奶牛粪源大肠埃希氏菌血清分型、系统进化分群及毒力基因分布

亓爱杰

阳谷县畜牧兽医事业发展中心，山东阳谷 252300

摘　要：[目的]为研究奶牛腹泻粪源大肠埃希氏菌血清分型、系统分群及毒力基因分布。[方法]试验采集自山东部分奶牛场有腹泻症状的奶牛新鲜粪便147 份，采用细菌常规分离培养、生化试验和细菌16S rDNA的PCR扩增分子生物学技术，证实分离菌株为致病性大肠埃希氏菌，并进一步对分离菌株进行血清型、系统进化分群和毒力基因检测，分析毒力基因在系统进化分群中的分布情况。[结果]鉴定出62 株大肠埃希氏菌，9 种致病性血清分型，其中，肠侵袭性（EIEC）、肠致病性（EPEC）、肠产毒性（ETEC）大肠埃希氏菌血清型，分别占17.74%、24.19%、19.35%，优势血清型为O125∶K70（B15）和O124∶K72。18 株属于A群，12 株属于B1群，15 株属于B2群，9 株属于D群，8 株未确定系统进化分群。毒力基因ibeB、mat和fimC的分布率较高，分别为100.00%、95.16%、91.94%，所有菌株至少分布4 种毒力基因、9 种毒力基因组合形式。毒力基因与系统进化分群关联分析显示，在4 种分群中ibeB分布率均为100%，在B1群中均能检测出17 种毒力基因。[结论]山东省部分地区奶牛场奶牛粪源大肠埃希氏菌血清分型和系统进化分群具有多样性，携带多种毒力基因，应引起重视，加强监测和防控。

关键词：奶牛粪源；大肠埃希氏菌；血清分型；系统进化分群；毒力基因

文章编号：1671–4393（2025）06–0080–08　　DOI:10.12377/1671–4393.25.06.14

0 引言

腹泻是奶牛养殖生产中比较常见的胃肠道疾病，由病原微生物、环境、饲养管理等多种因素引起。大肠埃希氏菌（*Escherichia coli*，*E. coli*）广泛存在于牛羊饲养环境，是造成奶牛腹泻的重要因素之一。大肠埃希氏菌是一种革兰氏阴性菌，天然存在于人和动物的肠道中，属于条件性致病菌[1]。大多数大肠埃希氏菌菌株对人和动物是非致病性的，但有些菌株是致病性的，可引起胃肠道和肠外感染，如致腹泻和肠道致病性大肠杆菌（Intestinal Pathogenic E. coli，InPEC）和肠外致病性大肠杆菌（Extraintestinal Pathogenic *E. coli*，ExPEC）[2]。奶牛

作者简介：亓爱杰（1978–），女，山东阳谷人，本科，高级兽医师，研究方向为动物疾病防控与诊疗。

中国乳业线上阅读

在机体免疫力下降、饲养环境应激状态下，大肠埃希氏菌在体内产生大量肠毒素，可使感染奶牛出现消化不良、腹泻，甚至导致全身性败血症等临床症状，且传播速度快，发病急，严重损害奶牛机体健康，给奶牛场造成经济损失。

依据大肠埃希氏菌是否存在yiaA、ChuA和DNA匿名片段TSPE4. C2，将大肠埃希氏菌系统进化分群分为A、B1、B2 和 D群[3]。大肠埃希氏菌抗原结构多样性，血清型众多，有一定的地域特征，不同血清型的菌株之间缺乏交叉免疫保护性[4]。携带的毒力基因较多，主要有耶尔森菌毒力岛、黏附素、侵袭性酶、摄铁系统、肠毒素和抗血清活性因子等[5]。大肠埃希氏菌致病性与菌株的系统进化分群、血清型和毒力基因密切相关[6]。大肠埃希氏菌既可通过外源捕获耐药基因和基因突变产生抗生素耐药性，也能借助转座子、质粒、整合子等在其他细菌之间水平或垂直传播，是一个天然的多重耐药基因库，也是评价细菌耐药性的指示菌[7]。因此，研究其系统进化分群、血清分型、耐药性和毒力基因分布情况对于有效防控该菌传播具有重要意义。然而，目前有关针对山东省部分地区奶牛场奶牛腹泻大肠埃希氏菌的血清分型、系统进化分群、毒力基因和耐药性尚未见报道。本研究以来自山东省部分地区规模奶牛场临床腹泻的病奶牛粪便分离鉴定的大肠埃希氏菌菌株为对象，进行血清型鉴定、系统进化分群，同时检测分离菌株耐药性和毒力基因分布情况，以期为大肠埃希氏菌防控和疫苗研制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 病料来源

