

西藏牦牛源肠出血性大肠杆菌毒力基因检测与进化分析

赵燕娟 王刚 索朗斯珠*

(西藏农牧学院 动物科学学院, 西藏 林芝 860000)

摘要 为调查西藏地区牦牛源肠出血性大肠杆菌的流行情况,利用 PCR 检测和生物进化分析方法,对西藏林芝、拉萨不同地、市 149 株牦牛源大肠杆菌的肠出血性大肠杆菌相关毒力基因进行了研究。结果表明:牦牛源肠出血性大肠杆菌 6 对毒力基因中,只检出 *ehxA* 基因,检出率为 9.40%;对检测到的 14 株牦牛源肠出血性大肠杆菌进行克隆测序,经系统发育分析发现牦牛源肠出血性大肠杆菌菌株内同源性达到 99.9% 左右,与 GenBank 中所录其他菌株的同源性达到 99%。因此,西藏牦牛源肠出血性大肠杆菌基因确实存在,其毒力基因主要为 *ehxA* 基因;西藏林芝、阿里、日喀则、昌都均有分布,拉萨、山南和那曲地区未检出,应引起重视。西藏地区要根据各地实际情况需要加强监测肠出血性大肠杆菌引起的腹泻,建立流行毒株预警机制并合理用药。

关键词 牦牛; 肠出血性大肠杆菌; 毒力基因; 进化分析

中图分类号 S855.1+2

文章编号 1007-4333(2019)02-0107-08

文献标志码 A

Virulence gene detection and phylogenetic analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from yak in Tibet

ZHAO Yanjuan, WANG Gang, Suolangsizhu

(Department of Animal Science, XiZang Agricultural and Animal Husbandry College, Linzhi 860000, China)

Abstract In order to investigate the epidemic situation of intestinal haemorrhagic *Escherichia coli* from Yak in Tibet area, the virulence genes of 149 of enterohemorrhagic *E. coli* strains from yak in Linzhi and Lhasa were studied by using PCR detection and phylogenetic analysis. The results showed: The *ehxA* gene was detected among the 6 pairs enterohemorrhagic *E. coli* virulence genes originated in yak and the detection rate was 9.40%. Fourteen strains were then cloned and sequenced by phylogenetic analysis. It was found that enterohemorrhagic *E. coli* strains were of 99.9% homology, and were 99.0% homology to other strains recorded in GenBank. These results indicated that the Tibetan exist enterohemorrhagic *E. coli* gene in yak, the main virulence gene was *ehxA* gene. Linzhi, Ali, Shigatse and Changdu in Tibet were the distribution areas. The enterohemorrhagic *E. coli* gene was not detected in Lhasa, Shannan and Nagqu. This study indicated that the survey for diarrhea caused by EHEC should be strengthened according to the actual situation. Early pandemic strain warning mechanism should then be established and the drug should be used rationally.

Keywords yak; enterohemorrhagic *Escherichia coli*; virulence gene; phylogenetic analysis

肠出血性大肠杆菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) 是重要的食源性致病菌,人和动物都可成为其传染源。肠出血性大肠杆菌不仅能引起严重的胃肠道疾病^[1],感染严重时还可致

命。肠出血性大肠杆菌病自 1982 年于美国首次发现以来,先后在英国、加拿大、瑞典等国家暴发和流行。我国首次于 1986 年在江苏省发现该病,随后蔓延到中部和东部地区^[2]。肠出血大肠杆菌菌株的毒

收稿日期: 2018-03-28

基金项目: 国家肉牛牦牛产业体系项目(CARS-37);西藏自治区科技厅 2015 基础应用计划项目(20150048);西藏农牧学院学科建设资助

第一作者: 赵燕娟, 硕士研究生, E-mail: 1591360469@qq.com

通讯作者: 索朗斯珠, 教授, 主要从事高原动物疫病防控研究, E-mail: xzslsz@163.com

力特点有以下几点:一方面是可产生毒力较强的志贺毒素(Vero毒素);另一方面是产生亲和素从而粘附到宿主细胞上,此外还可产生溶血素^[3-5]。肠出血性大肠杆菌菌株毒力特点是由多因子决定的,如:志贺毒素由 *Stx1* 基因和 *Stx2* 基因编码^[5]; *eaeA* 基因编码的外膜蛋白能产生亲和素; *ehxA* 基因编码的溶血素等同样也是重要的毒力因素^[6]。因此,通过PCR技术对样品进行毒力相关基因的检测不仅能作为该病特征性鉴定的一种手段,还可以对由这些基因编码导致的潜在致病性作出预测。

