

网络出版时间:2018-07-06 13:25

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.01.004

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180706.1323.008.html>

腹泻仔猪肠道菌群的 ERIC-PCR 指纹图谱分析

张振仓¹, 杨二帅², 郭抗抗², 罗艳¹

(1 杨凌职业技术学院 动物工程学院, 陕西 杨凌 712100; 2 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】分析腹泻仔猪周围环境菌群变化规律,为仔猪腹泻的诊断和治疗提供支持。【方法】采集健康对照和腹泻仔猪粪便、口腔以及产床和母猪乳头等样品,采用 ERIC-PCR 技术分析其菌群结构特征,并对粪便样品中的细菌进行分离和鉴定。【结果】对照组 4 类样品细菌 ERIC-PCR 指纹图谱十分相似,腹泻组各类样品之间电泳条带差异较大,出现了异常亮度的电泳条带,与对照组优势条带位置不同,其中口腔和母猪乳头部位电泳条带数显著低于对照组($P < 0.05$),菌群多样性指数降低,优势度指数升高。从粪便样品中分离出 2 株可疑菌株 b1 和 b2,细菌染色和生化试验初步证明分离株 b1 和 b2 分别符合大肠杆菌和奇异变形杆菌的特征;利用 ERIC-PCR 技术分析分离株 b1 和 b2 的指纹图谱,发现分离优势细菌的 ERIC-PCR 指纹图谱包含于粪便样品的 ERIC-PCR 图谱中,证明样品的 ERIC-PCR 指纹图谱能够反映出优势菌群的特征;测序结果显示,分离株 b1 与大肠杆菌基因组同源率为 99%,分离株 b2 与奇异变形杆菌基因组同源率为 98%。【结论】腹泻仔猪周围环境菌群发生明显变化,ERIC-PCR 技术可以快速、准确地监测和诊断菌群结构的变化,有助于细菌性仔猪腹泻的诊断和治疗。

【关键词】 仔猪腹泻;肠道菌群;ERIC-PCR;指纹图谱

【中图分类号】 S852.61

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)01-0031-08

ERIC-PCR fingerprint analysis of intestinal flora of diarrhea piglets

ZHANG Zhencang¹, YANG Ershuai², GUO Kangkang², LUO Yan¹

(1 College of Animal Engineering, Yangling Vocational and Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This study analyzed the changes of flora in the surrounding environment of diarrhea piglets to provide support for the diagnosis and treatment of diarrhea in piglets. 【Method】 Samples were collected from feces, mouth, obstetric table and sow nipple of health and diarrhea piglets. The bacterial community structure characteristics in the samples were analyzed by using ERIC-PCR technology, and the bacteria in fecal samples were isolated and identified. 【Result】 The ERIC-PCR fingerprints of the 4 samples in control group were very similar, but the electrophoresis bands were different in diarrhea groups. Abnormal brightness electrophoretic bands appeared in diarrhea groups and the locations of bands were different from the control group. Especially, the mean numbers of bands in mouth and nipple samples were significantly lower than those of control group ($P < 0.05$). In the diarrhea group, bacteria diversity index decreased, while the dominance index increased. Two suspicious strains b1 and b2 were separated from fecal samples of diarrhea piglets. Bacterial staining and biochemical experiments showed that strains b1 and b2 were identical with characteristics of *Escherichia coli* and *Proteus*. ERIC-PCR fingerprinting analysis showed that the ERIC-PCR fingerprints of the dominant bacteria were included in the ERIC-PCR map of

【收稿日期】 2017-11-03

【基金项目】 陕西省科学技术研究发展计划项目(2012K02-03);陕西省重点农业科技推广及示范项目(ZDKJ-2014-33)

【作者简介】 张振仓(1971—),男,陕西铜川人,副教授,国家执业兽医师,主要从事动物疫病防控研究。E-mail:602326286@qq.com

【通信作者】 郭抗抗(1973—),男,陕西咸阳人,副教授,博士,主要从事猪重要疫病致病机理和防控技术研究。

E-mail:guokk2007@nwsuaf.edu.cn

the fecal samples, indicating that the ERIC-PCR fingerprint of the samples could reflect the characteristics of the dominant flora. The sequencing results showed that DNA sequences of bands in isolated b1 and b2 were in 99% and 98% homology with *Escherichia coli* and *Proteus*, respectively. 【Conclusion】 The surrounding environmental flora of diarrhea piglets changed significantly. The ERIC-PCR technology can quickly and accurately monitor and diagnose the bacterial community structure characteristics, which is helpful for diagnosis and treatment of bacterial diarrhea in piglets.

