

一株同时携带 *optrA* 和 *cfrC* 基因的猪源多重耐药结肠弯曲菌的全基因组测序

唐梦君, 张小燕, 周倩, 陆俊贤, 唐修君, 张静, 杨星星, 陈薇, 高玉时*

江苏省家禽科学研究所, 江苏 扬州 225125

唐梦君, 张小燕, 周倩, 陆俊贤, 唐修君, 张静, 杨星星, 陈薇, 高玉时. 一株同时携带 *optrA* 和 *cfrC* 基因的猪源多重耐药结肠弯曲菌的全基因组测序[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3538-3549.

TANG Mengjun, ZHANG Xiaoyan, ZHOU Qian, LU Junxian, TANG Xiujun, ZHANG Jing, YANG Xingxing, CHEN Wei, GAO Yushi. Whole genome sequencing of a porcine multiresistant *Campylobacter coli* strain carrying both *optrA* and *cfrC*[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3538-3549.

摘要: 【背景】弯曲菌(*Campylobacter*)是一种世界范围内能引起胃肠炎的最常见食源性病原菌, 对临床上重要的抗菌药物耐药越来越严重, 对食品安全和公共健康造成重大威胁。【目的】研究一株同时携带 *optrA* 和 *cfrC* 基因的猪源结肠弯曲菌(*Campylobacter coli*)耐药表型和耐药基因, 同时对该菌全基因组特征、毒力基因分布情况以及 *optrA* 和 *cfrC* 基因环境进行分析。【方法】采用琼脂平板稀释法进行最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)测定, 并且对该菌进行全基因组测序。【结果】该菌株对四环素、克林霉素、阿奇霉素、氟苯尼考和利奈唑胺呈现高度耐药, 对环丙沙星和庆大霉素敏感。全基因组测序得到一条大小为 1 436 486 bp 的环状 DNA (GC 含量为 31.63%), 携带四大类抗生素中共计 12 种耐药基因, 均定位于染色体上, 其中氨基糖苷类耐药基因数量最多。此外, 携带包含黏附、侵袭和移动等相关毒力基因 83 个, 其中与移动相关的毒力基因数量最多。对 4 个基因岛分析发现, 基因岛 GIs002 和 GIs003 中含有耐药基因序列, *cfrC* 位于基因岛 GIs002 上, 与 *aph(3')-IIIa* 相连, 两侧与转座酶相连, *optrA* 位于染色体上, 在其上、下游两侧与插入序列 *integrase/IS607 family* 相连, 转座酶和插入序列可介导耐药基因水平转移。【结论】本研究通过全基因组测序分析了多重耐药结肠弯曲菌的基因组信息以及存在的耐药及毒力基因情况, 可移动遗传元件(转座酶和插入序列)在结肠弯曲菌耐药传播中起着重要作用, 该研究结果为弯曲菌耐药风险评估提供了参考依据。

关键词: 结肠弯曲菌; 全基因组测序; *optrA*; *cfrC*

资助项目: 国家自然科学基金(31700005); 江苏省农业科技自主创新资金(CX(21)2011); 江苏现代农业产业技术体系建设专项资金(JATS[2022]402)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31700005), the Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund [CX(21)2011], and the Earmarked Fund for Jiangsu Agricultural Industry Technology System (JATS[2022]402).

*Corresponding author. E-mail: gaoy100@sina.com

Received: 2023-02-07; Accepted: 2023-03-22; Published online: 2023-04-23

Whole genome sequencing of a porcine multiresistant *Campylobacter coli* strain carrying both *optrA* and *cfrC*

TANG Mengjun, ZHANG Xiaoyan, ZHOU Qian, LU Junxian, TANG Xiujun, ZHANG Jing, YANG Xingxing, CHEN Wei, GAO Yushi*

Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125, Jiangsu, China

Abstract: [Background] *Campylobacter* is a common group of foodborne pathogens that can cause gastroenteritis in the world. It is increasingly resistant to clinically important antibiotics and poses a serious threat to food safety and public health. [Objective] To investigate the resistance phenotype and genes of a *Campylobacter coli* strain carrying both *optrA* and *cfrC*, the whole genome characteristics of the strain, the distribution of virulence genes, and the gene environments of *optrA* and *cfrC*. [Methods] Agar dilution method was employed to determine the minimal inhibitory concentrations (MIC). Whole genome sequencing (WGS) was carried out to sequence the DNA of the strain. [Results] The strain was highly resistant to tetracycline, clindamycin, azithromycin, florfenicol, and linezolid, and sensitive to ciprofloxacin and gentamicin. WGS identified a circular DNA with a size of 1 436 486 bp (GC content of 31.63%), which carried 12 resistance genes involving four major categories of antibiotics. All of the 12 genes were detected on the chromosome, most of which were aminoglycoside resistance genes. A total of 83 virulence genes involved in adherence, invasion and motility were identified, and most of them were associated with motility. The gene islands GIs002 and GIs003 contained resistance genes. *CfrC* was located on the GIs002, linked with *aph(3')-IIIa* and flanked by two transposons. *Optra* was located on chromosome and connected to the insertion sequence Integrase/IS607 family at upstream and downstream sides. Transposon and insertion sequence could mediate the horizontal transfer of resistance genes. [Conclusion] The genome information, resistance genes, and virulence genes of a multiresistant *C. coli* strain were analyzed by WGS. The mobile genetic elements (transposase and insertion sequence) played an important role in the transmission of antibiotic resistance of *C. coli*. The findings provide basic information for risk assessment of antibiotic resistance of *Campylobacter*.

