



## 研究报告

## 雏鸡源致病性粪肠球菌的分离鉴定及其耐药性分析

夏伦斌<sup>\*1,2</sup> 郑秋润<sup>1</sup> 陈存武<sup>1,2</sup> 孙桃桃<sup>1,2</sup> 蒋平<sup>1,2</sup>

1 皖西学院生物与制药工程学院 安徽 六安 237012

2 安徽省中药资源保护与持续利用工程实验室 安徽 六安 237012

**摘要:**【背景】粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)是人和动物肠道正常菌群之一,也是一种条件性致病菌。近年来,粪肠球菌引起人和动物感染的报道越来越多。【目的】探明引起某养鸡场雏鸡发病死亡的病原及其致病性和有效治疗药物。【方法】结合临床症状和病理剖检,开展病原菌分离、生理生化特性检测和16S rRNA基因序列分析、致病性试验、耐药分析和对患病鸡群的药物治疗。【结果】患病鸡有昏睡、瘫痪或共济失调等临床症状;肝、脾肿大,肝脏发黄、少量出血点、质脆易碎,肠道粘膜增厚、出血,脑轻微水肿;从肝脏组织分离得到一株革兰氏阳性球菌,经纯化培养后命名为CJ517;依据该菌株形态特征、生理生化特性和16S rRNA基因序列分析鉴定为粪肠球菌;致病性试验显示CJ517菌株能致死小鼠,致死率为66.67%;该菌对头孢噻肟、磷霉素、丁胺卡那等药物敏感,对多西环素、卡那霉素、新霉素、氟苯尼考等药物耐药;经用敏感药物和提高免疫力结合治疗后,鸡群病情得到控制。【结论】研究结果可为临床诊断和治疗动物粪肠球菌感染提供参考。

**关键词:** 粪肠球菌, 分离, 鉴定, 致病性试验, 药敏试验

## Isolation and identification of pathogenic *Enterococcus faecalis* from chicks and the analysis of its drug resistance

XIA Lunbin<sup>\*1,2</sup> ZHENG Qiurun<sup>1</sup> CHEN Cunwu<sup>1,2</sup> SUN Taotao<sup>1,2</sup> JIANG Ping<sup>1,2</sup>

1 College of Biological and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an, Anhui 237012, China

2 Anhui Engineering Laboratory for Conservation and Sustainable Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources, Lu'an, Anhui 237012, China

**Abstract:** [Background] As a normal intestinal flora of human and animal, *Enterococcus faecalis* was also a conditional pathogenic bacterium, which could infect human and animal. [Objective] To analyze the pathogen of which cause the death of the chicks in chicken farm, and choose the effective drug. [Methods]

**Foundation items:** Excellent and Top-Notch Talent Cultivation Project of Universities in Anhui Province (GXGNFX2018027); Natural Science Research Project of West Anhui University (WXZR201629, WXZR201740); West Anhui University "Six Excellence One Top" Outstanding Talent Training Innovation Project (WXXY2019006); Undergraduate Education Quality Engineering Project of Anhui Province (2018SXZX49)

**\*Corresponding author:** E-mail: xlbwxc@126.com

**Received:** 16-07-2020; **Accepted:** 09-10-2020; **Published online:** 11-12-2020

**基金项目:** 安徽省高校优秀拔尖人才培养项目(GXGNFX2018027); 皖西学院自然科学研究项目(WXZR201629, WXZR201740); 皖西学院“六卓越一拔尖”卓越人才培养创新项目(WXXY2019006); 安徽省本科质量工程项目(2018SXZX49)

**\*通信作者:** E-mail: xlbwxc@126.com

**收稿日期:** 2020-07-16; **接受日期:** 2020-10-09; **网络首发日期:** 2020-12-11

The pathogen was isolated from clinical sample based on the clinical symptoms and pathological examination. Then, the physiological and biochemical characteristics, 16S rRNA gene sequence, pathogenicity and drug resistance were conducted to identify the pathogen. Drug therapy was performed to screen the effective drug towards the pathogen. **[Results]** The clinical symptoms of lethargy, paralysis and ataxia in sick chick could be observed. Swelling spleen, yellow, swelling, brittle and fragile liver with a small amount of bleeding points, thickened and bleeding intestinal mucosa, and mild cerebral edema could be observed by pathological examination. A gram-positive coccus, named CJ517 after purification and culture, was isolated from liver tissue. It was identified as *Enterococcus faecalis* according to physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis. The pathogenicity test showed that the mortality rate of CJ517 on mice was 66.67%. It is sensitive to cefotaxime, fosfomycin, butyramicina, while as resistant to doxycycline, kanamycin, neomycin and florfenicol. The disease was relieved after treating with sensitive drug combined immunopotentiator. **[Conclusion]** The result could provide reference for diagnosis and treatment of disease caused by the infection of *Enterococcus faecalis*.

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*, isolation, identification, pathogenicity test, drug sensitive test

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)是人和动物胃肠道正常菌群之一, 具有维持正常肠道菌群结构的重要作用<sup>[1]</sup>。在畜牧生产上, 粪肠球菌常作为益生菌添加剂来调节肠道菌群, 预防畜禽消化道疾病和提高生产性能<sup>[2-4]</sup>。然而, 近年来粪肠球菌引起人和动物感染的病例逐年增加。向盈盈等<sup>[5]</sup>从临床再治疗根管(牙根尖周炎)中分离鉴定了致病性粪肠球菌 YN771; 冯金果<sup>[6]</sup>对 569 株尿路感染病原菌分布进行了研究, 发现粪肠球菌占比为 3.51%; 陈涛等<sup>[7]</sup>报道了一例粪肠球菌致原发性腰椎间盘突出感染病例; 徐红静等<sup>[8]</sup>收集了医院临床血培养分离到的非重复肠球菌属 221 株, 经鉴定 221 株肠球菌属细菌中粪肠球菌为 74 株, 占 33.5%。动物感染粪肠球菌发病和死亡的报道也越来越多, 王婧祺等<sup>[9]</sup>在母猪产道内成功分离到一株致病性粪肠球菌, 该细菌可能是母猪子宫内膜炎的病原菌之一; 李博等<sup>[10]</sup>从病弱雏鸡的肝脏分离出 56 株菌, 其中粪肠球菌分离率为 46.4% (26/56); 葛俊伟等<sup>[11]</sup>从水貂中分离鉴定了一株致病性粪肠球菌; 王亚宾等<sup>[12]</sup>研究发现河南省一些猪场仔猪感染发病的病原体为粪肠球菌; 狄婷婷等<sup>[13]</sup>对引起雏鹅败血症的病原进行了分离鉴定, 分离菌株为中等致病力粪肠球菌, 可致小鼠急性败血症。以上研究结果表明, 粪肠球菌已经成为引起人和动

