

禽致病性大肠杆菌江苏、安徽分离株的生物学特性分析

白灏^{1,2} 冀辉¹ 韩先干² 龚建森³ 董洪亮²
丁铲² 祁克宗^{1*} 于圣青^{2*}

(1. 安徽农业大学 动物科技学院 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】研究禽致病性大肠杆菌(Avian Pathogenic *Escherichia coli*, APEC)江苏、安徽分离株的优势血清型, 并分析其生物学特性。【方法】对分离自病禽的细菌进行鉴定, 采用玻片凝集法测定禽致病性大肠杆菌的血清型, PCR 方法检测 14 种毒力基因的分布, 采用美国临床和实验室标准化研究所的方法进行药物敏感性检测, 改良结晶紫半定量法检测分离细菌的生物被膜形成能力。【结果】共分离到禽致病性大肠杆菌 56 株, 血清型检测结果表明, O78 血清型占 64.29%, 为主要血清型。毒力基因检测显示, *fimC*、*pfs*、*ompA* 和 *luxS* 的阳性率超过 90%。药物敏感性检测显示, 58.93% 的菌株对 8 种以上的药物耐受。生物被膜检测显示, 有 16 株细菌生物被膜形成能力为中等以上, 其中 68.75% 的菌株耐 8 种以上的药物。【结论】O78 为主要流行的血清型。*fimC*、*pfs*、*ompA* 和 *luxS* 基因为 APEC 保守基因。多重耐药性仍很普遍, 细菌生物被膜与耐药性具有相关性。

关键词: 禽致病性大肠杆菌, 血清型, 毒力基因, 耐药性, 生物被膜

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31001078, 30871851)

*通讯作者: 于圣青: Tel: 86-21-34293461; ✉: yus@shvri.ac.cn

祁克宗: Tel: 86-551-5786835; ✉: qkz@ahau.edu.cn

收稿日期: 2012-09-21; 接受日期: 2012-11-09

Characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* isolated from Jiangsu and Anhui provinces

BAI Hao^{1,2} JI Hui¹ HAN Xian-Gan² GONG Jian-Sen³ DONG Hong-Liang²
DING Chan² QI Ke-Zong^{1*} YU Sheng-Qing^{2*}

(1. Anhui Agricultural University, College of Animal Science & Technology, 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 aim of this study was to study the main serotypes and the biological characteristics of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from Jiangsu and Anhui provinces. [Methods] The tested strains were isolated from sick poultry and identified by slide agglutination to determine serotypes. Virulence-associated genes were identified by PCR and the drug susceptibilities were detected according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Moreover, the biofilm-forming abilities were detected through improved crystal violet semi-quantitative method. [Results] In total 56 strains were isolated and identified. Slide agglutination results show that O78 was the main serotype accounted for 64.29% of the isolates. PCR amplification results of the virulence-associated genes showed that *fimC*, *pfs*, *ompA* and *luxS* were amplified from more than 90% of the tested strains. Drug sensitivity test results showed that 58.93% of the strains were resistant to more than 8 antibiotics. Biofilm formation assay showed that 16 isolates produced moderate or strong biofilm *in vitro*, in which 68.75% were resistant to more than 8 antibiotics. [Conclusion] O78 was the main serotype among the isolates. The genes of *fimC*, *pfs*, *ompA* and *luxS* were conserved in APEC. Multi-antibiotic resistance was very common and drug resistance seemed relative to biofilm-forming ability.

Keywords: Avian Pathogenic *Escherichia coli*, Serotypes, Virulence-associated genes, Drug resistance, Biofilm formation

禽致病性大肠杆菌 (Avian Pathogenic *Escherichia coli*, APEC)可引起禽类的多种疾病, 常表现为心包炎、肝周炎、腹膜炎、气囊炎、输卵管炎、滑膜炎以及败血症等症状, 是目前严重危害养禽业的传染病之一^[1-2]。

