



## 苏北地区规模化猪场产肠毒素大肠杆菌的分离鉴定及灭活疫苗效果评估

杨德鸿<sup>1#</sup>, 张鹏<sup>1#</sup>, 于沛欣<sup>1</sup>, 任建鸾<sup>1</sup>, 李德志<sup>1</sup>, 王娟芳<sup>1</sup>, 孙建和<sup>2</sup>, 汤芳<sup>1\*</sup>, 戴建君<sup>1</sup>

<sup>1</sup>南京农业大学, 农业部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095

<sup>2</sup>上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240

**摘要:**【目的】产肠毒素大肠杆菌(*Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)是引起仔猪腹泻的重要病原菌, 本研究通过调查苏北地区规模化猪场 ETEC 的流行情况, 分析其生物学特性, 研制具有免疫保护效果的优势血清型菌株的灭活疫苗, 以期对苏北地区 ETEC 的防控提供参考。【方法】从苏北地区规模化猪场采集 3–30 日龄的仔猪新鲜粪样、肛拭子及小肠组织样, 分离出 ETEC, 对分离菌株进行血清型鉴定、耐药性测定、小鼠致病力测定; 最后通过动物免疫试验研究优势血清型菌株灭活疫苗对小鼠的免疫保护效果。【结果】从 21 个规模化猪场采集病料 562 份, 通过 PCR 鉴定及测序得到 141 株 ETEC; 血清凝集试验鉴定出 85 株菌的 O 抗原血清型, 其中 O8、O101 和 O128 为优势血清型, 占定型菌株的 61.2% (52/85), 其他血清型包括 O9、O3、O20、O148、O149 等; 分析 141 株 ETEC 对 14 种常见抗生素的耐药情况, 得出分离株对新霉素、红霉素、四环素、庆大霉素、强力霉素、阿莫西林、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑高度耐药, 耐药率均高达 80% 以上; 对恩诺沙星敏感性较高, 敏感率达 50.4% (71/141); 对多粘菌素 B 和头孢噻肟中介耐药, 占比分别为 66% (93/141) 和 51.8% (73/141); 多重耐药现象严重, 其中 10 重耐药的菌株占比最大, 为 19% (27/141); 小鼠攻毒试验测得 O8 血清型强毒株 YC-6 的半数致死量 (median lethal dose,  $LD_{50}$ ) 为  $1.4 \times 10^7$  CFU/只, 最低致死量 (minimum lethal dose, MLD) 为  $3 \times 10^7$  CFU/只; O8 血清型强毒株 YC-6 和 O101 血清型强毒株 LYG-3 制备的单价灭活疫苗对小鼠的保护率均达到 100%, 因此利用 O8 血清型强毒株 YC-6 和 O101 血清型强毒株 LYG-3 研制二价灭活疫苗, 结果显示该二价疫苗对感染不同血清型 ETEC 小鼠的保护率在 83% 以上。【结论】本研究通过对苏北地区 ETEC 的流行病

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500800); 江苏省自然科学基金优秀青年基金(BK20180075); 上海市兽医生物技术重点实验室开放基金(klab201709)

#共同第一作者。

\*通信作者。E-mail: tfalice@126.com

收稿日期: 2019-03-30; 修回日期: 2019-05-30; 网络出版日期: 2019-06-28

学调查, 得出其优势血清型, 并研制出针对对优势血清型免疫保护效果较好的二价灭活疫苗, 给临床 ETEC 的监测和防控提供参考。

**关键词:** 产肠毒素大肠杆菌, 分离鉴定, 血清型, 耐药性, 灭活疫苗

仔猪腹泻是一个多因素疾病, 同时也是近年来导致规模化猪场初生仔猪死亡的常见疾病, 严重阻碍了养猪业的健康发展。仔猪腹泻通常是由许多非传染性因素及传染性因素相互作用导致的, 非传染性因素包括饲养管理的不足、环境消毒的疏忽、温湿度控制不到位以及应激等; 传染性因素包括环境与肠道中的细菌、病毒以及寄生虫等病原微生物。仔猪腹泻的发生通常与一种或多种病原微生物有关, 但是腹泻的暴发往往是多种因素造成的。与仔猪腹泻相关的肠道病原菌有很多, 由于地域的不同, 病原菌的流行情况也不尽相同, 而 ETEC 是导致仔猪腹泻的主要病原菌<sup>[1]</sup>, 其感染仔猪后通常引起 1-7 日龄仔猪拉带泡沫样稀粪的黄痢, 10-30 日龄拉稍粘稠的白痢, 导致仔猪死亡、生长停滞成为僵猪、饲料报酬率变低和一些其他的继发疾病感染, 是规模化养殖场始终存在、难以根除的细菌性传染病, 在猪的病原学上具有重要意义<sup>[2]</sup>。

ETEC 在不同地区流行的优势血清型有较大差异, 而且在相同地区的不同猪场之间流行的血清型也有差别。因此分析各地区 ETEC 流行菌株的血清型与耐药性, 研制优势血清型菌株的灭活疫苗, 对临床养殖业的健康发展具有重要意义。本研究通过调查苏北地区 21 个规模化猪场 ETEC 菌株的血清型、耐药性和致病力, 研制出以小鼠为模型的保护性二价灭活疫苗, 对临床生产中由 ETEC 引起的仔猪腹泻的防控具有一定的指导意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要仪器和试剂

PCR 仪购自日本 TaKaRa 公司; 凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司; 分光光度计购自美国 Bio-Rad 公司; MAC (MacConkey Agar) 培养基购自英国 Oxoid 公司; MHA (Mueller-Hinton Agar) 培养基购自英国 Oxoid 公司; 胰蛋白胨(Tryptone)、酵母提取物(Yeast Extract)购自英国 Oxoid 公司; 2×PCR mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 药敏片购自杭州滨和微生物试剂有限公司; 猪大肠杆菌标准血清购自天津生物芯片有限责任公司; 佐剂购自法国 SEPPIC 公司。

