

牦牛源鲍氏志贺菌的鉴定及对 BALB/c 小鼠的致病性

冉丹丹¹, 于学辉^{1*}, 汤承¹, 李健^{1,2}, 宋定州¹

(1. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041;

2. 西南民族大学青藏高原生态保护与畜牧业高科技研发基地, 成都 610041)

摘要: 本试验旨在对从屠宰健康牦牛中分离的志贺菌进行鉴定及确定分离株的致病性。通过形态染色、培养特性、生化特性、血清型鉴定、16S rRNA 基因序列分析以及 BALB/c 小鼠的 LD₅₀ 测定等方面对分离株进行系统鉴定, 并对分离株进行电镜观察和药敏试验。结果显示, 分离株形态染色、培养和生化特性符合志贺菌的特点, 血清型鉴定为鲍氏 6 型志贺菌, 16S rRNA 基因序列系统演化分析表明, 分离菌株与人源鲍氏志贺菌和宋内志贺菌亲缘关系近, 而与其他动物志贺菌亲缘关系较远, 分离株对 BALB/c 小鼠具有致病性, 其 LD₅₀ 值为 $2.5 \times 10^{7.5}$ CFU, 药敏试验结果显示分离菌株对常用抗生素无耐药性。本次试验首次从健康牦牛中分离的鲍氏 6 型志贺菌具有较强的致病性, 与人源菌株亲缘关系较近, 提示牦牛中分离的鲍氏志贺菌具有公共卫生学意义。

关键词: 牦牛; 鲍氏 6 型志贺菌; 鉴定; 致病性

中图分类号: S852.61

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)01-0145-07

Identification of *Shigella boydii* in Yak and Its Pathogenicity to BALB/c Mice

RAN Dan-dan¹, YU Xue-hui^{1*}, TANG Cheng¹, LI Jian^{1,2}, SONG Ding-zhou¹

(1. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 2. The High-tech Research and Development Base for Ecological Protection and Animal Husbandry in Qinghai-Tibet Plateau, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: The aim of this study is to identify *Shigella* isolated from healthy slaughter yak, and to determine its pathogenicity to mice. The isolate was identified and eventually characterized by using several methods, including morphology observation, culture characteristics, biochemical tests, serotyping, 16S rRNA sequencing, electron microscopy and evaluation of pathogenicity to BALB/c mice. The results showed that morphological, culture and biochemical characteristics of the isolate is consistent with that of *Shigella*. The isolate was serotyped as *Shigella boydii* type 6. Phylogeny analysis based on 16S rRNA indicated that the isolate has close relationship with *Shigella boydii* and *Shigella sonnei* in human, and has further relationship with the *Shigella* from other animals. The isolate is pathogenic to BALB/c mice, and the LD₅₀ is $2.5 \times 10^{7.5}$ CFU. The bacterium is not resistant to antibiotics commonly used. We isolated *Shigella boydii* type 6 from yak for the first time. The isolate is highly pathogenic and phylogenetically related to human *Shigella*, indicating important significance of yak *Shigella* in public health.

Key words: yak; *Shigella boydii* type 6; identification; pathogenicity

收稿日期: 2012-06-06

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划(2012BAD136B06); 国家公益性行业(农业)科研专项经费(201203009); 中央高校基本科研业务费科研平台建设项目(11NPT03)

作者简介: 冉丹丹(1988-), 女, 土家族, 贵州沿河人, 硕士生, 主要从事动物传染病防治研究, E-mail: rdd244934359@yahoo.cn

* 通信作者: 于学辉, E-mail: yuxuehui@yahoo.cn

志贺菌属(*Shigella*)是从多个独立的大肠杆菌(*Escherichia coli*)起源,并经过趋同进化而形成的^[1],是具有高度传染性和严重危害性的革兰阴性胞内致病菌,可分为痢疾志贺菌(*Shigella dysenteriae*)、福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)、鲍氏志贺菌(*Shigella boydii*)和宋内志贺菌(*Shigella sonnei*)4个血清群^[2]。它引起的志贺菌病对人类健康具有重大影响,临床上主要引起重症菌痢,剖检可见结肠水肿、溃疡及炎症^[3]。据统计,全球每年有1.6亿病例,并导致约110万人死亡^[1,4]。细菌随患者粪便排出,污染水源、环境等,人通过摄入污染的食物和水而发生直接感染,或通过苍蝇、蟑螂等间接传播。该细菌除感染人以外,灵长类动物也能感染^[5],近年来人们逐渐认识到志贺菌在公共卫生方面的意义,国内外有报道志贺菌可感染猴、牛、猪、鸡等动物并引起相应的临床症状^[6-13],摄入了被粪便污染的食物和水是人类感染志贺菌的重要途径,国内也有从动物源性食品中检出志贺菌的报道^[14-16]。

