

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (2) :236 - 242; 4 February 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.02.013

猪源大肠杆菌 F18 菌毛的体外表达和抗原特性

陈祥^{1,2}, 宦海霞³, 万婷^{1,2}, 王雷², 高崧^{1,2*}, 焦新安^{1,2*}

¹扬州大学, 江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏 扬州 225009

²扬州大学, 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

³淮阴师范学院生命科学学院, 江苏 淮安 223300

摘要:【目的】揭示从仔猪腹泻和/或水肿病猪体内分离到的 *fedA*⁺ 大肠杆菌所携带的毒力因子、F18 菌毛在体外表达及其抗原变异情况。【方法】利用凝集试验测定 O 血清型, PCR 方法检测毒力基因, 单克隆抗体分析 F18 菌毛抗原特性。【结果】在 75 个 *fedA*⁺ 分离株中, 有 62 株测定出其 O 血清型, 覆盖 8 种血清型, 以 O107 和 O139 为主 (74.2%); *estI*、*estIII*、*elt*、*stx-2e*、*astA*、*orfA*、*irp2*、*fyuA*、*ler* 和 *eaeA* 基因在这 75 个菌株中的检出率分别为 64.0%、46.7%、28.0%、62.7%、26.7%、9.3%、9.3%、9.3%、1.3% 和 1.3%, 其中仅拥有 *stx-2e* 基因的菌株有 19 株, 同时拥有 *estI/estIII/stx-2e* 基因的菌株有 20 株。单抗鉴定结果显示, 在 33 株体外表达 F18 菌毛的菌株中, 21 株 (63.6%) 被鉴定为 F18ac 变体, 2 株 (6.1%) 被鉴定为 F18ab 变体, 其余 10 株 (30.3%) 仅跟 F18 “a” 因子单抗反应, 而不跟 F18 “b”、“c” 因子单抗反应。间接 ELISA 显示, 11 株单抗至少识别 F18 菌毛的 6 个表位, 其中 “a” 因子至少有 3 个表位, “b” 因子至少有 2 个表位, “c” 因子至少有 1 个表位。【结论】在猪源菌株中, F18ab 菌毛在体外表达率较低; F18ac 菌毛在体外表达率较高, 主要与肠毒素和 O107 血清型相关, 同时我国存在 F18 菌毛的抗原变异。

关键词: 猪, 大肠杆菌, F18 菌毛, 血清型, 毒力因子, 抗原特性

中图分类号: Q939.94 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2014)02-0236-07

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 (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*, AEEC)。ETEC 主要通过其表面的黏附素 (K88、K99、987P、F18 和 F41 等) 吸附于小肠上皮细胞, 产生热敏肠毒素 (Heat labile enterotoxin, LT) 和/或耐热肠毒素 (Heat stable enterotoxin, ST) 致仔猪腹泻。STEC 主要通过黏附素 (如 F18 菌毛等) 在消化道定殖, 产志贺样毒素 (Stx-2e, 又称 Vero 细胞毒素) 致仔猪水肿病^[1]。

断奶仔猪腹泻和水肿病多发于 4 - 12 周龄的猪, 是断奶仔猪死亡的重要病因, 给养猪业造成严重

基金项目: 国家自然科学基金 (31001079); 国家“863 计划” (2012AA101601-6, 2011AA10A212); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

