

龟嗜皮菌的快速鉴定及其在鳄蜥 皮肤病原检测中的应用

江海英 陈金平* 黄铭威 林立波 李林妙 张秀娟 李官钰

广东省科学院动物研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室 广州 510260

摘要: 龟嗜皮菌 (*Austwickia chelonae*) 感染爬行类、鸟类、哺乳类等, 造成野生动物和家养动物患皮肤病甚至死亡, 近年来这种病原体在 I 级保护动物鳄蜥 (*Shinisaurus crocodilurus*) 的救护种群中暴发。传统的病原检测方法费时耗力。本文基于龟嗜皮菌全基因组序列开发了特异性高、方便快捷的龟嗜皮菌检测方法, 并应用于鳄蜥的皮肤病风险预测。本研究开发的 3 对检测龟嗜皮菌的特异引物中, AC3 引物的使用效果最好。

关键词: 龟嗜皮菌; 鉴定; 皮肤病; 鳄蜥

中图分类号: Q95-3 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2021) 01-111-08

Rapid Identification of *Austwickia chelonae* and Its Application in Pathogenic Detection of Dermatitis in Crocodile Lizards

JIANG Hai-Ying CHEN Jin-Ping* HUANG Ming-Wei
LIN Li-Bo LI Lin-Miao ZHANG Xiu-Juan LI Guan-Yu

Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260, China

Abstract: *Austwickia chelonae* infects reptiles, birds, mammals, etc., causing skin diseases or deaths in the wild and domestic animals. In recent years, this pathogen outbreaked in the rescue population of the first-class protected animal—Crocodile Lizards (*Shinisaurus crocodilurus*). Traditional methods for pathogen detection are labor-consuming and time-costing. Therefore, this study developed a highly specific and convenient method for the detection of *Austwickia chelonae* based on its whole genome sequence, and applied this method to the risk prediction of skin disease in crocodile lizards. Among the three pairs of specific primers for *A. chelonae* detection developed in this paper, primer set AC3 shows the best results.

Key words: *Austwickia chelonae*; Identification; Dermatitis; Crocodile Lizard, *Shinisaurus crocodilurus*

基金项目 广东省科学院科技发展专项 (No. 2018GDASCX-0107, 2019GDASYL-0105046), 广州市科技创新委员会项目 (No. 201804020080), 国家林业和草原局项目 (No. 2020076079, 2019072);

* 通讯作者, E-mail: chenjp@giabr.gd.cn;

第一作者介绍 江海英, 女, 助理研究员; 研究方向: 野生动物疫病; E-mail: jianghywork@163.com。

收稿日期: 2020-09-16, 修回日期: 2020-11-25 DOI: 10.13859/j.cjz.202101013

嗜皮菌病宿主广泛，在哺乳类、鸟类、爬行类以及人类中均有报道（Wellehan et al. 2004, Burd et al. 2007, Amor et al. 2011, Hellebuyck et al. 2012, Gebreyohannes 2013, Nemeth et al. 2014, Aubin et al. 2016, Lunn et al. 2016, Scaglione et al. 2016, Tamukai et al. 2016, Caron et al. 2018, Shearnbochsler et al. 2018），是人兽共患皮肤病，主要在动物中传播，曾导致家养动物巨大经济损失（Shaibu et al. 2010, Ndhlovu et al. 2016）。

嗜皮菌病的病原体之一是龟嗜皮菌（*Austwickia chelonae*），属嗜皮菌科放线菌，是一种丝状的革兰氏阳性菌，在初始文献中被命名为 *Dermatophilus chelonae*（Masters et al. 1995），2010 年时被作为一个新属并将其学名修订为 *A. chelonae*（Hamada et al. 2010）。龟嗜皮菌导致的嗜皮菌病主要在爬行类中发现较多，最初于一种澳大利亚鳄龟（*Macrolemys temminckii*）中发现（Masters et al. 1995），并在王蛇（*Ophiophagus hannah*）中被分离到（Wellehan et al. 2004）。有报道称，日本的鬃狮蜥（*Pogona vitticeps*）曾暴发龟嗜皮菌和蛙病毒合并感染（Tamukai et al. 2016）；在实验中发现，中华石龙子（*Plestiodon chinensis*）亦会被感染（Jiang et al. 2019）。除了爬行类，龟、鸟类和哺乳类感染龟嗜皮菌的案例亦有被报道，如冠小嘴乌鸦（*Corvus orone ornix*，Scaglione et al. 2016）和牛（扬州大学 2013），注射龟嗜皮菌也会导致绵羊（*Ovis aries*）、白兔（*Oryctolagus cuniculus*）和豚鼠（*Cavia porcellus*）的嗜皮菌病（Masters et al. 1995）。

