



疾病诊断与防控 Disease Diagnosis, Treatment and Prevention

新生麋鹿出血性肺炎病原菌的 分离鉴定及生物学特性分析

闫铁梁^{1,2,3}, 钟震宇^{2,3}, 郭青云^{2,3}, 白加德^{2,3}, 王美慧^{2,3},
王晓晨^{2,3}, 王心缘^{1,2,3}, 程志斌^{2,3}, 单云芳^{2,3}, 杨聪山^{1*}, 张庆勋^{2,3*}

- (1. 安徽农业大学动物医学院, 合肥 230036;
2. 北京市科学技术研究院北京麋鹿生态实验中心, 北京 100076;
3. 麋鹿国家保护研究中心, 北京 100076)

稿件运行过程

收稿日期: 2025-10-13

修回日期: 2025-11-13



摘要

关键词: 新生麋鹿;

出血性肺炎;

大肠埃希菌;

链球菌;

分离鉴定;

耐药性;

致病性

Keywords: Newborn Chinese milu;

Hemorrhagic pneumonia;

Escherichia coli;

Streptococcus;

Isolation and identification;

Drug resistance;

Pathogenicity

中图分类号: S855.1; Q959.8

文献标志码: A

文章编号:

2310-1490(2026)-01-0061-10

DOI: 10.12375/ysdwx.202510007

为明确北京某机构新生麋鹿(*Elaphurus davidianus*)异常死亡的病因,本研究对死亡个体病理组织进行了病原学分析。根据临床症状、病理剖检、细菌分离培养、16S rRNA 基因测序及生化鉴定,确定其死亡原因为大肠埃希菌(*Escherichia coli*)和链球菌(*Streptococcus* sp.)混合感染引发的出血性肺炎。药敏试验显示,链球菌分离株对青霉素、红霉素、头孢曲松及美罗培南敏感;大肠埃希菌分离株对所试药物均未完全敏感,但对头孢曲松、美罗培南等药物呈中介;两菌株均对两性霉素B耐药。毒力基因检测表明,大肠埃希菌携带 *AatA*、*FimC*、*Mat* 等7种毒力基因,而链球菌未检出目标毒力基因。小鼠致病性试验结果显示,大肠埃希菌单独感染致死率为20%,链球菌单独感染仅引起沉郁症状,两者混合感染后致死率升至60%。研究结果揭示了导致新生麋鹿出血性肺炎的混合感染病原的生物学与致病特征,为该病的临床诊治和防控提供了科学依据。

基金项目: 北京市自然科学基金项目(5264025,6194031);北京市科学技术研究院创新工程项目(25CA005)

第一作者简介: 闫铁梁(2000—),男,硕士研究生;主要从事耐药菌感染机制及防控策略研究。E-mail:yantieliang123@163.com

*通信作者: 杨聪山, E-mail: congshanyang@sina.cn; 张庆勋, E-mail: zhangqingxun1990@126.com

Isolation, Identification and Biological Characteristics Analysis of Pathogens Causing Hemorrhagic Pneumonia in New-Born Chinese Milu (*Elaphurus davidianus*)

YAN Tieliang^{1,2,3}, ZHONG Zhenyu^{2,3}, GUO Qingyun^{2,3},
BAI Jiade^{2,3}, WANG Meihui^{2,3}, WANG Xiaochen^{2,3}, WANG Xinyuan^{1,2,3},
CHENG Zhibin^{2,3}, SHAN Yunfang^{2,3}, YANG Congshan^{1*}, ZHANG Qingxun^{2,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2. Beijing Milu Ecological Experimental Center, Beijing Academy of Science and Technology,
Beijing 100076, China;

3. National Milu Conservation Research Center, Beijing 100076, China)

Abstract: To clarify the causes of abnormal mortality of newborn Chinese milu (*Elaphurus davidianus*) at an institution in Beijing, the pathogenic analysis was conducted on pathological tissues from deceased individuals. Based on clinical symptoms, pathological autopsy, bacterial isolation and culture, 16S rRNA gene sequencing and biochemical identification, the cause of death was determined to be hemorrhagic pneumonia induced by mixed infection of *Escherichia coli* and *Streptococcus* sp. Antimicrobial susceptibility testing showed that the *Streptococcus* isolate was sensitive to penicillin, erythromycin, ceftriaxone and meropenem; the *Escherichia coli* isolate was not fully sensitive to all tested drugs but exhibited intermediate sensitivity to ceftriaxone, meropenem and other drugs. Both isolates were resistant to amphotericin B. Virulence genes detection revealed that *E. coli* carried seven virulence genes, including *AatA*, *FimC* and *Mat*, while no target virulence genes were detected in *Streptococcus*. The results of mice pathogenicity tests demonstrated that the mortality rate of *Escherichia coli* infection alone was 20%, *Streptococcus* infection alone induced only depressive symptoms, whereas the mortality rate increased to 60% after mixed infection of *Escherichia coli* and *Streptococcus*. The findings elucidate the biological and pathogenic characteristics of the mixed infection pathogens responsible for hemorrhagic pneumonia in newborn Chinese milu, and provide a scientific basis for the clinical diagnosis, treatment and prevention of this disease.