Keywords: *Campylobacter coli*; whole genome sequencing; *optrA*; *cfrC*

弯曲菌属(*Campylobacter*)是引起细菌性腹泻最常见的菌属之一。据统计,在欧盟每年约有24.6万人感染,其中大部分是由于食用被污染的食品^[1]。感染人类最常见的弯曲菌属主要是空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*),约占80%–90%,其次是结肠弯曲菌(*Campylobacter coli*)和海鸥弯曲菌(*Campylobacter lari*)^[2]。然而,结肠弯曲

菌虽然在引起人类弯曲菌病的病因中只占一小部分,但是该菌引起的健康负担不容小觑,在公共卫生领域也应引起足够重视^[3-4]。食源性动物家禽、牛和猪是弯曲菌常见和重要的宿主,空肠弯曲菌主要存在于家禽和牛的肠道^[5-6],猪则是结肠弯曲菌的主要贮存宿主^[7],猪携带结肠弯曲菌通常无临床症状,但容易在屠宰加工过程中污染

猪肉,食用被污染的猪肉可造成人类感染^[8-11]。人感染结肠弯曲菌与空肠弯曲菌症状相似,主要引起腹泻、呕吐、腹痛和发烧等症状,多为急性、自限性胃肠炎,但偶尔会伴随严重的或长期的感染后症状,在这种情况下需用抗生素进行干预^[12-13]。由于在畜禽养殖业中大量使用抗生素,促进了耐药弯曲菌的出现与传播,给临床弯曲菌病的治疗以及人类健康造成巨大威胁。

氟苯尼考是人工合成的甲砒霉素单氟衍生物,是畜禽专用的酰胺醇类抗生素,主要用于牛和猪的动物疾病治疗^[14]。由于氟苯尼考在畜牧业中的广泛使用,导致其耐药菌株不断出现。细菌对氟苯尼考耐药机制主要与 *floR*、*fexA* 和 *fexB* 等特异性外排泵基因^[14-15]、核糖体保护基因 *optrA* 和 *poxA* 以及 23S rRNA 的甲基化酶基因 *cfr* 有关^[16-18]。研究报道在弯曲菌中也检测到与氟苯尼考耐药相关的基因,包括 *cfrC*、*RE-CmeABC*、*fexA* 和 *optrA*^[19-23]。

多重耐药基因 *cfr* 基因可对 5 种化学结构不相关抗生素(林可酰胺类、截短侧耳素类、酰胺醇类和链阳菌素 A 类)的药物耐药^[24],2000 年首次在松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*)中发现^[25]。*Optra* 基因属于 ABC 转运蛋白,可介导噁唑烷酮类和酰胺醇类抗生素的多重耐药。*Optra* 基因还可介导利奈唑胺和新一代的恶唑烷酮类药物泰地唑利的耐药,而利奈唑胺和泰地唑胺是临床治疗革兰氏阳性菌感染“最后一道防线”。虽然这些药物并不常用于弯曲菌感染的治疗,但由于氟苯尼考在食源性动物中的广泛使用有可能促进 *optrA* 和 *cfr* 基因的扩散。Tang 等^[18]在耐氟苯尼考结肠弯曲菌中首次检测到 *cfrC* 基因,也有研究报道在多重耐药弯曲菌中检测到 *optrA* 基因^[22-23]。2018 年,本实验室从江苏省 10 个不同规模化猪场分离得到 22 株结肠弯曲菌,其中菌株 *Campylobacter coli*

18JS15S 经 PCR 扩增同时检测到 *cfrC* 和 *optrA* 基因,因此本研究通过全基因组测序对该菌株的毒力基因、耐药基因、基因岛以及 *cfrC* 和 *optrA* 基因环境进行分析,以期为进一步研究该菌株的基因组特征、致病力及耐药传播机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

2018 年从江苏省某规模化猪场的猪粪便样品中分离获得,鉴定结果为结肠弯曲菌(*Campylobacter coli*),编号为 18JS15S。PCR 扩增同时携带有 *optrA* 和 *cfrC* 耐药基因。结肠弯曲菌 ATCC 33559 为质控菌株,由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

弯曲菌改良 CCDA 培养基、哥伦比亚培养基和 MH 琼脂培养基, Oxoid 公司;脱纤维绵羊血,青岛海博生物技术有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;混合气(5% O₂、10% CO₂ 和 85% N₂),南京特种气体有限公司;四环素、克林霉素、环丙沙星、阿奇霉素、氟苯尼考和利奈唑胺, Dr. E 公司;20 mg/mL 庆大霉素贮备液, Biomed 生物技术公司。

厌氧罐, MGC 公司;生物安全柜, ESCO 公司;高速冷冻离心机, HITACHI 公司;二氧化碳培养箱, SIM 公司;PCR 仪, Eppendorf 公司;电泳仪,北京市六一仪器厂;凝胶成像系统,基因有限公司;NanoDrop 2000 微量核酸蛋白检测仪, Thermo Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)检测

根据美国临床实验室标准委员会(Clinical

and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的琼脂平板稀释法对7种抗菌药物MIC值进行测定和结果判定。具体步骤为:将抗生素采用相应溶剂(克林霉素、四环素和环丙沙星采用无菌水,阿奇霉素和利奈唑胺采用DMSO,氟苯尼考采用甲醇)溶解后配制成一定浓度的储备液。将储备液按一定比例加入到50℃左右的MH琼脂培养基中,充分混匀倾倒入灭菌皿,使其平板最终药物浓度分别为128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25和0.125 μg/mL。接种在哥伦比亚血平板上42℃培养36h的结肠弯曲菌于MH肉汤中,调整浓度至0.5 McFarland,接种于事先配制好的药敏板中,37℃培养18–24h,观察MIC值。

1.2.2 细菌基因组提取及定量

将接种于哥伦比亚血平板上42℃培养36h的结肠弯曲菌用无菌棉签刮取菌苔于无菌水中,采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌基因组DNA,利用琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和完整性,用微量核酸蛋白检测仪对其进行定量。

1.2.3 全基因组测序及数据处理

将符合条件的DNA送往北京诺禾致源生物信息科技有限公司,采用NanoPore构建1D文库和Illumina PE150构建350 bp小片段文库,库检合格后,把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量进行NanoPore PromethION和Illumina NovaSeq PE150测序。

1.2.4 基因组的生物信息学分析

将NanoPore测序后的数据进行过滤,得到有效数据,使用UniCycler软件(<https://github.com/rrwick/Unicycler>)采用二代+三代数据进行基因组组装,筛分染色体与质粒序列,并将染色体序列组装成为一个环状基因组,即最终的0 gap完成图序列。将组装的质粒序列与质粒数

