

MLST Analysis of Different Sources of Enterococcus Faecalis

Di Zhao¹, Zhigang Duan², Xinge Cui¹, Ruijie Yan¹, Fei Chen¹, Binzhou Hu¹, Hui Hu^{1*}, Yabin Wang^{1*}

¹College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou Henan

²Zhengzhou Animal Husbandry Bureau, Zhengzhou Henan

Email: *ybwang8686@126.com, *1850336635@qq.com

Received: Apr. 12th, 2017; accepted: Apr. 25th, 2017; published: Apr. 30th, 2017

Abstract

Objective: To explore the genetic relationships of *E. faecalis* originating from different animal origins. **Methods:** The seven housekeeping genes including *gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt* and *yiqL* of all 59 *E. faecalis* originating from different animal origins were amplified by PCR method and sequenced, respectively. The sequences were analyzed by multilocus sequence typing technique (Multilocus Sequence Typing, MLST). **Results:** The 59 *E. faecalis* were divided into 27 sequences type (Sequence type, ST), among them, the major epidemic sequence was ST-16 (16.9%), followed by ST-163 (representing 6.8%), ST-238 (6.8%) and ST-631 (6.8%), and is closely related to nosocomial infection of ST-16 sequence type, the ST-16 Sequence type associated with clinical infection were widely distributed in slow loris, chicken-origin, lesion viscera, fresh pork and pig dung. Additionally, seven sequences type were widely distributed in the pig and slow loris stool. And, all of them have ST-16 sequence type. **Conclusion:** A variety of animal sources contain the dung enterococcus sequence of infected people, it also laid the basis for study of pathogenesis in *E. faecalis*.

Keywords

Enterococcus Faecalis, Multilocus Sequence Typing (MLST), Housekeeping Gene, Sequence Type (ST)

动物源粪肠球菌的遗传关系分析

赵 娣¹, 段志刚², 崔新格¹, 闫瑞杰¹, 陈 飞¹, 李滨洲¹, 胡 慧^{1*}, 王亚宾^{1*}

¹河南农业大学牧医工程学院, 河南 郑州

²郑州市畜牧局, 河南 郑州

Email: *ybwang8686@126.com, *1850336635@qq.com

收稿日期: 2017年4月12日; 录用日期: 2017年4月25日; 发布日期: 2017年4月30日

*通讯作者。

文章引用: 赵娣, 段志刚, 崔新格, 闫瑞杰, 陈飞, 李滨洲, 胡慧, 王亚宾. 动物源粪肠球菌的遗传关系分析[J]. 农业科学, 2017, 7(2): 140-146. <https://doi.org/10.12677/hjas.2017.72017>

摘要

目的：为了探讨不同动物来源中粪肠球菌(*E.faecalis*)菌株之间的遗传关系。方法：利用PCR技术对59株不同来源粪肠球菌的7个管家基因*gdh*、*gyd*、*pstS*、*gki*、*aroE*、*xpt*、*yiqL*分别进行扩增测序，根据测序结果，利用多位点序列分型技术(Multilocus Sequence Typing, MLST)进行分析、比对。结果：59株不同来源粪肠球菌被分成了27个序列型(Sequence type, ST)，其中，主要流行序列型是ST-16 (占16.9%)，其次是ST-163 (占6.8%)、ST-238 (占6.8%)和ST-631 (占6.8%)，而与医院内感染密切相关的ST-16序列型，广泛分布在除熟食食品和羊粪外的其它5种来源中。另外，猪和蜂猴的粪便中分别含有7种序列型，且均有ST-16序列型。结论：多种动物来源中均含有感染人的粪肠球菌序列型，这也为粪肠球菌致病机理研究奠定了基础。

关键词

粪肠球菌，多位点序列分析，管家基因，序列型(ST)

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肠球菌(*Enterococcus*)是一种条件致病菌，可引起严重的医院内感染和感染多种动物[1] [2]，其中，粪肠球菌引起的感染占 85%~95% [3]。引起的主要症状包括尿路感染、腹腔感染、败血症、心内膜炎、腹泻等[2] [4] [5]。但目前肠球菌的致病机理不清，各感染菌株携带的毒力因子和抗生素抗性不同，尤其是在食品安全日趋严峻的形势下，动物源粪肠球菌与人的感染关系不明[1] [3]。因此，了解各来源粪肠球菌遗传关系就成为首要条件。