物感染的重要细菌性病原之一。研究表明, 粪肠球菌可通过动物或动物源性食品传播给人类<sup>[14]</sup>, 引起人畜共患病。因此, 做好畜禽养殖过程中粪肠球菌的防控, 有利于保护人类健康。

2020 年 5 月, 皖西学院小动物诊疗实验实训中心接到送检的不明原因发病雏鸡, 共 7 只, 其中死亡 4 只。本研究以送检的病雏鸡为研究对象, 结合临床诊断和病理剖检观察, 从病雏鸡肝脏分离得到一株分离菌, 通过菌株形态学、生理生化特性检测、16S rRNA 基因序列分析和系统发育进化树构建对菌株进行鉴定, 并开展了致病性试验和耐药性分析, 同时选择敏感药物对发病雏鸡群进行了治疗, 期望研究结果能为进一步研究该菌的生物学特性和致病机制奠定基础, 同时也为动物感染粪肠球菌的临床诊断与治疗提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂药品

MH 琼脂培养基和 BHI 培养基, 杭州百思生物技术有限公司; 血琼脂基础培养基, 上海一研生物科技有限公司; 无菌脱纤维绵羊血, 郑州德宁生物技术有限公司; 标准药敏纸片、革兰氏染色试剂, 杭州滨和微生物试剂有限公司; 粪肠球菌标准株(ATCC29212), 上海北诺生物科技有限

公司;革兰氏阳性菌生化检测卡,梅里埃诊断产品(上海)有限公司;治疗用药物,安徽天安生物科技股份有限公司; *Taq* 酶和 dNTP Mix 等,生工生物工程(上海)股份有限公司。

### 1.1.2 实验动物

4 周龄 SPF 昆明种小鼠 20 只,体重  $18 \pm 2$  g,购自安徽医科大学实验动物中心,许可证号为 SCXK (皖) 2017-001。

### 1.1.3 主要仪器

智能生化培养箱,合肥华德利科学器材有限公司;数码显微镜,重庆奥特光学仪器有限公司;VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪,梅里埃诊断产品(上海)有限公司;PCR 仪,Bio-Rad 公司。

### 1.1.4 病例来源

安徽省六安市裕安区青山乡某土鸡养殖场发病雏鸡。

## 1.2 方法

### 1.2.1 病史调查

2020 年 5 月 17 日,养殖户送检 7 只雏鸡,约 15 日龄,死亡 4 只,存活 3 只。通过询问养殖户对整个发病过程、病死情况做全面调查。了解到该养殖户从事散养土鸡养殖,雏鸡苗 900 只,采用地面垫料、电热保温伞保温育雏,温度  $35^{\circ}\text{C}$  以上,水线连续供水,面积约  $35\text{ m}^2$ 。近 2-3 d 陆续见有鸡只精神萎靡、采食量下降,发病约 5% 左右,送检前一天出现死亡。按照当地兽医的建议用过多西环素拌料进行治疗,病情未见好转。

### 1.2.2 临床症状与病理剖检观察

通过询问养殖户和观察送检活鸡了解发病鸡临床症状;剖检送检病鸡观察病理变化。

### 1.2.3 细菌分离及溶血试验

无菌采集病死鸡的肝脏组织,用划线法接种于 MH 琼脂培养基平板,  $37^{\circ}\text{C}$  恒温培养 24 h,观察菌落大小及形态,挑选形态一致的优势单个菌落进行革兰氏染色并显微镜镜检,并对优势菌落进行纯化培养。将纯化培养后的分离株接种于含 5% 绵羊血琼脂培养基上,  $37^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培

养 18 h 后,观察是否有溶血现象。

### 1.2.4 细菌生化鉴定

分离优势菌进行纯化培养后,用灭菌 0.45% NaCl 溶液(pH 6.5)调制菌悬液麦氏比浊度至 0.55,然后按照 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪使用说明书进行生化鉴定(共 43 种生化反应),并以粪肠球菌标准株(ATCC29212)作对照。

### 1.2.5 分离菌株 16S rRNA 基因扩增与系统发育树构建

采用水煮沸法提取分离菌 DNA: 收集  $37^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 培养过夜的菌液 1.5 mL, 12 000 r/min 离心 5 min,再用灭菌蒸馏水洗涤 1 次,加入 500  $\mu\text{L}$  1×TE Buffer,振荡混匀后煮沸 10 min,冰浴 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为 DNA 模板。采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')和 1492R (5'-CGGTTACCTTGTACG ACTT-3')扩增细菌 16S rRNA 基因。PCR 反应体系: DNA 模板 5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 2  $\mu\text{L}$ , 10×PCR 缓冲液 5  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , dNTP Mix (2.5 mmol/L) 3  $\mu\text{L}$ , 用灭菌超纯水补加至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  1 min,  $55^{\circ}\text{C}$  1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。预计扩增片段约为 1 500 bp。

PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行基因序列测定,经 DNASTar 软件分析后提交 GenBank 数据库,并将获得的基因序列在 NCBI 网站利用 BLAST 程序进行相似性比对,选取相似性高的序列,运用 MEGA 7.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining Method)构建系统发育树,确定分离菌株的生物种属。