禽致病性大肠杆菌血清型众多, O1、O2 和

O78 为主要的流行血清型。禽致病性大肠杆菌的主要毒力因子包括: 粘附素(Adhesins), 铁螯合蛋白系统(Aerobactin iron-sequestering system), 耶尔森杆菌素(Yersiniabactin), 血清增强存活因子(Increase serum survival), 外膜蛋白(Outer membrane proteins), 大肠杆菌素(Colicin production),

温度敏感血凝素(Temperature-sensitive hemagglutinin), 溶血素(Hemolysin E), 志贺毒素(Shiga toxin)等^[3]。

细菌生物被膜(Bacterial biofilms)是单细胞生物体粘附在固体表面聚集为一个群落, 分泌多糖蛋白、纤维蛋白、脂质蛋白等, 将自身包裹其中。细菌生物被膜已经被证明在许多细菌中存在, 包括大肠杆菌、猪链球菌、嗜血杆菌和鸭疫里默氏杆菌等^[4]。Lewis 经过长期研究发现生物被膜与细菌的耐药性相关, 当细菌存在于生物被膜内, 对抗菌剂的抵抗能力显著增强^[5-6]。

本研究通过对苏皖地区禽致病性大肠杆菌的分离、血清型鉴定、毒力基因的组成、耐药性和生物被膜的研究, 为探究禽致病性大肠杆菌可能的致病机理及防控工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂和菌株

禽致病性大肠杆菌菌株为本实验室 2007-2012 年分离自安徽、江苏地的病禽。麦康凯培养基, 购自青岛高科园海博公司。DNA marker、PCR MasterMix, 购自北京康为世纪公司。细胞培养板, 购自美国 Corning 公司。大肠杆菌 O 血清型鉴定用单因子血清 O1、O2、O78 和 O157, 购自中国兽医药品监察所。生化鉴定管, 购自广东环凯公司。药敏纸片, 购自杭州天和公司。生物被膜染色液 LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kits, 购自上海英骏生物技术有限公司。

1.2 禽致病性大肠杆菌的分离鉴定

将病禽无菌解剖, 取病变肝脏, 接种于麦康凯培养基中, 37 °C 培养过夜后, 挑取疑似菌株接种于 LB 液体培养基。

参照文献[7]的大肠杆菌鉴定引物(表 1), 对分离菌株进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系为: PCR MasterMix 10 μL、上下游引物(10 pmol/L)各 1 μL、模板(10 pmol/L) 1 μL、超纯水 7 μL。PCR 反应条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。对 PCR 鉴定阳性的菌株, 用三糖铁琼脂培养鉴定, 并做葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、乳糖发酵试验、吡哌啶试验、甲基红试验、VP 试验、枸橼酸盐利用试验、硫化氢试验、脲酶试验和动力试验等进一步进行鉴定。

1.3 禽致病性大肠杆菌的 O 血清型鉴定

将分离的大肠杆菌菌株接种于 LB 固体培养基中, 培养过夜, 用 0.5%石炭酸生理盐水洗下培养物, 制成菌悬液, 121 °C 高压 2 h, 制备菌体抗原。分别取 10 μL 菌体抗原和大肠杆菌 O 抗原血清置于玻板上混匀。明显凝集者为阳性, 同时以菌体抗原与 0.5%石炭酸生理盐水混合物作对照。

1.4 禽致病性大肠杆菌毒力相关基因的检测

参照文献[3]和[8], 设计 14 种毒力基因的检测引物(表 2)。PCR 反应体系和反应条件同上。

1.5 禽致病性大肠杆菌药物敏感性检测

参照美国临床和实验室标准化研究所(CLSI)制定的抗菌药物敏感性试验执行标准, 选取 16 种抗菌药, 分别为氨苄青霉素、头孢噻吩、庆大

表 1 禽致病性大肠杆菌鉴定用引物序列		
Table 1 Primers used for the identification of Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i>		
Primers	Sequences (5'→3')	Size (bp)
<i>E. coli</i> phoA P1	CGATTCTGGAAATGGCAAAAG	720
<i>E. coli</i> phoA P2	CGTGATCAGCGGTGACTATGAC	

表 2 禽致病性大肠杆菌毒力相关基因检测用引物序列

Table 2 Primers used for the identification of virulence-associated genes of Avian Pathogenic *Escherichia coli*