* 通信作者。Tel: +86-514-87971136; E-mail: jiao@yzu.edu.cn, gsong@yzu.edu.cn

作者简介: 陈祥 (1978 -), 男, 江苏盐城人, 博士, 副教授, 主要从事病原微生物学研究。E-mail: chenxiang@yzu.edu.cn

收稿日期: 2013-06-10; 修回日期: 2013-08-06

的经济损失。同一群猪可同时发生断奶仔猪腹泻和水肿病, 由于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, 所以从病原、流行病学和症状方面有时无法绝对区分这两种疾病, 但能否产生黏附素(如 F18 菌毛)并在肠道内定殖是这些大肠杆菌致病的关键。Berchinger 等^[2] (1990)在对致猪水肿病大肠杆菌 107/86 的研究中发现一种黏附性菌毛, 其抗原性与 ETEC 黏附素 K88、K99、987P 和 F41 不同, 这种菌毛被命名为 F107; 该菌毛不凝集包括豚鼠在内多种动物的红细胞, 在普通营养琼脂上表达很差或不表达, 电镜观察显示该菌毛较长而易弯曲, 直径为 4.6 nm。Nagy 等^[3]在匈牙利从断奶仔猪腹泻的粪便中分离到一些血清型为 O141、O157 的大肠杆菌菌株, 发现其表面黏附素不同于已知的其他任何一种黏附素, 命名为 2134P, 直径为 3.5 nm, 体内和体外试验都证明表达了 2134P 菌毛的大肠杆菌对断奶仔猪小肠上皮细胞的黏附能力大大强于对新生仔猪小肠上皮细胞。Salajka 等^[4] (1992 年)又报道了定居因子 8813。Rippinger 等^[5]对 F107、2134P 及 8813 等进行了比较研究, 根据血清学试验结果, 将 F107 命名为 F18ab, 与仔猪水肿病相关, 而 2134P、8199 及 8813 等被命名为 F18ac 菌毛, 与断奶仔猪腹泻有关。

有关致断奶仔猪腹泻和/或水肿病的 F18 大肠杆菌的毒力因子及 F18 菌毛抗原特性的研究, 国内报道较少, 有鉴于此, 我们对收集的 F18 大肠杆菌进行毒力相关因子测定、体外菌毛表达及抗原表位特性分析, 现将有关结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源与培养条件: 1998 - 2006 年以江苏、江西、安徽、浙江和山东 5 省部分地区临床上疑似断奶仔猪腹泻和/或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, 选取单个典型菌落纯培养后冻干保存^[6]。参考菌株 2134 (O157: K⁺: H19, STa + STb, F18ac), 8133 (O147: K?: H⁻, F18ac),

8199 (O141ab: H4, STa + STb, F18ac), 107/86 (O139: K12: H1, Stx-2e, F18ab) 由本室保存。

1.1.2 主要试剂: 麦康凯干粉培养基、营养琼脂斜面、生化鉴定试剂盒等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。抗 F18 菌毛单克隆抗体 (1B3、1B7、1E3、2E9、3B2、3C2、3C3、4D7、5E9、5H4 和 6C4) 及 F18 菌毛多克隆抗体由本室研制、保存^[7]。其它常规试剂均为国产分析纯级产品。

1.2 F18 黏附素基因的 PCR 检测

根据 GenBank 中发表的序列, 设计出针对 F18 黏附素主要亚单位基因 (*fedA*) 的特异性引物, 预期扩增出的目的片段大小为 510 bp, 引物、裂解法制备细菌 DNA 模板和 PCR 扩增体系按报道方法进行^[6, 8-9]。

1.3 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^[8-9]。大肠杆菌标准抗 O 血清购自中国兽医药品卫生监察所, 通过玻板凝集和试管凝集试验对分离株进行 O 血清型鉴定^[8-9]。

1.4 溶血特性的鉴定

大肠杆菌接种于含 5% 绵羊血平板上, 37℃ 培养 14 - 18 h, 观察有无溶血圈^[8]。

1.5 PCR 检测毒力相关基因和毒力岛相关基因

按文献报道方法对分离株的 STa (*estI*)、STb (*estII*)、LT (*elt*)、Stx-2e (*stx-2e*)、EAST1 (*astA*)、AIDA (*orfA*) 基因及 HPI 毒力岛 (*irp2*、*fyuA*) 和 LEE 毒力岛 (*ler*、*eaeA*) 基因进行 PCR 鉴定^[8-11]。