我国 I 级保护野生动物鳄蜥（*Shinisaurus crocodilurus*）素有“活化石”之称，全世界仅一千余只野生个体。近年，它的人工救护种群中暴发了严重的龟嗜皮菌感染，造成被感染鳄蜥运动和取食困难，如未及时处理，待病原扩散到体内后，会导致鳄蜥死亡（Jiang et al. 2019）。

根据对鳄蜥病原体的来源研究，鳄蜥感染

的龟嗜皮菌可能来源于它们生活的环境中。为了及时发现病原体、切断病原传播、避免将病原体传播到野生鳄蜥种群中，我们迫切需要能够快速检测龟嗜皮菌的方法，尤其是早期鉴定或者环境样本鉴定。

本文在我们前期获得的龟嗜皮菌全基因组序列的基础上（Jiang et al. 2018），开发了特异性好、成本低的龟嗜皮菌鉴定方法，服务于野生动物和家养动物的嗜皮菌病检测。并以鳄蜥为应用实例，将本次开发的特异引物用于检测无临床症状的鳄蜥皮肤微生物样品，预测鳄蜥患嗜皮菌病的风险，探讨鳄蜥感染的龟嗜皮菌是否来源于鳄蜥皮肤的正常菌群。

1 材料与方法

1.1 样品来源

龟嗜皮菌 LK16-18 为本实验室前期从患嗜皮菌病的鳄蜥中分离得到（Jiang et al. 2019）。用于引物特异性检验的验证菌株（表 1）均为不同时间段从患病的鳄蜥中分离得到。

用于检测的鳄蜥皮肤微生物样品采自广东罗坑鳄蜥国家级自然保护区救护饲养的鳄蜥。拍摄鳄蜥尾纹用于个体标记，用无菌棉签擦拭鳄蜥背部、腹部、前后肢、尾，让皮肤上的菌群粘在棉签上作为鳄蜥样本的皮肤拭子，保存于无水乙醇中，带回实验室提取 DNA。共采集 42 只鳄蜥的皮肤拭子，分别标记为 LKPF1 ~ LKPF42，其中，LKPF1 ~ LKPF7 采自该保护区大竹园的生态模拟池，LKPF8 ~ LKPF42 采自该保护区管理处的生态模拟池，采样时间均为 2018 年 11 月 24 日。

1.2 鉴定引物开发

根据前期组装好的龟嗜皮菌 LK16-18 基因组全序列（Jiang et al. 2018），用 Oligo7 软件在全基因组范围内设计特异引物，使用普通 *rTaq* 酶进行 PCR 扩增，初始扩增条件为 95 °C 3 min；35 个循环（95 °C 1 min，59 °C 1 min，72 °C 2 min）；72 °C 8 min，利用梯度 PCR 探索最佳退火温度，筛选出扩增条带单一的引物

及其最佳退火温度。选择 14 株从鳄蜥病灶中分离的归属不同门的革兰氏阴性或阳性的其他细菌以及混合 DNA, 进行引物的特异性验证, 用于验证的菌株见表 1。实验中使用的阳性对照 DNA 为龟嗜皮菌 LK16-18 的 DNA, 混合 DNA 由龟嗜皮菌 LK16-18 和其他 14 株用于验证的细菌的 DNA 配制而成。最后, 将引物用于扩增实验室前期获得的 8 个患嗜皮菌病的鳄蜥病灶 DNA 样品 (编号分别为 L.LK16、L.LK17 和 L.LK19 ~ L.LK22 以及 L.LK07、L.LK13) (Jiang et al. 2019), 验证引物的有效性。

