

DOI:10.13350/j.cjpb.220709

• 论著 •

不同来源粪肠球菌的比较基因组学分析*

孙淑玥¹, 王珊珊², 崔生辉², 徐颖华^{2**}, 卢雪梅^{1**}

(1. 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东省生物活性药物研究重点实验室, 广东广州 510006;

2. 中国食品药品检定研究院, 中国医学细菌保藏管理中心, 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室)

【摘要】 **目的** 分析不同来源粪肠球菌全基因组特征及其分子进化规律。 **方法** 对收集的不同来源粪肠球菌进行全基因组序列测序, 利用比较基因组学分析粪肠球菌的基因特征、耐药基因和毒力基因携带情况, 并以此进行泛基因组和核心基因组分析, 构建系统发育树, 进行系统进化分析。 **结果** 6株不同来源粪肠球菌染色体全基因组序列全长为2 450 754~2 731 452 bp, 共含有2 669~3 085个基因, 基因组的平均GC含量为38.0%。粪肠球菌具有开放型泛基因组, 而核心基因组为稳定型。不同来源菌株基因组中均含有3~14种耐药基因和8~17种毒力基因。基于核心基因系统进化树分析显示, 不同来源的粪肠球菌分子进化均匀分布, 相互重叠, 无明显聚类趋势。 **结论** 粪肠球菌具有开放型泛基因组, 其核心基因为稳定型, 不同来源分离菌株进化均匀分布, 这些结果为后续揭示粪肠球菌分子遗传进化规律等研究奠定了基础。

【关键词】 粪肠球菌; 全基因组测序; 系统发育分析; 比较基因组学

【中图分类号】 R378.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)07-0784-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jul. ;17(7):784-789.]

Complete genome analysis of food-derived *Enterococcus faecalis*

SUN Shu-yue¹, WANG Shan-shan², CUI Sheng-hui², XU Ying-hua², LU Xue-mei¹ (1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, School of Life Science and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Institute for Food and Drug Control)

【Abstract】 **Objective** To analyze the molecular characteristics of whole genome and the molecular evolution of diverse-source *Enterococcus faecalis*. **Methods** Diverse-source *E. faecalis* strains were collected, and whole-genome sequencing was performed using solexa sequencing technology. The comparative genomics approach was used to analyze genetic characteristics, drug-resistance genes and virulence genes in *E. faecalis* genomes. Furthermore, pan-genome and core genome analysis was performed and the phylogenetic tree was constructed. **Results** The whole-genome of six different-source *E. faecalis* ranged from 2,450,754 to 2,731,452 bp in length, of which contained 2,669 to 3,085 genes. These genomes had an average GC content of 38.0%. It was found that *E. faecalis* had an open pan-genome, while the core genome was stable. The genomes of strain from different sources contained 3~14 drug resistance genes and 8~17 virulence genes, respectively. The phylogenetic tree analysis based on core genes showed that the molecular evolution of *E. faecalis* from different sources was evenly distributed, overlapping, and no obvious trend were observed. **Conclusion** *E. faecalis* has an open pan-genome, and its core genes are stable and evolutionarily evenly distributed. These results will provide the foundation for understanding molecular genetic evolution of *E. faecalis*.

【Key words】 *Enterococcus faecalis*; whole-genome sequencing; phylogenetic analysis; comparative genomics

***粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 为肠球菌属 (*Enterococcus*) 的一种革兰阳性菌, 菌体形态呈球状或链状, 无芽孢无荚膜, 具有维持正常肠道菌群结构的重要作用。该菌具有耐受极端温度^[1-2]、高盐、高胆汁酸、低 pH 值和抗菌剂的能力, 具备在食品基质中的生存能力和发酵潜能, 可作为益生菌分泌细菌素抑制其他病原菌的生长、调节肠道微环境、降低胆固醇, 在机体增强免疫调节中扮演着重要的角色^[3-5]。同时, 粪肠球菌也是常见的条件性致病菌, 不仅会引起人的心内膜炎、泌尿道感染、腹腔感染和败血症等疾病, 还可引

