

密 级： 公开

学校代码： 10693

གཞི་རྒྱུ་གླིང་གི་འཕྲོད་ཕྱིན་པའི་སློབ་མཁན་གྱི་ལས་ཁུངས་

西藏农牧学院

硕士学位论文



牦牛腹泻粪便菌群多样性分析及致病性  
大肠杆菌的研究

姓 名： 王冰艺

学 号： 202100200142

领 域： 兽医

研究方向： 高原动物传染病学

指导教师： 董海龙

校外导师： 曾江勇

学 院： 动物科学学院

完成日期： 2023年5月

中国 西藏 林芝

Confidentiality level: public

University code: 10693

Thesis for Master's Degree  
Tibet Agricultural and Animal Husbandry University

*DIVERSITY ANALYSIS OF FECAL BACTERIA IN  
YAK DIARRHEA AND STUDY ON PATHOGENIC  
ESCHERICHIA COLI*

Name of Postgraduate : Wang Bingyi

Postgraduate number : 202100200142

Field : Veterinarian

Research direction : Plateau Zoodemiology

Adviser : Dong Hailong

Off-campus supervisor: Zeng Jiangyong

Department(Part) : College of Animal Science

Date of submission : May,2023

Linzi Tibet China

# 资金项目

“国家自然科学基金”：  
miR-128 靶向 GAREM 调控 ERK/MAPK 信号通路影响牦牛子宫  
内膜炎症损伤的分子机制  
(32060820)

“西藏自治区自然科学基金项目”：  
牦牛子宫内膜炎差异 miRNAs 表达谱的筛选及其调控机制研究  
(XZ202101ZR0024G)

“西藏自治区重点研发项目”：  
西藏地区牦牛专用抗春季腹泻病益生菌制剂的研发  
(XZ201902NB05)

“十四五重大科技专项”：  
牦牛重要疫病防控技术研究--牦牛主要传染病快速检测方法建立  
及防控技术研究  
(XZ202101ZD0002N-05)

“国家自然科学基金”：  
乳酸杆菌靶向 MAPK/Zonulin 信号轴调节牦牛肠道黏膜屏障及病  
原菌易位的作用机制  
(32160857)

## 摘要

我国牦牛总数约 1 400 余万头，占世界牦牛总数的 90%，可分为“横断高山型”和“青藏高原型”两大类型。牦牛的生活环境在 3 000 米以上的海拔高、氧气少、昼夜温差大的高原高山地带，因此造就了牦牛对生态环境的极强适应性。近年来，牦牛养殖行业在青藏高原地区发展迅速，给当地牧民及整个养殖业都带来巨大的经济效益。但是由大肠杆菌引起的牦牛腹泻给西藏地区牦牛产业造成了极大的影响。同时，由于抗生素类药物的不合理使用，引发的耐药性问题；以及牦牛源致病性大肠杆菌与肠道菌群多样性之间的关系也是本试验旨在研究的重点。本试验探讨了由大肠杆菌引起的牦牛腹泻粪便的微生物区系丰度变化；对牦牛源致病性大杆菌进行了分离鉴定、毒力检测和耐药性检测，并对其结果进行生物信息学分析，为找到行之有效的治疗牦牛腹泻的方法提供依据。具体研究工作如下：

### 1. 牦牛腹泻粪便中微生物菌群多样性分析

采用了 16s rDNA 基因测序的方法对牦牛腹泻粪便微生物菌群的多样性进行了分析。研究人员发现，在门分类水平下，厚壁菌门（Firmicutes）、放线菌门（Actinobacteriota）、变形菌门（Proteobacteria）和拟杆菌门（Bacteroidia）是牦牛粪便微生物菌群的优势菌群，在科分类水平下，微球菌科（Micrococcaceae）、动球菌科（Planococcaceae）、颤螺菌科（Oscillospiraceae）、梭菌科（Clostridiaceae）、毛螺菌科（Lachnospiraceae）和肠杆菌科（Enterobacteriaceae）是牦牛粪便微生物菌群的优势菌群。在属分类水平下，节杆菌属（*Arthrobacter*）、芽孢杆菌属（*Bacillus*）、土壤芽孢杆菌属（*Solibacillus*）和志贺氏埃希菌属（*Escherichia-Shigella*）是牦牛粪便微生物菌群的优势菌群。在门水平上，牦牛腹泻组粪便微生物群落中的变形菌门（Proteobacteria）、苜蓿菌门（Patescibacteria）、蓝藻（Cyanobacteria）和纤维杆菌门（Fibrobacterota）与健康牦牛组粪便微生物群落相比显著增多，而拟杆菌门（Bacteroidia）则显著减少。变形杆菌属（*Proteobacteri*）主要包括大肠杆菌、幽门螺旋杆菌和沙门氏菌等常常引起动物腹泻的致病菌，这表示牦牛腹泻可能主要是由 *Proteobacteria* 的菌群丰度增加引起的。

### 2. 牦牛腹泻粪便大肠杆菌的分离鉴定

采用常规方法进行样本细菌的分离提纯,同时将样本进行分离培养后通过革兰氏染色,然后将这些菌株进行 O-抗原血清型鉴定和分离菌 16s rRNA 鉴定,最终确定此项目中分离的菌株数以及血清型。本研究从采集的 59 份腹泻牦牛粪便样品中分离鉴定出 59 株大肠杆菌,分离率为 100%。大肠杆菌 O-抗原血清型鉴定结果为,分离的 59 株大肠杆菌有 42 株确定了血清型(71.19%),属于 14 种不同的血清型,其中 O1、O111 和 O128 为优势血清型,分别占比 11.86%(7/59), 11.86%(7/59) 和 8.47%(5/59)。

### 3.腹泻牦牛致病性大肠杆菌常见毒力因子检测

采用常规 PCR 的方法对分离鉴定的 59 株牦牛源大肠杆菌毒力基因携带情况进行检测,PCR 检测范围为常见的与耶尔森强毒力岛有关的 *irp2* 和 *FyuA*; 控制黏附素表达的基因 F41、K88、K99、987P 和 F18; 与产志贺毒素相关的毒力基因 *Stx1* 和 *Stx2* 等。结果表明,在 14 种牛源常见的致病性大肠杆菌相关毒力基因中,检测出来 *irp2*、*FyuA*、K99、987P、*Stx1*、*Stx2*、STb、*eaeA* 和 *HlyA* 这 9 种毒力基因,检测率分别为 20.34%、23.73%、94.91%、71.19%、3.39%、5.08%、93.22%、5.08%和 50.85%。F41、LT、STa、K88、F18 这 5 种毒力基因均未被检测到。通过毒力基因检测发现腹泻牦牛粪便分离出的大肠杆菌菌株携带毒力基因较多,可能与当地常年来饲养模式有关。

### 4.牦牛源致病性大肠杆菌耐药性分析

采用常规 PCR 的方法对分离的 59 株牦牛源大肠杆菌进行了常见的耐药基因检测,PCR 检测范围为常见的磺胺类、四环素类、氨基糖苷类和 $\beta$ -内酰胺类共四类 19 种耐药基因。结果表明,有 11 种耐药基因被检测到,包括 *sul1*、*sul2*、*tetA*、*tetE*、*aacC2*、*aacC4*、*aadA1*、*aadA2*、*aac(3)-11a*、SHV 和 TEM,检测率分别为 23.73%、44.07%、27.12%、62.71%、6.78%、10.17%、25.42%、55.93%、81.36%、8.47%和 50.85%,其余耐药基因均未被检测到。可以看出携带率最高的为 *aac(3)-11a* (81.36%),其次为 *tetE* (62.71%)、*aadA2* (55.93%)、TEM (50.85%) 和 *sul2* (44.07%), $\beta$ -内酰胺类耐药基因的检出率最高,应减少此类药物的使用。药敏试验结果显示,59 株牦牛源大肠杆菌对红霉素(88.14%)和克林霉素(98.31%)也高度耐药,其次是四环素(50.85%),对头孢他啶(30.51%)也有一定的耐药性。

### 5. 牦牛源大肠杆菌的致病性研究

小鼠在攻毒后 6 h 内均出现精神沉郁、食欲废绝和被毛粗乱，多数小鼠出现畏寒扎堆、腹泻等症状。其中在注射 F34 和 F42 菌液 3 h 内，小鼠全部死亡；注射 F8 和 F13 菌液 6 h 内，小鼠全部死亡；其他组小鼠在攻毒 12~72 h 后全部死亡。剖检死亡小鼠发现：小鼠腹腔有积液，脾脏肿大明显，肺脏充血，心脏肿大淤血，肝脏质脆易碎，肠壁变薄，肠系膜充血，肠道内有黄色稀便。同时，采用病理组织切片的方法对攻毒小鼠脏器进行观察，在显微镜下发现其出现了不同程度的病理性损伤。肺：肺组织呈弥漫性出血，血管淤血，部分肺泡囊融合形成腔体，少量纤维素性渗出，肺泡细胞坏死，坏死肺泡结构相互融合。肝：肝细胞结构排列无明显异常，汇管区小叶间动脉充血，小叶间静脉淤血，胆小管内充满血液，中央静脉淤血。脾：脾脏红髓白髓分布无明显异常，脾索结构无明显异常，结缔组织增厚。肾：部分肾近曲小管内充满血液，肾小管上皮细胞轻度空泡变性，刷毛边缘脱落，细胞扁平，管腔扩张。心：心肌呈条带状出血，部分心肌纤维断裂，静脉淤血。肠：肠上皮细胞变性坏死，出血严重，绒毛变短脱落，肠腔内有大量脱落的上皮细胞，基底膜下层水肿出血。

综上所述，本研究分离鉴定出的 59 株大肠杆菌，经过 O-抗原血清型鉴定发现 O1、O111 和 O128 为优势血清型。通过对导致牦牛腹泻的致病性大肠杆菌与粪便微生物菌群的多样性分析，发现牦牛腹泻可能主要是由 *Proteobacteria* 的菌群丰度增加引起的；同时所分离的 59 株大肠杆菌普遍携带有多个毒力基因，而牦牛源大肠杆菌与牛源大肠杆菌的黏附素表达种类明显不同。在大肠杆菌的致病性实验中，结果表明，这些致病菌对实验小鼠具有明显的致死性感染。

**关键词：** 牦牛，粪便微生物菌群，致病性大肠杆菌，分离鉴定，耐药性

## Abstract

The total number of yaks in China is about 14 million, accounting for 90% of the world's total, which can be divided into two types: "Hengduan high mountain type" and "Qinghai-Tibet Plateau type". The living environment of yaks is in the high altitude, low oxygen and high temperature difference between day and night, which makes yaks have a strong adaptability to the ecological environment. In recent years, yak breeding industry has developed rapidly in the Qinghai-Tibet Plateau region, bringing huge economic benefits to local herdsman and the whole breeding industry. However, the yak diarrhea caused by *E. coli* has greatly affected the yak industry in Tibet. At the same time, the problem of drug resistance caused by the irrational use of antibiotics; And the relationship between yak pathogenic *E. coli* and intestinal flora diversity is also the focus of this study. The variation of fecal microflora in yak diarrhea caused by *E. coli* was studied in this experiment. The pathogenic macrobacillus from yak was isolated, identified, virulence detected and drug resistance detected, and the results were analyzed by bioinformatics, which provided the basis for finding effective methods to treat yak diarrhea. Specific research work is as follows:

### 1. Diversity analysis of microbial flora in yak diarrhea feces

The diversity of fecal microflora of yak with diarrhea was analyzed by 16s rRNA gene sequencing. We found that at the phylum classification level, Firmicutes, Actinobacteriota, Proteobacteria and Bacteroidia were the dominant bacterial flora in yak feces. At the family classification level, Micrococcaceae, Planococcaceae, Oscillospiraceae, Clostridiaceae, Lachnospiraceae and Enterobacteriaceae were the dominant bacterial flora in yak feces. At the genus classification level, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Solibacillus* and *Escherichia-Shigella* were the dominant bacteria in the faecal microflora of yak. At phylum level, Proteobacteria, Patescibacteria, Cyanobacteria and Fibrobacterota in faecal microbial community of yak diarrhea group increased significantly compared with that of healthy yak group. But Bacteroidia decreased

significantly. Proteobacteria mainly includes *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* and other pathogenic bacteria that often cause diarrhea in animals. This suggests that the diarrhoea of yaks may be mainly caused by the increase in the abundance of Proteobacteria.

### 2. Isolation and identification of *E. coli* from yak diarrhea feces

The sample bacteria were isolated and purified by conventional methods. At the same time, the samples were isolated and cultured by Gram staining. Then, the O-antigen serotype identification and 16s rRNA identification of the isolated bacteria were carried out to determine the number and serotype of the isolated bacteria in this project. In this study, 59 strains of *E. coli* were isolated and identified from 59 samples of diarrhea yak feces, and the isolation rate was 100%. The serotype identification results of *E. coli* O-antigen showed that 42 (71.19%) of the 59 isolates were identified as serotypes, belonging to 14 different serotypes, of which O1, O111 and O128 were the dominant serotypes, accounting for 11.86% (7/59) respectively. 11.86% (7/59) and 8.47% (5/59).

### 3. Detection of common virulence factors of pathogenic *E. coli* in yaks with diarrhea in Tibet

The virulence genes of 59 strains of *E. coli* from Yak were detected by conventional PCR. The detection range of PCR was *irp2* and *FyuA*, which were commonly associated with Yersen's virulence island. The genes *F41*, *K88*, *K99*, *987P* and *F18* controlling the expression of adhesin; Virulence genes *Stx1* and *Stx2* related to shiga toxin production. The results showed that only nine virulence genes, *irp2*, *FyuA*, *K99*, *987P*, *Stx1*, *Stx2*, *STb*, *eaeA* and *HlyA*, were detected among 14 common pathogenic *E. coli* virulence genes from cattle. The detection rates were 20.34%, 23.73%, 94.91%, 71.19%, 3.39%, 5.08%, 93.22%, 5.08% and 50.85%, respectively. Five virulence genes, *F41*, *LT*, *STa*, *K88* and *F18*, were not detected. Virulence gene test showed that *E. coli* strains isolated from diarrhea yak feces in Tibet area carried more virulence genes, which may be related to the perennial stocking habit in Tibet.

#### 4. Drug resistance analysis of pathogenic *E. coli* from yak

The common drug resistance genes of 59 strains of *E. coli* from yak were detected by conventional PCR. The range of PCR detection were 19 kinds of drug resistance genes, including four classes of common sulfonamides, tetracycline, aminoglycosides and  $\beta$ -lactam. The results showed that 11 drug resistance genes were detected, including *sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetE*, *aacC2*, *aacC4*, *aadA1*, *aadA2*, *aac(3)-11a*, SHV and TEM. The detection rates were 23.73%, 44.07%, 27.12%, 62.71%, 6.78%, 10.17%, 25.42%, 55.93%, 81.36%, 8.47% and 50.85%, respectively. The other resistance genes were not detected. It can be seen that *aac(3)-11a* (81.36%) had the highest carrying rate, followed by *tetE* (62.71%), *aadA2* (55.93%), TEM (50.85%) and *sul2* (44.07%). The detection rate of  $\beta$ -lactam resistance genes was the highest, so the use of such drugs should be reduced. The results of drug susceptibility test showed that 59 strains of *E. coli* from yak were 88.14% to erythromycin and 98.31% to clindamycin. It was also highly resistant, followed by tetracycline (50.85%) and ceftazidime (30.51%).

#### 5. Study on the pathogenicity of *E. coli* from yak

Within 6 h after the challenge, the mice all showed depression, loss of appetite and coarse hair, and most of the mice showed symptoms such as chills clustering and diarrhea. All mice died within 3 h after injection of F34 and F42, 6 h after injection of F8 and F13, and 12 to 72 h after challenge of other groups. Necropsy of the dead mice showed that there was fluid in the abdominal cavity, spleen enlargement, lung congestion, enlarged heart congestion, brittle liver, thinning of the intestinal wall, mesenteric congestion, and yellow loose stool in the intestine. At the same time, pathological tissue sections were used to observe the organs of challenged mice. Under the microscope, it was found that different degrees of pathological injury appeared. Lung tissue showed diffuse bleeding, vascular congestion, part of alveolar sacs fused to form lumen, a small amount of cellulose exudation, alveolar cell necrosis, and necrotic alveolar structures fused with each other. Liver: There were no obvious

abnormalities in the structure of liver cells, interlobular artery congestion in the portal area, interlobular vein congestion, blood filling in the duct, and central vein congestion. Spleen: There was no obvious abnormality in the distribution of red pulp and white pulp in the spleen, no obvious abnormality in the splenic cord structure, and the connective tissue thickened. Kidney: Some of the proximal convoluted tubules of the kidney are filled with blood, the tubular epithelial cells of the kidney are mildly vacuolar degeneration, the edge of the bristles is shed, the cells are flattened, and the lumen is dilated. Heart: The myocardium showed banded bleeding, some myocardial fibers were broken, and venous congestion. Intestine: The epithelial cells of the intestine are denaturated and necrotic, bleeding is severe, the villi become short and fall off, there are a large number of shed epithelial cells in the intestinal cavity, and the subbasement membrane is edema and bleeding.

In summary, 59 strains of *E. coli* were isolated and identified from 80 stool samples of yak diarrhea in this study, and O1, O111 and O128 were found to be the dominant serotypes after O-antigen serotype identification. Through the diversity analysis of pathogenic *E.coli* and fecal microflora causing yak diarrhea, it was found that the increase in the abundance of Proteobacteria might be the main cause of yak diarrhea. At the same time, the 59 *E. coli* isolates generally carried multiple virulence genes, and the expression types of adhesion in yak *E. coli* and bovine *E. coli* were obviously different. In the pathogenicity experiment of *E. coli*, the results show that these pathogenic bacteria have obvious fatal infection to experimental mice.

Key words: yak, fecal microflora, pathogenic *Escherichia coli*, isolation and identification, drug resistance

# 目 录

第一章 文献综述 .....	1
1.1 肠道菌群研究进展 .....	1
1.1.1 牛肠道菌群生理功能 .....	1
1.1.2 牦牛胃肠道菌群多样性 .....	1
1.1.3 影响牦牛胃肠道微生物群落因素 .....	3
1.2 大肠杆菌的研究进展 .....	6
1.2.1 不同致病性大肠杆菌及相关毒力因子 .....	7
1.2.2 大肠杆菌耐药基因及耐药机理 .....	9
1.2.3 大肠杆菌血清型 .....	11
1.3 研究目的及意义 .....	11
第二章 腹泻与健康牦牛粪便菌群多样性分析 .....	12
2.1 材料 .....	12
2.1.1 样品来源 .....	12
2.1.2 DNA 提取和 16S rDNA 扩增 .....	12
2.1.3 生物信息学和统计分析 .....	12
2.2 结果 .....	13
2.2.1 序列分析 .....	13
2.2.2 各组牦牛肠道微生物多样性分析 .....	14
2.2.3 各组牦牛肠道细菌分类组成的显著变化 .....	15
2.3 讨论 .....	17
第三章 牦牛源大肠杆菌的分离鉴定 .....	19
3.1 材料 .....	19
3.1.1 样品来源 .....	19
3.1.2 主要试剂及仪器 .....	19
3.2 方法 .....	20
3.2.1 牦牛源大肠杆菌的分离培养 .....	20
3.2.2 牦牛源大肠杆菌 DNA 的制备 .....	20
3.2.3 牦牛源大肠杆菌的鉴定 .....	20
3.2.4 O-抗原血清型实验 .....	20
3.3 结果 .....	21
3.3.1 大肠杆菌分离培养结果 .....	21
3.3.2 革兰氏染色镜检结果 .....	21
3.3.3 分离菌 16s rRNA 鉴定结果 .....	21
3.3.4 O-抗原血清型实验结果 .....	22

3.4 讨论.....	22
第四章 腹泻牦牛大肠杆菌毒力基因检测和耐药性研究 .....	24
4.1 材料.....	24
4.1.1 受试菌株.....	24
4.1.2 主要仪器.....	24
4.1.3 引物的合成.....	25
4.2 方法.....	26
4.2.1 毒力基因研究.....	26
4.2.2 耐药性研究.....	27
4.2.3 致病性研究.....	29
4.3 结果.....	31
4.3.1 毒力基因检测结果.....	31
4.3.2 耐药性检测结果.....	34
4.3.3 致病性研究结果.....	38
4.4 讨论.....	40
结论.....	42
参考文献.....	43

## 第一章 文献综述

### 1.1 肠道菌群研究进展

#### 1.1.1 牛肠道菌群生理功能

动物胃肠道内的微生物主要以两种方式存在:(1)固定菌群,与肠道上皮紧密相连,形成更加稳固的微生物生态系统,维持着胃肠道微生态平衡;(2)过路菌群,在肠道内呈游离状态,无法在动物肠道内定居生长。大量研究表明,胃肠道内的微生物可以为宿主带来众多益处<sup>[1-3]</sup>,比如反刍动物瘤胃内微生物可以将粗纤维含量高的物质消化,使动物机体吸收。但动物胃肠道内不全是有益菌,还有致病菌,能引起宿主疾病的肠道菌,一般情况下该菌是无法长期定植在健康动物机体的肠道中;以及条件致病菌,当机体平衡遭到破坏时,所产生的一类致病细菌,在机体内益生菌占优势时无害,但是当机体被侵染时却会加重宿主损伤程度,如大肠杆菌等。