1.3 鳄蜥皮肤中龟嗜皮菌的检测

将采集的鳄蜥皮肤拭子用 PowerFecal[®] DNA Isolation Kit 试剂盒 (MOBIO, 美国) 提取总 DNA, 提取过程中加入 20 g/L 溶菌酶。

用本文开发的龟嗜皮菌特异引物 AC1 和 AC3 进行 PCR 扩增, 用 LK16-18 菌株的 DNA 作为阳性对照, 用无菌超纯水作为阴性对照, 扩增程序为 95 °C 预变性 3 min, 35 个循环 (95 °C 45 s, 65 °C 45 s, 72 °C 1 min), 终延伸 8 min。

2 结果

2.1 龟嗜皮菌特异引物具有特异性与有效性

经过 PCR 验证, 有 3 对引物能扩增出龟嗜皮菌的特异片段, 分别将其命名为 AC1、AC2 和 AC3, 目的片段大小分别为 912 bp、1 846 bp 和 1 853 bp。

温度梯度 PCR 结果显示, AC1 引物在 55 ~ 65 °C 退火条件下都能扩增出目的条带 (图 1a)。在 65 °C 退火的条件下, 所有验证菌株均无非特异扩增, 成功从混合液中扩增出龟嗜皮菌的片段, 测序结果显示目的片段序列正确, 在 750 bp 以下出现弱的非特异扩增, 但不影响目的条带的判断 (图 2a)。退火温度较低时, 如 57 °C 退火的条件下, 也能成功从混合液中扩增出条带单一、序列正确的龟嗜皮菌片段, 但是, 在目的片段大小的位置有 4 个验证菌株出现片段大小相似的、弱的非特异扩增条带, 分别是肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enterica* LK18-19)、不动杆菌 (*Acinetobacter* sp. Exi5-53)、伊丽莎白菌 (*Elizabethkingia* sp. Exi2-17) 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp. Exi3-7)。在 57 °C 退火条件下, 将

表 1 用于引物特异性验证的菌株

Table 1 The bacterial strains used for primer specificity examination

菌株 Strain	革兰氏阳性/阴性 Gram positive/negative	所属的门 Phylum
类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus</i> sp. LK16-15	阳性 Gram positive	厚壁菌门 Firmicutes
肠炎沙门氏菌 <i>Salmonella enterica</i> LK18-19	阴性 Gram negative	变形菌门 Proteobacteria
保护假单胞菌 <i>Pseudomonas protegens</i> Exi5-13	阴性 Gram negative	变形菌门 Proteobacteria
恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i> DG56-2	阴性 Gram negative	变形菌门 Proteobacteria
气单胞菌 <i>Aeromonas</i> sp. Exi4-46	阴性 Gram negative	变形菌门 Proteobacteria
摩氏摩根菌 <i>Morganella morganii</i> DG56-16	阴性 Gram negative	变形菌门 Proteobacteria
不动杆菌 <i>Acinetobacter</i> sp. Exi5-53	阴性 Gram negative	变形菌门 Proteobacteria
不动杆菌 <i>Acinetobacter</i> sp. LK16-25	阴性 Gram negative	变形菌门 Proteobacteria
谷氨酸杆菌 <i>Glutamicibacter</i> sp. Exi1-5	阳性 Gram positive	放线菌门 Actinobacteria
白色杆菌 <i>Leucobacter</i> sp. Exi1-11	阳性 Gram positive	放线菌门 Actinobacteria
类节杆菌 <i>Paenarthrobacter</i> sp. Exi3-13	阳性 Gram positive	放线菌门 Actinobacteria
金黄杆菌 <i>Chryseobacterium</i> sp. Ex1-9	阴性 Gram negative	拟杆菌门 Bacteroidetes
伊丽莎白菌 <i>Elizabethkingia</i> sp. Exi2-17	阴性 Gram negative	拟杆菌门 Bacteroidetes
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp. Exi3-7	阳性 Gram positive	厚壁菌门 Firmicutes

AC1 引物用于患嗜皮菌病的鳄蜥病灶 DNA 的扩增, 目的条带片段大小正确, 无非特异扩增 (图 3a), 测序结果显示序列正确。说明 AC1 引物可用于病灶和混合样品中龟嗜皮菌的特异性检测。

