

研究报告

羊源粪肠球菌多位点序列分型及其耐药特性和毒力基因检测分析

邓亚飞^{1,2}, 吴佳颖^{1,2}, 张留君^{1,2}, 闫康^{1,2}, 辛洪雷³, 贺绍君^{*1,2}

1 安徽科技学院 动物科学学院, 安徽 凤阳 233100

2 动物营养调控与健康安徽省重点实验室, 安徽 凤阳 233100

3 临泉县中原牧业发展中心, 安徽 临泉 236400

邓亚飞, 吴佳颖, 张留君, 闫康, 辛洪雷, 贺绍君. 羊源粪肠球菌多位点序列分型及其耐药特性和毒力基因检测分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3070-3084.

DENG Yafei, WU Jiaying, ZHANG Liujun, YAN Kang, XIN Honglei, HE Shaojun. Multilocus sequence typing, antibiotic resistance, and virulence genes of *Enterococcus faecalis* from sheep[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3070-3084.

摘要: 【背景】粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)作为一种普遍存在的条件致病菌, 能引起严重感染, 并能作为高耐药/毒力因子的储存和传播者对公共安全造成严重威胁。【目的】掌握安徽地区羊源粪肠球菌 ST 型分布特征及耐药、毒力特性, 并分析其耐药基因、毒力基因与 ST 型之间的相关性, 评估其潜在致病性及对公共卫生的危害性。【方法】以 2021–2023 年采集自安徽地区的 64 份羊直肠棉拭子为样本对粪肠球菌进行分离鉴定, 采用多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)方法对菌株进行分型鉴定, Kirby-Bauer (K-B)纸片扩散法测定粪肠球菌对 16 种抗菌药物的敏感性, 并检测 9 种耐药基因及 14 种毒力基因的分布。【结果】共分离得到 61 株粪肠球菌, 鉴定为 24 种 ST 型, 其中 9 种为新发现 ST 型; 奈替米星(72.13%)、丁胺卡那(75.41%)、四环素(55.74%)和红霉素(63.93%)的耐药比例最高, 少数对万古霉素(9.84%)、利奈唑胺(11.48%)耐药, 多重耐药(multi-drug resistance, MDR)率为 57.38%; 耐药基因 *ermB* (77.05%)、*aac(6')/aph(2')* (52.46%)、*tem* (55.74%)的携带率最高, *vanC* (8.20%)、*mefA* (1.64%)的携带率最低; 毒力基因 *cpd* (100%)、*efaA* (98.36%)、*ebp* (95.08%)和 *fsr* (81.97%)的携带率最高, *hyl* (11.48%)的携带率最低; 部分耐药基因、毒力基因的分布在不同 ST 型之间具有显著差异($P < 0.05$)。【结论】羊源粪便粪肠球菌中携带高耐药和高水平毒力基因, 且耐药特性及毒力的分布与 ST 型有着较高的相关性。

关键词: 粪肠球菌; 多位点序列分型; 耐药特性; 毒力基因

资助项目: 安徽省教育厅自然科学研究重大项目(2023AH040282); 安徽省现代农业产业技术体系建设专项资金([2022]10); 乡村振兴专项项目(2021XCZX05)

This work was supported by the Major Natural Science Research Program of Department of Education of Anhui Province (2023AH040282), the Special Fund for the Construction of Modern Agricultural Industry Technology System in Anhui Province ([2022]10), and the Special Fund for Rural Revitalization (2021XCZX05).

*Corresponding author. E-mail: shaojunhe2011@126.com

Received: 2023-11-11; Accepted: 2023-12-11; Published online: 2024-02-27

Multilocus sequence typing, antibiotic resistance, and virulence genes of *Enterococcus faecalis* from sheep

DENG Yafei^{1,2}, WU Jiaying^{1,2}, ZHANG Liujuan^{1,2}, YAN Kang^{1,2}, XIN Honglei³, HE Shaojun^{*1,2}

1 College of Animal Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, Anhui, China

2 Anhui Province Key Laboratory of Animal Nutrition Regulation and Health, Fengyang 233100, Anhui, China

3 Zhongyuan Animal Husbandry Development Center of Linqun County, Linqun 236400, Anhui, China

Abstract: [Background] As a common opportunistic pathogen, *Enterococcus faecalis* can cause severe infections and pose a serious threat to public safety as a carrier of high resistance/virulence factors. [Objective] To master the sequence type (ST) distribution, antibiotic resistance, and virulence of sheep-derived *E. faecalis* strains in Anhui Province, analyze the correlations of antibiotic resistance and virulence genes with ST, and evaluate the potential threat to the public health. [Methods] *E. faecalis* was isolated from 64 sheep anal swab samples collected from Anhui during 2021–2023. Multilocus sequence typing (MLST) was employed to classify and identify the isolates. Kirby Bauer (K-B) test was carried out to determine the sensitivity of *E. faecalis* isolates to 16 antibiotics. Furthermore, the distribution of 9 resistance genes and 14 virulence genes was tested. [Results] A total of 61 strains of *E. faecalis* were isolated and identified as 24 STs, of which 9 were newly discovered STs. Most of the strains showed resistance to netilmicin (72.13%), amikacin (75.41%), tetracycline (55.74%), and erythromycin (63.93%). A few strains were resistant to vancomycin (9.84%) and linezolid (11.48%). And the multi-drug resistance (MDR) rate was 57.38%. The carrier rates of resistance genes *ermB* (77.05%), *aac(6')/aph(2')* (52.46%), and *tem* (55.74%) were high, while those of *vanC* and *mefA* were low at 8.20% and 1.64%, respectively. The carrying rates of virulence genes *cpd* (100%), *efaA* (98.36%), *ebp* (95.08%), and *fsr* (81.97%) were high, while it was the lowest for *hyl* (11.48%). The distribution of some resistance and virulence genes showed differences among different STs ($P < 0.05$). [Conclusion] *Enterococcus faecalis* from sheep feces carry high resistance and high virulence genes, and the distribution of resistance and virulence is highly correlated with STs.

Keywords: *Enterococcus faecalis*; multilocus sequence typing; resistance characteristics; virulence genes

肠球菌(*Enterococcus* sp.)是人类和动物消化道、泌尿生殖道中的共生菌^[1]。特定的遗传特征(耐药/毒力基因)决定肠球菌是获得性感染中极其重要的一类细菌^[2]，在医院获得性感染中，仅次于链球菌(*Streptococcus* sp.)和葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.)。同时，伴随着肠球菌感染动物致病和死亡的报道不断增多、其自身耐药

性不断增强，由肠球菌引发的动物感染给养殖业也带来了极大的危害。肠球菌引发的感染大多数是由粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)所造成^[3]，粪肠球菌在各类感染中占比高，存在于心内膜炎、菌血症、败血症、腹膜炎与脑膜炎等多种疾病^[3-4]。粪肠球菌对几种常见抗生素如头孢菌素等具有

天然的耐药性^[5], 并且易于借助可移动遗传元件(质粒或转座子)获得耐药基因, 同时, 该菌还能够向其他共生甚至致病菌传播抗性基因^[5-6], 这导致临床上多重耐药(multi-drug resistance, MDR)粪肠球菌的大量出现^[7]。相较于屎肠球菌, 粪肠球菌具有更高、更广泛的毒力因子^[1,3]。另外, 由于抗生素在人类和动物中的广泛使用, MDR 粪肠球菌、耐万古霉素肠球菌(vancomycin-resistant *Enterococcus*, VRE)和耐高浓度氨基糖苷类抗生素(high-level aminoglycoside resistance, HLAR)的肠球菌等在选择性压力下出现的频率高、速度快^[8], 对公共卫生安全造成严重威胁^[9]。

