



## 研究报告

## 54 株猪源肠外致病性大肠杆菌血清型、系统进化群和基因型

周磊<sup>1</sup> 李泽伟<sup>1</sup> 孙起荣<sup>1</sup> 邢刚<sup>2</sup> 魏建忠<sup>1</sup> 孙裴<sup>1</sup> 刘雪兰<sup>1</sup> 李郁<sup>\*1</sup><sup>1</sup> 安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036<sup>2</sup> 马鞍山史记动物健康管理有限公司 安徽 马鞍山 238251

**摘要:**【背景】近年来,我国规模猪场着重加强了对猪繁殖与呼吸综合征、猪圆环病毒病、猪瘟、猪伪狂犬病、猪链球菌病、副猪嗜血杆菌病等疫病的防控,却忽视了由肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)对猪群健康产生的潜在危害性,了解和掌握猪源 ExPEC 流行特征意义显著。【目的】探究临床分离的 54 株猪源 ExPEC 血清型、系统进化群和基因型的分布及流行特征。【方法】应用玻板凝集试验和试管凝集试验鉴定 O 抗原血清型,采用 PCR 技术检测系统进化群鉴定相关基因、28 个 ExPEC 相关毒力基因以及多位点序列分型相关基因。【结果】受试菌中有 52 株确定了 O 抗原血清型,其中 40 株为 O38 (74.1%),为优势血清型;8 株为 O127 (14.8%),O93 和 O11 均 2 株(各占 3.7%)。受试菌中 44 株为 B2 群(81.5%),是主要系统进化群,D 群和 B1 群均 5 株(各占 9.3%);28 个 ExPEC 相关毒力基因中 *ompA*、*ibeA*、*fimH*、*traT*、*focD*、*papA*、*iroN*、*iutA*、*iucD*、*cvaC*、*tsh*、*kpsMT II*、*iss* 和 *ompT* 出现的频率超过 50%,其中 *ompA* 和 *ibeA* 检出率分别达 100% 和 96.3%,为高度流行的毒力基因,未检测到 *cnf1*,而 *bmaE*、*malX* 和 *iha* 更倾向分布于 D 群菌株中。受试菌共呈现 31 种 ST 型,其中 ST10 和 ST648 均 5 株(各占 9.3%),ST410 和 ST101 均 4 株(各占 7.4%)。【结论】猪源 ExPEC 优势血清型及系统进化群在不同地区、不同时段上的流行分布均存在一定差异,呈现动态过程,O38 作为优势血清型目前尚未见报道,具有高致病性的 B2 群和 D 群菌株有逐渐增多的趋势。ST 型复杂多样,呈现遗传多样性,在一定程度上与人源和禽源 ExPEC 具有相同的遗传背景。

**关键词:** 猪源肠外致病性大肠杆菌, O 抗原血清型, 系统进化群, 毒力基因, 多位点序列分型

**Foundation items:** Key Project of National Spark Program of China (2014GA710002); Key Research and Development Plan of Anhui Province (201904a06020013); Science and Technology Project of the Yangtze River Delta of Anhui Province (1101c0603065); Pig Industry System Fund of Anhui Province ([2016] 84)

**\*Corresponding author:** E-mail: liyouer@163.com

**Received:** 25-06-2020; **Accepted:** 10-09-2020; **Published online:** 11-12-2020

**基金项目:** 国家星火计划重点项目(2014GA710002); 安徽省重点研究与开发计划(面上攻关)项目(201904a06020013); 安徽省长三角联合科技攻关项目(1101c0603065); 安徽省生猪产业体系基金项目(皖农科[2016] 84 号)

**\*通信作者:** E-mail: liyouer@163.com

**收稿日期:** 2020-06-25; **接受日期:** 2020-09-10; **网络首发日期:** 2020-12-11

## Serotypes, phylogenetic groups and genotypes of 54 extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from pig

ZHOU Lei<sup>1</sup> LI Zewei<sup>1</sup> SUN Qirong<sup>1</sup> XING Gang<sup>2</sup> WEI Jianzhong<sup>1</sup> SUN Pei<sup>1</sup>  
LIU Xuelan<sup>1</sup> LI Yu<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

<sup>2</sup> Ma'an Shan Shiji Animal Health Management Corporation, Maanshan, Anhui 238251, China

**Abstract: [Background]** In recent years, pig farms have focused on the prevention and control of porcine reproductive and respiratory syndrome, porcine circovirus, classical swine fever, porcine pseudorabies, swine *Streptococcus* and *Haemophilus parasuis* disease, but ignored the potential harm of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) to pig health. It is of great significance to understand the epidemic characteristics of ExPEC. **[Objective]** To study the distribution and epidemic characteristics of serotypes, phylogeny groups and genotypes of 54 strains of ExPEC isolated from pigs. **[Methods]** The glass plate agglutination test and the test tube agglutination test were used to identify the O antigen serotype. The PCR technology detection system phylogeny groups identified related genes, 28 ExPEC-related virulence genes, and multi-site sequence typing-related genes. **[Results]** Of the tested bacteria, 52 strains were identified the O antigen serotype, of which 40 strains were O38 (74.1%), the dominant serotype, 8 strains were O127 (14.8%), and O93 and O11 were both 2 strains (3.7% each). Among the tested bacteria, 44 strains belong to group B2 (81.5%), which is the main phylogenetic group. Group D and group B1 each have 5 strains (9.3% each); The frequency of *ompA*, *ibeA*, *fimH*, *traT*, *focD*, *papA*, *iroN*, *iutA*, *iucD*, *cvaC*, *tsh*, *kpsMT II*, *iss*, and *ompT* was more than 50% of 28 ExPEC-related virulence genes, the detection rates of *ompA* and *ibeA* were 100% and 96.3% respectively, which were highly prevalent virulence genes. *cnfI* was not detected, but *bmaE*, *malX* and *iha* were more likely to be distributed in group D strains. The tested bacteria showed a total of 31 types of ST, including 5 strains of ST10 and ST648 (9.3% each), and 4 strains of ST410 and ST101 (7.4% each). **[Conclusion]** The prevalence of pig-derived ExPEC serotypes and phylogenetic groups in different regions and at different times have certain differences, showing a dynamic process. There is no report of O38 as the dominant serotype, and the highly pathogenic B2 and D strains have a trend of increasing gradually. The ST type is complex and diverse, presenting genetic diversity, and to some extent has the same genetic background as human and avian ExPEC.

