

## 研究报告



## 宁夏地区一株奶牛源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌流行株的高通量测序分析

陈程 王瞳 常佳伟 万佳宏 王桂琴\*

宁夏大学农学院 宁夏 银川 750021

**摘要:**【背景】耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是一种常见的条件性致病菌,由 MRSA 感染导致的奶牛乳腺炎给奶牛养殖户带来了重大的经济损失。【目的】了解宁夏地区奶牛源 MRSA 流行株基因组序列特征,为 MRSA 感染的防治提供理论依据。【方法】采用琼脂扩散法对分离株 Id11 进行抗菌药物敏感性试验,同时运用 Illumina 高通量测序平台对其基因组 DNA 进行高通量测序,使用网络数据库对获得的测序序列进行处理分析。【结果】药敏试验结果显示分离株 Id11 对头孢噻唑、磺胺异恶唑、氨苄西林、红霉素、庆大霉素、苯唑西林、克林霉素、四环素和多西环素耐药,数据分析显示分离株 Id11 携带耐药基因 *aadD*、*spc*、*str*、*blaZ*、*mecA*、*cat(pCI94)*、*erm(A)*、*norA*、*tet(k)*和 *tet(M)*,二者之间有很好的相关性;分离株 Id11 携带的耐药基因多于 MRSA 参考菌株,且分离株 Id11 和 MRSA252 的亲缘关系较近。COG 功能分析和 GO 注释结果显示,与维持菌体基本功能和菌株生长增殖相关的基因占优势;KEGG 通路分析结果显示,属于代谢通路的基因占比最多。从该菌株基因组序列上共检测到 4 个基因岛、9 个疑似的 CRISPR 序列和 1 个完整的前噬菌体序列。【结论】揭示了宁夏地区奶牛源 MRSA 流行株的部分基因组序列信息,为 MRSA 菌株间基因组序列信息的比较分析及 MRSA 感染的防控提供参考依据。

关键词:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,全基因组测序,序列分析

High-throughput sequencing analysis of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in dairy cattle in Ningxia province

CHEN Cheng WANG Tong CHANG Jia-Wei WAN Jia-Hong WANG Gui-Qin\*

College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China

**Abstract:** [Background] Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a common conditional pathogenic bacterium. Mastitis in dairy cows caused by MRSA infection has brought significant economic losses to dairy farmers. [Objective] To understand the genomic sequence characteristic of MRSA epidemic strain in dairy cows in Ningxia province, and provide a theoretical basis for the prevention and treatment of MRSA infection. [Methods] The isolate Id11 was tested for antimicrobial susceptibility by agar diffusion method, and the high-throughput sequencing of genomic DNA of isolate Id11 was carried out

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31360626)

\*Corresponding author: E-mail: nxwgq@126.com

Received: 31-07-2018; Accepted: 13-02-2019; Published online: 16-04-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31360626)

\*通信作者: E-mail: nxwgq@126.com

收稿日期: 2018-07-31; 接受日期: 2019-02-13; 网络首发日期: 2019-04-16

based on Illumina high-throughput sequencing platform, and the obtained sequencing sequences were processed and analyzed through network databases. **[Results]** The susceptibility test showed that the isolate Id11 was resistant to ceftiofur, sulfisoxazole, ampicillin, erythromycin, gentamicin, oxacillin, clindamycin, tetracycline, and doxycycline, and data analysis showed isolate Id11 carried the drug resistance genes *aadD*, *spc*, *str*, *blaZ*, *mecA*, *cat(pC194)*, *erm(A)*, *norA*, *tet(k)*, and *tet(M)*, and there was a good correlation between the two; The isolate Id11 carried more resistance genes than the MRSA reference strains, and the relationship between isolate Id11 and MRSA252 was closer. The results of COG (Clusters of orthologous groups of proteins) functional analysis and GO (Gene ontology) annotation showed that the genes involved in maintaining the basic functions of the cells and the growth and proliferation of the strains predominated. The KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) pathway analysis showed that the genes belonging to the metabolic pathway accounted for the most; four gene islands, nine questionable CRISPR sequences, and one complete prophage sequence were detected from the genome sequence. **[Conclusion]** This study revealed partial genomic sequence information of MRSA epidemic strain in dairy cows in Ningxia, which provided a reference for comparative analysis of genomic sequence information and prevention and control of MRSA infection among MRSA strains.

