

研究报告

狐、貉源大肠杆菌分离鉴定及毒力基因检测

李倩倩¹, 靳元元¹, 赵强¹, 李峰¹, 尉发正¹, 任洪林¹, 胡盼^{*1}, 王晓旭^{*2}

1 吉林大学动物医学学院 人兽共患病研究所教育部重点实验室, 吉林 长春 130062

2 中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 130112

李倩倩, 靳元元, 赵强, 李峰, 尉发正, 任洪林, 胡盼, 王晓旭. 狐、貉源大肠杆菌分离鉴定及毒力基因检测[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1048-1056

Li Qianqian, Jin Yuanyuan, Zhao Qiang, Li Feng, Yu Fazheng, Ren Honglin, Hu Pan, Wang Xiaoxu. Isolation, identification, and virulence gene detection of *Escherichia coli* from fox and raccoon dog[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1048-1056

摘要:【背景】狐、貉肺炎频发导致养殖户遭受巨大经济损失。【目的】调查黑龙江省、吉林省、河北省、山东省等地狐、貉肺炎原因, 对病原菌进行分离、鉴定及部分生物学特性研究。【方法】无菌采集患病狐、貉肺组织进行细菌分离培养; 对分离菌进行革兰氏染色、生化试验、特异性基因 PCR 鉴定、药物纸片扩散法敏感性试验、毒力基因检测及小鼠致病性试验。【结果】分离的 136 株菌的革兰氏染色均为阴性杆菌, 生化特性及特异性基因 PCR 均鉴定为大肠杆菌; 分离株具有多重耐药性且有 29 种毒力基因组合方式, 其主要流行毒力基因有 8 种: *yjiP*、*fimC*、*fimH*、*fyuA*、*iutA*、*papC*、*irp2*、*astA*; 小鼠致病性结果显示, 分离菌株含主要流行毒力基因越多对小鼠致病性越强。【结论】明确了引发狐、貉肺炎的病原菌为大肠杆菌, 其携带毒力基因数量与致病力相关。

关键词: 狐、貉肺炎; 大肠杆菌; 耐药性; 毒力基因; 致病性

Isolation, identification, and virulence gene detection of *Escherichia coli* from fox and raccoon dog

LI Qianqian¹, JIN Yuanyuan¹, ZHAO Qiang¹, LI Feng¹, YU Fazheng¹, REN Honglin¹, HU Pan^{*1}, WANG Xiaoxu^{*2}

1 Key Laboratory of Zoonosis Research, Ministry of Education, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

2 Institute of Special Animal and Plant Sciences of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, Jilin, China

Abstract: [Background] Frequent occurrence of pneumonia in foxes and raccoon dogs has resulted in

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2021XK23)

Supported by: Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (Y2021XK23)

*Corresponding authors: E-mail: HU Pan: hupan84@163.com; WANG Xiaoxu: wangxiaoxusdd@126.com

Received: 2021-09-14; Accepted: 2021-10-15; Published online: 2021-12-06

huge economic losses for farmers. **[Objective]** In order to investigate the causes of pneumonia attacking foxes and raccoon dogs in Heilongjiang, Jilin, Hebei, and Shandong provinces, we isolated, identified, and characterized the pathogenic bacteria. **[Methods]** The bacteria were isolated aseptically from the lung tissues of diseased foxes and raccoon dogs. Gram staining, biochemical test, PCR identification of specific genes, susceptibility test by disk diffusion method, virulence gene detection, and mouse pathogenicity test were then conducted for the isolates. **[Results]** All the 136 isolates were Gram-negative bacilli and were identified as *Escherichia coli* based on biochemical characteristics and specific gene PCR. The isolates had multiple drug resistance and 29 virulence gene combinations. The main virulence genes were *yijP*, *fimC*, *fimH*, *fyuA*, *iutA*, *papC*, *irp2*, and *astA*. The isolates carrying more virulence genes had stronger pathogenicity to mice. **[Conclusion]** *E. coli* was identified as the pathogen causing pneumonia of foxes and raccoon dogs, and the number of virulence genes was related to the pathogenicity.

