

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА *AEROCOCCUS* SP. 1KP-2016, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ ПАЦИЕНТА С ИНФЕКЦИЕЙ КРОВОТОКА

А. В. Чаплин^{1,2}✉, И. А. Чагина¹, А. С. Пименова¹, Н. Т. Гадуа¹, Н. М. Каргальцева¹, О. Ю. Борисова^{1,2}, Е. Е. Донских², Л. И. Кафарская²

¹ Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Бактерии рода *Aerococcus* часто ассоциированы с инфекциями мочевыводящих путей и кровотока у человека. Штамм *Aerococcus* sp. 1KP-2016, выделенный из лейкоцитарного слоя крови, обладал последовательностью 16S rPHK, совпадающей на 98,7% и менее с ранее описанными представителями данного рода. Целью работы было провести полногеномное секвенирование *Aerococcus* 1KP-2016 с последующей филогенетической реконструкцией. Показано, что *Aerococcus* 1KP-2016 является представителем нового вида рода *Aerococcus*, наиболее близкого к *Aerococcus viridans* и *Aerococcus urinaeequi*. Геномная последовательность, имеющая длину 2,042 млн п.н. и GC-состав 38,5%, депонирована в DBJ/EMBL/GenBank под идентификатором NEEY00000000.

Ключевые слова: *Aerococcus*, инфекция кровотока, лейкоцитарный слой крови, полногеномное секвенирование, филогенетический анализ

Вклад авторов: А. В. Чаплин — филогенетический анализ, анализ данных, подготовка рукописи; И. А. Чагина, А. С. Пименова, Н. Т. Гадуа — микробиологические исследования, подготовка рукописи; Н. М. Каргальцева, Л. И. Кафарская — анализ литературы, подготовка рукописи; О. Ю. Борисова — молекулярно-генетические исследования, анализ данных, анализ литературы, подготовка рукописи; Е. Е. Донских — анализ данных, анализ литературы, подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол № 28 от 18 ноября 2014 г.); от пациента получено добровольное письменное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Андрей Викторович Чаплин
ул. Адмирала Макарова, д. 10, г. Москва, 125212, Россия; okolomedik@gmail.com

Статья получена: 22.03.2023 **Статья принята к печати:** 16.04.2023 **Опубликована онлайн:** 25.04.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.012

GENETIC CHARACTERIZATION OF *AEROCOCCUS* SP. 1KP-2016 STRAIN ISOLATED FROM A PATIENT WITH BLOODSTREAM INFECTION

Chaplin AV^{1,2}✉, Chagina IA¹, Pimenova AS¹, Gadua NT¹, Kargaltseva NM¹, Borisova OYu^{1,2}, Donskikh EE², Kafarskaya LI²

¹ Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Aerococcus genus bacteria are often associated with human urinary tract and bloodstream infections. The *Aerococcus* sp. 1KP-2016 strain isolated from the buffy coat had the 16S rRNA sequence that was a 98.7% (and less) match with the previously described members of this genus. The purpose of this study was to perform whole genome sequencing of *Aerococcus* 1KP-2016 followed by phylogenetic reconstruction. We have shown that *Aerococcus* 1KP-2016 belongs to the new species of the *Aerococcus* genus that is closest to *Aerococcus viridans* and *Aerococcus urinaeequi*. The genomic sequence, which consists of 2.042 million bps with GC content at 38.5%, was deposited in the DBJ/EMBL/GenBank under identifier NEEY00000000.

Keywords: *Aerococcus*, bloodstream infection, buffy coat (blood leukocyte layer), whole genome sequencing, phylogenetic analysis

Author contribution: AV Chaplin — phylogenetic analysis, data analysis, manuscript authoring; IA Chagina, AS Pimenova, NT Gadua — microbiological studies, manuscript authoring; NM Kargaltseva, LI Kafarskaya — literature analysis, manuscript authoring; OYu Borisova — molecular genetic studies, data analysis, literature analysis, manuscript authoring; EE Donskikh — data analysis, literature analysis, manuscript authoring.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology (Minutes #28 of November 18, 2014); the patient signed a voluntary consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Andrey Viktorovich Chaplin
10 Admiral Makarov str., Moscow, 125212, Russia; okolomedik@gmail.co

Received: 22.03.2023 **Accepted:** 16.04.2023 **Published online:** 25.04.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.012

Род *Aerococcus* был впервые описан в 1953 г., первым его изученным представителем стал *Aerococcus viridans*, выделяемый из воздуха и уличной пыли [1]. В настоящее время известно восемь видов, входящих в род *Aerococcus*: *A. viridans*, *A. urinae*, *A. sanguinicola*, *A. christensenii*, *A. urinaehominis*, *A. urinaeequi*, *A. suis*, *A. vaginalis* [2].

