

研究报告

犊牛腹泻大肠杆菌临床症状及分子流行病学

张东, 张海龙, 许会会, 陈思, 张如, 高阳, 杨艳玲*

中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 130112

张东, 张海龙, 许会会, 陈思, 张如, 高阳, 杨艳玲. 犊牛腹泻大肠杆菌临床症状及分子流行病学[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 736-748.

ZHANG Dong, ZHANG Hailong, XU Huihui, CHEN Si, ZHANG Ru, GAO Yang, YANG Yanling. Clinical symptoms and molecular epidemiology of diarrhea caused by *Escherichia coli* in calves[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 736-748.

摘要:【背景】腹泻是导致新生犊牛死亡的主要原因之一, 而大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为机会性致病菌是新生犊牛肠道感染的主要病原。尽管常用抗生素对其进行治疗, 但大肠杆菌的多血清型及多种抗生素耐药性的增加给治疗带来了极大的困难。【目的】探究吉林省地区牛场犊牛腹泻中大肠杆菌感染的临床症状、毒力基因、血清型、耐药性及系统进化群等流行特征。【方法】采用PCR、药敏试验等方法对大肠杆菌的血清型、毒力因子和耐药性、系统发育进行检测。【结果】从150份病料中分离出92株大肠杆菌, 检出率为61.3%; 肠道内致病性大肠杆菌主要毒力基因为K88(10%)、K99(48%)、F17(85%)、F41(20%)、*fimH*(20%)、*csgA*(87%)、*eaeA*(4.5%)、*bfpA*(5%)、*hlyA*(4.5%)、*hlyE*(61.8%)、*stx1*(22%)、*stx2*(34%)、*fyuA*(3%)、STa(15%)、STb(92%), 未检出F6和F18。O血清检测中, 86%(79/92)的毒株确定了O抗原血清型, 其中O101(32%)为优势血清型; 其次为O103(15%)。分离菌株多数具有多重耐药性, 对氨苄西林、四环素、庆大霉素和链霉素耐药率分别为52.7%、53.3%、40.7%和50%。菌株携带 β -内酰胺类*ampC*(45.21%)、*bla_{CTX}*(42.47%)、*bla_{TEM}*(56.85%), 四环素类*tetA*(55.48%), 氨基糖苷类*addA*(55.48%)、*aph(3')-Ia*(43.15%)和*aphA3*(30.22%)基因。菌株中36株为A1群(24%), 27株为B1群(18%), 6株为B2群(4%), 20株为D群(13.3%)。【结论】吉林省牛场犊牛腹泻大肠杆菌感染率较为严重, 多属于A1和B1群, O101为优势血清型, 分离株携带多种毒力基因和耐药基因, 多重耐药严重。应加强犊牛饲养管理及疫苗免疫, 减少抗生素使用。

关键词: 犊牛腹泻; 肠道内致病性大肠杆菌; 毒力基因; 耐药性

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1802500); 吉林省自然科学基金(YDZJ202501ZYTS480, YDZJ202401460ZYTS)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1802500) and the Natural Science Foundation of Jilin Province (YDZJ202501ZYTS480, YDZJ202401460ZYTS).

*Corresponding author. E-mail: m18043213639@163.com

Received: 2024-08-29; Accepted: 2025-01-15; Published online: 2025-01-21

Clinical symptoms and molecular epidemiology of diarrhea caused by *Escherichia coli* in calves

ZHANG Dong, ZHANG Hailong, XU Huihui, CHEN Si, ZHANG Ru, GAO Yang, YANG Yanling*

Institute of Special Animal and Plant Sciences of Chinese Academy of Agriculture, Changchun 130112, Jilin, China

Abstract: [Background] Diarrhea is one of the main causes of death in newborn calves, and *Escherichia coli*, as an opportunistic pathogen, is the main pathogen of intestinal infection in newborn calves. Although antibiotics are commonly used to treat this pathogen, the multiple serotypes of *E. coli* and the enhancing resistance to multiple antibiotics have brought great difficulties to treatment. **[Objective]** To investigate the clinical symptoms of *E. coli*-induced diarrhea and the virulence genes, serotypes, drug resistance, and phylogenetic characteristics of *E. coli* in calves in Jilin Province. **[Methods]** PCR, drug sensitivity test, and other methods were employed to determine the serotypes, phylogeny, virulence factors, and drug resistance of *E. coli*. **[Results]** A total of 92 strains of *E. coli* were isolated from 150 samples, with the detection rate of 61.3%. The main virulence genes of intestinal pathogenic *E. coli* were K88 (10%), K99 (48%), F17 (85%), F41 (20%), *fimH* (20%), *csgA* (87%), *eaeA* (4.5%), *bfpA* (5%), *hlyA* (4.5%), *hlyE* (61.8%), *stx1* (22%), *stx2* (34%), *fyuA* (3%), STa (15%), and STb (92%), while F6 and F18 were not detected. Among the isolates, 86% (79/92) were of O-antigen serotypes, among which O101 (32%) was the dominant serotype, followed by O103 (15%). Most of the isolates had multidrug resistance, with the resistance rates to ampicillin, tetracycline, gentamicin, and streptomycin being 52.7%, 53.3%, 40.7%, and 50%, respectively. The strains carried *ampC* (45.21%), *bla_{CTX}* (42.47%), *bla_{TEM}* (56.85%) of β -lactams, *tetA* (55.48%) of tetracyclines, and *addA* (55.48%), *aph(3')-Ia* (43.15%), and *aphA3* (30.22%) of aminoglycosides. Among the strains, 36 (24%), 27 (18%), 6 (4%), and 20 (13.3%) strains belonged to groups A1, B1, B2, and D, respectively. **[Conclusion]** The infection rate of *E. coli* causing diarrhea in calves in Jilin Province is serious, and most of the pathogen strains belonged to A1 and B1 groups. O101 was the dominant serotype, and the isolates carried a variety of virulence genes and drug resistance genes, demonstrating serious multidrug resistance. Feeding management and vaccine immunization should be strengthened for calves, and the use of antibiotics should be reduced.

