

## 患病和痊愈牦牛源大肠杆菌对氨基糖苷类和磺胺类耐药性比较分析

李 阳<sup>1#</sup>, 叶忠明<sup>2#</sup>, 杨丹娇<sup>2</sup>, 陈朝喜<sup>1\*</sup>

(1. 西南民族大学畜牧兽医学院, 四川 成都 610041; 2. 四川省甘孜藏族自治州畜牧业科学研究所, 四川 康定 626000)

**摘要:** [目的] 为了探讨患病和痊愈牦牛源大肠杆菌的抗菌药物及其耐药性之间的相关性。 [方法] 采用微量肉汤稀释法对 91 株牦牛源大肠杆菌进行氨基糖苷类药物(链霉素和庆大霉素)和磺胺类药物(磺胺甲噁唑和磺胺二甲嘧啶)敏感性试验, 同时采用 PCR 方法检测氨基糖苷类相关耐药基因 *aac(6)-Ib*、*aac(3)-IV* 及磺胺类相关耐药基因 *sul2*、*sul3* 的携带情况。 [结果] 结果表明: 39 株患病牦牛源菌株对链霉素、庆大霉素、磺胺甲噁唑和磺胺二甲嘧啶的耐药率分别为 30.77%、5.13%、61.54% 和 87.18%, *aac(6)-Ib*、*aac(3)-IV*、*sul2* 和 *sul3* 的检出率分别为 43.59%、25.64%、38.46% 和 41.03%; 52 株痊愈牦牛源菌株对链霉素、庆大霉素、磺胺甲噁唑和磺胺二甲嘧啶的耐药率分别为 42.30%、21.15%、94.23% 和 71.15%, *aac(6)-Ib*、*aac(3)-IV*、*sul2* 和 *sul3* 的检出率分别为 71.15%、19.23%、69.23% 和 51.92%。 [结论] 试验结果表明, 痊愈牦牛源大肠杆菌对氨基糖苷类和磺胺类药物耐药率及相关耐药基因检出率均高于患病动物源大肠杆菌, 应科学合理选用和使用抗菌药物以减少耐药性的产生以提升牦牛大肠杆菌病的治疗效果。

**关键词:** 牦牛源大肠杆菌; 氨基糖苷类; 磺胺类; 药物敏感性试验; 耐药基因

**中图分类号:** S823 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9111(2023)03-0030-06

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 俗称大肠杆菌, 为肠杆菌科埃希菌属最具代表性的一种革兰氏阴性菌, 大小通常在  $0.5 \times 1^{-3} \mu\text{m}$  之间, 两端呈钝圆形, 多数菌株具有荚膜或微荚膜结构, 具有黏附、抗吞噬、抗损伤等多种功能<sup>[1]</sup>。大肠杆菌通常寄居在人和动物的肠道中, 其中小部分的血清型能在一定条件下引发疾病, 导致人和动物发生肠内外疾病或感染, 此外还会引起多种组织器官感染, 如各种关节炎、泌尿系统感染、败血性感染以及脑膜炎等<sup>[2]</sup>。

牦牛大肠杆菌病多发于泌乳期牦牛, 4 月龄以下的犊牦牛次之, 主要临床表现为发热寒战、食欲减退、萎靡不振、呼吸困难、腹泻下痢等, 其中以腹泻最为典型, 部分患病牦牛甚至排出水样或血色粪便<sup>[3]</sup>。相关研究表明, 污染的饲料及饮水会极大地增加该病的发生率并呈现散发或地方流行性<sup>[4-5]</sup>。牦牛作为牧民生活中是必不可少的生活资料 and 重要

的经济来源, 大肠杆菌引起的牦牛腹泻病在一定程度上对牧民生活水平和经济效益的提升造成一定影响。因此, 对牦牛源大肠杆菌开展耐药性研究极其重要, 在一定程度上能够避免抗菌药物的误用和滥用等。

