

# 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

李秀娟<sup>1</sup>, 崔玲玲<sup>2</sup>, 赵冬<sup>1</sup>, 潘琢<sup>1</sup>, 高伟利<sup>1</sup>

**摘要:**目的 建立针对食品来源的单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)分离株的多位点串联重复序列分型(Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis, MLVA)方法,为暴发确认和溯源检测提供实验室支持。方法 对2005—2014年间分离自食品的91株Lm进行14个可变数目串联重复序列(Variable Number of Tandem Repeats, VNTR)位点的检测,评估最优检测位点组合并分析检测结果。结果 通过采用软件分析,由LMV1、LMV2、LMV7、Lm10、Lm11、Lm23、LM-TR6、TR3和Lm15等9个VNTR位点组成的位点组合为最优MLVA检测位点,可以将91株Lm分离株分为70个型别,分型能力达到0.987 1。结论 本研究建立的基于全自动毛细管电泳的由9个检测位点组成的Lm的MLVA分型方法,具有操作简便、快速、结果客观、操作标准化、易于在不同实验室内比较的优势,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。

**关键词:**单核细胞增生李斯特氏菌;多位点串联重复序列分型;毛细管电泳

中图分类号:R378.99

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2015)09-0839-06

## Development of a multiple-locus variable number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* upon the capillary electrophoresis

LI Xiu-juan<sup>1</sup>, CUI Ling-ling<sup>2</sup>, ZHAO Dong<sup>1</sup>, PAN Zhuo<sup>1</sup>, GAO Wei-li<sup>1</sup>

(1. Department of Microbiology, Shijiazhuang Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang 050011, China;

2. Hebei Normal University, Shijiazhuang 050000, China)

**Abstract:** In order to develop a multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) method for *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), a total of 14 variable number of tandem repeats (VNTR) loci were used to detect the 91 *L. monocytogenes* isolated from food. Results showed that the optimal combination of loci consisted of 9 loci (LMV1, LMV2, LMV7, Lm10, Lm11, Lm23, LM-TR6, TR3, Lm15), which produced the high level of discriminatory ability with Simpson index of 0.987 1 for foodborne *L. monocytogenes*, could divided 91 *L. monocytogenes* isolates into 70 subtypes. This method required only one conventional PCR followed by automated capillary electrophoresis, providing high discriminatory ability. It was simple, easy to perform, relatively fast, inexpensive, objective, standardized operating and could provide conveniently interlaboratory comparisons, which would be useful in outbreak investigations and listeriosis surveillance as a first line screening method.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA); capillary electrophoresis

李斯特菌属为革兰染色阳性兼性厌氧无荚膜杆菌,有7个菌种,分别为单核细胞增生李斯特氏菌(*L. monocytogenes*, Lm)、绵羊李斯特菌(*Listeria iuanuii*)、英诺克李斯特菌(*Listeria innocua*)、威尔斯李斯特菌(*Listeria innocua*)、西尔李斯特菌

(*Listeria seeligeri*)、格氏李斯特菌(*Listeria grayi*)和默氏李斯特菌(*Listeria murrayi*)<sup>[1-2]</sup>。Lm是唯一能引起人类疾病的李斯特菌,作为一种人畜共患病的病原菌,它能引起人、畜的李氏特菌病,感染后主要表现为败血症、脑膜炎和单核细胞增多<sup>[3]</sup>。尽管李斯特菌病的发病率相对较低,但对老年人和有免疫缺陷的感染者,致死率可达30%<sup>[4]</sup>。李斯特菌病主要通过食源性途径感染,可引起散发和暴发事件的发生。由于该病的发病率较低,潜伏期长,最长

作者单位:1. 石家庄市疾病预防控制中心,石家庄 050011

2. 河北师范大学,石家庄 050000;

