

doi:10.3969/j.issn.1673-6184.2021.04.003

• 论著 •

新生儿及产妇感染单核细胞增生李斯特菌分离株的血清型、耐药性及分子特征研究

王双杰¹, 岑贞娇¹, 吕素玲², 曾尚娟¹, 阮佳玲¹, 李颖丰¹

1. 广西壮族自治区妇幼保健院检验科,广西壮族自治区 南宁 530002; 2. 广西壮族自治区疾病预防控制中心,广西壮族自治区 南宁 530028

摘要:为探讨广西南宁地区新生儿及产妇感染的单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, *Lm*)的血清型、药物敏感性及其分子流行病学特征,本研究回顾性收集2015—2017年广西壮族自治区妇幼保健院新生儿科及产科送检标本中分离的*Lm*,对其进行体外药物敏感性检测、血清学分型以及多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)分析菌株间的同源性;同时分析患儿及其母亲的临床特征及危险因素。结果显示,广西南宁地区新生儿感染*Lm*发病率较低,2015—2017年发病率为0.091%;所有分离的*Lm*分属4b(83.3%)和1/2a(16.7%)2个血清型;药物敏感性试验结果显示,*Lm*对青霉素、氨苄西林、复方新诺明及美罗培南均100%敏感,暂未发现耐药菌株;MLST分型共获得2个序列型(sequence types, ST),以ST-1型(83.3%)为主。其中分离自同一新生儿患者(Case 2)外周血(*Lm2*)、耳拭子(*Lm3*)及其母亲羊水(*Lm4*)、宫颈分泌物(*Lm5*)的4株菌具有相同的血清型、药物敏感性表型以及MLST分型。感染*Lm*的患儿主要表现为发热、肺炎、发绀、败血症及脑膜炎;而产妇感染则具有非特异性的临床特征。结果提示,广西南宁地区存在的*Lm*菌株为致病性较强的4b、1/2a血清型菌株;*Lm*可通过母婴垂直传播引起新生儿感染。因此,临床医师应重视孕产妇及新生儿*Lm*病原学检查、早期诊断和及时合理地使用抗生素预防、治疗,从而减少*Lm*引起的母婴感染。

关键词:新生儿;产妇;单核细胞增生李斯特菌;血清型;耐药;多位点序列分型

中图分类号: R378

文献标识码: A

Study of serotype distribution, antimicrobial resistance patterns and molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates from neonatal and maternal in Nanning, Guangxi Province

WANG Shuangjie¹, CEN Zhenjiao¹, LÜ Suling², ZENG Shangjuan¹, RUAN Jialing¹, LI Yingfeng¹

1. Department of Laboratory Medicine, The Maternal and Child Health Hospital in Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; 2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Prevention Control, Nanning 530028, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

基金项目:广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z20180091),广西壮族自治区妇幼保健院2018年“育苗计划”青年项目(GXWCH-YMJH-2018007)

通信作者:李颖丰

Correspondence to: LI Yingfeng E-mail: lyf1517@126.com

Abstract: In order to investigate the genotyping, molecular epidemiological characteristics in neonatal and maternal infection and sources of specimens as well as antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* (*Lm*) in neonatal and maternal in Nanning, Guangxi Province. The *Listeria monocytogenes* isolated from the department of neonatology and obstetrics of Maternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region from 2015 to 2017 were retrospectively reviewed, in vitro susceptibility testing and serological typing were carried out by a kit, and multilocus sequencing (MLST) for analysis of strains. And the clinical characteristics and risk factors analysis of perinatal listeriosis were analyzed. The results showed that the lower incidence of neonatal *Lm* infection was 0.091% between 2015 to 2017 in Nanning of Guangxi. The isolated *Lm* belonged to two stronger pathogenic strains serotypes [4b (83.3%) and 1/2a (16.7%)]. Drug susceptibility test showed that *Listeria monocytogenes* were 100% sensitive to penicillin, ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole and meropenem, and no resistant strains have been found. The genotyping obtains two sequence types (ST) by MLST, mainly ST-1 type (83.3%). Four strains of bacteria were isolated from a newborn patient(Case 2) of peripheral blood(*Lm*2), ear swab(*Lm*3) and amniotic fluid (*Lm*4) and cervical secretion(*Lm*5) of her mother, which were confirmed to be the same clone by antibiotic sensitivity test, serotype and MLST. The *Listeria monocytogenes* infections in pregnant women and their newborn infants may be derived from the same clone via vertical transmission. All the neonates in the reported cases had symptoms, including fever, pneumonia, Bluish-colored skin, Sepsis and Meningitis. All the pregnant women in the reported cases had atypical and nonspecific clinical symptoms. Clinical attention should be paid to the pathogen examination of *Listeria monocytogenes* in maternal and neonatal infections, early diagnosis, prevention and reduction of maternal-infant infection caused by *Listeria monocytogenes* by timely and reasonable antibiotic treatment.