大肠杆菌 O157:H7 是目前最常见的肠出血性大肠杆菌代表菌株^[7]。该菌株除引起腹泻、出血性肠炎外,还可导致严重的溶血性尿毒症^[2]。此外,还有 O5、O26、O91、O111 和 O113 等血清型,这些血清型菌株对公众健康造成的危害也不容忽视^[3]。目前我国部分地区已经加强了对 EHEC O157:H7 的监测,但是其他血清型病原菌的分离鉴定及其流行病学调查方面的研究还没有完整系统展开^[8]。

已有研究表明 EHEC 主要的自然宿主是反刍动物,因此牛被认为是人感染 EHEC 的主要来源^[9]。尽管很多国家都有关于 EHEC 在牛群中流行的报道^[10-11],然而在牦牛上还未见报道,本研究前期已做了有关西藏地区牦牛大肠杆菌毒力基因的检测^[12],本试验拟通过从西藏 7 个不同地区采集的牦牛腹泻粪便以及肠粘膜中分离肠出血性大肠杆菌菌株,后对这些分离菌株进行肠出血性大肠杆菌的相关毒力基因检测、分型和致病性试验等鉴定,旨在了解在西藏地区牦牛源肠出血性大肠杆菌的毒力和毒力基因分型情况,以期研究西藏牦牛肠出血性大肠杆菌病的致病机理和防控技术提供依据。

1 材料与方法

1.1 细菌分布及分离培养

本试验牦牛源大肠杆菌菌株分别分离自西藏拉萨、林芝、阿里、那曲、日喀则、山南、昌都等 7 市地区散养牦牛的腹泻粪便和病死牦牛的肠粘膜。细菌的分离培养方法见参考文献^[13-14]。

1.2 生化试验

取本试验分离鉴定后的纯培养物分别进行糖发

酵试验、M-R、V-P、柠檬酸盐利用试验、硝酸盐还原试验等常规生化试验,并观察反应结果。

1.3 血清型试验

将本试验纯培养物分别接种于普通琼脂斜面培养基中,24 h 后用 0.5% 石碳酸生理盐水清洗,随后于高压灭菌锅中高压 2 h 制成抗原。按中国兽药品监察所提供的血清型鉴定说明书,先后进行平板凝集反应、试管凝集反应,最后鉴定出血清型。

1.4 试剂

Taq DNA 聚合酶、PCR 试剂、核酸染料 Gel View、克隆载体 PMD18-T 购自 TaKaRa 公司;感受态细胞 Trans5 α 由 TaKaRa 公司制作并保存;胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒由美国 OMEGA Biotek 公司生产;麦康凯培养基、琼脂糖、LB 培养基均由北京陆桥公司生产。

1.5 仪器

高速离心机 centrifuge5804 由德国 Eppendorf 生产;PCR 仪 my cycleTM、电泳仪、凝胶成像系统均由美国 Bio-Rad 生产;移液器由德国 Eppendorf 生产;核酸蛋白测定仪由美国赛默飞世尔 Thermo 公司生产。

1.6 引物设计

从 GenBank 中检索已登录的肠出血性大肠杆菌毒力基因序列(*Stx1*、*Stx2*、*eae*、*ehxA*、*saa*、*o157*)及 16S rRNA 基因序列(*P*)信息,用 DNA Star 软件找出保守序列,然后采用 Primer 5 设计引物^[15-16](表 1),由上海生物工程有限公司合成。

1.7 PCR 检测

反应体系及反应条件参照参考文献^[17],反应结束后,取 6 μ L PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8 扩增产物的克隆测序

将扩增的目的片段进行纯化,纯化后在核酸蛋白测定仪上测定浓度,取胶回收纯化的 DNA 4.5 μ L, PMD18-T 载体 0.5 μ L, Solution 5.0 μ L,加水到 10.0 μ L 的体系进行,按照试剂盒说明将连接片段转化到感受态细胞中,转化后挑取单个菌落接种在保存用平板上,并对单菌落做 PCR 检测。验证正确的即为阳性克隆,挑取验证正确的单菌落接种于 LB 细菌瓶中过夜培养,吸取足量阳性的克隆菌液送金斯瑞生物公司进行测序^[12]。

