

## 研究报告

## 林麝源酪黄肠球菌的分离鉴定及全基因组序列分析

杨凯惟<sup>1</sup>, 丁慧<sup>1</sup>, 马炳存<sup>2</sup>, 李增婷<sup>2</sup>, 伍茜<sup>1</sup>, 刘洁<sup>1</sup>, 罗燕<sup>\*1</sup>

1 四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130

2 四川省药品检验研究院, 四川 成都 611731

杨凯惟, 丁慧, 马炳存, 李增婷, 伍茜, 刘洁, 罗燕. 林麝源酪黄肠球菌的分离鉴定及全基因组序列分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 1265-1280.

YANG Kaiwei, DING Hui, MA Bingcun, LI Zengting, WU Xi, LIU Jie, LUO Yan. Isolation, identification, and whole genome sequencing of *Enterococcus casseliflavus* from forest musk deer[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 1265-1280.

**摘要:**【背景】酪黄肠球菌(*Enterococcus casseliflavus*)为肠球菌属(*Enterococcus*)中的一种机会性致病菌, 其广泛存在于自然界中, 但是目前林麝源酪黄肠球菌的相关研究甚少。【目的】对从病死林麝肝脏中分离出一株酪黄肠球菌进行分离鉴定和全基因组测序, 以期为林麝相关细菌性疾病的预防和治疗奠定基础。【方法】将病原菌分离并纯化后, 对其进行生化试验、药敏试验、16S rRNA 基因分析和细菌载量试验, 并根据全基因组测序结果进行耐药基因、毒力基因注释及遗传进化分析。【结果】分离菌株经 16S rRNA 基因分析和平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)分类后判断其为酪黄肠球菌, 生化试验结果与酪黄肠球菌的一般特性相符合, 将分离株命名为 Dec0527。菌株 Dec0527 对头孢氨苄、氟康唑、丁胺卡那、妥布霉素等药物耐药, 对多西环素、四环素、氯霉素、复方新诺明和部分  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类药物敏感。细菌载量结果表明菌株 Dec0527 对肝脏的侵袭力明显高于心脏、肺脏、脾脏和肾脏。该菌株的基因组长度为 3 345 060 bp, G+C 含量为 42.55%。菌株 Dec0527 携带 *ebpC*、*tufA*、*groEL*、*cpsA*、*cap8E*、*psaA* 等多种毒力因子, 同时还携带对万古霉素、环丙沙星等多种药物耐药的基因, 菌株 Dec0527 对氨基糖苷类、大环内酯类和  $\beta$ -内酰胺类药物存在耐药基因与耐药表型不完全相符的现象。此外, 菌株 Dec0527 基因组还包含 2 个环状质粒和一个比较完整的噬菌体区域。【结论】从林麝肝脏分离出一株酪黄肠球菌并对其完成了全基因组测序及分析, 为林麝相关疾病的防治提供了参考依据。

**关键词:** 林麝; 酪黄肠球菌; 耐药性; 全基因组序列分析

资助项目: 四川省自然科学基金(2024NSFSC0378)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Sichuan Province (2024NSFSC0378).

\*Corresponding author. E-mail: Lycjg@163.com

Received: 2024-05-20; Accepted: 2024-06-17; Published online: 2024-07-22

## Isolation, identification, and whole genome sequencing of *Enterococcus casseliflavus* from forest musk deer

YANG Kaiwei<sup>1</sup>, DING Hui<sup>1</sup>, MA Bingcun<sup>2</sup>, LI Zengting<sup>2</sup>, WU Xi<sup>1</sup>, LIU Jie<sup>1</sup>, LUO Yan<sup>\*1</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Sichuan Institute for Drug Control, Chengdu 611731, Sichuan, China

**Abstract:** [Background] *Enterococcus casseliflavus* is an opportunistic pathogenic bacterium with wide distribution in the nature, while there are few studies about this bacterium in forest musk deer. [Objective] We isolated, identified, and sequenced a strain of *E. casseliflavus* from the liver of a death forest musk deer, aiming to lay a foundation for the prevention and treatment of related diseases in forest musk deer. [Methods] Biochemical tests, drug susceptibility tests, 16S rRNA gene analysis, and bacterial load tests were conducted for the isolate. The results of whole genome sequencing were used to annotate gene functions and analyze genetic evolution. [Results] The isolated strain was identified based on 16S rRNA gene analysis and average nucleotide identity as *E. casseliflavus*, which was consistent with the results of biochemical tests. The strain was named Dec0527. The strain was resistant to cephalixin, aztreonam, amikacin, and tobramycin, and it was sensitive to doxycycline, tetracycline, chloramphenicol, sulfamethoxazole trimethoprim, some  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, and quinolones. The bacterial load test results showed that the invasiveness of strain Dec0527 to the liver was significantly higher than that to the heart, lung, spleen, and kidney. The genome length of this strain was 3 345 060 bp, with the G+C content of 42.55%. Strain Dec0527 carried a variety of virulence genes such as *ebpC*, *tufA*, *groEL*, *cpsA*, *cap8E*, and *psaA*, as well as the genes for resistance to vancomycin and ciprofloxacin. The resistance genes of strain Dec0527 against aminoglycosides, macrolides, and  $\beta$ -lactams were not completely consistent with the drug resistance. In addition, the genome of the strain Dec0527 had 2 circular plasmids and a relatively complete phage region. [Conclusion] We isolated a strain of *E. casseliflavus* from the liver of a dead forest musk deer and sequenced and analyzed the whole genome of this strain, providing a reference for the prevention and control of diseases in forest musk deer.

**Keywords:** forest musk deer; *Enterococcus casseliflavus*; drug resistance; whole genome sequencing

酪黄肠球菌(*Enterococcus casseliflavus*)是一种革兰氏阳性的兼性厌氧菌,广泛地分布于土壤、水源等自然环境中,在动物胃肠道内也可存在。酪黄肠球菌可引起菌血症、胆管炎和腹膜炎等疾病<sup>[1-3]</sup>,是引发多种感染的致病性微生物之一,近年来有关肠球菌在手术后引起伤口感染的报道也日趋增加<sup>[4]</sup>。因其对万古霉素

等多种抗生素具有较高耐药性,临床上的防治具有一定难度。而且,有研究推测酪黄肠球菌因在自然界中分布广泛,具有耐药质粒“储存库”的生态作用,可以将耐药基因传播给其他具有致病力的物种<sup>[5]</sup>。

林麝(*Moschus berezovskii*)是偶蹄目(Artiodactyla)麝科(Moschidae)麝属(*Moschus*)哺

乳动物，俗称獐子<sup>[6]</sup>。林麝在我国主要分布于四川、甘肃等地，成年雄麝腹部香囊腺可分泌麝香，作为世界四大名贵香料之首，麝香是各类高档化妆品和香水必不可少的原料<sup>[7]</sup>，同时麝香也是我国传统医药行业中名贵的药材<sup>[8]</sup>。由于人类过度捕杀造成了野生林麝资源的枯竭，林麝已在《中国国家重点保护野生动物名录》<sup>[9]</sup>中被列为一级保护动物。目前，细菌性疾病在圈养麝群中发病率高且危害严重<sup>[10]</sup>，但是目前尚无林麝感染酪黄肠球菌(*E. casseliflavus*)的相关报道。

本研究从病死林麝的肝脏中分离出 1 株酪黄肠球菌(*E. casseliflavus*)，对分离菌株进行生化试验和药敏试验并依据全基因组测序结果，并对其毒力基因、耐药基因等进行注释和分析，探究林麝酪黄肠球菌(*E. casseliflavus*)的致病和耐药机制，以期为林麝细菌性疾病的防治提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品

病料来源于四川省某林麝养殖场中一头病死的 6 月龄雌性林麝。该林麝死亡前几日采食、活动均正常，无异常表现，死亡时口吐鲜血，呈卧姿，无其他症状。该养殖场在林麝发病后曾使用过丁胺卡那等药物，平时主要采用的生物安全措施为定期对林麝圈舍、养殖场库房等地点进行消毒。18 只雌雄各半的 6 周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级昆明小鼠购自成都达硕实验动物有限公司，动物实验通过四川农业大学动物福利委员会审查，批准编号为 20240235。

### 1.2 培养基、主要试剂和仪器

胰蛋白胨大豆琼脂(tryptone soy agar, TSA)培养基和 LB 培养基，青岛海博生物技术有限

公司。

细菌染色试剂和细菌微量生化管，青岛海博生物技术有限公司；药敏纸片，杭州微生物试剂有限公司；PBS 溶液，北京索莱宝科技有限公司；2×*SanTaq* PCR Mix，生工生物工程(上海)股份有限公司；DNA 分子质量标准，天根生化科技(北京)有限公司。

