



# 野生鸟类分离的多重耐药肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)耐药基因分子进化特征研究

王雪<sup>1</sup>, 王猛<sup>1,2</sup>, 赵佳男<sup>1</sup>, 季芳<sup>1</sup>, 武斌<sup>1</sup>, 王学静<sup>3</sup>, 秦建华<sup>2</sup>, 王承民<sup>1\*</sup>

- 1 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
- 2 河北农业大学动物医学院, 河北 保定 071000
- 3 河北省畜牧兽医研究所, 河北 保定 071000

王雪, 王猛, 赵佳男, 季芳, 武斌, 王学静, 秦建华, 王承民. 野生鸟类分离的多重耐药肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)耐药基因分子进化特征研究. 微生物学报, 2022, 62(11): 4477–4493.

Wang Xue, Wang Meng, Zhao Jia'nan, Ji Fang, Wu Bin, Wang Xuejing, Qin Jianhua, Wang Chengmin. Molecular evolutionary characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* genes isolated from wild birds. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4477–4493.

**摘要:** 【目的】调查野生鸟类携带菌的耐药状况, 探索其在细菌耐药性传播过程中的作用。

【方法】从野生鸟类石鸡、绯胸鸚鵡、太阳锥尾鸚鵡和黑领棕鸟的新鲜粪便分离 4 株 *Klebsiella pneumoniae*, 采用微量肉汤稀释法评估其多重耐药表型, 并利用全基因组测序技术和细菌全基因组关联分析、比较基因组学方法对分离株进行分子溯源, 系统解析其携带的多重耐药质粒或基因与其宿主、同源质粒间的关联。【结果】4 株肺炎克雷伯菌的耐药谱各不相同, 来自石鸡样本的分离株 S90-2 对 9 种药物耐受, 绯胸鸚鵡样本分离株 S141 对 3 种药物耐受, 太阳锥尾鸚鵡分离株 M911-1 仅耐受氨苄西林, 黑领棕鸟的样本分离株 S130-1 对所使用的 14 种药物完全敏感。S90-2 属于 ST629 型, 携带 *bla*<sub>CTX-M-14</sub>、*fosA6*、*aac(3)-Iid* 和 *bla*<sub>SHV-11</sub> 为主的 30 个耐药基因和携带 1 个耐药性质粒 pS90-2.3 (IncR 型)。S141 属于 ST1662 型, 携带 *fosA5*、*bla*<sub>SHV-217</sub> 等 27 个耐药基因, 1 个质粒 pS141.1 [IncFIB(K)(pCAV1099-114)/repB 型] 仅携带耐药基因 *adeF*。M911-1 为新 ST 类型, 携带 *bla*<sub>SHV-1</sub>、*fosA6* 等共计 27 个耐药基因, 其质粒 pM911-1.1 携带了 3 个耐药

**基金项目:** 广东省科学院人才专项(2016GDASRC-0205); 北京动物园北京市重点实验室开放课题(ZDK202105)

Supported by the Leading Talents Program of Guangdong Academy of Sciences (2016GDASRC-0205) and by the Open Project of Beijing Key Laboratory of Captive Wildlife Technology in Beijing Zoo (ZDK202105)

\*Corresponding author. E-mail: wangchm@giz.gd.cn

Received: 19 March 2022; Revised: 28 April 2022; Published online: 13 June 2022

基因。S130-1 属于 ST3753 型, 携带  $bla_{SHV-11}$ 、 $fosA6$  等 27 个耐药基因, pS130-1 [IncFIB(K)型] 则仅携带一个耐药基因  $tet(A)$ 。质粒比对表明, 质粒 pS90-2.3 携带的耐药基因片段源自不同的肠杆菌科菌株染色体或质粒。pS90-2.3 的同源质粒主要来自人类宿主菌, 且主要在中国分布, 这些质粒主要细菌宿主为 *K. pneumoniae* 和 *Escherichia coli*, 且 ST11 型 *K. pneumoniae* 分离株为重要宿主菌。【结论】本研究中来自野生鸟类的多重耐药 *K. pneumoniae*, 其耐药基因主要来自质粒, 质粒耐药基因主要由转座子、插入序列、整合子和前噬菌体等可移动元件介导, 这些多重耐药质粒与人类的宿主菌密切相关。

**关键词:** 野生鸟类; 多重耐药菌; 肺炎克雷伯氏菌; 耐药质粒

## Molecular evolutionary characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* genes isolated from wild birds

WANG Xue<sup>1</sup>, WANG Meng<sup>1,2</sup>, ZHAO Jia'nan<sup>1</sup>, JI Fang<sup>1</sup>, WU Bin<sup>1</sup>, WANG Xuejing<sup>3</sup>, QIN Jianhua<sup>2</sup>, WANG Chengmin<sup>1\*</sup>

1 Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260, Guangdong, China

2 College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

3 Hebei Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Baoding 071000, Hebei, China

**Abstract: [Objective]** To investigate the drug resistance status of wild birds carrying bacteria and to explore their role in the transmission of bacterial drug resistance. **[Methods]** Four *Klebsiella pneumoniae* were isolated from fresh feces of captured *Alectoris chukar*, *Psittacula alexandri*, *Aratinga solstitialis* and *Sturnus nigricollis*, and were assessed for multidrug resistance phenotypes by micro-broth dilution method. Bacterial genome-wide association analysis and comparative genomics were used to trace the isolates and systematically analyze the association between the multidrug resistance plasmids/genes and their hosts/homologous plasmids. **[Results]** Four strains of *K. pneumoniae* showed different drug resistance phenotypes. Specifically, S90-2 from *A. chukar* was resistant to nine drugs including ampicillin, cefuroxime, cefazolin, ceftriaxone and cefepime; S141 from *P. alexandri* was resistant to ampicillin, cefuroxime and cefazolin; M911-1 from *A. solstitialis* was resistant to ampicillin only; S130-1 from *S. nigricollis* was sensitive to all of the 14 drugs. S90-2 belonged to ST629 type and carried 30 resistance genes including  $bla_{CTX-M-14}$ ,  $fosA6$ ,  $aac(3)-IId$  and  $bla_{SHV-11}$ , and its plasmid pS90-2.3 (IncR) carried resistance genes of  $mphA$ ,  $dfrA12$ ,  $aadA2$ ,  $qacEdelta1$ ,  $sul1$ ,  $tet(A)$ ,  $aph(3')-Ia$ ,  $sul2$  and  $aph(3'')-Ib$ . S141 belonged to ST1662 type and carried 27 resistance genes including  $fosA5$  and  $bla_{SHV-217}$ , and only plasmid pS141.1 [IncFIB(K)(pCAV1099-114)/repB] carried one resistance gene  $adeF$ . M911-1 was a new ST type, carrying 27 resistance genes such as  $bla_{SHV-1}$  and  $fosA6$ , and its plasmid pM911-1.1 (novel) carried three resistance genes  $qnrS1$ ,  $bla_{LAP-2}$  and  $tet(A)$ . S130-1 belonged to ST3753 type, carrying 27 resistance genes such as  $bla_{SHV-11}$  and  $fosA6$ , and its plasmid pS130-1

[IncFIB(K)] carried only one resistance gene *tet(A)*. The plasmids pM911-1.1 and pS90-2.3 failed to perform conjugative transfer, but their resistance gene fragments were derived from multiple homologous chromosomes or plasmids of *Enterobacteriaceae* strains, and the formation of resistance gene fragments (MDR region) involved interactions between multiple mobile element genes, resulting in a complex and diverse structure of resistance plasmid. The homologous plasmids related to pM911-1.1 and pS90-2.3 were mainly from human bacteria hosts in China, such as *K. pneumoniae* and *Escherichia coli*, and the *K. pneumoniae* ST11 was a major host for the above drug-resistant homologous plasmids. **[Conclusion]** The multidrug-resistant *K. pneumoniae* from wild birds in this study had resistance genes mainly from plasmids, which were mediated by transposons, insertion sequences, integrons and prophage and other mobile elements, and these multidrug-resistant plasmids were closely related to the human host bacteria.

**Keywords:** wild birds; multidrug-resistant bacteria; *Klebsiella pneumoniae*; drug-resistant plasmids

抗生素类药物滥用所致的抗生素耐药性 (anti-microbial resistance, AMR) 问题日益严峻, 目前被视为全球公共卫生的主要威胁<sup>[1]</sup>。而质粒、插入序列、转座子和噬菌体等可移动基因元件可介导抗生素耐药基因在菌株间横向转移, 使得抗生素效力日益衰减<sup>[2]</sup>。我们在前期研究中发现, 动物园的赤袋鼠携带多重耐药 *Klebsiella pneumoniae* 分离株 M297-1, 与人类宿主分离株同源性超过 95%, 其染色体基因组与 2 个质粒携带 *bla<sub>CTX</sub>*、*bla<sub>TEM</sub>*、*aph*、*aac*、*qnr* 和 *fos* 等多种耐药基因, 与耐药表型密切相关, 且其质粒具有共轭转移能力<sup>[3]</sup>。马来穿山甲携带的 *Proteus mirabilis* 染色体中发现了包括碳青霉烯酶 *bla<sub>OXA-1</sub>* 和 *bla<sub>NDM-1</sub>* 在内的多种耐药基因, 且与 IS26 型插入序列、Int1 型整合酶等可移动元件有关<sup>[4]</sup>。此外马来穿山甲来源的 *Escherichia coli* 分离株 M172-1 携带 IncX1/IncX1 型多复制子质粒 pM172-1.3, 该质粒携带完整的 Is26/Int1/arr-2/*cmlA5*/*bla<sub>OXA-10</sub>*/*ant(3'')-IIa*/*dfpA14*/Is26 结构, 可能由 2 个 pM172-1.4 质粒 (IncX 型) 拷贝融合形成, 赋予菌株更为广泛的抗生素耐药性<sup>[5]</sup>。由野生动物来源细菌分离株携带的  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、