基于此, 本研究首先对采自川西北高原地区的患病牦牛和痊愈牦牛进行新鲜粪便样本采集, 采用常规方法进行大肠杆菌分离鉴定并对之进行代表性氨基糖苷类和磺胺类抗菌药物药物敏感性试验; 其次, 对分离菌株进行氨基糖苷类和磺胺类相关耐药基因检测, 以期对患病牦牛和痊愈牦牛源大肠杆菌进行耐药水平和耐药基因携带率比较分析, 从而为川西北高原地区牦牛大肠杆菌病的治疗提供一定的数据支持和用药指南, 在控制牦牛源大肠杆菌对抗菌药物的耐药性蔓延传播的同时减少抗菌药物的误用甚至滥用, 从而在一定程度上避免不必要的额外投入而间接提升牧民的收入水平。

收稿日期: 2022-11-14 修回日期: 2023-02-14

基金项目: 四川省科技厅项目(23NSFSC0321), 四川省科技计划项目(2022JDRC0121) 和西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金项目(ZYN2022014)

作者简介: 李阳(1996—), 女, 硕士生, 研究方向为兽医药理学与藏兽药学, #为共同第一作者。

\* 通讯作者: 陈朝喜, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 兽医药理学与毒理学, 细菌耐药性机制、兽药残留检测, 藏兽药药性与毒理学。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 样本来源 91份新鲜牦牛粪便样本采集自四川省川西北高原地区,其中39份采自患病牦牛,其余52份粪便样本采自痊愈牦牛。

1.1.2 质控菌株 标准菌株 ATCC25922 由西南民族大学畜牧兽医学院兽医药理学实验室提供。

1.1.3 培养基和仪器设备 Luria-Bertani (LB) 肉汤、胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB)、麦康凯琼脂培养基 (MAC)、伊红美蓝琼脂培养基 (EMB)、Mueller Hinton (MH) 等培养基均购自青岛高科园海博生物技术有限公司,细菌生化鉴定管购自杭州天河微生物试剂有限公司。本研究用到的主要仪器设备有全自动高压蒸汽灭菌器 (LDZF-50KB, 上海申安医疗器械公司)、高速离心机 (AG22331, 德国 Eppendorf 公司)、超净工作台 (SW-CJ-2FD, 苏州安泰空气技术有限公司)、电热恒温培养箱 (DHP-9162, 上海齐欣科学仪器有限公司)、PCR 扩增仪 (BYQ6078109-1958, 杭州博日科技有限公司) 和凝胶成像系统 (5200R, 上海天能科技有限公司)。

1.1.4 抗菌药物 链霉素 (批号 201171, 购自 BIO-SHARP) 及庆大霉素 (批号 GS1026B309J, 购自 BIO BASIC INC), 使用无菌去离子水溶解定容; 磺胺二甲基嘧啶 (批号 E1514023) 及磺胺甲噁唑 (批号 H1428053) 均购自上海阿拉丁生化科技有限公司,

使用氨水溶解定容。抗菌药物按照 CLSI 标准进行配制, 一次性 0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜除菌后  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2 方法

1.1.1 细菌的分离及鉴定 将采集的新鲜粪便样本部分接种于 LB 肉汤中,  $37^{\circ}\text{C}$  培养 12 ~ 18 h, 用接种环至麦康凯琼脂板划线培养,  $37^{\circ}\text{C}$  培养 12 ~ 16 h 后选取培养基上大小适中的粉红色、表面光滑的疑似菌落进行纯化培养。最后, 从纯化培养的菌落中挑选生长良好、大小适中的菌落分别接种于麦康凯培养基和伊红美蓝培养基进行交叉传代培养, 并进行生化鉴定反应以确定为大肠杆菌。