**Keywords:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Whole genome sequencing, Sequence analysis

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)是一类重要的人畜共患病原菌,在全球范围内引起了较高的发病率和死亡率<sup>[1]</sup>。在20世纪40年代青霉素推广使用之前,由SA感染导致的败血病的死亡率极高,青霉素在一段时间内有效遏制了SA的肆虐,但是不久后便出现了青霉素耐药的菌株<sup>[2-3]</sup>。甲氧西林在1959年开始用于治疗SA感染性疾病,两年后就在英国报道了第一例耐甲氧西林SA(Methicillin-resistant SA, MRSA)<sup>[4]</sup>。MRSA的耐药性强,人感染后病死率高,与艾滋病、乙型肝炎并列为世界三大医学难题<sup>[5]</sup>。在随后的几十年里,MRSA在世界各地被报道,MRSA的耐药性以及流行病学特征也越来越复杂。20世纪80年代末期,万古霉素对于治疗MRSA感染性疾病显示出很好的疗效,但是在选择压力作用下,1996年在日本发现了第一例对万古霉素中介耐药SA(Vancomycin-intermediate SA, VISA)<sup>[6]</sup>,2002年在美国发现首例耐万古霉素SA(Vancomycin-resistant SA, VRSA)<sup>[7]</sup>。

MRSA主要分为医院获得性MRSA(Hospital-acquired MRSA, HA-MRSA)和社区获得性MRSA(Community-acquired MRSA, CA-MRSA)<sup>[8]</sup>。随着人们对动物食品的需求增加,养殖业迅速发展,动

物源MRSA逐渐被人们关注,动物源MRSA又称为家畜相关性耐甲氧西林SA(Livestock-associated MRSA, LA-MRSA)<sup>[9]</sup>。早在1972年,就有牛源MRSA的相关报道<sup>[10]</sup>,目前在各类养殖动物及伴侣宠物身上分离到MRSA的报道比比皆是<sup>[11-13]</sup>。流行病学调查显示,LA-MRSA不仅可以在家畜中繁殖,而且可以直接传播给人<sup>[14]</sup>,甚至能感染与畜禽没有接触的社区人员<sup>[15]</sup>。

奶牛养殖业是宁夏地区的重要产业,每年由SA导致的奶牛乳腺炎都会给奶牛养殖户带来重大的经济损失。本研究基于本实验室前期分型研究结果,选取宁夏地区一株奶牛源MRSA流行株进行全基因组测序分析,旨在发现宁夏地区MRSA流行株特有的序列特征,为研究MRSA菌株之间的序列差异以及MRSA感染的防控提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

试验菌株Id11由本实验室于2015年12月从宁夏地区规模化奶牛养殖场临床型乳房炎乳样中分离鉴定并收集,通过科玛嘉SA显色培养基检测和多重PCR检测16S rRNA、*nuc*和*mecA*基因鉴定为MRSA菌株,运用*spa*和MLST分型鉴定为

宁夏地区 MRSA 流行株 t037-ST239, 20% 甘油 BHI 肉汤-80 °C 冻存。质控菌株 SA ATCC 29213, 由中国农业大学动物医学院提供。

### 1.1.2 主要试剂和仪器

BHI 肉汤培养基、BHI 琼脂培养基, 北京陆桥技术有限公司; 细菌基因组提取试剂盒、溶菌酶、溶葡萄球菌素, 北京博迈德基因技术有限公司; 荧光定量试剂盒 Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Tech 公司; 建库试剂盒 KAPA HyperPlus DNA Library Preparation Kit for Illumina, KAPA Biosystems 公司; 苯唑西林、多西环素、氨苄西林、头孢噻吩、环丙沙星、左氧氟沙星、四环素、磺胺异恶唑、红霉素、庆大霉素、克林霉素、阿米卡星、利奈唑胺、万古霉素, 中国兽医药品监察所和中国药品与生物制品检定所。

超声破碎仪, Covaris 公司; 生物分析仪, 安捷伦科技有限公司; 磁力架, Invitrogen 公司; 涡旋振荡器, 广州仪科实验室技术有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 抗菌药物敏感性测定

根据美国临床实验室标准委员会(Clinical and laboratory standards institute, CLSI)推荐的琼脂稀释法<sup>[16]</sup>进行, 测定苯唑西林、多西环素、氨苄西林、头孢噻吩、环丙沙星、左氧氟沙星、四环素、磺胺异恶唑、红霉素、庆大霉素、克林霉素、阿米卡星、利奈唑胺和万古霉素等 14 种抗菌药物对试验菌株的最小抑菌浓度值, 结果判定参照 CLSI 推荐标准。

