



## 研究报告

## 致病性大肠杆菌和蜡样芽胞杆菌的分离鉴定

殷鑫欢 曾喻兵 赵军 徐志文\* 朱玲\*

四川农业大学动物医学院动物生物技术中心 四川 成都 611130

**摘要:**【背景】猪只消化道疾病是养猪业上一大重要疾病,给养猪业带来一定的经济损失。大肠杆菌是引起猪腹泻的一种常见病原菌,可以引起不同日龄的猪腹泻,但主要以幼龄猪为主。【目的】旨在分离鉴定引起四川省眉山市一规模化养猪场病猪大规模腹泻的病原菌。【方法】采用常规细菌分离方法结合 16S rRNA 基因序列的分析方法从发病猪肝脏、胃以及污染的饲料分离鉴定细菌,并对分离株进行小鼠致病性试验、16S rRNA 基因遗传进化树分析、毒力基因的检测、药物敏感试验。【结果】从腹泻猪肝脏中分离到一株致病性大肠杆菌,胃中分离到一株蜡样芽胞杆菌,并且追溯到传染源是该猪场饲料。通过检测这两株菌相应的毒力基因发现大肠杆菌不属于肠外致病性型,蜡样芽胞杆菌检测到了 *nheA*、*nheB*、*nheC*、*bceT*、*entFM* 5 种毒力基因;药敏试验表明常规的氨基糖苷类和头孢类抗生素对大肠杆菌抑菌效果较好,红霉素、氟苯尼考、头孢氨苄、头孢哌酮对蜡样芽胞杆菌抑菌效果较好,而蜡样芽胞杆菌对青霉素、阿莫西林等常规药物不敏感。【结论】饲料存在大肠杆菌和蜡样芽胞杆菌的混合污染。

**关键词:** 大肠杆菌, 蜡样芽胞杆菌, 饲料污染, 毒力基因, 药敏试验

## Isolation and identification of pathogenic *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*

YIN Xin-Huan ZENG Yu-Bing ZHAO Jun XU Zhi-Wen\* ZHU Ling\*

Animal Biotechnology Center, College of Veterinary Medicine of Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China

**Abstract:** [Background] Pig digestive tract disease is one of the most important diseases in the pig industry and brings certain economic losses to the swine industry. *Escherichia coli* is a common pathogen causing diarrhea of pigs at different ages, but mainly in young pigs. [Objective] The purpose of this study was to isolate and identify pathogens causing large-scale diarrhea in pigs on a large-scale pig farm in Meishan City, Sichuan Province. [Methods] Bacteria were isolated and identified from the infected pig liver, stomach and contaminated feed using conventional bacterial isolation methods combined with 16S rRNA gene sequence analysis. The isolates were tested for pathogenicity in mice, 16S rRNA gene

**Foundation items:** Technology Support Plan of Sichuan Province (2017NZ0038); National Science and Technology Plan in the 12<sup>th</sup> Five-Year Plan for Rural Areas (2015BAD12B04-2.3); The 13<sup>th</sup> Five-Year Plan for Breeding Program and Research (2016NYZ0052); Sichuan Veterinary Medicine and Drug Innovation Group of China Agricultural Research System (CARS-SVDIP)

\*Corresponding authors: E-mail: XU Zhi-Wen: abtcxzw@126.com; ZHU Ling: abtczl72@126.com

Received: 22-04-2018; Accepted: 15-06-2018; Published online: 21-06-2018

基金项目: 四川省科技支撑计划(2017NZ0038); 十二五农村领域国家科技计划课题(2015BAD12B04-2.3); 十三五育种攻关计划(2016NYZ0052); 国家农业产业技术体系四川兽药创新团队专项(CARS-SVDIP)

\*通信作者: E-mail: 徐志文: abtcxzw@126.com; 朱玲: abtczl72@126.com

收稿日期: 2018-04-22; 接受日期: 2018-06-15; 网络首发日期: 2018-06-21

phylogenetic analysis, virulence genes, and drug sensitivity testing. [Results] One pathogenic *Escherichia coli* was isolated from the liver of diarrhea pigs, one strain of *Bacillus cereus* was isolated from the stomach, and the source of infection was traced back to the feed on the farm. By detecting the corresponding virulence genes of these two strains, it was found that *Escherichia coli* is not extra-intestinal pathogenic type. *Bacillus cereus* was detected to have five virulence genes: *nheA*, *nheB*, *nheC*, *bceT*, *entFM*; Aminoglycosides and cephalosporins have good antibacterial effects on *Escherichia coli*. Erythromycin, florfenicol, cephalixin, cefoperazone have good antibacterial effect on *Bacillus cereus*, but the bacteria were not sensitive to conventional antibiotics such as penicillin and amoxicillin. [Conclusion] Feed is contaminated by *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*.

