

研究报告

梅花鹿源奇异变形杆菌的分离鉴定及生物学特性

曹润来¹, 王奇林¹, 孙春庆², 薛竹青¹, 刘子瑜¹, 胡盼³, 王晓旭^{*1}, 刘志杰^{*1}

1 中国农业科学院特产研究所 农业农村部经济动物疫病重点实验室, 吉林 长春 130112

2 临沂市畜牧发展促进中心, 山东 临沂 276000

3 吉林大学 动物医学学院 人畜共患传染病重症诊治全国重点实验室 人兽共患病研究所教育部重点实验室, 吉林 长春 130062

曹润来, 王奇林, 孙春庆, 薛竹青, 刘子瑜, 胡盼, 王晓旭, 刘志杰. 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, 2025, 52(5): 2230-2243.

CAO Runlai, WANG Qilin, SUN Chunqing, XUE Zhuqing, LIU Ziyu, HU Pan, WANG Xiaoxu, LIU Zhijie. Isolation, identification, and characterization of sika deer-derived *Proteus mirabilis*[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2230-2243.

摘要:【背景】奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)是重要的人畜共患病病原,可引起梅花鹿仔鹿腹泻,给梅花鹿养殖业造成严重危害。【目的】鉴定引起吉林省某梅花鹿场仔鹿腹泻病的细菌性病原种类及其生物学特性,并确定该病原造成的主要病理特征。【方法】收集腹泻病空肠内容物,通过细菌分离培养、革兰氏染色、显微镜镜检、16S rRNA 基因及 *atpD* 基因测序和进化树分析等方法鉴定细菌种类。采集腹泻鹿的空肠、肺、肝、脾、肾和心等组织样品制作病理切片。通过检测毒力基因、生物膜形成能力、耐药性与耐药基因,以及部分菌株的小鼠致病性分析该菌的生物学特性。

【结果】共鉴定出 3 株奇异变形杆菌,分别命名为 SKPM1、SKPM2、SKPM3。3 株菌均携带 *ureC*、*zapA*、*atfC*、*atfA*、*rsbA*、*ucaA* 和 *pmfA* 等 7 种毒力基因,具有生物膜形成能力;3 株菌对青霉素、头孢氨苄、庆大霉素、四环素、多黏菌素 B 等抗生素表现出多重耐药性,并检测出 *bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M}、*tetB*、*ant*(3'')-I、*sul2* 等耐药基因;致病性上菌株 SKPM2 的 *LD*₅₀ 为 3.98×10^7 CFU/mL。【结论】本研究分离鉴定了 3 株梅花鹿源奇异变形杆菌,并研究了其生物学特性,为该菌引起的仔鹿腹泻病的防治和深入研究提供了实验基础。

关键词: 梅花鹿; 仔鹿腹泻; 奇异变形杆菌; 生物学特性

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1800704); 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2021-ISAPS)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1800704) and the Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-2021-ISAPS).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Xiaoxu, wangxiaoxussdd@126.com; LIU Zhijie, liuzhijie@caas.cn

Received: 2024-08-18; Accepted: 2024-10-07; Published online: 2024-11-19

Isolation, identification, and characterization of sika deer-derived *Proteus mirabilis*

CAO Runlai¹, WANG Qilin¹, SUN Chunqing², XUE Zhuqing¹, LIU Ziyu¹, HU Pan³,
WANG Xiaoxu^{*1}, LIU Zhijie^{*1}

1 Key Laboratory of Special Animal Epidemic Disease, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Special Animal and Plant Sciences of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, Jilin, China

2 Linyi Animal Husbandry Development Promotion Center, Linyi 276000, Shandong, China

3 Key Laboratory of Zoonosis Research, Ministry of Education, State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Severe Zoonotic Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

Abstract: [Background] *Proteus mirabilis* is a major zoonotic pathogen that can cause diarrhea of young sika deer (*Cervus nippon*), posing a serious threat to the sika deer farming industry. [Objective] To identify and characterize the bacterial pathogens and reveal the main pathological changes in the young sika deer suffering from diarrhea at a sika deer farm in Jilin. [Methods] We collected the jejunal contents of the young sika deer suffering from diarrhea, isolated the bacterial pathogens by the culture method, and identified the pathogens by Gram staining, microscopic examination, 16S rRNA and *atpD* sequencing, and phylogenetic analysis. In addition, we collected the jejunum, lung, liver, spleen, kidney, and heart samples from diarrheal sika deer to prepare pathological sections. The bacterial pathogens were characterized in terms of virulence genes, biofilm formation, antibiotic resistance, antibiotic resistance genes, and pathogenicity in mice. [Results] Three strains of *P. mirabilis* were identified and named SKPM1, SKPM2, and SKPM3, respectively. All of the three strains carried seven virulence genes (*ureC*, *zapA*, *atfC*, *atfA*, *rsbA*, *ucaA*, and *pmfA*) and could form biofilms. The three strains had resistance to multiple antibiotics including penicillin, cefalexin, gentamicin, tetracycline, and polymyxin B and carried resistance genes such as *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *tetB*, *ant*(3'')-I, and *sul2*. Strain SKPM2 showed the *LD*₅₀ of 3.98×10^7 CFU/mL in mice. [Conclusion] We isolated and characterized three strains of *P. mirabilis* from sika deer. The findings provided an experimental basis for the prevention, treatment, and intensive research of the disease that caused by this bacterium in young deer.

Keywords: sika deer (*Cervus nippon*); diarrhea of young deer; *Proteus mirabilis*; biological characteristics

奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)是一类革兰氏染色阴性肠杆菌科、变形杆菌属的人畜共患的条件性致病菌。它分布于多种环境中,包括人和动物的肠道。当宿主免疫功能降低时,容易引发呼吸道、尿道和消化道感染^[1-2]。奇异变形杆菌常导致人类泌尿系统感染,如膀胱炎和肾炎^[3],该菌会导致尿路结石,并在结石内

存活,若结石未完全清除,细菌反复感染的风险显著增加,治愈难度加大^[4]。随着多重耐药菌的出现,使得对β-内酰胺类(如:青霉素类、头孢菌素类等)、氨基糖苷类、四环素类和磺胺类抗生素的抗性提高^[5],以及该菌产生的生物膜对抗生素和炎症反应的抵御增强^[6-7],其引发疾病的治疗难度不断增大,对养殖业和公共卫

生安全危害逐渐上升^[8]。

有关动物研究中,发现该菌可从患肺炎或腹泻的鸡、鸭等禽类^[9-10],猪、牛、羊等家畜^[11-13],特种经济动物^[14]中分离到。在细菌的生物学特性研究中,奇异变形杆菌常携带多种毒力基因(如 *rsbA*、*ureC*、*zapA* 等),这些基因编码鞭毛、菌毛、脲酶等蛋白,帮助其完成定殖和免疫逃逸^[15]; *atpD* 基因是变形杆菌属中保守的基因之一,编码该菌 ATP 合成酶的 β 亚基,常用于该菌的检测和遗传进化分析^[16]。此外,该菌的多重耐药性常与抗性质粒和抗性基因岛有关,如该菌经常携带的广谱 β -内酰胺酶基因(如: *bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M} 等)是其抵抗 β -内酰胺类抗生素的重要原因^[17]。

梅花鹿具有重要的经济价值,而梅花鹿繁殖具有典型的季节性且一年仅一胎,一胎产一仔偶尔产两仔^[18],造成新生仔鹿数量较低,因此仔鹿的存活率影响着梅花鹿产业的发展。其中仔鹿腹泻病是导致存活率低的主要原因之一,奇异变形杆菌等细菌性病原可能是该病的关键诱因^[19]。因此,为了解仔鹿腹泻病理变化特征,确定病原种类及致病菌生物学特性,本研究采用细菌分离培养和 PCR 鉴定法确定病原,随后通过病理组织切片、毒力基因检测、耐药基因分析、药敏试验、生物膜形成能力评估和致病性试验,系统地分析该病原的生物学特性,以期科学防治由该病原引起的仔鹿腹泻病提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 样品

