

分型方法在单核细胞增多性李斯特菌监测溯源中的应用研究进展

杜冬冬¹, 钱晶¹, 王静¹, 王国红¹, 罗瑞峰¹, 殷月兰², 黄新³, 张星星³, 康立超^{1*}

(1. 新疆农垦科学院分析测试中心, 新疆生产建设兵团食品检验所, 石河子 832000; 2. 江苏省人兽共患病学重点实验室, 扬州 225000; 3. 新疆农垦科学院省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室, 石河子 832000)

摘要: 单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)简称单增李斯特菌,是引起人和动物李斯特菌病的重要食源性病原菌,具有较高的病死率,严重危害人类公共卫生安全和畜牧业发展。快速准确地对LM鉴定和溯源,对有效控制李斯特菌病的暴发和蔓延发挥重要作用。建立高效快捷的分型方法是LM溯源的关键。目前LM分型方法主要分为表型分型和分子分型,每种分型方法各有优劣,适用不同的流行病学调查。本文综述了LM分型方法的研究进展,以期开展LM的暴发确认和溯源检测方法的选择提供参考依据。

关键词: 单核细胞增多性李斯特菌; 表型分型方法; 分子分型方法; 溯源方法

Research progress on the application of typing methods for monitoring and source tracking of *Listeria monocytogenes*

DU Dong-Dong¹, QIAN Jing¹, WANG Jing¹, WANG Guo-Hong¹, LUO Rui-Feng¹, YIN Yue-Lan², HUANG Xin³, ZHANG Xing-Xing³, KANG Li-Chao^{1*}

(1. Analysis and Testing Center, Xinjiang Academy of Agriculture and Reclamation Science, Xinjiang Production and Construction Corps Institute for Food Control, Shihezi 832000, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou 225000, China; 3. Key Laboratory of Sheep Breed and Biotechnology of Xinjiang Production and Construction Corps, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China)

ABSTRACT: *Listeria monocytogenes* (LM) is described as an important foodborne pathogen that can cause human and animals listeriosis, with the characteristics of high mortality. LM seriously threatens the development of animal husbandry, human health and safety. It plays an important role in effectively controlling the foodborne disease outbreak and spread of listeriosis by rapid and accurate identification of LM pollution sources. Simple and efficient tracing techniques and typing methods are key to trace the source of LM. Currently, typing methods of LM include phenotypic typing and molecular typing. These typing methods have their own advantages and limitations, and have different applications on different epidemiological investigating. This paper reviewed the research progress of LM typing, in order to provide reference for the outbreak confirmation of LM and the

基金项目: 江苏省人兽共患病学重点实验室资助项目(R1901)、兵团生产建设兵团重点领域科技攻关计划项目(2019AB029)、兵团国际科技合作计划项目(2019BC004)

Fund: Supported by the Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis Support Project (R1901), Key Scientific and Technological Projects of Production and Construction Corps (2019AB029), and Corps and International Science and Technology Cooperation Project (2019BC004)

***通信作者:** 康立超, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为动物传染病诊断与防治及食品微生物检验。E-mail: 83511807@qq.com

***Corresponding author:** KANG Li-Chao, Master, Associate Professor, Diagnosis and Control of Animal Infectious Diseases and Food Microbiological Testing, Analysis and Testing Center, Xinjiang Academy of Agriculture and Reclamation Science, No.221, Wuyi Road, Shihezi 832000, China. E-mail: 83511807@qq.com

selection of traceability detection methods.

KEY WORDS: *Listeria monocytogenes*; phenotypic typing method; molecular typing method; traceability method

0 引言

单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)简称单增李斯特菌,是一种食源性人兽共患致病菌,广泛存在自然环境中,对恶劣环境(高盐、pH 5.0~9.6、低温)有较高的耐受性,不仅能抵御食品生产加工过程中常规的消毒防腐手段,而且易在冷链保藏的食品中增殖为优势菌群,造成食品(即食熟食、冷饮和冷食)交叉污染,从而增加感染机会,对食品安全造成严重威胁^[1-2]。人类感染李斯特菌病也多因食用被 LM 污染的食物所致,感染后的临床症状主要表现为胃肠炎、脑膜炎、脑炎、流产等,特别是新生儿、孕妇、老年人以及免疫功能缺陷者最为易感,病死率达到 30%^[3]。据研究统计,在发达国家有多次李斯特菌病暴发的报道^[4-6]。在国内仅有 2 次李斯特菌病暴发的报道,但在食品中的污染率达到 20%,而且近年来感染患病的情况逐年递增^[7-8],因此应加强对 LM 监测,并建立 LM 分型数据库,为有效追踪传染源、发现传播途径提供帮助。

