

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research

肠球菌中线性质粒传播与遗传稳定性研究

Study on the transmission and genetic stability of linear plasmids in *Enterococci*

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方面的研究

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 对比分析鸟肠球菌中线性质粒的分子特征, 明确肠球菌线性质粒的全球传播轨迹, 并通过接合子传代培养, 探究不同宿主菌株中线性质粒的遗传稳定性, 为临床耐药菌防控提供理论依据。方法 采用微量肉汤稀释法测定鸟肠球菌 ZB195、3 株受体菌(鸟肠球菌 07H170、粪肠球菌 FA2-2、屎肠球菌 BM4105RF)及其对应接合子的万古霉素最低抑菌浓度(MIC); 对 ZB195 菌株进行全基因组测序, 解析其质粒特征; 收集 2000~2019 年全球 18 株屎肠球菌的线性质粒序列, 通过 MAFFT、IQtree 及 BEAST 软件构建系统发育树与贝叶斯进化树, 结合 Spred3 软件模拟全球传播轨迹; 通过 15 d 无抗菌药选择压力的传代试验, 评估线性质粒在不同宿主中的遗传稳定性。结果 本研究首次于鸟肠球菌 ZB195 基因组中发现线性质粒, 该质粒含万古霉素耐药基因 *vanA*, 可水平转移至 3 株受体菌。序列比对显示, ZB195 线性质粒与日本屎肠球菌 AA708 线性质粒序列一致性最高, 系统发育分析证实二者亲缘关系最近。全球传播轨迹模拟显示, 肠球菌线性质粒最早于 2000 年在日本检出, 随后逐步扩散至中国、美国、挪威、丹麦及印度等国家。传代试验表明, 线性质粒在鸟肠球菌宿主中稳定性最优。结论 中国肠球菌检出的线性质粒可能起源于日本屎肠球菌的水平传播, 且该质粒转移至鸟肠球菌后可形成更优的宿主适应性, 提示需加强肠球菌线性质粒的跨区域监测, 以遏制耐药基因的全球扩散。

关键词: 万古霉素; 肠球菌; 线性质粒; 接合转移; 遗传稳定性

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.22.008

中图分类号: R378 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)22-3200-06

Abstract: Objective To comparatively analyze the molecular characteristics of linear plasmids in *Enterococcus avium*, clarify the global transmission trajectory of linear plasmids in *Enterococcus*, and explore the genetic stability of linear plasmids in different host strains through subculture of transconjugants, thereby providing a theoretical basis for the prevention and control of clinically drug-resistant bacteria. **Methods** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of vancomycin against *Enterococcus avium* ZB195, three recipient strains (*Enterococcus avium* 07H170, *Enterococcus faecalis* FA2-2, and *Enterococcus faecium* BM4105RF), and their corresponding transconjugants were determined using the broth microdilution method. Whole-genome sequencing of strain ZB195 was performed to characterize its plasmid features. Linear plasmid sequences from 18 global *Enterococcus faecium* strains isolated between 2000 and 2019 were collected, and phylogenetic trees and Bayesian evolutionary trees were constructed using MAFFT, IQtree, and BEAST software. The global transmission trajectory was simulated with

Spread3 software. The genetic stability of linear plasmids in different host strains was evaluated through a 15 – day subculture experiment without antibiotic selection pressure. **Results** For the first time, this study identified a linear plasmid in the genome of *Enterococcus avium* ZB195, which harbors the vancomycin resistance *vanA* gene and was capable of horizontal transfer to three recipient strains. Sequence alignment showed that the linear plasmid of ZB195 had the highest sequence identity with that of *Enterococcus faecium* AA708 from Japan, and phylogenetic analysis confirmed that they were most closely related. Simulation of global transmission trajectories revealed that the linear plasmid in *Enterococcus* was first detected in Japan in 2000, and then gradually spreaded to China, the United States, Norway, Denmark, India and other countries. Passage experiments indicated that the linear plasmid exhibited the highest stability in *Enterococcus avium* hosts. **Conclusion** The linear plasmids detected in *Enterococcus* strains in China may have originated from the horizontal transmission of *Enterococcus faecium* from Japan. Moreover, after transferring to *Enterococcus avium*, these plasmids can form better host adaptability. This suggests that it is necessary to strengthen cross – regional monitoring of linear plasmids in *Enterococcus* to curb the global spread of drug – resistant genes.

