

断奶仔猪源大肠杆菌 LEE 及 HPI 毒力岛的检测

成大荣, 孙怀昌, 徐建生, 高 崧

(扬州大学兽医学院 扬州 225009)

摘 要 应用 Duplex-PCR 方法, 对 240 株断奶仔猪源大肠杆菌分离株的 LEE 毒力岛的 *eaeA* 基因和耶尔森菌强毒力岛核心区的 *irp2* 基因进行了检测, 并对 HPI 毒力岛的 *fyuA* 基因及其在大肠杆菌染色体中的插入位置进行了分析, 以及随机选取部分 PCR 产物进行了克隆和序列分析。结果表明: 其中 29 株(12.08%)为 LEE⁺ HPI⁺, 39 株(16.25%)为 LEE⁺, 11 株(4.58%)为 HPI⁺; 另外还发现: 不同病例来源的分离株之间, 两种毒力岛的携带率不同, 在断奶仔猪腹泻源分离株中 29 株(20.71%)为 LEE⁺ HPI⁺, 22 株(15.71%)为 LEE⁺, 9 株(6.43%)为 HPI⁺; 断奶仔猪水肿病源分离株中, 仅 5 株(6.58%)为 LEE⁺, 2 株(2.63%)为 HPI⁺, 未发现 LEE⁺ HPI⁺ 菌株; 断奶仔猪水肿病并发腹泻源分离株中, 仅 12 株(50%)为 LEE⁺, 未发现 HPI⁺ 及 LEE⁺ HPI⁺ 菌株。本实验克隆的 *eaeA*(425bp) 与已发表序列完全一致, *irp2*(280bp), *fyuA*(948bp), *asn-tRNA-intB*(1391bp) 均与已发表的序列高度同源, 同源性分别在 98.2%、98.3%、95.8% 以上。740 株 LEE⁺ HPI⁺ 或 HPI⁺ 分离株中 29 株(72.5%)为 *fyuA*⁺, 且其 HPI 毒力岛位于大肠杆菌染色体 *asn-tRNA* 位点。

关键词 猪, 大肠杆菌, 毒力岛, LEE, HPI

中图分类号: Q852.6 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)03-0368-05

毒力岛(Pathogenicity island, PAI)是指细菌染色体上分子量较大(通常 > 30kb), G + C mol% 及密码使用与宿主菌染色体有明显差异的毒力基因簇。常与 tRNA 位点及噬菌体整合位点邻近, 两侧常具有同向重复序列, 偶尔为插入序列, 携带潜在的可移动成分, 具有不稳定性。毒力岛存在于许多病原菌中, 可能与新发现的病原菌及细菌的毒力进化有关。目前已在人、牛、兔的腹泻致病性大肠杆菌中发现了 LEE 毒力岛和 HPI 毒力岛的存在并与致病性密切相关^[1-6]。

在所有 AEEC 的染色体上均具有一个致病性基因簇^[1, 2], 命名为 LEE(Locus of enterocyte effacement)毒力岛, 约为 35.5kb, 编码 A/E(Attaching and effacing)作用所必须的蛋白^[7, 8]。其中 *eaeA* 编码的 94 ~ 97kDa 外膜蛋白, 已证明是与致病密切相关的亲密素(intimin)^[9]。检测 LEE 毒力岛通常有 (1) 如无特殊需要, 只需检测 *eaeA*, 而无需检测 LEE 上的其它基因^[7]; (2) 体外粘附实验, 通常使用 Hep-2 细胞或 HeLa 细胞上粘附试验^[10, 11]。与传统血清学方法相比, PCR 方法准确性高, 检出时间短, 是目前推广使用的方法。