Keywords: calf diarrhea; intestinal pathogenic *Escherichia coli*; virulence gene; drug resistance

新生犊牛是全球肉类或养殖动物生产的重要来源。腹泻是导致犊牛死亡的主要病因之一，30日龄以下犊牛发病率最高。由腹泻引起的死亡率占犊牛总死亡率的39%，严重影响牛出栏量以及牛产品质量，阻碍养牛产业的健康发展^[1]。新生犊牛腹泻是一种多因素的疾病，包括非传

于恶劣环境，对新生犊牛的关注不足；还包括传染性原因，如病原感染^[2]。大多数地区常见的流行感染病原主要是大肠杆菌(*Escherichia coli*)、牛轮状病毒(Bovine rotavirus, BRV)、牛冠状病毒(Bovine coronavirus, BCoV)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、沙门氏菌(*Salmonella*)和隐孢子虫(*Cryptosporidium tyzzeri*)^[3]。不同病原

感染和致病情况与犊牛日龄、饲养管理等密切相关。新生犊牛腹泻原因通常与其中一种以上的因素有关，多数暴发原因是多因素共同导致的。

大肠杆菌是引起新生犊牛腹泻非常重要的细菌性病原菌，一年四季均能发病，尤其是冬春季节，不仅能够引起犊牛腹泻，还能引起犊牛的败血症、腹膜炎等，严重者导致急性死亡，发病率高达 90%，死亡率约为 50%^[4]。因此，根据其临床症状分为败血症型、肠毒血症型和肠炎型^[5]。败血症型主要发生在 5 日龄以内的新生犊牛，被毛杂乱无光泽、精神萎靡、反应迟钝，体温升高，食欲减退甚至是废绝，呈现淡黄色水样粪便，发病后 24 h 内急性死亡，少数犊牛未出现以上临床症状而急性死亡，死亡率高达 50%以上；肠毒血症型主要发生于 7 日龄以内犊牛，发病率和死亡率高达 70%以上，常常不表现临床症状而突然死亡；肠炎型多发生于 14 日龄以内犊牛，温度升高，几小时后开始腹泻，腹泻初期稀粪呈淡黄色，慢慢转变成水样灰白色；发病后期，犊牛出现肛门失禁，出现脱水、酸中毒等症状，因脱水和电解质失衡而死亡^[6]。

肠道内致病性大肠杆菌主要包括产肠毒素大肠杆菌 (*enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)、肠致病性大肠杆菌 (*enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC)、肠出血性大肠杆菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC)、产志贺毒素大肠杆菌 (*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC)。肠道内致病性大肠杆菌的致病力取决于 2 种重要的毒力因子，菌体表面的菌毛(负责细菌能够黏附并定植于小肠腔表面)及影响肠道体液分泌的肠毒素^[7]。例如热稳定性肠毒素(heat-stable enterotoxin, ST)和菌毛 K99、F41 与犊牛腹泻有关^[8]；菌毛 F17 与

犊牛腹泻、败血症有关^[9]；志贺毒素 1 (Stx1)和志贺毒素 2 (Stx2)也是导致犊牛腹泻的主要原因^[10]。国内对犊牛大肠杆菌分子流行病学调研中发现，导致犊牛腹泻的大肠杆菌具有地域流行性，其中携带 K88、K99、F41 及 F17 毒力因子的产肠毒素大肠杆菌在腹泻犊牛中经常被分离出来^[11-13]。也有研究人员分离出 K99 和 F41 多价的致病菌株^[14]。

目前牛场大剂量使用抗生素来治疗犊牛腹泻，导致多重耐药菌的出现，极大地增加了治疗难度^[15]。为了有效预防和控制由大肠杆菌引起的犊牛腹泻，本研究收集吉林省肉牛养殖场中腹泻犊牛的粪便样，通过病原分离鉴定、血清型、毒力基因、系统发育及耐药性检测，旨在获得主要流行菌株，为将来新型疫苗的研制和临床防治过程中选择有效抗生素提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品

自 2023 年 1 月至 2024 年 1 月期间，实验室工作人员从我国吉林省不同规模牛场采集了 60 日龄以内腹泻犊牛粪便、肛拭子及肠道内容物等样品，共计 150 份。150 份病料来自 11 个县市共计 15 个大中小型牛场，分别是长春市的九台区、南关区、榆树、农安，吉林市的桦甸、磐石，四平市的梨树县、伊通满族自治县，通化市的通化县，松原市的长岭县，以及白城市的通榆县。所有采集的样品均保存在 4 °C，并在 24 h 内带回实验室进行大肠杆菌分离。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

LB 培养基，Oxoid 公司；麦康凯琼脂和伊红美蓝琼脂，青岛高科园海博生物技术有限公司。氯化钠，国药集团化学试剂有限公司；琼脂粉和革兰氏染色试剂盒，Solarbio 公司；大肠

埃希氏菌属诊断血清试剂盒, 宁波天润生物药业有限公司; $2\times$ Taq Master Mix (Dye Plus), 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; DL2000 DNA Marker, TaKaRa 公司; 药敏试验纸片, 赛默飞世尔科技公司; 大肠杆菌诊断血清型试剂盒, 宁波天润生物药业有限公司。赛洛捷克梯度 PCR 基因扩增仪, 上海珂淮仪器有限公司; 恒温细菌培养箱, 上海三腾仪器有限公司; 倒置显微镜, 上海徕卡仪器有限公司。

1.3 大肠杆菌的分离纯化及扩大培养

将粪便、肛拭子及肠道内容物样品分别溶于 PBS 中并分别划线接种于麦康凯琼脂培养基和伊红美蓝琼脂培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h 后观察菌落的分布和形态特征, 选择粉红色典型的单菌落, 再在伊红美蓝琼脂培养基上进行纯化; 纯化到第 3 代后, 挑取单菌落接种于 4 mL LB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 24 h 后按照 1% 的接种量将菌液接种于新鲜 LB 液体培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 8 h, 并加入 25% 甘油进行保种, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。剩余菌液用于革兰氏染色、DNA 模板制备及 O 抗原凝集试验。

1.4 革兰氏染色方法

取适量混匀的细菌培养液按照革兰氏染色试剂盒说明书进行革兰氏染色, 染色完成后镜检观察其纯度及形态。

1.5 分离纯化大肠杆菌的 PCR 鉴定

大肠杆菌基因组 DNA 的提取: 将 1.3 中剩余培养菌液通过煮沸法对细菌进行 DNA 模板制备, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

大肠杆菌毒力基因的 PCR 扩增: 使用大肠杆菌鉴定引物 K88、K99、F6、F17、F18、F41、*fimH*、*csgA*、*eaeA*、*bfpA*、*hlyA*、*hlyE*、*stx1*、*stx2*、*fyuA*、STa、STb 等毒力基因引物(表 1)进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系(25 μL): $2\times$ Taq

Master Mix 12.5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , 模板 DNA 2 μL , ddH₂O 8.5 μL 。PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 参照 DL2000 DNA Marker 判断产物大小是否正确。

