
1	0	0	0	5	5
0	0	1	2	0	3
阳性率 (%)	100.0	94.1	95.7	100.0	97.2

4. PFGE 分析: 107 株 Lm, 制备染色体全基因组 DNA, 用限制性内切酶 *Asc* I 酶切, 经 PFGE 分离, 可产生 8~14 条 DNA 片段, 分子质量大小在 20~1100 kb 之间 (图 1)。

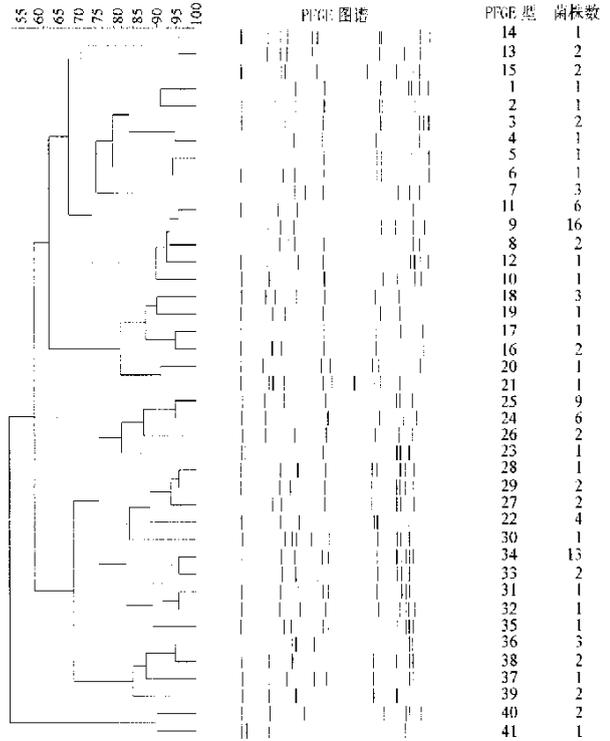


注: M: Marker 沙门菌 H9812; 1~12: 样品

图1 广东省部分地区食品中分离 Lm 的 PFGE 图谱

5. 聚类分析: 采用 UPGMA 方法对 107 株 Lm 进行聚类分析, 条带位置差异容许度选择 1.5%, 优化值选择 1.5%, PFGE 带型之间的相似度采用 Dice 系数来衡量。根据电泳产生条带的位置和数量的不

同, 共分为 41 个 PFGE 型, 相似度在 54.4%~100% (相似度为 100% 者视为同一 PFGE 型) (图 2)。这些实验菌株表现出较大的遗传多样性, 其中以 PFGE 9 型最多, 占 15.0% (16/107); 其次为 PFGE 34 型, 占 12.2% (13/107); 第三为 PFGE 25 型, 占 8.4% (9/107)。这三种 PFGE 型共有 38 株菌, 占 35.5% (38/107), 为广东省的优势型别。



注: 第 1 列为用 BioNumerics 分析获得 PFGE 分型的相关性; 第 2 列为用 *Asc* I 酶切的 PFGE 图谱; 第 3 列为 PFGE 型 (1~41 为自编号); 第 4 列为对应型别的菌株数

图2 广东省部分地区食品中分离 107 株 Lm 的 PFGE 分子分型结果

6. 各类食品中 Lm 的聚类分析: 对 8 类食品中分离的 Lm 进行聚类分析 (表 4), 发现从肉类食品中分离该菌的频率要比蔬菜类高; 从鸡肉中分离的菌株数最多, 占总数的 34.6% (37/107), 其中有 20 株菌分离自冷藏或冷冻鸡, 占 54.1% (20/37), PFGE 分型也最多, 占 46.3% (19/41), 可见同一类食物的分离株可出现多种不同的 PFGE 分型; 相同 PFGE 分型的菌株又可分布于不同的食物种类中: 其中 PFGE 9 型最常见, 有 16 株菌, 分别分离自羊肉、鸡肉、牛肉、猪肉和鲈鱼 (图 3); PFGE 11 型有 6 株菌, 分别分离自牛肉、熟肉制品、鸡肉、猪肉和水产品 (图 3); PFGE 25 型有 9 株菌, 分别分离自熟肉制品、鸡肉和青瓜色拉 (图 4); PFGE 34 型有 13 株菌, 分别