多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)具有很高的分辨率和可重复性, 对于理解全球流行病学、基因进化和种群结构至关重要^[10]。尽管粪肠球菌的致病机理目前尚不完全清楚, 但已证实毒力因子在致病过程中发挥主要作用。考虑到这 2 种特性(耐药/毒力)的形成涉及大量基因的获得和突变现象, 耐药和/或毒力的基因分析不应成为证明单个菌株基因组异质性的唯一工具^[11]。因此, 本研究通过对羊源粪肠球菌的 MLST 鉴定及耐药特性、毒力基因的检测, 以期探明羊源粪肠球菌在本地区的种群结构分布, 并评估生产动物源粪肠球菌作为菌株库所构成的潜在威胁。同时通过统计学软件对 ST 型和耐药、毒力特性分布之间的关联性进行统计分析, 以说明 ST 型与菌株耐药和/或毒力强弱的代表性关系。

1 材料与方 法

1.1 材料

64 份羊直肠棉拭子采自安徽地区羊场。SPF 级 KM 小鼠(体重 18-22 g)购于河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 小鼠实验获得实验动物伦理委员会批准(ASTU2023004)。Pfizer 选择性肠球菌(Pfizer selective *Enterococcus*, PSE)

琼脂培养基和脑心浸出液(brain heart infusion, BHI)琼脂, 广东环凯微生物科技有限公司; 生化鉴定管和药敏试纸片, 杭州滨和微生物试剂有限公司; DL2000 DNA Marker 和 2×SanTaq PCR Mix (Dye Plus), 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 细菌的分离和鉴定

用灭菌生理盐水稀释直肠棉拭子样本, 取稀释液划线于 PSE 琼脂, 37 °C 培养 24 h 后挑取特征菌落接种于 BHI 琼脂进行纯化, 对纯化菌株进行革兰氏染色、镜检, 对确认为革兰阳性球菌进行生化鉴定。挑取符合粪肠球菌生化特征的菌株, 以 200 μL TE 稀释, 采用煮沸法提取菌株 DNA, 对 16S rRNA 基因进行扩增、测序, 所用引物序列为上游引物 F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3')和下游引物 R (5'-GGTTAACC TTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系: 2×SanTaq PCR Mix 12.5 μL, 上、下游引物(0.4 μmol/L)各 1 μL, 细菌 DNA 模板(8 ng/μL) 2 μL, 超纯水 8.5 μL, 总体积为 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 60 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。通过 NCBI 数据库比对鉴定。

1.3 MLST 检测

对 PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecalis>)数据库所给出的 7 个管家基因进行扩增并测序, 引物见表 1。PCR 反应体系: 2×SanTaq PCR Mix (Dye Plus) 12.5 μL, 上、下游引物(0.4 μmol/L)各 1 μL, 模板(来源于 1.2, 8 ng/μL) 3 μL, ddH₂O 补足 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 60 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。将扩增产物在 110 V 条件下经 2%琼脂糖凝胶电泳 30 min, 选择阳性样本送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 MLST 扩增基因引物

Table 1 Primer of MLST amplification genes

Primer	Sequence (5'→3')	Product length (bp)
<i>gdh</i> -F	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530
<i>gdh</i> -R	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
<i>gyd</i> -F	CAAACCTGCTTAGCTCCAATGGC	395
<i>gyd</i> -R	CATTTTCGTTGTCATACCAAGC	
<i>pstS</i> -F	CGGAACAGGACTTTTCGC	583
<i>pstS</i> -R	ATTTACATCACGTTTCTACTTGC	
<i>gki</i> -F	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG	438
<i>gki</i> -R	ACCATTAAAGCAAATGATCGC	
<i>aroE</i> -F	TGGAAAACCTTTACGGAGACAGC	459
<i>aroE</i> -R	GTCCTGTCCATTGTTCAAAAAGC	
<i>xpt</i> -F	AAAATGATGGCCGTGTATTAGG	456
<i>xpt</i> -R	AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	
<i>yqiL</i> -F	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG	436
<i>yqiL</i> -R	GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	

将所得序列在 *Enterococcus faecalis* MLST 数据库进行查询比对, 将不同的等位基因编号分配给每个不同的序列, 按照 *gdh*、*gyd*、*pstS*、*gki*、*aroE*、*xpt*、*yqiL* 的顺序对应 7 个数字, 通过已公布的方案分析得到菌株 ST 型。使用 BioNumerics 软件通过非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)和分类相似系数, 生成包括等位基因图谱的 MLST 树状图。

1.4 药敏试验

采用 K-B 纸片扩散法进行药敏试验, 用无菌涂布棒粘取适量粪肠球菌均匀涂布于 BHI 琼脂, 然后均匀地贴上药敏纸片(青霉素、氨苄西林、头孢噻吩、头孢哌酮、头孢西丁、四环素、红霉素、奈替米星、丁胺卡那、万古霉素、利奈唑胺、复方新诺明、氨曲南、多黏菌素 B/黏菌素、林可霉素和恩诺沙星), 37 °C 培养 24 h, 观察记录结果。依据美国临床实验室标准化协会(Clinical Laboratory Standardization, CLSI, 2020)^[12]的标准判定。采用 BioNumerics 软件生

成耐药谱树状图, 分析与 ST 型关系。

1.5 耐药基因检测

由生工生物工程(上海)股份有限公司合成 9 对耐药基因引物(表 2), 包括耐药基因 β -内酰胺酶 *tem*; 大环内酯类 *ermB*、*mefA*; 四环素类 *tetM*; 高水平氨基糖苷类 *aac(6')*/*aph(2')*、*ant(6)-I*; 糖肽类 *vanA*、*vanB*、*vanC*, 部分引物参考自文献[13-14]。PCR 反应体系同 1.3。将扩增产物在 110 V 条件下经 2%琼脂糖凝胶电泳 30 min。采用 BioNumerics 软件生成 MLST 树状图, 分析耐药基因谱与 ST 型关系。

1.6 毒力基因检测

由生工生物工程(上海)股份有限公司合成 14 对毒力基因引物: *efaA*、*ace*、*asa1*、*esp*、*acm*、*ebpA*、*ebpB*、*ebpC*、*srtC*、*cpd*、*gelE*、*fsr*、*hyl* 和 *cylA*, 引物见表 3, 部分引物参考文献[15]。PCR 反应体系同 1.3。将扩增产物在 110 V 条件下经 2%琼脂糖凝胶电泳 30 min。MLST 树状图分析毒力基因谱与 ST 型关系。

1.7 致病性试验

选取 ST 型优势株 ST1291、携带最多毒力基因数目的菌株 ST180、ST479, 以及最少毒力基因的菌株 ST414、ST1061, 将 5 株粪肠球菌分别接种于 BHI 琼脂, 37 °C 培养 24 h 后挑取单菌落接种于 BHI 液体培养基, 37 °C、180 r/min 振荡培养 18 h。平板菌落计数法测定菌液浓度。

取 48 只 18-22 g 的 SPF 级 KM 小鼠, 随机均分至 6 个清洁干燥的笼中, 5 组试验组分别腹腔注射 0.2 mL 菌液, 菌液浓度设为 3.79×10^9 CFU/mL^[16], 对照组腹腔注射 0.2 mL 无菌 PBS。接种后隔离饲养, 每日定时观察小鼠精神状态, 记录发病和死亡情况。无菌剖检死亡小鼠, 取不同组织器官进行细菌的分离和鉴定。

1.8 统计分析

使用 IBM SPSS Statistics 21 软件进行统计

表 2 耐药基因引物序列、反应条件及产物长度

Table 2 Primer sequence, reaction condition, and product length of antibiotic resistant genes