**Keywords:** *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, Feed contamination, Virulence genes, Drug sensitive test

目前, 猪的肠道腹泻疾病是危害养猪业的一类重要疾病, 可以由细菌、病毒、寄生虫等混合感染引起<sup>[1]</sup>。2018年3月初四川省眉山市一规模化养猪场发生了大范围的猪腹泻, 囊括产房的小猪、母猪、保育舍和育肥舍的猪, 表现为仔猪败血、腹泻、大猪拉稀不间断, 造成了大量的猪死亡, 主要集中于产房猪和保育猪, 也造成了部分母猪死亡。送检来的猪剖解发现猪消化道严重出血、肝脏表面有白色的点状坏死灶。后续我们相继检测了各个年龄阶段的发病猪体内的病原, 包括保育猪和育肥猪。同时针对腹泻的病毒性病原猪德尔塔冠状病毒、猪流行性腹泻病毒、猪轮状病毒、猪伪狂犬病毒以及常发疾病猪蓝耳病毒和猪瘟病毒进行了检测, 结果全部是阴性, 证实此次发病是由细菌污染饲料引起的。

本试验经过细菌常规分离结合 16S rRNA 基因序列分析鉴定病原菌, 最终经过对该猪场的饲料、奶粉、豆粕、猪舍饮水几轮检查后发现该厂的一个批次饲料存在大肠杆菌和蜡样芽胞杆菌污染, 与在发病猪体内分离到的致病菌一致。参考文献[2-4]合成 10 对针对大肠杆菌和蜡样芽胞杆菌的毒力基因引物, 通过 PCR 鉴定其携带的毒力基因。同时对分离的 2 种菌选用了常规的抗生素做药敏试验, 用来确定感染猪死亡的细菌性病原及其特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本来源

送检样本来自四川眉山市一规模化猪场的猪组织器官, 包括肝脏和胃。该厂 3 月初猪的腹泻和败血症一直持续, 因此我们筛查到了饲料, 包括送

来的饲料、奶粉、豆粕和鱼粉。

### 1.2 实验试剂和动物

TSA 培养基、麦康凯培养基、药敏纸片购自瑞进特公司; DL2000 DNA marker、2×Taq PCR Master Mix、pMD19-T 载体、Solution I 均为宝生物工程(大连)有限公司产品; 细菌 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均为 TIANGEN 公司产品; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞为本实验室之前所保存。8 周龄的 BALB/c 小鼠购自达硕公司。

### 1.3 细菌的培养和纯化

猪送来的组织包括胃和肝脏, 用接种环从当中分别穿刺取样, 无菌接种于麦康凯、TSA 培养基, 培养皿置于 37 °C 细菌培养箱培养 24 h, 观察菌落形态, 挑取单个菌落继续划线扩大, 之后染色镜检。送检的饲料用无菌的生理盐水 2 mL 溶解 0.5 g 并漩涡振荡, 随后取 150  $\mu$ L 的上清分别涂抹麦康凯、TSA 培养基置于 37 °C 细菌培养箱, 24 h 后观察结果, 将疑似菌落继续挑单划线扩大。扩大后的菌落经过革兰氏染色观察形态。挑取单一形态的菌落接种于 TSB 液体培养基纯培养, 37 °C、170 r/min 培养过夜后取菌液与 50% 甘油等体积混合保种, 置于 -20 °C。

### 1.4 细菌 16S rRNA 基因的扩增及系统发育树构建

应用实验室设计的细菌 16S rRNA 基因通用引物扩增分离菌的 16S rRNA 基因, 预期扩增长度为 1 465 bp。引物序列见表 1。

反应体系(30  $\mu$ L): 上、下游引物(20  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L, 细菌基因组(427 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, 2×Taq PCR

