

密 级：公开

学校代码：10693

བོད་རྒྱལ་གྱི་ཉམས་ལེན་སྒྲིག་ཁོར་ཁྲིའི་

西藏农牧学院

硕士学位论文



牦牛源产气荚膜梭菌流行病学及

Qinghai-1 菌株生物学特性研究

姓 名： 吴 丹

指 导 教 师： 索朗斯珠 教授

院 （所）： 动物科学学院

专 业： 预防兽医学

研 究 方 向： 高原动物传染病

学 号： 202020301064

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

*Epidemiological investigation of Clostridium perfringens from
yak and study on biological characteristics of Qinghai-1
strain*

Name of Postgraduate: Wu Dan
Adviser : Suolang sizhu
Department(Part) : Animal Science
Major: Preventive Veterinary Medicine
Research field: highland of animal disease
Postgraduate number : 202020301064
Date of submission: May,2023

Nyingchi Tibet China

摘要

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*, *C.perfringens*, *Cp*) 旧称魏氏梭菌 (*Clostridium welchii*), 是一种可同时感染人和动物的人畜共患性条件致病菌。通常可引起人和动物气性坏疽、食物中毒、羔羊痢疾、绵羊猝狙、牛肠毒血症和坏死性肠炎等疾病。牦牛以放牧为主, 消毒防疫措施难以实施, 牦牛产气荚膜梭菌病春、秋两季多发, 是常见的牦牛疾病之一。本研究从西藏、青海两省收集了 744 头份牦牛粪便样品, 进行了产气荚膜梭菌的分离, 分离得到的菌株进行药敏试验分析, 随后利用 PCR 方法检测了分离株的毒素基因、耐药基因, 最后通过 MLST 分析其多样性与亲缘性。在此之后, 以牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株为研究对象, 研究其生物学特性, 并以小鼠为模型进行小鼠致病性研究。利用生物信息学技术更深入的了解牦牛源产气荚膜梭菌。旨在对牦牛产气荚膜梭菌的流行情况进行调查, 为当地牦牛产气荚膜梭菌病的预防和治疗提供依据, 为今后了解牦牛源产气荚膜梭菌致病机制和相关疫病防控提供参考资料。通过本研究得到以下结果:

1. 本研究从青藏高原地区采集牦牛粪样 744 头份, 通过分离、培养和鉴定, 确认其中 144 份为阳性样品, 总体阳性率为 19.35%。通过 MLST 技术分析得到, 144 株牦牛源产气荚膜梭菌的管家基因具有 15~50 个 (平均有 12.95 个) 等位基因, 89 个 STs, 11 个 CCs。

2. 144 株牦牛源产气荚膜梭菌中 108 株 (75%, 108/144) 为 A 型产气荚膜梭菌, 25 株 (17.36%, 25/144) 为 C 型产气荚膜梭菌, 4 株 (2.78%, 4/144) 为 D 型产气荚膜梭菌, 7 株 (4.86%, 7/144) 为 F 型产气荚膜梭菌。在本次分离菌种未检测到 *iap* 和 *netB* 基因。

3. 药敏试验表明, 从牦牛粪便中分离的 144 株产气荚膜梭菌对 26 种抗生素具有广泛的耐药性。分离菌具有严重耐药性的抗生素药物有链霉素 (93.75%)、磺胺甲恶唑 (86.81%)、卡那霉素 (81.25%)、红霉素 (81.25%)、多粘菌素 B (75%)、庆大霉素 (69.44%) 等; 敏感的抗生素药物有万古霉素、米诺环素、头孢噻肟、氟苯尼考、强力霉素。

4. 本次所有分离株均对 3 至 16 种抗生素耐药, 最少对 3 种药物耐药, 最多可对 16 种药物耐药, 没有分离株对本研究所用的 26 种抗生素都耐药。对 5~7 种药物耐药的菌株超过一半, 共 77 株, 占 53.47%。

98.61% 的分离菌为多重耐药菌株，最多的耐药模式为 MAC-AGA-POL-SAs，有 24 株（16.67%）。

5. 分离菌株携带 14 种耐药基因，检测出率为 42.43%（14/33），耐药基因 *erm* (B) 检测出率最高，检出率 74.31%。耐药基因 *erm* (B)、*mcr-2*、*sul2* 的检出率在 50% 以上；耐药基因 *erm* (X)、*sul1* 的检出率 30%~50%；耐药基因 *blaSHV*、*blaTEM*、*aph* (3')-III-F、*tetA*、*tetB*、*tetM*、*Flor*、*qnrS*、*aac* (6')-Ib-cr 的检出率 15% 以下；其余 19 种耐药基因未检出。

6. 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株为 A 型产气荚膜梭菌；MLST 分型确定该株菌为 ST-414 型，是一株新的 ST 型菌株。生长曲线显示，菌株有 2 h 的迟缓期，6 h 的对数生长期，8 h 的平稳期，随后进入衰亡期。最佳产毒时间为 12 h，其含量达 3.480 mg/mL。LD₅₀ 为 5.955×10^8 CFU/mL。动物实验显示发病小鼠腹部胀大，阴道出血。剖检发现腹腔出现红色积液，小肠等组织出血。死亡小鼠肠道有不同程度的细胞溶解现象，出现糜烂；肝脏细胞见空泡变性；肾小管见变性伴有透明管型；脾脏白髓可见组织细胞增生，红髓见淤血；大脑间质血管见充血。主要致病脏器为肠道、肝脏、脾脏、肾脏、大脑。

7. 生物信息学分析显示：牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株染色体基因组全长 3 042 374 bp，GC 含量 28.58%；质粒全长 38 989 bp，GC 含量 26.22%。共有 2 906 个基因（其中编码基因有 2 721 个）、94 个 tRNA、30 个 rRNA（5S rRNA、16S rRNA、23S rRNA 各 10 个）、60 个 miscRNA、1 个 tmRNA、65 个假基因。功能元件分析得出，该菌株含有 1 个基因岛；重复序列 968 条；不含有 CRISPR（成簇的规律间隔的短回文重复序列）；不含有前噬菌体。专有数据库注释，显示：有 1 个抗性基因；6 个碳水化合物酶；1 个耐药性相关基因；188 个细胞色素 P450 蛋白；237 个毒力相关因子；以及 828 个跨膜蛋白（其中 162 个为信号肽蛋白）。

综上所述，通过对牦牛源产气荚膜梭菌流行病学的调查，了解了青藏高原部分地区产气荚膜梭菌在牦牛群中的感染率以及毒素型；通过药敏试验揭示了牦牛源产气荚膜梭菌的耐药性及所含耐药基因种类；通过生物学特性和生物信息学分析，明确了牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株的生化特性、生长特性、致病性及菌株的结构和功能。

关键词：牦牛，产气荚膜梭菌，流行病学调查，药敏试验，生物

学特性，生物信息学分析

Abstract

Clostridium perfringens (*C. perfringens*, Cp), formerly known as *Clostridium welchii*, is a zoonotic opportunistic pathogen that can infect both humans and animals. It can usually cause human and animal gas gangrene, food poisoning, lamb dysentery, sheep gangrene, bovine enterotoxemia, necrotizing enteritis and other diseases. Yaks are mainly grazed, and it is difficult to implement disinfection and epidemic prevention measures. *Clostridium perfringens* disease of yaks occurs frequently in spring and autumn, which is one of the common diseases of yaks. In this study, 744 yak fecal samples were collected from Tibet and Qinghai provinces, and *Clostridium perfringens* was isolated. The isolated strains were analyzed by drug sensitivity test. Then the toxin gene and drug resistance gene of the isolated strains were detected by PCR method. Finally, their diversity and affinity were analyzed by MLST. After that, the biological characteristics of *Clostridium perfringens* Qinhai-1 strain from yak were studied, and the pathogenicity of mice was studied using mice as model. Subsequently, bioinformatics technology was used to further understand the *Clostridium perfringens* from yak at the molecular level. The purpose is to investigate the prevalence of *Clostridium perfringens* in yaks, provide basis for the prevention and treatment of *Clostridium perfringens* disease in local yaks, and provide reference data for understanding the pathogenic mechanism of *Clostridium perfringens* from yaks and the prevention and control of related diseases in the future. The following results are obtained from this study:

1. In this study, 744 yak dung samples were collected from the Qinghai-Tibet Plateau. Through isolation, culture and identification, 144 of them were confirmed to be positive, with an overall positive rate of 19.35%. According to MLST analysis, the housekeeper genes of 144 strains of *Clostridium perfringens* from yak have 15~50 (12.95 on average) alleles, 89 STs and 11 CCs.

2. Among 144 strains of *Clostridium perfringens* from yak, 108

strains (75%, 108/144) are *Clostridium perfringens* type A, 25 strains (17.36%, 25/144) are *Clostridium perfringens* type C, 4 strains (2.78%, 4/144) are *Clostridium perfringens* type D, and 7 strains (4.86%, 7/144) are *Clostridium perfringens* type F. No *iap* and *netB* genes were detected in this isolated strain.

3. The drug sensitivity test showed that 144 strains of *Clostridium perfringens* isolated from yak feces had extensive resistance to 26 antibiotics. The antibiotic drugs with severe drug resistance of isolated bacteria include streptomycin (93.75%), sulfamethoxazole (86.81%), kanamycin (81.25%), erythromycin (81.25%), polymyxin B (75%), gentamicin (69.44%), etc; The sensitive antibiotics include vancomycin, minocycline, cefotaxime, florfenicol and doxycycline.

4. All isolates were resistant to 3 to 16 antibiotics, at least 3 drugs, and at most 16 drugs. None of the isolates were resistant to 26 antibiotics used in this study. More than half of the strains were resistant to 5~7 drugs, with a total of 77 strains, accounting for 53.47%. 98.61% of the isolates were multidrug resistant, and the most resistant mode was MAC-AGA-POL-SAs, with 24 strains (16.67%).

5. The isolated strains carried 14 drug resistance genes, the detection rate was 42.43% (14/33), and the detection rate of the drug resistance gene *erm* (B) was the highest, with the detection rate of 74.31%. The detection rate of drug resistance genes *erm* (B), *mcr-2* and *sul2* was more than 50%; The detection rate of drug resistance genes *erm* (X) and *sul1* was 30%~50%; The detection rate of drug resistance genes *blaSHV*, *blaTEM*, *aph* (3') - III-F, *tetA*, *tetB*, *tetM*, *Flor*, *qnrS*, *aac* (6') - Ib-cr was less than 15%; The other 19 drug resistance genes were not detected.

6. The strain Qinghai-1 of *Clostridium perfringens* from yak is *Clostridium perfringens* type A; MLST typing confirmed that the strain was ST-414, which was a new ST-type strain. The growth curve showed that the strain had a slow period of 2 hours, a logarithmic growth period of 6 hours, a stable period of 8 hours, and then entered the decay period. The best time of producing toxin is 12 hours, and its content is 3.480 mg/mL. LD₅₀ is 5.955×10^8 CFU/mL. Animal experiments show that it can make mice have different degrees of clinical symptoms in spirit,

appetite, action and neurological symptoms. Abdominal distension and vaginal bleeding were found in the infected mice. The autopsy revealed red fluid accumulation in the abdominal cavity and bleeding in small intestine and other tissues. There were different degrees of cell lysis and erosion in the intestine of the dead mice; The liver cells showed vacuolar degeneration; Renal tubules showed degeneration with hyaline tubules, and no hyperemia, edema and inflammatory cell infiltration were found in the interstitium; Histocyte proliferation can be seen in the white pulp of spleen, and congestion can be seen in the red pulp; Congestion of cerebral interstitial blood vessels; No pathological changes were found in the heart, lungs and stomach. The main pathogenic organs are intestine, liver, spleen, kidney and brain.

7. Bioinformatics analysis showed that the total length of the chromosome genome of the strain of *Clostridium perfringens* Qinhai-1 from yak was 3 042 374 bp, and the GC content was 28.58%; The total length of the plasmid was 38 989 bp, and the GC content was 26.22%. There are 2 906 genes (including 2 721 coding genes), 94 tRNAs, 30 rRNAs (10 for 5S rRNA, 16S rRNA and 23S rRNA respectively), 60 miscRNAs, 1 tmRNA and 65 pseudogenes. The functional element analysis showed that the strain contained 1 gene island; 968 repetitive sequences; It does not contain CRISPR (clustered regular interval short palindrome repeat sequence); No prophage. The proprietary database annotation shows that there is 1 resistance gene; 6 carbohydrate enzymes; 1 drug resistance related gene; 188 cytochrome P450 proteins; 237 virulence related factors; And 828 transmembrane proteins (162 of which are signal peptide proteins).

To sum up, the infection rate and toxin type of *Clostridium perfringens* in yaks were obtained through the epidemiological investigation of *Clostridium perfringens* from yaks; The drug resistance of *Clostridium perfringens* from yak and the types of drug resistance genes were determined by drug sensitivity test; Through biological characteristics, the biochemical characteristics, growth characteristics and pathogenicity of the strain of *Clostridium perfringens* Qinhai-1 from yak were understood; Through bioinformatics analysis, the structure and

function of the strain of *Clostridium perfringens* Qinhai-1 from yak were recognized at the molecular level.

Keywords Yak, *Clostridium perfringens*, epidemiological investigation, drug sensitivity test, biological characteristics, bioinformatics analysis

目 录

第一章 文献综述	1
1.1 产气荚膜梭菌简介.....	1
1.2 产气荚膜梭菌病原学.....	1
1.3 产气荚膜梭菌毒素分型.....	2
1.4 产气荚膜梭菌流行情况及特点	2
1.5 产气荚膜梭菌临床症状.....	4
1.6 产气荚膜梭菌致病性.....	4
1.7 本研究的目的及意义.....	5
第二章 牦牛源产气荚膜梭菌流行病学研究	7
2.1 试验材料.....	7
2.1.1 样品来源.....	7
2.1.2 主要试剂.....	8
2.1.3 主要仪器.....	8
2.2 试验方法.....	8
2.2.1 细菌的分离纯化.....	8
2.2.2 染色镜检.....	9
2.2.3 16S rRNA 基因 PCR 鉴定	9
2.2.4 毒素分型.....	9
2.2.5 多位点序列分型(MLST)	10
2.2.6 最小生成树(MST)构建及分析.....	11
2.2.7 聚类树的构建及菌株多样性分析.....	11
2.3 试验结果.....	11
2.3.1 分离菌 16S rRNA PCR 鉴定结果	11
2.3.2 牦牛源产气荚膜梭菌阳性率.....	12
2.3.3 牦牛源产气荚膜梭菌毒素型流行情况	13
2.3.4 牦牛源产气荚膜梭菌 MLST 分型结果.....	13
2.3.5 牦牛源产气荚膜梭菌最小生成树(MST).....	13
2.3.6 牦牛源产气荚膜梭菌遗传多样性丰富程度	15
2.3.7 牦牛源产气荚膜梭菌聚类树.....	15
2.4 讨论.....	17
第三章 牦牛源产气荚膜梭菌耐药性研究	19
3.1 试验材料.....	19
3.1.1 试验菌株.....	19
3.1.2 主要试剂.....	20

3.1.3 主要仪器.....	20
3.2 试验方法.....	20
3.2.1 菌株复苏.....	20
3.2.2 DNA 提取.....	20
3.2.3 药敏试验.....	20
3.2.4 牦牛源产气荚膜梭菌多重耐药性分析	22
3.2.5 耐药基因检测.....	22
3.3 试验结果.....	30
3.3.1 药敏试验结果.....	30
3.3.2 耐药热图.....	31
3.3.3 多重耐药性结果.....	32
3.3.4 牦牛源产气荚膜梭菌耐药基因检测结果	33
3.4 讨论.....	40
第四章 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株生物学特性研究	42
4.1 试验材料.....	42
4.1.1 试验菌株和动物.....	42
4.1.2 主要试剂.....	42
4.1.3 主要仪器.....	43
4.2 试验方法.....	43
4.2.1 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株培养特性研究	43
4.2.2 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株生化特性研究	43
4.2.3 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株 DNA 提取.....	44
4.2.4 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株基因分型	44
4.2.5 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株生长特性研究	45
4.2.6 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株外毒素含量测定	46
4.2.7 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株 LD ₅₀ 的测定.....	46
4.2.8 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株动物致病性研究	46
4.3 试验结果.....	47
4.3.1 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株菌落形态及生长特性	47
4.3.2 生化反应结果.....	48
4.3.3 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株基因分型结果	48
4.3.4 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株生长特性	49
4.3.5 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株外毒素含量	51
4.3.6 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株 LD ₅₀	52
4.3.7 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株对小鼠内脏组织的致病性	53
4.4 讨论.....	57

第五章 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株全基因组生物信息学分析	60
5.1 试验材料.....	60
5.1.1 试验菌株.....	60
5.1.2 主要试剂.....	60
5.1.3 主要仪器.....	61
5.2 试验方法.....	61
5.2.1 菌株复苏及 DNA 提取	61
5.2.2 文库构建.....	61
5.2.3 上机测序.....	61
5.2.4 信息分析.....	61
5.2.5 上传 Qinghai-1 菌株基因组序列数据并构建遗传进化树 ..	64
5.3 试验结果.....	64
5.3.1 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株测序数据质控统计 ..	64
5.3.2 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株基因组组装结果统计	65
5.3.3 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株结构及核酸水平预测	65
5.3.4 功能元件分析.....	65
5.3.5 基因功能注释.....	66
5.3.6 专有数据库注释.....	70
5.3.7 细菌基因组圈图.....	71
5.3.8 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株基因组序列登录号 ..	72
5.4 讨论.....	73
全文总结.....	75
参考文献.....	76
附录.....	85

第一章 文献综述

1.1 产气荚膜梭菌简介

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*, *C. perfringens*, *Cp*) 旧称魏氏梭菌 (*Clostridium welchii*)，由 Welch 等^[1]人在 1892 年首次分离到，是一种可同时感染人和动物的人畜共患性条件致病菌^[2]，广泛存在于泥土、污水、腐殖质、饲草、排泄物等自然环境中以及人畜肠道中^[3]，是人和动物的肠道正常菌群成员之一。产气荚膜梭菌可产生多种外毒素 (α 、 β 、 ϵ 、 ι 等 20 余种) 和酶类 (如纤维蛋白酶、卵磷脂酶、胶原酶和透明质酸酶)。拥有 CpA、CpB、CpC、CpD、CpE、CpF、CpG 七个型^[4]。产气荚膜梭菌所产生的毒素是其致病的主要原因，通常可引起人和动物气性坏疽、食物中毒、羔羊痢疾、绵羊猝狙、牛肠毒血症和坏死性肠炎等疾病^[5]，每年因产气荚膜梭菌引起的动物胃肠道疾病给畜牧业造成了巨大的经济损失^[6]。

1.2 产气荚膜梭菌病原学

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 属于原核生物界、细菌域、厚壁菌门、梭菌纲、梭菌目、梭菌科、梭菌属、G⁺产芽胞粗大直杆菌，非严格厌氧，广泛存在于泥土、污水、腐殖质、饲草、排泄物等自然环境中以及人畜肠道中^[3]。该菌大小约为 (0.6~2.4) μm $\times$ (1.3~19.0) μm ，两端钝圆，无鞭毛、有荚膜，呈单个或双个排列，通常在动物的机体、含有血清的培养基等环境内培养时易形成荚膜，大多情况下以芽孢形式存在。产气荚膜梭菌可耐高温培养，且生长、繁殖迅速 (在含有庖肉、血清的培养基中仅需 8 min 就可完成增代)，在临床上通常可利用其耐高温 (常选择 43~47°C) 和传代时间短的特性来与大肠杆菌实现选择性分离培养的目的。该菌主要生长特性有：在胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂 (TSC) 培养基上形成直径 2~5 mm 的外围含有一圈白色晕圈的圆形黑色菌落；在血琼脂培养基上可形成表面光滑、颜色灰白、透明状的圆形菌落，且大多数菌株有明显的双层溶血环^[7] (外环为 α 毒素引起的不完全溶血环，内环是 θ 毒素引起的完全溶血环)；在含铁牛乳培或石蕊牛奶培养基中会迅速分解乳糖并产酸产气，使酪蛋白凝固并被其所产生的气体冲成蜂窝状，甚至喷至试管口或试管外，即有“爆裂发酵”^[8]现象存在；在卵黄琼脂培养基中可分解卵黄中的卵磷脂并形成乳白色的浑浊菌落；在液体硫乙醇酸盐 (FTG) 培养基中培养液由粉红色变为黄绿色、浑浊、产生大量气体，并伴有恶臭气味；在肉肝胃酶消化培养基、蛋白胨酵母提取物葡萄糖肉汤 (PYG) 培养基、厌氧肉肝汤培养基、梭菌增菌 (RCM) 培养基中均可出现浑浊，且产生大量的气泡。

1.3 产气荚膜梭菌毒素分型

研究表明，产气荚膜梭菌既能产生强烈的外毒素，又包含有多种侵袭性酶^[9]，目前已发现可产生多达 20 余种外毒素和酶类，可构成其强大的侵袭力，并导致感染致病。产气荚膜梭菌可产生多种外毒素和酶类（如纤维蛋白酶、卵磷脂酶、胶原酶和透明质酸酶），目前已发现产气荚膜梭菌产生的外毒素有 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 η 、 θ 、 ι 、 κ 、 λ 、 μ 、 ν 、CPE、netB、PFO 和 $\beta 2$ 等 20 余种^[2]，其中 α （CPA）、 β （CPB）、 ϵ （ETX）、 ι （ITX）是 4 种主要的致死性毒素^[10]。产气荚膜梭菌的毒力强弱很大程度上取决于其产生毒素和胞外酶的能力，产气荚膜梭菌通常可由单独一种或多种毒素联合引起人或动物不同疾病，根据产气荚膜梭菌产生 CPE、netB 和 4 种主要的致死性毒素能力与其抗毒素的中和试验，可将其分为 A~G 7 个毒素型^[4]（表 1-1）。

表 1-1 产气荚膜梭菌毒素分型判定标准

毒素型	毒素					
	α (<i>cpa</i>)	β (<i>cpb</i>)	ϵ (<i>etx</i>)	ι (<i>ia</i>)	CPE	NetB
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	-	-
D	+	-	+	-	-	-
E	+	-	-	+	-	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

注：“+”，能分泌的毒素；“-”，不能分泌的毒素

1.4 产气荚膜梭菌流行情况及特点

自从我国在 1964 年首次报道分离到猪源产气荚膜梭菌以来，此病在我国 24 省市自治区逐渐流行^[11]。随着养殖规模的扩大，并由当初的猪群扩展到猪、牛、羊、鸡、兔等 11 种畜禽群^[12]，甚至包括一些野生动物种群（如狼^[13]、朱鹮^[14]、麋鹿^[15]、迁徙鸟类^[16]等），危害日渐严重。同时产气荚膜梭菌也是人食物中毒的重要病原菌之一，如郑艳敏等^[17]在对 1 起校园集体腹泻、腹痛事件流行病学调查时确认为 A 型产气荚膜梭菌暴发的食物中毒；张慧等^[18]收集南京某高中发生腹痛、腹泻 ≥ 3 次者病例 98 例，经实验室诊断同样确认为是 1 起食用被产气荚膜梭菌污染肉类食品引起的食源性聚集性中毒事件。除此之外，产气荚膜梭菌在猪群的发病率为 5.8~9.7%，死亡率为 67.2%；在牛群的发病率为 7.2~7.7%，死亡率为 98.3%；在羊群的发病率为 3.1%以上；在兔群的死亡率达 46.1%。^[19]本病多发

于春季，致病性强，发病快，可引起多种传染病，我国每年约有 22.3 万头牲畜死亡，损失达 29.3 亿元。2022 年 6 月 23 日，我国农业农村部发布第 573 号公告，对原农业部颁布的《一、二、三类动物疫病病种名录》进行修订^[20]，其中魏氏梭菌病更名为产气荚膜杆菌病，并归为三类动物疫病^[21]。

产气荚膜梭菌病多呈超急性型，其病程较短，死亡较快。主要形式有：临床和亚临床两种。从上世纪八十年代我国在部分地区零星散发犊牛产气荚膜梭菌病开始，多年来在全国不断爆发，在二十一世纪高速发展的时代更是严重影响着我国养殖业的发展。如：

2002 年，李勤凡等^[22]报道了宁夏地区在养殖生产中因牛感染产气荚膜梭菌而导致 2620 头牛猝死；

2004-2005 年^[23, 24]，据相关报道称，在我国华东地区的浙江、西北地区的新疆和陕西、西南地区的四川等地同样发生因感染产气荚膜梭菌的牛、羊等猝死症；

2006 年，高丽英等^[25]报道了实验室诊断为 CpD 的菌，致使青海海西州爆发了以牛发生高热、急性、高致死性为特征的牛猝死症；

2006~2007 年，赵永江等^[26]报道了新疆地区鹿场大批数量鹿发生急性死亡，病程短，主要以公鹿死亡为主的猝死症；

2007 年，杨玉芝等^[27]报道了河南省某獭兔场发生产气荚膜梭菌感染，发病率为约为四分之一，病死率高达 100 %；

2011 年，邱慧玲^[28]对麋鹿自然感染产气荚膜梭菌的情况进行了调查，结果发现，北京南海子麋鹿苑阳性率分别为 13.04%、江苏大丰麋鹿国家级自然保护区麋鹿阳性率为 28.79%，总感染率为 26.45%；

2013 年，贵州省某野生动物园新引进的 2 头幼龄黑熊突然发病并死亡^[29]，经诊断，确诊为产气荚膜梭菌感染。

2014 年，吉林长春九台市一绵羊养殖场数只羊感染产气荚膜梭菌病^[29]，病程仅 3 天，病死率达 100%；同年，扬州大学接诊了 11 例山羊腹泻病例^[30]，同样均为产气荚膜梭菌感染；

2015 年，鄢红国等^[31]对我国南方 4 省份的 33 个猪场进行产气荚膜梭菌感染调查时发现，哺乳仔猪阳性率为 80%，母猪为 75%。

2016 年，李昆^[32]对江西部分地区哺乳仔猪产气荚膜梭菌流行病学调查时发现，有 96%的哺乳仔猪粪样为 CpA 阳性感染；

2019 年，张彤宇^[33]采集了华东部分地区肉羊样品进行产气荚膜梭菌调查时，显示，18.74%的粪样和 20%的组织样为产气荚膜梭菌阳性样品；

2020 年，陈祥杰等^[34]在珠三角地区 10 个规模化养鸡场 100 栋鸡舍，共采集 2500 份粪便样品，进行产气荚膜梭菌检测。结果显示：在珠三角地区所采集的

粪样中，阳性检出率 35%，且均为 A 型产气荚膜梭菌；

2021 年，王屿等^[35]在对甘肃陇东南地区规模养牛场常发传染性二三类疫病的感染状况调查时，结果显示：牛产气荚膜梭菌 A 6.23%、产气荚膜梭菌 D 5.45%、产气荚膜梭菌 C 3.89%；同年，曹思宇等^[36]在对采集江苏地区 10 市肉羊场及扬州大学动物医院的山羊新鲜粪便研究时临床粪样产气荚膜梭菌的总检出率 19.12%，且大多携带 A 型菌，少部分携带 D 型菌；

2022 年，张汉云等^[37]对我国湖南、浙江、福建、广东等 4 省 8 市的规模化猪场各阶段猪进行产气荚膜梭菌在猪中的感染情况的流行病学调查。结果表明，猪产气荚膜梭菌的总检出率为 20.81%；哺乳仔猪和后备母猪的产气荚膜梭菌阳性率分别为 22.73%和 14.29%。

以上事件均说明，目前对产气荚膜梭菌病的防控依然需要加强。总之，产气荚膜梭菌病在世界范围广泛分布，全年均可感染发病，但相对来说夏季发病率比其它季节较低^[38]。一般都呈最急性型，病情严重，死亡率高，给养殖业造成巨大的经济损失。

1.5 产气荚膜梭菌临床症状

产气荚膜梭菌是人和动物的肠道正常菌群成员之一，广泛存在于泥土、污水、腐殖质、饲草、排泄物等自然环境中以及人畜肠道中^[3]。产气荚膜梭菌也是一种可同时感染人和动物的人畜共患性条件致病菌^[2]，正常情况下产气荚膜梭菌不发病，但当受到天气、温度、饮食、环境等改变时，肠道内环境改变导致肠道菌群平衡被破坏，此时改菌迅速大量繁殖并产生致病毒素，引发疾病。

产气荚膜梭菌病一直困扰着畜牧业的发展。本病的潜伏期和前驱期过度迅速，即使出现临床症状，也没有特效药治疗，发病动物突然死亡；症状表现为极度衰弱，食欲不振，体温一般正常，步态不稳，随后卧倒，感觉过敏，大量流涎且脉搏加快，继而昏睡不醒，角膜反射几近消失，濒死时肢体麻痹，发生腹泻排便便，大约 18~24 h 内死亡。病理变化多见于消化道，小肠的病理变化最严重。十二指肠与空肠的整个肠段成为红色，肠粘膜与浆膜密布出血斑点，肠内容物含有破裂的红细胞和坏死的黏膜碎片，是典型的毒血症病变。胆囊明显肿大并充满了胆汁。肾脏被膜上散在出血点，而羊肠毒血症肾脏会发生软化^[39]，似脑髓样。剖检脑部可见脑膜血管肿大，出血，神经元坏死、溶解。

1.6 产气荚膜梭菌致病性

产气荚膜梭菌产生的众多毒素类型均能感染人或动物并引起人或动物特定的疾病（表 1-2），其中 A、C 和 D 型产气荚膜梭菌分布于世界各地。A 型产气荚膜梭菌（CpA）是该菌中危害最严重的一种，所产生的 α 毒素可引起人源食物

