

ANDRZEJ WERNICKI, JERZY RZEDZICKI

## Występowanie wybranych drobnoustrojów enteropatogennych u cieląt zdrowych oraz z objawami biegunki w wieku do trzeciego tygodnia życia\*)

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR,  
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

W naturalnych warunkach hodowlanych z chwilą urodzenia zwierzęta wkraczają w środowisko bogate w różnorodne mikroorganizmy. Efektem tego jest zasiedlenie głównie przewodu pokarmowego przez bakterie, wirusy oraz pierwotniaki. Znaczna ich część stanowi specyficzną florę fizjologiczną jelit, inne określane mianem „enteropatogenów” są czynnikami wywołującymi i wikłającymi schorzenia przewodu pokarmowego. Należą do nich enterotoksyczne szczepy *Escherichia coli* (*E. coli* K99<sup>+</sup>), *Clostridium perfringens*, pałeczki z rodzaju *Salmonella*, rota- oraz koronawirusy, a także *Cryptosporidium* sp. (5, 7, 11, 15, 22, 24, 28).

Stwierdzenie tych zarazków w przewodzie pokarmowym cieląt z objawami biegunki wskazuje na ich rolę w etiologii schorzenia, które w wielu przypadkach ma charakter złożony, mimo występowania tego samego syndromu klinicznego. Enteropatogenne mikroorganizmy izolowane są także od zwierząt klinicznie zdrowych (5, 10, 16, 18, 19). Rozwój procesu chorobowego i nasilenie objawów klinicznych jest głównie uwarunkowane poziomem odporności biernej oraz kompleksowym oddziaływaniem zarazków na organizm gospodarza, które niejednokrotnie przybiera charakter synergistyczny (1, 4, 9, 33).

Celem pracy było określenie flory bakteryjnej należącej do rodziny *Enterobacteriaceae* ze szczególnym uwzględnieniem enteropatogennych szczepów *E. coli* K99<sup>+</sup>, a także rotawirusa i *Cryptosporidium* sp. w kale zdrowych oraz chorych na biegunkę cieląt utrzymywanych w tych samych środowiskach hodowlanych.

### Materiał i metody

Do badań wykorzystano 111 cieląt rasy nizinnej czarno-białej w wieku od urodzenia do trzeciego tygodnia życia. Zwierzęta pochodziły z wielkostadnych środowisk hodowlanych rozmieszczonych w 7 województwach wschodniej Polski. Na podstawie objawów klinicznych zwierzęta klasyfikowano jako klinicznie zdrowe (31 szt.) oraz chore z objawami biegunki (80 szt.). Obserwacje prowadzono w okresie od kwietnia do listopada 1986 r. Przyjęto zasadę, aby z jednego środowiska hodowlanego wykorzystywany materiał pochodził zarówno od zwierząt chorych, jak też zdrowych.

Do badań użyto próbki kału oraz wymazy z odbytu pobieranych jednorazowo od chorych i zdrowych cieląt. Kał zbierany do plastikowych pojemników

przechowywano do chwili wykonania oznaczeń w temp. -20°C. Waciki z wymazem wykorzystywano bezpośrednio po dostarczeniu do laboratorium, wysiewając je na agar odżywczy z dodatkiem 5% krwi baraniej, podłoże McConkeya oraz *Salmonella-Shigella* (SS). Inkubację prowadzono w warunkach tlenowych w temp. 37°C przez 24 godziny. Szczepy bakteryjne identyfikowano na podstawie ich właściwości morfologicznych, hodowlanych oraz biochemicznych. Bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* określano w oparciu o system API 20E (API SYSTEM S.A., France).

Różniące się morfologicznie szczepy *Escherichia coli*, pochodzące od jednego zwierzęcia (każdorazowo w liczbie od 6 do 10) przesiewano na stałe podłoże Mince (6) i określano ich typ serologiczny. Badania serologiczne przeprowadzono metodą aglutynacji szkiełkowej.

Identyfikację oocyst *Cryptosporidium* sp. wykonano na odtłuszczonych szkiełkach podstawowych w oparciu o zmodyfikowaną wg Pohjola i wsp. (23) metodę Ziehl-Nielsen a oraz metodą z użyciem fuksyny karbolowej wg Heine (8).

