

# 陕西省致仔猪腹泻 ETEC 的分子流行病学调查

王春江, 赵献军, 赵 宝, 郝艳阳, 齐雪峰

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

**【摘要】** **【目的】**对陕西省致仔猪腹泻产肠毒素大肠埃希菌(*Enterotoxigenic E. coli*, ETEC)的肠毒素及黏附素进行分子流行病学调查。**【方法】**采集陕西省陕北(子洲、甘泉)、陕南(汉中、城固)和关中(杨凌、西安、户县)3个地区7个大型养猪场1~50日龄腹泻仔猪的粪便样品,进行大肠埃希菌的分离与鉴定。采用普通和多重PCR方法,检测已知能表达毒素的大肠埃希菌标准菌株,以验证试验方法的可行性;采用多重PCR方法,对分离自陕西省腹泻仔猪粪便样品中的大肠埃希菌进行肠毒素(STa、STb、LT)和黏附素(K88、K99、987P、F41)检测。**【结果】**试验共分离鉴定出104株大肠埃希菌,其中表达肠毒素的菌株有45株,STa、STb、LT和STa+LT阳性的菌株数量分别为28、5、8和4株;表达黏附素的共31株,K88、K99、987P和K88+987P阳性的菌株分别为4、22、2和3株。在被检测的样品中,同时表达肠毒素和黏附素的大肠埃希菌有14株,陕南地区仅检测出STa肠毒素和K99黏附素,陕北地区较复杂,各毒素类型均有出现。在1~7日龄,致仔猪腹泻大肠埃希菌表达的毒素主要是K99和STa;到20~30日龄时,各种毒素均有不同程度检出。**【结论】**陕西省致仔猪腹泻ETEC表达的肠毒素主要是STa,表达的黏附素主要是K99;毒力因子的分布与区域和仔猪日龄有密切关系。

**【关键词】** 陕西省;ETEC;分子流行病学

**【中图分类号】** S852.61<sup>+</sup>2

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2010)07-0021-06

## A molecular epidemiological investigation on piglets diarrhea induced by ETEC in Shaanxi Province

WANG Chun-jiang, ZHAO Xian-jun, ZHAO Bao, HAO Yan-yang, QI Xue-feng

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** **【Objective】**A molecular epidemiological investigation on piglets diarrhea induced by Enterotoxigenic *E. coli* was performed in Shaanxi Province. **【Method】** Isolation and identification of *E. coli* were performed from stool samples of 1—50-day-old piglet diarrhea collected from 7 pig farms in Northern Shaanxi Province Area (Zizhou, Ganquan), Southern Area (Hanzhong, Chenggu) and Guanzhong Area (Yangling, Xi'an, Huxian). The standard strains *E. coli* containing a known toxin were detected by using the ordinary and multi-PCR to verify the feasibility of testing; The enterotoxin(STa, STb, LT) and adhesion(K88, K99, 987P, F41) were detected respectively by multiplex PCR from *Escherichia coli* of formerly isolates. **【Result】** The separation and identification of 104 *E. coli* showed that harbored enterotoxin had a total of 45, STa, STb, LT, and STa+LT number of gene-positive strains were 28, 5, 8 and 4 respectively. Adhesion that harbored in *Escherichia coli* had a total of 31, including K88, K99, 987P and K88+987P, whose positive strains were 4, 22, 2 and 3 strains respectively. A total of 14 samples having expressions of toxin and adhesin were detected in all samples at the same time. Only STa enterotoxin and K99 adhesin in

\* [收稿日期] 2009-12-28

[基金项目] 西北农林科技大学引进人才科研启动经费项目(01140409)

[作者简介] 王春江(1982—),男,满族,河北秦皇岛人,在读硕士,主要从事动物中毒性与营养代谢性疾病研究。

E-mail: wchj0335@163.com

[通信作者] 齐雪峰(1977—),男,内蒙古赤峰人,讲师,主要从事兽医微生物学与免疫学研究。E-mail: yxian2002@126.com

the southern region of Shaanxi Province were detected. In northern Shaanxi Province, the toxin types appeared. The harbored toxins in 1—7-day-old piglets were mainly K99 and STa; Various toxin genes of the 20—30-day-old in detection were detected. 【Conclusion】 The main enterotoxin and adhesion of ETEC inducing piglets diarrhea in Shaanxi Province were STa and K99. The distribution of virulence factors was closely related to the region and the day age of piglets.

