

杜澳博, 胡浩, 王静, 等. 江苏省和山东省部分地区奶牛粪便中大肠埃希菌耐药性及分子流行特征[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(2): 357-365.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.02.014

# 江苏省和山东省部分地区奶牛粪便中大肠埃希菌耐药性及分子流行特征

杜澳博<sup>1,2</sup>, 胡浩<sup>2</sup>, 王静<sup>2</sup>, 杨祥牟<sup>2</sup>, 张莉莉<sup>2</sup>, 杨章平<sup>1</sup>, 李明勋<sup>1</sup>, 王冉<sup>2</sup>

(1.扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; 2.江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所/省部共建国家重点实验室培育基地——江苏省食品质量安全重点实验室, 江苏南京 210014)

**摘要:** 为明确江苏省和山东省规模化养殖场奶牛粪便中大肠埃希菌的耐药情况与分子流行病学特征, 本研究从江苏省徐州市、淮安市、宿迁市、盐城市和山东省日照市 5 市规模化养殖场采集腹泻奶牛粪便样品 156 份, 使用伊红美蓝琼脂培养基分离大肠埃希菌, 利用微量肉汤稀释法测定分离株对常见抗菌药物的耐药性, 基于全基因组测序结果分析分离菌株耐药基因和毒力基因的携带情况及其分子分型和主要流行特征。结果表明, 从 156 份奶牛粪便样品中共分离获得 46 株大肠埃希菌, 分离率为 29.49%, 分离株对庆大霉素、氨苄西林、四环素和磺胺甲噁唑的耐药率较高, 分别为 65.22%、63.04%、63.04% 和 60.81%; 58.70% 的分离株对 3 种及以上药物产生耐药性。分离株中共检测出 44 种耐药基因和 57 种毒力基因, 耐药基因主要包括 *bla<sub>EC</sub>*、*bla<sub>CTX-M-55</sub>*、*bla<sub>NDM-5</sub>*、*bla<sub>NDM-6</sub>*、*aph(3')-Ia*、*tet(A)*、*sul2*、*qnrS1* 和 *mph(A)*, 检出率分别为 100.00%、47.83%、6.52%、2.17%、30.43%、34.78%、30.43%、26.09%、32.61%, 毒力基因主要包括 *espXI*、*fedC*、*sslE*、*iss*、*eae*、*astA*、*stxA1a*、*stxB1a*、*stxB2c*, 检出率分别为 84.78%、80.43%、50.00%、34.78%、8.70%、4.34%、2.17%、2.17%。从 46 株分离株中共预测到 30 种血清型和 28 种多位点序列分型 (MLST), 其中 O101 为主要流行血清型, 占比 21.74%; ST10 为优势 MLST, 占比 17.39%。分离株可分为 4 个进化分支, 不同地区分离株之间遗传进化关系较远。本研究结果为江苏省和山东省地区奶牛大肠埃希菌引发的疾病的精准防治提供了参考依据。

**关键词:** 大肠埃希菌; 全基因组测序; 耐药性分析; 毒力基因

中图分类号: R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2026)02-0357-09

## Drug resistance and molecular epidemiological characteristics of *Escherichia coli* in dairy cow feces in Jiangsu and Shandong provinces

DU Aobo<sup>1,2</sup>, HU Hao<sup>2</sup>, WANG Jing<sup>2</sup>, YANG Xiangmu<sup>2</sup>, ZHANG Lili<sup>2</sup>, YANG Zhangping<sup>1</sup>, LI Mingxun<sup>1</sup>, WANG Ran<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety—State Key Laboratory Cultivation Base, Ministry of Science and Technology, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To clarify the drug resistance and molecular epidemiological characteristics of *Escherichia coli* in dairy manure from large-scale farms in Jiangsu province and Shandong province, 156 fecal samples were collected from large-scale

farms in Xuzhou, Huai'an, Suqian, Yancheng in Jiangsu province and Rizhao in Shandong province. *Escherichia coli* was isolated by Eosin Methylene Blue agar medium, and the drug resistance of the isolates to common antibiotics was determined by micro-broth dilution method. Based on the results of whole genome sequencing, the carrying status of drug resistance genes and virulence genes, molecular typing

收稿日期: 2025-05-09

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFE0101800, 2022YFF1001200)