麋鹿(*Elaphurus davidianus*)属鲸偶蹄目(Cetartiodactyla)鹿科(Cervidae)麋鹿属(*Elaphurus*),为中国特有珍稀鹿科物种,属国家一级重点保护野生动物^[1]。其起源可追溯至更新世早期,曾广泛分布于我国东部温暖湿润的季风区,是一种适应湿地环境的大型食草动物^[2]。受人类活动及栖息地丧失影响,麋鹿曾一度在中国本土绝迹。后通过国际合作重新引入,经数十年保育与繁衍,目前全国种群数量已恢复至上万只,被视为全球濒危物种保护的成功典范^[3-4]。然而,在种群复壮过程中,麋鹿仍面临多种疾病威胁,尤其是细菌性呼吸道感染,其往往呈现两种及以上病原菌混合感染的复杂情况,已成为影响其存活率的重要因素。在多种潜在病原中,

大肠埃希菌(*Escherichia coli*)与链球菌(*Streptococcus* spp.)是两类常见且致病性较强的细菌^[5]。大肠埃希菌又称大肠杆菌,是一种兼性厌氧的革兰氏阴性菌,广泛存在于自然环境中,属于条件性致病菌,可引发动物的肺炎、肠炎、脑膜炎及败血症等多种疾病^[6]。该菌可通过污染水体传播,而麋鹿习性亲水,因此感染风险显著增加,尤其易引发麋鹿出血性肠炎等疾病,严重时可导致死亡,对麋鹿保护与繁育工作构成潜在威胁^[7]。链球菌为需氧或兼性厌氧的革兰氏阳性菌,其种类繁多、分布广泛,镜下呈长短不一的链状结构^[8]。部分菌株如化脓链球菌(*S. pyogenes*)、肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)、猪链球菌(*S. suis*)和无乳链球菌(*S. agalactiae*)等具有较强的致病性,可导

致肺炎、败血症、脑膜炎和乳腺炎等疾病,对动物健康及公共卫生均构成严重威胁^[9]。尽管上述细菌在多种动物中已有较多研究,但其在新生麋鹿群体中的感染特征、致病机制及耐药情况仍缺乏系统报道。为查明北京某机构数例新生麋鹿异常死亡的原因,本研究采集其病变组织进行细菌分离纯化,通过16S rRNA基因测序、生化鉴定、药敏分析、毒力基因检测及小鼠致病性试验,明确了病原菌及其生物学特性,旨在为新生麋鹿肺炎的临床诊治和防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病料来源与处理

病料采集自北京某机构4例死亡新生麋鹿个体。发病麋鹿均表现为急性病程,临床表现为站立困难、侧卧和呼吸急促等症状,并最终死亡。解剖后,在无菌操作下采集心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏等组织样本各3份。组织样本置于保温箱中低温运送至实验室,其中一份低温冻存,保留病料;一份置于无菌甘油中低温保存,用于后续细菌分离与分子生物学鉴定;另一份则用4%多聚甲醛溶液固定后用于组织病理学检查。

1.2 方法

1.2.1 组织病理学检查与细菌分离培养

取经4%多聚甲醛固定的病料样本,依次进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡浸渍及包埋处理,制备石蜡切片,经苏木精-伊红(H&E)染色后在光学显微镜下观察组织病变情况。同时,取新鲜病料组织分别划线接种于LB琼脂平板(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司)和10%脱纤维羊血琼脂平板(北京索莱宝科技有限公司),置于恒温培养箱中37℃培养12~24 h。之后对菌株进行扩增,分别从LB琼脂平板和血琼脂平板上挑取形态特征典型的单菌落,对应接种在LB和BHI液体培养基中,37℃振荡培养12~16 h以获得纯化菌株^[10]。对增殖后的菌液进行革兰氏染色及镜检,并于-80℃条件下以50%甘油冻存菌种。

1.2.2 分离菌株16S rRNA基因测序

以分离菌株的基因组DNA为模板,采用细菌16S rRNA基因通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TACGGYTACCTGTGA

CGACTT-3')进行PCR扩增。反应体系总体积50 μL,包含2×*Tap Plus Master Mix II*(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)25 μL、上下游引物各2 μL、DNA模板2 μL,以ddH₂O补足至50 μL。反应程序:95℃预变性3 min;95℃变性15 s,60℃退火20 s,72℃延伸60 s,共33个循环;最后72℃终延伸10 min。扩增产物经纯化回收后送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。获得的序列结果通过NCBI数据库进行同源性分析,随后利用MEGA 12软件,采用邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树,并通过1 000次Bootstrap重复检验评估节点的支持率。

1.2.3 分离菌株生化鉴定

将两株分离菌分别制备为0.5麦氏浊度的菌悬液,采用商品化细菌生化鉴定管(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司)进行生化试验。检测项目包括动力、鸟氨酸、赖氨酸、柠檬酸盐、硫化氢、尿素、吲哚、V-P反应、苯丙氨酸、甘露醇、肌醇、山梨醇、蜜二糖、侧金盏花醇、棉籽糖、PYR、精氨酸、七叶苷、MAG、TMZ、蕈糖、蔗糖、DPP和PMG。各试验均设3次重复^[11]。将获得的生化结果与《伯杰细菌鉴定手册》^[12]对比,完成菌株鉴定。

1.2.4 分离菌株药敏试验

参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)指南^[13],选取青霉素、哌拉西林、红霉素、左氧氟沙星、替加环素、四环素、氯霉素、头孢曲松、美罗培南、庆大霉素和两性霉素B共11种药物(北京索莱宝科技有限公司),采用96孔板法进行药敏试验^[14]。首先向96孔板(12列×8行)的每个孔中加入100 μL BHI肉汤培养基,再用8通道移液枪向第1列各孔中加入100 μL药液(512 μg/mL),混匀后吸取100 μL转移至第2列,依次倍比稀释至第10列,最终形成256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 μg/mL的药物浓度梯度,每列最终体积为100 μL;第11孔为不含药的阴性对照,第12孔为不含菌液的阳性对照。最后再向每个孔中加入100 μL稀释后的菌液,混匀后置于恒温培养箱中37℃过夜培养后观察每个孔的状态,进而判定分离菌株的药敏性^[15],用敏感(S)、中介(I)和耐药(R)记录。

