

# 患子宫内膜炎母猪产道致病菌谱分析及卟啉单胞菌的分离鉴定

刘炜宁<sup>#1</sup>, 陶天宇<sup>#1</sup>, 郑桂花<sup>1</sup>, 杨贝莹<sup>1</sup>, 毛丹<sup>2</sup>, 何后军<sup>1</sup>, 戴益民<sup>1</sup>, 张锦华<sup>\*1</sup>

1 江西农业大学动物科学技术学院, 江西 南昌 330045

2 江西生物科技职业学院, 江西 南昌 330200

刘炜宁, 陶天宇, 郑桂花, 杨贝莹, 毛丹, 何后军, 戴益民, 张锦华. 患子宫内膜炎母猪产道致病菌谱分析及卟啉单胞菌的分离鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5045-5057

Liu Weining, Tao Tianyu, Zheng Guihua, Yang Beiyang, Mao Dan, He Houjun, Dai Yimin, Zhang Jinhua. Microbiota in the birth canal of sows with endometritis and isolation and identification of *Porphyromonas*[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5045-5057

**摘要:**【背景】子宫内膜炎是规模化养殖场母猪常患的生殖道疾病之一, 对养殖业造成的经济损失较大, 细菌感染是常见的病因之一, 但具体病原及致病机制尚未完全明确。【目的】探究产道菌群对母猪子宫内膜炎的影响。【方法】采用第三代细菌 16S rRNA 基因全长高通量测序技术进行对比, 研究健康和患有子宫内膜炎母猪产道菌群差异, 并依据菌群分析结果对子宫内膜炎母猪产道分泌物进行细菌分离。建立荧光定量 PCR 计数方法测定母猪产道样品中的卟啉单胞菌数。【结果】健康和患子宫内膜炎母猪产道菌群的丰富度和多样性差异显著; 与健康组母猪相比, 患子宫内膜炎母猪产道菌群变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门相对丰度显著增加( $P<0.05$ )。在属分类水平上, 健康母猪产道的主要优势菌属为金黄杆菌属、芽孢杆菌属、毛螺菌属等, 这些优势菌属在患子宫内膜炎母猪产道丰度降低, 患子宫内膜炎母猪产道丰度最高的菌属为埃希氏菌属(*Escherichia*)、*Rodentibacter* 和卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)。在种水平上, *Porphyromonas somerae* 是患子宫内膜炎母猪产道的主要条件性致病菌。依据菌群分析结果, 本研究从子宫内膜炎母猪产道分泌物中分离到一株卟啉单胞菌, 经鉴定该菌 16S rRNA 基因与 *Porphyromonas somerae* DSM 23386 strain JCM 13867 (NR\_113090.1)相似性达 99.04%。荧光定量 PCR 计数方法测定, 子宫内膜炎母猪产道卟啉单胞菌数量显著高于健康母猪( $P<0.05$ ), 推测卟啉单胞菌与该批次母猪子宫内膜炎病因有

基金项目: 国家自然科学基金(31860694); 江西省自然科学基金(20212ACB205005)

#对本文贡献相同

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (31860694); Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20212ACB205005)

#These authors equally contributed to this work

\*Corresponding author: E-mail: zhangjh1122@jxau.edu.cn

Received: 2022-06-29; Accepted: 2022-08-07; Published online: 2022-10-08

关。【结论】本研究为子宫内膜炎母猪的病因和发病机制奠定基础，并为其治疗提供理论依据。

关键词：母猪；子宫内膜炎；产道菌群；16S rRNA 基因高通量测序；卟啉单胞菌

## Microbiota in the birth canal of sows with endometritis and isolation and identification of *Porphyromonas*

LIU Weining<sup>#1</sup>, TAO Tianyu<sup>#1</sup>, ZHENG Guihua<sup>1</sup>, YANG Beiyang<sup>1</sup>, MAO Dan<sup>2</sup>, HE Houjun<sup>1</sup>, DAI Yimin<sup>1</sup>, ZHANG Jinhua<sup>\*1</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

2 Jiangxi Biotech Vocational College, Nanchang 330200, Jiangxi, China

**Abstract:** [Background] Endometritis, one of the common reproductive tract diseases of sows in large-scale breeding farms, causes severe economic losses to the breeding industry. Bacterial infection is one of the common causes of endometritis, while the specific pathogens and pathogenesis remain to be studied. [Objective] To explore the microbiota in birth canal on sow endometritis. [Methods] The third-generation bacterial 16S rRNA gene high-throughput sequencing was employed to compare the microbiota in the birth canal of sows with endometritis and healthy sows. According to the sequencing results, bacteria were isolated from the vaginal secretions of the sows with endometritis. Furthermore, quantitative real-time PCR (qPCR) was conducted to determine the number of *Porphyromonas* in the birth canal. [Results] The richness and diversity of the microbiota in the birth canal showed significant differences between health sows and those suffering from endometritis. Compared with the healthy sows, those suffering from endometritis had increased relative abundance of *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* ( $P < 0.05$ ). The dominant genera in the birth canal of healthy sows were *Chryseobacterium*, *Bacillus*, and *Lachnospira*, which showed declined abundance in the sows with endometritis. *Escherichia*, *Rodentibacter*, and *Porphyromonas* were the dominant genera in the birth canal of the sows suffering from endometritis. *Porphyromonas somerae* is a major bacterial species in the birth canal of sows with endometritis. According to the results of microbiota analysis, a strain of *Porphyromonas* was isolated from the vaginal secretion of sows with endometritis, which shared the 16S rRNA gene homology of 99.04% with *P. somerae* DSM 23386 strain JCM 13867 (NR\_113090.1). In addition, the number of *Porphyromonas* in the birth canal of the diseased sows was higher than that in the healthy sows ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] *Porphyromonas* may be related to the endometritis in this batch of sows. This study lays a foundation for deciphering the etiology and pathogenesis of sow endometritis as well as a theoretical basis for treating endometritis in sows.