Key words: piglet diarrhea; intestinal flora; ERIC-PCR; fingerprints

在现代规模化养猪产业中,仔猪腹泻已成为一种不可避免的疾病。该病是一种多因素相互影响的疾病^[1],诊断和治疗比较棘手,一旦暴发,会导致仔猪大批死亡,严重影响猪场的经济效益和养猪业的发展。据统计,在规模化猪场中仔猪的死亡率很高,约占猪只死亡总数的 60%~70%,而腹泻引起的死亡占 20%^[2],猪场一旦发生腹泻,除了增加医药开支外,还可使仔猪的成活率降低,生长速度变慢甚至停滞,进而影响饲料报酬,降低生产性能^[3]。因此,早期诊断对仔猪腹泻的防治十分重要。

引起仔猪腹泻的因素很多,总的来说包括病原性和非病原性 2 类因素。细菌是病原性仔猪腹泻的重要病原。仔猪发生细菌感染时,有害菌夺取宿主营养,产生毒素,拮抗有益菌的生长,从而导致肠道菌群发生相应的变化。健康仔猪消化道内数量最多的菌群是双歧杆菌和乳杆菌,而腹泻仔猪消化道内肠杆菌、肠球菌、韦荣氏球菌等有害菌群明显增多^[4]。

肠杆菌基因间重复共有序列(Enterobacterial repetitive in-tergenic consensus, ERIC)是一种高度保守的重复序列,主要分布于肠道细菌基因组内可转录的非编码区域或者与转录有关的区域内,并且 ERIC 在基因组中的分布和拷贝数具有肠杆菌种属特异性^[5]。因此,通过对 ERIC-PCR 图谱的对比分析,可以对动物肠道微生物菌群的种类组成和稳定性进行检测和评估,有助于腹泻的监测和诊断。本研究尝试应用 ERIC-PCR 技术对健康和腹泻仔猪周围环境肠道菌群进行检测,研究仔猪腹泻环境菌群变化规律,为仔猪腹泻的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2015 年 12 月陕西省某规模化猪场发生了小范围仔猪腹泻疫情,仔猪 7 日龄左右,排出黄色水样粪便,抗生素治疗有效,初步判断为细菌感染导致的仔猪腹泻。在发现腹泻初期,用无菌的棉拭子无菌采

集 3 窝腹泻仔猪(分别记为腹泻 1、2、3 组)的粪便、口腔唾液样品,并用棉拭子擦拭采集产床和母猪乳头等样品,每窝腹泻仔猪各类样品采集 3 份,同时采集正常仔猪对应 3 份样品作为对照组。样品移至装有 0.5 mL 生理盐水的无菌摇菌管中,4℃下短时保存送往实验室,于 4℃冰箱保存备用。

1.2 主要试剂和参考菌株

麦康凯培养基、伊红美兰培养基、血平板培养基、药敏试纸和细菌生化鉴定管,均为杭州天合微生物试剂有限公司产品;PCR Mix、DNA Marker、琼脂糖,均为 GENE 公司产品;TAKARA pMD-19T 试剂盒,购自大连宝生物工程有限公司;大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,购自北京全式金生物技术有限公司;细菌 DNA 提取试剂盒,购自天根生化科技有限公司;柱离心型 DNA 凝胶回收试剂盒、高纯度质粒小量提取试剂盒,均购自威格拉斯生物技术(北京)有限公司;其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。标准参考菌株大肠杆菌 2134P,由西北农林科技大学动物医学院重大动物疫病防治与畜禽产品安全实验室保存;奇异变形杆菌 ATCC29906,购自上海北诺生物科技有限公司。

1.3 样品的处理

将采集的样品从 4℃冰箱中取出,吸取 0.1 mL 的样品加入新的无菌摇菌管中,加入 4 mL 空白 LB 和 10 μ L 犍牛血清,置于恒温培养摇床中,37℃下培养过夜。吸取过夜培养的菌液 500 μ L 于 EP 管中,加体积分数 50%的无菌甘油-水 500 μ L,混匀后-80℃冻存备用;剩余的菌液全部用于细菌基因组 DNA 提取。

1.4 样品中细菌基因组的提取

采用细菌 DNA 提取试剂盒提取样品中细菌的 DNA。

1.5 ERIC-PCR 指纹图谱分析

以细菌基因组 DNA 为模板,采用常用引物 ERIC-F (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') 和 ERIC-R (5'-AAGTAAGTGACTGGGGT-

GAGCG-3')^[6]进行 ERIC-PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL ,其中包括 10 $\times$ *Taq* Buffer 2.5 μL ,5 mmol/L dNTP 5 μL ,*Taq* 酶 0.5 U,25 pmol/L 上下游引物各 1.5 μL ,100 ng DNA 模板,补 ddH₂O 至 25 μL 。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 7 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,65 $^{\circ}\text{C}$ 8 min,循环 30 次;65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 16 min。反应结束后取 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,并于 SYNGENE 型凝胶成像系统中进行拍照。

1.6 ERIC-PCR 结果分析

将 ERIC-PCR 图谱菌群条带转变为波峰图,每个 ERIC-PCR 条带下面积为该条带亮度,代表一个菌群的种群数量^[7]。利用 Shannon-Wiener 公式^[8]和 Simpson 公式^[9]分别计算 ERIC-PCR 指纹图谱中各样品菌群的多样性指数 (H') 和优势度指数 (C),进行菌群多样性和优势菌种分析。

1.7 样品中细菌的分离鉴定

挑出 ERIC-PCR 分析结果中与健康仔猪的菌群多样性指数和优势度指数差异最大的腹泻仔猪粪便样品进行细菌分离鉴定。

1.7.1 细菌分离及纯化 无菌条件下将粪便样品接种于血平板培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24~48 h,观察血平板上有无菌落生长,有菌落生长的用接种环挑取单个菌落进行涂片、革兰氏染色、镜检,将长出的菌落分别接种到麦康凯和伊红美兰鉴别培养基上进行菌落形态的观察。

