浙 江 农 林 大 学 学 报，2018，**35**(4)：771–777
Journal of Zhejiang A&F University
doi:10.11833/j.issn.2095-0756.2018.04.024

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

蒋　兵[1]，谢建华[2]，汪子淳[2]，梁望旺[2]，杨泽林[2]，蔺　露[2]，张婷娟[1]，
彭远义[1]，聂　奎[1]，方仁东[1]

（1. 西南大学 动物科技学院，重庆 400715；2. 重庆市动物疫病预防控制中心，重庆市猪主要传染病防治工程技术研究中心，农业部动物产品质量安全生物性危害因子风险评估实验室，重庆 401120）

摘要：单核细胞增生性李斯特菌 *Listeria monocytogenes* 是一种重要的食源性人畜共患病原菌，能引起人和多种动物流产、脑膜炎、肠胃炎、败血症、死胎等病症。与传统基于表型的分型方法相比，基因分型方法具有简单快速、分辨率高、敏感性强、重复性好等特点，在李斯特菌病病原菌的监测和溯源中具有重要的应用价值。对单核细胞增生性李斯特菌的 3 类基因分型方法：酶切技术，DNA 测序技术和聚合酶链式反应(PCR)扩增技术进行了概述，从分型成本、样本通量、分辨力、灵敏度、重复性、快捷性和普及性等方面比较了 3 类基因分型方法的主要特点，重点评述了这些方法在单核细胞增生性李斯特菌暴发监测和溯源上的应用案例，为研究不同基因分型方法在单核细胞增生性李斯特菌暴发诊断、分型检测及感染溯源等方面的应用提供参考。参 39

关键词：动物细胞学；单核细胞增生性李斯特菌；基因分型；监测溯源；综述
中图分类号：Q952；S852.61　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**2095-0756(2018)04-0771-07

Application of genotyping methods to monitoring and source-tracking of *Listeria monocytogenes*

JIANG Bing[1], XIE Jianhua[2], WANG Zichun[2], LIANG Wangwang[2], YANG Zelin[2], LIN Lu[2], ZHANG Tingjuan[1], PENG Yuanyi[1], NIE Kui[1], FANG Rendong[1]

(1. College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Chongqing Engineering Research Center of Prevention and Control of Swine Infectious Diseases, Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Animal Products on Biohazards (Chongqing), Ministry of Agriculture, Chongqing Animal Disease Prevention and Control Center, Chongqing 401120, China)

Abstract: As an important food-borne zoonotic pathogen, *Listeria monocytogenes* could cause people and various animals abortion, meningitis, gastroenteritis, sepsis, stillbirth and other diseases of listeriosis. Compared with the traditional phenotypic typing methods, the genotyping methods were characterized by simplicity and rapidity, high resolution, strong sensitivity and good reproducibility, thus having important application value in the monitoring and source-tracking of *L. monocytogenes*. In this research, three types of genotyping methods for *L. monocytogenes*, namely, enzyme digestion, DNA sequencing and PCR amplification were reviewed. The main features of these methods were compared in terms of the genotyping cost, sample throughput, resolution, sensitivity, reproducibility, rapidity and popularity, especially focusing on the application of these methods to the monitoring and source-tracking of *L. monocytogenes*. The research provided reference for the study of applying

收稿日期：2017-07-07；修回日期：2017-09-25
基金项目：国家重点研发计划专项(2018YFD0500500)；国家自然科学基金资助项目(31400762)；重庆市科学技术委员会资助项目(cstc2015jcyjBX0108)；农业部畜禽产品质量安全风险评估项目(GJFP2018007)；国家现代农业产业技术体系建设专项基金资助项目(CARS-37)；中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(XDJK2017A003)
作者简介：蒋兵，从事兽医公共卫生研究。E-mail: jiangbing1992@126.com。通信作者：方仁东，副教授，博士，从事兽医公共卫生研究。E-mail: frend023@hotmail.com

different genotyping methods to the diagnosis, typing and source-tracking of *L. monocytogenes*. [Ch, 39 ref.]
Key words: zoocytology; *Listeria monocytogenes*; genotyping; monitoring and source-tracking; review

