

研究报告

基于全基因组测序的单核细胞增生李斯特菌食品分离株分子特征分析

苏乐斌¹,李柏生²,谭海芳¹,朱颖梅¹,林凤¹,黎碧坚¹,郭凯华¹,周日辉¹

(1.肇庆市疾病预防控制中心,广东 肇庆 526060; 2.广东省疾病预防控制中心,广东 广州 511400)

摘要:目的 了解肇庆市单核细胞增生李斯特菌(以下简称单增李斯特菌)食品分离株的基因组特征、毒力岛的携带情况及遗传多样性。方法 对肇庆市13株单增李斯特菌食品分离株进行全基因组测序,将组装好的contigs/Scaffolds上传至在线分析平台Center for Genomic Epidemiology、Rast和VFanalyzer进行基因组注释与毒力因子基因鉴定,并应用基于全基因组测序的单核苷酸多态性分型(wg-SNPs)方法与美国生物技术信息中心(NCBI)上获取的25株国内外单增李斯特菌的基因组进行遗传进化分析。结果 13株单增李斯特菌食品分离株的基因组大小为2.82~3.04 Mb,CG含量为37.9%~38.1%,可分为6个ST型(ST1、ST3、ST8、ST59、ST87、ST101),分属于6个克隆复合群(CC1、CC3、CC8、CC59、CC87、CC101)。其中,ST3型菌株均携带LIPI-3毒力岛基因,ST87型菌株均携带完整LIPI-4毒力岛基因。wg-SNPs遗传进化分析显示13株单增李斯特菌食品分离株可分为2个进化分支,其中ST3型菌株位于进化树的根部,与其他ST型菌株进化上存在差异。结论 肇庆市单增李斯特菌食品分离株以高毒力的ST87型和ST3型为流行型,并发现一株同时携带LIPI-1~LIPI-4毒力岛的ST87型菌株,应加强对此类菌株的监测,警惕高毒力菌株在肇庆市引起感染性暴发的风险。

关键词:单核细胞增生李斯特菌;毒力岛;全基因组测序

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)06-0522-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.06.004

Molecular characterization analysis of foodborne *Listeria monocytogenes* strains based on whole-genome sequencing

SU Lebin¹, LI Bosheng², TAN Haifang¹, ZHU Yingmei¹, LIN Feng¹,
LI Bijian¹, GUO Kaihua¹, ZHOU Rihui¹

(1. Center for Disease Control and Prevention of Zhaoqing, Guangdong Zhaoqing 526060, China;

2. Center for Disease Control and Prevention of Guangdong, Guangdong Guangzhou 511400, China)

Abstract: Objective The aim was to study the genomic characteristics, virulence islands and genetic diversity of foodborne *Listeria monocytogenes* strains in Zhaoqing. **Methods** The whole-genome sequencing was carried out on 13 foodborne *Listeria monocytogenes* strains in Zhaoqing, and the assembled contigs/Scaffolds were uploaded to the online analysis platforms Center for Genomic Epidemiology, Rast and VFanalyzer for genome annotation and virulence factor gene identification, while the genetic evolution of 25 domestic and foreign foodborne *Listeria monocytogenes* isolated strains obtained from National Center for Biotechnology Information (NCBI) were analyzed by whole genome-based single-nucleotide polymorphisms (wg-SNPs) method. **Results** The genome sizes of 13 foodborne *Listeria monocytogenes* strains ranged from 2.82-3.04 Mb, and the CG content ranged from 37.9%-38.1%. The isolates could be divided into 6 ST types (ST1, ST3, ST8, ST59, ST87, ST101), corresponding to 6 clonal complex groups (CC1, CC3, CC8, CC59, CC87, CC101). Among them, all the ST3 strains carried LIPI-3 virulence island gene, and all the ST87 strains carried complete LIPI-4 virulence island gene. The genetic evolution analysis of wg-SNPs showed that these 13 foodborne *Listeria monocytogenes* strains could be divided into two evolutionary branches, among which ST3 strains were located at the root of the evolutionary tree, differing from other ST strains in evolution. **Conclusion** The predominant foodborne *Listeria monocytogenes* strains in Zhaoqing were ST87 and ST3 strains with high virulence, which were the same as those in other parts of China. It was found that a ST87 strain carrying both LIPI-1 and LIPI-4 virulence island genes. The risk that the two ST-type virulent strains might cause infectious outbreaks in local area called for alarm and intensified monitoring.

