

进口水产品中单增李斯特菌的分子流行病学特点

梁启平^{1,2}, 陈健舜¹, 陈巧妙¹, 劳华均², 黄绍棠², 方维焕^{1*}

(¹ 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 310029)

(² 宁波出入境检验检疫局, 宁波 315012)

摘要:【目的】探明进口水产品中单增李斯特菌的污染状况、致病性和分子特征。【方法】针对 2007 年 7 月至 2008 年 11 月间从 29 个国家进口的 1275 批水产品, 进行单增李斯特菌鉴定、谱系与血清型分析、小鼠毒力试验与多位点序列分析。【结果】检出单增李斯特菌 33 批次(2.6%), 其中以 4b 型为主(65.2%), 而 1/2a 型、1/2b 型与 1/2c 型仅分别占 13.0%、17.4% 与 4.4%。这些分离株对小鼠均具有与强毒参考株相当的毒力。基于 *actA* - *hisJ* - *ribC* - *sigB* 的多位点序列分析可将 32 个菌株分为 23 个序列型, 分辨力达 0.97。其中 3 个序列型包含 3 个以上分离株, 其中序列型 9 属于流行性克隆 I。【结论】进口水产品中单增李斯特菌污染率与国内水产品相近, 但血清型分布以 4b 型为主, 且有流行性克隆 I 检出, 因此要加强对进口水产品中单增李斯特菌的监测。

关键词: 单增李斯特菌; 进口水产品; 血清型 4b; 多位点序列分析; 毒力

中图分类号: Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 06-0766-07

单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 是重要的人兽共患食源性病原菌, 可分为 3 个谱系 (Lineage) 与 13 个血清型, 其中谱系 I 包括 1/2b、3b、4ab、4b、4d、4e 和 7 型, 谱系 II 包括 1/2a、1/2c、3a 和 3c 型, 谱系 III 包括 4a 和 4c 型^[1-2]。单增李斯特菌具备抵抗各种应激 (高盐、低 pH、氧化应激等) 的能力, 主要通过污染食品或饲料感染人和动物^[3-4]。

从上世纪 80 年代起, 欧美国家多次因食品污染暴发人李斯特菌病^[3], 且其发生率在近年不断攀升^[5]。2008 年, 美国波士顿与加拿大又相继因李斯特菌污染的牛奶与肉制品导致孕妇流产及多人死亡, 引起广泛关注。但并非所有单增李斯特菌均表现出相同致病力, 98% 以上的人李斯特菌病病例由 1/2a、1/2b、1/2c 和 4b 型引起^[1,3]; 其中绝大多数暴发病例归因于 4b 型, 脑膜炎病人的 4b 型分离率显著高于一般患者, 且 4b 型感染者的死亡率 (26%) 明显

高于 1/2 型感染者 (16%)^[3,6-7], 均提示 4b 型毒力最强。根据核糖体分型及多位点序列分析, 4b 型菌株中有 3 个克隆群 (Clonal group) 最常引起人李斯特菌病暴发, 被称为流行性克隆 (Epidemic clone) I、II、IV^[8-9]。而谱系 III 菌株则很少引起人发病^[3,6]。

欧美国家的李斯特菌病无论发生频率或规模均高于中国, 我们针对宁波口岸在 2007 年 7 月至 2008 年 11 月从北美洲、南美洲、欧洲以及亚洲共 29 个国家进口的 1275 批水产品中的单增李斯特菌污染状况和分子流行病学进行了调查。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株分离与培养: 2007 至 2008 年宁波口岸 1275 批进口水产品, 按照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 (SN/T 0184.1-2005) 分离单增李

基金项目: 国家自然科学基金 (30870068)

* 通信作者。Tel: +86-571-86971242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

作者简介: 梁启平 (1972-), 男, 浙江奉化人, 硕士研究生, 主要从事出入境动物及其产品的检验检疫。E-mail: liangqp@nbiq.gov.cn