表 1 肠出血性大肠杆菌毒力基因及 16S rRNA 基因序列 PCR 扩增及测序所用引物
Table 1 Primers used for the EHEC gene and 16S rRNA gene PCR amplification and sequencing

基因 Gene	引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度/°C Annealing temperature	产物大小/bp Product length
Stx1	stx1-F	ATGGCTCAGATTGAACGC	60	614
	stx1-R	CAGGTTCCCCTACGGTTA		
Stx2	stx2-F	ACACTGGATGATCTCAGTGG	62	255
	stx2-R	CTGAATCCCCCTCCATTATG		
eae	eae-F	GGCACTGTCGAAACTGCTCC	66	890
	eae-R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
ehxA	ehxA-F	GTGGCGAATACTGGCGAGACT	60	534
	ehxA-R	CCCCATTCTTTTTCACCGTCG		
saa	saa-F	GCATCATCAAGCGTACGTCC	60	1 688
	saa-R	ATTGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		
o157	o157-F	CCTCACATCTTCTGCAAATACC	60	259
	o157-R	GTTGTCGTTTCATATTTTACCATCCAATGGACATG		
P	P1	ATGGCTCAGATTGAACGC	52	1 500
	P2	CAGGTTCCCCTACGGTTA		

2 结果与分析

2.1 细菌的地理位置分布与培养结果

本试验分离菌株在麦康凯培养基上生长形态为中等大小、表面光滑、边缘整齐红色菌落，在伊红美蓝培养基上生长为深紫黑色、光滑、湿润、带有金

属光泽的圆形菌落，染色镜检结果为革兰氏阴性、短杆状、两端略圆^[12]。经细菌分离培养、生化鉴定获得西藏牦牛源大肠杆菌 149 株，其中，西藏阿里地区 13 株、西藏那曲地区 12 株、西藏日喀则地区 13 株、西藏山南地区 20 株、西藏拉萨地区 18 株、西藏林芝地区 77 株、西藏昌都地区 1 株(图 1)。

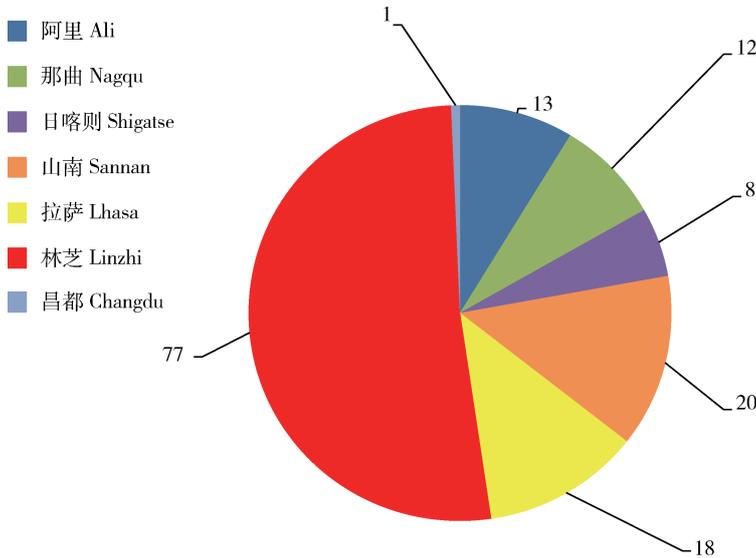


图 1 149 株大肠杆菌的地理位置分布及菌株数

Fig. 1 Geographical location distribution of the 149 strains of Escherichia coli

2.2 生化鉴定结果

149 株分离菌经 15 项生化试验，结果见表 2，

由表可知本试验分离菌株的生化特性基本保持一致。

表2 生化试验结果

Table 2 Results of biochemical test

生化特性 Biochemistry property	结果 Result
葡萄糖 Glucose	⊕
乳糖 Lactose	+
麦芽糖 Maltose	⊕
甘露醇 Manna	⊕
蔗糖 Sucrose	+
甲基红试验 M-R	+
二乙酰试验 V-P	-
吲哚 Indole	+
硫化氢 H ₂ S	-
肌醇 Inositol	-
山梨醇 Sorbitose	⊕
柠檬酸盐 Citrate	-
硝酸盐 Nitrate	+
尿素酶 Urease	-
明胶 Gelatin	-

注: ⊕表示发酵糖既产酸又产气; + 表示发酵糖产酸但不产气或阳性反应; - 表示阴性反应。

Notes: ⊕, fermented carbohydrate produce both gas and acid; +, producing acid not gas or positive reaction; -, negative reaction.