单核细胞增生性李斯特菌 *Listeria monocytogenes*(以下简称单增李斯特菌)是一种重要的食源性人畜共患病原菌，人类的感染能够引发脑膜炎、败血症和流产等疾病。李斯特菌病因其较高的致死率使其成为仅次于沙门氏菌 *Salmonella* 感染的致命食源性疾病，尤其对孕妇、婴儿、老人等免疫力低下人群风险极高[1-2]。单增李斯特菌的危险性目前已引起了世界各国的关注，中国与其他许多国家将其列为进出口食品的必检项目。根据美国食品网的调查显示[3]，美国每年约 2 600 人感染单增李斯特菌，造成约 260 人死亡，在所有食源性疾病引起的死亡中，李斯特菌病占 30%。据报道，中国大部分省市每年均有人和动物感染单增李斯特菌[4]。单增李斯特菌广泛存在于自然界中，主要以食物为传播媒介，特别在食品储运及加工过程中极易受单增李斯特菌污染。人类的李斯特菌病大多是通过食用受污染的肉类、蛋类、禽类、海产品、速冻食品、乳制品和蔬菜等多种食品所致[5]。单增李斯特菌的致病力与其血清型密切相关。目前，在食物和环境中发现的单增李斯特菌血清型有 16 种，与人类疾病相关的血清型主要有 4b，1/2a 和 1/2b[6]，但不同来源的分离株其毒力、致病性、耐药性等也存在较大差异[7]。鉴于李斯特菌病对人类健康构成极大的威胁，预防和控制这类疾病需要建立一个长期的追踪和调查方案，采用细菌溯源技术，通过亚种分型，能够准确、迅速地确定单增李斯特菌分离株的来源，鉴定比较致病菌株间的差别，为致病菌的溯源和疾病防控提供明晰可靠的科学资料[8-9]。近年来，食源性致病菌分子溯源分型技术发展较快，主要分为 3 类：①基于酶切技术的分型方法，包括脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)分型；②基于 DNA 测序技术的分型方法，包括多位点序列分型(multi-locus sequence typing, MLST)和全基因组测序(whole-genome sequencing, WGS)；③基于聚合酶链式反应(PCR)扩增技术的分型方法，包括多位点可变数串联重复序列分析(multi-locus variable-number of tandem repeats analysis, MLVA)，DiversiLab 系统和 CRISPR-Cas(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated proteins)系统。本文就以上述 3 类基因分型方法在单增李斯特菌监测溯源中的应用做一综述。

1 基于酶切技术的分型方法

PFGE 分型的基本原理是通过限制性内切酶切割 DNA 特异性位点，利用琼脂糖凝胶分离成大量的片段从而得出一组细菌带型。使用不同的限制性内切酶能够产生不同的带型，该技术通过利用多种限制性内切酶来提高分辨力，更深层次地对菌株间基因相关性进行分析。在食源性致病菌分子流行病学和溯源性追踪研究方面，PFGE 已成为基因分型方法的“金标准”[10]。有研究利用 PFGE 评估单增李斯特菌在家禽食品生产中的污染情况，发现在家禽生产链中多个环节存在潜在的单增李斯特菌污染风险[11]。此外，LEONG 等[12]采用 PFGE 分型技术对 48 个食品加工设备中分离的单增李斯特菌进行分型，结果显示在多个食品加工设备中检测出 PFGE 图谱相同的菌株，表明污染源的传播方向是从加工环境到食品。FUGETT 等[13]结合 AscI 和 ApaI 酶对不同来源的单增李斯特菌进行 PFGE 分型，结果显示：从洛杉矶一起暴发病例中分离到的单增李斯特菌与瑞士暴发病例中分离到的单增李斯特菌具有相同的 PFGE 图谱，表明二者具有较近的亲缘关系。为调查因单增李斯特菌引发食物中毒事件中的污染源，LOMONACO 等[14]利用 PFGE 型方法成功地追踪到本次事件与食用受污染的香瓜 *Cucumis melo* 有关。上述究结果表明：PFGE 在全基因组的水平上对病原菌进行分型，相同菌株在不同实验室进行试验均能得到相同分型图谱，分型指数往往在 0.95 以上，与传统核糖体分型相比其重复性更好、分辨力更高，目前该技术已成为多种细菌追踪溯源、分型鉴定和分子流行病学调查的常规工具之一。

