



专论与综述

大肠埃希氏菌的分型方法及其研究进展

黄涛¹ 山珊^{*1} 黄艳梅² 刘道峰³ 刘成伟³ 黄运红¹ 黄昭鸿¹ 龙中儿^{*1}

1 江西师范大学生命科学学院 江西 南昌 330022

2 江西业力医疗器械有限公司 江西 南昌 330008

3 江西省疾病预防控制中心 江西省食源性疾病预防溯源重点实验室 江西 南昌 330029

摘要: 大肠埃希氏菌是一种条件性致病菌,致病性的大肠埃希氏菌具有高度的传染性,会严重危害健康。快速准确地测定大肠埃希氏菌的污染来源对有效缩小疫情影响范围极有帮助,从而避免对人类健康和经济贸易造成重大损失。建立简便高效的分型方法是微生物溯源的关键,常见的大肠埃希氏菌分型方法可分为表型分型和分子分型,这些分型方法各有优劣,具有不同的适用范围。本文详细介绍了大肠埃希氏菌的分型方法,并对国内外大肠埃希氏菌分型的研究进展进行综述,为致病菌溯源方法的选择提供参考依据,对防御并控制致病菌引起的流行病传播具有重要的意义。

关键词: 大肠埃希氏菌, 表型分型方法, 分子分型方法, 溯源方法

Advances in typing methods for *Escherichia coli*HUANG Tao¹ SHAN Shan^{*1} HUANG Yan-Mei² LIU Dao-Feng³ LIU Cheng-Wei³
HUANG Yun-Hong¹ HUANG Zhao-Hong¹ LONG Zhong-Er^{*1}

1 College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China

2 Jiangxi YeLi Medical Device Co. Ltd., Nanchang, Jiangxi 330008, China

3 Jiangxi Province Key Laboratory of Diagnosing and Tracing of Foodborne Disease, Jiangxi Province Centre for Disease Control and Prevention, Nanchang, Jiangxi 330029, China

Abstract: *Escherichia coli* is a conditional pathogenic bacteria. Pathogenic *E. coli* is highly contagious and threatens human health. Rapid determination of the contaminant source of *E. coli* can help effectively control epidemic, to protect human health and reduce economy loss. Simple and efficient tracing techniques and typing methods are key to trace the source of pathogen. Common typing methods of *E. coli* include phenotypic typing and molecular typing. These typing methods have their own advantages and limitations, and have different application scopes. In this paper, phenotypic typing and molecular typing methods and the research progress of *E. coli* typing are reviewed. It will provide reference for the selection of traceability methods for pathogenic bacteria, and have the great significance for the prevention and

Foundation items: Key Research and Development Program of Jiangxi Province (20192BBGL70053, 20192BBG70069); Key Laboratory Project of Jiangxi Province (20171BCD40021); Science and Technology Program of Health Commission of Jiangxi Province (20196001)

***Corresponding authors:** E-mail: SHAN Shan: ncuskshanshan@163.com; LONG Zhong-Er: longzhonger@163.com

Received: 30-07-2019; **Accepted:** 17-09-2019; **Published online:** 06-11-2019

基金项目: 江西省重点研发计划(20192BBGL70053, 20192BBG70069); 江西省重点实验室计划(20171BCD40021); 江西省卫健委科技计划(20196001)

***通信作者:** E-mail: 山珊: ncuskshanshan@163.com; 龙中儿: longzhonger@163.com

收稿日期: 2019-07-30; **接受日期:** 2019-09-17; **网络首发日期:** 2019-11-06

control of epidemic spread caused by pathogenic bacteria.

Keywords: *Escherichia coli*, Phenotypic typing method, Molecular typing method, Traceability methods

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)又称大肠杆菌,属革兰氏阴性菌,于1885年首次被发现^[1],是人和动物体内的正常寄居菌。大肠埃希氏菌是一种条件致病菌,在正常情况下不致病,然而一些特殊血清型菌株可导致人或动物腹泻、腹痛甚至会产生血性粪便,重症病例会并发溶血性的尿毒综合征以及血小板减少性紫癜^[2-3]。根据大肠埃希氏菌对人类的致病机理不同,可将其分为5种类型:肠致病性大肠埃希氏菌(*Enteropathogenic escherichia coli*, EPEC)、肠产毒性大肠埃希氏菌(*Enterotoxigenic escherichia coli*, ETEC)、肠侵袭性大肠埃希氏菌(*Enteroinvasive escherichia coli*, EIEC)、肠出血性大肠埃希氏菌(*Enterohemorrhagic escherichia coli*, EHEC)和肠集聚性大肠埃希氏菌(*Enteraggregative escherichia coli*, EAEC)^[4]。

大肠埃希氏菌的肠道传染具有比较广泛的特性,而食品在生产、包装及运输过程中极易感染此菌,进而引发传染性疾病^[5]。2018年6月,大肠埃希氏菌 O157:H7 污染生菜事件的暴发,影响了美国36个州,事件造成96人住院和5人死亡^[6]。2019年4月,美国的10个州暴发牛肉感染大肠埃希氏菌 O103 事件,导致177人感染,其中21人住院,涉事公司紧急召回了53 200磅牛肉^[7]。大肠埃希氏菌是一些传染性疾病的重要来源之一,致病性的大肠埃希氏菌严重威胁着人类健康^[8]。迅速确定大肠埃希氏菌的污染来源可有效缩小疫情影响范围,避免对人类健康和经济贸易产生重大损失。根据大肠埃希氏菌表面抗原的不同,大肠埃希氏菌可分为1 000多种血清型^[9],建立简便高效的追溯技术和分型方法是微生物溯源的关键。

大肠埃希氏菌的常见分型方法可分为表型分型和分子分型,这两种类型的分型方法各有优劣,具有不同的适用范围,随着分子生物学和生物信息学等学科的迅速发展,大肠埃希氏菌的分型方法不

断地被丰富和完善,国内对大肠埃希氏菌的分型方法综述尚未见报道。本文围绕表型分型方法和分子分型方法综述了国内外大肠埃希氏菌分型的研究进展,为致病菌溯源方法的选择提供参考依据,对防御并控制致病菌引起的流行病传播具有重要的意义。

