

研究报告

不同分离源粪肠球菌的毒力基因比较

王彦杰 侯强川 李伟程 余中节 王旭 张和平 钟智*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室&农业农村部奶制品加工重点实验室

内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:【背景】粪肠球菌作为一种重要的乳酸菌在食品和医药领域应用广泛。由于很多粪肠球菌为条件致病菌,因此充分了解粪肠球菌基因组中毒力基因(Virulence genes)的携带情况对合理利用该菌种有重要的意义,但目前还没有研究专门报道不同分离源粪肠球菌基因组中毒力基因的携带情况。【目的】了解不同分离源粪肠球菌毒力基因的携带情况,评估分离自自然发酵乳制品中的粪肠球菌的安全性。【方法】利用比较基因组学方法确定 107 株分离自乳源、血液、尿液、粪便和水源中的粪肠球菌携带毒力基因情况,使用主成分分析比较不同分离源菌株毒力基因的差异,通过卡方检验筛选出环境特异性毒力基因。【结果】在 107 株粪肠球菌基因组共找到 88 种编码不同功能蛋白的毒力基因,其中与粘附相关的毒力基因最多。同时发现乳源分离株与其他环境分离株所携带的毒力基因没有显著差异。【结论】乳源分离株中携带的毒力基因与其他环境分离株无显著差异,表明分离自自然发酵乳制品中的粪肠球菌可能同样存在致病风险,因此在食品工业中使用粪肠球菌时一定要对菌株的安全性做全面的评估。

关键词: 粪肠球菌, 毒力基因, 乳制品

Comparison of the virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolated from different environments

WANG Yan-Jie HOU Qiang-Chuan LI Wei-Cheng YU Zhong-Jie WANG Xu
ZHANG He-Ping ZHONG Zhi*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education & Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: [Background] *Enterococcus faecalis*, as an important lactic acid bacteria, is widely used in dairy products and pharmacy. However, many *E. faecalis* isolates are opportunistic pathogen. So it is important to analyze of virulence genes in *E. faecalis*. [Objective] To study the virulence genes of *E. faecalis* from different environments and evaluate the safety of *E. faecalis* isolated from naturally fermented dairy products. [Methods] Comparative genomic analysis was used to determine the

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31601451)

*Corresponding author: Tel: 86-471-4308703; E-mail: imu150zhongzhi@163.com

Received: January 10, 2018; Accepted: June 12, 2018; Published online (www.cnki.net): June 26, 2018
基金项目: 国家自然科学基金(31601451)

*通信作者: Tel: 86-471-4308703; E-mail: imu150zhongzhi@163.com

收稿日期: 2018-01-10; 接受日期: 2018-06-12; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-26

virulence genes of 107 strains isolated from dairy products, blood, urine, feces and water. Principal component analysis (PCA) was used to compare the virulence genes of different isolates. The habitat-specific virulence genes were screened by Pearson's chi-squared test. **[Results]** A total of 88 virulence genes were identified in 107 genomes of *E. faecalis* isolates. These virulence genes were mainly involved in adhesion. There was no significant difference in the number of virulence genes between dairy isolates and the other isolates. **[Conclusion]** The results indicated that the *E. faecalis* isolated from dairy products were also at risk of pathogenicity. The safety of *E. faecalis* must be evaluated before using in the food industry.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, Virulence genes, Dairy products

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)是一种产乳酸革兰氏阳性需氧或兼性厌氧乳酸菌^[1-3],具有极强的耐受极端温度、pH 值、高胆汁酸、高盐和抗菌剂的能力^[1]。粪肠球菌的特点使其在自然界中广泛分布,除人和哺乳动物肠道外,在尿液、血液、土壤、水和食品中均有存在^[2]。

作为一种重要的乳酸菌,粪肠球菌在食品中的应用十分广泛。在一些欧美国家,粪肠球菌常添加在鲜奶和巴氏消毒奶中制作各种干酪,它可以通过分解脂类和蛋白质,产生芳香类化合物改善干酪的口感和风味^[4]。同时部分粪肠球菌能产生细菌素,有效抑制致病菌如单核细胞增多性李斯特菌、梭状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等的生长^[5],对食品保鲜起到重要作用。另外,粪肠球菌是人和动物的肠道共生菌,部分菌株具有益生作用,在医学领域常被用于治疗腹泻^[3]。

然而,考虑到很多粪肠球菌为条件致病菌,具有潜在的致病风险^[6],在食品医药领域应用粪肠球菌仍需要进一步评估。目前已经发现很多疾病如尿路感染^[7]、败血症、血液感染^[8]、心内膜炎^[9]和中枢神经系统感染^[10]等均与粪肠球菌密切相关。粪肠球菌成为医院致病菌与其可以获得毒力特性的能力有关^[11],同时其毒力因子基因传播性较强,加强了粪肠球菌对人们的危害性。充分了解粪肠球菌基因组中毒力基因的携带情况对合理利用该菌种和预防其感染有重要的意义。2006 年 Lepage 等首次大规模研究粪肠球菌基因组多样性,给出了粪肠球菌染色体的稳定区和可变区,该研究最重要的是在 30 株临床和食品粪肠球菌分离株中发

现了 6 个乳制品分离株中不存在的基因,它们可以成为发酵产物中粪肠球菌分离株风险评估的良好标志物^[12]。Bakshi 等在 2016 年利用比较基因组学方法评估粪肠球菌菌株的潜在致病性,并确定了一个粪肠球菌毒力岛富集模块^[13]。然而,目前鲜有研究报道多分离源环境粪肠球菌基因组中毒力基因携带情况,粪肠球菌乳源分离株是否更安全等都是亟需解决的问题。

为了全面评估自然发酵乳制品中粪肠球菌的安全性,本研究利用比较基因组学方法分析 19 株乳源粪肠球菌与其他 88 株分离自血液、尿液、粪便和水源粪肠球菌携带毒力基因情况,对比分析乳源分离株携带的毒力基因与其他分离源菌株携带毒力因子是否存在差异,进而评估粪肠球菌乳源分离株的安全性。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

本研究的 107 株粪肠球菌均具有明确的分离源,测序质量较好,其中包含 29 株血液分离株,19 株乳源分离株,26 株粪便分离株,21 株尿液分离株和 12 株水源分离株。所有菌株基因组均下载自 NCBI 的 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>),具体菌株信息如表 1 所示。

1.2 数据分析与统计

1.2.1 毒力基因分析

将 107 株粪肠球菌全基因组蛋白序列分别与毒力因子数据库(Virulence factor database, VFDB; <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)^[14]中的 Protein sequences of full dataset 进行比对,将比对结果中

