

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research同时携带 *vanA* 和 *vanM* 耐药基因屎肠球菌
流行现状研究Epidemiological landscape of *Enterococcus faecium* co – harboring both *vanA* and *vanM* resistance genes

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 对2011–2024年收集的2 307株屎肠球菌进行耐药表型和基因型分析。**方法** 用微量肉汤稀释法对菌株进行药敏试验, 后提取菌株基因组, 进行聚合酶链反应(PCR)扩增筛查耐药基因。**结果** 2011–2012年万古霉素耐药屎肠球菌检出率为1.67%, *vanM*基因阳性万古霉素敏感菌株检出率为0.34%, 而2023–2024年万古霉素耐药屎肠球菌检出率增长为5.11%, *vanM*基因阳性万古霉素敏感菌株检出率高达4.75%。2021–2024年检测出22株同时携带*vanA*和*vanM*耐药基因的屎肠球菌。**结论** 屎肠球菌中*vanM*型耐药基因检出率逐年上升, 其水平转移可能加剧近年同时携带*vanA*和*vanM*耐药基因屎肠球菌的流行。

关键词: 万古霉素; 屎肠球菌; *vanA* 基因; *vanM* 基因**DOI:** 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.21.007**中图分类号:** R978 **文献标志码:** A**文章编号:** 1001-6821(2025)21-3038-05

Abstract: Objective To analyze the drug resistance phenotypes and genotypes of 2 307 *Enterococcus faecium* strains collected from 2011 to 2024. **Methods** The antimicrobial susceptibility testing of the strains was performed using the broth microdilution method, followed by genomic DNA extraction from the strains and polymerase chain reaction (PCR) amplification for screening of resistance genes. **Results** From 2011 to 2012, the detection rate of vancomycin – resistant *Enterococcus faecium* was 1.67%, and the detection rate of *vanM* gene – positive vancomycin – susceptible strains was 0.34%. In contrast, from 2023 to 2024, the detection rate of vancomycin – resistant *Enterococcus faecium* increased to 5.11%, while the detection rate of *vanM* gene – positive vancomycin – susceptible strains reached as high as 4.75%. Additionally, 22 *Enterococcus faecium* strains co – harboring both *vanA* and *vanM* resistance genes were identified during the period from 2021 to 2024. **Conclusion** The detection rate of the *vanM* resistance gene in *Enterococcus faecium* has increased year by year, and its horizontal transfer may have contributed to the increased prevalence of *Enterococcus faecium* co – harboring both *vanA* and *vanM* resistance genes in recent years.

Key words: vancomycin; *Enterococcus faecium*; *vanA* gene; *vanM* gene

2024 年世界卫生组织发布细菌重点病原体清单,将万古霉素耐药屎肠球菌列入高优先级类别^[1]。早在 20 世纪 80 年代末,英美等西方国家就报道出万古霉素耐药屎肠球菌感染病例^[2]。万古霉素和替考拉宁均属于糖肽类抗菌药,通过干扰细菌细胞壁肽聚糖中的组分合成发挥抗菌作用。目前,在肠球菌中已发现 9 种获得性糖肽耐药基因(*vanA*、*vanB*、*vanD*、*vanE*、*vanG*、*vanL*、*vanM*、*vanN* 和 *vanP*) 和 1 种固有耐药基因(*vanC*)^[3]。美国发现的万古霉素耐药屎肠球菌主要携带 *vanA* 基因,而澳大利亚的耐药菌株主要携带 *vanB* 基因,欧洲多个国家近些年耐药菌株中基因型有 *vanA* 基因为主,向 *vanB* 基因转变的趋势^[4]。2006 年,中国上海一家医院首次报道携带 *vanM* 基因的万古霉素耐药屎肠球菌^[5]。目前,国内屎肠球菌以 *vanA* 和 *vanM* 基因为主^[6]。2019 年,日本在 1 株万古霉素耐药屎肠球菌中识别出一个线性质粒,该质粒同时携带 *vanA* 和 *vanM* 耐药基因,这是首次糖肽类双耐药基因出现在同一菌株中^[7]。随后,印度和美国监测到屎肠球菌中同时携带 *vanA* 型万古霉素耐药基因和 *optrA* 利奈唑胺耐药基因^[8-9]。国内屎肠球菌对万古霉素和替考拉宁的耐药率相对较低,尚缺乏对耐药菌株表型和基因型的系统性研究^[10]。本研究基于北京大学临床药理研究所收集的大量屎肠球菌,检测菌株糖肽类抗菌药的表型和基因型,分析双基因携带株的耐药表型特征及地域分布,为临床防控提供数据支持。