Keywords: fox and raccoon dog pneumonia; *Escherichia coli*; drug resistance; virulence gene; pathogenicity

我国作为世界上最大的裘皮服装消费国与出口国,年消费裘皮服装 600 万–800 万件,约占世界消费总量的 70%^[1]。狐、貉作为我国饲养规模较大的毛皮动物,养殖密度逐年攀升,但养殖户的饲养管理水平未见提高,导致细菌性肺炎成为危害毛皮动物养殖业发展的主要传染病之一。大肠杆菌作为病原菌之一,在导致特产经济动物狐、貉、貂肺炎方面发挥了不可轻视的作用^[2-7],常引发狐、貉急性肺炎。临床症状表现为咳嗽、流鼻涕等,轻者影响生长发育,重者出现死亡。通过听诊和叩诊可在胸部听到捻发音,病程很快,往往呈急性经过,剖检的尸体营养状态良好,嘴有分泌物,胸腔内器官有泡沫样粘液,肺充血、出血,切面呈暗红色、有血液流出,肺小叶间有散在的肉变区^[8]。因有众多病原菌与大肠杆菌导致的肺炎临床症状相似,如肺炎双球菌^[9]、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌^[10]、肺炎克雷伯菌^[11-12],所以养殖场在动物发病时很难辨别致病菌,以至无法选择出最佳敏感药物。仅凭临床经验用药不但贻误病情,还使病原菌产生了多重耐药性,导致大量狐、貉因病情危重死亡。目前有关致狐、

貉肺炎型大肠杆菌方面的研究有限,而且存在流行基数及背景不清的问题,因此,对引发毛皮动物肺炎的大肠杆菌进行大范围调查研究并总结其流行规律是亟待解决的问题。病原菌的致病能力对疾病的发生、发展起着决定作用,而致病能力往往与其所携带的毒力基因密切相关,将大肠杆菌的毒力基因作为研究重点是探究致狐、貉肺炎大肠杆菌流行特点的关键。

1 材料与方法

1.1 样本

2019–2020 年采自黑龙江省的肇州、肇源、牡丹江和河北省的荒佃庄、肃宁、石家庄、秦皇岛及山东省的淄博、海洋、烟台等地共 62 个规模化狐貉养殖场患肺炎的狐狸、貉子共 316 份。其中狐狸样品 78 份、貉子样品 238 份。

小鼠购自辽宁长生生物技术有限公司。小鼠品系为封闭群小鼠(SPF),品种为 KM 鼠,日龄为 5 周龄,体重为(18±2) g。

1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)、麦康凯琼脂培养基(MacC)、药敏片、

微量生化管、DL2000 DNA Marker, 青岛海博生物公司; 2×M5 Hiper Plus *Taq* HiFi PCR Mix, 北京聚合美生物科技有限公司; 革兰染色液, 北京奥博星生物技术有限责任公司; PCR 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

光学显微镜, 上海万恒精密仪器有限公司; PCR 仪, 赛默飞世尔科技有限公司; 核酸电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶图像分析系统, UVP 公司。

1.3 细菌分离培养及形态观察

无菌取肺部病料在 TSA 平板上涂板, 37 °C 培养 18–24 h 后, 挑取单菌落于 TSA 平板及麦康凯平板划线。37 °C 培养 18–24 h, 观察菌落形态, 并挑取典型单个菌落进行革兰氏染色镜检。

1.4 生化试验

取纯培养 18–24 h 后的分离株单菌落分别接种至靛基质、MR、VP、西蒙氏枸橼酸盐共

4 种微量生化管中, 37 °C 培养 24 h, 记录结果。

1.5 大肠杆菌特异性基因 *phoA* 的 PCR 鉴定

根据文献中大肠杆菌特异性基因 *phoA* 引物序列^[13]合成引物。上游引物 F: 5'-CGATTCTGGAAATGGCAAAA-3'; 下游引物 R: 5'-CGTGATCAGCGGTGA-3'。预期扩增产物大小为 720 bp 左右。PCR 反应体系(20 μL): 混合酶 10 μL, 引物 F、R (10 μmol/L)各 1 μL, 菌液模板 2 μL, ddH₂O 6 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 20 s, 58 °C 20 s, 72 °C 45 s, 共 35 次循环; 72 °C 5 min。取 10 μL PCR 扩增产物以 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.6 大肠杆菌分离株毒力基因检测

根据参考文献[2,14-15]中报道的大肠杆菌的 14 个毒力基因合成 14 对引物, 如表 1 所示。将纯培养的分离菌菌液作为模板进行 PCR。PCR 反应体系(20 μL): 混合酶 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 模板 2 μL, ddH₂O

