



宋内志贺氏菌 1173 质粒基因组及耐药基因转移机制

张德福^{1,2}, 赵禹宗^{1,2}, 刘东³, 冯娇², 张明¹, 曲道峰⁴, 周冬生², 励建荣¹, 殷喆^{2*}, 王丽^{3*}

¹渤海大学食品科学与工程学院, 辽宁省食品安全重点实验室, 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 辽宁 锦州 121013

²军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

³河南大学第一附属医院检验科, 河南 开封 475000

⁴浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018

摘要:【目的】研究质粒介导宋内志贺氏菌 1173 耐药基因 *bla*_{CTX-M-64} 转移的机制。【方法】用双纸片协同扩散法验证 1173 是否产超广谱 β-内酰胺酶(ESBL), 用 PCR 扩增鉴定其携带的耐药基因, 接合转移实验检验其耐药质粒是否可通过接合转移给其他细菌, 对接合子是否产 ESBL 和携带耐药基因进行检验, 利用 VITEK[®] 2 检测 1173 和接合子的耐药谱, 提取质粒进行高通量基因组测序, 并对质粒序列进行生物信息学分析, 以研究其耐药基因转移机制。【结果】1173 是产 ESBL 的多药耐药宋内志贺氏菌, 携带的耐药基因有 *bla*_{CTX-M-64} 和 *bla*_{TEM}, 其中的 *bla*_{CTX-M-64} 可通过接合转移作用传递给受体菌 EC600, 并使接合子具有相应的耐药谱。经序列测定和生物信息学分析表明, 介导 *bla*_{CTX-M-64} 水平转移的是 *ISEcp1-bla*_{CTX-M-64}-*Δorf477* 转座单元。【结论】质粒携带的 *bla*_{CTX-M-64} 介导 1173 对多类抗菌药物的耐药, *ISEcp1-bla*_{CTX-M-64}-*Δorf477* 转座单元介导 *bla*_{CTX-M-64} 在细菌间的转移。

关键词: 宋内志贺氏菌, 质粒, 多药耐药, 转座单元, 移动元件, *bla*_{CTX-M-64}

志贺氏菌属(*Shigellae*)通称痢疾杆菌, 是广泛存在于自然环境中的革兰氏阴性病原菌, 其引起的细菌性腹泻是常见的一种胃肠道疾病^[1-2]。据报道, 全球每年约有 1.6 亿人因感染志贺氏菌患病,

约占腹泻病例的 15%以上^[3]。根据血清型的不同, 志贺氏菌可以分为福氏志贺氏菌(*S. flexneri*)、宋内志贺氏菌(*S. sonnei*)、鲍氏志贺氏菌(*S. boydii*)和痢疾志贺氏菌(*S. dysenteriae*)四种^[1]。志贺氏菌属菌

基金项目: 国家自然科学基金(81501779); 辽宁省自然科学基金(20170540022); 辽宁省教育厅项目(LY2016001); 病原微生物生物安全国家重点实验室开放研究基金(SKLPBS1520); 博士后科学基金(2015M582803)

*通信作者。王丽, Tel/Fax: +86-371-22736871, E-mail: wangli851217@163.com; 殷喆, Tel: +86-10-66948556, Fax: +86-10-63815259, E-mail: jerry9yin@163.com

收稿日期: 2017-05-08; 修回日期: 2017-05-25; 网络出版日期: 2017-07-21

群分布复杂,因国家、地区和年代的不同而有差异,且世界各地流行的志贺氏菌每隔 20–30 年发生一次变迁^[2]。发达国家以宋内志贺氏菌为主,发展中国家以福氏志贺氏菌为主^[4];在我国,以福氏志贺氏菌和宋内志贺氏菌多见,且由福氏志贺氏菌向宋内志贺氏菌转移的趋势^[5]。由于抗菌药物在临床及畜牧养殖业中的广泛应用导致的选择性压力使大量多药耐药宋内志贺氏菌出现^[6–7],之前有效的青霉素类、四环素类和磺胺类药物不再有效,临床用药的形势变得严峻起来,严重威胁公众健康^[8–9]。

产 β -内酰胺酶是革兰氏阴性菌耐药的重要方式^[10]。自上个世界八十年代早期大量使用有广谱抗菌作用的头孢菌素以来,超广谱 β -内酰胺酶(Extended-spectrum beta-lactamase, ESBL)开始出现。它可以水解包括第三代头孢菌素和单环 β -内酰胺类在内的广谱 β -内酰胺类抗菌药物,并使之失去活性^[10–11]。CTX-M 已成为目前世界上最常见的超广谱 β -内酰胺酶类型,并且已发现存在于肠杆菌科多个种属细菌可接合转移的质粒上,从而能够在同种属和不同种属的细菌间水平转移^[11]。目前,CTX-M 型 β -内酰胺酶根据氨基酸序列的差异可以分为至少 6 个类群:CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-8、CTX-M-9、CTX-M-25 和 KLUC。其中,CTX-M-45、CTX-M-64、CTX-M-123 和 CTX-M-132 四个亚型是类群间的杂合体^[12]。

