

研究报告

笼养绿尾虹雉源肠球菌的分离鉴定及耐药性分析

陈方山¹, 冯少华¹, 丁小保¹, 罗维¹, 陈黎³, 李万洪³, 马红³, 张龙^{*1,2}, 吴邦元^{*1}

1 西华师范大学 生命科学学院 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川 南充 637009

2 西华师范大学 生态研究院, 四川 南充 637009

3 四川蜂桶寨国家级自然保护区管理中心, 四川 雅安 625700

陈方山, 冯少华, 丁小保, 罗维, 陈黎, 李万洪, 马红, 张龙, 吴邦元. 笼养绿尾虹雉源肠球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 327-336.

CHEN Fangshan, FENG Shaohua, DING Xiaobao, LUO Wei, CHEN Li, LI Wanhong, MA Hong, ZHANG Long, WU Bangyuan. Isolation, identification, and drug resistance of *Enterococcus* from captive Chinese monal (*Lophophorus lhuysii*)[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 327-336.

摘要:【背景】绿尾虹雉(*Lophophorus lhuysii*)是我国特有的一级重点保护野生鸟类, 长期以来由于受人类活动及疾病等因素的影响, 其种群数量不断减少。肠球菌(*Enterococcus* sp.)是一类广泛存在于自然界中的条件性致病菌, 其耐药性强, 治疗困难, 对野生动物的保护带来挑战。【目的】更好地保护绿尾虹雉, 关注其肠球菌感染或携带情况并对肠球菌特性的相关研究很有必要, 这对绿尾虹雉种群的生存与保护有重要意义。【方法】采集了蜂桶寨国家级自然保护区的笼养绿尾虹雉 1 年中 4 个不同月份的粪便, 对其中的细菌进行分离纯化, 再通过形态学鉴定、生化鉴定、分子生物学鉴定确定分离菌株种类, 最后进行药敏试验探究其耐药性。【结果】共分离出 17 株菌株, 其菌落在培养基上均呈现出灰白色不透明、表面光滑、直径 1 mm 内的圆形, 菌株的糖发酵试验、胆汁七叶苷水解试验呈阳性, 接触酶试验和产气试验呈阴性, 所有结果均符合肠球菌的基本特征, 16S rRNA 基因测序进一步验证了该结果。药敏试验结果表明绿尾虹雉源肠球菌具有较强的耐药性, 其中对四环素、环丙沙星、诺氟沙星、左氧氟沙星等药物的耐药性最高。【结论】成功分离出绿尾虹雉源肠球菌, 并对其耐药情况进行了研究, 为绿尾虹雉携带肠球菌的现状及其耐药情况提供了初步数据分析, 同时对其疾病防控提供了参考。

关键词: 绿尾虹雉; 肠球菌; 分离鉴定; 耐药性

资助项目: 国家自然科学基金(32200339)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32200339).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Long, long.zhang@cwnu.edu.cn; WU Bangyuan, wby2008@cwnu.edu.cn

Received: 2024-04-07; Accepted: 2024-05-24; Published online: 2024-06-13

Isolation, identification, and drug resistance of *Enterococcus* from captive Chinese monal (*Lophophorus lhuysii*)

CHEN Fangshan¹, FENG Shaohua¹, DING Xiaobao¹, LUO Wei¹, CHEN Li³, LI Wanhong³, MA Hong³, ZHANG Long^{*1,2}, WU Bangyuan^{*1}

1 Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation of Ministry of Education, College of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637009, Sichuan, China

2 Institute of Ecology, China West Normal University, Nanchong 637009, Sichuan, China

3 Administration Center of Fengtongzhai National Nature Reserve, Ya'an 625700, Sichuan, China

Abstract: [Background] The Chinese monal (*Lophophorus lhuysii*) is a protected wild bird endemic to China, with a declining population due to human activities and diseases. *Enterococcus*, a genus of common conditional pathogenic bacteria in the nature, is known for strong drug resistance and difficult treatment, posing challenges to wildlife conservation. [Objective] Therefore, it is necessary to pay attention to the enterococcal infection or carrier status and study the characteristics of enterococci in order to better protect the Chinese monal population, which is of great significance to the survival and protection of Chinese monal population. [Methods] Fecal samples were collected from captive Chinese monal at the Fengtongzhai National Nature Reserve in four different months of a year. The bacteria were isolated and then identified by morphological observation and biochemical and molecular analyses. Additionally, drug susceptibility tests were conducted to assess the resistance patterns of the isolated strains. [Results] A total of 17 strains were successfully isolated. These strains exhibited grayish opaque colonies with smooth surfaces and diameters not exceeding 1 mm on the culture media. Positive results were obtained for the sugar fermentation test, and bile esculin hydrolysis test. Negative results were observed for the catalase test and gas production test. All these characteristics aligned with those of *Enterococcus*, and 16S rRNA gene sequencing further validated the result. The strains of *Enterococcus* from Chinese monal showed strong resistance to tetracycline, ciprofloxacin, norfloxacin, and levofloxacin. [Conclusion] We successfully isolated *Enterococcus* strains from Chinese monal and comprehensively analyzed their drug resistance. The findings reveal the current status and drug resistance profile of *Enterococcus* carried by Chinese monal, giving insights into the disease prevention and protection of Chinese monal.