表 1 试验中使用的引物序列

Table 1 Primers sequence used in experiments

基因名称 Gene name	引物名称 Primers	引物序列 Primer sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	目的条带 Product size (bp)
<i>16S rRNA</i>	F-16SrRNA	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	55	1 465
	R-16SrRNA	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		
<i>hblA</i>	F-hblA	AAGCAATGGAATACAATGGG	56	1 154
	R-hblA	AGAATCTAAATCATGCCACTGC		
<i>hblC</i>	F-hblC	GATACTCAATGTGGCAACTGC	58	740
	R-hblC	TTGAGACTGCTCGTCTAGTTG		
<i>hblD</i>	F-hblD	ACCGGTAACACTATTCATGC	58	829
	R-hblD	GAGTCCATATGCTTAGATGC		
<i>nheA</i>	F-nheA	GTTAGGATCACAATCACC GC	56	755
	R-nheA	ACGAATGTAATTTGAGTCG		
<i>nheB</i>	F-nheB	TTAGTAGTGGATCTGTACGC	54	743
	R-nheB	TTAATGTTTCGTTAATCCTGC		
<i>nheC</i>	F-nheC	TGGATTCCAAGATGTAACG	58	683
	R-nheC	ATTACGACTTCTGCTTGTGC		
<i>entFM</i>	F-entFM	AAAGAAATTAATGGACAAACTCAA ACTCA	60	596
	R-entFM	GTATGTAGCTGGGCCTGTACGT		
<i>bceT</i>	F-bceT	TTACATTACCAGGACGTGCTT	52	428
	R-bceT	TGTTTGTGATTGTAATTCAGG		
<i>ces</i>	F-ces	GGTGACACATTATCATATAAGGTG	58	1 271
	R-ces	GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA		
<i>EM1</i>	F-EM1	GACAAGAGAAATTTCTACGAGCAAGTACAAT	60	635
	R-EM1	GCAGCCTTCCAATTACTCCTTCTGCCACAGT		

Master Mix 15  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 12  $\mu$ L。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离后用胶回收试剂盒回收片段, 连接至 pMD19-T 载体, 随后转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。蓝白斑筛选阳性克隆后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序的结果在 NCBI 上进行比对, BLAST 比对后下载 GenBank 中相似性较高的标准菌株, 采用 MEGA 6.0 软件中的 Neighbor-Joining 法建立分离菌与已知菌的系统进化树。

### 1.5 分离菌的生理生化鉴定

按照常规方法对分离菌进行各种糖发酵试验,

同时进行吲哚试验、甲基红试验、VP 试验、触酶试验、硫化氢试验, 观察生化反应特性。

### 1.6 动物试验

动物试验分为两组, 每组选取 4 只成年系 BALB/c 小鼠, 第一组选取两只老鼠注射蜡样芽胞杆菌, 另外两只注射大肠杆菌, 第二组全部注射生理盐水。挑取单菌落 37 °C、150 r/min 振荡培养过夜, 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用无菌生理盐水悬浮菌体, 按 0.2 mL/只( $6 \times 10^8$  CFU/mL)剂量腹腔注射, 对照组注射等量生理盐水。观察并记录小鼠状态和死亡情况, 剖检死亡小鼠并分离细菌。

### 1.7 分离株毒力因子的检测及测序

根据文献合成 *hblA*、*hblC*、*hblD*、*nheA*、*nheB*、

*nheC*、*entFM*、*bceT*、*ces*、*EMI* 等关于蜡样芽胞杆菌的 10 对毒力基因<sup>[2-4]</sup>，序列见表 1，由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以蜡样芽胞杆菌基因组为模板进行毒力因子的扩增，产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。大肠杆菌由于没有扩增出肠外致病性基因片段，因此未附引物序列。