1 表型分型方法

表型分型方法是以各种微生物基因产物发生的生物化学反应为基础来判断微生物菌体种类的一类分型方法^[10]。表型分型方法具有多方优势,如分型成本低、操作技术简单、不需要大型分析仪器和设备、一次可进行大批量样本分析等^[11],因此在基层应用比较广泛^[12]。然而,此类方法的鉴定结果容易受到菌体生存条件和培养条件的影响,导致鉴定结果不够准确和稳定,还需要其他分型方法的补充和验证^[13-14]。常用的表型分型方法有血清分型和噬菌体分型^[15]。

1.1 血清分型

血清分型是大肠埃希氏菌表型分型中最常用的方法之一,也是鉴定大肠埃希氏菌是否含有致病性的最重要方法。大肠埃希氏菌的抗原结构较复杂,可归为4类抗原:菌体抗原(O抗原)、表面抗原(K抗原)、鞭毛抗原(H抗原)和菌毛抗原(F抗原)^[16]。大肠埃希氏菌的血清分型是基于O抗原、K抗原和H抗原来进行分型,研究表明大肠埃希氏菌的K抗原、H抗原与O抗原具有一定程度的相关性,F1、F11菌毛抗原与O78、O1、O2三种菌体抗原型菌株之间存在较为显著的相关性^[17],因此通常在大肠埃希氏菌病的诊断过程中,若仅以鉴定O抗原难以达到预想的分型效果。血清分型的鉴定方法是通过血清凝集实验来实现的,血清凝集实验是通过高温(100℃, 2 h)处理菌株获得菌株表面O抗原,基于免疫共沉淀的原理,O抗原与相应抗体结合,在电解质存在的条件下,经过一段

时间可出现肉眼可见的凝集小块,以此来判断是否有目标抗原存在。

目前已知的大肠埃希氏菌 O 抗原血清型有 170 种,在中国已经有 50 多种致病性大肠埃希氏菌血清型被成功分离和鉴定^[18]。高崧等^[19]运用血清分型对 595 株大肠埃希氏菌进行了分析,发现 6 个血清型为优势血清型,分别是 O18、O78、O2、O88、O11 和 O26。2003 年我国颁布的《致泻大肠埃希氏菌检验国家标准》^[20]采用的是血清分型方法,2016 年修订了新的国家标准^[21],采用的是聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)对 5 种致泻大肠埃希氏菌的 14 种特征基因进行扩增,进而判断结果。有些菌株属于不可分型,例如有一些菌株因 O 抗原的相关基因发生突变或者丢失,导致丧失合成 O 抗原的能力,则不与抗血清发生凝集反应,这些菌株不能通过血清分型鉴定^[22]。血清分型依据细菌表面的单一抗原表位来对目标菌进行分型,不能将菌株之间的遗传关系完全反映出来,可能存在具有相同血清型但菌株之间遗传关系相差很远的现象,不同菌株致病性可能存在巨大差异,此时运用血清分型方法会影响分型的效果,导致鉴定结果不准确^[23]。

由于血清分型方法具有操作简单、易于掌握的特点,在基层得到了广泛的应用,但传统的血清学分型方法也有一定的缺陷,如耗时长、费用高,不利于大规模应用,敏感性也不高,需要重复检测才能得出结果。此外,该方法要求鉴定的致病菌纯度尽可能高、保持新鲜并传代次数较少,并且还要求标准免疫血清和标准菌株具备特异性强和滴度高的特点。分型结果会受到很多因素的影响,如血清质量、血清来源、血清交叉反应以及菌体表面其他抗原成分,使得检测准确度、检出率和灵敏度很难达到理想的效果^[24]。

1.2 噬菌体分型

噬菌体是一类能够感染细菌、真菌等微生物的病毒,主要结构是由蛋白质外壳包裹着遗传物质。噬菌体可以通过蛋白质外壳与宿主细菌表面的受

体特异性结合,将自身的遗传物质注入宿主细菌体内。噬菌体对宿主细菌的感染和裂解作用通常具有较高的特异性。噬菌体分型方法的原理就是依据噬菌体与相应细菌具有特异性的裂解作用,能够在培养基上形成直观清晰的噬菌斑来确定宿主细菌的种类^[25],通常被用于区分不同的细菌亚型。

噬菌体分型在众多细菌分型方法中扮演着非常重要的角色,常作为联合分型方法受到广泛运用^[26]。李萌等^[27]通过对肠出血性大肠埃希氏菌 O157:H7 的研究发现,由于该类型菌株的高度保守性,对其引起的流行病学检测研究必须采用不同种类的分型方法,比较不同分型方法的实验结果后发现噬菌体分型方法具有较高的分辨率,可将 66 种详细类别的大肠埃希氏菌 O157:H7 分离出来。

噬菌体分型具有高特异性和成本低廉的优点,并具有可区分活细菌和死细菌的能力,较易运用于其他检测领域,目前基于噬菌体识别食源性致病菌的模式已在检测领域得到广泛的应用^[28]。然而,此方法对噬菌体的用量、侵染时间等一系列条件有特殊的要求,通常需要较长时间,对操作人员的实践能力和操作技术要求较高,噬菌体分型方法的使用受到限制^[29]。

2 分子分型方法

分子分型方法基于致病菌(病原体)的遗传物质(DNA),通过构建不同细菌个体的“DNA 指纹”文库,将分离得到的细菌样本与可能的污染源(食品、粪便等)分离得到的同类细菌样本的“DNA 指纹”进行分析对比,从而判断致病菌的污染来源^[30]。常见的分子分型方法包括脉冲场凝胶电泳分型技术、多位点序列分型技术、限制性片段长度多态性分型技术、随机引物扩增多态性 DNA 分型技术、扩增片段长度多态性分型技术、变性高效液相色谱分型技术、重复序列聚合酶链反应分型技术、成簇的规律间隔的短回文重复序列分型技术、质粒图谱分型技术和单核苷酸多态性分型技术等分型方法。

