

## 正常仔猪肠道内大肠杆菌定居的研究

### II. 正常仔猪肠道内大肠杆菌血清型排除机制的探索

方定一 董国雄 朱承如

(江苏农学院畜牧兽医系, 扬州)

通过给 26 头仔猪口服大肠杆菌 NY-10 菌株 ( $O_{33}:K_-:H_-$ ) 和 ST-A 菌株(未定型,但与前者血清型不同),研究了不同日龄仔猪肠道内大肠杆菌定居的规律。给不同日龄仔猪口服  $10^8-3 \times 10^{10}$  个细菌,定期从各猪的直肠粪样中分离大肠杆菌,并用相应抗血清对所分离的各株大肠杆菌加以鉴定。结果表明, NY-10 或 ST-A 菌液经初生仔猪口服后,两者在肠道内的定居模式基本相同; NY-10 菌株在不同日龄仔猪肠道内的定居曲线也大体一致。一个血清型大肠杆菌在肠道内占 100% 的优势期为 5—6 天,而总的定居期约 10 天,以后则被其它血清型大肠杆菌更替。在最初接种的 NY-10 菌株于定居肠道中消失后 7—12 天,给仔猪再次口服该菌株  $4 \times 10^{10}$  个。发现该菌株迅速被排除,或者不能从这些仔猪的直肠棉拭中分离到,或者仅在肠道中定居很短的时期。与此相反,初次口服过 ST-A 菌株的仔猪,在口服 NY-10 菌株后,则后者在这些仔猪肠道内的定居模式与初次口服 NY-10 菌株的定居曲线相似。本试验证实,仔猪肠道对大肠杆菌的排斥具有抗原特异性,其机制可能主要是寄主肠道对定居菌的主动免疫应答所致的免疫排除。

**关键词** 正常仔猪;大肠杆菌

正常仔猪粪便中大肠杆菌的数量一般在  $10^5-10^9$  个/g。但迄今对正常仔猪肠道内大肠杆菌血清型的组成及更替情况了解甚少。方定一等<sup>[1]</sup>对正常仔猪肠道内大肠杆菌血清型的定居及更替情况的观察发现,肠道中大肠杆菌的血清型处在不断的更替之中。某一血清型大肠杆菌在肠道内定居时间一般为 6—12 天不等,以后则为另一血清型大肠杆菌所替代。在一定期间内曾出现过的优势血清型不再重复出现。他们认为寄主肠道内大肠杆菌的消失,可能是一种局部免疫现象。作者在此基础上,用大肠杆菌给不同日龄哺乳仔猪口服,以观察其在肠道内的定居情况,并就肠道对大肠杆菌的特异性排除机制作了初步探讨。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材料

1. 菌株: 本试验用两株大肠杆菌。菌株 NY-10 是方定一等<sup>[1]</sup>用于预防仔猪黄痢的能产生强有力肠菌素的非病原性大肠杆菌,抗原式为  $O_{33}:K_-:H_-$ ; 另一株 ST-A 系作者从正常仔猪肠道分离到的,经鉴定符合大肠杆菌的生化特性,其抗原式未定,但与前者无交叉血清学关系。结扎肠试验<sup>[2]</sup>证明,这两株大肠杆菌均不产生肠毒素。

2. 试验猪: 本次试验用 26 头乳猪,品种有姜曲海、二花脸及其杂交种,日龄 1—35 天。整个试验期内母猪及仔猪均未用过任何抗菌药物,也无任何泻痢症状。

3. 抗血清: 用 0.4% 甲醛灭活的 NY-10 株或 ST-A 株的菌液分别多次免疫成年山羊而制得

本文于 1982 年 9 月 6 日收到。

抗 NY-10 菌株与抗 ST-A 菌株的血清。二种抗血清与相应菌株的凝集效价均为 1:640。用 1:2 稀释的抗血清与适量的相应菌浓悬液在玻璃板上混合, 10 秒钟内即呈大片凝集。

(二) 方法

1. 初次口服菌液: 对 8 头初生乳猪按方定一等人<sup>[4]</sup>方法, 每头口服接种约 10 亿个菌。对 12、19、21、32 日龄的 4 头乳猪, 则试验时直接口服菌液 8—10ml, 总菌量 300 亿个/头。所有试验猪均自然哺乳。