中毒、人和动物的组织气肿，还可造成仔猪、羔羊、犊牛、兔子等动物的肠毒血症。B 型产气荚膜梭菌 (CpB) 所产生的 α 、 β 、 ϵ 毒素主要会让羔羊发生腹泻^[40, 41]，还引起很多种家畜的坏死性肠炎和肠毒血症^[42, 43]。C 型产气荚膜梭菌 (CpC) 是除 CpA 以外危害较为严重的一种，所产生的 α 、 β 毒素主要引起人和动物的坏死性肠炎和肠毒血症^[44]，以及目前报道可引起牛、猪、羊、狗、猫和鱼等多种经济动物的出血坏死性肠炎以及“猝死症”等疾病。D 型产气荚膜梭菌 (CpD) 所产生 α 、 ϵ 毒素会导致山羊和绵羊发病^[45]，在山羊上主要为出血性腹泻，在绵羊主要为软肾病，但临床上主要是以神经症状和呼吸症状为主^[46]。E 型 (CpE) 所产生 α 、 ι 毒素会导致羔羊和犊牛的肠毒血症^[3]，但目前关于 CpE 单独致病的报道很少，目前仅在青藏高原的野牦牛群中有报道^[47]。携带 α 、NetB 毒素的 CpF 菌主要引起人的食物中毒，而携带 α 、CPE 的 CpG 菌主要造成禽的坏死性肠炎。总而言之，在动物最常发生的产气荚膜梭菌病是由 B、C 和 D 型产气荚膜梭菌引起，引起坏死性肠炎和肠源性毒血症；在人类最常发的产气荚膜梭菌病是由 A 和 C 型产气荚膜梭菌引起，引起食物中毒和肠毒血症。除了以上几种主要外毒素，近年来 β_2 毒素、TpeL 毒素也受到了越来越多的关注^[48]。

表 1-2 各毒素型的产气荚膜梭菌主要致病种类

毒素型	主要毒素	主要致病种类
A	α	人源食物中毒、人和动物的组织气肿、动物的肠毒血症
B	α 、 β 、 ϵ	羔羊腹泻、家畜坏死性肠炎和肠毒血症
C	α 、 β	人和动物的坏死性肠炎和肠毒血症、牛羊“猝死症”
D	α 、 ϵ	山羊出血性腹泻、绵羊软肾病、羊猝狙
E	α 、 ι	羔羊和犊牛的肠毒血症
F	α 、NetB	人源食物中毒
G	α 、CPE	禽坏死性肠炎

1.7 本研究的目的及意义

产气荚膜梭菌是一种可同时感染人和动物的人畜共患性条件致病菌，广泛存在于泥土、污水、腐殖质、饲草、排泄物等自然环境中以及人畜肠道中，可引起人和动物气性坏疽、食物中毒、羔羊痢疾、绵羊猝狙、牛肠毒血症和坏死性肠炎等疾病。牦牛以放牧为主，消毒防疫措施难以实施，每年夏、秋季由产气荚膜梭菌引起的牦牛疫病时有发生，常引起牦牛腹泻、坏死性肠炎、肠毒血症以及猝死等疾病^[49]，然而关于研究牦牛源产气荚膜梭菌的分子分型和流行病学特征的报道缺很少，常年影响着牦牛产业的稳定发展。

为了系统的对青藏高原地区牦牛源产气荚膜梭菌进行研究，本研究对 2018

年 7 月至 2021 年 7 月收集的 744 头份牦牛粪便样品进行了产气荚膜梭菌流行病学调查。对分离得到的菌株进行药敏试验分析, 并利用 PCR 方法检测分离菌的毒素基因、耐药基因, 最后通过 MLST 分析其多样性与亲缘性。旨在对青藏高原地区牦牛产气荚膜梭菌的流行情况进行调查, 以期当地牦牛产气荚膜梭菌病的预防和治疗提供依据。通过对 Qinghai-1 菌株的生物学特性进行, 有望为研究牦牛源产气荚膜梭菌致病性提供技术支持, 对于我国规模化牦牛牛场产气荚膜梭菌病的有效预防具有重要的现实意义。

第二章 牦牛源产气荚膜梭菌流行病学研究

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*, *C. perfringens*) 旧称魏氏梭菌 (*Clostridium welchii*) 是一种可同时感染人和动物的人畜共患性条件致病菌^[2], 广泛存在于泥土、污水、腐殖质、饲草、排泄物等自然环境中以及人畜肠道中^[3], 是人和动物的肠道正常菌群成员。产气荚膜梭菌所产生的毒素是其致病的主要原因, 通常可引起人和动物气性坏疽、食物中毒、羔羊痢疾、绵羊猝狙、牛肠毒血症和坏死性肠炎等疾病^[5]。每年因产气荚膜梭菌引起动物的胃肠道疾病给畜牧业造成了巨大的经济损失。牦牛以放牧为主, 消毒防疫措施难以实施, 牦牛产气荚膜梭菌病春、秋两季多发, 是常见的牦牛疾病之一^[49, 50]。然而关于研究牦牛源产气荚膜梭菌的分子分型和流行病学特征的报道缺很少。本研究对 2018 年 7 月至 2021 年 7 月收集的 744 头份牦牛粪便样品进行了产气荚膜梭菌的分离, 随后利用 PCR 方法检测了分离株的毒素基因, 利用 MLST 技术探索了分离株的分子类型和遗传关系。旨在对青藏高原地区牦牛产气荚膜梭菌的流行情况进行调查, 为当地牦牛产气荚膜梭菌病的预防和治疗提供依据。

2.1 试验材料

2.1.1 样品来源

2018 年 7 月至 2021 年 7 月, 从中国青藏高原地区的牦牛主要放养牧区共采集新鲜的牦牛粪样 744 份。样品采集地来自青海海北藏族自治州、青海玉树藏族自治州、青海西宁市、西藏拉萨市、西藏林芝市、西藏那曲市、西藏山南市、西藏日喀则市 (图 2-1)。利用无菌粪便拭子采集新鲜牦牛粪便, 放入车载冰箱, 通过 4℃低温冷藏送至西藏农牧学院预防兽医实验室。

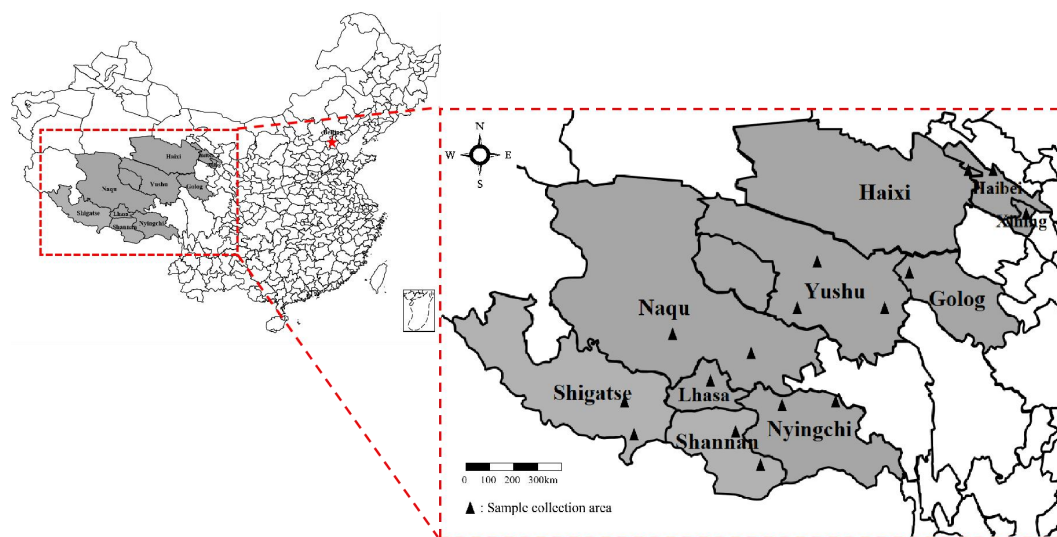


图 2-1 采集样本的地理位置 (标注为: ▲)

2.1.2 主要试剂

主要试剂见表 2-1。

表 2-1 试验主要试剂

试剂	批号	厂家
液体硫乙醇酸盐培养基	HB5190	青岛海博生物技术有限公司
胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养基	HB0253-9	青岛海博生物技术有限公司
梭菌增菌培养基	HB0316-1	青岛海博生物技术有限公司
7%羊血琼脂培养基	HB8519-1	青岛海博生物技术有限公司
D-环丝氨酸溶液	20200818	青岛海博生物技术有限公司
革兰氏染液试剂盒	20200803	青岛海博生物技术有限公司
无菌脱纤维绵羊血	20200106	北京索莱宝科技有限公司
pMD TM 18-T Vector Cloning Kit	AL13859A	日本 TaKaRa BIO 株式会社
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	S7708	北京天根生化科技有限公司
High Pure Maxi Plasmid Kit	AL14032A	日本 TaKaRa BIO 株式会社
AMP	RH279070	上海易恩化学技术有限公司
生化鉴定微量反应管	20200421	杭州微生物试剂有限公司

2.1.3 主要仪器

主要仪器见表 2-2。

表 2-2 试验主要仪器

试验仪器	型号	厂家
双人净化工作台	SW-CJ-2D	上海苏净实业有限公司
冷冻离心机	5430R	德国 Eppendorf 公司
立式压力蒸汽灭菌锅	LDZX-50KBS	上海申安医疗器械厂
干热灭菌箱	DHG-9070A	北京中科环试仪器有限公司
PCR 仪	Veriti96	德国 Eppendorf 公司
凝胶成像系统	Tanon2500BR	上海天能科技有限公司
核酸蛋白检测仪	NanoDrop2000	赛默飞世尔科技(中国)有限公司
电泳仪	DYY-6C	北京八一仪器

2.2 试验方法

2.2.1 细菌的分离纯化

无菌称取 1 g 样品接种于 10 mL 的生理盐水中,振荡后静置 1 h,吸取 1 mL 上清液接种于 FTG 培养基,用石蜡液封,在 41℃条件下培养 18~24 h。随后选

取其中有气泡产生的样品接种至含 5%环丝氨酸的 TSC, 在 41℃条件下厌氧培养 18~24 h。随后挑取黑色扁平圆形的单菌落接种于 RCM 培养基, 待培养液混浊后采用三区划线法接种于含 5%脱纤维绵羊血的琼脂培养基, 使用厌氧袋, 放入厌氧缸中, 在 41℃条件下培养 18~24 h。通过石蕊牛奶培养基、含铁牛乳培养基观察其“爆裂发酵”现象。

2.2.2 染色镜检

挑取血琼脂培养基中具有溶血环的单菌制成玻片进行革兰氏染色镜检, 通过菌落形态、细菌形状和生长特性初步判定阳性样品, 将符合产气荚膜梭菌形态学特征的单菌落接种至 RCM 培养基, 41℃恒温培养 18~24 h, 最后从每一份阳性样品中选取一株产气荚膜梭菌用于毒素基因检测、MLST 分型和遗传进化分析。

2.2.3 16S rRNA 基因 PCR 鉴定

合成细菌 16S rRNA 引物^[51], 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT, 片段大小为 1 465 bp。挑取纯化后的单菌落接种于 RCM 培养基, 石蜡液封, 41℃培养, 当培养液 $D_{600\text{ nm}}=0.6\sim0.8$ 时, 按照全菌水煮裂解法制备分离菌 DNA 模板, -20℃冻存备用。PCR 扩增采用 50 μL 体系: 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, 2×Tap Master Mix 酶 25 μL, 模板 2 μL, ddH₂O 21 μL。PCR 反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。最后, 将 PCR 扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳, 符合目的条带大小的 PCR 产物委托擎科生物科技有限公司进行测序。并将测序结果在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上的 Nucleotide 数据库中进行比对。

2.2.4 毒素分型

合成产气荚膜梭菌常见致死性毒素基因 (*cpa*、*cpb*、*etx*、*iap*、*cpe*、*netB*) 的引物^[4] (见表 2-3)。以利用 PCR 扩增技术以分离菌 DNA 为模板, 每个 PCR 扩增在 50 μL 反应体积中进行, 包括上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, 2×Tap-T DNA Polymerase 25 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 21 μL。随后, 将 PCR 产物在含 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 通过凝胶成像系统对分离菌所含毒素基因拍照分析, 并根据其所携带的毒素基因按照最新毒素分型方案^[4, 52]将其分为 A~G 七种毒素型 (见表 1-1)。

表 2-3 产气荚膜梭菌毒素基因引物信息

基因类型	基因名称	引物序列（5'→3'）	片段大小 /bp	退火温度 /°C	参考文献
常见致死性毒素	<i>cpa</i>	F GCTAATGTTACTGCCGTTGA	325	53	[53]
		R CCTCTGATACATCGTGTAAAG			
	<i>cpb</i>	F GCGAATATGCTGAATCATCTA	196		
		R GCAGGAACATTAGTATATCTTC			
	<i>etx</i>	F GCGGTGATATCCATCTATTC	656		
		R CCACTTACTTGTCTACTAAC			
	<i>ia</i>	F ACTACTCTCAGACAAGACAG	443		
		R CTTTCCTTCTATTACTATACG			
肠毒素	<i>cpe</i>	F GGAACCCTCAGTAGTTTCAAGT	461	53	[4]
		R CTGTAGCAGCAGCTAAATCAAG			
坏死性肠炎 B 样毒素	<i>netB</i>	F GGAAGGCAACTTTAAGTGAAC	680	54	[54]
		R GTTTGTTCTCGCCATTGAGT			

2.2.5 多位点序列分型 (MLST)

根据 Jost 等^[55]方案,选取产气荚膜梭菌 8 个管家基因 (*plc*、*ddlA*、*dut*、*glpK*、*gmk*、*recA*、*sod* 和 *tpi*) (表 2-4) 利用 PCR 技术对菌株 DNA 进行扩增。将 PCR 产物在含 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,利用 TIAN gel Midi Purification Kit 进行胶回收,并利用核酸蛋白检测仪测定 DNA 浓度和纯度。利用 pMD™18-T Vector,将回收的 DNA 片段 4 °C 过夜连接至 pMD™18-T 载体,随后转化至 DH5 α 感受态细胞,利用含 Amp⁺ 的 LB 培养基进行筛选。经 PCR 鉴定为阳性的菌液,按照 High Pure Maxi Plasmid Kit 操作说明提取质粒,并委托擎科生物科技(成都)有限公司进行测序。随后,对分离到的产气荚膜梭菌的 8 个管家基因 (*ddlA*, *dut*, *glpK*, *gmk*, *plc*, *recA*, *sod*, *tpiA*) 原始测序序列进行校对,拼接,剪切。随后使用 BIONUMERICS 8.1 (Applied Maths, Keijkstraat, Belgium) 软件对处理后的管家基因序列分配等位基因编号 (allele number),并为每个菌株分配序列型 (sequence type, ST)。

表 2-4 管家基因引物信息

基因名称		引物序列 (5'→3')	片段大小/bp
<i>plc</i>	F	ATATGAATGGCAAAGAGGAAAC	544
	R	AGTTTTTCCATCCTTTGTTTTG	
<i>ddlA</i>	F	ATAATGGGGGATCATCAGTTGC	429
	R	TTATTCCTGCTGCACTTTTAGG	
<i>dut</i>	F	TTAAGTATTTTGATAACGCAAC	441
	R	CTGTAGTACCAAATCCACCACG	
<i>glpK</i>	F	TGGGTTGAGCATGATCCAATGG	574
	R	CACCTTTTGCTCCAAGGTTTGC	
<i>gmk</i>	F	TAAGGGAAC TATTTGTAAAGCC	475
	R	TACTGCATCTTCTACATTATCG	
<i>recA</i>	F	GCTATAGATGTTTTAGTTGAGG	475
	R	CTCCATATGAGAACCAAGCTCC	
<i>sod</i>	F	GATGCTTTAGAGCCATCAATAG	478
	R	AATAATAAGCATGTTCCCAAAC	
<i>tpiA</i>	F	AAATGTGAAGTTGTTGTTTGCC	451
	R	CATTAGCTTGGTCTGAAGTAGC	

2.2.6 最小生成树 (MST) 构建及分析

将菌株的 8 个等位基因编号组成 profile, 以 categorical 法计算相似性系数, 构建最小生成树 (MST)。用圈代表序列型, 两个圈之间的不同连线代表这两个 ST 型之间位点差异不同, 不同的特征以不同颜色区分。8 个位点中有 7 个及以上位点相同的菌株被定义为同一个克隆复合体 (Clonal Complex, CC)。

2.2.7 聚类树的构建及菌株多样性分析

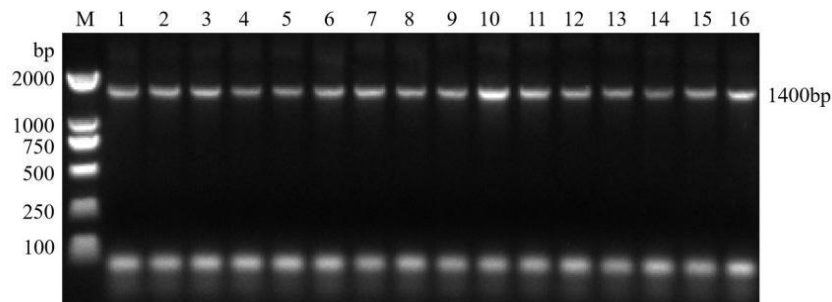
以 categorical 法计算相似性系数, 用 Unweighted Pair Group Method Arithmetic mean (UPGMA) 方法构建聚类树, 用于遗传进化分析。利用辛普森多样性指数 (Ds) 对不同地区菌株的多态性进行定量分析, Ds 指数越大代表多样性程度越丰富。

2.3 试验结果

2.3.1 分离菌 16S rRNA PCR 鉴定结果

经分离纯化共得到 144 株疑似产气荚膜梭菌, 且分离菌的 16S rRNA PCR 产

物凝胶电泳后在约 1 400 bp 处出现条带（图 2-2）。将测序结果在 NCBI 网站上的 Nucleotide 数据库中比对，144 株分离菌与 *C. perfringens* 相似性达 99.5%~100%，确定其为产气荚膜梭菌。



M: DL2000 DNA Marker; 1~16: 分离菌株

图 2-2 部分分离菌 16S rRNA PCR 产物凝胶电泳图

2.3.2 牦牛源产气荚膜梭菌阳性率

744 头份牦牛粪便样品共有 144 份阳性样品，阳性率 19.35%（144/744）。其中青海省有 61 份阳性样品，阳性率 23.12%（61/264）；西藏有 83 份阳性样品，阳性率 17.29%（83/480）（表 2-5）。

表 2-5 牦牛源产气荚膜梭菌的阳性率

省份	采样时间	采样地点	样品数量/头份	阳性样品数/株	阳性率
青海	2018.10	祁连县	18	7	38.89%（7/18）
	2018.07	称多县	19	3	15.79%（3/19）
	2018.10	清水河镇	45	9	20%（9/45）
	2019.07	大通县	82	18	21.95%（18/82）
	2020.10	治多县	52	12	23.08%（12/52）
	2020.10	杂多县	48	12	25%（12/48）
	合计 1		264	61	23.12%（61/264）
西藏	2020.07	班戈县	120	22	17.69%（22/120）
	2020.09	拉萨市	76	12	15.79%（12/76）
	2020.09	日喀则市	20	7	35%（7/20）
	2021.05	林芝市	60	13	21.67%（13/60）
	2021.07	曲松县	66	10	15.15%（10/66）
	2021.07	桑日县	62	10	16.13%（10/62）
	2021.07	嘉黎县	76	9	11.76%（9/76）
合计 2			480	83	17.29%（83/480）
合计 3			744	144	19.35%（144/744）

2.3.3 牦牛源产气荚膜梭菌毒素型流行情况

对分离到的 144 株产气荚膜梭菌的毒素基因检测显示(表 2-6):108 株(75%, 108/144)为 A 型产气荚膜梭菌, 25 株(17.36%, 25/144)为 C 型产气荚膜梭菌, 4 株(2.78%, 4/144)为 D 型产气荚膜梭菌, 7 株(4.86%, 7/144)为 F 型产气荚膜梭菌。在本次分离菌种未检测到 *iap* 和 *netB* 基因。

表 2-6 牦牛产气荚膜梭菌不同毒素类型的分布

毒素型	毒素基因	不同地区的阳性菌株数量 (%)		
		青海省 (n=61)	西藏自治区 (n=83)	合计 (n=144)
A	<i>cpa</i>	50 (81.96%)	58 (69.88%)	108 (75.00%)
C	<i>cpa + cpb</i>	5 (8.20%)	20 (24.10%)	25 (17.36%)
D	<i>cpa + etx</i>	4 (6.56%)	0	4 (2.78%)
F	<i>cpa + cpe</i>	2 (3.28%)	5 (6.02%)	7 (4.86%)

2.3.4 牦牛源产气荚膜梭菌 MLST 分型结果

经产气荚膜梭菌 8 种不同的管家基因数和相应的菌株的等位基因谱将 144 株产气荚膜梭菌分为 89 个 STs (附表 1), $D_s=0.9754$ 。144 株产气荚膜梭菌各管家基因分别具有 15~50 个不同的等位基因数(平均有 12.95 个),最多的为 *gmk* 基因 (n=50), 最少的为 *glpK* 基因 (n=15)。分离株的等位基因遗传多样性辛普森多样性指数 (D_s) 显示 (表 2-7): $0.5068 \leq D_s \leq 0.9560$, 遗传多样性最丰富的为 *gmk* 基因, 最保守的为 *tpi* 基因。

表 2-7 牦牛产气荚膜梭菌等位基因多样性

基因	<i>plc</i>	<i>ddlA</i>	<i>dut</i>	<i>glpK</i>	<i>gmk</i>	<i>recA</i>	<i>sod</i>	<i>tpi</i>
片段大小/bp	544	429	441	574	475	475	478	451
等位基因数	38	43	41	15	50	26	46	16
平均等位基因	15.12	15.78	16.89	3.72	23.14	8.21	18.11	2.60
辛普森多样性指数 (D_s)	0.9255	0.9344	0.9338	0.7542	0.9560	0.8867	0.9424	0.5068

2.3.5 牦牛源产气荚膜梭菌最小生成树 (MST)

牦牛源产气荚膜梭菌 MST 主要由 11 个克隆复合物(CC1-CC11)组成, CC1、CC6、CC10 各含有 3 个 STs 型, 其余 CCs 各只含有 2 个 STs 型。图 2-3 显示了以不同来源为特征的最小进化树, 图 2-4 显示了以不同毒素型为特征生成的最小进化树。

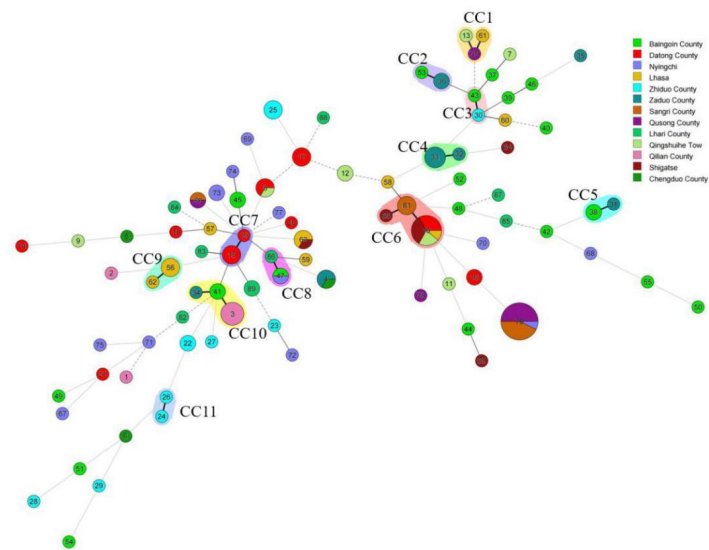


图 2-3 以不同来源为特征的最小进化树

注：圆圈代表序列类型，圆圈的大小代表应变的数量，圆圈上的数字代表 ST 类型的名称，两个圆圈之间的不同连接线代表两个 ST 类型之间的差异，粗实线表示两种 ST 型之间有一个位点差异，细实线表示有 2 个或 3 个不同的位点，细虚线表示有 4 个不同的座位，细虚线上表示有超过 4 个不同座位。相同颜色的菌株代表相同的克隆复合体（CC）。

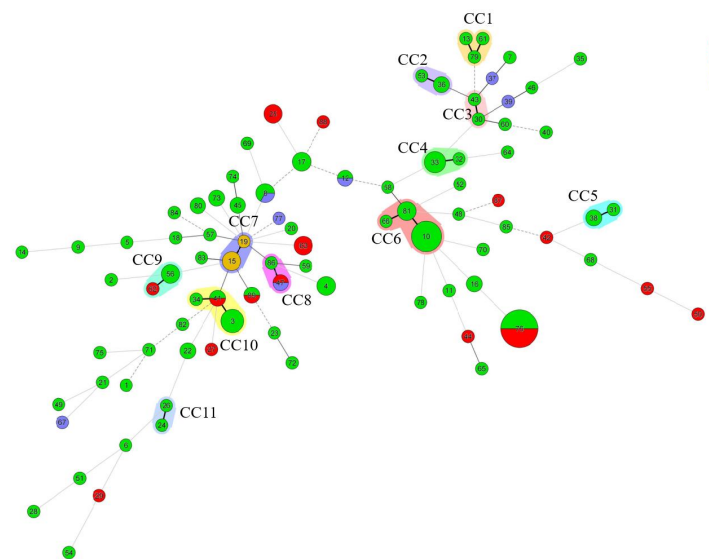


图 2-4 以不同毒素型为特征生成的最小进化树

注：圆圈代表序列类型，圆圈的大小代表应变的数量，圆圈上的数字代表 ST 类型的名称，两个圆圈之间的不同连接线代表两个 ST 类型之间的差异，粗实线表示两种 ST 型之间有一个位点差异，细实线表示有 2 个或 3 个不同的位点，细虚线表示有 4 个不同的座位，细虚线上表示有超过 4 个不同座位。相同颜色的菌株代表相同的克隆复合体（CC）。

2.3.6 牦牛源产气荚膜梭菌遗传多样性丰富程度

青海和西藏遗传多样性丰富程度相当，青海共 61 株分离菌被分为 36 个 STs ($D_s=0.9594$) (见表 2-8)，西藏共 83 株分离菌被分为 54 个 STs ($D_s=0.9551$) (见表 2-9)。遗传多样性丰富程度最高的地区为班戈县 (22 株分离菌被分为 19 个 STs, $D_s=0.9421$)，遗传多样性丰富程度最低的地区是祁连县 (7 株分离菌被分为 3 个 STs, $D_s=0.4490$)。

表 2-8 青海省各地牦牛源产气荚膜梭菌多样性

采样地点	祁连县	称多县	清水河镇	大通县	治多县	杂多县	总计
分离菌株数/株	7	3	9	18	12	12	61
STs 数/个	3	3	7	10	9	7	36
辛普森多样性指数 (D_s)	0.449	0.6667	0.5926	0.8765	0.8611	0.8056	0.9594

表 2-9 西藏各地牦牛源产气荚膜梭菌多样性

采样地点	班戈县	拉萨市	日喀则市	林芝市	曲松县	桑日县	嘉黎县	总计
分离菌株数/株	22	12	7	13	10	10	9	83
STs 数/个	19	9	5	12	4	3	8	54
辛普森多样性指数 (D_s)	0.9421	0.8611	0.7347	0.9112	0.4800	0.5400	0.8642	0.9551

2.3.7 牦牛源产气荚膜梭菌聚类树

从 144 株牦牛源产气荚膜梭菌聚类树 (图 2-5) 可知：从 CCs 来看，CC1、CC2、CC3 的遗传关系较近，CC7、CC8、CC10 的遗传关系也属同一枝，CC4、CC6、CC9 这 3 个 CCs 却处于较远的位置。其中 CC6 中菌株来源于青海省的清水河镇、大通县和西藏的拉萨市、日喀则市、桑日县，CC4 的菌株仅在青海省杂多县、CC7 的菌株仅在青海省大通县、CC9 的菌株仅在西藏拉萨市、CC11 的菌株仅在青海省治多县。从 ST 型来看，ST-50、ST-54、ST-55 在整个发育树中处于相对较远的位置，与其他 STs 分离株的遗传进化差异最大。从来源方面来看，可以看出同一分枝的分离菌来自不同地区的现象较为明显，存在着地区间相互夹杂的现象，但有部分地区 (如：曲松县和桑日县) 的遗传进化较为保守，单独处于同一分枝。

