



健康和子宫蓄脓猫的子宫菌群多样性

曾圣鑫¹, 陈志坤¹, 王寒², 孙成亮², 罗正中¹, 黄逸馨¹, 雍康³, 姚学萍¹, 曹随忠^{1*}

1 四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130

2 四川水利职业技术学院 生物工程学院, 四川 崇州 611231

3 重庆三峡职业学院 动物科技学院, 重庆 404155

曾圣鑫, 陈志坤, 王寒, 孙成亮, 罗正中, 黄逸馨, 雍康, 姚学萍, 曹随忠. 健康和子宫蓄脓猫的子宫菌群多样性[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3224-3237.

ZENG Shengxin, CHEN Zhikun, WANG Han, SUN Chengliang, LUO Zhengzhong, HUANG Yixin, YONG Kang, YAO Xueping, CAO Suizhong. Diversity of uterine microbiota in healthy felines and felines with pyometra[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3224-3237.

摘要:【目的】本研究通过测定健康猫和子宫蓄脓猫子宫菌群的变化,旨在揭示子宫蓄脓猫的子宫菌群的变化,并探究引起子宫蓄脓的主要病原菌。【方法】采用全长 16S rRNA 基因测序技术测定健康猫和子宫蓄脓猫子宫微生物组,分析子宫菌群组成及其差异。使用鉴别培养基对关键菌种进行分离鉴定。【结果】健康猫子宫核心菌属为不动杆菌属、假单胞菌属、嗜麦芽寡氧单胞菌属、魏斯氏菌属等;而子宫蓄脓猫子宫优势菌属为埃希氏-志贺氏菌属,优势菌种为大肠埃希菌。功能预测分析表明,子宫蓄脓组蛋白质的输出、氨基酸相关酶、内质网中蛋白质加工、氨酰 tRNA 生物合成相关通路显著降低。分离鉴定结果显示子宫蓄脓猫子宫内的优势菌种为大肠埃希菌种,分离株均属于 B2 型, *hylA*、*fimH*、*iroN*、*cnf1*、*papC*、*kpsMTII*、*iutA* 基因多呈阳性。【结论】本研究分析了健康猫和患子宫蓄脓猫子宫中菌群差异,其中健康猫子宫中优势菌群以非致病菌为主,而罹患子宫蓄脓的猫子宫中优势菌群发生显著改变,其中大肠埃希菌是猫蓄脓子宫中的主要菌种且存在多种毒力基因,为治疗猫子宫蓄脓提供了参考。

关键词: 猫; 子宫菌群; 子宫蓄脓; 16S rRNA 基因; 大肠埃希菌; 毒力基因

资助项目: 四川省自然科学基金(24NSFSC4469, 2023NSFSC0234); 重庆市自然科学基金(CSTB2022NSCQ-MSX1602)
This work was supported by the Natural Science Foundation of Sichuan Province (24NSFSC4469, 2023NSFSC0234) and the Chongqing Natural Science Foundation (CSTB2022NSCQ-MSX1602).

*Corresponding author. E-mail: suizhongcao@sicau.edu.cn

Received: 2024-02-03; Accepted: 2024-04-28; Published online: 2024-05-07

Diversity of uterine microbiota in healthy felines and felines with pyometra

ZENG Shengxin¹, CHEN Zhikun¹, WANG Han², SUN Chengliang², LUO Zhengzhong¹, HUANG Yixin¹, YONG Kang³, YAO Xueping¹, CAO Suizhong^{1*}

1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 College of Bioengineering, Sichuan Water Conservancy Vocational College, Chongzhou 611231, Sichuan, China

3 College of Animal Science and Technology, Chongqing Three Gorges Vocational College, Chongqing 404155, China

Abstract: [Objective] We characterized the uterine microbiota in healthy felines and felines with pyometra, aiming to reveal the effect of pyometra on the uterine microbiota of felines and explore the potential pathogens causing pyometra. **[Methods]** High-throughput sequencing of the full-length 16S rRNA gene was employed to determine and compare the uterine microbiota in healthy felines and felines with pyometra. The key strains were isolated and identified by the culture method. **[Results]** The dominant bacterial genera in the uterus of healthy felines were *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, and *Weissella*. The dominant bacterial genus and species in the uterus of felines with pyometra were *Escherichia-Shigella* and *Escherichia coli*, respectively. Functional prediction showed that pathways such as protein export, amino acid-related enzymes, protein processing in endoplasmic reticulum, and aminoacyl tRNA biosynthesis in the pyometra group were significantly reduced. The results of isolation and identification showed that the prevalent bacterial species in the uterus of felines with pyometra was *E. coli*. The isolates all belonged to the phylogroup B2 and were mostly tested positive for *hlyA*, *fimH*, *iroN*, *cnf1*, *papC*, *kpsMTII*, and *iutA*. **[Conclusion]** We compared the uterine microbiota in healthy felines and felines with pyometra. The dominant bacteria in the uterus of healthy felines were mostly non-pathogenic, while those in the uterus of felines with pyometra changed significantly, with *E. coli* being dominant and carrying multiple virulence genes. The findings provide a theoretical basis for treating pyometra in felines.

Keywords: feline; uterine microbiota; pyometra; 16S rRNA gene; *Escherichia coli*; virulence gene

子宫蓄脓是猫临床上常见的生殖系统疾病之一，在体内激素代谢紊乱、微生物感染等因素的共同作用下，引起子宫内膜增生、炎症，导致子宫内大量蓄脓^[1]。其中孕酮的长期刺激使局部免疫力降低、腺体分泌物增加和肌层活性降低，形成对病原体有利的子宫内环境，使细菌在这一阶段更有可能定殖^[2]。子宫蓄脓影响动物的繁殖活动，危害着动物健康，诊治不

及时还会波及肾脏等组织器官，严重时危及生命安全。微生物菌群与机体的健康息息相关，宿主-微生物组的相互关系被认为是一种互惠共生关系，动物为微生物种群提供营养和足够的物理环境，而微生物则执行基本功能^[3]。

长期以来，人们认为健康子宫处于无菌状态，只有在感染或病理状态时才会有微生物的定殖。然而，随着高通量测序技术的发展，人

们逐渐发现健康子宫内是存在微生物菌群的,“无菌子宫”的假说受到挑战^[4]。在健康非孕女性中,子宫似乎含有独特的低量微生物群,有助于胎儿定殖^[5]。全长 16S rRNA 基因测序避免了不同高变区和 PCR 偏好性的影响,更多的高变区信息能够显著提高物种注释的分辨率和准确性,目前已广泛运用于不同生境微生物群落研究。张玉珠研究表明,健康犬子宫内的核心菌门是变形菌门(*Proteobacteria*),核心菌属是假单胞菌属(*Pseudomonas*)、埃希氏-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)等^[6],大肠埃希菌(*Escherichia coli*)是犬蓄脓子宫中最常被检测出来的病原^[7],也是炎性子宫疾病猫子宫内容物培养最常见的分离菌^[8]。目前,国内外关于健康猫子宫菌群的研究尚属空白,而关于猫子宫蓄脓的菌群研究也很少,大量文献均来自于犬。本研究采用全长 16S rRNA 基因测序技术,揭示健康猫和子宫蓄脓猫的子宫菌群特征,为治疗猫的子宫蓄脓提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