Key words: *Listeria monocytogenes*; virulence island; whole-genome sequencing analysis

收稿日期:2019-09-06

作者简介:苏乐斌 男 主管技师 研究方向为食源性致病菌分子流行病学 E-mail:luffys@163.com

通信作者:李柏生 男 副主任技师 研究方向为病原微生物分子分型和全基因组测序及抗生素耐药监测 E-mail:libsn@126.com

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 以下简称单增李斯特菌) 为革兰阳性杆菌, 是重要的食源性致病菌, 主要通过污染食品引起新生儿、孕妇、老年人的感染, 可引发脑膜炎、败血症、流产等, 致死率高达 30%^[1]。近年来, 欧美多国发生过多起单增李斯特菌感染暴发事件^[2-3]。由于单增李斯特菌潜伏期长, 且与一般食源性疾病引起的症状不同, 因此很容易被忽视。目前, 我国单增李斯特菌病例分离株主要来自散发的孕妇感染病例^[4-5]。单增李斯特菌食品分离株与病例分离株在致病性上存在一定差异^[6]。

为进一步了解单增李斯特菌食品分离株的基因组特征、毒力岛携带情况和遗传进化多样性, 本研究对 2018 年肇庆市 13 株单增李斯特菌食品分离株进行全基因组测序, 并应用基于全基因组测序的单核苷酸多态性分型 (whole genome-based single-nucleotide polymorphisms, wg-SNPs) 方法对菌株分子特征进行分析, 该方法是在全基因组序列的水平上选择一定数目的 SNPs, 通过比较不同细菌基因组中 SNPs 的信息, 从而达到将同一个种内的不同菌株进行分型和遗传进化分析的目的, 比脉冲场凝胶电泳 (PFGE)、多位点序列分型 (MLST)、多位点可变数目串联重复序列分析 (MLVA) 等传统分子分型方法具有更高的分辨力、更好的重复性和空间可比性, 目前在国外已广泛应用于食源性疾病暴发事件调查和流行病学分析^[7-9], 因此本研究可以为更好地进行食品风险评估和决策提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

13 株单增李斯特菌分离自 270 份市售食品, 样品采集参考《肇庆市食品安全风险监测实施方案》^[10], 菌株分离按照 GB 4789.30—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》^[11] 进行分离培养, 经 VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定/药敏分析系统进行生化鉴定。质控菌株为大肠埃希菌 (ATCC 25922) 和单增李斯特菌 (CMCC 54004), 均于肇庆市疾病预防控制中心微生物检验科菌种室保存。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定/药敏分析系统 (法国梅里埃), NanoDrop1000 超微量分光光度计、Qubit 核酸蛋白定量仪均购自美国赛默飞, Miseq 高通量测序平台 (美国 Illumina)。

LB 培养基 (广州环凯生物科技公司), 李斯特菌显色培养基 (法国科玛嘉), 革兰阳性细菌鉴定卡

(法国梅里埃), QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒 (德国 Qiagen), Nextera XT DNA Library Preparation Kit 试剂盒 (美国 Illumina), 所有试剂均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

基因组 DNA 按试剂盒操作手册提取, 使用超微量分光光度计测定基因组 DNA 纯度, 用 Qubit DNA-HS 进行定量, 基因组 DNA 的平均浓度为 135 ng/ μ l, 最终体积为 100 μ l。

1.2.2 全基因组测序和序列拼接

分离株全基因组测序在 Miseq 平台上完成, 构建文库按试剂盒说明书操作, 测序文库为 600 bp, 测序深度为 100~200 \times , 获得的测序序列片段 (reads) 在 CLC Genomics Workbench 9.5.3^[12] 软件平台上按从头拼装 (de novo) 方式拼接和组装。组装好的 contigs/Scaffolds 应用在线分析平台基因组流行病学中心 (Center for Genomic Epidemiology, <https://cge.cbs.dtu.dk/services/>), 采用 Blast 方法进行 MLST 与毒力基因鉴定, 使用应用在线基因注释分析工具 Rast (<http://rast.nmpdr.org/>) 和 VFAnalyzer (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) 对基因组进行注释, 并将组装好的基因组序列上传到美国生物技术信息中心 (NCBI) 数据库, 获取收录号 (accession)。