### 1.2 样本采集及处理

2017-2018 年从苏北地区 21 个现代规模化猪场采集黄白痢发病仔猪新鲜粪便、肛拭子和小肠组织样品, 将采集的样品放 4 °C 保存, 并于 7 d 内带回试验室分离细菌。将样品分别进行 MAC 平板划线, 倒置放于 37 °C 恒温培养箱培养 12-16 h, 然后挑取粉红色或红色疑似大肠杆菌单菌落(图 1)于 LB 试管中, 放 37 °C 摇床 180 r/min 培养 8-12 h, 与 50 % 甘油 1:1 混合放于 -40 °C 冻存备用。

### 1.3 ETEC 的分离鉴定

采用 PCR 方法, 快速对疑似菌株进行分类和筛选, 不耐热肠毒素(heat labile enterotoxin, LT)和耐热肠毒素(heat stable enterotoxin, ST)是 ETEC 的重要毒力因子<sup>[3]</sup>, 本实验室通过设计合成

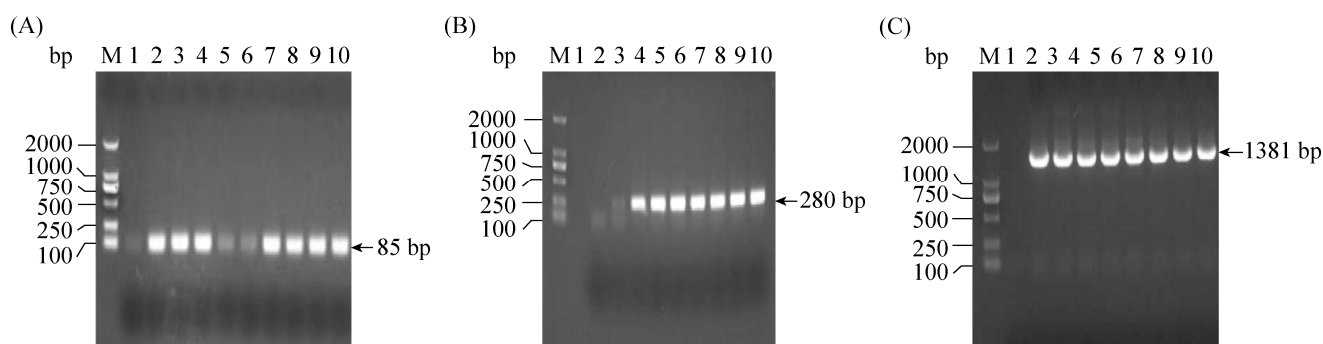


图 1. 基因扩增条带

Figure 1. Amplification of genes. A: Amplification of ST gene. M: DL marker 2000; Lane 1: Negative control; Lane 10: Positive control; Lane 2–9: Sample to be tested. B: Amplification of LT gene. M: DL marker 2000; Lane 1: Negative control; Lane 10: Positive control; Lane 2–9: Sample to be tested. C: Amplification of *16S rRNA* gene. M: DL marker 2000; Lane 1: Negative control; Lane 10: Positive control; Lane 2–9: Sample to be tested.

LT-F/LT-R 和 ST-F/ST-R 两对引物(表 1)扩增 ETEC 特异性片段, 筛选出含有 LT 或 ST 基因菌株, 同时扩增菌株的 *16S rRNA* 基因, 将扩增后的产物送生物公司进行测序, 由此筛选得到含有 LT 或 ST 基因的 ETEC 菌株。将分离株转接于 LB 试管中, 37 °C 条件下培养 6–8 h, 与 50 % 甘油 1:1 混合冻存储用。

### 1.4 血清型鉴定

通过查阅相关文献<sup>[4-5]</sup>, 找出 ETEC 的常见 O 抗原血清型有 O2、O3、O8、O9、O24、O45、O55、O101、O104、O111、O115、O119、O137、O138、O139、O141、O147、O149。从公司购买专用鉴定 ETEC O 抗原的血清进行玻片凝集试验, 使用

对应常见 7 种多价血清和 37 种单因子血清对分离株定型, 生理盐水作为对照, 记录玻片凝集试验出现 2+ 以上的阳性结果, 将菌株培养至对数期, 随后 5000×g 离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 遍, 之后等体积重悬于 PBS 中; 将菌体重悬液分别与相应的 O 抗原标准血清混合进行玻片凝集试验(表 2)。

### 1.5 药敏试验

根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的标准进行药敏试验。提前准备好 MHA 平板, 每块平板约 20–30 mL 培养基, 接着用 MH 培养基将分离的 ETEC 菌株

表 1. ETEC 特异性引物  
Table 1. Specific primer of ETEC

Primer	Primer sequences (5'→3')	Annealing temperature/°C	Product size/bp
ST-F	AGCCCCGCATCCAGTTAT	51.3	85
ST-R	CGAGTGACGGCTTTGTAG		
LT-F	ACGGCGTTACTATCCTCT	49	280
LT-R	CAATTTTGGTCTCGGTCA		
16S rRNA-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55	1381
16S rRNA-R	GGTACCTTGTTACGACTT		

表 2. 玻片凝集试验结果判断标准  
Table 2. Standard determination of serum agglutination test

Degree of reaction	Phenomenon of agglutination reaction
4+	After the reaction, the liquid is clear and transparent with more and larger aggregated particles.
3+	After the reaction, the liquid was clear and transparent with more and smaller aggregated particles.
2+	After the reaction, the liquid was somewhat turbid, but more aggregated particles were still visible.
1+	After the reaction, the liquid was very turbid with only a few agglutinated particles.
-	After the reaction, the liquid was completely turbid without agglutination.

