

## 研究报告



## 暹罗鳄食道结节病病原彭氏变形杆菌的分离与鉴定

曾晨熾<sup>1</sup> 林茂<sup>\*1,2</sup> 李忠琴<sup>1</sup> 马英<sup>1</sup> 王淑红<sup>1</sup>

1 集美大学水产学院 厦门市渔用药物工程技术研究中心 福建 厦门 361021

2 农业部东海海水健康养殖重点实验室 福建 厦门 361021

**摘要:** 【背景】2016年5月, 厦门南顺鳄鱼园中的养殖暹罗鳄(*Crocodylus siamensis*)幼鳄暴发了一种之前未见报道的食道结节病, 表现为鳄鱼不进食并伴有部分死亡。【目的】对患食道结节病的鳄鱼病料进行病原学鉴定, 旨在探明病因, 为该病的防治提供理论参考依据。【方法】对鳄鱼病灶处分离菌进行生理生化特征鉴定、16S rRNA 基因序列分析、回接感染试验以及药敏试验。【结果】从病鳄食道、肝脏和血液病灶处各分离到一株优势细菌, 综合菌株形态、生理生化特征以及16S rRNA 基因序列分析的结果, 判定3株分离菌均为彭氏变形杆菌(*Proteus penneri*)。由食道结节处分离的菌株2202经人工回接感染, 证实彭氏变形杆菌为引起此次暹罗鳄发病死亡的致病原。3株分离菌对12种药物的耐药率均为33%, 对恩诺沙星、复方新诺明、头孢噻肟、卡那霉素、四环素、强力霉素与茶啉酸共7种实验药物敏感, 对利福平、青霉素G、红霉素和氯霉素耐药, 而对链霉素则表现中介。【结论】彭氏变形杆菌与患病暹罗鳄的死亡有直接关系, 该菌多为侵袭人类的条件致病菌, 作为养殖鳄鱼的病原菌尚属首例。

关键词: 暹罗鳄, 食道结节病, 彭氏变形杆菌, 病原鉴定

## Isolation and identification of pathogen *Proteus penneri* from *Crocodylus siamensis* suffering nodulous esophagitis

ZENG Chen-Xi<sup>1</sup> LIN Mao<sup>\*1,2</sup> LI Zhong-Qin<sup>1</sup> MA Ying<sup>1</sup> WANG Shu-Hong<sup>1</sup>

1 Fisheries College, Jimei University, Engineering-Technology Research Center for Fishery Medicine, Xiamen, Fujian 361021, China

2 Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Xiamen, Fujian 361021, China

**Abstract:** [**Background**] In May 2016, an unprecedented outbreak of nodulous esophagitis occurred among the captive juvenile Siamese crocodiles (*Crocodylus siamensis*) in Xiamen Lonsun crocodile zoo, and diseased crocodiles manifested anorexia and some of them even died. [**Objective**] Pathogenic identification of crocodiles' pathological materials was performed to explore its causes, to provide data for estimating this disease, and to make references for preventive treatment. [**Methods**] The bacteria isolated from crocodiles' foci were identified by the physiological and biochemical characteristics, 16S rRNA gene sequence analysis, artificial infection test and sensitive drug test. [**Results**] Three bacterial strains isolated

**Foundation items:** Regional Demonstration Project of Marine Economy Development (16PZY002SF18); Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201203085)

\*Corresponding author: Tel: 86-592-6180204; E-mail: linmao@jmu.edu.cn

Received: 10-08-2018; Accepted: 29-10-2018; Published online: 14-12-2018

基金项目: 海洋经济发展区域示范项目(16PZY002SF18); 公益性行业(农业)科研专项项目(201203085)

\*通信作者: Tel: 0592-6180204; E-mail: linmao@jmu.edu.cn

收稿日期: 2018-08-10; 接受日期: 2018-10-29; 网络首发日期: 2018-12-14

from esophagus, liver, and blood of diseased crocodiles, were identified as *Proteus penneri* by means of morphological, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA gene sequence analysis. Besides, the *P. penneri* strain 2202 was confirmed as pathogen causing morbidity and mortality in *C. siamensis* after artificial infection test. The susceptibility test showed that the resistance rates of 3 isolated strains to 12 antimicrobial agents were all equal to 33%. The 3 pathogens were sensitive to 7 medicines, including enrofloxacin, sulfamethoxazole, cefotaxime, kanamycin, tetracycline, doxycycline, and nalidixic acid; resistant to rifampicin, penicillin G, erythromycin, and chloramphenicol; and intermediate resistant to streptomycin. **[Conclusion]** As a result, *P. penneri* was directly related to the death of diseased *C. siamensis*. To the best of our knowledge, this is the first report about *P. penneri*, the opportunistic pathogen mostly affected human, infected the captive crocodilians.

