



克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)细菌比较基因组学分析揭示多复制子抗性质粒介导广泛的抗性基因传播

王雪^{1,2#}, 赵佳男², 刘智慧^{1,2}, 张立敏³, 常晗^{4#}, 秦姣², 朱云芸⁵, 胡国成⁶, 胡诗佳², 阳建春², 贾仲昕^{1,2}, 李俊保⁷, 鞠厚斌⁸, 王承民², 季芳^{2*}, 秦建华^{1*}

¹河北农业大学动物医学院, 河北 保定 071001

²广东省科学院动物研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广东 广州 510260

³联勤保障部队北戴河康复疗养中心, 河北 秦皇岛 066100

⁴中国科学院动物研究所, 北京 100101

⁵北京动物园圈养野生动物技术北京市重点实验室, 北京 100044

⁶生态环境部华南环境科学研究所, 广东 广州 510530

⁷郑州市动物园, 河南 郑州 450008

⁸上海市动物疫病预防控制中心, 上海 200336

摘要:【目的】研究克雷伯氏菌与多复制子抗性质粒间的关系, 分析细菌携带多复制子质粒对抗生素环境的响应机制。【方法】以 2018–2020 年分离的 56 株不同来源克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)分离株为研究对象, 利用微量肉汤稀释法评估其多重耐药表型, 对分离菌株进行全基因组测序(WGS), 通过细菌全基因组关联分析(BGWAS)技术和比较基因组学方法深入解析多复制子抗性质粒形成的机制。【结果】耐药表型分析发现野生动物来源的菌株具有更广的耐药谱系, 总体 *Klebsiella* sp.对氨苄西林表现出很高的耐药率(80.36%), 尤其是马来穿山甲来源菌株对头孢类抗生素高度耐受, 同时对氯霉素、左氧氟沙星和复方新诺明等药物耐受, 基因组分析发现这些菌株携带了抗性质粒和更多的抗生素抗性基因。进一步对 69 个质粒序列分析, 发现有 28 个质粒为多复制子质粒, 主要携带 *bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{CTX-M-14}、

基金项目:河北省现代农业产业技术体系奶牛创新团队建设项目(HBCT2018120205); 河北省重点研发项目(20326603D); 广东省科学院人才专项(2016GDASRC-0205); 广东省科学院科技发展专项(2018GDASCX-0107); 北京动物园圈养野生动物技术北京市重点实验室开放课题(ZDK201909)

[#]并列第一作者。

^{*}通信作者。E-mail: 秦建华, qjhqqq@126.com; 季芳, 309533361@qq.com

收稿日期: 2020-11-17; 修回日期: 2021-01-04; 网络出版日期: 2021-01-13

*bla*_{CTX-M-55}、*bla*_{OXA-1} 和 *bla*_{TEM-1} 等 β -内酰胺酶基因。细菌携带质粒类型分析认为 *Klebsiella pneumoniae* 可能是多复制子质粒的重要宿主, 质粒骨架与结构分析发现多复制子质粒多由 2 个或 2 个以上单个质粒融合而成, 携带此类质粒的菌株不仅获得了更广的耐药表型, 而且在全球传播扩散分布逐年增加, 因此产生对抗生素环境更强的适应性。【结论】多重耐药性细菌呈现的表型与携带的多复制子质粒有关, 相比较下多复制子质粒比非多复制子质粒有更强的抗性基因携带能力, 或许是细菌在强大的抗生素压力下产生的重要响应机制。本研究对于未来探索细菌抗性基因的传播扩散机制具有重要意义。

关键词: 多复制子质粒, 克雷伯氏菌, 抗生素抗性基因, 比较基因组学分析

抗性基因的广泛传播通常与质粒介导的基因水平转移有关, 细菌的质粒接合可在不同的种属间发生, 共轭质粒是革兰阴性细菌传播抗生素抗性基因簇的重要载体^[1]。质粒类型多种多样, 依据复制调控或分裂相关的基因元件之间的差异, 质粒被定义为不同的不相容群^[2], 并且每个不相容群又细分为不同的不相容亚群^[3]。在肠杆菌科细菌携带的质粒中, 最常见的复制子类型包括(Inc)F、A/C、L/M、II、HI2 和 N^[4], 而 IncF、IncI、IncA/C、IncL(即 IncL/M)、IncN 和 IncH 经常被认为是携带更多种类抗性基因的质粒类型^[5]。在肠杆菌科致病菌成员中, 质粒呈现高度多样性, 这为它们的宿主提供了获得新基因的机会^[4]。IncF 是在肠杆菌科中广泛流行的窄宿主谱质粒, 可携带多种抗生素抗性基因(ARGs), 并且在某些特异性抗性基因的扩散起主要作用^[6]。大量研究认为 IncF 亚型质粒 IncFIB/IncFII 与 ARGs 间的关系密切^[7-12], 携带很多重要的抗性基因如头孢菌素酶基因(CTX-M 等)、碳青霉烯酶基因(KPC 等)、氨基糖苷乙酰化酶(*aac6'-1b*)^[13]和粘菌素耐药基因 *mcr-1*^[14]。这些耐药质粒在环境中扩散, 对公共卫生安全构成严重威胁。

近年来, 一些具有复杂结构的多复制子质粒逐渐受到关注, 这种多个复制子共存的情况在

IncF 不相容群组质粒中较为常见^[3]。一项研究对质粒 p721005-KPC、p504051-KPC 和 pA3295-KPC 的分析显示, p721005-KPC/p504051-KPC 的结构由 IncR 型骨架及 IncFII 型共轭移区、维持区和骨架共同组成, pA3295-KPC 骨架是由 IncFII 型骨架区、维持区与 IncN1 型维持区、共轭转移区杂交而成^[15];插入序列 IS26 介导了 IncN1-F33:A-B-质粒与携带 *mcr-1* 的噬菌体样质粒的融合, 暗示其在质粒重组过程中发挥重要作用^[16];另一项研究发现, 携带 IncFII 家族 pKPC-1k30/ pHN7A8 复合质粒菌株 CG258, 在中国多家医院间发生克隆性传播^[17]。Pesesky 等^[18]认为, 转座子可能对质粒嵌合体的形成发挥主要作用, 其在原核生物类群的基因组或质粒 DNA 中含量丰富且分布不均, 证明这些质粒嵌合体是多种 ARGs 的有效载体。因此, 深入研究在生态环境中的菌群携带质粒复制子类型与 ARGs 的关系, 对于揭示细菌群体对抗生素环境的响应策略以及监测流行病学动态、建立特定质粒传播的干预方案具有重要意义。

在前期研究中, 我们获得了来自马来穿山甲的 6 株多重耐药性肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*), 发现其对 β -内酰胺类、氟喹诺酮类和氯霉素类药物高度耐受, 并携带了多复制子复

合质粒。为了评估多复制子质粒的流行扩散情况及其与 ARGs 间的关联,本研究进一步分析了源自多种野生动物和医院临床样本分离到的 *Klebsiella* sp. 菌株,利用细菌全基因组关联分析 (BGWAS) 方法,深入探讨多复制子质粒对菌株响应抗生素环境的生存策略的重要意义。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株

本实验室收集和保存了 2018–2020 年期间分离的克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.) 分离株,选取 56 株(其中动物来源 21 株,人类临床来源 35 株) *Klebsiella* sp. 样本作为研究对象(附表 1)。将这些菌株冻存液重新划线于麦康凯琼脂平板(Beijing SanYao Science & Technology Development Co., Beijing, China), 35 °C 下过夜复壮,次日挑取单菌落放入 Mueller-Hinton Broth (MHB) 培养基中, 35 °C 过夜孵育富集,以用于后续实验。