起多种动物发病, 甚至引起动物死亡, 并且可在人与动物间传播^[6-9]。此外, 由于粪肠球菌细胞壁厚, 与其他病原菌相比, 其特殊生物学特性更容易出现耐药性, 且

* **【基金项目】** 国家重点研发计划项目 (No. 2018YFC1603900)。

** **【通讯作者】** 卢雪梅, E-mail: luxuemei@gdpu.edu.cn; 徐颖华, E-mail: xuyh@nifdc.org.cn

【作者简介】 孙淑玥(1996-), 女, 福建南平人, 硕士研究生在读。研究方向: 生物制药与材料工程。 E-mail: 834496214@qq.com

近年来粪肠球菌引起的感染呈上升趋势,出现耐药性转移现象。因此,鉴于粪肠球菌的巨大应用价值和潜在致病风险,从全基因组层面上了解不同来源粪肠球菌特征及其分子进化规律具有重要意义^[10-11]。

近年来基因测序技术与大数据分析技术日趋完善,为揭示相似生物类群环境适应性的分子遗传共性及其演化的客观规律提供了便利^[12-13]。为了进一步研究不同来源粪肠球菌环境适应性的分子基础,本研究对6株不同来源粪肠球菌进行全基因组测序,筛选鉴定核心基因组(core-genome)与泛基因组(pan-genome),分析不同菌株基因组中的耐药基因和毒力基因,并与已公布其他菌株数据进行比较基因组学分析,构建系统发育树,为解析粪肠球菌环境适应性的遗传基础与功能多样性的演化发生机制等提供新的线索。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株 6株粪肠球菌由中国食品药品检定研究院提供。从NCBI数据库中下载9株具有明确分离源的粪肠球菌,菌株信息见表1。

表1 6株粪肠球菌相关信息

Table 1 Information of *E. faecalis* used in this study

菌株编号 Strain number	分离来源 Separate source
NIFDC-32222	患者尿液
NIFDC-32226	N/A
NIFDC-32217	食品
NIFDC-32218	食品
NIFDC-32479	患者
NIFDC-32249	患者腹腔积液
ATCC19433	N/A
10244	患者血液
MA1	患者血液
TX0031	患者血液
TX0043	患者血液
TX0102	患者血液
MN16	环境水样
NY9	环境水样
MD6	环境水样

注:N/A表示信息未知;其中ATCC19433为粪肠球菌模式菌株。
Notes:N/A represents information of the unknown; Where in *E. faecalis* type strain ATCC19433.

1.2 主要仪器与试剂 DNA提取试剂盒由QIAGEN(德国)公司提供;细菌培养箱由中仪国科科技(北京)有限公司提供;2%含糖牛肉及其琼脂培养基由北京三药科技开发公司提供;TruSeqTMDNA Sample Prep Kit-Set A和TruSeq PE Cluster Kit由美国Illumina公司提供;其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 细菌培养和DNA提取 将细菌接种于2%含糖牛肉培养基复苏,放置37℃培养24h。按DNA提取

试剂盒说明书提取菌株全基因组DNA,放置于-80℃保存备用。

2.2 全基因组测序 将提取的粪肠球菌全基因组DNA送至上海人类基因组研究中心,使用Illumina公司的第二代Solexa测序技术进行全基因组测序,即利用超声仪打断总量约为1μg DNA,将纯化DNA片段切胶回收,并分别利用TruSeq™ DNA Sample Prep Kit-Set A和TruSeq PE Cluster Kit进行文库的制备与扩增,最后在Illumina机器(×10)上进行测序反应。