2. 再次口服菌液: 当初次口服的菌株在肠道内定居并消失后, 间隔一定的时间, 作第二次口服接种。其中 45、42 及 1、2、3、5、7 号仔猪均在初生时口服 NY-10 菌株, 45 和 42 号猪分别于 12 和 13 日龄时再次口服该菌, 其余 5 头仔猪则于 22 日龄时再次口服该菌。48 及 70 号仔猪则于 19 日龄时初次口服 NY-10 菌株, 然后分别于 32、33 日龄第二次口服该菌。11、12、16、17、19 号仔猪均在初生时口服 ST-A 菌株, 21 日龄时再口服 NY-10 菌株。上述 4 组共 14 头仔猪再次口服菌量为每头 10ml, 约含菌 300—500 亿个。

3. 口服菌株的分离与鉴定: 仔猪口服一种菌液后, 每日用无菌棉拭从直肠采集粪便, 于麦康凯琼脂平板上划线分离, 经 37℃ 培养 18 小时, 从每一粪便样品的培养物中任意挑取 30 个左右的典型大肠杆菌单个菌落, 分别接种于普通肉汤琼脂斜面上, 37℃ 培养 18 小时。将各管斜面培养物于玻璃板上——制成适量的生理盐水浓菌液并与相应的 NY-10 株或 ST-A 株抗血清凝集, 凡 10 秒内呈现大片凝集者, 判为阳性菌, 同时计算出它们的百分比。

结 果

(一) 初次口服的大肠杆菌在肠道内的定居

1. NY-10 菌株被初生仔猪口服后, 24 小时即可从粪便中检出, 直到 5—6 日龄时, 粪便中的大肠杆菌几乎全部是 NY-10 株。此后才出现其它血清型的大肠杆菌, 同时 NY-10 菌株的分离率也逐渐下降, 在 3—5 天内即全部消失。NY-10 株在初生

仔猪肠道内的定居期约为 10 天, 长者 14 天, 短者 6 天 (图 1、2)。ST-A 株经初生仔猪口服后, 其定居时间与模式同 NY-10 株大体一致 (图 3)。

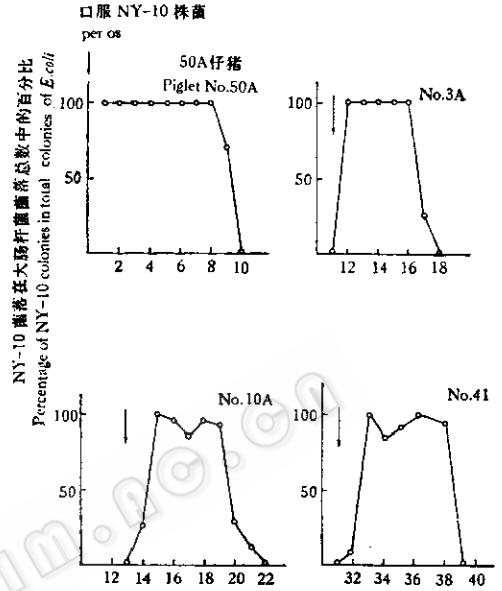


图 1 NY-10 菌株在不同日龄仔猪肠内的定居情况

Fig. 1 The persistence periods of NY-10 in piglets' intestine in different ages

2. 日龄较大的仔猪在初次口服 NY-10 菌株液后, 需经 24—48 小时, 该菌株在肠道内才能成为 100% 的优势菌。从 12、19、21 和 32 日龄仔猪肠内 NY-10 株的定居曲线 (图 1、2) 可见, 除个别猪外, NY-10 株在肠道中占优势的时间一般为 4—5 天, 总的定居期约为 8 天。

上述结果表明, NY-10 菌株在不同日龄仔猪肠道内的定居曲线基本相同, 并无猪体、品种上的明显差异。

(二) 再次口服的 NY-10 菌株在肠道内的定居情况

初次口服 NY-10 菌株的仔猪, 在再次口服该菌后, 其肠内该菌的定居情况见图 2。从图 2 可见, 试验猪对再次口服的 NY-10 菌株均具有明显的排斥作用。它

