

食源性大肠杆菌 O157 毒力、耐药性及 CRISPR 分型分析

杨广珠, 张淑红, 黄远斌, 吴清平, 张菊梅

(华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东省微生物研究所, 广东广州 510070)

摘要: 为深入了解食品源大肠杆菌 O157 的生物学特点, 本研究对 2014-2015 年分离的 39 株大肠杆菌 O157 进行了 PCR 鉴定, 毒力基因和耐药性检测, 并利用规律成簇的间隔短回文重复序列 (CRISPR) 分型技术对菌株的遗传特性进行了分析。结果表明, 39 株菌株中有 8 株鉴定为 O157:H7, 31 株为 O157; 检测的 11 种毒力基因中, *eae* 存在于所有菌株中, *stx2* 存在于 82.50% 菌株中, *stx1* 未检出, 其他毒力岛基因 *espA*、*etpD*、*tir*、*toxB*、*iha* 和 *katP* 携带率分别为 92.31%、94.87%、87.18%、79.49%、69.23% 和 46.15%。药敏试验结果表明, 菌株对四环素、复方新诺明、链霉素、氯霉素和氨苄西林等抗生素高度耐药, 超过 30% 菌株具有多重耐药性。CRISPR 分型结果表明菌株具有较高的遗传多样性, 39 株菌株中有 33 株存在 CRISPR1 位点, 8 株 *E. coli* O157:H7 产生了相同的 CRISPR spacer 图谱, 而 26 株 *E. coli* O157 产生了 13 种 spacer 图谱。本研究为食源性疾病的监测、疾病溯源和流行病学研究提供重要的基础数据。

关键词: 大肠杆菌 O157; 毒力基因; 耐药性; CRISPR 分型

文章编号: 1673-9078(2017)12-29-37

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.12.005

The Virulence Genes, Antimicrobial Susceptibility, and CRISPR Molecular Typing of *Escherichia coli* O157 from Retail Foods in China

YANG Guang-zhu, ZHANG Shu-hong, HUANG Yuan-bin, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei

(State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: *Escherichia coli* O157 is an important food-borne pathogen. 39 *E. coli* O157 strains identified during 2014 and 2015 in retail foods in China were identified by double PCR to understand the biological characteristics of food-borne *E. coli* O157. The virulence genes and antimicrobial susceptibility of isolates were also detected, and the genetic diversity of *Escherichia coli* O157 was analyzed by Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) typing. The results showed that 8 were identified as O157:H7 and 31 were O157 among the 39 strains. *Eae* gene was detected in all the isolates, and *stx2* was in 82.50% strains of isolates, while *stx1* was not detected in the tested 11 virulence genes. Other virulence genes such as *espA*, *etpD*, *tir*, *toxB*, *iha*, and *katP* were detected with the carrying rate of 92.31%, 94.87%, 87.18%, 79.49%, 69.23%, and 46.15%, respectively. Antimicrobial susceptibility results indicated that the isolates strains were highly resistant to TE, SXT, S, C, and AMP. More than 30% of the isolates were resistance to three and more antibiotics. The CRISPR typing indicated that these isolates strains had a high genetic diversity. Thirty-three of the 39 strains had CRISPR1 loci, including 8 *E. coli* O157:H7 and 26 *E. coli* O157. The 8 *E. coli* O157:H7 produced the same spacer maps, while 26 *E. coli* O157 produced 13 diversified spacer spectra. This study can provide important basic data for food borne disease surveillance, disease traceability and epidemiological research.

Key words: *Escherichia coli* O157; virulence genes; antimicrobial susceptibility; Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) typing

收稿日期: 2017-07-04

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目 (2016YFD0401204); 广东省科技计划项目 (2016A040403088、201704020089)

作者简介: 杨广珠 (1991-), 女, 研究实习生, 研究方向: 食源性致病菌检测技术

通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 研究员, 研究方向: 食品微生物安全检测及控制技术

大肠杆菌 *Escherichia coli* O157 是一种重要的食源性致病菌,可引起人感染性腹泻、出血性结肠炎 (hemorrhagic colitis, HC) 和溶血性尿毒综合征 (haemolytic-uraemic syndrome, HUS) 等疾病,严重时可致人死亡^[1,2]。近年来,国际上多个国家如美国、日本、英国等发生了 O157 食源性疾病暴发和流行,因此被列为重点监测致病菌之一^[3]。我国已将大肠杆菌 O157:H7 列为 21 世纪对国人卫生健康有重大影响的 12 种病原微生物之一^[4]。

