

## 研究报告

## 林麝缓慢葡萄球菌和大肠杆菌混合感染的病原分离鉴定及致病性

吴杰<sup>#1</sup>, 伍茜<sup>#2</sup>, 程建国<sup>\*1</sup>, 付文龙<sup>1</sup>, 周磊<sup>1</sup>, 刘洁<sup>2</sup>, 丁慧<sup>2</sup>, 罗燕<sup>\*2</sup>, 杜荣胜<sup>1</sup>, 张海玫<sup>1</sup>

1 四川养麝研究所, 四川 都江堰 610016

2 四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130

吴杰, 伍茜, 程建国, 付文龙, 周磊, 刘洁, 丁慧, 罗燕, 杜荣胜, 张海玫. 林麝缓慢葡萄球菌和大肠杆菌混合感染的病原分离鉴定及致病性[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4195-4211.

WU Jie, WU Xi, CHENG Jianguo, FU Wenlong, ZHOU Lei, LIU Jie, DING Hui, LUO Yan, DU Rongsheng, ZHANG Haimei. Isolation, identification, and pathogenicity of mixed infection of *Staphylococcus lentus* and *Escherichia coli* in *Moschus berezovskii*[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4195-4211.

**摘要:**【背景】林麝是我国特殊经济动物, 细菌性疾病在圈养麝种群中高发, 研究相关病原对林麝疾病防控具有重要意义。【目的】探究导致 1 例林麝死亡的病原微生物的耐药性和致病性。【方法】对死亡林麝进行细菌分离鉴定、药敏试验、小鼠致病性试验、耐药基因及毒力基因检测。【结果】该林麝为缓慢葡萄球菌(*Staphylococcus lentus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)混合感染, 两株分离菌分别命名为菌株 23HYSL 和菌株 23HYEC。药敏试验显示菌株 23HYSL 对氨基糖苷类、林可霉素、四环素和磺胺异噁唑耐药, 而菌株 23HYEC 为产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶的多重耐药大肠杆菌。小鼠致病性试验显示菌株 23HYSL 的  $LD_{50}$  为  $1.39 \times 10^8$  CFU, 菌株 23HYEC 的  $LD_{50}$  为  $8.97 \times 10^7$  CFU, 病理切片结果显示混合感染组的脾脏病变程度更严重, 并且混合感染能帮助菌株 23HYEC 在小鼠的心脏和肝脏定殖。两种菌均检出耐药基因 *sul2*、*tetA*、*tetC*、*bla*<sub>TEM</sub> 和 *bla*<sub>CTX-M</sub>。同时检出菌株 23HYSL 携带毒力基因 *clfA*, 菌株 23HYEC 携带包括 *astA* 在内的 5 个毒力基因。【结论】分离到林麝源缓慢葡萄球菌, 同时进行了该菌与混合感染的 *astA*<sup>+</sup>大肠杆菌的耐药性和致病性研究, 为相关疾病的防治和合理用药提供了依据。

**关键词:** 林麝; 缓慢葡萄球菌; 大肠杆菌; 致病性

资助项目: 四川省科技厅四川省级科研院所科技成果转化项目(2023JDZH0029)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

This work was supported by the Science and Technology Achievements Transfer Project from Scientific Research Institutions of Science & Technology Department of Sichuan Province (2023JDZH0029).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: CHENG Jianguo, cjgly1@163.com; LUO Yan, Lycjg@163.com

Received: 2024-01-06; Accepted: 2024-04-24; Published online: 2024-07-29

# Isolation, identification, and pathogenicity of mixed infection of *Staphylococcus lentus* and *Escherichia coli* in *Moschus berezovskii*

WU Jie<sup>#1</sup>, WU Xi<sup>#2</sup>, CHENG Jianguo<sup>\*1</sup>, FU Wenlong<sup>1</sup>, ZHOU Lei<sup>1</sup>, LIU Jie<sup>2</sup>, DING Hui<sup>2</sup>, LUO Yan<sup>\*2</sup>, DU Rongsheng<sup>1</sup>, ZHANG Haimei<sup>1</sup>

1 Sichuan Institute of Musk Deer Breeding, Dujiangyan 610016, Sichuan, China

2 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

**Abstract:** [Background] Forest musk deer are valuable economic animals in China. Captive musk deer populations frequently suffer from bacterial diseases, and thus studying the related pathogens is of great significance for the prevention and control of diseases attacking forest musk deer. [Objective] To investigate the drug resistance and pathogenicity of the microorganisms causing the death of a forest musk deer. [Methods] Bacteria were isolated from a deceased musk deer and identified. The drug susceptibility, pathogenicity in mice, and resistance gene and virulence genes of the isolates were studied. [Results] The forest musk deer suffered from mixed infection of *Staphylococcus lentus* (named 23HYSL) and *Escherichia coli* (named strain 23HYEC). The strain 23HYSL was resistant to aztreonam, lincomycin, tetracycline, and sulfisoxazole, while strain 23HYEC was a multi-drug resistant *E. coli* strain producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. The median lethal doses ( $LD_{50}$ ) of strain 23HYSL and strain 23HYEC in mice were  $1.39 \times 10^8$  CFU and  $8.97 \times 10^7$  CFU, respectively. The pathological sections showed that the mixed infection caused severer spleen lesions and facilitated the colonization of strain 23HYEC in the heart and liver of mice. Both strains carried the resistance genes *sul2*, *tetA*, *tetC*, *bla<sub>TEM</sub>*, and *bla<sub>CTX-M</sub>*. In addition, strain 23HYSL carried the virulence gene *clfa*, while strain 23HYEC carried 5 virulence genes including *astA*. [Conclusion] We isolated *S. lentus* from forest musk deer for the first time and studied the drug resistance and pathogenicity of this bacterium in the case of mixed infection with *astA*<sup>+</sup> *E. coli*, giving insights into the prevention of related diseases and the rational use of drugs.

**Keywords:** forest musk deer; *Staphylococcus lentus*; *Escherichia coli*; pathogenicity

林麝(*Moschus berezovskii*)是一种胆小、谨慎、独居的小型反刍动物,属于国家一级保护动物,同时被国际自然保护联盟列为濒危物种<sup>[1]</sup>。我国自1958年以来一直在发展人工养麝,而圈养种群患病对林麝繁殖、泌香和生存产生重要影响。据调查,发病率最高的是铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、解链食子酸链球菌(*Streptococcus gallolyticus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)等细菌引起的呼吸道、泌尿道

及外科疾病<sup>[2-3]</sup>。随着引起林麝死亡的弗格森埃希菌(*Escherichia fergusonii*)<sup>[4]</sup>、创口博德特氏菌(*Bordetella trematum*)<sup>[5]</sup>和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)<sup>[6]</sup>等被首次报道,机会致病菌在实验室检测中的重要性也更加值得关注。

缓慢葡萄球菌(*Staphylococcus lentus*)是一种凝固酶阴性葡萄球菌(coagulase-negative *Staphylococcus*, CoNS),属于松鼠葡萄球菌群。缓慢葡萄球菌普遍被认为是一种动物病原体,

已从宠物、农场动物、野生动物和零售肉类中分离出来<sup>[7]</sup>。在鼻窦炎、心内膜炎、腹膜炎、感染性休克、尿路感染、伤口感染等几种严重的人类感染中,也发现缓慢葡萄球菌的致病菌,其临床意义明显增加。作为一种机会致病菌,其通常易感于新生儿或者患有严重基础性疾病等免疫力相对低下的群体,但目前尚无林麝感染缓慢葡萄球菌的报道<sup>[8-10]</sup>。大肠杆菌存在于哺乳动物肠道中,根据遗传和临床标准分为共生型、致病性(肠道或腹泻性)和肠外致病性大肠杆菌三大类<sup>[11]</sup>。致病菌株可引起健康和免疫功能低下个体的胃肠道疾病或肠外疾病,严重程度取决于微生物和宿主因素,范围从轻度胃肠炎到严重并危及生命<sup>[11]</sup>。近年来,大肠杆菌引起林麝腹泻、肺炎甚至死亡的报道屡见不鲜<sup>[12-14]</sup>。本研究对一头疑似缓慢葡萄球菌和大肠杆菌混合感染致急性死亡的林麝进行细菌分离鉴定、耐药性及致病性研究,以期为林麝源缓慢葡萄球菌的相关生物学特性提供临床资料,并为二者混合感染的综合防治提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