Представители рода *Aerococcus* чаще связаны с инфекцией мочевыводящих путей и уросепсисом [3]. Вместе с тем, в последнее десятилетие появилось много сообщений о случаях осложнений, вызываемых бактериями этого рода, в виде инфекции кровотока и инфекционного эндокардита, при которых *A. urinae* и *A. sanguinicola* считают наиболее частой этиологической причиной [2, 3]. Кроме того, было показано, что аэрококки этого рода способны вызывать инвазивные

инфекции — остеомиелит, менингит, септический артрит, перитонит, инфекции мягких тканей, этиологию которых чаще связывают с выделением *Aerococcus*-подобных микроорганизмов и *A. urinae* [2]. В Дании с 1987 г. описано 17 случаев бактериемии/септицемии, вызванных *Aerococcus*-подобными микроорганизмами с выделением в чистой культуре из крови, из которых в шести случаях был эндокардит, и у остальных больных — септицемия, несмотря на адекватную антимикробную терапию у семи пациентов произошел летальный исход [4]. По данным других авторов, выделение *Aerococcus* в гемокультуре расценивали как этиологический фактор бактериемии при заболеваниях мочевыделительной системы [5].

Вирулентность видов *Aerococcus* связывают со способностью этих микроорганизмов к образованию

биофленок (в том числе *in vivo* на клапанах сердца), агрегации тромбоцитов, бактериальной адгезии с помощью капсульного полисахарида, наличие которого было подтверждено сравнительным геномным анализом, показавшим широкое внутривидовое разнообразие локусов, ответственных за его синтез у представителей этого рода [2, 6, 7].

Целью работы было представить характеристику штамма *Aerococcus* sp. 1KP-2016, выделенного из крови пациента с инфекцией кровотока.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование штамма *Aerococcus* sp. 1KP-2016 проводили на Columbia Agar Base (Conda; Испания) с добавлением 10% бараньей крови в течение 24–48 ч при температуре 37 ± 1 °C в микроаэрофильных условиях. Культурально-морфологические свойства выросших колоний оценивали с помощью стереоскопического микроскопа SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss; Германия) (объектив PlanApo S 1,0 — FWD 60 мм; окуляр Pl 10 x 23 Br foc). Тинкториальные свойства изучали путем окраски по Граму (ЗАО «ЭКОлаб»; Россия). Окрашенные мазки просматривали с помощью светового микроскопа Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3; окуляр Pl 10 x 23 Br foc (Carl Zeiss; Германия)). Биохимические свойства бактерий были изучены с помощью коммерческой биохимической тест-системы Микро-ЛА-Тест СТРЕПТОтест 16 (Лаксма; Чехия) и лабораторно-приготовленного теста на каталазу.

Антибиотикочувствительность изучали с помощью диско-диффузионного метода в соответствии с рекомендациями Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST) с использованием коммерческих стандартизованных бумажных дисков (HiMedia Laboratories Pvt. Limited; Индия).

Разрушение клеток для высвобождения хромосомной ДНК производили путем кипячения. Амплификацию фрагмента гена 16S рПНК осуществляли согласно общепринятому протоколу [8]. Реакционная смесь для ПЦР содержала 1,5 мМ MgCl₂, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 0,1 мкМ праймеров — 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGGYTACCTGTTCAGACTT-3'), 200 мМ каждого нуклеозидтрифосфата и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific; Литва). Амплификацию проводили с 1 мкл препарата ДНК в общем объеме реакционной смеси 25 мкл с использованием амплификатора «Терцик» («ДНК-Технология»; Россия). Очистку ПЦР-продуктов и их секвенирование проводили на базе ЗАО «Евроген» (Москва, Россия) (<http://evrogen.ru/>). Результаты секвенирования обрабатывали с помощью программного обеспечения ChromasLite (Technelysium Pty Ltd, Австралия) (для формата хроматограммы), секвенированные последовательности сопоставляли с международной онлайн-базой данных EMBL/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) с помощью алгоритма megablast.

