疾病监测
DISEASE SURVEILANCE

肠球菌菌种鉴定方法的探索

白一波 徐明超 焦一帆 周娟 张思慧 杨晶 刘丽云 徐建国

Exploration of methods for identification of *Enterococcus*

Bai Yibo Xu Mingchao Jiao Yifan Zhou Juan Zhang Sihui Yang Jing Liu Liyun Xu Jianguo

在线阅读 View online: https://doi.org/10.3784/jbjc.202102210083

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于16S rRNA和*gyrB*基因的施万菌种水平鉴定分析

Identification of *Shewanella* at species level based on16S rRNA and *gyrB* genes

疾病监测. 2021, 36(1): 42 https://doi.org/10.3784/jbjc.202007130239

青藏高原藏原羚携带海氏肠球菌的特征研究

Characteristics of *Enterococcus hirae* isolated from Tibetan gazelles in Qinghai-Tibet Plateau

疾病监测. 2020, 35(3): 231 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2020.03.012

高通量荧光PCR组合方法鉴定16种金黄色葡萄球菌肠毒素的方法建立及评估

Establishment and evaluation of high-throughput fluorescent PCR assay for identifying 16 kinds of *Staphylococcus aureus*enterotoxins

疾病监测. 2018, 33(9): 753 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2018.09.012

艾伯特埃希菌快速鉴定方法比较研究

Comparative study on rapid identification methods for Escherichia albertii

疾病监测. 2017, 32(8): 678 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2017.08.016

3 种方法鉴定气单胞菌临床分离株效果分析

Comparison of three methods for identification of clinical isolates of *Aeromonas*

疾病监测. 2019, 34(1): 70 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2019.01.017

四川省自贡市食品和环境携带屎肠球菌的耐药性和多位点序列分型研究

Antibiotic susceptibility and multilocus sequence typing of Enterococcus faecium strains isolated from foods and environment in Zigong, Sichuan

疾病监测. 2017, 32(12): 925 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2017.12.008

关注微信公众号，获得更多资讯信息

技术与方法

肠球菌菌种鉴定方法的探索

开放科学（OSID）

白一波[1,2]，徐明超[2]，焦一帆[2]，周娟[2]，张思慧[2]，杨晶[2]，刘丽云[2]，徐建国[1,2]

摘要：　目的　选择一种能将肠球菌属鉴定到种水平的快速准确的方法。**方法**　分别使用生化鉴定方法、16S rRNA 基因测序技术、*rpoA* 基因测序技术、基因组杂交技术（DNA–DNA hybridization，DDH）和平均核苷酸相似度（Average nucleotide identity，ANI）对 12 株肠球菌进行种水平鉴定，并比较生化鉴定方法、16S rRNA 基因测序技术和 *rpoA* 基因测序技术和 DDH/ANI 结果的一致性。**结果**　经过 DDH 和 ANI 鉴定，分离自高原野生岩羊粪便的 12 株肠球菌中有 5 株屎肠球菌，4 株海氏肠球菌，1 株蒙氏肠球菌，1 株鹑鸡肠球菌和 1 株疑似肠球菌属内新种，*rpoA* 基因序列比对结果与 DDH/ANI 结果高度一致，生化鉴定和 16S rRNA 基因测序技术与 DDH/ANI 结果不完全相符。**结论**　*rpoA* 基因序列比对可以方便快捷准确的将肠球菌鉴定到种水平。

关键词：　肠球菌；*rpoA* 基因；16S rRNA 基因；生化鉴定；基因组杂交技术；平均核苷酸相似度

中图分类号: R211; R446.5　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1003−9961（2021）05−0462−06

Exploration of methods for identification of *Enterococcus*

Bai Yibo[1,2], Xu Mingchao[2], Jiao Yifan[2], Zhou Juan[2], Zhang Sihui[2], Yang Jing[2], Liu Liyun[2], Xu Jianguo[1,2]. 1. *School of Public Health*, *Shanxi Medical University*, *Taiyuan* 030001, *Shanxi*, China; 2. *State Key Laboratory for Communicable Disease Prevention and Control*, *National Institute for Communicable Disease Prevention and Control*, *Chinese Center for Disease Control and Prevention*, *Beijing* 102206, China

***Corresponding author**: Xu Jianguo,* Email: xujianguo@icdc.cn

Abstract:　Objective　To select a rapid and accurate method to identify Enterococcus at genus level. **Methods**　By using biochemical identification, 16S rRNA gene sequencing, *rpoA* gene sequencing, DNA-DNA hybridization (DDH) and average nucleotide identity (ANI), 12 *Enterococcus* strains were identified at genus level., and the results were compared. **Results**　By DDH and ANI identifications, 12 *Enterococcus* strains isolated from stool samples of wild blue sheep in plateau area were classified as *Enterococcus faecium* (5 strains), *Enterococcus heisei* (4 strains), *Enterococcus montmund* (1 strain), *Enterococcus quail* (1 strain) and suspected new *Enterococcus* variant (1 strain). *rpoA* gene sequencing had highly consistent results with DDH/ANI, but biochemical identification, 16S rRNA gene sequencing had no fully consistent results with DDH/ANI. **Conclusion**　*rpoA* gene sequencing can be used to identify *Enterococcus* rapidly and accurately.

