

藏羊源粪肠球菌的分离鉴定与耐药性分析

陈建春

(西藏自治区昌都市卡若区农牧科技推广服务中心,西藏 昌都 854000)

摘要:分离鉴定导致昌都市卡若区牧民家中藏羊腹泻的病原菌,研究其耐药性,为发病地区藏羊腹泻病的防控提供数据支撑。从正在发生腹泻的藏羊群中采集腹泻粪便样品进行病原菌的分离培养,对分离菌进行染色镜检、生化鉴定及分子生物学鉴定,最后对分离菌进行体外药物敏感性试验。结果从7份藏羊腹泻粪便中分离到3株细菌,染色镜检为革兰氏阳性球菌,分别命名为 changdu-1、changdu-2、changdu-3。3株细菌表现出相同的生化特性,均能够分解海藻糖、麦芽糖、果糖、松三糖、蔗糖、乳糖、葡萄糖、山梨醇、甘露醇,不能分解阿拉伯糖、棉子糖、鼠李糖和木糖。提取分离菌基因组DNA,经16S rRNA PCR扩增得到长度为1500 bp左右的产物,与预期结果一致。序列同源性分析显示,3株分离株之间的同源性为100.0%,与粪肠球菌参考株之间的同源性高达99.6%~100.0%。进化树分析显示,分离株与粪肠球菌参考株处于同一分支,而与大肠杆菌、地衣芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和产气荚膜梭菌处于不同分支。3株分离株体外药物敏感性结果相似,对氧氟沙星、恩诺沙星等敏感,对复方新诺明、四环素、庆大霉素、林可霉素等耐药。

关键词:藏羊;粪肠球菌;分离鉴定;耐药性

中图分类号:S858.26

文献标识码:A

Isolation, Identification, and Drug Resistance Analysis of *Enterococcus Faecalis* from Xizang Sheep

CHEN Jianchun

(Chamdo Karuo District Agriculture and Animal Husbandry Science and Technology Promotion Service Center, Chamdo Xizang 854000, China)

Abstract: In order to isolate and identify the pathogenic bacteria that cause diarrhea in Xizang sheep in the herdsman households in Karuo District, Changdu City, and study their antibiotic resistance, providing data support for the prevention and control of diarrhea in Xizang sheep in affected areas, this study collected fecal samples from Xizang sheep suffering from diarrhea, isolated and cultured pathogenic bacteria, and performed staining microscopy, biochemical identification, and molecular biology identification to conduct in vitro drug sensitivity tests on the isolated bacteria. As a result, three strains of bacteria were isolated from seven samples of diarrhea feces from Xizang sheep, which were Gram positive cocci detected by staining microscopy. They were named changdu-1, changdu-2 and changdu-3. Three strains of bacteria exhibit the same biochemical characteristics, all capable of decomposing trehalose, maltose, fructose, trisaccharide, sucrose, lactose, glucose, sorbitol, and mannitol, but unable to decompose arabinose, raffinose, xylose, and xylose. The genomic DNA of the isolated bacteria was extracted and amplified by 16S rRNA PCR to obtain a product with a length of approximately 1500 bp, which was consistent with the expected results. The homology analysis of the 16S rRNA sequences of the isolates showed that the homology between the three isolates was 100.0%, and the homology with the reference strain of *Enterococcus faecalis* was as high as 99.6% to 100.0%. Evolutionary tree analysis shows that the isolated strain was on the same branch as the reference strain of *Enterococcus faecalis*, but on different branches from *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, and *Clostridium perfringens*. The in vitro drug sensitivity results of the three isolated strains were similar, showing sensitivity to ofloxacin, enrofloxacin, etc., but resistance to compound sulfamethoxazole, tetracycline, gentamicin, and lincomycin. The research results provided scientific guidance for the treatment of diarrheal sheep in herdsman households.

