

# 鸭源致病性大肠杆菌的血清型鉴定及其相关毒力基因分析

于学辉<sup>1,2</sup>,程安春<sup>1,3\*</sup>,汪铭书<sup>1,3\*</sup>,王英<sup>2</sup>,王远微<sup>2</sup>,汤承<sup>2</sup>

(1. 四川农业大学动物医学院禽病防治研究中心,雅安 625014;2. 西南民族大学生命科学  
与技术学院,成都 610041;3. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室,雅安 625014)

**摘要:** 自规模化养鸭场患典型大肠杆菌败血症雏鸭分离的 282 株致病性大肠杆菌(*E. coli*)中鉴定出 210 株(包含 37 种血清型),其中 O93、O78、O92、O76 占 43.8%(92/210)为优势血清型,O46、O32&O93 混合型、O60&O93 混合型为首次从鸭群中分离到。应用 PCR 结合核酸序列测定对 210 株致病性 *E. coli*(鸭大肠杆菌病分离株)和 28 株自健康雏鸭泄殖腔拭子分离的 *E. coli*(临床健康鸭大肠杆菌分离株)进行包括强毒力岛(HPI)中的鼠疫菌素受体基因(*fyuA*)和铁调节蛋白基因(*irp2*)、I 型菌毛必需蛋白基因(*fimC*)、P 型菌毛结构基因(*papA*)和血清耐受基因(*iss*)检测,结果表明:*fyuA*、*irp2*、*fimC*、*papA* 和 *iss* 基因在鸭大肠杆菌病分离株的携带率分别为 41.0%、43.3%、92.9%、97.6% 和 96.7%,在临床健康鸭大肠杆菌分离株的携带率分别为 21.4%、25.0%、92.9%、100% 和 92.9%,患病鸭和临床健康鸭大肠杆菌分离株 *iss*、*fimC* 和 *papA* 携带率差异不显著( $P>0.05$ ),但 *papA* 的携带率均显著高于其他宿主(鸡、猪和人)源 *E. coli*;HPI 毒力岛在鸭源 *E. coli* 中分布较广,其携带率表现为鸭大肠杆菌病分离株极显著高于临床健康鸭大肠杆菌分离株。HPI 毒力岛的携带率与菌株的致病性呈明显的正相关,与 O78 等特定的血清型有一定的关系。鸭大肠杆菌病分离株有 37.6%(79/210)同时携带 *fyuA*、*irp2*、*fimC*、*iss* 和 *papA* 基因,极显著高于健康鸭大肠杆菌分离株的 14.3%(4/28)( $P<0.01$ )。

**关键词:** 鸭;致病性大肠杆菌;血清型;毒力基因;分子流行病学

中图分类号:S852.61<sup>+</sup>2

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2008)01-0053-07

## Serotype Identification and Virulence-associated Genes Analysis of Pathogenic *E. coli* Isolated from Ducklings

YU Xue-hui<sup>1,2</sup>, CHENG An-chun<sup>1,3\*</sup>, WANG Ming-shu<sup>1,3\*</sup>,  
WANG Ying<sup>2</sup>, WANG Yuan-wei<sup>2</sup>, TANG Cheng<sup>2</sup>

(1. Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China; 2. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 3. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Yaan 625014, China)

**Abstract:** Among the 282 *E. coli* strains isolated from ducklings typically showing *E. coli* septicemia in large-scale duck farms in Southwest China, the serotypes of 210 strains were identified. The results showed that totally 37 serotypes were obtained, of which serotypes of O93, O78, O92 and O76 accounted for 43.8% and were the prevalent serotypes, and serotypes of O46, O32&O93, O60&O93 were isolated from ducks at the first time. The pesticin receptor gene (*fyuA*) within the highly pathogenicity islands (HPI), iron regulatory protein gene (*irp*), type

收稿日期:2007-08-16

基金项目:国家科技攻关重大项目(2004BA901A03);国家“十一五”科技支撑计划(2007Z06-017);教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-04-0906/NCET-06-0818);四川省重大基础科研项目(04JY029-006-1);四川省重点建设学科项目(SZD0418)

作者简介:于学辉(1961-),男,四川绵阳人,博士生,主要从事禽病学研究工作

\* 通讯作者:程安春,汪铭书, Tel:0835-2882918, Fax:0835-2885774, E-mail:chenganchun@vip.163.com