表 1 粪肠球菌菌株信息

Table 1 List of the *Enterococcus faecalis* strains analyzed in this study

菌株 Isolates	分离源 Origin	测序技术 Sequencing technology	基因组覆盖度 Genome coverage	NCBI 序列号 NCBI accession No.
V583	Blood	—	—	AE016830.1
MA1	Blood	Illumina HiSeq	834.0×	ANMP000000000.1
R712	Blood	Illumina	67.4×	ADDQ000000000.1
S613	Blood	Illumina	71.3×	ADDP000000000.1
TX0012	Blood	Illumina	76.2×	AECD000000000.1
TX0017	Blood	Illumina	81.3×	AEBP000000000.1
TX0102	Blood	Illumina	76.8×	AEBD000000000.1
TX0031	Blood	Illumina	76.1×	AEBF000000000.1
DAPTO 516	Blood	Illumina	71.1×	AEBS000000000.1
18297	Blood	Illumina	216.0×	AIIS000000000.1
B1290	Blood	Illumina	136.0×	AIJH000000000.1
B1327	Blood	Illumina	134.0×	AIJI000000000.1
B1376	Blood	Illumina	131.0×	AIJJ000000000.1
SF21521	Blood	Illumina	300.0×	AJEP000000000.1
RM3817	Blood	Illumina	150.0×	AJEV000000000.1
B1005	Blood	Illumina	284.0×	AIPS000000000.1
B1138	Blood	Illumina	291.0×	AIPT000000000.1
B1249	Blood	Illumina	318.0×	AIPU000000000.1
B1851	Blood	Illumina	126.0×	AIQG000000000.1
B1921	Blood	Illumina	153.0×	AIQI000000000.1
B2277	Blood	Illumina	268.0×	AIQO000000000.1
B2670	Blood	Illumina	149.0×	AIQU000000000.1
B2685	Blood	Illumina	149.0×	AIQV000000000.1
B2687	Blood	Illumina	149.0×	AIQW000000000.1
B2802	Blood	Illumina	271.0×	AIQX000000000.1
B2813	Blood	Illumina	155.0×	AIQY000000000.1
B2864	Blood	Illumina	301.0×	AIQZ000000000.1
NGS-ED-1009	Blood	Illumina	222.0×	JPWN000000000.1
MMH594	Blood	Illumina	500.0×	AOPW000000000.1
DM7-2*	Dairy	Illumina HiSeq	175.9×	MSQG000000000
ELS8-4*	Dairy	Illumina HiSeq	197.8×	MSQH000000000
HS5152*	Dairy	Illumina HiSeq	247.0×	MSQI000000000
HS5302*	Dairy	Illumina HiSeq	219.0×	MSQJ000000000
MGA44-7*	Dairy	Illumina HiSeq	225.1×	MSQK000000000
NM15-4*	Dairy	Illumina HiSeq	206.1×	MSQL000000000
NM31-3*	Dairy	Illumina HiSeq	230.2×	MSQM000000000
QH29-4*	Dairy	Illumina HiSeq	220.7×	MSQN000000000
QH9-5*	Dairy	Illumina HiSeq	219.3×	MSQO000000000
WZ21-1*	Dairy	Illumina HiSeq	216.7×	MSQP000000000
WZ34-2*	Dairy	Illumina HiSeq	189.1×	MSQQ000000000

(待续)

(续表 1)

XJ76305*	Dairy	Illumina HiSeq	222.5×	MSQR00000000
XM26-4*	Dairy	Illumina HiSeq	201.3×	MSQS00000000
YM11-6*	Dairy	Illumina HiSeq	189.5×	MSQT00000000
YM39-2*	Dairy	Illumina HiSeq	194.2×	MSQU00000000
F1	Dairy	Illumina	292.0×	ASDL00000000.1
SS-7	Dairy	Illumina	151.0×	ASDM00000000.1
ATCC 6055	Dairy	Illumina	217.0×	ASDZ00000000.1
LD33	Dairy	Illumina	328.0×	CP014949.1
L9	gut	Illumina HiSeq	310.0×	CP018004.1
L12	Gut	Illumina HiSeq	250.0×	CP018102.1
E1Sol	Gut	454	41.6×	ACAQ00000000.1
PC1.1	Gut	454	30.0×	ADKN00000000.1
Symbioflor 1	Gut	—	—	HF558530.1
DORA_14	Gut	Illumina HiSeq	255.0×	AZLY00000000.1
TX1302	Gut	454	83.4×	AEBK00000000.1
7330082-2	Gut	Illumina	127.0×	AIIW00000000.1
7330112-3	Gut	Illumina	250.0×	AIIX00000000.1
7330245-2	Gut	Illumina	122.0×	AIY00000000.1
7330257-1	Gut	Illumina	267.0×	AIIZ00000000.1
7430821-4	Gut	Illumina	250.0×	AIJG00000000.1
HEF39	Gut	Illumina	143.0×	AISB00000000.1
T16	Gut	Illumina	152.0×	AJEI00000000.1
T21	Gut	Illumina	142.0×	AJEQ00000000.1
P9-1	Gut	Illumina	62.0×	LKGS00000000.1
Enfs51	Gut	Illumina	378.0×	MJEK00000000.1
Enfs85	Gut	Illumina	297.0×	MJBV00000000.1
P.En250	Gut	Illumina	396.0×	MJBZ00000000.1
DBH18	Gut	Illumina	50.0×	LSFS00000000.1
TX1467	Gut	Illumina	241.1×	AFBS00000000.1
TX1346	Gut	Illumina	76.9×	AEBI00000000.1
TX2137	Gut	Illumina	71.7×	AEBQ00000000.1
TX4244	Gut	Illumina	87.3×	AEBH00000000.1
X98	Gut	454	33.7×	ACAW00000000.1
D32	Gut	—	—	CP003726.1
ATCC 29200	Urine	Illumina	134.0×	ACHK00000000.1
HH22	Urine	Illumina	291.0×	ACIX00000000.1
HS0914	Urine	Illumina HiSeq	102.0×	JPDQ00000000.1
T14	Urine	Illumina	141.0×	AJBE00000000.1
T13	Urine	454	283.0×	AJEJ00000000.1
T3	Urine	454	39.4×	ACAF00000000.1
EnGen0311	Urine	454	53.5×	AEBZ00000000.1
ERV81	Urine	Illumina	75.0×	ALZW00000000.1

(待续)

(续表 1)

