

< Original Article >

국내 분리 돼지 부종병 대장균의 병원성 유전자 및 시가독소 생성 검증

서병주 · 정창기 · 강아름 · 조호성 · 김원일*
전북대학교 수의과대학

Evaluation of the virulence genes and Shiga toxin-producing abilities of *Escherichia coli* field isolates causing edema disease in pigs

Byoung-Joo Seo, Chang-Gi Jeong, A-Rum Kang, Ho-Seong Cho, Won-Il Kim*

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea

(Received 13 February 2016; revised 29 May 2016; accepted 29 May 2016)

Abstract

Porcine edema disease (ED) is a communicable disease of pigs caused by infection with Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) which expresses F18 fimbriae and/or Stx type 2e (Stx2e). While STEC causes a severe illness including hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome in humans, it induces damage to the vascular endothelium, which results in edema, hemorrhage, and microthrombosis, leading in high mortality in pigs. In the present study, we cultured Stx2e-producing *E. coli* field isolates from conventional pig farms that experienced sudden deaths previously with symptoms similar to porcine edema disease, which were further investigated with Shiga toxin profiles. A total of 43 strains were identified from the collected samples by F18 or Stx2e specific PCR. Based on the PCR, 42 isolates out of 43 isolates were proved to carry one of F18 or Stx2e genes and 14 isolates to carry both F18 and Stx2e genes. All of the 30 isolates that harbored Stx2e gene induced the cytopathic effect (CPE) in vero cells and especially, the isolate 150229 produced the highest level of Shiga toxin. Therefore, we identified the virulence genes (F18 and Stx2e) and demonstrated Shiga toxin-producing abilities from porcine edema disease causing *E. coli* field isolates. These results suggested that one of the isolates could be a vaccine antigen candidate against STEC through further investigating to elicit an immune response.

Key words : Porcine edema disease, STEC, Shiga toxin, Cytotoxicity, F18, Stx

서 론

돼지 부종병(Porcine edema disease)은 시가독소 산생형 대장균(shiga toxin-producing *Escherichia coli*; STEC)에 의해 발생하는 질병으로 주로 4~8주령 이유자돈에 많이 발생하며, 대장균이 분비하는 시가독소에 의해 부종과 출혈성 병변을 나타낸다. 부종병은 돼지 뿐 아니라 다양한 동물에서 나타나며, 사람에게에는 용혈성 요독증과 출혈성 대장염을 유발

한다(Cornick 등, 2000; Bertin 등, 2001; Imberechts 등, 1992; Cornick 등, 2000; MacLeod 등, 1991; Matisse 등, 2003; Oanh et 등, 2011).

최근 국내 자료에 의하면 포유자돈에서는 F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) 등의 부착인자가 장관 상피세포에 부착한 이후 독소(주로 LT 또는 STb)를 분비함으로써 설사를 유발하였으나, 이유 후에는 부착인자가 F18이라는 섬모 항원으로 바뀌고 다양한 독소(LT, STa 또는 STb, Stx2e (부종병인자))가 관여하여 이유 전에 나타나는 병원성 대장균과는 다른 양상을 보인다. 특히 부종병 독소(Stx2e)를 분비하는 대장

*Corresponding author: Won-Il Kim, Tel. +82-63-270-3981, Fax. +82-63-270-3780, E-mail. kwi0621@jbnu.ac.kr

균(STEC: F18ab+Stx2e, Stx2e)이 증식하여 육성·비육돈에서 부종병을 일으키는 것으로 보고되었다(변재원, 2015).

부종병을 유발하는 대장균이 분비하는 시가 독소는 단량체인 A subunit과 오량체인 B subunit으로 이루어져 있고, 복합체의 분자량은 58~70 KDa으로 구성되어 있다(Fraser 등, 2004). A subunit은 세포 안으로 들어가 리보솜을 공격하여 단백질 합성을 저해하며, B subunit은 세포 수용체인 globotetraosylceramide와의 결합 및 세포독성의 특이성, 세포 외 정착성 및 항체형성에 관여하는 것으로 알려져 있다(Song 등, 1998; Cho 등, 2005; Takao 등, 1988; Cummings 등, 1998). 또한, 부종병 유발 인자 중 대장균이 보유한 섬모(Fimbria)이며, 대장균이 지니고 있는 여러 가지 섬모 항원 중 F18이 부종병을 유발 시키는 데에 크게 관여 한다고 보고되고 있다(Tseng 등, 2014; Gentry 등, 1980).