1.1.3 药物敏感性试验及结果判定 参考李宇涵等的方法进行<sup>[6]</sup>。

1.1.4 DNA 的提取 采用水煮法提取大肠杆菌总 DNA: 在超净工作台内用接种环挑取培养基上单个菌落于 3 mL 灭菌的 LB 肉汤试管中, 恒温培养箱中  $37^{\circ}\text{C}$  培养 18 h 后取出。无菌环境下将培养好的菌液摇匀后移至灭菌 Ep 管中。首先 12 000 rpm 离心 5 min, 弃上清液, 随后在 Ep 管中加入 1 mL 灭菌超纯水洗涤菌体。沸水浴 10 min 后冰浴 5 min。最后 10 000 rpm 离心 5 min, 取上清分装成两管, 每管 500  $\mu\text{L}$ 。标记后用塑封膜封好, 放入  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存待用。

1.1.5 引物设计与合成 耐药基因引物信息如表 1 所示。

表 1 耐药基因 PCR 扩增引物信息

耐药基因	引物序列(5'3')	扩增片段/bp	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$
<i>aac</i> (3')-IV	F: GGCCACTTGGACTGATCGAG R: GCGGATGCAGGAAGATCAAC	568	58
<i>aac</i> (6')-Ib	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGTIT	482	56
<i>sul2</i>	F: CCTGTTTCGTCCGACACAGA R: GAAGCGCAGCCGCAATTCAT	435	59
<i>sul3</i>	F: AGATGTGATTGATTTGGGAGC R: TAGTTGTTTCTGGATTAGAGCCT	443	55

1.1.6 耐药基因检测 采用常规 PCR 扩增方法对表耐药基因进行检测。PCR 反应体系为:  $2 \times \text{Taq}$  Master Mix 5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu\text{L}$ , 总体积为 10  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 以基因相对应的退火温度退火 30 ~ 50 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30 ~ 60 s, 共计 35 个循环, 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$  保存。退火和延伸时长根据目的基因片段大小做调整。取 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶电泳成像系统中观察并记录试验结果。

## 2 结果

### 2.1 大肠杆菌分离鉴定结果

经过营养肉汤培养和麦康凯培养基传代培养后, 可在麦康凯培养基上观察到粉色不透明的菌落, 菌落边缘平滑。在伊红美蓝培养基上可观察到有绿色金属光泽的紫黑色菌落。若符合这两项要求, 则可初步认定此菌为大肠杆菌, 对可疑菌株进行生化鉴定以最终确定。共分离到 91 株大肠杆菌, 其中患病牦牛源 39 株, 痊愈牦牛源 52 株。

### 2.2 药敏试验结果

91 株大肠杆菌药敏试验结果如表 2 所示:91 株牦牛源大肠杆菌对两类 4 种抗生素呈现出不同程度的耐药性:对磺胺类药物的耐药性较高,磺胺甲噁唑和磺胺二甲基嘧啶的耐药率分别为 80.22 % (73/91) 和 78.02 % (71/91);对氨基糖苷类药物的耐药性偏低,链霉素和庆大霉素的耐药率分别为 37.36 % (34/91) 和 14.29 % (13/91)。其中,患病牦牛

源与痊愈牦牛源大肠杆菌的耐药情况如图 1 所示:39 株患病牦牛源大肠杆菌对磺胺二甲基嘧啶的耐药水平最高,占比 87.18 % (34/39),而对庆大霉素的耐药菌株占比最低,仅有 5.13 % (2/39);而 52 株痊愈牦牛源大肠杆菌对磺胺甲噁唑的耐药水平最高,达到了 94.23 % (11/52),而对庆大霉素和链霉素的耐药水平则较低,分别为 21.15 % (11/52) 和 42.30 % (22/52)。

表 2 91 株大肠杆菌对 4 种抗生素的耐药情况

抗菌药物	耐药(占比/%)	中介(占比/%)	敏感(占比/%)
链霉素	34(37.36)	0(0)	57(62.64)
庆大霉素	13(14.29)	5(5.49)	73(80.22)
磺胺甲噁唑	73(80.22)	0(0)	18(19.78)
磺胺二甲基嘧啶	71(78.02)	0(0)	20(21.98)

