

# Charakterystyka wybranych właściwości szczepów *E. coli* izolowanych z przypadków ropomacicza suk

ANDRZEJ WERNICKI, JAN KRZYŻANOWSKI\*, ANDRZEJ PUCHALSKI, DANUTA KOWALCZYK

Katedra Profilaktyki Ogólnej i Chorób Ptaków, \*Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Wernicki A., Krzyżanowski J., Puchalski A., Kowalczyk D.

## Characteristics of some properties of *E. coli* isolates from canine pyometra

### Summary

A total of 128 cultures of *E. coli* isolated from uterine pus from 143 bitches with a clinical diagnosis of pyometra were examined by biotyping, resistotyping, drug susceptibility, serum resistance and enzymatic activities. Among the isolates a total of 12 different biochemical profiles were distinguished. The majority (92.8%) of the isolates fell into 5 biotypes. From among 20 biochemical features tested with the API 20E System, only six were recognized to induce variations of strains. These are ornithine decarboxylase, fermentation of rhamnose, saccharose, melibiose, sorbitol and inositol. Seven major enzymatic types were defined on the ground of differentiation in activity of esterase (C4), esterase lipase (C8),  $\beta$ -glukuronidase and  $\alpha$ -galactosidase. 47 (36.7%) of the *E. coli* strains were resistant to two or more drugs. However five strains were resistant to 12 or more antimicrobial agents. An analysis of resistance to some chemical agents was evidence of seven resistogram types. The majority (62.5%) of the isolates were included in profile ABEH. Resistance to bactericidal action of serum was detected in 119 (93%) strains tested.

**Keywords:** canine pyometra, *E. coli*, biotypes, drug and serum susceptibility, resistotyping.

W złożonej etiopatogenezie zespołu endometritis-pyometra u suk, istotną rolę odgrywają czynniki bakteryjne. Wśród nich, w przeważającej liczbie przypadków, z macic uzyskanych po chirurgicznym zabiegu ovariostomie izolowane są szczepy *E. coli* (10). Należą one do ograniczonej liczby grup serologicznych (4, 13, 21, 26), wytwarzają hemolizyny i kolicyny oraz specyficzne antygeny adhezyjne (3, 17, 21, 26, 27). Charakterystyczną cechą tej grupy szczepów *E. coli*, jest także znaczna oporność na bakteriobójcze działanie surowicy (14, 19). Wyniki wielu prac wskazują ponadto na częste występowanie wśród wymienionej grupy szczepów zjawiska lekooporności (2, 4, 5, 22).

Z uwagi na fakt, że w większości opublikowanych badań dotyczących właściwości czynników etiologicznych chorób układu moczowo-płciowego, charakterystyka *E. coli* obejmowała tzw. szczepy uropatogenne, celem prezentowanych badań była ocena cech oporności, w tym na bakteriobójcze działanie surowicy, chemioterapeutyki oraz wybrane związki chemiczne, a także charakterystyka właściwości biochemicznych szczepów *E. coli* izolowanych w czystej kulturze z przypadków ropomacicza suk. Określenie profili opornościowych populacji szczepów, które wywołują zespół endometritis-pyometra u suk, w połączeniu z prostymi metodami biochemicznej identyfikacji tej gru-

py szczepów, posiada istotne znaczenie praktyczne z uwagi na stosowane metody postępowania terapeutycznego, zarówno w aspekcie leczenia zachowawczego, jak i ovariostomie.

### Materiał i metody

W badaniach wykorzystano materiał pochodzący od 143 suk rasy mieszanej z klinicznie rozpoznany ropomaciczem, które zakwalifikowano do zabiegu ovariostomie w Klinice Rozrodu Zwierząt Wydz. Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie. Większość suk (51%) była w wieku reprodukcyjnym, tj. poniżej 8 lat, 37,8% w wieku 9-12 lat natomiast 11,2% zwierząt przekraczało 12 rok życia.

Z materiału pobranego z macic wyizolowano łącznie 128 szczepów *E. coli*, uzyskując na płytkach agaru krwistego (5% krew barania), wzrost czystej kultury bakteryjnej. Z pozostałych przypadków uzyskano wzrost mieszanej flory bakteryjnej, którą zidentyfikowano jako *Klebsiella*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* oraz *E. coli*. Materiał wysiewano na 5% agar krwisty prowadząc inkubację w warunkach tlenowych 24-48 godz. w temp. 37°C. Szczepy *E. coli* identyfikowane na podstawie charakterystycznej morfologii kolonii, przesiewano na podłoże MacConkeya.

