

# ETEC 多价定居因子 对仔猪大肠杆菌病的预防试验

李学伍, 张改平, 阎玉河, 邓瑞广, 杨艳艳, 王爱萍, 李青梅

(河南省农业科学院生物技术研究所, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 应用分子免疫学理论, 将定居因子 K88, K99, 987P, F41 与其特异受体结合, 封闭肠粘膜上皮细胞的受体, 阻断致病菌的定居因子与肠粘膜上皮细胞特异受体的结合, 使致病菌无法定居。试验结果显示, 其仔猪攻毒保护率为 100%, 预防试验保护率为 100%, 可以有效控制仔猪大肠杆菌的发生, 为该病的现有预防模式增添了新的内容。

**关键词:** 仔猪; 致病性大肠杆菌; 定居因子; 预防

**中图分类号:** S858.285.1<sup>+</sup>2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-7091(2001)02-0127-05

产肠毒素性大肠杆菌(ETEC)进入肠道后, 导致动物发病的首要条件是在肠道内定居, 这种定居作用是靠特定的菌毛来完成的, 人们通常把这种菌毛称为定居因子。目前河南省猪源性致病菌的定居因子有 K88, K99, F1987, 987P, F41 等, 定居因子不仅具有重要的致病性, 而且具有良好的免疫原性; 利用这种免疫原性制备了大肠杆菌菌苗及蛋白苗, 在控制该病中发挥了很大的作用, 国内外有关这方面的报道很多<sup>[1-6]</sup>, 但利用多价定居因子封闭肠粘膜上皮细胞上的特异受体, 阻断致病菌的定居预防该病的研究, 尚未见报道。试验应用重组基因工程菌表达的多价定居因子灌服初生仔猪, 成功地预防了该病的发生, 取得了显著效果, 为仔猪大肠杆菌病的预防开辟了一条新途径。现将结果回报如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

C83917(987P<sup>+</sup>), C83901(K88<sup>+</sup>), C83529(K99<sup>+</sup>), C83919(F41<sup>+</sup>) 由中国兽药监察所提供, PBK89(K88<sup>+</sup>K99<sup>+</sup>), PXLS(ST-LTFB), PEF87(987P<sup>+</sup>F41<sup>+</sup>) 重组基因工程菌由本所生物技术研究室构建。

### 1.2 培养基

Slanetz 培养基、BBL 培养基、Minca 培养基、LB 液体培养基, 均由本所生物技术研究室配制。

### 1.3 多价定居因子的制备

将工程菌 PBK89, PEF87 分别接种于最适宜菌毛形成的培养基中, 37℃培养 20~24 h,

利用热休克法脱毛,饱和硫酸铵沉淀定居因子,离心后取沉淀物,加入 PBS 溶液,4 ℃透析 48 h,在 595 nm 波长处测其光密度值。计算其蛋白含量,并将其含量调为 3 000 μg/mL,制备成 K88, K99, 987P, F41 多价定居因子悬液, - 20 ℃保存备用<sup>[7]</sup>。

1.4 试验动物

5~ 7 日龄昆明小白鼠,由本研究室自己繁育提供,初生仔猪及妊娠母猪均由驻马店市某猪场提供。该猪场仔猪大肠杆菌病发病率及死亡率均较高。

1.5 乳鼠攻毒保护试验

取 5~ 7 日龄乳鼠 30 只,分为两组,每组 15 只。试验组每只口服 0.5 mL 多价定居因子,并于口服后的 4, 10, 14 d 攻毒,观察乳鼠的保护效果。

1.6 仔猪攻毒保护试验

新生仔猪 40 头,均分为 4 组,试验组 30 头,对照组 10 头。试验组每头仔猪出生后,吃初乳前口服 6 mL 多价定居因子,于口服后第 4, 10, 14 d 攻毒,观察仔猪的发病情况。

1.7 仔猪预防保护试验

新生仔猪 50 头(均来自未注射大肠杆菌菌苗的母猪),分为 2 组,每组 25 头。试验组仔猪于出生后吃初乳前口服多价定居因子 5 mL,对照组不做任何处理。试验观察 1 个月,详细记录发病情况。

