

# 河北地区食源性单核细胞增生李斯特菌 脂肪酸的分型研究

狄慧玲<sup>1</sup>, 张耀祺<sup>1</sup>, 单潇潇<sup>2</sup>, 闫鹤<sup>1,3</sup>, 石磊<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510640)  
(3. 辽宁省食品安全重点实验室, 辽宁锦州 121013)

**摘要:** 对脂肪酸分型方法在单核细胞增生李斯特菌(LM)菌株鉴定、菌株相似性分析等方面的应用价值进行评价。本研究选取2005~2007年从河北地区六大类食品中分离到的90株LM菌, 提取脂肪酸, 利用MIDI公司Sherlock系统进行菌体脂肪酸成分分析, 使用SPSS 19.0软件对获得的数据资料进行统计分析及聚类分型, 并将脂肪酸分型与传统的血清分型和分型金标准PFGE分型进行比较。结果表明, 脂肪酸分析法判定LM菌的符合率为96.67%, 所有菌株共检出20种脂肪酸成分, 主要脂肪酸成分有3种, 分别为脂肪酸15:0 anteiso、17:0 anteiso和15:0 iso。各血清型间脂肪酸含量存在一定差异, 血清1/2c型菌株与血清1/2a、1/2b和4b型菌株相比, 有2种主要脂肪酸含量差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与PFGE分型相比, 在对结构简单的小样本资料的菌株亲缘关系鉴定中脂肪酸分型更具优势。将脂肪酸分型与血清学分型和PFGE分型相结合能够更好的分析LM菌菌株之间的相关性。

**关键词:** 单增李斯特菌(LM); 脂肪酸; 血清型; 脉冲场凝胶电泳

文章编号: 1673-9078(2014)11-65-70

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.013

## Fatty Acid Typing Analysis of Food-borne *Listeria monocytogenes* in Hebei Area

DI Hui-ling<sup>1</sup>, ZHANG Yao-qi<sup>1</sup>, SHAN Xiao-xiao<sup>2</sup>, YAN He<sup>1,3</sup>, SHI Lei<sup>1</sup>

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)  
(2. College of Biology and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)  
(3. Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Jinzhou 121013, China)

**Abstract:** In this study, the usefulness of fatty acid typing to identify and evaluate strain similarity among *Listeria monocytogenes* (LM) strains was evaluated. Ninety LM strains isolated from six types of food in Hebei area from 2005 to 2007 were selected for this study. The fatty acids were extracted, and their components were analyzed using the MIDI Sherlock system. SPSS 19.0 statistical software was used for data and cluster analyses. The fatty acid typing was compared with traditional serotyping and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), which is the gold standard for typing. The results showed that the fatty acid analysis method successfully identified 96.67% of LM strains, 20 fatty acid components were detected from all of the tested strains, and the three main fatty acid components were 15:0 anteiso, 17:0 anteiso, and 15:0 iso. The fatty acid components differed among the different serotypes, and the differences in two main fatty acid components between serotype 1/2c isolates and serotype 1/2a, 1/2b, and 4b isolates were statistically significant ( $P < 0.01$ ). Compared with PFGE typing, fatty acid typing was a more efficient method for identifying genetic relationships between strains in small samples with simple structures. The combination of fatty acid typing along with serotyping and PFGE typing could better identify correlations among LM strains.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*; fatty acid; serotype; pulsed field gel electrophoresis

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是一

收稿日期: 2014-01-27

基金项目: 国家“十二五”科技支撑项目(2012BAD28B09; 2014BAD13B00)

作者简介: 狄慧玲(1984-), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 食源性病菌的快速检测及其分子生物学特性研究

通讯作者: 石磊(1961-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食源性病原菌快速检测与诊断

种重要的兼性胞内条件致病菌, 是高致死率(~30%)疾病-李斯特菌病的病原菌<sup>[1]</sup>。从上世纪80年代起, 欧美国家多次因食品污染LM暴发人李斯特菌病疫情<sup>[1]</sup>, 且发生率在近年不断攀升<sup>[2]</sup>。2011年, 全美28个州因食用被LM污染的西瓜暴发李斯特菌病疫情, 146人感染, 29人死亡, 1人流产。李斯特菌属共有9个种, 16个血清型, 各种之间形态学和生化特性极其相似, 各血清型