### 1.8 药敏试验

药敏试验参照 CLSI 标准<sup>[5]</sup>采用纸片扩散法，选择对革兰氏阳性菌和阴性菌效果偏好的药物进行药敏实验，对于大肠杆菌和蜡样芽胞杆菌各选取 14 种药物，每组设置 3 个平行对照。密集划线两种菌于 MH 平板上，无菌镊子夹取药敏纸片贴于平板表面静置 2 min 后，37 °C 培养 24 h 后，测量各种药敏纸片的抑菌圈直径并判定药敏结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌的分离培养及镜检

在 12-18 h 的培养过后，TSA 培养基上长出了较扁平、干燥、直径约为 4 mm-5 mm 的浅黄色菌落，为革兰氏染色阳性的链状排列杆菌，有芽孢存在。麦康凯培养基上长出粉红色的菌落，革兰氏染色阴性的小杆菌，具体染色形态如图 1 所示。

### 2.2 分离菌株的生理生化鉴定

生理生化试验发现菌株 MS-2 能发酵葡萄糖、蔗糖和麦芽糖，不发酵乳糖、木糖、甘露醇和果胶糖。过氧化氢酶试验、甲基红试验(M.R.)和乙酰甲基甲醇试验(VP)为阳性，吲哚试验和硫化氢试验为阴性，这些符合蜡样芽胞杆菌的特性。MS-1 可以发酵乳糖和山梨醇，吲哚和甲基红试验(M.R.)均为阳性，乙酰甲基甲醇试验(VP)和枸橼酸盐利用试验阴性，氧化酶试验和硫化氢试验阴性，符合大肠杆菌的特点。

### 2.3 分离株 16S rRNA 基因扩增结果及进化树分析

16S rRNA 基因引物扩增出相应 1 465 bp 的片段(图 2)。将扩增片段连接 pMD-19T 载体转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  挑选阳性克隆测序。DNASTAR 软件进行序列拼接，然后在 NCBI 上进行比对，采用 MEGA 6.0 构建 16S rRNA 基因系统发育树，结果显示 MS-2 与蜡样芽胞杆菌 KU179332.1 相似性较高(99%)，位于一个分支上(图 3A)；而 MS-1 与大肠杆菌 KU870317.1 相似性较高(99%)，位于一个分支上(图 3B)。综合分析分离菌的形态特征、理化特性和 16S rRNA 基因序列的系统发育进化树，证实分离到大肠杆菌和蜡样芽胞杆菌各一株。

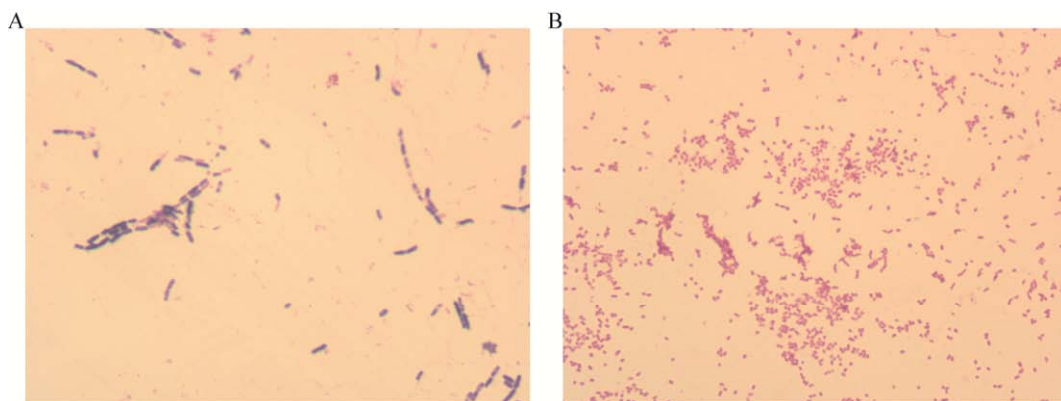


图 1 分离菌的革兰氏染色(1 000 $\times$ )

Figure 1 Gram stain of isolates (1 000 $\times$ )

注：A：疑似蜡样芽胞杆菌；B：疑似大肠杆菌。

Note: A: Suspected *Bacillus cereus* isolates; B: Suspected *Escherichia coli* isolates.

