

产志贺毒素大肠杆菌基因分型技术的研究进展

张世钦¹, 汪雯², 吉小凤², 王梓晨¹, 白芷焱¹, 李红梅^{1*}, 王翔¹, 董庆利¹

¹上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海

²农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室(筹), 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所, 农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(杭州), 浙江 杭州

Email: usst_zsq1110@163.com, *lihm@usst.edu.cn

收稿日期: 2020年8月19日; 录用日期: 2020年9月9日; 发布日期: 2020年9月16日

摘要

产志贺毒素大肠杆菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)是重要的食源性致病菌, 能引起人和动物发生腹泻、出血性肠炎和溶血性尿毒综合症等疾病。为了更好的开展STEC检测、表征、分子进化分析及溯源调查, 本文对国内外STEC基因分型技术包括基于酶切扩增分型方法、基于全基因组测序(Whole genome sequencing, WGS)分型方法以及多位点串联重复序列分析(MLVA)、DNA微阵列(DNA microarray)和成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)分型技术研究进展进行综述, 并对基因分型研究方法存在的问题进行探讨, 为STEC的溯源追踪和流行病学调查提供参考。

关键词

产志贺毒素的大肠杆菌, 分型技术, 全基因组测序

Research Progress in Genotyping of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*

Shiqin Zhang¹, Wen Wang², Xiaofeng Ji², Zichen Wang¹, Zhiye Bai¹, Hongmei Li^{1*}, Xiang Wang¹, Qingli Dong¹

¹School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai

²State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-Products (Currently Being Established), MOA Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-Products (Hangzhou), Institute of Quality and Standard of Agricultural Products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou Zhejiang

Email: usst_zsq1110@163.com, *lihm@usst.edu.cn

*通讯作者。

文章引用: 张世钦, 汪雯, 吉小凤, 王梓晨, 白芷焱, 李红梅, 王翔, 董庆利. 产志贺毒素大肠杆菌基因分型技术的研究进展[J]. 微生物前沿, 2020, 9(3): 125-132. DOI: 10.12677/amb.2020.93018

Abstract

Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an important food-borne pathogen, which can cause diseases, such as diarrhea, hemorrhagic enteritis and hemolytic uremic syndrome in humans and animals. In order to implement the detection, characterization, molecular evolution analysis and traceability investigation of STEC more efficiently, the worldwide STEC genotyping techniques including the genotyping methods based on enzyme-cut amplification and Whole Genome Sequencing (WGS), Multiple Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA), DNA microarray and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) were reviewed, and the issues of genotyping methods were discussed, which could provide the valuable information for the STEC traceability and epidemiological investigation.

Keywords

Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, Genotyping Methods, Whole Genome Sequencing

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

产志贺毒素大肠埃希氏菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)是一种能产生志贺毒素,并能引起人畜共患病的重要食源性致病菌,可以引起人体水样腹泻、出血性结肠炎等胃肠道疾病,严重时能导致溶血性尿毒综合症、血小板减少性紫癜等并发症甚至死亡[1] [2]。人体感染 STEC 的途径非常多,主要包括两种:人体直接接触反刍动物的蓄水池直接感染,或者通过摄入受粪便污染的食物或水间接感染[3]。自 1982 年首次发现 STEC 以来,已经发现 400 多种不同血清型的 STEC, O157:H7 是研究最多的血清型[4]。除此之外,其它 STEC 血清型: O26:H2、O45:H2、O103:H11、O111:H8、O121:H19、O145:H28 也能导致人体患病[3] [4] [5]。由此可见, STEC 血清型种类繁多,依靠传统检测分型手段难以快速识别感染源,导致人体感染 STEC 风险提高,因此掌握高效、高分辨率的 STEC 分型方法对保证食品安全尤为重要。

