

一株食源性多重耐药单核细胞增生李斯特菌的耐药性研究

李丽丽¹, 石磊^{1,2}, 何建华¹, 闫鹤¹, 孟赫诚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: 本研究对食品样本中分离的一株多重耐药单核细胞增生李斯特菌进行耐药机制的探讨, 以期对食源性单核细胞增生李斯特菌多重耐药现象的控制提供理论依据。本文通过聚合酶链式反应筛选耐药决定因子, 质粒消除及自然转化实验对耐药决定因子进行定位及传播能力的探讨, 最后通过传代实验验证该菌株多重耐药性传播的稳定性。结果表明, 对检测到的多重耐药菌株 LM78 (耐受氯霉素、红霉素、链霉素、四环素、复方新诺明) 进行相关耐药基因检测, 检测到 *cat*、*ermB*、*tetS* 3 个耐药基因。质粒消除后 MIC 值下降到敏感范围, 且该质粒可通过自然转化在不同菌属间传递, 说明这些耐药基因存在于质粒上。该质粒在无抗生素选择压力下连续传代, 仍具有较高稳定性。食源性致病菌多重耐药性有可能通过不同细菌种属间转移, 进而由食物链向人类传播, 对人类健康造成潜在的威胁。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌; 多重耐药性; 质粒

文章编号: 1673-9078(2015)7-105-110

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.018

Antibiotic Resistance of Foodborne Multidrug-resistant *Listeria monocytogenes*

LI Li-li¹, SHI Lei^{1,2}, HE Jian-hua¹, YAN He¹, MENG He-cheng¹

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

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

Abstract: The mechanism of antibiotic resistance in foodborne, multidrug-resistant (MDR) *Listeria monocytogenes* was investigated to develop measures to control the MDR phenomenon. Genetic factors of antibiotic-resistance were screened by polymerase chain reaction (PCR), the position and dissemination capacity of these factors were evaluated by plasmid curing and natural transformation, and the stability of drug-resistance dissemination was verified by consecutive subculture. The results showed that the MDR strain LM78 (resistant to chloramphenicol, erythromycin, streptomycin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole) carried the *cat*, *ermB*, and *tetS* genes. Following plasmid curing, the minimum inhibitory concentration (MIC) was reduced to the sensitive range. Moreover, the plasmid could be transferred between species by natural transformation. Plasmid curing and transformation results suggested that these resistance genes were encoded in the plasmid. After consecutive subculture without antibiotics, these plasmids remained sufficiently stable. The MDR trait of foodborne pathogens may be transferred between bacterial species, and subsequent infection in humans via contaminated food poses a potential threat against human health.

Key words: *Listeria monocytogenes*; multidrug-resistance; plasmid

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种革兰氏阳性人畜共患病原菌, 该菌可造成李斯特菌病, 症状主要表现为脑膜炎、败血症、肺

收稿日期: 2014-10-10

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 (2013ZB0015); 国家自然科学基金青年基金项目 (31201363); 广州市科技计划项目 (11C12080718)。

作者简介: 李丽丽 (1985-), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 食品安全

通讯作者: 孟赫诚 (1984-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品安全

炎、热性肠胃炎、流产、死胎等, 死亡率高达 30%。该菌在自然界分布极为广泛, 大多数食品如生肉类、牛奶、海产品、加工制品 (熟肉制品、奶酪、蔬菜沙拉及即食食品等) 很容易受到不同程度的污染^[1], 且该菌对各种应激 (低温、高盐、低 pH、氧化应激等) 条件有很强的耐受性, 进一步增大了对人类健康的危害性。上世纪 80 年代早期开始, 美国, 日本, 新西兰, 德国, 英国, 法国和其他欧洲国家已出现多次因食品污染爆发人李斯特菌病的报道, 目前我国还没有由该

菌引起的疾病爆发流行报道,但多年来该病在我国猪、羊、鸡、牛、兔等家畜家禽中仍有流行。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^[2]。