1.2.5 分离菌株毒力基因检测

以分离菌株的基因组DNA为模板,分别针对大肠埃希菌的14种主要毒力基因(*AatA*、*PapC*、*FimC*、

Mat、*IbeB*、*Vat*、*Yijp*、*OmpA*、*NeuC*、*Cva/Cvi*、*Iss*、*FyuA*、*IucD*和*HlyF*^[16-17]及链球菌的7种毒力基因(*Ply*、*PspA*、*NanA*、*PsaA*、*LytA*、*FneB*和*SeM*)^[18]设计引物。所有引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成，

其序列及预期扩增片段大小见表1。再以分离菌的DNA为模板对10种毒力基因进行PCR扩增。PCR反应体系和程序同1.2.2。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像分析仪观察^[19]。

表1 毒力基因引物序列

Table 1 Primer sequences for virulence genes

| 毒力基因 Virulence gene | 引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3') | 目的片段大小 /bp Amplified fragment size |
|------------------------|--|---------------------------------------|
| <i>AatA</i> | F: CATAGGCGTTTCTCTTTCCGAT R: CCTGTCGTTTCATACAGATTCCGTT | 1 226 |
| <i>PapC</i> | F: GCTGATATCACGCAGTCAGT R: GTCAACAAGAAGACGTGTTC | 768 |
| <i>FimC</i> | F: CCCGATGGTGTAAAGGATGG R: GCGTAAAGTCGCCATAATCA | 475 |
| <i>Mat</i> | F: CGACCTGGTCAGCAACAGCC R: TCCACGCCACATTTCAGTGT | 238 |
| <i>IbeB</i> | F: GTTCTCACTCAGCCAGAACC R: CATCCAGCACTTCCAGATAAC | 1 172 |
| <i>Vat</i> | F: TCCATGCTTCAACGTCTCAGAG R: CTGTTGTCAGTGTCTGTAACC | 939 |
| <i>Yijp</i> | F: TGGCTTGATTCTGCATCCGAT R: CATCGTCTGCTGTTGGTGAT | 517 |
| <i>OmpA</i> | F: AGCTATCGCGATTGCAGTG R: GGTGTTGCCAGTAACCCG | 919 |
| <i>NeuC</i> | F: GGTGGTACATTCCGGGATGTC R: CATGGTGGTAAAAAGACATTAGC | 792 |
| <i>Cva/Cvi</i> | F: TCCAAGCGGACCCCTTATAG R: CGCAGCATAGTTCATGCT | 598 |
| <i>Iss</i> | F: ATCAGATAGGATTCTGCCG R: CAGCCGAGTATAGATGCCA | 309 |
| <i>FyuA</i> | F: ACACGGTTTATCCTCTGGC R: GGCATATTGACGATTAACGAA | 953 |
| <i>IucD</i> | F: ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC R: CCTGATCCAGATGATGCTC | 714 |
| <i>HlyF</i> | F: GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC R: GGCGGTTTAGGCATTCGATACTCAG | 450 |
| <i>Ply</i> | F: CCCACTCTTCTTGGCGTTGA R: TGAGCCGTTATTTTCAT | 209 |
| <i>PspA</i> | F: CATAGACTAGAACAAGAGCTCAAA R: CTACATTATTGTTTCTTCAGCAG | 1 200 |
| <i>NanA</i> | F: CAGTGATAGAAAAAGAAGATGTTG R: ATTATTGTAACCTGCCATAGTGAA | 500 |
| <i>PsaA</i> | F: CTTTCTGCAATCATTCTTG R: GCCTTCTTACCTTGTTT | 838 |
| <i>LytA</i> | F: TGAAGCGGGATTATCACTGGC R: GCTAAACTCCCTGTATCAAGCG | 273 |
| <i>FneB</i> | F: TTTAGGAGCGTCATCATCGTTAGG R: TCAGGTGGCAAGGAAGAGCT | 435 |
| <i>SeM</i> | F: TTTGGATCCAAATCTCAACAAGAAATGCTT R: AAAGTCGACTTACATCTTAGCTGCTTTTCTTT | 201 |

1.2.6 小鼠致病性试验

4~6周龄健康昆明系小鼠(购自斯贝福生物技术有限公司)随机分为对照组和试验组,每组5只。分别将鉴定为大肠埃希菌和链球菌的分离株,采用涂板计数法用灭菌生理盐水稀释菌液浓度为 1.0×10^9 CFU/mL^[20]。试验组分为4组:阴性对照组、大肠埃希菌感染组、链球菌感染组和混合感染组(大肠埃希菌和链球菌的稀释菌液按1:1等体积混合)。试验组每只小鼠腹腔注射0.4 mL菌液,对照组腹腔注射等量的无菌生理盐水,连续观察7 d,记录小鼠的存活情况、临床症状及死亡数量。对死亡小鼠立即

进行剖检,观察主要脏器的病理变化^[21]。实验方案通过了北京麋鹿生态实验中心动物实验伦理委员会的审查(批件号:2025-007)。

2 结果

2.1 死亡新生麋鹿剖检及组织病理学观察

剖检可见肺组织明显充血、出血及淤血,肺表面暗红色,可见散布出血点及片状淤血区,心脏、肝脏、脾脏及肾脏等主要脏器未见明显病变。肺组织病理切片经H&E染色后镜检显示,肺组织结构存在血管扩张、红细胞增多,并伴有红细胞渗出;部分肺泡腔扩张,组织间隙增宽,提示水肿(图1)。