2.3 血清学试验结果

被检测的 149 株大肠杆菌中 O98、O8、O178、O104、O26 等 13 种血清型均有检出, 其中 O78、O148、O98、O8、O115 和 O178 检出率最高, 分别占定型菌株的 31.54%、7.38%、2.68%、2.01%、8.05%、2.68%, 共占定型菌株的 54.34%, 可见优势血清型为 O78、O148、O98、O8、O115 和 O178 (表 3)。

2.4 肠出血性大肠杆菌的毒力分型鉴定

对 149 株牦牛源大肠杆菌进行 6 对毒力基因检测, 只有 14 株检出 *ehxA* 基因, 检出的毒力基因菌株的分布情况为林芝市 2 株、日喀则市 3 株、昌都市 1 株、阿里地区 8 株; 拉萨市、山南市和那曲地区未检出, 检出率为 9.40%, 部分基因检测结果见图 2。

2.5 16S rRNA 基因克隆的鉴定

PCR 产物连接、转化后获得阳性重组质粒, 经相应的酶切, 切出的各基因片段大小与目的基因片段和线性 pMD18-T 载体大小相符, 部分菌株的 16S rRNA 基因序列阳性结果见图 3。

表3 血清型鉴定结果

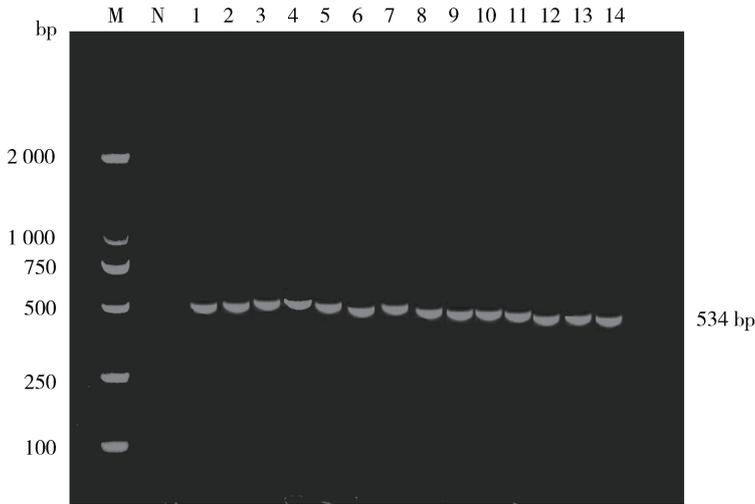
Table 3 Results of serotype identification

菌株来源 Origin	菌株数 No. of Strains	O98	O8	O178	O104	O26	O137	O142	O115	O117	O158	O148	O86	O78
阿里 Ali	13	2	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
那曲 Nagqu	12	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	4	1	4
日喀则 Shigatse	8	1	1	2	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
山南 Sannan	20	0	0	0	0	3	2	2	0	3	2	4	0	2
拉萨 Lhasa	18	0	0	0	0	2	2	2	4	1	2	1	0	4
林芝 Linzhi	77	1	0	0	0	10	7	0	8	6	10	0	0	35
昌都 Changdu	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.6 肠出血性大肠杆菌 16S rRNA 基因序列的同源性分析

对 14 株牦牛源大肠杆菌分离株的 16S rRNA 基因片段进行克隆测序分析, 发现 PCR 扩增片段长度约为 1 500 bp, 与 GenBank 中登录的 16S rRNA 基因序列大小一致。本次分离的牦牛源大肠杆菌

16S rRNA 核苷酸组内同源性为 99%~100%, 与 GenBank 中人源、牛源、禽源、猪源、羊源的部分菌株序列的同源性为 99%~100%。采用邻接法设置 bootstrap 值 1 000 进行构建进化树^[12], 所有菌株形成 2 个主要分支, 本次分离的其中 13 株西藏牦牛源大肠杆菌与人源、牛源、猪源、禽源大肠杆菌形成一