**Keywords:** sows; endometritis; microbiota in birth canal; 16S rRNA gene high-throughput sequencing; *Porphyromonas*

母猪子宫内膜炎(sow endometritis)是规模化种猪场常见的生殖道疾病之一<sup>[1]</sup>, 通常是子

宫黏膜层组织受到细菌、病毒和寄生虫等病原微生物侵害而引起的黏膜黏液性或化脓性炎症

的过程<sup>[2]</sup>。子宫内膜炎除了造成子宫生理性损伤外,还会影响受精及胚胎生长发育和着床,甚至会引起胎儿死亡或发生流产<sup>[3]</sup>。此病多发于产后,但部分未配种的后备母猪也可能发生,患病猪繁殖能力下降,有的母猪因此屡配不孕、被迫淘汰,使养殖业造成较大的经济损失<sup>[4]</sup>。

母猪正常产道内的微生物之间、微生物与宿主环境之间保持动态的平衡<sup>[5]</sup>。微生态平衡失调会导致某些条件致病菌过度生长,产道内细菌通过子宫颈的上升进入子宫,从而引发子宫内膜炎等生殖疾病。产道内细菌上升感染被认为是母猪子宫内膜炎最常见的感染途径,多数研究中,子宫内膜炎是由细菌感染产道并经由产道黏膜上行蔓延感染子宫所致。掌握母猪产道内的菌群结构,有利于更好地预防和治疗母猪子宫内膜炎<sup>[6]</sup>。本文通过细菌第三代 16S rRNA 基因全长高通量测序技术对子宫内膜炎及健康母猪产道菌群进行分析,探究其菌群结构差异,研究与子宫内膜形成有关的条件性病原菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样本采集

江西省某养殖场采集健康及患子宫内膜炎母猪产道分泌物样本。子宫内膜炎母猪外阴红肿、有不洁分泌物,症状轻时为白色黏液,严重时则为赤色、白色或者白赤相间散发腥臭味道黏液,排除病毒与寄生虫感染,判断为患细菌性子宫内膜炎;同时选取同场同群健康母猪,用 20 cm 加长无菌棉签深入产道 5 cm 左右取分泌物,避免接触到产道口和外阴部,防止污染,以能清晰看到分泌物附着为准,每组取样两份放置于 5.0 mL 无菌离心管中,一份取出后立即冷藏送至实验室用于组织涂片诊断和分

离细菌;另一份取出后立即将离心管放入液氮中,带回实验室在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于后续总 DNA 提取。共采集 10 份样品,健康产道分泌物(标记为 HV)和子宫内膜炎产道分泌物(标记为 EV)各 5 份。

#### 1.1.2 主要试剂、仪器和培养基

细菌 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;2×SYBR Green qPCR Master Mix,武汉塞维尔科技有限公司;DL2000 DNA Marker、dNTP、10×Buffer 和 HS Taq DNA Polymerase, TaKaRa 公司。快速实时荧光定量 PCR 仪, Thermo Scientific 公司;PCR 仪,中国东胜仪器有限公司。CDC 厌氧培养基(g/L):胰蛋白胨 15.0,氯化钠 5.0,酵母 5.0,大豆蛋白胨 5.0,半胱氨酸 0.4,氯化血红素 0.000 5,维生素 K 0.001,脱纤维羊血 50 mL。

### 1.2 微生态形态学评价

参照肖小芹等<sup>[7]</sup>方法,将采集的产道分泌物样本直接进行染色镜检:取少量分泌物样本置玻片上涂开,室温自然干燥,采用瑞氏染色法对涂片进行染色,置显微镜下观察红细胞、脱落表皮细胞及视野中细菌进行微生态学评价。

### 1.3 细菌总 DNA 提取和 16S rRNA 基因高通量测序

利用细菌 DNA 提取试剂盒提取样本细菌总 DNA,选用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增,对 DNA 进行质量检测,PCR 反应体系:2×Taq Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  10 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。利用 1%琼脂糖进行凝胶电泳。

将检测合格的 DNA 样本送至北京百迈客云科技有限公司进行 16S rRNA 基因全长高通量测序, 测序基于 PacBio 测序平台, 利用单分子实时测序(SMRT Cell)的方法对 marker 基因进行测序, 之后通过对 circular consensus sequencing (CCS) 序列进行过滤、聚类或去噪, 并进行物种注释及丰度分析, 可以揭示样品的物种构成。

#### 1.4 数据分析

运用 LimA V1.7.0 软件, 通过 barcode 对 CCS 进行识别, 得到 Raw-CCS 序列数据; 运用 cutadapt 1.9.1 软件进行引物序列的识别与去除并且进行长度过滤, 得到不包含引物序列的 clean-CCS 序列; 运用 UCHIME V4.2 软件鉴定并去除嵌合体序列, 得到 effective-CCS 序列。序列划分 feature (OTUs、ASVs), 进行多样性分析、差异分析、相关性分析及功能预测分析等。

#### 1.5 卟啉单胞菌分离纯化及 16S rRNA 基因的分子鉴定

用接种环从采集的子宫内膜炎母猪产道分泌物的样品中蘸取少许内容物, 无菌条件下接种于 CDC 厌氧培养基, 厌氧密封盒充气(氮气浓度 85%, CO<sub>2</sub> 浓度 15%的混合气体), 37 °C 培养 10 d。若长出不同形态菌落则需多次划线纯化培养, 直至菌落较为单一。挑取黑色单菌落进行革兰氏染色镜检, 结合细菌染色结果, 将初步筛选的疑似菌落接种于 CDC 液体培养基中富集培养。以菌液为 PCR 扩增模板, 利用 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系和反应条件参考 1.3, PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒回收片段, 与 pMD-18T 载体连接后转化大肠杆菌 Top-10 感受态细胞, 筛选阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序所得序列与 GenBank 数据库中的序列进行 BLAST 同源比对分析。

#### 1.6 荧光定量 PCR 测定样品中卟啉单胞菌数

参照 Walsh 等<sup>[8]</sup>方法, 设计卟啉单胞菌特异性引物 F (5'-TGCGTAGGTGGCTGATTAAG-3') 和 R (5'-AGTTTACGGCGTGGACTACC-3'), 对样品中卟啉单胞菌 16S rRNA 基因可变区片段进行扩增, 并选取大肠杆菌、产气荚膜梭菌和乳杆菌等检测引物特异性。PCR 反应体系参考 1.3, 反应条件: 94 °C 10 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35 个循环; 72 °C 7 min。根据试剂盒说明将 PCR 产物进行胶回收, 回收产物连接 T 载体, 转化至大肠杆菌感受态细胞, 培养菌液送测序。提取测序正确含卟啉单胞菌基因的重组质粒, 将质粒进行 10 倍系列梯度稀释(10<sup>4</sup>-10<sup>8</sup> 拷贝), 以梯度稀释质粒为模板进行 qPCR 检测并绘制标准曲线<sup>[9]</sup>。qPCR 反应体系: 2×SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.2 μL, 模板 1 μL。qPCR 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 10 s, 60 °C 32 s, 40 个循环。