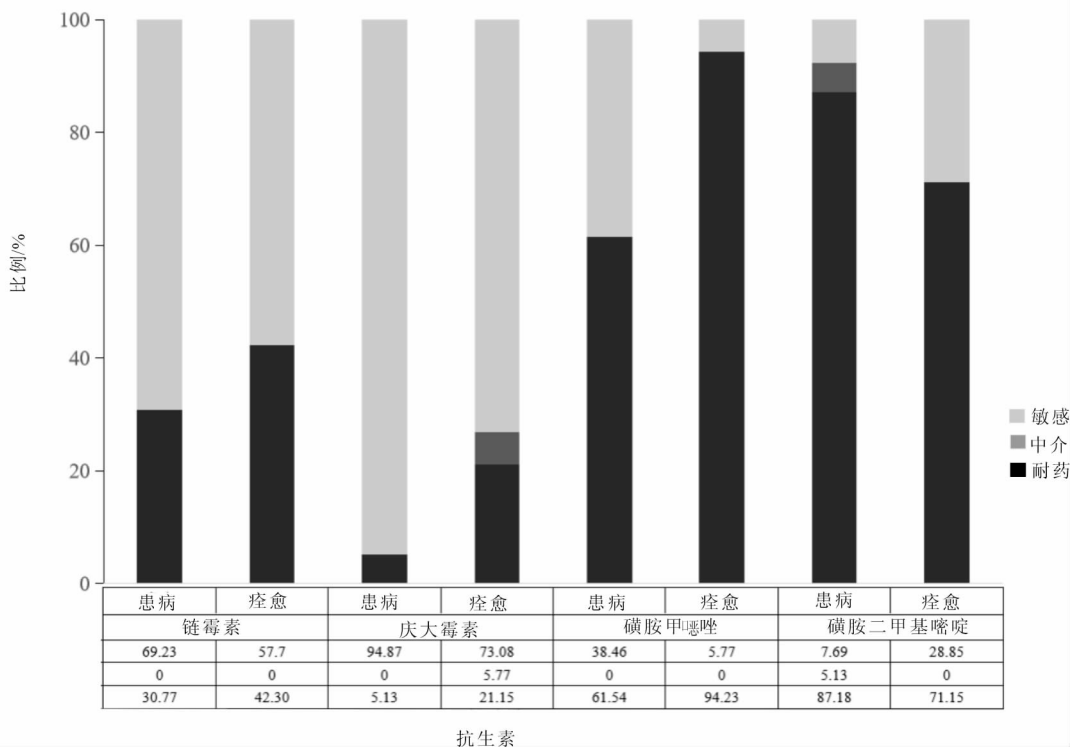


图 1 患病及痊愈牦牛源大肠杆菌药敏试验结果

### 2.3 大肠杆菌耐药基因检测

2.3.1 氨基糖苷类耐药基因检测 采用 PCR 检测 91 株大肠杆菌对 2 类 4 种耐药基因的携带情况,部分菌株耐药基因的扩增结果如下图 2A, 2B 所示。

患病牦牛源及痊愈牦牛源大肠杆菌具体检出率如图 4A 所示:对 *aac(6')-Ib* 的检出率分别为 43.59% 和 71.15%;而 *aac(3')-IV* 的检出率分别为 25.64% 和 19.23%。