Escherichia coli O157 的致病性与多种毒力因子有关,已经公认的毒力因子有:志贺样毒素 (Shiga-toxin, Stx)、LEE 毒力岛和质粒 pO157^[5,6]。志贺毒素是 *E. coli* O157:H7 最主要的毒力因子,包括 Stx1 和 Stx2 两种类型。Stx 在引起腹泻、肠粘膜出血水肿、出血性肠炎和溶血性尿毒综合征等症状中起着重要作用。LEE 毒力岛与细菌对粘附肠粘膜细胞和损伤相关。LEE 毒力岛包含多个毒力基因:编码分泌型蛋白的 *espABD* 基因,编码紧密连接素的 *eae* 基因、编码紧密连接素受体的 *tir* 基因等。几乎所有 *E. coli* O157:H7 菌株含有一个约 92 kb 的大质粒 (pO157),该质粒上的 *hly*、*katP*、*espP*、*tox B* 和 *stcE* 已被确认与细菌致病机制密切相关^[6]。大肠杆菌 O157:H7 致病机理不是由单一毒力因子所决定,而是多种毒力因子共同作用的结果,监测毒力谱的变化非常重要。

细菌耐药性问题已经成为全球关注的一个问题。食源性致病菌耐药性的报道不断增多^[7-9],给人类和动物健康带来极大的危害,监测这些细菌抗性谱的变化对临床选择抗生素具有重要指导意义。

近年来,多种分子分型技术被应用于食源性致病菌溯源和流行病学研究,如多位点序列分析 (Multilocus sequence typing, MLST)、肠杆菌基因间共有重多序列多态性 (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction, ERIC-PCR)、随机扩增片段多态性分析 (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 等^[10-12]。与传统分型技术相比,分子分型技术具有简便、快速和高分辨率等诸多优势。规律成簇的间隔短回文重复序列 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) 是一类重复结构,存在于 90% 的古细菌和 40% 的细菌基因组中,主要由重复序列 (repeat) 和间隔序列 (spacer) 等组成。一个细菌中可以有多个 CRISPR 位点,在每个 CRISPR 位点中重复序列几乎完全一致,而 spacer 高度可变。CRISPR 中的 spacer 对于不同菌株具有一定的识别意义,因此可用于致病菌遗传进化分析。作为一种新型分子分型

方法,CRISPR 已在沙门氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等致病菌分型中有所应用^[13-15]。

目前国内系统完善的食源性致病菌信息数据库仍在不断更新中,本研究对 2014~2015 年全国食品样品中收集的 39 株大肠杆菌 O157 菌株进行了毒力因子检测、耐药性和 CRISPR 分子分型,旨在为食源性疾病的监测、溯源和流行病学研究提供重要的基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

本实验中 39 株性大肠杆菌 O157 菌株全部来源于 2014~2015 年全国污染调查的肉制品和蔬菜样品,其中来自牛肉 12 株,鸡肉 20 株,羊肉 2 株,猪肉 2 株和蔬菜 3 株。所有菌株经过 API 20E 生化鉴定条和 O157 单因子诊断血清鉴定为大肠杆菌 O157。将菌株保藏在 15% 甘油管 -80 °C 保存。参考标准菌株 *E. coli* O157:H7 ATCC35150 由广东省微生物分析检测中心惠赠。

1.1.2 主要试剂与仪器

细菌 DNA 提取试剂盒,购自北京天根生化科技有限公司; 2×Taq PCR Master Mix、50×TAE、DNA Marker2000、琼脂糖,购自广州东盛生物科技有限公司; 大肠杆菌 O157 显色培养基、胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB)、MH 平板、营养琼脂平板,购自广东环凯微生物科技有限公司; 药敏纸片,购自英国 Oxoid 公司; 大肠杆菌 O157 和 H7 诊断血清,购自宁波天润生物药业有限公司; API 20E 生化鉴定试剂条,购自广州千江企业有限公司。

Biometra TProfessional PCR 仪 (德国 Biometra 公司),电泳仪 (EPS301、EPS501、EPS3501) (瑞典安玛西亚公司) 和凝胶分析成像系统 UVI (英国 GE Healthcare 公司)。

1.2 方法

1.2.1 双重 PCR 鉴定

将菌株接种到 TSB 肉汤,37 °C 培养 24 h,取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中,12000 r/min 离心 5 min,弃上清。按细菌 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA。利用本实验室建立的多重 PCR 方法,扩增 O157 抗原和 H7 抗原编码基因 (*rfbE* 和 *fliC*)。引物序列和扩增片段大小见表 1,由华大基因合成。反应总体积为 25 μL,包括 2×PCR mix 12.5 μL,正反向引物各 0.5 μL,模板 2 μL。以标准菌株 *E. coli* O157:H7 ATCC