传统的表型分型技术通过菌体培养、结合生化检测和免疫反应等开展检测鉴定,其中应用较多的表型分型技术是免疫血清分型技术。该技术结合 174 种体细胞表面抗原(O-抗原)和 53 种鞭毛抗原(H-抗原),用抗体检测抗原的方法[6] [7]。目前,采用该方法已经鉴定出 400 多种不同血清型的 STEC,并且根据报告的发病率和严重程度将其中几种血清型进一步分类为血清病理类型。命名范围从高发病率、致死的 A 类血清病理类型到症状轻微 E 类血清病理类型[4]。尽管表型分型技术具有操作简单的特点,但是该技术却有很多局限性,如表型特征数量有限、成本高、劳动强度大、抗体可能发生逐批变异等缺点[8]。目前研究报道最多的是基于 DNA 序列差异为基础的分型方法,这种方法不仅灵敏度、分辨率高、并且可将患者携带的 STEC 与污染源联系起来有利于开展流行病学调查,进而减少疫情的规模和地理范围。除此之外,基因分型技术分型能力更强,能区分传统表型分型方法不能分型的 STEC 血清型,如 O182:H25 型

STEC 采用传统血清凝集方法并不能鉴定、分型,而基因分型方法可基于 DNA 序列之间差异,通过与数据库序列比对,可快速、准确获得该型 STEC 血清型。因此,基因分型方法在 STEC 分型研究中越来越受到科研工作者青睐。

本文根据分型方法不同,将基因分型方法归为以下几类:基于酶切扩增分型技术、基于高通量全基因组测序分型技术、多位点串联重复序列分析(Multiple locus variable number of tandem repeat Analysis, MLVA)分型技术、基于 DNA 微阵列(DNA microarray)分型技术、基于成簇规律间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)分型技术,综述了 STEC 基因分型的研究进展,同时探讨了基因分型技术的优缺点,为 STEC 溯源追踪和流行病学调查选择基因分型技术方法提供理论依据。

2. 基于酶切扩增分型技术

2.1. PCR-限制性片段长度多态性

PCR-限制性片段长度多态性技术是传统 RFLP (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)技术的演变。传统 RFLP 技术是利用限制性核酸内切酶酶切菌体染色体 DNA 形成特定 DNA 片段,然后利用电泳技术对限制性片段进行常规分型[9]。而 PCR-RFLP 技术是先通过 PCR 扩增相应的目的片段(片段位于 DNA 保守区),再对 PCR 产物进行酶切、电泳,最后通过观察比较限制性图谱分析序列之间的差异进行分型。

Shima 等[10]利用 PCR-RFLP 方法对 202 株 STEC O157 片段 V 的多样性进行流行病学调查分析,结果显示 202 株菌可以分型为 24 组且这些菌株具有时间和空间上的相关多态性,并将分型结果与 PFGE 相比较,结果表明 PCR-RFLP 是一种更实用、更可靠的 STEC 分型方法。类似的研究也可见于 Shridhar 等[11]采用同样分型方法对 192 株非 O157 型 STEC 志贺毒素基因进行分型研究。除此之外,PCR-RFLP 还应用与沙门氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌等分型研究[12] [13] [14]。虽然 PCR-RFLP 技术应用广泛,但其实验操作复杂,实验周期长,已不能完全满足当今对食源性致病菌快速、准确分型的要求。

2.2. 扩增性片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)

1995 年,Colleague 和 Vos 首次提出了 AFLP 技术[15],原理是基于选择性基因组的一部分限制性片段实现分型,即用限制性核酸内切酶酶切菌体 DNA,获得分子量不同的限制性片段,使用特定互补双链接头与限制性片段连接作为扩增的模板,接头序列含有核心序列和酶特异性序列,为 PCR 引物结合和限制性片段扩增的靶点,接头和与接头相邻的酶切片段的碱基序列是引物结合位点,3 个选择性核酸加在接头 3'端为粘性末端。