2024 年 5 月,吉林省辽源市某梅花鹿场出现仔鹿血便并造成死亡的情况,剖检发现,主要病变为空肠出血,肺、肝、脾和肾等组织出现不同程度的出血点和肿胀。取其中两头病死仔鹿,分别采集空肠 2 份,并从其中 1 头仔鹿中采集肺、肝、脾、肾和心等组织各 1 份;并

于 6 月在吉林省长春市某梅花鹿场,购买 1 头健康仔鹿,安乐死后采集空肠、肺、肝、脾、肾和心等组织各 1 份。所有样品放入装有冰袋的保温箱中送至中国农业科学院特产研究所实验室进行后续分析。

36 只 5 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠,体重约 18–20 g,长春生物制品研究所有限责任公司。

动物实验获中国农业科学院特产研究所实验动物管理及福利伦理委员会批准,编号为 ISAPSAEC-2024-030。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

胰蛋白胨大豆肉汤(tryptone soy broth, TSB)培养基、胰蛋白胨大豆琼脂(tryptone soy agar, TSA)培养基、沙门-志贺菌属(*Salmonella-Shigella*, SS)琼脂培养基,海博生物技术有限公司。磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS),武汉赛维尔生物科技有限公司。革兰氏染色试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;2×*Taq* PCR Mix,康为世纪生物科技股份有限公司;DL2000 DNA marker, TaKaRa 公司;药敏纸片,杭州微生物试剂有限公司。PCR 仪,应用生物系统公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司;凝胶成像仪, Bio-Rad 公司;恒温培养箱,天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司。

1.3 细菌的分离培养

将腹泻仔鹿空肠内容物划线接种于 SS 琼脂培养基中,37 °C 培养 18 h。挑取中心黑色、边缘透明的圆形单菌落接种于 1 mL TSB 培养基中,37 °C、140 r/min 振荡培养过夜。之后进行革兰氏染色和显微镜观察,并接种至 TSA 和 SS 琼脂培养基中,37 °C 培养 18–24 h,观察分离株在不同培养基上的生长特性。

1.4 细菌 16S rRNA 基因和 *atpD* 基因的鉴定

以 1.3 中的菌液为模板,使用细菌 16S rRNA 基因的通用引物和奇异变形杆菌 *atpD* 基因的特异性引物(表 1),分别进行 PCR 扩增。通过琼脂

表 1 引物信息

Table 1 The introduction of primers

基因名称 Gene	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物大小 Product size (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)	功能 Function	参考文献 Reference
16S rRNA	F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG R: TACGGYTACCTTGTTACGACTT	1 542	60	细菌鉴定 Bacterial identification	[20]
<i>atpD</i>	F: GTATCATGAACGTTCTGGGTAC R: TGAAGTGATACGCTCTTGCAG	595	58	奇异变形杆菌鉴定 Identification of <i>Proteus mirabilis</i>	[6]
<i>ureC</i>	F: GTTATTCGTGATGGGATGGG R: ATAAAGGTGGTTACGCCAG	292	56	脲酶相关基因 Related gene of urease	[21]
<i>mrpA</i>	F: ATTCAGGAAACAAAAGATG R: TTCTTACTGATAAGACATTG	410	55	血凝素相关基因 Related gene of hemagglutinin	[21]
<i>zapA</i>	F: ACCGCAGGAAAACATATAGCCC R: GCGACTATCTTCCGCATAATCA	510	58	金属蛋白酶相关基因 Related gene of metalloproteinase	[21]
<i>atfC</i>	F: AGAAAGGGATCCTACAAATTAA R: TATAGCATGCATTAAATTGCC	472	57	ATF 菌毛合成 ATF pilus synthesis	[21]
<i>atfA</i>	F: CATAATTTCTAGACCTGCCCTAGCA R: CTGCTTGATCCGTAATTTTAAACG	331	56	ATF 菌毛结构亚单位 Structural subunit of ATF pilus	[21]
<i>pmfA</i>	F: GGATCATCTATAATGAAACTG R: CTGATAATCAACTTGGAAGTT	534	55	PMF 菌毛结构亚单位 Structural subunit of PMF pilus	[21]
<i>ucaA</i>	F: GTAAAGTTGTTGCGCAAAC R: TTGAGCCACTGTGGATACA	587	55	脲酶相关基因 Related gene of urease	[21]
<i>rsbA</i>	F: TCGATTTTCAGTGTTTGGCCAT R: CCGAGCTTCATCATGGCTG	2 297	58	迁徙相关基因 Related gene of migration	[21]
<i>bla_{TEM}</i>	F: ATCAGCAATAAACCAGC R: CCCCAGGAACGTTTTTC	516	54	青霉素类抗性基因 Resistance gene of penicillin	[6]
<i>bla_{CTX-M}</i>	F: ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC R: TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	593	54	头孢菌素类抗性基因 Resistance gene of cephalosporins	[6]
<i>tetA</i>	F: GCTACATCCTGCTTGCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	57	四环素类抗性基因 Resistance gene of tetracyclines	[22]
<i>tetB</i>	F: ACAGAAAGCTTATTATATAAC R: TGGCGTGTCTATGATGTTTAC	186	55	四环素类抗性基因 Resistance gene of tetracyclines	[22]
<i>tetO</i>	F: GATGGCATAACAGGCACAGACC R: GCCCAACCTTTTGCTTCACTA	418	58	四环素类抗性基因 Resistance gene of tetracyclines	[22]

(待续)

(续表 1)

基因名称 Gene	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物大小 Product size (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)	功能 Function	参考文献 Reference
<i>rmtA</i>	F: CTAGCGTCCATCCTTTCCTC R: TTTGCTTCCATGCCCTTGCC	635	55	氨基糖苷类抗性基因 Resistance gene of aminoglycosides	[22]
<i>ant(3'')-I</i>	F: TGATTTGCTGGTTACGGTGAC R: CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG	284	58	氨基糖苷类抗性基因 Resistance gene of aminoglycosides	[22]
<i>strA</i>	F: TGCTCCTCTTCTCCATCC R: CGCCGCCAATATGTTCTA	197	56	氨基糖苷类抗性基因 Resistance gene of aminoglycosides	[22]
<i>sul2</i>	F: CGGCATCGTCAACATAACCT R: TGTGCGGATGAAGTCAGCTC	721	55	磺胺类抗性基因 Resistance gene of sulfonamides	[22]
<i>sul3</i>	F: AGATGTGATTGTTTGGGAGC R: TAGTTGTTTCTGGATTAGAGCCT	443	55	磺胺类抗性基因 Resistance gene of sulfonamides	[22]
<i>pmi</i>	F: TGCCTTGAGACAGGGTAAGC R: GCCTTAACAAGTCCCATTCTG	739	57	磺胺类抗性基因 Resistance gene of sulfonamides	[22]

糖凝胶电泳检测是否有预计大小的扩增产物, 符合条件的样品进行测序确定菌株的种类。PCR 反应体系(25 μ L): 模板 2 μ L, $2\times$ Taq PCR Mix 13 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 30 s(退火温度见表 1), 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 次循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 结束。琼脂糖凝胶电泳步骤: 将 4 μ L PCR 产物加入已配好的 1%琼脂糖凝胶的加样孔中, 电泳 25 min 后置于紫外凝胶成像仪中观察。引物合成和目的片段测序由吉林省库美生物科技有限公司完成。根据 16S rRNA 基因和 *atpD* 基因测序结果, 再与 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中 BLASTn (v2.15.0)数据库进行同源性比较。