作者简介: 杜澳博(1999-), 男, 河南漯河人, 硕士研究生, 主要从事噬菌体研究。(E-mail) duaobo1101@163.com

通讯作者: 王冉, (E-mail) ranwang@jaas.ac.cn; 李明勋, (E-mail) limingxun@live.com

and main epidemic characteristics of the isolates were analyzed. The results showed that 46 strains of *Escherichia coli* were isolated from 156 cow feces samples, and the isolation rate was 29.49%. The resistance rates of the isolates to gentamicin, ampicillin, tetracycline and sulfamethoxazole were 65.22%, 63.04%, 63.04% and 60.81%, respectively. Additionally, 58.70% of the isolates demonstrated resistance to three or more drugs. A total of 44 drug resistance genes and 57 virulence genes were detected in the isolates. The drug resistance genes mainly included *bla<sub>EC</sub>*, *bla<sub>CTX-M-55</sub>*, *bla<sub>NDM-5</sub>*, *bla<sub>NDM-6</sub>*, *aph(3')-Ia*, *tet(A)*, *sul2*, *qnrS1* and *mph(A)*, and the detection rates were 100.00%, 47.83%, 6.52%, 2.17%, 30.43%, 34.78%, 30.43%, 26.09% and 32.61%, respectively. Virulence genes mainly included *espX1*, *fedC*, *sslE*, *iss*, *eae*, *astA*, *stxA1a*, *stxB1a* and *stxB2c*, with detection rates of 84.78%, 80.43%, 50.00%, 34.78%, 8.70%, 4.34%, 2.17%, 2.17% and 2.17%, respectively. A total of 30 serotypes and 28 multilocus sequence typing (MLST) types were predicted from 46 isolates. Among these, O101 was identified as the predominant serotype, accounting for 21.74%, and ST10 was the dominant MLST type, accounting for 17.39%. The isolates were classified into four phylogenetic clusters, with relatively distant genetic relationships observed among strains from different regions. The results of this study provide a reference for the precise prevention and control of diseases caused by *Escherichia coli* in dairy cows in Jiangsu and Shandong provinces.

**Key words:** *Escherichia coli*; whole genome sequencing; antimicrobial resistance analysis; virulence genes

大肠埃希菌(*Escherichia coli*)属革兰氏阴性菌,广泛存在于动物肠道及动物生活环境中。大肠埃希菌是引发奶牛腹泻的主要病原菌<sup>[1]</sup>。大肠埃希菌致病菌株毒力基因种类繁多,根据其临床特征及携带的特定毒力基因,可将致病大肠埃希菌分为肠致病性大肠埃希菌(Enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)、肠产毒素性大肠埃希菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)、肠侵袭性大肠埃希菌(Enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC)、肠出血性大肠埃希菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)、肠黏附性大肠埃希菌(Enterocolligative *Escherichia coli*, EAEC)和弥散黏附性大肠埃希菌(Diffusely adherent *Escherichia coli*, DAEC)6类<sup>[2]</sup>。

牛是大肠埃希菌的天然宿主,EHEC、EPEC和ETEC都可导致犊牛腹泻<sup>[3]</sup>。Bachmann等<sup>[4]</sup>研究发现,牛初乳中分离到的大肠埃希菌和粪便中分离到的大肠埃希菌有高度同源性,说明大肠埃希菌可能通过粪便污染初乳导致犊牛腹泻。养殖环境中的大肠埃希菌是导致奶牛乳腺炎的常见病原菌<sup>[5]</sup>。大肠埃希菌存在于养殖垫料、饮水及动物粪便中,在牛群之间广泛传播,同时牛粪的肥料化应用亦是造成大肠埃希菌广泛传播的重要途径之一<sup>[6]</sup>。

临床大肠埃希菌中耐药菌株占比为76.5%。20世纪90年代以来,牛源大肠埃希菌对 $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、氯霉素类、喹诺酮类和磺胺类抗生素的耐药率均逐步上升到50%~100%<sup>[7]</sup>。在中国北方及云南和四川地区的奶牛场,大肠埃希菌导致的奶牛腹泻严重,且大肠埃希菌携带多种耐药基因,多重耐药

现象严重<sup>[8-9]</sup>。大肠埃希菌耐药基因可以水平传播整合到其他微生物群中,严重威胁人类和动物健康<sup>[10]</sup>。

针对江苏省、山东省地区牛源大肠埃希菌耐药情况与分子流行病学特征缺乏研究的现状,本研究拟从江苏省徐州市、淮安市、宿迁市、盐城市和山东省日照市5市规模化养殖场采集腹泻奶牛粪便样品156份,利用全基因组测序技术分析江苏和山东地区奶牛养殖场中大肠埃希菌耐药情况及其分子分型、毒力基因和耐药基因携带情况,以期阐明该地区牛源大肠埃希菌遗传特性和流行特征,为该地区牛源大肠埃希菌引发的疾病的精准防治提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

伊红美蓝琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基、CAMHB肉汤培养基、LB肉汤培养基和琼脂粉均购自青岛海博生物科技有限公司;2×Taq Master Mix购自南京诺唯赞生物科技有限公司;甘油购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;DL2000 DNA Maker、Gel Red核酸染料购自生工生物工程(上海)股份有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒购自广州美基(Magen)生物科技有限公司。

SM830立式压力蒸汽灭菌器购自日本YAMATO公司;5810R高速冷冻离心机、Centrifuge5424R高速冷冻离心机购自德国Eppendorf股份公司;生物安全柜购自苏净安泰空气技术有限公司;DHP-9052电热恒温培养箱购自上海一恒科技有限公司;PCR仪、PowerPac HC电泳仪、Universal Hood II凝胶成

像仪购自美国 Bio-Rad Laboratories 公司。

## 1.2 牛源大肠埃希菌的分离和鉴定

从江苏省盐城市、徐州市、淮安市、宿迁市和山东省日照市 5 市的规模化奶牛场收集腹泻奶牛粪便拭子样品 156 份,于 4 °C 保存待测。粪便拭子样品放入装有 5 mL 无菌磷酸盐缓冲液(PBS)的微量离心管内,充分振荡混匀,使用接种环取培养液在伊红美蓝琼脂培养基平板划线,37 °C 恒温培养 18 h,挑取黑色带有绿色金属光泽的疑似大肠埃希菌单菌落,纯化 3~5 次,使用大肠埃希菌鉴定引物(表 1) *uidA*-F/*uidA*-R 对分离株进行 PCR 鉴定<sup>[11]</sup>。PCR 程序为,94 °C 预变性 5.0 min;94 °C 变性 30.0 s,55 °C 退火 30.0 s,72 °C 延伸 1.5 min,30 个循环;72 °C 延伸 5 min,于 4 °C 保存。PCR 产物通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 大肠埃希菌鉴定引物

