

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

陈 祥 高 崧* 王 雷 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 扬州 225009)

摘 要:从江苏、江西、安徽等 7 个省疑似黄、白痢直肠棉拭及病死猪的十二指肠和肠系膜淋巴结中分离鉴定出 339 株病原性大肠杆菌。经 O 血清型鉴定,除 77 株未能定型、41 株自凝外,测定出 221 个分离株的 O 血清型,这些分离株覆盖了 64 个血清型,以 O₁₀₇、O₁₀₁、O₂₀、O₉₃、O₁₁ 和 O₁₄₉ 为主,共 99 株,占定型菌株的 44.80%。这些血清型与已报道的常见血清型间存在一定差异。运用黏附素单抗对以上菌株进行 F4、F5、F6、F18、F41 5 种黏附素检测,共 97 个分离株表达黏附素(28.61%),而表达两种和 3 种黏附素的菌株分别有 22 株和 8 株,它们分别占表达黏附素菌株的 22.68%和 8.25%,其中单独表达 F4、F6、F5 + F41 黏附素菌株分别有 18、30、15 株,分别占表达黏附素菌株的 18.56%、30.93%和 15.46%。同时运用多重 PCR 对其中 145 个分离株进行毒素基因(*STa*、*STb*、*LT*、*SLT-2e*)的检测,拥有 *STa* 和 *STb* 毒素基因的菌株分别占检测菌株的 51.72%和 37.24%。F6、F4、F5 + F41 和 *STa*、*STb* 为该地区致初生仔猪腹泻大肠杆菌常见的毒力因子。

关键词:仔猪腹泻,大肠杆菌,O 血清型,黏附素,毒素

中图分类号 S852.61 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2004)01-0096-05

随着猪场规模的扩大和仔猪饲养密度的增加,仔猪腹泻已成为养猪业一个有重要经济意义的疾病。大肠杆菌是造成初生仔猪腹泻(习惯上称为仔猪黄痢和仔猪白痢)最重要的病原体。仔猪黄痢由肠产毒性大肠杆菌(*Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)引起,仔猪白痢症状与仔猪黄痢相似,但它发病程度轻,发病率较高(可达 80%),死亡率较低,但可影响仔猪生长发育和降低饲料报酬而造成较大经济损失^[1]。

有关猪大肠杆菌病流行病学的研究,国内已有不少报道^[2,3],但华东地区近年来在初生仔猪腹泻的流行病学方面报道不多,且有关大肠杆菌的黏附素及毒素的流行病学资料国内很少报道。有鉴于此,我们以华东地区为重点,同时包括其他地区的一些省份的仔猪黄、白痢中收集病料作为研究对象进行相关研究,现将有关结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 病料来源

江苏、江西、安徽、河南、广东、山东、上海等 7 个省市部分地区临诊上疑似仔猪黄、白痢直肠棉拭及

病死猪的十二指肠和肠系膜淋巴结作病料分离病原,所有分离株均来自患病猪。

1.2 培养基

麦康凯干粉培养基、营养琼脂斜面、营养肉汤为上海市医学化验所试剂厂产品;葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、吡啶、M.R、V-P、枸橼酸盐等生化发酵培养基参照文献配制^[4];LB 培养基、Slanetz、Minca 按文献^[5]方法制备;TSA、TSB 购自美国 Sigma 公司,按说明书配制 5% 犊牛血琼脂平板按常规方法制备^[5];大肠杆菌标准抗 O 血清购自中国兽药监察所。

1.3 参考菌株

C83907 (K88⁺), C83529 (K99⁺), C83710 (987P⁺), C83707 (F41⁺) 购自中国兽药监察所;E68 (STb⁺, LT⁺, SLT-2e⁺), 107/86 (SLT-2e⁺, F18ab⁺), 2134 (STa⁺, STb⁺, F18ac⁺), TM128 (K88⁺, LT⁺) 由扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室保存。