10 只健康猫样本(编号 H1-H10)和 10 只子宫蓄脓猫样本(编号 D1-D10)均来自它安宠物医院就诊病例,所有临床样本均得到宠主的知情同意。

1.1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司; Phusion Hot Start Flex 2×Master Mix, 上海仪涛生物仪器有限公司; DNA Marker、5×FastPfu Buffer, 2.5 mmol/L dNTPs, FastPfu Polymerase, TaKaRa 公司; 伊红美兰琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基, 青岛高科技工业园区海博生物技术有限公司; 引物, 北京擎科生物

科技股份有限公司。

PCR 扩增仪,杭州朗基科学仪器有限公司; 凝胶成像仪、电泳仪,上海天能科技有限公司。

1.2 样本采集

于它安宠物医院收集 10 例健康绝育猫样本和 10 例子宫蓄脓猫就诊病例样本,根据 B 超^[9]和血液学检查^[9-10]确诊子宫蓄脓。健康猫(H 组)全身麻醉后仰卧保定于手术台上,沿脐后腹中线切开皮肤、皮下组织及腹白线、腹膜,显露腹腔,暴露子宫。子宫表面消毒后将子宫沿子宫角背侧剪开,用无菌拭子采集子宫黏膜表面分泌物,立即放入超低温冰箱内(-80 °C)冷冻保存备检。子宫蓄脓猫(D 组)用一次无菌注射器抽出子宫内脓汁,立即放入-80 °C 冰箱内冷冻保存。

1.3 全长 16S rRNA 基因高通量测序

首先按照十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)法基因组提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]说明书提取样本 DNA,以获得的 DNA 为模板,使用全长通用引物对 27F (5'-AGRGTTTG ATYNTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TASGGHTAC CTTGTTASGACTT-3')^[11]对单菌落的 16S rRNA 基因全长进行扩增。PCR 反应体系: 5×FastPfu Buffer 4 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, FastPfu Polymerase (2.5 units/μL) 0.4 μL, 上、下游引物 (5 μmol/L) 各 0.8 μL, 模板 10 ng, ddH₂O 添加至 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 25 次; 72 °C 10 min。测序得到的原始数据,经 reads 拼接、Tags 过滤及去嵌合体后得到有效数据,然后基于有效数据在 100%相似度下进行扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASVs)聚类,对 ASVs 的代表序列进行物种注释,注释所用数据库为 Greengenes (version 13.5)。基于 ASVs 聚类分析结果,利用

QIIME 2 对 ASVs 进行多样性分析。使用 SILVA 数据库 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>) 进行物种注释, 根据物种注释结果, 获得各分类水平物种组成信息。

1.4 病原菌分离鉴定

将样本置于 LB 肉汤培养基 37 °C、120 r/min 培养 12 h, 菌液划线于麦康凯培养基 37 °C 培养 12 h, 挑选光滑、圆形、红色单菌落增菌培养 12 h, 培养后菌液划线于伊红美兰培养基 37 °C 培养 12 h, 挑选黑色、带有金属光泽的菌落增菌培养后再次划线于伊红美兰培养基, 重复多次后挑选最后一次培养的黑色、带金属光泽的菌落镜检后增菌培养, 取 1.5 L 菌液 8 000 r/min 离心 8 min 后倒掉废液, 加入 500 μ L 双蒸水, 沸水浴 10 min 提取核酸, 冷却至室温后放入 -20 °C 保存备用。使用特异性上、下游引物对 uidA-F (5'-ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC-3') 和 uidA-R (5'-AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG-3')^[12] 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (20 μ L): Hot Start Flex 2 \times Master Mix 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 6 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 63 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环 35 次; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.5 系统进化群鉴定及毒力基因检测

1.5.1 系统进化群鉴定

大肠埃希菌系统进化群鉴定基因 *chuA*、*yjaA*、*tspE4.C2* 引物序列及退火温度参考顾晓等^[13]的研究, PCR 反应体系为 20 μ L。系统进化群标准参考 Clermont 等^[14]的研究, 样品经过 PCR 扩增后, *chuA*、*yjaA*、*tspE4.C2* 均为阴性, 或仅 *yjaA* 阳性的菌株属于 A 群; 仅 *tspE4.C2* 基因阳性的菌株属于 B1 群; 同时 *chuA*、*yjaA* 阳性, 或 3 个基因均阳性的菌株属于 B2 型; 同时 *chuA* 和 *tspE4.C2* 基因阳性为 D 型。

1.5.2 毒力基因检测

选择 *hylA*、*fimH*、*iroN*、*cnf1*、*papC*、*kpsMTII*、*iutA*、*afa*、*papA*、*iss*、*ompt* 等 11 种基因作为检测对象, 引物序列及退火温度参考周磊等^[15]的研究, 反应体系为 20 μ L, PCR 产物进行琼脂凝胶电泳检测。

1.6 统计学方法和数据分析

采用相似性分析 (analysis of similarities, ANOSIM) 方法计算组间未加权 UniFrac 距离, 采用 SPSS 27.0 软件进行 *t* 检验比较 α 多样性及肠道微生物不同分类水平组成, 对相对丰度 >0.01% 的菌门和菌属进行差异性检验, 以 $P < 0.05$ 为标准筛选显著差异菌群。采用 SPSS 27.0 软件进行相关性分析, 通过杭州联川生物技术股份有限公司官网绘制网络相关图。使用 GraphPad Prism 9 绘制箱型图和物种丰度柱状图, PICRUST 软件检测不同丰度的 KEGG。

2 结果与分析

2.1 样本序列统计分析

20 份样品通过 Illumina MiSeq 平台测序, 并对得到的 raw data 进行拼接、过滤及去嵌合体后, 共得到 520 079 条 clean reads。将所有 clean reads 按 100% 的相似度聚类为 ASVs, 并对 ASVs 的代表序列进行物种注释。D 组注释得到 1 701 个 ASVs, H 组注释得到 398 个 ASVs, 2 组无共有的 ASVs (图 1)。

2.2 物种丰富度和多样性分析

α 多样性分析结果显示, D 组和 H 组的 Simpson、Shannon、Chao1 指数均无显著差异 ($P > 0.05$) (图 2A–2C)。通过多变量统计学的方法对 H 组和 D 组进行了基于 Unweighted UniFrac 距离主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA), 结果发现 H 组与 D 组之间有极显著分离 ($P < 0.001$) 的趋势, 如图 3 所示。

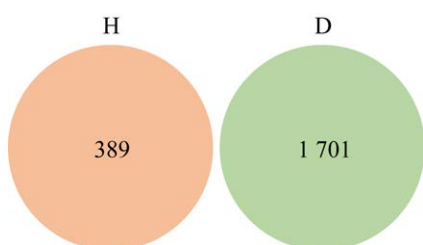


图1 ASVs 韦恩图 H: 健康组; D: 子宫蓄脓组
Figure 1 Venn diagrams of the ASVs. H is the healthy group and D is the group of felines with pyometra. The same below.