ERV85	Urine	Illumina	79.0×	ALZX00000000.1
ERV93	Urine	Illumina	80.0×	ALZY00000000.1
SF24397	Urine	Illumina	123.0×	AJAW00000000.1
V587	Urine	Illumina	147.0×	AJBB00000000.1
SF28073	Urine	Illumina	155.0×	AJBC00000000.1
WH257	Urine	Illumina	148.0×	AJBG00000000.1
SF19	Urine	Illumina	119.0×	AJBH00000000.1
WH571	Urine	Illumina	140.0×	AJBJ00000000.1
TX0635	Urine	Illumina	144.0×	AJEF00000000.1
CH136	Urine	Illumina	265.0×	AJEH00000000.1
SF24396	Urine	Illumina	146.0×	AJEM00000000.1
LRS29212	Urine	Illumina	500.0×	JPTY00000000.1
F165	Urine	Illumina	74.0×	MBRC00000000.1
AZ19	Water	Illumina HiSeq	100.0×	AYLU00000000.1
FL2	Water	Illumina HiSeq	100.0×	AYKK00000000.1
GA2	Water	Illumina HiSeq	100.0×	AYKL00000000.1
GAN13	Water	Illumina HiSeq	100.0×	AYLV00000000.1
KS19	Water	Illumina HiSeq	100.0×	AYND00000000.1
MD6	Water	Illumina HiSeq	100.0×	AYLN00000000.1
MN16	Water	Illumina HiSeq	100.0×	AYKM00000000.1
MTmid8	Water	Illumina HiSeq	100.0×	AYKU00000000.1
MTUP9	Water	Illumina HiSeq	100.0×	AYOJ00000000.1
NJ44	Water	Illumina HiSeq	100.0×	AYOK00000000.1
NY9	Water	Illumina HiSeq	100.0×	AYOL00000000.1
AMB05	Water	Illumina	2.7×	CP015998.1

注：*：本实验室前期在自然发酵乳制品中分离得到的粪肠球菌菌株。

Note: *: Isolated from naturally fermented dairy products.

相似度>50%， $E<1e-10$ ，匹配长度>300 的蛋白序列确定为毒力基因。

1.2.2 毒力基因差异分析

使用 R 语言软件(v3.3.2)中的 Prcomp 函数进行主成分分析(Principal component analysis，PCA)，比较不同环境分离株毒力基因整体差异。使用 BLAST 软件(v2.2.24+)将毒力基因序列与粪肠球菌全基因组序列进行对比，获取各毒力基因在粪肠球菌基因组中的位置，通过 R 语言 ggplot2 包将数据可视化。使用 MEGA 5.0 软件将共有毒力基因蛋白序列串联后构建系统发育树，重复值为 1 000。随

后将人工校对后的 9 个共有基因以 VFG000079-VFG000080-VFG005527-VFG012103-VFG016490-VFG016490-VFG030724-VFG032200-VFG032791 的顺序依次导入 BioNumerics v6.0 软件进行等位基因型的确认，对应的每一个等位基因有一个等位基因序列号，最后将 9 个等位基因序列号组合构建 107 株粪肠球菌毒力基因的 ST 型。

1.2.3 环境特异性毒力基因分析

如果一个毒力基因在某个环境出现频次显著高于其在所有环境分离株出现频次，那么该毒力基因具有环境特异性，称为环境特异性毒力基因。例

如,毒力基因 A 在 107 株菌中出现 19 次,出现频次为 17.8%,而在 19 株乳源分离株中有 16 次,频次为 84.2%,则该毒力基因很可能是乳源特异性的毒力基因,为了确定结果是否具有统计学意义,本研究采用 Pearson’s chi-squared 检验(SPSS 17.0 软件),将检验结果 $P<0.05$ 的毒力基因认定为环境特异性毒力基因。

2 结果与讨论

2.1 粪肠球菌毒力基因的鉴定

通过与毒力因子数据库(VFDB)进行比对,在 107 株粪肠球菌基因组中共找到 88 种毒力基因,平均每株粪肠球菌携带 42 种毒力基因。其中 *Enterococcus faecalis* B1005 (血液)、*Enterococcus faecalis* B2687 (血液)和 *Enterococcus faecalis* B2802 (血液)携带毒力基因数最多,为 54 种,*Enterococcus faecalis* NM31-3 (乳源)、*Enterococcus faecalis* YM11-6 (乳源)、*Enterococcus faecalis* AMB05 (水源)、*Enterococcus faecalis* FL2 (水源)和 *Enterococcus faecalis* P9-1 携带毒力基因数最少,均携带 32 种。

统计结果显示,粪肠球菌中携带的毒力因子主要包括粘附素、荚膜多糖、胞外酶、表面蛋白

和溶血素激活因子等,如表 2 所示。这些毒力基因在粪肠球菌感染宿主时通过编码毒力因子使粪肠球菌对宿主细胞产生粘附、定殖及抗吞噬和入侵等作用^[15]。

由表 2 可知,在粪肠球菌众多毒力基因中参与粘附的基因最多。粘附基因可以编码粘附力相关表面蛋白,这些蛋白促使细菌粘附在宿主细胞上,辅助细菌侵染宿主细胞,其中胶原结合蛋白 Ace 和心内膜炎抗原 EfaA 是粪肠球菌重要的表面粘附蛋白,Ace 与生物膜相关^[16],EfaA 和心内膜炎发病有关^[17]。产细胞表面蛋白的 Esp 最初在粪肠球菌临床分离株中被发现,其可以合成细胞壁相关蛋白,促进粪肠球菌粘附和定殖^[18],带有该基因的菌株可引起多重感染。体外试验也证明 Esp 蛋白可在聚苯乙烯或聚氯乙烯表面形成生物膜,形成的生物膜可以使细菌的感染更加持久^[19]。在粪肠球菌中还发现了能够介导血小板、胶原和纤维蛋白原粘附,从而引起心内膜炎的 *ebp* 菌毛相关毒力基因,如 *ebpA*、*ebpB* 和 *ebpC*,这些基因可以编码菌毛蛋白,调节菌毛生物作用^[18],研究证明 *ebp* 菌毛基因缺失突变株对血小板、胶原以及纤维蛋白原的粘附能力均显著降低^[20]。

表 2 毒力基因分类信息

Table 2 Categorize information of virulence genes

编码基因功能 Coding gene function	毒力基因 Virulence genes name
粘附素 Adhesins	<i>ace</i> , <i>ebpA/ebpB/ebpC</i> , <i>efaA</i> , EFD32-0899, OG1RF-10869, EFD32-0908, OG1RF-10870/OG1RF-10871, <i>ecbA</i> , EF2347, <i>lap</i> , <i>ssaB</i> , <i>pavA</i> , EFD32-0900, <i>cnm</i> , <i>asa1</i> , <i>prgB/asc10</i> , EF0149, <i>dltA</i> , <i>tig/ropA</i>
荚膜多糖 Capsule	STER-1222, <i>rfbB-1</i> , <i>capE/capD/cap8F/capP</i> , <i>galE</i> , SGO 1723, <i>manA</i> , <i>cpsG/cpsE/cpsD/cpsJ/cpsI/cpsC/cps4I/cps2K/cps2T</i> , ABTJ-03752, <i>wbfV/wcvB</i> , BCE-5394, SSP0068
溶血素 Cytolysin	<i>cylM</i> , <i>cylB</i> , <i>cylI</i> , <i>cylA</i>
产胞外酶 Protease	<i>gelE</i> , EFD32-2606, EF3023, OG1RF-12303, EF0818, OG1RF-10550, EFD32-0629, <i>lplA1</i> , <i>htrA/degP</i> , <i>eno</i> , <i>lisK/bsh</i> , <i>plr/gapA</i> , <i>fsrC</i> , <i>sigA/rpoV</i> , <i>tuf</i> , <i>katA</i>
表面蛋白 Surface protein	<i>groEL</i> , <i>bopD</i> , EFD32-0765, <i>esp</i> , <i>sugC</i> , <i>ctpV</i> , CT396, <i>srt2/srt1/bee1/bee3</i> , <i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>fss1/fss2/fss3</i> , EF0485

注:根据 VFDB 数据库提供的表达蛋白对菌株致病性产生的影响将毒力基因进行分类,“,”分开的基因代表编码不同蛋白的毒力基因,“/”分开的为不同基因但编码功能相似蛋白。

Note: Virulence genes were classified according to the effects of the expressed proteins provided by VFDB database on the pathogenicity of the strains, “,”: Virulence genes encoding different proteins, “/”: Virulence genes encoding similar proteins.