据库进行比对。使用GeneMarkS (V4.17)软件(<http://topaz.gatech.edu/GeneMark/>)对新测序的基因组进行编码基因预测。采用IslandPath-DIOMB软件(V0.2)预测基因岛,采用细菌致病菌毒力因子(Virulence Factors of Pathogenic Bacteria, VFDB)数据库对毒力基因进行比对注释,采用耐药基因数据库(antibiotic resistance genes database, ARDB)和CARD数据库(comprehensive antibiotic research database)对耐药基因比对和注释。

2 结果与分析

2.1 耐药性检测结果

采用琼脂平板稀释法对结肠弯曲菌18JS15S进行7种药物MIC值的测定,根据CLSI标准对其耐药情况进行判定,结果显示,该菌对四环素、克林霉素、阿奇霉素、氟苯尼考和利奈唑胺均耐药,呈现多重耐药,但对环丙沙星和庆大霉素敏感(表1)。

2.2 全基因组测序结果

通过测序组装拼接,筛分染色体与质粒序列,并将染色体序列组装成为一个环状的DNA,其长度为1 436 486 bp,GC含量为31.63%;将组装的质粒序列与质粒数据库进行比对,得到3个长度分别为20 893、26 417和92 445 bp的质粒。基因组DNA注释得到的基因数为1 714个,基因总长度为1 462 098 bp。对基因组非编码RNA(ncRNA)预测得到0个sRNA、9个rRNA(包括3个5S rRNA、3个16S rRNA和3个23S rRNA)和34个tRNA,采用Island Path-DIOMB软件预测菌株基因岛有4个,使用phiSpy软件预测基因组中存在1个前噬菌体;经CRISPRdigger预测未发现菌株具有相关序列。基因组结构预测结果见表2。该菌株在GenBank的序列号为CP115181.1。

表 1 结肠弯曲菌 18JS15S 耐药结果

Table 1 Drug resistance results of *Campylobacter coli* 18JS15S

抗生素分类	抗生素名称	最低抑菌浓度	临界值	结果
Type of the antibiotic	Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC breakpoint ($\mu\text{g/mL}$)	Result
喹诺酮类 Quinolone	环丙沙星 Ciprofloxacin	1	≥ 4	S
四环素类 Tetracycline	四环素 Tetracycline	>128	≥ 16	R
林可酰胺类 Lincosamide	克林霉素 Clindamycin	>128	≥ 8	R
大环内酯类 Macrolide	阿奇霉素 Azithromycin	>128	≥ 8	R
酰胺醇类 Amphenicols	氟苯尼考 Florfenicol	64	≥ 8	R
恶唑烷酮类 Oxazolidinone	利奈唑胺 Linazolidamide	64	≥ 8	R
氨基糖苷类 Aminoglycoside	庆大霉素 Gentamicin	4	≥ 16	S

R 为耐药; S 为敏感

R indicates drug resistance; S indicates drug sensitive.

2.3 毒力基因分析结果

采用 VFDB 数据库对结肠弯曲菌 18JS15S 全基因组进行比对, 设置 identity 阈值为 80%, 发现结肠弯曲菌 18JS15S 共携带 83 个相关毒力基因, 主要包括与运动、黏附、荚膜多糖合成、脂寡糖(lipooligosaccharide, LOS)合成、侵袭力以及毒素合成相关的基因, 具体基因分布见表 3 和图 1。

表 2 结肠弯曲菌 18JS15S 基因组序列基本信息

Table 2 Basic Information of genome sequence of *Campylobacter coli* 18JS15S

类型	数量	长度
Type	Quantity	Length (bp)
序列 Sequence		1 436 486
GC 含量 GC content	31.63%	
编码基因数量和总长度 Number and total length of coding genes	1 714	1 462 098
5S rRNA	3	345
16S rRNA	3	4 503
23S rRNA	3	8 864
tRNA	34	2 688
sRNA	0	0
基因岛 Genomic island	4	41 511
CRISPR	0	0
前噬菌体 Prophage	1	98 126

2.4 耐药基因分析结果

结肠弯曲菌经全基因组测序检测, 利用 CARD 数据库和 ARDB 数据库进行注释, 共发现 12 种耐药基因(表 4)。主要涉及氨基糖苷类、四环素类、酰胺醇类和林可霉素类等耐药基因, 以氨基糖苷类耐药基因(*ant(6)-Ib*、*ant(9)-Ia*、*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*、*sat4*、*aad6* 和 *aph(3')-IIIa*)最多, 其次是四环素类耐药基因(*tetO*、*tetA* 和 *tet44*), 发现同时携带恶唑烷酮类/酰胺醇类 *optrA* 和 *cfrC* 耐药基因, 所有抗性基因均定位于染色体基因组上。同时检测到 23S rRNA 2075A>G 的点突变, 未检测到 *rpsL* 和 *gyrA* 点突变。

2.5 *optrA* 和 *cfrC* 基因环境分析结果

将包含 *optrA* 基因的一段长为 10 001 bp 的序列上传到 RAST 网站(<http://rast.nmpdr.org/>)进行基因注释, 再通过 BLAST 进行人工比对, 从而获得 *optrA* 在染色体上的基因环境。分析发现在 *optrA* 上、下游各包含一段 repeat region, 上游 repeat region 包括 3 个 CDS, CDS1 长度为 639 bp, 为 integrase/IS607 family; CDS2 和 CDS3 长度分别为 195 bp 和 1 071 bp, 为 mobile element protein; 下游 repeat region 包含两个 CDS, CDS1 长度为 639 bp, CDS2 长度为 1 293 bp;