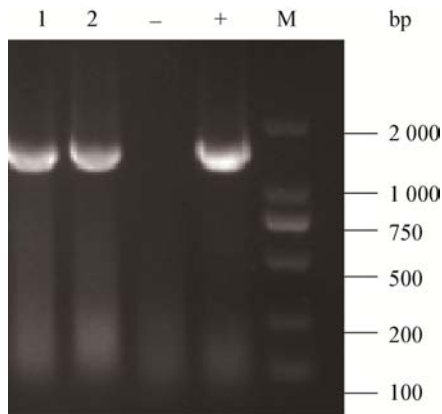


图 2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

Figure 2 The PCR amplification of 16S rRNA gene

注: A: M: DL2000 DNA marker; 1: 疑似蜡样芽胞杆菌分离株; 2: 疑似大肠杆菌分离株; -: 阴性对照; +: 阳性对照.

Note: A: M: DL2000 DNA marker; 1: Suspected *Bacillus cereus* isolates; 2: Suspected *Escherichia coli* isolates; -: Negative control; +: Positive control.

## 2.4 分离株致病性试验结果

注射两种细菌的老鼠感染后被毛凌乱, 呼吸急促呈现腹式呼吸, 双眼紧闭。接种蜡样芽胞杆菌和大肠杆菌的试验组小白鼠均在 12 h 内死亡, 而对照组未见任何异常变化。通过剖解发现蜡样芽胞杆菌注射的小鼠整个肠道出血发红、腹腔有渗出液、肝脏的边缘也有出血; 大肠杆菌注射组的老鼠肝脏边缘出血、肺脏有片状出血、腹腔内部有胶冻状物质。

## 2.5 蜡样芽胞杆菌毒力因子扩增结果

以蜡样芽胞杆菌基因组为模板, 对 10 种毒力因子进行 PCR 检测, 扩增到 *nheA* (755 bp)、*nheB* (743 bp)、*nheC* (683 bp)、*bceT* (428 bp)、*entFM* (596 bp), 见图 4。但实验中未检测到 *hbla*、*hblC*、*hblD*、*ces*、*EMI* 等基因。

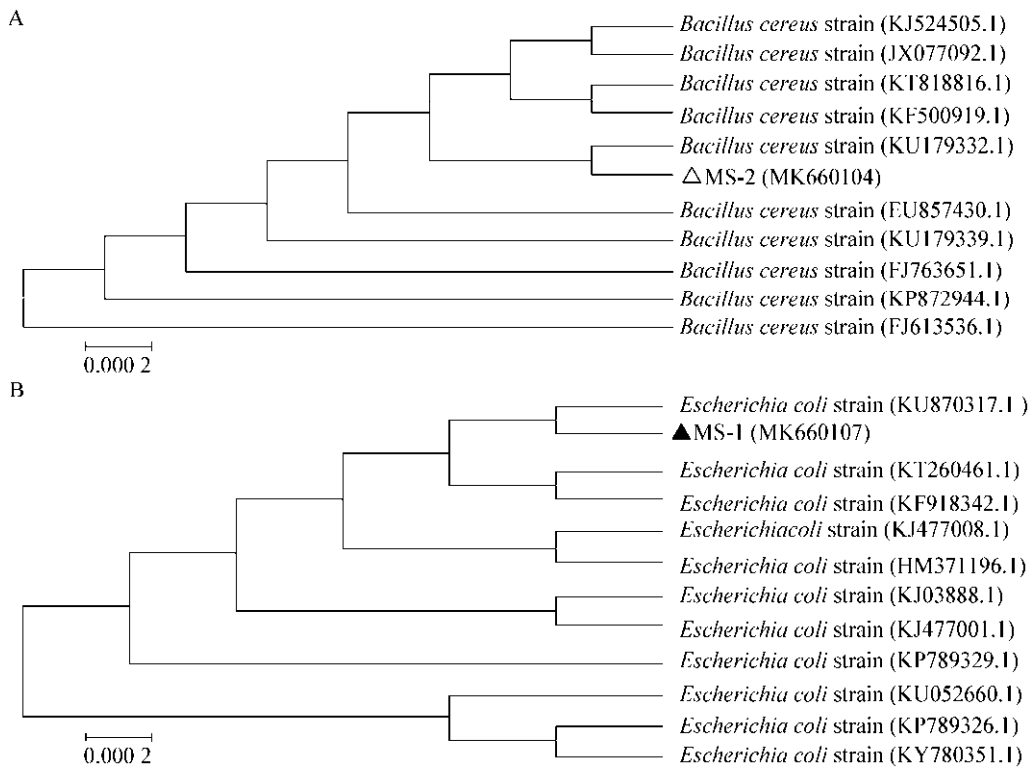


图 3 基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树

Figure 3 The phylogenetic analysis tree based on 16S rRNA gene sequence

注: A: 蜡样芽胞杆菌系统进化树; B: 大肠杆菌系统进化树.

