

仔猪大肠杆菌纤毛抗原反向间接血凝检测方法的建立与应用

刘泽文 田永祥 袁芳艳 刘威 周丹娜 杨克礼

农业部畜禽细菌病防治制剂创制重点实验室/
湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 武汉 430064

摘要 为建立大肠杆菌 K88、K99、987P 纤毛抗原的快速鉴别诊断和定量检测方法,用纯化的大肠杆菌 K88、K99、987P 纤毛抗原免疫家兔制备阳性血清,其琼扩效价分别达到 1:32、1:32、1:128;利用该阳性血清 IgG 致敏醛化的绵羊红细胞,确定了最适 K88、K99、987P 阳性血清 IgG 的质量浓度分别为 40、160、80 $\mu\text{g/mL}$ 。用该方法对同一批次的 K88、K99 和 987P 纤毛抗原进行 3 次检测, K88、K99 和 987P 纤毛样品的 RIHA 效价均为 1:1600、1:1600 和 1:800。结果表明,该检测方法具有较好的特异性和可重复性,可用于大肠杆菌 K88、K99、987P 纤毛抗原的快速鉴别诊断。

关键词 仔猪; 大肠杆菌; 纤毛抗原; 反向间接血凝

中图分类号 S 855.1⁺² **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)03-0069-05

仔猪产肠毒素性大肠杆菌 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) 是引起仔猪黄痢的主要病原^[1], 该病常发生于出生 1 周以内的新生仔猪, 以 1~3 日龄最常见, 发病率和死亡率极高, 给养猪生产带来严重的危害。ETEC 主要利用 F4 (K88)、F5 (K99)、F6 (987P) 或 F41 等纤毛粘附因子吸附在新生仔猪小肠粘膜上繁殖并产生肠毒素引起仔猪腹泻^[2]。因此, 快速鉴定引起致病菌株的纤毛抗原类型, 对本病的预防和控制有着极为重要的意义。目前用于鉴定 ETEC 的方法包括玻片凝集法 (PA)、琼脂扩散试验 (AGP) 和聚合酶链反应 (PCR) 方法等^[3-4], PA 和 AGP 方法虽然操作简单, 也可定量检测, 但是敏感性较差, 而 PCR 方法虽然特异性和敏感性均较高, 但又不能进行 ETEC 纤毛抗原的定量检测。本研究通过制备大肠杆菌 K88、K99、987P 纤毛抗原, 免疫家兔制备阳性血清, 利用阳性血清 IgG 致敏醛化的公绵羊红细胞, 建立了仔猪大肠杆菌纤毛抗原反向间接血凝检测方法 (RIHA), 该方法具有较好的特异性和重复性, 可用于大肠杆菌 K88、K99、987P 纤毛抗原的快速定性和定量检测,

现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 菌种。大肠杆菌 C83549 (K88)、C83644 (K99)、C83710 (987P) 菌株, 由中国兽医药品监察所鉴定、保管和提供。副猪嗜血杆菌 (HPS)、猪链球菌 2 型 (SS2)、胸膜肺炎放线杆菌 (APP)、沙门氏菌 (SE) 均由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所鉴定和提供。

2) 标准阳性血清。大肠杆菌 K88、K99、987P 单因子血清购自中国兽医药品监察所。

3) 日本大耳白兔 (家兔)。质量 1.5~2.0 kg, 购自湖北省实验动物中心。

1.2 大肠杆菌纤毛抗原的制备

将大肠杆菌 C83549、C83644 和 C83710 菌株分别接种改良 Minca 培养基, 37 °C 振荡培养 12~16 h 后收集菌液, 然后将 C83549 菌液、C83644 菌液和 C83710 菌液离心, 用适量 PBS (0.01 mol/L, pH 值 7.2) 悬浮菌泥和脱纤毛处理, 并将获得纤毛用硫酸铵进行

收稿日期: 2016-09-12

基金项目: 湖北省农业科技创新中心项目 (2011-620-001-003); 湖北省科技支撑计划项目 (2014BBB010); 湖北省自然科学基金 (重点) 项目 (2014CFA106); 湖北省技术创新专项重大项目 (2016ABA124)