本研究中,我们对临床分离到的 1 株产 ESBL 宋内志贺氏菌 1173 的耐药表型进行了鉴定,确定耐药质粒能够通过接合转移水平转移给其他细菌,并提取质粒进行了高通量基因组序列测定及生物信息学分析,对携带耐药基因的移动元件和耐药基因座位进行了精细注释,以探明其耐药基因转移的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:菌株 1173 分离自 2011 年就诊于 302 医院的一位 65 岁女性腹泻患者的大便样本。经沙门氏菌-志贺氏菌(*Salmonella-Shigella*, SS)培养基分离,挑单菌落进行玻片凝集实验鉴定,然后经质谱仪(Bruker 公司)和 16S rRNA 基因扩增,最终鉴定为宋内志贺氏菌。

1.1.2 主要试剂: *Taq* DNA 聚合酶、DNA 分子量标准为生工生物工程(上海)股份有限公司产品, *Pfu* 酶和 dNTPs 购自 Fermentas 公司, Qiagen Large Construct Kit 购自 QIAGEN 公司,引物由北京博迈德基因技术有限公司合成,头孢他啶(Ceftazidime, CAZ) (30 μ g)、头孢他啶/克拉维酸(Clavulanic acid, CA) (30 μ g/10 μ g)、头孢噻肟(Cefotaxime, CTX) (30 μ g)和头孢噻肟/克拉维酸(30 μ g/10 μ g)药敏纸片购自 OXID 公司, MH、BHI 培养基购自 BD Bioscience 公司, SS 培养基购自北京陆桥技术股份有限公司。

1.2 ESBL 确证实验

ESBL 确证实验参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)标准^[13],分别将头孢他啶和头孢他啶/克拉维酸纸片、头孢噻肟和头孢噻肟/克拉维酸纸片贴于涂布菌液的 MH 平板表面。37 °C 孵育 18–20 h 后观察、测量抑菌圈大小。含酶抑制剂的抑菌圈直径与单药抑菌圈相比 ≥ 5 mm 时,即判定该菌株产 ESBL。

1.3 耐药基因扩增及 CTX-M 全序列测定

根据 Chen 等^[14]的报道,合成主要的 ESBL 基因和碳青霉烯酶基因扩增引物,稀释到浓度为 10 μ mol/L 备用。根据试剂盒的说明,提取 1173

的全基因组 DNA, 稀释为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用或直接作为模板进行靶基因扩增, 扩增产物经 1%浓度的琼脂糖电泳后置于紫外灯下观察拍照, PCR 产物送博迈德公司进行序列测定。PCR 的反应体系为: DNA 10 ng, $10\times$ Buffer 5 μL , dNTPs 0.5 μL , *Taq* 酶 2 U, Pfu 酶 0.5 U, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 0.5 μL , ddH₂O 3 μL 。PCR 的反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30–50 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 s, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。

以 ISEcp1-F1 (5'-GGAGTGTATGAAAAATGTCTGG-3')/orf477-R1 (5'-CGTGCTGTCGCTGGATACC-3')为引物对进行 *bla*_{CTX-M}-orf477 区全序扩增及序列测定, 与 GenBank 中的参考序列进行对比, 确定 *bla*_{CTX-M} 的基因亚型。

1.4 接合转移实验

根据蒋晓圆等^[15]的方法, 以 *bla*_{CTX-M} 阳性的 1173 为供体菌, 以利福平耐药大肠杆菌 EC600 (LacZ⁻, Nal^R, Rif^R)为受体菌进行接合转移实验。将受体菌和供体菌分别接种于 BHI 肉汤中过夜培养, 分别取 3 mL 供体菌和受体菌混合, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $3000\times g$ 离心 5 min, 加入 80 μL BHI 肉汤吹打悬浮, 点加于贴在 BHI 琼脂培养基的滤膜上(1 cm^2 大小, 0.45 μm 孔径), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 12–18 h。取滤膜用适量 BHI 肉汤培养基(200 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄西林, 2.5 mg/mL 利福平)将菌体洗下, 涂布于含有 200 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄西林和 2.5 mg/mL 利福平的 BHI 琼脂培养基上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 24–28 h 后的单菌落即为接合子(1173-CTXM-EC600)。以 ISEcp1-F1/orf477-R1 为引物对, PCR 鉴定接合子是否存在 *bla*_{CTX-M} 基因, 利用质谱及 16S rRNA 基因扩增测定接合子是否为受体菌, 对接合子进行双纸片协同扩散法的 ESBL 确证实验。