在粪肠球菌基因组中存在较多与荚膜多糖合成相关的毒力基因,如 *capE/cap8E/capD* 和 *wbfV/wcvB*。对于很多人类病原菌,荚膜多糖在细菌免疫逃逸方面扮演着重要角色^[21]。它可以通过多重机制包括抵抗吞噬和隐蔽细菌表面抗原等方法增强微生物毒力^[22]。

粪肠球菌携带的细胞溶解素是唯一一种可以裂解真核细胞的羊毛硫细菌素(Lantibiotics)^[23],能裂解红细胞、血小板和巨噬细胞等,其作用于细胞膜会造成细胞结构和功能紊乱,并最终导致细胞死亡^[24]。研究证明表达溶血素肠球菌的毒力明显高于其他同型不表达溶血素的菌株^[25]。

与粪肠球菌生物膜形成相关的编码基因 *gelE* 可编码产生水解明胶、酪蛋白、血红蛋白等生物活性肽,介导自溶素促使细胞裂解,促进细菌扩散,参与炎症进程。因此, *gelE* 基因也被认为是粪肠球菌中较为重要的胞外酶基因,其与细菌毒性密切相关。另一个重要的粪肠球菌胞外酶是丝氨酸酶,其由基因 *sprE* 编码产生,丝氨酸酶能增加粪肠球菌的致病性,同时避免粪肠球菌发生自杀行为^[26]。

虽然很多毒力因子编码基因单独存在于某些非致病菌中没有使细菌表现出致病性,但是多种毒力因子之间的相互作用使得细菌的致病性明显增强。

2.2 毒力基因拷贝数分析

基于上述结果发现粪肠球菌携带的毒力基因多样性较高。此外,每种毒力基因在粪肠球菌基因组中的拷贝数对菌株安全性也非常重要,拷贝数越多,表达的可能性越大。鉴于此,统计了 88 种毒力基因在各菌株中拷贝数分布情况,其中有 11 个毒力基因出现了多拷贝,统计结果如表 3 所示。

根据毒力基因拷贝数分析可知, *esp*、*fss2* 和 *galE* 在多个分离源的菌株中均出现了多拷贝,并且携带多拷贝的菌株数占各分离源总菌株数的比例较高。其中 *esp* 和 *fss2* 为粘附素基因,辅助细菌定殖, *galE* 为荚膜多糖基因,帮助细菌逃避免疫反应,这两类基因在粪肠球菌毒力基因中普遍存在,对粪肠球菌致病性起到很大的辅助作用。

表 3 毒力基因拷贝数携带情况

Table 3 Copy number of virulence genes

毒力基因 Virulence genes	多拷贝数分 离源 Origin	拷贝数 Copy number	菌株数 Number of strains
EF0485	Blood	2	3/29, 10.3%
	Urine	2	3/21, 14.3%
<i>esp</i>	Blood	2	2/29, 6.9%
		3	2/29, 6.9%
	Dairy	≥3	1/19, 5.3%
	Urine	2	2/21, 9.5%
	Gut	2	2/26, 7.7%
		≥3	1/26, 3.8%
<i>galE</i>	Blood	2	21/29, 72.4%
	Dairy	2	4/19, 21.1%
	Water	2	1/12, 8.3%
	Urine	2	13/21, 61.9%
	Gut	2	15/26, 57.7%
<i>fss2</i>	Blood	2	17/29, 58.6%
		≥3	1/29, 3.4%
	Dairy	2	14/19, 73.7%
	Water	2	4/12, 33.3%
	Urine	2	6/21, 28.6%
<i>fss1</i>	Gut	2	16/26, 61.5%
	Dairy	2	3/19, 15.8%
	Water	2	1/12, 8.3%
	Gut	2	1/26, 3.8%
		≥3	1/26, 3.8%
EF3023	Dairy	2	1/19, 5.3%
<i>bsh</i>	Gut	2	2/26, 7.7%
<i>fss3</i>	Urine	2	2/21, 9.5%
<i>cps4I</i>	Gut	2	1/26, 3.8%
<i>lplA1</i>	Blood	2	1/29, 3.4%
<i>dltA</i>	Blood	2	129, 3.4%

2.3 毒力基因在基因组中分布情况

同时,为了了解众多毒力基因的分布规律,将毒力基因与本研究中仅有的 6 株具有完成图的粪肠球菌全基因组序列进行比对,获取各毒力基因在粪肠球菌基因组中的位置,结果如图 1 所示。