分离自水产品、鸡肉、猪肉和青瓜色拉(图 5)。值得注意的是,在所有分离株中,有 53 株来自于冷藏和冷冻食品,占 49.5% (53/107),其中有 26 株菌属于相似度极高的 PFGE 8~12 型,这些菌株分离自 2002-2005 年广州(番禺、增城)、深圳、汕头、湛江、中山市的超市或酒店里的冷藏或冷冻食品,它们的 PFGE 图谱非常相似,仅存在 1~2 个电泳条带的差异(图 3),相似度为 94.8%~100%,是紧密相关的。

表 4 广东省部分地区 8 类食品中 Lm 的聚类分析结果

食物种类	菌株数	PFGE 分型个数	DNA 片段条带数	相似度 (%)
生猪肉	9	7	10~14	60.2~100
生牛肉	10	6	9~12	67.1~100
生鸡肉	37	19	8~12	59.3~100
生羊肉	8	7	10~14	57.7~100
熟肉制品	17	10	8~12	54.7~100
水产品	18	12	9~11	55.6~100
蔬菜	2	2	9~10	84.2~100
青瓜色拉	6	3	11~12	81.0~100

7. 不同地区 Lm 的聚类分析:对不同地区分离的 Lm 进行聚类分析(表 5),发现韶关、仁化、始兴等粤北地区分离的 20 株菌分为 7 个 PFGE 型,PFGE 分型较为集中,其中 PFGE 24 型有 6 株菌,PFGE 25 型有 9 株菌,共 15 株菌,占 75.0% (15/20),是韶关地区的优势型别(图 4),并且是该地区特有的 PFGE 型;汕头、澄海等粤东地区分离的 27 株菌分为 11 个 PFGE 型,其中 PEGE 34 型中有 10 株菌分离自该地区(图 5),占 37.0% (10/27),是汕头、澄海地区的优势型别;惠州地区分离的 6 株 Lm 分为 3 个 PFGE 型,其中 PFGE 22 型有 4 株菌,占 66.7% (4/6),是惠州地区的优势型别(图 6),并且是该地区特有的 PFGE 型;其余地区 PFGE 分型较为分散。

表 5 广东省不同地区 Lm 的聚类分析

地区	菌株数	PFGE 分型个数	DNA 片段条带数	相似度 (%)
湛江	10	7	9~12	61.4~100
韶关、仁化、始兴	20	7	9~12	51.9~100
深圳	10	7	8~12	57.5~100
汕头、澄海	27	11	10~14	58.8~100
广州、番禺、增城	23	14	8~12	56.1~100
海丰	1	1	12	-
惠州	6	3	11~12	81.0~100
珠海	1	1	11	-
中山	5	3	9~12	56.0~100
佛山	1	1	11	-
肇庆	2	1	10	100
揭阳	1	1	10	-

8. 不同时间 Lm 的聚类分析:对来源于同一地区同一类食物但不同分离时间的 Lm 进行了聚类分析,发现 PFGE 34 型中的 04LM235 和 04LM236 分

离自 2004 年 7 月,04LM371、04LM372、04LM379、04LM380 和 04LM381 分离自 2004 年 11 月,均来自汕头某一超市中的冷藏或冷冻食品,时间间隔为 4 个月,它们为同一 PFGE 型(图 5);PFGE 9 型中的 04LM234 分离自 2004 年 7 月,ST035-05LM020 和 ST041-05LM025 分离自 2005 年 12 月,均来自汕头上述超市中的冷藏或冷冻食品,时间间隔为一年半,它们为同一 PFGE 型(图 3);提示这些带菌的冷藏和冷冻食品可能有相同的污染源,并且污染源持续存在,或者冷藏和冷冻食品在贮藏过程中可能存在交叉污染的情况。PFGE 25 型中 02LM088 和 04LM031 分别分离自 2002 年和 2004 年仁化地区某烧腊店的烧鸭;02LM089 和 04LM032 分别分离自 2002 年和 2004 年该地区另一家烧腊店的熟肉制品,时间横跨 2 年,它们的 PFGE 分型均没有发生变化(图 4)。但也发现在同一采样点存在微小差异的菌株,如 PFGE 25 型中的 02LM092 和 PFGE 24 型中的 03LM018 分别分离自 2002 年和 2003 年仁化地区一家烧腊店的熟肉制品,时隔一年,03LM018 比 02LM092 的图谱多了 1 个电泳条带(图 4)。