1.2.3 毒力基因分析和 wg-SNPs 进化树构建

使用 HemI 1.0^[13] 软件对 43 个与毒力相关的基因检出情况进行可视化分析, 并采用非加权组平均 (UPGMA) 法生成热力聚类图。同时使用 kSNP 3.0^[14] 软件对 13 株食品分离株的全基因组与 NCBI 上获得的不同地区和年份的 25 株具有代表性菌株基因组 (见表 1) 构建 wg-SNPs 进化树。首先使用 kSNP 3.0 的 Kchooser 工具采用 k-mer 算法, 其他参数默认, 对 38 株菌株的全基因组进行计算, 得出 k-mer 值为 k19, 再以 k19 为计算参数, 鉴定出核心 SNPs 为 28 364 个, 并以核心 SNPs 组成序列, 设置 bootstrap 为 1 000, 采用最大似然 (maximum likelihood) 法构建进化树。

2 结果

2.1 菌株基因组结构特征和 MLST

本研究的 13 株单增李斯特菌分离自 270 份食品, 其中 3 株分离自水果 (18ZQLM01、18ZQLM05、18ZQLM06)、4 株分离自熟食 (18ZQLM02、18ZQLM03、18ZQLM10、18ZQLM11)、1 株分离自凉拌食物 (18ZQLM04)、5 株分离自寿司 (18ZQLM07、18ZQLM08、18ZQLM09、18ZQLM12、18ZQLM13)。13 株单增李斯特菌的基因组大小在 2.82~3.04 Mb

表1 25株来自NCBI的单增李斯特菌菌株信息

Table 1 Information of 25 *Listeria monocytogenes* isolated strains from NCBI

菌株编号	分离地区	分离年份	来源	ST型	克隆复合群(CC)	家系	accession号
M7	中国	2011	食品	201	69	Ⅲ	GCA_000218305.1
NTSN	中国	2014	动物	1	1	I	GCA_000800335.1
NH1	中国	2018	食品	477	9	Ⅱ	GCA_002969195.1
LM201	中国	2012	食品	1	1	I	GCA_000804465.1
12-015	中国	2007	患者	8	8	Ⅱ	GCA_003388775.1
02-1103	加拿大	2002	患者	1	1	I	GCA_002213885.1
dc0214	美国	2014	食品	1	1	I	GCA_000600015.1
LL195	瑞士	1987	患者	1	1	I	GCA_000318055.1
N1-011 A	美国	2013	环境	3	3	I	GCA_000438685.2
LM07-00876	欧洲	2016	患者	3	3	I	GCA_001564835.1
LM07-00948	欧洲	2015	动物	3	3	I	GCA_001564855.1
R479a	意大利	1999	食品	8	8	Ⅱ	GCA_000613085.1
Lm N1546	瑞士	2011	患者	8	8	Ⅱ	GCA_001483445.1
10-4758	加拿大	2002	食品	16	8	Ⅱ	GCA_002213825.1
08-5578	加拿大	2008	患者	292	8	Ⅱ	GCA_000093125.2
LM_1823	意大利	2012	环境	8	8	Ⅱ	GCA_000585755.1
MOD1_LS152	美国	1988	患者	477	9	Ⅱ	GCA_002105655.1
2015TE24980	意大利	2015	患者	120	8	Ⅱ	GCA_003045325.1
DPC6895	爱尔兰	2011	食品	59	59	I	GCA_000987705.1
LM06-00444	欧洲	2006	动物	59	59	I	GCA_001564615.1
LM06-00918	欧洲	2006	患者	59	59	I	GCA_001564675.1
LM06-01598	南非	2006	食品	87	87	I	GCA_001564755.1
NCCP No. 15743	韩国	2012	患者	101	101	Ⅱ	GCA_000397145.1
2012-L5240	美国	2012	患者	101	101	Ⅱ	GCA_001466135.1
Lm_1840	意大利	2012	环境	101	101	Ⅱ	GCA_000585795.1

之间,鸟嘌呤和胞嘧啶之比(CG含量)在37.9%~38.1%之间。通过MLST数据库(<https://bigsd.bpasteur.fr/listeria/>)对7个管家基因(*abcZ*、*bglA*、*cat*、*dapE*、*dat*、*ldh*、*lhkA*)进行对比,结果显示,肇庆市分离的13株单增李斯特菌可分为6个ST型,其中2

株为ST1型,属于CC1群;3株为ST3型,属于CC3群;1株为ST8型,属于CC8群;1株为ST59型,属于CC59群;4株为ST87型,属于CC87群;2株为ST101型,属于CC101群,分属家系I和家系II(见表2)。