1.5 基于 *atpD* 基因的遗传进化分析

对分离菌的 *atpD* 基因测序后, 结果与 NCBI 中 BLASTn 数据库(v2.15.0)同源性比较, 选择合适的序列并下载, 使用 PhyloSuite 软件^[23] (<http://phylosuite.jushengwu.com>, v1.2.2), 采用贝叶斯法(MrBayes)以 SYM+G4 模型^[24], 构建

奇异变形杆菌 *atpD* 基因的系统发育树。系统发育树中各序列信息如表 2 所示。

1.6 病理变化

取健康和腹泻仔鹿空肠约 2 cm, 肺、肝、脾、肾和心等组织约 1 cm³, 立刻浸泡于大于组织块 10 倍体积的 4%多聚甲醛中固定。将样品送至武汉赛维尔生物科技有限公司制作病理切片, 比较腹泻仔鹿不同脏器的主要病理变化。

1.7 菌株毒力、耐药基因的检测

以 1.3 中奇异变形杆菌的菌液为模板, 按照表 1 引物和 1.3 中 PCR 体系扩增奇异变形杆菌的 8 种毒力基因(*ureC*, *mrpA*, *zapA*, *atfC*, *atfA*, *pmfA*, *ucaA*, *rsbA*)和 11 种耐药基因(*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *tetA*, *tetB*, *tetO*, *rmtA*, *ant(3'')-I*, *strA*, *sul2*, *sul3*, *pmi*), 通过电泳分析不同菌株携带毒力和耐药基因的情况。

1.8 药敏试验

参考美国临床和实验室标准协会(clinical and laboratory standards institute, CLSI)药敏试验标准^[25], 通过对携带相关耐药基因菌株的表

表 2 不同菌株序列信息

Table 2 The introduction of different bacteria strains

序号 Number	物种 Species	菌株 Strain	登录号 Accession number	版本号 Version number	地点 Location
1	奇异变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i>	ZA25	CP047352	CP047352.1	中国江苏 Jiangsu, China
2		PM22	CP137214	CP137214.1	中国浙江 Zhejiang, China
3		GN2	CP026581	CP026581.1	中国北京 Beijing, China
4		SNYG35	CP047589	CP047589.1	中国四川 Sichuan, China
5		JPM24	CP053894	CP053894.1	中国广东 Guangdong, China
6		1035	CP072779	CP072779.1	中国上海 Shanghai, China
7		PM11	CP137083	CP137083.1	中国浙江 Zhejiang, China
8		L90-1	CP045257	CP045257.1	中国浙江 Zhejiang, China
9		Yak2019	CP063440	CP063440.1	中国甘肃 Gansu, China
10		HK294	CP119297	CP119297.1	中国香港 Hongkong, China
11		W2	CP126338	CP126338.1	中国山东 Shandong, China
12		PM16	CP137335	CP137335.1	中国浙江 Zhejiang, China
13		PM32	CP137736	CP137736.1	中国浙江 Zhejiang, China
14	普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	TAF3	CP126335	CP126335.1	中国山东 Shandong, China
15		HJ90	CP150645	CP150645.1	中国黑龙江 Heilongjiang, China
16		ZN3	CP047344	CP047344.1	中国江苏 Jiangsu, China
17		FDAARGOS_556	CP033736	CP033736.1	美国 America
18	变形杆菌鸡油菌亚种 <i>Proteus terrae</i> subsp. <i>cibarius</i>	ZN2	CP047349	CP047349.1	中国江苏 Jiangsu, China
19		G32	CP053371	CP053371.1	中国浙江 Zhejiang, China
20		ZJ19PC	CP085032	CP085032.1	中国浙江 Zhejiang, China
21	天鸽变形杆菌 <i>Proteus columbae</i>	T60	CP043925	CP043925.1	中国河南 Henan, China
22		15H5D-4a	CP026364	CP026364.1	韩国 Korea

型验证, 采用 κ -B 纸片法, 将多种抗生素纸片贴到涂布菌液的 TSA 培养基上, 37 °C 培养 12 h 后根据抑菌直径的大小分析菌株对 β -内酰胺类、头孢菌素类、氨基糖苷类、磺胺类等 30 种抗生素的敏感程度。

1.9 生物膜形成能力的测定

采用改良结晶紫染色法评估细菌生物膜的形成能力^[26-27]。将菌株在 TSB 培养基中, 37 °C、140 r/min 振荡培养 12 h 以上, 菌液浓度稀释至 OD_{600} 为 0.1。在 96 孔板中每孔加入 200 μ L 菌液, 以 TSB 培养基为阴性对照, 每个样品设置 3 个重复, 37 °C 静置培养 24 h。弃上清, 每孔用 200 μ L 的 PBS 清洗 3 次。每孔加入 200 μ L 的甲醛固定 15 min, 弃去甲醛。晾干后每孔加入 200 μ L 的 0.1% 结晶紫染液, 室温染色 30 min。用蒸馏水清洗 4 次, 晾干后每孔加入 200 μ L 的无水乙醇, 30 min 后在 590 nm (OD_{590}) 波长处测定 OD 值。判定标准: 以阴性对照平均 OD 值加 3 倍标准差为临界值($OD_{cut-off}$), $OD_{590} \leq OD_{cut-off}$ 为非生物膜形成(-); $OD_{cut-off} < OD_{590} \leq 2OD_{cut-off}$ 为弱生物膜形成(+); $2OD_{cut-off} < OD_{590} \leq 4OD_{cut-off}$ 为中等生物膜形成(++); $OD_{590} > 4OD_{cut-off}$ 为强生物膜形成(+++)。

1.10 分离菌对小鼠的致病性试验

根据菌株的毒力、耐药基因携带情况, 选择 SKPM2 菌株测试其对小鼠的致病性。将菌株

接种于 TSB 培养基中, 37 °C、140 r/min 振荡培养过夜。通过平板计数法确定菌液中细菌浓度, 以 TSB 培养基为稀释液, 按照 10 倍梯度稀释制备 5 个不同浓度(1.5×10^9 、 1.5×10^8 、 1.5×10^7 、 1.5×10^6 和 1.5×10^5 CFU/mL) 的攻毒液。试验小鼠随机分为 6 组, 每组 6 只, 依次标记为 1-6 组, 1-5 组为实验组, 分别腹腔注射不同稀释倍数的菌液, 每只 0.5 mL, 第 6 组为阴性对照组, 腹腔注射 TSB 培养基, 每只 0.5 mL。记录小鼠一周内的死亡情况, 使用 GraphPad Prism 8.3.0 计算 LD_{50} 。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离培养结果

将肠道内容物划线培养, 挑取单菌落在 TSB 培养基培养后经革兰氏染色、显微镜观察, 发现革兰氏阴性小杆状或近似圆形的细菌, 单个或链状排列, 大小($0.1-0.2$) μ m $\times$ ($0.3-0.6$) μ m (图 1A)。菌液再次接种鉴别培养基(TSA 培养基和 SS 培养基)后, 在 TSA 培养基中出现明显的迁移生长现象(图 1B), 在 SS 琼脂培养基上形成中心黑色、边缘透明的圆形菌落(图 1C)。

2.2 16S rRNA 基因和 *atpD* 基因鉴定结果

通过菌液 PCR 和凝胶电泳, 16S rRNA 基因在 1 500 bp (图 2A), *atpD* 基因在 590 bp (图 2B) 处出现预期大小片段。经 NCBI 中 BLASTn 数

