

李斯特菌毒力因子及其进化

陈健舜, 江玲丽, 方维焕*

(浙江大学动物预防医学研究所 浙江省动物预防医学重点实验室 杭州)

摘 要 李斯特菌属包含 6 个种, 毒力各有差异。在细菌耐受外界环境、黏附侵袭及细胞内感染过程中, 毒力因子各司其职又相互协作。毒力基因常聚集为毒力岛, 其中 PrfA 依赖型毒力基因簇 (LIPI-1) 与内化素岛 (LIPI-2) 是致病种最重要的两个毒力岛。李斯特菌各个种可能来源于同一个携带有完整毒力岛的祖先, 在长期进化过程中, 通过基因水平转移或重组、整合等事件, 演化为目前流行的 6 个种。噬菌体、转座子、质粒等可能扮演着毒力进化执行者的角色。一些天然非典型菌株是目前研究的热点, 如含有 LIPI-1 的无害李斯特菌和缺失 LIPI-1 的塞氏李斯特菌, 其演化进程可能尚未达到或已超越目前流行的状态, 为李斯特菌毒力进化的研究提供了重要线索。

关键词 李斯特菌, 毒力因子, 毒力进化, 非典型菌株

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)04-0738-05

李斯特菌属 (*Listeria*) 细菌为短小的革兰氏阳性无芽孢兼性厌氧杆菌, 对外界环境耐受性较强, 可在较高的盐浓度 (10% NaCl) 以及宽泛的 pH (pH4.5 ~ 9) 和温度范围 (0 ~ 45°C) 内生长^[1-3]。李斯特菌常生活于土壤、河水、植物、屠宰场废弃物及动物源食品中 (肉、奶及其制品、海产品等)^[1]。根据基因组序列、毒力及分解糖的能力, 可将其分为 6 个种, 即单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌)、无害李斯特菌 (*Listeria innocua*)、伊氏李斯特菌 (*Listeria ivanovii*)、塞氏李斯特菌 (*Listeria seeligeri*)、威氏李斯特菌 (*Listeria welshimeri*) 和格氏李斯特菌 (*Listeria grayi*)。其中伊氏李斯特菌又包括伊氏亚种 (subsp. *ivanovii*) 和伦氏亚种 (subsp. *londoniensis*)、格氏李斯特菌包括格氏亚种 (subsp. *grayi*) 和默氏亚种 (subsp. *murrayi*)^[4,5]。

单增李斯特菌是重要的食源性人兽共患病原菌, 可引发胃肠炎、败血症、脑膜脑炎和流产等^[6], 2000 年即被 WHO 食品安全工作计划列为必检的食源性致病菌之一, 其危害严重性可见一斑。伊氏李斯特菌主要引起动物的感染, 特别是反刍兽, 常表现为败血症和流产, 但不引起脑炎^[7]。无害李斯特菌^[8]、塞氏李斯特菌^[9]和格氏李斯特菌^[10]虽也曾有引起人严重菌血症、化脓性脑膜炎和眼结膜炎的报道, 但很罕见, 一般被认为是非致病菌。其中, 无害李斯特菌常伴随单增李斯特菌出现, 被视为后者的指示菌。

李斯特菌属的基因组长度为 2.7 ~ 3.0 Mb, 约编码 2800 个蛋白^[3], 其中 65% 已探明功能。该属 G + C 含量低, 与芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌属、肠球菌属、链球菌属、葡萄球菌属、乳球菌属、乳杆菌属的亲缘关系较近^[11]。李斯特菌致病种的毒力基因常聚类于毒力岛, 如单增李斯特菌共有 100 个大小不等的毒力岛^[3]。Schmid 等^[12]通过对 *iap*、16S rRNA、23S rRNA 及 *prs*、*ldh*、*orfA*(*vclA*)、*orfB*(*vclB*) 等看家基因的序

列分析, 将李斯特菌属按进化关系分为三个分支, 单增李斯特菌和无害李斯特菌形成一支, 伊氏李斯特菌、塞氏李斯特菌和威氏李斯特菌形成另一支, 而格氏李斯特菌与其他种亲缘关系最远, 故单列一支。