AC2 引物在 60 ~ 65 °C 退火条件下均能扩增出条带单一的目的片段, 66 ~ 67 °C 时出现一条 1 000 bp 左右的非特异扩增条带, 且在 67 °C 时目的条带略变大, 但是, 测序结果显示序列是正确的。AC2 引物的最佳退火温度为 64 °C 和 65 °C (图 1b)。在 65 °C 退火的条件下, 所有验证菌株均未产生非特异扩增, 成功从混合液中扩增出龟嗜皮菌的片段, 测序显示目的片段的序列正确, 但是, 在 1 000 bp 左右有一条淡淡的非特异扩增条带 (图 2b)。在 65 °C 退火条件下, 将 AC2 引物用于患嗜皮菌病鳄蜥病灶 DNA 的扩增, 目的条带片段大小和序列均正确, 1 000 bp 处有一条弱的非特异扩增条带 (图

3b)。因此, AC2 引物也可用于病灶和混合样品中特异性检测龟嗜皮菌。

AC3 引物在 55 ~ 69 °C 退火条件下均能扩增出单一的目的条带, 70 ~ 71 °C 时出现 1 000 bp 左右的非特异扩增条带, 且条带位置略变大, 但与目的条带分开, 不影响目的条带的判断。AC3 引物的最佳退火温度为 63 ~ 65 °C (图 1c)。在 65 °C 退火的条件下, 所有的验证菌株均无非特异扩增, 成功从混合 DNA 中扩增出龟嗜皮菌的片段 (图 2c), 测序结果显示目的片段序列正确。65 °C 退火的条件下, 将 AC3 引物用于患嗜皮菌病的鳄蜥病灶 DNA 中龟嗜皮菌的检测, 目的条带片段大小正确、无非特异扩增 (图 3c), 测序结果显示序列正确。说明 AC3 引物也可用于病灶、混合样品中特异性检测龟嗜皮菌, 并且, AC3 引物的特异性优于 AC1 和 AC2 引物。

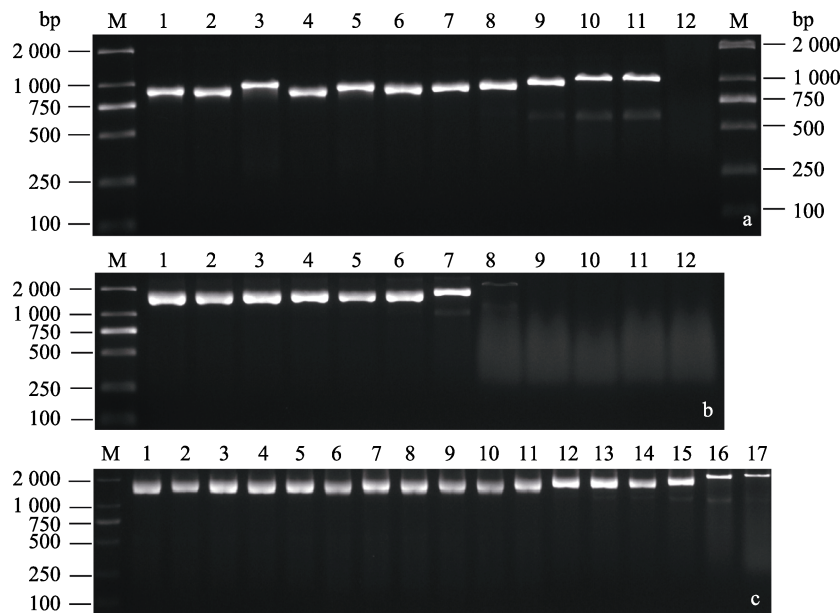


图 1 龟嗜皮菌 AC1 引物 (a)、AC2 引物 (b) 和 AC3 引物 (c) 的最佳退火温度摸索

Fig. 1 Optimal annealing temperature investigation for AC1 (a), AC2 (b) and AC3 (c) primer sets in *Austwickia chelonae*

M. DL2000 DNA 分子量标准; a. 1 ~ 11 退火温度 55 ~ 65 °C, 间隔 1 °C, 12 为无菌超纯水; b. 1 ~ 12 退火温度 60 ~ 71 °C, 间隔 1 °C; c. 1 ~ 17 退火温度 55 ~ 71 °C, 间隔 1 °C。

M. DL2000 Marker. a. 1 - 11 annealing temperature 55 - 65 °C, interval of 1 °C, 12. Sterile ultra-pure water. b. 1 - 12 annealing temperature 59 - 71 °C, interval of 1 °C. c. 1 - 17 annealing temperature 55 - 71 °C, interval of 1 °C.

