

禽致病性大肠杆菌脂多糖核心型分布与毒力基因的相关性分析

张宇曦^{1,2} 韩先干² 左佳坤² 龚建森³ 韩月² 范国博² 王少辉²
田明星² 丁铲² 祁克宗^{1*} 于圣青^{2*}

(1. 安徽农业大学 安徽 合肥 230036)

(2. 中国农业科学院上海兽医研究所 上海 200241)

(3. 中国农业科学院家禽研究所 江苏 扬州 225125)

摘要:【目的】大肠杆菌脂多糖(LPS)核心型根据其化学结构的不同分为5种,即R1、R2、R3、R4和K12。通过对禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)安徽、江苏、上海和河南等省市分离株的脂多糖核心型分布情况的研究,分析其与大肠杆菌主要毒力基因之间的潜在联系,以期为APEC的研究和防治提供参考。【方法】对分离到的76株APEC,利用PCR方法开展对LPS核心型分型鉴定和毒力基因检测;分析LPS核心型的分布和毒力基因、致病性之间的相关性。【结果】在76株APEC分离株中,68.4%(52株)为R1核心型,15.8%(12株)为R3型,11.8%(9株)为R4型,3.9%(3株)为R2型,未检测到K12核心型。毒力基因鉴定结果中*yijp*、*mat*、*fimC*、*ibeB*和*ompA*的检验阳性率均达到90%以上,可作为APEC的保守基因。其中LPS核心型R1与*neuC*、*cva/cvi*、*irp2*均具有显著正相关性($P<0.05$),R3与*iroN*、*irp2*均具有显著负相关性($P<0.05$),R4核心型与*aatA*显著正相关($P<0.05$)。【结论】APEC的LPS核心型主要为R1。LPS核心型对部分毒力基因分布具有显著影响。

关键词: 禽致病性大肠杆菌, 脂多糖核心型, 毒力基因, 分布, 致病性, 相关性分析

Distribution of lipopolysaccharide core type in avian pathogenic *Escherichia coli* and its correlation with virulence gene

ZHANG Yu-Xi^{1,2} HAN Xian-Gan² ZUO Jia-Kun² GONG Jian-Sen³ HAN Yue²
FAN Guo-Bo² WANG Shao-Hui² TIAN Ming-Xing² DING Chan² QI Ke-Zong^{1*}
YU Sheng-Qing^{2*}

(1. Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

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

(3. Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou, Jiangsu 225125, China)

Abstract: [Objective] The core type of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) is divided into 5

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31370045, 31372402); 上海市科技兴农重点攻关项目[No. 沪农科攻字(2015)第1-9号]; 农业公益性行业科研专项项目(No. 201303044)

*通讯作者: 祁克宗: Tel: 86-551-65786835; 信箱: qkz@ahau.edu.cn

于圣青: Tel: 86-21-34293461; 信箱: yus@shvri.ac.cn

收稿日期: 2014-10-24; 接受日期: 2014-11-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-12-26

types, R1, R2, R3, R4 and K12, based on their different chemical structure. The aim of the present study was to study the distribution of LPS core type in avian pathogenic *E. coli*, and its correlation with virulence genes. **[Methods]** LPS core type and 17 virulence genes were detected in 76 strains of APEC by PCR. The correlation of LPS core type and virulence was analyzed. **[Results]** The core types of R1, R3, R4 and R2 were 68.4%, 15.8%, 11.8% and 3.9%, respectively. The virulence genes *yijp*, *mat*, *fimC*, *ibeB* and *ompA* were conserved in APEC strains. The R1 core type was significantly positive correlated with *neuC*, *cva/cvi* and *irp2* ($P < 0.05$), the R4 core type was positive correlated with *aataA*, whereas the R3 core type was negative correlated with *iroN* and *irp2* ($P < 0.05$). **[Conclusion]** R1 core type is more prevalent than other LPS core types and associated with high pathogenicity.