## 2 结果与分析

### 2.1 微生态形态评价结果

参考人类医学临床中对妇女阴道微生态的诊断方法<sup>[10]</sup>: 临床观察产道分泌物情况、外阴是否有红肿及周围是否附有分泌物, 产道分泌物经镜检, 细菌密集度(油镜观察每个视野的平均数为 1-9 个为 I 级, 10-99 个为 II 级, 100 个以上为 III 级, 油镜下细菌聚集成团或密集覆盖黏膜上皮细胞为 IV 级)和菌群多样性(油镜下 1-3 种细菌为 I 级, 4-6 种细菌为 II 级, 7-9 种细菌为 III 级, 10 种细菌以上为 IV 级), 同时观察脱落上皮细胞和红细胞的数量。本次母猪样品形态学检测指标如表 1 所示: 子宫内膜炎母猪产道细菌密集度(IV 级), 明显高于健康母猪产道(I 级);

母猪产道样品镜检结果如图 1 所示, 在 1 个视野内, 子宫内膜炎母猪产道菌群多样性(III级)明显高于健康母猪产道(I级), 子宫内膜母猪产道分泌物还可以看到较多脱落的上皮细胞。

表 1 健康和患子宫内膜炎母猪产道分泌物形态学检测分析

Table 1 Morphological analysis of vaginal secretions in healthy and endometritis sows

| 形态学检测指数                       | 健康样品      | 子宫内膜炎样品   |
|-------------------------------|-----------|-----------|
| Morphological detection index | HV sample | EV sample |
| 细菌密集度                         | I         | IV        |
| Density of bacteria           | I         | IV        |
| 菌群多样性                         | I         | III       |
| Bacterial diversity           | I         | III       |

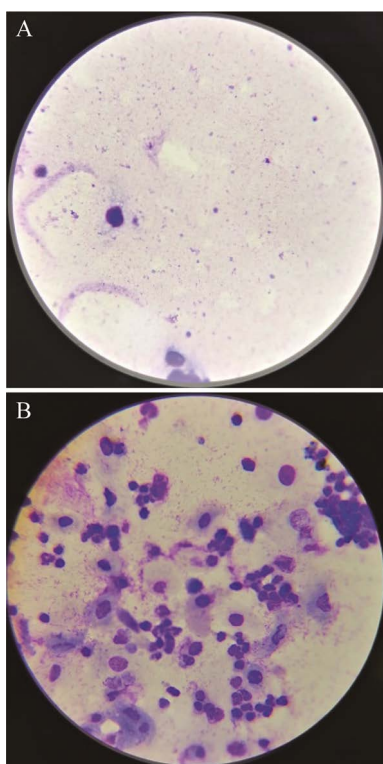


图 1 健康母猪(A)和子宫内膜炎母猪(B)产道分泌物镜检图(1 000×)

Figure 1 Microscopic examination of vaginal secretions of healthy sows (A) and endometritis sows (B) (1 000×).

## 2.2 OTU 及物种多样性分析

样品测序后通过 Barcode 识别后共获得 59 816 条 CCS 序列, 每个样品至少产生 4 525 条 CCS 序列, 平均产生 5 982 条 CCS 序列。如图 2 所示, 总共获得 1 064 个 OTU, 其中 EV 共产生 896 个 OTU, HV 共产生 582 个 OTU, HV 和 EV 共有 414 个。

稀释性曲线(rarefaction curve)用于反映测序深度, 验证测序数据量是否足以反映样品中的物种多样性, 并间接反映样品中物种的丰富程度<sup>[11]</sup>。如图 3A 所示, 曲线缓慢上升表明样品序列充分, 可以进行数据分析。香农指数曲线反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性, Shannon 指数越大说明 OTU 种类越多、物种越丰富。各样本香农指数曲线趋于平缓(图 3B)则说明测序数据量足够大, OTU 种类不会再随测序量增加而增长。

## 2.3 菌群结构门水平组成分析

在门水平上, 子宫内膜炎组相对丰度大于 1% 的优势菌门有 6 个: 变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、*Bacteroidetes*、梭杆菌门(*Fusobacteriota*)和软

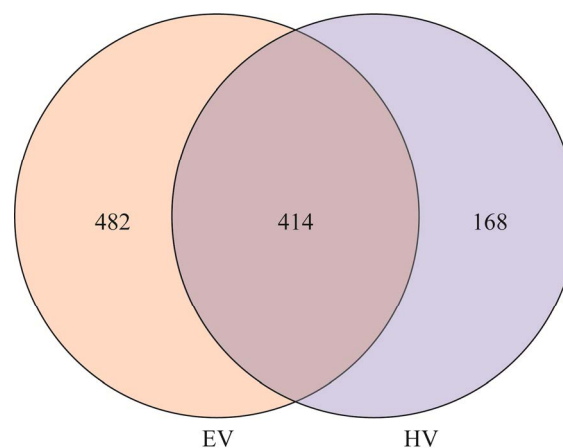


图 2 健康和患子宫内膜炎母猪产道样本 OTU 统计  
Figure 2 OTU statistics of birth canal samples from healthy and endometritis sows.

壁菌门(*Tenericutes*), 它们的相对丰度分别为 47.85%、24.87%、14.69%、6.99%、1.82%和 1.08%。健康组鉴定出 7 个相对丰度大于 1% 的优势菌门, 如图 4 所示。其中, 以厚壁菌门(*Firmicutes*)占比最高, 占比为 38.97%; 其次是

变形菌门(*Proteobacteria*)占比为 26.80%; 拟杆菌门(*Bacteroidota*)占比为 19.40%; *Bacteroidetes* 占比为 4.57%; 放线菌门(*Actinobacteriota*)占比为 1.98%; 软壁菌门(*Tenericutes*)占比为 1.56%; 蓝细菌门(*Cyanobacteria*)占比为 1.40%

