

猪源大肠杆菌(ETEC、STEC、AEEC)毒力基因及其与 O 抗原型的关系

陈祥^{**}, 赵李祥^{**}, 高崧^{*}, 苗晓青, 焦新安, 刘秀梵

(扬州大学, 农业部畜禽传染病学重点开放实验室/江苏省人兽共患病学重点实验室, 扬州 225009)

摘要: 【目的】 揭示从我国部分地区仔猪腹泻或水肿病病猪体内分离到的 300 个大肠杆菌分离株所属病原型 (pathotype)、毒力基因及其与 O 血清型的关系。【方法】 O 血清型采用常规的凝集试验进行测定, 毒力基因采用 PCR 方法检测。【结果】 通过对这 300 个分离株的 O 血清型及其毒素、紧密素和黏附素基因进行鉴定, 结果显示除 50 株未定型、17 株自凝外, 测定出 233 个分离株的血清型, 这些分离株覆盖了 45 个血清型, 其中以 O149、O107、O139、O93 和 O91 为主, 共 133 株, 占定型菌株的 57.1%; 拥有 *est*、*est*、*elt*、*stx2e* 和 *eaeA* 基因的菌株分别为 102 (34.0%)、190 (63.3%)、81 (27.0%)、57 (19.0%) 和 54 (18.0%) 株; 分离株中有 51 株 K88 基因阳性 (其中菌毛表达率为 100%), 75 株 F18 基因阳性 (其中菌毛表达率为 50.7%), 在 K88 菌株中, O149 血清型与 *est* 或 *est* + *elt* 密切相关, 在 F18 菌株中, O107 血清型与 *est* 或 *est*、O139 血清型与 *stx2e* 紧密相关。依其毒力特征可将这些分离株分为以下 6 种类型: ETEC、STEC、AEEC、ETEC/STEC、AEEC/ETEC 和 AEEC/ETEC/STEC, 分别拥有 190、24、36、32、17 和 1 个菌株, 占分离株的 63.3%、8.0%、12.0%、10.7%、5.7% 和 0.3%。通过分析这些分离株的 O 血清型、毒素类型和黏附素型之间的相关性: 猪源 ETEC 以 O149、O107、O93 和 O98 等血清型为主, O149: K88 菌株主要与 *est* 或 *est* + *elt* 肠毒素相关, O107: F18 菌株主要与 *est* 相关, O93 和 O98 血清型菌株主要与 *est* 肠毒素相关; STEC 菌株以 O139: F18 血清型为主, 拥有 *stx2e*; AEEC 菌株拥有紧密素, 无明显优势血清型; ETEC/STEC 菌株以 O107: F18 和 O116: F18 血清型为主, 主要与 *est* + *stx2e* 或 *est* + *stx2e* 密切相关, ETEC/AEEC 菌株以 O91 和 O107 血清型为主, 全部拥有肠毒素 *est* 和紧密素基因。【结论】 我国至少存在 6 种病原型的猪肠道致病性大肠杆菌, 其中 ETEC 为我国部分地区猪大肠杆菌病的主要病原, 同时其病原型日益复杂。

关键词: 仔猪; 大肠杆菌; 血清型; 毒力基因; 产肠毒素大肠杆菌; 产志贺毒素大肠杆菌; 黏附与脱落性大肠杆菌

中图分类号: Q939.94 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0857-06

猪大肠杆菌病主要包括初生仔猪腹泻 (习惯称为仔猪黄白痢)、断奶仔猪腹泻 (Postweaning *Escherichia coli* diarrhea, PWECD) 和/或水肿病 (Edema disease, ED)、

全身性感染、大肠杆菌性乳房炎及泌尿系统感染等, 猪肠道致病性大肠杆菌依其毒力特征及所致疾病症状不同, 可至少将其分为 3 种类型: 产肠毒素大肠杆菌

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(204050); 国家“863 计划”(2003AA222141)

*通讯作者: Tel: +86-514-87991448; Fax: +86-514-87972218; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

**作者简介: 对本文有同等贡献。陈祥(1978-), 男, 江苏盐城人, 博士, 主要从事病原生物学研究, E-mail: chenxiang@yzu.edu.cn;

赵李祥(1980-), 男, 江苏江都人, 博士, 主要从事微生物学研究, E-mail: zlxfranklin@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-10-08; 修回日期: 2008-02-25

(Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), 产志贺毒素大肠杆菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC), 黏附与脱落性大肠杆菌 (Attaching-effacing *E. coli*, AECC) [1]。ETEC 引起仔猪腹泻主要通过其表面的黏附素 (K88、K99、987P 和 F41 等) 吸附于小肠上皮细胞, 然后产生热敏肠毒素 (Heat labile enterotoxin, LT) 和/或耐热肠毒素 (Heat stable enterotoxin, ST) 致病。在猪上, STEC 可引起断奶仔猪腹泻和/或水肿病, 其主要通过黏附素在消化道定殖, 产生志贺样毒素 (Stx2e, 又称 Vero 细胞毒素), 某些致水肿病大肠杆菌菌株也能同时产生一种或几种肠毒素, 如 ST 和 LT。猪源 AECC 主要通过细菌外膜蛋白紧密素 (Intimin) 紧密局灶性黏附于小肠上皮细胞, 引起黏附与脱落 (Attaching and effacing, A/E) 效应, 其大多在回肠部引起轻度或中度炎症, 菌落多聚集于十二指肠和盲肠间, 小肠轻度至中度绒毛萎缩。AECC 不仅可引起猪腹泻, 而且也能引起人、兔、牛、羊、狗和猫等腹泻或死亡 [2, 3]。

有关我国猪肠道大肠杆菌性感染的病原分类和流行病学, 特别是 AECC 在猪腹泻中的地位国内很少报道, 有鉴于此, 我们以国内部分地区分离的猪源大

肠杆菌为研究对象进行了部分病原生物学特性研究, 现将有关结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源和培养条件: 1998~2007 年从江苏、江西、安徽、浙江、福建、上海、辽宁、山东、河南和广东等 10 个省市部分地区临床上疑似仔猪腹泻和水肿病病例的直肠棉拭及病死猪的十二指肠和肠系膜淋巴结作病料, 划线于麦康凯平板, 37℃ 培养 18h; 挑取典型菌落在麦康凯平板上分区划线, 37℃ 培养 18h, 选取单个典型菌落纯培养后冻干保存 [4, 5]。参考菌株 G7 (STb⁺, LT⁺, K88ab⁺)、C83907 (K88ac⁺)、TM128 (LT⁺, K88ac⁺)、UP001 (K88ad⁺)、C83529 (K99⁺)、C83710 (987P⁺)、C83707 (F41⁺)、107/86 (Stx-2e⁺, F18ab⁺) 和 2134P (STa⁺, STb⁺, F18ac⁺) 由本室保存 [5, 6]。

1.1.2 引物: 根据 GenBank 中发表的序列, 分别设计出针对 K88、F18、K99、987P 和 F41 的 5 种黏附素的特异性引物, 由上海生物工程技术服务有限公司合成 (表 1)

表 1 PCR 引物的寡核苷酸序列和扩增片段大小
Table 1 The sequence and oligonucleotide primers for the PCR and the sizes amplified

Primer	Sequence(5'→3')	Annealing Temp/℃	Size/bp
K88	AAGGTCGACATGAAAAAGACTCTGAATGC AGCCTCGAGTGTAATAAGTAATTGCTACGTTTCAG	65	850
F18	CTGAATTCCTTGTAAGTAACCGCGT GGATCCCAGCAAGGGGATGTTA	65	510
K99	TGGGACTACCAATGCTTCTG TATCCACCATTAGACGGAGC	58	450
987P	CCGCATTAACATTAGCAGTG TACCTGCTGAACGAATAGTC	58	550
F41	GAGGGACTTTCATCTTTTAG AGTCCATTCCATTATAGGC	58	431

1.1.3 主要试剂: 麦康凯干粉培养基、营养琼脂斜面、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、侧金盏花醇、吡啶、M.R、V-P、枸橼酸盐等试剂为杭州微生物试剂有限公司产品; TSA、TSB 购自 Sigma 公司(美国); PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。其它常规试剂均为国产分析纯级产品。

