

薛雅茜, 蔡昀轩, 黄纤涵, 等. 1株临床源产肠毒素性大肠埃希菌的耐药性及致病性分析[J]. 山西农业科学, 2025, 53(6): 115-126.

XUE Y Q, CAI Y X, HUANG X H, et al. Analysis of drug resistance and pathogenicity of a clinical enterotoxigenic *Escherichia coli* isolate[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2025, 53(6): 115-126.

doi:10.26942/j.cnki.issn.1002-2481.2025.06.14

1株临床源产肠毒素性大肠埃希菌的耐药性及致病性分析

薛雅茜, 蔡昀轩, 黄纤涵, 王晨曦, 付雷明, 董彦君

(中国农业大学 动物医学院/兽医公共卫生安全全国重点实验室, 北京 100193)

摘要:产肠毒素性大肠埃希菌(ETEC)是引起断奶仔猪腹泻的主要病原菌,其多重耐药性的不断上升加剧了临床防控难度。对临床腹泻仔猪分离的1株大肠埃希菌进行耐药性及致病性分析,通过药敏试验及全基因组测序分析该临床分离菌株的耐药表型及携带耐药基因情况,通过全基因组测序鉴定菌株携带的毒力基因,采用PCR检测鉴定菌株携带的毒力因子,进一步对断奶仔猪攻毒,通过观察仔猪腹泻情况、精神状态、生长性能、攻毒菌排出、剖检病变及肠道病理学变化来评估该菌株的致病力。结果表明,该菌株血清型为O149:H10,携带F4、STb、LT毒力因子,属于产肠毒素性大肠埃希菌,对多西环素、卡那霉素、氟苯尼考、环丙沙星等多种临床常用抗菌药物耐药,携带外排泵、四环素类、氨基糖苷类等耐药基因。致病性试验结果表明,攻毒后100%仔猪连续2d发生腹泻,100%仔猪粪便中持续6d被检测到攻毒菌的排出,剖检可见肠道充血肿胀;H&E染色可见肠绒毛破损、断裂、脱落。综上,该菌株具有多重耐药性和一定致病性,临床治疗中应优先选择头孢类等敏感药物,同时加强耐药性监测。

关键词:产肠毒素性大肠埃希菌;耐药基因;毒力因子;致病性;全基因组测序;仔猪腹泻

中图分类号:S852.61 文献标识码:A 文章编号:1002-2481(2025)06-0115-12

Analysis of Drug Resistance and Pathogenicity of a Clinical Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolate

XUE Yaqian, CAI Yunxuan, HUANG Xianhan, WANG Chenxi, FU Leiming, DONG Yanjun

(State Key Laboratory of Veterinary Public Health and Safety/College of Veterinary Medicine,

China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Enterotoxigenic *Escherichia coli*(ETEC) is a leading cause of post-weaning diarrhea in piglets, and the rising prevalence of multidrug resistance has posed increasing challenges for clinical prevention and treatment. In this study, an *E. coli* strain isolated from diarrheic piglets was systematically characterized for its antimicrobial resistance and pathogenic potential, antimicrobial susceptibility testing combined with whole-genome sequencing(WGS) revealed the strain's resistance phenotype and associated resistance genes. Virulence-associated factors carried by the strain were identified by PCR. Pathogenicity was further assessed by oral challenge in weaned piglets, evaluating diarrhea incidence, mental state, growth performance, bacterial shedding, gross lesions, and histopathological alterations. The results showed that the isolate was serotyped as O149:H10 and harbored F4 fimbriae, STb, and LT enterotoxins, consistent with ETEC characteristics. It exhibited resistance to multiple commonly used antimicrobials, including doxycycline, kanamycin, florfenicol, and ciprofloxacin, and carried genes associated with efflux pumps, tetracyclines, and aminoglycosides. In vivo, all challenged piglets developed diarrhea for two consecutive days, with continuous shedding of the inoculated strain detected for six days. Necropsy showed intestinal congestion and

收稿日期:2025-08-12

基金项目:国家重点研发计划(2022YFD1800400)

作者简介:薛雅茜,在读硕士,研究方向:动物源性食品安全,E-mail:1583250583@qq.com

通信作者:董彦君,副教授,博士,主要从事组织发育、病理生理研究,E-mail:yanjund@cau.edu.cn

swelling, while H&E staining revealed villus damage, breakage, and desquamation. Collectively, these findings demonstrated that the strain possessed both multidrug resistance and significant pathogenicity. Clinically, cephalosporins and other effective agents should be prioritized, and enhanced surveillance of antimicrobial resistance in ETEC was warranted.

Keywords: enterotoxigenic *Escherichia coli*(ETEC); antimicrobial resistance genes; virulence factors; pathogenicity; whole-genome sequencing; piglet diarrhea

产肠毒素性大肠埃希菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)是引起断奶仔猪腹泻的主要病原之一,ETEC感染会影响仔猪的生长发育,降低饲料转化率,严重威胁着集约化养猪业的经济效益与健康发展。自20世纪70年代以来,ETEC的致病机制逐步被系统研究阐明^[1],主要是通过菌毛黏附素(如F4、F5、F18、F41等)定植于小肠上皮,随后分泌大量肠毒素,如STa、STb、LT、Stx1/2等,引起仔猪水和电解质分泌增多、吸收减少,进而导致腹泻^[2]。近年来,猪源ETEC的耐药情况日益突出,抗生素的广泛使用甚至滥用导致ETEC普遍携带多种耐药基因,呈现对磺胺类、四环素类、喹诺酮类、大环内酯类、 β -内酰胺类等临床常用抗菌药物的耐药性^[3],基于全基因组测序的研究进一步揭示了ETEC耐药基因的多样性和流行特征,如PENG等^[3]利用全基因组测序分析技术,对我国31个省份猪场ETEC多重耐药的流行现状进行了监测,ZHU等^[4]对我国5个省份的猪源ETEC进行了基因组学和表型分析,研究了猪源ETEC当前流行趋势及进化轨迹。现有研究虽揭示了ETEC主要毒力因子和耐药情况,但针对临床分离株的耐药性与毒力因子整合分析,以及通过动物模型验证其致病力的研究相对较少。

本研究通过对1株临床分离的猪源大肠埃希菌复苏培养及PCR检测毒力因子,鉴定其属于产肠毒素性大肠埃希菌,进一步通过药敏试验、全基因组测序分析及仔猪致病性试验,系统评估其耐药性及致病性特征,以期对ETEC防控和合理用药提供试验数据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 试验动物与试验菌株 5头24日龄纯种大白猪,体质量7~10 kg,健康且精神状态良好,没有腹泻病史,购自北京市SPF技术研究与推广中心,实验动物福利与伦理审查批准文号为Aw7050505202-2-01。购买后转运至中国农业大学实验动物平台ABSL-2设施内分栏饲养。适应性饲养3 d后分组,用耳标进行个体标识,其中,对照组2头(2、8号),攻毒组3头(4、5、9号)。试验菌株为1株从四川某猪场的腹泻病猪肠道内容物中分离获得的大肠埃希菌。

1.1.2 主要试剂与药品 脑心浸出液肉汤(BHI)、无菌脱纤维羊血购自北京陆桥技术股份有限公司,胰蛋白胨大豆琼脂(TSA培养基)购自美国BD公司,CAMHB肉汤购自青岛海博生物科技有限公司。盐酸多西环素(DOX)、硫酸卡那霉素(KAN)购自上海阿拉丁生化科技有限公司,盐酸四环素(TET)购自北京索莱宝科技有限公司,硫酸新霉素(NEO)、硫酸黏菌素(COL)购自上海麦克林生化科技有限公司,阿莫西林钠(AMO)、头孢噻吩钠(CEF)、硫酸头孢喹肟(CEQ)、环丙沙星(CIP)购自北京普西唐生物科技有限公司,氟苯尼考(FFC)购自北京偶合科技有限公司。