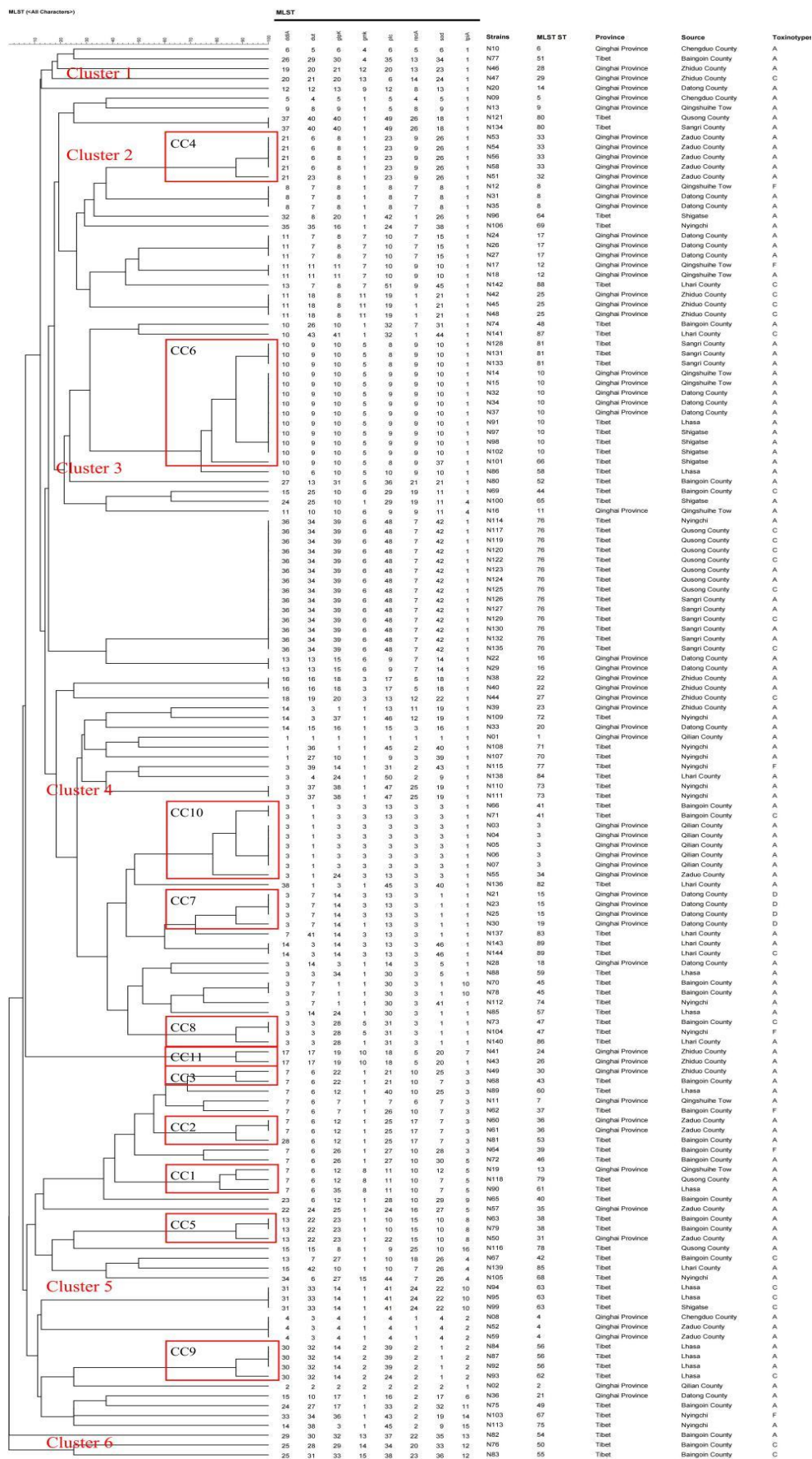


图 2-5 牦牛源产气荚膜梭菌系统发育聚类树及等位基因图谱

2.4 讨论

近年来,有关产气荚膜梭菌引起动物患病的报道时有出现,在最近的研究表明该病菌在鸡^[56]、猪^[57]、家禽^[58]、水牛^[59]、绵羊^[60]的流行率有所不同,然而,关于产气荚膜梭菌在牦牛中的流行情况的研究报道却很难找到。本研究从青藏高原地区采集牦牛粪样 744 头份,通过分离、培养和鉴定,确认其中 144 份为阳性样品,总体阳性率为 19.35%。其中青海省牦牛源产气荚膜梭菌阳性率明显高于西藏。本研究显示,牦牛中产气荚膜梭菌阳性率低于 Wu K 等^[60]对中国甘肃和青海地区藏绵羊(45%)的报道,与 Hussain MI 等^[57]对印度东北部的牛(20.8%)、山羊(18.3%)的报道相近。另有研究显示,巴基斯坦牛群的流行率为 65.42%^[59];印度圈养野生反刍动物(34.1%)^[61];埃及腹泻牛(69.7%)和死牛(61.5%)^[62];以及印度北部牛(37.2%)^[63]。总的来说,牦牛源产气荚膜梭菌阳性率较其他地区的动物阳性率偏低,且西藏(平均海拔>4000 m)的阳性率低于青海省(平均海拔>3000 m)。原因可能是牦牛长期生活于青藏高原地区,其海拔高、气温低、湿度低、紫外线强、空气颗粒污染物较少,细菌缺少可依附载体,为细菌的繁殖和传播造成了一定阻碍^[64]。这一观点也得到 Kumar S 等^[65]的关于高海拔地区微生物多样性及土壤理化特征的一项研究的证实,即:革兰氏阴性菌在高海拔地区选择性增殖,革兰氏阳性菌减少。

本研究从牦牛源产气荚膜梭菌中检测到 *cpa*、*cpb*、*etx*、*cpe* 毒素基因,未检测到 *iap* 和 *netB* 基因,即有 A 型、C 型、D 型和 F 型四种产气荚膜梭菌存在。其中, A 型、C 型和 F 型产气荚膜梭菌在青海和西藏地区均有分布, D 型仅在青海地区有分布。A 型菌株依然是数量最多的,具有一定的优势性,与吴丹^[66]、罗润波^[67]等研究结果相同。D 型和 F 型产气荚膜梭菌首次从青藏高原牦牛粪样中检测到。

通过 MLST 技术分析得到, 144 株牦牛源产气荚膜梭菌的管家基因具有 15~50 个(平均有 12.95 个)等位基因, 89 个 STs, 11 个 CCs。据报道显示, Jost 等^[55]分析 132 株产气荚膜梭菌得到平均有 24.4 个等位基因、80 个 STs 和 3 个 CCs; Chalmers 等^[68]分析了 61 株分离菌得到平均有 5.9 个等位基因, 22 个 STs 和 6 个 CCs; Hibberd 等^[69]分析了 139 个分离株,发现平均有 12.2 个等位基因、41 个 STs 和 6 个 CCs; Xu W 等^[70]分析 39 株产气荚膜梭菌平均发现了 12.13 个等位基因, 29 个 STs 和 3 个 CCs; 在另一份报道中^[71], Xu W 等分析了 110 株产气荚膜梭菌平均得到 16.25 个等位基因, 74 个 STs 和 7 个 CCs。本研究中分离菌平均等位基因数量不是最多,且与 Hibberd 等^[69]和 Xu W 等^[70]的结果接近,但是本研究中 CCs 群数量最多,表现出了典型的遗传多样性。在对 STs 的多样性量化研究时显示,总体辛普森多样性指数为 0.9754,青海省辛普森多样性指数为

0.9594, 西藏辛普森多样性指数为 0.9551, 同样说明了本研究中的牦牛源产气荚膜梭菌具有很大的遗传多样性。在所有 STs 中, 菌株数最多的为 ST76 (9.72%, 14/144), ST76 中所有菌株均来自西藏, 并集中在曲松县和桑日县, 可能是由于这两个县所处地理位置较近, 形成了一定程度的交叉传播。菌株数量最多的 CCs 为 CC6, 含有 ST10、ST81 和 ST66 三个 STs, 共 13 株菌 (9.03%, 13/144)。CC6 中菌株来源于青海省的清水河镇、大通县和西藏的拉萨市、日喀则市、桑日县, 其分布的地理范围广泛, 是青藏高原地区主要流行群。然而, 也有一些 CCs 的菌株只在一个地区有发现, 如 CC4 的菌株仅在青海省杂多县、CC7 的菌株仅在青海省大通县、CC9 的菌株仅在西藏拉萨市、CC11 的菌株仅在青海省治多县, 这些 CCs 的菌株代表了一个地区的主要流行群。

第三章 牦牛源产气荚膜梭菌耐药性研究

自人类首次发现抗生素以来，抗生素在畜牧业方面使用越来越频繁，从而导致抗菌素靶点的变化^[72]、抗性基因相互转移^[73]，使细菌通过遗传、多菌种传播等方式将耐药基因扩散开来，并形成高度耐药以及多重耐药的特性。最新研究表明，产气荚膜梭菌多重耐药性在世界各地各类动物中具有不同的发生率，泰国仔猪（82%）^[74]、韩国零售肉类（78.9%）^[75]、巴基斯坦家禽（100%）^[58]、孟加拉国肉鸡（78.1%）^[76]、中国种鸭（61.87%）^[77]。在牦牛的养殖中抗生素使用也较为普遍，然而，对牦牛源产气荚膜梭菌多重耐药性相关研究甚少。因此，检测牦牛源产气荚膜梭菌对抗菌药物的耐药性，有利于提高药物的治疗效果，促进牦牛业的发展。

3.1 试验材料

3.1.1 试验菌株

本研究所用 144 株牦牛源产气荚膜梭菌均由第二章分离得到，保存于西藏农牧学院预防兽医学实验室。试验菌株来源信息详见表 3-1。

表 3-1 144 株牦牛源产气荚膜梭菌来源信息

省份	菌株来源	菌株数/株	合计/株
青海省	祁连县	7	61
	称多县	3	
	清水河镇	9	
	大通县	18	
	治多县	12	
	杂多县	12	144
	班戈县	22	
	拉萨市	12	
西藏自治区	日喀则市	7	83
	林芝市	13	
	曲松县	10	
	桑日县	10	
	嘉黎县	9	

3.1.2 主要试剂

试验主要试剂见表 3-2。

表 3-2 试验主要试剂

试剂	批号	厂家
抗生素药敏片	成套	杭州微生物试剂有限公司
M-H 琼脂	HB6232	青岛海博生物技术有限公司
琼脂糖	S25759	上海源叶生物科技有限公司
DL2000 DNA Marker	Kdb2053139	北京博奥龙免疫技术有限公司

3.1.3 主要仪器

试验主要仪器见表 3-3。

表 3-3 试验主要仪器

试验仪器	型号	厂家
PCR 仪	Veriti96	德国 Eppendorf 公司
电泳仪	DYY-6C	北京八一仪器
凝胶成像系统	Tanon2500BR	上海天能科技有限公司
生化培养箱	SPX-150B-Z	上海博迅实业有限公司
高精度数字型游标卡尺	300 mm	上海宝工工具有限公司

3.2 试验方法

3.2.1 菌株复苏

将-80℃环境中保存的菌株，三区划线接种于 TSC 培养基上，41℃恒温培养 18~24 h，随后挑取 TSC 培养基中产气荚膜梭菌单菌落，接种于 RCM 培养基中，41℃恒温培养 8 h，作为种子液。

3.2.2 DNA 提取

挑取 TSC 上单菌落接种于 RCM 培养基，41℃培养，当培养液 $D_{600\text{ nm}}=0.6\sim0.8$ 时，按照全菌水煮裂解法制备分离菌 DNA 模板，-20℃冻存备用。

3.2.3 药敏试验

根据临床和实验室标准研究所 (CLSI) [78] 推荐的 Kirby-Bauer 纸片扩散法测定分离菌对 26 种常用抗菌药物的敏感性 (表 3-4)。挑 TSC 上单菌落接种于 RCM 培养基，石蜡液封，41℃培养，当 $D_{600\text{ nm}}=0.6\sim0.8$ 时，吸取 300 μL 菌液均匀地平铺于 Mueller-Hinton 琼脂，随后将 26 种抗生素药敏纸片放置于培养基上 (每

个培养基放 4 种药敏纸片), 41℃厌氧培养 24 h。利用游标卡尺测量抑菌圈直径, 并参照 CLSI 推荐的《抗菌药物敏感性试验执行标准》^[78]和制造商的说明书对分离菌的耐药情况进行判定。

表 3-4 产气荚膜梭菌抗菌药物耐药性判定标准

药物种类	药物名称	缩写	药物含量		抑菌圈大小/mm	
			/μg·片 ⁻¹	耐药 (R)	中介 (I)	敏感 (S)
β-内酰胺类抗生素	头孢噻肟	CTX	30	≤14	14-23	≥23
	头孢唑林	CZO	30	≤14	14-18	≥18
	氨苄西林	AMP	10	≤13	13-17	≥17
	头孢呋辛	CXM	30	≤14	14-23	≥23
	头孢他啶	CAZ	30	≤14	14-18	≥18
	青霉素	PEN	10 UI	≤13	13-17	≥17
	头孢氨苄	LEX	30	≤14	14-18	≥18
	苯唑西林	OXA	10	≤10	10-13	≥13
大环内酯类抗生素	麦迪霉素	MID	30	≤13	13-18	≥18
	红霉素	ERY	15	≤13	13-23	≥23
	庆大霉素	GEN	10	≤12	12-15	≥15
氨基糖苷类抗生素	卡那霉素	KAN	30	≤13	13-18	≥18
	链霉素	STR	10	≤11	12-15	≥15
	米诺环素	MNO	30	≤12	12-16	≥16
四环素类抗生素	多西环素	DOX	30	≤12	12-16	≥16
	四环素	TCY	30	≤14	14-19	≥19
林可酰胺类抗生素	克林霉素	CLI	2	≤14	14-21	≥21
氯霉素抗生素	氯霉素	CHL	30	≤12	12-18	≥18
	氟苯尼考	FFC	30	≤12	12-18	≥18
	万古霉素	VAN	30	≤9	9-12	≥12
多肽抗生素	杆菌肽	BAC	10 UI	≤8	8-13	≥13
	多粘菌素 B	POL	300 UI	≤8	8-12	≥12
喹诺酮类抗生素	环丙沙星	CIP	5	≤15	15-21	≥21
	氧氟沙星	OFX	5	≤12	12-16	≥16
硝基呋喃抗生素	呋喃唑酮	FRZ	300	≤14	14-17	≥17
磺胺类抗生素	磺胺甲恶唑	SOX	300	≤12	12-17	≥17

3.2.4 牦牛源产气荚膜梭菌多重耐药性分析

多重耐药菌是指对三类或三类以上抗菌药物耐药的菌株。根据上述药敏结果,对出现三类或三类以上药物耐药的细菌进行统计分析并总结归纳出牦牛源产气荚膜梭菌耐药谱。

3.2.5 耐药基因检测

3.2.5.1 β -内酰胺类耐药基因检测

(1) 引物设计与合成

根据文献^[79]设计 β -内酰胺类(*bla*CTX-M、*bla*SHV、*bla*TEM、*bla*OXA)耐药基因的引物,并委托上海生工生物(成都)有限公司合成,引物序列见表3-5。

表 3-5 β -内酰胺类耐药基因引物信息

基因名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp
<i>bla</i> SHV	F AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	713
	R ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
<i>bla</i> TEM	F ATGAGTATTCAACATTTCCTGT	861
	R TTACCAATGCTTAATCAGTGA	
<i>bla</i> CTX	F TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688
	R CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
<i>bla</i> OXA	F GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564
	R GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	

(2) PCR 扩增体系

PCR 扩增采用 25 μ L 体系:上游引物 1 μ L,下游引物 1 μ L,2 $\times$ Tap Master Mix 酶 12.5 μ L,模板 2 μ L,ddH₂O 8.5 μ L。

(3) PCR 反应程序

β -内酰胺类耐药基因 PCR 反应程序及参数见表 3-6。

表 3-6 β -内酰胺类耐药基因 PCR 反应程序

耐药基因	反应程序
<i>bla</i> SHV	94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>bla</i> TEM	94°C 5 min; 94°C 30 s, 48°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>bla</i> CTX	94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>bla</i> OXA	94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min

(4) PCR 产物检测

制备 1.5 %琼脂糖凝胶，每孔吸取 5 μL PCR 产物。放入电泳槽中，调置电压 120 V，进行 25 min 电泳，随后利用凝胶电泳成像仪拍照留存，观察并记录试验结果。

3.2.5.2 大环类脂类耐药基因检测

(1) 引物设计与合成

根据文献^[80]设计大环类脂类 (*ermA*、*ermB*、*ermC*、*ermF*、*ermX*) 耐药基因的引物，并委托上海生工生物（成都）有限公司合成，引物序列见表 3-7。

表 3-7 大环类脂类耐药基因引物信息

基因名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp
<i>erm (A)</i>	<i>F</i> GAAATY GGRTCAGGAAAAGG	332
	<i>R</i> AAYAGYAAACCYAAAGCT C	
<i>erm (B)</i>	<i>F</i> GATACCGTTTACGAAATTGG	364
	<i>R</i> GAATCGAGACTTGAGTGTGC	
<i>erm (C)</i>	<i>F</i> GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	642
	<i>R</i> TCAAAACATAATATAGATAAA	
<i>erm (F)</i>	<i>F</i> CGACACAGCTTTGGTTGAAC	309
	<i>R</i> GGACCTACCTCATAGACAAG	
<i>erm (X)</i>	<i>F</i> GAGATCGGRCCAGGAAGC	488
	<i>R</i> GTGTGCACCATCGCCTGA	

(2) PCR 扩增体系

PCR 扩增采用 25 μL 体系：上游引物 1 μL ，下游引物 1 μL ，2 $\times$ Tap Master Mix 酶 12.5 μL ，模板 2 μL ，ddH₂O 8.5 μL 。

(3) PCR 反应程序

大环类脂类耐药基因 PCR 反应程序及参数见表 3-8。

表 3-8 大环类脂类耐药基因 PCR 反应程序

耐药基因	反应程序
<i>erm</i> (A)	94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>erm</i> (B)	94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>erm</i> (C)	94°C 5 min; 94°C 30 s, 43°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>erm</i> (F)	94°C 5 min; 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>erm</i> (X)	94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min

(4) PCR 产物检测

制备 1.5 % 琼脂糖凝胶, 每孔吸取 5 μ L PCR 产物。放入电泳槽中, 调置电压 120 V, 进行 25 min 电泳, 随后利用凝胶电泳成像仪拍照留存, 观察并记录试验结果。

3.2.5.3 氨基糖苷类耐药基因检测

(1) 引物设计与合成

根据文献^[81]设计氨基糖苷类 (*aadA*、*strA*、*aph* (3') -III-F、*aadB*、*aphA*) 耐药基因的引物, 并委托上海生工生物 (成都) 有限公司合成, 引物序列见表 3-9。

表 3-9 氨基糖苷类耐药基因引物信息

基因名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp
<i>aadA</i>	F GTGGATGGCGGCCTGAAGCC	525
	R AATGCCCAGTCGGCAGCG	
<i>strA</i>	F ATGGTGGACCCTAAACTCT	893
	R CGTCTAGGATCGAGACAAAG	
<i>aph</i> (3') -III	F GCCGATGTGGATTGCGAAAA	292
	R GCTTGATCCCCAGTAAGTCA	
<i>aadB</i>	F GAGGAGTTGGACTATGGATT	208
	R CTTTCATCGGCATAGTAAAAG	
<i>aphA</i>	F ATGGGCTCGCGATAATGTC	600
	R CTCACCGAGGCAGTTCCAT	

(2) PCR 扩增体系

PCR 扩增采用 25 μ L 体系: 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, 2 $\times$ Tap Master Mix 酶 12.5 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。

(3) PCR 反应程序

氨基糖苷类耐药基因 PCR 反应程序及参数见表 3-10。

表 3-10 氨基糖苷类耐药基因 PCR 反应程序

耐药基因	反应程序
<i>aadA</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 63°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>strA</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 63°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>aph (3') -III</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>aadB</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>aphA</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min

(4) PCR 产物检测

制备 1.5 %琼脂糖凝胶, 每孔吸取 5 μ L PCR 产物。放入电泳槽中, 调置电压 120 V, 进行 25 min 电泳, 随后利用凝胶电泳成像仪拍照留存, 观察并记录试验结果。

3.2.5.4 四环素类耐药基因检测

(1) 引物设计与合成

根据文献^[82]设计四环素类 (*tetM*、*tetA*、*tetB*、*tetC*) 耐药基因的引物, 并委托上海生工生物(成都)有限公司合成, 引物序列见表 3-11。

表 3-11 四环素类耐药基因引物信息

基因名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp
<i>tetA</i>	F ATGGTTAATAAACTTTTCAG	1 263
	R TTAATTATTTTCTTCATAATC	
<i>tetB</i>	F ATGAAGAAAATAATTAATATAGG	1 959
	R TTAATCTCTAATTGCGTTT	
<i>tetC</i>	F CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	418
	R ATGGTCGTCATCTACCTGCC	
<i>tetM</i>	F GAACTCGAACAAGAGGAAAGC	740
	R ATGGAAGCCCAGAAAGGAT	

(2) PCR 扩增体系

PCR 扩增采用 25 μ L 体系: 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, 2 $\times$ Tap Master Mix 酶 12.5 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。

(3) PCR 反应程序

四环素类耐药基因 PCR 反应程序及参数见表 3-12。

表 3-12 四环素类耐药基因 PCR 反应程序

耐药基因	反应程序
<i>tetA</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 47°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>tetB</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 47°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>tetC</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>tetM</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min

(4) PCR 产物检测

制备 1.5 % 琼脂糖凝胶, 每孔吸取 5 μ L PCR 产物。放入电泳槽中, 调置电压 120 V, 进行 25 min 电泳, 随后利用凝胶电泳成像仪拍照留存, 观察并记录试验结果。

3.2.5.5 氯霉素类耐药基因检测

(1) 引物设计与合成

根据文献^[83]设计氯霉素类 (*CatI*、*Flor*、*cmlA*) 耐药基因的引物, 并委托上海生工生物 (成都) 有限公司合成, 引物序列见表 3-13。

表 3-13 氯霉素类耐药基因引物信息

基因名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp
<i>CatI</i>	F AACCAGACCGTTCAGCTGGAT	550
	R CCTGCCACTCATCGCAGTAC	
<i>Flor</i>	F AACCCGCCCTCTGGATCAAGTCAA	590
	R GCACCAGCCCCAACGAAACCAGTA	
<i>cmlA</i>	F TGCCAGCAGTGCCGTTTAT	900
	R CACCGCCCAAGCAGAAGTA	

(2) PCR 扩增体系

PCR 扩增采用 25 μ L 体系: 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, 2 $\times$ Tap Master Mix 酶 12.5 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。

(3) PCR 反应程序

氯霉素类耐药基因 PCR 反应程序及参数见表 3-14。

表 3-14 氯霉素类耐药基因 PCR 反应程序

耐药基因	反应程序
<i>CatI</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>Flor</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>cmlA</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min

(4) PCR 产物检测

制备 1.5 % 琼脂糖凝胶, 每孔吸取 5 μ L PCR 产物。放入电泳槽中, 调置电压 120 V, 进行 25 min 电泳, 随后利用凝胶电泳成像仪拍照留存, 观察并记录试验结果。

3.2.5.6 多肽类耐药基因检测

(1) 引物设计与合成

根据文献^[84]设计多肽类 (*mcr-1*、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4*、*mcr-5*) 耐药基因的引物, 并委托上海生工生物 (成都) 有限公司合成, 引物序列见表 3-15。

表 3-15 多肽类耐药基因引物信息

基因名称		引物序列 (5'→3')	片段大小/bp
<i>mcr-1</i>	F	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	320
	R	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	
<i>mcr-2</i>	F	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	715
	R	TCTAGCCCGACAAGCATAACC	
<i>mcr-3</i>	F	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	929
	R	AATGGAGATCCCCGTTTTT	
<i>mcr-4</i>	F	TCACTTTCATCACTGCGTTG	1 116
	R	TTGGTCCATGACTACCAATG	
<i>mcr-5</i>	F	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1 644
	R	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	

(2) PCR 扩增体系

PCR 扩增采用 25 μ L 体系: 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, 2 $\times$ Tap Master Mix 酶 12.5 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。

(3) PCR 反应程序

多肽类耐药基因 PCR 反应程序及参数见表 3-16。

表 3-16 多肽类耐药基因 PCR 反应程序

耐药基因	反应程序
<i>mcr-1</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>mcr-2</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>mcr-3</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>mcr-4</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>mcr-5</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min

(4) PCR 产物检测

制备 1.5 % 琼脂糖凝胶, 每孔吸取 5 μ L PCR 产物。放入电泳槽中, 调置电压 120 V, 进行 25 min 电泳, 随后利用凝胶电泳成像仪拍照留存, 观察并记录试验结果。

3.2.5.7 喹诺酮类耐药基因检测

(1) 引物设计与合成

根据文献^[85, 86]设计喹诺酮类 (*qnrA*、*qnrS*、*qnrB*、*aac (6') -Ib-cr*) 耐药基因的引物, 并委托上海生工生物 (成都) 有限公司合成, 引物序列见表 3-17。

表 3-17 喹诺酮类耐药基因引物信息

基因名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp
<i>qnrA</i>	F AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580
	R TGCCAGGCACAGATCTTGAC	
<i>qnrS</i>	F ACATAAAGACTTAAGTGATC	619
	R CAATTAGTCAGGATAAAC	
<i>qnrB</i>	F GGMATHGAAATTCGCCACTG	264
	R TTTGCYGYTCGCCAGTCGAA	
<i>aac (6') -Ib-cr</i>	F TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482
	R CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	

(2) PCR 扩增体系

PCR 扩增采用 25 μ L 体系: 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, 2 $\times$ Tap Master Mix 酶 12.5 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。

(3) PCR 反应程序

喹诺酮类耐药基因 PCR 反应程序及参数见表 3-18。

表 3-18 喹诺酮类耐药基因 PCR 反应程序

耐药基因	反应程序
<i>qnrA</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>qnrS</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>qnrB</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>aac (6') -Ib-cr</i>	94°C 5 min; 55°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min

(4) PCR 产物检测

制备 1.5 %琼脂糖凝胶, 每孔吸取 5 μ L PCR 产物。放入电泳槽中, 调置电压 120 V, 进行 25 min 电泳, 随后利用凝胶电泳成像仪拍照留存, 观察并记录试验结果。

3.2.5.8 磺胺类耐药基因检测

(1) 引物设计与合成

根据文献^[87]设计磺胺类 (*Sul1*、*Sul2*、*Sul3*) 耐药基因的引物, 并委托上海生工生物(成都)有限公司合成, 引物序列见表 3-19。

表 3-19 磺胺类耐药基因引物信息

基因名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp
<i>sul1</i>	<i>F</i> GGCCGATGAGATCAGACGTA	413
	<i>R</i> TTTGAAGGTTTCGACAGCACG	
<i>sul2</i>	<i>F</i> GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	285
	<i>R</i> GCGTTTGATACCGGCACCCGT	
<i>sul3</i>	<i>F</i> ATTGATTTGGGAGCCGCTTC	412
	<i>R</i> AAAAGAAGCCCATACCCGGA	

(2) PCR 扩增体系

PCR 扩增采用 25 μ L 体系: 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, 2 $\times$ Tap Master Mix 酶 12.5 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。

(3) PCR 反应程序

磺胺类耐药基因 PCR 反应程序及参数见表 3-20。

表 3-20 磺胺类耐药基因 PCR 反应程序

耐药基因	反应程序
<i>sul1</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>sul2</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 68°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min
<i>sul3</i>	94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min

(4) PCR 产物检测

制备 1.5 % 琼脂糖凝胶, 每孔吸取 5 μ L PCR 产物。放入电泳槽中, 调置电压 120 V, 进行 25 min 电泳, 随后利用凝胶电泳成像仪拍照留存, 观察并记录试验结果。

3.3 试验结果

3.3.1 药敏试验结果

药敏试验结果显示 (表 3-21): 耐药菌株最多的是链霉素 135 株 (93.75%, 135/144), 其次是磺胺甲恶唑 125 株 (86.81%, 125/144), 卡那霉素 117 株 (81.25%, 117/144), 红霉素 117 株 (81.25%, 117/144), 多粘菌素 B 108 株 (75%, 108/144), 庆大霉素 100 株 (69.44%, 100/144)。耐药菌株最少的 5 种抗生素药物分别是万古霉素 3 株 (2.08%, 3/144), 米诺环素 6 株 (4.17%, 4/144), 头孢噻肟 6 株 (4.17%, 4/144), 氟苯尼考 6 株 (4.17%, 4/144), 强力霉素 8 株 (5.56%, 8/144)。

表 3-21 114 株牦牛源产气荚膜梭菌耐药表型试验结果

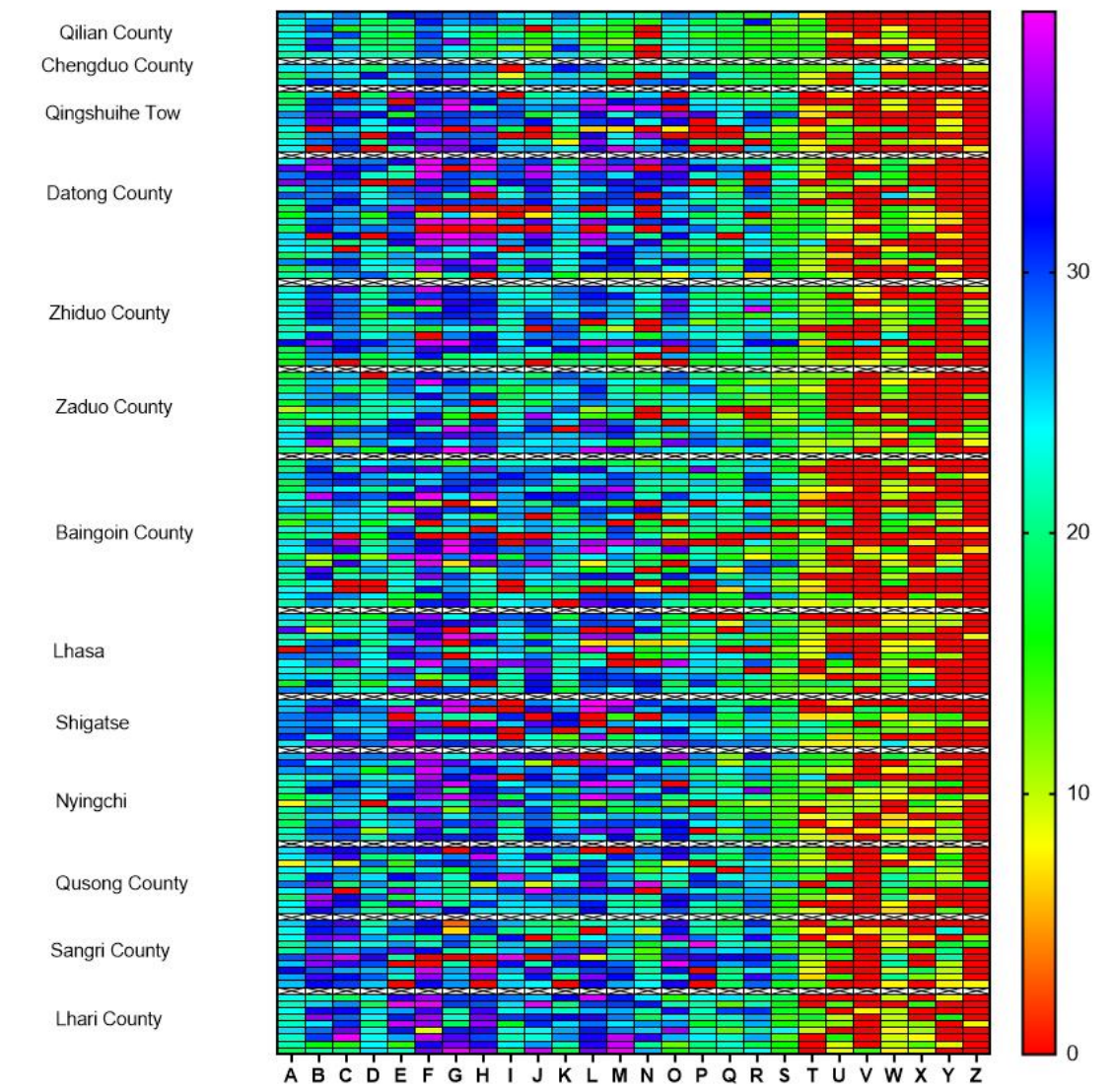
药物种类	药物名称	耐药 (R)		中介 (I)		敏感 (S)	
		菌株数/株	占比/%	菌株数/株	占比/%	菌株数/株	占比/%
β -内酰胺类抗生素	头孢噻肟	6	4.17	8	5.56	130	90.28
	头孢唑林	13	9.03	3	2.08	128	88.89
	氨苄西林	16	11.11	2	1.38	126	87.5
	头孢呋辛	16	11.11	6	4.17	122	84.72
	头孢他啶	16	11.11	7	4.86	121	84.03
	青霉素	17	11.81	7	4.86	120	83.33
	头孢氨苄	14	9.72	11	7.64	119	82.64
	苯唑西林	26	18.06	2	1.38	116	80.56
大环内酯类抗生素	麦迪霉素	18	12.5	33	22.92	93	64.58
	红霉素	117	81.25	14	9.72	13	9.03
氨基糖苷类抗生素	庆大霉素	100	69.44	23	15.97	21	14.58