### 1.2.2 菌株基因组的提取

根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行提取。

### 1.2.3 测序前样品的处理

根据参考文献[17]对提取的基因组进行质量检测 and 文库构建。

### 1.2.4 文库质检和测序

DNA 文库送北京安诺优达基因科技有限公司进行高通量测序。

### 1.2.5 测序结果的处理

运用分析软件 CLC genomic workbench 9.0 对测序结果进行拼接组装, 得到所测菌株的全基因组序列。

### 1.2.6 基因组基本特征

将组装好的菌株 Id11 全基因组序列上传到 cge 网络数据库(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/cge/>), 对基因组序列中的耐药基因进行查找统计, 同时从 GenBank 下载人源 MRSA (Mu50、MW2、N315 和 MRSA252)基因组作为参考基因组, 对参考基因组的耐药基因进行查找统计并将其与菌株 Id11 耐药基因的统计结果进行比较分析。通过 Harvest 软件包内的 Parsnp 模块对分离株 Id11 和 4 株人源参考菌株的基因组进行基于核心基因组的单核苷酸位点多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)系统进化树的构建。运用 Glimmer 3.02 (<http://www.cbcb.umd.edu/software/glimmer/>)软件进行菌株 Id11 基因组序列信息的预测。

### 1.2.7 基因功能注释

主要通过网络数据库对菌株基因组序列信息进行 COG (Clusters of orthologous groups of proteins) 功能分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)、KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)通路分析 (<http://www.genome.jp/kegg/>; [http://www.genome.jp/kegg/document/help\\_pathway.html](http://www.genome.jp/kegg/document/help_pathway.html)) 和 GO (Gene ontology)注释统计(<http://www.geneontology.org/>)。

### 1.2.8 基因岛预测

利用已获得的基因组 gbk 文件, 使用 Islander-viewer、SIGI-HMM 等软件对测序菌株中包含的基因岛序列进行预测。

### 1.2.9 CRISPR 分析

使用 CRISPR Finder 在线工具(<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/>)对菌株基因组进行 CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)预测, 找出基因组上所有潜在的 CRISPR 序列, 展示 CRISPR 序列在基因组上的位置、Repeats 和 Spacer 的碱基组成等。

### 1.2.10 前噬菌体序列分析

通过在线软件 PHAST (<http://phast.wishartlab.com/index.html>)预测菌株基因组上的前噬菌体(Prophage), 并对结果进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 药敏试验结果

药敏试验结果显示分离株 Id11 耐药情况严重, 对头孢噻唑、磺胺异恶唑、氨苄西林、红霉素、庆大霉素、苯唑西林、克林霉素、四环素和多西环素 9 种抗菌药物耐药, 对环丙沙星、左氧氟沙星、阿米卡星、利奈唑胺和万古霉素 5 种抗菌药物敏感。

### 2.2 基因组基本特征概述

将通过 Illumina 高通量测序技术得到的序列进行拼接组装, 通过 cge 网络数据库(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/cge/>)和 Glimmer 3.02 软件分析得出试验菌株 Id11 的基因数量为 2 699 个, 基因总长度为 2 408 730 bp, 基因平均长度为 892 bp, 基因区域(G+C)mol%含量为 33.4%, 基因占基因组百分比为 83%, 遗传区域长度为 494 727 bp, 遗传区域的(G+C)mol%含量为 28.8%, 分离株 Id11 基因组和 4 株 MRSA 参考菌株基因组均携带多种不同的耐药基因(表 1), 分离株 Id11 携带有氨基糖苷类耐药基因 *aadD*、*spc* 和 *str*,  $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *blaZ* 和 *mecA*, 酰胺醇类耐药基因 *cat(pC194)*, 大环内酯类耐药基因 *erm(A)*, 氟喹诺酮类耐药基因

表 1 Id11 分离株和 4 株人源参考菌株的耐药基因检测结果

Table 1 Test result of drug resistance genes of isolate Id11 and 4 human reference strains

菌株 Strains	耐药基因 Drug resistance genes
Id11	<i>aadD</i> , <i>spc</i> , <i>str</i> , <i>blaZ</i> , <i>mecA</i> , <i>cat(pC194)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>norA</i> , <i>tet(k)</i> , <i>tet(M)</i>
Mu50	<i>mecA</i> , <i>tet(M)</i> , <i>norA</i> , <i>aadD</i> , <i>spc</i> , <i>erm(A)</i>
MW2	<i>mecA</i> , <i>norA</i>
N315	<i>mecA</i> , <i>norA</i> , <i>spc</i> , <i>aadD</i> , <i>erm(A)</i>
MRSA252	<i>mecA</i> , <i>norA</i> , <i>blaZ</i> , <i>spc</i> , <i>aadD</i> , <i>erm(A)</i>

*norA*, 以及四环素类耐药基因 *tet(k)*和 *tet(M)*, 分离株 Id11 携带耐药基因数较多于 4 种参考菌株(表 1)。对分离株 Id11 和 4 株人源 MRSA 参考基因组基于核心基因组的进化树构建结果如图 1 所示, 结果表明分离株 Id11 和参考菌株 MRSA252 亲缘关系较近, 与参考菌株 MW2、N315 及 Mu50 亲缘关系相对较远。