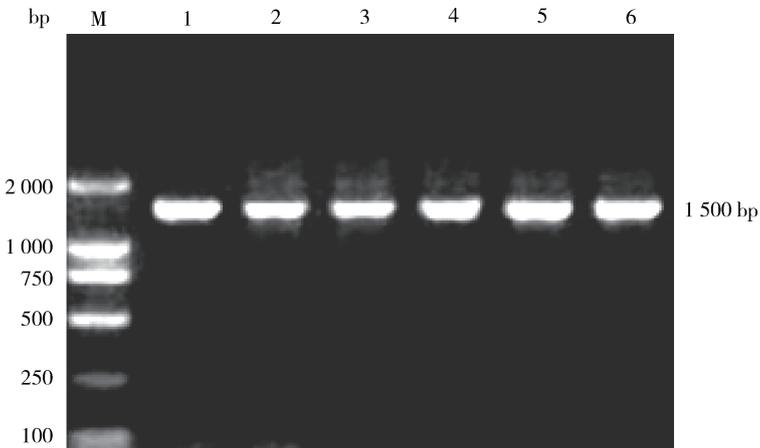


M, DNA 标记 DL 2 000; 1~14 *ehxA* 基因; N, 阴性对照

M, DNA Marker DL 2 000; 1~14 *ehxA* gene; N, negative control

图 2 *ehxA* 基因电泳图

Fig. 2 Electrophoresis map for PCR products of *ehxA* gene



M, DNA 标记 DL 2 000; 1~6 16S *rRNA* 重组质粒基因

M, DNA Marker DL 2 000; 1~6 16S *rRNA* recombinant plasmid gene

图 3 16S *rRNA* 基因重组质粒鉴定的电泳图

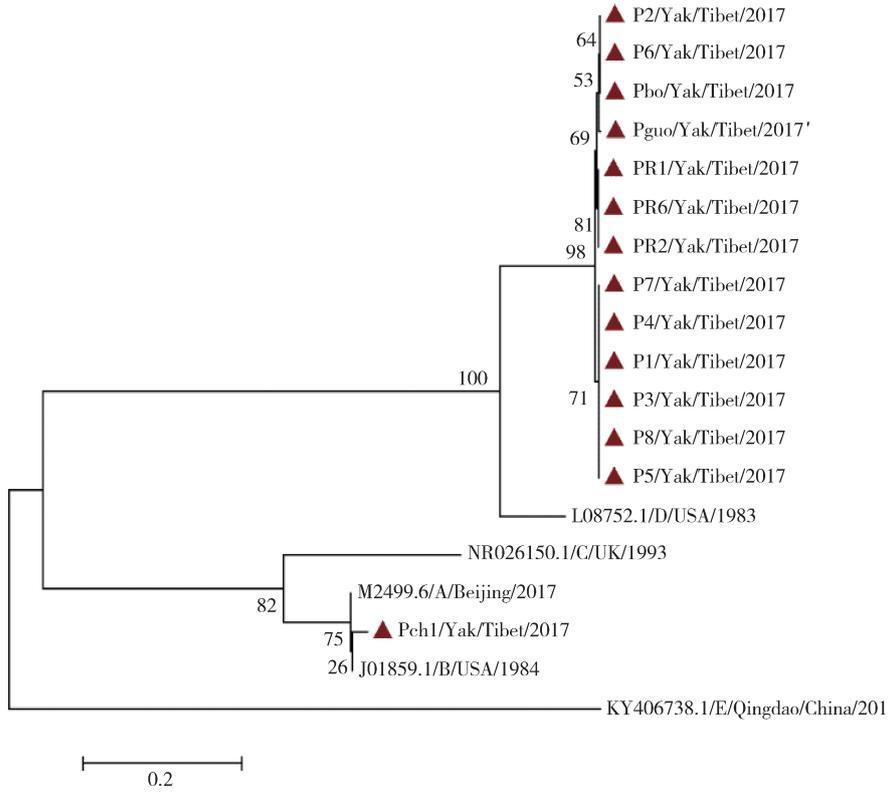
Fig. 3 Electrophoresis map for PCR products of 16S *rRNA* gene

个大的分支;Pch1 单独聚为 1 个分支而且可以看出其与 GenBank 登录的 J01859.1 和 M2499.6 同源性最近。系统发育树图片见图 4。

2.7 肠出血性大肠杆菌毒力基因的同源性分析

通过系统发育分析发现牦牛源肠出血性大肠杆菌菌株内同源性达到 99.9% 左右,与 GenBank 中所录其他菌株的同源性达到 99%。采用邻接法设置 bootstrap 值 1 000 进行构建进化树^[12,18-19],并与

