

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research一株携带特殊质粒的万古霉素耐药屎肠球菌
基因组特征分析Genomic characterization of a vancomycin – resistant *Enterococcus faecium* strain
carrying a special plasmid

苏 博, 郑 波

(北京大学 第一医院 临床药理研究所, 北京
100034)

SU Bo, ZHENG Bo

(Institute of Clinical Pharmacology,
Peking University First Hospital, Beijing
100034, China)作者简介: 苏博(1999 –), 男, 硕士研究生, 主
要从事细菌耐药机制研究

通信作者: 郑波, 主任医师, 博士生导师

Tel: (010) 82802542

E – mail: doctorzhengbo@163. com

摘要:目的 测序一株万古霉素耐药屎肠球菌, 对其质粒上携带的 *vanM* 基因簇和营养利用优势基因进行分析。方法 用微量肉汤稀释法对菌株 15P371 和其接合子 J15P371 进行药敏试验, 用 Nanopore 法对 2 株菌进行全基因组测序, 分析耐药质粒序列, 用细菌生长试验法验证肠道营养利用优势。结果 菌株 15P371 为万古霉素耐药菌株, 携带 6 个 *vanM* 基因簇拷贝, 其接合子 J15P371 能耐受更高浓度的万古霉素, 但只携带 3 个 *vanM* 基因簇拷贝。耐药质粒上存在肠道 *N* – 乙酰半乳糖胺利用优势基因。结论 *vanM* 型万古霉素耐药菌株中, 耐药基因拷贝数在接合转移过程中可变。携带 *N* – 乙酰半乳糖胺利用优势基因的质粒, 会赋予宿主菌生长优势。

关键词: 万古霉素; 屎肠球菌; *vanM* 基因簇; *N* – 乙酰半乳糖胺利用基因**DOI:** 10. 13699/j. cnki. 1001 – 6821. 2025. 18. 011**中图分类号:** R978. 1**文献标志码:** A**文章编号:** 1001 – 6821 (2025) 18 – 2635 – 04

Abstract: Objective To sequence a vancomycin – resistant *Enterococcus faecium* and analyze the *vanM* gene cluster carried on its plasmid as well as the genes conferring advantage in nutrient utilization.

Method The broth microdilution method was used to perform drug susceptibility tests on strain 15P371 and its transconjugant J15P371.

Subsequently, whole – genome sequencing was conducted using Nanopore technology for both strains, followed by analysis of the resistant plasmid sequences. Bacterial growth experiments were carried out to verify the advantage in intestinal nutrient utilization.

Results Strain 15P371 is a vancomycin – resistant strain carrying 6 copies of the *vanM* gene cluster. Its transconjugant J15P371 can tolerate a higher concentration of vancomycin but only harbors 3 copies of the *vanM* gene cluster. Genes conferring advantage in intestinal *N* – acetylgalactosamine utilization are present on the resistant plasmid.

Conclusion In *vanM* – type vancomycin – resistant strain, the copy number of resistance genes is variable during conjugative transfer. The plasmid carrying genes with advantage in *N* – acetylgalactosamine utilization confer growth advantage to the host bacteria.

Key words: vancomycin; *Enterococcus faecium*; *vanM* gene cluster; *N* – acetylgalactosamine utilization genes