1 李斯特菌主要毒力因子与毒力岛

致病性李斯特菌为侵袭性胞内菌, 可在巨噬细胞和非巨噬细胞 (如上皮细胞等) 中存活并增殖。其共同特点是可穿越感染宿主的三道屏障, 即肠道屏障、血脑屏障和胎盘屏障^[6]。李斯特菌感染过程中的每一步均有特定的毒力因子调控, 其中单增李斯特菌的感染过程已研究得较为详尽。

1.1 环境耐受相关毒力因子

细菌被宿主摄入消化道后, 需要耐受胃的酸性环境以及蛋白水解酶、胆酸盐和一些非特异性炎症因子的破坏作用。胆酸盐水解酶 (BSH) 可分解结合的胆酸盐, 保护细菌免受胆酸盐的杀伤作用, 其编码基因受转录调控因子 PrfA 和 Sigma 因子的调节, 单增李斯特菌、伊氏李斯特菌和塞氏李斯特菌均表现出 BSH 活性^[13]。其他应激应答因子如 OpuCA、Lmo1421 等亦通过各自途径保证细菌在消化道内的存活^[14]。

1.2 黏附侵袭相关毒力因子

内化素 A (InlA)、内化素 B (InlB) 为单增李斯特菌所特有, 位于菌体表面, 介导细菌侵袭入细胞并内化至吞噬小体, 这一过程是建立感染的前提。InlA、InlB 具有受体特异性, 前者与钙黏蛋白 (E-cadherin) 结合, 介导细菌进入上皮细胞, 而后者可与补体分子 C1q 受体或肝细胞生长因子受体 (Met) 结合, 介导细菌穿越肝细胞、成纤维细胞、上皮细胞等^[15-17]。同时, 细胞壁水解酶 (p60) 酰胺酶 (Ami)、纤连蛋白结合蛋白 A (FbpA)、肌动蛋白聚集因子 (ActA)、自溶素 (Auto) 等毒力因子均协同参与细菌的黏附与侵袭^[18-21]。

* 通讯作者。Tel 86-571-86971242; Fax 86-571-86971242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

作者简介: 陈健舜 (1982 -) 男, 江苏吴江人, 博士研究生, 主要从事动物病原微生物学研究。E-mail: allan_523@163.com

收稿日期: 2006-11-22; 接受日期: 2006-12-19; 修回日期: 2007-03-22

InlA、InlB 属于内化素家族,该族蛋白的 N 端都具有亮氨酸重复区域(LRRs),但重复数量不同,InlA、InlB 即通过 LRRs 与特异性受体结合。内化素家族主要分为两类,一类为大的表面蛋白(LA-Inls, > 50kDa)如 InlA、InlB, C 端具有细胞壁锚定区(Cwa);另一类为小的分泌蛋白(SE-Inls, 25~35kDa),如单增李斯特菌的 InlC,无细胞壁锚定能力^[7]。LA-Inls 的毒力作用已很清楚,而 SE-Inls 对毒力的影响尚不明了。单增李斯特菌共有 16~18 种 LA-inls 和 7~9 种 SE-inls,均聚集于内化素小岛^[22]。而另一致病种伊氏李斯特菌没有 LA-inls, A 种主要的 SE-inls 分列两处,即 *i-inlDC* 和 *i-inlFE*。*i-inlFE* 与中性神经磷脂酶基因 *smcL* 等 10 个基因构成伊氏李斯特菌所特有的毒力岛(LIPI-2),长约 22kb,是李斯特菌最大的内化素岛。其中 *smcL* 为伊氏李斯特菌所特有,其产物与强溶血活性、裂解噬菌体的能力等有关^[7,23]。非致病性李斯特菌基因组中也有 *inl* 基因,但不同种的 *inl* 种类、分布和活性各不相同。