35150 为阳性对照。扩增条件：94 °C 预变性 5 min；
然后 94 °C 变性 30 s，58 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min。

共进行 30 个循环，最后 72 °C 延伸 7 min。取 8 μL PCR
产物上在 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳，观察结果。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 PCR primers used in this study

目的基因	引物序列(5'-3')	片段大小/bp	参考文献
<i>eae</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	
<i>bfpA</i>	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	326	Paton and Paton, 1998
<i>stx1</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	
<i>stx2</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	
<i>saa</i>	CGTGATGAACAGGCTATTGC ATGGACATGCCTGTGGCAAC	119	
<i>katP</i>	CTTCCTGTTCTGATTCTTCTGG AACTTATTTCTCGCATCATCC	2125	
<i>etpD</i>	CGTCAGGAGGATGTTTCAG CGACTGCACCTGTTCCCTGATTA	1062	
<i>toxB</i>	ATACCTACCTGCTCTGGATTGA TTCTTACCTGATCTGATGCAGC	602	Monaghan et al., 2013
<i>iha</i>	CAGTTCAGTTTCGCATTCACC GTATGGCTCTGATGCGATG	1305	
<i>tir</i>	CATTACCTTCACAAACCGAC CCCCGTTAATCCTCCCAT	1550	
<i>espA</i>	CACGTCTTGAGGAAGTTTGG CCGTTGTTAATGTGAGTGCG	299	
<i>espB</i>	CGATGGTTAATCCGCTTCG GCCTGCTGAATCTGATAGCT	304	
<i>rfbE</i>	TGTCCATTATACGGACATCCATG CCTATAACGTCATGCCAA AT TGCC	291	Our Lab
<i>fliC_{H7}</i>	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625	
Crispr1	GTTATGCGGATAATGCTACC CGTAYYCCGGTRGATTTGGA	1500	Liang, 2016

Y 是 C 或 T; R 是 A 或 G; M 是 A 或 C

1.2.2 毒力基因检测

根据参考文献合成毒力基因引物^[16,17]，引物序列及扩增片段大小见表 1。PCR 扩增反应体系：2×PCR mix 12.5 μL，浓度为 10 μmol/L 的上下游引物各 1 μL，DNA 模板 2 μL，补足灭菌双蒸水至 25 μL。PCR 扩增程序参考文献进行，以标准菌株 *E. coli* O157:H7 ATCC35150 作为阳性对照，*E. coli* 25922 和无菌水为阴性对照。

1.2.3 药敏实验

采用纸片琼脂扩散法 (K-B 法) 进行药敏试验。

将菌株在 37 °C 营养肉汤中培养 18~24 h，划线于营养琼脂平板表面，用生理盐水稀释至 0.5 麦氏浊度，涂布 MH 平板，然后用无菌镊子将药敏片贴于 MH 培养基表面，37 °C 培养 24 h 后测抑菌圈直径，根据美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 标准判定菌株对药敏纸片的敏感性 (表 3)。所用 16 种药敏纸片包括：氨苄西林 (AMP, 10 μg)、阿莫西林/克拉维酸 (AMC, 30 μg)、头孢他啶 (CAZ, 30 μg)、头孢噻肟 (CTX,

30 μg)、头孢西丁 (FOX, 30 μg)、头孢噻吩 (KF, 30 μg)、环丙沙星 (CIP, 5 μg)、奈定酮酸 (NA, 30 μg) 诺氟沙星 (NOR, 10 μg)、阿米卡星 (AK, 30 μg)、庆大霉素 (CN, 10 μg)、卡那霉素 (K, 30 μg)、链霉素 (S, 25 μg)、氯霉素 (C, 30 μg)、复方新诺明 (SXT, 25 μg) 和四环素 (TE, 30 μg)。以大肠杆菌 *E. coli* 25922 为质控菌株。

1.2.4 CRISPR 分子分型

按试剂盒法提取细菌基因组 DNA。参考文献^[15]中的方法对菌株进行 CRISPR1 位点检测, CRISPR 引物序列如表 1 所示, 引物由华大基因合成。将 CRISPR1 的 PCR 扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 送华大基因公司测序将菌株的 CRISPR 序列通过 CRISPR finder 在线软件 (<http://crispr.u-psud.fr/Server/>) 进行分析并获取 DR 重复序列和 spacer 信息, 并与数据库中的序列进行比对, 绘制 spacer 排列图谱。