胃肠道中定植的微生物在动物体消化吸收营养物质的过程中具有关键作用,而且对于激活和调节免疫应答以及防止病原体定植至关重要<sup>[4]</sup>。免疫系统反过来也会对肠道菌群的结构构成产生影响,它们之间存在大量的信号通路作为相互作用的媒介。肠道黏膜可以分泌一种特殊的黏蛋白,可作为肠道内容物与肠上皮细胞的免疫屏障作用,分布在整个肠道管腔的上皮组织,不仅具有保护作用,微生物在肠道定植过程中的作用也十分显著。牛的胃肠道生态系统能帮助宿主消化机体自身难以降解的粗纤维物质获得能量,还可以降解牛在代谢时所生成的有害物质。

在宿主肠道中存在一部分共生微生物,并且这些共生微生物的数量是宿主本体细胞的数倍<sup>[5]</sup>,在近年来的研究中,肠道菌群的功能至关重要,尤其对宿主健康免疫具有关键的调控作用<sup>[6,7]</sup>。虽然,肠道菌群与动物机体的健康息息相关,肠道中的菌群结构十分复杂,其中不是所有微生物群落都对宿主的健康有益,也有一些菌群会对宿主的健康造成威胁。过去的研究中,由于没有对肠道菌群的平衡充分认识,滥用抗生素造成肠道菌群破坏。滥用抗生素,不仅破坏了肠道菌群的结构组成,使肠道菌群动态平衡无法维持,同时还可能会引发肠道疾病。肠道菌群平衡一旦被破坏,就很难恢复正常,健康的肠道菌群平衡可以保护机体的健康,肠道菌群与宿主之间发生相互作用,增强免疫屏障功能,同时刺激免疫系统分泌杀菌物质,对肠道内致病菌的定植有抑制作用。

#### 1.1.2 牦牛胃肠道菌群多样性

##### 1.1.2.1 牦牛瘤胃细菌多样性

和所有牛家族成员一样,牦牛胃肠道的消化吸收由瘤胃主导,与其他胃肠段相比,牦牛的瘤胃微生物群高细菌负荷。基于扩增子测序的研究中发现,在门水平上,拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和变形菌门(*Proteobacteria*)为优势菌群;属水平上,拟杆菌属(*Bacteroides*)和普雷沃氏菌属(*Prevotella*)为优势菌群<sup>[8]</sup>。Ren等<sup>[9]</sup>发现牦牛瘤胃的固体、液体、背侧和腹侧上皮部分中的细菌群落存在显著差异。其中,理研菌科 RC9 (*Rikenellaceae* RC9)、毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*)和疣微菌科 (*Verrucomicrobiaceae*)以及纤维杆菌属 (*Cellulomonas*) 在固体部分中富集,而普雷沃氏菌属和 *Prevotellaceae* UCG 003 属在液体部分中含量较高。弯曲杆菌属 (*Campylobacter*)、丛毛单胞菌属 (*Comamonas spp*) 和脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio spp*) 在背上皮中显著较高,而霍瓦德拉属 (*Howardella*)、*Prevotellaceae* UCG 001、瘤胃球菌科 UCG 005 (*Rumenococci* UCG 005) 和密螺旋体 2 (*Treponema 2*) 在腹上皮富集。黄色瘤胃球菌 (*Ruminococcus flavefacien*)、白色瘤胃球菌 (*Ruminococcus albuss*)、琥珀酸纤维杆菌 (*Fibrobacter succinogenes*) 是主要的纤维降解菌,而 *Prevotella ruminicola* 和双发酵梭状芽胞杆菌 (*Clostridium bifermentans*) 是主要的蛋白降解菌,右旋糖苷琥珀酸弧菌 (*Succinivibrio dextrinosolvans*)、溶淀粉琥珀弧菌 (*Succinivibrio amylolytica*)、嗜淀粉瘤胃杆菌 (*Ruminobacter amylophilus*) 和瘤胃硒单胞菌 (*Selenomonas ruminantium*) 是主要的淀粉降解菌<sup>[10]</sup>。Guo等<sup>[11]</sup>采用 16S rRNA 高通量测序技术,对牦牛瘤胃微生物区系进行分析,共获得 7 200 个操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU),其中 6 642 个 OTU 均为细菌。拟杆菌 (39.68%) 和厚壁菌 (45.90%) 是主要门类,与粟雨芯<sup>[12]</sup>报道一致。

#### 1.1.2.2 牦牛肠道细菌多样性

肠道分为小肠 (十二指肠、空肠、回肠) 和大肠 (盲肠、结肠、直肠), 由于其庞杂的结构组成, 因此每个肠段的菌群分布和功能各不相同。Ma等<sup>[13]</sup>比较了青藏高原生长迟缓和正常牦牛胃肠道细菌群落。阿尔法多样性 (Alpha,  $\alpha$ ) 表明, 正常组十二指肠和回肠的香农多样性指数 (Shannon's Diversity Index, Shannon) 高于生长迟缓组。然而, 在空肠和盲肠中发现了相反的趋势。主坐标分析 (Principal Coordinates Analysis, PCoA) 表明, 两组间各胃肠段的细菌结构存在差异。Wang等<sup>[14]</sup>研究包括了在牦牛所有发育阶段中细菌门 (厚壁菌门、拟杆菌门、螺旋藻门、软毛菌门、变形菌门和蓝藻门) 和真菌门 (壶菌门、摩苔菌门、新缘乳菌门、子囊菌门和担子菌门) 的丰度和比例的显著变化。随着牦牛年龄的增长, 变异减少, 而多样性增加。粟雨芯<sup>[12]</sup>还发现厚壁菌门在牦牛的十二指肠、回肠、盲肠到结肠的丰度呈增加趋势。Zhang等<sup>[10]</sup>报道, 在牦牛的各肠段中还存在大量厌氧菌, 如消化链球菌科 (*Peptostreptococcaceae*)、普雷沃氏菌科

和琥珀酸弧菌科 (*Succinivibrionaceae*), 并且在属水平上, 拟杆菌属在盲肠中大量存在。Qin 等<sup>[15]</sup>比较了家牦牛粪便和其他七个肠道部位(瘤胃, 十二指肠, 空肠, 回肠, 盲肠, 结肠和直肠)的肠道微生物多样性和功能。八个肠道部位的肠道微生物群在 $\beta$ 多样性水平上差异显著。然而, 粪便与盲肠、粪便与结肠之间微生物群的多样性和功能无显著差异。根据来源追踪分析, 大多数粪便微生物群起源于盲肠和结肠。Liu 等<sup>[16]</sup>从香格里拉、拉萨和玉树三个地区收集了 18 份牦牛粪便样本, 并通过高通量测序进行了分析。 $\alpha$ 多样性分析在香格里拉样本中最高。主坐标分析发现不同地区牦牛肠道微生物群组成存在显著差异。粪便样本共鉴定出 6 门、21 科、29 属。样本中的优势门是厚壁菌门和拟杆菌门, 最丰富的科是瘤胃球菌科。此外, *Ruminococcaceae* UCG-005 是主要属, 在玉树样品中比其他样品更丰富。

### 1.1.3 影响牦牛胃肠道微生物群落因素

影响动物胃肠道微生物区系的因素有很多, 包括海拔、健康状况、日粮组成等。Han 等<sup>[17]</sup>比较了西藏不同海拔地区牦牛瘤胃发酵参数和微生物群; Wu 等<sup>[18]</sup>通过 16S rRNA 基因序列表征腹泻成年牦牛肠道微生物群失调; Pang 等<sup>[19]</sup>分析了高精饲料对牦牛瘤胃发酵和微生物群的影响, 并且评估了日粮粗精比对牦牛瘤胃微生物群和代谢物的影响; Yi 等<sup>[20]</sup>研究了日粮浓缩饲料比对牦牛瘤胃细菌群落组成的影响; Liu 等<sup>[21]</sup>表征了饲料类型对牦牛瘤胃微生物群和代谢物的影响。可以看出牦牛胃肠道微生物的组成受诸多因素影响, 因此, 深入了解各因素和微生物的相互关系, 可以为牦牛的营养吸收、环境的适应能力以及免疫机制等方面提供理论指导。

#### 1.1.3.1 日粮

大量研究表明<sup>[22-24]</sup>, 日粮是影响胃肠道微生物的主要原因之一, 因为日粮直接决定了微生物所能利用的养分。Anum 等<sup>[25]</sup>研究探讨了日粮不同能量水平对牦牛瘤胃细菌群落丰度的影响。随着日粮中能量水平的增加, 记录了牦牛瘤胃中优势菌种的相对丰度, 并在属水平上记录了显著的种群变化。Zhang 等<sup>[26]</sup>发现牦牛瘤胃微生物群落随着高蛋白饮食而波动更大。有研究表明, 粗饲牦牛比精饲牦牛更有利于健康养殖, 长期高比例的浓缩饲喂抑制了放线菌 (*Actinomyces*)、变形菌、子囊菌 (*Ascomycetes*)、拟杆菌的生长, 刺激了链藻 (*Thalassiosira*)、蓝藻 (*Cyanobacteria*)、梭杆菌 (*Fusobacterium*) 和衣原体 (*Chlamydia*) 的生长<sup>[27]</sup>。Liu 等<sup>[28]</sup>比较了不同能量水平的低蛋白日粮, 对牦牛和柴达木牛瘤胃细菌群落的影响。发现随着日粮中能量水平的增加, 厚壁菌的相对丰度呈线性增加, 而拟杆菌的相对丰度显著降低。有人指出日粮代谢能和氮含量之比也会影响到牦牛瘤胃细菌的多样性, 并且在门水平上, 厚壁菌的相对丰度较

高，而拟杆菌的相对丰度较低<sup>[29]</sup>。日粮的营养水平还直接关系到动物的繁殖性能和动物产品品质，进一步对人类的生产生活造成一定影响。

#### 1.1.3.2 年龄

Sha 等<sup>[30]</sup>分析研究了不同年龄（2 岁和 3 岁）犏牛（黄牛与牦牛杂交）瘤胃微生物的物种组成和功能特征。发现瘤胃微生物群落组成在两个年龄段相似。厚壁菌、纤维杆菌、欧氏菌（*Erwinia*）、拟杆菌和变形杆菌是主要门，在成年犏牛瘤胃中检测到参与木质纤维素降解的细菌种类，包括 *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*, 和 *Prevotella ruminicola*, 其中 *Fibrobacter succinogenes* 含量最高。郭文杰等<sup>[31]</sup>发现各年龄组牦牛在门水平上，优势菌门相同。在属水平上，拟普雷沃菌属丰度随着年龄的增加而增加。功能预测结果表明，氨基酸代谢、信号传导、细胞运动和功能基因表达相关代谢通路在 2.5 岁组显著富集，但 0.5 岁、1.5 岁和 3.5 岁组之间功能基因表达丰度差异不显著。Li 等<sup>[32]</sup>分析 3、4、5、6 月龄牦牛粪便中菌群多样性，随着月份的增加疣微菌门和阿克曼均属（*Akkermansia*）呈下降趋势，并且通过对粪便微生物的功能预测发现，各功能途径的差异与某些微生物的丰度差异有关。年龄一直被推测是影响动物胃肠道微生物菌群的重要因素，并且随动物年龄的增长，其胃肠道微生物组的多样性逐渐丰富并趋于稳定。但也有研究发现，某些反刍动物在成年和幼年之间的微生物多样性差异并不显著<sup>[33]</sup>。

#### 1.1.3.3 性别

外部环境因素被认为是影响胃肠道微生物的多数因素，人们往往忽略了动物自身性别不同而造成的差异。关于性别对胃肠道微生物的影响，大量研究集中在人类和啮齿动物<sup>[34-37]</sup>，但是就性别与反刍动物胃肠道微生物之间的关系，研究较少。韩学平等<sup>[38]</sup>研究了牦牛瘤胃微生物区系特征和性别之间的差异。结果显示，在门水平上，公母牦牛瘤胃微生物组成基本相同。PCoA 和相似性分析（*Analysis of Similarities, Anosim*）结果说明 2 个性别之间瘤胃微生物区系存在显著差异。Qin 等<sup>[39]</sup>研究了家养大同牦牛（公、母）和野生公牦牛的肠道微生物群。发现 3 组牦牛的肠道微生物多样性存在显著差异，且野生公牦牛的肠道微生物  $\alpha$  多样性最高。家养公牦牛中理研菌科 RC9 和毛螺菌科的相对丰度显著较高。有研究指出，雌激素和雄激素的代谢与肠道微生物差异有关<sup>[40]</sup>，因此性别也是引起动物之间肠道微生物群出现差异的原因之一。

#### 1.1.3.4 海拔

牦牛是一种具有很强区域适应性的反刍动物，因此牦牛胃肠道的微生物群落与栖息地之间也存在一定关系。Fan 等<sup>[41]</sup>发现高海拔的牦牛具有更高的纤维消化能力，并且高海拔的牦牛瘤胃中富含螺旋体和密螺旋体。Wu 等<sup>[42]</sup>指出生活在

高海拔地区和低海拔地区的牦牛，纤维降解菌的比例存在显著差异，淀粉降解菌的丰度随海拔高度差异不显著。功能预测表明，不同海拔牦牛的甲烷代谢、淀粉和蔗糖代谢、离子耦合转运蛋白和细菌分泌系统存在显著差异。王保宁等<sup>[43]</sup>随机采集海拔 2 897~4 717 m 的 12 头牦牛新鲜粪便样本，结果显示，有 8 个菌在属水平差异显著，并且低海拔地区牦牛肠道菌群 OTU 丰度比高海拔的更为丰富。Han 等<sup>[44]</sup>发现与日喀则（海拔 3 800 m）和拉萨（海拔 3 650 m）相比，那曲（海拔 4 500 m）地区牦牛的丙酸、丁酸和总挥发性脂肪酸显著增多，而微生物丰度和多样性显著降低。主坐标分析和功能预测显示，不同地区牦牛瘤胃微生物组成差异显著。马艳等<sup>[45]</sup>采集海拔 4 220 m 和海拔 2 745 m 放牧牦牛的 22 份新鲜粪便品进行测序分析，结果发现，在高海拔地区，检测到的厚壁菌门和瘤胃菌科 UCG-005 菌属相对丰度显著高于低海拔地区，而拟杆菌门和理研菌科 RC9 菌属的相对丰度呈相反趋势。

#### 1.1.3.5 季节

Huang 等<sup>[46]</sup>发现牦牛瘤胃微生物随季节变化而发生改变。Wei 等<sup>[47]</sup>收集了牦牛和藏羊在不同季节（夏季和冬季）的粪便样本，聚类分析数据显示，肠道微生物群组成是随季节不同而发生改变，并非由遗传引起。Ma 等<sup>[48]</sup>对青藏高原高寒草甸的 10 头全放牧牦牛瘤胃原核生物群落组成的多样性进行了监测。发现春季牧草中粗蛋白（13.22%）含量较高，而冬季牧草中中性洗涤纤维（59.00%）含量较高。在春季期间牦牛瘤胃微生物的多样性和丰富度最高，随牧草生长阶段不同，微生物的相对丰度也有所改变。Jiang 等<sup>[49]</sup>研究调查了温暖季节自然放牧和寒冷季节补充饲喂过程中牦牛瘤胃微生物组的变化。结果表明拟杆菌在补充饲喂阶段（春季和冬季）发挥比厚壁菌更重要的作用，但在自然放牧阶段（夏季和秋季）的作用较小。Guo 等<sup>[50]</sup>发现牦牛会根据温暖和寒冷季节之间的饮食变化改变肠道微生物群的组成，以最好地利用氮和能量。

#### 1.1.3.6 疾病

腹泻是牦牛的常发疾病，对牦牛的健康状况带来威胁，造成其生产力、产奶量和繁殖能力的降低，如果腹泻发生在怀孕牦牛分娩前，还会导致犊牛营养不良甚至死亡<sup>[51]</sup>。引起牦牛腹泻的原因有很多，其中胃肠道菌群失调是腹泻的一大诱因。张玉莹等<sup>[52]</sup>发现在门水平上，健康与腹泻牦牛的优势菌门相似，在属水平上，腹泻牦牛的梭杆菌属比健康牦牛明显偏高；功能预测结果表明，聚糖生物合成与代谢、运转和分解代谢、脂代谢等相关通路在腹泻牦牛中显著富集，而氨基酸代谢、信号传导、细胞运动、遗传信息在健康牦牛中显著富集。Han 等<sup>[53]</sup>研究了腹泻对围产期牦牛肠道菌群数量和结构的影响，发现腹泻牦牛的肠道菌群中细菌种类数量低于健康牦牛，但两组间差异无统计学意义；两组在

门、纲、目、科和属水平上差异显著。

#### 1.1.3.7 饲养方式

我国牦牛大多分布在青藏高原地区，以丰富的天然优质牧场为主要的饲养场地。近年来，由于人为、气候和经济等方面的原因，越来越多的牦牛被转为养殖场集约化管理。从牧草到饲料，牧场到饲养场的突然转变，牦牛胃肠道内环境也会发生一定变化。Wen 等<sup>[54]</sup>发现与圈养牦牛相比，放养牦牛的瘤胃球菌科、真杆菌科、脱硫弧菌科的丰度较高，而琥珀弧菌科、梭菌目、毛螺菌科、普雷沃氏菌科、罗氏菌属和巴氏杆菌属的丰度相对较低。Tariq 等<sup>[55]</sup>研究了自然放牧和饲养场系统饲养的牦牛粪便微生物多样性。在门水平上，厚壁菌门是放牧组和饲喂组的主要细菌分类群。在科水平上，放牧组的瘤胃球菌科和理研菌科丰度极显著高于饲喂组，但饲喂组的普雷沃氏菌科丰度极显著高于放牧组。在属水平上，饲喂组的粪杆菌属 (*Faecalibacterium*)、拟普雷沃氏菌属和琥珀弧菌丰度高于放牧组。Han 等<sup>[56]</sup>分析了青藏高原全放牧牦牛胃肠道细菌群落特征。从 20 799 614 个有效标签中总共获得了 6 959 个 OTU，在所有样品中共获得了 16 个已知门和 66 个属。Sob、Shannon、Chao1 值在胃中最大，其次是大肠，而小肠的多样性最低。拟杆菌在瘤胃至十二指肠切片较多，而厚壁菌在空肠切片中最丰富。因牦牛特殊的生活环境，导致其独特的饲养方式。与其他反刍动物相比，牦牛现多以半放牧加半舍饲的形式进行管理，因此这也是造成牦牛胃肠道微生物发生改变的重要原因。

#### 1.1.3.8 饲料添加剂

饲料添加剂越来越受到饲料生产者和相关研究人员的重视，它可以增加基础饲料的营养价值，增加动物对饲料的利用率；保证动物健康生长，节约饲料加工成本，同时对动物胃肠道的微生物也有一定影响。Wu 等<sup>[57]</sup>和 Cui 等<sup>[58]</sup>发现在饲料中添加发酵剂和苜蓿干草刺激了牦牛胃肠道淀粉分解菌和纤维素分解菌的增值。Liu 等<sup>[59]</sup>发现在饲料中添加瘤胃保护氨基酸和精料，改变了泌乳牦牛瘤胃微生物群的组成和瘤胃挥发性脂肪酸的浓度。Wang 等<sup>[60]</sup>发现添加益生菌对犊牦牛的生长性能有积极影响，同时降低了犊牦牛肠道内威胁宿主健康的微生物群的定植。Wei 等<sup>[61]</sup>发现给早期断奶犊牦牛补充黄芪根提取物，增加了犊牦牛瘤胃内纤维降解菌的丰度。

## 1.2 大肠杆菌的研究进展

大肠杆菌 (*coliform bacilli*) 又称大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)，是 Escherich 在 1885 年发现的<sup>[62]</sup>。属于肠杆菌科，埃希氏菌属，革兰氏阴性无芽孢直杆菌。是所有温血动物（包括人）的肠道内正常菌群之一<sup>[63]</sup>。一般不致病，但根据血清型不同，某些大肠杆菌可引起人和动物共同感染，被认为是人和动物共患的病原

菌<sup>[64]</sup>。如仔猪黄白痢, 仔猪水肿病等。初生牛犊腹泻、败血症和奶牛乳腺炎<sup>[65-68]</sup>。

### 1.2.1 不同致病性大肠杆菌及相关毒力因子

#### 1.2.1.1 产肠毒素性大肠杆菌 (*Enterotoxigenic E. coli*, ETEC)

ETEC 可引起人和幼畜腹泻, 感染 ETEC 后多出现剧烈的水样腹泻, 进而造成脱水性死亡。其致病机理是因为有定植因子(黏附素)、内毒素和肠毒素(外毒素) 3 种致病因子, 在这些致病因素的综合作用下, 患畜会表现出各种临床症状和病理变化。

定植因子(colonization factor)存在于某些大肠杆菌表面, 包括菌毛和非菌毛类蛋白, 可以黏附在动物小肠上皮细胞, 因此又称为黏附素(adhesin), 是大肠杆菌在肠道内定居并引起感染的主要前提条件。ETEC 依赖定植因子黏附在小肠上皮细胞表面, 以避免被肠道蠕动和分泌的肠液所清除, 并且能在肠道内定居、繁殖和产生毒素, 从而起到致病的作用。在动物源 ETEC 中, 已发现有 F4(K88)、F5(K99)、F6(987P)、F41、和 F18 等黏附素, 而在人源中, 主要有 CFAI(F2)、CFaII(F3)和 CFAIII 这三种。这些菌毛除 F41 和 F17 为染色体编码外, 其余均为质粒编码。

