

蔡 瑶,周雪珂,江朝源,等.猪肺源致病性大肠杆菌和化脓隐秘杆菌混合感染病原的分离鉴定及主要毒力因子的检测[J].江苏农业学报,2020,36(1):254-256.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2020.01.036

猪肺源致病性大肠杆菌和化脓隐秘杆菌混合感染病原的分离鉴定及主要毒力因子的检测

蔡 瑶¹, 周雪珂², 江朝源¹, 曾喻兵¹, 徐志文¹, 朱 玲¹

(1.四川农业大学动物医学院动物生物技术中心,四川 成都 611130; 2.四川大学生命科学学院,四川 成都 610064)

关键词: 猪; 肠外致病性大肠杆菌; 化脓隐秘杆菌; 分离鉴定; 混合感染; 毒力基因

中图分类号: S852.61⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2020)01-0254-03

Isolation and identification of mixed pathogens of pathogenic *Escherichia coli* and *Trueperella pyogenes* from pig lung and detection of main virulence factors

CAI Yao¹, ZHOU Xue-ke², JIANG Chao-yuan¹, ZENG Yu-bing¹, XU Zhi-wen¹, ZHU Ling¹

(1.Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, College of Veterinary Medicine of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2.College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Key words: pig; extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*; *Trueperella pyogenes*; isolation and identification; mixed infection; virulence gene

大肠杆菌是一种重要人畜共患病病原体,可感染人和多种动物,根据其对宿主寄生部位不同,划分为肠内致病性大肠杆菌和肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)^[1]。近几年来,国内外众多学者陆续报道了关于 ExPEC 的感染案例,指出其可特异性定植于宿主肠道外,使感染宿主发生不同程度的脑膜炎、败血症、泌尿道及呼吸道感染^[2]。目前在 ExPEC 中发现了多种毒力因子,包括与其致病性相关的毒力岛(PAI)、黏附素、侵袭素、毒素、表面抗原、铁摄取系统和分泌系统等^[3]。

化脓隐秘杆菌(*Trueperella pyogenes*,原名 *Arcanobacterium*

pyogenes)又名化脓放线菌或化脓棒状杆菌,为隐秘杆菌属(*Trueperella*)细菌。可以感染牛、羊、猪、林麝等重要经济动物,也可以感染人,是一种机会致病菌^[4]。化脓隐秘杆菌可在家畜间广泛传播,常引起感染动物化脓性肺炎及乳房炎、心内膜炎、关节炎、多发性淋巴结炎,甚至会造成宿主流产和不孕等,最严重时可引发脓毒败血症导致家畜死亡^[5]。目前已发现的化脓隐秘杆菌毒力因子有4类,分别为化脓隐秘杆菌溶血素(PLO)、胶原结合蛋白质(CbpA)、神经氨酸酶(Nan)及菌毛合成蛋白质(Fim)^[6]。

秋季早晚温差大,猪群发生呼吸道疾病的可能性增加,发病的原因也是多种多样,多数由细菌、病毒或寄生虫等感染,甚至由多种病原混合感染诱发^[7]。2018年10月,四川省蒲江地区某规模化养猪场部分猪只出现严重的呼吸道症状,包括仔猪、保育猪、母猪均有发病,具体表现为呼吸急促且伴随厚重的喘气声,耳部发绀,眼部、鼻腔部黏液增多,采食减少,体温升高,最后因呼吸衰竭而亡。采用常用细菌分离方法结合16S rRNA基因序列分析综合鉴定病原菌,分离出1株肠外致病性大肠杆菌和1株化脓隐秘杆菌。为详细了解细菌毒力情况,对这2种菌进行特异性毒力基因检测,同时选用常用抗生素对分离菌进行药敏试验,为临床用药提供依据。

收稿日期:2019-05-09

基金项目:四川省科技支撑计划项目(2015NZ0072);“十二五”农村领域国家科技计划课题(2015BAD12B04-2.3);“十三五”育种攻关计划项目(2016NYZ0052);国家农业产业技术体系四川兽药创新团队专项(CARS-SVDIP)

作者简介:蔡 瑶(1994-),女,四川成都人,硕士研究生,主要从事动物微生物与免疫学研究。(E-mail)172305334@qq.com;周雪珂为共同第一作者。

