

2013-2014 年北京市顺义区熟肉制品中单核细胞增生李斯特氏菌致病因子检测分析

李长青*, 邵占涛*, 李颖, 王彦波, 王园园, 朱美娟

北京市顺义区疾病预防控制中心, 北京 101300

摘要:目的: 用PCR方法检测熟肉制品中单核细胞增生李斯特氏菌致病因子, 为顺义区熟肉食制品中单增李斯特氏菌污染危害风险评估提供依据。**方法:** 利用细菌培养法从熟肉制品监测样本中分离单增李斯特氏菌, PCR检测阳性菌株的16sRNA、侵袭蛋白P60、李氏溶血素、迟发型超敏反应蛋白等致病因子。**结果:** 180件食品样本共分离出6株单增李斯特氏菌; 通过PCR检测致病因子, 6株细菌都检出16sRNA和迟发型超敏反应蛋白的目的基因, 5株检出李氏溶血素和侵袭蛋白目的基因, 各引物检测目的基因敏感性略有差异。**结论:** 顺义区熟肉制品中单核细胞增生李斯特氏菌污染较为严重, 83.33% (5/6) 菌株携带李氏溶血素、侵袭蛋白P60等致病因子

关键词:单核细胞增生李斯特氏菌; 致病因子; 李氏溶血素; 侵袭蛋白P60

PCR analysis for virulence genes of *Listeria monocytogenes* in delicatessen in Shunyi District, Beijing, from 2013 to 2014.

LI Chang-qing, SHAO Zhang-tao, LI Ying, WANG Yan-bo, WANG Yuan-yuan, ZHU Mei-juan

Shunyi District Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China. 101300

Abstract:Objective: In this paper, PCR analysis were used to detect the virulence genes of *Listeria monocytogenes* in delicatessen in order to provide scientific evidence for risk assessment in Shunyi District of Beijing from 2013 to 2014. **Methods:** Delicatessen was collected randomly from markets, the isolation of *Listeria monocytogenes* was performed according to the GB/T 4789.30-2010. At the same time, the genes of 16sRNA, hlyA, ipa60, dth-18 were detected in the isolates. **Results:** A total of 6 *Listeria monocytogenes* were isolated from 180 samples. The genes of 16sRNA and dth-18 were found in all the isolates and hlyA and ipa60 were found in 5 of them. The sensitivity of these primers was different slightly. **Conclusions:** The results indicated that the delicatessen in markets of Shunyi District was contaminated by *Listeria monocytogenes* to a certain extent. 83.33% (5/6) isolates were hlyA⁺/ipa60⁺ strains.

Key words:*Listeria monocytogenes*; virulence genes; hlyA; ipa60

单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes* 以下简称单增李斯特氏菌) 已成为危害食品行业的一种重要致病菌。与其他致病菌相比, 有着独一无二的生物学特性, 可以在不同条件下生长。例如: 2-4℃其可以生长, 在-18℃冻融多次仍可以存活, 最适生长温度为 30-37℃, 可忍受 44℃ 高温; 忍受较宽 PH 值范围 (PH4.5-9.6); 具有兼性厌氧和亲盐的特性, 生长不受氧气缺乏和高浓度 NaCl (20%) 的限制^[1]; 此菌在水中和土壤中亦可生长, 延伸至各种表面如不锈钢、玻璃、橡胶等

[2]。在单增李斯特氏菌污染的案例中，肉与肉制品、乳制品和即食海产品都比较常见。人类感染单增李斯特氏菌后具有严重的临床症状和高病死率[3]，所以医疗机构已开始大量关注其所带来的公共卫生问题。李斯特菌病的临床症状不但包括胃肠症状、发热症状，而且具有中枢神经趋向性，可引起脑膜炎、脑脊髓炎以及肿块的形成。北京市顺义区将单增李斯特氏菌纳入熟肉制品污染致病因子监测的常规必检项目。2013年1月至2014年6月共监测样本180件，为深入研究本地区单增李斯特氏菌的致病因子，我们采用PCR方法分别对单增李斯特菌的16sRNA、LLO李氏溶血素、侵袭蛋白P60、迟发型超敏反应蛋白^[4-5]进行了基因检测与分析。现将检测结果汇总并加以分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 监测食品 来自顺义区各大型超市的熟肉制品共计180件，包括火腿、猪肝、猪头肉、自制肠、肚丝等，按照每月10件送至实验室进行分离培养。