1 pilus essential protein gene (*fimC*), the pap pilus structural protein gene (*papA*) and serum tolerance associated gene (*iss*) of the 210 pathogenic *E. coli* strains isolated from ducks showing clinical signs and the 28 *E. coli* strains isolated from cloacal swab of clinically healthy ducklings were detected by the method of polymerase chain reaction (PCR) and nucleic acid sequence analysis. The results demonstrated that the genes of *fyuA*, *irp2*, *fimC*, *papA* and *iss* were detected from pathogenic *E. coli* strains isolated from ducks showing clinical signs and account for 41.0%, 43.3%, 92.9%, 97.6% and 96.7% respectively, and the corresponding genes detected from *E. coli* strains isolated from clinically healthy ducklings account for 21.4%, 25.0%, 92.9%, 100% and 92.9% respectively. The results showed that there were no significant difference ( $P>0.05$ ) of *iss*, *fimC* and *papA* gene between the *E. coli* strains isolated from ducklings showing clinical signs and that isolated from clinically healthy ducklings. With the respects of *papA* gene detection, there were significant difference ( $P<0.05$ ) between the *E. coli* strains isolated from ducks showing clinical signs and that isolated from other hosts of chickens, swine and humans. The *fyuA* gene was widely distributed in ducklings and its detection rate in ducklings showing clinical signs was significantly higher ( $P<0.05$ ) than that in clinically healthy duckling. There was a close positive correlation between the *fyuA* gene and the pathogenicity of *E. coli*. Furthermore, the *fyuA* gene was closely related with the specific serotype of O78. The detection rate of *fyuA*, *irp2*, *fimC*, *iss* and *papA* in ducklings showing clinical signs (37.6%, 79/210) was significantly higher ( $P<0.01$ ) than that in clinically healthy ducklings (14.3%, 4/28).

**Key words:** ducklings; pathogenic *E. coli*; serotype; virulence associated gene; molecular epidemiology

致病性大肠杆菌是重要的人畜共患病病原,动物大肠杆菌病常常通过食物链途径对人类健康造成严重的危害<sup>[1]</sup>,我国是世界上养鸭最多的国家,随着集约化养殖的普及,鸭致病性大肠杆菌(*E. coli*)对养鸭业的危害和导致的经济损失日益严重,成为目前危害养鸭业最严重的传染病之一<sup>[2]</sup>。

现有禽病原性大肠杆菌(Avian Pathogenic *Escherichia coli*, APEC)资料绝大多数来源于鸡,其优势血清型国外报道主要是 O1、O2、O35 和 O78<sup>[3]</sup>,而国内血清型多且地区差异较大<sup>[4-5]</sup>。毒力相关基因的携带情况是阐明 APEC 致病机理的重要参数<sup>[6-7]</sup>,有研究表明相同血清型的不同菌株间携带毒力相关基因存在差异<sup>[8]</sup>。到目前为止,对鸭源致病性 *E. coli* 血清型流行病学的研究缺乏系统资料,也未见鸭源 *E. coli* 毒力相关基因的检测报道。本研究从不同地区规模化养鸭场患典型大肠杆菌败血症死亡的雏鸭中分离到 282 株 *E. coli*,对其进行 O 血清型鉴定和相关毒力基因(*fimC*、*papA*、*iss*、*irp2*、*fyuA*)检测,并与临床健康鸭大肠杆菌分离株进行对比分析,为阐明鸭源致病性 *E. coli* 的致病机理和制定有效的防制措施提供科学数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

受试 282 个鸭大肠杆菌病分离株系从四川、重庆和云南 3 个省(市)的 9 个不同地区规模化养鸭场送检的患典型大肠杆菌败血症的发病雏鸭中分离,由四川农业大学动物医学院禽病防治研究中心和西南民族大学禽病研究所鉴定和保存。参考菌株大肠杆菌 SYW004 株(*fyuA*<sup>+</sup>、*irp2*<sup>+</sup>、*fimC*<sup>+</sup>、*papA*<sup>+</sup>、*iss*<sup>+</sup>)和 28 株临床健康鸭大肠杆菌分离株均由西南民族大学禽病研究所鉴定并保存。

