樊 琛,程 霜,刘桂芹,等. 鸡大肠杆菌 iss 毒力基因研究进展[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):53 -54,128.

# 鸡大肠杆菌 *iss* 毒力基因研究进展

樊 琛,程 霜,刘桂芹,曾庆华,李 燕,王 会,孙小凡
(聊城大学农学院,山东聊城 252059)

**摘要:**鸡大肠杆菌病是由某些大肠杆菌的致病菌株引起的一种细菌性传染病,危害养殖业和食品安全。尽管大肠杆菌致病力是由多种毒力因子共同作用的,但近年对 *iss* 基因的研究结果表明,*iss* 基因可能在细菌致病力检测、蛋白免疫方面具有发展潜力。综述了鸡大肠杆菌发病机理、血清抗性、*iss* 基因等方面的最新研究进展。

**关键词:**鸡大肠杆菌;血清抗性;*iss* 基因

**中图分类号:**S852.61$^{+}$2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002 -1302(2014)08 -0053 -02

鸡大肠杆菌病是由某些大肠杆菌(*Escherichia coli*)的致病菌株引起的一种细菌性传染病,病型复杂,危害最大的是急性败血型[1-3]。某些菌株还会引起人畜禽共患传染病,危害养殖业和食品安全。大肠杆菌的毒力是由多种毒力因子共同作用的,包括黏附素、1 型菌毛、毒素、外膜蛋白、ColV 质粒、补体抗性、铁转运系统、宿主细胞表面改变因子等[4-9]。相关的毒力基因有上百个,如 *iss*(increased serum survival gene,血清抗性基因)、*tsh*(温度敏感血球凝集素)、*cvi*(ColV 操纵子的免疫性基因)、*fimD*、*fimF*、*fimG*、*fimH*、*gntP*、*uxaA* 等[7,10-12]。

## 1 鸡大肠杆菌毒力因素及发病机理

大肠杆菌的毒力由黏附素、1 型菌毛、毒素、外膜蛋白、ColV 质粒、补体抗性、铁转运系统、宿主细胞表面改变因子等多种毒力因子共同作用[4-9],多数研究集中于对鸡大肠杆菌 1 型菌毛的研究。正常机体的天然屏障具有抗病原微生物侵袭的能力,致病性大肠杆菌要发挥其致病作用,必须首先突破机体的天然屏障,即首先在局部吸附并定居繁殖,进而侵入体内。1 型菌毛对细菌在宿主中的起始增殖很重要,然而在细菌增殖达到一定水平后,在系统地进行感染前,1 型菌毛的表达就停止了。绝大多数 1 型菌毛由在气管、肺和气囊中增殖的细菌表达,而不是由那些在组织或血液中增殖的细菌表达[13-15]。细菌定居下来以后增殖形成集落(局部增殖),在条件适合时大肠杆菌从肺泡毛细血管进入血循环,引起菌血症,从而在全身组织内增殖,当机体抵抗力降低时,大肠杆菌大量繁殖引起败血症[5,13-15]。因此,进入血流是细菌发挥其致病作用的关键一步,一旦病原体获得到血流的通路,它将面对血清的抑菌作用和杀菌作用。

## 2 鸡大肠杆菌血清抗性的研究进展

血清抗性可能受荚膜抗原、脂多糖和特定外膜蛋白调节,在多数菌株中表现出与毒力相关的关系[16-19]。K1 荚膜抗原与禽致病性大肠杆菌的毒力相关性很高,尤其是在 O1、O2 血清型中,表达 K1 荚膜抗原的禽致病性大肠杆菌菌株相对于表达其他 K 荚膜抗原的禽致病性大肠杆菌菌株,对血清杀菌作用的抵抗性更强[16]。据报道,血清抗性也与脂多糖相关,平滑脂多糖层比粗糙型脂多糖抗性强。但有突变试验表明,突变后补体敏感的无毒型和野生补体抗性的有毒型大肠杆菌均具有平滑脂多糖层,不同之处是外膜蛋白。无毒突变株有 16.2 ku 的外膜蛋白,野生型没有,此蛋白可能是编码区被转座子插入的产物。显示编码某种外膜蛋白的基因被截断后,对补体抗性和毒力有影响[17-18]。外膜蛋白是革兰氏阴性菌细胞壁中所特有的结构,大肠杆菌中由质粒编码的外膜蛋白在其致病过程中起重要作用。基因研究鉴定了 TraT 和 Iss 等 2 个补体抗性决定簇。TraT 是由 R100、R6 -5 和 ColV 质粒编码的,分子量为 23 709 u,位于外膜外侧。它可增强细菌对血清的抗性,但其作用机制还不清楚。据报道,TraT 蛋白可增强细菌对补体裂解活性的抗性,从而使细菌的侵袭力加强。Iss 是由存在于 ColV 质粒上的 *iss* 基因编码的,Iss 蛋白属于外膜蛋白的一部分,与细菌抗补体作用有关,可增强大肠杆菌血清抗性[19-22]。另外,1 型菌毛对血清的杀菌作用也具有抗性[12]。