1.2 药敏试验

根据 CLSI 2019 年发布的《抗菌药物敏感性试验执行标准》^[19],使用微生物药敏试剂盒 (BIO-KONT, China) 对所有 *Klebsiella* sp. 进行肉汤微量稀释法药敏(MIC) 试验,检测氨苄西林、头孢呋辛钠、头孢唑林、头孢曲松、头孢吡肟、氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、美罗培南、庆大霉素、阿米卡星、氯霉素、左氧氟沙星、复方新诺明和替加环素(参照 EUCAST 标准)^[20] 等 14 种抗生素药物耐受情况,以评估其多重耐药表型。本实验用参考菌株 *E. coli* ATCC25922 作为质量控制菌株。

1.3 全基因组测序

选取 56 株 *Klebsiella* sp. 送测全基因组。具体方法如下:使用 Nanopore 测序平台^[21–22] 进行 WGS (Biomarker Technologies, China), 按照 ONT 提供的标准方法进行测序,采用 NanoDrop、Qubit 和 0.35% 琼脂糖凝胶电泳提取高质量的基因组 DNA,检测其纯度、浓度和完整性。BluePippin 核酸自动回收系统回收大片段 DNA,连接测序试剂盒(SQK-LSK109 Ligation Sequence Kit, Oxford Nanopore Technologies, UK) 构建文库,使用 DNA 损伤修复、末端修复和磁珠纯化等方法进行连接纯化,在机器上对 Qubit 文库进行定量和测序。提取菌株基因组 16S rRNA 数据绘制系统发育树,此项工作由 NCBI 在线 BLAST 工具和软件 MEGA-X 共同实现。

1.4 MLST 分型和 rMLST 种属鉴定

从全基因组数据中提取 MLST 分型所需的 7 个保守的持家基因序列(*rpoB*、*gapA*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*infB* 和 *tonB*),使用 *Klebsiella* sp. (<http://bigsd.bpasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) 的多位点序列分型数据库,对菌株进行多位点序列分型 (MLST),确定序列类型(ST)。同时使用核糖体 MLST 数据库(rMLST, <https://pubmlst.org/species-id>) 进一步确定菌株种属信息。

1.5 多复制子质粒基因组 DNA 分析

使用 PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) 数据库对质粒进行不相容群分型,利用质粒数据库数据比对测序质粒与已知质粒的相似程度(PLSDB, <https://ccb-microbe.cs.uni-saarland.de/plsdb/>, 参数确定: Max.p-value=0, Max.distance=0.04, Per.Ident≥60%),确认相

似质粒的不相容群组数据集, 并依据 PLSDB 数据库确定相似质粒报道年份和全球出现频率。使用抗生素抗性基因专有数据库 (CARD, <https://card.mcmaster.ca/>) 对测序质粒进行基因注释, 并依据基因组组分分析结果和功能注释(通用数据库 Nr、GO、Uniprot、COG、SwissProt、Pfam 和 KEGG 以及专有数据库 ISfinder、INTEGRALL 和 TN Number Registry) 对可移动元件和其他特征进行注释。使用软件 SnapGene 绘制了部分质粒的质粒图谱, 选取 pM1026-3Ar.1 数据为代表质粒构建质粒融合模式图。

2 结果和分析

2.1 *Klebsiella* sp. 的耐药表型分析

药敏结果显示, 56 株 *Klebsiella* sp. 中有 45 株对氨苄西林表现出较强的耐药性, 耐药率高达 80.36%。马来穿山甲分离株对头孢类药物高度耐受, 同时耐受药物还包括氯霉素、左氧氟沙星和复方新诺明, 非马来穿山甲来源的动物分离株仅 M1023-4Ar、N1059-5At、M1026-3Ar、M297-1、S141 和 S90-2 对上述 5 类药物耐受性较强(分离自牦牛、奶牛、白唇鹿、赤袋鼠、绯胸鹦鹉和石鸡)。人类来源临床分离菌株耐药性相对较弱, 仅 BS375-3 和 S183-1 对头孢呋辛钠、头孢唑林、头孢曲松和头孢吡肟显示出较强的耐药性(图 1)。值得注意的是, 所有克雷伯氏菌主要对 β -内酰胺类药物表现较强的耐受表型, 但均对美罗培南和替加环素敏感。

2.2 多复制子质粒与宿主 *Klebsiella* sp. 基因组的相关性分析

根据 16S rRNA 和 rMLST 鉴定结果, 在 56 株 *Klebsiella* sp. 中, 29 株确定为肺炎克雷伯氏菌

(*K. pneumoniae*), 携带质粒菌株有 27 株(93.10%); 9 株确定为肺炎克雷伯氏菌(*K. quasipneumoniae*), 携带质粒菌株有 8 株(88.89%); 18 株确定为变栖克雷伯氏菌(*K. variicola*), 携带质粒菌株有 5 株(27.78%)。MLST 分型鉴定出 33 种不同 ST 型, 其中 16 种 ST 型的菌株携带了多复制子质粒, 包括 ST1565 型(4 株), ST1 和 ST23 型(各 2 株), ST36、ST86、ST101、ST111、ST133、ST231、ST290、ST791、ST1035、ST1662、ST1910、ST2558 和 ST3972 型(各 1 株), 研究发现多复制子质粒与菌株 ST 型并没有明显相关性(附表 1)。CARD 数据库抗性基因注释结果表明, 总体上看, *Klebsiella* sp. 染色体 DNA 上通常携带 β -内酰胺类药物固有抗性基因 *bla*_{DHA}、*bla*_{SHV}、*bla*_{LEN} 和 *bla*_{OKP-B}, 每个菌株至少携带两个 β -内酰胺类药物抗性基因。此外, 染色体 DNA 上还携带有 ABC 家族、MFS 家族、SMR 家族或 MATE 家族等耐药泵基因。

基于 PlasmidFinder 数据库, 不相容群(Inc)分型是基于质粒 DNA 中复制子(rep)序列^[23]。本研究中, 对 69 个质粒 DNA 鉴定结果发现, 30 个质粒 DNA 属于单一复制子质粒, 28 个质粒 DNA 属于多复制子质粒以及 11 个质粒 DNA 属于未知复制子类型的质粒(unknown 或 novel) (附表 1)。进一步分析复制子类型与携带抗性基因的关系, 发现多复制子质粒可携带的抗性基因数量明显多于非多复制子质粒(图 2), 携带抗性基因数量 ≥ 5 个的单一复制子型质粒比例仅为 26.67%, novel 质粒仅为 9.09%, 而多复制子质粒比例高达 75.00%。当携带的抗性基因数量 ≥ 10 个时, 多复制子质粒占比为 35.71%, 且少数质粒携带抗性基因数量甚至大于 25 个, 而单一复制子质粒只有 1 个, novel 型质粒尚未检出。质粒携带抗性基因种类呈现多元化, 多复制子质粒主要携带 *bla*_{CTX-M-15}、