Keywords: Avian pathogenic *Escherichia coli*, LPS core, Virulence genes, Distribution, Pathogenicity, Correlation analysis

禽致病性大肠杆菌 (Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)可引起鸡、鸭及其他禽类的肠道外疾病,常见有心包炎、气囊炎、关节滑膜炎等,严重时可引起败血症及急性死亡^[1-2]。近年来,随着集约化养禽业的发展,该病严重制约养禽业的健康发展,同时对食品安全构成威胁,因此开展对APEC的监测和研究,具有重要的经济及社会意义。

影响APEC致病性的毒力因子包括:黏附素、溶血素、摄铁系统、脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、侵袭素、毒素等^[1]。LPS在APEC的致病过程中发挥重要作用,LPS是革兰氏阴性菌(G⁻菌)外膜的结构成分,不仅是内毒素的主要来源,而且其中的O抗原是血清分型的一个重要依据^[3-4]。LPS由类脂A、核心多糖(分为外核心和内核心)和O抗原三部分组成^[5]。不同于O抗原的复杂多变,核心多糖相对保守。在肠杆菌属中,核心多糖内核心部分非常保守,外核心部分由于多糖组成和排列不同而存在变化。依据外核心多糖的差异,大肠杆菌LPS分为5种类型,分别为R1、R2、R3、R4、K12^[6-8]。研究表明,外核心多糖的差异与大肠杆菌的致病性、免疫原性以及毒力基因分布等生物学特性有关联。Currie等^[9]报道R3核心型LPS与产vero细胞毒素*E. coli*存在显著联系;van Dijk等^[10]报道抗LPS核心型抗血清具有针对同核心型*E. coli*感染的免疫保护作用,而不用考虑其血清型的差异;Dissanayake等^[11]报道APEC的LPS核心型R4与*tsh*、*iss*两种毒力基因存在显著相关性。因此,开

展对LPS核心型的研究成为研究大肠杆菌(*E. coli*)致病性以及新型疫苗的新方向^[12]。

本研究对分离自安徽、江苏、上海和河南等省市APEC菌株的LPS核心型和毒力相关基因分布进行了检测,对LPS核心型的分布及与毒力因子的相关性进行了分析,以期对APEC核心型疫苗的研制和该病的防控提供参考。

1 材料与方 法

1.1 菌株和试剂

76株APEC菌株为本实验室在2007-2014年间分离于安徽、江苏、上海和河南等省市的病禽^[13-14]。DNA marker和2×ESTaq MasterMix购自北京康为世纪公司。引物合成由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成。细菌基因组提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。

1.2 细菌培养及基因组的制备

APEC分离株在LB液体培养基(胰蛋白胨10g,氯化钠10g,酵母提取物5g,加水至1L)中37℃培养至对数生长期。取1-2mL菌液,6000r/min离心5min收集菌体,根据细菌基因组DNA提取试剂盒(天根)说明书进行提取基因组。提取后检测纯度和浓度,纯度要求 OD_{260} 与 OD_{280} 比值在1.8-1.9之间。

1.3 禽致病性大肠杆菌脂多糖(LPS)核心型鉴定

参照Amor等^[15]发表的文献合成5种LPS核心型检测引物(表1),利用PCR方法检测APEC各菌株的LPS核心型。

表 1 APEC 的 LPS 核心型以及毒力基因鉴定引物
Table 1 Primers used for the identification of LPS core and virulence-associated genes of avian pathogenic *Escherichia coli*