AFLP 结合了 RFLP 和 RAPD (随机扩增多态性 DNA 标记)技术特点,是一种非常快速和相对简单的实验室工作[16]。Hahm BK 等[17]采用 AFLP、rep-PCR 和 PFGE 对 54 株 STEC 分型,结果显示 AFLP 要比 PFGE 更快速、简便区分 STEC 分离株。除此之外,该方法另外一个优点是不需要提前了解菌株的序列信息,可以鉴别任何种类菌株,因此,AFLP 技术应用非常广泛[18] [19] [20]。然而,该方法在检测菌株方面存在局限性,如显性标记不易转化成位点特异标记,DNA 纯度及内切酶质量要求高等。随着 AFLP 技术的发展和完善,目前,已经出现了一些新的 AFLP 技术如三限制性酶切 AFLP (TE-AFLP)、二次消化 AFLP (SD-AFLP)、单限制性酶切 AFLP (SADF-AFLP)等[21]技术。张平平等[22]利用 SADF-AFLP 技术对 113 株 O157:H7 血清型 STEC 基因分型,通过此分型技术发现 STEC 在不同地区和不同物种之间存在相互传播。

2.3. 脉冲凝胶电泳(Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)

PFGE 是将染色体 DNA 用限制性核酸内切酶消化, 产生 DNA 大片段, 通过改变外加正交变脉冲电场的方向、时间及电流大小, 将大小不同的 DNA 分子分开, 产生不同的电泳图谱, 再利用 BioNumerics 软件生成直观的条带和聚类树状图, 从而确定菌株间的亲缘关系。在流行病学调查、疾病爆发监测和菌群溯源等方面, PFGE 被认为是最经典的方法。通过计算机处理 PFGE 数据, 能够准确解释菌株亚型的数据信息[23], 具有分辨率高的优点。美国 PulseNet 通过标准菌株的应用实现 PFGE 实验方法的标准化, 被誉为细菌分子学分型技术的“金标准”。

王丽丽等[24]利用 *Swal*、*Smal* 和 *Apal* 三种内切酶酶切 STEC 基因组, 采用 PFGE 方法将 300 株 STEC 分型, 共获得 161 种表型, 初步建立了我国 STEC 菌株的 PulseNet 数据库, 且该数据库具有与其它国家数据库共享的潜力。类似的, Cotruta 等[25]采用 PFGE 方法将 15 株 STEC 菌株 O26 血清型分成 14 种脉冲型, Mariana 等[26]采用 PFGE 方法证明 O157 和非 O157 血清型分离株在同一批动物中间存在交叉污染。尽管 PFGE 分辨率高, 有标准的实验操作流程, 然而 PFGE 实验流程长, 对暴发菌株不能快速、准确的分型。目前 PFGE 技术常与 WGS 技术联合应用于基因分型。

3. 基于高通量 WGS 分型技术

高通量测序技术近几年发展迅猛, 它不仅能对单一物种进行深入的全基因组测序以及重测序, 也可以对多种物种基因信息进行高效、准确的遗传差异分析, 为微生物分型提供了更为有利的分析工具。在 STEC 分离株基因分型上, WGS 技术应用主要体现在单核苷酸多态性分型(SNPs)、基于核心基因组多位点序列分型(cgMLST)。

3.1. 基于 SNPs 分型

SNPs 分型主要根据菌株基因组特定位点碱基突变分型菌株, 突变位点可以通过参考序列与组装的 contigs 比对来完成[27]。SNPs 分型方法选择的参考基因组序列必须与测序样本具有高度的亲缘性, 否则在比对时会增加错配的机率。