Primer	Sequence (5'→3')	Annealing	Extension	Product length (bp)
<i>tetM</i> -F	GTGTGACGAACTTTACCGAA ^[13]	56 °C 30 s	72 °C 30 s	501
<i>tetM</i> -R	CCTGGTCAACTTGTGCAACTG ^[13]		(30 cycles)	
<i>ermB</i> -F	GAAAAGGTACTAAACCAAATA ^[13]	56 °C 30 s	72 °C 60 s	616
<i>ermB</i> -R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC ^[13]		(30 cycles)	
<i>aac(6')/aph(2')</i> -F	CCAAGAGCAATAAGGGCATA ^[13]	58 °C 30 s	72 °C 30 s	220
<i>aac(6')/aph(2')</i> -R	CACTATCATAACCACTACCG ^[13]		(30 cycles)	
<i>ant(6)-I</i> -F	ACTGGCTTAATCAATTTGGG	58 °C 30 s	72 °C 60 s	597
<i>ant(6)-I</i> -R	GCCTTTCGCCACCTCACCG		(30 cycles)	
<i>mefA</i> -F	ACTATCATTAACTACTAGTGC	58 °C 30 s	72 °C 30 s	346
<i>mefA</i> -R	TTCTTCTGGTACTAAAGTGG		(30 cycles)	
<i>vanA</i> -F	CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA ^[14]	54 °C 30 s	72 °C 60 s	1 030
<i>vanA</i> -R	CCCCTTAAACGCTAATACGATCAA ^[14]		(30 cycles)	
<i>vanB</i> -F	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA ^[14]	54 °C 30 s	72 °C 30 s	433
<i>vanB</i> -R	CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA ^[14]		(30 cycles)	
<i>vanC</i> -F	CGGGGAAGATGGCAGTAT ^[14]	54 °C 30 s	72 °C 30 s	484
<i>vanC</i> -R	CGCAGGGACGGTGATTTT ^[14]		(30 cycles)	
<i>tem</i> -F	AGGAAGAGTATGATTCAACA	51 °C 30 s	72 °C 60 s	535
<i>tem</i> -R	CTCGTCGTTTGGTATGGG		(30 cycles)	

分析,用 Spearman 相关系数检验耐药表型与耐药基因之间的相关性,用单样本 *t* 检验方法分析单个耐药、毒力基因在不同 ST 型中携带率的统计学差异, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离和鉴定结果

粪肠球菌在 PSE 琼脂上为黑色圆形小菌落,镜检为革兰氏阳性球菌,生化鉴定甘露醇、山梨醇、蔗糖、精氨酸双水解酶和海藻糖阳性,色素、山梨糖、阿拉伯糖、木糖和鼠李糖阴性,最后通过 16S rRNA 基因扩增测序(图 1),经 NCBI 数据库比对后确定分离得到 61 株粪肠球菌。

2.2 MLST 检测结果

61 株粪肠球菌共分为 24 种 ST 型(图 2),其中菌株 ST1291 (18.03%, 11/61)、菌株 ST1061

(13.11%, 8/61)为优势群,9 种为 PubMLST 数据库未登记类型,已上传至 PubMLST 数据库并获得分配 ST 型,分别为 ST1631、ST1632、ST1633、ST1634、ST1635、ST1636、ST1637、ST1638 和 ST1639。

图 2 为采用 BioNumerics 软件计算生成的树状图,可从树状图及等位基因图谱的成对差异矩阵中获得 61 株粪肠球菌 ST 型之间的相关性,优势株 ST1291 与 ST72 具有较近的亲缘关系,ST1061 与 ST1632、ST1634、ST1635、ST1638 具有较近的亲缘关系,ST506 单为一支。

2.3 药敏试验结果

粪肠球菌天然耐药,如头孢西丁、复方新诺明、氨基糖苷类、多黏菌素 B/黏菌素和林可霉素对其均无抗菌活性,符合预期结果,而头孢噻吩、头孢哌酮则表现出了一定的体外抗菌活性。万古

表3 毒力基因引物序列、反应条件及产物长度

Table 3 Primer sequence, reaction condition, and product length of virulence genes

Primer	Sequence (5'→3')	Annealing	Extension	Product length (bp)
<i>efaA</i> -F	CTACTAACACGTCACGAATG	55 °C 30 s	72 °C 30 s (30 cycles)	499
<i>efaA</i> -R	CGTGAGAAAGAAATGGAGGA			
<i>ace</i> -F	AAAGTAGAATTAGATCCACAC	56 °C 30 s	72 °C 30 s (30 cycles)	320
<i>ace</i> -R	TCTATCACATTTCGGTTGCG			
<i>asaI</i> -F	GCACGCTATTACGAACTATGA ^[15]	56 °C 30 s	72 °C 30 s (30 cycles)	375
<i>asaI</i> -R	TAAGAAAGAACATCACCACGA ^[15]			
<i>esp</i> -F	AGATTTCATCTTTGATTCTTG ^[15]	56 °C 30 s	72 °C 60 s (30 cycles)	510
<i>esp</i> -R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG ^[15]			
<i>acm</i> -F	GGCTAGTCGTTACAAATGAG	58 °C 30 s	72 °C 60 s (30 cycles)	655
<i>acm</i> -R	ATTTTATTCTTTTGATTTCAGTC			
<i>ebpA</i> -F	CCGCTCGAGAATAACAAAATGATTCGGCTCCAG	68 °C 30 s	72 °C 60 s (30 cycles)	1 064
<i>ebpA</i> -R	CCGCTCGAGCCATCTCACGCATTTTATCTTCAACT			
<i>ebpB</i> -F	CCGCTCGAGCTGAAGGAAAACGGTCCAA	70 °C 30 s	72 °C 60 s (30 cycles)	530
<i>ebpB</i> -R	CCGCTCGAGCTTTTTCGTCGTCAGTGTGT			
<i>ebpC</i> -F	CCGGAATTCTGATAAATATCAAGGACTGGCAGA	65 °C 30 s	72 °C 60 s (30 cycles)	963
<i>ebpC</i> -R	CGGGGTACCTAAGCATACTCTCCAGAAGTCACG			
<i>srtC</i> -F	ACACCAAAGAAATGGCTGAA	49.5 °C 30 s	72 °C 30 s (30 cycles)	273
<i>srtC</i> -R	TCGCACCACCTGTAGGATAG			
<i>cpd</i> -F	TGGTGGGTTATTTTCAATTC	56 °C 30 s	72 °C 60 s (30 cycles)	782
<i>cpd</i> -R	TACGGCTCTGGCTTACTA			
<i>gelE</i> -F	TATGACAATGCTTTTTGGGAT ^[15]	56 °C 30 s	72 °C 30 s (30 cycles)	213
<i>gelE</i> -R	AGATGCACCCGAAATAATATA ^[15]			
<i>fsr</i> -F	CGCCAGAGATTTACCTGACT	56 °C 30 s	72 °C 30 s (30 cycles)	218
<i>fsr</i> -R	ATGACGAAACATCGCTAGCTCT			
<i>hyl</i> -F	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG ^[15]	56 °C 30 s	72 °C 30 s (30 cycles)	276
<i>hyl</i> -R	GACTGACGTCCAAGTTTCCAA ^[15]			
<i>cylA</i> -F	ACTCGGGGATTGATAGGC ^[15]	56 °C 30 s	72 °C 60 s (30 cycles)	688
<i>cylA</i> -R	GCTGCTAAAGCTGCGCTT ^[15]			

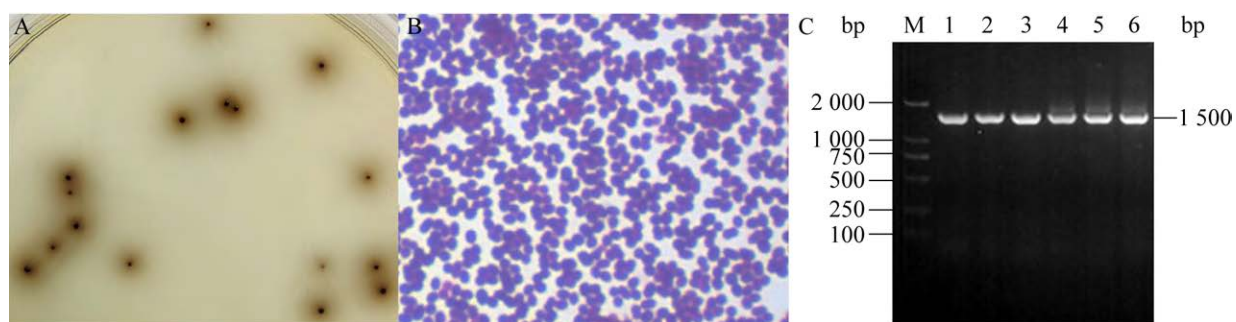


图1 粪肠球菌在PSE琼脂的生长形态(A)、革兰染色结果(B, 1 000×)及16S rRNA基因扩增凝胶电泳图 M: DL2000 DNA Marker; 1-6: 16S rRNA基因扩增产物

Figure 1 Growth morphology of *Enterococcus faecalis* on PSE agar (A) and Gram staining results (B, 1 000×) and 16S rRNA gene amplification gel electrophoresis. M: DL2000 DNA Marker; 1-6: 16S rRNA gene amplification product.

