

实验技术与方法

食品检测用产肠毒素大肠埃希氏菌标准物质的制备及评价

刘娜,王亚萍,赵琳娜,王学硕,崔生辉
(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

摘要:目的 制备并评价产肠毒素大肠埃希氏菌(ETEC)标准物质。方法 分别用基质辅助激光解吸电离(MALDI-TOF MS)、生化、16 s RNA 基因序列测定三种方法确认菌株种属。采用冷冻干燥技术制备 600 个 ETEC 标准样品(10^3 CFU/样品);从中随机抽取 20 个进行均匀性检验;模拟 25 °C 和 37 °C 的运输温度测试样品的运输稳定性,同时在 4 °C 和 -20 °C 的条件下进行保藏稳定性检验。组织 3 家实验室对样品进行协同验证。最后选择 20 件食品基质来验证样品的使用效果。结果 生化、MALDI-TOF MS、16 s RNA 基因序列鉴定 CMCC(B)43208 为大肠埃希氏菌, *lt*、*stp*、*sth* 基因确认其为 ETEC。均匀性检验中,单因素方差分析得 $F=1.48$, 小于 $F_{INV}(0.05, 19, 20)$ 。稳定性检验中,在 25 °C 和 37 °C 保藏 7 d 后结果为 10^3 CFU/样品,在 -20 °C 保藏 60 d 和 4 °C 保存 28 d 后结果为 10^3 CFU/样品。协同标定实验中,3 家实验室检测样品中菌株均为 ETEC(10^3 CFU/标准样品)。使用效果评价中,ETEC 标准样品加入 20 种食品基质后均可检出,而本底对照均未检出。结论 本实验制备的 ETEC 标准样品均匀且稳定,协同验证、食品基质验证实验结果均与预期设置的 10^3 CFU/样品一致,可以作为标准物质使用。

关键词:微生物标准物质;产肠毒素大肠埃希氏菌;均匀性;稳定性;应用

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)02-0270-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.02.012

Preparation and evaluation of enterotoxigenic *Escherichia coli* reference for food testing

LIU Na, WANG Yaping, ZHAO Linna, WANG Xueshuo, CUI Shenghui

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To prepare and evaluate Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) reference. **Methods** The standard strain CMCC(B)43208 was identified by biochemical reaction, matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and gene sequencing. 600 ETEC reference samples with 10^3 CFU/sample were prepared by freeze-drying. 20 samples were selected randomly for uniformity test, and samples were tested transportation stability by simulating 25 and 37 °C, and storage stability by storing samples at -20 and 4 °C. Three laboratories were organized for collaborative calibration. 20 kinds food were chosen as the substrates to evaluate the applicability. The strain CMCC(B)43208 was identified as *Escherichia coli* by all of biochemical reaction, MALDI-TOF MS and 16 s RNA gene sequencing, and was identified as ETEC by *lt*, *stp* and *sth* gene. The uniformity result was $F=1.48 < F_{INV}(0.05, 19, 20)$ by one-way anova. The samples were still 10^3 CFU/sample after storing 7 d at 25 and 37 °C, 28 d at 4 °C and 60 d at -20 °C. All the results of three laboratories were ETEC (10^3 CFU/sample). **Results** All 20 food substrates presented ETEC positively when adding the ETEC samples, while substrates presented ETEC negatively with no samples adding, the standard strain CMCC(B)43208 was ETEC. **Conclusion** The prepared samples were uniformity and stable, and the results of the collaborative calibration and applicability evaluation achieved expected requirements as 10^3 CFU/sample, so the samples can be used as ETEC reference.

Key words: Microbial reference; Enterotoxigenic *Escherichia coli*; uniformity; stability; application

产肠毒素大肠埃希氏菌(Enterotoxigenic

Escherichia coli, ETEC)是一种人畜共患病的致泻大肠埃希氏菌^[1-2],能够分泌热稳定性肠毒素或/和热不稳定性肠毒素^[3-4],患者一般表现为腹泻,严重时呈现霍乱样症状^[5],多发生在婴幼儿和旅游者中^[1,4,6-10]。由于 ETEC 引起危害健康的事件频发,国内外不少研究机构对 ETEC 的致病机理进行了研究^[11-14],先后研究出多种疫苗^[14-16],期望将 ETEC 风险降至最低^[3,14,17]。我国预包装和散装即食食品致