磺胺类和四环素类等多种耐药基因在世界各地广泛扩散<sup>[6-9]</sup>。

野生鸟类栖息地与人类活动区域存在明显交叉, 使其可能成为 AMR 菌株的重要宿主和传播者<sup>[10]</sup>, 每年约有 50 亿只候鸟飞越各大洲, 导致多种病原体的全球流行<sup>[11]</sup>。研究认为, ARGs 多样性与人类密度密切相关<sup>[12]</sup>, 粪污、废水等也可能有助于 ARGs 传播<sup>[13]</sup>。澳大利亚野生银鸥 (*Chroicocephalus novaehollandiae*) *Salmonella enterica* 分离株 SG17-135, 对  $\beta$ -内酰胺类、大环内酯类、氨基糖苷类、磺胺类等多种药物耐受, 其携带了 IncHI2 型多重耐药 (multidrug resistance, MDR) 质粒 pSG17-135-HI2, 该质粒携带了包括 *bla<sub>CTX-M-55</sub>* 在内的 16 个耐药基因<sup>[14]</sup>。从尼日利亚伊巴丹野生牛背鹭 (*Bubulcus ibis*) 和白脸树鸭 (*Dendrocygna viduata*) 分离的 *Escherichia coli* 分离株, 携带了 *bla<sub>CTX-M</sub>* 家族耐药基因, 而牛背鹭分离株携带了更多的 ARGs, 同时也携带了以 *intI1* 型整合酶基因为主的整合子<sup>[15]</sup>。Yuan 等的研究发现, 野生候鸟携带了多重耐药的 *Escherichia coli*, 478 株中的 43.7% 耐受  $\beta$ -内酰胺类药物, 22.6% 耐受四环素类药物, 73 株为多重耐药菌, 携带的耐药基因

主要包括 *bla*<sub>CTX-M</sub>、*bla*<sub>TEM-1</sub>、*tet*(A)、*tet*(B)、*tet*(M)、*sul1*、*sul2*、*sul3*、*cmlA* 和 *floR* 等<sup>[16]</sup>。罗马尼亚多瑙河三角洲野生鸟类携带的 *Vibrio* spp. 分离株, 76 个分离株中的 81.57% 具有多重耐药表型, 主要耐受药物包括青霉素类、氨基糖苷类和大环内酯类, 同时也证实了野生候鸟携带的 *Vibrio* spp. 致病性和耐药性均高于野生留鸟<sup>[17]</sup>。来自西班牙野生鸟类携带的分离株 *Staphylococcus* 属于 MDR, 且携带大量毒力基因 *lukF/S-PV*、*tst*、*eta*、*etb*、*etd* 和 *scn*<sup>[18]</sup>。因此探究野生鸟类携带菌株耐药性对于揭示 AMRs 的扩散传播方式及建立相应防控措施具有重要生物学意义。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株

4 株 *K. pneumoniae* 均由本实验室分离保藏, 其中石鸡分离株 S90-2 和太阳锥尾鹦鹉分离株 M911-1 的样品来自广东省广州市, 绯胸鹦鹉分离株 S141 和黑领椋鸟分离株 S130-1 来自广西河源市。将菌株培养在麦康凯琼脂平板 (BeijingSanYao Science & Technology Development Co) 表面, 35.2 °C 条件下培养 18 h, 挑取单个菌落, 于 Mueller-Hinton Broth (MHB) 液体培养基中, 35.2 °C 条件下培养 18 h 获得富集液, 以备后续实验使用。同时, 部分菌液被用于 16S rRNA 基因测序 (RuBiotech) 以确定其种属。

### 1.2 药敏试验

参照 CLSI 2021 年发布的《抗菌药物敏感性试验标准》<sup>[19]</sup> 与 EUCAST 2021 年发布的《欧盟药敏试验标准》<sup>[20]</sup>, 使用微生物药敏试剂盒 (BIO-KONT) 进行微量肉汤稀释法检测氨苄西林、头孢呋辛、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、磺胺甲恶唑/甲氧苄啶和替加环素共计 14 种药物的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC), 以评估其多重耐药表型。使用参考菌株 *Escherichia coli* ATCC 25922 作为质控菌株。

### 1.3 全基因组测序

利用 Nanopore 测序平台进行全基因组测序 (Biomarker Technologies)<sup>[21-22]</sup>。提取高质量基因组 DNA, 利用 Nanodrop、Qubit 和 0.35% 琼脂糖凝胶电泳进行纯度、浓度和完整性质检; 通过 BluePippin 全自动核酸回收系统回收大片段 DNA; 文库构建 (SQK-LSK109 连接试剂盒, 包括 DNA 损伤修复和末端修复、接头连接、磁珠纯化和 Qubit 文库定量); 上机测序。获得数据后, 过滤低质量和长度过短的 subreads, 使用软件 Canu v1.5 对过滤后的 subreads 进行从头组装, 并使用软件 Pilon 对组装后的 draft 基因组进行纠错, 构建基因组 DNA 文库, 完成预估大小为 6 M 的细菌完成图测序, 测序深度  $\geq 100 \times$ , 0 gap。

### 1.4 基因组功能注释

利用 Nr、Uniprot、COG 和 KEGG 等通用数据库, 转座子注册表 TN Number Registry (<https://transposon.lstmed.ac.uk/>)、插入序列数据库 ISfinder (<https://www-is.biotoul.fr/index.php>) 和整合子数据库 INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>) 等专有数据库对测序数据进行注释, PlasmidFinder 数据库 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) 用于分析质粒的不相容群类型。利用数据库 CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, <https://card.mcmaster.ca/home>), 检索耐药性基因。同时, 提取 7 个保守持家基因 (*rpoB*、*gapA*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*infB* 和 *tonB*) 序列, 利用 BIGSdb-Pasteur (<https://bigsdb.pasteur.fr/>) 提供的 *K. pneumoniae* MLST 分型数据库确定菌

株序列类型(ST)。使用核糖体 MLST 数据库 (rMLST, <https://pubmlst.org/species-id>) 确定菌株种属信息。

### 1.5 耐药质粒基因组分析

依据 CARD 数据库注释结果, 选取多重耐药质粒 pM911-1.1 和 pS90-2.3, 用 SnapGene Software (from Insightful Science; available at [snapgene.com](http://snapgene.com)) 绘制质粒图谱。利用 NCBI 对质粒耐药基因片段进行 BLAST, 利用软件 EasyFig<sup>[23]</sup> 对耐药基因及其上下游耐药基因相关元件差异情况进行深入比较(相似度  $\geq 95\%$ )。在质粒数据库 PLSDb (<https://ccb-microbe.cs.uni-saarland.de/plsdb/>) 中检索相似质粒(检索条件限制为 Max.p-value=0, Max.distance=0.04, Per.Ident  $\geq 60\%$ ), 收集其分离年份、国家和宿主信息。选取部分相似质粒(相似度  $\geq 90\%$ ) 进行质粒基因组, 用软件 Mauve<sup>[24]</sup> 绘图。

### 1.6 全基因组进化树构建

根据 PLSDb 数据库检索到的相似质粒结果(相似度  $\geq 95\%$ ), 选取部分质粒的宿主分离株 *K. pneumoniae* 进行 MLST 分型, 利用工具 REALPHY 1.13<sup>[25]</sup> 构建全基因组进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 *K. pneumoniae* 分离株的耐药表型

总体而言, 4 株 *K. pneumoniae* 的耐药性各不相同。来自石鸡样本的分离株 S90-2 耐受 9 种药物(共 14 种药物), 包括氨苄西林、头孢呋辛、头孢唑林、头孢曲松、头孢吡肟、庆大霉素、氯霉素、左氧氟沙星和磺胺恶唑/甲氧苄啶; 来自绯胸鹦鹉样本的分离株 S141 对氨苄西林、头孢呋辛、头孢唑林和庆大霉素高度耐受; 来自太阳锥尾鹦鹉的分离株 M911-1, 仅对氨苄西林耐受; 来自黑领椋鸟的样本分离株 S130-1 对 14 种药物均敏感(表 1)。4 株 *K. pneumoniae* 均对  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂类哌拉西林/他唑巴坦、碳青霉烯类药物美罗培南、半合成氨基糖苷类药物阿米卡星和甘氨酸环素类药物替加环素敏感(表 1)。

### 2.2 *K. pneumoniae* 分离株的基因组结构组成分析

分离株 S90-2 染色体全长 5 374.786 kb, 属于 ST629 型, 基因组携带 12 个基因岛, 同时携带包括 *bla*<sub>CTX-M-14</sub>、*fosA6*、*aac(3)-Iid* 和 *bla*<sub>SHV-11</sub> 在内的 30 个耐药基因。S90-2 共携带 3 个质粒,

表 1 *Klebsiella pneumoniae* 的耐药表型

Table 1 Drug resistance of strains

Name	Host	Non-susceptible phenotype <sup>a</sup>	Susceptible phenotype <sup>a</sup>
S90-2	<i>Alectoris chukar</i>	AMP, CXM, CZO, CRO, FEP, GEN, CHL, LVX, SXT	SAM, TZP, MEM, GEN, AMK, CHL, LVX, SXT, TGC
S141	<i>Psittacula alexandri</i>	AMP, CXM, CZO, GEN	TZP, MEM, GEN, AMK, CHL, LVX, SXT, TGC
M911-1	<i>Aratinga solstitialis</i>	AMP	CXM, CZO, CRO, FEP, SAM, TZP, MEM, GEN, AMK, CHL, LVX, SXT, TGC
S130-1	<i>Sturnus nigricollis</i>	N/A	AMP, CXM, CZO, CRO, FEP, SAM, TZP, MEM, GEN, AMK, CHL, LVX, SXT, TGC

<sup>a</sup>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; N/A: not applicable. Penicillins: AMP; cephalosporins: CXM, CZO, CRO, FEP;  $\beta$ -lactamaseinhibitors: SAM, TZP; carbapenems: MEM; aminoglycosides: GEN, AMK; chloramphenicols: CHL; fluoroquinolones: LVX; sulfonamides: SXT; glycylicyclones: TGC.