细菌分型技术通过鉴定比较菌株间的差别,亚种分型,能够快速、准确地确定 LM 分离株的来源,为控制李斯特菌病发生和蔓延提供清晰可靠的科学资料。本文阐述、比较了国内外 LM 表型分型方法和分子分型方法分型的研究进展,以期 LM 溯源方法的选择提供参考依据,对预防控制 LM 引起的流行病传播产生重要的意义。

1 传统表型分型方法

1.1 血清型分型

血清分型(serotyping)是最常用的表型分析技术,也是许多食源性致病菌的经典分型方法。血清分型是依据不同菌株表面抗原的不同,通过抗血清或抗体与抗原的凝集反应进行检测和区分菌株^[9]。LM 可以按照 O 抗原(菌体抗原)和 H 抗原(鞭毛抗原)差异分为 13 个血清型,其中 98%以上的李斯特菌病是由血清型 1/2b 和 4b 以及 1/2a 型菌株引起。据研究显示^[10-11],我国的 LM 的优势血清型为 1/2a 血清型,表明我国存在食源性李斯特菌病发生的潜在危险。血清分型操作简单,被广泛使用,但血清型 1/2b、4c、和 4d 可能与西尔李斯特菌(*Listeria seeligeri*)存在交叉凝集,使其结果不稳定,而且也不能区分 4a、4b、4c 血清型,所以血清学分型还需分子分型方法的支撑。

1.2 噬菌体分型

噬菌体分型(phage typing)是根据 LM 对一整套噬菌体的裂解敏感性不同,分为不同的噬菌体组和噬菌体型,这对

于追踪李斯特菌病暴发的起源和过程有很大的帮助^[12]。但该方法目前缺少标准化的参考噬菌体,也受到生物学变异和实验条件的影响,并且该方法对 10%的 LM 不能分型的,这严重制约了噬菌体分型技术在流行病学调查中的应用^[13]。

1.3 多区带酶电泳分型

多区带酶电泳分型(multilocus enzyme electrophoresis, MLEE)是根据可溶性酶的细胞提取液(细菌裂解液)的凝胶迁移率的不同,经特异性酶染色后进行分析而将 LM 分成不同的型的分型方法^[14]。BOERLIN 等^[15]为了解瑞士李斯特菌病发生原因,通过 MLEE 分型方法对从人、动物、食物和环境分离出的 181 株 LM 进行分型发现,发现从动物分离的 ET1 型菌株是导致瑞士和北美在 1983—1987 年的几次食源性暴发的原因。这种分型方法简单、成本低、易分析,但由于实验室间的标准化较难控制,工作量大、分型周期较长,缺乏不同国家和不同实验室的分型结果比较,因此限制了该方法的广泛应用。

2 分子分型

2.1 基于酶切技术的分子分型方法

2.1.1 脉冲场凝胶电泳

脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)分子分型是通过限制性内切酶切割全基因组 DNA 特异性位点,酶切 DNA 片段在琼脂糖凝胶中和脉冲电力场的不断改变作用下,产生不同的带型,根据带型不同将菌株进行型别区分。该技术具有分型率高、分辨力强、结果稳定、可重复性和能对菌株间基因相关性进行分析等优点,已成为 LM 分子分型的“金标准”^[16-17]。SARA 等^[18]利用 PFGE 分型方法对从病人、食物和环境分离的 LM 分型,结果发现 2011 年美国李斯特菌病暴发与食用受污染的香瓜有关。高波等^[19]采用 PFGE 分型技术对北京市辖区内分离的 1 株临床腹泻标本单增李斯特阳性菌株和 13 株食品单增李斯特阳性菌株分型,发现 LM 的临床菌株与 2 株食源性的 LM 基因型高度相似,表明有食源性感染的可能。该方法虽然有较多优点,但该技术比较费时费力,费用昂贵,某些限制性内切酶对一些 LM 不能进行酶切。

2.1.2 核糖体分型

核糖体分型(ribotyping, RT)是通过限制性内切酶技术和 Southern 杂交分析技术相结合对细菌进行分型。目前,该分型方法已经实现全自动化,并已实现商业化运作。例如美国 Dupont 公司已成功开发一套全自动化的核糖体指纹图谱分析仪(riboprinter microbial characterization system),

具有较高的重复性和标准化,能8 h内完成分型^[20-21]。李迎慧等^[22]运用自动化的核糖体基因分型系统对中国食品污染物监测网2000—2001年收集的67株LM分型,获得13条核糖体基因条带,有11种基因型与杜邦数据库中的DUP-1038、DUP-1039、DUP-1042、DUP-1044、DUP-1045、DUP-1052相似,分型结果为建立我国LM分子分型数据库积累了一定的数据和经验。SUIHKO等^[23]对法罗群岛、芬兰、冰岛、挪威和瑞典等地区食品加工厂分离的LM进行自动核糖体分型,将564株LM被分成了25个不同的核糖体型,经分析发现产品LM污染可能发生在食品加工过程中,所以需要加强对食品加工环境卫生的管理。

