

河西走廊地区犊牛腹泻致病性大肠杆菌分离鉴定、毒力因子及耐药性检测

马 忠

(甘肃省动物疫病预防控制中心, 兰州 730046)

摘 要: [目的] 为了分析河西走廊地区犊牛腹泻致病性大肠杆菌携带毒力基因和耐药性情况, [方法] 2020—2021 年在河西走廊地区采集患腹泻病犊牛的粪便、肛拭子及肝脏等病料组织 279 份, 采用人工感染试验动物、PCR 方法和 K-B 药敏纸片法分别检测犊牛腹泻性大肠杆菌致病性、毒力因子和耐药性。 [结果] 结果表明, 分离得到了 126 株大肠杆菌, 其中 79 株犊牛腹泻性大肠杆菌能引起小鼠死亡; 分离的 79 株致病性大肠杆菌的毒力基因 *crl*、*irp2*、*fimH*、*papC*、*K88*、*K99*、*stx1*、*stx2* 检测率在 40.5% ~ 100% 之间, 其他毒力基因检测率在 15.2% ~ 34.2% 之间; 分离的 79 株致病性大肠杆菌对氨苄西林、阿莫西林、新霉素等 8 种药物的耐药率在 49.4% ~ 96.2% 之间, 对其他药物的耐药率在 5.1% ~ 32.9% 之间。 [结论] 从河西走廊地区患腹泻病犊牛病料组织中分离得到 79 株致病性大肠杆菌, 这些菌株携带多种毒力基因, 对临床中常用的抗菌药物产生了耐药性。

关键词: 犊牛; 腹泻; 大肠杆菌; 致病性; 毒力基因; 耐药性

中图分类号: S823 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9111(2023)02-0029-05

大肠杆菌是临床中常见的人兽共患病原菌之一, 该菌分布在环境中分布比较广泛, 可以引起多种动物(牛、羊、猪、鸡、鹿等)、野生动物及人发病, 当感染大肠杆菌后主要表现出败血症、腹泻、肠炎、肺炎、脑膜炎等多种临床症状。该菌可以感染不同阶段的动物, 其中幼龄动物最易感, 严重可以导致其死亡^[1-2]。犊牛大肠杆菌病是奶/肉生产中常见的细菌性腹泻病之一, 该病是由致病性大肠杆菌引起, 以 10 日龄以内犊牛最易感, 临床主要表现为腹泻、脱水、消瘦等一系列的症状, 发病率和死亡率均较高, 且呈现地方流行性或散发性流行, 严重影响奶/肉业健康发展^[3-5]。国内外相关研究表明, 大肠杆菌的基因组中携带多种毒力基因, 毒力基因的表达可以调控其对宿主致病性, 尤其是腹泻性大肠杆菌能在宿主小肠中定植。避免免疫反应、引起肠道炎症的相关性反应, 与其携带毒力基因相关, 毒力基因在调控其致病性过程中起着重要的作用^[6-7]。当前临床中犊牛大肠杆菌病主要用抗生素进行治疗。相关研究表明, 临床中由于抗生素的滥用, 大肠杆菌耐药性越来越严重, 降低其治疗效果, 同时威胁着人类健康^[8-9]。本研究从 2020—2021 年在河西走廊地区采集患腹泻病犊牛的粪便、肛拭子及肝脏组织等病料组织

209 份进行大肠杆菌分离鉴定, 对其致病性、毒力基因携带情况和耐药性进行检测, 为该病的综合防控提供基础。

1 材料与方法

1.1 病料样品来源

2020—2021 年在河西走廊地区采集患腹泻病犊牛的粪便、肛拭子及肝脏组织等病料组织 279 份。

1.2 主要试剂

伊红美蓝培养基、大肠杆菌鉴别培养显示培养基、普通琼脂培养基、普通营养肉汤培养基, 均购自北京索莱宝科技有限公司; 梅里埃革兰阴性菌鉴定卡片购自上海欣中生物工程有限公司; 细菌基因组提取试剂盒、2 × *Taq* Marker Mix, DL-2000 DNA marker, 均购自北京天根生物有限公司; PLK0007 革兰氏阳性菌药敏纸片套装(动物源), 购自北京普纳德科技有限公司。