通过建立 PFGE 分型方法标准化操作规程，结合互联网平台实现实验室间数据共享及比对，这对于食源性病原菌暴发事件的追踪调查具有重要意义[15-16]。美国 PulseNet 已归纳整理了 13 284 个单增李斯特菌 PFGE 图谱，其中有人类 7 576 个，食品 2 863 个，环境 2 799 个以及动物 46 个(Joseph Lavin, personal communication)。目前，有一些国家正在进行类似的 PFGE 研究，利用不同国家和地区的研究成果通过网络共享平台可建立一个全球 PulseNet(http://www.pulsenetinternational.org/protocols/pfge/)数据库。尽管 PFGE 分型过程存在耗时长、成本高、操作复杂、带型之间比对困难等不足，但 PFGE 的优势在于能

对所有的单增李斯特菌分离株进行有效分型，使得该项技术成为目前单增李斯特菌基因分型的最优分型方法。

2　基于 DNA 测序的分型方法

2.1　WGS 分型

近年来，WGS 技术正逐步应用于病原菌的暴发调查和分型鉴定中。WGS 分型是指利用测序技术对病原菌整个基因组碱基序列进行测序，在全面了解病原菌的遗传信息与变异特征的基础上进行基因分型，提高了菌株进化和溯源分析的分辨力，有助于快速地进行暴发识别并追踪传染源。目前，用于病原菌全基因组测序分型的方法主要有 2 种：基于全基因组的单核苷酸多态性分型(wgSNP)和基于全基因组的多位点序列分型(wgMLST)。全基因组测序分型方法在肠炎沙门菌 *Salmonella enteritides*，单增李斯特菌，霍乱弧菌 *Vibrio cholerae*，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 中已得到初步应用。有研究对引发人类李斯特菌病相关联的病原菌进行 WGS 分型，进一步追踪其污染源。结果发现：该方法不仅能精确定位污染源，同时还能根据单核苷酸多态性分析菌株在该时段的进化关系[17]。FAGERLUND 等[18]对长期引起某食品工厂污染的 ST8 型单增李斯特菌进行 WGS 分析，发现这些菌株同之前丹麦和挪威暴发食品污染事件的 ST8 型单增李斯特菌的 wgSNP 分析结果几乎完全相同，此研究结果表明：食品加工环境中持续存在的致病性菌株易于传播，是威胁食品加工厂安全的重要因素。另外，RUPPITSCH 等[19]用 wgMLST 分析方法对单增李斯特菌进行分型，结果显示：基于 DNA 测序分析的 wgMLST 方法与 PFGE 分型相比对单增李斯特菌具有更高的分辨率和灵敏度，能对食源性疾病暴发源头进行精确确认。

WGS 分型结果包含了病原菌全部的遗传信息，有利于毒力基因、耐药基因的筛选，结合序列比对软件更易发现基因组的变异特征[20]。在 MLVA 分型中，利用重复序列分析软件 Tandem Repeat Finder 可对 WGS 序列进行搜索，直接确定重复序列数目。WGS 分型方法在病原菌的暴发调查和监控上与传统基因分型方法(PFGE，MLST，MLVA 等)相比其分辨力和灵敏度更高、重复性更好，且便于数据比对[18]。此外，不同实验室之间可通过国际 PulseNet(http://www.pulsenetinternational.org/protocols/wgs/)网络公共数据库进行全球数据的交流和共享。在食源性致病菌的暴发识别和溯源分析中，WGS 正逐渐成为一个准确、快速、高效的鉴定工具。

