



## 简 报

## V 型分泌系统(T5SS)在禽致病性大肠杆菌中的分布及流行情况

周栋梁<sup>1,2</sup> 王少辉<sup>2</sup> 吴晓君<sup>2</sup> 易正飞<sup>2</sup> 信素华<sup>2</sup> 张耀东<sup>2</sup> 丁铲<sup>2</sup> 于圣青<sup>\*2</sup> 戴建君<sup>\*1</sup>

1 南京农业大学动物医学院 江苏 南京 210095

2 中国农业科学院上海兽医研究所 上海 200241

**摘 要:**【背景】禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)可引起禽的大肠杆菌病, 严重危害养禽业。V 型分泌系统(Type V secretion system, T5SS)在 APEC 感染过程中发挥重要作用。【目的】分析不同致病型大肠杆菌的 T5SS 在 APEC 中的分布规律, 探讨 T5SS 与 APEC 的大肠杆菌进化分群及其他毒力因子的关联性。【方法】根据大肠杆菌的 15 个 T5SS 序列设计特异性引物, 采用 PCR 检测 T5SS 在 APEC 临床分离株中的分布; 分析 APEC 菌株的系统进化分群及毒力因子分布, 探讨 T5SS 分布和 APEC 系统进化分群及毒力因子的相关性。【结果】T5SS 在 APEC 临床分离株中广泛分布, 其中 *ydeK* 和 *pplfP* 的分布率最高, 分别为 98.55% 和 92.03%; 而 *upaC* 和 *pic* 的分布率均低于 10%。系统进化分群结果显示, APEC 主要属于 A、B1 和 D 进化分群, B2 群较少; T5SS 分布和进化分群分析发现 *ehaA*、*ehaB*、*pic*、*vat* 在 D 进化分群 APEC 菌株中分布率较高, 而 *ehaG*、*ag43/flu*、*apaC* 主要分布于 A 及 B1 群 APEC 中。然而, T5SS 和 APEC 其他毒力基因分布无明显的关联性。【结论】T5SS 广泛存在于 APEC 分离株中, 且部分 T5SS 分布与大肠杆菌系统进化分群存在关联性。

**关键词:** V 型分泌系统, 禽致病性大肠杆菌, PCR 检测, 分布, 进化分群

Distribution and epidemiological analysis of type V secretion system (T5SS) in avian pathogenic *Escherichia coli*ZHOU Dong-Liang<sup>1,2</sup> WANG Shao-Hui<sup>2</sup> WU Xiao-Jun<sup>2</sup> YI Zheng-Fei<sup>2</sup> XIN Su-Hua<sup>2</sup>  
ZHANG Yao-Dong<sup>2</sup> DING Chan<sup>2</sup> YU Sheng-Qing<sup>\*2</sup> DAI Jian-Jun<sup>\*1</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

**Abstract: [Background]** Systemic infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) are

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500800, 2018YFE0102200); National Natural Science Foundation of China (31572523)

**\*Corresponding authors:** DAI Jian-Jun: Tel: 86-25-86185360; E-mail: daijianjun@njau.edu.cn  
YU Sheng-Qing: Tel: 86-21-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

