

· 实验室研究 ·

基于不同方法的大肠埃希菌分型效果评价

梁文娟¹ 胡爱玲¹ 龙金照² 朱金钦¹ 段广才²¹新乡医学院公共卫生学院流行病与卫生统计教研室, 新乡 453003; ²郑州大学公共卫生学院流行病教研室, 郑州 450001

通信作者: 梁文娟, Email: wenwen3_1@126.com

【摘要】 目的 评价并验证成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPRs)、血清学和多位点测序分型(MLST)方法对大肠埃希菌分型的效果。方法 使用CRISPRsFinder分析大肠埃希菌全基因组序列的CRISPRs间隔序列,使用在线软件SeroTypeFinder和MLST获得血清型和序列型(ST);采用PCR扩增并分析349株大肠埃希菌CRISPRs,使用CRISPRs间隔序列预测血清型和ST,并比较血清学和MLST分型结果。结果 将I-E型CRISPR/Cas、I-F型CRISPR/Cas和CRISPR3-4分别命名CT-I、CT-II和CT-III。根据CRISPRs间隔序列构成和排列进一步进行分型,203株大肠埃希菌被分为79个CT型别,76个血清型和66个ST。CRISPRs分型的区分能力最强,辛普森指数为0.936。CRISPRs和血清学的关联程度最高,调整兰德指数为0.908。CRISPRs型能进一步区分相同血清或ST产志贺毒素的大肠埃希菌[O157:H7(ST11)、O104:H4(ST678)和O26:H11(ST21)]菌株。扩增实验室菌株的CRISPR1、CRISPR2、CRISPR3、CRISPR4和CRISPR3-4,检出率分别为81.1%、94.5%、1.4%、1.4%和4.6%;根据CRISPRs间隔序列预测O157:H7(ST11)和ST131准确率分别为95.0%和100.0%。结论 基于CRISPRs的大肠埃希菌的分子分型方法呈现较好的分型效果和临床应用效果,预期可以成为大肠埃希菌分型的重要分子标志物。

【关键词】 大肠埃希菌; 成簇规律间隔短回文重复序列; 血清型; 多位点测序分型

基金项目:新乡医学院博士课题(XYBSKYZZ201805)

Evaluation of effect based on different typing methods in *Escherichia coli*Liang Wenjuan¹, Hu Ailing¹, Long Jinzhao², Zhu Jinqin¹, Duan Guangcai²¹Department of Epidemiology and Statistics, School of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; ²Department of Epidemiology, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Corresponding author: Liang Wenjuan, Email: wenwen3_1@126.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the typing and clinical application effect based on clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs), serotype, and Multilocus Sequence Typing (MLST). **Methods** The spacers, serotype and sequence type (ST) were obtained with CRISPRsFinder, SeroTypeFinder and MLST. PCR was used to amplify the CRISPRs, and the spacers were used to predict serotype and ST, then comparing with the serotype and ST. **Results** We defined the I-E CRISPR/Cas as CT-I, I-F CRISPR/Cas as CT-II, and only CRISPR3-4 as CT-III. We designated each unique arrangement spacer profile as a unique CRISPRs type. A total of 79 CT types, 76 serotypes, and 66 STs were identified. The CRISPRs typing was the most discriminating, with the Simpson index of 0.936, having the highest correlation with serology with the adjusted Rand index of 0.908. The CRISPRs type could divide the same serotype (ST) into two subtypes [O157:H7(ST11), O104:H4(ST678), and O26:H11(ST21)]. The detection rates of CRISPR1, CRISPR2, CRISPR3, CRISPR4, and CRISPR3-4 were 81.1%, 94.5%, 1.4%, 1.4%, and 4.6%, with the accuracy rate of 95.0% and 100.0% according to the spacers to forecast O157:H7 (ST11) and ST131. **Conclusion** Based

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220303-00167

收稿日期 2022-03-03 本文编辑 万玉立

引用格式: 梁文娟, 胡爱玲, 龙金照, 等. 基于不同方法的大肠埃希菌分型效果评价[J]. 中华流行病学杂志, 2022, 43(8): 1321-1325. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220303-00167.