1.7.2 分离菌的生化鉴定 对鉴定培养基中的特征单菌落进行纯化扩增,将扩增菌分别接种于葡萄糖、硫化氢、吲哚、乳糖等 10 支生化鉴定管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24~48 h,记录结果。

1.7.3 细菌 ERIC-PCR 特异性条带测序分析 挑取特异性单菌落接种于 LB 培养基进行扩大培养,采用细菌 DNA 提取试剂盒提取扩增的纯化细菌 DNA,利用 ERIC-PCR 技术分析粪便样品和分离纯化菌株 b1 和 b2 的 ERIC-PCR 指纹图谱。ERIC-PCR 的具体操作和反应条件同 1.5 节所述。将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并采用柱离心型 DNA 凝胶纯化回收试剂盒回收 PCR 产物,参照 TAKARA pMD-19T 试剂盒使用说明,将纯化后的 PCR 产物与载体 (pMD-19T) 进行连接,构建重组质粒。将构建的重组质粒转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,于 LB 培养基中培养,挑取单菌落进行培养和菌落 PCR 鉴定,对菌落 PCR 阳性菌进行扩大培养,提取扩繁阳性菌质粒,送往金唯智生物科技有

限公司进行测序。测序结果利用 NCBI 在线软件 BLAST 与细菌基因组序列进行比对,确定分离菌株类型。

1.7.4 分离菌株毒力基因的检测 参照前人研究结果,合成大肠杆菌肠毒素 *STa* 和 *STb* 基因^[10]和奇异变形杆菌毒力因子 *zapA* 基因扩增引物^[11],并对分离菌株进行相关的毒力因子基因 PCR 检测。PCR 反应体系和条件参见文献^[10-11]。同时,应用标准菌株大肠杆菌 2134P 和奇异变形杆菌 ATCC29906 作为阳性对照。

1.8 数据分析

利用 SPSS 分析各组样品电泳条带数、菌群多样性指数和优势度指数,利用 LSD 方法检测各组之间差异显著性。

2 结果与分析

2.1 健康和腹泻仔猪 ERIC-PCR 指纹图谱的比较

利用 ERIC-PCR 技术分析健康和腹泻仔猪粪便、口腔以及产床和母猪乳头样品中细菌 ERIC-PCR 指纹图谱,结果如图 1-A、B 所示。由图 1 可以看出,对照组粪便、口腔、产床和母猪乳头样品细菌指纹图谱十分相似,均存在 6 条以上电泳条带,其中较亮的条带有 3 条(位于 500~3 000 bp);腹泻组各样品之间电泳条带差异较大,尤其是口腔和母猪乳头样品电泳条带减少,而且出现了异常亮度的电泳条带,与对照组优势条带位置不同。同窝仔猪同类样品之间存在大小相似的条带,但不同窝或同一窝腹泻仔猪的同一类样品间 ERIC-PCR 图谱不完全相同。ERIC-PCR 电泳图谱结果表明,腹泻仔猪各部位菌群发生了明显变化,而且不同发病菌群变化不同。

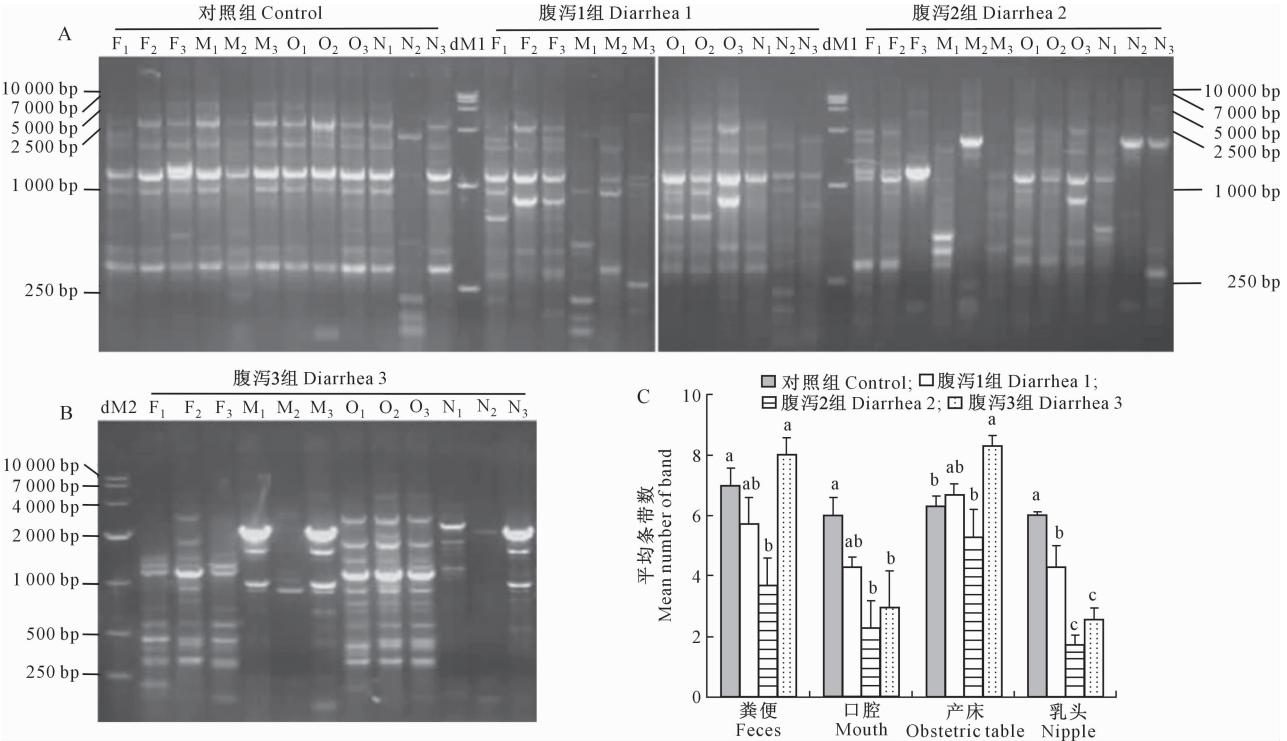
统计各类样品平均电泳条带数,结果(图 1-C)发现,与对照组相比,腹泻组粪便和产床样品的条带数没有明显变化规律,但口腔和母猪乳头样品电泳条带数显著低于对照组 ($P<0.05$)。结果表明,监测仔猪口腔和母猪乳头菌群多样性变化对仔猪腹泻诊断有一定指导意义。