表 1 毒力基因引物信息

Table 1 Information of virulence gene primer sequence

毒力基因 Virulence gene	上游引物 Upstream primer (5'→3')	下游引物 Downstream primer (5'→3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	扩增长度 Amplification length (bp)	文献 References
<i>tsh</i>	GTCTGTCAGACGTCTGTGTTTC	ATAGGATGACAGGCTACCGAC	55	598	[2]
<i>yijP</i>	TGGCTTGATTCTGCATCCGAT	CATCGTCTGCTGGTTGGTGAT	55	517	[2]
<i>ibeA</i>	GTATGACGGTGGAACAAGAG	TGGCAATAGCAGCGGCAGTC	55	321	[2]
<i>fimC</i>	GCCGATGGTGTAAGGATGG	GGGTAAGTGCGCCATAATCA	58	475	[2]
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	58	508	[14]
<i>afa</i>	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC	CCCCTAACGCGCCAGCATCTC	60	594	[15]
<i>iutA</i>	ATCGGCTGGACATCATGGGAAC	CGCATTTACCGTCGGGAACGG	60	314	[15]
<i>papC</i>	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTT	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	60	203	[15]
<i>astA</i>	TGCCATCAACACAGTATATCCG	ACGGCTTTGTAGTCCTTCCAT	57	102	[15]
<i>escV</i>	ATTCTGGCTCTCTTCTTTATGGCTG	CGTCCCCTTTTACAAACTTCATCGC	63	544	[15]
<i>eeA</i>	TAACGGCTATTTCCGCATGA	TCCCAGACGATACGATCCAG	58	552	[15]
<i>ler</i>	CGCACACAACAAGCCCATAC	GATGAGTTCCGGCGAGCAA	58	195	[15]
<i>irp2</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	58	280	[15]
<i>fyuA</i>	ATGATTAAACCCGCGACGGGAA	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	52	787	[15]

6 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 52–63 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 30 次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min。取 10 μL 扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.7 药敏试验

以大肠杆菌 ATCC 2592 为质控菌株。用移液器吸取各纯培养的分离株菌液 100 μL , 涂布于 TSA 平板。将 16 种药敏片分别粘贴于平板上, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18–24 h, 测量抑菌圈。

1.8 小鼠致病性试验

根据大肠杆菌毒力基因检测结果, 将毒力基因组合不同的菌株分别进行小鼠致病性试验。挑取单菌落于 TSB 培养基中培养 10 h 后平板计数, 并将菌落含量调整至 1×10^9 CFU, 以 200 μL 的剂量采取腹腔注射的方法各攻毒 6 只小鼠, 观察小鼠 10 d 内存活情况。随后将菌落含量调整至 1×10^8 CFU, 以同样剂量及方法各攻毒 6 只小鼠, 观察小鼠 10 d 内存活情况。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的形态

大肠杆菌在 TSA 培养基上呈乳白色圆形, 中央凸起, 如图 1A 所示。在麦康凯培养基上呈玫红色圆形, 中央凸起, 如图 1B 所示。革兰氏染色为杆状阴性菌, 如图 1C 所示。

2.2 生化试验结果

大肠杆菌西蒙氏枸橼酸盐试验阴性, 靛基质试验阴性, VP 试验阴性, MR 试验为阳性, 表明所分离的大肠杆菌为非典型性大肠埃希氏菌。

2.3 大肠杆菌特异性基因 *phoA* 的 PCR 部分鉴定结果

分离菌株经大肠杆菌 *phoA* 特异性基因 PCR 鉴定, 电泳条带均为 720 bp, 确认为大肠杆菌, 部分鉴定结果如图 2 所示。

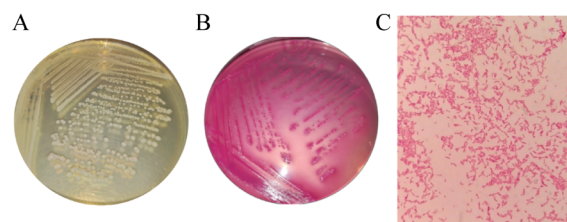


图 1 分离菌菌落形态及染色结果 A: 胰蛋白胨大豆琼脂平板; B: 麦康凯培养基平板; C: 革兰染色

Figure 1 Colony morphology and staining results of isolated bacteria. A: TSA plate; B: MacC plate; C: Gram stain.

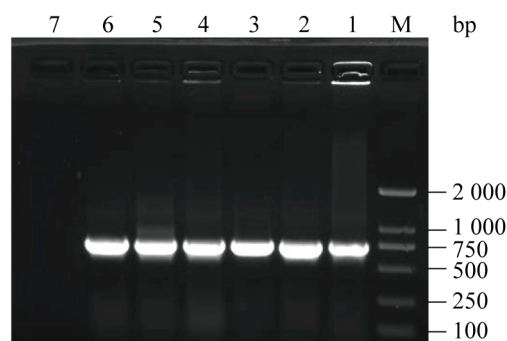


图 2 部分分离株特异性基因 PCR 产物电泳结果 M: DL2000 DNA Marker; 1–6: 为大肠杆菌分离株 *phoA* 引物扩增结果; 7: 阴性对照

Figure 2 Results of electrophoresis of specific genes PCR products of some isolates. M: DL2000 DNA Marker; 1–6: The results of *phoA* primer amplification of *E. coli* isolates; 7: Negative control.