2.2　MLST 分型

MLST 是在多位点酶切电泳技术的基础上为研究菌群基因结构而设计的一种高分辨率分型技术。该技术通过 PCR 扩增 7 个管家基因内部具有足够变异度的等位基因并对其产物进行测序。经 MLST 数据库分析后得出每个菌株各个位点的等位基因序号，将这些等位基因序号组合构成一个等位基因图谱，即序列类型(sequences type，STs)[21]。MLST 分型方法在与人类李斯特菌病爆发和散发相关的流行病学研究方面已得到广泛应用。有研究利用 MLST 分型技术探究单增李斯特菌种群进化关系[22]，结果显示单增李斯特菌的进化主要是菌株不断突变的结果。另有研究利用 3 种方法对 71 株单增李斯特菌进行基因分型，认为在单增李斯特菌的分型研究中 MLST 的分辨力优于血清分型和 PFGE，可用于追踪暴发疫情的传染源[23]。WANG 等[24]研究表明：国内 12 个省分离的 212 株单增李斯特菌中部分 ST 型别属于国内外潜在可能传播和暴发李斯特菌病的 STs 型。再者，WU 等[25]用 MLST 方法对国内零售的即食性食品(RTE)中分离出 80 株单增李斯特菌分型分析，发现部分菌株的 STs 型与人类李斯特菌病和不同地区的暴发事件相关。

细菌分型溯源技术种类繁多，MLST 以其简便快速，重复性强，分辨率高和数据可共享等优势在一定程度上满足了流行病学研究发展的要求。目前，已建立了多种病原菌的 MLST 数据库，巴斯德研究所根据单增李斯特菌 MLST 分型的 7 个管家基因(*acbZ*，*bglA*，*cat*，*dapE*，*dat*，*ldh*，*lhk*)建立了用于单增李斯特菌 MLST 分型的数据库(http://www.pasteur.fr/fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Lmono.html)[25]。随着新一代测序技术的出现，wgMLST 分型方法能同时将成百上千个基因位点的序列进行比对，与传统的 7 位点 MLST 基因分型方法相比具有更高的分辨力。但 2 种 MLST 分型方法均需要测序，使用成本较高。相信随着测序技术的发展，测序费用的降低，在不久的将来 MLST 分型技术有望成为某些细菌分型的“金标准”。

3 基于 PCR 扩增的分型方法

3.1 MLVA 分型

MLVA 分型是以 PCR 扩增为基础的基因分型方法之一，该方法利用存在于病原菌基因组 DNA 特殊位点中的大量可变串联重复序列作为检测靶标，设计特异性引物对每个位点进行 PCR 扩增产生不同大小的片段，通过毛细管电泳确定扩增产物大小，进而转化为每个位点的重复数，最终以一系列串联数字的形式来表示一个菌株型别。所有的细菌基因组序列都包含不同程度的串联重复数，这为细菌遗传多样性提供有关功能、进化及分型方面的重要信息。有研究对 91 株单增李斯特菌进行 MLVA 分型，结果显示该方法分辨力较高，可作为一线检测方法用于李斯特菌病的暴发确认和溯源检测[26]。此外，SALEH-LAKHA 等[27]利用 MLVA 方法对 2 421 株单增李斯特菌进行分型，并建立了关于 2 421 株单增李斯特菌 MLVA 分型结果的数据库，用于单增李斯特菌的流行病学监测和溯源研究。在 MLVA 分型方法的初步应用中，LUNESTAD 等[28]对农场和食品加工厂分离的 65 株单增李斯特菌进行 MLVA 分型时发现，其中 1 个 MLVA 图谱与曾经多次在本地区暴发的李斯特菌病病原菌图谱一致，表明消费一些鱼类产品仅仅是引起食源性李斯特菌病流行的可能因素之一。同样地，DASS 等[29]研究发现，造成冷冻熏鲤鱼加工厂单增李斯特菌污染的污染源除了来源于生产线外，还可能是原材料携带污染源并通过生产加工线传播，最终导致成品冷冻熏鲤鱼的污染。