Baha Abdalhamid 等[28]对 7 株非 O157 血清型的 STEC 采用 SNPs 血清分型, 结果显示 7 株菌株中 6 株菌株血清型为 O26:H11, 一株菌为 O182:H25。除此之外, 由于 STEC 菌株在分离过程中很容易受背景菌干扰, 导致 STEC 很难从样品中分离鉴定。为了消除背景菌的干扰, Singh Novjot 等[29]基于 WGS 技术创建 RNA 诱饵富集方法直接分析样品中的 STEC, 通过分析测序获得高质量 SNPs, 对样品中 STEC 直接血清型分析, 这种方法无需获得 STEC 分离株, 从而减少疫情溯源的成本和时间。同样的研究也见于 Claire Jenkins 等[30]通过分析两个暴发群 STEC 分离株 SNPs, 获得两个暴发群部分 STEC 分离株的共祖。因此, 作为第三代分子标记技术, SNPs 分型能力强、效率高、分辨率高, 但是实验标准不统一, 重复性差, 且该技术需要一定的计算机操作技能。

3.2. 基于 cgMLST 分型

1998 年, Maiden 等[31]提出 MLST 方法, 该方法是建立在 MLEE (multilocus enzyme electrophoresis, MLEE)的基础上, 根据 ECMLST (<https://www.shigatox.net/stec/cgi-bin/index>)数据库提供的分型方案, 一般测定 6~10 管家基因内部 400~600 bp 片段的 DNA 序列, 根据每个位点发现时间的先后顺序赋予其一个等位基因编号, 通过分析菌株的等位基因编号排列组成等位基因谱, 该等位基因谱对应唯一的编号, 即为此菌的序列型(sequence type, ST) [31]。该分型方法能够提供精确便携的数据, 能较好地反应出进化和菌群生物学变异。在 MLST 的基础上扩展的 cgMLST 以 WGS 数据为基础, 在构建核心基因组和分型的过

程中, 确保 MLST 管家基因存在于核心基因集合中, 然后再将构建获得的最小生成树同已有的数据进行比对, 保证分型结果的一致性。

Magdalena 等[32]采用 cgMLST 对 18 株 EHEC O80:H2 血清型分型, 结果显示 18 株 EHEC 均属于 ST301, 且 cgMLST 趋向于根据不同的毒力基因将菌株分为不同的簇, 通过构建最小生成树追溯毒力基因的进化。类似研究也见于邵纯纯等[33]采用 cgMLST 对 35 株 STEC 分型, 共获得 14 个序列型。其中 O157:H7 有 8 株, 将这 8 株菌通过与数据库中进行比较, 8 株 O157:H7 产生了变异。

综上所述, cgMLST 分型方法分辨率高, 对菌株之间的细微变异扫描灵敏, 为菌种鉴定及流行病学研究贡献了大量重要的数据基础。然而该方法操作较为复杂, 且不同的实验方案获得不同结果影响实验室数据的比较、共享。

4. 其他基因分型方法

4.1. 基于 MLVA 分型

MLVA 是选用多个数目可变串联重复序列(Variable number of tandem repeat, VNTR)位点分型的方法, 具有简单、通量高、分辨率高等特点。通过对菌株测序, 可获得大量高度保守的重复序列片段, 利用重复序列片段的长度、拷贝数、位点不同等特征可进行菌株分型。MLVA 分型方法要求采用的 VNTR 位点具备稳定性, 否则分型结果容易出现误差。所采用的稳定位点由中间的核心区和外围的侧翼区组成, 核心区含有两个或者两个以上头尾串联重复的短片段序列, 每个片段长度 6~40 bp 不等, 重复次数从几次到几百次不等[34]。

Bai 等[35]采用 MLVA 对 30 株来自中国不同地区 O157 血清型 STEC 分型研究, 共获得 23 个表型, 通过与 PFGE 及 MLST 分型结果比较, 表明 O157 血清型 STEC 在食品加工过程中存在交叉污染。相似的研究也见于 Chris 等[36]采用 MLVA、PFGE 对 84 株临床非 O157 血清型 STEC 分型, 结果表明 MLVA 在 O26、O111、O103 以及 O121 STEC 具有更准确的分型。除此之外, MLVA 技术也逐渐扩展到其它常见食源性致病菌的分型和流行病学溯源, 如沙门氏菌、单增李斯特菌及金黄色葡萄球菌等[37] [38]。MLVA 技术在食源性致病菌的分型研究中应用广泛, 但该技术仍有一些缺点限制了 MLVA 的应用, 如需要高质量特异性引物、不同实验室获得的结果不能共享和比较, 在国际上并没有统一的标准物质等。随着 STEC 全基因组序列的公布, 越来越多的 MLVA 数据库在逐步建立和完善。为了便于不同实验室研究结果的比较和分析, 需建立统一操作规程、试验标准等, 进而构建全球或者地区统一 MLVA 数据库, 使 MLVA 分型技术在 STEC 分型发挥更大作用。