收稿日期: 2009-02-05; 修回日期: 2009-03-14

斯特菌, 并经本实验室建立的多重 PCR 方法鉴定^[10] (表 1)。单增李斯特菌参考株 EGD、10403S、P8、HJ、ScottA、F2024、54006、F2208 与 J2071 均由本实验室保存(表 1)。各菌株接种于 5 mL BHI (Difco) 培养基, 37 °C 振荡培养过夜。

表 1 单增李斯特菌谱系、血清型对 ICR 小鼠的毒力及多位点序列分析 (MLST)

Table 1 Lineage classification, serotyping, *in vivo* virulence in ICR mouse model and multilocus sequencing typing (MLST) of *L. monocytogenes* isolates

Strain/ Isolate	Country	Source	Lineage	Serovar	<i>in vivo</i> virulence in ICR mouse			Sequence type (ST)				
					CFU	Mortality (no. of dead mouse) (n = 5)	Virulence/%	<i>actA</i>	<i>hisJ</i>	<i>ribC</i>	<i>sigB</i>	Concatenated
P8	-	Reference	I	1/2b	-	-	-	1	1	1	1	1
N9	Argentina	Squid	I	1/2b	3.7×10^7	5	100	2	2	2	1	2
N20	Mexico	Squid	I	1/2b	5.3×10^7	5	100	3	2	1	1	3
N26	India	Shrimp	I	1/2b	6.5×10^7	5	100	4	3	2	1	4
N27	Uruguay	Squid	I	1/2b	5.5×10^7	4	80	5	2	1	1	5
ScottA	-	Reference	I	4b	3.3×10^7	5	100	6	2	1	2	6
F2024	-	Reference	I	4b	-	-	-	7	2	1	3	7
N1	Argentina	Squid	I	4b	5.5×10^7	5	100	8	2	1	2	8
N4	U. S.	Salmon	I	4b	2.1×10^7	5	100	9	4	1	2	9
N6	Chile	Squid	I	4b	3.3×10^7	5	100	4	5	3	3	10
N7	Chile	Squid	I	4b	4.6×10^7	5	100	4	5	3	3	10
N8	Chile	Squid	I	4b	5.1×10^7	5	100	4	5	3	3	10
N10	Chile	Squid	I	4b	2.0×10^7	5	100	4	6	3	3	11
N11	U. S.	Sardine	I	4b	4.7×10^7	5	100	10	7	4	3	12
N13	Chile	Squid	I	4b	2.5×10^7	5	100	9	4	1	2	9
N14	Argentina	Squid	I	4b	4.7×10^7	5	100	8	2	1	2	8
N15	Argentina	Squid	I	4b	4.2×10^7	5	100	8	2	1	2	8
N16	Argentina	Squid	I	4b	4.6×10^7	5	100	8	2	1	2	8
N22	Uruguay	Squid	I	4b	5.7×10^7	5	100	11	4	1	2	13
N23	Peru	Squid	I	4b	1.5×10^7	5	100	9	4	1	2	9
N25	India	Shrimp	I	4b	4.8×10^7	5	100	12	8	1	2	14
N29	India	Shrimp	I	4b	5.7×10^7	5	100	12	9	1	2	15
EGD	-	Reference	II	1/2a	5.5×10^7	5	100	13	10	5	4	16
10403S	-	Reference	II	1/2a	5.0×10^7	5	100	14	11	6	4	17
N12	Peru	Squid	II	1/2a	5.1×10^7	5	100	15	11	6	4	18
N21	Vietnam	Acaleph	II	1/2a	3.9×10^7	4	80	16	12	7	4	19
N30	Uruguay	Squid	II	1/2a	6.0×10^7	5	100	13	13	8	4	20
HJ	-	Reference	II	1/2c	-	-	-	13	10	5	4	16
N28	Peru	Squid	II	1/2c	4.1×10^7	5	100	13	10	5	4	16
54006	-	Reference	III	4a	1.2×10^7	0	0	17	14	9	5	21
F2208	-	Reference	III	4a	1.5×10^7	5	100	18	15	10	6	22
J2071	-	Reference	III	4c	3.5×10^7	5	100	19	16	11	7	23