1.3 细胞内感染相关毒力因子

单增李斯特菌最具特色的是其在真核细胞内的感染周期,这与其在细胞内的存活与增殖能力以及在细胞间的扩散能力有关。通过李斯特菌溶血素(LLO)和磷脂酰肌醇特异性磷脂酶(PlcA)的裂解作用,细菌逃离吞噬小体进入细胞质^[6,18],并在己糖磷酸盐转运蛋白(Hpt)的作用下摄取细胞质中的营养成分以进行增殖^[24]。同时,借助肌动蛋白聚集因子(ActA)聚集肌动蛋白丝以实现细菌在细胞内及细胞间的扩散。细菌在相邻细胞膜处以伪足样结构完成细胞间的扩散,细胞膜的裂解由 LLO 和磷脂酰肌醇特异性卵磷脂酶(PlcB)介导。PlcB 先以无活性前体(proPlcB)形式存在,通过细菌金属蛋白酶(Mpl)裂解其 N 端而激活^[6,18]。细菌被临近细胞吞噬后,便开始新一轮的感染。这些作用于细菌胞内生活周期的主要毒力因子均由转录活化因子 PrfA 调控^[6,25]。PrfA 的表达具有典型的温控特点,当温度低于 30℃ 时, *prfA* 的 mRNA 形成稳定的二级结构(又称热传感器),屏蔽了核糖体结合位点-SD 序列^[26],因而 *prfA* 无法表达以至 LLO、PlcA、PlcB 等均表达很弱,而在高温如 37℃ 时该二级结构被熔解,其调控的毒力基因也相应得到表达。

prfA、*plcA*、*hly*、*mpl*、*actA*、*plcB* 位于 *prs* 和 *ldh* 间,形成长约 9kb 的第一毒力岛(LIPI-1),又称 PrfA 依赖型毒力基因簇。LIPI-1 不同于其他细菌毒力岛,它的 G+C 含量与毒力岛外的基因相似,且比较稳定,并没有发现明显的插入片段元件、整合酶识别位点等^[27]。伊氏李斯特菌也具有类似的 LIPI-1;塞氏李斯特菌虽含有以上毒力基因,但基因间被 3 个开放阅读框间隔^[11],因而其 LIPI-1 以无功能的形式存在;而其他种则无此毒力岛。

1.4 其他毒力因子

随着分子生物学技术的发展,一些新的毒力因子被不断发现。如应答调控因子 VirR 为仅次于 PrfA 的第二大毒力调控因子,调控包括 *dlfA*、*mprF* 在内的 12 个毒力基因^[28]。*mprF* 编码具有调节膜功能的左旋赖氨酸磷脂酰甘油酯蛋

白,该蛋白还可抵抗人源或细菌源的抗菌肽^[29]。而分选酶(Sortase)参与蛋白质的细胞壁锚定,其中表面蛋白 SvpA 可介导单增李斯特菌逃离巨噬细胞的吞噬小体^[16]。

2 李斯特菌毒力的分子进化

2.1 LIPI-2 的分子进化

LIPI-2 不稳定,其编码的蛋白常含有重复区域,容易发生重组事件。LIPI-2 两端分别为 *ysnB-tRNA^{arg}* 和 *ydel*,其中 *tRNA* 位点是典型的噬菌体及整合型质粒的插入位置;在 *i-inlCD* 附近,另有一个 *tRNA* 位点,提示内化素基因可能主要通过噬菌体的介导插入基因组中^[7]。在李斯特菌不同种甚至同一种的不同血清型之间, *ysnB-ydel* 间序列亦呈现明显的差异,因此这可能是研究基因组多态性及李斯特菌进化的热点区域。其中伊氏李斯特菌的种特异基因 *smcL* 与 LIPI-2 其他基因的转录方向相反,且不受 PrfA 调控;其两侧序列形成茎干长 42bp 的发夹环结构和长 14bp 的重复序列,这是特异性重组酶结合的绝佳位置;此外, *smcL* 的产物与蜡状芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌中性神经磷脂酶的氨基酸序列具有 56% 左右的同源性^[7,23]。这些特点均表明 LIPI-2 是逐步进化而来, *smcL* 是在进化后期插入至已经存在的 *inl* 位点。

除 *i-inlB1* 之外, LIPI-2 的内化素基因都受 PrfA 的调控,由此可推测 LIPI-2 的形成与发展晚于 LIPI-1。伊氏李斯特菌伊氏亚种在相同位置亦有 LIPI-2,说明 LIPI-2 的进化又先于亚种的形成。

