

研究报告

猪圆环病毒 2 型感染的仔猪空肠菌群变化

朱琳琳^{1,2} 武子涵¹ 邹战明¹ 杨宁¹ 王建舫¹ 李焕荣^{1*}

(1. 北京农学院动物科学技术学院 北京 102206)

(2. 北京市动物疫病预防控制中心 北京 102600)

摘要:【目的】研究猪圆环病毒 2 型(PCV2)感染导致的仔猪空肠病理变化及其菌群变化。【方法】经过口服和肌肉注射 PCV2 后测定 3 头仔猪病毒血症情况; 随后将 6 头断奶仔猪随机分为感染组和对照组, 感染组 3 头, 空白组 3 头。相同接种途径感染仔猪, 在感染后 21 d 宰杀仔猪, 无菌采集空肠肠段及内容物分别进行显微病理观察和 MiSeq 测序分析空肠菌群变化。【结果】PCV2 感染后 21 d 仔猪血清中病毒核酸达到较高水平, 感染组仔猪空肠绒毛萎缩脱落, 空肠微生物种类和丰度发生变化, 菌群多样性增高, 乳酸菌属含量显著降低, 假单胞菌属含量显著增高。【结论】PCV2 感染导致仔猪空肠菌群发生一定变化, 空肠有益菌减少, 有害菌增多, 加重仔猪空肠炎症发生。

关键词: 猪圆环病毒 2 型, 仔猪, 空肠菌群

Change of the jejunum flora from PCV2-infected piglets

ZHU Lin-Lin^{1,2} WU Zi-Han¹ ZOU Zhan-Ming¹ YANG Ning¹
WANG Jian-Fang¹ LI Huan-Rong^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

(2. Beijing Animal Disease Control Center, Beijing 102600, China)

Abstract: [Objective] To study changes of piglet's jejunum pathology and jejunum flora caused by porcine circovirus 2 type (PCV2) infections. [Methods] The viremia of three piglets infected with PCV2 by oral and intramuscular injection was determined. Then six weaned pigs, being randomly divided into PCV2 infected group and the control group (n=3), were infected with PCV2 with the same route of infection. The three piglets of each group were slaughtered at 21 d after infection. Jejunum and its contents were collected for microscopic pathology and flora sequencing. [Results] The virus loads of the piglets' serum achieved a higher level at 21 d after PCV2 infection. The jejunum villous of piglets in the infection group atrophied and fell off. The microbial species and

Foundation item: Natural Science Foundation of Beijing-Key Project of Science and Technology Plan of Beijing Education Commission (No. KZ201510020022); National Natural Science Foundation of China (No. 31472174)

*Corresponding author: Tel: 86-10-80795591; E-mail: lihuanrongl@126.com

Received: June 19, 2017; **Accepted:** October 09, 2017; **Published online** (www.cnki.net): October 24, 2017

基金项目: 北京市自然科学基金项目-北京市教育委员会科技计划重点项目(No. KZ201510020022); 国家自然科学基金项目(No. 31472174)

*通讯作者: Tel: 86-10-80795591; E-mail: lihuanrongl@126.com

收稿日期: 2017-06-19; **接受日期:** 2017-10-09; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-10-24

abundance in these jejunums changed, and jejunum flora diversity increased, including the significant decrease of *Lactobacillus* content and the significant increase of *Pseudomonas* genus content. [Conclusion] PCV2 infection results in certain changes in piglet's jejunum flora. A decline in the jejunum beneficial bacteria and the increase of harmful bacteria may further aggravate the piglet jejunum inflammation.

Keywords: Porcine circovirus 2 type, Piglets, Jejunum flora

猪圆环病毒病(PCVD)是由猪圆环病毒 2 型(PCV2)引起的威胁世界养猪业的重要免疫抑制性疾病^[1], 表现为断奶后多系统衰竭综合征、皮炎肾病综合征等。此外, PCV2 感染会引起仔猪胃肠炎症状的轻微腹泻, 剖解可见胃和肠黏膜有出血及肠绒毛变短脱落等病理变化^[2]。