分别被命名为 pS90-2.1 (110.388 kb, IncFIB (pKPHS1)型)、pS90-2.2 (109.675 kb, IncFIA(HI1)/IncFII(K)型)和 pS90-2.3 (57.825 kb, IncR 型), 仅 pS90-2.3 携带耐药基因, 主要包括 *mphA*、*dfrA12*、*aadA2*、*qacEdelta1*、*sul1*、*tet(A)*、*aph(3')-Ia*、*sul2* 和 *aph(3'')-Ib* (表 2, 附表 1)。

分离株 S141 染色体全长 5 383.698 kb, 属于 ST1662 型, 基因组携带 9 个基因岛, 携带 27 个耐药基因, 主要包括 *fosA5*、*bla<sub>SHV-217</sub>* 等重要基因。S141 携带了 2 个质粒, 分别被命名为 pS141.1 (194.302 kb, IncFIB(K)(pCAV1099-114)/repB 型)和 pS141.2 [112.160 kb, IncFIB (pKPHS1) 型]。只有质粒 pS141.1 携带了一个耐药外排泵基因 *adeF* (表 2, 附表 1)。分离株 M911-1 染色体全长 5 211.192 kb, 可能为新的 ST 类型, 基因组携带 15 个基因岛, 27 个耐药基因, 包括 *bla<sub>SHV-1</sub>*、*fosA6* 等重要基因。其携带了 3 个质粒, 分别被命名为 pM911-1.1 (75.711 kb, novel 型)、pM911-1.2 (85.824 kb, IncR/IncFII (pCTU2)型) 和 pM911-1.3 (21.377 kb, novel 型)。仅质粒

pM911-1.1 携带了 3 个耐药基因 *qnrS1*、*bla<sub>LAP-2</sub>* 和 *tet(A)*, 其余 2 个质粒未携带耐药基因(表 2, 附表 1)。分离株 S130-1 染色体全长 5 249.027 kb, 属于 ST3753 型, 基因组携带 10 个基因岛, 27 个耐药基因, 包括 *bla<sub>SHV-11</sub>*、*fosA6*。S130-1 携带了 1 个质粒, 被命名为 pS130-1 [150.355 kb, IncFIB(K)型], 其仅携带 1 个耐药基因 *tet(A)* (表 2, 附表 1)。

### 2.3 多重耐药质粒 pM911-1.1 和 pS90-2.3 质粒基因同源性分析

质粒 pM911-1.1 全长 75 711 bp, 在基因岛 pM911-1.1-GI-1 (3–35 601 bp)上存在 *trbB*、*traY*、*traL*、*traI* 和 *traJ* 共轭转移调控基因, 但并未发现 *finO* 基因与完整 *tra/trb* 基因簇, 其不具备共轭转移能力。基因岛 pM911-1.1-GI-2 (40 687–45 449 bp)上则存在 1 个 *intI2* 转座酶基因, 但该基因上下游未发现耐药基因。PlasmidFinder 数据库中未检索到 *repA* 所属的不相容群类型, 可能是新的不相容群质粒(图 1A)。进一步分析, pM911-1.1 携带一个 MDR 区域(大

表 2 野生鸟类肺炎克雷伯氏菌分离株基因组和质粒携带耐药基因

Table 2 Genomic information of *Klebsiella pneumoniae* isolates from wild birds

Chromosome group or plasmid name of strain	ST type <sup>a</sup>	PlasmidFinder <sup>a</sup>	Movable resistance determinants <sup>a</sup>
Chr-S90-2	ST629	N/A	<i>bla<sub>CTX-M-14</sub></i> , <i>fosA6</i> , <i>aac(3)-Iid</i> , <i>bla<sub>SHV-11</sub></i>
pS90-2.1	N/A	IncFIB(pKPHS1)	N/A
pS90-2.2		IncFIA(HI1)/IncFII(K)	N/A
pS90-2.3	N/A	IncR	<i>mphA</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacEdelta1</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')-Ib</i>
Chr-S141	ST1662	N/A	<i>fosA5</i> , <i>bla<sub>SHV-217</sub></i>
pS141.1	N/A	IncFIB(K)(pCAV1099-114)/repB	N/A
pS141.2	N/A	IncFIB(pKPHS1)	N/A
Chr-M911-1	Novel	N/A	<i>bla<sub>SHV-1</sub></i> , <i>fosA6</i>
pM911-1.1	N/A	Novel	<i>qnrS1</i> , <i>bla<sub>LAP-2</sub></i> , <i>tet(A)</i>
pM911-1.2	N/A	IncR/IncFII(pCTU2)	N/A
pM911-1.3	N/A	Novel	N/A
Chr-S130-1	ST3753	N/A	<i>bla<sub>SHV-11</sub></i> , <i>fosA6</i>
pS130-1	N/A	IncFIB(K)	<i>tet(A)</i>

<sup>a</sup>N/A: not applicable.

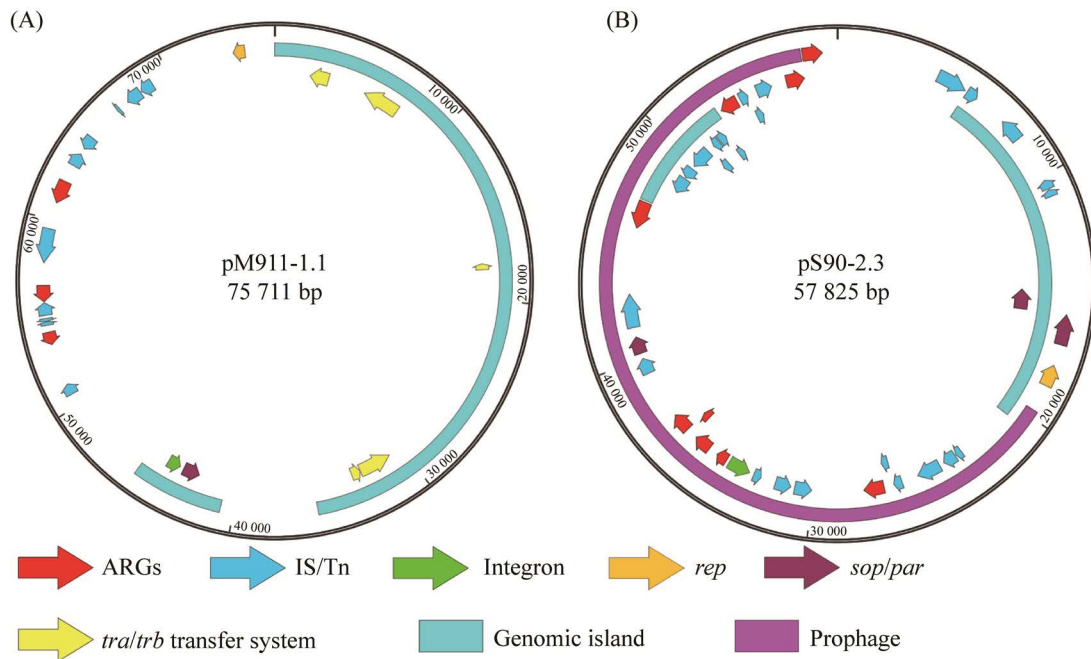


图 1 多重耐药质粒 pM911-1.1、pS90-2.3 的质粒图谱

Figure 1 Plasmid profiles of multi-drug resistant plasmids pM911-1.1 and pS90-2.3.

小为 13 104 bp, 50 659–63 762 bp, 图 2A), 包含 3 个耐药基因 *qnrS1*、*bla<sub>LAP-2</sub>* 和 *tet(A)* 及其上下游转座元件。BLAST 比对发现, 该基因区域与中国杭州分离的 *K. pneumoniae* 质粒 pCRKP78R-4-tetA、浙江 *K. pneumoniae* 质粒 p4\_L39、日本东京 *Raoultella ornithinolytica* 质粒 pWP8-W19-CRE-01\_3 和瑞士 *K. grimontii* 质粒 p2481359-2 携带的耐药基因结构高度同源(图 2B, 附表 2)。此外, pM911-1.1 MDR 区域中一个大小 1 180 bp 基因片段(54 463–55 643 bp), 包含 ISEc11 *insC21*、ISRso10 transposase 和 ISMaq2 *insD* 3 部分, 而同源质粒 pCRKP78R-4-tetA、p4\_L39、pWP8-W19-CRE-013 和 p2481359-2 该区域则为完整的 IS3 家族转座酶基因。质粒 pM911-1.1 携带的四环素类耐药基因 *tet(A)* (60 925–62 124 bp) 在质粒 p2481359-2 相应片段中缺失(图 2B)。

