



兔源多杀性巴氏杆菌、奇异变形杆菌、大肠杆菌 分离鉴定及混合感染致病性分析

陈冬冬^{1,2}, 胡子喆², 黄叶娥², 崔雪梅², 石团员², 季权安², 宋厚辉¹, 刘 燕^{2*}, 鲍国连^{2*}

(1. 浙江农林大学动物科技学院·动物医学院, 杭州 311300; 2. 浙江省农业科学院畜牧兽医研究所, 杭州 310021)

摘 要: 旨在确定引起宁夏某规模化肉兔养殖场家兔死亡可疑病原并进行致病性分析。通过病死兔剖检、细菌分离培养、16S rRNA 测序分析、PCR 鉴定、药敏试验、小鼠和家兔攻毒试验, 确定引起家兔死亡的病原菌及其致病性。结果显示, 细菌分离培养出 3 株革兰阴性菌, 经 16S rRNA 测序分析和 PCR 鉴定为荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌、奇异变形杆菌和大肠杆菌, 分别命名为 QF24-Pm01、QF24-Ps02 和 QF24-Ec03。通过 K-B 法药敏试验发现 QF24-Pm01、QF24-Ps02 和 QF24-Ec03 共同对青霉素、卡那霉素、头孢唑林等临床常用药物耐药, 对头孢曲松敏感。耐药基因检测结果, 3 株分离菌均检出耐药基因 *aadB*、*strA*、*strB*、*bla_{TEM}* 和 *sul1*。毒力基因检测结果, 巴氏杆菌携带 *exxB*、*exbD* 和 *hgbA* 等 16 种毒力基因, 奇异变形杆菌携带 *ureC*、*zapA*、*atfC*、*atfA* 和 *pmfA* 毒力基因, 大肠杆菌携带 *eaeA* 和 *fimC* 毒力基因。小鼠致病性试验显示, QF24-Pm01、QF24-Ps02 和 QF24-Ec03 的 LD_{50} 分别为 9.27×10^5 CFU、 1.43×10^6 CFU 和 1.88×10^7 CFU。小鼠混合感染致病性试验结果, QF24-Pm01 组、QF24-Ps02 组和 QF24-Ec03 组小鼠分别于攻毒后 9、18 和 16 h 发生死亡, QF24-Pm01+QF24-Ec03 混合感染组及 QF24-Ps02+QF24-Ec03 混合感染组小鼠分别于攻毒后 6 和 13 h 出现死亡。病理组织学观察显示, 单纯感染与混合感染均可导致肺、肝、肠等组织出现显著损伤。主要病理变化表现为: 肺组织出现间质水肿、毛细血管充血及中性粒细胞浸润; 肝组织呈现肝细胞脂肪变性及肝细胞索排列紊乱; 小肠组织则表现为上皮细胞脱落及肠绒毛断裂等病变。家兔致病性试验结果显示, QF24-Pm01+QF24-Ec03 混合感染组和 QF24-Pm01 组家兔分别于攻毒后 24 和 36 h 全部死亡, QF24-Ps02+QF24-Ec03 混合感染组、QF24-Ec03 和 QF24-Ps02 组家兔攻毒后 7 d 死亡率分别为 60%、20% 和 40%。试验兔剖检结果显示, QF24-Pm01+QF24-Ps02+QF24-Ec03 混合感染组家兔的肺出现充血、水肿, 呈现花玻璃样改变, 脾萎缩并呈深褐色, 该病理变化与临床解剖所观察到的家兔病变一致。综上所述, 多杀性巴氏杆菌与大肠杆菌混合后致病性增强, 大肠杆菌与奇异变形杆菌混合后亦如此。多杀性巴氏杆菌、奇异变形杆菌与大肠杆菌的混合感染可能是该场肉兔高死亡率的主要原因。因此在预防多杀性巴氏杆菌感染同时, 还应加强对大肠杆菌和奇异变形杆菌的防控, 以降低混合感染风险和死亡率。

关键词: 兔; 多杀性巴氏杆菌; 奇异变形杆菌; 大肠杆菌; 耐药性; 毒力基因; 混合感染

中图分类号: S852.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-1046-17

Isolation, Identification and Pathogenicity Analysis of Mixed Infection of *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* from Rabbits

CHEN Dongdong^{1,2}, HU Zizhe², HUANG Ye'e², CUI Xuemei², SHI Tuanyuan², JI Quanan²,
SONG Houhui¹, LIU Yan^{2*}, BAO Guolian^{2*}

收稿日期: 2025-02-13

基金项目: 浙江省重点研发项目(2021C02068-7); 国家兔产业体系项目(CARS-43-C-2)

作者简介: 陈冬冬, 硕士生, 主要从事畜禽传染病研究, E-mail: 869953523@qq.com; 胡子喆, 博士, 主要从事畜禽传染病研究, E-mail: huzizhede@163.com。陈冬冬和胡子喆为同等贡献作者

* 通信作者: 鲍国连, 主要从事畜禽细菌病研究, E-mail: baoguolian@163.com; 刘 燕, 主要从事畜禽细菌病研究, E-mail: ly-liuyan@163.com

(1. College of Animal Science and Technology·College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China; 2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: This study aimed to identify the suspected pathogens causing rabbit mortality in a large-scale meat rabbit farm in Ningxia and analyze their pathogenicity. The causative pathogens and their pathogenicity were determined through necropsy of deceased rabbits, bacterial isolation and culture, 16S rRNA sequencing analysis, PCR identification, antimicrobial susceptibility testing, and challenge experiments in mice and rabbits. Results showed that 3 Gram-negative bacterial strains were isolated and identified as capsular type A *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, and *Escherichia coli* through 16S rRNA sequencing and PCR identification. These strains were designated as QF24-Pm01, QF24-Ps02, and QF24-Ec03, respectively. Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer (K-B) method revealed that QF24-Pm01, QF24-Ps02, and QF24-Ec03 exhibited resistance to commonly used clinical drugs such as penicillin, kanamycin, and enrofloxacin, but were sensitive to ceftriaxone. Detection of resistance genes showed that all three isolates carried resistance genes *aadB*, *strA*, *strB*, *bla*_{TEM}, and *sul1*. Virulence gene analysis indicated that *Pasteurella multocida* carried 16 virulence genes, including *exbB*, *exbD*, and *hgbA*; *Proteus mirabilis* carried *ureC*, *zapA*, *atfC*, *atfA*, and *pmfA*; and *Escherichia coli* carried *eaeA* and *fimC*. Mouse pathogenicity experiments revealed LD_{50} values of 9.27×10^5 CFU, 1.43×10^6 CFU, and 1.88×10^7 CFU for QF24-Pm01, QF24-Ps02, and QF24-Ec03, respectively. The results of the mixed-infection pathogenicity assay in mice showed that mortality occurred at 9 h, 18 h, and 16 h post-inoculation in the QF24-Pm01, QF24-Ps02, and QF24-Ec03 groups, respectively. In contrast, the QF24-Pm01+QF24-Ec03 and QF24-Ps02+QF24-Ec03 co-infection groups exhibited mortality at 6 h and 13 h post-inoculation, respectively. Histopathological analysis revealed that both single and mixed infections resulted in tissue damage in the lungs, liver, and intestines. The primary pathological changes included pulmonary interstitial edema, capillary congestion, and neutrophil infiltration; hepatic steatosis and disordered hepatocyte cord arrangement; as well as intestinal epithelial shedding and villous rupture. In the rabbit pathogenicity assay, all rabbits in the QF24-Pm01 + QF24-Ec03 co-infection group and the QF24-Pm01 group succumbed at 24 and 36 h post-inoculation, respectively. The mortality rates at 7 days post-inoculation for the QF24-Ps02+QF24-Ec03, QF24-Ec03, and QF24-Ps02 groups were 60%, 20%, and 40%, respectively. Necropsy findings demonstrated that rabbits in the QF24-Pm01+QF24-Ps02+QF24-Ec03 co-infection group exhibited pulmonary congestion and edema with a ground-glass appearance, as well as splenic atrophy and dark brown discoloration. These pathological changes were consistent with the lesions observed in clinical necropsy examinations of affected rabbits. This study demonstrates that the pathogenicity of *Pasteurella multocida* is enhanced when co-infected with *Escherichia coli*, and that *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* exhibit increased virulence when co-infected. Therefore, co-infection with *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, and *Escherichia coli* may be the primary cause of high mortality rates in meat rabbits at the studied facility. Consequently, in addition to preventing *Pasteurella multocida* infection, control measures against *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* should be reinforced to reduce the risk of mixed infections and associated mortality.