1.6 种系发生分型

利用多重 PCR 方法检测分离株的 *chuA* 和 *yjaA* 基因、以及 DNA 片段 *TSPE4_C2*, 根据三者的检测结果对分离株进行种系发生分型^[12]。

1.7 电镜观察

F18 大肠杆菌 TSB 第 3 代培养物于 4℃、离心 10 min, 沉淀用 PBS 洗涤一次, 同样以 PBS 悬浮至 1×10^7 菌落形成单位 (CFU) / mL, 吸 10 μ L 滴于硫酸纸上, 将覆有 Formovar 膜的铜网悬浮于其上, 吸附 120 s, 于 37℃ 完全干燥后, 以 1% 磷酸酸 (pH 6.8) 负染 20 s, 铜网晾干后在 H300 透射电镜下观

察。

1.8 细菌菌毛表达鉴定

F18 基因阳性菌株接种 TSB 培养基, 37°C 静置培养 48 h, 同等培养条件下, 传代 2 次, 即为菌毛化菌体。当细菌在同样培养基, 17°C 培养时, 则为非菌毛化菌体。以 1×10^8 CFU/mL 的菌体分别包被酶标板, 加入倍比稀释的 F18 单抗后, 应用间接 ELISA 法检测菌毛的表达^[7, 13-14]。其中 3 株单抗(3B2, 4D7 和 5E9) 跟参考菌株 F18 “a” 反应, 3 株单抗(1B3, 3C2 和 3C3) 跟 F18 “b” 反应, 5 株单抗(1B7, 1E3, 2E9, 5H4 和 6C4) 跟 F18 “c” 反应。

2 结果

2.1 细菌分离和生化试验

从疑似仔猪腹泻和/或水肿病的病死仔猪中分离到 F18 (*fedA*⁺) 基因阳性菌株 75 个, 经生化试验鉴定, 这些分离株均符合大肠杆菌的特征。其中从江苏、江西、安徽、浙江和山东分别分离到 37、16、7、12 和 3 株大肠杆菌。

2.2 O 血清型和溶血特性鉴定

通过玻板凝集和试管凝集试验, 75 个分离株中, 除 10 株未能定型、3 株自凝外, 测定出 62 个分离株的血清型。这些分离株覆盖了 8 个血清型, 包括 O107、O139、O32、O116、O3、O4、O93 和 O141 血清型, 分别有 29、17、5、5、3、1、1 和 1 株。其中 O107 和 O139 血清型菌株分别占定型菌株的 46.8% 和 27.4%。

在这 75 个分离株中, 66 株 (88.0%) 具有溶血特性。

2.3 大肠杆菌毒力相关基因的检测

对 75 个分离株的毒力相关基因 (*estI*、*estIII*、*elt*、*stx-2e*、*astA* 和 *orfA*)、HPI 毒力岛 (*irp2*、*fyuA*) 和 LEE 毒力岛 (*ler*、*eaeA*) 基因进行 PCR 检测, 拥有 *estI*、*estIII*、*elt*、*stx-2e*、*astA* 和 *orfA* 基因的菌株分别有 48 (64.0%)、35 (46.7%)、21 (28.0%)、47 (62.7%)、20 (26.7%) 和 7 株 (9.3%)。拥有 HPI 和 LEE 毒力岛基因的菌株分别为 7 株 (9.3%) 和 1 株 (1.3%)。其中拥有 *estI* + *estIII* 的菌株有 29 株 (38.7%)、*estIII*

+ *elt* 的菌株 13 株 (17.3%)、*estI* + *estIII* + *stx-2e* 的菌株 20 株 (26.7%)。

依据大肠杆菌所携带毒力因子不同^[6], 这些分离株可分为不同的病原型, 其中 26 株为 ETEC, 19 株为 STEC, 28 株为 ETEC/STEC。

2.4 种系发生型分析

大肠杆菌可分为 A、B1、B2 和 D 这 4 个种系发生型。在研究的 75 株猪源大肠杆菌中, 39 株 (52.0%) 为 A 型, 23 株 (30.7%) 为 D 型, 9 株 (12.0%) 为 B1 型, 其余 4 株 (5.3%) 为 B2 型。