2.2 ERIC-PCR 指纹图谱的多样性

由图 2 可知,对照组各部位菌群多样性指数相似,腹泻组各类样品菌群多样性指数发生明显变化,尤其是腹泻 2 组各类样品菌群多样性指数明显下降,其中仔猪口腔的多样性指数显著降低 ($P<0.05$);与对照组相比,腹泻组粪便和产床样品菌群多样性指数变化无规律性,但是仔猪口腔和母猪乳

头样品的菌群多样性指数均呈现下降趋势。与对照组相比,腹泻组粪便和产床细菌优势度指数变化无规律性,但是口腔和母猪乳头样品的细菌优势度指数均呈上升趋势。以上结果表明,腹泻组各部位菌

群多样性指数和优势度指数均发生变化,其中口腔和母猪乳头部位的菌群多样性指数降低,优势度指数升高。



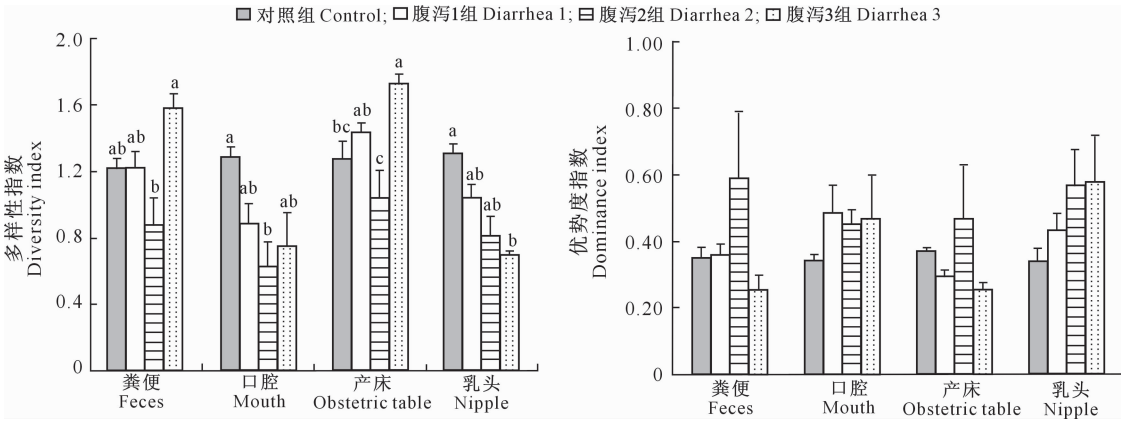
A,B. ERIC-PCR 指纹图:F,M,O,N 分别表示粪便、口腔、产床和母猪乳头样,下标 1、2、3 表示同类样品的重复,dM1 表示 DNA Marker VI (250~10 000 bp),dM2 表示 DNA Marker DL10000。C. 平均电泳条带数统计结果,图柱上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

A,B. ERIC-PCR fingerprinting:F,M,O and N represent samples from feces,mouth,obstetric table and nipple, respectively; The subscript 1,2 or 3 represent repeats of the same sample;dM1 represents DNA molecular Marker VI (250—10 000 bp), and dM2 represents DNA molecular Marker DL10000。C. Average number of electrophoresis band.

