

禽大肠杆菌 I 型菌毛鉴定方法的初步研究

许 静¹ 王 涛^{2*}

1.江苏省盱眙县动物卫生监督所,江苏盱眙 211700;2.江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300

摘要 禽大肠杆菌 I 型菌毛的表达和检测在禽大肠杆菌的发病机理和流行病学研究中至关重要。本试验运用麦康凯琼脂平板从临床样品中分离鉴定了 21 株禽大肠杆菌,对这些菌株进一步采用血凝/血凝抑制试验和 PCR 2 种方法检测其 I 型菌毛。检测结果显示:血凝/血凝抑制试验对待检菌株中 I 型菌毛的检出率为 85% (18/21),而运用 PCR 方法的检出率为 90% (19/21)。表明运用 PCR 方法检测 I 型菌毛的检出率比 MSHA 法更加敏感、快速,特异性强。

关键词 大肠杆菌;I 型菌毛;甘露糖敏感血凝试验;聚合酶链式反应;鉴定方法

禽大肠杆菌 I 型菌毛是禽源致病性大肠杆菌的相关毒力因子,在致病过程中介导细菌吸附于禽呼吸道黏膜上皮细胞,完成入侵的第一步,也是最重要的一步。禽大肠杆菌病的发生与菌毛的粘附作用有很大关系。一般认为,菌毛可粘附于鸡呼吸道的上皮,通过这种粘附,细菌得以定居,从而获得侵袭的通道^[1-3]。因此,禽大肠杆菌 I 型菌毛的表达与检测,在禽大肠杆菌病的发病机理和流行病学研究中显得至关重要^[4]。

1 材料与方法

1.1 材 料

1)样品。从盱眙县农贸市场健康家禽(其中鸡 5 只、鸭 5 只、鹅 2 只)中无菌采集小肠肠道内容物,经麦康凯琼脂平板分离培养。将经麦康凯琼脂平板分离到的大肠杆菌菌株分别命名为 C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、d₁、d₂、d₃、d₄、d₅、g₁、g₂。其它大肠杆菌菌株(分别命名为 1294、C₆₀₀、C₁₂₁₄₋₇₇、O₇₈F1⁺(5)、A₁、A₂、A₃、A₄、B₄)为扬州大学兽医学院微生物教研室提供,1294 为人工构建的表达 I 型菌毛操纵子全基因 DH5 α 大肠杆菌,大肠杆菌 C₆₀₀、C₁₂₁₄₋₇₇、O₇₈F1⁺(5)、A₁、A₂、A₃、A₄ 及 B₄ 为表达 I 型菌毛大肠杆菌致病菌株。

2)培养基。LB 培养基(胰蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、氯化钠 10 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 7.2)。

3)主要试剂。PBS 液,0.1%甘露糖-PBS 液,1%豚鼠红细胞,Taq DNA 聚合酶,10 \times buffer (Mg²⁺), dNTPs, 超纯水,10 \times Loading buffer, DL2000 (Marker), 溴化乙锭, TAE 电泳缓冲液。

1.2 病料的采集与分离

临床上尽量无菌采集小肠肠道内容物,经麦康凯琼脂平板分离培养。

1.3 纯培养

将临床分离的大肠杆菌挑取单个菌落划线接种至 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 恒温箱培养 24 h。

1.4 血凝与血凝抑制试验

1)甘露糖敏感的血凝试验(MSHA)。将待检菌株用 0.05 mol/L PBS (pH 7.4) 制备成细菌悬液,取细菌悬液与 1%豚鼠红细胞各一滴,滴在凝集反应板上混匀,立即观察。产生凝集判断为阳性,不凝集判断为阴性。

2)抗甘露糖血凝试验(MRHA)。将待检菌株用 0.1%甘露糖-PBS 制备成细菌悬液,取细菌悬液与 1%豚鼠红细胞各一滴,滴在凝集反应板上混匀,立即观察。产生凝集判断为阳性,不凝集判断为阴性。

收稿日期:2014-05-05

* 通讯作者

许 静,男,1971 年生,本科,兽医师。

表 1 大肠杆菌甘露糖敏感的血凝试验结果

被检细菌	1294	C ₆₀₀	C ₁₂₁₄₋₇₇	O ₇₈ F1*(5)	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	B ₄	g ₁	g ₂	d ₁	d ₂	d ₃	d ₄	d ₅	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
PBS	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	-	++	++	++	+	++	++	-	++	++	-