1.4 细菌分离培养

病料划线于麦康凯斜面,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

基金项目 国家 863 计划 (2003AA222141),江苏省自然科学基金 (BK2001148)

* 通讯作者。Tel 86-514-7979386 Fax 86-514-7323112 E-mail yzgsong@pub.yz.jsinfo.net

作者简介 陈 祥 (1978-),男,江苏盐城人,博士研究生,主要从事病原微生物致病机理研究。E-mail chenxiangjs@163.com

收稿日期 2003-05-20,修回日期:2003-10-24

取单个典型菌落纯培养后冻干保存。

1.5 生化试验

按文献报道方法对所有分离株进行 10 项生化指标的测定^[4]。

1.6 血清型鉴定

参照中国兽药监察所大肠杆菌“O”抗原定型血清使用说明完成。所有分离株首先经玻板凝集试验初步筛选可能的 O 血清型,然后通过试管凝集试验确定其 O 血清型。定型标准为血清的试管凝集价达到原血清“O”效价的 1/2 以上。

1.7 黏附素与溶血素的鉴定

分离到的大肠杆菌菌株(纯化后传代不超过两次)分别接种 TSA、Slanetz、Minca 培养基 37℃ 培养 24h,TSB 培养基 37℃ 培养 48h,其中 TSA 用于表达 F4(K88)菌毛、Slanetz 用于表达 F6(987P)菌毛、Minca 用于表达 F5(K99)和 F41 菌毛、TSB 用于表达 F18 菌毛。黏附素单抗 A-3(针对 F4a 因子)、EK409(针对 F5 菌毛)、EPN3(针对 F6 菌毛)、L10-5(针对 F41 菌毛)、19B4(针对 F18 菌毛)由扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室研制,应用玻板凝集试验检测黏附素;同时分离的菌株分别接种牛血琼脂平板,37℃ 培养 18h 观察溶血性。

1.8 多重 PCR 试验鉴定毒素

1.8.1 PCR 引物的设计 根据基因文库中已发表的大肠杆菌毒素基因序列,分别设计出 4 种毒素基因(STa、STb、LT、SLT-2e)的 4 对特异性引物,预期扩增出的目的片段大小分别为 166bp、283bp、314bp 和 386bp,由上海生物工程技术服务有限公司合成。引物序列见表 1)。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of synthetic oligonucleotide primers

Target gene	Primer code	Primer Sequence5'-3'	Size of amplified product/bp
STa	STa-1	TCTTTCCCTCTTTTACTGTCAG	166
	STa-2	ACAGGCAGGAT-TGCCCTACTAAG	
STb	STb-1	CATCTACACAATC	283
	STb-2	GCAGT-GAGAAATGCACAATC	
LT	LT-1	CGCGGTACTATCTCTCTA	314
	LT-2	ATTGGGGGTTTTATTATTCC	
SLT-2e		AGGAAGT-	386
	Slr-2e-1	TATATTTCGGTAGG	
	Slr-2e-2	GTATTTCCTCAACCGTAA	

1.8.2 细菌 DNA 模板的制备:分别挑取 LB 板上大

肠杆菌分离株的单个菌落加入 500μL 灭菌超纯水,混匀,10000r/min 离心 5min,弃上清,沉淀用 200μL 灭菌超纯水悬浮,置沸水浴 15min,10000r/min 离心 5min,上清液作为 PCR 反应的 DNA 模板。

1.8.3 多重 PCR 扩增 在总量为 50 μL 的反应体系中加入 10×PCR 缓冲液(含 1.5 mmol/L Mg²⁺) 5 μL、2.5 μmol/L dNTP 3 μL、混合引物 8 μL(每种引物为 20 pmol)、DNA 模板 10 μL(0.1 ~ 1μg)、3U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,加灭菌超纯水至 50 μL(PCR 试剂盒购自 Promega 公司)。运用热启动 PCR 和降落式 PCR,扩增条件为 94℃ 45s、53℃ 45s、72℃ 45s,共进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5min。同时以标准菌株作为阳性对照,以灭菌超纯水作为空白对照。琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