凝胶成像仪和 PCR 扩增仪，Bio-Rad 公司；蒸汽压力灭菌器，上海博迅股份有限公司；细菌培养箱，宁波乐电仪器有限公司；水浴恒温摇床，常州金坛友联仪器研究所；台式冷冻离心机，艾本德公司；生物显微镜，Olympus 公司。

### 1.3 病原菌的分离

无菌解剖病死林麝，将脏器明显病变部位分别划线接种于 TSA 培养基，37 °C 培养 24 h 后进行革兰氏染色，依据染色结果和菌落形态特征挑取单菌落进行纯化、保存。

### 1.4 分离菌株的生化试验

参照细菌微量生化管使用说明书将分离菌株接种到生化管中进行生化试验。

### 1.5 分离菌株的药敏试验

采用 Kirby-Barer 纸片法对菌株的药物敏感性进行测定，选取青霉素、氨苄西林、亚胺培南、庆大霉素、丁胺卡那、阿奇霉素、复方新诺明等共 21 种抗生素，参照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的推荐标准进行药物敏感性试验<sup>[11]</sup>。

### 1.6 16S rRNA 基因序列分析

挑取分离纯化后的单菌落至 LB 液体培养基中，于 37 °C、150 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.6–0.8，将菌液稀释后取 1 μL 作为模板，使用细菌 16S rRNA 基因通用引物<sup>[12]</sup> 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTACCTG TTACGACTT-3')对纯化的分离株进行 16S rRNA 基因扩增。PCR 反应体系(20 μL): 2×*SanTaq* PCR

Mix 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , 菌液 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件参照 2 $\times$ SanTaq PCR Mix 说明书进行。将扩增产物送擎科生物科技股份有限公司测序, 测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 比对, 使用 MEGA 7 软件构建系统发育树。

## 1.7 细菌载量的测定

挑取分离纯化的单菌落至 8 mL LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 12 h 后按 1% 接种量接种在 25 mL LB 液体培养基, 使  $OD_{600}$  值处于 0.6–0.8。将菌液在 7 500 r/min 条件下离心 10 min, 弃去上清液, 用无菌的 PBS 溶液重悬菌体沉淀, 以平板计数法计算菌液浓度<sup>[13]</sup>。

根据以上预试验结果将菌液浓度调整为  $10^8$  CFU/mL, 再使用平板计数法统计具体菌液浓度, 结合董妮华等<sup>[14]</sup>和娄欣宇等<sup>[15]</sup>的方法, 根据小鼠的体重随机将 18 只小鼠分为 2 组(雌雄各半), 其中试验组 12 只, 对照组 6 只, 试验组腹腔注射菌液 0.4 mL/只, 对照组腹腔注射等量的无菌 PBS 溶液。分别于攻毒后的 12、24 和 36 h 时无菌解剖 4 只试验组小鼠和 2 只对照组小鼠, 并采集部分心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏, 研磨后取 100  $\mu\text{L}$  组织匀浆加入提前准备好的 900  $\mu\text{L}$  无菌 PBS 溶液中进行 10 倍比稀释, 每个稀释梯度取 100  $\mu\text{L}$  涂布于 LB 固体培养基, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后对平板进行细菌计数, 同时将脏器病变明显的部位送成都里来生物公司进行病理组织学检测。

## 1.8 分离菌株的全基因组测序

将分离纯化后的菌株送至上海派森诺生物科技股份有限公司完成基因组测序工作。测序采用第二代、第三代单分子测序技术, 分别基于 Illumina NovaSeq 和 Oxford Nanopore ONT 测序平台对文库进行测序, 使用 Unicycler、Flye

软件对下机数据进行拼装, 纠错校正后得到完整序列。

## 1.9 分离菌株的全基因组分析

### 1.9.1 平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)比对

使用 OrthoANI<sup>[16]</sup>软件将分离菌株与该属其他菌株进行平均核苷酸一致性比对, 并利用 TBtools 软件绘制热图。

### 1.9.2 毒力基因和耐药基因注释

使用 BLAST 软件采用毒力因子数据库(www.mgc.ac.cn/VFs/)对毒力基因进行注释, 将 BLAST 比对参数  $E$ -value 设定为  $1E-5$ , 设置氨基酸序列的一致性为大于 60%, 序列比对长度大于与其对应毒力因子相关基因序列长度的 70%, 比对的 gap 长度小于序列比对长度的 10%。

采用综合抗生素耐药性数据库(https://card.mcmaster.ca)预测在基因组中存在的与抗生素抗性相关的基因, 将 BLAST 比对参数  $E$ -value 设定为  $1E-6$ , 氨基酸序列的一致性大于 45%。

### 1.9.3 COG 和 KEGG 聚类分析

将基因编码蛋白序列与同源聚类基因注释数据库(http://eggnogdb.embl.de/#/app/home/)中的蛋白序列进行比对, 设置序列比对的临界值为  $1E-6$ , 选取最佳 hits 的 eggNOG (COG) 编号赋值给相应的蛋白编码基因。

蛋白编码基因的 KEGG 注释使用代谢途径注释数据库(http://www.genome.jp/kegg/), 并基于 Brite 数据库将注释后的蛋白进行层次分类。

### 1.9.4 原噬菌体预测

利用在线工具 PHASTER (http://phaster.ca/) 预测基因组中存在的原噬菌体, 并对其完整性进行评估。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的形态特征

菌株 Dec0527 在 TSA 培养基上呈米白色，半透明，圆形，表面光滑湿润，边缘规整，中央稍稍隆起，直径在 0.5–1.0 mm (图 1A)。挑单菌落革兰染色镜检，显示其为革兰氏阳性菌，呈单个或成对排列(图 1B)。

### 2.2 生化试验结果

菌株 Dec0527 生化试验结果如表 1 所示，

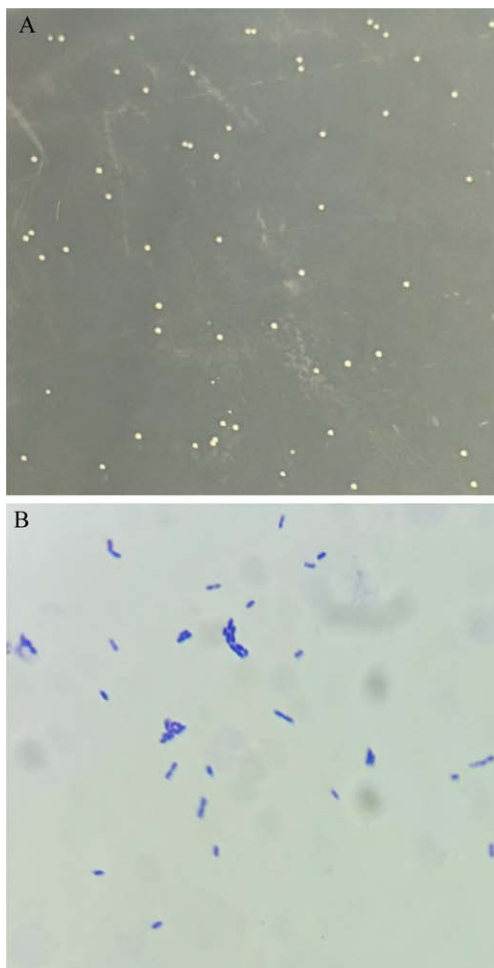


图 1 菌株 Dec0527 的形态特征 A: TSA 培养基上菌落形态; B: 革兰染色结果(1 000×)。

Figure 1 The morphology of strain Dec0527. A: Colony morphology on TSA medium; B: Gram staining of strain Dec0527 (1 000×).

表 1 菌株 Dec0527 的生化试验结果

Table 1 Biochemical test results of strain Dec0527

Test item	Result
Mannitol	+
Raffinose	+
Cane sugar	+
Protease	-
Cellulase	-
Sorbose	-
Arabinose	-
Pyruvate	-

+: Positive; -: Negative.