Primers	Sequences (5'→3')	Size (bp)
<i>iss</i> -F	CCGTTCTGTACGATACTCCG	957
<i>iss</i> -R	AGATCAATCTGCCCATCCC	
<i>ompA</i> -F	ACGCTGTTTCACGTTGTCA	
<i>ompA</i> -R	AACCCGTATGTTGGCTTTG	753
<i>luxs</i> -F	ATGCCGTTGTTAGATAGC	516
<i>luxs</i> -R	CTAGATGTGCAGTTCCTGC	
<i>pfs</i> -F	ATGAAAATCGGCATCATT	
<i>pfs</i> -R	TTAGCCATGTGCAAGTTT	699
<i>fimC</i> -F	GTTCATGGCAATGGTGGTT	514
<i>fimC</i> -R	AGTTCCGGCATTCAACTCT	
<i>stx2f</i> -F	TTACCTCAGCCTTCCAAGC	
<i>stx2f</i> -R	CAGCCTTTCTTCTGTCTTCTC	548
<i>tsh</i> -F	TAAGCACGAACTGGGAAGTAT	677
<i>tsh</i> -R	TAGCGTTTATCGCATCATCT	
<i>iucD</i> -F	GCGGAAATAAACTGGGTC	
<i>iucD</i> -R	GGCATCAGTGAGGGAAGTA	410
<i>fyuA</i> -F	GCCATTCTGCCCCAATAAGT	145
<i>fyuA</i> -R	TCTGGTGAACCATCGCTAA	
<i>hlyE</i> -F	CTCAATCGGCATCCACAT	
<i>hlyE</i> -R	GTTTCCCTTCAACAACCC	456
<i>irp2</i> -F	AGGATTCTGCTGTTACCGGAC	286
<i>irp2</i> -R	TCGTCGGGCGGCGTTTCTTCT	
<i>cvaC</i> -F	GAAGCCACTCGTTCAAATC	
<i>cvaC</i> -R	CTGAAGCACCACCAGAAAC	437
<i>iroC</i> -F	CACAGGCACGGCTGGAAAT	549
<i>iroC</i> -R	GACCGACGACCGCAACAAC	

霉素、丁胺卡那、阿莫西林、头孢呋肟、头孢吡肟、头孢曲松、环丙沙星、洛美沙星、甲氧萘啶、头孢他啶、氯霉素、四环素、壮观霉素和卡那霉素。新鲜的被检细菌培养于 LB 琼脂平板上, 将药敏纸片均匀贴于固体培养基表面, 37℃ 培养过夜后, 测量药敏片的抑菌圈直径。参照 CLSI 标准, 判定被检细菌对每种药物的敏感性, 分别为敏感(Susceptible, S)、中敏(Intermediate, I)或耐

药(Resistance, R)菌株。

1.6 禽致病性大肠杆菌生物被膜检测

参照文献[9]的方法, 在无菌 96 孔细胞培养板中加入 OD_{600} 为 0.1 的菌液 100 μ L, 阴性对照孔加入等量的 LB 液体培养基, 37℃ 培养 36 h; 弃去培养液并用灭菌 PBS 洗涤 3 次, 自然风干; 每孔加 100 μ L 0.1% 结晶紫染色 30 min, 再用 PBS 洗涤 3 次, 自然风干; 每孔加 200 μ L 95% 乙醇溶

解后，酶标仪测定 OD_{595} 。

参考文献[10]，细菌的生物被膜形成能力被分为4个等级， OD 为被检细菌的 OD_{595} ， OD_c 为阴性对照的 OD_{595} ，具体如下： $OD < OD_c$ ，为不形成生物被膜株； $OD_c < OD < 2OD_c$ ，为弱生物被膜形成能力株； $2OD_c < OD < 4OD_c$ ，为中度生物被膜形成能力株； $4OD_c < OD$ ，为强生物被膜形成能力株。所有样品重复3次，取3次结果的平均值作为判定依据。