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$)

图 1 正常和腹泻仔猪各类样品菌群的 ERIC-PCR 分析

Fig. 1 ERIC-PCR analysis of flora in different samples of normal and diarrhea piglets



图柱上标不同小写字母表示同类样品间差异显著($P<0.05$)

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$)

between same samples

图 2 正常和腹泻仔猪各类样品菌群的多样性指数和优势度指数

Fig. 2 Diversity index and dominance index of flora in different parts of normal and diarrhea piglets

2.3 粪便样品中细菌的分离鉴定

为了能提高细菌分离成功率,利用菌群多样性指数和优势度指数与对照组差异最大的腹泻 2 组粪便样品进行细菌分离鉴定,将粪便样品接种于血平板培养基,挑取可疑单菌落 b1 和 b2 进行染色镜检。发现分离株 b1 镜下呈现为红色的两端钝圆的小杆状细菌,分离株 b2 镜下呈现红色的球形或多形性的细菌。将 2 个分离株余下的部分菌落分别接种麦康

凯和伊红美兰培养基。分离株 b1 在麦康凯培养基上长成中等大小、圆形、表面湿润、粉红色的菌落,在伊红美兰培养基上长成黑色带金属光泽的菌落(图 3 中 b1 菌株)。分离株 b2 在麦康凯培养基上呈半透明圆形菌落,伊红美兰培养基上呈粉红色,扁平状,边缘不整齐的菌落(图 3 中 b2 菌株)。通过分离培养、染色和鉴别培养,初步认为分离株 b1 和 b2 分别是大肠杆菌和奇异变形杆菌。

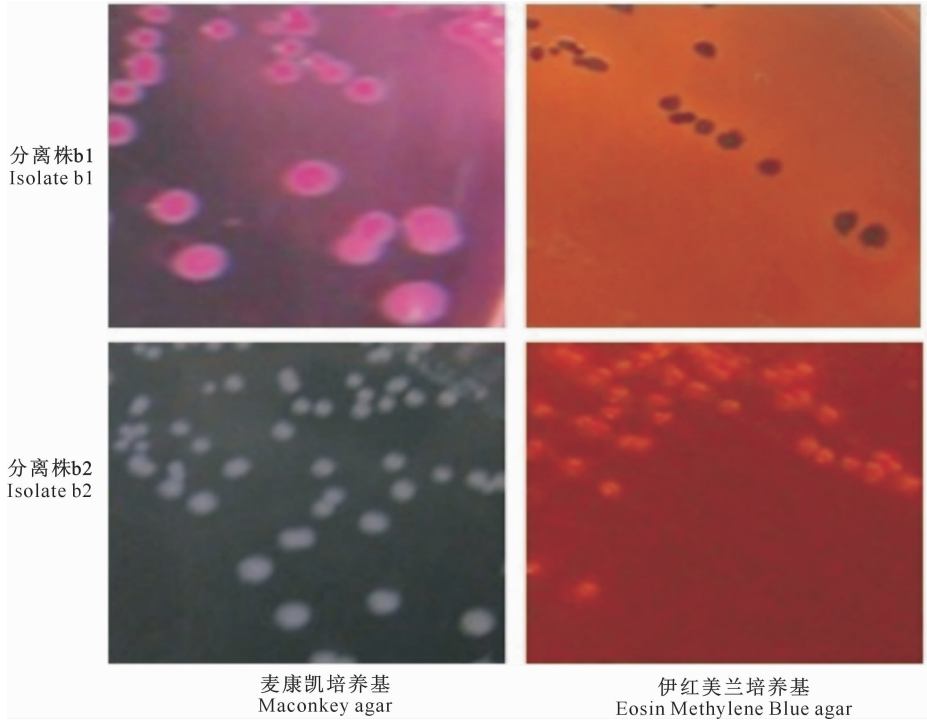


图 3 腹泻仔猪粪便分离菌株培养特征

Fig. 3 Growth characteristics of isolated bacteria from feces of diarrhea piglets

为进一步证实上述推测,对 2 个细菌分离株进行了一系列生化试验检测,结果(表 1)显示,分离株 b1 在吲哚、甲基红试验中呈阳性反应,在维培、硫化氢、尿素、蔗糖和枸橼酸盐试验中呈阴性反应,在葡萄糖、乳糖和麦芽糖发酵试验中表现为产酸产气;分

离株 b2 在甲基红、硫化氢、尿素和枸橼酸盐试验中呈阳性反应,在吲哚、维培、乳糖、蔗糖和麦芽糖试验中呈阴性反应,在葡萄糖发酵试验中产酸产气。参照伯杰氏细菌鉴定手册,分离株 b1 和 b2 分别符合大肠杆菌和奇异变形杆菌的生化特征。

表 1 腹泻仔猪粪便分离菌株的生化试验结果

分离株 Strain	吲哚 Indole	甲基红 Methyl red	维培 Viphet	硫化氢 Hydrogen sulfide	尿素 Urea	葡萄糖 Glucose	乳糖 Lactose	蔗糖 Sucrose	麦芽糖 Malt dust	枸橼酸盐 Citrate
b1	+	+	—	—	—	⊕	⊕	—	⊕	—
b2	—	+	—	+	+	⊕	—	—	—	+

注:“⊕”表示产酸产气,“+”表示阳性,“—”表示阴性。
Note:“⊕” producing acid and gas,“+” positive,“—” negative.