ETEC 的各种菌毛黏附素都属于蛋白质, 由许多蛋白质亚单位按照一定排列方式组合而成。必须在一定条件(37°C、需氧培养)下才能产生或表达, 而 18°C 下培养则不能产生; 通常情况下一株动物源 ETEC 只表达一种黏附素, 但有些菌株可同时表达 2 种或以上黏附素。菌毛的抗原性好, 可以刺激机体产生相应的特异抗体; 不耐热, 在 100°C 时就会失去生物学和免疫学活性。肠毒素(enterotoxin)是 ETEC 分泌到胞外的一种蛋白质毒素, 因此称为外毒素(exotoxin), 迄今发现的外毒素是不耐热肠毒素(heat-labile enterotoxin, LT)和耐热肠毒素(heat-stable enterotoxin, ST)。有些大肠杆菌会同时产生 LT 和 ST, 而有些只能产生一种, 一般 LT 的毒性稍大于 ST。

LT 是一类热敏感蛋白质, 65°C 30 min 就可以灭活, 具有抗原性和免疫原性。LT 的相对分子质量为  $88 \times 10^3$ , 由 1 个 A 亚单位和 5 个 B 亚单位组成。A 亚单位是由 A1 和 A2 两个亚基组成, 其中 A1 是 LT 的毒性部位, B 亚单位没有毒性但有免疫原性。LT 可分为 LT-I 和 LT-II 两种抗原型, LT-I 的编码基因位于肠毒素质粒(Ent), 而 LT-II 编码基因则位于染色体。

ST 是多肽, 其相对分子质量为  $18 \sim 5 \times 10^3$ , 没有抗原性, 耐热, 100 °C 30 min 也不失活。是否可以溶于甲醇而将其分为 ST-I (又称 STA 或 STa) 和 ST-II (又称 STB 或 STb) 两种, 两者在核苷酸序列和氨基酸组成上均无同源性。ST-I 的受体为鸟苷酸环化酶, 根据其来源是否相同可分为 ST-Ia 和 ST-Ib, ST-Ia 以猪源和牛源为主, 对人、猪、牛、羊均有肠毒性, ST-Ib 来自人源, 只引起人类腹泻。

### 1.2.1.2 产志贺毒素大肠杆菌 (*Shiga toxin-producing E.coli*, STEC) 或产类志贺毒素大肠杆菌 (*Shiga-like toxin-producing E.coli*, SLTEC)

是一类能产生志贺毒素的大肠杆菌(如 EPEC 和 EHEC 等)。因这种毒素对 Vero 细胞(非洲绿猴肾细胞)有致死作用,因此又将这类细菌称为产 Vero 细胞毒素大肠杆菌(*Verocytotoxin producing E.coli*, VTEC)。EPEC 能引起婴、幼儿及猪的水样腹泻,通常不含血液和炎性细胞,其特征性组织损伤是感染的小肠细胞“黏附和脱落”;感染 EHEC 后,通常为血便,靶细胞是大肠细胞,除产生黏附和脱落损伤外,还引起出血性腹泻。STEC 的某些菌株(如 O141:K85、O138:K81 和 O139:K82)是猪水肿病的病原菌。其黏附素为菌毛(如 F18),可在小肠定居和繁殖,产生 Stx2e;若毒素被肠道吸收,会造成血管内皮细胞受损,各组织器官血管的通透性发生改变,从而导致病猪水肿,出现典型的神经症状。目前确定的 STEC 血清型已超过 160 种,约 2/3 是 O157:H7,可通过污染食品而引起人类疾病,同时与犊牛出血性结肠炎也有密切关系。

志贺毒素(Shiga toxin, tx)具有良好的抗原性。Stx 不耐热,2-巯基乙醇等还原剂可破坏其细胞毒性,而胰酶等蛋白质水解酶能不同程度地增强其细胞毒性和肠毒性。根据产生条件的差异,Stx 可分为 Stx1 (SLT1 或 VT1) 和 Stx2 (SLT2 或 VT2), Stx1 受铁离子的调节,存在于细胞周质,并可被志贺 I 型痢疾杆菌毒素的多克隆抗体中和;而 Stx2 不受铁离子的调节,可分泌到培养液中,不被志贺 I 型痢疾杆菌的毒素多克隆抗体中和。Stx1 和 Stx2 的分子结构、受体结构及作用机理都相似,但免疫原性存在一定差异。

### 1.2.1.3 肠侵袭型大肠杆菌 (*Enteroinvasive E.coli*, EIEC)

侵袭型菌株可经结膜、口或脐带而感染易感动物。侵袭型大肠杆菌普遍存在由质粒编码的黏附素 F17,经口进入肠道的细菌首先黏附远端肠道靶细胞;随后,侵袭株被上皮细胞摄入进入淋巴,继而进入血流;细菌在淋巴和血流中繁殖,并引发内毒素血症。许多具有侵袭力的菌株可产生溶血素,引起肝、脾、关节和脑膜的炎性反应,并可引发心包膜、腹膜表面和肾上腺皮质的出血。

### 1.2.1.4 肠聚集型大肠杆菌 (*Enteroaggregative E.coli*, EAEC)

EAEC 与断奶幼猪和犊牛发生的腹泻相关,其腹泻通常为水样,有时亦可见血液和白细胞。细菌通过 AAF 黏附于小肠上皮细胞,随后,EAEC 分泌由 agg 基因编码的蛋白,形成一种促进细菌间互相黏附的微生物层(“生物膜”)。

### 1.2.1.5 牛致病性大肠杆菌 (*Bovine pathogenic E.coil*, BPEC)

BPEC 可引起新生犊牛的急性传染病,通常情况下 7~10 d 的犊牛最易发生,冬春季节,牛舍阴冷潮湿、饲养密度过高、通风不足、气候突变、饲养场地不及时清理等,还有饲养管理不当、饲料中营养物质缺乏等以及犊牛未喂食初乳,这

些因素都会造成本病的发生。

临床症状：急性型包括败血症，致死率极高，加上犊牛没有喂食母牛初乳。多以痢疾、败血症及肠毒血症等形式出现，病犊初期温度在 40℃左右，食欲降低或拒绝进食，排黄色或灰白色稀粪，犊牛常因脱水和酸中毒而死亡。肠毒血症型多发生在 7 d 的犊牛，食过初乳，突然发病死亡，也可见到典型的神经症状，死前剧烈腹泻。

病理变化：死于败血症和肠毒血症的犊牛，脏器没有特异性病灶；但死于痢疾的犊牛，尸体消瘦，黏膜苍白，有明显的急性胃肠炎，胃内有凝乳块，胃黏膜和肠黏膜部分充血。肠内容物常混有血液和气泡。有些病例被膜下和心内膜有出血点。

动物试验：可作豚鼠角膜试验，对侵袭性大肠杆菌进行鉴定。将分离均划线于固定培养基上，用接种环取菌苔夹入豚鼠眼结膜囊内，若为侵袭性大肠杆菌，就会造成角膜结膜炎。

### 1.2.2 大肠杆菌耐药基因及耐药机理

由于养殖业中各种药物的不合理使用，造成病原微生物耐药性的产生，同时给疾病的预防和治疗带来了严重影响，而且出现了一种细菌耐多种药物的情况。由目前的实际情况出发，开发新型药物以及正确用药是解决目前问题的关键。因此，了解大肠杆菌耐药机理及耐药性，对将来解决致病性大肠杆菌感染问题具有重要意义。

近几年研究表明，大肠杆菌极易产生耐药性。Bag 等<sup>[35]</sup>对从患有乳腺炎的奶牛中分离到的大肠杆菌进行了耐药实验，观察到对阿莫西林（94.5%）的最高耐药性，其次是氨苄西林（89.5%）和四环素（89.5%）。在 100% 的四环素耐药大肠杆菌中检测到四环素耐药基因（tetA），并且在 38.9% 的大肠杆菌分离株中存在 blaTEM-1。Martinez 等<sup>[36]</sup>评估了从牛粪便和胴体样本中分离的大肠杆菌菌株的抗菌素耐药性特征。在测试的 213 个大肠杆菌分离株中，有 94.8%（202/213）的菌株对至少一种抗菌药物表现出耐药性，主要是氨苄西林（83.0%；177/213），头孢噻吩（76.0%；162/213）和四环素类（69.0%；147/213）。

现在，不同细菌耐药性的出现，及多重耐药性也越来越普遍，加剧了各种疾病的治疗难度，这导致大部分细菌性疾病久治不愈，对畜禽的健康饲养带来威胁，造成巨大的经济损失，所以必须引起兽医的高度重视。

#### 1.2.2.1 大肠杆菌对磺胺类药物的耐药机制

磺胺类药物是一种应用较为广泛的临床抗菌药物，基础是氨基苯胺，而它的衍生物基本都是磺胺类药物。具有抗菌谱广，毒性小，抗菌作用好，口服易吸收的特点，而且性价比相对较高。革兰氏阴性菌对其产生耐药性主要与以下三种

耐药基因有关, 分别是 *sul1*、*sul2* 和 *sul3*。相对 *sul1* 和 *sul2* 来说, *sul3* 发现比较晚, 出现的几率也比较低。Bean 等<sup>[69]</sup>在 2004 年回收的 391 株大肠杆菌中, 耐磺胺类为 45.5%, 而 1999 年为 46.0%, 1991 年为 39.7%。*sul2* 基因仍然是最普遍的耐磺胺类的决定因素, 2004 年有 81% 的抗性分离株存在, 而 1999 年和 1991 年分别为 79% 和 67%; 28% 的抗性分离株同时携带 *sul1* 和 *sul2* 基因, 但不携带 *sul3*。因此, 是否能够达到彻底清除体内病原的关键是机体自身的防御能力。

#### 1.2.2.2 大肠杆菌对四环素类药物的耐药机制

1948 年, 四环素类抗生素被发现, 其主要包括四环素、土霉素、金霉素、多西环素等。因为其抗菌谱广、较强的杀菌作用及较小的副作用, 所以被广泛使用。在革兰氏菌中都存在外排基因, 相关的耐药基因有 35 种, 包括: *tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE* 等。Messele 等<sup>[70]</sup>检测了从生肉中分离出大肠杆菌的耐药性, 发现四环素的耐药率为 47.6%, 同时还携带 *tetA* 基因。Messele 等<sup>[71]</sup>对分离自肉牛粪便的大肠杆菌进行了耐药分析, 发现四环素的耐药率为 17.8%, 检出率为高的基因为 *tetB* (43.2%)。

#### 1.2.2.3 大肠杆菌对氨基糖苷类药物的耐药机制

氨基糖苷类抗生素, 是通过氧桥连接氨基糖与氨基环醇而成的临床常用的一种苷类抗生素, 包括庆大霉素、新霉素、大观霉素和安普霉素等。其耐药机制为氨基糖苷类抗生素作用于细菌蛋白质的合成过程, 使细菌合成异常, 阻碍以合成的蛋白释放, 使细菌细胞膜的通透性增大, 继而导致一些重要的生物物质外漏损失, 抑制细菌蛋白质的生物合成, 引起细菌死亡。Ojdana 等<sup>[72]</sup>发现大肠杆菌对庆大霉素的耐药率为 59%, 耐药基因的检出情况为: *aac(6')-Ib* (59.2%), *aph(3'')-Ib* (36.2%), *aac(3)-Ia* (15.9%) 和 *ant(2'')-Ia* (4.6%)。而 Nayme 等<sup>[73]</sup>对 42 份肉鸡源大肠杆菌进行氨基糖苷类耐药基因的检测, 结果为 *aac(3)-IIa* (12%), *aac(6')-Ib* (7%) 和 *aac(2')-Ia* (5%)。

#### 1.2.3.4 大肠杆菌对 $\beta$ -内酰胺类药物的耐药机制

1983 年, 第一个被描述的新型 $\beta$ -内酰胺酶是广谱 $\beta$ -内酰胺酶, 并被命名为 ESBLs, 也是人们最普遍了解的一个酶。这些酶能够水解临床常用的青霉素、头孢菌素, 以及新发现的头霉素类、先锋霉素和单环 $\beta$ -内酰胺类, 都被传统的 $\beta$ -内酰胺酶禁止因素所抑制。 $\beta$ -内酰胺耐药性是一个世界性问题, 也是抗菌治疗的严峻挑战, 在 20 世纪 80 年代和 90 年代期间在临床分离株中鉴定的 ESBLs 主要是 SHV 或者 TME 型。Khalifa 等<sup>[74]</sup>发现从大肠杆菌和肺炎克雷伯菌中最常检测到的 ESBL 基因是 *blaCTX-M-15* (86.3%), 其次是 *blaTEM-1* (81.3%) 和 *blaSHV-1* (35%)。

### 1.2.3 大肠杆菌血清型

动物机体在免疫功能受损或抵抗力下降时,大肠杆菌会导致机体感染。血清分型是大肠杆菌分型的传统方法,且其血清型十分复杂,分为 O、H、K 和 F 抗原。这四种抗原中,其中最重要的是 O 抗原,在每株菌中都会表达,也是大肠杆菌血清学分型的基础。由于抗原结构不同,相同抗原其血清型也有不同,有 180 多种 O 抗原,80 种 K 抗原和 56 种 H 抗原。

O 抗原是一种属于 S 型菌的菌体抗原,耐高压耐高温是其特点。在 121 °C 的高压锅内加热 2 h,它的结构不会被破坏。细胞壁最外层的一种脂多糖是其主要成分。一般用字母“O”加数字表示 O 抗原,通常用平板凝集实验来鉴定 O 抗原。如今,大量研究发现国内外的致病性大肠杆菌血清型都相对集中,大概有 O1、O2、O4、O7、O8、O9、O15、O18、O19、O20、O22、O35 等 50 多种。牛源大肠杆菌血清型主要有 O7、O8、O9、O17、O13、O18、O35、O44、O51、O55、O61、O62、O65、O69、O78、O80、O91、O92、O93、O95、O96、O98、O99、O100、O101、O112、O120、O127、O134、O142、O153、O158 等。

如今,各研究结果表明,在不同的地区,优势血清型也不一样,并且同一区域的不同牧场,优势血清型也有所不同。因此,鉴别大肠杆菌血清型意义重大。

### 1.3 研究目的及意义

牦牛作为我国青藏高原地区特有的珍稀牛种之一,主要分布于青海、西藏、四川、甘肃等地区,与当地牧民的衣食住行息息相关。牦牛主要用于牛奶和肉类的目的,在某些地区,牦牛被用作耕种农田的役力,其粪便也可作为燃料供牧民使用。此外,牦牛还以其独特性促进当地旅游业的发展。因此,牦牛养殖产业不仅对当地牧民具有重要的生产生活价值,同时对满足人们生活需求具有重要意义。但是,近年来,由致病性大肠杆菌导致的牦牛腹泻甚至死亡在牦牛养殖中频频高发,给牦牛养殖行业带来了巨大的经济损失,同时,抗生素类药物的滥用也对防治致病性大肠杆菌病带来了一定的困难。因此,考虑到高原牦牛养殖业的重要性和牦牛为高原农业发展带来的经济利益,本研究采集了腹泻牦牛的粪便样本,通过分离培养、血清型实验、16s rRNA 鉴定、毒力基因及耐药基因检测等方法来判断致病性大肠杆菌对牦牛粪便微生物菌群的多样性产生的影响,以及针对西藏地区牦牛致病性大肠杆菌的防治提出有效的理论依据。

## 第二章 腹泻与健康牦牛粪便菌群多样性分析

对于牦牛而言最丰富的细菌门为厚壁菌门、放线菌门、变形菌门和拟杆菌门，其中，变形菌门含有多种病原菌，可引起牦牛腹泻和肠炎等疾病。大量研究表明，肠道微生物的失调与许多疾病有直接关系，如牛白血病、寄生虫病、牛结核病、乳腺炎、腹泻<sup>[75-79]</sup>等。因此，当牦牛发生腹泻时，其肠道微生物结构会发生改变。本研究旨在利用 16S rDNA 基因高通量测序技术探讨由致病性大肠杆菌引起的牦牛腹泻，其粪便中微生物群组成的多样性和差异性，为牦牛腹泻的临床诊断及治疗提供理论依据。

### 2.1 材料

#### 2.1.1 样品来源

从西藏拉萨和那曲部分养殖户和养殖场采集的牦牛腹泻粪便样本 59 份，从中选取 9 份（FY2: 3 头、FY3: 3 份、FY4: 3 份）样本为黄褐色至黑色稀粪，混有气泡和黏液；另采集 3 份（FY1: 3 头）健康牦牛粪便，粪便形态正常，外观较硬。将样品储存在-80 °C冰箱中备用。

#### 2.1.2 DNA 提取和 16S rDNA 扩增

根据制造商说明，使用细菌基因组DNA提取试剂盒（天根生化科技有限公司，中国北京）从 12 份牦牛粪便中提取总细菌基因组DNA。利用琼脂糖凝胶电泳评估DNA的质量，紫外-可见分光光度计检测DNA浓度。使用 16S rDNA特异性引物 338F（5'-ACTCCTACGGGAG GCAGCA-3'）和 806R（5'-GGACTACHVGGGTW TCTAAT-3'）扩增细菌基因组DNA的V3~V4 高变区。PCR产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测，使琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒（天根生化科技有限公司，中国北京）对扩增产物进行纯化和回收。回收产物送上海阿趣生物科技有限公司（中国），进行测序文库构建以及V3~V4 序列的处理、拼接和分析。

#### 2.1.3 生物信息学和统计分析

测序完成后，得到原始数据（RawData），使用overlap软件进行数据拼接，质控、嵌合体过滤，获得高质量的CleanData。然后利用QIIME2（版本：2022.8）中的DADA2（Divisive Amplicon Denoising Algorithm）软件通过“去重复”（Dereplication，相当于以 100%相似度聚类）等步骤，获得单碱基精度的代表序列。然后使用ASVs（Amplicon Sequence Variants）的概念构建类OTU（Operational Taxonomic Units）表，获得最终的ASV特征表以及特征序列，进一步进行多样性分析、物种分类注释和差异分析等。Alpha多样性主要通过Chao1、Observed

species、Goods\_coverage、shannon、Simpson和pielou-e等指数来反映丰富度和均匀性。Beta多样性分析主要通过PCA、PCoA、UPGMA、NMDS、ANOSIM和Adonis等方法，观察样本之间的差异。为了更加准确的分析物种组成，使用SILVA以及NT-16S数据库做物种分类及后续分析。使用Kruskal-Wallis test进行物种差异检验。 $P<0.05$  为差异显著， $P>0.05$  为差异不显著， $P<0.01$  为差异极显著。

## 2.2 结果

### 2.2.1 序列分析

为了解牦牛肠道微生物因腹泻而发生的改变，将 12 份粪便样品进行扩增子测序。共获得 1,004,883 个原始数据，FY1、FY2、FY3 和FY4 组分别获得了 255,918、248,631、255,712 和 244,622 个原始数据。优化原始数据后，获得高质量有效序列 859,300 条，如表 2-1 所示。在 100%序列相似性的基础上，分别从FY1、FY2、FY3 和FY4 组的样品中获得 1748、2222、1345 和 1642 个ASVs，如图 2-1 所示。

表 2-1 不同组别牦牛粪便高通量测序序列信息

Sample	Raw_Tags	Valid_Tags	Valid%	GC%
FY1-1	87354	77012	88.16	53.06
FY1-2	87504	71021	81.16	53.58
FY1-3	81060	70954	87.53	53.39
FY2-1	85741	73920	86.21	54.44
FY2-2	82755	73680	89.03	54.03
FY2-3	80135	67898	84.73	54.27
FY3-1	84976	72148	84.90	54.62
FY3-2	84268	72581	86.13	55.35
FY3-3	86468	72694	84.07	55.41
FY4-1	87272	73396	84.10	53.95
FY4-2	85334	74204	86.96	54.25
FY4-3	72016	59792	83.03	55.68
Total	1004883	859300	85.51	54.34

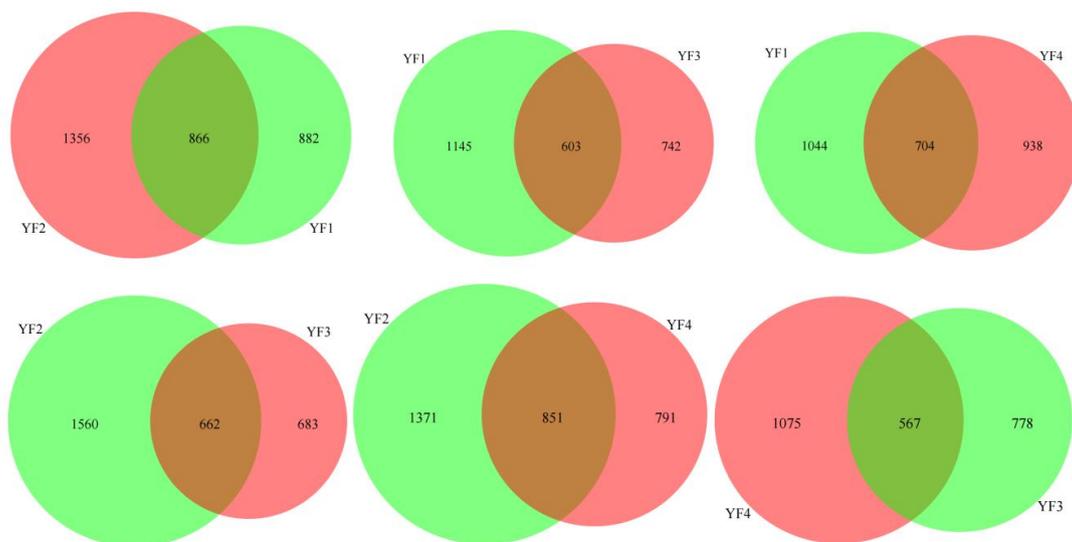


图 2-1 各组样品ASVs分布Venn图

### 2.2.2 各组牦牛肠道微生物多样性分析

为了进一步表征牦牛肠道微生物群落在腹泻期间的变化,对健康组和腹泻组进行分析和比较,并估算多个 $\alpha$ 和 $\beta$ 多样性指数。结果表明, Good-coverage 为 99%~100%, 如图 2-2A 所示, 这就意味着可以检测到样品中大多数细菌。各组样品的 Chao1 值分别为 FY1 (740.26)、FY2 (1037.72)、FY3 (581.07) 和 FY4 (677.62), 可以看出腹泻组 FY3 和 FY4 的菌群丰度相较于健康组明显下降, 如图 2-2B 所示。Simpson 指数显示分别为 FY1 (0.81-0.99)、FY2 (0.97-0.98)、FY3 (0.91-0.96) 和 FY4 (0.97-0.98), 表明腹泻组和健康组的物种多样性存在差异, 如图 2-2C 所示。由 PCA 分析显示, 各组样品分布较为集中, 如图 2-2D 所示; 而 PCoA 分析发现, 组间物种组成分布距离较远, 说明各组样品微生物存在显著差异, 如图 2-2E 所示。说明腹泻组粪便相比于健康组粪便微生物菌群有所失调, 因此粪便微生物菌群的总数有所下降, 肠道菌群的失衡则说明了大肠杆菌的增多对肠道内的一些有益菌产生了抑制作用, 导致免疫力下降, 从而诱导肠道疾病的产生。