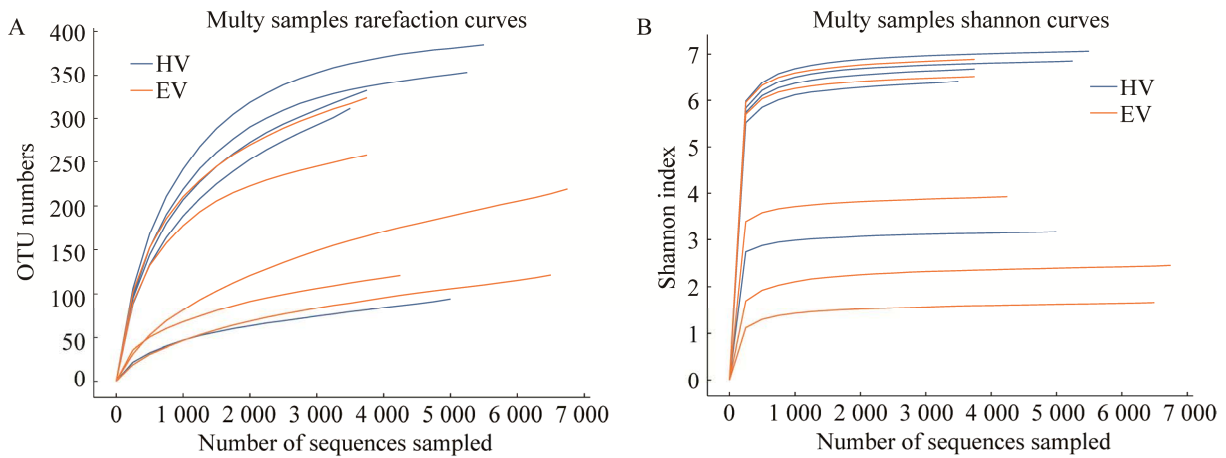


图 3 稀释性曲线(A)和香农指数曲线(B)

Figure 3 Rarefaction curve (A) and Shannon index curve (B).

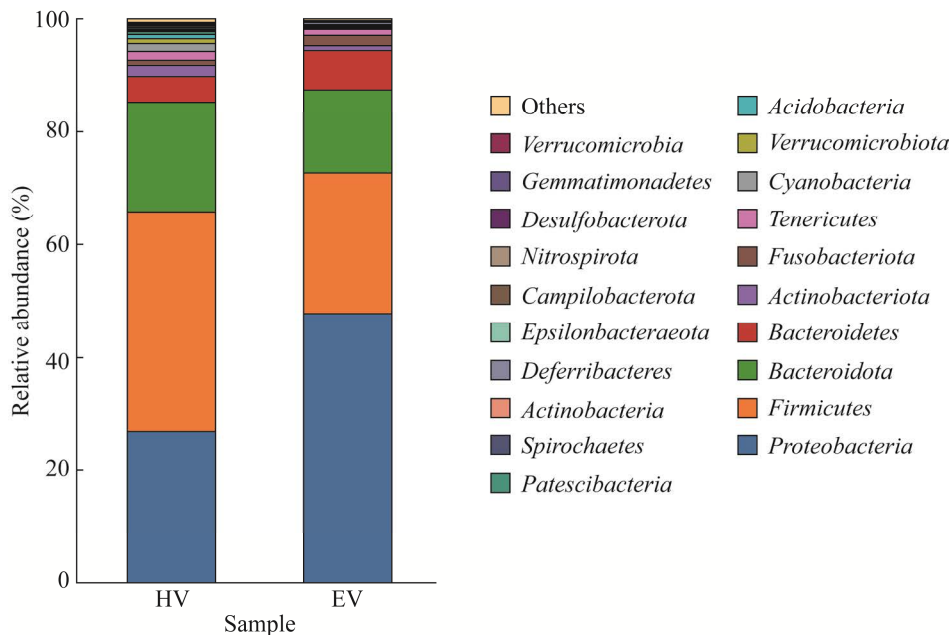


图 4 健康和患子宫内膜炎母猪产道菌群门水平构成差异

Figure 4 Differences in composition of birth canal microorganism between healthy and endometritis sows on the phylum level.



(图 4)。变形菌门和拟杆菌门在子宫内膜炎组样本中的相对丰度显著高于健康组( $P<0.05$ ); 而厚壁菌门、放线菌门和蓝细菌门的相对丰度显著低于健康组( $P<0.05$ )。

#### 2.4 菌群结构属水平组成分析

在属水平上, 两组优势菌不同, 如图 5 所示。子宫内膜炎组中的优势菌分别为埃希氏菌属(*Escherichia*)、*Rodentibacter* 和卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*), 分别占 21.29%、19.18%和 9.16%; 而健康组的优势菌分别为金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*), 占比分别为 14.70%、5.17%、4.15%和 4.08% (图 5)。相较于健康母猪, 子宫内膜炎母猪产道金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)丰度显著降低, 而卟啉单胞菌属丰度显著升高。

对子宫内膜炎组内各样品进一步分析发现, 每一个样本的优势属均不相同, 如图 6 所示。5 个 EV 样本中, 丰度最高的优势菌属分别为 *Rodentibacter*、埃希氏菌属(*Escherichia*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)。

#### 2.5 卟啉单胞菌分离鉴定

样品接种在 CDC 厌氧固体培养基上, 厌氧培养 10 d 后, 长出呈黑色、圆形突起、边缘整齐的菌落, 菌落周边出现溶血环, 革兰氏染色镜检可见阴性球状、杆状菌(图 7A); 挑取黑色菌落继续在 CDC 培养基上纯化培养后形成黑色溶血菌落(图 7B)。如图 8 所示, 16S rRNA 基因扩增条带大小约 1 500 bp。扩增序列进行 BLAST 比对, 发现其与 *Porphyromonas somerae* DSM 23386 strain JCM 13867 (NR\_113090.1)相似性达 99.04%, 鉴定为 *Porphyromonas somerae*。

