

猪肉中单核细胞增生李斯特菌的分离与耐药性研究

石磊^{1,2}, 王文燕¹, 闫鹤¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 厦门银祥集团有限公司, 福建厦门 361100)

摘要: 了解猪肉中单核细胞增生李斯特菌的污染情况、血清型和耐药性现状。按照国标 GB 4789.30-2010 程序分离猪肉中单核细胞增生李斯特菌; 多重 PCR 确定血清型; 纸片扩散法检测单核细胞增生李斯特菌对抗生素的敏感性。研究表明 273 份猪肉样本中有 52 (19.02%) 个受单核细胞增生李斯特菌的污染, 共检出 78 株该致病菌。33 株 (42.31%)、24 株 (30.71%)、16 株 (20.51%)、3 株 (3.85%)、2 株 (2.56%) 分别被确定为血清型 1/2a (或 3a)、1/2b (或 3b 或 7)、1/2c (或 3c)、4a (或 4c) 和 4b (或 4d 或 4e)。所有菌株对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、亚胺培能、环丙沙星、左氧氟沙星、万古霉素都敏感, 对四环素 (20.51%) 的耐药率最为严重。11.54% 的菌株对临床治疗李斯特菌病的青霉素、庆大霉素、红霉素等抗生素出现耐药。*tet(M)* 基因是单核细胞增生李斯特菌耐四环素的主要机制之一, 接合型转座子 Tn916 与该菌四环素耐药散播有直接关系。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌; 检测; 血清型; 耐药性; 接合型转座子 Tn916

文章编号: 1673-9078(2013)12-2826-2829

Isolation and Antimicrobial Susceptibilities of *Listeria monocytogenes* in Pork

SHI Lei^{1,2}, WANG Wen-yan¹, YAN He¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Xiamen Yinxiang Group CO., Ltd, Xiamen 361100, China)

Abstract: To investigate the pork contamination by *Listeria monocytogenes*, its susceptibility to antimicrobial agents and serotypes, all strains were isolated by the GB 4789.30-2010 method; *L. monocytogenes* serotypes were identified by PCR; and antibiotic resistant profile of the isolates was examined using disc diffusion assay. A total of 273 pork samples were examined, out of which 52 samples (19.02%) were positive for *L. monocytogenes* and 78 strains were detected. And 33 (42.31%), 24 (30.71%), 16 (20.51%), 2 (2.56%), 3 (3.85%) of the isolates were identified as serotypes 1/2a (or 3a), 1/2b (or 3b or 7), 1/2c (or 3c), 4a (or 4c) and 4b (or 4d or 4e), respectively. With disc diffusion assay, all strains were susceptible to the antibiotics, including ampicillin, ampicillin-sulbactam, imipenem, ciprofloxacin, levofloxacin, and vancomycin. However, the percentages of tetracycline resistances were higher. 11.54% isolates were resistant to penicillin, gentamicin, erythromycin. The conjugative transposon Tn916 is the important determinants of the resistance in spreading of the *L. monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*; detection; serotypes; antibiotic resistance; Tn916 conjugative transposon

单核细胞增生李斯特菌是一种革兰氏阳性短杆菌, 它广泛分布在自然界中, 如土壤、污水、饲料、动物、人和动物的粪便中等, 并且该菌对外界环境适应能力很强, 在不利因素如低温、高渗透压、酸性环境、抗菌物质中仍能生长。据WHO报道: 4~8%的水产品, 5~10%的奶与奶制品, 30%以上的肉与肉制品, 15%以上的家禽均被其污染。该菌可引起人和动物多种疾

收稿日期: 2013-08-17

基金项目: 华南理工大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (2012ZZ0083); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31201363); 广州市科技计划项目 (11C12080718)