之间致病力各异<sup>[3]</sup>,因此快速明确种型对诊断李斯特菌病和追查传染源具有重要意义。

LM可以在食物加工、运输、销售过程中许多不利或有害条件下(如高盐、强酸强碱、高温或低温等)存活,尤其是可以在冰箱冷藏温度下生长,污染痕量LM的食物经过一段时间的冰箱储存以后便可增殖为足以致病的优势菌群<sup>[4]</sup>,因此对食品安全危害极大。

脂肪酸类是允许LM在低温下生长的必要条件-膜的流动性的重要决定因子<sup>[4,6-7]</sup>。自1963年Able等<sup>[5]</sup>首次应用气相色谱(GC)对肠杆菌的菌体脂肪酸成分分析,脂肪酸分型方法就因菌体脂肪酸成分相对稳定,不受生化反应变异及质粒丢失等因素的影响,一般可通过单次试验比较准确地将微生物鉴定到种的水平等优势得到众多研究者的青睐,已开发成为一种适用于许多不同生物种群的、快速稳定的鉴定分型方法<sup>[6]</sup>。脂肪酸分型是将甲基脂肪酸(fatty acid methyl ester, FAME)提取与灵敏的气相色谱检测相结合,通过分析微生物细胞膜上的磷脂脂肪酸的组分来鉴定微生物的种属。LM脂肪酸谱广,含有大量(>95%)支链脂肪酸,国际上关于LM脂肪酸分析的报道多集中在其对低温适应性、抗逆性、毒力的调节等功能方面<sup>[7-10]</sup>,尚未见LM种内各血清型菌株的脂肪酸特征报道。

本研究利用MIDI公司Sherlock系统对河北地区6类食品中分离到的90株LM菌进行菌体脂肪酸成分分析,探究LM各血清型的脂肪酸成分的异同;根据各菌株脂肪酸组分的差异进行聚类分型,并与分型金标准PFGE进行比较,以期对河北地区LM流行株做出更准确的判断。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

90株单核细胞增生李斯特菌均由河北省疾病预防控制中心在2005~2007年全省9个监测点采样六大类(生肉、熟肉、速冻米面制品、非发酵豆类制品、水产品和蔬菜)食品中检出,按照GB/T 4789.30-2003进行单核细胞增生李斯特菌鉴定。血清型和PFGE分型先前文献已报道<sup>[11]</sup>,90株单核细胞增生李斯特菌中1/2a血清型42株(46.67%),1/2b血清型11株(12.22%),1/2c血清型27株(30%),3a血清型1株(1.11%),4b血清型8株(8.89%);PFGE分型共被聚为16个型(A-T),详见图1。

### 1.2 实验器材

HP6890气相色谱仪, Sherlock MIS系统, 8 mL特氟隆螺帽玻璃管;德国CNW公司;恒温水浴箱, Grant

公司。

### 1.3 主要试剂

TSBA培养基,美国BD公司;MIDI标准品, MIDI公司;溶液I: NaOH 45 g, 甲醇150 mL, 双蒸水150 mL;溶液II: 6.0 mol/L HCl 325 mL, 甲醇275 mL;溶液III: 正己烷200 mL, 甲基三丁基乙醚200 mL;溶液IV: NaOH 10.8 g, 双蒸水900 mL。

### 1.4 脂肪酸制备

按照MIDI公司的微生物识别系统的操作手册(MIDI; Microbial ID Inc.),在TSBA培养基上新鲜培养的待测菌株按四象限划线接种至新鲜的TSBA培养基,37 °C培养24 h。用一次性接种环刮取40 mg菌体,置于1 mL溶液I的8 mL玻璃管中,100 °C水浴30 min。冰浴中迅速冷却后加入2 mL溶液II,混匀后80 °C水浴作用10 min。迅速冰浴,加入1.25 mL溶液III。剧烈震荡10 min,吸弃上层溶液。在下层水相溶液中加入3 mL溶液IV及两滴饱和NaCl溶液,剧烈震荡5 min萃取脂肪酸甲酯脂肪酸。待溶液分层后,吸取2/3上层有机相液体于GC样品管中待测。