基因 Gene	描述 Description	引物序列 Prime sequences (5'→3')	扩增大小 Size (bp)
LPS core			
R1		F: GGGATGCGAACAGAATTAGT R: TTCCTGGCAAGAGAGATAAG	551
R2		F: GATCGACGCCGGAATTTTTT R: AGCTCCATCATCAAGTGAGA	1 141
R3		F: GGCCAAAACACTATCTCTCA R: GTGCCTAGTTTATACTTGAA	1 785
R4		F: TGCCATACTTATTTCATCA R: TGGAATGATGTGGCGTTTAT	699
K12		F: TTCGCCATTTTCGTGCTACTT R: TAATGATAATTGGAATGCTGC	916
Virulence-associated genes			
<i>aatA</i>	APEC autotransporter gene A	F: CATAGGCGTTTCTCTTTCCGAT R: CCTGTGCTTCATACAGATTCGTT	1 226
<i>papC</i>	Pilus associated with pyelonephritis	F: GCTGATATCACGCAGTCAGT R: GTCAACAAGAAGACGTGTTCC	768
<i>tsh</i>	Temperature-sensitive haemagglutinin	F: GTCTGTCAGACGTCTGTGTTTC R: ATAGGATGACAGGCTACCGAC	598
<i>fimC</i>	Type 1 fimbriae (D-mannose-specific adhesin)	F: GCCGATGGTGTAAGGATGG R: GGGTAAAGTGCGCCATAATCA	475
<i>mat</i>	Meningitis-associated and temperature regulated fimbriae	F: CGACCTGGTCAGCAACAGCC R: TCCACGCCACATTCAGTGT	238
<i>ibeB</i>	Invasion of brain endothelium	F: GTTCTCACTCAGCCAGAACG R: CATCCAGCACTTCCAGATAAC	1 172
<i>vat</i>	Vacuolating autotransporter toxin	F: TCCATGCTTCAACGTCTCAGAG R: CTGTTGTCAGTGTCGTGAACG	939
<i>yijp</i>	Invasin of brain endothelium	F: TGGCTTGATTCTGCATCCGAT R: CATCGTCTGCTGGTTGGTGAT	517
<i>ibeA</i>	Invasin of brain endothelium	F: GTATGACGGTGGGAACAAGAG R: TGGCAATAGCAGCGGCAGTC	321
<i>ompA</i>	Outer membrane protein	F: AGCTATCGCGATTGCAGTG R: GGTGTTGCCAGTAACCGG	919
<i>neuC</i>	K1 capsular polysaccharide	F: GGTGGTACATTCCGGGATGTC R: CATGGTGGTGAAAAGACATTAGC	792

(待续)

			(续表)
<i>cva/cvi</i>	Structural genes of colicin V operon	F: TCCAAGCGGACCCCTTATAG R: CGCAGCATAGTTCCATGCT	598
<i>iss</i>	Increased serum survival	F: ATCACATAGGATTCTGCCG R: CAGCGGAGTATAGATGCCA	309
<i>iroN</i>	Catecholate siderophore receptor	F: CCTCCGACGATGATAATGACG R: GATACCATTATGCGTAATGCC	866
<i>fyuA</i>	Ferric yersinia uptake	F: ATGTGAAACTGCGTCTGGCG R: CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	728
<i>iucD</i>	Aerobactin synthesis	F: GAAGCATATGACACAATCCTG R: CAGAGTGAAGTCATCACGCAC	613
<i>irp2</i>	Iron-repressible protein	F: CTGATGAACTCACTCGCTATCC R: AGCATCTCCTGGCTCTGCTC	440

以提取的 76 株 APEC 基因组 DNA 为模板, 用灭菌双蒸水将基因组 DNA 浓度稀释至 100 mg/L。PCR 反应体系为(25.0 μ L): 2 \times ESTaq MasterMix 12.5 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1.5 μ L, 模板(基因组 DNA) 1.0 μ L, 加灭菌双蒸水补至 25.0 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 130 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.4 禽致病性大肠杆菌毒力相关基因的检测

参照文献[16], 设计用于扩增 *aatA*、*papC*、*tsh*、*fimC*、*mat*、*ibeB*、*vat*、*yijp*、*ibeA*、*ompA*、*neuC*、*cva/cvi*、*iss*、*iroN*、*fyuA*、*iucD*、*irp2* 等 17 个 APEC 毒力相关基因的检测引物(表 1)。