Keywords: *Lophophorus lhuysii*; *Enterococcus*; isolation and identification; drug resistance

绿尾虹雉(*Lophophorus lhuysii*)又称贝母鸡、鹰鸡、火炭鸡,隶属于鸡形目雉科虹雉属,是国家一级重点保护野生动物,已被CITES列入附录I, IUCN红色名录列入“易危”物种^[1-3]。长期以来,由于过度捕杀、栖息地破坏、自然灾害和疾病等因素,其种群数量不断下降,为

保护这一濒危物种,就地保护和迁地保护工作正积极开展。但在人工饲养条件下,绿尾虹雉的种群数量仍未得到提升^[4-6]。一方面是由于笼养绿尾虹雉繁殖性能较低;另一方面,则是因为众多疾病在笼养条件下容易发生,如霉菌性肺炎、传染性鼻炎(或支气管炎)、皮肤性禽痘病、

鸡白痢、禽霍乱、禽伤寒、大肠杆菌感染、肠球菌感染等，其中细菌性感染疾病占多数，对绿尾虹雉的生存造成巨大威胁^[7-8]。疾病的发生导致笼养绿尾虹雉种群数量一直得不到提升，情况不容乐观。

肠球菌(*Enterococcus* sp.)，属于链球菌科肠球菌属，在自然界中分布广泛，主要寄生在人和动物体内胃和肠道中，为革兰氏阳性菌，需氧或兼性厌氧，菌体形态为圆形或卵圆形^[9-11]。肠球菌作为消化道内常见的共生菌种，参与宿主机体的正常生理活动，大多数情况下被认为无害，但当宿主免疫力降低或机体损伤时，仍然具有发生肠球菌感染的风险^[12]。目前，研究表明，肠球菌的致病性与其携带的毒力因子密切相关，如其中的胶原蛋白黏附素 Ace 会帮助肠球菌吸附至宿主肠道、尿路上皮细胞，引发尿路感染^[13]。此外，当机体受损，肠球菌进入血液中大量繁殖引起败血症，细胞溶血素 Cyl 也会使红细胞溶解形成溶血现象^[14]。2022 年北京大兴野生动物园发现一赤腹松鼠突然死亡，其死因是由屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)引起的败血症^[15]。因此，关注野生动物尤其是圈养野生动物肠球菌感染或携带情况的重要性不容忽视。同时，随着抗生素的滥用，肠球菌的耐药性也变得越来越强，甚至出现多重耐药菌株。2015 年斯洛伐克的野生鸚类被发现并分离出了具有 *vanA* 基因的万古霉素耐药屎肠球菌^[16]；2022 年意大利中部梅埃拉国家公园对野生马鹿和亚平宁羚羊的分离菌株进行药敏试验，发现分离的 48 株菌株中有 9 株(18.8%)对至少一种抗生素产生耐药性^[17]。

肠球菌是一类具有潜在致病性的细菌，已经导致许多野生动物感染致病，而绿尾虹雉作为我国特有的珍稀野生动物，同样也存在感染的风险。因此，本研究采集不同月份的绿尾虹

雉粪便对其中的肠球菌进行分离鉴定，并通过药敏试验确定菌株的耐药情况，以期为绿尾虹雉肠球菌感染类的疾病提供用药选择参考，同时为改善笼养绿尾虹雉生存状况、微生物感染与细菌耐药研究提供数据支持。

1 材料与方 法

1.1 样 品

在 1 月、4 月、7 月和 12 月对四川蜂桶寨国家级自然保护区管护中心饲养的绿尾虹雉进行粪便无菌采集(1 月 5 份，4 月 4 份，7 月 4 份，12 月 4 份)，保存至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

肠球菌肉汤、肠球菌琼脂培养基、MH 琼脂，青岛海博生物技术有限公司。酵母膏，北京奥博星生物技术有限公司；丙三醇、氯化钠、无水磷酸氢二钾、无水乳糖、D-无水葡萄糖、蔗糖，上海麦克林生化科技有限公司；细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒，生工生物工程(上海)股份有限公司；肠球菌编码鉴定试剂管，杭州滨和微生物试剂有限公司；药敏纸片，杭州微生物试剂有限公司。

立式压力蒸汽灭菌器，上海申安医疗器械厂；超净工作台，苏州安泰空气技术有限公司；电热恒温培养箱，上海一恒科学仪器有限公司；超低温冰箱，赛默飞世尔科技公司；光学显微镜，Leica 公司。

1.3 细菌的分离、纯化

将采集的绿尾虹雉粪便接种于肠球菌肉汤中， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 增殖培养 24 h，再将菌液接种至肠球菌琼脂培养基上 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h，挑取单菌落再次接种划线，重复纯化 3 次得到分离菌株。

1.4 细菌的形态学观察

观察培养基中菌落形态特征，拍照并记录。

革兰氏染色：挑取长势良好的菌落于载玻片上的一滴生理盐水中涂抹均匀，置于酒精灯火焰上方固定。固定完成后，经结晶紫初染，碘液媒染，95%乙醇脱色，番红/沙黄复染后，在光学显微镜下观察细菌形态结构特征及颜色，并拍照记录。