2.1.3 扩增片段长度多态性

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)是对细菌基因组DNA限制性酶切片段进行PCR扩增,通过鉴定产物来实现菌株分型的技术。该技术既具有RFLP技术的可靠性,也有PCR技术的高效性^[24]。PARISI等^[25]对乳品生产加工厂的产品、环境中分离的李斯特菌进行AFLP分型分析发现,李斯特菌主要存在于工厂的加工环境中,应加强对环境卫生的监测,防止李斯特菌对乳产品的污染。LOMONACO等^[26]对环境和食品中分离出的LM进行AFLP和PFGE 2种分型比较,发现AFLP具有与PFGE一样的分辨率,AFLP这种分型方法具有高通量、自动化的优势,不仅能区分不同李斯特菌属种,还能将LM区分为不同亚型,是一种分型能力较高的技术;缺点是实验步骤较多、技术难度高、耗时、费用较高,对DNA的纯度和内切酶的质量也有很高的要求。

2.2 基于普通PCR技术的分子分型方法

2.2.1 多位点串联重复序列分型

多位点串联重复序列分型(multilocus variable number of tandem repeat analysis, MLVA)是以PCR为基础的分子分型方法,通过检测细菌基因组中特殊位点的数目和可变串联重复序列(variable number of tandem repeat, VNTR)的差异对菌株进行分型^[27-28]。通常,以VNTR位点两边侧翼区域为模板设计PCR引物,使用多重PCR扩增VNTR位点,经毛细管电泳确定扩增产物的大小,依据VNTR的重复拷贝数来进行数字化编码,后通过聚类软件进行分析,确定菌株基因型和进化关系^[29]。据研究显示^[30],MLVA分型方法能有效区分流行病学相关菌株和非相关菌株,以及相关克隆和非相关克隆。LUNESTAD等^[31]对挪威地区的鲑鱼和加工厂环境中分离的65株LM进行MLVA分型时发现,其中9个MLVA图谱与从李斯特菌病患者分离的菌株的图谱相匹配,表明本地暴发的李斯特菌病可能与食用鲑鱼产品有关。MLVA基于PCR扩增技术,方法操作简单、重复性强、结果容易分析,在实验室内和实验室间具有非常好的可比性,并能提供数字化的分型信息,适宜于进行大量样本和网络化分析。据MARTÍN等^[32]研究显示,MLVA对

于LM的分辨力明显高于多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)技术。虽然MLVA广泛应用于细菌的分型研究,但由于MLVA分型技术在引物设计时需要菌株全基因组的序列信息,而目前公布的菌株序列较少,因此较难设计引物,从而限制了推广应用。

2.2.2 肠杆菌基因间重复一致序列聚合酶链式反应

肠杆菌基因间重复一致序列聚合酶链式反应(enterobacteria repetitive intergenic consensus sequence PCR, ERIC-PCR)是一种简便、快捷、分型率较高、准确性好的分子分型方法,是基于肠杆菌基因间重复一致序列设计引物,扩增出多态性的图谱,由于ERIC在基因组中的分布和拷贝数具有种属特异性,通过比较DNA图谱可以对细菌进行快速的分型^[33-34]。CHEN等^[35]对鱼片生产车间分离的LM进行ERIC-PCR技术分型,发现产品污染主要来自生产环节,而不是鲜鱼本身携带。2014年,陈谋通^[36]利用ERIC-PCR技术对金针菇生产厂进行单增李斯特菌污染溯源发现,LM在加工厂存在交叉污染的可能,污染的主要源头可能是搔菌机械刀头,防控LM污染金针菇产品,必须对主要生产环节执行严格的消毒措施。ERIC-PCR,具有分辨率高、稳定、重复性好等特点,同时可以利用ERIC-PCR技术对致病菌进行基因组多态性分析,并用于致病菌基因分型、致病菌耐药谱与基因型之间的关系研究、流行病学调查和传染源追踪等,但ERIC-PCR是一种半随机PCR,结果受多种因素影响,因此必须优化ERIC-PCR方法确保分型结果的可靠性^[37]。

2.2.3 随机扩增多态性DNA

随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)是对纯化后的基因组DNA或未经处理的细胞或细胞裂解液为模板,大小为10的DNA片段作为随机引物进行扩增,经电泳后获得扩增产物的带型,进而分析遗传多样性的分型方法^[38]。与其他分子分型方法相比,RAPD具有实验简单、快速、实验成本低、分辨率相对较高等优点,适合进行大规模流行病学的调查研究。KANG等^[39]以寡核苷酸RP1为引物,对河北省保定和石家庄地区分离的308株食源性单增李斯特菌进行分型,得到6个基因类群,其中基因聚类II和I为优势种群;同时发现食源性LM在不同食品中分离的基因型差异较大,但相同食品分离的LM基因型比较相似,表明食源性LM具有一定的寄主偏好性。虽然与其他方法相比RAPD具有其独特的优点,但重复性差也是不容忽视的缺点。