Key words: Vancomycin; *Enterococci*; linear plasmid; conjugative transfer; genetic stability

肠球菌是临床常见的医院获得性感染病原体,可引发尿路感染、血流感染及腹腔感染等多种疾病,尤其在免疫功能低下人群中致死率较高^[1]。近年来,随着抗菌药物的广泛使用,肠球菌耐药问题日益严峻,其中万古霉素作为治疗重症肠球菌感染的“最后一道防线”,其耐药率持续攀升,主要与 *vanA*、*vanM* 等耐药基因的传播密切相关^[2]。既往研究表明,肠球菌耐药基因多位于环性质粒上,2000 年日本分离的屎肠球菌 JHP9、JHP10 中首次出现携带 *vanA* 基因的线性质粒,对日本 2014 年分离的屎肠球菌 AA708 基因组研究,发现其线性质粒 pELF1 携带 *vanA* 和 *vanM* 基因,该质粒两端为共价闭合发夹样末端与蛋白结合末端结构,具备高效水平转移能力^[3–4]。随后,日本多地报道屎肠球菌线性质粒流行,且序列高度保守^[4];近年来,印度、爱尔兰、美国及中国等国家也相继检出此类质粒,提示其可能已形成全球传播趋势^[5–8]。现有研究中,肠球菌线性质粒主要分离自屎肠球菌,且在屎肠球菌中垂直传播稳定性优于粪肠球菌或鹌鸡肠球菌,尚无鸟肠球菌携带线性质粒的报道^[4]。本研究首次在一株临床分离鸟肠球菌 ZB195 中检出线性质粒,其序列与日本地区分离的屎肠球菌线性质粒高度同源,为探究线性质粒的宿主适应性拓展了新视角。此外,全球最早记录的肠球菌线性质粒可追溯至 2000 年,且不同地区、不同年份菌株的线性质粒序列存在差异,为解析其传播轨迹提供了丰富的分子标记^[4]。基于此,本研究通过全基因组测序、系统发育分析及传代试验,系统探究肠球菌线性质粒的分子特征、全球传播规律及宿主适应性,旨在为耐药元件传播监测与临床感染防控提供科学依据。

材料与方法

1 材料

菌株 鸟肠球菌 ZB195,分离自 2012 年北京市某

三级甲等综合医院重症监护室一名老年男性患者的肛拭子标本。鸟肠球菌 07H170、粪肠球菌 FA2 – 2 和屎肠球菌 BM4105RF,均保藏于北京大学临床药理研究所。粪肠球菌 ATCC 29212(标准质控菌株),购自国家卫健委临床检验中心。

药品与试剂 万古霉素,规格:每支 150 mg,纯度:1 066 U · mg⁻¹,批号:130360 – 202103、利福平,规格:每支 100 mg,纯度 98.8%,批号:130496 – 201403、左氧氟沙星,规格:每支 100 mg,纯度:97.1%,批号:130455 – 202108,均购自中国食品药品检定研究院;夫西地酸,规格:每支 100 mg,纯度 98.9%,批号:B23530,购自上海源叶生物科技有限公司。脑心浸液肉汤培养基(brain – heart infusion broth, BHI)、琼脂干粉,均购自英国 OXOID 公司;细菌全基因组测序由北京赛默百合生物科技有限公司提供。

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。

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类型。根据美国临床实验室标准化委员会(CLSI M100 – S35, 2025)^[9]推荐,使用微量肉汤稀释法测定供体菌、受体菌及接合子的万古霉素、左氧氟沙星、利福平和夫西地酸最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。质控菌株为粪肠球菌 ATCC 29212。