**Keywords:** *Crocodylus siamensis*, Nodulous esophagitis, *Proteus penneri*, Pathogenic identification

鳄鱼属两栖变温爬行动物, 在医疗保健、皮革制造、旅游观光等方面均有很高的经济价值和社会效益<sup>[1-3]</sup>。暹罗鳄(*Crocodylus siamensis*)作为我国从境外引进的野生物种, 具有皮质优良、生长迅速、繁殖能力强等特性, 目前已被列入国家首批《人工繁育国家重点保护陆生野生动物名录》, 可供相关从业者对其进行人工养殖、出售、购买和利用<sup>[4]</sup>。

在鳄鱼的人工饲养过程中, 细菌性感染是导致病害及死亡的主要原因之一<sup>[5]</sup>, 如雷氏普罗威斯登菌(*Providencia rettgeri*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、布氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter braakii*)等均能引发败血症<sup>[6-8]</sup>, 严重制约着鳄鱼养殖业的发展。2016年5月, 厦门南顺鳄鱼园养殖的暹罗鳄幼鳄(体长60 cm–80 cm)发现病情, 表现为不进食且伴有部分死亡(园内饲养有225尾暹罗鳄幼鳄, 其中发病31尾, 死亡12尾)。剖检结果可见病鳄食道密布粟粒状结节, 肝脏也有少量点布, 血液暗红呈现明显败血症, 肠道肉眼未见异常。为确认该病的病原, 本研究从患病不进食暹罗鳄食道、肝脏、血液等病变部位取样, 基于传统病原鉴定方法诊断病因, 旨在为今后该病的防控提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

发病暹罗鳄血液、食道、肝脏等病变样本均取自厦门南顺鳄鱼园。40只健康巴西龟(*Trachemys scripta*)购于厦门鱼都水族馆, 平均体重 $20.1\pm 1.8$  g, 暂养一周无异常后用于攻毒试验。用于回归感染的3尾健康暹罗鳄幼鳄由南顺鳄鱼园提供, 平均体重

467±53 g, 人工感染前隔离暂养10 d, 观其进食和外观无异常。

### 1.2 主要试剂和仪器及培养基

LB、MH培养基, 山东青海高科园海博生物技术有限公司; 细菌基因组DNA提取试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; 2×Taq Mix, 北京宝日生物技术有限公司; 16S rRNA基因序列扩增引物, 厦门铂瑞生物科技有限公司; 药敏纸片, 杭州天和微生物试剂有限公司。全自动微生物鉴定仪, Biolog公司; PCR仪, Thermo Fisher Scientific公司; 电泳仪, 上海天能科技有限公司。LB肉汤(g/L): 蛋白胨10.0, 酵母提取物5.0, NaCl 10.0; LB琼脂培养基(g/L): 胰蛋白胨10.0, 酵母浸粉5.0, NaCl 10.0, 琼脂15.0; MH琼脂平板(g/L): 牛肉粉6.0, 可溶性淀粉1.5, 酸水解酪蛋白17.5, 琼脂17.0。

### 1.3 病原菌的分离

解剖濒死暹罗鳄, 无菌操作取血液、食道、肝脏等病变部位样品, 划线接种于LB培养基, 30℃培养24 h后挑取优势菌接于LB培养基纯化3次。挑取纯化后单菌落存于含20%甘油的冻存管中, 于-80℃保藏备用。

### 1.4 病原菌表型与生化特征鉴定

观察菌落形态特征, 并经革兰氏染色、镜检。另挑取单菌落划线转接于BUG (Biolog universal growth)鉴定平板上, 30℃培养24 h。取Biolog细菌鉴定试剂盒IF-A接种液, 将管外壁擦拭干净后置于Biolog浊度仪, 调节读数至100% T。用接种环挑取BUG鉴定平板上大小适宜的单菌落与接种