HPI 毒力岛最早发现于耶尔森菌属, 因与该属菌的小鼠致死表型密切相关, 故被命名为强毒力岛

(High pathogenicity island, HPI)^[12, 13]。鼠疫耶尔森氏菌染色体上的 HPI 毒力岛, 主要包括以下基因: ① 色素沉着(pigmentation, *pgm*)基因座, 大小约为 102kb, 包括铁载体耶尔森杆菌素基因(*ybt*)和氯化高铁血红素聚积蛋白基因(*hms*)^[14]。② 铁调节蛋白基因(*irp1* 与 *irp2*), 编码两种高分子量的蛋白质 IRP1 和 IRP2, 与 *ybt* 编码的铁载体耶尔森杆菌素(Ybt)的合成密切相关; *irp2*、*irp1* 是 HPI 毒力岛核心保守区的主要结构基因, 其中 *irp2* 可以作为 HPI 毒力岛的检测标志^[15, 16]。③ 鼠疫菌素受体基因(*psn*)编码鼠疫菌素受体(FyuA), 故也称为 *fyuA*^[17-20]。Schubert 研究发现一些产大肠杆菌素的大肠杆菌菌株也携带有 HPI 毒力岛, 且其 *irp2*、*fyuA* 与耶尔森氏菌几乎相同, 这提示 HPI 毒力岛可在耶尔森氏菌和致病性大肠杆菌之间水平传播^[21-23]。

断奶仔猪腹泻通常是由产肠毒素大肠杆菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)引起, 断奶仔猪水肿病是由产志贺氏毒素大肠杆菌(Verotoxigenic *Escherichia coli*, STEC)引起, 相关的菌毛和毒素是这两类大肠杆菌常见的毒力因子。为研究这两类疾病是否还与其他毒力类型的大肠杆菌有关, 本研究建立了一种 Duplex-PCR 方法, 用于 LEE 和 HPI 毒力岛

基金项目: 国家 863 计划(2003AA222141)

作者简介: 成大荣(1973 -), 男, 江苏赣榆县人, 讲师, 博士, 主要从事病原微生物学及免疫学研究。Tel/Fax: 86-514-7972587; E-mail: yzcd@yzcn.net

收稿日期: 2005-06-30; 接受日期: 2005-07-26; 修回日期: 2005-09-15

的检测,研究了 LEE 和 HPI 毒力岛在断奶仔猪源大肠杆菌中的携带情况,并分析了部分菌株的相关基因序列。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:来自江苏省(2003~2004年)扬州、盐城、南通的断奶仔猪腹泻源 140 株,断奶仔猪水肿病源 76 株,断奶仔猪水肿病并发腹泻源 24 株;所有细菌均采用麦康凯平板划线分离,然后在 LB 培养基上 37℃ 纯培养 24h。LEE⁺ 大肠杆菌 S442712 株, HPI⁺ 大肠杆菌 S452621 株、S433014 株,LEE⁺ HPI⁺ 大肠杆菌 S461031 株,均为扬州大学兽医微生物实验室分离鉴定。

1.1.2 引物:根据文献 [24~27] 合成了 4 对引物用于 LEE 毒力岛 *eaeA* 基因(部分区域)和 HPI 毒力岛 *irp2*(部分区域)、*fyuA*、*asn-tRNA-intB* 基因的扩增,由 TaKaRa 公司合成,浓度均为 50mmol/L,引物序列详见表 1。

表 1 本试验中所用的引物

Table 1 Oligonucleotide primers used in the study

Primer	Primer sequence(5'-3')	Target gene	PCR fragment size/bp
eae-L	ATATCCGTTTTAATGCTATCT	<i>eaeA</i>	425
eae-R	AATCTTCTGCGTACTGTGTTC		
irp2-L	AAGGATTCGCTGTACCGGAC	<i>irp2</i>	280
irp2-R	TCGTCGGGACAGCTTCTCTCT		
fyuA-L	GCITTAATCCTCTGGCCCT	<i>fyuA</i>	948
fyuA-R	GGCATAATGACGATTAAC		
intB-L	GAACGGCGGACTGTTAAT	<i>asn-tRNA-intB</i>	1391
intB-R	ATCGCTTTGCGGCTCTAGG		