Liang WJ, Hu AL, Long JZ, et al. Evaluation of effect based on different typing methods in *Escherichia coli*[J]. Chin J Epidemiol, 2022, 43(8):1321-1325. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220303-00167.

on the CRISPRs spacer, this method can be used as an essential molecular typing for *E. coli*, as it presents a good typing and clinical application effect.

【Key words】 *Escherichia Coli*; Clustered regularly interspaced short palindromic repeats; Serotyping; Multilocus sequence typing

Fund program: Doctor Project of Xinxiang Medical College (XYBSKYZZ201805)

细菌分型是疫情调查、监测和系统发育研究的重要工具,在流行病学溯源调查中发挥重要作用^[1]。目前大肠埃希菌的分型方法主要有血清学分型、脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)、多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)^[2]等,其中血清型长期用于致病大肠埃希菌分型,但对于新发未知菌株,在确定其血清型时,耗费时间、人力和物力;MLST是基于DNA序列的分子生物学分型技术,该法对大肠埃希菌7个管家基因 *adh*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA* 和 *recA* 进行扩增测序,将测序结果与MLST数据库进行比对获取菌株的分型结果,即序列型(sequence type, ST),该方法数据结果可用于大规模和长期流行病学监测。

成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPRs)由一段不连续的重复序列和高度多变的间隔序列组成,细菌在进化过程中不断捕获更新外源可移动元件如噬菌体或质粒,形成更加动态多变间隔序列(spacer)。基于CRISPRs间隔序列的细菌分型,一定程度上不仅能反映细菌内在的遗传关系,还能显示出进化路径关系^[3]。在大肠埃希菌中存在I-E型或I-F型CRISPR/Cas系统,CRISPR1、紧邻的 *cas* 和下游 20 kb 的 CRISPR2 共同组成 I-E 型 CRISPR/Cas 系统,CRISPR3 及下游的 *cas* 和 CRISPR4 位点共同组成 I-F 型 CRISPR/Cas 系统。课题组前期发现 CRISPRs 的间隔序列的多态性可以作为大肠埃希菌分子分型的靶标^[4],但是并未将 I-F 型 CRISPR/Cas 和 CRISPR3-4 纳入大肠埃希菌的分型体系,且未与 MLST 和血清型方法进行比较。本研究选取 203 株全基因组序列测序不同致病类型的大肠埃希菌,分析 CRISPR/Cas 的结构特征,建立 CRISPRs 大肠埃希菌的分型方法,并与 MLST 和血清分型方法比较,同时扩增实验室保存的 349 株大肠埃希菌的 CRISPRs 并测序分析,评价其分型效果。

材料与方法

1. 菌株:选取 GenBank 中 203 株大肠埃希菌全

基因组序列和 349 株实验室保存的大肠埃希菌。试验菌株主要来自 2014–2015 年新乡医学院第三附属医院和河南省商丘睢县腹泻哨点监测医院,所有实验室菌株均进行 API 鉴定。

2. 主要仪器和试剂:诊断血清购自中国宁波天润生物药业有限公司;API20E 生化鉴定板条购自法国生物梅里埃公司;PTC-100 型基因体外扩增仪,加拿大 MJ Research 公司;DYY-8C 型稳压稳压定时电泳仪购自中国北京六一仪器厂;Gene snap 图像扫描仪购自美国 Syngene 公司。

3. 203 株大肠埃希菌全基因组序列分型:
①CRISPRs 的识别和间隔序列分析:具体方法参考文献[4]。②血清型:通过在线软件 SeroTypeFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/serotypefinder/>) 获得。③MLST 分型:通过在线软件 MLST Finder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/mlst/>) 获得 ST。

采用辛普森指数评价 3 种分型方法的分辨率;采用调整兰德指数(adjusted Rand index)评价任意 2 种分型方法之间吻合程度。采用 R 4.1.3 软件计算相应指标,数值越大分别代表分辨率越高和吻合程度越强。