注：“++”表示强阳性、“+”表示阳性、“-”表示阴性。下同。

表 2 大肠杆菌抗甘露糖血凝试验结果

被检细菌	1294	C ₆₀₀	C ₁₂₁₄₋₇₇	O ₇₈ F1*(5)	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	B ₄	g ₁	g ₂	d ₁	d ₂	d ₃	d ₄	d ₅	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
0.1%甘露糖 -PBS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1.5 多聚酶链式反应(PCR)鉴定

1)引物的设计合成。根据 GenBank 已发表禽大肠杆菌 I 型菌毛 *FimH* 序列设计一对引物如下,上游引物 Up*FimH*:ATGAAACGAGTTATTACCCTGTT,下游引物 Lo*FimH*:CGCCAATAATCGATTGCA-CATT;引物由上海基康生物技术有限公司合成。

2)模板 DNA 的制备。将细菌接种于 3 mL 的 LB 培养液中,37 °C 摇床培养过夜;取 1 mL 培养后的菌液于 1 个指形管中,于离心机中以 10 000 r/min 的转速离心 2 min,弃去上清液,取其沉淀;在沉淀中加入超纯水 1 mL,将沉淀悬浮;再次以 10 000 r/min 的转速离心 2 min,同样弃去上清取其沉淀;再加 300 μL 超纯水,将沉淀悬浮;隔水煮沸 6 min,使细菌裂解释放出 DNA;再离心,取其上清液于 1 个指形管中,作为 DNA 模板。

3)PCR 扩增体系。10 × buffer (5 μL),dNTPs (1 μL),Up*FimH* (1 μL),Lo*FimH* (1 μL),DNA 模板(5 μL),超纯水(36.5 μL),*Taq* 酶(0.5 μL)。

4)PCR 程序。94 °C 预变性 3 min;94 °C 1 min,53 °C 1 min,72 °C 1 min,共 25 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。

5)琼脂糖凝胶电泳。21 种样品扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,EB 染色,用凝胶成像系统照像,观察结果。

2 结果与分析

2.1 甘露糖敏感的血凝试验结果

将 21 株大肠杆菌菌株做甘露糖敏感的血凝试验,结果表明,21 株菌株中 18 株为阳性(其中 16 株为强阳性),3 株为阴性。具体结果见表 1。

2.2 抗甘露糖血凝试验结果

将 21 株大肠杆菌菌株做抗甘露糖血凝试验,结果全部为阴性。具体结果见表 2。

2.3 多聚酶链式反应结果

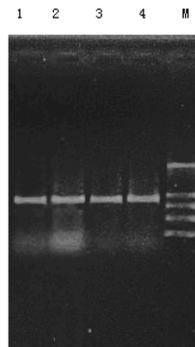
根据 GenBank 已发表的禽大肠杆菌 *fimH* 基因

序列设计引物,目的片断约 893 bp,PCR 扩增结果表明:21 个被检样品中,其中 19 个样品在 893 bp 附近出现一条清晰亮带,大小均一,与预计大小一致。阳性检出率为 90%。具体结果见图 1~ 图 4。

2.4 不同检测方法的结果比较

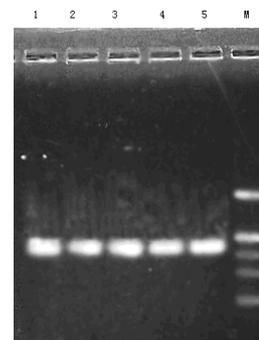
本试验用甘露糖敏感血凝试验 / 抗甘露糖血凝试验和 PCR 扩增法对 21 株禽大肠杆菌进行 I 型菌毛检测,结果显示:大多数禽大肠杆菌都产生 I 型菌毛。具体结果见表 3。

从表 3 可以看出,MSHA/MRHA 试验的阳性检出率为 85%,而 PCR 方法的检出率为 90%。说明在检测方法上,PCR 扩增法比 MSHA/MRHA 法更加敏感、快速,特异性更强。



1: *E. coli* 1294; 2: *E. coli* C₆₀₀; 3: *E. coli* C₁₂₁₄₋₇₇; 4: *E. coli* O₇₈F1*(5); M: Mark(DL2000).