## 3 *iss* 基因的研究进展

*iss* 基因存在于 ColV 质粒上,大小为 309 bp,在人源、禽源大肠杆菌中皆有发现。*iss* 基因编码的蛋白 Iss 属于外膜蛋白的一部分,与细菌抗补体作用有关,可增强大肠杆菌血清抗性。国内外普遍认为,*iss* 基因与鸡大肠杆菌毒力有一定关系[20-24]。但此相关性受何因素控制,国内外还无相关阐述。

在 1979 年,Binns 等从人源大肠杆菌 ColV、I -K94 质粒获得的 *iss* 基因的表达能力能显著增强含此基因的大肠杆菌对 1 日龄雏鸡的毒力,还能增强转化菌的血清抗性[8]。Chuba 将人源大肠杆菌 ColV2 -K94 质粒上 *iss* 基因的 1.4 kb 片断克隆入大肠杆菌 K12 细胞,重组细胞显示出血清抗性。经 Southern -blot 检测,人源大肠杆菌 *iss* 基因与 λ 噬菌体 DNA 及插入因子 IS2 有同源性[8]。美国研究人员从患大肠杆菌病的鸡体内分离出 1 株野生型禽致病性大肠杆菌(O2 型),并以此为来源扩增出 *iss* 基因,比较禽大肠杆菌 *iss* 基因与人源大肠杆菌 *iss* 基因的同源性,发现两者同源性达 96.8%[12]。

研究者近来普遍认为 *iss* 基因是定位在 ColV 质粒上的。

收稿日期:2013 -10 -20
基金项目:国家自然科学基金(编号:31302128)。
作者简介:樊 琛(1978—),女,山东茌平人,博士,副教授,从事病原体分子生物学、食品卫生学方向的研究。E -mail:fanchen7810@126.com。

在研究毒力因子与人源大肠杆菌 ColV 质粒相关性的试验中，分离自血液中的菌株有 95.5% 携带 *iss* 基因，分离自肠道中的菌株有 68.8% 携带 *iss* 基因。其后关于禽源大肠杆菌毒力因子的试验结果也表明，*iss* 基因与 ColV 同时出现的概率很高，但并不是 100%[16-18]。由此推测，*iss* 基因很可能与 ColV 质粒连在一起，但并不能肯定总是在 ColV 质粒上。

据推测，Iss 蛋白是通过调节细胞表面上对补体膜攻击复合体敏感的位点，导致表面排斥，使菌株具有抗血清补体溶菌作用的能力[19]。Ellis 对 25 个火鸡大肠杆菌菌株进行了 *iss* 基因的扩增试验及菌株对血清反应特性的试验。其中，18 株菌株属于血清抗性 - 有毒力和血清敏感 - 无毒力的范畴，5 株菌株为血清抗性但无毒力，2 株菌株为血清敏感但有毒力[10]。McDonough 等发现，*iss* 基因在致病性大肠杆菌中存在的可能性高于非致病性大肠杆菌，并且 *iss* 基因在大肠杆菌各种不同的血清型、各种禽类的大肠杆菌及其宿主不同部位的大肠杆菌中均有分布[11]。有研究反映，*iss* 基因扩增为阳性的菌株并不能降解血清中的 C6、C7、C8、C9，$iss^+$ 与 $iss^-$ 菌株在 C6、C7、C8、C9 的消耗试验中几乎没有差别，这暗示 Iss 蛋白的作用可能是针对最终的补体复合体，而不是各组成部分。有研究者据此认为，*iss* 基因的抗补体作用是受限制的，因为它不能降解各组成部分[13]。Kottom 认为，禽大肠杆菌的补体抗性可能与机体减弱 C3 在细胞表面的沉降能力有关，说明 *iss* 基因编码的外膜蛋白能调节细胞表面上对补体膜攻击复合体敏感的位点，导致表面排斥，减少 C3 在细菌表面的沉着，使菌株具有抗血清补体溶菌作用的能力，增强大肠杆菌的血清抗性[13]。与此相反，也有研究表明，*iss* 突变的禽致病性大肠杆菌在补体抗性方面并没有明显的减弱。