2.2 LIPI-1 的分子进化

LIPI-1 是李斯特菌毒力进化研究的热点^[11,30]。在威氏李斯特菌 *prs* 终止子下游和 *orfB* 终止子下游,已证实分别有 Tn1545 转座子的插入位点^[22];单增李斯特菌和无害李斯特菌在同样位置也发现有类似的插入位点,但尚需进一步证明。LIPI-1 的 G+C 含量与毒力岛外相似,这表明 LIPI-1 可能通过转座从其他低 G+C 含量的革兰氏阳性菌获得,进而影响细菌毒力的进化。

单增李斯特菌与伊氏李斯特菌的 LIPI-1 非常保守,而非致病种中除塞氏李斯特菌外均不含 LIPI-1。在塞氏李斯特菌的 *prfA* 和 *plcA* 之间,转录方向相反的 *orfE* 破坏了 *prfA* 对 PrfA 依赖型基因的自动调节;在 *hly* 和 *mpl*、*actA* 和 *plcB* 之间亦存在类似的插入序列^[6],因而塞氏李斯特菌并不致病。笔者推断,李斯特菌各个种可能来源于同一携带 LIPI-1、具有致病性的祖先,在进化过程中某些种丢失了 LIPI-1 并失去了毒力,这个丢失过程又是渐进的,LIPI-1 内插入事件的发生可能早于 LIPI-1 缺失事件,而塞氏李斯特菌可能正处于两个事件的交界处,毒力消除但仍保留着插入突变的 LIPI-1。

2.2.1 塞氏李斯特菌非典型菌株:Volokhov 等^[31]发现的塞氏李斯特菌天然非典型菌株无溶血活性,缺失整个 LIPI-1,曾被误认为是 Rha⁻Xyl⁺ 的威尔斯李斯特菌。但通过 16S rRNA、16S rRNA/23S rRNA 基因间序列、*iap*、若干看家基

addB, *lisA*, *bglA* 和 *betL*)以及塞氏李斯特菌特有的类内化素基因的序列分析,确定其为塞氏李斯特菌。*prs-LIPI-1-ldh* 区段的测序发现,这类菌株的残余长度仅为原长的 1/3, 剩余基因 *prs-orfA2-orfP-orfB-orfA-ldh* 与塞氏李斯特菌标准株的同源性在 91.3-100% 之间, 而与其他种则在 82% 以下, 其中 *orfA2* 为塞氏李斯特菌所特有。

这类非典型菌株与标准菌株在表型与基因组的差异源于前者 LIPI-1 的缺失, 而这种缺失事件可能已经超越了塞氏李斯特菌的进化进程。LIPI-1 的缺失可能由转座、重组或噬菌体介导的基因转移引起, 但在 *prs-ldh* 区段内并未发现转座子插入位点及 LIPI-1 整合或重组的线索。从理论上说, 塞氏李斯特菌作为一种自由生活的非致病菌, LIPI-1 的存在对其并无益处, 将其缺失并不影响细菌的生存, 因此这样的基因片段实则是一种不必要的负担, 即“基因垃圾”, 在自然选择的压力下, 这种垃圾基因的清除非常必要, 以使细菌能更好地适应生存环境。

2.2.2 无害李斯特菌非典型菌株: 无害李斯特菌已进化到无 LIPI-1 的状态, 但 Johnson 等^[32] 发现的天然非典型株却含有完整的 LIPI-1。这类菌株具有溶血活性, 生化反应结果为 Rha⁺ Xyl⁺, 因而起先被误认为是 Rha⁺ 的单增李斯特菌或 Xyl⁺ 的塞氏李斯特菌, 通过 API 鉴定以及 16S rRNA、16S rRNA/23S rRNA 基因间序列、*iap*、若干看家基因和无害李斯特菌特异性基因的序列分析, 确定其为无害李斯特菌。