Keywords: Newborn; Maternal; *Listeria monocytogenes*; Serotype; Drug tolerance; Multilocus sequence typing

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, *Lm*)可引起人畜共患李斯特菌病^[1],尤其是在孕产妇、新生儿、老年人和免疫功能低下者中可引起严重的侵袭性疾病,死亡率高达20%~30%^[2-4]。*Lm*为兼性胞内寄生菌,广泛存在于自然界,如水、土壤、腐败植物等。*Lm*能在0~45℃环境中生长,具有较强的耐干冷环境特性,易污染食品加工环境,导致食物污染引起人、畜感染,已成为重要的威胁食品安全的食源性致病菌^[5-6]。*Lm*可引起孕产妇宫内感染导致流产、早产及死胎^[7],其主要通过胎盘垂直传播或吸入污染的羊水引起新生儿严重感染。目前国内关于孕产妇感染*Lm*导致新生儿感染的病例不断被报道,提示孕产妇及新生儿*Lm*感染正在增加,且致死率升高^[8-9]。当前针对新生儿*Lm*感染的发病率、临床分离株分子流行病学特点及临床特征的研究尚缺乏,本研究回顾性收集分析2015—2017年广西壮族自治区妇幼保健院从新生儿科及产科送检的血液、羊水、宫颈分泌物及耳拭子标本中分离的*Lm*毒株资料,对分离株进行体外抗生素药物敏感试验、血清学分型及多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)后做进一步分

析,拟从药物敏感性、血清型和基因遗传背景角度为*Lm*的临床诊治提供更多的流行病学信息。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

临床分离菌株:分别从新生儿科患儿送检的血液、耳拭子标本,以及从产科送检的患儿母亲血液、宫颈分泌物、羊水标本中分离培养*Lm*。在哥伦比亚血琼脂平板上挑取呈现β-溶血环的菌落单克隆置于菌种保存管中,储存在-80℃低温冰箱备用。

1.2 实验菌株的鉴定及体外药物敏感性试验

菌株鉴定:使用革兰阳性菌鉴定卡片GP鉴定卡(法国生物梅里埃公司),严格按照厂家操作说明对所分离菌进行鉴定。

体外药物敏感性试验:采用*Lm*微量肉汤稀释法药敏试剂盒(上海星佰生物技术有限公司),严格按照厂家操作说明对所分离的*Lm*进行药敏试验:挑取数个新鲜菌落,用灭菌生理盐水制成0.5麦氏单位的菌悬液后,吸取菌悬液60μL,加至营养肉汤培养液中(12mL)。按说明书要求,加入600μL无菌马血清,完全混匀。用微量移液器吸取稀释菌液

100 μL, 加至除阴性对照孔外的微量药敏板中, 阴性对照孔加入 100 μL 无菌营养肉汤培养液。放入恒温培养箱中 35 °C 培养 20~24 h。根据美国临床和实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 关于 *Lm* 抗微生物药物敏感性试验的要求, 选择青霉素、氨苄西林、复方新诺明及美罗培南等药物进行测试。药敏试验结果判断参照不常见菌和苛氧菌药物敏感性试验解释标准^[10]执行。

1.3 血清学分型

Lm 的血清型由 O 抗原和 H 抗原共同决定。参照 *Lm* 诊断血清使用说明书, O 抗原检测采用玻片凝集法, H 抗原检测采用试管凝集法。所用试剂盒来自日本生研(Denka Seiken 公司, 日本)。结果判断参照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

《单核细胞增生李斯特菌血清分型方法》^[11]。

1.4 *Lm* 的 MLST 检测

1.4.1 *Lm* 总 DNA 提取 采用 lysis buffer for microorganism to direct PCR 试剂盒 (大连 TaKaRa 公司, Code No. 9164) 提取菌株 DNA, 同时采用 NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计 (Thermo Scientific 公司, 美国) 测定 DNA 浓度并于 -20 °C 保存备用。

1.4.2 *Lm* 的 MLST 分析 将所分离的 *Lm* 进行 MLST 分析。查阅相关文献^[12]可知, 所使用的 *Lm* 的 7 对管家基因分别为 *abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh* 及 *lhkA*; 引物序列均摘自 Institut Pasteur 在线数据库 (<http://bigsdb.pasteur.fr/index.html>), 具体如表 1 所示。

表 1 *Lm* 的 MLST 分型中 7 对管家基因引物序列

Tab. 1 The genes and primers of 7 housekeeping genes of *Listeria monocytogenes* used for MLST

管家基因	引物序列(5'-3')	扩增产物(bp)
<i>abcZ</i>	Fwd 5'-TCGCTGCTGCCACTTTATCCA-3'	537
	Rev 5'-CTCAAGGTGCGCGTTAGAG-3'	
<i>bglA</i>	Fwd 5'-GCCGACTTTTATGGGGTGGAG-3'	399
	Rev 5'-CCGATTAAATACGGTGCGGACATA-3'	
<i>cat</i>	Fwd 5'-ATTGGCGCATTTGATAGAGA-3'	486
	Rev 5'-CAGATTGACGATTCTGCTTTG-3'	
<i>dapE</i>	Fwd 5'-CGACTAATGGGCATGAAGAACAAAG-3'	462
	Rev 5'-CATCGAACTATGGGCATTTTACC-3'	
<i>dat</i>	Fwd 5'-GAAAGAGAAGATGCCACAGTTGA-3'	471
	Rev 5'-CTGCGTCCATAATACACCATCTT-3'	
<i>ldh</i>	Fwd 5'-GTATGATTGACATAGATAAAGA-3'	453
	Rev 5'-CTATAAATGTCGTTCATACCAT-3'	
<i>lhkA</i>	Fwd 5'-AGAATGCCAACGACGAAACC-3'	480
	Rev 5'-CTGGGAAACATCAGCAATAAAC-3'	