### 1.2.6 致病性试验

参照文献[15]的方法,将分离菌株和 ATCC29212 株分别接种于 BHI 培养基中,  $37^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 培养 24 h,无菌收集培养液, 12 000 r/min 离心 3 min,弃上清液;同样操作,用灭菌 PBS 液洗涤 2 次,然后分别制备成浓度为  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL 的细菌悬液。将 18 只小鼠分为攻毒试验组、攻毒

参照组和对照组, 每组 6 只。试验组小鼠每只腹腔注射分离菌株菌悬液 0.5 mL, 参照组小鼠每只腹腔注射等量的 ATCC29212 株细菌悬液, 对照组小鼠每只腹腔注射等量的 PBS, 攻毒后连续 10 d 观察小鼠状态和死亡情况, 剖检死亡小鼠并分离病菌。

### 1.2.7 药敏试验

采用划线法将分离菌均匀接种于 MH 琼脂培养基平板上, 采用 Kirby-Bauer (K-B) 纸片扩散法进行药敏试验, 将 4 类 7 种药敏纸片均匀紧贴于培养基表面, 37 °C 恒温培养 24 h 后, 测量抑菌圈直径大小, 参考美国国家临床实验室标准化研究所 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的标准<sup>[16]</sup>判定药敏试验结果。

### 1.2.8 防治措施

依据药敏试验结果, 选用敏感药物对患病雏鸡进行治疗, 采用肌肉注射、饮水或拌料等方法给药, 同时对整个雏鸡群进行预防性给药, 鸡舍每天全面消毒 1 次, 在做好保温的同时, 保持一定通风和良好卫生。

## 2 结果与分析

### 2.1 临床症状与病理剖检

送检的存活雏鸡见有昏睡、瘫痪或时而共济失调状, 未见甩鼻、呼噜等呼吸道症状, 粪便为不成形稀便; 病理剖检发现, 皮肤、肌肉未见出血, 肝脏、脾脏肿大, 肝脏表面有少量针尖大小出血点、呈黄色且质脆易碎, 心脏、肺脏、肾脏、气管未见明显病变, 肠道粘膜增厚、出血, 其中 3 只鸡脑部轻微水肿、未见出血。

### 2.2 细菌分离及溶血试验

从患病鸡肝脏分离到的细菌菌落为圆形、表面光滑湿润、不透明、边缘整齐、灰白色的隆起菌落, 菌落在延长培养时间后变为浅黄色(图 1)。挑选单个菌落制成细菌涂片, 革兰氏染色镜检, 呈单个、成双或多个菌体短链状排列的革兰氏阳性球菌(图 2)。经纯化培养后命名为 CJ517。溶血试验表明分离株 CJ517 菌落周围具有明显溶血现象, 呈  $\beta$  溶血(图 3)。



图 1 分离菌在 MH 培养基上的生长形态

Figure 1 Growth morphology of isolated bacteria in MH medium

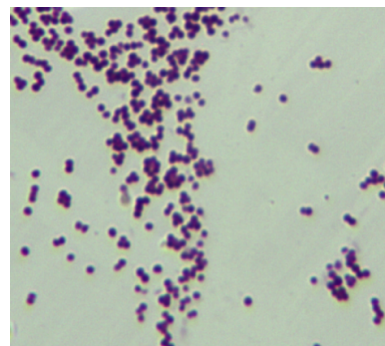


图 2 分离菌的革兰氏染色镜检结果(1 000×)

Figure 2 Microscopic examination of isolated bacteria with Gram stain (1 000×)



图 3 分离菌的溶血试验结果

Figure 3 Results of hemolysis test for isolated bacteria

### 2.3 CJ517 菌株生化鉴定结果

利用革兰氏阳性菌检测卡在 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪上进行生理生化特性测定, 结果见表 1, CJ517 菌株生理生化特性为: 能在高盐(6.5% NaCl)培养基生长, 发酵利用蔗糖、乳糖、D-麦芽糖、D-海藻糖、D-甘露糖、

表 1 分离菌株 CJ517 的生化特性鉴定结果

Table 1 Biochemical characterization identified of isolated strain CJ517

项目 Items	分离株 CJ517	标准株 ATCC29212	项目 Items	分离株 CJ517	标准株 ATCC29212
苦杏仁苷 AMY	+	+	尿素酶 URE	-	-
多粘菌素 B 耐受 POLYB	+	+	精氨酸双水解酶 2ADH2s	+	+
D-核糖 dRIB	+	+	甲基-B-D-葡萄糖吡喃苷 MBdG	+	+
精氨酸双水解酶 1ADH1	+	+	丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶 APPA	-	-
乳糖 LAC	+	+	D-麦芽糖 dMAL	+	+
$\alpha$ -葡萄糖苷酶 AGLU	+	+	L-乳酸盐产碱 ILATk	-	-
D-棉子糖 dRAF	-	-	$\beta$ -D-半乳糖苷酶 BGAL	-	-
丙氨酸芳胺酶 AlaA	-	-	$\alpha$ -半乳糖苷酶 AGAL	-	-
L-天冬氨酸芳胺酶 AspA	+	-	$\beta$ -半乳糖吡喃糖苷酶 BGAR	-	-
L-脯氨酸芳胺酶 ProA	-	-	D-海藻糖 dTRE	+	+
磷脂酰磷脂酶 C PIPLC	-	-	$\beta$ -D-葡萄糖醛酸 BGURr	-	-
新生霉素耐受 NOVO	+	+	D-甘露糖 dMNE	+	+
6.5% NaCl 生长 NC6.5	+	+	焦谷氨酸芳胺酶 PyrA	+	+
N-乙酰-D-氨基葡萄糖 NAG	+	+	$\beta$ -D-葡萄糖醛酸酶 BGUR	-	-
O/129 耐受 O129R	+	+	支链淀粉 PUL	-	-
D-山梨醇 dSOD	+	+	蔗糖 SAC	+	+
亮氨酸芳胺酶 LeuA	-	-	D-木糖 dXYL	-	-
D-半乳糖 dGAL	+	+	环式糊精 CDEX	+	-
$\alpha$ -甘露糖苷酶 AMAN	-	-	杆菌肽耐受 BACI	+	+
酪氨酸芳胺酶 TyrA	-	-	磷酸酶 PHOS	-	-
D-甘露醇 dMAN	+	+	水杨素 SAL	+	+
奥普托欣耐受 OPTO	+	+			