表2 13株单增李斯特菌菌株基因组结构特征和ST型信息

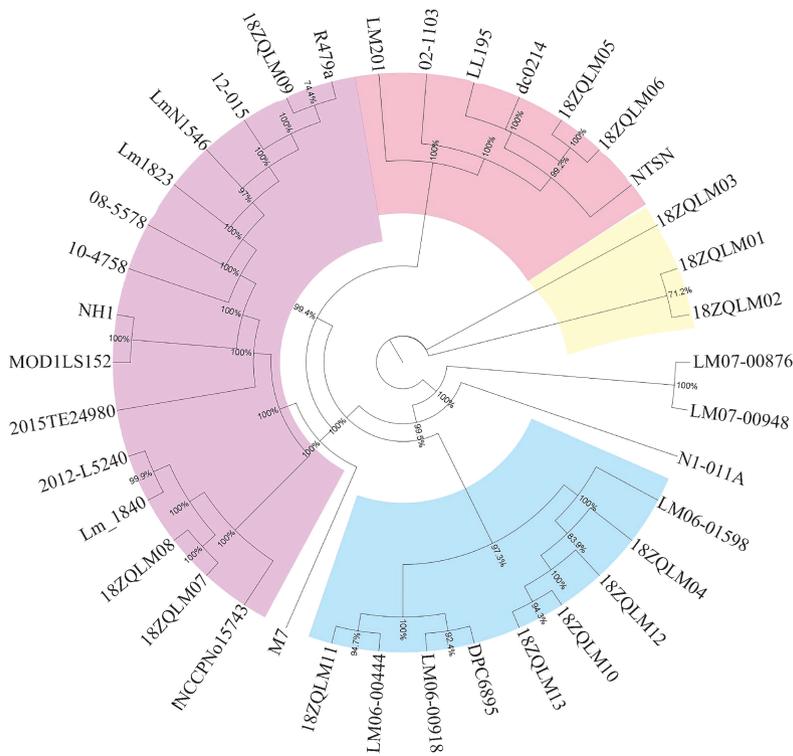
Table 2 Genomic structural characteristics and ST-type information of 13 *Listeria monocytogenes* strains

菌株号	分离食品	分离时间	全基因组大小/Mb	CG含量/%	ST型	CC群	家系	BioSample/Genome accession号
18ZQLM01	奇异果	2018.02	2.99	38.0	3	CC3	I	SAMN12505036/VOXC00000000
18ZQLM02	炸鸡块	2018.02	2.99	38.0	3	CC3	I	SAMN12565102/VOXP00000000
18ZQLM03	香肠	2018.02	2.99	37.9	3	CC3	I	SAMN12565103/VOXO00000000
18ZQLM04	凉拌秋葵	2018.05	2.94	38.0	87	CC87	I	SAMN12565104/VOXN00000000
18ZQLM05	草莓	2018.05	2.99	38.0	1	CC1	I	SAMN12565105/VPFG00000000
18ZQLM06	葡萄	2018.05	3.04	37.9	1	CC1	I	SAMN12565106/VOXM00000000
18ZQLM07	鳗鱼寿司	2018.05	2.94	37.9	101	CC101	Ⅱ	SAMN12565107/VOXL00000000
18ZQLM08	甜虾寿司	2018.05	2.93	37.9	101	CC101	Ⅱ	SAMN12565108/VOXK00000000
18ZQLM09	三文鱼寿司	2018.05	2.92	37.9	8	CC8	Ⅱ	SAMN12565109/VOXJ00000000
18ZQLM10	酱卤肉	2018.10	2.98	37.9	87	CC87	I	SAMN12565110/VOXI00000000
18ZQLM11	烧肉	2018.12	2.82	38.1	59	CC59	I	SAMN12565111/VOXH00000000
18ZQLM12	三文鱼寿司	2018.12	2.97	37.9	87	CC87	I	SAMN12565112/VOXG00000000
18ZQLM13	手卷寿司	2018.12	2.98	37.9	87	CC87	I	SAMN12565113/VOXF00000000

2.2 主要毒力基因

13株单增李斯特菌食品分离株共检出43个毒力基因,根据VFAnalyzer上对毒力基因编码蛋白的注释,43个毒力基因的蛋白产物可分为12个功能组(见图1),分别为转录激活因子功能组、胞外酶功能组、毒素功能组、侵入功能组、免疫调节功能组、