Obecność antygeny rotawirusa w kale określono metodą ELISA wykorzystując w tym celu zestawy diagnostyczne produkcji BIOVETA, Ivanowice, Czechosłowacja.

### Wyniki i omówienie

W prezentowanej pracy przebadano łącznie 20 wielkostadnych środowisk hodowlanych. Dane uzyskane z wywiadu epizootycznego wskazywały na enzootypyczne występowanie kolibakteriozy cieląt, co znajdowało także potwierdzenie w badaniach wykonanych przez pracownię bakteriologiczne Zakładów Higieny Weterynaryjnej. W okresie badawczym (kwiecień — październik) stwierdzano głównie łagodny przebieg biegunek. Wśród chorych cieląt nie notowano zejść śmiertelnych, obserwowano także liczne przypadki samowyleczenia.

Z uzyskanych danych wynika, że w krajowych warunkach hodowlanych, u cieląt w okresie neonatalnym dominuje infekcyjna etiologia biegunek. Przemawia za tym brak zakaźnego czynnika etiologicznego jedynie u 27,6% cieląt dotkniętych schorzeniem (tab. 1). Należy jednak mieć na względzie fakt, że odsetek ten może także ulec zmniejszeniu przy zastosowaniu

\*) Badania wykonano w ramach programu RR-II-24.

Tab. 1. Określenie częstotliwości występowania drobnoustrojów enteropatogennych u cieląt w wieku do 3 tygodnia życia

Zwierzęta	Liczba czynników enteropatogennych występujących u jednego cielęcia			
	0	1	2	3
Zdrowe (n=23) %	19 82,6	2 8,7	2 8,7	0 0
Chore (n=58) %	16 27,6	26 44,83	13 22,41	3 5,17

metod niezbędnych do identyfikacji np. *Clostridium perfringens*, *Campylobacter*, *Yersinia, calici-like*, a także parwowirusa.

Wykazanie w badaniach własnych obecności enteropatogenów u cieląt klinicznie zdrowych jest potwierdzeniem wcześniejszych prac Isaacson i wsp. (10), Morin i wsp. (16), Myers i wsp. (18) oraz Reynolds i wsp. (24). Świadczy także o wysokim poziomie odporności siarowej tych cieląt, skutecznie przeciwstawiającej się generalizacji procesu zakażenia i wystąpieniu zmian klinicznych.

Oceniając udział zakaźnych czynników etiologicznych w biegunkach cieląt w okresie neonatalnym należy stwierdzić, że w większości przypadków dominuje jeden czynnik infekcyj-

Tab. 2. Czynniki etiologiczne biegunek, izolowane od zdrowych oraz chorych cieląt

Drobnoustrój	Cielęta chore, (n=58) liczba dodatnich/%	Cielęta zdrowe (n=23) liczba dodatnich/%
Tylko <i>E. coli</i> K99 <sup>+</sup>	14/24,14	0
Tylko <i>Rotavirus</i>	9/15,52	0
Tylko <i>Cryptosporidium</i>	3/5,17	2/8,7
<i>E. coli</i> K99 <sup>+</sup> + <i>Rotavirus</i>	2/3,45	1/4,35
<i>E. coli</i> K99 <sup>+</sup> + <i>Cryptosporidium</i>	4/6,9	0
<i>Rotavirus</i> + <i>Cryptosporidium</i>	7/12,07	1/4,35
<i>E. coli</i> K99 <sup>+</sup> + <i>Rotavirus</i> + <i>Cryptosporidium</i>	3/5,17	0

ny (tab. 1). Najczęściej izolowano *E. coli* K99<sup>+</sup> (tab. 2), przy czym z pojedynczych przypadków zachorowań wyisobniono *E. coli* K99<sup>+</sup> w połączeniu z 3, a nawet 4 różnymi antygenami somatycznymi.