培养至  $OD_{600}=0.08-0.13$ , 使用灭菌棉签将每个菌液均匀涂布于 2 块 MHA 平板上, 然后将新霉素、氟苯尼考、丁胺卡那、红霉素、庆大霉素、恩诺沙星、环丙沙星、多粘菌素 B、头孢噻肟、强力霉素、阿莫西林、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑、四环素、氯霉素等 14 种抗生素药敏片平均贴于涂有细菌的平板上, 将贴好药敏片的平板倒置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  温箱培养 12–16 h, 记录每种药敏片对所分离 ETEC 菌株的抑菌圈直径大小, 判断 ETEC 的耐药性。

### 1.6 小鼠致病性试验

将 ETEC 优势血清型 O8 和 O101 分离株培养至对数期, 用 PBS 洗菌 2 次, 重悬调整其浓度, 以  $5\times 10^7$  CFU/只腹腔攻毒 4 周龄 ICR 小鼠, 每个 ETEC 菌株攻毒 6 只小鼠, 筛选优势血清型强毒株。挑选其中一株优势血清型强毒株, 以不同浓度腹腔攻毒 4 周龄 ICR 小鼠, 每组 6 只小鼠, 测定其  $LD_{50}$  及 MLD, 并设置 PBS 对照组。

### 1.7 免疫保护试验

将优势血清型 O8 强毒株 YC-6 和 O101 强毒株 LYG-3 培养至对数期, 加入终浓度为 0.4% 的甲醛溶液, 放于恒温摇床  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、90 r/min 条件下灭活 24 h, 将灭活后的菌液用 pH=7.4 的 PBS 洗涤 2 次, 再用 PBS 重悬, 将两株菌浓度均调整为  $4\times 10^9$  CFU/mL, 分别取 100  $\mu\text{L}$  灭活后的菌液涂

布于 LB 平板培养 24 h, 观察是否有菌落生长, 进行安全性检验; 检验合格后分别等体积加入  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  的 ISA206 佐剂充分乳化, 置于  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min, 观察是否分层, 若无分层且呈均匀的乳白色则表示乳化完成; 将乳化好的单价灭活疫苗以  $2\times 10^8$  CFU 免疫小鼠, 每组 6 只, 免疫采用 0.2 mL/只腹腔注射 4 周龄 ICR 小鼠, 免疫 2 周后二次免疫, 二免 1 周后以  $5\times 10^7$  CFU/只剂量攻毒, 观察 7 d, 记录各组小鼠死亡情况。

按照单价灭活疫苗的制备方法, 将优势血清型 O8 强毒株 YC-6 和 O101 强毒株 LYG-3 分别调整浓度为  $4\times 10^9$  CFU/mL, 然后等体积混合乳化制备二价灭活疫苗, 用二价灭活疫苗腹腔免疫 4 周龄 ICR 小鼠, 分别设置 4 组免疫组和 1 组 PBS 对照组, 二免后 1 周分别用 O8 强毒株 SQ-9 和 YC-6、O101 强毒株 LYG-3 和 XZ-16 以 10 倍  $LD_{50}$  剂量对小鼠进行腹腔攻毒, 每组 6 只, 观察 7 d, 记录各组小鼠死亡情况。

### 1.8 血清抗体效价测定

对 O8 血清型菌株 YC-6 免疫后的小鼠进行了抗体效价的测定, 分别在免疫前 2 d、免疫后 10 d 和 18 d 采取小鼠眼眶血液, 经离心得到上层血清, 置于离心管中保存, 通过间接 ELISA 测定疫苗免疫小鼠后血清抗体效价。

## 2 结果和分析

### 2.1 ETEC 的分离鉴定

从苏北地区 21 个现代化规模化猪场共计采样 562 份, 经划线、挑单菌落和纯培养共获得疑似大肠杆菌 792 株。用特异性引物扩增 ETEC 特异性基因 ST 和 LT, 分别在 85 bp 和 280 bp 位置出现特异性条带(图 1-A、B), 与预期大小一致。16S *rRNA* 扩增出现 1381 bp 的特异性条带(图 1-C), 与预期大小一致。经测序比对, 所分离菌株与大肠杆菌 16S *rRNA* 基因序列的同源性达到 99%, 由此可以确定为猪大肠杆菌。经毒力基因鉴定和测序分析, 总计分离出 141 株 ETEC (表 3)。

结果显示, 所分离株 O 抗原血清型种类较多(表 4), 覆盖大肠杆菌 18 种血清型, 最终定型 85 株, 占 ETEC 分离株总数的 61.3%; 其中 O8、O101 和 O128 为优势血清型, 分离得到 O8 血清型 25 株、O101 血清型 17 株、O128 血清型 10 株, 分别占定型菌株数的 29.4%、20% 和 11.8%。其他血清型包括 O9、O3、O20、O148、O149 等。同时查阅相关文献得知 O8 血清型大肠杆菌为引起腹泻的主要血清型, 与本研究所得结果一致。

### 2.2 药敏试验

药敏试验结果表明, 多粘菌素 B、恩诺沙星、头孢噻肟、丁胺卡那、氟苯尼考、环丙沙星具有

表 3. ETEC 分离鉴定情况

Table 3. Isolation of ETEC from samples

Samples	Number of samples	Number of positive samples	Positive rate/%
Fecal samples	506	473	93.5
Viscera samples	56	55	98.2
Total samples	562	528	94
Suspected	792		
<i>Escherichia coli</i>			
ETEC	141		

表 4. ETEC 分离株血清型鉴定情况

Table 4. Identification of serotypes of isolated ETEC strains

Serotypes	Number of strains	Percentage of the identified strains/%
O8	25	29.4
O101	17	20
O128	10	11.8
O9	4	4.7
O3	3	2.1
O20	3	2.1
O148	3	2.1
O149	3	2.1
O111	3	2.1
O138	3	2.1
O139	2	1.4
O141	2	1.4
O25	2	1.4
O115	1	0.7
O119	1	0.7
O153	1	0.7
O45	1	0.7
O89	1	0.7