1.5 MIC 测定

采用 VITEK[®] 2 仪器进行 MIC 的检测(法国梅里埃公司), 并按照 CLSI^[13]文件标准进行判定。

1.6 质粒基因组序列测定及生物信息学分析

将宋内志贺氏菌 1173 中携带 *bla*_{CTXM} 的质粒命名为 p1173-CTXM, 用 Qiagen Large Construct Kit 提取接合子 1173-CTXM-EC600 的质粒 DNA, 用 Illumina HiSeq 2500 进行高通量全基因组鸟枪法测序, 并对 GenBank 中的数据进行 BLASTn 比对分析, 查找近缘质粒, 并以近缘质粒的序列为参考用 Velvet 软件进行序列拼接, 然后采用 PCR 和 Sanger 双脱氧链终止法测序技术对缺失部分进行补充, 获得质粒序列全长。对全序列利用 GeneMarkS 和 RAST 对全序列进行基因预测, 随后通过对 NR 库、UniProtKB/Swiss-Prot 等数据库进行比对分析, 对预测的编码区基因进行注释。移动元件利用 ISfinder、INTEGRALL 及 Tn number registry 网站进行预测分析, 并进行精细注释。使用 Inkscape v0.48 软件进行质粒图谱的绘制。

1.7 序列登录号

将 p1173-CTXM 全序列及注释结果提交至 GenBank, 登录号为 KY174331。

2 结果和分析

2.1 ESBL 确证实验

双纸片协同扩散法结果表明(图 1), 1173 对头孢噻肟/克拉维酸的抑菌圈为 35 mm, 对头孢噻肟的抑菌圈为 10 mm, 相差 $25\text{ mm}\geq 5\text{ mm}$; 对头孢他啶/克拉维酸的抑菌圈为 30 mm, 对头孢他啶的抑菌圈为 21 mm, 相差 $9\text{ mm}\geq 5\text{ mm}$ 。因此, 1173 确证产 ESBL。同理, 1173-CTXM-EC600 亦产 ESBL。

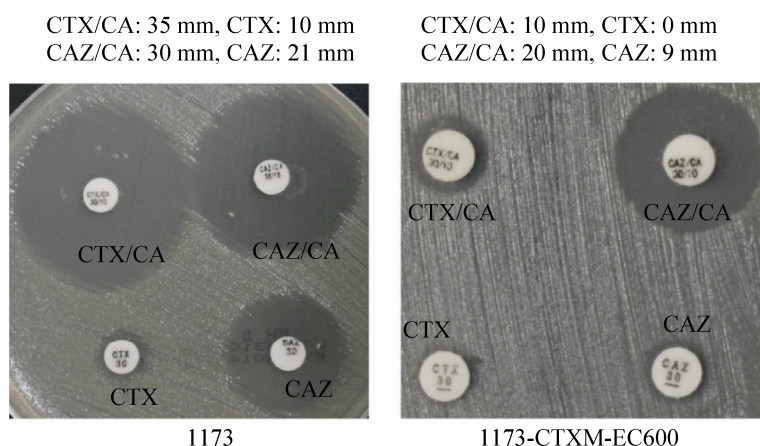


图 1. 双纸片协同扩散实验

Figure 1. Double-disk synergy test. Each experiment was conducted with three parallel replicates: three plates inoculated with three independent bacterial cultures of strains 1173 and its transconjugant strains p1173-CTXM-EC600, respectively. Only a representative figure is shown here. CA: clavulanic acid; CAZ: ceftazidime; CTX: cefotaxime.

2.2 耐药基因扩增及 CTX-M 全序列测定

利用 PCR 方法对 1173 及接合子 1173-CTXM-EC600 进行 ESBL 基因及碳青霉烯耐药基因的鉴定结果表明(图 2), 1173 及其接合子 1173-CTXM-EC600 都能扩增出 $bla_{\text{CTX-M-1G}}$ 基因, 且 PCR 扩增产物片段大小与理论值一致。利用 ISEcp1-F1/orf477-R1 引物进一步扩增及序列分析表明, 该基因亚型为 $bla_{\text{CTX-M-64}}$ 。此外, 1173 还含有 bla_{TEM} 基因, 而其接合子无 bla_{TEM} 基因。这表明, 1173 只有 $bla_{\text{CTX-M-64}}$ 能够通过接合转移进入受体菌。

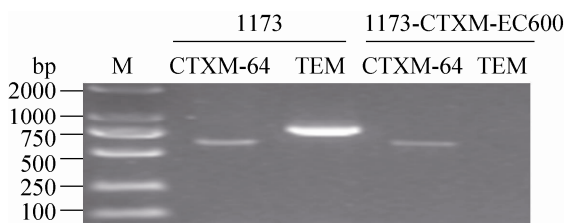


图 2. ESBL 及碳青霉烯酶基因 PCR 扩增结果

Figure 2. PCR detection of *bla* genes. Strains 1173 and p1173-CTXM-EC600 were screened for the major ESBL and carbapenemase genes with PCR. Of all the *bla* genes tested, $bla_{\text{CTX-M-64}}$, bla_{TEM} were present in 1173, but only $bla_{\text{CTX-M-64}}$ was detected in p1173-CTXM-EC600.