Table 1 Identification primers for *Escherichia coli*

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
<i>uidA</i> -F	ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC	1 487
<i>uidA</i> -R	AAAGTGTGGTCAATAATCAGGAAGTC	1 487

## 1.3 抗生素敏感性试验

以大肠埃希菌标准菌株 ATCC 25922 为质控菌株,采用微量肉汤稀释法(Minimum inhibitory concentration, MIC)对大肠埃希菌进行以氨苄西林(AMP)、四环素(TET)、环丙沙星(CIP)、硫酸黏菌素(CS)、美罗培南(MEM)、庆大霉素(GEN)、氯霉素(CHL)、替加环素(TIG)、磷霉素(FOS)、磺胺甲噁唑(SMZ)等 10 种抗菌药物为试验对象的药敏检测。根据美国临床实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐标准<sup>[12]</sup>,对结果进行判定,结果分为耐药(Resistance, R)、中介(Intermediate, I)、敏感(Susceptible, S)。耐药性标准如表 2 所示。

## 1.4 全基因组测序及分析

利用 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA 后,使用 Illumina HiSeq X-Ten 系统(美国 Illumina Inc 公司产品)进行测序。利用在线软件 SPAdes (<http://cab.spbu.ru/software/spades/>)进行序列读数组装,并使用 Unicycler v0.5.0 软件对原始序列进行质量控制,再利用 Pilon 软件对数据进一步组装,最终得到精确度高的全基因组。使用 Res Finder 和 VFDB Finder<sup>[13]</sup> 网络数据库分析大肠埃希菌分离株的耐药基

表 2 耐药性标准

Table 2 Criteria for antimicrobial resistance

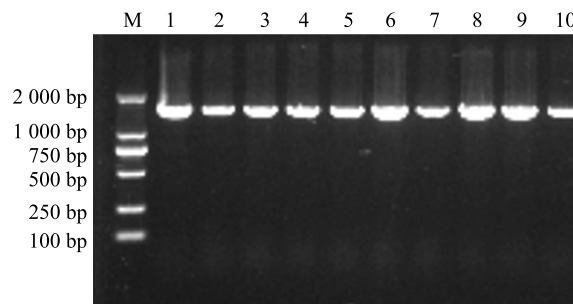
抗菌药物	敏感(≤)	中介	耐药(≥)
氨苄西林	8	16	32
四环素	4	8	16
环丙沙星	0.25	0.50	1.00
硫酸黏菌素	-	2	4
美罗培南	1	2	4
庆大霉素	4	8	16
氯霉素	8	16	32
替加环素	0.5	1.0	2.0
磷霉素	64	128	256
磺胺甲噁唑	256	-	512

因和毒力基因。使用基因组流行病学研究中心(Center for Gnomonic Epidemiology, CGE)序列分型(MLST) v2.0 数据库(<http://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>)对比分离株 MLST 分型,使用 Serotype Finder v2.0 数据库(<http://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>)对比分离株血清型;利用 Mash v2.1 软件构建分离株系统发育树,发育树分支网络通过 iTOL 在线软件(<http://itol.embl.de>)进行编辑。

## 2 结果与分析

### 2.1 大肠埃希菌分离与鉴定结果

大肠埃希菌 *uidA* 基因 PCR 扩增结果如图 1 所示。从图中可以看出,阳性样品在 1 487 bp 处均出现明显的条带,说明分离纯化得到的菌落为大肠埃希菌。



M: DL2 000 DNA Maker; 1~10 为样品扩增阳性条带。

图 1 大肠杆菌 *uidA* 基因 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification results of the *uidA* gene of *Escherichia coli*

156 份样品共分离与鉴定出 46 株大肠埃希菌,总分离率为 29.49%。各市奶牛粪便样品中大肠埃希菌的分离率存在较大变化,其中,于江苏省盐城市采集的

样本中大肠埃希菌分离率高达 52.94%，而于江苏省淮安市采集的样本中大肠埃希菌分离率最低，仅为 11.63% (表 3)。

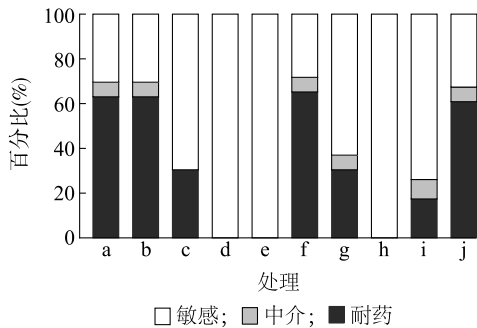
表 3 样品信息

Table 3 Sample information

样品来源	样品数量 (个)	大肠埃希菌菌株数 (个)	分离率 (%)
日照市	20	5	25.00
徐州市	30	5	16.67
淮安市	43	5	11.63
宿迁市	12	4	33.33
盐城市	51	27	52.94