动物肠道菌群多样性与饲料成分有关^[3]。猪的肠道微生物组成可影响猪的生长性能, 粪球菌、罗氏菌属细菌和乳酸菌在生长性能高的猪肠道中是优势菌^[4]。有益菌可通过分泌不同代谢产物抑制与杀伤有害菌, 或保护肠黏膜屏障而有利于机体健康^[5-6]。机体遭受应激时正常菌群能更好地保持动态平衡, 增加机体应对不良因素的能力^[7]。传染性肠炎和应激性肠炎患者, 肠道有益菌降低, 有害菌增多^[8-9]。至于 PCV2 感染的仔猪肠道结构变化是否可引起其肠道菌群发生变化, 还未见报道。

本研究拟通过 PCV2 感染后仔猪空肠结构变化与菌群的相互关系分析, 为开发微生态制剂用于病毒感染导致的肠黏膜损伤的恢复提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 PCV2: SD2008 株^[2], 河北农业大学动物传染病实验室分离鉴定, TCID₅₀ 为 $10^{5.5}$ /mL; GenBank 登录号为 GQ174519。

1.1.2 实验动物: 35 日龄长白/大白杂交二元仔猪 6 头, 购自首农集团北京养猪育种中心。PCV2、猪圆环病毒 I 型(PCV1)、猪细小病毒(PPV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪瘟病毒(CSFV)和猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)核酸 PCR/RT-PCR 检测均为阴性; ELISA 检测 PCV2 抗体为阴性。

1.1.3 主要试剂和仪器: 胎牛血清(FBS), Sigma 公司产品, 批号是 F2442; H-E 染色试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; DNA 提取试剂盒, Biowest 公司; Fastpfu DNA 聚合酶, 北京全式金生物技术有限公司; AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒, AxyGen 公司。QuantiFluorTMST 蓝色荧光定量系统, Promega 公司; Illumina MiSeq platform, Illumina 公司; 饲料购自江苏安佑科技饲料有限公司, 批号是 20160719-01。

1.2 方法

1.2.1 动物试验: 首先进行感染仔猪病毒血症的测定, 即选取 3 头仔猪, 口服与肌肉注射 5 mL/头 PCV2, 在 3、7、14、21、28、36、42 和 48 d 前腔静脉采血收集血清, 利用荧光定量 PCR 进行血清中病毒载量的检测。随后, 选 6 头仔猪, 随机分为空白组和感染组, 感染组 3 头, 空白组 3 头, 在北京农学院实验动物房隔离饲养, 实验条件统一, 自由采食和饮水。感染组接种量分别为 5 mL/头, 空白组接种细胞培养物上清, 接种途径和接种量相同。每天观察试验动物的临床症状并记录, 在病毒含量达较高水平时宰杀仔猪, 采集空肠内容物, 供 MiSeq 测序。同时取 2-3 cm 空肠肠管, 置 4%多聚甲醛固定 24 h, 进行病理形态观察。空白组采样同感染组。

1.2.2 PCV2 感染仔猪的病毒血症: 利用 Real-time FQ PCR 检测感染后不同时间血清中 PCV2 核酸, 在病毒载量较高时宰杀仔猪, 采集空肠及其内容物分别进行形态学观察和菌群测定。上游引物: 5'-AGTGAGCGGGAAAATGCAGA-3'; 下游引物: 5'-TCCTCCGTGGATTGTTCTCT-3'。20 μ L Real-time FQ PCR 反应体系: 2 \times UltraSYBR mixture 10 μ L, 25 pmol/ μ L 上、下游引物各 0.2 μ L, DNA 模板

1.0 μL , 三蒸水 8.6 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 熔解曲线: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60–95 $^{\circ}\text{C}$ 过程中全程读板收集荧光信号。

1.2.3 H-E 染色观察空肠形态变化: 通过脱水、透明、包埋、切片的步骤进行石蜡切片的制作, 按照 H-E 染色试剂盒的说明书进行 H-E 染色, 显微观察攻毒组空肠组织结构变化。

1.2.4 MiSeq 测序检测空肠菌群变化: 测序由上海美吉桑格生物科技有限公司完成, 即分别对 PCV2 感染组和空白组样品进行基因组 DNA 抽提后, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。针对 16S rRNA 基因 V4 区, 合成带有 Barcode 的特异引物(338F 5'-Barcode-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'和 806R 5'-GGA CTACHVGGGTWTCTAAT-3')。20 μL PCR 反应体系, 含 5 \times FastPfu Buffer 4 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , 5 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 0.8 μL , FastPfu 聚合酶 0.4 μL , 模板 DNA 10 ng。PCR 扩增反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 25 个循环。每个样品 3 个重复, 将一样品的 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