2.2.4 DiversiLab分型系统

DiversiLab分型系统是基于重复序列扩增(rep-PCR)的一个自动化、标准化、高度集成、便利和快速的测试分子分型系统平台。该分型系统与PFGE分型结果有良好的一致性,相比较PFGE,其结果的收集和处理不受主观限

制,花费时间短,从DNA提取到出分析结果不到24h;并且具有很高的分辨率,一般条带能达到10条左右;还因为使用的是标准化的试剂,所以重复性好,操作简单^[40-41]。唐中伟^[42]通过DiversiLab分型技术对国内食品和国外进口食品中分离的105株LM进行分型,发现某些食品是在销售或生产过程通过不同或相同的途径污染了相同的单增李斯特菌。据ROUSSEL等^[43]将DiversiLab分型系统和PFGE对LM的分型能力进行比较,发现DiversiLab的分辨力高、劳动强度小、花费时间少,更适用于长期的流行病学的研究。但DiversiLab也有其局限性,其分型结果受很多因素影响,如对实验操作人员专业技术要求高,仪器和试剂比较昂贵等一些问题。

2.3 基于测序技术的分子分型方法

2.3.1 多位点序列分型

多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是通过对细菌的多个管家基因测序后,分析不同等位基因间的差异从而确定菌株间的相关性^[44]。MLST由基因序列差异来分型,与PFGE分型相比,可以得到菌株间精确的遗传关系进行进化分析,数据也能与不同实验室比较。为方便进行不同实验室间数据比较,法国巴斯德研究所^[45]基于单增李斯特菌的7个管家基因(*abcZ*、*bglA*、*cat*、*dapE*、*dat*、*ldh*和*lhkA*)建立了LM的MLST分型数据库(<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Lmono.html>)。PARISI等^[46]利用MLST对103株LM进行分型,获得了66个ST型(Sequence type),绘制最小生成树显示,LM的进化主要是突变逐步积累的结果。WANG等^[47]对中国12个省市食品中分离的212株LM进行MLST分型,可将分离株分为36个ST型,其中ST9占29.1%,ST8占10.7%,ST87占9.2%。同时,这几种ST型也是世界上流行的ST型,是能引起母婴感染和李斯特菌病爆发的菌株,因此有必要对这几种ST型LM进行监测,并实施预防策略,以防止李斯特菌病的出现和爆发。俞骅等^[48]对杭州地区分离的133株LM进行MLST分型,共分为19个ST型别,并发现1个新的ST型ST767。ST9和ST121是数量最多的型别。通过Pasteur公共数据库构建的进化树显示与国内其他省份主要流行株ST型别相同。MLST具有诸多优点,但MLST是一个劳动密集型,费用昂贵的分型方法,而且目前尚未针对LM建立标准化MLST操作程序,不适用于一些管家基因突变程度低或无突变的菌株,在一定程度上给实验室间结果比对和全球流行病学调查研究造成困难。

2.3.2 多位点毒力序列分型

多位点毒力序列分型(multi-virulence-locus sequence typing, MVLST)是在MLST的基础上选择更保守的毒力基因和毒力相关基因对病原微生物进行分型的方法,分辨率更高^[49-50]。ZHANG等^[51]发现MLST分型对血清型1/2b

和4b菌株的分辨能力较低,对LM的流行病学调查研究所需的分辨能力受到限制,因此提出了MVLST分型技术,同时较PFGE和MLST分辨力强,尤其对4b和1/2b血清型的菌株。WOO等^[52]从2002—2014年间在19个州在牛奶场的牛奶,牛奶过滤器和挤奶设备中分离121株单核细胞增生李斯特菌,通过多位点毒力序列分型分析,鉴定出59种毒力类型(virulence type, VT),其中25%是流行性克隆菌株I、II、V、VI、VII、VIII、IX或X,经分析显示与人类李斯特菌病分离的菌株高度相似,另外发现31种新的VT。DOIJAD^[53]对印度地区分离的25株4b型LM进行MVLST分型发现流行克隆I型(epidemic clone I, ECI)的LM菌株在印度普遍存在,而ECI菌株又与人类李斯特菌病的暴发相关,此外还发现LM是从动物到环境再到人的复杂传播途径(或是通过动物的原始产品,到即食食品,再到人)。AMATO^[54]通过MVLST方法将43株ST38型LM分离株分成2种毒力类型VT80($n=12$)和VT104($n=31$)。同时进行了流行病学调查,从患者冰箱中奶酪样品分离的LM与VT104毒力类型菌株相匹配,表明意大利北部的一次重大李斯特菌病暴发与食用被LM污染的奶酪有关。

