

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2012.08.06

林麝肺源致病性大肠杆菌分离鉴定及毒力基因 PCR 检测

罗 燕^{1**}, 王 朋^{1*}, 赵洪明², 冯亚文³, 武革利², 程建国⁴, 邹立扣¹,
康纪平⁴, 马炳存¹, 李 蓓¹

(1. 四川农业大学 都江堰校区微生物学实验室, 四川 都江堰 611830; 2. 石家庄市动物疫病预防控制中心, 河北 石家庄 050000;
3. 河北省兽药监察所, 河北 石家庄 050000; 4. 四川养麝研究所, 四川 都江堰 611830)

摘 要: 为鉴定引起林麝肺炎的病原, 本研究采用常规鉴定方法和 16S rRNA PCR 方法从 94 份患肺炎的林麝肺组织病料中分离鉴定出 30 株大肠杆菌(*E. coli*)分离株。小白鼠感染试验表明, 30 个分离株均为致病性 *E. coli*, 对小白鼠的致死率为 100%。通过 PCR 方法检测这 30 株林麝肺源致病性 *E. coli* 分离株的 10 种毒力基因结果表明, 其中 *ompA* 毒力基因检出率为 80%, 显著高于其 *sat* (36.67%)、*vat* (26.67%) 和 *iucD*^a (23.33%); 而 *neuC*、*sitD ep.^a*、*sfa/focCD*、*afa/draB*、*iha* 和 *sitD chr.* 毒力基因的检出率均为阴性。结果提示结合常规鉴定方法, 16S rRNA PCR 可作为临床快速检测林麝肺源致病性 *E. coli* 的有效方法。对林麝肺源致病性 *E. coli* 毒力基因的检测及鉴定, 为进一步研究林麝肺源致病性 *E. coli* 的致病机理奠定了基础, 同时为防治林麝 *E. coli* 性肺炎提供了依据。

关键词: 林麝; 肺部致病性大肠杆菌; 16S rRNA; 毒力基因

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2012)08-0615-04

Isolation and identification of lung pathogenic *Escherichia coli* from musk deer and PCR detection of the virulence genes

LUO Yan^{1**}, WANG Peng^{1*}, ZHAO Hong-ming², FENG Ya-wen³, WU Ge-li², CHENG Jian-guo⁴,
ZOU Li-kou¹, KANG Ji-ping⁴, MA Bing-cun¹, LI Bei¹

(1. Laboratory of Microbiology, Dujiangyan Campus Sichuan Agricultural University, Dujiangyan 611830, China;
2. Shijiazhuang Animal Disease Control Center, Shijiazhuang 050000, China;
3. Hebei Institute of Veterinary Drug Control, Shijiazhuang 050000, China;
4. Sichuan Institute of Musk Deer Breeding, Dujiangyan 611830, China)

Abstract: To identify the pathogen which caused serious pneumonia in musk deer, a total of 30 *Escherichia coli* isolates were isolated from 94 lung tissue samples of affected forest musk deer and identified by bacteria characteristics and 16S rRNA PCR methods. All of the 30 isolates were pathogenic to mice, resulting in 100% mortality. Furthermore, ten virulence gene detection results showed that positive rate of *ompA* (80%) was higher than that of *sat* (36.67%), *vat* (26.67%) and *iucD* (23.33%), but no *neuC*, *sitD ep.^a*, *sfa/focCD*, *afa/draB*, *iha* and *sitD chr.* were detected in the isolates. The results demonstrated that 16S rRNA PCR could be used as a rapid method to detect lung pathogenic *E. coli* (LPEC) in forest musk deer, and the virulence gene detections of the LPEC would facilitate for further study of pathogenesis in forest musk deer, which provided basis on the disease prevention.

Key words: forest musk deer; lung pathogenic *Escherichia coli*; 16S rRNA; virulence factor

*Corresponding author; Equal contributors

收稿日期: 2012-01-23

基金项目: 四川省教育厅青年基金项目(11ZB063); 四川省科技厅科技支撑项目(2009SZ0228)

共同第一作者: 罗 燕(1974-), 女, 四川安岳人, 副教授, 博士, 主要从事微生物与分子生物学研究;
王 朋(1988-), 男, 山东聊城人, 硕士研究生, 主要从事微生物与分子生物学研究。

* 通信作者: E-mail: lycjg@163.com

林麝为国家一级保护动物,其麝香为传统的名贵中药材和高级动物香料,具有重要的经济价值^[1]。自1953年以来,我国开展了人工养麝保护及利用麝资源的研究,尽管人工养麝取得了一定的进展,但仍然没有形成规模化养殖,其中一个很重要的因素是受到林麝肺炎的制约。大肠杆菌(*E. coli*)是引起林麝肺炎的致病原之一^[2-3]。目前,对该病原的检测和鉴定仍然为传统检测方法,尚未有林麝致病性 *E. coli* 16S rRNA 分子鉴定的报道。