多位点序列分型(MLST)是 1998 年 Achtman 等提出并发展起来的分子生物学分型方法，是通过使用标准的核苷酸测序技术，通过分析多个管家基因 450 bp 左右的核心片段的核酸序列，从而对菌株的等位基因进行多样性的比较，根据不同的菌株对应不同的序列型来说明其遗传学关系[6] [7] [8]。由于 MLST 操作简单，实验重复性高，它有一个庞大的数据库，可将数据结果直接提交到数据库中进行国际间菌株比对、溯源分析、遗传进化分析等，这对研究不同来源、不同菌株、动物源与人类感染之间菌株的遗传关系和抗生素抗性、流行株、毒力基因携带等之间的相关性奠定了基础[6] [9]-[14]。因此，本试验将不同来源 59 株粪肠球菌利用 7 个管家基因进行多位点序列分析，根据得出不同的序列型来进行不同来源、不同菌株的遗传关系分析，以期研究粪肠球菌致病机理奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 菌种

59 株试验菌种为本实验室保存菌种，且均通过 16S rRNA 方法鉴定，确认 59 株菌种均为粪肠球菌，并于 50%甘油中-20℃保存，其来源与菌株编号如下表(表 1)所示。

Table 1. The source of the enterococcus faecalis isolates**表 1.** 粪肠球菌分离株的来源

来源	菌株数	菌株编号
蜂猴	12	2-9, 2-10, 2-11, 3-2, 3-5, 6-5, 6-6, 6-7, 6-11, 9-5, 9-8, 9-9
鸡源	10	1'A, 18A, 22A, 26A, 34A, 37B, 41B, 43B, 44B
猪病变内脏	12	N1, N2, N4, N5, N7, N8, N9, N10, N12, N30, N33, N41
生鲜肉样	9	4-1a, 4-1b, 6-2a, 12b, 14-2b, 16-1b, 20a, 27-2b, 27a
熟肉制品	7	S1, S2, S4, S7, S15, S18, S19
猪粪	7	F4, F7, F8, F9, Z 肥 20-1, Z 育肥④, Z 种 6-1
羊粪	3	D7①, J1-2, J9-1

注：菌株的 NCBI accession number 为：N1 (FJ378656), N2 (FJ378657), N4 (FJ378659), N5 (FJ378660), N7 (FJ378662), N8 (FJ378663), N9 (FJ378664), N10 (FJ378665), N12 (FJ378667), N30 (FJ378685), N33 (FJ378688), N41 (FJ378696)

2.2. 主要试剂

PCR 反应试剂：DL2000 DNA Ladder Marker、Agarose-Molecular Biology Grade 琼脂糖购自宝生物工程(大连)有限公司；*Taq*PCR Mastermix 和 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒均购自上海生工生物工程有限公司；DNA Green 核酸染料购自北京天恩泽生物技术有限公司；BHI 培养基；1 × TAE 电泳缓冲液；无水乙醇；异丙醇和双蒸水等。

2.3. 操作过程

2.3.1. 细菌的活化与纯化培养

将保存的菌种活化后无菌条件下划线于 BHI 琼脂平板上，37℃ 培养 24~48 h。挑取单个菌落，接种于 5 ml 液体 BHI 培养基中，37℃ 培养 12 小时。

2.3.2. DNA 的提取

将上述培养好的菌液按照 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书进行 DNA 的提取。

2.3.3. PCR 引物设计与合成

根据 www.mlst.net 网站确定粪肠球菌的 7 对管家基因 *gdh*、*gyd*、*pstS*、*gki*、*aroE*、*xpt* 和 *yiql* 作为目标基因，应用软件 Premier 5.0 设计引物(见表 2)，并送往上海生工生物工程有限公司合成，按照各引物的分子量将引物稀释为 20 pmol/μl，-20℃ 保存备用。

2.3.4. PCR 反应体系及扩增条件

对 59 株粪肠球菌进行单独扩增：模板 DNA 2 μl(空白对照为双蒸去离子水 2 μl)，上、下游引物各 1 μl (20 pmol/μl)，*Taq* 酶 10 μl，其余用去离子水补足，总体积 25 μl。7 种基因 PCR 扩增条件均为：94℃ 预变性 5 min，95℃ 变性 30 s，56℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 1 min，共进行 30 个循环；72℃ 延伸 7 min。

2.3.5. PCR 扩增产物测序

将经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后的 PCR 产物，送上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