2.3.3 WGS分型

全基因组测序分型(whole-genome sequencing, WGS)是通过用测序技对病原微生物全基因组测序后,从基因水平分析不同菌株表型相似性和差异性进行基因分型,从而快速准确的了解菌株进化和进行溯源分析^[55-56]。目前,WGS分型主要分为基于全基因组的单核苷酸多态性分型(whole genome single nucleotide polymorphism, wgSNP)和基于全基因组的多位点序列分型(whole genomemultilocus sequence typing, wgMLST),其中后者因为使用了核心基因组序列,所以也叫核心基因组多位点序列分型(coregenome multilocus sequence typing, cgMLST)。据PALMA^[57]研究显示, cgMLST对LM进行分型有更高的分辨率和灵敏度,能更好的用于传染源的追溯。他们对从兔肉中和兔肉加工环境分离到的ST14型分离株进行cgMLST分析,菌株可被分成3个种群(CT1701、CT1702、CT1703),而自动核糖分型和MLVA无法区分,进一步分析显示其中CT1701种群长期存在兔肉加工厂,在随后发生李斯特菌病的患者体内分离得到与CT1701种群相同李斯特菌病原菌。WGS分型结果包含了病原菌全部基因组序列,为研究病原菌的毒力、耐药性以及致病性提供了丰富的信息,有助于细菌基因组间的比较分析,更易发现基因组的变异特征^[58-59]。此外,还可以通过国际PulseNet(<http://www.pulsenetinternational.org/protocols/wgs/>)网络公共数据库与不同实验室之间进行信息交流和共享。随着基因组测序成本的不断降低和生物信息分析技术的不断进步,WGS分型技术已经逐渐成为一个快速、高效、稳定的病原菌的监测和分型鉴定工具^[60]。

3 结束语

分型技术是单增李斯特菌流行病学研究的重要工具,而不同的分型方法在分辨力、稳定性、便捷性及费用方面各有千秋,能从不同侧面反映 LM 的分型特点。目前,由于大多数的病原微生物的表型变化落后于基因变化,以表型特征为基础的传统分型方法已不能满足流行病学调查的需要,而一些分子分型方法具有较多优势已成为 LM 分型主要技术手段,其中 PFGE、MLST、MLVA 等分型技术已得到广泛应用,但这些分型技术均具备一定的优势同时也存在不足之处,在实际应用中可根据具体用途和各自的特点进行选择,另外这些技术大多是针对病原菌基因组中的特殊的基因序列进行分析,对于高度保守的菌株分辨力就比较低,很难区分开。而全基因组测序分型弥补了这一缺陷,通过对病原菌整个全基因组序列进行分析,不仅提高了分型分辨能力,还能通过进一步分析基因组序列来鉴定分子血清型,筛选毒力基因、耐药基因等。同时,还能利用全基因组序列的信息进行 MLST、MLVA、DiversiLab 系统分型等,不仅提高了分型的分辨率和分辨能力,也有利于不同分型方法的比较。但 WGS 目前存在一些缺点如测序耗时长、费用昂贵等,数据信息分析需要专业人员和设备,因此使推广存在难度。但随着技术的不断进步,分子分型技术逐渐标准化和规范化,在了解菌株的亲缘关系、追踪传染源、控制疫情的暴发和传播等方面,分子分型技术将以其准确、快速、高分辨力、高重复性、易于交流分享等优势会日益凸显其重要作用,在食品安全控制中会受到越来越多的研究者推广使用。