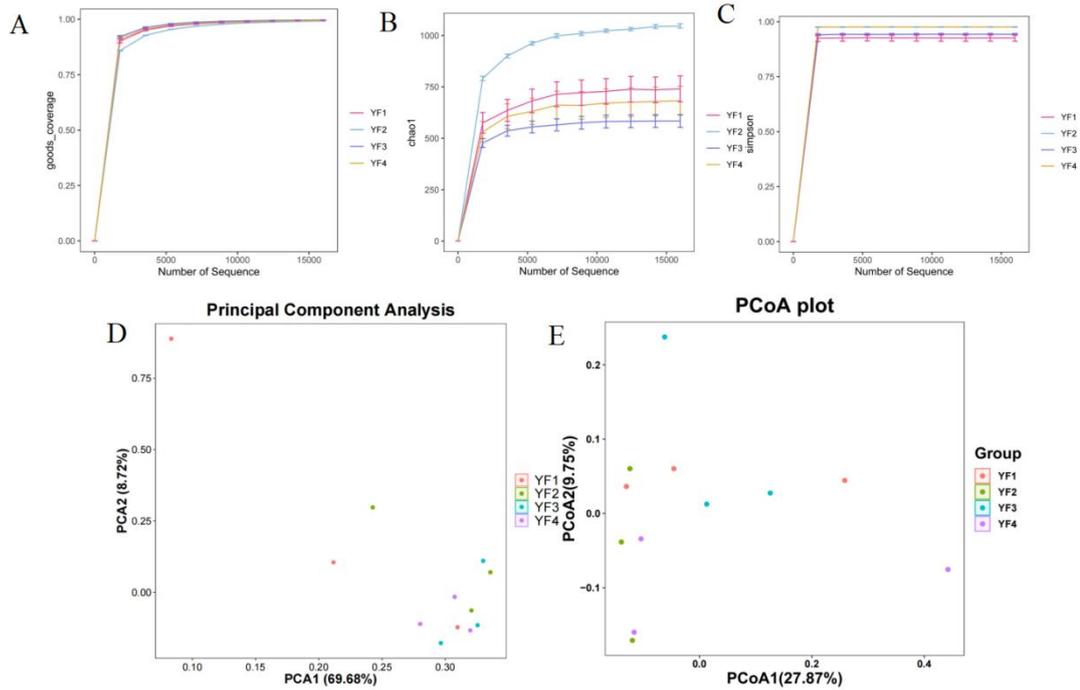


图 2-2 各组牦牛肠道微生物多样性分析 A: Good-coverage; B: Chao1; C: Simpson; D: PCA; E: PCoA

### 2.2.3 各组牦牛肠道细菌分类组成的显著变化

为更加准确的分析物种组成，研究人员使用 SILVA（Release 138，<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>）以及 NT-16S 数据库做物种分类及后续分析，以保证注释结果完整准确（注释阈值：置信度大于 0.7）。根据 ASV 注释结果和各样品 ASV 丰度表，获得界、门、纲、目、科、属、种水平物种丰度表，并针对不同水平物种丰度表进行不同样品（组）物种组成分析。在门水平上，肠道细菌群落共鉴定出 18 个门，如图 2-3A 所示。其中 Firmicutes（FY1=72.26%）、Actinobacteriota（FY1=14.10%）、Proteobacteria（FY1=4.84%）和 Bacteroidota（FY1=5.02%）是健康组中最主要的四个门，占细菌组成的 96.23%。Firmicutes（FY2=59.88%、FY3=52.30%、FY4=60.65%）是腹泻组的优势菌门，其次为 Actinobacteriota（FY2=23.10%、FY3=34.59%、FY4=20.95%）、Proteobacteria（FY2=7.27%、FY3=5.61%、FY4=9.31%）和 Bacteroidota（FY2=4.96%、FY3=3.98%、FY4=4.04%）。分别约占所有细菌群类的 95.20%（FY2）、96.48%（FY3）和 94.95%（FY4）。在各组中，主要的优势菌门相同，健康组 FY1 的 Firmicutes 占比最高。与其他组相比，腹泻 FY3 组的 Firmicutes 丰富度最低，而腹泻 FY2 组与腹泻 FY4 组的 Firmicutes 含量相差不大；但 Actinobacteriota 和 Proteobacteria 含量在腹泻组中明显增多。除优势菌门外，相较于健康组，腹泻组中的 Patascibacteria、Cyanobacteria 和 Spirochaetota 含量明显增多；而

Verrucomicrobiota则相反。

为了进一步评估各组肠道细菌组成的变化，在属水平上，研究人员根据物种丰度表和物种注释表，默认选取丰度 TOP30 物种分类进行分析，如图 2-3B 所示。在 FY1 中 *Bacillus* (18.81%) 为优势菌属，其次为 *Solibacillus* (12.81%)、*Arthrobacter* (11.27%) 和 *UCG-005* (5.16%)。而在 FY2、FY3 和 FY4 组中 *Arthrobacter* 占比最高，分别为 19.21%、30.97%和 16.84%，并且 *Solibacillus* 和 *Bacillus* 呈明显的下降趋势，*UCG-005* 在各组中相差不大。此外相较于健康组，腹泻组中的 *Clostridium\_sensu\_stricto\_1*、*Escherichia-Shigella*、*Christensenellaceae\_R-7\_group*、*Candidatus\_Saccharimonas*、*Ruminococcaceae\_unclassified*、*Romboutsia*、*BlautiaLachnospiraceae\_NK3A20\_group* 显著增加，而 *Clostridia\_UCG-014\_unclassified*、*Firmicutes\_unclassified*、*Akkermansia*、*Terrisporobacter*、*Rhodococcus*、*Prevotellaceae\_UCG-004*、*Paenibacillus* 和 *Clostridium\_sensu\_stricto\_13* 相反。

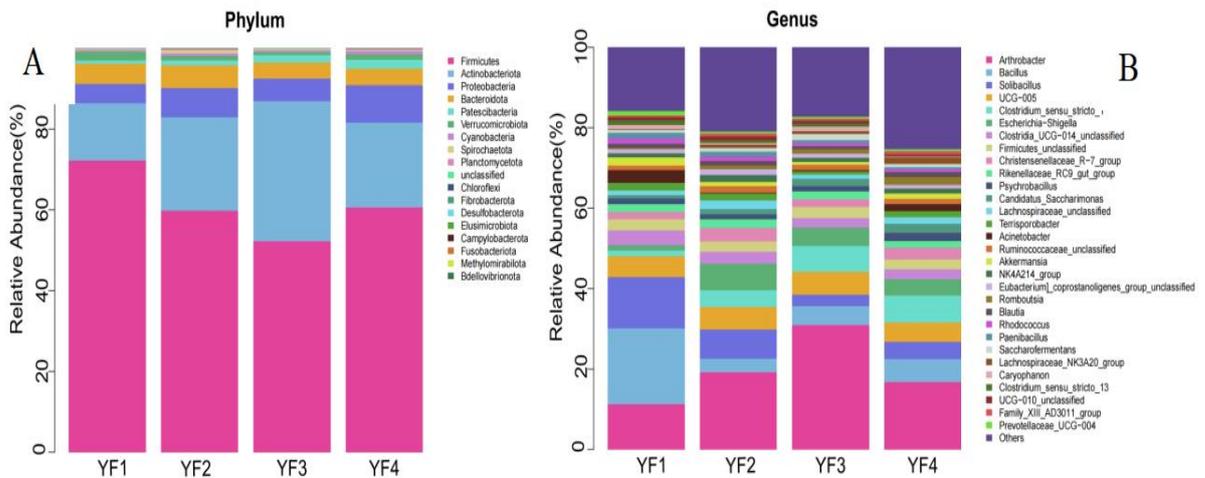


图 2-3 各组牦牛肠道细菌在门和属水平下的分类组成 A：门水平；B：属水平

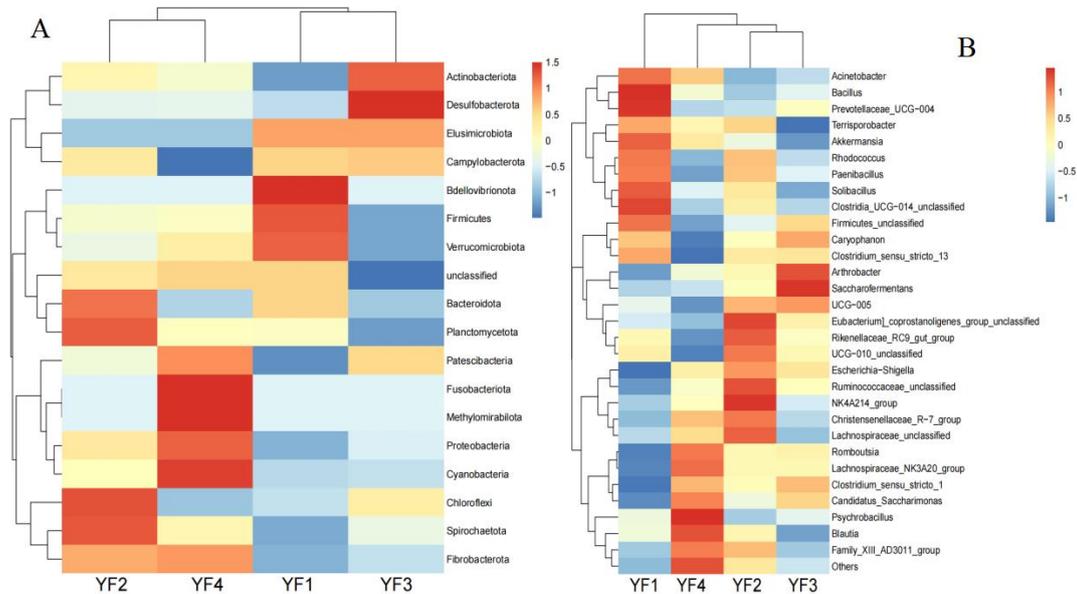


图 2-4 各组牦牛肠道细菌在门和属水平的组成及丰度 A: 门水平; B: 属水平

基于物种注释统计表, 研究人员通过柱状堆叠图、热图(见图 2-4)和聚类图等对物种丰度进行展示。在门水平和属水平上, 健康组和腹泻组的物种多样性和丰度存在显著差异, 这与前人的研究一致。

### 2.3 讨论

在高原畜牧行业中, 腹泻在牦牛中广泛流行, 这同时也是导致全球动物生产力下降的一个关键因素。通过近些年来的研究, 人们发现导致牦牛腹泻的主要病原体之一包括致病性大肠杆菌, 但是很少有关于青藏高原牦牛由于致病性大肠杆菌导致的腹泻引起微生物菌群紊乱的相关报道。在本研究中, 研究人员分析了从牦牛腹泻粪便中提取的大肠杆菌对粪便微生物区系的影响, 并探讨了它对牦牛腹泻产生的影响。

研究人员通过对牦牛粪便微生物菌群的测序来判断致病性大肠杆菌对牦牛肠道发育的影响, 牦牛胃肠道主要功能是消化吸收营养物质, 而微生物则在此过程中起着关键作用。比如为动物机体提供营养, 保护动物肠道健康, 维持肠道动态平衡等。腹泻是牦牛的常发疾病, 对牦牛的健康状况带来威胁, 造成其生产力、产奶量和繁殖能力的降低, 如果腹泻发生在怀孕牦牛分娩前, 还会导致犊牛营养不良甚至死亡<sup>[51]</sup>。引起牦牛腹泻的原因有很多, 其中胃肠道菌群失调是腹泻的一大诱因。本研究就结果表明, 腹泻组牦牛肠道菌群的 $\alpha$ 多样性明显下降, 这与 Liu 等<sup>[80]</sup>的结果一致。在门水平上, 本试验结果与张玉莹等<sup>[52]</sup>的发现相同, 但在属水平上, 腹泻组牦牛的 *Arthrobacter*、*Clostridium\_sensu\_stricto\_1* 和 *Escherichia-Shigella* 比健康组牦牛明显偏高。

本研究结果表明牦牛在感染致病性大肠杆菌后, 菌群结构发生变化, 这与 Kim 等<sup>[81]</sup>的研究结果相似。研究发现, 粪便菌群中门分类水平下的 Firmicutes、Actinobacteriota、Proteobacteria 和 Bacteroidota 是牦牛的优势菌群; 在纲分类水平下, Clostridia、Bacilli、Actinobacteria 和 Gammaproteobacteria 是牦牛的优势菌群; 在目分类水平下, Micrococcales、Bacillales、Oscillospirales 和 Clostridiales 是牦牛的优势菌群; 在科分类水平下, Micrococcaceae、Planococcaceae、Bacillaceae、Oscillospiraceae、Clostridiaceae、Lachnospiraceae 和 Enterobacteriaceae 是牦牛的优势菌群; 在属分类水平下, *Arthrobacter*、*Bacillus*、*Solibacillus*、*UCG-005*、*Clostridium\_sensu\_stricto\_1* 和 *Escherichia-Shigella* 是牦牛的优势菌群; 在种分类水平下, *Arthrobacter\_sp.\_B-R2A-4*、*UCG-005\_unclassified*、*Clostridium\_sensu\_stricto\_1\_unclassified* 和 *Escherichia-Shigella\_unclassified* 是牦牛的优势菌群。

从门分类水平来看, 牦牛腹泻组粪便微生物群落中的 Proteobacteria 明显增多, Proteobacteria 主要包括大肠杆菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、幽门螺杆菌等常常引起动物腹泻的致病菌, Proteobacteri 具有分解碳水化合物, 降解纤维和麦芽糖, 产生有机酸的作用, 这表示牦牛腹泻可能主要是由 Proteobacteria 的菌群丰度增加引起的。从属分类水平来看, 牦牛腹泻组粪便微生物群落中 *Escherichia-Shigella* 明显增多。先前的研究表明, 哺乳动物肠道微生物区系在发育过程中是动态变化的, 成熟时达到稳定<sup>[82]</sup>。*Escherichia-Shigella* 作为引起牦牛腹泻的主要致病菌, 其大幅度增加可能意味着牦牛粪便微生物群落动态平衡被打破, 微环境不再适合一些弱势菌群生存, 导致整体菌群的丰富度减少。

## 第三章 牦牛源大肠杆菌的分离鉴定

大肠杆菌作为条件致病菌，正常寄居于人类和动物的胃肠道内。腹泻一直是牦牛的常发疾病之一，大肠杆菌更是引起牦牛腹泻的主要病原菌，严重时造成牦牛死亡，甚至危及人类的生命安全。张开琴等<sup>[83]</sup>鉴定出拉萨某牛场的牦牛腹泻是由大肠杆菌引起；卓玛<sup>[84]</sup>等研究发现肠产毒性大肠杆菌也可导致牦牛腹泻。因此，研究人员通过对细菌的分离培养，革兰氏染色镜检，分离菌 16s rRNA 鉴定，O-抗原血清型实验，最终确定此项目中分离的菌株数量以及血清型，以此可确定导致牦牛腹泻的主要致病性大肠杆菌，为研究对应治疗和防治方案提供基础参考数据。

### 3.1 材料

#### 3.1.1 样品来源

试验于 2022 年 5~6 月采集了拉萨和那曲部分养殖户和养殖场中伴有腹泻的牦牛粪便样本 59 份，粪便呈黄褐色至黑色，混有气泡和黏液，-20 °C 保存备用。

#### 3.1.2 主要试剂及仪器

表 3-1 牦牛源大肠杆菌分离鉴定所需试剂及仪器

试剂、仪器	生产厂家及其型号
胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB)	
伊红美蓝琼脂培养基 (EMA)	
麦康凯琼脂培养基 (MAC)	青岛海博生物技术有限公司
LB 培养基	
细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (DP-302)	北京天根生化科技有限公司
药敏纸片	杭州微生物试剂有限公司
胎牛血清	浙江天杭生物科技股份有限公司
DL2000 DNA Marker	宝日医生物技术 (北京) 有限公司
2×Taq PCR Mixture	苏州博奥龙免疫技术有限公司
台式恒温振荡器	上海博讯实业有限公司医疗设备厂 型号: BSD-TF270
净化工作台	上海博讯实业有限公司医疗设备厂 型号: BJ-2CD
隔水式电热恒温培养箱	上海博讯实业有限公司医疗设备厂 型号: BG-270
电泳仪	Bio-Rad 公司 型号: 041BR
凝胶成像系统	北京君意东方电泳设备有限公司 型号: JYD4S-3C
正置生物显微镜	Leica 公司 型号: DM3000 LED
梯度 PCR 扩增仪	Analytik Jena AG 公司 型号: Biometra Tone 96G

## 3.2 方法

### 3.2.1 牦牛源大肠杆菌的分离培养

用接种环挑取灭菌采集管中收集的牦牛腹泻粪便 59 份接种于 LB 肉汤培养基中, 37 °C 恒温培养 18~24 h; 用接种环划线于 EMA 平板, 37 °C 恒温培养 18~24 h; 将长出紫黑色, 并带有绿色金属光泽的单菌落划线于 MAC 平板, 37 °C 恒温培养 18~24 h; 挑取鲜桃红色的单菌落进一步纯化。EMA 和 MAC 培养基交替纯化 5~7 代, 完成分离培养, 初步确定分离出 59 株牦牛源大肠杆菌。

### 3.2.2 牦牛源大肠杆菌 DNA 的制备

根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书对分离的菌株进行 DNA 提取, 将收集到的 DNA 按照每管 2~3  $\mu\text{l}$  的容量分装至数个 PCR 管中, 放置 -20 °C 冰箱可保存 30 d 以上, 注意使用过程中严禁反复冻融。

### 3.2.3 牦牛源大肠杆菌的鉴定

#### 3.2.3.1 革兰氏染色镜检

用无菌接种环挑取在 EMA 平板上生长的黑色带有金属色光泽的单个菌落, 均匀涂抹在载玻片上, 涂片经火焰固定; 然后滴加结晶紫溶液, 充分作用 1 min, 用清水冲去溶液, 吸水纸吸去残留水滴; 再加入碘液染 1 min 后水洗, 可用酒精灯对载玻片进行简单的干燥处理; 滴加 95% 乙醇溶液不时摇动进行脱色 10~30 s, 至无紫色洗脱为止; 用沙黄复染液复染 1 min 左右, 水洗、干燥, 处理完毕后镜检。

#### 3.2.3.2 分离菌 16s rRNA 鉴定

由成都擎科生物工程有限公司合成细菌 16s rRNA 通用引物 (F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, R: TACCTTGTTACGACTT)。PCR 反应体系 25  $\mu\text{L}$ : 2 $\times$ Taq PCR Mixture 12.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足体系。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 暂存, PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 3.2.4 O-抗原血清型实验

根据致病性大肠杆菌 O 抗原诊断血清说明书, 对分离株进行玻片凝集试验, 检测分离的 59 株大肠杆菌的血清型。凝集结果判断标准如表 3-2。

表 3-2 O-抗原血清凝集实验参考标准

序号	反应强度	判别依据
1	4+	反应澄清透明，凝集颗粒多而大
2	3+	反应澄清透明，凝集颗粒较多而小
3	2+	反应有些混浊，但仍有颗粒状凝集
4	1+	反应非常混浊，少许颗粒状凝集
5	-	反应完全混浊，无任何凝集

### 3.3 结果

#### 3.3.1 大肠杆菌分离培养结果

研究人员对来自拉萨和那曲部分养殖户和养殖场中伴有腹泻的牦牛粪便样本进行分离培养，最后获得 59 株在 EMA 平板上呈紫黑色菌落，并带有绿色金属光泽，如图 3-1A 所示。在 MAC 平板上呈鲜桃红色或微红色，菌落中心呈深桃红色，圆形，扁平，边缘整齐，表面光滑，湿润，如图 3-1B 所示。



图 3-1 EMA 平板上菌落形态 (A) MAC 平板上菌落形态 (B)