1.2 引物设计与合成

利用 DNASTar 软件的 Primer Select 设计引物, 并由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列、预期扩增片段长度及退火温度见表 2。

1.3 基因组 DNA 的制备

采用煮沸法提取细菌基因组 DNA^[11]。离心收集细菌沉淀后用等体积的 2 × TZ 和蒸馏水重悬, -20 °C 静置 45 min, 于沸水中 8 min 后立即置冰浴中冷却 7 min, 离心后取上清保存于 -20 °C 备用。

1.1.2 主要试剂: *Taq* DNA polymerase、DNA Ladder Marker 购自 TaKaRa 生物工程有限公司; dNTP Mix 购自上海申能博彩生物科技有限公司; DNA 胶回收试剂盒购自上海生工有限公司; 核酸电泳染料 Goldview 购自赛百盛生物公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.4 PCR 及其产物测序

采用 30 μL 反应体系: 10 × *Taq* Buffer (含 Mg^{2+}) 3 μL, 10 mmol/L dNTP Mix 0.6 μL, 25 μmol/L 引物各 0.6 μL, DNA 模板 2 μL, *Taq* DNA polymerase 0.8 μL, 加水补足体积。反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸时间按 1000 bp/min 计算, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物回收纯化后送至上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5 谱系分析

参照 Wiedmann 等建立的方法进行^[12]。基于毒力基因 *actA* 序列(第 259 至 437 位氨基酸)的测定,

采用 DNASTar 软件的 MegAlign 对各序列与 Wiedmann 等公布的谱系特异性氨基酸序列进行比较分析。

表 2 引物及扩增条件

Table 2 PCR and sequencing primers used

Locus	Putative function	Forward primer	Reverse primer	Length/ bp	Annealing t/°C	Reference
<i>actA</i>	Actin-assembly inducing protein precursor	GGTACGTGATAAAATCGACGA	TAGTTATGTCACCTTATCAGAGC	537 or 432	55	[10]
<i>lmo0737</i>	Putative transcriptional regulator	AGGGCTTCAAGGACTTACCC	ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691	53	[1]
<i>lmo1118</i>	Hypothetic protein	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	CGGCTTGTTCGGCATACTTA	906	53	[1]
<i>ORF2110</i>	Hypothetic protein	AGTGGACAATTGATTGGTGAA	CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	53	[1]
<i>ORF2819</i>	Putative transcriptional regulator	AGCAAAATGCCAAAACCTCGT	CATCACTAAAAGCCTCCCATTG	471	53	[1]
<i>hisJ</i>	Histidinol phosphate phosphatase	TCCACATGGTACGCATGAT	GGACATGTCAAAATGAAAGATC	716	58	This study
<i>ribC</i>	Riboflavin kinase and FAD synthase	AAGACGATATACTTACATCAT	GTCTTTTTCTAACTGAGCA	633	58	This study
<i>sigB</i>	Stress responsive alternative σ factor B	CCAAAAGTATCTCAACCTGAT	CATGCATTGTGATATATCGA	643	62	This study

1.6 分子血清分型

参照 Doumith 等建立的多重 PCR 方法进行^[1]。其中 *lmo0737* 的引物只在血清型 1/2a(3a)、1/2c(3c) 中有结合位点,而 *lmo1118* 的引物可进一步区分出 1/2c(3c); *ORF2819* 的引物针对血清型 1/2b(3b)、4b(4d、4e)与 7,而 *ORF2110* 可特异地识别血清型 4b(4d、4e);而未能扩增出任何条带的则为血清型 4a 与 4c。