2 结果与分析

2.1 双重 PCR 鉴定结果



图 1 PCR 鉴定结果

Fig.1 Results of PCR for *E. coli* O157 and *E. coli* O157:H7

注: 泳道 1 和 25: Marker2000; 泳道 2~24, 26~39: 食品菌株; 泳道 40: 阳性对照; 泳道 41: 阴性对照。

39 株大肠杆菌 O157:H7 菌株经双重 PCR 检测, 有 8 株鉴定为 O157:H7, 31 株为 O157 (如图 1)。

2.2 毒力基因分布

11 种毒力基因的分布情况如表 2 和图 2 所示。所有菌株都携带 *eae* 基因, 82.05% 携带 *stx2* 基因, 所有菌株均未携带 *stx1* 基因; 大部分菌株含有 *espA* (92.31%)、*etpD* (94.87%)、*tir* (87.18%)、*toxB* (79.49%) 和 *iha* (69.23%) 基因; 46.15% 菌株含有 *katP* 基因。*espB* 和 *saa* 基因未检测到。菌株的毒力谱是多样的, 大部分菌株携带 3 种以上的毒力基因, 部分菌株携带 8 种以上毒力基因。

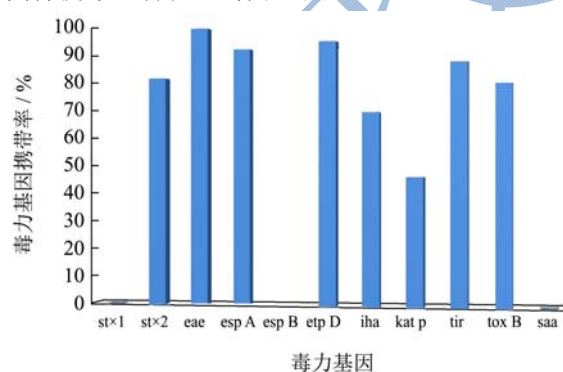


图 2 毒力基因分布情况

Fig.2 The distribution of 11 virulence genes

2.3 药敏实验

药敏试验结果表明, 菌株对 TE、C、SXT、S、NA、KF 和 AMP 具有较高的抗性, 对 CTX、CN、K、CIP 和 NOR 抗性非常普遍, 20.51% 菌株对 CAZ 具有抗性; 而对 AMC、FOX 和 AK 是相抗性较低 (表 3)。从抗性谱分布情况来看, 30% (30/39) 菌株抗三种以上抗生素, 为多重耐药菌株; 20 株 (51.28%) 菌株抗 10~15 种抗生素 (表 2)。

表 2 菌株血清型、毒力谱和耐药谱分布

Table 2 The serotypes, virulence genes, and antimicrobial resistance profiles of 39 isolates

菌株 编号	血清型	毒力基因											耐药谱
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>esp A</i>	<i>esp B</i>	<i>etp D</i>	<i>iha</i>	<i>kat p</i>	<i>tir</i>	<i>tox B</i>	<i>saa</i>	
36	O157:H7	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	/
33	O157:H7	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	/
37	O157:H7	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	/
35	O157:H7	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	/
1	O157:H7	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	KF
34	O157:H7	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	/
38	O157:H7	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	/
24	O157:H7	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	KF-K
2	O157	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	TE-NOR-C-NA-SXT-CIP-CN-CXT-AMP-AMC-CAZ-KF-K-S
39	O157	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	TE-C-NA-SXT-CIP-CN-CXT-AMP-AMC-KF-K-S
11	O157	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	转下页
14	O157	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	
9	O157	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	TE-NOR-C-NA-SXT-CIP-CN-CXT-AMP-AMC-CAZ-KF-K-S
23	O157	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	TE-NOR-NA-SXT-CIP-CXT-AMP-KF-K-S
13	O157	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	TE-NOR-NA-SXT-CIP-CXT-AMP-KF-K-S
6	O157	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	TE-NOR-C-NA-SXT-CIP-CN-CXT-AMP-CAZ-KF-K-S
20	O157	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	TE-NOR-C-NA-SXT-CIP-CN-CXT-AMP-CAZ-KF-K-S
16	O157	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	TE-NOR-C-NA-SXT-CIP-CN-CXT-AMP-AMC-CAZ-KF-K-S
30	O157	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	TE-C-NA-SXT-CN-CXT-AMP-AMC-KF-K-S
8	O157	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	TE-C-NA-SXT-CIP-CN-CXT-AMP-AMC-KF-K-S
27	O157	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	TE-C-NA-SXT-CIP-CN-CXT-AMP-AMC-KF-K-S
22	O157	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	TE-NOR-C-NA-SXT-CIP-CTX-AMP-KF-K-S
32	O157	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	TE-NOR-C-NA-SXT-CIP-CN-CXT-AMP-KF-K-S
21	O157	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	TE-NOR-C-NA-SXT-CIP-CN-CXT-AMP-KF-K-S
26	O157	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	TE-NOR-C-NA-SXT-CIP-CN-CXT-AMP-KF-K-S
31	O157	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	TE-NOR-C-NA-SXT-AK-CIP-CN-CXT-AMP-AMC-CAZ-KF-K-S
19	O157	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	TE-NOR-C-NA-SXT-AK-CIP-CN-CXT-AMP-AMC-CAZ-KF-K-S