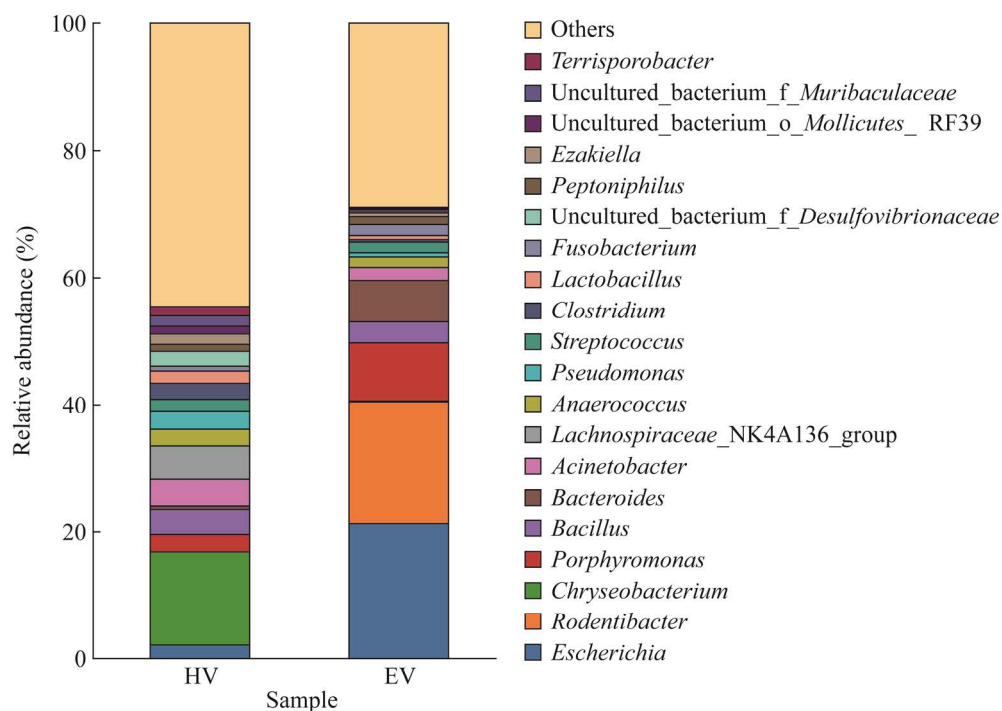


图 5 健康和患子宫内膜炎母猪产道菌群属水平构成差异

Figure 5 Differences in composition of birth canal microorganism between healthy and endometritis sows on the genus level.

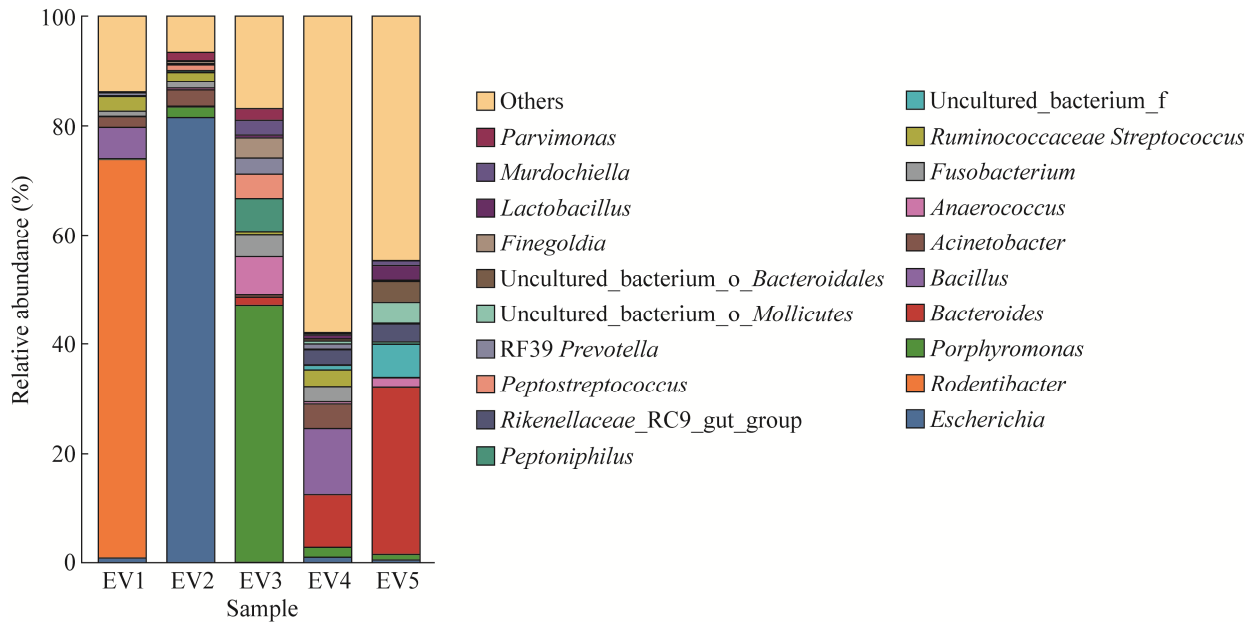


图 6 5 个子宫内膜炎样本产道菌群属水平构成差异

Figure 6 Difference diagram of the genus level composition of the bacterial community in the five endometritis samples.

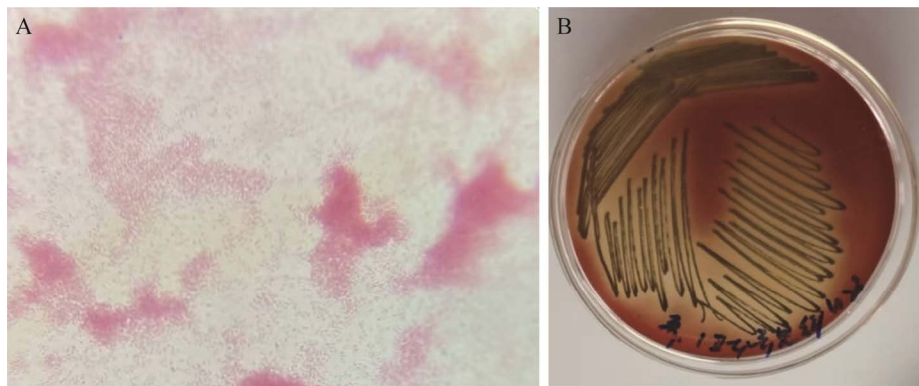


图 7 卟啉单胞菌镜检结果(A)和卟啉单胞菌菌落形态(B) (1 000×)

Figure 7 Microscopic examination results of *Porphyromonas* (A) and colonial morphology of *Porphyromonas* (B) (1 000×).

## 2.6 特异性检测及荧光定量 PCR 结果

引物特异性检测结果如图 9 所示, 仅 1、2 泳道的子宫内膜炎样本显示阳性, 其余细菌均显示阴性, 表明引物特异性良好。

对构建好的重组质粒进行 10 倍系列梯度稀释, 得到  $10^4$ – $10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准品, 显示扩增结

果较好, 以质粒拷贝数的对数为横坐标、 $C_t$  值(循环数)为纵坐标作标准曲线<sup>[12]</sup>。  $R^2$  值为 0.996, 这表明  $C_t$  值与标准质粒拷贝数的对数之间存在较好的线性关系(图 10A)。荧光定量 PCR 分析结果显示, 子宫内膜炎母猪产道样品 DNA 中检测到的卟啉单胞菌数量显著高于健康母猪( $P < 0.05$ , 图 10B)。



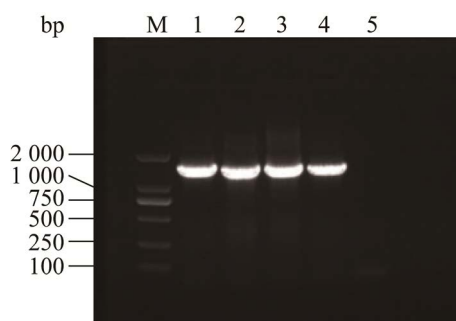


图 8 分离菌株 PCR 扩增电泳图 M: DL2000 DNA Marker; 1-4: 卟啉单胞菌 DNA; 5: 阴性对照  
Figure 8 Electrophoretic map of PCR amplification with specific primers. M: DL2000 DNA Marker; 1-4: *Porphyromonas* DNA; 5: Negative control.