1.4.3 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增产物分析 采用 50 μL PCR 体系: 6 μL DNA 模板, 正、反向引物各 2 μL, 25 μL Taq PCR MasterMix [天根生化科技(北京)有限公司], 15 μL H₂O。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 52 °C (*bglA* 为 45 °C) 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 终末延伸 10 min。PCR 产

物经电泳验证后, 送至广州艾基生物技术有限公司测序。使用 Chormas 软件查看编辑 DNA 峰形图, 评估测序结果质量。将所得到的 *Lm* 7 对管家基因测序结果提交至 *Lm* MLST 数据库 (<http://bigsdb.pasteur.fr/listeria/listeria.html>) 中进行分析, 确定各个管家基因的等位基因数值, 与已公布的 *Lm* 7 对管家基因的等位基因进行比较, 进而确

doi:10.3969/j.issn.1673-6184.2021.04.003

• 论著 •

新生儿及产妇感染单核细胞增生李斯特菌分离株的血清型、耐药性及分子特征研究

王双杰¹,岑贞娇¹,吕素玲²,曾尚娟¹,阮佳玲¹,李颖丰¹

1. 广西壮族自治区妇幼保健院检验科,广西壮族自治区 南宁 530002; 2. 广西壮族自治区疾病预防控制中心,广西壮族自治区 南宁 530028

摘要:为探讨广西南宁地区新生儿及产妇感染的单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, *Lm*)的血清型、药物敏感性及其分子流行病学特征,本研究回顾性收集2015—2017年广西壮族自治区妇幼保健院新生儿科及产科送检标本中分离的*Lm*,对其进行体外药物敏感性检测、血清学分型以及多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)分析菌株间的同源性;同时分析患儿及其母亲的临床特征及危险因素。结果显示,广西南宁地区新生儿感染*Lm*发病率较低,2015—2017年发病率为0.091%;所有分离的*Lm*分属4b(83.3%)和1/2a(16.7%)2个血清型;药物敏感性试验结果显示,*Lm*对青霉素、氨基西林、复方新诺明及美罗培南均100%敏感,暂未发现耐药菌株;MLST分型共获得2个序列型(sequence types, ST),以ST-1型(83.3%)为主。其中分离自同一新生儿患者(Case 2)外周血(*Lm2*)、耳拭子(*Lm3*)及其母亲羊水(*Lm4*)、宫颈分泌物(*Lm5*)的4株菌具有相同的血清型、药物敏感性表型以及MLST分型。感染*Lm*的患儿主要表现为发热、肺炎、发绀、败血症及脑膜炎;而产妇感染则具有非特异性的临床特征。结果提示,广西南宁地区存在的*Lm*菌株为致病性较强的4b、1/2a血清型菌株;*Lm*可通过母婴垂直传播引起新生儿感染。因此,临床医师应重视孕产妇及新生儿*Lm*病原学检查、早期诊断和及时合理地使用抗生素预防、治疗,从而减少*Lm*引起的母婴感染。

关键词:新生儿;产妇;单核细胞增生李斯特菌;血清型;耐药;多位点序列分型

中图分类号: R378

文献标识码: A

Study of serotype distribution, antimicrobial resistance patterns and molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates from neonatal and maternal in Nanning, Guangxi Province

WANG Shuangjie¹, CEN Zhenjiao¹, LÜ Suling², ZENG Shangjuan¹, RUAN Jialing¹, LI Yingfeng¹

1. Department of Laboratory Medicine, The Maternal and Child Health Hospital in Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; 2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Prevention Control, Nanning 530028, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

基金项目:广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z20180091),广西壮族自治区妇幼保健院2018年“育苗计划”青年项目(GXWCH-YMJH-2018007)

通信作者:李颖丰

Correspondence to: LI Yingfeng E-mail: lyf1517@126.com

Abstract: In order to investigate the genotyping, molecular epidemiological characteristics in neonatal and maternal infection and sources of specimens as well as antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* (*Lm*) in neonatal and maternal in Nanning, Guangxi Province. The *Listeria monocytogenes* isolated from the department of neonatology and obstetrics of Maternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region from 2015 to 2017 were retrospectively reviewed, in vitro susceptibility testing and serological typing were carried out by a kit, and multilocus sequencing (MLST) for analysis of strains. And the clinical characteristics and risk factors analysis of perinatal listeriosis were analyzed. The results showed that the lower incidence of neonatal *Lm* infection was 0.091% between 2015 to 2017 in Nanning of Guangxi. The isolated *Lm* belonged to two stronger pathogenic strains serotypes [4b (83.3%) and 1/2a (16.7%)]. Drug susceptibility test showed that *Listeria monocytogenes* were 100% sensitive to penicillin, ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole and meropenem, and no resistant strains have been found. The genotyping obtains two sequence types (ST) by MLST, mainly ST-1 type (83.3%). Four strains of bacteria were isolated from a newborn patient(Case 2) of peripheral blood(*Lm*2), ear swab(*Lm*3) and amniotic fluid (*Lm*4) and cervical secretion(*Lm*5) of her mother, which were confirmed to be the same clone by antibiotic sensitivity test, serotype and MLST. The *Listeria monocytogenes* infections in pregnant women and their newborn infants may be derived from the same clone via vertical transmission. All the neonates in the reported cases had symptoms, including fever, pneumonia, Bluish-colored skin, Sepsis and Meningitis. All the pregnant women in the reported cases had atypical and nonspecific clinical symptoms. Clinical attention should be paid to the pathogen examination of *Listeria monocytogenes* in maternal and neonatal infections, early diagnosis, prevention and reduction of maternal-infant infection caused by *Listeria monocytogenes* by timely and reasonable antibiotic treatment.