1.5 细菌的生化鉴定

根据肠球菌的生化特性设置相应试验：糖发酵试验、产气试验、接触酶试验和胆汁七叶苷水解试验，对分离菌株的生化特性进行检测，观察反应并记录结果^[18-19]。

1.6 细菌的分子生物学鉴定

细菌 DNA 的提取：将培养 24 h 的菌液于 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 沉淀得到菌体，使用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取细菌的 DNA^[20]。以提取的 DNA 为模板，选用 16S rRNA 基因的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系：2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL，正、反向引物(稀释至 10 μmol/L)各 1 μL，模板 1 μL，ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件：94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 32 个循环; 72 °C 10 min, 获得扩增产物。取扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测(120 V, 30 min), 通过凝胶成像系统检测 PCR 产物。

16S rRNA 基因序列分析：将合格产物送生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 结果经 NCBI 数据库中 BLAST 进行比对, 根据菌株基因序列与 GenBank 中已注册菌株的相似程度, 以确定菌株种类^[21]。

1.7 细菌的药敏试验

参考美国临床实验室标准化协会推荐的 Kirby-Bauer 纸片扩散法, 对分离菌株进行药敏

试验^[22]。将培养增殖后的菌液用无菌生理盐水稀释至 0.5 个麦氏浓度后涂布于 MH 培养基上, 分别将 12 种抗生素药敏纸片贴于 MH 琼脂培养基中, 37 °C 培养 24 h, 观察并记录抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 分离菌的纯化结果

采集的 17 份粪便样品中均成功分离目标菌株, 即 1 月份 5 株, 4 月份 4 株, 7 月份 4 株, 12 月份 4 株。

2.2 分离菌的形态学特征

从绿尾虹雉粪便中分离培养出的细菌如图 1 所示, 将分离菌株接种于肠球菌琼脂培养基表面, 平板划线结果如图 1A 所示, 菌落放大形态如图 1B 所示, 呈现出灰白色不透明、表面光滑、直径在 1 mm 内的圆形菌落。

将所有分离菌株进行革兰氏染色, 并通过光学显微镜进行观察。菌体呈现紫色或蓝紫色, 为革兰氏阳性菌, 形态为圆形或卵圆形, 单个、成对或短链状排列(图 2)。

对 17 株分离菌株的菌落和菌体形态特征进行观察和统计, 将结果与肠球菌形态特征对比, 确定所有分离菌株形态特征与肠球菌一致。

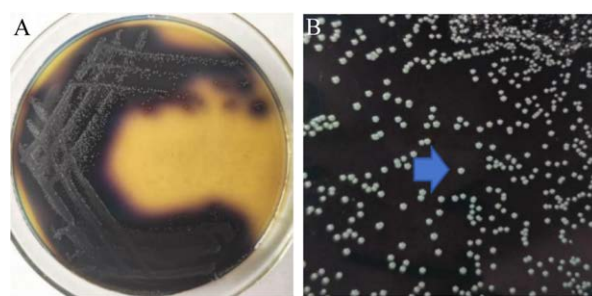


图 1 分离菌株的菌落形态 A: 平板划线, 培养基直径 90 mm; B: 菌落放大形态。

Figure 1 Colony morphology of isolated strains. A: Plate drawing, medium diameter 90 mm; B: Colony amplification.

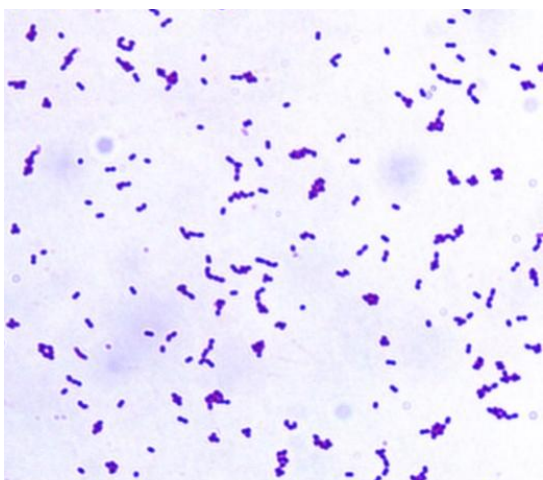


图2 分离菌株染色结果(1 000×)

Figure 2 Staining results of isolated strains (1 000×).

2.3 分离菌的生化特性鉴定结果

试验结果显示, 17 株分离菌株在糖酵解试验中, 3 种糖溶液颜色都由蓝色变为黄色, 说明该细菌可以分解这 3 种糖类, 反应结果均为

阳性; 试管中无气泡产生, 说明该细菌分解糖类不产生气体, 反应结果为阴性; 在接触酶试验中, 过氧化氢溶液未产生气泡, 说明该细菌缺乏分解过氧化氢的酶, 反应结果为阴性; 在胆汁七叶苷水解试验中, 该细菌能够分解七叶苷并产生黑色化合物, 反应结果为阳性。根据生化反应试验结果, 参考《伯杰氏细菌鉴定手册》判断 17 株分离菌均属于肠球菌属(*Enterococcus*)^[23]。