表 3-21 (续)

药物种类	药物名称	耐药 (R)		中介 (I)		敏感 (S)	
		菌株数/株	占比/%	菌株数/株	占比/%	菌株数/株	占比/%
氨基糖苷类抗生素	卡那霉素	117	81.25	22	15.28	5	3.47
	链霉素	135	93.75	5	3.47	4	2.78
	米诺环素	6	4.17	3	2.08	135	93.75
四环素类抗生素	多西环素	8	5.56	4	2.78	132	91.67
	四环素	19	13.19	17	11.81	108	75
林可酰胺类抗生素	克林霉素	21	14.58	32	22.22	91	63.19
氯霉素抗生素	氯霉素	18	12.5	4	2.78	122	84.72
	氟苯尼考	6	4.17	18	12.5	120	83.33
	万古霉素	3	2.08	1	0.69	140	97.22
多肽抗生素	杆菌肽	39	27.08	64	44.44	41	28.47
	多粘菌素 B	108	75	21	14.58	15	10.42
喹诺酮类抗生素	环丙沙星	19	13.19	32	22.22	93	64.58
	氧氟沙星	10	6.94	3	2.08	131	90.97
硝基呋喃抗生素	呋喃唑酮	30	20.83	63	43.75	51	35.42
磺胺类抗生素	磺胺甲恶唑	125	86.81	14	9.72	5	3.47

3.3.2 耐药热图

基于牦牛源产气荚膜梭菌耐药热图 (图 3-1) 可以直观地看到不同地区的牦牛源产气荚膜梭菌对抗生素耐药性的相似性和差异性。



注：左纵轴表示不同区域，横轴表示抗生素（A-Z）。彩色比例尺表示 0 至 40 mm 之间的抑制范围。
A：万古霉素；B：米诺环素；C：强力霉素；D：氧氟沙星；E：头孢噻肟；F：头孢唑林；G：氨苄西林；
H：头孢呋辛；I：氯霉素；J：头孢他啶；K：氟苯尼考；L：青霉素；M：头孢氨苄；N：苯唑西林；O：
四环素；P：环丙沙星；Q：米地霉素；R：克林霉素；S：呋喃唑酮；T：杆菌肽；U：庆大霉素；V：多粘
菌素 B；W：红霉素；X：卡那霉素；Y：磺胺甲恶唑；Z：链霉素

图 3-1 144 株牦牛源产气荚膜梭菌耐药性热图

3.3.3 多重耐药性结果

（1）多重耐药菌数量

本次药敏试验所使用的抗生素药物分为 10 类，没有只对一类抗生素耐药的菌株，也没有对十类抗生素都耐药的菌株，其中 98.61% 的分离菌为多重耐药菌株（对三类及三类以上抗生素具有耐药性）（表 3-22）。

表 3-22 牦牛源产气荚膜梭菌多重耐药的分布

抗微生物等级数量	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
多重耐药菌株数量	0	2	26	43	36	20	11	4	2	0
多重耐药率	98.61% (142/144)									

注：抗微生物等级的数量 ≥ 3 株是多重耐药菌株

(2) 多重耐药药物种数

本次所有分离株均对 3 至 16 种抗生素耐药，最少对 3 种药物耐药，最多可对 16 种药物耐药，没有分离株对本研究所用的 26 种抗生素都耐药。其中对 5~7 种药物耐药的菌株超过一半，共 77 株（53.47%，77/144）（图 3-2），对 7 种抗生素耐药菌株数量最多有 30 株（20.83%，30/144），主要表现为耐杆菌肽、庆大霉素、多粘菌素 B、红霉素、卡那霉素、磺胺甲恶唑、链霉素；对 14 种、15 种、16 种抗生素耐药菌株数量最少，各 1 株（0.69%，1/144）。

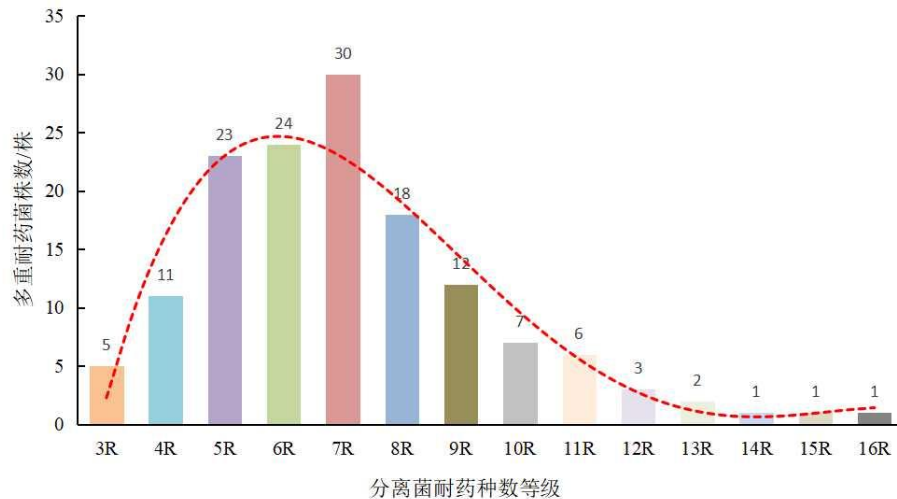


图 3-2 牦牛源产气荚膜梭菌耐药种数

(3) 耐药谱

牦牛源产气荚膜梭菌耐药谱见附表 2。其中四重耐药菌株最多有 42 株（29.17%，42/144），其次为五重耐药菌株 37 株（25.69%，37/144），三重耐药菌株 25 株（17.36%，25/144），六重耐药菌株 21 株（15.28%，22/144），七重耐药菌株 10 株（6.94%，10/144），八重耐药菌株 4 株（2.78%，4/144），九重和两重耐药菌株各 2 株（1.39%，2/144）。没有只对一类抗生素耐药的菌株，也没有对十类抗生素都耐药的菌株。最多的耐药模式为 MAC-AGA-POL-SAs，有 24 株（16.67%，24/144）。

3.3.4 牦牛源产气荚膜梭菌耐药基因检测结果

采用 PCR 方法对分离的产气荚膜梭菌进行 33 种耐药基因检测结果显示（图

3-3)：分离菌株携带 14 种耐药基因，检测出率为 42.43% (14/33)，耐药基因 *erm* (B) 检测出率最高，检出率 74.31%；耐药基因 *erm* (B)、*mcr-2*、*sul2* 的检出率在 50%以上；耐药基因 *erm* (X)、*sul1* 的检出率 30%~50%；耐药基因 *blaSHV*、*blaTEM*、*aph* (3') -III-F、*tetA*、*tetB*、*tetM*、*Flor*、*qnrS*、*aac* (6') -Ib-cr 的检出率 15%以下；其余 19 种耐药基因未检出。

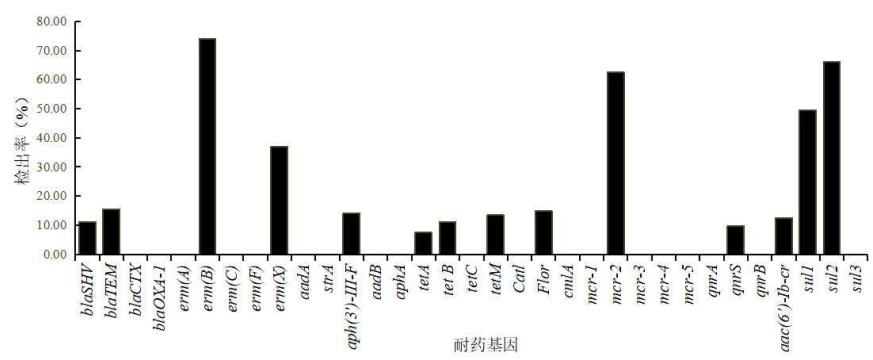


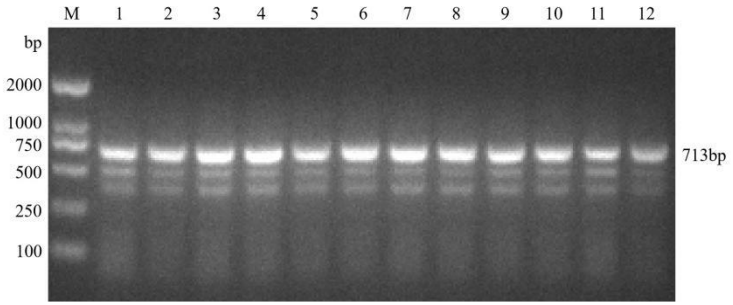
图 3-3 牦牛源产气荚膜梭菌各耐药基因的检出率

(1) β-内酰胺类耐药基因检测结果

经检测（表 3-23）144 株牦牛源产气荚膜梭菌中β-内酰胺类耐药基因检测出有 *blaSHV* 和 *blaTEM* 基因。*blaSHV* 基因检出有 16 株，占比 11.11% (16/144)；*blaTEM* 基因检出有 22 株，占比 15.28% (22/144)；未检出 *blaCTX* 和 *blaOXA-1* 基因。部分菌株 *blaSHV* 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-4，部分菌株 *blaTEM* 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-5。

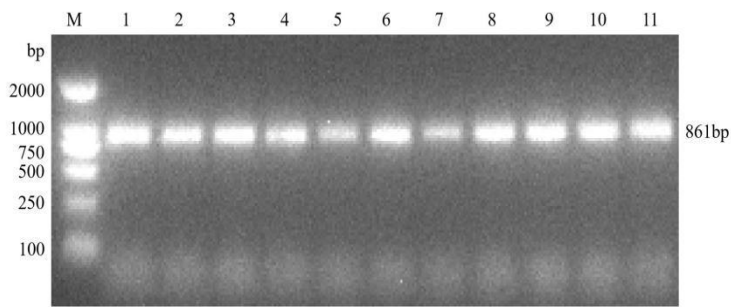
表 3-23 β-内酰胺类耐药基因检测结果

耐药基因	检出数/株	检出率/%	耐药基因	检出数/株	检出率/%
<i>blaSHV</i>	16	11.11	<i>blaTEM</i>	22	15.28
<i>blaCTX</i>	0	0	<i>blaOXA-1</i>	0	0



M: DL2000 DNA Marker; 1~12: 分离菌株

图 3-4 部分菌株 *blaSHV* 基因 PCR 产物凝胶电泳图



M: DL2000 DNA Marker; 1~11: 分离菌株

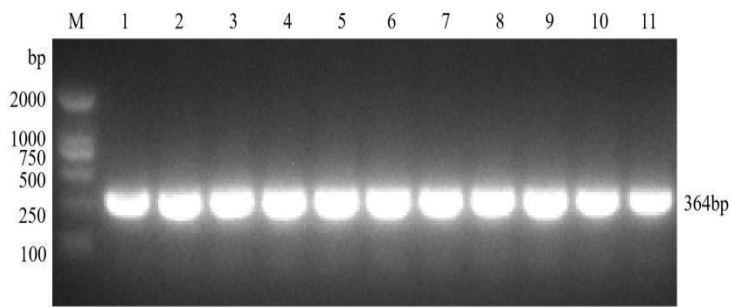
图 3-5 部分菌株 *blaTEM* 基因 PCR 产物凝胶电泳图

(2) 大环类脂类耐药基因检测结果

经检测（表 3-24）144 株牦牛源产气荚膜梭菌中大环类脂类耐药基因检测出有 *erm* (B) 和 *erm* (X) 基因。*erm* (B) 基因检出有 107 株，占比 74.31% (107/144)；*erm* (X) 基因检出有 53 株，占比 36.81% (53/144)；未检出 *erm* (A)、*erm* (C) 和 *erm* (F) 基因。部分菌株 *erm* (B) 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-6，部分菌株 *erm* (X) 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-7。

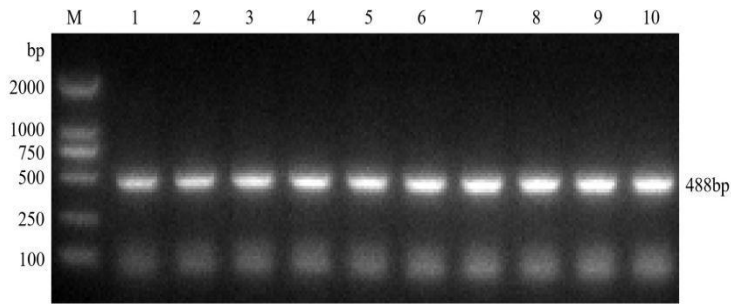
表 3-24 大环类脂类耐药基因检测结果

耐药基因	检出数/株	检出率/%	耐药基因	检出数/株	检出率/%
<i>erm</i> (A)	0	0	<i>erm</i> (B)	107	74.31
<i>erm</i> (C)	0	0	<i>erm</i> (F)	0	0
<i>erm</i> (X)	53	36.81	\	\	\



M: DL2000 DNA Marker; 1~11: 分离菌株

图 3-6 部分菌株 *erm* (B) 基因 PCR 产物凝胶电泳图



M: DL2000 DNA Marker; 1~10: 分离菌株

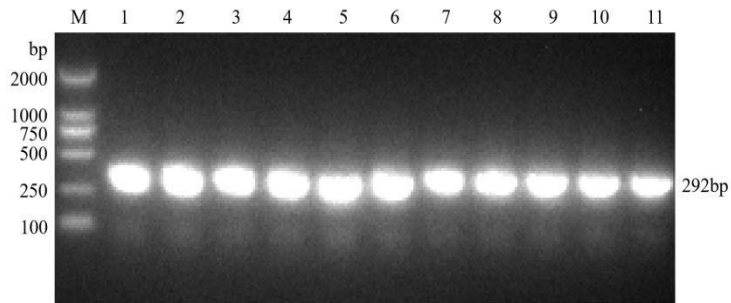
图 3-7 部分菌株 *erm* (*X*) 基因 PCR 产物凝胶电泳图

(3) 氨基糖苷类耐药基因检测结果

经检测（表 3-25）144 株牦牛源产气荚膜梭菌中氨基糖苷类耐药基因检测出有 *aph* (*3'*)-*III-F* 基因。*aph* (*3'*)-*III-F* 基因检出有 16 株，占比 11.11% (16/144)；未检出 *aadA*、*strA*、*aadB* 和 *aphA* 基因。部分菌株 *aph* (*3'*)-*III-F* 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-8。

表 3-25 氨基糖苷类耐药基因检测结果

耐药基因	检出数/株	检出率/%	耐药基因	检出数/株	检出率/%
<i>aadA</i>	0	0	<i>strA</i>	0	0
<i>aph</i> (<i>3'</i>)- <i>III-F</i>	20	13.89	<i>aadB</i>	0	0
<i>aphA</i>	0	0	\	\	\



M: DL2000 DNA Marker; 1~11: 分离菌株

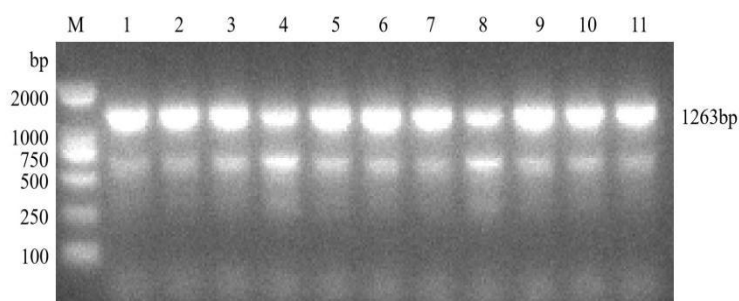
图 3-8 部分菌株 *aph* (*3'*)-*III-F* 基因 PCR 产物凝胶电泳图

(4) 四环素类耐药基因检测结果

经检测（表 3-26）144 株牦牛源产气荚膜梭菌中四环素类耐药基因检测出有 *tetA*、*tet B* 和 *tetM* 基因。*tetA* 基因检出有 11 株，占比 7.64% (11/144)；*tet B* 基因检出有 16 株，占比 11.11% (16/144)；*tetM* 基因检出有 19 株，占比 13.19% (19/144)；未检出 *tetC* 基因。部分菌株 *tetA* 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-9，部分菌株 *tet B* 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-10，部分菌株 *tetM* 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-11。

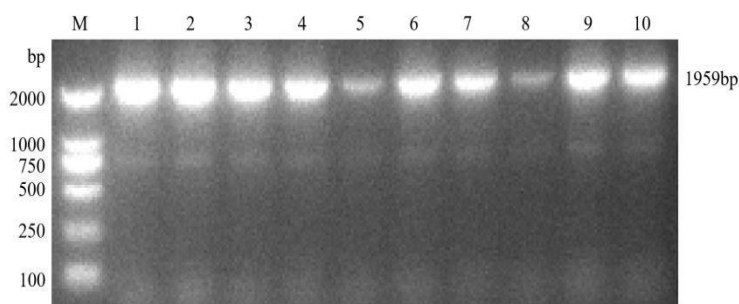
表 3-26 四环素类耐药基因检测结果

耐药基因	检出数/株	检出率/%	耐药基因	检出数/株	检出率/%
<i>tetA</i>	11	7.64	<i>tetB</i>	16	11.11
<i>tetC</i>	0	0	<i>tetM</i>	19	13.19



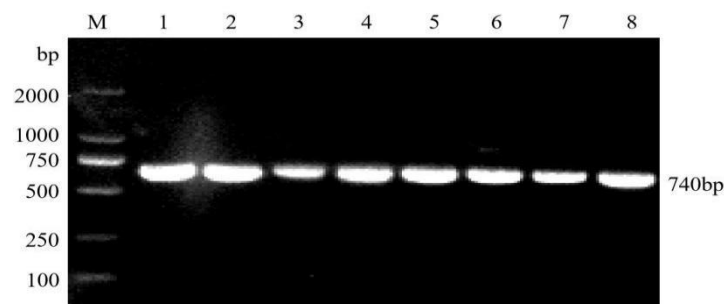
M: DL2000 DNA Marker; 1~11: 分离菌株

图 3-9 部分菌株 *tetA* 基因 PCR 产物凝胶电泳图



M: DL2000 DNA Marker; 1~10: 分离菌株

图 3-10 部分菌株 *tetB* 基因 PCR 产物凝胶电泳图



M: DL2000 DNA Marker; 1~8: 分离菌株

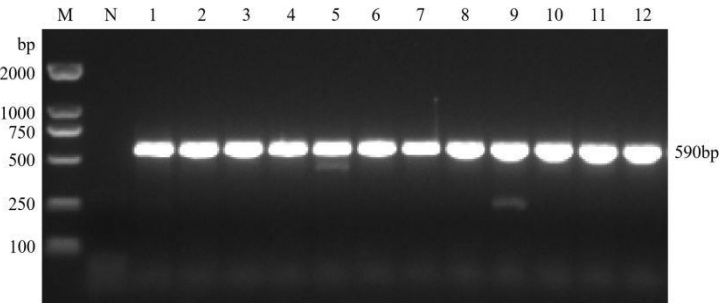
图 3-11 部分菌株 *tetM* 基因 PCR 产物凝胶电泳图

(5) 氯霉素类耐药基因检测结果

经检测（表 3-27）144 株牦牛源产气荚膜梭菌中氯霉素类耐药基因检测出有 *Flor* 基因。*Flor* 基因检出有 21 株，占比 14.58%（21/144）；未检出 *CatI* 和 *cmlA* 基因。部分菌株 *Flor* 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-12。

表 3-27 氯霉素类耐药基因检测结果

耐药基因	检出数/株	检出率/%	耐药基因	检出数/株	检出率/%
<i>CatI</i>	0	0	<i>Flor</i>	21	14.58
<i>cmlA</i>	0	0	\	\	\



M: DL2000 DNA Marker; N: 阴性对照; 1~12: 分离菌株

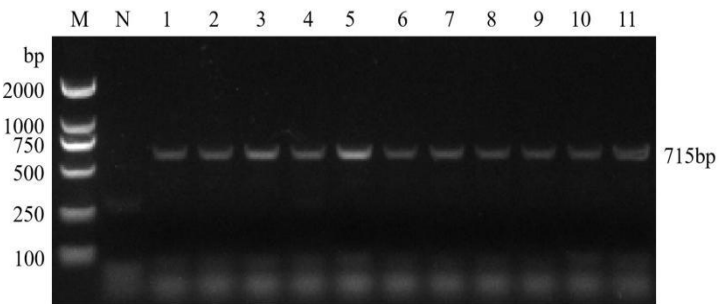
图 3-12 部分菌株 *Flor* 基因 PCR 产物凝胶电泳图

(6) 多肽类耐药基因检测结果

经检测（表 3-28）144 株牦牛源产气荚膜梭菌中多肽类耐药基因检测出有 *mcr-2* 基因。*mcr-2* 基因检出有 90 株，占比 62.50%（90/144）；未检出 *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-4* 和 *mcr-5* 基因。部分菌株 *mcr-2* 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-13。

表 3-28 多肽类耐药基因检测结果

耐药基因	检出数/株	检出率/%	耐药基因	检出数/株	检出率/%
<i>mcr-1</i>	0	0	<i>mcr-2</i>	90	62.50
<i>mcr-3</i>	0	0	<i>mcr-4</i>	0	0
<i>mcr-5</i>	0	0	\	\	\



M: DL2000 DNA Marker; N: 阴性对照; 1~11: 分离菌株

图 3-13 部分菌株 *mcr-2* 基因 PCR 产物凝胶电泳图

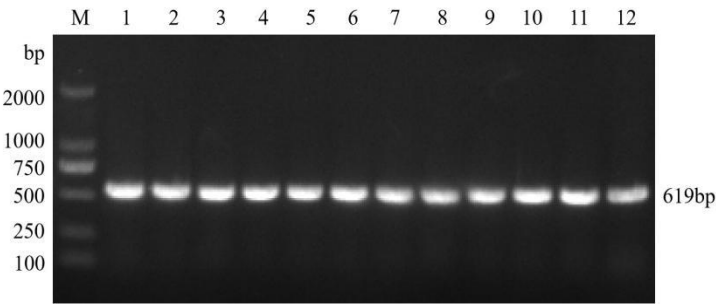
(7) 喹诺酮类耐药基因检测结果

经检测（表 3-29）144 株牦牛源产气荚膜梭菌中喹诺酮类耐药基因检测出有 *qnrS* 和 *aac (6')-Ib-cr* 基因。*qnrS* 基因检出有 14 株，占比 9.72%（14/144）；*aac (6')-Ib-cr* 基因检出有 18 株，占比 12.50%（18/144）；未检出 *qnrA* 和 *qnrB* 基因。部分菌株 *qnrS* 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-14，部分菌株 *aac (6')*

-Ib-cr 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-15。

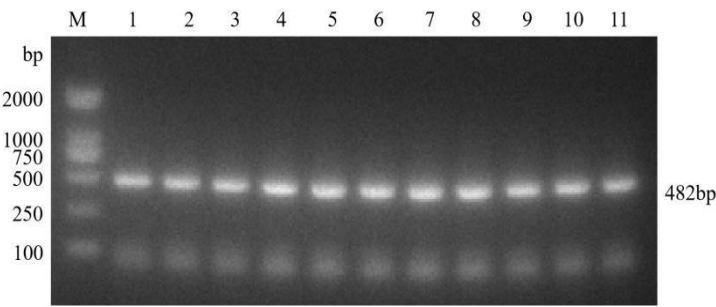
表 3-29 喹诺酮类耐药基因检测结果

耐药基因	检出数/株	检出率/%	耐药基因	检出数/株	检出率/%
<i>qnrA</i>	0	0	<i>qnrS</i>	14	9.72
<i>qnrB</i>	0	0	<i>aac (6') -Ib-cr</i>	18	12.50



M: DL2000 DNA Marker; 1~12: 分离菌株

图 3-14 部分菌株 *qnrS* 基因 PCR 产物凝胶电泳图



M: DL2000 DNA Marker; 1~11: 分离菌株

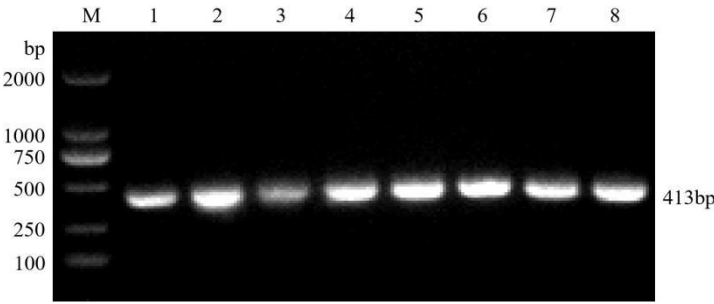
图 3-15 部分菌株 *aac (6') -Ib-cr* 基因 PCR 产物凝胶电泳图

(8) 磺胺类耐药基因检测结果

经检测(表 3-30)144 株牦牛源产气荚膜梭菌中磺胺类耐药基因检测出有 *sul1* 和 *sul2* 基因。*sul1* 基因检出有 71 株，占比 49.31% (71/144)；*sul2* 基因检出有 95 株，占比 65.97% (295/144)；未检出 *sul3* 基因。部分菌株 *sul1* 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-16，部分菌株 *sul2* 基因 PCR 产物凝胶电泳图见图 3-17。

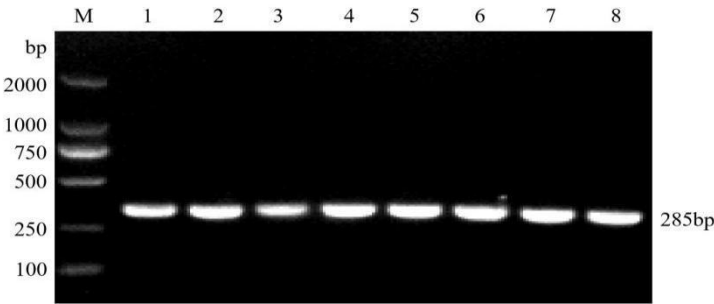
表 3-30 磺胺类耐药基因检测结果

耐药基因	检出数/株	检出率/%	耐药基因	检出数/株	检出率/%
<i>sul1</i>	71	49.31	<i>sul2</i>	95	65.97
<i>sul3</i>	0	0	\	\	\



M: DL2000 DNA Marker; 1~8: 分离菌株

图 3-16 部分菌株 *sul1* 基因 PCR 产物凝胶电泳图



M: DL2000 DNA Marker; 1~8: 分离菌株

图 3-17 部分菌株 *sul2* 基因 PCR 产物凝胶电泳图

3.4 讨论

药敏试验表明，从牦牛粪便中分离的 144 株产气荚膜梭菌对 26 种抗生素具有广泛的耐药性。分离菌具有严重耐药性的抗生素有链霉素（93.75%）、磺胺甲恶唑（86.81%）、卡那霉素（81.25%）、红霉素（81.25%）、多粘菌素 B（75%）、庆大霉素（69.44%）等；相对敏感的 5 种抗生素药物分别是万古霉素、米诺环素、头孢噻肟、氟苯尼考、强力霉素。本次所有分离株均对 3 至 16 种抗生素耐药，最少对 3 种药物耐药，最多可对 16 种药物耐药，没有分离株对本研究所用的 26 种抗生素都耐药。其中对 5~7 种药物耐药的菌株超过一半，共 77 株，占 53.47%。

本研究中没有只对一类抗生素耐药的菌株，也没有对十类抗生素都耐药的菌株。对三类及三类以上抗生素耐药的多重耐药菌株占 98.61%，最高可对 9 类抗生素耐药，其中具有四重（29.17%）、五重（25.69%）、六重（14.58%）耐药性的菌株总数约占 70%。最多的耐药模式为 MAC-AGA-POL-SAs 有 24 株（16.67%）。另外，分离菌均对氨基糖苷类抗生素和磺胺类抗生素的具有较强的耐药性，例如：链霉素、磺胺甲恶唑等。在对大环内酯类抗生素和多肽类抗生素的药敏试验中耐药率差异性却较大，对常用的红霉素、多粘菌素 B 表现出较高耐药率，对不常用的麦迪霉素、杆菌肽、万古霉素表现出了比较低的耐药率。动物来源的产气荚膜梭菌对大环内酯类药物的耐药性已得到充分证明^[88]，不同大环内酯类药物耐药

率的差异一般是由于不同的耐药机制所致。早期研究表明,梭状芽孢杆菌可以携带四环素抗性基因,编码保护细胞质蛋白的核糖体^[89];杆菌肽在产气荚膜梭菌预防中能降低发病率和死亡率,并对坏死性肠炎的治疗具有良好的作用^[90];β-内酰胺类抗生素药物依然是已被证明对产气荚膜梭菌非常有效药物^[91]。值得注意的是,分离菌对β-内酰胺类抗生素、四环素类抗生素、氯霉素类抗生素、喹诺酮类抗生素和硝基呋喃类抗生素同样都表现出敏感性。总之,人类和兽医过度使用或误用抗生素,这可能是抗生素多重耐药性增加的一个主要因素^[92]。鉴于此,我们应考虑对来自牦牛的产气荚膜梭菌的抗菌敏感性进行持续监测,以便减少和确定耐药性的趋势,以进行有效的预防和治疗相关疾病。

基因耐药为主要的耐药因素,引起基因耐药的因素主要包含质粒、转座子和整合子等移动基因原件介导。通过对牦牛源产气荚膜梭菌耐药基因的检测,在33种耐药基因中共检出14种耐药基因,比例最高的三种耐药基因依次是 *erm* (B)、*sul2*、*mcr-2*, 其中 *erm* (B) 检出率 74.31%。表明青藏高原地区分离的产气荚膜梭菌携带多种耐药基因。最后,由于目前对牦牛源产气荚膜梭菌及其耐药性相关研究较少,本文中未能做出对比分析,但根据本研究结果提示青藏高原地区牦牛源产气荚膜菌具有多样性和多重耐药性,在今后的生产中要加强预防、遵循正确的用药指导,避免耐药现象更加严重。