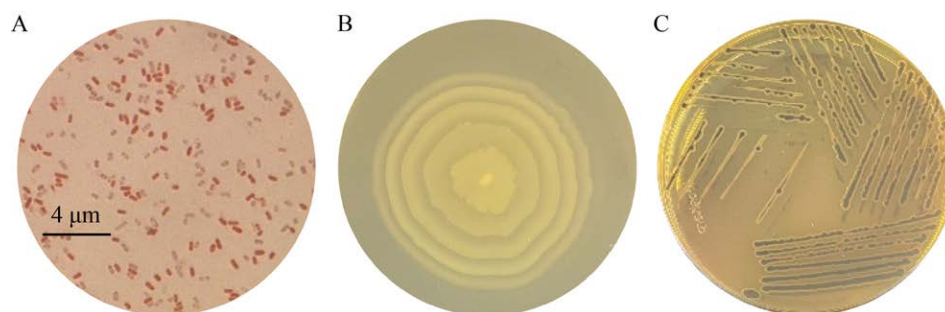


图 1 革兰氏染色及菌落形态 A: 革兰氏染色结果; B: 细菌在胰蛋白胨大豆琼脂培养基中迁移现象; C: 细菌在 SS 琼脂培养基中的菌落形态。

Figure 1 Gram staining and colony morphology. A: The result of Gram staining; B: The phenomenon of bacterial migration in tryptone soy agar (TSA) medium; C: The morphology of bacteria colony in SS agar medium.

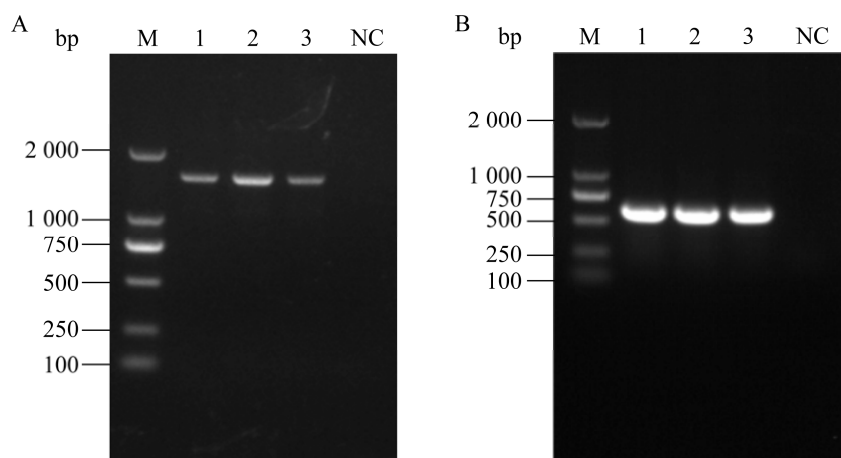


图2 奇异变形杆菌 16S rRNA 基因和 *atpD* 基因鉴定结果 A: 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果; B: *atpD* 基因 PCR 扩增结果; M: DL2000 DNA marker; 1: SKPM1 菌株; 2: SKPM2 菌株; 3: SKPM3 菌株; NC: 阴性对照。

Figure 2 The identify results of *P. mirabilis* 16S rRNA gene and *atpD* gene. A: The PCR amplification results of 16S rRNA genes; B: The PCR amplification results of *atpD* genes; M: DL2000 DNA marker; 1: SKPM1 strain; 2: SKPM2 strain; 3: SKPM3 strain; NC: Negative control.

数据库比对分析, 有 3 株菌与奇异变形杆菌的序列高度相似。其中 16S rRNA 基因序列相似性分别为 100%、99.93%和 99.93%, *atpD* 基因序列相似性分别为 99.82%、100%和 100%。根据序列比对结果, 这 3 株菌初步确定为奇异变形杆菌, 分别命名为 SKPM1、SKPM2、SKPM3。

2.3 遗传进化分析结果

基于 *atpD* 基因序列构建变形杆菌属的系统发育树(图 3)。经系统发育分析, 3 株菌均与奇异变形杆菌处于同一分支。其中, SKPM1 单独处于一个进化分支中, 与菌株 PM11、1035、JPM24 等亲缘较近。菌株 SKPM2 和 SKPM3 共处于一个进化分支, 与同一分支中的菌株 PM16、W2、HK294 等亲缘较近。因此, 结合 2.2 和 2.3 中的结果, 进一步证实本实验分离的菌株为奇异变形杆菌。

2.4 病理分析结果

通过对比健康仔鹿和腹泻仔鹿不同组织的病理切片(图 4), 结果显示腹泻仔鹿肠组织中广泛溃疡、黏膜脱落、肌层坏死、大量隐窝坏死, 伴有少量以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润(图 4B

和 b)。肺中肺泡内出现大量炎性渗出物, 可见中性粒细胞、纤维素, 肺泡壁毛细血管充血, 肺泡间隔增厚(图 4D 和 d)。肝细胞水肿, 肝索结构紊乱, 肝索间隙存在纤维素性渗出物, 少量中性粒细胞浸润(图 4F 和 f)。脾脏内充血, 有纤维素样渗出物, 脾白髓结构消失, 脾索结构不完整, 脾窦扩张(图 4H 和 h)。肾小管上皮细胞、肾小球细胞坏死, 少量淋巴细胞和单核细胞浸润, 肾小球轻度萎缩(图 4J 和 j)。心脏无明显病理变化(图 4L 和 l)。

2.5 毒力和耐药基因检测结果

通过菌液 PCR 检测, 分析了 3 株菌的 8 种毒力基因和 11 种耐药基因。结果显示, 这 3 株菌共检测出 7 种毒力基因和 5 种耐药基因。3 株菌携带毒力基因的情况一致, 均携带 *ureC*、*zapA*、*atfC*、*atfA*、*pmfA*、*ucaA* 和 *rsbA* 这 7 种毒力基因, 均不携带 *mrpA* 毒力基因。耐药基因分析发现, 3 株菌均携带 *bla*_{TEM} 和 *bla*_{CTX-M} 这 2 种基因, 菌株 SKPM2 携带耐药基因种类最多共有 5 种, 菌株 SKPM1 携带最少, 仅 3 种。具体携带毒力和耐药基因情况如表 3 所示, 菌株