Keywords: rabbit; *Pasteurella multocida*; *Proteus mirabilis*; *Escherichia coli*; antimicrobial resistance; virulence gene; mixed infection

* **Corresponding authors:** BAO Guolian, E-mail: baoguolian@163. com; LIU Yan, E-mail: ly-liuyan@163. com

多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*),多形态、无芽孢、无鞭毛、无运动性的革兰阴性小杆菌,是一种多宿主、条件性致病菌,可引起猪肺疫、牛出血性败血症、禽霍乱、兔巴氏杆菌病等,其中兔巴氏杆菌病对我国家兔养殖业造成了严重困扰和经济损失。家兔感染巴氏杆菌临床表现为严重的呼吸道症状、中耳炎、鼻炎、结膜炎、败血症等^[1],该病对2~6月龄仔兔危害最大,常常引起大批兔发病和死亡,严重阻碍了我国养兔行业的发展^[2]。目前,国内兔巴氏杆菌主要流行血清型为荚膜A型,近年来D型、F型发病率有所上升^[3-4]。奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)属于肠杆菌科变形杆菌属,无荚膜、无芽孢、有周身鞭毛,是一种极具运动力的兼性厌氧菌。相关研究报道,奇异变形杆菌可引起多种动物腹泻、肺炎、流产和尿道炎等^[5]。兔感染奇异变形杆菌后,常出现精神萎靡、扎堆、食欲不振、腹泻等症状,还可引起怀孕母兔流产,甚至在短时间内大量死亡^[6-7]。近年来,关于奇异变形杆菌引起的多种动物感染的报道越来越多,流行范围不断扩大^[8]。因此,在日常饲养管理过程中也要加强对奇异变形杆菌的防控。大肠埃希菌(*Escherichia coli*)是革兰阴性无芽孢直杆菌,大部分菌株属于人和动物肠道的正常菌群^[9]。大肠杆菌病是由致病性大肠杆菌及其毒素引起的肠道传染性疾病,病死率高,在家兔养殖中较为常见、多发^[10]。多数病兔发病初期腹部膨胀,粪球细小、成串,覆有透明、胶冻状黏液,随后出现水样腹泻。剖检可见胃膨大,充满液体和气体,空肠、回肠和盲肠充满半透明胶冻样液体^[11]。大肠杆菌病一年四季均可发生,各年龄家兔均易感,对断乳至4月龄的幼兔危害最大,是导致断乳后幼兔死亡的主要原因之一^[12]。

近期,某规模化家兔养殖场出现大量肉兔死亡,主要临床表现为腹泻、呼吸困难和急性死亡。本研究旨在鉴定引发该场家兔死亡的可疑病原,并对其致病性进行分析;同时,通过动物试验评估不同病原菌混合感染的致病性,以期为家兔细菌性疾病的综合诊断、治疗与防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

病死兔3只;SPF级ICR小鼠雌雄各半,购自杭

州杭斯生物科技有限公司;胰酪大豆胨液体培养基(Tryptone soya broth, TSB)、胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptic soy agar, TSA)、马丁肉汤培养基(martin broth, MTB)等培养基购自美国赛默飞世尔科技公司;麦康凯琼脂培养基,购自青岛海博;新生犊牛血清,购自浙江天杭生物科技有限公司;革兰染液,购自杭州微生物试剂有限公司;DL 2000 Marker,购自宝日医生物技术(北京)有限公司;核酸染料,购自广州赛百盛生物科技有限公司;琼脂糖,购自上海贝晶生物技术有限公司;2×Taq SuperMix,购自上海吐露港生物科技有限公司。

双目显微镜(ICX41,宁波舜宇仪器有限公司);PCR仪(846-x-070-301, Biometra);恒温培养箱(HWS-160Y,宁波科晟实验仪器有限公司);恒温振荡培养箱(ZQLY-180V,上海知楚仪器有限公司);高速冷冻离心机(GTR320C,湖南可成仪器设备有限公司);凝胶成像系统(GelDoc-It,德国耶拿分析仪器有限公司);高通量微生物生长曲线分析系统(MicroScreen,杰灵仪器制造(天津)有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 临床剖检及细菌分离培养 对3只死亡家兔进行剖检,无菌采集心、肝、肺和肾组织,划线接种于胰蛋白胨大豆琼脂培养基和麦康凯琼脂培养基,随后,放入37℃恒温培养箱培养24 h。挑取上述培养皿中不同形态单菌落划线接种于胰蛋白胨大豆琼脂培养基和麦康凯琼脂培养基进一步纯化。取纯化后单菌落进行革兰染色,步骤简述如下:1)将单菌落涂布于载玻片上,风干后热固定;2)滴加结晶紫染40 s,水洗;3)滴加碘液染40 s,水洗;4)用95%乙醇脱色30 s,立即水洗;5)番红复染50 s,水洗后吸干;6)油镜(100×)观察染色结果。

1.2.2 分子生物学鉴定 纯化后的单菌落接种于TSB培养基,37℃,200 r·min⁻¹振荡培养16 h。以菌液为模板,通过PCR扩增巴氏杆菌*kmt1*特异性基因、荚膜A、B、D、E、F型基因和细菌通用16S rRNA基因,引物信息见表1。PCR扩增体系:菌液模板1.5 μL,上、下游特异性引物各1.5 μL(浓度:10 μmol·L⁻¹),2×Taq SuperMix 15 μL, ddH₂O 10.5 μL。PCR反应程序为:95℃预变性5 min;

95 °C变性 15 s,退火 15 s,72 °C延伸 40 s,34 个循环,72 °C延伸 5 min,4 °C保存,通过凝胶电泳检测扩增

结果,将 16S rRNA 扩增产物送至杭州尚亚生物技术有限公司测序。

表 1 引物信息

Table 1 The detailed information of primers

血清型 Serogroup	基因 Genes	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	片段大小/bp Fragment length	参考文献 References
All	<i>kmt1</i>	F: ATCCGCTATTTACCCAGTGG R: GCTGTAAACGAACCTGCCAC	460	[13]
A	<i>hyaD-hyaC</i>	F: TGCCAAAATCGCAGTCAG R: TTGCCATCATTGTCAGTG	1 044	[13]
B	<i>bcdD</i>	F: CATTTATCCAAGCTCCACC R: GCCCGAGAGTTTCAATCC	760	[13]
D	<i>dcbF</i>	F: TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC R: CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657	[13]
E	<i>ecbJ</i>	F: TCCGCAGAAAATTATTGACTC R: GCTTGCTGCTTGATTTTGTC	511	[13]
F	<i>fcbD</i>	F: AATCGGAGAACGCAGAAATCAG R: TTCCGCCGTCAATTACTCTG	851	[13]
16S rRNA		F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R: GGTTACCTTGTACGACTT	1 492	[14]

1.2.3 系统发育分析 将分离菌株的 16S rRNA 序列与 NCBI 数据库 16S ribosomal RNA sequences 进行比对,并下载同源序列。使用 Mega 11.0 软件对本研究的测序 16S rRNA 序列和下载的同源序列进行 align 分析,并通过 Maximum Likelihood 法构建系统发育树。

1.2.4 分离菌株耐药基因和毒力基因检测 参考文献[15],合成氨基糖苷类、氯霉素类等共 8 类 20 种耐药基因引物。参考文献[15-17],合成 24 种巴氏杆菌毒力基因,8 种奇异变形杆菌毒力基因和 13 种大肠杆菌毒力基因引物。引物均由杭州尚亚生物技术有限公司合成。PCR 反应条件同“1.2.2”。

1.2.5 药敏试验 根据美国临床实验室标准化委员会标准,采用 Kirby-Bauer 纸片扩散法,选取氨苄西林、阿莫西林、头孢呋辛、头孢唑林、头孢曲松、阿米卡星、卡那霉素、链霉素、庆大霉素、四环素、多西环素、恩诺沙星、诺氟沙星、林可霉素、复方新诺明、氟苯尼考、吉他霉素、多黏菌素 B、新霉素和青霉素 20 种药敏纸片进行药敏试验,根据 CLSI 第 31 版 M100 规定的耐药性试验文献^[18]进行结果判定。

1.2.6 分离菌株生长曲线测定 使用高通量微生物生长曲线分析系统 MicroScreen 测定分离菌株的生长曲线,操作流程简要概述如下:1)将巴氏杆菌 QF24-Pm01 菌液接种于 1 mL MTB,奇异变形杆

菌 QF24-Ps02 和大肠杆菌 QF24-Ec03 菌液分别接种于 1 mL TSB,每株菌设置 3 个重复孔,并设置空白对照。2)将接种好的 48 孔板放入仪器卡槽内,仪器连接电脑。3)仪器参数设置:波长 600 nm,温度 37 °C,转速 800 r·min⁻¹,间隔 1 h 检测一次 OD 值,试验总时长 24 h。4)使用 GraphPad Prism 9.0 处理原始数据并绘制生长曲线。

1.2.7 动物试验

1.2.7.1 小鼠攻毒试验:挑取 QF24-Pm01 单菌落接种于 MTB,QF24-Ps02 和 QF24-Ec03 单菌落接种于 TSB,37 °C,200 r·min⁻¹振荡培养。3 株分离菌培养至对数生长期。将上述菌液 4 °C,5 000 r·min⁻¹,离心 5 min,弃上清,加入等量 PBS 并进行重悬。使用平板计数法计算菌液浓度。将 100 只小鼠分为 4 批,第 1 批、第 2 批和第 3 批小鼠,每批 4 组,每组设置 5 个重复,根据预试验,调整 3 株分离菌株菌液浓度大致为 10⁸、10⁷、10⁶ 和 10⁵ CFU·mL⁻¹ 4 个梯度。腹腔注射相应浓度梯度的 QF24-Pm01、QF24-Ps02 和 QF24-Ec03 菌液 0.2 mL。记录死亡时间,计算半数致死量 LD₅₀。第 4 批小鼠分为 8 组,每组设置 5 个重复,根据 LD₅₀ 试验结果,调整菌液浓度为 10⁹ CFU·mL⁻¹。采取腹腔注射方式进行攻毒,攻毒剂量为 0.2 mL·只⁻¹,第 1、2 和 3 组小鼠分别注射上述 QF24-Pm01、QF24-Ps02 和 QF24-Ec03 单菌液;

将 QF24-Pm01、QF24-Ps02 和 QF24-Ec03 菌液按 1:1 或 1:1:1 体积比进行混合。第 4 组注射 QF24-Pm01 与 QF24-Ps02 混合菌液;第 5 组注射 QF24-Pm01 与 QF24-Ec03 混合菌液;第 6 组注射 QF24-Ps02 与 QF24-Ec03 混合菌液;第 7 组注射 QF24-Pm01、QF24-Ps02 和 QF24-Ec03 混合菌液;第 8 组,对照组注射等量 PBS。攻毒后,记录小鼠的精神状态和死亡时间,无菌条件下解剖死亡小鼠,进行细菌分离鉴定并收集病料制作病理组织学切片。