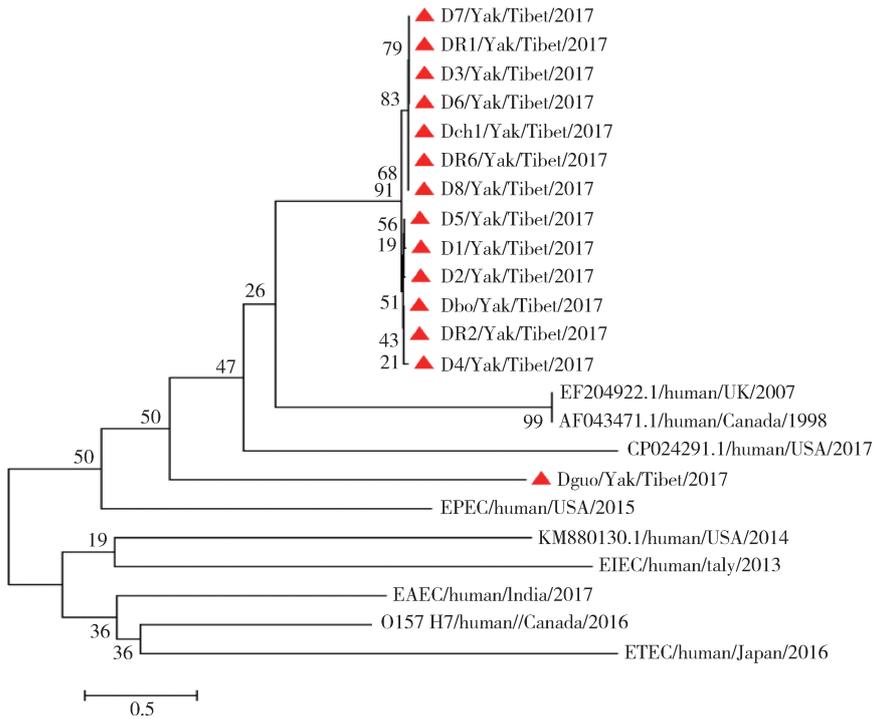
GenBank 已登录的 EHEC 基因序列做了同源性比对并进行了系统发育分析,所有菌株形成 2 个主要分支,本次分离的 149 株西藏牦牛源大肠杆菌属于 *ehxA* 类型的达到 14 株,与现有的 2 893 个 ST 序列相比,其中 D1、D2、D4、D5、Dbo、Dch1、DR6 与 GenBank 登录的 EF204922 和 AF043471 同源性最近,Dguo、D3、D6、DR1、DR2 与 GenBank 登录的 CP024291 和 km880130.1 同源性最近。系统发育树见图 5。



标尺表示遗传距离,标尺上的 0.2 指每个位点有 0.2 个氨基酸替换。
The scale indicates genetic distance. Number 0.2 represents 0.2 aa substitutions per site.

图 4 16S rRNA 基因序列进化树图状

Fig. 4 Phylogenetic tree graph of 16S rRNA gene sequence



标尺表示遗传距离,标尺上的 0.5 指每个位点有 0.5 个氨基酸替换。
The scale indicates genetic distance. Number 0.5 represents 0.5 aa substitutions per site.

图 5 EHEC Gene 基因序列进化树图状

Fig. 5 Phylogenetic tree graph of EHEC gene sequence

3 讨论与结论

从西藏7个不同地市分离到的149株菌株,根据它们的分离培养特性、染色镜检特征及生化反应特点显示都符合大肠埃希氏菌的基本特征,再结合16S *rRNA* 基因序列鉴定及系统发育分析结果,也能说明149株菌株符合大肠埃希氏菌的特征,故可判断其为大肠杆菌。

大肠杆菌有很多血清型,目前国内外已发现的血清型主要是O1、O2、O8、O35、O78、O86等^[20-23]。本试验所分离菌株中O98、O8、O178、O104等13种血清型均被检出,其中O78、O148、O98、O8、O115和O178检出率最高,分别占定型菌株的31.54%、7.38%、2.68%、2.01%、8.05%、2.68%,共占定型菌株的54.34%,可见优势血清型为O78、O148、O98、O8、O115和O178;O104、O142、O117、O86和O137、O158、O26均有检出。从中不难看出西藏不同地区其优势血清型存在差异,这与其他报道一致^[22]。