**Key words:** Shaanxi Province; ETEC; molecular epidemiology

产肠毒素大肠埃希菌(Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)是引起仔猪腹泻病的主要病原之一<sup>[1-2]</sup>,其致仔猪腹泻的发病机理主要是通过黏附素黏附定植在机体肠黏膜上皮细胞上,迅速增长繁殖,并产生大量的肠毒素,导致肠黏膜上皮细胞代谢紊乱,水盐和电解质分泌过多,重吸收减少,进而引起腹泻。据报道,ETEC 产生的肠毒素主要有 LT、STa 和 STb 等 3 种,黏附素主要有 K88、K99、987P 和 F41 等 4 种<sup>[3]</sup>。目前,检测大肠埃希菌毒力因子的方法主要有动物试验、组织培养和免疫学方法,这些方法不仅费时费力,而且具有一定的局限性。多重 PCR 方法不仅有较高的特异性、敏感性,而且操作简便,为临床提供了一种更为快速、灵敏的测定大肠埃希菌毒力因子的方法,因而可用于大肠埃希菌病的流行病学调查<sup>[4-5]</sup>。近几年,ETEC 引起的仔猪黄、白痢给陕西省养猪业造成了很大的损失,但是目前对陕西省 ETEC 的分子流行病学调查尚未见报道。为此,本研究利用多重 PCR 方法,对陕西省致仔猪腹泻 ETEC 的肠毒素及黏附素进行了分子流行病学调查,以期为该病的预防治疗提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 仔猪腹泻粪便样品 粪便样品 104 份,于 2009-03—04 采自陕北(子洲、甘泉)、陕南(城固、汉中)、关中(西安、户县、杨凌)3 个地区的 7 个大型猪场 1~50 日龄的腹泻仔猪,置于-20 ℃保存。

1.1.2 参考菌株 4 株大肠埃希菌标准菌株,即 C83903(能同时表达 K88 黏附素和 STa、STb 肠毒素)、C83912(能表达 987P 黏附素)、C83917(能同时表达 K99 和 LT、STb 肠毒素)、C83921(能表达 F41 黏附素),均购自中国兽药监察所菌种保藏中心。

1.1.3 主要试剂 DNA Marker DL2000(生产批号:038),购自西安沃尔森生物技术科技有限公司; 2×PCR Taq 酶(生产批号:060019),购自广州东盛生物技术科技有限公司。ETEC 黏附素及肠毒素扩增引物序列分别选自文献[6]和[7],具体见表 1 和表 2。引物序列由大连宝生物工程有限公司合成。

| 表 1 ETEC 黏附素扩增引物序列及扩增片段的长度                                                        |                                 |                          |                           |                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Table 1 ETEC adhesins amplification primer sequences and amplified fragment sizes |                                 |                          |                           |                                 |
| 黏附素类型<br>Adhesin type                                                             | 引物序列<br>Primer sequence         | 引物长度/bp<br>Primer length | 产物长度/bp<br>Product length | 退火温度/℃<br>Annealing temperature |
| K88                                                                               | 5'-GATGAAAAAGACTCTGATTGCA-3'    | 22                       | 841                       | 52.5                            |
|                                                                                   | 5'-GATTGCTACGTTACGCGGAGCG-3'    | 22                       |                           | 61.9                            |
| 987P                                                                              | 5'-GTTACTGCCAGTCTATGCCAAGTG-3'  | 24                       | 463                       | 60.4                            |
|                                                                                   | 5'-TCGGTGTAACCTGCTGAACGAATAG-3' | 24                       |                           | 60.4                            |
| F41                                                                               | 5'-GATGAAAAAGACTCTGATTGCA-3'    | 22                       | 682                       | 52.5                            |
|                                                                                   | 5'-TCTGAGGTCATCCCAATTGTGG-3'    | 22                       |                           | 58.1                            |
| K99                                                                               | 5'-CTGAAAAAAACACTGCTAGCTATT-3'  | 24                       | 543                       | 53.6                            |
|                                                                                   | 5'-CATATAAGTGACTAAGAAGGATGC-3'  | 24                       |                           | 55.3                            |