病料为采集自山东省部分奶牛场有腹泻症状的奶牛新鲜粪便147 份，装入采样袋编号，送本中心实验室检测。

1.2 主要培养基和试剂

麦康凯琼脂（MAC），伊红美蓝（EMB）琼脂，青岛海博生物技术有限公司；API 20E 肠杆菌的生化鉴定系统，上海欣中生物工程有限公司；细菌基因组DNA提取试剂盒，2×Taq PCR MasterMix，DNA Marker，天根生物试剂有限公司；血清诊断试剂盒，广州华南生物工程有限公司。

1.3 大肠埃希氏菌的分离培养与生化试验

取25 g粪便样品装入含有225 mL营养肉汤的均质杯，8 000 r/min，离心均质2 min，37 ℃恒温培养6 h，然后吸取10 μL培养液装入含有30 mL肠道菌增菌肉汤管中，42 ℃增菌培养18 h。取100 μL增菌液分别划线接种于伊红美蓝（EMB）琼脂，37 ℃培养18～24 h，观察菌落特征。挑取有金属光泽或没有金属光泽的紫黑色典型菌落接种于麦康凯琼脂（MAC），37 ℃培养24 h。挑取砖红色或桃红色菌落制作涂片，革兰氏染色，镜检，观察菌体形状。并对砖红色或桃红色菌落利用API 20E 肠杆菌的生化鉴定系统进行生化试验。生化试验结果符合E. coli的菌落进一步进行PCR扩增分离菌16S rRNA试验。

1.4 大肠埃希氏菌分子生物学 PCR 鉴定

根据细菌基因组DNA提取试剂盒操作说明提取分离菌株的DNA，以此为PCR反应的模板。16S rRNA扩增通用引物为：F：5 ' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′，R：5′ ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′，预计扩增目的条带大小为1 466 bp。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。PCR反应体系为25 μL：Taq PCR Master Mix 12. 5 μL，上、下游引物各1 μL，分离菌株DNA模板2 μL，ddH2O 8.5 μL。PCR反应程序：95 ℃预变性8 min；95 ℃变性25 s，55 ℃退火25 s，72 ℃延伸1 min，共运行35 个循环；72 ℃终延伸8 min。4 ℃保存。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测，凝胶成像系统拍照，鉴定为阳性扩增产物送生工生物工程（上海）股份有限公司基因测序，将测序结果与NCBI数据库公布的16S rRNA基因序列进行BLAST同源性比对，以

中国乳业杂志社版权所有

鉴定菌种。

1.5 大肠埃希氏菌血清型鉴定

分离菌株使用大肠杆菌血清型检测试剂盒（包括检测肠侵袭性大肠杆菌血清型、肠出血性大肠杆菌血清型、肠致病性大肠杆菌血清型、肠产毒性大肠杆菌血清型）采用玻板凝集试验检测大肠埃希氏菌血清型。

1.6 大肠埃希氏菌系统进化分群

参考Clermont[3]报道的大肠埃希氏菌三重PCR方法，对分离菌株进行系统进化分群。依据ChuA、YjaA、未知DNA片段TspE4C2设计合成3 对检测引物（表1）。PCR反应体系20 μL：分离菌株DNA模板1 μL，2×PCR Master Mix 12.5 μL，3 对引物各1 μL，补足ddH_2O至20 μL。PCR反应程序：95 ℃预变性5 min，94 ℃变性30 s，54 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，共运行30 个循环；72 ℃终延伸7 min。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统拍照。然后，使用ChuA和YjaA基因的PCR扩增结果和未知DNA片段TSPE4.C2，确定大肠埃希氏菌菌株的系统进化分群。