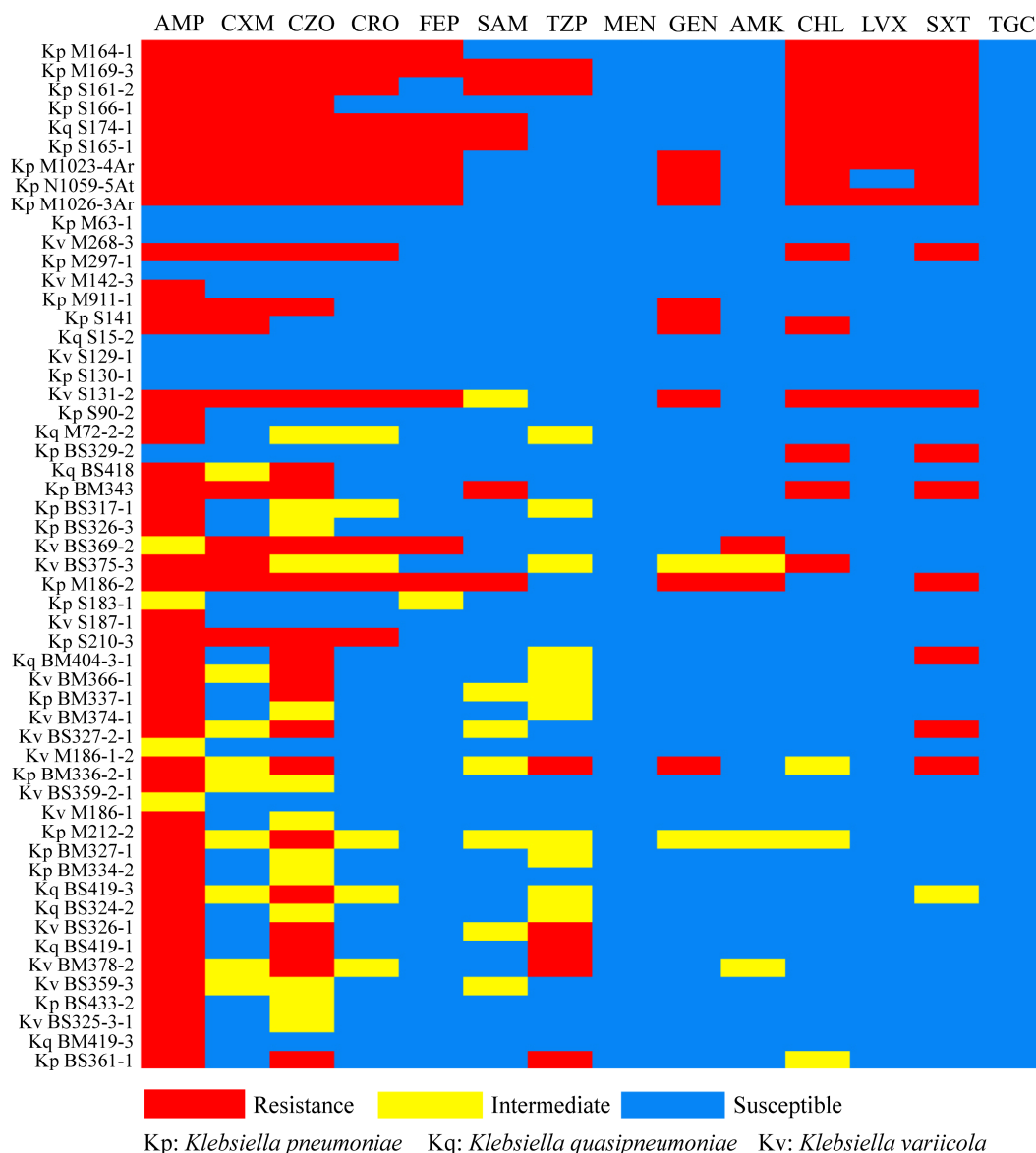


图 1. *Klebsiella* sp. 分离株的耐药表型

Figure 1. Drug resistance phenotype of *Klebsiella* sp. isolates. red: resistance; yellow: intermediate; blue: susceptible. AMP: ampicillin; CXM: cefuroxim; CZO: cefazolin; CRO: ceftriaxone; FEP: cefepime; SAM: ampicillin/sulbactam; TZP: piperacillin/tazobactam; MEM: meropenem; GEN: gentamicin; AMK: amikacin; CHL: chloramphenicol; LVX: levofloxacin; SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole; TGC: tigecycline.

*bla*_{CTX-M-14}、*bla*_{CTX-M-55}、*bla*_{OXA-1} 和 *bla*_{TEM-1} 等 β-内酰胺酶基因及 *aac*(6')-Ib-cr、*aph*(6)-Id 和 *aph*(3'')-Ib 等氨基糖苷酶基因，部分质粒还携带磺胺类抗性基因 *sul1*、*sul2* 和 *sul3*，四环素类抗性基因 *tetA*、*tetG*，介导氟喹诺酮类抗性的 *qnr* 基因

家族，以及介导氯霉素抗性的 *floR* 基因(附表 2)。综上所述，多复制子质粒携带抗生素抗性基因的能力要远远强于非多复制子质粒，*Klebsiella* sp. 摄取并携带多复制子质粒或许是其对抗生素环境压力的重要生存策略。

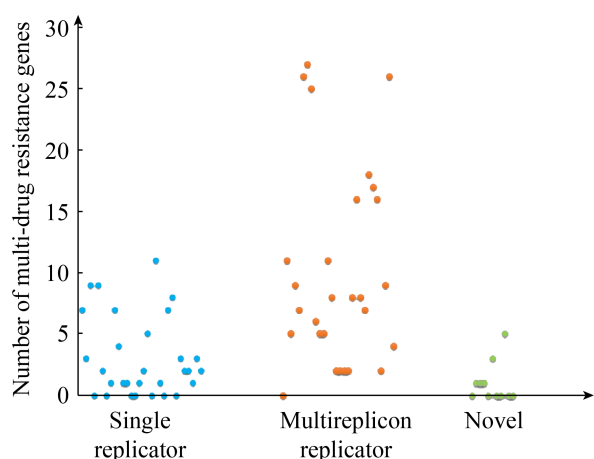


图 2. 质粒携带抗性基因数量的比较分析

Figure 2. Comparative analysis of drug resistance genes carried by plasmids.

本研究又对 *K. pneumoniae*、*K. variicola* 和 *K. quasipneumoniae* 3 个种携带的质粒和耐药基因情况进行了比较分析, 以评估不同种 *Klebsiella* sp. 与多复制子质粒间的关系。从整体上看, 多复制子复合质粒分布广泛, 与宿主菌株来源并无明显相关性, 但发现多复制子复合质粒多由 *K. pneumoniae* 携带, 而 *K. quasipneumoniae* 和 *K. variicola* 携带很少。利用 16S rRNA 构建了菌株系统发育树, 发现明显分为 5 个分支, 携带多复制子质粒的 *K. pneumoniae* 菌株明显在同一个进化分枝上, 暗示这些菌株存在很近的同源关系(图 3)。值得注意的是, 携带多复制子质粒的菌株多来源于野生动