第四章 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株生物学特性研究

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*, Cp), 又称魏氏梭菌 (*C.welchii*), 是一种革兰氏阳性、短杆状、产芽孢的兼性厌氧菌^[2], 广泛存在于泥土、污水、腐殖质、饲草、排泄物等自然环境中以及人畜肠道中^[3, 5], 是人和动物的肠道正常菌群成员。产气荚膜梭菌所产生的毒素是其致病的主要原因, 目前, 已发现产气荚膜梭菌产生的外毒素有 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 η 、 θ 、 ι 、 κ 、 λ 、 μ 和 ν 等 20 余种细胞毒素, 通常可引起人和动物气性坏疽 (gas gangrene)、食物中毒、羔羊痢疾 (lamb dysentery)、绵羊猝狙 (struck)、牛肠毒血症 (enterotoxemia in cattle) 和坏死性肠炎 (necrotizing enteritis) 等疾病。^[93]

本试验以牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株为研究对象, 通过细菌培养、生化实验和染色镜检等方法研究其生物学特性, 随后利用 PCR 技术对其进行基因分型, 最后利用振荡比浊法测定确定该菌的生长规律, 以小鼠为模型研究其毒力强弱、半数致死量和对小鼠致病性。本试验旨在为更深入的研究牦牛源产气荚膜梭菌毒素在患病动物组织的分布情况提供依据, 为科学研究牦牛产气荚膜梭菌致病机理提供重要理论依据。

4.1 试验材料

4.1.1 试验菌株和动物

2020 年 10 月中旬, 青海玉树地区出现部分牦牛腹泻现象, 相关工作人员采集新鲜牦牛腹泻粪样送至本实验室, 本实验室从中分离出多株牦牛源产气荚膜梭菌, 本文对其中一株牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株进行研究; 试验动物选取 4 周龄、SPF 级、体重 18 g~22 g 的昆明系小鼠 100 只, 从河南斯克贝斯生物科技有限公司购买。

4.1.2 主要试剂

试验主要试剂见表 4-1。

表 4-1 试验主要试剂

试剂	批号	厂家
DNA 聚合酶	N20321	北京全式金生物技术有限公司
7%羊血琼脂培养基	HB8519-1	青岛海博生物技术有限公司
梭菌增菌培养基 (RCM)	HB0316-1	青岛海博生物技术有限公司
胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养基 (TSC)	HB0253-9	青岛海博生物技术有限公司
液体硫乙醇酸盐培养基 (FTG)	HB5190-2	青岛海博生物技术有限公司
无菌脱纤维绵羊血	20200106	北京索莱宝科技有限公司
D-环丝氨酸溶液	20200818	青岛海博生物技术有限公司
革兰氏染液试剂盒	20200803	青岛海博生物技术有限公司
细菌基因组 DNA 提取试剂盒	O3831	北京天根生化科技有限公司
生化鉴定微量反应管	20200421	杭州微生物试剂有限公司

4.1.3 主要仪器

试验主要仪器见表 4-2。

表 4-2 试验主要仪器

试验仪器	型号	厂家
PCR 仪	Veriti96	德国 Eppendorf 公司
核酸蛋白检测仪	NanoDrop2000	赛默飞世尔科技（中国）有限公司
冷冻离心机	5430R	德国 Eppendorf 公司
台式智能精密摇床	BSD-TX270	上海博迅医疗生物仪器股份有限公司
气浴恒温振荡器	THZ-98A	上海博迅医疗生物仪器股份有限公司
电泳仪	DYY-6C	北京八一仪器
核酸照胶系统	Tanon2500BR	上海天能科技有限公司

4.2 试验方法

4.2.1 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株培养特性研究

将冻存的 Qinghai-1 菌株缓慢梯度升至室温（-80℃→-20℃→4℃→室温），依次划线接种于羊血琼脂培养基、TSC 培养基、MACC 培养基，41℃厌氧培养 18~24 h。挑单菌落接种于 FTG、含铁牛乳培养基、RCM，石蜡油液封，41℃培养 12 h。革兰氏染色后，利用显微镜对细菌进行镜检。

4.2.2 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株生化特性研究

参考伯杰细菌鉴定手册^[94]，将对数生长期的菌液分别接种于硫化氢、吲哚、

乳糖、鼠李糖、淀粉、木糖、纤维二糖、棉子糖、葡萄糖、麦芽糖、水杨苷、甘露醇、山梨醇、尿素、蔗糖、酪蛋白、脂酶、赖氨酸、鸟氨酸、硝酸盐、明胶、阿拉伯糖、卵磷脂酶、甘露糖 24 种细菌生化鉴定管对 Qinghai-1 菌株进行生化特性研究。

4.2.3 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株 DNA 提取

当 4.2.1 中 RCM 培养液 $D_{600\text{ nm}}=0.6\sim0.8$ 时, 按照细菌 DNA 提取试剂盒操作说明制备 Qinghai-1 菌株 DNA 模板, 并利用核酸蛋白检测仪检测 Qinghai-1 菌株基因组的纯度、浓度。 -20°C 冻存备用。

4.2.4 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株基因分型

(1) 毒素型

利用产气荚膜梭菌毒素分型基因引物 (表 2-3) 确定牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株毒素型。

(2) ST 型

根据在线网站 pubMLST (<https://pubmlst.org/>) 提供的产气荚膜梭菌多位点分型基因 (*plc*、*colA*、*groEL*、*gyrB*、*sigK*、*pgK*、*sodA*、*nadA*) 利用软件 primer premier5.0 设计对应的多位点分型基因引物 (表 4-3), 随后将 MLST 基因测序结果上传至在线网站 PubMLST 的产气荚膜梭菌数据库 (<https://pubmlst.org/organisms/clostridium-perfringens>), 获得每个管家基因位点的等位基因编号, 基于等位基因编号按照指定的顺序排列出独特的等位基因谱^[95], 最后确定该株牦牛源产气荚膜梭菌的 ST 型并给予序列号。

表 4-3 产气荚膜梭菌 MLST 基因引物

引物名称		引物序列 (5'-3')	片段大小 (bp)	退火温度 (°C)
<i>plc</i>	F	ATATGAATGGCAAAGAGGAAAC	544	49
	R	AGTTTTTCCATCCTTTGTTTG		
<i>colA</i>	F	CTCCATCAAGAGCAAGAAACAAC	417	53
	R	GTCTTCCTAAAGCCTCAACAA		
<i>groEL</i>	F	AGCTACTTTAACAGGAGGCGT	517	56
	R	AACTGAACCTTCTAGTCCTGCG		
<i>gyrB</i>	F	TAGTTGATGACGGAAGAGGTATG	638	53
	R	TAAGTGAGTACCACCTTCAACAG		
<i>sigK</i>	F	AAGATGGAGATGTTGAGGCA	421	53
	R	TCCTAGGACTTAAGACATCAG		
<i>pgK</i>	F	TTGCTCACATATGGGTAAAC	564	53
	R	CTTCCTACAGTATATCCTTGAGCT		
<i>sodA</i>	F	GATGCTTTAGAGCCATCAATAG	478	49
	R	AATAATAAGCATGTTCCCAAAC		
<i>nadA</i>	F	TATTACCAGTTATGGAAGCAGGC	499	53
	R	TTTCTCAACTGATGAAGTACCC		

4.2.5 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株生长特性研究

(1) 生长曲线绘制

挑取牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株单菌落接种于 FT 培养基, 41 °C 恒温厌氧培养 12 h~16 h。随后, 按体积分数 5% 接种量吸取菌液转接至 150 mL FT 液体培养基, 振荡混匀后分装至 15 支试管中, 放入 41 °C 恒温箱中厌氧培养。每隔 2 h 取出一只试管, 吸取适量菌液, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 用等量无菌生理盐水悬浮。以无菌生理盐水做对照进行调零, 测定菌液 $D_{600\text{nm}}$ 值, 每个时间点重复 3 次取平均值, 连续监测 24 h。以培养时间为横坐标, 以菌液 $D_{600\text{nm}}$ 值为纵坐标, 绘制出牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株的生长曲线。

(2) 菌液 $D_{600\text{nm}}$ 值与菌落 CFU 的相关性分析

选取对数期生长菌株, 按照 4.2.4 (1) 所述方法用无菌生理盐水将菌体重悬, 用平板菌落计数法测出相应 $D_{600\text{nm}}$ 值所对应的 CFU 值。使用 SPSS 19.0 软件通过曲线拟合法绘制菌液 $D_{600\text{nm}}$ 值与菌落 CFU 的相关性拟合图。

(3) 菌液 $D_{600\text{nm}}$ 值与稀释倍数的相关性分析

选取对数期生长的菌株, 按照 4.2.4 (1) 所述方法用无菌生理盐水将菌体重

悬, 并做 1~10 倍稀释, 以无菌生理盐水调零, 测定相应稀释倍数所对应的 $D_{600\text{nm}}$ 值。使用 SPSS 19.0 软件通过曲线拟合法绘制菌液 $D_{600\text{nm}}$ 值与稀释倍数的相关性拟合图。

4.2.6 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株外毒素含量测定

在 4.2.4 (1) 中相同培养时间下, 另吸取适量菌液, 12 000 r/min 离心 10 min, 用 0.22 μm 细菌滤器过滤, 制得外毒素粗提取液^[96]。测定其 $D_{280\text{nm}}$ 和 $D_{260\text{nm}}$ 值, 根据公式^[97]蛋白浓度 ρ (mg/ml) = $1.45 * D_{280\text{nm}} - 0.74 * D_{260\text{nm}}$ 计算出不同培养时间点培养液的蛋白质含量 (ρ)。

4.2.7 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株 LD₅₀ 的测定

(1) 预试验—LD₀ 和 LD₁₀₀ 的确定

选取对数期后期培养液, 按照 4.2.4 (1) 所述方法用无菌生理盐水将菌体重悬, 并测量原菌液 $D_{600\text{nm}}$ 值。以 5 只小鼠为一组, 每只腹腔注射菌液 1 mL。对照组每只腹腔注射 1 mL 生理盐水。注射后密切观察小鼠 7 天内死亡情况并做好试验记录。

(2) 终试验—LD₅₀ 的计算

将 LD₀ 作为第一组攻毒剂量, LD₁₀₀ 作为最后一组攻毒剂量, 各组剂量按等比排列, 公比 $r = \sqrt[G-1]{LD_{100}/LD_0}$ (G 为组数)^[98]。选取小鼠 56 只, 将小鼠随机分成 7 组 (6 个实验组, 1 个对照组), 每组 8 只小鼠。试验组每只小鼠腹腔注射菌液 1 mL, 对照组每只小鼠腹腔注射 1 mL 无菌生理盐水。注射后密切观察小鼠 7 天内死亡情况并做好试验记录。

根据熊浩明^[99]的方法, 使用 SPSS 19.0 软件录入数据, 并按照“分析”→“回归”→“概率 P”→“确定”的步骤进行操作。在弹出的“概率分析”对话框中“响应频率 (S)”选入“死亡数”, “协变量 (C)”选入“接种菌量”, “实测值总数 (T)”选入“动物数”, “转换 (N)”栏中选择“以 10 为底的对数”, 计算牦牛源 A 型产气荚膜梭菌的 LD₅₀ 及 95% 置信区间。

4.2.8 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株动物致病性研究

(1) 攻毒菌液制备

将牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株挑取单菌落接种于灭菌厌氧肉汤中, 37℃ 厌氧培养 16~18 h。离心后, 用 PBS 替换培养液, 通过平板计数法调整菌液浓度。

(2) 试验动物分组

选用 18~22 g 的雌性昆明小鼠, 共 15 只, 将小鼠随机分为 PBS 组 (对照组)、

小剂量攻毒组（慢性死亡组）和大剂量攻毒组（急性死亡组），每组各 5 只小鼠。

(3) 攻毒程序

分好组后，对各组小鼠进行腹腔注射攻毒，注射剂量 1 mL/只，菌量分别为 0（对照组）、1×LD₅₀（慢性死亡组）、4×LD₅₀（急性死亡组）。注射接种后，放回原笼，密切观察，并连续记录小鼠 7 天内的死亡情况。

(4) 临床症状

在攻毒期间密切观察各组的采食、饮水、排便情况以及小鼠的精神状态，进行记录。

(5) 病理剖检

观察攻毒死亡小鼠的死亡状态，并进行剖检，记录其病理变化。

(6) 病理切片分析

在无菌条件下选取攻毒后急性死亡（24 h 内）小鼠和慢性死亡（72 h 后）小鼠内脏组织于 4%多聚甲醛中进行固定，经脱水、石蜡包埋、切片和 H.E 染色后^[100]，光镜下观察小鼠内脏组织病理变化，通过设置空白对照小鼠并对其病理损伤程度进行分析。

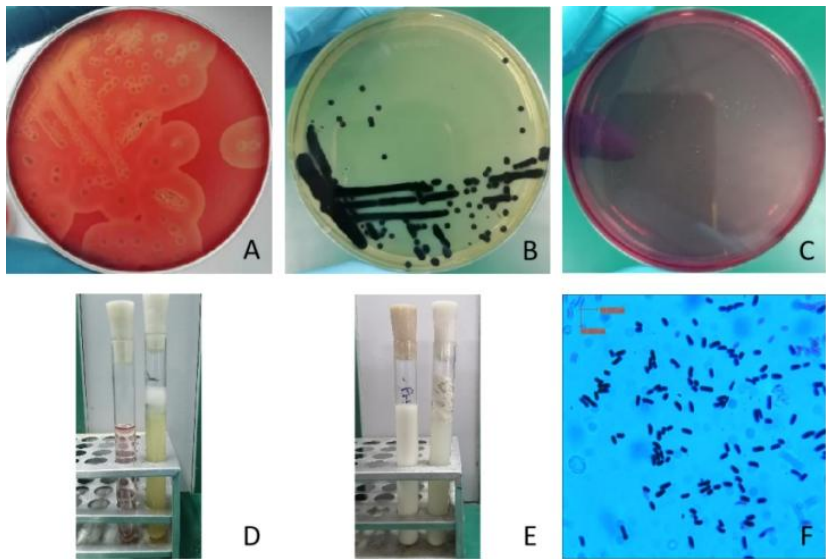
4.3 试验结果

4.3.1 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株菌落形态及生长特性

本将接种好的培养基置于 41 ℃恒温培养箱中，厌氧培养 18~24 h，观察并记录细菌及菌落在不同培养基的生长状况（表 4-4），细菌在不同培养基生长形态见图 4-1（A-E）。革兰氏染色镜检结果观察到（图 1F）：菌体大小约为（0.6~2.4）μm×（1.3~19.0）μm，其两端钝圆，呈单个或双个排列，有荚膜、无鞭毛的革兰阳性粗大直杆。

表 4-4 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株生长特性

培养基	生长形态特征
羊血琼脂培养基	直径在 2~5mm，中等大小，表面光滑，颜色灰白，透明状的圆形菌落，菌落周围有典型的双血环，内层完全溶血，外层不完全溶血
TSC 培养基	直径 2~5mm 的圆形黑色菌落，菌落周围有一圈白色的晕圈
MACC 培养基	无细菌生长
FTG 培养基	培养液由粉红色变为黄绿色，浑浊，产生大量气体，并伴有恶臭气味
含铁牛乳培养基	爆裂发酵，乳凝结物破碎形成海绵样物质，上升到培养基表面



A: 羊血琼脂培养基; B: TSC 培养基; C: MACC 培养基; D: FTG 培养基 (左: 对照组; 右: 实验组); E: 含铁牛乳培养基 (左: 对照组; 右: 实验组); F: 革兰氏染色 (1000×)

图 4-1 Qinghai-1 菌株在各培养基上生长情况

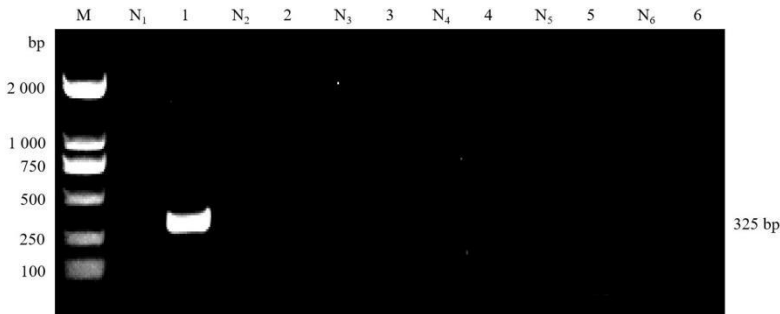
4.3.2 生化反应结果

生化试验结果显示: Qinghai-1 菌株在硫化氢、乳糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、赖氨酸、鸟氨酸、卵磷脂酶、明胶、硝酸盐、甘露糖、酪蛋白共 12 种生化鉴定管中成阳性反应, 有产酸产气或生长动力等试验现象出现。在其余 12 种生化鉴定管中成阴性反应, 生化管中无生化反应现象产生。

4.3.3 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株基因分型结果

(1) 毒素分型结果

经毒素基因引物 PCR 扩增, 其凝胶电泳结果显示仅在 325bp 处出现条带(图 4-3), 经鉴定比对得到牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株为 A 型产气荚膜梭菌。

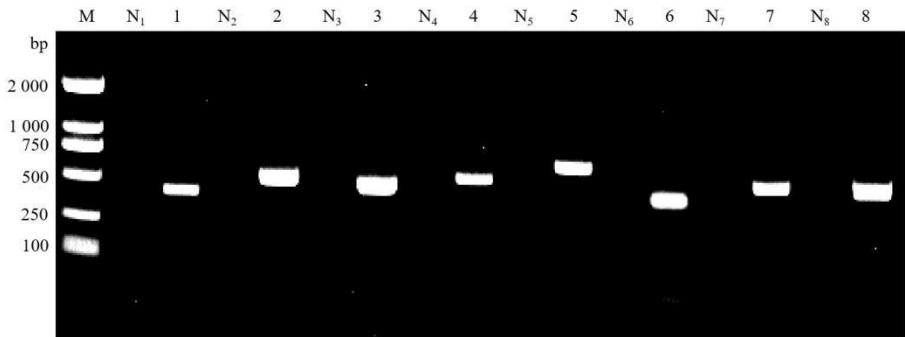


M: DL2000 DNA Marker; N: 阴性对照; 1~4: 四种常见致死性毒素 (α 、 β 、 ϵ 、 ι); 5: 肠毒素 (CPE); 6: 坏死性肠炎 B 样毒素 (NetB)

图 4-3 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株毒素基因凝胶电泳图

(2) MLST 分型结果

经产气荚膜梭菌 MLST 基因引物 PCR 扩增，其凝胶电泳结果显示八个管家基因皆在预期位置处出现较亮的条带（图 4-4），将其进行胶回收、克隆纯化后送至擎科生物公司进行测序。



M: DL2000 DNA Marker; N: 阴性对照; 1~8: 产气荚膜梭菌管家基因 (*colA*、*groEL*、*sodA*、*plc*、*gyrB*、*sigK*、*pgk*、*nadA*)

图 4-4 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株管家基因凝胶电泳图

测序结果经 PubMLST 的产气荚膜梭菌分型数据库比对得到牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株等位基因谱（表 4-5）。由于该菌株等位基因谱未匹配到 ST 型序列号，遂将其等位基因编号按照指定的顺序排列上传至产气荚膜梭菌 Manage submissions 数据库 (https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_cperfringens_seqdef&page=submit)，基于独特的等位基因谱确定该株牦牛源产气荚膜梭菌为一株新的 ST 型菌株，MLST 分型序列号为 ST-414 型。

表 4-5 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株等位基因谱

管家基因	<i>colA</i>	<i>groEL</i>	<i>sodA</i>	<i>plc</i>	<i>gyrB</i>	<i>sigK</i>	<i>pgk</i>	<i>nadA</i>
等位基因	9	96	91	44	67	55	8	16

4.3.4 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株生长特性

(1) 生长曲线

牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株生长曲线见图 5-5。菌株按 5%体积分数接种种子液至无菌 RCM 培养基后,0 h~2 h 为迟缓期,2 h~10 h 为对数期,10 h~18 h 为平稳期,18 h~24 h 为衰亡期。

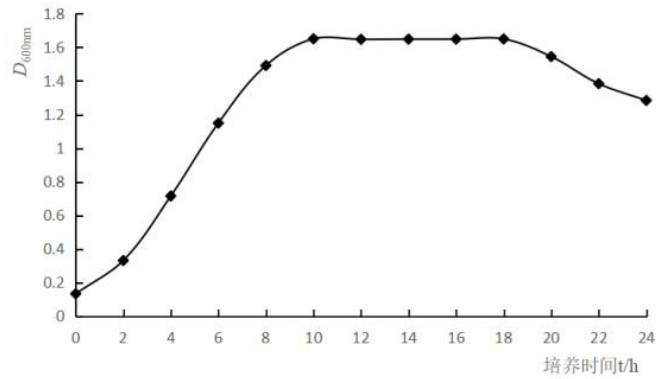


图 4-5 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株生长曲线

(2) 菌液 D_{600nm} 值与稀释倍数的关系

经 SPSS 19.0 软件分析（图 4-6），牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株菌液 D_{600nm} 值与稀释倍数的关系式为： $y=-0.607\ln(x)+1.551$ ， $R^2=0.990$ ，呈强相关性；显著性 $P<0.05$ ，为显著。

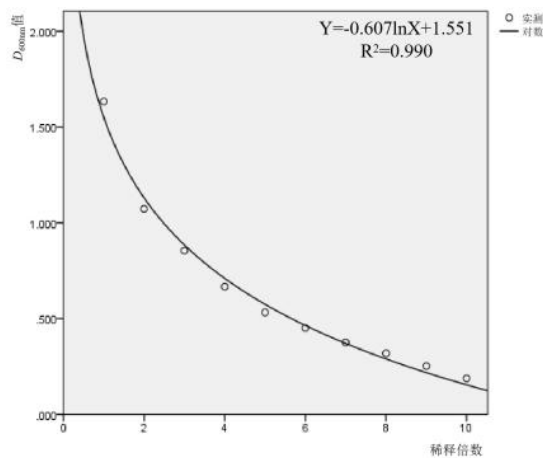


图 4-6 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株菌液 D_{600nm} 值与菌液稀释倍数的关系

(3) 菌液 D_{600nm} 值与菌落 CFU 的关系

经 SPSS 19.0 软件分析（图 4-7），牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株菌液 D_{600nm} 值与菌落 CFU ($\times 10^8$ CFU/mL) 的关系式为： $y=4.679x-4.448$ ， $R^2=0.995$ ，呈强相关性；显著性 $P<0.05$ ，为显著。

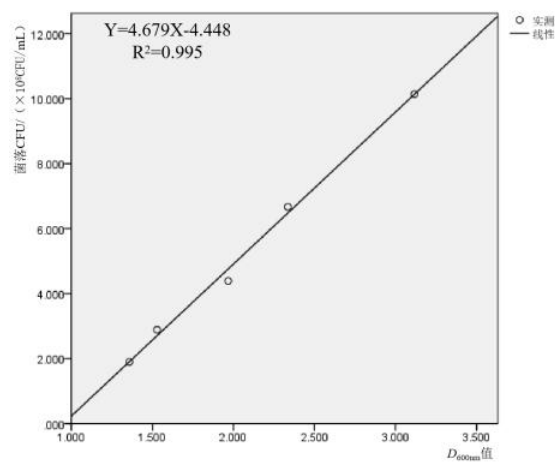


图 4-7 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株菌液 D_{600nm} 值与菌落 CFU ($\times 10^8$ CFU/mL) 的关系

4.3.5 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株外毒素含量

经测量牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株外毒素含量见表 4-6 和图 4-8。菌株在培养 12 h 后，所产毒素的蛋白质含量达 3.480 mg/mL，并随着时间的推移持续增长，且此时可确定为牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株的最佳产毒时间。

表 4-6 各时间点牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株外毒素蛋白含量

培养时间 (h)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
蛋白含量 (mg/mL)	0.245	0.315	0.4725	1.001	1.804	2.635	3.480	3.785	3.867	3.928	4.005	4.081	4.146

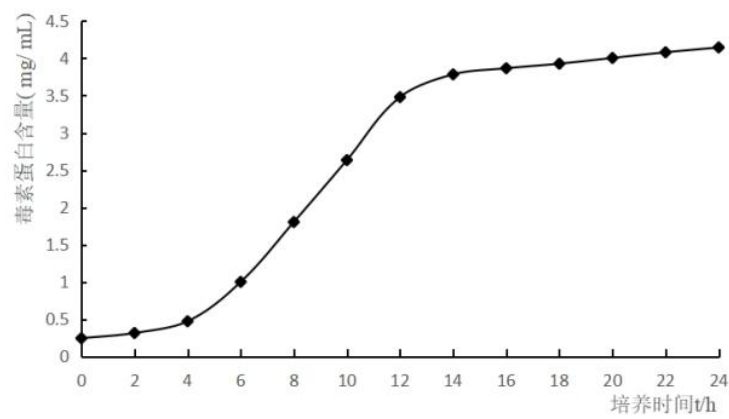


图 4-8 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株各时间点外毒素含量

4.3.6 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株 LD₅₀(1) LD₀ 和 LD₁₀₀

由预试验结果得出 (表 4-7), LD₀ 为 1.90×10^8 CFU/mL, LD₀₁₀₀ 为 1.52×10^9 CFU/mL。

表 4-7 预试验各组剂量与小鼠死亡情况

组别	组号	注射菌量 ($\times 10^8$ CFU/mL)	动物数	死亡数	死亡率
实验组	G1	0.95	5	0	0
	G2	1.90	5	0	0
	G3	3.80	5	1	25%
	G4	7.60	5	2	50%
	G5	15.20	5	5	100%
	G6	38.00	5	5	100%
	G7	76.00	5	5	100%
对照组	生理盐水	0	5	0	0

(2) LD₅₀

各组间公比 $r = \sqrt[6-1]{LD_{100}/LD_0} = 1.52$, 各组攻毒菌量依次为 1.900×10^8 CFU/mL、 2.888×10^8 CFU/mL、 4.390×10^8 CFU/mL、 6.672×10^8 CFU/mL、 10.142×10^8 CFU/mL、 15.200×10^8 CFU/mL。试验结果见表 4-8。

表 4-8 LD₅₀ 终试验

组别	组号	注射菌量 ($\times 10^8$ CFU/mL)	动物数	死亡数	死亡率
实验组	G1	1.900	8	0	0
	G2	2.888	8	1	12.5%
	G3	4.390	8	2	25.0%
	G4	6.672	8	4	50.0%
	G5	10.142	8	7	87.5%
	G6	15.200	8	8	100%
对照组	生理盐水	0	8	0	0

经 SPSS 19.0 软件分析 (表 4-9), LD₅₀ 为 5.955×10^8 CFU/mL, 95%置信区间为 4.606×10^8 CFU/mL ~ 7.817×10^8 CFU/mL。

表 4-9 SPSS 软件对 LD₅₀ 的计算结果

项目	概率	95%置信区间 (×10 ⁸ CFU/mL)		
		估算	下限	上限
LD ₅₀	0.5	5.955	4.606	7.817

4.3.7 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株对小鼠内脏组织的致病性

(1) 临床症状

细菌感染小鼠后（图 4-9）可明显观察到，小鼠食欲减退、流泪、眼睑下垂、阴道出血、精神状态不佳、逐渐出现神经症状、腹部胀大。



图 4-9 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株感染后的小鼠

(2) 剖检症状

对其进行剖检（图 4-10、图 4-11），出现全身性病理变化，各种组织器官都有不同程度的出血、病变，胸腹腔内出现红色积液。大脑淤血、脑积液增多；小肠出血；肝脏、肾脏、脾脏出血呈暗红色；心脏、肺脏、胃未见明显病变。对照组小鼠腹部未见肿胀，剖检后未见异常。对死亡小鼠病变组织进行涂片，可见有革兰氏阳性短杆菌大量存在，将其进行分离鉴定仍为产气荚膜梭菌，对照组未分离到产气荚膜梭菌。



对照组 实验组

图 4-10 攻毒后小鼠腹腔解剖图

组织	脑	肠	肝	脾	胃	肾	肺	心
对照组								
试验组								

图 4-11 攻毒后小鼠组织脏器剖检图

(3) 组织病理变化

A、小鼠脾脏组织病理变化

由小鼠脾脏组织病理切片（图 4-12）可知：对照组小鼠组织结构完整正常，红髓、白髓结构完整清晰；急性死亡小鼠组织结构完整，未见其他明显病理改变；慢性死亡小鼠白髓可见组织细胞增生，红髓见淤血。

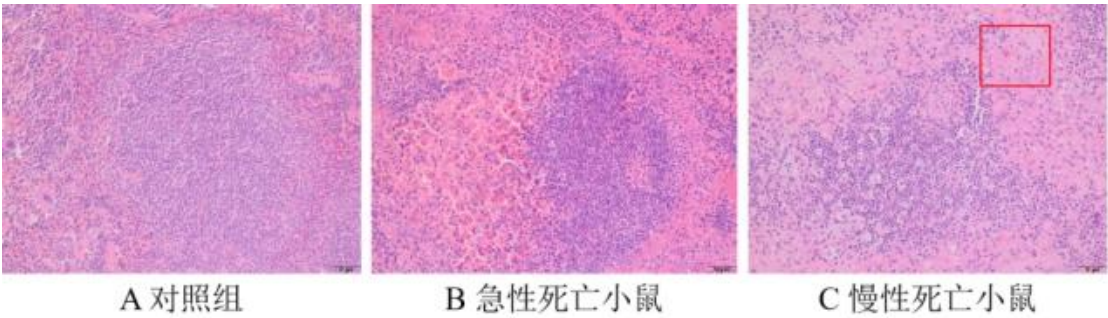


图 4-12 小鼠脾脏组织病理切片（H.E 染色，200×）

B、小鼠脑组织病理变化

由小鼠脑组织病理切片（图 4-13）可知：对照组小鼠组织结构完整正常，神经元未见变性、坏死，间质未见充血、水肿和炎细胞浸润；急性死亡小鼠组织结构完整正常，神经元未见变性、坏死，间质未见充血、水肿和炎细胞浸润；慢性死亡小鼠组织结构完整正常，神经元未见变性、坏死，间质血管见充血。