1.6 大肠杆菌血清型鉴定

O 抗原采用传统的玻片凝集试验, 根据大肠杆菌诊断血清型试剂盒说明书进行凝集试验鉴定血清型。

1.7 耐药表型和耐药基因型检测

采用 K-B 纸片法对分离株进行药敏试验。吸取 200 μL 细菌培养液均匀涂布于 LB 固体培养基上, 待吸收 10 min 后将药敏片等距放置于培养基上进行药敏试验, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 18 h 后判定结果^[16]。耐药基因所用检测引物列于表 2, PCR 反应体系(25 μL): $2\times$ Taq Master Mix 12.5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , 模板 DNA 2 μL , ddH₂O 8.5 μL 。反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 参照 DL2000 DNA Marker 判断产物大小是否正确。

1.8 系统发育群分析

利用快速系统发育分组 PCR 将大肠杆菌菌株分为 8 个系统发育群。因此, 通过 PCR 检测基因 *chuA*、*yjaA*、*TspE4* 来确定大肠杆菌分离株的系统发育群, 引物见表 3。

2 结果与分析

2.1 腹泻犍牛发病临床症状

收集的所有样品均来自腹泻犍牛。犍牛临床症状主要表现为高热($>38\text{ }^{\circ}\text{C}$)、厌奶、喜卧、腹泻, 呈粥样臭便, 粪便颜色多为黄色(图 1A)、白色(图 1B), 而有些粪便呈深棕色(图 1C); 病

表 1 分离株毒力基因引物

Table 1 Primer of virulence gene of isolated bacteria

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product length (bp)
K88-F	ATTTCAATGGTTCGGTCG	770
K88-R	GATTGCTACGTTACGCGGAGCG	
K99-F	AAACACTGCTAGCTATTATC	533
K99-R	ATAAGTGAATAAGAAGGATGC	
F6-F	ACTTCTAATCTGTGCGAAAACC	422
F6-R	GAACGAATAGTCATTACTGCAC	
F17-F	CTGATAAGCGATGGTGTAATTAAC	538
F17-R	GCAGAAAATTCAATTTATCCTTGG	
F18-F	GGTGATGATGATTAGTGATGTG	1 140
F18-R	TGTTGCCCCACTGAGA	
F41-F	ATCAGCGGCAGTATCTGGTT	643
F41-R	GAGGTCATCCCAATTGTG	
<i>fimH</i> -F	ATTTACCAGCCAACGTC	643
<i>fimH</i> -R	GGGTTTGTGGATTCAGGG	
<i>csgA</i> -F	GGTAATAATAGCGGCCCAA	305
<i>csgA</i> -R	CAAAGCCAACCTGAGTGA	
<i>eaeA</i> -F	GAAGCCAAAGCGCACAAAGACT	413
<i>eaeA</i> -R	CTCCGCGGTTTTAGCAGACAC	
<i>bfpA</i> -F	CTGTATATTGGGCAGACCAGTT	219
<i>bfpA</i> -R	CGTTGCAAGACTAACACATGC	
<i>hlyA</i> -F	AGCCGGAACAGTTCTCTCAG	526
<i>hlyA</i> -R	CCAGCATAACAGCCGATGTA	
<i>hlyE</i> -F	GAAACCGCAGATGGAGCATT	543
<i>hlyE</i> -R	CGCCCGCAGCAATAGAATAG	
<i>stx1</i> -F	CAGTTAATGTGGTGCGAAGG	348
<i>stx1</i> -R	CACCAGACAATGTAACCGCTG	
<i>stx2</i> -F	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	478
<i>stx2</i> -R	GGATGCATCTCTGGTCATTG	
<i>fyuA</i> -F	TGATTAACCCCGGACGGGAA	880
<i>fyuA</i> -R	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	
STa-F	TCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG	163
STa-R	GCACAGGCAGGATTACAACAAAGT	
STb-F	GCAATAAGGTTGAGGTGAT	368
STb-R	GCCTGCAGTGAGAAATGGAC	

症严重的犊牛出现卧地不起(图 1D), 腹泻血便(图 1E、1F), 并出现神经症状和呼吸困难; 而在剖检的某个死亡犊牛中发现, 犊牛腹腔呈严重积水(图 1G)和腹膜炎(图 1H), 以及肺部出血(图 1I)等症状。ETEC 主要多发现于 10 日龄以内腹泻

犊牛, 尤其是 K99(F5)、F17 和 F41、热稳定肠毒素等与犊牛腹泻显著相关, 粪便多呈黄色或者白色稀便, 导致犊牛脱水严重, 陷入昏迷状态, 腹腔肿胀, 死亡率很高。而其他的大肠杆菌多见于 10–60 日龄内腹泻犊牛, 菌株分泌的毒

表 2 分离株耐药基因引物

Table 2 Primer of antibiotic resistance gene of isolated bacteria

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product length (bp)
<i>strA</i> -F	TGCTCCTCTTCTCCATCC	197
<i>strA</i> -R	CGCCGCCAATATGTTCTA	
<i>strB</i> -F	ATGATGCAGATCGCCATGTA	326
<i>strB</i> -R	CGGTCGTAGAGGCAATCTG	
<i>mcr-1</i> -F	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	309
<i>mcr-1</i> -R	CTTGGTCGGTCTGTAGGG	
<i>mcr-2</i> -F	TGTTGCTTGTGCCGATTGGA	577
<i>mcr-2</i> -R	AGATGGTATTGTTGGTTGCTG	
<i>oqxA</i> -F	GACAGCGTCGCACAGAATG	339
<i>oqxA</i> -R	GGAGACGAGGTTGGTATGGA	
<i>oqxB</i> -F	GCGGTGCTGTCGATTTTA	781
<i>oqxB</i> -R	TACCGGAACCCATCTCGAT	
<i>qnrB</i> -F	GGCATCGAAATTCGCCACTG	264
<i>qnrB</i> -R	TTTGCCGCCCGCCAGTCGAA	
<i>qepA</i> -F	CTTGCACTTAGTTAAGCGCC	866
<i>qepA</i> -R	GAGGTTTTGATAGTGGAGGTAGG	
<i>tetA</i> -F	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	210
<i>tetA</i> -R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	
<i>tetB</i> -F	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG	695
<i>tetB</i> -R	GTAATGGGCCAATAACACCG	
<i>cat</i> -F	AGTTGCTCAATGTACCTATAACC	547
<i>cat</i> -R	TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	
<i>floR</i> -F	AACCCGCCCTCTGGATCAAGTCAA	590
<i>floR</i> -R	GCACCAGCCCCAACGAAACCAGTA	
<i>cmlA</i> -F	CTGAGGGTGTCGTCATCTAC	517
<i>cmlA</i> -R	GCTCCGACAATGCTGACTAT	
<i>ampC</i> -F	CCCCGCTTATAGAGCAACAA	634
<i>ampC</i> -R	TCAATGGTCGACTTCACACC	
<i>bla_{PSE}</i> -F	ATGCTTTTATATAAAATGTG	914
<i>bla_{PSE}</i> -R	TCAGCGCGACTGTGATGTAT	
<i>bla_{CTX-M}</i> -F	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	544
<i>bla_{CTX-M}</i> -R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	
<i>bla_{TEM}</i> -F	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	861
<i>bla_{TEM}</i> -R	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	
<i>bla_{SHV}</i> -F	AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC	713
<i>bla_{SHV}</i> -R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
<i>sul1</i> -F	TGGTGACGGTGTTCCGGCATT	789
<i>sul1</i> -R	GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	
<i>sul2</i> -F	CGGCATCGTCAACATAACC	722
<i>sul2</i> -R	GTGTGCGGATGAAGTCAG	
<i>sul3</i> -F	CATTCTAGAAAACAGTCGTAGTTCG	990
<i>sul3</i> -R	CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGA	