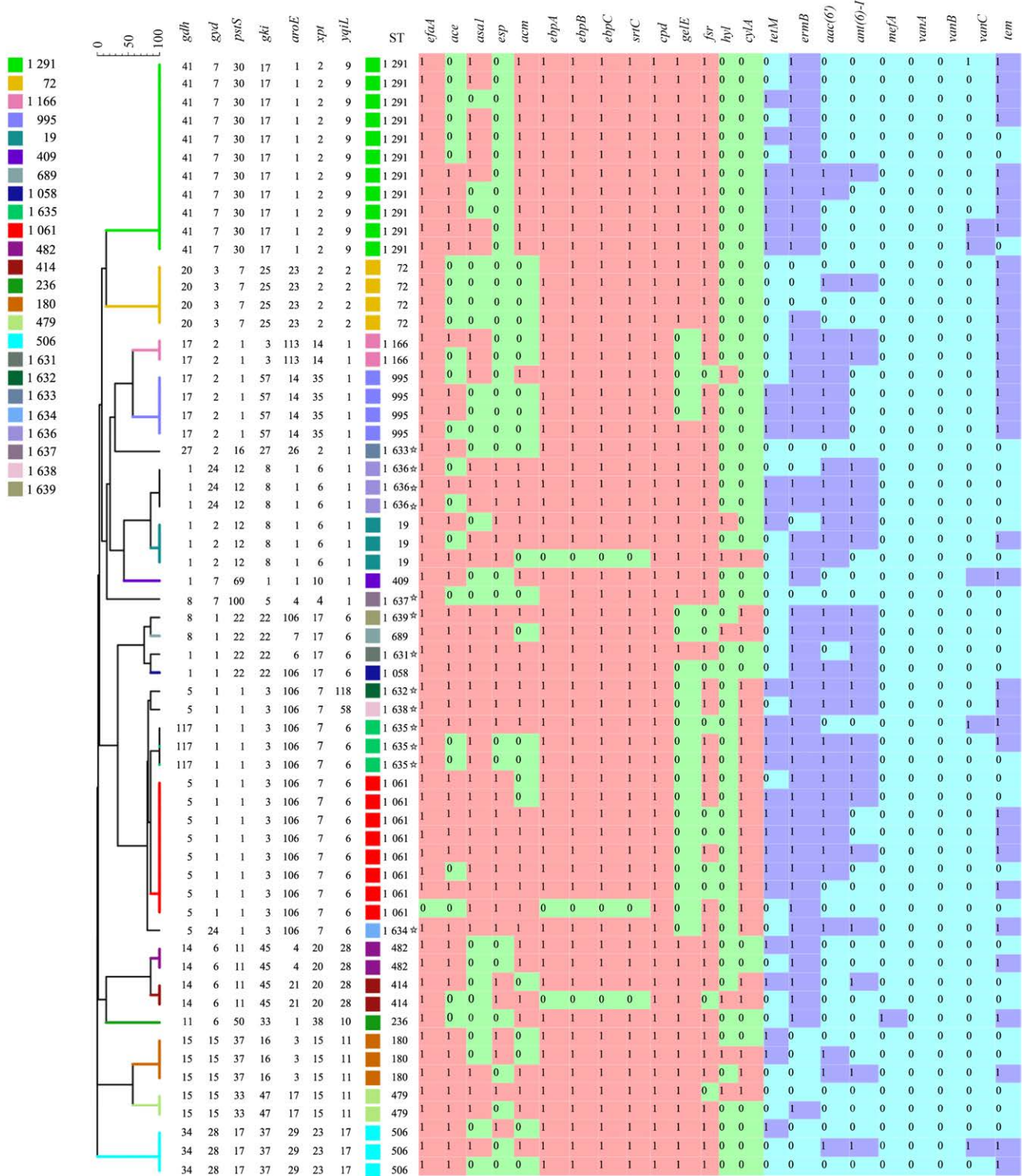


图 2 多位点序列分型树状图及毒力基因、耐药基因谱 0: 阴性; 1: 阳性; ☆: 新 ST 型.

Figure 2 Multi site sequence typing dendrogram and virulence gene and resistance gene spectrum. 0: Negative; 1: Positive; ☆: New ST type.

霉素、利奈唑胺的耐药率最低,分别为 9.84%和 11.48% (表 4)。多重耐药结果见图 3 (天然耐药头孢菌素类、复方新诺明、氨曲南、多黏菌素 B/黏菌素和林可霉素未包含), MDR 菌株占 57.38%。

图 4 展示了耐药谱与 ST 型之间的关系,耐药谱主要分 3 簇: II 簇为耐青霉素和氨苄西林、整体耐药较高的一簇,以菌株 ST995、ST1061、ST1291 为主要代表; I 簇为几乎不耐青霉素和氨苄西林、整体耐药较低的一簇,以菌株 ST180、ST479 为主要代表株。

2.4 耐药基因检测结果

使用 IBM SPSS Statistics 21 软件,通过单样本 *t* 检验方法对单个基因在不同 ST 型之间的分布率进行检验。如表 5 所示,耐药基因携带率最高的是 *ermB* (77.05%, 47/61),未发现 *vanA*、*vanB* 的携带株,*vanC* 的携带率为 8.20% (5/61)。*mefA* 基因仅在 ST236 中分离出 1 株,*aac(6')/aph(2')*、*ant(6)-I* 在 ST19、ST1166、

ST1636 中表现出较高的携带率,在 ST479、ST482、ST1291 中表现出较低的携带率 ($P<0.05$)。图 2 显示了耐药基因谱及其与 ST 型的关系。通过 Spearman 相关系数对耐药表型与耐药基因进行相关性分析,结果表明两者并无显著相关性 ($P>0.05$)。

2.5 毒力基因检测结果

毒力基因检测结果见表 6,其中的携带率最高的毒力基因是 *cpd* (100%, 61/61)、*efaA* (98.36%, 60/61)及 *ebp* (95.08%, 58/61),最低的是 *hyl* (11.48%, 7/61)。*efaA* 在 ST1061 中的分布率显著低于整体平均值 ($P<0.05$),菌毛基因 *ebp* 在 ST19、ST414 中分布率显著低于整体平均值 ($P<0.05$),溶血基因 *cylA* 在 ST180、ST414、ST1061、ST1635 中分布率显著高于整体平均值 ($P<0.05$),ST995 型毒力基因的携带整体低于其他 ST 型。图 2 显示了毒力基因谱及其与 ST 型的关系。

表 4 粪肠球菌药敏试验结果

Table 4 Antibiotic resistance test results of *Enterococcus faecalis*

Category	Antibacterial agents	Dosage (disk)	Rate (%)		
			R	I	S
β-lactams	PEN	10 U	40.98	—	59.02
	AMP	10 μg	36.07	—	63.93
Cephalosporins	CEF	30 μg	81.97	11.48	6.56
	CFP	75 μg	73.77	24.59	1.64
	FOX	30 μg	100.00	0.00	0.00
Tetracyclines	TCY	30 μg	55.74	8.20	36.07
Macrocyclic lactones	ERY	15 μg	63.93	24.59	11.48
Aminoglycosides	NET	30 μg	72.13	6.56	21.31
	AMK	30 μg	75.41	9.84	14.75
Glycopeptides	VAN	30 μg	9.84	24.59	65.57
Oxazolidinones	LNZ	30 μg	11.48	9.84	78.69
Sulfonamides	SXT	23.75/1.25 μg	100.00	0.00	0.00
Monocyclic β-lactam	ATM	30 μg	100.00	0.00	0.00
Peptides	POL	300 IU	100.00	0.00	0.00
Lincosamides	LIN	2 μg	100.00	0.00	0.00
Fluoroquinolones	ENR	10 μg	22.95	24.59	52.46

—: 无此判定区间

—: No such judgment interval exists.