4.2. 基于 DNA 微阵列分型

DNA 微阵列又称 DNA 芯片技术, 是一种程序化、规模化的基因分型技术, 原理是先将基因片段有序的排列在处理过的载体上制成芯片, 待测样品用荧光标记后与芯片杂交, 最后通过荧光扫描及计算机的分析, 获取样品核酸信息[39] [40]。

目前, 一些 DNA microarray 方法已经被用来鉴定分型 STEC。Quinones B 等[41]以 *stx1*、*stx2* 以及 *eae* 为靶点, 设计低密度 30-聚体寡核苷酸 DNA microarray 方法并结合光聚合比色方法对 6 株不同来源 O157 血清型 STEC1 株非 STEC 进行快速、准确基因分型。类似地, Quinones B 等[42]设计的以 O 抗原基因簇为靶点, 采用低密度 30-聚体寡核苷酸 DNA microarray 方法对 11 株不同来源、血清型 STEC 也可以快速、准确基因分型。但是也有报道 DNA microarray 方法使用荧光分析会出现空间阻隔作用导致实验灵敏度降低[43]。

DNA microarray 能同时筛选多组特定基因标记, 可用于在大量样本中对 STEC 进行快速准确的基因

分型。除此之外,相比于 WGS 技术, DNA microarray 不需要分析大量的序列,是一种值得推广的方法。

4.3. 基于 CRISPR 分型

CRISPR 广泛分布在细菌和古细菌中,具有高度多样化的遗传结构。CRISPR 由一段不连续的正向重复序列和插入其中的间隔序列组成。对于同一物种而言,大多数 CRISPR 位点的重复序列具有高度的保守性,而间隔序列则具有高度多态性,因此基于间隔序列,CRISPR 分型分析可用于病原菌的分型、鉴定及检测等[44],如已应用于结核分枝杆菌、沙门氏菌、单增李斯特菌、空肠弯曲杆菌等菌株的分型和进化研究中[45] [46] [47] [48]。

作为一种新兴的分型技术,采用 CRISPR 技术探究 STEC 的分型研究很少,Delannoy 等[49]采用 CRISPR 技术对 7 种重要的 STEC 进行实时荧光 PCR 检测分析,结果显示毒力基因与 O:H 血清型存在特定的相关性。梁文娟等[50]采用 CRISPR 分型技术对 705 株 STEC 分型,结果显示 CRISPR 分型效果要比 PFGE 具有更高的分辨率。CRISPRs 作为一种新颖基因分型研究方法,为 STEC 快速准确鉴定和预防提供新的思路。

5. 结语

由于 STEC 对公共卫生构成重大威胁,且存在大规模暴发的可能性,有必要采用效率高、分辨率高的分型方法进行有效监测。本文主要综述了 STEC 基因分型方法的研究进展,比较了基因分型方法与传统血清分型方法的异同点,分析了基因分型技术在 STEC 分型应用中的优点及局限性。鉴于 STEC 血清型复杂繁多,不同血清型菌株毒力、耐药等表型不同,需多种基因分型技术相结合开展回溯性分析,使 STEC 分型更加快速、准确。

基金项目

浙江省农业科学院省部共建农产品质量安全国家重点实验室(筹)开放基金课题(2010DS700124-KF2001)“鲜食蔬菜中致病性大肠杆菌基因组多态性与微进化研究”。