Key words: Xizang sheep; *enterococcus faecalis*; isolation and identification; drug resistance

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)也被称为粪链球菌(*Streptococcus faecalis*),是一种革兰

氏染色阳性兼性厌氧球菌,无芽孢和荚膜,是人和动物肠道内正常的菌群之一^[1]。个别粪肠球

收稿日期:2025-01-07

作者简介:陈建春(1990—),女,兽医师,主要从事高原动物疫病防控,E-mail:18981686511@163.com。

菌存在益生特性,在食品和微生态制剂领域发挥着重要作用^[2]。部分肠球菌可以产生细菌素抑制致病菌,因而有望成为替抗产品^[3]。粪肠球菌具有明显的两面性(益生性与致病性),在动物免疫力低时可以引起多种动物发病和死亡,如奶牛乳腺炎、鸡心内膜炎等多种疾病^[4]。此外,部分粪肠球菌还可与沙门氏菌、大肠杆菌等混合感染,引发动物发病死亡^[5-7]。近年来,由粪肠球菌引起人类的脑膜炎、心内膜炎、关节炎、尿道感染以及引起动物的脑膜炎、腹泻病例陆续增多,耐药性也在逐渐增强,已经成为一个严重的公共卫生问题,给畜牧业发展带来严重影响^[8]。

藏羊主产于我国青藏高原地区,是我国宝贵的畜禽种质资源,其肉质风味独特,营养丰富,是当地农牧民重要的食物来源^[9]。2024 年 4—5 月,西藏昌都市卡若区某牧民家中饲养的藏羊出现水样腹泻、食欲减退、精神沉郁等症状,经常规治疗效果不佳。本研究通过采集腹泻藏羊粪便,进行病原分离鉴定,并研究其体外药物敏感性,旨在为该病的治疗提供指导。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

培养基胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB),青岛海博生物技术有限公司;革兰氏染色试剂,珠海贝索生物技术有限公司;药敏纸片,杭州微生物试剂有限公司;微量生化反应管,青岛海博生物技术有限公司;2XTaq PCR MasterMix,上海生工。Trans2K

Plus DNA Ladder,细菌 16 S rRNA 通用引物干粉,天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 样品来源

从昌都市卡若区牧民家藏羊腹泻粪便中取样 7 份,运送回实验室后低温保存,待用。

1.3 分离培养与染色镜检

取适量藏羊腹泻粪便接种于 TSB 培养基,置于 37 °C 恒温培养箱中培养过夜,划线接种到 TSA 固体培养基上,再次恒温培养过夜,观察菌落形态,挑取单个菌落接种至 TSB 液体培养基中培养,得到待测菌液,挑取单个菌落进行革兰氏染色镜检。

1.4 生化鉴定

严格按照微量生化鉴定管说明书进行操作。

1.5 分子生物学鉴定

取 1.5 mL 菌液,提取细菌基因组 DNA,运用 16 S rRNA 基因的通用引物 27 F (5'-AGAGTTTGTGATCCTGGCTCAG-3')、1 492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增反应。PCR 反应体系 50 μL: 2 × Taq PCR Mix 25 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 2 μL, ddH₂O 21 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 32 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用凝胶成像系统获得 PCR 扩增结果。将扩增产物送至天根生化科技(北京)有限公司测序,通过 DNA Star 软件进行序列比对分析,构建系统进化树。参考菌株信息见表 1。

表 1 参考菌株信息

物种	菌株	登录号	宿主	国家
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	B5-M-100	OK271645.1	人类粪便	韩国
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	JCM 20381	LC311736.1		日本
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	28157_4 # 209	LR962792.1		荷兰
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	Y13	OP216752.1		中国
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	VE18379	CP039548.1	人	法国
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	M1-6-2	MT509927.1	蜜蜂	中国
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	S4.46	ON479009.1		阿尔及利亚
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	003	OQ405950.1		中国
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	VSE-WC032	CP092574.1	人类直肠	美国
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	N1021	OR018315.1	中肠	俄罗斯
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	ATCC14579	AF290547.1	土壤	美国
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	U 5/41	NR024570.1	尿液	美国
地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	AD6	OL757865.1	德贝德河	尼美尼亚
产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringens</i>	W16-2	KP944155.1	脓液	中国