Key words:　*Enterococcus*; *rpoA* gene; 16S rRNA gene; Biochemical identification; DNA–DNA hybridization; Average nucleotide identity

This study was supported by the National Key Research and Development Project (No. 2019YFC1200505)

肠球菌作为人类和动物肠道常见细菌，也是常见的院内感染致病菌，被美国医院感染监测系统列为医院感染的第二大病原菌。根据 2014－2019 年全国细菌耐药性监测报告肠球菌是除葡萄球菌外临床分离率第二的革兰阳性菌[1]。临床检出的常见肠球菌主要有屎肠球菌、粪肠球菌、鹑鸡肠球菌、耐久肠球菌和海氏肠球菌等。不同的肠球菌种的致病和耐药特点有所差异。屎肠球菌是一种常见的条件致病菌，能够引起如菌血症、尿路感染、腹腔感染等多种人体多器官感染，临床检出率高达 4.35%[2]。鹑鸡肠球菌是革兰阳性球菌，属肠球菌，1989 年报道 Facklam 和 Collins[3] 从临床标本中分离出，是肠道中的正常菌群。可引起人类感染，包括尿路感染、腹腔感染以及败血症、伤口感染、心内膜炎和脑膜炎等[4]。海氏肠球菌可能是一种动物源性致病菌，可以引起动物的感染性疾病，如败血症等，也可通过人与动物的接触而感染人，海氏肠球菌在肠球菌感染病例中仅占 0.40%～3.03%，但多为严重感染[5]。在临床上多使用全自动生化鉴定仪鉴定肠球菌，虽然肠球菌的生化鉴定技术比较成熟，但是生化反应常因为培养条件等因素的变化而导致鉴定结果不准确。另外，粪肠球菌、海氏肠球菌、

基金项目：国家重点研发计划项目（No. 2019YFC1200505）

作者单位：1. 山西医科大学公共卫生学院，山西 太原 030001；2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所，传染病预防控制国家重点实验室，北京 102206

作者简介：白一波，男，河北省衡水市人，在读硕士研究生，主要从事传染病的病原学研究，Email：byb435995812@163.com

通信作者：徐建国，Tel：010–58900749，Email：xujianguo@icdc.cn

收稿日期：2021−02−21　　网络出版日期：2021−05−17

鹑鸡肠球菌、蒙氏肠球菌和耐久肠球菌生化差异较小[6]，全自动生化鉴定仪器难以给出种水平的鉴定结果。该现象在 API 鉴定系统中也能见到。通过 16S rRNA 基因序列测定比对方法从青藏高原岩羊粪便中分离到 12 株肠球菌属菌株。序列比对发现，多株细菌 16S rRNA 基因具有高度相似性，16S rRNA 基因相似性 98.7% 以上为同一个种[7]，该标准并不适用于肠球菌不同菌种间的鉴定，在肠球菌属中有多个种如屎肠球菌、鹑鸡肠球菌、蒙氏肠球菌、耐久肠球菌和海氏肠球菌之间的 16S rRNA 相似度均超过了 99%。通过查阅文献发现，除 16S rRNA 基因，保守基因 *rpoA* 基因和保守基因 *pheS* 测序也被用于肠球菌种水平鉴定，但是由于保守基因 *pheS* 测序时需要两对引物且 *pheS* 基因不具有普遍使用性所以本研究使用保守基因 *rpoA* 基因测序进行鉴定[8]，此外基因组在线杂交技术和平均核苷酸相似度是细菌鉴定的“金标准”[9]。由于 16S rRNA 基因测序技术不能用来准确鉴定肠球菌，为明确一种将肠球菌鉴定到种水平的方法本研究将通过对比以上 4 种肠球菌种水平的鉴定方法，选择一种快速简便的鉴定方法，为临床鉴定肠球菌提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集 从青海省海西蒙古族藏族自治州都兰县巴隆乡（97°20′32″E，35°52′4″N）附近无菌采集野生岩羊 11 份粪便样本置于含 20% 甘油的 5 mL 无菌采样管中，−80 ℃ 条件下运回实验室。