表 3 结肠弯曲菌 18JS15S 毒力基因分析结果

Table 3 Virulence analysis of *Campylobacter coli* 18JS15S

毒力因子 Virulence factor	相关基因 Related gene	一致性 Identity (%)	毒力因子 Virulence factor	相关基因 Related gene	一致性 Identity (%)
黏附 Cell adhesion			移动 Motility		
纤连结合蛋白	<i>cadF</i>	82.6	趋化 Chemotaxis	<i>motA</i>	98.4
Outer membrane					
fibronectin-binding protein					
黏附蛋白 PEB1/CBF1	<i>pebA</i>	84.9		<i>cheW</i>	96.0
Adhesion protein PEB1/CBF1	<i>cj0596</i>	86.8		<i>cheY</i>	93.3
荚膜多糖 Capsule biosynthesis	<i>kpsS</i>	88.3		<i>cheA</i>	93.4
	<i>gmhA2</i>	88.0		<i>cheV</i>	95.6
	<i>wcbK</i>	93.6	鞭毛 Flagella	<i>fliW</i>	96.9
	<i>cjj81176_1424</i>	84.5		<i>fliR</i>	89.4
	<i>kpsF</i>	90.5		<i>flaB</i>	90.8
	<i>kpsD</i>	82.7		<i>flaA</i>	89.6
	<i>kpsT</i>	90.9		<i>fliL</i>	95.5
脂寡糖	<i>waaC</i>	82.2		<i>flgI</i>	94.3
Lipooligosaccharide (LOS)	<i>cjj81176-1152</i>	81.7		<i>flgJ</i>	88.5
	<i>waaF</i>	94.4		<i>flgM</i>	87.7
	<i>waaV</i>	92.2		<i>flgK</i>	94.9
	<i>gmhA-1</i>	97.3		<i>flhF</i>	87.5
	<i>hldE</i>	94.1		<i>flhG</i>	96.2
	<i>hldD</i>	93.4		<i>fliA</i>	91.7
	<i>gmhB</i>	83.6		<i>fliM</i>	98.1
侵袭 Invasion				<i>fliY</i>	85.4
侵袭抗原 C Invasion antigen C	<i>ciaC</i>	81.8		<i>flgE</i>	95.6
细胞毒性 Cytotoxins				<i>flgD</i>	91.3
细胞致死性膨胀毒素	<i>cdtB</i>	100		<i>cjj81176-1152</i>	81.7
Cytotoxic distending toxin					
	<i>cdtA</i>	100		<i>flgE2</i>	83.6
糖基化蛋白 Protein glycosylation				<i>fliQ</i>	95.5
N-糖基化蛋白	<i>pglF</i>	84.7		<i>fliI</i>	97.3
N-link protein glycosylation	<i>pglE</i>	89.6		<i>fliF</i>	95.2
	<i>pglD</i>	86.7		<i>fliG</i>	99.4
	<i>pglC</i>	96.5		<i>flhB</i>	92.0
	<i>pglA</i>	82.7		<i>fliN</i>	94.1
	<i>pglB</i>	81.5		<i>fliE</i>	89.9
	<i>pglJ</i>	89.6		<i>flgC</i>	99.4
	<i>pglI</i>	85.8		<i>flgB</i>	98.6
	<i>pglH</i>	83.5		<i>flaG</i>	82.1
O-糖基化蛋白	<i>pseC</i>	98.1		<i>fliS</i>	96.1
O-link protein glycosylation	<i>pseB</i>	97.3		<i>flgH</i>	94.4
	<i>pseF</i>	97.0		<i>flgG2</i>	93.3
	<i>pseG</i>	96.4		<i>flgG</i>	97.3
	<i>pseH</i>	95.4		<i>flaC</i>	95.2
	<i>pseA</i>	98.4		<i>rpoN</i>	87.3
	<i>pseI</i>	96.2		<i>cjj81176_0079</i>	91.7
	<i>pseD</i>	96.8		<i>cj0371</i>	94.5
	<i>pseE</i>	91.5	其他 Others		
	<i>maf3</i>	98.2	血红素直接提取系统	<i>chuB</i>	88.1
	<i>maf7</i>	94.0	Direct extraction system for heme	<i>chuC</i>	82.9

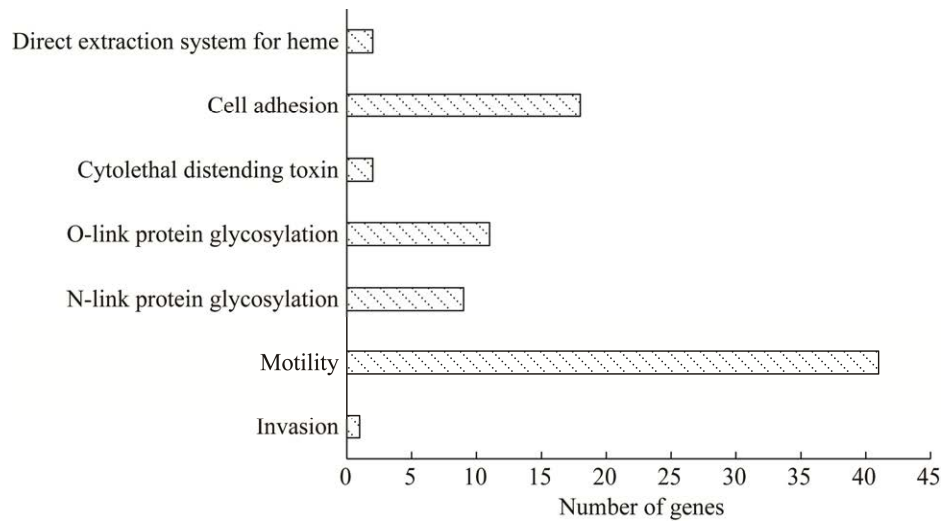


图 1 结肠弯曲菌 18JS15S 毒力基因分类分布图

Figure 1 Types and distribution of virulence factors of *Campylobacter coli* 18JS15S.