该菌株甘露醇、棉子糖、蔗糖试验结果为阳性，蛋白酶、纤维素酶、山梨糖、阿拉伯糖、丙酮酸盐试验结果均为阴性。

### 2.3 药敏试验结果

如表 2 所示，菌株 Dec0527 对四环素类药物(多西环素、四环素)、磺胺类药物(磺胺异噁唑、复方新诺明)、酰胺醇类药物(氯霉素、氟苯尼考)、部分  $\beta$ -内酰胺类药物(氨苄西林、阿莫西林、头孢他啶)和少数氨基糖苷类药物(链霉素)、喹诺酮类药物(环丙沙星)敏感。对大环内酯类药物(红霉素、阿奇霉素)和部分  $\beta$ -内酰胺类药物(头孢氨苄、氨曲南)、氨基糖苷类药物(丁胺卡那、妥布霉素)耐药。

### 2.4 16S rRNA 基因分析结果

将 16S rRNA 基因序列在 NCBI 进行比对，结果显示菌株 Dec0527 与肠球菌属(*Enterococcus*)的酪黄肠球菌(*E. casseliflavus*)、小肠肠球菌(*Enterococcus hirae*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、蒙氏肠球菌(*Enterococcus mundtii*)、鸡肠球菌(*Enterococcus gallinarum*)、耐久肠球菌(*Enterococcus durans*)及乳肠球菌(*Enterococcus lactis*)的相似度均在 98% 以上，由此可以初步判断菌株 Dec0527 为肠球菌属(*Enterococcus*)。基于测序结果构建的系统发育树如图 2 所示。

表 2 药敏试验结果

Table 2 Antibiotic susceptibility test results

抗生素类别	药物名称	抑菌圈直径	结果		
Antibiotics category	Antibiotic	Antibacterial circle diameter (mm)	Result		
β-内酰胺类 β-lactam antibiotics	青霉素类 Penicillins	青霉素 Penicillin	15	I	
	头孢菌素类 Cephalosporins	氨苄西林 Ampicillin	17	S	
		阿莫西林 Amoxicillin	21	S	
		头孢氨苄 Cefalexin	10	R	
	碳青霉烯类 Carbapenems	头孢唑林 Cefazolin	17	I	
		头孢他啶 Ceftazidime	23	S	
		头孢曲松 Ceftriaxone	15	I	
		亚胺培南 Imipenem	15	I	
	氨基糖苷类 Aminoglycosides	氨基糖苷类 Carbapenems	氨曲南 Aztreonam	6	R
		庆大霉素 Gentamicin	14	I	
链霉素 Streptomycin		19	S		
丁胺卡那 Amikacin		12	R		
妥布霉素 Tobramycin		12	R		
大环内酯类 Macrolide	红霉素 Erythromycin	10	R		
	阿奇霉素 Azithromycin	12	R		
四环素类 Tetracyclines	多西环素 Doxycycline	22	S		
	四环素 Tetracycline	20	S		
酰胺醇类 Amphenicols	氯霉素 Chloramphenicol	19	S		
	氟苯尼考 Florfenicol	20	S		
喹诺酮类 Quinolones	氧氟沙星 Ofloxacin	13	I		
	环丙沙星 Ciprofloxacin	16	S		
磺胺类 Sulfonamides	磺胺异噁唑 Sulfamethoxazole	19	S		
	复方新诺明 Cotrimoxazole	24	S		

S: 敏感; I: 中介; R: 耐药。

S: Sensitive; I: Intermediary; R: Resistance.

## 2.5 细菌载量试验结果

由图 3 小鼠脏器细菌载量统计结果可知, 在试验进行的 36 h 内, 对照组小鼠各脏器中均未检出酪黄肠球菌; 攻毒组小鼠的心脏和脾脏也几乎无酪黄肠球菌被检出, 而肺脏、肝脏和肾脏在感染的第 12、24 和 36 h 时载菌量均较高。其中, 在第 12 h 时, 肝脏中的细菌载量分别为肺脏和肾脏的 3.89 倍和 1.46 倍; 在第 24 h 时, 肝脏中的细菌载量分别为肺脏和肾脏的 5.33 倍和 11.67 倍; 在第 36 h 时, 肝脏中的细菌载量分别可达到肺脏和肾脏的 16.05 倍和 14.02 倍, 由此可以说明相比于其他脏器, 菌株

Dec0527 对肝脏有着更强的侵袭力。同时, 在攻毒后的 36 h 内各脏器中细菌载量均呈现不同程度的下降趋势, 说明在感染后的一段时间中, 小鼠自身的免疫系统发挥了一定的清除作用。

菌株 Dec0527 攻毒小鼠后, 36 h 内攻毒组小鼠表现为精神萎靡, 抱团取暖, 剖检后, 小鼠肺脏和肝脏均可见不同程度瘀血。肺脏和肝脏病理切片苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色结果如图 4 所示: 肺呼吸部肺泡隔增厚, 血管瘀血、出血, 肺泡萎陷、结构模糊。肝脏中央静脉及周围肝窦瘀血, 伴肝窦扩张。对照组小鼠无异常行为, 剖检后未观察到脏器病变。

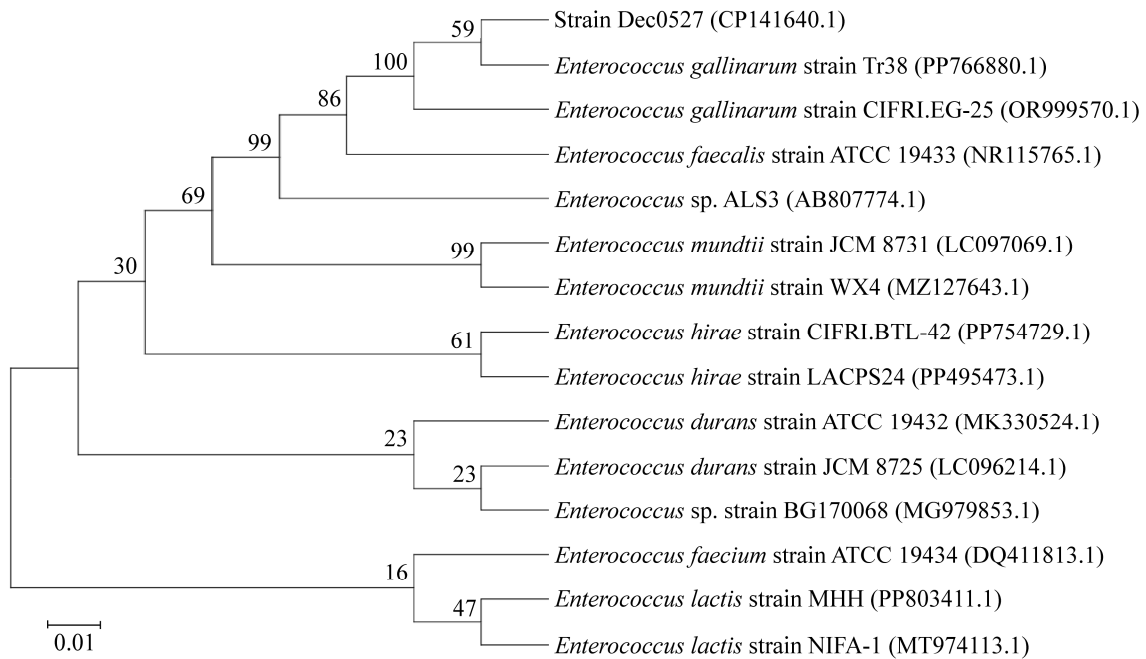


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 Dec0527 的系统发育树 括号内序号为菌株的 GenBank 登录号；分支点上的数字表示 Bootstrap 检验的置信度；比例尺“0.01”代表遗传距离的单位。

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain Dec0527. The serial number in parentheses is the GenBank accession number of the strain; The number on the branch point represents the confidence level of the Bootstrap test; Scale “0.01” represents the unit of genetic distance.