Uzyskane dane różnią się zasadniczo od rezultatów prac wykonanych przez innych autorów, którzy *E. coli* K99<sup>+</sup> izolowali jedynie od 4 do 17% cieląt ze schorzeniami przewodu pokarmowego (13, 14, 18, 19). Można przyjąć, że taki stan jest efektem skutecznej immunoprofilaktyki z zastosowaniem antygeny K99. Przeprowadzone coraz powszechniej szczepienia krów ciężarnych istotnie zmniejszają zapadalność cieląt na chorobę (3, 13, 17, 25, 26, 27, 30, 31), za-

pobiegając poprzez zawarte w siarze przeciwciała adherencji *E. coli* do nabłonka jelitowego i jego kolonizacji, a tym samym oddziaływaniu wytworzonych enterotoksyn.

W materiale pochodzącym od cieląt klinicznie zdrowych w żadnym z badanych przypadków nie stwierdzono samodzielnego występowania *E. coli* K99<sup>+</sup>. U jednego zwierzęcia tej grupy *E. coli* charakteryzujące się adhezynami K99 izolowano obok rotawirusa.

W infekcjach mieszanych diagnozowanych w grupie cieląt chorych dominowało łączne występowanie rotawirusa i *Cryptosporidium* sp. (tab. 2). W trzech przypadkach ustalono obecność *E. coli* K99<sup>+</sup>, rotawirusa oraz *Cryptosporidium*. Potwierdza to wcześniejsze wyniki Pohjola i wsp. (23), Angus (2) oraz De Rycke i wsp. (5) wskazujące na wikłające oddziaływanie *Cryptosporidium* w zakaźnych biegunkach indukowanych czynnikiem wirusowym. W badanej populacji cieląt chorych występowanie oocyst *Cryptosporidium* sp. ustalono na 28,75%. U cieląt tych inwazję określano najczęściej jako intensywną (8—20 oocyst w polu widzenia preparatu mikroskopowego), w przeciwieństwie do zwierząt klinicznie zdrowych, u których stwierdzono obecność pojedynczych oocyst w preparacie. Zbliżone wartości uzyskano także w Danii, RFN, Szwajcarii oraz Węgrzech (15, 20, 21). W warunkach krajowych, w prowadzonych w Wielkopolsce przez Kozakiewicza i wsp. (12) oraz Więckowskiego i wsp. (32) badaniach, odsetek wyników dodatnich przekraczał wartość 38%. Jest to prawdopodobnie wynikiem wykorzystania w badaniach własnych około 60% cieląt w wieku do jednego tygodnia, podczas gdy najwyższe wskaźniki intensywności i ekstensywności inwazji notowane są u 7—10-dniowych cieląt. Równie wysokie wartości wykazano w NRD (11) i Czechosłowacji (29).

Rotavirus jako pojedynczy czynnik etiologiczny biegunek ustalono w materiale pochodzącym od 15,52% cieląt chorych, co zgodnie jest z wynikami Pohjola i wsp. (23) oraz Nagy i wsp. (20). W wielu przypadkach były to zwierzęta w okresie pierwszych 48 godzin po urodzeniu, potwierdzając tym samym wyniki uzyskane w zakażeniach eksperymentalnych, w których okres inkubacji infekcji rotawirusowej określony został na 29 godzin (9). Jako czynnik samodzielnny oraz łącznie z pozostałymi entero-

Tab. 3. Występowanie drobnoustrojów enteropatogennych u zdrowych oraz chorych na biegunkę cieląt

Drobnoustrój	Zwierzęta chore		Zwierzęta zdrowe	
	liczba dodatnich/ liczba badanych %	liczba dodatnich/ liczba badanych %	liczba dodatnich/ liczba badanych %	liczba dodatnich/ liczba badanych %
<i>E. coli</i> K99 <sup>+</sup>	23/58	39,65	1/23	4,35
<i>Rotavirus</i>	31/80	38,75	5/31	16,1
<i>Cryptosporidium</i>	23/80	28,75	5/31	16,1
<i>Salmonella</i>	0	0	0	0

Tab. 4. Drobnooustroje z rodziny *Enterobacteriaceae* izolowane od zdrowych oraz chorych na biegunkę cieląt\*

Drobnoustrój	Liczba cieląt chorych	Liczba cieląt zdrowych
<i>Proteus mirabilis</i>	9	7
<i>Proteus vulgaris</i>	4	3
<i>Proteus morgani</i>	1	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1
<i>Enterobacter hafniae</i>	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	2
<i>Serratia liquefaciens</i>	2	1

Objaśnienie: \* identyfikacja na podstawie charakterystyki biochemicznej testu API 20E.

patogenami, antygen rotawirusa identyfikowano w materiale pochodzącym od 38,75% cieląt chorych (tab. 3).