2.3 MIC 测定结果

采用 VITEK[®] 2 仪器对菌株 1173 及 1173-CTXM-EC600 的 MIC 检测结果(表 1)表明, 二者均对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、氨曲南、头孢唑啉、头孢曲松、头孢吡肟耐药, 均对亚胺培南、厄他培南、环丙沙星、左氧氟沙星、呋喃妥因和替加环素敏感; 而对头孢西丁、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素和复方新诺明, 1173 均表现为耐药, 1173-CTXM-EC600 表现为敏感。

2.4 质粒基因组序列测定及生物信息学分析

对质粒 p1173-CTXM 的高通量测序结果表明, 该质粒全长为 63530 bp, 平均 G+C% 含量为 42.3%, 预测有 90 个开放阅读框(ORF) (图 3), 平均基因长度为 706 bp。将 p1173-CTXM 的序列与 GenBank 的 nr/nt 核酸数据库进行 BLASTn 比对分析表明, p1173-CTXM 与 IncI2 型质粒 p1081-CTXM (GenBank 登录号 KJ460501)^[16]和 pHN1122-1 (GenBank 登录号 JN797501)^[17]为近缘质粒, 其覆盖率(Coverage)和一致性(Identity)分别为 97%和

表 1. MIC 结果
Table 1. Antimicrobial drug susceptibility profiles

Category	Antibiotics	MIC (mg/L)/antimicrobial susceptibility		
		1173	1173-CTXM-EC600	EC600
Penicillins	Ampicillin	≥32R	≥32R	16I
	Ampicillin/sulbactam	≥32R	≥32R	4S
Monobactams	Aztreonam	32R	≥64R	≤1S
Cephalosporins	Cefazolin	≥64R	≥64R	≤4S
	Ceftriaxone	≥64R	≥64R	≤1S
	Cefoxitin	≤4R	8S	8S
	Cefepime	≥64R	≥64R	≤1S
Carbapenems	Imipenem	≤1S	≤1S	≤1S
	Ertapenem	≤0.5S	≤0.5S	≤0.5S
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	0.5S	≤0.25S	≤0.25S
	Levofloxacin	2S	≤0.5S	0.5S
Furanes	Levofloxacin	≤16S	≤16S	≤16S
	Amikacin	≤2R	≤2S	≤2S
Aminoglycosides	Gentamicin	≥16R	≤1S	≤1S
	Tobramycin	4R	≤1S	≤1S
Sulfanilamides	Trimethoprim/sulfamethoxazole	≥320R	≤20S	≤20S
Tetracyclins	Tigecycline	1S	≤0.5S	≤0.5S

S: susceptible; I: intermediate; R: resistant.

99%。对 p1173-CTXM 质粒序列进行生物信息学分析表明, p1173-CTXM 的结构可以分为骨架区(Backbone)和外源插入区(Accessory modules)两部分。骨架区含有保守的 IncI2 质粒骨架区基因, 又可进一步分为质粒复制区(Plasmid replication)、质粒稳定区(Plasmid maintenance)和质粒接合转移区(Conjugal transfer)。质粒复制区编码与质粒复制相关的质粒复制起始蛋白 RepR/RepA, 质粒稳定区编码与质粒稳定相关的 Mok/Hok 蛋白等, 质粒接合转移区编码与质粒接合转移相关的 NikABC 和菌毛蛋白 Pil/Tra 等。

p1173-CTXM 的外源插入区由插入序列 *ISEcp1* 和其携带的耐药基因 *bla*_{CTX-M-64} 组成的

*ISEcp1-bla*_{CTX-M-64-*Aorf477*} 转座单元和插入序列 IS2 组成。*ISEcp1-bla*_{CTX-M-64-*Aorf477*} 转座单元长度为 3080 bp, 两端为同源重组形成的 5 bp 正向重复序列(Direct repeat, DR)。*ISEcp1* 由两端的 14 bp 反向重复序列[Inverted repeat left (IRL) (5'-GGATCTAAGATGCA-3')和 Inverted repeat right (IRR-1) (5'-ACGTGGAATTTAGG-3')]和 1263 bp 的转座酶(Transposase, *tnpA*)基因组成。

p1173-CTXM 还携带有 2 个近缘质粒所没有的 IS2; 此外, 与 p1081-CTXM 和 pHN1122-1 相比, p1173-CTXM 分别有 1.1 kb 和约 500 bp 的片段发生了颠转(图 4)。