4. 349 株实验室保存的大肠埃希菌分型:
①CRISPRs 和 MLST 的检测:采用煮沸法提取大肠埃希菌 DNA,采用 PCR 扩增 CRISPRs 和大肠埃希菌 7 个管家基因 *adh*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA*、*recA*, CRISPR1、3、4 引物序列参考相关文献[5], CRISPR2 和 CRISPR3-4 引物序列参考文献[6]。7 个管家基因的引物和扩增程序参考 MLST 官网 (<http://www.mlst.net>)。CRISPRs 和 MLST 管家基因扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序、结果拼接。测得 CRISPRs 序列使用 CRISPRsFinder 分析,管家基因上传 MLST 官网获得 ST。②血清学鉴定:使用诊断血清确定血清型,具体方法参照产品说明书。

结 果

1. 大肠埃希菌 CRISPRs 的间隔序列:203 株大肠埃希菌全基因组序列中,有 151 株大肠埃希菌存

在 I-E 型 CRISPR/Cas, 其中 CRISPR1 和 CRISPR2 中存在 1 337 条和 1 216 条间隔序列(各包含 339 条和 346 条独特的间隔序列); 有 19 株存在 I-F 型 CRISPR/Cas, 其中 CRISPR3 和 CRISPR4 中存在 155 条和 180 条间隔序列(包含 57 条和 66 条独特的间隔序列); 35 株无 I-E 型和 I-F 型 CRISPR/Cas, 仅在 I-F 型 CRISPR/Cas 的位置留有一段序列, 即 CRISPR3-4, 共发现 40 条间隔序列和 5 条独特的间隔序列。

2. 基于 CRISPRs 的大肠埃希菌分型: 将 I-E CRISPR 定义为 CT- I、I-F 型 CRISPR 定义为 CT- II、CRISPR3-4 定义为 CT- III, 即基于 CRISPRs 将大肠埃希菌分为 3 个型别, 然后基于每个 CRISPRs 间隔序列构成和排列顺序, 将其分为相应的亚型, 203 株大肠埃希菌被分为 79 个 CT 亚型, 其中 CT- I 型 64 个, CT- II 型为 9 个, CT- III 型为 6 个。

3. 评价 CRISPRs 对大肠埃希菌的分型效果: 203 株大肠埃希菌分成 76 个血清型和 66 个 ST。采用辛普森指数评价 3 种分型方法的分辨率, 结果显示 CRISPRs 的辛普森指数为 0.936, 略高于血清型(0.935)和 MLST(0.933)。采用调整兰德指数评估任意 2 种分型方法之间吻合程度, 结果显示 CRISPRs 和血清学的一致程度最高为 0.908, CRISPRs 和 MLST 的一致程度为 0.761, 血清学和 MLST 的一致程度最低为 0.738。

部分菌株的 CRISPRs 亚型与 ST 和(或)血清型具有严格的一致性: 比如 CT- I 3 与 O55: H7 和 ST335; CT- III 1 与 O7: H45 和 ST62; CT- III 5 与 ST131 等。见表 1。

表 1 大肠埃希菌 CRISPRs 型与 ST 和(或)血清型的一致性

代表菌株	血清型	ST	CRISPRs 型	菌株数目
CB9615	O55: H7	335	CT- I 3	3
CFSAN004176	O145: H25	-	CT- I 6	2
W	O6: H49	1 079	CT- I 9	4
11128	O111: H8	16	CT- I 17	2
GB089	O168: H8	718	CT- I 30	2
BW2952	O16: H48	10	CT- I 40	43
ETEC H10407	O78: H11	48	CT- I 50	2
IA139	O7: H45	62	CT- III 1	2
536	O6: H31	127	CT- III 2	3
B str. REL606	O7/O7: H4	93	CT- I 27	11
str.'clone D i14'	O6: H1/O25: H1	73	CT- III 4	7
JJ1886	O25: H4/O16: H5	131	CT- III 5	20