### 2.2 耐药表型与多重耐药分析

46 株大肠埃希菌分离株对 10 种抗菌药物的耐药性如图 2 所示。从图中可以看出,65.22% 的分离株对庆大霉素耐药,63.04% 的分离株对氨苄西林和四环素耐药,60.81% 的分离株对磺胺甲噁唑耐药,30.43% 的分离株对环丙沙星和氯霉素耐药,17.39% 的分离株对磷霉素耐药,所有的分离株对硫酸黏菌素、替加环素和美罗培南均敏感。58.70% 的分离株为耐 3 类及以上药物的多重耐药性菌株 (图 3)。



a: 氨苄西林; b: 四环素; c: 环丙沙星; d: 硫酸黏菌素; e: 美罗培南; f: 庆大霉素; g: 氯霉素; h: 替加环素; i: 磷霉素; j: 磺胺甲噁唑。

图 2 抗生素敏感性测试结果

Fig.2 Antibiotic sensitivity test results

### 2.3 耐药基因分析

基于耐药基因预测网站 ResFinder, 46 株大肠埃希菌分离株中共预测到 44 个抗生素耐药基因 (表 4), 其中包括 9 个氨基糖苷类耐药基因 [ *aadA1*、*aadA2*、*aadA5*、*aph* (3')-*Ia*、*aac* (3)-*IId*、*aph* (4)-*Ia*、*aac* (6')-*Ib-cr5*、*aph* (6)-*Id*、*aac* (6')-*Ib3* ], 14 个 β-内酰胺类耐药基因 ( *bla<sub>SHV</sub>*、*bla<sub>NDM-6</sub>*、*bla<sub>NDM-5</sub>*、*bla<sub>CTX-M</sub>*、*bla<sub>CTX-M-65</sub>*、*bla<sub>CTX-M-55</sub>*、*bla<sub>EC</sub>*、*bla<sub>OXA-10</sub>*、*bla<sub>CTX-M-27</sub>*、

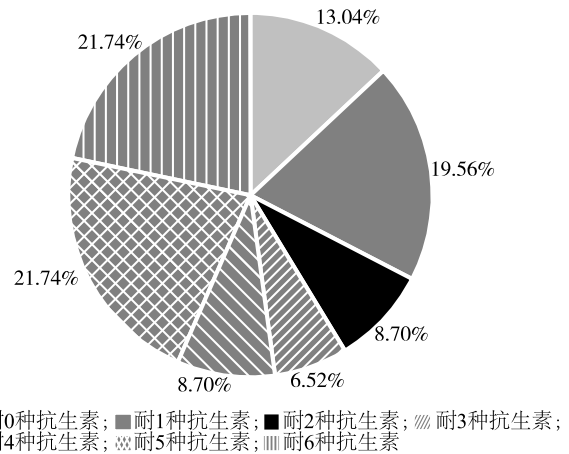


图 3 大肠埃希菌分离株的抗生素多重耐药性

Fig.3 Multidrug resistance of *Escherichia coli* isolates to antibiotics

*bla<sub>CTX-M-14</sub>*、*bla<sub>LAP-2</sub>*、*bla<sub>TEM</sub>*、*bla<sub>TEM-1</sub>*、*bla<sub>GII</sub>*), 3 个利福平类耐药基因 (*arr-3*、*arr-2*、*arr*), 2 个大环内酯类耐药基因 [ *erm* (B)、*mph* (A) ], 5 个氯霉素类耐药基因 (*catA*、*catB3*、*cmlA5*、*cmlA1*、*floR*); 6 个磺胺类耐药基因 (*sul1*、*sul2*、*sul3*、*dfrA12*、*dfrA17*、*dfrA14*), 2 个四环素类耐药基因 [ *tet* (A)、*tet* (B) ], 1 个喹诺酮类耐药基因 (*qnrS1*), 1 个磷霉素类耐药基因 (*fosA3*), 1 个林可胺类耐药基因 [ *lnu* (F) ]。其中 β-内酰胺类耐药基因 *bla<sub>EC</sub>* 的检出率为 100.00%, 氨基糖苷类耐药基因 *aph* (3')-*Ia* β-内酰胺类耐药基因 *bla<sub>CTX-M-55</sub>*、大环内酯类耐药基因 *mph* (A)、磺胺类耐药基因 *sul2* 和四环素类耐药基因 *tet* (A) 检出率均在 30.00% 以上。

### 2.4 毒力基因分析

基于 VFDB Finder 网络数据库, 46 株大肠埃希菌分离株中共预测到 57 种毒力基因 (表 5), 包括黏附素类毒力基因 (*papC*、*eae*、*iha*、*bmaE*、*fedC*、*papA*、*papC*、*papE*、*papH*、*f17a*、*f17g*、*efa1*、*sslE*、*pic*), 毒素和细胞损伤类毒力基因 (*stxB1a*、*stxA1a*、*stxB2c*、*astA*、*ehxA*、*cif*、*vactox*、*cvaC*), 效应器传递系统类毒力基因 (*espA*、*espX1*、*espB*、*espF*、*espL*、*espJ*、*espK*、*nleA*、*nleB2*、*nleC*、*tir*、*ireA*、*ipfA1*、*ipfA2*、*eilA*), 铁离子摄取类毒力基因 (*iroB*、*iroC*、*iroD*、*iroE*、*iroN*、*iutA*、*iucA*、*iucB*、*iucC*、*iucD*、*ybtQ*、*ybtP*、*ireA*), 免疫逃避类毒力基因 (*capU*、*iss*、*katP*), 及其他类毒力基因 (*espP*、*sinH*、*toxB*、*air*)。其中, 黏附素类毒力基因 *fedC*、*sslE* 和效应器传递系统类毒力基因 *espX1* 的检出率均 ≥ 50.00%。致病性大肠埃希菌相关毒力基因 *eae*、*stxB1a*、*stxA1a*、*stxB2c* 的检出率分别为 8.70%、2.17%、2.17%、2.17%, 这些基因是大肠埃