讨论

就细菌的分子分型而言,由于 PFGE 具有分型能力强、分辨力高、重复性好且结果易于解释等优点,是目前细菌分子分型方法的金标准。因此,本研究应用 PFGE 对 107 株分离自广东省食品中的 Lm 进行了分子分型,可产生 8~14 条 DNA 片段,分子质量大小在 20~1100 kb 之间。根据电泳产生的条带位置和数量的不同,共分为 41 个 PFGE 型,相似度在 54.4%~100%,其中以 PFGE 9、34 和 25 型为优势型别。Shen 等^[6]报道,用 PFGE 标准方法对分离自美国佛罗里达州的 91 株 Lm 进行分子分型,用 Asc I 酶切,可产生 8~13 条 DNA 片段,分为 31 个 PFGE 型;Leite 等^[3]报道,应用 PFGE 对分离自葡萄牙的 109 株 Lm 进行分子分型,用 Asc I 酶切,可产生 12~17 条 DNA 片段,分子质量大小在 13~700 kb 之间,分为 23 个 PFGE 型。上述结果都表明 Lm 的 PFGE 分型较为分散。本研究采用的分子质量标准 H9812 为国际标准参考菌株,可以进行不同实验室之间的比对,通过比较发现,广东省食品中 Lm 的 PFGE 图谱与美国佛罗里达州和葡萄牙的 PFGE 图谱没有相同的分型,提示广东省和这些地区的分离株相关性很弱。

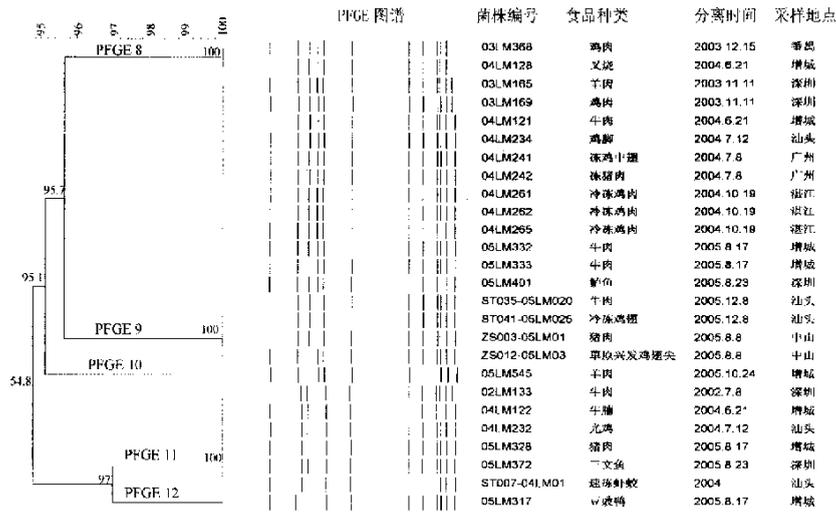


图3 广东省部分地区冷藏和冷冻食品中高度相似的 26 株 Lm PFGE 图谱

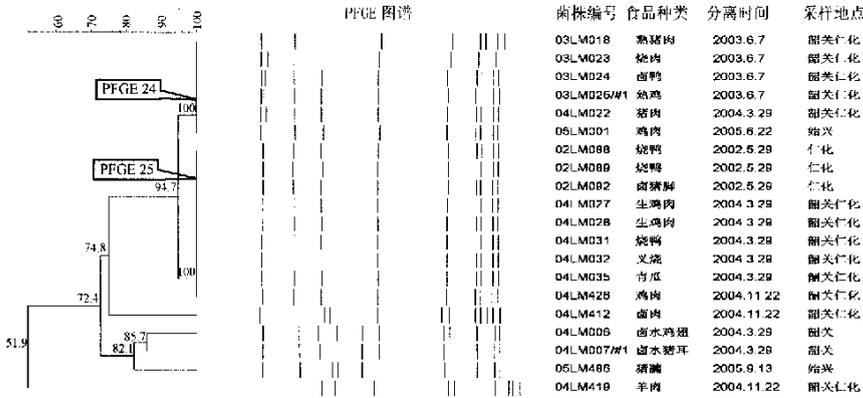


图4 广东省韶关、仁化和始兴地区 Lm 的 PFGE 图谱 (其中 PFGE 24、25 型为粤北地区特有菌型)