牦牛肉是藏区牧民最主要的蛋白质来源,因为国内外对牦牛食源性病原微生物的研究较少,因此牦牛肉也被认为是最天然和最安全的食品之一。2010—2011年作者对来源于四川省川西北草地(甘孜和阿坝州)健康牦牛进行食源性病原微生物的调查,首次分离到1株志贺菌。本研究旨在对来源于待屠宰健康牦牛分离的志贺菌进行系统鉴定,明确其致病性和系统进化关系,为牦牛肉等产品的食品安全提供相关资料。

1 材料与方法

1.1 样本采集

四川省川西北草地待屠宰健康成年牦牛173份肛门棉拭子,由西南民族大学动物医学四川省重点实验室采集。

1.2 试验材料

志贺菌因子血清购自卫生部兰州生物制品研究所,批号:20090625;XLD培养基购自杭州微生物试剂有限公司;Taq DNA聚合酶、PCR试剂、核酸染料GelView、DNA Marker、限制性内切酶EcoR I、Hind III、Buffer 10×K Buffer、克隆载体pMD19-T均购自TaKaRa公司;感受态细胞由本实验室制作并保存;胶纯化回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自美国Axygen公司。Vitek-32全自动细菌鉴定系统、GNI+革兰氏阴性菌鉴定卡均为法国生物-梅里埃

公司产品;Tecnia G² F20型透射电镜仪由FEI公司生产;S-450型扫描电镜由日本日立公司生产;高速离心机centrifuge5804由德国Eppendorf生产;普通PCR仪mycyclerTM、核算电泳仪powerpac universalTM、凝胶成像系统VerSaDoc2000均由美国Bio-Rad生产;核酸蛋白检测仪DU800由美国Beckman公司生产。

1.3 实验动物

SPF级BALB/c小鼠,体重18~22g,购自四川大学华西实验动物中心。

1.4 分离培养

将无菌采集的棉拭子接种于XLD培养基上,37℃恒温培养16h。挑取可疑菌落进行革兰氏染色镜检,并纯培养。

1.5 生化鉴定

将纯化后的菌落平板用无菌生理盐水进行稀释,调整细菌浓度为0.55~0.65麦氏单位,应用Vitek-32全自动微生物鉴定系统及生化鉴定卡(GNI+)进行生化鉴定。

1.6 血清学鉴定

生化鉴定为志贺氏菌的细菌样本,单菌落接种至固体培养基上增菌。采用玻片凝集试验,用微量加样器分别吸取4种多价血清和生理盐水10μL,然后挑取单菌落凝集抗原,立刻混匀,室温反应1~2min内判定结果。阳性多价血清为阳性者按上述方法进行单价血清型检测。并将细菌样本送至四川省疾病预防控制中心复检。

1.7 扫描电镜和透射电镜观察

1.7.1 扫描电镜样本前处理 将分离纯化的菌体挑入含有10mL LB液体培养基的摇瓶中,振荡培养12h。使用戊二醛对菌体进行固定,0.1mol·L⁻¹ PBS反复洗涤后经过20%、50%、80%、100%乙醇脱水,最后将菌体用叔丁醇置换、溶解。溶解产物滴于4mm×4mm干净盖玻片上经CO₂临界点干燥,喷镀金属膜后置于扫描电镜下观察。

1.7.2 透射电镜样本前处理 挑取复苏后的单菌落双线法接种于XLD平板上37℃恒温培养16h,向平板内加入约1mL pH 7.2的0.1mol·L⁻¹ PBS缓冲液。缓慢晃动平板,使平板上菌落悬浮于PBS中,晃动时间约为5min。取200目铜网蘸取菌液,多余液体用滤纸吸干。磷钨酸负染约2min后上样,透射电镜下进行样本观察。