1.6 药物敏感性试验

采用纸片扩散法(Kirly-Baue法),选取氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、复方新诺明、多粘菌素 B、四环素、多西环素、氯霉素、红霉素、万古霉素、庆大霉素、林可霉素、卡那霉素、青霉素、头孢哌酮、氨苄西林 16 种抗菌药进行分离菌体外药物敏感性试验。

2 结果与分析

2.1 分离纯化与形态观察

从 7 份藏羊腹泻粪便中,分离到 3 株细菌,分离株经革兰氏染色,镜检为革兰氏阳性球菌,并命名为 changdu-1、changdu-2、changdu-3。

2.2 生化鉴定

3 株细菌表现出相同的生化特性,均能够分解海藻糖、麦芽糖、果糖、松三糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、乳糖、葡萄糖,不能分解阿拉伯糖、棉子糖、鼠李糖和木糖,结果见表 2。

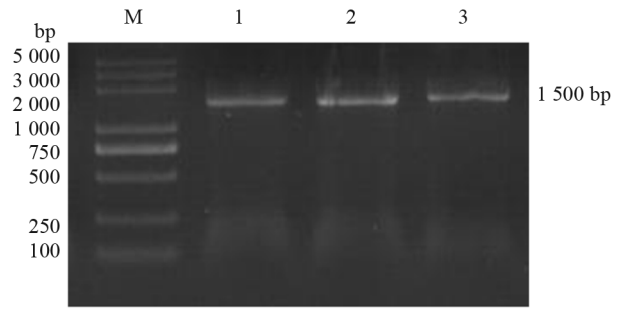
表 2 生化鉴定结果

项目	分离株		
	Changdu-1	Changdu-2	Changdu-3
海藻糖	+	+	+
麦芽糖	+	+	+
果糖	+	+	+
松三糖	+	+	+
阿拉伯糖	-	-	-
棉子糖	-	-	-
鼠李糖	-	-	-
木糖	-	-	-
蔗糖	+	+	+
山梨醇	+	+	+
甘露醇	+	+	+
乳糖	+	+	+
葡萄糖	+	+	+

注: + 为阳性, - 为阴性。

2.3 16 S rRNA PCR 鉴定结果

分离株 16 S rRNA PCR 扩增产物电泳结果与预期结果一致,长度为 1 500 bp 左右(图 1)。



注:M 为 DL5000 DNA Marker;

1~3 为分离株 changdu-1~changdu-3。

图 1 分离株 16 S rRNA 电泳图

2.4 序列分析

通过 DNA Star 软件进行核酸序列比对分析发现(图 2),3 株分离株之间的同源性为 100.0%,与粪肠球菌参考株之间的同源性高达 99.6%~100.0%,与大肠杆菌(NR024570.1)参考株的同源性为 67.2%,与产气荚膜梭菌(KP944155.1)参考株的同源性为 73.8%,与蜡样芽孢杆菌(AF290547.1)参考株的同源性为 88.7%,与地衣芽孢杆菌(OL757865.1)参考株的同源性为 87.4%。

进化树(图 3)显示,分离株 changdu-1、changdu-2、changdu-3 与粪肠球菌参考株处于同一分支,而与大肠杆菌、地衣芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和产气荚膜梭菌处于不同分支。