Email:wsws1120@126.com

可达 71 d,导致在确认李斯特菌病暴发以及追查污染源方面有较大的困难。而建立可靠的 Lm 分型方法,拥有分型数据库对于暴发确认和溯源检测具有十分重要的意义。本研究旨在通过对分离自食品的 Lm 的 14 个可变数目串联重复序列 (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) 位点的检测,通过评估检测位点组合,建立针对食品中 Lm 分离株的 MLVA 分型方法,确定优势型别,建立 MLVA 分型数据库,为以后的溯源检测和暴发确认提供实验室资料支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 91 株 Lm 为 2005—2014 年分离自生禽肉、生畜肉、水食产品、速冻米面制品及凉拌色拉,均经李斯特菌 API *Listeria* 生化鉴定试剂条检测确认。其中 43 株 Lm 分离株由石家庄市疾病预防控制中心分离,48 株由河北省疾病预防控制中心馈赠。

1.1.2 主要设备与试剂 9700 型 PCR 仪 (ABI 公司), Qiaxcel 型全自动毛细管电泳仪 (Qiagen 公司), GoTaq<sup>®</sup> Colorless Master Mix (Promega 公司), 高分辨率的毛细管电泳卡夹 (DNA High Resolution Kit Gel Cartridge, Qiagen 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 模板制备 从血平板上挑取过夜培养的 Lm 新鲜菌落至 400  $\mu$ L  $\times$  TE (pH8.0) 缓冲液中,震荡混匀,煮沸 5 min,冰上冷却,10 000 r/min 离心 5 min,取上清于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.2.2 MLVA 检测 本研究所用 MLVA 检测位点及引物参考文献<sup>[5-9]</sup>。为了避免检测位点的重复,全部 22 个位点均经过比对确认,最后确认 14 个位点作为筛选位点,见表 1。所有 14 个位点均采用单重 PCR 检测,PCR 体系:  $2 \times$  GoTaq<sup>®</sup> Colorless Master Mix 12.5  $\mu$ L,上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L,加水补足体积至 25  $\mu$ L。PCR 参数:  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $50^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  40 s, 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  5 min。采用高分辨率的毛细管电泳卡夹经全自动毛细管电泳仪检测 PCR 扩增结果。

1.2.3 串联重复序列数目的确认 对每个位点的不同长度的扩增产物均送上海生工公司进行双向测序,参考串联重复序列分析软件 Tandem Repeat Finder,确定重复序列数目。对于无扩增产物的位点,重复序列数目确定为 0;有扩增产物而无重复序列的位点,相应重复序列数目为 1;其余所有菌株重

复序列数目均为实际重复序列数目 + 1。

1.2.4 分子血清型检测 参考文献<sup>[10]</sup>,采用一个多重 PCR 进行 Lm 的分子血清学检测。每次 PCR 均使用阳性对照,阳性对照菌株为 09M692 (1/2c) 和 11M5102 (4b),由澳大利亚昆士兰州法医与科学研究所馈赠。

1.2.5 谱系检测 参考文献<sup>[11]</sup>,基于毒力基因 *actA* 序列第 259 位至 437 位氨基酸的测定,采用 Mega5.0 软件将各序列与文献中公布的谱系特异性氨基酸序列进行比较分析。

1.3 数据分析 采用辛普森指数 (Simpson's index of diversity, DI) 作为计算分辨力的方法<sup>[12]</sup>,检测位点的最优组合计算采用 Optimal Combination Finder (OCT) 软件进行<sup>[13]</sup>。采用 BioNumerics Version 6.6 软件对 MLVA 分型结果以 UPGMA 方法构建进化树。