较好的抑菌效果, 敏感菌株占比分别为 68.1%、66%、56%、54.6%、47.5% 和 48.2% (表 5), 表明多粘菌素 B 的抑菌效果最好。

本研究中的 141 株 ETEC 耐药性严重, 对 14 种抗生素普遍耐药(图 2)。其中对红霉素和强力霉素耐药率高达 100%; 对新霉素、庆大霉素、阿莫西林、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑、四环素、氯霉素耐药率均达 80% 以上。

分析 141 株 ETEC 的多重耐药情况得知, 所有菌株均至少对 6 种抗生素耐药(图 3), 其中具有 8 重、9 重、10 重、11 重、12 重、13 重耐药性的菌株较为广泛, 依次分别为 17%、16.3%、19.1%、15.6%、10.6%、11.3%, 占所分离 ETEC 菌株总数的 89.9%, 其中有 4 株细菌对 14 种抗生素均耐药, 提醒我们细菌耐药范围趋于广泛, 现代化规模化养殖应选择具有针对性药物进行治疗和防控, 才有可能控制疾病的蔓延, 避免形成广谱耐药菌。

表 5. 141 株 ETEC 菌株药敏试验结果

Table 5. Antimicrobial susceptibility test results of 141 ETEC strains

Antibiotics	Disk diffusion/mm			Number of strains		
	R	I	S	R	I	S
Neomycin	≤ 17	17–23	≥ 23	134 (95%)	7 (5%)	–
Florfenicol	≤ 14	15–16	≥ 17	74 (52.5%)	24 (17%)	43 (30.5%)
Amikacin	≤ 14	15–16	≥ 17	64 (45.4%)	40 (28.4%)	37 (26.2%)
Erythromycin	≤ 13	14–22	≥ 23	141 (100%)	–	–
Gentamicin	≤ 12	13–14	≥ 15	114 (80.9%)	19 (13.5%)	8 (5.6%)
Enrofloxacin	≤ 12	13–15	≥ 16	48 (34%)	22 (15.6%)	71 (50.4%)
Ciprofloxacin	≤ 15	16–20	≥ 21	73 (51.8%)	47 (33.3%)	21 (14.9%)
Polymyxin b	≤ 8	9–11	≥ 12	45 (31.9%)	93 (66%)	3 (2.1%)
Cefotaxime	≤ 16	16–25	≥ 26	62 (44%)	73 (51.8%)	6 (4.2%)
Doxycycline	≤ 18	18–22	≥ 23	141 (100%)	–	–
Amoxicillin	≤ 13	14–16	≥ 17	130 (92.2%)	2 (1.4%)	9 (6.4%)
Trimethoprim/sulfamethoxazole	≤ 10	11–15	≥ 16	136 (96.5%)	2 (1.4%)	3 (2.1%)
Tetracycline	≤ 14	15–18	≥ 19	140 (99.3%)	1 (0.7%)	–
Chloramphenicol	≤ 12	13–17	≥ 18	117 (83%)	8 (5.7%)	16 (11.3%)

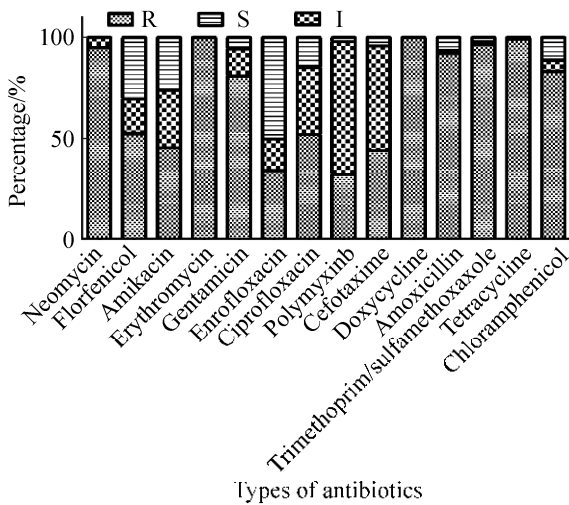


图 2. 141 株 ETEC 药敏试验结果

Figure 2. Results of antibiotic sensitivity test of 141 ETEC strains.

### 2.3 小鼠致病性试验

**2.3.1 分离株致病力测定:** 将 O8 和 O101 血清型分离株对小鼠进行腹腔攻毒, 结果显示, O8 血清型有 8 株菌致死全部小鼠, 占 O8 血清型测定菌株的 38.1%; O101 血清型有 5 株菌致死全部小鼠,

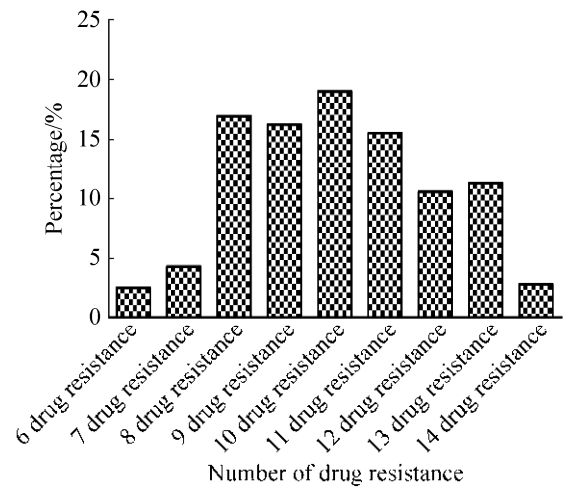


图 3. 141 株 ETEC 多重耐药性结果

Figure 3. Results of multidrug resistance of 141 ETEC strains.