病料来源于四川省某林麝养殖场。SPF 级昆明小鼠,成都达硕实验动物有限公司,动物试验由四川农业大学动物福利委员会审查通过(批准编号:20230174)。细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA Loading Buffer 和 2×*Taq* PCR Master Mix,天根生化试剂(北京)有限公司;2×SYBR Green Mix,宝日医生物技术(北京)有限公司;麦康凯培养基、胰酪大豆胨琼脂(tryptone soy agar, TSA)培养基、血琼脂培养基、水解酪蛋白(Müller-Hinton, MH)培养基、细菌微量生化反应管和药敏纸片,杭州微生物试剂有限公司;所用引物由北京擎科生物科技股份有

限公司合成。凝胶成像分析仪、凝胶电泳仪、PCR 扩增仪和荧光定量 PCR 仪,伯乐生命医学产品有限公司;恒温培养箱、恒温水摇床和 NanoDrop 2000,赛默飞世尔科技有限公司;微量高速冷冻离心机和台式高速离心机,艾本德公司。

### 1.2 病原菌的分离和纯化

无菌采集死亡林麝的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏及胸腹水,划线接种于麦康凯培养基、TSA 培养基和血琼脂培养基,于 37 °C 培养箱放置 48 h,根据菌落形态特征及革兰氏染色结果,挑取单菌落进一步纯化、保存。

### 1.3 病原菌的生化试验

依据细菌的理化特性,挑取纯培养物的单个菌落接种于细菌微量生化反应管中,37 °C 培养 24-48 h 后观察并记录结果。

### 1.4 16S rRNA 基因的扩增及测序

以菌液为模板,用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')扩增 16S rRNA 基因<sup>[15]</sup>。PCR 反应体系(20 μL):模板 1 μL, 2×*Taq* PCR Mix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL。同时设置 ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照。PCR 反应条件:95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 34 个循环; 72 °C 5 min。阳性 PCR 扩增产物送至北京擎科生物科技股份有限公司测序,并通过 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)在线分析。同时与 GenBank 中已收录的相关参考菌株的基因序列进行系统发育分析。

### 1.5 耐药基因和毒力基因的检测

分离菌使用的耐药基因引物有磺胺类耐药基因 *sul1*、*sul2*、*sul3*, 四环素类耐药基因 *tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetM*, 氨基糖苷类耐药基因 *aph(3')-IIa*、*ant(3'')-Ia*, β-内酰胺类耐药基

因 *bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>SHV</sub>、*bla*<sub>CTX-M</sub>、*bla*，喹诺酮类耐药基因 *qnrB*、*aac(6')-Ib-cr*，以及氯霉素类耐药基因 *floR*。毒力基因引物有葡萄球菌肠毒素基因 *sea*、*seb*、*sec*、*clfa*，黏附相关基因 *fnbA*、*fnbB*，溶血素基因 *hla*、*hly*，外毒素基因 *pvl*、*tst*，以

及大肠杆菌外毒素 *astA*、*hlyF*、*papC*，铁转运相关基因 *fyuA*、*irp2*、*iucD*、*sitA*，抗血清存活因子相关基因 *iss*、*cva/cvi*，黏附相关基因 *tsh*、*fimC*，侵袭及毒素相关基因 *vat*。引物信息如表 1 所示。

表 1 耐药基因和毒力基因引物信息

Table 1 Primers of resistance genes and virulence genes

Gene	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Source
<i>sul1</i>	F: ATTGCCTGGTTGCTTCAT R: ATCCGACTCGCAGCATTT	238	52.0	[16]
<i>sul2</i>	F: CATCATTTTCGGCATCGTC R: TCTTGCGGTTTCTTTCAGC	793	55.0	
<i>sul3</i>	F: AGATGTGATTGATTTGGGAGC R: TAGTTGTTTCTGGATTAGAGCCT	443	55.0	
<i>tetA</i>	F: GTAATTCTGAGCACTGTCGC R: CTGCCTGGACAACATTGCTT	1 000	50.0	[17]
<i>tetB</i>	F: CTCAGTATTCCAAGCCTTTC R: CTAAGCACTTGTCTCCTGTT	416	52.0	
<i>tetC</i>	F: TCTAACAAATGCGCTCATCGT R: GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC	569	53.0	
<i>tetD</i>	F: ATTACACTGCTGGACGCGAT R: CTGATCAGCAGACAGATTGC	1 103	51.0	
<i>tetE</i>	F: GTCATGATGGCACTGGTCAT R: CTCTGCTGTACATCGCTCTT	1 180	52.5	
<i>tetM</i>	F: GTTAAATAGTGTCTTGGAG R: CTAAGATATGGCTCTAACAA	657	57.0	[18]
<i>aph(3')-IIa</i>	F: TGGTGGGCACAACAGACAA R: CGGCGATACCGTAAAGCAC	667	52.0	[16]
<i>ant(3'')-Ia</i>	F: ATCTGGCTATCTTGCTGACA R: TATGACGGGCTGATACTGG	284	50.0	
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	F: CAGAAACGCTGGTGAAGTA R: ACTCCCCGTCGTGTAGATAA	719	54.5	[19]
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	F: TGGTTATGCGTTATATTCGCC R: GCTTAGCGTTGCCAGTGCT	800	54.0	
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	F: TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA R: CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	500	54.0	
<i>bla</i>	F: CATARTCCGATAATASMGCC R: CGTSTTTAACTAAGTATSGY	297	51.0	
<i>qnrB</i>	F: ACGATGCCTGGTAGTTGTCC R: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469	54.0	[20]
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482	55.0	
<i>floR</i>	F: TATCTCCCTGTCGTTCCAG R: AGA ACTCGCCGATCAATG	399	53.0	

(待续)

(续表 1)

Gene	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Source
<i>sea</i>	F: GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA R: CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC	560	57.0	[21]
<i>seb</i>	F: ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA R: ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT	404	57.0	
<i>sec</i>	F: GTAAAGTTACAGGTGGCAAAACTTG R: CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT	297	56.0	
<i>fnbA</i>	F: GTGAAGTTTTAGAAGGTGGAAAGATTAG R: GCTCTTGTAAGACCATTTTTCTTCAC	643	57.0	
<i>fnbB</i>	F: GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT R: CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	524	57.0	
<i>hla</i>	F: CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG R: CTTTCCAGCCTACTTTTTATCAGT	209	57.0	
<i>hlb</i>	F: GTGCACTTACTGACAATAGTGC R: GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	309	58.0	
<i>clfa</i>	F: ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT R: CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG	292	57.0	
<i>pvl</i>	F: ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA R: GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	433	56.0	
<i>tst</i>	F: TTCACTATTTGTA AAAAGTGT CAGACCCACT R: TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT	180	57.0	
<i>astA</i>	F: GCCATCAACACAGTATATCC R: GAGTGACGGCTTTGTAGTCC	106	58.0	[22]
<i>cva/cvi</i>	F: TGGTAGAATGTGCCAGAGCAAG R: GAGCTGTTTGTAGCGAAGCC	1 181	58.0	
<i>fimC</i>	F: GGGTAGAAAATGCCGATGGTG R: CGTAATTTTGGGGTAAGTGC	497	58.0	
<i>fyuA</i>	F: ATGATTAACCCCGCAGCGGAA R: CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	787	52.0	
<i>hlyF</i>	F: TCGGCATCCACATTAGTTG R: AATCGAGTTGTTCCGTCTCT	599	60.0	
<i>irp2</i>	F: AAGGATTCGCTGTTACCGGAC R: AACTCCTGATACGGTGGC	413	58.0	
<i>iss</i>	F: ATCACATAGGATTCTGCCG R: CAGCGGAGTATAGATGCCA	309	58.0	
<i>iucD</i>	F: AAAAAAGTTCTATCGCTTCC R: CCTGATCCAGATGATGCTC	714	58.0	
<i>papC</i>	F: TGATATCACGCAGTCAGTAGC R: CCGGCCTATTCACATAA	501	58.0	
<i>sitA</i>	F: AGGGGGCACA ACTGATTCTCG R: TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	608	60.0	
<i>tsh</i>	F: ACTATTCTCTCTGCAGGAAGTC R: CTTCCGATGTTCTGAACGT	824	58.0	
<i>vat</i>	F: TCCTGGGACATAATGGTCAG R: GTGTCAGAACGGAATTGT	981	58.0	

## 1.6 药敏试验

将菌株接种于 MH 液体培养基, 37 °C、180 r/min 振荡培养至 0.5 麦氏浊度。采用 Kirby-Barer 纸片法<sup>[23]</sup>在无菌条件下将 100 μL 菌液均匀涂布于 MH 固体培养基, 保持均匀间隔贴上药敏纸片, 37 °C 倒置培养 18–20 h。选用抗生素包括青霉素、氨苄西林、哌拉西林、头孢氨苄、头孢唑林、头孢呋辛、头孢他啶、头孢曲松、头孢哌酮、氨曲南、亚胺培南、阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、红霉素、林可霉素、甲氧苄啶、多黏菌素 B、万古霉素、四环素、多西环素、呋喃妥因、氧氟沙星、环丙沙星、复方新诺明、磺胺异恶唑、氯霉素、利福平和磷霉素, 参照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)鉴定手册(2022 版)筛选分离菌的药物敏感性<sup>[23]</sup>。