单核细胞增生李斯特菌多年以来被认为除了对老一代喹诺酮类、磷霉素和广谱头孢菌素类在体外具有天然抗性外,对临床使用的各种革兰氏阳性菌抗生素均敏感。但自从 1988 年法国分离出一株多重耐药单核细胞增生李斯特菌菌株以来^[3],在食物、环境和人类李斯特菌病例中相继分离出对一种或多种抗菌药物耐受的菌株^[4,5]。单核细胞增生李斯特菌能接受其他细菌传递的耐药基因,同时也可以通过移动性遗传元件(如转座子、质粒)将耐药基因转移传播到其它食源性细菌。单核细胞增生李斯特菌耐药基因大部分来源于肠球菌和链球菌,但其它革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌也都有可能通过接合转移将耐药基因传递给单核细胞增生李斯特菌^[6]。

单核细胞增生李斯特菌作为四大食源性致病菌之一,对公共卫生的威胁不仅仅在于其能引发高致死率的感染疾病,还在于该菌愈发严重的耐药性及其耐药性转移所带来的危害。目前,国内外学者多集中在对单核细胞增生李斯特菌的分离分型和耐药性分析,深入研究其耐药性的传播及耐药稳定性的研究报道较为鲜见。

本研究以在对食品样本中单核细胞增生李斯特菌分布的监测中分离到的一株单核细胞增生李斯特菌为研究对象,对其进行血清型,18种抗生素的耐药性分析及多重耐药机制的探讨,以期对单核细胞增生李斯特菌多重耐药现象的控制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 菌株

单核细胞增生李斯特菌 LM78,分离自某品牌速冻米面制品^[1]。

药敏质控菌株 *Staphylococcus aureus* ATCC25923、*Escherichia coli* ATCC25922 和 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC2LM7853,实验室保藏。

质粒消除对照菌株 *Listeria monocytogenes* ATCC 19115,实验室保藏。

自然转化受体菌 *Streptococcus mutans* strain UA159,实验室保藏。

质粒大小对照菌株 *Escherichia coli* V517(含有 8 个不同大小的质粒,其大小依次为:54 kb、7.2 kb、

5.6 kb、5.1 kb、3.9 kb、3.0 kb、2.7 kb 和 2.1 kb),*Escherichia coli* J53/R1(携带一个大小为 92 kb 的质粒)和 *Escherichia coli* J53 由上海华山医院抗生素研究所王明贵教授惠赠。

1.2 培养基和主要试剂

脑-心浸液肉汤(Brain Heart Infusion Broth, BHI)培养基,琼脂粉,广东环凯微生物科技有限公司;水解酪蛋白(Mueller-Hinton, MH)肉汤培养基,英国 Oxoid 公司;单增李斯特菌分型血清(日本デンカ生研株式会社)。抗生素纸片(杭州微生物试剂有限公司)。脱氧核糖核酸(DNA)提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司);Taq DNA 聚合酶、dNTP、10×PCR 反应缓冲液;溶菌酶、蛋白酶 K(德国 Sigma 公司)、电泳级琼脂糖(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 血清学分型

参照单增李斯特菌诊断血清使用说明书,O 抗原采用玻片凝集法,H 抗原采用试管凝集法。

1.4 药敏试验

选择目前临床用药和兽药共 18 种抗生素。采用美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute of America, CLSI-2012)推荐的微量肉汤稀释法测试对氨苄西林(AMP),氨苄西林-舒巴坦(AMP-SUL),盘尼西林(PEN),头孢噻吩(CEP),头孢噻肟(CEF),亚胺培南(IMI),环丙沙星(CIP),莫西沙星(MOX),左氧氟沙星(LEV),四环素(TET),强力霉素(DOX),红霉素(ERM),庆大霉素(GEN),万古霉素(VAN),利福平(RIF),氯霉素(CHL),链霉素(STR),复方新诺明(TMP)的耐药能力,根据 CLSI 的标准(2012)可分为耐药,中介,敏感^[7]。