2 结果

2.1 细菌分离和生化试验

从疑为患仔猪黄白痢(440 头)的病死仔猪中共分离出 501 株细菌。经 10 项生化鉴定,339 个分离株符合大肠杆菌的特征(表 2)。

表 2 339 株大肠杆菌的来源与鉴定结果

Table 2 The origins and O-serogroups identifications of 339 *Escherichia coli* isolates of piglet origin

Region	No. of isolates	No. of sero-groupable isolates	No. of non-groupable isolates	No. of O-rough isolates
Jiangsu	175	111	44	20
Jiangxi	77	44	15	18
Anhui	54	38	16	0
Guangdong	19	16	1	2
Shandong	9	8	0	1
Shanghai	3	2	1	0
Henan	2	2	0	0
Total	339	221	77	41

2.2 血清型鉴定

通过玻板凝集和试管凝集,在 339 个分离株中,除 77 株未能定型、41 株自凝外,测定出 221 个分离株的血清型(表 2)。这些分离株覆盖了 64 个血清型,前 11 种血清型为:O₁₀₇、O₁₀₁、O₂₀、O₉₃、O₁₁、O₁₄₉、O₁₁₉、O₉、O₃₈、O₆₄和 O₈₉,它们拥有 129 个分离株。其中以 O₁₀₇、O₁₀₁、O₂₀、O₉₃、O₁₁和 O₁₄₉为主,共 99 株,占定型菌株的 44.80%,为这次初生仔猪腹泻大肠杆菌调查的主要流行血清型(表 3)。

表 3 339 株初生仔猪腹泻大肠杆菌分离株的 O 血清型

Table 3 Serogroups among 339 *E. coli* isolates from diarrhea in piglets

O-serogroups	No. of isolates	Percentage/%
O ₁₀₇	27	12.22
O ₁₀₁	18	8.14
O ₂₀	16	7.24
O ₉₃	15	6.79
O ₁₁	12	5.43
O ₁₄₉	11	4.98
O ₁₁₉	7	3.17
O ₉	7	3.17
O ₃₈	6	2.71
O ₆₄	5	2.26
O ₈₉	5	2.26
O ₃₂	4	1.81
O ₁₄₇	4	1.81
O ₁₅₇	4	1.81
O ₁₄₁	3	1.45
O ₈	2	0.90
O ₆₀	1	0.45
Other	74	33.48
Total	221	
OR	41	
NT	77	
Total	339	

Other : O₁₂、O₁₆、O₂₁、O₂₃、O₂₆、O₂₇、O₃₃、O₃₄、O₃₈、O₄₃、O₄₆、O₅₇、O₅₈、O₆₃、O₇₅、O₇₆、O₇₉、O₈₇、O₁₀₃、O₁₀₄、O₁₁₄、O₁₁₆、O₁₁₇、O₁₂₁、O₁₂₈、O₁₃₁、O₁₅₉(One isolate each) ; O₁₀、O₁₅₀、O₁₆₀、O₃₆、O₄、O₄₂、O₅、O₆₆、O₆₈、O₇₄、O₈₅、O₉₁、O₉₈ (Two isolates each) ; O₁、O₁₅、O₁₆₂、O₁₅₄、O₄₄、O₆₅、O₁₃₂ (Three isolates each). OR : O-rough ; NT :not serogroupable .

2.3 黏附素鉴定

运用黏附素单抗对 339 个分离株进行玻板凝集试验 ,其中 97 个分离株表达黏附素 ,占分离株的 28.61%(97/339) ,而表达 2 种和 3 种黏附素的菌株分别为 22 株和 8 株 ,它们分别占表达黏附素菌株的 22.68%和 8.25%。其中单独表达 F4、F6、F5 + F41 黏附素菌株分别有 18、30、15 株 ,分别占表达黏附素菌株的 18.56%、30.93%和 15.46%。在拥有黏附素大肠杆菌中 ,有 5 株表达 F18 菌毛 ,F18 与 F5、F41 共表达的菌株有 2 株(表 4、表 5)。