占 O101 血清型测定菌株的 29.4%; PBS 对照组小鼠无死亡。

**2.3.2  $LD_{50}$  和 MLD 的测定:** 选取优势血清型 O8 强毒株 YC-6 测定其  $LD_{50}$  (表 6), 得出其  $LD_{50}$  为  $1.4 \times 10^7$  CFU; 然后再进行梯度稀释测定 YC-6 强

毒株的 MLD (表 7), 得出其 MLD 为  $3 \times 10^7$  CFU。

### 2.4 灭活疫苗对小鼠的保护效果

首先, 本研究确定了单价灭活疫苗的免疫保护效果, 同型 O 血清型菌株交叉保护率高, O8 血清型强毒株 YC-6 和 O101 强毒株 LYG-3 制备的单价疫苗对感染同种血清型大肠杆菌小鼠的保护率均达到 100% (表 8, 9)。

接着将 O8 血清型强毒株 YC-6 和 O101 强毒株 LYG-3 混合制备二价灭活疫苗, 结果显示, 二价灭活疫苗对 O8 和 O101 血清型的强毒株具有较好的保护效果, 对小鼠的保护率均在 83% 以上, PBS 免疫组小鼠经攻毒感染后 48 h 内全部死亡, 同时用 PBS 腹腔注射免疫组与对照组均无死亡(表 10)。表明该优势菌株制备的二价灭活疫苗对同种血清型菌株具有良好免疫保护效果。

### 2.5 血清抗体效价测定

为探究免疫后小鼠体内抗体水平, 我们选取 O8 血清型免疫组小鼠, 用 ELISA 方法测定其抗体效价, 结果显示免疫组血清均为阳性, PBS 对照和空白组均为阴性。比较一免和二免其血清抗体效价差异显著, 两组小鼠同时免疫相同剂量疫苗

作为平行对照, 发现一免后抗体上升较为缓慢, 二免之后抗体水平显著上升。两组小鼠的血清抗体效价水平存在差异, 这可能与小鼠个体差异有关(图 4)。

表 6. 优势血清型菌株对小鼠的半数致死量( $LD_{50}$ )测定

Table 6.  $LD_{50}$  of dominant serotype strain on mice

Dose/CFU	Number of challenged mice	Deaths
$2 \times 10^8$	6	6
$1 \times 10^8$	6	6
$2 \times 10^7$	6	6
$1 \times 10^7$	6	2
$2 \times 10^6$	6	0
$1 \times 10^6$	6	0
$2 \times 10^5$	6	0
PBS	6	0

表 7. 优势血清型菌株小鼠最低致死量(MLD)测定

Table 7. MLD of dominant serotype strain on mice

Dose/CFU	Number of challenged mice	Deaths
$6 \times 10^7$	6	6
$5 \times 10^7$	6	6
$4 \times 10^7$	6	6
$3 \times 10^7$	6	6
$2 \times 10^7$	6	5
$1 \times 10^7$	6	1
$2 \times 10^6$	6	0
PBS	6	0

表 8. O8 血清型单价灭活疫苗对小鼠的保护效果测定

Table 8. Immunoprotective effect of O8 monovalent inactivated vaccine on mice

Strains	Serotypes	Dose/CFU	YCDF1-6 immunization		PBS control	
			Deaths	Protection rate/%	Deaths	Protection rate/%
XZ-17	O8	$5 \times 10^7$	0/6	100	6/6	0
XZ-10	O8	$5 \times 10^7$	0/6	100	6/6	0
SQ-9	O8	$5 \times 10^7$	0/6	100	6/6	0
HA-3	O8	$5 \times 10^7$	0/6	100	6/6	0
YC-6	O8	$5 \times 10^7$	0/6	100	6/6	0
YC-7	O8	$5 \times 10^7$	0/6	100	6/6	0
LYG-3	O101	$5 \times 10^7$	1/6	83.3	6/6	0
XZ-16	O101	$5 \times 10^7$	2/6	66.7	6/6	0
PBS	-		0/6	100	0/6	100

表 9. O101 血清型单价灭活疫苗对小鼠的保护效果测定

Table 9. Immunoprotective effect of O101 monovalent inactivated vaccine on mice

Strains	Serotypes	Dose/CFU	LYGML-3 immunization		PBS control	
			Deaths	Protection rate/%	Deaths	Protection rate/%
LYG-3	O101	$5 \times 10^7$	0/6	100	6/6	0
XZ-16	O101	$5 \times 10^7$	0/6	100	6/6	0
YC-6	O8	$5 \times 10^7$	2/6	66.7	6/6	0
SQ-9	O8	$5 \times 10^7$	1/6	83.3	6/6	0
PBS	-		0/6	100	0/6	100

表 10. 二价灭活疫苗对小鼠的免疫保护效果

Table 10. Immunoprotective effect of bivalent inactivated vaccine on mice

Strains	Serotypes	Dose/CFU	YC-6+LYG-3 immunization		PBS control	
			Deaths	Protection rate/%	Deaths	Protection rate/%
YC-6	O8	$1 \times 10^8$	1/6	83.3	6/6	0
SQ-9	O8	$1 \times 10^8$	0/6	100	6/6	0
LYG-3	O101	$1 \times 10^8$	1/6	83.3	6/6	0
XZ-16	O101	$1 \times 10^8$	0/6	100	6/6	0
PBS	-		0/6	100	0/6	100

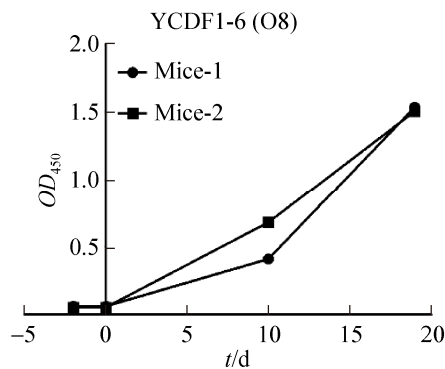


图 4. 小鼠抗体水平随免疫时间的变化

Figure 4. Changes of antibody level with immune time in mice.