参照电泳初步定量结果, 将 PCR 产物进行定量, 按相应比例进行混合。测序得到的 PE reads (Paired-end reads), 首先根据 Overlap 关系进行拼接, 同时对序列质量进行质控和过滤, 区分样品后利用 Mothur 软件对序列进行 OTU 聚类, 用于样品间的相似性分析, 并绘制样品的稀释性曲线, 计算样品的 Alpha 多样性, 分析 PCV2 感染后仔猪空肠菌群变化。

1.2.5 数据分析: 以 *t* 检验对各组数据进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著, 以“*”表示。

2 结果与分析

2.1 临床症状

感染组在感染后 7–21 d 仔猪表现被毛粗乱, 食欲有所下降, 轻微咳嗽, 体温有所升高, 未见明显腹泻症状; 空白组采食饮水均正常, 无任何临床症状。

2.2 病毒感染后血清中 PCV2 核酸含量的动态变化

如图 1 所示, 仔猪感染后 7 d 出现病毒血症, 21 d 时病毒载量达到较高值, 28 d 后开始下降, 49 d 接近 7 d 水平。

2.3 空肠组织显微病理观察

与空白组相比, PCV2 感染 21 d 仔猪空肠肠绒毛脱落严重, 固有层淋巴细胞增多及其肠腺上皮细胞脱离基底膜(图 2B 空心箭头所示), 肠腺之间组织疏松水肿(图 2B 实心箭头所示), 表明 PCV2 感染后可导致空肠黏膜的损伤。

2.4 测序结果与分析

2.4.1 稀释性曲线: 当测序数据量相同时, 攻毒组比空白组 OTU 数量多, 当测序数量达到 60 000 左右时, 空白组与 PCV2 感染组 OTU 量随测序数量的增加变化不大(图 2、3)。说明本次测序样本量充足, 可以进行后续分析。

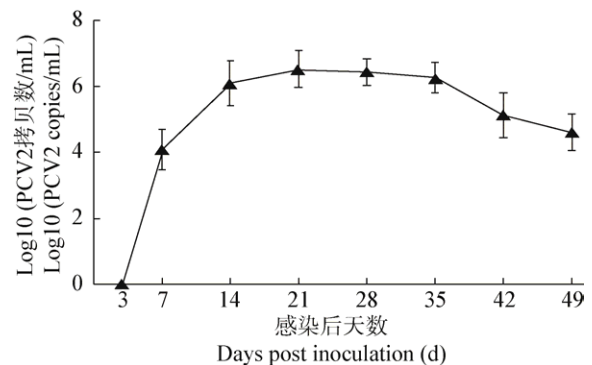


图 1 PCV2 感染猪血清中核酸动态

Figure 1 Kinetics of PCV2 in serum of pigs inoculated with PCV2

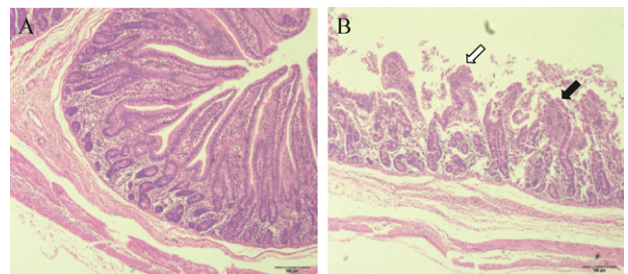


图 2 仔猪感染后空肠组织病理变化

Figure 2 Histologic lesions of piglets after infection with PCV2

注: 21 dpi, H-E 染色, 200 \times ; A: 对照组; B: 攻毒组。

Note: 21 dpi, H-E staining, 200 \times ; A: Control group; B: Infected group.