### 1.5 气相色谱分析

采用Sherlock全自动细菌分析系统使用HP6890气相色谱仪对脂肪酸成分进行分析,根据流出组分的等值碳链长度(ECL)值进行脂肪酸成分的定性,并通过百分归一化进行各组分的相对定量。再将二者与系统谱库中的标准菌株数值匹配计算相似度(SI),从而给出一种或几种可能的菌种鉴定结果。在鉴定结果的判断上,一般 $SI \geq 0.600$ ,且第一选择和第二选择的SI差值大于0.100,则可以认为鉴定成功,鉴定结果为第一选择所列的菌种名。气相色谱条件参照MIDI Sherlock推荐方法设置;质量控制由MIDI自带质控标准品控制,每隔7个样品测定一次标准品。

### 1.6 数据分析

将脂肪酸分析结果用SPSS 19.0统计软件进行处理,按照不加权配对平均法(unweighted pair group average, UWPGA)生成基于菌体脂肪酸成分的聚类图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 脂肪酸分析方法在种水平上对LM的判别能力

按照MIDI Sherlock全自动细菌分析系统相似指数 合率为96.67%。其余3株（L22、L27、L38）未在MIDI判断标准，90株菌判断为LM的有87株，SI>0.600，符合 数据库中找到匹配。

表1 河北地区6类食品中LM菌株脂肪酸成分表

Table 1 Fatty acid components of LM strains isolated from six types of food in Hebei area

Ligease Serotypes	II				I			Total #
	1/2a	1/2c	3a	average	1/2b	4b	average	
10:00	0.14	0.09	N	0.12	0.11	N	0.11	-
12:00	0.16	0.21	N	0.19	0.13	0.12	0.12	-
13:0iso	0.09	N	N	0.09	N	N	N	-
13:0anteiso	0.17	0.14	0.24	0.18	0.14	0.15	0.14	-
14:0iso	0.46	0.38	0.6	0.48	0.4	0.47	0.43	-
14:00	0.45	0.46	0.54	0.48	0.45	0.36	0.41	-
15:0iso*	8.28	6.96	8.04	7.76	8.36	8.88	8.62	7.95
15:0anteiso*	45.64	44.66	51.57	47.29	44.91	44.98	44.95	45.19
14:0iso 3OH	0.21	0.48	N	0.35	N	N	N	-
16:0iso	2.3	2.04	2.69	2.24	2.07	2.48	2.23	-
16:00	2.84	2.86	3.3	3	3.23	3.25	3.24	-
15:03OH	N	N	N	N	N	0.13	0.13	-
17:1anteiso w9c	N	0.41	N	0.41	N	N	N	-
17:0 iso	3.44	3.3	2.24	2.99	3.69	3.17	3.48	-
17:0 anteiso*	36.1	38.98	30.78	35.29	36.58	35.52	36.05	36.94
16:1 2OH	N	0.73	N	0.73	N	N	N	-
18:00	0.49	0.21	N	0.35	N	N	N	-
19:0iso	1	0.6	N	0.8	N	N	N	-
19:0 anteiso	0.27	0.26	N	0.27	0.24	0.21	0.23	-
20:00	0.37	N	N	0.37	N	N	N	-
Total <sup>&amp;</sup>	90.02	90.6	90.39	90.34	89.85	89.38	89.62	90.08

注：\*：加粗并用下划线标注的为 主要脂肪酸组分；N：表示不含有该组分。

表2 5种血清型主要脂肪酸含量的方差分析

Table 2 ANOVA for major fatty acid components among five serotypes

Fatty acid	Serotypes	No.	Mean	Std.Deviation	F value	P value	ligease	Mean	Std.Deviation	F value	P value
15:0 iso	1/2a	41	8.28	1.14	10.753	<0.01	II	7.76	1.19	5.671	<0.01
	1/2c	25	6.96	0.8							
	3a	1	8.04	0							
	1/2b	11	8.36	0.64							
15:0 anteiso	4b	8	8.99	1.00	5.505	0.06	I	8.62	0.84	1.507	0.125
	1/2a	41	45.64	1.87							
	1/2c	25	44.66	1.63							
	3a	1	51.57	0							
17:0 anteiso	1/2b	11	44.91	1.36	9.006	<0.01	II	44.95	1.94	7.574	0.204
	4b	8	44.15	1.74							
	1/2a	41	36.1	2.67							
	1/2c	25	38.89	1.44							
17:0 anteiso	3a	1	30.78	0	I	36.05	2.54	36.11	2.44		
	1/2b	11	36.58	1.57							
	4b	8	36.11	2.44							