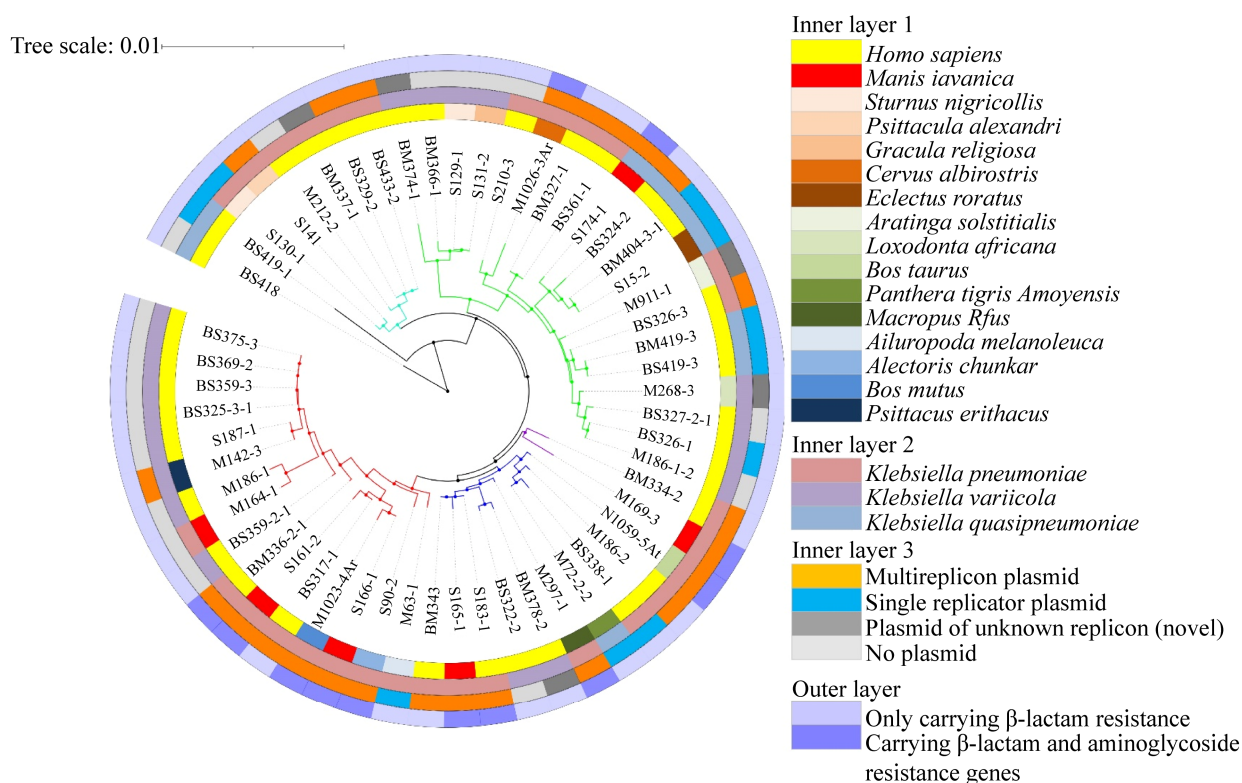


图 3. 基于菌株 16S rRNA 序列的系统发育树

Figure 3. Contruction of Phylogenetic Tree based on 16S rRNA sequences. Inner layer 1: isolation source; inner layer 2: species; inner layer 3: isolates carrying plasmid; outer layer: plasmids carrying with β -lactam resistance genes and aminoglycoside resistance genes.

物,而并非人类(图 3),暗示野生动物可能是多重耐药菌的重要的保藏宿主。因此, *K. pneumoniae* 被认为可能是多复制子质粒的重要宿主菌,野生动物又是多重耐药的 *K. pneumoniae* 的重要宿主。

2.3 多复制子质粒基因组成和骨架分析

本研究中,共发现 28 个多复制子质粒,其中 IncFIB/IncFII/(IncQ1)型 8 个, IncFIB/IncHI1B/(IncQ1)型 5 个, IncFII/IncR 型 4 个, IncHI1B/repB 型 4 个, IncFII/IncQ1 型 2 个, IncFIA/IncFIB/IncFII/IncFII/IncFII、IncFIA/IncFII、IncFIA/IncR、IncFII/IncHI1B/IncR/IncR/repB 和 IncN/IncN 型各 1 个。除 IncFII/IncR 型和 IncFIA/IncFII 型质粒外,其余多复制子质粒都显示能够容纳更多的抗性基因。当质粒上的抗性基因数量增多时,质粒碱基数也明显增多,但质粒总体 G+C 含量并未明显增加,这些质粒可以将多种不同 ST 型 *K. pneumoniae* 作为宿主并被其稳定携带(附表 2)。

质粒骨架通常由复制调控区、分配系统、结

合转移系统和质粒维持区组成^[2,24],选取 28 个多复制子质粒中的 5 种类型进行 Blast 分析,筛选出 5 个质粒骨架基因高同源性(同源性 $\geq 93\%$)同时携带耐药基因较多的质粒用于进一步分析质粒重组(表 1),质粒骨架基因包括 *rep* 基因、*sop/par* 基因、*tra/trb* 基因区域、抗生素抗性基因和可移动元件基因。通过质粒图谱发现,质粒 pM1026-3Ar.1 IncFIB (属于 IncFIB/IncFII/(IncQ1)型)复制子的 *repB* 基因上下游基因结构为 IS609 *insQ-sopB-sopA-repB-intI-parD-ybdN-parB-IS110 tnp*, IncFII 复制子的 *repA* 基因上下游基因结构为 Tn5393 *tnpA-repA-repA2-pld-IS1 insB*, IncQ1 复制子的不完整 *repA* 基因被包含在 18 个抗性基因和 5 个可移动元件组成的复合结构之间,其上下游基因结构为 *repC-repA-IS431mec tnp-Tn21 tnpM-intI1*; 质粒 pS174-1.3 IncFIB [属于 IncFIB/IncHI1B/(IncQ1)型]复制子的 *repB* 基因上下游结构为 *intM-int-repB-sopA-sopB*, IncHI1B 复制子的 *repA*

表 1. 代表性多复制子质粒基因组信息

Table 1. Plasmid genome information of representative multireplicon

Name	Size/kb	G+C content/%	Plasmid finder	Number of multi-drug resistance genes	Type of multi-drug resistance genes
pBS361-1	104.834	52.83	IncFII(K)/IncR	2	<i>mexT, tetG</i>
pM297-1.2	225.763	52.59	IncFII(K)/IncQ1	17	<i>sul2, aph(3')-Ia, aac(3)-IIa, floR, tetG, mphA, mrx, sul1, qnrB2, sul1, emrE, aadA16, arr-3, aac(6')-Ib-cr, bla_{TEM-1}, bla_{CTX-M-3}, qnrS1</i>
pM1026-3Ar.1	262.519	51.84	IncFIB(K)/IncFII(K)/IncQ1	27	<i>mtrA, oprM, adeB, arlR, nmcR, tetG, catII, mphA, mrx, sul1, emrE, arr-3, catB3, bla_{OXA-1}, aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, sul2, dfrA12, aadA2, cmlA1, aadA, qacH, sul3, mefB</i>
pS161-2.2	178.411	50.80	IncHI1B (pNDM-MAR)/repB	16	<i>aph(3')-Ia, mphA, mrx, sul1, nmcR, bla_{DHA-1}, qnrB4, emrE, arr-3, catB3, bla_{OXA-1}, aac(6')-Ib-cr, mtrA, oprM, mexD, arlR</i>
pS174-1.3	159.310	50.83	IncFIB(K) (pCAV1099-114)/IncHI1B (pNDM-MAR)/IncQ1	8	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, sul2, bla_{TEM-1}, arlR, adeB, oprM, mtrA</i>

基因上下游基因结构为 *IS431mec tnp-other-repA-yadA-other-Tn903 tnp*, IncQ1 复制子的 *repA* 基因上下游基因结构为 *repC-repA-IS431mec tnp-Tn3 tnpR*, 它也被 4 个抗性基因和 2 个转座酶基因组成的复合结构包围在内; 质粒 pBS361-1 IncFII (属于 IncFII/IncR 型)复制子的 *repA1* 基因上下游基因结构为 *IS431mec tnp-yedK-repA1-pld-aer-Tn4653 tnpR-Tn1721 tnpA*, IncR 复制子的 *repB* 基因上下游基因结构为 *parM-parA-other-repB-other-resD*, 4 个 IncFII/IncR 结构相似度很高 ($\geq 99\%$), 暗示其可能为相同质粒的不同拷贝, 携带的抗性基因数量都是 2 个, 且均为 *mexT* 和 *tetG* (附表 2)。

质粒 pS161-2.2 IncHI1B (属于 IncHI1B/repB 型)复制子的 *repA* 基因上下游基因结构为 *Tn1721 tnpA-other-other-repA-other-other-Tn903 tnp*, repB 复制子的 *repA* 基因上下游基因结构为 *sopB-sopA-repA-int-intM*, 此类型质粒也具有较的抗性基因携带能力, 且拥有两套分配系统 *sopA-sopB/parA-parB*; 质粒 pM297-1.2 IncFII (属于 IncFII/IncQ1 型)复制子的 *repA* 基因与 IncQ1 复制子的 *repA* 基因物理距离十分接近(4038 bp), 其结构为 *Tn903 tnp-other-repA(IncFII)-pld-aer-IS431mec tnp-other-repA(IncQ1)-repC*。值得注意的是, IncQ1 复制子的 *repA* 基因虽然没有处于抗性基因和可移动元件复合结构内, 但 *repA-repC* 基因之后总是跟随一个磺胺类抗性基因 *sul2* (图 4)。质粒 pM279-1.2、pM1026-3Ar.1 和 pS174-1.3 均携带 IncQ1 复制子, 且携带的抗性基因数量分别为 17、27 和 8, 对 β -内酰胺类、氨基糖苷类和磺胺类抗性