**Keywords:** pig-derived extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, O antigen serotype, phylogenetic group, virulence gene, multi-site sequence typing

动物的大肠杆菌病可以发生在多种家畜、家禽、养殖经济动物以及其他陆生动物和某些水产动物, 其中猪和鸡是最为易感的, 而且该病的危害十分严重。在世界各地, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)在猪群中是引起很多疾病, 包括新生仔猪腹泻、断奶仔猪腹泻、败血症、多发性浆膜炎、乳房炎、尿路感染的一个重要原因。肠外致病性大肠杆菌(Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, ExPEC)是一组不同种类的 *E. coli*, 不仅可正常定植于肠道, 而且能侵入血液循环系统引起菌血

症, 并诱发败血症或局部肠道外感染, 如脑膜炎、关节炎、肺炎、心内膜炎等<sup>[1]</sup>。

近年来, 我国规模猪场着重加强了对猪繁殖与呼吸综合征、猪圆环病毒病、猪瘟、猪伪狂犬病、猪链球菌病、副猪嗜血杆菌病等疫病的防控, 却忽视了由 ExPEC 对猪群健康产生的潜在危害性<sup>[2]</sup>。猪源 ExPEC 在临床上的检出率已呈现逐年升高的态势。由于发病率、死亡率和体重降低的增加, 以及治疗、疫苗和饲料添加剂的成本增加, ExPEC 引起的猪大肠杆菌病导致的经济损失

日益显著。目前,关于 ExPCE 的研究报道多聚焦于禽源和人源上,对于猪源 ExPEC 的探究仍需更多的研究数据。为了有效防控猪群 ExPEC 感染,了解和掌握猪源 ExPEC 临床分离株的血清型、系统进化群和基因型的分布及流行特征意义显著。本研究针对临床分离的 54 株猪源 ExPEC,利用玻板凝集试验和试管凝集试验进行 O 抗原血清型鉴定,采用 PCR 技术进行系统进化群相关基因、28 个 ExPEC 相关毒力基因以及多位点序列分型相关基因检测,并应用统计软件 SPSS 25.0 进行系统进化群与毒力基因相关性分析,从而为丰富猪源 ExPEC 流行病学资料以及防治相关疾病奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 受试菌株

研究中的 54 株 ExPEC 源自 2018 年 3 月至 2019 年 3 月某集团公司在安徽、江苏、山东、河北和广西地区家庭农场的病猪,病猪患有至少包含高热、咳嗽、关节肿大、皮肤发绀、败血症、脑膜炎等临床症状中的一种,由安徽农业大学动

物传染病研究室分离、鉴定和保存<sup>[3]</sup>,相关背景信息见表 1。

### 1.2 主要试剂和仪器

麦康凯琼脂培养基、纯化琼脂粉,绍兴天恒生物科技有限公司;酵母浸粉、胰蛋白胨、氯化钠,北京奥博星生物技术有限公司;2×Taq PCR Master Mix、DL2000 DNA Marker 和 GelRed 核酸染色液,天根生化科技(北京)有限公司。超净工作台,苏州安泰空气技术股份有限公司;电热恒温培养箱,上海实验仪器厂有限公司;全自动高压灭菌器,上海博讯医疗生物仪器股份有限公司;医用冷藏箱(4℃),中科美菱低温科技有限公司。

### 1.3 大肠杆菌 O 抗原单因子标准血清

*E. coli* 的 26 种 O 抗原单因子标准血清 O1、O2、O7、O8、O11、O18、O20、O26、O38、O44、O53、O54、O64、O78、O93、O101、O119、O120、O127、O138、O141、O142、O147、O149、O152 和 O157 均购于中国兽医药品监察所。

表 1 54 株 ExPEC 的背景信息

Table 1 Background information of 54 ExPEC strains

序号 No.	菌株编号 Strains No.	分离时间 Time	分离地区 Location	分离部位 Origin	ST 型 ST type	系统进化群 Phylogenetic group	血清型 Serotype
1	AHshou18-1	2018 03	安徽 Anhui	肺脏 Lung	ST3368	B2	O38
2	AHshou18-2	2018 03	安徽 Anhui	肝脏 Liver	ST3368	B2	O38
3	AHshou18-4	2018 03	安徽 Anhui	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST4223	B2	O38
4	AHshou18-5	2018 03	安徽 Anhui	肺脏 Lung	ST648	D	O38
5	AHshou18-6	2018 03	安徽 Anhui	肺脏 Lung	ST648	D	O38
6	AHshou18-7	2018 03	安徽 Anhui	肝脏 Liver	ST648	B2	O38
7	AHshou18-8	2018 03	安徽 Anhui	脾脏 Spleen	ST542	B2	O38
8	AHshou18-9	2018 03	安徽 Anhui	肺脏 Lung	ST648	B2	O38
9	AHshou18-10	2018 03	安徽 Anhui	肝脏 Liver	ST648	B2	O38
10	AHhuai18-2	2018 03	安徽 Anhui	肝脏 Liver	ST10	B2	O38
11	AHhuai18-12	2018 03	安徽 Anhui	肺脏 Lung	ST617	B2	O38
12	AHsui18-1	2018 03	安徽 Anhui	肺脏 Lung	ST10	B1	O38
13	AHlin18-3	2018 03	安徽 Anhui	肺脏 Lung	ST410	B2	O38
14	AHquan18-1	2018 03	安徽 Anhui	肺脏 Lung	ST410	B2	O93

(待续)

(续表 1)

15	AHquan18-2	2018 03	安徽 Anhui	心包积液 Pericardial	ST196	B2	O93
16	AHquan18-3	2018 03	安徽 Anhui	脾脏 Spleen	ST5229	B2	O38
17	AHquan18-4	2018 03	安徽 Anhui	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST5229	B2	O38
18	AHquan18-6	2018 03	安徽 Anhui	肝脏 Liver	ST88	B2	未定型 Undifferentiated
19	AHsi18-3	2018 03	安徽 Anhui	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST761	B2	未定型 Undifferentiated
20	AHli19-1	2018 03	安徽 Anhui	肺脏 Lung	ST101	B1	O38
21	AHli19-2	2018 03	安徽 Anhui	脾脏 Spleen	ST3944	B2	O38
22	AHli19-3	2018 03	安徽 Anhui	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST3944	B2	O38
23	AHli19-4	2018 03	安徽 Anhui	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST100	D	O38
24	AHli19-5	2018 03	安徽 Anhui	脾脏 Spleen	ST29	B2	O38
25	AHli19-6	2018 03	安徽 Anhui	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST746	D	O38
26	JSxu18-1	2018 05	江苏 Jiangsu	肺脏 Lung	ST117	D	O38
27	JSxu18-2	2018 05	江苏 Jiangsu	肝脏 Liver	nST1	B2	O38
28	JSxu18-3	2018 05	江苏 Jiangsu	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	nST2	B2	O38
29	JSda18-8	2018 05	江苏 Jiangsu	肝脏 Liver	nST3	B2	O38
30	JSda18-9	2018 05	江苏 Jiangsu	肺脏 Lung	ST603	B2	O38
31	JSda18-10	2018 05	江苏 Jiangsu	脾脏 Spleen	ST101	B2	O38
32	JSda18-12	2018 05	江苏 Jiangsu	肺脏 Lung	ST88	B2	O38
33	SDjie18-3	2018 07	山东 Shandong	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST612	B2	O38
34	SDjie18-10	2018 07	山东 Shandong	肺脏 Lung	ST2505	B2	O38
35	SDjie18-11	2018 07	山东 Shandong	肺脏 Lung	ST88	B2	O38
36	SDlin18-7	2018 07	山东 Shandong	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST117	B2	O38
37	SDlin18-10	2018 07	山东 Shandong	肺脏 Lung	ST746	B2	O38
38	SDlin18-12	2018 08	山东 Shandong	肺脏 Lung	ST224	B2	O38
39	SDlan18-2	2018 08	山东 Shandong	脾脏 Spleen	ST365	B1	O127
40	HBgu18-8	2018 12	河北 Hebei	肺脏 Lung	ST10	B2	O38
41	HByan18-2	2018 12	河北 Hebei	肝脏 Liver	ST2731	B2	O127
42	HByan18-3	2018 12	河北 Hebei	肝脏 Liver	ST58	B2	O127
43	HByan18-4	2018 12	河北 Hebei	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST58	B2	O11
44	HByan18-5	2018 12	河北 Hebei	肺脏 Lung	ST10	B2	O127
45	HByan18-8	2018 12	河北 Hebei	脾脏 Spleen	ST10	B2	O127
46	HBxian18-3	2018 12	河北 Hebei	关节积液 Jiont	ST3492	B2	O38
47	HBxian18-4	2018 12	河北 Hebei	肺脏 Lung	ST746	B2	O38
48	HBcang18-4	2018 12	河北 Hebei	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST101	B2	O127
49	GXxin19-8	2019 03	广西 Guangxi	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST361	B2	O11
50	GXheng19-6	2019 03	广西 Guangxi	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST101	B1	O38
51	GXgui19-4	2019 03	广西 Guangxi	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST410	B2	O127
52	GXgui19-5	2019 03	广西 Guangxi	肝脏 Liver	ST410	B2	O127
53	GXqin19-4	2019 03	广西 Guangxi	肠系膜淋巴结 Lymph nodes	ST93	B2	O38
54	GXqin19-8	2019 03	广西 Guangxi	肝脏 Liver	ST156	B1	O38

