

禽源大肠杆菌的分离及其毒力因子的检测

朱善元^{1,2} 陆 辉² 王 健²

(¹南京农业大学 动物医学院 南京 210095)

(²江苏畜牧兽医职业技术学院 泰州 225300)

摘 要 :从临床疑似大肠杆菌感染的病禽组织中分离到 69 株细菌(其中鹅源 29 株,鸡源 40 株),通过常规形态学、培养特性和生化特征的研究,确定为大肠杆菌。PCR 检测表明,其中 46 株(66.7%)为 F1⁺ 大肠杆菌,10 株(14.5%)为 F1⁺ HPI⁺ 大肠杆菌,2 株(2.9%)为 HPI⁺ 大肠杆菌。通过比较还发现,F1 菌毛和 HPI 在鹅源和鸡源大肠杆菌中以及不同脏器来源的菌株中具有相似的分子流行病学。O 抗原鉴定结果表明鹅源大肠杆菌的 O 抗原型主要有 O26、O78、O18、O117,鸡源大肠杆菌的 O 抗原型主要有 O109、O24、O18、O139、O78。药敏试验表明,其中绝大多数菌株对先锋霉素 V、呋喃妥因、庆大霉素敏感,对环丙沙星因菌株差异而不同,林可霉素、四环素、多粘菌素多不敏感。

关键词 :禽;大肠杆菌;分离;毒力因子;F1;HPI

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)05-0795-05

禽大肠杆菌病是由致病性大肠杆菌感染引起家禽的传染病,临床表现多种病型。在规模养殖的条件下,该病仍然是影响养禽业发展的重要疾病之一,造成的损失仍然不可低估。菌毛是大肠杆菌的重要毒力因子,研究表明,鸡源大肠杆菌在侵袭宿主的过程中,主要依靠菌毛对组织上皮细胞的黏附,使细菌易于定植、移行,从而获得侵袭的通道^[1-3]。禽源大肠杆菌主要有 F1 和 P 菌毛,其中 F1 菌毛最为多见^[4]。近年来,在许多病原菌中发现了毒力岛的存在,并可能与其毒力进化有关;例如 HPI(high pathogenicity island)是最早发现于耶尔森菌属的强毒力岛^[5],但在人源、猪源、牛源、兔源大肠杆菌中也广泛存在^[6-8]。本试验对江苏省泰州市、扬州市及其周边地区部分养殖户的疑似大肠杆菌病的病禽进行了实验室诊断,并对分离的大肠杆菌进行了毒力因子(F1 菌毛、HPI)检测、O 抗原鉴定以及药物敏感性试验。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 :TaKaRa Taq(5U/ μ L) 10 × PCR Buffer(Mg²⁺ Free) MgCl₂ (25mmol/L) dNTP

Mixture(each 2.5mmol/L) DNA Marker DL2000 等均购自 TaKaRa 公司;琼脂糖购自上海 Yito 公司(西班牙产);大肠杆菌 O 抗原单因子血清购自中国兽药监察所;吡啶试剂、M. R 试剂、V-P 试剂、革兰氏染色液均根据文献配制^[9]。呋喃妥因、林可霉素、四环素、庆大霉素、先锋霉素 V、环丙沙星、多粘菌素等药敏纸片,均购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.1.2 病料与参考菌株 :病料来自 2006 年 3 ~ 5 月份江苏省泰州市、扬州市及周边地区的 8 个鹅场和 15 个鸡场的疑似大肠杆菌(*Escherichia coli*)感染的病禽;所有病禽均有腹泻和呼吸道罗音等症状,剖检均可见肠炎、肝周炎、气囊炎、肺炎以及气管黏液增多等病变;采集十二指肠、肺以及肝脏作为分离细菌的材料。F1⁺ 大肠杆菌 C600 株、1253-77 株、C121v-77 株,F1⁻ 大肠杆菌 TG1 ;HPI⁺ 大肠杆菌 S452621 株、S433014 株 ;HPI⁻ 大肠杆菌 S442712 株(LEE⁺),为扬州大学兽医微生物实验室收藏。