| 表 2 ETEC 肠毒素扩增引物序列及扩增片段的长度                                                            |                             |                          |                           |                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Table 2 ETEC Enterotoxins amplification primer sequences and amplified fragment sizes |                             |                          |                           |                                 |
| 肠毒素类型<br>Adhesin type                                                                 | 引物序列<br>Primer sequence     | 引物长度/bp<br>Primer length | 产物长度/bp<br>Product length | 退火温度/℃<br>Annealing temperature |
| LT                                                                                    | 5'-CGGCGTTACTATCCTCTCTA-3'  | 20                       | 314                       | 55.4                            |
|                                                                                       | 5'-ATTGGGGGTTTTATTATTCC-3'  | 20                       |                           | 49.2                            |
| STa                                                                                   | 5'-TCTTTCCCTCTTTTAGTCAG-3'  | 21                       | 166                       | 53.9                            |
|                                                                                       | 5'-ACAGGCAGGATTACAACAAAG-3' | 21                       |                           | 53.9                            |
| STb                                                                                   | 5'-TGCCTATGCATCTACACAATC-3' | 21                       | 283                       | 53.9                            |
|                                                                                       | 5'-GCAGTGAGAAATGGACAATG-3'  | 20                       |                           | 53.4                            |

1.2 方 法

1.2.1 粪便中大肠埃希菌的分离与鉴定 取上述仔猪腹泻粪便少许,用 EMB 培养基分离纯化大肠埃希菌,对分离菌进行葡萄糖、枸橼酸盐、靛基质、甲基红、苯丙氨酸、尿素、鸟氨酸、山梨醇、H<sub>2</sub>S、木糖等 10 项生化指标鉴定。对于符合大肠埃希菌基本特征的分离菌,用 LB 液体培养基增菌。标准菌株直接用 LB 液体培养基于 37℃ 培养 12 h,备用。

1.2.2 细菌基因组 DNA 的抽提 通过酚-氯仿抽提法<sup>[8-9]</sup>提取细菌基因组作为多重 PCR 的模板。具体步骤如下:将增菌后的菌液用 3 mL TE 缓冲液洗净后转入 10 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 3 min;取上清,6 000 r/min 离心 10 min;弃上清,向沉淀的细菌中加入 1 mL TE 缓冲液溶解并转移到 1.5 mL 离心管中,6 000 r/min 离心 10 min;弃上清,加入-20℃ 预冷的丙酮,充分漩涡清洗细菌,6 000 r/min 离心 5 min;弃上清,取下部细菌沉淀,加入 100 μL TE 和 50 μL 溶菌酶,37℃ 水浴 30 min;加入 200 μL 裂解液和 10 μL 蛋白酶 K,55℃ 水浴 1~3 h;加等体积酚,上下颠倒混匀,静置 2 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清于另一管中;加等体积 V(酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1 的溶液,上下颠倒混匀,静置 2 min,12 000 r/min 离心 6 min,取上清于另一管中;加等体积 V(氯仿):V(异戊醇)=24:1 的溶液,上下颠倒混匀静置 2 min,12 000 r/min 离心 6 min,取上清于另一管中;加入等体积异丙醇,-20℃ 放置 30 min,14 000 r/min