参考文献[7]，对强生物被膜形成能力的菌株进行荧光染色，在6孔板细胞培养板中，放入无菌的飞片，每孔加4 mL培养至 $OD_{600}=0.1$ 的菌液，培养36 h后，弃去培养物，用PBS洗3次，每孔加入200 μ L染色液，避光孵育15 min，PBS洗3次，将飞片放入载玻片，荧光显微镜观察细菌的生物被膜。

2 结果

2.1 禽致病性大肠杆菌的分离鉴定

根据临床症状和病理变化，结合麦康凯培养基的鉴别结果、PCR鉴定结果(图1)。对疑似大

肠杆菌进行三糖铁试验和生化鉴定。三糖铁试验结果显示阳性。生化鉴定结果显示，葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、乳糖、吡哌试验、甲基红、运动性试验阳性，VP试验、枸橼酸盐、硫化氢试验、脲酶试验阴性，上述检测结果表明共分离禽致病性大肠杆菌56株。

2.2 禽致病性大肠杆菌的O血清型鉴定

禽致病性大肠杆菌的O血清型鉴定结果表明，10.71%的分离株为大肠杆菌O1(6株)，14.29%的分离株为大肠杆菌O2(8株)，64.29%的分离株为大肠杆菌O78(36株)，3.57%的分离株同时表现为大肠杆菌O2和O78(2株)，7.14%的分离株为非上述4种O抗原血清型(4株)，未检测到O157型大肠杆菌(图2)。

2.3 禽致病性大肠杆菌毒力相关基因的检测

对14个毒力相关基因的检测结果表明，在56株分离株中检测阳性率超过90%的基因有4个，分别为 *fimC*、*pfs*、*ompA*和*luxS*基因，检出率分别为96.43%、98.21%、98.21%和100%。溶血素*hlyE*基因检出率最低，为5%。*iss*、*iroC*、*iucD*、*irp2*、*cvaC*、*tsh*、*fuyA*、*stx2f*和*ibeA*基因的检出率分别为59%、52%、55%、44.64%、44.64%、39.29%、25%、16.07%和10.71%(图3)。

2.4 禽致病性大肠杆菌的药物敏感性检测

对56株禽致病性大肠杆菌进行了16种抗菌

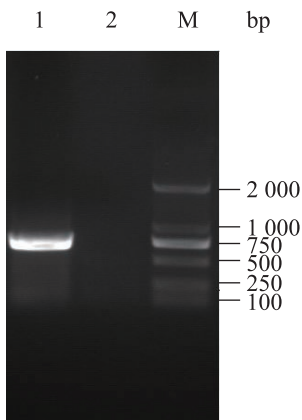


图1 *E. coli* 的PCR鉴定结果
Fig. 1 Identification of *E. coli* using PCR amplification
注：M：DL2000 DNA 相对分子质量标准；1： *E. coli* 的PCR鉴定结果；2：阴性对照。
Note: M: DNA marker DL2000; 1: PCR analysis of *E. coli*; 2: Negative control.

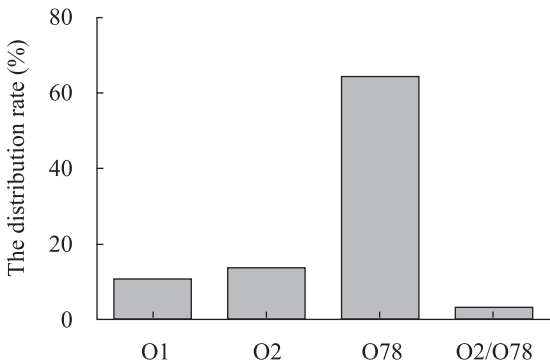


图2 56株禽致病性大肠杆菌的血清型分布
Fig. 2 Serotype distributions of 56 strains of Avian Pathogenic *Escherichia coli*

药物的敏感性检测。结果表明, 耐药性达到 50% 以上的有 9 种药, 分别为氨苄青霉素、头孢噻吩、阿莫西林、头孢呋肟、洛美沙星、甲氧苄啶、氯霉素、四环素和卡那霉素, 其中氨苄青霉素耐药率最高, 达到 94.64%。头孢他啶和头孢吡肟的耐药率最