以提取的 76 株 APEC 基因组 DNA 作为模板, 使用灭菌双蒸水将基因组 DNA 浓度稀释至 100 mg/L, 应用 4 组 PCR 反应进行扩增鉴定。PCR 反应体系(25.0 μ L): 2 \times ESTaq MasterMix 12.5 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L, 模板(基因组 DNA) 1.0 μ L, 加灭菌双蒸水补至 25.0 μ L。PCR 反应条件均为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 50 s, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.5 5 种 LPS 核心型禽致病性大肠杆菌致病能力的评价

APEC 的致病能力可以用 8 种毒力基因 *PapC*、*iucD*、*irp2*、*tsh*、*vat*、*aatA*、*iss* 和 *cva/cvi* 的分布进行评价, 一株大肠杆菌若具有上述 8 种毒力基因的 4 种及以上即为强致病性菌株^[17]。依据这一标准,

本文对 APEC 分离株的 LPS 核心型和毒力基因的分布情况进行统计、分析, 评价 LPS 核心型与致病性的相关性。

1.6 数据分析

使用 IBM SPSS Statistics 21 软件对实验数据进行分析。利用 Fisher's exact test 方法分析 LPS 核心型(R1、R2、R3、R4、K12)的分布, 以及与 APEC 毒力基因之间的相关性。设定检验水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 5 种 LPS 核心型在 APEC 分离株中的分布

运用 LPS 核心型的 5 种特异性引物对临床分离的 76 株 APEC 的核心型进行鉴定。结果表明, 可扩增出大小分别为 551 bp (R1)、1 141 bp (R2)、1 785 bp (R3)、699 bp (R4)的特异性条带(图 1)。LPS 核心型检测结果为, 在 76 株 APEC 分离株中, 68.4% (52 株)为 R1 核心型, 15.8% (12 株)为 R3 型, 11.8% (9 株)为 R4 型, 3.9% (3 株)为 R2 型, 未检测到 K12 核心型(图 2)。

2.2 毒力基因在 APEC 分离株中的分布情况

对 17 个 APEC 毒力相关基因进行 PCR 检测, 结果见表 2。检测结果表明, *yijp*、*mat*、*fimC*、*ibeB* 和 *ompA* 是 APEC 的保守基因, 在检测菌株中阳性率超过 90%; 含有 *iroN*、*iss*、*fyuA*、*iucD* 和 *cva/cvi* 的菌株阳性率介于 76.3%–50%; 而 *aatA*、*tsh*、*irp2*、*vat*、*papC*、*neuC* 和 *ibeA* 在分离菌株中含量较低, 阳性率低于 40%。

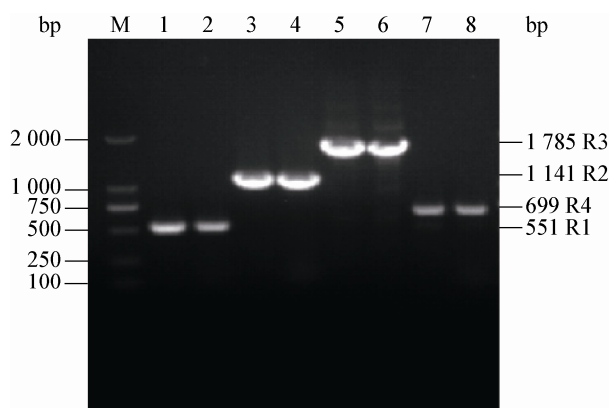


图1 大肠杆菌脂多糖核心型的 PCR 扩增
Figure 1 PCR amplification of LPS core genes from *E. coli* strains

注: M: DNA marker; 1, 2: R1 型, 分别扩增自 APEC CE03 菌株和 APEC CE58 菌株; 3, 4: R2 型, 分别扩增自 APEC CE02 菌株和 APEC CE04 菌株; 5, 6: R3 型, 分别扩增自 APEC CE23 菌株和 APEC CE40 菌株; 7, 8: R4 型, 分别扩增自 APEC CE26 菌株和 APEC CE65 菌株。

Note: M: DNA marker; 1, 2: Type R1 (Amplified from APEC CE03 strain and APEC CE58 strain, respectively); 3, 4: Type R2 (Amplified from APEC CE02 strain and APEC CE04 strain, respectively); 5, 6: Type R3 (Amplified from APEC CE23 strain and APEC CE40 strain, respectively); 7, 8: Type R4 (Amplified from APEC CE26 strain and APEC CE65 strain, respectively).

