

综述

单核细胞增生性李斯特菌分子分型研究进展

杨 洋 刘秀梅

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘 要: 近年来出现了各种灵敏、快速、自动化并且易于操作的分子分型方法。为了解各种分型方法应用于单核细胞增生性李斯特菌对食品链中食源性疾病监测、暴发的诊断及溯源的重要意义,对单核细胞增生性李斯特菌各种分子分型方法进行综述性介绍。

关键词: 利斯特菌,单核细胞增生;研究方法;分子生物学

Research Progress in Molecular Typing Methods for *Listeria Monocytogenes*

YANG Yang, LIU Xiu-mei

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: The sensitive, rapid, automated and increasingly easy-to-use molecular typing methods were developed in recent years. Molecular typing methods not only improve the abilities to detect and track human listeriosis out breaks, but also provide tools to track sources of *Listeria monocytogenes* contamination throughout the food system. The highlights key aspects of molecular typing methods for different *Listeria monocytogenes* were reviewed.

Key word: *Listeria monocytogenes*; RESEARCH METHODS; Molecular Biology

单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 是一种能引起人类和动物李斯特菌病的革兰阳性短杆菌^[1,2]。单核细胞增生性李斯特菌感染的潜伏期长(3~70 d),使得诊断和溯源及控制传播途径非常困难。对于分型方法来说,有三方面非常重要,即分辨能力强、重复性好、简便快速。单核细胞增生性李斯特菌生物学分型对食品链中食源性疾病监测、暴发的诊断及溯源具有重要意义。本文对单核细胞增生性李斯特菌的分子分型技术进行介绍。

目前已有许多分子分型方法用于单核细胞增生性李斯特菌分型,包括限制性酶切分析(Restriction Enzyme Analysis, REA)、脉冲场凝胶电泳(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)、核糖体分型(Ribotyping, RT)、限制性片段长度多态性分析(Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, RFLP)、扩增片段长度多态性分析(Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis, AFLP)、随机引物扩增多态性 DNA 分析(Random Amplification of Polymorphic DNA Analysis, RAPD)、多基因位点序列

分型(Multicous Sequence Typing, MLST)、多重毒力基因位点序列分型(Multi-Virulence-Locus Sequence Typing, MVLST)、微阵列等等。

1 PFGE 分型

PFGE 的原理为:细菌包埋于琼脂块中,用适当的内切酶在原位对整个细菌染色体进行酶切,酶切片段在特定的电泳系统中借助电场方向不断交替变换及合适的脉冲时间等条件得到良好的分离^[1]。

PFGE 分型内切酶的选用至关重要,所采用的内切酶常为寡切点酶,这种酶酶切后的片段少而大,适合于作 PFGE 电泳^[2]。Howard 等^[3]对李斯特菌 PFGE 分型内切酶的选用进行了研究。其结果显示,用 *Apa* I、*Asc* I、*Not* I 和 *Sma* I 进行酶切后获得的大片段,对李斯特菌的区分非常有用。*Apa* I 分辨能力强于 *Sma* I,因为 *Apa* I 产生的条带数目少于 *Sma* I,清晰易读^[4,5]。*Apa* I 分辨能力虽然也强于 *Asc* I,但 *Asc* I 数据更易解释,原因是 *Asc* I 产生(8~14 个)片段比 *Apa* I 产生的片段(18~23 个)少^[6]。两种酶联用可提高 PFGE 的分辨能力。

PFGE 分型采用的寡切点酶可获得大而少的片段,且电泳系统特有的电泳条件能使大片段得到很好的分离,形成的图谱清晰、可重复性好,结果易于观察和解释。PFGE 分型能区分其它分型方法不能

基金项目:国家“十一五”科技支撑项目(编号 2006BAK02A15)

作者简介:杨洋 男 博士研究生

通讯作者:刘秀梅 女 研究员

区别的菌株(包括 4b 型),具有较强的分辨能力。而与流行病学相关的菌株,PFGE 则显示为同一型别^[7],所以 PFGE 已成为单核细胞增生性李斯特菌分型方法中最优异的方法之一^[6~9]。1998 年和 2002 年美国发生了 2 起李斯特菌病暴发流行事件,美国 PulseNet 实验室就是用 PFGE 分型方法成功追踪到传染源^[10,11]。

但该方法也存在一些问题,如由于插入、缺失或点突变等单一基因事件使 PFGE 在长期流行病学研究中显得不稳定;某些内切酶(如 Apa I)能很好地消化大多数单核细胞增生性李斯特菌株,而对某些克隆株却不消化等等,这些问题都有待进一步探讨和解决,以使该方法更加完善。