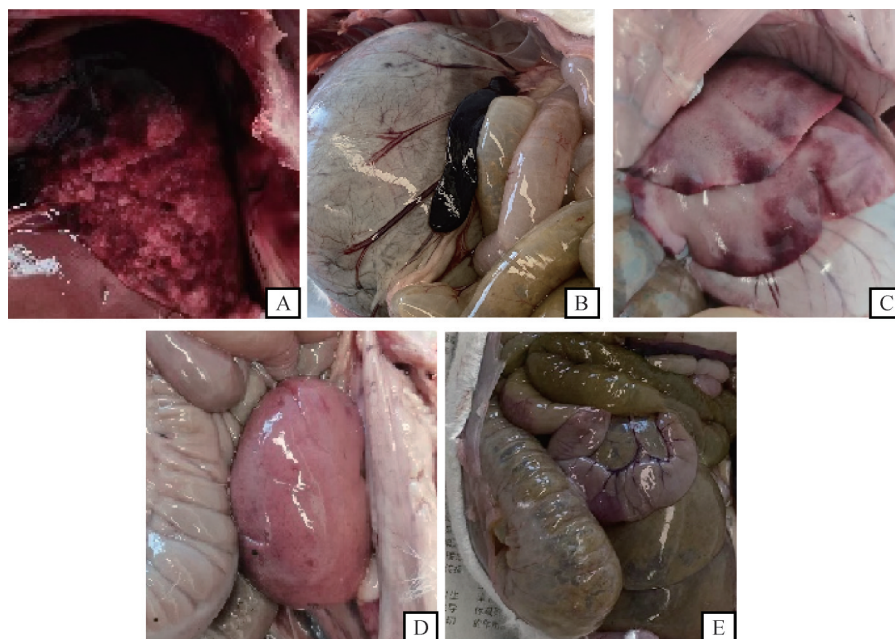
1.2.7.2 家兔攻毒试验:根据预试验,将 3 株菌液浓度均调至 10^9 CFU·mL⁻¹。将 40 只家兔分成 8 组、每组设置 5 个重复,采取耳缘静脉注射方式进行攻毒,攻毒剂量为 1 mL·只⁻¹。第 1 组注射 QF24-Pm01 菌液;第 2 组注射 QF24-Ps02 菌液;第 3 组注射 QF24-Ec03 菌液。将 QF24-Pm01、QF24-Ps02 和 QF24-Ec03 菌液按 1:1 或 1:1:1 体积比进行混合。第 4 组注射 QF24-Pm01 与 QF24-Ps02 混合菌

液;第 5 组注射 QF24-Pm01 与 QF24-Ec03 混合菌液;第 6 组注射 QF24-Ps02 与 QF24-Ec03 混合菌液;第 7 组家兔注射 QF24-Pm01、QF24-Ps02 和 QF24-Ec03 混合菌液;第 8 组,对照组家兔注射等量 PBS。观察并记录家兔的精神状态和死亡时间,解剖死亡家兔,观察解剖病理变化。

2 结果

2.1 临床剖检

临床剖检病死兔,观察各内脏器官的剖检变化,肺充血肿大具有淤血呈花玻璃状(图 1A),根据该兔场既往病史推断这可能是由于多杀性巴氏杆菌引起。脾脏萎缩呈深褐色(图 1B);肝肿大、淤血(图 1C);肾具有明显针尖状出血点(图 1D);肠道明显鼓气,肠壁变薄,且有弥散充血和出血斑,肠道内充满胶冻状物质(图 1E),该病变与大肠杆菌所致剖检症状相似度较高。



A. 肺;B. 脾;C. 肝;D. 肾;E. 肠

A. Lung; B. Spleen; C. Liver; D. Kidney; E. Intestine

图 1 病死兔剖检

Fig. 1 The necropsy examination of deceased rabbits

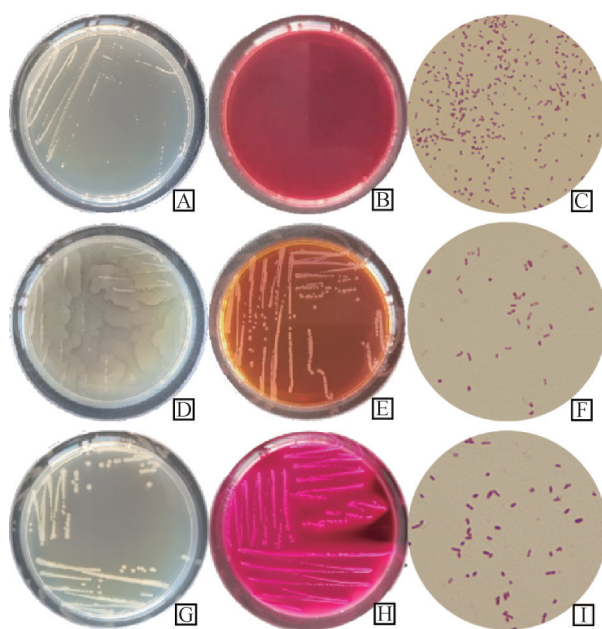
2.2 细菌分离培养

经病原菌的分离纯化、革兰染色及镜检,从 3 只病死家兔的心、肝和肺中均分离出 3 种革兰阴性菌(图 2)。观察发现分离菌株 A 在 TSA 培养基上生长缓慢,在 45°折光下有荧光,呈边缘光滑的扁平菌

落,在麦康凯培养基上不生长。菌株 B 在 TSA 培养基上表现出游散性生长特性,培养基表面形成薄膜状扩散结构,并呈现厚薄相间、层层波状排列的同心环状菌苔,同时伴有明显的腐败性气味。在麦康凯琼脂平板上,该菌株形成无色、半透明且扁平的

菌落。分离菌株C在TSA培养基呈透明或者半透明、微隆起、表面光滑、圆形的灰白色小菌落,在麦

康凯琼脂平板上为无色至淡粉色圆形光滑、半透明、湿润的小菌落。



A、B. 分离菌株A分别在胰蛋白胨大豆琼脂培养基和麦康凯琼脂培养基上的菌落形态;C. 分离菌株A革兰染色(1 000×);D、E. 分离菌株B分别在胰蛋白胨大豆琼脂培养基和麦康凯琼脂培养基上的菌落形态;F. 分离菌株B革兰染色(1 000×);G、H. 分离菌株C分别在胰蛋白胨大豆琼脂培养基和麦康凯琼脂培养基上的菌落形态;I. 分离菌株C革兰染色(1 000×)

A, B. Colony morphology of isolate strain A on TSA medium and MacKay agar medium, respectively; C. Gram staining of isolated strain A (1 000×); D, E. Colony morphology of isolate strain B on TSA medium and MacKay agar medium, respectively; F. Gram staining of isolated strain B (1 000×); G, H. Colony morphology of isolate strain C on TSA medium and MacKay agar medium, respectively; I. Gram staining of isolated strain C (1 000×)

图2 三株分离菌的形态和培养特性观察

Fig. 2 Observation on morphology and culture characteristics of 3 strains of isolated bacteria

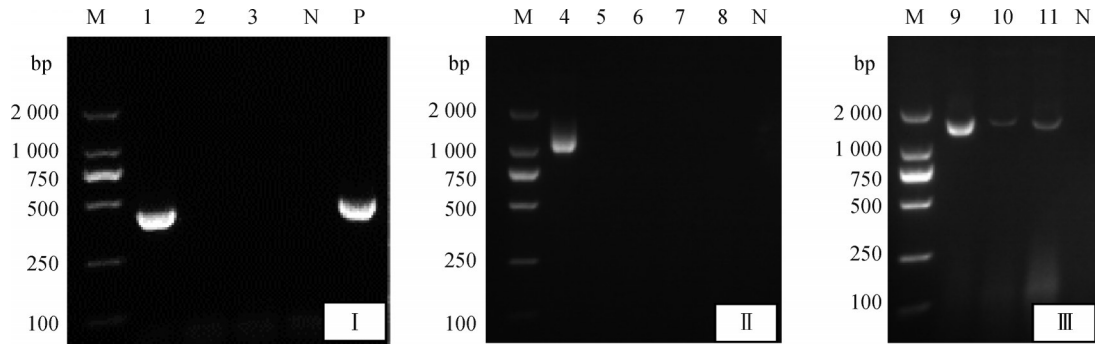
2.3 分子生物学鉴定及系统发育分析

以A、B、C菌液作为模版,菌株A扩增到了*kmt1*基因,表明分离菌株A可能是多杀性巴氏杆菌(图3I),进一步通过PCR血清型鉴定,发现该菌株为荚膜A型多杀性巴氏杆菌(图3II)。使用细菌16S rRNA通用引物扩增到了分离菌株A、B和C的16S rRNA条带(图3III),将扩增产物送公司进行Sanger测序。系统发育进化分析如图4所示。分离菌株A与登录号为NR041810.1的多杀性巴氏杆菌同源性为99.93%(图4A),故将其命名为QF24-Pm01;分离菌株B与登录号为NR043997.1的奇异变形杆菌同源性为99.79%(图4B),故将其命名为QF24-Ps02;分离菌株C与登录号为NR074902.1的大肠杆菌同源性为99.29%(图4C),故将其命名为QF24-Ec03。