质粒 pS90-2.3 全长 57 825 bp, PlasmidFinder 数据库 BLAST 分析表明, 位于其基因岛 pS90-

2.3-GI-1 (5 483–20 485 bp) 区域的复制调控蛋白基因 *repB* 属于 IncR 型。基因岛 pS90-2.3-GI-2 (47 134–52 200 bp), 主要包含 TnAs1、IS15DIV 和 IS26 家族转座酶基因(图 1B)。该质粒 63.40% 的区域由前噬菌体结构组成(19 709–56 370 bp), 除介导氨基糖苷类药物耐受的磷酸转移酶基因 *aph(3'')-Ib* (56 431–57 234 bp) 外, 其余耐药基因均存在于前噬菌体中, 且还包含一个 IntI1 型整合子结构(图 1B)。根据 pS90-2.3 携带的耐药基因不同, 进一步分为 MDR1 区域(长度 13 626 bp, 26 378–40 003 bp, 图 3A), 携带耐药基因 *mphA*、*dfrA12*、*aadA2*、*qacEdelta1* 和 *sul1* 与 MDR2 区域(长度 15 907 bp, 41 417–57 234 bp, 图 3C), 携带耐药基因 *tet(A)*、*aph(3')-Ia*、*sul2* 和 *aph(3'')-Ib*。基因溯源发现, MDR1 区域中的一个基因片段(长度 7 644 bp, 32 359–40 003 bp) 与中国浙江、中国台湾, 瑞士, 美国分离得到的 *Escherichia fergusonii* 质粒 pEF01、*K. pneumoniae*



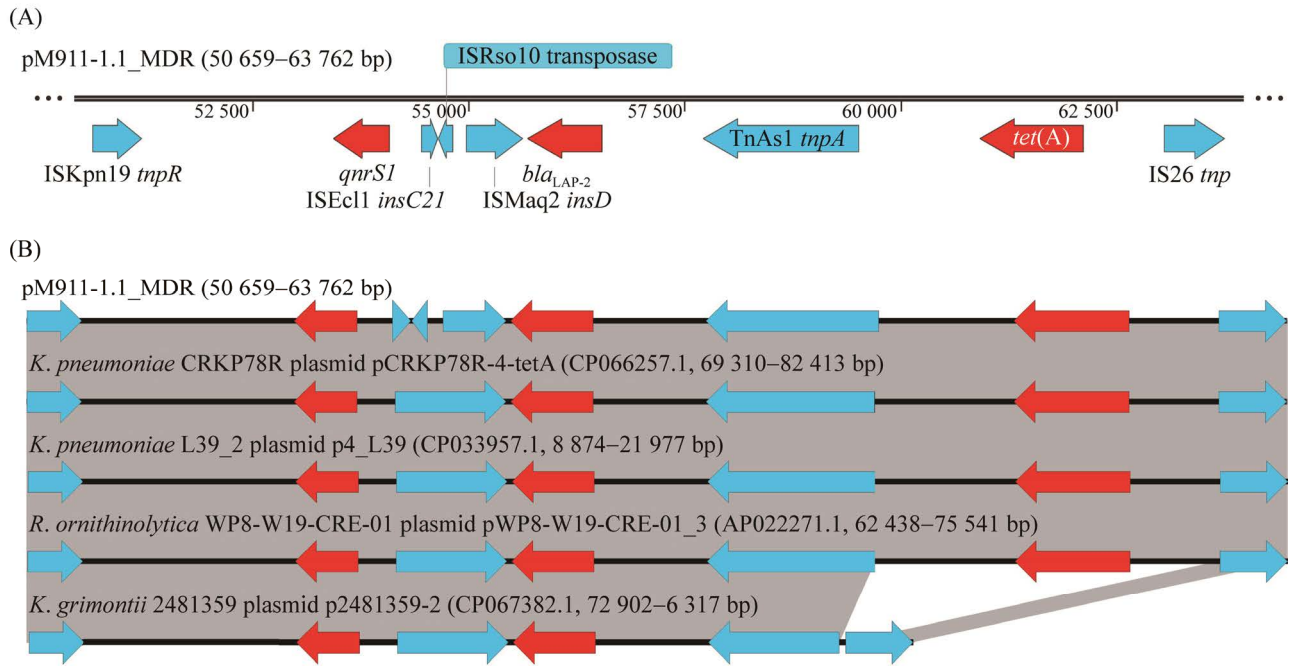


图 2 质粒 pM911-1.1 MDR 区域结构及其同源片段结构

Figure 2 Structure of plasmid pM911-1.1 MDR region and its homologous fragment structure. A: schematic diagram of gene element combination in pM911-1.1 MDR region; B: comparison of pM911-1.1 homologous fragment structure. Red fragment, drug resistance gene; blue fragment, transposase gene. The arrow direction represents the gene coding direction.

质粒 p2018C01-046-3、*K. pneumoniae* 质粒 pMV-u1-SK2-O-a 和 *Salmonella Typhimurium* 质粒 p24362-1 部分片段高度同源，该结构还与中国广西的分离株 *Citrobacter freundii* Cf.1 部分染色体基因组高度同源(图 3B, 附表 2)。与 pS90-2.3 MDR1 结构相比，质粒 pMV-u1-SK2-O-a 和 p2018C01-046-3 缺少 IS26 *tnp* 片段 (39 299–40 003 bp)，*Citrobacter freundii* Cf.1 和质粒 p24362-1 缺少了 TnAs3 *tnpM* 片段(32 359–32 709 bp)与 IS26 *tnp* 片段(39 299–40 003 bp) (图 3B)。对于 pS90-2.3 MDR2，则未检索出与该区域高度同源的片段(图 3C)。

## 2.4 多重耐药质粒流行分析

在 PLSDB 数据库中，筛选出了 155 个相似质粒，其中与质粒 pM911-1.1 高度相似质粒有

61 个，来源时间和地点分析，发现 52.46% (32/61) 的相似质粒是在 2020 年分离的，且主要来自中国(62.30%，38/61)。来源宿主细菌分析发现，68.85% (42/61) 来自人类宿主菌，其余来自猪和未知来源宿主菌(图 4A)。与 pS90-2.3 高度相似质粒有 94 个，2020 年分离占 42.43% (38/94)，有 17.02% (16/94) 来自中国，36.17% (34/94) 来自人类宿主菌，其余来自狗、猫、猪、鸭子、白鹭和未知来源宿主菌(图 4B)。pM911-1.1 和 pS90-2.3 与数据库中的部分质粒(相似度  $\geq 90\%$ )，以 *K. pneumoniae* 和 *Escherichia coli* 为主要宿主，质粒 pM911-1.1 与相似质粒存在 7 个同源区域(附图 1A)，质粒 pS90-2.3 与相似质粒存在 10 个同源区域(附图 1B)。但由于进化环境差异，同源区域存在重排现象。



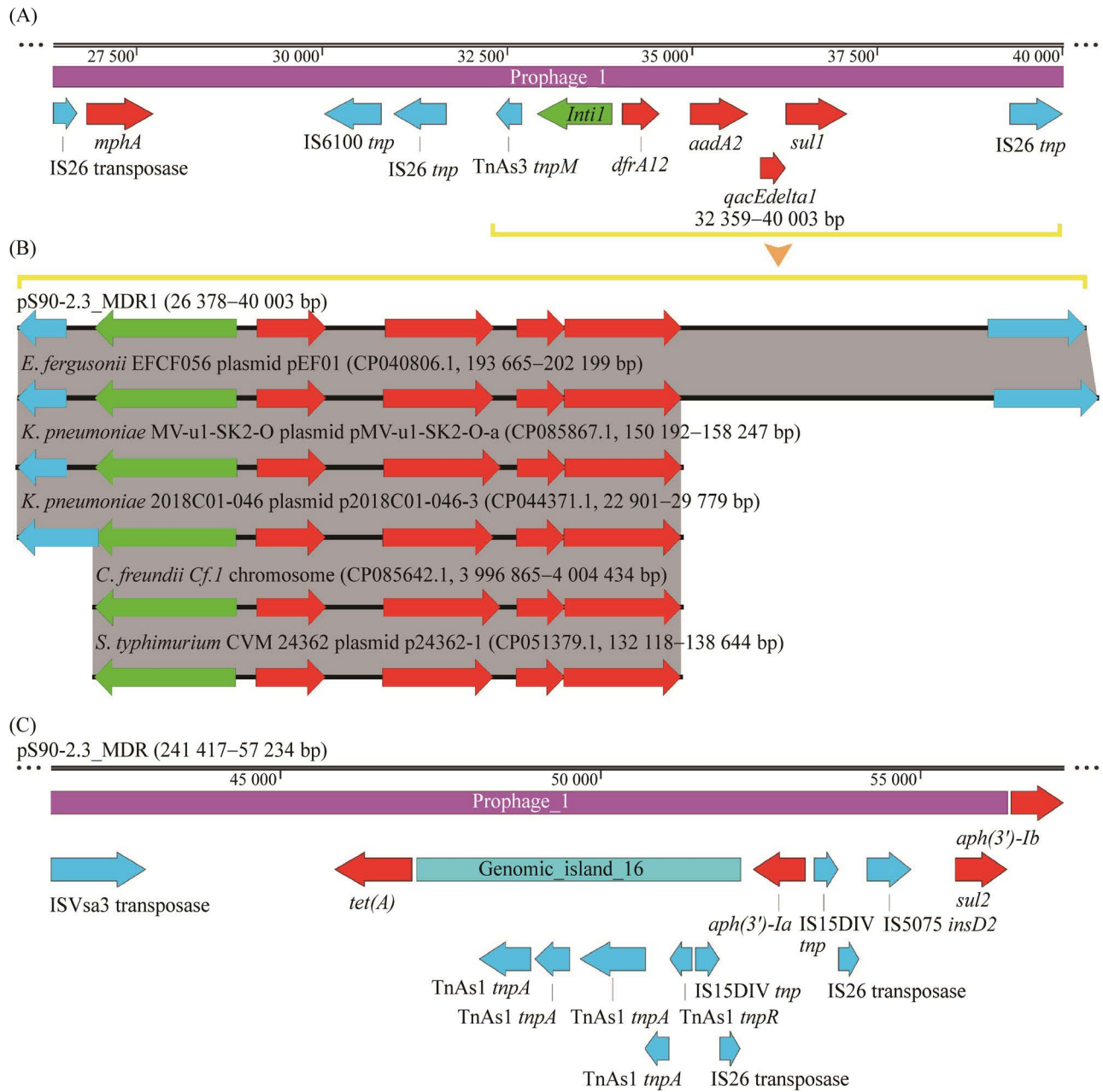


图 3 质粒 pS90-2.3 MDR 区域结构及其同源片段结构

Figure 3 Structure of plasmid pS90-2.3 MDR region and its homologous fragment structure. A: schematic representation of gene element assembly in pS90-2.3 MDR1 region; B: comparison of pM911-1.1 homologous fragment structure; C: schematic representation of gene element assembly in pS90-2.3 MDR2 region. Red fragment, drug resistance gene; blue fragment, transposase gene; green fragment, integrase gene; purple fragment, prephage; cyan, gene island. The arrow direction represents the gene coding direction.