将各菌株的菌落加入肠球菌编码鉴定试剂管中, 培养 24–36 h 后观察试剂管颜色变化并记录结果, 参考编码检索表, 对每株肠球菌的种类进行分析。统计结果为, 在 17 株分离菌中, 12 株为粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) (编码为 1227、1327、1627), 1 株为海氏肠球菌(*Enterococcus hirae*) (编码为 1106), 2 株为肠球菌 PNS-E3 (编码为 1127), 1 株为驴肠球菌(编码为 1406), 1 株无对应类型(编码为 1226) (表 1)。

表 1 分离菌的编码鉴定

Table 1 Coding identification of isolated bacteria

Number	PYR	V-P	精氨酸 Arginine	DPP	PMG	MAG	TMZ	蕈糖 Mushroom sugar	蔗糖 Sucrose	山梨醇 Sorbitol	编码结果 Coded result
1-1	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	1227
1-2	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	1106
1-3	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	1327
1-4	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	1226
1-5	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	1227
4-1	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	1627
4-2	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	1327
4-3	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	1227
4-4	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	1227
7-1	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	1327
7-2	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	1127
7-3	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	1327
7-4	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	1127
12-1	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	1227
12-2	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	1227
12-3	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	1406
12-4	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	1227

+: 该菌株对该试剂反应呈阳性; -: 呈阴性。编码鉴定管的试剂成分为糖和醇类。编码结果是对该菌株所有试剂反应结果的加权统计, 计算出编码结果可参考检索表确定肠球菌种类。

+: The strain is positive for this agent; -: It is negative. The coding results are weighted statistics of all reagent reaction results of this strain, and the coding results can be calculated by reference to the search table to determine enterococcus species.

2.4 分离菌的分子生物学鉴定结果

分离菌株经 PCR 扩增得到的 16S rRNA 基因片段在 1 500 bp 处出现较亮的条带, 如图 3 所示。对检测得到的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库中 BLAST 程序进行比对, 统计各分离菌株基因序列与 GenBank 中已注册菌株的相似程度(Per.ident 值), 确认各菌株的种类, 结果如表 2 所示。

2.5 分离菌的耐药性特征

对所有菌株进行药敏试验, 结果显示, 所有菌株对氨苄西林、青霉素、万古霉素和氯霉素均表现为敏感, 其中 15 株对四环素耐药, 11 株对环丙沙星、左氧氟沙星、诺氟沙星耐药。此外, 分离菌对其他几类药物如多西环素、红霉素等也表现出不同程度的耐药(表 3)。

3 讨论

肠球菌作为肠道内普遍存在的一类细菌,

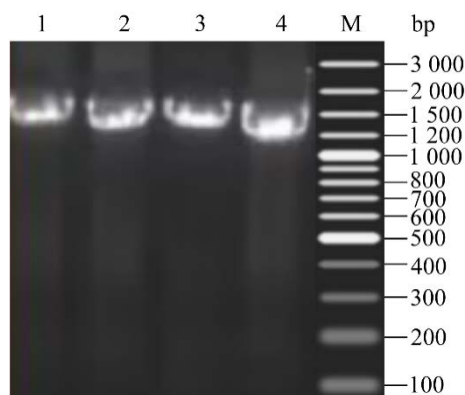


图 3 部分分离菌株 PCR 鉴定结果电泳图

Figure 3 Electrophoretic map of PCR identification results of some isolated strains.

对宿主肠道内的菌群平衡有着一定的调节作用和免疫效应^[24]。但在某些特定条件下, 也可能出现肠球菌致病甚至致死的情况, 如当宿主免疫力低下或长期使用抗生素, 宿主与肠球菌之间的共生平衡状态被打破, 从而导致肠球菌离开正常定殖部位而移位侵入其他组织器官造成

表 2 分子生物学鉴定结果

Table 2 Molecular biological identification results

菌株编号 Strain number	菌株类型 Type of strain	Per. ident (%)
1-1	<i>Enterococcus faecalis</i> EnGen0336 strain T5	100.00
1-2	<i>Enterococcus hirae</i> strain FDAARGOS_234	97.50
1-3	<i>Enterococcus faecalis</i> EnGen0336 strain T5	100.00
1-4	<i>Enterococcus faecium</i> strain SRR24	98.46
1-5	<i>Enterococcus faecalis</i> EnGen0336 strain T5	100.00
4-1	<i>Enterococcus faecalis</i> EnGen0336 strain T5	100.00
4-2	<i>Enterococcus faecalis</i> EnGen0336 strain T5	98.88
4-3	<i>Enterococcus hirae</i> strain FDAARGOS_234	99.90
4-4	<i>Enterococcus faecalis</i> EnGen0336 strain T5	100.00
7-1	<i>Enterococcus faecalis</i> EnGen0336 strain T5	99.24
7-2	<i>Enterococcus mundtii</i> strain DSM 4838	97.03
7-3	<i>Enterococcus faecalis</i> EnGen0336 strain T5	100.00
7-4	<i>Enterococcus mundtii</i> strain DSM 4838	97.01
12-1	<i>Enterococcus faecalis</i> EnGen0336 strain T5	98.61
12-2	<i>Enterococcus faecalis</i> EnGen0336 strain T5	100.00
12-3	<i>Enterococcus hirae</i> strain FDAARGOS_234	99.39
12-4	<i>Enterococcus faecalis</i> EnGen0336 strain T5	100.00