希菌导致疾病的主要毒力基因<sup>[14]</sup>。

表 4 分离株耐药基因

Table 4 Drug-resistance genes of *Escherichia coli* isolates

抗生素类别	耐药基因	含耐药基因菌株数	检出率 (%)	
氨基糖苷类	<i>aadA1</i>	2	4.34	
	<i>aadA2</i>	2	4.34	
	<i>aadA5</i>	5	10.87	
	<i>aph(3')-Ia</i>	14	30.43	
	<i>aac(3)-IId</i>	4	8.70	
	<i>aph(4)-Ia</i>	1	2.17	
	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	1	2.17	
	<i>aph(6)-Id</i>	11	23.91	
	<i>aac(6')-Ib3</i>	5	10.87	
	$\beta$ -内酰胺类	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	1	2.17
		<i>bla<sub>NDM-6</sub></i>	1	2.17
		<i>bla<sub>NDM-5</sub></i>	3	6.52
		<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	2	4.34
		<i>bla<sub>CTX-M-65</sub></i>	2	4.34
<i>bla<sub>CTX-M-55</sub></i>		22	47.83	
<i>bla<sub>EC</sub></i>		46	100.00	
<i>bla<sub>OXA-10</sub></i>		2	4.34	
<i>bla<sub>CTX-M-27</sub></i>		1	2.17	
<i>bla<sub>CTX-M-14</sub></i>		3	6.52	
<i>bla<sub>LAP-2</sub></i>		1	2.17	
<i>bla<sub>TEM</sub></i>		11	23.91	
<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>		5	10.87	
<i>bla<sub>GIL</sub></i>		1	2.17	
利福平类	<i>arr-3</i>	1	2.17	
	<i>arr-2</i>	2	4.34	
	<i>arr</i>	1	2.17	
大环内酯类	<i>erm(B)</i>	9	19.57	
	<i>mph(A)</i>	15	32.61	
氯霉素类	<i>catA</i>	2	4.34	
	<i>catB3</i>	1	2.17	
	<i>cmlA5</i>	2	4.34	
	<i>cmlA1</i>	2	4.34	
	<i>floR</i>	4	8.70	
	<i>sul1</i>	4	8.70	
磺胺类	<i>sul2</i>	14	30.43	
	<i>sul3</i>	2	4.34	
	<i>dfrA12</i>	1	2.17	
	<i>dfrA17</i>	4	8.70	
	<i>dfrA14</i>	9	19.57	
四环素类	<i>tet(A)</i>	16	34.78	
	<i>tet(B)</i>	3	6.52	
喹诺酮类	<i>qnrS1</i>	12	26.09	
磷霉素类	<i>fosA3</i>	1	2.17	
林可酰胺类	<i>lnu(F)</i>	1	2.17	

表 5 大肠埃希菌分离株毒力基因

Table 5 Virulence genes of *Escherichia coli* isolates

毒力基因类别	毒力基因	含毒力基因菌株数	检出率 (%)	
黏附素类	<i>papC</i>	7	15.22	
	<i>eae</i>	4	8.70	
	<i>iha</i>	4	8.70	
	<i>bmaE</i>	8	17.39	
	<i>fedC</i>	37	80.43	
	<i>papA</i>	6	13.04	
	<i>papC</i>	7	15.22	
	<i>papE</i>	1	2.17	
	<i>papH</i>	7	15.22	
	<i>fl7a</i>	1	2.17	
	<i>fl7g</i>	1	2.17	
	<i>efa1</i>	2	4.34	
	<i>sslE</i>	23	50.00	
	<i>pic</i>	1	2.17	
毒素和细胞损伤类	<i>stxB1a</i>	1	2.17	
	<i>stxA1a</i>	1	2.17	
	<i>stxB2c</i>	1	2.17	
	<i>astA</i>	2	4.34	
	<i>ehxA</i>	2	4.34	
	<i>cif</i>	2	4.34	
	<i>vactox</i>	1	2.17	
	<i>cvaC</i>	2	4.34	
	效应器传递系统类	<i>espA</i>	6	13.04
		<i>espX1</i>	39	84.78
<i>espB</i>		3	6.52	
<i>espF</i>		2	4.34	
<i>espL</i>		2	4.34	
<i>espJ</i>		2	4.34	
<i>espK</i>		3	6.52	
<i>nleA</i>		3	6.52	
<i>nleB2</i>		2	4.34	
<i>nleC</i>		3	6.52	
<i>tir</i>		3	6.52	
<i>ireA</i>		1	2.17	
<i>ipfA1</i>		3	6.52	
铁离子摄取类	<i>ipfA2</i>	2	4.34	
	<i>eilA</i>	4	8.70	
	<i>iroB</i>	1	2.17	
	<i>iroC</i>	2	4.34	
	<i>iroD</i>	2	4.34	
	<i>iroE</i>	2	4.34	
	<i>iroN</i>	2	4.34	
	<i>iutA</i>	5	10.87	
	<i>iucA</i>	5	10.87	
	<i>iucB</i>	5	10.87	
<i>iucC</i>	5	10.87		
<i>iucD</i>	5	10.87		
<i>ybtQ</i>	11	23.91		
<i>ybtP</i>	11	23.91		
<i>ireA</i>	1	2.17		
免疫逃避类	<i>capU</i>	3	6.52	
	<i>iss</i>	16	34.78	
	<i>katP</i>	1	2.17	
其他	<i>espP</i>	2	4.34	
	<i>sinH</i>	3	6.52	
	<i>toxB</i>	2	4.34	
	<i>air</i>	2	4.34	