2.1 脉冲场凝胶电泳分型技术

脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)分型技术在 1984 年由 Schwartz 和 Cantor 首次提出^[31], 其原理是在脉冲电场的作用下, 可分离大于 20 kb 以及小于 5 Mb 的 DNA 分子混合物, 然而传统的琼脂糖凝胶电泳技术仅能分离小于 50 kb 的 DNA 分子片段, 无法清晰地分辨大于 50 kb 的 DNA 分子片段, PFGE 使得 DNA 分子片段的分离更为准确。大量研究已证实, PFGE 方法具有很高的鉴定能力, 在致病菌的研究领域中具有较大的优势^[32], 大肠埃希氏菌是其中较为显著的菌种之一。PFGE 被称为细菌分子分型技术的“金标准”, 被广泛地应用于致病微生物的分型^[33]。如今 PFGE 还为致病菌基因分型、传染源追踪和传播途径探讨等研究提供了有力的支持。

Bono 等^[34]利用 PFGE 研究产志贺毒素大肠埃希氏菌(shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC) O157 的来源, 对 426 个致病菌株进行了分析, 研究结果显示 STEC O157 存在 762 个基因组多态性, 可被分成 175 个型, 研究还发现在其中 8 个主要的 STEC O157 谱系中, 有 7 个谱系的菌株来源于牛, 作者还对流行病菌株内部之间的进化关系进行了详细的探讨。吴宁鹏等^[35]采用 PFGE 对分离到的 32 株耐黏菌素大肠埃希氏菌进行分型研究, 实验结果显示, 32 株耐黏菌素大肠埃希氏菌呈现出遗传多样性, 但不同的菌株之间具有着一定的遗传关系, 表明 PFGE 在大肠埃希氏菌的分型和溯源中起重要作用。

然而 PFGE 的使用也存在一定的缺陷, 如需要花费较长的时间, 且色谱图上只能反映片段的尺寸和数目, 无法明确具体的序列信息, 两个片段碱基序列不同的菌株可能存在相似分子量, 因此结果可能会出现假阳性。此外, 如果实验中使用的限制性内切酶不同, 所得到的电泳图谱会有一些的误差^[36]。

2.2 多位点序列分型技术

多位点序列(multilocus sequence typing, MLST)

分型技术是近些年发展比较迅速的分子分型方法, 该方法合理地运用了高通量测序技术和生物信息学方法。MLST 方法一般测定 6–10 个管家基因的核苷酸序列(内部长度为 400–600 bp), 如金黄色葡萄球菌通常需要测定 7 个管家基因, 致伤弧菌需测定 10 个管家基因; 根据每个位点的序列被发现的时间顺序来赋予等位基因编号, 每一株细菌的等位基因编号按照指定的顺序排列就是它的等位基因谱, 称为该株菌的序列型(sequence type, ST), 所得到的 ST 代表一组单独的核苷酸序列信息。通过比较菌株的 ST 可判定菌株的相关性, 密切相关菌株具有相同的 ST 或仅有极个别基因位点不同的 ST, 不相关菌株的 ST 至少有 3 个或 3 个以上基因位点不同^[37]。该方法只涉及扩增细菌的管家基因, 操作过程简便, 研究者将数据提交到 MLST 网站上就可以了解到全球不同国家实验室的相关菌株信息, 该技术具有快速简便、重复性好、分辨率较高、数据标准和实验结果可比性高等优点, 被广泛应用于许多致病微生物的进化研究中。

王龙光等^[38]利用 MLST 对 698 株鸡源大肠埃希氏菌进行分型研究, 将 135 株高致病菌株分型为 48 个 ST 型。Aghamohammad 等^[39]运用 MLST 对产超广谱 β -内酰胺酶的大肠埃希氏菌毒力群(ESBL-EC)进行分型, 结果在 120 例受试个体中, ESBL-EC 携带率为 60.0% (72/120), ESBL-EC 分离株的主要序列类型为 ST 769 和 ST 472, 分析结果表明 MLST 具有较好的分型能力。

MLST 的不足之处是不适用于管家基因无变异或变异程度低的菌株分型, 此外, 测序成本相对较高也是限制其广泛应用的一个重要因素。

2.3 限制性片段长度多态性分型技术

限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分型技术是最早用于反映 DNA 分子中不同限制性酶切位点分布的分子标记技术, 其原理是利用特定的限制性内切酶识别并切割不同生物个体的基因组 DNA, 得到大小不等的 DNA 片段, 所产生的 DNA 数目和各个片段

的长度反映了 DNA 分子上不同酶切位点的分布情况。结合凝胶电泳法可将不同的条带分离,与标记菌体特异性 DNA 片段的探针进行 Southern 印迹杂交或放射自显影处理,以获得反映不同个体特征的 RFLP 图谱,从而识别致病菌株的种类^[40]。RFLP 的优点是共显性好、结果稳定,并且不受标记基因座数量的限制,该法有利于构建遗传连锁图谱。

Ho 等^[41]利用 PCR-RFLP 方法对不同来源的大肠埃希氏菌进行分析,研究结果发现携带 CTX-M 编码质粒的大肠埃希氏菌同时存在于检测目标来源,包括动物粪便、人粪或人尿,结果证实此类大肠埃希氏菌具有人和动物交叉污染的风险。Shridhar 等^[42]从牛粪中分离的除大肠埃希氏菌 O157 以外的 STEC 血清群菌株的 stx 亚型,通过计算机模拟 RFLP,在核苷酸水平上鉴定了志贺毒素基因型,结果显示 RFLP 具有较好的基因分型能力,可为致病菌的分型提供参考。

RFLP 的拷贝编码序列分布低且十分稳定,但 RFLP 方法的实验操作比较繁琐,而且检测周期较长,成本相对较高,不便于进行大规模的操作。

2.4 随机引物扩增多态性 DNA 分型技术

随机引物扩增多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)分型技术利用随机引物进行 PCR 扩增基因组 DNA,然后通过电泳分离产物,进而分析片段多态性。任何特定的 RAPD 引物在基因组 DNA 序列上都有特异的结合位点,如果在基因组区域发生 DNA 片段插入、缺失或碱基突变,可能会导致某个特定结合位点的分布发生变化^[43]。由于引物的使用量不同会导致扩增产物的数量和大小不一样,最终展现出多态性,因此 RAPD 可用来检测细菌体全基因组的 DNA 多态性,进而可构建基因组指纹图谱^[44]。