#### 3.3.2 革兰氏染色镜检结果

分离株经革兰氏染色镜检，呈红色或粉红色杆状阴性菌，如图 3-2 所示。

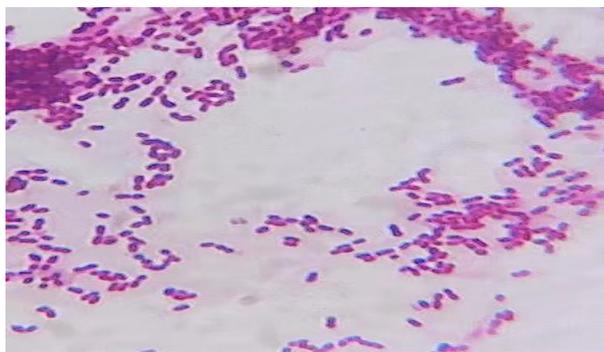


图 3-2 大肠杆菌革兰氏染色 (100×)

#### 3.3.3 分离菌 16s rRNA 鉴定结果

16S rRNA 基因 PCR 扩增结果显示，在约 1 500 bp 处可见目的片段，如图 3-3 所示，与预期大小一致。

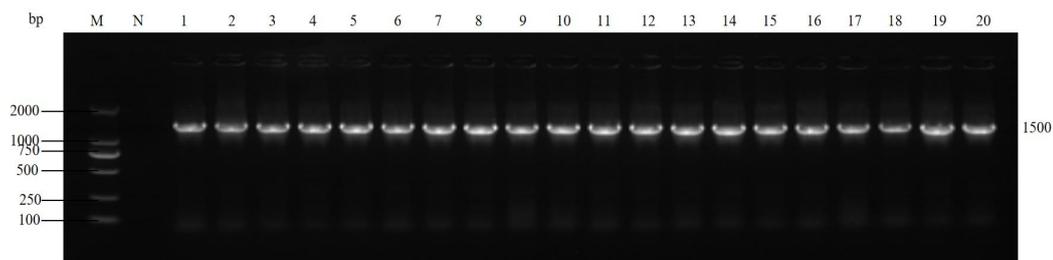


图 3-3 M, DL2000 DNA Marker; N, 阴性对照; 1~20, 部分大肠杆菌的 PCR 扩增产物

### 3.3.4 O-抗原血清型实验结果

用大肠杆菌标准 O 型血清因子进行玻片凝集试验检测分离菌株的血清型, 结果显示 59 株大肠杆菌共有 14 种不同的血清型, 42 株定型, 17 株未定型。以 O1、O111 和 O128 为优势血清型, 分别占比 11.86% (7/59)、11.86% (7/59) 和 8.47% (5/59)。而 O18、O44、O114、O125 和 O158 检出的菌株数均为 1 株, 各占比 1.69%, 见表 3-3。

表 3-3 大肠杆菌血清型检测

序号	血清型	检出菌数/株	检出率/%
1	O1	7	11.86
2	O18	1	1.69
3	O26	4	6.78
4	O44	1	1.69
5	O86	3	5.08
6	O88	3	5.08
7	O111	7	11.86
8	O114	1	1.69
9	O119	2	3.39
10	O125	1	1.69
11	O128	5	8.47
12	O142	4	6.78
13	O151	2	3.39
14	O158	1	1.69

## 3.4 讨论

本实验从 59 份牦牛腹泻粪便中分离出 59 株大肠杆菌。牦牛表现精神不振, 食欲废绝, 多卧地不起, 排黄褐色至黑色稀粪, 混有气泡和黏液。

奶牛感染致病性大肠杆菌后, 可引起乳腺炎, 大量研究从奶牛乳腺炎中分离

出大肠杆菌<sup>[85-88]</sup>。同时,大肠杆菌还是引起奶牛子宫炎的重要病原菌,造成奶牛产奶量减少,降低受孕率以及奶牛淘汰和扑杀<sup>[89]</sup>。牛在感染STEC后,可从腹泻到严重的出血性结肠炎(HC)和溶血性尿毒综合征(HUS)的肠道以及全身性疾病<sup>[90]</sup>。EHEC被认为是重要的食源性病原菌,牛是EHEC的主要宿主<sup>[91]</sup>,随粪便排泄而污染环境和食物。未煮熟的牛肉和未经高温处理的牛奶是引起人类感染的主要途径<sup>[92]</sup>。ETEC是新生犊牛的重要病原之一<sup>[93-95]</sup>,通常在小牛出生后前几天感染,诱发轻度至急性水样腹泻,也可伴有全身性疾病,对养殖场造成严重的经济损失<sup>[96,97]</sup>。

由于大肠杆菌分型复杂,并且抗原结构复杂多样,变异性大,迄今为止,大肠杆菌O-抗原血清型已超过190种<sup>[98]</sup>,导致对该病的预防十分困难,目前主要用O-抗原分型来划分大肠杆菌。牦牛源大肠杆菌血清型主要为O1、O2、O4、O7、O8、O11、O13、O14、O15、O18、O21、O22、O24、O25、O26、O27、O28、O34、O36、O38、O39、O43、O51、O52、O54、O56、O57、O58、O60、O61、O68、O74、O78、O86、O87、O91、O96、O98、O108、O110、O111、O117、O126、O127、O130、O133、O141、O142、O148、O149、O151、O153、O158、O159、O161<sup>[99-102]</sup>。因大肠杆菌的血清型繁多,导致其不同区域、不同时间段,出现不同的O-抗原血清型,因此明确大肠杆菌的O-抗原血清型,可以有效预防该病的发生。

贡嘎次仁等<sup>[99]</sup>发现拉萨市曲水县牦牛源大肠杆菌的优势血清型为O26、O142、O148和O158。贡嘎等<sup>[102]</sup>对西藏7个地市牦牛源大肠杆菌的O-抗原进行分型鉴定发现O78为优势血清型,其次为O26、O158、O142和O117,这与贡嘎次仁等人的研究结果相近。诸明欣等<sup>[100]</sup>发现四川阿坝州牦牛源溶血性大肠杆菌的优势血清型为O14、O51、O57、O161、O38、O58和O61,这与郝一妹等<sup>[101]</sup>发现的牦牛源大肠杆菌优势血清型为O1、O15存在差异。本实验分离鉴定的59株牦牛源大肠杆菌O-抗原血清型实验结果显示:共有14种不同的血清型,以O1、O111和O128为优势血清型,这不仅与四川地区同时与西藏地区的牦牛源大肠杆菌O-抗原血清型都存在较大差异。这些研究结果证实了大肠杆菌血清型的多样性和复杂性,因此鉴定出当地大肠杆菌O-抗原优势血清型,对于防治由大肠杆菌引起的各类疾病有很重要的意义。

## 第四章 腹泻牦牛大肠杆菌毒力基因检测和耐药性研究

大肠杆菌是人和动物肠道内的正常菌群，但一些致病性菌株可通过菌毛、黏附素和肠毒素等攻击牦牛肠道，导致牦牛肠道内水电解质紊乱以及酸碱失衡，进而引起牦牛不同程度的消化道疾病。毒力基因是判断大肠杆菌致病性的重要因子，因此研究人员选择了常见的牛源大肠杆菌毒力基因进行检测，以此判断拉萨和那曲地区牦牛源致病性大肠杆菌的流行情况。

近年来，由于抗生素的滥用，特别是在动物的临床治疗和日常预防中的不合理使用，导致大肠杆菌耐药性日益严重，并有逐年上升趋势。近年来，国内外开展了大量牦牛源大肠杆菌磺胺类、四环素类、氨基糖苷类和 $\beta$ -内酰胺类等耐药基因的研究。因此，采用 PCR 方法对磺胺类、四环素类、氨基糖苷类和 $\beta$ -内酰胺类等 19 种耐药基因进行检测，旨在了解拉萨和那曲地区牦牛源大肠杆菌中耐药基因的流行病学分布，耐药性与耐药基因的相关性，利于进一步揭示大肠杆菌耐药基因的流行扩散机制，从而为抗菌药物合理使用与大肠杆菌病的控制，为兽医合理使用和选择抗菌药物提供参考。

### 4.1 材料

#### 4.1.1 受试菌株

2022 年 5~6 月从拉萨和那曲部分养殖户和养殖场中伴有腹泻的牦牛粪便样本分离出的 59 株大肠杆菌。

#### 4.1.2 主要仪器

表 4-1 牦牛源大肠杆菌的毒力基因检测及耐药性研究所需仪器及其型号

仪器	生产厂家及其型号
超低温保存箱	青岛 Haier 特种电器有限公司 型号: DW-86L486
立式压力蒸汽灭菌器	上海三申医疗器械有限公司 型号: YM75
通用型台式高速冷冻离心机	HETTICH 型号: UNIVERSAL 320R
恒温水浴锅	金坛市盛蓝仪器制造有限公司 型号: HH S-2
普通梯度 PCR 仪	德国耶拿公司 型号: Biometra TOne 96G
电泳仪	美国 BIO-RAD 公司 型号: 041BR84226
凝胶成像分析系统	北京君意东方电泳设备有限公司 型号: JY04S-3C
隔水式电热恒温培养箱	上海博讯实业有限公司医疗设备厂 型号: BG-270

## 4.1.3 引物的合成

引物的合成参照已经报道的文献[103-110],设计合成 14 种常见的牛源致病性大肠杆菌毒力基因,引物基因序列及其长度见表 4-2,引物合成委托商为上海生工生物公司。

表 4-2 牛源大肠杆菌相关毒力基因引物序列及其长度

序号	引物名称	序列 ( 5'→3' )	片段大小 (bp)
1	irp2	F:AAGGATTCGCTGTTACCGGA R:TCGGCCAGGATGATTCGTCG	301
2	FyuA	F:ACACGGCTTATCCTCTGGC R:GGCATCTTGACGATTAACGAA	953
3	F41	F:GAGGGACTTTCATCTTTTAG R:AGTCCATTCCATTTATAGGC	431
4	K88	F:GCTGCATCTGCTGCATCTGGTATG R:CCACTGAGTGCTGGTAGTTACAGCC	792
5	K99	F:TATTATCTTAGGTGGTATGG R:GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTTC	314
6	987P	F:TCTGCTCTTAAAGCTACTGG R:AACTCCACCGTTTGTATCAG	333
7	F18	F:GTGAAAAGACTAGTGTTTATTTTC R:CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC	510
8	Stx1	F:TTAGACTTCTCGACTGCAAAG R:TGTTGTACGAAATCCCCTCTG	531
9	Stx2	F:CCATGACAACGGACAGCAGTT R:CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	779
10	STb	F:GCAATAAGGTTGAGGTGAT R:GCCTGCAGTGAGAAATGGAC	368
11	STa	F:TCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG R:GCACAGGCAGGATTACAACAAAGT	163
12	LT	F:GGCGACAGATTATACCGTGC R:CGGTCTCTATATCCCTGTT	450
13	eaeA	F:ATTACTGAGATTAAGGCTGAT R:ATTTATTTGCAGCCCCCAT	682
14	hlyA	F:GCATCATCAAGCGTACGTTCC R:AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534

## 4.2 方法

对实验前期分离鉴定出的 59 株牦牛源大肠杆菌进行牛源常见毒力基因的检测。PCR 反应 50  $\mu$ l 体系如表 4-3 所示。

表 4-3 50 $\mu$ l 普通 PCR 反应体系组分

体系组分	体积/ $\mu$ L
DNA 模板	4
上游引物(F)	2
下游引物(R)	2
2 $\times$ Taq PCR Mixture	25
ddH <sub>2</sub> O	17

### 4.2.1 毒力基因研究

对前期分离鉴定的 59 株牦牛源大肠杆菌进行常见的牛源致病性大肠杆菌相关毒力基因检测。PCR 反应程序如表 4-4。

表 4-4 牛源大肠杆菌毒力基因 PCR 反应程序

序号	基因名称	循环反应程序					
		预变性	Cyclic reaction system				
		( $^{\circ}$ C/min)	循环变性 ( $^{\circ}$ C/s)	退火温度 ( $^{\circ}$ C/s)	循环延伸 ( $^{\circ}$ C/s)	循环数 (次)	延伸 ( $^{\circ}$ C/min)
1	irp2	94/2	94/30	55/30	72/40	30	72/5
2	FyuA	94/2	94/30	52/30	72/90	35	72/5
3	F41	94/2	94/30	48/30	72/55	30	72/5
4	K88	94/2	94/30	58/30	72/90	30	72/5
5	K99	94/2	94/30	46/30	72/40	35	72/5
6	987P	94/2	94/30	48/30	72/45	35	72/5
7	F18	94/2	94/30	50/30	72/70	30	72/5
8	Stx1	94/2	94/30	50/30	72/60	35	72/5
9	Stx2	94/2	94/30	55/30	72/90	35	72/5
10	STb	94/2	94/30	50/30	72/50	35	72/5
11	STa	94/2	94/30	54/30	72/30	35	72/5
12	LT	94/2	94/30	54/30	72/55	30	72/5
13	eaeA	94/2	94/30	48/30	72/90	35	72/5
14	hlyA	94/2	94/30	53/30	72/60	35	72/5

### 4.2.2 耐药性研究

耐药性研究对于动物疾病的预防和治疗具有十分重要的临床意义,由于一些传统的抗生素和治疗药物的滥用,导致目前我国动物细菌性疫病呈现出发生率高、突变率高、致死率高和耐药性强的特点,因此通过耐药性研究来寻找更有针对性的治疗药物对临床预防和治疗动物细菌性疾病可以提供合理用药的理论支持。

#### 4.2.2.1 药物敏感性实验

研究人员对分离得到的 59 株牦牛源大肠杆菌进行药物敏感性试验,研究人员从杭州微生物试剂有限公司购取了四环素、新霉素、卡那霉素、庆大霉素、头孢他啶、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、氯霉素、克林霉素和红霉素共 11 种常见抗生素药物。采用 K-B 纸片扩散法对分离菌进行药敏试验,参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)抗生素药敏试验操作标准<sup>[111]</sup>,判定分离菌对临床常用抗菌药的敏感性。抑菌圈测量大小标准见表 4-5。

表 4-5 药敏试验抑菌圈标准

序号	抗生素	药片含量(μg/片)	抑菌圈判定标准/mm		
			耐药	中介	敏感
1	红霉素 Erythromycin	15	≤15	16~20	≥21
2	卡那霉素 Kanamycin	30	≤13	14~17	≥18
3	新霉素 Neomycin	30	≤12	13~16	≥17
4	头孢他啶 Ceftazidime	30	≤14	15~17	≥18
5	四环素 Tetracycline	30	≤18	19~22	≥23
6	环丙沙星 Ciprofloxacin	5	≤15	16~20	≥21
7	诺氟沙星 Norfloxacin	10	≤12	13~16	≥17
8	氧氟沙星 Ofloxacin	5	≤12	13~15	≥16
9	庆大霉素 Gentamicin	10	≤12	13~14	≥15
10	氯霉素 Chloramphenicol	30	≤17	18~20	≥21
11	克林霉素 Clindamycin	2	≤15	16~18	≥19

#### 4.2.2.2 耐药基因检测

参考文献[103]设计了 19 种耐药基因(磺胺类: sul1、sul2、sul3; 四环素类: tetA、tetB、tetE; 氨基糖苷类: aacC2、aacC4、aadA1、aadA2、aadB、aadD、aac(3)-1a、aac(3)-11a、aph(3)-11a; β-内酰胺类: SHV、TEM、CTX-M、OXA)。

耐药基因的引物设计序列见表 4-6, 耐药基因的 PCR 反应程序见表 4-7。

表 4-6 耐药基因引物序列及其长度

序号	引物名称	序列 (5'→3')	片段大小 (bp)
1	sul1	F:TTTCCTGACCCTGCGCTCTAT	425
		R:GAGCGGACGTAGTCAGCGCCA	
2	sul2	F:CCTGTTTCGTCCGACACAGA	435
		R:GAAGCGCAGCCGAATTCAT	
3	sul3	F:ATGAGCAAGATTTTTGGAATCGTAA	792
		R:CTAACCTAGGGCTTTGGATATTT	
4	tetA	F:TTGGCATTCTGCATTCACTC	494
		R:GTATAGCTTGCCGGAAGTCG	
5	tetB	F:CAGTGCTGTTGTTGTCATTAA	571
		R:GCTTGAATACTGAGTGTAATA	
6	tetE	F:TATTAACGGGCTGGCATT	544
		R:AGCTGTCAGGTGGGTCAAAC	
7	aacC2	F:GGCAATAACGGAGGCAATTCGA	698
		R:CTCGATGGCGACCGAGCTTCA	
8	aacC4	F:CGATGCTCTATGAGTGGCTAA	356
		R:GTCCGTTTGGATCTTGGTGA	
9	aadA1	F:GCTCCATTGCCAGTCG	497
		R:TTTGCTGGTTACGGTGAC	
10	aadA2	F:CATCCCGTGGCGTTATCC	370
		R:CTGGGCAGGTAGGCGTTT	
11	aadB	F:GCGAAATCTGCCGCTCTG	412
		R:TGCGAGCCTGTAGGACTC	
12	aadD	F:TATATCCGTGTCGTTCTGTCCA	419
		R:CTCTATTTTGCCGATTTATGATTC	
13	aac(3)-1a	F:TGCGGGCTGCTCTTGATCTT	436
		R:ATCTCGGCTTGAACGAATTG	
14	aac(3)-11a	F:TGGCTGAAACGCTGACGG	369
		R:ACAGGTAGCACTGGGCAAAA	
15	aph(3)-11a	F:AATCAGGTGCGACAATCT	409
		R:TTACGCTCGTCATCAAAA	

16	SHV	F:TGTATTATCTCCCTGTTAGC R:TTAGCGTTGCCAGTGCTC	843
17	TEM	F:CAGAAACGCTGGTGAAAG R:TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	788
18	CTX-M	F:GCTGGGTAAAGCATTGGG R:TAGGTTGAGGCTGGGTGA	224
19	OXA	F:TTTTCTGTTGTTTGGGTTTC R:TTTCTTGGCTTTTATGCTTG	447

表 4-7 耐药基因 PCR 反应程序

序号	基因名称	循环反应体系					延伸 (°C/min)
		预变性 (°C/min)	循环变性 (°C/s)	退火温度 (°C/s)	循环延伸 (°C/s)	循环数 (次)	
1	sul1	94/2	94/30	59/30	72/50	35	72/5
2	sul2	94/2	94/30	55/30	72/50	35	72/5
3	sul3	94/2	94/30	48/30	72/90	35	72/5
4	tetA	94/2	94/30	51/30	72/60	35	72/5
5	tetB	94/2	94/30	47/30	72/70	35	72/5
6	tetE	94/2	94/30	51/30	72/60	35	72/5
7	aacC2	94/2	94/30	57/30	72/80	35	72/5
8	aacC4	94/2	94/30	51/30	72/50	35	72/5
9	aadA1	94/2	94/30	51/30	72/60	35	72/5
10	aadA2	94/2	94/30	54/30	72/50	35	72/5
11	aadB	94/2	94/30	54/30	72/55	35	72/5
12	aadD	94/2	94/30	50/30	72/55	35	72/5
13	aac(3)-1a	94/2	94/30	53/30	72/55	35	72/5
14	aac(3)-11a	94/2	94/30	54/30	72/50	35	72/5
15	aph(3)-11a	94/2	94/30	46/30	72/50	35	72/5
16	SHV	94/2	94/30	48/30	72/90	35	72/5
17	TEM	94/2	94/30	47/30	72/90	35	72/5
18	CTX-M	94/2	94/30	51/30	72/30	35	72/5
19	OXA	94/2	94/30	45/30	72/55	35	72/5

### 4.2.3 致病性研究

#### 4.2.3.1 动物接种

为确定携带毒力基因分离株的致病性,从 59 株大肠杆菌中选取携带多种毒力基因的 19 株分离菌进行动物接种试验。F1 (irp2、FyuA、K99、987P、STb)、F2 (hlyA、K99、987P、STb)、F8 (irp2、FyuA、hlyA、K99、987P、STb)、F11 (irp2、FyuA、K99、987P、STb)、F13 (Stx1、hlyA、K99、987P、STb)、F14 (hlyA、eaeA)、F16 (Stx2、hlyA、K99、987P、STb)、F17 (Stx1、Stx2、hlyA、K99、987P、STb)、F34 (irp2、FyuA、hlyA、K99、STb)、F37 (irp2、FyuA、K99、987P、eaeA)、F42 (Stx2、irp2、FyuA、hlyA、K99、987P、STb)、F44 (irp2、FyuA、K99、987P、STb)、F47 (FyuA、hlyA、K99、987P、STb)、F48 (FyuA、K99)、F50 (irp2、FyuA、K99、STb)、F53 (irp2、FyuA、K99、987P、STb)、F54 (irp2、FyuA、K99、987P、STb)、F55 (irp2、FyuA、K99、987P、STb)、F56 (irp2、FyuA、K99)。实验组小鼠每组 3 只,每只注射 0.2 ml 菌液,同时对照组 3 只小鼠注射灭菌生理盐水,0.2 ml/只。注射后 6 h、12 h、24 h、36 h 至一周时间,观察并记录小鼠的死亡状况。

#### 4.2.3.2 大肠杆菌回收分离试验

将死亡的小鼠进行剖检,观察到脾脏肿大,肝脏肿大有出血点,肾脏肿大,肺脏充血,肠管内有黄色稀便等现象,对脾脏、肝脏和肾脏进行无菌采集,并涂抹在 EMA 培养基上,37 °C 恒温培养 18~24 h,观察结果。