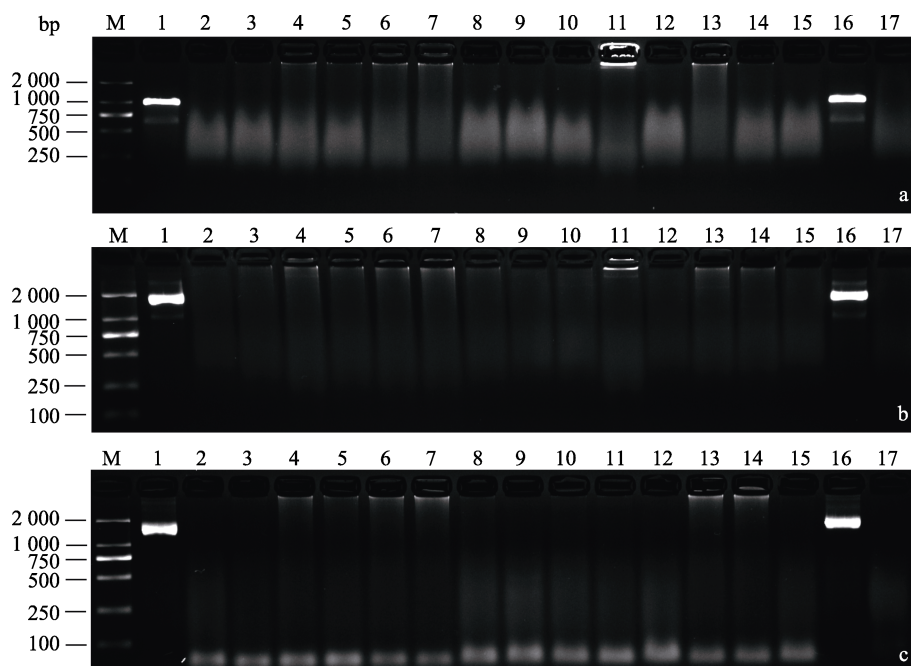


图2 龟嗜皮菌 AC1 引物 (a)、AC2 引物 (b) 和 AC3 引物 (c) 的特异性验证

Fig. 2 Specificity of AC1 (a), AC2 (b) and AC3 (c) primer sets for *Austwickia chelonae*

M. DL2000 DNA 分子量标准; 1. 阳性对照 (龟嗜皮菌 LK16-18); 2. 类芽孢杆菌 LK16-15; 3. 肠炎沙门氏菌 LK18-19; 4. 保护假单胞菌 Exi5-13; 5. 恶臭假单胞菌 DG56-2; 6. 气单胞菌 Exi4-46; 7. 摩氏摩根菌 DG56-16; 8. 不动杆菌 Exi5-53; 9. 不动杆菌 LK16-25; 10. 谷氨酸杆菌 Exi1-5; 11. 白色杆菌 Exi1-11; 12. 类节杆菌 Exi3-13; 13. 金黄杆菌 Ex1-9; 14. 伊丽莎白菌 Exi2-17; 15. 芽孢杆菌 Exi3-7; 16. 混合 DNA; 17. 阴性对照 (无菌超纯水)。

M. DL2000 Marker. 1. Positive control (*Austwickia chelonae* LK16-18). 2. *Paenibacillus* sp. LK16-15. 3. *Salmonella enterica* LK18-19. 4. *Pseudomonas protegens* Exi5-13. 5. *Pseudomonas putida* DG56-2. 6. *Aeromonas* sp. Exi4-46. 7. *Morganella morganii* DG56-16. 8. *Acinetobacter* sp. Exi5-53. 9. *Acinetobacter* sp. LK16-25. 10. *Glutamicibacter* sp. Exi1-5. 11. *Leucobacter* sp. Exi1-11. 12. *Paenarthrobacter* sp. Exi3-13. 13. *Chryseobacterium* sp. Ex1-9. 14. *Elizabethkingia* sp. Exi2-17. 15. *Bacillus* sp. Exi3-7. 16. Mixed DNA. 17. Negative control (Sterile ultra-pure water).