E. coli 一般分为共生性非致病 *E. coli*, 肠道致病性 *E. coli* 和肠外致病性 *E. coli* 3 大类。目前致病性 *E. coli* 研究较多的为肠外致病性 *E. coli*^[4]。致病性 *E. coli* 之间存在较大的基因差异性,其中包括许多毒力基因编码的毒力因子,如:粘附素类、毒素类、摄铁因子类、血清抗性、侵袭类及其他毒力因子^[5]。目前尚未见林麝肺源致病性 *E. coli* (Lung pathogenic *E. coli*, LPEC)毒力因子的研究报道。

本研究通过传统方法和 16S rRNA 分子鉴定方法从患严重肺炎的林麝肺组织病料中分离到 30 株 *E. coli* 分离株,而且属于致病性 *E. coli*,并对其粘附素类(*afa/draB*、*iha*、*sfa/focCD*)、铁转运系统类(*sitD ep.a*、*sitD chr.*、*iucD a*)、血清类(*neuC*、*ompA*)和毒素类(*sat*、*vat*)4 大类毒力基因进行了检测,鉴定结果显示这些 *E. coli* 分离株属于 LPEC。该研究为林麝 *E. coli* 的致病机理研究及其疾病防治奠定基础。

1 材料和方法

1.1 病料 从四川省都江堰市白沙养麝场和马尔康养麝场采集的 94 份患肺炎的林麝病料。

1.2 主要试剂 高保真 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPS、DNA Marker (DL2000)、TIANamp 细菌基因组 DNA

提取试剂盒均购自天根生物有限公司。

1.3 培养基和生化反应管 伊红-美兰培养基(EMB)、胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)均购自杭州微生物试剂有限公司;糖发酵管(包括乳糖、蔗糖、麦芽糖、葡萄糖和甘露醇)、葡萄糖蛋白胨水培养基(甲基红 M.R.和伏-普 V-P 试验)、蛋白胨水培养基(吡啶试验)和枸橼酸盐利用培养基均购自杭州微生物试剂有限公司。

1.4 实验动物 3 周龄昆明小鼠 62 只,体质量为 20 g~22 g,雌雄各半,购自四川大学实验动物中心。

1.5 引物的设计与合成 16S rRNA 扩增通用引物: 27 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492 R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')。10 种毒力因子扩增引物参照文献[5-8]报道的序列合成,其中 4 个主要毒力基因扩增片段大小见表 1。由上海生物工程技术有限公司合成。

1.6 细菌的分离 对采集的 94 份林麝肺脏病料,划线接种于伊红-美兰培养基上,于 37 °C 恒温培养 16 h,挑单个具有金属光泽菌落革兰氏染色镜检,并于胰蛋白胨大豆肉汤培养基上增菌。

1.7 分离菌株的生化试验 将分离菌株划线接种于胰蛋白胨大豆琼脂培养基上的,挑取纯菌落分别接种于 5 种糖(葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖和甘露醇)生化管、葡萄糖蛋白胨水培养基、蛋白胨水培养基和枸橼酸盐培养基中,按照杭州微生物试剂有限公司生化反应使用说明培养。根据《伯杰氏细菌鉴定手册》第 8 版标准判定试验结果^[9]。

1.8 分离菌株的小白鼠致病性试验 供试验的小白鼠,实验前禁食、禁水 24 h。试验小鼠腹腔接种分离菌液 0.2 mL/只(2×10^9 cfu)。对照组注射同体积的无菌生理盐水。接种后对各组小鼠的发病和死亡情况进行统计。

1.9 分离菌株的 16S rRNA PCR 鉴定 以 TIANamp

表 1 林麝肺源致病性 *E. coli* 毒力基因扩增引物
Table 1 PCR primers of LPEC virulence gene amplifications

毒力因子 Virulence gene	引物序列 Primer sequence (5' to 3')	产物大小 /bp Product size (bp)	退火温度 /°C Annealing Temperature/°C
<i>afa/draB</i> 粘附素 / 特异性抗原粘附素	F: TAAGGAAGTGAAGGAGCGTG R: CCAGTAACTGTCCGTGACA	810	58
<i>iha</i> 铁调节基因同源粘附素	F: TAGTGC GTTGGGTTATCGCTC R: AAGCCAGAGTGGTTATTCGC	609	58
<i>sfa/focCD</i> S 菌毛和 FIC 菌毛	F: GTCCTGACTCATCTGAAACTGCA R: CGGAGA AACTGGGTGCATCTTA	1242	59
<i>iucD</i> 肠杆菌素综合体	F: ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC R: CCTGATCCAGATGATGCTC	714	57