1.5 耐药基因检测

针对单核细胞增生李斯特菌 LM78 的耐药表型,本实验检测其对氯霉素耐药基因 *cat*,链霉素耐药基因 *aad6*、*str*,红霉素耐药基因 *ermB*、*ermC*,四环素耐药基因 *tetM*、*tetS*,甲氧苄啶耐药基因 *dhfrD* 以及多重耐药泵基因 *mdtA* 共 9 种耐药基因。对扩增出的耐药基因设计引物进行耐药基因全长序列的扩增,目的基因序列引物,氯霉素耐药基因 *cat* 全长序列引物 *catI*,红霉素耐药基因 *ermB* 全长序列引物 *ermBI*,四环素耐药基因 *tetS* 全长分段序列引物 *tetSI*, *tetSII*,和产物长度见表 1。

表 1 PCR 所用的引物

Table 1 Primers used in polymerase chain reaction (PCR)

目的基因	Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	产物长度/bp	文献来源
<i>cat</i>	cat-F	GAACAGGAATTAATAGTGAG	384	[8]
	cat-R	GGTAACCATCACATAC		
<i>tetM</i>	tetM-F	GAACCTCGAACAAGAGGAAAGC	740	[6]
	tetM-R	ATGGAAGCCCAGAAAGGAT		
<i>tetS</i>	tetS-F	AATGCGGCAAGGTATTGTT	9	[9]
	tetS-R	CCCACAATTACTGTCTCCCAT		
<i>ermB</i>	ermB-2F	GAAAAGGTACTCAACCAATA	636	[10]
	ermB-2R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC		
<i>ermC</i>	ermC-F	TCAAAACATAATATAGATAAA	641	[8]
	ermC-R	GCTAATATGTTTAAATCGTCAAT		
<i>aad6</i>	aad6-F	AGAAGATGTAATAATATAG	9	[8]
	aad6-R	CTGTAATCACTGTTCCCGCCT		
<i>dfpD</i>	dfpD-F	AGAGTAATCGGCAAGGATAACG	199	[8]
	dfpD-R	AATGGGCAATTTACAATCC		
<i>str</i>	str-F	ACACCCTTTGCTACAT	275	GenBank: X92946.1
	str-R	TTATTCACCTGATT		
<i>mdtA</i>	mdtA-F	GATGATATCGATGACAATGCAATGATGG	1879	[11]
	mdtA-R	TTCCAGATCGATATCAAACCTGACTGTG		
<i>catI</i>	cat2-F	CGTTAAGAGGTGACACAATA	862	GenBank: JQ922409
	cat2-R	GAATAAATCAGTCCATAAGTT		
<i>ermBI</i>	erm3F	TGGAAATAAGACTTAGAAGCA	1095	GenBank: JX535233
	erm3R	AATTTACAAAAGCGACTCATA		
<i>tetSI</i>	tet4F	TAAATCGTTATTAAATCGCTGAA	2157	GenBank: AB290882.1
	tet4R	AATGAGAATGACCTCGTTACCTT		
<i>tetSII</i>	tet5F	AGAGTTATTAGAGCCATATC	675	GenBank: JX865374
	tet5R	CACTTATTTCTTATAAAGG		

1.6 质粒消除实验

使用 Qiagen 质粒中提试剂盒对单核细胞增生李斯特菌 LM78 进行质粒 DNA 提取。质粒大小参照采用 Quantity-one 软件对提取的质粒与 *E. coli* V517 及 *E. coli* J53/R1 所携带的质粒进行比较, 以确定其分子量大小。

参考文献^[12], 采用高温-新生霉素结合消除法对单核细胞增生李斯特菌 LM78 进行质粒消除试验。用接种环从平板上挑取单菌落于 3 mL BHI 液体培养基中, 37℃ 恒温摇床中过夜培养; 用移液枪取 30 μL 过夜培养物稀释到 3 mL 含亚抑菌浓度新生霉素(0.25 mg/L) 的 BHI 液体培养基中, 40℃ 水浴摇床(180 r/min) 培养 24 h; 连续传代: 每 12 h 取培养物稀释到含新生霉素的新鲜 BHI 液体培养基中, 每次传代接种量均为 1%; 将传代 10 次、16 次后的菌液进行 10 倍浓度梯度稀释,