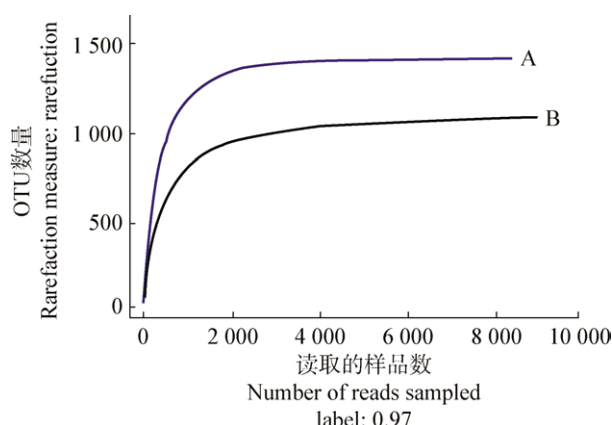


图3 空肠菌群稀释性曲线

Figure 3 The dilution curve of jejunum flora

注: A: 感染组; B: 对照组.

Note: A: Infected group; B: Control group.

2.4.2 物种丰度及多样性分析: Alpha 多样性是对单个样品中物种多样性的分析,包括 ACE 值、Chao1 值、Shannon 指数等。Chao1 值和 ACE 值是根据所测得的 OTU 数量预测样品中微生物的种类, Shannon 指数是一个多样性指数, Shannon 指数越大,则表示该样品中的物种越丰富。

利用 USEARCH 软件计算在 97% 的相似水平上每个样品的 OTU (Operational taxonomic units) 数量。空白组 OTU 数量是 996, 而感染组 OTU 数量达到了 1313, PCV2 感染组的 Ace 值、Chao1 值和 Shannon 指数较高, Simpson 值较低, 表明 PCV2 感染后, 肠道菌群多样性增高(表 1)。

表 1 仔猪空肠菌群 OTU 数量及 Alpha 多样性
Table 1 OTU number and Alpha diversity of the jejunum flora in piglets

样本 Sample	Reads	OTU	Ace	Chao1	Coverage	Shannon	Simpson
空白组 Blank group	89 003	996	1 010	1 032	0.999 528	4.10	0.069 6
感染组 Infection group	83 656	1 313	1 316	1 323	0.999 857	5.40	0.025 9

2.4.3 仔猪空肠菌群结构分析: 仔猪空肠样品中微生物的 16S rRNA 基因 Illumina 测序, 门水平上显示有 5 个主要菌门, 分别为厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和螺旋体门(Spirochaetes)。与空白对照组相比, 感染组厚壁菌门平均相对丰度降低, 但差异不显著; 变形菌门、拟杆菌门、放线杆菌门、螺旋体属平均丰度上调, 且前三个差异显著($P < 0.05$) (图 4)。

属水平上分析, 显示空白组和 PCV2 感染组仔猪空肠内有益菌和有害菌的变化趋势及差异情况。相对丰度高于 1% 的菌属数量, PCV2 感染组高于空白组。PCV2 感染组中主要优势菌群为芽孢杆菌属及假单胞菌属, 相对丰度是 13.92% 和 11.47%, 乳酸杆菌属相对丰度仅为 3.94%; 而空白组空肠样品的主要优势菌群是乳酸杆菌属和芽孢杆菌属, 相对丰度分别为 45.36%、9.58%, 假单胞菌属相对丰度是 3.98%。与空白组相比, 感染组假单胞菌属含量显著的增高, 乳酸杆菌属含量显著降低(表 2)。