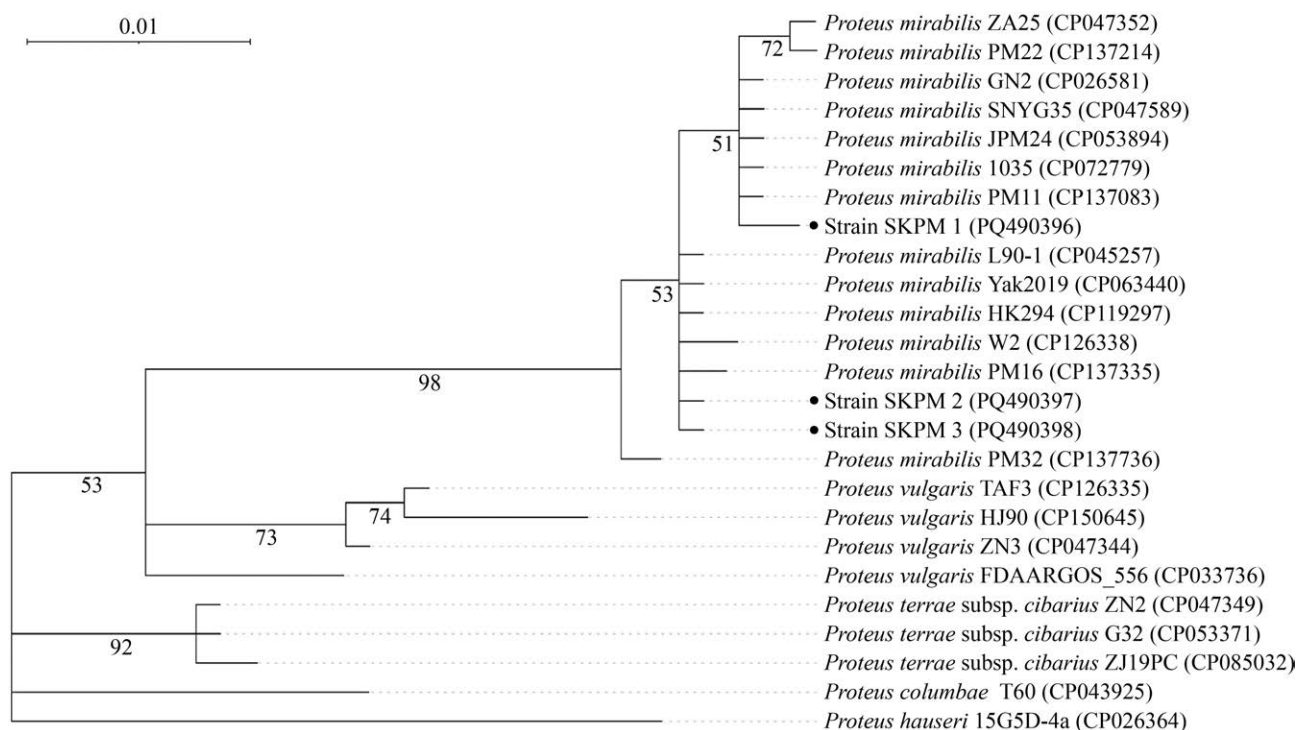


图3 基于 *atpD* 基因序列构建的系统发育树 括号内序号为 GenBank 登录号; 分支上的数字表示置信度; 图片左上角标尺表示进化距离单位。

Figure 3 Phylogenetic tree constructed based on *atpD* gene sequence. The serial number is GenBank accession number; Branch number are bootstrap; Scale in the upper left corner of the picture is distance.

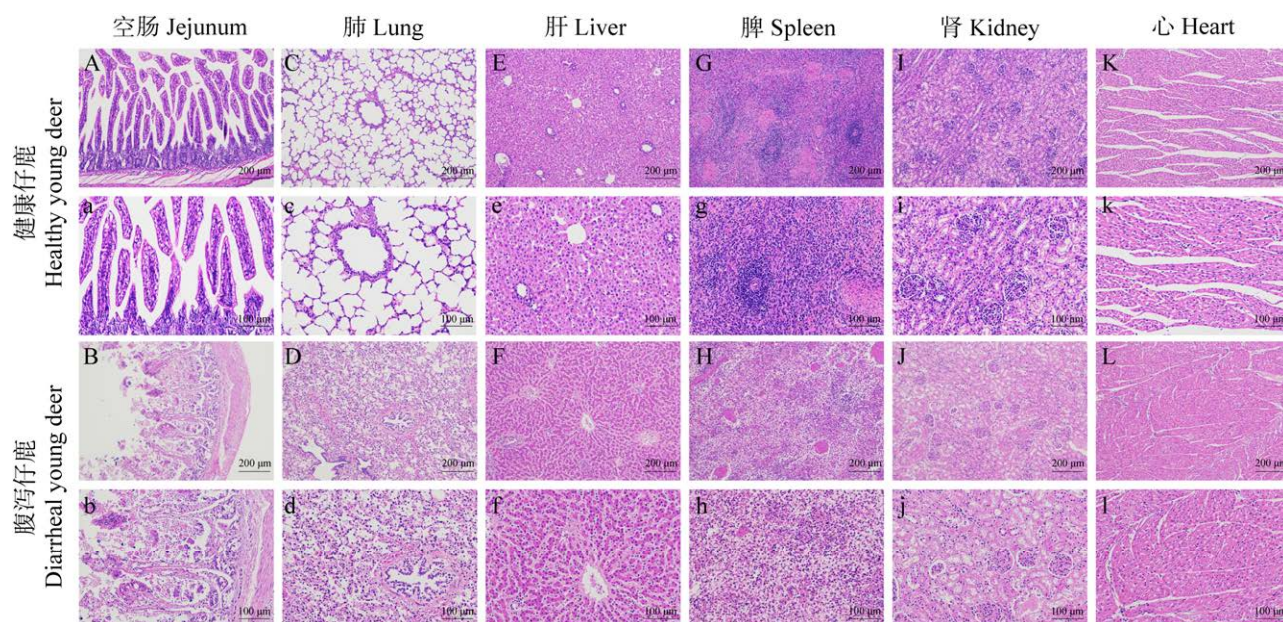


图4 仔鹿不同组织病理切片图

Figure 4 The pathological section picture of different tissues of young deer. Bar: A-L, 200 μ m, a-l, 100 μ m.

表 3 不同菌株毒力和耐药基因携带情况

Table 3 The carrying status of virulence gene and drug-resistance gene of different bacteria strains

基因类型	基因	SKPM1	SKPM2	SKPM3
Gene type	Gene			
毒力基因 Virulence gene	<i>ureC</i>	+	+	+
	<i>mrpA</i>	-	-	-
	<i>zapA</i>	+	+	+
	<i>atfC</i>	+	+	+
	<i>atfA</i>	+	+	+
	<i>pmfA</i>	+	+	+
	<i>ucaA</i>	+	+	+
	<i>rsbA</i>	+	+	+
	<i>bla</i> _{TEM}	+	+	+
	<i>bla</i> _{CTX-M}	+	+	+
耐药基因 Drug- resistance gene	<i>tetA</i>	-	-	-
	<i>tetB</i>	-	+	-
	<i>tetO</i>	-	-	-
	<i>rmtA</i>	-	-	-
	<i>ant</i> (3'')-I	+	+	+
	<i>strA</i>	-	-	-
	<i>sul2</i>	-	+	+
	<i>sul3</i>	-	-	-
	<i>pmi</i>	-	-	-

+: 携带该基因; -: 不携带该基因。

+: Carrying this gene; -: Not carrying this gene.

SKPM2 是 3 株菌中携带毒力和耐药基因种类最多的菌株。菌株 SKPM2 的毒力基因和耐药基因检测结果如图 5 所示。

2.6 药敏试验结果

根据药敏试验结果(表 4), 本试验中, 3 株菌仅对头孢他啶敏感, 菌株 SKPM1 和 SKPM3 对丁胺卡那中度敏感, 菌株 SKPM2 对丁胺卡那耐药, 3 株菌对其余 28 种抗生素均耐药。

2.7 生物膜形成能力测定结果

通过改良结晶紫染色法分析 3 株菌的生物膜形成能力, 实验结果显示, 本试验中 $OD_{cut-off}$ 为 0.12, 3 株菌 SKPM1、SLPM2 和 SKPM3 的 OD_{590} 分别为 0.94、0.93 和 1.10, 均大于 $4OD_{cut-off}$ 。因此, 3 株菌均为生物膜形成能力强的菌株。