1.7 大肠埃希氏菌毒力基因检测

参考文献[8, 9]和GenBank数据库收录的毒力基因序列，设计17 种大肠埃希氏菌毒力基因引物，引物委托生工生物工程（上海）股份有限公司完成。引物毒力基因基本信息见表2。提取62 株大肠埃希氏菌DNA为多重PCR反应模板检测毒力基因。PCR反应体系25 μL：2×PCR Master Mix 12.5 μL，上、下游引物各1 μL，分离菌株DNA模板 2 μL，补足ddH_2O至25 μL。PCR 反应条件：95 ℃预变性10 min，94 ℃变性30 s，各毒力基因退火温度按表2中条件下反应30 s，72 ℃延伸 30 s，运行30 个循环；72 ℃延伸 8 min。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测、凝胶成像系统拍照。

2 结果

2.1 大肠埃希氏菌的分离培养与生化试验

分离菌株经增菌培养后，在伊红美蓝琼脂表面出现圆形、黑色、有金属光泽（部分菌落无金属光泽）的菌落，在麦康凯琼脂表面出现砖红色菌落，革兰氏染色镜检发现分离菌株为革兰氏阴性，呈两端钝圆、红色、短小杆状。根据对应的生化鉴定编码手册判定生化试验结果，在118 份病料样品中有62 株分离菌符合大肠埃希氏菌。

2.2 大肠埃希氏菌分子生物学 PCR 鉴定

对62 株分离菌16S rRNA 进行PCR扩增，均获得长度为1 466 bp的基因扩增条带，符合预期长度，且测序结果经BLAST比对分析，与大肠杆菌参考菌株同源性均在99.72%～100%（图1）。通过培养基培养、形态学观察、生化试验和PCR扩增反应，结果表明，62 株分离菌为大肠埃希氏菌，检出率为52.54%。

2.3 大肠埃希氏菌血清型鉴定

使用大肠杆菌血清型检测试剂盒对62 株大肠埃希氏菌血清型检测，结果显示，有38 株检测出肠致

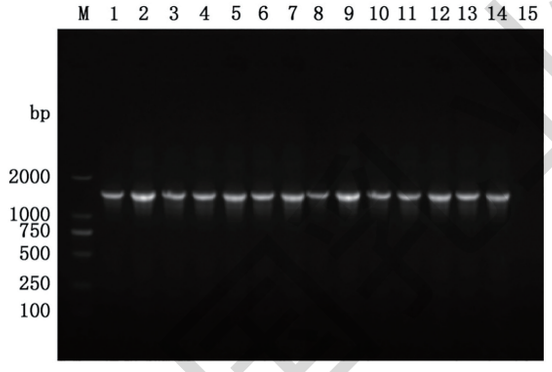
表 1 大肠埃希氏菌系统进化分群检测引物

基因名称	序列（5 ' → 3 ' ）	退火温度（℃）	长度（bp）	GenBank 登录号
ChuA	5′ –GACGAACCAACGGTCAGGAT–3′ 5′ –TGCCGCCAGTACCAAAGACA–3′	54	279	56816109
YjaA	5′ –TGAAGTGTCAGGAGACGCTG–3′ 5′ –ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC–3′	54	211	948515
TspE4C2	5′ –GAGTAATGTCGGGGCATTCA–3′ 5′ –CGCGCCAACAAAGTATTACG–3′	54	152	AF222188.1