**Received:** 22-05-2019; **Accepted:** 15-07-2019; **Published online:** 27-08-2019

**基金项目:** 国家重点研发计划(2016YFD0500800, 2018YFE0102200); 国家自然科学基金(31572523)

**\*通信作者:** 戴建君: Tel: 025-86185360; E-mail: daijianjun@njau.edu.cn

于圣青: Tel: 021-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

**收稿日期:** 2019-05-22; **接受日期:** 2019-07-15; **网络首发日期:** 2019-08-27

economically devastating to poultry industries worldwide. Type V secretion system (T5SS) plays an important role during the infection of APEC. **[Objective]** This study was carried out to analyze the distribution of T5SS in APEC and its correlation with *E. coli* phylogenetic group and other virulence factors. **[Methods]** The 15 *E. coli* T5SS were selected for primers designing, and the distribution of these T5SS in APEC clinical isolates were detected by PCR. The phylogenetic group and virulence factor of APEC strains were determined. The correlations between T5SS distribution and phylogenetic group and other virulence factors of APEC were analyzed. **[Results]** T5SS was widely distributed in APEC isolates. T5SS *ydeK* and *pplfP* was present in 98.55% and 92.03% of the APEC isolates, respectively. However, the distribution rates of T5SS *upaC* and *pic* in APEC were less than 10.00%. Most APEC isolates belonged to A, B1 and D phylogenetic groups, following by B2. The combinations analysis showed that T5SS *ehaA*, *ehaB*, *pic* and *vat* were predominated present in phylogenetic group D APEC isolates. While, the phylogenetic groups A and B1 were the predominated groups that harbor the *ehaG*, *ag43/flu* and *apaC*. However, no significant correlation between the distribution of T5SS and other virulence genes in APEC were found. **[Conclusion]** T5SS is widely distributed in APEC, and some T5SS was correlated with the phylogenetic group of APEC.

**Keywords:** Type V secretion system, Avian pathogenic *Escherichia coli*, PCR detection, Distribution, Phylogenetic group

禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)属于肠道外致病性大肠杆菌(Extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC),主要引起鸡、鸭和其他禽类局部或全身性感染,表现为气囊炎、蜂窝织炎、输卵管炎、腹膜炎以及败血症等炎症,给养禽业造成了巨大的经济损失。研究表明,APEC与人类ExPEC具有许多共同的O血清型、毒力因子及致病机制<sup>[1-3]</sup>。另外,由于抗生素的大规模不当使用,使APEC产生了广泛的耐药性。APEC是人类致病性大肠杆菌的毒力基因和耐药基因贮库,可通过禽类及其产品传播给人类,对人类健康造成潜在威胁<sup>[1-3]</sup>。因此,加强对APEC的长期监测和研究,对养禽业和公共卫生具有重要意义。

毒力因子在APEC致病过程中发挥着重要作用,与APEC致病相关的毒力因子已被相继报道,如黏附素、侵袭素、铁摄取系统、分泌系统等。目前,在革兰阴性菌中鉴定了6种不同的分泌系统,其中V型分泌系统(Type V secretion system, T5SS)的分泌装置最为单一,仅由一个蛋白分泌家族组成,其序列包括信号肽区、自分泌重复序列、膜外功能区和跨膜区。T5SS属于Sec依赖型分泌系统,首先N端的Sec信号肽介导功能区转运至外周质间隙,然后C端的 $\beta$ 结构域在外膜上形成

一个通道,从而将膜外功能区运送至胞外,整个过程不消耗能量。由于T5SS将自身蛋白分泌至胞外,因此又被称为自分泌转运系统。根据序列及结构特征的差别,V型分泌系统分为5种亚型(Va、Vb、Vc、Vd、Ve)<sup>[4-5]</sup>。研究表明,T5SS在大肠杆菌的感染致病过程中发挥重要作用,主要参与大肠杆菌的黏附、生物被膜形成、凝集沉降等过程<sup>[6]</sup>。研究者在不同致病型大肠杆菌中鉴定了20多个T5SS,包括肠出血性大肠杆菌(Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)的EhaA/EhaB/EhaC、尿道致病性大肠杆菌(Uropathogenic *E. coli*, UPEC)的UpaB/UpaC/UpaG,其在EHEC和UPEC黏附宿主的过程中发挥重要作用<sup>[7-8]</sup>。在APEC中已经鉴定的T5SS包括温度敏感性血凝素(Temperature-sensitive hemagglutinin, Tsh)、空泡形成毒素(Vacuolating autotransporter toxin, Vat)、APEC自分泌黏附素AatA和AatB等,这些T5SS广泛分布于APEC中并参与APEC对宿主的黏附定殖及呼吸道感染过程<sup>[9]</sup>。

本研究对APEC分离株中不同致病型大肠杆菌的T5SS分布进行了检测,并进一步分析了T5SS分布与APEC的大肠杆菌进化分群、毒力基因之间的关联性,发现不同致病型大肠杆菌的T5SS广泛存在于APEC菌株中,且部分T5SS与大肠杆菌进

化分群存在相关性,为进一步解析 T5SS 在 APEC 感染过程中的作用及相关防控技术研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