부종병 유발 대장균을 검출하기 위한 다양한 방법들이 개발되어 있으며, 주요 방법으로는 선택 배지를 이용한 균 분리 방법과 특이 primer를 이용한 PCR 방법이다. 또한, 시가 독소 검출은 일반적으로 세포 배양법을 통한 세포변성효과를 확인하거나, ELISA법 등을 이용하고 있다(Bettelheim 등, 2003; Kim 등, 2009). 이런 부종병 유발 대장균을 예방하기 위해 국내의 농가에서는 적절한 백신이나 이용 가능한 치료 방법이 있으나, 항생제의 사용은 항생제 내성균이 출현할 수 있는 우려가 있어 사용을 꺼려하는 실정이다. 이로 인해, 국내 뿐 아니라 국외에서도 항생제를 대체 할 수 있는 치료방법에 관한 연구가 활발히 진행 중에 있다(Lo 등, 2014).

본 연구는 국내 양돈장에 확보된 부종병 돼지 진단 케이스로부터 대장균을 분리하였으며, 분리된 대장균에 대한 병원성 유전자를 확인하였다. 병원성 유전자 검사를 통해 확인된 부종병 유발 대장균과 야외 분리 부종병 대장균의 시가독소 생산에 대한 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

공시재료

2014년부터 2015년 12월까지 전북대학교 동물질병 진단센터로부터 돼지 부종병으로 진단된 시료를 확

보하였다(Table 1). 돼지 분변 및 장기(폐, 비장 및 장) 1 g을 phosphate buffer saline (PBS) 9 mL에 희석하여 MacConkey 배지(MBcell, Seoul, Korea)에 37°C 조건으로 24시간 배양하였다. MacConkey 배지에서 핑크색을 나타내는 세균 집락(colony)을 혈액 배지(MBcell, Seoul, Korea)에 37°C 조건으로 24시간 배양하여 베타 용혈(β -hemolysis)을 나타내는 단일 세균 집락을 확보

Table 1. Information of edema disease cases used in the study

Case	Age	Tissue	Farm	Region
14005	90 days	Intestine	JH	Gyeongsan
14011	40 days	Intestine	CS	Yeongcheon
14169	Piglet	Feces	JH	Changwon
14171	60 days	Lung	KS	Unknown
14234	66 days	Feces	OH	Icheon
14307	Piglet	Feces	BJ	Hongseong
14338	Unknown	Spleen	JW	Yangpyeong
14351	10 days	Intestine	HL	Iksan
14414	60 days	Intestine	DS	Gimhae
14422	Piglets	Feces	GD	Hadong
14434	Porker	Feces	AT	Boryeong
14443	25 days	Feces	YD	Gangwon
14459	60 days	Spleen	BH	Jeoneup
14499	Sow	Feces	BH	Yeoncheon
14546	Unknown	Intestine	AM	Imsil
14561	Unknown	Intestine	BK	Kimhe
14612-1	Growing pig	Feces	JD	Jeju
14612-2	Porker	Feces	JD	Jeju
14618	100 days	Feces	JW	Cheonan
14724	Piglets	Intestine	ML	Sunchang
14762	Piglets	Feces	LH	Yangsang
14796	Growing pig	Feces	BL	Hadong
14819	Unknown	Feces	MW	Goryeong
14925-1	60 days	Lung	WA	Jinju
14925-2	60 days	Intestine	WA	Jinju
14977	30 days	Intestine	IS	Unknown
150029	50~70 days	Feces	GS	Hongseong
150047	Weaning pig	Intestine	TH	Heanam
150088	Unknown	Feces	KTJ	Jeonnam
150100	Unknown	Feces	YGM	Gyeongnam
150201	7 days	Intestine	BE	Wanju
150229	Weaning pig	Feces	GC	Haman
150298	100 days	Feces	WDG	Hapcheon
150311	120~140 days	Intestine	HA	Pochen
150315	40 days	Feces	JY	Gyeongsan
150477	Piglet	Intestine	DJ	Daejeon
150505	Weaning pig	Feces	BL	Pochen
150561	60 days	Intestine	EL	Wanju
150653	Unknown	Feces	JK	Gyeonggi
150707	Unknown	Feces	DY	Pochen
150834	110~130 days	Intestine	HS	Hwaseong
150837	Unknown	Intestine	WA	Unknown
150926	Unknown	Feces	SY	Hapcheon

하였으며, 증균 배양 및 시가 독소 생성을 확인하게 위해 LB (Affymetrix USB, CA, USA) 액체 배지에서 37°C 조건으로 48시간 배양 하여 본 연구에 사용하였다.