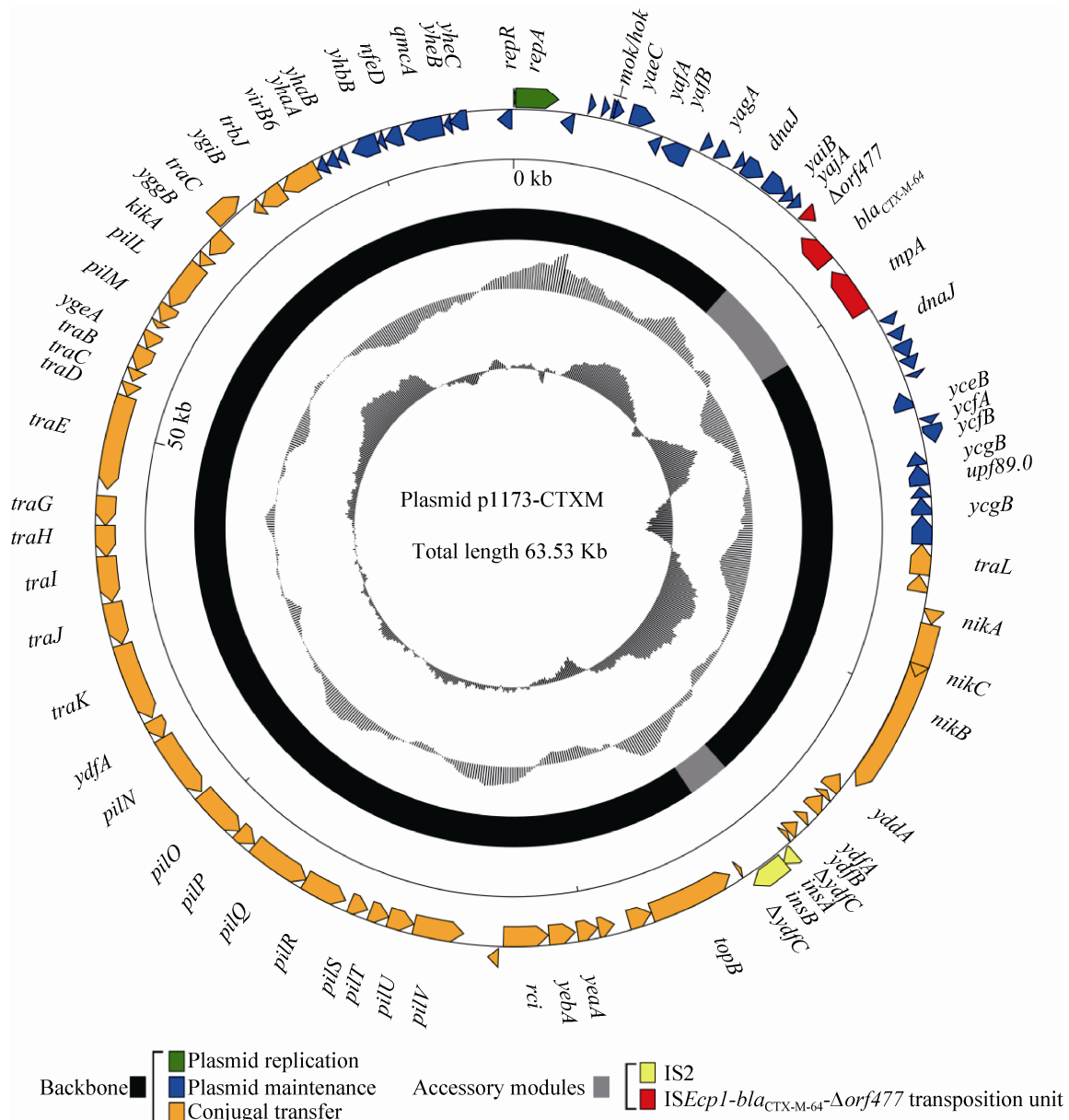


图 3. 质粒 p1173-CTXM 全序列示意图

Figure 3. Schematic map of the sequence of plasmid p1173-CTXM. Genes are denoted by arrows and colored according to gene function classification. The innermost circle presents GC skew ($[G-C]/[G+C]$) with a window size of 500 bp and a step size of 20 bp. The next-to-innermost circle presents GC content. The backbone and accessory module regions are also shown.