2.4 耐药基因和毒力基因检测结果

分离菌株QF24-Pm01、QF24-Ps02和QF24-Ec03的耐药基因(表2)和毒力基因(表3)PCR扩增结果。3株分离菌株都具有氨基糖苷类耐药基因*aadB*;链霉素类耐药基因*strA*和*strB*;β-内酰胺类耐药基因*bla_{TEM}*;磺胺类耐药基因*sul1*。氯霉素类耐药基因*floR*;β-内酰胺类耐药基因*bla_{OXA}*和磺胺类耐药基因*sul2*仅在QF24-Ps02中存在。QF24-Ec03还具有四环素类耐药基因*tetA*和喹诺酮类耐药基因*qnrS*。

毒力基因结果显示,QF24-Pm01具有铁离子摄取因子*exbB*、*exbD*、*hgbA*、*hgbB*和*tonB*;黏附素相关基因*fimA*、*hsf2*和*ptfA*;膜蛋白相关基因*ompH*、*plpB*、*psl*、*plpE*和*oma87*;超氧化物歧化酶基因*sodA*;唾液酸激酶相关基因*nanB*;透明质酸相关基因*pm_{HAS}*。QF24-Ps02具有脲酶相关基因*ureC*,金

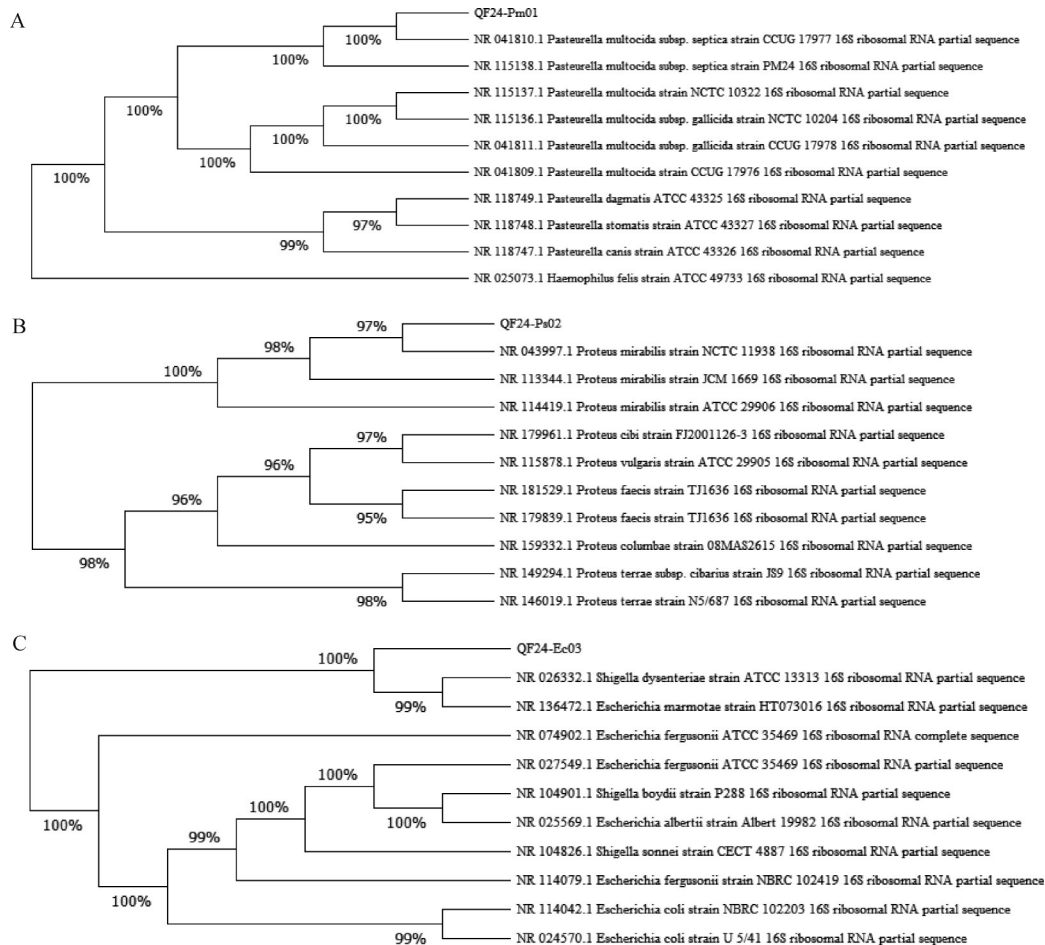


I. *kmt1* 基因扩增: M. Marker; 1. 分离菌株 A; 2. 分离菌株 B; 3. 分离菌株 C; N. 阴性对照; P. 多杀巴氏杆菌。II. 分离菌株 A 荚膜血清型鉴定结果: M. Marker; 4. 荚膜血清 A 型; 5. 荚膜血清 B 型; 6. 荚膜血清 D 型; 7. 荚膜血清 E 型; 8. 荚膜血清 F 型; N. 阴性对照。III. 分离菌株 16S rRNA 扩增结果: M. Marker; 9. 分离菌株 A; 10. 分离菌株 B; 11. 分离菌株 C; N. 阴性对照

I. Amplification of *kmt1* gene: M. Marker; 1. Isolate A; 2. Isolate B; 3. Isolate C; N. Negative control; P. *Pasteurella multocida*. II. Identification results of serotype of isolated strain A capsule: M. Marker; 4. Capsule serum type A; 5. Capsule serum type B; 6. Capsule serum type D; 7. Capsule serum type E; 8. Capsule serum type F; N. Negative control. Panel III. The amplification results of the 16S rRNA from the isolated strain; M. Marker, 9. Isolate A, 10. Isolate B, 11. Isolate C, N. Negative control

图 3 分离菌株 *kmt1* 基因、荚膜血清型、16S rRNA 的扩增结果

Fig. 3 The results of PCR amplification for the isolated strain's *kmt1* gene, capsular serotypes and 16S rRNA



A. QF24-Pm01 (多杀巴氏杆菌); B. QF24-Ps02 (奇异变形杆菌); C. QF24-Ec03 (大肠杆菌)

A. QF24-Pm01 (*Pasteurella multocida*); B. QF24-Ps02 (*Proteus mirabilis*); C. QF24-Ec03 (*Escherichia coli*)

图 4 分离菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of isolates based on 16S rRNA gene sequence

表 2 耐药基因检测结果

Table 2 Drug resistance gene test results

基因类型 Gene classification	基因 Gene	QF24-Pm01 (<i>Pasteurella multocida</i>)	QF24-Ps02 (<i>Proteus mirabilis</i>)	QF24-Ec03 (<i>Escherichia coli</i>)
氨基糖苷类 Aminoglycosides	<i>aadA25</i>	—	—	—
	<i>aadB</i>	+	+	+
氯霉素 Chloramphenicol class	<i>floR</i>	—	+	—
四环素类 Tetracyclines	<i>tetA</i>	—	—	+
	<i>tet(H)</i>	—	—	—
	<i>tetB</i>	—	—	—
	<i>tetG</i>	—	—	—
链霉素类 Aminoglycosides	<i>strA</i>	+	+	+
	<i>strB</i>	+	+	+
喹诺酮类 Quinolones	<i>qnrS</i>	—	—	+
	<i>qnrA</i>	—	—	—
	<i>qnrB</i>	—	—	—
β -内酰胺类 Beta-lactam antibiotics	<i>bla_{TEM}</i>	+	+	+
	<i>ermA</i>	—	—	—
	<i>bla_{OXA}</i>	—	+	—
	<i>bla_{CTX-M-2}</i>	—	—	—
	<i>bla_{SHV}</i>	—	—	—
多肽类 Polypeptides	<i>mcr-1</i>	—	—	—
磺胺类 Sulfonamides	<i>sul1</i>	+	+	+
	<i>sul2</i>	—	+	—

“+”表示阳性;“—”表示阴性

“+” means positive; “—” means negative

表 3 毒力基因检测结果

Table 3 Results of virulence genes detection

多杀性巴氏杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>		奇异变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i>		大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	
毒力基因 Virulence gene	结果 Results	毒力基因 Virulence gene	结果 Results	毒力基因 Virulence gene	结果 Results
<i>exbB</i>	+	<i>oma87</i>	—	<i>ureC</i>	+
<i>exbD</i>	+	<i>oomph</i>	+	<i>mrpA</i>	—
<i>hgbA</i>	+	<i>plpB</i>	+	<i>zapA</i>	+
<i>hgbB</i>	+	<i>psl</i>	+	<i>atfC</i>	+
<i>tonB</i>	+	<i>plpE</i>	+	<i>atfA</i>	+
<i>fur</i>	—	<i>soda</i>	+	<i>pmfA</i>	+
<i>fimA</i>	+	<i>sodC</i>	—	<i>ucaA</i>	—
<i>hsf1</i>	—	<i>tbpA</i>	—	<i>rsbA</i>	—
<i>hsf2</i>	+	<i>nanB</i>	+		
<i>ptfA</i>	+	<i>nanH</i>	—		
<i>pfhA</i>	—	<i>pmHAS</i>	+		
<i>tadD</i>	—				
<i>oma87</i>	+				

“+”表示阳性;“—”表示阴性

“+” means positive; “—” means negative

属蛋白酶相关基因 *zapA*, ATF 菌毛合成相关基因 *atfC*, ATF 菌毛结构亚单位相关基因 *atfA* 和 PMF 菌毛结构亚单位相关基因 *pmfA*。QF24-Ec03 具有非菌毛黏附素 *eaeA* 基因和 I 型菌毛亚基 *fimC* 基因。