通讯作者:徐志文,(E-mail)abtexzw@126.com;朱 玲,(E-mail)abtczl72@126.com

1 材料和方法

1.1 样品来源

样品来源于四川省蒲江某猪场发病濒死保育猪,无菌采集病猪心脏、肺脏、肝脏及肺门淋巴结、脾脏备用。

1.2 细菌 *16S rRNA* 基因的扩增及系统发育树构建

细菌基因组 DNA 的提取按试剂盒说明书进行。细菌 *16S rRNA* 通用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, *F-16S rRNA* 为 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', *R-16S rRNA* 为 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3', 预期扩增长度为 1 465 bp。反应体系(30 μ l): 上、下游引物各 0.5 μ l (20 μ mol/L), 细菌基因组 1.5 μ l (634 ng/ μ l), 2 \times Taq PCR MasterMix 15.0 μ l, ddH₂O 12.5 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。

PCR 产物用回收试剂盒回收片段, 与 pMD-19T 载体 16 $^{\circ}$ C 过夜连接, 之后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆后送至上海生物工程公司测序。将测序结果与 GenBank 数据库中已发表菌株序列进行比对分析。

1.3 分离株毒力因子的检测及测序

根据文献[8]~[10]所设计的 9 对肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)毒力基因 *papA*、*sfaS*、*focG*、*iutA*、*hlyD*、*afa*、*fyuA*、*ireA*、*vaT* 特异性引物, 同时根据 Zastempowska 等^[11]、徐凝等^[12]设计的 8 对化脓隐秘杆菌的毒力基因 *plo*、*nanH*、*nanP*、*cbpA*、*fimA*、*fimC*、*fimE*、*fimG* 特异性引物检测两种细菌的毒力基因, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。分别以大肠杆菌和化脓隐秘杆菌基因组为模板进行毒力因子的扩增, 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.4 药敏试验

参照 CLSI 标准^[13], 采用纸片扩散法测定两株菌对临床上常用抗生素的敏感情况, 测量抑菌圈的直径, 判定药敏试验结果。

2 结果与分析

2.1 分离株 *16S rRNA* 基因扩增结果及进化树分析

提取分离菌株 DNA, 用 *16S rRNA* 基因通用引物扩增出 1 465 bp 的目的片段, 测序后将结果与 GenBank 上已发表序列进行同源性分析。结果显示疑似大肠杆菌菌株(MS-1)与大肠杆菌 CP022959.1 同源性达 99% 且位于一个分支上, 疑似化脓隐秘杆菌菌株(MS-2)与化脓隐秘杆菌 CP007519.1 同源性达 99% 且位于一个分支上。确认分离到 1 株大肠杆菌和 1 株化脓隐秘杆菌, 且由于大肠杆菌是从患病猪的肺部病变区域中分出, 在病猪肠道并未发现明显的病变, 初步判定该大肠杆菌为肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)。

2.2 分离菌株毒力因子扩增结果

以大肠杆菌基因组为模板, 对 9 种毒力因子进行 PCR 检测, 结果扩增出 *iutA* (314 bp)、*fyuA* (787 bp) 基因, 未扩增

出 *papA*、*sfaS*、*focG*、*hlyD*、*afa*、*ireA*、*vaT* 基因; 以化脓隐秘杆菌基因组为模板, 对 8 种毒力因子进行 PCR 检测, 扩增出 *plo* (150 bp)、*nanH* (1004 bp)、*fimA* (605bp)、*fimC* (843bp)、*fimG* (929bp) 基因, 未扩增出 *nanP*、*cbpA*、*fimE* 基因。

2.3 药敏试验

分别对分离出的大肠杆菌和化脓隐秘杆菌进行常用抗生素的敏感性试验, 根据杭州天和微生物试剂有限公司的药敏试验纸片法抑菌范围解释标准进行药物敏感性判断, 结果显示两种菌对庆大霉素、头孢噻肟以及氟苯尼考均表现敏感。