## 2.2 LM脂肪酸成分

87株鉴定为LM的菌株中,共检出20种脂肪酸组分,其中支链脂肪酸的平均含量为95.44%,与文献(>95%)的报道<sup>[10]</sup>一致。所有菌株共有的脂肪酸成分有7种,其中主要脂肪酸有3种,分别是15:0 anteiso、17:0 anteiso和15:0 iso,主要脂肪酸含量之和在所有血清型中均高达90%左右。

## 2.3 5种血清型主要脂肪酸含量差异

用方差分析方法比较87菌株的3种主要脂肪酸含量见表3。脂肪酸C17:0 anteiso和15:0 iso在不同血清型之间的含量差异显著( $P<0.01$ ),15:0 anteiso在所有血清型中含量都高达40%以上,但各血清型之间含量差异无统计学意义。(见表2)

进一步使用LSD法进行两两比较(因3a血清型仅检出1株菌,不参与比较),脂肪酸15:0 iso和17:0 anteiso在1/2c和1/2a、1/2b、4b之间差异显著(15:0 iso: LSD-t分别8.434、0.348、2.203,  $P<0.01$ ; 17:0 anteiso: LSD-t分别10.192、0.114、1.353,  $P<0.01$ ) 在1/2a和1/2b、1/2a和4b、4b和1/2b之间的差异无统计学意义(15:0 iso: LSD-t分别7.789、0.211、5.447, P值分别为0.777、0.988、0.145; 17:0 anteiso: LSD-t分别3.686、0.747、0.469, P值分别为0.566、0.043、0.613)。

脂肪酸15:0 anteiso在4种不同血清型菌株之间的含量差异无统计学意义( $F=5.505, P=0.03$ )。

有研究表明,脂肪酸15:0 anteiso对LM菌在低温条件下生存是非常重要的<sup>[10]</sup>,本研究对速冻食品中分离的菌株和非速冻食品中分离的菌株进行比较发现,两组脂肪酸15:0 anteiso的含量并无显著差异( $F=4.747, P=0.489$ )。

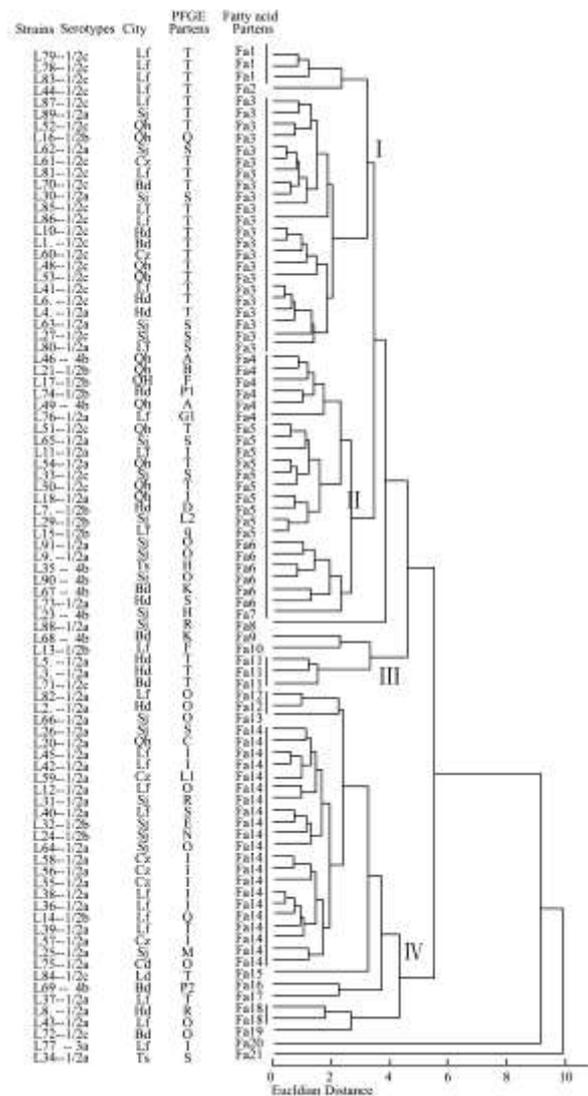
谱系I和谱系II仅脂肪酸15:0 iso的含量差异显著( $F=5.671, P<0.01$ ),其他两种对低温生长起相对更关键作用的主要脂肪酸<sup>[10]</sup>的含量差异无统计学意义,这表明本研究中谱系I和谱系II的菌对低温的适应性并无差异。