2.8 小鼠致病性试验结果

选用菌株 SKPM2, 通过平板计数法确定菌

液浓度为 1.5×10^9 CFU/mL, 10 倍梯度稀释获得 1.5×10^9 、 1.5×10^8 、 1.5×10^7 、 1.5×10^6 和 1.5×10^5 CFU/mL 的 5 个浓度梯度的菌液, 依次接种 1-5 组小鼠。接种后, 第 1 组小鼠在 8 h 内全部死亡, 第 2 组 24 h 内全部死亡, 第 3 组小鼠出现精神萎靡、被毛凌乱、活动减少、采食减少、消瘦等症状, 随后出现死亡。其余组小鼠主要表现活动和食量减少等情况, 但在 3 d 后逐渐恢复。剖检小鼠发现, 肝脏出现白色坏死点, 脾脏肿大、坏死, 肠道肿胀鼓气。对照组小鼠无明显异常。通过 PCR 测序鉴定, 从病死小鼠组织中分离出的细菌为奇异变形杆菌。证明该菌株可引起小鼠发病并死亡, 小鼠死亡率如图 6 所示, 其中 LD_{50} 为 3.98×10^7 CFU/mL。

3 讨论

奇异变形杆菌是一种重要的条件性致病菌, 常引起人类泌尿系统感染^[28]。同时, 在不同动物中有着一定的发病率^[11-12]。本研究中, 从便血仔鹿肠道中分离出奇变形杆菌, 确定了本次引起仔鹿腹泻病的主要病原为奇异变形杆菌。通过分析不同组织的主要病理变化, 发现除空肠黏膜层损伤严重并出现脱落和肌层细胞坏死等病变外, 其他主要脏器均出现一定程度的病变, 这表明奇异变形杆菌或其毒素可能具有广泛的组织嗜性, 可引起仔鹿严重的腹泻和显著的病理损伤。目前, 关于梅花鹿感染奇异变形杆菌的研究较少。在其他物种中, 刘妍罕等^[29]利用野猪源奇异变形杆菌建立小鼠感染模型, 发现小鼠被感染后会出现肠绒毛断裂、脱落等病理变化。王佳宁等^[30]分离的兔源奇异变形杆菌也可以引起家兔空肠绒毛黏膜和上皮细胞脱落, 与本研究发现的仔鹿空肠中的病理变化结果存在相似性。此外, Gong 等^[31]分离的人源奇异变形杆菌也可对小鼠不同肠段造成损伤, 并且发现由 IV 型分泌系统介导的通路是其重要的致病机制。而该菌在梅花鹿肠道中的致病机制还需要进一步研究。

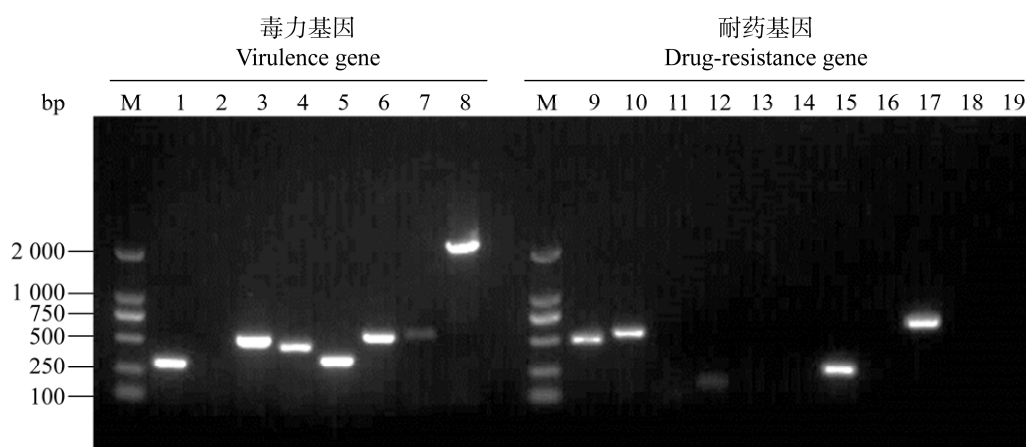


图5 菌株SKPM2的毒力基因和耐药基因检测结果

Figure 5 Detection results of virulence and resistance genes of strain SKPM2. M: DL2000 DNA marker; 1: *ureC* gene; 2: *mrpA* gene; 3: *zapA* gene; 4: *atfC* gene; 5: *atfA* gene; 6: *pmfA* gene; 7: *ucaA* gene; 8: *rsbA* gene; 9: *bla_{TEM}* gene; 10: *bla_{CTX-M}* gene; 11: *tetA* gene; 12: *tetB* gene; 13: *tetO* gene; 14: *rmtA* gene; 15: *ant(3'')-I* gene; 16: *strA* gene; 17: *sul2* gene; 18: *sul3* gene; 19: *pmi* gene.

奇异变形杆菌是一种常见的多重耐药菌，已有多项研究对此进行了报道^[32-33]。本研究发现，3株菌均显示出显著的耐药性，在测试的30种抗生素中，1株菌对29种抗生素耐药，另2株菌对28种抗生素耐药，与董贵等^[12]、廖娟等^[22]报道的奇异变形杆菌相比耐药性更强，尤其是本研究发现该菌对β-内酰胺类(青霉素、氨苄西林、头孢氨苄等)、氨基糖苷类(庆大霉素、卡那霉素等)和四环素类(四环素、多西环素等)等临床常用兽药表现出高度耐药性，说明该养殖场在梅花鹿养殖中存在严重的抗生素滥用现象，从而增加了动物临床治疗难度。另一方面，本研究的分离株对部分非兽用抗生素(头孢唑啉、头孢拉定等)的耐药性，提示该菌对公共卫生安全的潜在威胁。此外，通过PCR方法检测了β-内酰胺类(*bla_{TEM}*、*bla_{CTX-M}*)、四环素类(*tetB*)、氨基糖苷类[*ant(3'')-I*]和磺胺类(*sul2*)等耐药基因，表明这些菌株可能长期稳定地保持对相关抗生素的抵抗能力，并有可能通过水平传播方式将耐药基因传递至其他菌株中^[34]，从而对公众卫生安全造成更大的威胁。

在细菌毒力方面，本研究分离的3株奇异变形杆菌均携带*ureC*、*zapA*、*atfC*、*atfA*、*rsbA*、

*ucaA*和*pmfA*等7种毒力基因，这些基因分别编码细菌脲酶、菌毛等蛋白，调控细菌迁移等^[35]，并且3株菌均表现出强生物膜形成能力。在致病性方面，3株菌在毒力基因和生物膜形成方面都具有相似的性质，而菌株SKPM2具有更强的耐药性，因此选择菌株SKPM2为代表进行小鼠致病性试验，结果表明菌株SKPM2对小鼠有一定的致死性，其 LD_{50} 为 3.98×10^7 CFU/mL，相较于陈赫威等^[13]分离的猪源奇异变形杆菌，半数致死浓度更低，说明本次分离株具有更强的致病性。其中生物膜可能是具有多重耐药性及更强毒力的重要原因，Sun等^[36]的研究也发现了这一现象。本研究通过对分离菌毒力特性的研究，可以推测这些含有较多毒力基因的菌株可能具有良好的免疫原性，适合作为疫苗候选菌株进行更深入的研究。同时，研发抑制奇异变形杆菌生物膜形成的相关产品，也可作为防治该病的新策略。

4 结论

从腹泻仔鹿肠道成功分离出3株奇异变形杆菌。毒力方面，这些细菌携带*ureC*、*zapA*、*atfC*等毒力基因，具有生物膜形成能力。其中菌株

表 4 不同菌株药敏试验结果

Table 4 The antimicrobial susceptibility test results of different bacteria strains