Секвенирование генома штамма *Aerococcus* sp. 1KP-2016 было выполнено на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора с помощью системы Ion Proton (Thermo Fisher Scientific; США). Сборка генома *de novo* была сделана с помощью программного обеспечения SPAdes [9]. Проверка на контаминацию сборки проведена с помощью Contest16S [10] и CheckM [11]. Для поиска систем CRISPR-Cas использовали CRISPRCasFinder [12], интегрированных фаговых геномов — PHASTER [13], генов антибиотикорезистентности — ResFinder [14].

Для сравнительного анализа были использованы все публично доступные геномы рода *Aerococcus* из базы данных Refseq на момент 4 октября 2021 г., а также *Abiotrophia defectiva* ATCC 49176T в качестве внешнего представителя (outgroup). Белок-кодирующие области в геномах, в соответствии с представленными в базах данных аннотациями, были кластеризованы в группы ортологов с использованием программного обеспечения ProteinOrtho [15] со стандартными настройками. В результате была получена консервативная часть протеома из 543 групп ортологов, включающих в себя по одному однокопийному белок-кодирующему гену из каждого генома. Аминокислотные последовательности белков в данных группах ортологов были выровнены с помощью MUSCLE [16] и конкатенатированы. Филогенетическая реконструкция на основании полученного конкатената выполнена с помощью алгоритма RapidNJ [17]. Среднюю нуклеотидную идентичность между геномами рассчитывали с помощью подхода ANIb и онлайн-сервиса JSpeciesWS [18]. Данные по средней нуклеотидной идентичности представлены двумя значениями через черту, чтобы отобразить различия между картированием фрагментов первого генома на второй и второго на первый соответственно. База данных GTDB, содержащая в себе альтернативную таксономию на основании исключительно филогеномного подхода [19], на момент написания статьи была представлена релизом 202.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штамм *Aerococcus* sp. 1KP-2016 был выделен из лейкоцитарного слоя крови пациента с инфекцией

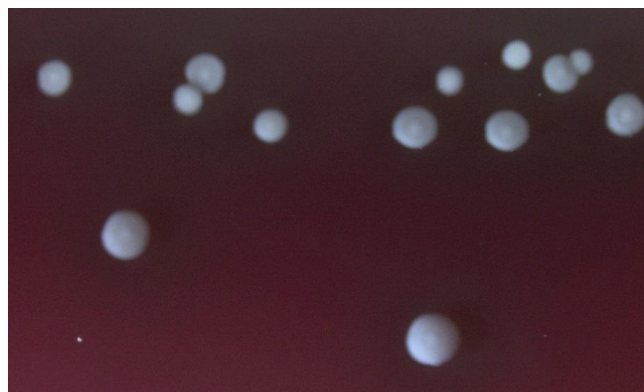


Рис. 1. Колонии *Aerococcus* sp. 1KP-2016 на колумбийском агаре (стереомикроскоп Stereo Discovery V12 (Carl Zeiss; Германия))

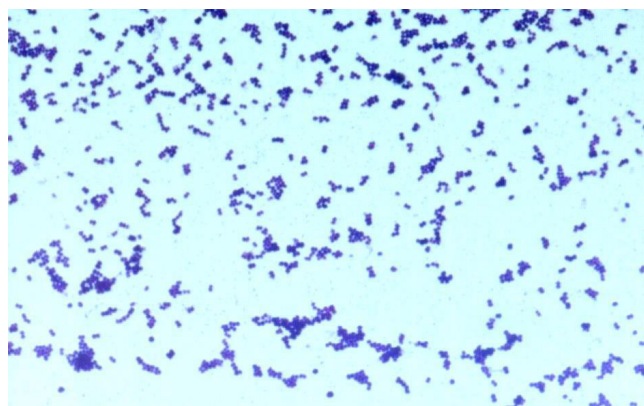


Рис. 2. Микрофотография мазка *Aerococcus* sp. 1KP-2016, окрашенного по Граму (световой микроскоп Axio Scope A1, объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3; окуляр Pl 10 x 23 Br foc (Carl Zeiss; Германия))

кровотока (36 лет, г. Ставрополь) в августе 2016 г., у которого на протяжении длительного времени (в течение года) отмечалась субфебрильная температура.