1.7 小鼠毒力试验

ICR 小鼠(雌性,20~22 g)购自浙江省中医学院实验动物中心。参照 Liu 的方法进行并稍加改进^[13],将细菌浓度调至 OD_{540} 为 1.35,用 0.01 mol/L PBS(pH7.4)稀释 20 倍后腹腔注射小鼠,剂量为 0.1 mL(约 10^7 CFU),每组 5 只小鼠,连续观察 10 d。同时,设 ScottA、EGD 与 10403S 攻毒阳性对照组与 PBS 阴性对照组。致死率计算公式如下:致死率(%) = 每组死亡小鼠数/每组小鼠总数。

1.8 多位点序列分析与系统进化树构建

选择毒力基因 *actA*、看家基因 *hisJ*、*ribC* 及应激调控基因 *sigB* 进行序列测定与分析。应用 MAGE4.0 软件对 *actA* - *hisJ* - *ribC* - *sigB* 串联序列进行比对,以代表单增李斯特菌 - 无害李斯特菌进化枝上处于进化过渡状态的 4a 型参考株 54006^[14] 作为进化树的根,选用 Neighbor - joining 法构建系统进化树,经重复取样 1000 次,进行 Bootstrap 值分析。*actA*、*hisJ*、*ribC* 和 *sigB* 的分辨力(Discrimination Index, D.I.)按以下公式计算^[15]:

$$D.I. = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s nj(nj-1)$$

2 结果

2.1 进口水产品中单增李斯特菌的检出率

在来自北美洲、南美洲、欧洲以及亚洲共 29 个国家的 1275 批进口水产品中,单增李斯特菌在 8 个国家共计 33 个批次中检出,污染率为 2.6%(表 3)。其中智利的 16 个批次中,单增李斯特菌污染率高达 31.3%;阿根廷/乌拉圭与美国次之,分别为 11.5% 与 11.1%;越南、印度、秘鲁与墨西哥分别为 5.9%、1.8%、1.8% 与 1.0%;而其他 21 个国家均无检出。

表 3 各国进口水产品中单增李斯特菌的检出率

Country	Total batches	Tainted batches (%)
Argentina/Uruguay	122	14 (11.5)
Chile	16	5 (31.3)
India	163	3 (1.8)
Mexico	97	1 (1.0)
Peru	338	6 (1.8)
U.S.	18	2 (11.1)
Vietnam	34	2 (5.9)
Others	487	0 (0)
Subtotal	1275	33 (2.6)

2.2 进口水产品中单增李斯特菌的谱系与血清型分布

在检出的 33 株单增李斯特菌中,选择 23 株代表不同国家与时间段(即批次不相连)的菌株进行分析。其中 19 个菌株(82.6%)属于谱系 I,4 个菌株(17.4%)属于谱系 II,无谱系 III 菌株。在谱系 I 菌株中,4b 型占 78.9%(15/19),占总菌株的 65.2%(15/23),而 1/2b 型占总菌株的 17.4%(4/23)。在谱

系 II 菌株中, 1/2a 型与 1/2c 型各占总菌株的 13.0% (3/23) 与 4.4% (1/23) (表 4)。

表 4 进口水产品中单增李斯特菌血清型分布

Table 4 Lineage and serovar distribution of *L. monocytogenes*

in imported fishery products			
Lineage	No. (%)	Serovar	No. (%)
I	19/23 (82.6%)	1/2b (or 3b)	4/23 (17.4%)
		4b (or 4d, 4e)	15/23 (65.2%)
II	4/23 (17.4%)	1/2a (or 3a)	3/23 (13.0%)
		1/2c (or 3c)	1/23 (4.4%)
III	0/13 (0%)	4a (or 4c)	0/23 (0%)

2.3 ICR 小鼠体内毒力

以约 10^7 CFU 的单增李斯特菌分离株及参考株注射 ICR 小鼠后 10 d, 谱系 III 菌株 54006 不能引起小鼠死亡, 1/2a 型菌株 N21 与 1/2b 菌株 N27 致死率为 80%, 其余菌株致死率均为 100% (表 1), 表明进口食品中的单增李斯特菌分离株均具有与强毒参考株 ScottA、EGD、10403S 相当的毒力。

