

文章编号: 1001-8689(2019)05-0586-05

## 血流感染肺炎克雷伯菌中 CRISPR-Cas 系统的分布及其与毒力基因和耐药的关系

杜芳玲<sup>1</sup> 黄先琪<sup>2</sup> 魏丹丹<sup>1</sup> 梅艳芳<sup>1</sup> 刘盼盼<sup>1</sup> 刘洋<sup>1,\*</sup> 万腊根<sup>1</sup>

(1 南昌大学第一附属医院检验科, 南昌 330006; 2 南昌大学公共卫生学院, 南昌 330006)

**摘要:** 目的 了解血流感染肺炎克雷伯菌中 CRISPR-Cas 系统的分布特征并分析其与毒力基因和耐药的关系。方法 收集非重复血流感染肺炎克雷伯菌 248 株, 使用 Vitek2-Compact 全自动微生物分析系统进行菌株鉴定及药物敏感性分析, PCR 检测 CRISPR-Cas 系统 3 个相关基因 (*CRISPR1*、*CRISPR2* 和 *casI*)、筛查 6 种常见高毒力荚膜血清型 (K1、K2、K5、K20、K54 和 K57)、12 种毒力基因及检测 13 种耐药基因, 用  $\chi^2$  检验比较携带有 CRISPR-Cas 系统菌株与不携带 CRISPR-Cas 系统菌株毒力及耐药差异。结果 CRISPR-Cas 系统的检出率为 29.8%(74/248); K1 型是携带 CRISPR-Cas 系统肺炎克雷伯菌的主要荚膜血清型, 占 28.4%(21/74); 除 *kpn* 基因外, 携带 CRISPR-Cas 系统菌株的毒力基因检出率均大于不携带 CRISPR-Cas 系统菌株, 其中 7 种差异有统计学意义; 除对氨苄西林耐药率达 100% 外, 携带有 CRISPR-Cas 系统菌株的其他抗菌药物耐药率均小于不携带有 CRISPR-Cas 系统菌株, 其中 13 种差异有统计学意义; 携带 CRISPR-Cas 系统菌株的耐药基因阳性率小于不携带 CRISPR-Cas 系统的菌株, 且 *bla<sub>KPC</sub>*、*bla<sub>SHV</sub>*、*qnrS* 基因差异有统计学意义。结论 高毒力荚膜血清型肺炎克雷伯菌中主要为 K1 型携带 CRISPR-Cas 系统, 携带 CRISPR-Cas 系统的肺炎克雷伯菌相对于不携带 CRISPR-Cas 系统菌株的毒力基因阳性率高, 耐药率低, 耐药基因的阳性率低。CRISPR-Cas 系统可能降低耐药基因在肺炎克雷伯菌中的水平传播, 尤其是在 K1 型肺炎克雷伯菌。

**关键词:** 肺炎克雷伯菌; CRISPR-Cas 系统; 毒力基因; 耐药

中图分类号: R978.1 文献标志码: A

## Distribution of the CRISPR-Cas system in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from blood samples and its relationship with virulence genes and resistance

Du Fang-ling<sup>1</sup>, Huang Xian-qi<sup>2</sup>, Wei Dan-dan<sup>1</sup>, Mei Yan-fang<sup>1</sup>, Liu Pan-pan<sup>1</sup>, Liu Yang<sup>1</sup> and Wan La-gen<sup>1</sup>

(1 The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006; 2 Nanchang University Public Health School, Nanchang 330006)

**Abstract Objective** To understand the distribution of the CRISPR-Cas system in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from blood samples and its relationship with virulence genes and resistance. **Methods** Two hundreds and forty-eight *K. pneumoniae* strains were collected from blood samples. The strains were identified using Vitek2-compact automatic microorganisms analysis system, and the drug susceptibility was analyzed. All the isolates were assessed for three CRISPR-Cas system related genes, six hypervirulent capsular serotypes, twelve virulence genes, and thirteen resistant genes by PCR. The virulence and drug resistance between CRISPR-Cas<sup>+</sup> strains and CRISPR-Cas<sup>-</sup> were compared by chi-square tests. **Results** The positive rate of the CRISPR-Cas systems was 29.8% (74/248). K1-kps was the major capsule serotype of *Klebsiella pneumoniae* carrying the CRISPR-Cas system, accounting for