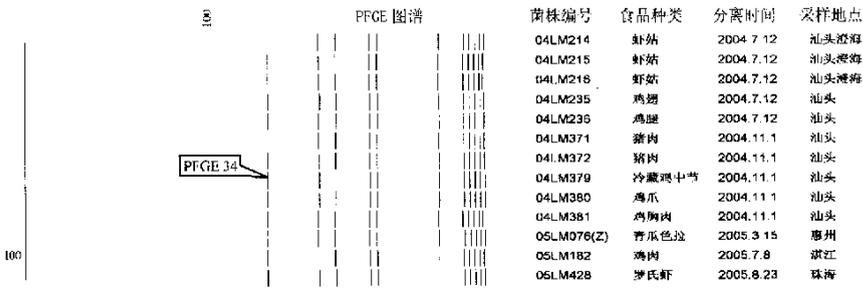


图5 13 株 PFGE 34 型 Lm (粤东地区的优势型别) 的 PFGE 图谱

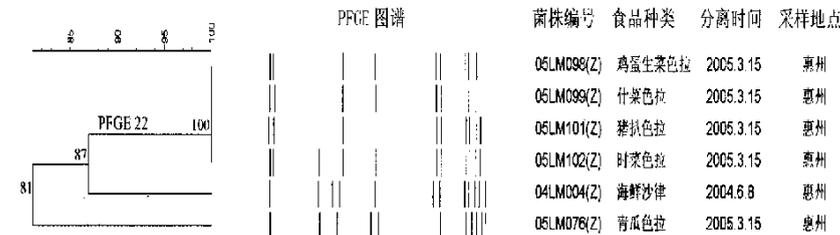


图6 广东省惠州地区 Lm 的 PFGE 图谱 (PFGE 22 型为该地区特有菌型)

在对来源于各类食品的 Lm 聚类分析中,发现从鸡肉中分离的菌株数最多,可能与抽检的多为冷藏或冷冻鸡肉有关,这些菌的 PFGE 分型也最多,提示同一类食物的污染情况比较复杂;相同 PFGE 分型的菌株又可分布于不同的食物种类中,提示广东省的食品之间可能有相同的污染源,或者食物之间交叉污染的情况比较严重,并且污染源持续存在。李斯特菌病是“冰箱病”,该菌可在 4℃ 生长繁殖,具有嗜冷性,能抵抗 -20℃ 的低温,因此在冷藏和冷冻食品中分离率较高。本次研究共从冷藏和冷冻食品中分离了 53 株 Lm,构成比为 49.5%,其中有 26 株菌分为 5 个 PFGE 型,相似度极高 (94.8%~100%),绝大多数菌株仅有 1~2 个电泳条带的差异。在解释 PFGE 结果时, Tenover 等^[7] 为标准 PFGE 结果的分析推荐了一个体系,用于确定菌株间的相关性。如各实验菌的 PFGE 产生相同的条带数且相应条带大小相同,在流行病学上则认为传染源为同一克隆;若分离株有 1~3 个电泳条带的差异,则说明其基因组上有一个遗传性状的改变,认为其紧密相关;若分离株有 4~6 个电泳条带的差异,则说明其基因组上有 2 个独立遗传性状的改变,认为其可能相关;若分离株有 6 个以上电泳条带的差异,则说明它们之间有 3 个或更多遗传性状的改变,可以认

为不具相关性。来源于冷藏或冷冻食品中的 Lm, 很可能因为在低温条件下, 其生长发育及其分化速度大大减慢, 传代次数减少, 因此, 与处于常温下生长的菌株相比, 基因突变事件较少, 突变频率相对较低, 反映在 PFGE 分析结果上, 表现为 PFGE 图谱 DNA 片段的差异很少, 因此这 26 株菌很可能是紧密相关的。

经过对 107 个菌株的分析, 发现 PFGE 24 和 25 型是韶关地区的优势型别, 并且是该地区的独特型别; PFGE 22 型是惠州地区的优势型别, 并且是该地区的独特型别, 其他地区均没有发现这三种 PFGE 型, 说明广东省部分地区的 Lm 很可能存在着地区特异性。