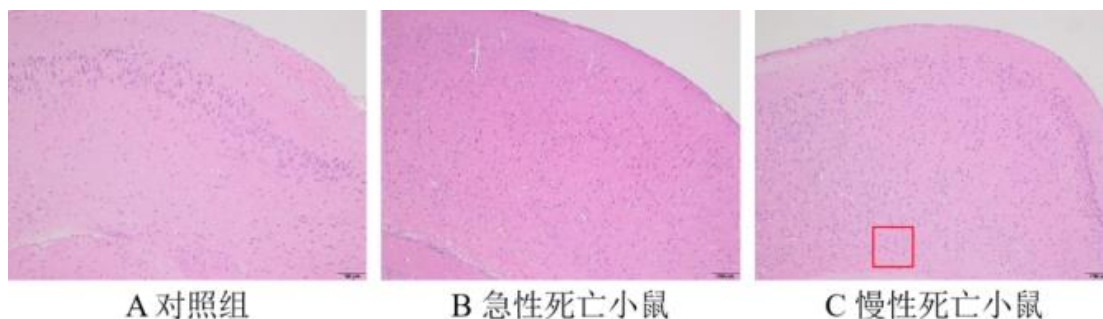


图 4-13 小鼠脑组织病理切片（H.E 染色，100×）

C、小鼠肝脏组织病理变化

由小鼠肝脏组织病理切片（图 4-14）可知：对照组小鼠组织结构完整正常，肝细胞沿中央静脉呈放射状排列，未见变性、坏死，肝窦未见扩张、淤血和炎细胞浸润；急性死亡小鼠组织结构完整，肝细胞见空泡变性，肝窦未见扩张、淤血和炎细胞浸润；慢性死亡小鼠组织结构完整，肝细胞见空泡变性，肝窦未见扩张、淤血和炎细胞浸润。

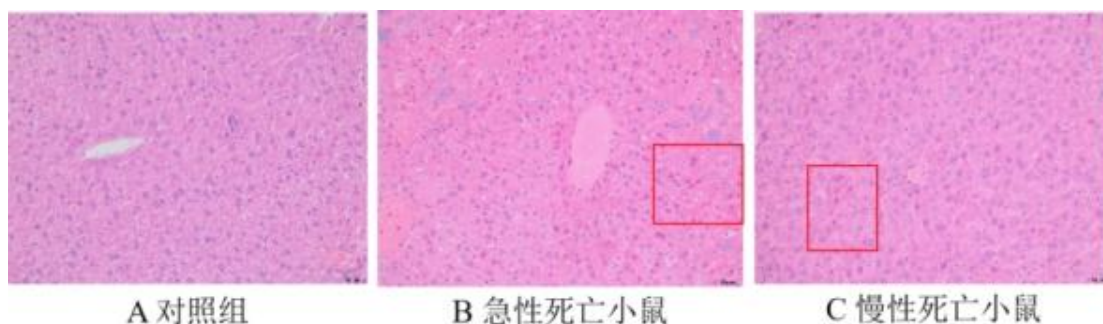


图 4-14 小鼠肝脏组织病理切片（H.E 染色，200×）

D、小鼠肾脏组织病理变化

由小鼠肾脏组织病理切片（图 4-15）可知：对照组小鼠组织结构完整正常，肾小管上皮未见变性、坏死，肾小球未见萎缩，包曼氏囊未见扩张，间质未见充血、水肿和炎细胞浸润；急性死亡小鼠组织结构完整正常，肾小管上皮未见变性、坏死，肾小球未见萎缩，包曼氏囊未见扩张，间质未见充血、水肿和炎细胞浸润；慢性死亡小鼠组织结构完整，肾小管见变性伴有透明管型，间质未见充血、水肿和炎细胞浸润。

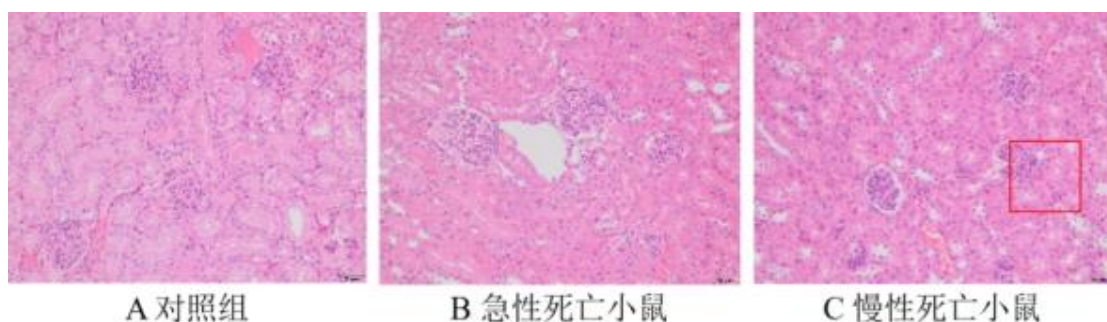


图 4-15 小鼠肾组织病理切片 (H.E 染色, 200×)

E、小鼠肠道组织病理变化

由小鼠肠道组织病理切片 (图 4-16) 可知: 对照组小鼠组织结构完整正常, 黏膜上皮未见变性、坏死, 固有层和黏膜下层未见充血、水肿和炎细胞浸润; 急性死亡小鼠组织结构完整正常, 黏膜上皮未见变性、坏死, 固有层和黏膜下层未见充血、水肿和炎细胞浸润; 慢性死亡小鼠肠组织出现自溶现象。

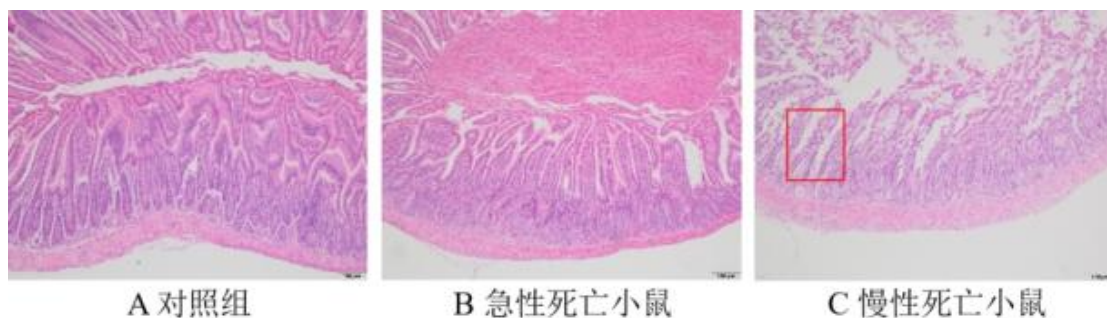
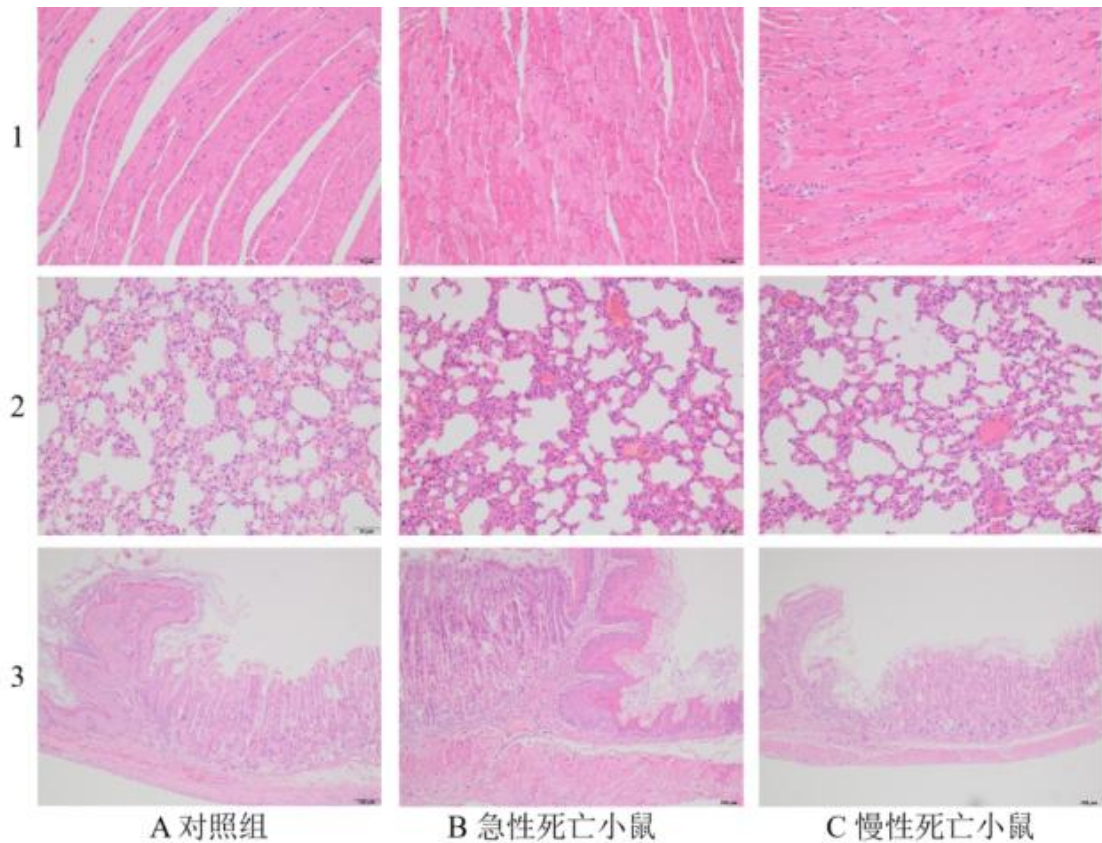


图 4-16 小鼠肠组织病理切片 (H.E 染色, 100×)

F、小鼠其他组织病理变化

由小鼠心脏、肺脏、胃组织病理切片 (图 4-17) 可知: 心脏、肺脏、胃均未出现病理变化。



1: 心脏组织 (H.E 染色, 200×); 2: 肺脏组织 (H.E 染色, 200×); 3: 胃组织 (H.E 染色, 100×)

图 4-17 小鼠心、肺、胃组织病理切片

4.4 讨论

目前, 细菌分子分型分为相似度比较 (Pairwise similarities)、种群结构分析 (Population modelling)、遗传进化关系分析 (Evolutionary modelling) 三个层次^[101]。MLST 适合用于长期的、大范围的流行病学调查和监测菌群结构变化, 研究地域性传播和流行性变迁^[102]。近年来有关产气荚膜梭菌引起牦牛感染的报道^[49, 50]时有出现, 通常认为一些动物的坏死性肠炎、下痢、气性坏疽与 A 型产气荚膜梭菌感染有关, 一些动物的肠毒血症、红痢、猝狙与 C 型产气荚膜梭菌感染有关。本试验以一株从青海玉树地区牦牛新鲜腹泻粪样中分离的产气荚膜梭菌为研究对象, 首先对其进行基础培养、革兰氏染色、基因分型, 随后免疫小鼠进行致病性研究。通过 PCR 鉴定其为 A 型产气荚膜梭菌; MLST 分型确定该菌株为 ST-414 型, 是一株新的 ST 型菌株。对其进行生化试验探究, 了解到了牦牛源产气荚膜梭菌能发酵葡萄糖、麦芽糖、乳糖和蔗糖并产酸产气, 不发酵甘露醇或水杨苷; 能液化明胶, 不能消化已凝固的蛋白质等常规生化现象, 拓宽了牦牛源产气荚膜梭菌生化谱, 可为进一步研究牦牛源产气荚膜梭菌代谢产物、代谢方

式和代谢条件提供依据。

利用振荡比浊法对牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株生长曲线进行测定结果显示, 菌株有 2 h 的迟缓期, 6 h 的对数生长期, 8 h 的平稳期, 随后进入衰亡期。通过对比发现, 王璞等^[103]、王开功等^[96]、吕静等^[104]测定的 A 型产气荚膜梭菌对数生长期为 6 h~7 h, 其结果均比牦牛源 A 型产气荚膜梭菌的 8 h 短。对其毒素蛋白含量测定显示, 菌株 Qinghai-1 最佳产毒时间为 12 h, 其含量达 3.480 mg/mL。这与王开功等^[96]研究的 A 型产气荚膜梭菌所产毒素的最佳时间 8 h (含量 3.246 mg/mL), 与单雪梅等^[105]研究的 D 型产气荚膜梭菌所产毒的最佳时间是 10 h (含量 3.275 mg/mL), 均有差异。分析其原因, 一方面可能是培养基不同和接种菌量不同所造成的生长速率存在着差异; 另一方面可能是牦牛源产气荚膜梭菌长期生活于高海拔地区, 生长性能有所改变。

研究表明^[106]细菌在对数期拥有着最大的生长速率且其生长相对稳定, 其生长菌液 $D_{600\text{nm}}$ 值与细菌数量之间呈线性关系, 其生长菌液稀释倍数与生长菌液 $D_{600\text{nm}}$ 值呈指数关系。本试验取对数生长期的细菌, 利用 SPSS 19.0 软件建立生长菌液稀释倍数与菌液 $D_{600\text{nm}}$ 值之间的回归方程, 得到牦牛源 A 型菌的关系式为: $y = -0.607 \ln(x) + 1.551$, $R^2 = 0.990$; 其结果符合指数关系, 且相关性高, $P < 0.05$ 。利用 SPSS 19.0 软件建立菌落 CFU 与菌液 $D_{600\text{nm}}$ 值之间的回归方程, 得到牦牛源 A 型菌的关系式为: $y = 4.679x - 4.448$, $R^2 = 0.995$; 其结果符合线性关系, 且相关性高, $P < 0.05$ 。这两个关系式的建立既体现出试验数据的可靠程度, 又体现菌株的生长速率。利用这两个关系式可准确、快速的计算出不同 $D_{600\text{nm}}$ 值所对应的活菌量, 减少了人工测量的误差, 使数据结果更准确, 节约大量测量时间, 为下一步动物攻毒试验的顺利进行提供了可靠的数据保障。

LD_{50} 计算方法多达二十余种^[107], 且随着计算机的普及各统计软件 (如 SAS、SPSS、DPS、R、Origin 等) 的发展, 利用计算机程序分析计算 LD_{50} 成为最准确、最有效的方法^[99]。SPSS 软件具有完备的数据访问、数据管理和数据呈现功能, 同时还可简便、快速、直观地计算出 LD_{50} 及 95% 置信区间, 且结果与改良寇氏法 (Karber) 计算结果无显著差异^[99]。本实验通过 SPSS 19.0 软件计算得出, A 型菌的 LD_{50} 为 5.955×10^8 CFU/mL, 95% 置信区间为 4.606×10^8 CFU/mL ~ 7.817×10^8 CFU/mL。

疾病的演变是一个极其复杂的过程, 即使在医学影像技术飞速发展的时代, 病理诊断依然是各种检查方法中最可靠的、最终的诊断依据^[108]。通过病理诊断可确定疾病病因、病变起源、指导治疗、分析预后。本研究通过细菌感染小鼠观察到, 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株能使小鼠在精神上、食欲上、行动上以及神经症状上出现不同程度的临床症状。发病小鼠腹部胀大, 阴道出血。剖检

发现腹腔出现红色积液，小肠等组织出血。通过甲醛固定、切片、染色后，镜检观察到感染牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株急性死亡小鼠病变不明显，慢性死亡小鼠肠道有不同程度的细胞溶解现象，出现糜烂；肝脏细胞见空泡变性；肾小管见变性伴有透明管型，间质未见充血、水肿和炎细胞浸润；脾脏白髓可见组织细胞增生，红髓见淤血；大脑间质血管见充血；未见到心脏、肺脏和胃出现病理变化。本试验确定牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株主要致病脏器为肠道、肝脏、脾脏、肾脏、大脑，对心脏、肺脏和胃不致病，在临床对症治疗时，优先考虑主要致病器官的药物吸收效果，并对其进行对症用药。在日常养殖中应改善饲养条件、减少养殖密度、控制环境卫生，及时按质按量注射疫苗，增强牛群免疫力。尽量避免因环境变化、体质下降、天气骤变时该菌大量增殖而导致疫病的发生。本文可为进一步研究牦牛源产气荚膜梭菌病积累了宝贵资料，可为提高相关疾病的临床诊断水平服务。

第五章 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株全基因组生物信息学分析

产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*, Cp），又称魏氏梭菌（*C.welchii*），属于原核生物界、细菌域、厚壁菌门、梭菌纲、梭菌目、梭菌科、梭菌属、G⁺产芽胞粗大直杆菌^[3]，非严格厌氧，常单个或成双存在，常见于土壤、污水、沉积质、腐殖质、食物、粪便、人和其他脊椎动物肠道中^[2]。可引起人和动物气性坏疽（gas gangrene）、食物中毒、羔羊痢疾（lamb dysentery）、绵羊猝狙（struck）、牛肠毒血症（enterotoxemia in cattle）和坏死性肠炎（necrotizing enteritis）等疾病^[2,3]。牦牛源产气荚膜梭菌能引起牦牛猝死综合征^[49]，病畜通常临床表现出腹部鼓气胀大，心、肝、脾、肾等实质器官出血性病变，急性出血性肠炎^[67]，以及突然倒地死亡等症状，发病急，病程短，严重影响着牦牛养殖业的经济效益^[93]。

本文以牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株为研究对象，通过提取 Qinghai-1 菌株基因组，采用 Nanopore 基因组测序技术，并将第三代测序技术与第二代测序技术的测序结果相结合，获得牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株的全基因组序列，并对牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株基因组进行序列分析和功能注释。将从分子生物学技术上更深入的了解牦牛源产气荚膜梭菌，为今后了解牦牛源产气荚膜梭菌致病机制和相关疫病防控提供参考资料。

5.1 试验材料

5.1.1 试验菌株

牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株由西藏农牧学院预防兽医实验室从青海省玉树地区牦牛腹泻粪样中分离得到。

5.1.2 主要试剂

试验主要试剂见表 5-1。

表 5-1 试验主要试剂

试剂	批号	厂家
厌氧产气袋	RH279070	日本 Mitsubishi Chemical 公司
梭菌增菌培养基	HB0316-1	青岛海博生物技术有限公司
胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养基	HB0253-9	青岛海博生物技术有限公司
细菌基因组 DNA 提取试剂盒	O3831	北京天根生化科技有限公司

5.1.3 主要仪器

试验主要仪器见表 5-2。

表 5-2 试验主要仪器

试验仪器	型号	厂家
双人净化工作台	SW-CJ-2D	上海苏净实业有限公司
核酸蛋白检测仪	NanoDrop2000	赛默飞世尔科技（中国）有限公司
立式压力蒸汽灭菌锅	LDZX-50KBS	上海申安医疗器械厂
冷冻离心机	5430R	德国 Eppendorf 公司
生化培养箱	SPX-150B-Z	上海博迅实业有限公司

5.2 试验方法

5.2.1 菌株复苏及 DNA 提取

将冻存的牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株缓慢梯度升至室温（-80℃→-20℃→4℃→室温），划线接种于 TSC 培养基上，41℃恒温培养 18~24 h，随后挑取 TSC 培养基中产气荚膜梭菌黑色单菌落，接种于 RCM 培养基中，石蜡油液封，41℃恒温培养。当 RCM 培养液 $D_{600\text{ nm}}=0.6\sim0.8$ 时，按照细菌 DNA 提取试剂盒操作说明制备 Qinghai-1 菌株 DNA 模板，利用核酸蛋白检测仪检测 Qinghai-1 菌株基因组的纯度、浓度。冷冻保存送至生工生物（成都）有限公司。

5.2.2 文库构建

取质检合格的 DNA 样本，对损伤和末端进行修复、Barcode 标签连接、磁珠纯化等，Qubit 定量。最后，将加好标签的不同样本以相同比例混合成总体积为 65 μL ，总量为 2.5 μg 的一个 Pooling 文库。

5.2.3 上机测序

将配置好的文库加载到 R9.4 测序芯片中，PromethION sequencer（Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK）上机测序 48~72 h。

5.2.4 信息分析

（1）测序数据统计

Nanopore 测序的下机原始数据为 fast5 文件，通过 GUPPY（4.4.2）进行 base calling 后转换为 fastq 格式。然后将原始测序数据进行过滤得到有效数据（ $Q\geq 7$ ），用于后续组装分析。

（2）基因组组装

首先用高准确度的 illumina 数据 (Q30>85%) 进行组装, 得到高质量的细菌基因组骨架 (contig), 然后用 Nanopore 数据将高质量 contig 连接成完成图。该策略组装得到的细菌完成图, 准确度由 illumina 数据的准确度决定, 而且可以有效避免 Nanopore 数据拆分错误引入的序列污染。最后采用 Pilon (1.23) 软件利用二代数据进一步对组装基因组进行纠错, 得到最终准确度更高的基因组。

(3) 基因组结构分析

基因组结构分析, 包括: 重复序列、编码基因、非编码 RNA、基因岛、CRISPR 等分析。常用分析软件见表表 5-3。

表 5-3 基因组结构分析所用软件及功能

软件	网址	功能
GUPPY		碱基识别软件, 主要用于将 nanopore 各测序平台原始数据转换为碱基
SOAPnuke	https://github.com/BGI-flexlab/SOAPnuke	fastq 数据质控过滤软件
unicycler	https://github.com/rrwick/Unicycler	ONT 细菌完成图组装软件
miniasm	https://github.com/lh3/miniasm	长时间读取并从头组装的软件
Racon	https://github.com/isovic/racon	对组装得到的原始 contig 序列纠错的软件
SPAdes	https://github.com/ablab/spades	方便、快速的基因组组装软件
Bowtie2	https://github.com/BenLangmead/bowtie2	基因组比对软件
Pilon	https://github.com/broadinstitute/pilon/	基于二代测序数据进行纠错的软件
bwa	https://github.com/lh3/bwa	将序列比对到参考基因组上的软件
minimap2	https://github.com/lh3/minimap2	将 DNA 或 mRNA 序列与大型参考数据库进行比对的软件
samtools	https://github.com/samtools/samtools	处理高通量测序数据的常用软件
Prokka	https://github.com/tseemann/prokka	适用于原核生物的基因组自动注释的软件
Prodigal	https://github.com/hyatt/Prodigal	为细菌和古菌基因组进行蛋白编码基因预测的软件
Aragorn	http://130.235.244.92/ARAGORN/Downloads/	图片上传软件
RNAmmer	http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/	可以直接进行核糖体 RNA 预测的软件
Infernal	http://eddylab.org/infernal/	注释其他复杂 ncRNA 的软件
Pseudofinder	https://github.com/filip-husnik/pseudofinder	利用同源匹配 (Homologousmapping) 鉴定假基因的软件
MinCED	https://github.com/ctSkennerton/minced/tree/master	在全基因组或环境数据集 (如组装) 中查找重复回文序列的软件
IslandViewer 4	http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/	对基因岛进行预测的软件

表 5-3 (续)

软件	网址	功能
PhiSpy	https://github.com/linsalrob/PhiSpy	在细菌（或者古菌）基因组中识别溶源噬菌体的软件
RepeatMasker	http://www.repeatmasker.org/	是重复序列检测的软件
antiSMASH	https://docs.antismash.secondarymetabolites.org/	用来鉴定微生物基因组次级代谢物合成基因簇的软件
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	基于局部序列比对算法的搜索工具
Diamond	http://github.com/bbuchfink/diamond/	是分子和晶体结构可视化软件
SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	找出含有信号肽的蛋白
tmhmm	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	找出含有跨膜螺旋的蛋白，即为跨膜蛋白

(4) 基因组功能注释

功能注释，主要包括通用数据库：Pfam、Refseq、Uniprot、Nr、Tigrfams、COG、KEGG、GO 等八大数据库；专有数据库：ARDB、CAZy、CARD、CYP450、VFDB、TCDB 及信号肽预测等。常用基因组功能注释数据库见表 5-4。

表 5-4 基因组功能注释所用数据库及功能

数据库	网址	功能
Uniprot	https://www.uniprot.org/	非冗余数据库
refseq	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/	参考序列数据库
Pfam	https://pfam.xfam.org/	同源蛋白家族数据库，识别出蛋白质中的结构域
TIGRFA	http://tigrfams.jcvi.org/cgi-bin/index.cgi	由多序列比对、隐马尔可夫模型和相关信息组成的数据库
Ms		库，用于蛋白质序列分类
GO	http://geneontology.org/	国际标准化的基因功能分类体系
KEGG	https://www.kegg.jp/kegg/	京都基因和基因组数据库，分析基因产物在细胞中的代谢途径（Pathway）以及这些基因产物功能
COG	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/	同源蛋白簇数据库
Nr	https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/	非冗余蛋白质的氨基酸序列数据库
ARDB	Ftp://ftp.cbcb.umd.edu/pub/data/ARDB/	抗性基因数据库，还包括了 12 个药物作用靶点
CAZy	http://www.cazy.org/	碳水化合物酶数据库
PHI	http://www.phi-base.org/	病原与宿主互作数据库
CARD	http://arpcard.mcmaster.ca	耐药基因预测数据库
CYPED	https://cyped.biocatnet.de	细胞色素 P450 预测数据库
VFDB	http://www.mgc.ac.cn/VFs/	毒力因子数据库
TCDB	http://www.tcdb.org/	对膜转运蛋白数据库

5.2.5 上传 Qinghai-1 菌株基因组序列数据并构建遗传进化树

将牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株全基因组核苷酸序列上传至 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得 GenBank 登录号, 并与其他已公开序列比对, 下载相关序列, 利用 MEGA 7.0 软件采用邻接法 (Neighbor Joining) 构建 Qinghai-1 菌株遗传进化树。

5.3 试验结果

5.3.1 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株测序数据质控统计

(1) 三代数据过滤及统计

Nanopore 测序的下机原始数据为 fast5 文件, 通过 GUPPY (4.4.2) 进行 base calling 后转换为 fastq 格式。然后将原始测序数据进行过滤得到有效数据 ($Q \geq 7$), 用于后续组装分析。三代有效数据统计结果见表 5-5。

表 5-5 Nanopore 有效数据统计

项目	统计结果
reads 数	80 374
总长/bp	1 000 004 476
最短的 reads 的长度	2 782
平均 reads 的长度	12 441.9
最长的 reads 的长度	112 119
N50	18 474

注: N50, 片段从长到短排列并相加, 加到长度为总长度一半时片段的长度即为 N50。

(2) 二代数据过滤及统计

二代原始测序数据经 SOAPnuke (Version: 2.1.2) ^[109] 过滤后 (表 5-6), 得到有效测序数据共 1 477 525 500 bp。

表 5-6 二代数据质量统计表

项目	统计结果
reads 长度/bp	150
原始数据总 reads 数	9 863 024
原始数据的总碱基数	1 479 453 600
过滤后的总 reads 数	9 850 170
过滤后的总碱基数	1 477 525 500
GC 含量/%	29.45
Q20/%	97.79

5.3.2 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株基因组组装结果统计

使用 Unicycler^[110]对二、三代数据进行组装，组装结果见表 5-7 所示。

5-7 基因组组装结果统计

项目	染色体序列	质粒序列
contig 的长度	3 042 374	38 989
contig 数目	1	1
GC 含量/%	28.58	26.22
gap 数目	0	0

5.3.3 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株结构及核酸水平预测

(1) 基因预测

通过 Prokka(1.13)^[111]软件对组装后的基因组进行编码基因预测，结果显示（表 5-8）：共含 2906 个基因，2721 个 CDS 区，94 段 tRNA，10 段 23S rRNA，10 段 16S rRNA，10 段 5S rRNA，60 段 miscRNA，1 段 tmRNA，968 段重复序列和 1 个基因岛，不含 CRISPR 序列。

表 5-8 基因预测结果统计

预测得到的基因	预测得到的基因	预测得到的基因	预测得到的平均基因	占基因组长度的百
类型	数目/个	总长/bp	长度/bp	分比/%
Gene	2 906	2 620 521	902	85.04
CDS	2 721	2 556 033	939	82.95
tRNA	94	7 347	78	0.24
23S rRNA	10	29 030	2 903	0.94
16S rRNA	10	15 010	1 501	0.49
5S rRNA	10	1 172	117	0.04
tmRNA	1	361	361	0.01
miscRNA/段	60	11 568	193	0.38

(2) 假基因预测

使用 Pseudofinder^[112]检测来自细菌和古细菌基因组的注释 genbank 文件中的假基因候选序列。结果显示：预测假基因序列总长度为 25 493 bp；预测假基因数量为 65 个；预测假基因的平均长度为 392.2 bp。

5.3.4 功能元件分析

(1) CRISPR 序列预测

使用 MinCED (0.4.2) 对基因组进行 CRISPR (成簇的规律间隔的短回文重

复序列) 预测, 预测结果显示: 不含有 CRISPR 序列。

(2) 基因岛预测

通过 IslandViewer 4 预测基因组中存在的基因岛, 预测结果显示: 含有 1 个基因岛, 预测得到的基因岛在基因组中的起始、终止位置为 1 416 651~1 426 012, 基因岛序列长度为 9 362 bp。

(3) 前噬菌体分析

整合在宿主基因组上的温和噬菌体的核酸称之为前噬菌体 (Prophage)。通过 PhiSpy 网站预测基因组中的前噬菌体, 预测结果显示: 不含有前噬菌体。

(4) 重复序列分析

原核生物基因组中重复序列含量极少。采用 RepeatMasker (4.1.0) [113] 软件对细菌基因组进行重复序列的预测, 结果显示 (表 5-9): 共有重复序列 968 条, 总长度 61 042 bp, 占总序列 1.98%。其中重要的有: 转座子重复序列 1 条, 长度 53 bp; 简单重复序列 643 条, 长度 31 774 bp; 低复杂性重复序列 201 条, 长度 9 975 bp。