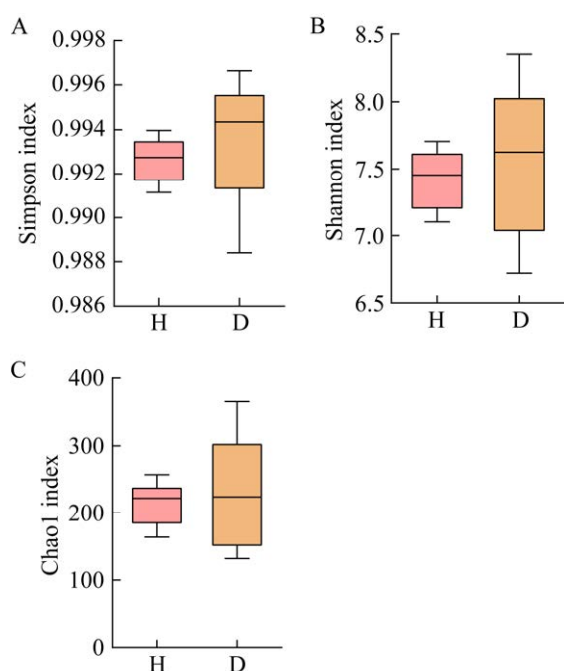


图2 α 多样性箱型图 A: Simpson 指数. B: Shannon 指数. C: Chao1 指数
Figure 2 Alpha diversity box plot. A: Simpson index. B: Shannon index. C: Chao1 index.

2.3 物种组成及差异分析

在门分类水平, 共检测出 5 个门, D 组相对丰度大于 0.01% 的有变形菌门(*Proteobacteria*, 99.86%)、厚壁菌门(*Firmicutes*, 0.10%)和拟杆菌门(*Bacteroidota*, 0.03%); H 组大于 0.01% 的有变形菌门(99.95%)和厚壁菌门(0.05%) (图 4)。门水平各组间均无显著差异。

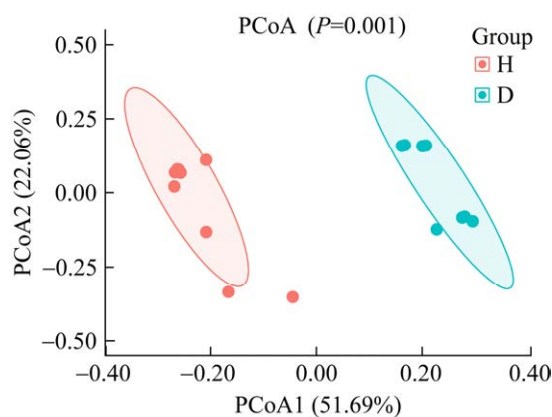


图3 主坐标分析
Figure 3 Principal co-ordinates analysis.

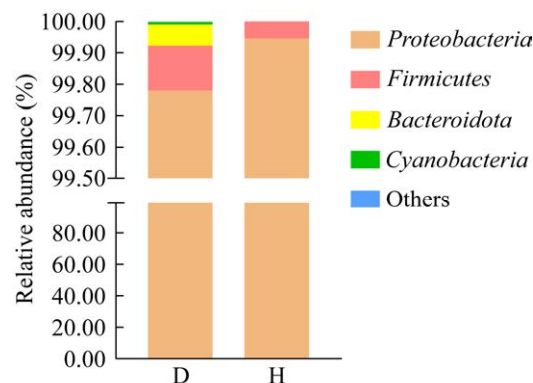


图4 门水平菌群组成柱状图
Figure 4 The abundance of microbiota at the phylum level.

在属分类水平, D 组相对丰度大于 0.01% 的只有埃希氏-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*, 99.7%), 与 H 组有极显著差异($P < 0.001$); H 组相对丰度大于 0.01% 的有 5 个, 分别是不动杆菌属(*Acinetobacter*, 96.61%)、草酸杆菌属(*Massilia*, 1.89%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 1.36%)、嗜麦芽寡氧单胞菌属(*Stenotrophomonas*, 0.09%)和魏斯氏菌属(*Weissella*, 0.05%)。其中不动杆菌属、草酸杆菌属、假单胞菌属与 D 组相比有极其显著差异($P < 0.001$); 嗜麦芽寡氧单胞菌属与 D 组相比有极显著差异($P < 0.01$); 魏斯氏菌属与 D 组相比有显著差异($P < 0.05$) (图 5)。

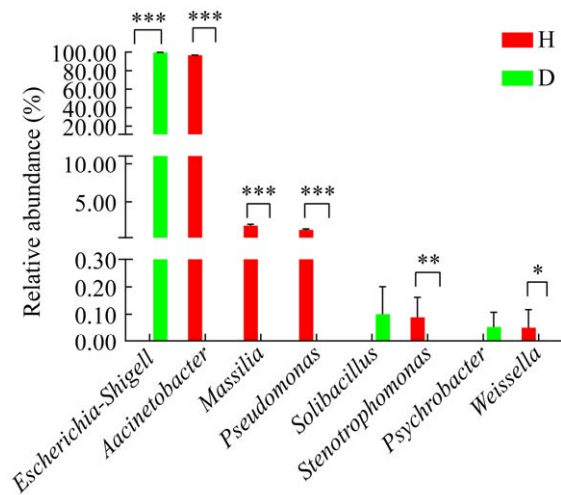


图5 属水平菌群差异

Figure 5 Bacterial differences at the genus level.
*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

在种分类水平上, H 组核心菌种是约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*, 91.51%)和利沃夫氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*, 3.88%); D 组中占绝对优势的菌种是大肠埃希菌(99.58%)。

2.4 功能预测

为预测子宫蓄脓对机体代谢功能的影响, 通过 PICRUST 方法分析代谢过程中的潜在功能, 分析细菌 KEGG 同源(KEGG orthology, KO) Pathway Hierarchy 下的第三层级(level 3)。有 30 种显著差异的代谢通路, 与 H 组相比, D 组蛋白质输出(protein export)、氨基酸相关酶(amino acid related enzymes)、内质网中蛋白质加工(protein processing in endoplasmic reticulum)、氨酰 tRNA 生物合成(aminoacyl-tRNA biosynthesis)均显著降低(图 6)。

2.5 病原分离鉴定结果

LB 肉汤培养结果显示, 健康组和子宫蓄脓组肉汤均是浑浊状态, 空白对照组肉汤澄清, 表明健康组和子宫蓄脓组子宫内均有菌存在。麦康凯鉴别培养结果显示, 健康组未出现菌落, 子宫蓄脓组出现了光滑、圆形、红色菌落(图 7A)。伊红美兰选择培养结果显示, 子宫蓄脓组各样

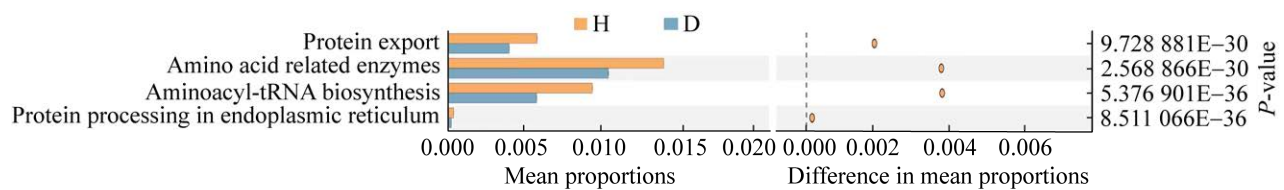


图6 KEGG 功能预测的差异分析

Figure 6 Differences in KEGG function predictions.