注: nST: 新序列型

Note: nST: The new sequence type

1.4 ExPEC 的 O 抗原血清型鉴定

将 ExPEC 接种于 LB 琼脂培养基上, 37 °C 培养 18–24 h, 用 3 mL 0.5% 石炭酸生理盐水洗下菌苔, 置试管中, 制成浓稠悬液, 1×10<sup>5</sup> Pa 高压灭菌 2 h, 即成 O 抗原。取 O 抗原分别与 *E. coli* 的 O 抗原单因子血清进行玻板凝集反应, 2 min 内出现明显凝集者为“阳性”反应。同时以 O 抗原与 0.5% 石炭酸生理盐水混合物作对照, 观察有无自凝集现象。经玻板凝集试验初步筛选可能的 O 血清型后, 再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≥1:640。

1.5 ExPEC 的系统进化群鉴定

参考文献[4]合成针对 *chuA* 基因、*yjaA* 基因和 DNA 片段 *TspE4.C2* 的特异性引物, 引物序列、退火温度及片段预期大小见表 2, 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。通过煮沸法提取的受试 ExPEC 基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应。PCR 反应体系(25 μL): 2×*Taq* PCR MasterMix 12.5 μL,

上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 退火 45 s (不同引物的退火温度见表 2), 72 °C 50 s, 循环 35 次; 72 °C 5 min。取 5 μL PCR 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 凝胶成像系统观察并记录结果。

1.6 ExPEC 的相关毒力基因检测

参考文献[5-6]合成 28 个 ExPEC 相关毒力基因, 包括: 黏附素相关基因 *papA*、*papC*、*afa*、*tsh*、*focD*、*iha*、*fimH*、*nfaE*、*bmaE* 和 *gafD*, 铁摄取系统相关基因 *iutA*、*iucD* 和 *iroN*, 外膜蛋白相关基因 *ompA*、*ompT*、*traT* 和 *iss*, 荚膜多糖相关基因 *kpsMT II*, 毒素相关基因 *vat*、*cnf1*、*hylA*、*ibeA* 和 *cvaC*, 毒力岛相关基因 *irp1*、*fyuA*、*irp2*、*ler* 和 *malX*。引物序列、退火温度及片段预期大小见表 2, 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。反应体系和反应条件同 1.5。

表 2 ExPEC 系统进化群鉴定、相关毒力基因检测和多位点序列分型用基因引物  
Table 2 Gene primers for phylogenetic group identification, detection of related virulence genes and multi-site sequence typing of the ExPEC system

基因分型 Genotyping	检测基因 Detection genes	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	产物大小 Product size (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
系统进化群 分群基因 System evolution group gene	<i>chuA</i>	<i>chuA-F</i> <i>chuA-R</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	60
	<i>yjaA</i>	<i>yjaA-F</i> <i>yjaA-R</i>	TGAAGTGTCTCAGGAGACGCT ATGGAGAATGCGTTCTCTCAAC	211	60
	<i>TspE4.C2</i>	<i>TspE4.C2-F</i> <i>TspE4.C2-R</i>	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	60
毒力基因 Virulence genes	<i>papA</i>	<i>papA-F</i> <i>papA-R</i>	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA CGTCCCACCATACTGCTCTTC	508	61
	<i>afa</i>	<i>afa-F</i> <i>afa-R</i>	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	559	63
	<i>iutA</i>	<i>iutA-F</i> <i>iutA-R</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	61
	<i>tsh</i>	<i>tsh-F</i> <i>tsh-R</i>	GGTGGTGCACCTGGAGTGG AGTCCAGCGTGATAGTGG	640	55
	<i>fyuA</i>	<i>fyuA-F</i> <i>fyuA-R</i>	TGATTAACCCCGCGACGGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880	63
	<i>ler</i>	<i>ler-F</i> <i>ler-R</i>	CGCACACAACAAGCCCATAC GATGAGTTCCGGCGAGCAA	195	58
	<i>irp2</i>	<i>irp2-F</i> <i>irp2-R</i>	AAGGATTCTGCTGTTACCGGA TCGGCCAGGATGATTTCGTCG	301	60
	<i>iss</i>	<i>iss-F</i> <i>iss-R</i>	TCACATAGGATTCTGCCG AGAAATCAAAAGGTGGCC	607	55
(待续)					

(续表 2)