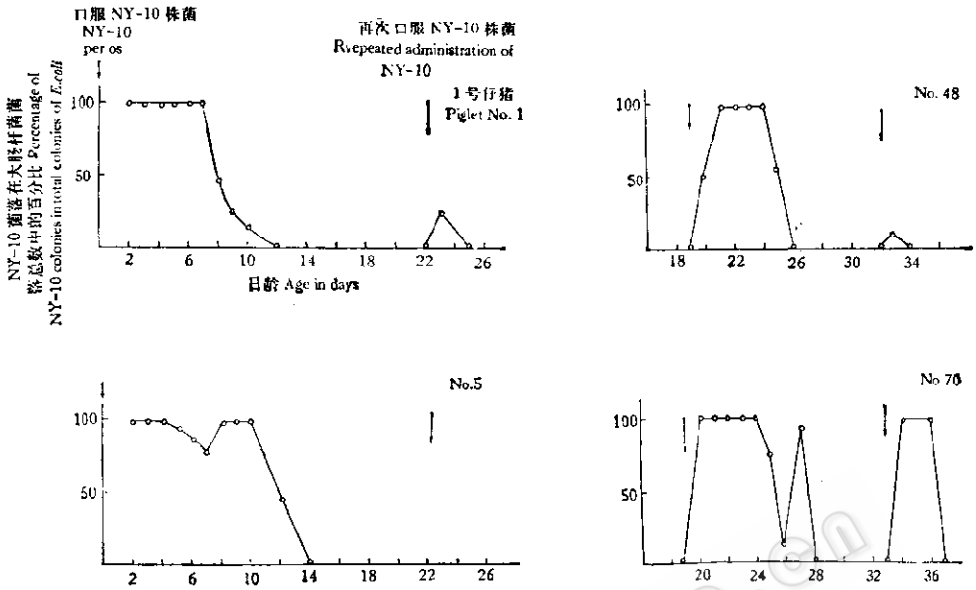


图2 不同口龄仔猪中再次口服 NY-10 菌株的定居情况

Fig. 2 The persistence periods of repeated administration of NY-10 to piglets in different ages

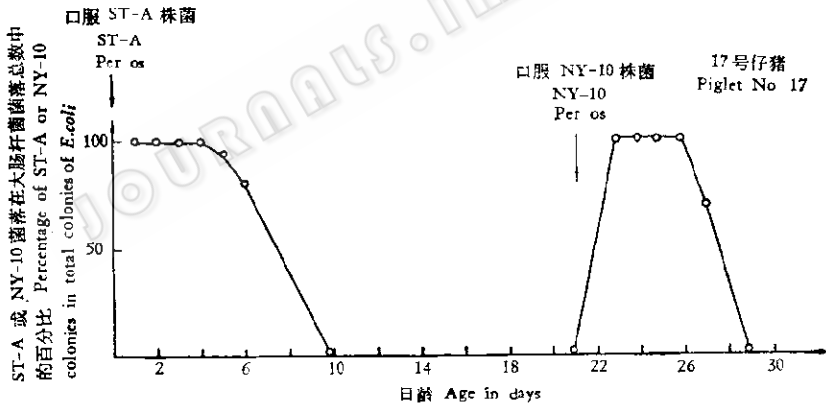


图3 NY-10 菌株在初次口服 ST-A 菌株 21 天后的仔猪肠内的定居情况

Fig. 3 The persistence period of NY-10 in piglet's rectum after 21 days of the first administration of strain ST-A

表现为两个方面: 一是粪样中的该菌分离率大大下降(除 70 号猪外, 均不超过 60%), 不再像初次口服该菌时一样, 在接种后的最初几天内, 一直是肠内的绝对优势菌; 二是再次口服的 NY-10 菌株在肠道中的定居期大为缩短, 最长 3 天, 一般为 1—2 天即终止。这与初次口服的 NY-10 菌株在