3 讨论

目前, 已报道的 CTX-M 基因已有 180 余种亚型 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources>), 根据氨基酸序列的异质性可以

分为 6 个群, 其中 Group 1 和 Group 9 是世界范围内最主要的流行群。bla_{CTX-M-64} 隶属于 Group 1, 是 bla_{CTX-M-55} 和 bla_{CTX-M-14} 的杂合体^[18]。已报道的宋内志贺氏菌携带的 CTX-M 至少有 10 种亚型, 如 CTX-M-2、CTX-M-3、CTX-M-14、CTX-M-15、

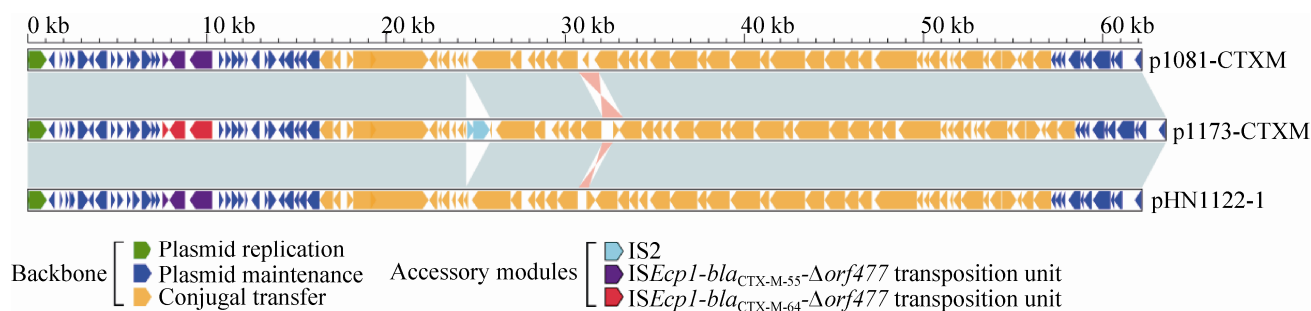


图 4. p1173-CTXM 与近缘质粒序列线性比较

Figure 4. Linear comparison of sequenced plasmid p1173-CTXM. Genes are denoted by arrows colored according to gene function classification. Shaded regions denote regions of homology (>95% nucleotide identity).

CTX-M-55 和 CTX-M-64 等, 而在中国, 常见的类型为 CTX-M-14、CTX-M-15 和 CTX-M-55^[16]。

*bla*_{CTX-M} 通常由插入序列 *ISEcp1* 和 *ISCR1* 或噬菌体相关序列携带, 形成 *ISEcp1-bla*_{CTX-M}-*IS903D* 或 *ISEcp1-bla*_{CTX-M}-*orf477* 转座单元, 在相同或不同种属的肠杆菌科细菌间进行水平转移、传播^[11]。

ISEcp1 属于 *IS1380* 家族, 与普通的插入序列不同, *ISEcp1* 为单末端插入序列, 它仅靠单个插入序列即可介导其下游邻近的耐药基因进行转移, 从而大大提高了耐药基因转移的概率^[19-20]。在 p1173-CTXM 的 *ISEcp1-bla*_{CTX-M-64}-*Δorf477* 转座单元中, *ISEcp1* 通过识别其自身的 IR 和转座单元下游另外一个与 IRR-1 序列高度相似的 IRR-2 (5'-ACGTAGGTCCCAGG-3')介导 *ISEcp1-bla*_{CTX-M-64}-*Δorf477* 转座单元整体在细菌间的传播^[16,19]。*ISEcp1* 的 IRR-1 与 *bla*_{CTX-M-64} 的起始密码子 ATG 间有 45 bp 间隔区 (Spacer)。常见的间隔区还有 42 bp 和 127 bp 等形式, 其长短可影响 *bla*_{CTX-M-64} 的表达^[21]。对 GenBank 中的 *bla*_{CTX-M-64} 序列分析表明, CTX-M-64 质粒的宿主菌范围比较窄。目前已报道的携带 CTX-M-64 质粒的宿主菌有大肠埃希菌 (GenBank 登录号 KX013540、KJ020576、KP091735、AB976601、KC576517、GQ456156)、阴沟肠杆菌 (GenBank 登录号 GQ300937) 等, 本研究是第一例关于宋内志贺氏菌携带完整的 *ISEcp1-bla*_{CTX-M}-*orf477*

转座单元的报道。

本研究中从腹泻患者大便样本中分离到一株产 ESBL 的宋内志贺氏菌 1173, PCR 检测表明其携带 2 种 ESBL 编码基因——*bla*_{CTX-M-64} 和 *bla*_{TEM}。接合转移实验获得一个接合子 1173-CTXM-EC600, 也为产 ESBL 菌株, 但其只携带 *bla*_{CTX-M-64} 耐药基因, 这说明 *bla*_{CTX-M-64} 和 *bla*_{TEM} 在 1173 基因组中的位置可能是不同的: *bla*_{CTX-M-64} 位于质粒上, 且可通过性菌毛接合转移至受体菌 EC600 中, 同时使接合子 1173-CTXM-EC600 获得了 *bla*_{CTX-M-64} 编码的 ESBL 表型; *bla*_{TEM} 可能位于另一个不可接合质粒上或者染色体上 (对后期基因组测序结果分析表明, 其位于染色体上)。MIC 测定结果可以看出, 1173 和 1173-CTXM-EC600 对青霉素类、单环 β-内酰胺类、一代、二代和四代头孢菌素类、碳青霉烯类、喹诺酮类、呋喃类、四环素类抗菌药物的敏感性一致, 都对青霉素类、单环 β-内酰胺类、一代、二代和四代头孢菌素类耐药, 说明 1173 对这些药物的耐药性是由携带 *bla*_{CTX-M-64} 的质粒介导的, 并可通过性菌毛将耐药性传递给受体菌。