MLVA 方法在大肠埃希菌 *Escherichia coli*，单增李斯特菌和沙门氏菌等的分型研究中已得到广泛应用，并建立了国际 PulseNet(http://www.pulsenetinternational.org/protocols/mlva/)网络在线数据库，用于全球范围内 MLVA 分型结果的共享与比较，从而为大范围细菌暴发事件的确认提供有利的数据支撑。MLVA 方法不仅具有方便快捷、重复性好、高通量等优势，其分型结果能够以数字化的形式显示，降低了之前琼脂糖凝胶电泳分析过程中产生的主观影响，更利于资料的分析、共享和比较。虽然该方法已在细菌流行病学分析和溯源研究中广泛应用，但因其需要专门的序列分析仪器，同时试剂费用昂贵，故在普通实验室还难以普及。

3.2 DiversiLab 分型

DiversiLab 是以 repetitive-sequence-based PCR(rep-PCR)技术为原理的自动化基因分型系统。通过 PCR 扩增细菌基因组的非编码重复序列，再将扩增片段在 Agilent 2100 自动生物分析仪上进行微流体电泳分离，并使用软件实时分析和处理数据对细菌进行基因分型[30]。该方法通过电泳产生的特异性指纹图谱来比较菌株间的相似性，提高了其分型能力，能对环境及食品样品中的病原微生物进行有效地监测和追踪。目前，该技术已被广泛应用于多种细菌和真菌的分子流行病学研究。有研究利用 DiversiLab 分型系统对食品中分离出的 25 株单增李斯特菌进行基因分型，结果显示某类食品在加工过程中通过不同或相同的途径污染了相同的单增李斯特菌，除此之外还有一些相同来源的菌株已发生变异[31-32]。另有研究对 91 株单增李斯特菌的同源性进行分析，结果发现所有菌株的 rep-PCR 型相似度较低，表明该地区单增李斯特菌的 rep-PCR 型存在多样性[33]。此外，ROUSSEL 等[34]将 DiversiLab 分型系统同 PFGE 相比较，发现 DiversiLab 分型系统更适用于食品加工过程和环境中污染源的快速追踪。综合上述文献资料和数据可知，DiversiLab 系统一次能对 12 个样本进行分析，总操作时长大约 6~8 h，是单增李斯特菌暴发流行普查阶段最理想的分型方法。

DiversiLab 系统分型与 PFGE 分型结果有良好的一致性[35-36]，相对于分型“金标准”的 PFGE 来说，其重复性更高，操作流程更简便，产生的数据易于标准化[37]，可作为快速分型或暴发疫情的流行病学分析首选分型方法。DiversiLab 分型系统在食源性致病菌的主动监测及病原体溯源等方面具有重要的应用价值，但 DiversiLab 分型系统也存在一定的局限性。该系统试剂成本较高，需要昂贵的仪器设备，对实验操作人员的专业素养要求较高，结果判定标准还不够明确。这些问题都亟待进一步探讨和解决。

3.3 CRISPR-Cas 系统分型

CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)序列由一种成簇的、有规律间隔的短回文重复序列构成，其与周围的一些辅助蛋白(Cas)共同组成 CRISPR-Cas 系统(简称 CASS 系统)。该系统是细菌通过基因水平转移而形成的一种获得性免疫系统，与细菌抵抗外源遗传物质入侵有关。根据