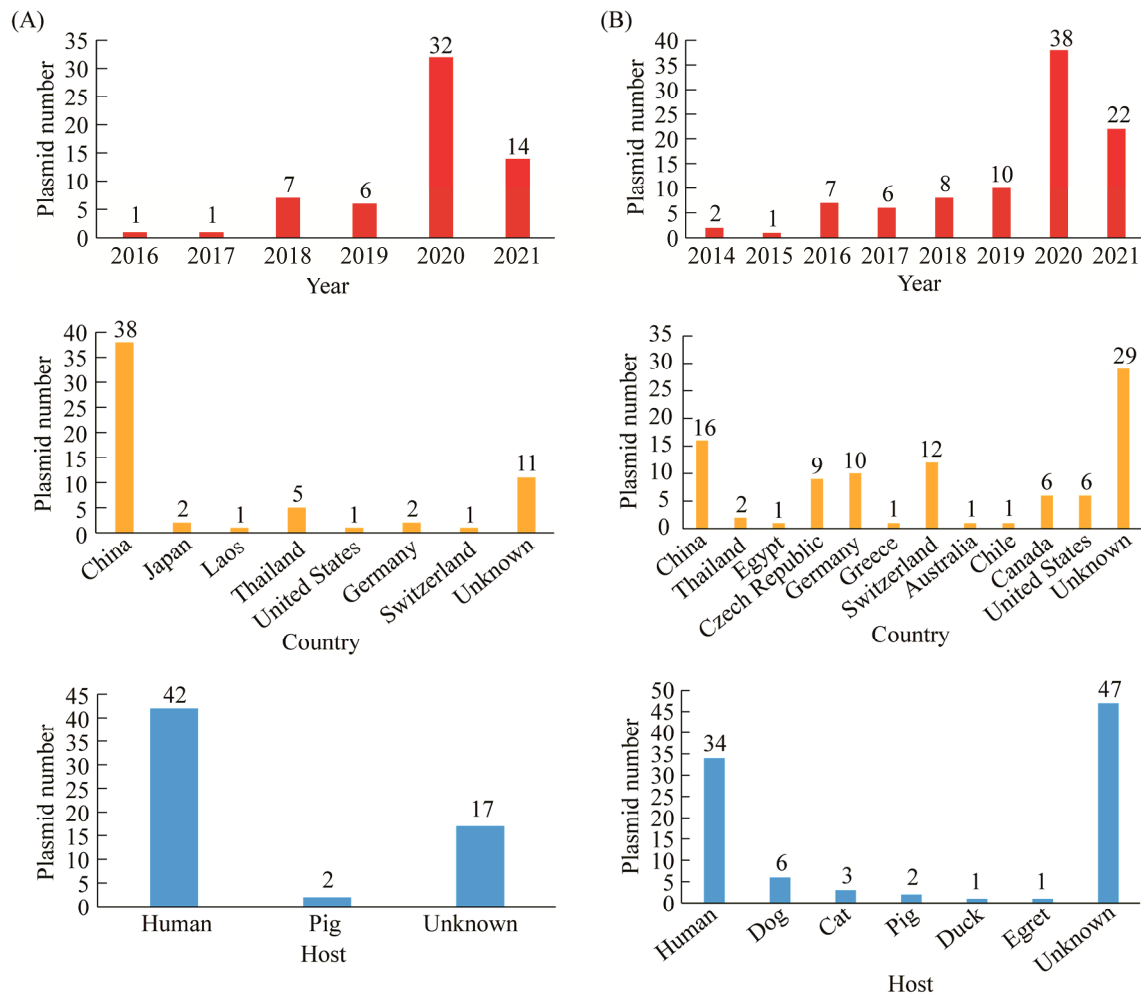


图 4 质粒 pM911-1.1、pS90-2.3 同源质粒的全球分布情况

Figure 4 Global distribution of plasmids pM911-1.1, pS90-2.3 homologs. A: time of isolation, country and host information of pM911-1.1 homologs; B: time of isolation, country and host information of pS90-2.3 homologs.

## 2.5 相似质粒 *K. pneumoniae* 宿主菌的全基因组进化分析

在 155 个相似质粒中, 筛选了与多重耐药质粒 pM911-1.1 和 pS90-2.3 13 株 *K. pneumoniae* 宿主菌株(相似度  $\geq 95\%$ ), 以及本实验室前期研究中分离的 *K. pneumoniae* 分离株 S210-3、BS433-2 和 BM334-2 (人类样品)和 M63-1 (熊猫样品), 构建全基因组进化树。系统进化分析结果表明, 10 株 *K. pneumoniae* 分离株属于 ST11 型, 在进化树处于同一分支, 6 株携带的质粒与质粒 pM911-1.1 高度同源, 4 株携带的质粒与

质粒 pS90-2.3 高度同源。菌株 19KM1053 分离自家猫, 菌株 KP18-29 宿主未知, 其余菌株均来自人类宿主(图 5, 红色分支)。此外, 携带 pS90-2.3 同源质粒的分离株 *K. pneumoniae* 2e (ST4024 型)与人类来源分离株 BM334-2 (ST86 型)处于同一分支, 分离株 2018C01-046 (novel 型)与 M911-1 (novel 型)处于同一分支, 分离株 SCKP020135 (ST1 型)与 M63-1 (ST628 型, 熊猫)处于同一分支(图 5)。同源质粒宿主 *K. pneumoniae* 主要分离自中国的人类样品, 分离时间段 2010–2019 年(图 5)。

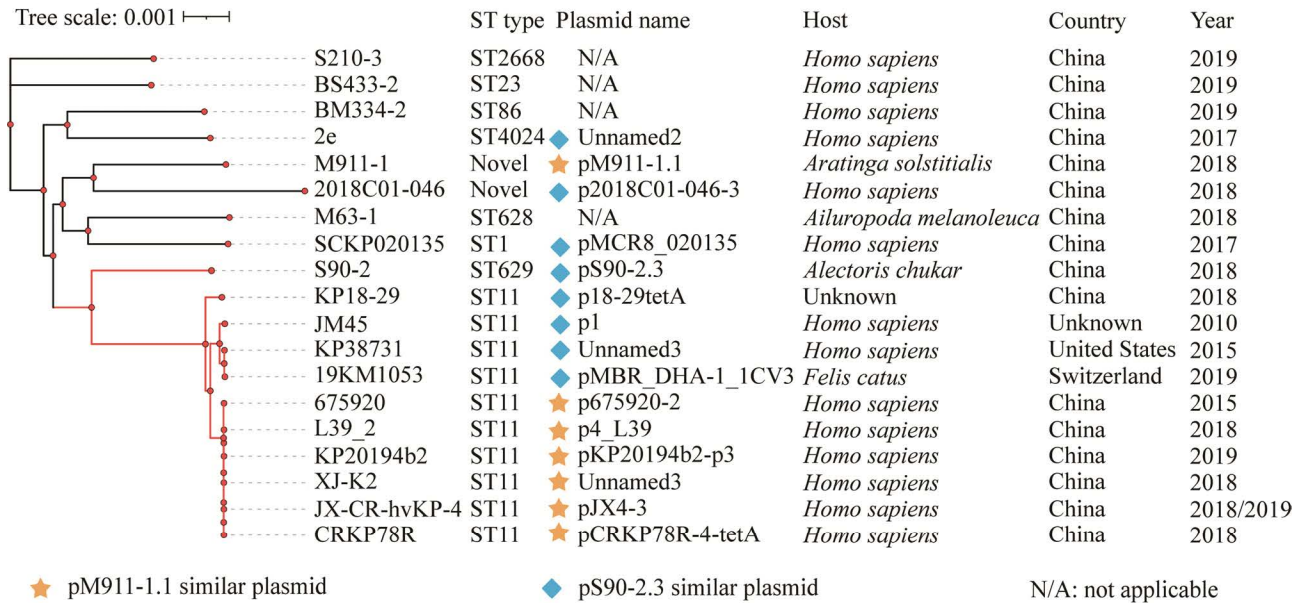


图 5 质粒 pM911-1.1、pS90-2.3 同源质粒 *Klebsiella pneumoniae* 宿主与菌株 M911-1、S90-2.3 的全基因组进化树

Figure 5 Genome-wide evolutionary tree of plasmids pM911-1.1, pS90-2.3 homologous plasmids *Klebsiella pneumoniae* host and strains M911-1 and S90-2.3. Red branch: main clustering branch of similar plasmid hosts; orange pentagons: pM911-1.1 similar plasmid; blue diamond: pS90-2.3 similar plasmid.