禽致病性大肠杆菌临床分离株由本实验室在 2013–2015 年间分离于安徽、河南、江苏和上海等地区养殖场的病禽<sup>[10]</sup>。

1.2 主要试剂和仪器

2×*Taq* PCR Master Mix、DNA Marker, 北京康为世纪生物科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取

试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。PCR 仪, ABI 公司; 核酸电泳仪、全自动凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司。

1.3 引物设计

根据已报道的大肠杆菌 T5SS 的基因序列, 设计特异性检测引物(表 1), 由华津生物科技有限公司合成。

1.4 基因组 DNA 的提取

根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书分别提取 APEC 临床分离株的基因组 DNA。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	产物大小 Product size (bp)	功能分类 Function
T5SS detection			
ehaA-F	TCAGTGGTGAAGGTAGCCAG	3 010	Adherence and biofilm formation
ehaA-R	TATCCAGCTTCCAGTGAAGC		
ehaB-F	TGTAGCAGGTATTACGCTGACTC	1 353	Adherence and biofilm formation
ehaB-R	TTGACGTAGATCAGCTCGTTG		
ehaC-F	GACTGCTACGGTCTGACGATA	2 180	Adherence and biofilm formation
ehaC-R	TAATGATCCACGCCATCTTC		
ehaD-F	GGCAGTGCTTTAGTTGCCA	2 848	Adherence and biofilm formation
ehaD-R	GGTTCCAGTTACCATCGGTAA		
ehaG-F	TGATTACGGTAGTGGATCAGC	1 442	Adherence, biofilm formation and cell aggregation
ehaG-R	CTTCGACATCGTCATTGGTAG		
upaB-F	CGACTCTGGATCAAGATGTTGT	1 461	Adherence
upaB-R	TTACATCCAGGTCATAGGATGC		
upaC-F	TACAGCATTACTCCTGCAGAAG	1 969	Biofilm formation
upaC-R	TCATATCACCTTTAGCGAAGC		
upaG-F	CTAACACCACCAATATCACCAA	1 500	Adherence, biofilm formation and cell aggregation
upaG-R	GTCACCGACGTTGTTGTAAC		
ag43/flu-F	CTGCTACAGGCTGGTATGGA	3 102	Adherence, biofilm formation and cell aggregation
ag43/flu-R	TGTCAGAAGGTCACATTCAGTG		
apaC-F	TGAACACCAGTGGTTCCAGTA	4 100	Adherence and biofilm formation
apaC-R	TCAGCTGCGACACGTTAAC		
pplfp-F	AGATAACAACCCACGGAACA	1 987	Putative pectin lyase fold protein
pplfp-R	ATCACTGCGGTGTCATTGTAG		
yejO-F	GGCATCAACAGTTGAGTATGGT	1 224	Adherence
yejO-R	GACATCGCAAGGTTAGCTAAGT		
ydeK-F	TACGTAGGGACATCTGGTACG	2 061	Adherence
ydeK-R	TGCCGTATTAATGGCAGAGT		
pic-F	TACCTGGTGCCAATGATATTC	3 787	Serine protease and adherence
pic-R	ATCTGCGCATTCATACCAAC		
vat-F	CGGTGATGGTCAGAACAGTTA	2 999	Vacuolating autotransporter toxin, biofilm formation and cell aggregation
vat-R	GCAGGGTATAGTGGTCAGTGAA		
Phylogenetic group			
ChuA-F	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	
ChuA-R	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
YjaA-F	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	211	
YjaA-R	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
TspE4C2-F	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152	
TspE4C2-R	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

1.5 大肠杆菌系统进化分群

参考 Clermont 等<sup>[11]</sup>建立的方法，根据 *chuA*、*yiaA* 基因和 DNA 片段 TspE4.C2 合成 3 对引物(表 1)，通过三重 PCR 方法对 APEC 临床分离株进行系统进化分群。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，放置紫外灯下观察扩增片断大小，并根据 PCR 扩增结果判定 APEC 分离株的进化分群。

1.6 T5SS 基因分布检测

采用 PCR 方法检测 T5SS 在 APEC 分离株中的分布。PCR 反应体系：2×PCR Mix 12.5 μL，引物 (10 μmol/L) 各取 0.5 μL，基因组 DNA 模板 (100 ng/μL) 2.0 μL，最后补灭菌超纯水至 25 μL。PCR 反应条件：95 °C 5 min；95 °C 30 s，56 °C 30 s，72 °C 30–50 s，30 个循环；72 °C 10 min。取 5 μL PCR 产物，于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统观察记录 PCR 结果。胶回收 PCR 产物，送华津生物科技有限公司进行测序。