### 1.2 主要试剂及仪器

PCR 反应试剂购自美国 MBI 公司、DNA Marker II (北京 TIANGEN 公司)、pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;优质琼脂糖(英国 OXOID 公司);PCR 仪(美国 Bio-RAD 公司);凝胶成像分析系统(GELDOC2000,美国 Bio-RAD 公司);离心机(德国 Eppendorf 公司);核酸蛋白检测仪(美国 Bio-RAD 公司)。

### 1.3 大肠杆菌标准抗 O 因子血清

大肠杆菌抗 O<sub>1</sub> ~ O<sub>163</sub> 因子血清(批号:

20040512),购自中国兽医药品监察所。

#### 1.4 试验鸭

种蛋购自成都市新津种鸭场,自行孵化,隔离器内饲养至 7 日龄。

#### 1.5 大肠杆菌 O 血清型鉴定

血清型鉴定按中国兽医药品监察所提供的产品使用说明书进行操作。所有分离株首先经玻板凝集试验初步筛选出可能的 O 血清型,然后通过试管凝集试验确定其 O 血清型。定型标准为血清的试管凝集价不小于 1:640。

#### 1.6 致病性试验

从优势血清型中各选 8 株,共 32 株,分别接种于营养肉汤培养基,37℃ 振荡培养 18 h,4 000 r/min 离心 20 min,用灭菌生理盐水配为含菌量为  $10^9$  CFU/mL 悬浮液作攻毒用。将 1 周龄雏鸭 165 只分为 33 组,每组 5 只;前 32 组经腿部肌肉接种

0.2 mL 菌液,第 33 组为空白对照组。每天上、下午各记录一次雏鸭的死亡数、病变,并以心血、肝脏作细菌分离、鉴定,直到接种后 7 d 为止,7 d 后扑杀仍存活的雏鸭,观察病变并作细菌分离鉴定。参照文献[9]确定分离株的致病性:50%及 50%以上的接种鸭死亡为高致病株;接种鸭死亡不超过 50%为中等致病株;接种鸭不死亡为低致病性分离株。解剖可见明显心包炎、肝周炎和气囊炎病变。

#### 1.7 毒力基因的 PCR 检测

1.7.1 DNA 模板的制备 参照文献[10]方法进行,最后溶于 50  $\mu$ L TE 缓冲液中备用。

1.7.2 引物 根据 GenBank 中已发表的序列,分别设计针对 HPI 的 I 型菌毛、Iss 蛋白和 P 型菌毛的 *irp2*、*fyuA*、*fimC*、*iss* 和 *papA* 基因的 5 对特异性引物,由北京博迈德公司合成(详见表 1)。

表 1 本试验检测的基因及其引物

Table 1 Target genes and its oligonucleotide primers used in the study

目的基因 Target genes	引物及序列(5'-3') Primer and sequence(5'-3')	产物大小/bp PCR fragments/bp
<i>fyuA</i>	<i>fyuA</i> -L:GCTTTATCCTCTGGCCTT; <i>fyuA</i> -R:GGCATATTGACGATTAAC	947
<i>irp2</i>	<i>irp2</i> -L:AAGGATTCGCTGTTACCGGAC; <i>irp2</i> -R:TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	267
<i>fimC</i>	<i>fimC</i> -L:TAAGGAAATCGCAGGAA; <i>fimC</i> -R:GCTGTGGGATAA TGGACTG	542
<i>iss</i>	<i>iss</i> -L:AACCGACAGCAGTAACAC; <i>iss</i> -R:ATGAAGACCCGAGGGAT	275
<i>papA</i>	<i>papA</i> -L:GGAACGAACGCAGAAACG; <i>papA</i> -R:CGCAATGGGCGAATACTT	297

1.7.3 *fyuA* 和 *irp2* 基因的 PCR 检测 采用已建立的双重 PCR 方法,对 210 株鸭大肠杆菌病分离株和 28 株临床健康鸭大肠杆菌分离株 *fyuA* 和 *irp2* 基因进行检测。PCR 反应体系:10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ L、Mg<sup>2+</sup> 2  $\mu$ L (10 mol/mL)、4  $\times$  dNTPs (10 mmol/L) 2  $\mu$ L、*fyuA* 和 *irp2* 上、下游引物(均为 10 pmol)各 1  $\mu$ L、Taq 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.15  $\mu$ L、DNA 模板 1.5  $\mu$ L;加 H<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件:95℃ 5 min;94℃ 40 s,52℃ 40 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。以参考菌株作为阳性对照,灭菌超纯水作为空白对照。随机取 *fyuA* 和