2.2 细菌接合试验

以菌株 ZB195 作为供体菌,对利福平及夫西地酸耐药的菌株 FA2 – 2 和 BM4105RF、对左氧氟沙星耐药的菌株 07H170 分别作为受体菌。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 °C 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 100 μL 菌液分别均匀涂布于选择培养基上(供体菌 ZB195 用含 6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的万古霉素 BHI 琼脂培养基;接合菌 ZB195:FA2-2 和 ZB195:BM4105RF 用含 6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 万古霉素、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 利福平和 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 夫西地酸的 BHI 琼脂培养基;接合菌 ZB195:07H170 用含 6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 万古霉素和 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左氧氟沙星的 BHI 琼脂培养基)37℃ 孵育 48 h,观察菌落生长情况,分别使用接合菌数与 ZB195 供体菌数的比值计算接合频率^[3-4]。

2.3 细菌全基因组测序及分析

将菌株 ZB195 和接合菌株 ZB195:BM4105RF 接种于 BHI 肉汤培养基中 37℃ 孵育过夜,高速离心(12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,10 min)获取菌株沉淀,送至赛默百合生物科技有限公司进行全基因组测序。测序流程为:提取菌株的基因组脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid,DNA),Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行二代短序列测序,Nanopore 平台对菌株进行长读长测序。通过短序列匹配长序列的方式清洗数据后,使用层次基因组组装进程(hierarchical genome-assembly process,HGAP)组装测序片段^[10]。将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>),使用 blastn 程序比对同源序列。选取相似度最高的屎肠球菌 AA708 线性质粒为参考,应用 Easyfig V2.2.5(<https://mjsull.github.io/Easyfig>)进行序列可视化比对^[11]。

2.4 细菌系统发育树构建及进化传播分析

从 NCBI 数据库下载 2000~2019 年全球不同地区(日本、中国、印度、美国、挪威、丹麦)18 株屎肠球菌的线性质粒序列,结合本研究 ZB195 线性质粒序列,共 19 条序列用于分析,所有菌株均按分离时间与国家进行数据整理。使用 MAFFT V7.487 软件^[12]进行多序列比对(参数设置为“mafft-auto”),通过 IQtree V2.3.6 软件^[13]基于最大似然法构建系统发育树,利用 iTOL V7 在线工具标注菌株来源国家与采集时间并可视化。采用 BEAST V10.5.0 软件^[14]构建贝叶斯进化树,参数设置为:GTR 核苷酸替代模型、strict clock 时钟模型、Bayesian skyline 种群模型,链长 2 亿次,每 10 000 次迭代取样 1 次;使用 Tracer V1.7.1 软件^[14]验证结果收敛性(有效样本量 ESS>200),通过 TreeAnnotator V1.10.4 软件^[14]去除 10% 燃烧期样本后,利用 iTOL V7 可视化进化树。将含地理信息的贝叶斯进化树导入 SpreaD3 V0.9.6 软件^[15],在世界地

图上模拟线性质粒的全球传播路径。

2.5 细菌传代培养试验

在无抗菌药选择压力下,将 ZB195、ZB195:07H170、ZB195:FA2-2、ZB195:BM4105RF 分别接种于 BHI 肉汤,37℃ 振荡培养,每 24 h 传代 1 次(取 30 μL 菌液转接至 3 mL 新鲜 BHI 肉汤),连续传代 15 d。分别在第 5、10、15 d 取样,稀释后同时涂布于含 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 万古霉素的 BHI 琼脂(计数耐药菌落)与不含万古霉素的 BHI 琼脂(计数总菌落),24 h 后计数,48 h 后复核,计算耐药菌落占比(耐药菌落数与总菌落数的比值);使用 GraphPad Prism V9.5.1 软件绘制稳定性曲线^[16]。

结 果

1 肠球菌药敏试验与接合试验结果

鸟肠球菌 ZB195 对万古霉素高度耐药(MIC 为 512 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),其他 3 株受体菌均为万古霉素敏感表型(MIC 为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。接合试验表明:菌株 ZB195 线性质粒可成功转移至 3 株受体菌,其中向鸟肠球菌 07H170 的接合频率最高(7.30×10^{-3}),向粪肠球菌 FA2-2 的接合频率最低(1.60×10^{-4})。收集 3 株受体菌对应的接合子 ZB195:07H170、ZB195:FA2-2 和 ZB195:BM4105RF 后,分别测定其对万古霉素的敏感性,结果发现 3 株接合子均对万古霉素耐药(MIC 介于 256~512 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间)。见表 1。