1.7 APEC 毒力基因检测

根据本实验室建立的多重 PCR 方法<sup>[10]</sup>分析 APEC 临床分离株的 14 个毒力基因进行检测，并分析毒力基因与 T5SS 的相关性。

2 结果与分析

2.1 APEC 临床分离株的系统进化分群

通过三重 PCR 方法扩增 *chuA*、*yiaA* 和 DNA TspE4.C2，分析 APEC 临床分离株的系统进化分群。结果显示，APEC 临床分离株属于 A、B1、B2 和 D 进化分群的比例分别为 29.71%、28.99%、13.77%和 22.46%，表明 APEC 主要属于 A、B1 和 D 进化分群，B2 群较少(表 2)。然而，根据 Clermont 等<sup>[11]</sup>建立的方法，无法对 7 株 (5.07%) APEC 分离株进行分群。

2.2 T5SS 在 APEC 中的分布

对 15 个 T5SS 基因进行 PCR 检测，分别扩增出与预期大小相符的片段(部分检测结果，图 1)，PCR 产物测序结果与 GenBank 中 T5SS 的序列相似性均在 99%–100%。PCR 检测结果显示，*ydeK* 和 *pplfP* 的分布率最高，分别为 98.55% 和

92.03%；其次是 *apaC*、*ehaG*、*ehaC*，其存在于 65.94%–89.86% 的 APEC 分离株中；而 *yejO*、*upaG*、*ehaA*、*ag43/flu*、*upaB*、*ehaB* 的分布率介于 28.26%–48.55%；但是 *pic* 和 *upaC* 的分布率均低于 10.00% (表 3)。结果表明，不同 T5SS 在 APEC 中广泛分布，但不同 T5SS 的分布率差别较大。

表 2 APEC 分离株的系统进化分群分析

Table 2 Phylogenetic groups of APEC strains

进化分群 Phylogenetic group	阳性菌数/总菌数 Numbers of postive strain/ Numbers of total strain	百分比 Percent (%)
A	41/138	29.71
B1	40/138	28.99
B2	19/138	13.77
D	31/138	22.46
Unknown	7/138	5.07

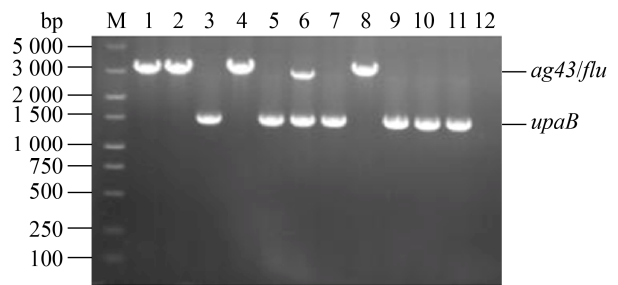


图 1 PCR 检测 T5SS 在 APEC 中的分布

Figure 1 Detection of T5SS in APEC using PCR

注：M：DNA marker；1–11：APEC 临床分离株；12：阴性对照。

Note: M: DNA marker; 1–11: Clinical isolates of APEC; 12: Negative control.

表 3 T5SS 在 APEC 分离株中的分布

Table 3 Distribution of T5SS in APEC strains

T5SS 基因 Genes of T5SS	阳性菌数/总菌数 Numbers of postive strain/ Numbers of total strain	百分比 Percent (%)
<i>ehaA</i>	46/138	33.33
<i>ehaB</i>	39/138	28.26
<i>ehaC</i>	124/138	89.86
<i>ehaD</i>	18/138	13.04
<i>ehaG</i>	92/138	66.67
<i>upaB</i>	59/138	42.75
<i>upaC</i>	11/138	7.97
<i>upaG</i>	65/138	47.10
<i>ag43/flu</i>	67/138	48.55
<i>apaC</i>	91/138	65.94
<i>pplfP</i>	127/138	92.03
<i>yejO</i>	66/138	47.83
<i>ydeK</i>	136/138	98.55
<i>pic</i>	12/138	8.70
<i>vat</i>	20/138	14.49