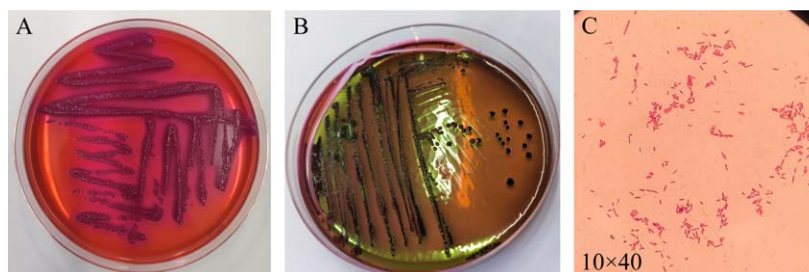


图7 子宫蓄脓猫大肠埃希菌分离结果

基. C: 镜检结果

A: 子宫蓄脓组麦康凯培养基. B: 子宫蓄脓组伊红美兰培养基.

Figure 7 Results of the *Escherichia coli* isolated from the felines with pyometra. A: MacConkey medium culture of the samples from the group with pyometra. B: Eosin-Methylene Blue medium culture of the samples from the group with pyometra. C: Isolated bacteria observed under microscopy.

本均出现黑色、带有金属光泽的圆形菌落(图 7B)。取最后一次纯化的单菌落革兰染色镜检可见到红色、革兰氏阴性的短杆菌(图 7C), PCR 产物电泳结果显示: 10 个样本在 1 487 bp 附近均出现了目的条带(图 8)。

2.6 系统进化群鉴定及毒力基因检测结果

对 10 个大肠埃希菌分离株进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增, 电泳结果显示, 10 个分离株中, *chuA* (288 bp)、*tspE4.C2* (152 bp) 和 *yjaA* (211 bp) 基因均为阳性, 参考 Clermont 等^[14]系统进化群标准, 10 个样本均属于 B2 群(图 9)。

对 10 个分离株检测 11 种毒力基因, 结果如图 10 所示, 对于 *iroN* (667 bp)、*hlyA* (1177 bp)、*fimH* (508 bp)、*cnf1* (498 bp) 基因, 10 个分离株均呈阳性; *iutA* (302 bp) 基因中, D2、D3、D6、D10 为阳性, 其余均为阴性; *kpsMTII* (272 bp) 基因中, 除 D10 外, 其余均为阳性, *papC* (328 bp) 基因中, 除 D5 以外, 其余分离株均为阳性; 对于 *afa*、*papA*、*iss*、*ompt* 基因, 10 个分离株均为阴性。

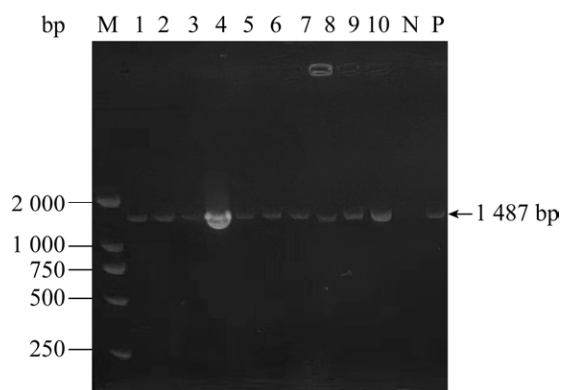


图 8 PCR 鉴定结果 M: DNA marker; 1–10: 从子宫蓄脓猫分离的大肠埃希菌菌株; N: 阴性对照; P 为阳性对照

Figure 8 Results of the PCR identification. M: DNA marker; 1–10: *Escherichia coli* strains isolated from the felines with pyometra; N: Negative control; P: Positive control.

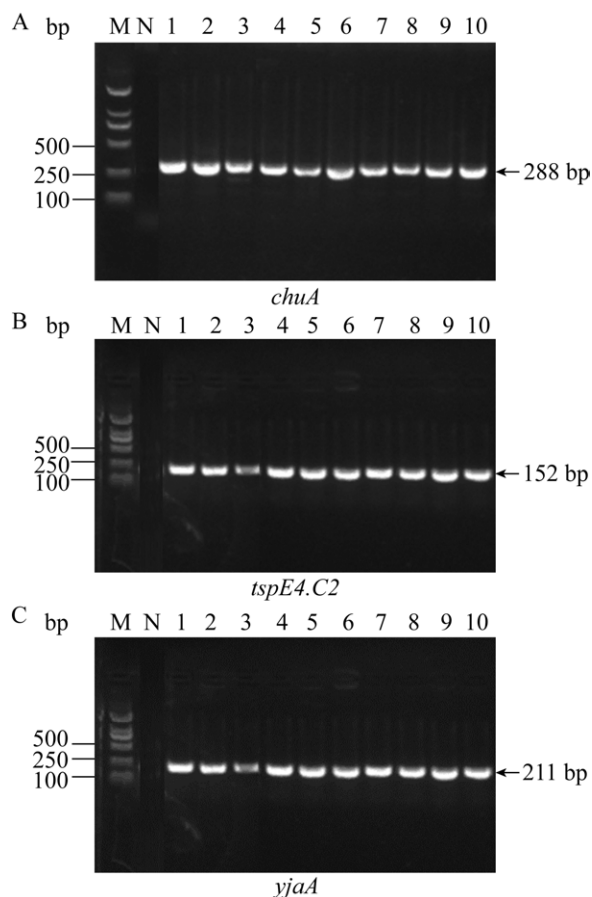


图 9 PCR 鉴定结果 A: *chuA* 鉴定结果. B: *tspE4.C2* 鉴定结果. C: *yjaA* 鉴定结果. M: DNA marker; N: 阴性对照; 1–10: 从子宫蓄脓猫分离的大肠埃希菌菌株

Figure 9 Results of the PCR identification. A: The results of the *chuA* identification. B: The results of the *tspE4.C2* identification. C: The results of the *yjaA* identification. M: DNA marker; N: Negative control; 1–10: *Escherichia coli* strains isolated from the felines with pyometra.

3 讨论与结论

3.1 健康猫子宫中核心菌群分析

近年来, “无菌子宫”的假说逐渐受到挑战^[4]。张玉珠^[6]取健康犬子宫内膜组织进行 16S rRNA 基因高通量测序发现, 门水平相对丰度前三的分别是变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门。丘甜美等^[16]