## 2.4 聚类分析

87株LM菌体脂肪酸成分的聚类图见图1,图中所示横坐标为欧氏距离(euclidian distance)。87株菌在欧氏距离10时聚为一类,说明总体而言LM各血清型菌株之间脂肪酸成分差异非常小。在欧氏距离约为4时,所有菌株分为4支,但分支情况与血清分型和PFGE分型情况并不一一对应,但总体看来血清型1/2c的菌株多聚集在第I支,血清型1/2b和4b多聚集在

第II支,血清型1/2a多聚集在第IV支,且仅有的3a血清型菌株L77与其他血清型差异明显,独立成簇。

因为细菌脂肪酸组成成分受外界条件影响敏感,脂肪酸分型相对更灵敏,根据MIDI Sherlock系统的判断准则,菌株间欧氏距离 $\leq 2$ 时,结合菌株流行病学信息,可以认为是同一克隆。当欧氏距离 $\leq 2$ 时,87株LM共聚为21簇(Fa1-21,见图1)。



间从廊坊速冻食品中采集的样品,在PFGE分型中,五个菌株被聚为一类(PFGE T型),但在脂肪酸分型中又将L83与其他4株区分出来,查阅菌株资料发现,L83与其他4株菌分别在两个超市采集,且为非同一品牌食品样本,这说明脂肪酸分析在对结构相对简单的小样本资料的菌株亲缘关系鉴定中比PFGE分型更有优势。但脂肪酸分析在某种程度上是对菌株表型的分析易受生存环境影响(如温度),对于菌株来源复杂,亲缘关系较远的菌株,准确性明显不如直接反应基因型差异的PFGE分型,如PFGE A-H型在脂肪酸分型中就无法区分。

表3 河北地区流行的LM主要克隆株

Table 3 Major LM clones found in Hebei area

Clone(Serotype, PFGE pattern, Fatty acid pattern)	Strains *	City #
C1 (1/2c, T, Fa1)	L78, L79, L83	Lf
C2 (1/2a, S, Fa3)	L30, L62, L63; L80	Sj; Lf
C3 (1/2c, T, Fa3)	L1, L70; L6, L10, L41, L48, L52, L53; L60, L61; L41, L81, L85 L86, L87	Bd; Hd; Qh; Cj; Lf
C4 (4b, A, Fa4)	L46, L49	Qh
C5 (1/2a, O, Fa6)	L9, L91	Sj
C6 (1/2a, I, Fa6)	L65; L73	Sj; Hd
C7 (1/2a, I, Fa5)	L11; L18	Lf; Qh
C8 (1/2a, T, Fa11)	L3, L5	Hd
C9 (1/2a, O, Fa12)	L2; L82	Lf; Hd
C10 (1/2a, O, Fa14)	L12; L64, L66; L75	Lf; Sj; Cd
C11 (1/2a, S, Fa14)	L26; L40	Sj; Lf
C12 (1/2a, I, Fa14)	L36, L38, L39, L42, L45; L55, L56, L57, L58	Lf, Cz

注: \*: 不同城市分离的菌株用“;”隔开。#: Lf 廊坊, Sj 石家庄, Bd 保定, Hd 邯郸, Cz 沧州, Cd 承德, Qh 秦皇岛, Ts 唐山。