基因的携带能力较强(表 1), 提示抗性基因携带能力可能与 IncQ1 型质粒有关。另外, 质粒 pM1026-3Ar.1、pBS361-1 和 pM297-1.2 都存在共轭结合转移系统基因簇 *traABCDEFGHIKLMNOPQRSTUVWXYZ/trbABCDEFGHIKLMN-finO* 样结构, pM297-1.2 甚至存在 2 套较为完整的转移系统。5 个质粒都至少在其中 1 个 *rep* 基因的上下游发现了可移动元件(IS 序列、转座子或整合酶基因), 这可能是由于可移动元件能够作为融合关键位点, 进而介导质粒片段融合而形成复合结构。

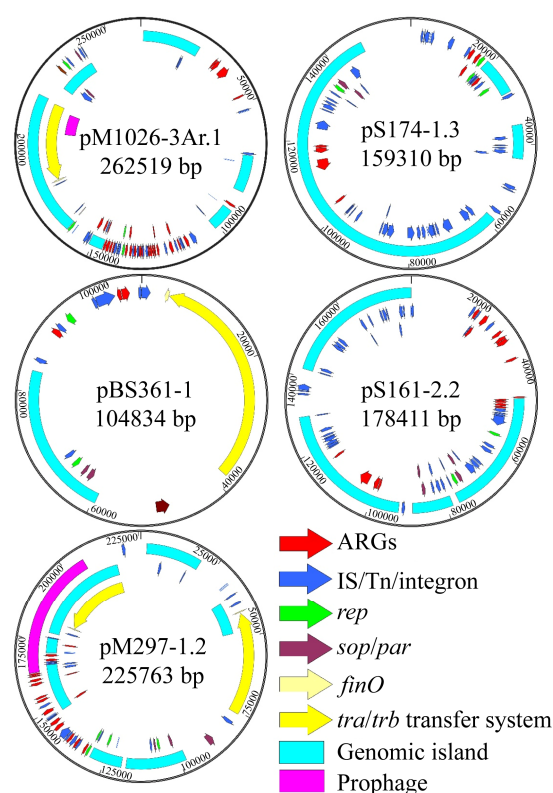


图 4. 多复制子质粒图谱

Figure 4. Multireplicon plasmid map. pM1026-3Ar.1, pS174-1.3, pBS361-1, pS161-2.2 and pM297-1.2 are selected as representatives, and different colors represent different functional region.

多复制子质粒 pM1026-3Ar.1 基因组 DNA 上含有 3 个复制子结构 IncFIB、IncFII 和 IncQ1, 通过 blast 和 PLSDB 数据库查询到 3 个单一复制子质粒与其复制子高度同源(同源区域 $\geq 97\%$), 其中 IncFIB 复制子区域(32883–96121 bp)与 2018 年在美国分离的人类宿主 *K. pneumoniae* 质粒 p203 同源性高(GenBank 登录号: NZ_CP021166.1, Query Cover=40%), IncFII 复制子区域(94997–1421 bp)与 2018 年在日本某污水处理厂分离的产 KPC-2 酶 *K. pneumoniae* 菌株质粒 pGSU10-3-2 同源性高(GenBank 登录号: NZ_AP018673.1, Query Cover=31%), IncQ1 复制子区域(451–5462 bp)与 2012 年分离的 *S. enterica* 亚种质粒 pSRC15 同源性高(GenBank 登录号: NC_013104.1, Query Cover=1%), 暗示多复制子质粒 pM1026-3Ar.1 可能由这 3 种质粒融合而成。根据这些质粒的结构信息绘制了可能的质粒融合模式图(图 5), 质粒 pM1026-3Ar.1 全长 262519 bp, 推测 p203 样质粒作为基础的质粒结构提供了约 63239 bp 的基因片段, pGSU10-3-2 样质粒提供了共轭转移区约 40295 bp 的基因片段, p203 和 pGSU10-3-2 样质粒也为 pM1026-3Ar.1 提供了大量抗性基因和可移动元件(图 5-A)。而 pSRC15 样质粒提供了约 5012 bp 基因片段, 包括 *aph(6)-Id*、*aph(3'')-Ib*、*sul2*、*bla_{OXA-1}* 和 *aac(6')-Ib-cr* 等抗生素抗性基因以及少量外排泵基因(图 5-B)。因此, 在细菌面对外界抗生素的压力不断选择下, 多个单复制子质粒向多复制子融合质粒的转变, 为降低生存成本这种质粒融合模式或许是细菌对较强抗生素环境压力产生适应性进化的结果。

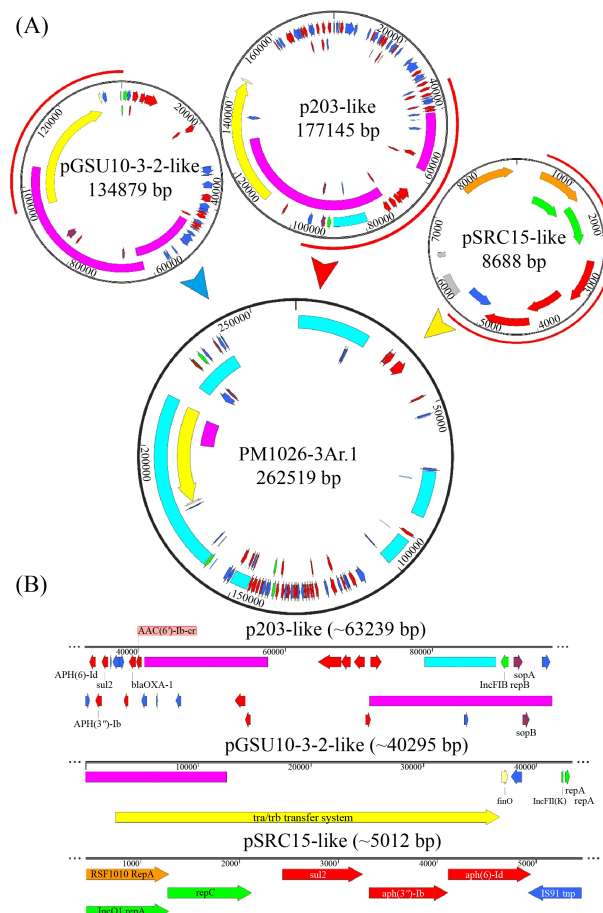


图 5. 质粒 pM1026-3Ar.1 可能的质粒融合示意图

Figure 5. The potential fusion process schematic diagram of plasmid pM1026-3Ar.1. A: The fusion process of plasmid P203, pGSU10-3-2 and pSRC15, the red semicircle on the outside of the plasmid indicates the fusion region; B: The specific structure and genetic composition of the fusion fragments provided by plasmids P203, pGSU10-3-2 and pSRC15.

3 讨论

克雷伯氏菌属菌株 *Klebsiella* sp. 染色体 DNA 上大多仅携带固有抗性基因, 而未携带质粒的菌株对抗生素耐受性较弱(图 1), 因此固有抗性基因不足以赋予菌株对多种药物的耐受表型, 质粒上携带的抗性基因是菌株多重耐药性表型的关键。

我们研究发现,克雷伯氏菌属菌株携带的质粒复制子主要为 IncFIB/IncFII/(IncQ1)型(无论其是否为多复制子质粒)(附表 1),相关研究表明,在中国四川、山东 2 省抽检的 7 个猪样品分离的肠沙门氏菌 *S. enterica* 分离株中,检测到与 IncFIB/IncFII 型复制子相连锁的高水平甘氨酸环素类抗性基因 *tetX4*^[10],与转座子 Tn1548 相关的抗性基因 *qnrB2*、*aac(6')-Ib-cr* 和 *bla_{CTX-M-3}* 共定位于 *S. enterica* 亚种 IncFII 质粒上^[25],IncFIB 和 IncFII 型质粒是 *bla_{NDM}*、*bla_{KPC}*、*bla_{CTX-M}* 和 *bla_{OXA}* 等超广谱 β -内酰胺酶(EBSLs)基因的适合载体^[26-28],且具有容纳并稳定携带多种抗性基因的能力。