各猪肠内的定居曲线, 特别是与该菌株在先口服 ST-A 菌株的仔猪肠内所表现的定居模式(图 3)相比, 两者差异极其显著。

## 讨 论

1. 对于人或动物肠道内大肠杆菌菌型的组成及变化, 一些学者曾作过详细的观

察。Sears 等人<sup>[15-17]</sup>在长期观察人粪中大肠杆菌菌型的组成之后,认为人的肠道中在任何时候都存在 3 个或 4 个以上的不同血清型的大肠杆菌。其中一些为“过路菌”,另一些属“常住菌”,且最终可为别的菌型所更替。Hartley<sup>[7]</sup>的试验表明,肠道中大肠杆菌的血清型不呈现规律性更替。而 Wallick 等<sup>[18]</sup>在对一位受试者长达 14 个月的观察中发现,从同一个人的某次粪样中分离的大肠杆菌占优势的菌型仅有一种,且优势菌型处在不断的更替之中。在他所获得的 4 个优势菌型中,定居期长者可达 5 个月,短者仅 7 天。Linton<sup>[9]</sup>从 2 头猪的 25 周的粪样的大肠杆菌菌型的分离鉴定结果的分析中,并未发现有不同的优势菌型及规律性更替现象。方定一等<sup>[4]</sup>的研究发现,仔猪肠内大肠杆菌菌型呈有规律的不断的更替,在整个试验期间(50 天),凡出现过的优势菌型不再复现。某一大肠杆菌菌型在乳猪肠内的定居期是有限的,并在优势定居期后很快即为另一菌型所替代。本试验对方定一等人研究作了进一步

验证。

2. 影响大肠杆菌在肠道内定居的因素很多。就本试验的情况来说,这种因素或为寄主的免疫排除,或为菌株间的竞争性排斥。

关于肠菌素在大肠杆菌定居过程中所起的作用,目前尚有争论。但肠菌素在试管内对敏感菌有抑制作用现已被肯定<sup>[6,10]</sup>。在 NY-10 菌株定居过程中,是否由于仔猪肠内出现足量的产肠菌素的大肠杆菌而使该菌株受到抑制而被排除呢?对此,我们用 Mackie 等氏<sup>[3]</sup>所推荐的方法,作了 NY-10 菌株对它的取代菌株的体外抑制试验。结果表明,取代 NY-10 株的大肠杆菌,非但不能抑制 NY-10 株菌的生长,反而大多数被 NY-10 株菌所抑制(表 1)。可见, NY-10 株的清除不是替代菌所产的肠菌素抑制作用的结果。

在本试验的两次口服菌液的 14 头仔猪中,有 9 头先口服 NY-10 株,5 头先口服 ST-A 菌株。待接种菌于肠道内消失后 5—13 天,一律再次口服 NY-10 株菌。结

表 1 NY-10 在体外对其取代菌的抑制能力

Table 1 The ability of inhibition of NY-10 to those successive strains *E. coli* in the intestine of a same piglet in vitros

仔猪号 Piglet No.	NY-10 对其取代菌株的抑制作用 The inhibition of strain NY-10 to strains which displaced NY-10		仔猪号 Piglet No.	NY-10 对其取代菌株的抑制作用 The inhibition of strain NY-10 to strains which displaced NY-10	
45	6/7*	3/6	5	5/7	3/8
42	6/6	5/5	7	4/4	3/6
48	4/8	6/7	11	4/6	
70	4/4		12	7/7	
1	4/4	4/7	16	3/6	
2	4/4	5/7	17	6/8	
3	3/3	6/6	19	6/8	

\* 分子为被 NY-10 抑制的菌落数,分母为被检测的大肠菌落数。

$$\text{Namerator/Denominator} = \frac{\text{No. of colonies inhibited by NY-10}}{\text{No. of colonies of } E. coli \text{ tested}}$$

果表明,凡先接种 ST-A 菌株的 5 头仔猪,对后接种的 NY-10 菌株均不表现出任何排斥作用。在这些仔猪中, NY-10 菌株仍呈典型的、初次口服后所见到的那种定居模式(图 3)。与此相反,在先口服 NY-10 菌株的 9 头仔猪中,再次口服的 NY-10 菌株或者完全被排斥,或者虽能定居于肠内,但定居时间大大缩短,多数不出现优势分离率。尽管 70 号猪在再次口服 NY-10 菌株后,该菌株曾出现过 100% 的分离率,但总的定居期与初次口服 NY-10 菌株的定居期仍有明显差异(图 2)。

综合方定一等<sup>[4]</sup>和此次的试验结果可以看出,任何血清型大肠杆菌在乳猪肠道内只能作有限期的定居且最终被寄主肠道所清除,从而构成肠内大肠杆菌菌型的不断更替的生物学反应现象。我们的试验说明,造成这种现象的主要原因可能是寄主对其肠内定居菌刺激所引起的一种特异性免疫应答的结果,因为这种清除具有明显的抗原特异性,定居菌被排除的时间符合机体一般免疫反应的规律,也与国外 Porter<sup>[12]</sup>、Peter<sup>[11]</sup> 等人所测得的动物肠道对大肠杆菌刺激所产生的高滴度抗体的时间是基本吻合的。