Krüger 等^[45]分析来自动物的 6 株大肠埃希氏菌获得 3 种 RAPD 图谱,在此过程中发现了 2 种新的人源大肠埃希氏菌 RAPD 图谱,为研究大肠埃希氏菌的分型提供了支持。Fazel 等^[46]在 5 个不同的城市采集了来源于 14 个奶牛群的 430 份临床

乳腺炎样本,采用多重 PCR 方法确定系统发育群,并运用 RAPD 对所有菌株进行分型,研究结果均表明 RAPD 具有较好的分型能力且操作简便;此方法耗时较短,所需用的菌体 DNA 量较少,并且在实验过程中引物可通用,不需要全基因组的序列信息来确定特定靶标。

RAPD 分型技术的不足是随机性较高,模板量、 Mg^{2+} 浓度和 DNA 聚合酶质量等因素会影响分型效果,可重复性较差,且准确性低于 PFGE 和扩增片段长度多态性分型技术^[47],这些不足导致 RAPD 未得到广泛的应用。

2.5 扩增片段长度多态性分型技术

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphisms, AFLP)分型技术最早是由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos^[48]在 1992 年提出的,其结合了 RFLP 与 RAPD 的特性,即通过核酸内切酶切割基因组 DNA 获得大小不一的 DNA 片段,这些离散的 DNA 片段由特定的连接子连接,通过对连接子序列的识别和 PCR 扩增,经过聚丙烯酰胺电泳分离获得特异限制性片段。AFLP 既有 RFLP 的可靠性,又有 RAPD 的灵敏性,使其更适合分子分型研究。该方法需要的 DNA 用量少、检测效率高,且有含量丰富的多态信息,是相对有效的分子标记方法^[49]。

Leung 等^[50]利用 AFLP 技术研究了分离自不同寄主的 110 株大肠埃希氏菌寄主的溯源和致病性鉴定,结果显示了 AFLP 技术对寄主的识别率超过 90%,对肠致病性大肠埃希氏菌、非致病性大肠埃希氏菌和细胞毒素型大肠埃希氏菌的鉴别率均超过 90%,研究结果表明 AFLP 技术对大肠埃希氏菌寄主的溯源及其致病性研究具有较高的效率。Spindola 等^[51]对尿源性大肠埃希氏菌中引起泌尿系统感染的毒力基因、系统发育背景和克隆多样性进行研究,成功地将巴西母猪分离得到的 186 株尿源性大肠埃希氏菌分为 4 种类型。

AFLP 的缺点是费用较昂贵、对模板质量要求较高,同时要求操作人员具有较高的工作技能,因

此 AFLP 难以实现在基层使用。

2.6 变性高效液相色谱分型技术

变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)分型技术是近年来迅速发展的一种新型基因突变筛查技术。其原理是首先提取多种细菌 16S rRNA 基因中含有的高度变异序列片段,然后分别将上述细菌和参照菌株的扩增产物混合,通过控制调节不同的变性温度,得到同源双链和异源双链扩增样品,这两种双链产物具有不同的洗脱时间,所以具有高度不同的色谱峰,病原菌的检测和溯源就是通过比对不同目标菌的色谱峰而得出^[52]。该方法具有较高的灵敏度和特异性。

姜芹等^[53]利用 PCR 结合 DHPLC 测定大肠埃希氏菌喹诺酮耐药决定区 *gyrA* 和 *gyrB* 的基因突变率,通过 PCR 扩增 22 株喹诺酮耐药大肠埃希氏菌的 2 种基因,产物经 DNA 杂交后运用 DHPLC 进行检测和序列测定,结果发现其中 20 株试验菌的 *gyrA* 基因出现异常峰型,14 株试验菌的 *gyrB* 基因发现异常峰型。实验结果证明运用 DHPLC 分型方法得出的结果与传统血清学鉴定结果没有明显的差别,并且鉴定时间较短、通量较高。Xu 等^[54]采用 PCR 结合 DHPLC 方法对食源性肠毒素大肠埃希氏菌、肠致病性大肠埃希氏菌、肠出血性大肠埃希氏菌和肠侵袭性大肠埃希氏菌进行分型,并且建立了一种可以同时检测不同种类大肠埃希氏菌的方法,结果表明多重 PCR-DHPLC 可同时快速鉴定上述四大类大肠埃希氏菌。

DHPLC 对引物的设计和反应条件要求比较高,需要筛选 DNA 片段的多个解链温度,并且只能定性,无法确定具体的突变位点和突变类型。

2.7 重复序列聚合酶链反应分型技术

重复序列聚合酶链反应(repetitive sequence-based polymerase chain reaction, Rep-PCR)分型技术是指原核生物基因组中存在重复的 DNA 序列,如基因外重复回文序列(repetitive extragenic palindrome, REP)、肠杆菌基因间重复一致序列

(enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC)、插入序列(insertion sequence, IS)等^[55], Rep-PCR 根据重复序列设计引物,应用 PCR 技术对目标基因进行扩增,通过电泳对比分析,实现对细菌分型和溯源^[56]。该方法的优势在于操作简单、鉴定率较高。

韩彦垒等^[57]运用 Rep-PCR 法验证环境因素对大肠埃希氏菌 Rep-PCR 指纹图谱稳定性是否存在一定的影响,研究结果表明 Rep-PCR 指纹图谱具有高度稳定性,从而证实大肠埃希氏菌可被用作粪便指示菌。Dominguez 等^[58]从阿根廷商业肉鸡场收集的粪便样品中获得大肠埃希氏菌菌株($n=41$),通过 ERIC-PCR 和 Rep-PCR 分析发现分离株具有较高的多样性,同时对分离株携带的耐药基因进行了分析,发现健康鸡携带的大肠埃希氏菌具有广泛的抗生素耐药机制,该研究为防控动物滥用抗生素的风险及其对公共卫生的影响提供了依据。

2.8 成簇的规律间隔短回文重复序列分型技术

成簇的规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)分型技术是一种新发现的可遗传性原核防御系统,用于获取外源遗传物质(如噬菌体)的遗传性^[59],它于 1987 年在大肠埃希氏菌中首次被发现^[60]。CRISPR 序列是由一段不连续的同向 DNA 重复序列(direct repeat,通常为 24–47 bp)组成,其中插入了间隔序列(spacer,通常为 21–72 bp)。在 CRISPR 序列中,同向重复序列的大小和顺序几乎无差别,但间隔序列在不同致病菌、相同致病菌的不同血清型或不同菌株之间差异很大^[61]。由于间隔序列的获得、丢失或复制,促使 CRISPR 序列成为细菌中进化最快的位点之一^[62]。因此,基于间隔序列的特异性,CRISPR 不仅能够精确地反映致病性菌株或血清型之间的关系,而且可以反映宿主环境和地理位置的差异^[63]。