2 RT 分型

RT 是一种以标记的大肠杆菌 rRNA 操纵子为探针,与限制性酶切后的染色体 DNA 杂交,通过出现频率不同的片段来反映细菌 DNA 多态性的方法^[1]。它有 2 个显著的特点:一.因为核糖体基因具有高度保守性,所以一种通用的探针可用于几种不同的生物体^[12];二.细菌通常具有多个 rRNA 操纵子,通过核糖体分型,可获得足够数量不同分子大小的条带(一般为 5~15 条)^[13]。RT 具备较高的分型率和良好的重复性,但其对单核细胞增生性李斯特菌的分辨能力低于 REA、MEE、RAPD、PFGE 等分子分型方法^[14,15],在单核细胞增生性李斯特菌各血清型中,RT 对 1/2a、1/2c、3a 的分辨能力较强,而区分 1/2b、4b 的能力较差^[14]。所以,单独使用 RT 对单核细胞增生性李斯特菌进行分型就显得不充分,应与其他分型方法联用,以提高分辨能力。

随着美国 Dupont 公司全自动微生物核糖体基因分型系统(RiboPrinter microbial characterization system)的推出,RT 分型方法实现了自动化和标准化,这是其在分子分型中应用的优势。Alessandra De Cesare 等^[15]利用该系统对 15 种限制性内切酶的分辨能力进行评价。结果显示,15 种酶中,Pvu II、EcoR I、BstE II、Ban I 和 Xho I 的分辨能力较强(D I > 0.900),由于 BstE II 和 Ban I 会产生较弱的低分子量条带,需要人工确定和分析,故不适用于自动分析。利用 Pvu II、EcoR I 和 Xho I 对 71 株单核细胞增生性李斯特菌的分型结果显示,使用不同的内切酶分步分型可增强 RT 对单核细胞增生性李斯特菌(包括血清型 4b)的分辨能力。但也指出,虽然使用多种酶和全自动微生物核糖体基因分型系统能够实现对人类李斯特菌病的监测和流行病学调查,但仍需要使用其它分型方法对菌株进一步区分。

3 RFLP 分型

RFLP 作为反映微生物内在遗传进化关系的基因分型方法之一,被一些学者用于单核细胞增生性李斯特菌的分子分型。当 DNA 序列的差异发生在限制性内切核酸酶的识别位点时,或当 DNA 片段的插入、缺失或重复导致基因组 DNA 经限制性内切核酸酶酶解后,其片段长度的改变可以经凝胶电泳区分时,DNA 多态性就可应用限制性内切核酸酶进行分析。Nocera 等^[16]以 EcoR I 为限制性内切酶,对 28 株血清型为 4b 的单核细胞增生性李斯特菌进行了 RFLP 分析,获得了 10 个不同 RFLP 型。Saunders 等^[17]运用生物素标记的 DNA 探针和 Nci 酶切片段杂交的方法对 64 株单核细胞增生性李斯特菌进行了 RFLP 分析,获得了 19 个不同的型别,并且发现与流行病学相关的菌株属于同一型别。

1995 年,A M Ridley^[18]报道了对这种方法的评价结果。其结果显示,RFLP 对 1/2 血清群单核细胞增生性李斯特菌的分辨能力较强($DI = 0.883$),提示 RFLP 对 1/2 血清群流行病学研究意义较大,但是 RFLP 对 4 血清群的分辨能力较差,其在 4 血清群流行病学研究中的价值有限。A M Ridley 的评价结果还指出,RFLP 具有良好的可重复性,且结果的解释较简单,可比性也较强,是英国公共卫生中心实验室 1/2 血清群单核细胞增生性李斯特菌分型的常规方法。

4 AFLP 分型

AFLP 是一种以限制性酶切片段选择性扩增为基础的 DNA 指纹图谱技术,与 RFLP 相似,两者的主要区别是 AFLP 以 PCR 扩增代替 RFLP 的 Southern 杂交来检测限制性酶切片段^[19]。AFLP 已被成功地应用于多种细菌的分子分型,有关单核细胞增生性李斯特菌 AFLP 分析的报道也较多。Aarts H J 等^[20]将自动激发荧光分析(ALFA)和 AFLP 联合使用,对 106 株单核细胞增生性李斯特菌进行了分型,指出两者联用的分辨能力较高,适用于单核细胞增生性李斯特菌的分型。但自动激发荧光分析(ALFA)在多数实验室都无法实现,故限制了其使用。