肠球菌是一类革兰氏阳性球菌,以成对或短链状排列,是人体肠道的正常菌群之一^[1]。肠球菌容易在免疫功能低下或接受侵入性操作(如手术、导管插入)的人群中引发感染,万古霉素可以有效治疗肠球菌感染^[2]。1986年至1988年,英国、美国等西方国家相继出现万古霉素耐药肠球菌感染,致使肠球菌感染的治疗更加棘手^[1]。2007年,我国首次在分子层面解析了一株 *vanA* 型万古霉素耐药屎肠球菌^[3]。通过对万古霉素耐药肠球菌耐药基因簇的分析,我国主要流行的是 *vanA* 和 *vanM* 基因簇^[4]。携带单拷贝 *vanM* 基因簇的菌株常常为万古霉素敏感菌株,而 *vanM* 基因簇的串联扩增容易导致万古霉素耐药^[5]。对比敏感菌株和耐药菌株发现,*vanM* 基因簇拷贝数的增加介导高水平耐药,但耐药菌株中 *vanM* 基因簇的拷贝数是可变的^[4]。除治疗肠球菌感染患者外,监测万古霉素耐药肠球菌在患者肠道中的定植也至关重要^[6]。2022年,瑞士报道了一株携带线性质粒的屎肠球菌,该质粒上不携带耐药基因,但存在营养利用优势基因,该基因可赋予宿主菌肠道 *N*-乙酰半乳糖胺(*N*-acetylgalactosamine, GalNAc)利用优势,帮助肠球菌在肠道环境中定植^[7]。目前尚无同时携带 *vanM* 基因簇和 GalNAc 利用基因的质粒特征报道。由于耐药基因和营养利用优势基因都可以发生水平转移,因此必须定期监测肠球菌的定植和感染^[4-7]。

材料与方法

1 材料

菌株 屎肠球菌 15P371,分离自2016年某医院重症监护室一名成年男性患者的脑脊液标本。药敏试验标准质控菌株:粪肠球菌 ATCC 29212。细菌接合试验受体菌株:粪肠球菌 FA2-2。

药品与试剂 万古霉素,规格:每支150 mg,批号:130360-202103、替考拉宁,规格:每支100 mg,批号:130374-202103、利福平,规格:每支100 mg,批号:130496-201403,均购自中国食品药品研究院;夫西地酸,规格:每支100 mg,批号:B23530,购自上海源叶生物科技有限公司;脑心浸液(brain heart infusion, BHI)肉汤培养基、琼脂干粉,均购自英国 OXOID 公司;溶菌肉汤(lysogeny broth, LB)培养基、*N*-乙酰半乳糖胺,均购自北京兰博利德商贸有限公司。

仪器 Microflex LRF 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪,德国 Bruker 公司产品;X1R 高速冷冻离心机,美国 Thermo fisher scientific 公司产品;ND-100超

微量紫外分光光度计,美国 NanoDrop 公司产品。

2 试验方法

2.1 细菌鉴定与药敏试验

用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪鉴定菌株 15P371。根据美国临床实验室标准化委员会^[8]推荐,使用微量肉汤稀释法分别测定供体菌株 15P371、接合菌株 J15P371 和受体菌株 FA2-2 的万古霉素和替考拉宁最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。

2.2 细菌接合试验

以菌株 15P371 作为供体菌,无质粒且对利福平及夫西地酸耐药的菌株 FA2-2 作为受体菌^[3]。将供体菌和受体菌单个菌落分别接种于 BHI 肉汤培养基中,37℃ 孵育过夜,之后按照 1:10(供体菌:受体菌)混匀后,37℃ 孵育 4 h,取菌液 100 μL 分别均匀涂布于选择培养基上(供体菌用含 6 μg·mL⁻¹ 的万古霉素 BHI 琼脂培养基;接合菌用含 6 μg·mL⁻¹ 万古霉素、50 μg·mL⁻¹ 利福平和 50 μg·mL⁻¹ 夫西地酸的 BHI 琼脂培养基),37℃ 孵育 48 h,观察菌落生长情况,使用 J15P371 接合菌数与 15P371 供体菌数的比值计算接合频率^[3-5]。

2.3 细菌全基因组测序、组装和注释

将菌株 15P371 和接合菌株 J15P371 接种于 BHI 肉汤培养基中,37℃ 孵育过夜,用高速冷冻离心机离心获取菌株沉淀,由赛默百合生物科技有限公司进行全基因组测序。提取菌株的基因组脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA),用 Nanopore 平台对菌株进行长读长测序、Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行二代短序列测序。通过短序列匹配长序列的方式进行数据过滤后,使用层次基因组组装进程(hierarchical genome-assembly process, HGAP)组装测序片段^[9]。用 Prokka v1.14.5 注释基因组^[10]。