2.4 多位点序列分析

选择毒力基因 *actA*、看家基因 *hisJ*、*ribC* 与应激调控基因 *sigB*, 对 23 个分离株及 9 个参考株进行分析。其中 *hisJ* 含有比例最高的多态性位点, 达 15.2%; *ribC* 次之, 为 15.0%; 而 *actA* 与 *sigB* 分别为 10.7% 与 5.6%。但 *actA* 却可分辨出最多的序列型 (Sequence Type, ST), 为 19 个; *hisJ*、*ribC* 与 *sigB* 可分别分辨出 16、11 与 7 个序列型。*actA* 的分辨力亦为最强, 达 0.95; *hisJ* 为 0.90; 而 *sigB* 与 *ribC* 分辨力较弱, 仅为 0.80 与 0.77 (表 5)。将 4 个基因串联后, 多态性位点比例为 11.81%, 可分辨出 23 个序列型, 分辨力达 0.97 (表 5)。

表 5 毒力基因 *actA*、看家基因 *hisJ*、*ribC* 及应激调控基因 *sigB* 的多态性分析

Table 5 Allelic polymorphisms of virulence gene *actA*, house-keeping genes *hisJ* and *ribC*, and stress-response gene *sigB*

Gene	Size/bp	No. alleles	No. polymorphic sites (%)	D. I.
<i>actA</i>	412	19	44 (10.7)	0.95
<i>hisJ</i>	716	16	109 (15.2)	0.90
<i>ribC</i>	633	11	95 (15.0)	0.77
<i>sigB</i>	643	7	36 (5.6)	0.80
Concatenated	2404	23	284 (11.8)	0.97

在这些分离株中, 来自阿根廷鱿鱼的 N1、N14、N15 与 N16 同为序列型 8, 来自智利鱿鱼的 N6、N7 与 N8 同为序列型 10, 而来自美国三文鱼

(*Oncorhynchus keta*) 的 N4、来自智利鱿鱼的 N13 与来自秘鲁鱿鱼的 N23 同为序列型 9 (表 1)。这 3 个主要序列型均分布于谱系 I 的进化枝上。谱系 I 共 22 个菌株 (含参考株, 下同), 分为 15 个序列型; 而谱系 II 的 7 个菌株可分为 5 个序列型, 谱系 III 的 3 个菌株可分为 3 个序列型。其中 17 个 4b 型菌株形成 10 个序列型, 而 5 个 1/2b 型菌株、5 个 1/2a 型菌株、2 个 4a 型菌株均各成一型, 表明 4b 型菌株具有较高的同质性 (monophyletic) (图 1)。

3 讨论

单增李斯特菌与沙门氏菌、大肠杆菌 O157:H7、空肠弯曲杆菌并称四大食源性病原菌。本实验室对 2000 至 2007 年间我国 13 个省食品中的病原微生物污染进行统计, 单增李斯特菌在水产品中的检出率为 2.7% [4]。而本次在 2007 年 7 月至 2008 年 11 月进口的 1275 批水产品中, 单增李斯特菌的检出率为 2.6%, 与国内情况基本持平。但值得注意的是, 从智利、阿根廷/乌拉圭与美国进口的水产品中, 单增李斯特菌的污染率高达 11.1% 至 31.3%, 明显高于其他国家 ($P < 0.05$)。