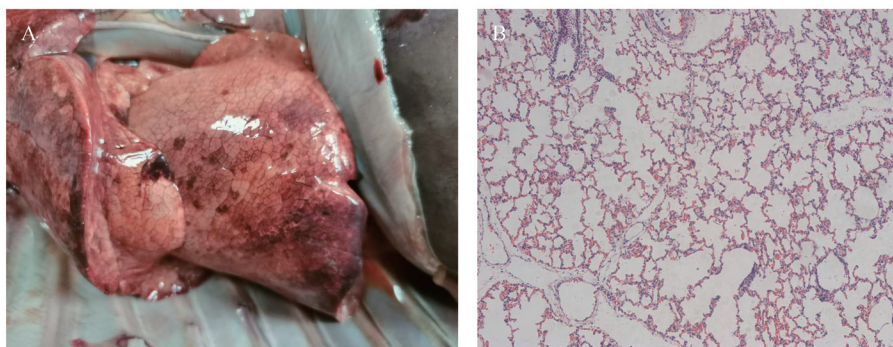


图1 新生麋鹿肺脏大体病变(A)与组织病理学变化(B)(100×)

Figure 1 Lung lesions (A) and histopathological changes (B) of newborn Chinese milu (100×)

2.2 分离菌株的形态学观察

肺组织病料分别划线于LB琼脂平板和10%绵羊血琼脂平板,置于37℃恒温培养12~24 h。在LB琼脂平板上可见直径约3 mm、淡黄色、表面光滑、边缘整齐的圆形菌落,分离株编号为MiluDC508(图

2A);在血琼脂平板上观察到直径0.50~0.75 mm、灰白色、具乳光、表面光滑、边缘整齐的细小菌落,分离株编号为MiluLQ417(图2B)。革兰氏染色镜检显示,MiluDC508为革兰氏阴性短杆菌,两端钝圆;MiluLQ417为革兰氏阳性球菌,呈链状排列。

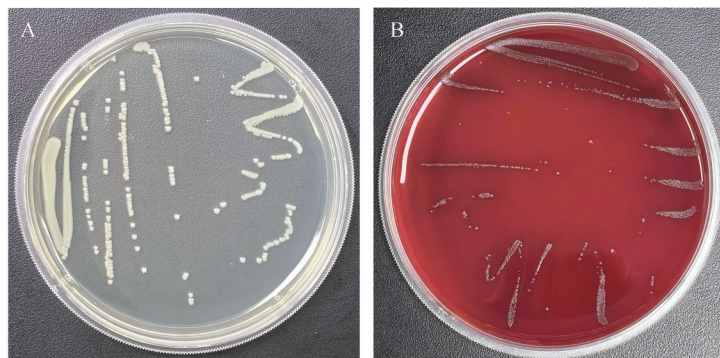


图2 分离菌株在LB琼脂平板(A)与10%绵羊血琼脂平板(B)上的菌落形态

Figure 2 Colony morphology of isolated strains on LB agar plates (A) and 10% sheep blood agar plates (B)

2.3 分离菌株16S rRNA基因的分子鉴定

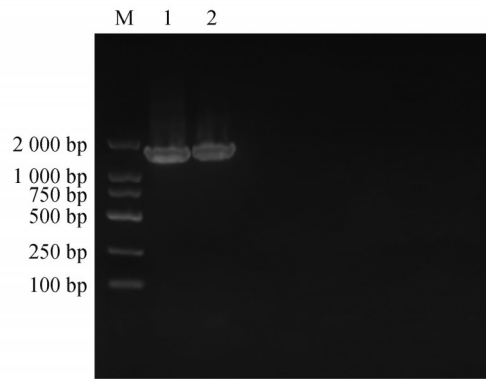
以分离菌株MiluDC508和MiluLQ417的基因组

DNA为模板,利用16S rRNA基因通用引物27F/1492R进行PCR扩增。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳

检测,在约 1 500 bp 处均可见清晰的特异性条带(图3)。将测序结果在 NCBI 数据库进行 BLAST 对比分析并构建系统发育进化树(图4)。由图4可见,菌株 MiluDC508 与大肠埃希菌参考菌株聚于同一分支,而菌株 MiluLQ417 与链球菌属代表菌株聚类。结合序列相似性(均 > 99%)及系统发育地位,最终鉴定 MiluDC508 为大肠埃希菌, MiluLQ417 为链球菌。

2.4 生化鉴定特征

对分离菌的生化鉴定结果显示(表2),大肠埃希菌(MiluDC508)在动力、鸟氨酸、赖氨酸、甘露醇、山梨醇、蜜二糖和棉籽糖等试验中呈阳性,在柠檬酸盐、硫化氢、尿素、吲哚、V-P 反应、苯丙氨酸、肌醇和侧金盏花醇试验中呈阴性。链球菌(MiluLQ417)在 PYR、精氨酸、七叶苷、MAG、TMZ、蕈糖、蔗糖和山梨醇试验中呈阳性,在 V-P 反应、DPP 和 PMG 试验中呈



M. DL2000 DNA Marker; 1. MiluDC508; 2. MiluLQ417。
M. DL2000 DNA Marker; 1. MiluDC508; 2. MiluLQ417。
图3 分离株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物电泳结果

Figure 3 Electrophoresis result of PCR amplification products of the 16S rRNA gene of the isolated strains