	<i>papC</i>	<i>papC-F</i>	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	328	61
		<i>papC-R</i>	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA		
	<i>vat</i>	<i>vat-F</i>	TCCTGGGACATAAGGGTCAG	981	55
		<i>vat-R</i>	GTGTCAGAACGGAATTGT		
	<i>irp1</i>	<i>irp1-F</i>	GCGATGTTTAACCCCGATT	1 691	55
		<i>irp1-R</i>	TGCCTGGAAACCCTGAGACT		
	<i>kpsMT II</i>	<i>kpsMT II-F</i>	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272	55
		<i>kpsMT II-R</i>	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA		
	<i>focD</i>	<i>focD-F</i>	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	60
		<i>focD-R</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC		
	<i>iroN</i>	<i>iroN-F</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCCG	667	63
		<i>iroN-R</i>	GACGCCGACATTAAGACGCAG		
	<i>ompA</i>	<i>ompA-F</i>	ACGCTGTTTCACGTTGTCA	753	58
		<i>ompA-R</i>	AACCCGTATGTTGGCTTTG		
	<i>ompT</i>	<i>ompT-F</i>	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT	496	63
		<i>ompT-R</i>	TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC		
	<i>fimH</i>	<i>fimH-F</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508	63
		<i>fimH-R</i>	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA		
	<i>hlyA</i>	<i>hlyA-F</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1 177	63
		<i>hlyA-R</i>	ACCATATAAGCGGTCATTCCTGCA		
	<i>gafD</i>	<i>gafD-F</i>	TGTTGGACCGTCTCAGGGCTC	952	63
		<i>gafD-R</i>	CTCCCGGAACTCGCTGTTACT		
	<i>cnf1</i>	<i>cnf1-F</i>	AAGATGGAGTTTCCCTATGCAGGAG	498	61
		<i>cnf1-R</i>	CATTGAGATCCTGCCCTCATTATT		
	<i>bmaE</i>	<i>bmaE-F</i>	ATGGCGCTAACTTGCCATGCTG	507	63
		<i>bmaE-R</i>	AGGGGGACATATAGCCCCCTTC		
	<i>cvaC</i>	<i>cvaC-F</i>	CACACACAAACGGGAGCTGTT	680	63
		<i>cvaC-R</i>	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT		
	<i>ibeA</i>	<i>ibeA-F</i>	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170	63
		<i>ibeA-R</i>	TGGTGCTCCGGCAAACCATG		
	<i>iucD</i>	<i>iucD-F</i>	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	714	55
		<i>iucD-R</i>	CCTGATCCAGATGATGCT		
	<i>traT</i>	<i>traT-F</i>	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	290	63
		<i>traT-R</i>	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG		
	<i>iha</i>	<i>iha-F</i>	TTTCAGCCAGCAGCATAG	1 071	55
		<i>iha-R</i>	GGACAACTCCGTCTTTTCAT		
	<i>nfaE</i>	<i>nfaE-F</i>	GCTTACTGATTCTGGGATGGA	559	63
		<i>nfaE-R</i>	CGGTGGCCGAGTCATATGCCA		
	<i>malX</i>	<i>malX-F</i>	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	925	63
		<i>malX-R</i>	TCGCCACCAATCACAGCCGAAC		
多位点序列	<i>adk</i>	<i>adk-F</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583	54
分型基因		<i>adk-R</i>	CCGTCAACTTTTCGCGTATTT		
Multiple point	<i>fumC</i>	<i>fumC-F</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	54
sequence		<i>fumC-R</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC		
genotypes	<i>gyrB</i>	<i>gyrB-F</i>	TCGCGACACGGATGACGGC	911	60
		<i>gyrB-R</i>	ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
	<i>icd</i>	<i>icd-F</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	878	54
		<i>icd-R</i>	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
	<i>mdh</i>	<i>mdh-F</i>	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGG	932	60
		<i>mdh-R</i>	TTAACGAACTCCTGCCCCAG		
	<i>purA</i>	<i>purA-F</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816	54
		<i>purA-R</i>	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
	<i>recA</i>	<i>recA-F</i>	CGCATTCGCTTTACCCTGACC	780	58
		<i>recA-R</i>	AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG		

1.7 ExPEC 的多位点序列分型

根据 *E. coli* 数据([http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele\\_st\\_search](http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search))提供的 *E. coli* 多位点序列(Multilocus Sequence Typing, MLST)分型方案, 合成 7 个管家基因 *adk*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA* 和 *recA*, 引物序列、退火温度及片段预期大小见表 2, 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。反应体系和反应条件同 1.5。PCR 产物经纯化后, 送至上海桑尼生物科技有限公司对产物进行双向测序, 用 SeqMan 软件结合菌株等位基因的正反向序列图谱对等位基因序列进行拼接, MEGA 7.0 软件将拼接后的序列进行校正比对, 受试菌株序列与库中菌株序列相似性为 100%时, 认为等位基因序列号相同。7个管家基因序列号的组合即为该菌的 ST 型, 并根据数据库结果进行克隆复合体(Clone Complex, CC)的分群。

1.8 数据分析

应用统计软件 SPSS 25.0 的卡方检验对 54 株猪源 ExPEC 的系统进化群与毒力基因进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 ExPEC 的 O 抗原血清型鉴定结果

54 株 ExPEC 中有 52 株确定了血清型, 占比 96.3%。共涉及 4 种血清型, 其中 40 株属于 O38, 占比 74.1%, 为优势血清型; 其次是 O127, 8 株, 占比 14.8%; O93 和 O11 各 2 株, 分别占比 3.7%。在各地区上, 安徽、江苏、山东和广西分离株以 O38 为优势, 河北分离株以 O127 为优势(表 3)。

2.2 ExPEC 的系统进化群鉴定结果

54 株 ExPEC 中属于 A 群 0 株; B1 群 5 株, 占比 9.3% (5/54); B2 群 44 株, 占比 81.5% (44/54), 为主要系统进化群; D 群 5 株, 占比 9.3% (5/54)。各地区均以 B2 群为主要系统进化群, 如表 4 所示。

表 3 54 株 ExPEC 的 O 抗原血清型地区分布

Table 3 Regional distribution of O antigen serotypes of 54 ExPEC strains

地区 Region	菌株数(株)/占比 Number of strains (strains)/Proportion (%)					菌株总数(株) Total number of strains
	O38	O93	O11	O127	Undifferentiated	
安徽 Anhui	21 (84.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	25
江苏 Jiangsu	7 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7
山东 Shandong	6 (85.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (14.3)	0 (0.0)	7
河北 Hebei	3 (33.3)	0 (0.0)	1 (11.1)	5 (55.6)	0 (0.0)	9
广西 Guangxi	3 (50.0)	0 (0.0)	1 (16.7)	2 (33.3)	0 (0.0)	6
合计 Total	40 (74.1)	2 (3.7)	2 (3.7)	8 (14.8)	2 (3.7)	54

表 4 54 株 ExPEC 的系统进化群地区分布

Table 4 Regional distribution of phylogenetic group of 54 ExPEC strains

地区 Region	菌株数(株)/占比 Number of strains (strains)/Proportion (%)				菌株总数(株) Total number of strains
	A	B1	B2	D	
安徽 Anhui	0 (0.0)	2 (8.0)	19 (76.0)	4 (16.0)	25
江苏 Jiangsu	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (85.7)	1 (14.3)	7
山东 Shandong	0 (0.0)	1 (14.3)	6 (85.7)	0 (0.0)	7
河北 Hebei	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (100.0)	0 (0.0)	9
广西 Guangxi	0 (0.0)	2 (33.3)	4 (66.7)	0 (0.0)	6
合计 Total	0 (0.0)	5 (9.3)	44 (81.5)	5 (9.3)	54

### 2.3 ExPEC 的毒力基因检测结果

54 株 ExPEC 的 28 个相关毒力基因检测结果显示, 除 *cnfI* 基因检测均为阴性外, 其余 27 个基因均有检出, 各基因检出率从高到低依次为 *ompA* (100% , 54/54)、*ibeA* (96.3% , 52/54)、*fimH* (87.0% , 47/54)、*traT* (87.0% , 47/54)、*focD* (79.6% , 43/54)、*papA* (77.8% , 42/54)、*iroN* (75.9% , 41/54)、*iutA* (70.4% , 38/54)、*iucD* (63.0% , 34/54)、*cvaC* (63.0% , 33/54)、*tsh* (59.3% , 32/54)、*kpsMT II* (59.3% , 32/54)、*iss* (51.9% , 28/54)、*ompT* (50.0% , 27/54)、*iha* (33.3% , 18/54)、*irp2* (27.8% , 15/54)、*fyuA* (27.8% , 15/54)、*malX* (25.9% , 14/54)、*vat* (25.9% , 14/54)、*afa* (24.1% , 13/54)、*irp1* (24.1% , 13/54)、*papC* (22.2% , 12/54)、*nfaE* (18.5% , 10/54)、*ler* (16.7% , 9/54)、*hlyA* (14.8% , 8/54)、*bmaE* (13.0% , 7/54)、*gafD* (9.3% , 5/54)和 *cnfI* (0% , 0/54), 其中 *ompA*、*ibeA*、*fimH*、*traT*、*focD*、*papA*、*iroN*、*iutA*、*iucD*、*cvaC*、*tsh*、*kpsMT II*、*iss* 和 *ompT* 基因出现的频率超过 50%。