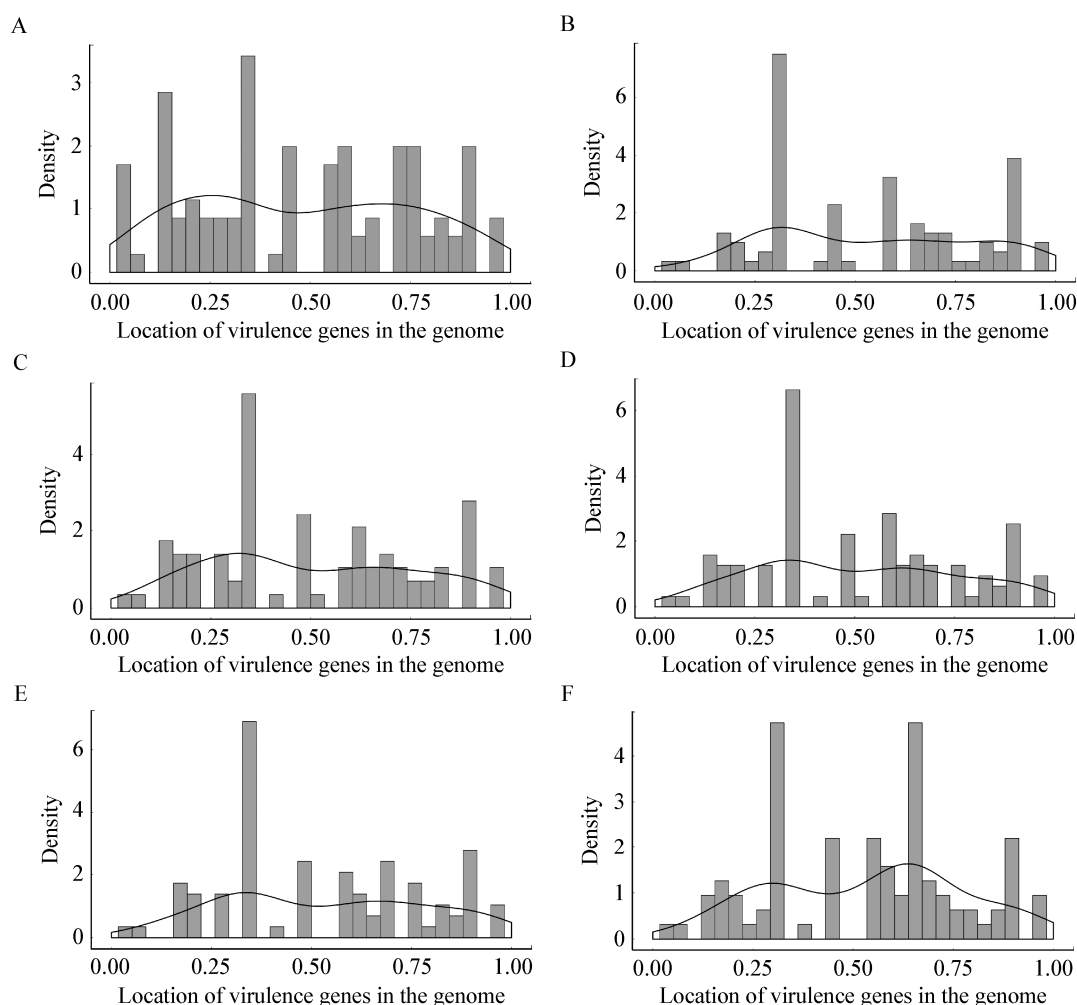


图1 毒力基因在基因组中分布

Figure 1 Distribution of virulence factor in the genome

注：横坐标表示菌株基因组位置，0 为基因组起始，1 为基因组末尾。纵坐标表示在粪肠球菌基因组该位置存在的毒力基因个数，即该位置毒力基因的密度。A: *Enterococcus faecalis* V583; B: *Enterococcus faecalis* L9; C: *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1; D: *Enterococcus faecalis* LD33; E: *Enterococcus faecalis* L12; F: *Enterococcus faecalis* D32.

Note: The abscissa indicates the genomic location of the strain, and the ordinate indicates the number of virulence genes present in the position of the *Enterococcus faecalis* genome, that is, the density of virulence genes at this position. A: *Enterococcus faecalis* V583; B: *Enterococcus faecalis* L9; C: *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1; D: *Enterococcus faecalis* LD33; E: *Enterococcus faecalis* L12; F: *Enterococcus faecalis* D32.

由图1可知,毒力基因在粪肠球菌全基因组各个位置均有分布,同时不同菌株毒力基因分布情况不尽相同。然而,研究发现一个共同的规律,在以DnaA为起始基因情况下,上述6菌株在基因组的1/3处均出现了一个毒力基因密集区。通过对这部分基因进行分析发现,此处的毒力基因多为与细菌粘附相关的基因,此外还存在一个*ebp*菌毛基因簇,帮助粪肠球菌借助菌毛粘附到宿主组织细

胞表面。

2.4 粪肠球菌共有的毒力基因分析

107株粪肠球菌共有9种毒力因子编码基因,热休克蛋白GroEL可提高细菌对宿主细胞的粘附能力^[27];ClpC和ClpE为100 kD热休克蛋白家族成员,研究发现李斯特单核*clpC*突变体细胞入侵能力增强,缺失*clpC*的突变体导致病毒因子InlA、InlB和ActA的转录减少,进一步证实*clpC*对病

原体的毒力有重要作用^[28], ClpE 与细菌中的 4 种有关毒力和致病相关的蛋白相互作用, 共同调节细菌的粘附和侵袭^[29]; *tuf* 基因编码 EF-TU, EF-TU 因作为病原相关分子模式而备受关注, Granato 等研究发现 *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) 中携带该编码基因促进其对宿主细胞的粘附作用, 从而诱导了细胞的炎症反应^[30]; 其他共有毒力因子包括 Tig/RopA (起动因子), 有研究发现人畜患病病原体猪链球菌 2 型中的 *tig* 基因影响菌株的抗逆性和少数毒力基因的表达, 猪链球菌 2 型 *tig* 基因缺失株导致细菌粘附性显著降低, 溶血性缺失^[31]; *dltA* 操纵子编码 D-丙氨酰, 参与整合脂磷壁酸和细胞壁磷壁酸合成, 对单增李斯特菌属的粘附和致病性有重要作用^[32]。 *htrA/degP* 为丝氨酸蛋白酶编码基因, *htrA/degP* 基因的缺失后影响肺炎链球菌表面蛋白 A (PspA)、自溶素(LytA)和神经酰胺酶(NanA)这 3 个毒力因子的表达, 从而降低了链球菌的致病性^[33]。根据这 9 种毒力基因编码蛋白功能发现均与致病菌粘附作用相关, 粘附是致病菌入侵宿主细胞的前提条件, 本研究的粪肠球菌中也均含有这 9 种毒力基因, 辅助了粪肠球菌的致病作用。

虽然所有菌株中均有这 9 种毒力基因, 但不同分离源菌株中携带的这些基因存在怎样的进化关系, 这些基因与分离源是否有明显的相关性? 于是将每株粪肠球菌的 9 种毒力基因的编码序列串联后做系统发育树, 分析不同分离源菌株携带的共有毒力基因是否存在差异, 进一步评估乳源分离株中共有毒力基因是否与其他分离株之间存在分离现象, 结果如图 2 所示。

由图 2 发现该系统发育树共分为两个分支, 分别为 A 分支和 B 分支, A 分支中含有大部分血液分离株(21/29), 其中肠球菌导致的血液感染比例逐年增加, 血液分离株可能存在更大的致病风险, 由此推测处于 A 分支的分离株携带的毒力基因产生致病的可能性更大, 同时可以看出在该分支中存在 10 株粪肠球菌分离自乳源, 并没有和其他分离源

出现明显分离现象, 这也预示着部分乳制品中存在的粪肠球菌也有致病的可能性。

通过多位点序列分型对 107 株粪肠球菌的 9 个关键基因进行分型, 最终将 107 株粪肠球菌分为 70 个 ST 型, 其中, 菌株数量最多的 ST 型为 ST-1, 共包含 17 株粪肠球菌, 其中 16 株菌均分离自血液, 占总菌株数的 15.9%, 是主要的序列型。其次含有菌株数较多的是 ST-8 和 ST-21, 均有 5 株菌。其余 ST 型包含菌株在 1-4 株之间。根据菌株来源分析, 发现除了 16 株血液分离株存在明显相同的 ST 型外, 其余菌株大部分 ST 型不相同, 再一次显示出同一分离源菌株的基因具有多样性, 也表明不同分离源菌株毒力基因具有较大的遗传多样性。既然分离自乳源的粪肠球菌没有出现较为单一的分型, 也证实了在乳制品中的粪肠球菌毒力基因多样性较为丰富, 这增加了其致病风险性。