2.2 鳄蜥皮肤中龟嗜皮菌的快速检测

利用引物 AC3 检测 42 只鳄蜥皮肤样品中龟嗜皮菌 (图 4), 共有 10 个样品扩增出龟嗜皮菌, 阳性率为 23.81%。按照 PCR 扩增条带的明亮程度将它们分别记为强阳性、弱阳性和阴性。有 4 个样品为强阳性, 条带明亮, 它们分别是 LKPF8、LKPF17、LKPF21 和 LKPF30; 有 6 个样品为弱阳性, 有微弱的扩增条带, 它们分别是 LKPF14、LKPF28、LKPF31、LKPF35、LKPF40 和 LKPF41。用 AC1 引物验证也得到相似的结果。测序显示, 强阳性的样品序列与 LK16-18 菌株的序列相似度 100%。

3 讨论

龟嗜皮菌感染龟、蛇、蜥蜴、鸟、牛等动物 (Masters et al. 1995, 扬州大学 2013, Wellehan et al. 2004, Scaglione et al. 2016, Tamukai et al. 2016), 龟嗜皮菌特异引物的开发不仅为鳄蜥嗜皮菌病的快速诊断提供帮助, 也能辅助其他野生动物的疾病检测。

传统的鉴定方法主要通过培养分离、病理切片、显微观察菌丝等手段, 耗时费力。有报道利用 16S rRNA 基因序列设计定量 PCR 引物, 在扩增刚果嗜皮菌 (*D. congolensis*) 的同

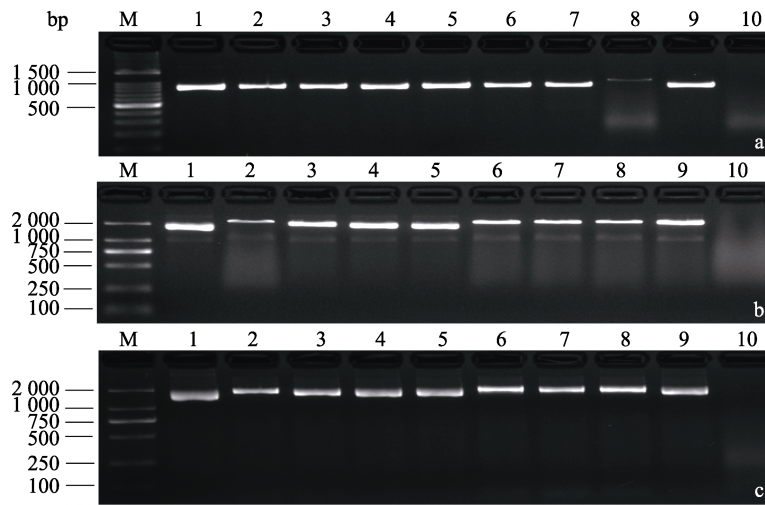


图3 龟嗜皮菌 AC1 引物 (a)、AC2 引物 (b) 和 AC3 引物 (c) 的有效性检验

Fig. 3 Effectiveness of AC1 (a), AC2 (b) and AC3 (c) primer sets for *Austwickia chelonae*

M. DL2000 DNA 分子量标准; 1. 阳性对照 (龟嗜皮菌 LK16-18); 2. L.LK16; 3. L.LK17; 4. L.LK19; 5. L.LK20; 6. L.LK21; 7. L.LK22; 8. L.LK07; 9. L.LK13; 10. 阴性对照 (无菌超纯水)。

M. DL2000 Marker. 1. Positive control (*Austwickia chelonae* LK16-18). 2. L.LK16. 3. L.LK17. 4. L.LK19. 5. L.LK20. 6. L.LK21. 7. L.LK22. 8. L.LK07. 9. L.LK13. 10. Negative control (Sterile ultra-pure water).