综合图1三种分型结果,我们将血清型,PFGE型和脂肪酸型均一致的菌株定义为同一克隆(clone),我们可以确定河北地区6大类食品中检测的LM菌,有12个大的流行克隆(C1-C12)(见表3)。如表3所示,C3克隆为最大的流行克隆,共在5个城市中检出14个菌株。其次廊坊地区检出的LM菌最复杂,有>7个克隆在流行。有些克隆亲缘关系非常近,如C6和C7、C9和C10,血清型和PFGE型一致,欧式距离<3。此外,有多个血清型为1/2a的克隆在河北地区流行。

### 3 结论

3.1 食品是LM散播的主要媒介,世界卫生组织(WHO)

关于LM食物中毒的报告中指出,有4%~8%的水产品,5%~10%的奶及奶制品,30%以上的肉制品,15%以上的家禽被该菌污染。我国自2000年起将食品中单增李斯特菌的监测纳入食品污染物监测网,各类食物LM阳性率在0.1%~7.7%间,其中以生畜禽肉检出率最高<sup>[13]</sup>。因为LM在自然界中分布广泛且潜伏期较长(2~90 d),散发病例的食物污染源常难以确定<sup>[12]</sup>。

3.2 分子分型对于李斯特菌病暴发的检测和传染源的追溯至关重要。许多分型方法的研究表明<sup>[14]</sup>,LM菌至少有四个进化谱系,各谱系有自己特有的表型、基因型、生态学和流行病学的特征,其中谱系I (serotype 1/2b,4b,7,3b)的菌株是人类李斯特菌病爆发流行的主要致病菌株,基因组DNA比较保守,谱系内各菌株差异较小;谱系II (serotype 1/2a,1/2c,3a,3c)菌株,多为食品和环境的分离株,基因组中含有较多的可移动遗传因子(转座子、质粒、前噬菌体等),呈现更高的基因重组率,因而表现丰富的遗传多样性;谱系III和IV (serotype 4a,4c和少部分4b)较少见,主要感染动物,未在人类病例中检出。

3.3 基于气相色谱的脂肪酸检测是一种非常灵敏的分型方法,它是菌株基因型差异的外在表现,同时也反映了菌株对外界环境条件的不同反应。国外已有诸多对LM脂肪酸的研究<sup>[7-10]</sup>,但多集中在对脂肪酸组分对LM低温生长适应性的影响,还没有关于脂肪酸分析对LM菌种鉴定及分型的研究报道。本研究通过对河北地区6大类零售食品中分离到的90株LM进行脂肪酸分析分型研究,证实脂肪酸分析方法在种水平鉴定LM的可靠性较高,符合率达96.67% (87/90),提示脂肪酸分析对LM的快速鉴定是有应用价值的。

3.4 脂肪酸分析结果显示87株鉴定为LM脂肪酸成分基本接近,支链脂肪酸的平均含量为>95%,与文献报道<sup>[10]</sup>一致,所有菌株共有的脂肪酸成分有7种,其中主要脂肪酸有3种,分别是15:0 anteiso, 17:0 anteiso和15:0 iso,主要脂肪酸含量之和高达90%左右。

3.5 本研究所有菌株共呈现5种血清型,属于两个进化谱系。对各个血清型别之间的主要脂肪酸成分含量差异进行统计分析发现,血清型1/2c菌株主要脂肪酸15:0 iso和17:0 anteiso的平均含量跟其他4种血清型差异显著(P<0.01),其余血清型之间三种主要脂肪酸的含量差异不明显。两个谱系之间主要脂肪酸含量无显著差异。对低温生长最关键的脂肪酸15:0 anteiso<sup>[10]</sup>的含量在各血清型菌株中含量均为最高,>40%,但各菌株之间平均含量差异不明显,其中3a血清型的菌株含量最高,达到51.57%,但本研究只检出1株该血清型的菌株,因而没有统计学意义。但该菌株是从速冻食品中检出,