中国乳业线上阅读

表 2 17 种毒力基因基本信息

毒力基因名称	序列（5 '→3 '）	长度（bp）	退火温度（℃）
eaeA	F：GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG；R：GGCGCTCATCATAGTCTTTC	346	50
papA	F：GGAACGAACGCAGAAACG；R：CGCAATGGGCGAATACTT	297	55
papC	F：GCTGATATCACGCAGTCAGT；R：GTCAACAAGAAGACGTGTTCC	768	55
tsh	F：TCTGTCAGACGTCTGTGTTTC；R：ATAGGATGACAGGCTACCGAC	598	55
fimC	F：GCCGATGGTGTAAAGGATGG；R：GGGTAAGTGCGCCATAATCA	475	62
mat	F：CGACCTGGTCAGCAACAGCC；R：TCCACGCCCACATTCAGTGT	238	58
ibeB	F：GTTCTCACTCAGCCAGAACG；R：CATCCAGCACTTCCAGATAAC	1 172	63
vat	F：CCATGCTTCAACGTCTCAGAG；R：CTGTTGTCAGTGTCGTGAACG	939	55
ibeA	F：GTATGACGGTGGGAACAAGAG；R：TGGCAATAGCAGCGGCAGTC	321	62
ompA	F：AGCTATCGCGATTGCAGTG；R：GGTGTTGCCAGTAACCGG	919	60
neuC	F：GGTGGTACATTCCGGGATGTC；R：ATGGTGGTGAAAAGACATTAGC	792	55
cva/cvi	F：TCCAAGCGGACCCCTTATAG；R：CGCAGCATAGTTCCATGCT	598	66
iss	F：ATCACATAGGATTCTGCCG；R：CAGCGGAGTATAGATGCCA	309	62
roN	F：CCTCCGACGATGATAATGACG；R：GATACCATTATGCGTAATGCC	866	55
fyuA	F：ATGTGAAACTGCGTCTGGCG；R：CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	728	55
iucD	F：GAAGCATATGACACAATCCTG；R：CAGAGTGAAGTCATCACGCAC	613	60
irp2	F：CTGATGAACTCACTCGCTATCC；R：AGCATCTCCTGGCTCTGCTC	440	62



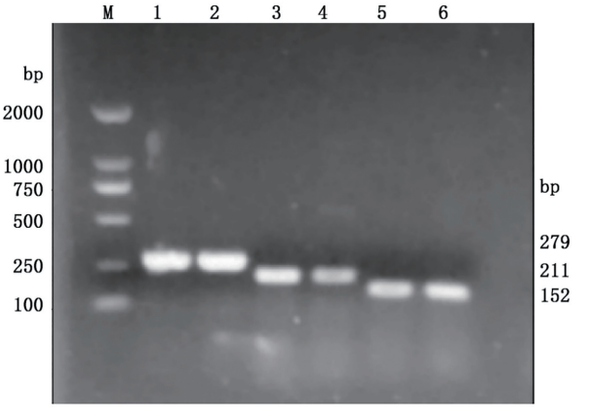
M，DL2000 DNA Marker；1～14，部分菌株16 S rRNA基因；15，阴性对照
M，DL2000 DNA Marker；1～14：Partial isolate16S rRNA gene；15，Negative control

图 1 部分大肠埃希氏菌 16 S rRNA 电泳检测结果

病性、肠侵袭性、肠产毒性大肠埃希氏菌血清型，分别占24.19%、17.74%、19.35%，未见肠出血性大肠埃希氏菌血清型，共9 种致病性血清型，其中，O125：K70（B15）和O124：K72为优势血清型（表3）。

2.4 大肠埃希氏菌系统进化分群

根据分离菌株电泳图谱和系统进化分群标志基因二分决策树判断标准，62株大肠埃希氏菌系统进化分群结果显示，18 株属于A群（29.03%）、12 株属于B1群（19.35%），15 株属于B2群（24.19%）、9 株属于D群（14.52%），8 株（12.90%）未确定系统进化分群。部分菌株PCR检测电泳图谱见图2。



M，DNA Marker；1 ~ 2，ChuA；3 ~ 4，yjaA；5 ~ 6，TspE4C2

图 2 大肠埃希氏菌系统进化分群三重 PCR 扩增电泳图

2.5 大肠埃希氏菌毒力基因检测

17 种毒力基因经PCR检测分析，发现不同毒

中国乳业线上阅读

表 3 62 株大肠埃希氏菌血清型检测结果

致病性大肠埃希氏菌分类	血清型	菌株数（株）	占比（%）
肠致病性大肠杆菌	O125 ： K70（B15）	8	12.90（8/62）
	O86 ： K61（B7）	6	9.68（6/62）
	O142 ： K86（B）	1	1.61（1/62）
肠侵袭性大肠杆菌	O136 ： K78	2	3.23（2/62）
	O124 ： K72	8	12.90（8/62）
	O143 ： K7	1	1.61（1/62）
肠产毒性大肠杆菌	O6 ： K15	5	8.06（5/62）
	O8 ： K40（A）/K47（A）	3	4.84（3/62）
	O78 ： K80（B）	4	6.45（4/62）
肠出血性大肠埃希氏菌	O104	0	0（0/62）
	O157 ： H7	0	0（0/62）