### 2.4 ExPEC 的多位点序列分型结果

54 株 ExPEC 呈现 31 种不同的 ST 型, 其中 51 株在数据库中有与之对应的 ST 型, 占比为 90.3% (28/31), 另 3 株相对应的则属于新的 ST 型 (3/31), 鉴于该 3 株测序结果上传 *E. coli* 的 MLST 数据库失败等原因, 暂命名为 nST1、nST2 和 nST3。因此共确定 28 种 ST 型, 以 ST648 和 ST10 最多, 均为 5 株, 各占比 9.3% (5/54); 其次为 ST410 和 ST101, 均为 4 株, 各占比 7.4% (4/54)。31 种不同的 ST 型可划归 9 个 CC, 分别是 CC23 (ST410、ST88、ST612、ST2505 和 ST2371)、CC648 (ST648、ST3368 和 ST4223)、CC101 (ST101、ST5229 和 ST365)、CC10 (ST10 和 ST617)、CC155 (ST58)、CC156 (ST156)、CC165 (ST100)、CC168 (ST93)和 CC29 (ST29)共计 18 种 ST 型, 另有无 CC 的 13 种 ST 型, 分别是 ST746、

ST117、ST3944、ST361、ST761、ST542、ST3492、ST224、ST603、ST196、nST1、nST2 和 nST3 (表 5)。同一 CC 中的不同 ST 型菌株存在亲缘关系, 不同 CC 间 ST 型菌株、无 CC 的 ST 型菌株相互间没有亲缘关系。

### 2.5 ExPEC 的系统进化群和毒力基因相关性分析

由表 6 可知, 54 株 ExPEC 中 B2 群(44 株)、B1 群(5 株)和 D 群(5 株)之间的毒力基因数量无显著性差异( $P>0.05$ ), D 群携带毒力基因平均数为 15.6, B1 群为 13.8, B2 群为 12.7。通过对毒力基因与系统进化群的差异显著性分析可知, *bmaE*、*malX* 和 *iha* 更倾向分布于 D 群分离株中( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

*E. coli* 抗原主要有菌体 O 抗原、荚膜 K 抗原和鞭毛 H 抗原 3 种, 是血清型鉴定的物质基础。由于致病性 *E. coli* 常与其 O 抗原密切相关, 而且 O 抗原是 *E. coli* 分群的基础, 因而鉴定 O 抗原显得比鉴定 K 抗原和 H 抗原更为重要。ExPEC 的 O 抗原血清型众多, 不仅引发不同感染症类型的 ExPEC 优势血清型有所不同, 如尿道致病性大肠杆菌(Uropathogenic *E. coli*, UPEC)为 O1、O2、O4、O6、O7、O16、O18 和 O75<sup>[5]</sup>。新生儿脑膜炎大肠杆菌(Neonatal Meningitis-Associated *E. coli*, NMEC)为 O1、O7、O12、O18 和 O83<sup>[6]</sup>。败血性大肠杆菌(Sepsis-Causing *E. coli*, SEPEC)为 O1、O2、O4、O6、O7、O12、O15、O16、O18、O25、O75 和 O157<sup>[7]</sup>。来自同一种动物的 ExPEC 优势血清型也存在差异, 在猪源 ExPEC 优势血清型的相关报道中, 黑龙江地区以 O8、O78 和 O120 为优势<sup>[8]</sup>, 江苏地区以 O9、O45、O107 和 O139 为优势<sup>[9]</sup>, 河北地区以 O53、O93 和 O157 为优势<sup>[11]</sup>, 广东地区以 O101 和 O157 为优势<sup>[10]</sup>, 湖南湖北地区以 O8、O11、O26、O101、O138 和 O161 为优势<sup>[11]</sup>, 河南地区以 O8、O9、O11、O26、O101、O138 和 O161 为优势<sup>[2]</sup>。本研究的



表 5 54 株 ExPEC 多位点序列分型结果

Table 5 The results of 54 strains of ExPEC multi-site sequence typing

ST 型	菌株数(株)/占比	克隆复合体	ST 型成员(总数)
ST type	Number of strains (strains)/Proportion (%)	Clone complex	ST type members
ST648	5 (9.3)	CC648	ST624, ST648, ST3368, ST4223..... (68)
ST10	5 (9.3)	CC10	ST4, ST10, ST34, ST617..... (89)
ST410	4 (7.4)	CC23	ST88, ST410, ST612, ST2505, ST2371..... (98)
ST101	4 (7.4)	CC101	ST101, ST359, ST365, ST5229..... (56)
ST746	3 (5.6)	/	ST746 (1)
ST88	3 (5.6)	CC23	ST88, ST410, ST612, ST2505, ST2371..... (98)
ST3368	2 (3.7)	CC648	ST624, ST648, ST3368, ST4223..... (68)
ST117	2 (3.7)	/	ST117 (1)
ST3944	2 (3.7)	/	ST3944 (1)
ST58	2 (3.7)	CC155	ST55, ST56, ST58, ST155..... (73)
ST5229	2 (3.7)	CC101	ST101, ST359, ST365, ST5229..... (56)
ST4223	1 (1.9)	CC648	ST624, ST648, ST3368, ST4223..... (68)
ST361	1 (1.9)	/	ST361 (1)
ST100	1 (1.9)	CC165	ST8, ST100, ST165, ST189..... (36)
ST2505	1 (1.9)	CC23	ST88, ST410, ST612, ST2505, ST2371..... (98)
ST29	1 (1.9)	CC29	ST16, ST29, ST97, ST113..... (56)
ST761	1 (1.9)	/	ST761 (1)
ST617	1 (1.9)	CC10	ST4, ST10, ST34, ST617..... (89)
ST542	1 (1.9)	/	ST542 (1)
ST3492	1 (1.9)	/	ST3492 (1)
ST224	1 (1.9)	/	ST224 (1)
ST603	1 (1.9)	/	ST603 (1)
ST196	1 (1.9)	/	ST196 (1)
ST93	1 (1.9)	CC168	ST93, ST168, ST181, ST186..... (16)
ST156	1 (1.9)	CC156	ST156, ST348, ST611, ST840..... (13)
ST612	1 (1.9)	CC23	ST88, ST410, ST612, ST2505, ST2371..... (98)
ST2731	1 (1.9)	CC23	ST88, ST410, ST612, ST2505, ST2371..... (98)
ST365	1 (1.9)	CC101	ST101, ST359, ST365, ST5229..... (56)
nST1	1 (1.9)	/	nST1 (1)
nST2	1 (1.9)	/	nST2 (1)
nST3	1 (1.9)	/	nST3 (1)