부종병 유발 대장균 검출을 위한 PCR

야외 분리 대장균에 대한 병원성 및 독소 유전자를 검증 확인하였다. Zhang 등(2007)의 방법에 따라, 병원성 및 독소 유전자를 검출하기 위한 primer는 Table 2과 같다. 야외 분리 대장균 배양액을 100°C에서 10분간 반응(boiling methods) 하고, 10,000 g로 5분간 원심분리하여 상층액을 사용하였다. PCR mixture의 조건은 3 µL template DNA와 1 µL의 각 primer (10 pM), 17 µL DW를 PCR premixture (AccuPower® Multiplex PCR PreMix, Bioneer, Daejeon, Korea)에 첨가하여 최종 volume이 20 µL가 되도록 하여 사용하였다. PCR 수행은 SimpliAmp Thermal Cycler (Life technologies, Carlsbad, California, USA)를 사용하였으며, 반응 조건은 pre-incubation을 95°C에서 15분간 반응한 후 denaturation은 95°C에서 30초, annealing은 63°C에서 90초, extension 72°C에서 90초로 25회 반복하고 72°C에서 10분간 반응하였다. PCR 수행 후 PCR 산물 10 µL를 3% agarose gel에 Red Safe™ (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea) 첨가하여 전기영동을 실시하였다. Zhang 등(2007)의 방법에 따라, DNA 밴드 사이즈를

확인하여 병원성 및 독소 유전자를 확인하였다.

세포변성효과 검증

야외 분리 대장균의 시가 독소 생성을 검증하기 위해 vero cells (ATCC CRL-1587)을 이용하여 세포변성 효과를 검증하였다(Schmitt 등, 1991). 야외 분리 대장균을 LB 액체 배지로 37°C 조건으로 48시간 배양하였으며, 배양된 대장균은 4,500 g로 30분간 원심분리하여 상층액을 회수 하였다. 0.22 mm 여과 필터(500 mL Corning Filter System, NY, USA)를 실시하여 상층액에 남아 있을 세균은 모두 제거하였다.

Vero cells은 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Welgene, Korea)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, NY, USA), 1% L-glutamine 200 mM (100X) (Gibco, NY, USA) 및 1% Antibiotic-Antimycotic (100X) (Gibco, NY, USA)를 사용하여 5% CO₂ 조건으로 37°C에서 배양하였다.

야외 분리 대장균 중 부종병 유발 대장균에서 생성되는 시가 독소에 대한 세포 독성 평가는 96 well tissue culture plates (Falcon, USA)에 부종병 유발 대장균 배양 상층액을 세포배양 배지로 십진 희석하고, vero cells이 배양된 96 well tissue culture plates에 분주하여 72시간 동안 세포변성효과를 확인하였다.

결 과

Table 2. Detection of virulence genes from *E. coli* isolates

Target gene	Primer sequences (5' to 3')	Product size
K88	TGAATGACCTGACCAATGGTGAACC GCGTTACTCTTTGAATCTGTCCGAG	484 bp
K99	GCGACTACCAATGCTTCTGCGAATAC GAACCAGACCAGTCAATACGAGCA	230 bp
987P (Pig)	GCCAGTCTATGCCAAGTGGATACTTC GTTTGTATCAGGATTCCTGTGGTGG	391 bp
F18	TGGCACTGTAGGAGATACCATTACAGC GGTTTGACCACCTTTCAGTTGAGCAG	334 bp
F41	TTAGCAGCGAAGATGAGTGATGGG GTACTACCTGCAGAAACACCAGATCC	515 bp
LT	ACGGCGTTACTATCCTGTCTATGTGC TTGGTCTCGTTCAGATATGTGATTCT	275 bp
STa	GTCAGTCAACTGAATCACTTGACTCT CATGGAGCACAGGCAGGATTACAACA	152 bp
STb	GCTACAAATGCCTATGCATCTACACA CATGCTCCAGCAGTACCATCTCTAAC	125 bp
Stx2e (Pig)	CGGTATCCTATTCCAGGAGTTTACG GTCTTCCGGCGTCAATCGTATAAACAG	599 bp