分析 O 血清型和种系发生型的相关性, 结果显示: 在 29 株 O107 分离株中, A 型有 19 株 (65.5%), D 型有 7 株 (24.1%), 3 株为 B1 型或 B2 型; 在 17 株 O139 分离株中, D 型有 11 株 (64.7%), 5 株为 B1 型 (29.4%), 1 株为 B2 型。

分析病原型和种系发生型的相关性, 结果显示: 在 26 株 ETEC 菌株中, A 型有 13 株 (50.0%), D 型有 10 株 (38.5%), 3 株为 B1 型; 在 19 株 STEC 分离株中, B1 型有 5 株 (26.3%), D 型有 12 株 (63.2%), 各 1 株为 A 型或 B2 型; 在 28 株 ETEC/STEC 菌株中, A 型有 23 株 (82.1%), B2 型有 3 株 (10.7%), B1 或 D 型各 1 株。

2.5 F18 菌毛体外表达鉴定

通过 TSB 体外 37°C 静置培养, 电镜观察菌株 107/86 及 2134, 可见菌体周围有许多长而弯曲的菌毛, 确认菌毛已大量表达, 而在 17°C 培养不表达菌毛。

运用 F18 菌毛单抗对 75 个 *fedA* 基因阳性菌株进行间接 ELISA 试验, 有 33 株能与 F18 菌毛多抗反应, F18 菌毛表达率为 44.0%, 其中 ETEC 的菌毛表达率为 42.3% (11/26), STEC 的菌毛表达率为 26.3% (5/19), ETEC/STEC 的菌毛表达率为 60.7% (17/28)。通过单抗与 33 个菌毛化菌体进行 ELISA 反应, 21 株被鉴定为 F18ac 变体, 2 株被鉴定为 F18 ab 变体, 10 株仅跟 F18 “a” 因子单抗反应, 而不跟 F18 “b”, “c” 因子单抗反应。一些菌毛化菌体在与针对 a 因子的 3 株单抗和针对 b 因子单抗的反应中出现了不一致的反应结果, 而菌毛化菌体与针对 c 因子的 5 株单抗反应结果表现一致 (表 1)。

表 1. 33 株 *fedA* 基因阳性菌株与 F18 单抗的间接 ELISA 结果Table 1. The reactivity of 33 *fedA*⁺ *E. coli* strains with F18 monoclonal antibodies by indirect ELISA

strains		virulence genes	F18 monoclonal antibody										
strains	formula		5E9	3B2	4D7	1B3	3C2	3C3	6C4	5H4	1B7	1E3	2E9
2134	O157:H19	<i>estI, estII</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
8133	O147:K?:H-		+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
8199	O141ab:H4	<i>estI, estII</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
107/86	O139:K12:H1	<i>stx-2e</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
SEC172	NT	<i>estI, estII, stx-2e</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SEC330	O107	<i>estI</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SEC429	O107	<i>estI, elt, stx-2e</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SEC595	O139	<i>stx-2e</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SEC604	O139	<i>stx-2e</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SEC653	O3	<i>estI</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SEC654	O3	<i>estI</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SEC657	O3	<i>estI</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SEC902	NT	<i>estI, elt</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SEC908	O107	<i>estI</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SEC035	O107	<i>estI, estII</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC091	O107	<i>estI, estII</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC206	O116	<i>estI, estII, elt, stx-2e</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC207	O116	<i>estI, estII, elt, stx-2e</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC208	O116	<i>estI, estII, elt, stx-2e</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC298	O107	<i>estI, estII, stx-2e</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC301	O107	<i>estI, estII, stx-2e</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC306	O107	<i>estI, estII, stx-2e</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC470	O4	<i>estI, estII, elt, stx-2e</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC473	O107	<i>estI, estII, elt, stx-2e</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC476	O107	<i>estI, estII, elt, stx-2e</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC477	O107	<i>estI, estII, elt, stx-2e</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC484	OR	<i>estI, estII, stx-2e</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC485	OR	<i>estI, estII, stx-2e</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC488	O32	<i>estI, estII, stx-2e</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC489	O107	<i>estI, estII, stx-2e</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC616	NT	<i>estI</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC792	NT	<i>estI</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC817	O107	<i>estII, stx-2e</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC896	O107	<i>estI, estII</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC924	O139	<i>stx-2e</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SEC811	O139	<i>stx-2e</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
O139	O139	<i>stx-2e</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