### 2.5 基因型分析

大肠埃希菌分离株的全基因组序列构建的 Mash 系统发育树如图 4 所示。从图中可以看出,46

株大肠埃希菌可划分为 4 个大的进化分支,分支中存在多种不同的克隆株,大肠埃希菌亲缘关系较为复杂,存在同一地区流行多种不同血清型的情况。

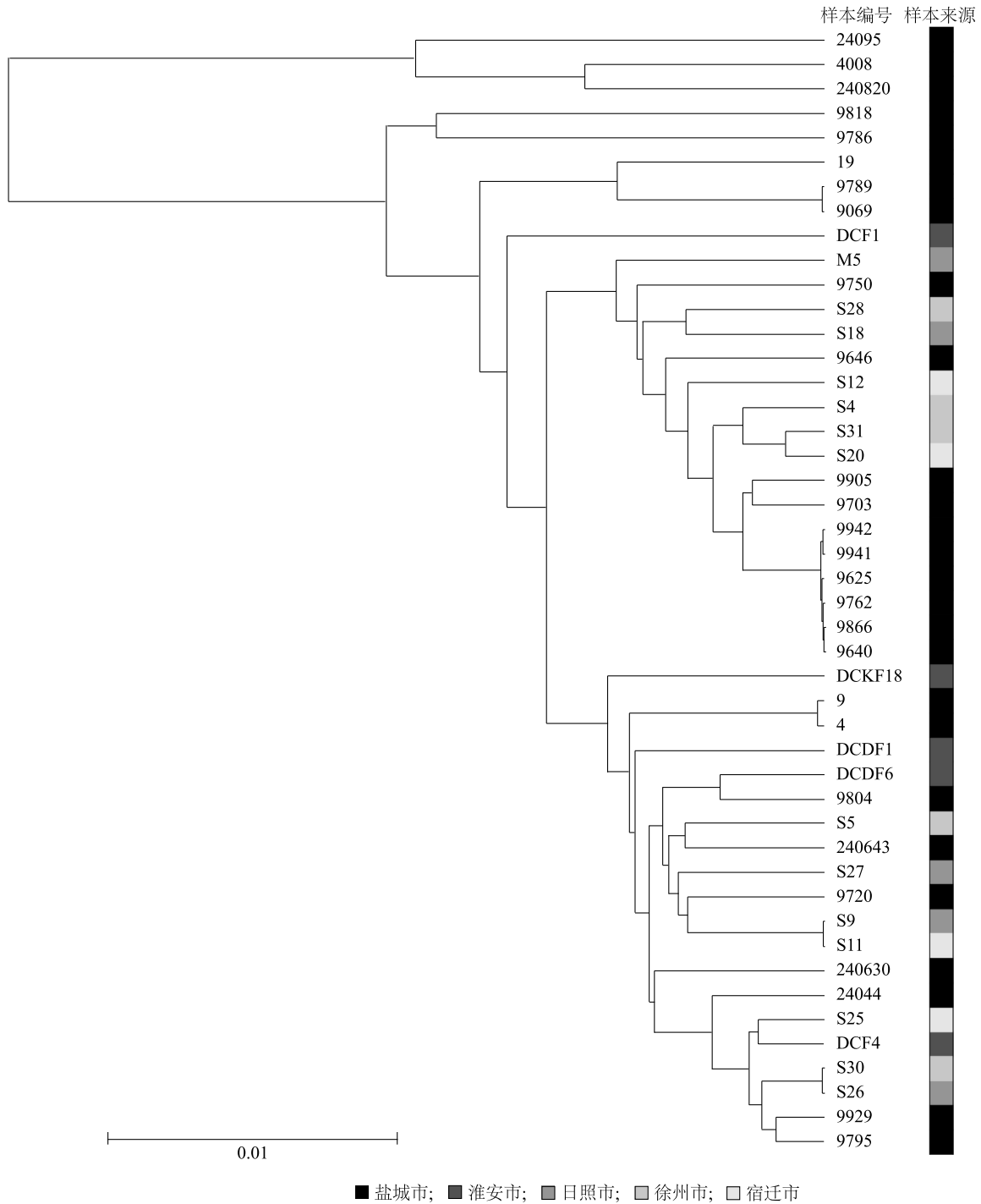


图 4 大肠埃希菌分离株遗传进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of *Escherichia coli* isolates

基于 Serotype Finder v2.0 在线数据库比对后, 46 个菌株可分为 30 种不同的血清型, 其中主要流

行血清型为 O101, 占比 21.74%(表 6)。基于 MLST v2.0 在线数据库比对后, 46 个菌株的多位点序列分

表 6 大肠埃希菌分离株血清型

Table 6 Serotypes of *Escherichia coli* isolates

血清型	菌株数量	占比(%)
O101	10	21.74
O132	2	4.34
O169	2	4.34
O180	2	4.34
O22	2	4.34
O26	2	4.34
O55	2	4.34
O8	2	4.34
O10	1	2.17
O11	1	2.17
O119	1	2.17
O125ab	1	2.17
O130	1	2.17
O134	1	2.17
O144	1	2.17
O153	1	2.17
O17	1	2.17
O171	1	2.17
O174	1	2.17
O36	1	2.17
O4	1	2.17
O45	1	2.17
O49	1	2.17
O5	1	2.17
O86	1	2.17
O93	1	2.17
H28	1	2.17
H31	1	2.17
H40	1	2.17
H48	1	2.17