1.1.3 试剂:*Taq* 酶、DNA Marker DL2000、限制性内切酶、pGEM[®]-T 载体系统、λDNA/*EcoR* I + *Hind* III Marker、DNA Marker DL2000、X-Gal 等均购自 TaKaRa 公司;RNase A、氨苄青霉素、Tris-平衡酚、优质琼脂糖等均购自上海华美生物工程公司。

1.2 DNA 模板的制备

所有 240 株断奶仔猪源大肠杆菌均在 LB 平板上 37℃ 纯培养 24h,各挑取 1 个菌落,分别均匀悬浮于 50μL 超纯水中;100℃ 10min 后,迅速冰浴 5min,4℃ 10000r/min 离心 5min。取上清于 4℃ 保存作为 PCR 的 DNA 模板。

1.3 检测 *eaeA* 与 *irp2* 的 Duplex-PCR 方法的建立

取 10 × PCR Buffer 5μL、MgCl₂(25mmol/L) 4μL、4 × dNTPs(10mmol/L) 4μL、引物 eae-L、eae-R、irp2-L、irp2-R(均为 50μmol/L)各 1μL、*Taq* 酶(5U/μL)1μL、

DNA 模板 2μL;加 H₂O 至 50μL。PCR 反应条件:94℃ 3min;94℃ 0.5min,64℃ 0.5min,72℃ 1min,每两个循环降低 1℃,共 12 个循环。然后 94℃ 0.5min,58℃ 0.5min,72℃ 1min,72℃ 10min,共 20 个循环,4℃ 保温。

1.4 HPI 毒力岛 *fyuA* 的 PCR 检测

取 10 × PCR Buffer 5μL、MgCl₂(25mmol/L) 4μL、4 × dNTPs(10mmol/L) 4μL、引物(*fyuA*-L、*fyuA*-R)均为 50μmol/L)各 1μL、*Taq* 酶(5U/μL)1μL、DNA 模板 2μL 加 H₂O 至 50μL;PCR 循环参数如下:94℃ 3min;94℃ 0.5min,58℃ 0.5min,72℃ 1min,共 30 个循环;72℃ 10min 4℃ 保温。

1.5 HPI 毒力岛 *asn-tRNA-intB* 的 PCR 检测

取 10 × PCR Buffer 5μL、MgCl₂(25mmol/L) 4μL、4 × dNTPs(10mmol/L) 4μL、引物 intB-L、intB-R(均为 50μmol/L)各 1μL、*Taq* 酶(5U/μL)1μL、DNA 模板 2μL 加 H₂O 至 50μL;PCR 循环参数同 1.4。取 PCR 扩增产物 4μL 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳 1h。以 DNA Marker DL2000 为参照,观察扩增片段大小。

1.6 断奶仔猪源大肠杆菌 LEE 和 HPI 的分子流行病学

取上述制备的 240 株断奶仔猪源大肠杆菌的 DNA 模板,分别采用方法 1.3 进行 PCR 扩增,以确定 LEE 和 HPI 在断奶仔猪源大肠杆菌中的分子流行病学。

1.7 *eaeA*、*irp2*、*fyuA*、*asn-tRNA-intB* 的克隆与序列分析

随机取检测为 LEE⁺ 大肠杆菌 5 株和 HPI⁺ 大肠杆菌 7 株(*irp2*⁺ *fyuA*⁺ *intB*⁺ 5 株、*irp2*⁺ *fyuA*⁻ *intB*⁻ 2 株)的 DNA 模板分别用于 *eaeA*、*irp2*、*fyuA*、*asn-tRNA-intB* 基因的 PCR 扩增。将来自各菌株的 *eaeA*、*irp2*、*fyuA*、*intB* 扩增片段分别克隆至 pGEM[®]-T 载体。将含有 *eaeA* 的重组质粒用 *EcoR* I + *Sal* I 双酶切,将含有 *irp2* 基因的重组质粒、含有 *fyuA* 基因的重组质粒、含有 *asn-tRNA-intB* 基因的重组质粒均用 *Sph* I + *Sal* I 双酶切。所有酶切产物经琼脂糖凝胶电泳,以 DNA/*EcoR* I + *Hind* III Marker、DNA Marker DL-2000 为参照观察酶切片段大小。由 TaKaRa 对重组质粒中的插入片段进行序列测定。