参考文献

- [1] Gonzalez, C.A. (2020) Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in the Animal Reservoir and Food in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, **128**, 1268-1282. <https://doi.org/10.1111/jam.14500>
- [2] Amézquita-López, Bianca, A., Soto-Beltrán, et al. (2018) Isolation, Genotyping and Antimicrobial Resistance of Shiga Toxin-Producing, *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, **51**, 425-434. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.07.004>
- [3] 顾玲, 祖荣强, 周璐, 等. 徐州地区 73 株大肠杆菌 O157:H7 的遗传多样性分析[J]. 江苏预防医学, 2019, 30(1): 36-38.
- [4] Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., et al. (2003) Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. *Clinical Microbiology*, **41**, 4930-4940. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.4930-4940.2003>
- [5] Mathusa, E.C., Chen, Y., Enache, E., et al. (2010) Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Foods. *Journal of Food Protection*, **73**, 1721-1736. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.9.1721>
- [6] Ørskov, I., Ørskov, F., Jann, B., et al. (1977) Serology, Chemistry, and Genetics of O and K Antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriological Reviews*, **41**, 667-710. <https://doi.org/10.1128/MMBR.41.3.667-710.1977>
- [7] Brendon, P., Nathan, Z., Byron, B., et al. (2016) Detection, Characterization, and Typing of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 478-490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00478>
- [8] Lacher, D.W., Gangiredla, J., Jackson, S.A., et al. (2014) Novel Microarray Design for Molecular Serotyping of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Fresh Produce. *Applied & Environmental Microbiology*, **80**, 4677-4682. <https://doi.org/10.1128/AEM.01049-14>