收稿日期:2021-11-04

基金项目:科技部“食品安全关键技术研发”重点专项项目(2018YFC1603904);中国食品药品检定研究院中青年基金(2020C3)

作者简介:刘娜 女 助理研究员 研究方向为食品安全检测

E-mail: xinyiliuna@163.com

通信作者:崔生辉 男 研究员 研究方向为食品安全检测

E-mail: cuishenghui@aliyun.com

病菌限量标准也将本菌列为必检致病菌指标之一。

《食品安全国家标准微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》GB4789.6—2016 规定了 5 种致泻大肠埃希氏菌检验方法。方法中明确要求使用阳性对照和阴性对照,针对 ETEC 检测阳性对照一般为提前培养的 ETEC 标准菌株(菌株培养至少 18 h)。在日常食品检验中,增加阳性对照会导致增加步骤和检验时间,如果实验室保存的阳性菌株污染或死亡,还可能导致结果错误。而使用即用型 ETEC 标准物质则可以简化检测步骤,提高检验的时效性和准确性。我国目前还没有关于 ETEC 标准物质的相关报道,本研究对 ETEC 标准菌株 CMCC(B)43208 展开研究,制备了均匀、稳定的 ETEC 标准物质,期望优化 ETEC 检测方法,为检测机构提高 ETEC 检测水平提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

菌株 CMCC(B)43208 来源于中国医学细菌保藏管理中心(National Center for Medical Culture Collection, CMCC)。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK COMPACT 2 全自动微生物分析系统(法国梅里埃公司);基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS, 德国 Bruker 公司产品);LABCONCO FreeZone12 L 冷冻干燥机(德国 LABCONCO 公司产品);Thermo1389 生物安全柜(美国 Thermo 公司产品);Thermo205050GC 恒温培养箱(美国 Thermo 公司产品);FORMA 恒温摇床、HYC-940 螺旋涂布仪(西班牙 IUL 公司产品)。

营养肉汤培养基、脑心浸液肉汤(Brain Heart Infusion, BHI)培养基,麦康凯琼脂(MacConkey Agar, MAC)培养基、伊红美蓝琼脂(Eosin-Methylene Blue Agar, EMB)培养基、胰酪大豆胨琼脂(Tryptic Soy Agar, TSA)培养基(美国 BD 公司产品);肠道菌增菌肉汤(北京奥博星生物技术有限责任公司);生理盐水、氯化钠、L 型细胞涂布棒(L 棒)(国药集团);西林瓶(2 mL)(肖特药品包装(浙江)有限公司)。所有试剂均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定

用 10 μ m 接种环取冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冻存液(50% 甘油配制的 BHI 液体培养基)的 CMCC(B)43208 菌

株一环,分区划线于 TSA 平板,置(36 \pm 1) $^{\circ}$ C 培养 18-24 h。挑取单菌落分区划线于 TSA 平板,置(36 \pm 1) $^{\circ}$ C 培养 18-24 h。使用 VITEK COMPACT 2 全自动微生物分析系统、MALDI-TOF MS、16 s RNA 基因序列测定初步鉴定菌株种属。然后提取菌株基因组 DNA,依据 GB4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》扩增 *lt*、*stx*、*stx* 基因,进一步确认基因特征进行菌株分型。

1.2.2 ETEC 样品的制备

用灭菌后的棉签收集 CMCC(B)43208 新鲜培养物于冻干保护剂中,涡旋震荡确保菌液均匀,以 20 μ L/样品进行速冻,于冷冻干燥机中进行冷冻干燥,制备样品。

取 20 μ L 冻干前菌液加入到 1 mL 生理盐水中混匀,通过螺旋涂布仪的 E50 模式涂布于 TSA 平板,置(36 \pm 1) $^{\circ}$ C 培养 18-24 h 后,统计 CFU 数作为冻干前数据。用 1 mL 生理盐水溶解冻干后的样品,并依照上述方法涂布、培养,统计 CFU 数作为冻干后数据,冻干存活率=(冻干前数据/冻干后数据) \times 100%。依照冻干存活率调制菌液,最终制备成 10³ CFU/样品的 ETEC 标准样品 600 个,将每个样品放入 2 mL 的西林瓶中,并用冷冻干燥机真空干燥、压盖,待用。