## 2 结果

2.1 14 个 VNTR 位点检测结果 通过对 14 个 VNTR 位点的 PCR 扩增,绝大多数位点均可扩增出唯一的目的条带,但也有些位点无扩增产物 (表 1)。在 91 株 Lm 中, LM-TR6 位点有 70 株菌无扩增产物,其次为 Lm11、LMV9、LMV7 和 Lm23 位点,菌株数分别为 17、14、1 和 1 株。Lm11 位点无扩增产物的 17 株菌株均为 1/2a 血清型,LMV9 位点无扩增产物的 14 株菌株均为 1/2b 血清型,LMV7 和 Lm23 位点无扩增产物的菌株分别为 1 株 1/2a 血清型和 1 株 1/2b 血清型;而 LM-TR6 位点在 28 株 1/2b 血清型菌株中均无扩增产物,在 15 株 4b 型菌株中有 14 株无扩增产物,在 1/2a 型和 1/2c 型中,分别有 27 株和 1 株菌株无扩增条带。其余 9 个位点均有不同长度的扩增产物。在 14 个检测位点中 LMV2 位点的分型能力最强,将 91 株菌分为 15 个型别,分型指数为 0.891 5,其次为 Lm23,分型指数为 0.879 1。而 LM-TR2 位点的分型能力最弱,91 株菌为同一型别。

2.2 MLVA 位点最优组合的选择 通过采用 OCT 软件计算由 2-10 个检测位点组成的所有组合的分型能力 (表 2),发现随着组合位点数目的增多,大体呈现分型能力提高的趋势,但在组合位点达到 9 个和 10 个时,分型能力并无增加,而是停留在 0.987 1。由此可见,由 LMV1、LMV2、LMV7、Lm10、Lm11、Lm23、LM-TR6、TR3 和 Lm15 等 9 个位点组成的 MLVA 检测体系是最优的检测位点组合,将 91 株菌分为 70 个型别,分型能力达到 0.987 1。

表 1 14 个 VNTR 位点检测结果

Tab. 1 Test results of 14 VNTR loci used for MLVA

序号 No. of loci	VNTR 位点 VNTR locus	重复序列片段 Repeat unit	扩增产物 长度 Amplicon range(bp)	重复序列 数目 No. of repeat range	无扩增产物 菌株数 No. of isolates with null allele	等位基因数目 No. of alleles (including null allele)	DI Simpson's index
1	LMV1	GTATTT	344-410	11-18	0	6	0.716 7
2	LMV2	GTAGATCCG	329-522	6-27	0	15	0.891 5
3	LMV6	AGTACCACCAACACC	215-262	3-6	0	4	0.615 1
4	LMV7	TAAAACCTA	438-522	7-14	1	7	0.789 2
5	LMV9	AGAAAAACC	483-555	2-4	14	4	0.632 4
6	Lm8	CAGCTTCTCAGCAG	228-252	1-3	0	3	0.145 0
7	Lm10	GAAGAACCAAAA	322-357	2-4	0	3	0.512 8
8	Lm11	TTGCTTGTTTTT	141-166	3-4	17	3	0.625 8
9	Lm15	CAAAAGATACAC	335-423	3-10	0	8	0.776 3
10	Lm23	CATCGG	320-415	9-23	1	12	0.879 1
11	Lm32	AACACC	145-194	5-12	0	6	0.736 9
12	LM-TR2	TATTTTTATTTAAAAATG	585-630	2	0	1	0
13	LM-TR6	CCAGACCCAACA	250-324	3-5	70	4	0.396 0
14	TR3	TCA	363-385	9-13	0	4	0.663 4

2.3 最优的 9 个 VNTR 位点组合对不同血清型菌株的分型检测 利用分子血清分型方法,可将 91 株 Lm 分为四种血清类型,分别为 1/2a 型(1/2a 和 3a) 41 株、1/2b 型(1/2b、3b 和 7) 28 株、1/2c 型(1/2c 和 3c) 7 株 和 4b 型(4b、4d 和 4e) 15 株。新建立的最优的 9 个位点组合对不同血清型 Lm 菌株的分型能力均较好,DI 值除 1/2a 型为 0.948 7 以外,余均大于 0.95(表 3)。各血清型的主要基因型别非常集中,且该主要基因型同时是该血清型的独特基因型,在其他血清型中均未检出。