1.1.2 主要仪器设备 PCR 仪：Gene Max 基因扩增仪，型号：TC-S/96/G/H（b）B A；恒温孵箱：生化培养箱 ICP600；恒压恒流电泳仪：JY600C；凝胶成像系统：Gel Doc XR+System（Bio-Rad）；台式离心机：Sigma1-14；恒温金属浴：CHB-202 购自杭州博日科技有限公司；全自动生化鉴定仪：WALKWAY-40 SI 购自德灵公司。

1.1.3 实验材料 脑心培养基（BHI）购自英国 OXOID 公司；Pos Combo Type 33 购自西门子医学诊断产品有限公司；2×PCRMix 购自北京擎科科技有限公司；16S rRNA 基因测序通用引物 27F（5'-AGA GTT TGA TCC TGG CAC AG-3'），1492R（5'-ACG GCT ACC TTG TTA CTC AG-3'）和 *rpoA* 基因测序引物 *rpoA* 21F（ATG ATY GAR TTT GAA AAA CC），*rpoA* 23R（ACH GTR TTR ATD CCD GCR CG）[8] 均购自北京睿博兴科生物技术有限公司；API 20 STREPT 生化鉴定试剂条购自法国梅里埃公司。

1.1.4 参考菌株 本研究所用参考菌株均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心（CGMCC），菌株编号为屎肠球菌（*Enterococcus faecium*，CGMCC1.1925）、海氏肠球菌（*E. hirae*，CGMCC1.2140）、坚忍肠球菌（*E. durans*，CGMCC1.2284）、蒙氏肠球菌（*E. mundtii*，CGMCC1.2486）和鹑鸡肠球菌（*E. gallinarum*，CGMCC1.1925）。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离培养 将 11 份岩羊粪便样本从 −80 ℃ 冰箱内取出，置于室温下完全解冻。取 2～3 g 样本置放于 1 mL 0.9% 生理盐水 NaCl 溶液中并且使用灭菌后的 1 mL 移液枪充分吹吸混匀，吸取 20 μL 悬浊液均匀涂布在 BHI 培养基上于 37 ℃ 培养 48 h 后挑选单菌落同条件下纯化培养，纯培养物保存于含 20% 甘油的脑心浸液保菌液中，−20 ℃ 冰箱冻存。

1.2.2 生化实验 使用购自梅里埃公司的 API 20 STREPT 试剂条进行生化检验，将纯化培养后的单菌落制作菌悬液严格按照说明书进行接种，分别于 4 h 后按照说明书要求加入指示剂，并根据说明书判读反应对比记录试验结果。最后将生化鉴定结果输入 Apiweb 网站（http://localhost/jsp/ident/index.jsp）得出生化鉴定结果。同时使用全自动生化鉴定仪将 12 株菌使用 PC33 革兰阳性鉴定板严格按照说明书操作[10]。

1.2.3 细菌 16S rRNA 基因测序 在高压灭菌的 1.5 mL EP 管中加入 200 μL 的无菌水，使用无菌接种环刮取适量菌落纯培养物放于 EP 管中保证液体没过菌体，将 EP 管置于 96 ℃ 金属浴中加热 15 min，使用离心机 14 000 r/min 离心 2 min 取上清置于新的灭菌 EP 管中并做好标记，作为 PCR 的鉴定模板。16S rRNA 基因 PCR 反应体系：2×Mix 15 μL；无菌水 12 μL；27F 1 μL；1492R 1 μL；模板（处理好的菌液上清）1 μL；PCR 扩增条件为 94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 90 s，30 个循环；72 ℃ 后延伸 10 min[11]。委托北京睿博兴科科技有限公司对 PCR 产物完成测序。测序结果使用 seqman 6.1 软件进行拼接并去除载体序列，最终获得 16S rRNA 基因序列，使用 NCBI 网站 BLAST（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）工具进行在线比对，比对结果序列相似性＞98.7% 判定为同一菌种。

1.2.4 细菌 *rpoA* 基因测序 *rpoA* 基因 PCR 扩增体系：2×Mix 15 μL；无菌水 12 μL；*rpoA* 21F 1 μL；*rpoA* 23R 1 μL；模板 DNA 1 μL。PCR 扩增条件为 94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，54 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，30 个

循环；72 ℃ 后延伸 10 min。委托北京睿博兴科生物技术有限公司对 PCR 产物完成测序。测序结果同样使用 seqman 6.1 软件进行拼接并去除载体序列，最终获得 *rpoA* 基因序列使用 NCBI 网站 BLAST 进行在线比对，比对结果＞97% 鉴定为同一菌种[9]。