CASS 系统中的 Cas 蛋白和识别机制的不同，CASS 系统分为 3 个不同的类型，即 TypeⅠ，TypeⅡ和 TypeⅢ。典型的 CASS 系统主要由 leader，repeat，spacer 和一套 *cas* 基因组成，其中短的重复回文序列 repeat 是最核心的结构，*cas* 基因主要负责编码修饰核酸的相关蛋白。根据细菌中是否存在CASS 系统及细菌中 spacer 序列的数目和排列状态特征可对细菌进行基因分型[38]。目前已有研究利用CASS 系统对空肠弯曲杆菌 *Campylobacter jejuni* 和沙门氏菌进行基因分型，但关于 CASS 系统在单增李斯特菌上的应用还未见报道。FABRE 等[39]研究显示 CASS 系统在操作程序和样本通量上优于 PFGE，MLST，MLVA 等分型方法，更适合于沙门氏菌的暴发调查。因此，在食源性疾病污染源的追踪中，可利用 CASS 系统对环境和食品中病原菌的 CRISPR 结构进行测序分析，用于追踪疫情传染源和控制疫情蔓延。

4　展望

综上所述，基因分型方法已成为单增李斯特菌流行病学研究的重要工具，在单增李斯特菌的暴发调查和溯源研究中，PFGE，MLST，MLVA 等分型技术已得到广泛应用。其中，PFGE 技术具有高的再现性和分辨力，是病原微生物基因分型的“金标准”；而有着更高分辨力和再现力的 MLST 新技术正在逐渐被使用；MLVA 重复性好、高通量，有利于实验室间数据交流共享；DiversiLab 系统操作简便，快速省时，易于标准化；CRISPR-Cas 系统在操作程序和样本通量上优势较大；WGS 分型能结合多种基因分型方法对病原菌进行分析，具有更高的分辨率和灵敏度。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，但这些技术大多是针对病原菌基因组中的小部分遗传信息进行分析，对于高度克隆的菌株在分辨力上就略显不足。而全基因组测序分型是对病原菌整个基因组碱基序列进行分析，不仅提高了分型能力，还能鉴定分子血清型，筛选毒力基因、耐药基因等。此外，利用全基因组测序获得的序列信息，可同时对病原菌进行 MLST，MLVA，DiversiLab 系统和 CRISPR-Cas 系统分型，不仅提高了分型的准确性，也有利于不同分型方法的比较。但全基因组测序技术目前还存在测序耗时长，费用昂贵等不足，在推广上还存在难度。相信未来在确定病原菌的亲缘关系、追踪传染源、控制疫情的暴发和传播等方面，基因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受到越来越多研究者的青睐。

5　参考文献

[1] MELO J, ANDREW P W, FALEIRO M L. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: the role of stress responses [J]. *Food Res Int*, 2015, **67**: 75 – 90.

[2] FERREIRA V, WIEDMANN M, TEIXEIRA P, *et al*. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health [J]. *J Food Prot*, 2014, **77**(1): 150 – 170.

[3] KAWAMATA R, TAKAHASHI N, YADA Y, *et al*. Cytokine profile of a premature infant with early onset listeriosis [J]. *Pediatr Int Off Jpn Fediatr Soc*, 2011, **53**(3): 386 – 388.

[4] 连凯，谈卫军，赵丹，等. 2002–2012 年人和动物李斯特菌感染报告数据流行病学分析[J]. 中国人兽共患病学报，2014，**30**(10)：1033 – 1038.
LIAN Kai, TAN Weijun, ZHAO Dan, *et al*. Epidemiology of listeriosis infection in humans and animals, China, 2002–2012 [J]. *Chin J Zoonoses*, 2014, **30**(10): 1033 – 1038.

[5] 杨修军，赵薇，刘桂华，等. 2011–2015 年吉林省食品中单增李斯特菌的监测数据分析[J]. 食品安全质量检测学报，2017，**8**(1)：105 – 110.
YANG Xiujun, ZHAO Wei, LIU Guihua, *et al*. Analysis on the monitoring data of *Listeria monocytogenes* in food of Jilin Province in 2011–2015 [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, **8**(1): 105 – 110.

[6] ORSI R H, den BAKKER H C, WIEDMANN M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics [J]. *Int J Med Microbiol*, 2011, **301**(2): 79 – 96.