NT: not serogroupable; OR: O-rough.

3 讨论

致 PWECD/ED 大肠杆菌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]。本实验中分离到的 19 个 STEC 菌株, 其中 89.5% (17/19) 为 O139 血清型 (F18, Stx-2e), 是猪水肿病的主要血清型, 与文献报道类似。另外 28 个 ETEC/STEC 菌株以 O107 血清型为主 (53.6%), 种系发生型主要为 A 型 (82.1%)。

F18 菌毛存在两种血清学变体, 分别为 F18ab 和 F18ac^[5], 这些菌毛含有一种共同的抗原决定簇

“a”,另外各含一特异性的抗原决定簇称“b”或“c”,免疫电镜试验表明“a”和“b”或“a”和“c”沿同一菌毛分布;分别针对共同的抗原决定簇“a”和特异性抗原决定簇“b”或“c”的抗血清在免疫印迹试验中均可识别分子量约为 15KD 的蛋白条带,同时对 *fedA* 基因进行了 PCR 扩增,发现了两种类型的 *fedA* 相关性亚单位编码基因,与血清学试验结果一致。在本实验中发现 3 株针对 F18 a 因子的单抗,与 TSB 培养物的反应谱却不尽相同,同样 3 株针对 b 因子的单抗也有不同的反应结果,而 5 株针对 c 因子的单抗与 TSB 培养物反应得到了一致的结果。由此推测,a 因子至少是由 3 个不同抗原区构成的抗原表位,b 因子至少是由 2 个不同抗原区构成的抗原表位,c 因子抗原表位至少有 1 个抗原区。所以 F18 a、b/c 因子不是指单个的抗原表位,而更可能是指不同菌毛亚单位上的抗原表位构成的抗原群。

Nagy 等^[15]发现 F18 菌毛的两个变体 F18ab 和 F18ac 的生物学特性截然不同。F18ab 菌毛在体内和体外表达均较差,与血清型为 O139 产生 Stx-2e 毒素的大肠杆菌相关;F18ac 菌毛在体内和体外表达均较好,主要与血清型为 O141、O157 产肠毒素大肠杆菌相关。Wittig 等^[16]使用玻板凝集试验对分离自德国致断奶仔猪腹泻和水肿病大肠杆菌的 F18 菌毛表达情况进行测定,结果显示 160 株血清型为 O139:K82 的大肠杆菌中有 139 株可检出 F18 菌毛,其他 146 株猪源致病性血清型的大肠杆菌中 F18 菌毛的检出率为 100%;在检出的 F18⁺菌株中,绝大多数 O139:K82 血清型菌株、近半数 O138:K81 血清型菌株以及少量 O157 血清型菌株表达 F18ab 变体,剩余的菌株则表达 F18ac 变体。在本文对 1998-2006 年保存的 75 个 *fedA*⁺菌株进行 F18 单抗测定,在体外培养条件下,菌毛表达率仅为 44.0% (33/75),其中 26 株 ETEC 分离株有 11 株 (42.3%) 表达;19 株 STEC 分离株有 5 株 (26.3%) 表达;28 株 ETEC/STEC 分离株有 17 株 (60.7%) 表达,远低于国外文献报道的数量。在 33 株 F18⁺菌株中,F18ab 菌毛在体外表达较差,F18ac 菌毛在体外表达较好,主要与肠毒素和 O107 血清型相关,同时除了 F18ab 和 F18ac 变体外,还有仅跟 F18a 因子