1.2.5　基因组杂交技术（DNA–DNA hybridization，DDH）和平均核苷酸相似度（Average nucleotide identity，ANI）　使用 promega 试剂盒提取 12 株菌的核酸并委托北京诺禾致源科技股份有限公司对 12 株菌株进行全基因组测序，从 NCBI 官网下载肠球菌参考菌株全基因组序列屎肠球菌（*E. faecium* NZ CP039729.1）、海氏肠球菌（*E. hirae* NZ CP023011.2）、耐久肠球菌（*E. durans* NZ JAAMRZ010000001.1）、蒙氏肠球菌（*E. mundtii* NZ CP018061.1）和鹑鸡肠球菌（*E. gallinarum* NZ JXKP01000001.1）。通过基因组在线杂交网站（http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#）和平均核苷酸相似度（https://www.ezbiocloud.net/）进行两两比对获得 DDH（DNA–DNA hybridization）值[12]和 ANI（Average nucleotide identity）值[13]，一般认为 DDH 值≥70% 或 ANI 值≥95%～96% 则支持该菌株划分为该种成员，反之 ANI 值＜95%～96% 或 DDH 值＜70% 则该菌株不属于任何已知种成员。

2　结果

2.1　生化鉴定结果　11 份岩羊粪便样本中分离的 12 株肠球菌在 Apiweb 网站能判定到种水平的有 6 株，并给了具体的鉴定值。剩下 6 株菌株均不能明确鉴定到种水平，只是给了可以参考的分类单元，没有给出具体相似度参考值，在参考菌株鉴定结果中可见将海氏肠球菌（*E. hirae*）鉴定为坚忍肠球菌（*E. durans*），将蒙氏肠球菌（*E. mundtii*）鉴定为屎肠球菌（*E. faecium*），仅屎肠球菌（*E. faecium*）、坚忍肠球菌和鹑鸡肠球菌（*E. gallinarum*）鉴定正确。全自动生化鉴定仪结果可见能鉴定到种水平的菌株有 7 株，剩下 5 株只能鉴定到属水平，且均没有给出具体参考值，在鉴定参考菌株时将海氏肠球菌鉴定为坚忍肠球菌或海氏肠球菌，将坚忍肠球菌鉴定为血链球菌（*Strepiococtus sanguinis*）将蒙氏肠球菌鉴定为屎肠球菌，仅屎肠球菌和鹑鸡肠球菌鉴定正确详细结果可见表 1。

表 1　待测菌株鉴定结果

Table 1　Identification results of test strains

菌株编号	Apiweb 鉴定结果	可能的分类单元	鉴定（%）	全自动生化鉴定仪鉴定结果	16S rRNA基因比对结果	相似性（%）	*rpoA*基因比对结果	相似性（%）
B345	可疑	*Enterococcus durans*	66.0	*Enterococcus* sp.	*Enterococcus hirae*	100.00	*Enterococcus hirae*	100.00
B350	有意义的分类单元	*Enterococcus faecium*	86.0	*Enterococcus* sp.	*Enterococcus hirae*	99.93	*Enterococcus faecium*	96.53
B399	可疑	*Enterococcus durans*	66.0	*Enterococcus gallinarum*	*Enterococcus hirae*	100.00	*Enterococcus hirae*	100.00
JY007	不能接受	*Enterococcus faecium*	–	*Enterococcus durans.*	*Enterococcus hirae*	99.87	*Enterococcus hirae*	99.62
JY266	不能接受	*Enterococcus faecium*	–	*Enterococcus* sp.	*Enterococcus faecium*	100.00	*Enterococcus faecium*	99.87
JY268	不能接受	*Enterococcus faecium*	–	*Enterococcus* sp.	*Enterococcus faecium*	100.00	*Enterococcus faecium*	99.32
MC4	可以接受	*Enterococcus faecium*	86.0	*Enterococcus gallinarum*	*Enterococcus hirae*	99.66	*Enterococcus hirae*	100.00
MC1	好的	*Enterococcus faecium*	98.0	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus faecium*	100.00	*Enterococcus faecium*	99.62
MC49	低识别力	*Enterococcus faecium*	–	*Enterococcus* sp.	*Enterococcus gallinarum*	100.00	*Enterococcus gallinarum*	99.87
MC57	好的	*Enterococcus faecium*	98.0	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus durans*	100.00	*Enterococcus faecium*	99.88
MC42	好的	*Enterococcus faecium*	98.6	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus durans*	99.72	*Enterococcus faecium*	99.87
MC35	好的	*Enterococcus faecium*	99.7	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus mundtii*	100.00	*Enterococcus mundtii*	99.25
E.faecium	好的	*Enterococcus faecium*	97.1	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus faecium*	99.79	*Enterococcus faecium*	100.00
E.hirae	好的	*Enterococcus durans*	95.5	*Enterococcus durans/ hirae*	*Enterococcus hirae*	99.93	*Enterococcus hirae*	100.00
E. gallinarum	好的	*Enterococcus gallinarum*	99.9	*Enterococcus gallinarum*	*Enterococcus durans*	99.93	*Enterococcus gallinarum*	100.00
E.durans	好的	*Enterococcus durans*	95.5	*Strepiococtus sanguinis*	*Enterococcus durans*	99.93	*Enterococcus durans*	100.00
E.mundtii	好的	*Enterococcus faecium*	96.0	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus mundtii*	100.00	*Enterococcus mundtii*	100.00