单增李斯特菌虽发病率不高, 但其致死率 (20% ~ 30%) 远高于其他常见食源性病原菌, 如肠炎沙门氏菌 (0.38%)、弯曲杆菌 (0.02% ~ 0.1%) 与弧菌 (0.005% ~ 0.01%) 等 [16-17]。其中血清型 4b 毒力最强, 不仅引起绝大多数暴发病例, 且其感染者的死亡率 (26%) 明显高于 1/2 型感染者 (16%) [3, 6]。血清型 1/2a 通常在食品中分离率最高 [18]。2008 年本实验室对 88 株中国食品源单增李斯特菌进行分子流行病学调查, 其中 47.7% 为 1/2a 型, 26.1% 为 1/2b 型, 17.0% 为 1/2c 型, 而仅有 6.8% 为 4b 型, 其余 2.4% 为 4a 和 4c 型 [19]。然而在这 1275 批进口水产品中, 1/2a 型、1/2b 型与 1/2c 型仅分别占 13.0%、17.4% 与 4.4%, 而 4b 型则高达 65.2%。在 ICR 小鼠模型中, 这些分离株均具有与强毒参考株相当的毒力。

基于看家基因的多位点序列分析 (MLST) 因其良好的分辨力与重复性, 越来越多地被应用于食源性病原菌的分子分型 [7, 9]。毒力基因较看家基因更易发生重组, 具有更快的进化速度, 因此最初未被用于 MLST。但随后 Zhang 等通过大样本菌株的验证, 发现毒力基因多位点序列分析 (MVLST) 具有更高的分辨力 [12]。本研究亦发现毒力基因 *actA* 的多态性位点比例 (10.68%) 明显低于看家基因 *hisJ* (15.22%)