На колумбийском агаре через 24–48 ч формировались единичные мелкие гладкие колонии размером менее 1 мм с неровными краями, приподнятым центром, полупрозрачные серовато-белого цвета с небольшой зоной гемолиза (рис. 1). В мазке, окрашенном по Граму, были выявлены грамположительные кокки, образующие тетрады (рис. 2). При оценке биохимических свойств выделенная культура дала положительные результаты на галактозидазу, эскулин, лактозу, трегалозу, и отрицательные на каталазу, гиппурат, фосфатазу, лейцин, альфа-аргинин, уреазу, маннитол, сорбитол, раффинозу, инулин, мелибиозу, рибозу. Культура была резистентна к ципрофлоксацину, офлоксацину, пенициллину, эритромицину, доксициклину, сохраняла промежуточную резистентность к клиндамицину и чувствительность только к имипенему.

Геном штамма *Aerococcus* sp. 1KP-2016, собранный до уровня контигов, был депонирован в DBJ/EMBL/GenBank под идентификатором NEEY00000000, впоследствии он вошел в NCBI Refseq как NZ_NEEY00000000. В результате сборки получено 119 контигов со средним покрытием 78х, суммарная длина полученной геномной последовательности составила 2,042 млн п.н. GC-состав достигал 38,5%. Алгоритм Contest16S не выявил различающихся фрагментов гена 16S рПНК, свидетельствующих о контаминации. Анализ набора консервативных генов с помощью CheckM показал оценку полноты генома 98,9% и оценку контаминации 1,1%, что соответствует высокому качеству сборки. В геноме не обнаружено локусов CRISPR. По данным PHASTER, геном имеет два предполагаемых профага в своем составе, в одном из которых присутствуют неповрежденные гены главного капсидного белка (B9P78_00230), белка хвоста (B9P78_00200) фаговой терминазы (B9P78_00240) и праймазы (B9P78_00325), что указывает на его интактность. Несмотря на низкую чувствительность штамма к антибактериальным препаратам, в результате поиска генов резистентности к антибиотикам был обнаружен только ген, кодирующий хлорамфеникол-О-ацетилтрансферазу (B9P78_09255). Регион в начале контига NEEY01000023 кодирует ряд ферментов биосинтеза полисахаридов (B9P78_05530-B9P78_05565), входящих в состав клеточной стенки или капсулы.

Последовательность 16S рПНК штамма *Aerococcus* sp. 1KP-2016 была на 98,7% и 98,6% идентична последовательностям типовых штаммов *A. viridans* и *A. urinaeequi* соответственно. В настоящий момент для дифференциации бактериальных видов принят порог в 98,7% [20] и, таким образом, схожесть 16S рПНК в данном случае не позволяет однозначно судить о таксономическом положении. В то же время средняя нуклеотидная идентичность между просеквенированной геномной последовательностью и геномами типовых штаммов *A. viridans* ATCC 11563 и *A. urinaeequi* DSM 20341 составит 77,38/77,39% и 76,49/76,26% соответственно. Это значительно ниже, чем общепринятый порог в 95–96% для отнесения бактерий к одному виду [20, 21], что говорит о необходимости введения нового вида. Полученный результат дополнительно подтверждается базой данных альтернативной, построенной на сравнении геномов таксономии GTDB, в которой штамм 1KP-2016 отнесен к отдельному виду *Aerococcus* sp002252085.