2.4 大肠杆菌毒力基因鉴定结果

对 14 个致病性大肠杆菌毒力基因进行检测, 分离的 136 株大肠杆菌毒力基因组合形式和各类型菌株数量及所占比例见表 2。根据各毒力基因在 136 株菌中的出现频率, 分析可知各毒力基因的流行率(图 3)。

2.5 药敏试验结果

对 136 株分离菌进行耐药表型鉴定的结果显示, 大肠杆菌分离株对 16 种药物不同程度耐药, 详细结果见表 3。

表 2 大肠杆菌毒力基因组合

Table 2 *Escherichia coli* virulence gene combination

毒力基因组合	菌株数量	百分比
Virulence gene combination	Number of strains	Percentage (%)
<i>yijP, fimC, fimH, fyuA, iutA, papC, irp2, astA</i>	5	3.68
<i>Yijp, fimC, fimH, fyuA, iutA, irp2, astA, tsh</i>	5	3.68
<i>yijP, fimC, fyuA, iutA, papC, irp2, astA</i>	1	0.74
<i>YijP, fimC, fimH, fyuA, iutA, papC, irp2</i>	11	8.09
<i>yijP, fimC, fimH, fyuA, papC, irp2, ibeA</i>	12	8.82
<i>yijP, fimC, fimH, fyuA, iutA, astA, tsh</i>	1	0.74
<i>yijP, fimC, fimH, fyuA, papC, irp2, astA</i>	1	0.74
<i>yijP, fimC, fimH, fyuA, iutA, papC, tsh</i>	1	0.74
<i>yijP, fimC, fyuA, iutA, papC, irp2</i>	7	5.15
<i>yijP, fimC, fimH, fyuA, iutA, papC</i>	19	13.97
<i>yijP, fimC, fimH, fyuA, iutA, tsh</i>	3	2.21
<i>yijP, fimC, fimH, fyuA, iutA, astA</i>	2	1.47
<i>yijP, fimC, fimH, iutA, astA, tsh</i>	1	0.74
<i>yijP, fimC, fimH, fyuA, irp2, astA</i>	4	2.94
<i>yijP, fimC, fyuA, papC, irp2, astA</i>	1	0.74
<i>yijP, fyuA, iutA, papC, irp2</i>	2	1.47
<i>yijP, fimC, fimH, fyuA, iutA</i>	11	8.09
<i>yijP, fimC, fyuA, iutA, papC</i>	6	4.41
<i>yijP, fimC, fyuA, iutA, ibeA</i>	2	1.47
<i>yijP, fyuA, iutA, ibeA, afa</i>	1	0.74
<i>yijP, fimC, fimH, iutA, papC</i>	8	5.88
<i>yijP, fimC, fimH, fyuA, papC</i>	1	0.74
<i>yijP, fimC, fimH, fyuA</i>	16	11.76
<i>yijP, fimC, fimH, astA</i>	1	0.74
<i>yijP, fimC, fimH, iutA</i>	1	0.74
<i>yijP, fimC, fimH, ibeA</i>	2	1.47
<i>yijP, fimC, fimH</i>	9	6.62
<i>yijP, fimC, iutA</i>	1	0.74
<i>yijP, fimC, fyuA</i>	1	0.74

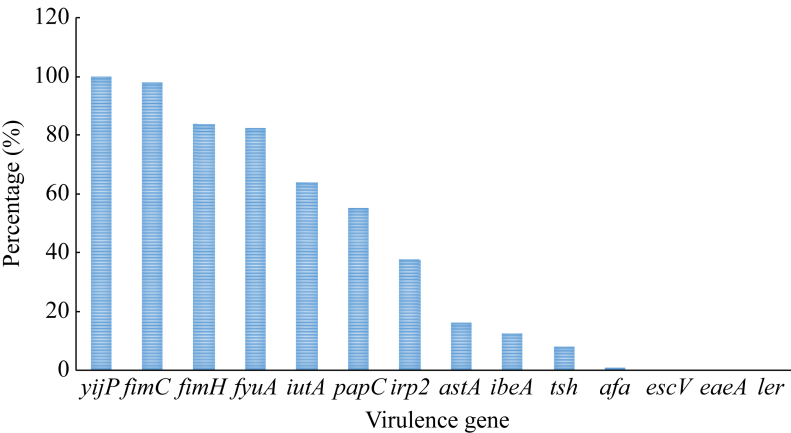


图 3 大肠杆菌单个毒力基因流行率

Figure 3 Prevalence of a single virulence gene in *Escherichia coli*.