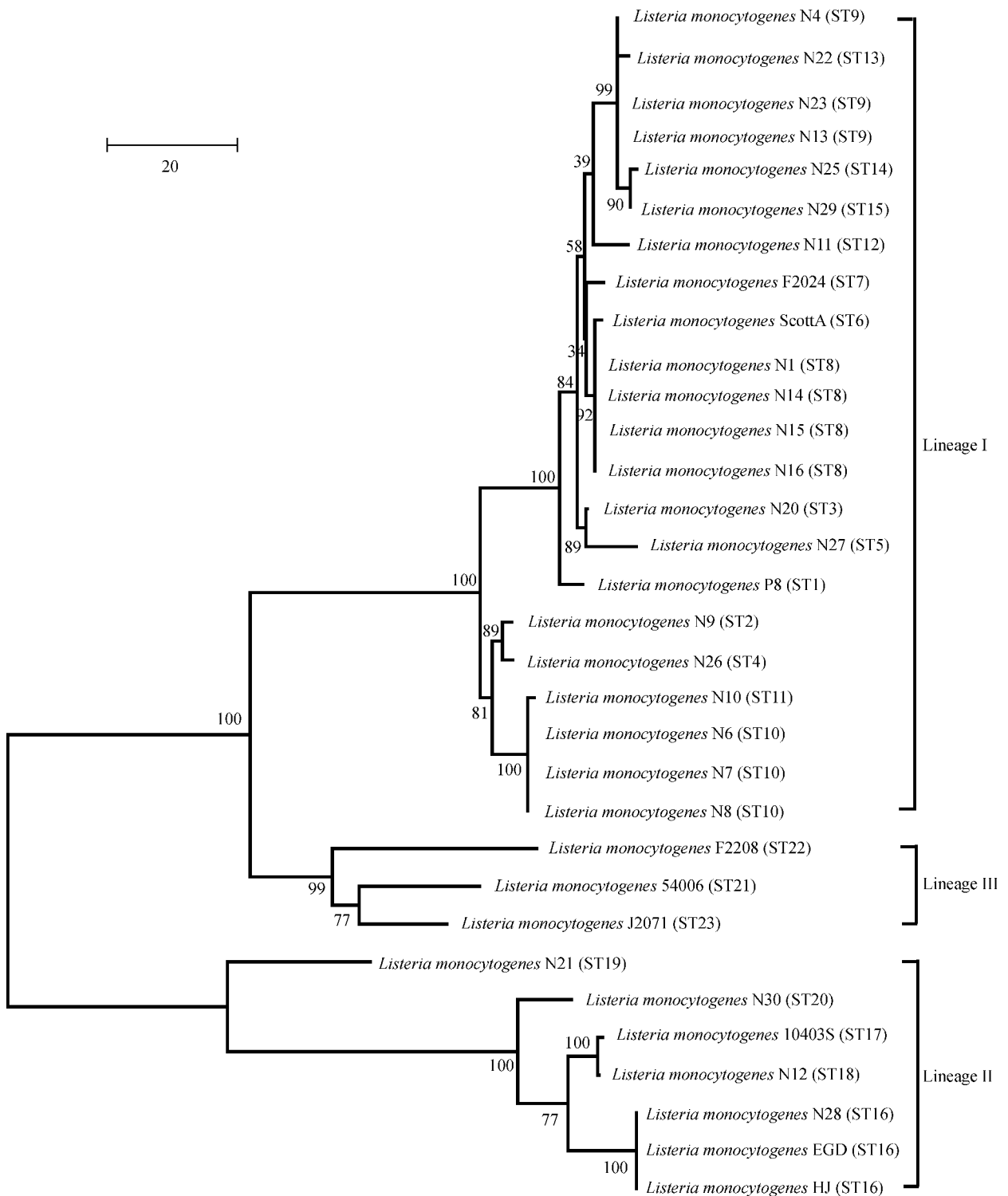


图 1 基于 *actA-hisJ-ribC-sigB* 串联序列的 Neighbor-joining 系统进化树

Fig.1 Neighbor-joining cladogram based on *actA-hisJ-ribC-sigB* concatenated gene cluster. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on the neighbor-joining analyses of 1000 resampled data sets. ST, sequencing type.

与 *ribC* (15.01%), 但其可分辨出最多的序列型 (19), 具有最强的分辨力 (0.95)。 *actA-hisJ-ribC-sigB* 串联序列可分辨出 23 个序列型, 分辨力达 0.97。系统进化树表明, 4b 型菌株较之 1/2a 型、1/2b

型、4a 型及 4c 型具有较高的同质性。

在这 23 个序列型中, 来自阿根廷鱿鱼的 4 个菌株与来自智利鱿鱼的 3 个菌株分别同属序列型 8 和 10, 可能分别为同一个克隆。更值得注意的是, 来自

美国三文鱼的 N4, 来自智利鱿鱼的 N13 与来自秘鲁鱿鱼的 N23 同为序列型 9, 因其来源地与分离产品均不同, 这可能为一流行非常广泛的克隆。根据本实验室的进一步研究, 该克隆属于流行性克隆 I (Epidemic clone I, ECI)(未发表数据)。1992 年法国因污染 ECI 的冻猪舌造成 85 人死亡, 为李斯特菌病迄今死亡人数最多的一次。加拿大、瑞士、美国、丹麦等也分别因 ECI 污染的凉菜、奶酪等引起李斯特菌病暴发^[3,9], ECI 的危害性可见一斑。

综上所述, 进口水产品中单增李斯特菌污染率与国内水产品相近, 但部分南美国家的水产品中的检出率特别高, 血清型分布以 4b 型为主, 且有流行性克隆 I 检出。因此, 对进口水产品中李斯特菌污染的潜在危险性不容忽视, 特别是要加强对单增李斯特菌检出率较高的部分南美国国家水产品的监测。