Ripabelli 等^[21]用限制性内切酶 Hind III 进行酶切,并结合琼脂糖凝胶电泳对单核细胞增生性李斯特菌进行了 AFLP 分析,结果显示,这种方法对于单核细胞增生性李斯特菌流行病学分型来说,分辨能力不令人满意。Guerra M M 等^[22]在 Ripabelli 等研究的基础上,用 EcoR I 代替 Hind III,对 84 株单核细胞增生性李斯特菌进行了 AFLP 分析,获得 14 种不同的型别,血清型 1/2a、1/2b、4b 都被区分为不同的

AFLP型,并指出这种简单的、单酶切的 AFLP 方法具有可重复性,可用于单核细胞增生性李斯特菌流行病学分型。Keto-Timonen RO 等^[27]用 9 种双酶切组合(Hind III、Apa I、EcoR I 和 HpyCH4 IV、Mse I、Taq I 分别组合)对 34 株单核细胞增生性李斯特菌进行了 AFLP 分析,其中 Hind II 和 HpyCH4 IV 组合在琼脂糖凝胶电泳中获得的信号最强,34 株菌分别属于 29 种 AFLP 型,分辨能力较强(DI > 0.999)。Keto-Timonen R O 等指出该方法具有较高的分辨能力和可重复性,是一种利用价值较高的分型方法。

5 RAPD 分型

RAPD 是以 PCR 为基础的 DNA 指纹图谱法。它以寡核苷酸(一般含 10 个核苷酸)为引物,对细菌的基因组 DNA 进行扩增,经电泳后获得的扩增产物的带型可反映基因组 DNA 的多态性。RAPD 不仅可用于纯化后的 DNA,还可用于未经处理的细胞或细胞裂解液,因此,RAPD 相对于其他分子分型方法如 RT、PFGE 等来说,是一种简便快速的方法^[24]。

首先将 RAPD 用于单核细胞增生性李斯特菌分型的是 Mazurier S I 和 Wernars K^[25],他们以 10 个碱基的寡核苷酸 HLWL 74 为引物,对 60 株李斯特菌的完整细胞进行了 RAPD 分析。60 株菌(49 株单核细胞增生性李斯特菌和 11 株其它李斯特菌)分成 29 个不同的型别。其结果还显示,李斯特菌完整细胞的 RAPD 型别具有可重复性。以 HLWL 74 为单一引物,同一血清型的单核细胞增生性李斯特菌可分为不同型别,尤其是 1/2a 和 4b。但也发现,一些血清型不同的菌株属于同一 RAPD 型,因此,RAPD 分型应与血清分型联用,或者加用其他引物进行分析,以提高分辨能力。由于基因组目标序列一个碱基对的变化可产生完全不同的 RAPD 图谱,而 10 个核苷酸长度的引物仅能覆盖基因组的小部分,位于非扩增部位的重要变化位点可能被忽视,因此,在用 RAPD 分型时,使用一系列不同的 10 个核苷酸长度引物是很重要的。

Mazuri S I 和 Wernars K^[35]还指出 RAPD 分析可直接使用完整细胞,节省了获得目的 DNA 的时间和花费;由于可以随时更换引物,所以 RAPD 的分辨能力实际上是无限的;与其他分型方法如 REA、MEE 比较,它操作简便、快速、结果分析较简单,普通实验室可开展此实验,并有可能实现自动化,Lawrence L M 等^[29]的研究还显示 RAPD 对 4 型血清群也有较好的分辨能力,这些优势使其成为流行病学研究中的便利手段之一。Boerlin P 等^[24]用 RAPD 方法,以 3 种不同的引物,PB 1、PB 4 和 HLWL 74 对 100 株单核

细胞增生性李斯特菌在不同时间进行了两次分型,以探讨 RAPD 的可重复性,并将 RAPD 结果与其他分型方法进行了比较。结果显示,以 PB 1 或 PB 4 为引物时,两次结果完全一致,而以 HLW 74 为引物时,有些菌株的一条次要条带不能重现,但这些菌株显著区别于其它菌株,单独聚为一型。所以,RAPD 的可重复性较好。作者同时指出了一些影响 RAPD 重复性的因素:通过反复冻融部分溶解细胞可提高可重复性;目的 DNA 的浓度、裂解液中的样制成分、引物的 GC 含量和 Td、不同引物和热循环仪都可能会影响 RAPD 的重复性。因此,为了获得良好的可重复性,不同实验室应该分别对 RAPD 分型方法进行优化,而实验室间 RAPD 结果的标化可能还有困难。通过其他方法的比较发现,2 种或 3 种引物联合使用的分辨能力较强,将 RAPD 与其他方法联用可提高分辨能力,最佳组合是 RAPD 与噬菌体分型。