离心 6 min,弃上清,待异丙醇挥发后加入 20 μL TE 溶解,-20℃ 保存备用。

1.2.3 多重 PCR 扩增肠毒素和黏附素的 PCR 反应体系均为 50 μL,其中 20 pmol/μL 上、下游引物各 1 μL(黏附素 4 对引物共 8 μL,肠毒素 3 对引物共 6 μL),模板 1 μL,Taq 酶 25 μL,最后补加超纯水至 50 μL。黏附素的 PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s,58℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,共进行 6 个循环;94℃ 变性 45 s,54℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,共 24 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。肠毒素的 PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,54℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min 共进行 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。为验证试验中所用引物的特异性,于多重 PCR 反应之前分别对大肠埃希菌标准菌株黏附素及肠毒素进行普通 PCR 扩增,反应体系也为 50 μL,引物及模板浓度均与多重 PCR 反应体系相同。

1.2.4 PCR 产物电泳检测 取 PCR 扩增产物 9 μL,与 1 μL 上样缓冲液充分混合,加样于 15 g/L 琼脂糖凝胶,以 10 V/cm 的电场强度于 1×TAE 缓冲液中电泳 25 min,用紫外凝胶成像系统观察并照相。

2 结果与分析

2.1 大肠埃希菌标准菌株黏附素及肠毒素的检测 分别采用单引物及多重 PCR 对 4 株大肠埃希菌标准菌株的毒力因子进行扩增,结果表明均检测到了预期长度的 PCR 产物(图 1,2)。

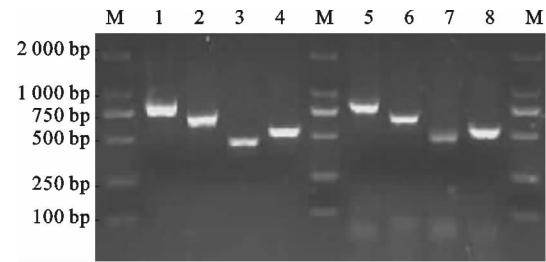


图 1 大肠埃希菌标准菌株黏附素多重引物和单引物 PCR 结果  
M. DNA 标样 DL2000;1~4. 分别为 C83903(K88)、C83921(F41)、C83912(987P)、C83917(K99)单引物扩增产物;5~8. 分别为 C83903(K88)、C83921(F41)、C83912(987P)、C83917(K99)多重引物扩增产物

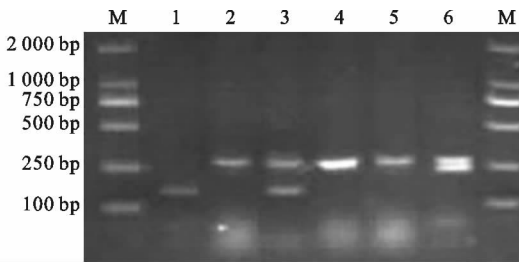


图 2 大肠埃希菌标准菌株肠毒素多重引物和单引物 PCR 结果  
M. DNA 标样 DL2000;1~2. 分别为 C83903(STa)、C83903(STb)单引物扩增产物;4~5. 分别为 C83917(STb)、C83917(LT)单引物扩增产物;3,6. 分别为 C83903(STa,STb)、C83917(STb,LT)多重引物扩增产物

Fig. 1 Comparison of separate multi adhesion primer PCR to standard strain of *E. coli*  
M. DNA Marker DL2000;1-4. C83903(K88),C83921(F41), C83912(987P),C83917(K99),single primer;  
5-8. C83903(K88),C83921(F41),C83912(987P), C83917(K99),multiple primer

Fig. 2 Comparison of separate multi enterotoxin primer PCR to standard strain of *E. coli*  
M. DNA Marker DL2000;1-2. C83903(STa),C83903(STb), single primer;4-5. C83917(STb),C83917(LT),single primer;  
3,6. C83903(STa,STb),C83917(STb,LT),multiple primer