Keywords: Newborn; Maternal; *Listeria monocytogenes*; Serotype; Drug tolerance; Multilocus sequence typing

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, *Lm*)可引起人畜共患李斯特菌病^[1],尤其是在孕产妇、新生儿、老年人和免疫功能低下者中可引起严重的侵袭性疾病,死亡率高达20%~30%^[2-4]。*Lm*为兼性胞内寄生菌,广泛存在于自然界,如水、土壤、腐败植物等。*Lm*能在0~45℃环境中生长,具有较强的耐干冷环境特性,易污染食品加工环境,导致食物污染引起人、畜感染,已成为重要的威胁食品安全的食源性致病菌^[5-6]。*Lm*可引起孕产妇宫内感染导致流产、早产及死胎^[7],其主要通过胎盘垂直传播或吸入污染的羊水引起新生儿严重感染。目前国内关于孕产妇感染*Lm*导致新生儿感染的病例不断被报道,提示孕产妇及新生儿*Lm*感染正在增加,且致死率升高^[8-9]。当前针对新生儿*Lm*感染的发病率、临床分离株分子流行病学特点及临床特征的研究尚缺乏,本研究回顾性收集分析2015—2017年广西壮族自治区妇幼保健院从新生儿科及产科送检的血液、羊水、宫颈分泌物及耳拭子标本中分离的*Lm*毒株资料,对分离株进行体外抗生素药物敏感性试验、血清学分型及多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)后做进一步分

析,拟从药物敏感性、血清型和基因遗传背景角度为*Lm*的临床诊治提供更多的流行病学信息。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

临床分离菌株:分别从新生儿科患儿送检的血液、耳拭子标本,以及从产科送检的患儿母亲血液、宫颈分泌物、羊水标本中分离培养*Lm*。在哥伦比亚血琼脂平板上挑取呈现β-溶血环的菌落单克隆置于菌种保存管中,储存在-80℃低温冰箱备用。

1.2 实验菌株的鉴定及体外药物敏感性试验

菌株鉴定:使用革兰阳性菌鉴定卡片GP鉴定卡(法国生物梅里埃公司),严格按照厂家操作说明对所分离菌进行鉴定。

体外药物敏感性试验:采用*Lm*微量肉汤稀释法药敏试剂盒(上海星佰生物技术有限公司),严格按照厂家操作说明对所分离的*Lm*进行药敏试验:挑取数个新鲜菌落,用灭菌生理盐水制成0.5麦氏单位的菌悬液后,吸取菌悬液60μL,加至营养肉汤培养液中(12mL)。按说明书要求,加入600μL无菌马血清,完全混匀。用微量移液器吸取稀释菌液

100 μL, 加至除阴性对照孔外的微量药敏板中, 阴性对照孔加入 100 μL 无菌营养肉汤培养液。放入恒温培养箱中 35 °C 培养 20~24 h。根据美国临床和实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 关于 *Lm* 抗微生物药物敏感性试验的要求, 选择青霉素、氨苄西林、复方新诺明及美罗培南等药物进行测试。药敏试验结果判断参照不常见菌和苛氧菌药物敏感性试验解释标准^[10]执行。

1.3 血清学分型

Lm 的血清型由 O 抗原和 H 抗原共同决定。参照 *Lm* 诊断血清使用说明书, O 抗原检测采用玻片凝集法, H 抗原检测采用试管凝集法。所用试剂盒来自日本生研(Denka Seiken 公司, 日本)。结果判断参照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

《单核细胞增生李斯特菌血清分型方法》^[11]。

1.4 *Lm* 的 MLST 检测

1.4.1 *Lm* 总 DNA 提取 采用 lysis buffer for microorganism to direct PCR 试剂盒 (大连 TaKaRa 公司, Code No. 9164) 提取菌株 DNA, 同时采用 NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计 (Thermo Scientific 公司, 美国) 测定 DNA 浓度并于 -20 °C 保存备用。

1.4.2 *Lm* 的 MLST 分析 将所分离的 *Lm* 进行 MLST 分析。查阅相关文献^[12]可知, 所使用的 *Lm* 的 7 对管家基因分别为 *abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh* 及 *lhkA*; 引物序列均摘自 Institut Pasteur 在线数据库 (<http://bigsdb.pasteur.fr/index.html>), 具体如表 1 所示。