Note: A: Phylogenetic analysis tree of *Bacillus cereus*; B: Phylogenetic analysis tree of *Escherichia coli*.

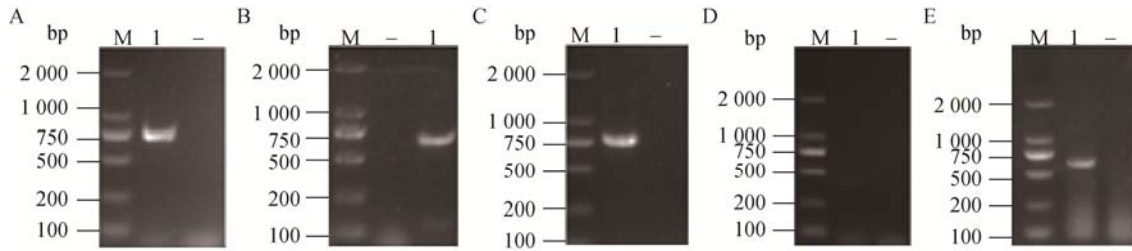


图4 蜡样芽胞杆菌的毒力因子 PCR 扩增结果

Figure 4 PCR amplification of virulence factors of *Bacillus cereus*

注: A: *nheA*; B: *nheB*; C: *nheC*; D: *bceT*; E: *entFM*. M: DL2000 DNA marker; 1: 蜡样芽胞杆菌; -: 阴性对照.

Note: A: *nheA*; B: *nheB*; C: *nheC*; D: *bceT*; E: *entFM*. M: DL2000 DNA marker; 1: *Bacillus cereus*; -: Negative control.

## 2.6 药敏试验

药敏结果如表 2 和表 3 所示, 分别选用 14 种抗生素对两种菌做药敏试验, 蜡样芽胞杆菌对红霉素、头孢氨苄、头孢哌酮、氟苯尼考敏感, 对头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、头孢噻肟、青霉素、氨苄西林、阿莫西林耐药, 对多西环素、四环素、头孢唑林中度敏感。大肠杆菌对头孢曲松、头孢他啶、头孢氨苄、头孢哌酮、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢唑林、大观霉素、丁胺卡那、恩诺沙星、卡那霉素敏感, 对链霉素、林可霉素耐药。

表 2 蜡样芽胞杆菌药敏结果

Table 2 The results of *Bacillus cereus* drug sensitive tests

药物名称 Drug names	抑菌圈直径 Diameter of the inhibition zone (mm)	分离菌敏感性 Sensitivity of the isolate
青霉素 PEN	9	R
红霉素 ERY	28	S
氨苄西林 AMP	8	R
阿莫西林 AMX	9	R
多西环素 DOX	15	I
头孢曲松 CRO	10	R
头孢他啶 CAZ	9	R
头孢氨苄 CFR	20	S
头孢哌酮 CFP	20	S
头孢吡肟 FEP	8	R
头孢噻肟 CTX	11	R
头孢唑林 CZO	16	I
四环素 TCY	16	I
氟苯尼考 FFC	30	S

注: S: 敏感; I: 中度敏感; R: 耐药.

Note: S: Sensitivity; I: Intermediately sensitivity; R: Resistance.