1.1.2 培养基和耗材 李氏增菌肉汤 LB1/LB2（北京陆桥）；PALCAM 琼脂（北京陆桥）；TSA-YE 琼脂（北京陆桥）；李斯特显色培养基（法国科玛嘉）；生化鉴定 GP 卡（梅里埃）；PCR 扩增体系液 Premix TaqTM Version2.0（日本 TaKaRa）；致病因子扩增引物（上海生工）。

1.1.3 标准菌株 单增李斯特菌 CICC21633（阳性对照）；大肠埃希菌 CICC10389（阴性对照）。购自中国工业微生物菌株保藏中心。

1.2 方法

1.2.1 分离培养

将采样食品 25 g 在 225 ml LB1 中 30℃ 匀质增菌培养 24h，取 0.1 ml 转入 LB2 中继续 30℃ 二次增菌培养 24 h，转种李斯特显色培养基和 PALCAM 培养基分离培养 48 h，挑取典型菌落接种 TSA-YE 琼脂 30℃ 培养 24 h，通过 GP 细菌鉴定卡生化鉴定，阳性菌株-70℃ 冻存。

1.2.2 致病因子 PCR 检测

针对单增李斯特氏菌的致病因子的特异性与敏感性，我们选择 7 对引物检测单增李斯特的 4 个靶基因，包括李氏溶血素 LLO 的 hlyA 基因引物 3 对（FM1/FM2、LMA/LMB、HA1/HA2），侵袭蛋白 P60 的 iap 基因引物 2 对（LAP1/LAP2、MonoA/LisB），李斯特菌属 16sRNA 基因引物 L II/U1，迟发超敏反应蛋白的 Dth-18 基因引物（A1/A2）；反应体系液选用 TaKaRa 公司 Premix TaqTM Version2.0 50μl 体系，其中上下游引物各 1μl（10μmol），模板 DNA 2μl；细菌 DNA 采用煮沸裂解法获得；扩增条件参数为预变性 95℃ 5min，变性 95℃ 30s、退火 45s（各引物退火温度略有差异）、延伸 72℃ 45s、35 个循环，72℃ 最后延伸 5min，采用毛细管电泳进行产物分析。

2. 实验结果

2.1 细菌培养结果

在 180 件熟肉制品样本中成功分离单增李斯特氏菌阳性样本 6 件。阳性率 3.33%。由于熟肉制品大多即买即食，所以人群暴露于单增李斯特氏菌感染几率较大。

2.2 致病因子 PCR 检测结果

PCR 检测 6 株单增李斯特氏菌致病因子，阳性菌致病因子 PCR 检测产物浓度见表 1。可见李斯特菌属 16sRNA 与迟发型超敏反应蛋白 Dth-18 基因均为阳性；李氏溶血素检出阳性 5 株，阴性 1 株；侵袭蛋白 P60 的 iap 基因检测中，LAP1/LAP2 引物的检出阳性样本 5 件，阴性样本 1 件，MonoA/LisB 引物未能扩增成功，结果均为阴性。

表 1：阳性菌致病因子 PCR 检测产物浓度表

细菌名称及编号	来源食品	PCR 扩增结果（产物浓度值 conc）						
		hlyA			iap		16sRNA	迟发超敏反应蛋白
		FM1/FM2	LMA/LMB	HA1/HA2	LAP1/LAP2	MonoA/LisB	L11/U1	A1/A2
单增李斯特 2013-1-6	广味香肠	0	0	0	0	0	2.03	0.28
单增李斯特 2013-14-1	里脊	3.61	3.88	0.36	0.73	0	3.44	4.10
单增李斯特 2013-14-7	牛筋	0.11	2.06	0.42	0.43	0	2.56	2.04
单增李斯特 2014-2-4	地方肠	0.49	3.23	0.42	0.33	0	1.88	0.33
单增李斯特 2014-5-8	地方肠	0.34	1.24	0	0.15	0	2.33	1.27
单增李斯特 2014-5-10	酱鸭胗	3.85	4.14	0.47	0.88	0	2.32	4.54
阳性对照 CICC21633		2.66	2.30	0.53	0.62	0	2.84	3.94
阴性对照 CICC10389		0	0	0	0	0	0	0