## 1.7 小鼠致病性试验

根据预试验分别将 2 种菌液大致调整为 10<sup>9</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup> CFU/mL 这 5 个梯度, 再使用平板计数法统计具体菌液浓度。同时将小鼠分为 3 批, 每批再按每组 6 只的数量分为 5 组, 分别按不同的浓度梯度注射菌液。第 1 批和第 2 批小鼠分别单独注射缓慢葡萄球菌和大肠杆菌每只各 0.4 mL, 第 3 批小鼠每只注射 0.2 mL 缓慢葡萄球菌和 0.2 mL 大肠杆菌的混合液, 最后对 1 组小鼠注射等剂量的生理盐水作为对照。攻毒后 7 d 内正常饲喂, 观察并记录

小鼠状态, 然后根据小鼠死亡情况计算半数致死量 LD<sub>50</sub>。在无菌环境下对死亡小鼠进行剖检, 观察脏器变化和平板划线接种, 并采集其肺、肝、脾组织, 经体积分数 4% 甲醛固定后, 制作病理组织切片。同时解剖菌液注射量为 10<sup>8</sup> CFU/mL 的小鼠, 根据田国钦等<sup>[24]</sup>的方法, 取其心、肝、脾、肺、肾各 30 mg, 研磨为匀浆后收集上清至离心管, 然后分别按照细菌基因组提取试剂盒的说明书提取 DNA, 经 NanoDrop 2000 检测 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值均在 1.7–1.9 间。使用表 2 所示引物 qS1 和 qEc 进行实时荧光定量 PCR, 分别检测小鼠各脏器中缓慢葡萄球菌和大肠杆菌的载量, PCR 反应体系(20 μL): DNA 模板 1 μL、2×SYBR Green Mix 10 μL、qS1 或 qEc 的上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL; PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 退火 30 s, 42 个循环, 并进行溶解曲线分析。每个反应设置 3 个重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离菌株的形态特征

分离菌呈现 2 种菌落特点, 1 号菌在 TSA 平板和血平板上均生长为湿润、光滑、隆起的白色菌落, 无溶血现象, 革兰染色镜检呈阳性球菌; 2 号菌在麦康凯培养基上呈光滑的桃红色菌落, 在血平板上呈灰白色菌落, 不溶血, 革兰染色镜检呈阴性短小杆菌(图 1)。

表 2 缓慢葡萄球菌和大肠杆菌实时荧光定量 PCR 引物

Table 2 Primer for real-time quantitative PCR of *Staphylococcus lentus* and *Escherichia coli*

Primer	Sequence (5'→3')	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Source
qS1F	ATCAGCTCAACGTGTTCCAGT	204	59	CP120062.1
qS1R	ACACGAGTTTGAGTTGCGTC			
qEcF	GCGATGACCTTTAACTTTGGCGAAC	133	63	[24]
qEcR	TGTCGGCAATGGCATCAGTATAGC			

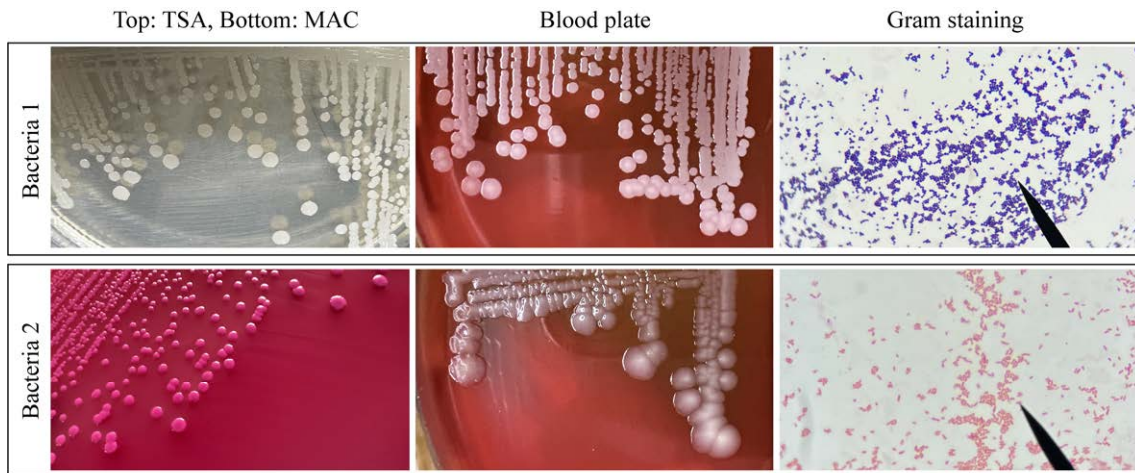


图 1 分离菌株在不同培养基上的形态及革兰染色镜检形态(1 000×)

Figure 1 Morphology of isolated strains on different culture media and Gram staining microscopy (1 000×).

## 2.2 分离菌的生化鉴定结果

1号菌的乳糖、β-半乳糖苷、蔗糖、葡萄糖酸盐、蛋白胨、山梨醇、氧化酶和赖氨酸试验结果均呈阳性，木糖、尿素酶和凝固酶试验结果均呈阴性，初步判断为凝固酶阴性葡萄球菌。

2号菌的乳糖、葡萄糖、三糖铁、吲哚试验、蛋白胨、木糖、赖氨酸、尿素酶、甘露醇和木糖试验结果均呈阳性，枸橼酸盐、硫化氢、氧化酶、山梨醇和尿素酶试验结果均呈阴性，符合大肠杆菌的生化特征。

## 2.3 16S rRNA 基因鉴定结果

1号菌和2号菌的16S rRNA基因PCR扩增结果显示，约在1 400 bp处出现特异性条带，与目的条带大小一致(图 2)。将测序结果上传至NCBI, BLAST 比对结果显示1号菌和2号菌分别与缓慢葡萄球菌和大肠杆菌的相似性最高，达99%，结合培养特征与生化结果，鉴定1号菌为缓慢葡萄球菌，命名为23HYSL (GenBank 登录号：PP439483)，2号菌为大肠杆菌，命名为23HYEC (GenBank 登录号：PP439482)。

## 2.4 菌株的系统发育分析

基于分离菌株23HYSL和菌株23HYEC的16S rRNA基因序列分别构建系统发育树。由图3A

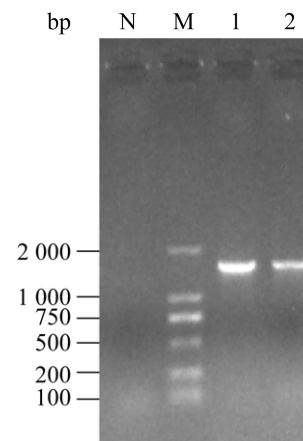


图 2 分离菌的 16S rRNA 基因 PCR 结果 N: 阴性对照; M: DL2000 DNA Marker; 1: 1号菌; 2: 2号菌

Figure 2 16S rRNA gene PCR results of isolated bacteria. N: Negative control; M: DL2000 DNA Marker; 1: Bacteria 1; 2: Bacteria 2.