2.5 不同分离源粪肠球菌所含毒力基因

粪肠球菌分布广泛, 不同分离源菌株所含毒力因子数量及种类差别是研究者所关心的问题。统计结果显示, 各分离源菌株平均携带毒力基因数量为: 血液 48 (37-54)种, 乳源 39 (32-49)种, 粪便 40 (32-47)种, 尿液 44 (35-52)种, 水源 36 (32-40)种, 经 *t* 检验发现水源分离株携带的毒力基因数量最少, 除乳源分离株与肠道分离株和水源分离株之间无显著差异外($P>0.05$), 其他各环境分离株之间均有显著差异($P>0.05$), 具体结果如图 3 所示。

然而更为关心的是不同分离源分离株所携带的毒力基因是否相同。为此, 本文进行了基于 107 株粪肠球菌分离株毒力基因分布结果的主成分分析, 结果如图 4 所示。

由图 4 发现, 除水源分离株主要集中在图片左下角, 血液、乳源、粪便和尿液分离株分布较为离散, 且不同分离源菌株相互重叠, 没有明显聚类趋势。说明上述分离源的菌株可能携带有较为相似的毒力基因, 再次证明菌株携带毒力基因与分离源无显著差异。这也预示着在粪肠球菌乳制品分离株与其他环境分离株一样, 同样存在致病风险。

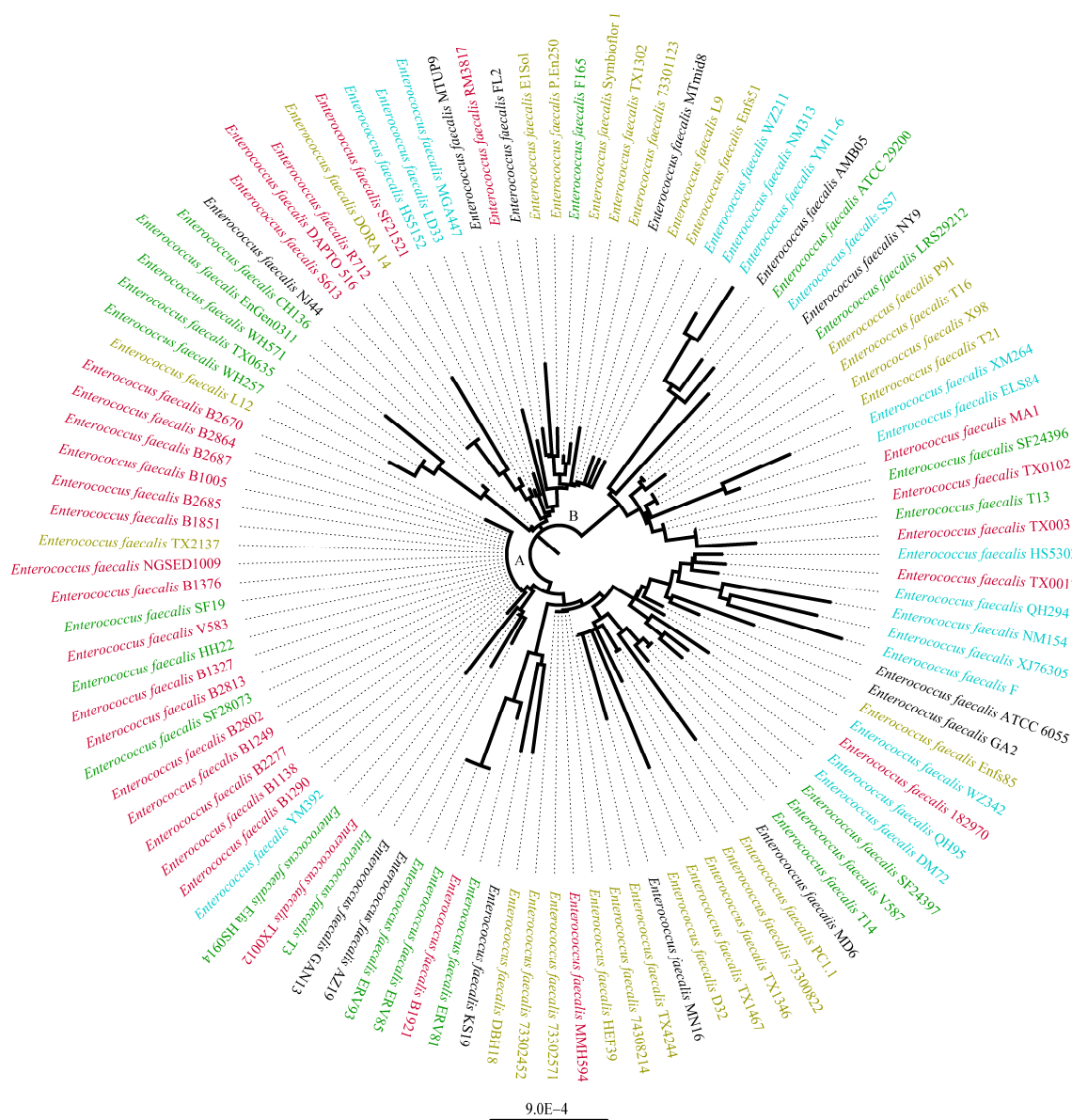


图2 共有毒力基因系统发育进化树

Figure 2 Phylogenetic tree with common virulence genes

注：红色：血液分离株；蓝色：乳源分离株；绿色：尿液分离株；黄色：粪便分离株；黑色：水源分离株；标尺：不同菌株间遗传距离。

Note: Red: Blood isolates; Blue: Dairy products isolates; Green: Urine isolates; Yellow: Gut isolates; Black: Water isolates; Scaleplate: Genetic distance between different strains.