1.1.3 引物 试验所用ETEC毒力因子扩增引物参照文献[5],引物序列详见表1,由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表1 ETEC毒力因子扩增引物序列

Tab.1 ETEC virulence factors amplification primers sequences

引物	Primer	引物序列(5'-3')	Primer sequences(5'-3')	产物大小/bp	Product size
F4-F		GATGAAAAAGACTCTGATTGCA		478	
F4-R		GATTGCTACGTTACGCGGAGCG			
F5-F		CTGAAAAAAACACTGCTAGCTATT		543	
F5-R		CATATAAGTGACTAAGAAGGATGC			
F18-F		ATGAAAAGACTAGTGTTTATTTCTT		513	

续表1 ETEC毒力因子扩增引物序列
Tab.1(Continued) ETEC virulence factors amplification primers sequences

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	产物大小/bp Product size
F18-R	TTACTTGTAAGTAACCGCGTAAGCC	
F41-F	GATGAAAAAGACTCTGATTGCA	682
F41-R	TCTGAGGTCATCCAATTGTGG	
987P-F	GTTACTGCCAGTCTATGCCAAGTG	391
987P-R	TCGGTGTACCTGCTGAACGAATAG	
STa-F	GGGTTGGCAATTTTTATTCTGTA	183
STa-R	ATTACAACAAAGTTCACAGCAGTA	
STb-F	ATGTAAATACCTACAACGGGTGAT	360
STb-R	TATTTGGGCGCCAAAGCATGCTCC	
LT-F	TAGAGACCGGTATTACAGAAATCTGA	282
LT-R	TCATCCCGAATTCTGTTATATATGTC	
Stx1-F	ATTCGCTGAATGTCATTTCGCT	664
Stx1-R	ACGCTTCCCAGAATTGCATTA	
Stx2-F	TTTCTTCGGTATCCTATTCCC	484
Stx2-R	GATGCATCTCTGGTCATTGTA	

1.2 试验方法

1.2.1 菌株复苏与生长曲线测定 将分离菌株甘油肉汤冻存菌接种于TSA(含5%绵羊血)琼脂培养基上划线分离,37℃培养16~18h,随后挑取恢复活力的单菌落接种到5mL无菌BHI肉汤中,在200r/min、37℃恒温摇床中过夜培养。将培养好的菌液按1:100比例接种到无菌BHI肉汤中,混匀后取200μL菌液加入到无菌96孔板中,3次重复;将96孔板放入微孔板恒温振荡器上,以37℃、200r/min培养24h,使用酶标仪每隔1h检测菌液OD₆₀₀。以时间为横坐标、吸光度为纵坐标,绘制细菌生长曲线。

1.2.2 最小抑菌浓度(MIC)测定 参照美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)抗微生物药物敏感性试验执行标准M100-Ed34^[6]及VET01-A4^[7],采用微量肉汤稀释法进行最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)的测定,以能抑制细菌生长的最低药物浓度判定为MIC,试验重复3次,质控菌株为大肠埃希菌ATCC 25922。

1.2.3 毒力因子鉴定 使用表1中的ETEC毒力因子特异性扩增引物对分离菌株的DNA进行PCR扩增^[5,8],用大肠埃希菌CVCC196作阳性对照、ATCC25922作阴性对照。采用煮沸法制备待鉴定细菌的DNA模板,具体方法为:挑取1个单菌落,均匀悬浮于100μL无菌去离子水中,100℃

金属浴煮沸10min,迅速冰浴5min,然后在4℃、12000r/min离心2min,取上清储存于4℃备用。PCR反应体系共25μL:上下游引物各0.5μL, DNA模板1μL, 2×PCR SuperMix 12.5μL, ddH₂O 10.5μL; PCR反应程序为:94℃预变性5min; 94℃变性30s, 60℃复性30s, 72℃延伸30s, 35个循环; 72℃延伸5min, 4℃保存。PCR反应产物用2%琼脂糖凝胶电泳,使用紫外照胶仪观察电泳结果。

1.2.4 全基因组测序鉴定 收集对数生长期的菌液5mL左右,低速离心后弃掉培养基,用预冷的无酶无菌水或PBS清洗1~2次,5000r/min弃上清收集沉淀菌体,立即液氮速冻3~4h,送北京擎科生物科技有限公司进行全基因组测序;通过VFDB数据库^[9]对组装后的序列进行毒力因子检索,利用CARD耐药基因数据库^[10]对该菌株具有的各类抗生素耐药基因进行预测和注释。

1.2.5 致病性试验 参照文献[11]中的明胶胶囊口服饲喂攻毒法进行攻毒,具体操作为:将0.4mL菌液/无菌BHI肉汤装入肠溶明胶胶囊,长度为(19.2±0.5)mm中,现装现用,将胶囊放置在猪的舌根部,经口饲喂仔猪,确保完整吞咽。攻毒组每日以2.0×10¹¹cfu/mL浓度的菌液进行攻毒,一次给予0.8mL,每天2次,连攻3d,总剂量为9.6×10¹¹cfu/头,空白对照组仔猪给予等体积无菌BHI肉汤。攻毒前适应性饲养期为3d,分别记为D-2、D-1和D0;攻

毒第 1 天为 D1, 攻毒第 2 天为 D2, 试验结束屠宰日为 D8。分别在 D1 前及 D8 前, 空腹称量仔猪个体质量(提前禁食 12 h), 以组为单位称量饲料质量, 计算试验期间各组仔猪的平均日增质量、各组仔猪耗料量及饲料转化情况(料肉比)^[12]。

$$\text{各组平均日增质量} = \frac{\text{总增质量}}{\text{仔猪头数} \times \text{试验天数}} \quad (1)$$

$$\text{平均日采食量} = \frac{\text{采食总质量}}{\text{仔猪头数} \times \text{试验天数}} \quad (2)$$

$$\text{料肉比} = \frac{\text{平均日采食量}}{\text{平均日增质量}} \quad (3)$$

在试验期间每天上午喂料前用肛温计测量各组仔猪的直肠温度, 对仔猪精神状态进行观测统计, 按照精神状态评分标准^[13]进行评分(表 2); 每天以个体为单位观察记录试验仔猪的粪便性状情况并评分, 参照文献[14]制定评分标准(表 3)。连续 2 d 评分 ≥ 2 时, 判定为仔猪腹泻发生, 攻毒后对每组每日腹泻发生率进行统计。

$$\text{腹泻发生率} = \frac{\text{腹泻头数}}{\text{仔猪头数}} \times 100\% \quad (4)$$

$$\text{腹泻指数} = \frac{\text{各组仔猪腹泻评分总和}}{\text{天数} \times \text{仔猪头数}} \quad (5)$$

表 2 精神状态评分标准

Tab.2 Mental state rating criteria

评分	Score	精神状态	Mental state	评分标准	Rating criteria
0		正常		活泼好动, 眼睛明亮, 对声音或触碰反应灵敏, 采食饮水正常	
1		轻度抑郁		活动稍有减少, 刺激反应稍迟缓, 眼睛半闭, 嗜睡	
2		中度抑郁		长时间躺卧, 不愿起身, 站立时斜倚, 刺激反应迟缓, 目光呆滞	
3		严重抑郁/濒死		完全无法站立, 侧卧或俯卧不动, 对刺激无反应	