#### 4.2.3.3 病理切片观察

将新鲜组织样本做好标记后,置于 20 倍 10% 中性福尔马林固定液中固定 24 h 后换液,继续固定 24 h。而后取出用手术刀修剪至 5~10 mm 厚度即可置于包埋盒内。流水冲洗 8 h 后,将样本分别以 50%、70%、80%、95% 浓度的乙醇和无水乙醇进行梯度浓度脱水,根据组织厚度灵活设定脱水时间,一般小鼠组织每个浓度脱水时间控制在 10~30 min 之间,但是需要在 95% 和 100% 乙醇中脱水两次。脱水完毕后按步骤进行透明,在实验中采用二甲苯透明 2 h 左右,将组织块透明至半透明状态即可,透明时间不宜过长,时间过长会导致组织质地变脆。透明后浸蜡,将透明后的组织块完全浸入 56~60 °C 的石蜡 I 中 1 h,再浸入 56~60 °C 石蜡 II 中 1 h。然后将浸蜡后的组织块取出放进包埋盒进行包埋,然后等蜡块自然冷却后进行切片。

将全自动石蜡切片机切片厚度设定为 4~5  $\mu\text{m}$  进行切片,然后在 58~60 °C 的温箱中进行 2 h 左右的烤片,烤片完毕后按 HE 染液说明书进行染色,最后使用中性树脂进行盖片。待中性树脂固化后,采用 Motic EasyScan 数字切片扫描仪进行扫描留存。

## 4.3 结果

### 4.3.1 毒力基因检测结果

#### 4.3.1.1 牛源大肠杆菌毒力基因检测结果

检测结果显示,在合成的 14 种常见的牛源致病性大肠杆菌相关毒力基因中,检测出来 *irp2*、*FyuA*、*K99*、*987P*、*Stx1*、*Stx2*、*STb*、*eaeA* 和 *HlyA* 这 9 种毒力基因,检测率分别为 20.34%、23.73%、94.91%、71.19%、3.39%、5.08%、93.22%、5.08%和 50.85%,见表 4-8。*F41*、*LT*、*STa*、*K88*、*F18* 这 5 种毒力基因均未被检测到。其中各毒力基因电泳结果如图 4-1 到 4-9。

表 4-8 59 株分离株毒力基因检出率

基因名	检出株数	菌株编号	阳性检出率%
<i>irp2</i>	12	F1、F8、F11、F34、F37、F42、F44、F50、F53-F56	20.34
<i>FyuA</i>	14	F1、F8、F11、F34、F37、F42、F44、F47、F48、F50、F53-F56	23.73
<i>F41</i>	0	0	0
<i>K88</i>	0	0	0
<i>K99</i>	56	F1-F56	94.91
<i>987P</i>	42	F1-F18、F23、F24、F25、F26、F28、F30-F34、F37-F39、F41-F45、 F47、F49、F51-F53、F55	71.19
<i>F18</i>	0	0	0
<i>Stx1</i>	2	F13、F17	3.39
<i>Stx2</i>	3	F16、F17、F42	5.08
<i>STa</i>	0	0	0
<i>STb</i>	55	F1-F55	93.22
<i>LT</i>	0	0	0
<i>eaeA</i>	3	F14、F32、F37	5.08
<i>hlyA</i>	30	F2-F6、F10、F12、F13、F14、F16、F17、F21、F23、F25-F28、 F30-F34、F38、F40、F42、F43、F45-F47	50.85

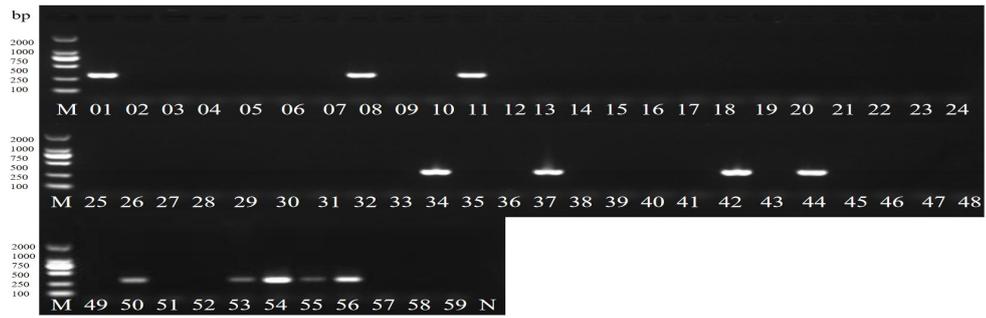


图 4-1 59 株分离菌株牛源 *irp2* 目的基因扩增电泳图

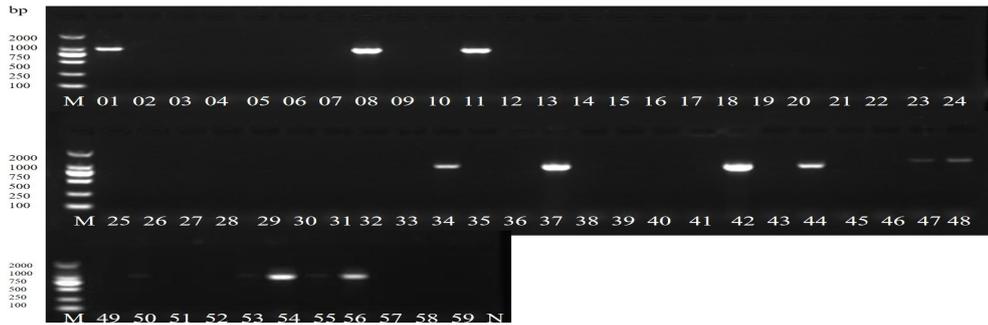


图 4-2 59 株分离菌株牛源 *FyuA* 目的基因扩增电泳图

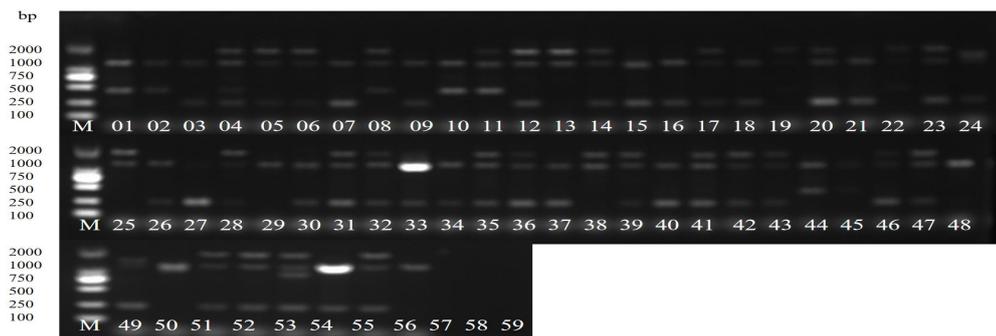


图 4-3 59 株分离菌株牛源 *K99* 目的基因扩增电泳图



图 4-4 59 株分离菌株牛源 *987P* 目的基因扩增电泳图



图 4-5 59 株分离菌株牛源 Stx1 目的基因扩增电泳图

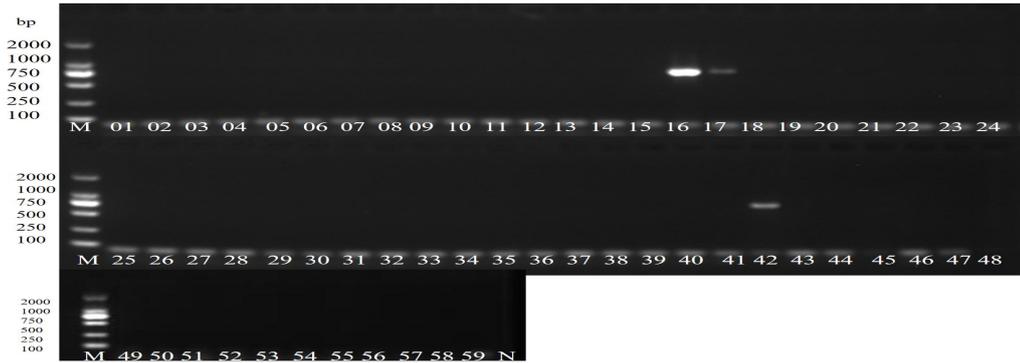


图 4-6 59 株分离菌株牛源 Stx2 目的基因扩增电泳图

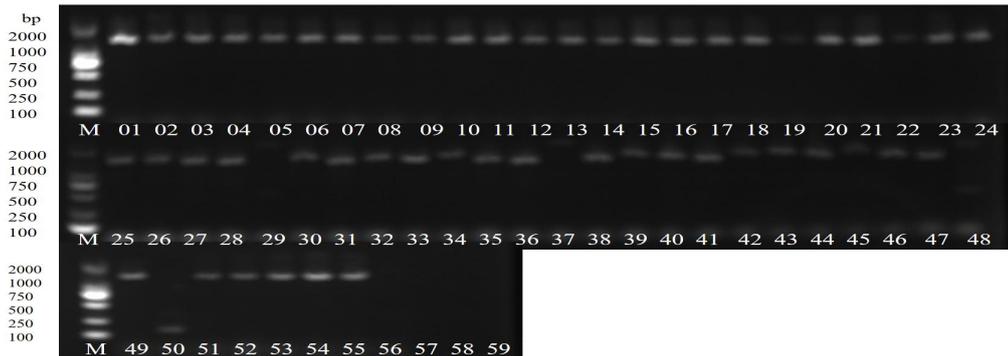


图 4-7 59 株分离菌株牛源 STb 目的基因扩增电泳图

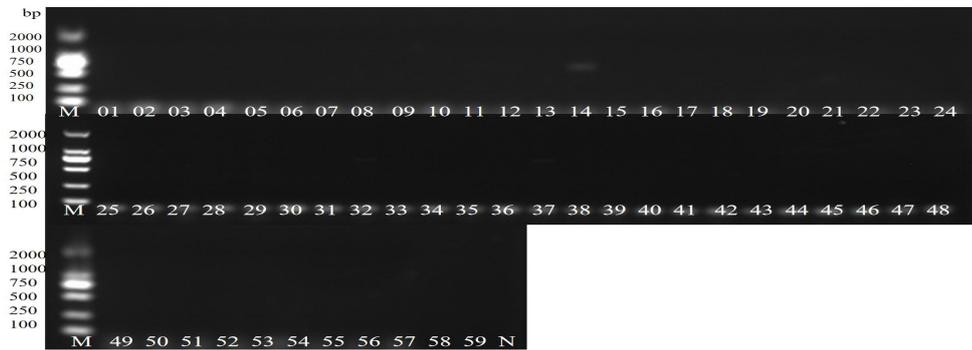


图 4-8 59 株分离菌株牛源 eaeA 目的基因扩增电泳图

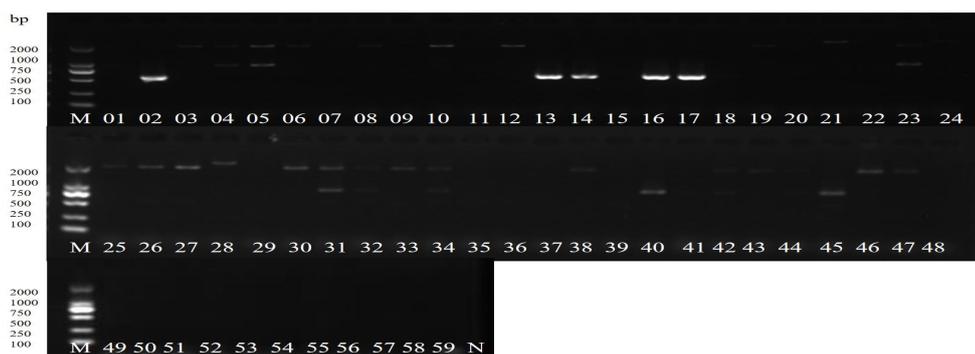


图 4-9 59 株分离菌株牛源 HlyA 目的基因扩增电泳图

### 4.3.2 耐药性检测结果

#### 4.3.2.1 药物敏感性试验结果

通过对 59 株大肠杆菌进行药敏试验,观察抑菌圈有无和测量其大小,通过分析结果可以发现,分离株对环丙沙星、诺氟沙星和氧氟沙星高度敏感,对卡那霉素、头孢他啶、庆大霉素和氯霉素的敏感性超过 60%。对红霉素(88.14%)和克林霉素(98.31%)也高度耐药,其次是四环素(50.85%),对头孢他啶(30.51%)也有一定的耐药性。59 株细菌耐药菌株数量及耐药率如表 4-9 所示。

表 4-9 59 株细菌耐药菌株数量及耐药率

序号	抗生素	药片含量( $\mu\text{g}/\text{片}$ )	耐药率/%	中介率/%	敏感率/%
1	红霉素 Erythromycin	15	88.14(52/59)	11.86(7/59)	0(0/59)
2	卡那霉素 Kanamycin	30	8.74(5/59)	20.34(12/59)	71.19(42/59)
3	新霉素 Neomycin	30	10.17(6/59)	44.07(26/59)	45.76(27/59)
4	头孢他啶 Ceftazidime	30	30.51(18/59)	8.47(5/59)	61.02(36/59)
5	四环素 Tetracycline	30	50.85(30/59)	47.46(28/59)	1.7(1/59)
6	环丙沙星 Ciprofloxacin	5	15.25(9/59)	0(0/59)	84.75(50/59)
7	诺氟沙星 Norfloxacin	10	15.25(9/59)	0(0/59)	84.75(50/59)
8	氧氟沙星 Ofloxacin	5	15.25(9/59)	0(0/59)	84.75(50/59)
9	庆大霉素 Gentamicin	10	16.95(10/59)	3.39(2/59)	79.66(47/59)
10	氯霉素 Chloramphenicol	30	13.56(8/59)	11.86(7/59)	74.58(44/59)
11	克林霉素 Clindamycin	2	98.31(58/59)	1.7(1/59)	0(0/59)

#### 4.3.2.2 耐药基因检测结果

检测结果显示,在合成的四类 19 种耐药基因中,检测出来 *sul1*、*sul2*、*tetA*、*tetE*、*aacC2*、*aacC4*、*aadA1*、*aadA2*、*aac(3)-11a*、SHV 和 TEM 11 种耐药基因,检测率分别为 23.73%、44.07%、27.12%、62.71%、6.78%、10.17%、25.42%、55.93%、81.36%、8.47%和 50.85%,见表 4-10。其余耐药基因均未被检测到。其中各耐药基因电泳结果如图 4-10 到 4-20。

表 4-10 59 株分离株耐药基因检出率

基因名	检出株数	菌株编号	阳性检出率%
sul1	14	F2、F8、F12、F17、F35、F36、F39、F40、F49、F50、F52、 F55、F56、F58	23.73
sul2	26	F2、F6、F8、F12、F15、F17、F33-F44、F49-F52、F55、F56、 F58、F59	44.07
sul3	0	0	0
tetA	16	F4、F8、F11、F15、F18、F35、F36、F39、F40、F49、F51、 F52、F55、F56、F58、F59	27.12
tetB	0	0	0
tetE	37	F1-F14、F16、F18-F24、F26-F34、F39-F43、F45、F4F8	62.71
aacC2	4	F8、F35、F36、F40	6.78
aacC4	6	F17、F36-F40	10.17
aadA1	15	F4、F15、F18、F19、F22、F28、F29、F36、F42、F50-F53、F55、 F58	25.42
aadA2	33	F1-F7、F9、F10、F12、F13、F17、F20、F24、F26、F27、F30-F40、 F43-F46、F50、F51	55.93
aadB	0	0	0
aadD	0	0	0
aac(3)-1a	0	0	0
aac(3)-11a	48	F1-F9、F11-F19、F21-F24、F26-F30、F33-F40、F42-F49、F51、 F52、F55、F56、F58	81.36
aph(3)-11a	0	0	0
CTX-M	0	0	0
OXA	0	0	0
SHV	5	F6、F34、F35、F42、F44	8.47
TEM	30	F2、F3、F8-F10、F12、F13、F15、F17、F18、F20、F26、F28、 F33-F44、F48、F49-F52、F56、F58	50.85