值得关注的是 2007 年就有研究报道常作为益生菌的粪肠球菌菌株的 *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 与常见的致病菌株 *Enterococcus faecalis* V583 相比缺失部分编码肠球菌溶菌素,明

胶酶和透明质酸酶的毒力基因^[34], 这可能是该菌株能成为益生菌的主要原因。然而在本研究分离自乳制品的粪肠球菌中发现部分菌株出现了这 3 种毒力基因,这一结果再次证明粪肠球菌乳源分离株

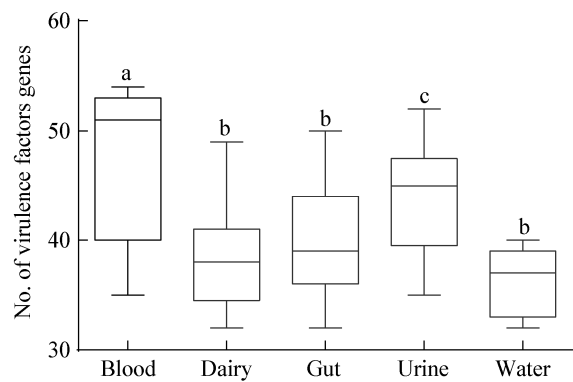


图 3 不同分离源菌株毒力基因携带情况
Figure 3 The number of virulence genes in isolates from different habitats

不一定安全。

2.6 环境特异性毒力基因

107 株菌中共发现 7 个环境特异性毒力基因，其中血液特异性毒力基因 3 个，乳源特异性毒力基因 4 个，在尿液、粪便和水源分离株中未发现环境特异性毒力基因(表 4)。

血液分离株中特异性毒力基因主要包括 *esp* 基因，在重症监护室分离的细菌中常携带该基因^[35]，可增强菌株耐药能力^[36]。同时在血液分离株中存在一个促进致病性的聚集物质(AS)编码基因 EF0485，该蛋白有助于粪肠球菌粘附在肠上皮细胞、肾小管细胞和心脏内皮细胞上，常出现在粪肠

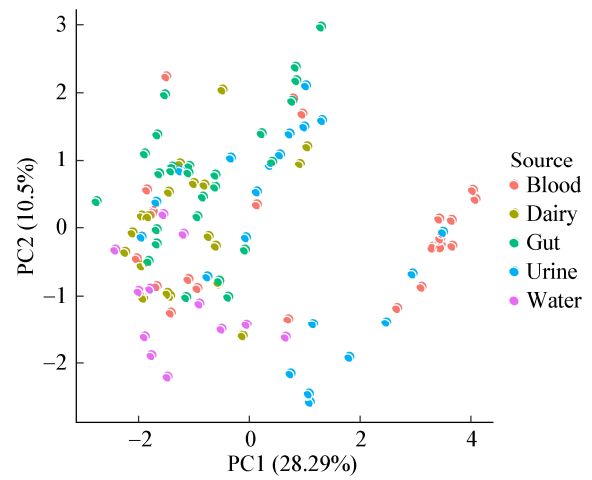


图 4 菌株毒力基因聚类分析
Figure 4 PCA and clustering of virulence genes
注：基于菌株携带毒力基因存在与否的“1/0”矩阵做主坐标分析聚类图。
Note: PCA and clustering of samples of 107 isolates of *E. faecalis* by using virulence genes presence-absence matrix (“1/0” matrix).

球菌质粒中，流动性较强，容易发生转移^[13]。毒力因子 SsaB 参与细菌金属离子转运，尤其是介导细菌在低 Mn^{2+} 环境下存活。2014 年 Crump 等研究发现脂蛋白 SsaB 是一种重要的血链球菌毒力因子，利于血链球菌感染宿主并引发心内膜炎^[37]。这些血液特异性毒力因子都直接或者间接增强了粪肠球菌致病性，促使粪肠球菌成为了医院最主要的感染菌株之一。

表 4 环境特异性毒力基因分析
Table 4 Identification of environment-specific virulence genes

毒力基因 Virulence genes	分离源 Origin	功能 Function	总检出率 Detection rate (Total) (%)	单分离源检出率 Detection rate (Single) (%)
<i>esp</i>	Blood	Enterococcal surface protein	39/107, 35.8	20/29, 69.0
EF0485	Blood	Aggregation substance (AS)	39/107, 35.8	22/29, 75.9
<i>ssaB</i>	Blood	Manganese/Zinc ABC transporter substrate-binding lipoproteinprecursor	51/107, 47.7	25/29, 86.2
<i>wbfV/wcvB</i>	Dairy	Capsular polysaccharide	13/107, 12.1	6/19, 31.6
<i>srt2</i>	Dairy	Biofilm enhancer in enterococci	2/107, 1.9	2/19, 10.5
<i>srt1</i>	Dairy	Biofilm enhancer in enterococci	2/107, 1.9	2/19, 10.5
<i>bee3</i>	Dairy	Biofilm enhancer in enterococci	2/107, 1.9	2/19, 10.5
<i>bee1</i>	Dairy	Biofilm enhancer in enterococci	2/107, 1.9	2/19, 10.5

乳源分离株特异性毒力基因主要包括 *wbfV/wcvB*、*srt1/srt2/bee1/bee3*。*wbfV/wcvB* 毒力基因主要参与编码荚膜多糖,荚膜可以帮助细菌抵抗宿主免疫细胞的吞噬作用^[38],同时帮助细菌隐蔽其表面抗原^[22],荚膜多糖也因此在细菌免疫逃逸和增强细菌毒力方面扮演着重要角色^[21]。毒力因子 *Srt1/Srt2/Bee1/Bee3* 为粪肠球菌生物膜增强因子^[39],其中有 65% 的人类细菌感染可能与细菌生物膜相关,而这些毒力因子促进了生物膜形成,增加了粪肠球菌的感染能力,使细菌感染更持久。上述结果进一步说明存在于乳制品中的粪肠球菌具有一定程度致病风险性。

3 结论

本研究在基因组层面揭示了不同分离源粪肠球菌菌株中所含有的毒力基因,在 107 株粪肠球菌中共发现 88 种毒力基因,分别参与菌株的粘附、抗吞噬和入侵。正是这些毒力基因的存在使得粪肠球菌的安全性一直受到质疑,通过分析共有毒力基因的进化关系发现毒力基因多样性较高,乳制品中分离的粪肠球菌也具有较多基因型,无法证明其安全性。深入分析发现,乳源分离株中毒力基因与其他环境分离株的毒力基因无显著差异,因此在乳制品中使用粪肠球菌要格外注意,即使是自然发酵乳中分离得到的粪肠球菌菌株,在应用于食品工业中也必须经过严格的安全性评估后才能考虑应用。