### 3 讨论与结论

本研究中,我们评估了 4 株来自野生石鸡、绯胸鹦鹉、太阳锥尾鹦鹉和黑领椋鸟的 *K. pneumoniae* 分离株的耐药性(表 2)。有研究表明,野生鸟类能够携带介导以  $bla_{CTX-M}$ 、 $bla_{SHV}$  型为主的超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBL)为主高致病多重耐药性的 *Escherichia coli*<sup>[26-28]</sup>、*K. pneumoniae*<sup>[29]</sup>、*Pseudomonas* spp.<sup>[30]</sup>和 *Campylobacter jejuni*<sup>[31]</sup>, 这些 MDR 菌株的耐药性主要由其携带的耐药质粒赋予。因此,野生鸟类已经成为耐药性细菌重要贮存宿主。

本研究中分离株的染色体组中均携带了 SHV 型 ESBL 耐药基因(表 2),该型 ESBL 与 TEM 型 ESBL 共享 68%左右的氨基酸序列,

整体结构相似,主要存在于 *Escherichia coli*、*K. pneumoniae* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 中<sup>[32-33]</sup>。S90-2 与 M911-1 所携带的  $bla_{SHV-1}$  是 SHV 型 ESBL 家族中最早被描述的水解酶基因,它存在于大多数 *K. pneumoniae* 中,由染色体或质粒介导表达,*Escherichia coli* 质粒也可携带  $bla_{SHV-1}$ <sup>[34]</sup>。S130-1 携带的  $bla_{SHV-11}$  型 ESBL 则最早发现于来自瑞士的 *K. pneumoniae* 分离株<sup>[35]</sup>,其除了介导  $\beta$ -内酰胺类药物的耐受外,可与菌株核苷酸切除修复、错配修复、DNA 复制、芳香化合物降解、氮代谢以及氨基酸代谢调控基因互作,  $bla_{SHV-11}$  还与 *dnaJ*、*ligA*、*mutS*、*recA* 和 *recF* 协同诱导 DNA 损伤修复,有利于维持基因组的完整性<sup>[36]</sup>。S141 中携带了  $bla_{SHV-217}$ ,该基因发现较晚,相关信息比较少,  $bla_{SHV-217}$  基因序列全部来自 *K. pneumoniae*。上述 SHV 型 ESBL 均

可介导青霉素类、头孢菌素类药物的耐受, 与本研究观察到的氨苄西林耐受结果相符(表 1)。

S90-2、M911-1 和 S130-1 染色体组携带了 *fosA6* 型磷霉素耐药基因, 该基因在美国某医院产 *bla*<sub>CTX-M-2</sub> 酶的 *Escherichia coli* 临床菌株中发现, *fosA6* 位于 69 kb 大小的 IncFII 型质粒基因组上, 介导高水平磷霉素抗性, 该耐药基因与多株 *K. pneumoniae* 染色体基因组片段高度同源<sup>[37]</sup>。S141 基因组携带的 *fosA5* 型磷霉素耐药基因, 该基因发现于产 ESBL *Escherichia coli* E265 分离株, 介导高水平磷霉素抗性。基因溯源表明质粒介导的 *fosA5* 可能来源于 *K. pneumoniae* CG4 分离株, 插入序列 IS10 在其转移中起重要作用<sup>[38]</sup>。本研究还发现菌株 S90-2 染色体组携带了 *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 型 ESBL 基因与乙酰转移酶基因 *aac(3)-Iid*, 这与菌株具有较高水平的 β-内酰胺类、氨基糖苷类药物耐受表型相一致(表 1)。因此, 肠杆菌科菌株间可能存在较为频繁的基因交流。

耐药基因的横向转移通常由可移动遗传元件(如插入序列、转座子、整合子和前噬菌体等)介导<sup>[2]</sup>。多重耐药质粒中 pM911-1.1 和 pS90-2.3 携带的 MDR 片段与肠杆菌科多种菌株染色体或质粒高度同源(图 2 和图 3, 附表 2), 表明其耐药基因转移可能存在多种机制。pM911-1.1 的 MDR 区域由 *tnpR-qnrS1-insC21-transposase-insD-bla*<sub>LAP-2</sub>-*tnpA-tet(A)-tnp* 组成, 该片段中的耐药基因的上下游均存在转座酶基因, 耐药基因明显被 ISEc11 *insC21*、ISRso10 transposase 和 ISMaq2 *insD* 3 个转座酶基因隔开, 该片段中的 *qnrS1* 与 *bla*<sub>LAP-2</sub> 不再共享 Tn3 转座酶基因(图 2A)。值得注意的是, 在同源参考序列中基因 *qnrS1* 与 *bla*<sub>LAP-2</sub> 之间仅存在 1 个完整的 IS3 家族转座酶基因(图 2B)。因此推测 pM911-1.1 的 MDR 的耐药基因可在 ISEc11、ISRso10 和

ISMaq2 转座酶介导下, 能够同时发生水平转移, 而同源参考质粒片段(质粒 pCRKP78R-4-tetA、p4\_L39、pWP8-W19-CRE-01\_3 和 p2481359-2, 图 2)中的耐药基因簇仅发生 *qnrS1* 或 *bla*<sub>LAP-2</sub> 的单个水平转移。pM911-1.1 MDR 片段中耐药基因 *qnrS1* 发现于 *Shigella flexneri* 可共轭转移质粒中, 介导低水平氟喹诺酮类药物耐受<sup>[39]</sup>, 而 *bla*<sub>LAP-2</sub> 是一种源自 *Enterobacter cloacae* 的 Ambler A 型 β-内酰胺酶耐药基因<sup>[40]</sup>。*tet(A)* 型四环素外排泵基因发现于多种革兰氏阴性细菌<sup>[41]</sup>, 质粒 p2481359-2 的同源片段缺少 *tet(A)* (图 2)。因此, 该 MDR 区域可能由多次发生的转座或同源重组事件进化而成。

PlasmidFinder 数据库中, BLAST 结果表明 pM911-1.1 的 *rep* 基因与 IncFII (pCRY) 型不相容质粒 *rep* 片段的同源率为 81.32%, 其可能为一种新型的质粒不相容群类型。IncFII 型不相容群质粒在世界各地广泛流行, 成为 *bla*<sub>NDM</sub>、*bla*<sub>SHV</sub>、*bla*<sub>OXA</sub> 和 *bla*<sub>KPC</sub> 等多种 ESBLs 的载体, 其介导高水平 β-内酰胺类药物耐受, 其中包括 *K. pneumoniae*、*Escherichia coli* 和 *Enterobacter cloacae* 在内的多种肠杆菌科菌株<sup>[42-45]</sup>。质粒 pCRY 发现于 *Yersinia pestis* 分离株 91001<sup>[46]</sup>, 研究证实 *K. pneumoniae* 临床分离株携带的多重耐药质粒 pMET1 与质粒 pCRY 复制调控蛋白基因 *repA* 相似度 ≥ 95%<sup>[47]</sup>, 这表明细菌宿主携带的质粒在适应环境的过程中可能发生自然进化。

质粒 pS90-2.3 携带的 MDR1 片段由 IS26 transposase-*mphA*-IS6100 *tnp*-IS26 *tnp*-TnAs3 *tnpM-intI1-dfrA12-aadA2-qacEdelta1-sull*-IS26 *tnp* 组成(图 3A), 介导大环内酯类、甲氧苄啶、氨基糖苷类和磺胺类等多种药物的耐受<sup>[48-52]</sup>。BLAST 显示该区域内存在 7 645 bp 大小(32 359-40 003 bp)的同源序列, 其核心结构为 TnAs3 *tnpM-intI1-dfrA12-aadA2-qacEdelta1-sull*-IS26 *tnp*,

其中存在一个 4 199 bp 大小的整合子结构 (*intI1-dfrA12-aadA2-qacEdelta1-sul1*), 发现该整合子经典结构主要存在于 *Escherichia coli* 和 *K. pneumoniae* 为主的多种肠杆菌科菌株染色体组上(相似度 100%), 但其上下游大多缺少转座酶基因(图 3B), 而 pS90-2.3 中的整合子结构上下游存在 *tnpM* 与 *tnp* 基因, 因此该片段既构成整合子结构又构成了转座子结构。这一结果暗示其原宿主菌株染色体组该片段的上下游获得了转座酶基因<sup>[53-54]</sup>, 菌株染色体整合子片段转移至质粒并进一步增强耐药基因的传播。

pS90-2.3 的 MDR2 区域则由 ISVsa3 *transposase-tet(A)-TnAs1 tnpA-TnAs1 tnpA-TnAs1 tnpA-TnAs1 tnpA-TnAs1 tnpR-IS15DIV tnp-IS26 transposase-aph(3'')-Ia-IS15DIV tnp-IS26 transposase-IS5075 insD2-sul2-aph(3'')-Ib* 组成, 该片段包含 4 个耐药基因, 主要介导四环素类、氨基糖苷类和磺胺类药物的耐受。此外该区域存在 11 个转座酶基因, 其中 7 个转座酶基因位于基因岛上(图 3C), 表明 MDR2 可能由转座子介导多次基因水平转移而形成。值得注意的是, pS90-2.3 质粒基因组中的 63.40% 为前噬菌体结构 (19 709–56 370 bp), 这一片段与血清型 O8:H19 *Escherichia coli* 725 中发现的 P1 样噬菌体 RCS47 (accession: NC\_042128.1) 100% 同源。RCS47 中仅携带了 1 个抗生素耐药基因 *bla<sub>SHV-2</sub>*, 在其上下游存在多个 IS26、IS5 和 IS1 转座酶基因<sup>[55]</sup>, 而本研究中的质粒 pS90-2.3 共携带 9 个耐药基因, 除 *aph(3'')-Ib* (56 431–57 234 bp) 外, 其余 8 个耐药基因均由前噬菌体提供(图 1B, 图 3)。这一点虽与其同源噬菌体 RCS47 不同, 但同样与多个转座酶基因相关联, 这些转座酶为质粒获取耐药基因与整合携带耐药基因的噬菌体提供了条件。质粒 pS90-2.3 属于 IncR 型, IncR 型质粒在 2009 年首次发现, 不具备接合转移能