阴性。该生化特征与《伯杰细菌鉴定手册》中大肠埃希菌和链球菌的典型反应谱一致,进一步支持了前述分子鉴定结果。

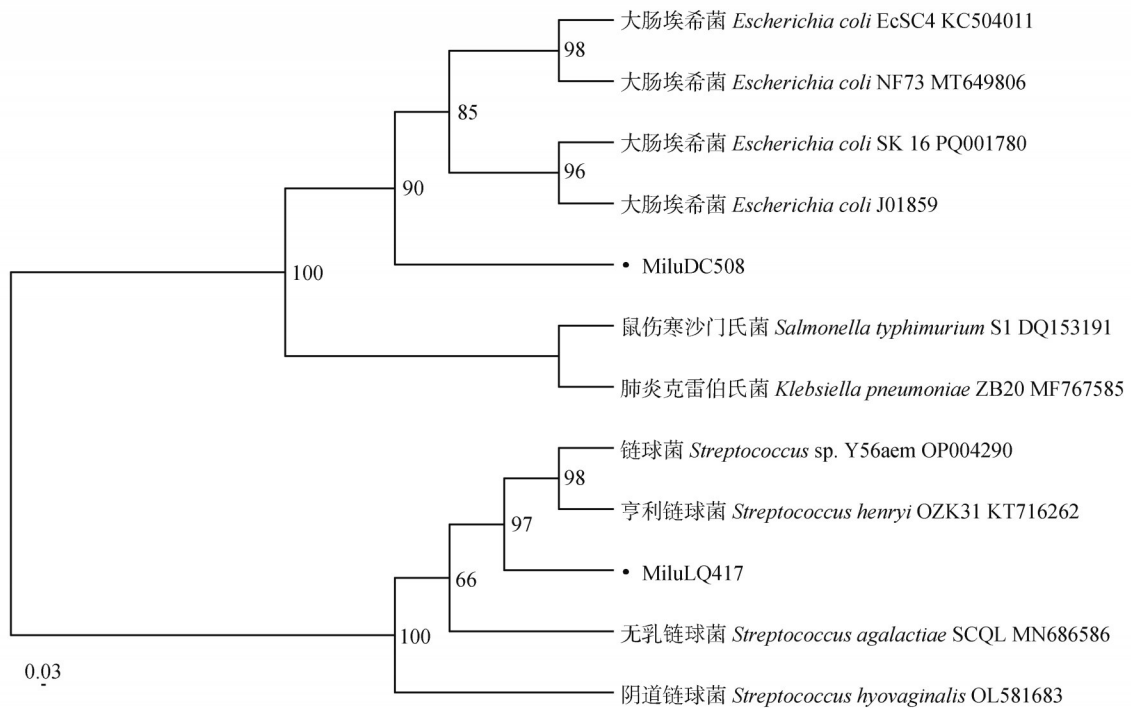


图4 基于 16S rRNA 基因序列的分离菌株系统发育进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of the isolated strains based on 16S rRNA gene sequences

2.5 药敏试验结果

药敏试验结果显示,大肠埃希菌分离株对青霉素、哌拉西林、红霉素、四环素和两性霉素 B 耐药,对左氧氟沙星、替加环素、氯霉素、头孢曲松、美罗培南

和庆大霉素中介。链球菌分离株对两性霉素 B 耐药,对哌拉西林、左氧氟沙星、替加环素、四环素、氯霉素和庆大霉素中介,对青霉素、红霉素、头孢曲松和美罗培南敏感(表3)。

表 2 分离菌生化试验鉴定结果

Table 2 Results of biochemical test identification of the isolated bacteria

| 分离菌 Isolation bacteria | 鉴定类别 Identification category | 结果 Result | 分离菌 Isolation bacteria | 鉴定类别 Identification category | 结果 Result |
|--|---------------------------------|--------------|---|---------------------------------|--------------|
| 大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i> (MiluDC508) | 动力 Motility | + | 链球菌 <i>Streptococcus</i> sp. (MiluLQ417) | 侧金盏花醇 Adonitol | - |
| | 赖氨酸 Lysine | + | | 棉籽糖 Raffinose | + |
| | 鸟氨酸 Ornithine | + | | PYR | + |
| | 柠檬酸盐 Citrate | - | | DPP | - |
| | 硫化氢 Hydrogen sulfide | - | | MAG | + |
| | 尿素 Urea | - | | 蔗糖 Sucrose | + |
| | 吲哚 Indole | - | | V-P 反应 Voges-Proskauer | - |
| | V-P 反应 Voges-Proskauer | - | | PMG | - |
| | 苯丙氨酸 Phenylalanine | - | | TMZ | + |
| | 甘露醇 Mannitol | + | | 山梨醇 Sorbitol | + |
| | 肌醇 Inositol | - | | 精氨酸 Arginine | + |
| | 山梨醇 Sorbitol | + | | 七叶苷 Esculin | + |
| | 蜜二糖 Melibiose | + | | 蕈糖 Trehalose | + |

表 3 分离菌药敏试验结果

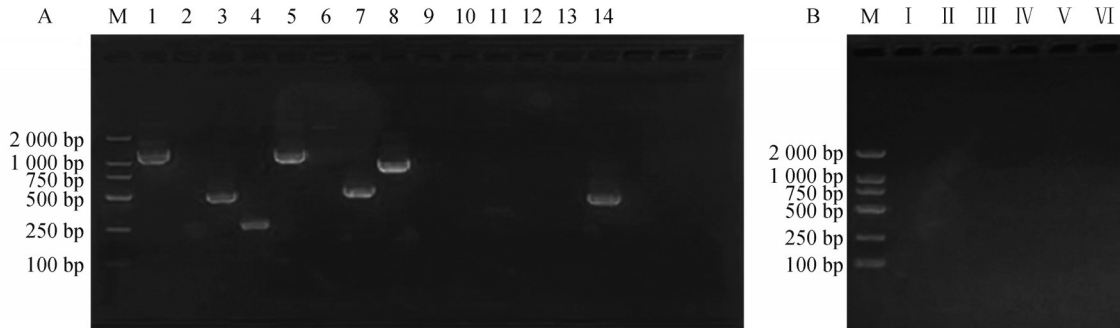
Table 3 Results of drug sensitivity test of isolated bacteria