注：nST：新序列型；/：无克隆复合体的 ST 型

Note: nST: The new sequence type; /: The ST type of the clonal-free complex

54 株猪源 ExPEC 优势血清型为 O38, 其次为 O127, 与国内其他地区不同, 尤其是 O38 作为优势血清型目前尚未见报道; 表明 ExPEC 血清型的种类繁多, 流行的优势血清型分布不同, 猪源 ExPEC 优势血清型在不同地区、不同时段上的流行分布均存在一定差异, 呈现动态过程, 因此, 实时检测猪群中 ExPEC 的血清型变化有益于有效防控相关疾病的发生。

*E. coli* 包括共生型(一般不致病)、肠内致病型和肠外致病型 3 类菌群, 分为 4 种系统进化群, 其中共生型 *E. coli* 多属于 A 群和 B1 群, 肠内致病型

*E. coli* 多属于 A 群、B1 群和 D 群, 而 ExPEC 多属于 B2 群, 其次为 D 群<sup>[12]</sup>。研究显示, 在人源 ExPEC 中, Maluta 等<sup>[13]</sup>发现 30.2% 为 D 群, 26.4% 为 B2 群; Maynard 等<sup>[14]</sup>发现 54% 为 B2 群, 23% 为 D 群。在犬猫源 ExPEC 中, Maynard 等<sup>[14]</sup>发现 88% 属于 B2 群; 王鹏勇<sup>[15]</sup>发现 30.3% 为 B2 群, 20.7% 为 D 群。在禽源 ExPEC 中, Maynard 等<sup>[14]</sup>发现 63% 属于 D 群; 王瑶等<sup>[16]</sup>发现 31.9% 为 B2 群, 21.9% 为 D 群。人源、犬猫源、禽源 ExPEC 主要来自 B2 群, 一部分是 D 群, 而猪源 ExPEC 超过半数属于 A 和 B1 群。在猪源 ExPEC 相关研

表 6 54 株 ExPEC 系统进化群与毒力基因的相关性  
Table 6 Correlation between the ExPEC phylogenetic group and virulence genes in 54 strains

毒力基因 Virulence genes	系统进化群 Phylogenetic group			合计(株) The total (strains)
	B1 (n=5)株数(占比)	B2 (n=44)株数(占比)	D (n=5)株数(占比)	
	B1 (n=5) Number of strains (%)	B2 (n=44) Number of strains (%)	D (n=5) Number of strains (%)	
<i>afa</i>	2 (40)a	11 (25)a	0 (0)a	13
<i>iutA</i>	4 (80)a	31 (70.5)a	3 (60)a	38
<i>tsh</i>	4 (80)a	24 (54.5)a	4 (80)a	32
<i>vat</i>	0 (0)a	12 (27.3)a	2 (40)a	14
<i>fyuA</i>	2 (40)a	12 (27.3)a	1 (20)a	15
<i>ler</i>	2 (40)a	7 (15.9)a	0 (0)a	9
<i>irp2</i>	3 (60)a	11 (25)a	1 (20)a	15
<i>iss</i>	4 (80)a	21 (47.7)a	3 (60)a	28
<i>papC</i>	1 (20)a	9 (20.5)a	2 (40)a	12
<i>irp1</i>	2 (40)a	10 (22.7)a	1 (20)a	13
<i>focD</i>	5 (100)a	33 (75)a	5 (100)a	43
<i>iroN</i>	4 (80)a	32 (72.7)a	5 (100)a	41
<i>ompA</i>	5 (100)	44 (100 )	5 (100)	54
<i>kspMT II</i>	2 (40)a	26 (59.1)a	4 (80)a	32
<i>fimH</i>	4 (80)a	39 (88.6)a	4 (80)a	47
<i>hlyA</i>	1 (20)a	5 (11.4)a	2 (40)a	8
<i>gafD</i>	0 (0)a	4 (9.1)a	1 (20)a	5
<i>cnf1</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
<i>bmaE</i>	1 (20)ab	4 (9.1)a	2 (40)b	7
<i>cvaC</i>	3 (60)a	26 (59.1)a	4 (80)a	33
<i>ibeA</i>	5 (100)a	42 (95.5)a	5 (100)a	52
<i>iucD</i>	3 (60)a	28 (63.6)a	3 (60)a	34
<i>traT</i>	4 (80)a	39 (88.6)a	4 (80)a	47
<i>iha</i>	1 (20)a	12 (27.3)a	5 (100)b	18
<i>nfaE</i>	0 (0)a	9 (20.5)a	1 (20)a	10
<i>malX</i>	0 (0)a	12 (27.3)ab	3 (60)b	15
<i>papA</i>	4 (80)a	33 (75)a	5 (100)a	42
<i>ompT</i>	3 (60)a	21 (47.7)a	3 (60)a	27
The total virulence genes	69 a	557 a	78 a	
Virulence genes mean	13.8	12.7	15.6	

注：表中同行字母相同表示系统进化群间的毒力基因差异不显著( $P>0.05$ )，字母不同表示系统进化群间的毒力基因差异显著( $P<0.05$ )  
Note: The same letters in the same row in the table indicated that there was no significant difference in virulence genes among phylogenetic groups ( $P>0.05$ ), while different letters indicated that there were significant differences in virulence genes among phylogenetic groups ( $P<0.05$ )

究中，Tan 等<sup>[11]</sup>发现 30.8%属于 A 群，29.2%属于 B1 群，17.5%属于 B2 群，22.5%属于 D 群，以 A、B1 和 D 群为主；张茹<sup>[17]</sup>研究结果显示，64%为 A 群，32%为 B1 群，B2 群和 D 群各占 2%，以 A 群和 B1 群为主；Zhu 等<sup>[18]</sup>研究的菌株 57.8%属于 A 群，9.4%属于 B1 群，10.9%属于 B2 群，21.9%属于 D 群，以 A 和 D 群为主；朱雪婷<sup>[19]</sup>分

离的菌株 50%为 B1 群，20%为 B2 群，17.7%为 D 群，13.3%为 A 群，以 B1 群最多，其次是 B2 和 D 群，A 群所占菌株最少。本研究的 54 株猪源 ExPEC 有 81.5%为 B2 群，属于 D 群和 B1 群各占 9.3%，没有 A 群菌株。综上，研究表明不同来源的 ExPEC 所属系统进化群存在差异，人源、犬猫源、禽源 ExPEC 多见 B2 群和 D 群，虽然猪源

ExPEC 多见 A 群和 B1 群,但随着时间的推移,系统进化群的流行分布也出现了变化。我国猪群中属于 B2 群和 D 群的 ExPEC 在临床上的检出率越来越高<sup>[11]</sup>。Kawamura-Sato 等<sup>[20]</sup>研究结果显示,属于 B2 群的致病性 *E. coli* 携带毒力因子较其他群多。