2.3 生物信息学分析 应用Velvet 1.2.03软件对上述各菌株测序获得的原始数据进行拼装,并结合软件Glimmer 3.02对组装结果进行编码区域识别与基因预测;搜寻美国NCBI的非冗余蛋白质数据库NR库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>)、KEGG蛋白数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.kegg.jp/>)以及SEED蛋白数据库进行功能分类和基因注释,利用蛋白保守区(CDD)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)进行直系同源簇(COG)分类^[14],通过KEGG数据库构建代谢通路。利用多个数据库的比对结果分析进一步确定注释基因的功能与结构。使用Virulence finder (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>)和ResFinder (<http://cge.Cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)对菌株基因组中所包含的毒力基因和耐药基因进行预测分析^[15]。基于同源基因家族筛选6株不同来源粪肠球菌的核心基因组(core-genome)与泛基因组(pan-genome),并以此进行积累曲线分析。将上述不同来源的粪肠球菌基因组与已发表的9株不同粪肠球菌进行核心基因分析,并以此构建系统进化树。

结果

1 不同来源粪肠球菌基因组特征

应用Solexa测序技术进行全基因组测序分析,每株菌测序深度覆盖基因组超过500倍。采用Velvet V1.2.03软件对有效序列进行拼接和组装,6株菌株最终获得35~45大小contig。经拼接比对分析,粪肠球菌染色体全基因组序列全长为2 450 754~2 731 452 bp。通过基因预测分析,在6株菌株中鉴定出2 669~3 085个基因,平均长度为2061 bp。编码基因占各自基因组序列的85.50%~87.50%,其平均GC含量为38.0%,低于40%,属于具有较强GC偏好的基因组。6株粪肠球菌基因组中非编码基因间区域大小为350 094~446 135 bp,在各自基因组序列中平均占比为13.7%(表2)。

表 2 不同来源粪肠球菌基因组特征
Table 2 Genomic characteristics of *E. faecalis* from different sources

菌株 Strain	基因 数量 Gene Number	编码区大小 (bp) Coding region size (bp)	编码基因 GC 含量(%) GC content of coding region (%)	编码区比例 (%) Coding region/ Genome length (%)	平均基因大小 (bp) Average Gene Length (bp)	基因间隔区域 大小(bp) Intergenic region size (bp)	基因间隔区 GC 含量(%) GC content of Intergenic region	基因间隔区 所占比率(%) Ratio of Intergenic region(%)
NIFDC-32222	2 860	2 580 087	38.00	86.10	902	416 689	33.20	13.90
NIFDC-32226	2 745	2 451 324	38.20	86.80	893	371 505	33.10	13.20
NIFDC-32217	2 917	2 639 793	37.90	85.50	904	446 135	32.90	14.50
NIFDC-32218	2 892	2 637 756	37.90	85.50	912	449 124	33.00	14.50
NIFDC-32479	2 669	2 450 754	38.10	87.50	918	350 094	33.20	12.50
NIFDC-32249	3 085	2 731 452	38.10	86.40	885	429 298	33.70	13.60

2 粪肠球菌的泛基因组和核心基因组分析

基于比较基因组学分析,将 6 株不同来源的粪肠球菌的核心基因组和泛基因组分别拟合了泛基因组大小(y)与基因组数目(x)关系的积累曲线方程($y = 2749.9x^{0.2149}$)以及核心基因个数(y)与基因组数目(x)关系方程($y = 2690.7e^{-0.046x}$)(图 1)。随着粪肠球菌基因组测序数量的增加,泛基因组随之增加,6 株不同来源的粪肠球菌泛基因组所含基因数量多达 4 069 个,远多于每株粪肠球菌基因组数量;核心基因组基因数量随着粪肠球菌菌株数量的逐渐增加而趋于稳定,所含基因数量为 2 139 个。

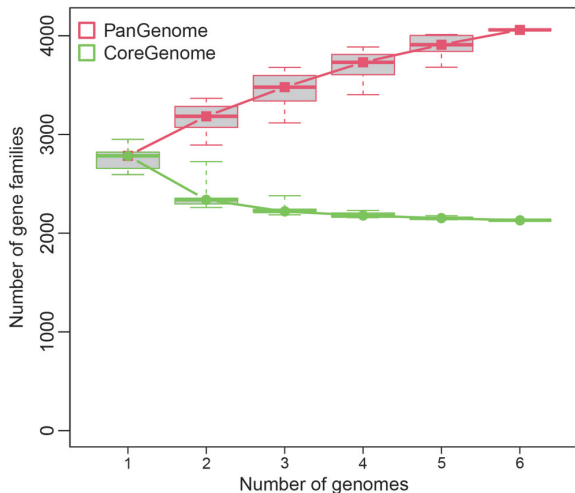


图 1 6 株不同来源粪肠球菌泛基因组和核心基因组的积累曲线分析
Fig. 1 Accumulation curve analysis of the pan-genome and core-genome of 6 *E. faecalis* strains from different sources