杨广珠等^[64]应用 CRISPR 成功地对 39 株大肠埃希氏菌 O157 进行分型,结果发现大肠埃希氏菌 O157:H7 有 8 株,大肠杆菌 O157 有 3 株。Toro 等^[65]

用 CRISPR 对产 194 株志贺毒素大肠埃希氏菌进行分型, 研究发现具有相同 H 抗原的大肠埃希氏菌 O26、O103 和 O111 含有相同的 CRISPR 序列。研究结果表明 CRISPR 的分型能力比较强, 并且可为致病菌的分型研究提供有效的参考依据。

由于 CRISPR 的高度多态性为致病菌分子分型提供了理想的位点, CRISPRS 网络数据库 (<https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/crispr/>) 已建成, 在该数据库可查到原核生物基因组测序的 CRISPR 位点信息。CRISPR 在数据分析、输出、标准化和数据交换方面优于现行的分型方法, 现广泛应用于各类微生物致病菌的分子分型中, 并成为现今多种分型方法的补充手段。

2.9 质粒图谱分型技术

质粒图谱分型技术是在病原微生物和流行病学研究中较早被使用的分子分型技术之一。质粒是可以在细菌体内自我复制的环状双链 DNA 分子, 在细菌染色体外可以稳定且独立的存在。质粒通常具有选择性的特点, 可以携带编码将具有毒性、抗生素抗性和重金属耐受性的基因转录到宿主细菌中。每株细菌可能含有几种不同大小的质粒, 在经过电泳后会呈现出几条大小不同的电泳条带^[66]。细菌的质粒相对稳定, 并且其指纹图谱具有特异性, 因此质粒图谱分型技术是根据该特点实现对不同细菌鉴定的目的^[67]。

彭苗苗等^[68]运用质粒图谱分型技术分析了猪源大肠埃希氏菌耐药性, 发现其中含有 3 个或更多质粒条带的大肠埃希氏菌有 9 株, 其质粒谱型均不一样。王淑娟等^[69]对携带鸡白细胞介素-6 (ChIL-6) 基因的重组大肠埃希氏菌的遗传稳定性进行了质粒图谱分型研究, 结果显示不同代次菌株的蛋白电泳图谱、ChIL-6 蛋白表达量、ChIL-6 蛋白的体外促鸡脾淋巴细胞增殖活性方面并无显著差异, 研究结果表明质粒图谱分型技术为致病菌株遗传稳定性的分型和检测提供有效依据。

质粒图谱分型技术在暴发性流行菌株的鉴定和流行病学的调查中具有一定的优势, 此方法克服

了传统的表型分型方法稳定性差和灵敏度低的缺点, 具有较高的特异性, 可重复且鉴定周期短^[70]。

2.10 单核苷酸多态性分型技术

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分型技术是第三代分子标记技术, 是基于基因组上单个核苷酸发生突变引起的 DNA 序列多态性实现对细菌进行分型^[71]。SNP 所涉及的变异由单个碱基的转换或颠换所引起, 该比例约为 2:1。SNP 是双等位基因多态性, 出现 3 或 4 个等位基因多态性的可能性很小^[72], 由于双等位基因多态性是非此即彼, 通常只做阳性和阴性分析, 这有利于进行快速的基因分型^[73]。SNP 可被广泛应用, 一切已知或未知基因附近几乎都能找到相关的标记位点^[74]。

大量研究证实, 在获得更加丰富的单核苷酸多态性基础上, 可大大提高对大肠埃希氏菌的分型能力^[75]。Hommais 等^[76]利用 MLST 研究大肠埃希氏菌 SNP 位点, 并进行了基于单核苷酸多态性的进化关系, 结果都显示出良好的分型效果。Zhang 等^[77]利用 STEC O157:H7 全基因组测序芯片获得了大量的单核苷酸多态性, 在 523 对染色体组基因中共发现 906 个不同的单核苷酸多态性, 因此获得了 STEC O157:H7 染色体 SNP 结构图, 对 STEC O157:H7 的起源做了进一步深入研究。

基于 SNP 方法所特有的数量多、分布广、耗时短、筛查规模大和容易基因分型等优势, 该方法在对致病菌分型和溯源识别方面展示了良好的效果, 在食品安全相关的致病菌溯源研究中也具有巨大的潜力^[78]。

3 总结与展望

目前, 致病性大肠埃希氏菌的有效分型方法有表型分型方法和分子分型方法, 它们各有其适应范围以及不足。表型分型方法包括血清分型和噬菌体分型, 由于其易操作和低成本的特点, 被用于初步检测法或者补充方法。分子分型方法中的 PFGE、MLST、RFLP、RAPD、AFLP、DHPLC、Rep-PCR

等分型方法因其特有的灵敏度高、重复性好、耗时短等优势,这些分型方法成为如今较为重要的分型检测方法,CRISPR、质粒图谱分型技术和SNP分型方法作为重点发展的下一代分型方法,其稳定性、操作性和准确性有待于改进。随着分型技术的发展,大肠埃希氏菌的分型越来越强调由早期的单一方法到如今的多种方法联合检测。

基于表型特征的传统分型方法已经难以满足现今流行病学调查研究的需要,如何快速、准确、高效地将细菌进行分型,对了解菌株之间的亲缘关系、溯源追踪食物的污染源、阻止病原菌的扩散和防止食源性疾病的暴发具有重要的意义。但随着分子生物学和生物信息学等学科的发展,基于分子分型技术不断的标准化和规范化,有望形成一套兼顾操作简便、成本低、分辨率高、灵敏度强和重复性好的分型方法。