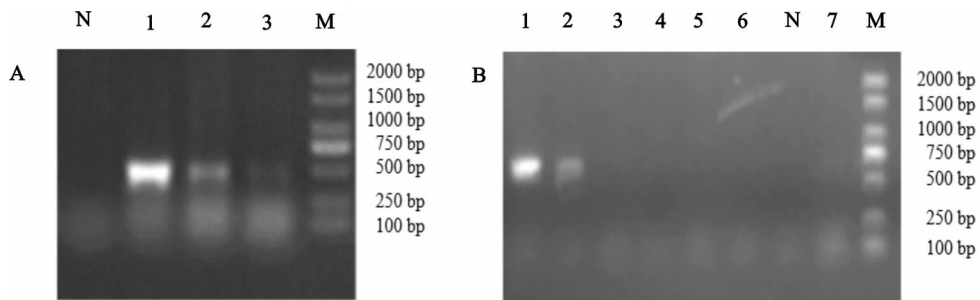


图 2 部分分离菌株氨基糖苷类耐药基因 PCR 扩增产物电泳图

A: *aac(6')-Ib* 基因的 PCR 扩增(M: DNA Marker DL2000; N: 阴性对照; 1-3: 部分 *aac(6')-Ib* 基因阳性株)  
 B: *aac(3')-IV* 基因的 PCR 扩增(M: DNA Marker DL2000; N: 阴性对照; 1, 2, 7: 部分 *aac(3')-IV* 基因阳性株)

2.3.2 磺胺类相关耐药基因的检测 采用PCR检测91株大肠杆菌对2类4种耐药基因的携带情况,部分菌株耐药基因的扩增结果如下图3A,3B所示。患病牦牛源及痊愈牦牛源大肠杆菌具体检出率如图

4B所示:对 *sul2* 的检出率分别为 38.46% 和 69.23%; 而 *sul3* 的检出率分别为 41.03% 和 51.92%。

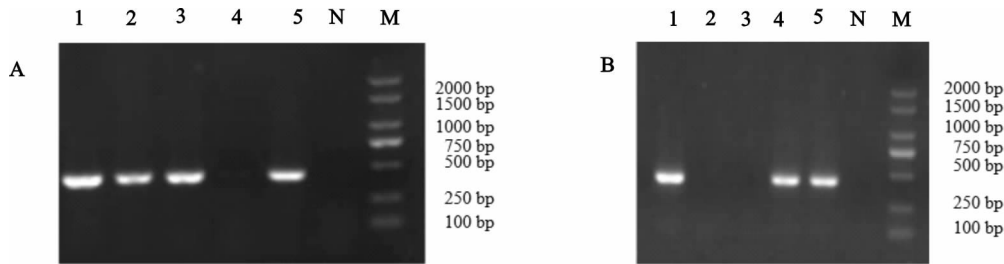


图3 部分分离菌株磺胺类耐药基因的PCR扩增产物电泳图

A: *sul2* 基因的PCR扩增(M: DNA Marker DL2000; N: 阴性对照; 1, 2, 3, 5: 部分 *sul2* 基因阳性株)

B: *sul3* 基因的PCR扩增(M: DNA Marker DL2000; N: 阴性对照; 1, 4, 5: 部分 *sul3* 基因阳性株)