На основании реконструкции филогении (рис. 3) показано, что наиболее родственным к штамму *Aerococcus* sp. 1KP-2016 является штамм *Aerococcus* sp. SJQ22 (RKM01000000), выделенный из почвы и на данный момент не отнесенный ни к одному валидированному виду рода *Aerococcus*. Однако средняя нуклеотидная идентичность между *Aerococcus* sp. 1KP-2016 и этим штаммом составила всего лишь 87,87/88,05%, что опять же ниже общепринятого уровня сходства внутри вида.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Aerococcus являются причиной спорадических заболеваний мочевого тракта, эндокардита, инфекций ликвора и кровотока. Наиболее часто выделяют *A. urinae* (55–60%), *A. sanguinicola* (26–46%) и реже — *A. viridians*. В Европе и США превалирует *A. sanguinicola* и редко — *A. viridians*. *Aerococcus* рассматривают как часть нормальной микрофлоры урогенитального тракта и выделяют из мочи при отсутствии клинических симптомов заболевания. Ретроспективное когортное исследование 2010–2015 гг. показало этиологическую роль *Aerococcus* при инфекциях мочевыводящих путей и бессимптомной бактериурии, преимущественно у пожилых женщин, при этом в 35% случаев помимо аэрококков были выделены другие микроорганизмы [5, 22]. Ретроспективное когортное исследование 2005–2020 гг. больных с положительной гемокультурой аэрококков показало в 22,4% случаев достоверную клиническую картину наличия инфекции кровотока, где летальность зависела от продолжительности заболевания: при 30-дневной она составляла 17% и при трехмесячной — 24% случаев [2]. При выделении из пробы мочи или крови микробиологам трудно идентифицировать *Aerococcus*, так как по морфологии эти бактерии часто принимают за стафилококки, по гемолизу — за α-гемолитические стрептококки. Учитывая низкую биохимическую активность, биохимические тесты не позволяют получить достоверные результаты. В связи с этим видовая идентификация до вида возможна с использованием масс-спектрометрии, однако данная технология позволяет идентифицировать пять видов аэрококков: *A. christensenii*, *A. sanguinicola*, *A. urinae*, *A. urinaehominis*, *A. viridians*. Поэтому для идентификации штаммов аэрококков, выделенных из крови, применяют секвенирование гена 16S рПНК [5, 22].

Проведенное исследование позволило впервые идентифицировать штамм *Aerococcus* sp. 1KP-2016, который выделен из лейкоцитарного слоя крови человека, обладает последовательностью 16S рПНК, совпадающей на 98,7% и менее с ранее описанными представителями данного рода. Проведенное полногеномное секвенирование с последующей филогенетической реконструкцией показало, что данный штамм является представителем нового вида рода *Aerococcus*, наиболее близкого к *A. viridans* и *A. urinaeequi*.

Следовательно, представители *Aerococcus* остаются микроорганизмами, у которых эпидемиологические и клинические характеристики полностью не изучены. Имеется много фундаментальных вопросов о патогенетической роли аэрококков в инфекционной инвазивной патологии. Сложности видовой идентификации внутри рода *Aerococcus* требуют применения современных молекулярно-генетических технологий, что позволяет определять новые виды микроорганизмов и расширять