表 3 药敏试验结果
Table 3 Results of drug sensitivity test

菌株编号 Strain number	药敏试验结果 Susceptibility test results											菌株耐药 总计 Total strain resistance	菌株耐药率 Drug resistance rate of strain (%)	
	氨苄西林 Ampicillin	青霉素 Penicillin	环丙沙星 Ciprofloxacin	左氧氟沙星 Levofloxacin	诺氟沙星 Norfloxacin	四环素 Tetracycline	多西环素 Doxycycline	呋喃妥因 Furantoin	红霉素 Erythromycin	万古霉素 Vancomycin	氯霉素 Chloramphenicol			利福平 Rifampicin
1月 January	1-1 S	S	R	R	R	R	I	S	R	S	S	R	6	50.00
	1-2 S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	3	25.00
	1-3 S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	5	41.67
	1-4 S	S	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S	2	16.67
	1-5 S	S	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S	4	33.33
4月 April	4-1 S	S	R	R	R	R	I	S	I	S	S	I	4	33.33
	4-2 S	S	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S	2	16.67
	4-3 S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	6	50.00
	4-4 S	S	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	7	58.33
7月 July	7-1 S	S	R	R	R	R	I	S	S	S	S	I	4	33.33
	7-2 S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0.00
	7-3 S	S	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	6	50.00
	7-4 S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0.00
12月 December	12-1 S	S	R	R	R	R	I	S	S	S	I	I	4	33.33
	12-2 S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	7	58.33
	12-3 S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	3	25.00
	12-4 S	S	R	R	R	R	I	S	R	S	S	S	5	41.67
药品耐药总计 Drug resistance total	0	0	11	11	11	15	7	1	6	0	0	6		
药品耐药率 Drug resistance rate (%)	0	0	64.71	64.71	64.71	88.24	41.18	5.88	35.29	0.00	0.00	35.29		

R: 耐药; S: 高度敏感; I: 中度敏感。
R: Resistance; S: High sensitivity; I: Moderate sensitivity.

疾病, 2021 年内蒙古鄂尔多斯某羊场的数十头母羊出现流产死亡等情况, 并且先后使用多种抗生素治疗均无效果, 后续研究发现, 是由具有强耐药性的羊源致病性屎肠球菌感染引起^[25]。

本研究从不同月份的绿尾虹雉粪便中均成功分离鉴定出肠球菌, 16S rRNA 基因测序发现, 17 株肠球菌中粪肠球菌占多数, 为 11 株(64.71%), 其余为海氏肠球菌 2 株(11.77%), 蒙氏肠球菌 2 株(11.77%), 屎肠球菌 1 株(5.88%)。结果表明, 肠球菌是普遍存在于绿尾虹雉消化道中的一类细菌。在其他野生动物及鸟类体内也有肠球菌的发现, 如从藏羚羊粪便中分离出了肠球菌, 且为粪便菌群当中的优势种^[26]; 对鸡场中雏鸡泄殖腔中的粪肠球菌进行分离, 其占比最高达到 96.6%^[27]。粪肠球菌的分离率在所有肠球菌当中的占比最高, 本研究结果也符合这一情况。粪肠球菌感染会导致动物患病甚至死亡, 2021 年河南省周口市某养殖场的番鸭因致病性粪肠球菌感染出现精神沉郁、缩脖、采食减少、拉稀等症状, 死亡率达到 20%^[28]; 2020 年安徽某养殖户送检了以精神沉郁、腹泻、肠道广泛出血等为主要特征的病死鹅 8 只, 经检测鉴定为粪肠球菌感染致死^[29]。粪肠球菌在绿尾虹雉源肠球菌中占比最高, 并且在动物体内存在潜在致病风险, 在对绿尾虹雉进行研究和保护的时候需要更加留意这一类常见细菌所带来的影响。

对肠球菌的 12 种抗生素药敏试验发现, 17 株分离菌株对多种药物存在耐药现象, 其中四环素的平均耐药率最高, 达到了 88.24%, 几乎所有菌株都对其耐药, 其次是环丙沙星, 达到了 64.71%, 对其他药物也表现出不同程度的耐药性, 而对氨苄西林、青霉素(β -内酰胺类)、万古霉素和氯霉素表现出完全敏感, 因此可考虑使用敏感药物对肠球菌感染进行治疗。研究表明, 肠球菌普遍具有较强的耐药性, 这与它们的细

胞结构所带来的天然耐药性有关, 较厚的细胞壁能够隔绝多种抗生素的侵入, 此外, 一些细菌特有的耐药机制也会使其对药物产生更强的耐受性, 如“外排泵”系统通过转运蛋白主动将侵入细胞的药物排出; 某些细菌通过改变自身的靶点结构使药物无法与靶点结合而失去作用; 灭活酶与修饰酶作用于抗生素使其丧失功能等^[30-31]。药敏试验结果显示绿尾虹雉源肠球菌已普遍产生较强耐药性, 部分菌株甚至出现多重耐药。在人工饲养条件下, 无法避免抗生素的使用, 随着饲养年限增加, 笼养绿尾虹雉对抗生素的耐药性也逐渐增加, 导致其在用药和治疗上的问题更加严峻。因此, 在绿尾虹雉的饲养过程中, 需特别注意抗生素的使用要求, 避免更多更强耐药菌株的出现, 同时提高养殖管理水平, 优化饲料营养, 加强疾病预防, 定期监测评估, 保障绿尾虹雉生存环境洁净, 维持其状态健康, 以减少患病概率。