参考文献

- [1] Wang L, Liu L, Liu D, Yin Z, Feng J, Zhang DF, Fang HH, Qiu YF, Chen WJ, Yang RS, Wang JL, Fa YZ, Zhou DS. The first report of a fully sequenced resistance plasmid from

- Shigella boydii*. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1579.
- [2] Mahemuti, Wupuer X, Li XL, Li F, Husaiyin M, Gu BS, Zhang J, Shataer W, Tuohuti M. Analysis on groups and serotypes of *Shigella* in Xinjiang, 2003-2013. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2015, 49(5): 447-449. (in Chinese)
马合木提, 夏依旦·吾甫尔, 李新兰, 李方, 木合亚提·胡塞英, 顾本思, 张建, 外力·沙塔尔, 穆塔里普·托呼提. 2003-2013年新疆维吾尔自治区哨点医院的志贺菌菌型分布及变迁分析. *中华预防医学杂志*, 2015, 49(5): 447-449.
- [3] Killackey SA, Sorbara MT, Girardin SE. Cellular aspects of *Shigella* pathogenesis: focus on the manipulation of host cell processes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2016, 6: 38.
- [4] Lima IF, Havt A, Lima AA. Update on molecular epidemiology of *Shigella* infection. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2015, 31(1): 30-37.
- [5] Livio S, Strockbine NA, Panchalingam S, Tennant SM, Barry EM, Marohn ME, Antonio M, Hossain A, Mandomando I, Ochieng JB, Oundo JO, Qureshi S, Ramamurthy T, Tamboura B, Adegbola RA, Hossain MJ, Saha D, Sen S, Faruque ASG, Alonso PL, Breiman RF, Zaidi AKM, Sur D, Sow SO, Berkeley LY, O'Reilly CE, Mintz ED, Biswas K, Cohen D, Farag TH, Nasrin D, Wu YK, Blackwelder WC, Kotloff KL, Nataro JP, Levine MM. *Shigella* isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. *Clinical Infectious Diseases*, 2014, 59(7): 933-941.
- [6] Nhu NTK, Vinh H, Nga TVT, Stabler R, Duy PT, Vien LTM, van Doorn HR, Cerdeño-Tárraga A, Thomson N, Campbell J, van Minh Hoang N, Nga TTT, van Minh P, Thuy CT, Wren B, Farrar J, Baker S. The sudden dominance of *bla*_{CTX-M} harbouring plasmids in *Shigella* spp. Circulating in Southern Vietnam. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2010, 4(6): e702.
- [7] Zhang WL, Luo YP, Li JY, Lin L, Ma Y, Hu CQ, Jin SH, Ran L, Cui SH. Wide dissemination of multidrug-resistant *Shigella* isolates in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011, 66(11): 2527-2535.
- [8] Klontz KC, Singh N. Treatment of drug-resistant *Shigella* infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2015, 13(1): 69-80.
- [9] Niyogi SK. Increasing antimicrobial resistance—an emerging problem in the treatment of shigellosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007, 13(12): 1141-1143.
- [10] Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 2008, 8(3): 159-166.
- [11] D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 2013, 303(6/7): 305-317.
- [12] Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 110.
- [13] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [14] Chen ZH, Li HX, Feng J, Li YX, Chen X, Guo XM, Chen WJ, Wang L, Lin L, Yang HY, Yang WH, Wang J, Zhou DS, Liu CT, Yin Z. NDM-1 encoded by a pNDM-BJ01-like plasmid p3SP-NDM in clinical *Enterobacter aerogenes*. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 294.
- [15] Jiang XY, Liu D, Xu L, Fang HH, Feng J, Yin Z, Zhou DS, Wang L, Zhang DF, Song YJ. Resistance mechanisms of *bla*_{CTX-M-55} in a clinical *Shigella sonnei* strain. *Military Medical Sciences*, 2016, 40(9): 717-721. (in Chinese)
蒋晓圆, 刘东, 徐丽, 方海红, 冯娇, 殷喆, 周冬生, 王丽, 张德福, 宋亚军. *bla*_{CTX-M-55} 介导的宋内志贺菌耐药机制研究. *军事医学*, 2016, 40(9): 717-721.
- [16] Qu F, Ying Z, Zhang CL, Chen ZH, Chen SM, Cui EB, Bao CM, Yang HY, Wang J, Liu CT, Mao YL, Zhou DS. Plasmid-encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-55 in a clinical *Shigella sonnei* strain, China. *Future Microbiology*, 2014, 9(10): 1143-1150.
- [17] Lü LC, Partridge SR, He LY, Zeng ZL, He DD, Ye JH, Liu JH. Genetic characterization of IncI2 plasmids carrying *bla*_{CTX-M-55} spreading in both pets and food animals in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(6): 2824-2827.
- [18] Nagano Y, Nagano N, Wachino JI, Ishikawa K, Arakawa Y. Novel chimeric β -lactamase CTX-M-64, a hybrid of CTX-M-15-like and CTX-M-14 β -lactamases, found in a *Shigella sonnei* strain resistant to various oxyimino-cephalosporins, including ceftazidime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(1): 69-74.
- [19] Messai Y, Ibadene H, Benhassine T, Alouache S, Tazir M, Gautier V, Arlet G, Bakour R. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie*, 2008, 56(5): 319-325.
- [20] Tamang MD, Nam HM, Kim TS, Jang GC, Jung SC, Lim SK. Emergence of extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-15 and CTX-M-14)-producing nontyphoid *Salmonella* with reduced susceptibility to ciprofloxacin among food animals and humans in Korea. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49(7): 2671-2675.
- [21] Ma L, Siu LK, Lu PL. Effect of spacer sequences between *bla*_{CTX-M} and *ISEcp1* on *bla*_{CTX-M} expression. *Journal of Medical Microbiology*, 2011, 60(12): 1787-1792.