依附功能组、纤维二糖家族转运功能组、抗胆盐功能组、免疫回避功能组、代谢适应功能组、胞内生长功能组和应激蛋白功能组。同时13株单增李斯特菌食品分离株根据毒力基因携带情况又可分为2个聚类(图1),聚类1包括18ZQLM01~04,聚类2包括18ZQLM05~13。13株食品分离株均检测到



注:黄色部分为分支 1;蓝色部分为分支 2a;紫色部分为分支 2b,红色部分为分支 2c

图 2 38 株单增李斯特菌 wg-SNPs 系统进化树

Figure 2 Wg-SNPs phylogenetic tree of 38 *Listeria monocytogenes* isolated strains

菌入侵和细胞内生长的关键因子^[18-19],LIPI-3 毒力岛的携带情况则把肇庆市食品分离株毒力基因聚类图分为 2 个聚类,LIPI-3 毒力岛只存在于家系 I 的某些 CC 内,主要编码细菌溶血素和细胞毒性毒力因子,其中的 *lvsX* 基因被公认为重要的毒力因子,其编码的肽类细胞溶血素在肠道侵入中起着重要作用,是建立感染和病原体在中性粒细胞中存活的关键^[20-21]。此外,肇庆市食品分离株的聚类 1 中有 3 株为 ST3 型(18ZQLM01、18ZQLM02、18ZQLM03),1 株为 ST87 型(18ZQLM04),均携带 LIPI-3 毒力岛中的 *lvsX* 基因,这提示肇庆市的主要优势流行菌株具有潜在引起严重的人类感染或暴发的风险,值得公共卫生防控部门高度警惕。进一步分析聚类图发现,4 株 ST87 型菌株均发现携带完整的 LIPI-4 毒力岛,这与之前报道的自贡市 ST87 型菌株 LIPI-4 毒力岛携带情况^[17]一致。而 LIPI-4 毒力岛是在近年才被发现的,该毒力岛包含 6 个毒力基因,共同编码一个纤维二糖家族的转运系统,而完整的 LIPI-4 毒力岛在母婴李斯特菌病感染中发挥着重要的作用,目前已被证实了在临床中参与宿主的神经和胎盘感染^[22],而 4 株 ST87 型菌株中,有 1 株(18ZQLM04)同时携带 LIPI-1~LIPI-4 毒力岛,应加强对此类菌株的监测,警惕发生母婴李斯特菌病的风险。

wg-SNP 系统进化树分析显示,13 株食品分离株分别处于两个主分支上,3 株 ST3 型菌株(18ZQLM01、18ZQLM02、18ZQLM03)处于整个进化树的根部,与其余 10 株菌株进化差异较大,也与 3 株欧美流行的 ST3 型菌株存在较大差异,这提示可能由于对地理环境的适应性出现了进化上的差异。而 2a 分支则是由两个 ST 型(ST59 和 ST87)的菌株构成,其中包括 5 株肇庆市食品株(18ZQLM04、18ZQLM10、18ZQLM11、18ZQLM12 和 18ZQLM13),这提示 ST87 型与 ST59 型可能进化自同一祖先。3 株家系 II 菌株(18ZQLM07、18ZQLM08 和 18ZQLM09)集中位于 2b 分支,18ZQLM09 与意大利食品株 R479a 亲缘较近。而 2c 分支在整个系统进化树的位置也值得注意,包含 2 株肇庆市食品分离株和 5 株来自于世界的单增李斯特菌全基因组,均为 ST1 型,属于家系 I 菌株,却与 2b 分支同属于一个进化节点,与其他家系 I 菌株有进化差别,值得进一步研究。在 2c 分支中,2 株肇庆市食品分离株(18ZQLM05 和 18ZQLM06)与瑞士分离株 LL195、美国分离株 dc0214 亲缘较近,而 LL195 则是 1983—1987 年瑞士李斯特菌病流行期间的高毒力临床分离株^[23],这提示 18ZQLM05 和 18ZQLM06 与 LL195 具有共同的进化祖先,与此同时 ST1 型又是世界上主要引起李斯特菌病的型别^[22],故该 ST 型

菌株在肇庆市有引起感染的风险,值得防控部门关注。

综上所述,本研究通过 wg-SNPs 方法分析了肇庆市 13 株单增李斯特分离株的分子特征,结果显示,ST87 型和 ST3 型为优势型,ST87 型菌株毒力强,均携带能引起母婴李斯特菌病的完整 LIPI-4 毒力岛基因,而其中 1 株菌株携带全部 4 个主要的毒力岛基因,值得引起防控部门的高度关注。同时 ST3 型菌株也值得重视,3 株分离株均携带 3 个主要的毒力岛,且与国内外主要引起感染的 ST 型菌株不在同一个进化支上,有关防控部门应加强监测,警惕 ST87 和 ST3 型高毒力菌株在肇庆市引起感染性暴发的风险。