表 3 大肠杆菌分离菌株药敏试验结果

Table 3 Results of drug sensitivity test of *Escherichia coli* isolated strains

药敏片 Drug sensitive tablets	耐药菌株数 Number of resistance strains (%)	中介菌株数 Number of intermediary strains (%)	敏感菌株数 Number of sensitive strains (%)
丁胺卡那 Amikana	36 (26.47)	9 (6.62)	91 (66.91)
多西环素 Doxycycline	136 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
多粘菌素 B Polymyxin B	14 (10.29)	54 (39.71)	68 (50.00)
氟苯尼考 Florfenicol	60 (44.12)	14 (10.29)	62 (45.59)
复方新诺明 Compound trimethoprim	113 (83.09)	9 (6.62)	14 (10.29)
卡那霉素 Kanamycin	99 (72.79)	23 (16.91)	14 (10.29)
链霉素 Streptomycin	108 (79.41)	9 (6.62)	19 (13.97)
氯霉素 Chloramphenicol	99 (72.79)	9 (6.62)	28 (20.59)
美洛西林 Mezlocillin	126 (92.65)	0 (0.00)	10 (7.35)
萘啶酸 Nalidixic acid	113 (83.09)	0 (0.00)	23 (16.91)
诺氟沙星 Norfloxacin	108 (79.41)	9 (6.62)	19 (13.97)
庆大霉素 Gentamicin	99 (72.79)	9 (6.62)	28 (20.59)
头孢曲松 Ceftriaxone	68 (50.00)	14 (10.29)	54 (39.71)
新霉素 Neomycin	86 (63.24)	36 (26.47)	14 (10.29)
左氧氟沙星 Levofloxacin	99 (72.79)	0 (0.00)	37 (27.21)
妥布霉素 Tobramycin	104 (76.47)	32 (23.53)	0 (0.00)

注: 括号外数字是菌株数, 括号内数值是耐药率

Note: The number outside the brackets is the number of strains, and the number inside the brackets is the resistance rate.

2.6 小鼠致病性试验结果

以菌含量为 1×10^9 CFU 和 1×10^8 CFU 攻毒小鼠, 小鼠存活数量及时间试验结果见表 4。

3 讨论与结论

本研究通过对 2019–2020 年间采集自 62 个规模化狐貉养殖场患肺炎的 316 份狐狸和貉子样品进行病原菌分离鉴定, 共分离出 136 株大肠杆菌, 分离率为 43.04%, 表明大肠杆菌是引发狐、貉肺炎的主要病原菌。

大肠杆菌为一种携带黏附素铁获取系统、毒素和保护蛋白等毒力因子(virulence factor, VF)^[16]的条件致病性病原菌。编码这些 VF 的基因通常存在于致病岛中^[17], 包括黏附素 *papC* 和铁载体 *fyuA*、*iutA* 及与 ColV/BM 质粒相关的

毒力基因 *tsh* 等^[18]。病原体在宿主中生存和传播的先决条件是避免补体攻击, 肠外致病性大肠杆菌已经进化出应对策略^[19]。大肠杆菌毒力基因有促进细菌定殖、宿主组织损伤^[20]、生物膜形成和免疫逃逸的作用^[21], 其作用之一就是抵抗补体介导的杀伤和吞噬^[22]。此外, 不同的毒力基因也具备独特的功能。其中大肠杆菌 *fim* 基因的表达能够促进细菌定殖、侵袭和生物膜的形成, 对细菌的毒力至关重要^[20]。毒力基因 *fimC*、*fimH* 位点的产物是 1 型菌毛生物合成所必需的^[23]。*irp2-fyuA* 基因簇已被证实是参与高致病性毒力岛(high pathogenicity island, HPI)合成的主要基因^[24]。大肠杆菌 K1 基因 *ompA*、*ibeA* 和 *yijP* 参与侵袭脑微血管内皮细胞^[25]。

表 4 大肠杆菌的小鼠致病性试验结果

Table 4 Results of pathogenicity test of *Escherichia coli* in mice

毒力基因数量(组合类型) Number of virulence genes (combination type)	攻毒剂量 dose (CFU)	小鼠死亡数 Number of dead mice	死亡时间 Time to death (h)
8 (2)	1×10^8	6	20
	1×10^9	6	16
7 (6)	1×10^8	0	—
	1×10^9	6	16
6 (7)	1×10^8	0	—
	1×10^9	6	16
5 (7)	1×10^8	0	—
	1×10^9	6	16
4 (4)	1×10^8	—	—
	1×10^9	0	—
3 (3)	1×10^8	—	—
	1×10^9	0	—

注：—：试验观察期结束，小鼠未死亡

Note: —: The mouse has not died until the end of the experimental observation period.