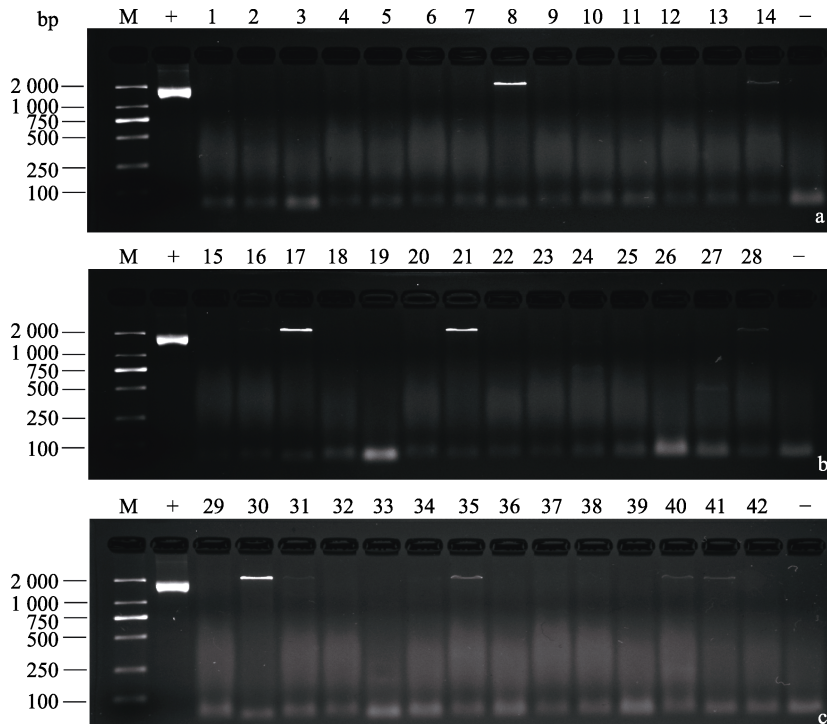


图4 鳄鱼皮肤中龟嗜皮菌的检测结果 (AC3 引物)

Fig. 4 Detection of *Austwickia chelonae* in the skin of crocodile lizards (AC3 primer set)

M. DL2000 DNA 分子量标准; +. 阳性对照 (龟嗜皮菌 LK16-18); 1~42. LKPF1~LKPF42; -. 阴性对照 (无菌超纯水)。

M. DL2000 Marker. +. Positive control (*Austwickia chelonae* LK16-18). 1-42. LKPF1-LKPF42. -. Negative control (Sterile ultra-pure water).

时扩增出龟嗜皮菌, 通过熔解温度对两者进行区分, 从而达到快速鉴定的目的(扬州大学 2013)。16S rRNA 基因序列保守性高, 常用于细菌鉴定, 但也正由于其保守性强, 很容易同时扩增出相近菌株的序列。另一方面, 荧光定量 PCR 试剂和仪器价格高, 成本高。本研究基于龟嗜皮菌的全基因组序列开发了 3 对特异引物, 扩增产物不在保守区序列, 物种特异性高, 不易扩增出相近菌株。经验证, 本研究开发的 3 对引物都有效, 仅通过电泳检测即可初步判断检测结果, 其中, AC3 引物的特异性最好, AC1 引物片段最小, 用时最少, 成功将它们应用于病灶中龟嗜皮菌的检测。本文开发的龟嗜皮菌的鉴定方法具有特异性和灵敏度高、成本低、操作简单的特点。

在最佳扩增温度摸索实验中发现, 退火温度增高可以提高引物的特异性, 降低在其他验证菌株中的非特异扩增。但是, 当温度达到一定程度后会出现比目的片段小的淡淡的非特异条带, 说明退火温度太高也会出现非特异性扩增。在使用时, 推荐的退火温度 AC1 引物为 58 ~ 62 °C, AC2 引物为 64 °C 和 65 °C, AC3 引物最好在 55 ~ 69 °C, 以 63 ~ 65 °C 为最佳。

将开发的引物应用于鳄蜥皮肤微生物的检测时发现, 检出龟嗜皮菌阳性的 10 个鳄蜥皮肤样品均来自广东罗坑鳄蜥国家级自然保护区管理处的生态模拟池, 说明此处的龟嗜皮菌未被消除干净, 其他鳄蜥有被传染的风险, 需要继续对生态模拟池进行定期消毒。