1.8 与母乳抗体的对比保护试验

新生仔猪 40 头(20 头来自未经大肠杆菌菌苗免疫母猪),来自非免疫母猪的为试验组,来自免疫母猪的为对照组。试验组仔猪出生后吃初乳前口服多价定居因子 5 mL,对照组按正常的饲养管理进行,观察 15 d,详细记录仔猪的发病情况。

2 结果与分析

2.1 乳鼠攻毒保护试验

口服多价定居因子后分别于第 4, 10, 14 d 攻毒,每次攻毒时试验组与对照组各取乳鼠 5 只,试验结果发现,试验组乳鼠攻毒后全部存活,对照组乳鼠攻毒后全部发病,死亡 11 只,详见表 1。

表 1 多价定居因子对乳鼠攻毒保护试验结果

组别	小白鼠(只)	口服剂量(mL)	攻毒剂量(mL)	死亡数(头)
试验组	15	0.5	0.1	0
对照组	15	0	0.1	11

注:攻毒致病菌为 C83917, C83901, C83529, C83919 混合培养物(5×10<sup>10</sup>CFU/mL)。

2.2 仔猪攻毒保护试验结果

初生仔猪口服多价定居因子后,在不同时间进行攻毒(即口服多价定居因子的仔猪分别在第 4, 10, 14 d 攻毒),结果发现试验组仔猪均未发生腹泻,对照组仔猪则全部出现腹泻并有 8 头死亡,详见表 2。

表 2 多价定居因子对仔猪攻毒保护试验结果

组别	仔猪数 (头)	口服剂量 (mL)	攻毒剂量(mL)			死亡数 (头)
			4 d	10 d	14 d	
试验组 A	10	6	5	0	0	0
试验组 B	10	6	0	5	0	0
试验组 C	10	6	0	0	5	0
对照组	10	0	5	0	0	8

注: 攻毒致病菌为 C83917, C83901, C83529, C83919 混合培养物( $5 \times 10^{10}$ CFU/mL)。

2.3 仔猪预防保护试验

对初生仔猪口服多价定居因子后, 可明显提高仔猪对致病菌的抵抗力, 使仔猪腹泻的发生得到控制, 与对照组仔猪发病率相比差异显著, 详见表 3。

表 3 多价定居因子对仔猪预防保护试验结果

组别	仔猪数 (头)	口服剂量 (mL)	发病头数 (1~ 15 d)	发病率 (%)	发病头数 (15~ 30 d)	发病率 (%)
试验组	25	5	0	0	1	4
对照组	25	0	20	80	4	16

2.4 与母乳抗体的对比保护试验结果

利用大肠杆菌苗产前免疫怀孕母猪, 通过初乳使仔猪获取抗体得到保护, 而未免疫母猪所产仔猪通过多价定居因子获得保护, 对比试验表明多价定居因子对仔猪的保护更加可靠, 试验组仔猪 15 d 内未见 1 头发病, 对照组有 3 头发病, 详见表 4。

表 4 多价定居因子与母乳抗体的对比保护试验

组别	仔猪数 (头)	口服剂量 (mL)	发病头数			发病率 (%)
			4 d	10 d	15 d	
试验组	20	5	0	0	0	0
对照组	20	0	0	1	3	15

3 讨论

致病性大肠杆菌侵入寄主后, 首先借助定居因子粘附于特定的靶细胞上<sup>[8]</sup>, 从而发挥致病作用。研究证实, 1 个上皮细胞平均可接纳带有 K88 或 K99 定居因子的大肠杆菌 22. 5 ~ 35. 1 个<sup>[7]</sup>, 这些大肠杆菌定居后, 大量繁殖并分泌肠毒素, 导致腹泻, 甚至死亡, 如果没有定居因子的存在, 或定居因子不能与靶细胞结合, 则就不再发病。我们应用工程菌表达的多价定居因子, 一次性灌服新生仔猪(吃初乳前口服), 多价定居因子完全占据靶细胞上的受体, 对肠粘膜上皮细胞的受体起封闭作用, 使病原菌的定居因子无法与靶细胞上的受体结合, 使其无法定居肠粘膜细胞, 由肠道机械性蠕动, 将其从肠道内排出体外, 从而丧失致病作用。