2.4 测序结果比对分析

将菌株 15P371 和接合菌株 J15P371 中耐药质粒的测序信息上传至美国国家生物信息中心网站(National Center for Biotechnology Information, NCBI)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>),用 blastn 程序进行序列相似性分析。用 BRIG 0.95(<https://sourceforge.net/projects/brig/>)对耐药质粒序列比对的结果进行可视化^[11],并标注关键基因。

2.5 细菌生长试验

为验证耐药质粒上携带的营养利用优势基因对 GalNAc 的利用优势,分别将菌株 15P371、接合菌株 J15P371 和受体菌株 FA2-2 接种于 LB 培养基中,在实

验组 LB 培养基中添加 0.1% 的 GalNAc,对照组中不添加,37 ℃培养,每隔 12 h 用超微量紫外分光光度计测量菌液 600 nm 的吸光度(optical density, OD),记录数据^[7]。

结 果

1 药敏试验和接合试验结果

经基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪鉴定,菌株 15P371 为屎肠球菌。受体菌为粪肠球菌 FA2-2 时,接合频率达到 1.07×10^{-2} 。菌株 15P371 万古霉素耐药,替考拉宁敏感。当耐药质粒接合转移到万古霉素和替考拉宁都敏感的受体菌 FA2-2 中,其接合菌株 J15P371 对万古霉素和替考拉宁的耐药性都增强。药物敏感性结果见表 1。

2 耐药质粒环形图谱分析

菌株 15P371 中的耐药质粒序列全长为 159 323 碱基对(base pair,bp),而接合菌株 J15P371 中的耐药质粒序列全长为 133 213 bp。耐药质粒接合转移到受体菌后,比对转移前后两个耐药质粒,其序列基本一致。菌株 15P371 中耐药质粒上携带 6 个拷贝的 *vanM* 基因簇,而接合菌株 J15P371 中耐药质粒上只携带 3 个拷贝的 *vanM* 基因簇,转移后缺失的 26 110 bp 片段中包含 3 个 *vanM* 基因簇拷贝。这些 *vanM* 基因簇均由“IS1216E-*vanR*-*vanS*-*vanY*-*vanH*-*vanM*-*vanX*-IS1216E”组成。同时,该耐药质粒上携带一个“*firR*-*lacC*-*lacD2*-*agaS*-*yvoA*”基因簇,为肠道营养利用优势基因,可水解 GalNAc 为细菌生长提供营养。耐药质粒转移前后测序结果的比对见图 1。

3 细菌生长试验结果

相对于只含有胰蛋白胨、酵母提取物和氯化钠的 LB 培养基,添加 GalNAc 后,携带耐药质粒的菌株 15P371 和 J15P371 生长更快。“*firR*-*lacC*-*lacD2*-

agaS-*yvoA*”基因簇可赋予宿主菌 GalNAc 利用优势,而缺少该基因簇的菌株 FA2-2 则没有表现出明显生长优势。菌株在不同培养基中的生长情况见表 2。

表 1 不同菌株的药物敏感性结果及耐药基因拷贝数

Table 1 Drug susceptibility results and resistance gene copy numbers of different strains

Strains	Vancomycin MIC ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Teicoplanin MIC ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Copy number of the <i>vanM</i> gene cluster
15P371	64 (R)	8 (S)	6
J15P371	256 (R)	16 (I)	3
FA2-2	1 (S)	0.5 (S)	0

MIC: Minimum inhibitory concentration; S: Susceptible; I: Intermediate; R: Resistant.