2.3 T5SS 分布与进化分群的关系

通过结合大肠杆菌系统进化分群分析 T5SS 分布与大肠杆菌进化分群的相关性。结果表明, T5SS 在大肠杆菌进化分群中的分布差别较大。其中, *ydeK*、*ehaC* 和 *pplfP* 在所有大肠杆菌进化分群中的分布率均较高。61.29% (19/31)的 D 群 APEC 菌株含有 *ehaA* 和 *ehaB* 基因, 而 68.29% (28/41)的 A 进化分群 APEC 分离株为 *ag43/flu* 阳性, 显示其分布与大肠杆菌进化分群存在一定的关联性。*ehaG* 和 *apaC* 阳性 APEC 菌株主要属于 A 及 B1 进化分群, 而 *pic* 和 *vat* 主要分布于 B2 及 D 进化分群 APEC 菌株中。但是 *upaB*、*upaG* 主要分布于 B1、B2 及 D 进化分群 APEC 菌株中, 在 A 进化分群中的分布率较低(表 4)。

通过分析阳性菌株与大肠杆菌进化分群发

现, 41.30% (19/46)、48.72% (19/39)、50.00% (6/12)、45.00% (9/20)的 *ehaA*、*ehaB*、*pic*、*vat* 阳性 APEC 菌株属于 D 进化分群; 而 *upaC* 阳性 APEC 菌株主要属于 B2 进化分群。*upaB* 和 *yejO* 主要存在于 B1 群 APEC 菌株中; 但是 *ehaG*、*ag43/flu* 和 *apaC* 的阳性 APEC 菌株主要属于 A 及 B1 进化群(表 5)。然而, 其他 T5SS 与大肠杆菌进化分群无明显的相关性。

2.4 T5SS 与其他 APEC 毒力基因的关联性分析

结合本实验室前期的 APEC 毒力基因分子流行病学调查结果, 分析 APEC 分离株的 T5SS 及其他毒力基因分别的相关性。结果显示 T5SS 与 APEC 其他毒力基因(*fimC*、*papC*、*tsh*、*mat*、*irp2*、*fyuA*、*iroN*、*iucD*、*iss*、*cva/cvi*、*neuC*、*ompA*、*ibeA*、*ibeB*)的分布均无显著关联性。

表 4 T5SS 在不同进化分群 APEC 中 T5SS 的分布

Table 4 The distribution of T5SS in each phylogenetic groups of APEC

T5SS 基因 Genes of T5SS	阳性菌株数/进化分群总菌株数(百分比) Numbers of postive strain/Numbers of total strain of each phylogenetic group (Percent)				
	A	B1	B2	D	Unknown
<i>ehaA</i>	5/41 (12.20%)	13/40 (32.50%)	7/19 (36.84%)	19/31 (61.29%)	2/7 (28.57%)
<i>ehaB</i>	5/41 (12.20%)	7/40 (17.50%)	7/19 (36.84%)	19/31 (61.29%)	1/7 (14.29%)
<i>ehaC</i>	40/41 (97.56%)	35/40 (87.50%)	13/19 (68.42%)	29/31 (93.55%)	7/7 (100.00%)
<i>ehaD</i>	4/41 (9.76%)	4/40 (10.00%)	0/19 (0.00)	7/31 (22.58%)	3/7 (42.86%)
<i>ehaG</i>	38/41 (92.68%)	28/40 (70.00%)	8/19 (42.11%)	14/31 (45.16%)	4/7 (57.14%)
<i>upaB</i>	7/41 (17.07%)	20/40 (50.00%)	12/19 (63.16%)	17/31 (54.84%)	3/7 (42.86%)
<i>upaC</i>	1/41 (2.44%)	3/40 (7.50%)	6/19 (31.58%)	1/31 (3.23%)	0/7 (0.00%)
<i>upaG</i>	14/41 (34.15%)	18/40 (45.00%)	11/19 (57.89%)	18/31 (58.06%)	4/7 (57.14%)
<i>ag43/flu</i>	28/41 (68.29%)	17/40 (42.50%)	7/19 (36.84%)	11/31 (35.48%)	4/7 (57.14%)
<i>apaC</i>	37/41 (90.24%)	30/40 (75.00%)	8/19 (42.11%)	12/31 (38.71%)	4/7 (57.14%)
<i>pplfP</i>	38/41 (92.68%)	38/40 (95.00%)	16/19 (84.21%)	28/31 (90.32%)	7/7 (100.00%)
<i>yejO</i>	11/41 (26.83%)	28/40 (70.00%)	4/19 (21.05%)	19/31 (61.29%)	4/7 (57.14%)
<i>ydeK</i>	41/41 (100.00%)	39/40 (97.50%)	19/19 (100.00%)	30/31 (96.77%)	7/7 (100.00%)
<i>pic</i>	0/41 (0.00%)	2/40 (5.00%)	4/19 (21.05%)	6/31 (19.35%)	0/7 (0.00%)
<i>vat</i>	1/41 (2.44%)	3/40 (7.50%)	7/19 (36.84%)	9/31 (29.03%)	0/7 (0.00%)