刘泽文, 副研究员. 研究方向: 家畜疾病诊断与预防. E-mail: liuzwen2004@sina.com

通信作者: 田永祥, 研究员. 研究方向: 家畜传染病. E-mail: tyxanbit@163.com

纯化,即得到纯化的 K88、K99 和 987P 纤毛蛋白。

1.3 阳性血清的制备及纯化

1) 阳性血清的制备。参照文献[5]进行,分别用大肠杆菌 K88、K99 和 987P 纤毛抗原加入弗氏完全佐剂进行 2 次免疫和弗氏不完全佐剂进行第 3 次免疫家兔,待其血清琼扩效价达 1:32 以上时,采血和分离血清,经 56 °C 水浴灭活 30 min,备用。

2) K88、K99、987P 阳性血清的纯化。取 10 mL 阳性血清与 40 mL 醋酸盐缓冲液混合,搅拌下逐滴加入正辛酸,室温混合 30 min,2~8 °C 静置 2 h 以后,以 10 000 r/min 离心 30 min,取上清,加入 1/10 体积的 PBS(0.01 mol/L, pH 值 7.2),用 2 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.4;加入等体积的饱和硫酸铵溶液,2~8 °C 静置过夜后 5 000 r/min 离心 30 min,弃上清;沉淀用适量 PBS(0.01 mol/L, pH 值 7.2)溶解,2~8 °C 透析过夜;取透析后样品进行 SDS-PAGE 电泳,用蛋白定量试剂盒检测蛋白含量;定量分装,置 -40 °C 冰箱保存。

1.4 绵羊红细胞的制备和醛化

参照文献[6]进行,无菌操作采集健康公绵羊血,放 2~8 °C 冰箱稳定 3~5 d,再用 PBS(0.01 mol/L, pH 值 7.2)洗 5 次后用 PBS(0.15 mol/L, pH 值 7.2)配成的 10% 红细胞悬液,按 5 份红细胞悬液加入 1 份 3% 戊二醛溶液进行醛化,用 PBS(0.01 mol/L, pH 值 7.2)将醛化红细胞洗涤 4~5 次,用 PBS(0.01 mol/L, pH 值 7.2)配成 10% 绵羊红细胞。加 0.01% 硫柳汞,2~8 °C 保存,不超过 6 个月。

1.5 大肠杆菌纤毛抗原反向间接血凝方法的建立

1) 阳性血清 IgG 致敏浓度的确定。用 PBS(0.01 mol/L, pH 值 7.2)将纯化好的 K88 IgG 稀释至 10、20、40、80 μg/mL, K99、987P IgG 稀释至 40、80、160、320 μg/mL,用于致敏。

2) 阳性血清 IgG 的致敏。取 20 mL 稀释的血清 IgG 与 10 mL 的 CrCl₃ 溶液(10 μg/mL)混合,充分混匀,37 °C 水浴 10 min,取 6 mL 10% 醛化红细胞液,用 PBS(0.01 mol/L, pH 值 7.2)洗涤 2 次,离心,弃去上清,将血清和 CrCl₃ 混合液加入到洗涤过的沉积红细胞中,充分混匀后,立即加入 10 mL 的 1:20 000 鞣酸溶液,混匀,37 °C 水浴 30 min。用含 0.1% BSA 的 PBS(0.01 mol/L, pH 值 7.2)洗涤 3 次,弃上清,用 80 mL 含 0.1% BSA 的 PBS(0.01 mol/L, pH 值 7.2)悬浮红细胞,0.01% 硫柳汞防腐,即为 0.75% 的致敏红细胞,于 2~8 °C 放置保存。

3) RIHA 特异性试验。取大肠杆菌 C83549、C83644、C83710、副猪嗜血杆菌、猪链球菌 2 型、胸膜肺炎放线杆菌、沙门氏菌的菌液,分别用大肠杆菌 K88、K99 和 987P 抗体致敏红细胞进行检测并判定结果。

4) RIHA 重复性试验。在不同时间对 K88、K99、987P 纤毛样品进行 3 次纤毛抗原测定,记录每次测定的 RIHA 效价。

5) RIHA 的临床应用。采集 5 个疑似仔猪黄痢发病猪场的仔猪肠内容物,接种麦康凯培养基,挑选单个红色菌落,接种改良 Minca 汤,37 °C 振荡培养 12~16 h 后收集菌液,用 RIHA 方法检测大肠杆菌纤毛抗原血清型及 RIHA 效价,同时用 K88、K99 和 987P 标准阳性血清进行玻片凝集试验进行检测。

2 结果与分析

2.1 纤毛抗原的制备

SDS-PAGE 电泳结果显示,经过纯化的大肠杆菌 K88、K99、987P 纤毛纯度较高,其蛋白分子质量分别约为 26、18、20 ku(图 1)。经 BCA 将其定量,按 2 mg/mL 进行分装,置 -20 °C 保存备用。