肠球菌耐药性强弱与肠球菌种类的关系表明, 在分离的 17 株肠球菌中, 粪肠球菌在种类上占比较高, 同时耐药性较强。全国细菌耐药监测网 2021 年全国细菌耐药监测报告统计数据显示, 肠球菌在耐药性革兰氏阳性菌分离率中排名前三, 其中粪肠球菌在所有种类的肠球菌中分离率最高, 占有革兰氏阳性菌的 10.8%^[32], 与本研究结果一致。此外, 对于绿尾虹雉源粪肠球菌的研究还需深入, 对其毒力因子的种类、数量, 以及在绿尾虹雉体内存在的具体致病机制进行探究, 从而为其疾病预防和治疗提供更多依据。

4 结论

本试验从不同月份笼养绿尾虹雉的粪便中成功分离出 17 株肠球菌, 其中粪肠球菌 11 株, 海氏肠球菌 3 株, 蒙氏肠球菌 2 株, 屎肠球菌 1 株。药敏试验结果显示, 几乎所有菌株都对四环素耐

药, 而对氨苄西林、青霉素、万古霉素和氯霉素敏感, 对其他药物均有不同程度的耐药表现。本试验为绿尾虹雉携带肠球菌的现状及其耐药情况提供了初步分析, 同时为绿尾虹雉疾病防控提供了参考。

致谢

感谢西华师范大学生命科学学院及西南野生动植物资源保护教育部重点实验室为本实验提供实验条件, 感谢四川蜂桶寨国家级自然保护区为本实验提供实验样本。

REFERENCES

- [1] 程彩云, 李金录, 刘凤玲. 绿尾虹雉迁地保护繁殖研究[J]. 动物学报, 1996, 42(S1): 54-61.
CHENG CY, LI JL, LIU FL. Study on *ex situ* conservation and reproduction of green-tailed pheasant[J]. Current Zoology, 1996, 42(S1): 54-61 (in Chinese).
- [2] XU XQ, WANG B, ZHOU CQ, YANG HL, ZHONG X, LI WH, CHEN L, JIAN Y, ZHANG L. Characterization of highly polymorphic microsatellite markers for the Chinese monal (*Lophophorus lhuysii*, Galliformes) using Illumina MiSeq sequencing[J]. Molecular Biology Reports, 2023, 50(4): 3903-3908.
- [3] JIANG DD, HE X, VALITUTTO M, CHEN L, XU Q, YAO Y, HOU R, WANG HR. Gut microbiota composition and metabolomic profiles of wild and captive Chinese monals (*Lophophorus lhuysii*) [J]. Frontiers in Zoology, 2020, 17(1): 36.
- [4] 唐卓. 利用红外相机研究卧龙雪豹和绿尾虹雉及其同域野生动物[D]. 北京: 清华大学硕士学位论文, 2016.
TANG Z. Study on snow leopard (*Panthera uncia*), Chinese monal (*Lophophorus lhuysii*), and the sympatric wildlife in Wolong national nature reserve using infrared camera[D]. Beijing: Master's Thesis of Tsinghua University, 2016 (in Chinese).
- [5] 刘梦瑶, 高依敏, 陈建宁, 肖珍, 杜重阳子, 李敏洁, 王洁清, 王淋波, 刘武华, 杨承忠. 绿尾虹雉保护生物学研究现状[J]. 江西林业科技, 2013, 41(2): 36-39.
LIU MY, GAO YM, CHEN JN, XIAO Z, DU C, LI MJ, WANG JQ, WANG LB, LIU WH, YANG CZ. Research status of conservation biology on *Lophophorus lhuysii* [J]. Jiangxi Forestry Science and Technology, 2013, 41(2): 36-39 (in Chinese).
- [6] MA LL, ZHANG XY, YUE BS, RAN JH. Complete mitochondrial genome of the Chinese Monal pheasant *Lophophorus lhuysii*, with phylogenetic implication in Phasianidae[J]. Mitochondrial DNA, 2010, 21(1): 5-7.
- [7] 张敬, 邓江宇, 马红, 罗毅, 陶玉静, 李莹, 左琳, 张成林. 绿尾虹雉迁地保护现状及对策[J]. 野生动物学报, 2019, 40(3): 790-796.
ZHANG J, DENG JY, MA H, LUO Y, TAO YJ, LI Y, ZUO L, ZHANG CL. Conservation status of Chinese monal *Lophophorus lhuysii* and strategy for captive rearing[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2019, 40(3): 790-796 (in Chinese).