- [9] Ayala, C.D., Moreno, A.C., Martinez, M.B., *et al.* (2012) Determination of Flagellar Types by PCR-RFLP Analysis of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga Toxin-Producing *E. coli* (STEC) Strains Isolated from Animals in São Paulo, Brazil. *Research in Veterinary Science*, **92**, 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.025>
- [10] Shima, K., Wu, Y., Sugimoto, N., *et al.* (2006) Comparison of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Assay to Pulsed-Field Gel Electrophoresis to Determine the Effect of Repeated Subculture and Prolonged Storage on RFLP Patterns of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**, 3963-3968. <https://doi.org/10.1128/JCM.00717-06>
- [11] Pragathi, S., Chris, S., Noll, L.W., *et al.* (2017) Shiga Toxin Subtypes of Non-O157 *Escherichia coli* Serogroups Isolated from Cattle Feces. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **7**, 121. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00121>
- [12] Murgia, M., Rubino, S., Wain, J., *et al.* (2016) A Novel Broadly Applicable PCR-RFLP Method for Rapid Identification and Subtyping of H58 *Salmonella* Typhi. *Journal of Microbiological Methods*, **127**, 219-223. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.018>
- [13] Rousseaux, S., Olier, M., Lemaitre, J., *et al.* (2004) Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of inlA for Rapid Screening of *Listeria monocytogenes* Strains Deficient in the Ability to Invade Caco-2 Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 2180-2185. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2180-2185.2004>
- [14] Sohail, M. and Latif, Z. (2018) Molecular Typing of Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Device Related Infections by SCCmec and PCR-RFLP of Coagulase Gene. *Advancements in Life Sciences*, **6**, 34-40.
- [15] Pieter, V., Rene, H., Marjo, B., *et al.* (1995) AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- [16] Mueller, W. (1999) AFLP Genotyping and Fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution*, **14**, 389-394. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01659-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01659-6)
- [17] Hahm, B.K., Maldonado, Y., Schreiber, E., *et al.* (2003) Subtyping of Foodborne and Environmental Isolates of *Escherichia coli* by Multiplex-PCR, rep-PCR, PFGE, Ribotyping and AFLP. *Journal of Microbiological Methods*, **53**, 387-399. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00259-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00259-2)
- [18] Vittorio, L. (2003) AFLP: A Useful Tool for Biodiversity Conservation and Management. *Comptes Rendus Biologies*, **326**, 43-48. [https://doi.org/10.1016/S1631-0691\(03\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(03)00026-X)
- [19] Zhi, Y.W., Kwok, H.T. and Ka, H.C. (2004) Applications of AFLP Technology in Genetic and Phylogenetic Analysis of Penaeid Shrimp. *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**, 399-407. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.10.006>
- [20] Lee, J.H. and Han, T.H. (2006) Identification of Parental Species of the *Alstroemeria* cv. Jubilee Using AFLP Marker Technique. *Scientia Horticulturae*, **111**, 63-67. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.08.001>
- [21] 田舜, 李韬. AFLP 技术操作流程的变革及其衍生技术[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2006, 27(4): 62-66.
- [22] 张平平. 江苏省大肠杆菌 O157:H7 的 RAPD 和 AFLP 分子分型分析[D]: [硕士学位论文]. 南京: 东南大学, 2010.
- [23] Neves, E., Lourenc, A., *et al.* (2008) Pulsed-Field Gelelectrophoresis (PFGE) Analysis of *Listeria monocytogenes* Isolates from Different Sources and Geographical Origins and Representative of the Twelve Serovars. *Systematic and Applied Microbiology*, **31**, 387-392. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.08.005>
- [24] 王丽丽. 我国大肠杆菌 O157 和猪链球菌脉冲场凝胶电泳分析[D]: [硕士学位论文]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2006.
- [25] Codruța, R.U., Ciontea, A.S., Condei, M., *et al.* (2017) Molecular Characterisation of Human Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26 Strains: Results of an Outbreak Investigation, Romania, February to August 2016. *Eurosurveillance*, **22**, 17-24. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.47.17-00148>
- [26] Mariana, C., Carbonari, C., Beatriz, A., *et al.* (2018) Frequency, Characterization and Genotypic Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Beef Slaughterhouses of Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, **51**, 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.03.005>
- [27] Schurch, A.-A., *et al.* (2018) Whole Genome Sequencing Options for Bacterial Strain Typing and Epidemiologic Analysis Based on Single Nucleotide Polymorphism versus Gene-by-Gene-Based Approaches. *Clinical Microbiology and Infection*, **24**, 350-354. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.016>
- [28] Abdalhamid, B., *et al.* (2019) Whole Genome Sequencing to Characterize Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26 in a Public Health Setting. *Infect Public Health*, **12**, 884-889. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.008>
- [29] Navjot, S., Pascal, L., Tammy, Q., *et al.* (2019) Whole-Genome Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis Applied Directly to Stool for Genotyping Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: An Advanced Molecular Detection Method for Foodborne Disease Surveillance and Outbreak Tracking. *Journal of Clinical Microbiology*, **57**, 307-319. <https://doi.org/10.1128/JCM.00307-19>

