



肺炎克雷伯菌质粒 p1512-KPC 的测序及比较基因组学分析

蒋昭芳¹, 赵亚超², 李曼莉², 周冬生², 朱天川¹, 谭小艳¹, 童贻刚^{2*}, 龙军^{1*}

¹南方医科大学珠江医院, 广东 广州 510630

²军事科学院军事医学研究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

摘要:【目的】对多重耐药的肺炎克雷伯菌 1512 中的质粒 p1512-KPC 进行测序及比较基因组学的分析。

【方法】利用 16S rRNA 基因测序进行菌种鉴定, 根据 7 对管家基因(*gapA*、*infB*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*rpoB* 和 *tonB*)对菌株进行多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST)。利用 PCR 进行耐药基因的筛查, 通过接合转移实验及电转化实验将质粒转入受体菌大肠杆菌 EC600。采用改良 Carba NP 法检测细菌碳青霉烯酶的活性以及类型, 使用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析仪检测菌株最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。最后通过高通量测序技术结合生物信息分析手段明确菌株 1512 及质粒 p1512-KPC 的耐药基因谱, 并通过比较基因组学方法对质粒 p1512-KPC 的基本结构、耐药基因遗传环境及移动元件等结构基因组学特征进行分析。【结果】菌株 1512 为产 A 类碳青霉烯酶的多重耐药肺炎克雷伯菌, MLST 分型结果显示该菌为 ST11 型。经 PCR 筛查, 菌株 1512 包含 *bla*_{KPC-2}、*dfiA1* 和 *sul1* 耐药基因, 其中 *bla*_{KPC-2} 基因位于不可结合转移但电转成功的质粒 p1512-KPC 上。测序结果显示, 质粒 p1512-KPC 长度为 117.69 kb, 同时包含 IncFII 型复制子和属于 Rep_3 家族但类型未知的复制子 *repB*, 并携带耐药基因 *bla*_{KPC-2}、*bla*_{CTX-M-65}、*bla*_{TEM-1} 及 *rmtB*。其中 *bla*_{KPC-2}、*bla*_{CTX-M-65} 及 *bla*_{TEM-1} 分别存在于截短的 Tn6296、Tn6367 及截短的 Tn2 的基因环境中。【结论】携带 *bla*_{KPC-2}、*bla*_{CTX-M-65}、*bla*_{TEM-1} 及 *rmtB* 基因的质粒 p1512-KPC 介导了肺炎克雷伯菌 1512 对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、单环 β-内酰胺类及氨基糖苷类抗生素耐药, 并能引起相应耐药基因的水平传播。此外, 本研究还对 IncFII 型复制子和 Rep_3 家族复制子 *repB* 共存的质粒进行了比较基因组学分析, 为该类型质粒的多样性和进化提供了更深入的理解。

关键词: 肺炎克雷伯菌, p1512-KPC, 碳青霉烯酶, *bla*_{KPC-2}

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2016A020219005)

*通信作者。龙军, Tel: +86-20-84311852, E-mail: longjun327@163.com; 童贻刚, Tel: +86-10-63869835, E-mail: tong.yigang@gmail.com

收稿日期: 2018-04-15; 修回日期: 2018-06-25; 网络出版日期: 2018-07-30

根据 Ambler 分类法, 碳青霉烯酶可分为 A、B 和 D 三类, 能够水解绝大多数的 β -内酰胺类抗生素。其中肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(*Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase, KPC)属于 A 类酶, 在产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌中最为常见。自 1996 年于美国北卡罗来纳州分离到第一株包含 *bla*_{KPC-2} 的肺炎克雷伯菌以来^[1-2], 目前已经报道了 23 个 *bla*_{KPC} 亚型(*bla*_{KPC-2} 到 *bla*_{KPC-24})^[3]。

*bla*_{KPC} 存在于多种不相容群质粒当中, 如 IncFII、IncI、IncA/C、IncN、IncX 及 IncR 等^[4], 其中最为常见的质粒不相容群为 IncFII。IncFII 型质粒多见于肠杆菌科细菌, 通常表现为一个典型的 IncFII 型复制子和其他不相容群复制子(FIA 型及 FIB 型等)同时出现, 从而成为一个包含两个或多个复制子的质粒^[5]。IncFII 型复制子还可进一步分为多个亚型, 从而产生更多的相容变种, 用于克服外来质粒带来的不相容压力^[5]。

首个 IncFII 型复制子和 Rep_3 家族复制子 *repB* 共存的质粒为肺炎克雷伯菌 283747 中分离的质粒 p283747-KPC(GenBank 登录号: MF168406)。本研究中的肺炎克雷伯菌 1512 中携带 *bla*_{KPC-2} 的质粒 p1512-KPC 为第二例包含相同复制子的质粒。因此, 本文将对 p283747-KPC 与 p1512-KPC 二者进行比较基因组学分析, 旨在明确质粒 p1512-KPC 的基本结构、耐药基因遗传环境及移动元件等结构基因组学特征, 同时增加对于 IncFII 型复制子和 Rep_3 家族复制子 *repB* 共存质粒的多样性和进化的理解。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源和背景信息: 菌株 1512 分离自南

方医科大学珠江医院重症监护室一名 53 岁原发性肝癌术后患者静脉血, 分离时间为 2017 年 4 月。经 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析仪鉴定为多重耐药的肺炎克雷伯菌; 接合转移实验及电转化实验中受体菌 EC600 为利福平耐药的大肠杆菌; 改良 Carba NP 法中 ATCC BAA-1705 和 ATCC BAA-2146 分别为产 A 类和 B 类碳青霉烯酶的标准株。

1.1.2 试剂和仪器: Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和 DNA marker(北京全式金有限公司); QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Mini Kit 和 QIAGEN Plasmid Midi Kit (德国 Qiagen 公司); PCR 仪(美国 ABI 公司); VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析仪(法国 bioMérieux 公司); MicroPulser 电穿孔仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 菌株鉴定及多位点序列分型

采用 16S rRNA 基因测序对菌株 1512 进行菌种的再次鉴定^[6]。使用 7 对管家基因(*gapA*、*infB*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*rpoB* 和 *tonB*)对菌株 1512 进行多位点序列分型, 引物序列见表 1^[7]。PCR 扩增条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 20 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后观察结果, 之后通过 Sanger 测序法获得序列信息。

1.3 耐药基因筛查

利用 PCR 对碳青霉烯酶基因及其他常见耐药基因进行筛查, 引物序列见表 2。PCR 扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 50–56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳后观察结果, 产物序列最终通过 Sanger 测序法获得。

表 1. MLST 引物序列
Table 1. Primer sequence for MLST

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Locus	Size/bp
gapA-F	TGAAATATGACTCCACTCACGG	<i>gapA</i>	450
gapA-R	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT		
infB-F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	<i>infB</i>	318
infB-R	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC		
mdh-F	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	<i>mdh</i>	477
mdh-R	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG		
pgi-F	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	<i>pgi</i>	432
pgi-R	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT		
phoE-F	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	<i>phoE</i>	420
phoE-R	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT		
rpoB-F	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	<i>rpoB</i>	501
rpoB-R	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC		
tonB-F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	<i>tonB</i>	414
tonB-R	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG		