到目前为止，国内外多数研究采用 PCR 和/或探针杂交来检测大肠杆菌是否带有目标基因，并将鸡大肠杆菌菌株分为 $iss^+$、$iss^-$ 菌株[12,17]。樊琛等发现，*iss* 基因在 21 株高毒力菌株及低毒力菌株中都存在；与高毒力菌株相反，绝大多数低毒力的菌株在第 1 次扩增时检测不到 *iss* 基因，还须进行第 2 次套式 PCR 扩增才能检测到。由此推测，因 *iss* 基因存在于质粒上，可能其拷贝数（基因数量）与菌株毒力相关。樊琛等还通过试验证实 1 株鸡致病性大肠杆菌 $HO_2$ 菌株的 Iss 融合蛋白抗血清在体外试验中可以降低 $HO_2$ 菌株的血清抗性[25]。

## 4 小结

综上所述，尽管鸡大肠杆菌的毒力受多因子影响，但分析 *iss* 基因及 Iss 蛋白与大肠杆菌毒力的关系，可为研究 *iss* 的致病特性并以 *iss* 作为毒力标志基因在鸡大肠杆菌病的诊断、免疫防制中的作用等提供理论依据。

**参考文献：**

[1] Bekal S, Brousseau R, Masson L, et al. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(5): 2113 - 2125.

[2] 卡尔尼克 B W. 禽病学[M]. 10 版. 北京：中国农业大学出版社，2001：1459 - 1502.

[3] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 3 版. 北京：中国农业出版社，2001：215 - 257.

[4] 陈 倩，贾珍珍，郭福全. 食品中出血性大肠杆菌 O157：H7 检验方法的建立[J]. 中国食品卫生杂志，2000，12(3)：19 - 21.

[5] 史 云. 肠致病性大肠杆菌的致病因子及致病机制的研究进展[J]. 国外医学：卫生学分册，2003，30(4)：205 - 211.

[6] 史 云，李业鹏，计 融. 肉及肉制品中肠致病性大肠杆菌两重 PCR 检测方法的建立[J]. 卫生研究，2005，34(3)：309 - 311.

[7] Zahraei S T, Derakhshandeh A, Tadjbakhsh H, et al. Comparison and phylogenetic analysis of the *iss* gene in two predominant avian pathogenic *Eschefichia coli* serogroups isolated from avian colibacillosis in Iran[J]. Research in Veterinary Science, 2013, 94(1): 5 - 8.

[8] Ewers C, Janssen T, Wieler L H. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)[J]. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 2003, 116(9/10): 381 - 395.

[9] Janben 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]. International Journal of Medical Microbiology: IJMM, 2001, 291(5): 371 - 378.

[10] Johnson T J, Giddings C W, Horne S M, et al. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate[J]. Avian Diseases, 2002, 46(2): 342 - 352.

[11] Nolan L K, Giddings C W, Horne S M, et al. Complement resistance, as determined by viable count and flow cytometric methods, and its association with the presence of *iss* and the virulence of avian *Escherichia coli*[J]. Avian Diseases, 2002, 46(2): 386 - 392.

[12] Dho - Moulin M, Fairbrother J M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)[J]. J Vet Res, 1999, 30(2/3): 299 - 316.

[13] Marc D, Dho - Moulin M. Analysis of the fim cluster of an avian O2 strain of *Escherichia coli*: serogroup - specific sites within *fimA* and nucleotide sequence of *fimI*[J]. Journal of Medical Microbiology, 1996, 44(6): 444 - 452.

[14] Marc D A P, Dho - Moulin M. Colonization ability and pathogenic properties of a fim - mutant of an avian strain of *Escherichia coli* res[J]. Microbiol, 1998, 149(7): 473 - 485.

[15] 樊 琛，王亚君，李一经. *fimI* 基因与鸡大肠杆菌毒力相关性的测定[J]. 中国预防兽医学报，2006，28(1)：70 - 72.

[16] Gordon D M, Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects[J]. Microbiology, 2003, 149(Pt 12): 3575 - 3586.

[17] Ewers C, Janssen T, Kiessling S, et al. Rapid detection of virulence - associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction[J]. Avian Diseases, 2005, 49(2): 269 - 273.

[18] Johnson J R, Sannes M R, Croy C, et al. Antimicrobial drug - resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002 - 2004[J]. Emerging Infectious Diseases, 2007, 13(6): 838 - 846.

[19] Johnson T J, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, et al. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1: K1: H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *Eschefichia coli* genomes[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(8): 3228 - 3236.