液混匀置于浊度仪中,使其读数范围保持在92%–98% T之间,再用8孔移液枪移取接种混合液至GEN III鉴定微平板中,每孔100  $\mu$ L。最后将鉴定板装载于Biolog鉴定仪中,系统自动检测菌株对碳源利用的特异性,并给出种属的鉴定相似度。

### 1.5 16S rRNA 基因序列的扩增与测序

将分离菌接种于LB培养基中,30  $^{\circ}$ C、150 r/min振荡培养24 h,参照细菌基因组抽提试剂盒提取细菌总DNA作为PCR反应的模板,以特异性引物27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')<sup>[9]</sup>扩增其16S rRNA基因序列。50  $\mu$ L的PCR反应体系:正、反向引物(10 mmol/L)各2  $\mu$ L, DNA模板1  $\mu$ L, 2 $\times$ Taq Mix 25  $\mu$ L,加ddH<sub>2</sub>O至50  $\mu$ L。PCR反应条件:94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后送至厦门铂瑞生物科技有限公司测序。

### 1.6 序列同源性分析与系统发育树的构建

在NCBI数据库中将测序结果与已知核酸序列进行相似性比对分析,采用ClustalX 2.1软件对与分离菌相似性较高的同属其它菌株序列进行多重序列匹配排列(Multiple alignments)。使用MEGA 6.0软件以邻接(Neighbor-Joining)法构建系统发育树,置信度检测设为自举分析(Bootstrap)1 000次。

### 1.7 攻毒与回归感染试验

将暂养7 d后的40只健康巴西龟(由于暹罗鳄珍贵,根据鳄鱼的系统发育和遗传相关性,选择同为爬行动物的巴西龟作为攻毒试验的动物模型)均分为5组,各8只龟。其中1组注射生理盐水,其余4组注射不同浓度的菌液。取病鳄食道处分离纯化所得的菌株2202单菌落与0.9%生理盐水混合制成菌悬液。结合McFarland比浊法<sup>[10]</sup>与平板菌落计数的结果,稀释菌液至 $1.22 \times 10^9$  CFU/mL,经连续10倍比稀释后( $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ )于巴西龟后肢基部肌肉注射,每只200  $\mu$ L。连续观察7 d,每天记录巴西龟发病及死亡情况,及时解剖死亡病龟观察各内脏器官病理变化。参照Bliss法<sup>[11]</sup>计算出菌株

对巴西龟的半致死剂量(LD<sub>50</sub>),并以该剂量菌液分别肌肉注射于3尾健康暹罗鳄体内,连续观察7 d,记录受试鳄鱼的症状和体征并及时解剖病死鳄鱼,取患病部位进行病原菌的重分离与鉴定。

### 1.8 抗生素纸片药敏试验

基于K-B纸片扩散法<sup>[12]</sup>,取新鲜菌悬液稀释至 $1.5 \times 10^8$  CFU/mL。用医用无菌棉签沾取菌液均匀地涂布于MH琼脂培养基表面,用无菌镊子夹取12种药敏纸片轻轻贴至平板表面,30  $^{\circ}$ C倒置培养24 h后测量抑菌圈直径。参照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and laboratory standards institute, CLSI)标准<sup>[13]</sup>,根据抑菌圈直径大小判断菌株对不同抗生素的敏感性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株形态特征

自病死暹罗鳄食道、肝和血液中各分离出一株细菌(菌株编号分别记作2202、2203和2204)。3株分离菌的菌落大小、颜色、形态相近,以接种针点接于LB琼脂平板中心,30  $^{\circ}$ C恒温培养24 h后均形成乳黄色、中心近圆形并伴有大片层叠云雾状的菌落。显微镜下菌体两段钝圆,多为单个或成对的多形性短杆菌,游动速度快,革兰氏染色呈阴性(图1)。

### 2.2 病原菌生理生化特征

Biolog自动鉴定结果表明(图2),菌株2202、2203和2204与系统数据库中彭氏变形杆菌(*Proteus penneri*, 参照菌株PP-1)的相似性分别为0.704、0.667与0.704。