1.1.3 培养基 :麦康凯琼脂(购自上海中科昆虫生物技术开发有限公司);EMB 琼脂(尹红美蓝琼脂,购自上海精析化工科技有限公司);LB 培养基、三糖铁琼脂等均根据文献^[9]配制。葡萄糖、麦芽糖、甘露糖、乳糖、蔗糖、枸橼酸盐等微量生化培养管均为杭

基金项目 :江苏省自然科学基金(BK2006085)

作者简介 :朱善元(1967 -)男,江苏泰州人,副教授,南京农业大学在职博士研究生,主要从事病原微生物学研究。Tel :86-523-6667616 ;

Fax :86-523-6663808 ;E-mail :jstzsy@126.com

收稿日期 :2007-01-11 ;接受日期 :2007-02-25 ;修回日期 :2007-06-11

州天和微生物试剂有限公司生产。

1.1.4 引物:根据文献报道的 F1 菌毛主要结构亚单位 (FimA 基因 (*fimA*)^[10-12]), 在序列分析比较的基础上, 根据保守区域设计用于 PCR 鉴定 F1 菌毛的引物, 根据文献^[13]合成 1 对引物, 用于 HPI 核心区基因 *irp2* 的扩增; 所有引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 其序列见表 1。

表 1 用于大肠杆菌 F1 菌毛和 HPI 毒力岛鉴定的 PCR 引物

Table 1 PCR primers specific for F1 or HPI in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Target gene	Size/bp
F1-F	AATGCCGGCTCTGTGATCAAACCGT	<i>fimA</i>	420
F1-R	AGATACTGAACCTTGAAGTCCGATC		
<i>irp2</i> -L	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	<i>irp2</i>	280
<i>irp2</i> -R	TCGTCGGGCAGCGTTCTTCT		

1.2 细菌的分离和培养

取采集的病料, 使用麦康凯琼脂平板进行划线分离, 37℃ 培养 24h 后, 挑取疑似大肠杆菌的菌落连续纯培养 3 代。纯培养物进行革兰氏染色镜检后, 分别于接种 EMB 琼脂平板和三糖铁琼脂。

1.3 生化试验

糖类发酵试验、吲哚试验、M.R 试验、V-P 试验、枸橼酸盐利用试验、尿素分解试验、硫化氢产生试验等均按照文献^[9]进行。

1.4 PCR 检测大肠杆菌毒力基因

1.4.1 DNA 模板的制备:参考菌株和分离株分别在 LB 平板上 37℃ 培养 24h, 各挑取 1 个菌落, 以煮沸法制备细菌的 DNA 模板^[7,8]。

1.4.2 PCR 检测 F1⁺ 大肠杆菌:取 10 × PCR Buffer 5μL, MgCl₂ 3μL, 4 × dNTPs 4μL, 引物 F1-F、F1-R 各 1μL (浓度均为 50mmol/L), 参考菌株的 DNA 模板 2μL, TaKaRa Taq 1μL, 加灭菌超纯水至 50μL。反应条件 94℃ 3min, 94℃ 40s, 58℃ 40s, 72℃ 1min, 30 循环, 72℃ 10min。

1.4.3 PCR 检测 HPI 核心基因 *irp2*:参考菌株的 DNA 模板 2μL, 引物 *irp2*-L、*irp2*-R 各 1μL (浓度均为 50mmol/L) 其它同步骤 1.4.2; 反应条件 94℃ 3min; 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 30s, 30 循环, 72℃ 10min。

1.4.4 PCR 产物电泳鉴定:取 PCR 产物 4μL 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 以 DNA Marker DL2000 为参照, 溴化乙锭 (EB) 染色后置紫外灯下观察。

1.4.5 大肠杆菌 F1 和 HPI 的 PCR 检测:取分离菌的 DNA 模板, 分别按步骤 1.4.2、1.4.3 进行 PCR 扩

增, 以确定 F1 和 HPI 在泰州、扬州及其周边地区禽源大肠杆菌中的流行情况。

1.5 O 抗原型鉴定

取分离菌在 LB 平板上的培养物, 用灭菌生理盐水漂洗 3 次后, 制成约 1 × 10¹⁰ CFU/mL 的悬液; 105kPa 高压蒸汽处理 1h 后, 使用大肠杆菌 O 抗原单因子血清, 以玻板凝集试验鉴定 O 抗原型。