6 MLST 和 MVLST 分型

目前常用的分子分型法都有一个重要的局限性,即不同实验间的结果相互比较较为困难。运用 MLST 解决了这一问题^[26]。

MLST 是一种以多位点酶电泳原理为基础的新型分子分型方法,它通过 DNA 序列的测定,反映不同管家基因上等位基因的特征^[27]。MLST 有以下特点:① MLST 是以测定核苷酸序列为基础的,具有较高的分辨能力,而且其结果明确,可直接进行网络实验室间比较^[28];② 管家基因上核苷酸变异积累是一个相对缓慢的过程,等位基因模式稳定,因此 MLST 非常适合全球流行病学研究^[29];③ PCR 和 DNA 自动测序相结合,省时省力^[26];④ 辨别能力接近或高于指纹图谱法^[26,29]。

Tamara Revazishvili^[30]选择 *hlyA*、*actA* 和 4 种管家基因(*betI*、*gyrB*、*pgm*、*recA*)对 175 株单核细胞增生性李斯特菌进行了 MLST 分析,并与 PFGE 进行了比较。依据 4 种管家基因获得了 122 种型别(STs) Sequence types,依据 *hlyA* 和 *actA*,分别获得了 34 和 38 种型别。STs Sequence types 是 PFGE 型别的 2 倍,一些 PFGE 型别相同的菌株可被 MLST 区分开,这说明 MLST 的分辨能力强于 PFGE。作者还指出,MLST 可以区分 PFGE 和血清分型不能鉴别的菌株,是单核细胞增生性李斯特菌分型的有效方法,在食源性李斯特菌病暴发调查中有重要意义。

由于管家基因序列变化较小,当需要了解单核细胞增生性李斯特菌地区流行状况时,MLST 的分辨能力就显得不足^[31]。一些毒力基因和毒力相关基因对单核细胞增生性李斯特菌的胞内生存、细胞间

转移和致病力起着重要作用^[32],这些基因频繁暴露于不断变化的环境中,与管家基因相比,进化得较快,因此这些基因具有较高的核苷酸序列多态性,用于本地流行病学研究也可具有较强的分辨能力^[33]。MVLST是一种以 MLST 为基础,用毒力基因和毒力相关基因代替管家基因的分型方法。

Wei Zhang 等^[31]选择 3 种毒力基因(*prfA*、*inlB*和 *inlC*)和 3 种毒力相关基因(*dal*、*lisR*和 *clpP*)对 28 株单核细胞增生性李斯特菌进行了 MVLST 分析,共获得 28 个型别,并将结果与 PFGE、RT 和 MLST 进行了比较。结果显示,MVLST(DI=1.000)可区分 RT(DI=0.921)和 PFGE(DI=0.970)不能分型的菌株。与 MLST 相比,MVLST 对血清型为 1/2a 和 4b 的菌株分辨能力较强。随着 PCR 扩增和 DNA 测序逐步自动化和商业化,在流行病学尤其是地区流行病学研究中,MVLST 将成为比指纹图谱法更简便的分型方法。

7 微阵列分型

Douglas R Call 和 Monica K Borucki 等^[34,35]建立了一个混合基因组微阵列(Mixed-genome microarrays)的方法用于单核细胞增生性李斯特菌的分型。首先用来自单核细胞增生性李斯特菌的 DNA 片段构建微阵列,然后将待测菌株与之杂交,通过分析杂交结果来分型。这种方法有以下优点:微阵列的构建和使用相对简单;用其分型,可以保留有关菌株间系统发育关系的信息;可鉴定将菌株区分开的特定序列,这些序列可以构建更小的微阵列;研究对象污染对结果影响较小;该方法可识别遗传标志物,这些遗传标志物可能与细菌微环境的生存和致病力有关,因此可以为致病菌检测、治疗、控制和生态学研究提供新的靶点。该方法的分辨能力接近甚至高于 PFGE。