2 线性质粒序列特征与系统发育分析

全基因组测序结果显示,ZB195 携带 1 条长度为 109 948 碱基对(base pair,bp)的线性质粒(命名为 pELF_ZB195),其上含完整的 *vanA* 耐药基因簇;接合子 ZB195:BM4105RF 携带的线性质粒(命名为 pELF_ZB195-Efm)长度为 120 192bp,与 pELF_ZB195 序列一致性达 98%,且 *vanA* 基因簇完整。两个线性质粒序列理论上应高度一致,但线性质粒 pELF_ZB195-Efm 中增加了一段序列,其可编码调控质粒稳定性与水平转移的蛋白。序列比对显示,pELF_ZB195 与日本屎肠球菌 AA708 的线性质粒 pELF1(143 316bp,GenBank accession:LC495616)序列覆盖度和一致性最高,且核心区域(含 *vanA* 基因)完全保守。2016 年中国采集的另一菌株 SRR12 携带线性质粒 pSRR12_vanM(147 131bp,GenBank accession:CP133954),其与 pELF_ZB195 序列覆盖度在 87%,一致性接近 100%。系统发育树显示,19 株肠球菌的线性质粒可分为 3 个进化分支,ZB195 线性质粒与菌株 AA708、SRR24 等菌株的线性质粒同属一支,且亲缘关系最近;贝叶斯

表 1 供体菌 ZB195 和 3 株受体菌的药敏结果及接合频率

Table 1 Antimicrobial susceptibility results and conjugation frequencies of donor strain ZB195 and three recipient strains

Strains	Vancomycin MIC(μg·mL ⁻¹)	Levofloxacin MIC (μg·mL ⁻¹)	Rifampicin MIC (μg·mL ⁻¹)	Fusidic acid MIC (μg·mL ⁻¹)	conjugation frequency of linear plasmid (ZB195)
Enterococcus avium ZB195	512	2	1	1	—
Enterococcus avium 07H170	1	128	1	1	—
Enterococcus faecalis FA2 -2	1	2	256	256	—
Enterococcus faecium BM4105RF	1	2	256	256	—
Transconjugant ZB195: 07H170	512	128	1	1	7.30 × 10 ⁻³
Transconjugant ZB195: FA2 -2	256	2	256	256	1.60 × 10 ⁻⁴
Transconjugant ZB195: BM4105RF	256	2	256	256	1.50 × 10 ⁻³

MIC; minimum inhibitory concentration

进化树进一步证实,菌株 ZB195 和 AA708 携带的线性质粒进化分歧时间最晚,提示 ZB195 线性质粒可能起源于日本菌株的水平传播。系统发育分析和质粒线性比对结果见图 1 和图 2。

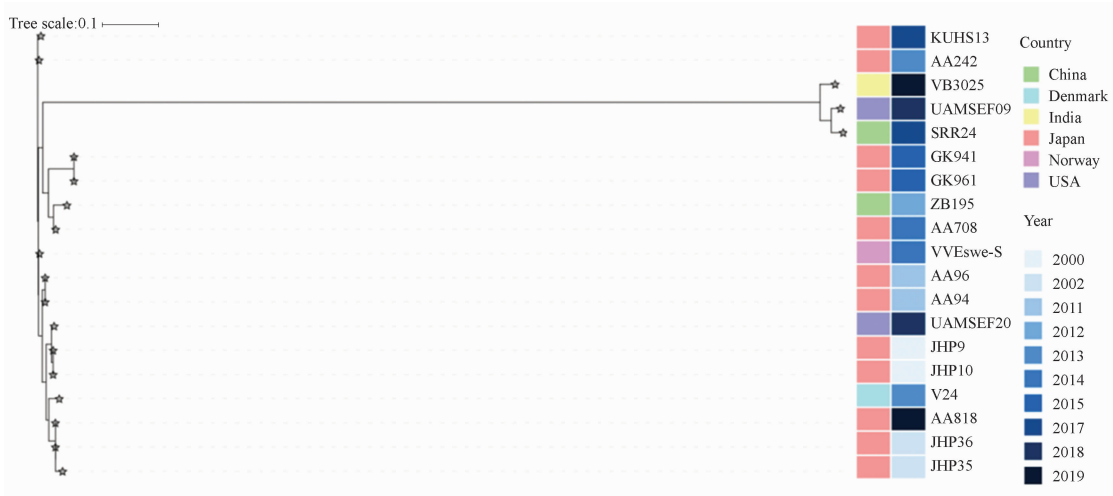


图 1 19 株肠球菌中线性质粒全基因序列的系统发育分析

Figure 1 Phylogenetic analysis of the complete genomic sequences of linear plasmids in 19 Enterococcus strains