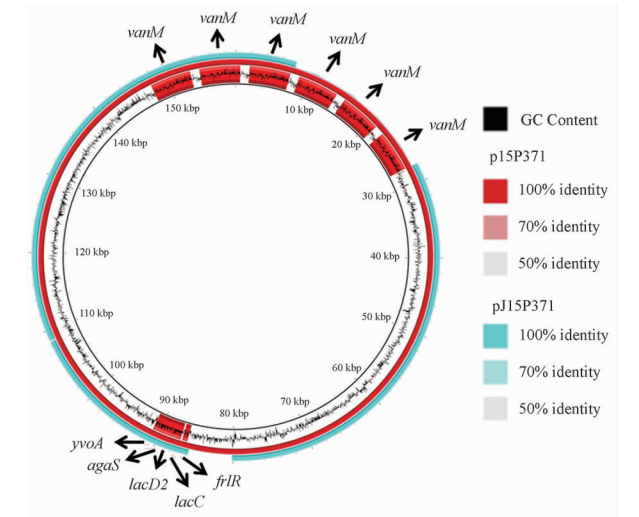


图 1 15P371 供体菌株及接合子中耐药质粒的环形基因组比对

Figure 1 Circular genome alignment of the resistance plasmid in the 15P371 donor strain and transconjugant

表 2 不同菌株在 2 种培养基上的吸光度(OD)600 nm

Table 2 The optical density (OD) of different strains in two mediums

Growth in LB medium			Growth in LB +0.1% GalNAc medium		
Strains	Reach the 12th hour of growth	Reach the 24th hour of growth	Strains	Reach the 12th hour of growth	Reach the 24th hour of growth
15P371	0.12	0.16	15P371	0.39	0.64
J15P371	0.11	0.15	J15P371	0.28	0.45
FA2-2	0.12	0.17	FA2-2	0.11	0.19

讨 论

本研究分析了一株万古霉素耐药屎肠球菌中

耐药质粒序列,该质粒携带 *vanM* 基因簇,且含有肠道 GalNAc 营养利用优势基因。同时,该质粒可水平转移到受体菌中,赋予受体菌耐药特性和营养利

用优势。菌株15P371携带6个拷贝的 *vanM* 基因簇,为万古霉素耐药菌株,其接合菌J15P371虽只携带3个拷贝的 *vanM* 基因簇,但药敏结果显示,接合菌J15P371的万古霉素和替考拉宁MIC相比受体菌FA2-2显著增加。

vanM 型屎肠球菌的万古霉素异质性耐药机制研究表明,敏感菌株中单拷贝 *vanM* 基因簇串联扩增后会出现耐药菌株,因此相比携带单拷贝 *vanM* 基因簇的敏感菌株, *vanM* 基因簇的拷贝数和表达量增加可介导高水平的万古霉素抗性^[4-5]。在耐药菌株中, *vanM* 基因簇的串联扩增是不稳定的,连续传代试验表明,在无抗菌药压力或万古霉素浓度递增时, *vanM* 基因簇拷贝数显著下降,但菌株的生长速率相对增加,提示多 *vanM* 基因簇拷贝数会增加适应性成本^[4]。同样,针对肺炎克雷伯菌头孢地尔异质性耐药机制研究表明,耐药菌株相比敏感菌株,其 *bla*_{SHV-12} 基因的拷贝数和表达量明显增加,耐药菌株中 *bla*_{SHV-12} 基因扩增也具有不稳定性,在头孢地尔浓度递增或无抗菌药压力时,连续传代发现该基因拷贝数显著下降,而菌株生长速率有所提升^[12]。大肠埃希菌基因拷贝数依赖异质性耐药机制研究中,基因拷贝数增加介导高水平耐药,但耐药基因拷贝数增加并不总是与MIC升高相关,在 β -内酰胺酶基因拷贝数增加时,测定厄他培南及头孢他啶-阿维巴坦的MIC会出现平台期^[13]。由于异质性耐药现象在多种细菌中都有报道,因此合理使用抗菌药、及时监测耐药动态至关重要。另外,瑞士报道的屎肠球菌中携带的线性质粒,其营养利用优势基因为“*yvoA* - *agaS* - *lacD2* - *lacC* - *frlR* - *bga* - *levE* - *sorC* - *manZ* - *manX* - *immR* - *pbpX*”,可赋予宿主菌对肠道GalNAc的利用优势^[7]。本研究中耐药质粒上的营养利用优势基因虽仅有其一部分,但核心基因 *agaS* 的存在仍可赋予宿主菌对GalNAc的水解能力。未来仍需继续探究 *vanM* 型屎肠球菌中耐药基因簇拷贝数变化的分子机制,补充体内实验验证营养利用优势基因赋予宿主菌的生长优势。