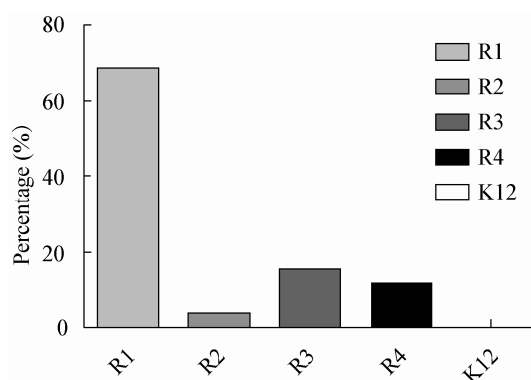


图2 76 株 APEC 中脂多糖核心型的分布情况
Figure 2 Distribution of LPS core types in 76 APEC strains

2.3 LPS 核心型的毒力评价

对不同 LPS 核心型 APEC 中 *PapC*、*iucD*、*irp2*、*tsh*、*vat*、*aatA*、*iss*、*cva/cvi* 八种毒力基因的分布进行了研究(表 3)。结果表明, 在 52 株 R1 核心型的 APEC 分离株中, 8 种毒力基因同时存在 4 种以上的占 50.0%, 高于 R2 型、R3 型、R4 型和 K12 型中的比例(分别为 0、33.3%、22.2%、0); 同时存在 3 种以上毒力基因的占 82.6%, 同样高于 R2 型、R3 型、R4 型和 K12 型(分别为 33.3%、41.7%、77.8%、0)。

表2 76 株 APEC 临床分离株中 LPS 核心型以及 17 个毒力相关基因分布情况
Table 2 Distribution of LPS core and 17 virulence-associated genes in 76 APEC isolates

脂多糖核心型 LPS core	分布率 Distribution of LPS core (%)	不同核心型 APEC 中毒力基因的检出率 Percentage of virulence genes in APEC isolates with different LPS core (%)																
		<i>yijp</i>	<i>mat</i>	<i>fimC</i>	<i>ibeB</i>	<i>ompA</i>	<i>iroN</i>	<i>iss</i>	<i>fyuA</i>	<i>iucD</i>	<i>cva/cvi</i>	<i>aatA</i>	<i>tsh</i>	<i>irp2</i>	<i>vat</i>	<i>papC</i>	<i>neuC</i>	<i>ibeA</i>
R1	68.42	96.2	96.2	92.3	94.2	88.5	82.7	75.0	65.4	67.3	59.6	34.6	42.3	44.2	34.6	32.7	23.1	15.4
R2	3.95	100	100	100	100	100	66.7	66.7	66.7	66.7	33.3	0.0	0.0	0	33.3	0.0	0	0.0
R3	15.79	100	83.3	91.7	91.7	100	41.7	50.0	75.0	50.0	33.3	33.3	33.3	8.3	25.0	16.7	0	8.3
R4	11.84	100	100	100	88.9	100	88.9	66.7	88.9	77.8	22.2	88.9	33.3	33.3	11.1	22.2	0	11.1
All Samples	100	97.4	94.7	93.4	93.4	92.1	76.3	69.7	69.7	65.8	50.0	39.5	38.2	35.5	30.3	27.6	15.8	13.2

表3 76 株 APEC 分离株中 *papC*、*iucD*、*irp2*、*tsh*、*vat*、*aatA*、*iss*、*cva/cvi* 存在情况统计
Table 3 Percentages of *papC*、*iucD*、*irp2*、*tsh*、*vat*、*aatA*、*iss*、*cva/cvi* in 76 APEC isolates