收稿日期: 2018-05-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81560323); 江西省教育厅青年基金资助项 (No. GJJ160233); 江西省卫生计生委科技计划基金资助项目 (No. 20155140); 2018 年南昌大学研究生创新专项资金项目 (No. CX2018199)

作者简介: 杜芳玲, 女, 生于 1994 年, 在读硕士研究生, 主要从事微生物耐药及致病机制的研究, E-mail: 2352598205@qq.com

\* 通讯作者, E-mail: ly13767160474@sina.com

28.4% (21/74). Except for *kpn* gene, the positive rates of virulence genes carrying the CRISPR-Cas system strains were larger than those without the CRISPR-Cas system strains, of which seven types of differences were statistically significant. Except for ampicillin intrinsic resistance, the resistance rates of other antimicrobials carrying the CRISPR-Cas system strains were smaller than those without the CRISPR-Cas system strains, of which 13 types of differences were statistically significant. The positive rate of drug resistance genes carrying the CRISPR-Cas system was smaller than that of the strains that did not carry the CRISPR-Cas system, and the differences of *KPC*, *SHV*, and *qnrS* genes were statistically significant. **Conclusions** Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* carrying CRISPR-Cas systems was K1-kpn. The *Klebsiella pneumoniae* carrying the CRISPR-Cas systems had a higher positive rate of the virulence gene, a lower resistance rate and a lower rate of drug resistance genes than that didn't carry the CRISPR/Cas system strain. The CRISPR-Cas system might reduce the horizontal transference of drug resistance genes in *Klebsiella pneumoniae*, especially in K1-kpn.

**Key words** *Klebsiella pneumoniae*; CRISPR-Cas system; Virulence gene; Drug resistance

肺炎克雷伯菌是临床常见的条件致病菌之一，近年来呈现多耐药、高毒力特点，严重危害人类健康。在肠杆菌科中，肺炎克雷伯菌是仅次于大肠埃希菌的血流感染病原菌<sup>[1]</sup>。由成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关序列 (CRISPR-associated sequences, Cas) 组成的 CRISPR-Cas 系统是新发现的原核生物获得性免疫系统，具有调控细菌耐药和毒力的重要作用<sup>[2]</sup>，但具体的作用机制不清楚。本研究以血流感染非重复肺炎克雷伯菌 248 株为研究对象，阐述了血流感染肺炎克雷伯菌中 CRISPR-Cas 系统的分布及其与毒力基因和耐药的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源及鉴定

收集南昌大学第一附属医院 2015 年 1 月—2017 年 12 月分离 248 株血流感染的非重复肺炎克雷伯菌作为实验菌株，采用 Vitek2-Compact 全自动细菌鉴定仪进行生化鉴定并保存。

### 1.2 CRISPR/CAS 系统检测

参考 Lin 等<sup>[3]</sup>文献，PCR 扩增检测 *cas1*、*CRISPR1* 和 *CRISPR2* 3 个基因，引物、体系和条件参照文献进行。*cas1* 阳性及至少 1 个 CRISPR 基因座 (*CRISPR1* 或 *CRISPR2*) 阳性说明 CRISPR-Cas 系统存在，定义为 CRISPR/Cas<sup>+</sup>，其余为 CRISPR/Cas<sup>-</sup>。