### 2.3 基因功能注释

对试验菌株 Id11 的基因组进行 COG 功能分析、KEGG 通路分析以及 GO 注释统计。COG 功能分类显示, 所有注释蛋白分布于 21 个条目中(图 2), 其中具有较多功能未知的基因(S), 其次碳水化合物的运输和代谢(G)、氨基酸转运和代谢(E)、无机离子转运和代谢(P)等维持菌体基本功能的相关基因占优势。KEGG 通路分析结果显示, 共计 1 497 条注释序列归类为 157 个通路分类条目中, 最常见的 6 个通路依次是代谢通路(450, 30.06%)、次生代谢物的生物合成通路(227, 15.2%)、不同环境中的微生物代谢通路(133, 8.9%)、氨基酸生物合成通路(109, 7.3%)、ABC 转运蛋白通路(97, 6.7%)和碳代谢通路(86, 5.7%)。

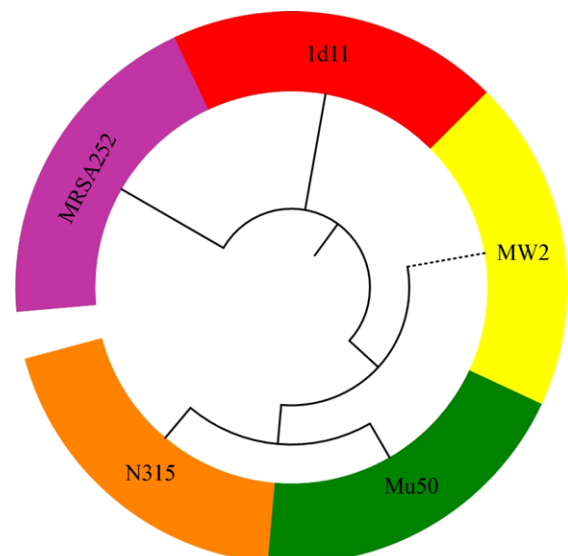


图 1 分离株 Id11 和 4 株人源 MRSA 参考菌株的核心基因组系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of core genome of isolate Id11 and 4 human MRSA reference strains

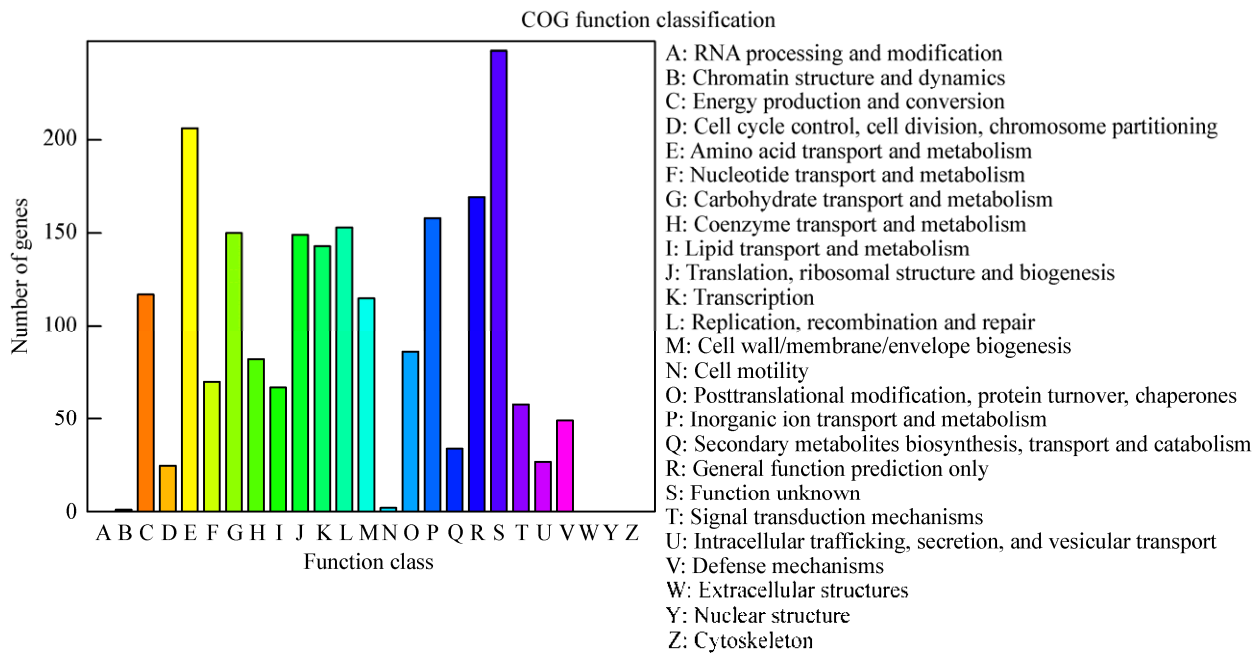


图 2 Id11 基因组注释序列 COG 功能分类图

Figure 2 The COG function classification of the genome annotation sequence of MRSA Id11 strain