利用6对肠出血性大肠杆菌毒力基因引物进行PCR检测,检出*ehxA*基因,共检出1株含有*ehxA*基因的大肠杆菌,其在西藏的分布情况为:*ehxA*基因林芝市2株、阿里8株、日喀则3株、昌都1株;拉萨、那曲、山南未检出。因本次试验设计的引物是肠出血性大肠杆菌特异性引物,说明西藏林芝市、阿里地区、日喀则市、昌都市这4个地市的牦牛源大肠杆菌中存在EHEC,由于该病危害性较大,有感染养殖人员的可能性^[24],应引起当地的关注和重视,需制定合理的防控措施进行预防本病的发生,特别是阿里地区养殖户要对本病做好防范。本团队也会密切关注该病在当地的流行情况,给予长时间的监测,以掌握其流行规律,为当地养殖业的发展提供科学依据。

利用MEGA4.0软件对14株EHEC进行遗传进化分析,本次分离的14株EH₁EC中D1、D2、D4、D5、Dbo、Dch1、DR6与GenBank已登录的肠出血性大肠杆菌菌株EF204922(O98:H-)和AF043471(O8:H19)同源性最近,Dguo、D3、D6、DR1、DR2与GeneBank登录的CP024291(O178:H19)和km880130.1(O104:H21)同源性最近。这说明此次分离的菌株大多数与国际流行的EHEC血清型O98:H-、O8:H19亲缘关系较近。其次是以O178:H19、O104:H21 2种血清型处在另一个分支上。

大肠杆菌O157:H7是重要的肠出血性大肠杆菌代表菌株,通过本次血清型结果可以看出此经典血清型菌株在本试验中未曾检出,说明所分菌株均不是O157:H7血清型菌株,本次试验中检出的O98、O8、O178、O104、O26、O137、O142、O115、O117、O158、O148、O86、O78血清型菌株对西藏地区牦牛有一定的致病性,与报道对人致病的主要血清型中只有O104存在交叉,说明这种血清型的菌株对人及牦牛都有致病性,应引起重视。目前对该病的治疗尚无有效办法,最好的防控措施就是加强对该病的监测,防止宿主的感染^[16]。

参考文献 References

- [1] Cid D, Martín-Espada C, Maturrano L, García A, Luna L, Rosadio R. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from young peruvian alpacas (*Vicugna pacos*) with diarrhea [J]. *Fibre Production in South American Camelids and Oher Fibre Animal*, 2011, 321(10):1635-1638
- [2] 张秀丽, 廖兴广, 张丁, 张聪恪, 王想霞, 夏胜利. 河南省首次检出O157:H7大肠埃希氏菌[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(3):102-103
Zhang X L, Liao X G, Zhang D, Zhang C K, Wang X X, Xia S L. *Escherichia coli* O157:H7 isolated from row pork in Henan Province [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2000, 16(3):102-103(in Chinese)
- [3] Bettelheim K A. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: A new problem, an old group of organisms [J]. *Australian Veterinary Journal*, 2010, 73(1):20-26
- [4] Hofmann S L. Southwestern internal medicine conference: Shiga-like toxins in hemolytic-uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura [J]. *American Journal of the Medical Sciences*, 1993, 306(6):398-406
- [5] Holmes A D. Shiga and shiga-like toxins [J]. *Microbiological Reviews*, 1987, 51(2):206-220
- [6] Schmidt H, Plaschke B, Franke S, Russman H, Schwarzkopf A, Heesemann J, Karch H. Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes [J]. *Medical Microbiology and Immunology*, 1994, 183(1):23-31
- [7] Armstrong G L, Hollingsworth J, Morris J G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world [J]. *Epidemiologic Reviews*, 1996, 18(1):29-51
- [8] 白向宁, 赵爱兰, 夏胜利, 熊衍文, 徐建国. 非O157志贺毒素大肠杆菌分离株的多位点序列分型研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(6):544-548, 560
Bai X N, Zhao A L, Xia S L, Xiong Y W, Xu J G. Multilocus sequence typing of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia*