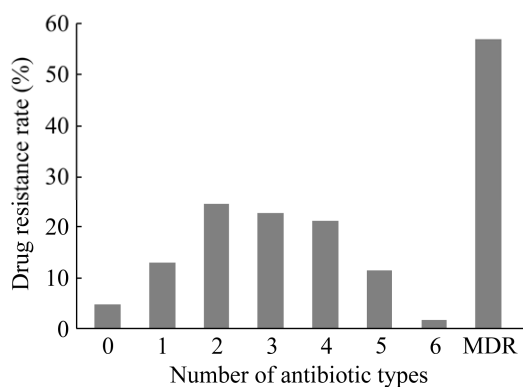


图3 粪肠球菌多重耐药性结果

Figure 3 Multi-drug resistance results of *Enterococcus faecalis*.

2.6 致病性试验结果

试验组小鼠接种后表现为精神沉郁、闭眼不睁、食欲下降。24 h 内高毒力 ST180 组和 ST479 组分别死亡 5 只和 4 只；48 h 内 ST180 组全部死亡、ST479 组另有 2 只死亡，同时优势株 ST1291 组死亡 3 只。死亡鼠剖检可见心脏淤血与出血，胃、肠道内膨胀鼓气，从血液以及肝、肾、脑等实质器官可分离出粪肠球菌。低毒力 ST1061 组和 ST414 组的小鼠 24 h 内几乎无活动、饮食，72 h 后逐渐恢复活力，未出现死亡个体。对照组未表现任何异常症状，剖检无肉眼可见病理变化。

3 讨论

肠球菌是全球引发感染最频繁的路原体之一^[2,11]，天然耐药及对恶劣条件(如极端温度、大范围的 pH 变化以及高浓度的盐和胆汁)耐受的能力^[3]，使其能够在环境中广泛分布并能长时间生存^[17]，另外，肠球菌还可能会通过激活两种不同的生存策略[饥饿(starvation)和可存活但不可培养(viable but nonculturable, VBNC)状态]来应对环境变化^[18]。MLST 被作为探索微生物物种内菌株水平差异的工具已被广泛接受，

该方法为变异株的鉴定溯源和防控提供了有力的工具^[19]。本研究中共检测出 24 种 ST 型，ST1291、ST1061 为优势群。通过 MLST 树状图观察到，不同 ST 型整体被归为 6 个分支，其中 ST506 相对其他分支亲缘关系较远。9 种新 ST 型均为本试验已知 ST 型通过部分管家基因编码发生变异形成，生物作用或菌体自身对外部环境的主动应答，都可能导致菌体内部遗传成分发生改变^[20]，从而在进化过程中表现出较大的遗传多样性。

考虑到粪肠球菌对耐药的易于获得性，了解它们的耐药情况是针对性治疗的必要途径^[11]。在徐琦琦等^[21]的研究中，羊源粪肠球菌对红霉素、四环素的耐药率(78%，83%)显著高于鸡源(36%，48%)，表明了不同动物源粪肠球菌对抗菌药物表现出不同程度的耐药；Trościańczyk 等^[11]的研究表明来自宠物猫、狗的粪肠球菌对红霉素、四环素的耐药率也分别达到了 96%和 82%。而在本研究中，红霉素、四环素的耐药率分别为 63.93%和 55.74%，低于前者羊源和后者宠物源。综合研究结果可推论，相对于地域和物种的差异，抗生素的使用对耐药菌株的出现起到更关键的作用。另外羊源粪肠球菌对利奈唑胺的耐药率为 42.5%^[21]，高于本研究中的 11.48%，这也与其长期临床使用有着密切关系。本研究中也出现 9.84%对万古霉素耐药的菌株，这与 8.20%的 *vanC* 携带有着直接的关联。通过图 4 可观察到耐药谱被分为 3 个主要的簇，II 簇为以 ST995、ST1061、ST1291 等为代表的、对青霉素和氨苄西林皆耐药且整体耐药较高的一簇，I 簇为以 ST180、ST479 等为代表的、对青霉素和氨苄西林几乎不耐药且整体耐药较低的一簇。具有相似耐药谱的菌株并未表现出明显的 ST 型趋向分布，表明粪肠球菌抗性的获得和 ST 型并无较大关联。本研究对粪肠球菌天然