부종병 진단 돼지로부터 야외 대장균 분리

2014년부터 2015년 12월까지 돼지 부종병 진단 시료를 43개를 확보하였다. 확보된 진단 케이스의 분변 및 장기 조직으로부터 혈액 배지에서 베타 용혈을 나타내는 대장균 43주를 분리하였다(Table 1).

야외 분리 대장균의 병원성 유전자 검증

야외 분리 대장균 43주에 대한 병원성 유전자 검증 및 부종병 관련 유전자 검증을 PCR법으로 수행하였다. 대장균 43주 중 42주에서 부종병 관련 유전자인 Stx2e 혹은 F18 유전자 중 하나를 가지고 있었으며, 그 중 14주는 Stx2e와 F18 두 유전자 모두를 가지고 있었으며, 시가 독소 생성과 관련된 Stx2e 유전자를 갖는 30주도 확인하였다(Table 3). 그 외 다양한 병원

성 유전자도 함께 확인되었다.

시가 독소 생성 대장균 검증

야외 분리 대장균주에 대한 시가 독소 생성을 확인하기 위해 vero cells에서 세포변성효과를 확인하였다. 48시간 LB 액체 배지로 배양된 야외 분리 대장균

배양 상층액을 십진희석법으로 10⁶까지 희석하였으며, 96 well tissue plate에 monolayer로 배양된 vero cells에 투여하였다. 72시간 vero cells을 배양하며 시가 독소에 의한 세포 독성을 검증한 결과, 야외 분리

Table 3. Detection of virulence genes from *E. coli* isolates

Case	virulence gene
14005	Stx2e, F18
14011	Stx2e, F18
14169	Stx2e, F18
14171	Stx2e, F18
14234	Stx2e, F18
14307	Stx2e, STb
14338	Stx2e
14351	F18
14414	Stx2e, F18
14422	F18, STa
14434	F18, F41, K88, STa
14443	F18
14459	F18
14499	Stx2e, K88, LT, STa,
14546	Stx2e, F18
14561	F18, F41, STb
14612-1	F18, F41, Sta
14612-2	Stx2e, F18, F41, STa
14618	F18, K88, Sta
14724	Stx2e, F41, K99
14762	Stx2e, LT, STb
14796	Stx2e, K99, LT, 987p
14819	F18, STa, 987p
14925-1	Stx2e
14925-2	Stx2e
14977	Stx2e, F18, LT, STa
150029	Stx2e
150047	Stx2e, F18, LT, STb
150088	Stx2e, 987p
150100	Stx2e, STb
150201	Stx2e, LT
150229	Stx2e, F18
150298	Stx2e, F18
150311	F18
150315	F41
150477	Stx2e, F18
150505	F18
150561	Stx2e, F18, LT, STa
150653	F18, STa, STb
150707	Stx2e, STa, STb
150834	Stx2e
150837	Stx2e
150926	Stx2e

Table 4. Evaluation of cytotoxicity for *E. coli* isolates in vero cells

Strains	Dilution					
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
14005	+ ^{a)}	+	- ^{b)}	-	-	-
14011	+	-	-	-	-	-
14169	+	+	-	-	-	-
14171	+	+	-	-	-	-
14234	+	-	-	-	-	-
14307	+	-	-	-	-	-
14338	+	-	-	-	-	-
14351	-	-	-	-	-	-
14414	+	+	-	-	-	-
14422	-	-	-	-	-	-
14434	-	-	-	-	-	-
14443	-	-	-	-	-	-
14459	-	-	-	-	-	-
14499	+	-	-	-	-	-
14546	+	+	-	-	-	-
14561	-	-	-	-	-	-
14612-1	+	-	-	-	-	-
14612-2	-	-	-	-	-	-
14618	-	-	-	-	-	-
14724	+	-	-	-	-	-
14762	+	-	-	-	-	-
14796	+	-	-	-	-	-
14819	-	-	-	-	-	-
14925-1	+	-	-	-	-	-
14925-2	+	+	-	-	-	-
14977	+	+	-	-	-	-
150029	+	-	-	-	-	-
150047	+	-	-	-	-	-
150088	+	-	-	-	-	-
150100	+	+	-	-	-	-
150201	+	-	-	-	-	-
150229	+	+	+	+	-	-
150298	+	+	-	-	-	-
150311	-	-	-	-	-	-
150315	-	-	-	-	-	-
150477	+	+	-	-	-	-
150505	-	-	-	-	-	-
150561	+	+	+	-	-	-
150653	-	-	-	-	-	-
150707	+	+	-	-	-	-
150834	+	+	-	-	-	-
150837	+	+	+	-	-	-
150926	+	+	+	-	-	-