2.2 腹泻仔猪粪便中大肠埃希菌肠毒素和黏附素的检测

试验共分离到 104 株大肠埃希菌,表达肠毒素的共有 45 株,占总检测数的 43.27%,其中表达 STa 的 28 株(占检出样品的 62.22%),表达 STb 的 5 株(占检出样品的 11.11%),表达 LT 的 8 株(占检出样品的 17.78%),表达 STa+LT 的 4 株(占检出样品的 8.89%);表达黏附素的共有 31 株,占总

检测数的 29.80%,其中表达 K88 的 4 株(占检出样品的 12.90%),表达 K99 的 22 株(占检出样品的 70.97%),表达 987P 的 2 株(占检出样品的 6.45%),表达 K88+987P 的 3 株(占检出样品的 9.68%);未检测出表达 F41 黏附素的样品。陕西省致仔猪腹泻 ETEC 肠毒素 STa、STb 及 LT 均被检出,但以 STa 为主;黏附素则以 K99 为主(表 3)。

表 3 陕西省大肠埃希菌分离株毒素的检测结果  
Table 3 Toxin test results in *Escherichia coli* isolates from Shaanxi Province

| 地区<br>Region | 肠毒素 Enterotoxin |     |    |        | 黏附素 Adhesin |     |      |     |          |
|--------------|-----------------|-----|----|--------|-------------|-----|------|-----|----------|
|              | STa             | STb | LT | STa+LT | K88         | K99 | 987P | F41 | K88+987P |
| 子洲 Zizhou    | 3               | 5   | 8  | 1      | 0           | 10  | 0    | 0   | 1        |
| 汉中 Hanzhong  | 2               | 0   | 0  | 0      | 0           | 2   | 0    | 0   | 0        |
| 城固 Chenggu   | 7               | 0   | 0  | 0      | 0           | 3   | 0    | 0   | 0        |
| 户县 Huxian    | 6               | 0   | 0  | 0      | 4           | 3   | 2    | 0   | 0        |
| 西安 Xi'an     | 4               | 0   | 0  | 0      | 0           | 2   | 0    | 0   | 1        |
| 甘泉 Ganquan   | 2               | 0   | 0  | 1      | 0           | 0   | 0    | 0   | 1        |
| 杨凌 Yangling  | 4               | 0   | 0  | 2      | 0           | 2   | 0    | 0   | 0        |

2.3 仔猪日龄与大肠埃希菌毒素类型的关系

由图 3 可以看出,在所有被检测的日龄段,肠毒素 STa 均占有绝对的优势;STb 在 20 日龄以后的腹泻仔猪中才出现;LT 主要在 20~50 日龄的腹泻

仔猪中检出,且其检出率低于 STa。黏附素 K99 在各个日龄均能检出,但在 20 日龄以下仔猪中检出率较低;K88 黏附素随着仔猪日龄的增加检出率不断增加,尤其在断奶仔猪中检出率最高。

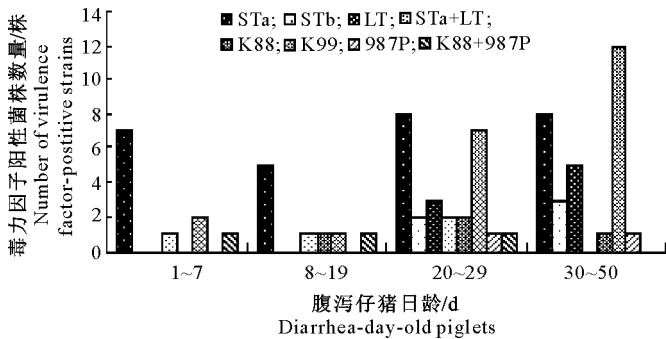


图 3 腹泻仔猪日龄和毒素类型的关系

Fig. 3 Relationship between day age of diarrhea piglets and toxin type

2.4 同时表达肠毒素和黏附素大肠埃希菌的检测

在检测出表达毒素的 62 株大肠埃希菌中,同时

携带肠毒素和黏附素的菌株共有 14 株,其中以同时携带黏附素 K99 与肠毒素 STa 或 STb 为主(表 4)。

表 4 致仔猪腹泻 ETEC 肠毒素和黏附素的关系  
Table 4 Relationship between intestinal toxins and adhesins in ETEC