为了能够在宿主体内定殖和存活，用高度适应的大肠杆菌克隆获得了一系列 VF，但是具有最成功 VF 组合的大肠杆菌才能持续成为致病性病原体类型，导致被感染的机体产生严重的疾病^[20]。因此，本研究对毒力基因进行检测并根据其结果总结大肠杆菌分离株的毒力基因流行情况：136 株大肠杆菌共有 29 种毒力基因组合方式；14 个毒力基因 *yijP*、*fimC*、*fimH*、*fyuA*、*iutA*、*papC*、*irp2*、*astA*、*ibeA*、*tsh*、*afa*、*escV*、*eaeA*、*ler* 的检出率分别为 100%、97.79%、83.82%、82.35%、63.97%、55.15%、37.5%、16.18%、12.50%、8.09%、0.74%、0、0、0，与马帅等检测来自黑龙江省、山东省不同养殖场的共 15 株引发狐、貉肺炎的大肠杆菌 *ibeA*、*tsh* 毒力基因的 100% 高检出率不同^[2]，造成此差异的原因可能与其样品来源分散和总量过少有关。与朱利霞等对河北地区狐肺炎大肠杆菌

的 4 个毒力基因 *fyuA*、*irp2*、*eaeA*、*ler* 的检出率 56.8%、50.6%、23.5%、9.9% 相比^[6]，本研究未检出 *eaeA* 和 *ler* 这 2 个毒力基因，推断其为河北地区狐肺炎大肠杆菌所特有，引发狐肺炎的大肠杆菌具有地域差异性。与芮萍等所检测引发狐貉貂流产的大肠杆菌毒力基因结果相比，发现其 *ler*、*irp2*、*iutA*、*fyuA*、*astA* 和 *papC* 基因的检出率分别为 100%、75.0%、50.0%、50.0%、50.0% 和 50.0%^[15]。*ler* 基因检出率的极大差异表明，*ler* 毒力基因可能是区别致毛皮动物流产型大肠杆菌和致毛皮动物肺炎型大肠杆菌的关键。

分别将 29 种毒力基因组合的菌株以 1×10^9 CFU 的菌含量对小鼠进行致病性试验，毒力基因组合数量为 8、7、6、5 的菌株可导致小鼠在 16 h 内死亡，毒力基因组合数量为 4、3 的菌株攻毒小鼠 1 周后仍存活；进一步减小攻菌含量，以 1×10^8 CFU 的菌含量攻毒小鼠后，仅含 8 个毒力基因的 2 种毒力基因组合类型的菌株使小鼠在攻毒后 20 h 内死亡，其余 27 种毒力基因组合的菌株攻毒小鼠 1 周后仍存活。可见基因流行率居前 8 名的毒力基因组合类型对小鼠致病性最强。此外，分析药敏试验结果发现，分离菌对丁胺卡那的敏感率为 66.91%，多粘菌素 B 敏感率为 50%，其余药物敏感率均低于 50%。可见，只有极少的抗生素仍然对结合多种灵活毒力机制的肠外致病性大肠杆菌有效^[26]。此类强致病性的大肠杆菌毒力基因组合菌株类型可为黑龙江、吉林、河北、山东四省的狐貉养殖场中由大肠杆菌引发的肺炎病例提供病情评定参考，一旦发现引发狐、貉肺炎的病原菌为大肠杆菌且携带此种毒力基因组合，应尽快采取措施对患病动物进行隔离，对场地进行全面消毒、杀菌，防止更多动物受到病原菌的感染。

综上所述, 本研究对分离的 136 株大肠杆菌进行了耐药表型、毒力基因及致病性分析, 结合临床发病情况, 发现引发狐貉肺炎的大肠杆菌具有多重耐药性及多毒力基因组合, 致病性增强, 治疗难度增大, 亟须探索一种有效的广谱抗生素治疗方法。此外, 针对多毒力基因不同血清型的多价大肠杆菌疫苗可能是预防此类疾病负担的一种有前途的替代方法。