抗生素类型 Type of antibiotic	抗生素 Antibiotic	SKPM1	SKPM2	SKPM3
β-内酰胺类 β-lactams	青霉素 Penicillin	R	R	R
	苯唑西林 Oxacillin	R	R	R
	氨苄西林 Ampicillin	R	R	R
	羧苄西林 Carbenicillin	R	R	R
	哌拉西林 Piperacillin	R	R	R
	头孢氨苄 Cefalexin	R	R	R
	头孢唑啉 Cefazolin	R	R	R
	头孢拉定 Cefradine	R	R	R
	头孢呋辛 Cefuroxime	R	R	R
	头孢他啶 Ceftazidime	S	S	S
	头孢曲松 Ceftriaxone	R	R	R
	头孢哌酮 Cefoperazone	R	R	R
氨基糖苷类 Aminoglycosides	丁胺卡那 Amikacin	I	R	I
	庆大霉素 Gentamicin	R	R	R
	卡那霉素 Kanamycin	R	R	R
	新霉素 Neomycin	R	R	R
四环素类 Tetracyclines	四环素 Tetracycline	R	R	R
	多西环素 Doxycycline	R	R	R
	米诺环素 Minocycline	R	R	R
大环内酯类 Macrolides	红霉素 Erythromycin	R	R	R
	麦迪霉素 Midecamycin	R	R	R
喹诺酮类 4-quinolones	诺氟沙星 Norfloxacin	R	R	R
	氧氟沙星 Ofloxacin	R	R	R
	环丙沙星 Ciprofloxacin	R	R	R
多肽类 Polypeptides	万古霉素 Vancomycin	R	R	R
	多黏菌素 B Polymyxin B	R	R	R
磺胺类 Sulfonamides	复方新诺明 Compound sulfamethoxazole	R	R	R
硝基呋喃类 Nitrofurans	呋喃唑酮 Furazolidone	R	R	R
氯霉素类 Chloramphenicol	氯霉素 Chloramphenicol	R	R	R
林可酰胺类 Lincosamides	克林霉素 Clindamycin	R	R	R

S: 敏感; I: 中度敏感; R: 耐药。

S: Sensitivity; I: Intermediary sensitivity; R: Resistance.

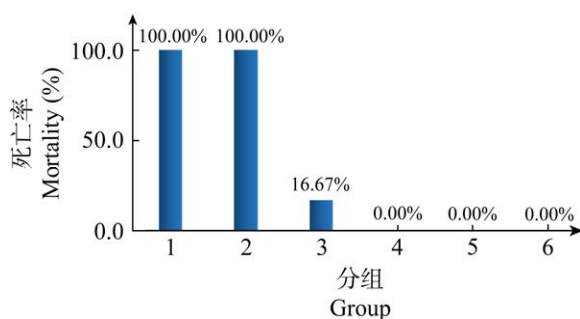


图 6 小鼠致病性试验结果

Figure 6 The test results of pathogenicity in mouse. 1: 1.5×10^9 CFU/mL; 2: 1.5×10^8 CFU/mL; 3: 1.5×10^7 CFU/mL; 4: 1.5×10^6 CFU/mL; 5: 1.5×10^5 CFU/mL; 6: TSB medium.

SKPM2 菌液浓度为 1.5×10^9 CFU/mL 时, 8 h 内致小鼠死亡。耐药性方面, 检测出 *bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M}、*tetB* 等耐药基因, 该菌对 β-内酰胺类、四环素类和氨基糖苷类等抗生素具有多重耐药性。

作者贡献声明

曹润来: 实验研究、数据分析、图表制作、文章撰写; 王奇林: 实验研究、图表制作、数据处理; 孙春庆: 样品采集、文章修改; 薛竹青、刘子瑜: 实验研究、数据收集; 胡盼: 论文修改; 王晓旭: 实验设计, 论文修改; 刘志

杰: 实验设计、论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] LIU LJ, DONG ZY, AI SQ, CHEN SY, DONG MY, LI QL, ZHOU ZY, LIU HF, ZHONG ZJ, MA XP, HU YC, REN ZH, FU HL, SHU G, QIU XM, PENG GN. Virulence-related factors and antimicrobial resistance in *Proteus mirabilis* isolated from domestic and stray dogs[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1141418.
- [2] QU XY, ZHOU J, HUANG HQ, WANG W, XIAO YP, TANG B, LIU HL, XU CG, XIAO XN. Genomic investigation of *Proteus mirabilis* isolates recovered from pig farms in Zhejiang Province, China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 952982.
- [3] ARMBRUSTER CE, MOBLEY HLT. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(11): 743-754.
- [4] BICHLER KH, EIPPER E, NABER K, BRAUN V, ZIMMERMANN R, LAHME S. Urinary infection stones[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2002, 19(6): 488-498.
- [5] SCHAFER JN, PEARSON MM. *Proteus mirabilis* and urinary tract infections[J]. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(5): 3.5.10.
- [6] ALGAMMAL AM, HASHEM HR, ALFIFI KJ, HETTA HF, SHERABA NS, RAMADAN H, EL-TARABILI RM. *atpD* gene sequencing, multidrug resistance traits, virulence-determinants, and antimicrobial resistance genes of emerging XDR and MDR-*Proteus mirabilis*[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 9476.
- [7] FUSCO A, CORETTI L, SAVIO V, BUOMMINO E, LEMBO F, DONNARUMMA G. Biofilm formation and immunomodulatory activity of *Proteus mirabilis* clinically isolated strains[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(2): 414.
- [8] PROTONOTARIOU E, POULOU A, POLITI L, MELETIS G, CHATZOPOULOU F, MALOUI A, METALLIDIS S, TSAKRIS A, SKOURA L. Clonal outbreak caused by VIM-4-producing *Proteus mirabilis* in a Greek tertiary-care hospital[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020, 56(2): 106060.
- [9] 杨霞, 张飘, 曾茂芹, 刘妍罕, 程振涛, 文明. 1 株鸭源奇异变形杆菌的分离鉴定与毒力基因检测[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(3): 1084-1092.
- YANG X, ZHANG P, ZENG MQ, LIU YH, CHENG ZT, WEN M. Isolation, identification and virulence gene detection of a strain of *Proteus mirabilis* from ducks[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(3): 1084-1092 (in Chinese).
- [10] 王涛, 马轲, 张建刚, 蔺小奇, 刘真真, 杨勇军. 长春地区鸡源奇异变形杆菌的分离鉴定及毒力分析[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(12): 4987-4998.
- WANG T, MA K, ZHANG JG, LIN XQ, LIU ZZ, YANG YJ. Isolation, identification, and virulence analysis of a *Proteus mirabilis* strain from chicken in Changchun[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(12): 4987-4998 (in Chinese).
- [11] 张召兴, 韩平, 王亚男, 王珍珊, 张妍, 郭磊, 衡江鸿, 闫港, 张艳英. 冀北地区致犊牛腹泻奇异变形杆菌的分离鉴定及耐药性研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2024, 46(1): 24-31.
- ZHANG ZX, HAN P, WANG YN, WANG ZS, ZHANG Y, GUO L, HENG JH, YAN G, ZHANG YY. Isolation, identification and drug resistance of *Proteus mirabilis* isolated from diarrhea calves in northern Hebei Province[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2024, 46(1): 24-31 (in Chinese).
- [12] 董贵, 杨光, 蒋秀梅, 张珊玲, 王尧, 贺建忠, 陶大勇. 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 XM, ZHANG SL, WANG Y, HE JZ, TAO DY. 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).
- [13] 陈赫威, 马玲, 秦树英, 陈樱, 宋瑞鹏, 孙倩, 覃绍敏, 刘金凤, 陈凤莲, 吴健敏. 产 AmpC 酶的猪源奇异变形杆菌分离鉴定及生物学特性分析[J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55(7): 46-52.
- CHEN HW, MA L, QIN SY, CHEN Y, SONG RP, SUN Q, QIN SM, LIU JF, CHEN FL, WU JM. Isolation, identification and biological characteristics of swine-sourced *Proteus mirabilis* producing AmpC enzyme[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(7): 46-52 (in Chinese).
- [14] 靳元元, 王奇林, 曹润来, 孙春庆, 胡盼, 刘志杰, 王晓旭. 狐貉大肠杆菌、肺炎克雷伯菌和奇异变形杆菌三联菌壳疫苗的制备及免疫学研究[J/OL]. *特产研究*, 2024. DOI: 10.16720/j.cnki.tcyj.2024.097.
- JIN YY, WAN QL, CAO RL, SUN CQ, HU P, LIU ZJ, WANG XX. Research on the preparation and immunological characteristics of ghost vaccines of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* for fox and raccoon dog[J/OL]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2024. DOI: 10.16720/j.cnki.tcyj.2024.097 (in Chinese).
- [15] COKER C, POORE CA, LI X, MOBLEY HLT. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection[J]. *Microbes and Infection*, 2000, 2(12): 1497-1505.
- [16] 毕水莲, 唐书泽, 陈守义, 吴希阳. 2 种检测变形杆菌 PCR 方法的比较研究[J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(7): 122-126.
- BI SL, TANG SZ, CHEN SY, WU XY. Comparison of two detection method in *Proteus* by polymerase chain reaction[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2008, 34(7): 122-126 (in Chinese).
- [17] LEI CW, CHEN YP, KANG ZZ, KONG LH, WANG HN. Characterization of a novel SXT/R391 integrative and conjugative element carrying *cfr*, *bla_{CTX-M-65}*, *fosA3*, and *aac(6')-ib-cr* in *Proteus mirabilis*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, 62(9): e00849-18.
- [18] 孙慧敏, 范冰冰, 张旭林, 邵静, 刘理想, 许保增. 梅花鹿早期妊娠不同时期血液转录组分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2024, 51(9): 3892-3908.