### 1.3 荚膜血清分型及毒力基因检测

热裂解法提取菌株 DNA。对所有肺炎克雷伯菌用 PCR 方法筛选高毒力荚膜血清型基因 (K1、K2、K5、K20、K54 和 K57)<sup>[4]</sup>，并用 PCR 方法对其扩增 12 种常见毒力基因 (*rmpA*, *iutA*, *magA*, *wcaG*, *mrkD*, *aerobactin*, *rmpA2*, *fimH*, *entB*, *kfu*, *ybtS*, *kpn*)，PCR 的扩增引物、体系和条件参照相关文献进行<sup>[5-6]</sup>。

### 1.4 药敏试验和耐药基因检测

体外药物敏感性试验用 Vitek2-Compact 全自动微生物分析仪开展，参照美国临床实验室标准化研究所 (M100-S27) 规定的标准对耐药 (R)、中介 (I)、敏感 (S) 的解释。PCR 扩增检测 13 种耐药基因，其中 4 种碳青霉烯酶基因 (*bla*<sub>NDM</sub>、*bla*<sub>KPC</sub>、*bla*<sub>VIM</sub> 和 *bla*<sub>O<sub>X</sub>A-48</sub>)、3 种 β-内酰胺酶基因 (*bla*<sub>SHV</sub>、*bla*<sub>CTX-M-14</sub> 和 *bla*<sub>TEM</sub>)、2 种 16S rRNA 甲基化酶基因 (*arma* 和 *rmtB*)，4 种 PMQR 基因 (*acc(6')-Ib-cr*、*qnrA*、*qnrB* 和 *qnrS*)，PCR 的扩增引物、体系和条件参照文献 [7] 进行。

### 1.5 统计分析

使用 SPSS 21 统计软件进行统计分析，根据是否携带 CRISPR-Cas 分为两组，对其荚膜血清分型、毒力基因、抗菌药物的耐药性、耐药基因、进行比较。由于是计量资料使用  $\chi^2$  检验进行分析， $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CRISPR-Cas 系统检测、荚膜血清分型及毒力基因分布

248 株血源性肺炎克雷伯菌中，携带有 CRISPR-Cas 系统菌株共 74 株，阳性率为 29.8%(74/248)，高毒力荚膜血清型 69 株，阳性率为 27.8 %(69/248)，且主要为 K1 型 (23 株，33.3%)、K2 型 (21 株，30.4%) 和 K54(11 株，15.9%)，其余为 K5 型 (1 株，1.4%)、K20(4 株，5.8%) 和 K57(9 株，13.0%)，其中携带 CRISPR-Cas 与的高毒力血清型肺炎克雷伯菌 29 株，阳性率为 11.7%(29/248)。此外，7 种毒力基因中检出率最高为 *fimH*(94.8%)，其次为 *mrkD*(92.3 %)(表 1)。

### 2.2 CRISPR-Cas 系统与荚膜血清分型、毒力基因的关系

高毒力荚膜血清型菌株在 CRISPR-Cas<sup>+</sup> 与

表 1 CRISPR-CAS、K 分型及毒力基因携带 [n(%)]  
**Tab. 1** Detection of CRISPR-CAS, capsular serotypes and virulence genes [n(%)]

类型	基因	株数 (n=248)	组别		P 值
			CRISPR/Cas <sup>+</sup> 肺炎克雷伯菌 (n=74)	CRISPR/Cas <sup>-</sup> 肺炎克雷伯菌 (n=174)	
荚膜血清型基因	K1	23(9.3)	21(28.4)	2(1.1)	<0.001
	K2	21(8.5)	4(5.4)	17(9.8)	0.259
	K5	1(0.4)	0	1(0.6)	NA
	K20	4(1.6)	1(1.4)	3(1.7)	1.000 <sup>a</sup>
	K54	11(4.4)	1(1.4)	10(5.7)	0.181 <sup>a</sup>
	K57	9(3.6)	2(2.7)	7(4.0)	1.000 <sup>a</sup>
	NT	179(72.2)	45(60.8)	134(77)	0.009
毒力基因	rmpA	100(40.3)	41(55.4)	59(33.9)	0.002
	iutA	107(43.1)	40(54.1)	67(38.5)	0.024
	magA	39(15.7)	29(39.2)	10(5.7)	<0.001
	mrkD	229(92.3)	71(95.9)	158(90.8)	0.164
	wcaG	74(29.8)	42(56.8)	32(18.4)	<0.001
	aerobact	172(69.4)	60(81.1)	112(64.4)	0.009
	rmpA2	90(36.3)	34(45.9)	56(32.2)	0.039
	fimH	235(94.8)	71(95.9)	164(94.3)	0.760 <sup>a</sup>
	entB	211(85.1)	66(89.2)	145(83.3)	0.236
	kfu	88(35.5)	57(77)	31(17.8)	<0.001
	ybtS	157(63.3)	52(70.3)	105(60.3)	0.138
	kpn	179(72.2)	36(48.6)	143(82.2)	<0.001