1.6 药敏试验

随机取纯培养后的鹅源大肠杆菌 4 株、鸡源大肠杆菌 5 株, 通过纸片扩散法测定其对临床常用抗生素的敏感性。

2 结果和分析

2.1 细菌的分离和培养

共分离到细菌 69 株, 其中鹅源 29 株 (分离自肝脏 7 株、肺脏 13 株、肠道 9 株), 鸡源 40 株 (分离自肝脏 12 株、肺脏 14 株、肠道 14 株)。所有细菌在麦康凯平板上均生长为表面光滑、边缘整齐、圆形、隆起的红色菌落, 在 EMB 琼脂平板上为黑色带金属闪光的菌落, 在三糖铁琼脂中为斜面变黄、底部变黄、产气、不产生 H₂S。革兰氏染色镜检均为两端钝圆、形态均一、中等大小、散在排列的红色杆菌, 初步确定为大肠杆菌。

2.2 生化试验结果

所有菌株均分解葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖产酸产气, 约 11.6% 的菌株 (鹅源 13.8%, 鸡源 10%) 分解蔗糖产酸产气, 所有的菌株均能产生吲哚、M.R 试验阳性、V-P 试验阴性、不能利用枸橼酸盐、不能产生硫化氢、不分解尿素, 证明了所分离的细菌就是大肠杆菌。

2.3 PCR 检测 F1⁺ 大肠杆菌

结果表明从 F1 菌毛阳性大肠杆菌 C600 株、

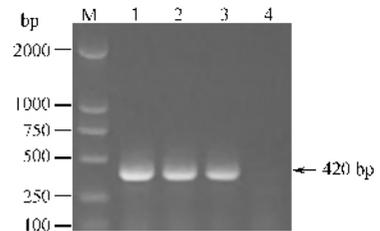


图 1 PCR 检测 F1 菌毛阳性大肠杆菌

Fig.1 PCR detection of the F1⁺ *E. coli* strains; M. DNA DL2000 Marker; 1. PCR product of F1⁺ *E. coli* strains C600; 2. PCR product of F1⁺ *E. coli* strains C1253-77; 3. PCR product of F1⁺ *E. coli* strains C1215-77; 4. PCR product of F1⁺ *E. coli* strains TG1.

C1253-77 株、C121v-77 株均可扩增到约为 420bp 的片段,与期望的长度大小相当(图 1),而从 F1⁻ 大肠杆菌 TG1 中不能扩增到期望的片段;这表明引物 F1-F、F1-R 可特异性鉴定 F1⁺ 大肠杆菌。

2.4 PCR 检测 HPI 核心基因 *irp2*

结果表明从 HPI⁺ 大肠杆菌 S452621 株、S433014 株中均可扩增到约 280bp 的片段,与期望的大小相当(图 2),而从 HPI⁻ 大肠杆菌 S442712 株中不能扩增到期望的片段;这表明引物 *irp2*-L、*irp2*-R 可特异性鉴定 HPI⁺ 大肠杆菌。

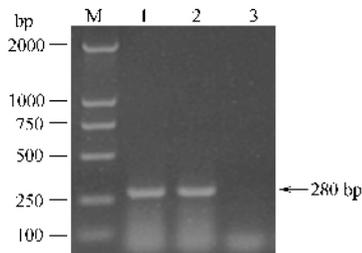


图 2 PCR 检测 HPI 核心基因 *irp2*

Fig.2 PCR detection of the HPI⁺ *E. coli* strains. M. DNA DL2000 Marker;1. PCR product of HPI⁺ *E. coli* strains S452621;2. PCR products of HPI⁺ *E. coli* strains S433014;3. PCR product of HPI⁻ *E. coli* strains S442712.