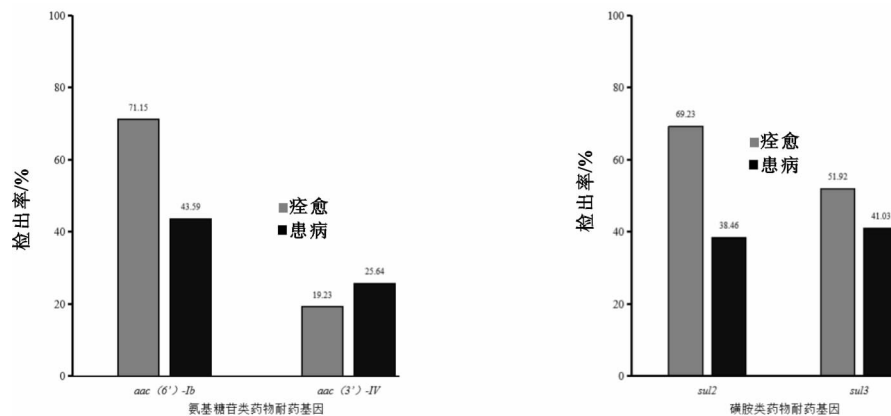


图4 耐药基因检出率

A: 氨基糖苷类药物耐药基因检出率

B: 磺胺类药物耐药基因检出率

### 3 讨论

细菌耐药性问题已经成为全球重要的公共卫生问题,这是由于近年来在养殖业大量使用抗生素,养殖从业人员过分依赖并滥用抗生素导致的现象<sup>[7]</sup>。研究表明,从不同来源动物种均分离到动物源致病性大肠杆菌并表现出一定的耐药性<sup>[8-9]</sup>。本研究中分离菌株对磺胺甲噁唑的耐药率达到了 80.22%,对磺胺二甲基嘧啶的耐药率也达到了 78.02%;而对氨基糖苷类抗生素链霉素和庆大霉素的耐药率分别为 37.36% 和 14.29%,与相关报道的耐药水平相近<sup>[10-12]</sup>。此外,患病牦牛源大肠杆菌对 4 种不同抗生素的耐药及中介趋势大体一致:整体来看,痊愈牦牛源大肠杆菌对氨基糖苷和磺胺类的耐药率更高一些,尤其是磺胺类药物磺胺甲噁唑,其耐药率达到 94.23%,远高于患病牦牛源的 61.54%,对磺胺二甲基嘧啶的耐药率也达到了 71.15%;氨基糖

苷药物的耐药性也有相同的趋势,其中庆大霉素的耐药率甚至比患病牦牛源高出 1 倍,可能与痊愈牦牛使用抗菌药物的次数和剂量而引起耐药水平的提升有关。梁园<sup>[13]</sup>等人对晋北地区部分养殖场中犍牛源大肠杆菌的耐药性分析显示对链霉素和庆大霉素的耐药率为 54.17% 和 62.50%,磺胺甲噁唑的耐药率则达到了 79.17%;Rehman<sup>[14]</sup>等人对青海高原腹泻牦牛源大肠杆菌的耐药性研究显示当地牦牛源大肠杆菌对磺胺甲噁唑和链霉素的耐药率仅为 61.64% 和 56.85%,对庆大霉素的耐药率则达到了 79.45%,Li<sup>[15]</sup>等对高原地区腹泻犏牛源大肠杆菌耐药性的研究发现其对庆大霉素和磺胺甲噁唑的耐药率仅有 14.6% 和 36.6%。上述研究结果表明,不同地区的牦牛源大肠杆菌的耐药情况也存在较大区别,可能与当地防治牦牛大肠杆菌病时的用药频率和用药习惯有关。

本研究通过对分离株进行 2 大类抗生素对应的

4种相关耐药基因的携带情况进行检测。整体来看,本研究中磺胺类耐药基因 *sul2* 和 *sul3* 的检出率高于氨基糖苷类耐药基因 *aac(6')-Ib* 和 *aac(3')-IV* 高,其中 *sul2* 和 *sul3* 分别达到了 56.04% 和 47.25%。对痊愈牦牛源和患病牦牛源大肠杆菌磺胺类耐药基因 *sul2*、*sul3* 和氨基糖苷类耐药基因 *aac(6')-Ib*、*aac(3')-IV* 携带情况进行比较发现,痊愈牦牛源大肠杆菌中氨基糖苷类耐药基因 *aac(6')-Ib* 的阳性检出率最高,达到了 73.15%,而磺胺类耐药基因 *sul2* 和 *sul3* 的阳性检出率分别 69.23% 和 51.92%,患病牦牛氨基糖苷类耐药基因 *aac(3')-IV* 的检出率高于健康牦牛。此外,本研究结果也显示,部分分离菌株存在耐药性和耐药基因携带情况不相符的情况,可能与耐药基因在细菌耐药机制中有复杂而密切的关系,而细菌耐药性是其基因型和环境条件共同作用的结果<sup>[16-17]</sup>,具体原因还有待进一步研究。

综上所述,本研究对川西北高原患病和痊愈牦牛源大肠杆菌对氨基糖苷类和磺胺类耐药性比较分析结果,能够为临床兽医从业人员提供一定的用药参考和数据支持。同时,对患病牦牛源和痊愈牦牛源大肠杆菌的耐药性进行对比分析,在一定程度上警示牧民过度的抗生素治疗可能导致牦牛对抗生素产生耐药性,造成治疗失败的同时增加医疗投入成本的同时不利于川西北畜牧业健康可持续发展。