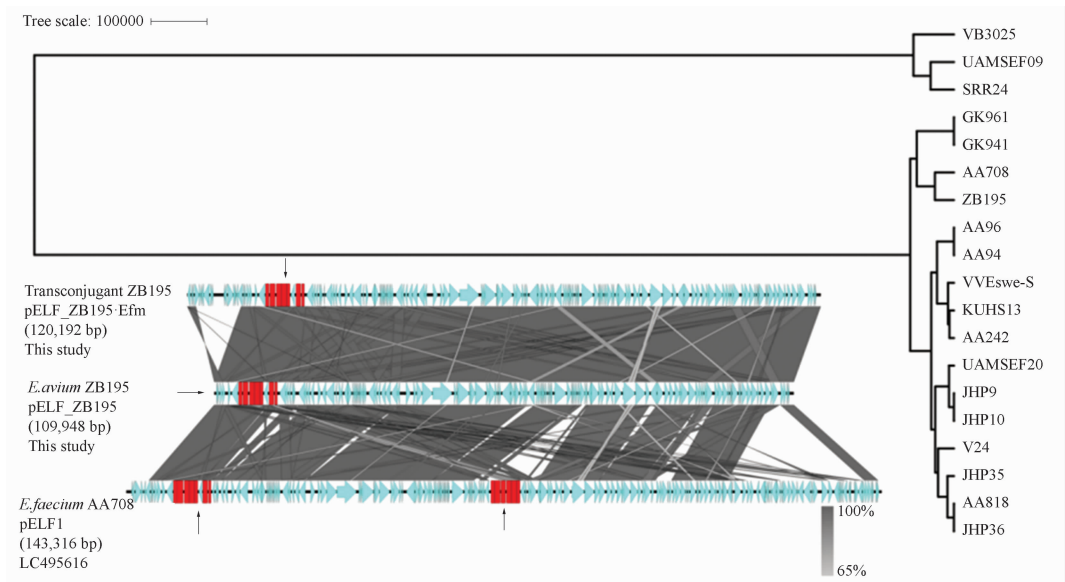


图 2 肠球菌中线性质粒进化贝叶斯推断结果和 2 株肠球菌线性质粒全基因序列比对

Figure 2 Bayesian inference results of linear plasmid evolution in Enterococci and complete genomic sequence alignment of linear plasmids from 2 Enterococcus strains

Transconjugant ZB195: (ZB195: BM4105RF). ↑: The red - labeled one is the vancomycin - resistant gene.

3 线性质粒全球传播轨迹

传播轨迹模拟显示,肠球菌线性质粒的传播起点为日本(2000年首次检出),2010~2018年逐步扩散至中国、美国、挪威及丹麦,之后进一步传播至印度;其中,中国菌株的线性质粒存在两条传播路径:一是由日本直接传入,二是由中国向印度、美国传播,提示中国可能已成为线性质粒的重要传播枢纽。

4 线性质粒在不同宿主中的传代稳定性

15天无抗菌药选择压力下连续传代结果表明,菌株 ZB195 中线性质粒稳定存在,第15 d时耐药菌落数与总菌落数相比仍接近于1。接合子 ZB195:07H170 中线性质粒前10 d相对稳定存在,但第15 d时会有部分菌株丢失,耐药菌落数与总菌落数比值为0.10。接合子 ZB195:FA2-2 中线性质粒在传代过程中会不断丢失,第15 d时耐药菌落数与总菌落数比值的 1.00×10^{-5} ,线性质粒位于粪肠球菌时稳定性最差。3株接合子中线性质粒传代稳定性结果见图3。