| 毒力因子<br>Virulence factor        | STa | STb | LT | STa+LT | 肠毒素未检出<br>Enterotoxin not detected |
|---------------------------------|-----|-----|----|--------|------------------------------------|
| K88                             | 1   | 0   | 0  | 0      | 3                                  |
| K99                             | 4   | 5   | 1  | 0      | 12                                 |
| 987P                            | 0   | 0   | 0  | 0      | 2                                  |
| F41                             | 0   | 0   | 0  | 0      | 0                                  |
| K88+987P                        | 1   | 0   | 0  | 2      | 0                                  |
| 黏附素未检出<br>Adhesins not detected | 22  | 0   | 7  | 2      | 42                                 |

3 讨论

多重 PCR 技术可同时对多种基因进行检测,较

普通 PCR 方法具有很多优点<sup>[4]</sup>。本研究采用普通 PCR 及多重 PCR 技术,分别对大肠埃希菌标准菌株进行检测,以验证多重 PCR 方法的实用性及准确

性,同时应用多重 PCR 技术对分离自陕西省腹泻仔猪粪便中的 ETEC 的毒素类型进行检测。结果表明,采用多重 PCR 技术对 ETEC 多种肠毒素或黏附素进行同时检测,是高效可行的。

### 3.1 黏附素的检出情况

能引起仔猪发病的 ETEC 黏附素有很多种<sup>[3]</sup>,主要包括 K88、K99、987P、F18 和 F41 等菌毛类黏附素和 AIDA-I、Paa 和 EAE 等非菌毛类黏附素,其中引起新生仔猪腹泻的主要黏附素类型是 K88、K99、987P 和 F41 4 种。有研究表明,引起仔猪腹泻的大肠埃希菌的菌毛中以 K88 最为流行<sup>[3,10-12]</sup>。研究人员用不同方法对我国东南部分地区不同时期致仔猪黄、白痢大肠埃希菌黏附素进行了统计,结果发现黏附素的种类在不同时期发生了较大的变化,但 K88 和 F18 始终占有绝对优势<sup>[7,13-14]</sup>。姜中其等<sup>[15]</sup>对浙江省集约化猪场 PWD 病原性大肠埃希菌毒力因子的特征进行检测,结果表明,K88 菌毛阳性率仅为 24.53%。本试验黏附素检测阳性率为 29.80%,从结果来看,在陕西省流行的黏附素类型主要为 K99,占检测阳性样品的 70.97%,而 K88 仅占检出阳性样品的 12.90%,说明 ETEC 黏附素的流行在时间和空间上具有差异性。

### 3.2 肠毒素的检出情况

ETEC 可携带 LT 和 ST 的遗传信息,其中 ST 又分为 STa 和 STb 2 种<sup>[16]</sup>。陈祥等<sup>[7]</sup>通过普通 PCR 技术对华东地区致仔猪腹泻大肠埃希菌分离株的肠毒素进行了检测,阳性率达 41.59%;2006 年陈祥等<sup>[14]</sup>对我国部分地区腹泻仔猪和水肿病猪体内分离的 300 株大肠埃希菌携带的肠毒素进行了检测,阳性率为 63.3%,优势大肠埃希菌毒素类型为 STb,占 71.6%。姜中其等<sup>[15]</sup>研究表明,浙江省大肠埃希菌主要的肠毒素类型是 STa 和 STb。从本试验的结果来看,陕西省流行的大肠埃希菌肠毒素类型主要为 STa。对比华东地区、浙江省和陕西省的检测结果显示,地区差异性是大肠埃希菌肠毒素流行的主要特征。