^{a)}Cytopathic effect.

^{b)}None cytopathic effect.

대장균 중 Stx2e 유전자를 포함하는 29주에서 세포 변성효과를 확인 할 수 있었으며, 대부분의 야외 분리 대장균에서 생성되는 시가 독소는 희석배수 10^1 에서 10^3 까지 세포변성효과를 나타내었다. 야외 분리 대장균 중 150229주는 희석배수 10^4 까지 세포변성효과가 나타나 가장 높은 시가 독소 생성을 확인하였다 (Table 4).

고 찰

돼지 부종병은 특정 계절에 제한되어 발생되지 않으며 신경장애, 설사, 기립 불능 등의 증상이 발생하고 높은 폐사율을 나타내어 양돈 산업에 큰 경제적 손실을 주는 질병이다. 국내 부종병의 경제적 손실은 모든 100두 규모 농장에서 부종병 발생시 대략 30%의 폐사율을 적용할 경우 연간 2억원 정도의 피해가 발생하며, 폐사돈 처리용을 감안하면 피해는 더욱 커질 것으로 보고되어져 있다(변재원, 2015). 최근 영국에서 보고된 자료에는 돼지에서 발생한 대장균성 질병 중 부종병이 차지하는 비율이 5~10% 정도이며, 특히 13~14년도에 큰 폭으로 증가된 것으로 확인되었다(Emerging Threats Quarterly Report, 2014). 또한, Zhang 등(2007)의 보고에 의하면, 돼지로부터 확보된 분변 및 장으로부터 304개의 대장균을 분리하였으며, 그 중 107개의 대장균에서 fimbrial 유전자 K88 (64.6%), F18 (34.3%), F41 (0.57%), K99 (0.57%), 987P (0)와 독소 유전자 LT (57.7%), STb (72.6%), STa (27.4%), STx2e (17.4%), EAST1 (35%)를 확인하였다.

본 연구는 2014년부터 2015년 12월까지 전북대학교 동물질병진단센터로부터 돼지 부종병 진단 시료를 확보하여, 돼지 부종병 의심 대장균 43주를 분리하였다. 42개의 부종병 진단 시료의 분변 및 장에서 부종병 관련 유전자인 Stx2e 혹은 F18 유전자 중 하나를 가지고 있었으며, 그중 14개의 부종병 진단 시료에서는 Stx2e와 F18 두 유전자를 모두 확인되었다. 또한, Stx2e 유전자를 내제하는 야외 분리 대장균에서 희석배수 10^3 까지 세포변성효과를 나타냈으며, 그중 150229주는 희석배수 10^4 까지 세포변성효과가 나타나 가장 높은 시가 독소 생성을 확인되었다. 국내 양돈 농가에서 확보된 부종병 의심 케이스 중 약 97%가 부종병 관련 유전자를 갖고 있는 대장균으로 확인되었으며, 그 중 Stx2e 유전자가 포함된 대장균에서 시가 독소 생성을 확인되었다.

이에 본 연구를 통해 국내 다양한 지역에서 발생하는 부종병 의심 케이스를 진단하고, 부종병 유발 대장균이 생산하는 시가 독소의 역할을 측정하여 향후 지속적인 돼지 부종병 진단에 활용 할 수 있는 자료가 될 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 국내 다양한 지역에서 확보된 부종병 의심 케이스를 다양한 방법으로 진단하였으며, 야외 분리 부종병 대장균을 확보하여 시가 독소 생산능을 분석하였다. 부종병 의심 병변을 나타낸 돼지에서 대부분 부종병 관련 병원성 유전자인 F18과 Stx2e 유전자가 검출하였으며, Stx2e 유전자를 내제한 대장균에서는 시가 독소 생성을 확인하였다. 본 결과를 토대로 시가 독소 생성이 우수한 야외 분리 부종병 유발 대장균을 이용하여 국내 실정에 맞는 부종병 진단 항체 개발 및 사독 백신으로 활용이 가능하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사업 (관리번호: 1121314)의 지원에 의해 수행된 것입니다.