低, 分别为 7.14% 和 14.29%, 具体结果如表 3 所示。

在 56 株分离菌中, 同时耐药 8 种以上的有 33 株, 占 58.93%, 耐药最多的达到同时耐 15 种药, 仅对一种药中敏。有 7 株细菌只耐其中的一种或两种药, 未发现不耐药的菌株。

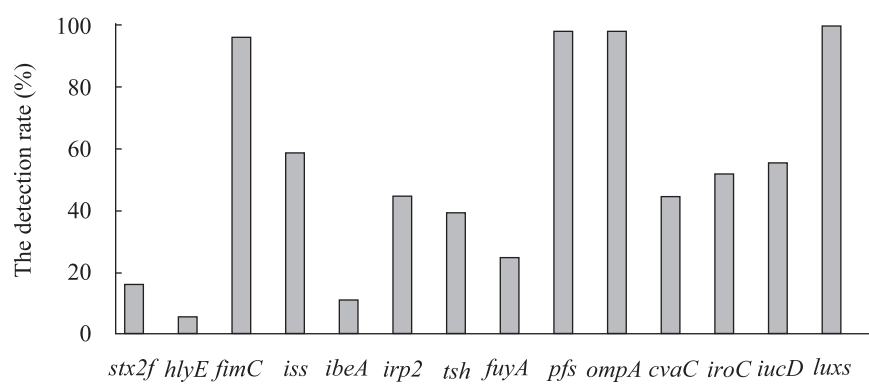


图 3 14 种毒力相关基因在 56 株禽致病性大肠杆菌中的检出率

Fig. 3 Distribution of 14 virulence-associated genes in 56 strains of Avian Pathogenic *Escherichia coli*

表 3 56 株禽致病性大肠杆菌的药敏试验			
Table 3 Drug sensitivity assay for 56 strains of Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i>			
药物 Drugs	菌株数 Number of isolates (%)		
	耐药(R)	中敏(I)	敏感(S)
氨苄青霉素 Ampicillin	53 (94.64%)	3 (5.36%)	—
头孢噻吩 Cephalothin	37 (66.07%)	14 (25%)	5 (8.93%)
庆大霉素 Gentamycin	23 (41.07%)	2 (3.57%)	31 (55.36%)
丁胺卡那 Amikacin	13 (23.21%)	27 (48.22%)	16 (28.57%)
阿莫西林 Amoxicillin	40 (71.43%)	16 (28.57%)	—
头孢呋肟 Cefuroxime	31 (55.36%)	23 (41.07%)	2 (3.57%)
头孢吡肟 Cefepime	8 (14.29%)	10 (17.86%)	38 (67.85%)
头孢曲松 Ceftriaxone	24 (42.86%)	3 (5.36%)	29 (51.78%)
环丙沙星 Ciprofloxacin	26 (46.43%)	3 (5.36%)	27 (48.21%)
洛美沙星 Lomefloxacin	33 (58.93%)	10 (17.86%)	13 (23.21%)
甲氧苄氨嘧啶 Trimethoprim	41 (73.21%)	15 (26.79%)	—
头孢他啶 Ceftazidime	4 (7.14%)	3 (5.36%)	49 (87.5%)
氯霉素 Chloroamphenicol	35 (62.5%)	3 (5.36%)	18 (32.14%)
四环素 Tetracycline	44 (78.57%)	—	12 (21.43%)
壮观霉素 Spectinomycin	11 (19.64%)	16 (28.57%)	29 (51.79%)
卡那霉素 Kanamycin	28 (50%)	20 (35.71%)	8 (14.29%)

2.5 禽致病性大肠杆菌生物被膜检测

生物被膜检测结果表明，具有强生物被膜形成能力的分离株有 4 株、中等的有 12 株、弱的有 10 株，30 株不形成生物被膜(图 4)。其中具有中等或强生物被膜形成能力的 16 株细菌中，耐药达到 8 种以上的占 68.75%，在 4 株生物被膜形成能力强的细菌中，有 3 株耐药达到 10 种以上。在这 16 株中等或强生物被膜形成能力细菌中，有 10 株以上都耐的药物达到 9 种，分别为氨苄青霉素、头孢噻吩、阿莫西林、头孢呋肟、头孢曲松、环丙沙星、洛美沙星、甲氧氨嘧啶和四环素。