图 9 特异性引物 PCR 扩增电泳图 M: DL2000 DNA Marker; 1-2: 提取的样本总 DNA; 3-10: 链球菌、大肠杆菌、产气荚膜梭菌、奇异变形杆菌、沙门氏菌、粪肠球菌、德氏乳杆菌和罗伊氏乳杆菌; 11: 阴性对照  
Figure 9 Electrophoretic map of PCR amplification with specific primers. M: DL2000 DNA Marker, 1-2: Total DNA from sow samples with endometritis; 3-10: *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus germanicus* and *Lactobacillus reuteri*; 11: Negative control.

### 3 讨论与结论

对动物产道分泌物进行微生态评价分析的相关报道较少, 小鼠阴道分泌物涂片技术主要用于判定小鼠动情周期, 根据动情前期、动情期和动情后期阴道涂片上皮细胞变化特点判断

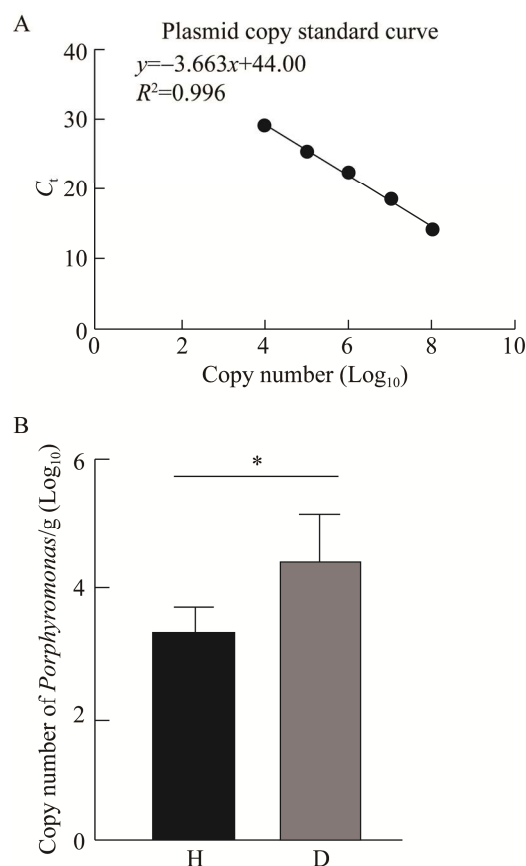


图 10 荧光定量 PCR 标准曲线(A)和母猪产道样品中卟啉单胞菌数量(B)  
Figure 10 Fluorescence quantitative PCR standard curve (A) and the number of *Porphyromonas* in sow birth canal sample (B). \*:  $P < 0.05$ .

小鼠性周期<sup>[13-14]</sup>。目前暂未发现母猪产道微生态评价方面的报道, 本研究通过对母猪产道分泌物瑞氏染色发现, 子宫内膜炎母猪产道细菌密集度(IV级)和多样性(III级)明显高于健康母猪产道(I级), 子宫内膜母猪产道分泌物还可以看到较多脱落的上皮细胞, 该判定方法进一步完善后可作为评价母猪产道微生态平衡的依据, 对临床诊断和预防子宫内膜炎发挥一定的作用。

本研究菌群结果显示变形菌门在子宫内膜炎组中占有绝对优势地位, 这与许多研究结果相似。在 Wang 等<sup>[15]</sup>的研究中, 变形菌

门在患病样品中上升为优势菌门；黄安妮等<sup>[16]</sup>对母猪子宫内膜炎产道菌群研究也发现，变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、疣微菌门和拟杆菌门为患子宫内膜炎母猪产道的优势菌群。变形菌门包括了许多致病菌，如大肠杆菌、沙门氏菌等。大多研究报告健康母猪产道菌群在门水平上为 5 种：厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、梭杆菌门和放线菌门<sup>[17]</sup>。本研究结果显示，健康母猪产道变形菌门占比高于拟杆菌门(*Bacteroidota*)。其中拟杆菌门在健康与子宫内膜炎样品中丰度都较高，健康母猪(19.40%)占比高于子宫内膜炎母猪(14.69%)，但该门中的金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)是健康组中丰度最高的属，而且远高于子宫内膜炎组。金黄杆菌属(*Chryseobacterium* spp.)为一种非发酵革兰氏阴性杆菌，属于条件致病菌，可引起脑膜炎、菌血症、心内膜炎和皮肤软组织感染等多种疾病<sup>[18]</sup>，其在母猪产道的作用有待进一步的研究。

子宫内膜炎组中，菌群丰度最高的菌属是埃希氏菌属(*Escherichia*)，其次为 *Rodentibacter* 和卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)。目前的报道中，埃希氏菌属(*Escherichia*)在患病母猪中多见。叶健毅等<sup>[19]</sup>从 52 份子宫内膜炎样品大肠杆菌的检出率为 64.6%；王改玲等<sup>[4]</sup>发现引起子宫内膜炎的致病菌也以大肠杆菌、链球菌和葡萄球菌多见。*Rodentibacter* 是巴氏杆菌科的一种革兰氏阴性杆状细菌，经常在实验室小鼠和大鼠的呼吸道和泌尿生殖道定居<sup>[20]</sup>，也可从小鼠的上呼吸道和子宫中分离<sup>[21]</sup>。这种感染在免疫活性小鼠中大多为无症状<sup>[22]</sup>，但对免疫缺陷小鼠和其他转基因小鼠显示出轻度甚至致命的疾病，在各种器官中有化脓性病变<sup>[23]</sup>。目前在啮齿动物中有报道 *Rodentibacter*，如