表 1 *Lm* 的 MLST 分型中 7 对管家基因引物序列

Tab. 1 The genes and primers of 7 housekeeping genes of *Listeria monocytogenes* used for MLST

管家基因	引物序列(5'-3')	扩增产物(bp)
<i>abcZ</i>	Fwd 5'-TCGCTGCTGCCACTTTATCCA-3'	537
	Rev 5'-CTCAAGGTGCGCGTTAGAG-3'	
<i>bglA</i>	Fwd 5'-GCCGACTTTTATGGGGTGGAG-3'	399
	Rev 5'-CCGATTAAATACGGTGCGGACATA-3'	
<i>cat</i>	Fwd 5'-ATTGGCGCATTTGATAGAGA-3'	486
	Rev 5'-CAGATTGACGATTCTGCTTTG-3'	
<i>dapE</i>	Fwd 5'-CGACTAATGGGCATGAAGAACAAAG-3'	462
	Rev 5'-CATCGAACTATGGGCATTTTACC-3'	
<i>dat</i>	Fwd 5'-GAAAGAGAAGATGCCACAGTTGA-3'	471
	Rev 5'-CTGCGTCCATAATACACCATCTT-3'	
<i>ldh</i>	Fwd 5'-GTATGATTGACATAGATAAAGA-3'	453
	Rev 5'-CTATAAATGTCGTTCATACCAT-3'	
<i>lhkA</i>	Fwd 5'-AGAATGCCAACGACGAAACC-3'	480
	Rev 5'-CTGGGAAACATCAGCAATAAAC-3'	

1.4.3 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增产物分析 采用 50 μL PCR 体系: 6 μL DNA 模板, 正、反向引物各 2 μL, 25 μL Taq PCR MasterMix [天根生化科技(北京)有限公司], 15 μL H₂O。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 52 °C (*bglA* 为 45 °C) 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 终末延伸 10 min。PCR 产

物经电泳验证后, 送至广州艾基生物技术有限公司测序。使用 Chormas 软件查看编辑 DNA 峰形图, 评估测序结果质量。将所得到的 *Lm* 7 对管家基因测序结果提交至 *Lm* MLST 数据库 (<http://bigsdb.pasteur.fr/listeria/listeria.html>) 中进行分析, 确定各个管家基因的等位基因数值, 与已公布的 *Lm* 7 对管家基因的等位基因进行比较, 进而确

定 *Lm* 临床分离株的序列分型 (sequence type, ST)。

2 结果

2.1 临床感染 *Lm* 情况分析

从 2015 年 1 月—2017 年 12 月广西妇幼保健院新生儿科及产科送检的血液、羊水、宫颈分泌物及耳拭子标本中共分离培养出 6 株 *Lm*, 分别命名为 *Lm1*~*Lm6*。其中 *Lm1*、*Lm2* 及 *Lm6* 从新生儿血标本中分离获得, *Lm3* 和 *Lm4* 分别从患儿母亲(病例 2)羊水及宫颈分泌物标本中分离获得, *Lm5* 从新生儿(病例 2)耳拭子标本中分离获得(表 2)。期间共计 32 864 例活产儿纳入本研究, 新生儿 *Lm* 发病率为 0.091% (3/32 864), 2 例患儿最终放弃治

疗死亡, 死亡率高达 66.7% (2/3)。其中血培养检出 *Lm* 的 2 例患儿(病例 1 及病例 2), 均因宫内感染导致胎儿窘迫, 行剖宫产娩出, 为早产(<32 周)低出生体重儿(出生体重<2 500 g), 出生后均出现呼吸困难、气促、呼吸不规则, 可见三凹征, 两肺呼吸音粗; 1 例患儿(病例 6)顺产娩出, 出生后出现呼吸困难、气促、呻吟、少许红色血性痰、指端凉以及心率、血氧下降等重度窒息症状(见表 2)。

患儿的母亲主要表现为呼吸系统症状、全身酸痛、乏力、急性发热等似流感样轻度症状, 同时伴有胎膜早破、先兆早产、胎儿窘迫等宫内感染症状, 流行病学调查显示均存在不洁净饮食史, 近期食用过易被 *Lm* 污染的食物如冰淇淋、生冷食物、凉拌菜及蔬菜沙拉等, 这些均增加了感染的风险(见表 2)。

表 2 侵袭性 *Lm* 感染患儿及其母亲的流行病学特征

Tab. 2 Epidemiological characteristics of invasive *Lm* infection in neonates and their mothers