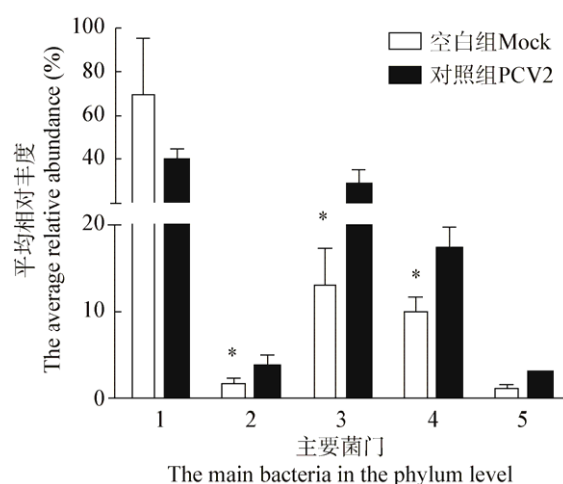


图4 空肠菌群在门水平上的相对丰度

Figure 4 The relative abundance of jejunum flora in the phylum level

注: 1: 厚壁菌门; 2: 放线菌门; 3: 变形菌门; 4: 拟杆菌门; 5: 螺旋体门. *: 差异显著($P < 0.05$).Note: 1: Firmicutes; 2: Actinobacteria; 3: Proteobacteria; 4: Bacteroidetes; 5: Spirochaetes. *: Significant difference ($P < 0.05$).

表 2 空肠菌群在属水平上的相对丰度
Table 2 Relative abundance of jejunum flora in the genus level

空肠群落结构组成(1%以上) Jejunum community structure (1% or more)	空白组 Blank group	感染组 Infection group (%)
密螺旋体属 <i>Treponema</i> _2	1.1	2.47
鞘氨醇单胞菌 <i>Sphingomonas</i>	*	1.14
瘤胃球菌科 <i>Ruminococcaceae</i> _UCG-005	*	1.23
理研菌科 <i>Rikenellaceae</i> _RC9_gut_group	*	1.54
假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	3.98	11.47
普雷沃氏菌科 <i>Prevotellaceae</i> _NK3B31_group	*	1.11
普氏菌属 <i>Prevotella</i> _9	*	1.26
普氏菌属 <i>Prevotella</i> _1	*	1.89
片球菌属 <i>Pediococcus</i>	*	1.33
海洋芽孢杆菌属 <i>Oceanobacillus</i>	*	1.03
乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	2.55	4.62
乳酸杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	45.36	3.94
埃希氏杆菌属 <i>Escherichia-Shigella</i>	1.48	3.07
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	1.76	1.08
拟杆菌目 <i>Bacteroidales</i> _S24-7_group_norank	1.32	3.03
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	9.58	13.92
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	*	1.08

注：*：相对丰度小于 1%。
Note: *: Relative abundance is less than 1%.

3 讨论

感染 PCV2 的猪表现肠炎是近几年来 PCVD 临床症状之一，同时感染猪外周血淋巴细胞减少及细胞因子等免疫功能的重要指标也发生改变，但是关于 PCVD 引起的肠炎和免疫功能的改变是否与肠道菌群的变化相关却不得而知。有研究表明，流感病毒的刺激可引起免疫细胞向肠道聚集^[9]，导致小鼠肠道菌群变化^[10]。PCV2 感染可引起 DC、NK 细胞、T 淋巴细胞在肠黏膜中聚集^[11]。本研究所用实验动物在相同饲养条件下结果显示，人工感染 PCV2 7 d 后，仔猪出现病毒血症，在感染 21 d 时病毒血症达到较高水平，而且在感染后 21 d 仔猪空肠肠绒毛脱落、萎缩，与已有报道小肠固有层细胞、黏膜下层细胞及粘液腺中间存在淋巴细胞浸润等现象相符^[2]，说明 PCV2 感染造成了仔猪空肠的病理学损伤，且 PCV2 感染导致猪空肠有益微生物菌群减少，有害微生物菌群增多，推测与 PCV2 感染猪肠炎的产生

存在一定的相关性。

猪空肠肠道黏膜免疫系统效应部位主要包括肠道黏膜上皮淋巴细胞及黏膜固有层细胞，是主要免疫反应部位^[12]。CD8⁺ T 细胞造成的细胞毒效应将会加剧肠炎^[13]。PCV2 感染仔猪后空肠黏膜免疫系统效应部位 B 细胞和 DCs 抗原递呈能力增强，总 T 淋巴细胞数量增多，NK 细胞数量增多，提示 PCV2 感染后 NK 细胞与细胞免疫共同引起仔猪肠道的炎症病理损伤^[11]。此外，PCV2 感染仔猪后外周血单个核细胞中 IL-1β、IL-6、IL-8 和 TNF-α 等促炎细胞因子的 mRNA 表达水平显著上调，参与炎症过程^[14]。本研究显示 PCV2 感染仔猪空肠出现明显的炎症损伤，可能与 PCV2 感染后猪空肠黏膜免疫系统变化有关。