1.8 16S rRNA 基因序列的测定

1.8.1 模板 DNA 和上下游引物的制备 采用氟氯酚法提取细菌 DNA, 调整 DNA 浓度至 100

ng · μL⁻¹ 作为 PCR 的模板。16S rRNA 上下游引物序列(表 1)参考相关文献设计^[17], 由上海生物工程公司合成。

表 1 PCR 引物

Table 1 Oligonucleotide primers used in PCR

引物 Primer	序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	引物位置/bp Targets	PCR 产物/bp PCR products
P1	ATGGCTCAGATTGAACGC	19~37	1 505
P2	CAGTTCCCCTACGGTTA	1 505~1 523	

1.8.2 PCR 方法 PCR 反应采用 25 μL 反应体系, 其中含 DNA 模板 1 μL, 上、下游引物各 1 μL (10 pmol), 4 × dNTPs (10 mmol · L⁻¹) 2 μL, *Taq* 酶 (5 U · μL⁻¹) 0.125 μL, Mg²⁺ (25 mmol · mL⁻¹) 3 μL, 10 × PCR Buffer 2.5 μL, 用超纯水补足至 25 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环; 再 72 °C 延伸 10 min, 37 °C 结束反应, 同时设参考菌株阳性、无模板对照。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8.3 目的片段的纯化回收 将 1.7.2 的 PCR 阳性产物 100 μL 以 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳产物用 Axygen 公司的胶回收试剂盒操作说明进行纯化回收, 回收后再用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8.4 扩增产物克隆测序 胶回收产物 4.2 μL, 连接液 Solution 5 μL, pMD-19 载体 0.8 μL 混匀, 16 °C 连接过夜。将连接产物转入感受态细胞中表达, 取白斑的菌落进行培养增菌。所得菌液按照 Axygen 公司生产的质粒提取试剂盒提取质粒。取纯化后质粒 16 μL, 经过 *EcoR* I、*Hind* III 各 0.5 μL, 10 × K Buffer 2 μL, 27 °C 酶切 2 h。空载体酶切作为阴性对照。将酶切产物与质粒进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 取电泳得到质粒片段和目的片段的阳性产物送上海生物工程公司进行测序。

1.8.5 测序分析及系统发生树的构建 测序所得 16S rRNA 基因序列通过 NCBI 的 BLAST 检索系统进行序列同源性比对分析, 选取相似性大于 98% 的菌株序列采用 DNASTar 进行多序列匹配对比, 运用 Mega4.0 软件中的 Neighbor-joining 构建系统发生树, Boot strap 置信度检测, 自举数据集为 1 000 次。

1.9 药物敏感性测定

志贺菌对抗生素的敏感性测定采用 CLSI 推荐

的 Kirby-Bauer 法操作及判断结果^[18], 庆大霉素、链霉素、氧哌嗪青霉素、先锋 V、先锋 VI、氨苄西林、丁胺卡那霉素、头孢氨噻肟、头孢吡肟、头孢噻吩、复达欣、氟哌酸、丙氟哌酸、单环菌素、亚胺配能、左氟沙星、美福仙共 18 种药物药敏片购自杭州微生物试剂有限公司, 药敏质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922。

1.10 BALB/c 小鼠 LD₅₀ 试验

30 只 BALB/c 小鼠随机分组, 每组 5 只, 共 6 组, 1~5 组为试验组, 6 组为对照组, 正常饲养观察 2 d。取纯化的单菌落于无菌 LB 培养基中培养 14 h, 进行活菌计数, 以无菌 LB 增菌液稀释或浓缩细菌, 调整细菌浓度为 5 × 10⁶ ~ 5 × 10¹⁰ CFU · mL⁻¹。腹腔注射 0.5 mL · 只⁻¹。攻毒后正常饲喂, 并分别于接种后每隔 3 h 观察 1 次, 连续观察 5 d 并记录。出现小鼠死亡则立即解剖, 并取心脏血液、肝脏、脾脏接种 XLD 平板回收细菌。采用 Reed-Muench 氏法计算 LD₅₀ 值。