- coli* isolates[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2012, 28(6): 544-548, 560(in Chinese)
- [9] 陈祥, 崔一晨, 高崧, 焦新安. 肠出血性大肠杆菌传播模式[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(6): 574-577
Chen X, Cui Y C, Gao S, Jiao X A. Transmission mode of enterohemorrhagic *Escherichia coli* [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2008, 24(6): 574-577(in Chinese)
- [10] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120
- [11] Zerbino D R, Birney V E. Algorithms for *de novo* short read assembly using *de Bruijn* graphs[J]. *Genome Research*, 2008, 18(5): 821-829
- [12] 王刚, 罗润波, 贡嘎, 益西措姆, 李家奎, 索朗斯珠. 西藏牦牛源大肠杆菌毒力基因检测与分型[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(10): 1913-1918
Wang G, Luo R B, Gongga, Yixicuomu, Li J K, Suolangsizhu. *Escherichia coli* virulence gene detection and classification in Tibetan yak [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(10): 1913-1918(in Chinese)
- [13] Angiuoli S V, Gussman A, Klimke W, Cochrane G, Field D, Garrity G, Kodira C D, Kyrpides N, Madupu R, Markowitz V, Tatusova T, Thomson N, White O. Toward an online repository of standard operating procedures (SOPs) for (meta) genomic annotation [J]. *Omics A Journal of Integrative Biology*, 2008, 12(2): 137
- [14] Kaper J B, Nataro J P, Mobley H L. Pathogenic *Escherichia coli* [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2005, 295(6-7): 355-356
- [15] Fagan P K, Hornitzky M A, Bettelheim K A, Djordjevic S P. Detection of Shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(2): 868-872
- [16] 郭锐, 谭臣, 彭忠, 华琳, 曾东柱, 吴斌. 牛源肠出血性大肠埃希菌的分离鉴定及进化分析[J]. 动物医学进展, 2015, 36(8): 11-17
Guo R, Tan C, Peng Z, Hua L, Zeng D Z, Wu B. Isolation, identification and phylogenetic analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from cows [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2015, 36(8): 11-17(in Chinese)
- [17] Kehl K S, Havens P, Behnke C E, Acheson D W. Evaluation of the premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(8): 2051
- [18] Kendall M M, Gruber C C, Parker C T, Sperandio V. Ethanolamine controls expression of genes encoding components involved in interkingdom signaling and virulence in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O₁₅₇: H₇ [J]. *Mbio*, 2012, 3(3): 6-6
- [19] Luzader D H, Clark D E, Gonyar L A, Kendall M M. EutR is a direct regulator of genes that contribute to metabolism and virulence in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O₁₅₇: H₇ [J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(21): 4947-4953
- [20] 斯木吉德, 敖日格乐, 王纯洁, 吴美云. 6种血清型牛源致病性大肠杆菌的体外抑菌效果研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009(9): 60-70
Simujide, Aorigele, Wang C J, Wu M Y. Bacteriostatic effect of 6 serotype bovine pathogenic *Escherichia coli in vitro* [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2009(9): 60-70(in Chinese)
- [21] 陈明勇, 张冰, 陈德威, 曾群辉. 牦牛致病性大肠杆菌生物学特性研究[J]. 中国农业大学学报, 2001, 6(3): 119-122
Chen M Y, Zhang B, Chen D W, Zeng Q H. Study on biological characteristics of pathogenic *Escherichia coli* in yak [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2001, 6(3): 119-122(in Chinese)
- [22] 李玉, 敖日格乐, 王纯洁, 斯木吉德, 白同日格. 临床型乳房炎奶牛致病性大肠杆菌血清型研究[J]. 中国奶牛, 2010(12): 40-41
Li Y, Aorigele, Wang C J, Simujide, Baitongrige. Serotype of pathogenic *Escherichia coli* in dairy cows with clinical mastitis [J]. *China Dairy Cattle*, 2010(12): 40-41(in Chinese)
- [23] 张天华, 敖日格乐, 王纯洁, 斯木吉德, 满达. 奶牛粪样中致病性大肠埃希菌的分离与鉴定[J]. 动物医学进展, 2012, 33(5): 122-124
Zhang T H, Aorigele, Wang C J, Simujide, Manda. Isolation and identification of pathogenic *Escherichia coli* from feces of dairy cows [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2012, 33(5): 122-124(in Chinese)
- [24] Kaplan B S, Cleary T G, Obrigt T G. Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic uremic syndromes[J]. *Pediatric Nephrology*, 1990, 4(3): 276-283

责任编辑: 杨爱东