*irp2* 阳性菌株 5 株,对其 PCR 产物进行回收纯化,克隆至 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌 JM109,取阳性克隆送上海生工生物工程公司进行测序,并进行序列比较分析。

1.7.4 *fimC*、*iss* 和 *papA* 基因的 PCR 检测 采用 PCR 方法,同样对上述 210 株鸭大肠杆菌病分离株和 28 株临床健康鸭大肠杆菌分离株的 *fimC*、*iss* 和 *papA* 基因分别进行检测,PCR 反应体系和反应条件同上,引物分别为 *fimC*-L、*fimC*-R、*iss*-L、*iss*-R、*papA*-L 和 *papA*-R。随机取 *fimC*、*iss* 和 *papA* 阳性菌株各 5 株,按 1.7.3 方法对各 PCR 产物进行

克隆、测序和分析。

## 2 结果

### 2.1 鸭致病性大肠杆菌分离株 O 血清型鉴定

282 株鸭大肠杆菌病分离株中,除 67 株未能定型、5 株自凝外,210 株分属 37 个血清型(详见表 2),其中 O93、O78、O92 和 O76 共 92 株,为优势血清型;O46、O32&O93 混合型、O60&O93 混合型在鸭群中为第一次发现。

### 2.2 致病性试验

32 株优势血清型鸭大肠杆菌病分离株接种雏鸭 7 h 普遍出现精神萎顿等症状,于接种后 10 h 开

始出现死亡。剖检死亡鸭,24 h 内死亡的雏鸭可见肝、脾、肾脏出血。24 h 以后死亡的雏鸭心包积液、心包膜增厚混浊;肝、脾、肾肿大出血。未死亡雏鸭剖杀后均可观察到不同程度的心包炎、肝周炎和气囊炎,从死亡和剖杀雏鸭的心、肝样品中均能分离出与攻毒菌株相同血清型的 *E. coli*。在致病性试验中,高致病性菌株 O78(100%, 8/8)、O92(87.5%, 7/8)、O93(75%, 6/8)和 O76(75%, 6/8)共 27 株,占受试菌株的 84.4%(27/32);中等致病性菌株有 5 株,占受试菌株的 15.6%(5/32)。对照组雏鸭均健活,扑杀时未见任何肉眼变化,心血、肝等器官未分离出任何细菌。

表 2 210 株鸭大肠杆菌病分离株的血清型

Table 2 *E. coli* serotypes of 210 isolates from ducklings with colibacillosis

血清型 Serotype	菌株数 Number	百分比/% Percentage	血清型 Serotypes	菌株数 Number	百分比/% Percentage	血清型 Serotype	菌株数 Number	百分比/% Percentage
O93	33	15.71	O22	5	2.38	O117	2	0.95
O78	28	13.33	O77	5	2.38	O2	1	0.48
O92	23	10.95	O18	4	1.90	O11	1	0.48
O76	8	3.81	O36	4	1.90	O43	1	0.48
O9	7	3.33	O45	4	1.90	O46	1	0.48
O51	7	3.33	O61	4	1.90	O63	1	0.48
O142	7	3.33	O88	4	1.90	O104	1	0.48
O149	7	3.33	O101	4	1.90	O141	1	0.48
O21	6	2.86	O154	4	1.90	O192	1	0.48
O60	6	2.86	O158	4	1.90	O60&O93	1	0.48
O79	6	2.86	O20	3	1.43	O32&O93	1	0.48
O137	6	2.86	O106	2	0.95			
O17	5	2.38	O109	2	0.95			

