

# 正常仔猪肠道内大肠菌定居的研究

## 1. 正常仔猪肠道内大肠菌血清型的定居及更替的观察

方定一 董国雄 刘立人

(江苏农学院畜牧兽医系, 扬州)

用 NY-10 株大肠菌口饲初生仔猪 14 头, 定期用直肠棉拭从仔猪分离大肠菌并鉴定其血清型。其中 10 头猪共观察 7—13 天不等, 直至 NY-10 从棉拭中消失为止, 二头猪观察 16 和 24 天, 最后二头猪观察 50 和 53 天。

发现接种的 NY-10 于仔猪肠内繁殖后在 7—8 天内均占优势, 至第 5 到第 8 天之间开始出现新的血清型, NY-10 即迅速消失, 4—5 天后全部被新出现的菌型所替代。新菌型在猪体内的情况如 NY-10, 经短期的优势繁殖之后, 即为后来者所替代。有一头猪在 50 天的观察期间发生了 6 次菌型替代, 共出现 7 个优势菌型; 另一头猪有 7 次替代, 8 个优势菌型。

发生这种现象的机理尚未清楚。但注意到仔猪肠内清除一个菌型所需的时间, 约与其它免疫应答所需的时间相同 (约 10—20 天)。这种清除似乎具有抗原特异性。因为当一个优势菌型在肠内被清除以后, 在此后试验期间即不会出现第二次。作者推测这种现象是由于寄主的一种正常的生理功能所引起, 可能是一种局部免疫的现象。

方定一等于 1963 年找到了一株能产生强有力肠菌素的非致病性大肠菌, 称为 NY-10, 将其接种入初生仔猪的无菌肠道使之大量繁殖, 以其绝对优势的数量来抑制后侵入的致新生仔猪腹泻的肠病原性大肠菌的繁殖, 保护仔猪免于发病。1976 年又将其与一株嗜酸性乳酸杆菌混合制成 NY-10 制剂, 经多年来大量现场试用结果证明, 本制剂对初生仔猪腹泻具有明显的预防效果<sup>[1]</sup>。但对由大肠菌所致的 10 日龄以后的白痢及断奶后的水肿病则毫无效用。

除刚出生的幼畜外, 动物肠道内本来就有大量的大肠菌定居。那些后侵入的致病性大肠菌在进入肠道后, 首先必须和原来在数量上占优势的正常大肠菌相竞争, 只有使自己繁殖到在数量上压倒正常菌以后, 才能使寄主产生疾病。犊、驹和羔羊下

痢的病原菌是如此, 而使仔猪发生水肿病的大肠菌更是如此, 它们往往在幼小动物肠道内突然出现, 排挤掉原有的大肠菌型使自己成为优势菌型, 使寄主发病。这种菌型替代现象在正常动物肠道内是否存在以及产生这种现象的原因何在? 到目前为止, 有关这方面的知识甚少。本试验企图在这一方面作点探索。

## 材 料 和 方 法

### (一) 试验材料

1. 菌种: NY-10 株大肠菌系本院牧医系微生物教研组用于防止初生仔猪腹泻的冻干生物制品。其抗原式为 O<sub>33</sub>:K<sub>-</sub>:H<sub>-</sub>。其余供鉴定的大肠菌株均系定期在仔猪直肠所分离的自然出现的菌型。