可见，菌株23HYSL与多数缓慢葡萄球菌处于同一分支，其中亲缘关系最近的是2023年于俄罗斯莫斯科的鸡窝中分离到的宿主为鸡虱的缓慢葡萄球菌Mg1-7。在图3B中，大肠杆菌在进化上聚类，其中与菌株23HYEC亲缘关系最近的为2019年于巴西的断奶仔猪粪便样本中分离得到的大肠杆菌UFV 627。

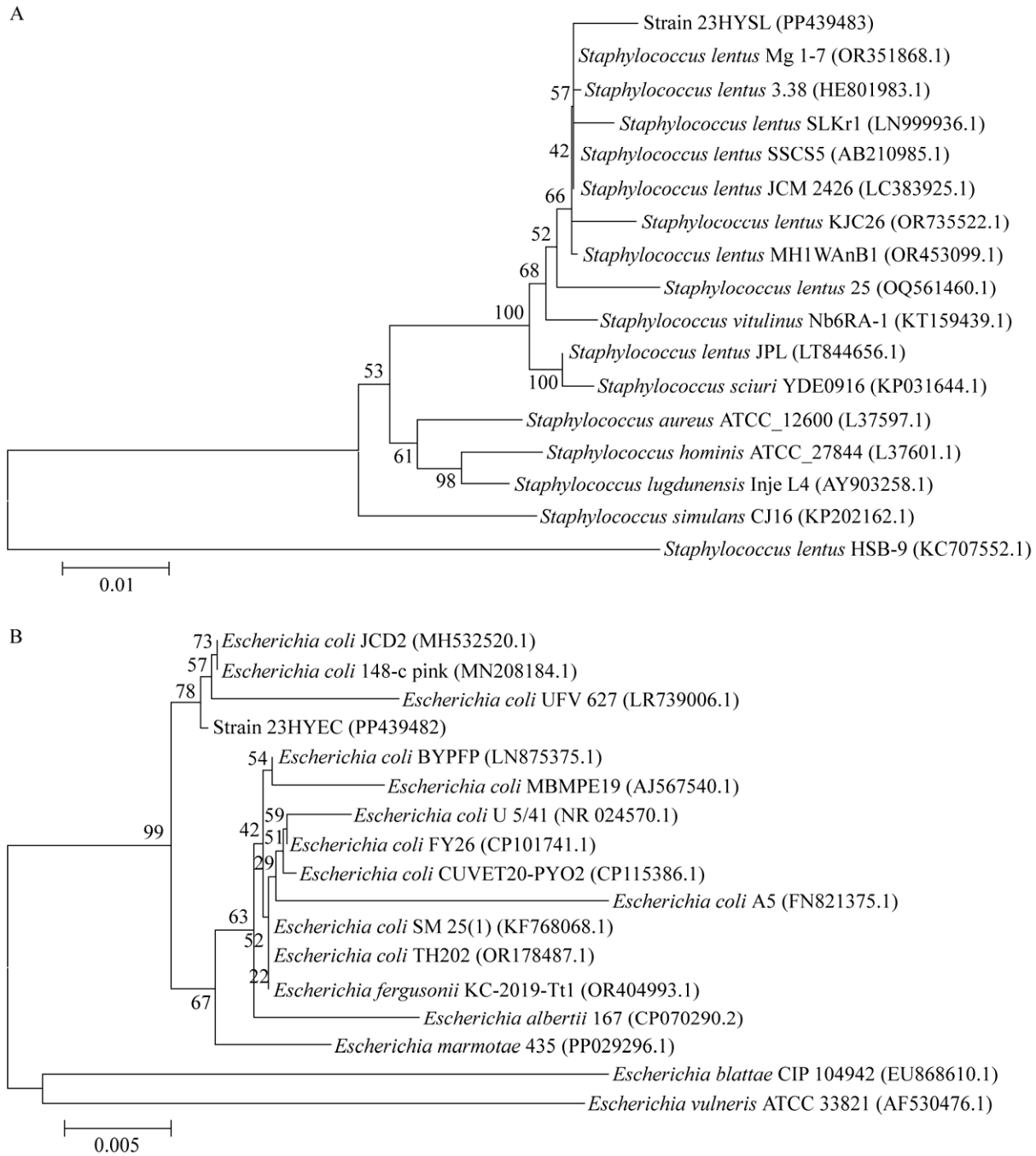


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 23HYSL (A)和菌株 23HYEC (B)系统发育树 括号内为 GenBank 登录号; 节点的数字为 bootstrap 值, 范围从 0-100, 值越大置信度越高; 标尺表示该长度分支代表的基因组遗传变异度

Figure 3 Phylogenetic trees of strains 23HYSL (A) and 23HYEC (B) based on 16S rRNA gene sequence. GenBank accession number in parentheses; The number of the node is the bootstrap value, ranging from 0 to 100, the larger the value, the higher the confidence; The scale indicates the degree of genetic variation in the genome represented by the length branch.



## 2.5 药敏试验结果

药敏试验显示(表 3), 缓慢葡萄球菌对氨曲南、林可霉素、四环素和磺胺异噁唑耐药, 对红霉素表现为中介; 大肠杆菌对大多数  $\beta$ -内酰

胺类、庆大霉素、链霉素、红霉素、林可霉素、万古霉素、四环素类、环丙沙星、磺胺类、利福平表现为耐药, 亚胺培南介于敏感和耐药之间, 对表中其余抗生素表现为敏感。大肠杆菌

表 3 药敏试验结果

Table 3 Drug sensitivity test results

Drug type	Drug name	Strain 23HYSL		Strain 23HYEC	
		Diameter of antibacterial zone (mm)	Result	Diameter of antibacterial zone (mm)	Result
$\beta$ -lactam	Penicillin	33	S	6	R
	Ampicillin	33	S	6	R
	Piperacillin	34	S	16	R
	Cefalexin	37	S	13	R
	Cefazolin	26	S	6	R
	Cefuroxime	29	S <sup>a</sup>	7	R
	Ceftazidime	20	S	15	R
	Ceftriaxone	26	S <sup>a</sup>	12	R
	Cefoperazone	30	S	9	R
	Aztreonam	6	R	13	R
Aminoglycosides	Imipenem	40	S	22	I
	Amikacin	22	S	22	S
	Gentamicin	23	S	8	R
	Kanamycin	24	S	19	S
Macrolides	Streptomycin	19	S	10	R
	Erythrocine	16	I	7	R
	Lincomycin	11	R	10	R
Lincosamides	Trimethoprim	19	S	20	S
Polypeptide	Polymyxin B	14	S	14	S
	Vancomycin	17	S	13	R
Tetracyclines	Tetracycline	9	R	7	R
	Doxycycline	16	S	7	R
Furane	Furadantin	25	S	20	S
Quinolones	Ofloxacin	17	S	27	S
	Ciprofloxacin	21	S	20	R
Sulfonamides	Sulfamethoxazole	22	S	6	R
	Sulfisoxazole	6	R	9	R
Amphenicol	Chloramphenicol	22	S	27	S
Rifamycin	Rifampicin	22	S	16	R
Other antibiotics	Fosfomycin	33	S	35	S

S: 敏感; I: 中介; R: 耐药; <sup>a</sup>: 判断标准为杭州微生物试剂提供的参考范围

S: Sensitive; I: Intermediary; R: Resistance; <sup>a</sup>: The judgment criteria are within the reference range provided by Hangzhou microbial reagents.

对 9 类药物的至少 1 种表现为耐药, 根据细菌多重耐药(multi-drug resistance, MDR)的定义, 菌株 23HYEC 被归类为 MDR 大肠杆菌。

## 2.6 攻毒小鼠存活率统计

根据平板计数法, 缓慢葡萄球菌的初始菌液浓度为  $1.11 \times 10^9$  CFU/mL, 大肠杆菌的初始菌液浓度为  $4.46 \times 10^9$  CFU/mL。3 批攻毒小鼠的生存曲线如图 4 所示, 攻毒缓慢葡萄球菌的批次中, 菌液浓度为  $10^9$  组小鼠在 4 d 内全部死亡,  $10^8$  组小鼠 7 d 内存活率为 83.3%, 其余组小鼠全部存活, 通过 SPSS 计算得到缓慢葡萄球菌的  $LD_{50} = 1.39 \times 10^8$  CFU。攻毒大肠杆菌的批次中, 菌液浓度为  $10^9$  组小鼠在 1 d 内全部死亡,  $10^8$  组小鼠 7 d 内存活率为 16.7%, 其余组小鼠全部存活, 可得大肠杆菌的  $LD_{50} = 8.97 \times 10^7$  CFU。混合感染的批次中, 菌液浓度为  $10^9$  组小鼠在 1 d 内全部死亡,  $10^8$  和  $10^7$  组小鼠 7 d 内存活率分别为 16.7% 和 66.7%, 其余组小鼠全部存活, 通过 SPSS 计算得到仅需  $4.87 \times 10^6$  CFU 的缓慢葡

萄球菌与  $1.95 \times 10^7$  CFU 的大肠杆菌混合即可达小鼠半数致死量, 与 2 种菌单独攻毒所需量相比均减少, 可见同剂量下混合感染的致死率更高。

## 2.7 攻毒小鼠组织病理变化情况

由图 5 可见, 无菌剖检死亡小鼠 3 个试验组小鼠的各脏器被膜完整, 肺脏呈轻微出血, 由于死亡时间不同而色泽不一; 缓慢葡萄球菌组和混合感染组的肝脏以瘀血、暗红为主要特点, 大肠杆菌组则无明显异常; 脾脏均表现为不同程度的瘀血肿大; 心脏和肾脏未观察到明显病变。在死亡小鼠体内均分离到大量相应攻毒细菌。