表 5 T5SS 阳性菌株与大肠杆菌进化分群的关系  
Table 5 The correlation between T5SS and phylogenetic groups

T5SS 基因 Genes of T5SS	不同进化分群中阳性菌株数/总阳性菌株数(百分比) Numbers of positive strain in each phylogenetic group/ Numbers of total positive strain (Percent)				
	A	B1	B2	D	Unknown
<i>ehaA</i>	5/46 (10.87%)	13/46 (28.26%)	7/46 (15.22%)	19/46 (41.30%)	2/46 (4.35%)
<i>ehaB</i>	5/39 (12.82%)	7/39 (17.95%)	7/39 (17.95%)	19/39 (48.72%)	1/39 (2.56%)
<i>ehaC</i>	40/124 (32.26%)	35/124 (28.23%)	13/124 (10.48%)	29/124 (23.39%)	7/124 (5.65%)
<i>ehaD</i>	4/18 (22.22%)	4/18 (22.22%)	0/18 (0.00%)	7/18 (38.89%)	3/18 (16.67%)
<i>ehaG</i>	38/92 (41.30%)	28/92 (30.43%)	8/92 (8.70%)	14/92 (15.22%)	4/92 (4.35%)
<i>upaB</i>	7/59 (11.86%)	20/59 (33.90%)	12/59 (20.34%)	17/59 (28.81%)	3/59 (5.08%)
<i>upaC</i>	1/11 (9.09%)	3/11 (27.27%)	6/11 (54.55%)	1/11 (9.09%)	0/11 (0.00%)
<i>upaG</i>	14/65 (21.54%)	18/65 (27.69%)	11/65 (16.92%)	18/65 (27.69%)	4/65 (6.15%)
<i>ag43/flu</i>	28/67 (41.79%)	17/67 (25.37%)	7/67 (10.45%)	11/67 (16.42%)	4/67 (5.97%)
<i>apaC</i>	37/91 (40.66%)	30/91 (32.97%)	8/91 (8.79%)	12/91 (13.19%)	4/91 (4.40%)
<i>pplfP</i>	38/127 (29.92%)	38/127 (29.92%)	16/127 (12.60%)	28/127 (22.05%)	7/127 (5.51%)
<i>yejO</i>	11/66 (16.67%)	28/66 (42.42%)	4/66 (6.06%)	19/66 (28.79%)	4/66 (6.06%)
<i>ydeK</i>	41/136 (30.15%)	39/136 (28.68%)	19/136 (13.97%)	30/136 (22.06%)	7/136 (5.15%)
<i>pic</i>	0/12 (0.00%)	2/12 (16.67%)	4/12 (33.33%)	6/12 (50.00%)	0/12 (0.00%)
<i>vat</i>	1/20 (5.00%)	3/20 (15.00%)	7/20 (35.00%)	9/20 (45.00%)	0/20 (0.00%)