1.3 试验动物

25 g 左右的健康昆明系小白鼠 600 只, 购自北京维通利华实验动物有限公司, 在本单位实验动物中心进行饲养和管理。

收稿日期: 2022-10-28 修回日期: 2022-12-10

作者简介: 马忠(1968—), 男, 藏族, 本科, 高级兽医师, 从事动物疫病防控工作。

1.4 细菌分离培养

将采集患腹泻病犊牛的粪便、肛拭子及肝脏等病料组织经过处理后,接种于伊红美蓝培养基进行细菌培养,37℃恒温培养箱培养 12~18 h 后,挑取伊红美蓝培养基上优势菌落,无菌的条件下,接种于大肠杆菌鉴别培养显示培养基,37℃恒温培养箱培养 12~18 h,取大肠杆菌鉴别培养显示培养基单个菌落接种营养肉汤中进行纯化培养,取纯化培养的分

1.5 细菌生化鉴定

按照梅里埃革兰阴性菌鉴定试纸条说明书,将

纯化培养的菌株接种到梅里埃革兰阴性菌鉴定试纸条中 37℃培养 12~18 h 后,进行比对确定其生化特性。

1.6 细菌的 PCR 鉴定

参考文献[7],设计细菌(大肠杆菌)16S rRNA 基因通用引物,由华大基因合成(表 1)。按照细菌基因组提取试剂盒说明书提取分离菌株的基因组,用细菌(大肠杆菌)16S rRNA 基因对分离菌株进行 PCR 鉴定。将分离菌株的 PCR 产物回收送华大基因公司测序与比对。

表 1 引物序列

引物	引物序列(5'-3')	长度/bp	退火温度/℃
16SrRNA	F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAGG R:TACGGCTACCTTGTTACGACTTG	1500	55.5

1.7 致病性试验

参考文献[6],采用人工感染小白鼠进行分离菌株的致病性试验,取纯化培养的分

1.8 分离菌株的毒力基因检测

根据文献[10-11]报道的致牛腹泻大肠杆菌毒力基因作为检测对象,主要包括黏附素类毒力基因(*crl*、*fimH*、*papC*、*sfaS*、*K88*、*K99*、*eaeA*、*fliC*),毒素类毒力基因(*stx1*、*stx2*、*hlyE*、*astA*、*iucD*、*malX*、*irp2*、*ibeA*、*ompA*、*ompC*、*ompF*)和铁摄取系统类毒力基因(*ireA*)共 20 种。20 种毒力基因的引物序列在华大基因合成,用 PCR 方法进行毒力基因检测。

1.9 药敏试验

参照 1.7 致病性试验方法,将分离菌株培养至对数期,调整菌液浓度为 10⁸ cfu/mL,用 K-B 药敏纸片法进行药敏试验。参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2013 年推荐的标准药敏试验法进行操作和试验结果判断^[14]。

2 结果

2.1 细菌分离鉴定结果

疑似大肠杆菌分离菌株在伊红亚甲蓝培养基上长出圆形、大小一致的铁锈色菌落,在大肠杆菌鉴别培养显示培养基上长出了圆形的、大小一致的淡绿

色菌落;纯化的菌株革兰氏染色显微镜观察其形态学可见单个或者聚在一起的两头钝圆的杆菌(图 1)。分离菌株的培养特性和形态学均符合大肠杆菌培养特性和形态学。



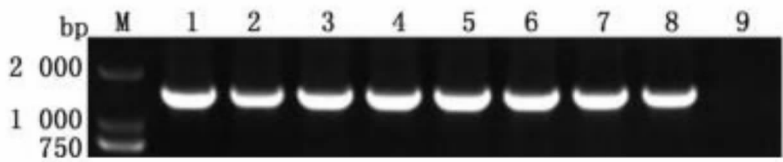
图 1 分离菌株形态学观察(1000×)

2.2 细菌生化试验鉴定结果

参照梅里埃革兰阴性菌鉴定试纸条说明书,对符合大肠杆菌培养特性和形态学进行生化试验鉴定,结果显示,分离的 126 株病原菌初步鉴定为大肠杆菌。大肠杆菌的分离率为 45.2%(113/279)。

2.3 细菌的 PCR 鉴定结果

对利用细菌分离鉴定和生化鉴定的方法初步鉴定的 126 株大肠杆菌,通过 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 鉴定,结果(图 2)显示,126 株大肠杆菌分离菌株均扩增出大约为 1 500 bp 的目条条带。其分离菌株的测序结果与 GenBank 中登录大肠杆菌的参考株基因序列同源性均大于 98.9%,说明分离的 126 株菌为大肠杆菌,其大肠杆菌的分离率为 45.2%(113/279)。