取 100 μL 稀释液涂布于 BHI 平板(涂 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 4 个稀释梯度的菌液), 37℃ 过夜培养; 随机挑选平板上长出的 100 个单菌落, 用灭菌牙签将单菌落同时转板至 3 种不同的 BHI 抗性平板(3 种抗性平板分别含 50 μg/mL 氯霉素, 8 μg/mL 四环素, 10 μg/mL 红霉素)。每种抗性平板均用 LM78 原始菌株、*Listeria monocytogenes* ATCC 19115 分别作为阳性、阴性对照; 挑选在 3 种 BHI 抗性平板上生长情况不同的若干单菌落, 进行质粒提取、耐药基因菌落 PCR 验证。

采用微量肉汤稀释法对质粒消除前后进行抗生素敏感性试验, 以确定其 MIC 值变化。以单核细胞增生李斯特菌 LM78 原始菌株作为对照, 随机挑选经过质粒消除步骤后在抗性平板上能生长、不能生长的 10 个单菌落进行测定。所测试抗生素为单核细胞增生李斯特菌 LM78 耐药的氯霉素、红霉素、链霉素、卡那霉素、四环素、复方新诺明、克林霉素、米诺环素

及单核细胞增生李斯特菌 LM78 敏感的庆大霉素。

1.7 自然转化实验

参照文献^[9], 以 *Streptococcus mutans* strain UA159 作为受体菌, 用 3 种抗性平板 (分别含 50 μg/mL 氯霉素, 8 μg/mL 四环素, 10 μg/mL 红霉素) 进行转化子的筛选。转化子的验证采用 PCR 扩增 *cat*, *ermB*, *tetS* 耐药基因并测序。

1.8 无抗生素选择压力下耐药性的稳定性评价

参考文献进行^[13], 具体步骤如下:

(1) 将单核细胞增生李斯特菌 LM78 在不含抗生素的 BHI 液体培养基中进行连续传代, 传代接种量为 1:100 (即取 30 μL 培养物稀释到 3 mL 新鲜 BHI 液体培养基中), 传代培养条件为 37 °C, 180 r/min, 每 12h 传代接种一次。将传代 400 代所得的菌液进行 10 倍浓度梯度稀释后涂布于 BHI 平板;

(2) 用灭菌牙签随机挑取平板上长出的 100 个单菌落, 同时转至 3 种 BHI 抗性平板;

(3) 对长出的菌落提取质粒验证。

1.9 序列的上传

将获得的 *cat*、*ermB*、*tetS* 全长序列上传至美国国家生物技术信息中心 DNA 数据库 GenBank 上, 获得登录号(accession number)分别为 JQ922409.1, JX535233.1, JX865374.1。

2 结果与分析

2.1 血清型及药敏试验结果

血清型测试发现单核细胞增生李斯特菌 LM78 为 1/2c, 同时耐受氯霉素、红霉素、链霉素、四环素、复方新诺明, 对其它药物均敏感。

2.2 耐药基因检测结果

采用 PCR 方法扩增出 3 种耐药基因 *cat*、*ermB*、*tetS*, 见图 1。PCR 没有检测到链霉素相关抗性基因 (*aad6*、*str*)及氧苄啶相关抗性基因(*dfiD*), LM78 对链霉素抗性可能是由核糖体突变产生。

cat 所测序列全长 862 bp, 在 NCBI GenBank 中进行 Blast 比对, 发现序列与登录号为 X92946.1 的乳乳球菌(*Lactococcus lactis*)中报道的 *cat* 基因核苷酸序列同源性为 100%。与单核细胞增生李斯特菌中报道

的 *cat* 基因序列(登录号: X68412.1)同源性为 99%, 有 6 个碱基差异(T336→A, T88→C, C801→A, A802→T, G815→T, 819 缺失 G), 其中有一处天冬氨酸→谷氨酸 (GAU→GAA)的有义突变。