表 2. PCR 耐药基因筛查部分引物序列
Table 2. Primer sequence for PCR screening of resistance genes

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Gene name	Size/bp
KPC-F	GTATCGCCGTCTAGTTCTGC	<i>bla_{KPC}</i>	638 ^[8]
KPC-R	GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC		
NDM-F	GGTTTGCGATCTGGTTTTC	<i>bla_{NDM}</i>	621 ^[9]
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	<i>bla_{IMP}</i>	232 ^[9]
IMP-R	GGTTTAAAYAAAACAACCACC		
VIM-F	GATGGTGTGGTTCGCATA	<i>bla_{VIM}</i>	390 ^[9]
VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG		
sul1-F	TAGCGAGGGCTTTACTAAGC	<i>sul1</i>	299 ^[10]
sul1-R	ATTCAGAATGCCGAACCCG		
dfrA1-F	CTTGTTAACCTTTTGCCAGA	<i>dfrA1</i>	474 ^[10]
dfrA1-R	TTGTGAAACTATCACTAATGGTAG		

1.4 接合转移实验

以菌株 1512 为供体菌, 大肠杆菌 EC600 为受体菌, 进行接合转移实验。供体及受体甘油菌分别接种于新鲜的 BHI (Brain heart infusion broth, BHI) 液体培养基, 37 °C 下过夜培养。分别取等量供体菌和受体菌培养物混合、离心并弃上清, 沉淀物用 BHI 液体培养基重悬后点加在贴于 BHI 固

体培养基的滤膜(孔径为 0.45 μm)上, 37 °C 培养 12–18 h。然后用 BHI 液体培养基(含有 0.2 mg/mL 氨苄西林和 2.5 mg/mL 利福平)洗下菌体, 涂布于 BHI 固体培养基(含有 0.2 mg/mL 氨苄西林和 2.5 mg/mL 利福平)上, 37 °C 下培养 24–48 h, 最后挑取单菌落进行耐药基因 *bla_{KPC-2}* 以及 16S rRNA 基因测序验证^[11]。

1.5 电转化实验

①质粒提取：菌株 1512 接种于新鲜 LB (Lysogeny-Broth, LB)液体培养基, 37 °C 下培养 12–16 h。利用 QIAGEN Plasmid Midi Kit 并按照试剂盒操作说明对菌株 1512 进行质粒提取。②感受态细胞制备:受体菌 EC600 接种于新鲜 SOB(Super optimal broth, SOB)液体培养基, 37 °C 下培养至 OD_{600} 值为 0.4–0.6。取 10 mL 上述培养物冰浴 15 min 后离心并弃尽上清, 再用电转缓冲液洗菌 3 次, 最后用 100 μ L 电转缓冲液重悬。③电击: 将 100 ng 质粒 DNA 与 100 μ L 感受态细胞混合, 冰浴 30 min 后转入电转杯, MicroPulser 电穿孔仪设置为 Ec1 模式(25 μ F, 200 Ω , 1.80 kV)电击。④电转子筛选: 将电击后的菌体接种到 SOB 固体培养基(含有 0.2 mg/mL 氨苄西林和 2.5 mg/mL 利福平), 37 °C 下培养 24–48 h, 挑取单菌落进行耐药基因 *bla*_{KPC-2} 以及 16S rRNA 基因测序验证^[12]。

1.6 碳青霉烯酶活性检测

菌株 1512 (甘油菌)接种于新鲜的 MH (Mueller-Hinton, MH)液体培养基, 37 °C 下培养至 OD_{600} 值为 1.0–1.4。取 2 mL 上述培养物, 用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8)清洗 2 遍后, 用 500 μ L 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8)重悬菌体, 超声破碎并离心后, 取 50 μ L 上清分别与 50 μ L 底物 I (含 0.054%酚红和 0.1 mmol/L ZnSO₄)、II (含 0.054%酚红、0.1 mmol/L ZnSO₄ 和 600 mg/mL 亚胺培南)、III (含 0.054%酚红、0.1 mmol/L ZnSO₄、600 mg/mL 亚胺培南和 800 mg/mL 他唑巴坦)、IV (含 0.054%酚红、0.1 mmol/L ZnSO₄、600 mg/mL 亚胺培南和 3 mmol/L EDTA)和 V (含 0.054%酚红、0.1 mmol/L ZnSO₄、600 mg/mL 亚胺培南、800 mg/mL 他唑巴坦和 3 mmol/L EDTA)混合 37 °C 孵育, 1–2 h 后判

定碳青霉烯酶活性及其类型^[11–12]。

1.7 药敏检测

使用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析仪对菌株 1512、电转子 1512-KPC-EC600 以及受体菌 EC600 分别进行药敏检测, 并依据美国临床与实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)2015 标准判读结果^[13]。

1.8 全基因组测序及组装

使用 QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Mini Kit 提取菌株 1512 基因组, 针对菌株 1512, 构建 Mate Pair 大片文库, 再通过 Illumina Miseq 测序平台进行高通量测序。测序原始数据过滤后, 利用 Newbler 3.0^[14]软件构建 contigs 和 scaffolds, 然后采用 PCR 和 Sanger 测序法对 contigs 间缺失部分进行补充, 最终得到质粒 p1512-KPC 全序列。

1.9 序列注释和对比分析

开放阅读框首先采用 RAST^[15]初步确定, 之后通过 BLASTN/BLASTP^[16]与 UniProtKB/Swiss-Prot^[17]及 RefSeq^[18]数据库比对进行进一步的注释。所有的移动元件均利用 ISfinder^[19]、the Tn Number Registry^[20]以及 INTEGRAL^[21]网站进行鉴定及注释。

1.10 GenBank 登录号

质粒 p1512-KPC 序列已提交 GenBank, 登录号为 MF918372。

2 结果和分析

2.1 菌株鉴定、多位点序列分型及耐药基因筛查

菌株 1512 经 16S rRNA 基因测序鉴定为肺炎克雷伯菌。细菌多位点序列分型结果显示该菌为广泛流行的序列型 ST11。经 PCR 耐药基因筛查, 该菌含有碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC-2}、甲氧苄啶类耐

药基因 *dfrA* 及磺胺类耐药基因 *sulI*。

2.2 接合转移实验及电转化实验

本研究多次尝试接合转移实验, 均不能将菌株 1512 中的耐药基因 *bla*_{KPC-2} 转移到受体菌 EC600 当中。但在电转化实验中, 通过 PCR 及 Sanger 测序法鉴定, 发现电转子 1512-KPC-EC600 包含耐药基因 *bla*_{KPC-2}, 但不包含耐药基因 *dfrA1* 和 *sulI* (图 1), 16S rRNA 序列等同于受体菌

EC600。表明 *bla*_{KPC-2} 基因由质粒携带并且该质粒能够通过电转化实验转移到受体菌 EC600 中。

2.3 碳青霉烯酶活性及类型检测

改良 Carba NP 法结果判断原则^[12-13]: 底物 II 和 IV 呈橙黄色, 其他底物呈红色判断为 A 类酶; 底物 II 和 III 呈橙黄色, 其他底物呈红色判断为 B 类酶; 底物均呈红色则为不产酶。本研究实验结果显示菌株 1512 和电转子 1512-KPC-EC600 均为产 A 类酶株(图 2)。