表 5-9 重复序列预测结果统计

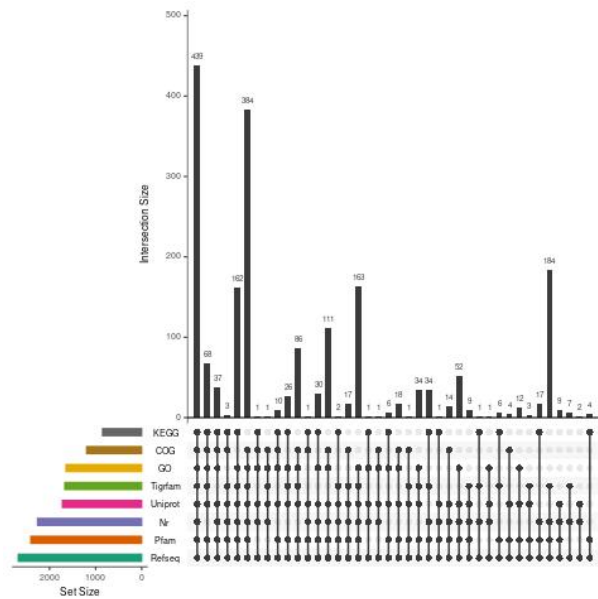
项目	数量	长度/bp	覆盖率/%
短散在元件	4	277	0.01
长散在元件	3	116	0.00
长散在元件 (Copia)	2	141	0.00
长散在元件 (Gypsy)	2	141	0.00
DNA 转座子	1	53	0.00
卫星重复序列	1	88	0.00
简单重复	643	31 774	1.03
低复杂性重复	201	9 975	0.32
其他类型重复	113	18 792	0.61
未知的重复序列	1	75	0.00
总的重复序列	968	61 042	1.98

5.3.5 基因功能注释

(1) 通用数据库比例统计

利用软件 hmmer (3.3.1) [114] 基于 Pfam、TIGERFAM 数据库进行功能注释。注释统计结果 (图 5-1) 显示: UniProt 数据库 1 721 个基因, KEGG 数据库 849 个基因, KEGG Pathway 数据库 815 个基因, GO 数据库 1 643 个基因, Pfam 数据库 2 406 个基因, COG 数据库 1 196 个基因, TIGERfams 数据库 1 669 个基因,

RefSeq 数据库 2 679 个基因，NR 数据库 2 261 个基因。

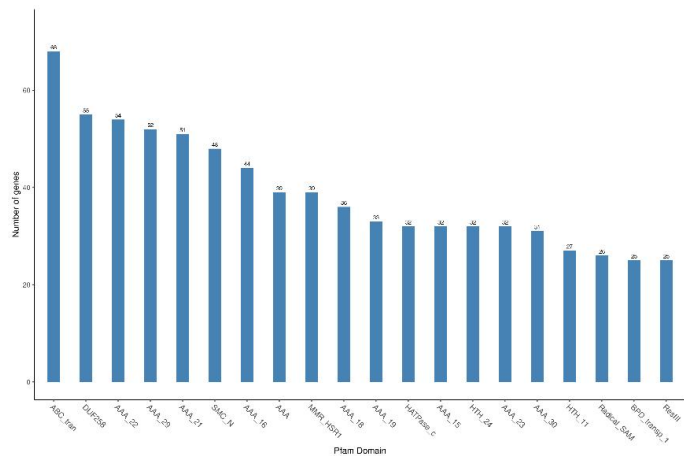


注：左侧为通用数据库基因注释统计；右侧为共有和特有统计，例如第一列为所有通用数据库共有统计，上方为数目统计，下方为共有或特有数据库的标注。

图 5-1 编码基因通用数据库注释共有和特有注释统计图

(2) Pfam 结构域分类

基于 Pfam 结构域的注释，对每个结构域注释的基因进行统计汇总，并将注释最多的前 20 个结构域绘图展示，结果见图 5-2。



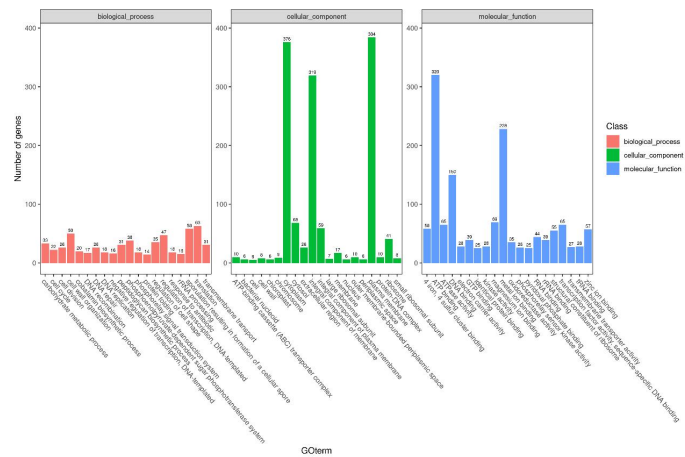
注：Pfam 数据库是一系列蛋白质家族的集合，其中每一个蛋白家族都以多序列比对和隐马尔科夫模型的形式来表示。图中横坐标是蛋白质家族的名称，纵坐标是比对到该蛋白质家族的基因的数。

图 5-2 PFAM 结构域统计图

(3) GO 分类

将 GO (Gene Ontology) 注释信息经简化后得到 GOslim 分类，将基因的功能从细胞组分、分子功能、生物学过程三个方面进行汇总统计后，选取每个分类下前 20 个注释最多的 GOslim 的二级分类进行绘图 (图 5-3)，生物过程的各基

因功能数量相对平均，富集程度最高的为翻译过程（translation）共有 63 个基因；细胞组分的部分基因功能数量差异明显，其中富集程度前三的为质膜（plasma membrane）共 384 个基因，细胞质（cytoplasm）共 376 个基因，质膜组成部分（integral component of plasma membrane）共 316 个基因；分子功能中的 ATP 结合功能（ATP binding）基因富集程度最高，共 320 个基因。

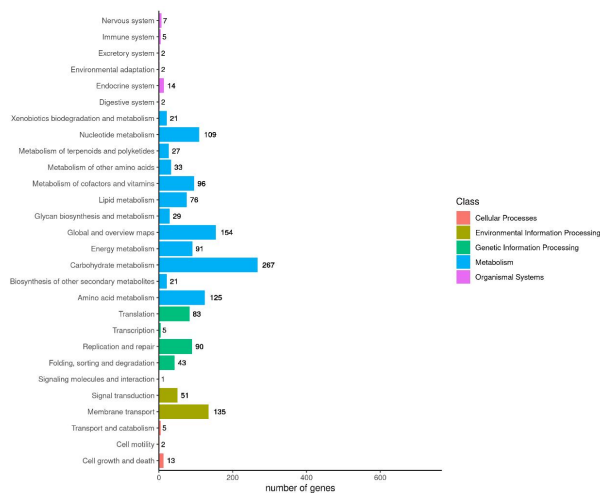


注：横坐标为 GO 各分类内容，纵坐标为基因数目。此图展示的是在全部基因背景下 GO 各二级功能的基因富集的情况，体现此背景下各二级功能的地位。

图 5-3 GO 注释结果分类图

(4) KEGG 分类

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库从其对基因产物的代谢途径和功能的不同通路将 Qinghai-1 菌株基因组基因分为 5 个大类 28 个小类 (图 5-4)，其中富集最高的基因代谢途径为代谢类 (metabolism) 中的碳水化合物代谢 (carbohydrate metabolism) 共有 267 个基因。

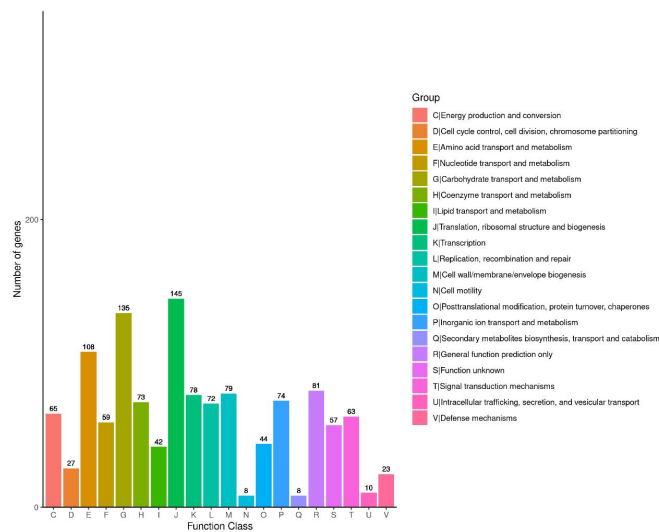


注：横坐标为 Pathway 分类下注释的基因数目；纵坐标为 Pathway 分类，不同颜色代表所属的不同的大类。

图 5-4 KEGG pathway 结果分类图

(5) COG 分类

COG (Cluster of Orthologous Groups of proteins, 基因产物直系同源分类) 数据库以细菌、藻类、真核生物具有完整基因组的编码蛋白、系统进化关系为构建基础, 将 Qinghai-1 菌株基因组基因分为 20 类 (图 5-5), 其中基因数量富集程度前三位的功能途径是翻译、核糖体结构和生物发生 (Translation, ribosomal structure and biogenesis), 含 145 个基因; 碳水化合物运输和代谢 (Carbohydrate transport and metabolism), 含 135 个基因; 氨基酸转运和代谢 (amino acid transport and metabolism), 含 108 个基因。



注: 横坐标为 COG 各分类内容, 纵坐标为基因数目。在不同的功能类中, 基因所占多少反映对应时期和环境下代谢或者生理偏向等内容, 可以结合研究对象在各个功能类别的分布作出科学的解释。

图 5-5 COG 结果分类图

(6) NR 注释

NR 数据库: 非冗余蛋白质的氨基酸序列数据库, 包含 SwissProt、PIR (Protein Information Resource)、PRF (Protein Research Foundation)、PDB (Protein Data Bank) 蛋白质数据库非冗余的数据以及从 GenBank 和 RefSeq 的 CDS 数据翻译来的蛋白质数据。结果显示 (图 5-6): 95.97% 属于产气荚膜梭菌类。

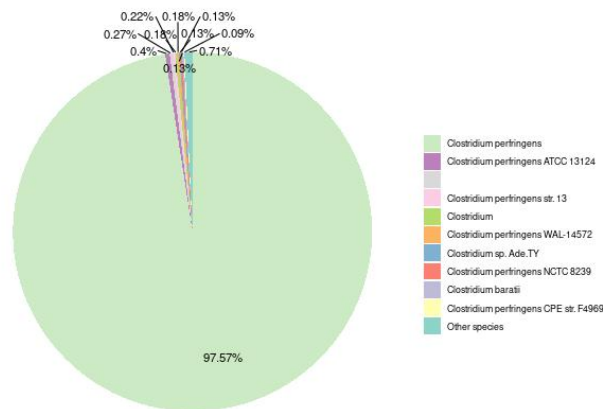


图 5-6 NR 物种分布图

5.3.6 专有数据库注释

(1) 抗性基因数据库注释

抗性基因数据库（ARDB），主要是靠文献、数据库检索，对比分析和整理得到。除抗性基因外，还包括了 12 个药物作用靶点。使用 Diamond blastp (version 2.9.0) [115] 基于 ARDB 数据库对目的蛋白质序列进行注释，结果显示：仅有一个抗性基因，即抗杆菌肽抗性基因。

(2) 碳水化合物酶注释

碳水化合物酶（CAZy）数据库专注于分析碳水化合物酶的基因组、结构和生物化学信息。用 HMMER 基于 CAZy 数据库对蛋白质序列进行注释得到：糖苷水解酶（GH）3 个；糖基转移酶（GT）2 个；多糖裂合酶（PL）0 个；碳水化合物酯酶（CE）0 个；辅助氧化还原酶（AA）0 个；碳水化合物结合模块（CBM）1 个。

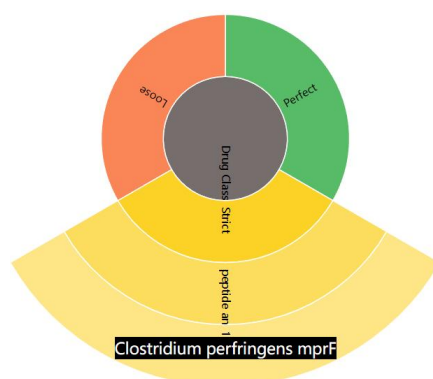
(3) 病原宿主互作分析

病原宿主互作（PHI），即病原与宿主互作数据库。该数据库收录的内容经过实验验证，主要来源于真菌、卵菌和细菌病原感染的宿主包括动物、植物、真菌以及昆虫。使用 Diamond blastp 基于 PHI 数据库对目的蛋白质序列进行注释：共有 8 049 条序列对上数据库的目标序列。

(4) 耐药基因预测

耐药基因数据库（CARD）[116] 对 Qinghai-1 菌株序列注释结果显示（图 5-7）：牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株仅含有 1 个耐药性相关基因，即 *Clostridium perfringens mprF* 基因，其主要通过抗生素靶标改变的方式来耐受肽类抗生素，该类抗生素常见的药物有杆菌肽、多黏菌素 B、黏菌素、万古霉素、太古霉素、

沙拉霉素等。



注：从内到外依次为分析种类、RGI 运算方式、耐药种类、耐药基因

图 5-7 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株耐药基因及耐药种类 RGI 分析图

(5) 细胞色素 P450 注释

细胞色素 P450（简称 CYP450）是一大类以亚铁血红素为辅基的蛋白家族。它们能催化许多种底物的氧化反应。它参与内源性物质和包括药物、环境化合物在内的外源性物质的代谢。使用 BLASTp 对 CYPED^[117]进行注释：共注释到 188 条相关基因。

(6) 毒力因子注释

毒力因子数据库（VFDB）是一个综合的、全面的在线资源，用于收集有关细菌病原体毒力因子的信息。使用 Diamond blastp 基于 VFDB 数据库对目的蛋白质序列进行注释，结果显示：注释到 237 个与毒力因子有关的基因，主要包括 α 毒素基因（PLC）、 θ 毒素基因（*pfoA*）、 κ -毒素基因（*colA*）、外源- α -唾液酸酶基因（*nanI*）、 α -梭菌蛋白酶基因（*cloSI*）、唾液酸酶基因（*nanH*）等毒力相关因子。

(7) 信号肽预测

使用软件 SignalP^[118]对所有的预测到的基因的蛋白序列进行分析，共有跨膜蛋白 828 条，其中 162 条为信号肽蛋白。

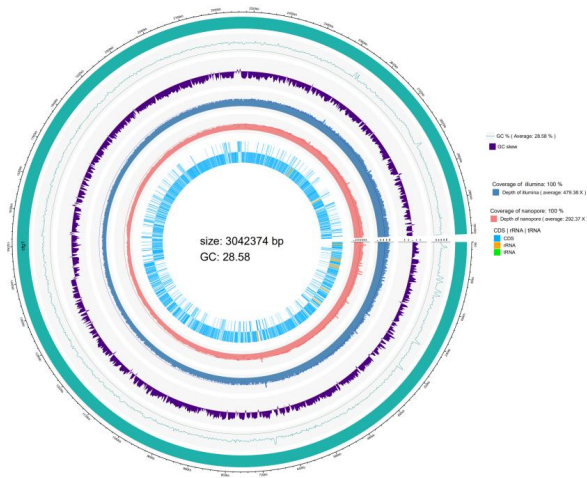
(8) TCDB 转运蛋白预测

TCDB 是对膜转运蛋白（Membrane Transport Protein）进行分类的一个数据库，它制定了一套转运蛋白分类系统（Transporter Classification），简称 TC System。使用 Diamond blastp 基于 TCDB 数据库对目的蛋白质序列进行注释，共有 526 个膜转运蛋白。

5.3.7 细菌基因组圈图

利用预测得到的基因组信息，如基因组测序深度、GC 分布及基因组结构注释进行整合，绘制基因组圈图（图 5-8），可以更清晰的探索基因组组件或位置

之间的关系。



注：由外到内依次为：第一圈，基因组序列信息；第二圈，基因组序列的 GC 含量曲线；第三圈，基因组序列的 GC skew 曲线；第四圈，二代测序深度及覆盖度信息；第五圈，三代测序深度及覆盖度信息；第六圈，展示了参考基因组中的基因编码区（CDS）以及非编码 RNA 区（rRNA、tRNA），以内外两层表示，外层代表正链，内层代表负链。

图 5-8 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株基因组圈图

5.3.8 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株基因组序列登录号

将牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株基因组序列上传至 Gene Bank 得到：16S rRNA 的基因序列登录号为：MW980090；全基因组序列登录号为：CP092481。

通过利用 MEGA 7.0 软件构建 Qinghai-1 菌株遗传进化树，结果显示(图 5-9)：Qinghai-1 菌株与中国云南山羊源（MK156683）产气荚膜梭菌处于同一枝，与西藏安多县牦牛源（MN960263、MN960262）产气荚膜梭菌和西藏班戈县牦牛源（MN960261）产气荚膜梭菌却有着相对较远的亲缘关系。

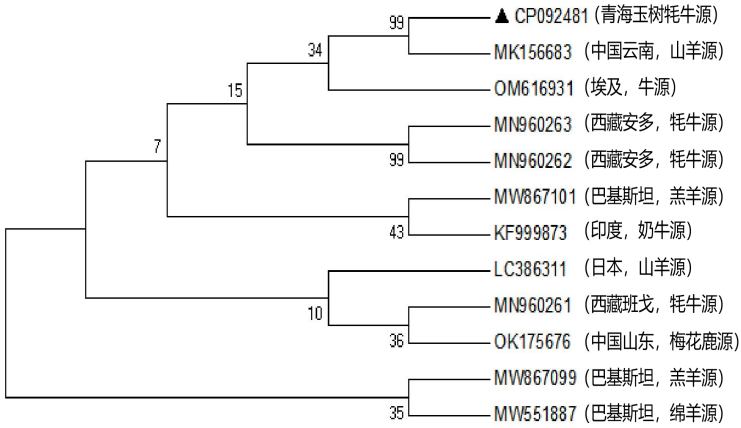


图 5-9 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株 16S rRNA 遗传进化树

5.4 讨论

本文选用一株由本实验室从青藏高原玉树藏族自治州牦牛腹泻粪样中分离到的一株产气荚膜梭菌为研究对象。经 Nanopore（三代测序）和 Illumina（二代测序）对牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株全基因组测序分析得到，三代和二代过滤后有效数据总长分别为 1 000 004 476 bp 和 1 477 525 500 bp。使用 Unicycler 组装后得到牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株染色体基因组全长 3 042 374 bp，GC 含量 28.58%；质粒全长 38 989 bp，GC 含量 26.22%。根据 NCBI 全基因数据库目前已公布进四百个产气荚膜梭菌全基因组数据可知，产气荚膜梭菌基因组大小约为 2.69~4.17M^[119]，GC 含量 24.30%~31.10%，故 Qinghai-1 菌株基因组基本特征符合数据库中产气荚膜梭菌基因组特征，结构无较大变异。

对牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株结构及核酸水平预测得出，共有 2 906 个基因，其中 CDS（编码基因）有 2 721 个，94 个 tRNA，30 个 rRNA（5S rRNA、16S rRNA、23S rRNA 各 10 个），60 个 miscRNA，1 个 tmRNA，65 个假基因。利用预测得到的基因组信息，包括基因组测序深度、GC 分布及基因组结构注释进行整合，绘制出基因组圈图，可更清晰的探索基因组组件或位置之间的关系。功能元件分析得出，该菌株含有 1 个基因岛，起始、终止位置为 1 416 651~1 426 012，序列长度为 9 362 bp；有重复序列 968 条，总长度 61 042 bp，占总序列 1.98%；不含有 CRISPR（成簇的规律间隔的短回文重复序列）；不含有前噬菌体。

另外，基因功能注释显示：该菌株在 UniProt 数据库 1 721 个基因，KEGG 数据库 849 个基因，KEGG Pathway 数据库 815 个基因，GO 数据库 1 643 个基因，Pfam 数据库 2 406 个基因，COG 数据库 1 196 个基因，TIGERfams 数据库 1 669 个基因，RefSeq 数据库 2 679 个基因，NR 数据库 2 261 个基因。GO 数据库是一个国际化的基因功能分类体系，提供了一套动态更新的标准词汇表

（controlled vocabulary）来全面描述生物体中基因和基因产物的属性^[120]。在 GO 数据库中生物过程富集程度最高的为翻译过程；细胞组分富集程度最高的为质膜；分子功能富集程度最高的为 ATP 结合功能。KEGG 数据库注释结果显示，富集程度最高的基因代谢途径为碳水化合物代谢，通过 5 个大类 28 个小类共同描述了 Qinghai-1 菌株基因产物在细胞中的代谢途径以及这些基因产物的功能，可以进一步研究基因在生物学上的复杂行为^[121]。COG 数据库从宏观上认识 Qinghai-1 菌株的基因功能分布特征^[122]，将 Qinghai-1 菌株注释到 COG 数据库的 1 196 个基因分为 20 类，其中基因数量富集程度最高的功能途径是翻译、核糖体结构和生物发生。本次全基因组测序的功能注释应用促进了对研究牦牛源产气荚膜梭菌遗传变异性、基因功能、毒力机制和耐药机制等方向提供理论依据，为分析高原牦牛源产气荚膜梭菌分子生物学特性提供支撑。

对牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株专有数据库注释, 得出: 仅含有 1 个抗性基因 (即抗杆菌肽抗性基因); 6 个碳水化合物酶; 1 个耐药性相关基因 (*Clostridium perfringens mprF* 基因); 188 个细胞色素 P450 蛋白; 237 个毒力相关因子; 以及 828 个跨膜蛋白 (其中 162 个为信号肽蛋白)。VFDB 数据库对收集到的 Qinghai-1 菌株毒力因子主要包括 α 毒素基因 (*PLC*)、 θ 毒素基因 (*pfoA*)、 κ -毒素基因 (*colA*)、外源- α -唾液酸酶基因 (*nanI*)、 α -梭菌蛋白酶基因 (*cloSI*)、唾液酸酶基因 (*nanH*) 等毒力相关因子。耐药基因数据库 (CARD)^[116] 中 1 个耐药性相关基因, 即 *Clostridium perfringens mprF* 基因, 其主要通过抗生素靶标改变的方式来耐受肽类抗生素, 该类抗生素常见的药物有杆菌肽、多黏菌素 B、黏菌素、万古霉素、太古霉素、沙拉霉素等。

最后, 将牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株基因组序列上传至 Gene Bank 得到: 16S rRNA 的基因序列登录号为: MW980090; 全基因组序列登录号为: CP092481。通过利用 MEGA 7.0 软件构建 Qinghai-1 菌株遗传进化树显示: Qinghai-1 菌株与中国云南山羊源 (MK156683) 产气荚膜梭菌处于同一枝, 与西藏安多县牦牛源 (MN960263、MN960262) 产气荚膜梭菌和西藏班戈县牦牛源 (MN960261) 产气荚膜梭菌却有着相对较远的亲缘关系。

总之, 该结果可为研究人员提供 Qinghai-1 菌株使用的各种机制的最新知识, 阐明尚未很好表征的细菌性疾病的致病机制, 并开发新的合理的传染病治疗和预防方法。丰富了产气荚膜梭菌基因库宿主的类型, 为进一步了解牦牛源产气荚膜梭菌耐药基因和遗传进化信息提供了理论参考。

全文总结

1. 牦牛源产气荚膜梭菌总体阳性率为 19.35%。144 株牦牛源产气荚膜梭菌的每个管家基因分别具有 15~50 个（平均有 12.95 个）等位基因，89 个 STs，11 个 CCs。其中，108 株（75%，108/144）为 A 型产气荚膜梭菌，25 株（17.36%，25/144）为 C 型产气荚膜梭菌，4 株（2.78%，4/144）为 D 型产气荚膜梭菌，7 株（4.86%，7/144）为 F 型产气荚膜梭菌。未检测到 *iap* 和 *netB* 基因。

2. 药敏试验表明，分离菌具有严重耐药性的抗生素有链霉素、磺胺甲恶唑、卡那霉素、红霉素、多粘菌素 B、庆大霉素等；敏感的抗生素药物有万古霉素、米诺环素、头孢噻肟、氟苯尼考、强力霉素。对 5~7 种药物耐药的菌株超过一半，共 77 株。98.61% 的分离菌为多重耐药菌株，最多的耐药模式为 MAC-AGA-POL-SAs。分离菌株携带 14 种耐药基因，耐药基因 *erm* (B) 检测出率最高，检出率 74.31%

3. 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株为 A 型产气荚膜梭菌；MLST 分型确定该株菌为 ST-414 型。生长曲线显示，2~6 h 的为对数生长期。最佳产毒时间为 12 h，其含量达 3.480 mg/mL。LD₅₀ 为 5.955×10^8 CFU/mL。

4. 动物实验显示：能使小鼠在精神上、食欲上、行动上以及神经症状上出现不同程度的临床症状。发病小鼠腹部胀大，阴道出血。剖检发现腹腔出现红色积液，小肠等组织出血。死亡小鼠肠道有不同程度的细胞溶解现象，出现糜烂；肝脏细胞见空泡变性；肾小管见变性伴有透明管型，间质未见充血、水肿和炎细胞浸润；脾脏白髓可见组织细胞增生，红髓见淤血；大脑间质血管见充血；未见心脏、肺脏和胃出现病理变化。主要致病脏器为肠道、肝脏、脾脏、肾脏、大脑。

5. 牦牛源产气荚膜梭菌 Qinghai-1 菌株染色体基因组全长 3 042 374 bp，GC 含量 28.58%；质粒全长 38 989 bp，GC 含量 26.22%。共有 2 906 个基因，其中 CDS（编码基因）有 2 721 个。

参考文献

- [1] Petit L, Gibert M, Popoff M R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype[J]. Trends Microbiol, 1999,7(3):104-110.
- [2] Uzal F A, Freedman J C, Shrestha A, et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease[J]. Future Microbiol, 2014,9(3):361-377.
- [3] 陆承平等. 兽医微生物学[M]. 中国农业出版社, 2021.
- [4] Rood J I, Adams V, Lacey J, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme[J]. Anaerobe, 2018,53:5-10.
- [5] Navarro M A, McClane B A, Uzal F A. Mechanisms of Action and Cell Death Associated with *Clostridium perfringens* Toxins[J]. Toxins (Basel), 2018,10(5).
- [6] 吴雅玲. 产气荚膜梭菌所致动物猝死症[J]. 甘肃畜牧兽医, 2002(04):34-36.
- [7] 吴允正, 韩春生, 戴益民, 等. 多种动物源A型产气荚膜梭菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 江西农业大学学报, 2020,42(03):546-552.
- [8] 周姣. 仔猪A型产气荚膜梭菌 β 2毒素毒性作用及菌株JXJA17全基因组序列分析[D]. 江西农业大学, 2018.
- [9] 蔡玉梅. 山东省四大湖(库)淡水鱼产气荚膜梭菌毒素型调查及致病机理研究[D]. 山东农业大学, 2008.
- [10] Uzal F A, Vidal J E, McClane B A, et al. *Clostridium Perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases[J]. Open Toxinology J, 2010,2:24-42.
- [11] 张红英 杨霞 卢中华. 魏氏梭菌肠毒素研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2004(09):35-37.
- [12] 周浮伍 李华章 吕正云 王明政. A型魏氏梭菌所致家畜“猝死症”的诊断与防制[J]. 畜牧与兽医, 1997(06):22.
- [13] 董秀梅, 李秀云, 刘念, 等. 狼源产气荚膜梭菌的分离鉴定及分子分型[J]. 中国预防兽医学报, 2022,44(08):831-836.
- [14] 王斌, 张娜, 冯航, 等. 朱鹮产气荚膜梭菌的分离鉴定和致病性[J]. 中国兽医学报, 2021,41(09):1770-1773.
- [15] 付宇航. 麋鹿源产气荚膜梭菌的分离鉴定及强毒株CX1-4全基因组测序分析[D]. 华中农业大学, 2022.

- [16] 司南, 祝令伟, 景洁, 等. 迁徙候鸟产气荚膜梭菌的分离鉴定与特性分析[J]. 中国兽医学报, 2020,40(01):129-134.
- [17] 郑艳敏, 滕臣刚, 韩迪, 等. 一起产气荚膜梭菌引发校园食物中毒的流行病学调查[J]. 中国校医, 2022,36(08):568-570.
- [18] 张慧, 冯佩蓉. 1起疑似食源性聚集性病例的流行病学调查[J]. 江苏预防医学, 2022,33(02):204-205.
- [19] 柴同杰, 马瑞华, 常维山, 等. 产气荚膜梭状芽孢杆菌病的流行与致病机制[J]. 中国预防兽医学报, 2001(01):71-73.
- [20] 本刊讯. 《一、二、三类动物疫病病种名录》及《三类动物疫病防治规范》发布[J]. 中国水产, 2022(08):23-26.
- [21] 倪俊忠, 孙庆峰, 宋华英, 等. 新版《一、二、三类动物疫病病种名录》变动内容分类与汇总[J]. 畜牧兽医科学(电子版), 2022(13):125-127.
- [22] 李勤, 凡蒿, 王建华. 牛猝死症的研究进展[J]. 黄牛杂志, 2002(05):28-29.
- [23] 周宗长, 杨玲, 郭海燕. 羊猝死症的诊断与防制[J]. 新疆畜牧业, 2004(04):51.
- [24] 张彦明, 任晓玲, 张铁战. 陕西省牛猝死症的病原分离鉴定[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005(02):33-35.
- [25] 高丽英, 杨安圈, 李永福, 等. D型魏氏梭菌引起黄牛猝死的诊断报告[J]. 中国牛业科学, 2008(02):94-96.
- [26] 赵永江, 刘丽洁, 詹武, 等. 规模化鹿场爆发鹿魏氏梭菌和巴氏杆菌病[J]. 畜牧兽医杂志, 2008(02):125.
- [27] 杨玉芝. 一起獭兔产气荚膜梭菌病的诊治[J]. 中国养兔杂志, 2008(08):26-27.
- [28] 邱慧玲. 麋鹿产气荚膜梭菌病的流行病学调查[D]. 南京农业大学, 2012.
- [29] 刘雪慧. C、D型产气荚膜梭菌二价类毒素疫苗及抗毒素血清的研制[D]. 山东农业大学, 2015.
- [30] 金铎, 林家琪, 董真, 等. 江苏部分地区山羊产气荚膜梭菌病原的分离鉴定[J]. 中国兽医科学, 2016,46(11):1401-1405.
- [31] 鄢红国, 刘立茂. 南方4省份猪场产气荚膜梭菌感染情况调查[J]. 养猪, 2015(06):121-122.
- [32] 李昆. 江西部分地区哺乳仔猪含 β_2 毒素基因的A型产气荚膜梭菌分子流行病学调查及拮抗CpA的乳酸杆菌筛选[D]. 江西农业大学, 2016.
- [33] 张彤宇. 华东部分地区羊源、水禽源产气荚膜梭菌的流行病学调查与毒力特性研究[D]. 扬州大学, 2019.