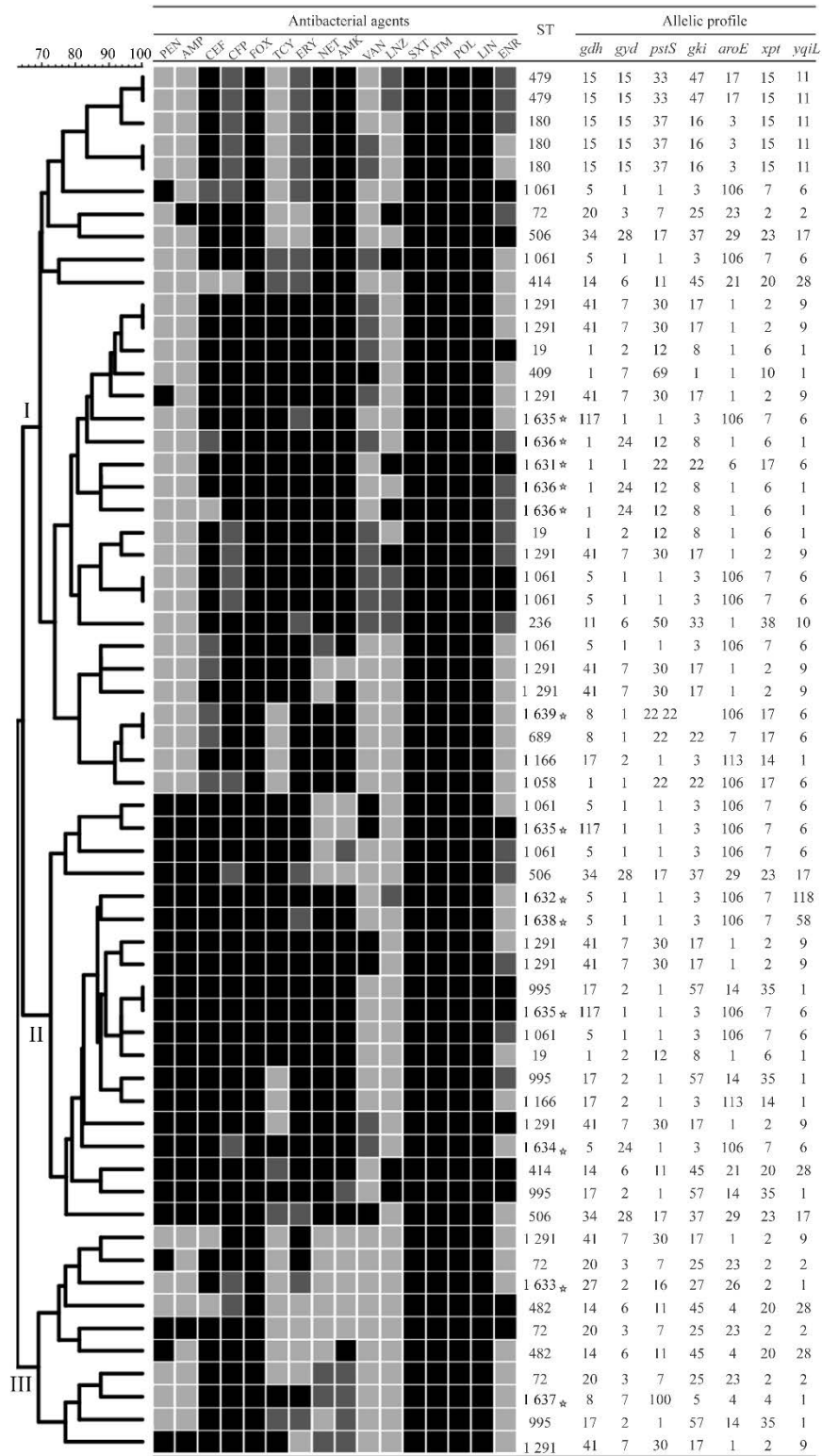


图 4 粪肠球菌耐药谱及 ST 型表现 ■：耐药；■：中度敏感；■：敏感；☆：新 ST 型

Figure 4 Antibiotic resistance spectrum and ST type expression of *Enterococcus faecalis*. ■: Resistance; ■: Moderate sensitivity; ■: Sensitivity; ☆: New ST type.

表5 粪肠球菌耐药基因检测结果

Table 5 Detection results of antibiotic resistance genes in *Enterococcus faecalis*

ST types	<i>tetM</i> (%)	<i>ermB</i> (%)	<i>aac(6')/aph(2')</i> (%)	<i>ant(6)-I</i> (%)	<i>mefA</i> (%)	<i>vanA</i> (%)	<i>vanB</i> (%)	<i>vanC</i> (%)	<i>tem</i> (%)
ST19 (<i>n</i> =3)	33.33	66.67	100.00 ⁺	66.67 ⁺	0.00	0.00	0.00	0.00	33.33
ST72 (<i>n</i> =4)	0.00 ⁻	25.00 ⁻	25.00 ⁻	25.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00 ⁺
ST180 (<i>n</i> =3)	66.67	0.00 ⁻	66.67	33.33	0.00	0.00	0.00	0.00	33.33
ST236 (<i>n</i> =1)	0.00	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻	100.00 ⁺	0.00	0.00	0.00	100.00 ⁺
ST409 (<i>n</i> =1)	0.00 ⁻	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00	0.00	0.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺
ST414 (<i>n</i> =2)	50.00	100.00 ⁺	0.00 ⁻	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ⁻
ST479 (<i>n</i> =2)	0.00 ⁻	50.00	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ⁻
ST482 (<i>n</i> =2)	50.00	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00	0.00	0.00	0.00	50.00
ST506 (<i>n</i> =3)	33.33	0.00 ⁻	33.33	33.33	0.00	0.00	0.00	33.33 ⁺	66.67
ST689 (<i>n</i> =1)	0.00 ⁻	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ⁻
ST995 (<i>n</i> =4)	75.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00 ⁺
ST1058 (<i>n</i> =1)	0.00 ⁻	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ⁻
ST1061 (<i>n</i> =8)	75.00 ⁺	100.00 ⁺	75.00	37.50	0.00	0.00	0.00	0.00	50.00
ST1166 (<i>n</i> =2)	0.00 ⁻	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00 ⁺
ST1291 (<i>n</i> =11)	63.64	100.00 ⁺	18.18 ⁻	09.09 ⁻	0.00	0.00	0.00	18.18 ⁺	72.73
ST1631 (<i>n</i> =1)	0.00 ⁻	100.00 ⁺	0.00 ⁻	100.00 ⁺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ⁻
ST1632 (<i>n</i> =1)	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00 ⁺
ST1633 (<i>n</i> =1)	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00	0.00 ⁻	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ⁻
ST1634 (<i>n</i> =1)	0.00 ⁻	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00 ⁺
ST1635 (<i>n</i> =3)	100.00 ⁺	100.00 ⁺	66.67	66.67 ⁺	0.00	0.00	0.00	33.33 ⁺	66.67
ST1636 (<i>n</i> =3)	66.67	0.67	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ⁻
ST1637 (<i>n</i> =1)	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ⁻
ST1638 (<i>n</i> =1)	0.00 ⁻	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00 ⁺
ST1639 (<i>n</i> =1)	0.00 ⁻	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ⁻
Total (<i>n</i> =61)	45.90	77.05	52.46	39.34	1.64	0.00	0.00	8.20	55.74

⁺: 显著高于整体平均值($P<0.05$); ⁻: 显著低于整体平均值($P<0.05$). 下同

⁺: Significantly higher than the overall average ($P<0.05$); ⁻: Significantly lower than the overall average ($P<0.05$). The same below.

耐药如头孢菌素类、单环 β -内酰胺类等抗生素也进行了药敏试验, 在这些抗生素中, 头孢噻吩、头孢哌酮表现出了一定程度的体外抗菌活性, 对于出现的部分个例, 为进一步深入研究提供启发。

在许多研究^[11,21]中, 耐药表型与耐药基因的高度相关性都得到了证实, 而本研究通过 Spearman 相关系数对耐药表型与耐药基因进行相关性检验, 发现两者并未显示出较高的相关性, 其主要原因在于本研究中奈替米星、丁胺

卡那的耐药率(72.13%, 75.41%)与相关基因 *aac(6')/aph(2')*、*ant(6)-I* (52.46%, 39.34%)携带率相差过大, 粪肠球菌对于大部分低浓度氨基糖苷类抗生素表现为天然耐药, 而对高浓度氨基糖苷类抗生素表现为获得性耐药^[22], 本试验所使用氨基糖苷类抗生素并未达到相应浓度, 因此表现出较高的耐药性。高浓度氨基糖苷类获得性耐药主要与氨基糖苷类修饰酶(aminoglycoside-modifying enzyme, AME)的产生有关, *aac(6')/aph(2')*是迄今为止最重要的