表 3 粪便性状评分标准

Tab.3 Rating criteria for fecal characteristics

评分	程度	粪便外观
Score	Degree of diarrhea	Fecal characteristics
0	正常(无腹泻)	条形或粒状
1	软便	能成形但易散开
2	腹泻	稠状、不成形、粪水未分离, 黏附明显
3	严重腹泻	液状、不成形、粪水分离, 流动明显

攻毒前及攻毒后每天无菌采集各组仔猪的新鲜粪便样品及肛拭子样品, 划线接种于 TSA 血琼脂平板, 采用多重 PCR 方法^[15]检测分离的菌落是否含有 F4、STb、LT 等 3 种毒力因子。判定标准: 粪便及肛拭子任一样品多重 PCR 阳性即认为检出攻毒菌。

试验结束时, 屠宰所有试验仔猪, 迅速剖开试验仔猪胸腔、腹腔, 检查胸、腹腔脏器有无病变, 拍照留存。采集十二指肠、空肠、回肠中段约 2 cm 各 2 段, 用生理盐水冲洗后, 取材进行 4% 多聚甲醛固定, 制作切片, 用于苏木精-伊红(H & E)染色, 观察组织形态。

1.3 数据分析

通过 GraphPad Prism 9 软件对数据进行显著性分析, 两两比较使用双尾 *t* 检验, 双因素比较使用双因素方差分析。P < 0.05 认定为在统计学意义上有显著差异。

2 结果与分析

2.1 细菌复苏培养

该临床分离株在 TSA 血琼脂平板上呈现边缘光滑, 大小均匀, 凸起的无色、半透明菌落, 呈 α -溶血(图 1)。

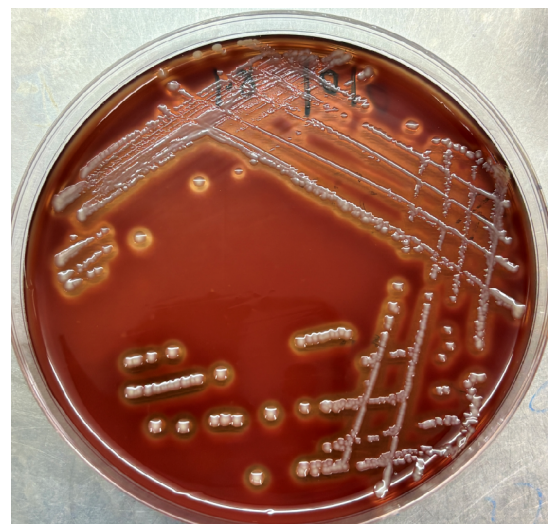


图 1 分离菌株在 TSA 血琼脂平板上的生长情况

Fig.1 The growth characteristics of the isolated strain on TSA blood agar

2.2 分离菌株生长曲线

分离菌株生长曲线如图 2 所示。

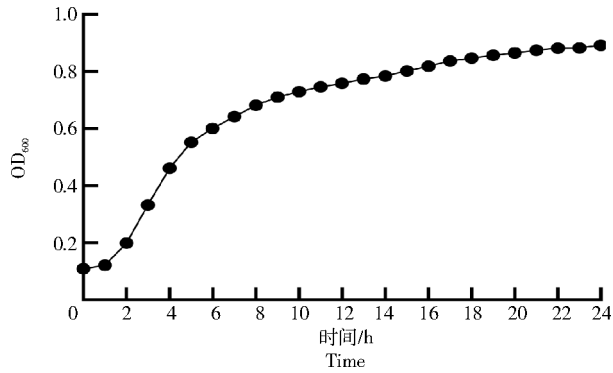


图2 分离菌株生长曲线

Fig.2 The growth curve of the isolated strain

从图2可以看出,该分离菌株在2~8 h内处于对数生长期,之后繁殖速度下降,逐渐进入稳定期。

2.3 药敏试验结果

临床常用抗菌药物对该临床分离菌株的MIC测定结果如表4所示,阿莫西林、四环素、新霉素、卡那霉素及氟苯尼考对该临床分离菌株在CAMHB肉汤中的MIC均 $\geq 128 \mu\text{g/mL}$,表明该菌株对阿莫西林、四环素、多西环素、新霉素、卡那霉素、氟苯尼考及环丙沙星耐药,对头孢噻吩及头孢唑肟敏感。

表4 临床常用抗菌药物对分离菌株在CAMHB肉汤中的MIC

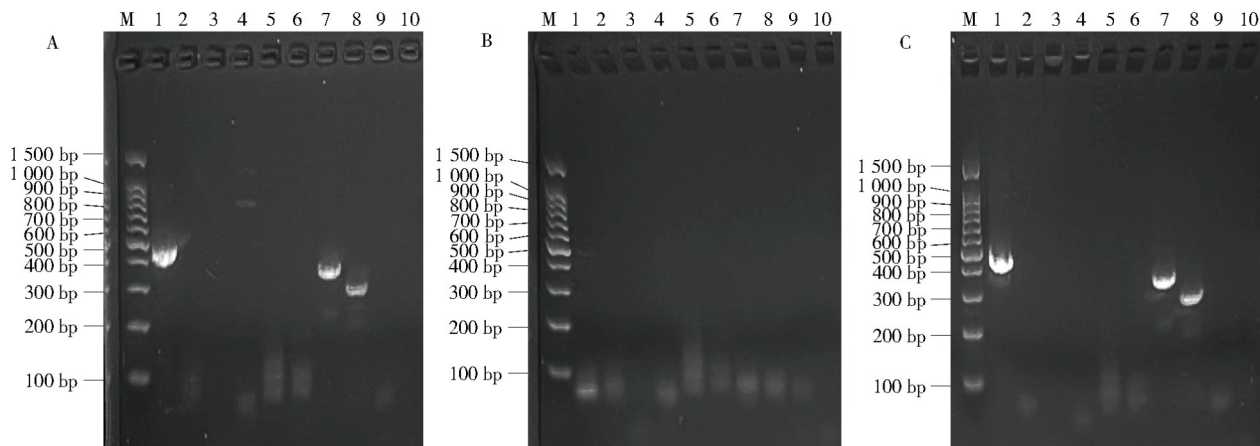
Tab.4 MICs of clinically used antimicrobial agents against the isolated strain in CAMH broth

项目 Item	MIC/($\mu\text{g/mL}$)									
	AMO	TET	DOX	NEO	KAN	CEF	CEQ	FFC	COL	CIP
结果 Results	> 128	128	16	128	>128	0.25	0.5	>128	0.25	64
敏感性 Susceptibility	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R
判定标准 Standard of criterion	敏感(S)	≤ 8	≤ 4	≤ 4	≤ 16	≤ 16	≤ 1	≤ 1	≤ 8	≤ 0.25
	中介(I)	16	8	8	32	32	2	2	16	≤ 2
	耐药(R)	≥ 32	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≥ 4	≥ 32	≥ 4

2.4 毒力基因检测结果

通过PCR扩增,经2%琼脂糖凝胶电泳,可以观察到携带F4、STb、LT毒力因子的参考菌株CVCC196在478、360、282 bp处产生3条特异性目的条带,阴性对照菌株ATCC25922未扩增出条

带,分离菌株在478、360、282 bp处产生3条特异性条带,与F4、STb、LT这3种毒力因子的预期扩增条带大小相符,表明分离菌株携带F4菌毛黏附素及STb和LT这2种肠毒素,为产肠毒素性大肠埃希菌(图3)。