表 3 大肠杆菌药敏结果

Table 3 The results of *Escherichia coli* drug sensitive tests

药物名称 Drug names	抑菌圈直径 Diameter of the inhibition zone (mm)	分离菌敏感性 Sensitivity of the isolate
大观霉素 STP	19	S
林可霉素 LIN	6	R
庆大霉素 GEN	15	S
恩诺沙星 ENR	16	S
卡那霉素 KAN	18	S
丁胺卡那 AMK	18	S
链霉素 STR	6	R
头孢氨苄 CFR	20	S
头孢哌酮 CFP	20	S
头孢吡肟 FEP	28	S
头孢噻肟 CTX	23	S
头孢唑林 CZO	22	S
头孢他啶 CAZ	22	S
头孢曲松 CRO	21	S

注: S: 敏感; I: 中度敏感; R: 耐药.

Note: S: Sensitivity; I: Intermediately sensitivity; R: Resistance.

## 3 讨论与结论

蜡样芽胞杆菌是一种常见的食品污染菌和食源性条件致病菌, 1950 年挪威首次报道它可以引起食物中毒以来, 关于蜡样芽胞杆菌引起食物污染的报道较多, 1973 年就有报道其污染乳制品引起食物中毒<sup>[6-7]</sup>, 它在土壤中、灰尘中、污水中较常见, 蔬菜和许多食物制品很容易被污染。蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒事件在国内外都有发生, 中毒后可导致胃肠功能紊乱, 全身局部或全身性感染, 如坏死



性肠炎、肝功能衰竭、菌血症和脑膜炎<sup>[8-9]</sup>, 但最为常见的是腹泻和呕吐两种类型的食物中毒<sup>[10-12]</sup>。

大肠杆菌属于肠杆菌科埃希氏菌属, 是一种重要的人兽共患型致病菌, 大肠杆菌的毒力因子主要分为黏附素和肠毒素两大类<sup>[13-14]</sup>, 与猪腹泻相关的肠外致病性大肠杆菌通过菌毛或者黏附素因子定殖在小肠黏膜上皮细胞, 然后分泌肠毒素引发猪发生腹泻<sup>[15]</sup>。临床中, 因大肠杆菌引发的猪腹泻案例很多, 在肝脏中也可以分离到该菌。

细菌 16S rRNA 基因保守性较强, 碱基替换速率为每 5 000 万年进化 1%, 现阶段常作为细菌鉴定的金标准<sup>[16]</sup>。本研究通过扩增细菌 16S rRNA 基因和测序再结合分离菌的形态特征确定分离到一株大肠杆菌和一株蜡样芽胞杆菌, 动物实验表明这两种菌都对小鼠具有致病性, 剖解可见蜡样芽胞杆菌感染的小鼠胃肠道出血鲜红呈现胶冻状, 这可能有细菌产生的肠毒素有关。蜡样芽胞杆菌的致病性可以由溶血性毒素 BL (HBL)、非溶血性肠毒素(NHE)和肠毒素 FM (entFM)等引起。编码 HBL 的 3 个基因位于染色体上, 是共转录的, 分别是 *hblA*、*hblC* 和 *hblD*; 而编码 NHE 的 3 个基因位于质粒上, 分别是 *nheA*、*nheB*、*nheC*; 除此之外肠毒素相关基因还有 *entFM*、*bceT* 等<sup>[17-18]</sup>。在针对蜡样芽胞杆菌合成的 10 对毒力基因中, 本次试验中 *nheA*、*nheB*、*nheC*、*bceT*、*entFM* 都被检测到, *hblL*、*cytK*、*ces* 等毒力基因未检测到。

为了分辨该株大肠杆菌是否是肠外致病性大肠杆菌, 本研究参考文献<sup>[19]</sup>设计合成了 10 对肠外大肠杆菌的毒力基因, 但是并没有检测到 *papA*、*sfaS*、*focG*、*iutA*、*hlyD*、*afa*、*fyuA*、*ireA* 和 *vat* 等基因, 且本次猪场的猪就是腹泻, 因此该株大肠杆菌就是肠内致病性大肠杆菌。通过对分离株进行药敏试验发现该株蜡样芽胞杆菌对红霉素、头孢氨苄、头孢哌酮、氟苯尼考等药物敏感, 该株大肠杆菌对常规的对革兰氏阴性菌有效的药物都比较敏感, 例如大观霉素、卡那霉素、丁胺卡那、卡那霉