力基因分布差异较大。毒力基因ibeB、mat和fimC的分布率较高，分别为100.00%（62/62）、95.16%（59/62）、91.94%（57/62），均超过90%。而毒力基因papA、papC、irp2、roN、vat、ibeA分布率相对偏低，分别为29.03%（18/62）、22.58%（14/62）、19.35%（12/62）、24.19%（15/62）、4.84%（3/62）。其余毒力基因分布率在46.77%～74.19%，见图3。对大肠埃希氏菌分离株毒力基因进一步分析，发现所有菌株至少分布4 种毒力基因，共有9 种毒力基因组合形式。其中分布4～9 种毒力基因的菌株占比较多，分别为100.00%（62/62）、91.94%（57/62）、83.87%（52/62）、80.65%（50/62）、75.81%（47/62）、67.74%（42/62），表明分离菌株分布毒力基因广泛，具有多样性，致病力较强。

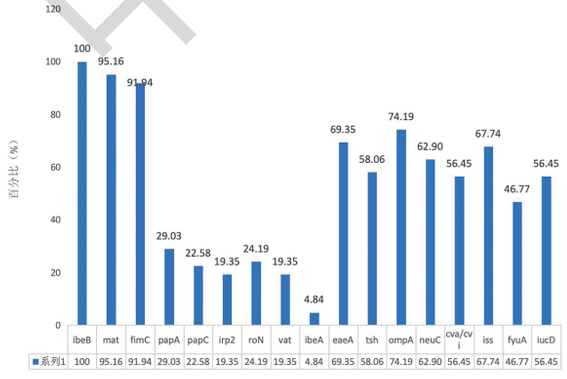


图 3 毒力基因分布率

2.6 大肠埃希氏菌毒力基因与系统进化分群之间关系分析

根据17 种大肠埃希氏菌毒力基因在系统进化分群中的分布结果，分析两者之间的关系。结果发现，A、B1、B2、D群的毒力基因分布差异不明显。在4 种分群中ibeB分布率均为100%，在A群中未检测出ibeA、roN，B2群未检测出papC，D群未检测出irp2。在B1群中均能检测出17 种毒力基因。A、B1、B2、D群和未确定分群的基因平均数分别为8.06、10.00、10.60、9.78和5.63，见表4。

3 讨论

作为条件性致病菌和肠道内常驻菌，致病性大肠埃希氏菌在奶牛免疫机能降低状态下可以引起腹泻、败血症、尿路感染等一系列症状，是动物常见的病原菌之一。本研究从147 份粪便中分离鉴定得到62 株致病性大肠埃希氏菌，检出率为42.18%，提示该菌在山东省部分地区腹泻奶牛中流行较严重，应引起重视。由于该菌O抗原血清型众多，不同血清型间无交叉保护性，且不同区域或时期的流行血清型菌株不断发生变化。吴道义等[10]报道，贵州毕节