随着时间的变迁, 菌株不断传代, 会出现突变与分化, 但部分菌株仍然存在着不同程度的相关性。菌株 02LM088 和 04LM031 分离自仁化地区的某烧腊店的烧鸭, 时隔 2 年, 两者均为 PFGE 25 型。根据 Tenover 等^[7]提出的观点, 在流行病学上推断这两株菌的传染源为同一克隆。Lm 是胞内寄生菌, 对不良环境具有较强的耐受性, 能抵抗 -20℃ 的低温, 可在 pH 值 5~8 生长, 耐受 20% 的高盐, 并可对多种抗生素耐药。因此, 自然环境中的 Lm 可长期存在, 人、畜和家禽感染后, 在临床上一方面表现为显性感染, 另一方面也可长期处于带菌状态, 从而对周围环境产生交叉污染和传播^[8], 故推测这两株菌的传染源为同一克隆, 表现为相同的 PFGE 型。类似情况在冷藏和冷冻食品中也有发现。另外, 菌株 02LM092 和 03LM018 分离自仁化地区的一家烧腊店的熟肉制品, 时隔一年, 两者仅存在 1 条 DNA 片段的差异, 相似度为 94.7%。根据 Tenover 等^[7]提出的观点, 当一些分离菌株被多次重复培养时可观察到紧密相关的这种现象。菌株 02LM092 可能由于长期存在于环境中, 与周围的食物、环境发生交叉污染和传播, 多次传代后发生了单一基因事件的变化, 因此这两株菌很可能是紧密相关的。

由于 PFGE 可以揭示短期内从可疑食品中分离的菌株、从患者排泄物分离的菌株和从可能的传染源分离的菌株三者之间的相互关系, 因此被广泛应用于食源性疾病的溯源中, 它是判断引起食物中毒的致病食品、追溯来源, 并在此基础上采取措施控制食物中毒的关键技术^[9,10]。菌株 04LM261、04LM262 和 04LM265 是在同一天分别分离自湛江的肯德基、多美丽和麦当劳的冷冻鸡肉, PFGE 分析

结果显示, 它们都是 PFGE 9 型(图 3)。根据 Tenover 等^[7]提出的观点, 在流行病学上推断这三株菌应该来自同一克隆。现代社会交通越来越发达, 即使是同一家冷冻厂生产出来的各种冷冻食品, 都会通过不同的运输渠道运送到全国各地甚至全世界。因此, 如果食品在流入市场前受到污染, 由于大批量的生产与销售, 那么就有可能引起食源性疾病的暴发, 导致病例扩散。由于 PFGE 技术可以揭示菌株之间的相互关系, 进而追踪食源性疾病暴发的源头, 故本研究所建立的数据库可为 Lm 引发的食源性疾病的溯源和分子流行病学研究提供基础数据。

参 考 文 献

- [1] Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(8):3819-3822.
- [2] Roche SM, Gracieux P, Milohanic E, et al. Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(10):6039-6048.
- [3] Leite P, Rodrigues R, Ferreira M, et al. Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from portuguese farmhouse cwe's cheese and from humans. *Inter J Food Microbiol*, 2006, 106:111-121.
- [4] Cali DR, Borucki MK, Besser TE, et al. Mixed-genome microarrays reveal multiple serotype and lineage-specific differences among strains of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(2):632-639.
- [5] Lukinmaa S, Miettinen M, Nakari UM, et al. *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections: variation of sero- and genotypes during an 11-year period in Finland. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4):1694-1700.
- [6] Shen YL, Liu Y, Zhang YF, et al. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods in Florida. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(7): 5073-5076.
- [7] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9):2233-2239.
- [8] 张秀丽, 廖兴广, 张丁, 等. 河南省李斯特氏菌种群特征和生态分布的研究. *河南医学研究*, 2001, 10(1):71-76.
- [9] Lukinmaa S, Takkunen E, Siitonen A. Molecular epidemiology of clostridium perfringens related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(8):3744-3749.
- [10] Proctor ME, Kurzynski T, Koschmann C, et al. Four strains of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from patients during an outbreak of disease associated with ground beef; importance of evaluating multiple colonies from an outbreak-associated product. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(4):1530-1533.

(收稿日期:2007-04-12)

(本文编辑:张林东)