2 结果和分析

2.1 *eaeA* 与 *irp2* Duplex-PCR 产物鉴定

引物 eae-L、eae-R 单独用于 *eaeA* 的扩增及引物

irp2-L、*irp2*-R 单独用于 *irp2* 的扩增,其特异性相关文献已有描述^[24,25];在此基础上本试验利用引物 *eae*-L、*eae*-R、*irp2*-L、*irp2*-R 建立了 Duplex-PCR,并可从 LEE⁺ 大肠杆菌中扩增到约 425bp 的片段,可从 HPI⁺ 大肠杆菌中扩增到约 280bp 的片段,可从 LEE⁺ 和 HPI⁺ 大肠杆菌中扩增到 2 个片段,且与期望的大小相当(图 1),而从其他 LEE⁻ 和/或 HPI⁻ 大肠杆菌中不能扩增到期望的片段。表明该 Duplex-PCR 可特异性扩增 *eaeA* 与 *irp2* 基因并用于鉴定 LEE⁺ 大肠杆菌与 HPI⁺ 大肠杆菌。

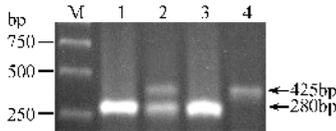


图 1 检测 *eaeA* 与 *irp2* 的 Duplex-PCR 产物电泳图

Fig. 1 Duplex-PCR amplicons with all *eaeA* and *irp2* primer pairs. M. DNA Marker DL2000; 1. PCR product from HPI⁺ *E. coli* S452621 strain; 2. PCR products from LEE⁺ HPI⁺ *E. coli* S461031 strain; 3. PCR products from and HPI⁺ *E. coli* S433014 strain; 4. PCR product from LEE⁺ *E. coli* S442712 strain.

2.2 HPI 毒力岛 *fyuA* 的 PCR 检测

引物 *fyuA*-L、*fyuA*-R 单独用于 *fyuA* 基因的检测,其特异性相关文献中已描述^[26,27]。本研究利用此 PCR 体系也可从部分 HPI⁺ 大肠杆菌中鉴定到相应的 948bp 的 DNA 片段(图 2),表明引物 *fyuA*-L、*fyuA*-R 可用于 *fyuA* 基因的 PCR 检测。

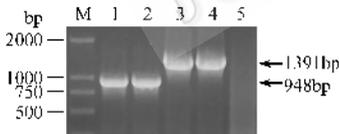


图 2 检测 *fyuA* 与 *asn-tRNA-intB* 的 PCR 产物电泳图

Fig. 2 PCR detection for *fyuA* and *asn-tRNA-intB* gene of HPI. M. DNA Marker DL2000; 1~2. PCR products (948bp) of *fyuA* from *E. coli* strain S452621 and S433014 respectively; 3~4. PCR products (1391bp) of *asn-tRNA-intB* from *E. coli* strain S452621 and S433014 respectively; 5. No PCR products from LEE⁺ *E. coli* S442712 strain by using primers of *fyuA* and *asn-tRNA-intB*.