1.2.3 均匀性检验

依据 CNAS—GL003:2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》进行均匀性检验。随机抽取 ETEC 标准样品 20 个,依照检测冻干后样品 CFU 数目的方法,设置 2 个平行,统计标准样品 CFU 数目。通过 SPSS 软件的单因素方差分析程序分析本次研制的 ETEC 标准样品的均匀性。

1.2.4 稳定性检验

依据 CNAS—GL003:2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》进行稳定性检验。将 ETEC 标准样品分别放置于 25 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 环境中,分别于第 1、3、5 和 7 天抽取 3 个,依照均匀性检验方法统计标准样品 CFU 数目,存活率=(CFU 数/均匀性检验均数) \times 100%,对运输稳定性进行评价。

将 ETEC 样品放置于 -20 $^{\circ}$ C 和 4 $^{\circ}$ C 冰箱中,其中 4 $^{\circ}$ C 保存的样品分别于第 7、14 和 28 天各抽取 3 个, -20 $^{\circ}$ C 保存的标准样品分别于第 28 和 60 天各抽取 3 个,依照运输稳定性的方法对保藏稳定性进行评价。

1.2.5 协作标定

向 3 家实验室分别发放随机抽取的 10 个标准样品,并提供作业指导书。作业指导书提供方法如下:将每个标准样品溶解于 1 mL 生理盐水中,使用

涡旋振荡器充分混匀作为原液,然后用生理盐水制成 1:10 稀释液,分别取上述两种浓度的稀释液 100 μL ,用 L 棒或全自动螺旋涂布仪涂布于 TSA 平板,设置 2 个平行,将平板置 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 18–24 h 后,统计标准样品 CFU 数目,并对菌落依照 GB4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》进行鉴定。

1.2.6 食品基质验证

为保证研制的 ETEC 标准样品具有广泛的应用范围,本研究根据 GB 29921—2013《食品安全国家标准 食品中致病菌限量》选择 20 种食品基质(详见表 5)做验证试验,包括高盐类(腐乳、肉干)和高油脂类食品(薯片、饼干)。称取每种基质 2 份(25 g/份),

1 份作为验证基质,1 份作为本底对照。用 3 ml 生理盐水溶解 3 个标准样品作为待验证菌液,取 100 μL 至各个验证基质作为试验组,另取 100 μL 生理盐水至本底对照组,随后依照 GB4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》进行检验。

2 结果

2.1 菌株种属确认

菌株 CMCC(B)43208 经生化、MALDI-TOF MS、16 s RNA 基因序列测定均鉴定为 *Escherichia coli*,进一步扩增 *lt*、*stp*、*sth* 基因,均为阳性,确认为 ETEC,见图 1。

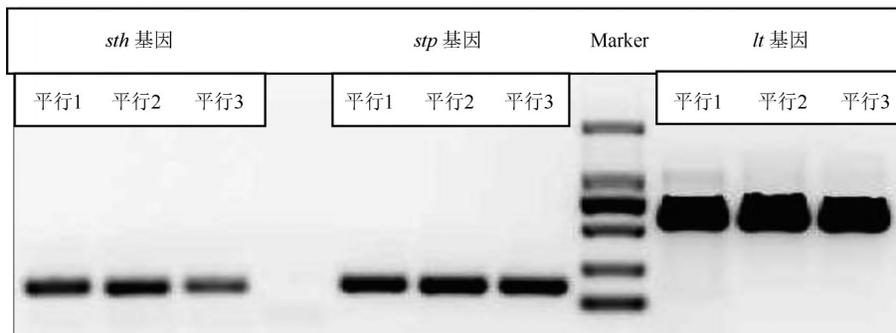


图 1 *lt*、*stp*、*sth* 基因琼脂糖凝胶电泳分离图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis separation diagram of gene *lt*, *stp*, *sth*