3 讨论与结论

APEC 能够引起鸡、鸭、火鸡等多种禽类的大肠杆菌病，给养禽业造成了严重的经济损失。研究表明，毒力因子在 APEC 致病过程中发挥着重要作用，其中 T5SS 广泛存在于不同致病型大肠杆菌中并参与黏附、生物被膜形成、凝集沉降等过程<sup>[6]</sup>。为了分析不同致病型大肠杆菌的 T5SS 在 APEC 中分布及规律，本研究通过 PCR 方法检测 T5SS 的分布。结果发现，15 个大肠杆菌 T5SS 广泛存在于 APEC 中，其中 T5SS *ydeK* 和 *pplfP* 在 APEC 中分布率最高，而 *pic*、*upaC* 在 APEC 中分布率低于 10%。值得注意的是，EHEC 的 T5SS *ehaA*、*ehaB*、*ehaC*、*ehaD*、*ehaG* 和 UPEC 的 T5SS *upaB*、*upaC*、*upaG* 也广泛存在于 APEC 分离株中，说明某些 T5SS 可能存在不同致病型大肠杆菌中，与国外学者的结论一致<sup>[7]</sup>，进一步提示 APEC 可能是人源致病性大肠杆菌的毒力基因贮库<sup>[1]</sup>。

依据 Clermont 等<sup>[11]</sup>的方法，可将大肠杆菌分为 A、B1、B2、D 四个系统进化分群。本研究利用该方法分析了 APEC 分离株的系统进化分群，发现 APEC 主要属于 A、B1、D 进化分群，B2 群较少，该结果与我们以前的调查结果一致<sup>[12-13]</sup>。然而，国外学者通过调查发现不同国家及地区 APEC 分离株的主要进化分群不同，有些国家的优势进化分群为 B2 群，但有些国家地区主要为 A 和 B1 进化分群 APEC<sup>[2,14]</sup>。国内学者检测了 100 株 APEC 发现 A 和 B2 为主要进化分群<sup>[15]</sup>，与我们的研究结果有些差异，这主要是由于不同地区的 APEC 流行菌株及优势血清型差异导致的。另外，本研究检测的 APEC 菌株主要分离于水禽病料，其也可能是 APEC 菌株进化分群不同的原因之一。结合 APEC 进化分群分析，发现 T5SS 在进化分群中的分布不一。T5SS *ehaA*、*ehaB*、*ehaD*、*pic*、*vat* 在 D 群 APEC 中分布率较

高, *upaC* 主要存在于 B2 群 APEC 中, 而 *ehaG*、*ag43/flu*、*apaC* 主要分布于 A 及 B1 群 APEC 中。类似的, Zude 等的研究表明部分 T5SS 和大肠杆菌进化分群存在一定的相关性, 通过研究发现 *ehaA*、*ehaG* 主要分布于 B1 群, 这些结果与本文结果存在一定的差异<sup>[7]</sup>。Zude 等检测了致病性大肠杆菌及正常的非致病性大肠杆菌中的 T5SS 分布, 由于不同致病型大肠杆菌的进化分群差异较大, 其可能是导致与我们结果不一致的原因之一。通过分析发现 T5SS 与 APEC 毒力基因分布之间不存在明显的关联性, 与其他研究结论一致<sup>[7]</sup>。