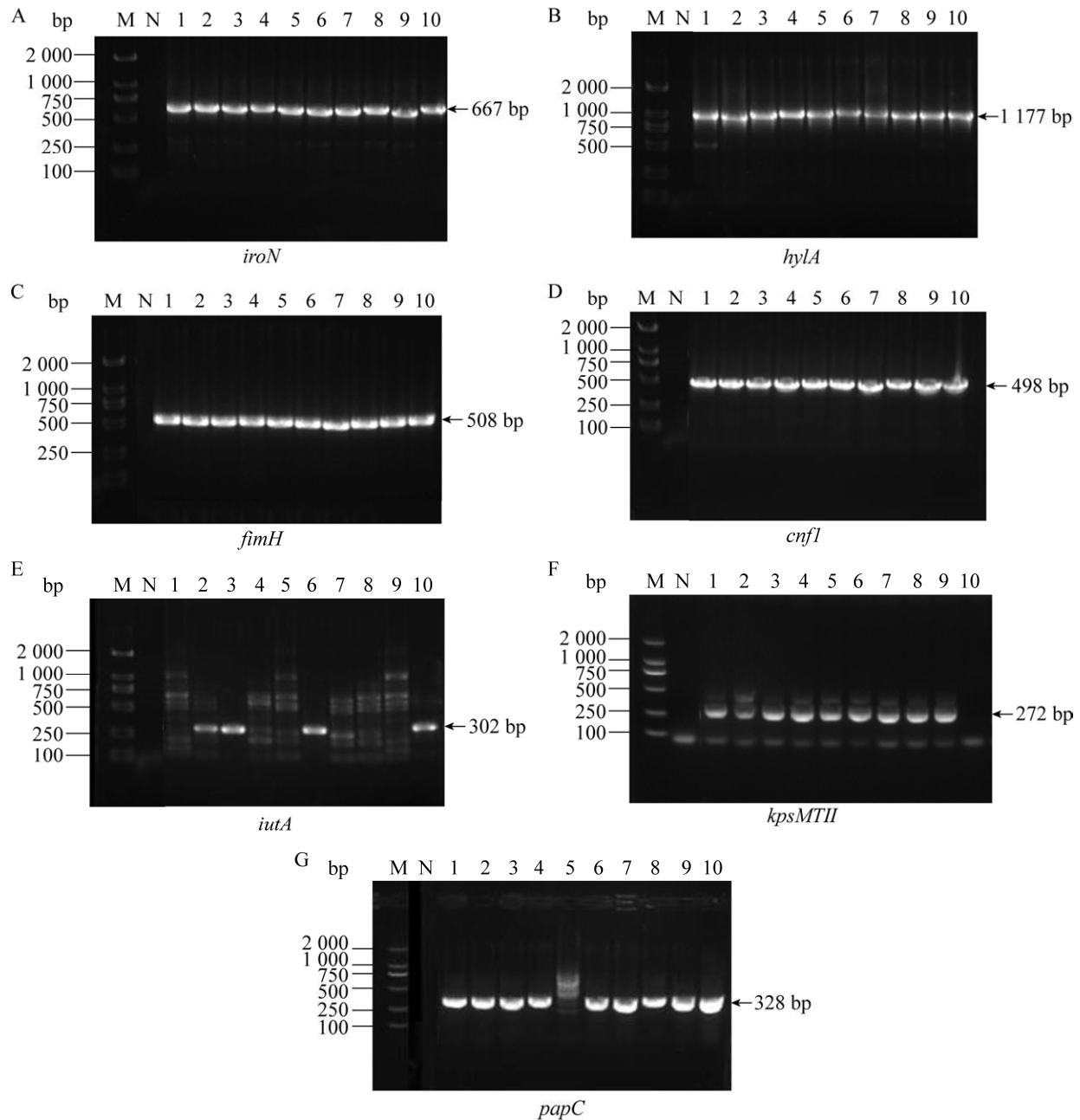


图 10 PCR 结果鉴定 A 为 *iroN* 鉴定结果. B 为 *hylA* 鉴定结果. C 为 *fimH* 鉴定结果. D 为 *cnfI* 鉴定结果. E 为 *iutA* 鉴定结果. F 为 *kpsMTII* 鉴定结果. G 为 *papC* 鉴定结果. M 为 DNA marker; N 为阴性对照; 1–10 为从子宫蓄脓猫分离的大肠埃希菌菌株

Figure 10 Results of the PCR identification. A: The results of the *iroN* identification. B: The results of the *hylA* identification. C: The results of the *fimH* identification. D: The results of the *cnfI* identification. E: The results of the *iutA* identification. F: The results of the *kpsMTII* identification. G: The results of the *papC* identification. M: DNA marker; N: Negative control; 1–10: *Escherichia coli* strains isolated from the felines with pyometra.

发现人子宫内的核心菌门是变形菌门, 与本研究的结果有一致性。研究表明, 变形菌门是新生小鼠结肠中的核心菌门^[17], 其中 1 周龄的小鼠变形杆菌门相对丰度可达到 70%以上, 胎儿的肠道定殖可能是由胎盘和羊水中不同的微生物群落在子宫内启动的^[4], 胎儿肠道菌群可能就源自母体子宫。胃肠道中常见的肠杆菌科细菌都属于变形菌门, 如大肠埃希菌、沙门氏菌、志贺菌和变形杆菌等。新生健康哺乳动物结肠中变形菌门丰度稍高, 主要作用是吸收氧气, 创造厌氧环境, 抑制需氧菌的生长^[18]。由此推测, 健康子宫内变形菌门的主要作用可能是抑制其他菌群的生长, 维持子宫内相对无菌的环境。

Winters 等研究表明, 不动杆菌属是健康子宫内核心菌属^[19], 假单胞菌属、嗜麦芽寡氧单胞菌属也是子宫内的常见菌属^[20]。不动杆菌属可能引起感染^[21], 不动杆菌属常存在于皮肤湿润的区域如腋窝、腹股沟、泌尿生殖道等, 偶尔见于呼吸道和口腔。其中引起致病感染的主要是鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*), *A. johnsonii* 引起的感染相对较少^[22]。健康组检测到的菌种主要是 *A. johnsonii*, 未检测到 *A. baumannii*。正常情况下, *A. johnsonii* 不引发疾病, 与其他菌群之间相互制约、相互协调, 处于被抑制状态^[23]。铜绿假单胞菌是假单胞菌属的主要菌种, 铜绿假单胞菌通过精氨酸二水解酶分解精氨酸, 在没有氧气的情况下, 提供运动所需的能量来源^[24]。嗜麦芽寡氧单胞菌与人类健康和环境安全息息相关^[25]。嗜麦芽寡氧单胞菌因胞内过氧化氢酶和氧化酶作用, 产生独特的类胡萝卜素, 类胡萝卜素具有耐受环境胁迫和抗氧化作用, 能够有效预防肿瘤的形成和黄斑变性, 抗癌抗衰老^[26]。草酸杆菌属是机会致病菌, 有报道发现某个脓毒性流产中分离出的主要病原菌是草酸杆菌属^[27], 也有一些脓

毒症体征的患者血液中被检出的报道^[28], 子宫内的草酸杆菌属可能是潜在的致病菌。魏斯氏菌属与乳酸菌属密切相关, 是一种潜在的益生菌, 菌株可以产生细菌素、过氧化氢、有机酸和维生素, 具有抑制病原体的生长、抗氧化等作用^[29], 其益生菌制剂被推荐用于治疗或预防各种疾病, 如寻常痤疮、皮肤病、口腔疾病、肠道微生物群失衡、腹泻和特应性皮炎等^[30]。

3.2 子宫蓄脓猫的子宫中优势菌群分析

子宫蓄脓组在门水平优势菌属仍是变形菌门, 属水平和种水平发生了显著变化, 张玉珠等^[31]取子宫蓄脓猫子宫内脓液进行 16S rRNA 基因高通量测序发现, 门水平相对丰度前三的门分别是变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门, 与本研究的结果相同。鲜有文献报道子宫蓄脓动物子宫内的主要菌门, 但有很多报道表明^[32-33]引起子宫蓄脓感染的主要病原是大肠埃希菌, 大肠埃希菌的大量增殖会挤压其他菌群的生存空间, 且大肠埃希菌属于变形菌门。与健康组相比, 子宫蓄脓组无显著差异的门, 说明子宫蓄脓未改变猫子宫的核心菌门。由于疾病组猫子宫内的核心菌属埃希氏-志贺氏菌属和健康组猫子宫核心菌属不动杆菌属均是变形菌门下的属, 因此, 即便子宫内菌群结构发生了显著的改变, 门水平却无显著差异。