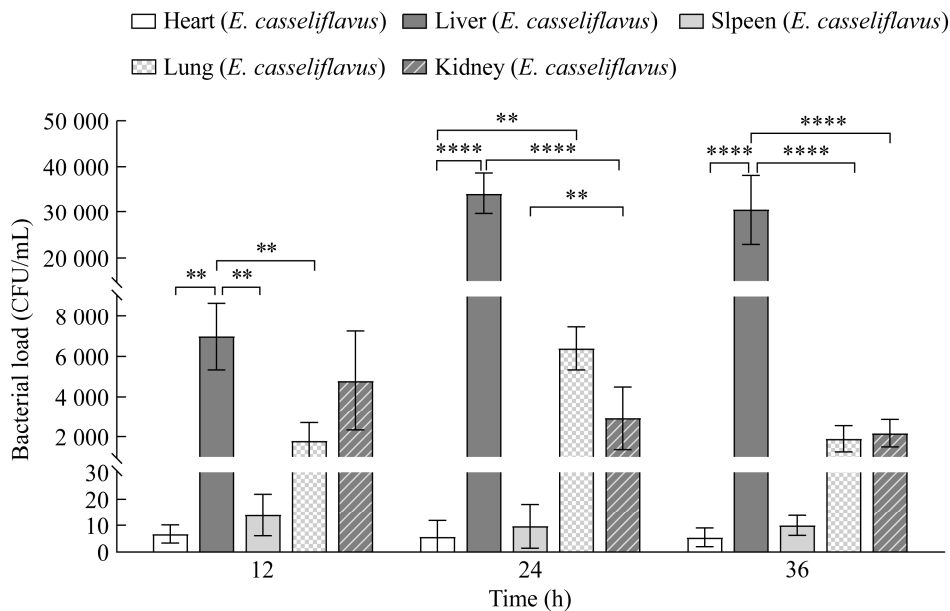
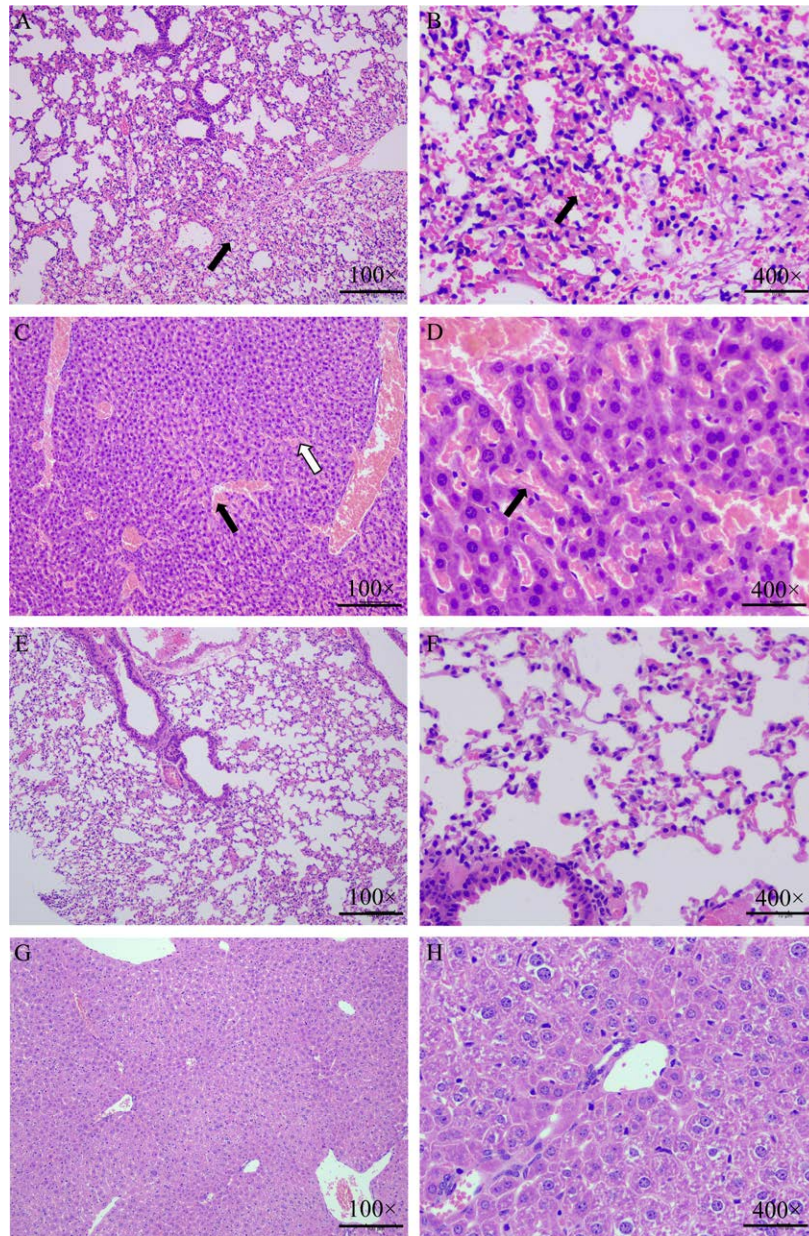


图 3 小鼠脏器细菌载量

Figure 3 Bacterial load in organs of mice. \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ .



**图 4** 小鼠病变器官病理切片苏木精-伊红图 A: 肺脏病理切片(100×), 肺泡萎陷、出血(黑色箭头)。B: 肺脏病理切片(400×), 肺泡萎陷、出血(黑色箭头)。C: 肝脏病理切片(100×), 静脉瘀血(黑色箭头), 肝窦瘀血扩张(白色箭头)。D: 肝脏病理切片(400×), 肝窦瘀血扩张(黑色箭头)。E: 对照组小鼠肺脏切片(100×)。F: 对照组小鼠肺脏切片(400×)。G: 对照组小鼠肝脏切片(100×)。H: 对照组小鼠肝脏切片(400×)。

**Figure 4** Hematoxylin-eosin (HE) staining pathological sections of mouse diseased organs. A: Pathological section of the lung (100×), alveolar collapse and hemorrhage (black arrow). B: Pathological section of lung (400×), alveolar collapse and hemorrhage (black arrow). C: Pathological sections of the liver (100×), venous congestion (black arrow), hepatic blood congestion and dilation (white arrow). D: Pathological sections of the liver (400×), hepatic sinusoidal stasis and expansion (black arrow). E: Lung sections from negative control mice (100×). F: Lung sections from negative control mice (400×). G: Liver sections from negative control mice (100×). H: Liver sections from negative control mice (400×).



## 2.6 全基因组测序及分析结果

### 2.6.1 菌株全基因组基本信息

菌株 Dec0527 基因组由一条环状染色体 (3 345 060 bp) 和 2 个环状质粒组成, G+C 含量为 42.55%, 编码 3 274 个基因, 包含 tRNA 62 个, rRNA 15 个, 测序结果显示染色体和质粒的覆盖倍数均为 318 倍。将 FASTQ 格式的原始数据上传至 NCBI 数据库, 获得序列登录号分别为 CP141640.1、CP141641.1 和 CP141642.1, 基因组详细信息见表 3。

### 2.6.2 ANI 分析结果

分别选取肠球菌属的酪黄肠球菌 (*E. casseliflavus*) 4 株、小肠肠球菌 (*E. hirae*) 5 株、屎肠球菌 (*E. faecium*) 5 株、粪肠球菌 (*E. faecalis*) 5 株、蒙氏肠球菌 (*E. mundtii*) 5 株、鸡肠球菌 (*E. gallinarum*) 5 株、耐久肠球菌 (*E. durans*) 5 株及乳肠球菌 (*E. lactis*) 5 株进行比对分析。结果显示, 菌株 Dec0527 与所选取的酪黄肠球菌相似性均在 95% 以上, 而与其他几种所选取的菌株相似性均低于 80%, 因此可以判断菌株 Dec0527 为酪黄肠球菌 (*E. casseliflavus*) (图 5)。

### 2.6.3 毒力因子注释结果

菌株 Dec0527 的毒力因子检测结果如表 4 所示, 检测到的毒力因子相关基因所编码的产

物具有参与黏附和侵袭等功能, 包括参与菌毛及生物膜形成相关基因 (*ebpC*)、促进细菌黏附或侵袭相关基因 (*tufA*)、细胞壁锚定蛋白相关基因 (*groEL*)、宿主免疫逃避相关基因 (*cpsA*, *cpsB*)、抗吞噬基因 (*clpC*) 以及参与细菌代谢的相关基因 (*psaA*)。

### 2.6.4 耐药基因注释结果

菌株 Dec0527 的多种耐药基因与氨基糖苷类、氟喹诺酮类、糖肽类抗生素等药物有关, 还包含产生抗生素耐药性的外排泵相关基因, 结果见表 5。

### 2.6.5 蛋白编码基因的 eggNOG 和 KEGG 注释结果

通过数据库的比对分析, 菌株 Dec0527 的 2 856 个基因分别被注释到 19 组 COG 功能中, 共有 2 176 个蛋白与已知蛋白或已知的假设蛋白同源, 另有 680 个蛋白功能未知。与碳水化合物运输、代谢 (carbohydrate transport and metabolism) 相关基因数量最多, 为 356 个, 其次是参与转录 (transcription) 和氨基酸运输、代谢 (amino acid transport and metabolism) 的相关基因, 分别为 270 个和 213 个 (图 6)。

此外, 菌株 Dec0527 共有 3 186 个基因被注释到 KEGG 功能分类中, 8 个一级分类中与新陈代谢有关的蛋白最多, 有 1 001 个。Brite 数据库将注释后的蛋白进行层次分类, 数量最多的是与信号转导和细胞进程 (signaling and cellular processes) 相关的基因, 为 488 个, 其次是与遗传信息加工 (genetic information processing) 和碳水化合物代谢 (carbohydrate metabolism) 相关的基因, 分别为 484 和 348 个。另外, 还有 288 个蛋白因缺乏特征而未被包含 Brite 数据库和代谢通路中 (图 7)。

表 3 菌株 Dec0527 基因组基本信息

Table 3 Basic information of strain Dec0527 genome

Item	Chromosome	Plasmid 1	Plasmid 2
GenBank accession No.	CP141640.1	CP141641.1	CP141642.1
Sequence length (bp)	3 345 060.00	60 671.00	6 708.00
G+C content (%)	42.90	35.74	36.30
Open reading frame number	3 199.00	64.00	11.00