作者简介: 石磊 (1961-), 男, 教授, 博士

通讯作者: 闫鹤 (1972-), 女, 讲师, 主要从事细菌耐药机制及食品安全

病, 人畜感染后主要表现为脑膜炎、败血症等, 对于人类, 特别是新生儿、孕妇、老年人以及免疫功能缺陷者, 很容易发病, 致死率达20~30%^[1]。自上世纪80年代以来, 欧洲等国家多次因食品污染爆发人李斯特菌病, 目前我国还没有由该菌引起的疾病爆发流行报告, 但多年来该病在我国猪、羊、鸡、牛、兔等家畜家禽中有流行^[2]。2002年单核细胞增生李斯特菌被WHO列为仅次于大肠杆菌O157、沙门氏菌、志贺氏菌后的第四大重要的食源性致病菌^[3]。

20世纪50年代, 美国FDA和大部分欧洲国家允许使用抗生素作为动物饲料添加剂, 造成食源性致病菌耐药性明显提高。自1988年首次报道单核细胞增生李斯特菌耐受四环素以来, 此后不断的从食物、环境、

人、动物中分离到对一种或多种抗生素耐药的单核细胞增生李斯特菌。细菌对四环素类抗生素耐药的分子机理主要是编码外输泵蛋白、核糖体保护蛋白、灭活或钝化四环素的酶,已知的四环素耐药基因有20余种,在革兰氏阳性菌中发现6类四环素耐药基因: *tet(K)*、*tet(L)*、*tet(M)*、*tet(O)*、*tet(P)*、*tet(S)*。接合转座子Tn916是散播*tet(M)*介导的四环素耐药的重要载体,能在不同的菌间转移^[4]。

单核细胞增生李斯特菌有13个血清型,不同的血清型致病力不同,98%以上的人李斯特菌病病例由1/2a、1/2b、1/2c和4b血清型引起。在这13个血清型中,1/2a型在食物中最普遍,而4b型是最常在患有李斯特菌病的人身上检测到。这些血清型可以分为三个谱系,其中谱系I包括1/2b、3b、4a、4b、4d、4e和7血清型,主要来自人类李斯特菌病;谱系II包括1/2a、1/2c、3a和3c血清型,主要来自食品及动物李斯特菌病;谱系III菌株很少,包括4a和4c血清型,主要来自动物和环境样本^[5]。

本研究主要对广州市及厦门市猪肉中单核细胞增生李斯特菌的污染情况、血清型和耐药性进行监测分析,且研究四环素耐药菌的耐药机制,为预防和控制李斯特菌病提供科学的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源

在广州天河区超市和菜市场及厦门的某养殖场共采样猪肉样本273份。其中在广州天河区的超市和菜市场采样145份,分别为:生猪肉100份,包括腿肉、里脊肉、方肉、夹心肉、五花肉、肉糜、小排、大排、肋排、尾骨等;猪肉脏25份,包括猪肝、猪肾、猪大肠、猪肚、猪心;熟肉20份。在厦门某养殖场,采样128份,包括生猪肉和猪肉脏。

1.1.2 菌株

药敏质控菌株 *Staphylococcus aureus* ATCC25923、*Escherichia coli* ATCC25922 和 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853。

1.2 仪器和试剂

LB1、LB2增菌液、单增李斯特菌显色培养基、PALCAM琼脂、单核细胞增生李斯特生化鉴定试剂盒,广东环凯微生物科技有限公司;M-H培养基,美国Oxoid公司;抗生素纸片,杭州微生物试剂有限公司;选择目前临床用药和兽药共17种抗生素。

1.3 方法

1.3.1 单核细胞增生李斯特鉴定方法

参照GB 4789.30-2010《食品卫生微生物学检验单核细胞增生李斯特氏菌检验》方法检测^[6],获得阳性菌株,用80%甘油保存。

1.3.2 多重PCR鉴定血清型

参考Michel等的方法,设计4对引物分别特异性扩增单核细胞增生李斯特菌基因*Lmo0737*、*Lmo11180*、*ORF2819*和*ORF2110*,引物信息参考文献^[7]。

1.3.3 药敏试验

采用标准琼脂扩散法(Kirby-Bauer),结果按照CLSI(2012)标准进行结果判断^[8](对单核细胞增生李斯特菌CLSI无抑菌圈直径折点判读标准的药物,参见葡萄球菌和肠球菌)。