注:M 为 DNA 标准分子质量标准(DL2000 DNA marker);1~8 为分离菌株;9 为空白对照。

图 2 部分分离菌株 PCR 鉴定结果

2.4 分离菌株的致病性试验结果

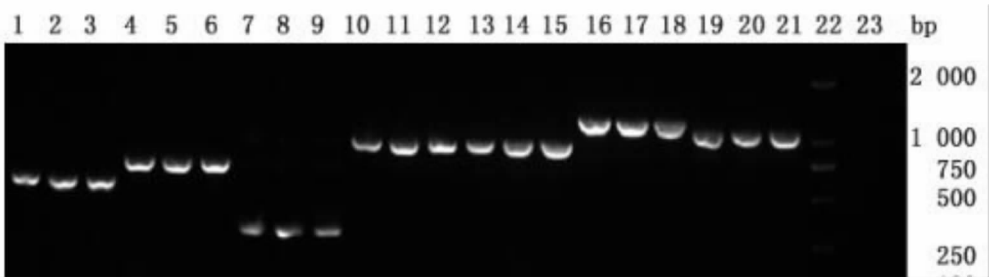
攻毒组小鼠在攻毒后的 2~6 d 出现精神沉郁、采食量减少、扎堆、严重腹泻等不同临床症状,有个别小鼠没有表现出急性死亡。剖检死亡的小鼠可见肝、肾及脾等出现不同程度的出血,尤其肠道出血严重,肠黏膜脱落,采集病料组织分离得到大肠杆菌,而对照组小鼠健康存活。经统计,79 株大肠杆菌分离菌株能引起小鼠发病与死亡,致病性试验表明 79 株大肠杆菌为致病性大肠杆菌。

2.5 毒力基因检测结果

用 PCR 方法检测 79 株致病性大肠杆菌的 22 个毒力基因的携带情况,结果显示,79 株致病性大肠杆菌携带 16 种不同的毒力基因,其中毒力基因 *crl*、*irp2*、*fimH**papC*、*K88*、*K99*、*stx1*、*stx2* 检测率在 40.5%~100% 之间;毒力基因 *hlyE*、*iucD*、*malX*、*ibeA*、*ompA*、*ompC*、*ompF*、*fliC* 检测率在 15.2%~34.2% 之间;毒力基因 *sfaS*、*eaeA*、*astA*、*ireA* 未检出(见表 2、图 3)。

表 2 毒力基因检测结果

毒力基因	检出菌数/株	比例/%	毒力基因	检出菌数/株	比例/%
<i>crl</i>	79	100.0	<i>hlyE</i>	21	26.6
<i>fimH</i>	56	70.9	<i>astA</i>	0	0
<i>papC</i>	54	68.4	<i>iucD</i>	13	16.5
<i>sfaS</i>	0	0	<i>malX</i>	12	15.2
<i>K88</i>	42	53.2	<i>irp2</i>	79	100.0
<i>K99</i>	32	40.5	<i>ibeA</i>	8	10.1
<i>eaeA</i>	0	0	<i>ompA</i>	11	13.9
<i>fliC</i>	27	34.2	<i>ompC</i>	15	19.0
<i>stx1</i>	33	41.2	<i>ompF</i>	12	15.2
<i>stx2</i>	35	44.3	<i>IreA</i>	0	0



注:1~3 为 *hlyE*;4~6 为 *iucD*;7~9 为 *ompC*;10~12 为 *malX*;13~15 为 *ompA*;16~18 为 *ompC*;19~21 为 *ompF*;22 为 DL2000DNA Marker;23 为阴性对照。

图 3 部分分离菌株毒力基因 PCR 检测结果

2.6 耐药性分析结果

用 K-B 药敏纸片法对 79 株致病性大肠杆菌进行药敏试验,结果由表 3 可知,79 株致病性大肠杆菌对氨苄西林、阿莫西林、新霉素、庆大霉素、红霉

素、链霉素、磺胺间甲氧嘧啶、多黏菌素 8 种药物耐药性较强,耐药率在 49.4%~96.2% 之间;对头孢噻吩、头孢噻肟、大观霉素、多西环素、恩诺沙星、环丙沙星、林可霉素、氟苯尼考 8 种药物耐药率在