参考文献

- [1] 尤祯丹, 韩国全, 陈传君, 等. 即食食品中单增李斯特氏菌快速检测技术的研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 358–362.
YOU ZD, HAN GQ, CHEN CJ, et al. Research progress of rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(10): 358–362.
- [2] 尚丛珊. 食源性致病菌单增李斯特菌检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(14): 4702–4707.
SHANG CS. Research progress of detection technology for food-borne pathogenic *Listeria monocytogenes* [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(14): 4702–4707.
- [3] JORDANK, MCAULIFFE O. *Listeria monocytogenes* in foods [J]. Adv Food Nutr Res, 2018, 86: 181–213.
- [4] RICCI A, ALLENDE A, BOLTON D, et al. *Listeria monocytogenes* contamination of RTE foods and the human health risk in the EU [J]. EFSA J, 2018, 16(1): 5134.
- [5] ANGELO KM, CONRAD AR, SAUPE A, et al. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014–2015 [J]. Epidemiol Infect, 2017, 145(5): 848–856.
- [6] SHAMLOO E, HOSSEINI H, MOGHADAM A, et al. Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: A review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance [J]. J Vet Res, 2019, 20(4): 241–254.
- [7] FAN Z, XIE J, LI Y, WANG H. Listeriosis in mainland China: A systematic review [J]. Int J Infect Dis. 2019, 81: 17–24.
- [8] CHEN Y, CHEN M, WANG J, et al. Heterogeneity, characteristics, and public health implications of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and pasteurized milk in China [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 642.
- [9] 钱晶, 杜冬冬, 刘玉霞, 等. 新疆食源性单增李斯特菌监测及血清型分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(20): 219–224.
QIAN J, DU DD, LIU YX, et al. Monitoring and serotype analysis of food-borne *Listeria monocytogenes* in Xinjiang Uygur autonomous region [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(20): 219–224.
- [10] WANG Y, JIAO Y, LAN R, et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from human Listeriosis cases in China [J]. Emerg Microbes Infect, 2015, 4(8): e50.
- [11] ZHANG Y, DONG S, CHEN H, et al. Prevalence, genotypic characteristics and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* from retail foods in bulk in Zhejiang province, China [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1710.
- [12] LIU D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen [J]. J Med Microbiol, 2006, 55(6): 645–659.
- [13] CAPITA R, ALONSO-CALLEJA C, MEREGHETTI L, et al. Evaluation of the international phage typing set and some experimental phages for typing of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain [J]. J Appl Microbiol, 2002, 92(1): 90–96.
- [14] 马盼盼, 夏丹丹, 赵莹莹, 等. 食源性单增李斯特菌检测方法研究进展[J]. 河南大学学报(医学版), 2019, 38(4): 290–295.
MA PP, XIA DD, ZHAO YY, et al. Research progress on detection methods of food-borne *Listeria monocytogenes* [J]. J Henan Univ (Med Sci), 2019, 38(4): 290–295.
- [15] BOERLIN P, PIFFARETTI JC. Typing of human, animal, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(6): 1624–1629.
- [16] 张晓媛, 刘玉竹, 张鹏航, 等. 2019 年北京市食源性单增李斯特菌的分子特征和耐药性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9343–9348.
ZHANG XA, LIU YZ, ZHANG PH, et al. Molecular characteristics and drug resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* in Beijing in 2019 [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(24): 9343–9348.
- [17] ABDOLLAHZADEH E, OJAGH, et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood and humans in Iran [J]. Microb Pathog, 2016, 100: 70–74.
- [18] SARA L, BINDHU V, PETER G, et al. Novel epidemic clones of *Listeria monocytogenes*, United States, 2011 [J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(1): 147–150.
- [19] 高波, 霍哲, 安希龙, 等. 食源性单增李斯特菌监测溯源技术研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(15): 67–69.
GAO B, HUO Z, AN XL, et al. Study on traceability technology of food-borne *Listeria monocytogenes* [J]. Chin J Health Lab Tec, 2014, 24(15): 67–69.
- [20] 田敏, 冯震, 曲瑞丹, 等. ERIC-PCR 及全自动核糖体分型法鉴定不同来源的解脂金黄色杆菌[J]. 食品工业科技, 2020, 41(1): 105–111.