### 2.3 HPI 毒力岛 *fyuA* 和 *irp2* 的 PCR 检测

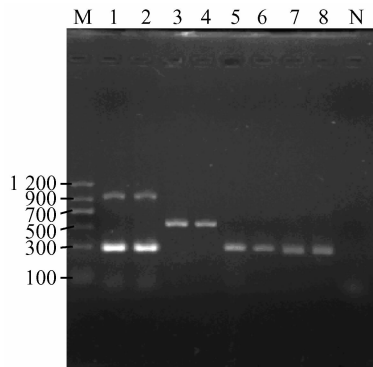
*fyuA* 和 *irp2* 的 PCR 扩增分别获得约 947 和 267 bp 电泳条带,与预期目的片段大小相符(见图 1),测序结果与 GenBank 中 *fyuA*、*irp2* 基因序列的相似性高于 98%。*fyuA* 和 *irp2* 阳性率在鸭大肠杆菌病分离株分别为 41.0%(86/210)和 43.3%(91/210),在临床健康鸭大肠杆菌分离株分别为 21.4%(6/28)和 25.0%(7/28)(详见表 3)。鸭大肠杆菌病分离株携带 *fyuA* 和 *irp2* 的阳性率显著高于健康鸭大肠杆菌分离株( $P < 0.01$ )。

### 2.4 *fimC*、*papA* 和 *iss* 的 PCR 检测

*fimC*、*papA* 和 *iss* 的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,分别在 542、297 和 275 bp 左右出现

一条清晰的条带,所得条带与预期目的片段大小相符(见图 1),测序结果与 GenBank 中提供的 *fimC*、*iss* 和 *papA2* 基因序列相似性高于 98%。*fimC*、*papA* 和 *iss* 阳性率在鸭大肠杆菌病分离株分别为 92.9%(195/210)、97.6%(205/210)和 96.7%(203/210),在临床健康鸭大肠杆菌分离株分别为 92.9%(26/28)、100%(28/28)和 92.9%(26/28)(详见表 3),鸭大肠杆菌病分离株携带 *fimC*、*iss* 和 *papA* 基因的阳性率与健康鸭大肠杆菌分离株无显著差异( $P > 0.05$ )。

鸭大肠杆菌病分离株有 37.6%(79/210)同时携带 *fyuA*、*irp2*、*fimC*、*iss* 和 *papA* 基因,显著高于健康鸭大肠杆菌分离株的 14.3%(4/28)( $P <$



M. DNA maker II ;1. HPI 毒力岛基因的双重 PCR 阳性对照;2. YA-1 分离株 HPI 毒力岛基因双重 PCR 呈阳性;3. *fimC* 基因阳性对照;4. MY-13 分离株 *fimC* 基因呈阳性;5. *papA* 基因阳性对照;6. CD-5 分离株 *papA* 基因呈阳性;7. *iss* 基因的阳性对照;8. LS-3 分离株 *iss* 基因呈阳性;N. 无模板对照

M. DNA maker II ;1. Positive control of double PCR of HPI island gene; 2. HPI island gene positive result from YA-1 strain ; 3. Positive control of *fimC* gene; 4. *fimC* gene positive result from MY-13 strain; 5. Positive control of *papA* gene; 6. *PapA* gene positive result from CD-5 strain; 7. Positive control of *iss* gene; 8. *iss* gene positive result from LS-3 strain; N. Negative control

图 1 鸭源 *E. coli* 分离株 HPI、*fimC*、*papA* 和 *iss* 基因 PCR 结果

Fig. 1 PCR results of HPI, *fimC*, *papA*, and *iss* gene from ducklings *E. coli* isolates

0.01), 详见表 3。

### 2.5 不同血清型鸭大肠杆菌病分离株 HPI 检出率

210 株鸭大肠杆菌病分离株 HPI 检出率见表 4。在优势血清型中, O78 阳性率最高 (85.7%), O92、O93 和 O76 分别为 78.3%、27.3% 和 25.0%。在非优势血清型菌株中, 检出率高的有 O158 (100%, 4/4)、O137 (83.3%, 5/6)、O61 (75%, 3/4) 和 O142 (57.1%, 4/7) 等, 而 O149 (7 株) 和 O60 (6 株) 均未检出。