表 4 结肠弯曲菌 18JS15S 耐药基因分析结果

Table 4 Analysis results of drug resistance genes in *Campylobacter coli* 18JS15S

耐药基因 Resistance gene	位置 Location	基因位点 Gene site	耐药表型 Antibiotic resistance phenotype
<i>ant(6)-Ib</i>	染色体 Chromosome	252 428–253 294	氨基糖苷类耐药 Aminoglycoside resistance
<i>ant(9)-Ia</i>	染色体 Chromosome	254 215–254 994	氨基糖苷类耐药 Aminoglycoside resistance
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	染色体 Chromosome	592 811–594 250	氨基糖苷类耐药 Aminoglycoside resistance
<i>sat4</i>	染色体 Chromosome	591 305–591 835	氨基糖苷类耐药 Aminoglycoside resistance
<i>aad6</i>	染色体 Chromosome	591 844–592 545	氨基糖苷类耐药 Aminoglycoside resistance
<i>aph(3')-IIIa</i>	染色体 Chromosome	258 821–259 615	氨基糖苷类耐药 Aminoglycoside resistance
<i>tetO</i>	染色体 Chromosome	250 783–251 823	四环素类耐药 Tetracycline resistance
<i>tetA</i>	染色体 Chromosome	1 330 637–1 331 365	四环素类耐药 Tetracycline resistance
<i>tet44</i>	染色体 Chromosome	597 058–598 977	四环素类耐药 Tetracycline resistance
<i>lnuC</i>	染色体 Chromosome	594 881–595 375	林可霉素类耐药 Lincosamide resistance
<i>cfrC</i>	染色体 Chromosome	257 632–258 771	酰胺醇类耐药 Amino alcohol resistance
<i>optrA</i>	染色体 Chromosome	33 013–34 926	酰胺醇类耐药 Amino alcohol resistance

CDS1 为 integrase/IS607 family, CDS2 为 transposase, 并与序列号 MT780493、MT780491 和 MT780492 的 ISChh1-like 的插入序列进行了比对(图 2)。Integrase-mobile element-*optrA*-integrase-transposase 整合在 2 个 NAD(P)H nitroreductase/dihydropteridine 之间。然而 *cfrC* 则与 *tetO*、*ant(6)-Ib*、*ant(9)-Ia* 和 *aph(3')-IIIa* 等耐药基因在基因岛 GIs002 中, 在基因岛下游存在 transposase (图 3), 该基因岛长度为 10 851 bp, 其 GC 含量为 40.16%,

高于结肠弯曲菌基因组的 GC 含量。基因岛 GIs003 包含 *sat4*、*aad6*、*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*、*lnuC* 和 *tet44* 耐药基因, 其长度为 15 128 bp, GC 含量为 33.57% (图 4)。

3 讨论与结论

本研究对结肠弯曲菌 18JS15S 的药敏测定结果显示, 该菌对四环素、克林霉素、阿奇霉素、氟苯尼考和利奈唑胺均耐药, 呈现多重耐

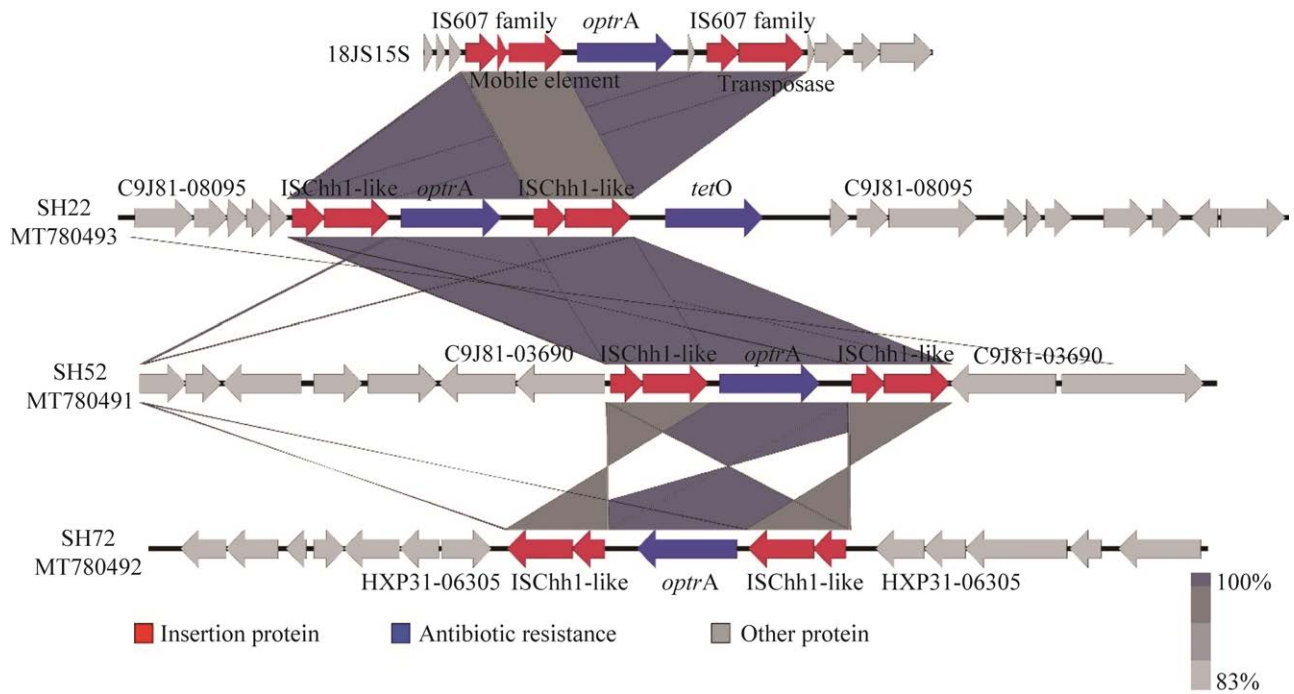


图 2 结肠弯曲菌 18JS15S 中 *optrA* 基因环境分析

Figure 2 Genetic environment of the *optrA* gene in *Campylobacter coli* 18JS15S.