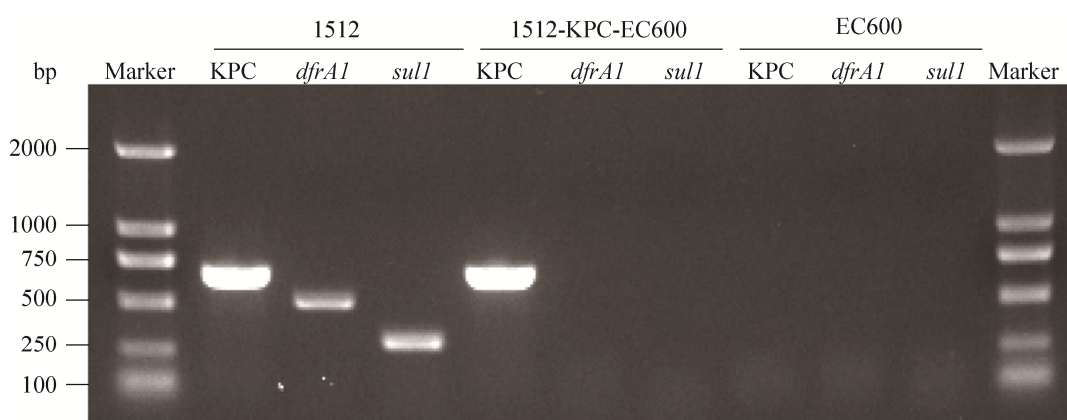


图 1. *bla*_{KPC-2}、*dfrA1* 和 *sulI* 耐药基因 PCR 扩增结果

Figure 1. Results of PCR amplification for resistance genes screening. Resistance genes *bla*_{KPC-2}, *dfrA1* and *sulI* were located in drug-resistant strain 1512, but only carbapenemase gene *bla*_{KPC-2} was transferred into EC600 and generated electroporant 1512-KPC-EC600.

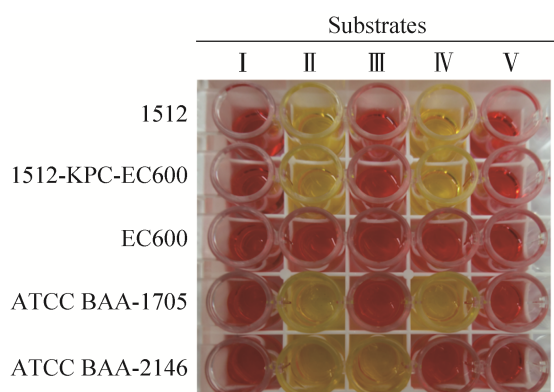


图 2. 改良 Carba NP 法检测碳青霉烯酶活性及类型结果
Figure 2. Results of Carba NP. Both 1512 and 1512-KPC-EC600 showed Ambler class A carbapenemase. ATCC BAA-1705 and ATCC BAA-2146 were quality-control strains producing Ambler class A and B carbapenemase respectively.

2.4 药敏分析结果

抗生素敏感试验结果显示, 菌株 1512 及电转子 1512-KPC-EC600 都对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、单环 β -内酰胺类及氨基糖苷类抗生素耐药, 此外菌株 1512 还对喹诺酮类、磺胺类及呋喃类抗生素耐药, 而受体菌 EC600 对以上抗生素均不耐药(表 3)。

2.5 生物信息分析

2.5.1 菌株 1512 及质粒 p1512-KPC 的耐药基因谱:

通过对菌株 1512 的基因组进行测序, 可知, 菌株 1512 携带: 超广谱 β -内酰胺酶基因 *bla*_{TEM-1}、*bla*_{CTX-M-65} 和 *bla*_{SHV-11}; 碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC-2};

表 3. 菌株 MIC 鉴定结果

Table 3. MIC identification results of bacterial strains

Category	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
		1512	1512-KPC-EC600	EC600
Penicillins	Ampicillin	$\geq 32/\text{R}$	$\geq 32/\text{R}$	16/I
	Ampicillin/sulbactam	$\geq 32/\text{R}$	$\geq 32/\text{R}$	8/S
	Piperacillin	$\geq 128/\text{R}$	$\geq 128/\text{R}$	$\leq 4/\text{S}$
	Piperacillin/tazobactam	$\geq 128/\text{R}$	$\geq 128/\text{R}$	$\leq 4/\text{S}$
Cephalosporins	Cefazolin	$\geq 64/\text{R}$	$\geq 64/\text{R}$	$\leq 4/\text{S}$
	Cefuroxime axetil	$\geq 64/\text{R}$	$\geq 64/\text{R}$	16/I
	Ceftazidime	$\geq 64/\text{R}$	16/R	$\leq 1/\text{S}$
	Ceftriaxone	$\geq 64/\text{R}$	$\geq 64/\text{R}$	16/I
	Cefepime	$\geq 64/\text{R}$	$\geq 64/\text{R}$	$\leq 2/\text{S}$
Carbapenems	Imipenem	$\geq 16/\text{R}$	$\geq 16/\text{R}$	$\leq 1/\text{S}$
	Meropenem	$\geq 16/\text{R}$	8/R	$\leq 0.25/\text{S}$
Aminoglycosides	Gentamicin	$\geq 16/\text{R}$	$\geq 16/\text{R}$	$\leq 1/\text{S}$
	Amikacin	$\geq 64/\text{R}$	$\geq 64/\text{R}$	$\leq 2/\text{S}$
	Tobramycin	$\geq 16/\text{R}$	$\geq 16/\text{R}$	$\leq 1/\text{S}$
Monobactams	Aztreonam	$\geq 64/\text{R}$	$\geq 64/\text{R}$	$\leq 1/\text{S}$
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	$\geq 4/\text{R}$	$\leq 0.25/\text{S}$	$\leq 0.25/\text{S}$
	Levofloxacin	$\geq 8/\text{R}$	0.5/S	0.5/S
Nitrofurans	Nitrofurantoin	$\geq 512/\text{R}$	$\leq 16/\text{S}$	$\leq 16/\text{S}$
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim/sulfamethoxazole	$\geq 320/\text{R}$	$\leq 20/\text{S}$	$\leq 20/\text{S}$

S: Susceptible; R: Resistant; I: Intermediate.