注: CRISPRs: 成簇规律间隔短回文重复序列; ST: 序列型; -: 新的型别

CRISPRs 型能将相同血清型和(或)ST 的大肠埃希菌分成不同的亚型: 将大肠埃希菌 O157: H7, O104: H4, O26: H11, O83: H1 分成 2 类, 分别分成 CT- I 4 和 CT- I 5, CT- I 11 和 CT- I 12, CT- I 15 和 CT- I 16, CT- II 1 和 CT- II 2 (表 2); 将 ST95 菌株分为 4 类: CT- II 3, CT- II 4, CT- II 6 和 CT- II 7 (表 3); 将 O145: H28 分成 2 类, ST6130 与 CT- I 1, ST32 与 CT- I 2 两类(表 2)。表现部分相同 ST 和(或)CRISPRs 型的大肠埃希菌其血清型表现多样化(表 3)。不同血清型菌株如大肠埃希菌 12009 (O103: H2), 11368 (O26: H11) 和 11128 (O111: H8) 既具有部分相同的间隔序列, 也存在不同的间隔序列, 可显示进化的亲缘关系。

表 2 CRISPRs 型区分相同血清型和(或)ST 的大肠埃希菌

代表菌株	血清型	ST	CRISPRs 型	菌株数目
EDL933	O157: H7	11	CT- I 4	15
O157 180-PT54	O157: H7	11	CT- I 5	2
55989	O104: H4	678	CT- I 11	1
2009EL-2050	O104: H4	678	CT- I 12	5
O26: H11 str. 11368	O26: H11	21	CT- I 15	1
FORC_028	O26: H11	21	CT- I 16	1
LF82	O83: H1	135	CT- II 1	1
O83: H1 str. NRG 857C	O83: H1	135	CT- II 2	1
RM12761	O145: H28	6 130	CT- I 1	2
RM12581	O145: H28	32	CT- I 2	2

注: CRISPRs: 成簇规律间隔短回文重复序列; ST: 序列型

表 3 相同 ST 和(或)CRISPRs 型大肠埃希菌的血清型

代表菌株	血清型	ST	CRISPRs 型	菌株数目
IHE3034	O18: H7	95	CT- II 3	5
strain SF-173	O18ac: H7	95	CT- II 3	1
strain SF-166	O1: H7	95	CT- II 4	1
APEC O1	O1: H7	95	CT- II 6	1
S88	O45: H7	95	CT- II 6	1
strain SF-468	O25: H4	95	CT- II 6	1
strain SF-088	O1: H7	95	CT- II 7	1
str.'clone D i14'	O6: H1	73	CT- III 4	6
ABU 83972	O25: H1	73	CT- III 4	1
JJ1886	O25: H4	131	CT- III 5	16
NA114	H4	131	CT- III 5	1
MVAST0167	O16: H5	131	CT- III 5	3

注: ST: 序列型; CRISPRs: 成簇规律间隔短回文重复序列

4. 实验验证基于 CRISPRs 的大肠埃希菌分型效果: 收集并鉴定大肠埃希菌 349 株, 其中 134 株分离于 2014 年河南省新乡市; 215 株分离于河南省睢县(2002 年 40 株, 2014 年 175 株)。PCR 扩增 CRISPR1、CRISPR2、CRISPR3、CRISPR4 和 CRISPR3-4, 其检出率分别为 81.1%(283 株)、94.5%

(330 株)、1.4%(5 株)、1.4%(5 株)和 4.6%(16 株)。PCR 产物测序结果使用 CRISPRsfinder 或者 BLAST 分析间隔序列,根据 CRISPR1、2 的间隔序列分布预测 38 株 O157:H7(ST11)、34 株 O16:H48(ST10)肠共生大肠埃希菌;根据 CRISPR3-4 间隔序列预测 13 株 O25:H4(ST131)大肠埃希菌。本研究对实验室菌株进行 O157:H7、O16:H48 和 O25:H4 的血清型和 MLST 鉴定,结果显示存在 40 株 O157:H7(ST11)和 13 株 ST131 菌株;根据 CRISPRs 的间隔序列分布预测 O157:H7(ST11)和 ST131 的一致率分别为 95.0% 和 100.0%,因 O16:H48 和 O25:H4 的血清凝集结果并不明显,所以未进行分析。