### 3.3 ETEC 各毒力因子在陕西省的分布情况

从本研究结果可知,陕北地区(子洲、甘泉)的毒素类型较复杂;而陕南地区(汉中、城固)的 ETEC 肠毒素和黏附素类型均趋于单一化,肠毒素是 STa,黏附素是 K99;关中地区(杨凌、户县和西安)处于陕西省南北交界地带,其 ETEC 肠毒素和黏附素类型较陕南地区复杂,但比陕北地区流行的毒素类型简单。但是总体来看,K99 和 STa 的流行在陕西省占

有很大优势,单独检出 K88 黏附素的情况仅仅在关中地区出现,与国内其他地区的报道<sup>[7,14]</sup>有很大的区别,由此不难发现,毒力因子流行的地区差异是很明显的。

### 3.4 不同日龄仔猪中 ETEC 各毒素类型的分布情况

本研究结果表明,随着仔猪日龄的增加,ETEC 毒素类型的分布越趋复杂。在检测的肠毒素中,STa 无论在哪个日龄阶段都占绝对的优势,但是随着日龄的增大,LT 毒素的检出率逐渐提高;同时,K99 菌毛检出率也不断增加,并在整个日龄中占有很大的比率。随着日龄的增加,K88 的检出率不断增加,这与文献<sup>[3,17]</sup>的报道相类似。由此不难发现,大肠埃希菌的流行与仔猪日龄的关系很密切<sup>[18]</sup>,这可能与仔猪的生理特点有关。

### 3.5 ETEC 各毒力因子间的相互关系

在检测的样品中,共有 62 株大肠埃希菌表达毒素,阳性率为 59.62%,其中有 14 株菌同时表达黏附素和肠毒素,仅占检出总数的 22.58%。姜中其等<sup>[15]</sup>研究表明,大肠埃希菌菌毛与肠毒素相关性达 67.86%。本试验黏附素和肠毒素的相关性较低,主要是因为大肠杆菌的毒力因子很多,除本试验检测的 K88、K99、987P、F41、STa、STb 和 LT 等毒力因子外,还有 EAST1 肠毒素和 F18、AIDA 及 Paa 黏附素<sup>[3,19]</sup>等,因此本试验所检测的样品中含有其他未检测毒力因子的可能性很大。另外,从本试验结果不难发现,5 株表达 STb 肠毒素的大肠埃希菌均可同时表达 K99 黏附素;而 8 株表达 LT 肠毒素的大肠埃希菌中,只有 1 株能表达 K99 黏附素,由此可推测 STa 和 LT 肠毒素与 K99 黏附素可能有一定关系。

### [参考文献]

- [1] 房海. 大肠埃希氏菌 [M]. 河北石家庄:河北科学技术出版社,1997.  
Fang H. *Escherichia coli* [M]. Shijiazhuang, Hebei: Hebei Science and Technology Press, 1997. (in Chinese)
- [2] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 北京:中国农业出版社,2001:215-223.  
Lu C P. *Veterinary microbiology* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001:215-223. (in Chinese)
- [3] Wei P Z, Zhao M J, Laura R, et al. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US [J]. *Vet Micro Biology*, 2007, 123:145-152.
- [4] 陈芳,王丙云,杨林,等. 猪大肠埃希菌肠毒素基因的多重