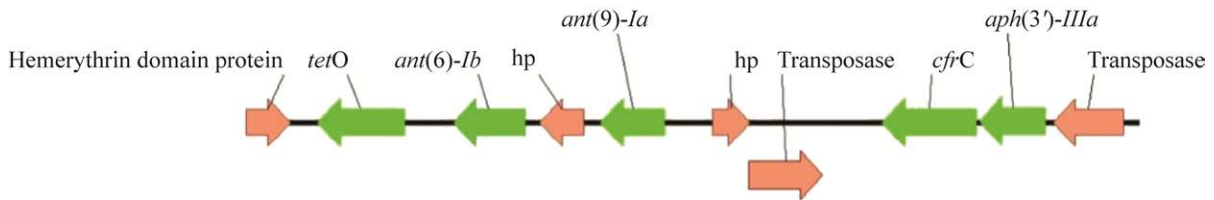


图 3 结肠弯曲菌 18JS15S 中 *cfrC* 基因环境分析

Figure 3 Genetic environment of the *cfrC* gene in *Campylobacter coli* 18JS15S.

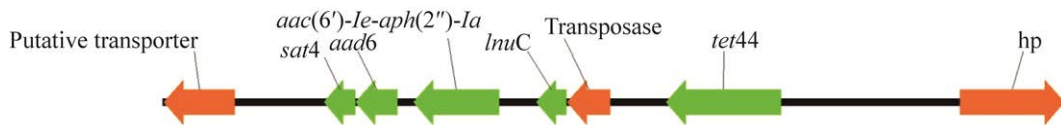


图 4 结肠弯曲菌 18JS15S 中 GI5003 示意图

Figure 4 Schematic diagram of GI5003 in *Campylobacter coli* 18JS15S.

药, 且 MIC 值 ≥ 8 倍临界值, 呈现高水平耐药。通过全基因组测序, 发现该菌株携带多种耐药基因, 尤其是氨基糖苷类耐药基因较丰富, 包括氨基糖苷磷酸转移酶(aminoglycoside phosphotransferase,

APH)、氨基糖苷核苷转移酶(aminoglycoside nucleotidyltransferases, ANT)和氨基糖苷乙酰转移酶(aminoglycoside acetyltransferases, AAC)基因^[26]。Aph(3')钝化酶主要介导卡那霉素和新霉

素的耐药^[27], *aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia* 具有编码磷酸转移酶和乙酰基转移酶双功能活性^[28], 携带该基因的弯曲菌对庆大霉素、卡那霉素、妥布霉素、阿米卡星和链霉素耐药, 而在本研究中该菌对庆大霉素敏感, 其耐药基因型和表型并不呈现一致性, 在本菌中发现该基因与 *sat4*、*aad6*、*lunC* 和 *tet44* 等多种基因组成耐药基因岛, 定位于染色体上。介导链霉素的 *sat4* 基因一般与 *aadE*、*aphA-3* 组成基因簇 *aadE-sat4-aphA-3*, 但在该菌株中未发现该耐药基因簇。已被证实弯曲菌对四环素耐药主要由 *tetO* 介导, 该菌株不仅有 *tetO* 耐药基因, 同时还发现 *tetA* 和 *tet44* 共同介导四环素的耐药^[29-30]。研究发现 *lunC* 耐药基因与林可霉素耐药具有相关性, 克林霉素耐药主要与 23S rRNA (2075A>G) 突变以及 *cfrC* 基因有关, 同时在本菌中还发现了恶唑烷酮类耐药基因/酰胺醇类耐药基因 *optrA*^[31]。因此, 耐药基因 *tetO*、*tetA*、*tet44*、*cfrC*、*optrA* 和 23S rRNA (2075A>G) 的存在与四环素、克林霉素、氟苯尼考、利奈唑胺和阿奇霉素高水平耐药具有相关性。

本研究对 *cfrC* 和 *optrA* 的基因环境进行了分析。基因 *cfrC* 可由染色体和质粒介导, 通过质粒、插入序列和转座子等方式进行传播。Tang 等^[19]在猪源结肠弯曲菌中发现 *cfrC* 可以定位在质粒上, 也可以定位在基因组染色体上, 主要由插入序列 IS607*、IS1380-like、ISCco7 等介导传播。本研究发现 *cfrC* 基因与 *tetO*、*aadE*、*ant(9)-Ia* 和 *aph(3′)-IIIa* 共同定位于染色体的一个基因岛上, 在其上游有一个转座子介导传播, 该基因岛 GC 含量为 40.16%, 高于结肠弯曲菌的 GC 含量, 推测其来源于其他 GC 含量较高的菌株。Wang 等^[32]研究发现结肠弯曲中耐药基因岛的流行率高于空肠弯曲菌, Pearson 等^[33]分析其原因主要是结肠弯曲菌缺乏 *cas9* 和

CRIPR-repeat, 容易从其他菌中获得耐药基因。Liu 等^[22]首次在结肠弯曲菌中检测发现了基因 *optrA*, 且其与 *fexA*、*catA9*、*tetO*、*tetL*、*ermA-like*、*spc* 和 *aadE* 等耐药基因定位在基因组的基因岛上, 插入序列 IS1216E 在弯曲菌 *optrA* 水平转移中起重要作用。Tang 等^[23]在猪源结肠弯曲菌中检测到基因 *optrA*, 在其上、下游具有插入序列 ISChh1-like 移动元件, 该插入序列有 2 个 ORF (TnpA 和 TnpB), TnpB 具有转座子的功能, TnpA 为附属蛋白。本研究中基因 *optrA* 定位于染色体上, 在其上、下游均有插入序列, 上、下游的重复序列相似性为 97.5%, 上游重复序列被 RAST 注释了 3 个 CDS, 而下游被注释了 2 个 CDS, 将下游的 CDS 与 ISChh1-like 序列进行比对, CDS1 与 TnpA 的相似性为 98.5%, CDS2 与 ISChh1-like 的 TnpB 相似性为 97.9%, 且 CDS1 与 CDS2 之间有 16 个核苷酸重叠, 而 ISChh1-likeTnpA 和 TnpB 之间有 17 个核苷酸重叠, 插入序列是染色体特殊组成部分, 可携带耐药基因转移。尽管恶唑烷酮类和氟苯尼考不常用于弯曲菌感染的治疗, 但氟苯尼考在猪、鸡和牛等食源性动物生产上广泛应用, 在药物的共同选择压力下, 有可能会促进含有大环内酯类、氟喹诺酮类以及氨基糖苷类多重耐药基因的基因岛广泛流行, 从而影响临床弯曲菌感染的治疗。