讨 论

细菌分型是识别和追溯传染源的重要流行病学工具,好的分型方法必须具备高度鉴别力和追溯性^[7]。本研究结果显示,CRISPRs 分辨率和与血清学分型一致程度较高,扩增实验室保存的 349 株大肠埃希菌的 CRISPRs 并测序分析,根据 CRISPRs 间隔序列预测 O157:H7(ST11)和 ST131 准确率分别为 95.0% 和 100.0%。

本研究将 I-E 型 CRISPRs 定义为 CT-I、I-F 型 CRISPRs 定义为 CT-II、CRISPR3-4 定义为 CT-III,即基于 CRISPRs 将大肠埃希菌分为 3 个型别,可涵盖目前分析的所有大肠埃希菌,基于 CRISPRs 可以对 203 株不同致病类型的大肠埃希菌分为 79 个 CT 型别。已有研究表明 serotypeFinder 和 MLST 对于识别大肠埃希菌全基因组序列血清型和 ST 具有很好的敏感性和特异性^[8-9],分析显示 203 株大肠埃希菌被分为 76 个血清型和 66 个 ST。

运用辛普森指数评价基于 CRISPRs 的大肠埃希菌分子分型效果,结果表明 CRISPRs 分型比血清分型及 MLST 方法具备更高的分辨力。Zeng 等^[10]在克罗诺杆菌中的研究发现与 MLST 方法相比,CRISPRs 分型有更高的分辨率。MLST 分辨率最低,通过检测大肠埃希菌的管家基因,其序列突变积累较慢,导致进化相对保守,而 CRISPRs 序列是细菌记录其整合外源遗传物质某个片段,其持续动态多样化的特征为分型奠定了基础。推测 MLST 管家基因相对比较保守,对进化的反映可能不如 CRISPRs 快,与 Marraffini^[11]认为 CRISPRs 序列是为细菌中进化最快的位点之一研究结果一致。血清型依据细菌表面抗原—菌体抗原(O 抗原)和鞭毛

抗原(H 抗原),细菌进化过程中表面抗原也会经常发生变异,但其变异的速度可能没有 CRISPRs 快,因此分辨率不如 CRISPRs 高。其次,本研究使用调整兰德指数评估任意 2 种分型方法之间吻合程度,结果显示 CRISPRs 和血清学的一致程度最高,显示大肠埃希菌 CRISPRs 和细菌表面抗原进化的一致性。但是大肠埃希菌细菌表面抗原会导致血清学检测方法不能有效地识别变异菌株和新发未知菌株,且该方法易受到血清质量、血清交叉反应以及菌体表面其他抗原成分的影响,确定其血清型时不仅比较耗费时间、物力和人力,使可能影响检测准确度、检出率和灵敏度^[12]。CRISPRs 和 MLST 的一致程度为 0.761,MLST 法需要测序 7 条序列,相对费用较高,且因个别碱基的变化会导致型别改变,因此对测序技术要求非常严格^[13]。此时用 CRISPRs 分型替代血清型和 MLST,不仅降低工作量,还可以节省成本。更重要的是,CRISPRs 型能将相同血清型和 ST 的大肠埃希菌分成不同的亚型:如 CT-I 4 的 15 株 O157:H7 均分离于 2011 年之前^[14-15],而 CT-I 5 的 2 株 O157:H7 于 2012 年分离自英国;CT-I 11 的 1 株细菌 55989 来源于非洲中部艾滋病患者,属肠黏附大肠埃希菌,CT-I 12 的 2 株细菌分别为引起 2009 年和 2011 年的欧洲暴发菌株^[16];ST21 的 O26:H11 大肠埃希菌 CT-I 15 和 CT-I 16,分别分离于 2003 年韩国和 2001 年日本^[17]。CRISPRs 还能将相同血清型 O145:H28 分成 2 类 CT-I 1 与 CT-I 2,CT-I 1 于 2007 年分离于比利时,CT-I 2 于 2010 年分离于美国^[18],由此推测基于 CRISPRs 的分型有可能提示会跟菌株的分离时间和地区有一定的关系,有可能在追踪传染源会更具价值。CRISPRs 能将相同的 ST(血清型不同)的大肠埃希菌分成亚型:如 ST10 的 VR50 全基因组序列测序显示类似肠共生大肠埃希菌,但是获得了能黏附人类膀胱的相关毒力基因^[19];分离自同一地区 ST95 菌株 SF-173、SF-166、SF-088 和 SF-468,分离于 2007-2010 年,有不同的 *fimH* 等位基因,其研究者认为跟耐药和宿主自身的适应性有关^[20]。CRISPRs 的间隔序列能反映出菌株间的亲缘关系。前期已发现 O55:H7 和 O157:H7、O104:H4 与肠黏附大肠埃希菌 55989 的关系。本研究发现产志贺毒素大肠埃希菌 O26:H11、103:H2、O111:H8 既有相同的间隔序列,也有不同的间隔序列,由此推测 O26:H11、O103:H2、O111:H8 的相同的间隔序列可能反映出经历过相同的进化环境,但