氨基糖苷类耐药基因 *aadA1*、*aphA1*、*aacC2* 和 *rmtB*；喹诺酮类耐药基因 *oqxAB*；磷霉素类耐药基因 *fosA*；甲氧苄啶类耐药基因 *dfpA1* 及磺胺类耐药基因 *sull*，其中 *bla_{KPC-2}*、*bla_{TEM-1}*、*bla_{CTX-M-65}* 及 *rmtB* 由质粒 p1512-KPC 携带，剩余耐药基因则位于染色体和其他质粒上。

2.5.2 质粒 p1512-KPC 基本信息：质粒 p1512-KPC 总长度为 117.69 kb，包含 180 个开放阅读框，平均 GC 含量为 53.72%(图 3-A)。通过将 p1512-KPC 的全序列与 GenBank 数据库比对，发现该质粒与质粒 p283747-KPC 包含相同的复制子并且序列高度相似。二者都包含保守的骨架区和多个外源插入区。保守的骨架区都由质粒复制相关区(含 *repA2*、*repA6*、*repA1*、*repA4* 和 *repB* 等基因)、质粒稳定相关区(含 *parAB*、*stbAB* 和 *ssb* 等基因)以及质粒接合转移相关区(含 *tra*、*tivF* 和

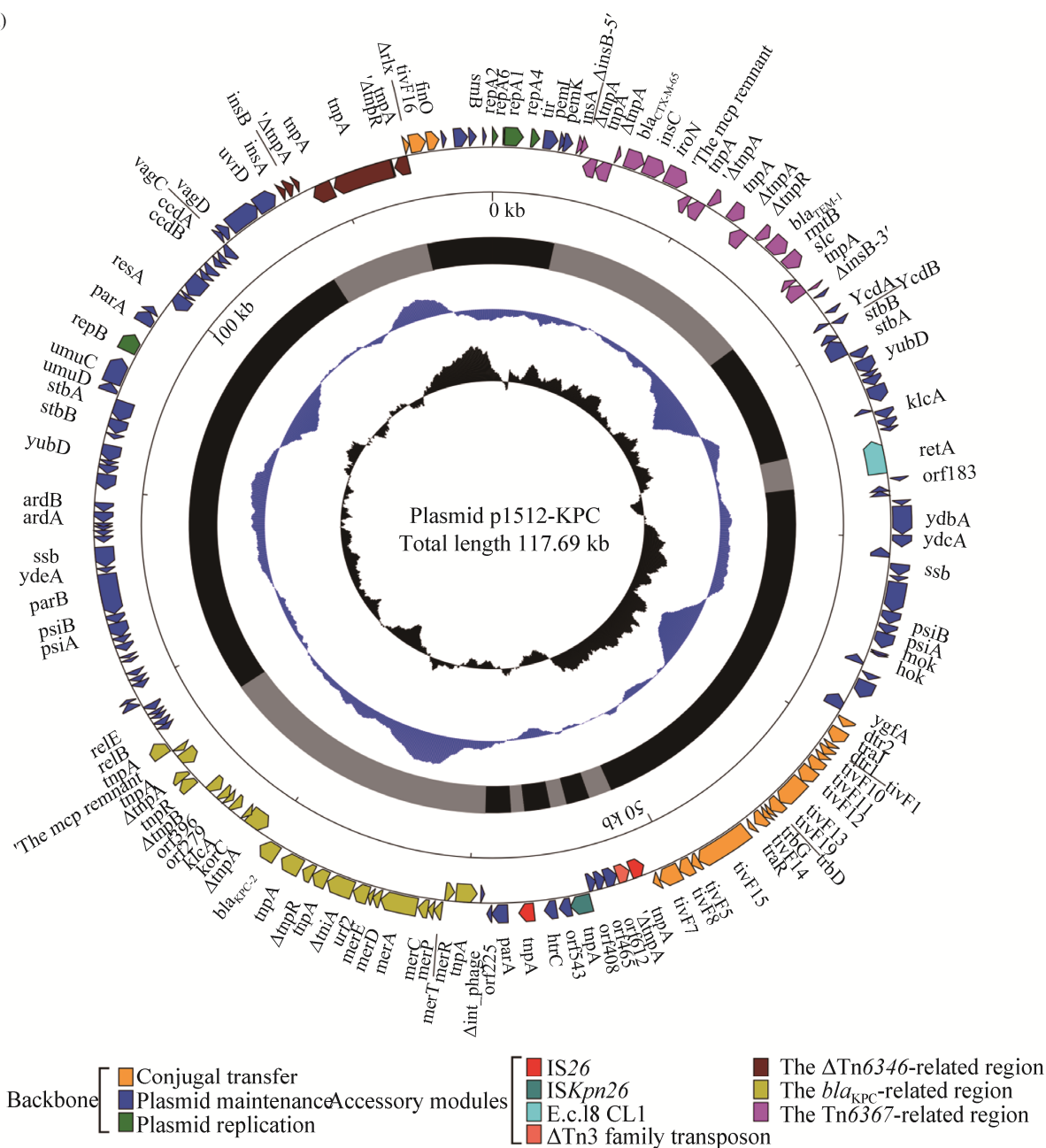
finO 等基因)组成。p1512-KPC 的外源插入区由 Tn6367 相关区、*bla_{KPC}* 相关区和其他外源插入区(由 $\Delta\text{Tn}6346$ 、ISKpn26 和 Tn3 家族转座子等构成)组成(图 3-A)。p283747-KPC 的外源插入区由多重耐药(Multidrug resistance, MDR)区、*bla_{SHV}*-*bla_{KPC}* 相关区和其他外源插入区组成(图 3-B)。

2.5.3 骨架区：p1512-KPC 的骨架区总长度为 76.91 kb，其中质粒复制相关区由一个典型的 IncFII 型的复制子和一个属于 Rep_3 家族但类型未知的复制子 *repB* 组成。质粒稳定区包含大量与质粒稳定相关的基因，该区占据 p1512-KPC 骨架区的大部分。质粒接合转移区包含编码 F 型 IV 分泌系统及质粒接合转移调控的基因，但在 p1512-KPC 中该区被打断成两部分，并且编码释放酶的 *rlx* 基因被截短，但这是否是导致质粒 p1512-KPC 接合转移实验失败的原因还有待研究。

p1512-KPC 与 p283747-KPC 的骨架区较为相似(93%的序列覆盖度上有>95%的核苷酸一致性)(图 4)。但二者不同的地方表现为: p1512-KPC 在质粒稳定区缺少一段长约 15.2 kb 的片段(包含 *psiA*、*psiB*、*umuC* 及 *umuD* 等基因)(图 4-①)。在

转录调节蛋白基因 *ydeA* 下游, p1512-KPC 缺少 *ydaB* 和 *ssb* 等质粒稳定相关基因(图 4-②)。此外, 两个质粒在复制起始基因 *repB* 下游虽然都包含两个 *parB* 蛋白结合位点(该位点由一系列的串联重复构成)^[22]: *parC1*(ATcTTGtT)和 *parC2*(ATCTTGTT),

(A)



由以 IS26 作为侧翼的 Tn6367 构成, Tn6367 内部包含截短的转座单元 *ISEcp1-bla_{CTX-M-65}-IS903D* 及 Tn1722 残余。第二个片段为 IS26-*fosA3*-IS26 转座

单元, 但在 p1512-KPC 中该片段仅剩余 IS26。第三个片段由 *rmtB* 基因与截短的 Tn2 构成, 截短的 Tn2 携带耐药基因 *bla_{TEM-1}*(图 5)。

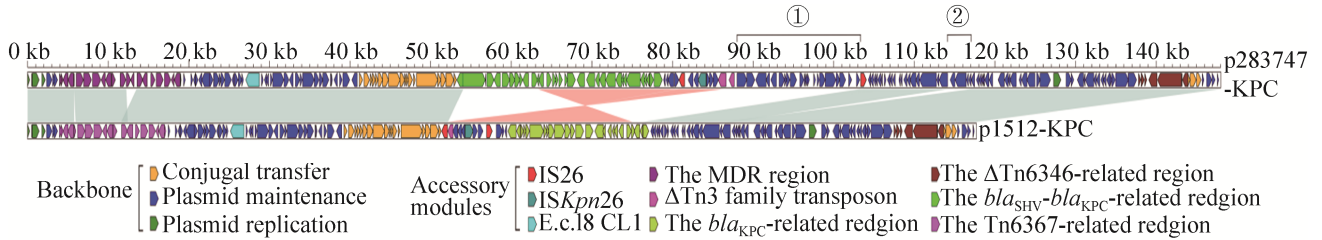


图 4. p1512-KPC 和 p283747-KPC 全基因线性结构比对图

Figure 4. Linear comparison of p1512-KPC and p283747-KPC. Genes are denoted by arrows and colored based on gene function classifications. Shading regions denote shared DNA regions of homology (>95% nucleotide identity).