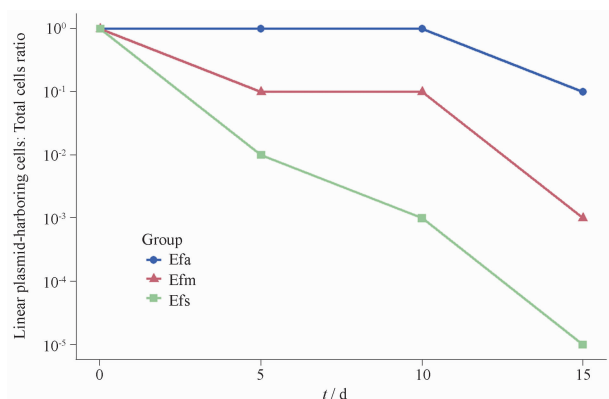


图3 不同接合子中线性质粒传代稳定性结果

Figure 3 Results of passage stability of linear plasmids in different transconjugants

Efa: ZB195: 07H170; Efm: ZB195: BM4105RF; Efs: ZB195: FA2-2

讨 论

本研究首次在临床分离的鸟肠球菌中发现携带 *vanA* 基因的线性质粒,证实该质粒具备跨种属水平转移能力,且在鸟肠球菌宿主中具有最优的遗传稳定性,为解析肠球菌线性质粒的宿主适应性机制提供了新证据。

ZB195 携带的线性质粒 pELF_ZB195 长度约 110 kb,与日本屎肠球菌 AA708 的 pELF1 序列高度同源,且核心耐药区域(*vanA* 基因簇)保守,提示二者可

能具有共同的进化起源^[3]。接合试验显示,该质粒向鸟肠球菌的接合频率最高(7.30×10^{-3}),显著高于向粪肠球菌的接合频率(1.60×10^{-4}),这一结果与既往研究中“线性质粒在亲缘关系更近的宿主中转移效率更高”的结论一致^[4]。此外,所有接合子均表现为万古霉素高度耐药,证实该质粒是 *vanA* 基因的关键载体,其水平转移是肠球菌万古霉素耐药率升高的重要原因。值得注意的是,接合子 ZB195: BM4105RF 的线性质粒长度较供体菌增加约 10 kb,可能是由于质粒在屎肠球菌宿主中发生了片段插入或重复,这一现象在既往研究中也有报道^[4-7],提示线性质粒可能通过基因重组不断获得新功能(如耐药基因、定植相关基因),从而增强宿主的适应能力。

本研究通过系统发育分析与传播轨迹模拟,首次证实肠球菌线性质粒的全球传播始于日本,且中国已成为重要的传播枢纽。这一结论与流行病学数据相符:日本对国内万古霉素耐药肠球菌分析发现,携带线性质粒的菌株已在多省传播或某地区暴发流行^[3-4],而中国 2012 年分离的 ZB195 菌株携带该类型质粒,提示线性质粒可能已跨国播散。线性质粒的全球传播可能与以下因素相关:一是医疗全球化导致的患者跨国流动,二是环境与动物源肠球菌的交叉污染^[17]。例如,猪源鸟肠球菌已被证实携带耐药质粒^[17],而人与动物的密切接触可能促进质粒向临床菌株传播^[18];此外,瑞士研究发现线性质粒可携带肠道 N-乙酰半乳糖胺利用基因,增强菌株定植能力^[19],这也可能加速其不同地区的流行。

传代试验显示,线性质粒在鸟肠球菌中的稳定性显著优于屎肠球菌与粪肠球菌,这一现象可能与以下机制相关:首先,鸟肠球菌与屎肠球菌同属肠球菌属,但鸟肠球菌的基因组 GC 含量(36%)与线性质粒 GC 含量(34%)更接近,可能减少质粒与宿主基因组的排斥反应^[18]。其次,线性质粒的复制依赖末端蛋白与宿主酶系统的协同作用,鸟肠球菌可能表达更适合质粒复制的酶类,从而提高其稳定性^[3]。另外,相比人体肠道中的粪肠球菌和屎肠球菌,鸟肠球菌多存在于环境与动物肠道,在与其他微生物竞争和适应外界恶劣环境过程中,鸟肠球菌可能通过获得质粒更具生存优势^[18-19]。