| 分离菌 Isolation bacteria | 药物名称 Drug name | 敏感性 Sensitivity | 最小抑菌浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) MIC | 分离菌 Isolation bacteria | 药物名称 Drug name | 敏感性 Sensitivity | 最小抑菌浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) MIC |
|---|------------------------|--------------------|--|--|------------------------|--------------------|--|
| 大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i> (MiluDC508) | 青霉素 Penicillin | R | > 128 | 链球菌 <i>Streptococcus</i> sp. (MiluLQ417) | 青霉素 Penicillin | S | < 0.25 |
| | 哌拉西林 Piperacillin | R | > 128 | | 哌拉西林 Piperacillin | I | 0.25 |
| | 红霉素 Erythromycin | R | > 128 | | 红霉素 Erythromycin | S | < 0.25 |
| | 左氧氟沙星 Levofloxacin | I | 16 | | 左氧氟沙星 Levofloxacin | I | 4 |
| | 替加环素 Tigecycline | I | 4 | | 替加环素 Tigecycline | I | 0.25 |
| | 四环素 Tetracycline | R | > 128 | | 四环素 Tetracycline | I | 2 |
| | 氯霉素 Chloramphenicol | I | 128 | | 氯霉素 Chloramphenicol | I | 16 |
| | 头孢曲松 Ceftriaxone | I | 2 | | 头孢曲松 Ceftriaxone | S | < 0.25 |
| | 美罗培南 Meropenem | I | 0.5 | | 美罗培南 Meropenem | S | < 0.25 |
| | 庆大霉素 Gentamicin | I | 32 | | 庆大霉素 Gentamicin | I | 8 |
| 两性霉素 B Amphotericin B | R | > 128 | 两性霉素 B Amphotericin B | R | > 128 | | |

2.6 毒力基因

PCR 检测结果表明,大肠埃希菌分离株携带 *AatA* (1 226 bp)、*FimC* (475 bp)、*Mat* (238 bp)、*IbeB* (1 172 bp)、*Yijp* (517 bp)、*OmpA* (919 bp) 和 *HlyF*

(450 bp) 7 种毒力基因(图 5A);链球菌分离株没有显示特异性条带,表明该分离菌不含 *Ply*、*PspA*、*NanA*、*PsaA*、*LytA*、*FneB* 和 *SeM* 毒力基因(图 5B)。



A. 大肠埃希菌电泳结果;B. 链球菌电泳结果;M. DL2000 DNA Marker;1~14. *AatA*、*PapC*、*FimC*、*Mat*、*IbeB*、*Vat*、*Yijp*、*OmpA*、*NeuC*、*Cva/Cvi*、*Iss*、*FyuA*、*IucD*、*HlyF*; I~VII. *Ply*、*PspA*、*NanA*、*PsaA*、*LytA*、*FneB*、*SeM*。

A. *Escherichia coli* electrophoresis results; B. *Streptococcus* electrophoresis results; M. DL2000 DNA Marker; 1-14. *AatA*、*PapC*、*FimC*、*Mat*、*IbeB*、*Vat*、*Yijp*、*OmpA*、*NeuC*、*Cva/Cvi*、*Iss*、*FyuA*、*IucD*、*HlyF*; I-VII. *Ply*、*PspA*、*NanA*、*PsaA*、*LytA*、*FneB*、*SeM*。

图5 分离株毒力基因 PCR 扩增产物电泳结果

Figure 5 Electrophoresis result of PCR amplification products of virulence genes of isolates

2.7 小鼠致病性评价

小鼠致病性试验显示,对照组小鼠无异常表现。大肠埃希菌单独感染组小鼠死亡 1 例(致死率 20%),存活小鼠表现为鼻孔和眼睛流出淡黄色液体并伴眼周脓肿,精神沉郁、食欲减退、被毛杂乱、活动减少及粪便粘连肛门等异常。链球菌单独感染组小鼠未见死亡,仅出现精神沉郁,活动减少。大肠埃希菌和链球菌混

合感染组小鼠死亡 3 例(致死率 60%),其余症状与大肠埃希菌单独感染组相似。对死亡小鼠剖检发现,混合感染组肺脏有明显病变,局部出血、充血,淤血区呈暗红色,并可见散布出血点(图 6)。组织病理学观察显示,对照组肺泡结构基本完整,混合感染组部分组织形态改变,血管和肺泡腔出现扩张,在肺泡间隙和血管中有大量红细胞聚集、渗出(图 7)。

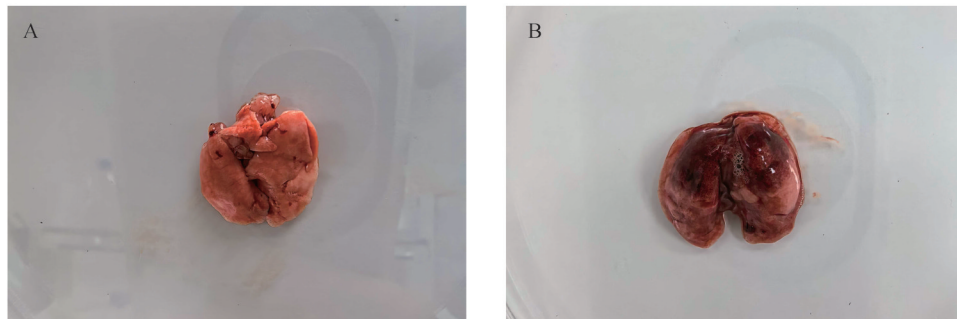


图6 对照组小鼠(A)和混合感染组死亡小鼠(B)肺脏

Figure 6 Lung of postmortem mice in control group(A) and mixed infection group(B)