在某个节点又进入不同的进化分支上。Ogura 等^[17]研究 3 株全基因组测序的 O26:H11、O103:H2、O111:H8 大肠埃希菌,显示存在噬菌体、整合元件和携带相同或相似毒力基因的质粒,但是却有不同的进化历史,驱使各自的进化。Yang 等^[21]研究发现相同型别的 CRISPRs 位点可以出现在相同的 MLST 金葡菌菌株中,推测相同 MLST 型别的金葡菌菌株可能在遗传关系上彼此紧密相连,CRISPRs 位点所在基因元件在入侵细菌基因组时,菌株对于外源入侵 CRISPRs 位点的接收具有一定的选择性。在大肠埃希菌中,目前并未发现可移动基因元件上存在 CRISPRs,有待于进一步研究。

本研究进一步验证 CRISPRs 分型方法的临床应用效果,设计引物扩增并测序分析实验室 349 株大肠埃希菌 CRISPRs 的间隔序列,根据 CRISPRs 的间隔序列分布预测 O157:H7(ST11)的准确率是 95.0%,ST131 的准确性达 100.0%。有 2 株 O157:H7 的 CRISPR1 未扩增出来,其余 4 株 O157:H7 的 CRISPR2 的间隔序列分别 4 条,这种多样性的存在也许是因为菌株在进化路径不一致产生的,也提示当时分离地区存在多种亚型的大肠埃希菌 O157:H7,推测其可以作为亚型分型,有待后续进一步研究。研究显示血清型 O16:H48 和 O25:H4 的血清凝集结果并不明显,提示对于 K12 肠共生大肠埃希菌和肠外致病菌 O25:H4,其血清型并不适用。

研究显示,与血清学和 MLST 方法相比,基于 CRISPRs 的大肠埃希菌的分子分型方法呈现较好的分型效果和临床应用效果,预期可以成为大肠埃希菌分型的重要分子标志物。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 梁文娟:实验操作、论文撰写和经费支持;胡爱玲、龙金照、朱金钦:数据整理、统计学分析;段广才:研究指导、经费支持