2.5 临床分离株 F1 菌毛和 HPI 的检测

对 29 株鹅源大肠杆菌、40 株鸡源大肠杆菌的 PCR 检测发现,其中 46 株(66.7%)为 F1⁺ 大肠杆菌,10 株(14.5%)为 F1⁺ HPI⁺ 大肠杆菌,2 株(2.9%)为 HPI⁺ 大肠杆菌(表 2)。

表 2 所分离的禽源大肠杆菌毒力因子的检测结果(单位:株)

Table 2 PCR detection of virulence factors in avian

E. coli isolates in this study

Animal	Sample	Total	F1 ⁺	F1 ⁺ HPI ⁺	HPI ⁺
Goose	liver	7	3	2	1
	lung	13	10	1	0
	duodenum	9	6	1	1
Chook	liver	12	9	2	0
	lung	14	10	2	0
	duodenum	14	8	2	0
Total		69	46	10	2

其中鹅源大肠杆菌分离株中,19 株(65.5%)为 F1⁺、4 株(13.8%)为 F1⁺ HPI⁺、2 株(6.9%)为 HPI⁺、鸡源大肠杆菌分离株中,27 株(67.5%)为 F1⁺、6 株(15%)为 F1⁺ HPI⁺、未发现(0%)HPI⁺ 大肠杆菌;F1 菌毛和 HPI 在鹅源和鸡源大肠杆菌中的分子流行病学基本相似(图 3)。通过比较还发现,

F1 菌毛和 HPI 在不同脏器来源的鹅源和鸡源大肠杆菌分离株中的也具有相似的分子流行病学(图 4)。

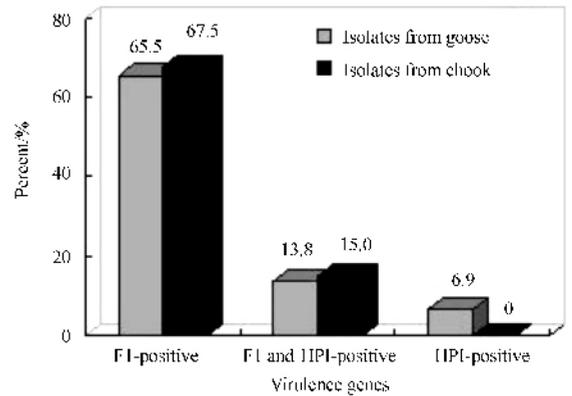


图 3 鹅源和鸡源大肠杆菌分离株 F1 与 HPI 的分子流行病学

Fig.3 Prevalence of F1 fimbria and HPI in avian *E. coli* isolates from different animal.

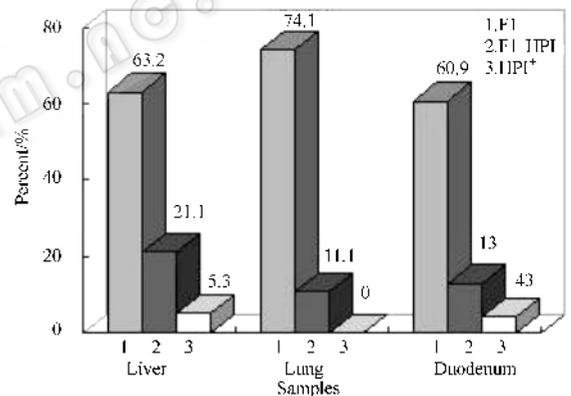


图 4 不同脏器来源的大肠杆菌分离株 F1 与 HPI 的分子流行病学

Fig.4 Prevalence of F1 fimbria and HPI in avian *E. coli* isolates from different tissue.

