

# 一类不具有 $K_{88}$ 和 $K_{99}$ 抗原的大肠杆菌对仔猪小肠上皮的粘着性和电镜形态观察

崔 治 中

(江苏农学院畜牧兽医系, 扬州)

由北京市农业科学院畜牧兽医研究所提供的苇沟 5、巨山 1 及大兴 1 三个仔猪黄痢病原性大肠杆菌菌株, 都不具有  $K_{88}$  和  $K_{99}$  抗原, 但它们对仔猪都有很强的致黄痢作用。它们的菌体 O 抗原都属  $O_{15}$ , 同时具有一个共同的  $K(L)$  抗原。这三个菌株均能强烈地粘着于仔猪迴肠和空肠的粘膜绒毛上皮上。电镜形态观察, 可见菌体表面有多条菌毛样结构, 在铬喷镀投影标本中, 这种菌毛可长达  $4\mu m$ 。这类不具有  $K_{88}$  和  $K_{99}$  抗原的肠病原性大肠杆菌菌株同时具有另一种与菌毛有关的表面粘着素 K 抗原。

**关键词** 大肠杆菌; 仔猪; 表面粘着素 K 抗原

引起新生仔猪大肠杆菌性腹泻 (即仔猪黄痢) 的肠毒性大肠杆菌, 除了能产生肠毒素外, 还分别具有  $K_{88}$ 、 $K_{99}$ 、 $K_{987D}$  等表面抗原。这些抗原是一种与菌毛样结构有关的仔猪小肠上皮粘着素抗原, 与细菌在小肠内大量定居有关<sup>[1-4]</sup>。近几年来,  $K_{88}$  肠毒性大肠杆菌在我国仔猪黄痢发病中的作用已被普遍证明<sup>[5,6]</sup>。随后, 又从仔猪黄痢患猪也分离出  $K_{99}$  大肠菌<sup>[7]</sup>。但与此同时, 也从黄痢病猪分离到一些不具有  $K_{88}$  或  $K_{99}$  抗原的大肠杆菌菌株, 它们也具有很强的致黄痢作用。本文的目的在于证明这些菌株是否也具有另一种与菌毛有关的上皮粘着素 K 抗原。

## 材料与 方法

### (一) 菌株及培养

苇沟 5、巨山 1 和大兴 1 三个菌株均由北京市农业科学院畜牧兽医研究所提供。系 1980 年初从北京郊区三个猪场的黄痢仔猪中分离得到, O 抗原均属  $O_{15}$ , 不具有  $K_{88}$  及  $K_{99}$  抗原。经仔猪感染试验及仔猪结扎肠试验已确证是引起仔猪黄痢的肠毒性大肠杆菌。在我们所做的预备试验中还证明, 这三个菌株在用 OK 血清凝集反应时

呈交叉反应, 而且均不能对豚鼠、水牛、绵羊和山羊红细胞呈现能抵抗 D-甘露糖的血凝反应 (Mannose-Resistant Hemagglutination)。

所有菌株均用胰酪豆汤或胰酪豆汤琼脂斜面 [其成分: 在 1000ml 黄豆粉液汁 (按宣氏法<sup>[8]</sup>配制, 但不加氯化钠) 中分别加入 Bacto-胰酪 (Difco) 5g, NaCl 和  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  各 3g, 琼脂 20g, 调 pH 至 7.8], 在  $37^\circ C$  下培养 18 小时。

### (二) 仔猪的人工感染及肠组织切片检查

所有试验仔猪均来自经产母猪。既有本地二花脸或大伦庄猪的后代, 也有与约克夏或长白猪杂交的后代。在产后 1—27 小时 (喂或不喂初乳), 试验仔猪分别口服接种 2—10 ml 苇沟 5、巨山 1 和大兴 1 三株菌的胰酪豆汤 ( $37^\circ C$  18 小时) 培养物。将接种三株菌的仔猪隔离, 定时喂消毒牛乳, 定期观察仔猪是否发生腹泻。将全部仔猪在接种后 18—24 小时杀死并解剖, 分别截取十二指肠、空肠、迴肠和结肠各一段约 10cm 长, 用 pH 7.0 的生理盐水 50—100ml 将肠内容物冲洗干净, 置 10% 福尔马林生理盐水中, 以备石蜡包埋切片或

本文于 1982 年 7 月 2 日收到。

本文经方定一教授审阅; 小肠冰冻切片及显微照相由扬州市肉联厂王晨光同志及南京农学院秦爱霞同志协助完成; 电镜观察由南京军区总医院黄福林同志协助完成; 承北京市农业科学院畜牧兽医研究所提供试验菌株, 特此一并致谢。