中国乳业线上阅读

表 4 17 种毒力基因在系统进化分群中的分布

毒力基因	17 种毒力基因在系统进化分群中占比				
	A 群（n = 18）	B1 群（n = 12）	B2 群（n = 15）	D 群（n = 9）	未确定分群（n = 8）
eaeA	83.33%（15/18）	83.33%（10/12）	46.67%（7/15）	66.67%（6/9）	62.50%（5/8）
papA	11.11%（2/18）	41.67%（5/12）	46.67%（7/15）	44.44%（4/9）	0.00%（0/8）
papC	16.67%（3/18）	50.00%（6/12）	0.00%（0/15）	55.56%（5/9）	0.00%（0/8）
tsh	66.67%（12/18）	41.67%（5/12）	66.67%（10/15）	66.67%（6/9）	37.50%（3/8）
fimC	88.89%（16/18）	100.00%（12/12）	86.67%（13/15）	100.00%（9/9）	87.50%（7/8）
mat	94.44%（17/18）	91.67%（11/12）	100.00%（15/15）	100.00%（9/9）	87.50%（7/8）
ibeB	100.00%（18/18）	100.00%（12/12）	100.00%（15/15）	100.00%（9/9）	100.00%（8/8）
vat	5.56%（1/18）	25.00%（3/12）	33.33%（5/15）	22.22%（2/9）	12.50%（1/8）
ibeA	0.00%（0/18）	8.33%（1/12）	6.67%（1/15）	11.11%（1/9）	0.00%（0/8）
ompA	83.33%（15/18）	83.33%（10/12）	86.67%（13/15）	66.67%（6/9）	25.00%（2/8）
neuC	77.78%（14/18）	50.00%（6/12）	80.00%（12/15）	66.67%（6/9）	12.50%（1/8）
cva/cvi	55.56%（10/18）	58.33%（7/12）	86.67%（13/15）	55.56%（5/9）	0.00%（0/8）
iss	61.11%（11/18）	83.33%（10/12）	60.00%（9/15）	100.00%（9/9）	37.50%（3/8）
roN	0.00%（0/18）	33.33%（4/12）	53.33%（8/15）	33.33%（3/9）	0.00%（0/8）
fyuA	11.11%（2/18）	41.67%（5/12）	93.33%（14/15）	55.56%（5/9）	37.50%（3/8）
iucD	33.33%（6/18）	75.00%（9/12）	86.67%（13/15）	33.33%（3/9）	50.00%（4/8）
irp2	16.67%（3/18）	33.33%（4/12）	26.67%（4/15）	0.00%（0/9）	12.50%（1/8）
总数	145	120	159	88	45
平均数	8.06	10.00	10.60	9.78	5.63

某奶牛场大肠埃希氏菌检出率为62.00%（31/50）。侯铭源[11]研究发现，河北省奶牛大肠埃希氏菌存在9 种血清型，优势血清型为O89和O128。新疆克拉玛依地区奶牛原大肠埃希氏菌的检出率为51.89%，优势血清型为O124：K72和O142：K86（B）[12]。本研究中62 株分离菌经血清型鉴定，有38 株鉴定出O86、O125、O142、O136、O124、O143、O6、O8、O78共9 种致病性大肠埃希氏菌血清型，占比61.29%，优势血清型为O125：K70（B15）和O124：K72，占总分离菌株的比例均为12.90%，结果表明，山东省部分地区致病性大肠埃希氏菌血清型较多，增加防控难度。大肠埃希氏菌致病力与血清型有一定关系，如我国流行的O142、O125、O136、O6、O143、O124、O8等血清型均为致病力较强的血清型[13]。山东省部分奶牛腹泻病的流行与优势血清型O125和O124有密切关系，起到关键的致病作用。

国内外相关研究表明，大肠埃希氏菌的致病力与分群有相关性，在系统进化4 个群中，寄居于消化道黏膜的A、B1群多属于肠内致病型和共生型大肠埃希氏菌，B2和D群被认为是主要的致病群，肠外致病性大肠埃希氏菌多属于B2群和D群，说明A和B1群为条件致病性，B2和D群致病性较强[3, 14]。本研究系统进化分群结果显示，62 株在A、B2群占比相对较高，其次是B1和D群。这与国内部分学者报道的动物源大肠埃希氏菌分群结果基本一致[15]。不同类群的优势也可能因地理位置、感染部位和抗生素耐药性水平而有所不同[16]。应结合当地实际，改善奶牛饲养环境和提高免疫力，降低A、B1群菌株条件性致病因素，同时针对致病力强的B2、D群菌株开展药物防治和疫苗研制、预防。

传统上，根据致病因子和病原特性将致病性大肠埃希氏菌分为6 种致病群，包括肠毒素大肠埃希氏菌（ETEC）、肠出血性大肠埃希氏菌（EHEC）或志贺毒素大肠埃希氏菌（STEC）、肠聚集性大肠埃希氏菌（EAEC）、肠致病性大肠埃希氏菌