REFERENCES

- [1] Desroches M, Royer G, Roche D, et al. The odyssey of the ancestral *Escherichia coli* strain through culture collections: an example of allopatric diversification[J]. *mSphere*, 2018, 3(1): e00553-17
- [2] Shan S, Lai WH, Chen MH, et al. Research progress in sources and distribution of *Escherichia coli* O157:H7 in agricultural products[J]. *Food Science*, 2014, 35(1): 289-293 (in Chinese)
山珊, 赖卫华, 陈明慧, 等. 农产品中大肠杆菌O157:H7的来源及分布研究进展[J]. *食品科学*, 2014, 35(1): 289-293
- [3] Shan S, Liu DF, Guo Q, et al. Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on cascade signal amplification in ELISA[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(9): 7025-7032
- [4] Hu AT, Wang P, Zhang CX, et al. Establishment of multiplex real-time PCR assay to detect five strains of diarrheagenic *Escherichia coli*[J]. *Food Science*, 2018, 39(22): 249-255 (in Chinese)
胡安妥, 王婷, 张彩霞, 等. 5类致泻性大肠埃希氏菌多重荧光PCR检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2018, 39(22): 249-255
- [5] Guo Q, Han JJ, Shan S, et al. DNA-based hybridization chain reaction and biotin-streptavidin signal amplification for sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 through ELISA[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 86: 990-995
- [6] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections linked to romaine lettuce[R]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2018
- [7] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *E. coli* infections linked to ground beef[R]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2018
- [8] Fratamico PM, Bagi LK, Cray WC Jr. Detection by multiplex real-time polymerase chain reaction assays and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 in ground beef[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2011, 8(5): 601-607
- [9] Ding Q. The establishment and application of the multiplex PCR to detect eight different serotype of enterohemorrhagic *Escherichia coli*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2017 (in Chinese)
丁琦. 八种不同血清型肠出血性大肠埃希氏菌多重PCR检测方法的建立及应用[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2017
- [10] Zhao H, Zhao HB, Qu P, et al. A review of *Escherichia coli* traceability technology[J]. *Food Research and Development*, 2013, 34(11): 123-127 (in Chinese)
赵宏, 赵化冰, 曲鹏, 等. 大肠杆菌溯源技术研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(11): 123-127
- [11] Xiong QR, Cui X, Jasdeep KS, et al. Development of an immunomagnetic separation method for efficient enrichment of *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Food Control*, 2014, 37: 41-45
- [12] Yang H, Rehman MU, Zhang SQ, et al. High prevalence of CTX-M belonging to ST410 and ST889 among ESBL producing *E. coli* isolates from waterfowl birds in China's tropical island, Hainan[J]. *Acta Tropica*, 2019, 194: 30-35
- [13] Boehmer T, Vogler AJ, Thomas A, et al. Phenotypic characterization and whole genome analysis of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from dogs in Germany[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0206252
- [14] Schoepp NG, Schlappi TS, Curtis MS, et al. Rapid pathogen-specific phenotypic antibiotic susceptibility testing using digital LAMP quantification in clinical samples[J]. *Science Translational Medicine*, 2017, 9(410): eaal3693
- [15] Kim S, Masum F, Jeon JS. Recent developments of chip-based phenotypic antibiotic susceptibility testing[J]. *BioChip Journal*, 2019, 13(1): 43-52
- [16] Kauffmann HF. The serology of the *coli* group[J]. *The Journal of Immunology*, 1947, 57(1): 71-100
- [17] Feng MY, Lin SQ, Fang YB, et al. Analysis of mixed O-antigen serotypes of *E. coli* isolated from chickens in Shandong Province[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(9): 1676-1679 (in Chinese)
冯敏燕, 林树乾, 房玉波, 等. 山东省鸡源致病性大肠杆菌O-抗原混合血清型分析[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(9): 1676-1679
- [18] Lin XG, Ma DH, Kang GY, et al. Identification of serogroup of *E. coli* O-antigen from calves with diarrhea[J]. *Chinese*

- Journal of Biologicals, 2018, 31(1): 55-58 (in Chinese)
蔺旭光, 马德慧, 康桂英, 等. 犍牛腹泻大肠埃希菌O-抗原血清型鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(1): 55-58
- [19] Gao S, Liu XF, Zhang RK, et al. The outer membrane protein (OMP) patterns of *Escherichia coli* isolates of predominant O serogroups originated from chickens in different regions in China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1999, 39(3): 226-233 (in Chinese)
高崧, 刘秀梵, 张如宽, 等. 我国部分地区禽源性大肠杆菌的外膜蛋白型[J]. 微生物学报, 1999, 39(3): 226-233
- [20] National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. GB 4789.6-2003 Microbiological examination of food hygiene- Examination of diarrheogenic *Escherichia coli*[S]. Beijing: China Standard Press, 2004 (in Chinese)
国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.6-2003 食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004
- [21] National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. GB 4789.6-2016 Microbiological examination of food hygiene- Examination of diarrheogenic *Escherichia coli*[S]. Beijing: China Standard Press, 2017 (in Chinese)
国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.6-2016 食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [22] DebRoy C, Fratamico PM, Yan XH, et al. Correction: comparison of O-antigen gene clusters of all O-serogroups of *Escherichia coli* and proposal for adopting a new nomenclature for O-typing[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0154551
- [23] Zhang YX, Xu HY. Research progress on typing of *E. coli* from poultry[J]. Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2011, 32(5): 98-100 (in Chinese)
张玉霞, 徐怀英. 家禽大肠杆菌分型方法研究进展[J]. 家畜生态学报, 2011, 32(5): 98-100
- [24] Liu CY, Zhang JP, Wang BY. Research progress on identification of *Escherichia coli* O-antigen serogroups[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2016, 32(10): 928-933 (in Chinese)
刘璨颖, 张济培, 王丙云. 大肠杆菌O-抗原血清型鉴定研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(10): 928-933
- [25] Ripp S. Bacteriophage-based pathogen detection[A]//Belkin S, Gu MB. Whole Cell Sensing System II: Applications[M]. Berlin: Springer, 2009, 118: 65-84
- [26] Xie TF. Study on genetic diversity and cold stress of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in China[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2018 (in Chinese)
谢腾飞. 中国食源性副溶血性弧菌遗传多样性分析与冷胁迫研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2018
- [27] Li M, Wang JX, Lin H. Research progress of the use of bacteriophage to detect foodborne pathogenic bacteria[J]. Food Science, 2010, 31(23): 439-446 (in Chinese)
李萌, 王静雪, 林洪. 噬菌体检测食源性致病菌的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 439-446
- [28] Wang XM. Study on typing methods of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. Chinese Journal of Public Health, 2005, 21(4): 451-452 (in Chinese)
王晓萌. 肠出血性大肠埃希菌O157:H7不同分型方法比较[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(4): 451-452
- [29] Wei L, Zhu FL, Zhou Y, et al. Progress in the application of bacteriophage in the detection of foodborne pathogenic bacteria[J]. Food Science, 2018, 39(17): 314-322 (in Chinese)
魏麟, 朱方莉, 周洋, 等. 噬菌体在检测食源性病原菌中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(17): 314-322
- [30] Zhao H. Highly discriminatory single-nucleotide polymorphism interrogation of source of *Escherichia coli* in food[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Military Medical Sciences, 2012 (in Chinese)
赵宏. 基于单核苷酸多态性的食品中大肠埃希氏菌溯源技术[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院博士学位论文, 2012
- [31] Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis[J]. Cell, 1984, 37(1): 67-75
- [32] Anahita B, Mojtaba N, Pejvak K, et al. Genetic analysis of clinical and vaccine strains of *Bordetella pertussis* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multi Locus Sequence Typing (MLST) and serotyping[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2019, 64: 168-175
- [33] Lopez-Canovas L, Benitez MBM, Isidron JAH, et al. Pulsed field gel electrophoresis: past, present, and future[J]. Analytical Biochemistry, 2019, 573: 17-29
- [34] Bono JL, Smith TPL, Keen JE, et al. Phylogeny of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated from cattle and clinically ill humans[J]. Molecular Biology and Evolution, 2012, 29(8): 2047-2062
- [35] Wu NP, Lv XY, Yu H, et al. Study on PFGE typing and drug resistance of swine *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(6): 21-25 (in Chinese)
吴宁鹏, 吕小月, 于辉, 等. 猪源耐黏菌素大肠杆菌PFGE分型及耐药性研究[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(6): 21-25
- [36] Wang K, Pei ZH, Chen ZQ, et al. Research progress of common foodborne pathogenic bacteria and their molecular typing techniques[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2013, 49(12): 51-54 (in Chinese)