3 讨论

麋鹿是我国特有的珍稀野生动物,具有重要的保护和研究价值^[22]。近年来,随着种群复壮工作的推进,麋鹿面临的疾病风险也逐渐凸显,其中呼吸系统感染是影响其存活的重要威胁之一^[23]。本研究针

对北京某机构数例新生麋鹿突发死亡的病因开展研究,经形态学观察、生化特性分析、16S rRNA 基因测序及系统发育分析,确定其死亡原因为大肠埃希菌(MiluDC508)和链球菌(MiluLQ417)混合感染所致的出血性肺炎。动物致病性试验结果显示,大肠埃希菌单独感染可引起 20% 的死亡率,而链球菌单独

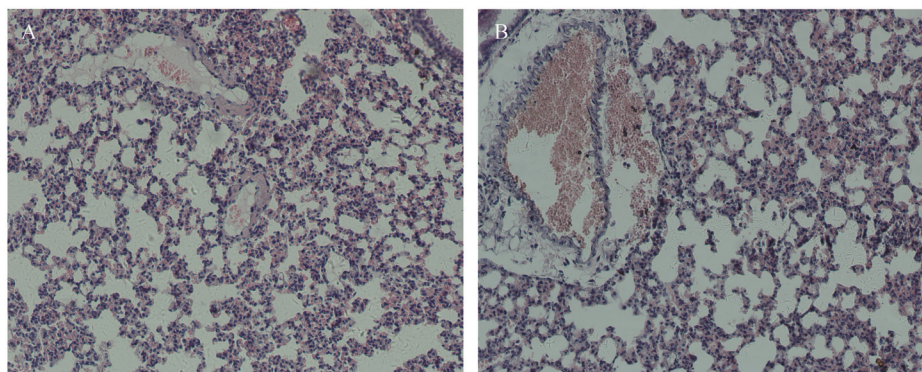


图7 对照组小鼠(A)和混合感染组死亡小鼠(B)肺脏病理切片(200×)

Figure 7 Histopathological sections of mice lungs in control group(A) and mixed infection group (B) (200×)

感染未造成死亡,仅出现轻微症状;但两者混合感染后死亡率显著升高至60%,上述结果表明,大肠埃希菌的致病性强于链球菌,且二者混合感染可能产生协同致病效应。毒力基因检测发现,大肠埃希菌携带 *AatA*、*FimC*、*Mat*、*IbeB*、*Yjip*、*OmpA* 和 *HlyF* 七种毒力基因,这些基因分别编码与黏附(如菌毛组装)、侵袭(如宿主细胞侵入)、毒素合成(如溶血素)、抗血清存活及铁转运系统相关的蛋白,其组合特征提示该菌株具有潜在的高度致病性特征。相比之下,链球菌分离株未检出所测毒力基因,这一结果与其单独感染时所导致轻微临床表现相符。

目前抗生素是治疗细菌性疾病的主要手段,在药敏试验中,大肠埃希菌分离株对本研究测试的11种抗菌药物均不敏感,且对青霉素、哌拉西林、红霉素、四环素及两性霉素B耐药,表明其具有较广的耐药谱,可能与环境及兽医临床中的抗菌药物选择压力有关。相比之下,链球菌对青霉素、红霉素、头孢曲松及美罗培南敏感,但其对两性霉素B的耐药现象需引起关注。综合两菌株的药敏结果,在临床上遇到类似混合感染时,可优先考虑选用头孢曲松或美罗培南进行经验性治疗,但最终方案应依据分离菌株的药敏试验确定,并需加强对麋鹿源细菌耐药机制的持续监测与研究。

4 结论

本研究证实新生麋鹿出血性肺炎由大肠埃希菌与链球菌混合感染引起,并系统阐明了病原的生物学特征、毒力基因携带情况及耐药特征,为该病的临床诊断、防控及合理用药提供了科学依据,对促进麋鹿种群健康保育具有实践意义。

参考文献:

- [1] 国家重点保护野生动物名录(2021年2月1日修订)[J]. 野生动物学报, 2021, 42(2): 605-640.
List of national key protected wild animals in China (revised on February 1, 2021)[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2021, 42(2): 605-640.
- [2] 单云芳, 钟震宇, 程志斌, 等. 不同栖息地麋鹿肠道寄生虫的调查研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(5): 240-242.
SHAN Y F, ZHONG Z Y, CHENG Z B, et al. A survey study on intestinal parasites in Chinese milu from different habitats [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017(5): 240-242.
- [3] 程志斌, 郭青云, 钟震宇, 等. 麋鹿常见疾病及其防治[J]. 野生动物学报, 2021, 42(3): 897-902.
CHENG Z B, GUO Q Y, ZHONG Z Y, et al. Common diseases of Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) and their prevention methods [J]. Chinese Journal of Wildlife, 2021, 42(3): 897-902.
- [4] CHENG Z B, TIAN X H, ZHONG Z Y, et al. Reintroduction, distribution, population dynamics and conservation of a species formerly extinct in the wild: A review of thirty-five years of successful milu (*Elaphurus davidianus*) reintroduction in China [J]. Global Ecology and Conservation, 2021, 31: e01860.
- [5] 田国钦, 李丰阳, 杨求磊, 等. 大肠杆菌、模仿葡萄球菌和猪链球菌混合感染对小鼠致病性的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(11): 1230-1234; 1239.
TIAN G Q, LI F Y, YANG Q L, et al. Study on the pathogenicity of mixed infection of *Escherichia coli*, *Staphylococcus simulans* and *Streptococcus suis* in mice [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2022, 44(11): 1230-1234; 1239.
- [6] LIU C Y, ZHENG H J, YANG M J, et al. Genome analysis and in vivo virulence of porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain PCN033 [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 717.
- [7] 郭定宗, 邹苗, 万春云, 等. 石首麋鹿致病性大肠埃希菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 动物医学进展, 2016, 37(3): 52-58.
GUO D Z, ZOU M, WAN C Y, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of pathogenic *Escherichia coli* from