2.3.6. MLST 数据分析

测序后在线递交到肠球菌 MLST 分析网络服务器进行分析得出等位基因型和序列型(ST)。

Table 2. PCR primer sequence and the gene length
表 2. PCR 引物序列与目的基因长度

基因	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
<i>gdh-1</i>	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530
<i>gdh-2</i>	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
<i>gyd-1</i>	CAAACCTGCTTAGCTCCAATGGC	395
<i>gyd-2</i>	CATTTTCGTTGTCATACCAAGC	
<i>pstS-1</i>	CGGAACAGGACTTTTCGC	583
<i>pstS-2</i>	ATTTACATCACGTTCTACTTGC	
<i>gki-1</i>	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG	438
<i>gki-2</i>	ACCATTAAAGCAAAAATGATCGC	
<i>aroE-1</i>	TGGAAAACCTTTACGGAGACAGC	459
<i>aroE-2</i>	GTCCTGTCCATTGTTCAAAAAGC	
<i>xpt-1</i>	AAAATGATGGCCGTGTATTAGG	456
<i>xpt-2</i>	AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	
<i>yiql-1</i>	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG	436
<i>yiql-2</i>	GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	

3. 结果与分析

3.1. PCR 产物扩增结果

根据上述引物、扩增条件,以 59 株粪肠球菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增,59 株粪肠球菌均获得了 *gdh*、*gyd*、*pstS*、*gki*、*aroE*、*xpt* 和 *yiql* 7 个基因片段,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,大小与预期大小一致,详见图 1 和图 2。

3.2. 59 株粪肠球菌 MLST 分析结果

将 59 株粪肠球菌的 7 个管家基因 *gdh*、*gyd*、*pstS*、*gki*、*aroE*、*xpt* 和 *yiql* 的扩增产物送基因公司测序,测序结果在国际 MLST 网络数据库中比对分析,结果 59 株粪肠球菌被分成了 27 个 ST 型,详细结果见表 3。通过对 27 个序列型分析,ST-16 序列型最多,占总数的 16.9%,其次是 ST-163、ST-238、ST-631 序列型,分别占 6.8%,ST-69、ST-138、ST-330、ST-597 序列型分别占 5.1%。

从 ST 序列型和菌株来源关系分析,ST-16 序列型的菌株来源较广,在猪病变内脏、生鲜肉样、猪粪、蜂猴、鸡源均有分布;从菌株来源中所含的 ST 序列型分析,猪病变内脏、猪粪和蜂猴来源的菌株分别均含有 7 个 ST 型,其中,猪病变内脏和猪粪便中均含有 ST-16 和 ST-330 两个序列型;而猪粪便和蜂猴粪便则分别含有 ST-16 和 ST-225 两个序列型。除过 ST-16 外,其他来源的菌株中则不含有相同的序列型。

4. 讨论

肠球菌广泛的分布性与环境抵抗力以及它的抗药性和致病性,都使得人们对肠球菌越来越重视,而对来源、菌株与抗性和毒力因子携带等遗传关系的研究,以试图为肠球菌致病机理研究打下基础已成为当今研究的一大热点[1] [15] [16]。MLST 可通过揭示管家基因的变异来揭示病原菌之间遗传关系,且操作十分简单,分型结果具有高度的可重复性及可比性[3]。

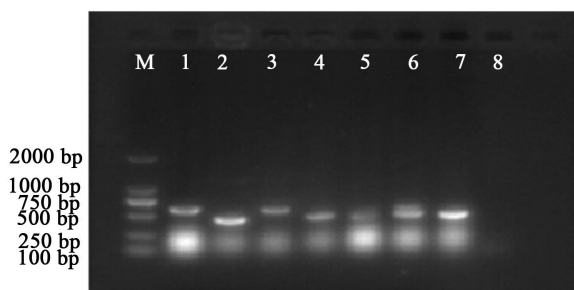


Figure 1. PCR amplification products of 7 housekeeping genes in enterococcus faecalis. M: DL2000DNA Marker 1: *gdh* gene; 2: *gyd* gene; 3: *pstS* gene; 4: *gki* gene; 5: *aroE* gene; 6: *xpt* gene; 7: *yiqL* gene; 8: blank control

图 1. 粪肠球菌 7 个管家基因的 PCR 扩增结果。M: DL2000DNA Marker 1: *gdh* 基因 2: *gyd* 基因 3: *pstS* 基因 4: *gki* 基因 5: *aroE* 基因 6: *xpt* 基因 7: *yiqL* 基因 8: 空白对照