2. 试验猪: 本院农牧场新准猪所生的正常仔

本文于 1981 年 9 月 10 日收到。

猪, 在试验期间均未发现肠道疾病的症状。耳号分别为 2、4、123、125、1、8、9、10、11、13、14、15、16、17, 共 14 头。

3. 家兔: 用于制备大肠菌抗菌血清的家兔为本院农牧场自繁自养的健康活泼, 体重在 2 公斤以上的日本大耳兔。

4. 抗血清: 抗 NY-10 血清系本系微生物教研组贮存的特异抗血清。至于其它大肠菌的抗血清均随时用所分离到的未知菌型制备。

## (二) 试验方法

1. 初生仔猪口服接种 NY-10 株大肠菌试验

母猪分娩前, 产房进行清洗和消毒, 并用 0.2% 新洁而灭溶液洗刷母猪肩、背和整个后躯及阴户。当每头仔猪一出阴户后即用手接住并迅速用消毒纱布擦去口腔粘液, 经口滴入 NY-10 株大肠菌悬液(冻干剂, 以无菌生理盐水作 1:10 稀释) 1 毫升, 约含活菌 4 亿个, 然后放入干净的草窝中, 2 小时后取出任其吮乳。在第一次吮乳前, 母猪乳房乳头先用新洁尔灭溶液洗涤一次。

2. 仔猪直肠内大肠菌的分离及保存

口饲 NY-10 菌株的仔猪一律留在母猪身边自然哺乳。定期用直肠棉拭采集粪便作分离, 每次分离间隔期分别从 1—5 天不等。将棉拭用缓冲盐水洗下后, 再用铂耳随机取材料于麦康盖琼脂平板上划线分离, 获得分散的单个菌落。除了测定 NY-10 时取数十个大肠菌菌落并测定血清型之外, 其余自然出现的未知型的大肠菌, 每次挑取 5 个菌落, 分别培养于半固体琼脂内, 贮于普通冰箱中以备将来制备抗血清及鉴定细菌血清型之用。对所有保存的菌株全部作了生化鉴定, 证明各株确系大肠菌。

3. 大肠菌型的鉴定与抗血清的制备

对口饲 NY-10 菌株的仔猪, 在最初菌型的鉴定中, 一律挑取多个菌落, 分别与 NY-10 的抗 O 血清作玻板凝集试验。如发现有对 NY-10 抗血清凝集阴性的菌落, 即随机挑取 5 个, 一一穿刺于半固体琼脂, 培养后作为保存菌种, 然后任意取其中的一支菌种, 在普通琼脂平板上扩大培养, 以无菌生理盐水洗下菌苔, 用 0.4% 福尔马林灭活制成免疫抗原, 多次静脉注射于家兔制成抗血清。用未稀释的抗血清一滴与相应细菌的浓悬液在玻

板上混合, 如在 10 秒钟内产生大片凝集块, 该血清即认为合格, 用于对同期分离的其余菌株及以后直肠棉拭所分离的各个菌落的半固体保存菌株的血清型检验。如若发现有凝集阴性的菌落, 即以该株用同样方法制成抗菌血清再试。如此反复测定及制备抗血清直至区别出全部不同的血清型为止。由于非特异凝集一般出现较迟, 故以 10 秒内者为限。

4. 对仔猪的大肠菌血清抗体和肠道抗体的初步探索

1 号猪口服 NY-10 第 12 天后即将 NY-10 全部从肠道内排除, 于第 16 天将该猪心脏采血致死, 分离出血清, 并取空迴肠捣碎作成 1:5 悬液, 经离心去掉组织碎片, 加入等量饱和硫酸铵溶液盐析、离心沉淀, 沉淀物加入适量生理盐水重新溶解, 再经透析去盐。取血清与 NY-10 作平板和试管凝集试验。除用透析物作试管凝集反应外, 又在普通营养琼脂平板与肉汤内作抑制 NY-10 菌生长试验。

## 结 果

### (一) 单个菌型(NY-10)的定居情况测定

在口饲 NY-10 之后, 大多数经 24 小时即完全占领肠道, 从 14 头仔猪直肠棉拭中, NY-10 的分离率为 100% 的期间大多为 4 天, 最短两天, 最长 7 天。以后出现少数异型菌落, 经数天后 NY-10 即迅速被新型菌落所替代。第 I 血清型(NY-10)在肠道内存在的时间最长在个别猪达 19 天, 大多数为 9—12 天, 最短者为 7 天(见图 1, 表 1)。

### (二) 两个菌型的测定

共试验了两头乳猪, 在口服 NY-10 后, 用 NY-10 抗血清检查直肠分离物直至 NY-10 全部消失。再连续测定第 II 菌型存在的时间。第 II 菌型与第 I 菌型存在的情况大体类似, 在 6 天左右占绝对优势, 以后迅速为其它菌型所替代(见图 2—5,