- Elaphurus davidianus* in Shishou[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2016, 37(3): 52-58.
- [8] 付明山, 王海锋, 包雨鑫, 等. 猪链球菌病研究进展[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2024(7): 27-30.
FU M S, WANG H F, BAO Y X, *et al.* Research advances in *Streptococcus suis* infection [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2024(7): 27-30.
- [9] 王宏图, 张金江, 冷婧, 等. 仔鹿感染绵羊链球菌、肠球菌的分离鉴定[J]. *现代畜牧兽医*, 2023(2): 19-22.
WANG H T, ZHANG J J, LENG J, *et al.* Isolation and identification of *Streptococcus ovine* and *Enterococcus* in young deer [J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2023(2): 19-22.
- [10] 韩金洁, 冯梦瑶, 房军洋, 等. 林麝出血性肺炎病原菌的分离鉴定和菌影疫苗的制备[J]. *中国兽医杂志*, 2024, 60(3): 27-34.
HAN J J, FENG M Y, FANG J Y, *et al.* Isolation and identification of pathogenic bacteria causing hemorrhagic pneumonia in *Moschus berezovsky* and preparation of bacterial ghost vaccine [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2024, 60(3): 27-34.
- [11] 尹凯雯, 毛伟, 曹金山, 等. 内蒙古地区牛呼吸道感染的主要病原菌及支原体分离鉴定及耐药性和毒力基因检测[J]. *中国畜牧兽医*, 2025, 52(3): 1328-1341.
YIN K W, MAO W, CAO J S, *et al.* Isolation and identification of major pathogenic bacteria and *Mycoplasma* causing bovine respiratory tract infection and detection of drug resistance and virulence genes [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2025, 52(3): 1328-1341.
- [12] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
BUCHANAN R E, GIBBONS N E. *Bergey's manual of bacterial identification* [M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 30th ed: CLSI supplement M100 [M]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- [14] 张振, 陈鑫, 刘淑华, 等. 一株猪链球菌的分离鉴定与毒力和耐药基因分析[J]. *北京农学院学报*, 2025, 40(1): 48-53.
ZHANG Z, CHEN X, LIU S H, *et al.* Isolation, identification, virulence and drug resistance gene analysis of 1 strain of *Streptococcus suis* [J]. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2025, 40(1): 48-53.
- [15] KOETH L K, DIFRANCO-FISHER J M, HARDY D J, *et al.* Multilaboratory comparison of omadacycline MIC test strip to broth microdilution MIC against Gram-negative, Gram-positive, and fastidious bacteria [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2022, 60(1): e01410-21.
- [16] YU Y, HU B, FAN H H, *et al.* Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* causing hemorrhagic pneumonia in mink in northern China [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 781068.
- [17] 萨家祺, 曾繁文, 翟俊琼, 等. 一株海南坡鹿源化脓隐秘杆菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. *野生动物学报*, 2025, 46(1): 178-185.
SA J Q, ZENG F W, ZHAI J Q, *et al.* Isolation, identification and biological characteristics analysis of a strain of *Trueperella pyogenes* derived from *Rucervus eldii hainanus* [J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2025, 46(1): 178-185.
- [18] 孙丹岚, 买占海, 佟盼盼, 等. 北疆地区马链球菌分离鉴定及耐药性和毒力基因分析[J]. *中国动物传染病学报*, 2023, 31(3): 34-40.
SUN D L, MAI Z H, TONG P P, *et al.* Isolation, identification, drug resistance and virulence genes of *Streptococcal* strains from northern Xinjiang [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2023, 31(3): 34-40.
- [19] 张庆勋, 景胜凡, 韩姝伊, 等. 水貂源铜绿假单胞菌的分离鉴定、耐药性及毒力基因检测[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(6): 2230-2237.
ZHANG Q X, JING S F, HAN S Y, *et al.* Isolation, identification, drug resistance and virulence genes detection of *Pseudomonas aeruginosa* from mink [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(6): 2230-2237.
- [20] 马培培, 苏梦茹, 李鑫鑫, 等. 大肠埃希菌细菌计数分光光度计法的建立及应用[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(5): 29-33.
MA P P, SU M R, LI X X, *et al.* Establishment and application of *Escherichia coli* counting method based on spectrophotometer [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41(5): 29-33.
- [21] 张海威, 程悦宁, 王晓旭, 等. 水貂出血性肺炎大肠杆菌毒力基因测定和H基因分型[J]. *中国动物传染病学报*, 2022, 30(1): 141-149.
ZHANG H W, CHENG Y N, WANG X X, *et al.* Virulence gene detection and H genotyping of *Escherichia coli* from mink hemorrhagic pneumonia [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2022, 30(1): 141-149.
- [22] 王立波, 姜慧, 安玉亭, 等. 中国麋鹿种群现状分析及保护对策探讨[J]. *野生动物学报*, 2020, 41(3): 806-813.
WANG L B, JIANG H, AN Y T, *et al.* Current status and conservation measures for Père David's deer in China [J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2020, 41(3): 806-813.
- [23] 刘永杰, 颜新敏, 刘萍, 等. 一起鹿呼吸道综合征相关病原的分析与鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2025, 55(1): 18-25.
LIU Y J, YAN X M, LIU P, *et al.* Analysis and identification of pathogens associated with deer respiratory syndrome [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2025, 55(1): 18-25.