目前, 由于抗生素的滥用, 导致细菌耐药性日趋严重, 因此研发新型药物或疫苗来防控细菌性疾病显得尤为重要。由于 T5SS 在病原菌感染宿主第一步, 即黏附过程中发挥重要作用, 且其属于胞外蛋白, 具有一定的免疫原性, 因此 T5SS 成为潜在的疫苗靶标。近 50 年, 有许多 T5SS 已成功用作疫苗成分, 如百日咳杆菌黏附素 (Pertactin)、流感副血菌的自分泌黏附素 Hap 等<sup>[16]</sup>。我们前期研究也发现, 免疫纯化表达的 APEC 及鼠伤寒沙门菌 T5SS 可刺激机体产生高水平的抗体, 并对 APEC 及鼠伤寒沙门菌感染提供免疫保护作用<sup>[17]</sup>。另外, 由于 T5SS 的抗原性及自分泌蛋白特性, T5SS 还被作为载体用于保护性抗原的表面展示<sup>[18]</sup>。已有研究通过大肠杆菌 AIDA 和奈瑟菌 IgA 表达并转运恶性疟原虫的蛋白, 并可以刺激机体产生高水平抗体<sup>[19-20]</sup>。鉴于 T5SS 广泛存在于 APEC, 且参与 APEC 感染及致病过程, 因此需要进一步深入研究 T5SS 的致病机制及作为疫苗候选成分, 从而为防控禽大肠杆菌病奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Belanger L, Garenaux A, Harel J, et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2011, 62(1): 1-10
- [2] Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(10): 3366-3376
- [3] Tivendale KA, Logue CM, Kariyawasam S, et al. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(8): 3412-3419
- [4] Leo JC, Grin I, Linke D. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2012, 367(1592): 1088-1101
- [5] Fan EG, Chauhan N, Udatha DB, et al. Type V secretion systems in bacteria[A]//Kudva IT, Cornick NA, Plummer PJ, et al. Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens[M]. 5th ed. Washington, DC: ASM Press, 2016
- [6] Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(3): 1231-1243
- [7] Zude I, Leimbach A, Dobrindt U. Prevalence of autotransporters in *Escherichia coli*: what is the impact of phylogeny and pathotype?[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2014, 304(3/4): 243-256
- [8] Andrade FB, Abreu AG, Nunes KO, et al. Distribution of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* in typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2017, 50: 83-86
- [9] Zhuge XK, Pan ZH, Tang F, et al. The effects of *upaB* deletion and the double/triple deletion of *upaB*, *aatA*, and *aatB* genes on pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(24): 10639-10654
- [10] Meng QM, Wang SH, Han XG, et al. Multiplex PCR assay for detection of virulence genes in Avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(6): 696-702 (in Chinese)  
孟庆美, 王少辉, 韩先干, 等. 禽致病性大肠杆菌毒力基因多重 PCR 方法的建立和应用[J]. 微生物学报, 2014, 54(6): 696-702
- [11] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4555-4558
- [12] Wang SH, Dai JJ, Lu CP. Distribution of putative virulence genes of Avian pathogenic *Escherichia coli* IMT5155 in *E. coli* strains isolated from human and animal[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(7): 972-978 (in Chinese)  
王少辉, 戴建君, 陆承平. 禽致病性大肠杆菌 IMT5155 疑似毒力基因在人源及动物源大肠杆菌中的分布[J]. 微生物学报, 2011, 51(7): 972-978
- [13] Hu L, Liu XY, Wang HJ, et al. Phylogenetic clustering and virulence-associated genes of avian pathogenic *Escherichia coli* in some areas of eastern China[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 46(1): 9-13 (in Chinese)

- 胡林, 刘晓燕, 王颢锦, 等. 华东部分地区禽致病性大肠杆菌系统进化分群及毒力相关基因的检测[J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(1): 9-13
- [14] Coura FM, Diniz SA, Silva MX, et al. Phylogenetic group of *Escherichia coli* isolates from broilers in brazilian poultry slaughterhouse[J]. The Scientific World Journal, 2017, 2017: 5898701
- [15] Zhao LX, Gao S, Huan HX, et al. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model[J]. Microbiology, 2009, 155: 1634-1644
- [16] Wells TJ, Tree JJ, Ulett GC, et al. Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 274(2): 163-172
- [17] Wang SH, Yang DH, Wu XJ, et al. Autotransporter MisL of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium facilitates bacterial aggregation and biofilm formation[J]. FEMS Microbiology Letters, 2018, 365(17): 142
- [18] Rutherford N, Mourez M. Surface display of proteins by gram-negative bacterial autotransporters[J]. Microbial Cell Factories, 2006, 5: 22
- [19] Klauser T, Krämer J, Otzelberger K, et al. Characterization of the *Neisseria* IgA<sub>β</sub>-core: the essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion[J]. Journal of Molecular Biology, 1993, 234(3): 579-593
- [20] Konieczny MPJ, Suhr M, Noll A, et al. Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2000, 27(4): 321-332

~~~~~  
(上接 p.3075)

## 征 稿 简 则

### 4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受作者独立创作的原创性作品, 享有自主知识产权, 无抄袭问题; 文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过, 并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题; 论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题; 全部数据真实可靠, 且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题, 编辑部调查核实后可随时终止流程, 已发表的将发布公告公开撤销发表, 并将作者列入黑名单, 本刊不再受理该作者任何稿件。作者文责自负。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式即各种文字、各种介质版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

### 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

### 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>