1.3.4 四环素耐药基因*tet(M)*和接合型转座子Tn916检测

所有耐四环素的菌株PCR扩增检测四环素耐药基因*tet(M)*,引物序列及条件参考文献^[9];对*tet(M)*阳性菌株,PCR检测接合型转座子Tn916,引物序列及条件参考文献^[10]。在www.ncbi.nlm.nih.gov网站对测得的序列进行分析,用Standard Nucleotide BLAST对获得的基因序列进行同源性检索。

2 结果与分析

2.1 猪肉中单核细胞增生李斯特菌的检测结果

表1 猪肉中单核细胞增生李斯特菌污染情况

Table 1 Contamination of *Listeria monocytogenes* in pork

采样点	采样时间	样品	检测件数	检出件数	样本检出率/%
广州	2012.8~2012.10	生猪肉	100	40	40
广州	2012.8~2012.10	猪肉脏	25	0	0
广州	2012.8~2012.10	熟肉	20	4	20
厦门	2012.11~2012.12	生猪肉	113	8	7.07
厦门	2012.11~2012.12	猪肉脏	15	0	0
合计	-	-	273	52	19.05

从表1中知273份猪肉有52个样本受到单核细胞增生李斯特菌的污染,共得到78株菌,样本检出率为19.05%。广州的145份猪肉中,有44个样本检出单核细胞增生李斯特菌,样本检出率为30.34%,生猪肉、猪肉脏、熟肉的测出率分别为40%、0、20%。从这44个样本中得到65株菌,其中60株来自生肉,其余5株菌

来自熟肉。厦门某养殖场的128份猪肉有8个样本检出13株单核细胞增生李斯特菌，样本检出率为6.25%，生猪肉、猪内脏的检出率分别为7.07%、0。

本研究中，单核细胞增生李斯特菌的检出率为19.05%，略高于之前的研究，如有报道2000年生肉中单核细胞增生李斯特菌的检出率为2.47%，2003~2005

年为7.1%，2005~2006年为28%，2006~2009年为11.67%，2008~2009年为12%^[11-12]。养殖场的单核细胞增生李斯特菌检出率低于超市和零售市场，这与猪肉的运输和销售过程长时间暴露在空气中有关。20%的熟肉样本受单核细胞增生李斯特菌的污染可能是由于此次熟肉样

表2 猪肉中单核细胞增生李斯特菌对抗生素敏感性结果

Table 2 Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* from pork

药物种类	抗生素名称	抑菌圈直径折点			耐药菌株数	耐药率/%
		S	I	R		
β-内酰胺类	氨苄西林	≥17	-	≤16	0	0
	青霉素	≥15	-	≤14	1	1.28
	氨苄西林/舒巴坦	≥15	12~14	≤11	0	0
	头孢噻吩	≥18	15~17	≤14	4	5.13
	头孢噻肟	≥23	15~22	≤14	7	8.97
	亚胺培能	≥16	14~15	≤13	0	0
喹诺酮	环丙沙星	≥21	16~20	≤15	0	0
	左氧氟沙星	≥19	16~18	≤15	0	0
四环素	四环素	≥19	15~18	≤14	16	20.51
	强力霉素	≥16	13~15	≤12	4	5.13
大环内酯	红霉素	≥23	14~22	≤13	3	3.85
氨基糖苷	链霉素	≥10	7~9	≤6	5	6.41
	庆大霉素	≥15	13~14	≤12	5	6.41
糖肽	万古霉素	≥17	15~16	≤14	0	0
利福平	利福平	≥20	17~19	≤16	2	2.56
氯霉素类	氯霉素	≥18	13~17	≤12	1	1.28
磺胺类	甲氧苄啶	≥16	11~15	≤10	4	5.13

本全部来自零售市场且为家庭式的小作坊生产，原料、生产、运输和销售各环节缺乏严格的卫生质量监控。因此，需要加强和规范猪肉的运输、销售和加工等各环节的卫生监督和管理。