力<sup>[56]</sup>。在 *K. pneumoniae* 临床分离株中, IncR 型质粒主要携带 *bla<sub>KPC-2</sub>*、*bla<sub>DHA-1</sub>*、*bla<sub>NDM-1</sub>*、*bla<sub>VIM-1</sub>*、*qnrS1* 或 *armA* 的耐药基因为主<sup>[57-59]</sup>。IncR 型质粒能够与 IncC、IncN、IncHI 和 IncFII 等多种类型的复制子质粒共存, 其携带的耐药基因可通过转座或质粒重组事件横向转移, 从而促进耐药基因在细菌种间扩散<sup>[60]</sup>。

与质粒 pM911-1.1 和 pS90-2.3 高度同源的 155 个质粒主要分布在中国及其周边国家, 但欧洲、美洲部分国家亦有报道(图 4)。2020 年之前, pM911-1.1 的 15 个相似质粒在德国、泰国、老挝和中国均有报道; 52.46% (32/61) 的相似质粒在 2020 年发现, 22 株分布在中国, 其余则分布在日本; 2021 年发现的 14 个相似质粒则分别分布于中国、泰国、美国和瑞士。pS90-2.3 的相似质粒在 2020 年以前共发现 34 个, 分布在美国、加拿大、德国、希腊、埃及、泰国和中国 7 个国家; 2020 年分离质粒占 42.43% (38/94), 瑞士发现 11 个, 数量最多, 其余质粒则分布在德国、智利、澳大利亚、加拿大和中国; 2021 年发现最多国家为捷克和中国, 分别为 9 个, 其余质粒则分布在美国和瑞士。因此, 上述 2 种与人类来源的宿主菌密切相关质粒已经广泛扩散传播, 且在中国地区广泛分布, 可能正在逐步成为流行的优势质粒类型。本研究中, 野生留鸟太阳锥尾鹦鹉、石鸡携带耐药性细菌, 且其栖息地和候鸟的栖息地与人类聚集地存在交叉区域<sup>[10]</sup>, 而鸟类的迁徙行为可能会进一步增加耐药菌株和耐药质粒的扩散传播风险。耐药性质粒的宿主菌以 ST11 型的 *K. pneumoniae* 为主(图 5, 红色分支), 近十年来 ST11 型 *K. pneumoniae* 已成为我国流行的优势克隆<sup>[61]</sup>。ST11 型 *K. pneumoniae* 中广泛出现的 ESBLs 与 IncFII 样质粒关联密切<sup>[62]</sup>, 在插入

序列 IS26 的介导下,多种 ESBLs 基因可在 ST11 型 *K. pneumoniae* 携带的 IncF/IncR 型质粒中共存<sup>[63]</sup>。亚洲地区流行的 *K. pneumoniae* ST11 分离株携带的 ESBLs 质粒,主要是重组质粒<sup>[64]</sup>。而本研究中的分离株 M911-1 与 S90-2 均非 ST11 型,同源质粒宿主与其他 ST 型非耐药性 *K. pneumoniae* 存在较近的亲缘关系(图 5)。因此,ST11 型 *K. pneumoniae* 可能是多重耐药质粒重要宿主,但在多种不同宿主菌中也存在传播扩散。

综上所述,野生鸟类携带的 *K. pneumoniae* 可携带多重耐药质粒,且与人类临床分离株之间存在密切联系,这些质粒通过多种可移动元件获取耐药基因,并赋予菌株多重耐药表型。因此,野生鸟类也许成为耐药细菌和临床上重要耐药基因的潜在储存库,并存在耐药基因扩散的巨大风险,进一步增加 AMRs 在人类-动物-环境间水平转移的可能性,从而构成公共安全隐患。

## 参考文献

- [1] Burnham CAD, Leeds J, Nordmann P, O'Grady J, Patel J. Diagnosing antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(11): 697–703.
- [2] Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 2018, 31(4): e00088-17.
- [3] Wang X, Kang Q, Zhao J, Liu Z, Ji F, Li J, Yang J, Zhang C, Jia T, Dong G, Liu S, Hu G, Qin J, Wang C. Characteristics and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from red Kangaroo, China. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 560474.
- [4] Kang Q, Wang X, Zhao J, Liu Z, Ji F, Chang H, Yang J, Hu S, Jia T, Wang X, Tang J, Dong G, Hu G, Wang J, Zhang Y, Qin J, Wang C. Multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates carrying *bla*<sub>OXA-1</sub> and *bla*<sub>NDM-1</sub> from wildlife in China: increasing public health risk. *Integrative Zoology*, 2021, 16(6): 798–809.
- [5] Ji F, Liu S, Wang X, Zhao J, Zhu J, Yang J, Zhang C, Jia Z, Zhao R, Hu G, Wang J, Qin J, Li G, Wu B, Wang C. Characteristics of the multiple replicon plasmid IncX1-X1 in multidrug-resistant *Escherichia coli* from Malayan pangolin (*Manis javanica*). *Integrative Zoology*, 2022. DOI: 10.1111/1749-4877.12637.
- [6] Stokes HW, Gillings MR. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, 35(5): 790–819.
- [7] Eiamphungporn W, Schaduangrat N, Malik AA, Nantasenamat C. Tackling the antibiotic resistance caused by class A  $\beta$ -Lactamases through the use of  $\beta$ -lactamase inhibitory protein. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(8): 2222.
- [8] Karen B, Bradford PA. Epidemiology of beta-lactamase-producing pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 2020, 33(2): e00047-19.
- [9] Chang HH, Cohen T, Grad YH, Hanage WP, O'Brien TF, Lipsitch M. Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 79(1): 101–116.
- [10] Wang J, Ma ZB, Zeng ZL, Yang XW, Huang Y, Liu JH. Response to comment on “The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes”. *Zoological Research*, 2017, 38(4): 212.
- [11] Guenther S, Aschenbrenner K, Stamm I, Bethe A, Semmler T, Stubbe A, Stubbe M, Batsajkhan N, Glupczynski Y, Wieler LH, Ewers C. Comparable high rates of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia. *PLoS One*, 2012, 7(12): e53039.
- [12] Hassell JM, Ward MJ, Muloi D, Bettridge JM, Phan H, Robinson TP, Ogendo A, Imboma T, Kiiru J, Kariuki S, Begon M, Kang'ethe EK, Woolhouse MEJ, Fèvre EM. Deterministic processes structure bacterial genetic communities across an urban landscape. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 2643.
- [13] Marcelino VR, Wille M, Hurt AC, González-Acuña D, Klaassen M, Schlub TE, Eden JS, Shi M, Iredell JR, Sorrell TC, Holmes EC. Meta-transcriptomics reveals a diverse antibiotic resistance gene pool in avian microbiomes. *BMC Biology*, 2019, 17(1): 31.
- [14] Cummins ML, Sanderson-Smith M, Newton P, Carlisle N, Phalen DN, Maute K, Monahan LG, Hoye BJ, Djordjevic SP. Whole-genome sequence analysis of an