### 2.3 16S rRNA 基因序列及系统发育分析

电泳检测结果显示,3株分离菌的特异性PCR扩增条带约为1 500 bp,大小正确、浓度合适,可进行后续测序。测序结果与NCBI上的GenBank中相关序列进行相似性比对,发现3株细菌与普通变形杆菌、彭氏变形杆菌的相似性最为相近(均为99%)。MEGA序列比对结果表明这3株细菌的16S rRNA基因碱基序列完全一致,因此以分离菌2202(GenBank登录号MG685657)为代表构建系统发育树,结果(图3)显示其与彭氏变形杆菌(GenBank

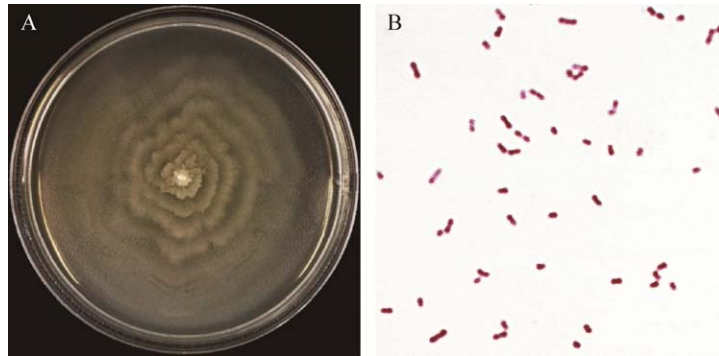


图 1 分离菌株 2202 的菌落(A)和革兰氏染色镜检(1 000×)的形态特征(B)  
 Figure 1 Bacterial colony (A) and micrograph (1 000×) following Gram-staining (B) of isolated strain 2202

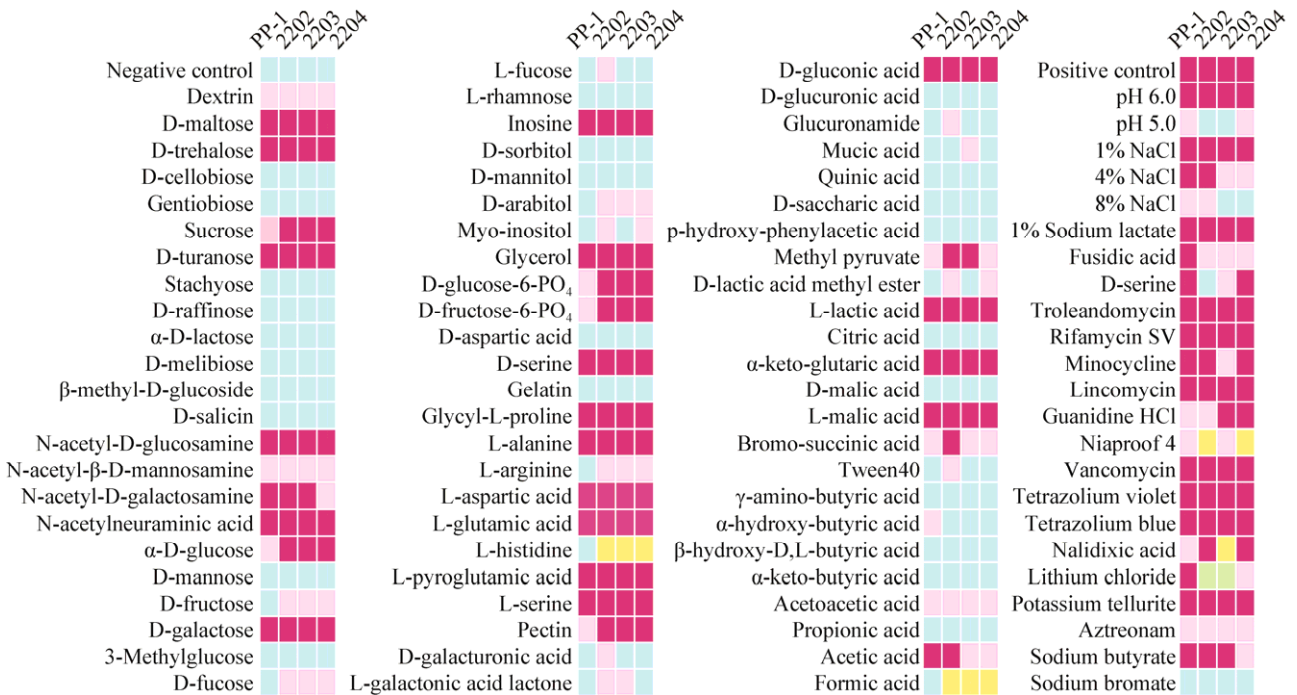


图 2 3 株分离菌的 Biolog 系统鉴定指标结果  
 Figure 2 The result of Biolog system indexes of 3 bacterial isolates