注：+：阳性；-：阴性  
Note: +: Positive; -: Negative

N-乙酰-D-氨基葡萄糖、D-甘露醇、D-山梨醇、苦杏仁苷、甲基-B-D-葡萄糖吡喃苷、环式糊精和水杨素等，精氨酸双水解酶 2、精氨酸双水解酶 1、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、L-天冬氨酸芳胺酶、焦谷氨酸芳胺酶等反应为阳性，对多粘菌素 B 耐受、杆菌肽耐受、新生霉素耐受、奥普托欣耐受和 O/129 耐受等反应均为阳性，其余反应为阴性；与标准株 ATCC29212 仅在 AspA 和 CDEX 这 2 项反应指标存在差异，均为阳性。参照《伯杰细菌鉴定手册》(第 8 版)<sup>[17]</sup>，结合 CJ517 菌株菌落、菌体形态、染色及生理生化特性，初步判断该菌株为粪肠球菌。

2.4 CJ517 菌株 16S rRNA 基因扩增与系统发育树构建

PCR 扩增出大小约 1 500 bp 的目的片段。经测序获得 CJ517 菌株 16S rRNA 基因长为 1 482 bp 的有效片段，序列提交 GenBank 数据库，获得登录号为 MT748041。将序列在 NCBI 上利用 BLASTn 检索程序进行序列相似性比对，CJ517 菌株与 *E. faecalis* gypsy moth larva (AY395018)、*E. faecalis* XR7 (EU708623)、*E. faecalis* KLDS4 (GQ337884)、*E. faecalis* FUA3372 (JN102567)、*E. faecalis* OGR1 (KT180316)的 16S rRNA 基因序列相似性分别为 100%、99.72%、99.8%、99.93%、

99.86%。

选取肠球菌属不同来源菌株的 16S rRNA 基因序列与 CJ517 菌株进行系统发育进化树构建, 同时选取肠杆菌科沙门氏菌(*Salmonella* sp. D194-2, GenBank 登录号为 FJ463825)作为外群。由图 4 可知, 分离菌株 CJ517 的 16S rRNA 基因序列与粪肠球菌的相应序列最近, 聚为一支, 置信度为 99%。结合 CJ517 菌株的形态特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列的系统发育分析, 判定分离菌 CJ517 为肠球菌属(*Enterococcus*)的粪肠球菌(*E. faecalis*)。

## 2.5 菌株 CJ517 的致病性测定结果

菌株 CJ517 攻毒试验组每只小鼠腹腔注射  $0.5 \times 10^8$  CFU 细菌悬液 24 h 后, 小鼠均表现精神萎

靡、行动迟缓、采食行为明显减少, 第 3 天死亡 1 只, 第 4 天死亡 2 只, 第 5 天死亡 1 只, 第 6 天之后未再有小鼠死亡, 小鼠死亡率为 66.67% (表 2); ATCC29212 株攻毒参照组小鼠注射后均精神萎靡, 仅在第 3 天死亡 1 只; 对照组小鼠未见有异常, 采食正常。对试验组攻毒致死小鼠剖检发现, 肝脏、脾脏肿大, 血液颜色较深呈暗红色, 从肝脏分离培养致病菌, 通过与分离菌株 CJ517 相同方法进行鉴定, 结果一致(图 5); 参照组攻毒致死小鼠剖检未见脏器明显病变, 肝组织分离菌经鉴定与标准株 ATCC29212 一致; 对照组小鼠致死剖检, 各脏器颜色状态均正常, 从其肝脏组织未能分离出致病菌。说明分离菌株 CJ517 能够致死小鼠, 而且致病性较强。

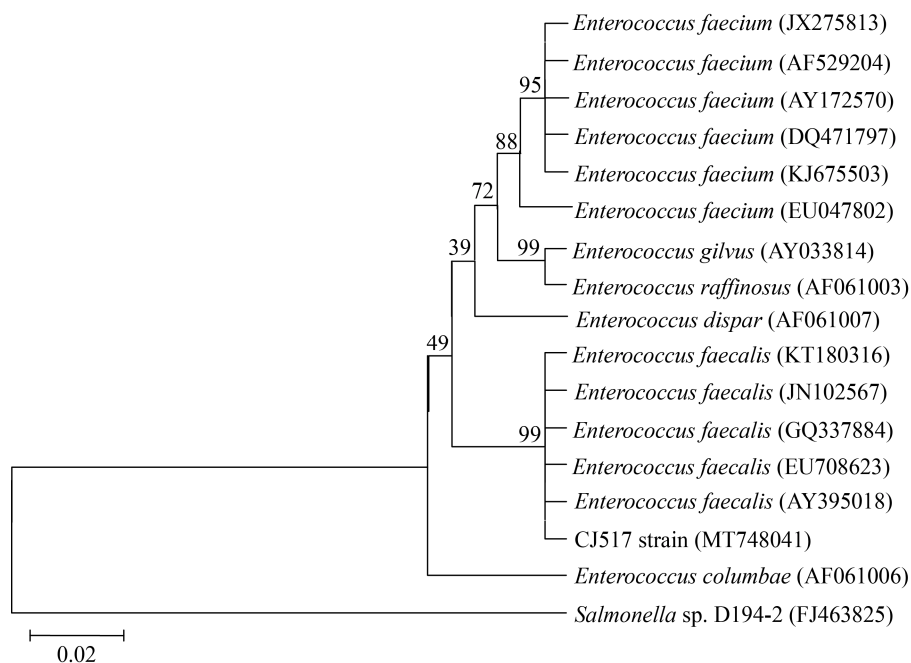


图 4 分离菌株 CJ517 基于 16S rRNA 基因序列构建的发育进化树

Figure 4 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequence of isolated strain CJ517