1.2 大肠杆菌生化试验和 O 血清型鉴定

按文献报道方法对分离株进行 10 项生化指标的测定 [5]。大肠杆菌标准抗 O 血清购自中国兽医药品卫生监督所, 运用玻板凝集和试管凝集试验对分离株进

行 O 血清型鉴定 [4, 5]。

1.3 PCR 试验检测毒素和 LEE 毒力岛基因

按文献报道方法对分离株的 *est* (STa)、*est* (STb)、*elt* (LT)、*stx2e* (Stx2e) 毒素和 LEE 毒力岛 *eaeA* (Intimin) 基因进行 PCR 鉴定 [3-5]。

1.4 黏附素基因的 PCR 检测

K88、F18、K99、987P 和 F41 预期扩增出的目的片段大小分别为 850、510、450、550 和 431 bp, 裂解法制备细菌 DNA 模板和 PCR 扩增体系按报道方法进行 [4-6]。

1.5 细菌菌毛表达鉴定

K88 基因阳性菌株接种 TSA 培养基, 37 °C 培养 24 h, F18 基因阳性菌株接种 TSB 培养基, 37 °C 静置培养 48h, 大肠杆菌菌毛单抗 A-3 和 K-11 (针对 K88 a 因子) 5E9 和 4D7 (针对 F18 a 因子) 由本室研制保存, 应用单抗作玻板凝集试验检测菌毛的表达^[4-6]。

2 结果

2.1 细菌分离和生化试验

从我国部分地区疑似仔猪腹泻和水肿病的病死仔猪中分离到毒素基因或紧密素基因阳性菌株 300 个, 经葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、侧金

盞花醇、吲哚、M.R、V-P、枸橼酸盐利用等 10 项生化试验鉴定, 这 300 个分离株均符合大肠杆菌的特征。其中从江苏、江西、安徽、浙江、上海、辽宁、福建、山东、河南和广东分别分离到 160、43、31、30、9、8、6、5 和 4 株大肠杆菌。

2.2 O 血清型鉴定

通过玻板凝集和试管凝集试验, 在 300 个分离株中, 除 50 株未能定型、17 株自凝外, 测定出 233 个分离株的血清型。这些分离株覆盖了 45 个血清型, 其中 O149、O107、O139、O93 和 O91 血清型菌株分别有 47、43、17、16 和 10 株, 共 133 株, 占定型菌株的 57.1% (表 2)。

表 2 不同类型猪源大肠杆菌毒力型与 O 血清型的关系

Table 2 Predominant pathotypes and O-serogroups in *E. coli* isolates from pigs with diarrhea or edema disease

Pathotype	Virotypes	No. of isolates	O-serogroups (Isolate no. of this sergroup)
ETEC	STa	19	O3(3), O20(1), O21(1), O32(1), O64(1), O107(3), O119(1), O149(2), NT(6)
	STb	85	O7(1), O9(3), O11(4), O15(3), O16(2), O21(1), O32(2), O35(1), O38(1), O43(1), O45(2), O57(1), O64(1), O85(1), O89(2), O91(1), O93(4), O98(8), O101(3), O104(1), O107(11), O109(1), O116(1), O119(1), O147(3), O149(3), O157(1), NT(16), OR(5)
	LT	1	O8(1)
	STa STb	23	O8(2), O9(1), O93(5), O95(1), O107(4), NT(9), OR(1)
	STa LT	4	O7(1), O93(2), NT(1)
	STb LT	49	O8(2), O93(4), O107(2), O116(1), O149(36), NT(1), OR(3)
	STa STb LT	9	O93(1), O107(2), O149(6)
	STe	24	O2(2), O9(1), O55(1), O107(1), O139(16), NT(3)
AEEC	Intimin	36	O4(1), O9(1), O26(1), O38(1), O49(1), O65(1), O78(1), O91(4), O103(1), O111(1), O123(1), O139(1), O145(2), O157(7), NT(8), OR(4)
ETEC/STEC	STb Stx-2e	2	O2(1), O107(1)
	LT Stx-2e	1	O107(1)
	STa STb Stx-2e	13	O32(2), O107(6), O141(1), NT(2), OR(2)
	STa LT Stx-2e	7	O107(3), O116(2), NT(2)
	STa STb LT Stx-2e	9	O4(1), O107(5), O116(3)
ETEC/AEEC	STa/ Intimin	17	O4(1), O9(1), O91(5), O107(4), O111(2), O142(1), NT(2), OR(1)
ETEC/STEC/ AEEC	STa LT/Stx-2e/ Intimin	1	OR(1)
Total		300	