虽然传统微阵列分型具有较高分辨力和较好保留遗传学信息的能力,但仍存在低通量、技术具有一定挑战性问题^[36]。为了解决这一问题,Monica K Borucki 等^[36]建立了悬浮阵列(Suspension Microarray)方法,它可以高通量地对单核细胞增生性李斯特菌进行分型。悬浮微阵列是将微阵列系统从传统的玻片移至高通量、高效率的微球上,具体来说,就是含有荧光染料的 5.6 μm 的聚苯乙烯微滴(微球)附着于 DNA 探针上,每个 DNA 探针是一个含有唯一荧光染料的特定微球,这些微球混合放于 96 孔板中,这使多种探针同时分析成为可能。目的 DNA 分子则用其它显著不同的荧光染料标记,并在微球上与探针杂交,然后用双重流式细胞仪进行检测。这种方法允许 96 孔板每孔容纳 100 种探针,可使微阵列

分型方法更快速、廉价。悬浮微阵列法消除了传统微阵列法分析中许多与技术相关的问题,如印迹、手动洗板、杂交后图像分析和资料标准化等,因此,悬浮微阵列法的发展将有利于微阵列分析技术的标准化。悬浮微阵列法是一项新技术,还需不断完善,以使其更好地用于单核细胞增生性李斯特菌的分型。

综上所述,分子分型方法已成为单核细胞增生性李斯特菌流行病学研究的重要工具。大多数分子分型方法在分辨能力、可重复性、分型率、操作技术等方面各有优势,实际应用时,可几种方法同时使用,以提高分辨率,获得更佳的分型效果。1998 - 1999 年,美国多个州的李斯特菌病暴发导致了 100 多人患病,其中 21 例死亡,病人至少分布在 15 个州。该暴发开始是通过核糖体分型和 PFGE 检出的,发现某一分子型的菌株引起的病例数不断的增加,并最终发现该暴发与食用了污染的热狗有关。2000 年 5 月至 12 月间,用核糖体分型和 PFGE 在 10 个州发现了 29 例李斯特菌病病例,并确定火鸡是其污染源。在新西兰联合使用血清分型、RELPT 和 PFGE 也发现了一起与食用了被单核细胞增生性李斯特菌污染的蚌类有关的李斯特菌病暴发^[37]。

参考文献

- [1] ROMEO J, HUBNER, EILEEN M, et al. Types of *Listeria monocytogenes* predicted by the positions of EcoRI cleavage sites relative to ribosomal RNA sequences[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, (92):5234-5238.
- [2] 陈太基,封幼玲. 脉冲场凝胶电泳用于李斯特菌分型及分子流行病学研究[J]. 中国人兽共患病杂志. 2000,16(1):90-93.
- [3] HOWARD PJ, HARSONO KD, LUCHANSKY J B. Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* and *Listeria seeligeri* by pulsed-field gel electrophoresis [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 57:709-712.
- [4] LOUIE M, JAYARATNE P, LUCHSINGER I, et al. Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes* [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(1):15-19.
- [5] IVELA A, FERNANDEZGARYZABA J F I, VZZQUEZ J A, et al. Molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of Spanish animal and human *Listeria monocytogenes* isolates [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(12):5840-5843.
- [6] ROLAND BROSCHE, JIANCHI CHEN, JOHN LUCHANSKY B. Pulsed-field fingerprinting of *Listeria*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(7):2584-2592.
- [7] BROSCHE R, BUCHRIESER C, ROCURT J. Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis[J]. Res Microbiol, 1991, 142:667-675.
- [8] CARRIERE C, ALLARDET SERVENT A, BOURG G, et al. DNA polymorphism in strains of *Listeria monocytogenes* [J]. J Clin