2.4 溶血素鉴定

339 个分离株溶血性反应中 ,仅有 8 株大肠杆菌呈 β 溶血 ,占分离株的 2.36%。

2.5 毒素鉴定

对 339 个分离株中的 145 株仔猪黄、白痢大肠杆菌毒素基因(*Sta*、*Stb*、*LT*、*SLT-2e*)进行 PCR 检测 ,共有 141 株大肠杆菌检测到毒素基因 ,其中单独拥有 *Sta* 基因的菌株有 75 株(51.72%) ;单独拥有 *Stb* 基因的菌株有 54 株(37.24%)(表 4)。

表 4 145 株初生仔猪腹泻大肠杆菌分离株黏附素与毒素的关系

Table 4 Adhesin and toxin genes detected in 145 *E. coli* isolates from diarrhea in piglets

	<i>Sta</i>	<i>Stb</i>	<i>Sta</i> , <i>Stb</i>	<i>Sta</i> , <i>Stb</i> <i>SLT-2e</i>	<i>Sta</i> , <i>SLT-2e</i>	<i>Sta</i> , <i>Stb</i> , <i>LT</i>	Toxin- neg	No. of strains
F4	5	9	1				3	18
F5	1	7	1					9
F6	23	6	1					30
F18		3	1				1	5
F41	4	1						5
F6 + F41	2			1				3
F5 + F41	2	13						15
F5 + F6					1			1
F4 + F6	2	1						3
F4 + F5 + F41						3		3
F5 + F18 + F41		2						2
F5 + F6 + F41	1	2						3
5P ⁻	35	10	3					48
Total	75	54	7	1	1	3	4	145

5P⁻ :No adhesins of F4 , F5 , F6 , F18 and F41 were detected in these isolates.

表 5 339 株初生仔猪腹泻大肠杆菌分离株黏附素与 O 血清型的关系
Table 5 The relationship between adhesin and o-serogroup detected in 339 *E. coli*

Adhesin	No. of isolates	O-serogroup
F4	18	10Ⅹ(3), 14Ⅹ(2), Ⅸ(1), Ⅸ(1), 11Ⅰ(1), 1Ⅰ(1), 3Ⅹ(1), 13Ⅹ(1), 14Ⅹ(1), NT(6)
F5	9	3Ⅹ(2), Ⅸ(1), 4Ⅹ(1), NT(4), OR(1)
F6	30	14Ⅹ(3), 6Ⅳ(2), 9Ⅹ(2), 14Ⅰ(2), 12Ⅹ(1), 4Ⅹ(1), 5Ⅹ(1), 6Ⅹ(1), 7Ⅹ(1), 8Ⅹ(1), 10Ⅰ(1), 10Ⅹ(1), NT(8), OR(5)
F18	5	9Ⅹ(1), 10Ⅳ(1), 11Ⅰ(1), 13Ⅰ(1), NT(1)
F41	5	10Ⅰ(2), Ⅸ(1), 4Ⅳ(1), 16Ⅹ(1)
F5 + F41	15	1Ⅰ(6), 10Ⅹ(2), 2Ⅰ(1), 4Ⅳ(1), 6Ⅳ(1), 14Ⅹ(1), 14Ⅹ(1), NT(1), OR(1)
F4 + F6	3	Ⅰ(1), 10Ⅰ(1), 14Ⅹ(1)
F5 + F6	1	Ⅸ(1)
F6 + F41	3	10Ⅹ(1), 14Ⅰ(1), OR(1)
F5 + F6 + F41	3	10Ⅰ(1), 9Ⅰ(1), NT(1)
F5 + F18 + F41	2	10Ⅹ(1), NT(1)
F4 + F5 + F41	3	14Ⅹ(3),
5P ⁻	242	10Ⅹ(19), 2Ⅳ(16), 10Ⅰ(13), 9Ⅹ(12), 11Ⅸ(7), 11(5), 3Ⅹ(5), 8Ⅸ(5), 15Ⅹ(4), Other(68), NT(55), OR(33)
Total	339	

NT : Not serogrupable ; OR : O-rough ; 5P⁻ : No adhesins of F4 , F5 , F6 , F18 and F41 were detected in these isolates .