注: ■: 阳性; □: 阴性; ■: 临界值; ■: 假阳性; ■: 假阴性.  
 Note: ■: Positive; □: Negative; ■: Borderline; ■: Mismatched positive; ■: Mismatched negative.

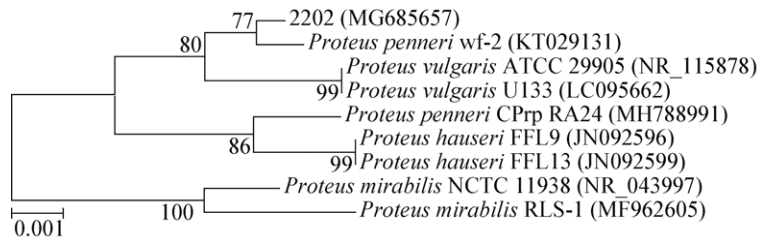


图 3 基于变形杆菌 16S rRNA 基因序列的系统发育树  
 Figure 3 Phylogenetic tree of *Proteus* based on 16S rRNA gene sequence

注: 标尺为序列差异的分支长度; 节点处的数字为 Bootstrap 值; 括号内的数字为 GenBank 登录号.  
 Note: Bar: Nucleotide divergence; Numbers at the branch points indicated the Bootstrap values; Numbers in parenthesis represented GenBank accession number.

登录号 KT029131)聚为一支。综上所述,根据分离菌的生理生化特征,结合其 16S rRNA 基因序列和系统发育树的比对结果,可以确定自暹罗鳄病灶处分离出的 3 株细菌均为彭氏变形杆菌。

#### 2.4 攻毒试验和人工回归感染

自病鳄食道处分离的细菌 2202 人工感染巴西龟的结果显示(表 1),攻毒 1 d 后,注射量为  $1.21 \times 10^7$  CFU/g 组的巴西龟即出现死亡,组间其余巴西龟较攻毒前活动明显减少,四肢无力,碰触时不能正常收缩; $1.21 \times 10^6$  CFU/g 组巴西龟则较健康时更为懒散,多将头缩入壳内;其余各组巴西龟未见异常。第 2 天开始, $1.21 \times 10^7$  CFU/g 组巴西龟开始出现大量死亡,此时该组累计死亡率已达 87.5%,并在 3 d 内全部死亡,而  $1.21 \times 10^6$  CFU/g 组巴西龟开始出现死亡;其余 2 个攻毒组巴西龟在感染后第 4 天陆续出现死亡;对照组巴西龟未见异常。解剖死亡巴西龟发现其食道没有出现结

节症状,但龟体血液暗红。通过 Bliss 法计算出菌株 2202 对巴西龟的半致死剂量(LD<sub>50</sub>)为  $1.36 \times 10^5$  CFU/g。以半致死剂量肌肉注射 3 尾健康暹罗鳄幼鳄 2 d 后,鳄鱼均出现不进食、反应迟钝的症状,1 尾鳄鱼于 4 d 后死亡,其余 2 尾均于 5 d 后死亡,解剖后发现鳄体食道密布白色结节,血液暗红,与自然发病暹罗鳄的症状相似(图 4)。对食道结节处的致病菌进行重分离与鉴定,菌落形态与 16S rRNA 基因序列比对结果表明其为彭氏变形杆菌。

#### 2.5 药敏试验

3 株分离菌对 12 种抗菌药物的敏感性结果一致(表 2),均对恩诺沙星、复方新诺明、头孢噻肟、卡那霉素、四环素、强力霉素以及茶啶酸共 7 种实验药物敏感;对红霉素和氯霉素耐药;对利福平和青霉素 G 极度耐药;对链霉素则表现中介。3 株分离菌对 12 种药物的耐药率均为 33%。