2.5 药物敏感性试验

药物敏感性试验结果见表 3,分离株 changdu-1 对氧氟沙星、恩诺沙星、氯霉素、万古霉素、卡那霉素、青霉素和氨苄西林敏感,对环丙沙星、多西环素、头孢哌酮中度敏感,对复方新诺明、多粘菌素 B、四环素、红霉素、庆大霉素、林可霉素耐药;分离株 changdu-2 对氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、氯霉素、万古霉素、卡那霉素敏感,对四环素、红霉素、青霉素、头孢哌酮中度敏感,对复方新诺明、多粘菌素 B、多西环素、庆大霉素、林可霉素和氨苄西林耐药;分离株 changdu-3 对氧氟沙星、恩诺沙星、万古霉素、卡那霉素、青霉素、头孢哌酮敏感,对环丙沙星、多粘菌素 B、多西环素、氯霉素、红霉素、氨苄西林中度敏感,对复方新诺明、四环素、庆大霉素、林可霉素耐药。

		PercentIdentity																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
Divergence	1	100.0	100.0	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	67.2	88.7	87.4	73.8	1	changdu-1
	2	0.0	100.0	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	67.2	88.7	87.4	73.8	2	changdu-2
	3	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	67.9	89.2	87.8	73.2	3	changdu-3
	4	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	67.0	88.7	87.3	73.8	4	<i>Enterococcus faecalis</i> (CP092574.1)
	5	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	67.0	88.7	87.3	73.8	5	<i>Enterococcus faecalis</i> (LC311736.1)
	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	67.0	88.7	87.3	73.8	6	<i>Enterococcus faecalis</i> (LR962792.1)
	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	67.0	88.7	87.3	73.8	7	<i>Enterococcus faecalis</i> (MT509927.1)
	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	67.0	88.7	87.3	73.8	8	<i>Enterococcus faecalis</i> (OK271645.1)
	9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	67.0	88.7	87.3	73.8	9	<i>Enterococcus faecalis</i> (ON479009.1)
	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	67.0	88.7	87.3	73.8	10	<i>Enterococcus faecalis</i> (OP216752.1)
	11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	67.0	88.7	87.3	73.8	11	<i>Enterococcus faecalis</i> (OP039548.1)
	12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	67.0	88.7	87.3	73.8	12	<i>Enterococcus faecalis</i> (OQ405950.1)
	13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	67.0	88.7	87.3	73.8	13	<i>Enterococcus faecalis</i> (OR018315.1)	
	14	27.2	27.2	26.2	27.3	27.3	27.3	27.3	27.3	27.3	27.3	27.3	27.3	27.3	27.3	66.6	67.3	67.5	14	<i>Escherichia coli</i> (NR024570.1)
	15	9.7	9.7	9.4	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	26.3	91.2	73.3	15	<i>Bacillus cereus</i> (AF290547.1)
	16	9.6	9.6	9.7	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	26.7	6.6	74.1	16	<i>Bacillus licheniformis</i> (OL757865.1)
	17	18.2	18.2	17.8	18.3	18.3	18.3	18.3	18.3	18.3	18.3	18.3	18.3	18.3	18.3	27.9	20.0	18.8	17	<i>Clostridium perfringens</i> (KP944155.1)