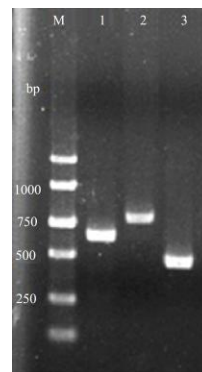


图 1 耐药基因 *cat*, *ermB*, *tetS* PCR 结果

Fig.1 PCR Result of *cat*, *ermB*, *tetS* gene screening

注: M: Marker; 1: *ermB*; 2: *tetS*; 3: *cat*。

ermB, 所测序列全长 1095 bp, 在 NCBI GenBank 中进行 Blast 比对, 发现序列与登录号为 AB290882.1 的格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)中报道的 *ermB* 基因核苷酸序列同源性为 100%。目前 GenBank 中还没有单核细胞增生李斯特菌中 *ermB* 序列的报道。

tetS 两对引物扩增片段大小分别为 2157 bp、675 bp, 拼接后的全长序列为 2696 bp, 在 NCBI GenBank 中进行 Blast 比对, 发现序列与登录号为 JN208881.1 的粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、GQ900487.1 的屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、EF682210.1 的缺乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)、AB290882.1 的格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)中报道的 *tetS* 同源性为 100%。与单核细胞增生李斯特菌中报道的 *tetS*(登录号: L09756.1)有 4 个碱基差异(非编码区)。

2.3 质粒消除实验结果

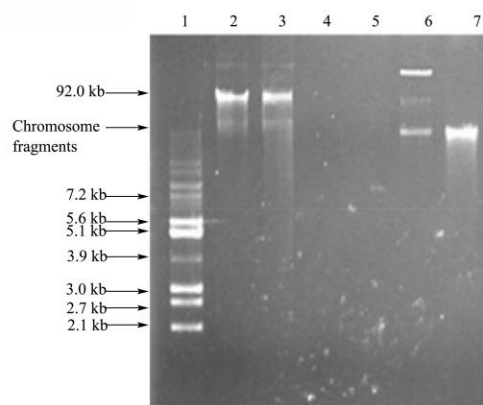


图 2 LM78 及 *S. mutans* 转化子的质粒图谱

Fig.2 Plasmids patterns of LM78 and *S. mutans* transformant

注: 1: *E. coli* V517; 2: LM78; 3: *S. mutans* 转化子; 4:

LM78 质粒消除株 1; 5: LM78 质粒消除株 2; 6: *E. coli* J53/R1; 7: *E. coli* J53.

对 LM78, *S.mutans* 转化子及 LM78 消除株质粒提取, 凝胶电泳显示 LM78 及 *S.mutans* 转化子含有一个大小约 85.3-kb 的质粒, LM78 消除株质粒成功消除, 见图 2。

在含亚抑菌浓度新生霉素(0.25 mg/L)的 BHI 液体培养基中, 40 °C 条件下培养。连续传代 10 次, 在平板上随机挑选的 50 个单菌落中, 得到 3 种抗性均被消除的 2 个单菌落(在氯霉素/红霉素/四环素平板上均不能生长)。对这 2 株菌进行质粒提取验证发现 85.3-kb 质粒已经被消除(图 2)。测定菌株质粒消除前后抗生素 MIC 值的变化, 结果显示单核细胞增生李斯特菌 LM78 质粒消除前后 MIC 值变化明显, 质粒消除子对

所氯霉素、红霉素、四环素 MIC 值均明显降低, 下降到敏感范围(表 2), 表明 LM78 对氯霉素, 红霉素, 四环素耐药性由质粒介导。进一步 PCR 验证发现, 质粒消除株已不能扩增出相应的 *cat*、*ermB*、*tetS* 基因。此外, 消除子对克林霉素、链霉素、米诺环素、复方新诺明的 MIC 值也均下降到敏感范围, 表明 *cat*(氯霉素), *ermB*(红霉素、克林霉素), *tetS*(四环素、米诺环素)3 个耐药基因消除的同时, 单核细胞增生李斯特菌 LM78 对其他抗生素(链霉素、复方新诺明)的抗性也随着质粒消除而被消除了, 表明单核细胞增生李斯特菌 LM78 对链霉素、复方新诺明的抗性决定因子有可能也存在于被消除的质粒上, 或质粒消除改变了单核细胞增生李斯特菌 LM78 中某些基因的表达, 其具体机制尚待进一步研究。