NT: not serogroupable; OR: O-rough

2.3 大肠杆菌 *est*、*est*、*elt*、*stx2e* 和 *eaeA* 基因的检测

对 300 个分离株的毒素基因 (*estI*、*est*、*elt* 和 *stx2e*) 和 LEE 毒力岛 *eaeA* 基因进行 PCR 检测, 拥有 *est*、*est*、*elt*、*stx2e* 和 *eaeA* 基因的菌株分别有 102 (34.0%)、190 (63.3%)、81 (27.0%)、57 (19.0%) 和 54 株 (18.0%), 其中拥有 *est* + *est* 的菌株有 54 株 (18.0%)、*est* + *elt* 的菌株 67 株 (22.3%), *est* + *est* + *stx2e* 的菌株 22 株 (7.3%), *est* + *eaeA* 的菌株 18 株 (6.0%)。这 300 个猪源分离株依其毒力特征

可分为以下 6 种类型: ETEC、STEC、AEEC、ETEC/STEC、AEEC/ETEC 和 AEEC/ETEC/STEC。

2.4 黏附素基因检测

通过 PCR 对 300 个分离株的常见黏附素 (K88、K99、987P、F41 和 F18) 基因进行检测, 其中 K88 基因阳性有 51 株, F18 基因阳性有 75 株, K99 基因阳性有 1 株, 987P 和 F41 基因没有检测到。51 株 K88 大肠杆菌全部为 ETEC 菌株, 其以 O149 为常见血清型 (88.2%, 45/51), 且全部菌株拥有 *est* 毒素基因, 82.3% (42/51) 菌株拥有 *est* + *elt* 毒素基因 (表 3)。

表3 51株K88大肠杆菌的O血清型与毒素的关系
Table 3 The relationship between O-serogroups and toxin genes detected in K88 *E. coli* isolates

O-serogroup	<i>est</i>	<i>+est</i>	<i>est</i>	<i>+est</i>	<i>+elt</i>	<i>est</i>	<i>est</i>	<i>+elt</i>	Total
O149			6			3		36	45
O93		4							4
O8		2							2
Total		6	6			3		36	51

在75株F18大肠杆菌中，ETEC、STEC、ETEC/STEC和AEEC/ETEC/STEC分别拥有25、18、31和1个菌株，占阳性菌株的33.3%、24.0%、41.3%和1.3%。拥有*est*毒素基因的菌株有48个，*est*菌株37个，*elt*菌株24个，*stx2e*菌株50个。这些菌

株以O107和O139血清型为主，分别拥有29和16个菌株，占F18基因阳性菌株的38.7%和21.3%，在O107血清型菌株中，82.8% (24/29)为*estI*阳性，75.9% (22/29)为*est*阳性，在O139血清型菌株中，100.0% (16/16)含有*stx2e*毒素基因(表4)。

表4 75株F18大肠杆菌的O血清型与毒素的关系
Table 4 The relationship between O-serogroups and virulence genes detected in F18 *E. coli* isolates

O-sero group	<i>est</i>	<i>est</i>	<i>stx-2e</i>	<i>est</i>	<i>est</i>	<i>est</i>	<i>est</i>	<i>est</i>	<i>est</i>	<i>elt</i>	<i>elt</i>	<i>est</i>	<i>est</i>	<i>est</i>	<i>elt</i>	Total
				<i>est</i>	<i>est</i>	<i>elt</i>	<i>elt</i>	<i>stx-2e</i>	<i>stx-2e</i>	<i>stx-2e</i>	<i>stx-2e</i>	<i>est</i>	<i>est</i>	<i>elt</i>	<i>stx-2e</i>	
												<i>stx-2e</i>	<i>stx-2e</i>	<i>eaeA</i>		
O107	3	2		4	2			1	3	1		6	5			29
O139			16													16
O116									2				3			5
O32	1											2				3
O3	3															3
O4													1			1
O141												1				1
NT	2	2	2	1			1			2		2				12
OR				1		1						2			1	5
Total	9	4	18	6	2	1	3	1	7	1		13	9	1		75