图2 同源性比对

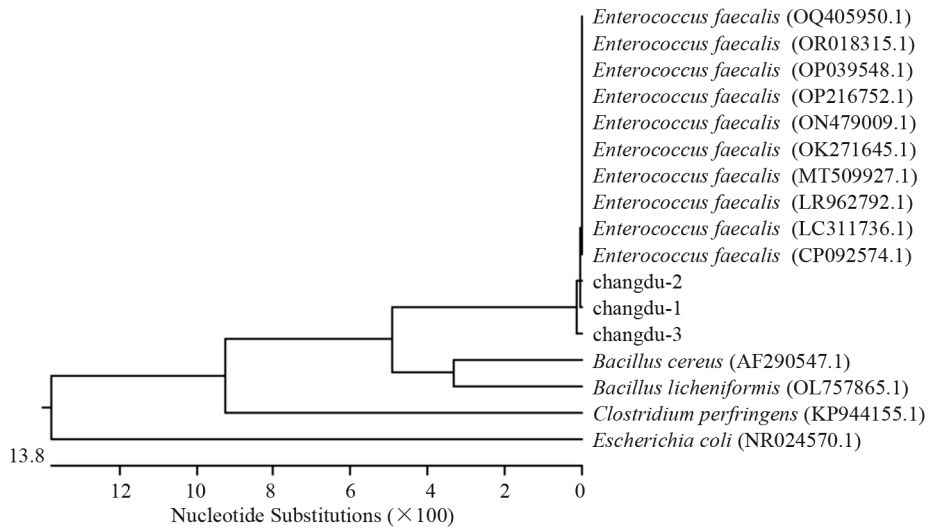


图3 进化树

表3 耐药性结果表

药物名称	分离株		
	changdu-1	changdu-2	changdu-3
氧氟沙星	S	S	S
恩诺沙星	S	S	S
环丙沙星	I	S	I
复方新诺明	R	R	R
多粘菌素 B	R	R	I
四环素	R	I	R
多西环素	I	R	I
氯霉素	S	S	I
红霉素	R	I	I
万古霉素	S	S	S
庆大霉素	R	R	R
林可霉素	R	R	R
卡那霉素	S	S	S
青霉素	S	I	S
头孢哌酮	I	I	S
氨苄西林	S	R	I

注:S为敏感,I为中度敏感,R为耐药。

3 讨论与结论

粪肠球菌是人和动物肠道的正常菌群,也是重要的人畜共患条件致病菌^[10]。由于抗菌药物的广泛使用,粪肠球菌的耐药性不断增加,引起的动物疾病也日益增多^[11]。夏伦斌等^[12]从具有昏睡、瘫痪或共济失调等症状的雏鸡内脏中分离出致病性粪肠球菌,对小鼠致死率为 66.67%。2020年,阿迪莱·卡哈曼等^[13]从新疆南疆某羊场陆续死亡的 8 只羔羊的肺、脾、肝、肾、心等组织中分离到致病性的粪肠球菌和金黄色葡萄球菌。林倩颖^[14]从 320 只疑似感染粪肠球菌的羊肝、肺等病变组织中分离出了 108 株粪肠球菌,分离株对小鼠的致死率达 100%。

肠球菌耐药机制复杂,不仅对氨基糖苷类、头孢类抗菌药物具有固有耐药,还可以作为肠道中其他致病菌耐药基因的“蓄水池”,促进耐药性

的传播^[15]。陈万昭等^[16]从新疆9个区县养殖场猪、牛、羊、骆驼、鸡和鸽的粪样中分离到242株粪肠球菌,这些粪肠球菌对红霉素、四环素、利福平和多西环素的耐药率均高达80%,对恩诺沙星和氟苯尼考敏感性较高,未检出万古霉素和氨苄西林的耐药菌株。徐琦琦等^[17]的研究结果显示,羊源粪肠球菌对红霉素、四环素、氟苯尼考、多西环素的耐药率均大于75.0%,显著高于鸡源和牛源粪肠球菌($p < 0.05$)。钟锐等^[18]从四川某动物园病死浣熊肝脏中分离到的粪肠球菌对头孢西丁、头孢哌酮、头孢曲松、头孢吡肟、头孢噻肟、氨苄西林、卡那霉素、链霉素、奈替米星、丁胺卡那、阿奇霉素、红霉素、多西环素、四环素耐药,仅对万古霉素和庆大霉素中度敏感。本次研究结果显示,3株藏羊源粪肠球菌对氧氟沙星、恩诺沙星等敏感,对复方新诺明、庆大霉素、林可霉素等耐药,与陈万昭等^[16]和钟锐等^[18]的研究结果类似。研究结果再次表明,藏羊源粪肠球菌具有较强的耐药性。