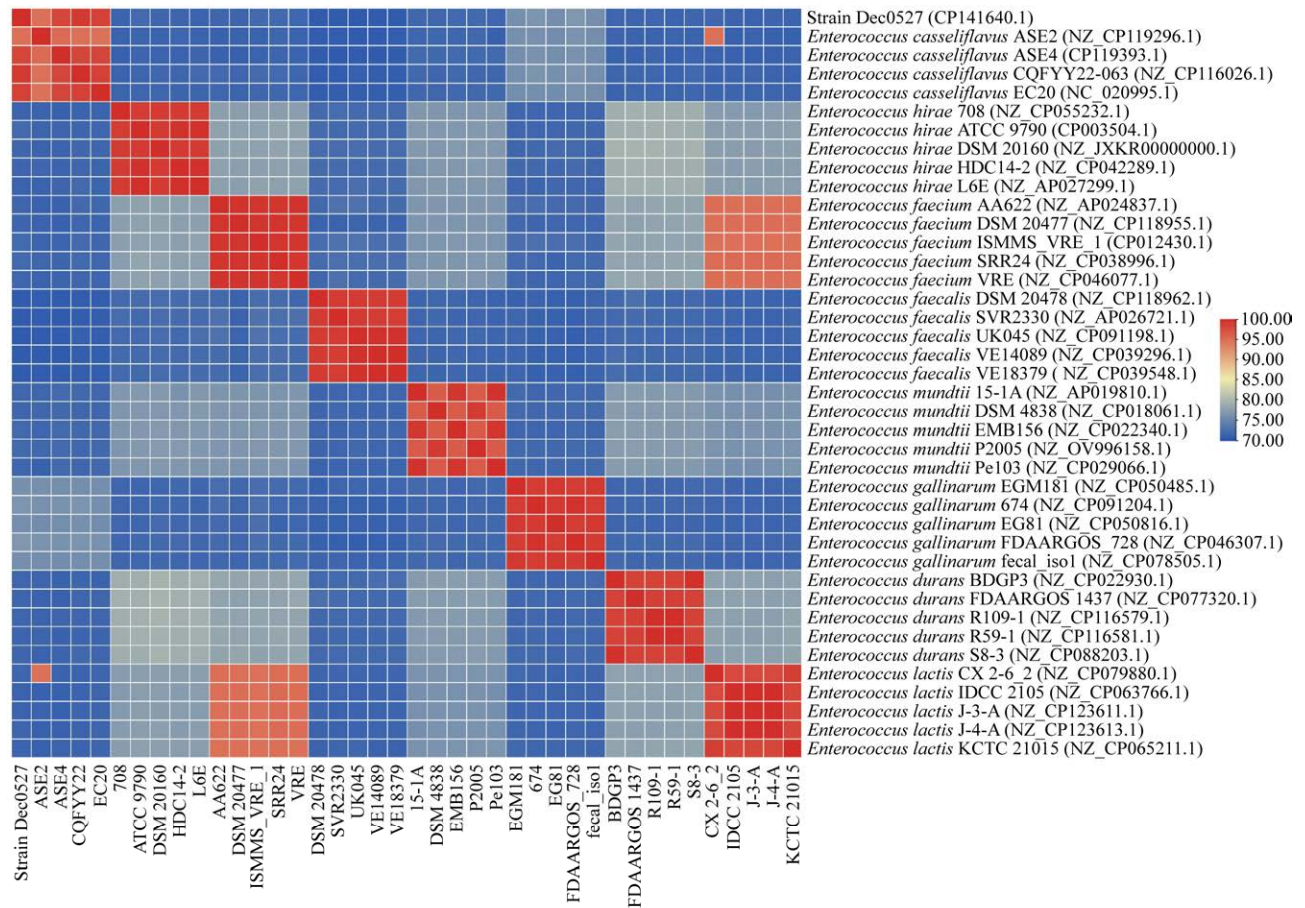


图 5 菌株 Dec0527 与肠球菌群菌株的平均核苷酸一致性比对

Figure 5 Comparison of average nucleotide identity between strain Dec0527 and *Enterococcus* group.

表 4 菌株 Dec0527 基因组中的毒力因子

Table 4 Virulence factors in strain Dec0527 genome

毒力因子类别	毒力因子	相关基因
VF category	Virulence factor	Related gene
Adherence	Ebp pili	<i>ebpC</i>
	EF-Tu	<i>tufA</i>
	GroEL	<i>groEL</i>
	Lap	<i>lap</i>
Biofilm	BopD	<i>bopD</i>
Immune modulation	Capsule	<i>cap8E, cps4E, cps4J, cpsA, cpsB, gndA</i>
	Hyaluronic acid capsule	<i>hasC</i>
	LPS	<i>wbtB, wbtE, wbtF</i>
Nutritional/Metabolic factor	LplA1	<i>lplA1</i>
	PsaA	<i>psaA</i>
Stress survival	BSH	<i>bsh</i>
	ClpC	<i>clpC</i>
	ClpP	<i>clpP</i>

表 5 菌株 Dec0527 耐药基因预测

Table 5 Prediction of antibiotic resistance gene in strain Dec0527

Resistant gene category	Resistant gene
Fluoroquinolone-resistance	<i>gyrA, parC, parE</i>
Peptide-resistance	<i>cls, gyrB, pgsA, rpoC, yvqC</i>
Phosphonic acid-resistance	<i>fosX, mdtG</i>
Rifamycin-resistance	<i>rpoB, rpoC</i>
Aminoglycoside antibiotic	<i>strA</i>
Glycopeptide antibiotic	<i>vanC, vanR, vanRc, vanRF, vanSc, vanTc, vanU, vanXYc</i>
Lincosamide antibiotic	<i>lmrC, lmrD</i>
Efflux pump conferring antibiotic resistance	<i>arlR</i>

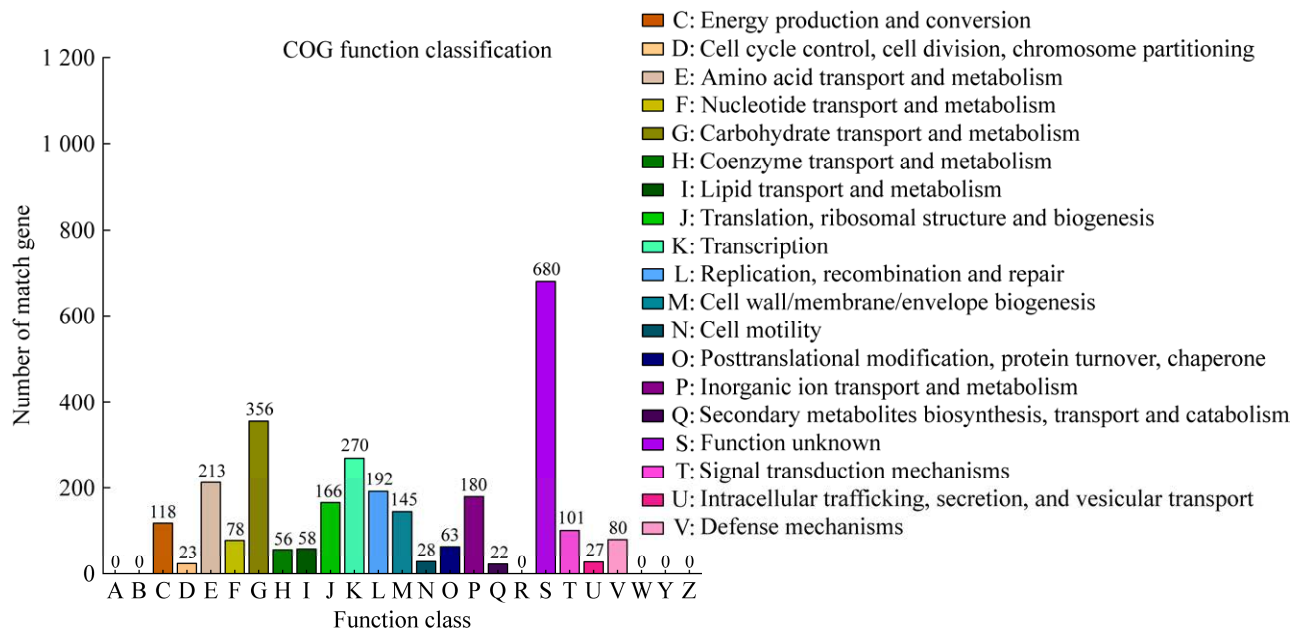


图 6 eggNOG (COG)功能分类图

Figure 6 eggNOG (COG) cartogram.