表 1 不同菌型在肠道内定居的最长时间

Table 1 The Longest Colonized time of respective *E. coli* serotypes in pigs intestines

猪号 Pig No.	菌型 Serotypes	天数 Days							平均定 居天数 Average	备 注 Remarks
		NY-10	II	III	IV	V	VI	VII		
No. 2		9	10	17	17	14	10	10	12.4	见图 1 (Fig.1)
No. 4		19	17	7	11	10			12.3	见图 2 (Fig.2)
No. 123		14	20						17	见图 3 (Fig.3)
No. 125		12	10						11	见图 4 (Fig.4)
No. 9		12								见图 5 (Fig.5)

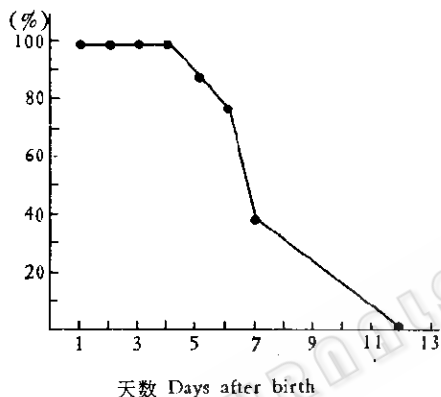


图 1 9号猪肠道内大肠杆菌 NY-10 菌株定居情况

Fig. 1 The persistence of NY-10 in the intestines of pig No. 9

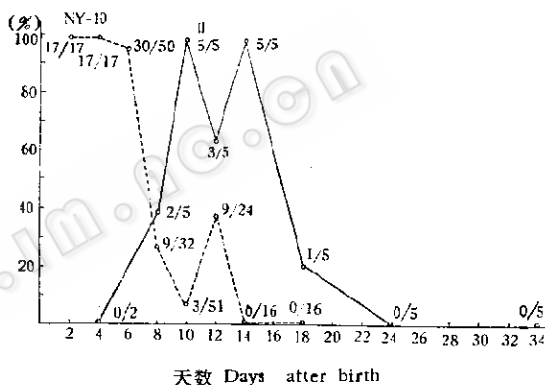


图 2 123号猪肠道内大肠杆菌血清型定居与替代情况

Fig. 2 Persistence and substitution of *E. coli* serotypes in intestines of pig No. 2.

分子/分母 = 与特异血清凝集之菌落数/菌落总数; II: 血清型 II

Numerator: No. of colonies with positive reaction  
Denominator: No. of colonies tested. II: Serotype II

有对 NY-10 菌的凝集抗体, 亦未观察到能抑制其生长的现象。

## 讨 论

1. 本试验还有不足之处。首先是每次直肠棉拭分离、取出供鉴定的菌落太少, 个别为30余个, 一般为5个, 极少数到鉴定时只有4个, 因此可能检不出直肠中出现的所有菌型; 其次是各次分离的间隔期长短不一, 一般是长了一点(5天)。在这样的间

表 1)。

### (三) 多个菌型的测定

试验的两头乳猪分别连续测定 50 或 53 天。以后菌型的变化情况与一、二两项相似。每个菌型在肠内占绝对优势的时间都不出 6 天, 短者可能只有 1—2 天。至于总的存在时间则稍长, 最长者先后共 19 天, 最短者为 7 天, 大多在 10—17 天之间 (见图 1、2, 表 1)。