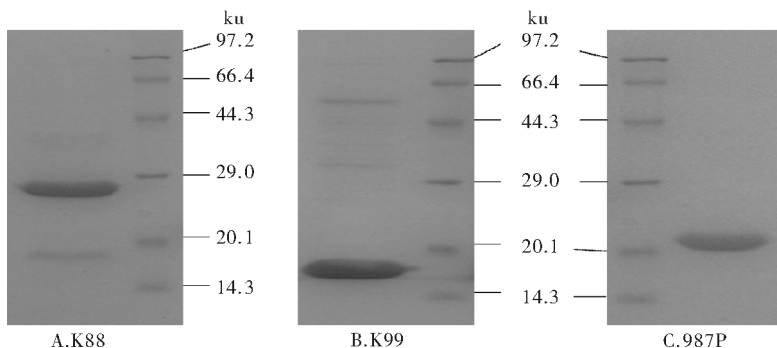


图 1 纤毛纯化的 SDS-PAGE 结果

Fig.1 Result of pili SDS-PAGE

2.2 阳性血清的制备及血清效价的测定结果

将制备的纤毛抗原免疫家兔，制备得到阳性血清，经琼脂扩散试验测定其 K88、K99、987P 抗体效价，K88、K99 效价达到 1 : 32，987P 抗体效价达到 1 : 128。纯化的兔 K88、K99、987P 阳性血清 IgG 含 2 条主要蛋白带，分别为重链和轻链，其分子质量分别约为 55、25 ku(图 2、图 3)。

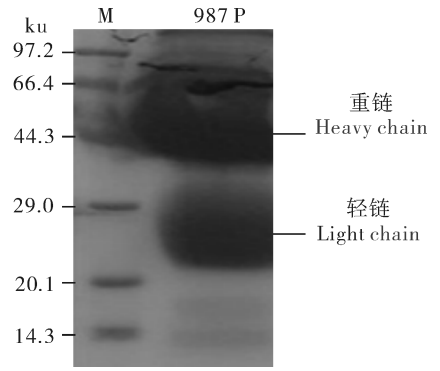


图 3 纯化的 987P 兔阳性血清 IgG SDS-PAGE 电泳
Fig.3 Result of purified 987P rabbit positive serum IgG SDS-PAGE

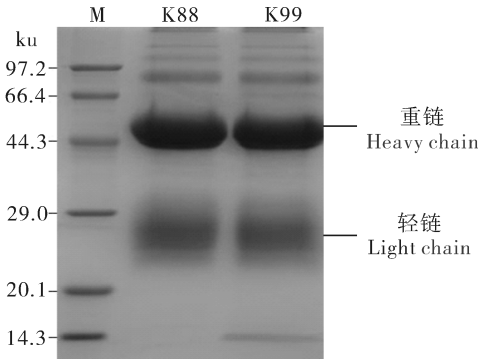


图 2 纯化的 K88、K99 兔阳性血清 IgG SDS-PAGE 电泳
Fig.2 Result of purified K88 and K99 rabbit positive serum IgG SDS-PAGE

2.3 RIHA 抗体最佳致敏质量浓度的确定

K88 抗体选择了 10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4 个质量浓度，K99 和 987P 抗体选择了 40、80 160、320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4 个质量浓度。当 K88 阳性血清 IgG 质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，血凝效价为 400。随着 K88 抗体浓度的升高，血凝效价提高，但当 K88 阳性血清 IgG 质量浓度超过 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，血凝效价均为

表 1 阳性血清 IgG 最佳质量浓度的确定

Table 1 Determination of the optimal concentration of IgG

抗体名称 Antibody	抗体致敏质量浓度/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Antibody concentration	K88 纤毛样品稀释的倍数 Times of dilution of K88 pili											
		50	100	200	400	800	1 600	3 200	6 400	12 800	C1	C2	C3
K88	10	++++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
	20	++++	++++	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-	
	40	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	-	-	-	
	80	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	-	-	-	
K99	40	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	
	80	++++	++++	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-	
	160	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	-	-	-	
987P	320	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	-	-	-	
	40	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	
	80	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	
	160	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	
		320	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-	

注：C1 为稀释液 + 0.75% 阳性血清致敏红细胞悬液；C2 为稀释液 + 0.75% 健康兔血清致敏红细胞悬液；C3 为纤毛样品 + 0.75% 健康兔血清致敏红细胞悬液。下同。Note: C1 is the dilution liquid + 0.75% positive serum sensitized red cell suspension; C2 is the diluted solution + 0.75% negative rabbit serum sensitized red blood cell suspension; C3 is the pili sample + 0.75% negative rabbit serum sensitized red blood cell suspension. The same as below.