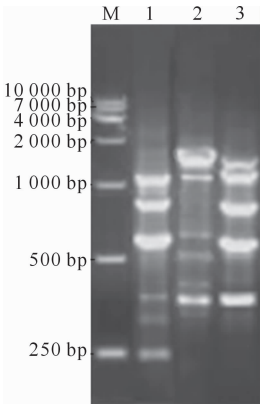
对腹泻 2 组粪便样品、细菌分离株 b1 和 b2 进行 ERIC-PCR 分析,结果(图 4)显示,粪便样品在 1 000 bp 左右有 5 条高亮度条带,与图 1-A 相对应样品的位置一致;在 500~2 000 bp,分离株 b1 有 3

条亮度较高的条带;在 250~2 000 bp,分离株 b2 有 3 条亮度较高条带,2 个分离株的亮度较高的条带在腹泻 2 组粪便样品中能够找到对应的条带。说明,利用 ERIC-PCR 技术分析粪便菌群多样性能够反

映出粪便中优势菌群的特征。参照文献报道,对分离株 b1 长度为 1 200 bp 左右^[12]和分离株 b2 长度为 1 500 bp 左右^[13]的条带进行回收和测序,测序结果经 NCBI 在线软件 BLAST 与 NCBI 中的细菌基因数据进行比对,结果显示,分离株 b1 送检基因片段的序列与大肠杆菌基因组同源性为 99%;分离株 b2 送检基因片段的序列与奇异变形杆菌的同源性为 98%,进一步证实分离株 b1 和 b2 分别属于大肠杆菌和奇异变形杆菌。

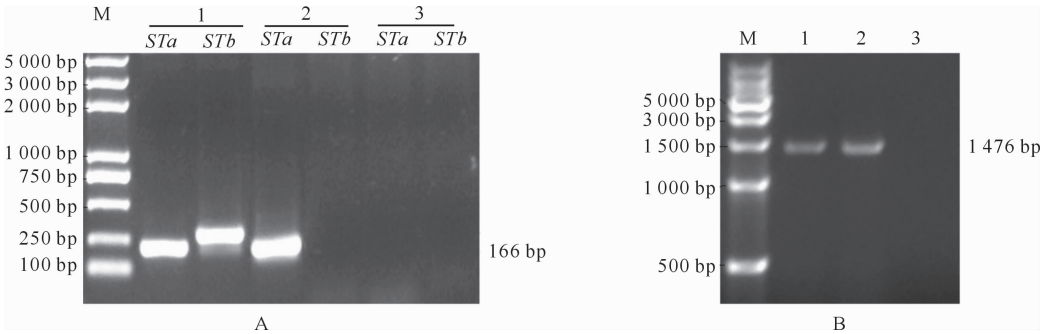
2.4 分离株毒力因子 PCR 检测

分离株 b1 和 b2 的毒力因子 PCR 检测结果显示,从分离株 b1 能扩增到大小为 166 bp 左右的大肠杆菌肠毒素 *STa* 基因片段(图 5-A);从分离株 b2 能扩增到大小为 1 476 bp 左右的奇异变形杆菌毒力因子 *zapA* 基因片段(图 5-B)。结果表明,分离菌株 b1 和 b2 分别是具有致病性的大肠杆菌和奇异变形杆菌。



M. DNA Marker DL10000;1. 分离菌株 b1;
2. 分离菌株 b2;3. 粪便样品
M. DNA Marker DL10000;1. Isolate b1;
2. Isolate b2;3. Fecal samples

图 4 腹泻仔猪粪便分离菌株的 ERIC-PCR 指纹图谱
Fig. 4 ERIC-PCR fingerprinting of isolated strains from feces of diarrhea piglets



A. 大肠杆菌毒力因子 *STa* 和 *STb* PCR 检测结果:M 表示 Trans 2k plus DNA Marker;1~3 分别表示大肠杆菌标准株及分离株 b1、分离株 b2 的 *STa* 和 *STb* 扩增结果。B. 奇异变形杆菌毒力因子 *zapA* 检测结果:M 表示 Trans 15k DNA Marker;1~3 分别表示奇异变形杆菌标准株及分离株 b2、分离株 b1 的 *zapA* 扩增结果
A. Results of virulence factors *STa* and *STb* detection by PCR;M indicates Trans 2k plus DNA Marker;1—3 show the results of *STa* and *STb* amplification from standard strain of *Escherichia coli*, isolates b1 and b2, respectively.
B. Results of virulence factor *zapA* detection by PCR;M indicates Trans 15k DNA Marker;1—3 show the results of *zapA* amplification from standard strain of *Proteus mirabilis*, isolates b2 and b1, respectively

图 5 腹泻仔猪粪便分离菌株毒力因子的 PCR 检测结果

Fig. 5 PCR results of virulence factor of isolates from feces of diarrhea piglets

3 讨论

仔猪由于肠道微生态系统不稳定及自身免疫机能不完善,抵抗力很低,对外界刺激比较敏感,易受各种病原微生物侵害和有害因素刺激的影响而诱发腹泻^[14]。因此,早期及时监控和诊断对仔猪腹泻的预防和治疗非常关键。