材料与方法

1 材料

菌株 2011 年至 2024 年从全国 19 座城市 19 家 3 级医院收集屎肠球菌,共计收集到 2 307 株,保藏于北京大学临床药理研究所微生物菌种库。其中,2011 年至 2012 年收集到 299 株,2013 年至 2014 年收集到 343 株,2015 年至 2016 年收集到 348 株,2017 年至 2018 年收集到 357 株,2019 年至 2020 年收集到 347 株,2021 年至 2022 年收集到 280 株,2023 年至 2024 年收集到 333 株。药敏试验标准质控菌株:粪肠球菌 ATCC 29212,购自国家卫生健康委员会临床检验中心。

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;均购自中国食品药品研究院;脑

心浸液(brain heart infusion, BHI)肉汤培养基和琼脂干粉,均购自英国 OXOID 公司;聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)中 2 × Taq PCR MasterMix 和 PCR Marker(100 bp DNA ladder),均购自北京天根生化科技有限公司;GelRed 核酸染料,购自美国 Biotium 公司;PCR 反应体系中引物合成和扩增产物的 Sanger 测序,均由北京诺赛基因组研究中心有限公司提供。

仪器 Epgradient-S PCR 扩增仪,德国 Eppendorf 公司产品;DYY-6C 电泳仪,北京市六一仪器厂产品;Syngene Gene Genius 全自动凝胶成像系统,英国 Syngene 公司产品;GHX-9270B-1 型恒温培养箱,上海福玛实验设备有限公司。

2 实验方法

2.1 细菌鉴定与药敏试验

提取屎肠球菌的基因组脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA),通过 PCR 扩增 16S 核糖体核糖核酸(16S ribosomal ribonucleic acid, 16S rRNA)片段,与美国国家生物技术信息中心数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)中的已知序列比对以复核菌种^[11]。根据美国临床实验室标准化委员会(clinical and laboratory standards institute, CLSI) M100-S35, 2025^[12]推荐,用微量肉汤稀释法测定万古霉素和替考拉宁最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。质控菌株为粪肠球菌 ATCC 29212。

2.2 PCR 检测细菌 *van* 基因型

菌株复苏后,用煮沸法提取细菌基因组 DNA,配制好 PCR 反应体系,用万古霉素耐药基因 *vanA* 和 *vanM* 的特异引物对菌株进行 *van* 基因筛查和鉴定^[13], *vanA* 基因的上游引物为 GGGAAAACGACAAT-TGC、下游引物为 GTACAATGCGGCCGTTA,反应条件:94 °C 预变性 2 min;94 °C 1 min、54 °C 1 min、72 °C 1 min,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,产物大小为 732 bp; *vanM* 基因的上游引物为 CCTATGTAGGCT-GCGATATTCAAAG、下游引物为 TAGTTCTGCGG-GAACGGTTATAGT,反应条件:94 °C 预变性 2 min;98 °C 10 s、52 °C 30 s、72 °C 1 min,共 40 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,产物大小为 500 bp。PCR 扩增完成后,进行琼脂糖凝胶电泳,电泳条件设置为 120 V、40 min。电泳完成后用凝胶成像系统观察、拍照。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行数据整理和分析。用

R4.3.2 软件进行数据可视化。

结 果

1 药敏试验和耐药基因型检测结果

2 307 株屎肠球菌药物敏感性检测显示,14 年间共检测出 63 株万古霉素耐药屎肠球菌。其中,2011 年至 2012 年检测到 5 株耐药菌(5 株/299 株,1.67%),都携带 *vanA* 型耐药基因;2013 年至 2014 年检测到 9 株耐药菌(9 株/343 株,2.62%),全部携带 *vanA* 型耐药基因;2015 年至 2016 年检测到 11 株耐药菌(11 株/348 株,3.16%),8 株携带 *vanA* 型耐药基因,3 株携带 *vanM* 型耐药基因;2017 年至 2018 年检测到 6 株耐药菌(6 株/357 株,1.68%),5 株携带 *vanA* 型耐药基因,1 株携带 *vanM* 型耐药基因;2019 年至 2020 年检测到 7 株耐药菌(7 株/347 株,2.02%),6 株携带 *vanA* 型耐药基因,1 株携带 *vanM* 型耐药基因;2021 年至 2022 年检测到 8 株耐药菌(8 株/280 株,2.86%),6 株同时携带 *vanA* 型和 *vanM* 型耐药基因,2 株仅携带 *vanM* 型耐药基因;2023 年至 2024 年检测到 17 株耐药菌(17 株/333 株,5.11%),16 株同时携带 *vanA* 型和 *vanM* 型耐药基因,1 株仅携带 *vanM* 型耐药基因。2011 年至 2012 年万古霉素耐药屎肠球菌的检出率为 1.67%,而 2023 ~ 2024 年万古霉素耐药屎肠球菌的检出率已高达 5.11%,从 2017 年开始,耐药菌的检出率呈现上升趋势。22 株同时携带 *vanA* 型和 *vanM* 型耐药基因的屎肠球菌属于近年来新增耐药菌,主要分布于北京、吉林、湖南等地。相比仅携带 *vanA* 耐药基因的菌株,同时携带 *vanA* 和 *vanM* 耐药基因的菌株替考拉宁 MIC 更高(替考拉宁 MIC 为 $512 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,双耐药基因携带株