我们研究还发现 *K. pneumoniae* 携带的多复制子质粒主要由 IncFIB、IncFII 和 IncQ1 型复制子融合产生,IncQ1 型质粒的宿主范围广泛,可以在细菌中稳定存在,是一种可被诱导结合的质粒类型,已知其能够编码抗性基因 *sul2*、*strAB*、*tetA* 和 *bla_{KPC-2}*,分别介导对磺胺甲恶唑、链霉素、四环素和亚胺培南等药物的抗性,证明该质粒与耐药性菌株的传播密切相关^[29-30]。*K. pneumoniae* 携带的 pBS361-1、pM297-1.2、pM1026-3Ar.1、pS161-2.2 和 pS174-1.3 均为多复制子质粒,单复制子质粒为其提供了 *rep* 基因和 *sop/par* 基因的框架区域、*tra/trb-finO* 基因的结合转移区域、部分功能基因的维持区域以及各类抗生素抗性基因(图 4)。

多复制子质粒携带抗性基因的能力明显强于非多复制子质粒,研究中发现其携带抗性基因数量通常都多于 5 个,其质粒碱基数量随着携带抗性基因数量的增多而增多,当以细菌携带质粒的适应性成本与质粒编码抗生素抗性决定因素

数量作为变量时,两变量呈负相关^[31]。在我们的研究中发现,多复制子质粒并非单独与菌株共存,更多 *Klebsiella* sp.在携带多复制子质粒的同时也会同时携带一个或数个单复制子质粒或未知类型质粒,这些质粒基因组大小和携带基因数量远远小于多复制子质粒(附表 1),甚至有些质粒似乎缺乏对宿主有用的基因^[32]。有研究认为,肠杆菌科和芽孢杆菌中同时携带大质粒和小质粒时,小质粒的出现频率高于预期值,单个细菌携带多个无明显关联的可结合质粒,认为其携带成本比每个质粒单独携带成本更高,但实际结果却是携带两个结合型质粒的成本低于只携带单个质粒的成本^[33]。

自然界中细菌菌株携带多个质粒现象十分常见,大质粒(100–400 kb)和小质粒(< 25 kb)间的联系比预想的更为密切,质粒间的正上位性使质粒携带的成本负担最小化且有利于提高质粒稳定性^[34]。我们研究发现多复制子质粒总 G+C 含量并未明显升高,少量质粒的 G+C%甚至有所降低(附表 2),G+C 含量是影响菌株携带质粒适应性成本的关键因素之一,当其降低时适应性成本也会随之降低^[35]。多个复制子配合不同来源的维持接合区,使得多复制子质粒具备了稳定复制的能力^[15],可能允许质粒以类似于分配系统的方式规避不相容性,或者提供一种改变质粒拷贝数以调节质粒基因表达的方式,从而达到拓宽窄宿主谱质粒宿主范围的目的^[36],获得额外抗性质粒或抗性突变也会提高抗性菌株的适应性^[37],这也解释了研究中发现的多复制子质粒类型为何如此复杂的同时仍然具备携带大量耐药基因并与菌株共存的现象。

本研究重点分析的 5 个质粒, *rep* 基因上下游均含有包括插入序列、转座子和整合酶在内的大量可移动元件(图 4), 表明多复制子质粒的形成与可移动元件间的联系密不可分。已有研究证明, 多复制子质粒形成机制以指向插入序列(IS)介导的质粒融合重组事件为主, 插入序列 ISPa40 介导子质粒 pSa44-CRO、pSa44-CIP 发生同源重组, 整合为同时编码环丙沙星和头孢曲松耐药 IncI1/IncFIB 型质粒 pSa44-CIP-CRO, 并在 *S. typhimurium* 中传播^[38], IncFIB 型质粒 pBJ114-141 与 IncX3 型质粒 pBJ114-46 的融合则可能由插入序列 ISKpn19、IS3000 和 ISAbal25 间的转座事件共同介导^[39], Leelaporn 等^[40]研究发现插入序列 IS257 元件可以通过未明确的复制转座机制介导质粒整合。IS26 是在各种抗性质粒中经常被检测到的插入序列元件, 它可介导 IncN1-F33:A-B-质粒与携带 *mcr-1* 的噬菌体样质粒的融合, 也可同时介导毒力、抗性和高传播性的 *S. enteritidis* 的多复制子质粒 pSE380T (IncHI2/IncFIA) 的出现^[16,41]。本研究中, 以质粒 pM1026-3Ar.1 为代表探讨质粒融合模式, 认为 p203 样质粒提供了主要框架结构, pGSU10-3-2 样质粒提供了共轭转移区, pSRC15 样质粒提供了少量抗性基因(图 5), IS1、IS26、IS609 和 IS903B 分布在这些结构两端, 与插入序列介导质粒融合的报道相一致^[16,38-41], 3 个子质粒携带的 IS 元件可能是发生质粒融合的关键位点, 在介导多复制子质粒形成的同时也为其提供了大量新的基因元件。

我们进一步研究了多复制子质粒与宿主菌株的关联性, 认为多复制子质粒与 *K. pneumoniae* 具有良好的相容性, *K. quasipneumoniae* 则具备

携带质粒的潜力, 而 *K. variicola* 并不是多复制子质粒的最佳宿主, 这些菌株在以马来穿山甲为主的野生动物来源菌株中广泛分布(图 3)。多复制子质粒与菌株 ST 型并无明显相关性, 在多种 ST 型中均可检出多复制子质粒(附表 1)。针对多复制子质粒 pBS361-1、pM297-1.2、pM1026-3Ar.1、pS161-2.2 和 pS174-1.3 的全球分布分析, 发现这些质粒在中国及其周边国家广泛分布, 检出频率逐年升高(图 6)。这些相似质粒中多复制子质粒占比分别为 50.00%、37.10%、90.00%、92.86% 和 33.33%, 暗示多复制子质粒正在扩散, 由于其在具备良好的抗性基因携带能力同时也兼顾了低成本适应性优势, 大量获得性革兰氏阴性多重耐药菌株的出现似乎与多复制子质粒广泛传播存在密切关联, 或许是造成亚洲地区严重抗生素耐药的关键因素之一^[42]。

总之, 我们的研究证实, 可移动元件介导质粒重组事件产生多复制子质粒, 促进了细菌间各种抗性基因的积累, 这些多复制子质粒具备容纳多种抗生素抗性基因的能力, 携带该类质粒菌株的生存能力得以提升, 但适应性成本并未因此而显著增加。因此, 野生动物来源菌株与多复制子质粒间存在密切联系, 作为其应对外界抗生素压力的重要生存手段, 此现象使得菌株抗生素抗性机制变得更为复杂, 从而造成不容忽视的公共健康隐患。