注: 发育进化树采用 MEGA 7.0 软件邻接法构建; 括号内的数字为 GenBank 登录号; 分支点处的数字为 Bootstrap 值; 比例尺为单位核苷酸的替换率, 表示遗传距离

Note: The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method within MEGA software (version 7.0); Number in parenthesis represented GenBank accession number; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values; The scale bar is the replacement rate per unit of nucleotide and represents the genetic distance



表 2 分离株 CJ517 致病性测定结果  
Table 2 Pathogenicity of isolated strain CJ517

组别 Group	小鼠死亡数 Number of death (ind.)										死亡率 Mortality rate (%)
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	
对照组 Control group	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
攻毒试验组 Challenge test group	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	66.67
攻毒参照组 Challenge reference group	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	16.67

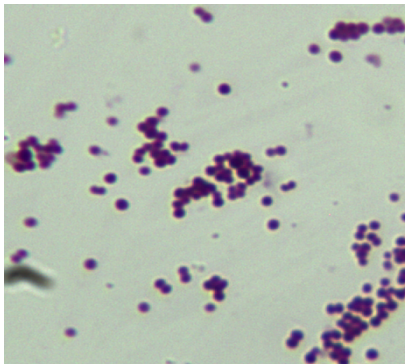


图 5 分离菌 CJ517 致死小鼠肝脏分离菌的革兰氏染色镜检结果(1 000×)  
Figure 5 Gram staining microscopic examination results of isolated bacteria in liver of mice killed by CJ517 (1 000×)

2.6 药敏试验结果

由图 6 和表 3 可知，分离菌株 CJ517 对头孢噻肟、磷霉素、丁胺卡那等药物敏感，对多西环素、氟苯尼考、卡那霉素、新霉素等药物

耐药。  
2.7 防治效果  
由于雏鸡数量较多、日龄较小，全群口服或注射给药不便，根据药敏试验结果，建议养殖户采用隔离分群给药，把精神萎靡和疑似发病鸡只进行隔离，另舍饲喂。对未出现明显症状的雏鸡群采用药物预防，饲料中添加头孢噻肟(25 mg/kg)连续饲喂 3 d 进行预防，同时更换垫料并进行全面消毒；对疑似发病鸡隔离治疗，采用头孢噻肟(按体质量 25 mg/kg)连续腿部肌肉注射 5 d，每日早晚各一次；所有雏鸡饮水中添加 VC (200 mg/L)和芪黄素(主要成分为黄芪多糖，含量≥450 mg/g，按 100 mg/L 添加)，连用 5 d。回访了解到，用药第 2 天后未再有鸡只死亡，也未增加新发病例，鸡群病情得到有效控制。

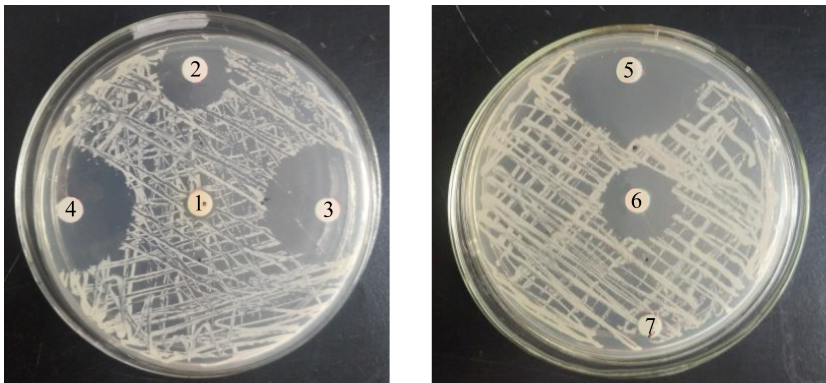


图 6 分离菌株 CJ517 的药敏试验结果  
Figure 6 The result of drug sensitivity test for isolated strain CJ517  
注：1：多西环素；2：卡那霉素；3：丁胺卡那；4：磷霉素；5：头孢噻肟；6：新霉素；7：氟苯尼考  
Note: 1: Doxycycline; 2: Kanamycin; 3: Amikacin; 4: Fosfomycin; 5: Cefotaxime; 6: Neomycin; 7: Florfenicol

表 3 分离菌株 CJ517 的药敏试验结果  
Table 3 Drug sensitivity test results of isolated strain CJ517

药物名称 Drug name	抑菌圈直径 Diameter of inhibitory zone (mm)	敏感性 Sensitivity	药物类别 Drug classification
多西环素 Doxycycline	0	R	四环素类 Tetracyclines
卡那霉素 Kanamycin	9	R	氨基糖苷类 Aminoglycosides
丁胺卡那 Amikacin	21	S	氨基糖苷类 Aminoglycosides
磷霉素 Fosfomycin	23	S	磷霉素类 Fosfomycin
头孢噻肟 Cefotaxime	25	S	头孢类 Cephalosporins
新霉素 Neomycin	10	R	氨基糖苷类 Aminoglycosides
氟苯尼考 Florfenicol	0	R	氯霉素类 Chloramphenicols

注: S: 敏感; I: 中介; R: 耐药  
Note: S: Susceptible; I: Intermediate; R: Resistant

3 讨论

本研究结合病雏鸡的临床症状和病理特征观察对病原进行分离, 利用 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪对分离菌株生理生化特性测定, 同时进行 16S rRNA 基因序列分析和系统发育进化树构建, 成功分离并鉴定了一株粪肠球菌, 将其命名为 CJ517。VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪依据微生物的生化代谢特点, 结合现代自动化技术, 可快速、准确测定细菌生理生化特性, 相较于传统鉴定方法避免了耗时、繁琐的过程<sup>[18-21]</sup>; 16S rRNA 基因检测技术在分子水平上对细菌进行鉴定, 具有特异性高、准确等特点, 但缺乏表型鉴定<sup>[20]</sup>。因此, 本研究对分离菌株鉴定采用 2 种方法结合, 相互补充、相互辅证, 鉴定结果准确可靠。