W żadnej z badanych próbek kału pochodzącego zarówno od zwierząt chorych oraz zdrowych klinicznie nie wykazano obecności pałeczek z rodzaju *Salmonella*. Wśród innych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, w obu badanych grupach cieląt izolowano najczęściej *Proteus mirabilis*. W tab. 4 przedstawiono skład flory jelitowej wyizolowanej od cieląt w okresie neonatalnym.

W świetle przeprowadzonych badań własnych oraz danych z piśmiennictwa można sądzić, że w warunkach krajowych istnieje potencjalna możliwość zredukowania ilości infekcyjnych schorzeń przewodu pokarmowego cieląt występujących w najwcześniejszym okresie ich rozwoju. Poza brakiem skutecznej terapii w zakażeniach *Cryptosporidium sp.*, dwa pozostałe enteropatogeny będące dobrymi immunogenami powinny zostać wykorzystane do przygotowania szczepionki stosowanej do stymulacji biernej odporności siarowej.

### Wnioski

1. W krajowych warunkach hodowlanych terenu wschodniej Polski, u cieląt w okresie neonatalnym dominuje zakaźna etiologia schorzeń przewodu pokarmowego, indukowana jednym czynnikiem infekcyjnym.

2. Dominującym czynnikiem etiologicznym biegunek są enteropatogenne szczepy *Escherichia coli* posiadające adhezyny K99<sup>+</sup>. W infekcjach mieszanych najczęściej diagnozowane jest łączne występowanie rotawirusa i *Cryptosporidium sp.*

3. W etiologii biegunek cieląt występujących w okresie od kwietnia do listopada, pałeczki z rodzaju *Salmonella* nie stanowią problemu epizootycznego.

### Piśmiennictwo

1. Acres S. D., Isaacson R. E., Khackatourians G., Babiuk L., Kapitany R. A.: Proc. Sec. Int. Symp. on Neonatal Diarrhea 443, 1978.
2. Angus K. W.: J. R. Soc. Med. 76, 62, 1983.
3. Bürki F., Möstl K., Spiegl E., Horvath E., Szekely H.: Zentbl. VetMed. 6, 33, 241, 1986.
4. Contrepoint M., Girardeau J. P., Dubourguier H. C., Gouet Ph., Lelieur D.: Ann. Rech. Vét. 9, 385, 1978.
5. De Rycke J., Bernard S., Laperte J., Naciri M., Popoff M. R., Rodolakis A.: Ann. Rech. Vét. 17, 159, 1986.