2.5 药敏试验

药敏试验结果表明 3 株分离菌株对头孢唑林、阿米卡星、卡那霉素、链霉素、庆大霉素、恩诺沙星、林可霉素、吉他霉素、多粘菌素 B、新霉素和青霉素

全部耐药,对头孢曲松敏感。QF24-Pm01 对氨苄西林和氟苯尼考敏感;QF24-Fs02 对头孢呋辛敏感, QF24-Ec03 对氨苄西林、阿莫西林、头孢呋辛和复方新诺明敏感。QF24-Fs02 和 QF24-Ec03 对四环素、多西环素、诺氟沙星、氟苯尼考耐药。QF24-Fs02 对氨苄西林、阿莫西林、复方新诺明耐药。表明该兔场分离的 3 株分离菌株多重耐药现象严重(表 4)。

表 4 分离菌株药敏试验结果

Table 4 Results of antimicrobial susceptibility test of the isolated strain

抗菌药物 Antibacterial drugs	含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{片}^{-1}$) Content	多杀性巴氏杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>		奇异变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i>		大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	
		抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone	敏感程度 Sensitivity	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone	敏感程度 Sensitivity	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone	敏感程度 Sensitivity
氨苄西林 Ampicillin	10	19	S	10	R	17	S
阿莫西林 Amoxicillin	20	11	R	0	R	21	S
头孢呋辛 Cefuroxim	30	15	I	20	S	19	S
头孢唑林 Cefazolin	30	9	R	14	R	19	R
头孢曲松 Ceftriaxone	30	25	S	30	S	28	S
阿米卡星 Amikacin	30	9	R	16	R	9	R
卡那霉素 Kanamycin	30	10	R	12	R	0	R
链霉素 Streptomycin	10	0	R	0	R	9	R
庆大霉素 Gentamicin	10	9	R	0	R	12	R
四环素 Tetracycline	30	18	I	0	R	0	R
多西环素 Doxycycline	30	16	I	0	R	0	R
恩诺沙星 Enrofloxacin	10	19	R	9	R	0	R
诺氟沙星 Norfloxacin	10	14	I	10	R	0	R
林可霉素 Lincomycin	2	0	R	0	R	0	R
复方新诺明 cotrimoxazole	23.75/ 1.25	17	I	0	R	19	S

(转下页 Carried forward)

(续表4 Continued)

抗菌药物 Antibacterial drugs	含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{片}^{-1}$) Content	多杀性巴氏杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>		奇异变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i>		大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	
		抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone	敏感程度 Sensitivity	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone	敏感程度 Sensitivity	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone	敏感程度 Sensitivity
氟苯尼考 Flufenicol	30	22	S	7	R	9	R
吉他霉素 Kitsamycin	15	11	R	0	R	0	R
多粘菌素B Polymyxin B	300	10	R	0	R	11	R
新霉素 Neomycin	200	11	R	12	R	0	R
青霉素 Penicillin	10	14	R	0	R	0	R

R. 耐药;I. 中度敏感;S. 敏感

R. Resistance; I. Intermediary; S. Sensitive

2.6 生长曲线测定

3株分离菌株生长曲线测定结果图5所示。QF24-Pm01、QF24-Fs02和QF24-Ec03分离菌株

分别从7.4~9.5 h、2.2~10.5 h和2.2~11.5 h,处于对数期,该阶段细胞代谢旺盛,细菌以几何级数快速增殖,活菌数与时间呈指数关系。

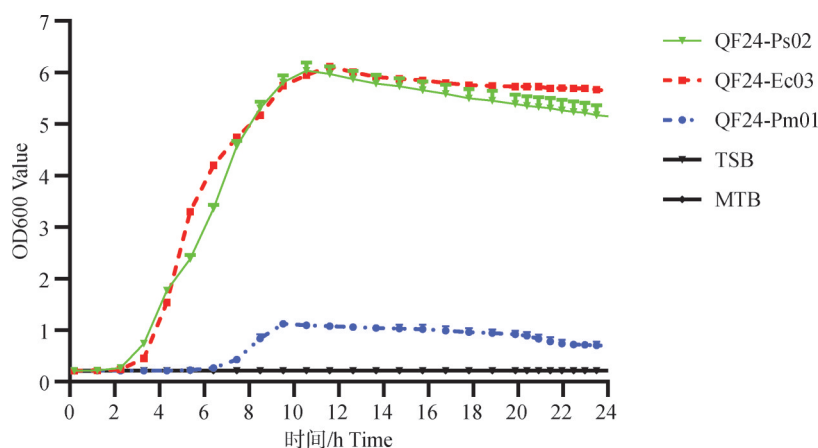


图5 三株分离菌株的生长曲线

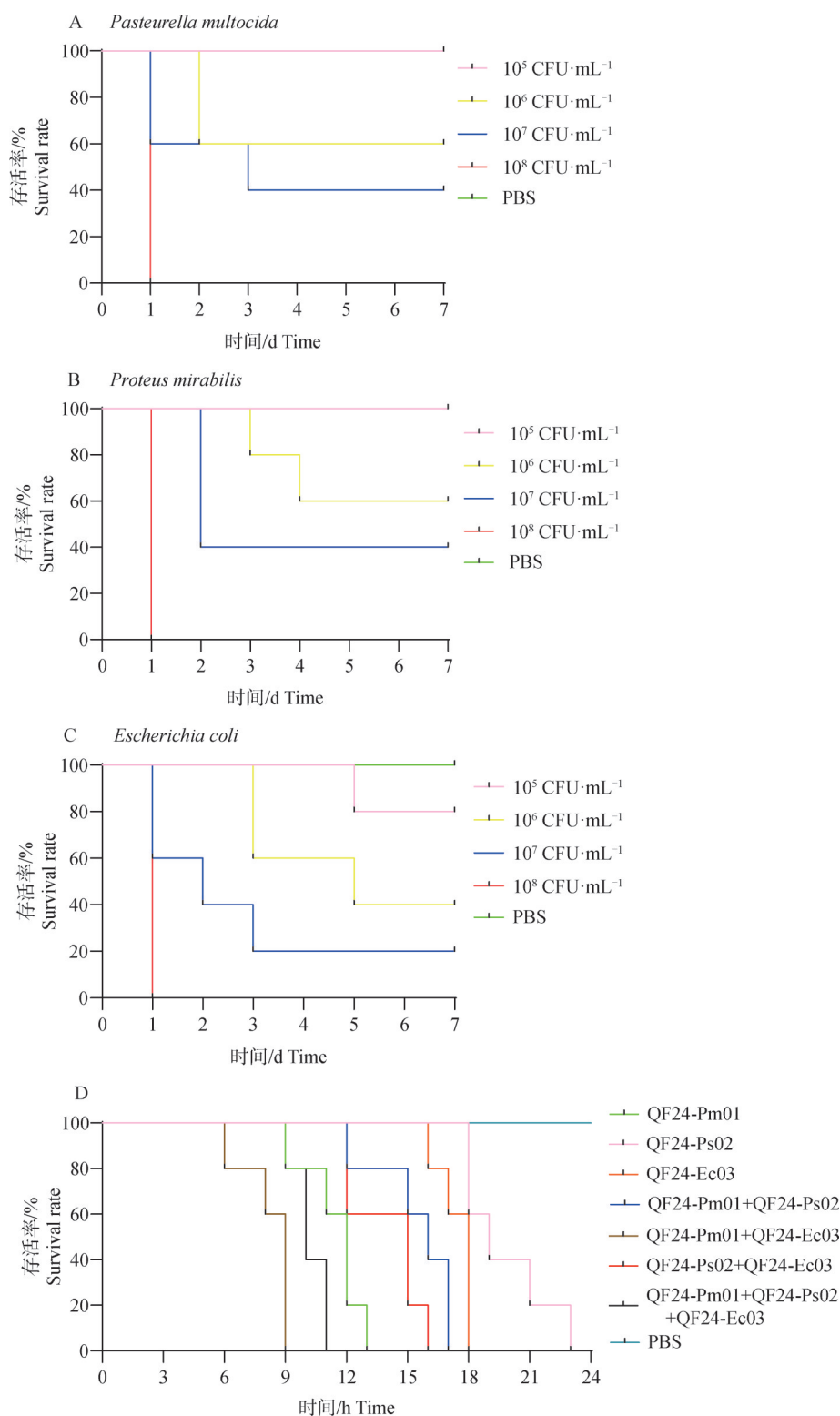
Fig. 5 Growth curves of 3 isolates

2.7 致病性试验

2.7.1 小鼠攻毒试验结果 多杀性巴氏杆菌、奇异变形杆菌和大肠杆菌初始浓度为 1.46×10^9 CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 2.70×10^9 CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 4.51×10^9 CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。第1、2和3批攻毒小鼠生存曲线如图6A、B和C所示,通过累积法计算得到巴氏杆菌 $LD_{50}=9.27 \times 10^5$ CFU;奇异变形杆菌 $LD_{50}=1.43 \times 10^6$ CFU;大肠杆菌 $LD_{50}=1.88 \times 10^7$ CFU。无菌采集死亡小鼠心、肝和肺病变组织,并从中再次分离出相应的病原菌。第4批攻毒小鼠生存曲线

如图6(D)所示。攻毒4 h后,各组小鼠均出现精神萎靡、呼吸急促、毛痂扎堆、停止进食等明显症状,对照组未见异常。QF24-Pm01+QF24-Ec03组小鼠攻毒6 h死亡1只,9 h内全部死亡;QF24-Pm01+QF24-Ps02+QF24-Ec03组小鼠攻毒后9 h出现死亡,11 h内全部死亡;QF24-Pm01组小鼠攻毒后9 h出现死亡,13 h内全部死亡;其余组小鼠攻毒后12 h出现死亡。

2.7.2 家兔攻毒试验 攻毒家兔存活曲线见图7, QF24-Pm01单独感染组、QF24-Pm01+



A. 多杀性巴氏杆菌感染小鼠生存曲线; B. 奇异变形杆菌感染小鼠生存曲线; C. 大肠杆菌感染小鼠生存曲线; D. 不同菌液感染小鼠生存曲线

A Survival curve of mice following *Pasteurella multocida* infection; B. Survival curve of mice following *Proteus mirabilis* infection; C. Survival curve of mice following *Escherichia coli* infection; D. Survival curves of mice infected with different bacterial suspensions.