2 结果

2.1 细菌分离培养特性及显微形态

细菌在 XLD 平板上 37 °C 培养 16 h, 形成直径 ≤ 1 mm 黄色圆形单菌落, 湿润, 边缘光滑整齐。革兰氏染色后镜检可见红色短杆菌, 单个、成双或聚堆存在。

2.2 生化鉴定

采用 Vitek 全自动生化鉴定仪进行生化鉴定, 173 株分离细菌仅有 1 株鉴定结果为宋内志贺菌, 可靠性为 97%。重复鉴定结果一致。各项生化指标结果见表 2。

表 2 分离菌株生化试验结果

Table 2 Biochemical features of the isolate

生化项目	结果	生化项目	结果	生化项目	结果
Identification item	Result	Identification item	Result	Identification item	Result
APPA	—	ADO	—	PyrA	—
H ₂ S	—	BNAG	—	AGLTp	—
BGLU	—	dMAL	+	dMAN	+
ProA	—	LIP	—	PLE	—
SAC	—	dTAG	—	dTRE	+
ILATk	—	AGLU	—	SUCT	+
GlyA	—	ODC	—	LDC	—
O129R	+	GGAA	—	IMLTa	—
IARL	—	dCEL	—	BGAL	—
dGLU	+	GGT	—	OFF	—
dMNE	+	BXYL	—	BAIap	—
TyrA	+	URE	—	dSOR	—
CIT	—	MNT	—	5KG	—
NAGA	—	AGAL	+	PHOS	—
IHISa	—	CMT	+	BGUR	+
ELLM	—	ILATa	—		

2.3 血清学鉴定

血清学试验鉴定为鲍氏 6 型志贺菌,四川省疾病预防控制中心复检结果与之相符。

2.4 细菌电镜观察

透射电镜观察结果为短杆菌大小为 $2.23 \mu\text{m} \times 0.88 \mu\text{m}$,部分细菌呈二分裂状态。菌体在电镜下清晰可见其细胞壁以及细胞内容物,细菌无鞭毛,无荚膜,无芽孢,未发现菌毛;扫描电镜观察结果显示为短杆菌大小为 $2.35 \mu\text{m} \times 0.62 \mu\text{m}$,细菌无鞭毛,无荚膜,无芽孢,未发现菌毛(图 1)。

2.5 16S rRNA 序列扩增测序及同源性分析

16S rRNA PCR 扩增产物片段大小为 1 506 bp。于 NCBI 上比对后发现牦牛源志贺菌 16S rRNA 核苷酸相似性为 99.9%。基因序列上传 GenBank,序列号为 JQ073777。选取亲缘性最为相近的基因序列以及禽源、猪源、山羊源的 16S rRNA 序列与牦牛源志贺菌的测序结果进行比对,建立系统发生树见图 2。

由系统发生树可见牦牛源志贺菌分离菌株(Yak JQ073777)与人源鲍氏志贺菌(EU009178、

JQ315923、EU009179、EU009181、EU009180)、人源宋内志贺菌(EU009199)、人源大肠杆菌(AP012030、AP010953)形成一个大的分支,各序列间有小分支,相互亲缘关系较近。而禽源鲍氏志贺菌(FJ440029)、禽源(DQ229902)、山羊源(FJ405324)和猪源(FJ405330)志贺菌以及人源福氏志贺菌(HQ407235)单独聚为一个大的分支,与牦牛源志贺菌分离株亲缘关系较远。