6. Guinee P. A. M., Veldkamp J., Jensen W. H.: Infect. Immun. 15, 272, 1977.
7. Haddad J. J., Gyles C. L.: Am. J. vet. Res. 43, 41, 1982.
8. Heine J., Boch J.: Berl. Münch. tierärztl. Wsch. 94, 289, 1981.
9. Hess R. G., Bachmann P. A., Baljer G., Mayr A., Pospischil A., Schmid G.: Zentbl. VetMed. 3, 31, 585, 1984.
10. Isaacson R. E., Moon H. W., Schneider R. A.: Am. J. vet. Res. 39, 1750, 1978.
11. Jungmann R., Hiepe T.: Mh. Vet. Med. 38, 299, 1983.
12. Kozakiewicz B., Maszewska I.: Materiały VIII Kongresu PTNW, Warszawa, 1987, 103.
13. Krogh H. V.: Ann. Rech. Vet. 14, 522, 1983.
14. Krogh H. V.: Nord. VetMed. 35, 346, 1983.
15. Lintermans S., Pohl P.: Ann. Rech. Vet. 14, 412, 1983.
16. Morin M., Larviere S., Lallier R.: Proc. Sec. Int. Symp. on Neonatal Diarrhea 2, 347, 1978.
17. Myers L. L.: Am. J. vet. Res. 41, 1952, 1980.
18. Myers L. L., Firehammer B. D., Border M. M., Shoop D. S.: Am. J. vet. Res. 45, 1544, 1984.
19. Nagy B., Antal A., Lakner J.: Proc. Int. Symp. Vet. Lab. Diagn. 2, 431, 1980.
20. Nagy B., Csantes L., Pálfi V., Nagy G., Bozo M.: Wien. Tierärztl. Wsch. 73, 181, 1986.
21. Nagy B., Pohlenz J.: Tierärztl. Prax. 10, 613, 1982.
22. Nilo L.: Can. Vet. J. 21, 141, 1980.
23. Pohjola S., Oksanen H., Neuvonen E., Veijalainen P., Henriksson K.: Preventive Vet. Med. 3, 547, 1986.
24. Reynolds D. J., Morgan J. H., Chanter N., Jones P. W., Bridger J. C., Debney T. G., Bunch K. J.: Vet. Rec. 119, 34, 1986.
25. Saif L. J., Redman D. R., Smith K. L., Theil K. W.: Infect. Immun. 41, 1118, 1983.
26. Snodgrass D. R.: Vet. Rec. 119, 39, 1986.
27. Snodgrass D. R., Nagy L. K., Sherwood D., Campbell I.: Infect. Immunol. 37, 586, 1982.
28. Snodgrass D. R., Terzolo H. R., Sherwood D., Campbell I., Menzies J. D., Synge B. A.: Vet. Rec. 119, 31, 1986.
29. Soph M., Lávička M., Zajíček D.: Veterinarství 34, 107, 1984.
30. Stepánek J., Salajka E., Zuffa A., Mensik J., Franz J.: Vet. Med. 32, 65, 1987.
31. Waiter-Toews D., Martin S. V., Meek A. M., McMillan J., Crouch C.: Can. J. comp. Med. 49, 1, 1985.
32. Wlecekowski W., Kneblewska G.: Mat. VIII Kongresu PTNW, t. IV, Warszawa 245, 1987.
33. Van Zaane D., Ijzerman J., De Leeuw P. W.: Vet. Immunol. Immunopathology 11, 45, 1986.

Adres autora: dr Andrzej Wernicki, ul. Kochanowskiego 4/4, 21-040 Świdnik

Верницкий А., Жедзицкий Е. — Появление избранных энтеропатогенных микроорганизмов у здоровых телят и у телят с симптомами поноса возрастом до 3 недель жизни

Пробы кала и мазки из заднего прохода от 111 телят (80 больных и 31 здорового) из 20 крупностадных животноводческих сред Восточной Польши исследовали на присутствие ро тавируса, *Escherichia coli* K99<sup>+</sup>, палочек из рода *Salmonella* и *Cryptosporidium sp.* В большинстве диагностируемых случаев доминировал один инфекционный фактор (44,83% телят). *E. coli* K99<sup>+</sup>, ротавирус и *Cryptosporidium* отметили самостоятельно соответственно у 24,14%, 15,52% и 5,17% больных телят. Смешанные инфекции, из которых изолировали 2 и 3 разных энтеропатогенных микроорганизма, отметили соответственно у 22,41% и 5,17% телят. Чаще всего отмечали совместное появление антигена ротавируса и *Cryptosporidium sp.* Ни в одном из исследуемых случаев не отметили палочек из рода *Salmonella*.

Wernicki A., Rzedzicki J. — Occurrence of selected enteropathogenic microorganisms in normal calves and those with the signs of diarrhoea at the age of up to three weeks

The samples of faeces and swabs from the rectum derived from 111 calves (80 ill and 31 normal ones) of 20 large scale farms were examined for the presence of rotaviruses, *E. coli* K99<sup>+</sup>, *Salmonella sp.* and *Cryptosporidium sp.* Usually one infectious factor prevailed: *E. coli* K99<sup>+</sup> or rotavirus or *Cryptosporidium* were only found in 24.14%, 15.52% and 5.17% of diseased calves, respectively. Mixed infections of which two or three different pathogens were isolated took place in 22.41% and 5.17% respectively. Most often the presence of rotavirus antigen and *Cryptosporidium sp.* was found. In no case *Salmonella sp.* was observed.