肺脏、肝脏和脾脏的组织病理切片如图 6 所示, 缓慢葡萄球菌攻毒组肝脏可见轻微肝细胞脂肪变性, 局部肝窦内见嗜碱性物质沉积和肝窦轻微瘀血扩张, 脾脏红髓区轻度瘀血, 肺脏存在轻微肺泡上皮细胞变性坏死, 少量炎症细胞浸润和局部肺泡腔及肺间质内少量出血, 红细胞溢出; 大肠杆菌攻毒组肝脏可见部分肝

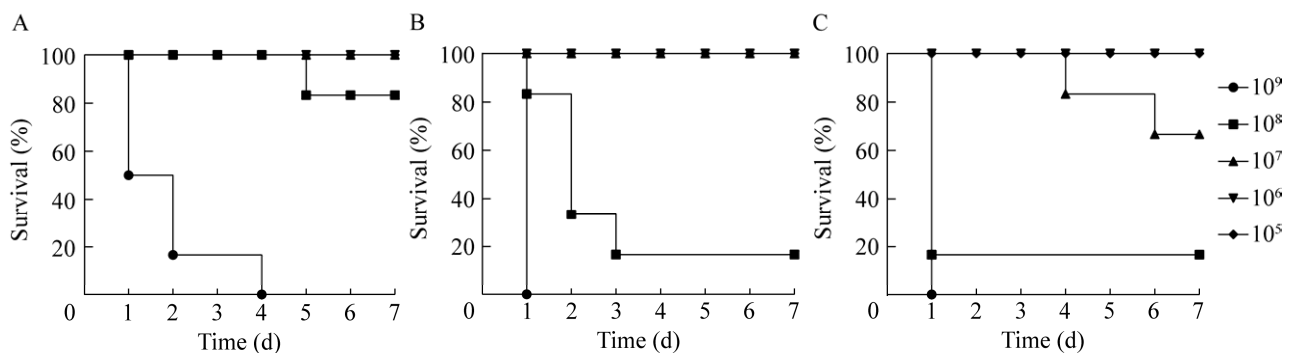


图 4 不同浓度缓慢葡萄球菌和大肠杆菌攻毒小鼠的 7 d 内存存曲线 A: 不同浓度缓慢葡萄球菌感染小鼠的 7 d 内存存曲线. B: 不同浓度大肠杆菌感染小鼠的 7 d 内存存曲线. C: 不同浓度缓慢葡萄球菌和大肠杆菌共同感染小鼠的 7 d 内存存曲线

Figure 4 Survival curves of mice infected with different concentrations of *Staphylococcus lentus* and *Escherichia coli* within 7 d. A: Survival curves of mice infected with different concentrations of *Staphylococcus lentus* within 7 d. B: Survival curves of mice infected with different concentrations of *Escherichia coli* within 7 d. C: Survival curves of mice co infected with different concentrations of *Staphylococcus lentus* and *Escherichia coli* within 7 d.

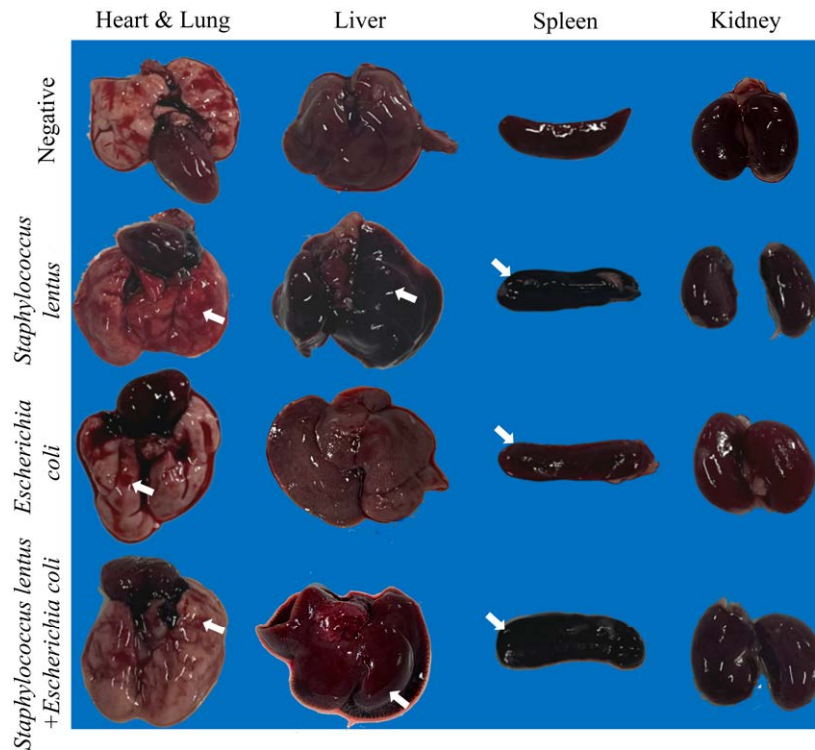


图 5 小鼠剖检结果

Figure 5 Pathological examination results of mice.

细胞空泡变性，极少量肝细胞脂肪变性，少量肝细胞变性坏死和轻微肝窦瘀血，肺脏炎性细胞浸润程度大于缓慢葡萄球菌攻毒组，脾脏无明显病变。混合感染组的肝脏与大肠杆菌攻毒组病变相似，肺脏与之相比还能多观察到轻度充血，除此之外，该组的脾脏白髓脾小结部分脾小结萎缩，生发中心不明显，淋巴细胞数量明显减少，边缘区丢失，红髓区瘀血明显，可见大量红细胞聚集。根据病变情况分级，相较于单独感染组，混合感染组的脾脏病变程度更为严重。

### 2.8 攻毒小鼠主要脏器相对载菌量

进一步检测单独感染组和混合感染组的脏器相对载菌量，结果显示(图 7)，缓慢葡萄球菌攻毒组只能在肝脏和脾脏扩增出大量 qSI 产物，与对照组相比分别可达 263 倍和 584 倍，其他

脏器的相对载菌量较低，几乎无法检出大肠杆菌；大肠杆菌攻毒组在肝脏的载菌量最高，与对照组相比最高可达 776 倍，在脾脏最低，为 173 倍，几乎无法检出缓慢葡萄球菌；混合感染组内两种菌的相对载菌量均较对照组升高，除心脏外，该组缓慢葡萄球菌的相对载菌量较单独感染组减少，而大肠杆菌在小鼠的心脏和肝脏中的相对载菌量均显著高于单独感染组，在其他脏器中的含量较为相似。可见混合感染能帮助大肠杆菌在小鼠的心脏和肝脏定殖。

### 2.9 耐药基因和毒力基因检测结果

1 号分离菌株和 2 号分离菌株的毒力基因和耐药基因 PCR 扩增结果见表 4。缓慢葡萄球菌具有磺胺类耐药基因 *sul1* 和 *sul2*；四环素类耐药基因 *tetA* 和 *tetC*； $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *bla<sub>TEM</sub>* 和 *bla<sub>CTX-M</sub>*，同时含有毒力因子 *clfa*。大肠