A. 阳性对照菌株 CVCC196; B. 阴性对照菌株 ATCC25922; C. 分离菌株; M. 100 bp DNA Marker; 泳道 1~10 依次为 F4、F5、F18、F41、987P、STa、STb、LT、Stx1、Stx2 毒力因子

A. Positive control strain CVCC196; B. Negative control strain ATCC25922; C. The isolated strain; M. 100 bp DNA Marker; Lane 1-10. virulence factors F4, F5, F18, F41, 987P, STa, STb, LT, Stx1, and Stx2

图3 毒力因子PCR鉴定结果

Fig.3 PCR identification results of virulence factors

2.5 全基因组测序结果

对该菌株进行全基因组测序及毒力基因和耐药基因分析,测序结果显示,该菌株基因组大小为 5 587 932 bp,GC 含量为 50.36%,检测到 O149-1-

wzx、O149-2-*wzy* 及 H10-27-*fliC* 基因,故该菌株血清型为 O149:H10。通过数据库注释含有 1 059 个病原与宿主互作基因、28 个毒力基因和 69 个耐药基因,该菌株结构示意图见图 4。

登录号 Accession JBPZPE000000000

基因组长度 Genome length 5 587 932 bp

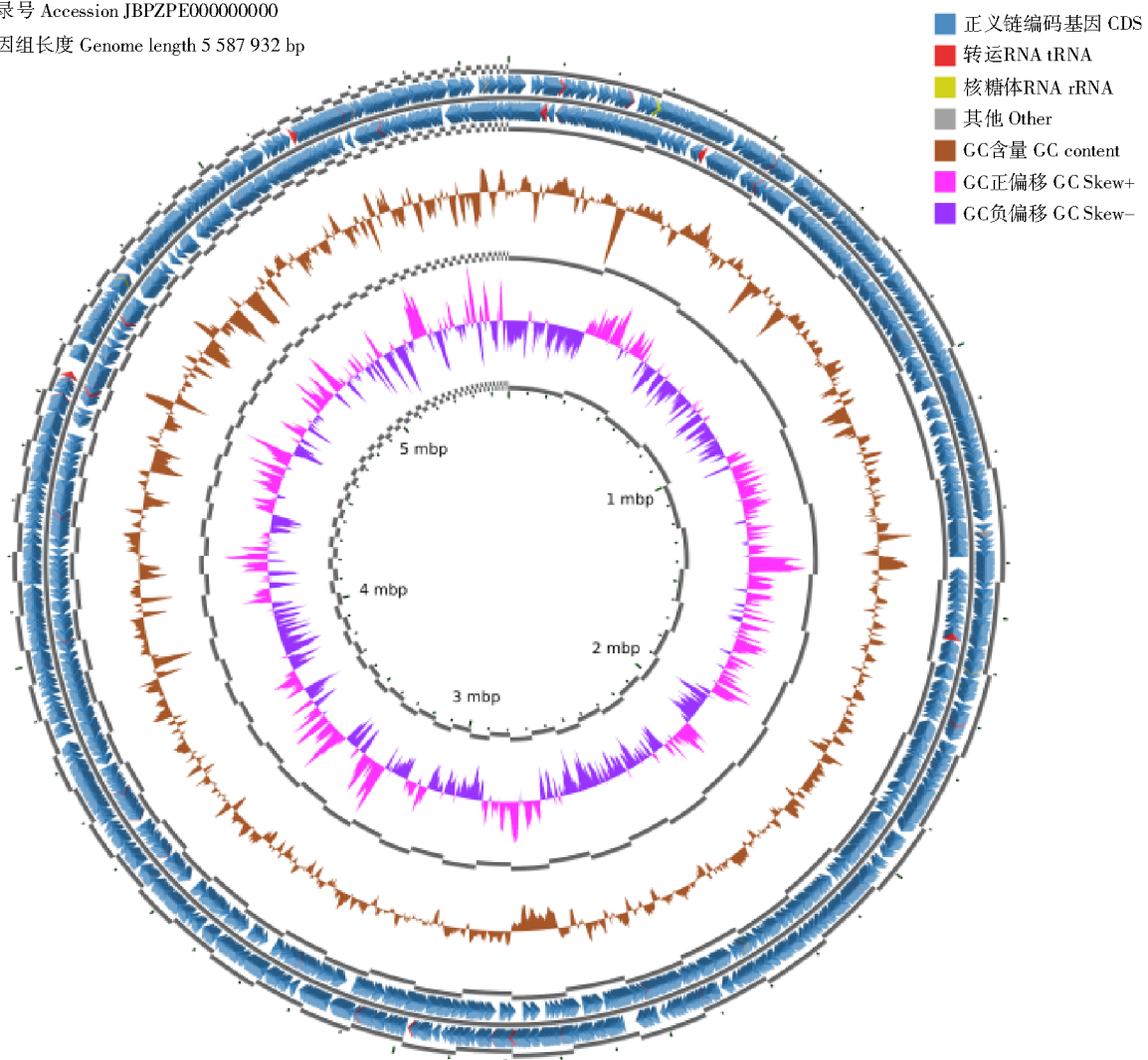


图 4 分离菌株基因组结构

Fig.4 Graphical representation of the genome of the isolated strain

基于分离菌株与参考菌株的全基因组序列,采用邻接法构建系统发育树,结果表明,本研究的分离菌株与标准参考菌株 *E. coli* K-12 聚类于同一分支,在基因组水平具有较高的整体同源性,亲缘关系密切。多数节点的 Bootstrap 支持率高于 70%,显示该系统发育具有良好的统计支持,进一步验证了该菌株为典型的 *E. coli* 成员(图 5)。

与 VFDB 数据库比对,筛选到的毒力基因(基因相似性 90% 以上)共有 28 个,分别与菌毛与黏附素、毒素、免疫逃避、免疫调节、侵袭等相关(表 5)。

黏附相关因子包括 F4(K88) 菌毛基因 *FaeGac*、*faeB*、*faeC*、*faeE*、*faeF*、*faeH*、*faeI*、*faeJ*, YHD 菌毛合成基因簇 *yehA*、*yehB*、*yehC*、*yehD*, 以及其他黏附素基因 *fdeC*、*iha*、*csgA*。该菌株所含毒素包括肠毒素相关基因 *astA*、*eltIAB-4*、*estb-STb1* 及溶血素基因 *hlyA*、*hlyE*。

与 CARD 数据库比对,检测到该菌株耐药基因共有 69 个,与外排泵、 β -内酰胺类、四环素类、氨基糖苷类抗生素及调控因子等相关,其中,与外排泵相关的基因最多(表 6)。