REFERENCES

- 변재원. 2015. 돼지 부종병의 원인과 대책. 월간한돈 2015년 12월호
- Bertin Y, Boukhors K, Pradel N, Livrelli V, Martin C. 2001. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol* 39: 3060-3065.
- Bettelheim KA, Beutin L. 2003. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VETC/STEC). *J Appl Microbiol* 95: 205-217.
- Cho EJ, Kim DK, Kim SH, Kim YI, Lee CH, Lee WW, Son WG, Shin JU, Kim YH. 2005. Induction of Deletion Mutation for the Enzymatic Domain in the Shiga toxin 2e A Subunit Gene of *Escherichia coli* O139 Isolates and Expression of Mutated Protein. *J Vet Clin* 22: 386-391.
- Cornick NA, Matisse I, Samuel JE, bosworth BT, Moon HW. 2000. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection: Temporal and Quantitative Relationships among Coloni-

- zation, Toxin Production, and Systemic Disease. *Journal of Infectious Diseases* 181: 242-251.
- Cummings MD, Ling H, Armstrong GD, Brunton JL, 1998. Read RJ. Modeling the carbohydrate-binding specificity of pig edema toxin. *Biochem* 37: 1789-1799.
- Emerging Threats Quarterly Report, Pig diseases. 2014. AHVLA Regional Laboratories and SACCVS Veterinary Surveillance Centres, Quarterly Report 2014.
- Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-Celsa AR, Twiddy EM, O'Brien AD, James MN. 2004. Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* 279: 27511-27517.
- Gentry MK, Dalrymple JM. 1980. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. *J Clin Microbiol* 12: 361-366.
- Imberechts H, De Greve H, Lintermans P. 1992. The pathogenesis of edema disease in pigs. A review. *Vet Microbiol* 31: 221-233.
- Kim MJ, Kim SH, Kim TS, Kee HY, Seo JJ, Kim ES, Park JT, Chung JK, Lee JE. 2009. Identification of Shiga Toxin-producing *E. coli* Isolated from Diarrhea Patients and Cattle in Gwangju Area, Korea. *J Bacteriol Virol* 39: 29-39.
- Lo AWH, Moonens K, Kerpel MD, Brys L, Pardon E, Remaut H, Greve HD. 2014. The Molecular Mechanism of Shiga Toxin Stx2e Neutralization by a Single-domain Antibody Targeting the Cell Receptor-binding Domain. *J Biol Chem* 289: 25374-25381.
- MacLeod DL, Gyles CL, Wilcock BP. 1991. Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant. *Vet Pathol* 28: 66-73
- Matise I, Cornick NA, Samue JE, Moon HW. 2003. Binding of shiga toxin 2e to porcine erythrocytes in vivo and in vitro. *Infect Immun* 71: 5194-5201.
- Oanh TK, Nguyen VK, De Greve H, Goddeeris BM. 2011. Protection of piglets against Edema disease by maternal immunization with Stx2e toxoid. *Infect Immun* 80: 469-473.
- Schmitt CK, McKee ML, O'Brien AD. 1991. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect Immun* 59: 1065-1073.
- Song HJ, Chai HS. 1998. Colibacillosis in domestic animals, a review. *Korean J Vet Serv* 21: 413-429.
- Tseng M, Fratamico PM, Manning SD, Funk JA. 2014. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine: the public health perspective. *Animal Health Research Reviews* 15: 63-75.
- Takao T, Tanabe, T, Hong YM, Shimonishi Y, Kurazono H, Yutsudo T, Sasakawa C, Yoshikawa M, Takeda Y. 1988. Identity of molecular structure of Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157:H7 with that of Shiga toxin. *Microb Pathog* 5: 57-69.
- Zhang W, Zhao M, Ruescg L, Omot A, Francis D. 2007. Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhea. *Vet Microbiol* 123: 145-152.