传统的体外培养技术和显微镜计数法研究菌群种类丰富的肠道样品，不仅不能精确区分具有不同特征的菌群种类，而且检测效率也低，且许多细

菌体外根本无法培养或者有偏爱性,不能准确反映胃肠道微生物区系的全貌。变性梯度凝胶电泳和单链构象多态性等技术被广泛应用于微生物菌群多样性研究^[15],但也不能真实反映肠道内容物中菌群多样性与丰度。而 Illumina MiSeq 测序技术克服了以上几种检测方法的缺陷,将荧光定量 PCR 敏感性和测序的准确性相结合,能客观全面地反映动物肠道菌群结构^[16-17]。本研究通过对 PCV2 感染仔猪病毒血症处于较高水平的空肠内容物进行菌群测序,显示 PCV2 感染后肠道菌群多样性增高,与脂肪沉积成正相关的厚壁菌门^[18-19]数量降低,负相关的拟杆菌门^[18-19]显著上调,可能是 PCV2 感染导致的断奶仔猪消瘦的原因之一。在属水平上,病毒感染仔猪空肠内容物主要优势菌群是假单胞菌属和芽孢杆菌属,而未感染猪是乳杆菌属,说明 PCV2 感染后可导致有益菌乳酸菌含量的降低,产生拮抗和杀死有害微生物的物质减少,降低对有害微生物的抑制和杀伤作用,促进有害微生物破坏肠道黏膜保护作用,降低对肠黏膜损伤修复,加重空肠炎症的发生。众所周知,乳酸菌主要包括乳杆菌属,是最具代表性的肠道内益生菌。有报道乳酸菌可抑制或杀死大肠杆菌等显示其有益菌作用^[20],而铜绿假单胞菌是仔猪肠壁囊泡性脓肿的病原菌^[21],猪源性蜡样芽孢杆菌存在潜在危害^[22],表明这两种菌的有害性。

有研究显示旋毛虫侵袭小鼠后,可引起肠道炎症反应,同时小鼠肠道内菌群结构产生变化,表现为肠道益生菌的数量明显减少,而致病菌与机会致病菌的数量增加^[23]。本研究结果显示 PCV2 感染仔猪空肠黏膜结构发生损伤,结合空肠肠黏膜免疫系统相关免疫细胞紊乱,细胞毒效应增强^[11],促炎因子 mRNA 表达水平显著上调^[14],推测 PCV2 感染先导致仔猪肠道损伤与炎症,破坏菌群内环境,导致乳杆菌等有益菌定植量下降,菌群稳态失衡,有害菌增多,进一步加剧肠道炎症的发生,从而形成恶性循环。