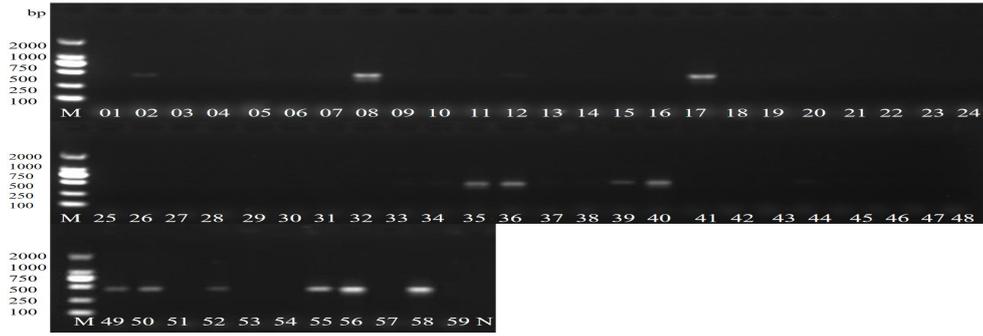


图 4-10 59 株分离菌株牛源 *sul1* 目的基因扩增电泳图

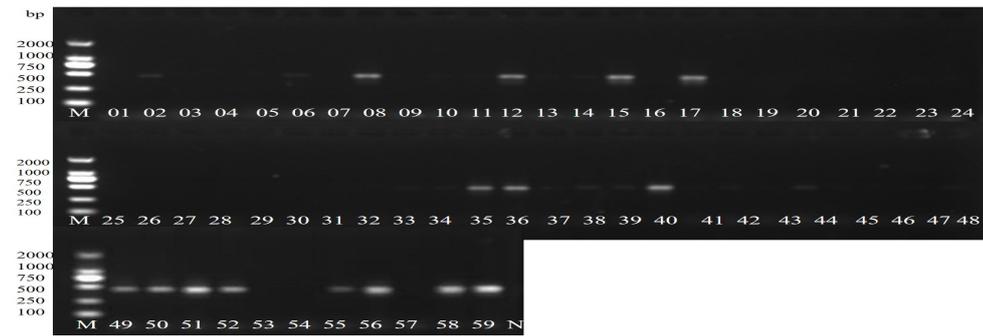


图 4-11 59 株分离菌株牛源 *sul2* 目的基因扩增电泳图

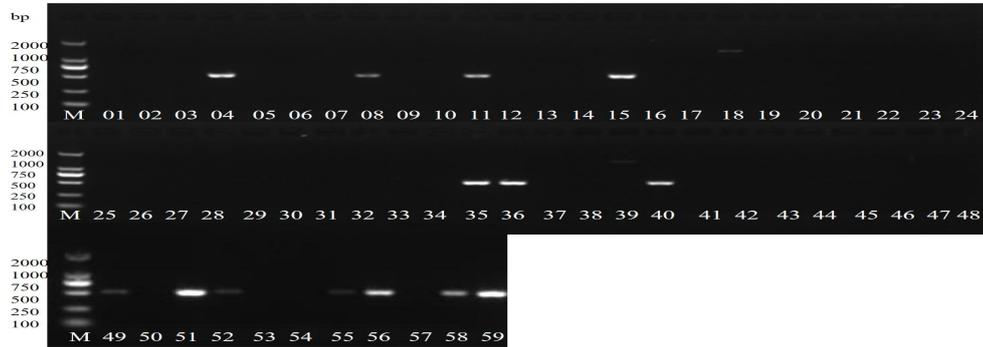


图 4-12 59 株分离菌株牛源 *tetA* 目的基因扩增电泳图

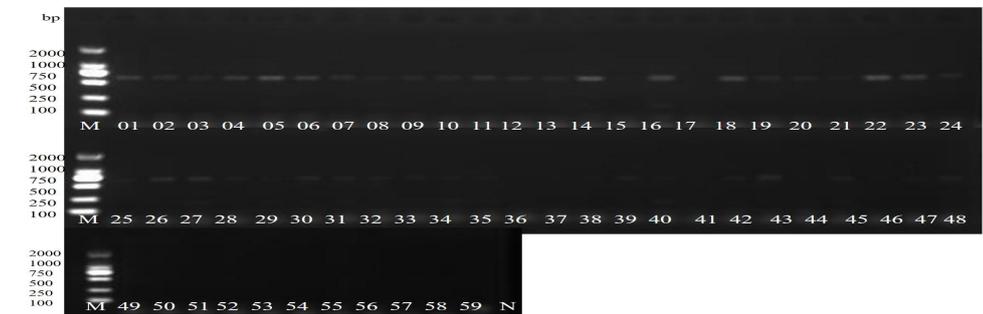


图 4-13 59 株分离菌株牛源 *tetE* 目的基因扩增电泳图



图 4-14 59 株分离菌株牛源 *aacC2* 目的基因扩增电泳图

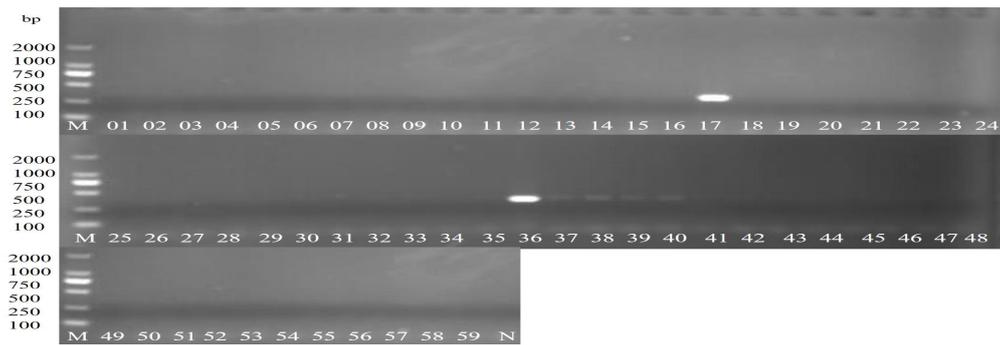


图 4-15 59 株分离菌株牛源 *aacC4* 目的基因扩增电泳图

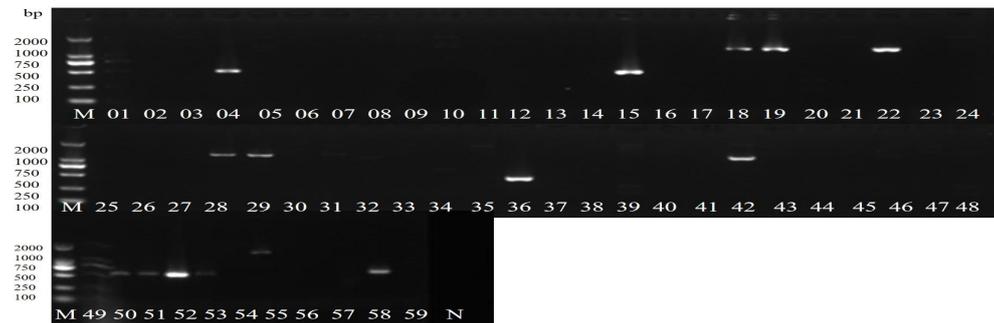


图 4-16 59 株分离菌株牛源 *aadA1* 目的基因扩增电泳图

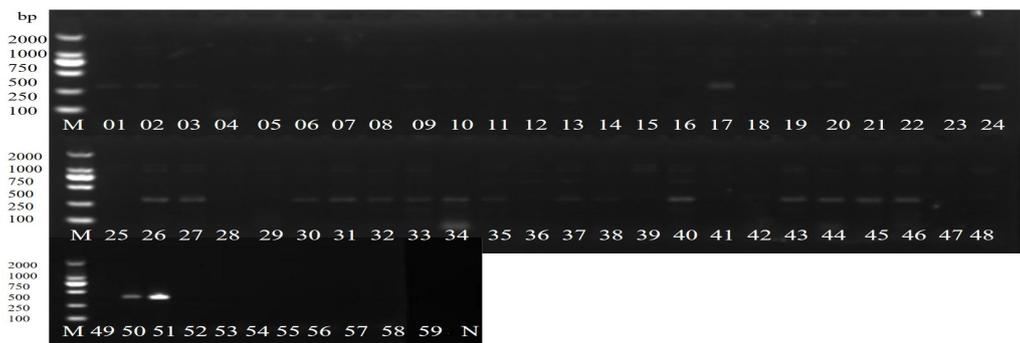


图 4-17 59 株分离菌株牛源 *aadA2* 目的基因扩增电泳图

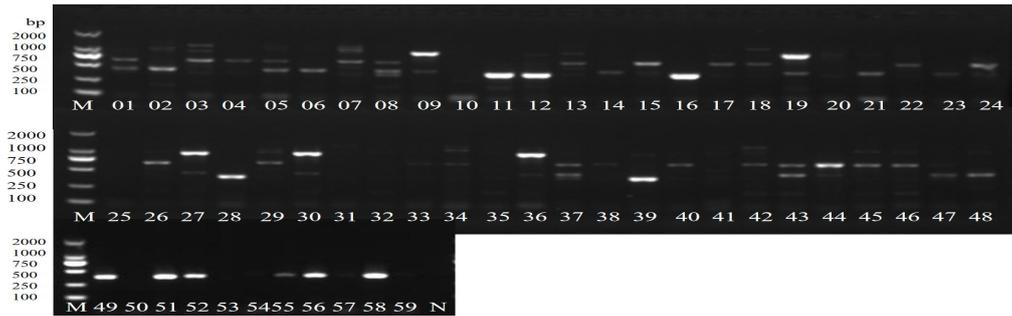


图 4-18 59 株分离菌株牛源 *aac(3)-IIa* 目的基因扩增电泳图

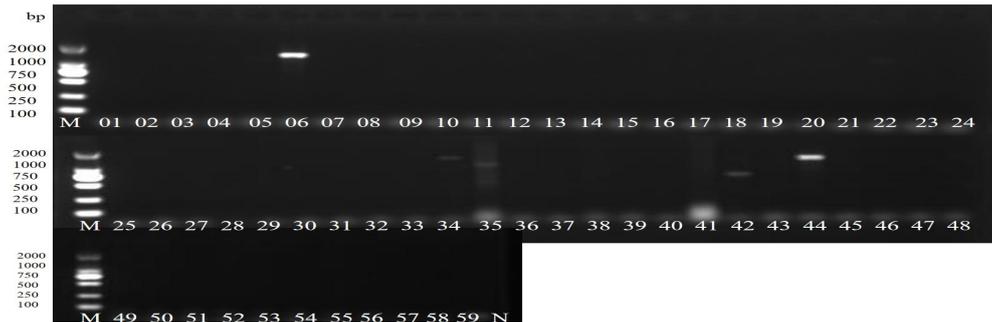


图 4-19 59 株分离菌株牛源 SHV 目的基因扩增电泳图

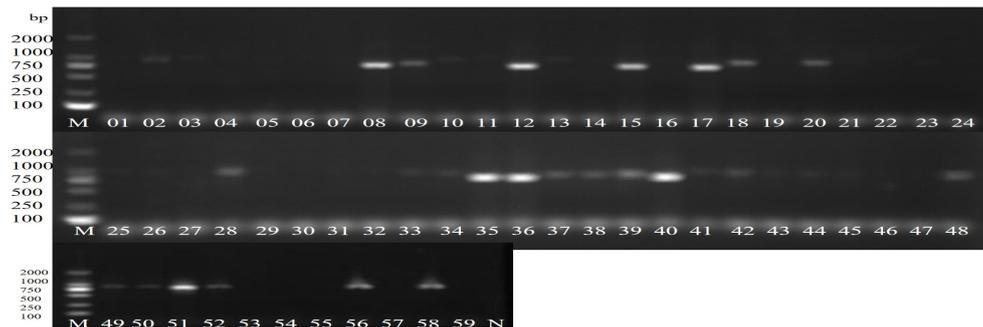


图 4-20 59 株分离菌株牛源 TEM 目的基因扩增电泳图

### 4.3.3 致病性研究结果

#### 4.3.3.1 动物剖检结果分析

小鼠在攻毒后 6 h 内均出现精神沉郁、食欲废绝和被毛粗乱，多数小鼠出现畏寒扎堆，腹泻等症状。其中在注射 F34 和 F42 菌液 3 h 内，小鼠全部死亡，注射 F8 和 F13 菌液 6 h 内，小鼠全部死亡，其他组小鼠在攻毒 12~72 h 后全部死亡。剖检死亡小鼠发现：小鼠腹腔有积液，脾脏肿大明显，肺脏充血，心脏肿大淤血，肝脏质脆易碎，肠壁变薄，肠系膜充血，肠管内有黄色稀便。如图 4-21 所示。

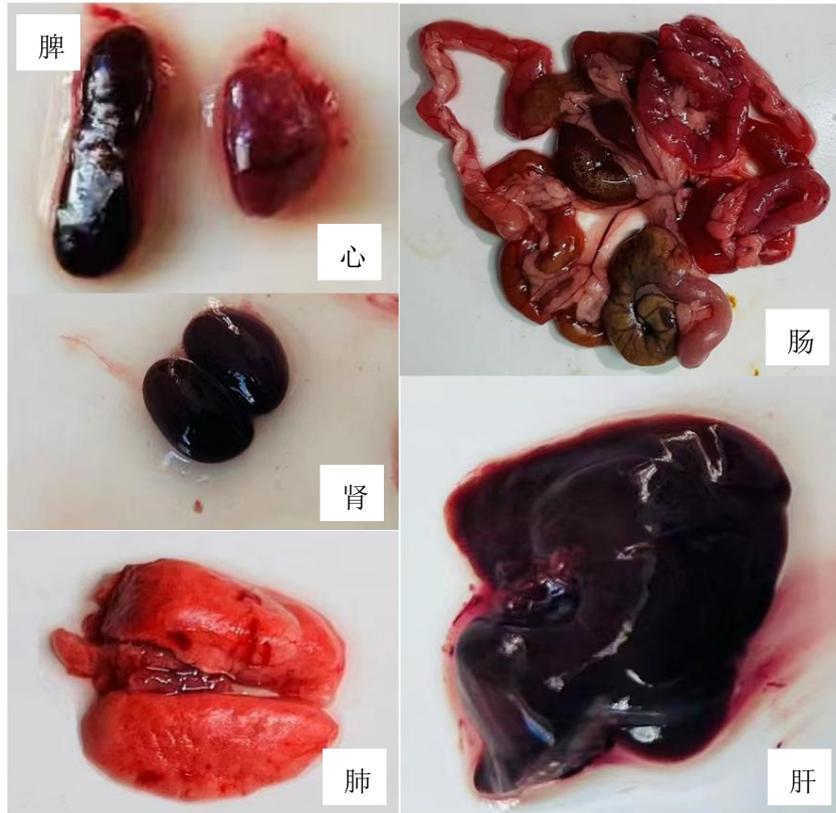


图 4-21 攻毒小鼠剖检脏器

#### 4.3.3.2 病理切片结果分析

将攻毒小鼠的肺、肝、脾、肾、心和肠在新鲜的状态下固定于 10%中性福尔马林固定液中浸泡 24 h 以上，而后按病理切片流程进行制作，染色封片后于数字切片扫描仪内进行扫描。可以发现攻毒小鼠的多个器官全部出现不同程度的病理性损伤，肺：肺组织呈弥漫性出血，血管淤血，部分肺泡囊融合形成腔体，少量纤维素性渗出，肺泡细胞坏死，坏死肺泡结构相互融合。肝：肝细胞结构排列无明显异常，汇管区小叶间动脉充血，小叶间静脉淤血，胆小管内充满血液，中央静脉淤血。脾：脾脏红髓白髓分布无明显异常，脾索结构无明显异常，结缔组织增厚。肾：部分肾近曲小管内充满血液，肾小管上皮细胞轻度空泡变性，刷毛边缘脱落，细胞扁平，管腔扩张。心：心肌呈条带状出血，部分心肌纤维断裂，静脉淤血。肠：肠上皮细胞变性坏死，出血严重，绒毛变短脱落，肠腔内有大量脱落的上皮细胞，基底膜下层水肿出血。攻毒脏器病理切片扫描图见图 4-22。

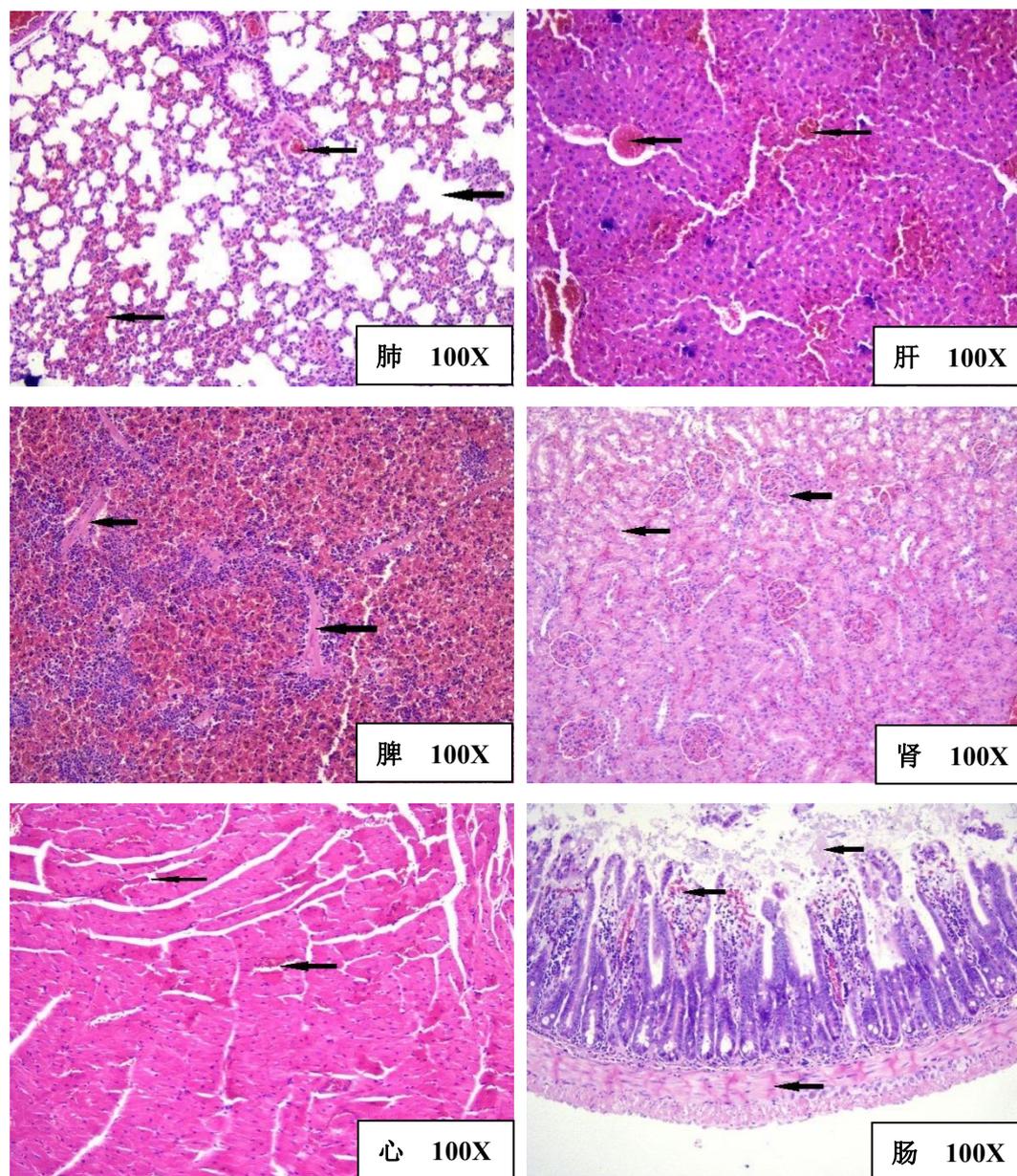


图 4-22 攻毒小鼠脏器病理切片

#### 4.4. 讨论

通过毒力基因检测，可以发现与耶尔森强毒力岛有关的 *irp2* 和 *FyuA* 的检出率为 20.34%和 23.73%，而陈朝喜等<sup>[112]</sup>对川西北地区牦牛源大肠杆菌毒力基因 *irp2* 和 *FyuA* 的检出率均为 7.28%（15/206），结果相近。在控制黏附素表达的基因 F41、K88、K99、987P 和 F18 中，仅检出 K99 94.91%和 987P 71.19%。*Stx1* 和 *Stx2* 作为与产志贺毒素相关的毒力基因，整体检出率分别为 3.39%和 5.08%。孟含等<sup>[113]</sup>从牦牛屠宰场检出 *Stx1* 和 *Stx2* 阳性，而姚望远等<sup>[114]</sup>对青海腹泻牦牛进行大肠杆菌毒力基因检测，未检出 *Stx1* 和 *Stx2* 阳性。在肠毒素 STa、STb 和 LT 中，本实验只有 STb 被检出阳性，检出率为 93.22%。编码非菌毛黏附素的毒

力基因 *eaeA* 的整体阳性检出率为 5.08%，而编码 EHEC 溶血素的毒力基因 *hlyA* 的整体阳性检出率为 50.85%。诸明欣等<sup>[100]</sup>对牦牛源溶血性大肠杆菌进行毒力相关基因检测，发现溶血素毒力基因 *hlyA* 的检出率高达 96%，*irp2* 和 *FyuA* 的检出率为 93.2%，*Stx2* 为 2.7%，其他包括 *LT*、*STa*、*STb*、*K99*、*stx1* 均未被检出。因此，研究人员发现牦牛源致病性大肠杆菌的毒力基因存在明显差异。

本研究的耐药基因检测结果显示，磺胺类、四环素类、氨基糖苷类和 $\beta$ -内酰胺类四类 19 种耐药基因中共检出 11 种，其中 *aac(3)-IIa* 的检出率最高为 81.36% (48/59)，其次为 *tetE* 62.71%、*aadA2* 55.93%、*TEM* 50.85%、*sul2* 44.07%、*tetA* 27.12%、*aadA1* 25.42%、*sul1* 23.73%、*aacC4* 10.17%、*SHV* 8.47% 和 *aacC2* 6.78%。Jia 等<sup>[115]</sup>对致犊牛腹泻大肠杆菌进行耐药基因检测，发现分离株对四环素类耐药基因检出率分别为 *tetB* (29%)、*tetA* (19%) 和 *tetD* (14%)， $\beta$ -内酰胺类耐药基因检出率分别为 *CTX-M* (29%)，*TEM* (29%)，和 *SHV* (9.5%)，氨基糖苷类耐药基因检出率分别为 *aacC* (33%) 和 *aadA1* (24%) 以及磺胺类耐药基因 *sul2* 检出率为 33%。王刚等<sup>[116]</sup>对牦牛源产肠毒素性大肠杆菌进行了 $\beta$ -内酰胺类耐药基因检测，未检出 *OXA* 和 *SHV* 基因。索朗斯珠等<sup>[117]</sup>对牦牛源大肠杆菌进行磺胺类耐药基因检测显示 *sul1* 6.56%、*sul2* 4.92% 和 *sul3* 13.11% 均有检出。

Lei 等<sup>[118]</sup>测试了中国青藏高原牦牛腹泻性大肠杆菌的抗菌素耐药性，发现分离株对四环素的耐药率高 (93.6%)，对氧氟沙星的耐药率低 (16.7%)，与本实验的结果相近。Rehman 等<sup>[119]</sup>发现分离自腹泻牦牛大肠杆菌的抗生素耐药性为氨苄西林 (95.5%)、四环素 (90.1%) 和庆大霉素 (79.4%) 的耐药率最高，而本实验中的分离菌却对庆大霉素的敏感性超过 60%。本实验分离的 59 株牦牛源大肠杆菌，对红霉素 (88.14%) 和克林霉素 (98.31%) 高度耐药，其次是四环素 (50.85%)，对头孢他啶 (30.51%) 也有一定的耐药性。从此数据可以看出，西藏部分地区牦牛源致病性大肠杆菌，对这些抗生素耐药性较强，应减少这些抗生素的使用。

## 结论

研究人员对腹泻牦牛粪便菌群多样性以及导致牦牛腹泻病的致病性大肠杆菌进行综合性的试验分析。通过第二代宏基因组测序对腹泻牦牛粪便微生物区系的种类组成、丰度等相关数据从分子生物学层面加以剖析。在此基础上,对导致牦牛腹泻的致病性大肠杆菌进行分离培养、O-抗原血清型鉴定、16s rRNA 鉴定、毒力性检测、耐药性检测、动物致病性试验以及病理切片分析。

1、牦牛在发生腹泻后,肠道菌群平衡被打破,并且变形菌门丰度显著增加。变形菌门包括大肠杆菌、幽门螺旋杆菌和沙门氏菌等有害菌。通过分析发现牦牛腹泻可能主要是由变形菌门的菌群丰度增加引起的。

2、通过细菌分离培养、O-抗原血清型鉴定、16s rRNA 序列分析等方法。本研究共分离鉴定出 59 株大肠杆菌,分离率为 100%,实验结果表明腹泻牦牛粪便样本中提取出来的大肠杆菌菌株有 11.86%属于 O1、11.86%属于 O111、8.47%属于 O128。

3、通过毒力基因检测分析发现,西藏地区腹泻牦牛粪便分离出的大肠杆菌菌株同时携带多种毒力基因,可能与当地常年来放养习惯有关。

4、研究发现西藏地区牦牛源致病性大肠杆菌对于氨基糖苷类耐药基因检出率最高,应减少此类药物的使用。药敏试验结果显示,对红霉素和克林霉素耐药率高。在临床用药时,应减少这些抗生素的使用。