- [34] 陈祥杰, 古红霞, 袁伟康, 等. 珠三角地区规模化养鸡场产气荚膜梭菌分子流行病学调查研究[J]. 广东畜牧兽医科技, 2020,45(05):21-24.
- [35] 王珂, 王建强. 甘肃陇东南规模养牛场常发二三类牛病的血清流行病学调查[J]. 中国兽医杂志, 2021,57(03):11-13.
- [36] 曹思宇, 张彤宇, 张燕, 等. 山羊产气荚膜梭菌的分子流行病学调查与毒素型分析[J]. 现代畜牧兽医, 2021(02):73-75.
- [37] 张汉云, 冯琪, 蓝国文, 等. 我国部分地区猪产气荚膜梭菌流行病学调查及毒素型分析[J]. 养猪, 2022(01):121-124.
- [38] 刘增禄. A、C、D型牛产气荚膜梭菌三价类毒素疫苗的初步研制及免疫效果评价[D]. 黑龙江八一农垦大学, 2018.
- [39] Songer J G, Miskimmins D W. *Clostridium perfringens* type E enteritis in calves: two cases and a brief review of the literature[J]. Anaerobe, 2004,10(4):239-242.
- [40] 李志强. 羔羊痢疾的诊断与防治[J]. 中国动物保健, 2020,22(08):36-53.
- [41] 纪广林. 羔羊痢疾的流行病学、临床特征、剖检变化与防治[J]. 现代畜牧科技, 2021(05):70-71.
- [42] 王玉建, 刘娜, 徐煜琳, 等. 规模化羊场B型产气荚膜梭菌分离鉴定及生物学特性检测[J]. 中国兽医学报, 2018,38(11):2100-2106.
- [43] 石芸, 殷杰, 史量全, 等. 牛源B型产气荚膜梭菌的分离鉴定与毒力基因检测[J]. 中国兽医科学, 2020,50(01):57-63.
- [44] Amimoto K, Noro T, Oishi E, et al. A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C[J]. Microbiology (Reading), 2007,153(Pt 4):1198-1206.
- [45] 卢田粉. 产气荚膜梭菌 α 和 ϵ 毒素蛋白高效表达体系的构建及其免疫保护性的研究[D]. 山东农业大学, 2012.
- [46] 温新水. 不同源产气荚膜梭菌交叉感染及类毒素疫苗免疫保护效果比较[D]. 山东农业大学, 2017.
- [47] 韩志辉. 野牦牛魏氏梭菌性肠炎的诊治[J]. 中兽医医药杂志, 2001(02):27-28.
- [48] Li J, Adams V, Bannam T L, et al. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2013,77(2):208-233.
- [49] 卓玛才仁. 牦牛魏氏梭菌病的调研及诊治[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2018,34(06):320.
- [50] 刘娣琴, 贾志江. 牦牛魏氏梭菌病的诊治[J]. 畜牧兽医科技信息, 2012(04):38.

- [51] Sipos R, Szekely A J, Palatinszky M, et al. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2007,60(2):341-350.
- [52] 钟建辉, 纪甜甜, 杨文霞, 等. 扩展产气荚膜梭菌毒素型分型的概述[J]. 畜禽业, 2021,32(08):25-27.
- [53] 董洁, 杨晓静, 苗承霞, 等. 产气荚膜梭菌菌落多重PCR方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报, 2013,33(12):1842-1847.
- [54] 郑晓星. 产气荚膜梭菌plc和NetB基因的表达及单克隆抗体制备与鉴定[D]. 东北农业大学, 2012.
- [55] Jost B H, Trinh H T, Songer J G. Clonal relationships among *Clostridium perfringens* of porcine origin as determined by multilocus sequence typing[J]. Vet Microbiol, 2006,116(1-3):158-165.
- [56] Xu W, Wang H, Liu L, et al. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* isolated from different chicken farms in China[J]. Anaerobe, 2021,72:102467.
- [57] Hussain M I, Borah P, Hussain I, et al. Densitometric analysis of rep-PCR data: Insight into genetic variability and transmission of *Clostridium perfringens* typed with an improved multiplex PCR[J]. Anaerobe, 2021,70:102383.
- [58] Haider Z, Ali T, Ullah A, et al. Isolation, toxinotyping and antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium perfringens* isolated from Pakistan poultry[J]. Anaerobe, 2022,73:102499.
- [59] Khan M, Humza M, Yang S, et al. Occurrence and Toxicogenetic Profiling of *Clostridium perfringens* in Buffalo and Cattle: An Update from Pakistan[J]. Toxins (Basel), 2021,13(3).
- [60] Wu K, Feng H, Ma J, et al. Prevalence, toxin-typing and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* in sheep with different feeding modes from Gansu and Qinghai provinces, China[J]. Anaerobe, 2022,73:102516.
- [61] Milton A, Agarwal R K, Bhuvana P G, et al. Prevalence and molecular typing of *Clostridium perfringens* in captive wildlife in India[J]. Anaerobe, 2017,44:55-57.
- [62] Selim A M, Elhaig M M, Zakaria I, et al. Bacteriological and molecular studies of *Clostridium perfringens* infections in newly born calves[J]. Trop Anim Health Prod, 2017,49(1):201-205.
- [63] Athira C K, Milton A, Reddy A, et al. Diversity of toxin-genotypes among *Clostridium perfringens* isolated from healthy and diarrheic neonatal cattle and

- buffalo calves[J]. *Anaerobe*, 2018,49:99-102.
- [64] Pan H U, Zhou J, Dawa Z, et al. Diversity of Culturable Bacteria Isolated from Highland Barley Cultivation Soil in Qamdo, Tibet Autonomous Region[J]. *Pol J Microbiol*, 2021,70(1):87-97.
- [65] Kumar S, Suyal D C, Yadav A, et al. Microbial diversity and soil physiochemical characteristic of higher altitude[J]. *PLoS One*, 2019,14(3):e213844.
- [66] 吴丹, 罗润波, 黄家旗, 等. 青海玉树牦牛源产气荚膜梭菌的分离鉴定及耐药性研究[J]. *中国兽医学报*, 2022,42(03):522-528.
- [67] 罗润波, 贡嘎, 高家登, 等. 西藏那曲牦牛源产气荚膜梭菌的分离鉴定及生物学特性[J]. *中国兽医学报*, 2021,41(01):74-80.
- [68] Chalmers G, Bruce H L, Hunter D B, et al. Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations[J]. *J Clin Microbiol*, 2008,46(12):3957-3964.
- [69] Hibberd M C, Neumann A P, Rehberger T G, et al. Multilocus sequence typing subtypes of poultry *Clostridium perfringens* isolates demonstrate disease niche partitioning[J]. *J Clin Microbiol*, 2011,49(4):1556-1567.
- [70] Xu W, Zhang H, Hu Z, et al. Prevalence and multilocus sequence typing of *Clostridium perfringens* isolated from retail chicken products and diseased chickens in Tai'an region, China[J]. *Vet Med Sci*, 2021,7(6):2339-2347.
- [71] Xu W, Wang H, Chen S, et al. Tracing *Clostridium perfringens* strains along the chicken production chain from farm to slaughter by multilocus sequence typing[J]. *Zoonoses Public Health*, 2021,68(5):431-442.
- [72] Rowe-Magnus D A, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture[J]. *Int J Med Microbiol*, 2002,292(2):115-125.
- [73] Hooper D C, DeMaria A, Limbago B M, et al. Antibiotic resistance: how serious is the problem, and what can be done?[J]. *Clin Chem*, 2012,58(8):1182-1186.
- [74] Ngamwongsatit B, Tanomsridachchai W, Suthienkul O, et al. Multidrug resistance in *Clostridium perfringens* isolated from diarrheal neonatal piglets in Thailand[J]. *Anaerobe*, 2016,38:88-93.
- [75] Jang Y S, Kim D H, Bae D, et al. Prevalence, toxin-typing, and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from retail meats in Seoul, Korea[J]. *Anaerobe*, 2020,64:102235.
- [76] Tresha A O, Arif M, Islam S S, et al. Investigation of *Clostridium perfringens* in small-scale commercial broiler flocks in Mymensingh district of Bangladesh[J].

- Vet World, 2021,14(10):2809-2816.
- [77] Liu L, Wang H, Xu W, et al. Tracking *Clostridium perfringens* strains from breeding duck farm to commercial meat duck farm by multilocus sequence typing[J]. Vet Microbiol, 2022,266:109356.
- [78] Waites K B, Bade D J, Bebear C, et al. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas; Approved Guideline[M]. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
- [79] Dallenne C, Da C A, Decre D, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae[J]. J Antimicrob Chemother, 2010,65(3):490-495.
- [80] Chen J, Yu Z, Michel F J, et al. Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems[J]. Appl Environ Microbiol, 2007,73(14):4407-4416.
- [81] Kozak G K, Boerlin P, Janecko N, et al. Antimicrobial resistance in Escherichia coli isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada[J]. Appl Environ Microbiol, 2009,75(3):559-566.
- [82] Olsvik B, Olsen I, Tenover F C. Detection of tet(M) and tet(O) using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease[J]. Oral Microbiol Immunol, 1995,10(2):87-92.
- [83] 杨鑫. 细菌氯霉素类药物耐药基因三重PCR检测试剂盒研究与应用[D]. 四川农业大学, 2008.
- [84] Rebelo A R, Bortolaia V, Kjeldgaard J S, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes[J]. Euro Surveill, 2018,23(6).
- [85] Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates[J]. J Antimicrob Chemother, 2007,60(2):394-397.
- [86] Cattoir V, Weill F X, Poirel L, et al. Prevalence of *qnr* genes in Salmonella in France[J]. J Antimicrob Chemother, 2007,59(4):751-754.
- [87] Jiang H, Cheng H, Liang Y, et al. Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Escherichia coli Isolates From Penaeus vannamei and Pork From Large

- Markets in Zhejiang, China[J]. Front Microbiol, 2019,10:1787.
- [88] Baquero F, Reig M. Resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents in Spain[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1992,11(11):1016-1020.
- [89] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2001,65(2):232-260.
- [90] Brennan J, Skinner J, Barnum D A, et al. The efficacy of bacitracin methylene disalicylate when fed in combination with narasin in the management of necrotic enteritis in broiler chickens[J]. Poult Sci, 2003,82(3):360-363.
- [91] Johansson A, Greko C, Engstrom B E, et al. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes[J]. Vet Microbiol, 2004,99(3-4):251-257.
- [92] Wellington E M, Boxall A B, Cross P, et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria[J]. Lancet Infect Dis, 2013,13(2):155-165.
- [93] Glenn S J, Miskimins D W. Clostridial abomasitis in calves: case report and review of the literature[J]. Anaerobe, 2005,11(5):290-294.
- [94] R. E. Buchanan. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 科学出版社, 1984.
- [95] 王婧祺, 戴益民, 王娇, 等. 健康与腹泻仔猪源A型产气荚膜梭菌的多位点序列分型[J]. 中国兽医学报, 2021,41(01):68-73.
- [96] 王开功,文明,周碧君, 等. A型产气荚膜梭菌最佳产毒时间的确定[J]. 中国兽医科技, 2003(08):43-45.
- [97] 赵武玲. 基础生物化学[M]. 中国农业大学出版社, 2008.
- [98] 相思宇, 陈建, 闫可心, 等. 弗格森埃希菌生长曲线及半数致死量测定[J]. 动物医学进展, 2020,41(09):51-54.
- [99] 熊浩明, 魏柏青, 魏荣杰, 等. 用SPSS软件计算鼠疫菌半数致死量(LD₅₀)[J]. 中国人兽共患病学报, 2013,29(11):1127-1130.
- [100] 胡国梅, 张瑜, 田敏. 改良病理技术HE染色在病理诊断中的应用研究[J]. 中国社区医师, 2021,37(19):107-108.
- [101] 吴雨辰, 胡燕燕, 张嵘. 细菌分型方法的研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021,21(05):617-623.
- [102] 寸月娥. 上海市某区域综合ICU耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌感染危险因素模型及分子流行病学研究[D]. 南昌大学, 2021.

- [103] 王璞, 盛巧玲, 李鑫, 等. A型产气荚膜梭菌小鼠感染模型的建立[J]. 中国兽医杂志, 2013,49(05):36-38.
- [104] 吕静, 柴同杰, 张兴晓, 等. A型产气荚膜梭菌 α -毒素生产发酵工艺[J]. 中国兽医学报, 2010,30(01):60-64.
- [105] 单雪梅, 金鑫, 李云霄, 等. D型产气荚膜梭菌最佳产毒时间及毒素大小的确定[J]. 畜牧兽医杂志, 2008(04):22-24.
- [106] 徐凤, 雷萍. 菌悬液稀释倍数与OD₆₀₀的关系实验[J]. 环保科技, 2010,16(03):43-45.
- [107] 梅开顺. 概率单位加权回归法计算LD₅₀在微机上的应用[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2000(05):366.
- [108] 陈杰. 再接再厉,努力提高我国的病理诊断和研究水平[J]. 中华病理学杂志, 2006(11):642-643.
- [109] Chen Y, Chen Y, Shi C, et al. SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data[J]. Gigascience, 2018,7(1):1-6.
- [110] Wick R R, Judd L M, Gorrie C L, et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. PLoS Comput Biol, 2017,13(6):e1005595.
- [111] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. Bioinformatics, 2014,30(14):2068-2069.
- [112] Syberg-Olsen M J, Garber A I, Keeling P J, et al. Pseudofinder: Detection of Pseudogenes in Prokaryotic Genomes[J]. Mol Biol Evol, 2022,39(7).
- [113] Tempel S. Using and understanding RepeatMasker[J]. Methods Mol Biol, 2012,859:29-51.
- [114] Eddy S R. Accelerated Profile HMM Searches[J]. PLoS Comput Biol, 2011,7(10):190-195.
- [115] Buchfink B, Reuter K, Drost H G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND[J]. Nat Methods, 2021,18(4):366-368.
- [116] McArthur A G, Waglechner N, Nizam F, et al. The comprehensive antibiotic resistance database[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013,57(7):3348-3357.
- [117] Fischer M, Knoll M, Sirim D, et al. The Cytochrome P450 Engineering Database: a navigation and prediction tool for the cytochrome P450 protein family[J]. Bioinformatics, 2007,23(15):2015-2017.
- [118] Almagro A J, Tsirigos K D, Sonderby C K, et al. SignalP 5.0 improves signal

- peptide predictions using deep neural networks[J]. *Nat Biotechnol*, 2019,37(4):420-423.
- [119] 付宇航. 麋鹿源产气荚膜梭菌的分离鉴定及强毒株CX1-4全基因组测序分析[D]. 华中农业大学, 2022.
- [120] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium[J]. *Nat Genet*, 2000,25(1):25-29.
- [121] Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, et al. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004,32(Database issue):D277-D280.
- [122] Tatusov R L, Galperin M Y, Natale D A, et al. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000,28(1):33-36.

附录

附表 1 144 株牦牛源产气荚膜梭菌详细信息

菌株编号	菌株来源	毒素型	毒素基因						ST 型	CCs
			<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	<i>cpe</i>	<i>netB</i>		
N01	祁连县	A	+	-	-	-	-	-	1	
N02	祁连县	A	+	-	-	-	-	-	2	
N03	祁连县	A	+	-	-	-	-	-	3	CC10
N04	祁连县	A	+	-	-	-	-	-	3	CC10
N05	祁连县	A	+	-	-	-	-	-	3	CC10
N06	祁连县	A	+	-	-	-	-	-	3	CC10
N07	祁连县	A	+	-	-	-	-	-	3	CC10
N08	称多县	A	+	-	-	-	-	-	4	
N09	称多县	A	+	-	-	-	-	-	5	
N10	称多县	A	+	-	-	-	-	-	6	
N11	清水河镇	A	+	-	-	-	-	-	7	
N12	清水河镇	F	+	-	-	-	+	-	8	
N13	清水河镇	A	+	-	-	-	-	-	9	
N14	清水河镇	A	+	-	-	-	-	-	10	CC6
N15	清水河镇	A	+	-	-	-	-	-	10	CC6
N16	清水河镇	A	+	-	-	-	-	-	11	
N17	清水河镇	F	+	-	-	-	+	-	12	
N18	清水河镇	A	+	-	-	-	-	-	12	
N19	清水河镇	A	+	-	-	-	-	-	13	CC1
N20	大通县	A	+	-	-	-	-	-	14	
N21	大通县	D	+	-	+	-	-	-	15	CC7
N22	大通县	A	+	-	-	-	-	-	16	
N23	大通县	D	+	-	+	-	-	-	15	CC7
N24	大通县	A	+	-	-	-	-	-	17	
N25	大通县	D	+	-	+	-	-	-	15	CC7
N26	大通县	A	+	-	-	-	-	-	17	
N27	大通县	A	+	-	-	-	-	-	17	
N28	大通县	A	+	-	-	-	-	-	18	

附表 1 (续)

菌株编号	菌株来源	毒素型	毒素基因						ST 型	CCs
			<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	<i>cpe</i>	<i>netB</i>		
N29	大通县	A	+	-	-	-	-	-	16	
N30	大通县	D	+	-	+	-	-	-	19	CC7
N31	大通县	A	+	-	-	-	-	-	8	
N32	大通县	A	+	-	-	-	-	-	10	CC6
N33	大通县	A	+	-	-	-	-	-	20	
N34	大通县	A	+	-	-	-	-	-	10	CC6
N35	大通县	A	+	-	-	-	-	-	8	
N36	大通县	A	+	-	-	-	-	-	21	
N37	大通县	A	+	-	-	-	-	-	10	CC6
N38	治多县	A	+	-	-	-	-	-	22	
N39	治多县	A	+	-	-	-	-	-	23	
N40	治多县	A	+	-	-	-	-	-	22	
N41	治多县	A	+	-	-	-	-	-	24	CC11
N42	治多县	C	+	+	-	-	-	-	25	
N43	治多县	A	+	-	-	-	-	-	26	CC11
N44	治多县	C	+	+	-	-	-	-	27	
N45	治多县	C	+	+	-	-	-	-	25	
N46	治多县	A	+	-	-	-	-	-	28	
N47	治多县	C	+	+	-	-	-	-	29	
N48	治多县	C	+	+	-	-	-	-	25	
N49	治多县	A	+	-	-	-	-	-	30	CC3
N50	杂多县	A	+	-	-	-	-	-	31	CC5
N51	杂多县	A	+	-	-	-	-	-	32	CC4
N52	杂多县	A	+	-	-	-	-	-	4	
N53	杂多县	A	+	-	-	-	-	-	33	CC4
N54	杂多县	A	+	-	-	-	-	-	33	CC4
N55	杂多县	A	+	-	-	-	-	-	34	CC10
N56	杂多县	A	+	-	-	-	-	-	33	CC4
N57	杂多县	A	+	-	-	-	-	-	35	
N58	杂多县	A	+	-	-	-	-	-	33	CC4

附表 1 (续)

菌株编号	菌株来源	毒素型	毒素基因						ST 型	CCs
			<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	<i>cpe</i>	<i>netB</i>		
N59	杂多县	A	+	-	-	-	-	-	4	
N60	杂多县	A	+	-	-	-	-	-	36	CC2
N61	杂多县	A	+	-	-	-	-	-	36	CC2
N62	班戈县	F	+	-	-	-	+	-	37	
N63	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	38	CC5
N64	班戈县	F	+	-	-	-	+	-	39	
N65	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	40	
N66	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	41	CC10
N67	班戈县	C	+	+	-	-	-	-	42	
N68	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	43	CC3
N69	班戈县	C	+	+	-	-	-	-	44	
N70	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	45	
N71	班戈县	C	+	+	-	-	-	-	41	CC10
N72	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	46	
N73	班戈县	C	+	+	-	-	-	-	47	CC8
N74	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	48	
N75	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	49	
N76	班戈县	C	+	+	-	-	-	-	50	
N77	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	51	
N78	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	45	
N79	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	38	CC5
N80	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	52	
N81	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	53	CC2
N82	班戈县	A	+	-	-	-	-	-	54	
N83	班戈县	C	+	+	-	-	-	-	55	
N84	拉萨市	A	+	-	-	-	-	-	56	CC9
N85	拉萨市	A	+	-	-	-	-	-	57	
N86	拉萨市	A	+	-	-	-	-	-	58	
N87	拉萨市	A	+	-	-	-	-	-	56	CC9
N88	拉萨市	A	+	-	-	-	-	-	59	

附表 1 (续)

菌株编号	菌株来源	毒素型	毒素基因						ST 型	CCs
			<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	<i>cpe</i>	<i>netB</i>		
N89	拉萨市	A	+	-	-	-	-	-	60	
N90	拉萨市	A	+	-	-	-	-	-	61	CC1
N91	拉萨市	A	+	-	-	-	-	-	10	CC6
N92	拉萨市	A	+	-	-	-	-	-	56	CC9
N93	拉萨市	C	+	+	-	-	-	-	62	CC9
N94	拉萨市	C	+	+	-	-	-	-	63	
N95	拉萨市	C	+	+	-	-	-	-	63	
N96	日喀则市	A	+	-	-	-	-	-	64	
N97	日喀则市	A	+	-	-	-	-	-	10	CC6
N98	日喀则市	A	+	-	-	-	-	-	10	CC6
N99	日喀则市	C	+	+	-	-	-	-	63	
N100	日喀则市	A	+	-	-	-	-	-	65	
N101	日喀则市	A	+	-	-	-	-	-	66	CC6
N102	日喀则市	A	+	-	-	-	-	-	10	CC6
N103	林芝市	F	+	-	-	-	+	-	67	
N104	林芝市	F	+	-	-	-	+	-	47	CC8
N105	林芝市	A	+	-	-	-	-	-	68	
N106	林芝市	A	+	-	-	-	-	-	69	
N107	林芝市	A	+	-	-	-	-	-	70	
N108	林芝市	A	+	-	-	-	-	-	71	
N109	林芝市	A	+	-	-	-	-	-	72	
N110	林芝市	A	+	-	-	-	-	-	73	
N111	林芝市	A	+	-	-	-	-	-	73	
N112	林芝市	A	+	-	-	-	-	-	74	
N113	林芝市	A	+	-	-	-	-	-	75	
N114	林芝市	A	+	-	-	-	-	-	76	
N115	林芝市	F	+	-	-	-	+	-	77	
N116	曲松县	A	+	-	-	-	-	-	78	
N117	曲松县	C	+	+	-	-	-	-	76	
N118	曲松县	A	+	-	-	-	-	-	79	CC1

附表 1 (续)

菌株编号	菌株来源	毒素型	毒素基因						ST 型	CCs
			<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	<i>cpe</i>	<i>netB</i>		
N119	曲松县	C	+	+	-	-	-	-	76	
N120	曲松县	C	+	+	-	-	-	-	76	
N121	曲松县	A	+	-	-	-	-	-	80	
N122	曲松县	C	+	+	-	-	-	-	76	
N123	曲松县	A	+	-	-	-	-	-	76	
N124	曲松县	A	+	-	-	-	-	-	76	
N125	曲松县	C	+	+	-	-	-	-	76	
N126	桑日县	A	+	-	-	-	-	-	76	
N127	桑日县	A	+	-	-	-	-	-	76	
N128	桑日县	A	+	-	-	-	-	-	81	CC6
N129	桑日县	C	+	+	-	-	-	-	76	
N130	桑日县	A	+	-	-	-	-	-	76	
N131	桑日县	A	+	-	-	-	-	-	81	
N132	桑日县	A	+	-	-	-	-	-	76	
N133	桑日县	A	+	-	-	-	-	-	81	
N134	桑日县	A	+	-	-	-	-	-	80	
N135	桑日县	C	+	+	-	-	-	-	76	
N136	嘉黎县	A	+	-	-	-	-	-	82	
N137	嘉黎县	A	+	-	-	-	-	-	83	
N138	嘉黎县	A	+	-	-	-	-	-	84	
N139	嘉黎县	A	+	-	-	-	-	-	85	
N140	嘉黎县	A	+	-	-	-	-	-	86	CC8
N141	嘉黎县	C	+	+	-	-	-	-	87	
N142	嘉黎县	C	+	+	-	-	-	-	88	
N143	嘉黎县	A	+	-	-	-	-	-	89	
N144	嘉黎县	C	+	+	-	-	-	-	89	

附表 2 144 株牦牛源产气荚膜梭菌耐药谱

耐药模式	耐药菌株数量 (%)		
	青海 (n=61)	西藏 (n=83)	合计 (n=144)
一重	0	0	0
两重	1 (1.64)	1 (1.20)	2 (1.39)
AGA-SAs	1 (100)	0	1 (50)
CEP-POL	0	1 (100)	1 (50)
三重	10 (16.39)	15 (18.07)	25 (17.36)
AGA-LIN-SAs	1 (10)	0	1 (4)
MAC-AGA-SAs	6 (60)	1 (6.67)	7 (28)
AGA-POL-SAs	1 (10)	1 (6.67)	2 (8)
MAC-POL-SAs	2 (20)	0	2 (8)
MAC-AGA-POL	0	6 (40)	6 (24)
CPE-AGA-POL	0	2 (13.33)	2 (8)
AGA-POL-SAs	0	3 (20)	3 (12)
MAC-AGA-TET	0	1 (6.67)	1 (4)
MAC-AGA-FZ	0	1 (6.67)	1 (4)
四重	16 (26.23)	26 (31.33)	42 (29.17)
CEP-MAC-AGA-SAs	2 (12.5)	1 (3.85)	3 (7.14)
MAC-AGA-POL-SAs	1 (6.25)	1 (3.85)	2 (4.76)
MAC-AGA-POL-SAs	7 (43.75)	17 (65.38)	24 (57.14)
PEN-AGA-POL-SAs	3 (18.75)	3 (11.54)	6 (14.29)
MAC-AGA-LIN-SAs	1 (6.25)	0	1 (2.38)
CEP-MAC-AGA-POL	1 (6.25)	4 (15.38)	5 (11.90)
MAC-AGA-FZ-SAs	1 (6.25)	0	1 (2.38)
五重	14 (22.95)	23 (27.71)	37 (25.69)
MAC-AGA-LIN-POL-SAs	3 (21.43)	1 (4.35)	4 (10.81)
PEN-MAC-AGA-POL-SAs	3 (21.43)	6 (26.09)	9 (24.32)
PEN-MAC-AGA-CAP-SAs	1 (7.14)	2 (8.70)	3 (8.11)
MAC-AGA-TET-POL-SAs	3 (21.43)	0	3 (8.11)
MAC-AGA-POL-QUIN-SAs	1 (7.14)	3 (13.04)	4 (10.81)
CEP-AGA-CAP-POL-SAs	2 (14.29)	1 (4.35)	3 (8.11)
MAC-TET-POL-FZ-SAs	1 (7.14)	6 (7.23)	7 (18.92)

附表 2 (续)

耐药模式	耐药菌株数量 (%)		
	青海 (n=61)	西藏 (n=83)	合计 (n=144)
CEP-AGA-TET-POL-SAs	0	1 (4.35)	1 (2.70)
PEN-MAC-AGA-TET-SAs	0	1 (4.35)	1 (2.70)
MAC-AGA-CAP-POL-SAs	0	2 (8.70)	2 (5.41)
六重	12 (19.67)	10 (12.05)	22 (15.28)
PEN-MAC-AGA-POL-FZ-SAs	3 (25.00)	1 (10.00)	4 (18.18)
CPE-MAC-AGA-CAP-POL-SAs	1 (8.33)	0	1 (4.55)
MAC-AGA-LIN-CAP-POL-SAs	1 (8.33)	0	1 (4.55)
MAC-AGA-TET-POL-QUIN-SAs	1 (8.33)	2 (20.00)	3 (13.64)
PEN-MAC-POL-QUIN-FZ-SAs	1 (8.33)	0	1 (4.55)
CEP-MAC-AGA-TET-FZ-SAs	2 (16.67)	0	2 (9.09)
MAC-AGA-POL-QUIN-FZ-SAs	1 (8.33)	0	1 (4.55)
MAC-AGA-LIN-POL-FZ-SAs	1 (8.33)	3 (30.00)	4 (18.18)
PEN-MAC-AGA-LIN-POL-SAs	1 (8.33)	2 (20.00)	3 (13.64)
MAC-AGA-TET-LIN-QUIN-SAs	0	2 (20.00)	2 (9.09)
七重	6 (9.84)	4 (4.82)	10 (6.94)
MAC-AGA-TET-LIN-CAP-POL-SAs	2 (33.33)	0	2 (20)
CEP-MAC-AGA-LIN-POL-QUIN-SAs	2 (33.33)	1 (25)	3 (30)
PEN-AGA-LIN-CAP-POL-FZ-SAs	1 (16.67)	0	1 (10)
PEN-MAC-AGA-TET-LIN-POL-SAs	1 (16.67)	0	1 (10)
CEP-MAC-AGA-CAP-POL-FZ-SAs	0	2 (50)	2 (20)
CEP-MAC-AGA-CAP-POL-QUIN-SAs	0	1 (25)	1 (10)
八重	2 (3.28)	2 (2.41)	4 (2.78)
PEN-MAC-AGA-TET-POL-QUIN-FZ-SAs	1 (50)	0	1 (25)
CEP-MAC-AGA-TET-CAP-POL-QUIN-SAs	1 (50)	2 (100)	3 (75)
九重	0	2 (2.41)	2 (1.39)
PEN-MAC-AGA-TET-LIN-CAP-POL-FZ-SAs	0	1 (50)	1 (50)
PEN-MAC-AGA-TET-LIN-POL-QUIN-FZ-SAs	0	1 (50)	1 (50)

注: PEN, 青霉素类抗生素; CPE, 头孢菌素类抗生素; MAC, 大环内酯类抗生素; AGA, 氨基糖苷类抗生素; TET, 四环素类抗生素; LIN, 林可酰胺类抗生素; CAP, 氯霉素抗生素; POL, 多肽抗生素; QUIN, 喹诺酮类抗生素; FZ, 呋喃唑酮类抗生素; SAs, 磺胺类抗生素; PEN和CEP属于 β -内酰胺类抗生素。