- TIAN M, FENG Z, QU RD, *et al.* Identification of chryseobacteriumproteolyticum from different regions using ERIC-PCR and automated ribotyping [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(1): 105–111.
- [21] 罗力文, 鄢明辉, 游春幸, 等. 细菌分型方法研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(7): 836–841.
- LUO LW, YAN MH, YOU CP, *et al.* Progress in research on typing methods of bacteria [J]. Chin J Microecol, 2020, 32(7): 836–841.
- [22] 李迎慧, 刘衡川, 姚景会, 等. 食源性单核细胞增生李斯特菌的自动化核糖体基因分型[J]. 现代预防医学, 2009, 36(21): 168–172.
- LI YH, LIU HC, YAO JH, *et al.* Automated ribotyping of foodborne *Listeria monocytogenes* [J]. Mod Prev Med, 2009, 36(21): 168–172.
- [23] SUIHKO M, SALO S, NICLASSEN O, *et al.* Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from the meat, poultry and seafood industries by automated rib typing [J]. Int J Food Microbiol, 2002, 72(1): 137–146.
- [24] BETTANI G, SARDARO MS, NEVIANI E, *et al.* AFLP protocol comparison for microbial diversity fingerprinting [J]. J Appl Genet, 2019, 60(2): 217–223.
- [25] PARISI A, LATORRE L, FRACCALVIERI R, *et al.* Occurrence of *Listeria* spp. in dairy plants in southern Italy and molecular subtyping of isolates using aflp [J]. Food Control, 2013, 29(1): 91–97.
- [26] LOMONACO S, NUCERA D, PARISI A, *et al.* Comparison of two aflp methods and pfge using strains of *Listeria monocytogenes* isolated from environmental and food samples obtained from Piedmont, Italy [J]. Int J Food Microbiol, 2011, 149(2): 177–182.
- [27] SANDRINE D, JÉRÉMIE L, XAVIER A, *et al.* Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) and tandem repeat sequence typing (TRST), helpful tools for subtyping staphylococcus *Lugdunensis* [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 11669–11680.
- [28] BAKHSHI B, BAYAT B, LARI AR. Multiple- locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) of *Shigella sonnei* isolates of 2012 outbreak I. R. Iran [J]. Microb Pathog, 2017, 102: 69–73.
- [29] LIU ZG, DI DD, WANG M, *et al.* MLVA Genotyping characteristics of human *Brucella melitensis* isolated from Ulanqab of Inner Mongolia, China [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 6–16.
- [30] 李秀娟, 崔玲玲, 赵冬, 等. 基于全自动毛细管电泳技术建立的单核细胞增生李斯特氏菌 MLVA 分型方法[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(9): 63–68.
- LI XJ, CUI L L, ZHAO DL, *et al.* Development of a multiple-locus variable number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* upon the capillary electrophoresis [J]. Chin J Zoonoses, 2015, 31(9): 63–68.
- [31] LUNESTAD BT, TRUONG TTT, LINDSTEDT B. A multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of *Listeria monocytogenes* isolated from norwegian salmon-processing factories and from listeriosis patients [J]. Epidemiol Infect, 2013, 141(10): 2101–2110.
- [32] MARTÍN B, BOVER-CID S, AYMERICH T. MLVA subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates from meat products and meat processing plants [J]. Food Res Int, 2018, 106: 225–232.
- [33] MOOSAVIAN M, EMAM N. The first report of emerging mobilized colistin-resistance (*mcr*) genes and ERIC-PCR typing in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in southwest Iran [J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 1001–1010.
- [34] LONDERO A, COSTA M, SUCARI A, *et al.* Comparison of three molecular subtyping techniques for *Listeria monocytogenes* [J]. Rev Argent Microbiol. 2019, 51(4): 359–362.
- [35] CHEN BY, PYLA R, KIM T, *et al.* Prevalence and contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in catfish processing environment and fresh fillets [J]. Food Microbiol, 2010, 27(5): 645–652.
- [36] 陈谋通. 食源性单核细胞增生李斯特菌遗传多样性分析和群体感应研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- CHEN MT. Study on the genetic diversity and quorum sensing of foodborne *Listeria monocytogenes* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014.
- [37] 赵晨晖, 丁承超, 刘箐. 不同培养基及培养条件对单增李斯特菌 ERIC-PCR 分子分型的影响[J]. 现代食品科技, 2017, 33(5): 108, 121–126.
- ZHAO CH, DING CC, LIU Q. Influence of different medium conditions on molecular typing of *Listeria monocytogenes* by enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 33(5): 108, 121–126.
- [38] ZARE S, DERAKHSHANDEH A, HAGHKHAH M, *et al.* Molecular typing of *Staphylococcus aureus* from different sources by RAPD-PCR analysis [J]. Heliyon, 2019, 5(8): e02231.
- [39] KANG CY, YU HW, GUO RF, *et al.* Genetic diversity of isolates of foodborne *Listeria monocytogenes* by rapid-PCR [J]. Ann Microbiol, 2016, 66(3): 1057–1064.
- [40] MOMENI SS, WHIDDON J, CHEON K, *et al.* Genetic diversity and evidence for transmission of *Streptococcus mutans* by Diversi Lab rep-PCR [J]. J Microbiol Methods, 2016, 128: 108–117.
- [41] 郑晶, 唐中伟, 陈彬, 等. 对同一地区分离的单增李斯特菌进行 Diversi Lab 分型及同源性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(1): 9–11.
- ZHENG J, TANG ZW, CHEN B, *et al.* DiversiLab typing and homology analysis of *Listeria monocytogenes* isolated from the same place [J]. Chin J Health Lab Tec, 2016, 26(1): 9–11.
- [42] 唐中伟. 食品中单增李斯特菌分型技术的研究及其在溯源中的应用[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- TANG ZW. Study on the typing technology for *Listeria monocytogenes* isolated from food and its application in traceability [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012.
- [43] ROUSSEL S, FÉLIX B, COLANÉRI C, *et al.* Semi-automated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction compared to pulsed-field gel electrophoresis for *Listeria monocytogenes* subtyping [J]. Foodborne Pathog Dis, 2010, 7(9): 1005–1012.
- [44] 王亚鸽, 闫鹤. 一株 ST477 型单增李斯特菌的全基因组测序及 *inlA* 基因遗传多样性[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1100–1107.
- WANG YG, YAN H. Whole-genome sequencing of a *Listeria monocytogenes* ST477 and genetic diversity of *inlA* gene [J]. Microbiol China, 2019, 46(5): 1100–1107.
- [45] 孟昭倩, 段然, 吕东月, 等. 2014–2019 年阜阳市食品和病人分离单增李斯特菌的分子特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(12): 1019–1024.
- MENG ZR, DUAN R, LU DY, *et al.* Molecular characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from food and patients in Fuyang city, 2014–2019 [J]. Chin J Zoonoses, 2020, 36(12): 1019–1024.