表 1 菌株 2202 人工感染巴西龟的攻毒试验

Table 1 Artificial infection of pathogenic strain 2202 in healthy red-eared turtles

组别 Groups	细菌注射量 Injection volume of bacterium (CFU/g)	感染数量 Infection numbers	不同感染时间死亡数							累计死亡数 Total death number	累计死亡率 Cumulative mortality (%)
			Number of death at different infected time								
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d		
Infection groups	$1.21 \times 10^7$	8	1	6	1	0	0	0	0	8	100.0
	$1.21 \times 10^6$	8	0	1	1	0	2	1	0	5	62.5
	$1.21 \times 10^5$	8	0	0	0	1	0	1	2	4	50.0
	$1.21 \times 10^4$	8	0	0	0	0	1	0	1	2	25.0
Control group	Normal saline	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0

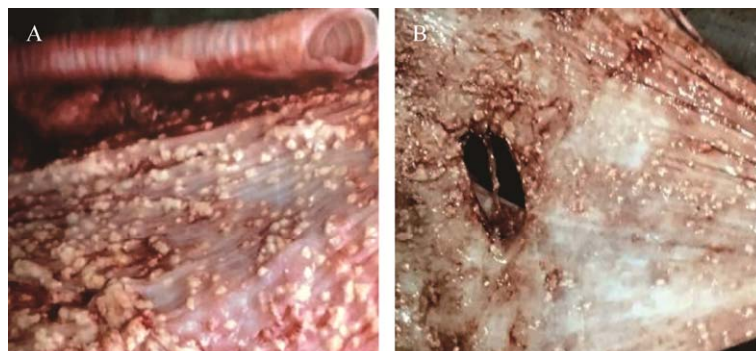


图 4 自然发病暹罗鳄(A)与回归感染暹罗鳄(B)显示食道结节

Figure 4 The natural (A) and artificial infected (B) *Crocodylus siamensis* with symptom of nodule in esophagus

表 2 3 株分离菌对 12 种抗菌药物的敏感性(抑菌圈直径, mm)

Table 2 Sensibility of 3 isolated bacteria to 12 antibiotics (inhibition zone, mm)

药物名称(用量) Antibiotics (content, µg/disc)	2202	2203	2204
Rifampicin (5)	-(XR)	-(XR)	-(XR)
Penicillin G (10)	-(XR)	-(XR)	-(XR)
Enrofloxacin (10)	22(S)	21(S)	23(S)
Streptomycin (10)	13(I)	12(I)	13(I)
Erythromycin (10)	8(R)	7(R)	12(R)
Sulfamethoxazole (15)	26(S)	26(S)	27(S)
Cefotaxime (30)	29(S)	34(S)	30(S)
Kanamycin (30)	20(S)	20(S)	24(S)
Tetracycline (30)	15(S)	21(S)	23(S)
Doxycycline (30)	18(S)	16(S)	23(S)
Nalidixic acid (30)	28(S)	26(S)	29(S)
Chloramphenicol (30)	8(R)	12(R)	10(R)

注: XR: 极度耐药; R: 耐药; S: 敏感; I: 中介; -: 无抑菌圈。

Note: XR: Extremely resistant; R: Resistant; S: Sensitive; I: Intermediate; -: None of the inhibition zone.

### 3 讨论与结论

变形杆菌是存在于人类和动物胃肠道中的正常菌群之一, 具有条件致病性, 其中以普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、奇异变形杆菌(*P. mirabilis*)和彭氏变形杆菌最为常见<sup>[14]</sup>。有报道认为普通变形杆菌是造成暹罗鳄患病的重要致病原之一, 可使鳄体出现眼部肿胀等病症<sup>[15]</sup>; 奇异变形杆菌能引起患者食物中毒及泌尿道结石<sup>[16-17]</sup>; 彭氏变形杆菌常被报道能侵染人类, 造成原发性或继发性的食道、呼吸道、肠道等部位感染并伴有败血症<sup>[18-19]</sup>, 而本研究发现彭氏变形杆菌也可感染暹罗鳄幼鳄, 引起食道结节(肝脏少量)和败血症, 并造成幼鳄部分死亡, 此病例为首次报道。