GO 注释结果显示, 该基因组的所有注释序列被映射到 3 大类 45 个子功能条目中, 总计 10 801 条注释序列分别归类到分子功能(2 614, 24.2%)、细胞成分(2 723, 25.2%)及生物学过程(5 464, 50.6%)三大类中(图 3)。在 GO 分子功能分类中, 与催化活性以及结合相关的注释序列较多, 分别为 1 252 条序列和 933 条序列; 在细胞成分分类中, 细胞和细胞组分所包含的注释序列较多, 均为 727 条序列; 在生物学过程分类中, 与代谢进程以及细胞进程相关的注释序列较多, 分别为 1 503 条和 1 337 条。

## 2.4 基因岛预测

通过分析软件对试验菌株基因组序列上的基因岛进行预测分析, 结果显示从 Id11 基因组序列上共预测到 4 个基因岛(表 2), 基因岛 1 的基因编码产物多是假定蛋白; 基因岛 2 的基因编码产物多是假定蛋白和肠毒素; 基因岛 3 的基因编码产物多是蛋白酶和调节因子; 基因岛 4 的基因编码产物多是假定蛋白和转座酶。

## 2.5 CRISPR 分析及前噬菌体序列分析

通过分析软件对试验菌株基因组序列上可能存在的 CRISPR 序列进行预测分析, 分析结果显示, Id11 基因组序列上存在 9 个疑似 CRISPR 序列, 其中 6 个 CRISPR 在同一条序列上, 该序列长度为 882 317 bp, 剩余的 3 个 CRISPR 在不同的序列上, 序列长度分别为 614 960、401 863、109 482 bp (表 3)。对试验菌株基因组序列上的前噬菌体序列进行预测分析, 结果显示, Id11 基因组序列含有一个完整的前噬菌体序列, 序列长度为 45.5 kb, 位置在 83 731–129 253 bp。

## 3 讨论与结论

MRSA 是一类重要的人畜共患病原菌, 由 MRSA 感染导致的奶牛乳腺炎疾病给奶牛养殖业带来了巨大的经济损失<sup>[18]</sup>。MRSA 的研究和防控一直是各国研究人员关注的重点, 从 MRSA 的外部形态以及生化特征等表型鉴定, 到后来基因组测序技术的应用等, 研究人员对 MRSA 菌株的致病机理、流行病学特征等研究一直在逐步深入。本研