3 讨论

根据发病情况、临床症状以及实验室常用细菌分离和 *16S rRNA* 基因序列测定结果, 结合之前实验室检测结果(未发现患病猪有寄生虫感染迹象, 且常见呼吸道病毒性疾病检测结果全部为阴性), 综合判定该猪场疫情由大肠杆菌和化脓隐秘杆菌混合感染造成。

有研究者认为, 从动物肠道以外的脏器中分离到的大肠杆菌均可判定为 ExPEC, 也有人提出可根据大肠杆菌携带的特定毒力基因种类和数量初步确定是否为 ExPEC^[14]。在本研究中, 我们从猪肺脏中分离出 1 株具有较强致病性的大肠杆菌, 通过基因检测发现该大肠杆菌具有 *iutA*、*fyuA* 2 种毒力基因, 综合判定其为肠外致病性大肠杆菌。*iutA* 是大肠杆菌代谢相关毒力基因, 是铁摄取蛋白系统中的一种基因, 对细菌的生存至关重要。*fyuA* 基因也参与铁的吸收, 是耶尔森强毒力岛(HPI)中的核心结构和功能基因, 与大肠杆菌毒力的进化密切相关^[3]。Jost 等^[4]研究结果表明, 化脓隐秘杆菌的毒力是由多种毒力因子决定的, 各类毒力基因具有协同作用, 并且细菌可以在不同宿主中差异表达各种毒力基因而引发不同的感染症状。本研究中分离出的化脓隐秘杆菌中检测出 8 种毒力基因中的 5 种(*plo*、*nanH*、*fimA*、*fimC*、*fimG*), 其中 *plo* 编码的溶血素(*plo*)是一种细菌外毒素, 能够裂解多种动物的红细胞、免疫细胞, 引起动物皮肤坏死最终死亡。神经氨酸酶 *nanH* 也具有多种毒力作用: 分解宿主唾液酸作为碳源提高自身在宿主的生存力; 降低细胞膜表面的黏滞性, 促进其对宿主细胞的感染力; 分解免疫球蛋白 IgA, 降低宿主防御能力。针对化脓隐秘杆菌菌毛合成蛋白质的研究还不够深入, 只知道其与细菌的黏附作用相关, 目前已报道的 4 种化脓隐秘杆菌菌毛合成蛋白质中, 本研究分离的菌株中含 3 种, 推测该菌可能具有较强的黏附性。

大肠杆菌是猪临床中较为常见的一种传染病原, 以往也有肠外致病性大肠杆菌引发猪肺炎的病例报道^[15], 而化脓隐秘杆菌感染的案例在林麝、牛、羊中报道的较多, 对猪感染的案例相对较少。但近年来, 国内报道从猪呼吸道疾病中分离出化脓隐秘杆菌的频率也逐年提高^[16-19]。在林麝^[20]、奶牛^[21-22]中有报道大肠杆菌会同化脓隐秘杆菌混合感染, 尤其是奶牛, 在大多数患有乳房炎和子宫炎的奶牛中都能分离出

大肠杆菌和化脓隐秘杆菌。但是,在猪呼吸道疾病中却几乎没有大肠杆菌同化脓隐秘杆菌混合感染的病例报道,本研究发现这2种细菌在猪中的混合感染,对今后猪病的研究具有较好的参考价值。Jost等^[4]在对机会致病菌化脓隐秘杆菌的研究中也发现,化脓隐秘杆菌不是具有实质致病潜力的细菌,往往同其他病原体共同感染导致宿主发病。Zerbe等^[21]和Bicalho等^[22]在大肠杆菌和化脓隐秘杆菌的毒力因子与奶牛子宫疾病的关系研究中发现,大肠杆菌感染后会抑制奶牛子宫中性粒细胞的功能,很有可能是大肠杆菌先感染奶牛子宫造成子宫内环境发生变化,从而给化脓隐秘杆菌提供适宜的生存条件,继发感染导致子宫内膜炎的加重和生殖功能衰竭。Wagener等^[23]研究发现并不是所有大肠杆菌都会促进化脓隐秘杆菌的感染,而只有肠外致病性大肠杆菌菌株(ExPEC)才能促进化脓隐秘杆菌感染。对小鼠的致病性研究结果表明,两种菌混合感染会相互加强毒力。而药物敏感性试验结果显示,两种菌对庆大霉素、头孢噻肟以及氟苯尼考均表现敏感,这3种药物对两种病原菌均可能具有较强的杀灭作用。