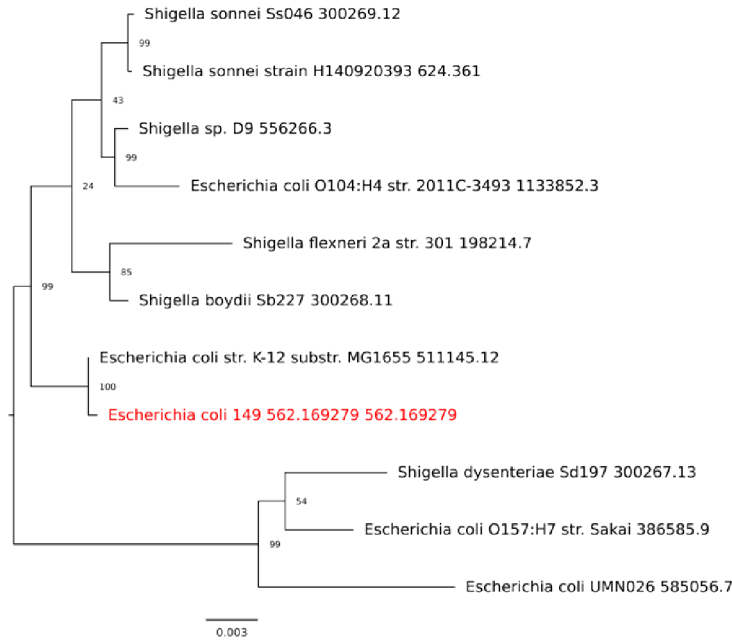


图5 分离菌株基因组进化树

Fig.5 Phylogenomic tree of the isolated strain

表5 分离菌株毒力基因统计结果

Tab.5 Virulence genes of the isolated strain

毒力因子类型 Type of virulence factor	毒力因子 Virulence factor	基因数量 Number of genes	毒力基因 Virulence gene
菌毛与黏附素 Pili and adhesins	F4(K88)菌毛	8	<i>FaeGac ,faeB ,faeC ,faeE ,faeF ,faeH ,faeI ,faeJ</i>
	YHD 菌毛簇	4	<i>yehA ,yehB ,yehC ,yehD</i>
	其他黏附素	3	<i>fdeC ,iha ,csgA</i>
毒素 Toxins	肠毒素	3	<i>astA ,eltIAB-4 ,estb-STb1</i>
	溶血素	2	<i>hlyA ,hlyE</i>
免疫逃避 Immune evasion		2	<i>traT ,nlpI</i>
调控因子 Regulatory factors		1	<i>anr</i>
其他 Others		5	<i>AslA ,capU ,shiA ,terC ,yghJ</i>

表6 分离菌株耐药基因统计结果

Tab.6 Antibiotic resistance genes of the isolated strain

耐药基因类型 Antibiotic resistance category	耐药基因 Antibiotic resistance gene
抗生素激活酶 Antibiotic activation enzyme	<i>KatG</i>
抗生素灭活酶 Antibiotic inactivation enzyme	<i>AAC(3)-II,III,IV,VI,VIII,IX,X,APH(4)-I,BlaEC family</i>
耐药基因簇、盒、操纵子 Antibiotic resistance gene cluster, cassette, and operon	<i>MarA ,MarB ,MarR</i>
抗生素靶标 Antibiotic target in susceptible species	<i>Alr ,Ddl ,dxr ,EF-G ,EF-Tu ,folA ,Dfr ,folP ,gyrA ,gyrB ,inhA ,fabI ,Iso-tRNA ,kasA ,MurA ,rho ,rpoB ,rpoC ,S10p ,S12p</i>
靶标保护蛋白 Antibiotic target protection protein	<i>BcrC</i>
多重耐药外排泵 Efflux pump conferring multi-antibiotic resistance	<i>AcrAB-TolC ,AcrAD-TolC ,AcrEF-TolC ,AcrZ ,CmlA family ,EmrAB-TolC ,EmrD ,EmrKY-TolC ,FloR family ,MacA ,MacB ,MdfA /Cmr ,MdtABC-TolC ,MdtEF-TolC ,MdtL ,MdtM ,QacE ,SugE ,Tet(A) ,TolC /OpmH</i>
耐药性缺失基因 Gene conferring resistance via absence	<i>gidB</i>
改变细胞壁电荷耐药蛋白 Protein altering cell wall charge conferring antibiotic resistance	<i>GdpD ,PgsA</i>
耐药调控因子 Regulator modulating expression of antibiotic resistance genes	<i>AcrAB-TolC ,EmrAB-TolC ,GadE ,H-NS ,OxyR</i>

2.6 致病性分析

攻毒组仔猪在开始攻毒后陆续排出黄色糊状稀便,发生腹泻,均出现连续 3 d 粪便性状评分 ≥ 2 的情况。各组每日腹泻率显示,攻毒组在攻毒开

始后有 2 d 达到 100% 腹泻,而对照组仔猪全程均未发生腹泻。各组腹泻指数显示,攻毒组仔猪腹泻指数为 1.13,显著高于对照组腹泻指数 ($P < 0.05$) (图 6)。

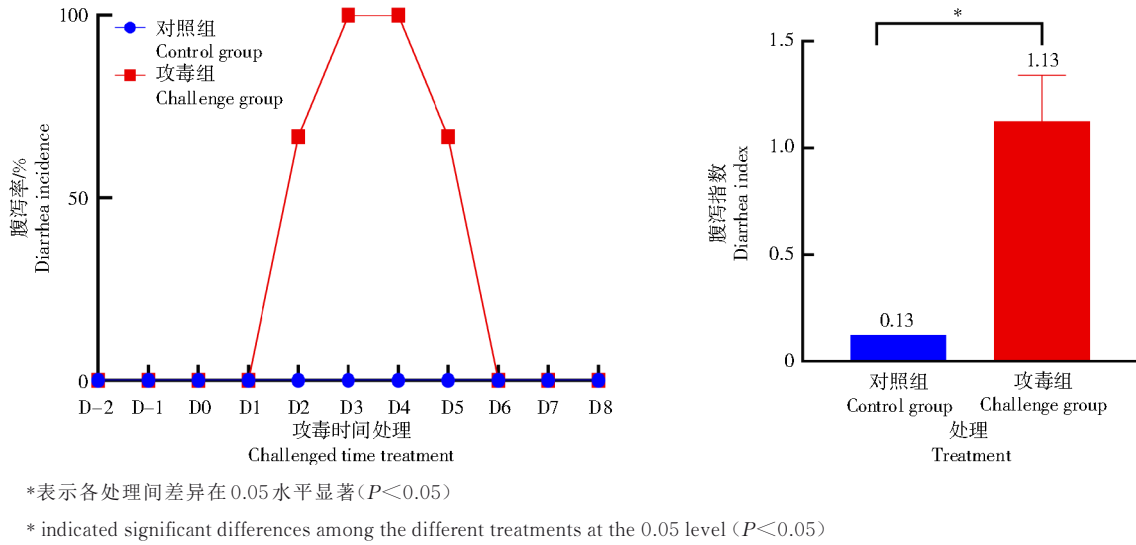
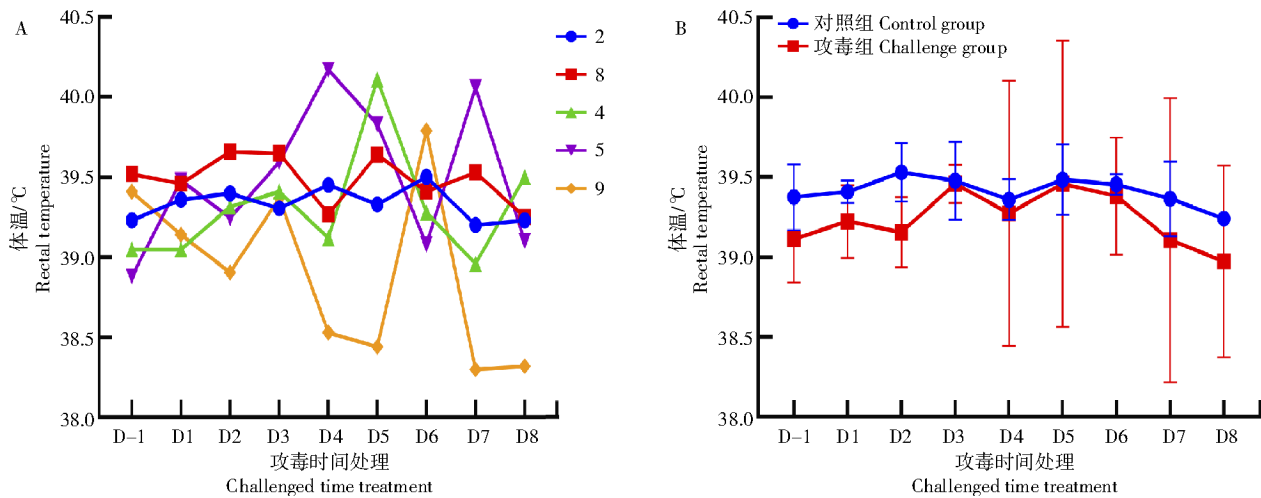