2.6 O 抗原鉴定结果

该试验分离的鹅源大肠杆菌分离株主要为 O26 (25.0%)、O78 (12.5%)、O18 (12.5%)、O117 (12.5%)、未定型 37.5%;鸡源大肠杆菌分离株主要为 O109 (37.5%)、O24 (18.75%)、O18 (12.5%)、O139 (12.5%)、O78 (6.25%)、未定型 12.5%。

2.7 药敏试验结果

通过对 11 株大肠杆菌的药敏试验,发现绝大多数菌株对先锋霉素 V、呋喃妥因、庆大霉素敏感,对环丙沙星因菌株差异而不同,林可霉素、四环素、多粘菌素多不敏感(表 3)。

表 3 11 株禽源大肠杆菌的药敏试验结果

Table 3 The antibiotics susceptibility of the 11 avian *E. coli* isolates

Sample	Gentamycin	Ciprofloxacin	Cefazolin	Nitrofurantoin	Lincomycin	Tetracyclin	Polymycin B
1	L	M	M	M	-	-	-
2	L	L	M	L	-	M	-
3	L	-	M	L	-	-	-
4	-	-	L	L	-	-	-
5	L	-	H	H	-	-	-
6	M	L	H	H	-	-	-
7	M	-	H	M	-	-	-
8	L	-	-	M	-	-	-
9	M	M	H	H	-	-	-
10	M	M	H	M	-	-	-
11	M	H	H	H	-	H	-

Remark: "H" is abbreviation for "high sensitive"; "M" is abbreviation for "medium sensitive"; "L" is abbreviation for "low sensitive"; "-" is abbreviation for "resistive". Samples 1-4 were isolated from geese and samples 5~11 were isolated from chook.

3 讨论

本试验建立了检测禽源大肠杆菌毒力因子(F1菌毛、HPI)的PCR方法,具有敏感、特异、快速等优点,并利用建立的PCR方法对江苏省泰州市、扬州市及其周边地区鹅源与鸡源大肠杆菌进行了鉴定,这对于科学防控大肠杆菌感染具有积极的意义。

许多研究表明F1菌毛是禽源大肠杆菌的重要毒力因子^[1-4],本试验结果也揭示了其在泰州市、扬州市及其周边地区鹅源与鸡源大肠杆菌中广泛存在,证明了F1⁺大肠杆菌是该地区重要的禽大肠杆菌病原。许多资料表明HPI是人源、牛源、猪源、兔源致泻性大肠杆菌的重要毒力因子^[5-8],但在禽源大肠杆菌中尚未见系统报道;本试验结果表明,HPI在禽源大肠杆菌中已经存在(17.4%),这为揭示HPI在不同细菌之间的转移提供了又一重要证据,同时对今后禽大肠杆菌病的防制具有指导意义。

大肠杆菌血清型众多,我国已分离鉴定的禽致病性大肠杆菌血清型有74个之多,本试验中发现江苏省泰州市、扬州市及其周边地区的鸡源大肠杆菌O抗原型主要有O109、O24、O18、O139、O78,鹅源大肠杆菌O抗原型主要有O26、O78、O18、O117,与国外报道(O1、O2、O35和O78)、高崧等报道(O18、O78、O2、O88、O11、O26)、李富金等报道(O78、O36、O6、O107、O2、O120、O15、O109、O8)以及韦平等报道(O50、O88、O133、O8、O78和O15)的大肠杆菌优势血清型不尽相同^[14-16],这也进一步证明了我国禽源大肠杆菌血清型复杂多样。