2.3 HPI 毒力岛 *asn-tRNA-intB* 的 PCR 检测

引物 *intB*-L、*intB*-R 单独用于 *asn-tRNA-intB* 基因的检测,其特异性相关文献已描述^[26,27]。本研究利用此 PCR 体系也可从部分 HPI⁺ 大肠杆菌中鉴定到相应的 1391bp 的 DNA 片段(图 2),表明引物 *intB*-L、*intB*-R 可用于 *asn-tRNA-intB* 基因的 PCR 检测,以确定 HPI 毒力岛在大肠杆菌基因组中的整合位置。

2.4 *eaeA*、*irp2*、*fyuA*、*asn-tRNA-intB* 基因的克隆

重组质粒的酶切分析表明:从含有 *eaeA* 基因的

重组质粒中均可切出约 425bp 的 DNA 片段;从含有 *irp2* 基因的重组质粒中均可切出约 280bp 的 DNA 片段;从含有 *fyuA* 基因的重组质粒中均可切出约 948bp 的 DNA 片段;从 1 个含有 *intB* 基因的重组质粒中可切出约 130bp 和 1260bp 的两个 DNA 片段,从其它 4 个含有 *intB* 基因的重组质粒中可切出约 130bp、360bp 和 900bp 的 3 个 DNA 片段。

2.5 重组质粒插入片段的序列分析

重组质粒中插入片段的序列分析表明:① 5 个 *eaeA* 序列均为 425bp,与已发表的 *eaeA* 基因的大小及序列一致;② 7 个 *irp2* 基因均为 280bp,与已发表的 *irp2* 序列同源性大于 98.2%;其中 5 株 *irp2*⁺ *fyuA*⁺ *intB*⁺ 菌株与 2 株 *irp2*⁺ *fyuA*⁻ *intB*⁻ 菌株的 *irp2* 序列的同源性大于 99.3%;③ 5 个 *fyuA* 基因均为 948bp,与已发表的 *fyuA* 序列的同源性大于 98.3%;④ 5 个 *asn-tRNA-intB* 序列均为 1391bp,与已发表的 *asn-tRNA-intB* 序列的同源性大于 95.8%;其中 4 个序列分别在第 133、494 位碱基处各有 1 个 *Sph* I 酶切位点,而另外一个序列由于在第 493~495 位碱基处发生了 ATG→CAA 变异,故只第 133 位碱基处有 1 个 *Sph* I 酶切位点,这与酶切分析完全吻合。

2.6 断奶仔猪源大肠杆菌 LEE 和 HPI 的分子流行病学

利用建立的 Duplex-PCR 对 240 株断奶仔猪源大肠杆菌分离株的 LEE 毒力岛的 *eaeA* 基因和 HPI 毒力岛核心区的 *irp2* 基因进行了检测,结果发现 29 株为 LEE⁺ HPI⁺ (12.08%),39 株为 LEE⁺ (16.25%),11 株为 HPI⁺ (4.58%)。进一步分析发现:在断奶仔猪腹泻源分离株中,LEE⁺ HPI⁺ 菌株共 29 株 (20.71%),LEE⁺ 菌株共 22 株 (15.71%),HPI⁺ 菌株共 9 株 (6.43%);在断奶仔猪水肿病源分离株中,LEE⁺ 菌株共 5 株 (6.58%),HPI⁺ 菌株共 2 株 (2.63%),没有发现 LEE⁺ HPI⁺ 菌株;在断奶仔猪水肿病并发腹泻源分离株中,LEE⁺ 菌株共 12 株 (50%),没有发现 HPI⁺ 菌株和 LEE⁺ HPI⁺ 菌株。

2.7 *fyuA* 和 *asn-tRNA-intB* 基因的检测

在 40 株 HPI⁺ 分离株中,*fyuA*⁺ 有 29 株 (72.5%);*asn-tRNA-intB*⁺ 有 29 株 (72.5%);*fyuA* 与 *asn-tRNA-intB* 均是同时出现。耶尔森菌的 HPI 有一个与 P4 噬菌体整合酶基因同源的编码序列 *intB*,位于 *asn-tRNA* 位点,本试验结果也表明断奶仔猪源大肠杆菌的 HPI 大多数与此位点连锁。