注：–. 未给出具体鉴定值，全自动生化鉴定结果未给出具体相似性

2.2 16S rRNA 基因测序结果和 *rpoA* 基因测序结果 将得到的 16S rRNA 基因序列使用 NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）BLAST 平台进行比对得出结果[14]，且在比对结果中每株菌均与肠球菌属中的 3～4 个种序列相似性在 98.7% 以上，如菌株 B345 16S rRNA 相似性在 98.6% 以上的有：海氏肠球菌（99.93%）、坚忍肠球菌（99.65%）、屎肠球菌（99.45%）和蒙氏肠球菌（99.24%）等，因此 16S rRNA 基因并不能很好的确定到种水平。同时将得到的 *rpoA* 基因序列使用 NCBI BLAST 平台与数据库进行比对同时与参考菌株 *rpoA* 基因进行比对得出结果，在比对结果中每株菌比对序列相似性最高的都为同一个种（＜97%），且菌株 B350 被检测为疑似肠球菌属细菌新种（＜97%），是 16S rRNA 基因比对结果中没有的。具体结果同见表 1。

2.3 DDH/ANI 结果 基因组在线杂交和平均核苷酸一致性是鉴定菌株种水平的金标准，也适用于肠球菌属内种水平鉴定。根据已测全基因组草图与肠球菌属几株参考菌株全基因组进行 DDH 和 ANI 比较。鉴定结果显示 12 株菌株均为肠球菌属，其中 5 株菌株为屎肠球菌，包含菌株 JY266、JY268、MC57、MC42 和 MC1；4 株菌株鉴定结果是海氏肠球菌，包括菌株 B345、B399、JY007 和 MC4；其余 2 株菌，菌株 MC35 和 MC49分别为蒙氏肠球菌和鹑鸡肠球菌；而菌株 B350 为疑似肠球菌新种。根据 DDH 和 ANI 结果可知 *rpoA* 基因比对结果与 DDH、ANI 结果高度一致，16S rRNA 基因比对结果与 DDH 和 ANI 结果存在差异，比对结果中菌株 MC42 和 MC57 比对错误且菌株 B350 没有被鉴定出是肠球菌株未被描述的细菌新种。生化鉴定结果与 DDH、ANI 差异较大，菌株 B345、B350、B399、JY007、MC4、MC49 和 MC25 均诊断错误，只有 5 株屎肠球菌的鉴定结果较为准确，生化鉴定 Apiweb 网站鉴定肠球菌到属水平较为准确，不能很好的鉴定到种水平，全自动生化鉴定仪与 DDH、ANI 差异较大，仅有菌株 MC1、MC42、MC57 被正确鉴定到种水平，但与生化鉴定结果一致的是鉴定到属水平较为准确（表 2）。

3 讨论

肠球菌目前有 70 个种和 2 个亚种，其中包含许多临床上常见的条件致病菌包括屎肠球菌、粪肠球菌等。肠球菌作为临床上分离率第二的革兰阳性致病菌，不同的种的致病性和流行病学有差异，因而进行种水平的准确鉴定存在公共卫生意义。

全自动生化鉴定仪器是临床常用的生化鉴定方法，但其需要至少 2 d 时间，对临床分离率相对低的肠球菌如海氏肠球菌鉴定结果不准确，且需要购买其配套检测板，费用较大。临床生化鉴定由于生长环境等因素影响鉴定结果差异较大导致鉴定结果不准确，且 API 20 STREP 生化反应中海氏肠球菌生化表型易与其他肠球菌混淆，因而生化鉴定限制较大[15]。