## 3 讨论和小结

### 3.1 关于鸭致病性大肠杆菌血清型

*E. coli* 是一种条件性致病菌, 血清型复杂, 不同动物、同种动物不同地区感染 *E. coli* 的血清型有明显差异<sup>[10]</sup>。国内外对 APEC 的研究主要集中于鸡 *E. coli*, 而我国 *E. coli* 的血清型比国外更为复杂, 全国目前已报道 67 种致病血清型<sup>[4-5]</sup>。国内外对鸭源 *E. coli* 血清型的调查并不多, 特别是针对较为广泛地区和较大样本量的调查研究, 本次调查结果证实, 我国西南地区规模化养鸭场鉴定出的 210 个 *E. coli* 分离株的血清型达 37 个之多, 4 个优势血清型中除 O78 外, O93、O92 和 O76 并不是鸡致病性 *E. coli* 的优势血清型。值得注意的是, 本次分离到的 O46、O32 & O93 混合型及 O60 & O93 混合型是鸭群中还

表 3 鸭源大肠杆菌毒力基因的 PCR 检测结果

Table 3 The virulence genes detected by PCR of *E. coli* isolates from duckling

毒力基因 The virulence genes	鸭大肠杆菌病分离株 Isolates from duckling with colibacillosis		临床健康鸭大肠杆菌分离株 Isolates from clinical healthy duckling fecal	
	菌株数 Count	百分比/% Percent	菌株数 Count	百分比/% Percent
	<i>fyuA</i>	86	41.0(86/210)	6
<i>irp2</i>	91	43.3(91/210)	7	25.0(7/28)
<i>fimC</i>	195	92.9(195/210)	26	92.9(26/28)
<i>papA</i>	205	97.6(205/210)	28	100(28/28)
<i>iss</i>	203	96.7(203/210)	26	92.9(26/28)
<i>fyuA, irp2</i>	86	41.0(86/210)	6	21.4(6/28)
<i>fimC, papA</i>	193	91.9(193/210)	26	92.9(26/28)
<i>fyuA, irp2, fimc, papA, iss</i>	79	37.6(79/210)	4	14.3(4/28)

没有报道过的血清型。在致病性试验中, 4 个优势血清型中的 32 个受试菌株均有较强致病性(高致病性菌株占 84.4%, 中等致病性菌株占 15.6%)。

### 3.2 *fimC* 和 *papA* 基因在鸭源 *E. coli* 中的分布及

### 其公共卫生意义

菌毛是 APEC 的一种重要致病因子, 有学者认为 I 型菌毛主要在 APEC 致病的第一阶段起作用<sup>[12-14]</sup>, P 型菌毛则是在细菌的进一步致病中起作

表4 不同血清型鸭大肠杆菌病分离株 HPI 检出率  
Table 4 Detection rate of HPI of different serotype  
*E. coli* isolated from duckling with colibacillosis

血清型 Serotypes	阳性比例 Positive ratio	血清型 Serotypes	阳性比例 Positive ratio
O93	9/33	O22	1/5
O78	24/28	O17	2/5
O92	18/23	O77	2/5
O76	2/8	O18	1/4
O9	1/7	O36	2/4
O51	3/7	O61	3/4
O142	4/7	O158	4/4
O149	0/7	O88	2/4
O21	1/6	O101	1/4
O79	1/6	O154	1/4
O137	5/6	O45	0/4
O60	0/6	其他	9/19

数据以“HPI 阳性菌株数/检测菌株数”形式给出

The data were presented in form of “the number of HPI positive isolates/number of isolates”.

用<sup>[14]</sup>。*fimC* 编码的蛋白 FimC 是 I 型菌毛生物合成过程中所必需的蛋白,是检测 I 型菌毛的标志;*papA* 编码的蛋白 PapA 则是 P 型菌毛的主要成分,是检测 P 型菌毛的标志,因而本研究选择 *fimC* 和 *papA* 作为鸭源 *E. coli* 分子流行病学检测的靶基因。检测结果显示,91.9%(193/210) 鸭大肠杆菌病分离株和 92.9%(26/28) 临床健康鸭大肠杆菌分离株同时具有 *fimC*(I 型菌毛)和 *papA*(P 型菌毛)基因,差异不显著。*fimC* 在临床健康鸭大肠杆菌分离株中有如此高的检出率,与王亚君等认为 *fimC* 几乎只存在于高致病力鸡 *E. coli* 中,可以作为高致病力鸡 *E. coli* 鉴定的标志基因的研究结果差异较大<sup>[15]</sup>。*papA* 基因在鸭大肠杆菌病分离株和临床健康鸭大肠杆菌分离株的检出率分别为 97.6%和 100%,远远高于 Dozois 等对鸡 *E. coli* 分离株的 *papA* 基因 44%的检出率<sup>[16]</sup>和 Delicato 等对鸡 *E. coli* 分离株的 *papA* 基因的检出率不足 20%<sup>[17]</sup>。一般认为 APEC 菌毛以 I 型菌毛为主,而 P 型菌毛分布很少,笔者的研究表明,I 型和 P 型菌毛在鸭源 *E. coli* 广泛存在,P 型菌毛基因的携带率显著高于其他宿主源 *E. coli*,而 P 菌毛主要见于尿道致病性 *E. coli* 的黏附素,能介导 *E. coli* 黏附于尿道上皮细胞,导致急性肾盂肾炎,多与人、狗及猪尿