转下页

接上页

菌株 编号	血清型	毒力基因											耐药谱
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>esp A</i>	<i>esp B</i>	<i>etp D</i>	<i>iha</i>	<i>kat p</i>	<i>tir</i>	<i>tox B</i>	<i>saa</i>	
17	O157	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	TE-C
28	O157	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	C-SXT-CN
25	O157	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	TE-C-AMP-AMC
12	O157	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	TE-C-KF
29	O157	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	TE-C-AMP-AMC
10	O157	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	TE-NOR-C-NA-SXT-CIP-AMP-AMC-K-S
3	O157	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	TE-NOR-C-NA-SXT-AK-CIP-CN-CXT-AMP-AMC-CAZ-KF-K-S
4	O157	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	TE-C-NA
5	O157	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	TE-NOR-C-NA-SXT-CIP-CN-CXT-AMP-AMC-KF-K-S
7	O157	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	TE-C-NA--KF
15	O157	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	TE-C-S
18	O157	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	NA-SXT-KF
													FOX-AMP-KF
													FOX-AMP-AMC-KF-S

表3 菌株的抗生素抗性结果

Table 3 Antimicrobial susceptibility of 39 isolates

Antibiotics	Antibiotic disc content	susceptibility		
		Resistant/%	Intermediate/%	Susceptible/%
<i>β</i> -lactams				
ampicillin (AMP)	10 μg	23(58.97)	1(2.56)	15(38.46)
amoxicillin-clavulanicAcid (AMC)	30 μg	6(15.38)	9(23.08)	24(61.54)
ceftazidime (CAZ)	30 μg	8(20.51)	0	31(79.49)
cefotaxime (CTX)	30 μg	19(48.72)	0	20(51.28)
Cefoxitin (FOX)	30 μg	2(5.13)	0	37(94.87)
Cephalothin(KF)	30 μg	22(56.41)	4(10.26)	13(33.33)
Quinolones and fluoroquinolones				
ciprofloxacin(CIP)	5 μg	15(38.46)	4(10.26)	20(51.28)
nalidixic acid (NA)	30 μg	23(58.97)	0	16(41.03)
norfloxacin (NOR)	10 μg	14(35.90)	2(5.13)	23(58.97)
Aminoglycosides				
amikacin (AK)	30 μg	1(2.56)	2(5.13)	36(92.31)
gentamicin (CN)	10 μg	17(43.59)	0	22(56.41)
kanamycin (K)	30 μg	19(48.72)	2(5.13)	18(46.15)
Streptomycin (S)	25 μg	22(56.41)	0	17(43.59)
Phenicol				
chloramphenicol (C)	30 μg	26(66.67)	0	13(33.33)
Sulfonamides and synergistic agents				
trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)	25 μg	22(56.41)	0	17(43.59)
Tetracyclines				
tetracycline (TE)	30 μg	26(66.67)	0	13(33.33)

2.4 CRISPR 分子分型结果

其中8株O157:H7全部含有CRISPR1位点,31株O157中26株检测到CRISPR1位点,6株未检测到,CRISPR1位点的PCR扩增产物符合其长度。

将33株菌株的spacer信息与CRISPR database数据库的CRISPR序列用CRISPR Finder软件进行分析,结果显示菌株中含有两条保守的29 bp的共有序列DR序列(CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAAC AC和CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGA ACT C);33株菌株共产生了76条独特的spacer序列(暂未列出),每个菌株spacer数量为3~19个。将spacer序列进行排列后,产生的图谱结果如图3所示,从图中可以看出,菌株具有较高的遗传多态性。8株O157:H7 CRISPR spacer位点分布完全一致。26株O157菌株呈现13种不同的spacer图谱。