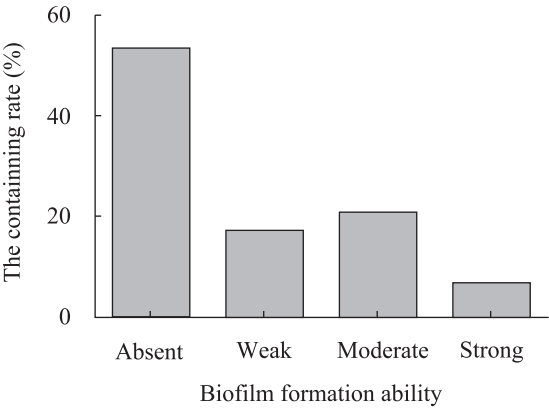


图 4 56 株禽致病性大肠杆菌生物被膜表型分析
Fig. 4 Biofilm formation of 56 strains of Avian Pathogenic *Escherichia coli*

具有生物被膜形成能力的禽致病性大肠杆菌经过荧光染色，在荧光显微镜下观察为大量的细菌相互缠绕聚集在一起，形成一个致密的网状结构，由自身分泌的胞外基质包裹其中，不同生物被膜形成能力分离株如图 5 所示。

3 讨论

本研究对 56 株江苏、安徽临床分离的禽致病性大肠杆菌进行了血清型鉴定，其优势血清型主要为 O78。有两株分离株具有与 O2 和 O78 两种抗血清都有凝集反应的特性。Lothar 等^[11]发现大肠杆菌 O123 的两个 H 型分别与 O4 和 O12 发生

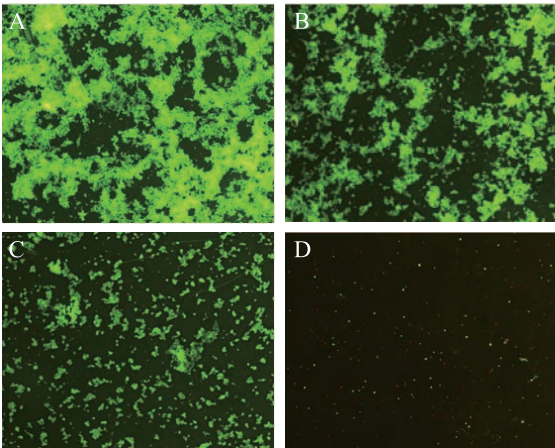


图 5 36 h 时生物被膜的荧光照片(400×)
Fig. 5 Fluorescence microscope images of biofilm at 36 h (400×)
注：A：强生物被膜形成株；B：中度生物被膜形成株；C：弱生物被膜形成株；D：不形成生物被膜株。
Note: A: Strong biofilm; B: Moderate biofilm; C: Weak biofilm; D: No biofilm.

交叉血清型反应，可能的原因是细菌 O 抗原表面结构的差异。此外，本次研究还有 4 株细菌血清型未定型，可能与本研究采用的检测血清型数量有限有关。

对 56 株禽致病性大肠杆菌毒力基因检测结果表明，*fimC*、*pfs*、*ompA* 和 *luxS* 为 APEC 的保守基因，在 APEC 中的阳性率达到 90% 以上。*fimC* 参与 I 型菌毛的生物合成，与细菌的黏附、入侵和繁殖有密切关系，*pfs* 和 *luxS* 参与合成密度感应系统中的信号分子 AI-2，通过信号分子 AI-2 调节毒力基因的表达，*ompA* 参与合成外膜蛋白，与禽大肠杆菌的致病性有密切联系，上述研究结果与国内外对 APEC 的毒力基因检测结果一致^[3,12]。此外，*hlyE* 参与合成溶血素，在禽致病性大肠杆菌中，国外学者或未检测到，或为极低的阳性率，与本研究中的低阳性率是一致的^[3,13]。