(待续)

(续表 2)

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product length (bp)
<i>addA</i> -F	GTGGATGGCGGCCTGAAGCC	525
<i>addA</i> -R	AATGCCCAGTCGGCAGCG	
<i>aph(3')-Ia</i> -F	TGACTGGGCACAACAGACT	717
<i>aph(3')-Ia</i> -R	TCAAGAAGGCGATAGAAGGC	
<i>rmtB</i> -F	ATGAACATCAACGATGCCCTC	756
<i>rmtB</i> -R	TTATCCATTCTTTTTTATCAAGTATAT	
<i>aphA3</i> -F	TGACTGGGCACAACAGACAA	697
<i>aphA3</i> -R	CGGCGATACCGTAAAGCAC	

表 3 四种主要系统发育群基因引物

Table 3 Primer of the four main phylogenetic groups

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product length (bp)
<i>chuA</i> -F	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
<i>chuA</i> -R	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA</i> -F	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211
<i>yjaA</i> -R	AATGCGTTCCTCAACCTGTG	
<i>TspE4</i> -F	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152
<i>TspE4</i> -R	CGCGCCAACAAAGTATTACG	

素 Stx1/Stx2 导致犊牛腹泻及肠道出血等症状紧密相关。目前发现多为混合菌株感染。

2.2 大肠杆菌分离培养及染色镜检结果

共获得 92 株疑似大肠杆菌的菌株。这些菌株在麦康凯琼脂培养基上为边缘整齐、表面光滑的圆形或者椭圆形粉红色单菌落(图 2),在伊红美蓝培养基上为紫黑色带有金属光泽的圆形菌落(图 3)。挑取单菌落进行革兰氏染色,显微镜下观察可见单个存在的红色两端钝圆的短杆菌(图 4)。



图 1 腹泻犊牛临床症状

Figure 1 Clinical symptoms of diarrhea calves.

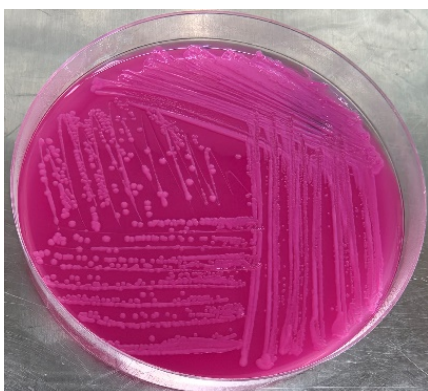


图2 麦康凯琼脂培养基培养结果
Figure 2 The result of McConkey agar medium.

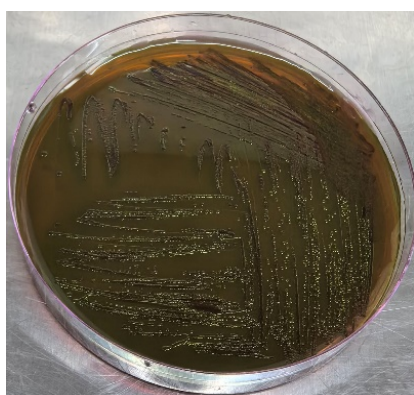


图3 伊红美蓝培养基培养结果
Figure 3 The result of eosin methylene blue medium.

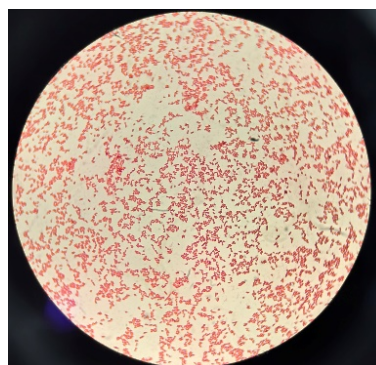


图4 革兰氏染色镜检结果(1 000×)
Figure 4 Gram staining microscopic results (1 000×).

2.3 大肠杆菌毒力基因鉴定结果

通过 PCR 试验对 92 株大肠杆菌分离株进行菌毛毒力基因、黏附基因及毒素基因的检测(图 5)。在 92 株菌株中, K88 (10, 10.9%)、K99 (45, 48.9%)、F17 (79, 85.9%)、F41 (19, 20.7%)、*fimH* (19, 20.7%)、*csgA* (80, 87.0%)、*eaeA* (4, 4.3%)、*bfpA* (5, 5.4%)、*hlyA* (4, 4.3%)、*hlyE* (57, 62.0%)、*stx1* (21, 22.8%)、*stx2* (32, 34.8%)、*fyuA* (3, 3.2%)、STa (14, 15.2%)、STb (85, 92.4%), 未检测到 F6、F18。结果表明, 致腹泻大肠杆菌主要菌株为产肠毒素大肠杆菌, 其次为产志贺毒素大肠杆菌。