5.1% ~ 32.9% 之间。

表 3 药敏试验结果

药物	耐药菌数/株	耐药率/%	药物	耐药菌数/株	耐药率/%
头孢噻呋	8	10.1	大观霉素	25	31.6
头孢噻肟	4	5.1	磺胺间甲氧嘧啶	75	94.9
阿莫西林	76	96.2	多西环素	23	29.1
氨苄西林	75	94.9	恩诺沙星	19	24.1
新霉素	63	79.7	环丙沙星	21	26.6
庆大霉素	67	84.8	林可霉素	26	32.9
红霉素	56	70.1	氟苯尼考	15	19.0
链霉素	65	82.3	多黏菌素	39	49.4

3 讨 论

相关研究表明,大肠杆菌是广泛存在于环境中的条件性致病菌,当外界环境发生冷、热、换料、转群、卫生条件差等变化时,可以导致动物机体抵抗力下降。大肠杆菌病在我国养殖场广泛发生与流行,外界中的大肠杆菌可以通过多种途径进入体内定植、繁殖并引起一系列的临床症状^[12]。因此,在动物养殖的过程中应该注意该病的综合防控。犊牛大肠杆菌病是养牛业中常见细菌性传染病之一,其感染率和死亡率均较高,对犊牛危害较大,严重影响养牛业发展^[13]。近几年,犊牛大肠杆菌病在我国不同地区的养殖场中广泛流行。本试验研究表明,从 2020—2021 年,在河西走廊地区存在 79 株致病性大肠杆菌,说明河西走廊地区致犊牛致腹泻性大肠杆菌感染比较严重,应该注意该病的综合防控。

相关研究表明,致病性大肠杆菌携带定植或黏附因子、热敏性肠毒素外毒素、热稳定肠毒素、细胞毒性坏死因子等多种不同的毒力因子,这些毒力基因的可以调控该菌的致病性,刺激动物肠道的炎症反应并产生腹泻等一系列的病理反应。许多研究表明,大肠杆菌携带的毒力基因与其致病性相关^[11-14]。本研究表明,分离的 79 株致病性大肠杆菌毒力基因 *crl*、*irp2*、*fimH*、*papC*、*K88*、*K99*、*stx1*、*stx2* 检测率在 40.5% ~ 100% 之间,其他毒力基因检测率在 15.2% ~ 34.2% 之间,说明分离的致犊牛致腹泻性大肠杆菌携带多种毒力基因。刘源等^[14]从山西省 33 个肉牛场 205 头腹泻新生犊牛直肠拭子样品中分离得到 101 株含有毒力因子的大肠杆菌。胡夏佩等^[15]报道从江苏、云南和河北等地共分离到羊源 STEC 菌株 11 株,牛源 STEC 菌株 1 株,且携带多

种毒力基因。张凌等^[16]报道了新疆地区分离的牛源非 157 产志贺毒素大肠埃希氏菌携带多种毒力。本研究与上述报道一致,说明毒力基因在犊牛致腹泻性大肠杆菌广泛存在,且与致病性相关。临床中犊牛致腹泻性大肠杆菌防治主要依靠抗菌药物治疗,其耐药性也逐年增加,给该菌的防治带来一定困难^[1-3]。本研究表明,分离的 79 株致病性大肠杆菌对氨苄西林、阿莫西林、新霉素等 8 种药物耐药率在 49.4% 以上,说明分离的 79 株致病性大肠杆菌耐药性严重,这与杨斯琴等报道的内蒙古呼和浩特地区奶牛肠道致病性大肠杆菌对常用药物产生严重的耐药性一致。大肠杆菌耐药性问题已经很普遍。因此,在治疗犊牛致腹泻性大肠杆菌病一定合理使用药物,减少耐药性产生,同时加强饲养管理,注意消毒。

参考文献:

- [1] 高海慧,黎玉琼,汪洁,等.宁夏地区牛源产与非产 ESBLs 大肠埃希氏菌耐药性差异比较[J]. 动物医学进展,2022,43(4): 18-24.
- [2] 高海慧,汪洁,扈宁霞,等.宁夏地区犊牛腹泻型产 ESBLs 大肠埃希氏菌的筛选及相关基因型分析[J]. 动物医学进展,2022,43(7):19-23.
- [3] 王国艳,范建强,党文庆,等.山西部分地区犊牛腹泻大肠杆菌耐药基因分析[J]. 安徽农业科学,2022,50(12):79-81,104.
- [4] 梁圆,张丹丹,程景,等.犊牛源大肠杆菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. 中国兽医杂志,2022,58(5):52-57,63.
- [5] 梁艳艳,李可,贾丽,等.致病性大肠杆菌所致犊牛腹泻的病原分析及治疗[J]. 中国兽医学报,2022,42(3):477-482,495.
- [6] 操义恒,马雪,张丽媛,等.致犊牛脑炎大肠杆菌分离鉴定、耐药性及毒力基因检测[J]. 中国兽医学报,2022,42(7):1411-1417,1423.
- [7] 张召兴,贾青辉,张艳英,等.致犊牛产死胎肠外致病性大肠杆

- 菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(8): 1626-1631.
- [8] 麻海澜, 樊宏亮, 周伟光, 等. 内蒙古地区犊牛源大肠杆菌的分离鉴定及其生物被膜的形成与耐药性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(2): 74-78, 138-139.
- [9] 刘勃兴, 付祥, 刘畅, 等. 犊牛腹泻大肠杆菌 K99 株抗生素敏感性试验及中草药提取物体外抑菌试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(22): 82-85.
- [10] 顾晓晓, 郭琴, 陶乔孝慈, 等. 犊牛肺源致病性大肠杆菌分离鉴定、耐药性及耐药基因检测[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(1): 240-248.
- [11] 李文豪. 呼和浩特牛腹泻部分细菌性病原检测及三重 PCR 检测方法的建立[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
- [12] 严勇, 李新圃, 武小虎, 等. 牛源大肠杆菌研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(5): 35-41.
- [13] 关一凡, 李妍, 高亚桃, 等. 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.
- [14] 刘源, 李红丽, 闫益波, 等. 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.
- [15] 胡夏佩, 王惠, 孔学维, 等. 反刍动物产志贺毒素大肠杆菌的分离鉴定和致病潜力分析[J]. 微生物学报, 2021, 61(8): 2495-2505.
- [16] 张凌. 新疆牛源非 O157 产志贺毒素大肠埃希菌的 O-血清群、毒力因子与耐药性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2021.
- [17] 杨斯琴, 敖日格乐, 王纯洁, 等. 内蒙古呼和浩特地区牛源致病性大肠杆菌的血清型、毒力基因检测及耐药性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(10): 761-764.

Isolation, Identification Virulence Factors and Drug Resistance Test of Pathogenic *E. coli* from Calf Diarrhea in Hexi Corridor Region

MA Zhong

(Gansu Animal Disease Prevention and Control Center, Lanzhou 730046)

Abstract: [Objective] In order to analyze the virulence gene and drug resistance of calf diarrhea pathogenic *E. coli* in Hexi Corridor region. [Method] From 2020 to 2021, 279 diseased tissues such as feces, anal swabs and liver of calves suffering from diarrhea disease were collected in Hexi Corridor region. The pathogenicity, virulence factors and drug resistance of calf diarrhea *E. coli* were detected by artificial infection test animals, PCR method and K-B drug sensitive paper method. [Result] The results showed that 126 strains of *E. coli* were isolated, among which 79 strains of calf diarrhea *E. coli* could cause death of mice. The detection rates of virulence genes *crl*, *irp2*, *fimH*, *papC*, *K88*, *K99*, *stx1* and *stx2* of 79 strains of pathogenic *E. coli* were 40.5% ~ 100%, and the detection rates of other virulence genes were 15.2% ~ 34.2%. The resistance rate of 79 strains of pathogenic *E. coli* isolated to 8 drugs, such as ampicillin, amoxicillin and neomycin, was 49.4% ~ 96.2%, and the resistance rate to other drugs was 5.1% ~ 32.9%. [Conclusion] 79 strains of pathogenic *E. coli* were isolated from the diseased tissues of calves suffering from diarrhea in the Hexi Corridor. 79 strains of pathogenic *E. coli* carry multiple virulence genes and are resistant to commonly used antibiotics in clinical practice.

Key words: calf; diarrhea; *E. coli*; pathogenicity; virulence gene; drug resistance