表 6 粪肠球菌毒力基因检测结果

Table 6 Detection results of virulence genes in *Enterococcus faecalis*

ST types	<i>efaA</i> (%)	<i>ace</i> (%)	<i>asal</i> (%)	<i>esp</i> (%)	<i>acm</i> (%)	<i>ebp</i> (%)	<i>cpd</i> (%)	<i>gelE</i> (%)	<i>fsr</i> (%)	<i>hyl</i> (%)	<i>cylA</i> (%)
ST19 (<i>n</i> =3)	100.00	66.67	66.67	100.00 ⁺	66.67	66.67 ⁻	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	66.67 ⁺	33.33
ST72 (<i>n</i> =4)	100.00	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00 ⁻	100.00	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻
ST180 (<i>n</i> =3)	100.00	100.00 ⁺	33.33	66.67	33.33	100.00	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	33.33 ⁺	66.67 ⁺
ST236 (<i>n</i> =1)	100.00	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00 ⁻	100.00 ⁺	100.00	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻
ST409 (<i>n</i> =1)	100.00	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻	100.00 ⁺	100.00	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻
ST414 (<i>n</i> =2)	100.00	50.00	0.00 ⁻	100.00 ⁺	50.00	50.00 ⁻	100.00	100.00 ⁺	50.00 ⁻	50.00 ⁺	100.00 ⁺
ST479 (<i>n</i> =2)	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	50.00	100.00 ⁺	100.00	100.00	100.00 ⁺	50.00 ⁻	50.00 ⁺	50.00
ST482 (<i>n</i> =2)	100.00	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻	100.00 ⁺	100.00	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻
ST506 (<i>n</i> =3)	100.00	100.00 ⁺	33.33	33.33	33.33	100.00	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻
ST689 (<i>n</i> =1)	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00 ⁻	100.00	100.00	0.00 ⁻	0.00 ⁻	100.00	100.00 ⁺
ST995 (<i>n</i> =4)	100.00	50.00	25.00 ⁻	0.00 ⁻	25.00 ⁻	100.00	100.00	25.00 ⁻	75.00	25.00	0.00 ⁻
ST1058 (<i>n</i> =1)	100.00	100.00 ⁺	100.00	100.00	100.00 ⁺	100.00	100.00	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00 ⁻
ST1061 (<i>n</i> =8)	87.50 ⁻	75.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	75.00	87.50	100.00	0.00 ⁻	50.00 ⁻	0.00 ⁻	100.00 ⁺
ST1166 (<i>n</i> =2)	100.00	50.00	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻	100.00	100.00	0.00 ⁻	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻
ST1291 (<i>n</i> =11)	100.00	45.45	72.73	0.00 ⁻	100.00 ⁺	100.00	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻
ST1631 (<i>n</i> =1)	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻
ST1632 (<i>n</i> =1)	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00	100.00	0.00 ⁻	100.00 ⁺	0.00 ⁻	100.00 ⁺
ST1633 (<i>n</i> =1)	100.00	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00 ⁻	100.00	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻
ST1634 (<i>n</i> =1)	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00	100.00	0.00 ⁻	100.00 ⁺	0.00 ⁻	100.00 ⁺
ST1635 (<i>n</i> =3)	100.00	33.33 ⁻	100.00 ⁺	33.33	33.33	100.00	100.00	0.00 ⁻	66.67 ⁻	0.00 ⁻	100.00 ⁺
ST1636 (<i>n</i> =3)	100.00	33.33 ⁻	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻
ST1637 (<i>n</i> =1)	100.00	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00 ⁻	100.00	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	0.00 ⁻	0.00 ⁻
ST1638 (<i>n</i> =1)	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00	100.00	0.00 ⁻	100.00 ⁺	0.00 ⁻	100.00 ⁺
ST1639 (<i>n</i> =1)	100.00	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00 ⁺	100.00	100.00	0.00 ⁻	0.00 ⁻	0.00 ⁻	100.00 ⁺
Total (<i>n</i> =61)	98.36	62.30	62.30	45.90	63.93	95.08	100.00	63.93	81.97	11.48	36.07

AME 基因, *ant(6)-I* 也与高浓度氨基糖苷类耐药机制密切相关^[23]。因此两基因的携带与本试验中氨基糖苷类耐药表型表现出较大差异。*aac(6')/aph(2')*的检出率高于 *ant(6)-I*, 这与该基因存在于肠球菌质粒或转座子上, 易于在菌株之间转移、扩散的特点有关^[24]。Miller 等^[25]提到在停止糖肽类抗生素的作用后, 耐万古霉素粪肠球菌菌株量相对稳定在 7%–10%。本研究中 *vanC* 的携带率为 8.20%, 鸡肠球菌、卡氏肠球菌在染色体上携带 *vanC* 操纵子(C1/C2), 它们对糖肽类

抗生素表现天然低水平耐药^[26]。因此, 本研究中 *vanC* 的出现可能与粪肠球菌对耐药基因的随机获得有关^[7]。通过单样本 *t* 检验发现基因 *tem* 在 ST995 中的分布显著高于整体平均值($P<0.05$), 同时 ST995 对 β -内酰胺类抗生素也表现较强耐药性(75%, 3/4)。作为优势菌株 ST1291 及 ST1061, *ermB* 在 ST1291 中的分布显著高于整体平均值($P<0.05$), *tetM* 在 ST1061 中的分布显著高于整体平均值($P<0.05$), 并且这些高耐药基因与相应耐药表型之间表现出较强的相关性。

除了广泛多样化的耐药性及易于获得的能力之外, 粪肠球菌也具有多种与感染相关的毒力因子^[27]: EfaA 广泛分布于临床感染粪肠球菌菌株, 是一种表面蛋白黏附素; *acm*、*ace* 基因表达一种胶原结合蛋白, 粪肠球菌以此实现定殖, 引发致病; *Asal* 具有凝集作用, 增强黏附; *Esp* 是参与免疫逃避的膜结合表面蛋白, 其分子量在肠球菌表面最大, 与感染有关; *cpd* 表达性信息素, 对人类白细胞有趋化作用; *GelE* 是细胞外金属肽酶, 可水解明胶酶、胶原蛋白和血红蛋白等生物活性化合物, *fsr* 双组分系统可调控其基因表达; *hyl* 可产生具有侵袭性作用的透明质酸酶; *Cyl* 具有杀菌活性, 是激活细胞溶素的必要条件之一, 可裂解真核细胞和革兰氏阳性细胞; *ebpA*、*ebpB*、*ebpC* 和 *srtC* 为粪肠球菌 *ebp* 菌毛丛 4 个完整的开放阅读框, 共同实现菌毛的功能^[28]。本研究中, *cpd* 的携带率为 100%, *cpd* 能够促进质粒在菌株之间的转移^[29], 这也是粪肠球菌易于获得耐药、毒力基因的原因之一。*ebp* 相关基因(*ebpA*, *ebpB*, *ebpC*, *srtC*)的携带率为 95.08%, 高携带率也说明了以 *ebp* 基因制备多克隆抗体对抗生物膜形成的可行性^[28]。致病性试验结果表明, 毒力基因的携带决定了菌株致病力的强弱。通过单样本 *t* 检验发现基因 *gelE*、*fsr* 在 ST1291 中的分布显著高于整体平均值($P < 0.05$), *cylA* 在 ST1061 中的分布显著高于整体平均值($P < 0.05$)。粪肠球菌毒力因子的高度多样性不仅在种类, 还有它们之间的调控组合的功能关系, 比如 *fsr* 不仅对 *gelE*、*sprE* 有调控, 还能增强毒力作用, 同时与生物膜形成有关^[30]。然而与生物膜形成有关的 *ebp*^[31]、*esp*^[13]、*ace/acm*、*efaA* 也具有黏附作用^[32-33]等。在很多研究中对不同毒力基因的携带率都有记录^[5,34], 本研究中毒力基因的携带率整体较高, 这些菌株往往都具有引起严重感染的可能^[5],

特别是在机体处于免疫力低下的状态, 甚至能引起生产中相关疾病的暴发性流行。

4 结论

本研究结果显示羊源粪肠球菌高度耐药, 且有较高毒力因子携带率及致病作用; 耐药、毒力因子的分布与 ST 型的显著相关性也得到了证实。本研究结果证实了羊源粪肠球菌可作为流行病学上重要的微生物载体, 并对公共卫生安全构成潜在威胁。本研究结果提示肉羊生产中要注意粪肠球菌特性监测, 从源头减少高耐药、多毒力因子菌株的产生。

REFERENCES

- [1] NOWAKIEWICZ A, ZIÓLKOWSKA G, TROŚCIAŃCZYK A, ZIĘBA P, GNAT S. Determination of resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* strains isolated from poultry and their genotypic characterization by ADSRRS-fingerprinting[J]. Poultry Science, 2017, 96(4): 986-996.
- [2] OZMA MA, KHODADADI E, REZAEI MA, KAMOUNAH FS, ASGHARZADEH M, GANBAROV K, AGHAZADEH M, YOUSEFI M, PIRZADEH T, KAFIL HS. Induction of proteome changes involved in biofilm formation of *Enterococcus faecalis* in response to gentamicin[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 157: 105003.
- [3] GARCÍA-SOLACHE M, RICE LB. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2019, 32(2): e00058-18.
- [4] GAWRYSZEWSKA I, ŻABICKA D, BOJARSKA K, MALINOWSKA K, HRYNIEWICZ W, SADOWY E. Invasive enterococcal infections in Poland: the current epidemiological situation[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2016, 35(5): 847-856.
- [5] EL-ZAMKAN MA, MOHAMED HMA. Antimicrobial resistance, virulence genes and biofilm formation in *Enterococcus* species isolated from milk of sheep and goat with subclinical mastitis[J]. PLoS One, 2021, 16(11): e0259584.
- [6] HAMED SM, ELKHATIB WF, EL-MAHALLAWY HA, HELMY MM, ASHOUR MS, ABOSHANAB