表 7 大肠埃希菌分离株多位点序列分型

Table 7 Multilocus sequence typing of *Escherichia coli* isolates

MLST 分型	菌株数量	占比(%)
ST10	8	17.39
ST58	3	6.52
ST1415	3	6.52
ST29	2	4.34
ST155	2	4.34
ST162	2	4.34
ST446	2	4.34
ST543	2	4.34
ST68	1	2.17
ST69	1	2.17
ST101	1	2.17
ST117	1	2.17
ST195	1	2.17
ST224	1	2.17
ST345	1	2.17
ST540	1	2.17
ST744	1	2.17
ST1121	1	2.17
ST1178	1	2.17
ST1431	1	2.17
ST1589	1	2.17
ST1819	1	2.17
ST2073	1	2.17
ST6401	1	2.17
ST6721	1	2.17
ST6732	1	2.17
ST6844	1	2.17
ST8677	1	2.17
无分类	2	4.34

型(MLST)共有 28 种,其中 ST10 为优势分型,占比 17.39%(表 7)。

### 3 讨论与结论

在长期的动物养殖过程中,随着抗生素使用量的增加,动物致病菌的耐药性呈增强趋势。对动物致病菌的耐药性及分子流行特征进行研究对中国养殖业的健康发展有重要意义。大肠埃希菌是奶牛腹泻的主要致病菌,对奶牛健康有重要影响。本研究

发现,江苏省和山东省部分地区奶牛粪便中大肠埃希菌分离株对庆大霉素、氨苄西林、四环素和磺胺甲噁唑的耐药率均超过 60.00%,且 58.70%的分离株表现为多重耐药性。其中,本研究筛选得到的奶牛源大肠埃希菌分离株对氨苄西林的耐药率高于吴少鹏等<sup>[15]</sup>分离得到的山东省部分地区奶牛源大肠杆菌,亦显著高于苏北地区奶牛源大肠杆菌对庆大霉素和四环素的耐药水平<sup>[16]</sup>。此外,本研究还发现,所有分离株对硫酸黏菌素、替加环素和美罗培南均敏感,说明这些药物可作为该地区大肠埃希菌感染

的治疗选择。多重耐药菌株的高比例存在可能与养殖场长期不合理使用 $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类和四环素类抗生素有关<sup>[7]</sup>,因此,生产中需要通过药敏试验指导临床用药,避免耐药性进一步扩散。

随着抗生素的长期不合理应用,病原菌耐药基因呈现多样化特点,其中 $\beta$ -内酰胺类耐药基因在牛源大肠埃希菌中广泛流行<sup>[16-17]</sup>。本研究筛选得到的奶牛源大肠埃希菌全基因组测序共检测到 44 个耐药基因,其中 $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *bla<sub>EC</sub>* 检出率达 100.00%。此外,*bla<sub>NDM-5</sub>* 和 *bla<sub>NDM-6</sub>* 等碳青霉烯类耐药基因的检出率虽然比例较低(分别为 6.52% 和 2.17%),但因其可通过质粒水平传播至其他革兰氏阴性菌,因此,需警惕其在养殖环境中的扩散风险。本研究分离株中四环素耐药基因 *tet(A)* 和 $\beta$ -内酰胺类 *bla<sub>TEM</sub>* 的携带率分别高达 34.78% 和 23.91%,与河南地区奶牛源大肠杆菌的检出率相差不大,而其他耐药基因携带率存在较大差距<sup>[18]</sup>,这可能与不同地区抗生素使用类型及方法有关。耐药基因的多样性和水平传播能力加剧了耐药性治理的复杂性,因此,加强养殖场抗生素使用监管及养殖环境中耐药菌的监测对健康养殖至关重要<sup>[10]</sup>。

本研究从分离得到的 46 株大肠埃希菌中共鉴定出 57 种毒力基因,其中菌毛黏附素基因 *fedC* 和毒素因子 *espXI* 的检出率分别高达 80.43% 和 84.78%,说明黏附素与毒素分泌是该地区奶牛腹泻的主要致病机制<sup>[2]</sup>。*fedC* 基因参与 I 型菌毛的合成,促进细菌在肠道黏膜表面的定植<sup>[19]</sup>,*espXI* 作为肠集聚性大肠埃希菌(EAEC)的毒力因子,可能与犊牛腹泻的发生相关。本研究分离株中 *eae*、*stxB1a*、*stxA1a*、*stxB2c* 等毒力基因的检出率虽然仅为 8.70%、2.17%、2.17% 和 2.17%,但这些基因是肠致病性疾病和肠出血性疾病的主要毒力因子<sup>[20]</sup>,因此需要重点关注。*eae* 基因编码的紧密黏附素是 EPEC 引发肠道炎症的关键因子,*stx* 毒素基因是影响人类食品安全的重要风险因子,因此,生产中亟需加强奶牛养殖环境中 EPEC 和 EHEC 的监测<sup>[21]</sup>。