参 考 文 献

- Amor A, Enríquez A, Corcuera M T, et al. 2011. Is infection by *Dermatophilus congolensis* underdiagnosed? *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1): 449–451.
- Aubin G G, Guillouzoic A, Chamoux C, et al. 2016. Two family members with skin infection due to *Dermatophilus congolensis*: a case report and literature review. *European Journal of Dermatology*, 26(6): 621–622.
- Burd E M, Juzych L A, Rudrik J T, et al. 2007. Pustular dermatitis caused by *Dermatophilus congolensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(5): 1655–1658.
- Caron T J, Artim S C, Israelsen W J, et al. 2018. Cutaneous dermatophilosis in a meadow jumping mouse (*Zapus hudsonius*). *Comparative Medicine*, 68(1): 25–30.
- Gebreyohannes M. 2013. An overview on dermatophilosis of animals. *Journal of Animal Science Advances*, 3(7): 337–344.
- Hamada M, Iino T, Iwami T, et al. 2010. *Mobilicoccus pelagius* gen. nov., sp. nov. and *Piscicoccus intestinalis* gen. nov., sp. nov., two new members of the family Dermatophilaceae, and reclassification of *Dermatophilus chelonae* (Masters et al. 1995) as *Austwickia chelonae* gen. nov., comb. nov. *Journal of General and Applied Microbiology*, 56: 427–436.
- Hellebuyck T, Pasmans F, Haesebrouck F, et al. 2012. Dermatological diseases in lizards. *The Veterinary Journal*, 193(1): 38–45.
- Jiang H Y, Huang M W, Lin L B, et al. 2018. Complete genome sequence of *Austwickia chelonae* LK16-18, isolated from crocodile lizards. *Microbiology Resource Announcements*, 7(16): e01140–01118.
- Jiang H, Zhang X, Li L, et al. 2019. Identification of *Austwickia chelonae* as cause of cutaneous granuloma in endangered crocodile lizards using metataxonomics. *PeerJ*, 7: e6574.
- Lunn T, Macgregor J, Munks S, et al. 2016. *Dermatophilus congolensis* Infection in Platypus (*Ornithorhynchus anatinus*), Tasmania, Australia, 2015. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(4): 965–967.
- Masters A M, Ellis T M, Carson J M, et al. 1995. *Dermatophilus chelonae* sp. nov., isolated from chelonids in Australia. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1): 50–56.
- Ndhlovu D N, Masika P J. 2016. Bovine dermatophilosis: Awareness, perceptions and attitudes in the small-holder sector of north-west Zimbabwe. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 83(1): 1004.
- Nemeth N M, Ruder M G, Gerhold R W, et al. 2014. Demodectic mange, dermatophilosis, and other parasitic and bacterial dermatologic diseases in free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in the United States from 1975 to 2012. *Veterinary Pathology*, 51(3): 633–640.

- Scaglione F E, Cucuzza L S, Pregel P, et al. 2016. *Dermatophilus* spp. and *Candida* spp. infections in free-living hooded crows (*Corvus corone cornix*). *Journal of Comparative Pathology*, 154: 119.
- Shaibu S J, Kazeem H M, Abdullahi U S, et al. 2010. The use of polymerase chain reaction in the diagnosis of dermatophilosis from cattle, sheep and goats in Nigeria. *Journal of Animal & Veterinary Advances*, 9(6): 1034–1036.
- Shearnbochsler V, Schulz J L, Dobbs R C, et al. 2018. Novel dermatophilosis and concurrent amyloidosis in sanderlings (*Calidris alba*) from Louisiana, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 54(1): 189–192.
- Tamukai K, Tokiwa T, Kobayashi H, et al. 2016. Ranavirus in an outbreak of dermatophilosis in captive inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*). *Veterinary Dermatology*, 27(2): 99–105.
- Wellehan J F, Turenne C, Heard D J, et al. 2004. *Dermatophilus chelonae* in a king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Journal of Zoo & Wildlife Medicine*, 35(4): 553–556.
- 扬州大学. 2013. 一种刚果嗜皮菌和龟型嗜皮菌的荧光定量 PCR 引物、探针及试剂盒. [P/OL]. [2020-08-30]. <http://epub.sipo.gov.cn/gjcx.jsp>.