粪肠球菌属条件致病菌,预防其感染:1)加强饲养管理,保证洁净的饲料和饮水,及时清除圈舍里的粪便,保持圈舍内环境干燥,安排专人定时消毒,夏季做到通风防暑,冬季做到保暖防冻;2)注意引种安全,做好隔离和监测,如有发病羊只及时采取治疗和控制手段^[14]。此外,应加强产后母羊和羔羊的饲养管理,做到保温、防风,保证充足的饲料和饮水,以增强羊只免疫力,降低粪肠球菌等致病菌的发生几率。

本研究检测发现昌都市卡若区牧民家养藏羊源粪肠球菌对氧氟沙星、恩诺沙星等敏感,对复方新诺明、庆大霉素、林可霉素等耐药,因此建议相关地区加强抗菌药物的规范合理使用,结合本次试验中的药物敏感性结果,进行科学合理的抗生素治疗。

参考文献:

- [1] 宋乐辉.鸡源性粪肠球菌的分离及益生特性研究[D].南昌:江西农业大学,2023.
- [2] 沈婷婷,马昕玮,路镜达,等.基于比较基因组学研究粪肠球菌乳源分离株的安全性[J].中国食品学报,

2024,24(5):359-372.

- [3] 车笑吟,涂会鑫,杨舒涵,等.产细菌素粪肠球菌 EF-3 的分离鉴定及其细菌素理化特性[J].中国兽医杂志,2023,59(9):73-76.
- [4] 王赞嘉.奶牛乳腺炎粪肠球菌溶血素 *cylA* 基因逃逸奶牛巨噬细胞完全吞噬功能的分子机制研究[D].通辽:内蒙古民族大学,2023.
- [5] 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].家畜生态学报,2023,44(10):82-88.
- [6] 王子煜,焦哲.1例斑鸠大肠杆菌和粪肠球菌混合感染的诊断[J].中兽医学杂志,2023(1):64-66.
- [7] 张佰莲,马珺,刘群秀.卷羽鹈鹕源大肠埃希菌和粪肠球菌的分离及耐药性试验[J].野生动物学报,2021,42(3):795-800.
- [8] 曹梦园,陈明杰,王晨豫,等.粪肠球菌感染小鼠的脑组织病理学观察及转录组学差异分析[J].畜牧兽医学报,2022,53(9):3160-3171.
- [9] 赵建,赵鑫盛,王雷,等.发酵全混合日粮对藏羊营养物质表观消化率、血清生化指标、屠宰性能及肉品质的影响[J].动物营养学报,2024,36(8):5217-5228.
- [10] 姬晶晶,刘娜,刘彦威,等.鸡粪肠球菌感染的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2020(13):52-54.
- [11] 慈洋,史晓洁,宋鹏,等.毛皮动物源粪肠球菌的分离鉴定[J].中国畜牧兽医,2020,47(9):2997-3005.
- [12] 夏伦斌,郑秋润,陈存武,等.雏鸡源致病性粪肠球菌的分离鉴定及其耐药性分析[J].微生物学通报,2021,48(5):1626-1636.
- [13] 阿迪莱·卡哈曼,伍麦尔·麦海提,布帕提买木·麦麦提,等.绵羊羔羊金黄色葡萄球菌与粪肠球菌混合感染的研究[J].现代畜牧兽医,2021(8):55-59.
- [14] 林倩颖.保定地区羊源致病性粪肠球菌感染的流行病学调查及治疗[D].保定:河北农业大学,2022.
- [15] 陈万昭,轩慧勇,宋超慧,等.新疆昌吉地区某规模化猪场不同日龄猪源粪肠球菌耐药性及耐药基因分析[J].动物医学进展,2021,42(9):126-131.
- [16] 陈万昭,陈月月,易海波,等.新疆动物源粪肠球菌的耐药性分析与耐药基因检测[J].中国农业大学学报,2022,27(2):110-119.
- [17] 徐琦琦,陈月月,李宏博,等.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.
- [18] 钟锐,何廷美,毕波,等.浣熊源粪肠球菌的分离鉴定与耐药性分析[J].中国畜牧兽医,2021,48(3):1112-1120.