反应的变体,这与国外的报道有差别,说明我国存在 F18 菌毛的抗原变异。

参考文献

- [1] Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. Diseases of Swine. 9th eds. Ames Iowa: Blackwell Publishing, 2006.
- [2] Bertschinger HU, Bachmann M, Mettler C, Pospischil A, Schraner EM, Stamm M, Sydler T, Wild P. Adhesive fimbriae produced *in vivo* by *Escherichia coli* O139:K12 (B): H1 associated with enterotoxaemia in pigs. *Veterinary Microbiology*, 1990, 25 (2-3): 267-281.
- [3] Nagy B, Arp LH, Moon HW, Casey TA. Colonization of the small intestine of weaned pigs by enterotoxigenic *Escherichia coli* that lack known colonization factors. *Veterinary Pathology*, 1992, 29 (3): 239-246.
- [4] Salajka E, Salajkova Z, Alexa P, Hornich M. Colonization factor different from K88, K99, F41, and 987P in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhoea in pigs. *Veterinary Microbiology*, 1992, 32: 163-175.
- [5] Rippinger P, Bertschinger HU, Imberechts H, Nagy B, Sorg I, Stamm M, Wild P, Wittig W. Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. *Veterinary Microbiology*, 1995, 45 (4): 281-295.
- [6] Chen X, Zhao L, Gao S, Miao X, Jiao X, Liu X. Virulence genes of pathogenic *Escherichia coli* from ill pigs in China and their relationship with O-serogroups. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (7): 857-862. (in Chinese)
陈祥, 赵李祥, 高崧, 苗晓青, 焦新安, 刘秀梵. 猪源大肠杆菌 (ETEC、STEC、AEEC) 毒力基因及其与 O 抗原型的关系. *微生物学报*, 2008, 48 (7): 857-862.
- [7] 王雷. 致断奶仔猪腹泻、水肿病大肠杆菌 F18 菌毛 a、b、c 因子单克隆抗体的研制及初步应用. 扬州大学硕士学位论文, 2005.
- [8] Chen X, Gao S, Jiao X, Liu X. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated

- from pigs with postweaning diarrhea in eastern China. *Veterinary Microbiology*, 2004, 103 (1) : 13-20.
- [9] Chen X, Gao S, Wang L, Jiao X, Liu X. Serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* associated with diarrhea in piglets in eastern China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44 (1) :96-100. (in Chinese)
- 陈祥, 高崧, 王雷, 焦新安, 刘秀梵. 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, 2004, 44 (1) : 96-100.
- [10] Chen X, Zhao J, Gao S, Miao X, Liu J, Huang L, Jiao X, Liu X. Detection of related genes of LEE and HPI pathogenicity island of *Escherichia coli* strains isolated from pigs in China. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2006, 22 (1) :33-35. (in Chinese)
- 陈祥, 赵娟, 高崧, 苗晓青, 刘静, 黄莉莉, 焦新安, 刘秀梵. 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, 2006, 22 (1) : 33-35.
- [11] Zhao LX, Chen X, Xu XJ, Gao S, Liu XF. Analysis of the AIDA-I gene sequence and prevalence in *Escherichia coli* isolates from pigs with post-weaning diarrhoea and oedema disease. *The Veterinary Journal*, 2009, 180 (1) : 124-129.
- [12] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (10) : 4555-4558.
- [13] Xu Z, Chen X, Shan F, Meng C, Sun L, Huang J, Pan Z, Geng S, Jiao X. Expression and antiviral assay of bovine interferon- γ . *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27 (2) : 269-276. (in Chinese)
- 徐正中, 陈祥, 单锋丽, 孟闯, 孙林, 黄金林, 潘志明, 耿士忠, 焦新安. 牛 γ 干扰素的表达及其抗病毒活性测定. 生物工程学报, 2011, 27 (2) : 269-276.
- [14] Li Y, Liu X. Monoclonal antibodies specific for K88ab, K88ac and K88ad antigens of *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 1989, 29 (5) : 348-353. (in Chinese)
- 李毅, 刘秀梵. 抗大肠埃希氏菌 K88ab、K88ac 和 K88ad 特异单克隆抗体. 微生物学报, 1989, 29 (5) : 348-353.
- [15] Nagy B, Whipp SC, Imberechts H, Bertschinger HU, Dean-Nystrom EA, Casey TA, Salajka E. Biological relationship between F18ab and F18ac fimbriae of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs with oedema disease or diarrhoea. *Microbial Pathogenesis*, 1997, 22 (1) : 1-11
- [16] Wittig W, Klie H, Gallien P, Lehmann S, Timm M, Tschäpe H. Prevalence of the fimbrial antigens F18 and K88 and of enterotoxins and verotoxins among *Escherichia coli* isolated from weaned pigs. *Zentralbl Bakteriologie*, 1995, 283 (1) : 95-104.