2.8 LEE 和 HPI 毒力岛与毒素之间的关系

通过 LEE 和 HPI 毒力岛与毒素之间关系的比较发现:在断奶仔猪源大肠杆菌中,LEE⁺ 或 HPI⁺ 或 LEE⁺ HPI⁺ 的分离株通常为不产毒素的菌株;STEC/EPEC 携带 LEE 的比率(50%)明显高于 STEC(8.33%)和 ETEC(20.83%);仅有 2 株 STEC 为 HPI⁺,而 ETEC 均为 HPI⁻(表 2)。

表 2 断奶仔猪源大肠杆菌毒力岛 LEE 和 HPI 与毒素之间的关系

Table 2 Distribution of LEE and HPI in 240 isolates from diarrheic or edematous swines

Isolates from	Toxin	LEE ⁺ HPI ⁺	LEE ⁺ and HPI ⁺	LEE ⁻ and HPI ⁻
Diarrheic swine	ST-I			3
	ST-II			4
	LT-I + ST-II	2		6
	ST-I + ST-II	3		
	LT-I + ST-I + ST-II			6
	Toxins negative	17	9	29
Edematous swine	Stx2e	5	2	53
	Toxins negative			16
Edematous and Diarrheic swine	Stx2e + ST-I	6		12
	Stx2e + LT-I + ST-I	5		
	Stx2e + LT-I + ST-II	1		

3 讨论

LEE 和 HPI 毒力岛是人源、牛源、兔源致泻性大肠杆菌的重要毒力因子^[1-6, 28, 29],但在断奶仔猪源大肠杆菌中的报道尚少。为研究 LEE 和 HPI 毒力岛在断奶仔猪源大肠杆菌中的分子流行病学,本试验基于 LEE 毒力岛 *eaeA* 基因和 HPI 毒力岛保守基因 *irp2* 建立了 Duplex-PCR 方法。

本研究结果表明,LEE 和 HPI 毒力岛在断奶仔猪源大肠杆菌中广泛流行分布,但在致仔猪腹泻和水肿病菌株之间存在差异。致断奶腹泻大肠杆菌除了公认的 ETEC 外,LEE⁺、HPI⁺ 以及 LEE⁺ HPI⁺ 大肠杆菌也已经占有重要地位,这对今后大肠杆菌病的防治具有指导意义。至于断奶仔猪源大肠杆菌 LEE 和 HPI 毒力岛与致病能力的关系有待进一步研究。

肠道菌的大部分毒力岛仅存在于某种细菌甚至某种致病性的细菌,如 LEE 毒力岛仅存在于致病性大肠杆菌,其它细菌中未发现^[30]。但耶尔森菌的 HPI 却不同,它不仅存在小鼠致死性耶尔森菌中,而且也存在于肠杆菌科细菌的基因组(如克雷伯菌、枸橼酸杆菌和大肠杆菌)提示耶尔森菌 HPI 能在肠杆菌科不同属之间水平转移。本研究发现,16.66% 的断奶仔猪源大肠杆菌为 HPI⁺,而且序列分析也证明

断奶仔猪源大肠杆菌的 *irp2*、*fyuA*、*asn-tRNA-intB* 分别与 GenBank 中已发表的序列高度同源,这不仅进一步证明了本试验所设计的 PCR 方法的可靠性,也为耶尔森菌 HPI 的水平转移提供了重要证据。

现有报道认为,HPI 毒力岛具有不稳定性,并含有潜在的插入序列、整合酶等可移动成分,主要转移到大肠杆菌染色体的 *asn-tRNA* 位点。HPI 的主要结构基因有 *irp2*、*irp1* 和 *fyuA*,*irp2* 和 *fyuA* 通常同时存在。而本研究结果表明:在 HPI⁺ 断奶仔猪源大肠杆菌中,某些菌株却为 *fyuA*⁻ 约有 72.5% HPI 毒力岛整合到 *asn-tRNA* 位点,提示大肠杆菌在通过水平转移获得 HPI 的过程中可能对其进行了修饰或重组,使得 *intB*、*fyuA* 基因片段丢失;*asn-tRNA-intB* 阴性也有可能与 HPI 被整合到其他位置有关。