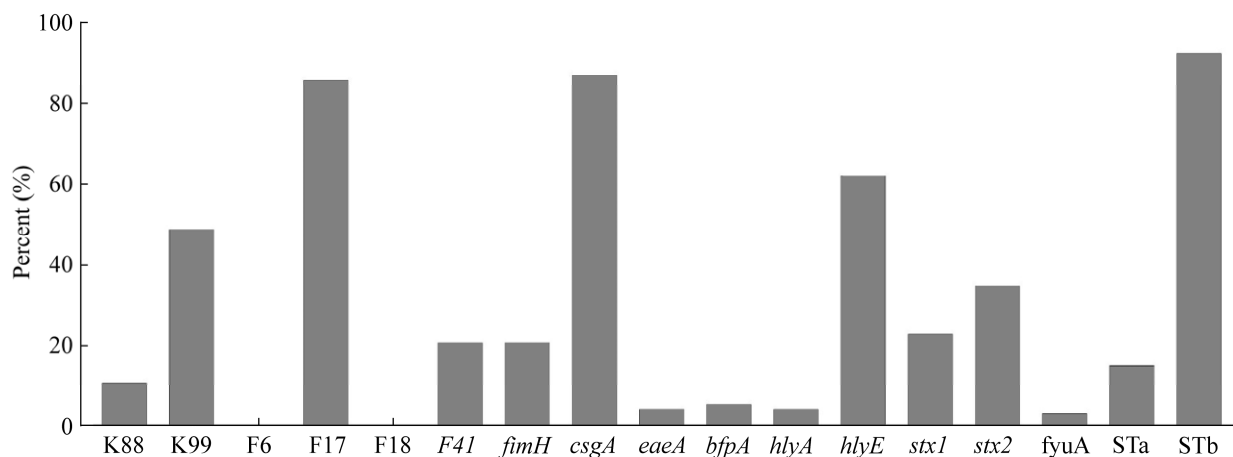


图5 大肠杆菌毒力基因鉴定结果
Figure 5 The result of virulence gene identification in *Escherichia coli*.

2.4 大肠杆菌优势血清型鉴定结果

对大肠杆菌 O 抗原血清型进行鉴定,结果显示(图 6)血清分型中 86% (79/92)的大肠杆菌分离株可分为 O 血清型,而 13 株不能分为任何血清型。在鉴定出的 O 血清型中,有 O6 (3, 3.8%)、O7 (1, 1.3%)、O12 (8, 10.1%)、O15 (7, 8.9%)、O16 (3, 3.8%)、O18 (3, 3.8%)、O78 (7, 8.9%)、O101 (26, 32.9%)、O103 (12, 15.2%)、O145 (3, 3.8%)和 O157 (4, 5.1%), O101 和 O103 为流行血清型。这些结果表明,吉林省主要的流行血清型为 O101,其次是 O103 和 O12。

2.5 大肠杆菌药敏试验结果

药敏试验结果中(图 7),92 株大肠杆菌对链霉素(46, 50%)、壮观霉素(39, 42.4%)、新霉素(43, 46.7%)、庆大霉素(37, 40.2%)、四环素(49, 53.3%)、氯霉素(40, 43.5%)、卡那霉素(43, 46.7%)和氨苄青霉素(48, 52.2%)表现出高度耐药,多数具有至少 3 种抗生素耐药性。在检测 92 株大肠杆菌耐药基因的结果中(图 8),检出的耐药基因有链霉素类 *strA*、*strB*, 多黏菌素类 *mcr-1*、*mcr-2*, 喹诺酮类 *oqxA*、*oqxB*、*qnrB*、*qepA*, 四环素类 *tetA*、*tetB*, 氯霉素类 *cat*、*floR*、*cmlA*, β -内酰胺类 *ampC*、*bla_{PSE}*、*bla_{CTX-M}*、*bla_{TEM}*、*bla_{SHV}*, 磺胺类 *sul1*、*sul2*、*sul3*, 以及氨基糖

苷类 *addA*、*aph(3')-Ia*、*rmtB*、*aphA3*。

2.6 系统发育群结果

系统发育群分型结果表明(图 9),大部分大肠杆菌菌株属于 A 群(36, 39.1%)、B1 群(18, 19.6%)和 D 群(20, 21.7%)。只有 6.5%的大肠杆菌菌株属于 B2 群。然而,有 13%的大肠杆菌菌株未被归类在这 4 种系统发育群里。因此,引起犊牛腹泻的大肠杆菌菌株与系统发育群 A、B1 和 D 密切相关。

多数毒力因子、流行血清型与系统发育群 A、B1 和 D 相关(如表 4 和表 5 所示)。其中, F17、F41、*fimH*、*csgA*、*hlyE*、STb 在所有群中均有分布; K88、K99、F17、F41、*fimH*、*csgA*、*hlyE*、*stx1*、*stx2*、STa 和 STb 在系统发育群 A 群中分布广泛。而 *eaeA* 和 *stx1* 仅与系统发育群 A 和 B1 相关。O12、O78、O101、O103 血清型在所有群中均有分布; O12、O15、O101、O103 在系统发育群 A 中广泛分布, O7 仅在系统发育群 A 中发现。O18、O145 与系统发育群 A 和 D 相关。

3 讨论

新生犊牛对致病性大肠杆菌易感,尤其是出生 1 周以内的发病率和死亡率较高。因此,

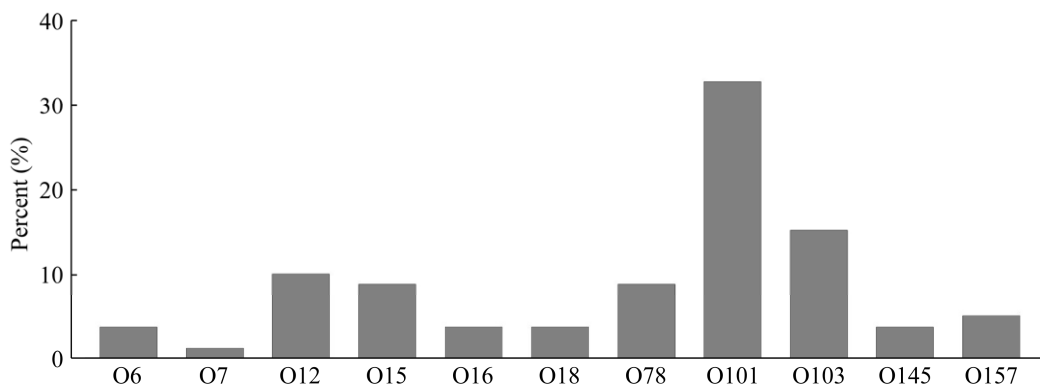


图 6 大肠杆菌 O 血清型结果

Figure 6 The result of O serotype in *Escherichia coli*.