研究表明结肠弯曲菌具有与运动、细胞黏附、定殖、毒素等相关的毒力基因^[34]。弯曲菌首先通过鞭毛黏附并侵入宿主肠道上皮细胞, 进而释放毒素从而使宿主致病^[35]。Cantero 等^[36]发现在弯曲菌中有 34 种与运动性、趋化性、黏附性和侵袭性相关毒力相关基因; 梁昊^[37]研究发现结肠弯曲菌和空肠弯曲菌有 38 个完整的鞭毛合成相关基因, 且在目前发现的毒力相关基因致病性上基本无差异。本研究的试验菌株

结肠弯曲菌 18JS15S 株一致性大于 80% 有 83 个毒力因子得到注释, 其中有 36 个与鞭毛合成基因相关, 占毒力基因的 43.37%, 有 *cdtA* 和 *cdtB* 两个毒素基因, *cadF* 和 *pebA* 两个黏附基因, 1 个侵袭相关基因 *ciaC*, 说明该菌株具有黏附、侵袭、细胞毒和运动性。Karlyshev 等和 Richards 等^[38-39]研究发现弯曲菌毒力变化较大的区域主要位于与致病性高度相关的 CPS 和 LOS 区域。脂寡糖是弯曲菌重要的毒力因子, 由一簇 LOS 生物合成基因合成。LOS 核心生物合成基因簇以基因 *waaC* 和 *waaF* 作为起始和终止基因, 期间的基因序列为 LOS 的核心区域, 变异较小, 在本实验的菌株中具有 8 个 LOS 合成相关的基因, 其中包含 *waaC*、*waaF* 和 *waaV*。在 LOS 基因簇中 *neu* 基因群和 *cst-II* 是合成唾液酸的相关基因, 是格林巴利综合征重要的毒力因子^[40], 在本试验菌株中并未发现相关基因。梁昊^[37]分析发现在结肠弯曲菌中该类基因分布很少, 目前也未见报道该疾病的发生与结肠弯曲菌有关。

综上所述, 本研究通过全基因组测序对江苏省某生猪养殖场粪便中分离的一株结肠弯曲菌进行了分析, 该菌株对环丙沙星、四环素、克林霉素、阿奇霉素、氟苯尼考和利奈唑胺呈现高水平耐药, 携带多种耐药基因, 且同时携带 *cfrC* 和 *optrA*, 耐药形势严峻, 携带多种毒力基因。该研究结果为结肠弯曲菌毒力因子和耐药基因研究提供了依据, 为动物源细菌耐药性监测提供了参考。

REFERENCES

- [1] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012[J]. EFSA Journal, 2014, 12(2): 3547.
- [2] MAN SM. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2011, 8(12): 669-685.
- [3] GILLESPIE IA, O'BRIEN SJ, FROST JA, ADAK GK, HORBY P, SWAN AV, PAINTER MJ, NEAL KR, COLLABORATORS CSSS. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses[J]. Emerging Infectious Diseases, 2002, 8(9): 937-942.
- [4] TAM CC, O'BRIEN SJ, ADAK GK, MEAKINS SM, FROST JA. *Campylobacter coli*-an important foodborne pathogen[J]. The Journal of Infection, 2003, 47(1): 28-32.
- [5] HERMANS D, PASMANS F, MESSENS W, MARTEL A, van IMMERSEEL F, RASSCHAERT G, HEYNDRIKX M, van DEUN K, HAESBROUCK F. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*[J]. Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N Y), 2012, 12(2): 89-98.
- [6] GROVE-WHITE DH, LEATHERBARROW AH, CRIPPS PJ, DIGGLE PJ, FRENCH NP. Temporal and farm-management-associated variation in the faecal-pat prevalence of *Campylobacter jejuni* in ruminants[J]. Epidemiology and Infection, 2010, 138(4): 549-558.
- [7] KEMPF I, KEROUANTON A, BOUGEARD S, NAGARD B, ROSE V, MOURAND G, OSTERBERG J, DENIS M, BENGTTSSON BO. *Campylobacter coli* in organic and conventional pig production in France and Sweden: prevalence and antimicrobial resistance[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 955.
- [8] MATARAGAS M, SKANDAMIS PN, DROSINOS EH. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126(1/2): 1-12.
- [9] Di DONATO G, MAROTTA F, NUVOLONI R, ZILLI K, NERI D, Di SABATINO D, CALISTRI P, Di GIANNATALE E. Prevalence, population diversity and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated in Italian swine at slaughterhouse[J]. Microorganisms, 2020, 8(2): 222.
- [10] RIEDEL C, FÖRSTNER KU, PÜNING C, ALTER T, SHARMA CM, GÖLZ G. Differences in the transcriptomic response of *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* to heat stress[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 523.
- [11] NIEDERER L, KUHNERT P, EGGER R, BÜTTNER S, HÄCHLER H, KORCZAK BM. Genotypes and antibiotic resistances of *Campylobacter jejuni* and