参 考 文 献

- [1] Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance[J]. Euro Surveill, 2013, 18(4):20380.
- [2] 黄涛,山珊,黄艳梅,等. 大肠埃希氏菌的分型方法及其研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 892-902. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.190630. Huang T, Shan S, Huang YM, et al. Advances in typing methods for *Escherichia coli*[J]. Microbiol China, 2020, 47(3):892-902. DOI:10.13344/j.microbiol.china.190630.
- [3] Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. Nat Rev Microbiol, 2020, 18(2): 67-83. DOI:10.1038/s41579-019-0299-x.
- [4] 梁文娟,张荣光,段广才,等. 基于 CRISPR/Cas 的大肠埃希菌分子标志物的监测研究[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(8): 1080-1086. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.08.005. Liang WJ, Zhang RG, Duan GC, et al. A surveillance study on CRISPR/Cas molecular biomarker in *Escherichia coli* [J]. Chin J Epidemiol, 2016, 37(8): 1080-1086. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.08.005.
- [5] Touchon M, Charpentier S, Clermont O, et al. CRISPR distribution within the *Escherichia coli* species is not suggestive of immunity-associated diversifying selection [J]. J Bacteriol, 2011, 193(10):2460-2467. DOI: 10.1128/JB.01307-10.
- [6] 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]. 郑州:郑州大学, 2017. Liang WJ. The genotyping method based on CRISPRs and the relationship between the CRISPR/Cas and the virulence and resistant in *Escherichia coli*[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017.
- [7] Shariat N, Dudley EG. CRISPRs: molecular signatures used for pathogen subtyping[J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(2):430-439. DOI:10.1128/AEM.02790-13.
- [8] Joensen KG, Tetzschner AM, Iguchi A, et al. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(8):2410-2426. DOI:10.1128/JCM.00008-15.
- [9] Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacterial[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(4): 1355-1361. DOI: 10.1128/JCM.06094-11.
- [10] Zeng HY, Li CS, He WJ, et al. *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, and *Cronobacter dublinensis* genotyping based on CRISPR locus diversity[J]. Front Microbiol, 2019, 10:1989. DOI:10.3389/fmicb.2019.01989.
- [11] Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes[J]. Nature, 2015, 526(7571): 55-61. DOI: 10.1038/nature15386.
- [12] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2016.010.015. Liu CY, Zhang JP, Wang BY. Research progress on identification of *Escherichia coli* O-antigen serogroups[J]. Chin J Zoon, 2016, 32(10): 928-933. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2016.010.015.
- [13] 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. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2017.09.08. Wang LG, Jiang W, Pang CH, et al. Genetic evolutionary relationship of drug-resistant and pathogenic chicken originated *Escherichia coli* strains from different regions with MLST[J]. Chin J Vet Sci, 2017, 37(9):1680-1686. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2017.09.08.
- [14] Yokoyama K, Makino K, Kubota Y, et al. Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak[J]. Gene, 2000, 258(1-2):127-139. doi:10.1016/S0378-1119(00)00416-9.
- [15] Kulasekara BR, Jacobs M, Zhou Y, et al. Analysis of the genome of the *Escherichia coli* O157:H7 2006 spinach-associated outbreak isolate indicates candidate genes that may enhance virulence[J]. Infect Immun, 2009, 77(9): 3713-3721. DOI:10.1128/IAI.00198-09.
- [16] Ahmed SA, Awosika J, Baldwin C, et al. Genomic comparison of *Escherichia coli* O104:H4 isolates from 2009 and 2011 reveals plasmid, and prophage heterogeneity, including shiga toxin encoding phage stx2[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48228. DOI: 10.1371/journal.pone.0048228.
- [17] Ogura Y, Ooka T, Iguchi A, et al. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(42):17939-17944. DOI: 10.1073/pnas.0903585106.
- [18] Cooper KK, Mandrell RE, Louie JW, et al. Comparative genomics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H28 demonstrates a common evolutionary lineage with *Escherichia coli* O157:H7[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 17. DOI:10.1186/1471-2164-15-17.
- [19] Beatson SA, Ben Zakour NL, Totsika M, et al. Molecular analysis of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain VR50 reveals adaptation to the urinary tract by gene acquisition[J]. Infect Immun, 2015, 83(5): 1749-1764. DOI:10.1128/IAI.02810-14.
- [20] Stephens CM, Skerker JM, Sekhon MS, et al. Complete genome sequences of four *Escherichia coli* ST95 isolates from bloodstream infections[J]. Genome Announc, 2015, 3(6):e01241-15. DOI:10.1128/genomeA.01241-15.
- [21] Yang SY, Liu J, Shao FY, et al. Analysis of the features of 45 identified CRISPR loci in 32 *Staphylococcus aureus*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(3): 894-900. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.07.062.