1 600(表 1)。因此，确定最适 K88 阳性血清 IgG 质量浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同样确定最适 K99 阳性血清 IgG 质量浓度为 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，最适 987P 阳性血清 IgG 质量浓度为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4 特异性试验结果

取大肠杆菌 C83549、C83644、C83710、副猪嗜血杆菌、猪链球菌 2 型、胸膜肺炎放线杆菌、沙门氏菌的菌液进行反向间接血凝试验。结果发现，大肠

杆菌 C83549 只能凝集 K88 阳性血清致敏红细胞,凝集;大肠杆菌 C83710 只能凝集 987P 阳性血清致敏红细胞,其他细菌均不发生凝集(表 2),结果表明凝集 K99 阳性血清致敏红细胞,其他细菌均不发生凝集。该方法的特异性较高。

表 2 RIHA 特异性试验结果

Table 2 Result of specific of the RIHA

抗体名称 Antibody	C83549	C83644	C83710	HPS	SS2	APP	SE
K88	++++	-	-	-	-	-	-
K99	-	++++	-	-	-	-	-
987P	-	-	++++	-	-	-	-

2.5 重复性试验结果

对每种纤毛样品在不同时间均进行了 3 次重复性试验。试验结果发现,K88 纤毛样品的 RIHA 效

价均为 1 600;K99 纤毛样品的 RIHA 效价均为 1 600,987P 纤毛样品的 RIHA 效价均为 800 (表 3),结果表明,该方法具有较好的重复性。

表 3 纤毛抗原效价测定结果

Table 3 Result of the titre of the pili

检测次数 Detection times	K88 纤毛样品 Pili of K88	K99 纤毛样品 Pili of K99	987P 纤毛样品 Pili of 987P
1	1 : 1 600	1 : 1 600	1 : 800
2	1 : 1 600	1 : 1 600	1 : 800
3	1 : 1 600	1 : 1 600	1 : 800

2.6 临床应用结果

用建立的 RIHA 检测方法对 5 个疑似仔猪黄痢发病猪场的分离菌株进行纤毛抗原检测,检测结果表明,有 2 个猪场检测出 K99 型纤毛抗原大肠杆菌,抗原效价达到 1 : 800~1 : 1 600,1 个猪场为

K88 型纤毛抗原大肠杆菌感染,纤毛抗原效价为 1 : 400,1 个猪场为 K99 和 987P 型纤毛抗原大肠杆菌混合感染,效价均为 1 : 400,另 1 个猪场未检测出上述 3 种血清型的大肠杆菌,玻片凝集法的检测结果与 RIHA 方法检测结果基本一致。

表 4 临床样品检测结果

Table 4 Result of clinical sample test results

猪场序号 Number of pig farm	致敏 IgG Sensitized IgG	检测结果 Detection result	纤毛抗原效价 Pili antigen titre	玻片凝集试验检测结果 Result of PA
1	K88	+	1 : 400	+
	K99	-	0	-
	987P	-	0	-
2	K88	-	0	-
	K99	+	1 : 800	+
	987P	-	0	-
3	K88	-	0	-
	K99	+	1 : 1 600	+
4	987P	-	0	-
	K88	-	0	-
	K99	-	0	-
5	987P	-	0	-
	K88	-	0	-
	K99	+	1 : 400	±
	987P	+	1 : 400	+

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性,“±”表示可疑 Note:“+”:Positive,“-”:Negative,“±”:Suspicious.

3 讨论

猪大肠杆菌病是由大肠杆菌中某些致病性血清型或亚型引起的一类猪的传染性疾病,包括新手仔猪大肠杆菌病(仔猪黄痢)、断奶仔猪大肠杆菌腹泻、迟发性仔猪大肠杆菌病(仔猪白痢)和猪水肿病。根据大肠杆菌毒力机制,可将猪大肠杆菌分为致病性

大肠杆菌(EPEC)和肠毒素性大肠杆菌(ETEC),ETEC 能产生定植在新生仔猪小肠的 K88、K99、987P 和 F41 等纤毛,并依附该纤毛黏附在小肠黏膜上并产生肠毒素,引起仔猪发生腹泻^[7]。该病主要发生于 0~4 日龄仔猪,发病后药物治疗效果很差,因此通过免疫母猪而使新生仔猪吸食初乳后获得被动免疫是预防该病发生的最有效方法。但是由