保守基因鉴定 16S rRNA 基因在肠球菌种水平鉴定中存在较大限制，肠球菌属内多个种的种水平 16S rRNA 基因差异在 98.7% 以上，如海氏肠球

表 2 待鉴定菌株与参考菌株的 ANI/DDH 结果

Table 2 ANI /DDH results of test strains and reference strains

ANI\DDH	1	B345	B350	B399	JY007	JY266	JY268	MC4	MC1	MC49	MC57	MC42	MC35	2	3	4	5	鉴定结果
1	–	92.60	29.40	92.30	92.40	29.70	29.70	92.60	22.50	24.40	21.90	22.10	22.50	23.00	23.30	23.20	23.10	*E.hirae*
B345	98.92	–	21.80	90.10	89.60	22.50	22.50	100.00	22.50	24.10	22.00	22.10	22.70	22.90	22.70	23.20	22.00	*E.hirae*
B350	76.47	76.51	–	21.70	21.70	22.40	22.40	21.80	22.40	20.20	22.30	22.40	23.30	22.40	22.00	22.00	22.90	*E.sp*
B399	98.84	98.83	76.67	–	99.30	22.20	22.20	90.00	22.20	22.50	21.80	21.80	22.50	22.10	22.30	22.90	22.40	*E.hirae*
JY007	98.83	98.90	76.80	99.89	–	22.40	22.40	89.60	22.50	22.40	21.90	22.00	22.50	22.30	22.40	22.90	22.00	*E.hirae*
JY266	76.88	77.03	78.87	76.86	77.23	–	100.00	22.50	100.00	22.80	60.90	61.90	22.50	88.70	22.30	22.00	22.50	*E. faecium*
JY268	76.87	77.04	78.94	76.83	77.23	100.00	–	22.50	100.00	22.90	60.90	61.80	22.50	88.60	22.30	22.00	22.50	*E. faecium*
MC4	98.93	100.00	76.62	98.84	98.87	76.97	77.03	–	22.50	24.10	22.00	22.10	22.70	22.90	22.70	23.20	22.00	*E.hirae*
MC1	76.89	76.89	78.88	76.94	77.30	99.99	99.99	76.96	–	22.90	60.90	61.80	22.40	88.70	22.30	22.00	22.50	*E. faecium*
MC49	72.08	72.10	71.88	71.76	71.92	72.10	72.14	72.14	72.17	–	21.70	22.50	22.10	26.20	23.10	21.80	78.90	*E. gallinarum*
MC57	76.76	76.81	78.78	76.88	76.87	95.01	94.96	76.80	94.96	72.00	–	99.80	22.30	91.00	21.70	22.30	22.90	*E. faecium*
MC42	76.81	76.80	78.79	76.97	76.85	95.17	95.13	76.74	95.12	72.26	99.99	–	22.50	91.10	22.00	22.40	22.90	*E. faecium*
MC35	76.53	76.92	76.71	76.81	76.78	76.59	76.59	76.90	76.63	72.35	76.35	76.50	–	22.90	71.80	22.10	33.70	*E. faecium*
2	76.62	76.34	78.81	76.48	76.71	98.67	98.67	76.45	98.70	72.24	98.75	98.74	72.00	–	22.10	22.60	23.10	*E. faecium*
3	71.95	71.64	75.84	71.69	72.01	72.17	72.17	71.60	76.41	76.00	71.91	76.01	96.18	72.02	–	23.10	23.30	*E. mundtii*
4	78.65	78.83	77.05	78.87	79.01	77.40	77.40	78.87	72.11	72.04	76.89	72.08	76.80	73.22	72.25	–	21.30	*E. durans*
5	77.66	77.50	71.64	77.30	77.31	76.49	76.49	77.50	77.37	97.67	76.00	76.89	76.52	76.41	76.98	77.22	–	*E. gallinarum*

注：1. *Enterococcus hirae* FDAARGOS_234^T；2. *Enterococcus faecium* ZY2^T；3. *Enterococcus mundtii* DSM 4838^T；4. *Enterococcus durans* 8L1-82^T；5. *Enterococcus gallinarum* DSM 24841^T

菌最早是为明确人体内粪肠球菌与猪、鸡等其他来源的粪肠球菌的区别而确立的种，海氏肠球菌与屎肠球菌的 16S rRNA 基因相似性为 99.52%；耐久肠球菌与海氏肠球菌 16S rRNA 基因相似性高达 99.65%。王怡婷等[11] 2016 年报道首次在青藏高原旱獭粪便中分离到鹑鸡肠球菌.

本研究是为了区分肠球菌在种水平上的差异而不是为了明确肠球菌属内的系统进化位置，在 *rpoA* 基因比对结果中可以看出，*rpoA* 基因比对阈值明显，相比于 16S rRNA 基因可以高分辨率的区分不同的肠球菌种。在本研究中可以看到 16S rRNA 基因难以区分肠球菌属种的近缘种如屎肠球菌、海氏肠球菌、坚忍肠球菌、耐久肠球菌 16S rRNA 基因相似性在 99.24%～99.93%，但 *rpoA* 基因相似性均在 97% 以下。因而 *rpoA* 基因可以满足我们的研究目的，同时也证明了管家基因在肠球菌种水平区别鉴定上的优势。*rpoA* 基因适用于肠球菌种水平分析可能与管家基因可以整合染色体上不同分子种的信息有关[16–17]。除了 16S 和 *rpoA* 基因还有其他保守基因用于肠球菌种水平的鉴定。如 *pheS*、*rpoB*、*sodA* 基因等，但是 *pheS* 基因 PCR 过程中退火温度过高易导致 PCR 失败，*rpoB* 基因测序不能识别所有肠球菌属内的种，*sodA* 基因需要使用多重 PCR 进行扩增，耗时费力且同样识别不了所有肠球菌属内成员，目前正在研究使用蛋白质编码基因序列数据来确定基因组相关性的方法克服这些技术的缺点[18–19]。