3 讨论

在这次调查中 ,我们共分离到 339 株致初生仔猪腹泻大肠杆菌 ,包括 O₁₀₇、O₁₀₁、O₂₀、O₉₃、O₁₁、O₁₄₉、O₁₁₉、O₉、O₃₈、O₈₉、O₆₄和 O₃₂等 O 血清型。致仔猪黄、白痢大肠杆菌 O 血清型国外主要报道有 :O₈、O₉、O₂₀、O₄₅、O₆₄、O₁₀₁、O₁₃₈、O₁₃₉、O₁₄₁、O₁₄₇、O₁₄₉、O₁₅₇等^[6-9] ,国内部分地区也有一些报道 ,如刘书亮等报道四川部分地区分离株血清型为 O₁₄₁、O₈、O₂、O₁₅₇、O₁、O₉、O₅₄、O₁₄₉等^[2] ;王红琳等则发现湖北部分地区分离株以 O₁₀₇、O₁₀₁、O₉₃、O₉、O₁₃₉、O₁₄₁、O₁₅₇等血清型为主^[3] ,我们的调查结果除与王红琳等的报道有一定相似外 ,与国外及国内其他地区的报道间存在较大差异。这是否意味着 ETEC 的 O 血清型出现多样性的可能 ,值得关注。

仔猪黄、白痢主要由 ETEC 引起的 ,其致病机理是 ETEC 通过其表面的黏附素(Fimbrial adhesins)吸附于小肠上皮细胞 ,然后通过其产生的肠毒素致病^[1]。在国内 ,高崧等^[10]发现江苏、上海地区致仔猪黄、白痢大肠杆菌粘附素的阳性率为 30.54% (317/1038)与我们这次调查所得粘附素的阳性率 28.61%(97/339)相似 ,但黏附素的种类有了较大的变化。具体表现在两方面 :一是单独表达 F6、F4、F5 + F41 黏附素菌株分别占表达黏附素菌株的 30.93%、18.56%和 15.46% ,即 F6 阳性株的比例上升 ,而 F4 阳性株的比例相对下降 ,这是否与我国

K88、K99 基因工程疫苗的广泛应用有关需进一步的研究 ;二是表达 2 种和 3 种黏附素的菌株分别占表达黏附素菌株的 22.68%和 8.25%。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 两种血清型变异体。本调查分离到表达 F18 黏附素菌株 ,其中有 5 株表达 F18 菌毛 ,F18 与 F5、F41 共表达的菌株有 2 株。

关于 ETEC 肠毒素与 O 血清型、黏附素类型之间的关系 ,国外发现致新生仔猪腹泻最常见的 ETEC 属于血清型 O₁₄₉、O₈、O₁₄₇及 O₁₅₇ ,且呈 F4 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 F5、F6 及 F41 阳性并产生肠毒素 STa 或很少产生 STb^[11]。与国外报道相比 ,尽管本次调查所得 ETEC 分离株的 O 血清型以及黏附素的种类均发生了一定变化 ,但肠毒素的检测结果却与国外的报道相似 ,即分离株主要产生 STa(75/145)和 STb(54/145)2 种肠毒素 (表 4)。

常规检测猪源大肠杆菌毒素的方法费时耗钱 ,操作复杂 ,不适合大批量临床分离株的检测。多重 PCR 方法的建立为临床实验室等提供了一个更为快速、简便、灵敏的测定毒素的方法。此外 ,我们还发现 ,绝大多数致仔猪腹泻 ETEC 分离株不能产生针对犊牛红细胞的溶血素。