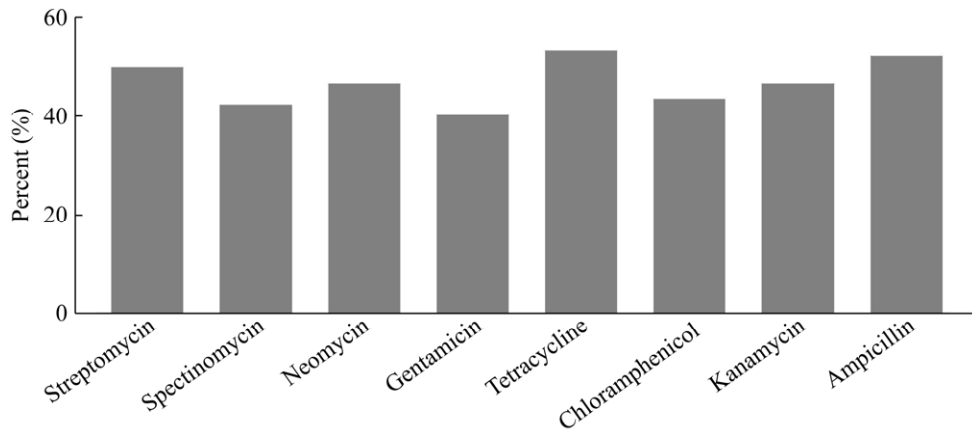


图 7 大肠杆菌耐药性结果
Figure 7 The result of drug resistance in *Escherichia coli*.

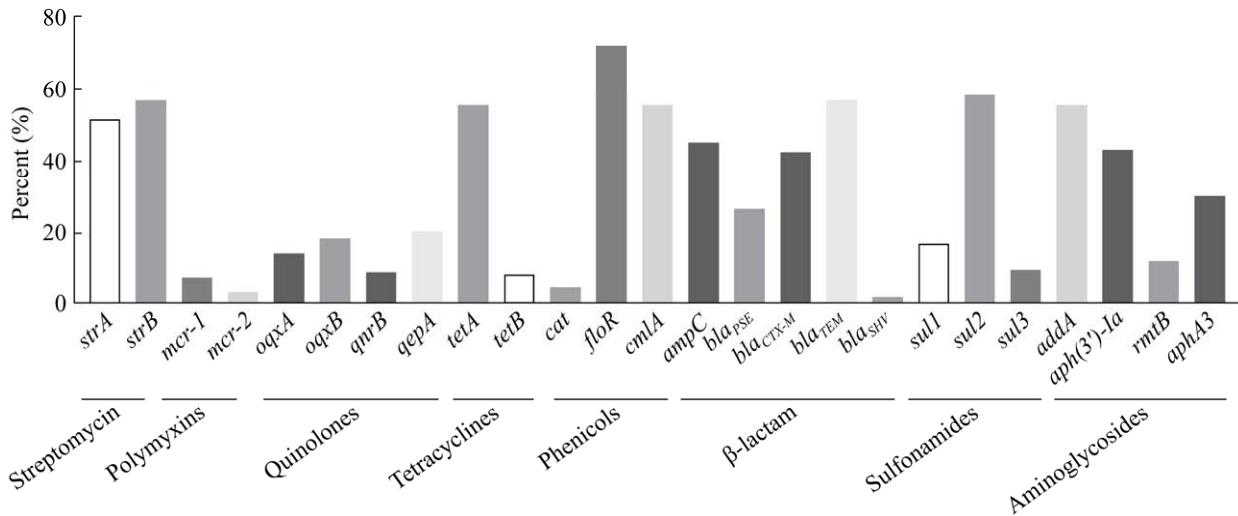


图 8 大肠杆菌耐药基因结果
Figure 8 The result of drug resistance gene in *Escherichia coli*.

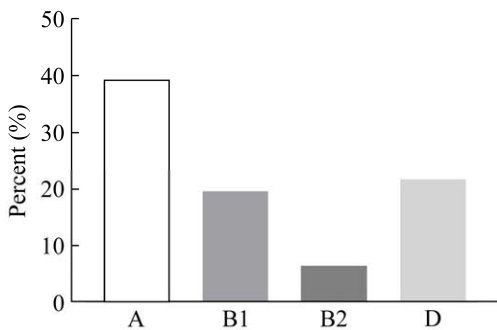


图 9 系统发育群结果
Figure 9 The result of phylogenetic group in *Escherichia coli*.

本实验样本多采自 60 日龄以内犊牛粪便样品，有利于了解犊牛不同日龄下易感流行株及其毒力基因分布等。本研究利用大肠杆菌鉴别培养方法、PCR 技术、药敏试验鉴定了大肠杆菌检出率、流行菌株及耐药性。通过鉴定的毒力基因结果结合采集粪便形态颜色、腹泻犊牛发病症状及死亡犊牛剖检病症，总结分析不同种类大肠杆菌感染所导致犊牛的临床症状。首先，通过鉴别培养筛选出吉林省腹泻犊牛大肠杆菌总检出率为 61.3% (92/150)。贾垆等^[17]报道 2020 年

表 4 系统发育群与毒力基因相关性

Table 4 Relationship among phylogenetic groups and virulence genes

Gene	Phylogenetic group (n (%))				Total
	A (N=36)	B1 (N=18)	B2 (N=6)	D (N=20)	
K88	6 (16.7%)	3 (16.7%)	0 (0%)	1 (5%)	10
K99	25 (69.4%)	15 (83.3%)	1 (16.7%)	4 (20%)	45
F17	36 (100%)	18 (100%)	6 (100%)	19 (95%)	79
F41	10 (27.8%)	5 (27.8%)	2 (33.3%)	2 (10%)	19
<i>fimH</i>	10 (27.8%)	4 (22.2%)	4 (66.7%)	1 (5%)	19
<i>csgA</i>	36 (100%)	18 (100%)	6 (100%)	20 (100%)	80
<i>eaeA</i>	1 (2.8%)	3 (16.7%)	0 (0%)	0 (0%)	4
<i>bfpA</i>	2 (5.6%)	2 (11.1%)	0 (0%)	1 (5%)	5
<i>hlyA</i>	1 (2.8%)	0 (0%)	2 (33.3%)	1 (5%)	4
<i>hlyE</i>	33 (91.7%)	12 (66.7%)	6 (100%)	6 (30%)	57
<i>stx1</i>	19 (52.8%)	2 (11.1%)	0 (0%)	0 (0%)	21
<i>stx2</i>	17 (47.2%)	13 (72.2%)	0 (0%)	2 (10%)	32
<i>fyuA</i>	1 (2.8%)	1 (5.6%)	0 (0%)	1 (5%)	3
<i>STa</i>	10 (27.8%)	3 (16.7%)	0 (0%)	1 (5%)	14
<i>STb</i>	36 (100%)	18 (100%)	6 (100%)	20 (100%)	80

n: 毒力基因型的数量; *N*: 系统发育群的数量。

n: The number of virulence genes; *N*: The number of phylogenetic groups.