2.2 样品制备

本研究制备 ETEC 标准样品 600 个。在冻干研究中发现,不同种属菌株的存活率差距较大,从不足 1% 到 80% 均有可能出现。即使同一种属菌株,存活率也存在差异。如本研究中的 ETEC 的冻干存活率为 60% 左右,而同为致泻大肠杆菌的肠道出血性大肠埃希氏菌(*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC)和肠道致病性大肠埃希氏菌(*Enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC)的冻干存活率则分别为 80% 和 40% 左右,推测可能与菌体内不同抗压机制有关。本研究通过优化冻干条件,如选择液氮快速塑形(样品为白色球状)、真空冻干以及真空压盖,已经形成了稳定的研制方法:制备适宜浓度 ETEC 母液浓度,在液氮中快速塑形成球(20 μL /球)、真空冻干 16 h、真空压盖、 -20°C 保存样品。

2.3 均匀性检验结果

20 个 ETEC 标准样品计数结果见表 2。经分析,数值符合正态分布,最大值为 2 520 CFU/样品,最小值为 1 920 CFU/样品,均值为 2 356 CFU/样品(稳定性检验以此数据为基数计算存活率)。经单因素方差分析,样品满足均匀性检验要求($F = 1.48$, $P > 0.05$)。

表 1 ETEC 标准样品均匀性计数结果(10^3 CFU/样品)

Table 1 Results of uniform count of ETEC samples(10^3 CFU/sample)

序号	平行 1	平行 2
1	2.18	2.30
2	2.52	2.46
3	2.04	2.48
4	1.92	2.28
5	2.24	2.46
6	2.52	2.38
7	2.52	2.32
8	2.38	2.24
9	2.46	2.46
10	2.18	2.38
11	2.52	2.48
12	2.36	2.24
13	2.28	2.16
14	2.40	2.20
15	2.36	2.18
16	2.38	2.52
17	2.42	2.46
18	2.22	2.38
19	2.52	2.48
20	2.58	2.38

2.4 稳定性检验结果

ETEC 标准样品运输稳定性检验结果见表 3。从结果可以看出,在 25°C 和 37°C 存放 7 d 后仍满足研制前设定的 10^3 CFU/样品要求。但是随着时

表2 ETEC标准样品运输稳定性计数结果(10³ CFU/样品)
Table 2 Counting results of transport stability of ETEC samples
(10³ CFU/sample)

时间/d	37 °C(10 ³ CFU/ 样品)	存活率/%	25 °C(10 ³ CFU/ 样品)	存活率/%
1	2.35	99.9	2.17	92.1
3	2.30	97.7	2.37	100.6
5	1.92	81.5	2.15	91.1
7	1.36	57.6	2.01	85.3

表3 ETEC样品标准储藏稳定性试验结果(10³ CFU/样品)
Table 3 Counting results of preservation stability of ETEC
samples(10³ CFU/sample)

时间/d	-20 °C(10 ³ CFU/ 样品)	存活率/%	4 °C(10 ³ CFU/ 样品)	存活率/%
7	—	—	2.28	94.2
14	—	—	2.08	88.1
28	2.36	100	1.75	74.4
60	2.33	98.9	—	—

间的延长,ETEC标准样品存活率下降速率在加快,在37 °C存放7 d时存活率仅为57.6%;但是依据GB4789.6—2016,ETEC为定性检测,且使用的是高灵敏度的聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)方法,一般当样品中有存活的ETEC时,均可检出。考虑我国发达快捷的运输系统,即使较偏远地区一般3~5 d也能送达,若在邮寄时添加冰袋或干冰等降温物品,则稳定性会进一步加强。

ETEC标准样品保藏稳定性检验结果见表4。从结果可以看出,-20 °C保藏60 d或4 °C保藏28 d后仍满足研制前设定的10³ CFU/样品要求。-20 °C可以作为长期存放条件,而4 °C可以作为短期储存

条件。实验室在收到样品后,如若需要存放一段时间,建议低温条件下保藏。

2.5 协同验证

为保证ETEC样品数据准确可靠,本实验室组织了3家有资质实验室开展协作验证。验证结果显示,3家实验室鉴定结果标准样品均为ETEC,具体CFU数目见表5。从结果可以看出,3家实验室标准样品验证结果均满足10³ CFU/样品要求,与研制前设计含量一致。

表4 3家实验室ETEC标准样品协作标定结果(10³ CFU/样品)
Table 4 Collaborative calibration results of 3 laboratories on
ETEC samples(10³ CFU/sample)