参 考 文 献

- [1] Fairbrother J M. Enteric colibacillosis. In : Leman A D , Straw B E , Mengeling W L , *et al.* ed. Disease of Swine. Ames : Iowa State University Press , 1999 , 433 – 440.
- [2] 刘书亮 , 王红宁 , 陶 勇 , 等. 四川省规模化猪场仔猪黄白痢 *E. coli* 分离鉴定. 中国预防兽医学报 2001 **23** (5) : 367 – 371.
- [3] 王红琳 , 熊忠良 , 周绍凤 , 等. 湖北省仔猪致病性大肠杆菌血清型鉴定. 动物医学进展 2002 **23** (3) : 68 – 69.
- [4] 曹澍泽 , 郭玉璞 , 董国雄 , 等. 兽医微生物学及免疫学技术. 北京 : 北京农业大学出版社 , 1992 , 34 – 95.
- [5] 房 海. 大肠埃希氏菌. 石家庄 : 河北科学技术出版社 , 1997 , 392 – 393.
- [6] Garabal J I , Gonzalez E A , Vazquez F , *et al.* Serogroups of *E. coli* isolated from piglets in Spain. *Vet Microbiol* , 1996 **48** : 113 – 123.
- [7] 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. *Zentralbl Veterinarmed B* , 1994 **41** : 49 – 59.
- [8] Osek J , Gallien P , Truszczyński 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.
- [9] Woodward M J , Carroll P J , Wray C. Detection of entero- and verotoxin genes in *E. coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* , 1992 , **31** : 251 – 261.
- [10] 高 崧 , 刘秀梵. 抗大肠埃希氏菌黏附素单克隆抗体诊断试剂的研制及其现场初步应用. 畜牧兽医学报 , 1993 , **24** (3) : 248 – 253.

Serogroups and Virulence Factors of *Escherichia coli* Associated with Diarrhea in Piglets in Eastern China

CHEN Xiang GAO Song* WANG Lei JIAO Xin-An LIU Xiu-Fan

(Animal Infectious Diseases Laboratory , Ministry of Agriculture , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China)

Abstract The purpose of this study was to determine the present distribution of O-serogroups and virulence factors among pathogenic *Escherichia coli* isolates collected from diarrheal piglets from 7 provinces in eastern China. 339 strains were identified with *Escherichia coli* isolates in 10 biochemical reactions. Among 339 *E. coli* isolates , serogroups of 221 strains were determined while 77 were unable to be classified as certain groups , and 41 were self-agglutinated. These isolates distributed in 64 serogroups and 44.80% (99/221) out of which belonging to 6 O-serogroups : O₁₀₇、O₁₀₁、O₂₀、O₉₃、O₁₁ and O₁₄₉ . Several uncommon O serogroups were discovered in this study. 339 *E. coli* isolates were used for determination of F4 , F5 , F6 , F18 and F41 by slide agglutination with monoclonal antibodies and 145 *E. coli* strains were examined for toxin STa , STb , LT and SLT-2e genes by means of multiple PCR assay. 97 strains (28.61%) carried the fimbrial adhesions , 67 *E. coli* strains expressed one fimbriae and 30 strains expressed two or more fimbriae. Among 339 *E. coli* isolates , the positive percents for F6、F4、F5 + F41 were 30.93% , 18.56% and 15.46% , respectively. PCR analysis showed that nearly seventy-two percent (75/145) of those isolated harboured the genes for enterotoxin STa , and thirty-seven percent (54 /145) possessed the genes for enterotoxin STb. The above adhesions and heat-stable enterotoxins seemed to be the common virulence factors in tested isolates.

Key words Piglet , Diarrhea , *Escherichia coli* , O-serogroups , Fimbrial adhesin , Toxin

Foundation item : Chinese Program for High Technology Research and Development (2003AA222141) ; Jiangsu Province Natural Science Foundation (BK2001148)

* Corresponding author. Tel 86-514-7979386 ; Fax 86-514-7323112 ; E-mail : yzgsong@pub. yz. jsinfo. net

Received date : 05-20-2003