- 王开, 裴志花, 陈中秋, 等. 常见食源性致病菌及其分子分型技术的研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(12): 51-54
- [37] Wang T. Multilocus sequence typing of a *Salmonella enteritidis* isolated from chicken and analysis of its type three secretion system genes[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- 王涛. 一株鸡源性肠炎沙门氏菌MLST分型及三型分泌系统基因分析[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2012
- [38] Wang LG, Jiang W, Feng CH, et al. Genetic evolutionary relationship of drug-resistant and pathogenic chicken originated *Escherichia coli* strains from different regions with MLST[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2017, 37(9): 1680-1686 (in Chinese)
- 王龙光, 姜雯, 逢春华, 等. 利用MLST技术探讨不同地区致病性耐药鸡源大肠杆菌的遗传进化关系[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(9): 1680-1686
- [39] Aghamohammad S, Badmasti F, Shirazi AS, et al. Considerable rate of putative virulent phylo-groups in fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli*[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2019, 73: 184-189
- [40] Dehdashti S, Ghanbarpour R, Hajikolaei MRH. Molecular detection of shiga toxin-producing and antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from buffaloes in southwest of Iran[J]. Tropical Animal Health and Production, 2019, 51(6): 1725-1736
- [41] Ho PL, Lo WU, Yeung MK, et al. Dissemination of pHK01-like incompatibility group IncFII plasmids encoding CTX -M-14 in *Escherichia coli* from human and animal sources[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 158(1/2): 172-179
- [42] Shridhar PB, Siepker C, Noll LW, et al. Shiga toxin subtypes of Non-O157 *Escherichia coli* serogroups isolated from cattle feces[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 121
- [43] Kao CY, Chen JW, Liu TL, et al. Comparative genomics of *Escherichia coli* sequence type 219 clones from the same patient: evolution of the *incI1 bla_{CMY}*-carrying plasmid *in vivo*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1518
- [44] Mosavie M, Blandy O, Jauneikaite E, et al. Sampling and diversity of *Escherichia coli* from the enteric microbiota in patients with *Escherichia coli* bacteraemia[J]. BMC Research Notes, 2019, 12: 335
- [45] Krüger A, Padola NL, Parma AE, et al. Intraserotype diversity among argentinian verocytotoxigenic *Escherichia coli* detected by random amplified polymorphic DNA analysis[J]. Journal of Medical Microbiology, 2006, 55(Pt5): 545-549
- [46] Fazel F, Jamshidi A, Khoramian B. Phenotypic and genotypic study on antimicrobial resistance patterns of *E. coli* isolates from bovine mastitis[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 132: 355-361
- [47] Shao DH, Qiu YF, Shen Y, et al. Advance in genotyping of pathogenic *Escherichia coli* O157:H7[A]/Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Institute of Animal Infectious Diseases, Pig Disease Symposium[C]. Zhengzhou: Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine, 2010 (in Chinese)
- 邵东华, 邱亚峰, 沈阳, 等. 致病性大肠杆菌O157:H7基因分型研究进展[A]/中国畜牧兽医学动物传染病学分会第四次猪病学术研讨会论文集[C]. 郑州: 中国畜牧兽医学, 2010
- [48] Velappan N, Snodgrass JL, Hakovirta JR, et al. Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2001, 39(2): 77-83
- [49] El-Shazly DA, Nasef SA, Mahmoud FF, et al. Expanded spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis in Egypt[J]. Poultry Science, 2017, 96(7): 2375-2384
- [50] Leung KT, Mackereth R, Tien YC, et al. A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(1): 111-119
- [51] Spindola MG, Cunha MPV, Moreno LZ, et al. Genetic diversity, virulence genotype and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from sows[J]. Veterinary Quarterly, 2018, 38(1): 79-87
- [52] Eskandarian MR, Golmohamadi T, Tabrizi AA, et al. Optimizing denaturing HPLC as a robust technique for identification of Short Tandem Repeats (STR) in forensic medicine[J]. Journal of Forensic and Legal Medicine, 2019, 61: 108-114
- [53] Jiang Q, Sun BQ, Wang XX, et al. Rapid detection of *gyrA* and *gyrB* gene mutations in animal-derived *Escherichia coli* by DHPLC[J]. Shanghai Livestock and Veterinary Communication, 2019(2): 20-22 (in Chinese)
- 姜芹, 孙冰清, 王晓旭, 等. DHPLC法快速检测动物源大肠埃希菌 $gyrA$ 、 $gyrB$ 基因突变的研究[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2019(2): 20-22
- [54] Xu YG, Cui LC, Li SL, et al. Development and clinical validation of a multiplex polymerase Chain reaction-denaturing high-performance liquid chromatography method for the identification of foodborne diarrheagenic *Escherichia coli*[J]. Journal of Food Safety, 2012, 32(1): 6-12
- [55] Pusparini N, Waturangi DE, Usia T, et al. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from ice cube production sites[J]. BMC Research Notes, 2018, 11: 659
- [56] Mairi A, Pantel A, Ousaleem F, et al. OXA-48-producing Enterobacterales in different ecological niches in Algeria: clonal expansion, plasmid characteristics and virulence traits[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2019, 74(7): 1848-1855
- [57] Han YL, Liang B, Li DM, et al. Effect of environmental factors of REP-PCR fingerprinting patterns stability of