- [30] Claire, J., Dallman, T.J. and Grant, K.A. (2019) Impact of Whole Genome Sequencing on the Investigation of Food-Borne Outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serogroup O157:H7, England, 2013 to 2017. *Eurosurveillance*, **24**, 84-90. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.4.1800346>
- [31] Maiden, B., *et al.* (1998) Multilocus Sequence Typing: A Portable Approach to the Identification of Clones within Populations of Pathogenic Microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 3140-3145. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>
- [32] Nüesch-Inderbilen, M., Nicole, C., Wüthrich, D., *et al.* (2018) Genetic Characterization of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* Belonging to the Emerging Hybrid Pathotype O80:H2 Isolated from Humans 2010-2017 in Switzerland. *International Journal of Medical Microbiology*, **308**, 534-538. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.05.007>
- [33] 邵纯纯. 不同来源产志贺毒素大肠埃希菌的分子流行病学研究[D]: [硕士学位论文]. 济南: 山东大学, 2017.
- [34] 唐学明. 数目可变的串联重复顺序(VNTR)的研究方法进展[J]. 国外医学遗传学分册, 1994(3): 120-124.
- [35] Bai, L., Guo, Y., Lan, R., *et al.* (2015) Genotypic Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Isolates in Food Products from China between 2005 and 2010. *Food Control*, **50**, 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.045>
- [36] Timmons, C., Trees, E., *et al.* (2016) Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis for Strain Discrimination of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, **125**, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2016.04.005>
- [37] Marie-Léone, V., Emeline, C., Muriel, M., *et al.* (2017) MLVA for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Dublin: Development of a Method Suitable for Inter-Laboratory Surveillance and Application in the Context of a Raw Milk Cheese Outbreak in France in 2012. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 295. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00295>
- [38] Bai, Y., Wang, W., Yan, L., *et al.* (2018) Molecular Typing Characterization of Food-Borne Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in China. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, **52**, 364-371.
- [39] Liu, Y.H. and Fratamico, P. (2006) *Escherichia coli* O Antigen Typing Using DNA Microarrays. *Molecular and Cellular Probes*, **20**, 239-244. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2006.01.001>
- [40] Zhang, F., Hu, S., Huang, J., *et al.* (2006) Development and Clinical Evaluation of Oligonucleotide Microarray for HLA-AB Genotyping. *Pharmacogenomics*, **7**, 973-985. <https://doi.org/10.2217/14622416.7.7.973>
- [41] Quinones, B., Swimley, M.S., Taylor, A.W., *et al.* (2011) Identification of *Escherichia coli* O157 by Using a Novel Colorimetric Detection Method with DNA Microarrays. *Foodborne Pathogens and Disease*, **8**, 705-711. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0753>
- [42] Quinones, B., Swimley, M.S., Narm, K.E., *et al.* (2012) O-Antigen and Virulence Profiling of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* by a Rapid and Cost-Effective DNA Microarray Colorimetric Method. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*, **2**, Article No. 61. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00061>
- [43] Kuck, L.R. and Taylor, A.W. (2008) Photopolymerization as an Innovative Detection Technique for Low-Density Microarrays. *Bio-Techniques*, **45**, 179-186. <https://doi.org/10.2144/000112889>
- [44] Shariat, N., Dudley, *et al.* (2014) CRISPRs: Molecular Signatures Used for Pathogen Subtyping. *Applied and Environment Microbiology*, **80**, 430-439. <https://doi.org/10.1128/AEM.02790-13>
- [45] Groenen, P.M., Bunschoten, A.E., Soolingen, D., *et al.* (1993) Nature of DNA Polymorphism in the Direct Repeat Cluster of *Mycobacterium tuberculosis*: Application for Strain Differentiation by a Novel Typing Method. *Molecular Microbiology*, **10**, 1057-1065. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x>
- [46] Li, H., Li, P., Xie, J., *et al.* (2014) A New CRISPR Loci Spacer-Pair Typing (CLSPT) Method Based on The Newly Incorporated Spacer for *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, **52**, 2955-2962. <https://doi.org/10.1128/JCM.00696-14>
- [47] 狄慧玲. 单核细胞增生李斯特菌分子分型研究及 CRISPR/Cas 系统解析[D]: [博士学位论文]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- [48] Schouls, L.M., Reulen, S., Duim, B., *et al.* (2003) Comparative Genotyping of *Campylobacter jejuni* by Amplified Fragment Length Polymorphism, Multilocus Sequence Typing, and Short Repeat Sequencing: Strain Diversity, Host Range, and Recombination. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**, 15-26. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.15-26.2003>
- [49] Delannoy, B. and Fach, P. (2012) Use of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat Sequence Polymorphism for Specific Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains of Serotypes O26:H11, O45:H2, O103:H2, O111:H8, O121:H19, O145:H28, and O157:H7 by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**, 4035-4040. <https://doi.org/10.1128/JCM.02097-12>
- [50] 梁文娟. 基于 CRISPRs 的大肠埃希菌分型方法及其与耐药和毒力关系[D]: [博士学位论文]. 郑州: 郑州大学, 2017.