### 2.6.6 原噬菌体预测结果

菌株 Dec0527 基因组中共发现 3 个噬菌体基因组区域的存在，但是只有一个区域的完整性总分大于 90，可被判定为完整噬菌体(图 8)。该噬菌体位于 chr 的 1 606 839–1 645 707 bp 处，长度为 38.8 kb，包含 53 个编码序列(coding sequence, CDS)，G+C 含量为 37.76%，完整性得分为 140，与其最相似的噬菌体是肠球菌噬菌体 phiFL4A (GenBank 登录号为 NC\_013644)。

## 3 讨论

酪黄肠球菌(*Enterococcus casseliflavus*)属于肠球菌属(*Enterococcus*)，肠球菌属细菌是革兰阳性菌中仅次于葡萄球菌属(*Staphylococcus*)的可在医院引起感染的病原菌，曾有研究认为肠球菌是对人类无害的共栖菌，但随着研究的深入，人们已证明肠球菌具有一定的致病力<sup>[17]</sup>，在与宿主共同进化以适应定殖环境的同时，肠

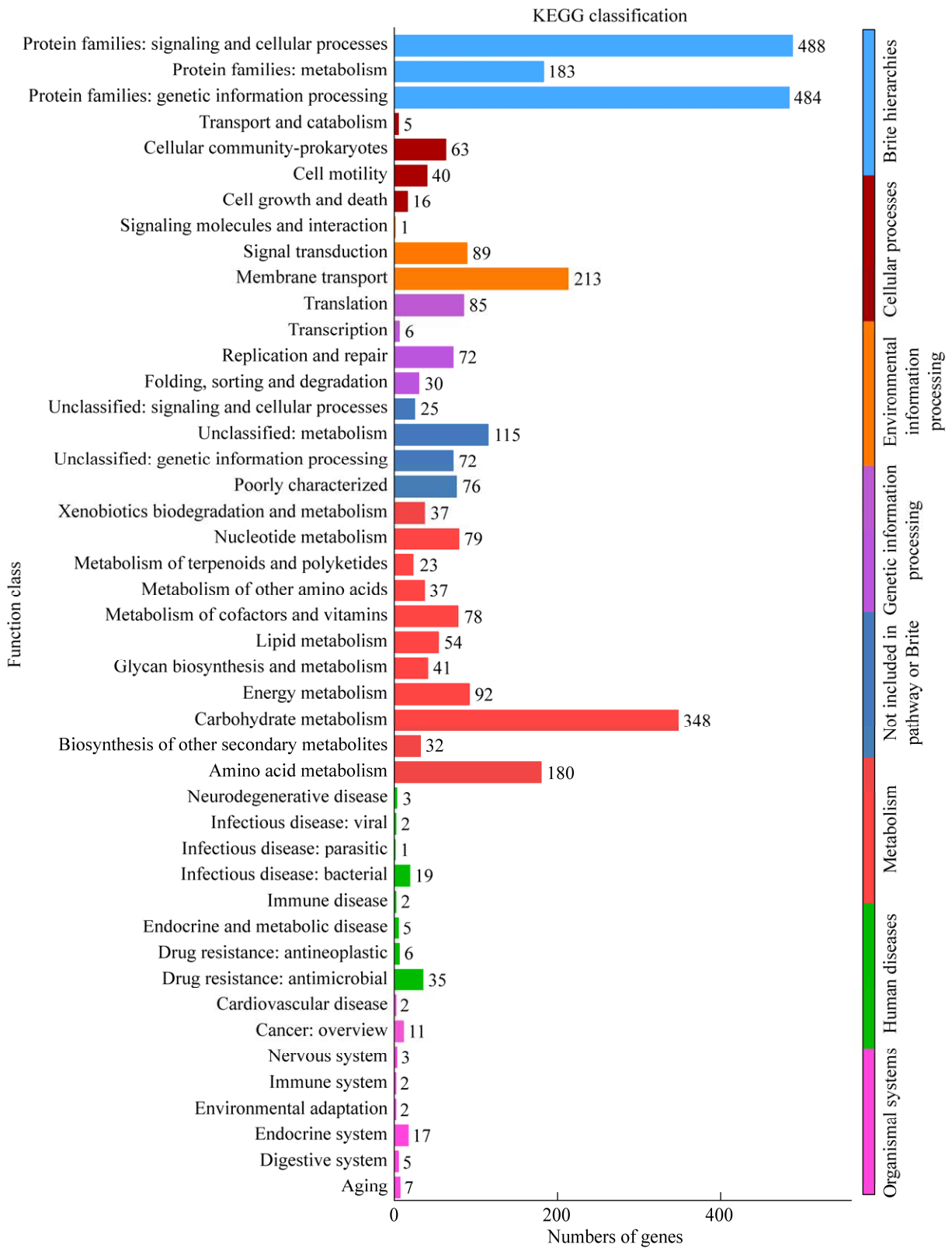


图 7 菌株 Dec0527 的 KEGG 统计图

Figure 7 KEGG cartogram of strain Dec0527.

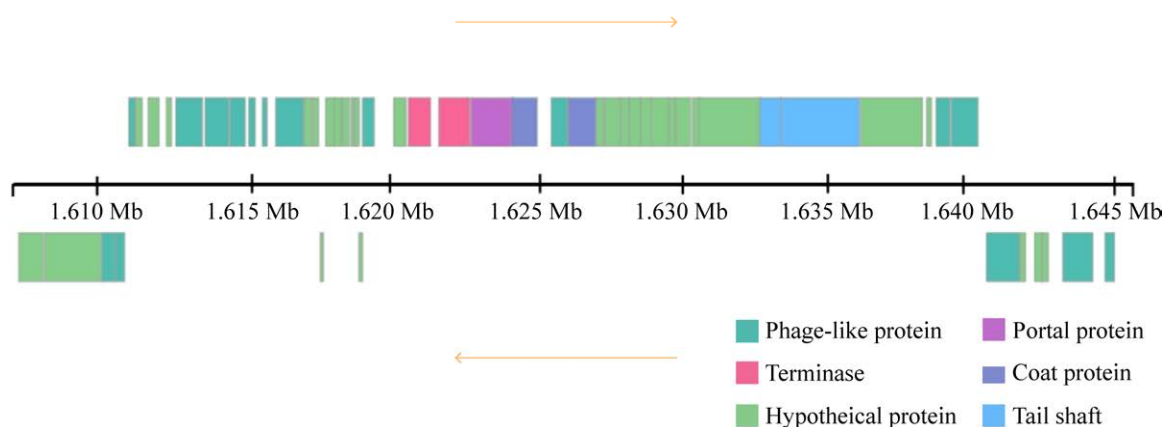


图 8 菌株 Dec0527 原噬菌体视图和噬菌体元件注释

Figure 8 The prophage view and phage elements annotation of strain Dec0527.

球菌还可与定殖部位的其他细菌进行遗传信息的交换，所以肠球菌进化出了可塑性较强的基因组，这也在一定程度上促进了其耐药性的产生。酪黄肠球菌(*E. casseliflavus*)广泛分布于水、土壤等自然环境，以及人和动物的肠道中，作为一种机会性致病菌，在临床上有关酪黄肠球菌感染的报道大多发生于婴幼儿、老人及有基础性疾病的患者等免疫力低下的人群<sup>[18]</sup>，并且往往表现出对肝脏的高侵袭力<sup>[19-20]</sup>，这也与本次细菌载量试验中的结果相一致。

菌株 Dec0527 的基因组由一条 3 345 060 bp 的环状染色体和 2 个环状质粒组成，染色体含有 3 199 个开放阅读框(open reading frame, ORF)，基因编码密度(即每 1 kb 碱基内存在的基因数目)为 0.956，开放阅读框平均序列长度为 911.29 bp，其中最长的开放阅读框长度为 9 390 bp，ORF 序列占该环状染色体总长度的 87.15%，开放阅读框平均 G+C 含量为 43.79%，不含有 CRISPRs 序列。此外，该染色体基因间区序列长度为 429 846 bp，占基因组总长度的 12.85%，基因间区平均 G+C 含量为 36.92%。两个环状质粒各含有 64 个和 11 个开放阅读框，开放阅读框长度分别为 50 124 bp 和 4 518 bp，开放阅读框平均 G+C 含量分别为

36.71%和 36.12%。

在对菌株 Dec0527 进行 ANI 分析时，依据常规的 95% ANI 规定种界限<sup>[21]</sup>，在与所选取的肠球菌属细菌进行比对分析后结果显示，菌株 Dec0527 仅与所选取的酪黄肠球菌相似性均在 95%以上，而与其他几种所选取的肠球菌属细菌相似性均低于 80%，因此可以确定菌株 Dec0527 为酪黄肠球菌。