中国乳业线上阅读

（EPEC）、肠侵袭性大肠埃希氏菌（EIEC）以及广泛黏附性大肠埃希氏菌[17]，这些致病大肠埃希氏菌携带复杂的毒力因子。大肠埃希氏菌毒力基因种类繁多，包括铁摄取系统、肠毒素、侵袭素、黏附素、HPI毒力岛、多糖荚膜和脂多糖等，一般位于质粒、致病岛和其他可移动的遗传元件上[18]，这些毒力因子主要编码黏附、侵入、定植、铁载体的形成和分泌毒素等，直接影响菌株的致病力，也是导致动物腹泻的主要因子。本研究检测17 种常见的大肠埃希氏菌毒力因子，结果发现在62 株大肠埃希氏菌中均有分布，其中，毒力基因ibeB、mat和fimC的分布率较高，均超过90%，有9 种组合形式的毒力谱，毒力基因组合形式多样化。表明山东省部分地区大肠埃希氏菌毒力基因同样具有多样性、分布广泛的特点。侵袭性相关基因ibeB是侵袭脑血管内皮细胞的毒力因子，黏附相关基因fimC、mat是分布在菌体表面的毒力因子，为肠道致病菌定植提供前提条件[19]。本研究发现所有菌株至少分布4 种毒力基因，这也是导致山东省部分地区奶牛粪源大肠埃希氏菌检出率较高和腹泻的重要因素。众多研究显示，毒力因子分布数量、优势毒力因子和基因组合形式呈现地区差异性和时间动态变化性，因此，开展大肠埃希氏菌毒力基因监测有助于精准防控。

参考文献

[1] 陈海波，宴卓，曹兴，等.一例规模化猪场仔猪水肿病和链球菌病混合感染的诊治[J].中南农业科技，2024，45（8）：265–267.

[2] Tao Q，Lu Y，Liu Q，et al.Antibacterial activity of the antimicrobial peptide PMAP–36 in combination with tetracycline against porcine extraintestinal pathogenic Escherichia coli in vitro and in vivo[J].Veterinary Research，2024，55（1）：35.

[3] Clermont O，Bonacorsi S，Bingen E.Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group[J].Applied and Environmental Microbiology，2000，66（10）：4555–4558.

[4] 佟盼盼，黄顺敏，王芋丹，等.新疆地区腹泻仔猪源大肠杆菌的分群、血清型鉴定及耐药性分析[J].畜牧兽医学报，2023，54（1）：414–420.

[5] 李迎晓，焦凤超，张李敏，等.鸭源大肠杆菌分离鉴定及其毒力基因检测[J].畜牧与兽医，2020，52（3）：73–77.

[6] Johnson J R，Kuskowski M A，O'Bryan T T，et al.Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among Escherichia coli blood isolates from adults with diverse–source bacteremia[J].The Journal of Infectious Diseases，2002，185（10）：1439–1447.

[7] 李进福，丁海峰，李小申，等.河南地区猪呼吸道隐性感染大肠杆菌耐药基因检测及分析[J].河南农业科学，2017，46（9）：144–148.

[8] 顾晓晓.新疆部分地区牛、羊源肠外致病性大肠杆菌分离鉴定、分子分型及耐药性研究[D].石河子：石河子大学，2020.

[9] 石田，韩生义，李淑萍，等.青海牧区犏牛腹泻大肠埃希氏菌毒力基因及血清型分布特征研究[J].动物医学进展，2024，45（6）：20–25.

[10] 吴道义，马金萍，王明进，等.腹泻奶牛源大肠杆菌的分离鉴定及中药的体外抑菌效果[J].畜牧与兽医，2024，56（2）：116–123.

[11] 侯铭源.河北省奶牛子宫内膜炎的流行病学调查及致病菌大肠杆菌毒力与耐药检测[D].保定市：河北农业大学，2022.

[12] 江婉琳，马勋，王静，等.新疆克拉玛依地区奶牛源致病性大肠杆菌的血清型、系统进化群及MLST分析[J].中国畜牧兽医，2021，48（4）：1414–1422.