脂多糖核心型 LPS core	菌株数 ≥ 4 (百分比, %)		菌株数 ≥ 3 (百分比, %)		全部 Total
	Number of strain ≥ 4 (Percentage, %)	Number of strain ≥ 4 (Percentage, %)	Number of strain ≥ 3 (Percentage, %)	Number of strain ≥ 3 (Percentage, %)	
R1	26 (50.0)	26 (50.0)	43 (82.6)	43 (82.6)	52
R2	0 (0)	0 (0)	1 (33.3)	1 (33.3)	3
R3	4 (33.3)	4 (33.3)	5 (41.7)	5 (41.7)	12
R4	2 (22.2)	2 (22.2)	7 (77.8)	7 (77.8)	9
K12	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0

依据 Ewers 等^[17]评价 APEC 毒力的标准(同时存在 4 种毒力基因的为强毒株), 本研究中 5 种 LPS 核心型的 APEC 分离株中存在强毒力菌株的比率由大到小排列依次为 R1 型、R3 型、R4 型、R2 型、K12 型。

2.4 LPS 核心型与 APEC 毒力基因之间的相关性

使用 IBM SPSS Statistics 21 进行 Fisher's exact test 方法分析 APEC 分离株的 4 个 LPS 核心型与毒力基因的相关性, 结果显示 LPS 核心型 R1 与 *neuC*、*cva/cvi*、*irp2* 均呈显著正相关性, 其 *P* 值分别为 0.014、0.025、0.021; R3 与 *iroN*、*irp2* 均具有显著负相关性, 其 *P* 值分别为 0.005、0.046; R4 核心型与 *aatA* 显著正相关(*P*=0.002)。分析结果表明 LPS 核心型对部分毒力基因分布具有显著影响。

3 讨论

本研究对分离自安徽、江苏、上海和河南等省市的 76 株 APEC 的 LPS 核心型进行鉴定, 结果表明 R1 型为优势核心型, 占分离株的 68.4%。这一结果与国外报道 LPS 核心型在大肠杆菌中的分布情况一致。Appelmek 等^[18]发现从临床菌血症患者分离得到的 138 株 *E. coli* 中有 68% 分离株为 R1 核心型。Amor 等^[15]分析 72 株不同来源的 *E. coli* 发现有 69.4% 为 R1 型 LPS。2008 年, Dissanayake 对 193 株禽类大肠杆菌分离株进行检测, 发现 61% 的菌株为 R1 核心型^[11]。

本研究对来自安徽、江苏、上海及河南等地区的 76 株 APEC 分离株核心型分布数据与 Dissanayake 对分离自斯里兰卡的多个地区的 APEC 的 LPS 核心型检测数据基本吻合^[11], 却与人源大肠杆菌和牛源大肠杆菌的 LPS 分型分布存在很大差异^[15,18-19]。由此, 本文推测不同 LPS 核心型菌株可能存在不同的宿主偏好性, 致使不同宿主来源的大肠杆菌 LPS 核心型分布不一致。

Ewers 等报道, 依据 APEC 中是否存在 4 及更多种的毒力基因(*PapC*、*iucD*、*irp2*、*tsh*、*vat*、*aatA*、

iss 和 *cva/cvi*)来评价 APEC 是否具有强致病性^[17]。本研究结果表明 R1 核心型中, 具有强致病性的 APEC 菌株比例最高(50.0%), 其次为 R3 型(33.3%)和 R4 型(22.2%), 表明相对于其他 LPS 核心型的菌株, R1 核心型的 APEC 在禽类生理环境中具有存活、定殖优势。

对选择的 17 种毒力基因和 5 种脂多糖核心型分布进行相关性分析, 结果表明 LPS 核心型与部分毒力基因分布具有显著相关性。R1 型作为 APEC 的优势 LPS 核心型, 其与 *neuC*、*cva/cvi*、*irp2* 具有显著正相关性(*P*<0.05)。R3 与 *iroN*、*irp2* 具有显著负相关性(*P*<0.05)。R4 核心型与 *aatA* 显著正相关(*P*<0.05)。推测大肠杆菌 LPS 核心多糖的结构可能参与细菌维持某些生物学特性, 进而影响毒力基因的分布。