### (四) 血清抗体和肠道抗体测定

在肠道内已排除 NY-10 的一头仔猪, 其血清和肠道组织提取物内并未发现

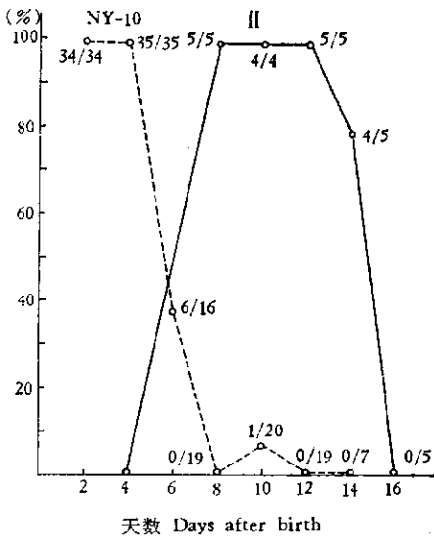


图 3 125 号猪肠道内大肠杆菌血清型定居与替代情况  
 Fig. 3 Persistence and substitution of *E. coli* serotypes in intestines of pig No. 125  
 Legend as in figure 2

隔期中,很多菌型只出现一次就消失了,摸不到它们出现与消失的详细过程,因此对于一个菌型在肠内定居期间的估计是很难准确的。我们的试验结果只能反映肠内优势菌型定居与更替规律的一般概貌,并不表示在一段时间内肠内只有这种优势者,

可能同时存在其它一些菌型,只不过他们在数量上较少而未被检出罢了。尽管如此,在试验中我们仍然得到了一些初步的、过去很少了解的有关知识。

2. 对正常动物肠道内大肠菌型定居和变化的情况,人们了解得很少。从文献来看,对这类问题大致有二种不同意见。一种认为大肠菌进入肠道后即长期定居不易改变。Sears<sup>[2]</sup>从某人粪便大肠菌型鉴定中,即认为人肠道中的大肠菌型很难变更。另一种意见认为动物肠内大肠菌定居是不稳定的,其血清型也在不断地变化。Creven与 Barnum<sup>[3,4]</sup>研究了猪肠道内大肠埃希氏菌血清型随时间与环境而变化的情况,他们的观察表明,少数大肠埃希氏菌血清型在几周内占大肠菌丛的优势,而在一个被污染的猪圈内许多批样品所检出的血清型始终不变。Linton 等人<sup>[5]</sup>对猪一生中大肠埃希氏菌血清型的变动情况作了详细的研究,其结果表明,猪肠内大肠菌型随猪年龄与使用抗菌素而发生很大的波动,各株大肠菌型间的定居能力也有很大差异,但他们没有说明各株菌型的定居时间与替代规

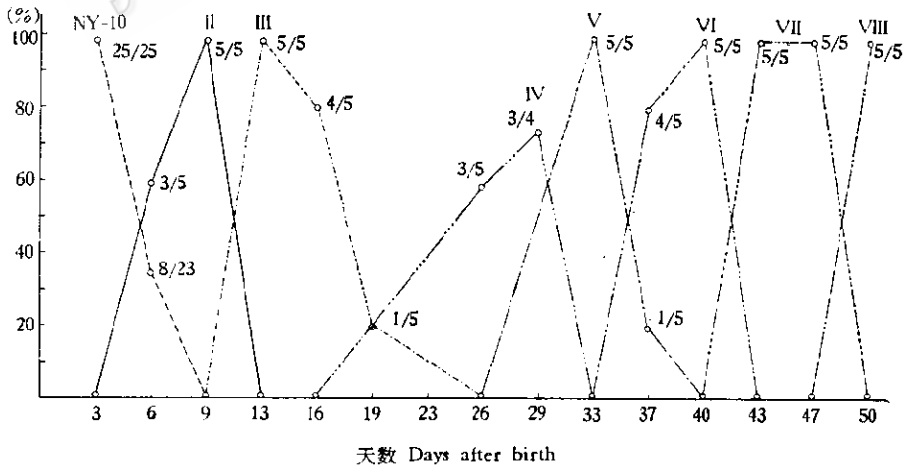


图 4 2 号猪肠道内大肠杆菌血清型定居与取代情况  
 Fig. 4 Persistence and substitution of *E. coli* serotypes in intestines of pig No. 2  
 II-VIII: Serotypes  
 Legend as in figure 2