图6 不同试验组小鼠的生存曲线

Fig. 6 Survival curves of mice subjected to distinct experimental conditions

QF24-Ps02 组、QF24-Pm01+QF24-Ps02+QF24-Ec03 组家兔攻毒后 36 h 全部死亡;QF24-Ps02、QF24-Ec03 单独感染组家兔攻毒后 7 d 存活率分别为 60% 和 80%;QF24-Ps02+QF24-Ec03 感染组 7 d 存活率为 40%。QF24-Pm01+QF24-Ec03 组家兔攻毒后 24 h 全部死亡。以上研究说明 QF24-Pm01 和 QF24-Ec03 混合后致病性增强, QF24-Ps02 和 QF24-Ec03 混合后致病性增强。由图 8 可见各试验组家兔肺和肝有不同程度充血肿胀,

QF24-Pm01+QF24-Ps02+QF24-Ec03 混合感染组试验兔肺脏呈花玻璃状与临床解剖家兔肺的病变一致。QF24-Pm01 组、QF24-Ec03 组和 QF24-Pm01+QF24-Ps02+QF24-Ec03 组肝组织有坏死点。QF24-Pm01+QF24-Ps02+QF24-Ec03 混合感染组试验兔脾组织呈暗紫色且萎缩与临床解剖家兔脾组织病变一致。QF24-Ps02 组家兔肾有出血点,其他试验组肾未见明显病变。

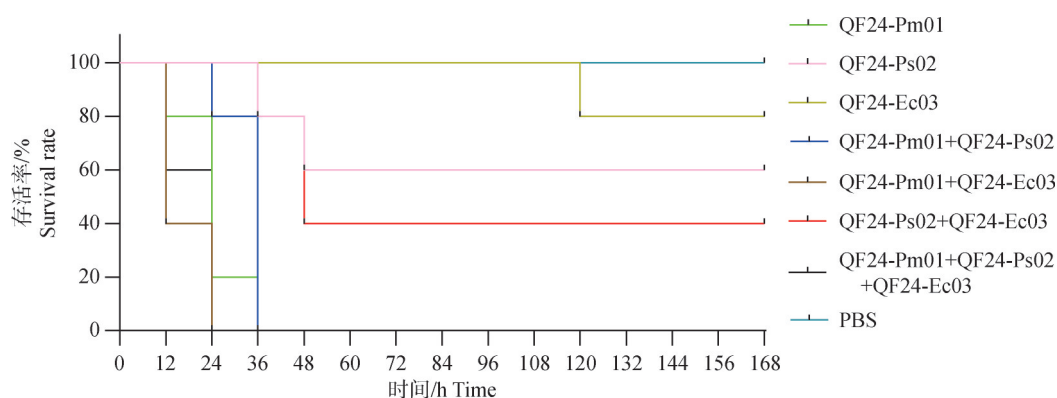


图7 各组家兔感染后存活率

Fig. 7 Survival rate of rabbits after infection in each group

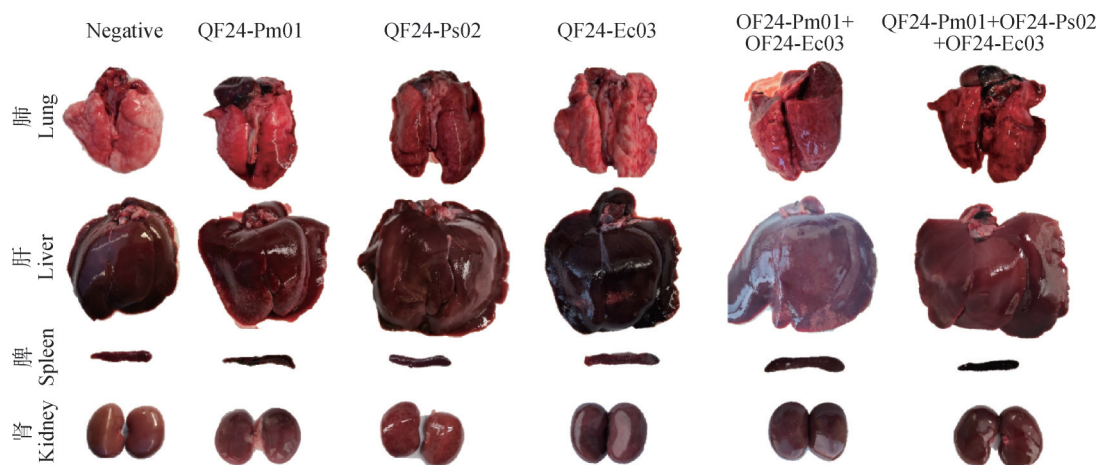


图8 致病性试验家兔剖检结果

Fig. 8 Pathogenicity test rabbit necropsy results

2.8 攻毒小鼠组织病理学观察

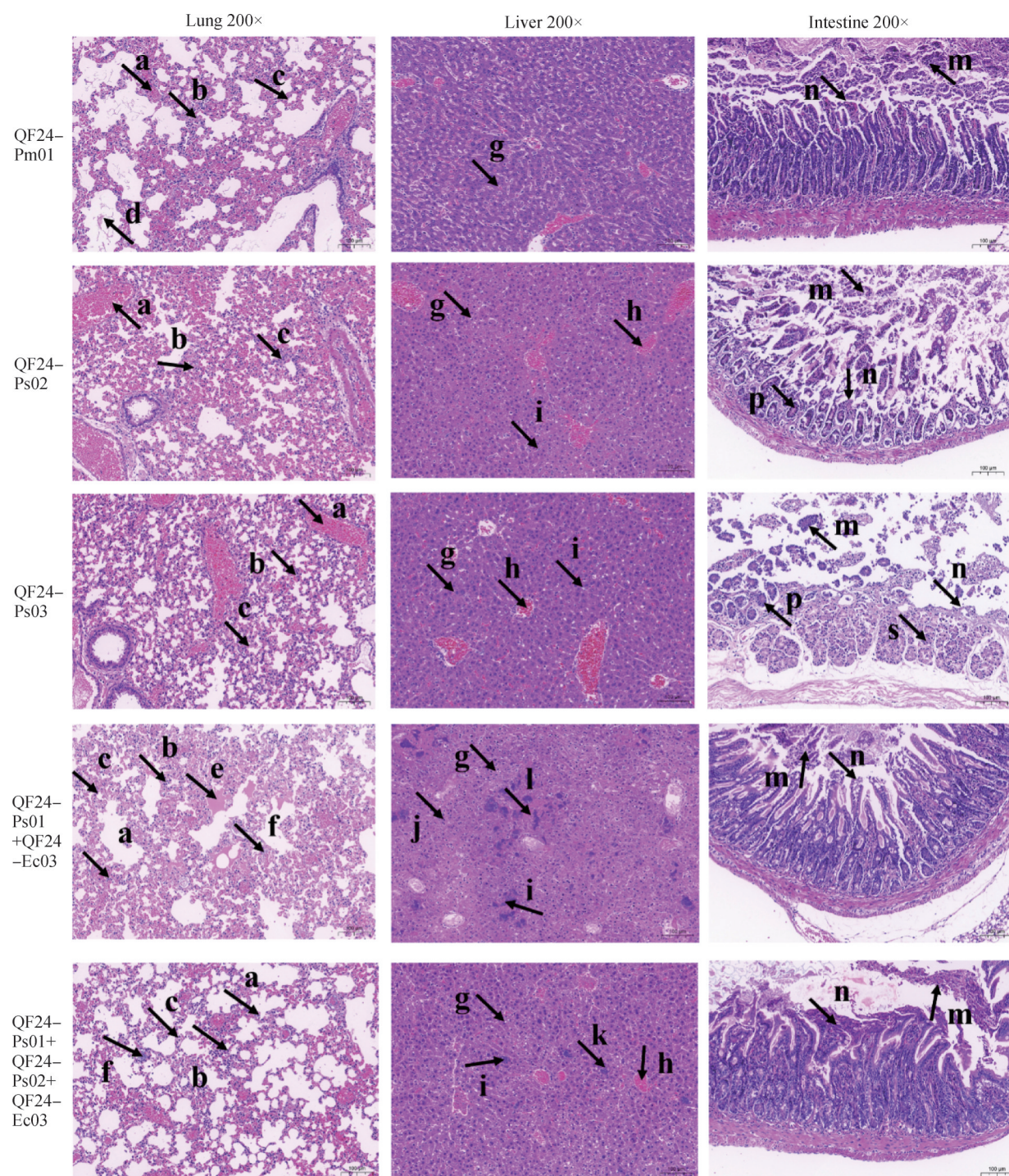
采集试验组小鼠的肺、肝和小肠制备病理切片,组织病理变化如图9所示。结果显示,各个感染组均表现出肺间质水肿、肺泡壁结构疏松、毛细血管及血管充血,且肺泡腔内可见少量中性粒细胞浸润。QF24-Pm01+QF24-Ec03 混合感染组小鼠肺泡壁及血管内观察到疑似细菌的嗜碱性颗粒物质以及嗜酸性絮状物,其病变程度较单

纯感染组更为严重;QF24-Pm01+QF24-Ps02+QF24-Ec03 组小鼠肺泡壁及血管内观察到大量嗜碱性颗粒物质,提示细菌定植现象较单纯感染组更为明显。QF24-Pm01+QF24-Ec03 混合感染组小鼠肝组织呈现显著病理损伤,主要表现为肝细胞广泛坏死,胞核溶解消失;同时观察到大量肝细胞形态异常,胞核固缩且染色加深。感染组小鼠均表现出小肠上皮细胞脱落及肠绒毛断裂,