特征	病例编号					
	病例 1 (<i>Lm1</i>)	病例 2 (<i>Lm2</i>)	病例 3 (<i>Lm3</i>)	病例 4 (<i>Lm4</i>)	病例 5 (<i>Lm5</i>)	病例 6 (<i>Lm6</i>)
性别	男	女	女	女	女	男
标本类型	PB	PB	AM	CX	EA	PB
出生体重(g)	2 020	1 520	\	\	\	2 700
胎龄(wk)	32	31	\	\	\	37
生产方式	剖宫产	剖宫产	\	\	\	顺产
Apgar 评分	8-10-10	8-9-9	\	\	\	2-2-4
早发型/晚发型	早发型	早发型	\	\	\	早发型
患儿临床特征						
(发热/发绀/易激怒/败血症/肺炎/脑膜炎)	发热、发绀、败血症、肺炎、脑膜炎	发热、发绀、败血症、肺炎、脑膜炎	\	\	\	发热、发绀、败血症、肺炎、脑膜炎
患儿母亲临床特征						
(呼吸系统症状/绒毛膜羊膜炎/宫内感染/胎膜早破/腹痛/不洁净饮食史)	呼吸系统症状、宫内感染、胎膜早破、不洁净饮食史	呼吸系统症状、宫内感染、胎膜早破、不洁净饮食史	\	\	\	呼吸系统症状、宫内感染、胎膜早破、不洁净饮食史
ST 型	ST-1	ST-1	ST-1	ST-1	ST-1	ST-20
血清型	4b	4b	4b	4b	4b	1/2a
结局	痊愈	死亡	痊愈	痊愈	死亡	死亡

PB: 外周血; AM: 羊水; CX: 宫颈分泌物; EA: 耳拭子; \: 无。

2.2 分离株药物敏感性试验及血清学分型

Lm 药物敏感性试验结果显示,分离株对 CLSI M45 推荐检测的 4 种抗菌药物均 100% 敏感。最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 分别为青霉素 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、氨苄西林 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、复方新诺明 0.015/0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及美罗培南 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

血清凝集试验检测发现, *Lm* 分离株分属 2 个血清型, 分别为 4b(5 株) 和 1/2a(1 株)。其中 4b 是分离率最高的血清型, 占 83.3% (5/6); 其次是 1/2a, 占 16.7% (1/6) (见表 2)。

2.3 MLST 分型结果

按照 Institut Pasteur MLST 官网 (<http://bigsdb.pasteur.fr/>) 提供的特异性引物序列合成引物, 经过特定的 PCR 体系扩增后, 得到 *Lm* 的 7 对管家基因 *abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh* 及 *lhkA* 的特异性 PCR 产物, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳可见各个管家基因清晰特异的目的条带, 且阴性无污染, 无明显二聚体。

将 *Lm* 分离株的 7 个管家基因等位基因数值提交至 MLST 数据库以获取对应的 ST 值。ST 结果显示, 临床所分离的 *Lm* 分为 2 个不同的 ST 型, 对照数据库中的序列分型结果均能找到相同等位基因数值排列, 即均为已知的 ST 型(见表 2)。*Lm* 的 MLST 分析定义 7 个管家基因的等位基因型中, 拥有 5 个以上相同等位基因型的菌株组成一个克隆复合物 (clonal complex, CC)^[13]。在确定 ST 的基础上应用 Institut Pasteur MLST 数据库对分离的菌株进行同源性分析, 结果显示, 所分离的 6 株 *Lm* 可分为 2 个 ST 型 (ST-1 和 ST-20), ST-1 属于 CC1 克隆复合物, ST-20 属于 CC20 克隆复合物。

3 讨论

李斯特菌病具有低致病率和高致死性的特点。据统计, 国外新生儿李斯特菌病发病率为 0.52‰^[14], 死亡率达 20%~30%^[15]。孕产妇感染 *Lm* 致流产及早产的发生率为 2.4‰~5.5‰, 与种族、饮食习惯及社会经济状况等有关^[16-18]。目前, 国内同类研究报道较少, 本研究针对新生儿 *Lm* 感染的发病率及临床分离株的血清型、耐药性及分子特征进行研究, 同时分析总结患儿及其母亲的临床特征。结果显示, 广西南宁地区新生儿李斯特菌病发病率为 0.091% (3/32 864), 低于国外水平, 可能与我国以熟食为主的饮食习惯有较大关系。本研究

统计发现该地区新生儿感染 *Lm* 的死亡率高达 66.7% (2/3), 远高于其他地区水平。其中 3 例(病例 1、病例 2 及病例 6)患儿均为败血症且于出生后 24 h 内发病(早发型感染, 即出生后 6 d 内发病), 患儿母亲均有宫内感染指征, 提示大多数早发型感染在子宫内即发病。这 3 例早发型感染患儿(患儿出生后不久均出现呼吸困难、气促、发绀)均发生严重的败血症合并化脓性脑膜炎, 最终 1 例(病例 1)患儿治愈出院, 2 例(病例 2 及病例 6)患儿因感染严重而放弃治疗。国内外因孕产妇感染 *Lm* 导致新生儿败血症及化脓性脑膜炎死亡的病例不断有报道^[19], 且有上升趋势。李斯特菌病多为散发病例, 且潜伏期较长, 大多数情况下呈隐性感染, 无明显特异性症状^[20]。本研究中 3 例患儿母亲的临床症状均不典型, 具体表现为呼吸道感染(似流感样)、产前发热、宫内感染、胎膜早破及 C 反应蛋白显著持续升高(等), 疾病预防控制中心(简称“疾控中心”)流行病学调查显示均有不良饮食因素如凉食及生食蔬菜、水果史, 增加了感染 *Lm* 的风险。以上资料提示临床医师面对孕晚期产妇出现急性发热、腹痛、羊水浑浊及轻度流感样等症状时, 应重视排查其感染 *Lm* 的可能性, 从而进行病原学检查, 做到早期诊断与及时治疗, 可降低新生儿感染发生。