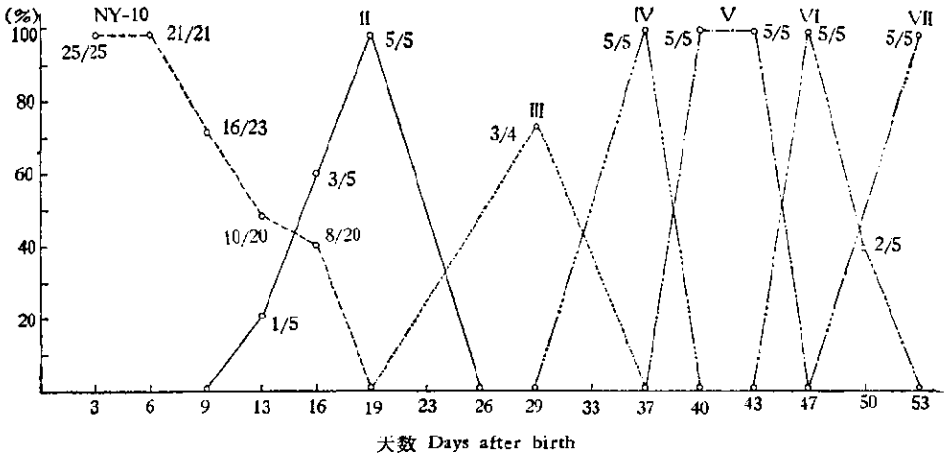


图5 4号猪肠道内大肠杆菌血清型定居与取代情况

Fig. 5 Persistence and substitution of *E. coli* serotypes in intestines of pig No. 4  
II--VIII: Serotypes  
Legend as in figure 2

律。我们的试验表明乳质肠内大肠菌型不是静止不动的，而是剧烈地变化着。一个优势菌型的最长定居期一般不超过十几天，只有个别达 20 天。一旦出现有少数新菌型时，原有者即迅速消失，被新来者所全部替代。在所有试验的 14 头仔猪中无一例外。整个大肠菌群就如不断流动的大江，前浪被后浪所替代，此现象在其它动物中可能同样存在。只有这样才能说明为什么已经具有优势地位的正常大肠菌所定居的动物肠道仍能被病原性大肠菌型侵入而致病，突出的例子就是猪水肿病。

3. 一个血清型在仔猪肠内占绝对优势的时间通常只有 6 天左右，而各优势菌型在一头仔猪肠内平均存在期约 12 天。这些在肠内占优势而数量又是如此庞大的原有血清型，在十多天之内居然被消失到难以检出，显然不能单纯用菌型间的繁殖速度或适应性强弱来圆满解释，其中必然还有寄主的作用或其它第三种因素在起重要的作用。Baljei<sup>[6]</sup>用 O<sub>3</sub>:K<sub>39</sub> 及 O<sub>139</sub>:K<sub>61</sub> 死菌苗口饲初生仔猪，每猪每天 10<sup>10</sup> 个菌，连续 10 天，至 14 日龄时即从血和肠中测定到免

疫抗体。O'Hanley 等人<sup>[9]</sup>用试验证明，人工感染一株侵袭性大肠埃希氏菌的兔子，在出现腹泻后的 11—13 天，体内抗该株菌的抗体合成即达高峰，21—24 天时抗体减少至原来的一半以下，但 30—33 天时又再次上升。他们认为兔肠道在受致病性大肠菌感染之后，SigA 在抑制侵入者中起着主要作用。但在正常仔猪中，引起肠内大肠菌型替代的原因是否也有类似的情况？迄今尚未见有报道。虽然我们未能从一头试验猪的血清和小肠组织中找到对 NY-10 菌的凝集抗体或特异的生长抑制因素，可能所产生的免疫抗体或其它抑制因素含量太低，不易检出。因此这种替代现象仍有可能由于仔猪的一种正常生理功能所引起。因为其一，连两头经 50 天左右连续测定菌型的仔猪中，一头发生了六次菌型替代，出现七个优势菌型，另一头是七次菌型替代，八个优势菌型。在这些血清型中，就同一头猪而言，还未看到后来重复出现以前出现过的菌型。按理以前出现过的菌型，在猪舍内分布的范围较广，应该更易出现，但试验结果并非如此。这很可能是由于仔猪