细菌是导致仔猪腹泻的一种重要病原^[15]。ERIC-PCR 技术操作简单、快速、准确性好,长期以来得到了广泛应用,其扩增的目标序列是肠杆菌基

因间 ERIC 序列,这些序列有高度同源性^[16-18]。ERIC-PCR 扩增的条带数量可反映微生物优势菌群的多少,而条带的亮度可反映微生物量的多少^[19]。李云飞等^[12]应用 ERIC-PCR 图谱分析了兔粪便中的菌群结构,发现兔肠道优势菌群为大肠杆菌和双歧杆菌。罗永久等^[7]应用 ERIC-PCR 图谱分析草食动物、肉食动物和杂食动物肠道菌群结构,发现动物肠道菌群的多样性在一定程度上与食物有关。本试验应用 ERIC-PCR 技术获得了仔猪粪便、口腔、产床和母猪乳头样品的 ERIC-PCR 图谱,结果显

示,腹泻组各样品的菌群多样性指数和优势度指数与正常组相比发生明显变化,说明腹泻仔猪周围环境菌群发生了变化。其中最显著的变化规律是腹泻仔猪口腔和母猪乳头菌群多样性指数降低,优势度指数升高,ERIC-PCR 图谱中出现异常高亮度条带,说明口腔和母猪乳头部位有异常细菌过度增殖^[20],这一发现为细菌性仔猪腹泻的诊断和治疗提供了重要参考。仔猪肠道和周围环境菌群结构的变化,会导致仔猪正常菌群的紊乱,这是仔猪腹泻的一个重要原因^[21-22]。因此,根据仔猪周围环境菌群变化,制定严格的饲养管理和预防措施,及时对环境进行消毒处理,是预防仔猪腹泻的重要手段。

本研究对猪仔粪便中的优势菌群进行了分离和鉴定,常规细菌分离和鉴定结果显示,优势菌为大肠杆菌和奇异变形杆菌,并且这 2 种分离菌包含有毒力因子基因,具有致病性,极可能是导致此猪场仔猪腹泻的重要病原。Deng 等^[23]在腹泻仔猪肠道中也分离到了大肠杆菌和奇异变形杆菌,并发现了奇异变形杆菌的致病性和抗药性相关基因。自然情况下,这 2 种杆菌广泛存在于水、土壤、腐败的有机物以及人和动物的肠道中,为条件致病菌^[24-25]。此外,本研究利用 ERIC-PCR 技术分析了分离纯化菌株的 ERIC-PCR 指纹图谱,并进行了测序分析,结果表明分离优势细菌的 ERIC-PCR 指纹图谱包含于粪便样品的 ERIC-PCR 图谱中,证明样品的 ERIC-PCR 指纹图谱能够反映出优势菌群的特征。前人研究表明,ERIC-PCR 图谱中,在 1 300 bp 左右处有大肠杆菌特征性条带^[12-13],在 1 500 bp 左右处有奇异变形杆菌特征性条带^[13]。本试验中,分离菌株的 ERIC-PCR 图谱中也同样扩增到大小近似于上述细菌特征性条带的产物。结合 DNA 测序技术,分析了分离菌株的各疑似特征条带序列,结果表明,分离菌株 b1 和 b2 分别属于大肠杆菌和奇异变形杆菌。这一研究结果说明,ERIC-PCR 技术结合 DNA 测序可以快速、准确地确认样品中优势菌群的细菌种类,比传统的细菌分离和鉴定技术更具有优势。

综合以上研究结果,腹泻仔猪周围环境菌群发生明显变化,利用 ERIC-PCR 技术监测口腔和母猪乳头部位菌群变化,对诊断和预防仔猪腹泻有一定指导意义;ERIC-PCR 结合 DNA 测序技术可以快速、准确地确定样品中优势细菌的种类,有助于细菌性仔猪腹泻的早期诊断和预防,降低生产损失,提高生产效益。

[参考文献]