（下转第 128 页）

图1 锯子带菌传播腐烂病菌及发病状况

表 1 修剪工具带菌引起苹果树腐烂病发生结果

| 处理 | 总锯口数（个） | 发病锯口数（个） | 发病率（%） |
|---|---|---|---|
| 锯子带菌 | 160 | 95 | 59.4 |
| 空白对照 | 160 | 0 | 0.0 |

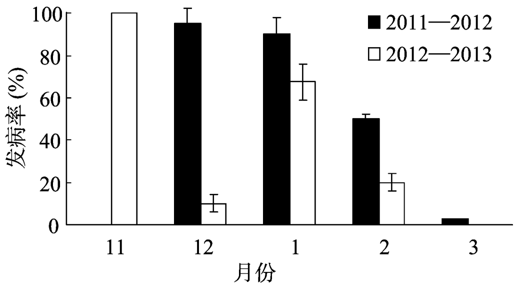


图2 不同时期带菌修剪的发病率

## 3 讨论

陈策等认为苹果树腐烂病菌从 3 月至 11 月均能发生侵染，病菌通过落皮层侵入，一旦侵入树体，有的会很快发病，但也有很多病菌会经过一个很长时期的潜育阶段然后造成发病[5]。在这种思想的指导下，人们对腐烂病的防控主要不是针对抗侵入，而主要是针对抗扩展，因此，研发具有铲除作用的化学药剂以及在实践当中对腐烂病病斑的刮治成为了重点的工作。经过多年的实践，人们也发现仅通过病斑的刮治解决不了根本问题，也意识到对腐烂病的预防非常重要；但是，由于人们尚未认识的腐烂病菌在冬季通过修剪工具也能够侵染，在理论上总是缺乏依据。本试验结果表明，携带苹果树腐烂病病菌的修剪工具在冬季能够传播腐烂病菌并引起侵染，这对于指导腐烂病的防控显得尤为重要。

杜社妮等认为更新修剪有利于减少腐烂病的发生并提高树体的抗病能力[4]，但更新修剪仍然是在冬季，只是留枝量等不同，而本试验选择了冬季和春季 2 个不同的时间进行修剪，并且结果表明在严冬修剪较初春修剪更容易传播腐烂病。由这一点可以看出，冬季低温虽然对苹果树和腐烂病菌都不利，但是对于树体伤口的伤害更大，这可能是造成寒冷时节病菌侵染率反而更高的原因。因此，笔者认为在生产实践中改目前的冬剪为早春春剪会有效地减轻病菌侵染发病。笔者所在研究室在前期的试验还表明，无论春夏秋冬，新造成的伤口比老伤口更容易被侵染[2]，因此，在修剪以后及时对伤口涂抹含杀菌剂的伤口愈合剂，应该能极大地减轻腐烂病发生的可能。修剪是造成 80% 腐烂病发生的重要环节，因此，改变过去的观念，将冬剪改为早春修剪，并对剪锯口加以保护有望预防 80% 的腐烂病发生，这在腐烂病的防控上会产生十分重要的影响。

参考文献：

[1]王彩霞，董向丽，张振芳，等. 2011 年烟台苹果产区腐烂病发病情况调查与原因分析[J]. 农业科学与技术，2014，38(1)：83－86.
[2]曹克强，王树桐，胡同乐. 苹果病虫害防控研究进展[M]. 北京：中国农业出版社，2013.
[3]Holb I J. Effect of pruning on apple scab in organic apple production[J]. Plant Disease，2005，89(6)：611－618.
[4]杜社妮，白岚栓，史吉刚，等. 修剪方法对盛果末期苹果树腐烂病发生的影响[J]. 北方园艺，2012(5)：35－38.
[5]陈 策，李美娜，史秀琴，等. 苹果树腐烂病(*Valsa malimiyabe* Yamada)侵染时期研究[J]. 植物病理学报，1987，17(2)：3－6.

(上接第 54 页)

[20]Johnson T J，Wannemuehler Y M，Nolan L K. Evolution of the *iss* gene in *Eschefichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology，2008，74(8)：2360－2369.
[21]樊 琛，王亚君，李一经. *iss* 基因与鸡大肠杆菌毒力相关性的分析[J]. 畜牧兽医学报，2005，36(1)：58－61.
[22]樊 琛，王亚君，李一经. 鸡大肠杆菌 *iss* 基因的克隆测序及原核表达[J]. 中国兽医杂志，2004，40(12)：7－10.
[23]樊 琛，王 宇，王亚君，等. *iss* 基因与鸡大肠杆菌致病力的关系[J]. 中国兽医科学，2010，40(1)：55－60.
[24]樊 琛，刘桂芹，王亚君，等. Iss 蛋白在鸡源大肠杆菌不同毒力菌株中的检测[J]. 畜牧与兽医，2010，42(2)：71－73.
[25]樊 琛，刘桂芹，王 宇，等. 鸡源致病性大肠杆菌 *iss* 基因原核表达产物的免疫保护作用[J]. 畜牧与兽医，2010，42(11)：84－86.