2.4 进化树分析 采用 BioNumerics Version 6.6 软件以 UPGMA 方法构建进化树(图 1),进化树分析可将 91 株 Lm 分为两大分支,分别为谱系 I 和谱系 II,谱系 I 由 1/2b 和 4b 血清型的菌株组成,谱系 II 由 1/2a 和 1/2c 血清型的菌株组成。谱系 I 的 1/2b 和 4b 血清型混杂在一起,不能进一步区分。而谱系 II 中的 7 株 1/2c 血清型菌株单独聚集成一支。

3 讨论

细菌分型检测的主要意义在于暴发确认和污染源追踪,根本目的是为了确认关联菌株。PFGE 分型方法采用单一酶切,并不能很好的分辨不同的 Lm 菌株,需同时进行两种酶切才能增加分辨力。PFGE 虽目前已作为金标准用于分型和暴发溯源检测,但该方法的缺点如仪器昂贵、方法难于标准化、结果分析不可避免的主观化、结果分析需采用专门

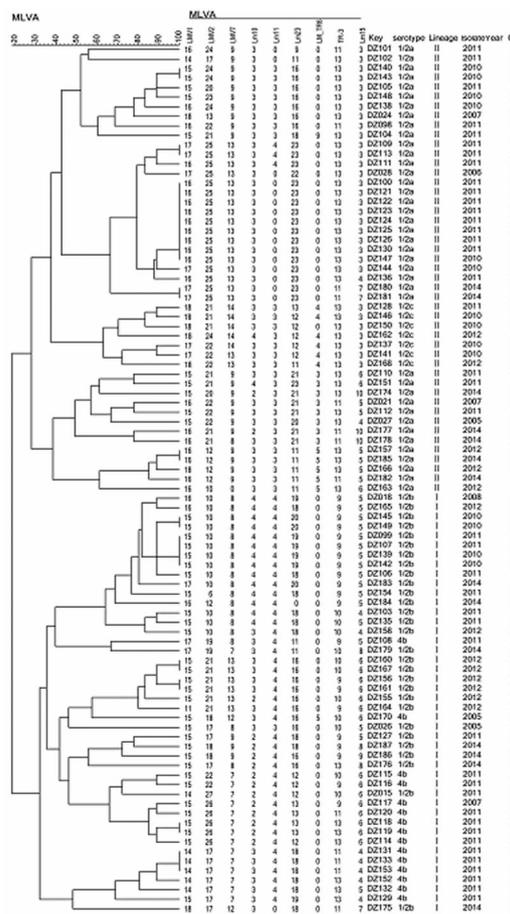


图 1 以 UPGMA 方法对 MLVA 检测结果构建进化树  
Fig. 1 UPGMA dendrogram of MLVA results for 91 *L. monocytogenes* isolates