细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取的细菌分离株 DNA 为模板, 采用通用引物 27 F 和 1492 R 进行 PCR 扩增。扩增反应程序: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 1 min, 30 次循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶检测。回收的 PCR 产物由上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.10 分离菌株 10 种毒力基因的 PCR 检测 分别提取各分离株 DNA 作为模板进行毒力基因 PCR 检测。PCR 体积 25 μL, 扩增反应程序: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s、退火 30 s (10 种毒力基因的退火温度见表 1)、72 °C 延伸 3 min, 25 次循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结 果

2.1 细菌分离和生化试验 通过伊红 - 美兰培养基的筛选, 从 94 份病料中分离出 *E. coli* 30 株, 革兰氏染色均为阴性。经葡萄糖、乳糖、甘露醇、蔗糖和麦芽糖发酵试验及 M.R.、V-P、吲哚和枸橼酸盐利用共 9 项生化试验鉴定, 分离的 30 株细菌大部分符合 *E. coli* 的典型生化特征, 仅有个别分离菌株不符合 *E. coli* 的典型生化特征。

2.2 分离菌株对小白鼠的致病力 小鼠在接种后先后表现出不同程度的精神萎靡, 食欲降低, 毛被散乱, 此外还表现出抽搐, 颤抖等神经症状。阴性对照组小鼠无异常症状。各感染组小鼠在感染后 3 d ~ 7 d 陆续出现死亡, 小白鼠死亡率达到 100%。死亡小鼠剖检后病变主要为: 肺脏、心脏、肾脏均有不同程度的肿大或出血, 肺部切面暗红色, 偶见小

化脓斑点。小肠有明显的肠腔积液及粘连。实验组受检小鼠肺脏、肾脏以及心脏活菌分布基本一致, 脏器中细菌回归检测, 阳性率为 100%。经 *t* 检验, 肺脏带菌率显著高于其他脏器 ($p < 0.01$)。

小白鼠致病试验表明 30 株林麝 *E. coli* 均能够引起小白鼠出现明显的临床症状和实质器官的病理变化, 同时从小白鼠实质器官中能分离到 *E. coli*。鉴定结果表明, 这 30 株为致病性 *E. coli*。

2.3 分离菌株的 16S rRNA PCR 分子鉴定 30 株分离菌株经 16S rRNA 特异性引物进行 PCR 扩增均能够出现一条约 1.6 kb 的片段, 部分电泳图谱见图 1。其测序结果与 GenBank 中已知的 *E. coli* 16S rRNA 序列进行比对, 同源性达到 97% ~ 99%, 16S rRNA 鉴定结果表明 30 株分离菌株为 *E. coli*。

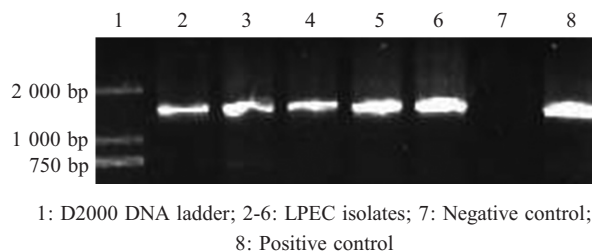


图 1 林麝 LPEC 分离株的 16S rRNA 电泳结果
Fig.1 Identification of LPEC isolates by 16S rRNA PCR amplifications

2.4 分离菌株 10 种毒力因子的 PCR 检测 30 株林麝 LPEC 中, *ompA* 毒力基因检出率为 80%, 远远高于其他毒力基因, 如 *sat* (36.67%)、*vat* (26.67%) 和 *iucD^a* (23.33%); 而 *neuC*、*sitD ep.^a*、*sfa/focCD*、*afa/draB*、*iha* 和 *sitD chr.* 毒力基因的检出率均为阴性 (0/30)。林麝 LPEC 的毒力因子检测结果见表 2。

表 2 林麝肺部致病 *E. coli* 10 种毒力因子检测结果

Table 2 Detected results of 10 virulence factors of 30 LPEC isolates in musk deer

菌株 Numbers of Isolates	粘附素 Adhesins			铁转运系统 Iron acquisition			血清抗性 Serum resistance		毒素类 Toxins	
	<i>afa/draB</i>	<i>iha</i>	<i>sfa/focCD</i>	<i>iucD^a</i>	<i>sitD chr.</i>	<i>sitD ep.^a</i>	<i>neuC</i>	<i>ompA</i>	<i>vat</i>	<i>sat</i>
1 ^a	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
1 ^b	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
1 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1 ^d	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
3 ^a	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
3 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
6	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Posifive rate	0/30	0/30	0/30	7/30	0/30	0/30	0/30	24/30	8/30	11/30

注: "1^a、1^b、1^c、1^d、2、3^a、3^b、4、6 和 8" 分别代表 10 种毒力基因检测结果相同的分离菌株数目。

Note: "1^a、1^b、1^c、1^d、2、3^a、3^b、4、6 和 8" stand for numbers of isolates with the same virulent gene, respectively.