- PCR 检测 [J]. 华南农业大学学报, 2009, 30(3): 122-124.
- Chen F, Wang B Y, Yang L, et al. Swine *Escherichia coli* enterotoxin gene PCR detection of multiple [J]. South China Agricultural University, 2009, 30(3): 122-124. (in Chinese)
- [5] 赵红庆, 苑锡铜, 黄留玉, 等. 多重 PCR 检测致腹泻大肠埃希菌方法的建立 [J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(10): 2223-2226.
- Zhao H Q, Yuan X T, Huang L Y, et al. Multi-PCR method of detection of the establishment of *Escherichia coli* induced diarrhea [J]. China's Health Inspection Magazine, 2009, 19(10): 2223-2226. (in Chinese)
- [6] 成大荣. 断奶仔猪源大肠杆菌毒力因子的分子流行病学及 F18 菌毛部分特性的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2005: 5.
- Cheng D R. Postweaning *Escherichia coli* virulence factors of molecular epidemiology and F18 fimbriae of some characteristics of [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2005: 5. (in Chinese)
- [7] 陈 祥, 高 崧, 刘秀梵, 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 [J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 96-100.
- Chen X, Gao S, Liu X F, et al. The newborn piglet diarrhea caused by *Escherichia coli* O serotype and virulence factors in china east [J]. Microbiological Sinica, 2004, 44(1): 96-100. (in Chinese)
- [8] Kocher T, Thomas W K, Meyer A, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals; amplification and sequencing with conserved primers [J]. Proc Nat Acad Sci, 1989, 86: 6196-6200.
- [9] 李 娜, 李迪强, 刘 毅, 等. 粪便不同保存方法对动物基因组提取效果的影响 [J]. 国际遗传学杂志, 2006, 29(5): 341-345.
- Li N, Li D Q, Liu Y, et al. Feces of different preservation methods to extraction genome of animals effects [J]. International Journal of Genetics, 2006, 29(5): 341-345. (in Chinese)
- [10] Moon H W, Hoffman L J, Cornic K N A, et al. Prevalences of some virulence genes among *Escherichia coli* isolates from swine presented to a diagnostic laboratory in Iowa [J]. J Vet Diagn Investig, 1999, 1: 557-560.
- [11] Nagy B, Casey T A, Moon H W, et al. Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary [J]. J Clin Microbiol, 1990, 28: 651-663.
- [12] Wittig W, Klie H, Gallien P, et al. Prevalence of the fimbrial antigens F18 and K88 enterotoxins and verotoxins among *E. coli* isolated from weaned pigs [J]. Zbl Bakt, 1995, 283: 95-104.
- [13] 高 崧, 刘秀梵. 抗大肠埃希氏菌粘附素单克隆抗体诊断试剂的研制及其现场初步应用 [J]. 畜牧兽医学报, 1993, 24(3): 248-253.
- Gao S, Liu X F. Resistant *Escherichia coli* adhesin monoclonal antibody diagnostic reagents for the development and on-site preliminary application [J]. Veterinary Journal, 1993, 24(3): 248-253. (in Chinese)
- [14] 陈 祥, 赵李祥, 高 崧, 等. 猪源大肠杆菌 (ETEC, STEC, AEEC) 毒力基因及其与 O 抗原型的关系 [J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 857-862.
- Chen X, Zhao L X, Gao S, et al. Swine *E. coli* (ETEC, STEC, AEEC) virulence genes and their relationship with the O antigen type [J]. Microbiological Sinica, 2008, 48(7): 857-862. (in Chinese)
- [15] 姜中其, 王 娜, 方维焕, 等. 集约化猪场 PWD 病原性大肠杆菌毒力因子分析 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2006, 32(5): 520-526.
- Jiang Z Q, Wang N, Fang W H, et al. Intensive pig farms PWD pathogenic *E. coli* virulence factor analysis [J]. Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Science Edition, 2006, 32(5): 520-526. (in Chinese)
- [16] Sears C L, Kaper J B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion [J]. Microbiol Rev, 1996, 60: 167-215.
- [17] Francis D H, Erickson A K, Grange P A, et al. K88 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their porcine enterocyte receptors [J]. Adv Exp Med Biol, 1999, 473: 147-154.
- [18] Nagy B, FeKete P Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine [J]. Int J Mol Med, 2005, 295: 443-454.
- [19] Fairbrother J M, Nadeau E, Gyles C L, et al. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies [J]. Anim Health Res Rev, 2005, 6: 17-39.