样品编号	实验室代码		
	A	B	C
CODE1	1.6	2.2	1.8
CODE2	2.0	2.6	2.4
CODE3	2.5	2.3	2.4
CODE4	2.3	2.6	2.4
CODE5	1.8	2.2	2.1
CODE6	2.1	2.3	2.3
CODE7	1.9	2.1	1.2
CODE8	2.0	2.6	2.3
CODE9	2.2	2.4	2.1
CODE10	2.0	2.4	2.1

2.6 使用效果验证

表5食品基质验证结果显示,20种食品基质通过加入ETEC标准样品均能检出目标菌,而基质本底均未检出。证明本研究研制的ETEC标准物质可以直接作为阳性对照适用于各类食品的检验,可以简化检验程序,提高结果准确性。

表5 食品基质信息表

Table 5 Food matrices information

编号	名称及验证结果	编号	名称
1	呀土豆蜂蜜黄油薯片(+)	11	老布特麦麸饼干(+)
2	呀土豆番茄薯片(+)	12	老布特南瓜饼干(+)
3	呀土豆烤鸡薯片(+)	13	爱优诺优益力特殊婴儿配方奶粉(+)
4	九日蜂蜜薯片(+)	14	萌臻婴儿配方羊奶粉(+)
5	香老太五香腐乳(+)	15	宝素力幼儿配方奶粉(+)
6	香老太秘制白腐乳(+)	16	贝因美特殊医学用途婴儿配方奶粉(+)
7	香老太秘制辣腐乳(+)	17	老绥远手撕风干牛肉(+)
8	香老太桂林腐乳(+)	18	内蒙古保牛乳业风干牛肉(+)
9	乐之饼干(+)	19	大牧场手撕风干牛肉(+)
10	太平饼干(+)	20	草原心意手撕牛肉(+)

注:“+”代表食品基质通过添加ETEC标准样品溶液检出ETEC;“-”代表食品基质通过添加ETEC标准样品溶液未检出ETEC

3 结论

本研究研制的ETEC标准样品已被纳入国家药品标准物质(编号为800025)。ETEC标准物质样品不仅可以用于食品中致泻大肠埃希氏菌检验的质量控制,还可以用于实验室培养基质量控制、方法确认和人员考核等各个环节的内部质量控制。此

外,本研究制备的ETEC标准物质样品不含任何基质,实验室可以单独使用或依据不同目的加入不同基质中使用,因此可以在多个方面缓解由于菌株培养造成的时间压力,为提高食品中ETEC检验时效性奠定了基础,同时也弥补了我国在ETEC标准物质方面的不足。

确保检验结果有效性是食品微生物检验的关键因素。CNAS CL01—A001《检测和校准实验室能力认可准则在微生物检测领域的应用说明》中要求针对微生物定性检测项目,应定期使用标准物质/标准样品、质控样品或用标准菌种人工污染的样品开展内部质量控制。新近颁布实施的食品和环境领域微生物检验方法标准都增加了使用阴阳性对照菌株的质量控制要求。建议检测机构在日常食品检验中增加标准物质使用频次,保证结果科学准确。为保障食品安全提供有效技术支撑。