参考文献:

- [1] SMITH J L, FRATAMICO P M, GUNTHER N W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2007, 4(2): 134-163.
- [2] TAN C, TANG X, ZHANG X, et al. Serotypes and virulence genes of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from diseased pigs in China [J]. The Veterinary Journal, 2012, 192(3): 483-488.
- [3] 郭霞,孔令聪,刘树明,等. 动物源肠外致病性大肠杆菌毒力因子研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(5): 405-408.
- [4] JOST B H, BILLINGTON S J. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2005, 88(2): 87-102.
- [5] NANDANWAR N, JANSSEN T, KÜHL M, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) of human and avian origin belonging to sequence type complex 95 (STC95) portray indistinguishable virulence features [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2014, 304(7): 835-842.
- [6] 郭文洁,赵敬翠,刘耀川,等. 化脓隐秘杆菌毒力因子的研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2010(1): 52-53.
- [7] OPRIESSNIG T, GIMÉNEZ-LIROLA L G, HALBUR P G. Polymicrobial respiratory disease in pigs [J]. Animal Health Research Reviews, 2011, 12(2): 133-148.
- [8] JAKOBSEN L, SPANGHOLM D J, PEDERSEN K, et al. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 142(1/2): 264-272.
- [9] OBENG A S, RICKARD H, NDI O, et al. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry [J]. Veterinary Microbiology, 2012, 154(3/4): 305-315.
- [10] JOHNSON J R, STELL A L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2000, 181(1): 261-272.
- [11] ZASTEMPOWSKA E, LASSA H. Genotypic characterization and evaluation of an antibiotic resistance of *Trueperella pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*) isolated from milk of dairy cows with clinical mastitis [J]. Veterinary Microbiology, 2012, 161(1/2): 153-158.
- [12] 徐凝,刘琰,张明富,等. 牛化脓隐秘杆菌的分离及其主要毒力基因的PCR鉴定[J]. 中国兽医科学, 2013(2): 126-130.
- [13] 杨沙沙,王喜仁,韩杰. 美国 CLSI 抗菌药物敏感试验操作标准(2010年版)部分变更内容[J]. 中国感染控制杂志, 2010, 9(4): 303-304.
- [14] JAKOBSEN L, SPANGHOLM D J, PEDERSEN K, et al. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 142(1/2): 264-272.
- [15] 于雪,郭霞,张馨元,等. 一株致猪肺炎大肠杆菌的分离鉴定及其耐药表型、耐药基因型分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(23): 132-134.
- [16] 鲁杏华,何世成,谈志祥,等. 猪化脓隐秘杆菌的分离与鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(5): 149-152.
- [17] 张乐宜,蔡汝健,宋长绪. 猪化脓隐秘杆菌的分离鉴定及病原特性研究[J]. 动物医学进展, 2014(5): 44-49.
- [18] 齐新永,徐锋,张维谊,等. 猪化脓隐秘杆菌的分离鉴定[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2015(1): 30-31.
- [19] 董文龙,王家祯,朱世馨,等. 猪源化脓隐秘杆菌的分离鉴定及病理组织学观察[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2016, 34(3): 22-27.
- [20] 唐婕,李斐然,刘文华,等. 林麝肺部大肠杆菌和化脓隐秘杆菌混合感染的诊断[J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(7): 94-96.
- [21] ZERBE H, OSSADNIK C, LEIBOLD W, et al. Influence of *Escherichia coli* and *Arcanobacterium pyogenes* isolated from bovine puerperal uteri on phenotypic and functional properties of neutrophils [J]. Veterinary Microbiology, 2001, 79(4): 351-365.
- [22] BICALHO M L S, MACHADO V S, OIKONOMOU G, et al. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows [J]. Veterinary Microbiology, 2012, 157(1/2): 125-131.
- [23] WAGENER K, GRUNERT T, PRUNNER I, et al. Dynamics of uterine infections with *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* and *Trueperella pyogenes* in post-partum dairy cows and their association with clinical endometritis [J]. The Veterinary Journal, 2014, 202(3): 527-532.

(责任编辑:张震林)