本研究通过对分离自安徽、江苏、上海和河南等省市 APEC 菌株的 LPS 核心型和毒力基因相关性进行分析, 以期对 APEC 的防控提供参考。

参考文献

- [1] Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)[J]. *Veterinary Research*, 1999, 30(2/3): 299-316
- [2] Lu CP. *Veterinary Microbiology*[M]. 4th Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2007: 99-107 (in Chinese)
陆承平. 兽医微生物学[M]. 第4版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 99-107
- [3] Ewers C, Janßen T, Wieler L. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)[J]. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 2002, 116(9/10): 381-395
- [4] Han Y, Han X, Yu S, et al. The *waaL* gene is involved in lipopolysaccharide synthesis and plays a role on the bacterial pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 172(3/4): 486-491
- [5] Skidmore BJ, Morrison D, Chiller J, et al. Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS). II. The unresponsiveness of C3H/HeJ Mouse spleen cells to LPS-induced mitogenesis is dependent on the method used to extract LPS[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1975, 142(6): 1488-1508
- [6] Heinrichs DE, Yethon JA, Whitfield C. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 30(2): 221-232
- [7] Poxton IR. Antibodies to lipopolysaccharide[J]. *Journal of*

- Immunological Methods, 1995, 186(1): 1-15
- [8] Rietschel ET, Brade H, Holst O, et al. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification[J]. Current Topics Microbiology and Immunology, 1996, 216: 39-81
- [9] Currie CG, Poxton IR. The lipopolysaccharide core type of *Escherichia coli* O157:H7 and other non-O157 verotoxin-producing *E. coli*[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 1999, 24(1): 57-62
- [10] van Dijk WC, Verhoef H, van Eme-van der Tol ME, et al. *Escherichia coli* antibodies in opsonisation and protection against infection[J]. Journal of Medical Microbiology, 1981, 14(4): 381-389
- [11] Dissanayake D, Wijewardana T, Gunawardena G, et al. Distribution of lipopolysaccharide core types among avian pathogenic *Escherichia coli* in relation to the major phylogenetic groups[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 132(3): 355-363
- [12] Erridge C, Stewart J, McIntosh TJ, et al. The biological activity of a liposomal complete core lipopolysaccharide vaccine[J]. Journal of Endotoxin Research, 2002, 8(1): 39-46
- [13] Bai H, Han XG, Yu SQ, et al. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from Jiangsu and Anhui provinces[J]. Microbiology China, 2013, 40(7): 1315-1322 (in Chinese)
白灏, 韩先干, 于圣青, 等. 禽致病性大肠杆菌江苏, 安徽分离株的生物学特性分析[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1315-1322
- [14] Chen WJ, Han XG, Yu SQ, et al. Characterization of duck pathogenic *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Veterinary Parasitology, 2010, 18(2): 34-40 (in Chinese)
陈文静, 韩先干, 于圣青, 等. 鸭致病性大肠杆菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(2): 34-40
- [15] Amor K, Heinrichs DE, Fridrich E, et al. Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from *Escherichia coli*[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(3): 1116-1124
- [16] Meng QM, Wang SH, Yu SQ, 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, 于圣青, 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
- [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] Appelmelk BJ, An Y, Hekker TA, et al. Frequencies of lipopolysaccharide core types in *Escherichia coli* strains from bacteraemic patients[J]. Microbiology, 1994, 140(5): 1119-1124
- [19] Gibbs RJ, Stewart J, Poxton IR. The distribution of, and antibody response to, the core lipopolysaccharide region of *Escherichia coli* isolated from the faeces of healthy humans and cattle[J]. Journal of Medical Microbiology, 2004, 53(10): 959-964