张玉珠研究表明, 子宫蓄脓猫子宫内膜组织中埃希氏-志贺氏菌属显著富集^[6], 子宫蓄脓猫子宫内膜组织和脓液菌群无明显差异^[31]。本研究中, 与正常组相比, 疾病组埃希氏-志贺氏菌属相对丰度极显著增多且该菌属相对丰度高达 99.70%, 极可能是引起子宫蓄脓继发感染的主要菌属。

蓄脓子宫中的优势菌种大肠埃希菌^[34-35]是常见的引起感染的致病菌。目前许多研究表明, 大肠埃希菌是子宫蓄脓细菌感染的主要病原

菌^[32-33], 与本研究的结果一致。Tsumagari 等^[36]使用 60 只临床健康的比格母犬在发情期不同阶段分别通过将大肠埃希菌接种到子宫中来诱导子宫积液, 研究发现, 在乳铁蛋白(lactoferrin, LH)激增后第 11-20 天和第 21-30 天接种大肠埃希菌的积液发生率分别为 90.9%和 78.9%, 表明在动物发情前期感染大肠埃希菌更易诱发子宫蓄脓。健康子宫清除入侵细菌的能力随着发情周期的变化而改变, 粪便或尿路感染是入侵子宫的细菌的主要来源。发情时, 孕酮促进子宫内黏膜增生释放高营养物质, 并抑制子宫内黏膜局部免疫, 此时子宫内黏膜更易被大肠埃希菌定殖感染, 研究表明, 在黄体期使用大肠埃希菌诱导子宫蓄脓比其他发情周期更易成功^[37]。然而, 蒋春阳研究发现子宫蓄脓中大肠埃希菌与肠道内粪源性大肠埃希菌的亲缘性进化关系并不密切, 但与尿道致病性大肠埃希菌的某些菌株进化关系较亲近^[38]。因此尿道致病性大肠埃希菌才是导致子宫蓄脓的主要细菌, 子宫蓄脓患犬中经常可以从子宫和膀胱中分离出相同的菌株型^[39], 其具有特殊的尿道感染毒力基因(uropathogenic virulence factors, UVFs), UVFs 帮助细菌吸附和定殖于尿道和子宫黏膜, 为细菌的生长繁殖提供必要的营养物质^[40]。例如 ExPEC 菌株合成的毒素主要以溶血素和细胞毒性坏死因子为代表, 两者都促进真核细胞的破坏, 并特别有助于肠外感染的发生; 载体如需氧杆菌素, 导致从周围介质中摄取铁, 使菌株在存活和复制方面具有优势^[41]。毒力基因的数量可能与毒力成正比, 毒力基因越多, 越容易感染诱发子宫蓄脓^[42]。通过免疫某些重要的毒力因子(如黏附因子、侵袭因子等), 可能限制细菌在子宫内黏膜定殖, 降低疾病发生的可能^[43]。

3.3 PICRUST 功能预测

子宫蓄脓组蛋白质的输出、氨基酸相关酶、

内胚层中蛋白质加工、氨酰 tRNA 生物合成相关通路显著降低, 表明疾病组子宫内蛋白质的合成在减少。健康组的主要菌属不动杆菌属与这几个通路均是显著正相关, 疾病组主要菌属埃希氏-大肠杆菌属和大肠埃希菌与这几个通路呈负相关的趋势。刘雨珂等^[44]的研究表明, LF 可在局部与 Fe^{3+} 结合, 使局部形成相对无铁的状态, 从而抑制细菌生长, 参与局部免疫, 而且在子宫腺上皮细胞、子宫腺膜上皮细胞、卵巢黄体、卵泡、间质、血管、生殖上皮均有表达, 并且患子宫蓄脓时猫子宫和卵巢中 LF 的表达水平降低。由此可以推测不动杆菌属可能参与 LF 的表达, 不动杆菌属的降低可能会导致 LF 减少从而使子宫内黏膜免疫下降, 变得更易被大肠埃希菌感染。

3.4 系统进化群鉴定及毒力基因检测

大部分肠道内的大肠埃希菌是不具备致病性的, 仅有某些特殊血清型的大肠埃希菌具有致病性, 根据致病机制及病变部位的不同, 致病性大肠埃希菌可分为肠致病性大肠埃希菌(intestinal pathogenic *Escherichia coli*, IPEC)和肠外致病性大肠埃希菌(extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC)^[45]。Clermont 等研究基于特定基因的存在或缺失, 将大肠埃希菌分为 A、B1、B2、C、D、E、F 和 clade I 共 8 个系统发育群^[14]。Bujňáková 等^[46]认为 A 和 B1 分群的大肠埃希菌引起疾病感染的风险较小, 为正常肠道微生物组的成员, B2 和 D 分群的大肠埃希菌为肠外感染病原体。大多数 ExPEC 属于 B2、D 和 F 分群。Johnson 等^[47]认为, 大肠埃希菌株中 5 种毒力基因 *papA/papC*、*sfa/foc*、*afa/dra*、*iutA* 和 *kpsMTII* 中存在 2 种及以上可认定为 ExPEC。本研究经过系统进化群鉴定基因和毒力基因鉴别分离到的 10 个菌株, 结果表明其均属于 B2 型的 ExPEC。在检测到的阳性毒力基因中, 黏附素

相关基因 *papC*、*fimH* 可以促使 ExPEC 组织定殖及介导入侵,其中 *papC* 能促进大肠埃希菌的黏附侵袭从而增强感染能力,同时,促进被膜生长进而增强其对机体免疫的抵抗力^[48], *fimH* 与I型菌毛合成有关^[49],推测此类基因在大肠埃希菌定殖子宫内膜过程中发挥重要作用。*iutA* 和 *iroN* 是大肠埃希菌必需的生长因子,属于铁摄取系统相关基因,可以帮助细菌调节胞内铁离子浓度,摄铁能力影响着细菌的致病性^[50]。*hlyA* 和 *cnf1* 为毒素相关基因, *cnf1* 为细胞毒性坏死因子,是大肠埃希菌重要的毒力基因,通过阻断细胞凋亡和诱导有丝分裂突变,从而促进非整倍体和细胞质分裂失调^[51]。*kpsMTII* 为荚膜外糖相关基因。综上所述,推测大肠埃希菌通过黏附因子在猫子宫内膜定殖,通过抗血清杀菌因子逃避宿主免疫反应,进而释放效应因子破坏宿主细胞导致病变发生。

本研究通过高通量测序的方法检测了健康猫和罹患子宫蓄脓猫子宫菌群的组成及差异,结果表明健康猫子宫内的优势菌群主要为不动杆菌属、假单胞菌属、嗜麦芽寡氧单胞菌属、魏斯氏菌属等。子宫蓄脓会显著改变子宫菌群结构,肠道外致病性大肠埃希菌是主要病原菌且存在多种毒力基因。本研究为进一步研究健康猫菌群作用和针对病原治疗子宫蓄脓提供了理论依据。

