

携带质粒李斯特菌耐药及重金属抵制特性研究

张辉, 包红朵, 周艳, 张莉莉, 王冉

(江苏省农业科学院 农业部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室, 江苏省畜禽产品安全性研究重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要: 鉴定单核细胞增生性李斯特菌 (*Lm*) 携带质粒特性, 分析携带质粒 *Lm* 对抗生素、重金属镉及苯扎氯铵的敏感性。结果表明, 11 株 *Lm* 携带内源性质粒; 所有 *Lm* 菌株对阿莫西林、红霉素和利福平均敏感 (22/22), 对头孢拉定 100% 耐药 (22/22); 其中 5 株对盐酸万古霉素中度耐受, 部分菌株对盐酸环丙沙星 (17/22)、硫酸新霉素 (16/22) 及盐酸四环素 (9/22) 具有一定耐受性。耐药分析表明, 菌株对重金属镉呈现抵制特性 (14/22), 且均为携带质粒菌株; 而在苯扎氯铵敏感性检测中, 仅 3 株携带质粒 *Lm* 菌株对苯扎氯铵具有抵制性。对 *Lm* 菌株进行噬菌体杀菌检测, 结果均能够被噬菌体识别并裂解。综上所述, *Lm* 分离株耐药性增强, 且对苯扎氯铵和镉有抵制特性, 而噬菌体能够杀灭抵制菌株, 为控制耐药及抵制性菌株污染提供了新途径。

关键词: 单核细胞增生性李斯特菌; 抗生素; 重金属; 噬菌体

文章编号: 1673-9078(2015)4-58-62

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.010

Characterization of Antibiotic, Heavy Metal, and Benzalkonium Chloride

Resistance of Plasmid-carrying *Listeria monocytogenes*

ZHANG Hui, BAO Hong-duo, ZHOU Yan, ZHANG Li-li, WANG Ran

(Key Laboratory of Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Key Lab of Animal-derived Food Safety of Jiangsu Province, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The major aims of this study included the characterization of plasmids carried by *Listeria monocytogenes* (*Lm*), and an in-depth analysis of the sensitivity of plasmid-carrying *Lm* towards antibiotics, the heavy metal cadmium, and benzalkonium chloride. The results of this study showed the presence of endogenous plasmids in 11 *Lm* strains. All *Lm* strains displayed average sensitivity to amoxicillin, erythromycin, and rifampicin (22/22), and 100% resistance to cefradine (22/22). Five strains showed intermediate resistance to vancomycin hydrochloride, while some strains were resistant to ciprofloxacin (17/22), neomycin sulphate (16/22), and tetracycline hydrochloride (9/22). The analysis of cadmium resistance showed the presence of plasmids in all strains resistant to the heavy metal cadmium (14/22). In contrast, only three of the plasmid-carrying *Lm* strains were determined to be resistant to benzalkonium chloride. All *Lm* strains were identified and lysed via the phage sterilization method. In summary, although the plasmid-carrying *Lm* isolates displayed increased drug-, benzalkonium chloride-, and cadmium-resistance, they were susceptible to phage action. Therefore, the results of this study indicate a novel method for the control of drug resistance and pollution by resistant-bacteria.

Key words: *Listeria monocytogenes*; antibiotics; heavy metal; phage

李斯特菌(*Listeria*)是重要的食源性人畜共患病原, 目前国际上公认的李斯特菌共有七个种, 其中单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*, *Lm*) 是重要的食源性人畜共患病原菌。调查研究表明, 96% 李斯特菌病例都是由 *Lm* 1/2a, 1/2b 和 4b 血清型引发的, 主要表现为胃肠炎、败血症、脑膜脑炎和流产等, 死亡率高

收稿日期: 2014-07-30

基金项目: 国家自然科学基金 (31101291); 江苏省农业科技自主创新项目 (CX(13)3068)

作者简介: 张辉 (1978-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事食源性病原菌监测及防控研究

率高达 25~30%^[1]。早在 1926 年, 首次从患有败血症的兔子和豚鼠中分离出该病原, 而在 1929 年丹麦首次报导由李斯特菌引发的病例。李斯特菌病在工业化程度高的国家报道较多, 在非洲、亚洲和南美洲报道较少, 发达国家李斯特菌病的临床发病率较高; 据美国疾病控制中心(CDC)进行的流行病学研究表明, 美国每年约有 1600~2500 例李斯特菌病发生。目前 *Lm* 在食品中检出率呈上升趋势, 在国内, 近年来 *Lm* 在食品中的总检出率高达 9.7%^[2]。在国外, 美国和加拿大曾爆发过 6 起重大的李斯特菌病, 而这都与食用了污染李斯特菌的食品有关, 2008 年, 加拿大 1 名消费