利用 COG 数据库对 6 株粪肠球菌的泛基因组和核心基因组进行基因功能注释分析,结果如表 2。与泛基因组所含基因功能相比较,核心基因组所含基因的功能主要集中在翻译、能量生产和转化、氨基酸转运和代谢、核苷酸转运和代谢以及脂质转运和代谢,在泛基因组中所占比例均超过 85%(表 3)。泛基因组中含有参与复制、重组和修复、防御机制相关基因数量分别为 215 个和 87 个,多于核心基因组中的 101 个和 39 个。

表 3 粪肠球菌核心基因组和泛基因组所含基因功能分类

Table 3 Functional classification of genes contained in the core-genome and pan-genome of *E. faecalis*

COG 功能分类 COG Function category	核心基因 数量 No. of core genes	泛基因 数量 No. of pan genes	泛基因组中核心 基因的比例(%) Proportion of core genes among pan genes
翻译、核糖体结构与生物合成	150	162	92.6
RNA 加工和修饰	0	0	0.0
转录	147	224	65.6
复制、重组和修复	101	215	47.0
染色质结构与动力	0	0	0.0
细胞周期调控、细胞分裂、染色体分离	20	36	55.6
细胞核结构	0	0	0.0
防御机制	39	87	44.8
信号转导机制	56	84	66.7
细胞壁、细胞膜、细胞外膜生物合成	89	151	58.9
细胞运动	7	14	50.0
细胞骨架	1	1	100.0
细胞外结构	0	0	0.0
细胞内运输、分泌和囊泡运输	16	26	61.5
翻译后修饰、蛋白质周转、分子伴侣	47	60	78.3
能量生产和转化	92	101	91.1
碳水化合物运输和代谢	204	294	69.4
氨基酸转运和代谢	154	173	89.0
核苷酸转运和代谢	85	100	85.0
辅酶转运与代谢	58	75	77.3
脂质转运与代谢	44	47	93.6
无机离子转运和代谢	98	126	77.8
次级代谢产物生物合成、转运和分解代谢	17	22	77.3
一般功能预测	227	293	77.5
未知功能	225	315	71.4
未分类	262	1463	17.9

3 耐药基因

耐药基因预测分析显示 6 株不同来源的粪肠球菌基因组中含有对杆菌肽、林可酰胺、氟喹诺酮、四环素和异帕霉素等抗生素的 3~14 种不等耐药基因。其中

来自临床患者的 NIFDC-32249 菌株中含有耐药基因数量最多,为 14 种。所有粪肠球菌基因组均含有抗杆菌肽、林可酰胺及氟喹诺酮耐药基因。除 NIFDC-32226 菌株,其他 5 株菌株基因组均携带抗万古霉素耐药基因,其中 NIFDC-32249 菌株基因组中存在 *vanRB*, *VanSB*, *VanYB*, *VanWB*, *VanHB*, *VanB* 和 *VanXB* 7 种抗万古霉素耐药基因。有 4 株菌含有抗异帕霉素、四环素、氯霉素耐药基因,占比 66.7%。有 1 株菌含有抗林可霉素基因(表 4)。

4 毒力基因

对 6 株粪肠球菌基因组毒力基因进行比对分析,共找到 20 种编码不同功能蛋白的毒力基因。其中粪肠球菌 NIFDC-32217、NIFDC-32218、NIFDC-32222、NIFDC-32226、NIFDC-32479 和 NIFDC-32249 注释到的毒力基因数量分别为 17、17、15、8、11、11 个,以参与胞外酶、溶血素和群体感应系统毒力基因数量最多。6 株粪肠球菌基因组中均含有 *efaA*, *hasC*, *clpP*, *gelE*, *EF1817* 和 *EF0954* 毒力基因(表 5)。