冰冻切片。切片标本用姬姆萨染液染色后,在油镜下观察。

### (三) 大肠杆菌电镜标本的制作

将苇沟 5 及巨山 1 菌株接种胰酪胨汤斜面, 37℃ 培养 18 小时。用镊子夹住铜网在斜面培养物上蘸取少量菌苔, 并在蒸馏水中漂洗, 除去过多的菌体。待其自然干燥后, 在 18° 角下用铬喷镀投影。为制取负染标本, 将细菌悬液滴加于铜网上后, 再滴加一滴 2% 磷钨酸液, 混合几秒钟后, 用滤纸从边缘吸去多余液体, 待自然干燥后, 进行电镜观察。

## 结 果

### (一) 人工感染及肠组织切片检查

先后用苇沟 5、巨山 1 和大兴 1 三菌株的培养物分别口服接种 1—27 小时龄初生仔猪, 共 28 头。其中 8 头未吃过初乳, 其余均吃过初乳。所有人工感染的仔猪均在口服细菌后 6—24 小时发生明显的水泻及不同程度的脱水症状, 与自然发病的病状极为相似。

对人工感染发病仔猪的小肠组织切片检查表明, 所有 28 头仔猪迴肠绒毛上皮都有不同程度的大肠杆菌粘着。其中 21 头

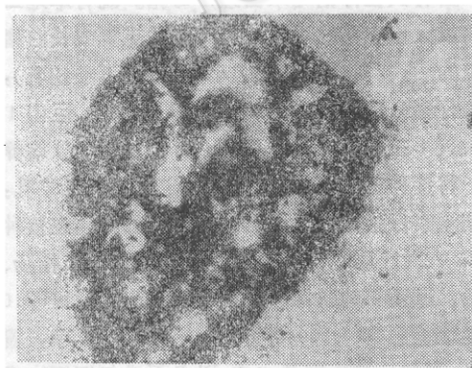


图 1 口服接种了苇沟 5 株大肠杆菌的仔猪空肠粘膜一根绒毛的横切面, 许多细菌粘附在绒毛的表面(石蜡切片,  $\times 1,000$ )

Fig. 1 Transverse section of a villus of Jejunum mucosa of a piglet orally inoculated with *E. coli* WG5, Showing many bacteria adhere to the surface of the villus

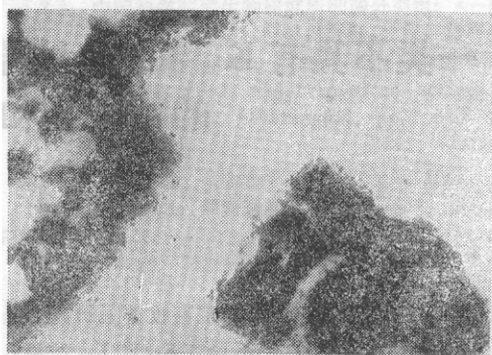


图 2 在口服接种了巨山 1 株大肠杆菌的仔猪空肠绒毛上皮细胞的表面粘附着许多细菌(冰冻切片,  $\times 1,000$ )

Fig. 2 Jejunum villi epithelia of a piglet orally inoculated with *E. coli* JS1, Showing many bacteria adhere to the surface of epithelia

呈强度粘着, 几乎每根绒毛上都有许多菌粘着, 而且绝大部分绒毛面上都布满着一层或多层大肠杆菌。在被检的 27 头仔猪空肠切片中, 有 24 头空肠绒毛上有大肠杆菌粘着, 其中 10 头呈强度粘着 (图 1、2)。8 头未喂过初乳的仔猪接种这三个菌株后, 在迴肠和空肠粘膜上皮上都有大肠杆菌强度粘着。但在吃过初乳的仔猪, 即使用同一菌株在同一条件下接种感染, 细菌对迴肠和空肠上皮的粘着强度也不一致, 有的仔猪明显, 有的较轻微, 表现出个体差异性。这对于空肠来说更为明显, 有些仔猪空肠上完全没有细菌粘附。在所有受检仔猪的十二指肠 (14 份标本) 及结肠 (13 份标本) 切片中均未发现细菌粘着现象。在三头正常哺乳的健康仔猪及七头死于它病的新生仔猪 (1—3 日龄) 的小肠和结肠切片绒毛上皮也未发现细菌粘着现象。