3 讨 论

本研究中细菌初期分离阶段,使用麦康凯培养基筛选 *E. coli*,但发现长出的桃红色菌落并非全部为 *E. coli*,所以后期筛选 *E. coli* 选用了伊红-美兰培养基,减少了假阳性现象的出现。30株患肺炎林麝病料中分离菌株的生化试验结果大部分符合 *E. coli* 典型生化特征,仅有个别菌株的生化试验出现不符合的情况。

本研究将30个分离菌株通过16S rRNA PCR扩增,所得到的序列在GenBank中比对,结果显示与GenBank中 *E. coli* 16S rRNA的同源性达到97%~99%。据报道凡是16S rRNA序列的同源性大于97%便可认为是同一种^[10-11]。结合16S rRNA PCR分子鉴定结果和生化鉴定的结果,可将30个分离菌株鉴定为 *E. coli*。本研究为临床快速检测林麝 *E. coli* 的提供了依据。

由于林麝是国家一级保护动物,规定不允许作为实验动物,因此选取了实验动物小白鼠。采用腹腔注射的途径。实验结果表明,分离株对小鼠具有致死性。

E. coli 的致病性与毒力因子关系密切。*E. coli* 毒力因子种类繁多。毒力因子的存在决定了所致疾病的种类和严重程度^[5,12],本研究对临床分离的30株林麝 LPEC 用 PCR 方法进行了10种毒力因子相关基因的检测。结果表明,从30株林麝肺 LPEC 分离菌株中检测到24株菌具有 *ompA* 基因,表明 *ompA* 基因在林麝 LPEC 肺炎的致病中同样起着重要的作用。但在这些分离菌株中却未能检测出 *neuC*、*sitD* *ep.a*、*sfa/focCD*、*afa/draB*、*iha* 和 *sitD chr*。这6种毒力基因,而据 Ewers 报道,这6种毒力基因在尿道致病性 *E. coli* (UPEC)、禽致病型 *E. coli* (APEC)、新生儿脑膜炎 *E. coli* (NMEC)均有一定的检出率^[5]。林麝 LPEC 部分毒力基因与其他已报道的肠外致病性 *E. coli* 毒力基因表现出较大的差异性,这是由于种属特异性还是毒力基因进化造成,尚待进一步的研究。林麝 LPEC 毒力基因的研究,为进一步了解林麝 LPEC 病的致病机理奠定了基础,同时为开发相关疫苗,防治林麝 LPEC 性肺炎提供了依据。

参考文献:

- [1] 汪松. 中国濒危动物红皮书[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 237-240.
- [2] 崔恒敏, 蔡永华. 家养林麝大肠杆菌病的病理学观察[J]. 中国兽医科技, 1996, 26(9): 34-35.
- [3] 唐捷, 刘文华, 王永奇. 大肠杆菌引起林麝死亡的初步研究[J]. 特产研究, 2009, 1: 23-24.
- [4] Russo T A, Johnson J R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC [J]. J Infect Dis, 2000, 181: 1753-1754.
- [5] Ewers C, Wilkinga H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? [J]. Intern J Med Microbiol, 2007, 297: 163-176.
- [6] Janssen T, Schwarz C, Preikschat P, et al. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis [J]. Intern J Med Microbiol, 2001, 291: 371-378.
- [7] Watt S, Lanotte P, Mereghetti L, et al. *Escherichia coli* strains from pregnant women and neonates: intraspecies genetic distribution and prevalence of virulence factors [J]. J Clin Microbiol. 2003, 41: 1929-1935.
- [8] Ewers C, Janssen T, Kiessling S. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry [J]. Vet Microbiol, 2004, 104: 91-101.
- [9] Buchanan R R, Gibbons N E. Bergey's Manual of determinative bacteriology, eighth [M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1974, 385-389.
- [10] 师福山, 赵德明. 禽大肠杆菌的分离鉴定和16S rRNA的鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(2): 111-113.
- [11] 李永峰, 任南琪, 杨传平, 等. 16S rDNA 测序快速鉴定废水生物处理系统目标细菌[J]. 哈尔滨工程大学学报, 2005, 26(6): 806-810.
- [12] 徐春泉, 周翠, 徐琦煜, 等. 大肠埃希菌毒力因子检测及其与耐药相关性研究[J]. 疾病检测, 2010, 25(7): 542-546.

(本文编辑: 赵晓岩)