仔猪攻毒保护试验证明, 其攻毒保护率为 100%, 仔猪预防试验证明 1~ 15 日龄其保护率为 100%, 对照组发病率为 80%。结果显示, 用多价定居因子口服初生仔猪可有效控制仔猪大肠杆菌病, 为仔猪大肠杆菌病的控制和预防开辟了新的途径。

与母乳抗体的对比保护试验结果显示, 母乳抗体能够有效的祛除致病菌的定居, 预防此病的发生<sup>[9~11]</sup>, 由于母猪免疫应答的差异, 母乳抗体水平较低、下降快、仔猪摄入量不均, 因此仍有部分仔猪发病, 多价定居因子对仔猪的预防保护克服了上述缺点, 则效果更加可靠。

## 参考文献:

- [1] 张绍杰, 刘兴汉. K<sub>99</sub>-F<sub>41</sub> 双纤毛菌的构建[J]. 生物技术, 1991, 1(5): 26- 29.
- [2] 潘松年, 夏业才. 仔猪大肠杆菌腹泻 K88、K99、987P 三价灭活苗的研究[J]. 中国兽药杂志, 1992, 26(4): 14- 16.
- [3] 黄培堂, 李丰生. 表达 K99 和 F41 双价保护性抗原工程菌株的构建及免疫效果研究[J]. 中国科学 B 辑, 1993, 23(9): 960- 965.
- [4] Moon H W, Bunn T O. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals[J]. Vaccine, 1993, 11: 213- 220.
- [5] Nagy L K, Mackenzie T, Painter K R. Protection of the nursing pig against experimentally induced enterocolibacillosis by vaccination of dam with fimbrial antigens of *E. coli* (K88, K99 and 9887P) [J]. Veterinary Record, 1985, 117(16): 408- 413.
- [6] Attridge S, Hackett J, Morona R, *et al.* Towards a live oral vaccine against enterotoxigenic *Escherichia coli* of swine[J]. Vaccine, 1988, 6(5): 387- 389.
- [7] 房海. 大肠埃希氏菌[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1997.
- [8] Tzipori S, Withers M, Hayes J, *et al.* Attachment of *E. coli* bearing K88 antigen to equine brush-border membranes[J]. Veterinary Microbiology, 1984, 9(6): 561- 570.
- [9] Duchet-Suchaux. Protective antigens against enterotoxigenic *Escherichia coli* O101: K99- F41 in the infant mouse diarrhea model[J]. Journal of Clinical Microbiology 1988, 26(5): 879- 884.
- [10] Schlink G T. Protection against F41 colibacillosis with a combination K88, K99, 987P and F41 subunit vaccine [C]. Abstracts of Papers Presented at the Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease, 1985, 6, 28.
- [11] Greenwood P E, Clark S J, Cahill A D, *et al.* Development and protective efficacy of a recombinant-DNA derived fimbrial vaccine against enterotoxic colibacillosis in neonatal piglets[J]. Vaccine, 1988, 6(5): 389- 392.

## Protection Against Piglets Colibacillosis with Polyvalent Resident Factors of Enterotoxigenic Escherichia Coli

LI Xue-wu, ZHANG Gai-ping, YAN Yu-he, DENG Rui-guang,

YANG Yan-yan, WANG Ai-ping, LI Qing-mei

(Institute of Biology and Technique Sciences,

Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The resident factors K88, K99, 987P and F41 had been combined with the specific receptors of the intestinal mucosa epithelial cells under the molecular immunoreaction, and the specific receptors had been blocked. The receptors blocked by resident factors couldn't attach the resident factors, and prevented the enterotoxigenic *E. coli* settling down the intestine. The results showed that the piglets infected protection rate was 100%, preventive protection rate was 100%. The experiments proved that the method was effective measures against piglets colibacillosis, and added new content to preventive model at present.

**Key words:** Piglets; Enterotoxigenic *E. coli*; Resident factors; Prevention