5 粪肠球菌的分子进化分析

将 6 株不同来源的粪肠球菌与 NCBI 数据库中 9

株不同来源的菌株进行核心基因分子进化分析,聚类图见图 2。模式菌株在进化树最外侧,与其他菌株进化距离较远。除了 4 株血液分离株集中分布,其余水源、尿液、食品等不同来源的粪肠球菌均匀分布,相互重叠,食品分离株与临床分离株共处同一分支,表明菌株分离来源与其系统进化无明显聚类趋势。

表 4 6 株粪肠球菌基因组中耐药基因分析
Table 4 Analysis of drug resistance genes of 6 *E. faecalis* strains

抗菌药物 Antibacterial drug	耐药基因 Resistance gene	含耐药基因菌株数 Number of Strains	含耐药基因菌株占比(%) Resistance gene contained in the ratio
异帕霉素	<i>Aph3IIIa</i> , <i>Aac6Ie</i>	4	66.7
林可酰胺	<i>ErmB</i> , <i>lsa</i>	6	100.0
四环素	<i>tetL</i> , <i>tetM</i>	4	66.7
杆菌肽	<i>BacA</i>	6	100.0
氟喹诺酮	<i>EmeA</i>	6	100.0
氯霉素	<i>catA1</i> , <i>catA8</i>	4	66.7
万古霉素	<i>VanRG</i> , <i>VanXB</i> , <i>VanB</i> , <i>VanHB</i> , <i>VanWB</i> , <i>VanYB</i> , <i>VanSB</i> , <i>VanRB</i>	5	83.3
林可霉素	<i>LnuB</i>	1	16.7

表 5 6 株粪肠球菌毒力基因统计
Table 5 Statistics of virulence genes of 6 strains of *E. faecalis*

菌株 Strain	毒力基因数量 Number of virulence genes	毒力基因种类 Types of virulence genes						
		粘附素 Aggregation substance	荚膜多糖 Capsule	溶血素 Cytolysin	胞外酶 exoenzyme	表面蛋白 Surface protein	群体感应系统 Quorum sensing system	
NIFDC-32217	17	<i>efaA</i>	<i>hasC</i>	<i>cylR2</i> , <i>cylL-l</i> , <i>cylL-s</i> , <i>cylM</i> , <i>cylB</i> , <i>cylA</i> , <i>cylI</i>	<i>gelE</i> , <i>EF1817</i>	<i>bsh</i>	<i>clpP</i>	<i>fsrA</i> , <i>fsrB</i> , <i>fsrC</i> , <i>EF0954</i>
NIFDC-32218	17	<i>efaA</i>	<i>hasC</i>	<i>cylR2</i> , <i>cylL-l</i> , <i>cylL-s</i> , <i>cylM</i> , <i>cylB</i> , <i>cylA</i> , <i>cylI</i>	<i>gelE</i> , <i>EF1817</i>	<i>bsh</i>	<i>clpP</i>	<i>fsrA</i> , <i>fsrB</i> , <i>fsrC</i> , <i>EF0954</i>
NIFDC-32222	15	<i>Ace</i> , <i>efaA</i> , <i>psaA</i>	<i>hasC</i>	<i>cylR2</i> , <i>cylL-l</i> , <i>cylL-s</i> , <i>cylM</i> , <i>cylB</i> , <i>cylA</i> , <i>cylI</i>	<i>gelE</i> , <i>EF1817</i>		<i>clpP</i>	<i>EF0954</i>
NIFDC-32226	8	<i>ace</i> , <i>efaA</i>	<i>hasC</i>	/	<i>gelE</i> , <i>EF1817</i>	<i>bsh</i>	<i>clpP</i>	<i>EF0954</i>
NIFDC-32479	11	<i>ace</i> , <i>efaA</i>	/	/	<i>gelE</i> , <i>EF1817</i>	<i>bsh</i>	<i>clpP</i>	<i>fsrA</i> , <i>fsrB</i> , <i>fsrC</i> , <i>EF0954</i>
NIFDC-32249	11	<i>ace</i> , <i>efaA</i>	<i>hasC</i>	/	<i>gelE</i> , <i>EF0818</i> , <i>EF1817</i>		<i>clpP</i>	<i>fsrA</i> , <i>fsrB</i> , <i>fsrC</i> , <i>EF0954</i>