者被证实是因为食用 *Lm* 污染的熟肉制品而致死；2009~2010 年，先后在美国和加拿大都发生多次因李斯特菌污染而导致的食品召回事件^[1]，其污染状况令人堪忧。

目前，在动物性食品生产及加工中，都是利用化学方法来控制致病菌的污染和传播的，而针对李斯特菌患者均通过抗生素治疗，因此导致了化学杀菌剂和抗生素的频繁使用，已使 *Lm* 对其产生抵制（耐药）特性，其不仅能够具有较强的耐受性，且能够适应不同压力生长环境，有报道称导致其多重耐药及环境适应性的原因是其内部质粒的转移^[4-5]。因此，本研究通过对 *Lm* 分离株内源性质粒鉴定，分析携带质粒菌株对抗生素、化学消毒剂及重金属镉的耐受性，并利用噬菌体来作用于宿主菌，评价携带质粒 *Lm* 菌株的生物学特性。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

1.1.1 菌株及其生长条件

Lm 菌株(GIM1.228)、威尔氏李斯特菌(GIM 1.231)、英诺克李斯特菌(GIM 1.230)购自广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心；*Lm* 分离株由扬州市疾病预防控制中心巢国祥博士惠赠(表1)；*Lm* ATCC 19114、大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 及 *Lm* 噬菌体 LipG2-5 均由江苏省畜禽产品安全生性研安重点实验室保存。李斯特菌所用培养基为脑心浸液(BHI)，30 °C 培养；金黄色葡萄球菌培养基为 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE)，37 °C 培养；大肠杆菌培养基为 LB 肉汤，37 °C 培养。

1.1.2 试剂

表 1 *Lm* 分离株来源

Table 1 Sources of *Lm* isolates

菌株	来源	菌株	来源
Lm002	生猪肉	XZ58	零售熟食
Lm003	生猪肉	XZ09-14	零售熟食
Lm004	生猪肉	NJ5-4	零售熟食
Lm005	生猪肉	NJ2-4	零售熟食
Lm006	生猪肉	NJ5-9	零售熟食
Lm007	生猪肉	NJ8-6	熟食
Lm008	生猪肉	NJ023	生鸡肉
XZ5-7	零售熟食	NJ05	生鸡肉
XZ09-59	零售熟食	2000/47	临床分离
XZ56	零售熟食	SQ2009020	生猪肉

脑心浸液(BHI)、琼脂等购自上海超妍生物科

技有限公司；TSB-YE、LB 肉汤、琼脂 青岛高科园海博生物技术有限公司、DNA Marker, 限制性内切酶, Taq DNA 聚合酶等均购自上海皓嘉科技发展有限公司；高纯质粒小提中量制备试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司；AgNO₃、3(CdSO₄)·8H₂O 购自国药集团化学试剂有限公司；红霉素、头孢拉定、阿莫西林、泰乐菌素均来自中国药品生物制品检定所；利福平、盐酸万古霉素、硫酸新霉素均购自 Ruitaibio 公司；盐酸环丙沙星、盐酸四环素来自中国兽药品监察所；苯扎氯铵购自阿法埃莎(天津)化学有限公司；高纯质粒小提中量制备试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *Lm* 菌对抗生素、重金属及苯扎氯铵的敏感性分析

1.2.1.1 菌液的准备

挑取 *Lm* 菌株单菌落接种于 BHI 中 30 °C，150 r/min 震荡培养过夜，次日测定 OD₆₀₀ 值，用 BHI 将浓度调整为 10⁶ CFU/mL。

1.2.1.2 敏感性试验

参照美国临床标准委员会(CLSI)推荐的标准^[6]，采用微量稀释法测定 9 种主要抗生素对 *Lm* 菌株的最小抑菌浓度。计算各菌对各种抗生素的耐药率，判断细菌的耐药性。以大肠杆菌 ATCC 25922 和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 作为质控菌。将抗生素、重金属及苯扎氯铵配制为母液，其浓度为 2048 μg/mL，微量稀释法测定对 *Lm* 菌株的敏感性。将抗生素在 96 孔中用磷酸盐缓冲液作对比稀释，每孔 50 μL，然后将稀释好的细菌依次从抗生素的低浓度到高浓度加入到 96 孔板中，每孔 50 μL，细菌和抗生素充分混合后，置于 37 °C 孵育 18 hr 读取结果。