于 ETEC 各血清型之间缺乏交叉保护力,因此,早期确定病原及其血清型对预防本病有非常重要的意义。

本研究将制备的仔猪大肠杆菌 K88、K99 和 987P 纤毛抗原免疫家兔制备得到 3 种大肠杆菌阳性血清,琼脂扩散试验检测结果证明,各阳性血清与相应纤毛抗原之间的沉淀线单一,且该沉淀线与阳性对照的沉淀线首尾相连。结果证明,我们制备的大肠杆菌 K88、K99、987P 阳性血清的特异性很高,可用于绵羊红细胞的致敏。

本研究通过提取和纯化大肠杆菌 K88、K99 和 987P 纤毛抗原,免疫家兔制备阳性血清,然后用不同浓度的阳性血清致敏绵羊红细胞,制备成了大肠杆菌纤毛抗原反向间接血凝检测试剂。该致敏红细胞只能与有相应纤毛抗原的大肠杆菌发生凝集反应,而与副猪嗜血杆菌、猪链球菌 2 型、胸膜肺炎放线杆菌、沙门氏菌等均不能发生凝集反应,说明该致敏红细胞具有高度的特异性;用该试剂分 3 次对同一纤毛抗原进行检测,每次检测结果均一致,结果表明,该致敏红细胞具有较好的重复性。

用我们建立的反向间接血凝方法对 5 个疑似仔猪黄痢的发病猪场进行大肠杆菌 K88、K99 和 987P

纤毛抗原检测,结果从 4 个猪场分别检测出 K88、K99 和 987P 纤毛抗原大肠杆菌,该方法的检测结果与同时进行的玻片凝集试验检测结果一致,该结果表明,本检测方法能够用于临床仔猪大肠杆菌 K88、K99、987P 纤毛抗原的快速定性检测。

参 考 文 献

- [1] VU-KHAC H, HOLODA E, PILIPCINEC E, et al. Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia[J]. Veterinary journal, 2007, 174(1): 176.
- [2] FAIRBROTHER J M, 汪铭书. 从腹泻病新生仔猪分离的非传统血清型 *E. coli* 的纤毛抗原和肠毒素检测[J]. 国外兽医学——畜禽传染病, 1989, 9(3): 26-28.
- [3] 房海. 大肠埃希氏菌[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1997.
- [4] 陆桂平, 华荣虹, 张书霞, 等. 检测 K88+肠毒素性大肠杆菌 PCR 方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2002, 34(12): 7-9.
- [5] 熊媛媛, 黄涛, 邢佳, 等. 大肠杆菌 K88、K99、987P 纤毛抗原提纯及抗血清制备[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(12): 2-4.
- [6] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [7] JEFFERY J Z, LOCKE A K, ALEJANDRO R, 等. 猪病学[M]. 10 版. 赵德明, 张中秋, 周向梅, 等, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2014.

Development and application of a reverse indirect hemoagglutination method for detecting piglet *E. coli* pili antigen

LIU Zewen TIAN Yongxiang YUAN Fangyan LIU Wei ZHOU Danna YANG Keli

Key Laboratory of Prevention and Control Agents for Animal Bacteriosis (Ministry of Agriculture)/
Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Hubei Academy of Agricultural Science,
Wuhan 430064, China

Abstract To develop a rapid differentiation and quantitative method for detecting the pili antigen of *E. coli* K88, K99 and 987P strain, positive serum of rabbit was prepared with purified *E. coli* K88, K99 and 987P pili antigen and their AGP titers were 1 : 32, 1 : 32 and 1 : 128, respectively. Through sensitizing the Aldehydated sheep erythrocyte with the positive serum IgG, the optimal IgG concentrations in K88, K99 and 987P positive sera were determined at 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The same batch of K88, K99 and 987P pili antigens were detected three times using the same method and the RIHA titer of K88, K99 and 987P samples were 1 : 1 600, 1 : 1 600 and 1 : 800, respectively. The results showed that the detecting method had good specificity and reproducibility and could be used for differentiation and quantitative detection of pili antigen of *E. coli* K88, K99 and 987P strain.

Keywords piglet; *Escherichia coli*; pili antigen; reverse indirect hemoagglutination(RIHA)

(责任编辑:边书京)