这类非典型菌株具溶血性, 且在 BCM 和 ALOA 试验中表现出 PlcA 活性, 从表型上证实了 *hly* 和 *plcA* 的表达, 作为 *hly*、*plcA* 的调控因子, *prfA* 也必然存在, 此外, PCR 和分子杂交技术结果表明, LIPI-1 的 6 个毒力基因的大小及排列顺序均与单增李斯特菌相同。通过 *prs-prfA* 与 *plcB-ldh* 区段的序列分析, 发现 *prs-prfA* 序列中有重复序列 AAAACAGGATTTCW, 这可能为转座子的一个插入位点, 在 *orfZ* 和 *orfB* 之间也存在与转座子相关的重复序列, 提示 LIPI-1 可能通过转座子插入无害李斯特菌基因组。小鼠毒力试验表明其仍无毒力, 这可能与 *inlA*、*inlB*、*inlC*、*daaA* 等毒力基因缺失有关。

这类保留 LIPI-1 的非典型菌株有两个方向可以解释。一是这类菌株可能是李斯特菌祖先的遗骸, 尚须进一步进化以达到目前无害李斯特菌所流行的状态; 二是这类菌株发生了类似“返祖”的现象, 根据 *prs-prfA* 与 *plcB-ldh* 区段的序列分析以及 DNA 摄取基因的存在, 这类菌株可能通过转座或其他形式的基因转移, 失而复得 LIPI-1。但由于仅是部分毒力基因的转移, 所以这些菌株依然没有毒力。

笔者也从牛奶和海产品中分离到无害李斯特菌天然非典型株(未发表), 对小鼠、鸡胚均无毒力, 生化反应结果为 Rha⁺ Xyl⁺, 部分有溶血现象, 并扩增到 *prfA*、*hly*、*mpl* 等毒力基因片段, 曾被误认为是单增李斯特菌弱毒株。但这些菌株的 LIPI-1 并不完整, 其进化状态可能正处于 Johnson 发现的菌株与目前流行菌株之间, 但还需要进一步的论证。

2.3 毒力进化的执行者

毒力基因的水平转移在李斯特菌属毒力进化的过程中

起着极为重要的作用, 而噬菌体在这个过程中显得较为关键。在所有已测序的李斯特菌全基因组中都至少有一个原噬菌体(prophage)或噬菌体残骸(remnants of bacteriophage)存在。单增李斯特菌 1/2a 型和 4b 型分别含有温和噬菌体 A118^[33] 和 PSA^[34], 目前已完成测序, 通过比较基因组学分析发现, 这两个噬菌体同源性很低, 提示噬菌体具有宿主细胞特异性。

而质粒和转座子在李斯特菌属毒力进化过程中似乎并不那么重要。仅在无害李斯特菌 CLIP11262 和单增李斯特菌 H7858 中发现携带有一个质粒^[3, 22]。在威氏李斯特菌中被证实有 Tn1545 转座子插入位点^[27], 而其他种是否存在类似位点尚需进一步考证, 而类似 Tn916 的转座子也仅发现于单增李斯特菌 EGD-e 菌株^[3]。

3 展望

李斯特菌属含 6 个种, 现已将其作为衡量食品卫生状况的一个指标^[35]。其中单增李斯特菌被公认为是危害食品行业和公共卫生的一种重要人兽共患致病菌, 伊氏李斯特菌主要引起反刍兽的败血症和流产, 而其他种是否具有致病潜力以及这种潜力被激发的条件尚有待研究。

随着分子生物学新技术的发展及更完善动物模型的建立, 李斯特菌主要毒力因子的功能已不断明晰, 新的毒力因子陆续被发现, 如 VirR、Sortase、Auto、MprF 等, 毒力调控机理的研究也不断深入, 毒力因子之间层层调控, 环环相扣, 使李斯特菌在各种环境中适应、生存并表现致病力。

李斯特菌家族并不庞大, 且致病种与非致病种的基因组区别明显, 因此李斯特菌是研究毒力分子进化的优良模型。比较基因组学为之提供了重要的研究手段。李斯特菌属各个种可能来源于同一个祖先, 通过噬菌体、转座子或质粒等介导, 发生毒力基因的水平转移, 并逐渐分化为现在的 6 个种。同时, 一些进化不完全或返祖的现象以一个未知的比率发生, 这类菌株一般认为正处于过渡状态, 如果这样的非典型菌株较大规模地存在, 可能会演变为一个独立的种。非典型菌株是目前研究的热点, 为李斯特菌属毒力进化的研究提供了重要线索。