表 2 不同位点组合的分型能力

Tab. 2 Discriminatory ability of different loci combination

组合位点数目 Combinations for a given selection of loci	DI 值居前 3 位的组合 The best 3 optimal combinations of loci ranked in descending DI order	分型数目 Genotypes	DI Simposon's index
2	Lm23 Lm15	32	0.950 9
	LMV1 LMV2	29	0.950 6
	Lm23 Lm32	28	0.950 2
3	LMV1 Lm23 Lm15	48	0.973 6
	LMV1 LMV2 Lm23	49	0.971 9
	LMV1 LMV2 TR3	46	0.971 9
4	LMV1 LMV2 Lm23 TR3	60	0.979 7
	LMV1 Lm23 TR3 Lm15	57	0.979 7
	LMV1 LMV2 Lm23 Lm15	56	0.978 5
5	LMV1 LMV2 Lm23 TR3 Lm15	63	0.982 9
	LMV1 LMV2 Lm11 Lm23 TR3	62	0.982 7
	LMV1 Lm11 Lm23 TR3 Lm15	59	0.982 4
6	LMV1 LMV2 Lm11 Lm23 TR3 Lm15	65	0.985 6
	LMV1 LMV2 Lm11 Lm23 Lm32 TR3	63	0.984 9
	LMV1 Lm10 Lm11 Lm23 TR3 Lm15	64	0.984 6
7	LMV1 LMV2 Lm10 Lm11 Lm23 TR3 Lm15	68	0.986 6
	LMV1 LMV2 LMV7 Lm11 Lm23 TR3 Lm15	67	0.986 1
	LMV1 LMV2 Lm10 Lm11 Lm23 Lm32 TR3	66	0.986 1
8	LMV1 LMV2 LMV7 Lm10 Lm11 Lm23 TR3 Lm15	69	0.986 8
	LMV1 LMV2 Lm10 Lm11 Lm23 LM-TR6 TR3 Lm15	69	0.986 8
	LMV1 LMV2 LMV6 Lm10 Lm11 Lm23 TR3 Lm15	68	0.986 6
9	LMV1 LMV2 LMV7 Lm10 Lm11 Lm23 LM-TR6 TR3 Lm15	70	0.987 1
	LMV1 LMV2 LMV6 LMV7 Lm10 Lm11 Lm23 TR3 Lm15	69	0.986 8
	LMV1 LMV2 LMV6 Lm10 Lm11 Lm23 LM-TR6 TR3 Lm15	69	0.986 8
10	LMV1 LMV2 LMV6 LMV7 Lm10 Lm11 Lm23 LM-TR6 TR3 Lm15	70	0.987 1
	LMV1 LMV2 LMV7 Lm10 Lm11 Lm23 Lm32 LM-TR6 TR3 Lm15	70	0.987 1
	LMV1 LMV2 LMV7 Lm10 Lm11 Lm23 LM-TR6 LMV9 TR3 Lm15	70	0.987 1

表 3 新建立 MLVA 方法对不同血清型菌株的分型结果

Tab. 3 Test results of different serotype strains with new MLVA method

分子血清类型 Serotype	菌株数(株) No. of strains	分型数目 No. of genotypes	DI Simposon's index	主要基因型/独特基因型 (菌株数目) Main genotype/unique genotype (No. of strains)
1/2a 型	41	29	0.948 7	16-25-13-3-0-23-0-13-3(8)
1/2b 型	28	22	0.978 8	15-10-8-4-4-19-0-9-3(3)
1/2c 型	7	7	1.000 0	/
4b 型	15	12	0.961 9	14-17-7-3-4-18-0-11-5(3)
合计 Total	91	70	0.987 1	16-25-13-3-0-23-0-13-3(8)

软件等,已明显限制了该方法的推广应用。目前已有多篇文献报道,MLVA 分型方法可区分流行病学相关菌株和非相关菌株<sup>[7,14-16]</sup>以及相关克隆和非相

关克隆<sup>[17]</sup>。2007 年,Murphy<sup>[8]</sup>等首次报道了采用 MLVA 方法进行 Lm 的分型检测,至目前也已有多篇文献对该方法的建立进行了报道。但由于各文献

采用不同的检测位点和组合,且没有稳定的标准对位点组合进行评估,因此到目前为止还没有一套稳定的位点组合作为 Lm 的 MLVA 分型检测标准。在目前报道的一些检测位点中,有些位点的分型能力较弱,有些检测位点则互相重叠,另还有一些位点出现较多的无扩增现象。筛选合适的检测位点组合,建立标准化的位点组合和分型策略,对分型检测结果的确定和比对具有十分重要的意义。