2.6 药敏试验

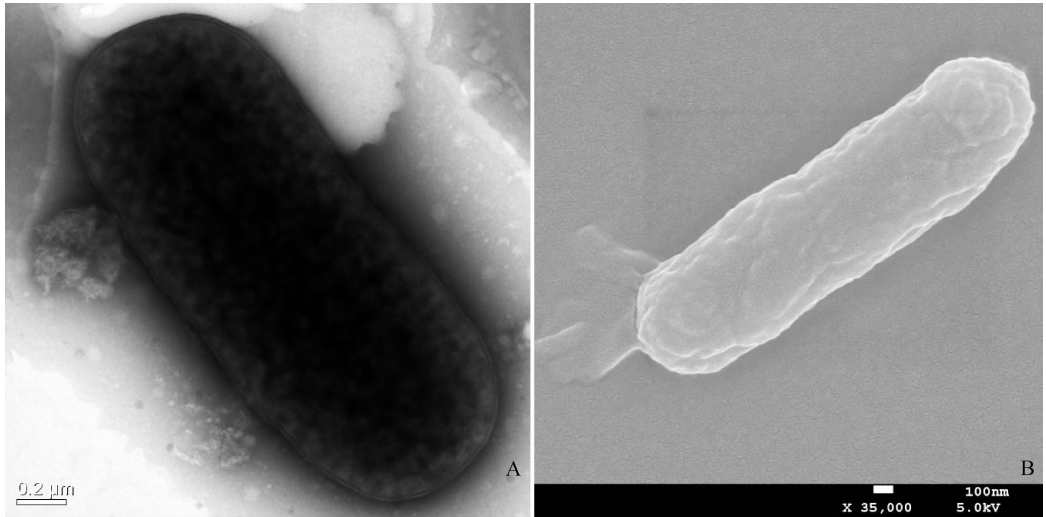
牦牛源鲍氏 6 型志贺菌分离菌株除对氨苄西林、头孢噻吩和先锋 VI 中介外,对其余 15 种抗生素均敏感。

2.7 BALB/c 小鼠 LD₅₀ 试验

攻毒后小鼠均出现不同程度的发抖、被毛杂乱、采食量减少、精神差、嗜睡等症状。攻毒后 8 h 最高剂量组小鼠开始发生死亡,攻毒后 19 h 最高剂量组小鼠全部死亡。次剂量组(5×10^9 和 $5 \times 10^8 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)各死亡小鼠 4 只。死亡时间段主要集中在攻毒后 14~48 h, $5 \times 10^7 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组死亡小鼠 1 只。最低剂量组未出现死亡,对照组小鼠未出现发

病和死亡。剖检死亡小鼠的病理变化,小鼠心脏上白色坏死灶、脾脏肿大、肺脏有出血点、肠道肠黏膜脱离、内充满黄色水样液体等病变症状。心脏血液、

肝脏、脾脏组织中均回收到目的细菌。采用 Reed-Muench 氏法计算得出该分离菌株的 LD₅₀ 为 2.5 × 10^{7.5} CFU。



A 图示分离菌株透射电镜观察,菌体大小 2.23 μm × 0.88 μm (10 000 ×); B 图示分离菌株扫描电镜观察,菌体大小 2.35 μm × 0.62 μm (35 000 ×)
TEM (A) and SEM (B) observation of the isolate. Bacteria size: 2.23 μm × 0.88 μm (10 000 ×, TEM) and 2.35 μm × 0.62 μm (35 000 ×, SEM)