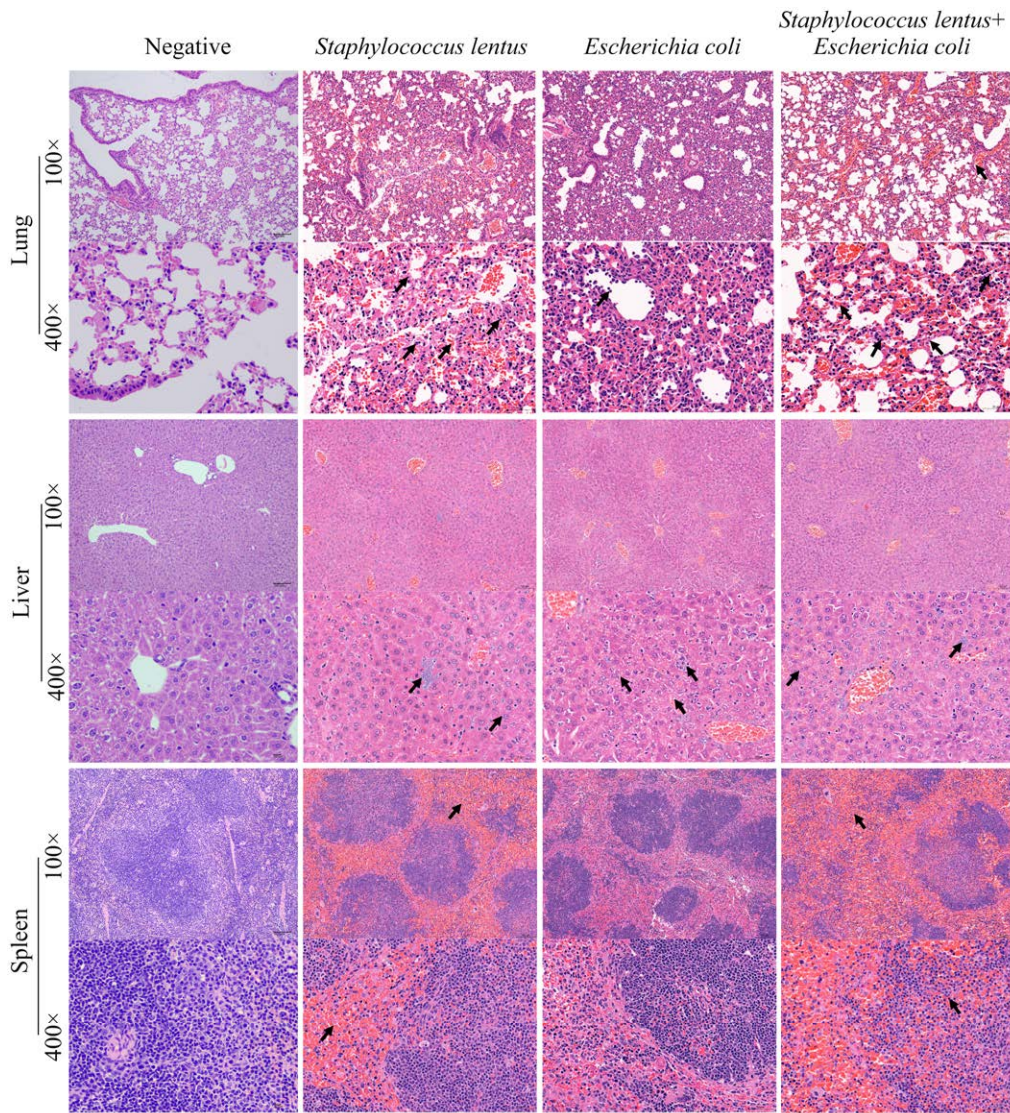


图 6 剖检小鼠组织病理切片  
Figure 6 Pathological section of mice tissue.

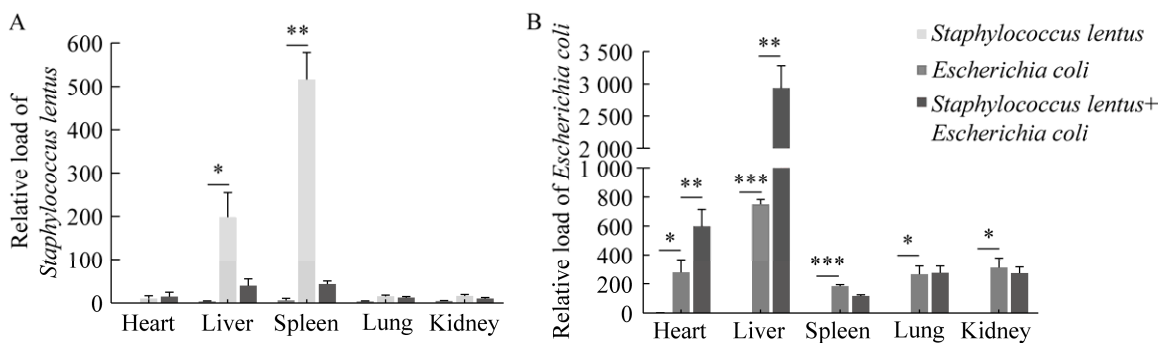


图 7 攻毒小鼠脏器相对载菌量  
Figure 7 Relative bacterial load in organs of infected mice. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

表 4 耐药基因和毒力基因检测结果

Table 4 Drug resistance gene and virulence gene test results

Strain 23HYSL				Strain 23HYEC			
Drug resistance gene	Result	Virulence gene	Result	Drug resistance gene	Result	Virulence gene	Result
<i>sul 1</i>	+	<i>sea</i>	-	<i>sul 1</i>	-	<i>astA</i>	+
<i>sul 2</i>	+	<i>seb</i>	-	<i>sul 2</i>	+	<i>cva/cvi</i>	-
<i>sul3</i>	-	<i>sec</i>	-	<i>sul3</i>	-	<i>fimC</i>	+
<i>tetA</i>	+	<i>fnbA</i>	-	<i>tetA</i>	+	<i>fyuA</i>	+
<i>tetB</i>	-	<i>fnbB</i>	-	<i>tetB</i>	+	<i>hlyF</i>	-
<i>tetC</i>	+	<i>hla</i>	-	<i>tetC</i>	+	<i>irp2</i>	-
<i>tetD</i>	-	<i>hlb</i>	-	<i>tetD</i>	+	<i>iss</i>	+
<i>tetE</i>	-	<i>clfa</i>	+	<i>tetE</i>	-	<i>iucD</i>	-
<i>tetM</i>	-	<i>pvl</i>	-	<i>tetM</i>	-	<i>papC</i>	-
<i>aph(3')-IIa</i>	-	<i>tst</i>	-	<i>aph(3')-IIa</i>	+	<i>sitA</i>	+
<i>ant(3'')-Ia</i>	-			<i>ant(3'')-Ia</i>	+	<i>tsh</i>	-
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	+			<i>bla<sub>TEM</sub></i>	+	<i>vat</i>	+
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	-			<i>bla<sub>SHV</sub></i>	+		
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	+			<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	+		
<i>bla</i>	-			<i>bla</i>	-		
<i>qnrB</i>	-			<i>qnrB</i>	-		
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	-			<i>aac(6')-Ib-cr</i>	-		
<i>floR</i>	-			<i>floR</i>	-		

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

杆菌具有磺胺类耐药基因 *sul2*; 四环素类耐药基因 *tetA*、*tetB*、*tetC* 和 *tetD*; 氨基糖苷类耐药基因 *aph(3')-IIa* 和 *ant(3'')-Ia*,  $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *bla<sub>TEM</sub>*、*bla<sub>SHV</sub>* 和 *bla<sub>CTX-M</sub>*, 同时含有毒力基因 *astA*、*fimC*、*fyuA*、*iss*、*sitA* 和 *vat*。结合耐药表型, 大肠杆菌菌株 23HYEC 对亚胺培南外的  $\beta$ -内酰胺类药物均表现为耐药, 为产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBL) 的 MDR 大肠杆菌。

### 3 讨论与结论

临床感染性疾病通常由多种病原菌混合感染导致<sup>[25]</sup>。本研究的林麝经实验室诊断是由缓慢葡萄球菌和大肠杆菌混合感染致死, 这也是国内外关于林麝源缓慢葡萄球菌致病性研究的

首次报道。在动物上, 该菌曾引起一窝仓鼠急性死亡<sup>[26]</sup>以及猪场发生高死亡率的传染病<sup>[27]</sup>, 均表明其感染后具有致病性。通过小鼠攻毒, 得到分离株 23HYSL 的半数致死量为  $1.39 \times 10^8$  CFU, 对小鼠的毒力低于刘富来等<sup>[27]</sup>的结果。对其进行葡萄球菌属 10 种主要毒力基因检测, 仅发现其携带 *clfa*。据报道, 该基因表达的葡萄球菌细胞壁锚定蛋白聚集因子 A (cell wall-anchored protein clumping factor A, ClfA) 是菌体表面主要黏附因子, 在发病机制和毒力中起重要作用, 它能抑制吞噬作用, 帮助细菌免疫逃逸, 在识别宿主靶细胞后介导与纤维蛋白和纤维蛋白原的黏附, 促进细菌的入侵和增殖<sup>[28]</sup>。在金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)中, ClfA 被认为是建立感染的先决条件<sup>[29]</sup>。由于该蛋白在识

别和结合宿主组织细胞的同时还能识别血浆蛋白, 结合缓慢葡萄球菌造成仓鼠全身性菌血症的报道<sup>[26]</sup>, 可知缓慢葡萄球菌同样是能侵入血液循环, 是引起急性感染的不可忽视的潜在病原。剖检单独感染该菌的小鼠未发现内脏有明显致死性病灶, 病理切片显示肺脏有炎性细胞浸润, 肝脏和脾脏相对载菌量较高, 推测小鼠处于由菌血症形成的多器官转移性感染的病发期。