REFERENCES

- [1] Klare I, Werner G, Witte W. Enterococci. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants[J]. Contributions to Microbiology, 2001, 8: 108-122
- [2] Paulsen IT, Banerjee L, Myers GSA, et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*[J]. Science, 2003, 299(5615): 2071-2074
- [3] Franz CMAP, Huch M, Abriouel H, et al. Enterococci as probiotics and their implications in food safety[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 151(2): 125-140
- [4] Giraffa G. Functionality of Enterococci in dairy products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 88(2/3): 215-222
- [5] de Vuyst L, Vandamme EJ. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria[A]//de Vuyst L, Vandamme EJ. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria[M]. Boston, MA: Springer, 1994: 543-550
- [6] Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety?[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 47(1/2): 1-24
- [7] Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1993, 6(4): 428-442
- [8] Dougherty SH, Flohr AB, Simmons RL. 'Breakthrough' Enterococcal septicemia in surgical patients. 19 cases and a review of the literature[J]. Archives of Surgery, 1983, 118(2): 232-238
- [9] Martínez OP, Muñoz SJ, Arriola MP, et al. Enterococcal infective endocarditis: description of 12 cases[J]. Anales de Medicina Interna, 2007, 24(11): 539-542
- [10] Bayer AS, Seidel JS, Yoshikawa TT, et al. Group D Enterococcal meningitis. Clinical and therapeutic considerations with report of three cases and review of the literature[J]. Archives of Internal Medicine, 1976, 136(8): 883-886
- [11] Silva N, Igrejas G, Vaz J, et al. Virulence factors in Enterococci from partridges (*Alectoris rufa*) representing a food safety problem[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(7): 831-833
- [12] Lepage E, Brinster S, Caron C, et al. Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: identification of genes absent from food strains[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(19): 6858-6868
- [13] Bakshi U, Sarkar M, Paul S, et al. Assessment of virulence potential of uncharacterized *Enterococcus faecalis* strains using pan genomic approach-identification of pathogen-specific and habitat-specific genes[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 38648
- [14] Chen LH, Yang J, Yu J, et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(D1): D325-D328
- [15] Zhong Z. Comparative genomic analysis of the type strains of genus *Enterococcus* and multilocus sequence typing of *Enterococcus faecalis* isolated from fermented foods[D]. Hohhot: Doctor Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2015 (in Chinese)
钟智. 肠球菌属模式株比较基因组分析及发酵食品中粪肠球菌多位点序列分型研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2015
- [16] Dong M. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* expression in the biofilm of starvation phase and after two root canal conventional drugs[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Medical University, 2011 (in Chinese)
董明. 饥饿期粪肠球菌生物膜形成相关毒力因子的表达及两种根管常用药物对其作用研究[D]. 大连: 大连医科大学硕士学位论文, 2011
- [17] Zheng XH. The construction of gene *efaA*⁺ Enterococcus transformant and preliminary study of its influence on biofilm formation[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Medical University, 2010 (in Chinese)
郑晓辉. 肠球菌 *efaA* 基因阳性转化株的构建及其对生物膜形成影响的初步探讨[D]. 福州: 福建医科大学硕士学位论文, 2010
- [18] Wu EL. The influence of bacterial coculture on biological

- characteristics of porcine-originated *Enterococcus faecalis* strain[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- 武二丽. 细菌共培养对猪源粪肠球菌生物学特性的影响[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2016
- [19] Zhu B. Survey for virulence factors of enterococcus strains and prokaryotic expression of *Enterococcus faecalis* cytolysin *cylI*, *cylA*[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Medical University, 2006 (in Chinese)
- 朱波. 肠球菌毒力因子的检测及溶血素 *cylI* 和 *cylA* 基因的原核表达[D]. 福州: 福建医科大学硕士学位论文, 2006
- [20] Nallapareddy SR, Sillanpää J, Mitchell J, et al. Conservation of Ebp-type pilus genes among Enterococci and demonstration of their role in adherence of *Enterococcus faecalis* to human platelets[J]. Infection and Immunity, 2011, 79(7): 2911-2920
- [21] Luong TT, Lee CY. Overproduction of type 8 capsular polysaccharide augments *Staphylococcus aureus* virulence[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(7): 3389-3395
- [22] Thurlow LR, Thomas VC, Fleming SD, et al. *Enterococcus faecalis* capsular polysaccharide serotypes C and D and their contributions to host innate immune evasion[J]. Infection and Immunity, 2009, 77(12): 5551-5557
- [23] Moreno MRF, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, et al. The role and application of enterococci in food and health[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 106(1): 1-24
- [24] Chen X, Suo ZW, Xu JQ, et al. Review on classification and representative species of hemolysin[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(8): 16-22 (in Chinese)
- 陈希, 索占伟, 许剑琴, 等. 细菌溶血素的分类及代表性溶血素研究进展[J]. 中国农学通报, 2008, 24(8): 16-22
- [25] Xu JG. Virulence genes, Multilocus sequence typing and drug resistance analysis on clinical Enterococci[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2010 (in Chinese)
- 徐建国. 临床分离肠球菌耐药性、毒力基因及多位点序列分型研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2010
- [26] Thomas VC, Hiromasa Y, Harms N, et al. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*[J]. Molecular Microbiology, 2009, 72(4): 1022-1036
- [27] Tsugawa H, Ito H, Ohshima M, et al. Cell adherence-promoted activity of *Plesiomonas shigelloides* groEL[J]. Journal of Medical Microbiology, 2007, 56(1): 23-29
- [28] Nair S, Milohanic E, Berche P. ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(12): 7061-7068
- [29] Yan WJ. Screening and identification of ClpE interaction protein *Streptococcus pneumoniae*[D]. Chongqing: Doctor Dissertation of Chongqing Medical University, 2013 (in Chinese)
- 闫文娟. 肺炎链球菌 ClpE 相互作用蛋白的筛选鉴定[D]. 重庆: 重庆医科大学博士学位论文, 2013
- [30] Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, et al. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(4): 2160-2169
- [31] Wu T, Zhao ZQ, Zhang L, et al. Trigger factor of *Streptococcus suis* is involved in stress tolerance and virulence[J]. Microbial Pathogenesis, 2011, 51(1/2): 69-76
- [32] Li XH. Distribution and pathogenicity to virulence genes of foodborne *Listeria monocytogenes*[D]. Baoding: Master's Thesis of Agricultural University of Hebei, 2012 (in Chinese)
- 李欣华. 食源性单核增生性李斯特氏菌毒力基因分布及致病力的研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2012
- [33] Huang YS, Xu SX, Zhu D, et al. Effect of HtrA gene deletion on virulence of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2006, 27(17): 1542-1546 (in Chinese)
- 黄远帅, 许颂霄, 朱旦, 等. HtrA 基因缺陷对肺炎链球菌毒力影响的研究[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(17): 1542-1546
- [34] Domann E, Hain T, Ghai R, et al. Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2007, 297(7/8): 533-539
- [35] Wang GF, Wu LX, Xue SP. Relationship between *esp* gene in *Enterococcus* from ICU and vancomycin resistance[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2012, 22(13): 2724-2726 (in Chinese)
- 王国富, 吴利先, 薛士鹏. ICU 肠球菌属 *esp* 基因分布及对万古霉素耐药的相关性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(13): 2724-2726
- [36] Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*[J]. Nature, 2002, 417(6890): 746-750
- [37] Crump KE, Bainbridge B, Brusko S, et al. The relationship of the lipoprotein SsaB, manganese and superoxide dismutase in *Streptococcus sanguinis* virulence for endocarditis[J]. Molecular Microbiology, 2014, 92(6): 1243-1259
- [38] Kadioglu A, Taylor S, Iannelli F, et al. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(6): 2886-2890
- [39] Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(6): 2063-2072