道 *E. coli* 感染有密切关系<sup>[13]</sup>。P 型菌毛在鸭源 *E. coli* 中广泛存在的公共卫生意义值得关注,对鸭的致病机理值得进一步探讨。

### 3.3 *iss* 基因与鸭 *E. coli* 致病性的关系

血清耐受基因(Increased serum survival gene, *iss*)是决定 APEC 致病因素之一,*iss* 基因存在于 ColV 质粒上,编码的蛋白 Iss 属于外膜蛋白的一部分,与细菌抗补体作用有关,而补体抗性又与毒力高度相关,是重要的致病因素<sup>[18]</sup>。已有资料表明鸡致病性 *E. coli* 的 *iss* 检出率显著高于临床健康鸡分离的 *E. coli*,如 Pfaff-McDonough 等报道鸡致病性 *E. coli* 中 *iss* 检出率为 78.7%,健康鸡粪样中 *E. coli* 分离株的 *iss* 检出率仅为 18.7%<sup>[19]</sup>。Delicato 等报道鸡致病性 *E. coli* 中 *iss* 检出率为 38.5%,健康鸡粪样中分离的 *E. coli* 的 *iss* 检出率为 16%<sup>[17]</sup>。本研究鸭大肠杆菌病分离株和临床健康鸭大肠杆菌分离株的 *iss* 检出率相近,分别高达 96.7%和 92.9%,显著高于鸡致病性 *E. coli* 和健康鸡源 *E. coli*,如此高的检出率及与致病能力的关系有待进一步研究。

### 3.4 HPI 毒力岛与鸭 *E. coli* 致病性

HPI 毒力岛是细菌重要的致病因素,也是 *E. coli* 的重要毒力因子,*fyuA* 和 *irp2* 是构成 HPI 的两个重要毒力基因,常常作为检测 HPI 是否存在的指示基因<sup>[20]</sup>。一些 *E. coli* 携带的 *irp2*、*fyuA* 与耶尔森氏菌几乎相同,表明 HPI 可在耶尔森氏菌和 *E. coli* 之间水平传播<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,鸭大肠杆菌病分离株 HPI 检出率为 43.3%,与金文杰等检测 216 株鸡致病性 *E. coli* 中有 44.9%的菌株携带有 HPI 相似<sup>[22]</sup>,显著高于断奶仔猪源大肠杆菌(12.8%)<sup>[23]</sup>、人肠产毒性大肠杆菌(14%)<sup>[24]</sup>、人产志贺样毒素 *E. coli* 菌(18.06%)<sup>[25]</sup>等菌株的 HPI 携带率。结合本研究结果,鸡、鸭源致病性 *E. coli* 的 HPI 检出率要高于人源和其他动物源性菌株。

HPI 在鸭源 *E. coli* 中分布较广,鸭大肠杆菌病分离株显著高于临床健康鸭大肠杆菌分离株,HPI 毒力岛的检出率与菌株的致病力呈明显的正相关,如 O78、O92、O93 和 O76 的 HPI 毒力岛的检出率分别为 85.7%、78.3%、27.3%和 25.0%,与其相对应的是对雏鸭感染的死亡率分别是 100%、87.5%、75%和 75%。同时,不同血清型鸭源 *E. coli* 携带 HPI 毒力岛的阳性率却存在很大差异,表明不同血清型菌株携带 HPI 的倾向性是不同的,如 O149 和 O60 检出率均为 0,而 O158 则 100%携带 HPI。