NT: not serogroupable, OR: O-rough

2.5 大肠杆菌O血清型、毒素类型和黏附素型相关性分析

ETEC菌株只拥有肠毒素，共190个分离株，*est*阳性菌株有55个，占28.9%，*est*阳性菌株有136个，占71.6%，*elt*阳性菌株有63个，占33.2%，*est*+*est*有32株，占16.8%，*est*+*elt*有58株，占30.5%。ETEC菌株共包含31个O血清型，以O149、O107、O93和O98等血清型为主，占ETEC菌株的48.9% (93/190)。在O149血清型菌株中，95.7% (45/47)拥有*est*，89.4% (42/47)拥有*est*+*elt*，95.7% (45/47)拥有K88菌毛基因；O107血清型菌株中，86.4% (19/22)拥有*est*，59.1% (13/22)拥有F18菌毛基因；O93血清型菌株中，87.5% (14/16)拥有*est*，25.0% (4/16)拥有K88菌毛基因；O98血清型菌株中，100.0% (8/8)拥有*est*。

STEC菌株仅拥有*stx-2e*，共24个分离株，5个O血清型，以O139血清型为主，占STEC菌株的66.7% (16/24)，75.0% (18/24)拥有F18菌毛基因。

AEEC菌株仅拥有紧密素，共36个分离株，14

个O血清型，无明显优势血清型。

ETEC/STEC菌株拥有肠毒素和志贺样毒素，共有32个分离株，96.9% (31/32)含有F18菌毛基因，分为6个O血清型，以O107和O116血清型为主，分别占这些菌株的50.0% (16/32)和15.6% (5/32)；*est*+*stx2e*阳性菌株有29个，占90.6%，*est*+*stx2e*阳性菌株有24个，占75.0%，*elt*+*stx2e*阳性菌株有17个，占53.1%。在O107血清型菌株中，87.5% (14/16)的菌株拥有*est*+*stx2e*，75.0% (12/16)的菌株含有*est*+*stx2e*，100.0% (16/16)为F18基因阳性。在O116血清型菌株中，100.0% (5/5)为*est*+*elt*+*stx2e*和F18基因阳性。

ETEC/AEEC菌株全部为肠毒素*est*和紧密素基因阳性，共有17个分离株，6个O血清型，以O91和O107血清型为主，分别占这些菌株的29.4% (5/17)和23.5% (4/17)。

AEEC/ETEC/STEC菌株同时拥有肠毒素、志贺样毒素和紧密素，仅分离到1个菌株(表2)。

2.6 黏附素表达鉴定

运用黏附素单抗对黏附素基因阳性菌株进行玻板凝集试验,其中 51 个 K88 基因阳性分离株均能与 K88 a 因子单抗反应,菌毛表达率为 100%;75 个 F18 基因阳性分离株中,有 38 株能与 F18 a 因子单抗反应,F18 菌毛表达率为 50.7%。

3 讨论

引起仔猪腹泻的大肠杆菌血清型随地区和时间不同而有所差异,世界范围内猪源 ETEC 菌株多属于 O8、O9、O20、O45、O64、O101、O138、O139、O141、O147、O149、O157 等血清型,O149 作为 ETEC 的主要血清型至少维持了 20 多年^[1,7-9]。关于 ETEC 肠毒素与 O 血清型、黏附素类型之间的关系,国外发现致仔猪腹泻最常见的 ETEC 属于血清型 O149、O8、O147 及 O157,且呈 K88 阳性,并能产生 LT、STb 肠毒素;同时,越来越多的 O8、O9、O64 和 O101 血清型的 ETEC 被分离到,这些 ETEC 是 K99、987P 及 F41 阳性并产生肠毒素 STa 或很少产生 STb^[1]。在这次调查中,我们共分离到 190 株致仔猪腹泻 ETEC 菌株,包含 31 个 O 血清型,以 O149、O107、O93 和 O98 等血清型为主,占 ETEC 菌株的 48.9%(93/190)(表 2)。其中最常见血清型 O149 中,大部分菌株拥有 STb+LT 肠毒素基因(89.4%,42/47)或 STb 肠毒素基因(95.7%,45/47)和 K88 菌毛基因(95.7%,45/47),而国外报道较少的血清型 O107、O93 和 O98 中,86.4%(19/22)和 59.1%(13/22)的 O107 菌株拥有 STb 毒素基因和 F18 菌毛基因;87.5%(14/16)和 25.0%(4/16)的 O93 血清型菌株拥有 STb 毒素和 K88 菌毛基因;100.0%(8/8)的 O98 血清型菌株拥有 STb。与报道相比,尽管本次调查所得 ETEC 分离株的 O 血清型、毒素型以及黏附素型的种类发生了一定变化,如出现了 O107、O93、O98 等常见血清型和大部分菌株为 STb 毒素阳性,但在最优势血清型 O149 菌株中,黏附素型(K88)和毒素型(STb+LT)却惊人的相似。结果可以推测 O149 大肠杆菌仍然是当今世界猪源 ETEC 的优势菌株,同时其病原生物学多样性趋势在我国也日益明显。