- SUN HM, FAN BF, ZHANG XL, SHAO J, LIU LX, XU BZ. Transcriptomic analysis of blood in early pregnancy at different time points in sika deer[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 51(9): 3892-3908 (in Chinese).
- [19] 孙绘程. 仔鹿腹泻源沙门氏菌、奇异变形杆菌分离鉴定及耐药分析[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2023.
- SUN HC. Isolation and identification of *Salmonella*, *Proteus mirabilis* and analysis of their drug resistance[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [20] HEUER H, KRSEK M, BAKER P, SMALLA K, WELLINGTON EM. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3233-3241.
- [21] 尹有勤, 马德慧, 李岩松, 蒙小刚, 霍晓伟, 刘锴. 鹅源奇异变形杆菌的分离鉴定及毒力基因检测[J]. 微生物学通报, 2018, 45(10): 2152-2163.
- YIN YQ, MA DH, LI YS, MENG XG, HUO XW, LIU K. Isolation, identification of goose *Proteus mirabilis* and it's virulence genes detection[J]. Microbiology China, 2018, 45(10): 2152-2163 (in Chinese).
- [22] 廖娟, 石英子, 冯丹妮, 王钢, 喻世刚, 杨子艺, 梁梓. 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 YZ, FENG DN, WANG G, YU SG, YANG ZY, LIANG Z. Isolation, identification and detection of antibiotics resistance genes of *Proteus mirabilis* from rabbit[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(4): 125-129 (in Chinese).
- [23] ZHANG D, GAO FL, JAKOVLIC I, ZOU H, ZHANG J, LI WX, WANG GT. PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies[J]. Molecular Ecology Resources, 2020, 20(1): 348-355.
- [24] KALYAANAMOORTHY S, MINH BQ, WONG TKF, von HAESELER A, JERMIIN LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates[J]. Nature Methods, 2017, 14(6): 587-589.
- [25] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing - 31st Edition: CLSI M100-Ed31[S]. Malvern: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- [26] 刘丽娟. 成都地区犬猫粪便源奇异变形杆菌的分离鉴定及耐药性检测[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2023.
- LIU LJ. Isolation, identification and antibiotic resistance detection of *Proteus mirabilis* from dog and cat feces in Chengdu[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [27] HU QH, HAN XG, ZHOU XJ, DING SY, DING C, YU SQ. Characterization of biofilm formation by *Riemerella anatipestifer*[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 144(3/4): 429-436.
- [28] ARMBRUSTER CE, MOBLEY HLT, PEARSON MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection[J]. EcoSal Plus, 2018, 8(1): 10.1128/ecosalplus.ESP-10.1128/ecosalplus0009-2017.
- [29] 刘妍罕, 曾茂芹, 张飘, 杨霞, 杨颖, 程振涛, 粟海军, 文明. 野猪源奇异变形杆菌的分离鉴定及致病性分析[J]. 中国动物传染病学报, 2022, 30(1): 44-52.
- LIU YH, ZENG MQ, ZHANG P, YANG X, YANG Y, CHENG ZT, SU HJ, WEN M. Isolation, identification and pathogenicity of *Proteus mirabilis* isolates from wild boars[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2022, 30(1): 44-52 (in Chinese).
- [30] 王佳宁, 李双军, 张自强, 王帅帅, 位兰, 朱雪敏, 刘玉梅. 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 JN, LI SJ, ZHANG ZQ, WANG SS, WEI L, ZHU XM, LIU YM. Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Proteus mirabilis* in rabbits[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2024, 46(1): 32-38 (in Chinese).
- [31] GONG ZL, SHI XL, BAI F, HE XL, ZHANG HY, LI YB, WAN Y, LIN YM, QIU YQ, CHEN QC, HU QH, CAO H. Characterization of a novel diarrheagenic strain of *Proteus mirabilis* associated with food poisoning in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2810.
- [32] LEI CW, ZHANG AY, WANG HN, LIU BH, YANG LQ, YANG YQ. Characterization of SXT/R391 integrative and conjugative elements in *Proteus mirabilis* isolates from food-producing animals in China[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016, 60(3): 1935-1938.
- [33] LI XY, DU Y, DU PC, DAI H, FANG YJ, LI ZP, LV N, ZHU BL, KAN B, WANG DC. SXT/R391 integrative and conjugative elements in *Proteus* species reveal abundant genetic diversity and multidrug resistance[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37372.
- [34] 王文洁, 于丽明, 邵梦莹, 贾延天, 刘柳青青, 马小涵, 郑宇, 刘一帆, 张瑛臻, 罗先香, 李锋民, 郑浩. 畜禽养殖环境中抗生素抗性基因污染的研究进展[J]. 应用生态学报, 2023, 34(5): 1415-1429.
- WANG WJ, YU LM, SHAO MY, JIA YT, LIU LQQ, MA XH, ZHENG Y, LIU YF, ZHANG YZ, LUO XX, LI FM, ZHENG H. Research review on the pollution of antibiotic resistance genes in livestock and poultry farming environments[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2023, 34(5): 1415-1429 (in Chinese).
- [35] 黎娜铭, 王彬, 舒正强, 曾智勇, 黄涛, 汤德元, 吴学祥. 猪源奇异变形杆菌的分离鉴定、耐药性分析及毒力基因检测[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(3): 89-94.
- LI NM, WANG B, SHU ZQ, ZENG ZY, HUANG T, TANG DY, WU XX. Isolation and identification of swine-sourced *Proteus mirabilis*, and detection of its drug resistance and virulence genes[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(3): 89-94 (in Chinese).
- [36] SUN YD, WEN SS, ZHAO LL, XIA QQ, PAN Y, LIU HH, WEI CW, CHEN HY, GE JW, WANG HB. Association among biofilm formation, virulence gene expression, and antibiotic resistance in *Proteus mirabilis* isolates from diarrhetic animals in northeast China[J]. BMC Veterinary Research, 2020, 16(1): 176.