肠腔内积聚大量组织碎片;而 QF24-Ec03 组小鼠肠绒毛基部上皮内陷形成李氏隐窝,隐窝上皮细胞与固有层分离,局部肌层出现自溶现象,呈现无细胞红染均质状,其病变程度较其他感染组更为严重。

3 讨论

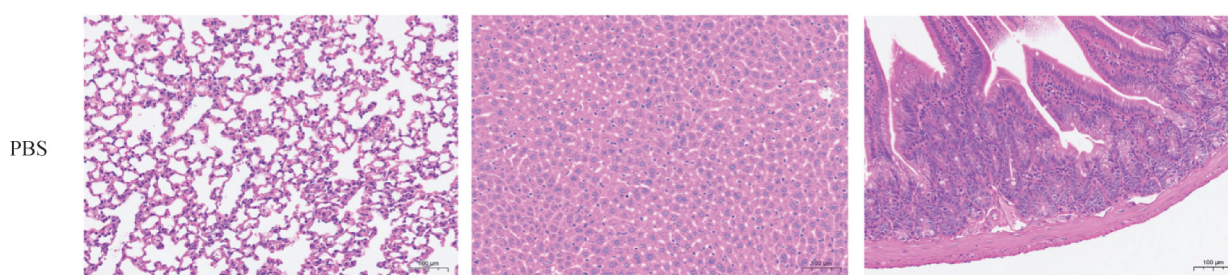
近年来,兔巴氏杆菌病流行率较高,由大肠杆菌和奇异变形杆菌引起兔消化道疾病频发,对养殖户造成经济损失。乔国峰等^[19]从发生腹泻和呼吸



(图9 Fig.9)

(转下页 Carried forward)

(续图 9 Continued)



比例尺=100 μm

Scale bar = 100 μm

a. 血管淤血;b. 中性粒细胞浸润;c. 肺脏实质间质水肿;d. 肺泡腔内有嗜酸性絮状物质;e. 肺泡腔内可见嗜酸性蛋白样物质;f. 肺泡壁与血管内可见嗜碱性颗粒物质;g. 肝细胞脂肪变性,胞质内含有微小的圆形空泡;h. 静脉淤血;i. 肝细胞坏死;j. 细胞核溶解;k. 炎性细胞点状浸润;l. 肝细胞坏死;m. 肠腔内含组织碎片;n. 肠绒毛及绒毛上皮细胞脱落;p. 肠绒毛基部上皮内陷;s. 中性粒细胞浸润

a. Vascular congestion; b. Neutrophil infiltration; c. Pulmonary interstitial edema; d. Presence of eosinophilic flocculent material within alveolar spaces; e. Presence of eosinophilic, proteinaceous material within alveolar spaces; f. Presence of basophilic granular material in alveolar walls and blood vessels; g. Hepatocyte steatosis (fatty degeneration) with small, round vacuoles in the cytoplasm; h. Venous congestion; i. Hepatocyte necrosis; j. Karyolysis; k. Focal inflammatory cell infiltration; l. Hepatocyte necrosis; m. Tissue debris within the intestinal lumen; n. Exfoliation of intestinal villi and villous epithelial cells; p. Invagination of epithelial cells at the base of intestinal villi; s. Neutrophil infiltration

图 9 各组小鼠攻毒后肺、肝和肠的病理损伤结果

Fig. 9 Pathological findings in lungs, liver, and intestines of mice post-virus challenge

道症状的兔群中分离出多杀性巴氏杆菌和大肠杆菌,王佳宁等^[7]从腹泻死亡兔中分离出大肠杆菌和奇异变形杆菌。然而,关于多杀性巴氏杆菌、奇异变形杆菌和大肠杆菌混合感染的相关报道很少。本研究从宁夏某兔场病死兔中同时分离出血清荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌、奇异变形杆菌和大肠杆菌。小鼠致病性试验结果显示:分离菌株 QF24-Pm01、QF24-Ps02 和 QF24-Ec03 的半数致死量分别为 9.27×10^5 CFU、 1.43×10^6 CFU 和 1.88×10^7 CFU。小鼠感染试验结果表明,与单纯感染组及其他混合感染组相比,巴氏杆菌与大肠杆菌混合感染组的致病性增强。家兔攻毒试验,在注射相同细菌量的情况下,攻毒 7 d 单纯感染组和混合感染组均有家兔死亡。有研究报道多种病原共同感染机体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,混合感染导致更严重的临床症状^[21-25]。此外,有文献报道,猪同时感染大肠杆菌和多杀性巴氏杆菌后,其呼吸系统损伤程度加倍,共同感染加速了炎症过程^[26],这与本研究中巴氏杆菌和大肠杆菌混合感染毒性加强的结果相一致。剖检发现,奇异变形

杆菌单独感染组家兔肺充血肿胀、肝肿大、肾出血等病变,剖检结果与王俊书等^[27]和王佳宁等^[28]的报道基本一致。巴氏杆菌、奇异变形杆菌和大肠杆菌混合感染家兔肺脏和脾脏病变与自然感染死亡家兔病变相似,但肝和肾的病变较轻,这可能与细菌感染的先后顺序、感染剂量以及动物免疫力存在一定关系^[20,28]。

大肠杆菌和奇异变形杆菌均为环境中的常在条件性致病菌,当机体免疫力降低或受到外界刺激时,可引发家兔腹泻,严重时可导致死亡^[10,27]。本研究分离的奇异变形杆菌和大肠杆菌可导致家兔死亡,与单一感染相比,大肠杆菌和奇异变形杆菌混合后致病性增强,这与谢常虹等^[20]研究结果一致,但二者混合感染后致病性增强的具体机制仍有待进一步阐明。小鼠病理组织切片结果,3 株分离菌株均可引起肺、肝和肠道等器官严重病变,这表明奇异变形杆菌和大肠杆菌不仅损伤消化道,还可造成多器官损伤。

细菌毒力方面,本研究分离的巴氏杆菌携带 *exbB*、*exbD* 和 *hgbA* 等 16 种毒力基因,检测出超氧化物歧化酶 *sodA* 基因未检测出 *sodC* 基因,这与

Fourour等^[21]在A型菌株中,*sodC*基因和*sodA*基因不会同时存在的的结果相一致。铁离子摄取因子、黏附因子、超氧化物歧化酶等毒力基因相互作用增强细菌的生存能力、提高免疫逃逸能力以及加剧宿主的组织损伤,使其在体内定植并扩散,严重影响动物的健康^[30]。石建存等^[31]对78株奇异变形杆菌进行毒力基因检测,研究发现*ureC*、*zapA*、*atfC*、*atfA*、*pmfA*检出率为79.5%以上。本研究分离的奇异变形杆菌携带脲酶相关基因*ureC*,金属蛋白酶相关基因*zapA*,ATF菌毛合成相关基因*atfC*,ATF菌毛结构亚单位基因*atfA*和PMF菌毛结构亚单位相关基因*pmfA*共5种。奇异变形杆菌的毒力基因和相关因子在其致病过程中具有高度的协同性,赋予了它在泌尿道感染等疾病中的显著病原性^[32]。家兔致病性试验结果显示,单独感染奇异变形杆菌后家兔肾组织出现出血,这说明本研究分离的奇异变形杆菌具有一定的致病性可损伤泌尿系统。大肠杆菌携带*eaeA*和*fimC*毒力基因,*fimC*介导I型菌毛的组装,与感染黏附有关。*eaeA*介导大肠杆菌与宿主肠上皮细胞的黏附,携带该毒力基因的大肠杆菌是断奶后幼兔发生腹泻症的主要细菌性病原^[33]。

本研究中3株菌均检出耐药基因*aadB*、*strA*、*strB*、*bla_{TEM}*和*sul1*,巴氏杆菌还携带 β -内酰胺类*bla_{OXA}*和*bla_{CTX-M-2}*耐药基因,奇异变形杆菌携带 β -内酰胺类*bla_{OXA}*、磺胺类耐药基因*sul2*、氯霉素类耐药基因*floR*,大肠杆菌携带喹诺酮类耐药基因*qnrS*和四环素类耐药基因*tetA*。耐药基因可通过水平基因转移跨菌门传播^[22],三者共同携带的耐药基因可能是相互传播所致。药敏试验结果,三株分离菌对9类19种药物呈不同程度的耐药,对头孢曲松敏感,为该场正确选用抗菌药提供了理论依据。根据该养殖场养殖现状以及免疫情况,推测该场可能是多杀性巴氏杆菌免疫不规范,导致家兔感染多杀性巴氏杆菌后机体免疫力降低。养殖场消毒措施不到位,环境中致病微生物含量高,从而继发大肠杆菌和奇异变形杆菌混合感染,造成大量家兔发病死亡。

4 结 论

本研究发现了多杀性巴氏杆菌、奇异变形杆菌和大肠杆菌混合感染家兔案例,国内相关研究报道较少。巴氏杆菌和大肠杆菌混合后致病性增强,奇

异变形杆菌和大肠杆菌混合后致病性增强,提示在预防家兔巴氏杆菌感染的同时,还要加强大肠杆菌和奇异变形杆菌的防治,避免发生混合感染增加死亡率。分离菌多重耐药严重,应选用氟苯尼考、头孢呋辛和复方新诺明2种及以上联合用药方式进行治疗。

参考文献(References):