## 参考文献

- [1] Savage D C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1977,31:107-133.
- [2] Ley R E, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes[J]. *Science*, 2008,320(5883):1647-1651.
- [3] Sommer F, Backhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013,11(4):227-238.
- [4] Kamada N, Chen G Y, Inohara N, et al. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota[J]. *Nat Immunol*, 2013,14(7):685-690.
- [5] Manichanh C, Borruel N, Casellas F, et al. The gut microbiota in IBD[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012,9(10):599-608.
- [6] Han H, Jiang Y, Wang M, et al. Intestinal dysbiosis in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): focusing on the gut-liver axis[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021:1-18.
- [7] Li A, Wang Y, He Y, et al. Environmental fluoride exposure disrupts the intestinal structure and gut microbial composition in ducks[J]. *Chemosphere*, 2021,277:130222.
- [8] Su Y, Su J, Li F, et al. Yak Gut Microbiota: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *Front Vet Sci*, 2022,9:889594.
- [9] Ren Q, Si H, Yan X, et al. Bacterial communities in the solid, liquid, dorsal, and ventral epithelium fractions of yak (*Bos grunniens*) rumen[J]. *Microbiologyopen*, 2020,9(2):e963.
- [10] Zhang L, Jiang X, Li A, et al. Characterization of the microbial community structure in intestinal segments of yak (*Bos grunniens*)[J]. *Anaerobe*, 2020,61:102115.
- [11] Guo W, Li Y, Wang L, et al. Evaluation of composition and individual variability of rumen microbiota in yaks by 16S rRNA high-throughput sequencing technology[J]. *Anaerobe*, 2015,34:74-79.
- [12] 粟雨芯. 牦牛肠道菌群影响因素分析及牦牛乳对人体粪便菌群的影响[D]. 西北民族大学, 2022.
- [13] Ma J, Zhu Y, Wang Z, et al. Comparing the Bacterial Community in the Gastrointestinal Tracts Between Growth-Retarded and Normal Yaks on the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *Front Microbiol*, 2020,11:600516.
- [14] Wang Y, Fu Y, He Y, et al. Longitudinal Characterization of the Gut Bacterial and Fungal Communities in Yaks[J]. *J Fungi (Basel)*, 2021,7(7).
- [15] Qin W, Song P, Li J, et al. Representativeness of Fecal Microbiota Is Limited to Cecum and Colon in Domestic Yak[J]. *Sustainability*, 2022.
- [16] Liú W, Wang Q, Song J, et al. Comparison of Gut Microbiota of Yaks From Different Geographical Regions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021,12.
- [17] Han L, Xue W, Cao H, et al. Comparison of Rumen Fermentation Parameters and Microbiota of Yaks From Different Altitude Regions in Tibet, China[J]. *Front Microbiol*, 2021,12:807512.
- [18] Wu Z L, Wei R, Tan X, et al. Characterization of gut microbiota dysbiosis of diarrheic

- adult yaks through 16S rRNA gene sequences[J]. *Front Vet Sci*, 2022,9:946906.
- [19] Pang K, Dai D, Yang Y, et al. Effects of high concentrate rations on ruminal fermentation and microbiota of yaks[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022,13.
- [20] Yi S, Dai D, Wu H, et al. Dietary Concentrate-to-Forage Ratio Affects Rumen Bacterial Community Composition and Metabolome of Yaks[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022,9.
- [21] Liu C, Wu H, Liu S, et al. Dynamic Alterations in Yak Rumen Bacteria Community and Metabolome Characteristics in Response to Feed Type[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019,10.
- [22] Omoniyi L A, Jewell K A, Isah O A, et al. An analysis of the ruminal bacterial microbiota in West African Dwarf sheep fed grass- and tree-based diets[J]. *J Appl Microbiol*, 2014,116(5):1094-1105.
- [23] Mohammed R, Brink G E, Stevenson D M, et al. Bacterial communities in the rumen of Holstein heifers differ when fed orchardgrass as pasture vs. hay[J]. *Front Microbiol*, 2014,5:689.
- [24] Liu C, Meng Q, Chen Y, et al. Role of Age-Related Shifts in Rumen Bacteria and Methanogens in Methane Production in Cattle[J]. *Front Microbiol*, 2017,8:1563.
- [25] Ahmad A A, Zhang J, Liang Z, et al. Age-dependent variations in rumen bacterial community of Mongolian cattle from weaning to adulthood[J]. *BMC Microbiol*, 2022,22(1):213.
- [26] Zhang X, Xu T, Wang X, et al. Effect of Dietary Protein Levels on Dynamic Changes and Interactions of Ruminal Microbiota and Metabolites in Yaks on the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *Front Microbiol*, 2021,12:684340.
- [27] Jia J, Liang C, Wu X, et al. Effect of high proportion concentrate dietary on Ashdan Yak jejunal barrier and microbial function in cold season[J]. *Res Vet Sci*, 2021,140:259-267.
- [28] Liu H, Ran T, Zhang C, et al. Comparison of rumen bacterial communities between yaks (*Bos grunniens*) and Qaidam cattle (*Bos taurus*) fed a low protein diet with different energy levels[J]. *Front Microbiol*, 2022,13:982338.
- [29] Liu X, Li J, Hao L, et al. Effect of the ratio of dietary metabolizable energy to nitrogen content on production performance, serum metabolites, rumen fermentation parameters, and bacterial diversity in yaks[J]. *Front Microbiol*, 2022,13:1013980.
- [30] Sha Y, Hu J, Shi B, et al. Characteristics and Functions of the Rumen Microbial Community of Cattle-Yak at Different Ages[J]. *Biomed Res Int*, 2020,2020:3482692.
- [31] 郭文杰, 刘书杰, 崔占鸿, 等. 基于 16S rRNA 测序技术对不同年龄放牧公牦牛肠道细菌区系的比较分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2021,48(10):3614-3624.
- [32] Li Y, Li X, Liu Y, et al. Comparison of Bacterial and Fungal Community Structure and Potential Function Analysis of Yak Feces before and after Weaning[J]. *Biomed Res Int*, 2022,2022:6297231.
- [33] Wang Y, Zhang H, Zhu L, et al. Dynamic Distribution of Gut Microbiota in Goats at Different Ages and Health States[J]. *Front Microbiol*, 2018,9:2509.
- [34] Santos-Marcos J A, Rangel-Zuniga O A, Jimenez-Lucena R, et al. Influence of gender and menopausal status on gut microbiota[J]. *Maturitas*, 2018,116:43-53.
- [35] Wen J, Cao P, Yang G, et al. Changes of the mice intestinal microbes by the oligosaccharides-enriched fermented milk in a gender-dependent pattern[J]. *Food Res Int*, 2021,140:110047.

- [36] Darch H T, Collins M K, O'Riordan K J, et al. Microbial memories: Sex-dependent impact of the gut microbiome on hippocampal plasticity[J]. *Eur J Neurosci*, 2021,54(4):5235-5244.
- [37] Beale A L, Kaye D M, Marques F Z. The role of the gut microbiome in sex differences in arterial pressure[J]. *Biol Sex Differ*, 2019,10(1):22.
- [38] 韩学平, 刘宏金, 胡林勇, 等. 环湖牦牛瘤胃微生物区系特征及性别之间的差异[J]. *动物营养学报*, 2020,32(01):234-243.
- [39] Qin W, Li S, Wu N, et al. Main Factors Influencing the Gut Microbiota of Datong Yaks in Mixed Group[J]. *Animals (Basel)*, 2022,12(14).
- [40] Yoon K, Kim N. Roles of Sex Hormones and Gender in the Gut Microbiota[J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2021,27(3):314-325.
- [41] Fan Q, Wanapat M, Yan T, et al. Altitude influences microbial diversity and herbage fermentation in the rumen of yaks[J]. *BMC Microbiol*, 2020,20(1):370.
- [42] Wu D, Vinitchaikul P, Deng M, et al. Exploration of the effects of altitude change on bacteria and fungi in the rumen of yak (*Bos grunniens*)[J]. *Arch Microbiol*, 2021,203(2):835-846.
- [43] 王保宁, 陈昱作, 贡嘎, 等. 不同海拔区域内牦牛肠道菌群结构组成多样性研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2021,58(05):152-158.
- [44] Han L, Xue W, Cao H, et al. Comparison of Rumen Fermentation Parameters and Microbiota of Yaks From Different Altitude Regions in Tibet, China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022,12.
- [45] 马艳, 向信, 樊嘉凯, 等. 海拔高度对青藏高原放牧牦牛肠道菌群多样性的影响[J]. *微生物学通报*, 2022,49(02):620-634.
- [46] Huang X, Mi J, Denman S E, et al. Changes in rumen microbial community composition in yak in response to seasonal variations[J]. *J Appl Microbiol*, 2022,132(3):1652-1665.
- [47] Wei X, Dong Z, Cheng F, et al. Seasonal diets supersede host species in shaping the distal gut microbiota of Yaks and Tibetan sheep[J]. *Sci Rep*, 2021,11(1):22626.
- [48] Ma L, Xu S, Liu H, et al. Yak rumen microbial diversity at different forage growth stages of an alpine meadow on the Qinghai-Tibet Plateau[J]. *PeerJ*, 2019,7:e7645.
- [49] Jiang H, Cao H W, Chai Z X, et al. Dynamic alterations in yak (*Bos grunniens*) rumen microbiome in response to seasonal variations in diet[J]. *Physiol Genomics*, 2022.
- [50] Guo N, Wu Q, Shi F, et al. Seasonal dynamics of diet-gut microbiota interaction in adaptation of yaks to life at high altitude[J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2021,7(1):38.
- [51] Heuer C, Healy A, Zerbini C. Economic effects of exposure to bovine viral diarrhea virus on dairy herds in New Zealand[J]. *J Dairy Sci*, 2007,90(12):5428-5438.
- [52] 张玉莹, 刘书杰, 冯宇哲, 等. 基于 16S rRNA 测序分析正常与腹泻牦牛犊牛粪便细菌区系组成[J]. *中国畜牧兽医*, 2021,48(09):3293-3302.
- [53] Han Z, Li K, Shahzad M, et al. Analysis of the intestinal microbial community in healthy and diarrheal perinatal yaks by high-throughput sequencing[J]. *Microb Pathog*, 2017,111:60-70.
- [54] Wen Y, Li S, Wang Z, et al. Intestinal Microbial Diversity of Free-Range and Captive Yak in Qinghai Province[J]. *Microorganisms*, 2022,10(4).
- [55] Shah T, Ding L, Ud D A, et al. Differential Effects of Natural Grazing and Feedlot Feeding on Yak Fecal Microbiota[J]. *Front Vet Sci*, 2022,9:791245.

- [56] Han X, Liu H, Hu L, et al. Bacterial Community Characteristics in the Gastrointestinal Tract of Yak (*Bos grunniens*) Fully Grazed on Pasture of the Qinghai-Tibetan Plateau of China[J]. *Animals (Basel)*, 2021,11(8).
- [57] Wu S R, Chen X D, Li J L, et al. Effect of alfalfa hay and starter feed supplementation on caecal microbiota and fermentation, growth, and health of yak calves[J]. *Animal*, 2021,15(3):100019.
- [58] Cui Z, Wu S, Li J, et al. Effect of Alfalfa Hay and Starter Feeding Intervention on Gastrointestinal Microbial Community, Growth and Immune Performance of Yak Calves[J]. *Front Microbiol*, 2020,11:994.
- [59] Liu H, Jiang H, Hao L, et al. Rumen Bacterial Community of Grazing Lactating Yaks (*Poephagus grunniens*) Supplemented with Concentrate Feed and/or Rumen-Protected Lysine and Methionine[J]. *Animals (Basel)*, 2021,11(8).
- [60] Wang Y, An M, Zhang Z, et al. Effects of Milk Replacer-Based *Lactobacillus* on Growth and Gut Development of Yaks' Calves: a Gut Microbiome and Metabolic Study[J]. *Microbiol Spectr*, 2022,10(4):e115522.
- [61] Wei H, Ding L, Wang X, et al. Astragalus root extract improved average daily gain, immunity, antioxidant status and ruminal microbiota of early weaned yak calves[J]. *J Sci Food Agric*, 2021,101(1):82-90.
- [62] 房海. 《大肠埃希氏菌》著作简介[J]. *畜牧兽医科技信息*, 1998(24):12.
- [63] 陈继明. 《兽医微生物学》第四版介绍[J]. *中国动物检疫*, 2008(04):3.
- [64] Blount Z D. The unexhausted potential of *E. coli*[J]. *Elife*, 2015,4.
- [65] 尚婷婷, 张耀相, 林青, 等. 犊牛大肠杆菌病病原的分离鉴定[J]. *动物医学进展*, 2012,33(06):143-146.
- [66] 常军帅, 杨瑞钰, 戴小智, 等. 奶牛乳房炎源大肠埃希氏菌噬菌体的分离与生物学特性分析[J]. *动物医学进展*, 2022,43(04):25-29.
- [67] Dean-Nystrom E A, Bosworth B T, Cray W J, et al. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves[J]. *Infect Immun*, 1997,65(5):1842-1848.
- [68] Sandhu K S, Gyles C L. Pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the intestine of calves[J]. *Can J Vet Res*, 2002,66(2):65-72.
- [69] Bean D C, Livermore D M, Papa I, et al. Resistance among *Escherichia coli* to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2005,56(5):962-964.
- [70] Messele Y E, Abdi R D, Yalew S T, et al. Molecular determination of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from raw meat in Addis Ababa and Bishoftu, Ethiopia[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2017,16(1):55.
- [71] Messele Y E, Alkhalawi M, Veltman T, et al. Phenotypic and Genotypic Analysis of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Recovered from Feedlot Beef Cattle in Australia[J]. *Animals (Basel)*, 2022,12(17).
- [72] Ojdana D, Sienko A, Sacha P, et al. Genetic basis of enzymatic resistance of *E. coli* to aminoglycosides[J]. *Adv Med Sci*, 2018,63(1):9-13.
- [73] Nayme K, Barguigua A, Diawara I, et al. Occurrence of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Escherichia coli* isolates from chicken meat[J]. *Br Poult Sci*, 2019,60(6):798-801.
- [74] Khalifa S M, Abd E A, Hassan R, et al. beta-lactam resistance associated with

- beta-lactamase production and porin alteration in clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae*[J]. *PLoS One*, 2021,16(5):e251594.
- [75] Uchiyama J, Murakami H, Sato R, et al. Examination of the fecal microbiota in dairy cows infected with bovine leukemia virus.[J]. *Veterinary microbiology*, 2020,240:108547.
- [76] Ramirez A L, Herrera G, Munoz M, et al. Describing the intestinal microbiota of Holstein Fasciola-positive and -negative cattle from a hyperendemic area of fascioliasis in central Colombia[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2021,15(8):e9658.
- [77] Sabey K A, Song S J, Jolles A, et al. Coinfection and infection duration shape how pathogens affect the African buffalo gut microbiota[J]. *ISME J*, 2021,15(5):1359-1371.
- [78] Wang Y, Nan X, Zhao Y, et al. Dietary Supplementation of Inulin Ameliorates Subclinical Mastitis via Regulation of Rumen Microbial Community and Metabolites in Dairy Cows[J]. *Microbiol Spectr*, 2021,9(2):e10521.
- [79] Zeineldin M, Aldridge B, Lowe J. Dysbiosis of the fecal microbiota in feedlot cattle with hemorrhagic diarrhea[J]. *Microb Pathog*, 2018,115:123-130.
- [80] Liu J, Wang X, Zhang W, et al. Comparative analysis of gut microbiota in healthy and diarrheic yaks[J]. *Microb Cell Fact*, 2022,21(1):111.
- [81] Kim E T, Lee S J, Kim T Y, et al. Dynamic Changes in Fecal Microbial Communities of Neonatal Dairy Calves by Aging and Diarrhea[J]. *Animals (Basel)*, 2021,11(4).
- [82] 聂远洋, 邓岳, 刘戎梅, 等. 不同年龄麦洼牦牛肠道菌群的分离鉴定及其群落结构的变化[J]. *中国测试*, 2016,42(12):53-59.
- [83] 张开琴, 王刚, 穷珍, 等. 西藏牦牛源腹泻病原菌的分离鉴定及耐药性研究[J]. *甘肃畜牧兽医*, 2021,51(05):43-45.
- [84] 卓玛, 赵燕娟, 王刚, 等. 西藏班戈县牦牛源肠产毒性大肠杆菌的毒力基因检测[J]. *甘肃畜牧兽医*, 2019,49(08):45-50.
- [85] Tomazi T, Coura F M, Goncalves J L, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from bovine clinical mastitis[J]. *J Dairy Sci*, 2018,101(10):9406-9418.
- [86] Suojala L, Pohjanvirta T, Simojoki H, et al. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis[J]. *Vet Microbiol*, 2011,147(3-4):383-388.
- [87] Zhang D, Zhang Z, Huang C, et al. The phylogenetic group, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of *Escherichia coli* from clinical bovine mastitis[J]. *J Dairy Sci*, 2018,101(1):572-580.
- [88] Bag M, Khan M, Sami M, et al. Virulence determinants and antimicrobial resistance of *E. coli* isolated from bovine clinical mastitis in some selected dairy farms of Bangladesh[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021,28(11):6317-6323.
- [89] Ma Z, Ginn A, Kang M, et al. Genomic and Virulence Characterization of Intrauterine Pathogenic *Escherichia coli* With Multi-Drug Resistance Isolated From Cow Uteri With Metritis[J]. *Front Microbiol*, 2018,9:3137.
- [90] Elmonir W, Shalaan S, Tahoun A, et al. Prevalence, antimicrobial resistance, and genotyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods of cattle origin, diarrheic cattle, and diarrheic humans in Egypt[J]. *Gut Pathog*, 2021,13(1):8.

- [91] Segura A, Bertin Y, Durand A, et al. Transcriptional analysis reveals specific niche factors and response to environmental stresses of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine digestive contents[J]. *BMC Microbiol*, 2021,21(1):284.
- [92] Bellin T, Pulz M, Matussek A, et al. Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes[J]. *J Clin Microbiol*, 2001,39(1):370-374.
- [93] Cho Y I, Han J I, Wang C, et al. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea[J]. *Vet Microbiol*, 2013,166(3-4):375-385.
- [94] Kolenda R, Burdukiewicz M, Schierack P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015,5:23.
- [95] Coura F M, de Araujo D S, Mussi J, et al. Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil[J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2017,62(2):139-144.
- [96] Foster D M, Smith G W. Pathophysiology of diarrhea in calves[J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2009,25(1):13-36.
- [97] Prieto A, Lopez-Novo C, Diaz P, et al. Antimicrobial Susceptibility of Enterotoxigenic *Escherichia coli* from Diarrhoeic Neonatal Calves in Spain[J]. *Animals (Basel)*, 2022,12(3).
- [98] DebRoy C, Fratamico P M, Yan X, et al. Correction: Comparison of O-Antigen Gene Clusters of All O-Serogroups of *Escherichia coli* and Proposal for Adopting a New Nomenclature for O-Typing[J]. *PLoS One*, 2016,11(4):e154551.
- [99] 贡嘎次仁, 次旺罗布. 西藏牦牛大肠杆菌的分离鉴定及部分生物学特性[J]. *西藏科技*, 2017(12):71-73.
- [100] 诸明欣, 张焕容, 汤承, 等. 四川阿坝州牦牛源溶血性大肠杆菌血清型鉴定及毒力相关基因检测[J]. *中国预防兽医学报*, 2018,40(01):9-13.
- [101] 郝一妹, 张焕容. 牦牛源产肠毒素性大肠杆菌血清型和毒力基因调查[J]. *中国兽医杂志*, 2015,51(01):51-52.
- [102] 贡嘎, 王刚, 罗润波, 等. 西藏牦牛源大肠杆菌分离株的致病性及遗传进化分析研究[J]. *中国农业大学学报*, 2018,23(10):57-62.
- [103] 马超. 奶牛乳腺炎大肠杆菌优势血清型相关毒力基因与耐药基因的检测与序列分析[D]. 宁夏大学, 2014.
- [104] Woodward M J, Carroll P J, Wray C. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction[J]. *Vet Microbiol*, 1992,31(2-3):251-261.
- [105] Fagan P K, Hornitzky M A, Bettelheim K A, et al. Detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999,65(2):868-872.
- [106] Ngeleka M, Pritchard J, Appleyard G, et al. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2003,15(3):242-252.
- [107] Lortie L A, Dubreuil J D, Harel J. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea[J]. *J Clin*

- Microbiol, 1991,29(3):656-659.
- [108] 张金宝. 宁夏地区牛源大肠杆菌优势血清型和毒力基因检测及耐药性分析[D]. 宁夏大学, 2015.
- [109] Vu K H, Holoda E, Pilipcinec E, et al. Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia[J]. BMC Vet Res, 2006,2:10.
- [110] 宋康. 新疆地区致犊牛腹泻大肠杆菌的分离鉴定及部分特性研究[D]. 石河子大学, 2016.
- [111] 胡继红, 高振翔, 尹铭芳. 美国 NCCLS2002 年版抗生素药敏试验操作标准更新内容[J]. 中华检验医学杂志, 2002(06):46-48.
- [112] 陈朝喜, 李宇涵, 谭敏, 等. 川西北高原牦牛和藏猪源大肠杆菌生物被膜表型、耐药基因、整合酶基因和毒力基因检测[J]. 中国农业科学, 2021,54(23):5144-5162.
- [113] 孟含, 陈娟, 龙虎, 等. 牦牛屠宰环境中大肠杆菌分离菌株的病原学特征研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(03):80-84.
- [114] 姚望远, 郝亚男, 王蕾, 等. 青海腹泻牦牛大肠杆菌分离株的生物学特性研究[J]. 中国奶牛, 2018(08):31-36.
- [115] Jia Y, Mao W, Liu B, et al. Study on the drug resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* isolated from calf diarrhea and the distribution of virulence genes and antimicrobial resistance genes[J]. Front Microbiol, 2022,13:992111.
- [116] 王刚, 赵燕娟, 索朗斯珠, 等. 38 株西藏牦牛源肠产毒性大肠杆菌 ESBLs 基因型检测及耐药性分析[J]. 江苏农业科学, 2020,48(14):211-214.
- [117] 索朗斯珠, 王刚, 罗润波, 等. 西藏牦牛源大肠杆菌主要耐药表型及耐药基因检测[J]. 中国兽医学报, 2017,37(08):1501-1506.
- [118] Lei L, Rehman M U, Huang S, et al. Antimicrobial resistance and prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC), in diarrheic yaks of Tibetan Plateau, China[J]. Acta Trop, 2018,182:111-114.
- [119] Rehman M U, Zhang H, Iqbal M K, et al. Antibiotic resistance, serogroups, virulence genes, and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from yaks with diarrhea in Qinghai Plateau, China[J]. Gut Pathogens, 2017,9(1):24.