细菌的毒力基因是细菌对宿主产生致病作用的主要因素，主要表现在侵袭力和产生毒素这 2 个方面<sup>[22]</sup>。菌株 Dec0527 基因组中所携带的毒力基因主要与细菌黏附与定殖，以及抗吞噬和逃避宿主免疫等功能相关，如参与菌毛及生物膜形成的 *ebpC* 基因，该基因除在本次分离的细菌中被发现外，在肠球菌属其他细菌中也具有较高的携带率<sup>[23]</sup>。

此外，通过毒力基因筛选还发现菌株 Dec0527 中存在可编码胆盐水解酶(bile salt hydrolase, BSH)的 *bsh* 基因<sup>[24]</sup>。该基因主要分布在革兰氏阳性肠道细菌中，不同微生物所产生的 BSH 在亚基组成、大小、最适温度、pH 等方面均存在一定差异，但 BSH 具有 6 个严格的保守催化位点，其中 Cys2 是埋藏在  $\alpha\beta\alpha$  核心中的形成活

性位点, 另外还有 5 个重要的催化残基(Arg18, Asp21, Asn82, Asn175, Arg228)<sup>[25]</sup>。在低 pH 下, 肠道中高浓度的胆汁酸能对细菌细胞膜造成损伤, 导致细胞内物质流失从而引发细胞死亡, 低浓度的胆汁酸也可通过对细胞膜流动性、疏水性和膜电位的改变来干扰细菌的正常生长, 而 BSH 通过将胆汁酸解偶联使得细菌免受胆汁酸性损伤, 还可通过增强细菌对胆汁酸的耐受性提高细菌的定殖能力<sup>[26-27]</sup>。

通过对耐药基因进行注释后的结果可知菌株 Dec0527 存在与氨基糖苷类、氟喹诺酮类、糖肽类等抗生素有关的耐药基因, 但细菌药敏试验结果显示, 菌株 Dec0527 还对大环内酯类(红霉素、阿奇霉素)和部分  $\beta$ -内酰胺类药物(头孢氨苄、氨曲南)耐药, 对氨基糖苷类抗生素中的链霉素敏感, 存在表型与基因型不一致的结果。分析其原因可能包括两方面:(1) 细菌遗传背景对耐药基因表达的影响, 有些细菌通过减少耐药基因的表达从而降低代谢负担;(2) 气温、光照、代谢物以及抗生素的使用等外界环境因素也可对细菌的耐药基因表达水平造成影响<sup>[28]</sup>。

在对菌株 Dec0527 进行耐药基因注释的过程中发现耐糖肽类抗生素基因数量最多, 万古霉素是糖肽类抗生素的代表性药物之一, 因可以特异性与革兰氏阳性菌细胞壁合成前体结合从而抑制细菌细胞壁的形成, 糖肽类抗生素在对革兰氏阳性菌的防治中表现出较好的效果<sup>[29]</sup>, 但自从 1988 年欧洲首次对耐万古霉素肠球菌进行报道以来, 耐万古霉素肠球菌(*vancomycin-resistant Enterococcus*, VRE)的检出率增长迅猛, VRE 可通过自身携带的万古霉素耐药基因簇合成新的细胞壁前体, 并降低糖肽类抗生素与细胞壁前体的亲和力, 从而产生耐药性<sup>[30]</sup>。

万古霉素耐药基因簇可根据基因序列和结

构的不同分类, 最主要的包括 *vanA*、*vanB* 和菌株 Dec0527 中所携带的 *vanC* 这 3 种基因型。与常位于质粒上的 *vanA*、*vanB* 基因簇不同, *vanC* 基因簇主要位于细菌染色体上<sup>[31]</sup>。在菌株 Dec0527 携带的耐药基因中, *vanC*、*vanXYc*、*vanTc* 这 3 个基因可通过表达具有酶活性的蛋白改变肽聚糖前体的合成路径, 将肽聚糖前体末端的氨基酸残基丙氨酸转变为丝氨酸, 这一改变可以降低万古霉素与肽聚糖前体结合的亲和力, 从而产生对万古霉素的耐药性<sup>[32-33]</sup>。另一携带的耐药基因 *vanR* 主要作为 *vanA* 基因簇中胞质反应的调节剂, 起转录激活作用<sup>[34]</sup>。

通过对 COG 和 KEGG 注释结果分析可知, 菌株 Dec0527 有着较强的新陈代谢能力, 在 COG 分析中, 总共注释有 19 种功能的 2 176 个基因, 其中大多与代谢编码和氨基酸转运等功能相关。在 KEGG 分析中, 富集程度最高的基因分别是参与 Brite 层次信号转导和细胞进程以及遗传信息加工的基因, 其次是碳水化合物代谢相关基因。

原噬菌体预测结果显示在菌株 Dec0527 的染色体和质粒上可能存在噬菌体插入片段, 这体现了细菌与噬菌体在进化过程中的相互影响, 这一过程也增加了细菌基因组的丰富度。

## 4 结论

本研究从病死林麝中分离得到 1 株酪黄肠球菌 Dec0527, 对其进行了生化试验、药敏试验、16S rRNA 基因分析和细菌载量试验, 并通过全基因组测序及分析进行了物种间亲缘关系评估、基因功能注释, 扩充了酪黄肠球菌基因数据库。目前, 在兽医学领域关于酪黄肠球菌的研究并不广泛, 有关林麝源酪黄肠球菌的研究也尚且不足, 菌株 Dec0527 的基因组测序和注释将有助于探究酪黄肠球菌在自然界及动物