粪肠球菌虽然是人和动物肠道正常菌群, 但也是一种条件性致病菌, 可引起免疫力低下宿主的机会感染<sup>[22]</sup>。据报道, 粪肠球菌可引起人的尿道<sup>[23]</sup>、口腔、腹腔、生殖道及手术伤口等感染<sup>[5]</sup>; 由粪肠球菌感染引起的动物疾病有蜜蜂幼虫腐臭病<sup>[24]</sup>、犊牛死亡<sup>[25]</sup>、鹅败血症<sup>[13]</sup>、母猪子宫内膜炎<sup>[9]</sup>、水貂败血症<sup>[11]</sup>、鸡胚和雏鸡的死亡<sup>[26]</sup>等。由此可见, 目前粪肠球菌引起人和动物的感染越来越多, 对该病菌的分离鉴定是做好防控的前体, 也是进一步探究该菌生物学特性和致病机制的基础。

葛俊伟等<sup>[11]</sup>将从呈败血症死亡水貂淋巴结中分离鉴定的粪肠球菌制成菌液( $1.0 \times 10^8$  CFU/mL), 接种于小鼠 12 h 后出现食欲不振、活动迟缓、精神萎靡等临床症状, 24 h 后出现死亡, 36 h 全部死亡; 王晓禹等<sup>[25]</sup>将分离鉴定的致犊牛死亡的粪肠球菌进行致病性试验, 试验组小鼠接种菌液( $1.0 \times 10^8$  CFU/mL) 72 h 陆续死亡, 剖检发现死亡小鼠肝、脾、肾肿大, 从病变脏器中分离的致病菌经鉴定与分离株一致; 而对照组小鼠活力无异常, 致死剖检未发现脏器有病变, 颜色状态均正常。本研究分离菌株 CJ517 致病性试验显示, 小鼠接种 48 h 后出现死亡, 致死率为 66.67% (4/6), 死亡小鼠肝、脾肿大, 呈败血症, 肝脏组织分离菌经鉴定与接种菌株一致。本研究结果与以上研究结果相似, 说明分离鉴定的粪肠球菌 CJ517 株具有较强的致病性。

人和动物一旦疑似感染粪肠球菌, 及时分离鉴定病原菌和筛选敏感药物治疗, 是阻断粪肠球菌进一步感染的有效手段。分离菌株 CJ517 药敏试验结果显示, 其对多种抗菌药物呈多重耐药, 这与近几年的一些国内外报道一致<sup>[27-30]</sup>。同时, 药敏试验表明, 不同动物源的分离株虽然呈多重耐药, 但是耐药的药物类别却有差异, 敏感药物也存在差异。分离的 CJ517 菌株对头孢噻肟、磷霉素、丁胺卡那等药物敏感, 对多西环素、氟苯尼考、卡那霉素、新霉素等药物耐药; 高杰英等<sup>[29]</sup>



对某医院不同年份临床分离的 487 株粪肠球菌的耐药性进行了分析,发现对多西环素、红霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、利福平、庆大霉素等药物耐药,而且耐药率呈上升趋势;李金磊等<sup>[31]</sup>对河南省部分地区猪和鸡源粪肠球菌的耐药性分析表明,猪源的粪肠球菌对氟苯尼考和多西环素的总体耐药率分别为 79.73%和 89.86%,鸡源的分别为 19.00%和 78.00%;葛俊伟等<sup>[11]</sup>报道了水貂源粪肠球菌对多西环素、氟苯尼考、头孢曲松等药物敏感,对头孢噻肟等药物耐药。以上报道与分离株 CJ517 的耐药性既有相似性又存在差异,这种现象可能由于长期使用的抗菌药物不同所致。

粪肠球菌可以通过动物或动物性食品引起人的感染,因此,做好畜禽生产中粪肠球菌的防控是兽医工作者面临的重要课题。结合本研究,作者认为畜禽一旦疑似感染粪肠球菌,应从以下 3 方面进行防控:(1) 及时对发病畜禽和密切接触畜禽进行隔离,并全场进行消毒;(2) 及时分离鉴定病原并筛选敏感药物;(3) 用敏感药物进行治疗,同时结合提高畜禽免疫力等治疗措施。采用以上措施,本研究中的发病鸡场对粪肠球菌感染取得了较好的治疗效果,减少了损失。

## 4 结论

本研究从安徽省六安市某养鸡场病死雏鸡肝脏分离鉴定了一株粪肠球菌 CJ517,该菌株对头孢噻肟、磷霉素、丁胺卡那等药物敏感,对多西环素、氟苯尼考、卡那霉素、新霉素等药物耐药;小鼠腹腔注射 CJ517 菌悬液( $0.5 \times 10^8$  CFU/只)致死率达 66.67%;针对发病鸡群,选择头孢噻肟拌料或肌肉注射,同时饮水中添加 VC 和芪黄素,用药 2 d 后疫情好转,5 d 后得到控制。本研究结果可为临床诊断和治疗动物粪肠球菌感染提供参考。