- KMA. Multiple mechanisms contributing to ciprofloxacin resistance among Gram negative bacteria causing infections to cancer patients[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 12268.
- [7] QUIÑONES D, KOBAYASHI N, NAGASHIMA S. Molecular epidemiologic analysis of *Enterococcus faecalis* isolates in Cuba by multilocus sequence typing[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2009, 15(4): 287-293.
- [8] de BRIYNE N, ATKINSON J, POKLUDOVÁ L, BORRIELLO SP. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe[J]. *The Veterinary Record*, 2014, 175(13): 325.
- [9] MAGIORAKOS AP, SRINIVASAN A, CAREY RB, CARMELI Y, FALAGAS ME, GISKE CG, HARBARTH S, HINDLER JF, KAHLMETER G, OLSSON-LILJEQUIST B, PATERSON DL, RICE LB, STELLING J, STRUELENS MJ, VATOPOULOS A, WEBER JT, MONNET DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, 18(3): 268-281.
- [10] RUIZ-GARBAJOSA P, BONTEN MJM, ROBINSON DA, TOP J, NALLAPAREDDY SR, TORRES C, COQUE TM, CANTÓN R, BAQUERO F, MURRAY BE, del CAMPO R, WILLEMS RJL. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(6): 2220-2228.
- [11] TROŚCIAŃCZYK A, NOWAKIEWICZ A, GNAT S, ŁAGOWSKI D, OSIŃSKA M. Are dogs and cats a reservoir of resistant and virulent *Enterococcus faecalis* strains and a potential threat to public health?[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(4): 2061-2071.
- [12] Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing[S]. CLSI supplement M100-S30, 30th ed. Wayne, Pennsylvania, USA, 2020.
- [13] WOŹNIAK-BIEL A, BUGLA-PŁOSKOŃSKA G, BURDZY J, KORZEKWA K, PLOCH S, WIELICZKO A. Antimicrobial resistance and biofilm formation in *Enterococcus* spp. isolated from humans and turkeys in Poland[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2019, 25(2): 277-286.
- [14] KARIYAMA R, MITSUHATA R, CHOW JW, CLEWELL DB, KUMON H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(8): 3092-3095.
- [15] VANKERCKHOVEN V, van AUTGAERDEN T, VAEL C, LAMMENS C, CHAPELLE S, ROSSI R, JABES D, GOOSSENS H. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(10): 4473-4479.
- [16] 李慧, 王蒙蒙, 李傲寒, 高静雯, 高健鹏, 张华雷, 张莉, 齐亚银. 致动物脑膜炎粪肠球菌人工感染小鼠脑部模型的建立[J]. *动物医学进展*, 2019, 40(8): 34-39.
- LI H, WANG MM, LI AH, GAO JW, GAO JP, ZHANG HL, ZHANG L, QI YY. Establishment of brain model of artificially infected mice with *Enterococcus faecalis* causing animal encephalitis[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019, 40(8): 34-39 (in Chinese).
- [17] BEN SAID L, KLIBI N, LOZANO C, DZIRI R, BEN SLAMA K, BOUDABOUS A, TORRES C. Diversity of enterococcal species and characterization of high-level aminoglycoside resistant enterococci of samples of wastewater and surface water in Tunisia[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 530/531: 11-17.
- [18] del MAR LLEÒ M, BONATO B, BENEDETTI D, CANEPARI P. Survival of enterococcal species in aquatic environments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 54(2): 189-196.
- [19] DOMÁN M, MAKRAI L, BÁNYAI K. Molecular phylogenetic analysis of *Candida krusei*[J]. *Mycopathologia*, 2022, 187(4): 333-343.
- [20] 史秀杰, 郑晓聪, 阮周曦, 贾鹏, 何俊强, 王津津, 兰文升, 杨锦舜, 刘荻. 水生动物中分离的副溶血性弧菌菌株分子分型研究[J]. *中国动物检疫*, 2012, 29(6): 47-53, 63.
- SHI XJ, ZHENG XC, RUAN ZX, JIA P, HE JQ, WANG JJ, LAN WS, YANG JS, LIU H. Molecular subtyping studies of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from aquatic animals[J]. *China Animal Health Inspection*, 2012, 29(6): 47-53, 63 (in Chinese).
- [21] 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).
- [22] 白耀霞, 任建元. 肠球菌氨基糖苷类高水平耐药基因与毒力基因研究进展[J]. 甘肃医药, 2019, 38(3): 212-213, 217.
- BAI YX, REN JY. Advances on resistance gene and virulence gene of high-level aminoglycosides in *Enterococci*[J]. Gansu Medical Journal, 2019, 38(3): 212-213, 217 (in Chinese).
- [23] KRAUSE KM, SERIO AW, KANE TR, CONNOLLY LE. Aminoglycosides: an overview[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2016, 6(6): a027029.
- [24] 贾伟, 赵梅, 王文, 魏军. 肠球菌属耐药性与耐药基因的比较研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(24): 5551-5554.
- JIA W, ZHAO M, WANG W, WEI J. Comparative study on drug resistances and drug-resistant genes of *Enterococcus* species in clinic[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2015, 25(24): 5551-5554 (in Chinese).
- [25] MILLER WR, MURRAY BE, RICE LB, ARIAS CA. Resistance in vancomycin-resistant *Enterococci*[J]. Infectious Disease Clinics of North America, 2020, 34(4): 751-771.
- [26] NAVARRO F, COURVALIN P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1994, 38(8): 1788-1793.
- [27] EATON TJ, GASSON MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1628-1635.
- [28] 张留君. 动物源性粪肠球菌 *ebp* 菌毛基因的保守性及其多克隆抗体的制备[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2015.
- ZHANG LJ. *ebp* pilus gene conservation analysis and polyclonal antibody preparation of animal-originated *E. faecalis* isolates[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [29] GOLINSKA E, TOMUSIAK A, GOSIEWSKI T, WIĘCEK G, MACHUL A, MIKOŁAJCZYK D, BULANDA M, HECZKO PB, STRUS M. Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease[J]. World Journal of Gastroenterology, 2013, 19(23): 3562-3572.
- [30] QIN X, SINGH KV, WEINSTOCK GM, MURRAY BE. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(5): 2579-2586.
- [31] NALLAPAREDDY SR, SINGH KV, SILLANPÄÄ J, GARSIN DA, HÖÖK M, ERLANDSEN SL, MURRAY BE. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2006, 116(10): 2799-2807.
- [32] LEBRETON F, RIBOULET-BISSON E, SERRON P, SANGUINETTI M, POSTERARO B, TORELLI R, HARTKE A, AUFRAY Y, GIARD JC. *ace*, which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by *Ers* and is involved in virulence[J]. Infection and Immunity, 2009, 77(7): 2832-2839.
- [33] NIU HY, YU H, HU TP, TIAN GL, ZHANG LX, GUO X, HU H, WANG ZL. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(3): 691-696.
- [34] CUI PF, FENG L, ZHANG L, HE J, AN TW, FU X, LI C, ZHAO XD, ZHAI YR, LI H, YAN WJ, LI HD, LUO XL, LEI CW, WANG HN, YANG X. Antimicrobial resistance, virulence genes, and biofilm formation capacity among *Enterococcus* species from yaks in Aba Tibetan Autonomous Prefecture, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1250.