讨论

随着全基因组测序技术的飞速发展,利用生物信息学工具已成为研究致病菌潜在致病性、耐药性以及分子进化规律等的一种重要手段^[16]。本研究对获得的 6 株不同来源粪肠球菌进行全基因组测序,解析了这些菌株的全基因特征,发现 6 株不同分离源粪肠球菌泛基因组为开放型,而核心基因组为稳定型。COG(蛋白相邻类的聚簇)是对蛋白质进行直系同源分类的数据库,是微生物基因组注释和比较基因组中的常用工具^[17]。与核心基因组相比,COG 注释结果证实泛基因组中主要扩展一些与复制、重组和修复以及防御机制相关的基因。在核心基因组仅存在 47.0%(泛基

因组中 215 个中的 101 个)与复制、重组和修复相关基因,以及 44.8%(泛基因组中 87 个中的 39 个)与防御机制相关基因。He 等^[18]研究发现粪肠球菌核心基因主要编码 ATP 结合盒(ABC)转运系统通透酶和 ABC 亚家族 B,与细菌多重耐药性相关。这可能是粪肠球菌易形成抗生素耐药特性的原因之一。而粪肠球菌泛基因组含有大量修复和防御相关基因,并呈现逐渐增多趋势。根据以上分析推测蛋白功能为参与防御噬菌体等入侵病毒、负责细菌基因组 DNA 切割和修饰过程中 DNA 结合位点的特异性识别,表明粪肠球菌的开放型泛基因组具有高度的可塑性,可形成多种防御机制和修复方式来保护自身免受病毒入侵,以适

应不同环境而生存。

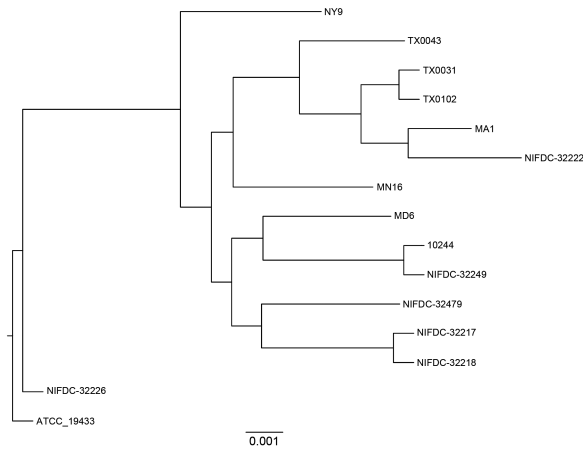


图2 不同来源粪肠球菌核心基因组系统进化发育树
Fig.2 Phylogenetic tree constructed by core-genome of *E. faecalis* from different sources

随着抗生素的广泛使用,出现了耐药粪肠球菌,甚至以前对肠道菌属临床一线用抗生素—万古霉素的耐药率已在粪肠球菌超过10%^[19]。因此,分析细菌基因组所含耐药基因,探讨其与细菌耐药性的关系,可为指导临床合理用药和抗生素的管理提供指导^[20]。本研究中的6株不同来源粪肠球菌存在数量不等的耐药基因,非临床与临床患者来源菌株基因组中的耐药基因无明确关联,支持Kim等^[21]的研究结论。但本研究中绝大多数粪肠球菌基因组中存在抗万古霉素耐药基因,尽管这些菌株不一定具有抗万古霉素耐药表型,推测粪肠球菌从近祖先分子进化过程中获得了抗万古霉素耐药基因,可能会在不同环境中受不同抗生素作用的进化压力,诱导出现耐药表型。因此应合理使用抗生素,并密切检测粪肠球菌耐药性动态变化规律。