- Escherichia coli*[J]. Marine Environmental Science, 2011, 30(5): 614-617 (in Chinese)
- 韩彦垒, 梁斌, 李冬梅, 等. 环境因素对大肠杆菌 REP-PCR 指纹图谱稳定性影响研究[J]. 海洋环境科学, 2011, 30(5): 614-617
- [58] Dominguez JE, Redondo LM, Espinosa RAF, et al. Simultaneous carriage of *mcr-1* and other antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* from poultry[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1679
- [59] Barrangou R. The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond[J]. Current Opinion in Immunology, 2015, 32: 36-41
- [60] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12): 5429-5433
- [61] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(11): 722-736
- [62] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712
- [63] Shen JL, Wu YF, Cui SY, et al. Study of clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequence subtyping and its application in pathogens[J]. Biotechnology, 2017, 27(2): 186-191 (in Chinese)
- 申进玲, 吴瑜凡, 崔思宇, 等. 成簇的规律间隔短回文重复序列在致病菌中分型研究及应用[J]. 生物技术, 2017, 27(2): 186-191
- [64] Yang GZ, Zhang SH, Huang YB, et al. The virulence genes, antimicrobial susceptibility, and CRISPR molecular typing of *Escherichia coli* O157 from retail foods in China[J]. Modern Food Science and Technology 2017, 33(12): 29-37,227 (in Chinese)
- 杨广珠, 张淑红, 黄远斌, 等. 食源性大肠杆菌O157毒力、耐药性及CRISPR分型分析[J]. 现代食品科技, 2017, 33(12): 29-37,227
- [65] Toro M, Cao GJ, Ju WT, et al. Association of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) elements with specific serotypes and virulence potential of shiga toxin-producing *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(4): 1411-1420
- [66] Wang LJ. Resistance analysis and genotype research of pathogenic *Escherichia coli* derived from swines in Harbin[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2013 (in Chinese)
- 王磊杰. 哈尔滨地区猪源致病性大肠杆菌耐药性分析及基因分型研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2013
- [67] Jain P, Sudhanthirakodi S, Chowdhury G, et al. Antimicrobial resistance, plasmid, virulence, multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium clinical and environmental isolates from India[J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0207954
- [68] Peng MM, Qiu MZ, Wang H, et al. Analysis of resistance plasmid profiles and drug resistance of *Escherichia coli* from swine[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2017, 26(2): 183-188 (in Chinese)
- 彭苗苗, 邱美珍, 王慧, 等. 猪源大肠杆菌耐药质粒图谱及耐药性分析[J]. 激光生物学报, 2017, 26(2): 183-188
- [69] Wang SJ, Cui P, Wang DF, et al. Study on the heredity stability of a recombinant *Escherichia coli* pQE30-ChIL-6/JM109[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017(5): 1-7 (in Chinese)
- 王淑娟, 崔沛, 王东方, 等. 重组大肠杆菌pQE30-ChIL-6/JM109的遗传稳定性研究[J]. 现代畜牧兽医, 2017(5): 1-7
- [70] Zhang YK, Zhang ZZ, Gan MH. Analysis on *Escherichia coli* from chicken using plasmid DNA finger printing[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 1995, 26(5): 473-480 (in Chinese)
- 张渊魁, 张中直, 甘孟侯. 用质粒DNA指纹图谱分析法研究鸡源大肠杆菌的流行病学特征[J]. 畜牧兽医学报, 1995, 26(5): 473-480
- [71] Wu XY, Zhang QH, Chen Z. Research of single nucleotide polymorphism application[J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2000, 17(1): 57-59 (in Chinese)
- 吴昕彦, 张庆华, 陈竺. 单核苷酸多态性研究及应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2000, 17(1): 57-59
- [72] Towantakavanit K, Park YS. Ethylene metabolism and bioactive compounds in ethylene-treated 'Hayward' kiwifruit during ripening[J]. Horticulture Environment and Biotechnology, 2011, 51(2): 89-94
- [73] Collins BH, Horska A, Hotten PM, et al. Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and *in vitro*[J]. Nutrition and Cancer, 2001, 39(1): 148-153
- [74] Gorinstein S, Haruenkit R, Poovarodom S, et al. The comparative characteristics of snake and kiwi fruits[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(8): 1884-1891
- [75] Felde O, Kreizinger Z, Sulyok KM, et al. Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates from Central Europe for fifteen antibiotics by microbroth dilution method[J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0209030
- [76] Hommais F, Pereira S, Acquaviva C, et al. Single-nucleotide polymorphism phylotyping of *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4784-4792
- [77] Zhang W, Qi WH, Thomas JA. Probing genomic diversity and evolution of *Escherichia coli* O157 by single nucleotide polymorphisms[J]. Genome Research, 2006, 16(6): 757-767
- [78] Qiu HF, Li YH, Dai WJ. Codon-usage frequency mediated SNPs selection in *LasR* gene of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates[J]. Microbiological Research, 2019, 223-225: 137-143