ExPEC 通过其特有的毒力因子侵袭、定植于肠外组织并引起感染。Zhu 等<sup>[18]</sup>报道 B2 群猪源 ExPEC 携带毒力基因平均数为 12.1,明显多于 A 群(4.4)、B1 群(3.8)和 D 群(4.3),而且毒力也显著强于 A 群、B1 群和 D 群菌株,这 3 群菌株不仅毒力基因分布均匀,而且毒力相似。本研究 54 株猪源 ExPEC 中, B2 群携带毒力基因平均数为 12.7,与 B1 群(13.8)和 D 群(15.6)之间无显著性差异,并且本实验室前期的研究结果显示,对小鼠的致死率达 100%–80% 的占比分别为 B2 群 64%、B1 群 60%、D 群 80%,呈现相似的毒力。综上,研究表明在不同系统进化群的 ExPEC 之间,致病力强弱与其所携带的毒力基因数量有关,即数量多则往往致病力强。在本研究检测的 28 种毒力基因中,有 14 种出现的频率超过 50%,分别是 *ompA*、*ibeA*、*fimH*、*traT*、*focD*、*papA*、*iroN*、*iutA*、*iucD*、*cvaC*、*tsh*、*kpsMT II*、*iss* 和 *ompT*,其中 *ompA* 和 *ibeA* 分别达到 100% 和 96.3%,呈高度流行。由 *ompA* 编码的 OmpA 是 ExPEC 重要的结构性蛋白,保证了菌体形态完整性<sup>[21]</sup>。在一些 ExPEC 感染病例中,OmpA 可增强 ExPEC 的抗血清杀菌能力,提高菌株生存能力<sup>[22]</sup>。同时,OmpA 有助于菌株 K1 荚膜入侵脑微血管内皮细胞(Brain Microvascular Endothelial Cells, BMEC),引发脑膜感染,增强菌株的致病能力<sup>[23]</sup>。徐引弟等<sup>[2]</sup>和 Zhu 等<sup>[18]</sup>分别检测了 52 株和 64 株猪源 ExPEC,结果均携带 *ompA*,表明 *ompA* 在猪源 ExPEC 中普遍存在,与菌株的生存和致病性相关。*ibeA* 编码的侵袭素 IbeA 是 NMEC 中重要的致病因素<sup>[23]</sup>,常见于人源高致病性 B2 群 ExPEC 的报道。IbeA 有助于菌株在宿主体内的进一步扩散并侵袭 BMEC,在 ExPEC 穿透血脑屏障引起脑膜炎

过程中发挥重要作用。同时 IbeA 还有助于菌株形成生物膜,导致耐药性增强,增加临床治疗用药的难度。本研究中猪源 ExPEC 的 *ibeA* 阳性检出率为 96.3%,显著高于相关报道的 3.1% (2/64 株)<sup>[18]</sup>、5.8% (3/52 株)<sup>[2]</sup>和 44.4% (140/315 株)<sup>[11]</sup>,这可能由于菌株适应宿主能力不同所致<sup>[21]</sup>。由 *iha*、*malX* 和 *bmaE* 编码的黏附素、磷酸转移酶系统酶 II 和 M-凝集素等毒力因子更倾向在 D 群分离株中出现,与主要分布于 B2 群、其次为 D 群菌株中的相关报道有所差异<sup>[24]</sup>,这或许因为菌株在选择进化过程中承受的压力不同所致<sup>[21]</sup>,从而使 D 群菌株的黏附力提高以增强其致病力。由上可知,随着 ExPEC 在猪群中的感染率逐年升高,其致病潜力也越来越强,对猪群健康的危害将愈发凸显,应引起高度重视。虽然本研究的 54 株 ExPEC 均未检出 *cnfI* 基因,但 Chang 等<sup>[25]</sup>研究发现 *cnfI* 基因缺失的 ExPEC 能增强 NMEC 对 BMEC 的侵入,加重 NMEC 引起的脑膜炎病变。

多位点序列分型可反映细菌的进化生物学。在禽源 ExPEC 中,盖文燕等<sup>[26]</sup>从 42 株中检出 18 种 ST 型,最多见 ST23,其次是 ST354、ST2505 和 ST117;胡林等<sup>[27]</sup>从 124 株中检出 38 种 ST 型,最多见 ST117,其次是 ST23。蒋春阳<sup>[28]</sup>从 11 株犬源 ExPEC 中检出 7 种 ST 型,以 ST12 最多。丁一<sup>[21]</sup>从 81 株猪源 ExPEC 中检出 43 种 ST 型,最多见 ST1687,其次是 ST10。本研究从 54 株猪源 ExPEC 中检出 31 种 ST 型,最多见 ST10 和 ST648,其次是 ST410 和 ST101。综上,结果表明 ExPEC 的 ST 型复杂多样,呈现遗传多样性。研究报道显示 ST10、ST23、ST95、ST117 和 ST131 等是 ExPEC 主要流行的 ST 型<sup>[29]</sup>,其中 ST10 在国内外人源、禽源和猪源 ExPEC 中均为多见<sup>[21,27]</sup>。ST23 常出现在引起人溶血性尿毒综合征的 ExPEC (O157:H7)和禽源 ExPEC 中<sup>[26,30]</sup>。本研究受试菌的 ST 型分型归属于 ST410、ST88、ST612、ST2505 和 ST2371 的共 10 株,占比 18.5%,这 10 株菌与 ST23 亲缘关系很近,属于 CC23。ST648 虽不是公认流

行的主要 ST 型,但在猪源、人源和禽源 ExPEC 中也多有分布<sup>[18,21]</sup>。表明猪源 ExPEC 在一定程度上与人源和禽源 ExPEC 具有相同的遗传背景。

#### 4 结论

本研究中 54 株猪源 ExPEC 的血清型和系统进化群分别以 O38 和 B2 群为优势,在不同地区、不同时段上,猪源 ExPEC 的主要流行分布均存在一定差异,呈现动态过程, O38 作为优势血清型目前尚未见报道,具有高致病性的 B2 群和 D 群菌株有逐渐增多的趋势; 28 个相关毒力基因中,除 *cnf1* 外均有检出, *bmaE*、*malX* 和 *iha* 更倾向分布于 D 群菌株中, *ompA* 和 *ibeA* 为高度流行的毒力基因,猪源 ExPEC 的致病性与生存力越来越强; 31 种 ST 型中以 ST10 和 ST648 最多, ST 型复杂多样,呈现遗传多样性,在一定程度上与人源和禽源 ExPEC 具有相同的遗传背景。