Lm 通常对青霉素、氨苄西林、复方新诺明及美罗培南等抗生素敏感。本研究结果显示, 所有分离的 *Lm* 对上述 4 种抗生素的敏感率均为 100%, 暂未发现该地区有耐药菌株。需要特别注意该菌对头孢菌素天然耐药, 而临床针对感染 *Lm* 孕产妇的标准治疗方案多为头孢菌素。本研究中 1 例患儿(病例 6)胎龄 37 周, Apgar 评分 2-2-4, 出生体重 2 700 g, C 反应蛋白 66.22 mg/L, 在当地医院未明确病原菌前经验性使用头孢他啶抗感染, 转至广西壮族自治区妇幼保健院后, 病情严重, 予美罗培南 + 氨苄西林舒巴坦抗感染, 但最终因病情危重放弃治疗。

Lm 目前可分为 13 个血清型, 而引起人类感染的 90% 血清型^[21-22] 为 1/2a、1/2b 和 4b, 均具有较强的致病性。其中 1/2a 和 1/2b 血清型主要引起 *Lm* 散发感染, 4b 血清型主要引起 *Lm* 大范围暴发流行^[23-24]。本研究结果中新生儿及产妇 *Lm* 血清型以 4b 型为主, 占 83.3%, 血清型 1/2b 型占 16.7%, 与国内外相关研究一致^[25-27]。结果提示该地区存在可引起暴发流行的血清型别, 须加强食源性疾病监测, 警惕大范围暴发流行的可能。

MLST 是一种基于核酸序列测定的分型方法,

可对病原菌生物进化进行分析及对耐药菌株进行追踪^[28]。本研究对来源于新生儿血培养及患儿母亲分泌物的6株*Lm*进行MLST检测分析,ST分型结果显示,临床所分离的6株*Lm*可分为2个ST型(ST-1和ST-20),ST-1属于CC1克隆复合物,ST-20属于CC20克隆复合物。同源性分析结果表明广西南宁地区新生儿*Lm*感染的主要流行菌株为ST-1(83.3%)。在本研究中,分析来自同一新生儿患者(病例2)外周血(*Lm*2)、耳拭子(*Lm*3)及其母亲羊水(*Lm*4)、宫颈分泌物(*Lm*5)的4株菌,发现其具有相同的药物敏感表型、血清型以及MLST分型,提示新生儿早发型*Lm*感染源于宫内感染,由母婴垂直传播引起或在分娩过程中新生儿受到产道的病原菌感染。

被*Lm*感染的孕妇在围生期可有轻微自限性流感样症状、发热、腹痛、呕吐、腹泻、先兆早产等不同表现;新生儿则可表现出发热、气促、皮疹、反应差、呼吸异常、惊厥等,但临床表现缺乏特异性。因此,应高度重视具有高危因素的孕产妇及新生儿,警惕宫内感染的可能,及时给予适当的干预。在未明确病原菌前,临床经验性用药方案多为头孢菌素类抗生素,但须注意*Lm*对头孢菌素天然耐药。本研究纳入病例数较少,主要原因为目前该地区产*Lm*感染率较低,但研究内容仍可在一定程度上为临床诊治提供数据支持。实验室检出*Lm*后,应主动联系临床,并告知疾控中心食源性疾病监测工作组,及时对孕期妇女、新生儿家属进行食品安全宣传教育及流行病学调查,降低妊娠期感染率,减少新生儿李斯特菌病,杜绝*Lm*感染暴发的可能。

综上所述,临床医师积极采集孕产妇的血液、羊水及宫颈分泌物进行*Lm*检测,可对部分病例做出早期诊断;胎儿出生时可对血液、脑脊液、胎盘、羊水、皮肤拭子或婴儿的胎粪等标本进行*Lm*筛查培养,为临床医师明确病因、早期诊断、及时精准治疗、降低病死率提供帮助。