本研究的局限性在于:一是仅分析 19 条线性质粒序列,可能无法完全覆盖全球流行菌株;二是全球传播轨迹仅基于目前已测序菌株,未测序菌株中携带的线性质粒加入分析可能重塑传播链条;三是传代试

验未模拟体内复杂微环境,需进一步通过动物模型验证质粒稳定性。

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] ALMEIDA - SANTOS AC, NOVAIS C, PEIXE L, *et al.* Vancomycin - resistant *Enterococcus faecium*: A current perspective on resilience, adaptation, and the urgent need for novel strategies [J/OL]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2025, 41:233—252. 2025 - 01 - 10 [2025 - 10 - 03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39880121/>.
- [3] 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 - 10 - 03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31798546/>.
- [4] HASHIMOTO Y, SUZUKI M, KOBAYASHI S, *et al.* Enterococcal linear plasmids adapt to *Enterococcus faecium* and spread within multidrug - resistant clades [J/OL]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2023, 67(4): e0161922. 2023 - 04 - 18 [2025 - 10 - 03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36975786/>.
- [5] BAKTHAVATCHALAM YD, 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 - 10 - 03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35339734/>.
- [6] KAVANAGH NL, KINNEVEY PM, BRENNAN GI, *et al.* Co - carriage of diverse vancomycin - resistant *Enterococcus faecium* ST80 - lineages by 70% of patients in an Irish hospital [J]. *JAC Antimicrob Resist*, 2025, 7(3): dla065.
- [7] KENT AG, SPICER LM, 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 - 10 - 03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39404260/>.
- [8] SUN L, CHEN Y, HUA X, *et al.* Tandem amplification of the *vanM* gene cluster drives vancomycin resistance in vancomycin - variable enterococci [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75(2):283—291.
- [9] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th ed. CLSI supplement M100 [EB/OL]. 2025 - 01 - 27 [2025 - 10 - 03]. <https://clsi.org/shop/standards/m100/>.
- [10] LU H, GIORDANO F, NING Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016, 14(5):265—279.
- [11] SULLIVAN MJ, PETTY NK, BEATSON SA. Easyfig: A genome comparison visualizer [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(7):1009—1010.
- [12] KATO H K, STANDLEY DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(4):772—780.
- [13] YAO C, JIN L, WANG Q, *et al.* Unraveling the evolution and global transmission of high level tigecycline resistance gene *tet(X)* [J/OL]. *Environ Int*, 2025, 199:109499. 2025 - 04 - 25 [2025 - 10 - 03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40311233/>.
- [14] SUCHARD MA, LEMEY P, BAELE G, *et al.* Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 [J/OL]. *Virus Evol*, 2018, 4(1):vey016. 2018 - 06 - 08 [2025 - 10 - 03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29942656/>.
- [15] BIELEJEK F, BAELE G, VRANCKEN B, *et al.* Spread3: Interactive visualization of spatiotemporal history and trait evolutionary processes [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(8):2167—2169.
- [16] WAGNER TM, JANICE J, SIVERTSEN A, *et al.* Alternative *vanHAX* promoters and increased *vanA* - plasmid copy number resurrect silenced glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* [J/OL]. *J Antimicrob Chemother*, 2021, 76: 876—882. 2021 - 03 - 12 [2025 - 10 - 03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33367710/>.
- [17] COCCITTO SN, CINTHI M, SIMONI S, *et al.* Identification of plasmids co - carrying *cfr(D)/optrA* and *cfr(D2)/poxtA* linezolid resistance genes in two *Enterococcus avium* isolates from swine brain [J/OL]. *Vet Microbiol*, 2023, 282: 109749. 2023 - 04 - 24 [2025 - 10 - 03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37116421/>.
- [18] PATEL R, KEATING MR, COCKERILL FR 3rd, *et al.* Bacteremia due to *Enterococcus avium* [J]. *Clin Infect Dis*, 1993, 17(6):1006—11.
- [19] BOUMASMOUD M, DENGLER HV, SCHWEIZER TA, *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 - 10 - 03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35343787/>.

(收稿日期 2025 - 10 - 08)