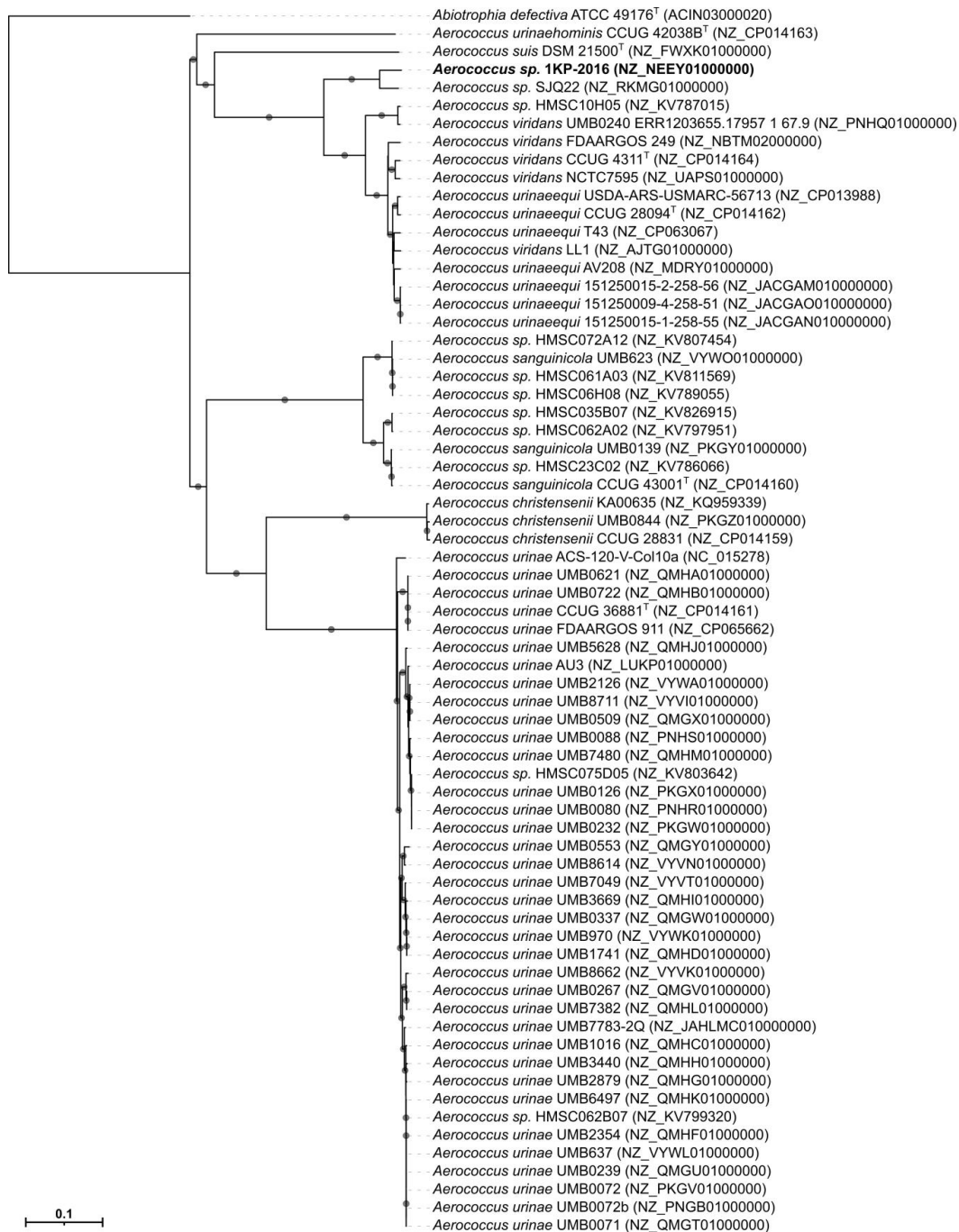


Рис. 3. Филогенетическое древо, реконструированное по последовательностям 543 консервативных однокопийных белков. Штамм, описанный в данной работе, выделен полужирным. Типовые штаммы отмечены верхним индексом «Т». Видовые названия указаны в соответствии с названиями в базе данных Refseq. Клады с уровнем bootstrap > 90 отмечены кругами

этиологический спектр возбудителей тяжелых инвазивных заболеваний.

ВЫВОДЫ

Генотипические особенности изученного штамма позволяют сделать вывод, что выделенный из крови

штамм 1KP-2016 является представителем нового вида рода *Aerococcus*, который эволюционно близок *A. viridans* и *A. urinaeequi*, но в то же время отличается от них. Необходимо дальнейшее изучение его фенотипических и хемотаксономических свойств в рамках полифазного подхода к бактериальной систематике.

Литература

- Williams RE, Hirsch A, Cowan ST. *Aerococcus*, a new bacterial genus. *J Gen Microbiol*. 1953; 8: 475–80.
- Tai DBG, Go JR, Fida M, Saleh JA. Management and treatment of *Aerococcus* bacteremia and endocarditis. *International J Infect Dis*. 2021; 102: 584–9.
- Rasmussen M. *Aerococcus*: an increasingly acknowledged human pathogen. *Clin Microbiol Infect*. 2016; 22: 22–7.
- Christensen JJ, Jensen IP, Faerk J, Kristensen B, Skov R, Korer B. The Danish ALO Study Group. Bacteremia / Septicemia Due to *Aerococcus*-Like Organisms: Report of Seventeen Cases. *Clin Infect Dis*. 1995; 21 (4): 943–94.
- Rasmussen M. *Aerococci* and *aerococcal* infections. *J Infection*. 2013; 66: 467–74.
- Yaban B, Kikhney J, Musci M, Petrich A, Schmidt J, Hajduczenia M et al. *Aerococcus* *urinae* – A potent biofilm builder in endocarditis. *PLoS One*. 2020; 15: e0231827.
- Carkaci D, Højholt K, Nielsen XC, Dargis R, Rasmussen S, Skovgaard, O. et al. Genomic characterization, phylogenetic analysis, and identification of virulence factors in *Aerococcus sanguinicola* and *Aerococcus* *urinae* strains isolated from infection episodes. *Microb Pathog*. 2017; 112: 327–40.
- Mathieu A, Delmont TO, Vogel TM, Robe P, Nalin R, Simonet P. Life on human surfaces: skin metagenomics. *PLoS One*. 2013; 8 (6): e65288.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012; 19: 455–77.
- Lee I, Chalita M, Ha S-M, Na S-I, Yoon S-H, Chun J. ContEst16S: an algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017; 67: 2053–57.
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*. 2015; 25: 1043–55.
- Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, Touchon M, Michalik J, Néron B. CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46: W246–51.
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: W16.
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67: 2640–4.
- Lechner M, Findeiß S, Steiner L, Marz M, Stadler PF, Prohaska SJ. Proteinortho: Detection of (Co-)orthologs in large-scale analysis. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12.
- Edgar RC MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: 1792–7.
- Simonsen M, Mailund T, Pedersen CNS. Rapid Neighbour-Joining. In *Algorithms in Bioinformatics*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; 113–22.
- Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. 2016; 32: 929–31.
- Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarshewski A, Chaumeil PA. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat Biotechnol*. 2018; 36: 996.
- Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018; 68: 461–6.
- Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 19126–31.
- Narayanasamy S, King K, Dennison A, Spelman DW, Aung AK. Clinical characteristics and laboratory identification of *Aerococcus* infections: an Australian tertiary centre perspective. *Hindawi International J Microbiology*. 2017; 5684614.