参考文献

- [1] Bundrant BN, Hutchins T, den Bakker HC, Fortes E, Wiedmann M. Listeriosis outbreak in dairy cattle caused by an unusual *Listeria monocytogenes* serotype 4b strain [J]. J Vet Diagn Invest, 2011, 23(1): 155-158.
- [2] Kruszyna T, Walsh M, Peltekian K, Molinari M. Early invasive *Listeria monocytogenes* infection after orthotopic liver transplantation: case report and review of the literature [J]. Liver Transpl, 2008, 14(1): 88-91.
- [3] Pontello M, Guaita A, Sala G, Cipolla M, Gattuso A, Sonnessa M, Gianfranceschi MV. *Listeria monocytogenes* serotypes in human infections (Italy, 2000-2010) [J]. Ann Ist Super Sanita, 2012, 48(2): 146-150.
- [4] Foerster C, Vidal L, Troncoso M, Figueroa G. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cattle and ground beef by pulsed-field gel electrophoresis [J]. Rev Argent Microbiol, 2012, 44(3): 195-200.
- [5] Buchrieser C, Rusniok C, Consortium TL, Kunst F, Cossart P, Glaser P. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, 35: 207-213.
- [6] Cartwright EJ, Jackson KA, Johnson SD, Graves LM, Silk BJ, Mahon BE. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008 [J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(1): 1-9.
- [7] Smith B, Kemp M, Ethelberg S, Schiellerup P, Bruun BG, Gerner-Smidt P, Christensen JJ. *Listeria monocytogenes*: maternal-foetal infections in Denmark 1994-2005 [J]. Scand J Infect Dis, 2009, 41(1): 21-25.
- [8] Feng Y, Wu S, Varma JK, Klena JD, Angulo FJ, Ran L. Systematic review of human Listeriosis in China, 1964-2010 [J]. Trop Med Int Health, 2013, 18(10): 1248-1256.
- [9] 范张玲. 李斯特菌病的流行病、临床及病原学特征初探[D/OL]. 北京, 北京协和医学院, 2019. https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CMFD&dbname=CMFD20001&filename=1019267503.nh&uniplatform=NZKPT&v=h14_uPhRGFko7DqWWF-zLROYadBuUZ5CgkuPCaFdEfpREd0nQPCAJsWFkh4ml2Lj
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria [M]. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 单核细胞增生李斯特氏菌血清分型方法: SN/T2521-2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [12] Stessl B, Rückerl I, Wagner M. Multilocus sequence typing (MLST) of *Listeria monocytogenes* [J]. Methods Mol Biol, 2014, 1157: 73-83.
- [13] Salcedo C, Arreaza L, Alcalá B, de la Fuente L, Vázquez JA. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(2): 757-762.
- [14] Imanishi M, Routh JA, Klaber M, Gu W, Vanselow MS, Jackson KA, Sullivan-Chang L, Heinrichs G, Jain N, Albanese B, Callaghan WM, Mahon BE, Silk BJ. Estimating the attack rate of pregnancy-associated listeriosis during a large outbreak [J]. Infect Dis Obstet Gynecol, 2015, 201479. doi: 10.1155/2015/201479.
- [15] Hedberg C. Food-related illness and death in the United

- States [J]. *Emerg Infect Dis*, 1999, 5(6): 840-842. doi: 10.3201/eid0506.990624.
- [16] Goulet V, Hebert M, Hedberg C, Laurent E, Vaillant V, de Valk H, Desenclos JC. Incidence of Listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis [J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 54(5): 652-660.
- [17] Elinav H, Hershko-Klement A, Valinsky L, Jaffe J, Wiseman A, Shimon H, Braun E, Paitan Y, Block C, Sorek R, Nir-Paz R; Israeli Listeria Study Group. Pregnancy-associated listeriosis: clinical characteristics and geospatial analysis of a 10-year period in Israel [J]. *Clin Infect Dis*, 2014, 59(7): 953-961.
- [18] Mateus T, Silva J, Maia RL, Teixeira P. Listeriosis during pregnancy: a public health concern [J]. *ISRN Obstet Gynecol*, 2013: 851712. doi: 10.1155/2013/851712.
- [19] Pagliano P, Arslan F, Ascione T. Epidemiology and treatment of the commonest form of Listeriosis: meningitis and bacteraemia [J]. *Infez Med*, 2017, 25(3): 210-216.
- [20] Madjunkov M, Chaudhry S, Ito S. Listeriosis during pregnancy [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2017, 296 (2): 143-152.
- [21] Roussel S, Félix B, Grant K, Dao TT, Brisabois A, Amar C. Fluorescence amplified fragment length polymorphism compared to pulsed field gel electrophoresis for *Listeria monocytogenes* subtyping [J]. *BMC Microbiol*, 2013, 13: 14. doi: 10.1186/1471-2180-13-14.
- [22] Werbrouck H, Botteldoorn N, Ceelen L, Decostere A, Uyttendaele M, Herman L, van Coillie E. Characterization of virulence properties of *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains of different origins [J]. *Zoonoses Public Health*, 2008, 55(5): 242-248.
- [23] Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen [J]. *Microbiol Rev*, 1991, 55(3): 476-511.
- [24] Schwartz B, Hexter D, Broome CV, Hightower AW, Hirschhorn RB, Porter JD, Hayes PS, Bibb WF, Lorber B, Faris DG. Investigation of an outbreak of Listeriosis: new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections [J]. *J Infect Dis*, 1989, 159(4): 680-685.
- [25] 张丽萍, 张克俭, 高涛, 席桂绒, 薛莉, 薛彩娥. 食源性单增李斯特菌血清分型及耐药性的研究 [J]. 实用预防医学, 2013, 20(05): 611-613.
- [26] Wijendra S. First report of *Listeria monocytogenes* serotypes detected from milk and milk products in Sri Lanka [J]. *Adv Anim Vet Sci*, 2014, 2(5S): 11-16.
- [27] Wang K, Ye K, Zhu Y, Huang Y, Wang G, Wang H, Zhou G. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from chilled pork in Nanjing, China [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2015, 64(2): 905-910.
- [28] 廖亚玲, 邹全明. 病原微生物基因多位点序列分型的研究进展 [J]. 微生物学免疫学进展, 2007, 35(4): 65-68.

(收稿日期:2020-05-14)