[7] LIU Dongyou, AINSWORTH A J, AUSTIN F W, *et al*. Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes [J]. *J Med Microbiol*, 2003, **52**(12): 1065 – 1070.

[8] GAGE R, CRIELLY A, BAYSINGER M, *et al*. Outbreaks of *Escherichia coli* O157: H7 infections among children as-

sociated with farm visits-Pennsylvania and Washington, 2000 [J]. *Can Commun Dis Rep*, 2001, **27**(14): 117 – 120.

[9] GOUVEIA S, PROCTOR M E, LEE M S, *et al.* Genomic comparisons and shiga toxin production among *Escherichia coli* O157: H7 isolates from a day care center outbreak and sporadic cases in southeastern Wisconsin [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**(3): 727 – 733.

[10] GALVÃO N N, CHIARINI E, DESTRO M T, *et al.* PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities [J]. *Meat Sci*, 2012, **92**(4): 635 – 643.

[11] FOX E M, WALL P G, FANNING S. Control of *Listeria* species food safety at a poultry food production facility [J]. *Food Microbiol*, 2015, **51**: 81 – 86.

[12] LEONG D, ALVAREZ-ORDOÑEZ A, JORDAN K. Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland [J]. *Front Microbiol*, 2014, **5**: 436. doi: 10.3369/fmicb. 2014. 00436.

[13] FUGETT E B, SCHOONMÁKERBOPP D, DUMAS N B, *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, **45**(3): 865 – 873.

[14] LOMONACO S, VERGHESE B, GERNER-SMIDT P, *et al.* Novel epidemic clones of *Listeria monocytogenes*, United States, 2011 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, **19**(1): 147 – 150.

[15] GERNER-SMIDT P, HISE K, KINCAID J, *et al.* PulseNet USA: a five-year update [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2006, **3**(1): 9 – 19.

[16] HALPIN J L, GARRETT N M, RIBOT E M, *et al.* Re-evaluation, optimization, and multilaboratory validation of the PulseNet-standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Listeria monocytogenes* [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2010, **7**(3): 293 – 298.

[17] BURALL L S, GRIM C J, MAMMEL M K, *et al.* Whole genome sequence analysis using jspecies tool establishes clonal relationships between *Listeria monocytogenes* strains from epidemiologically unrelated listeriosis outbreaks[J]. *PLoS One*, 2016, **11**(3): e0150797. doi: 10.1371/journal. pone. 0150797.

[18] ANNETTE F, SOLVEIG L, BJØRN C T, *et al.* Genome analysis of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 strains persisting in salmon and poultry processing environments and comparison with related strains [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(3): e0151117. doi: 10.1371/journal. pone. 0151117.

[19] RUPPITSCH W, PIETZKA A, PRIOR K, *et al.* Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Listeria monocytogenes* [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, **53**(9): 2869 – 2876.

[20] KWONG J C, McCALLUM N, SINTCHENKO V, *et al.* Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology [J]. *Pathology*, 2015, **47**(3): 199 – 210.

[21] PULLINGER G D, LÔPEZBENAVIDES M, COFFEY T J, *et al.* Application of multilocus sequence typing: analysis of the population structure detected among environmental and bovine isolates from New Zealand and the United Kingdom [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(2): 1429 – 1436.

[22] 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.

[23] KNABEL S J, REIMER A, VERGHESE B, *et al.* Sequence typing confirms that a predominant *Listeria monocytogenes* clone caused human listeriosis cases and outbreaks in Canada from 1988 to 2010 [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, **50**(5): 1748 – 1751.

[24] WANG Yan, ZHAO Ailan, ZHU Renfa, *et al.* Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China [J]. *BMC Microbiol*, 2012, **12**(1): 119. doi: 10.1186/1471-2180-12-119.