猪水肿病主要由 STEC 产生的 Stx-2e 毒素引起,主要血清型为 O139,其次为 O138、O141 和 O8 等,该病发病率较低,但死亡率可高达 90%以上,给养猪业造成了相当大的经济损失^[1]。在我们分离的 24 个

STEC 菌株中,66.7%(16/24)为 O139 血清型,75.0%(18/24)含有 F18 基因。

同一群猪可同时发生断奶仔猪腹泻和水肿病,某些大肠杆菌菌株在不同条件下既可引起断奶仔猪腹泻也可引起水肿病,从病原、流行病学和症状方面有时无法区分这两种疾病,这两种疾病主要是由定居于小肠上皮细胞的某些特定 O 血清型大肠杆菌产生的一种或几种毒素所引起的,如在瑞士,引起 PWECD/ED 的典型菌株有 O139:K12:H1(F18ab,Stx-2e)、O141:H4(F18ab,Stx-2e,LT,STb)和 O149:K91:H10(K88ac,LT,STb)^[1]。而在本次调查中共分离到 32 个 ETEC/STEC 菌株,同时拥有肠毒素和志贺样毒素,且以 O107 和 O116 血清型为主,主要为 *est*+*stx2e* 毒素和 F18 菌毛基因阳性。F18 菌毛是致猪水肿病和断奶仔猪腹泻大肠杆菌的主要毒力因子之一。现已知,F18 菌毛包括 F18ab 与 F18ac 2 种血清型变体。在本次调查中共分离到 75 个 F18 黏附素基因阳性菌株,它们分别属于 ETEC、STEC、ETEC/STEC 和 AEEC/ETEC/STEC 菌株,通过与 F18 a 因子单抗反应,在体外菌毛表达率仅为 50.7%(38/75)。

AEEC 也是引起猪腹泻的一种重要病原,研究表明能够引起特征性的粘附与脱落(A/E)损伤的 AEEC 株可导致非出血性腹泻^[2,10]。An 等(2000)发现,所有导致 A/E 损伤的猪源大肠杆菌都有 LEE 毒力岛^[11]。在本研究中,有 18.0%(54/300)的菌株 *eaeA* 基因扩增阳性,LEE 毒力岛在猪源大肠杆菌中的存在,这可能是我国某些猪场仔猪腹泻的原因之一。我们分离的 AEEC 菌株血清型较多,无明显优势血清型,这可能与这次 AEEC 菌株的数量较少或其特有的遗传进化有关。

以上试验数据显示我国猪大肠杆菌病的病原类型复杂,主要可分为 ETEC、STEC、AEEC、ETEC/STEC、AEEC/ETEC 和 AEEC/ETEC/STEC 等 6 种类型,ETEC 仍为主要病原型,同时 AEEC 菌株也已经成为仔猪腹泻的一种重要病原菌。

参 考 文 献

- [1] Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, *et al.* Diseases of Swine. 9th edition. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2006.
- [2] Janke BH, Francis DH, Collins JE, *et al.* Attaching and effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs, and dogs. *J Vet Diagn Investig*, 1989, 1: 6-11.
- [3] 陈祥, 赵娟, 高崧, 等. 我国部分地区猪源大肠杆菌 LEE 和