1.2.2 *Lm* 菌株质粒鉴定

Lm 菌株质粒的提取按高纯质粒小提中量制备试剂盒说明进行，对提取的质粒进行限制性内切酶酶切分析鉴定。

1.2.3 李斯特菌与噬菌体的反应活性分析

分别取不同菌株过液培养物 0.2 mL 涂布于 TSB 平板(含 1.5% 琼脂)，置于 30 °C 培养 1 h。取 *Lm* 噬菌体 LipG2-5 裂解液 10 μL 分别进行平板点样，30 °C 培养 18~24 h 后观察裂菌圈。

2 结果与分析

2.1 李斯特菌内源性质粒鉴定结果

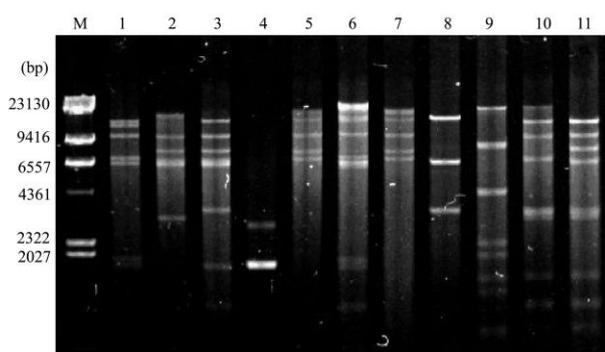


图 1 质粒酶切图谱分析结果

Fig.1 Restriction enzyme digestion profiles of the plasmids

注: M. λ -HindIII DNA Maker, 1~11:Lm002, XZ5-7, Lm005, XZ09-59, Lm007, XZ09-14, NJ05, XZ56, XZ58, NJ 5-9, Lm008。

对 22 株 *Lm* 菌株进行了内源性质粒的提取, 结

果 11 株中含有内源性质粒。对质粒进行 *Bam*H I 酶切消化, 结果如图 1 所示中, 其中 Lm007 与 NJ05 图谱相同, 其他 9 株酶切图谱均不相同, 即存在 10 种质粒。

2.2 抗生素敏感性检测结果

将不同李斯特菌对 7 类 9 种抗生素进行了耐药分析, 由于没有针对 *Lm* 菌株的耐药临界值参考, 本研究参照 CLSI 标准中金黄色葡萄球菌相关标准进行结果判定, 所有 *Lm* 菌株对阿莫西林、红霉素及利福平较敏感, 对头孢拉定高度耐药, 其中 17 株菌对盐酸环丙沙星高度耐受, 16 株对硫酸新霉素具有耐受作用, 9 株对盐酸四环素具有耐受性, 5 株对盐酸万古霉素中度耐受。

表 2 *Lm* 菌株对抗生素、重金属及苯扎氯铵的敏感性

Table 2 Sensitivity of *Lm* strains to antibiotics, heavy metals, and benzalkonium chloride

菌株	头孢拉定	阿莫西林	泰乐菌素	红霉素	盐酸四环素	硫酸新霉素	盐酸万古霉素	利福平	盐酸环丙沙星	硫酸镍	硝酸银	苯扎氯铵
Lm002	R	S	>4	S	S	S	S	S	S	+	-	S
Lm003	R	S	>8	S	S	R	S	S	S	-	-	S
Lm004	R	S	>4	S	S	R	S	S	R	-	-	S
Lm005	R	S	>4	S	S	S	S	S	R	+	-	S
Lm006	R	S	>8	S	S	S	S	S	R	-	-	S
Lm007	R	S	>8	S	S	R	S	S	R	+	-	S
Lm008	R	S	>8	S	S	R	S	S	R	+	+	R
GIM1.228	R	S	>8	S	R	S	S	S	R	-	-	S
XZ5-7	R	S	>4	S	R	R	S	S	R	+	-	S
XZ09-59	R	S	>8	S	R	R	S	S	R	+	-	S
XZ56	R	S	>4	S	R	R	S	S	R	+	-	S
XZ58	R	S	>8	S	R	R	S	S	R	+	-	S
XZ09-14	R	S	>8	S	R	R	S	S	R	+	-	R
NJ5-4	R	S	>8	S	S	R	I	S	R	-	-	S
NJ2-4	R	S	>8	S	R	R	I	S	R	-	-	S
NJ5-9	R	S	>8	S	S	R	I	S	R	+	-	S
NJ8-6	R	S	>8	S	R	R	I	S	R	-	-	S
NJ023	R	S	>4	S	S	S	S	S	I	-	-	S
NJ05	R	S	>4	S	S	R	S	S	I	+	-	R
2000/47	R	S	>4	S	S	R	S	S	R	+	-	S
SQ2009020	R	S	>8	S	R	R	I	S	I	+	-	S
ATCC19114	R	S	>8	S	S	S	S	S	R	+	+	S
25922	R	I	>16	R	S	R	R	R	R	+	-	/
25923	R	S	>4	I	S	R	I	S	R	-	-	/