### 3 讨论

目前仔猪腹泻和黄白痢在各大规模化猪场中病例较多, 是仔猪的一种常见病症, 给养猪业带来巨大的困扰和损失。据报道导致该病的病原菌

主要是 ETEC<sup>[6]</sup>, 本研究通过对苏北地区 21 个现代规模化猪场的仔猪腹泻和黄白痢发病猪群临床采样和调查, 分析其优势血清型、耐药性和致病力, 并根据优势菌型菌株研制用于防控该地区 ETEC 的二价灭活疫苗, 对该地区仔猪腹泻的防控具有重要意义。

本研究分离的 ETEC 菌株覆盖大肠杆菌的 18 种血清型, 其中以 O8、O101、O128 为优势血清型, 且优势血清型菌株在各猪场普遍存在。有报道, 方向红等<sup>[7]</sup>调查江苏省苏中地区猪大肠杆菌的血清型以 O9、O107、O45 和 O139 等为主; 王文豪等<sup>[8]</sup>对华南地区猪致病性大肠杆菌的血清型鉴定得出 O107、O101、O9、O26 和 O60 等为优势血清型; 王振玲等<sup>[9]</sup>调查北京地区仔猪大肠杆菌的血清型得出 O101、O64、O8 和 O20



为主要血清型; 与本研究结果有一定的交叉性。大肠杆菌的血清有 190 多种, 不同地区流行的血清型有较大差异, 相同地区不同的猪场所流行的血清型也有区别, 本研究表明苏北地区优势血清型为 O8、O101 和 O128, 应该引起我们的重视。

药敏试验结果显示分离株整体耐药性较强, 耐药范围广泛, 多重耐药严重, 对一些常见抗生素如庆大霉素、阿莫西林、氟苯尼考、复方新诺明等具有不同程度的高耐药性。敏感性较好的为多粘菌素 B, 但也有 34% 的菌株表现出耐药。另外多粘菌素 B 和丁胺卡那对分离株也具有一定的抑制作用, 但敏感菌株整体较少。所以针对性用药尤为关键, 既可有效防治仔猪腹泻和黄白痢, 又可防止多重耐药菌株的产生。颜友荣等<sup>[10]</sup>对江苏省苏中地区猪大肠杆菌的耐药性分析表明, 分离株对氟苯尼考和四环素高度耐药, 对头孢噻肟敏感性较高, 多重耐药则以 10 耐、11 耐、12 耐等居多; 谢永平等<sup>[11]</sup>对广西地区猪大肠杆菌的耐药情况分析表明, 猪大肠杆菌的耐药性很强, 对阿莫西林、强力霉素、卡那霉素等的耐药菌株比例较大, 对头孢三嗪、氟苯尼考和丁胺卡那较为敏感; 舒蕾等<sup>[12]</sup>对四川地区规模化猪场大肠杆菌的耐药性监测结果显示, 分离株对阿莫西林、红霉素高度耐药, 对氧氟沙星、头孢唑林较为敏感, 7 重耐药以上的菌株占大部分。此外, 国外有报道称, Begum 等<sup>[13]</sup>分离到 ETEC 菌株对抗生素的耐药率为氨苄西林 66%、复方新诺明 46%、多西环素 44%、红霉素 96%、纳利地西酸 83%、链霉素 48% 和四环素 42%; Tuem 等<sup>[14]</sup>研究表明大肠杆菌对氨苄西林(83.81%) 和阿莫西林(75.79%) 的耐药率最高, 而只有 13.55% 的大肠杆菌对硝基

呋喃妥因耐药。国外对 ETEC 耐药情况的研究也表明, ETEC 对红霉素、阿莫西林等抗生素表现出极高的耐药性。本研究对苏北地区 ETEC 的耐药性调查结果与以上报道结论相似, 规模化猪场中猪大肠杆菌耐药性整体较高, 多重耐药性普遍, 提醒我们细菌耐药谱趋于广泛, 选择具有敏感性的药物进行治疗和防控, 才能有效控制致病菌带来的危害。

动物致病力试验结果显示不同血清型菌株的致病力存在差异, O8 为本研究鉴定出的优势血清型, 其对小鼠的致病力普遍较高。有研究报道<sup>[15]</sup>, O8 是 ETEC 的常见血清型同时也是致病性血清型, 这与本研究得出的结论相符。接着按照梯度稀释测定  $LD_{50}$  的标准方法<sup>[16-17]</sup>, 测定出 O8 血清型强毒株的  $LD_{50}$  为  $1.4 \times 10^7$  CFU, MLD 为  $3 \times 10^7$  CFU, 可以作为分离株致病力的一个参照, 同时为下一步深入研究提供了前提试验条件。

ETEC 的菌体 O 抗原是大肠杆菌的主要抗原成分, 同时也是重要毒力部位, 能够诱发机体的免疫反应<sup>[18-20]</sup>。本研究以优势血清型为前提研制优势菌群二价灭活疫苗, 免疫试验结果显示, 本研究所研制的 ETEC 二价灭活疫苗对感染小鼠具有良好的免疫保护效果, 保护率在 83% 以上, 较为稳定, 能对优势血清型多个强毒株起到免疫保护作用。索朗斯珠等<sup>[21]</sup>从藏猪体内分离出致病性大肠杆菌并制备成灭活疫苗, 对小鼠的保护率达到 100%; 杨莉等<sup>[22]</sup>将本地分离的 3 株致病性大肠杆菌制备成灭活疫苗, 对小鼠的保护率达 100%; 张永国等<sup>[23]</sup>对黑龙江省猪场的大肠杆菌进行分离并制备多价灭活疫苗, 对仔猪的保护率高达 96% 以上, 比 K88-K99 二价基因工程疫苗免疫保护率更高。