## REFERENCES

- [1] Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci[J]. Journal of Medical Microbiology, 2007, 56(12): 1581-1588
- [2] Wei QT, Li PH, Wang H, Shi L, Niu Q, Lin MX, Wu WJ, Zhou B, Huang RH. Effect of dietary *Enterococcus faecalis* replacing of antibiotic on growth performance, diarrhea rate, humoral immunity and intestinal microflora of nursery pigs[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2014, 37(6): 143-148 (in Chinese)  
魏清甜, 李平华, 汪涵, 石磊, 牛清, 林明新, 吴望军, 周波, 黄瑞华. 粪肠球菌替代抗生素对保育仔猪生长性能、腹泻率、体液免疫指标和肠道微生物数量的影响[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(6): 143-148
- [3] Shehata AA, Tarabees R, Basiouni S, Elsayed MS, Gaballah A, Krueger M. Effect of a potential probiotic candidate *Enterococcus faecalis*-1 on growth performance, intestinal microbiota, and immune response of commercial broiler chickens[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2020, 12(2): 451-460
- [4] Tao ZY, Zhang YW, Cao ZY, Jiao GB, Zhang ZD, Liu FY, Wang J, Wang ZB. Effects of *Enterococcus faecalis* on production performance, egg quality and intestinal morphology of laying hens during the late laying period[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(5): 1421-1428 (in Chinese)  
陶振阳, 张耀文, 曹忠洋, 焦国宝, 张志丹, 刘方圆, 王杰, 王占彬. 粪肠球菌对产蛋后期蛋鸡生产性能、蛋品质及肠道组织形态的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(5): 1421-1428
- [5] Xiang YY, Yu HB, Zhou J, Yang XH, Song F, Wei YL, Ji XL. Isolation and identification of pathogenic *Enterococcus faecalis* YN771 and analysis of its biological characteristics[J]. Journal of Kunming Medical University, 2020, 41(5): 46-51 (in Chinese)  
向盈盈, 于鸿滨, 周静, 杨向红, 宋飞, 魏云林, 季秀玲. 致病性粪肠球菌 YN771 的分离鉴定及其生物学特性[J]. 昆明医科大学学报, 2020, 41(5): 46-51
- [6] Feng JG. Analysis of pathogen distribution and drug resistance of 569 urinary tract infections[J]. Journal of Binzhou Medical University, 2020, 43(2): 154-155 (in Chinese)  
冯金果. 569 株尿路感染病原菌分布及耐药分析[J]. 滨州医学院学报, 2020, 43(2): 154-155
- [7] Chen T, Liu KY, Chang HR, Shi MX, Song CJ, Meng XZ. A case of primary lumbar intervertebral space infection caused by *Enterococcus faecalis*[J]. Orthopedic Journal of China, 2019, 27(22): 2109-2111 (in Chinese)  
陈涛, 刘开宇, 常恒瑞, 石明鑫, 宋成杰, 孟宪中. 粪肠球菌致原发性腰椎间隙感染 1 例[J]. 中国矫形外科杂志, 2019, 27(22): 2109-2111
- [8] Xu HJ, Zhang J, Zhou WQ, Zhang ZF. Distribution and drug

- resistance of *Enterococci* causing bloodstream infection in 2012–2016[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2019, 29(10): 1461-1465 (in Chinese)
- 徐红静, 张静, 周万青, 张之烽. 2012–2016 年肠球菌血流感染的菌种分布与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(10): 1461-1465
- [9] Wang JQ, Zhang JH, Zeng X, Wang LK, Wu YZ, Dai YM. Isolation and identification of a pathogenic *Enterococcus faecalis* in the vagina of the sow[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2020(8): 55-58,147 (in Chinese)
- 王婧祺, 张锦华, 曾秀, 王林康, 吴允正, 戴益民. 一株母猪产道致病性粪肠球菌的分离鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(8): 55-58,147
- [10] Li B, Li HF, Liu N, Liu YW, Liu LQ, Liu JC, Zhang X, Xing X. Analysis of pathogenic bacteria of the infected chicks[J]. Chinese Veterinary Science, 2018, 48(8): 971-978 (in Chinese)
- 李博, 李慧芳, 刘娜, 刘彦威, 刘利强, 刘建钊, 张欣, 邢鑫. 出壳雏鸡感染病原菌的分析[J]. 中国兽医科学, 2018, 48(8): 971-978
- [11] Ge JW, Xia S, Zhao LL, Wei CW, Cui W, Jiang YP, Zhang P, Chen HY. Characterization of a pathogenic *Enterococcus faecalis* isolated from mink[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2015, 46(11): 28-35 (in Chinese)
- 葛俊伟, 夏爽, 赵丽丽, 魏成威, 崔文, 姜艳平, 张萍, 陈洪岩. 一株水貂源致病性粪肠球菌分离与鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(11): 28-35
- [12] Wang YB, Chen LY, Zhang HY, Liu L, Cheng JP, Cui BA. Identification and determination of virulence gene for different isolates of *E. faecalis* originated from infective piglet[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2010, 30(5): 615-619 (in Chinese)
- 王亚宾, 陈丽颖, 张红英, 刘磊, 程金平, 崔保安. 感染仔猪粪肠球菌不同分离株的鉴定及毒力基因检测[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(5): 615-619
- [13] Di TT, Gao Y, Nie X, Ma WX, Dong GJ, Zeng YR. Isolation and identification of *Enterococcus faecalis* causing geese septicemia[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2012, 34(3): 192-196 (in Chinese)
- 狄婷婷, 高原, 聂鑫, 马万欣, 董国军, 曾钰然. 致鹅败血症粪肠球菌的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(3): 192-196
- [14] Jamet E, Akary E, Poisson MA, Chamba JF, Bertrand X, Serror P. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses[J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 191-198
- [15] Guo QQ, Kong JY, Chai YJ, Huang X, Han ML, Zhang XX, Wu TZ, Zhou X, Zhong FG. Isolation and identification of pathogenic *Escherichia coli* from sheep lung[J]. Microbiology China, 2017, 44(12): 2805-2811 (in Chinese)
- 郭强强, 孔静雅, 柴迎锦, 黄新, 韩猛立, 张星星, 吴桐忠, 周霞, 钟发刚. 绵羊肺源性致病性大肠杆菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2017, 44(12): 2805-2811
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI document M02-A10 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard-eleventh edition[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012
- [17] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Translation Group of Berger's Manual for Bacterial Identification, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 661-675 (in Chinese)
- Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 8版. 北京: 科学出版社, 1984: 661-675
- [18] Lin J, Zhang JY, Wang L, Wang HR, Zou L, Zhu YG, Bian YB, Li JX, Yang ZQ, Wang XR. Assessment of VITEK2 Compact automatic microbial analysis system for *Staphylococcus* in raw milk[J]. Microbiology China, 2016, 43(11): 2514-2520 (in Chinese)
- 林杰, 张景艳, 王磊, 王海瑞, 邹璐, 朱永刚, 边亚彬, 李建喜, 杨志强, 王旭荣. VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统对牛乳中葡萄球菌的鉴定效果评价[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2514-2520
- [19] Ye HX, Li LL, Jiang LL. Application of VITEK 2 Compact microbe automatic analysis system and analysis of identification results[J]. China Medical Device Information, 2017, 23(24): 152-153,156 (in Chinese)
- 叶桦秀, 李丽丽, 江莉莉. VITEK 2 Compact 微生物全自动分析系统的应用及鉴定结果分析[J]. 中国医疗器械信息, 2017, 23(24): 152-153,156
- [20] Wu JS, Lu Z, Yang QH, Zhu ZH, Zhou C, Lin KB, Ge H. Identification and drug sensitivity analysis of pathogenic bacteria causing skin ulceration disease of *Takifugu bimaculatus*[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 522-531 (in Chinese)
- 吴建绍, 陆振, 杨求华, 朱志煌, 周宸, 林克冰, 葛辉. 双斑东方鲀皮肤溃烂症病原菌鉴定及药敏分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 522-531
- [21] Yang XP. Identification capability and application value of automatic microorganism identification drug sensitivity analyzer for clinically relevant bacteria[J]. Journal of Bengbu Medical College, 2016, 41(6): 808-810 (in Chinese)
- 杨兴萍. 全自动微生物鉴定药敏分析仪对临床相关细菌