- HPI 毒力岛相关基因的检测. 中国人畜共患病学报(*Chinese Journal of Zoonoses*), 2006, 22(1): 33–36.
- [4] 陈祥, 高崧, 王雷, 等. 华东地区致初生仔猪腹泻大肠杆菌的 O 血清型和毒力因子. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 44(1): 96–100
- [5] Chen X, Gao S, Jiao X, *et al.* Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhea in eastern China. *Vet Microbiol*, 2004, 103: 13–20.
- [6] 陈祥, 苗晓青, 刘静, 等. 近年来大肠杆菌 K88ac 菌毛的变异和生物学特性. 农业生物技术学报(*Journal of Agricultural Biotechnology*), 2006, 14(5): 757–762.
- [7] Garabal JI, Gonzalez EA, Vazquez F, *et al.* Serogroups of *E. coli* isolated from piglets in Spain. *Vet Microbiol*, 1996, 48: 113–123.
- [8] Ojeniyi B, Ahrens P, Meyling A. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. *J Vet Med B*, 1994, 41: 49–59.
- [9] Osek J, Gallien P, Trusczyński M, *et al.* The use of polymerase chain reaction for determination of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs in Poland. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1999, 22: 163–174.
- [10] Zhu C, Harel J, Jacques M, *et al.* Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect Immun*, 1994, 62: 4153–4159.
- [11] An H, Fairbrother JM, Desautels C, *et al.* Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. *Microb Pathog*, 2000, 28(5): 291–300.

Virulence genes of pathogenic *Escherichia coli* from ill pigs in China and their relationship with O-serogroups

Xiang Chen^{**}, Lixiang Zhao^{**}, Song Gao^{*}, Xiaoqing Miao, Xinan Jiao, Xiufan Liu

(Animal Infectious Disease Laboratory of Ministry of Agriculture, Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: [Objective] We determined the distribution of serogroups and virulence factors among *Escherichia coli* isolates from pigs with diarrhea and/or edema disease from 10 provinces in China between 1998 and 2007. **[Methods]** Three hundred *E. coli* isolates were serogrouped with O-antisera and detected for genes of enterotoxins, shiga-toxin-two-variant (Stx2e), intimin, K88, K99, 987P, F18 and F41 fimbrial antigens by PCR. **[Results]** Among 300 isolates, 233 were determined to be placed in serogroups, 50 were unable to be serogrouped, and the rest 17 auto-agglutinated. These isolates distributed in 45 serogroups and 57.1% (133/233) belonged to 5 O serogroups: O149, O107, O139, O93 and O91. Several uncommon O serogroups were discovered. PCR analysis confirmed the genes of *est* (STa), *est* (STb), *elt* (LT), *stx2e* (Stx2e) and *eaeA* (Intimin) within the isolates. There were six pathotypes of porcine *E. coli* by their pathogenic factors, namely enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), attaching-effacing *E. coli* (AEEC), ETEC/STEC, AEEC/ETEC and AEEC/ETEC/STEC. The correlation between pathotypes and serogroups showed that the combinations of O149/K88/*est*, O149/K88/*est* + *elt*, O107/F18/*est*, O93/*est* and O98/*est* were common types in ETEC strains, O139/F18/*stx2e* for STEC strains, *eaeA* gene for AEEC strains, O107/F18/*est* + *stx2e*, O107/F18/*est* + *stx2e* and O116/F18/*est* + *elt* + *stx2e* for ETEC/STEC strains, O91/*est* /*eaeA* and O107/*est* /*eaeA* for AEEC/ETEC/STEC strains. **[Conclusion]** ETEC was commonly associated with swine colibacillosis, whereas the kinds of enteric *E. coli* pathogens become more complex in China.

Keywords: piglet; *Escherichia coli*; serogroups; virulence gene; enterotoxigenic *E. coli*; shiga toxin-producing *E. coli*; attaching-effacing *E. coli*

Supported by Key Program of Science and Technology from Ministry of Education (204050) and the Chinese National Programs for High Technology and Development (2003AA222141)

^{**}These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel: +86-514-87991448; Fax: +86-514-87972218; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

Received: 8 October 2007/ Revised: 25 February 2008