素、恩诺沙星、以及头孢类药物。本实验中的两种菌污染饲料导致猪场发生大规模且持续的污染, 对于生产中饲料的良好保存有着警戒意义。

## REFERENCES

- [1] He QG. Differential diagnosis and prevention and control of pig diarrhea[J]. Northern Animal Husbandry, 2014(9): 17 (in Chinese)  
何启盖. 猪腹泻病的鉴别诊断与防控措施[J]. 北方牧业, 2014(9): 17
- [2] Seong SJ, Lim JS, Lee KG, et al. Toxin gene profiling of *Bacillus cereus* food isolates by PCR[J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2008, 51(4): 263-268
- [3] Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, et al. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71(1): 105-113
- [4] Bennett RW, Harmon SM. *Bacillus cereus* food poisoning[A]//Balows A, Hausler WJ, Ohashi M, et al. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases[M]. New York: Springer, 1988: 83-93
- [5] Yang SS, Wang XR, Han J. Part of changes in the US CLSI antimicrobial susceptibility test operating standard (2010 edition)[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2010, 9(4): 303-304 (in Chinese)  
杨沙沙, 王喜仁, 韩杰. 美国 CLSI 抗菌药物敏感试验操作标准(2010 年版)部分变更内容[J]. 中国感染控制杂志, 2010, 9(4): 303-304
- [6] Berthold-Pluta A, Pluta A, Garbowska M. The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract[J]. Microbial Pathogenesis, 2015, 82: 7-14
- [7] Wang J. Study on contamination distribution and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from food in China[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangdong University of Technology, 2013 (in Chinese)  
王君. 全国食品中蜡样芽胞杆菌的污染分布规律及遗传多样性研究[D]. 广州: 广东工业大学硕士学位论文, 2013
- [8] Dierick K, Van Coillie E, Swiecicka I, et al. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(8): 4277-4279
- [9] Chon JW, Kim JH, Lee SJ, et al. Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in *Sunsik*[J]. Food Microbiology, 2012, 32(1): 217-222
- [10] Cao FY. Research on the virulence genes and antibiotic resistance phenotypes of *Bacillus cereus* detected from fermented bean curd in Beijing[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2017 (in Chinese)  
曹飞扬. 北京市腐乳中蜡样芽胞杆菌检测及毒力基因和耐药性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2017
- [11] Zhuang ZH. Study on biochemical type, virulence gene and drug sensitivity of food-derived *Bacillus cereus* in China[D].

- Beijing: Master's Thesis of Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2013 (in Chinese)  
 庄子慧. 我国食源性蜡样芽胞杆菌生化型、毒力基因及药物敏感性研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心硕士学位论文, 2013
- [12] Kim JY, Kim SH, Kwon NH, et al. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157: H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2005, 6(1): 7-19
- [13] Liu CY, Zheng HJ, Yang MJ, et al. Genome analysis and in vivo virulence of porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain PCN033[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 717
- [14] Zhou HL, Xiong JL, Wang CY, et al. Identification and drug sensitivity test of swine pathogenic *Escherichia coli*[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2009, 36(1): 109-111 (in Chinese)  
 周华林, 熊江林, 王长义, 等. 猪致病性大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(1): 109-111
- [15] Yang X, Lu ZH, Chen LY, et al. Isolation and identification of enteropathogenic *E. coli* in newborn piglets[J]. *Animal Husbandry and Veterinary*, 2005, 37(9): 34-35 (in Chinese)  
 杨霞, 卢中华, 陈丽颖, 等. 仔猪致病性大肠杆菌的分离鉴定[J]. *畜牧与兽医*, 2005, 37(9): 34-35
- [16] Li L, Chen Y, Zhang C, et al. A review: Identification of aeromonas in aquaculture[J]. *Fisheries Science*, 2015, 34(2): 128-134 (in Chinese)  
 李莉, 陈颖, 张超, 等. 水产动物气单胞菌鉴定方法研究进展[J]. *水产科学*, 2015, 34(2): 128-134
- [17] Kamat AS, Nair CKK. Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus cereus* BIS-59[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1992, 8(2): 210-211
- [18] Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 232(2): 189-195
- [19] Johnson JR, Russo TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2005, 295(6/7): 383-404

~~~~~  
 (上接 p.810)

## 征 稿 简 则

### 3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿; (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA、ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

\*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

\*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.878)