占比更高),而 2 者的万古霉素 MIC 无显著差异。图 1、图 2 和表 1 分别展示了万古霉素耐药屎肠球菌中耐药基因分布、耐药表型与基因型的关联及双基因携带株的菌株信息和药敏结果。

2 万古霉素敏感菌株中 *van* 基因检测结果

对 2 244 株万古霉素敏感屎肠球菌的 *van* 基因检测显示,共检出 57 株携带 *vanM* 耐药基因,未检出 *vanA* 耐药基因。与 *vanM* 基因阴性的万古霉素敏感屎肠球菌相比,*vanM* 基因阳性的万古霉素敏感菌株,其万古霉素和替考拉宁的 MIC 分布特征一致。2011 年至 2012 年万古霉素敏感菌株中 *vanM* 基因的检出率为 0.34%,2023 年至 2024 年检出率已上升到 4.75%,14 年间 *vanM* 基因的检出率在持续上升。图 3 展示了 2011 年至 2024 年万古霉素敏感菌株中 *vanM* 基因的检出率变化趋势。

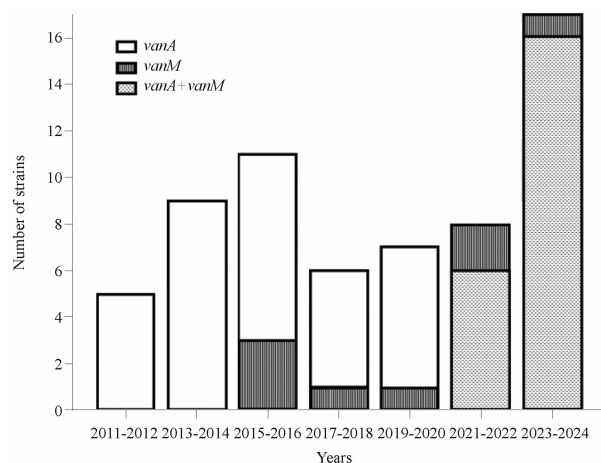


图 1 2011 年至 2024 年万古霉素耐药屎肠球菌中耐药基因分布情况

Figure 1 Prevalence of resistance genes in vancomycin – resistant *Enterococcus faecium* from 2011 to 2024

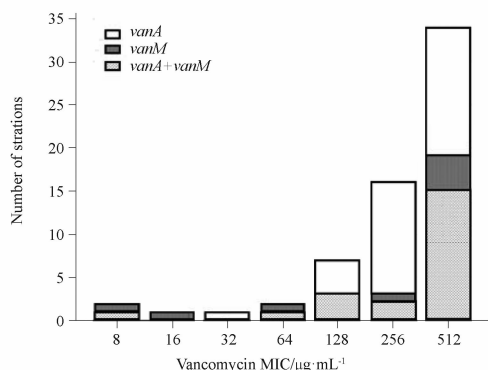


图 2 63 株万古霉素耐药屎肠球菌的万古霉素和替考拉宁最低抑菌浓度分布情况

Figure 2 Distribution of minimum inhibitory concentrations (MICs) of vancomycin and teicoplanin in 63 strains of vancomycin – resistant *Enterococcus faecium*