图 1 分离菌株电镜观察

Fig. 1 Observation of the *Shigella boydii* isolate

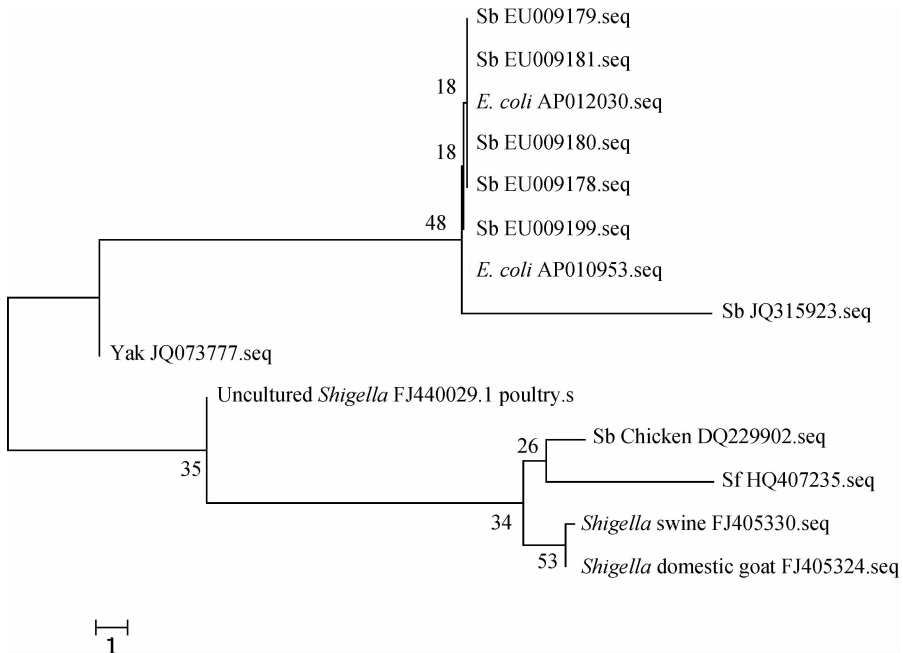


图 2 基于 16S rRNA 序列的系统发生树

Fig. 2 The phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences

3 讨论

通过细菌形态染色、生化反应和 16S rRNA 序列比对,可以确定从待屠宰健康成年牦牛分离到的细菌为志贺菌。虽然采用 Vitek 全自动生化鉴定仪鉴定结果为宋内志贺菌(可靠性为 97%),但生化鉴定通常只能将肠道菌鉴定到属,血清型的鉴定必须依靠血清学试验,国外已有全自动生化鉴定仪鉴定细菌种属时出现误差的报道^[19-20],志贺菌属 O 抗原是分类的依据,分群特异性抗原和型特异性抗原,籍以将志贺菌属分为 4 群(种)40 余个血清型^[21],其中鲍氏志贺菌有 20 个血清型。通过 O 因子血清凝集试验将牦牛源志贺菌进一步鉴定为鲍氏 6 型志贺菌。以前医学微生物教材强调志贺菌无动物宿主^[21],近年国内外虽有志贺菌可感染猴、牛、猪、小鼠、豚鼠和鸡的报道^[6-13],但从牦牛中分离出鲍氏志贺菌在国内外属首次报道,对小鼠的致病性试验证实分离株的致病力稍强于 2007 年从兰州市病人中分离的菌株^[22],本研究结果进一步丰富了志贺菌病的流行病学资料,病原的获得也为进一步研究牦牛源志贺菌的毒力基因奠定基础。

人类对志贺菌较易感,少至 200 个菌就可发病,鲍氏志贺菌主要是感染儿童引起重症菌痢^[21]。食源性致病菌污染是影响食品卫生和安全的主要因素之一,S. Jorgen^[23]认为动物源性食品中重要的致病菌出现常常与屠宰的动物污染有关,即屠宰加工过程中的污染,即这些动物在屠宰之前已感染该病菌但临床并不发病,即使在发达国家,食物污染等造成的腹泻暴发也难以避免。牦牛这一特殊物种生活环境特殊,较少使用抗菌药物,致使分离株对大多数药物均敏感,无耐药现象,从药物残留角度来看,牦牛肉是绿色安全、值得人欣慰的。但是国内外对牦牛食源性病原微生物的研究较少,其污染情况并不清楚,本研究结果提示牦牛肉、奶等产品存在安全隐患,屠宰加工过程中应避免其污染,本研究具有公共卫生学意义。

志贺菌属是从多个独立的大肠杆菌起源,并经过趋同进化而形成的,16S rRNA 基因序列分析方法不能有效区分超家族中密切相关菌种问题,如志贺菌、大肠埃希菌^[24],像志贺菌与大肠杆菌这样亲缘关系比较近的种间仅运用细菌高度保守的 16S rRNA 基因序列并不能很好地地区别其种系关系,故建立的系统发生树牦牛源鲍氏 6 型志贺菌分离菌株

与人源大肠杆菌亲缘关系较近,但是从系统发生树可发现牦牛源鲍氏 6 型志贺菌与人源鲍氏志贺菌、宋内志贺菌亲缘关系较近,与禽源、山羊源和猪源志贺菌亲缘关系较远,从遗传演化的角度来看牦牛源鲍氏 6 型志贺菌可能来源于人。

用电镜对该菌进行形态观察,可以进一步观察该菌的形态结构特性,结果更加直观,本研究结果表明,牦牛源鲍氏 6 型志贺菌为短小杆菌,细菌无鞭毛、无荚膜、无芽孢、未发现菌毛,其大小、形态符合志贺菌的特征,但志贺菌有菌毛,而本研究中未观察到,有可能在样品制备的过程中造成了菌毛的丢失,需进一步研究。