Bacterial plasmid genome analysis and the mechanism of resistance gene transfer in the clinical *Shigella sonnei* isolate 1173

Defu Zhang^{1,2}, Yuzong Zhao^{1,2}, Dong Liu³, Jiao Feng², Ming Zhang¹, Daofeng Qu⁴, Dongsheng Zhou², Jianrong Li¹, Zhe Yin^{2*}, Li Wang^{3*}

¹ Food Safety Key Laboratory of Liaoning Province, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, College of Food Science and Project Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning Province, China

² State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

³ Department of Clinical Laboratory, the First Hospital Affiliated to Henan University, Kaifeng 475000, Henan Province, China

⁴ School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] To sequence and analyze plasmid p1173-CTXM from the clinical multidrug-resistant *Shigella sonnei* isolate 1173 with the aim of investigating the mechanism of *bla*_{CTX-M-64} resistance gene transfer. [Methods] A double-disk synergy test was conducted to determine if strain 1173 produced extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), then antibiotic resistance genes were PCR-amplified and sequenced. Conjugation experiments were used to verify the transferability of plasmids carrying ESBL genes. The transconjugant was detected to certify the production of ESBL and the existence of corresponding resistance genes. Strains 1173 and 1173-CTXM-EC600 underwent testing for antimicrobial drug susceptibility. Plasmid p1173-CTXM-EC600 was sequenced by high-throughput genomic sequencing to illustrate the mechanism of resistance gene transfer. [Results] The multidrug-resistant isolate *Shigella sonnei* 1173 was shown to be an ESBL-producing strain and to carry the antibiotic resistance genes *bla*_{CTX-M-64} and *bla*_{TEM}; however, only *bla*_{CTX-M-64} was horizontally transferred to the recipient strain EC600 which endowed the corresponding antibiotic resistant profiles to EC600. Sequencing and bioinformatics analysis revealed that the resistance gene *bla*_{CTX-M-64} was carried by the *ISEcp1-bla*_{CTX-M-64}-*Δorf477* transposition unit. [Conclusion] The resistance gene *bla*_{CTX-M-64} carried by plasmid p1173-CTXM mediated the resistance of *Shigella sonnei* isolate 1173 to multiple antibacterial agents. Horizontal transfer of *bla*_{CTX-M-64} was mediated by the *ISEcp1-bla*_{CTX-M-64}-*Δorf477* transposition unit.

Keywords: *Shigella sonnei*, plasmid, multidrug resistance, transposition unit, mobile element, *bla*_{CTX-M-64}

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81501779), by the Natural Science Foundation of Liaoning Province (20170540022), by the Project of Liaoning Provincial Department of Education (LY2016001), by the State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity (Academy of Military Medical Sciences) (SKLPBS1520) and by the China Postdoctoral Science Foundation (2015M582803)

*Corresponding author. Li Wang, Tel/Fax: +86-371-22736871, E-mail: wangli851217@163.com; Zhe Yin, Tel: +86-10-66948556, Fax: +86-10-63815259, E-mail: jerry9yin@163.com

Received: 8 May 2017; Revised: 25 May 2017; Published online: 21 July 2017