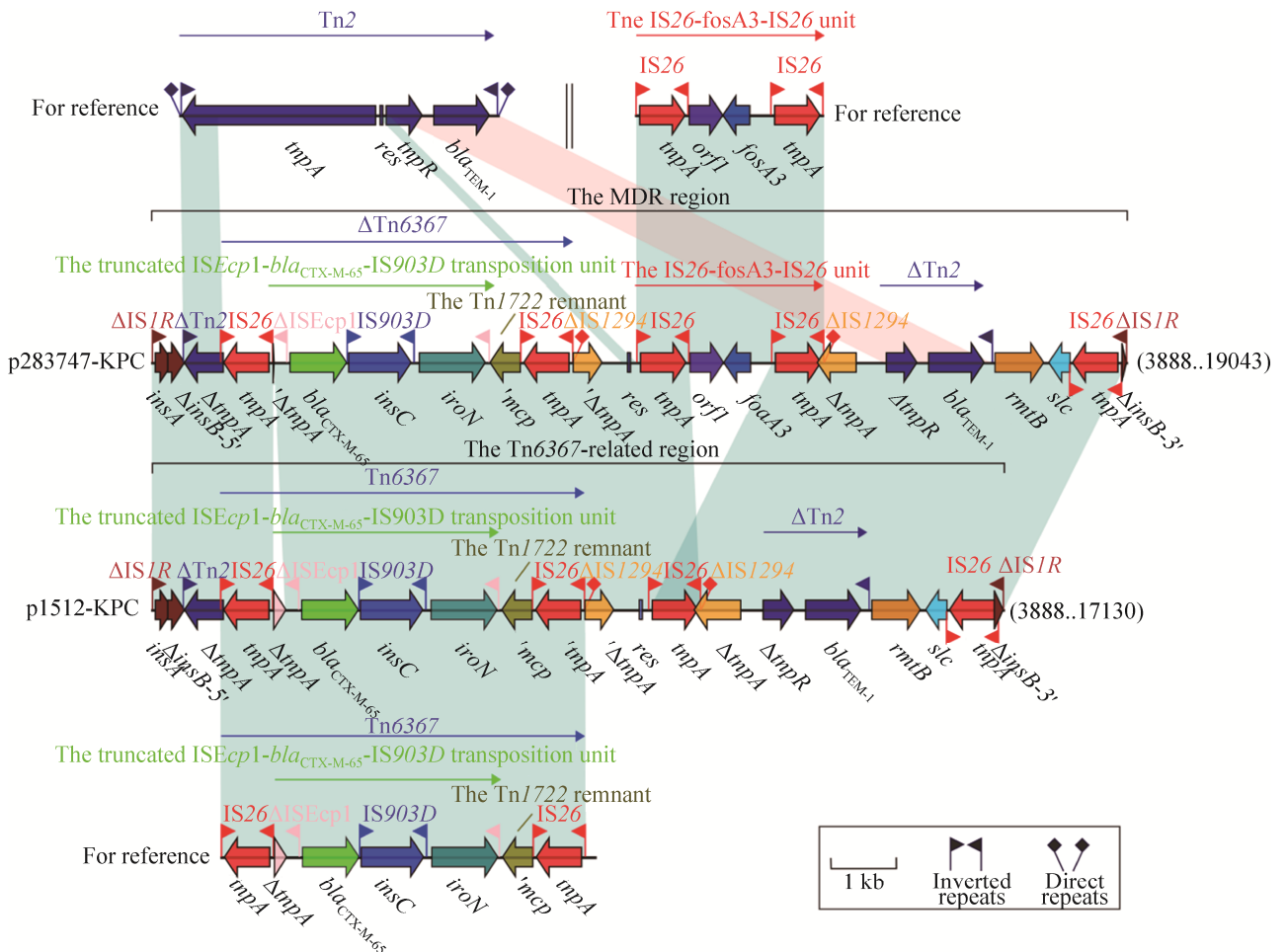


图 5. p1512-KPC 的 Tn6367 相关区线性比较图

Figure 5. Comparison of Tn6367-related region from p1512-KPC. Genes are denoted by arrows and colored based on gene function classifications. Shading regions denote shared DNA regions of homology (>95% nucleotide identity).

p1512-KPC 的 *bla*_{KPC} 相关区长度为 17.79 kb, 携带耐药基因 *bla*_{KPC-2} 及汞抗性操纵子 *merEDACPTR*。该区与 p283747-KPC 的 *bla*_{SHV}-*bla*_{KPC} 相关区相比, 二者都包含两端被 IS26 截短的转座子 ΔTn6296 (Δ*tnpA*_TnI722-*tnpR*_TnI722-Δ*repB*-*orf396*-*orf279*-*klcA*-*korC*-ΔISKpn6-*bla*_{KPC-2}-ISKpn27-Δ*tnpR*_Tn6376) 以及 5' 端被 IS26 截短的转座子 ΔTn21(Δ*tniA*_In2-*urf2*-*merEDACPTR*)。不同的地方在于, p283747-KPC 的 *bla*_{SHV}-*bla*_{KPC} 相关区多包含一个由截短的转座单元 IS26-*bla*_{SHV-12}-IS26 和 Δ*tnpA*_TnI722 组成的区域。此外, 与 p283747-KPC 的 *bla*_{SHV}-*bla*_{KPC} 相关区相比, p1512-KPC 的

*bla*_{KPC} 相关区整体序列发生了颠转(图 6)。

p1512-KPC 的其他外源插入区包括不携带任何耐药基因的 ΔTn6346 相关区和散布在不同位置的单个移动元件。p1512-KPC 和 p283747-KPC 的 ΔTn6346 相关区结构相同, 均为 ISKpn14-the IS903D remnant-IS5075-ΔTn6346-IS26 (图 7)。二者剩余的外源插入区也都分别由 ISKpn26、IS26 及截短的 Tn3 家族转座子组成, 但在 p1512-KPC 中, Tn3 家族转座子仅剩余长度为 640 bp 的两端均被截短的转座酶(假基因), 而在 p283747-KPC 中, Tn3 家族转座子剩余长度为 2095 bp, 包含完整的转座酶、解离酶及左侧的反向重复序列。