[13] 王雅丽，张灵枝，李志君，等.动物源大肠埃希氏菌耐药机制及中药对其耐药性消减的研究进展[J].动物医学进展，2021，42（2）：92–96.

[14] 王瑶，张耀东，易正飞，等.禽致病性大肠杆菌血清型、进化分群及毒力基因的分子流行病学调查[J].中国兽医科学，2020，50（9）：1159–1166.

[15] 刘鑫欢，恽佳蕾，毛立，等.羊腹泻样本中大肠杆菌的分离、毒力基因与耐药性分析[J].畜牧兽医学报，2023，54（8）：3445–3454.

[16] Koczura R，Mokracka J，Barczak A，et al.Association between the presence of class 1 integrons，virulence genes，and phylogenetic groups of Escherichia coli isolates from river water[J].Microbial Ecology，2013，65（1）：84–90.

[17] Ji X，Liang B，Sun Y，et al.An extended–spectrum beta–lactamase–producing hybrid shiga–toxigenic and enterotoxigenic Escherichia coli strain isolated from a piglet with diarrheal disease in northeast china[J].Foodborne Pathogens and Disease，2020，17（6）：382–387.

[18] 赫鸣睿.大肠杆菌毒力因子及耐药机制研究进展[J].现代畜牧科技，2018（9）：4–5.

[19] 高丽，付金蕾，黄雯静，等.黑龙江省大庆地区鹅源大肠杆菌的分离鉴定及毒力基因检测[J].中国动物传染病学报，2023，31（4）：144–149.

下转92页

中国乳业线上阅读

calcium<2.2 mmol/L） resulted in ovarian quiescence （follicle diameter <10 mm） and reduced hormone levels （FSH<5 IU/L）. Reproductive performance was significantly improved by dietary addition of per rumen fat （7%~8%） and GnRH combined with PGF2α treatment. This study provides a theoretical basis for nutritional and reproductive management of early lactation cows.

Keywords：early lactation；negative energy balance；reproductive hormones；nutritional regulation；ovarian quiescence

▲上接86页

Serotyping，Phylogenetic Clustering and Virulence Gene Distribution of *Escherichia coli* from Dairy Cow Manure

QI Aijie
Yanggu County Animal Husbandry and Veterinary Business Development Center，Yanggu Shandong 252300

Abstract：In order to study the serotyping，phylogenetic clustering and virulence gene distribution of *Escherichia coli* isolated from dairy cow manure with diarrhea in dairy cows，147 fresh feces of dairy cows with diarrhea symptoms were collected from some dairy farms in Shandong Province.The isolated strain was confirmed to be pathogenic *Escherichia coli* by routine bacterial isolation and culture，biochemical test and PCR amplification of bacterial 16S rDNA molecular biology technology.The serotype，phylogenetic clustering and virulence gene of the isolated strain were further detected，and the distribution of virulence gene in the phylogenetic clustering was analyzed.The results showed that 62 strains of *Escherichia coli* were identified and 9 pathogenic serotypes were identified.Among them，intestinal invasion（EIEC），intestinal pathogenicity（EPEC），and enterotoxigenic （ETEC） *E.coli* serotypes accounted for 17.74%，24.19%，and 19.35%，respectively.The dominant serotyping were O125：K70（B15） and O124：K72.18 strains belonged to group A，12 strains belonged to group B1，15 strains belonged to group B2，9 strains belonged to group D，and 8 strains could not determine the phylogenetic clustering.The distribution rates of virulence genes ibeB，mat and fimC were high，which were 100.00%，95.16% and 91.94%，respectively.At least 4 virulence gene and 9 virulence gene combinations were distributed in all strains. The correlation analysis between virulence gene and phylogenetic clustering showed that the distribution rate of ibeB in the four groups was 100%，and 17 virulence gene were detected in group B1.The results showed that the serotyping and phylogenetic clustering of pathogenic *Escherichia coli* in dairy cow with diarrhea in some areas of Shandong Province were diverse，carrying a variety of virulence gene，which should be paid attention to and strengthened monitoring and prevention and control.

Keywords：dairy cow manure；*Escherichia coli*；serotyping；phylogenetic clustering；virulence gene

中国乳业线上阅读