参考文献

- [1] 罗春海, 李冉, 王哲, 郝丹丹, 周鑫, 付世新. 母猫子宫蓄脓继发急性肾衰竭的诊治[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(4): 115-117.
LUO CH, LI R, WANG Z, HAO DD, ZHOU X, FU SX. Diagnosis and treatment of acute renal failure secondary to pyometra in female cats[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2022, 58(4): 115-117 (in Chinese).
- [2] SUGIURA K, NISHIKAWA M, ISHIGURO K, TAJIMA T, INABA M, TORII R, HATOYA S, WIJEWARDANA V, KUMAGAI D, TAMADA H, SAWADA T, IKEHARA S, INABA T. Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch[J]. Immunobiology, 2004, 209(8): 619-627.
- [3] CHOW J, LEE SM, SHEN Y, KHOSRAVI A, MAZMANIAN SK. Host-bacterial symbiosis in health and disease[J]. Advances in Immunology, 2010, 107: 243-274.
- [4] COLLADO MC, RAUTAVA S, AAKKO J, ISOLAURI E, SALMINEN S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 23129.
- [5] VERSTRAELEN H, VILCHEZ-VARGAS R, DESIMPEL F, JAUREGUI R, VANKEIRSBIJCK N, WEYERS S, VERHELST R, de SUTTER P, PIEPER DH, van de WIELE T. Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene[J]. PeerJ, 2016, 4: e1602.
- [6] 张玉珠. 犬子宫内菌群特征及其与子宫蓄脓的相关性研究[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2022.
ZHANG YZ. Study on characteristics of microflora in canine uterus and its correlation with pyometra[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2022 (in Chinese).
- [7] 包喜军, 李建基, 叶俊华, 徐玉生, 龚剑锋, 戴宗浩, 刘占斌. 犬子宫蓄脓病因学研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 30(10): 97-100.
BAO XJ, LI JJ, YE JH, XU YS, GONG JF, DAI ZH, LIU ZB. Progress on pathogenesis of canine pyometra[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2009, 30(10): 97-100 (in Chinese).
- [8] FONTBONNE A, PROCHOWSKA S, NIEWIADOMSKA Z. Infertility in purebred cats: a review of the potential causes[J]. Theriogenology, 2020, 158: 339-345.
- [9] HOLLINSHEAD F, KREKELER N. Pyometra in the queen: to spay or not to spay?[J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2016, 18(1): 21-33.
- [10] VILHENA H, FIGUEIREDO M, CERÓN JJ, PASTOR J, MIRANDA S, CRAVEIRO H, PIRES MA, TECLES F, RUBIO CP, DABROWSKI R, DUARTE S, SILVESTRE-FERREIRA AC, TVARIJONAVICIUTE A. Acute phase proteins and antioxidant responses in queens with pyometra[J]. Theriogenology, 2018, 115: 30-37.

- [11] GUO L, WANG X, LIN Y, YANG X, NI K, YANG F. Microorganisms that are critical for the fermentation quality of paper mulberry silage[J]. Food and Energy Security, 2021, 10(4): 1.
- [12] BHARDWAJ P, KAUR G, RAMPAL S. Impact of marbofloxacin administration on the emergence of marbofloxacin-resistant *Escherichia coli* in faecal flora of goats and elucidation of molecular basis of resistance[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2020, 21: 116-123.
- [13] 顾晓晓, 邬琴, 陶乔孝慈, 马雪, 李劫, 周霞, 韩猛立, 黄新, 吴桐忠, 张星星, 钟发刚. 犊牛肺源致病性大肠杆菌分离鉴定、耐药性及耐药基因检测[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(1): 240-248.
- GU XX, WU Q, TAO Q, MA X, LI J, ZHOU X, HAN ML, HUANG X, WU TZ, ZHANG XX, ZHONG FG. Isolation, identification and detection of drug resistance and drug resistance gene of pulmonary pathogenic *Escherichia coli* from calves[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(1): 240-248 (in Chinese).
- [14] CLERMONT O, CHRISTENSON JK, DENAMUR E, GORDON DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups[J]. Environmental Microbiology Reports, 2013, 5(1): 58-65.
- [15] 周磊, 李泽伟, 孙起荣, 邢刚, 魏建忠, 孙裴, 刘雪兰, 李郁. 54 株猪源肠外致病性大肠杆菌血清型、系统进化群和基因型[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1182-1194.
- ZHOU L, LI ZW, SUN QR, XING G, WEI JZ, SUN P, LIU XL, LI Y. Serotypes, phylogenetic groups and genotypes of 54 extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from pig[J]. Microbiology China, 2021, 48(4): 1182-1194 (in Chinese).
- [16] 丘甜美, 蔡慧华, 何援利, 莫沁晖. 基于 Illumina 测序分析宫腔粘连患者子宫内膜菌群多样性[J]. 现代妇产科进展, 2020, 29(8): 588-592.
- QIU TM, CAI HH, HE YL, MO QH. Analysis of endometrial microbiota diversity in patients with uterine adhesion based on Illumina sequencing[J]. Progress in Obstetrics and Gynecology, 2020, 29(8): 588-592 (in Chinese).
- [17] MIRPURI J, RAETZ M, STURGE CR, WILHELM CL, BENSON A, SAVANI RC, HOOPER LV, YAROVINSKY F. *Proteobacteria*-specific IgA regulates maturation of the intestinal microbiota[J]. Gut Microbes, 2014, 5(1): 28-39.
- [18] 郭仕辉, 余永涛, 万佳宏, 毛彦妮, 张浩东, 张津慎, 田新岳, 赵清梅. 变形菌门与哺乳动物结肠肠道菌群失调相关研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(4): 479-484.
- GUO SH, YU YT, WAN JH, MAO YN, ZHANG HD, ZHANG JS, TIAN XY, ZHAO QM. Progress in research on the relationship between *Proteobacteria* and the imbalance of mammalian colonic intestinal flora[J]. Chinese Journal of Microecology, 2022, 34(4): 479-484 (in Chinese).
- [19] WINTERS AD, ROMERO R, GERVASI MT, GOMEZ-LOPEZ N, TRAN MR, GARCIA-FLORES V, PACORA P, JUNG E, HASSAN SS, HSU CD, THEIS KR. Does the endometrial cavity have a molecular microbial signature?[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 9905.
- [20] CHEN C, SONG XL, WEI WX, ZHONG HZ, DAI JJ, LAN Z, LI F, YU XL, FENG Q, WANG ZR, XIE HL, CHEN XM, ZENG CW, WEN B, ZENG LP, DU H, TANG HR, XU CL, XIA Y, XIA HH, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 875.
- [21] van der KOLK JH, ENDIMIANI A, GRAUBNER C, GERBER V, PERRETE V. *Acinetobacter* in veterinary medicine, with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2019, 16: 59-71.
- [22] 田国忠, 崔步云. 约翰逊不动杆菌研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(3): 316-319.
- TIAN GZ, CUI BY. Progress in research on *Acinetobacter johnsonii*[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2011, 32(3): 316-319 (in Chinese).
- [23] 周刚, 李宏, 王哲. 泌尿生殖系统不动杆菌微生物生态失调感染[J]. 中国微生态学杂志, 2000, 12(5): 306-307.
- ZHOU G, LI H, WANG Z. Infection of *Acinetobacter* microecological imbalance in genitourinary system[J]. Chinese Journal of Microecology, 2000, 12(5): 306-307 (in Chinese).
- [24] PALLERONI NJ. The *Pseudomonas* story[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(6): 1377-1383.
- [25] LEE JS, SHIN YK, YOON JH, TAKEUCHI M, PYUN YR, PARK YH. *Sphingomonas aquatilis* sp. nov., *Sphingomonas koreensis* sp. nov., and *Sphingomonas taejonensis* sp. nov., yellow-pigmented bacteria isolated from natural mineral water[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,