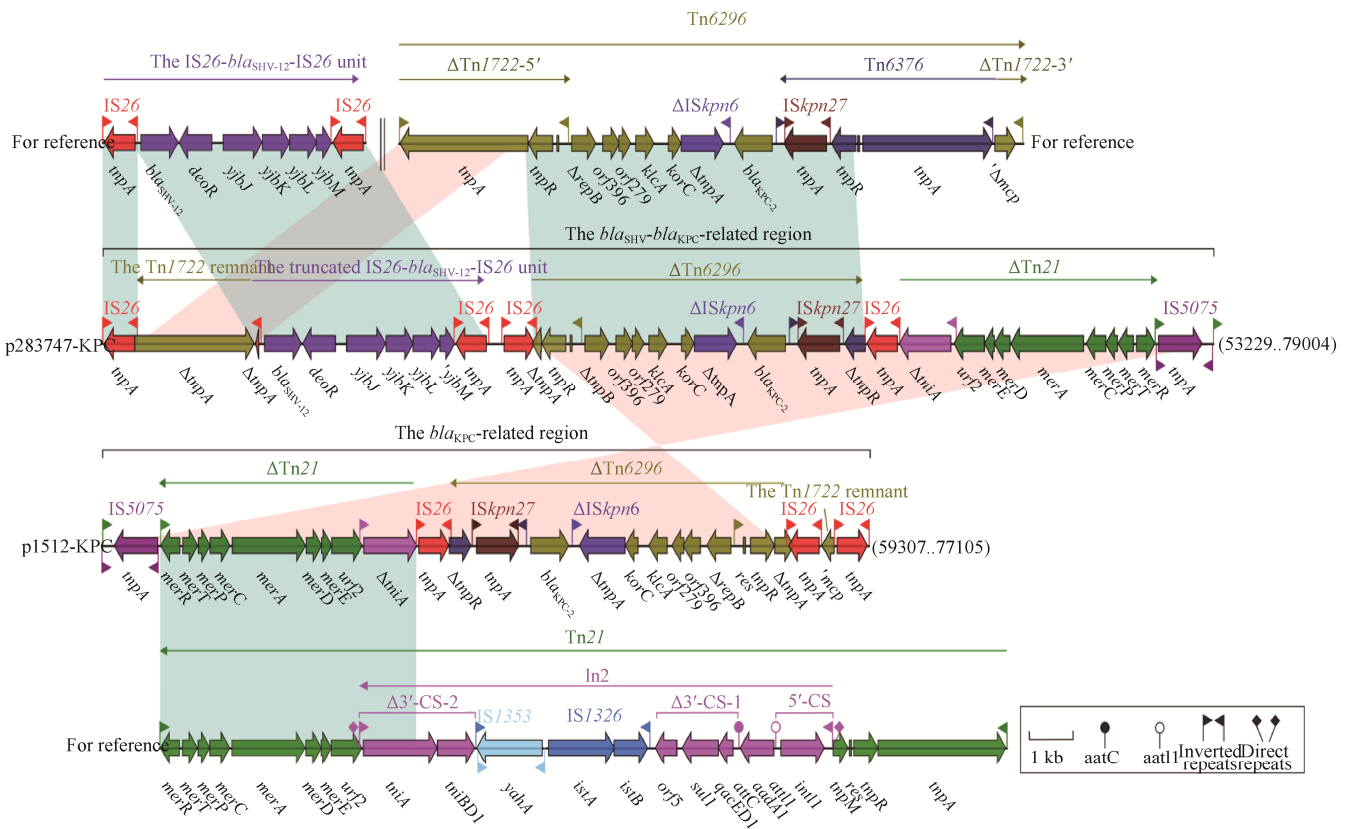


图 6. p1512-KPC 的 *bla*_{KPC} 相关区线性比较图

Figure 6. Comparison of the *bla*_{KPC}-related region from p1512-KPC. Genes are denoted by arrows and colored based on gene function classifications. Shading regions denote shared DNA regions of homology (>95% nucleotide identity).

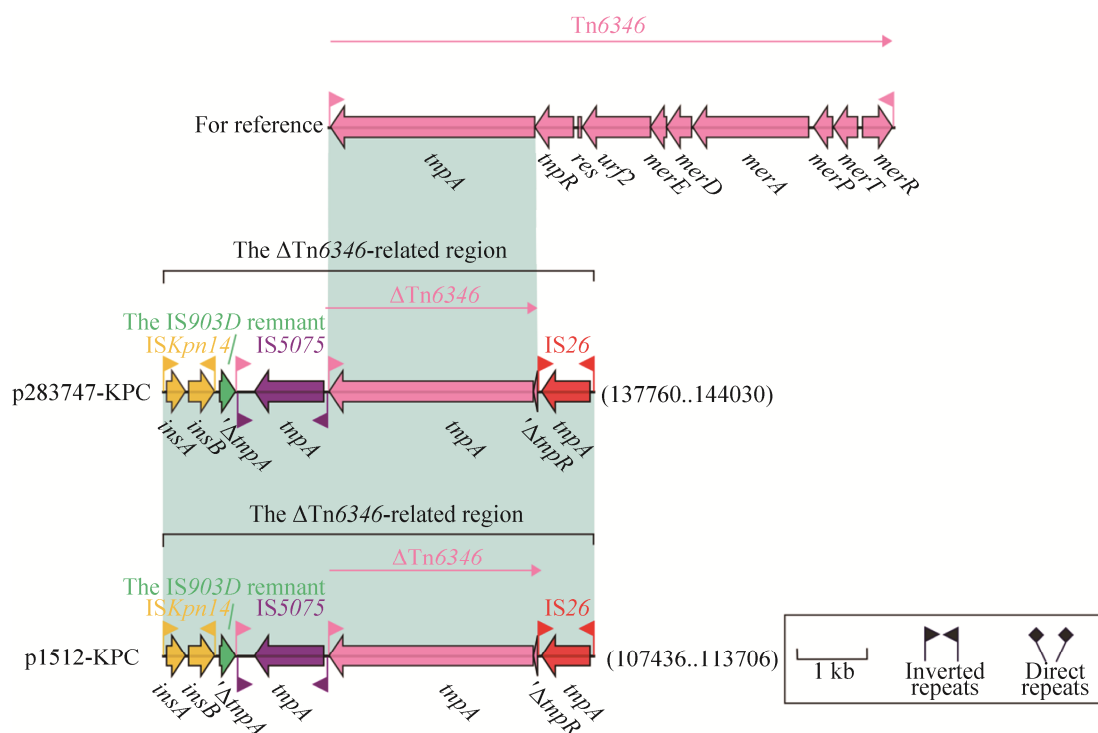


图 7. p1512-KPC 的 $\Delta Tn6346$ 相关区线性比较图

Figure 7. Comparison of the $\Delta Tn6346$ -related region from p1512-KPC. Genes are denoted by arrows and colored based on gene function classifications. Shading regions denote shared DNA regions of homology (>95% nucleotide identity).