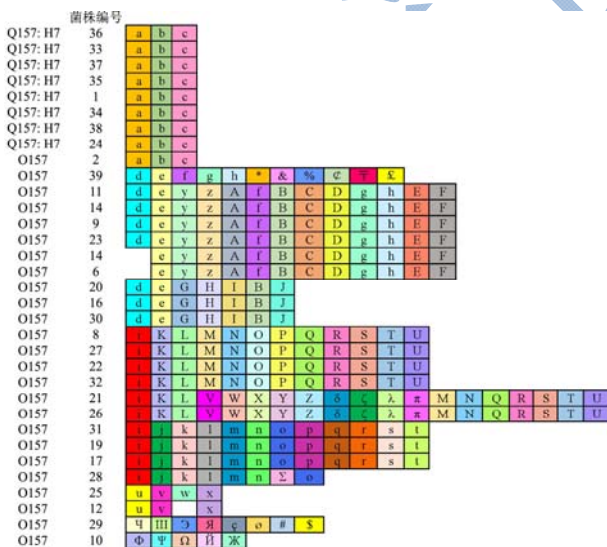


图3 CRISPR1 spacer 分布图谱

Fig.3 The distribution of CRISPR1 spacers

注:一种颜色和符号组合代表一个单独的 spacer。

利用PCR扩增菌株的CRISPR1位点,结果发现39株菌株中有33株(84.61%)含有CRISPR1位点,

3 讨论与结论

3.1 大肠杆菌 O157 导致的食源性疾病已引起了人们的高度重视,但目前我国食品源 O157 菌株的病原特点等方面的研究仍相对较少,对其毒力因子分布、耐药变化和遗传特性缺乏系统的调查数据。前期研究中,

尽管已有学者对大肠杆菌 O157 的毒力因子进行了研究,但仅限于少数几个毒力基因如 *eae*、*stx* 和 *hly*,而对其他毒力因子分布情况未见详细报道,且其研究区域多为某个地区或省份。水新云等^[18]从武汉市售肉类食品中分离到 4 株 O157:H7 菌株,检测发现这 4 株菌都携带 *eae*、*stx* 和 *hly* 基因。白莉等^[19]对 2005~2007 年中国食品中疑似大肠杆菌 O157 进行四个毒力基因 (*eae*、*hlyA*、*stx1* 和 *stx2*) 检测,发现菌株出现多种不同毒力基因谱。Sallam 等^[20]对非洲零售牛肉中分离的大肠杆菌 O157 和 O157:H7 进行了四种毒力基因检测 (*eae*、*hlyA*、*stx1* 和 *stx2*),发现 46.70% 菌株同时含有 *eae*、*hlyA*、*stx1* 和 *stx2*,40% 菌株同时含有 *eae*、*stx2* 和 *hlyA* 基因。Dong 等^[21]对我国牛肉加工厂分离的 O157:H7 的毒力基因进行鉴定,结果发现 *eae*、*stx2* 和 *hlyA* 基因存在于所有菌株中,而 *stx1* 基因未检测到。赵嘉咏^[22]对河南省 2009~2010 年收集的 O157 进行了 *eae* 和 *hly* 毒力基因检测,发现来自食品的 8 株 O157 均不含毒力因子。

3.2 本研究同时对 11 种毒力基因进行了检测, *eae*、*stx1* 和 *stx2* 携带率与文献报道有所不同,分析可能与样品来源和地区差异有关。另外,不同年份分离的菌株其毒力特点也有不同,表明菌株可能会随时间变化而发生变异。除了 *eae*、*stx1* 和 *stx2* 基因,本研究还对 LEE 毒力岛和大质粒 (pO157) 上的其他毒力基因进行了研究,发现 *espA*、*katP*、*toxB*、*tir* 和 *etpD* 等广泛存在于 O157 和 O157:H7 菌株中,这些毒力因子已被证实与致病性相关。因此,加强其他毒力因子的检测非常必要。