REFERENCES

- [1] 李伟, 李鑫, 刘洁, 任二军, 刘进军, 杨福合. 河北省毛皮动物产业现状与发展对策[J]. 北方牧业, 2021(5): 11-12
Li W, Li X, Liu J, Ren EJ, Liu JJ, Yang FH. Present situation and development countermeasures of fur animal industry in Hebei province[J]. BeiFang MuYe, 2021(5): 11-12 (in Chinese)
- [2] 马帅, 于莹, 王聪, 胡博, 王少辉, 白雪. 狐、貉肠外致病性大肠杆菌的分离鉴定及致病性、耐药性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(1): 90-95, 164
Ma S, Yu Y, Wang C, Hu B, Wang SH, Bai X. Identification, pathogenicity and drug resistance of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from fox and raccoon dog[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021(1): 90-95, 164 (in Chinese)
- [3] 郭家媚, 葛成, 张文斌, 吴同奎, 张志强, 贾青辉, 张召兴, 张艳英. 水貂源致病性大肠杆菌对喹诺酮类药物耐药表型与耐药基因型检测与分析[J]. 野生动物学报, 2021, 42(1): 166-170
Guo JM, Ge C, Zhang WB, Wu TL, Zhang ZQ, Jia QH, Zhang SX, Zhang YY. Detection and analysis on drug-resistant phenotypes and genotypes of quinolones of pathogenic *Escherichia coli* from mink[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2021, 42(1): 166-170 (in Chinese)
- [4] 张庆明, 王向阳, 周大卫. 三例不同病原水貂肺炎病例分析[J]. 北方牧业, 2020(24): 28, 27
Zhang QM, Wang XY, Zhou DW. Analysis of three cases of mink pneumonia with different pathogens[J]. BeiFang MuYe, 2020(24): 28, 27 (in Chinese)
- [5] 朱利霞, 王洪彬, 杨楠, 高光平. 中草药水提物对貉肺炎大肠杆菌体外抑菌作用的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(11): 176-178
Zhu LX, Wang HB, Yang N, Gao GP. Study on the bacteriostatic effect of aqueous extract of Chinese herbal medicine on *Escherichia coli* of raccoon dog pneumonia *in vitro*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018(11): 176-178 (in Chinese)
- [6] 朱利霞, 王洪彬, 赵希艳, 王双月, 史秋梅, 高光平. 狐肺炎大肠杆菌毒力基因和耐药基因检测及药物敏感性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(2): 138-144
Zhu LX, Wang HB, Zhao XY, Wang SY, Shi QM, Gao GP. Detection of virulence and resistance gene and drug sensitivity analysis of *Escherichia coli* in fur-bearing animal[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 41(2): 138-144 (in Chinese)
- [7] 李巧玲, 张召兴, 张文举, 张志强, 吴同奎, 史秋梅, 贾青辉, 李佩国. 致狐狸肺炎大肠杆菌血清鉴定与毒力基因检测[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(3): 432-437, 444
Li QL, Zhang ZX, Zhang WJ, Zhang ZQ, Wu TL, Shi QM, Jia QH, Li PG. Identification and detection of the serotypes, virulence genes of the pathogenic *Escherichia coli* from foxes[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2019, 39(3): 432-437, 444 (in Chinese)
- [8] 刘德庆. 狐、貉、貂肺炎的防治[J]. 中国畜禽种业, 2014, 10(6): 105
Liu DQ. Prevention and treatment of pneumonia in foxes, raccoon dogs and minks[J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding, 2014, 10(6): 105 (in Chinese)
- [9] 王春富. 一起貉肺炎双球菌感染病例[J]. 北方牧业, 2016(12): 31
Wang CF. A case of pneumococcal infection in raccoon dogs[J]. BeiFang MuYe, 2016(12): 31 (in Chinese)
- [10] 朱利霞, 王洪彬, 赵希艳, 高光平, 高桂生, 史秋梅. 水貂铜绿假单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 动物医学进展, 2020, 41(9): 128-132
Zhu LX, Wang HB, Zhao XY, Gao GP, Gao GS, Shi QM. Isolation, identification and drug susceptibility test of *Pseudomonas aeruginosa* in mink[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 41(9): 128-132 (in Chinese)
- [11] 张传美, 谢士杰, 孙晓琦, 郭玉广, 王丽红, 单虎, 杨海燕. 貂源肺炎克雷伯菌耐药性、毒力及免疫原性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(1): 29-34
Zhang CM, Xie SJ, Sun XQ, Guo YG, Wang LH, Shan H, Yang HY. Drug sensitivity test, virulence and