Table 3. MLST data analysis of 59 dung enterococcus strains

表 3. 59 株粪肠球菌的 MLST 数据结果

菌株数	等位基因							ST	菌株编号
	<i>Gdh</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>gki</i>	<i>aroE</i>	<i>xpt</i>	<i>yqil</i>		
1	8	7	7	5	4	4	1	4	Z 育肥 4
10	5	1	1	3	7	7	6	16	N8...
3	27	12	1	32	6	2	33	69	N4, N12, N41
1	24	11	17	25	39	35	3	80	D7①
2	17	2	22	1	14	14	1	116	N33, 9-9
3	27	7	46	5	39	2	36	138	18A, 26A, 43B
4	1	5	29	25	4	3	12	163	S7...
2	4	4	46	33	2	1	3	207	2-10, 3-5
2	39	2	49	3	7	57	17	225	6-5, F7
4	10	1	51	24	49	12	50	238	4-1b...
1	9	5	29	25	4	3	12	240	S4
2	27	12	35	32	50	57	23	22	J9-1, F9
1	40	11	1	37	9	7	21	265	4-1a
1	5	11	49	45	7	11	60	320	3-2
1	9	6	4	49	11	15	61	314	1'A
3	14	1	18	22	16	17	12	330	N5, N7, F4
1	8	7	7	5	4	66	1	338	Z 种 6-2
1	54	11	1	3	7	7	6	363	Z 肥 20-1
1	62	17	29	11	1	10	17	367	37B
1	5	1	1	3	7	7	69	372	6-11
2	1	7	69	1	1	10	1	409	S1, S2
1	8	7	7	5	7	4	1	410	J1-2
1	4	6	56	29	7	1	20	475	N10
2	12	7	3	32	1	48	46	525	N1, N30
1	12	7	3	32	1	23	1	543	N2
3	74	2	73	72	78	18	17	597	6-2a, 20a, 27a
4	40	11	17	15	15	17	34	631	2-11...

注: N8...表示 N8, N9, 14-2b, F8, 6-6, 6-7, 9-5, 9-8, 2-9, 44B; S7...表示 S7, S15, S18, S19; 4-1b...表示 4-1b, 12b, 16-1b, 27-2b; 2-11...表示 2-11, 22A, 41B, 34A

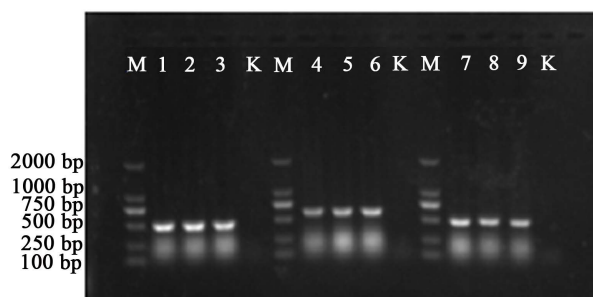


Figure 2. PCR amplification products of part of the housekeeping gene in enterococcus faecalis. M: DL2000DNA Marker; 1, 2, 3: *gki* gene; 4, 5, 6: *pstS* gene; 7, 8, 9: *aroE* gene; K: blank control

图 2. 部分管家基因 PCR 扩增结果。M: DL2000DNA Marker 1, 2, 3: *gki* 基因 4, 5, 6: *pstS* 基因 7, 8, 9: *aroE* 基因 K: 空白对照

ST-16 序列型在本次分型试验中占 16.9%，共包括了 10 个菌株，而且菌株来源广泛，在猪病变内脏、生鲜肉样、猪粪、蜂猴和鸡源中均有分布。而且也是医院内的感染菌株[17] [18]，ST-16 序列型虽对万古霉素、替考拉宁、莫西沙星等药物敏感，但含有氨基糖苷类抗性基因 *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')*, *ant(6)*, *ant(3'')(9)* 在 ST-16 中能被频繁地检测到，且对庆大霉素有较强的耐药性。ST-16 在西班牙、荷兰、丹麦、波兰和匈牙利等多个国家均有分布[17]。因此，从 ST-16 序列型感染和分布情况分析，ST-16 很可能是一种在不同国家、不同来源间流行的感染菌株，而且有可能携带氨基糖苷类抗性基因，具体情况有待进一步研究。

肠球菌引起的临床感染的治疗越来越困难，其原因除了具有复杂的耐药机制外还有其具有众多的毒力因子，肠球菌的毒力因子已被确认为是这种微生物在宿主上生存及致病性的重要因素[17] [19]。据了解，*cyl* 基因的存在与 ST-16 具有一定的联系，而且 *esp*、*gelE* 和 *agg* 基因的存在不针对任何特定的 ST，但在 ST-16 中，却同时含有 *esp* 阳性和 *esp* 阴性菌株[16]。因此，ST-16 在动物源性粪肠球菌中是否存在这种毒力因子关系，需要进一步研究。

ST-163、ST-238 序列型各自占总数的 6.8%，这两个序列型菌株均来源肉制品中，ST-163 主要出现在熟肉制品中，ST-238 则来源于生鲜肉样中，而且在其他的来源中均没有出现。这说明熟肉制品和生鲜肉中污染的本型菌株来源于其它来源，如环境污染，提示我们应加强环境卫生，避免污染，并应加强加强食品中对 ST-163 和 ST-238 的监控。