2.2 单核细胞增生李斯特菌药敏试验结果

表2概述了78株菌对17种抗生素的耐药情况，试验中的药敏质控菌株均在参考标准给定的范围内。所有菌株对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、亚胺培能、环丙沙星、左氧氟沙星、万古霉素都敏感。78株菌中有24（30.77%）株耐药，其中有2株来自熟肉，其耐受抗生素为四环素、强力霉素、头孢噻肟、链霉素、庆大霉素、氯霉素、红霉素、利福平、头孢噻吩、甲氧苄啶、青霉素。试验菌株耐四环素最为严重，耐药率达到20.51%；其次为头孢噻肟（8.97%）。耐受一种抗生素的有13（16.67%）株，耐受三类或三类以上的抗生素有5（6.41%）株。一株分离自广州某零售市场，1/2a血清型，分别耐受头孢噻肟、头孢噻吩、四环素、强

力霉素、甲氧苄啶、氯霉素、链霉素、庆大霉素、利福平；一株分离自广州某超市，1/2c血清型，分别耐受四环素、强力霉素、红霉素、庆大霉素、头孢噻吩、头孢噻肟、链霉素。

药敏试验结果表明所有菌株对四环素耐药（20.51%）最严重，这与前人的研究是一致的^[11]，并且在厦门某养殖场检出的单核细胞增生李斯特菌有6株耐药，这6株菌仅有一株耐四环素和红霉素，其他只耐四环素。单核细胞增生李斯特菌耐四环素严重是因为四环素作为动物生长促进剂添加在动物饲料中。一般临床治疗人的李斯特菌病把氨苄西林、利福平或青霉素和庆大霉素作为首选的抗生素，其次是甲氧苄啶和磺胺类抗生素，红霉素和万古霉素也会使用，本研究中分离到了耐青霉（1.28%）、庆大霉素（6.41%）、利福平（2.56%）的单核细胞增生李斯特菌。另一个值得注意的是发现多重耐药菌（6.41%），单核细胞增生李斯特菌的多重耐药性会导致临床治疗李斯特菌病失败，密切关注单核细胞增生李斯特菌的耐药情况，以

便找到切实可行的方法,消除这些耐药菌对人类健康的危害。

2.3 单核细胞增生李斯特菌血清型分型结果

实验得到的单核细胞增生李斯特菌被分属为五组血清型。33株(42.31%)属于第一组(血清型1/2a和3a)(42.31%),第二组(1/2b和3b)(30.71%),第三组(1/2c和3c)(20.51%),第四组(4a和4c)(3.85%),第五组(4b和4d和4e)(2.56%)。谱系II(1/2a, 1/2c,3a和3c)为主要的占62.82%,谱系I(1/2b、3b、4b、4d、4e)占33.27%,谱系III(4a和4c)占3.85%(图1)。

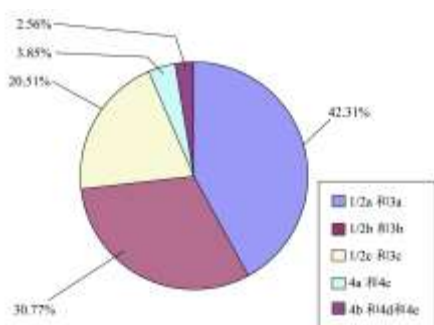


图1 单核细胞增生李斯特菌的血清型分布

Fig.1 Distribution of serotypes among *L. monocytogenes* strains isolate

多重PCR无法区分1/2a与3a、1/2c与3c、1/2b和3b、4b与4d或者4e。但是在食物中属于3a、3b、3c、4a、4c、4e和4d这几种血清型的单核细胞增生李斯特菌是很少的。分离得到的实验菌株的血清型主要为1/2a、1/2c和1/2b(93.53%),这和国内外报道是一致的^[13]。1/2a型的单核细胞增生李斯特菌具有较强的耐细菌素能力,且带有更多的质粒,这些质粒赋予它对环境中的抗生素和重金属更强的抵抗力,因此其在环境中有很好的适应能力^[14]。1/2a、1/2b和4b这三种血清型的单核细胞增生李斯特菌能引起人类李斯特病。因此,需要加强对单核细胞增生李斯特菌以上几种血清型的检测力度,重点防治李斯特病的爆发。所得到的菌株大部分是属于谱系I(33.27%)和谱系II(62.82%)。