- [8] KUEHLER C, LIEBERMAN A. Breeding programme for Chinese monal at the San Deigo Zoo[J]. Journal of the World Pheasant As Society, 1989, 14: 33-41.
- [9] 粟玉刚, 李向勇, 李蜜, 刘彬, 彭从笑, 夏青珍, 刘友琼. 高山兀鹫拉奎拉棒状杆菌和肠球菌属的分离鉴定[J]. 家禽科学, 2023, 45(7): 54-57.
SU YG, LI XY, LI M, LIU B, PENG CX, XIA QZ, LIU YQ. Isolation and identification of *Corynebacterium* and *Enterococcus* from L 'Aquila, an alpine vulture[J]. China Poultry Science, 2023, 45(7): 54-57 (in Chinese).
- [10] JOSHI S, SHALLAL A, ZERVOS M. Vancomycin-resistant enterococci: epidemiology, infection prevention, and control[J]. Infectious Disease Clinics of North America, 2021, 35(4): 953-968.
- [11] 张永祥, 胡健欣, 陆毅兴, 胡悦莹, 卢嘉璇, 辛琳, 曾振灵, 曾东平. 广东省某屠宰场猪源肠球菌的分离鉴定及耐药性和毒力基因分析[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(11): 4714-4723.
ZHANG YX, HU JX, LU YX, HU YY, LU JX, XIN L, ZENG ZL, ZENG DP. Isolation and identification of swine-derived *Enterococcus* and analysis of drug resistance and virulence genes from a slaughterhouse in Guangdong Province[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(11): 4714-4723 (in Chinese).
- [12] 刘宇, 刘海玲, 祖建成, 赵天望, 胡建军, 颜冲, 陈毅夫, 何天衢. 长沙市儿童尿路感染病原菌种类与常见病原菌耐药性分析[J]. 实用预防医学, 2023, 30(11): 1356-1358.
LIU Y, LIU HL, ZU JC, ZHAO YW, HU JJ, YAN C, CHEN YF, HE TQ. Species of pathogenic bacteria and drug resistance of common pathogens in children with urinary tract infection in Changsha City[J]. Practical Preventive Medicine, 2023, 30(11): 1356-1358 (in Chinese).
- [13] 原庭玉. 东北地区犬、猫源肠球菌分离鉴定与特异性噬菌体研究[D]. 济南: 山东师范大学硕士学位论文, 2023.
YUAN TY. Study on isolation and identification of *Enterococcus* from dog and cat in northeast China and specific phage[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Normal University, 2023 (in Chinese).
- [14] BZDIL J, SLADCEK V, SENK D, STOLAR P, WAICOVA Z, KOLLERTOVA N, ZOUHAROVA M, MATIASKOVA K, LINHART P, NEDBALCOVA K. Enterococci isolated from one-day-old chickens and their phenotypic susceptibility to antimicrobials in the Czech republic[J]. Antibiotics, 2023, 12(10): 1487.
- [15] 胡秀花, 孙芷馨, 赵梦洋, 谢佳琪, 王敏, 陈海良, 葛昕, 刘天龙, 王少林. 野生松鼠源屎肠球菌的致病性与耐药性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(7): 3012-3021.
HU XH, SUN ZX, ZHAO MY, XIE JQ, WANG M, CHEN HL, GE X, LIU TL, WANG SL. Pathogenicity and resistance analysis of *Enterococcus faecium* from wild squirrels[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2023, 54(7): 3012-3021 (in Chinese).
- [16] AMBROSIONI J, HERNANDEZ-MENESES M, TÉLLEZ A, PERICÀS J, FALCES C, TOLOSANA J, VIDAL B, ALMELA M, QUINTANA E, LLOPIS J,