Brennan 等<sup>[24]</sup>发现该菌可能与肺炎、皮下脓肿、结膜炎、乳腺炎、子宫炎、膀胱炎和流产有关，但在母猪产道菌群中尚未报道过。

卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)属拟杆菌门(*Bacteroidetes*)，不产生芽孢、不运动。由于氯化血红素，通常在血琼脂上呈黑色菌落。Walsh 等<sup>[8]</sup>已经证实 *Porphyromonas somerae* 是最具预测子宫内膜癌的微生物标志物。梁珊珊<sup>[25]</sup>发现牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)可以促进孕鼠炎症系统反应，导致血清 IL-1 $\beta$  和 IFN- $\gamma$  的表达水平升高。Arzese 等<sup>[26]</sup>也从细菌性阴道病中分离到利氏卟啉单胞菌(*Porphyromonas levii*)。Elad 等<sup>[27]</sup>发现 *Porphyromonas levii* 可以引起牛坏死性外阴阴道炎。本研究中，菌群分析结果显示，子宫内膜炎母猪产道卟啉单胞菌属丰度显著高于健康母猪产道，荧光定量 PCR 结果进一步证实卟啉单胞菌在子宫内膜炎母猪产道含量显著高于健康母猪( $P < 0.05$ )。但本研究对子宫内膜炎组个体菌群组成分析发现，每一个样本的核心菌属都不一致，丰度最高的菌属分别为 *Rodentibacter*、*Escherichia*、*Porphyromonas*、*Bacillus* 和 *Bacteroides*，这符合“安娜·卡列尼娜原则”<sup>[28-29]</sup>。

从微生物生态学的角度分析，造成母猪子宫内膜炎的并非单一病原菌，而是内源性共生细菌在产道微生态失调时大量增殖，直接参与了炎症的发展，这些细菌称为致病共栖菌谱(pathobionts)<sup>[30]</sup>。Pathobionts 在动物肠炎的报道中较多，在母猪产道及子宫内膜炎中的报道较少。本研究结合本团队前期研究结果<sup>[31]</sup>，卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)在母猪子宫内膜炎病例中出现的频率较高，对该菌进行更深入的研究，并首次从子宫内膜炎母猪产道分泌物样品中分离出 *Porphyromonas somerae*。卟啉单

胞菌(*Porphyromonas* sp.)与母猪子宫内膜炎的关系有待进一步研究,推测该菌可能是子宫内膜炎致病共栖菌谱中的一员。

综上所述,本研究采用产道分泌物微生态评价和16S rRNA基因全长序列测定高通量测序技术研究子宫内膜炎与健康母猪在菌群结构上存在差异,发现子宫内膜炎组中的*Porphyromonas*可能与母猪子宫内膜炎存在关联,并在子宫内膜炎母猪产道分泌物中成功分离到*Porphyromonas somerae*,建立荧光定量PCR计数方法发现子宫内膜炎母猪产道卟啉单胞菌数量显著高于健康母猪。由于卟啉单胞菌极不活泼,生长缓慢,目前该菌株的生长条件还在进一步摸索中,卟啉单胞菌与母猪子宫内膜炎的关联性探究及具体影响还需更多的试验数据支撑,是否与人类阴道炎中的加德纳菌<sup>[32]</sup>一样能成为母猪子宫内膜炎的指示菌,还有待进一步的研究。

## REFERENCES

- [1] 叶健毅. 规模化猪场母猪子宫内膜炎病因调查与防治技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2008  
Ye JY. Survey on the reasons of sow endometritis and the research on its control technique in large scale pig farm[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008 (in Chinese)
- [2] 谷涛, 闫伟硕. 母猪常见疾病与防控措施[J]. 畜牧兽医学(电子版), 2021(3): 88-89  
Gu T, Yan WS. Common sow diseases and prevention and control measures[J]. Graziery Veterinary Sciences: Electronic Version, 2021(3): 88-89 (in Chinese)
- [3] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 崔益洙. 从疑似 PRRS 流产胎几分离 PRRSV 的研究[J]. 中国畜禽传染病, 1996, 18(2): 1-5  
Guo BQ, Chen ZS, Liu WX, Cui YZ. Isolation and identification of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from aborted fetuses suspected of PRRS[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 1996, 18(2): 1-5 (in Chinese)
- [4] 王改玲, 王明成, 薛永康, 杜蒙娟, 李恩中. 母猪子宫内膜炎病原菌的鉴定及治疗[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 239-240  
Wang GL, Wang MC, Xue YK, Du MJ, Li EZ. Identification and treatment of pathogenic bacteria of sow endometritis[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(11): 239-240 (in Chinese)
- [5] Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome: rethinking health and disease[J]. Annual Review of Microbiology, 2012, 66: 371-389
- [6] Waller CM, Bilkei G, Cameron RDA. Effect of periparturient diseases accompanied by excessive vulval discharge and weaning to mating interval on sow reproductive performance[J]. Australian Veterinary Journal, 2002, 80(9): 545-549
- [7] 肖小芹, 汤婉婷, 成绍武, 邓桂明. 小鼠阴道涂片技术及其染色方法的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(4): 376-378  
Xiao XQ, Tang WT, Cheng SW, Deng GM. Study of vaginal smear and staining methods of mice[J]. Journal of Hunan University of Chinese Medicine, 2018, 38(4): 376-378 (in Chinese)
- [8] Walsh DM, Hokenstad AN, Chen J, Sung J, Jenkins GD, Chia N, Nelson H, Mariani A, Walther-Antonio MRS. Postmenopause as a key factor in the composition of the Endometrial Cancer Microbiome (ECbiome)[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 19213
- [9] 顿国栋, 童亚楠, 卢晓雪, 冯宇阳, 叶新力, 李静, 唐彬, 邓铃, 何晓奕, 李倩, 毛晓虎. 粪便具核梭杆菌的免疫磁珠捕获联合实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及评价[J]. 免疫学杂志, 2019, 35(9): 811-816, 822  
Dun GD, Tong YN, Lu XX, Feng YY, Ye XL, Li J, Tang B, Deng L, He XY, Li Q, Mao XH. Establishment and evaluation of immunomagnetic bead and quantitative real-time PCR for detection of *Fusobacterium nucleatum* in feces[J]. Immunological Journal, 2019, 35(9): 811-816, 822 (in Chinese)
- [10] 廖秦平. 阴道微生态评价的临床应用专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2016(10): 721-723  
Liao QP. Expert consensus on clinical application of vaginal microecology evaluation[J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2016(10): 721-723 (in Chinese)
- [11] 李俊锋. 基于16S rRNA和宏基因组高通量测序的微生物多样性研究[D]. 北京: 清华大学硕士学位论文, 2015