参考文献

- [1] Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 42(3): 3819 – 3822.
- [2] 陈健舜, 江玲丽, 方维焕. 李斯特菌毒力因子及其进化. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(4): 738 – 742.
- [3] Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1236 – 1243.
- [4] Chen J, Zhang X, Mei L, et al. Prevalence of *Listeria* in Chinese food products from 13 provinces between 2000 and 2007 and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2009, 6(1): 7 – 14.
- [5] Goulet V, Hedberg C, Monnier AL, et al. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14: 734 – 740.
- [6] Gerner-Smidt P, Ethelberg S, Schiellerup P, et al. Invasive listeriosis in Denmark 1994 – 2003: a review of 299 cases with special emphasis on risk factors on mortality. *Clinical Microbiology and Infection*, 2005, 11: 618 – 624.
- [7] Ragon M, Wirth T, Hollandt F, et al. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(9): e1000146.
- [8] Kathariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(11): 1811 – 1829.
- [9] Chen Y, Zhang W, Knabel SJ. Multi-virulence-locus sequencing typing identifies single nucleotide polymorphism which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(3): 835 – 846.
- [10] 陈健舜, 江玲丽, 吴蓓蓓, 等. 李斯特菌种别及毒力快速鉴定方法的建立及应用. *扬州大学学报(农业与生命科学版) (Journal of Yangzhou University)*, 2008, 29(S1): 118 – 122.
- [11] Jiang L, Chen J, Xu J, et al. Virulence characterization and genotypic analyses of *Listeria monocytogenes* isolates from food and processing environments in eastern China. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 121(1): 53 – 59.
- [12] Wiedmann M, Bruce JL, Keating C, et al. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection and Immunity*, 1997, 65(7): 2707 – 2716.
- [13] Liu D. *Listeria monocytogenes*: comparative interpretation of mouse virulence assay. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 233(1): 159 – 164.
- [14] Chen J, Jiang L, Chen X, et al. *Listeria monocytogenes* serovar 4a is a possible evolutionary intermediate between *L. monocytogenes* serovars 1/2a and 4b and *L. innocua*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(x) in press. (doi: 10.4014/jmb.0805.304)
- [15] Zhang W, Jayarao BM, Knabel SJ. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 913 – 920.
- [16] Altekruse SF, Cohen ML, Swerdlow DL. Emerging foodborne disease. *Emerging Infectious Diseases*, 1997, 3(3): 285 – 293.
- [17] Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 2006, 55(6): 645 – 659.
- [18] Buchrieser C. Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1147 – 1155.
- [19] Chen J, Luo X, Jiang L, et al. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiology*, 2009, 26(1): 103 – 111.

Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates from imported fishery products to China

Qiping Liang^{1,2}, Jianshun Chen¹, Qiaomiao Chen¹, Huajun Lao², Shaotang Huang², Weihuan Fang^{1*}

(¹Zhejiang University Institute of Preventive Veterinary Medicine and Zhejiang Provincial Key Laboratory of Prevent Veterinary Medicine, Hangzhou 310029, China)

(²Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo 315012, China)

Abstract: [Objective] We examined the prevalence, molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from imported fishery products to gain further insights on the public health risk caused by this important food borne pathogen. [Methods] *L. monocytogenes* isolates, screened from 1275 batches of fishery products imported from July 2007 to November 2008, were studied by lineage classification, serotyping, *in vivo* virulence assessment in ICR mouse model and multilocus sequence typing (MLST). [Results] Thirty-three batches were contaminated by *L. monocytogenes* (33/1275, 2.6%), in which serovar 4b dominated (65.2%), followed by serovars 1/2b (17.4%), 1/2a (13.0%) and 1/2c (4.4%). These isolates were all as virulent as *L. monocytogenes* reference strains. Of 23 selected *L. monocytogenes* isolates and 9 reference strains, 23 sequence types (STs) were recognized with discrimination index (D. I.) of 0.97, based on the concatenated gene cluster covering one virulent gene *actA*, two housekeeping genes *hisJ* and *ribC*, and one stress-response gene *sigB*. Remarkably, 3 isolates from American salmon, Argentina squid and Peru squid respectively belonged to ST9 which represented epidemic clone I (ECI). The isolation rate of *L. monocytogenes* in imported fishery products (2.6%) was similar to that in domestic fishery products (2.7%). Serovar 4b, which was more virulent than other serovars in humans, was dominant in imported fishery products, and even ECI was recognized. [Conclusion] All of these isolates were as virulent as *L. monocytogenes* reference strains, suggesting inspection and quarantine strategies of imported fishery products should be strengthened effectively.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; imported fishery products; serovar 4b; multilocus sequence typing; pathogenicity

(本文责编 : 张晓丽 , 谷志静)