#### 参考文献:

- [1] 殷泽禄,万虎. 大肠杆菌的研究综述[J]. 甘肃畜牧兽医,2019,49(5):33-35.
- [2] 马晓迪,Gestier T. 大肠杆菌—误区和误解[J]. 国外畜牧学(猪与禽),2011,31(4):10-11.
- [3] 曾群辉,朱国玉,索朗斯珠,等. 牦牛大肠埃希氏菌病灭活疫苗的制备[J]. 中国兽药杂志,2007(9):24-26.
- [4] 赵龙. 犏牛大肠杆菌病的流行病学、临床特征和防治措施[J]. 现代畜牧科技,2020(1):51-52.
- [5] 马福海. 牦牛腹泻病的诊断与防治[J]. 中国畜牧业,2022(12):103-104.
- [6] 李宇涵. 牦牛和藏猪源大肠杆菌生物被膜形成能力、耐药基因及毒力基因检测[D]. 成都:西南民族大学,2020.
- [7] 郝运,周沁怡,李锐,等. 四川省动物源常见细菌耐药性现状[J]. 动物医学进展,2021,42(8):107-111.
- [8] 徐海生. 仔猪大肠杆菌性腹泻病的病原分离鉴定[J]. 今日畜牧兽医,2020,36(3):7-9.
- [9] 唐仰龙. 一例大肠杆菌性幼腹腹泻病的综合防治[J]. 畜牧兽医科技信息,2021(10):189.
- [10] 2018年中国兽用抗菌药使用情况报告[J]. 中国动物保健,2019,21(12):8-9.
- [11] 张开琴,王刚,穷珍,等. 西藏牦牛源腹泻病原菌的分离鉴定及耐药性研究[J]. 甘肃畜牧兽医,2021,51(5):43-45+51.
- [12] 徐雨,冯明祥,韦登雄,等. 2020—2021年关岭牛犏牛源大肠杆菌的分离鉴定和耐药性检测[J]. 贵州畜牧兽医,2022,46(3):53-55.
- [13] 梁园,张丹丹,景程,等. 牦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.
- [14] REHAMAN M U, ZHANG H, LQBAL M K, et al. 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(1):24.
- [15] LI K, WANG X Q, SHAHZAD M, et al. Antibiotic resistance and screening of the resistant genes of *Escherichia coli* (*E. coli*) isolated from diarrheal yak calves in Sichuan Province, China[J]. Trop Biomed,2018,35(2):478-486.
- [16] 韩天飞,刘娜,张青青,等. 七类常见抗菌药耐药机制及耐药基因国内流行现状[J]. 中国动物检疫,2019,36(11):53-58.
- [17] ANDERSSON D I, HUGHES D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance[J]. Nat Rev Microbiol. 2010,8(4):260-71.

## Comparative Analysis of Antibacterial Resistance to Aminoglycosides and sulfonamides of *Escherichia coli* Isolated from sick and Recovered Yaks

LI Yang<sup>1#</sup>, YE Zhong-ming<sup>2#</sup>, YANG Dan-jiao<sup>2</sup>, CHEN Chao-xi<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal and Veterinary sciences, Southwest Minzu University, Chengdu, Sichuan, China. ;