近年来,由于各种抗菌药物的广泛应用,导致耐药菌株数的迅速上升,尤其广谱及超广谱抗菌药物的不加控制的使用,是造成耐药菌株大量出现的重

要原因。加强对病原菌的耐药性的检测,定期总结经验,观察耐药趋势,对指导临床合理用药减缓细菌耐药的产生具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Gyimah JE, Panigrahy B. Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of pathogenic *Escherichia coli* to chicken tracheal epithelium. *Avian Dis*, 1988, **32**(1): 74-78.
- [2] Dozois CM, Chanteloup N, Dho-Moulin M, et al. Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis*, 1994, **38**(2): 231-239.
- [3] Dozois CM, Pourbakhsh SA, Fairbrother JM. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet Microbiol*, 1995, **45**(4): 297-309.
- [4] 陈雷,董国雄,李俊宝,等. 鸡致病性大肠杆菌菌毛分型的初步研究. *中国预防兽医学报*, 2002, **24**(5): 371-375.
- [5] Carniel E, Guilvout I, Prentice M. Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, 1996, **178**(23): 6743-6751.
- [6] Bach S, de Almeida A, Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **183**(2): 289-294.
- [7] Cheng D, Sun H, Xu J, et al. Prevalence of Fimbrial Colonization Factors F18ab and F18ac in *Escherichia coli* Isolates from Weaned Piglets with Edema and/or Diarrhea in China. *Veterinary Microbiology*, 2005, **110**(1-2): 35-39.
- [8] 成大荣,孙怀昌,徐建生,等. 断奶仔猪源大肠杆菌LEE及HPI毒力岛的检测. *微生物学报*, 2006, **46**(3): 368-372.
- [9] 李健强,李六金. 兽医微生物学实验实习指导. 西安: 陕西科学技术出版社, 1999.
- [10] 高崧,彭大新,吴晓东,等. 禽病原性大肠杆菌1型菌毛主要亚单位结构基因的克隆、测序与表达. *畜牧兽医学报*, 2003, **34**(3): 292-298.
- [11] Peek AS, Souza V, Eguarte LE, et al. The interaction of protein structure, selection, and recombination on the evolution of the type-1 fimbrial major subunit (fimA) from *Escherichia coli*. *J Mol Evol*,

- [12] Vandemaele F, Vandekerchove D, Vereecken M, *et al.* Sequence analysis demonstrates the conservation of *fimH* and variability of *fimA* throughout Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res*, 2003, **34**(2):153-163.
- [13] Schubert S, Rakin A, Karch H, *et al.* Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun*, 1998, **66**(2):480-485.
- [14] 高崧, 刘秀梵, 张如宽, 等. 我国部分地区禽源性大肠杆菌的分离与鉴定. *畜牧兽医学报*, 1999, **30**(2):164-171.
- [15] 李富金, 高崧, 嵇宝山, 等. 山东省禽致病性大肠杆菌菌株的分离与鉴定. *中国家禽学报*, 2005, **1**(1):139-142.
- [16] 韦平, 李康然, 施万球. 广西大肠杆菌的分离与鉴定. *广西农学院学报*, 1989, **2**(2):31-38.

Isolation of avian *Escherichia coli* and PCR detection of their F1 and HPI genes

ZHU Shan-yuan^{1,2*}, LU Hui², WANG Jian²

(¹ College of Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 21009, China)

(² Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou 225300, China)

Abstract: To further investigate into the prevalence of F1 fimbriae and high pathogenicity island (HPI) in avian *Escherichia coli*, a total of 69 bacteria isolates (29 from geese and 40 from chickens) were obtained from deceased poultry and characterized to be *Escherichia coli* by gram staining, culture characterizing and bio-chemical testing. Two sets of primers were designed or analyzed with DNASTar software based on the F1 and HPI sequences that deposited in GenBank and synthesized by Sangon Biological Engineering Technology and Service Co. Ltd. (Shanghai, P. R. China). All the primers were tested for their specificities by using reference *E. coli* strains, and it is confirmed that the PCR using primers F1-F and F1-R could identify F1⁺ *E. coli*, as well as the PCR using primers irp-F and irp-R could identify HPI⁺ *E. coli*. All the isolates were submitted to PCR detection, and the data shows 46 isolates (66.7%) were F1-positive, 10 isolates (14.5%) were F1⁺ HPI-positive and 2 isolates (20.0%) were HPI-positive. Furthermore analysis indicated that the prevalence of F1 and HPI have no different between the isolates from geese and chickens, and no different among the isolates from different tissue, such as liver, lung and duodenum. In addition, all the 69 *E. coli* isolates serological typed, and the results show that the isolates from geese were belonged to O26(25.0%), O78(12.5%), O18(12.5%) and O117(12.5%), while *E. coli* from chickens were fell into O109(37.5%), O24(18.75%), O18(12.5%), O139(12.5%) and O78(6.25%). Seven kinds of antibiotics were tested on 11 isolates, and it revealed that most isolates were sensitive to cefazolin, nitrofurantoin and gentamycin, while resistant to lincomycin, tetracycline and polymycin B.

Keywords: avian; *Escherichia coli*; isolate; virulence factor; F1 fimbriae; HPI