- Microbiol, 1991, 29:1351-1355.
- [9] PATRICK BOERLIN, ELIZABETH BANNERMAN, THOMAS JEMMI, et al. Subtyping *Listeria monocytogenes* isolates genetically related to the Swiss epidemic clone[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(9):2148-2153.
- [10] BALA SWAMINATHAN, TIMOTHY BARRETT J, Susan B, et al. PulseNet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States [J]. Emerging Infectious Diseases, 2001, 7(3):382-389.
- [11] LEWIS GRAVES M, SUSAN HUNTER B, ANNA RAE ONG, et al. Microbiological aspects of the investigation that traced the 1998 outbreak of listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular subtyping-based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulseNet Network[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5):4834-4840.
- [12] GRIMONT F, GRIMONT P A D. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools[J]. Ann Inst Pasteur/Microbiol, 1986, 137B:165-175.
- [13] ANNE SCHUCHAT, BALA SWAMINATHAN, CLAIRE Broome V. Epidemiology of Human Listeriosis[J]. Clin Microbiol Rev, 1991, 4(2):169-183.
- [14] ANDREA BALOGA, SUSAN K, HARLANDER. Comparison of methods for discrimination between [J]. Microbiol, 1991, 57(8):2324-2331.
- [15] LEWIS M, GRAVES, BALASUBRAMANIAN SWAMINATHAN, et al. Comparison of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates [J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(12):2936-2943.
- [16] NOCERA D A, FONJALLAZ M H, BANNERMAN E, et al. 1989. Abstr Annu Meet. Am. Soc. Microbiol. 1989, D-233, p. 12.
- [17] SAUNDERS N A, RIDLEY A M, TAYLOR A G. Typing of *Listeria monocytogenes* for epidemiological studies using DNA probes[J]. Acta Microbiol Hung, 1989, (36):205-210.
- [18] RIDIEY A M. Evaluation of a restriction fragment length polymorphism typing method for *Listeria monocytogenes* [J]. Res Microbiol, 1995, 146:21-34.
- [19] PLETER VOS, RENE HOGERS, MARIO BLEEKER, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21):4407-4414.
- [20] AARTS H J, HAKEMULDER L E, VAN HOEF A M. Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns[J]. Int J Food Microbiol, 1999, 43(1-2):95-102.
- [21] RIPABELL G, MCLAUCHLIN J, THRELFALL E J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes* [J]. Syst Appl Microbiol, 2000, 23:132-136.
- [22] GUERRA M M, BERNARDO F, MCLAUCHLIN J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes* [J]. Syst Appl Microbiol, 2002, 25(3):456-61.
- [23] KETOTIMONEN R O, AUTIO T J, KORKEALA H J. An improved amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for discrimination of *Listeria* isolates [J]. Syst Appl Microbiol, 2003, 26(2):236-44.
- [24] BOERLIN P, BANNERMAN E, ISCHER F, et al. Typing *Listeria monocytogenes*: a comparison of random amplification of polymorphic DNA with 5 other methods. Res Microbiol, 1995, 146(1):35-49.
- [25] MAZURIER S I, WERNARS K. Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA [J]. Res Microbiol, 1992, (143):499-505.
- [26] MARTIN C, MAIDEN J, JANE A, et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, (95):3140-3145.
- [27] SALCEDO C, ARREAZA L, ALCALAI B, et al. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(2):757-762.
- [28] ENRIGHT M C, DAY N P, SPRATT B G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38:1008-1015.
- [29] ENRIGHT M C, SPARRATT B G. Multilocus sequence typing. Trends Microbiol [J]. 1999, 23(7):482-287.
- [30] TAMARA REVAZISHVILI, MAMUKA KOTETISHVILI, COLIN STINE O, et al. Comparative analysis of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for characterizing *Listeria monocytogenes* strains isolated from environmental and clinical sources [J]. J Clin Microbiol, 2004, 43(1):276-285.
- [31] WEI ZHANG, BHUSHAN M, STEPHEN J. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes* [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(2):913-920.
- [32] THOMPSON R J, BOUWER H G A, PORTINO Y D A. Pathogenicity and immunogenicity of a *Listeria monocytogenes* strain that requires D-alanine for growth [J]. Infect Immun, 1998, 66:3552-3561.
- [33] CAI S, KABUKI D Y, KUAYE A Y, et al. Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes* [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40:3319-3325.
- [34] DOUGLAS R CALL, MONICA K BORUCKI, FRANK J LOGE. Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays [J]. J Microbiol Med, 2003, 53:235-243.
- [35] DOUGLAS R CALL, MONICA K BORUCKI, THOMAS E BESSER. Mixed-genome microarrays reveal multiple serotype and Lineage-Specific Differences among Strains of *Listeria monocytogenes* [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(2):632-639.
- [36] MONICA K BORUCKI, JAMES REYNOLDS, DOUGLAS R Call, et al. Suspension microarray with dendrimer signal amplification allows direct and high-throughput subtyping of *Listeria monocytogenes* from genomic DNA [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(7):3255-2359.
- [37] MARTIN WIEDMANNA. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of AOAC International. 2002, 85(2):524-531.

[收稿日期:2007-12-03]

中图分类号:R15;Q939.122 文献标识码:E 文章编号:1004-8456(2008)02-0158-05