表 2 单核细胞增生李斯特菌 LM78 质粒消除前后对 9 种抗生素 MIC 值对比 ($\mu\text{g/mL}$)

Table 2 The MIC of nine antimicrobials for LM78 and the two cured derivatives

抗生素种类	CHL	TET	MIN	ERY	STR	TMP	KAN	CLI	GEN
LM78	128	32	1	32	64	64	32	16	0.125
质粒消除株 1	8	1	0.0625	0.125	2	1	1	0.25	0.125
质粒消除株 2	8	1	0.0625	0.125	2	1	1	0.25	0.125

2.4 自然转化实验结果

从菌株 LM78 中提取的质粒通过自然转化试验, 被成功转移至 *S.mutans* UA159 中。转化子经含 50 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素, 8 $\mu\text{g/mL}$ 四环素, 10 $\mu\text{g/mL}$ 红霉素的 BHI 琼脂平板分别进行筛选, 转化子获得氯霉素, 红霉素, 四环素耐药性。通过质粒提取显示转化子中含有一个 85.3 kb 质粒(图 2), PCR 及测序验证其含有 *cat*、*ermB* 及 *tetS* 基因。本实验说明 *cat*、*ermB* 及 *tetS* 基因存在于质粒上, 单核细胞增生李斯特菌 LM78 多重耐药质粒存在转移至人类致病菌中, 并在其中介导多重耐药性的风险。

2.5 耐药性的稳定性评价实验结果

将单核细胞增生李斯特菌 LM78 在不添加抗性选择压力的 BHI 液体培养基中连续传代 400 代后, 随机挑选的 100 个单菌落在 3 种抗性(氯霉素、红霉素、四环素)平板上均正常生长, 且质粒条带没有发生变化, 表明没有添加相应抗生素选择压力的情况下, 单核细胞增生李斯特菌 LM78 编码氯霉素、红霉素、四环素抗性的耐药性质粒仍然具有很强的稳定性, 并没有在频繁传代过程中丢失。

3 结论

3.1 目前为止, 已不断有从临床和食品、环境中分离

到多重耐药单核细胞增生李斯特菌的报道。单核细胞增生李斯特菌对氯霉素耐药是通过获得 *cat* 基因, 对红霉素耐药是通过获得 *ermB*、*ermC* 基因, 对四环素耐药为获得 *tetM*、*tetS*、*tetL*^[14-15]。在临床菌株中已发现一株多重耐药单核细胞增生李斯特菌含 *cat221*、*erm(B)*、*aad6*、*tet(S)* 及一株含 *cat221*、*erm(B)*、*tet(S)*^[15]。食品分离株中同时检测到多种耐药基因尚属罕见。本研究从食品中分离到的单核细胞增生李斯特菌含有大型质粒, 同时检测到 *cat*、*ermB*、*tet(S)* 基因, 且 *cat*、*tet(S)* 序列有突变。*cat* 通过编码的氯霉素乙酰转移酶使细菌对氯霉素耐药。*ermB* 基因编码 23S rRNA 甲基转移酶通过改变大环内酯类-林可胺类-链阳菌素 B 结合位点使细菌产生对大环内酯类(如红霉素)、林可霉素类(如克林霉素)、链阳菌素 B 的交叉耐药, 即 MLS_B 表型。*ermB* 基因主要存在于耐 MLS_B 的葡萄球菌、链球菌和肠球菌中。研究表明, *ermB* 基因通常位于转座子 Tn917、Tn1545 上, 携带有 *ermB* 的 Tn917、Tn1545 能在不同菌属内外传播^[15]。*tetS* 与 *tetM*、*tetO* 相似, 通过编码的核糖体保护蛋白(RPPS)与核糖体结合, 从而阻止了四环素对细菌蛋白合成的抑制作用而产生耐药性。*tetS* 最早即发现于一株临床多重耐药单核细胞增生李斯特菌(LMBM4210)^[13], 随后陆续有在肠球菌、链球菌等检测到 *tetS* 的报道^[16-17]。研究表明, 单核细胞增生李斯特菌主要是通过获得两种可移动的基因元件质粒、接合型转座子(Tn916-Tn1545)携带抗生