2. Institute of Animal Husbandry, Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture of Sichuan province, China. )

**Abstract:** [Objective] To investigate the relationship between antibacterial drugs and antibacterial resistance of *Escherichia coli* isolated from sick and recovered yaks, [Method] In this study, micro-broth dilution method was used for antibacterial sensitivity test of 91 yak-derived *Escherichia coli* to aminoglycosides (Streptomycin and Gentamicin) and sulphonamides (Sulphamethoxazole and Sulfamethazine) and aminoglycoside-related resistance genes *aac(6)-Ib*, *aac(3)-IV* and sulfonamide-related resistance genes *sul2* and *sul3* were detected by PCR method. [Result] The results showed that the antibacterial resistance rates of 39 *Escherichia coli* isolated from sick yaks to Streptomycin, Gentamicin, Sulphamethoxazole and Sulfamethazine were 30.77%、5.13%、61.54% and 87.18%,

respectively, and the detection rates of antibacterial resistance genes of *aac(6)-Ib*, *aac(3)-IV*, *sul2* and *sul3* were 43.59%、25.64%、38.46% and 41.02%, respectively; The antibacterial resistance rates of 52 *Escherichia coli* isolated from recovered yaks to Streptomycin, Gentamicin, Sulphamethoxazole and Sulfamethazine were 42.30%、21.15%、94.23% and 71.15%, respectively, and the detection rates of antibacterial resistance genes of *aac(6)-Ib*, *aac(3)-IV*, *sul2* and *sul3* were 71.15%、19.23%、69.23% and 51.92%, respectively. [Conclusion] The experimental results revealed that both antibacterial resistance rate and detection rate of antibacterial resistance genes of *Escherichia coli* isolated from recovered yaks were higher than sick yaks, and rational select and correct use of antibacterial drugs should be scientifically to reduce the occurrence of drug resistance and improve the therapeutic effect of colibacillosis in yaks.

**Key words:** Yak-derived *Escherichia coli*; aminoglycosides; sulphonamides; antibacterial sensitivity test; antibacterial resistance genes

(上接第15页)

## Effects of Different Feeding Patterns on Growth and Development Performances of Simmental Calves

HE Jia-rong, LEI Heng, SU Hua-wei, OUYANG Xiao-fang, HE Hua-chuan,

LI Hong, LIN Xiang-sheng, JIANG Chuan-zhu, LIU Shao-gui\*

(Yunnan Vocational College of Agriculture, Kunming, Yunnan 650212)

**Abstract:** [Objective] The aim of this study is to investigate the effects of different feeding methods on the growth and development performances of Simmental calves. [Methods] According to the breeding methods and growth and development performance of Simmental calves from 2018 to 2021, Simmental cattle was taken as the research object to compare the breeding effects of four groups. Group I, calving cows were grazing in the daytime and nursing in the rest of the time; Group II, lactating cows were grazing in the daytime with early supplementary feeding, and nursing in the rest of the time; Group III (traditional way), lactating cows were fed in houses all day, and nursing freely all day; Group IV, lactating cows were fed in houses, regular nursing (the number of lactations was limited according to the month age) and feeding calves in the calf hutch. For the supplemental feeding groups, calves were fed on day 7, and then the growth and development performances of 0~4 months calves (weaned at 4 months) and 4~6 months calves were compared between each group. [Results] The results showed that both male and female birth weights of Simmental calves were 45 kg and 41 kg, respectively, and the four breeding methods had little effect on the birth weight of Simmental calves. Group IV of the experiment was fed in a cow shed, and the timed lactation method significantly improved the daily weight gain of the calves. The growth and development performance of the calves was the best, with the lowest feed to weight ratio. The weaned weights at 4 months and body weights of 6 months were the highest, of which the body weights of male and female calves reached  $217.19 \pm 52.27$  kg and  $191.50 \pm 14.62$  kg,  $296.11 \pm 26.51$  kg and  $259.11 \pm 24.92$  kg, respectively. Through the stepwise weaning, regular nursing and supplementary feeding in calf hutch could improve the survival rate, reduce weaning stress, promote the growth and development, and promote the breeding level. [Conclusion] It is better to breeding calves by limiting the nursing time and duration of calves according to the month age, of which the method of lactating cows in the barn and feeding calves in the calf hutch according to the month age is the best manner to promote the growth of calves, and gain the lowest feed to weight ratio.

**Key words:** simmental; Calf; feeding methods; growth and development performance