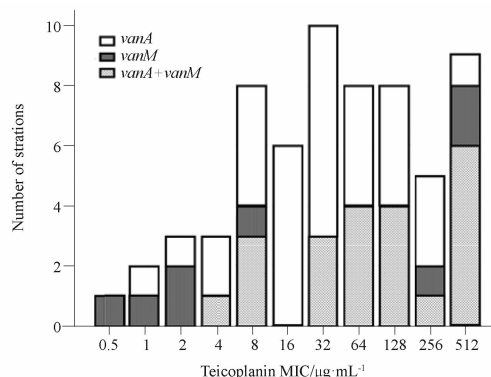


表 1 2021 年至 2024 年检出的 22 株同时携带 *vanA* 和 *vanM* 耐药基因的屎肠球菌菌株信息和药敏结果

Table 1 Information and antimicrobial susceptibility test results of 22 *Enterococcus faecium* strains co – harboring both *vanA* and *vanM* resistance genes detected from 2021 to 2024

Strain	Collection time	Collection region	MIC ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
			Vancomycin	Teicoplanin
1	2021	Beijing	256	64
2	2022	Beijing	512	64
3	2022	Beijing	512	256
4	2024	Beijing	512	512
5	2024	Beijing	512	64
6	2022	Jilin	512	512
7	2023	Jilin	8	8
8	2024	Jilin	128	32
9	2024	Jilin	128	32
10	2024	Jilin	512	32
11	2021	Hunan	512	128
12	2023	Hunan	512	512
13	2023	Hunan	512	512
14	2024	Hunan	512	512
15	2024	Hunan	512	512
16	2023	Guizhou	512	128
17	2024	Guizhou	512	128
18	2023	Shaanxi	64	8
19	2024	Shaanxi	512	4
20	2021	Hebei	256	64
21	2024	Jiangsu	512	128
22	2023	Hubei	128	8

MIC: Minimum inhibitory concentration.

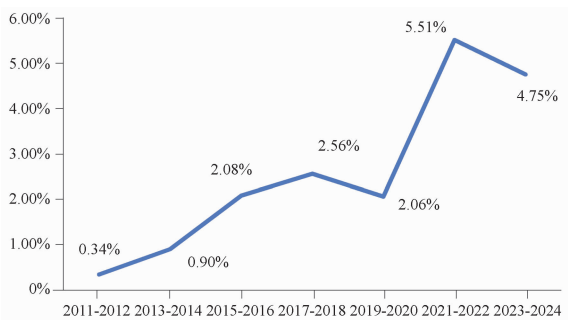


图 3 2011 年至 2024 年万古霉素敏感屎肠球菌中 *vanM* 基因检出率变化趋势

Figure 3 Trend in the detection rate of the *vanM* gene in vancomycin – susceptible *Enterococcus faecium* from 2011 to 2024

讨 论

本研究对 2 307 株屎肠球菌进行糖肽类抗菌药敏

感试验,共检测出 63 株万古霉素耐药菌株,其中22 株同时携带 *vanA* 型和 *vanM* 型耐药基因,这些菌株主要源于北京、吉林、湖南等地。回顾菌株临床信息,这 22 株细菌先后于不同年份、不同地区、不同科室采集,院内传播风险相对较低。相比仅携带单个耐药基因的菌株,同时携带 *vanA* 和 *vanM* 耐药基因的菌株对替考拉宁的耐药水平更高。因此需要重点关注北京、吉林、湖南等地来源的屎肠球菌,其万古霉素耐药水平相对更高。万古霉素敏感菌株中 *vanM* 型耐药基因的检出率逐年上升,这可能是双耐药基因携带株出现的潜在因素。另外,COVID – 19 疫情期间国内抗菌药物的使用率增加,糖肽类抗菌药的较多使用也可能加速双耐药基因携带株的流行^[14]。

2022 年 CHINET 三级医院细菌耐药监测显示, 14 243 株屎肠球菌中万古霉素耐药率为 2. 3%, 替考拉宁耐药率为 2. 7%^[10]。虽然耐药菌出现频率不高,但糖肽类耐药基因已在环境中广泛播散^[3]。杭州地区既往研究(针对 55 株 *vanM* 基因阳性屎肠球菌)显示,54 株虽携带该基因但对万古霉素、替考拉宁敏感,仅 1 株表现为高水平耐药,*vanM* 基因阳性万古霉素敏感菌株的出现,可能与 *vanM* 基因簇部分结构缺失相关;而 *vanM* 基因阳性万古霉素耐药菌株中,*vanM* 基因簇结构相对完整,且其表达水平显著高于上述敏感菌株^[15]。在本研究中,双耐药基因携带株替考拉宁 MIC 更高,推测 *vanM* 基因可能通过补偿性表达强化 *vanA* 基因介导的替考拉宁耐药。因此未来针对双耐药基因携带株临床感染病例,需要适当降低糖肽类抗菌药的使用,选择利奈唑胺、达托霉素等替代药物治疗。既往研究显示,*vanA* 基因常位于 Tn1546 转座子,*vanM* 基因可整合于环形质粒或线性质粒,因此 *vanA* 型和 *vanM* 型耐药基因都具有菌株间水平转移能力^[7]。国内 *vanM* 耐药基因流行范围较广,其水平转移可能导致双耐药基因携带株增多,具体基因转移方向仍需实验验证。本研究菌株主要来自大型医院,社区来源菌株缺失,可能低估耐药基因总体流行率。未来需加强对同时携带 *vanA* 和 *vanM* 耐药基因菌株的监测,重点对“沉默”的 *vanM* 型耐药基因早期筛查,精准防控双耐药基因携带株的流行,加强区域协作提升防控效率,另外及时应用生物信息学技术分析菌株分子特征及同源性等。