- immunogenicity of *Klebsiella pneumoniae* isolates from minks[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2021, 43(1): 29-34 (in Chinese)
- [12] 邓玄威, 赵越. 狐肺炎克雷伯氏菌病的诊断与防治讨论[J]. 养殖技术顾问, 2012(1): 75
- Deng XW, Zhao Y. Discussion on diagnosis and prevention of fox pneumonia *Klebsiella* disease[J]. Technical Advisor for Animal Husbandry, 2012(1): 75 (in Chinese)
- [13] 李迎晓, 焦凤超, 张李敏, 杨露露, 李洵, 刘锦妮, 吴海港, 黄立, 赵聘. 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
- Li YX, Jiao FC, Zhang LM, Yang LL, Li X, Liu JN, Wu HG, Huang L, Zhao P. Isolation of duck-derived pathogenic *Escherichia coli* and test of virulence genes[J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2020, 52(3): 73-77 (in Chinese)
- [14] 王绍红, 柴荣, 李政志, 张艳芳, 刘伟石, 薛原, 孙颖. 狐源大肠杆菌毒力基因的检测[J]. 野生动物学报, 2018, 39(4): 933-937
- Wang SH, Chai R, Li ZZ, Zhang YF, Liu WS, Xue Y, Sun Y. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from fox[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2018, 39(4): 933-937 (in Chinese)
- [15] 芮萍, 马增军, 杨彩然, 逯春香, 刘曜综, 蔺红海. 狐貉貂源致病性大肠杆菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医科学, 2015, 45(5): 517-521
- Rui P, Ma ZJ, Yang CR, Lu CX, Liu YZ, Lin HH. Isolation and identification of pathogenic *Escherichia coli* from fox, racoon dog and mink[J]. Chinese Veterinary Science, 2015, 45(5): 517-521 (in Chinese)
- [16] Rashki A. Cervico-vaginopathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties[J]. Microbial Pathogenesis, 2014, 75: 29-34
- [17] Monroy-Pérez E, Cerón AB, García Cortés LR, Alonso NN, Domínguez-Trejo P, Hernández-Jaimes T, Bustos-Martínez J, Hamdan-Partida A, Rojas Jiménez EA, Vaca S, et al. Virulence gene transcription, phylogroups, and antibiotic resistance of cervico-vaginal pathogenic *E. coli* in Mexico[J]. PLoS One, 2020, 15(6): e0234730
- [18] Whitfield C, Roberts IS. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 1999, 31(5): 1307-1319
- [19] Abreu AG, Barbosa AS. How *Escherichia coli* circumvent complement-mediated killing[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 452
- [20] Floyd KA, Moore JL, Eberly AR, Good JAD, Shaffer CL, Zaver H, Almqvist F, Skaar EP, Caprioli RM, Hadjifrangiskou M. Adhesive fiber stratification in uropathogenic *Escherichia coli* biofilms unveils oxygen-mediated control of type 1 pili[J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(3): e1004697
- [21] Song Y, Wu KY, Wu WJ, Duan ZY, Gao YF, Zhang LD, Chong T, Garstka MA, Zhou WD, Li K. Epithelial C5aR1 signaling enhances uropathogenic *Escherichia coli* adhesion to human renal tubular epithelial cells[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 949
- [22] Cyويا PS, Rodrigues GR, Nishio EK, Medeiros LP, Koga VL, Pereira APD, Vespero EC, Houle S, Dozois CM, Nakazato G, et al. Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil[J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2015, 9(10): 1068-1075
- [23] Klemm P. FimC, a chaperone-like periplasmic protein of *Escherichia coli* involved in biogenesis of type 1 fimbriae[J]. Research in Microbiology, 1992, 143(9): 831-838
- [24] Tu J, Xue T, Qi KZ, Shao Y, Huang BY, Wang XY, Zhou XH. The *irp2* and *fyuA* genes in high pathogenicity islands are involved in the pathogenesis of infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)[J]. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2016, 19(1): 21-29
- [25] Huang SH, Stins MF, Kim KS. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis[J]. Microbes and Infection, 2000, 2(10): 1237-1244
- [26] Naili I, Vinot J, Baudner BC, Bernalier-Donadille A, Pizza M, Desvaux M, Jubelin G, D'Oro U, Buonsanti C. Mixed mucosal-parenteral immunizations with the broadly conserved pathogenic *Escherichia coli* antigen SsIE induce a robust mucosal and systemic immunity without affecting the murine intestinal microbiota[J]. Vaccine, 2019, 37(2): 314-324