3 讨论

3.1 菌株的多重耐药

药敏检测结果显示菌株 1512 及电转子 1512-KPC-EC600 都对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、单环 β -内酰胺类及氨基糖苷类抗生素耐药, 这是由于菌株 1512 及电转子 1512-KPC-EC600 都包含了携带 *bla*_{KPC-2}、*bla*_{TEM-1}、*bla*_{CTX-M-65} 及 *rmtB* 基因的质粒 p1512-KPC^[23-24]。此外, 由于菌株 1512 还携带 *oqxAB*、*dfrA1* 和 *sul1* 基因, 所以对喹诺酮类抗生素及叶酸通路抑制剂复方新诺明耐药^[25]。而菌株 1512 对呋喃类抗生素耐药可能是由于位于染色体上的硝基还原酶编码基因 *nfsA* 和 *nfsB* 突变导致^[26]。

3.2 p1512-KPC 质粒复制子

质粒 p1512-KPC 同时包含 IncFII 型复制子和 Rep₃ 家族复制子 *repB*。典型的 IncFII 型复制子由 *repA2*、*repA6*、*repA1* 和 *repA4* 四部分组成。其中长度为 858 bp 的 *repA1* 是复制起始的核心基因, 其表达最初依赖于前导肽 RepA6, 后期受 RepA2 的负性调节(通过抑制 RepA6 的表达), RepA4 则参与复制的终止^[27]。p1512-KPC 的另一个复制子 *repB* 属于 Rep₃ 家族未知不相容群复制子^[28], Rep₃ 家族复制子包括许多不同的亚型, 迄今为止还没有明确定义的划分标准。目前, IncFII 型复制子与 Rep₃ 家族复制子 *repB* 共存的质粒在 GenBank 数据库中仅有两例, 即 p283747-KPC 和本研究中的质粒 p1512-KPC。并且质粒

p283747-KPC 仅提交了序列信息,并未对其全序进行结构基因组学分析。因此,本研究首次对 IncFII 型复制子与 Rep_3 家族复制子 *repB* 共存的质粒进行了精细结构的比较分析,明确了该类型质粒的骨架区及外源区基因结构、耐药基因周边遗传环境异同。

3.3 Tn6367 相关耐药区

p1512-KPC 的 Tn6367 相关区包含耐药基因 *bla*_{CTX-M-65}、*bla*_{TEM-1} 和 *rmtB*。其中 *bla*_{CTX-M} 和 *bla*_{TEM} 为超广谱 β-内酰胺酶基因, *bla*_{CTX-M} 通常由插入序列 *ISEcp1* 和 *ISCR1* 携带,形成 *ISEcp1-bla*_{CTX-M-IS903D} 或 *ISEcp1-bla*_{CTX-M-orf477} 转座单元^[29]; *bla*_{TEM} 则常由转座子 Tn1、Tn2 和 Tn3 携带,其中又以 Tn2 最为常见^[30]。*rmtB* 是一种介导氨基糖苷类抗生素高水平耐药的 16S rRNA 甲基转移酶基因, *rmtB* 常位于转座子 Tn2 下游,构成 Tn2-*rmtB* 元件^[31]。在 Tn6367 相关区中, *bla*_{CTX-M-65} 和 *bla*_{TEM-1} 分别由转座子 Tn6367(内部包含截短的 *ISEcp1-bla*_{CTX-M-65-IS903D} 转座单元)和截短的转座子 Tn2 携带, *rmtB* 位于 Tn2 下游。由此可见,在 p1512-KPC 的 Tn6367 相关区中,耐药基因 *bla*_{CTX-M-65}、*bla*_{TEM-1} 及 *rmtB* 均由较为典型的移动元件携带,但这些移动元件都经历了不同程度的截短。

3.4 *bla*_{KPC} 相关耐药区

碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC} 通常出现在基因环境 Tn4401 和 Tn6296 中,目前国内以 Tn6296 多见^[32],如质粒 pKP048^[33]、p0716-KPC^[28]、p12181-KPC^[28]及本研究的 p1512-KPC 中的 *bla*_{KPC} 均存在于 Tn6296 中。Tn6296 在肺炎克雷伯菌质粒 pKP048^[33]中首次被鉴定,是由一个以 *bla*_{KPC} 为核心的基因结构 (Tn6376-*bla*_{KPC}-ΔISKpn6-*korC*-*klcA*-*orf279*-*orf396*-Δ*repB*) 插入到 Tn1722 中形

成^[34]。在肠杆菌科细菌中,由于各种复杂重组事件的发生, Tn6296 经常以各种截短的形式存在^[28,33-34]。此外, Tn6296 还常与 Tn21 相邻出现,如在质粒 pKP1034^[35]、pKPC-LK30^[35-36]及本研究的 p1512-KPC 中。Tn21 为携带耐药基因 *aadA1*、*sul1* 和汞抗性操纵子 *merEDACPTR* 的转座子,是由 1 型整合子 In2 整合到 *tnpM* 和 *urf2* 基因之间所形成^[37]。

综上所述,携带耐药基因 *bla*_{KPC-2}、*bla*_{CTX-M-65}、*bla*_{TEM-1} 及 *rmtB* 的质粒 p1512-KPC 介导了肺炎克雷伯菌 1512 对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、单环 β-内酰胺类及氨基糖苷类抗生素耐药,并能导致相应耐药基因的水平转移。在质粒 p1512-KPC 中,耐药基因 *bla*_{KPC-2}、*bla*_{CTX-M-65} 及 *bla*_{TEM-1} 分别存在于截短的 Tn6296、Tn6367 及截短的 Tn2 的基因环境中。此外,本研究还将包含 IncFII 型复制子和 Rep_3 家族复制子 *repB* 的质粒 p283747-KPC 及 p1512-KPC 进行了比较基因组学分析,为该类型质粒的多样性和进化提供了更深入的理解。

参考文献

- [1] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing β-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(4): 1151-1161.
- [2] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing β-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(2): 809.
- [3] Ramos AC, Gales AC, Monteiro J, Silbert S, Chagas-Neto T, Machado AMO, Carvalhaes CG. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of distinct variants

- of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Microbiological Methods*, 2017, 142: 1–3.
- [4] Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(12): 686–696.
- [5] Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(12): 2518–2529.
- [6] Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(8): 2461–2470.
- [7] Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(8): 4178–4182.
- [8] Hong SS, Kim K, Huh JY, Jung B, Kang MS, Hong SG. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding class A carbapenemases. *Annals of Laboratory Medicine*, 2012, 32(5): 359–361.
- [9] Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2011, 70(1): 119–123.
- [10] Hu LF, Chang X, Ye Y, Wang ZX, Shao YB, Shi W, Li X, Li JB. *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfrA* genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 37(3): 230–234.
- [11] Zhao YC, Wang LJ, Zhang ZY, Feng J, Kang HX, Fang LQ, Jiang XY, Zhang DF, Zhan Z, Zhou DS, Tong YG. Structural genomics of pNDM-BTR harboring In191 and Tn6360, and other *bla*_{NDM}-carrying IncN1 plasmids. *Future Microbiology*, 2017, 12(14): 1271–1281.
- [12] 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.
- [13] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [14] Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembgen LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen ZT, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Goodwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer MLI, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu PG, Begley RF, Rothberg JM. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 2005, 437(7057): 376–380.
- [15] Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 75.
- [16] Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, Madden TL, Matten WT, McGinnis SD, Merezuk Y, Raytselis Y, Sayers EW, Tao T, Ye J, Zaretskaya I. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41: W29–W33.
- [17] Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, Schneider M, Bansal P, Bridge A J, Poux S, Bougueleret L, Xenarios I. UniProtKB/Swiss-Prot, the manually annotated section of the UniProt KnowledgeBase: how to use the entry view//Edwards D. Plant Bioinformatics. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1374. New York, NY: Humana Press, 2016: 23–54.
- [18] O’Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciuffo S, Haddad D, McVeigh R, Rajput B, Robbertse B, Smith-White B, Ako-Adjei D, Astashyn A, Badretdin A, Bao YM, Blinkova O, Brover V, Chetvernin V, Choi J, Cox E, Ermolaeva O, Farrell CM, Goldfarb T, Gupta T, Haft D, Hatcher E, Hlavina W, Joardar VS, Kodali VK, Li WJ, Maglott D, Masterson P, McGarvey KM, Murphy MR, O’Neill K, Pujar S, Rangwala SH, Rausch D, Riddick LD, Schoch C, Shkeda A, Storz SS, Sun HZ, Thibaud-Nissen F, Tolstoy I, Tully RE, Vatsan AR, Wallin C, Webb D, Wu W, Landrum MJ, Kimchi A, Tatusova T, DiCuccio M, Kitts P, Murphy TD, Pruitt KD. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic*