数据可用性声明

研究中所使用的测序样本序列资料, 包括宿主、采集地和日期信息已提交至 GenBank, 具体登录号信息请见附表 1。

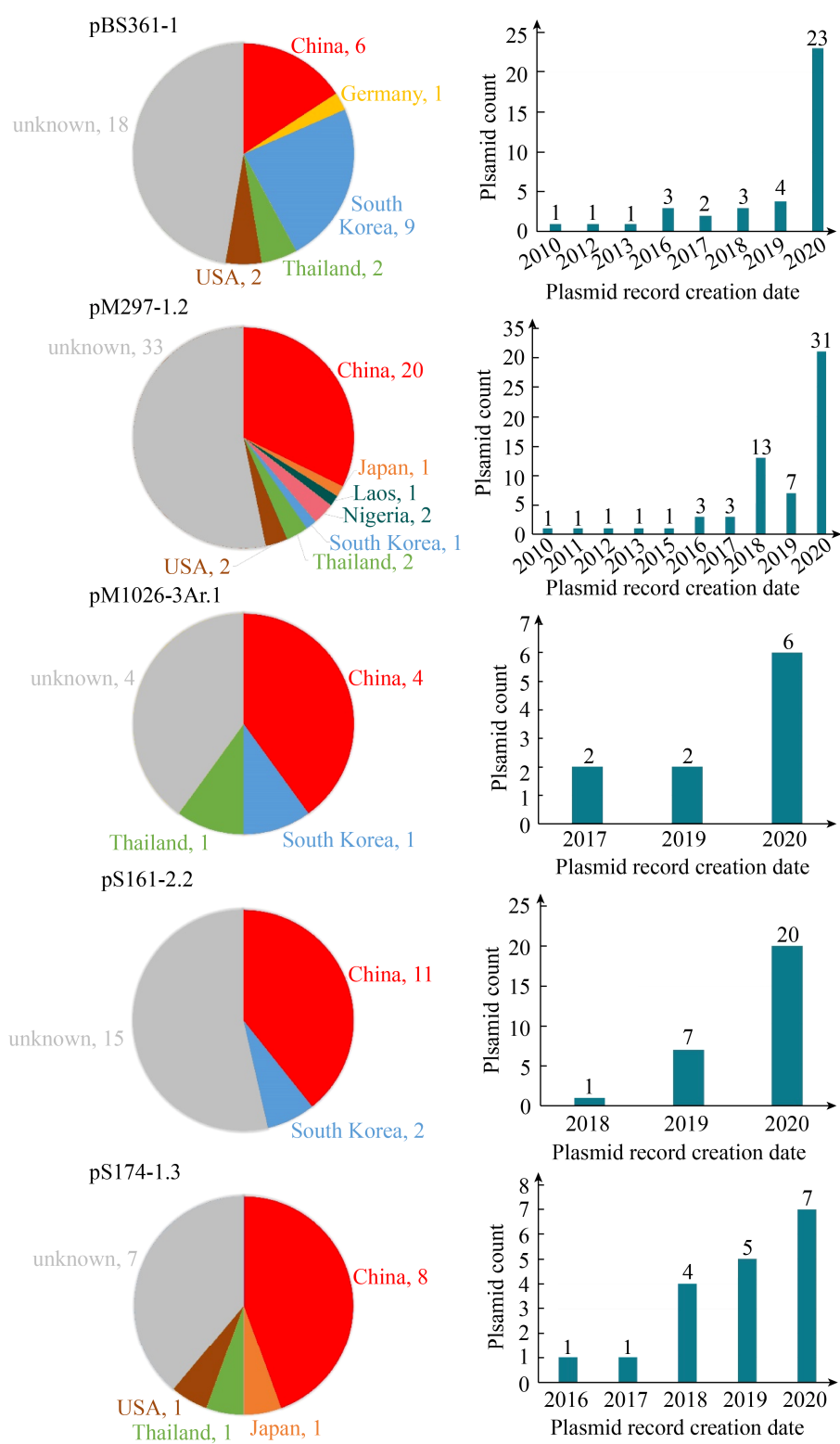


图 6. pBS361-1、pM297-1.2、pM1026-3Ar.1、pS161-2.2 和 pS174-1.3 相似质粒的全球分布

Figure 6. Global distribution of similar plasmids pBS361-1, pM297-1.2, pM1026-3Ar.1, pS161-2.2 and pS174-1.3.

参考文献

- [1] Moran RA, Richardson IA, Hall RM. Analysis of two B/O plasmids, R805a from 1972 and pCERC6 from 2008, reveals extensive mosaicism in B/O plasmid backbones. *Plasmid*, 2019, 102: 62–70.
- [2] Novick RP. Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews*, 1987, 51(4): 381–395.
- [3] 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.
- [4] Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(6): 2227–2238.
- [5] Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, Mevius DJ, Hordijk J. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018, 73(5): 1121–1137.
- [6] Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, 2011, 301(8): 654–658.
- [7] Wang QJ, Sun J, Li J, Ding YF, Li XP, Lin JX, Hassan B, Feng YJ. Expanding landscapes of the diversified *mcr-1*-bearing plasmid reservoirs. *Microbiome*, 2017, 5(1): 70.
- [8] Bougnom BP, Thiele-Bruhn S, Ricci V, Zongo C, Piddock LJV. Raw wastewater irrigation for urban agriculture in three African cities increases the abundance of transferable antibiotic resistance genes in soil, including those encoding extended spectrum β -lactamases (ESBLs). *Science of the Total Environment*, 2020, 698: 134201.
- [9] Pérez-Vázquez M, Sola Campoy PJ, Ortega A, Bautista V, Monzón S, Ruiz-Carrascoso G, Mingorance J, González-Barberá EM, Gimeno C, Aracil B, Sáez D, Lara N, Fernández S, González-López JJ, Campos J, Kingsley RA, Dougan G, Oteo-Iglesias J, Spanish NDM Study Group. Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Spain: phylogeny, resistome, virulence and plasmids encoding *bla*_{NDM}-like genes as determined by WGS. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, 74(12): 3489–3496.
- [10] Bai L, Du PC, Du YJ, Sun HH, Zhang P, Wan YP, Lin Q, Fanning S, Cui SH, Wu YN. Detection of plasmid-mediated tigecycline-resistant gene *tet* (X4) in *Escherichia coli* from pork, Sichuan and Shandong Provinces, China, February 2019. *Eurosurveillance*, 2019, 24(25): 1900340.
- [11] Wu WJ, Feng Y, Tang GM, Qiao F, McNally A, Zong ZY. NDM Metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clinical Microbiology Reviews*, 2019, 32(2): e00115-18.
- [12] Deng Y, Zeng Z, Chen S, He L, Liu Y, Wu C, Chen Z, Yao Q, Hou J, Yang T, Liu JH. Dissemination of IncFII plasmids carrying *rmtB* and *qepA* in *Escherichia coli* from pigs, farm workers and the environment. *Clinical Microbiology and Infection*, 2011, 17(11): 1740–1745.
- [13] Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 64(S1): i3–i10.
- [14] Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian GB, Dong BL, Huang XH, Yu LF, Gu DX, Ren HW, Chen XJ, Lv LC, He DD, Zhou HW, Liang ZS, Liu JH, Shen JZ. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16(2): 161–168.
- [15] Qu DF, Shen Y, Hu LF, Jiang XY, Yin Z, Gao B, Zhao YE, Yang WH, Yang HY, Han JZ, Zhou DS. Comparative analysis of KPC-2-encoding chimera plasmids with multi-replicon IncR:Inc_{pA1763-KPC}:IncN1 or IncFII_{pHN7A8}:Inc_{pA1763-KPC}:IncN1. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12: 285–296.
- [16] He DD, Zhu YY, Li RC, Pan YS, Liu JH, Yuan L, Hu GZ. Emergence of a hybrid plasmid derived from IncN1-F33: A-B- and *mcr-1*-bearing plasmids mediated by IS26. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, 74(11): 3184–3189.
- [17] Shi LN, Feng J, Zhan Z, Zhao YZ, Zhou HJ, Mao HF, Gao YJ, Zhang Y, Yin Z, Gao B, Tong YG, Luo YP, Zhang DF, Zhou DS. Comparative analysis of *bla*_{KPC-2}- and *rmtB*-carrying IncFII-family pKPC-LK30/pHN7A8 hybrid plasmids from *Klebsiella pneumoniae* CG258 strains disseminated among multiple Chinese hospitals. *Infection and Drug Resistance*, 2018, 11: 1783–1793.
- [18] Pesesky MW, Tilley R, Beck DAC. Mosaic plasmids are abundant and unevenly distributed across prokaryotic taxa. *Plasmid*, 2019, 102: 10–18.
- [19] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed. CLSI Supplement M100, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.
- [20] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. [2020]. <http://www.eucast.org>.