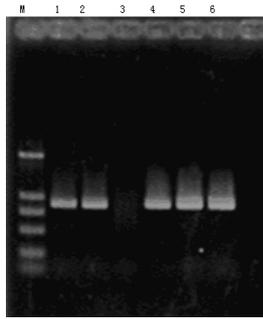
图 1 *fimH* 基因的 PCR 扩增产物



1: *E. coli* A₁; 2: *E. coli* A₂; 3: *E. coli* A₃;

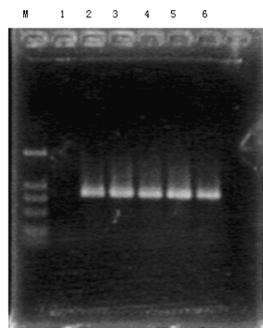
4: *E. coli* A₄; 5: *E. coli* B₄; M: Mark(DL2000).

图 2 *fimH* 基因的 PCR 扩增产物



M:Mark(DL2000);1: *E.coli* g₁;2: *E.coli* c₁;3: *E.coli* c₂;
4: *E.coli* c₄;5: *E.coli* d₁;6: *E.coli* d₂.

图 3 *fimH* 基因的 PCR 扩增产物



M:Mark(DL2000);1: *E.coli* g₂;2: *E.coli* d₃;3: *E.coli* d₄;
4: *E.coli* d₅;5: *E.coli* c₃;6: *E.coli* c₅.

图 4 *fimH* 基因的 PCR 扩增产物

表 3 MSHA 试验与 PCR 扩增结果对比

菌株	MSHA	PCR	菌株	MSHA	PCR
1294	+	+	d ₁	+	+
C ₆₀₀	+	+	d ₂	+	+
C ₁₂₁₄₋₇₇	+	+	d ₃	+	+
O ₇₈ F1*(5)	+	+	d ₄	+	+
A ₁	+	+	d ₅	+	+
A ₂	+	+	c ₁	+	+
A ₃	+	+	c ₂	-	-
A ₄	+	+	c ₃	+	+
B ₄	+	+	c ₄	+	+
g ₁	+	+	c ₅	-	+
g ₂	-	-			

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。

3 讨论

目前，禽大肠杆菌 I 型菌毛的检测常采用玻板 O 抗原凝集试验、免疫荧光技术、酶联免疫吸附试验、甘露糖敏感血凝试验等。其中，玻板 O 抗原凝集

方法简易，无需特殊设备，但敏感度较低，尤其在菌液中非菌毛化细菌量过多或单因子血清效价不高时，易出现不完全凝集或假阴性，且结果判定具有主观性，直接影响结果的判定；免疫荧光技术和酶联免疫吸附试验都需要特殊的抗体标记技术，但检测方法繁琐，且测得的抗体水平与疫苗保护力之间相关性较差；甘露糖敏感血凝试验方便、快速、较为准确，但不敏感，有些无菌毛菌株可能因红细胞非特异性凝集呈假阳性^[9]。

甘露糖敏感血凝试验是对 I 型菌毛表现型的检测，而多聚酶链式反应是对 I 型菌毛基因型的检测。基因型检测结果为阳性的并不一定表现型检测也为阳性。本试验依据 I 型菌毛结构基因的保守区设计一对引物，对待检细菌进行 PCR 扩增，同时进行甘露糖敏感血凝试验对禽源致病性大肠杆菌 I 型菌毛进行检测，结果表明：菌株 c₅ MSHA 结果为阴性，而 PCR 结果为阳性。MSHA 试验阳性检出率为 85%，而 PCR 检出率为 90%。因为大肠杆菌即使有 I 型菌毛基因，由于培养条件等其他因素影响，不一定表达 I 型菌毛，所以导致甘露糖敏感血凝试验结果为阴性。这说明 MSHA 试验不太敏感，检出率低，而 PCR 方法更加准确，更加方便，特异性更强。

参 考 文 献

[1] NAVEH M W,ZUSMAN T,SKUTELSKY E,et al.Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: effect on pathogenicity [J].Avian Dis,1984,28:651-661.

[2] DOZOIS C M,FAIRBROTHER J M,HAREL J,et al.Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1(type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*[J].Avian Dis,1994,38(2):231-239.

[3] LA RAGIONE R M,COOLEY W A,WOODWARD M J.The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants[J].J Med Microbiol,2000,49:327-338.

[4] LA RAGIONE R M,SAYERS A R,WOODWARD M J.The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old-chick model [J].Epidemiol Infect,2000,124:351-363.

[5] 戴鼎盛,郑明珠,汪银才,等. 鸡大肠埃希氏菌菌毛分类方法的研究[J]. 中国兽医科技,2000,30(8):8-10.