素耐药基因(如 *tet*、*cat221*、*ermB*、*aad6* genes 等)而产生耐药,且这些质粒和接合型转座子在肠球菌和链球菌中普遍存在,并能在肠球菌、链球菌和李斯特菌内部及各菌之间传递,人类和动物的肠道被认为是单核细胞增生李斯特菌从链球菌和肠球菌获得可移动质粒和接合型转座子的场所^[14]。

3.2 本研究中的单核细胞增生李斯特菌分离自冷冻食品,具有多重耐药性,由质粒介导,能够在不同菌属间水平转移,且在传代中较稳定。食源性多重耐药单核细胞增生李斯特菌的出现无疑会给食品安全带来危害,因此应加强对各种来源的李斯特菌的耐药性监测及耐药机制研究,从基因水平全面监测细菌多重耐药情况,研究可能的耐药机制,从而为制定相应预防控制策略提供理论依据。

参考文献

- [1] Yan H, Neogi S B, Mo Z, et al. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005-2007 [J]. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, 144(2): 310-316
- [2] 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
- [3] Poyart-Salmeron C, Carlier C, Trieu-Cuot P, et al. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* [J]. *The Lancet*, 1990, 335(8703): 1422-1426
- [4] Rahimi E, Yazdi F, Farzinezhadizadeh H. Prevalence and antimicrobial resistance of *listeria* species isolated from different types of raw meat in Iran [J]. *J. Food Prot.*, 2012, 75(12): 2223-2227
- [5] Derra F A, Karlsmose S, Monga D P, et al. Occurrence of *Listeria* spp. in retail meat and dairy products in the area of Addis Ababa, Ethiopia [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2013, 10(6): 577-579
- [6] Brenciani A, Bacciaglia A, Vecchi M, et al. Genetic elements carrying *erm(B)* in *Streptococcus pyogenes* and association with *tet(M)* tetracycline resistance gene [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(4): 1209-1216
- [7] Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [S]. American National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2012
- [8] Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(6): 2728-2731
- [9] Wang H H, Manuzon M, Lehman M, et al. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes [J]. *FEMSMicrobiol. Lett.*, 2006, 254(2):226-231
- [10] Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(11): 2562-2566
- [11] Perreten V, Schwarz F V, Teuber M, et al. Mdt(A), a new efflux protein conferring multiple antibiotic resistance in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(4): 1109-1114
- [12] Romanova N A, Wolffs P F, Brovko L Y, et al. Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72(5): 3498-3503
- [13] Li X, Alvarez V, Harper W J, et al. Persistent, toxin-antitoxin system-independent, tetracycline resistance-encoding plasmid from a dairy *Enterococcus faecium* isolate [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77(20): 7096-7103
- [14] Morvan, C Moubareck, A Leclercq, et al. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Humans in France [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 54(6): 2728-2731
- [15] 闫鹤,陈妙瑞,石磊.食源性单核细胞增生李斯特菌四环素、红霉素耐药基因研究[J].*现代食品科技*,2010,26:772-775
YAN He, CHEN Miao-Rui, SHI Lei. Tetracycline and Erythromycin Resistant Genes in Foodborne *Listeria monocytogenes* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 26: 772-775
- [16] Carl Novais, Ana R Freitas, Eduarda Silveira, et al. Different Genetic Supports for the *tet(S)* Gene in Enterococci [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(11): 6014-6018
- [17] Barile S, Devirgiliis C, Perozzi G, et al. Molecular characterization of a novel mosaic *tet(SM)* gene encoding tetracycline resistance in foodborne strains of *Streptococcus bovis* [J]. *Microbiology*, 2012, 158, 2353-2362