- Acids Research*, 2016, 44(D1): D733–D745.
- [19] Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(S1): D32–D36.
- [20] Roberts AP, Chandler M, Courvalin P, Guédon G, Mullany P, Pembroke T, Rood JI, Smith CJ, Summers AO, Tsuda M, Berg DE. Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid*, 2008, 60(3): 167–173.
- [21] Moura A, Soares M, Pereira C, Leitão N, Henriques I, Correia A. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics*, 2009, 25(8): 1096–1098.
- [22] Ebersbach G, Gerdes K. Plasmid segregation mechanisms. *Annual Review of Genetics*, 2005, 39(1): 453–479.
- [23] Maurya AP, Mishra S, Talukdar AD, Chanda DD, Chakravarty A, Bhattacharjee A. Diverse genetic array of *bla*_{CTXM-15} in *Escherichia coli*: a single-center study from India. *Microbial Drug Resistance*, 2016, 22(1): 7–14.
- [24] Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R, Rodriguez-Villalobos H, Struelens M, Glupczynski Y. Emergence of *ArmA* and *RmtB* aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 59(3): 459–464.
- [25] Kim HB, Wang MH, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(8): 3582–3584.
- [26] Sandegren L, Lindqvist A, Kahlmeter G, Andersson DI. Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 62(3): 495–503.
- [27] Blomberg P, Nordström K, Wagner EG. Replication control of plasmid R1: RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *The EMBO Journal*, 1992, 11(7): 2675–2683.
- [28] Feng J, Yin Z, Zhao QY, Zhao YC, Zhang DF, Jiang XY, Wu WL, Chen WJ, Wang H, Song YJ, Tong YG, Wang JL, Li YJ, Zhou DS. Genomic characterization of novel IncFII-type multidrug resistant plasmids p0716-KPC and p12181-KPC from *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 5830.
- [29] 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.
- [30] Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, 35(5): 820–855.
- [31] Martins WMBS, Gales AC. Frequent Tn2 misannotation in the genetic background of *rmtB*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(8): e00811–17.
- [32] Ho PL, Cheung YY, Lo WU, Li Z, Chow KH, Lin CH, Chan JFW, Cheng VCC. Molecular characterization of an atypical IncX3 plasmid pKPC-NY79 carrying *bla*_{KPC-2} in a *Klebsiella pneumoniae*. *Current Microbiology*, 2013, 67(4): 493–498.
- [33] Jiang Y, Yu DL, Wei ZQ, Shen P, Zhou ZH, Yu YS. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying *bla*_{KPC-2}, *bla*_{DHA-1}, *qnrB4*, and *armA*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(9): 3967–3969.
- [34] Wang L, Fang HH, Feng J, Yin Z, Xie XF, Zhu XM, Wang J, Chen WJ, Yang RS, Du H, Zhou DS. Complete sequences of KPC-2-encoding plasmid p628-KPC and CTX-M-55-encoding p628-CTXM coexisted in *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 838.
- [35] Xiang DR, Li JJ, Sheng ZK, Yu HY, Deng M, Bi S, Hu FS, Chen W, Xue XW, Zhou ZB, Doi YH, Sheng JF, Li LJ. Complete sequence of a novel IncR-F33:A-:B- plasmid, pKP1034, harboring *fosA3*, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-65}, *bla*_{SHV-12}, and *rmtB* from an epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 strain in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(3): 1343–1348.
- [36] Chen YT, Lin JC, Fung CP, Lu PL, Chuang YC, Wu TL, Siu LK. KPC-2-encoding plasmids from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, 69(3): 628–631.
- [37] Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(3): 507–522.

Sequencing and comparative genomics analysis of *Klebsiella pneumoniae* plasmid p1512-KPC

Zhaofang Jiang¹, Yachao Zhao², Manli Li², Dongsheng Zhou², Tianchuan Zhu¹, Xiaoyan Tan¹, Yigang Tong^{2*}, Jun Long^{1*}

¹ Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

² State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Abstract: [Objective] Comparative genomics analysis of the fully sequenced plasmid p1512-KPC from the multi-drug resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* 1512 isolate. [Methods] We used 16S rRNA gene sequencing to identify the bacterium. Seven housekeeping genes (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, and *tonB*) were used for the multilocus sequence typing (MLST) scheme. Resistance genes were screened by PCR amplification. The plasmid was transferred into recipient *Escherichia coli* EC600 using conjugal transfers and electroporation experiments. The activity and type of carbapenemase were detected using Carba NP, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using VITEK 2 compact system. Sequencing and bioinformatics analysis were used to characterize the plasmid p1512-KPC. [Results] The 1512 isolate was an ST11 multi-drug resistant *K. pneumoniae* strain showing Ambler class A carbapenemase. PCR demonstrated strain 1512 harbored *bla*_{KPC-2}, *dfrA1* and *sull* genes. The *bla*_{KPC-2} gene was located in non-self-transmissible plasmid p1512-KPC. Sequencing and bioinformatics analysis revealed that p1512-KPC, 117.69 kb in length, harbored IncFII replicon and replicon *repB* belonging to Rep_3 family unknown incompatibility groups. In addition, p1512-KPC contained *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-65}, *bla*_{TEM-1} and *rmtB* genes, among which *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-65} and *bla*_{TEM-1} were carried by Δ Tn6296, Tn6367 and Δ Tn2 respectively. [Conclusion] The resistance of *K. pneumoniae* 1512 to penicillin, cephalosporin, carbapenem, monobactam and aminoglycoside were mediated by non-self-transmissible plasmid p1512-KPC. Moreover, the comparative genomics analysis provided a deeper insight into the diversification and evolution of those plasmids that harbored IncFII replicon and replicon *repB* belonging to Rep_3 family unknown incompatibility groups.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, p1512-KPC, carbapenemase, *bla*_{KPC-2}

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, China (2016A020219005)

*Corresponding author. Jun Long, Tel: +86-20-84311852, E-mail: longjun327@163.com; Yigang Tong, Tel: +86-10-63869835, E-mail: tong.yigang@gmail.com

Received: 15 April 2018; Revised: 25 June 2018; Published online: 30 July 2018