表 5 系统发育群与 O 血清型相关性

Table 5 Relationship among phylogenetic groups and O serotype

Serotype	Phylogenetic group (n (%))				Total
	A (N=36)	B1 (N=18)	B2 (N=6)	D (N=20)	
O6	1 (2.8%)	1 (5.6%)	0 (0%)	1 (5%)	3
O7	1 (2.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1
O12	4 (11.1%)	2 (11.1%)	1 (16.7%)	1 (5%)	8
O15	3 (8.3%)	2 (11.1%)	0 (0%)	2 (10%)	7
O16	1 (2.8%)	1 (5.6%)	0 (0%)	1 (5%)	3
O18	2 (5.6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	3
O78	1 (2.8%)	3 (16.7%)	2 (33.3%)	1 (5%)	7
O101	10 (27.8%)	6 (33.3%)	2 (33.3%)	8 (40%)	26
O103	7 (19.4%)	2 (11.1%)	2 (33.3%)	1 (5%)	12
O145	2 (5.6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	3
O157	2 (5.6%)	1 (5.6%)	0 (0%)	1 (5%)	4

n: O 血清型的数量; *N*: 系统发育群的数量。

n: The number of O serotypes; *N*: The number of phylogenetic groups.

12 月至 2021 年 7 月京津冀部分地区牛场大肠杆菌总检出率为 97.3%; 关一凡等^[18]报道河北省部分地区检出率为 85.7%; 通常产肠毒素大肠杆菌 K99/F5、F17、F41 是新生犊牛易感染毒株,

本研究毒力基因的 PCR 检测结果同样证明了产肠毒素大肠杆菌 K99 (48%)、F17 (85%)、F41 (20%)是犊牛腹泻流行株, 其中在白色和黄色粪便中分离结果中, 多为 K99/F41 或者两者均有

的 ETEC 毒株感染导致；血便多为 F17/STEC 感染所致；导致犊牛发生腹膜炎、腹腔积水和肺部出血的菌株为 K99/F17/F41/STEC 感染。犊牛大肠杆菌感染率处于较高水平，能进一步反映饲养管理及无犊牛大肠杆菌疫苗免疫等问题，亟须制定改善饲养环境、新生犊牛初乳喂养等管理措施，并通过获得流行菌株制备大肠杆菌疫苗来预防犊牛感染大肠杆菌导致的腹泻。

大肠杆菌血清型分布广泛，种类繁多。本研究的 92 株大肠杆菌经血清鉴定分析共得到 11 个血清型，其中以 O101 为优势血清型。这与大多数研究报道的犊牛腹泻大肠杆菌是我国部分地区优势血清型基本一致^[7,19]。本研究通过利用常用抗生素耐药性及 8 类抗生素耐药基因的检测，结果显示，大肠杆菌中至少具有 3 种耐药性，部分菌株多重耐药问题严重，达到 8 种抗生素耐药，说明吉林省地区犊牛腹泻大肠杆菌耐药情况不容乐观。其中四环素耐药率最高为 53.3%、氨基青霉素耐药次之为 52.7%，而其他抗生素的耐药率也较高。提示本地区临床用药慎用这些抗生素，多地区还要加强对饲料添加剂的监管，降低抗生素滥用率。耐药基因是细菌产生耐药性的机制之一，本研究的 92 株分离株中，通过检测链霉素类、多黏菌素类、喹诺酮类、四环素类、氯霉素类、 β -内酰胺类、磺胺类和氨基糖苷类 8 类抗生素耐药基因，其优势耐药基因分别为 *strB*、*mcr-1*、*oqxB*、*tetA*、*floR*、*bla_{TEM}*、*sul2* 和 *addA*。发现具有多重耐药性菌株与大肠杆菌存在多重耐药性相关性，同时也暗示了大肠杆菌具有更复杂耐药表型的潜在能力。系统发育结果表明，犊牛腹泻大肠杆菌多数属于系统发育群 A，其次属于 B1 和 D，这与肠道外致病性大肠杆菌报道的菌株不同；如 Rehman 等^[20]分离出 140 株大肠杆菌大部分属

于 A 群。系统发育群与毒力因子和血清型之间存在一定的联系，我们的研究表明，系统发育群 A 和 B1 携带的毒力基因及 O 血清型更为丰富，这与之前致病性毒株主要属于 D 群和 B2 群的研究结果不同^[21]。我们的结果为犊牛腹泻大肠杆菌流行菌株的分布和遗传进化提供参考。

综上所述，从吉林省腹泻犊牛粪便及肠道内容物中分离的大肠杆菌菌株为肠道内致病性菌株，主要病原是产肠毒素大肠杆菌及产志贺毒素大肠杆菌，优势血清型为 O101。A、B1 和 D 是大肠杆菌中主要的系统发育群，系统发育群 A 和 B1 中含有多个毒力基因及血清型，均具有多重耐药性。应当根据犊牛腹泻不同的临床症状改进抗生素的使用策略，不能盲目地滥用抗生素来进行治疗，尤其是治疗过程中尽量使用对菌株敏感的抗生素。目前，国内有大肠杆菌 K99 灭活疫苗以及获得新兽药的牛大肠杆菌 *galE* 基因缺失灭活疫苗(Z9 株)，可通过注射疫苗来对犊牛大肠杆菌腹泻进行有效的防控。此外，在换季时多注意畜舍通风，冬季注意控制室内温度和湿度，保持舍内良好的卫生环境并定期消毒，早发现早治疗，遵循“养大于防，防大于治”的原则。