- 2001, 51(Pt 4): 1491-1498.
- [26] 张颖, 杨悦, 韦庆慧, 赵敏. 嗜麦芽寡氧单胞菌的特性及应用研究进展[J]. 化学与生物工程, 2021, 38(3): 6-13.
- ZHANG Y, YANG Y, WEI QH, ZHAO M. Research progress in characteristic and application of *Sphingomonas*[J]. Chemistry & Bioengineering, 2021, 38(3): 6-13 (in Chinese).
- [27] ALI GA, IBRAHIM EB, DOIPHODE SH, GORAVEY W. *Massilia timonae* bacteremia: an unusual pathogen of septic abortion[J]. IDCases, 2022, 29: e01592.
- [28] van CRAENENBROECK AH, CAMPS K, ZACHÉE P, WU KL. *Massilia timonae* infection presenting as generalized lymphadenopathy in a man returning to Belgium from Nigeria[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(7): 2763-2765.
- [29] TEIXEIRA CG, FUSIEGER A, MILIÃO GL, MARTINS E, DRIDER D, NERO LA, de CARVALHO AF. *Weissella*: an emerging bacterium with promising health benefits[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2021, 13(4): 915-925.
- [30] KIM E, YANG SM, KIM HY. *Weissella* and the two Janus faces of the genus[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(4): 1119-1127.
- [31] 张玉珠, 郑慧华, 刘祥雨, 杨泞毓, 杜崇涛, 谢光洪. 微生物组技术分析犬子宫蓄脓宫内菌群特征[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2022, 42(2): 73-78.
- ZHANG YZ, ZHENG HH, LIU XY, YANG NY, DU CT, XIE GH. Microbiome analysis of intrauterine bacteria characteristics of canine pyometra[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2022, 42(2): 73-78 (in Chinese).
- [32] PAUDEL M, KAFLE S, GOMPO TR, KHATRI KB, ARYAL A. Microbiological and hematological aspects of canine pyometra and associated risk factors[J]. Heliyon, 2023, 9(12): e22368.
- [33] XAVIER RGC, SANTANA CH, da SILVA PHS, PARAGUASSÚ AO, NICOLINO RR, FREITAS PMC, SANTOS RL, SILVA ROS. Association between bacterial pathogenicity, endometrial histological changes and clinical prognosis in canine pyometra[J]. Theriogenology, 2024, 214: 118-123.
- [34] HAGMAN R, KINDAHL H, LAGERSTEDT AS. Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F_{2α} metabolite levels[J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 2006, 47(1): 55-67.
- [35] 刘燕霏, 崔垚鑫, 刘俊华, 杨建德. 犬猫子宫蓄脓症研究进展[J]. 天津农学院学报, 2020, 27(3): 86-88.
- LIU YF, CUI YX, LIU JH, YANG JD. Research advance on pyometra in dogs and cats[J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2020, 27(3): 86-88 (in Chinese).
- [36] TSUMAGARI S, ISHINAZAKA T, KAMATA H, OHBA S, TANAKA S, ISHII M, MEMON MA. Induction of canine pyometra by inoculation of *Escherichia coli* into the uterus and its relationship to reproductive features[J]. Animal Reproduction Science, 2005, 87(3/4): 301-308.
- [37] XAVIER RGC, SANTANA CH, Da SILVA PHS, ABURJAILE FF, PEREIRA FL, FIGUEIREDO HCP, FREITAS PMC, SANTOS RL, SILVA ROS. Transmission of *Escherichia coli* causing pyometra between two female dogs[J]. Microorganisms, 2022, 10(12): 2465.
- [38] 蒋春阳. 犬子宫蓄脓大肠杆菌毒力基因及其 LD50、耐药性和致病性研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2014.
- JIANG CY. Study on virulence genes of *E. coli* isolated from canine pyometra and its LD50, resistance and pathogenicity[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [39] HAGMAN R, KÜHN I. *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 84(1/2): 143-153.
- [40] SIQUEIRA AK, RIBEIRO MG, Da S LEITE D, TIBA MR, de MOURA C, LOPES MD, PRESTES NC, SALERNO T, Da SILVA AV. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs[J]. Research in Veterinary Science, 2009, 86(2): 206-210.
- [41] EMODY L, KERÉNYI M, NAGY G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2003, 22(Suppl 2): 29-33.
- [42] ARORA N, SANDFORD J, BROWNING GF, SANDY JR, WRIGHT PJ. A model for cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex in the bitch[J]. Theriogenology, 2006, 66(6/7): 1530-1536.
- [43] KREKELER N, MARENDAS MS, BROWNING GF, HOLDEN KM, CHARLES JA, WRIGHT PJ. The role of Type 1, P and S fimbriae in binding of *Escherichia coli* to the canine endometrium[J]. Veterinary

- Microbiology, 2013, 164(3/4): 399-404.
- [44] 刘雨珂, 徐倩倩, 孙佩芳, 陈美伊, 刘铭峰, 段德勇. 犬正常发情期与患子宫蓄脓的子宫和卵巢组织结构及乳铁蛋白表达的对比[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(4): 1103-1114.
- LIU YK, XU QQ, SUN PF, CHEN MY, LIU MF, DUAN DY. Comparison of histological structure and lactoferrin expression in uterine and ovarian of dogs during normal estrus and with pyometra[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2021, 52(4): 1103-1114 (in Chinese).
- [45] RILEY LW. Distinguishing pathovars from nonpathovars: *Escherichia coli*[J]. Microbiology Spectrum, 2020, 8(4): 1-14.
- [46] BUJŇÁKOVÁ D, KOCÚREKOVÁ T, KARAHUTOVÁ L. Distribution of virulence-associated genes, antibiotic resistance and phylogenetic groups in *Escherichia coli* isolated from domestic and racing pigeons[J]. Veterinary Research Communications, 2023, 47(3): 1697-1705.
- [47] JOHNSON JR, MURRAY AC, GAJEWSKI A, SULLIVAN M, SNIPPES P, KUSKOWSKI MA, SMITH KE. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(7): 2161-2168.
- [48] 史唯地, 康立超, 刘彩霞, 寇丽君, 吕双飞, 任慧杰, 钱瑞宣, 马勋, 王静, 蒋建军, 高盛杰. 犍牛源肠外致病性大肠杆菌分离鉴定、致病性及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(12): 5022-5031.
- SHI WD, KANG LC, LIU CX, KOU LJ, LYU SF, REN HJ, QIAN RX, MA X, WANG J, JIANG JJ, GAO SJ. Isolation, identification, pathogenicity and drug resistance analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from calves[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(12): 5022-5031 (in Chinese).
- [49] KLEMM P. FimC, a chaperone-like periplasmic protein of *Escherichia coli* involved in biogenesis of type 1 fimbriae[J]. Research in Microbiology, 1992, 143(9): 831-838.
- [50] SAROWSKA J, FUTOMA-KOLOCH B, JAMAKMIECIK A, FREJ-MADRZAK M, KSIAZCZYK M, BUGLA-PLOSKONSKA G, CHOROSZY-KROL I. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports[J]. Gut Pathogens, 2019, 11: 10.
- [51] MALORNI W, FIORENTINI C. Is the Rac GTPase-activating toxin CNF1 a smart hijacker of host cell fate?[J]. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2006, 20(6): 606-609.