本研究对 8 株 O2 型禽致病性大肠杆菌的毒力基因检测结果表明，有 7 株或以上的菌株检测到有 *fimC*、*ompA*、*luxS*、*pfs*、*iucD* 和 *iroC* 基因的存在，表明上述基因与 O2 血清型的高度相关

性, Ewers 等^[14]曾经揭示血清型与毒力基因类型的关系, 两者的关系可能与基因的水平转移相关, 毒力基因与血清型的相关性及其具体机制仍需进一步的研究。

本研究对 56 株禽致病性大肠杆菌进行了 16 种药物的药物敏感试验, 耐药性达到 50% 以上的药物有 9 种, 同时耐药 8 种以上的菌株占 58.93%, 耐药最多的达到同时耐 15 种药, 仅对一种药中敏, 证明目前禽致病性大肠杆菌多重耐药性仍然很严重, 与抗菌药的不合理使用, 以及大肠杆菌的血清型众多有密切关系。头孢他啶和头孢吡肟作为头孢类抗菌药物的第 3 代和第 4 代产品在本次研究中有较低的耐药性, 临床可考虑作为治疗禽大肠杆菌病的候选药物。

生物被膜是限制抗菌药物进入菌体的天然屏障, 是造成细菌产生耐药性的主要因素之一。本研究通过结晶紫染色法对 56 株细菌进行生物被膜的检测, 结果表明, 生物被膜形成能力强的菌株有 4 株, 其中 3 株耐 10 种以上的药物。16 株生物被膜形成能力中等以上的菌株中, 耐药达到 8 种以上的菌株占 68.75%。本研究结果表明, 禽致病性大肠杆菌生物被膜的形成能力与细菌的耐药性相关。

本研究通过对苏皖地区禽致病性大肠杆菌的分离、血清型鉴定、毒力基因检测、生物被膜测定以及耐药性的研究, 为探究禽致病性大肠杆菌可能的致病机理及防控工作提供参考。

参 考 文 献

- [1] Ewers C, Janssen T, Wieler LH. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)[J]. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 2003, 116(9/10): 381–395.
- [2] 韩先干, 白灏, 刘蕾, 等. 禽致病性大肠杆菌安徽分离株 *luxS* 和 *pfs* 基因的克隆、表达与细胞外合成 AI-2 活性检测[J]. 微生物学报, 2012, 52(9): 1167–1172.
- [3] Janßen 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, 2001, 291(5): 371–378.
- [4] Hu QH, Han XG, Zhou XJ, et al. Characterization of biofilm formation by *Riemerella anatipestifer*[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 144(3/4): 429–436.
- [5] Lewis K. Riddle of biofilm resistance[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(4): 999–1007.
- [6] Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival[J]. Biochemistry (Moscow), 2005, 70(2): 267–274.
- [7] Hu QH, Tu J, Han XG, et al. Development of multiplex PCR assay for rapid detection of *Riemerella anatipestifer*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica* simultaneously from ducks[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 87(1): 64–69.
- [8] La Ragione RM, Woodward MJ. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia[J]. Research in Veterinary Science, 2002, 73(1): 27–35.
- [9] Wang Y, Zhang W, Wu ZF, et al. Reduced virulence is an important characteristic of biofilm infection of *Streptococcus suis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 316(1): 36–43.
- [10] Stepanović S, Vuković D, Dakić I, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 40(2): 175–179.
- [11] Beutin L, Wang Q, Naumann D, et al. Relationship between O-antigen subtypes, bacterial surface structures and O-antigen gene clusters in *Escherichia coli* O123 strains carrying genes for Shiga toxins and intimin[J]. Journal of Medical Microbiology, 2007, 56(Pt 2): 177–184.
- [12] 陈文静, 韩先干, 何亮, 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.
- [13] Blanco JE, Blanco M, Moraand A, et al. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with *in vivo* pathogenicity[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(11): 2953–2957.
- [14] Ewers C, Janßen T, Kießling S, et al. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry[J]. Veterinary Microbiology, 2004, 104(1/2): 91–101.