- [21] Loman NJ, Quick J, Simpson JT. A complete bacterial genome assembled *de novo* using only nanopore sequencing data. *Nature Methods*, 2015, 12(8): 733–735.
- [22] Ashton PM, Nair S, Dallman T, Rubino S, Rabsch W, Mwaigwisya S, Wain J, O'Grady J. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(3): 296–300.
- [23] Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(7): 3895–3903.
- [24] Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological Reviews*, 1988, 52(3): 375–395.
- [25] Du XD, Li DX, Hu GZ, Wang Y, Shang YH, Wu CM, Liu HB, Li XS. Tn1548-associated *armA* is co-located with *qnrB2*, *aac(6')-Ib-cr* and *bla_{CTX-M-3}* on an IncFII plasmid in a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B strain isolated from chickens in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(1): 246–248.
- [26] Zhang RM, Li JY, Wang Y, Shen JZ, Shen ZQ, Wang SL. Presence of NDM in non-*E. coli* Enterobacteriaceae in the poultry production environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, 74(8): 2209–2213.
- [27] Liu Y, Long D, Xiang TX, Du FL, Wei DD, Wan LG, Deng Q, Cao XW, Zhang W. Whole genome assembly and functional portrait of hypervirulent extensively drug-resistant NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* of capsular serotype K2 and ST86. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, 74(5): 1233–1240.
- [28] Musicha P, Msefula CL, Mather AE, Chaguza C, Cain AK, Peno C, Kallonen T, Khonga M, Denis B, Gray KJ, Heyderman RS, Thomson NR, Everett DB, Feasey NA. Genomic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates from Malawi reveals acquisition of multiple ESBL determinants across diverse lineages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, 74(5): 1223–1232.
- [29] Oliva M, Monno R, D'Addabbo P, Pesole G, Dionisi AM, Scrascia M, Chiara M, Horner DS, Manzari C, Luzzi I, Calia C, D'Erchia AM, Pazzani C. A novel group of IncQ1 plasmids conferring multidrug resistance. *Plasmid*, 2017, 89: 22–26.
- [30] Martins WMBS, Nicolas MF, Yu Y, Li M, Dantas P, Sands K, Portal E, Almeida LGP, Vasconcelos ATR, Medeiros EA, Toleman MA, Walsh TR, Gales AC, Andrey DO. Clinical and molecular description of a high-copy IncQ1 KPC-2 plasmid harbored by the international ST15 *Klebsiella pneumoniae* clone. *mSphere*, 2020, 5(5): e00756-20.
- [31] Vogwill T, MacLean RC. The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. *Evolutionary Applications*, 2015, 8(3): 284–295.
- [32] Francino MP. Horizontal gene transfer in microorganisms. 3rd ed. Caister Academic Press, 2012.
- [33] Gama JA, Zilhão R, Dionisio F. Impact of plasmid interactions with the chromosome and other plasmids on the spread of antibiotic resistance. *Plasmid*, 2018, 99: 82–88.
- [34] San Millan A, Heilbron K, MacLean RC. Positive epistasis between co-infecting plasmids promotes plasmid survival in bacterial populations. *The ISME Journal*, 2014, 8(3): 601–612.
- [35] Yano H, Shintani M, Tomita M, Suzuki H, Oshima T. Reconsidering plasmid maintenance factors for computational plasmid design. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2019, 17: 70–81.
- [36] Pilla G, Tang CM. Going around in circles: virulence plasmids in enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(8): 484–495.
- [37] Silva RF, Mendonça SCM, Carvalho LM, Reis AM, Gordo I, Trindade S, Dionisio F. Pervasive sign epistasis between conjugative plasmids and drug-resistance chromosomal mutations. *PLoS Genetics*, 2011, 7(7): e1002181.
- [38] Chen KC, Chan EWC, Chen S. Evolution and transmission of a conjugative plasmid encoding both ciprofloxacin and ceftriaxone resistance in *Salmonella*. *Emerging Microbes & Infections*, 2019, 8(1): 396–403.
- [39] Xie MM, Li RC, Liu ZH, Chan EWC, Chen S. Recombination of plasmids in a carbapenem-resistant NDM-5-producing clinical *Escherichia coli* isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018, 73(5): 1230–1234.
- [40] Leelaporn A, Firth N, Paulsen IT, Skurray RA. IS257-mediated cointegration in the evolution of a family of staphylococcal trimethoprim resistance plasmids. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(20): 6070–6073.
- [41] Wong MHY, Chan EWC, Chen S. IS26-mediated formation of a virulence and resistance plasmid in *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, 72(10): 2750–2754.
- [42] Jean SS, Hsueh PR. High burden of antimicrobial resistance in Asia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 37(4): 291–295.

Comparative genomic analysis of *Klebsiella* reveals extensive transmission of resistance genes mediated by multireplicon resistance plasmids

Xue Wang^{1,2#}, Jianan Zhao², Zhihui Liu^{1,2}, Limin Zhang³, Han Chang^{4#}, Jiao Qin², Yunyun Zhu⁵, Guocheng Hu⁶, Shijia Hu², Jianchun Yang², Zhongxin Jia^{1,2}, Junbao Li⁷, Houbin Ju⁸, Chengmin Wang², Fang Ji^{2*}, Jianhua Qin^{1*}

¹ College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei Province, China

² Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Science, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China

³ Beidaihe Rehabilitation and Recuperation Center of Joint Logistics Support Force, Qinhuangdao 066100, Hebei Province, China

⁴ Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

⁵ Beijing Key Laboratory of Captive Wildlife Technologies, Beijing Zoo, Beijing 100044, China

⁶ South China Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment, Guangzhou 510530, Guangdong Province, China

⁷ Zhengzhou Zoo, Zhengzhou 450008, Henan Province, China

⁸ Shanghai Animal Disease Prevention and Control Center, Shanghai 200336, China

Abstract: [Objective] To study the relationship between *Klebsiella* and multireplicon resistance plasmids, and to analyze the mechanism of multireplicon plasmid carrier in response to antibiotic pressure. [Methods] We collected fifty-six isolates of *Klebsiella* from different wild animals and environments during 2018 to 2020. We analyzed the multidrug resistance (MDR) phenotype by microbroth dilution method, sequenced and analyzed the representative isolates by bacterial genome-wide association study (BGWAS). [Results] Our results revealed that the isolates from non-human sources showed a more extensive drug resistance, and especially stronger resistance to ampicillin (reach 80.36%). In particular, the isolates from *Malay pangolin* were highly resistant to cephalosporins, chloramphenicol, levofloxacin and sulfamethoxazole. Genomic analysis showed that the resistance plasmids carried by these isolates were related to carry many antibiotic resistance genes. Further analysis of 69 plasmids demonstrated that 28 plasmids were multireplicon plasmids, mainly carrying beta-lactamase genes such as *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{TEM-1}. According to the analysis of plasmids carried by different isolates, *Klebsiella pneumoniae* may be an important host of multireplicon plasmid. Plasmid skeleton and structure analysis showed that multireplicon plasmid was formed by the fusion of two or more single plasmids, which made the isolates strong adaptability to the antibiotic environment, and increased the ability of drug-resistant isolates to spread around the world year by year. [Conclusion] The phenotype of multidrug-resistant bacteria is related to the carrying multireplicon plasmid. Multireplicon plasmid has a stronger ability to carry resistance genes than non-multireplicon plasmid, which may be an important mechanism for bacteria response to adapt to stronger antibiotic pressure environment. This phenomenon is of great significance for exploring the transmission and diffusion mechanism of bacterial resistance genes in the future.

Keywords: multireplicon plasmid, *Klebsiella*, antibiotic resistance genes, comparative genomic analysis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Earmarked Fund for Hebei Dairy Cattle Innovation Team of Modern Agro-industry Technology Research System (HBCT2018120205), by the Key R&D Projects of Hebei Province (20326603D), by the Introduction of Leading Talents Program of Guangdong Academy of Sciences (2016GDASRC-0205), by the GDAS Special Project of Science and Technology Development (2018GDASCX-0107) and by the Open Project of Beijing Key Laboratory of Captive Wildlife Technology in Beijing Zoo (ZDK201909)

[#]Those authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: Jianhua Qin, qjhqqq@126.com; Fang Ji, 309533361@qq.com

Received: 17 November 2020; Revised: 4 January 2021; Published online: 13 January 2021