参考文献

- [1] 周海慧,周继恩,章跃炎.一起由产肠毒素大肠埃希氏菌引起的食源性疾病[J].中国卫生检验杂志,2013,23(7):1809-1810.
ZHOU H H, ZHOU J N, ZHANG Y Y. Identification of a foodborne disease due to enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2013, 23(7): 1809-1810.
- [2] 黄健强,南文金,胡鸿惠,等.粤北地区仔猪腹泻大肠杆菌分离鉴定及耐药性分析[J].微生物学杂志,2017,37(3):59-64.
HUANG J Q, NAN W J, HU H H, et al. Isolation and identification of *E. coli* from piglets diarrhea and drug resistance analysis in north Guangdong Region [J]. Journal of Microbiology, 2017, 37(3): 59-64.
- [3] RIAZ S, STEINSLAND H, HANEVIK K. Human mucosal IgA immune responses against enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. Pathogens, 2020, 9(9): 714.
- [4] 李蓉,王洁,马翠琴,等.感染性腹泻样本中致泻性大肠埃希菌的检测结果分析[J].安徽预防医学杂志,2013,19(6):463.
LI R, WANG J, MA C Q, et al. Ganranxing fuxieyangben Zhong zhixiexingdachangaixijun de jiancejieguo fenxi [J]. Anhui Journal of Preventive Medicine, 2013, 19(6): 463.
- [5] PONCET D, HESSLER C, LIANG H, et al. Preclinical optimization of an enterotoxigenic *Escherichia coli* adjuvanted subunit vaccine using response surface design of experiments [J]. Npj Vaccines, 2020, 5: 83.
- [6] 胡兆祥,郝笑.一起产肠毒素大肠埃希氏菌引起的食物中毒[J].安徽预防医学杂志,2012,18(5):390.
HU Z X, HAO X. Yiqi chanchangdusu dachangaixishijun yinqi de shiwuzhongdu [J]. Anhui Journal of Preventive Medicine, 2012, 18(5): 390.
- [7] 唐震,沈赞,秦思,等.2017年江苏省食源性疾病中致泻大肠埃希氏菌的感染状况及耐药性分析[J].南京医科大学学报(自然科学版),2018,38(10):1371-1375.
TANG Z, SHEN Y, QIN S, et al. Infection status and drug resistance of diarrheogenic *Escherichia coli* in foodborne disease in Jiangsu Province, 2017 [J]. ACTA Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science), 2018, 38(10): 1371-1375.
- [8] 傅祎欣,洪锦春,叶素贞,等.福建省2017—2018年畜禽肉中致泻大肠埃希氏菌污染状况及耐药分析[J].海峡预防医学杂志,2020,26(2):51-53.
FU Y W, HONG J C, YE S Z, et al. Fujiansheng 2017-2018nian xujinrou Zhong zhixiedachangaixishijun wuranzhuangkuang jinaiyao fenxi [J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 2020, 26(2): 51-53.
- [9] 傅祎欣,陈伟伟,叶素贞,等.2019年福建省哨点医院腹泻患者中致泻大肠埃希菌感染状况及病原学特征分析[J].中国食品卫生杂志,2020,32(5):539-543.
FU Y X, CHEN W W, YE S Z, et al. Infection status and etiological characteristics of diarrheogenic *Escherichia coli* among diarrhea patients in sentinel hospitals of Fujian Province in 2019 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2020, 32(5): 539-543.
- [10] BUUCK S, SMITH K, FOWLER R C, et al. Epidemiology of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in Minnesota, 2016-2017 [J]. Epidemiology and Infection, 2020, 148: e206.
- [11] RIDDLE M S, MACIEL M JR, PORTER C K JR, et al. A first in human clinical trial assessing the safety and immunogenicity of transcutaneously delivered enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial tip adhesin with heat-labile enterotoxin with mutation R192G [J]. Vaccine, 2020, 38(45): 7040-7048.
- [12] DUARTE M E, TYUS J, KIM S W. Synbiotic effects of enzyme and probiotics on intestinal health and growth of newly weaned pigs challenged with enterotoxigenic F18+*Escherichia coli* [J]. Frontiers in Veterinary Science, 2020, 7: 573.
- [13] ZONG X, WANG H, XIAO X, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection promotes enteric defensin expression via FOXO6-METTL3-m6A-GPR161 signalling axis [J]. RNA Biology, 2021, 18(4): 576-586.
- [14] AMCHESLAVSKY A, WALLACE A L, EJEMEL M, et al. Anti-CfaE nanobodies provide broad cross-protection against major pathogenic enterotoxigenic *Escherichia coli* strains, with implications for vaccine design [J]. Scientific Reports, 2021, 11: 2751.
- [15] MEDEIROS P H Q S, BOLICK D T, LEDWABA S E, et al. A bivalent vaccine confers immunogenicity and protection against *Shigella flexneri* and enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in mice. Npj Vaccines, 2020, 5: 30.
- [16] BRAVO SANTANO N, JUNCKER BOLL E, CATRINE CAPERN L, et al. Comparative evaluation of the antimicrobial and mucus induction properties of selected *Bacillus* strains against enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. Antibiotics, 2020, 9(12): 849.
- [17] ZHOU Y, NI X Q, DUAN L, et al. *Lactobacillus plantarum* BSGP201683 improves the intestinal barrier of giant Panda microbiota-associated mouse infected by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2021, 13(3): 664-676.