- [1] 苗立中,李峰,王艳,等.兔多杀性巴氏杆菌的分离与PCR鉴定[J].中国兽医杂志,2011,47(1):21-22.
MIAO L Z, LI F, WANG Y, et al. The isolation and PCR identification of *Pasteurella multocida* from rabbits [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2011, 47(1): 21-22. (in Chinese)
- [2] 王岩,邵延福,尹琨伊,等.兔巴氏杆菌病的诊断与防治[J].中国养兔杂志,2023(3):41-42.
WANG Y, SHAO Y F, YIN J Y, et al. Diagnosis and Prevention of *Pasteurella multocida* Infection in Rabbits [J]. *Chinese Journal of Rabbit Farming*, 2023 (3): 41-42. (in Chinese)
- [3] 张娜,李书光,陈金龙,等.兔F型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及其致病性[J].中国兽医科学,2012,42(07):685-689.
ZHANG N, LI S G, CHEN J L, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Pasteurella multocida* serogroup F from rabbits [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2012, 42(7): 685-689. (in Chinese)
- [4] 王林柏,孙久鹤,郭东春,等.国内部分地区多杀性巴氏杆菌荚膜血清型和基因型的研究[J].中国预防兽医学报,2016,38(2):116-119.
WANG L B, SUN J H, GUO D C, et al. Identification of capsule serotype and genotype of *Pasteurella multocida* in some areas of China [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38(2): 116-119. (in Chinese)
- [5] 董贵,杨光,蒋秀梅,等.新疆羔羊腹泻奇异变形杆菌的分离鉴定与小鼠致病性试验[J].畜牧与兽医,2022,54(3):91-95.
DONG G, YANG G, JIANG X M, et al. Isolation and identification of *Proteus mirabilis* from diarrhea lamb in Xinjiang and its pathogenicity in mice [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 54(3): 91-95. (in Chinese)
- [6] 廖娟,石英子,冯丹妮,等.兔源奇异变形杆菌的分离鉴定及耐药基因检测[J].江苏农业科学,2021,49

- (4):125-129.
- LIAO J, SHI Y Z, FENG D N, et al. Isolation, identification and detection of antibiotics resistance genes of *Proteus mirabilis* from rabbit [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2021, 49 (4) : 125-129. (in Chinese)
- [7] 王佳宁,张自强,王帅帅,等. 兔源大肠杆菌、奇异变形杆菌和球虫混合感染及药物敏感性分析[J]. 畜牧兽医学报,2024,55(9):4204-4212.
- WANG J N, ZHANG Z Q, WANG S S, et al. Mixed infection and drug sensitivity analysis of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and coccidia from rabbits [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2024, 55(9) : 4204-4212. (in Chinese)
- [8] QU X, ZHOU J, HUANG H, et al. Genomic investigation of *Proteus mirabilis* isolates recovered from pig farms in Zhejiang Province, China [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13:952-982.
- [9] NEWELL D G, LA RAGIONE R M. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli*(STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65:49-71.
- [10] 栾慧慧. 山东部分地区腹泻兔致病性大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析[D]. 泰安:山东农业大学, 2022.
- LUAN H H. Isolation, identification and drug resistance analysis of pathogenic *Escherichia coli* from diarrhea rabbits in some areas of Shandong[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [11] 张艳红. 兔大肠杆菌病诊断及防治[J]. 中国畜禽种业, 2017, 13(2):102-103.
- ZHANG Y H. The diagnosis and prevention of *escherichia coli* infection in rabbits [J]. *The Chinese Livestock and Poultry Breeding*, 2017, 13 (2) : 102-103. (in Chinese)
- [12] MILON A, OSWALD E, DE RYCKE J. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. *Vet Res*, 1999, 30(2-3):203-219.
- [13] TOWNSEND K M, BOYCE J D, CHUNG J Y, et al. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(3):924-929.
- [14] 王 蕾, 邬 琴, 柴迎锦, 等. 羊源D型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及毒力基因检测[J]. 动物医学进展, 2019, 40(1):25-30.
- WANG L, WU Q, CHAI Y J, et al. Isolation and identification of *Pasteurella multocida* serotype D and detection of virulence genes from sheep [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019, 40 (1) : 25-30. (in Chinese)
- [15] 马 雪. 新疆地区犊牛呼吸道巴氏杆菌分子检测及分离株部分生物学特性研究[D]. 石河子:石河子大学, 2021.
- MA X. Molecular detection and biological characteristics of *Pasteurella* isolated from calf respiratory tract in Xinjiang [D]. Shihezi: Shihezi University, 2021. (in Chinese)
- [16] 曹润来,王奇林,孙春庆,等. 梅花鹿源奇异变形杆菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 微生物学通报, 2024: 1-18.
- CAO R L, WANG Q L, SUN C Q, et al. Isolation, identification, and characterization of sika deer-derived *Proteus mirabilis* [J]. *Microbiology China*, 2024: 1-18. (in Chinese)
- [17] 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 L H, HU M, LIU Y Q. Analysis of antibiotic resistance genes and virulence genes of multiple high resistant *Escherichia coli* from animals in Shandong Province [J]. *China Poultry Science*, 2022(6) : 4-15. (in Chinese)
- [18] HUMPHRIES R, BOBENCHIK A M, HINDLER J A, et al. Overview of changes to the Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100, 31st Edition [J]. *J Clin Microbiol*, 2021, 59 (12) : JCM0021321-JCM0021321.
- [19] 乔国峰,孙乐天,张国权,等. 獭兔源大肠杆菌和巴氏杆菌的混合感染及耐药性鉴定 [J]. 中国养兔, 2020 (5):12-14, 24.
- QIAO G F, SUN L T, ZHANG G Q, et al. Mixed infection and drug resistance of *E. coli* and *Pasteurella* from rax rabbits [J]. *Chinese Journal of Rabbit Farming*, 2020(5):12-14, 24. (in Chinese)
- [20] 谢常红,刘桂兰,王 颖,等. 鸡源金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、奇异变形杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(12):5549-5559.
- XIE C H, LIU G L, WANG Y, et al. Isolation, Identification and biological characteristics of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* from chickens [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 51(12), 5549-5559. (in

- Chinese)
- [21] FOUROUR S, MAROIS-CRÉHAN C, MARTELET L, et al. 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):34-34.
- [22] SHORT F L, MURDOCH S L, RYAN R P. Polybacterial human disease: the ills of social networking [J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22(9):508-516.
- [23] WOLFGANG E, THOMAS R, JURGEN H, et al. How viral and intracellular bacterial pathogens reprogram the metabolism of host cells to allow their intracellular replication [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9:42.
- [24] 吴 杰, 伍 茜, 程建国, 等. 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 J, WU X, CHENG J G, et al. Isolation, identification, and pathogenicity of mixed infection of *Staphylococcus lentus* and *Escherichia coli* in *Moschus berezovskii* [J]. *Microbiology China*, 2024, 51 (10) : 4195-4211. (in Chinese)
- [25] KUMAR N, SHARMA S, BARUA S, et al. Virological and immunological outcomes of coinfections [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2018, 31(4):e00111-17.
- [26] HALLOY D J, KIRSCHVINK N A, MAINIL J, et al. Synergistic action of *E. coli* endotoxin and *Pasteurella multocida* type A for the induction of bronchopneumonia in pigs [J]. *Vet J*, 2005, 169 (3) : 417-426.
- [27] 王俊书, 徐进强, 金红岩, 等. 兔奇异变形杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(5): 1508-1515.
- WANG J S, XU J Q, JIN H Y, et al. Isolation identification and Drug Resistance Analysis of Rabbit *Proteus mirabilis* [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 46 (5) : 1508-1515. (in Chinese)
- [28] 王佳宁, 李双军, 张自强, 等. 家兔奇异变形杆菌的分离鉴定及致病性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2024, 46(1):32-38.
- WANG J N, LI S J, ZHANG Z Q, et al. Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Proteus mirabilis* in rabbits [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2024, 46(1):32-38. (in Chinese)
- [29] LUO Z, XIE X, QI Y, et al. Hemolytic *Escherichia coli* inhibits swarming and differentiation of *Proteus mirabilis* [J]. *Curr Microbiol*, 2018, 75(4):471-475.
- [30] 王锦祥, 孙世坤, 陈岩峰, 等. 一株致兔结膜炎多杀性巴氏杆菌的分子分型及毒力基因分布[J]. 中国养兔, 2020(3):8-10.
- WANG J X, SUN S K, CHEN Y F, et al. Molecular characterisation of *Pasteurella Multocida* causing conjunctivitis in rabbits [J]. *Chinese Journal of Rabbit Farming*, 2020(3):8-10. (in Chinese)
- [31] 石建存, 刘 冬, 张召兴, 等. 仔猪腹泻性奇异变形杆菌分离鉴定、致病性及耐药性检测[J]. 家畜生态学报, 2023, 44(9):72-77.
- SHI J C, LIU D, ZHANG Z X, et al. Isolation, identification, pathogenicity and drug resistance of *Proteus Mirabilis* diarrhea in raccoon dogs [J]. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2023, 44(9):72-77. (in Chinese)
- [32] 郭玉梅, 潘 琢, 秦丽云, 等. 奇异变形杆菌毒力基因检测和药物敏感性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(18):2671-2673.
- GUO Y M, PAN Z, QIN L Y, et al. Detection of virulence genes and analysis of drug sensitivity in (in Chinese) *Proteus mirabilis* [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2016, 26(18):2671-2673. (in Chinese)
- [33] 高荣琨, 王丽芳, 李 锐, 等. 猪、牛和兔粪中致病性大肠杆菌LEE毒力岛的检测分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2013, 33(3):239-243.
- GAO R K, WANG L F, LI R, et al. Detection and analysis of pathogenic *Escherichia coli* and LEE PAI in porcine, bovine and rabbit feces [J]. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2013, 33(3):239-243. (in Chinese)

(编辑 范子娟)