CRISPR-Cas<sup>+</sup> 菌株中的阳性率分别为 39.2%(29/74) 和 23.0%(40/174)，两者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，K1 型是携带 CRISPR-Cas 系统肺炎克雷伯菌的主要荚膜血清分型，占 28.4%(21/74)。除 kpn 基因外，携带 CRISPR-Cas 系统菌株的毒力基因的检出率均大于不携带 CRISPR-Cas 系统菌株，其中 7 种 (rmpA、iutA、magA、wcaG、aerobactin、rmpA2 和 kfu) 差异有统计学意义 ( $P$  值均小于 0.05)(表 1)。

### 2.3 药敏结果及其与 CRISPR-Cas 系统的关系

药敏结果显示，除对氨苄西林耐药率达 100% 外，携带有 CRISPR-Cas 系统菌株对于其他抗菌药物的耐药率均小于不携带有 CRISPR-Cas 系统菌株，其中 12 种 (头孢唑林、头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟、哌拉西林/三唑巴坦、氨曲南、阿米卡星、左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑、厄他培南、亚胺培南、美罗培南) 差异有统计学意义 ( $P$  值均小于 0.05)(表 2)。

### 2.4 耐药基因分布及其与 CRISPR-Cas 系统的关系

PCR 扩增耐药基因显示对于 bla<sub>NDM</sub>、bla<sub>KPC</sub>、bla<sub>TEM</sub>、bla<sub>CTX-M-14</sub>、bla<sub>SHV</sub>、rmtB、qnrB、qnrS、acc(6')-Ib-cr 阳性率，携带 CRISPR-Cas 系统的菌株

表 2 抗菌药物耐药分布 [n(%)]  
**Tab. 2** Distribution of antimicrobial drug resistance R[n(%)]

抗菌药物	株数 (n=248)	组别		P 值
		CRISPR/Cas <sup>+</sup> 肺炎克雷伯菌 (74 株)	CRISPR/Cas <sup>-</sup> 肺炎克雷伯菌 (174 株)	
头孢唑林	174(70.2)	40(54.1)	134(77.0)	<0.001
头孢曲松	154(62.1)	37(50.0)	117(67.2)	0.010
头孢他啶	102(41.1)	18(24.3)	84(48.3)	<0.001
头孢吡肟	133(53.6)	26(35.1)	107(61.5)	<0.001
氨苄西林	248(100)	74(100)	174(100)	NA
哌拉西林 / 三唑巴坦	81(32.7)	13(17.6)	68(39.1)	0.001
氨曲南	141(56.9)	32(43.2)	109(62.6)	0.005
庆大霉素	68(27.4)	16(21.6)	52(29.9)	0.182
妥布霉素	64(25.8)	13(17.6)	51(29.3)	0.053
阿米卡星	47(19.0)	8(10.8)	39(22.4)	0.033
左氧氟沙星	86(34.7)	15(20.3)	71(40.8)	0.002
复方磺胺甲噁唑	92(40.4)	22(29.7)	70(45.5)	0.023
厄他培南	126(50.8)	25(33.8)	101(58.0)	<0.001
亚胺培南	77(31.0)	11(14.9)	66(37.9)	<0.001
美罗培南	74(29.8)	10(13.5)	64(36.8)	<0.001