4 结论

本研究首次从健康牦牛中分离到鲍氏 6 型志贺菌,该菌具有较强的致病性,且与人源菌株亲缘关系较近,结果表明牦牛肉、奶等产品存在安全隐患,屠宰加工过程中应避免其污染食品,造成人的重症菌痢的流行。

参考文献:

- [1] 彭俊平,杨 剑,金 奇. 志贺菌研究进展[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学,2010,40(1):14-22.
- [2] ALABOUDI A R, HAMMED D A, BASHER H A. Potential pathogenic bacteria from dead in shell chicken embryos [J]. *J Vet Sci*, 1992, 5(2): 109-114.
- [3] MATHAN M M, MATHAN V I. Morphology of rectal mucosa of patients with shigellosis [J]. *Rev Infect Dis*, 1991, 13(4): 314-318.
- [4] KOTHOFF K L, WINICKOFF J P, IVANOFF B, et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies [J]. *Bull World Health Organ*, 1999, 77: 651-666.
- [5] 蔡亦红. PCR 快速检测食品中志贺菌方法的建立 [J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(2): 150-153.
- [6] 杨玉蓉. 食蟹猴肠道志贺菌感染情况的调查 [J]. 中国实验动物学报, 2000, 8(1): 31-35.
- [7] PRIAMUKHINA N S, KILESSO V A, TIKHOMIROV E D. Animal carriers of *Shigella* and their possible epidemiological importance [J]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 1984, 11: 20-24.
- [8] UEDA S, SASAKI S, KABUTO M, et al. *Shigella* organisms isolated from slaughtered cattle and hogs [J]. *Nippon Juigaku Zasshi*, 1963, 4(2): 127-131.

- [9] MAURELLI A T, ROUTH P R, DILLMAN R C, et al. *Shigella* infection as observed in the experimentally inoculated domestic pig [J]. *Sus Scrofa Domestica Microb Pathog*, 1998, 10(4): 189-196.
- [10] JAKSIC B L. Current possibilities for prevention of dysentery in white piglets and calves in mass maintenance of these animals [J]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 1967, 10(10): 539-545.
- [11] TRABULSIL R, ZULIANI M E, SERRANO J A. On two new enterobacteria pathogenic to the guinea-pig eye [J]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1965, 7(4): 241-246.
- [12] 许兰菊, 王川庆, 胡功政, 等. 鸡志贺菌病在我国的发现及其病原特性研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2004, 7(4): 281-286.
- [13] 王彦红, 苗晓青, 周 琼, 等. 奶牛大肠杆菌与鲍氏志贺菌混合感染的诊疗 [J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(9): 70-71.
- [14] 陆季严, 林 禧, 林汉城. 从进口家禽冻品检出志贺菌 [J]. 动植物检疫, 1996, 3(1): 22-24.
- [15] 尹 旭, 陈惠清. 从阿根廷进口冻鸡爪检出福氏志贺菌 [J]. 中国动物检疫, 1998, 15(1): 19-20.
- [16] 游勇来, 陈 文. 动物源性食品中志贺菌的分离与鉴定 [J]. 检验检疫学刊, 2010, 20(5): 35-37.
- [17] 于学辉, 程安春, 王远微, 等. 规模化养鸭场鸭源大肠杆菌分离株的致病性及系统发育学分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(12): 927-931.
- [18] CLSI. Performance standards for antimicrobial disk-susceptibility tests; Approved standard [S]. 9th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
- [19] DAVID P, DOOLE Y, MIRIAM L, et al. Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated vitek yeast biochemical card [J]. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(12): 2889-2892.
- [20] ERT F, WOOLFRE Y, RICHARD T, et al. Evaluation of the automicrobic system for identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli [J]. *J Clin Microbiol*, 1984, 20(6): 1053-1059.
- [21] 贾文祥. 医学微生物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 208-211.
- [22] 郝 宁, 韩 俭, 吴 玲. 兰州市不同毒力基因型志贺菌致病力研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(3): 273-275.
- [23] JORGEN S. Emerging food-borne pathogens [J]. *Biomed Environmen Sci*, 2001, 14: 44-52.
- [24] DEMARTA A, DERESPINIS S, DOLINA M, et al. Molecular typing of *Yersinia fredriksenii* strains by means of 16S rRNA and gyrB genes sequence analyses [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 238(2): 423-428.

(编辑 白永平)