Chenal-Francisque 等<sup>[17]</sup>曾根据 VNTR 位点在染色体中位置的不同,选用了 18 个 VNTR 位点作为检测对象,根据每个位点扩增结果是否满意,即是否有非特异性扩增,是否有无扩增产物的菌株出现,串联重复序列数目是否容易计算等原因,选择了 11 个 VNTR 位点作为优化位点组合,但由于未考虑位点组合不同会导致不同分型结果,因此该方法的 DI 值只有 0.945,低于 PFGE 方法。笔者曾在澳大利亚采用该 14 个位点对澳大利亚的 183 株 Lm 菌株进行 MLVA 检测,DI 值最高可达 0.991 4,最优组合同样也是 9 个位点的组合。其中与本研究相同的位点有 LMV1、LMV2、LMV7、Lm10、Lm11、Lm23、LM-TR6,不同的位点是以 TR3、Lm15 替换了 LMV6 和 Lm32。提示菌株来源的不同可能会导致不同的检测结果,即需要不同的位点组合进行 MLVA 分型的检测。Lindstedt<sup>[6]</sup>也曾报道采用相同的位点组合针对挪威和瑞典两个国家的 Lm 分型时显示出不同的分辨能力,作者认为分辨能力的不同是由于选取菌株来源不同所致。由于 MLVA 检测方法的建立是基于具有较高变异率的 VNTR 位点,因此可能会表现出由于菌株来源不同,而导致分型能力的差异,同时也会出现不同的位点组合导致不同的分型能力的结果,因此建立一套适合我国的、稳定的 Lm 的 MLVA 方法在李斯特菌病的防控上具有十分重要的意义。本研究最初采用 14 个 VNTR 位点对 91 株 Lm 进行了检测,通过采用 OCT 软件进行不同位点组合的 DI 值计算,考虑了不同位点组合对分辨力的影响,确定了由 9 个检测位点组成的 Lm 的 MLVA 检测体系。

多篇文献报道<sup>[7-10,14]</sup>显示 LMV2 位点的分型能力最强,这与本研究的结果相同,提示该位点变异较大。Sperry 报道<sup>[9]</sup>LM-TR6 位点不能扩增 1/2b、3b 和 4b 型菌株,本研究结果同样显示该位点在 1/2b 血清型中不存在,而分子血清型为 4b 的 15 株菌株中,同样有 14 株无扩增产物,而仅有的一株有扩增产物的菌株有可能为 4d 或 4e 型菌株,还有待进一步做血清凝集证实。而 lm11 位点在 Sperry<sup>[9]</sup>首次

使用该位点进行 MLVA 分析时,并未显示出所有的 1/2a 菌株均无扩增条带,本研究显示的 17 株 1/2a 菌株均无扩增条带,可能为样本量少,也可能为菌株来源差异所致。LMV9 位点在 14 株 1/2b 菌株中无扩增条带,这与 Lindstedt<sup>[6]</sup>文献中显示的部分 1/2b 菌株无扩增条带的结果相同,但目前由于文献中菌株量较少,尚无能确定该位点仅在 1/2b 菌株中会出现缺失。

在 17 种 Lm 的血清型中,引起人类李斯特菌病的主要为 1/2a、1/2b 和 4b 型菌株。Lindstedt<sup>[6]</sup>报道采用针对 4b 型菌株的 VNTR 位点进行的 MLVA 分析,检测结果经进化树分析可见 4b 型菌株形成不同于 1/2 血清型的单一簇,可以用于快速区分 4b 型菌株。本研究采用优化的 9 个位点进行 MLVA 分型检测,对不同血清型均有很好的分辨力,但进化树分析并不能进一步将 4b 型菌株区分开来,但能区分谱系 I 和谱系 II 的菌株,提示该结果同样也可作为暴发和菌株的确认提供支持。

本研究优化的 9 个位点,虽然有 LM-TR6 等可产生较多无扩增条带的位点,但在确定整体优化组合时,LM-TR6 位点的加入可使分型数目由 69 增加至 70,增加了一个基因型,DI 值达最大。本研究结果还显示,Lm23 与 Lm15 两个位点的组合,DI 值即可达到 0.950 9,可满足区分不同菌株的能力,提示当检测菌株数量较多,时间较紧时,可以通过减少检测位点的数量,同样可达到很好的分析结果,可作为实验室的一线方法用于李斯特菌病暴发调查和监测。