参 考 文 献

- [1] Ge XN, Wang F, Guo X, et al. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in China[J]. Virus Research, 2012, 164(1/2): 100-106
- [2] Yang F, Chen LG, Li YQ, et al. Pathogenicity of SD/2008 strain of porcine circovirus type 2 in piglets[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2013, 33(4): 538-544,565 (in Chinese)
杨芳, 陈立功, 李艳琴, 等. 猪圆环病毒 2 型 SD/2008 株对仔猪的致病性[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(4): 538-544,565
- [3] Singh KM, Shah TM, Reddy B, et al. Taxonomic and gene-centric metagenomics of the fecal microbiome of low and high feed conversion ratio (FCR) broilers[J]. Journal of Applied Genetics, 2014, 55(1): 145-154
- [4] He BB, Li TT, Zhu YH, et al. Differential analysis of intestinal microflora in pigs with different growth performance[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(8): 2327-2334 (in Chinese)
何贝贝, 李天天, 朱玉华, 等. 不同生长性能猪肠道菌群差异分析[J]. 动物营养学报, 2014, 26(8): 2327-2334
- [5] Wang XQ, Yang F, Liu C, et al. Dietary supplementation with the probiotic *Lactobacillus fermentum* I5007 and the antibiotic aureomycin differentially affects the small intestinal proteomes of weanling piglets[J]. The Journal of Nutrition, 2012, 142(1): 7-13
- [6] Guilloteau P, Martin L, Eeckhaut V, et al. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate[J]. Nutrition Research Reviews, 2010, 23(2): 366-384
- [7] Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota[J]. Nature Reviews Immunology, 2010, 10(3): 159-169
- [8] Jiang BY. The impact of probiotics treat patients with IBS in intestinal flora, psychology, quality of life and symptom[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Medical University, 2012 (in Chinese)
姜彬言. 益生菌治疗对 IBS 患者肠道菌群、心理状况、生活质量及症状的影响[D]. 合肥: 安徽医科大学硕士学位论文, 2012
- [9] Esplugues E, Huber S, Gagliani N, et al. Control of T_H17 cells occurs in the small intestine[J]. Nature, 2011, 475(7357): 514-518
- [10] Liu J, Wang H, Sun JM, et al. The influence of influenza virus infection on the mice intestinal flora and the regulation action of mulberry leaf during the treatment of influenza in mice[J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25(9): 1001-1004,1009 (in Chinese)
刘骏, 王辉, 孙经梦, 等. 流感病毒感染对小鼠肠道菌群的影响及桑叶的调节作用[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(9): 1001-1004,1009
- [11] Zou ZM, Qiao JZ, Yang N, et al. Changes of immune cells in the jejunum mucosal immune system after PCV2 infection in piglets[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2016, 31(1): 50-54 (in Chinese)
邹战明, 乔金增, 杨宁, 等. 仔猪感染 PCV2 后空肠黏膜免疫系统中相关免疫细胞变化[J]. 北京农学院学报, 2016, 31(1): 50-54
- [12] Dong YL, Wang SY. The research advances on mucosal immune cells in animal[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2003, 24(1): 100-106

- 7-9 (in Chinese)
董玉兰, 王树迎. 动物黏膜免疫细胞研究进展[J]. 动物医学进展, 2003, 24(1): 7-9
- [13] Müller S, Lory J, Corazza N, et al. Activated CD4⁺ and CD8⁺ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease[J]. The American Journal of Pathology, 1998, 152(1): 261-268
- [14] Shi KC, Guo X, Ge XN, et al. Cytokine mRNA expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from piglets experimentally co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 140(1/2): 155-160
- [15] Combes S, Michelland RJ, Monteils V, et al. Postnatal development of the Rabbit caecal microbiota composition and activity[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 77(3): 680-689
- [16] Eshar D, Weese JS. Molecular analysis of the microbiota in hard feces from healthy rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) medicated with long term oral meloxicam[J]. BMC Veterinary Research, 2014, 10: 62
- [17] Huybens N, Houeix J, Licois D, et al. Pyrosequencing of epizootic rabbit enteropathy inocula and rabbit caecal samples[J]. The Veterinary Journal, 2013, 196(1): 109-110
- [18] Guo X, Xia X, Tang R, et al. Development of a real-time PCR method for *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 47(5): 367-373
- [19] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity[J]. Nature, 2006, 444(7122): 1022-1023
- [20] Wan RF, Jiang SX. Experiment of 3 strains of lactic acid bacteria against pathogenic *Escherichia coli*[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2007, 39(3): 50-52 (in Chinese)
万荣峰, 江善祥. 3 株乳酸菌体外拮抗致病性大肠杆菌试验[J]. 畜牧与兽医, 2007, 39(3): 50-52
- [21] Qiu L, Wang XL, Hao HF, et al. The bio-characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from piglets with intestinal vesicles cysts[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2012, 32(11): 1640-1644 (in Chinese)
邱立, 王兴龙, 郝华芳, 等. 致仔猪肠壁囊泡性脓肿铜绿假单胞菌的生物学特性研究[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(11): 1640-1644
- [22] Zhao ZY, Dai RS, Liu DY, et al. Isolation and characterization of a pathogenic *Bacillus cereus* from a piglet with diarrhea[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2014, 40(3): 311-315 (in Chinese)
赵振宇, 戴荣四, 刘东友, 等. 一株猪源致病性蜡样芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2014, 40(3): 311-315
- [23] Wang Y. Alternation of murine enteric bacteria in intestinal inflammation induced by *Tichina spiralis* infection[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2014 (in Chinese)
王莹. 旋毛虫感染后小鼠肠道炎症与肠道菌群的相关变化[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2014