攻毒试验的结果验证了彭氏变形杆菌 2202 对巴西龟具有强致病力, 其半致死剂量对暹罗鳄幼鳄进行人工感染后和自然患病的暹罗鳄临床表现大体一致, 表明此次养殖鳄鱼的发病死亡与感染彭氏变形杆菌后所引发的食道结节病和败血症有直接关系。彭氏变形杆菌为条件致病菌, 可正常共存于

宿主消化道内, 而在机体免疫力或抵抗力下降时可能引发疾病。药敏试验表明, 自鳄鱼病灶处分离所得的 3 株细菌均为多重耐药菌, 对利福霉素类(利福平)、 $\beta$ -内酰胺类(青霉素 G)、大环内酯类(红霉素)、酰胺醇类(氯霉素)四类抗菌药物耐药, 其中恩诺沙星、复方新诺明、头孢噻肟、卡那霉素、四环素、强力霉素以及萘啶酸对 3 株分离菌有一定的抑杀菌作用。结合药敏试验的结果制定治疗方案, 轻度症状仍能少量进食的病鳄, 以 20 mg/kg 体重的剂量于肉食中注射恩诺沙星投喂, 每日 2 次; 重度症状不进食者, 以 20 mg/kg 体重的剂量腹部肌肉注射, 每日 1 次。连用 5 日用药之后, 各病鳄相继好转, 期间又死亡 4 尾, 由此可见恩诺沙星用于治疗由彭氏变形杆菌所引发的暹罗鳄食道结节病有较好的临床疗效。

人工繁育鳄鱼具有生长速度快、饲料系数低、日常易管理、经济效益高等优点, 但细菌性感染会严重阻碍鳄鱼养殖产业的发展。粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)可在鳄鱼抵抗力下降时引起肺组织脓性结节和胃肠黏膜坏死<sup>[20]</sup>, 摩氏摩根氏菌(*Morganella morganii*)能使养殖暹罗鳄罹患腐皮病<sup>[21]</sup>, 迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)也能感染暹罗鳄并引发腹水病<sup>[22]</sup>, 而布氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter braakii*)可侵染尼罗河鳄(*Crocodylus niloticus*)并造成严重的败血症<sup>[8]</sup>, 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)则能够造成鳄鱼的皮肤损伤及败血症<sup>[7]</sup>, 另有研究表明沙门氏菌(*Salmonella*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)可以混合感染鳄体, 主要表现为厌食与腹泻等病症<sup>[23]</sup>。上述致病菌除嗜水气单胞菌外均属肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*), 大多正常存在于人和动物的消化道内, 这暗示鳄鱼的细菌类疾病除外源性感染外, 也一定程度上与自身免疫力或抵抗力下降所引发的内源性感染有关。鳄鱼属变温动物, 外界环境的压力、体表温度的异常变化(该病例发生时正值当地春夏交接, 气温骤热)均会明显影响其抵抗力<sup>[7]</sup>, 内环境微生态的失衡将可能使原本正常定殖于肠道内的条件致病菌引发宿主