本研究所用的 Lm 均来源于食品,虽然来源较单一,但采用本研究确定的 MLVA 方法仍可将 91 株菌分为 70 个基因型别,分型能力达 0.987 1,可用于不同血清型 Lm 菌株的分型检测。该方法建立在普通 PCR 基础之上,联合使用高分辨率的全自动毛细管电泳,具有操作简便、快速、价廉、高通量、重复性好,可对食品样品直接进行检测<sup>[16]</sup>的优点,另外该方法将检测结果数字化,而非采用图片分析形式,减少了在结果分析过程中的主观影响,更易实现结果客观化和操作标准化,因此便于不同实验室间的结果比较。据此可建立类似于 PulseNet 网络的在线数据库,进行全国范围的结果比较,从而为该菌在大范围内的暴发事件确认提供支持。

#### 参考文献:

- [1] Jeffers GT, Bruce JL, McDonough PL, et al. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from hu-

- man and animal listeriosis cases[J]. *Microbiol*, 2001, 147 (5): 1095-1104.
- [2] Snehal J, Mrinal B, Enzo A. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes* [J]. *J Microbiol Methods*, 2012, 88 (3): 327-341. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.01.002
- [3] Xie MH, Yang XM, Lv XB. Investigation on pollution status of *Listeria monocytogenes* in food [J]. *Hubei Prev Med*, 1999, 10 (2): 31. (in Chinese)
- 谢茂慧, 杨晓敏, 吕斌. 食品中单核细胞增生李斯特菌污染的调查研究 [J]. *湖北预防医学杂志*, 1999, 10 (2): 31.
- [4] Mead PS, Slutsker L, Dietz V. Food-related illness and death in the United States [J]. *Emerg Infect Dis*, 1999, 5(5): 607-625. DOI: 10.3201/eid0506.990624
- [5] Li X, Huang B, Eglezos S, et al. Identification of an optimized panel of variable number tandem-repeat (VNTR) loci for *Listeria monocytogenes* typing [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 75 (2): 203-206. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.007
- [6] Lindstedt BA, Tham W, Danielsson-Tham ML, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 72 (2): 141-148. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.11.012
- [7] Miya S, Kimura B, Sato M, et al. Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains [J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 124 (3): 239-249. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.023
- [8] Murphy M, Corcoran D, Buckley JF, et al. Development and application of multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) to subtype a collection of *Listeria monocytogenes* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 115 (2): 187-194. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.022
- [9] Sperry KE, Kathariou S, Edwards JS, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis as a tool for subtyping *Listeria monocytogenes* strains [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46 (4): 1435-1450. DOI: 10.1128/JCM.02207-07
- [10] Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42 (8): 3819-3822. DOI: 10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004
- [11] Wiedmann M, Bruce JL, Keating C, et al. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential [J]. *Infect Immun*, 1997, 65(7): 2707-2716.
- [12] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity [J]. *J Clin Microbiol*, 1988, 26 (11): 2465-2466.
- [13] Wang X, Huang B, Blair B, et al. Selection of optimal combinations of loci by the Optimal Combination Finder computer program from a group of variable number tandem repeat loci for use in *Staphylococcus aureus* food poisoning case investigations [J]. *J Med Microbiol*, 2012, 61 (5): 631-639. DOI: 10.1099/jmm.0.040287-0
- [14] Lunestad BT, Truong TT, Lindstedt BA. 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: 2101-2110. DOI: 10.1017/S0950268812002750
- [15] Saleh-Lakha S, Allen VG, 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. DOI: 10.1128/AEM.00759-13
- [16] Chen S, Li J, Saleh-Lakha S, et al. Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of *Listeria monocytogenes* directly in food samples [J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 148 (1): 8-14. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.014
- [17] Chenal-Francisque V, Diancourt L, Cantinelli T, et al. Optimized multilocus variable-number tandem-repeat analysis assay and its complementarity with pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing for *Listeria monocytogenes* clone identification and surveillance [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51 (6): 1868-1880. DOI: 10.1128/JCM.00606-13

收稿日期:2015-03-12;修回日期:2015-06-12