4 结论

吉林省分离的大肠杆菌具有相似的基因，部分菌株具有区域聚集和传播的特征。此外，这些菌株对多种抗生素具有耐药性，说明牛场长期滥用抗生素导致治疗大肠杆菌引起的犊牛腹泻难度加大。本研究通过调研出吉林省主要肉牛养殖场的优势菌株血清型和基因型，并分离得到致病毒株，这为牛场饲养管理、抗生素使用提供了参考，也为研制预防犊牛大肠杆菌腹泻疫苗奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 严勇, 李新圃, 武小虎, 丁学智, 严作廷, 王胜义, 李宏胜, 王旭荣. 牛源大肠杆菌研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(5): 35-41.
- YAN Y, LI XP, WU XH, DING XZ, YAN ZT, WANG SY, LI HS, WANG XR. Advances in *Escherichia coli* of bovine origin[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2020, 39(5): 35-41 (in Chinese).
- [2] NAVANEETHAN U, GIANNELLA RA. Mechanisms of infectious diarrhea[J]. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology, 2008, 5(11): 637-647.
- [3] 王晨豫, 胡馨匀, 魏勇, 陈杰, 曹梦园, 陈明杰, 齐亚银. 新疆某规模化牧场中引发犊牛腹泻的病因调查[J]. 中国乳业, 2021(10): 67-71.
- WANG CY, HU XY, WEI Y, CHEN J, CAO MY, CHEN MJ, QI YY. Investigation on the etiology of calf diarrhea in a large-scale commercial farm in Xinjiang[J]. China Dairy, 2021(10): 67-71 (in Chinese).
- [4] DALL AGNOL AM, LORENZETTI E, LEME RA, LADEIA WA, MAINARDI RM, BERNARDI A, HEADLEY SA, FREIRE RL, PEREIRA UP, ALFIERI AF, ALFIERI AA. Severe outbreak of bovine neonatal diarrhea in a dairy calf rearing unit with multifactorial etiology[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2021, 52(4): 2547-2553.
- [5] 杨振杰. 犊牛大肠杆菌病的防治[J]. 今日畜牧兽医, 2019, 35(1): 103.
- [6] 许洪祥. 犊牛大肠杆菌病诊断及防治[J]. 农村实用科技信息, 2007, 13(9): 26.
- [7] MOHAMMED SAE, MAROUF SAE, ERFANA AM, EL-JAKEE JKAE, HESSAIN AM, DAWOUD TM, KABLI SA, MOUSSA IM. Risk factors associated with *E. coli* causing neonatal calf diarrhea[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26(5): 1084-1088.
- [8] KASSÉ FN, FAIRBROTHER JM, DUBUC J. Relationship between *Escherichia coli* virulence factors and postpartum metritis in dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(6): 4656-4667.
- [9] KOLENDA R, BURDUKIEWICZ M, SCHIERACK P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2015, 5: 23.
- [10] ALGAMMAL AM, EL-KHOLY AW, RIAD EM, MOHAMED HE, ELHAIG MM, YOUSEF SAA, HOZZEIN WN, GHOBASHY MOI. Genes encoding the virulence and the antimicrobial resistance in enterotoxigenic and shiga-toxigenic *E. coli* isolated from diarrheic calves[J]. Toxins, 2020, 12(6): 383.
- [11] 秦平伟, 陈楠楠, 王岩, 尹珺伊, 张军, 刘秋谨, 田秋风, 王欢, 王爽, 陈亮, 史同瑞. 一例牛源致病性大肠杆菌的分离鉴定[J]. 现代畜牧科技, 2021(12): 14-15, 46.
- QIN PW, CHEN NN, WANG Y, YIN JY, ZHANG J, LIU QJ, TIAN QF, WANG H, WANG S, CHEN L, SHI TR. Isolation and identification of a bovine pathogenic *Escherichia coli*[J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2021(12): 14-15, 46 (in Chinese).
- [12] 马广强, 张维军, 栾婧婧, 林树乾, 杨少华, 刘文强, 高运东, 仲跻峰, 赵宏坤. 直接从粪便中检测致犊牛腹泻产肠毒素大肠杆菌的双重 PCR 方法的建立与应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(2): 153-156.
- MA GQ, ZHANG WJ, LUAN JJ, LIN SQ, YANG SH, LIU WQ, GAO YD, ZHONG JF, ZHAO HK. Direct detection of the enterotoxigenic *Escherichia coli* in bovine feces by multiplex PCR[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2006, 22(2): 153-156 (in Chinese).
- [13] 刘源, 李红丽, 闫益波, 乔国峰, 温永亮, 郭锦龙, 张国权. 山西省犊牛腹泻致病性大肠杆菌毒力因子筛查[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(8): 1552-1557.
- LIU Y, LI HL, YAN YB, QIAO GF, WEN YL, GUO JL, ZHANG GQ. Screening of virulence associated factors of pathogenic *Escherichia coli* in calves from Shanxi Province[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2021, 41(8): 1552-1557 (in Chinese).
- [14] GÜLER L, GÜNDÜZ K, OK. Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey[J]. Zoonoses and Public Health, 2008, 55(5): 249-257.
- [15] COŞKUN MR, ŞAHİN M. Prevalence of neonatal calf diarrhea caused by *Escherichia coli* and investigation of virulence factors, serotypes, and antibiotic susceptibility[J]. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2023, 26(3): 335-341.
- [16] WAYNE PA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 32th ed[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022.
- [17] 贾桐, 张迪, 张兆天, 陈攀亮, 张杰, 李莹慧, 朱悦, 秦建华, 李妍. 京津冀部分地区致犊牛腹泻大肠杆菌毒力基因、耐药基因检测及药物敏感性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(12): 4820-4831.
- JIA T, ZHANG D, ZHANG ZT, CHEN PL, ZHANG J, LI YH, ZHU Y, QIN JH, LI Y. Detection of virulence and resistance genes and drug sensitivity analysis of *Escherichia coli* derived from diarrheic calves in Beijing-Tianjin-Hebei partial regions[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(12): 4820-4831 (in Chinese).
- [18] 关一凡, 李妍, 高亚桃, 常丽云, 杨晓彤, 贾仲昕, 秦建华, 赵月兰. 河北省部分地区犊牛腹泻大肠杆菌优势血清型筛选及兼性菌毛株的致病性[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(7): 1282-1289.
- GUAN YF, LI Y, GAO YT, CHANG LY, YANG XT, JIA ZX, QIN JH, ZHAO YL. Screening of predominant serotypes of *Escherichia coli* from calf diarrhea and isolation and identification of facultative fimbriae strains in some areas of Hebei Province[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2021, 41(7): 1282-1289 (in Chinese).
- [19] MA L, ZHU YK, LA TENG ZHU LA A, LOURENCO JM, CALLAWAY TR, BU DP. *Schizochytrium* sp. and lactoferrin supplementation alleviates *Escherichia coli* K99-induced diarrhea in preweaning dairy calves[J]. Journal of Dairy Science, 2024, 107(3): 1603-1619.
- [20] REHMAN MU, ZHANG H, IQBAL MK, MEHMOOD K, HUANG SC, NABI F, LUO HQ, LAN YF, LI JK. Antibiotic resistance, serogroups, virulence genes, and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from yaks with diarrhea in Qinghai Plateau, China[J]. Gut Pathogens, 2017, 9: 24.
- [21] COURA FM, de ARAÚJO DINIZ S, MUSSI JMS, SILVA MX, LAGE AP, HEINEMANN MB. Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil[J]. Folia Microbiologica, 2016, 62(2): 1-6.