的内源性感染。因此要减少鳄鱼细菌病的发生,除了做好日常管理与合理用药外,如何提高鳄鱼自身的抵抗力也是疾病预防的关键。

## REFERENCES

- [1] Venter T, Fox LT, Gerber M, et al. Physical stability and clinical efficacy of *Crocodylus niloticus* oil lotion[J]. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2016, 26(4): 521-529
- [2] Buenviaje GN, Hirst RG, Ladds PW, et al. Isolation of *Dermatophilus* sp. from skin lesions in farmed saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*)[J]. *Australian Veterinary Journal*, 2010, 75(5): 365-367
- [3] Ryan C. Saltwater crocodiles as tourist attractions[J]. *Journal of Sustainable Tourism*, 1998, 6(4): 314-327
- [4] Geng GB. The first batch of national approved nine kinds of artificial breeding national key protected animals should be sold by Logo[J]. *Green China*, 2017(7): 68-69 (in Chinese)  
耿国彪. 国家首批批准九种人工繁育国家重点保护动物要凭标识出售[J]. *绿色中国*, 2017(7): 68-69
- [5] Buenviaje GN, Ladds PW, Melville L, et al. Disease-husbandry associations in farmed crocodiles in Queensland and the Northern Territory[J]. *Australian Veterinary Journal*, 2010, 71(6): 165-173
- [6] Camus AC, Hawke JP. *Providencia rettgeri*-associated septicemia and meningoencephalitis in juvenile farmed American alligators *Alligator mississippiensis*[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2002, 14(2): 149-153
- [7] Roh YS, Park H, Cho HU, et al. *Aeromonas hydrophila*-associated septicemia in captive crocodiles (*Crocodylus johnstoni* and *Crocodylus porosus*)[J]. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2011, 42(4): 738-742
- [8] Rosell J, Barragán A, Carbonell MD, et al. Septicaemia caused by *Citrobacter braakii* infection in a captive Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*)[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2017, 156(1): 105
- [9] Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2008, 14(10): 908-934
- [10] Mcfarland J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines[J]. *Journal of the American Medical Association*, 1907(49): 1176-1178
- [11] Bliss CI. The calculation of the dosage-mortality curve[J]. *Annals of Applied Biology*, 1935, 22(1): 134-167
- [12] Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4)[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 56(1): 60-76
- [13] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. 28th Edition. CLSI document M100-S28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018: 30-37
- [14] Drzewiecka D. Significance and roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments[J]. *Microbial Ecology*, 2016, 72(4): 741-758
- [15] Chen FY, Huang GC, Huang CL, et al. Isolation and identification of pathogenic *Proteus vulgaris* from *Crocodylus siamensis*[J]. *Jiangxi Agriculture*, 2016(11): 51-54 (in Chinese)  
陈福艳, 黄国城, 黄彩林, 等. 暹罗鳄鱼致病性普通变形杆菌的分离与鉴定[J]. *江西农业*, 2016(11): 51-54
- [16] Yong W, Zhang SY, Yu JY, et al. An outbreak of *Proteus mirabilis* food poisoning associated with eating stewed pork balls in brown sauce, Beijing[J]. *Food Control*, 2010, 21(3): 302-305
- [17] Cohen-Nahum K, Saidel-Odes L, Riesenber K, et al. Urinary tract infections caused by multi-drug resistant *Proteus mirabilis*: risk factors and clinical outcomes[J]. *Infection*, 2010, 38(1): 41-46
- [18] Krajden S, Fuksa M, Lizewski W, et al. *Proteus penneri* and urinary calculi formation[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1984, 19(4): 541-542
- [19] Cai J, Yang YB, Cong LH. One case of esophagus infection caused by two kinds of opportunistic enteric pathogens[J]. *Journal of Audiology and Speech Pathology*, 2012, 20(4): 398-399 (in Chinese)  
蔡晶, 杨一兵, 丛林海. 两种肠道条件致病菌同时引起的喉部感染一例[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2012, 20(4): 398-399
- [20] Huang SJ, Wang CS. Infection of crocodile's pathogen *Serratia marcescens*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 1998, 20(10): 53 (in Chinese)  
黄淑坚, 王朝尚. 鳄鱼致病性粘质沙雷氏菌感染[J]. *中国兽医杂志*, 1998, 20(10): 53
- [21] Sun M, Meng Y, Liu TT, et al. Isolation and identification of pathogen from *Crocodylus siamensis* suffering skin fester disease[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017(24): 197-199 (in Chinese)  
孙萌, 孟洋, 刘亭亭, 等. 暹罗鳄腐皮病原菌的分离与鉴定[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(24): 197-199
- [22] Guo GY, Jiang JH, Yang N, et al. An investigation of sudden death in farmed infant Siamese crocodiles during winter and spring in Hainan, China[J]. *Indian Journal of Animal Research*, 2018, 52(7): 1058-1062
- [23] Chen JM, Yang S, Zhao W, et al. Diagnosis and treatment of co-infection of *Salmonella* with *Escherichia coli* in crocodile[J]. *Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2007, 32(5): 22-23 (in Chinese)  
陈俊敏, 杨珊, 赵伟, 等. 一例鳄鱼沙门氏菌与大肠杆菌混合感染的诊治[J]. *广东畜牧兽医科技*, 2007, 32(5): 22-23