对这些菌型具有特异排斥力的结果。换句话说,这种清除现象似乎具有抗原特异性。当然,如果长年累月地查下去,在相隔更长的时间以后,猪体对某种菌型的排斥力愈来愈小,这时再出现以前的菌型不是不可能的。其二,从试验结果清楚看出,仔猪完全排除一个血清型所需时间大约相当于机体产生其它免疫应答所需的时间(约 10—20 天),这种现象与上述 O'Hanley 等人的试验结果是基本一致的。

鉴于以上两点理由,我们推测这是一种免疫现象,很可能是一种肠道局部免疫现象。要彻底搞清这一机理,有待今后作进一步地试验证实。既然仔猪被一种血清型大肠菌寄生之后,能在 10 天左右的时间内产生某种免疫力,使以后的一段时间内

(至少 40 多天)免受该血清型菌株的再寄生,那末口饲活的或灭活的病原菌株以刺激仔猪肠道产生对该株的免疫力,从而预防疫病(如猪水肿病)或许是能做到的。

### 参 考 文 献

- [1] 方定一、董国雄: 畜牧兽医学报, 10(2):79—86, 1979。
- [2] Sears, H. J. and I. Brewnlee: *J. Bacteriol.*, 63: 47—58, 1952.
- [3] Craven, J. A. and D. A. Barnum: *Can. J. Comp. Med.*, 35: 274—278, 1971.
- [4] Craven, J. A. and D. A. Barnum. *ibid.*, 35: 324—331, 1971.
- [5] Linton, A. H. et al.: *J. Appl. Bact.*, 44: 285—298, 1978.
- [6] Baljel, G. et al.: *Zentralblatt Für Veterinärmedizin*, 22B(6): 448—498, 1975.
- [7] O'Hanley, P. D. and J. R. Cantey: *Infect. Immun.*, 31(1): 316—322, 1981.

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

## I. AN OBSERVATION ON THE PERSISTENCE AND SUBSTITUTION OF *ESCHERICHIA COLI* SEROTYPES IN THE INTESTINAL TRACT OF NORMAL PIGLETS

Fang Dingyi Dong Guoxiong Liu Liren

(*Jiangsu Agricultural College, Yangzhou*)

Fourteen neonatal piglets were inoculated per os with a definite strain of *E. coli* designated NY-10 (O33:K:H-) immediately after birth, and rectal swabs were taken daily or with an interval of 2—3 days after inoculation for the isolation and determination of *E. coli* serotypes. Of the 14 piglets, ten piglets were observed for 7—13 days until the inoculated strain was completely disappeared from the rectal swabs, while two piglets were observed for 16 or 24 days and the remainders for 50 or 53 days.

It was found that the inoculated strain, NY-10, was predominant in population and persisted in the intestine of these piglets for first 7—8 days (Fig. 1), while the initial strain (NY-10) was declining in population, a new serotype of *E. coli* occurred, and usually on 5th to 8th days, and became predominant within 4—5 days, at this time, the initial strain NY-10 entirely disappeared. The fate of the 2nd predominant strain was similar to that of the predecessor, it was soon displaced by another new serotype as

its successor. Thus the predominant serotypes substituted from one to another continuously in the intestinal tract. In the two piglets observed for a period of 50 or 53 days, six substitutions with seven predominant serotypes were found in one piglet, and seven substitutions with eight different serotypes in the other one (Fig. 2—5).

The physiological basis of this phenomenon has poorly been understood. The authors, however, noted that the time needed to eliminate an *E. coli* serotype was approximately equal to that in other immune responses (about 10—20 days to reach its maximum effect). The elimination seemed to be antigenically specific, because once a serotype had been disappeared it would never be seen again during the rest experimental days in the rectum of the same piglet. It suggests that such phenomenon be likely caused by a normal physiological function of the host, and certain type of local immunity might be responsible for this effect.