## 参考文献:

- [1] 陈前进,郭维植,曹春远,等. 5株产硫化氢大肠杆菌 O157 的分离鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志,2004,20(1):74-75.
- [2] SAIF Y M, BARNES H J, GLISSON J R, et al. Diseases of poultry [M]. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003:354-363.
- [3] BLANCO J E, BLANCO M, MORA A, et al. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (northwest Spain)[J]. Vet Microbiol, 1998, 61(3): 229-235.
- [4] 高 崧,刘秀梵,张如宽,等. 我国部分地区禽病原性大肠杆菌的分离与鉴定[J]. 畜牧兽医学报,1999,30(2):164-171.
- [5] 宋 立,宁宜宝,张秀英,等. 中国不同地区家禽大肠杆菌血清型分布和耐药性比较研究[J]. 中国农业科学,2005,38(7): 1 466-1 473.
- [6] VANDEKERCHOVE D, VANDEMAELE F, ADRIAENSEN C, et al. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks[J]. Vet Microbiol, 2005, 108(1-2):75-87.
- [7] KAWANO M, YAGUCHI K, OSAWA R. Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan [J]. Microbiol Immunol, 2006,50(12):961-966.
- [8] RITCHIE J M, THORPE C M, ROGERS A B, et al. Critical role for stx2, eae and tir in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced diarrhea and intestinal inflammation in infant rabbits[J]. Infection and Immunity, 2003,7 129-7 139.
- [9] ROSENBERGER J K, FRIES P A, CLOUD S S, et al. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. II. Factors associated with pathogenicity[J]. Avian Dis, 1985,29:1 094-1 107.
- [10] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等译. 第 3 版. 北京:科学出版社,2002.
- [11] 房 海. 大肠埃希氏杆菌[M]. 石家庄:河北科学技术出版社,1997.
- [12] DOZOIS C M, POURBAKHS S A, FAIRBROTHER J M. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry [J]. Vet, Microbiol, 1995,45:297-309.
- [13] VIDOTTO M C, NAVARRO H R, GAZIRI L C. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli* [J]. Vet Microbiol, 1997,59:79-87.
- [14] DOZOIS C M, CHANTELOUP N, DHO-MOULIN M, et al. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1 (type1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli* [J]. Avian Dis, 1994, 38:231-239.
- [15] 王亚君,樊 琛,李一经. *fimC* 基因与鸡源大肠杆菌致病性的相关[J]. 畜牧兽医学报,2004,35(6),680-684.
- [16] DOZOIS C M, FAIRBROTHER J M, HAREL J, et al. Pap- and pil- related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys [J]. Infect Immun, 1992, 60: 2 648-2 656.
- [17] DELICATO E R, DE BRITO B G, GAZIRI L C J, et al. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis[J]. Vet Microbiol, 2003, 94: 97-103.
- [18] NOLAN L K, WOOLEY R E, BROWN J, et al. Comparison of a complement resistance test, a chicken embryo lethality test, and the chicken lethality test for determining virulence of avian *Escherichia coli* [J]. Avian Dis, 1992, 36(2):395-397.
- [19] PFAFF-McDONOUGH S J, HORNE S M, GIDDINGS C W, et al. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis [J]. Avian Dis, 2000, 44(1): 23-33.
- [20] CAMIEL E. The Yersinzoo high-pathogenicity island: an iron-uptake island [J]. Microbes Arid Infection, 2001, 3(7):561-569.
- [21] RAKIN A, URBITSCH P, HEESEXNAINN J. Evidence for two evolutionary lineages of highly pathogenic Yersinzoo species [J]. J Bruteriol, 1995,177(9): 2 292- 2 298.
- [22] 金文杰,郑志明,秦爱建,等. 禽致病性大肠杆菌中耶尔森菌强毒力岛的分子流行病学调查[J]. 中国兽医科学,2006,36(10):787-790.
- [23] 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[J]. 微生物学报,2006,46(3):368-372.
- [24] 张冬梅,俞守义,唐根富. 中国肠产毒性大肠杆菌中耶尔森菌强毒力岛的检测[J]. 中国人兽共患病杂志,2003,19(1):78-81.
- [25] 程伯鲲,叶长芸,徐建国,等. 肠产志贺样毒素的大肠杆菌菌株中小肠结肠炎耶尔森菌毒力岛基因 *irp-2* 的检测[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2000,20(6): 489-492.