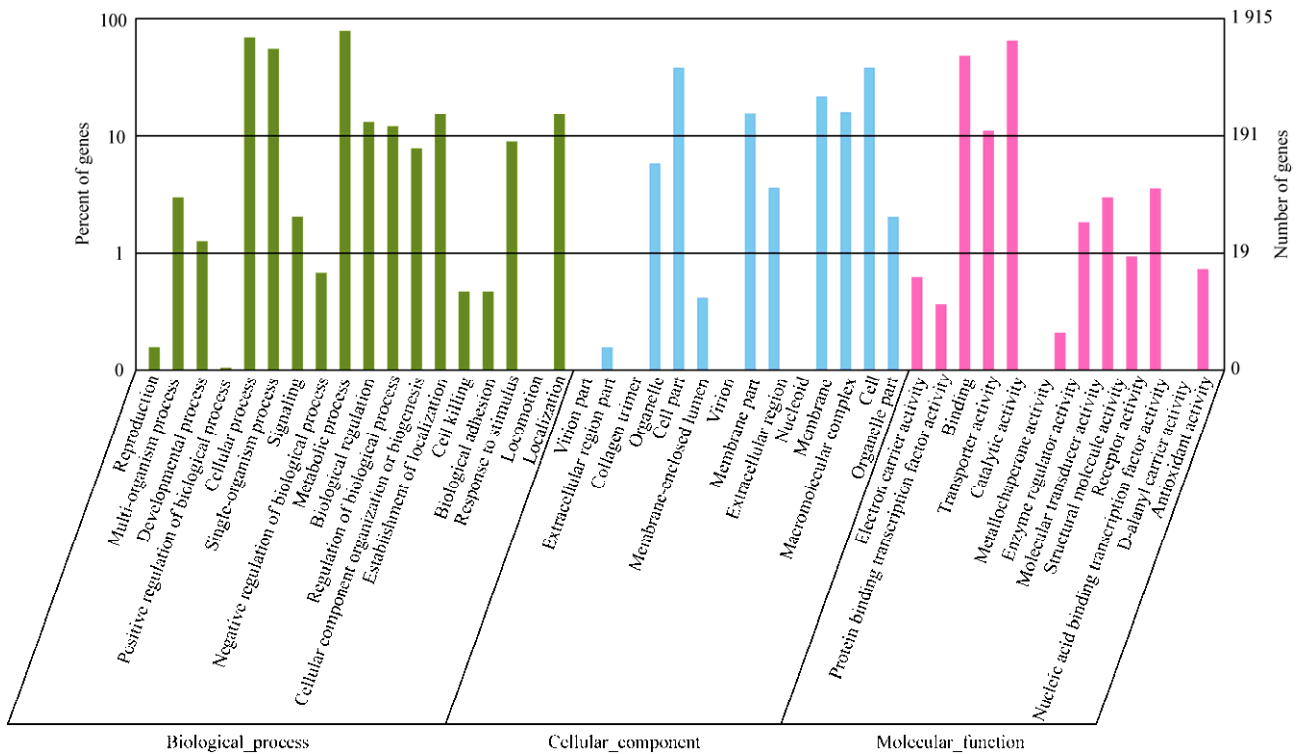


图 3 Id11 基因组注释序列 GO 功能分类图

Figure 3 The GO function classification of the genome annotation sequence of MRSA Id11 strain

表 2 Id11 MRSA 菌株基因组的基因岛预测

Table 2 Gene islands prediction of the genome of MRSA Id11 strain

基因岛编号	序列长度	基因数
Gene island number	Sequence length (bp)	Number of genes
1	9 209	14
2	5 657	9
3	10 176	10
4	3 587	7

究通过全基因组测序技术及数据库比对分析,对宁夏地区奶牛源 MRSA 流行株 Id11 的基因组基本特征进行了详细的概述。同时对分离株 Id11 进行了药敏试验,结果显示分离株 Id11 对 9 种抗菌药物均耐药(表 1),运用网络数据库对 Id11 基因组携带的耐药基因进行筛查,发现分离株 Id11 携带多种耐药基因,二者之间呈现出了很好的对应性。将分离株 Id11 和 4 株人源 MRSA 参考基因组进行对比分析,结果表明分离株 Id11 携带的耐药基因多于参考菌株携带的耐药基因,体现出了分离株 Id11

的耐药性较为严重。分离株 Id11 和参考菌株的核心基因组进化树结果显示分离株 Id11 和参考菌株 MRSA252 亲缘关系较近,值得关注。

COG 数据库是通过测序完的编码蛋白序列进行相互比较而构建的,通过 COG 数据库比对,可以对预测蛋白进行归类以及蛋白进化分析。本研究中菌株 Id11 的 COG 功能分析结果如图 2 所示,除了功能未知的基因外,碳水化合物的运输和代谢(G)、氨基酸转运和代谢(E)、无机离子转运和代谢(P)等维持菌体基本功能的相关基因占优势,使菌体对周围环境具有较强的适应性,这与 Kuroda 等报道的人源 MRSA 基因组的基因功能预测结果<sup>[19]</sup>类似,值得注意的是其报道的人源 MRSA 基因功能预测结果中的 RNA 合成和修饰功能基因占有一定优势,而本研究中动物源 MRSA Id11 的 RNA 加工和修饰的功能基因占比较低,不同 MRSA 基因组功能基因之间的区别与联系有待进一步探讨和

表 3 *ld11* 基因组的 CRISPR 分析Table 3 CRISPR analysis of the genome of MRSA *ld11* strain

序列号 Sequence number	序列长度 Sequence length (bp)	CRISPR 编号 CRISPR number	重复序列 Repeat sequence	间隔序列 Spacer sequence
NODE_1	882 317	1	CTAAAGGTGAAGAGGAACGC AGTTGGATGCTA	AGGCACAACACTGCATAAAAAGCC TCTAATCG
NODE_1	882 317	2	CCAATTTCTACAGACAATGCA AGTTGG	CGGGGCCCAACATAGAGAAA TTGGAACG
NODE_1	882 317	3	CCAACTTGCACATTATTGTAAG CTGACTTT	CCGCCAGCTTCTGTGTTGGGG CCCCG
NODE_1	882 317	4	CCCCAACTTGCATTGTCTGTAG AA	ATTGGGAATCCAATTTCTCTTT GTTGGGGCCCAT
NODE_1	882 317	5	CCCCTAACAACTAAAAGTTGT AAGG	AAGGAGAGGGGATACATGCGCC GAGCACATGCATAAAAT
NODE_1	882 317	6	AAAGTCAGCTTACAATAATGT GCAAGTTGG	CGGGGCCCAACATAGAAGCT GGCGG
NODE_2	614 960	7	GAAATTCTACAGGCAATGCGA GTTAGGGTG	TGGGTCCCAACACAGAGAATT TCGAAAT
NODE_3	401 863	8	TTTATGAATTGAGTATTAAATTT G	AAAGTAAATTACAGTTCTATAG GTTTATAAAAATCAGTTTTTAA ATCAAAGCTA
NODE_6	109 482	9	TGCATAAGAGCCCCTAACAAAC TAAAGTT	GAAAAATAGAGGAACACAGTT GGATGCTACGCATCAAC