- Li JF. Microbial diversity research based on high-throughput sequencing data of 16S rRNA and metagenome[D]. Beijing: Master's Thesis of Tsinghua University, 2015 (in Chinese)
- [12] 张锦华. 猪源乳酸杆菌的筛选及其对仔猪肠道黏膜免疫影响的研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2011
- Zhang JH. Screening of porcine *Lactobacillus* and its effect on mucosal immunity of piglets[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- [13] 宋孟秋, 马永生, 曹玉凤, 刘阳, 杨焕, 范艳乐, 陈炯, 殷玉鹏, 赵善廷, 陈树林. 小鼠发情周期中黄体大小及细胞的数量变化规律[J]. 动物医学进展, 2015, 36(11): 31-35
- Song MQ, Ma YS, Cao YF, Liu Y, Yang H, Fan YL, Chen J, Yin YP, Zhao ST, Chen SL. Variation of corpus luteum sizes and cell numbers in estrus cycle of mice[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(11): 31-35 (in Chinese)
- [14] 覃海章, 肖胜军, 华英杰, 卢德杰, 米超, 赵玮, 章一帆, 任亚萍. 不同方法确定动情周期及动情期生殖器官结构[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(11): 1650-1653
- Qin HZ, Xiao SJ, Hua YJ, Lu DJ, Mi C, Zhao W, Zhang YF, Ren YP. Different methods to determine estrus cycle and the structure of reproductive organs[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2017, 52(11): 1650-1653 (in Chinese)
- [15] Wang J, Li CJ, Nesengani LT, Gong YS, Zhang SM, Lu WF. Characterization of vaginal microbiota of endometritis and healthy sows using high-throughput pyrosequencing of 16S rRNA gene[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 111: 325-330
- [16] 黄安妮, 闫鹤. 患子宫内膜炎母猪阴道菌群变化与发病关系研究[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(2): 19-22
- Huang AN, Yan H. Study on relationship of vaginal microbiome changes and pathogenesis in sow with endometritis[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(2): 19-22 (in Chinese)
- [17] Lorenzen E, Kudirkiene E, Gutman N, Grossi AB, Agerholm JS, Erneholt K, Skytte C, Dalgaard MD, Bojesen AM. The vaginal microbiome is stable in prepubertal and sexually mature Ellegaard Göttingen Minipigs throughout an estrous cycle[J]. Veterinary Research, 2015, 46: 125
- [18] Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995, 39(6): 1211-1233
- [19] 叶健毅, 赵学峰, 兰邹然, 陶家树. 规模化猪场母猪子宫内膜炎致病菌的分离鉴定[J]. 畜牧兽医杂志, 2011, 30(1): 5-7
- Ye JY, Zhao XF, Lan ZR, Tao JS. Pathogenic bacteria isolation and identification of sow endometritis in scale breeding pig[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2011, 30(1): 5-7 (in Chinese)
- [20] Adhikary S, Nicklas W, Bisgaard M, Boot R, Kuhnert P, Waberschek T, Aalbæk B, Korczak B, Christensen H. *Rodentibacter* gen. nov. including *Rodentibacter pneumotropicus* comb. nov., *Rodentibacter heylii* sp. nov., *Rodentibacter myodis* sp. nov., *Rodentibacter rattii* sp. nov., *Rodentibacter heidelbergensis* sp. nov., *Rodentibacter trehalosifermentans* sp. nov., *Rodentibacter rarus* sp. nov., *Rodentibacter mrazii* and two genomospecies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(6): 1793-1806
- [21] Mikazuki K, Hirasawa T, Chiba H, Takahashi K, Sakai Y, Ohhara S, Nenui H. Colonization pattern of *Pasteurella pneumotropica* in mice with latent pasteurellosis[J]. Jikken Dobutsu Experimental Animals, 1994, 43(3): 375-379
- [22] Barthold SW, Stephen MG, Percy DH. Mouse[A]//Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits[M]. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 2016
- [23] Kawamoto E, Sasaki H, Okiyama E, Kanai TK, Ueshiba H, Ohnishi N, Sawada T, Hayashimoto N, Takakura A, Itoh T. Pathogenicity of *Pasteurella pneumotropica* in immunodeficient NOD/ShiJic-scid/jcl and immunocompetent crlj: CD1 (ICR) mice[J]. Jikken Dobutsu Experimental Animals, 2011, 60(5): 463-470
- [24] Brennan PC, Fritz TE, Flynn RJ. *Pasteurella pneumotropica*: cultural and biochemical characteristics, and its association with disease in laboratory animals[J]. Laboratory Animal Care, 1965, 15(5): 307-312
- [25] 梁珊珊. 牙龈卟啉单胞菌感染引起孕鼠早产的实验研究[D]. 武汉: 武汉大学硕士学位论文, 2018
- Liang SS. The study on *Porphyromonas gingivalis*-induced preterm birth in pregnant rats[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan University, 2018 (in Chinese)
- [26] Arzese AR, Tomasetig L, Botta GA. Detection of *tetQ* and *ermF* antibiotic resistance genes in *Prevotella* and

- Porphyromonas* isolates from clinical specimens and resident microbiota of humans[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, 45(5): 577-582
- [27] Elad D, Friedgut O, Alpert N, Stram Y, Lahav D, Tiomkin D, Avramson M, Grinberg K, Bernstein M. Bovine necrotic vulvovaginitis associated with *Porphyromonas levii*[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, 10(3): 505-507
- [28] Zaneveld JR, McMinds R, Vega Thurber R. Stress and stability: applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17121
- [29] Altabtaei K, Maney P, Ganesan SM, Dabdoub SM, Nagaraja HN, Kumar PS. Anna Karenina and the subgingival microbiome associated with periodontitis[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 97
- [30] Fujimoto K, Kimura Y, Shimohigoshi M, Satoh T, Sato S, Tremmel G, Uematsu M, Kawaguchi Y, Usui Y, Nakano Y, et al. Metagenome data on intestinal phage-bacteria associations aids the development of phage therapy against pathobionts[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(3): 380-389
- [31] Zhang L, Wang LK, Dai YM, Tao TY, Wang JQ, Wu YZ, Zeng X, Zhang JH. Effect of sow intestinal flora on the formation of endometritis[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 663956
- [32] Deng TY, Shang AQ, Zheng Y, Zhang LZ, Sun H, Wang W. Log (*Lactobacillus crispatus*/*Gardnerella vaginalis*): a new indicator of diagnosing bacterial vaginosis[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 2981-2991