参 考 文 献

- [1] Jores J, Rumer L, Kiessling S, et al. A novel locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island inserted at pheV in bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain O103:H2. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, **204**(1): 75-79.
- [2] Sperandio V, Kaper JB, Bortolini MR, et al. Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **164**(1): 133-139.
- [3] Penteado AS, Ugrinovich LA, Blanco J, et al. Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 2002, **89**(1): 41-51.
- [4] Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes and Infection*, 2001, **3**(7): 561-569.
- [5] Bach S, de Almeida A, Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **183**(2): 289-294.
- [6] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. The *Yersinia* high-pathogenicity island is highly predominant in virulence-associated phylogenetic groups of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, **196**(2): 153-157.
- [7] McNamara BP, Donnenberg MS. A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **166**(1): 71-78.
- [8] Tonia SA, Marcia KW. Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans and swine. *Infection and Immunity*, 1997, **65**(1): 320-326.
- [9] Jerse AE, Kaper JB. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilo-dalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun*, 1991, **59**(12): 4302-4309.
- [10] Goffaux F, China B, Maimil J. Organisation and *in vitro* expression of esp genes of the LEE (locus of enterocyte effacement) of bovine enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiol Lett*, 2001, **83**(3): 275-286.

- [11] Ragione RML , Best A , Sprigings KA , *et al.* Interaction between attaching and effacing *Escherichia coli* serotypes O157:H7 and O26 : K60 in cell culture. *Veterinary Microbiology* , 2004 , **104** (1 - 2) : 119 - 124 .
- [12] Carniel E , Guilvout I , Prentice M . Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island " in biotype 1B *Yersinia enterocolitica* . *J Bacteriol* , 1996 , **178** (23) : 6743 - 6751 .
- [13] Mokracka J , Koczura R , Kaznowski A . *Yersiniabactin* and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp. . *FEMS Immunology and Medical Microbiology* , 2004 , **40** (1) : 51 - 55 .
- [14] Perry RD , Pendrak ML , Schuetze P . Identification and cloning of a hemin storage locus involved in the pigmentation phenotype of *Yersinia pestis* . *J Bacteriol* , 1990 , **172** (10) : 5929 - 5937 .
- [15] Lucier TS , Fetherston JD , Brubaker RR , *et al.* Iron uptake and iron-repressible polypeptides in *Yersinia pestis* . *Infect Immun* , 1996 , **64** (8) : 3023 - 3031 .
- [16] Koczura R , Kaznowski A . Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* . *Microbial Pathogenesis* , 2003 , **35** (5) : 197 - 202 .
- [17] Carniel E , Guilyou A , Guilvout L , *et al.* Molecular cloning , iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2 , a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia* . *Mol Microbiol* , 1992 , **6** (3) : 379 - 388 .
- [18] Carniel E , Mercereau-Puijalon O , Bonnefoy S . The gene coding for the 190,000-dalton iron-regulated protein of *Yersinia* species is present only in the highly pathogenic strains. *Infect Immun* , 1989 , **57** (4) : 1211 - 1217 .
- [19] Heesemann J , Hantke KT , Vocke E , *et al.* Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production , expression of an iron-repressible outer membrane protein of 65000Da and pesticin sensitivity. *Mol Microbiol* , 1993 , **8** (2) : 397 - 408 .
- [20] Rakin A , Saken E , Harmsen D , *et al.* The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica* : a novel virulence factor with dual function. *Mol Microbiol* , 1994 , **13** (2) : 253 - 263 .
- [21] Rakin A , Urbitsch P , Heesemann J . Evidence for two evolutionary lineages of highly pathogenic *Yersinia* species. *J Bacteriol* , 1995 , **177** (9) : 2292 - 2298 .
- [22] Schubert S , Rakin A , Fischer D , *et al.* Characterization of the integration site of *Yersinia* high-pathogenicity island in *Escherichia coli* . *FEMS Microbiol Lett* , 1999 , **179** (2) : 409 - 414 .
- [23] Rakin A , Schubert S , Guilvout I , *et al.* Local hopping of IS3 elements into the A + T-rich part of the high-pathogenicity island in *Yersinia enterocolitica* 1B , O:8 . *FEMS Microbiol Lett* , 2000 , **182** (2) : 225 - 229 .
- [24] Yu J , Kaper JB . Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* , 1992 , **6** (3) : 411 - 417 .
- [25] Hubbard AL , Harrison DJ , Moyes C , *et al.* Direct detection of *eae*-positive bacteria in human and veterinary colorectal specimens by PCR. *J Clin Microbiol* , 1998 , **36** (8) : 2326 - 2330 .
- [26] Franck SM , Bosworth BT , Moon HW . Multiplex PCR for enterotoxigenic , attaching and effacing , and shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *Journal of Clinical Microbiology* , 1998 , **36** (6) : 1795 - 1797 .
- [27] Schubert S , Rakin A , Karch H , *et al.* Prevalence of the "high pathogenicity island " of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to human. *Infect Immun* , 1998 , **66** (2) : 480 - 485 .
- [28] Wieler LH , McDaniel TK , Whittam TS , *et al.* Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiol Lett* , 1997 , **156** (1) : 49 - 53 .
- [29] China B , Jacquemin E , Devrin AC , *et al.* Heterogeneity of the *eae* genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle : comparison with human strains. *Research in Microbiology* , 1999 , **150** (5) : 323 - 332 .
- [30] McDaniel TK , Jarvis KG , Donnenberg MS , *et al.* A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1995 , **92** (5) : 1664 - 1668 .