本研究提示:发现了一株携带特殊质粒的万古霉素耐药屎肠球菌,该质粒携带 *vanM* 基因簇和营养利用优势基因,且质粒转移到受体菌后 *vanM* 基因簇拷贝数可变。由于该质粒水平转移能力强,质粒进入宿主菌后可以赋予菌株耐药和肠道营养利用优势特性。因此,临床环境中需监测万古霉素耐药肠球菌的定植、感染和传播情况,谨防耐药菌的暴发流行。

参考文献:

- [1] GARCIA-SOLACHE M, RICE L B. The *Enterococcus*: A model of adaptability to its environment [J/OL]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32(2): e00058—18. 2019-01-30 [2025-07-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30700430/>.
- [2] WEI Y, ARAYA D P, PALMER K L. *Enterococcus faecium*: Evolution, adaptation, pathogenesis and emerging therapeutics [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2024, 22(11): 705—721.
- [3] ZHENG B, TOMITA H, XIAO Y H, et al. The first molecular analysis of clinical isolates of *VanA*-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains in Mainland China [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2007, 45(3): 307—312.
- [4] SUN L, ZHUANG H, CHEN M, et al. Vancomycin heteroresistance caused by unstable tandem amplifications of the *vanM* gene cluster on linear conjugative plasmids in a clinical? *Enterococcus faecium* [J/OL]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2024, 68(5): e0115923. 2024-05-02 [2025-07-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38506549/>.
- [5] ZHOU Y, YANG Y, DING L, et al. Vancomycin heteroresistance in *vanM*-type *Enterococcus faecium* [J]. *Microb Drug Resist*, 2020, 26(7): 776—782.
- [6] STELLFOX M E, TYNE D V. Last bacteria standing: VREfm persistence in the hospitalized gut [J/OL]. *mBio*, 2022, 13(4): e0067022. 2022-08-30 [2025-07-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35762592/>.
- [7] BOUMASMOUD M, HAUNREITER V D, SCHWEIZER T A, et al. Genomic surveillance of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* reveals spread of a linear plasmid conferring a nutrient utilization advantage [J/OL]. *mBio*, 2022, 13(2): e0377121. 2022-04-26 [2025-07-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35343787/>.
- [8] CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* [M]. 34th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2024: CLSI supplement M100.
- [9] LU H, GIORDANO F, NING Z. Oxford nanopore MinION sequencing and genome assembly [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016, 14(5): 265—279.
- [10] SEEMANN T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068—2069.
- [11] ALIKHAN N F, PETTY N K, BEN ZAKOUR N L, et al. BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons [J/OL]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 402. 2011-08-08 [2025-07-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21824423/>.
- [12] LIU C, YI J, LU M, et al. Dynamic within-host cefiderocol heteroresistance caused by *bla*_{SHV-12} amplification in pandrug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 [J/OL]. *Drug Resist Updat*, 2024, 73: 101038. 2023-12-27 [2025-07-28]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38181587/>.
- [13] NICOLOFF H, HJORT K, ANDERSSON D I, et al. Three concurrent mechanisms generate gene copy number variation and transient antibiotic heteroresistance [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 3981. (收稿日期 2025-07-30)