Antigenic determinants analysis and detection of virulence factors in F18 fimbriae *Escherichia coli* strains isolated from pigs

Xiang Chen^{1, 2}, Haixia Huan³, Ting Wan^{1, 2}, Lei Wang², Song Gao^{1,2*},
Xin'an Jiao^{1, 2*}

¹Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

²Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Disease and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

³School of Life Science, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] We determined the present distribution of serogroups and virulence factors among F18 *Escherichia coli* isolates from pigs with diarrhea and/or edema disease during 1998 to 2006. Epitope of F18 fimbriae was also analyzed. [Methods] A total of 75 *E. coli* isolates harbored *fedA* gene coding the major subunit of F18 fimbriae were identified by biochemical procedures and serological techniques. PCR was used to detect the virulence-related genes. An indirect ELISA was also used to analyze the antigen patterns of 33 F18 bearing *E. coli* strains. [Results] Among these 75 isolates, 62 were determined to be placed in total 8 serogroups, and O107 and O139 were main serogroups (61.3%) of *fedA*-positive isolates. The percentage of the detection of the *estI*, *estIII*, *elt*, *stx-2e*, *astA*, *orfA*, *irp2*, *fyuA*, *ler* and *eaeA* among 75 strains was 64.0%, 46.7%, 28.0%, 62.7%, 26.7%, 9.3%, 9.3%, 9.3%, 1.3% and 1.3%, respectively. Of the 75 strains 19 were positive for *stx-2e* gene only, and 20 for *estI/estIII/stx-2e*. The 11 MAbs against F18 “a”, “b” and “c” had been used in indirect ELISA to detect F18 pili antigen, 44.0% (33/75) of these isolates were F18⁺ when cultured in TSB cultures. Among 33 isolates expressed F18 fimbriae, 21 isolates were identified as the “ac” variant, 2 were identified as the “ab” variant and 10 reacted only with F18 “a” specific MAbs while not with F18 “b”, “c” specific MAbs. The results also revealed that the 11 MAbs recognized at least 6 epitopes including at least three common typespecific antigenic determinants “a” and two “b” antigen determinants and one “c” antigen determinant. [Conclusion] The antigenic variants of F18 fimbriae are biologically distinct. F18ab fimbriae are expressed poorly *in vitro*, while F18ac are more efficiently expressed *in vitro* and most often are linked with enterotoxin (STa and/or STb) production and serogroups O107. Some F18 fimbrial antigens experienced some variations comparing with those of F18ab and F18ac strains.

Keywords: pig, *Escherichia coli*, F18 fimbriae, serogroups, virulence factor, antigen patterns

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31001079), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA101601-6, 2011AA10A212) and by the Project Funded from the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

* Corresponding author. Tel: +86-514-87971136; E-mail: jiao@yzu.edu.cn, gsong@yzu.edu.cn

Received: 10 June 2013/Revised: 6 August 2013