3.3 药敏实验结果发现,本次分离的菌株对临床和农业上常用的抗生素产生了较高的抗性,特别是对 TE、SXT、NA、S、C、KF 和 AMP,这与文献报道的具有相似之处。Msolo 等^[23]调查了南非某省原料奶、奶制品机械和工人手套等样品分离的 O157:H7 的耐药性,发现菌株对 TE (81%)、S (52%) 和 C (45%) 高度耐药。Disassa 等^[24]对从原料牛奶分离的 O157:H7 进行耐药研究,发现菌株对 TE (81.8%)、S (81.8%) 和 K (63.6%) 具有高度抗性。Beyi^[25]对肉店和餐馆分离的大肠杆菌 O157 耐药性进行检测,结果发现 9 株中 5 株抗 AMC、2 株抗 S 和 3 株抗 C。分析可能与该国临床和畜牧业中长期大量使用这类抗生素有关。从耐药谱来看,超过 30% 菌株具有多重耐药性。部分菌株对 CAZ 和 CTX 有一定抗性,可能为超广谱抗性菌株。由于抗性菌株可通过食物进入人体,给人类健康带来很大隐患,因此需要密切跟踪这些菌株的变化,减少其传播和扩散。

3.4 本研究采用 CRISPR1 位点对菌株的遗传特点进行了分析,结果发现菌株具有较高的遗传多样性。即使同一血清的菌株也可能出现不同的遗传进化特征,利用 CRISPR 分型可以深入分析其变异特点。值得说明的是,本研究中有部分菌株缺失 CRISPR1 位点,这之前文献报道有一致之处。Ison 等^[26]对牛粪中的大肠杆菌 O26:H11 菌株进行 CRISPR 分型,发现 CRISPR1 和 CRISPR2 位点有不同程度缺失。Tymensen 等^[27]用 CRISPR1 分析了地表水和粪便样品中的大肠杆菌,结果有菌株 CRISPR1 位点未能检测到。在沙门氏菌 CRISPR 分子分型方面,庄孝飞^[28]利用设计的 CRISPR1 引物对 36 种沙门氏菌血清型进行 PCR 扩增,结果发现 5 种血清型未能扩增出目的条带,无法分型。这些结果表明,尽管 CRISPR 分型具有高的分辨率,但是单一的分子分型技术仍不够完善,需要辅助其他分型技术,多种分子分型技术综合应用会更有利深入挖掘生物学特点。另外,本研究未发现毒力谱和耐药性与 CRISPR 分型结果间的明显相关性,可能与菌株数量少有关,后续工作中可进一步深入研究。

参考文献

- [1] Galli L, Brusa V, Singh P, et al. High prevalence of clade 8 *Escherichia coli* O157:H7 isolated from retail meat and butcher shop environment [J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2016, 45: 1-5
- [2] D'Astek B A, DEL-Castillo L L, Miliwebsky E, et al. Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from human infections and healthy cattle in Argentina [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2012, 9(5): 457-464
- [3] Sharapov U M, Wendel A M, Davis J P, et al. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach: United States, 2006 [J]. *Journal of Food Protection*, 2016, 79(12): 2024-2030
- [4] 陈雅君,王亚宾,张莉娟,等.动物源性肠出血性大肠杆菌 O157:H7 及其 3 个毒力基因的多重 PCR 快速检测研究[J]. *中国人兽共患病学报*,2013,29(7):686-691
CHEN Ya-jun, WANG Ya-bin, ZHANG Li-juan, et al. Detection of animal-derived *Escherichia coli* O157:H7 and its three virulence genes by multiplex PCR technique [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2013, 29(7): 686-691
- [5] 张书萧.大肠杆菌 O157 的分子流行病学调查和毒力因子研究[D].长春:吉林农业大学,2012
ZHANG Shu-xiao. Molecular epidemiology and study on virulence factor of *Escherichia coli* O157 [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2012