### (二) 苇沟 5 和巨山 1 两株菌的电镜形态观察

不论在铬喷镀投影标本中还是在磷钨酸负染标本中, 二株菌的菌体表面四周均呈放射状排布着许多纤直的菌毛样结构,

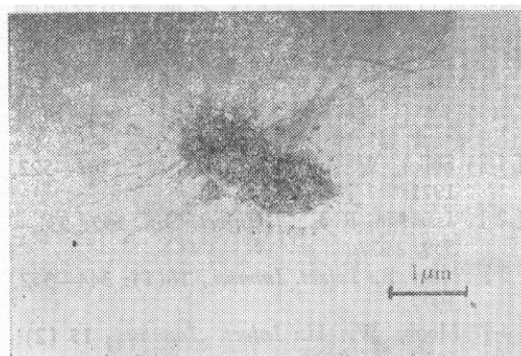


图3 苇沟5株大肠杆菌菌体表面的长菌毛  
(喷镀投影)

Fig. 3 Electron micrograph of *E. coli* WG5, to show the long pili on the surface of bacteria

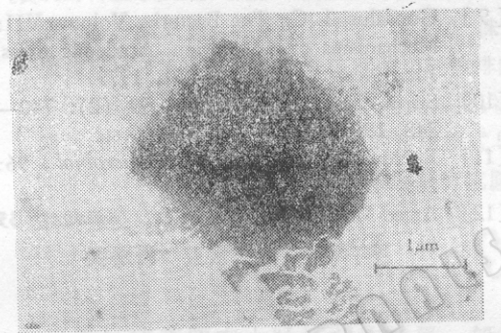


图4 巨山1株大肠杆菌菌体表面的菌毛  
(磷钨酸负染)

Fig. 4 Electron micrograph of *E. coli* JS1, to show the pili on the surface of bacteria

在每个细菌周围都有 60—100 条之多 (图 3、4)。在铬喷镀标本中,这种菌毛显得很长,达  $4\mu\text{m}$ 。在负染标本中所表现的菌毛较短。

## 讨 论

1. 在我国发生仔猪黄痢的地区,从许多猪场都分离到  $K_{88}^+$  肠毒性大肠杆菌<sup>[5,6]</sup>,有的还分离到  $K_{99}^+$  肠病原性大肠杆菌<sup>[7]</sup>。 $K_{88}$  和  $K_{99}$  抗原都是菌体表面一种与菌毛样构造有关的肠上皮粘着素,是肠病原性大肠杆菌在仔猪肠道内的定居因子<sup>[1,2,4]</sup>。北京市农业科学院畜牧兽医研究所从北京

郊区分离到的苇沟 5、巨山 1 和大兴 1 三个菌株,虽然不具有  $K_{88}$  和  $K_{99}$  抗原,但对人工感染发病仔猪的小肠做组织切片检查表明,这些菌株都能强烈地粘着于仔猪的迴肠和空肠绒毛。因此,这些菌株的菌体表面也一定具有另一种肠上皮粘着素抗原。

在我们以往用吃过初乳的一日龄仔猪所做的人工感染试验中, $K_{88}^+$  和  $K_{99}^+$  菌株都只能引起 50% 左右的试验仔猪发病。但用苇沟 5 等三个菌株分别人工接种 20 头吃过初乳的一日龄仔猪,100% 发病。而且在组织切片中对肠绒毛粘着的程度也更为强烈。显然,这三个菌株对本试验所用的猪群的肠绒毛的亲性和性比  $K_{88}^+$  或  $K_{99}^+$  菌株更强。其原因可能与母猪初乳有关。

2. 电镜观察表明,苇沟 5 等菌株表面也呈放射状排布着很长的菌毛。在组织切片中还发现,粘附于肠绒毛表面的细菌,其菌体并不直接与绒毛上皮相接触,在菌体与绒毛上皮间存有一定间隙。而且,在一些部位,还有多层菌体粘附。这都表明,这种粘着作用也可能由菌体表面的菌毛所介导的。也就是说,苇沟 5 等菌株的表面粘着素也是与菌毛密切相关的。

3. 在具有菌毛样结构的大肠杆菌中,除数量较少的性菌毛(每个菌体只有 1—2 根,偶而可达 7—10 根)较粗长(直径  $8.5—9.5\text{nm}$ ,长可达  $20\mu\text{m}$ )外,在菌体四周排布着的普通菌毛都比较短细纤直,一般长度不超过  $2\mu\text{m}$ <sup>[9]</sup>。在已确定与肠道粘着有关的几种菌毛中, $K_{88}$  菌毛在喷镀标本中长为  $0.2—1.3\mu\text{m}$ <sup>[10]</sup>。 $K_{99}$  菌毛在喷镀标本中也不过  $1—2\mu\text{m}$ <sup>[11]</sup>。至于大肠杆菌 987 株的菌毛,在文献中已报道了其磷钨酸负染标本的电镜照片,其长度为  $1\mu\text{m}$  左右<sup>[2]</sup>。而本研究中苇沟 5 株在铬喷镀投影标本中,其菌毛可长达  $4\mu\text{m}$ ,是大肠杆菌的普通菌