图 6 各组每日腹泻率及腹泻指数

Fig.6 Daily diarrhea incidence and diarrhea index in each group

试验期间,所有仔猪精神状态均较为良好,未见明显异常,评分均为 0 分。对照组仔猪(2、8号)体温波动较为平稳,未见明显异常,而攻毒组仔

猪(4、5、9号)体温在攻毒后波动较大(图 7-A)。但攻毒前后各组仔猪每日平均体温无显著差异(图 7-B)。



A. 各试验猪每日体温; B. 各组每日平均体温

A. Rectal temperature of each pig per day; B. Daily mean rectal temperature of each group

图 7 各组仔猪每日体温变化情况

Fig.7 Daily rectal temperature of piglets in each group

试验期间各组仔猪平均日增质量及平均料肉比如图 8 所示,对照组仔猪平均日增质量略高于

攻毒组,平均料肉比略低于攻毒组,但均无显著差异。

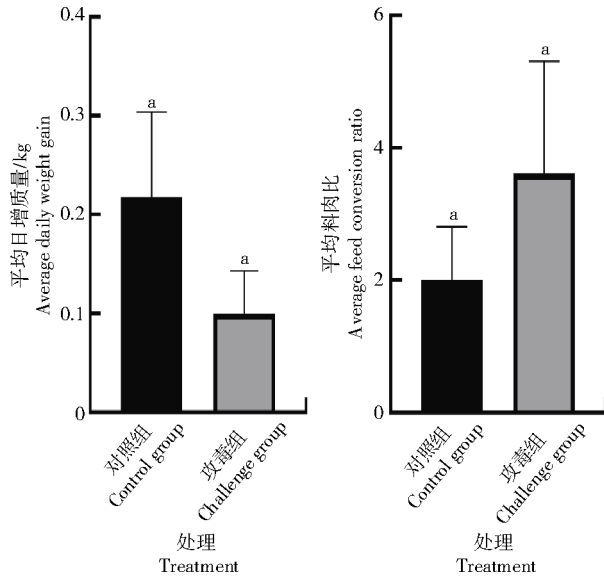


图8 各组仔猪平均日增质量及平均料肉比
Fig.8 Average daily weight gain and average feed conversion ratio of piglets in each group

试验期间,各组仔猪粪便、肛拭子样品中攻毒菌的分离鉴定结果如图9所示,攻毒前各试验组样品中均未检出攻毒菌,攻毒开始后,D1日下午攻毒组即有1头仔猪检出攻毒菌,随后持续6 d 100% 检出攻毒菌,D8日屠宰前检出率下降,只有

1头仔猪检出攻毒菌;对照组全程均未检出攻毒菌。

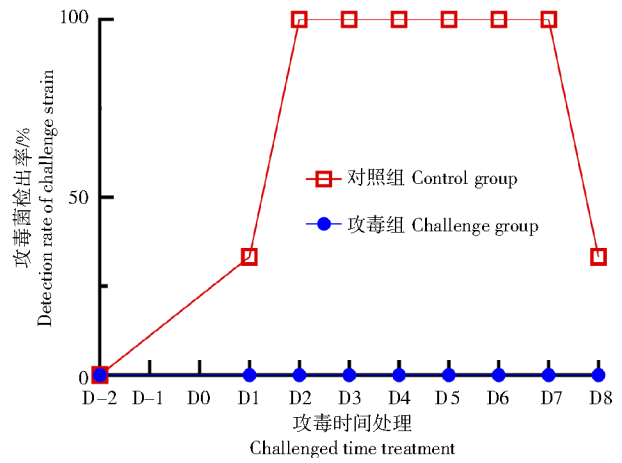


图9 各组仔猪粪便及肛拭子中攻毒菌检出率
Fig.9 Detection rate of challenge strain in feces and rectal swabs of piglets in each group

试验期间,各组仔猪粪常规及潜血检测结果如表7所示,攻毒组仔猪在D4(攻毒结束第1 d)开始出现粪便稀软及白细胞增多,其中,1头仔猪出现红细胞增多,而对照组仔猪各项指标未见明显异常。

表7 粪常规及潜血检测结果

Tab.7 Fecal routine and occult blood test results

时间 (Time)	组别 (Group)	编号 (Number)	颜色 (Color)	性状 (Appearance)	红细胞 (RBC)	白细胞/(个/hpf) (WBC)	潜血 (Occult blood)	上皮细胞/(个/hpf) (Epithelial cells)
D3	对照组	2	黄色	成形	未见	0~1	阴性	未见
		8	黄色	成形	未见	0~1	阴性	未见
	攻毒组	4	黄色	成形	未见	未见	阴性	0~1
		5	黄色	成形	未见	1~3	阴性	0~1
		9	黄色	成形	未见	未见	阴性	0~1
D4	对照组	2	黄色	成形	未见	0~1	阴性	未见
		8	黄色	成形	未见	0~1	阴性	未见
	攻毒组	4	黄色	软	未见	8~10	阴性	未见
		5	黄色	软	未见	0~2	阴性	未见
		9	黄色	软	4~6个/hpf	4~6	阴性	未见

D8屠宰所有试验仔猪,剖检结果可见,对照组仔猪肠道均未见明显异常(图10-A);而攻毒组仔猪均出现肠道肿胀,浆膜充血及鼓气(图10-B、C白色箭头所指),其中,9号仔猪结肠浆膜局部明显出血(图10-D白色箭头所指)。

H & E染色结果显示,对照组仔猪十二指肠、

空肠、回肠各层的结构清晰,肠绒毛结构较为完整,而攻毒组仔猪有部分肠绒毛断裂、脱落,肠道黏膜形态、结构和肠绒毛完整性受到破坏。此外,攻毒组仔猪十二指肠、空肠及回肠的固有层均呈现明显的水肿,回肠出现明显的淋巴细胞浸润(图11)。