- Campylobacter coli* isolates from domestic and travel-associated human cases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(1): 288-291.
- [12] KAAKOUSH NO, CASTAÑO-RODRÍGUEZ N, MITCHELL HM, MAN SM. Global epidemiology of *Campylobacter* infection[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2015, 28(3): 687-720.
- [13] O'KANE PM, CONNERTON IF. Characterisation of aerotolerant forms of a robust chicken colonizing *Campylobacter coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 513.
- [14] LIU HB, WANG Y, WU CM, SCHWARZ S, SHEN ZQ, JEON B, DING SY, ZHANG QJ, SHEN JZ. A novel phenicol exporter gene, *fexB*, found in enterococci of animal origin[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(2): 322-325.
- [15] KEHRENBERG C, SCHWARZ S. *FexA*, a novel *Staphylococcus lentus* gene encoding resistance to florfenicol and chloramphenicol[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(2): 615-618.
- [16] FAN R, FEßLER AT, WU C, SCHWARZ S, WANG Y. Distribution of *optrA* and *cfr* in florfenicol-resistant *Staphylococcus sciuri* of pig origin[J]. Veterinary Microbiology, 2017, 210: 43-48.
- [17] ANTONELLI A, D'ANDREA MM, BRENCIANI A, GALEOTTI CL, MORRONI G, POLLINI S, VARALDO PE, ROSSOLINI GM. Characterization of *poxTA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2018, 73(7): 1763-1769.
- [18] TANG YZ, DAI L, SAHIN O, WU ZW, LIU MY, ZHANG QJ. Emergence of a plasmid-borne multidrug resistance gene *cfr(C)* in foodborne pathogen *Campylobacter*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72(6): 1581-1588.
- [19] TANG YZ, LAI Y, YANG XT, CAO XT, HU YW, WANG XY, WANG HN. Genetic environments and related transposable elements of novel *cfr(C)* variants in *Campylobacter coli* isolates of swine origin[J]. Veterinary Microbiology, 2020, 247: 108792.
- [20] YAO H, SHEN ZQ, WANG Y, DENG FR, LIU DJ, NAREN GW, DAI L, SU CC, WANG B, WANG SL, WU CM, YU EW, ZHANG QJ, SHEN JZ. Emergence of a potent multidrug efflux pump variant that enhances *Campylobacter* resistance to multiple antibiotics[J]. mBio, 2016, 7(5): e01543-e01516.
- [21] TANG B, TANG YZ, ZHANG L, LIU X, CHANG J, XIA XD, YANG H, SHEN ZQ. Emergence of *fexA* in mediating resistance to florfenicol in *Campylobacter*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2020, 64(7): e00260-e00220.
- [22] LIU DJ, YANG DW, LIU X, LI X, FEßLER AT, SHEN ZQ, SHEN JZ, SCHWARZ S, WANG Y. Detection of the enterococcal oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Campylobacter coli*[J]. Veterinary Microbiology, 2020, 246: 108731.
- [23] TANG YZ, LAI Y, WANG XY, LEU CW, LI C, KONG LH, WANG YL, WANG HN. Novel insertion sequence IS*Chh1-like* mediating acquisition of *optrA* gene in foodborne pathogen *Campylobacter coli* of swine origin[J]. Veterinary Microbiology, 2020, 252: 108934.
- [24] LONG KS, POEHLSSGAARD J, KEHRENBERG C, SCHWARZ S, VESTER B. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin a antibiotics[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(7): 2500-2505.
- [25] SCHWARZ S, WERCKENTHIN C, KEHRENBERG C. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(9): 2530-2533.
- [26] RAMIREZ MS, TOLMASKY ME. Aminoglycoside modifying enzymes[J]. Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, 2010, 13(6): 151-171.
- [27] JANA S, DEB JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(2): 140-150.
- [28] ZHAO S, MUKHERJEE S, LI C, JONES SB, YOUNG S, McDERMOTT PF. Cloning and expression of novel aminoglycoside phosphotransferase genes from *Campylobacter* and their role in the resistance to six aminoglycosides[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 62(1): e01682-e01617.
- [29] CHOPRA I, ROBERTS M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2001, 65(2): 232-260; second page, table of contents.
- [30] GIBREEL A, TRACZ DM, NONAKA L, NGO TM, CONNELL SR, TAYLOR DE. Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta,

- Canada, from 1999 to 2002, with special reference to *tet(O)*-mediated tetracycline resistance[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(9): 3442-3450.
- [31] LI WJ, JIAO D, KANG J, YU RH, ZHAO WB, XU CY, LI RC, DU XD, YAO H. Emergence of *lnu(C)* variant conferring lincomycin resistance in *Campylobacter coli* of chicken origin[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2023, 388(2): 110098.
- [32] WANG Y, DONG YN, DENG FR, LIU DJ, YAO H, ZHANG QJ, SHEN JZ, LIU ZH, GAO YN, WU CM, SHEN ZQ. Species shift and multidrug resistance of *Campylobacter* from chicken and swine, China, 2008-14[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 71(3): 666-669.
- [33] PEARSON BM, LOUWEN R, van BAARLEN P, van VLIET AHM. Differential distribution of type II CRISPR-cas systems in agricultural and nonagricultural *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolates correlates with lack of shared environments[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2015, 7(9): 2663-2679.
- [34] BOLTON DJ. *Campylobacter* virulence and survival factors[J]. *Food Microbiology*, 2015, 48: 99-108.
- [35] BURNHAM PM, HENDRIXSON DR. *Campylobacter jejuni*: collective components promoting a successful enteric lifestyle[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(9): 551-565.
- [36] CANTERO G, CORREA-FIZ F, RONCO T, STRUBE M, CERDÀ-CUÉLLAR M, PEDERSEN K. Characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* broiler isolates by whole-genome sequencing[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2018, 15(3): 145-152.
- [37] 梁昊. 弯曲菌快速检测及基因组水平遗传特征分析[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心博士学位论文, 2019. LIANG H. Rapid detection of *Campylobacter* and analysis of genetic characteristics at genome level[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2019 (in Chinese).
- [38] KARLYSHEV AV, CHAMPION OL, CHURCHER C, BRISSON JR, JARRELL HC, GILBERT M, BROCHU D, ST MICHAEL F, LI JJ, WAKARCHUK WW, GOODHEAD I, SANDERS M, STEVENS K, WHITE B, PARKHILL J, WREN BW, SZYMANSKI CM. Analysis of *Campylobacter jejuni* capsular loci reveals multiple mechanisms for the generation of structural diversity and the ability to form complex heptoses[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(1): 90-103.
- [39] RICHARDS VP, LEFÉBURE T, PAVINSKI BITAR PD, STANHOPE MJ. Comparative characterization of the virulence gene clusters (lipooligosaccharide [LOS] and capsular polysaccharide [CPS]) for *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and related *Campylobacter* species[J]. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 2013, 14: 200-213.
- [40] PARKER CT, GILBERT M, YUKI N, ENDTZ HP, MANDRELL RE. Characterization of lipooligosaccharide-biosynthetic loci of *Campylobacter jejuni* reveals new lipooligosaccharide classes: evidence of mosaic organizations[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(16): 5681-5689.