参考文献

- [1] ALLERBERGER F, HUHULESCU S. Pregnancy related listeriosis: treatment and control [J]. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2015, 13(3) :395-403.
- [2] IVO V W, BJÖRKMAN J T, CORMICAN M, et al. Retrospective validation of whole genome sequencing-enhanced surveillance of listeriosis in Europe, 2010 to 2015 [J]. Euro Surveill, 2018, 23(33) :1700798.
- [3] ALLERBERGER F, WAGNER M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection [J]. Clinical Microbiology & Infection, 2010, 16(1) :16-23.
- [4] 冯延芳,冉陆,张立实.2000—2009 年中国李斯特菌病文献报告病例分析 [J]. 疾病监测, 2011, 26(8) :654-659.
- [5] 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.
- [6] BERGHOLZ T M, SHAH M K, BURALL L S, et al. Genomic and phenotypic diversity of *Listeria monocytogenes* clonal complexes associated with human listeriosis [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(8) :3475-3485.
- [7] 周海健,阚飙.细菌基因组分型方法的应用研究进展 [J]. 疾病监测, 2016, 31(8) :668-675.
- [8] GRAD Y H, LIPSITCH M, FELDGARDEN M, et al. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104 : H4 outbreaks in Europe, 2011 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(8) :3065-3070.
- [9] PERNILLE G, GITTE S, EVA L, et al. Investigation of Outbreaks of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variants using whole-genome sequencing, Denmark [J]. Emerging Infectious Diseases, 2017, 23(10) :1631-1639.
- [10] 肇庆市卫生和计划生育局. 关于印发 2017 年肇庆市食品安全风险监测实施方案的通知:肇卫函[2017]179 号 [Z]. 2017.
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验: GB 4789. 30—2016 [S]. 北京:中国标准出版社, 2016.
- [12] COUTO N, SCHUELE L, ROSSEN J W, et al. Critical steps in clinical shotgun metagenomics for the concomitant detection and typing of microbial pathogens [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1) :13767.
- [13] DENG W K, WANG Y B, LIU Z X, et al. HemI: a toolkit for illustrating heatmaps [J]. PLoS One, 2014, 9(11) :e111988.
- [14] GARDNER S N, SLEZAK T, HALL B G. kSNP3.0: SNP detection and phylogenetic analysis of genomes without genome alignment or reference genome [J]. Bioinformatics, 2015, 31(17) :2877-2888.
- [15] 祝仁发,叶长芸.单核细胞增生李斯特菌的毒力因子 [J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(2) :158-162.
- [16] WANG Y, ZHAO A L, ZHU R F, et al. Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China [J]. BMC Microbiol, 2012, 12(1) :119.
- [17] WANG H, LUO L J, ZHANG Z D, et al. Prevalence and molecular characteristics of *Listeria monocytogenes* in cooked products and its comparison with isolates from listeriosis cases [J]. Front Med, 2018, 12(1) :104-112.
- [18] VÁZQUEZ-BOLAND J A, DOMÍNGUEZ-BERNAL G, GONZÁLEZ-ZORN B, et al. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria* [J]. Microbes and Infection, 2001, 3(7) :571-584.
- [19] DOMÍNGUEZ-BERNAL G, MÜLLER-ALTROCK S, GONZÁLEZ-ZORN B, et al. A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins [J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(2) :415-432.
- [20] CHEN M T, CHENG J H, WU Q P, et al. Prevalence, potential virulence, and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from edible mushrooms in Chinese markets [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9:1711.
- [21] COTTER P D, DRAPER L A, LAWTON E M, et al. *Listeriolysin S*, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes* [J]. PLoS Pathogens, 2008, 4(9) :e1000144.
- [22] WEINMAIER T, RIESING M, RATTEI T, et al. Complete genome sequence of *Listeria monocytogenes* LL195, a serotype 4b strain from the 1983-1987 listeriosis epidemic in Switzerland [J]. Genome Announcements, 2013, 1(1) :e00152-12.
- [23] MAURY M M, TSAI Y H, CHARLIER C, et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity [J]. Nature Genetics, 2016, 48(3) :308-313.