研究。KEGG 是用于基因组分析的数据库, KEGG 数据库中丰富的通路信息有助于从分子水平了解生物系统的高级功能和效用。本研究中菌株 *ld11* 基因组序列的 KEGG 通路分析结果显示属于代谢通路的基因占比最多,这可能与菌株自身的产毒性有关,菌体通过代谢可产生多种毒素和侵袭性酶,对细菌的致病性具有重大的作用。KEGG 通路分析结果与之前的一株人源 MRSA 报道相似,略有不同的是本研究中 KEGG 通路分析注释序列较多<sup>[20]</sup>。GO 注释更便于理解基因背后所代表的生物学意义,GO 注释一般包括细胞成分、分子功能和生物学过程 3 个方面的内容。本研究通过对菌株基因组序列进行 GO 注释,注释结果显示与催化活性、细胞、细胞组分、结合、代谢进程以及细胞进程相关的注释序列较多,而这些优势序列通常与菌体的生长增殖以及各项生理活动密切相关,表明 MRSA 菌株 *ld11* 具有发达的新陈代谢能力和很强的传播能力,给人类带来巨大的危害和经济损失<sup>[21]</sup>。GO 注释在个体的基因产物和本体论术语之

间起到了一种连接作用,并在定量和定性信息之间扮演了桥梁的作用<sup>[22]</sup>。目前国内关于 MRSA 基因组序列信息 GO 注释分析的报道较少,需要加强补充分析。

基因岛通常包含不同的基因,可以编码多种功能蛋白,涉及多种共生关系,还可以提高生物的适应性。本研究从 *ld11* 基因组序列中预测到 4 个基因岛,基因岛内包含的基因产物大部分是假定蛋白,但是从其中的一个基因岛上发现了肠毒素基因的存在,肠毒素会给动物和人类脏器带来重大的损害,同时携带肠毒素的基因岛还能通过水平转移的方式传播到其他菌株,需加以重视。基因岛由于携带耐药基因或毒力基因通常又被称为“耐药岛”或“毒力岛”,MRSA 菌株的产生主要就是因为其基因组序列中的葡萄球菌染色体 *mec* 基因岛(Staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*)获得了外源性 *mecA* 基因,从而较大程度地加强了菌株的耐药性。对 MRSA 菌株基因组序列中基因岛的持续关注和研究,使我们能更好地在分子水平了解 MRSA 的

多重耐药性和毒力性产生的原因, 做好防控措施, 减少 MRSA 感染带来的损失。

CRISPR 是一串包含多个短而重复的碱基序列, 重复序列之间是一些约 30 bp 左右的间隔序列, CRISPR 序列在原核生物中起免疫保护的作用。本研究 CRISPR 分析结果显示, 1d11 基因组序列上存在 9 个疑似 CRISPR 序列, 其中 6 个 CRISPR 在同一条序列上, 剩余的 3 个 CRISPR 在不同的序列上。CRISPR 序列的发现及 CRISPR 位点间间隔序列的变化可能对 MRSA 的毒力、耐药性传递和生物膜形成等生理学特性有影响, 同时可以反映该菌株的进化历程, 为研究该地区 MRSA 菌株间的亲缘关系提供参考依据<sup>[23-24]</sup>。前噬菌体是指病毒在宿主体内真正形成之前, 以核酸的形式插入宿主基因组的阶段。本研究对 1d11 基因组序列上的前噬菌体序列进行预测分析, 结果显示 1d11 基因组序列含有 1 个完整的前噬菌体序列。前噬菌体序列的存在可能会允许一些细菌获取抗生素抗性, 增强对环境的适应性, 提高粘附力或使细菌成为致病菌。近年来, 国内外关于 MRSA 基因组中前噬菌体的报道也逐渐增多, 不同地区报道的 MRSA 基因组携带的前噬菌体的分布种类可能有所不同, 多个研究表明, 前噬菌体种类分布与其所属克隆谱系均有密切关系<sup>[17,25]</sup>。

目前, 随着基因组测序技术的不断进步, 第二、三代测序成本在不断降低, SA 基因组的测序、数据分析已经成为当前研究的热点。对 MRSA 菌株进行高通量测序, 利用高性能计算平台和生物信息学方法, 为 MRSA 菌株基因组信息的解析、功能基因的挖掘、致病因子的预测等都提供了可靠的技术和方法的支持<sup>[26]</sup>, 同时还可以对包括基因组岛、CRISPR-Cas 系统、前噬菌体在内的具有水平转移功能的可移动元件进行预测, 这些可移动元件携带的基因可能赋予菌株特殊的抗性和代谢途径, 对它们进行预测分析, 有利于更全面地认识 MRSA 菌株基因组的特征, 为 MRSA 的感染治疗和中长期防控提供理论依据。