本次研究主要着重于各菌株间的遗传关系研究，下一步工作将是将这种分型与各菌株表型特性相结合，以便更好地为致病性、耐药性以及防治打下基础。

参考文献 (References)

- [1] 卢雅敏. 肠球菌毒力基因和万古霉素耐药基因研究[D]: [硕士学位论文]. 温州: 温州医学院, 2013: 1-57.
- [2] 刘磊, 王亚宾, 程金乎, 等. 猪粪肠球菌两种致病基因和表型的检测[J]. 中国农学通报, 2009, 25(1): 17-20.
- [3] 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]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2010: 1-59.
- [4] Shanker, N., Lockett, C.V. and Baghdayan, A.S. (2001) Role of *Enterococcus faecium* Surface Protein Esp in the Pathogenesis of Ascending Urinary Tract Infection. *Infection and Immunity*, **69**, 4366-4372. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4366-4372.2001>
- [5] Van, D., Bogaard, A.E., Jansen, L.B., et al. (1997) Vancomycin-Resistant Enterococci in Turkeys and Farmers. *New England Journal of Medicine*, **337**, 1558-1559. <https://doi.org/10.1056/NEJM199711203372117>
- [6] 姬小微, 廖亚玲, 毛旭虎, 等. MLST 分析在病原微生物基因分型应用中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 246-249.

- [7] Cooper, J.E. and Feil, E.J. (2004) Multilocus Sequence Typing What Is Resolved. *Trends in Microbiology*, **12**, 373-377. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.06.003>
- [8] 王浩竹, 王正祥. 细菌分子鉴定技术的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(23): 9880-9884.
- [9] 王中强, 邱少富, 王勇, 等. 多位点序列分型技术及其研究进展[J]. 军事医学科学院刊, 2010, 34(1): 76-79.
- [10] 赵冰, 朱林英, 黄红, 等. 多位点序列分析在空肠弯曲菌监测中的运用[J]. 职业与健康, 2016, 32(20): 2792-2795.
- [11] 赵瑞珂, 顾国浩, 韩清珍, 等. 褪色沙雷菌耐药率与多位点序列分析研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(18): 4084-4087.
- [12] Klein-Jobstl, D., Sofka, D., Iwersen, M., et al. (2016) Multilocus Sequence Typing and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* Isolated from Dairy Calves in Austria. *Frontiers in Microbiology Trends in Microbiology*, **7**, 72. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00072>
- [13] Korczak, B.M., Zurfluh, M., Emler, S., et al. (2009) Multiplex Strategy for Multilocus Sequence Typing, Fla Typing, and Genetic Determination of Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates Collected in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**, 1996-2007. <https://doi.org/10.1128/JCM.00237-09>
- [14] 王中强, 邱少富, 王勇, 等. 多位点序列分型技术及其研究进展[J]. 军事医学科学院刊, 2010, 34(1): 76-79.
- [15] Nallapareddy, S.R., Wenxiang H., Weinstock, G.M., et al. (2005) Molecular Characterizations of a Widespread, Pathogenic, and Antibiotic Resistance-Receptive *Enterococcus faecalis* Lineage and Dissemination of Its Putative Pathogenicity Island. *J. Bacterio*, **187**, 5709-5718. <https://doi.org/10.1128/jb.187.16.5709-5718.2005>
- [16] 王亚宾. 猪肠球菌病原分离鉴定及其分子致病机制研究[D]: [博士学位论文]. 郑州: 河南农业大学, 2009: 1-116.
- [17] Quinones, D., Kobayashi, N. and Nagashima, S. (2009) Molecular Epidemiologic Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates in Cuba by Multilocus Sequence Typing. *Microbial Drug Resistance*, **15**, 287-293. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0028>
- [18] Poulsen, L.L., Bisgaard, M., Son, N.T., et al. (2012) *Enterococcus* and *Streptococcus* spp. Associated with Chronic and Self-Medicating Urinary Tract Infections in Vietnam. *BMC Infectious Diseases*, **12**, 320-327. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-320>
- [19] Vergis, E.N., Shankar, N., Chow, J.W., et al. (2002) Association between the Presence of Enterococcal Virulence Factors Gelatinase, Hemolysin, and Enterococcal Surface Protein and Mortality among Patients with Bacteremia Due to *Enterococcus faecalis*. *Clinical Infectious Diseases*, **35**, 570-575. <https://doi.org/10.1086/341977>

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网覆盖推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjas@hanspub.org