4. 讨论

李氏溶血素（LLO）是单增李斯特氏菌最重要的毒力因子，可帮助单增李斯特氏菌逃离吞噬细胞，由 hlyA 基因表达。和大多数革兰阳性菌产生的毒素一样，LLO 是一种结合胆固醇、活化巯基的细胞溶解素^[6]。这些细胞溶解素可以由于氧化作用或在胆固醇、抗溶血素抗体存在的条件下被抑制。在本次针对 LLO 检测的三对引物中只有 HA1/HA2 出现一份样本未能扩增成功，比较另外两对基因的产物浓度，可以看出“单增李斯特 2014-5-8”是产物浓度是最低的，所以这一样本未能成功扩增可能与 DNA 模板浓度过低没有达到最低检测阈值限有关，三对引物在扩增这一基因时体现了较好的一致性。侵袭性蛋白 P60 由 iap 基因编码，与单增李斯特氏菌的侵染有关^[7-9]，李斯特菌属都具有这一蛋白，但不同菌种 P60 中间区域序列具有特异性，是鉴定种的良好目的基因。在侵袭蛋白 P60 的 iap 基因检测中，LAP1/LAP2 引物的检出阳性样本 5 件，阴性样本 1 件，阳性结果的产物浓度均较低，这证明 iap 基因的检测敏感性弱于 hlyA 基因。MonoA/LisB 引物未能扩增成功，结果均为阴性，这表明 MonoA/LisB 引物扩增敏感性弱于 LAP1/LAP2 引物，要求的 DNA 模板起始浓度更高，但因为其目的基因长度明显高于 LAP1/LAP2 引物，所以在更深层次研究侵袭蛋白 P60 时，我们应该更加关注这对引物的使用。结合致病因子 PCR 检测结果与细菌培养生化鉴定结果可以证实，

我区分离到的 6 株细菌均为单增李斯特菌，其中 1 株细菌未能检出李氏溶血素 LLO 和侵袭蛋白 P60 的目的基因，这可能是基因缺失或序列突变造成的。

顺义区熟肉制品监测中单增李斯特氏菌的阳性分离率达到 3.33%，这表明食用熟肉制品存在较高单增李斯特氏菌感染风险。通过检测我区熟肉制品中分离出来的单增李斯特氏菌致病因子，可以发现，这些单增李斯特氏菌 83.33% 带有溶血毒素和侵袭蛋白，增加了单增李斯特氏菌作为食源性致病菌所存在的危险程度。今后我们应该加强食品中单增李斯特氏菌的监测工作，尤其在食品的加工销售环节中进行跟踪采样，寻找单增李斯特氏菌的污染环节。另外我们应加强致病因子的检测能力，从食品增菌环节直接进行 PCR 检测，增加致病因子监测的敏感性。

参考文献:

- [1] Cooper J, Walker RD. Listeriosis J]. *Vetclin North Am Food An-imPract*, 1998, 14(1): 113-125.
- [2] 邹运明,邹丽红,任艳红,等.单核增生性李斯特杆菌感染和李氏溶血素[J].*中国农业大学学报*,2006,37(1): 120-124.
- [3] 徐伟,李素芳,刘军,等.PCR 技术检测单核细胞增生李斯特氏菌研究进展[J].*生物技术通报*,2008,1: 95-99.
- [4] 王海燕,刘中学,刘虹,等.食品中单增李斯特氏菌 PCR 检测方法所用引物的特异性比较[J].*检验检疫科学*,2007, 6: 3-7.
- [5] Palmer M. The family of thiol-activated,cholesterol-binding cytoosins[J].*Toxicon*. 2001, 39(11): 1681-1689.
- [6] Zhou XH, Jiao XN. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* using oligonucleotide primers targeting actA gene[J].*Food Control*,2005,43 (2):125-130.
- [7] 张晓峰,李爱云,方维焕 ,等.多重聚合酶链反应鉴别单核细胞增生李斯特菌的研究[J].*中华检验医学杂志*,2003, 26(2): 93-95.
- [8] Klein PG,JunejaVK. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(11):4441-4448.
- [9] Burtscher C,Wuertz S. Evaluation of the use of PCR and reverse transcriptase PCR for detection of pathogenic bacteria in biosolids from anaerobic digestors and aerobic composters[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(8): 4618-4627.