该菌株脂肪酸的组成也从某种程度上印证了之前的报道。另据报道LM菌在45~5℃条件下生长时,会呈现两个适应低温增殖的脂肪酸成分模式:(i)脂肪酸链长度缩短;(ii)支链由iso变为anteiso。本研究发现,短链脂肪酸10:0、12:0、13:0 iso和13:0 anteiso在速冻食品中检出率和含量相对较高,但与非速冻食品分离株相比,无显著差异,没有统计学意义,这可能是因为本研究做脂肪酸分型研究同一培养温度为37℃,而LM对温度的适应性极强,能快速对环境温度做出反应。

3.6 聚类分型也表明,3a血清型的菌株脂肪酸含量与其他血清型菌株存在差异,欧氏距离>8。但总体而言LM各血清型菌株之间脂肪酸成分差别不大,欧式距离<10,显示该方法有着良好的可靠性和重复性。部分血清型菌株本身的脂肪酸成分具有多样性,血清分型、PFGE分型和脂肪酸聚类分析的结果存在交叉。综合三种分析分型方法,发现河北地区有12个主要的流行克隆,其中克隆C3(1/2c,T,Fa3)在五个城市检出14个菌株,为第一大流行株,此外,检出多个亲缘关系非常接近的1/2a血清型克隆,进一步印证了谱系II菌株的高度的基因重组率及多样性<sup>[14]</sup>。

3.7 脂肪酸聚类结果与PFGE分型总体一致,在分型能力上,脂肪酸分析在对结构相对简单的小样本资料的菌株亲缘关系鉴定中比PFGE分型更有优势,但在复杂菌株同源性判断的准确性上与PFGE分型还有差距。我们可以设想将2种分型方法与血清分型及其他流行病学资料相结合,利用脂肪酸分型操作简单、检测迅速的特点,进行非相关菌株的筛查,在此基础上应用脉冲场分型对脂肪酸分型确定的相关菌株进一步进行同源性分析,这将大大节约人力物力,降低试验消耗,也会加快实验进程。总之,通过结合血清学分析和PFGE分型,脂肪酸分型技术能够更好的分析LM菌菌株之间的相关性

## 参考文献

- [1] Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis [J]. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1236-1243
- [2] Goulet V, Hedberg C, Monnier AL, et al. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14: 734-740
- [3] Vazquez-Boland, J A Kuhn, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, 14: 584-640
- [4] Yvonne S, Brian J W, Theodore J S, et al. Fatty acids regulate stress resistance and virulence factor production for *Listeria monocytogenes* [J]. *J. Bacteriol.*, 2012, 194(19): 5274-5284
- [5] Welch D F. Applications of cellular fatty acid analysis [J]. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1991, 4: 422-438
- [6] Juneja V K, P M Davidson. Influence of temperature on the fatty acid profile of *Listeria monocytogenes*. *J rapid methods automat [J]. Microbiol.*, 1993, 2: 73-81
- [7] Pu'ttman M, N Ade, H Hof. Dependence of fatty acid composition of *Listeria spp.* on growth temperature [J]. *Res. Microbiol.*, 1993, 144: 279-283
- [8] Able K, De Schmet zing H, Peterson JI. Classification of microorganisms of chemical composition feasibility of utilizing gas chromatography [J]. *J. Bacteriol.*, 1963, 85: 1039-44
- [9] Yvonne Sun, Mary X D O'Riordan. Branched-chain fatty acids promote *Listeria monocytogenes* intracellular infection and virulence [J]. *Infection and Immunity*, 2010: 4667-4673
- [10] Bassam A A, Lynne A B, Darrell O B, et al. Critical role of anteiso-c 15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures [J]. *Applied and Environmental Micro.*, 1997, 63(10): 3887-3894
- [11] Yan H, Neogi S B, Mo Z, et al. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of food-borne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005-2007 [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 144: 310-316
- [12] Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis [J]. *Microbes Infect*, 2007, 9(10): 1236-1243
- [13] Chen J, Zhang X, Mei L, et al. Prevalence of *Listeria* in Chinese food products from 13 provinces between 2000 and 2007 and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* isolates [J]. *Foodborne Pathog Dis.*, 2009, 6(1): 7-14
- [14] Renato H O, Henk C d B, Martin W. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2011, 301: 79-96