以上报道与本研究的免疫效果基本相符, 本研究采用一次免疫 1 周后进行攻毒, 免疫保护效果稳定。另外本研究通过试验验证, 以  $2 \times 10^8$  CFU 剂量免疫小鼠带来的副反应小且免疫效果较好, 而低剂量会出现保护效果差, 高剂量则可能会引起小鼠免疫部位结块。为了对大部分 ETEC 分离株进行防控, 选择优势血清型菌株来制备二价灭活疫苗成为本研究的一个思路。通过前期对分离株优势血清型和致病力的分析, 研制出以小鼠为模型, 保护效果良好的 ETEC 二价灭活疫苗, 为猪场仔猪黄白痢的防控具有重要指导意义。

## 参 考 文 献

- [1] Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*, 2005, 295(6/7): 443–454.
- [2] Liu WX, Yuan CW, Meng XQ, Du YC, Gao RZ, Tang J, Shi DF. Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from suckling pigs with diarrhoea in China. *The Veterinary Journal*, 2014, 199(2): 286–289.
- [3] Yuan WZ, He KW, Lu CP, Hao QZ, Qiu XL, Zuo YZ. Progress of study on major virulence factors in Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Progress in Veterinary Medicine*, 2005, 26(2): 6–9. (in Chinese)  
袁万哲, 何孔旺, 陆承平, 郝勤宗, 裘孝良, 左玉柱. 产肠毒素性大肠杆菌主要毒力因子的研究进展. *动物医学进展*, 2005, 26(2): 6–9.
- [4] DebRoy C, Roberts E, Fratamico PM. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Animal Health Research Reviews*, 2011, 12(2): 169–85.
- [5] DebRoy C, Fratamico PM, Yan XH, Baranzoni G, Liu YH, Needleman DS, Tebbs R, O'Connell CD, Allred A, Swimley M, Mwangi M, Kapur V, Raygoza Garay JA, Roberts EL, Katani R. Comparison of O-antigen gene clusters of all of all O-serogroups of *Escherichia coli* and proposal for adopting a new nomenclature for O-typing. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147434.
- [6] Do T, Stephens C, Townsend K, Wu X, Chapman T, Chin J, McCormick B, Bara M, Trott DJ. Rapid identification of virulence genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates associated with diarrhoea in Queensland piggeries. *Australian Veterinary Journal*, 2005, 83(5): 293–299.
- [7] Fang XH, Wang YJ, Yan YR. Serotype identification and virulence gene investigation of porcine *E. coli* disease in central Jiangsu. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2013, (8): 112–113. (in Chinese)  
方向红, 王永娟, 颜友荣. 苏中地区猪大肠杆菌病血清型鉴定及毒力基因的调查. *黑龙江畜牧兽医*, 2013, (8): 112–113.
- [8] Wang WH, Su DP, Zhang DL, Shen HQ, Zhang XH, Chen RA, He DS. Identification and serotype distribution of pathogenic porcine *Escherichia coli* in South China. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2013, 49(4): 33–34. (in Chinese)  
王文豪, 苏丹萍, 张丹琳, 申翰钦, 张显浩, 陈瑞爱, 贺东生. 华南地区致病性猪大肠杆菌的鉴定和血清型分布. *中国兽医杂志*, 2013, 49(4): 33–34.
- [9] Wang ZL, Duan YQ, Wang JQ, Wang Y. Detection of serotypes and virulence factors of *Escherichia coli* from piglets in Beijing. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 44(5): 1302–1308. (in Chinese)  
王振玲, 段跃强, 王金秋, 王宇. 北京地区仔猪大肠杆菌血清型鉴定及其毒力因子检测. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(5): 1302–1308.
- [10] Yan YR, Fang XH, Wang LL. Drug resistance and drug resistance genes of porcine *Escherichia coli* in central Jiangsu. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 52(2): 90–92. (in Chinese)  
颜友荣, 方向红, 王琳琳. 苏中地区猪大肠杆菌的耐药性与耐药基因的试验. *中国兽医杂志*, 2016, 52(2): 90–92.
- [11] Xie YP, Yang W, Chen ZX, Xu LG, Xuan XB, Hu S, Li SL. Investigation on serotypes and antibiotic resistance of swine pathogenic *E. coli* in Guangxi. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2010, 41(4): 380–382. (in Chinese)  
谢永平, 杨威, 陈泽祥, 许力干, 禩雄标, 胡帅, 李素兰. 广西地区猪大肠杆菌血清型调查及耐药性检测. *广西农业科学*, 2010, 41(4): 380–382.
- [12] Shu L, Wan L, Zhang Q, Ma L, Xie ZY, Yang Y, Guo L, Yan QG. Isolation, identification and drug resistance monitoring of *Escherichia coli* from some large-scale pig farms in Sichuan. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2012, 48(3): 32–34.