注：NA：无法计算

表 3 耐药基因携带 [n(%)]

Tab. 3 Detection of resistance gene[n(%)]

耐药基因	株数 (n=248)	组别		P 值
		CRISPR/Cas <sup>+</sup> - 肺炎克雷伯菌 (n=74)	CRISPR/Cas- 肺炎克雷伯菌 (n=174)	
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	0(0)	0(0)	0(0)	NA
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	4(1.6)	1(1.4)	3(1.7)	1.000 <sup>a</sup>
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	69(27.8)	12(16.2)	57(32.8)	0.008
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	0(0)	0(0)	0(0)	NA
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	165(66.5)	39(52.7)	126(72.4)	0.003
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	168(67.7)	47(63.5)	121(69.5)	0.353
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	108(43.5)	30(40.5)	78(44.8)	0.533
<i>rmtB</i>	42(16.9)	12(16.2)	30(17.2)	0.844
<i>armA</i>	0(0)	0(0)	0(0)	NA
<i>qnrA</i>	0(0)	0(0)	0(0)	NA
<i>qnrB</i>	37(14.9)	10(13.5)	27(15.5)	0.685
<i>qnrS</i>	77(31.0)	11(14.9)	66(37.9)	<0.001
<i>acc6</i>	49(19.8)	13(17.8)	36(20.7)	0.604

注: <sup>a</sup>: Fisher 精确检验; NA: 无法计算; NT: 未分型

小于不携带 CRISPR-Cas 系统的菌株, 且 *bla*<sub>KPC</sub>、*bla*<sub>SHV</sub>、*qnrS* 差异有统计学意义 (*P* 值均小于 0.05)(表 3)。

### 3 讨论

CRISPR-Cas 系统是细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御, 可对抗噬菌体、质粒等外源性 DNA<sup>[8]</sup>。本研究首次分析了血流感染肺炎克雷伯菌中 CRISPR-Cas 系统的分布情况, 并初步探讨了该系统与毒力基因和耐药的关系。

本研究中 CRISPR-Cas 系统的检出率为 29.8%(74/248), 比 Marth 等<sup>[9]</sup>报道(11.5%)和 Lin 等<sup>[3]</sup>报道(12.4%)检出率高。荚膜血清分型结果表明大部分 K1(91.3%)携带 CRISPR-Cas 系统, 这与 Lam 等<sup>[10]</sup>报道相符: 大多数 CG23 型(*n* 93, 94.9%)肺炎克雷伯菌携带 CRISPR/Cas 系统。

毒力基因检测结果显示携带 CRISPR-Cas 系统菌株的毒力基因检出率均大于不携带 CRISPR-Cas 系统菌株, 其中 7 种差异有统计学意义, 所以携带 CRISPR-Cas 系统的肺炎克雷伯菌毒力基因检出率更高。CRISPR-Cas 系统对存在质粒上的毒力基因 *iutA*、*rmpA2* 等没有剪辑作用有待进一步研究。然而在志贺菌中活性 CRISPR-Cas 系统的存在与所检测毒力基因的分布无关<sup>[11]</sup>; 在肺炎链球菌中, 含有荚膜基因的质粒的菌株可以通过 CRISPR-Cas 系统干扰阻断其质粒进入无毒菌株, 从而抑制毒力株的出现<sup>[12]</sup>。