[25] WU Shi, WU Qingping, ZHANG Jumei, *et al.* Analysis of multilocus sequence typing and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from chinese retail ready-to-eat food [J]. *Front Microbiol*, 2016, **7**: 168. doi: 10.3389/fmicb. 2016. 00168.

[26] LI Xiujuan, HUANG Bixing, EGLEZOS S, *et al.* Identification of an optimized panel of variable number tandem-re-

peat (VNTR) loci for *Listeria monocytogenes* typing [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, **75**(2): 203 – 206.

[27] SALEH-LAKHA S, ALLEN V G, LI J, *et al*. Subtyping of a large collection of historical *Listeria monocytogenes* strains from Ontario, Canada, by an improved multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, **79**(20): 6472 – 6480.

[28] LUNESTAD B T, TRUONG T T, LINDSTEDT B A. 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): 1 – 10.

[29] DASS S C, ABU-GHANNAM N, ANTONY-BABU S, *et al*. Ecology and molecular typing of *L. monocytogenes* in a processing plant for cold-smoked salmon in the Republic of Ireland [J]. *Food Res Int*, 2010, **43**(5): 1529 – 1536.

[30] WERNER G, FLEIGE C, NEUMANN B, *et al*. Evaluation of DiversiLab®, MLST and PFGE typing for discriminating clinical *Enterococcus faecium* isolates [J]. *J Microbiol Methods*, 2015, **118**: 81 – 84.

[31] 郑晶，唐中伟，陈彬，等. 禽肉制品中单增李斯特菌的 DiversiLab 分型[J]. 食品科学，2015，**36**(24)：220 – 223.
ZHENG Jing, TANG Zhongwei, CHEN Bin, *et al*. DiversiLab typing research of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products [J]. *Food Sci*, 2015, **36**(24): 220 – 223.

[32] 郑晶，唐中伟，陈彬，等. 对同一地区分离的单增李斯特菌进行 DiversiLab 分型及同源性分析[J]. 中国卫生检验杂志，2016，**26**(1)：9 – 11, 15.
ZHENG Jing, TANG Zhongwei, CHEN Bin, *et al*. DiversiLab typing and homology analysis of *Listeria monocytogenes* isolated from the same place [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2016, **26**(1): 9 – 11, 15.

[33] 劳华均，李如松，孙萍，等. DiversiLab 系统用于食品中单增李斯特菌同源性分析[J]. 食品工业，2013，**34**(8)：154 – 156.
LAO Huajun, LI Rusong, SUN Ping, *et al*. Homologous analysis of *Listeria monocytogenes* by DiversiLab system [J]. *Food Ind*, 2013, **34**(8): 154 – 156.

[34] ROUSSEL S, FÉLIX B C, COLARNÉN 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.

[35] LIGOZZI M, FONTANA R, ALDEGHEN M, *et al*. Comparative evaluation of an automated repetitive-sequence-based PCR instrument versus pulsed-field gel electrophoresis in the setting of a *Serratia marcescens* nosocomial infection outbreak [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, **48**(5): 1690 – 1695.

[36] PITOUT J D D, CAMPBELL L, CHURCH D L, *et al*. Using a commercial DiversiLab semiautomated repetitive sequence-based PCR typing technique for identification of *Escherichia coli* clone ST131 producing CTX-M-15 [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, **47**(4): 1212 – 1215.

[37] DEPLANO A, DENIS O, RODRIGUEZ-VILLALOBOS H, *et al*. Controlled performance evaluation of the DiversiLab repetitive-sequence-based genotyping system for typing multidrug-resistant health care-associated bacterial pathogens [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, **49**(10): 3616 – 3620.

[38] SNYDER J C, BATESON M M, LAVIN M, *et al*. Use of cellular CRISPR (clusters of regularly interspaced short palindromic repeats) spacer-based microarrays for detection of viruses in environmental samples [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, **76**(21): 7251 – 7258.

[39] FABRE L, ZHANG Jian, GUIGON G, *et al*. CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(5): e36995. doi: 10.1371/journal.pone.0036995.