本研究分离得到的 46 株分离株血清型和多位点序列分型结果显示,优势血清型为 O101,优势序列分型为 ST10。O101 血清型在土耳其犊牛腹泻菌株中检出率高达 52.50%<sup>[22]</sup>,说明其可能具有广泛的宿主适应性和传播能力。ST10 作为全球流行的克隆复合体,常与病原菌多重耐药性相关。本研究

在盐城地区分离得到 6 株 O101:H9-ST10 菌株,与新疆腹泻犊牛粪便样品中大肠埃希菌的分型相同,均为全球流行的多重耐药菌株,且 ST10 菌株均携带 *bla<sub>EC</sub>*、*tet(A)* 和 *sul2* 等耐药基因,因此,生产中加强该类菌株引起的疾病的防治、减少其传播对健康养殖非常重要<sup>[23]</sup>。

本研究为江苏省和山东省部分地区奶牛大肠埃希菌病的临床治疗和流行病学防治、抗生素合理使用提供了重要参考,未来的研究中可以进一步扩大样品采集范围,结合抗生素使用情况调查,深入分析大肠埃希菌的传播路径,明确大肠埃希菌耐药性与用药方式的相关性,从而实现研究地区奶牛大肠埃希菌病的精准防控。

#### 参考文献:

- [1] ZHANG Z, LI X P, YANG F, et al. Influences of season, parity, lactation, udder area, milk yield, and clinical symptoms on intramammary infection in dairy cows [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(8): 6484-6493.
- [2] FARFÁN-GARCÍA A E, ARIZA-ROJAS S C, VARGAS-CÁRDENAS F A, et al. Virulence mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. Revista Chilena de Infectología, 2016, 33(4): 438-450.
- [3] STEIN R A, KATZ D E. *Escherichia coli*, cattle and the propagation of disease [J]. FEMS Microbiology Letters, 2017, 364(6): fnx050.
- [4] BACHMANN L, WEBER L, LIERMANN W, et al. Colostrum as a source of ESBL-*Escherichia coli* in feces of newborn calves [J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 9929.
- [5] VANGROENWEGHE F, DUCHATEAU L, BURVENICH C. Short communication: J-5 *Escherichia coli* vaccination does not influence severity of an *Escherichia coli* intramammary challenge in primiparous cows [J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(7): 6692-6697.
- [6] BROOKS K, EZE J, ONALENNA O, et al. Analysis of antibiotic resistance from a rural community and wastewater contaminated environment linked to human and animal activities [J]. Journal of Hazardous Materials Advances, 2023, 9: 100232.
- [7] 张玉杰, 王晓旭, 徐 锋, 等. 牛源大肠杆菌耐药性研究进展 [J]. 中国奶牛, 2023(10): 29-36.
- [8] 张 伟, 崔冰冰, 孙武文, 等. 北方不同地区犊牛腹泻大肠杆菌耐药性和耐药基因携带率的检测分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(11): 162-165.
- [9] WEI X J, WANG W W, LU N N, et al. Prevalence of multidrug-resistant CTX-M extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from different bovine feces in China [J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9: 738904.
- [10] WILLYARD C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest

- health threats[J]. *Nature*, 2017, 543(7643):15.
- [11] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验致泻大肠埃希氏菌检验: GB 4789.6-2016[S]. 北京:中国标准出版社,2017.
- [12] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100[S]. Wayne, PA:CLSI, 2023.
- [13] CHEN L H, YANG J, YU J, et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(Database issue):D325-D328.
- [14] BOERLIN P, MCEWEN S A, BOERLIN-PETZOLD F, et al. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(3):497-503.
- [15] 吴少鹏,王国华,赵效南,等. 山东省某地区奶牛源大肠埃希菌的血清型、耐药特性及分子特性[J]. *微生物学报*, 2020, 60(3):486-498.
- [16] 赵静雯. 苏北地区奶牛乳腺炎病原菌流行病学调查及大肠杆菌耐药性与毒力基因相关性分析[D]. 扬州:扬州大学,2022.
- [17] 张玥,张学迪,徐楷,等. 河北省部分地区腹泻犊牛源大肠埃希氏菌毒力基因检测与耐药性分析[J]. *动物医学进展*, 2024, 45(10):40-47.
- [18] 赵敏,杨涛,朱金凤,等. 河南省部分规模化奶牛场奶牛乳房炎源大肠杆菌耐药性分析与耐药基因检测[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023(6):84-88, 142.
- [19] CAPITANI G, EIDAM O, GLOCKSHUBER R, et al. Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*[J]. *Microbes and Infection*, 2006, 8(8):2284-2290.
- [20] BAGEL A, SERGENTET D. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and milk fat globules[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(3):496.
- [21] ZHANG P F, LIU L S, SHENG H J, et al. Antibiotic resistance and genomic analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from dairy cattle, raw milk, and farm environment in Shaanxi Province, China[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2024, 21(10):624-633.
- [22] COŞKUN M R, 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.
- [23] HE W Y, ZHANG X X, GAO G L, et al. Clonal spread of *Escherichia coli* O101: H9-ST10 and O101: H9-ST167 strains carrying *fosA3* and *blaCTX-M-14* among diarrheal calves in a Chinese farm, with Australian chroicocephalus as the possible origin of *E. coli* O101: H9-ST10[J]. *Zoological Research*, 2021, 42(4):461-468.

(责任编辑:石春林)