CRISPR-Cas 系统通过 Cas 蛋白将外源性基因裂

解, 从而限制基因的水平转移, 抵抗噬菌体感染及质粒接合转移等<sup>[13]</sup>。而肺炎克雷伯菌耐药的主要机制之一是耐药基因的水平转移, 目前有关 CRISPR 与耐药关系的报道在不同的细菌中尚不一致, 粪肠球菌中 *cas1* 或 *cas3* 与多重耐药的获得呈负相关<sup>[14]</sup>; 另一研究也发现粪肠球菌的 CRISPR-Cas 与获得性耐药关相反<sup>[15]</sup>。但王琳琳等<sup>[16]</sup>发现志贺菌中 CRISPR-S4 阳性菌株与阴性菌株之间多重耐药的分布差异无统计学意义; Touchon 等<sup>[17]</sup>发现大肠埃希菌的 CRISPER-cas I-E 在敏感株和耐药株间无差异, 并且耐药质粒仍可以在 CRISPR 阳性大肠埃希菌之间传播。本研究分析了 CRISPR-Cas 系统与耐药的分布, 药敏结果发现除对氨苄西林天然耐药外, CRISPR-Cas 系统与其他抗菌药物的耐药率呈负相关, 与 Lin 等<sup>[3]</sup>报道相符。耐药基因结果显示携带 CRISPR-Cas 系统的肺炎克雷伯菌相对于不携带 CRISPR-Cas 系统菌株耐药基因阳性率低, 且 *KPC*、*SHV* 和 *qnrS* 差异有统计学意义。

本研究只是初步地探讨了肺炎克雷伯菌中 CRISPR-Cas 系统与毒力基因和耐药的关系, 发现了 CRISPR-Cas 系统可能降低耐药基因在肺炎克雷伯菌中的水平传播, 尤其是在 K1 型肺炎克雷伯菌, 但其对毒力基因没有剪辑作用还待研究。另外 CRISPR-Cas 对毒力和耐药的影响机制也还待进一步研究探讨。

### 参 考 文 献

- [1] 魏泽庆, 沈萍, 陈云波, 等. Mohnarin 2010 年报告: 血流感染细菌构成及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(3): 465-470.
- [2] Jansen R, Embden J D A V, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Mol Microbiol, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [3] Lin T L, Pan Y J, Hsieh P F, et al. Imipenem represses CRISPR-Cas interference of DNA acquisition through H-NS stimulation in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Sci Rep, 2016, 6: 31644.
- [4] Liu C, Shi J, Guo J. High prevalence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infection in the genetic background of elderly patients in two teaching hospitals in China[J]. Infect Drug Resist, 2018, 11: 1031-1041.
- [5] 吕继芳. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌耐药基础及毒力因子分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [6] El F R, Messai Y, Alouache S, et al. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens[J]. Pathol Biolog, 2013, 61(5): 209-216.
- [7] Wei D D, Wan L G, Yu Y, et al. Characterization of

- extended-spectrum beta-lactamase, carbapenemase, and plasmid quinolone determinants in *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying distinct types of 16S rRNA methylase genes, and their association with mobile genetic elements[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2015, 21(2):186-193.
- [8] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [9] Ostriahernández M L, Sánchezvallejo C J, Ibarra J A, et al. Survey of clustered regularly interspaced short palindromic repeats and their associated Cas proteins (CRISPR/Cas) systems in multiple sequenced strains of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *BMC Res Notes*, 2015, 8(1): 332.
- [10] Lam M M C, Wyres K L, Duchêne S, et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination[J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 2703.
- [11] 郭向娇, 王颖芳, 王琳琳, 等. 临床分离志贺菌中 CRISPR/Cas 系统的分布及其与毒力基因的关系 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(3): 543-549.
- [12] Bikard D, Hatoum-Aslan A, Mucida D, et al. CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during *in vivo* bacterial infection[J]. *Cell Host Microbe*, 2012, 12(2): 177-186.
- [13] Jansen R, Embden J D A V, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [14] Burley K M, Sedgley C M. CRISPR-Cas, a prokaryotic adaptive immune system, in endodontic, oral, and multidrug-resistant hospital-acquired *Enterococcus faecalis*[J]. *J Endodont*, 2012, 38(11): 1511-1515.
- [15] Palmer K L, Gilmore M S. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas[J]. *Mbio*, 2010, 1(4): 516-524.
- [16] 王琳琳, 王颖芳, 薛泽润, 等. 志贺菌 CRISPR 的检测及