- [46] PARISI A, LATORRE L, NORMANNO G, *et al.* Amplified fragment length polymorphism and multi-locus sequence typing for high-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment [J]. Food Microbiol, 2010, 27(1): 101–108.
- [47] WANG Y, ZHAO A, ZHU RF, *et al.* Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China [J]. BMC Microbiol, 2012, 12(1): 119.
- [48] 俞骅, 潘劲草, 汪皓秋, 等. 杭州地区单核细胞增生李斯特菌食品分离株分子型别研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(3): 264–270.
- YU H, PAN JC, WANG HQ, *et al.* Molecular characteristics of *Listeria monocytogenes* foodborne isolates in Hangzhou, China [J]. Chin J Zoonoses, 2017, 33(3): 264–270.
- [49] BURALL LS, GRIM CJ, MAMMEL MK, *et al.* A Comprehensive evaluation of the genetic relatedness of *Listeria monocytogenes* serotype 4b variant strains [J]. Frontiers Public Health, 2017, 5: 241–251.
- [50] DOIJADSP, WEIGEL M, BARBUDDHE S, *et al.* Phylogenomic grouping of *Listeria monocytogenes* [J]. Canadian J Microbiol, 2015, 61(9): 637.
- [51] ZHANG W, JAYARAO BM, KNABEL SJ. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes* [J]. Appl Environ Microb, 2013, 79(9): 3146–3146.
- [52] WOO KS, JULIE H, KELLER EN, *et al.* Genetic diversity and virulence profiles of *Listeria monocytogenes* recovered from bulk tank milk, milk filters, and milking equipment from dairies in the United States (2002 to 2014) [J]. Plos One, 2018, 13(5): e0197053.
- [53] DOIJAD S, LOMONACO S, POHARKAR K, *et al.* Multi-virulence-locus sequence typing of 4b *Listeria monocytogenes* isolates obtained from different sources in India over a 10-year period [J]. Foodborne Pathog Dis, 2014, 11(7): 511–516.
- [54] AMATO E, FILIPELLO V, GORI M, *et al.* Identification of a major *Listeria monocytogenes* outbreak clone linked to soft cheese in northern Italy—2009–2011 [J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 342.
- [55] 蒋兵, 谢建华, 汪子淳, 等. 基因分型技术在单核细胞增生性李斯特菌监测溯源上的应用[J]. 浙江农林大学学报, 2018, 35(4): 194–200.
- JIANG B, XIE JH, WANG ZC, *et al.* Application of genotyping methods to monitoring and source-tracking of *Listeria monocytogenes* [J]. J Zhejiang A&F Univ, 2018, 35(4): 194–200.
- [56] HURKEY D, LUQUE-SASTRE L, PARKER CT, *et al.* Whole-genome sequencing-based characterization of 100 *Listeria monocytogenes* isolates collected from food processing environments over a four-year period [J]. Msphere, 2019, 4(4): e00252.
- [57] PALMA F, PASQUALI F, LUCCHI A, *et al.* Whole genome sequencing for typing and characterisation of *Listeria monocytogenes* isolated in a rabbit meat processing plant [J]. Ital J Food Saf, 2017, 6(3): 125–130.
- [58] QUAINOO S, COOLEN J, HIJUM SV, *et al.* Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: The future of nosocomial outbreak analysis [J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(4): 1015–1063.
- [59] ALLARD MW, BELL R, FERREIRA CM, *et al.* Genomics of foodborne pathogens for microbial food safety [J]. Curr Opin Biotechnol, 2018, 49: 224–229.
- [60] 王旭. 基于比较基因组学和转录组学技术揭示单增李斯特菌毒力因子的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- WANG X. Research of virulence factor in *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomic and transcriptome analysis [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



杜冬冬, 硕士, 实验师, 主要研究方向为动物传染病诊断与防制及食品微生物检验。
E-mail: 1642237366@qq.com



康立超, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为动物传染病诊断与防制及食品微生物检验。
E-mail: 83511807@qq.com