DDH 和 ANI 是鉴定细菌的“金标准”，但是鉴定步骤繁琐、周期长、费用高，很少有实验室能够执行这种技术。因而找一种简单快捷且准确的鉴定方式非常重要，*rpoA* 基因测序技术鉴定肠球菌种水平方便快捷，与 DDH 和 ANI 结果高度一致。且在本研究中可以看到 *rpoA* 基因测序技术在筛选肠球菌新种方向也有较好的作用。所以 *rpoA* 基因在肠球菌属种水平鉴定中作用明显，仅需完成必要 PCR 过程，对实验条件要求小。仅需几小时就能完成 PCR 扩增，方便快捷适合替代 DDH/ANI 等步骤繁琐的技术用于肠球菌种水平鉴定。但是由于本研究并未检测肠球菌属内所有的种，所以 *rpoA* 基因测序方法是否能够通用与所有肠球菌菌种的鉴定仍有待验证。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] 全国细菌耐药监测网. 全国细菌耐药监测网 2014—2019 年门诊患者临床分离细菌耐药监测报告[J]. 中国感染控制杂志，2021，20(1)：31–42. DOI：10.12138/j.issn.1671-9638.20216184.

[2] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志，2020，20(1)：1–10. DOI：10.16718/j.1009-7708.2020.01.001.
Hu FP, Guo Y, Zhu DM, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance in China: 2018 report[J]. *Chin J Infect Chemother*, 2020, 20(1): 1–10. DOI: 10.16718/j.1009-7708.2020.01.001.

[3] Facklam RR, Collins MD. Identification of enterococcus species isolated from human infection by a conventional test scheme[J]. *J Clin Microbiol*, 1989, 27: 731–734. DOI: 10.1128/JCM.27.4.731-734.1989.

[4] Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*[J]. *Clin Microbiol Rev*, 1990, Jan; 3(1): 46–65. DOI: 10.1128/cmr.3.1.46.

[5] Merlo J, Bustamante G, Llibre JM. Bacteremic pneumonia caused by *Enterococcus hirae* in a subject receiving regorafenib[J]. *Enfermed Infecc Microbiol Clin*, 2020, 38(5): 226–229. DOI: 10.1016/J.EIMC.2019.06.002.

[6] Collins MD, Farrow JAE, Jones D. *Enterococcus mundtii* sp. nov.[J]. *Int J Systemat Bacteriol*, 1986, 36(1): 8–12. DOI: 10.1099/00207713-36-1-8.

[7] Wayne LG. International committee on systematic bacteriology: announcement of the report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics[J]. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 1988, 268(4): 433–434. DOI: 10.1016/S0176-6724(88)80120-2.

[8] Naser SM, Thompson FL, Hoste B, et al. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes[J]. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 7): 2141–2150. DOI: 10.1099/mic.0.27840-0.

[9] Schumann P, Kämpfer P, Busse HJ, et al. Proposed minimal standards for describing new genera and species of the suborder *Micrococcineae*[J]. *Int J System Evolut Microbiol*, 2009, 59(7): 1823–1849. DOI: 10.1099/ijs.0.012971-0.

[10] 蒙家嘉, 董魁, 周娟, 等. 青藏高原藏原羚携带海氏肠球菌的特征研究[J]. 疾病监测，2020，35(3)：231–236. DOI：10.3784/j.issn.1003-9961.2020.03.012.
Meng JJ, Dong K, Zhou J, et al. Characteristics of *Enterococcus hirae* isolated from Tibetan gazelles in Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Dis Surveill*, 2020, 35(3): 231–236. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2020.03.012.

[11] 王怡婷, 金东, 杨晶, 等. 喜马拉雅旱獭源鹑鸡肠球菌的分离及其耐药性检测[J]. 疾病监测，2016，31(5)：380–386. DOI：10.3784/j.issn.1003-9961.2016.05.008.
Wang YT, Jin D, Yang J, et al. Isolation and antibiotic resistance detection of *Enterococcus gallinarums* from *Marmota himalayana*[J]. *Dis Surveill*, 2016, 31(5): 380–386. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2016.05.008.