- 的鉴定能力及应用价值[J]. 蚌埠医学院学报, 2016, 41(6): 808-810
- [22] Lv N, Gao Y. Advances in research on pathogenic factor of *Enterococcus faecalis*[J]. Journal of Inner Mongolia University for Nationalities, 2015, 30(4): 323-326 (in Chinese)
- 吕娜, 高原. 粪肠球菌致病因子的研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2015, 30(4): 323-326
- [23] Ren YL, Zhang W, Hou YN, Bo T, Shang AQ. Analysis on the drug resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* in urine isolation in a hospital in Jiaozuo[J]. Experimental and Laboratory Medicine, 2019, 37(2): 228-229,248 (in Chinese)
- 任艳利, 张伟, 侯豫娜, 薄涛, 商安全. 焦作某医院中段尿分离粪肠球菌与屎肠球菌耐药性分析[J]. 实验与检验医学, 2019, 37(2): 228-229,248
- [24] Wu YY, Zhou T, Wang Q, Dai PL, Luo QH, Song HL. Isolation and identification of *Enterococcus faecalis* in honeybee larvae[J]. Microbiology China, 2010, 37(10): 1486-1490 (in Chinese)
- 吴艳艳, 周婷, 王强, 代平礼, 罗其花, 宋怀磊. 蜜蜂幼虫粪肠球菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(10): 1486-1490
- [25] Wang XY, Ma WW, Zhou XZ. Isolation, identification, and analysis of the biological characteristics of 2 strains of *Enterococcus* from cattle[J]. Journal of Pathogen Biology, 2018, 13(8): 809-813 (in Chinese)
- 王晓禹, 马维武, 周学章. 两株牛源致病性肠球菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(8): 809-813
- [26] Sui ZF, Zhu JP, Li J, Guo LZ, Xu CT. Investigation on the infection rate of dead embryo faecal enterococcus and determination of pathogen characteristics in late incubation period[J]. China Poultry, 2018, 40(13): 50-53 (in Chinese)
- 隋兆峰, 朱俊平, 李婧, 郭龙宗, 许传田. 孵化后期死胚粪肠球菌感染率调查及病原部分特性测定[J]. 中国家禽, 2018, 40(13): 50-53
- [27] Jiang YF, Li DX, Bao XY, Li MX. Drug resistance and multi-locus sequence typing of *Enterococcus faecalis* strains isolated from pigs and chickens in Hunan province[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2020, 28(6): 102-107 (in Chinese)
- 蒋逸凡, 李岱霞, 鲍翔宇, 黎满香. 湖南省部分地区猪、鸡源粪肠球菌耐药性及多位点序列分型分析[J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(6): 102-107
- [28] Zavaryani SM, Mirnejad R, Piranfar V, Moghaddam MM, Sajjadi N, Saeedi S. Assessment of susceptibility to five common antibiotics and their resistance pattern in clinical enterococcus isolates[J]. Iranian Journal of Pathology, 2020, 15(2): 96-105
- [29] Gao JY, Wang FK, Gu J, Chen J, Gao P, Guo M, Wang JY, Cheng Y. Analysis of drug resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*[J]. Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2019, 31(11): 37-42 (in Chinese)
- 高杰英, 王缚鲲, 顾江, 陈晶, 高鹏, 郭萌, 王佳钰, 程琰. 粪肠球菌和屎肠球菌耐药性分析[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(11): 37-42
- [30] Shiadeh SMJ, Pormohammad A, Hashemi A, Lak P. Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis[J]. Infection and Drug Resistance, 2019, 12: 2713-2725
- [31] Li JL, Dong P, Di YR, Fang ZY, Gao YL, Zhou HX, Wu ZM. Isolation, identification and antimicrobial resistance analysis of *Enterococcus faecalis* from swine and chickens in some areas of Henan province[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2018, 39(4): 122-127 (in Chinese)
- 李金磊, 董鹏, 狄元冉, 方忠意, 高延玲, 周红霞, 吴志明. 河南省部分地区猪和鸡源粪肠球菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. 动物医学进展, 2018, 39(4): 122-127