本研究提示:万古霉素敏感屎肠球菌中 *vanM* 基因的检出率呈现上升趋势,其播散可能是促使目前同时携带 *vanA* 型和 *vanM* 型耐药基因菌株流行的驱动因素,因此需要定期监测屎肠球菌中的

vanM 基因,进而防止耐药性更强的双耐药基因携带株暴发流行。

参考文献:

- [1] SATI H, CARRARA E, SAVOLDI A, *et al.* The WHO bacterial priority pathogens list 2024: A prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance [J]. *Lancet Infect Dis*, 2025, 25(9): 1033—1043.
- [2] 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 [2025-08-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30700430/>.
- [3] ALMEIDA-SANTOS A C, NOVAIS C, PEIXE L, *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: A current perspective on resilience, adaptation, and the urgent need for novel strategies [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2025, 41: 233—252. 2025-03-31 [2025-08-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39880121/>.
- [4] HAMMERUM A M, KARSTENSEN K T, ROER L, *et al.* Surveillance of vancomycin-resistant *Enterococci* reveals shift in dominating clusters from *vanA* to *vanB* *Enterococcus faecium* clusters, Denmark, 2015 to 2022 [J/OL]. *Euro Surveill*, 2024, 29(23): 2300633. 2024-06-06 [2025-08-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38847117/>.
- [5] XU X, LIN D, YAN G, *et al.* *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(11): 4643—4647.
- [6] PENG L, SONG J, SUN H, *et al.* Molecular investigation of an epidemic dissemination of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* sequence type 80 in Guangdong province, China [J/OL]. *Int J Antimicrob Agents*, 2025, 65(3): 107412. 2024-12-09 [2025-08-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39709131/>.
- [7] HASHIMOTO Y, TANIGUCHI M, UESAKA K, *et al.* Novel multidrug-resistant enterococcal mobile linear plasmid pELF1 encoding *vanA* and *vanM* gene clusters from a Japanese vancomycin-resistant *Enterococci* isolate [J/OL]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2568. 2019-11-13 [2025-08-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31798546/>.
- [8] BAKTHAVATCHALAM Y D, PURASWANI M, LIVINGSTON A, *et al.* Novel linear plasmids carrying *vanA* cluster drives the spread of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* in India [J/OL]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2022, 29: 168—172. 2022-03-23 [2025-08-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35339734/>.
- [9] KENT A G, SPICER L M, CAMPBELL D, *et al.* Sentinel surveillance reveals phylogenetic diversity and detection of linear plasmids harboring *vanA* and *optrA* among *Enterococci* collected in the United States [J/OL]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2024, 68(11): e0059124. 2024-11-06 [2025-08-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39404260/>.
- [10] 郭燕, 胡付品, 朱德妹, 等. 2022年CHINET三级医院细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2024, 24(3): 277—286.
- [11] XENOULIS P G, PALCULICT B, ALLENSPACH K, *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 66(3): 579—589.
- [12] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th ed. CLSI supplement M100 [EB/OL]. 2025-01-27 [2025-08-05]. <https://clsi.org/shop/standards/m100/>.
- [13] HE Y, RUAN G, HAO H, *et al.* Evaluation of quadruple real-time PCR method to detect enterococci carrying vancomycin-resistant genes *vanA*, *vanB*, *vanM* in rectal swabs [J/OL]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: 403. 2020-09-08 [2025-08-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33015079/>.
- [14] 张尧, 马玉燕, 苏逸, 等. 616例上海市新型冠状病毒肺炎病例抗菌药物应用分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(24): 3681—3685.
- [15] SUN L, QU T, WANG D, *et al.* Characterization of *vanM* carrying clinical *Enterococcus* isolates and diversity of the suppressed *vanM* gene cluster [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 68: 145—152.

(收稿日期 2025-08-08)