大肠杆菌的致病性很大程度上取决于特殊毒力因子的存在, 例如菌毛、黏附素、毒素、铁载体、荚膜、溶血素和侵袭素, 这些毒力因子有助于避免或破坏宿主防御, 定殖于关键部位, 引发宿主炎症反应, 从而引起疾病<sup>[11]</sup>。大肠杆菌单独感染后各脏器的相对载菌量均显著升高, 混合感染后也以大肠杆菌的定殖为主导, 表明大肠杆菌菌株 23HYEC 具有强大的定殖功能。在检出的毒力基因中, *fimC* 介导大肠杆菌 I 型菌毛的装配, 与感染黏附有关<sup>[30]</sup>。此外, *astA*、*fyuA*、*iss*、*sitA* 和 *vat* 均是大肠杆菌重要的毒力基因。*fyuA* 是耶尔森氏菌(*Yersinia*)强毒力岛核心区的主要结构基因之一, 该毒力岛与小鼠致死表型密切相关, 可在耶尔森氏菌和大肠杆菌之间水平传播, *fyuA* 编码鼠疫菌素受体与细菌的摄铁能力调节有关<sup>[31]</sup>; 血清存活率增加基因 *iss* 编码外膜蛋白的组成部分, 参与细菌抗补体作用从而增加其致病力<sup>[24]</sup>; *SitA* 介导铁和锰的输入, 锰能保护细菌免受活性氧、辐射和酸性环境的影响<sup>[32]</sup>; 空泡自转运蛋白毒素 *Vat* 能使细胞连接改变, 使细胞骨架变化, 从而形成病变<sup>[33]</sup>。另外, 在分离菌株 23HYEC 中, 由 *astA* 编码的肠聚集性大肠杆菌热稳定肠毒素 1 (enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1, EAST1) 是一种新型致病性肠毒素, 只含有 EAST1 唯一毒素的大肠杆菌定义为肠聚集性大肠杆菌热稳定性肠毒素 1 大肠杆菌

(enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 *Escherichia coli*, EAST1EC)<sup>[34]</sup>。携带 *astA* 基因的致泻性大肠杆菌通常比未携带的表现出更强的致病性<sup>[34]</sup>。因此 EAST1 可能是导致林麝发病的关键原因, 但其是否与其他毒力因子关联作用, 以及在林麝机体内的作用机制等都需要进一步探究。

混合感染结果受多种因素调控, 如不同病原毒力因子间的相互作用、病原菌与宿主细胞之间的相互作用及机体免疫系统抵抗病原体的方式不同等<sup>[25]</sup>。研究显示, 共感染或重复感染的病原之间的相互作用会影响机体的免疫功能<sup>[25]</sup>。共感染会通过诱导免疫细胞的细胞毒性或影响细胞因子的分泌来影响宿主免疫反应, 与单一感染相比, 混合感染常常导致更严重临床症状<sup>[35-37]</sup>。田国钦等<sup>[24]</sup>研究表明, 大肠杆菌、模仿葡萄球菌(*Staphylococcus simulans*)、猪链球菌(*Streptococcus suis*)的混合感染较单独感染的细菌更易在宿主体内快速定殖和增殖, 导致致病性增强。在本研究中, 混合感染组的脾脏病变程度比 2 种菌单独感染更为严重, 并且混合感染增加了大肠杆菌在小鼠心脏和肝脏的定殖, 表明二者对机体的致病产生一定的协同作用。除此之外, 本研究分离的菌株 23HYEC 为产 ESBL 的 MDR 大肠杆菌, 而这种菌在预防和治疗上具有一定困难, 众所周知, 细菌的耐药基因主要通过转移在宿主细胞中保持稳定的质粒或噬菌体获得。本研究中, 2 种菌均检出耐药基因 *sul2*、*tetA*、*tetC*、*bla<sub>TEM</sub>* 和 *bla<sub>CTX-M</sub>*, 并且菌株 23HYEC 还携带菌株 23HYSL 中未检出的氨基糖苷类耐药基因。研究表明, 抗生素抗性基因能够跨菌门传播, 包括革兰氏阴性和革兰氏阳性菌之间的传播<sup>[38]</sup>, 由此不排除二者共同携带的耐药基因是互相传播的结果。因此混合感染的病例在治疗方面应综合考虑, 避免盲

目用药导致质粒携带的耐药基因转移。对于本研究缓慢葡萄球菌与大肠杆菌混合感染的情况,应根据药敏试验结果,选用均敏感的阿米卡星、卡那霉素、甲氧苄啶、多黏菌素 B、呋喃妥因、氧氟沙星、氯霉素和磷霉素治疗,或使用 2 种及以上药物联合治疗的方式。

## REFERENCES

- [1] WANG Y, HARRIS R. *Moschus berezovskii* (errata version published in 2016)[J]. The IUCN Red List of Threatened Species, 2015: e.T13894A-e.T103431781A.
- [2] 祁佳丽. 凤县人工养殖林麝常见疾病调查及呼吸道病原菌的检测分离[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2022.
- QI JL. Investigation on main diseases of artificially cultured forest musk Deer in Fengxian and detection and isolation of respiratory pathogens[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest Agriculture and Forestry University, 2022 (in Chinese).
- [3] 刘春燕. 林麝 *Moschus berezovskii* 养殖种群死亡原因及其生命生理特征研究[D]. 上海: 华东师范大学博士学位论文, 2008.
- LIU CY. A study on reasons of death and physiological features for breeding forest musk Deer (*Moschus berezovskii*)[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of East China Normal University, 2008 (in Chinese).
- [4] 彭茜翎, 王如意, 乔美萍, 周磊, 王洪永, 蒋本模, 吴杰, 杨杰, 其美拉姆, 颜其贵. 一株林麝源弗格森埃希菌的分离鉴定及耐药性[J]. 野生动物学报, 2023, 44(4): 870-877.
- PENG QL, WANG RY, QIAO MP, ZHOU L, WANG HY, JIANG BM, WU J, YANG J, QIMEI RM, YAN QG. Identification and drug resistance analysis of *Escherichia fergusonii* from forest musk Deer[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2023, 44(4): 870-877 (in Chinese).
- [5] 曾红梅, 赵位, 王翔, 晏仕强, 杨泽晓, 罗燕, 程建国, 王印, 姚学萍. 一株林麝肺源创口博德特氏杆菌全基因组及细胞致死性肿胀毒素分析[J]. 微生物学报, 2021, 61(7): 2007-2017.
- ZENG HM, ZHAO W, WANG X, YAN SQ, YANG ZX, LUO Y, CHENG JG, WANG Y, YAO XP. Whole genome sequence and cytolethal distending toxin analysis of a *Bordetella trematum* from the lung of a forest musk Deer[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(7): 2007-2017 (in Chinese).
- [6] 刘洁, 伍茜, 丁慧, 李依濛, 付文龙, 周磊, 程建国, 吴杰, 杨凯惟, 罗燕. 林麝源蜡样芽孢杆菌 SCBCM001 株的分离鉴定及全基因组序列分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4090-4108.
- LIU J, WU X, DING H, LI YM, FU WL, ZHOU L, CHENG JG, WU J, YANG KW, LUO Y. Isolation, identification, and whole genome sequencing of *Bacillus cereus* SCBCM001 from forest musk deer (*Moschus berezovskii*)[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4090-4108 (in Chinese).
- [7] WU CY, ZHANG XY, LIANG JL, LI QL, LIN HL, LIN CQ, LIU HM, ZHOU DY, LU W, SUN ZW, LIN X, ZHANG HL, LI KW, XU T, BAO QY, LU JW. Characterization of florfenicol resistance genes in the coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) isolates and genomic features of a multidrug-resistant *Staphylococcus lentus* strain H29[J]. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 2021, 10(1): 9.
- [8] RIVERA M, DOMINGUEZ MD, MENDIOLA NR, ROSO GR, QUEREDA C. *Staphylococcus lentus* peritonitis: a case report[J]. Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis, 2014, 34(4): 469-470.
- [9] HAY CY, SHERRIS DA. *Staphylococcus lentus* sinusitis: a new sinonasal pathogen[J]. Ear, Nose, & Throat Journal, 2020, 99(6): NP62-NP63.
- [10] ORTEGA-PEÑA S, FRANCO-CENDEJAS R, SALAZAR-SÁENZ B, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ S, CANCINO-DÍAZ ME, CANCINO-DÍAZ JC. Prevalence and virulence factors of coagulase negative *Staphylococcus* causative of prosthetic joint infections in an orthopedic hospital of Mexico[J]. Cirugia y Cirujanos, 2019, 87(4): 428-435.
- [11] Da SILVA GJ, MENDONÇA N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*[J]. Virulence, 2012, 3(1): 18-28.
- [12] 胡勇, 简莹娜, 王戈平, 李秀萍, 林伟山, 王光华, 韦希斌, 马利青. 青海省祁连地区林麝腹泻原因调查与分析[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2023, 53(1): 41-44.
- HU Y, JIAN YN, WANG GP, LI XP, LIN WS, WANG GH, WEI XB, MA LQ. Investigation and analysis on the causes of diarrhea of forest musk Deer in Qilian area of Qinghai Province[J]. Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2023, 53(1): 41-44 (in Chinese).
- [13] 唐婕, 刘文华, 王永奇. 大肠杆菌引起林麝死亡的初步研究[J]. 特产研究, 2009, 31(1): 23-24.
- TANG J, LIU WH, WANG YQ. A preliminary study on