[12] Meier-Kolthoff, Jan P, Klenk, et al. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and; improved distance functions[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14(1): 60–60. DOI: 10.1186/1471-2105-14-60.

[13] Yoon SH, Ha SM, Lim J, et al. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity[J]. Antonie

Van Leeuwenhoek. 2017, 110(10): 1-6. DOI: 10.1007/s10482-017-0844-4 Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, et al. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 60. DOI: 10.1186/1471-2105-14-60.

[14] 刘佳, 陈霞, 雷红, 等. 肠球菌种属鉴定及万古霉素耐药基因型检测的多重聚合酶链反应方法的建立及应用[J]. 疾病监测, 2015, 30(4): 332 –336. DOI: 10.3784/j.issn.1003−9961.2015.04.021.

Liu J, Chen X, Lei H, et al. Establishment and application of multiplex polymerase chain reaction assay to identify *Enterococcus* and vancomycin-resistant genotypes[J]. *Dis Surveill*, 2015, 30(4): 332–336. DOI: 10.3784/j.issn.1003−9961.2015.04.021.

[15] Farrow JAE, Collins MD. *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens[J]. *Int J Systemat Bacteriol*, 1985, 35(1): 73–75. DOI: 10.1099/00207713−35−1−73.

[16] Lerat E, Daubin V, Moran NA. From gene trees to organismal phylogeny in prokaryotes: the case of the γ-Proteobacteria[J]. *PLoS Biol*, 2003, 1(1): e19. DOI: 10.1371/journal.pbio.0000019.

[17] Naser S, Thompson FL, Hoste B, et al. Phylogeny and identification of Enterococci by *atpA* gene sequence analysis[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(5): 2224 –2230. DOI: 10.1128/JCM.43.5.2224−2230.2005.

[18] Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(8): 3558–3565. DOI: 10.1128/JCM.42.8.3558−3565.2004.

[19] Drancourt M, Roux V, Fournier PE, et al. *rpoB* gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(2): 497–504. DOI: 10.1128/jcm.42.2.497−504.2004.

白一波

ORCID: 0000−0003−1919−3749

作者贡献：

白一波：文章撰写、实验研究

徐明超、焦一帆、周娟、张思慧：实验辅助

杨晶、刘丽云：样本采集、论文修改

徐建国：论文审阅

本文创新点和学术评论句见开放科学（OSID）平台，欢迎扫描开放科学（OSID）二维码，与作者开展交流互动

读者 · 作者 · 编者

关于创新点和学术评论句的要求与说明

本刊要求论文在正文中要阐明研究的创新性，明确撰写论文的创新点；同时，也倡导明确撰写学术评论句，以体现论文对学术传承和创新的贡献。举例说明如下：

创新点：指论文独创的认识世界、改造世界的新知识，其知识形态有事实、问题、数据、概念、原理、假设、方法、技巧、理念、观念、观点、思想、理论体系、学说。创新点是作者对自己创新成果进行高度提炼的语句。通常包含 1～3 个要素，即创新成果、创新背景及其意义。作者可经 CNKI 或 Pubmed 数据库检索后概括说明研究（成果）的创新性贡献。

学术评论句：指在一篇学术论文中对于另一篇学术论文的具有显性评论性质的语句。学术评论句是作者对同行贡献进行显性评论的语句，包括 3 个要素：（1）被评价文献的作者；（2）被评价文献发表的年份；（3）用于评价的标志性词语（标志词）；与学术评论句配对的文末参考文献必须是严格对应的被评文献本身。

创新点和学术评论句必须客观、准确、简洁。现各举一例，供大家参考。

创新点例句：本文首次在中国大陆的临床病例中，鉴定了由罕见施万菌属导致的肺部感染和菌血症，对今后施万菌属致病的研究有重大意义。（出自文献：梁胜楠，姜祥坤，杜银菊，周璞，刘莉，程利红，王多春. 2016 年山东省聊城市临床病例中 2 种罕见施万菌的鉴定.疾病监测, 2019, 34(9): 817–5821）

学术评论句例句：肠道病毒 D68 型（Enterovirus D68，EV-D68）是肠道病毒 D 组，1967 年首次由美国研究者 Schieble 等在肺炎患者中检测得到并报告。

（施评文献：沈玲羽，田竞，张铁钢，龚成，黄芳. 北京市房山区首例肠道病毒 D68 病例临床症状与体征及病原学监测研究. 疾病监测, 2019, 34(4): 328）

（被评文献：Schieble JH, Fox VL, Lennette EH. A probable new humanpicornavirus associated with respiratory disease［J］. *Am J Epidemiol*, 1967, 85(2): 297–310. DOI: 10.1093/oxfordjourchangdaonals.aje.a120693.）

《疾病监测》杂志编辑部