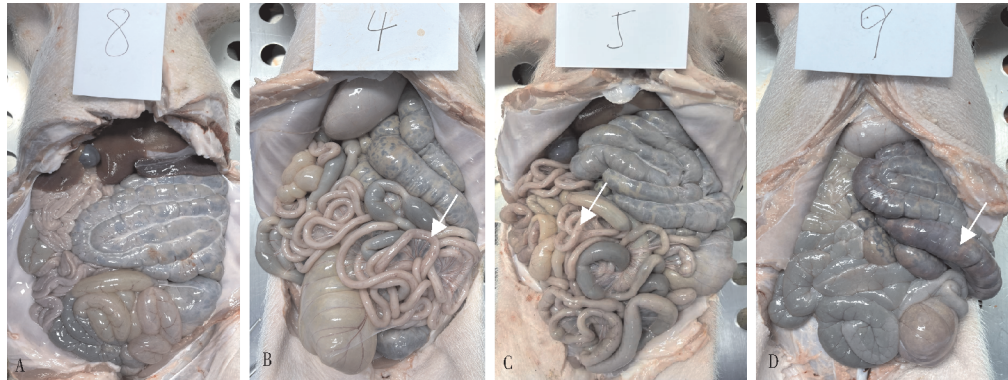
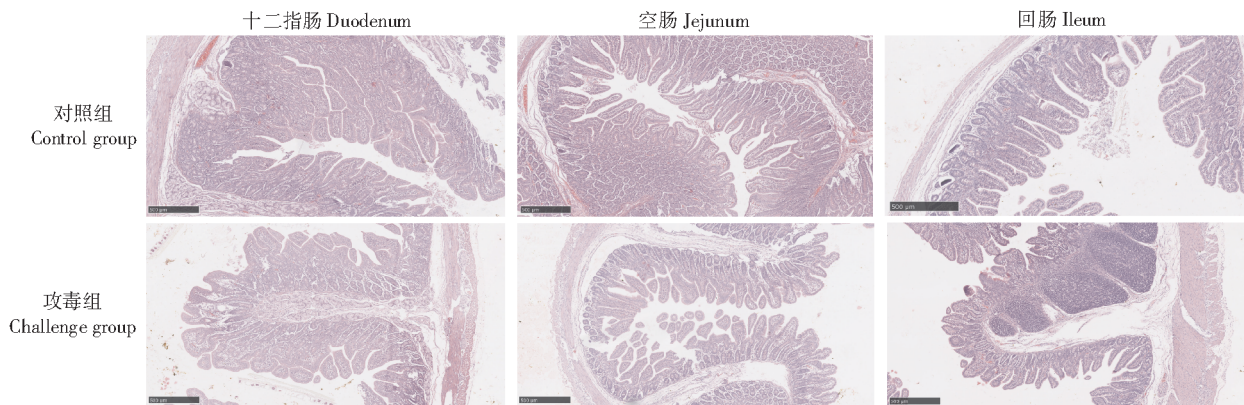


图 10 各组试验仔猪肠道剖检大体病理变化

Fig.10 Gross pathological changes of the intestinal tract of piglets in each group

图 11 各组仔猪小肠石蜡切片 (H & E 染色, 比例尺: 500 μm)Fig.11 Paraffin sections of small intestine of piglets in each group (H & E staining, scale: 500 μm)

3 结论与讨论

ETEC 是导致儿童和幼龄动物腹泻的主要病原体之一,在全球范围内对公共卫生构成重大威胁^[16-17]。本研究对 1 株临床分离的大肠埃希菌进行了系统耐药性与致病性分析。PCR 检测鉴定该菌株携带 F4 菌毛黏附素、STb 和 LT 肠毒素,属于典型的 F4+ETEC 菌株,是引起新生仔猪和断奶仔猪腹泻的主要病原^[18]。全基因组测序显示,该菌株血清型为 O149:H10,该血清型通常与 F4 菌毛基因型关联,其致病性与 O157:H7 相似,与多个国家的仔猪腹泻暴发相关^[4]。该菌株携带多种毒力因子,其中,F4 菌毛黏附素与猪肠上皮细胞上的受体结合,是黏附和定植的关键介质^[19],其受体还与猪的遗传易感性密切相关^[20]。LT、STb 及 EAST-1 肠毒素能通过增强 ETEC 黏附及促进肠道液体分泌来加重腹泻^[21-22]。此外,还检测到溶血素 (*hlyA*、*hlyE*) 以及多种辅助黏附、侵袭及免疫逃避相关基因,这些毒力基因在该菌株的致病机制中发挥着

关键作用,协同促进菌株在宿主小肠定植并诱导腹泻^[23]。

药敏试验结果表明,该菌株对阿莫西林、四环素、多西环素、新霉素、卡那霉素、氟苯尼考及环丙沙星耐药,仅对头孢噻唑及头孢唑林敏感。全基因组测序检测到多个耐药基因,类型丰富,涉及外排泵相关基因、四环素耐药蛋白、氨基糖苷类修饰酶、 β -内酰胺酶等相关基因,这与近年来国内外对猪源 ETEC 的耐药监测结果较为一致^[24-25],提示抗生素的广泛使用甚至滥用可能加剧耐药菌株的传播。近年来相关研究表明,ETEC 对多种常用抗菌药物表现出高水平耐药。如 LI 等^[26]对 2010—2021 年我国东部的病猪分离菌株系统回顾发现,99.12% 的大肠埃希菌均为多重耐药菌,氨苄西林和阿莫西林/克拉维酸耐药率 100%,环丙沙星和四环素耐药率分别高达 96.49% 和 94.74%。此外,21.05% 的分离菌株对黏菌素具有耐药性,并首次检测到 ETEC 同时携带 *mcr-1* 和 *mcr-3* 共 2 种多黏菌素耐药基因^[26]。对

ETEC携带的耐药基因监测结果显示,*mcr*、*tet*(X4)等耐药基因通过质粒水平广泛传播^[27-28]。此外,*bla*_{TEM}、*aadA*、*aac*(3)-II、*qnrS*及*floR*等耐药基因的检出率普遍较高^[26],ETEC的多重耐药趋势问题日益突出,给养殖业健康和公共卫生安全带来了严峻挑战。

临床上,新生仔猪感染ETEC通常出现黄痢,患病猪临床表现为突然发病,排出白色至黄色或是深浅不一的棕色,水样至奶油样的碱性粪便,有时可见粪中出现乳凝块^[29]。10~30日龄的仔猪感染ETEC可出现仔猪白痢,病猪临床表现为精神萎靡,被毛杂乱,食欲衰退,排出黄色、灰色或略带粉色的水样或糊状粪便,持续约7 d^[30]。剖检病猪通常可见胃扩张,充满凝固的乳汁或干燥的饲料,胃底充血且大弯侧有静脉梗死,小肠通常扩张、轻度水肿且充血,肠系膜淋巴结充血肿大,病程较长的猪肠道壁变薄甚至呈现透明状,还有部分病猪表现为心脏、肝脏和肾脏具有明显的出血点和坏死灶^[31]。ETEC感染会影响仔猪发育,使其生产性能与生产指标降低,甚至形成僵猪,严重影响着集约化养猪业的经济效益和健康发展^[32]。

本研究中,仔猪攻毒试验结果进一步验证了该菌株的致病性,ETEC感染最显著且易于检测的临床症状是腹泻^[33],攻毒后,仔猪迅速出现腹泻,排大量黄色糊状稀便,粪便中连续6 d持续检出攻毒菌。剖检和组织病理结果显示肠道充血肿胀、肠绒毛损伤、隐窝加深,这与国内外对菌毛F4+ETEC的相关研究中观察到的临床表现及病理变化结果较为一致,病变主要集中在仔猪肠道。其他指标如体温、精神状态和生长性能与对照组无显著差异,可能与试验菌株毒力、仔猪个体差异性等有关,现有研究也较少将体温纳入仔猪腹泻的监测指标中^[34]。

综上,本研究系统分析了临床分离的F4+O149:H10型产肠毒素性大肠埃希菌的耐药性及致病性。该菌株携带多种毒力基因及耐药基因,对四环素、多西环素、卡那霉素、氟苯尼考、环丙沙星等多种临床常用抗菌药物耐药,仅对头孢类抗菌药物敏感,建议在临床治疗中优先选择头孢类等敏感抗菌药物进行治疗,同时需加强耐药监测,进行综合防控。致病性试验证实了该菌株对断奶仔猪攻毒后会引发仔猪迅速腹泻,肠道损伤。研究结

果揭示的致病性与耐药性特征,可为该菌株引起的传染性疾病的防控提供重要的数据支持,丰富了猪源ETEC的流行规律,对维护公共卫生安全具有重要意义。

参考文献:

- [1] 吕林芬,庞胜美,李保良,等. 仔猪产肠毒素大肠杆菌疫苗的研究进展[J]. 河南农业科学, 2023, 52(5): 1-8.
- [2] LÜ L F, PANG S M, LI B L, et al. Research progress of enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine for piglets[J]. Journal of Henan Agriculture Sciences, 2023, 52(5): 1-8.
- [3] FAIRBROTHER J M, GYLES C L. Disease of Swine[M]. 10th edition. Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell, 2012.
- [4] PENG Z, HU Z Z, LI Z G, et al. Antimicrobial resistance and population genomics of multidrug-resistant *Escherichia coli* in pig farms in mainland China[J]. Nature Communications, 2022, 13: 1116.
- [5] ZHU J J, LIU Z W, WANG S Y, et al. Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial resistance profile of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from pig farms in China[J]. Foods, 2025, 14(7): 1188.
- [6] 邢涛,郁星星,朱爱军,等. 上海临港地区猪源ETEC毒力因子及耐药性调查[J]. 中国动物传染病学报, 2018, 26(1): 55-59.
- [7] XING T, YU X X, ZHU A J, et al. Prevalence of virulence factors and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic *E. coli* from piglets in Lingang district, Shanghai[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2018, 26(1): 55-59.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 34th ed. CLSI M100[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2024: 2.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standard-4th ed. CLSI VET01-A4[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013: 7.
- [10] 沈莉萍,徐锋,王建. 上海地区猪源大肠杆菌血清型及其毒力因子分布调查[J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(8): 94-97.
- [11] SHEN L P, XU F, WANG J. Investigation on serotype and virulence factors of *Escherichia coli* from pigs in Shanghai[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 46(8): 94-97.
- [12] LIU B, ZHENG D D, ZHOU S Y, et al. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50: D912-D917.
- [13] ALCOCK B P, HUYNH W, CHALIL R, et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database Open Access[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51: D690-D699.
- [14] STERNDAL S O, MILLER D W, MANSFIELD J P, et al. Technical note: novel delivery methods for an enterotoxigenic *Escherichia coli* infection model in *MUC4*-locus se-

- quenced weaner pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 2019, 7(11):4503-4508.
- [12] 库朝锋,王献伟,吕玲燕,等.艾草粉对育肥猪生长性能、养分表观消化率、抗氧化功能及粪便微生物数量的影响[J].*河南农业科学*,2025,54(9):141-148.
KU C F, WANG X W, LÜ L Y, et al. Effects of *Artemisia argyi* powder on growth performance, nutrient apparent digestibility, antioxidant function and fecal microbial population in fattening pigs[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2025, 54(9):141-148.
- [13] 肖天石.加米霉素注射液对猪安全性与治疗细菌性SRD临床疗效研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2019.
XIAO T S. Study on safety of gamithromycin injection in pigs and its clinical efficacy against bacterial swine respiratory disease[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.
- [14] PONS A M, GONZÁLEZ B, PUJOLS J, et al. A proposal of a fecal scoring system based on physicochemical analyses of suckling pig feces[J]. *Porcine Health Management*, 2025, 11(1):5.
- [15] 毕澜婷.仔猪致病性大肠杆菌毒力因子多重PCR检测方法的建立及其致病性研究[D].长春:吉林大学,2022.
BI L T. Establishment of multiplex PCR for detection of virulence factors in pathogenic *Escherichia coli* of piglets and study on its pathogenicity[D]. Changchun: Jilin University, 2022.
- [16] XIE W C, SONG L Y, WANG X Y, et al. A bovine lactoferricin-lactoferrampin-encoding *Lactobacillus reuteri* CO21 regulates the intestinal mucosal immunity and enhances the protection of piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 challenge[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1):1956281.
- [17] CROXEN M A, LAW R J, SCHOLZ R, et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, 26(4):822-880.
- [18] VON MENTZER A, SVENNERHOLM A M. Colonization factors of human and animal-specific enterotoxigenic *Escherichia coli*(ETEC)[J]. *Trends in Microbiology*, 2024, 32(5):448-464.
- [19] MOONENS K, VAN DEN BROECK I, DE KERPEL M, et al. Structural and functional insight into the carbohydrate receptor binding of F4 fimbriae-producing enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(13):8409-8419.
- [20] SINHA R, SAHOO N R, SHRIVASTAVA K, et al. Resistance to ETEC F4/F18-mediated piglet diarrhoea: opening the gene black box[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2019, 51(6):1307-1320.
- [21] DUAN Q D, PANG S M, FENG L L, et al. Heat-labile enterotoxin enhances F4-producing enterotoxigenic *E. coli* adhesion to porcine intestinal epithelial cells by upregulating bacterial adhesins and STb enterotoxin[J]. *Veterinary Research*, 2022, 53(1):88.
- [22] ZAJACOVA Z S, KONSTANTINOVA L, ALEXA P. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in *AstA* positive strains[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 154:369-375.
- [23] 吴文文,丁雪燕,洪天旗,等.猪源产肠毒素性大肠杆菌主要毒力因子研究进展[J].*中国兽医学报*,2019,39(7):1403-1409.
WU W W, DING X Y, HONG T Q, et al. Research progress on the main virulence factors of enterotoxin-producing *Escherichia coli* from pigs[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2019, 39(7):1403-1409.
- [24] FU Y Z, NAWROCKI E M, M I N M, et al. Host species shapes genotype, antimicrobial resistance, and virulence profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) from livestock in the United States[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024, 90(8):e00724-e00749.
- [25] HU J M, LI J L, HUANG X B, et al. Genomic traits of multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from diarrheic pigs[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14:1244026.
- [26] LI J X, CHANG J, MA J G, et al. Genome-based assessment of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* recovered from diseased swine in Eastern China for a 12-year period[J]. *mBio*, 2025, 16(5):e0065125.
- [27] ZHANG S Q, WEN J F, WANG Y W, et al. Dissemination and prevalence of plasmid-mediated high-level tetracycline resistance gene *tet(X4)*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13:9697691.
- [28] SHAO L, WU C B, LI C J, et al. Genomic characterization revealing the high rate of *tet(X4)*-positive *Escherichia coli* in animals associated with successful genetic elements[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15:1423352.
- [29] 李先富.仔猪黄痢的预防与治疗[J].*国外畜牧学(猪与禽)*, 2024, 44(5):37-39.
LI X F. Prevention and treatment of yellow dysentery in piglets[J]. *Animal Science Abroad (Pigs and Poultry)*, 2024, 44(5):37-39.
- [30] 乔静.仔猪大肠杆菌病的临床症状及防治措施[J].*猪业科学*,2025,42(3):72-74.
QIAO J. Clinical symptoms and preventive measures of colibacillosis in piglets[J]. *Swine Industry Science*, 2025, 42(3):72-74.
- [31] LUPPI A, D'ANNUNZIO G, TORREGGIANI C, et al. Diagnostic approach to enteric disorders in pigs[J]. *Animals (Basel)*, 2023, 13(3):338.
- [32] XU J J, ANDRANI M, KJÆRUP R B, et al. In-feed provision of binding proteins sustains piglet gut health and mitigates ETEC-induced post-weaning diarrhea[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2025, 16(1):78.
- [33] SUN Y W, DUARTE M E, KIM S W. Dietary inclusion of multispecies probiotics to reduce the severity of post-weaning diarrhea caused by *Escherichia coli* F18+ in pigs[J]. *Animal Nutrition*, 2021, 7(2):326-333.
- [34] ZHANG Z Q, ZHANG H, LIU T H. Study on body temperature detection of pig based on infrared technology: a review[J]. *Artificial Intelligence in Agriculture*, 2019, 1:14-26.