3. 我们曾试图用对定居菌有特异排斥作用的仔猪血清、肠系膜淋巴结,肠内容物中提取的  $\gamma$  球蛋白和粪浸液作被动红血球凝集试验,以测定试验仔猪体内的相应抗体的存在,但未获成功。其原因可能由于

抗体含量过少及 IgA 的凝集作用不强,或由于我们对相应抗体的提纯手段还不够高,或仔猪还具有其它免疫排斥方式。这些有待于今后进一步的研究和探索。

## 参 考 文 献

- [1] Maskie and Mecartncy: Handbook of Bacteriology, ed by Robert Cruickshank, E. and S. Livingstone Ltd., Great Britain, 10 ed., pp. 600—601, 1960.
- [2] 方定一、董国雄: 畜牧兽医学报, 10 (2): 79—84, 1979.
- [3] 方定一: 江苏农学院学报, 1: 1—7, 1980.
- [4] 方定一等: 微生物学报, 23(1): 84—90, 1983.
- [5] 诸长贵等: 江苏农学院学报, 2: 1—3, 1981.
- [6] Cooke, E. M.: J. Med. Microbiol., 5: 361—369, 1972.
- [7] Hartley, C. L. et al.: J. Appl. Bacteriol., 43: 261—269, 1977.
- [8] Kenworthy, R.: Advance in Applied Microbiology, 16: 31—54, 1973.
- [9] Linton, A. H.: J. Appl. Bacteriol., 44: 285—298, 1978.
- [10] Mason, T. G. et al.: J. Appl. Bacteriol., 1: 1—16, 1981.
- [11] Peter, D. et al.: Infect. Immun., 31 (1): 316—322, 1981.
- [12] Porter, P. et al.: Immunol., 27: 841—853, 1974.
- [13] Rose, N. et al.: Methods in Immunodiagnosis, Wiley, New York, 1973.
- [14] Savage, D. C.: Ann. Rev. Microbiol., 31: 107—133, 1977.
- [15] Sears, H. J. et al.: J. Bacteriol., 59: 293—301, 1950.
- [16] Sears, H. J. et al.: ibid., 63: 47—58, 1952.
- [17] Sears, H. J. et al.: ibid., 71: 370—372, 1956.
- [18] Wallick, H. et al.: ibid., 45: 121—126, 1943.

# A STUDY ON INHABITATION OF *E. COLI* IN THE INTESTINAL TRACT OF NORMAL PIGLETS

## II. AN EXPLORATION OF THE MECHANISM OF ELIMINATION OF *E. COLI* SEROTYPES IN THE INTESTINAL TRACT OF NORMAL PIGLETS

Fang Dingyi Dong Cuoxiong Zhu Chengru

(Jiangsu Agricultural College, Yangzhou)

Two *E. coli* strains designated NY-10 (O<sub>3a</sub>:K:-H-) and ST-A were chosen for this experiment to trace their persistence and elimination of *E. coli* in the intestinal tract of suckling piglets. Each of the piglets was administered  $10^9 - 3 \times 10^{10}$  bacteria, orally. The faecal specimens were taken daily, for *E. coli* isolation and colonies were identified with homologous antisera. It was demonstrated that the colonization models of NY-10 and ST-A were similar both in the intestine of the neonatal and a little aged sucklings. The administered *E. coli* became predominated (100%) for 5—6 days and the total persisted period in the intestine of these piglets lasted about 10 days. Then another *E. coli* serotype emerged out and displaced the former within a few days. As NY-10

were eliminated from the intestine 7—12 days later, the piglets were given  $4 \times 10^{10}$  NY-10 bacteria repeatedly. The repeated strain could not be found in rectum swabs from these piglets or could persist only for a very short period. In contrast, piglets were administered with strain ST-A first, and then administered with NY-10, the colonization and persistence of NY-10 were similar to the models of first administration. It was found that the elimination of *E. coli* (NY-10) from the intestine was due to the active immune response in the intestine of the sucklings. The elimination was proved to be antigen-specific.

### Key words

Normal piglets; *E. coli*