#### REFERENCES

- [1] Ma ZJ, Rui P, Lu CX, Yang CR, Liu XR, Wang QY, Liu YZ, Zhang JW. Isolation and identification of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from swine[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2015, 31(2): 130-134 (in Chinese)  
马增军, 芮萍, 逯春香, 杨彩然, 刘谢荣, 王秋悦, 刘曜宗, 张建文. 猪源肠外致病性大肠杆菌的分离与鉴定[J]. 中国人兽共患学报, 2015, 31(2): 130-134
- [2] Xu YD, Zhang QX, Wang ZF, Zhu WH, Jiao WQ, Li HL, Lang LM, Wang KL. Identification and distribution of virulence factors of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of swine in Henan Province[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2018, 46(11): 1921-1925, 1948 (in Chinese)  
徐引弟, 张青娴, 王治方, 朱文豪, 焦文强, 李海利, 郎利敏, 王克领. 河南省猪肠外致病性大肠杆菌毒力因子的检测及分布[J]. 山西农业科学, 2018, 46(11): 1921-1925, 1948
- [3] Ding JH, Lv LM, Zhou L, Li ZW, Sun QR, Liu XL, Li Y. Isolation and identification of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from pigs and its drug sensitivity test[J]. Swine Production, 2020(2): 92-96 (in Chinese)  
丁建华, 吕李明, 周磊, 李泽伟, 孙起荣, 刘雪兰, 李郁. 猪源肠外致病性大肠杆菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 养猪, 2020(2): 92-96
- [4] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4555-4558
- [5] Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1991, 4(1): 80-128
- [6] Johnson JR, Oswald E, O'Bryan TT, Kuskowski MA, Spanjaard L. Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2002, 185(6): 774-784
- [7] Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2000, 181(1): 261-272
- [8] Xu TL, Xing GL, Jiang CG, Liu JS, Liu DF, Jiang Q, Li ZJ, Kang HT, Guo DC, Qu LD. Phylogenetic group, antimicrobial resistance and pathogenic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from swine, chicken and mink[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2018, 40(5): 386-391 (in Chinese)  
许腾林, 邢桂玲, 姜成刚, 刘家森, 刘大飞, 姜骞, 李志杰, 康洪涛, 郭东春, 曲连东. 猪、鸡与貂源肠外致病性大肠杆菌群型、耐药性与致病性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(5): 386-391
- [9] Yuan YG, Peng QL, Chen S, Li YC. Serotype identification and virulence gene investigation of swine *Colibacillosis* in central Jiangsu Province[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2013(22): 83-84 (in Chinese)  
袁玉国, 彭秋玲, 陈思, 李宇琛. 江苏中部地区猪大肠杆菌病血清型鉴定及毒力基因的调查[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013(22): 83-84
- [10] Jiang B, Dong JW, Zhang XJ, Guo XF. Isolation and drug sensitive test of animal *E. coli* from Guangdong[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2009, 43(1): 14-16 (in Chinese)  
江飙, 董嘉文, 张献杰, 郭霄峰. 广东地区动物源性大肠杆菌的分离及药敏分析[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(1): 14-16
- [11] Tan C, Tang XB, Zhang X, Ding Y, Zhao ZQ, Wu B, Cai XW, Liu ZF, He QG, Chen HC. Serotypes and virulence genes of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from diseased pigs in China[J]. The Veterinary Journal, 2012, 192(3): 483-488
- [12] Blum SE, Leitner G. Genotyping and virulence factors assessment of bovine mastitis *Escherichia coli*[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 163(3/4): 305-312
- [13] Maluta RP, Logue CM, Casas MRT, Meng T, Guastalli EAL, Rojas TCG, Montelli AC, Sadatsune T, De Carvalho Ramos M, Nolan LK, et al. Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105016
- [14] Maynard C, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC,

- Brousseau R, Masson L, Lariviere S, Harel J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(12): 5444-5452
- [15] Wang PY. Preliminary study on biological characteristics of uropathogenic *E. coli* in canines and cats[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2019 (in Chinese) 王鹏勇. 犬猫源尿路致病性大肠杆菌生物学特性初步研究[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2019
- [16] Wang Y, Zhang YD, Yi ZF, Xin SH, Tao CL, Li Y, Li T, Qi JJ, Tian MX, Ding C, et al. Molecular epidemiological investigation on serotype, phylogenetic group and virulence genes of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(9): 1159-1166 (in Chinese) 王瑶, 张耀东, 易正飞, 信素华, 陶程琳, 李妍, 李涛, 祁晶晶, 田明星, 丁铲, 等. 禽致病性大肠杆菌血清型、进化分群及毒力基因的分子流行病学调查[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(9): 1159-1166
- [17] Zhang R. Isolation and identification of swine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains and construction of *kspM-iucB* deleted mutant[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese) 张茹. 猪肠外致病性大肠杆菌分离鉴定及双基因缺失突变株构建[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2013
- [18] Zhu YC, Dong WY, Ma JL, Yuan LF, Hejair HMA, Pan ZH, Liu GJ, Yao HC. Characterization and virulence clustering analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from swine in China[J]. BMC Veterinary Research, 2017, 13(1): 94
- [19] Zhu XT. Isolation and identification of porcine extracorporeal pathogenic *Escherichia coli* and pathogenicity evaluation[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2018 (in Chinese) 朱雪婷. 猪源肠外致病性大肠杆菌的分离鉴定及致病性评价[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2018
- [20] Kawamura-Sato K, Yoshida R, Shibayama K, Ohta M. Virulence genes, quinolone and fluoroquinolone resistance, and phylogenetic background of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Japan[J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2010, 63(2): 113-115
- [21] Ding Y. Epidemiology investigation of porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* and functional study of regulator Ydiv[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese) 丁一. 猪源肠外致病性大肠杆菌流行病学调查及 Ydiv 功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2018
- [22] Maciel JF, Matter LB, Trindade MM, Camillo G, Lovato M, De Ávila Botton S, De Vargas AC. Virulence factors and antimicrobial susceptibility profile of extraintestinal *Escherichia coli* isolated from an avian colisepticemia outbreak[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 103: 119-122
- [23] Huang SH, Wan ZS, Chen YH, Jong AY, Kim KS. Further characterization of *Escherichia coli* brain microvascular endothelial cell invasion gene *ibeA* by deletion, complementation, and protein expression[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2001, 183(7): 1071-1078
- [24] Ewers C, Li GW, Wilking H, Kießling S, Alt K, Antão EM, Laturnus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they?[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2007, 297(3): 163-176
- [25] Chang AC, Krishnan S, Prasadara NV. The effects of cytotoxic necrotizing factor 1 expression in the uptake of *Escherichia coli* K1 by macrophages and the onset of meningitis in newborn mice[J]. Virulence, 2016, 7(7): 806-818
- [26] Gai WY, Wang J, Qu ZN, Wang JW, Huang XM, Wang YD, Zhao SJ, Hong J. Molecular classification and drug resistance analysis of *Escherichia coli* in Shandong Province[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2015, 27(2): 109-114 (in Chinese) 盖文燕, 王娟, 曲志娜, 王君玮, 黄秀梅, 王玉东, 赵思俊, 洪军. 山东地区大肠杆菌的耐药性及分子分型研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(2): 109-114
- [27] Hu L, Liu XY, Wang HJ, Zhuge XK, Dai JJ. Phylogenetic clustering and virulence-associated genes of avian pathogenic *Escherichia coli* in some areas of eastern China[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 46(1): 9-13 (in Chinese) 胡林, 刘晓燕, 王颢锦, 诸葛祥凯, 戴建君. 华东部分地区禽致病性大肠杆菌系统进化分群及毒力相关基因的检测[J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(1): 9-13
- [28] Jiang CY. Study on virulence genes of *E. coli* isolated from canine pyometra and its LD<sub>50</sub>, resistance and pathogenicity[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese) 蒋春阳. 犬子宫蓄脓大肠杆菌毒力基因及其 LD<sub>50</sub>、耐药性和致病性研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2014
- [29] Dissanayake DRA, Octavia S, Lan RT. Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 168(2/4): 403-412
- [30] Wang P. Genetic and virulence analysis of China outbreak associated *Escherichia coli* O157:H7 isolates[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2010 (in Chinese) 王婷. 中国大肠杆菌 O157:H7 暴发相关菌株的遗传学和毒力分析[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心博士学位论文, 2010