注: S: susceptibility, I: intermediate sensitive, R: resistance, “+”对重金属有抵制作用 MIC \geq 70 μ g/mL; “-”为敏感 MIC<70 μ g/mL, “/”未检测。

2.3 重金属敏感性检测结果

对菌株进行了重金属抵制特性鉴定,结果见表2,菌株对两种重金属都表现出一定的抵制性(MIC \geq 70 $\mu\text{g/mL}$),其中仅2株 *Lm* 耐受 AgNO_3 , 14株对重金属镉具有抵制性, MIC \geq 70 $\mu\text{g/mL}$,其中 Lm007、Lm008和 XZ5-7的 MIC为256 $\mu\text{g/mL}$,对镉抵制作用显著。其他11株中有6株的作用浓度达到128 $\mu\text{g/mL}$,呈现一定的抵制性。在对 AgNO_3 抵制性分析中,仅分离株 Lm008和 ATCC 19114具有抵制性,其作用相对敏感。

2.4 苯扎氯铵敏感性检测结果

对 *Lm* 菌株进行苯扎氯铵敏感性检测,结果见表2,其中3株 *Lm* 菌株对苯扎氯铵表现出一定的抵制性(MIC \geq 10 $\mu\text{g/mL}$),其他菌株在作用浓度为2~4 $\mu\text{g/mL}$ 时能够抑制菌株生长。

2.5 *Lm* 与噬菌体反应活性鉴定结果

经双层平板法鉴定噬菌体与李斯特菌的反应活性,结果可见表3,24株李斯特菌对 *Lm* 噬菌体 LipG2-5 反应有所差异,仅一株李斯特菌分离株反应为阴性,其他李斯特菌中包括威尔氏李斯特菌(GIM 1.231)、英诺克李斯特菌(GIM 1.230)均能够被噬菌体裂解形成噬菌斑。

表3 *Lm* 菌株与噬菌体反应活性鉴定结果

Table 3 Results of the phage reactivity test on *Lm* strains

菌株	反应活性	菌株	反应活性
Lm002	+	XZ5-7	+
Lm003	+	XZ09-59	+
Lm004	+	NJ2-4	-
Lm005	+	NJ5-4	+
Lm006	+	NJ5-9	+
Lm007	+	NJ8-6	+
Lm008	+	NJ023	+
XZ56	+	NJ05	+
XZ58	+	GIM1.228	+
XZ09-14	+	GIM 1.231	+
SQ2009020	+	GIM 1.230	+
ATCC19114	+	2000/47	+

注：“+”噬菌体可裂解株；“-”噬菌体不可裂解株。

3 讨论

大部分 *Lm* 都携带质粒,其中从食品分离的 *Lm* 携带质粒的频率高达50%,且其大部分仅含有单个质粒。Lemaître 等首次报道了携带耐氯霉素、红霉素、

链霉素及四环素质粒的 *Lm* 分离株^[7],且95.3%携带质粒的 *Lm* 都对镉有抵制性。因此,本研究对不同 *Lm* 分离株进行质粒鉴定,结果在11株菌中检测到10种内源性质粒,且均为单个质粒。由于质粒中编码多种功能基因,因此携带质粒 *Lm* 菌株其特性具有一定的复杂性。因此本研究中所获得的携带质粒 *Lm* 菌株为耐药及镉抵制等研究提供了必要条件。