体内所产生的影响, 同时为林麝相关疾病的防治提供了参考。

## REFERENCES

- [1] YOSHINO Y. *Enterococcus casseliflavus* infection: a review of clinical features and treatment[J]. Infection and Drug Resistance, 2023, 16: 363-368.
- [2] DAVE VP, PATHENGAY A, BRAIMAH IZ, PANCHAL B, SHARMA S, PAPPURU RR, MATHAI A, TYAGI M, NARAYANAN R, JALALI S, DAS T. *Enterococcus* endophthalmitis: clinical settings, antimicrobial susceptibility, and management outcomes[J]. Retina, 2020, 40(5): 898-902.
- [3] NZANA VB, ROHIT A, GEORGE D, VIJAYAN M, MATHEW M, SANKARAN S, NAGARAJAN P, ABRAHAM G. Twenty-one episodes of peritonitis in a continuous ambulatory peritoneal dialysis patient: what is the root cause?[J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2018, 36(2): 282-284.
- [4] ABAMECHA A, WONDAFRASH B, ABDISSA A. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* species isolated from intestinal tracts of hospitalized patients in Jimma, Ethiopia[J]. BMC Research Notes, 2015, 8: 213.
- [5] MONTICELLI J, KNEZEVIČ A, LUZZATI R, Di BELLA S. Clinical management of non-faecium non-faecalis vancomycin-resistant enterococci infection. Focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens*[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2018, 24(4): 237-246.
- [6] 刘晨苗, 洪婷婷, 王淑辉, 董响贵, 任战军. 林麝泌香的分子机制研究进展[J]. 动物学杂志, 2022, 57(1): 152-158.
- LIU CM, HONG TT, WANG SH, DONG XG, REN ZJ. Research progress on molecular mechanism of musk secretion in forest musk deer[J]. Chinese Journal of Zoology, 2022, 57(1): 152-158 (in Chinese).
- [7] 孟根达来, MYAGMARSUREN, BATKHUU, CHIMEDRAGCHAA, 哈斯苏荣. 麝属动物的分类学研究历史沿革[J]. 野生动物学报, 2018, 39(4): 966-971.
- MENG G, MYAGMARSUREN, BATKHUU, CHIMEDRAGCHAA, HA S. Historical evolution of taxonomy research on musk deer species[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2018, 39(4): 966-971 (in Chinese).
- [8] 罗燕, 王朋, 赵洪明, 冯亚文, 武革利, 程建国, 邹立扣, 康纪平, 马炳存, 李蓓. 林麝肺源致病性大肠杆菌分离鉴定及毒力基因 PCR 检测[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(8): 615-618.
- LUO Y, WANG P, ZHAO HM, FENG YW, WU GL, CHENG JG, ZOU LK, KANG JP, MA BC, LI B. Isolation and identification of lung pathogenic *Escherichia coli* from musk deer and PCR detection of the virulence genes[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2012, 34(8): 615-618 (in Chinese).
- [9] 黄静. 国家重点保护野生动物名录(陆生部分)[J]. 森林与人类, 2021(12): 111-117.
- HUANG J. List of Wild Animals under National Key Protection (Terrestrial Part)[J]. Forests and People, 2021(12): 111-117 (in Chinese).
- [10] 罗燕, 程建国, 王建明, 康纪平, 蔡永华, 李秋波, 贾炼. 林麝肺炎及化脓性疾病的病理组织学观察[J]. 动物医学进展, 2009, 30(11): 122-123.
- LUO Y, CHENG JG, WANG JM, KANG JP, CAI YH, LI QB, JIA L. Histopathological observations of forest musk deer died in pneumonia and suppurative diseases[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2009, 30(11): 122-123 (in Chinese).
- [11] GUPTA V, YU K, POGUE JM, WEEKS J, CLANCY CJ. 642. facility reported vs. CLSI MIC breakpoint comparison of carbapenem non-susceptible (carb-NS) *Enterobacteriaceae* (ENT) from 2016–2019: a multicenter evaluation[J]. Open Forum Infectious Diseases, 2021, 8(Supplement 1): S423.
- [12] 吴悦妮, 冯凯, 厉舒祯, 王朱珺, 张照婧, 邓晔. 16S/18S/ITS 扩增子高通量测序引物的生物信息学评估和改进[J]. 微生物学通报, 2020, 47(9): 2897-2912.
- WU YN, FENG K, LI SZ, WANG ZJ, ZHANG ZJ, DENG Y. In-silico evaluation and improvement on 16S/18S/ITS primers for amplicon high-throughput sequencing[J]. Microbiology China, 2020, 47(9): 2897-2912 (in Chinese).
- [13] 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- National Health Commission, State Administration for Market Regulation. National food safety standard-Microbiological examination of food: Aerobic plate count: GB 4789.2—2022[S]. Beijing: Standards Press of China, 2022 (in Chinese).
- [14] 董妮华, 陈小珺, 李昱昊, 孙卿, 陈梦莉, 周黎笋, 付宁宁, 邵东华, 刘珂, 李宗杰, 邱亚峰, 李蓓蓓, 魏建超, 马志永. 猪链球菌 2 型在感染兔体内的分布及其致病性研究[J]. 中国动物传染病学报, 2024, 32(5): 33-38.
- DONG NH, CHEN XJ, LI YH, SUN Q, CHEN ML, ZHOU LS, FU NN, SHAO DH, LIU K, LI ZJ, QIU YF, LI BB, WEI JC, MA ZY. Distribution and pathogenicity of *Streptococcus suis* Type 2 in infected rabbits[J]. Chinese Journal of Animal Infections Diseases, 2024, 32(5): 33-38 (in Chinese).
- [15] 娄欣宇, 倪敬轩, 林炜明. 鱼精蛋白对大肠杆菌急性感染小鼠的保护作用研究[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(5): 506-511.
- LOU XY, NI JX, LIN WM. The protective effects of protamine protein on *Escherichia coli* acute infection in mice[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2020, 42(5): 506-511 (in Chinese).
- [16] LEE I, KIM YO, PARK SC, CHUN J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(2): 1100-1103.
- [17] REID KC, COCKERILL III FR, PATEL R. Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases[J]. Clinical Infectious Diseases, 2001, 32(11): 1540-1546.
- [18] KANDARAKIS SA, SPERNOVASILIS N, GEORGALAS I, MENDRIS M, TSIOUTIS C, AGOURIDIS AP. Endophthalmitis caused by *Enterococcus casseliflavus*: a systematic review of literature[J]. Germs, 2023, 13(4): 343-351.
- [19] OKUMURA N, WATANABE T, TERANISHI S,

- SUZUKI D, HASHIMOTO T, TAKAHASHI K, HARA T. Successful treatment of aortic valve endocarditis caused by *Enterococcus casseliflavus*: a case report[J]. BMC Infectious Diseases, 2021, 21(1): 447.
- [20] MOTIE I, BURNS K, THOMPSON R, FRIAR E, BERMINGHAM I, RANASINGHE U, WIESE-ROMETSCH W. *Acinetobacter radioresistens* and *Enterococcus casseliflavus* co-infection with endocarditis, bacteremia, and pneumonia[J]. IDCases, 2022, 30: e01622.
- [21] JAIN C, RODRIGUEZ-R LM, PHILLIPPY AM, KONSTANTINIDIS KT, ALURU S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. Nature Communications, 2018, 9: 5114.
- [22] 陈秀, 何江波, 任祺, 曹艳茹, 曹丽琰, 魏云芳, 王纪爱, 孔璟, 柴雁菁. 昆明越冬红嘴鸥粪便潜在病原细菌及耐药基因与毒力因子组成[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 1898-1916.
- CHEN X, HE JB, REN Z, CAO YR, CAO LY, WEI YF, WANG JA, KONG J, CHAI YJ. Potential pathogenic bacteria, antibiotic resistance genes, and virulence factors from the feces of *Chroicocephalus ridibundus* overwintering in Kunming[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 1898-1916 (in Chinese).
- [23] TAN YH, ARROS P, BERRÍOS-PASTÉN C, WIJAYA I, CHU WHW, CHEN YH, CHEAM G, NAIM ANM, MARCOLETA AE, RAVIKRISHNAN A, NAGARAJAN N, LAGOS R, GAN YH. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* employs genomic island encoded toxins against bacterial competitors in the gut[J]. The ISME Journal, 2024, 18(1): wrac054.
- [24] 杨玲双, 谢新强, 李滢, 张菊梅, 丁郁, 吴清平, 王涓. 屎肠球菌 132 胆盐水解酶基因的克隆表达与酶学特性[J]. 现代食品科技, 2022, 38(8): 35-43.
- YANG LS, XIE XQ, LI Y, ZHANG JM, DING Y, WU QP, WANG J. Cloning, heterologous expression, and enzymatic characteristics of the bile salt hydrolase gene from *Enterococcus faecium* 132[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 35-43 (in Chinese).
- [25] 曾忠花, 刘容容, 汤俐, 李卫芬. 肠道菌群与胆汁酸代谢的互相作用[J]. 中国微生物生态学杂志, 2021, 33(7): 849-856.
- ZENG ZH, LIU RR, TANG L, LI WF. Interaction between gut microbiota and bile acid metabolism[J]. Chinese Journal of Microecology, 2021, 33(7): 849-856 (in Chinese).
- [26] 卢方云, 杨彪, 马晶晶, 杨静, 李鹏鹏, 徐为民, 王道营, 邹焯. 胆盐水解酶酶学性质与基因结构研究进展[J]. 食品工业科技, 2023, 44(8): 469-475.
- LU FY, YANG B, MA JJ, YANG J, LI PP, XU WM, WANG DY, ZOU Y. Progress on enzymatic properties and gene structure of bile salt hydrolase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(8): 469-475 (in Chinese).
- [27] BEGLEY M, HILL C, GAHAN CGM. Bile salt hydrolase activity in probiotics[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1729-1738.
- [28] 李一鸣, 王少林. 肠杆菌科细菌耐药基因表达的遗传和环境调控[J]. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1092-1106.
- LI YM, WANG SL. The impact of genetic and environmental regulation on the expression of antibiotic resistance genes in *Enterobacteriaceae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(4): 1092-1106 (in Chinese).
- [29] REYNOLDS J, CHAN L, TRUDEAU R, SEVILLE MT. Impact of positive vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) screen result on appropriateness of definitive antibiotic therapy[J]. Infection Control & Hospital Epidemiology, 2020, 41(S1): s263.
- [30] 陈春辉, 徐晓刚. 肠球菌万古霉素耐药基因簇遗传特性[J]. 遗传, 2015, 37(5): 452-457.
- CHEN CH, XU XG. Genetic characteristics of vancomycin resistance gene cluster in *Enterococcus* spp.[J]. Hereditas, 2015, 37(5): 452-457 (in Chinese).
- [31] AHMED MO, BAPTISTE KE. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health[J]. Microbial Drug Resistance, 2018, 24(5): 590-606.
- [32] 袁妍, 朱卫民. 耐万古霉素肠球菌耐药机制的研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2022, 43(2): 70-75.
- YUAN Y, ZHU WM. Advances research on vancomycin-resistant *Enterococcus*[J]. World Notes on Antibiotics, 2022, 43(2): 70-75 (in Chinese).
- [33] HASHIMOTO Y, KITA I, SUZUKI M, HIRAKAWA H, OHTAKI H, TOMITA H. First report of the local spread of vancomycin-resistant enterococci ascribed to the interspecies transmission of a *vanA* gene cluster-carrying linear plasmid[J]. mSphere, 2020, 5(2): e00102-20.
- [34] RAZA T, ULLAH SR, MEHMOOD K, ANDLEEB S. Vancomycin resistant *Enterococci*: a brief review[J]. Journal of the Pakistan Medical Association, 2018, 68(5): 768-772.