2.4 四环素耐药基因和转座子Tn916检测结果

16株四环素耐药菌株中有12株检出tet(M)基因,且这12株菌的耐药基因tet(M)均位于转座子Tn916上。Tet(M)是最常见的四环素耐药基因,临床分离18种革兰氏阳性菌均已检tet(M)基因^[9]。本研究中检测到tet(M)基因均位于转座子Tn916上。研究表明,细菌主要是通过质粒和接合型转座子(Tn916-Tn1545)两种可移动基因元件携带的抗生素耐药基因而产生耐药性,且这两种可移动元件在肠球菌和链球菌中普遍存在,并能

在革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌之间传递,人类和动物的肠道细菌是获得可移动质粒和接合型转座子的场所^[11]。

3 结论

对广州市及厦门市猪肉样本检测结果表明,单核细胞增生李斯特菌检出率为19.05%,血清型主要为1/2a、1/2b和1/2c,且存在具有强致病性4b性,这几种血清型能引起严重的李斯特病,该批菌株对临床治疗李斯特菌病常用药物如庆大霉素、红霉素等存在一定的耐药性。转座子Tn916是造成该批菌对四环素耐受的主要原因,关注可移动基因元件介导的耐药性在各种食源性细菌间传播极为重要,持续监测这些不断出现的耐药菌株及研究各种耐药机制,以确保有效的人类李斯特菌病的治疗。

参考文献

- [1] Arslan S, Ozdemir F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese [J]. Food Control, 2008, 19(4): 360-363
- [2] 闫鹤,王彬,师宝忠,等.单核细胞增生李斯特菌血清型、耐药性研究[J].中国抗生素杂志,2010,35(10):774-778
Yan He, Wang Bin, Shi Bao-zhong et al. Study on serotype and antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2010, 35(10): 774-778
- [3] 刘海泉,赵强,孙晓红,等.多重PCR快速检测食品中的单核细胞增生性李斯特菌[J].中国农业科学,2010,43(23): 4893-4900
LIU Hai-quan, ZHAO Qiang, SUN Xiao-hong, et al. Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Food by Multiple PCR [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(23): 4893-4900
- [4] Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(2): 232-260
- [5] Ayaz N D, Erol I. Relation between serotype distribution and antibiotic resistance profile of *Listeria monocytogenes* isolated from ground turkey [J]. Journal of Food Protection, 2010, 73:967-972
- [6] GB 4789.30-2010 食品卫生检验方法微生物学部分[S]
GB 4789.30-2010 National food safety standard Food microbiological examination: *Listeria monocytogenes* [S]
- [7] Doumith M, Buchrieser C, Philippe G, et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR

- [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42: 3819-3822
- [8] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M31 A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2012
- [9] Bertrand S, Huys G, Yde M, et al. Detection and characterization of *tet* (M) in tetracycline-resistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France [J]. Journal of Medical Microbiology, 2005, 54: 1151-1156
- [10] Poyart C, Quesne G, Acar P, et al. Characterization of the Tn916-like Transposon Tn3872 in a Strain of *Abiotrophia Defectiva* (*Streptococcus Defectivus*) Causing Sequential Episodes of Endocarditis in a Child [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(3): 790-793
- [11] Yan H, Neogi SB, Ziyao M, 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: 310-316
- [12] Wang Y, Qiao X, Yuan B, et al. Surveillance on foodborne pathogenic bacteria in foods in Jiangsu province between 2006 and 2009 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2010, 22: 43-434
- [13] Osri RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2011, 301: 79-96
- [14] Ward TJ, Gorski L, Borucki MK, et al. Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186: 4994-5002