毛中迄今见到的最长的一种。

4. 除了  $K_{88}^+$  及  $K_{99}^+$  大肠杆菌外,在美国也还从新生仔猪大肠杆菌性腹泻患猪分离到二类不具有  $K_{88}$  和  $K_{99}$  抗原的肠病原性大肠杆菌菌株。其中一类的代表菌株是 987 株 ( $O_9:K_{103[A]}:987p:NM$ ), 它含有另一种与菌毛有关的表面粘着素 K 抗原, 暂称其为  $K_{987p}$  抗原。此外,在另一株菌 ( $O_{20}:K_{101}:987p:NM$ ) 中也发现有这种  $K_{987p}$  抗原<sup>[2,3]</sup>。在 VAC-1676 株 ( $O_{101}:K_{30}:H^-$ ) 和 VC-1751 株 ( $O_{101}:K_{27}:H^-$ ) 大肠杆菌中还发现了另一类新的与菌毛有关的粘着素 K 抗原,称为  $K_{3p}$ -抗原(指缺乏上述三种菌毛抗原的菌株)<sup>[12]</sup>。但由于对  $K_{987p}$  和  $K_{3p}$ -菌毛抗原的性质尚未进行深入研究,因此至今未被国际大肠杆菌中心正式列入 K 抗原的系列。至于苇沟 5 等菌株的表面菌毛粘着素抗原是否与  $K_{987p}$  抗原或  $K_{3p}$ -抗原相同,还是另一种新型的 K 抗原,待与 987 株、VAC-1676 株或 VC-1751 株等原始

菌株进行血清学比较后,才能得出较明确的结论。

## 参 考 文 献

- [1] Sojka, W. J.: *Vet. Bull.*, 41 : 509—522, 1971.
- [2] Isaacson, R. E.: *J. Infect. Dis.*, 135: 531—539, 1977.
- [3] Nagy, B.: *Infect. Immun.*, 16(1): 344—352, 1977.
- [4] Moon, W. H.: *Infect. Immun.*, 15 (2): 614—620, 1977.
- [5] 郭景煜等: 中国兽医杂志, 6(10):2—5, 1980.
- [6] 崔治中等: 畜牧兽医学报, 13(2):131—136, 1982.
- [7] 郭景煜等: 中国兽医杂志, 7(11):2—3, 1981.
- [8] 宣卿华编: 《细菌检验用培养基手册》, 第 2 版, 人民卫生出版社, 北京, 1961 年, 103—106 页。
- [9] Gunsalus, I. C.: *The Bacteria*, Volume VII: Mechanisms of Adaptation, Academic press, Inc., New York, 243—251, 1979.
- [10] Stirm, S.: *J. Bacteriology*, 93 (2): 740—748, 1967.
- [11] Burrows, M. R.: *J. Gen. Microbiol.*, 96: 269—275, 1976.
- [12] Awad-Masalmen, M.: *Infect. Immun.*, 35 (1): 305—313, 1982.

## ADHESION TO PIGLET INTESTINAL EPITHELIAL CELLS AND ELECTRON MICROGRAPH OF SOME *E. COLI* STRAINS LACKING $K_{88}$ AND $K_{99}$ ANTIGENS

Cui Zhizhong

(Jiangsu Agricultural College, Yangzhou)

Three enterotoxigenic *E. coli* strains lacking  $K_{88}$  and  $K_{99}$  antigens, which were supplied by Beijing animal husbandry and veterinary institute, caused serious diarrhoea in neonatal piglets. All of them belong to  $O_{64}$  group and have a common K(L) antigen. In accordance with histological observation on sections of intestines, it was shown that these *E. coli* strains could firmly adhere to jejunum

and ileum epithelia of the orally infected piglets. There are many long ( $4\mu m$ ) pili on the bacterial surface. It is the longest one among enteropathogenic *E. coli* reported so far. Apparently, these *E. coli* strains have another surface adhesin K antigen related to pili.

### Key words

*E. coli*; Piglet; Surface adhesin K antigen