Prevalence of LEE and HPI pathogenicity islands of *Escherichia coli* isolates from weaned piglets in China

CHENG Da-rong* , SUN Huai-chang , XU Jian-sheng , GAO Song

(Department of Veterinary Medicine , College of Veterinary Medicine , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China)

Abstract : To investigate the distribution of LEE pathogenicity island and HPI of *Yersinia enterocolitica* in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets , PCR based on intimin gene (*eaeA*) of LEE pathogenicity island and high molecular weight protein 2 (HMWP1) gene (*irp2*) of HPI was developed. A total of 240 isolates from 140 diarrheic , 76 edematous and 24 edematous/diarrheic weaned piglets from different farms were tested for the presence of the two genes. Sequence analysis of randomly selected PCR products showed that *eaeA* gene of 5 isolates was 100% , *irp2* gene of 7 isolates was 98.2% , *fyuA* gene of 5 isolates was 98.3% and Asn-tRNA-intB of 5 isolates was 95.8% identical to the published sequences. Isolates with LEE + HPI gene were more frequently detected in diarrheic swine than in edematous swine and edematous/diarrheic swine , and isolates with LEE gene were more frequently detected in edematous/diarrheic piglets than in edematous and diarrheic piglets. Furthermore , isolates with LEE or HPI or LEE + HPI were more frequently detected in diarrheic swine. 72.5% of HPI⁺ isolates were *fyuA* positive and linked to asn-tRNA.

Keywords : Piglet ; *Escherichia coli* ; Pathogenicity island ; LEE ; HPI

Foundation item : The National High Technology Research and Development Program of China (2003AA222141)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-514-7972587 ; E-mail : yzcdr@yzcn.net

Received : 30 June 2005 / Accepted : 26 July 2005 / Revised : 15 September 2005