参 考 文 献

- [1] Gandhi M, Chikindas ML. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol*, 2006, **113**(1): 1 - 15.
- [2] Liu DY, Lawrence M, Austin FW, et al. Comparative assessment of acid, alkali, and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **243**(2): 373 - 378.
- [3] Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, et al. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, 2001, **294**(26): 849 - 852.
- [4] Hain T, Steinweg C, Kuenne CT, et al. Whole genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*,

- [5] Rocourt J, Cossart P. *Listeria monocytogenes*. Washington D. C : ASM Press , 1997 , 337 – 352.
- [6] Vazquez-Boland JA , Kuhn M , Berche P , et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* , 2001 , **14**(548) : 584 – 640.
- [7] Dominguez-Bernal Gustavo , Muller-Altrock Stefanie , Gonzalez-Zom Bruno , et al. A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2 , a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins. *Mol Microbiol* , 2006 , **59**(2) : 415 – 432.
- [8] Perrin M , Bemer M , Delamare C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *J Clin Microbiol* , 2003 , **41**(11) : 5308 – 5309.
- [9] Rocourt J , Hof H , Schrettenbrunner A , et al. Acute purulent *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult. *Schweiz Med Wochenschr* , 1986 , **116**(8) : 248 – 251.
- [10] 敖必蓉. 格氏李斯特菌感染 1 例报道. 临床检验杂志 , 2001 , **19**(3) : 174.
- [11] Hain T , Steinweg C , Chakraborty T. Comparative and functional genomics of *Listeria spp.* *J Biotechnol* , 2006 , **126**(1) : 37 – 51.
- [12] Schmid MW , Ng EY , Lampidis R , et al. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Syst Appl Microbiol* , 2005 , **28**(1) : 1 – 18.
- [13] Dussurget O , Cabanes D , Dehoux P , et al. *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol Microbiol* , 2002 , **45**(4) : 1095 – 1106.
- [14] Sleator RD , Gahan CGM , Hill C. A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* , 2003 , **69**(1) : 1 – 9.
- [15] Schubert W D , Urbanke C , Ziehm T , et al. Structure of internalin , a major invasion protein of *Listeria monocytogenes* , in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* , 2002 , **111**(6) : 825 – 836.
- [16] Shen Y , Naujokas M , Park M , et al. InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* , 2000 , **103**(3) : 501 – 510.
- [17] Hamon M , Bierne H , Cossart P. *Listeria monocytogenes* : a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* , 2006 , **4**(6) : 423 – 434.
- [18] Dussurget O , Pizarro-Cerda J , Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol* , 2004 , **58** : 587 – 610.
- [19] Milohanic E , Jonquieres R , Cossart P , et al. The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol Microbiol* , 2001 , **39**(5) : 1212 – 1224.
- [20] Dramsi S , Bourdichon F , Cabanes D , et al. FbpA , a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol* , 2004 , **53**(2) : 639 – 649.
- [21] Cabanes D , Dussurget O , Dehoux P , et al. Auto , a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Mol Microbiol* , 2004 , **51**(6) : 1601 – 1614.
- [22] Nelson KE , Fouts DE , Mongodin EF , et al. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res* , 2004 , **32**(8) : 2386 – 2395.
- [23] Openshaw AEA , Race PR , Monzo HJ , et al. Crystal structure of SmcL , a bacterial neutral sphingomyelinase from *Listeria*. *J Biol Chem* , 2005 , **280**(41) : 35011 – 35017.
- [24] Chico-Calero I , Suarez M , Gonzalez-Zom , et al. Hpt , a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase , mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2002 , **99**(1) : 431 – 436.
- [25] Scotti M , Lacharme-Lora L , Wagner M , et al. Coexpression of virulence and fosfomycin susceptibility in *Listeria* : molecular basis of an antimicrobial *in vitro-in vivo* paradox. *Nat Med* , 2006 , **12**(5) : 515 – 517.
- [26] Johansson J , Mandin P , Renzoni A , et al. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* , 2002 , **110**(5) : 551 – 561.
- [27] Cai Steven , Wiedmann M. Characterization of the prfA virulence gene cluster insertion site in non-hemolytic *Listeria spp.* : probing the evolution of the *Listeria* virulence gene island. *Curr Microbiol* , 2001 , **43**(4) : 271 – 277.
- [28] Mandin P , Fsihi H , Dussurget O , et al. VirR , a response regulator critical for for *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol Microbiol* , 2005 , **57**(5) : 1367 – 1380.
- [29] Thedieck K , Hain T , Mohamed W , et al. The MprF protein is required for lysinylation of phospholipids in listerial membranes and confers resistance to cationic antimicrobial peptides (CAMPs) on *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* , 2006 , **62**(5) : 1325 – 1329
- [30] Jiang LL , Xu JJ , Chen N , et al. Virulence phenotyping and molecular characterization of a low-pathogenicity of *Listeria monocytogenes* from cow's milk. *Acta Biochim et Biophys Sin* , 2006 , **38**(4) : 262 – 270.
- [31] Volokhov D , George J , Anderson C , et al. Discovery of natural atypical nonhemolytic *Listeria seeligeri* isolates. *Appl Environ Microbiol* , 2006 , **72**(4) : 2439 – 2448.
- [32] Johnson J , Jinneman K , Smith B G , et al. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Appl Environ Microbiol* , 2004 , **70**(7) : 4256 – 4266.
- [33] Loessner MJ , Inman RB , Lauer P , et al. Complete nucleotide sequence , molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes* : implication for phage evolution. *Mol Microbiol* , 2000 , **35**(2) : 324 – 340
- [34] Zimmer M , Sattlberger E , Inman RB , et al. Genome and proteome of *Listeria monocytogenes* phage PSA : an unusual case for programmed + 1 translational frameshifting in structural protein synthesis. *Mol Microbiol* , 2003 , **50**(1) : 303 – 317.
- [35] Johnston LM , Jaykus LA , Moll D , et al. A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *Int J Food Microbiol* , 2006 , **112**(2) : 83 – 95.