References

- Williams RE, Hirsch A, Cowan ST. *Aerococcus*, a new bacterial genus. *J Gen Microbiol*. 1953; 8: 475–80.
- Tai DBG, Go JR, Fida M, Saleh JA. Management and treatment of *Aerococcus* bacteremia and endocarditis. *International J Infect Dis*. 2021; 102: 584–9.
- Rasmussen M. *Aerococcus*: an increasingly acknowledged human pathogen. *Clin Microbiol Infect*. 2016; 22: 22–7.
- Christensen JJ, Jensen IP, Faerk J, Kristensen B, Skov R, Korer B. The Danish ALO Study Group. Bacteremia / Septicemia Due to *Aerococcus*-Like Organisms: Report of Seventeen Cases. *Clin Infect Dis*. 1995; 21 (4): 943–94.
- Rasmussen M. *Aerococci* and *aerococcal* infections. *J Infection*. 2013; 66: 467–74.
- Yaban B, Kikhney J, Musci M, Petrich A, Schmidt J, Hajduczenia M et al. *Aerococcus* *urinae* – A potent biofilm builder in endocarditis. *PLoS One*. 2020; 15: e0231827.
- Carkaci D, Højholt K, Nielsen XC, Dargis R, Rasmussen S, Skovgaard, O. et al. Genomic characterization, phylogenetic analysis, and identification of virulence factors in *Aerococcus sanguinicola* and *Aerococcus* *urinae* strains isolated from infection episodes. *Microb Pathog*. 2017; 112: 327–40.
- Mathieu A, Delmont TO, Vogel TM, Robe P, Nalin R, Simonet P. Life on human surfaces: skin metagenomics. *PLoS One*. 2013; 8 (6): e65288.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012; 19: 455–77.
- Lee I, Chalita M, Ha S-M, Na S-I, Yoon S-H, Chun J. ContEst16S: an algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017; 67: 2053–57.
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*. 2015; 25: 1043–55.
- Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, Touchon M, Michalik J, Néron B. CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46: W246–51.
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: W16.
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67: 2640–4.
- Lechner M, Findeiß S, Steiner L, Marz M, Stadler PF, Prohaska SJ. Proteinortho: Detection of (Co-)orthologs in large-scale analysis. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12.
- Edgar RC MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: 1792–7.
- Simonsen M, Mailund T, Pedersen CNS. Rapid Neighbour-Joining. In *Algorithms in Bioinformatics*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; 113–22.
- Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. 2016; 32: 929–31.

19. Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarshewski A, Chaumeil PA. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat Biotechnol.* 2018; 36: 996.
20. Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018; 68: 461–6.
21. Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 19126–31.
22. Narayanasamy S, King K, Dennison A, Spelman DW, Aung AK. Clinical characteristics and laboratory identification of *Aerococcus* infections: an Australian tertiary centre perspective. *Hindawi International J Microbiology.* 2017; 5684614.