- (in Chinese)  
舒蕾, 万莉, 张琦, 马磊, 谢智勇, 杨映, 郭玲, 颜其贵. 四川某些规模化猪场大肠杆菌的分离鉴定及耐药性监测. 中国兽医杂志, 2012, 48(3): 32–34.
- [13] Begum YA, Talukder KA, Azmi IJ, Shahnaij M, Sheikh A, Sharmin S, Svennerholm AM, Qadri F. Resistance pattern and molecular characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated in Bangladesh. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0157415.
- [14] Tuem KB, Gebre AK, Atey TM, Bitew H, Yimer EM, Berhe DF. Drug resistance patterns of *Escherichia coli* in Ethiopia: a meta-analysis. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 4536905.
- [15] Ding Y, Tang XB, Lu P, Wu B, Xu ZF, Liu WG, Zhang RX, Bei WC, Chen HC, Tan C. Clonal analysis and virulent traits of pathogenic extraintestinal *Escherichia coli* isolates from swine in China. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8: 140.
- [16] Wang SH, Niu CL, Shi ZY, Xia YJ, Yaqoob M, Dai JJ, Lu CP. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 2011, 79(1): 279–287.
- [17] Wang SH, Xia YJ, Dai JJ, Shi ZY, Kou YH, Li HQ, Bao YL, Lu CP. Novel roles for autotransporter adhesin AatA of avian pathogenic *Escherichia coli*: colonization during infection and cell aggregation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2011, 63(3): 328–338.
- [18] Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 2002, 71: 635–700.
- [19] Lerouge I, Vanderleyden J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, 26 (1): 17–47.
- [20] Wang L, Wang Q, Reeves PR. The variation of O antigens in gram-negative bacteria//Wang XY, Quinn PJ. Endotoxins: Structure, Function and Recognition. Dordrecht: Springer, 2010: 123–152.
- [21] Wang BN, Gong G, Wang G, Huang XJ, Zhang X, Qiangba YZ, Suolang SZ. Preparation and effect evaluation of the adjuvant vaccine of enteropathogenic *Escherichia coli* in Tibetan piglets. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2018, 34(1): 73–78. (in Chinese)  
王保宁, 贡嘎, 王刚, 黄筱均, 张璇, 强巴央宗, 索朗斯珠. 藏仔猪致病性大肠杆菌疫苗的制备及效果评价. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(1): 73–78.
- [22] Yang L, Li DM, Wu WH, Pan SH, Yuan C, Huang KR, Wei XC, Xiao MC, Yang SK. Preparation of multivalent inactivated vaccine for local pig *Escherichia coli* strain in Guizhou. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 37(12): 151–153. (in Chinese)  
杨莉, 李道敏, 吴位珩, 潘淑惠, 袁灿, 黄开荣, 魏锡开, 肖明才, 杨胜坤. 贵州猪大肠杆菌本地株多价灭活疫苗的研制. 中国畜牧兽医, 2010, 37(12): 151–153.
- [23] Zhang YG, Gao R, Yang LL. Preparation of multivalent inactivated vaccine against swine colibacillosis. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2007, (4): 97. (in Chinese)  
张永国, 高睿, 杨丽丽. 猪大肠杆菌病多价灭活疫苗的研制. 畜牧兽医科技信息, 2007, (4): 97.

# Isolation, identification and evaluation of inactivated vaccine of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in large-scale pig farms in northern Jiangsu

Dehong Yang<sup>1#</sup>, Peng Zhang<sup>1#</sup>, Peixin Yu<sup>1</sup>, Jianluan Ren<sup>1</sup>, Dezhi Li<sup>1</sup>, Juanfang Wang<sup>1</sup>, Jianhe Sun<sup>2</sup>, Fang Tang<sup>1\*</sup>, Jianjun Dai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Animal Bacteriology, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Shanghai 200240, China

**Abstract:** [Objective] Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is an important pathogen causing diarrhea of piglets. In this study, the prevalence and biological characteristics of ETEC in large-scale pig farms in northern Jiangsu was investigated, and protective and inactivated vaccines of predominant serotype were developed to provide guidance and suggestions for the prevention and control of ETEC in northern Jiangsu. [Methods] Fresh fecal samples, anal swabs and small intestinal tissue samples of piglets aged 3–30 days were collected from large-scale pig farms in northern Jiangsu province, ETEC was isolated, and serotypes, antibiotic resistance, pathogenicity on mice of these isolates were determined. Finally, the inactivated vaccine of predominant serotype was developed and the immune protection effect of mice was evaluated. [Results] We collected 562 samples from 21 large-scale pig farms. We identified 141 ETEC strains containing ST or LT virulence genes by PCR. O serotypes of 85 isolates were determined by serum agglutination tests. O8, O101 and O128 were dominant serotypes, accounting for 61.2% of the confirmed strains, besides, O9, O3, O20, O148, O149 and the like were identified. The drug resistance of 141 ETEC isolates to 14 common antibiotics was analyzed. The isolates were highly resistant to neomycin, erythromycin, tetracycline, gentamicin, doxycycline, amoxicillin, and trimethoprim/sulfamethoxazole, with resistance rate higher than 80%. Strains were most sensitive to enrofloxacin, with the rate of 50.4% (71/141). 66% (93/141) and 51.8% (73/141) strains were intermediate to polymyxin B and cefotaxime. Multiple drug resistance is serious. 19% (27/141) of strains were resistant to 10 drugs. The virulence of the dominant serotype strains was obtained by mice challenge test.  $LD_{50}$  of one strong strain YC-6 of O8 serotype was measured as  $1.4 \times 10^7$  CFU, while the  $MLD_{50}$  was  $3 \times 10^7$  CFU. The monovalent inactivated vaccines prepared by O8 virulent strain YC-6 and O101 virulent strain LYG-3 both have a protection rate of 100% for mice. The bivalent inactivated vaccine of YC-6 and LYG-3 were developed as well, the protection rate of which in mice was more than 83%. [Conclusion] Based on the epidemiological investigation of ETEC in northern Jiangsu, dominant serotypes and drug resistance were tested, and bivalent inactivated vaccine with superior immune protection effect against isolated strains were developed, which will provide reference for monitoring and prevention in pig industry.

**Keywords:** enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), identification, serotype, antibiotic resistance, inactivated vaccine

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500800), by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20180075) and by the Foundation of Key Laboratory of Veterinary Biotechnology (klab201709), Shanghai, PR China.

<sup>#</sup>Those authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: tfalice@126.com

Received: 30 March 2019; Revised: 30 May 2019; Published online: 28 June 2019