粪肠球菌在自然界中普遍存在,能从各类畜禽肉类、蛋类等食物中分离,是人和动物肠道的正常菌群,但也是一种条件性致病菌。近年来,粪肠球菌已成为异源获得性感染的主要病原菌之一,可引起免疫功能低下患者的机会感染,对公共卫生安全构成极大隐患^[22-23]。粪肠球菌的感染和致死主要是由其毒力基因引起的,这是多因子多功能协同作用的结果。根据基因功能分类,毒力基因的功能主要是参与编码粘附素、荚膜多糖、溶血素、胞外酶、表面蛋白和群体感应系统^[24-26]。在粪肠球菌感染宿主时,相关毒力基因通过编码,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。本研究对分离自水源、尿液、食品、腹腔积液、临床和血液等的粪肠球菌进行毒力基因和进化关系分析,发现不同来源粪肠球菌毒力基因具有多样性,食品来源菌株 NIFDC-32217、NIFDC-32218 中也含有较多毒力基因,与其他生态环境分离菌株毒力基

因无明显不同,提示这些来源菌株具有潜在的致病风险。

基于全基因组的系统进化树可以提供不同细菌物种间的亲缘性信息和可靠的遗传进化关系^[27]。15株粪肠球菌的核心基因系统进化树分析显示,不同来源的粪肠球菌分子进化均匀分布,相互重叠,无明显聚类趋势,表明菌株分离来源可能与菌株的系统进化发育无明显相关性,推测非临床与临床分离株均来自相同的近祖先,具有相类似的核心基因组,也进一步支持在粪肠球菌进化过程中通过获得特定基因形成庞大的泛基因组,以适应不同环境而生存。

综上所述,粪肠球菌的泛基因组为开放型,而核心基因组为稳定型。基于核心基因系统进化树分析显示,不同来源的粪肠球菌分子进化均匀分布,表明菌株分离来源与系统发育无明显聚类趋势。这为探究粪肠球菌适应不同环境的遗传基础与分子进化规律等研究奠定了基础。

【参考文献】

[1] Garcia-Solache M, Rice LB. The *enterococcus*: A model of adaptability to its environment[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00058-00018.

[2] Gao W, Howden BP, Stinear TP. Evolution of virulence in *enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen [J]. Curr Opin Microbiol, 2018(41):76-82.

[3] Torres C, Alonso CA, Ruiz-Ripa L, et al. Antimicrobial resistance in *enterococcus* spp. of animal origin[J]. Microbiol Spectr, 2018, 6(4): ARBA-0032-2018.

[4] Cheng Y, Ling Z, Li L. The intestinal microbiota and colorectal cancer[J]. Front Immunol, 2020(11):615056.

[5] Bartolini I, Risaliti M, Ringressi MN, et al. Role of gut microbiota-immunity axis in patients undergoing surgery for colorectal cancer; Focus on short and long-term outcomes[J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(20):2498-2513.

[6] Beganovic M, Luther MK, Rice LB, et al. A review of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* bloodstream infections and infective endocarditis[J]. Clin Infect Dis, 2018, 67(2): 303-309.

[7] Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin[J]. Toxins (Basel), 2013, 5(5):895-911.

[8] Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, et al. Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options[J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(5):269-284.

[9] Abat C, Huart M, Garcia V, et al. *Enterococcus faecalis* urinary-tract infections; Do they have a zoonotic origin? [J]. J Infect, 2016, 73(4):305-313.

[10] Haghi F, Lohrasbi V, Zeighami H. High incidence of virulence determinants, aminoglycoside and vancomycin resistance in *enterococci* isolated from hospitalized patients in northwest iran [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1):744.

[11] Sharifzadeh Peyvasti V, Mohabati Mobarez A, Shahcheraghi F, et