- MORENO A, MIRO JM, the Hospital Clinic Infective Endocarditis Investigators. The changing epidemiology of infective endocarditis in the twenty-first century[J]. *Current Infectious Disease Reports*, 2017, 19(5): 21.
- [17] GOŁAŚ-PRADZYŃSKA M, ROLA JG. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from goat's milk[J]. *Journal of Veterinary Research*, 2021, 65(4): 449-455.
- [18] 白一波, 徐明超, 焦一帆, 周娟, 张思慧, 杨晶, 刘丽云, 徐建国. 肠球菌菌种鉴定方法的探索[J]. *疾病监测*, 2021, 36(5): 462-467.
BAI YB, XU MC, JIAO YF, ZHOU J, ZHANG SH, YANG J, LIU LY, XU JG. Exploration of methods for identification of *Enterococcus*[J]. *Disease Surveillance*, 2021, 36(5): 462-467 (in Chinese).
- [19] 阚威. 奶牛乳房炎链球菌和肠球菌的分离鉴定及毒力基因的检测[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2014.
KAN W. Isolation, characterization and virulence gene analysis of *Streptococcus* and *Enterococcus* collected from bovine mastitis[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [20] 云飞, 梁林, 鲍彦彬, 石雅丽, 孙亚超, 李永丽, 兰辉. 革兰氏阳性与阴性细菌基因组 DNA 提取方法的优化[J]. *安徽农业科学*, 2021, 49(10): 98-100.
YUN F, LIANG L, BAO YB, SHI YL, SUN YC, LI YL, LAN H. Optimization of methods for genomic DNA extraction from bacteria[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2021, 49(10): 98-100 (in Chinese).
- [21] 丁嘉仪, 邓宇慧, 李国豪, 朱婉, 刘希华. 毛竹耐铅内生细菌分离及其 16S rDNA 鉴定[J]. *寒旱农业科学*, 2023, 2(8): 740-744.
DING JY, DENG YH, LI GH, ZHU W, LIU XH. Isolation and 16S rDNA identification of Pb-resistant endophytic bacteria isolated from *Phyllostachys pubescens*[J]. *Journal of Cold-Arid Agricultural Sciences*, 2023, 2(8): 740-744 (in Chinese).
- [22] 韩荣嘉, 彭祖焜, 刘建华, 苑丽, 梁梦菊, 潘玉善, 贺丹丹, 吴华. 郑州市宠物猫源病原菌毒力基因检测及其耐药性分析[J]. *安徽农业科学*, 2023, 51(20): 86-94.
HAN RJ, PENG ZK, LIU JH, YUAN L, LIANG MJ, PAN YS, HE DD, WU H. Detection of virulence genes and their drug resistance analysis of pathogens isolated from pet cats in Zhengzhou city[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2023, 51(20): 86-94 (in Chinese).
- [23] 廖延雄. 《伯杰氏鉴定细菌学手册》与《伯杰氏分类细菌学手册》[J]. *微生物学通报*, 1992, 19(4): 249.
LIAO YX. *Bergey's Manual of Identification Bacteriology and Bergey's Manual of Classification Bacteriology*[J]. *Microbiology China*, 1992, 19(4): 249 (in Chinese).
- [24] 王伯涛, 王秋菊, 雷高, 杨文玲, 权淑静, 刘德海. 1 株高产乳酸粪肠球菌的筛选、鉴定及益生性能的研究[J]. *饲料研究*, 2023, 46(1): 95-99.
WANG BT, WANG QJ, LEI G, YANG WL, QUAN SJ, LIU DH. Screening, identification and probiotic property of a *Enterococcus faecalis* strain with high lactic acid production[J]. *Feed Research*, 2023, 46(1): 95-99 (in Chinese).
- [25] 白伟琴, 李宏, 孟克, 瞿占飞, 李杰, 赵利军, 王金玲, 格日勒图, 李琦, 吉林台. 1 株羊源致病性屎肠球菌的分离与鉴定[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(10): 3889-3895.
BAI WQ, LI H, MENG K, ZI ZF, LI J, ZHAO LJ, WANG JL, GE R, LI Q, JI LT. Isolation and identification of a pathogenic *Enterococcus faecium* from sheep[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(10): 3889-3895 (in Chinese).
- [26] 李俊琴. 藏羚羊粪便和高原鼠兔肠内容物可培养菌群结构与新种发现[D]. 太原: 山西医科大学博士学位论文, 2020.
LI JQ. The cultured Microbiota Analysis of Tibetan *Antelope* Feces and Plateau Pika Intestinal Content and Discovery of Novel Bacterial Species[D]. Taiyuan: Doctoral Dissertation of Shanxi Medical University, 2020 (in Chinese).
- [27] FERTNER ME, OLSEN RH, BISGAARD M, CHRISTENSEN H. Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* among layer chickens during hatch[J]. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2011, 53(1): 56.
- [28] 周改玲, 乔宏兴. 番鸭感染粪肠球菌与沙门氏菌的分离鉴定、遗传进化及耐药基因检测分析[J]. *家畜生态学*, 2023, 44(10): 82-88.
ZHOU GL, QIAO HX. Isolation, identification, genetic evolution analysis and drug resistance gene detection of *Enterococcus faecalis* and *Salmonella* in Muscovy duck infection[J]. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2023, 44(10): 82-88 (in Chinese).
- [29] 路振香, 陈晓鹏, 吴东琪, 刘国月, 魏春燕, 潘燕妹, 郭伟娜, 刘畅, 赵磊, 张宁, 李贺侠. 鹅粪肠球菌分离鉴定及耐药与毒力基因检测[J]. *北京农学院学报*, 2022, 37(4): 86-90.
LU ZX, CHEN XP, WU DQ, LIU GY, WEI CY, PAN YM, GUO WN, LIU C, ZHAO L, ZHANG N, LI HX. Isolation and identification of *Enterococcus Faecalis* from goose and detection of related drug resistance genes and virulence genes[J]. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2022, 37(4): 86-90 (in Chinese).
- [30] 徐琦琦, 陈月月, 李宏博, 陈万昭, 秦蕾, 王东, 夏利宁. 新疆伊犁昭苏不同动物源粪肠球菌耐药性及耐药基因检测[J]. *中国农业科技导报*, 2023, 25(9): 140-146.
XU QQ, CHEN YY, LI HB, CHEN WZ, QIN L, WANG D, XIA LN. Detection of drug resistance and drug resistance genes of *Enterococcus faecalis* from different animal sources in Zhaosu, Yili, Xinjiang[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2023, 25(9): 140-146 (in Chinese).
- [31] AUNG MS, URUSHIBARA N, KAWAGUCHIYA M, OHASHI N, HIROSE M, KUDO K, TSUKAMOTO N, ITO M, KOBAYASHI N. Antimicrobial resistance, virulence factors, and genotypes of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* clinical isolates in northern Japan: identification of *optrA* in ST480 *E. faecalis*[J]. *Antibiotics*, 2023, 12(1): 108.
- [32] 全国细菌耐药监测网. 2021 年全国细菌耐药监测网门诊患者分离细菌耐药监测报告[J]. *中华医院感染学杂志*, 2023, 33(22): 3403-3409.
China Antimicrobial resistance surveillance system. Antimicrobial resistance surveillance reports from patients of outpatient departments from China Antimicrobial Resistance Surveillance System in 2021[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2023, 33(22): 3403-3409 (in Chinese).