- [6] 万成松.大肠杆菌 O157:H7 的毒力岛与毒力因子的研究进展[J].微生物学免疫学进展,2006,34(2):58-62
WAN Cheng-song. The pathogenic islands and virulence factors of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2006, 34(2): 58-62
- [7] Kim H S, Chon J W, Kim Y J, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae*, in ready-to-eat vegetables [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 207: 83-86
- [8] Yang B, Wang Q, Cui S, et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Salmonella* strains isolated from retail foods in Shaanxi and Henan province, China [J]. Food Microbiology, 2014, 42(12): 14-18
- [9] Ahmed A M, Shimamoto T. Molecular analysis of multidrug resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from meat and dairy products [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 193: 68-73
- [10] 叶菊莲,占利,梅玲玲,等.利用 MLST 技术对浙江省大肠杆菌 O157 的分子流行病学研究[J].中国人兽共患病学报,2011,27(10):901-904
YE Ju-lian, ZHAN Li, MEI Ling-ling, et al. Multilocus sequence typing analysis application in molecular epidemiological research of *Escherichia coli* O157 isolates in Zhejiang province [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2011, 27(10): 901-904
- [11] 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
WANG Kai, PEI Zhi-hua, CHEN Zhong-qiu, et al. Research progress of common food-borne pathogens and their molecular typing techniques [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2013, 49(12): 51-54
- [12] Fabre L, Zhang J, Guigon G, et al. CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections [J]. PLoS One. 2012, 7(5): e36995
- [13] Shariat N, Dudley E G. CRISPRs: molecular signatures used for pathogen subtyping [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(2): 430-439
- [14] Di H, Ye L, He Y, et al. Comparative analysis of CRISPR loci in different *Listeria monocytogenes*, lineages [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 454(3): 399-403
- [15] 梁文娟,张荣光,段广才,等.基于 CRISPR 对大肠埃希菌 O157:H7 的检测[J].西安交通大学学报(医学版),2016, 37(5):748-753
LIANG Wen-juan, ZHANG Rong-guang, DUAN Guang-cai, et al. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on CRISPR loci [J]. Department of Preventive Medicine, Henan University of Science and Technology, 2016, 37(5): 748-753
- [16] Monaghan Á, Byrne B, Fanning S, et al. Serotypes and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*, (EPEC) isolated from bovine farms and abattoirs [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(2): 595-603
- [17] Paton A W, Paton J C. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(2): 598-602
- [18] 水新云,王虎虎,高峰,等.4株 *E. coli* O157:H7 毒力基因检测及其冷应激损伤[J].食品科学,2016,37(4):176-180
SHUI Xin-yun, WANG Hu-hu, GAO Feng, et al. Detection of virulence genes of four *Escherichia coli* O157:H7 strains and cold stress injury in the bacteria [J]. Food Science, 2016, 37(4): 176-180
- [19] 白莉,刘秀梅,付萍,等.2005~2007 年中国食品中疑似 O157 大肠埃希菌的鉴定及毒素基因的检测[J].卫生研究,2010,39(3):335-338
BAI Li, LIU Xiu-mei, FU Ping, et al. Serotyping and virulence genes of suspected *Escherichia coli* O157 strains in food from 2005 to 2007 [J]. Journal of Hygiene Research, 2010, 39(3): 335-338
- [20] Sallam K I, Mohammed M A, Ahdy A M, et al. Prevalence, genetic characterization and virulence genes of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H- and *E. coli* O157:H7 isolated from retail beef [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 165(3): 295-301
- [21] Dong P, Zhu L, Mao Y, et al. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from samples along the production line in Chinese beef-processing plants [J]. Food Control, 2015, 54(1): 39-46
- [22] 赵嘉咏,穆玉姣,张白帆,等.河南省 2009-2010 年出血性大肠埃希菌 O157 毒力基因分布与脉冲场凝胶电泳分型研究[J].中华流行病学杂志,2015,36(11):1324-1326
ZHAO Jia-yong, MU Yu-jiao, ZHANG Bai-fan, et al. Distribution of virulence genes and PFGE molecular typing of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in Henan from 2009 to 2010 [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2015, 36(11): 1324-1326
- [23] Msolo L, Igbinsosa E O, Okoh A I. Prevalence and antibiogram profiles of *Escherichia coli* O157:H7 isolates

- recovered from three selected dairy farms in the Eastern Cape Province, South Africa [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2016, 6(11): 990-995
- [24] Disassa N, Sibhat B, Mengistu S, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of *E.coli* O157:H7 isolated from traditionally marketed raw cow milk in and around Asosa town, Western Ethiopia [J]. *Veterinary Medicine International*, 2017, 2017: 7581531
- [25] Beyi A F, Fite A T, Tora E, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157 in beef at butcher shops and restaurants in central Ethiopia [J]. *Bmc Microbiology*, 2017, 17(1): 49
- [26] Ison S A, Delannoy S, Bugarel M, et al. Genetic diversity and pathogenic potential of attaching and effacing *Escherichia coli* O26:H11 strains recovered from bovine feces in the United States [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(11): 3671-8
- [27] Tymensen L D. CRISPR1 analysis of naturalized surface water and fecal *Escherichia coli* suggests common origin [J]. *Microbiology Open*, 2016, 5(3): 527-533
- [28] 庄孝飞. 基于 CRISPR 序列的沙门氏菌分子分型方法的建立[D]. 上海: 上海交通大学, 2015
- ZHUANG Xiao-fei. Development of CRISPR-Based molecular typing method of *Salmonella* [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2015