- forest musk Deer death caused by *Escherichia coli*[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2009, 31(1): 23-24 (in Chinese).
- [14] 罗燕, 王朋, 赵洪明, 冯亚文, 武革利, 程建国, 邹立扣, 康纪平, 马炳存, 李蓓. 林麝肺源致病性大肠杆菌分离鉴定及毒力基因 PCR 检测[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(8): 615-618.  
LUO Y, WANG P, ZHAO HM, FENG YW, WU GL, CHENG JG, ZOU LK, KANG JP, MA BC, LI B. Isolation and identification of lung pathogenic *Escherichia coli* from musk Deer and PCR detection of the virulence genes[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2012, 34(8): 615-618 (in Chinese).
- [15] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing[M]//Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. New York: John Wiley & Sons, 1991: 115-175.
- [16] ZHANG AY, WANG HN, TIAN GB, ZHANG Y, YANG X, XIA QQ, TANG JN, ZOU LK. Phenotypic and genotypic characterisation of antimicrobial resistance in faecal bacteria from 30 Giant pandas[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2009, 33(5): 456-460.
- [17] COSTA D, POETA P, SÁENZ Y, COELHO AC, MATOS M, VINUÉ L, RODRIGUES J, TORRES C. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 127(1/2): 97-105.
- [18] MAZAHARI NEZHAD FARD R, BARTON MD, HEUZENROEDER MW. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(6): 559-564.
- [19] HUMMEL AS, HERTEL C, HOLZAPFEL WH, FRANZ CMAP. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(3): 730-739.
- [20] 李怡瑾, 邱宇, 田思璐, 周剑婧, 曹宇恒, 赵位, 喻东, 杨威, 罗燕, 程建国. 林麝肠源和圈舍土源大肠埃希菌的分离鉴定及其耐药基因的检测[J]. 西北农业学报, 2020, 29(10): 1492-1501.  
LI YJ, QIU Y, TIAN SL, ZHOU JJ, CAO YH, ZHAO W, YU D, YANG W, LUO Y, CHENG JG. Isolation, identification and detection of drug-resistant genes of *Escherichia coli* from intestinal tract of forest musk Deer and soil in captive house[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2020, 29(10): 1492-1501 (in Chinese).
- [21] 胥兰. 新疆部分地区牛羊源金黄色葡萄球菌毒力基因检测及耐药性分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2020.  
XU L. Detection of virulence genes and analysis of drug resistance of *Staphylococcus aureus* from cattle and sheep in parts of Xinjiang[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [22] 刘玲红, 胡明, 刘玉庆. 山东省动物源多重高抗大肠杆菌的抗药基因和毒力基因分析[J]. 家禽科学, 2022(6): 4-15.  
LIU LH, HU M, LIU YQ. Analysis of antibiotic resistance genes and virulence genes of multiple high resistant *Escherichia coli* from animals in Shandong Province[J]. Poultry Science, 2022(6): 4-15 (in Chinese).
- [23] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 32nd ed. CLSI supplement M100[M]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022: 1-325.
- [24] 田国钦, 李丰阳, 杨求磊, 闫广谋, 孙长江, 郭昌明, 李娜, 雷连成. 大肠杆菌、模仿葡萄球菌和猪链球菌混合感染对小鼠致病性的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(11): 1230-1234, 1239.  
TIAN GQ, LI FY, YANG QL, YAN GM, SUN CJ, GUO CM, LI N, LEI LC. Study on the pathogenicity of mixed infection of *Escherichia coli*, *Staphylococcus simulans* and *Streptococcus suis* in mice[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2022, 44(11): 1230-1234, 1239 (in Chinese).
- [25] KUMAR N, SHARMA S, BARUA S, TRIPATHI BN, ROUSE BT. Virological and immunological outcomes of coinfections[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2018, 31(4): e00111-17.
- [26] 盛相鹏, 杜崇涛, 许会会, 顾敬敏, 雷连成, 韩文瑜. 仓鼠源缓慢葡萄球菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 动物医学进展, 2010, 31(7): 30-35.  
SHENG XP, DU CT, XU HH, GU JM, LEI LC, HAN WY. Identification and biological characteristics of *Staphylococcus lentus* strain isolated from hamsters[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2010, 31(7): 30-35 (in Chinese).
- [27] 刘富来, 冯翠兰. 猪源缓慢葡萄球菌的分离鉴定及致病性研究[J]. 中国动物检疫, 2011, 28(4): 56-58.  
LIU FL, FENG CL. Identification and pathogenic study of *Staphylococcus lentus* strain isolated from swine[J]. China Animal Health Inspection, 2011, 28(4): 56-58 (in Chinese).



- [28] BROWN AF, MURPHY AG, LALOR SJ, LEECH JM, O'KEEFFE KM, MAC AOGÁIN M, O'HALLORAN DP, LACEY KA, TAVAKOL M, HEARNDEN CH, FITZGERALD-HUGHES D, HUMPHREYS H, FENNELL JP, VAN WAMEL WJ, FOSTER TJ, GEOGHEGAN JA, LAVELLE EC, ROGERS TR, McLOUGHLIN RM. Memory Th1 cells are protective in invasive *Staphylococcus aureus* infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(11): e1005226.
- [29] 达举云. 银川某牛场牛源金黄色葡萄球菌的耐药性分析及 *clfa* 基因多克隆抗体的制备[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2022.
- DA JY. Drug resistance analysis of bovine *Staphylococcus aureus* and preparation of *clfa* gene polyclonal antibody from a cattle farm in Yinchuan[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [30] KLEMM P. FimC, a chaperone-like periplasmic protein of *Escherichia coli* involved in biogenesis of type 1 fimbriae[J]. *Research in Microbiology*, 1992, 143(9): 831-838.
- [31] 成大荣, 朱善元, 丁文卫, 高小攀, 冒灵慧. 3株 HPI<sup>+</sup> 大肠杆菌 *fyuA* 与 *intB* 基因的检测及序列分析[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2009, 30(2): 1-4.
- CHENG DR, ZHU SY, DING WW, GAO XP, MAO LH. Detection and sequencing of *fyuA* and *intB* gene of three HPI-positive *Escherichia coli* isolates[J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2009, 30(2): 1-4 (in Chinese).
- [32] SEYMOUR M, WRIGHT Z, WATERS L. Manganese homeostasis in bacteria: interaction of the small protein MntS and manganese exporter MntP in *E. coli*[J]. *The FASEB Journal*, 2022, 36(S1): R5302.
- [33] DÍAZ JM, DOZOIS CM, AVELAR-GONZÁLEZ FJ, HERNÁNDEZ-CUELLAR E, POKHAREL P, de SANTIAGO AS, GUERRERO-BARRERA AL. The vacuolating autotransporter toxin (vat) of *Escherichia coli* causes cell cytoskeleton changes and produces non-lysosomal vacuole formation in bladder epithelial cells[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 299.
- [34] 何一民, 徐永平, 李晓宇, 柳知君, 杨雪莹, 陈凯迪, 王丽丽. 肠聚集性大肠杆菌热稳定肠毒素 1(EAST1) 的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(14): 27-30.
- HE YM, XU YP, LI XY, LIU ZJ, YANG XY, CHEN KD, WANG LL. Research progress on enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1)[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2022(14): 27-30 (in Chinese).
- [35] SHORT FL, MURDOCH SL, RYAN RP. Polybacterial human disease: the ills of social networking[J]. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(9): 508-516.
- [36] EISENREICH W, RUDEL T, HEESEMANN J, GOEBEL W. How viral and intracellular bacterial pathogens reprogram the metabolism of host cells to allow their intracellular replication[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 42.
- [37] FOUROUR S, MAROIS-CRÉHAN C, MARTELET L, FABLET C, KEMPF I, GOTTSCHALK M, SEGURA M. Intra-species and inter-species differences in cytokine production by porcine antigen-presenting cells stimulated by *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, and *M. flocculare*[J]. *Pathogens*, 2019, 8(1): 34.
- [38] YANG QE, MA XD, ZENG LS, WANG QQ, LI MC, TENG L, HE MZ, LIU C, ZHAO MS, WANG MZ, HUI D, MADSEN JS, LIAO HP, WALSH TR, ZHOU SG. Interphylum dissemination of NDM-5-positive plasmids in hospital wastewater from Fuzhou, China: a single-centre, culture-independent, plasmid transmission study[J]. *The Lancet Microbe*, 2024, 5(1): e13-e23.