- extensively drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Agona isolate from an Australian silver gull (*Chroicocephalus novaehollandiae*) reveals the acquisition of multidrug resistance plasmids. *mSphere*, 2020, 5(6): e00743-20.
- [15] Fashae K, Engelmann I, Monecke S, Braun SD, Ehrlich R. Molecular characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* in wild birds and cattle, Ibadan, Nigeria. *BMC Veterinary Research*, 2021, 17(1): 33.
- [16] Yuan Y, Liang B, Jiang BW, Zhu LW, Wang TC, Li YG, Liu J, Guo XJ, Ji X, Sun Y. Migratory wild birds carrying multidrug-resistant *Escherichia coli* as potential transmitters of antimicrobial resistance in China. *PLoS One*, 2021, 16(12): e0261444.
- [17] Páll E, Niculae M, Brudaşcă GF, Ravişov RK, Şandru CD, Cerbu C, Olah D, Zăblău S, Potârniche AV, Spinu M, Duca G, Rusu M, Rzewuska M, Vasiu A. Assessment and antibiotic resistance profiling in *Vibrio* species isolated from wild birds captured in Danube delta biosphere reserve, Romania. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(3): 333.
- [18] Ruiz-Ripa L, Gómez P, Alonso CA, Camacho MC, Ramiro Y, De La Puente J, Fernández-Fernández R, Quevedo MÁ, Blanco JM, Báguena G, Zarazaga M, Höfle U, Torres C. Frequency and characterization of antimicrobial resistance and virulence genes of coagulase-negative *Staphylococci* from wild birds in Spain. Detection of *tst*-carrying *S. sciuri* isolates. *Microorganisms*, 2020, 8(9): 1317.
- [19] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed.
- [20] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, version 10.0, 2021.
- [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] Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*, 2011, 27(7): 1009–1010.
- [24] Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, 2004, 14(7): 1394–1403.
- [25] Bertels F, Silander OK, Pachkov M, Rainey PB, Van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Molecular Biology and Evolution*, 2014, 31(5): 1077–1088.
- [26] Borges CA, Beraldo LG, Maluta RP, Cardozo MV, Barboza KB, Guastalli EAL, Kariyawasam S, DebRoy C, Ávila FA. Multidrug-resistant pathogenic *Escherichia coli* isolated from wild birds in a veterinary hospital. *Avian Pathology*, 2017, 46(1): 76–83.
- [27] Carroll D, Wang J, Fanning S, McMahon BJ. Antimicrobial resistance in wildlife: implications for public health. *Zoonoses and Public Health*, 2015, 62(7): 534–542.
- [28] Rybak B, Krawczyk B, Furmanek-Blaszak B, Wysocka M, Fordon M, Ziolkowski P, Meissner W, Stepniowska K, Sikorska K. Antibiotic resistance, virulence, and phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from free-living birds in human habitats. *PLoS One*, 2022, 17(1): e0262236.
- [29] Oteo J, Mencía A, Bautista V, Pastor N, Lara N, González-González F, García-Peña FJ, Campos J. Colonization with *Enterobacteriaceae*-producing ESBLs, AmpCs, and OXA-48 in wild avian species, Spain 2015–2016. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 2018, 24(7): 932–938.
- [30] Rodrigues JGC, Nair HP, O'Kane C, Walker CA. Prevalence of multidrug resistance in *Pseudomonas* spp. isolated from wild bird feces in an urban aquatic environment. *Ecology and Evolution*, 2021, 11(20): 14303–14311.
- [31] Aksomaitiene J, Ramonaite S, Tamuleviciene E, Novoslavskij A, Alter T, Malakauskas M. Overlap of antibiotic resistant *Campylobacter jejuni* MLST genotypes isolated from humans, broiler products, dairy cattle and wild birds in Lithuania. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1377.
- [32] Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(4): 933–951.
- [33] Lee JH, Bae IK, Lee SH. New definitions of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. *Medicinal Research Reviews*, 2012, 32(1): 216–232.
- [34] Bradford PA. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *bla*



- (SHV) genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43(12): 2960–2963.
- [35] Nüesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hächler H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, 41(5): 943–949.
- [36] Miryala SK, Anbarasu A, Ramaiah S. Role of SHV-11, a class A  $\beta$ -lactamase, gene in multidrug resistance among *Klebsiella pneumoniae* strains and understanding its mechanism by gene network analysis. *Microbial Drug Resistance: Larchmont, N. Y.*, 2020, 26(8): 900–908.
- [37] Guo QL, Tomich AD, McElheny CL, Cooper VS, Stoesser N, Wang MG, Sluis-Cremer N, Doi Y. Glutathione-S-transferase FosA6 of *Klebsiella pneumoniae* origin conferring fosfomycin resistance in ESBL-producing *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 71(9): 2460–2465.
- [38] Ma Y, Xu X, Guo Q, Wang P, Wang W, Wang M. Characterization of *fosA5*, a new plasmid-mediated fosfomycin resistance gene in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 60(3): 259–264.
- [39] Hata MM, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S, Sakae K. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(2): 801–803.
- [40] Huang Z, Mi Z, Wang C. A novel beta-lactamase gene, LAP-2, produced by an *Enterobacter cloacae* clinical isolate in China. *The Journal of Hospital Infection*, 2008, 70(1): 95–96.
- [41] Aldema ML, McMurry LM, Walmsley AR, Levy SB. Purification of the Tn10-specified tetracycline efflux antiporter TetA in a native state as a polyhistidine fusion protein. *Molecular Microbiology*, 1996, 19(1): 187–195.
- [42] Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- $\beta$ -lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clinical Microbiology Reviews*, 2019, 32(2): e00115-18.
- [43] Bourouis A, Ben Moussa M, Belhadj O. Multidrug-resistant phenotype and isolation of a novel SHV-beta-lactamase variant in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Journal of Biomedical Science*, 2015, 22(1): 27.
- [44] Simner PJ, Antar AAR, Hao S, Gurtowski J, Tamma PD, Rock C, Opene BNA, Tekle T, Carroll KC, Schatz MC, Timp W. Antibiotic pressure on the acquisition and loss of antibiotic resistance genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018, 73(7): 1796–1803.
- [45] Doumith M, Findlay J, Hirani H, Hopkins KL, Livermore DM, Dodgson A, Woodford N. Major role of pKpQIL-like plasmids in the early dissemination of KPC-type carbapenemases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, 72(8): 2241–2248.
- [46] Song Y, Tong Z, Wang J, Wang L, Guo Z, Han Y, Zhang J, Pei D, Zhou D, Qin H, Pang X, Han Y, Zhai J, Li M, Cui B, Qi Z, Jin L, Dai R, Chen F, Li S, Ye C, Du Z, Lin W, Wang J, Yu J, Yang H, Wang J, Huang P, Yang R. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate a virulent to humans. *DNA Research: an International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 2004, 11(3): 179–197.
- [47] Soler Bistué AJC, Birshan D, Tomaras AP, Dandekar M, Tran T, Newmark J, Bui D, Gupta N, Hernandez K, Sarno R, Zorreguieta A, Actis LA, Tolmasky ME. *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pMET1: similarity with the *Yersinia pestis* plasmid pCRY and integrative conjugative elements. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1800.
- [48] Pawlowski AC, Stogios PJ, Koteva K, Skarina T, Evdokimova E, Savchenko A, Wright GD. The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 112.
- [49] Thungapathra M, Amita, Sinha KK, Chaudhuri SR, Garg P, Ramamurthy T, Nair GB, Ghosh A. Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes *aac(6)-Ib*, *dfrA5*, *dfrA12*, and *ereA2* in class I integrons in non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(9): 2948–2955.
- [50] Chen YT, Lauderdale TL, Liao TL, Shiau YR, Shu HY, Wu KM, Yan JJ, Su IJ, Tsai SF. Sequencing and comparative genomic analysis of pK29, a 269-kilobase conjugative plasmid encoding CMY-8 and CTX-M-3 beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(8): 3004–3007.
- [51] Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T. Characterization of the antiseptic-resistance gene *qacEA1* isolated from clinical and environmental isolates of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* non-O1. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 174(2): 379–384.
- [52] Martínez N, Mendoza MC, Rodríguez I, Soto S, Bances M, Rodicio MR. Detailed structure of integrons

- and transposons carried by large conjugative plasmids responsible for multidrug resistance in diverse genomic types of *Salmonella enterica* serovar Brandenburg. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 60(6): 1227–1234.
- [53] Zhao JY, Mu XD, Zhu YQ, Xi LJ, Xiao ZJ. Identification of an integron containing the quinolone resistance gene *qnrA1* in *Shewanella xiamenensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(18): fmv146.
- [54] Petrova M, Gorlenko Z, Mindlin S. Tn5045, a novel integron-containing antibiotic and chromate resistance transposon isolated from a permafrost bacterium. *Research in Microbiology*, 2011, 162(3): 337–345.
- [55] Billard-Pomares T, Fouteau S, Jacquet ME, Roche D, Barbe V, Castellanos M, Bouet JY, Cruveiller S, Médigue C, Blanco J, Clermont O, Denamur E, Branger C. Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from an *Escherichia coli* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(11): 6550–6557.
- [56] García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 63(2): 274–281.
- [57] Guo QL, Spychala CN, McElheny CL, Doi Y. Comparative analysis of an IncR plasmid carrying *armA*, *bla<sub>DHA-1</sub>* and *qnrB4* from *Klebsiella pneumoniae* ST37 isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 71(4): 882–886.
- [58] Kocsis E, Gužvinec M, Butić I, Krešić S, Crnek SŠ, Tambić A, Cornaglia G, Mazzariol A. *bla<sub>NDM-1</sub>* carriage on IncR plasmid in *Enterobacteriaceae* strains. *Microbial Drug Resistance: Larchmont, N. Y.*, 2016, 22(2): 123–128.
- [59] 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<sub>pA1763-KPC</sub>:IncN1 or IncFII<sub>pHN7A8</sub>:Inc<sub>pA1763-KPC</sub>:IncN1. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12: 285–296.
- [60] Compain F, Frangeul L, Drieux L, Verdet C, Brisse S, Arlet G, Decré D. Complete nucleotide sequence of two multidrug-resistant IncR plasmids from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(7): 4207–4210.
- [61] Liao W, Liu Y, Zhang W. Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: a review over the last 10 years. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2020, 23: 174–180.
- [62] Fu P, Tang Y, Li G, Yu L, Wang Y, Jiang X. Pandemic spread of *bla<sub>KPC-2</sub>* among *Klebsiella pneumoniae* ST11 in China is associated with horizontal transfer mediated by IncFII-like plasmids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2019, 54(2): 117–124.
- [63] Feng Y, Liu L, McNally A, Zong ZY. Coexistence of three *bla<sub>KPC-2</sub>* genes on an IncF/IncR plasmid in ST11 *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2019, 17: 90–93.
- [64] Kim SY, Ko KS. Diverse Plasmids Harboring *bla<sub>CTX-M-15</sub>* in *Klebsiella pneumoniae* ST11 Isolates from several Asian countries. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 2019, 25(2): 227–232.

## 补充材料

附图 1 基于软件 Mauve 对多重耐药质粒 pM911-1.1、pS90-2.3 相似质粒的同源结构比对

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

附表 1 菌株基本数据

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

附表 2 耐药质粒 MDR 区同源基因片段来源

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。