Virulence determinants and its evolution of the genus *Listeria*

CHEN Jian-shun , JIANG Ling-li , FANG Wei-huan *

(*Institute of Preventive Veterinary Medicine , Zhejiang Provincial Key Laboratory of Prevent Veterinary Medicine , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China*)

Abstract :The genus *Listeria* consists of six species : *L. monocytogenes* , *L. innocua* , *L. welshimeri* , *L. ivanovii* , *L. seeligeri* and *L. grayi* . Two of the species , *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* are pathogenic. The heterogeneity of remaining species , previously assumed to be nonpathogenic , regarding their capability of acquiring virulence-associated genes may reflect their potential ability to be causative agents of diseases , especially in immunocompromised mammals. Virulence determinants involved in environmental tolerance , adhesion and invasion of eukaryotic cells and intracellular life function interactively. The virulence genes are mostly organized into discrete genetic units known as pathogenicity islands (PAIs) , among which *Listeria* pathogenicity island 1 (LIPI-1) and island 2 (LIPI-2) are the most important. During the evolution of pathogenicity , a common ancestor bearing PAIs gave rise to the currently prevailing typical strains of six species through horizontal transfer of virulence determinants or by events such as recombination and natural selection. Bacteriophages , transposons and plasmids might play critical roles in these processes as the executors. Compared to pathogenic species , the nonpathogenic species lost LIPI-1 (*L. innocua* , *L. welshimeri* and *L. grayi*) or harbored corrupted LIPI-1 (*L. innocua* , *L. welshimeri*). Some types of natural atypical *Listeria* strains such as nonhemolytic *L. seeligeri* and hemolytic *L. innocua* , although complicating taxonomic identification , should contribute fruitful insights into the evolution events of pathogenicity underlying the phylogeny of the genus *Listeria* .

Keywords : *Listeria* ; virulence determinants ; evolution of pathogenicity ; atypical strains

* Corresponding author. Tel 86-571-86971242 Fax 86-571-86971242 E-mail : whfang@zju.edu.cn

Received : 22 November 2006 / Accepted : 19 December 2006 / Revised : 22 March 2007