- [1] 张 欣,胡兴权,王伟立. 仔猪腹泻病的诊断与防治 [J]. 畜禽业,2012(7):70-72.
Zhang X, Hu X Q, Wang W L. Diagnosis and prevention of diarrhea in piglets [J]. Livestock and Poultry Industry, 2012(7): 70-72.
- [2] 孙 涛,李东春,朱雅宁. 提高新生仔猪成活率的有效对策 [J]. 中国畜禽种业,2009(1):39-40.
Sun T, Li D C, Zhu Y N. Effective measures to improve the survival rate of new born piglets [J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding, 2009(1):39-40.
- [3] 李志亚. 猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻的区别 [J]. 现代农业科技,2010(1):371.
Li Z Y. The difference between transmissible gastroenteritis and porcine epidemic diarrhea [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2010(1):371.
- [4] 赵桂英,段 纲,杨亮宇,等. 仔猪消化道菌群变化与仔猪腹泻的关系 [J]. 家畜生态,2004,25(4):44-47.
Zhao G Y, Duan G, Yang L Y, et al. Relationship between microflora changes in digestive tract of piglets and diarrhea in piglets [J]. Livestock Ecology, 2004, 25(4):44-47.
- [5] Katara J, Deshmukh R, Singh N K, et al. Molecular typing of native *Bacillus thuringiensis* isolates from diverse habitats in India using REP-PCR and ERIC-PCR analysis [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2012, 58(2):83-94.
- [6] Yuan W, Chai T J, Miao Z M. ERIC-PCR identification of the spread of airborne *Escherichia coli* in pig houses [J]. Science of the Total Environment, 2010, 408(6):1446-1450.
- [7] 罗永久,钟志军,彭广能,等. 不同食性动物肠道菌群的 ERIC-PCR 指纹图谱分析 [J]. 中国兽医学报,2014,34(11):1764-1769.
Luo Y J, Zhong Z J, Peng G N, et al. ERIC-PCR fingerprinting analysis of intestinal flora in different feeding animals [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(11):1764-1769.
- [8] Shannon C E, Weaver W. The mathematical theory of communication [M]. Urbana: University of Illinois Press, 1998.
- [9] Hunter P R, Gaston M A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1988, 26(11):2465-2466.
- [10] 陈 祥,高 崧,王 雷,等. 华东地区致初生仔猪腹泻大肠杆菌的 O 血清型和毒力因子 [J]. 微生物学报,2004,44(1):96-100.
Chen X, Gao S, Wang L, et al. Serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* associated with diarrhea in piglets in eastern China [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(1): 96-100.
- [11] 倪 莉,徐丽敏,马 宁,等. 山羊奇异变形杆菌毒力因子 *zapA* 基因的克隆及蛋白结构预测 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2012,37(6):46-50.
Ni L, Xu L M, Ma N, et al. Cloning and prediction of protein structure of virulence factors *zapA* gene of *Proteus mirabilis*

- from goat [J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition), 2012, 37(6): 46-50.
- [12] 李云飞, 秦翠丽, 王忠泽, 等. 兔粪中微生物区系 ERIC-PCR DNA 指纹图谱的建立及分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(4): 716-722.
- Li Y F, Qin C L, Wang Z Z, et al. Establishment and analysis of ERIC-PCR DNA fingerprinting of microbial flora in rabbit feces [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2016, 47(4): 716-722.
- [13] 潘玉善. 禽源大肠杆菌、奇异变形杆菌多重耐药的分子特征及 CTX-M 基因传播扩散机制 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.
- Pan Y S. Molecular characterization and mechanism of dissemination of CTX-M-type extended-spectrum- β -lactamase genes in multidrug-resistant isolates of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* from poultry [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2012.
- [14] 田存锋, 吴同山, 王敬军, 等. 仔猪腹泻的病因分析及防控措施探索 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2015(3): 48-50.
- Tian C F, Wu T S, Wang J J, et al. Pathogeny analysis and prevention and control measures of piglet diarrhea [J]. Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science, 2015(3): 48-50.
- [15] Ruiz V L A, Bersano J G, Carvalho A F, et al. Case-control study of pathogens involved in piglet diarrhea [J]. BMC Research Notes, 2016, 9(1): 22.
- [16] Khosravi A D, Hoveizavi H, Mohammadian A, et al. Genotyping of multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn and wound infections by ERIC-PCR [J]. Acta Cirurgica Brasileira, 2016, 31(3): 206-211.
- [17] Madhusudana Rao B, Surendran P K. Genetic heterogeneity of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from shrimp aquaculture system: a comparison of RS-, REP- and ERIC-PCR fingerprinting approaches [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(1): 65-74.
- [18] 陈玲, 张菊梅, 杨小鹏, 等. 南方食品中沙门氏菌污染调查及分型 [J]. 微生物学报, 2013, 53(12): 1326-1333.
- Chen L, Zhang J M, Yang X J, et al. Investigation and typing of *Salmonella* contamination in food in South China [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(12): 1326-1333.
- [19] Chen L, Li Y, Yu Y. Soil bacterial and fungal community successions under the stress of chlorpyrifos application and molecular characterization of chlorpyrifos-degrading isolates using ERIC-PCR [J]. Journal of Zhejiang University (Science B), 2014, 15(4): 322.
- [20] Tungao W, Nimnoi P, Lumyong S, et al. Determination of bacterial diversity in bulk soil and rhizospheres using molecular fingerprintings and phenotypic features [J]. World Applied Sciences Journal, 2012, 19(11): 1613-1620.
- [21] Pieper R, Janczyk P, Urubschurov V, et al. Effect of a single oral administration of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 8862/8866 before and at the time point of weaning on intestinal microbial communities in piglets [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 130(3): 227-232.
- [22] Bhandari S K, Xu B, Nyachoti C M, et al. Evaluation of alternatives to antibiotics using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhea: effects on gut microbial ecology [J]. Journal of Animal Science, 2008, 86(4): 836-847.
- [23] Deng H, Zhuang Y, Cai Y, et al. Isolation and molecular biological analysis of pig *Proteus mirabilis* [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2015, 3: 6.
- [24] Chen X, Wang Y W, Wang Y, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Proteus mirabilis* from goats with diarrhea [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2014, 41(8): 215-218.
- [25] 张博. 城市污水中肠杆菌的抗生素耐药性和多种耐药基因的检测 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- Zhang B. Detection of antibiotic resistance and multidrug resistance genes of *Enterobacteriaceae* isolated from municipal wastewater [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013.