先前报道称 *Lm* 较其他革兰氏阳性菌而言,对抗生素更为敏感,但在本研究中的 *Lm* 菌株对头孢拉定程高度耐药,其中5株对盐酸万古霉素中度耐受,部分菌株对盐酸环丙沙星(17/22)、硫酸新霉素(16/22)及盐酸四环素(9/22)具有一定耐受性,这与先前的相关报道并不完全一致^[8],虽然分离株大部分源于生肉和即食性食品,但可能因使用抗生素使用频率及类别的不同导致耐药性有异。与质粒分布分析表明,不同来源的携带质粒菌株已出现较为严重的多重耐药特性^[9],其可能伴随着质粒转移等多种因素导致的耐药性上升^[10]。

在镉耐受性分析中,携带质粒的 *Lm* 菌株均对镉具有抵制性,且其中3株菌耐受性高达256 $\mu\text{g/mL}$,而这3株菌均携带质粒。而在 *Lm* 菌株与抵抗消毒剂的研究中,因质粒中编码的消毒剂抵制基因(*bcr ABC*)导致的敏感性低及抵制转移也逐渐受到关注^[5]。在苯扎氯铵敏感性检测中,3株 *Lm* 菌株对其产生较强的抵制性,且3株 *Lm* 菌均含有内源性质粒,由此可见,质粒中可能存在编码菌株某些重要功能的基因,从而影响其对化学消毒剂的作用效果^[5]。因此,我们通过噬菌体的裂解作用来分析其与化学杀菌剂的作用效用性,结果无论是否含有质粒,其菌株均能被噬菌体裂解,由此可见,噬菌体在杀菌效用中较抗生素及消毒制剂更具有优势。

4 结论

综上所述, *Lm* 菌株携带质粒与耐药、抵制重金属及消毒剂有一定相关性,其在食品生产及加工过程中已对外界环境产生一定的适应性,而这都有可能因其质粒的改变而发生变化,因此质粒中必然存在重要的功能基因或基因簇,随着研究的深入,我们将逐渐揭示李斯特菌质粒中的关键功能基因并为控制李斯特菌污染、致病性、噬菌体裂解及毒力研究提供重要的遗传信息,从而为李斯特菌的控制奠定基础。

参考文献

- [1] Vázquez-boland JA, Kuhn M, Patrick B, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J].

- Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(548): 584-640
- [2] 刘燕,汪永禄,陶勇,等.食品中产单核细胞增生李斯特菌污染状况的分析[J].现代预防医学,2009,36(15):2841-2843
LIU Yan, WANG Yong-lu, TAO Yong, et al. Analysis for *Listeria Monocytogenes* contamination statu in foods in maanshan [J]. Modem Preventive Medicing, 2009, 36(15): 2841-2843
- [3] www.foodmate.net/news/yujing/2008/12/129417.htmL <http://www.listeriablog.com/listeria-recalls/pennsylvanias-phillips-mushroom-farm-in-listeria-recall/>; <http://www.cbc.ca/canada/toronto/story/2010/07/31/meat-recall.html>; http://www.fsis.usda.gov/News_&_Events/Recall_029_2010_Release/index.asp
- [4] Elhahafid D, Dutta V, Kathariou S. Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *Listeria monocytogenes* strain from the 1998-1999 outbreak [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(24): 8231-8238
- [5] Katharios-Lanwermyer S, Rakic-Martinez M, Elhanafi D, et al. Coselection of cadmium and benzalkonium chloride resistance in conjugative transfers from nonpathogenic *Listeria* spp. to other *Listeriae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(21): 7549-7556
- [6] Jorgensen J H, Hindler J A, Bernard K, et al. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria [S]. Approved guideline-2nd edition. CLSI document M45-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2010, 30(18)
- [7] Ortiz S, López P, López V, Martínez-Suárez JV. Antibiotic susceptibility in benzalkonium chloride-resistant and -susceptible *Listeria monocytogenes* strains [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(7): 517-519
- [8] Bertsch D, Mueller M, Weller M, et al. Antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance gene transfer analysis of foodborne, clinical, and environmental *Listeria* spp. isolates including *Listeria monocytogenes* [J]. Microbiologyopen, 2014, 3(1): 118-127
- [9] Gómez D, Azón E, Marco N, et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment [J]. Food Microbiol., 2014, 42: 61-65
- [10] Mullapudi S, Siletzky R M, Kathariou S. Diverse cadmium resistance determinants in *Listeria monocytogenes* isolates from the Turkey processing plant environment [J]. Applied and Environment al Microbiology, 2010, 76(2): 627-630