## REFERENCES

- [1] Adnan SN, Ibrahim N, Yaacob WA. Disruption of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* protein synthesis by tannins[J]. *Germs*, 2017, 7(4): 186-192
- [2] Kim YK, Kim JS, Kim HS, et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from blood on the basis of coagulase gene polymorphism and toxin genes[J]. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 2008, 28(4): 286-292
- [3] Montesinos I, Salido E, Delgado T, et al. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein a and coagulase gene polymorphisms[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(6): 2119-2125
- [4] Vázquez-sánchez D, López-cabo M, Saá-Ibusquiza P, et al. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain)[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 157(2): 286-296
- [5] Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, 45(2): S344-S349
- [6] Kérouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 115(3): 369-375
- [7] Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(1): 275-280
- [8] Harada D, Nakaminami H, Miyajima E, et al. Change in genotype of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) affects the antibiogram of hospital-acquired MRSA[J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2018, 24(7): 563-569
- [9] Kizerwetter-Świda M, Pławińska-Czarnak J. Livestock-associated strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA)-the current state of knowledge[J]. *Medycyna Weterynaryjna*, 2017, 73(2): 92-98
- [10] Devriese LA, Hommez J. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds[J]. *Research in Veterinary Science*, 1975, 19(1): 23-27
- [11] Dhup V, Kearns AM, Pichon B, et al. First report of identification of livestock-associated MRSA ST9 in retail meat in England[J]. *Epidemiology and Infection*, 2015, 143(14): 2989-2992
- [12] Peeters LEJ, Argudín MA, Azadikhah S, et al. Antimicrobial resistance and population structure of *Staphylococcus aureus* recovered from pigs farms[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 180(1/2): 151-156
- [13] Fox A, Pichon B, Wilkinson H, et al. Detection and molecular characterization of Livestock-Associated MRSA in raw meat on retail sale in North West England[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2017, 64(3): 239-245
- [14] Liu YD, Wang H, Du N, et al. Molecular evidence for spread of two major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones with a unique geographic distribution in Chinese hospitals[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(2): 512-518



- [15] Van Rijen MML, Bosch T, Verkade EJ, et al. Livestock-associated MRSA carriage in patients without direct contact with livestock[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e100294
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals[M]. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015
- [17] Li J. Epidemiological characteristics and phylogenetic analysis of pig associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2017 (in Chinese)  
李君. 猪源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌流行病学特征及遗传进化分析[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2017
- [18] Neeraj S, Varsha S, Anju N, et al. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) mastitis in dairy cattle in Jabalpur, Madhya Pradesh[J]. Journal of Animal Research, 2017, 7(1): 77-84
- [19] Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. The Lancet, 2001, 357(9264): 1225-1240
- [20] Yao WM, Chen Z, Wang HY, et al. Analysis of complete genome sequence of methicillin resistant *Staphylococcus Aureus*-MS4[J]. Shenzhen Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2017, 27(15): 6-9 (in Chinese)  
姚伟明, 陈重, 王红燕, 等. 一株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MS4 的全基因组测序结果分析[J]. 深圳中西医结合杂志, 2017, 27(15): 6-9
- [21] Wang C. Primary screening of virulence genes of *B. melitensis* base on whole-genome sequencing[D]. Yinchuan: Master's Thesis of Ningxia Medical University, 2014 (in Chinese)  
汪超. 基于全基因组测序技术对 *B. melitensis* 毒力基因的初筛[D]. 银川: 宁夏医科大学硕士学位论文, 2014
- [22] Broadbent JA, Sampson DL, Broszczak DA, et al. Choose wisely: Network, ontology and annotation resources for the analysis of *Staphylococcus aureus* omics data[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2015, 305(3): 339-347
- [23] Zhang K, Chen JC, Li Y, et al. Application progress of CRISPR/Cas9 technology in microbiological research[J]. Microbiology China, 2018, 45(2): 451-464 (in Chinese)  
张昆, 陈景超, 李祎, 等. CRISPR/Cas9 技术在微生物研究中的应用进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 451-464
- [24] Ye LN, Chen L, Qu D. CRISPR/Cas systems of *Staphylococcus*[J]. Journal of Microbes and Infections, 2017, 12(4): 254-262 (in Chinese)  
叶立娜, 陈力, 瞿涤. 葡萄球菌 CRISPR/Cas 系统[J]. 微生物与感染, 2017, 12(4): 254-262
- [25] Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, et al. Prophage and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Iran[J]. Archives of Virology, 2012, 157(9): 1807-1811
- [26] Zhang R, Zhang CT. The impact of comparative genomics on infectious disease research[J]. Microbes and Infection, 2006, 8(6): 1613-1622