Analizę biochemiczną szczepów *E. coli* przeprowadzono w oparciu o gotowy zestaw testów (Api 20E bioMerieux). Wykonanie testów oraz klasyfikacja szczepów do poszczególnych kodów biochemicznych zostały przepro-

wadzone zgodnie z zaleceniami producenta. Dla każdego z badanych szczepów określono ponadto profil enzymatyczny w oparciu o zestaw API ZYM (bioMerieux). Kolonie bakteryjne z hodowli uzyskanej na płytkach agaru krwistego (inkubacja w 37°C, 24 godz.), zawieszano w 3 ml wody destylowanej, ustalając koncentrację zawiesiny tak, aby odpowiadała nr. 5 skali McFarlanda. Zawiesiny poszczególnych szczepów, w ilości po 0,1 ml przenoszono następnie do mikroprobówek umieszczonych na paskach testowych. Po 4 godz. inkubacji w temp. 37°C, w indywidualnych komorach wilgotnych, do każdej mikroprobówki dodawano dołączone do zestawu reagenty A i B. Wynik reakcji odczytywano po 5 min. reakcji w temp. pokojowej, porównując intensywność powstałego zabarwienia reagentów z wzorcami barwnymi dołączonymi przez producenta.

Oznaczenie wrażliwości szczepów w stosunku do 17 chemioterapeutyków wykonano na podłożu Mueller-Hintona (Difco) techniką Bauera i wsp. (1), stosując krążki (bioMerieux) z: ampicylina 10 µg; tetracyklina 30 µg; kanamycyna 30 µg; gentamycyna 10 µg; chloramfenikolem 30 µg; nitrofurantoiną 10 µg; kwasem nalidyksowym 30 µg; tobramycyna 10 µg; amikacyna 30 µg; streptomycyna 10 µg; erytromycyna 15 µg; cefolotyna 30 µg; cefiksymem 10 µg; neomycyna 30 µg; kolistyna 10 µg; trimetoprimem z sulfametaksazolem 1,25 + 23,75 µg oraz amoksycylina z kwasem klawulonowym 20 + 10 µg (Mast Laboratories Ltd).

Oporność szczepów na wybrane substancje chemiczne, określono metodą wg Elek i Higney (8), w stosunku do następujących koncentracji (w/v): akryflawiny (0,09%), zieleni malachitowej (0,003%), siarczanu miedzi (0,7%), kwasu bornego (3,0%), arsenianu sodu (0,75%), azotanu fenylortęciowego (0,0006%) oraz 4-chlororezorcyny (0,7%).

Oporność badanej kolekcji szczepów na bakteriobójcze działanie surowicy określono metodą wg Fierer i wsp. (9).

## Wyniki i omówienie

Wśród wielu fenotypowych oraz genotypowych cech *E. coli*, wykorzystywanych w badaniach epidemiologicznych w tym w metodach identyfikacji i różnicowania szczepów wywołujących poszczególne jednostki lub zespoły chorobowe stosuje się między innymi analizę profili plazmidowych, typowanie biochemiczne, serologiczne, profile oporności na chemioterapeutyki oraz wybrane substancje chemiczne, wytwarzanie kolicyn, aerobaktyn oraz określenie właściwości hemaglutynacyjnych wyizolowanych szczepów (7, 8, 14, 15, 18, 20, 21, 24, 27).

Na podstawie wyników uzyskanych z 20 reakcji biochemicznych populację 128 wyizolowanych szczepów zakwalifikowano do 12 zróżnicowanych biotypów (tab. 1). Ustalono, że większość szczepów (92,8%) wykazuje reakcje charakterystyczne jedynie dla 5 biotypów. W przypadku 9 szczepów (7,0%) wyodrębniono natomiast 7 typów biochemicznych. Największy odsetek izolatów (60,9%) zakwalifikowano do biotypu określonego kodem 5144552, natomiast 13,3% szczepów charakteryzowało się kodem 5144572. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze badania Godbout-

Tab. 1. Klasyfikacja szczepów *E. coli* na podstawie kodu Api 20E

Kod numeryczny API 20E	Liczba szczepów (%)
5144552	78 (60,9)
5144572	17 (13,3)
5044552	14 (10,9)
5144512	6 (4,7)
5144532	4 (3,1)
5144542	2 (1,6)
5044542	
5144502	
5144172	
5144752	1 (0,8)
5044152	
5144152	

Tab. 2. Charakterystyka cech biochemicznych szczepów *E. coli*

Typy reakcji biochemicznych		Odsetek wyników pozytywnych	
Wytwarzanie:	β-galaktozydazy	100	
	indolu		
Dekarboksylacja lizyny			
Fermentacja:	glukozy		
	arabinozy		
	mannitolu		
Rozkładanie: argininy, cytrynianu sodu, mocznika, żelatyny			0
Wytwarzanie H <sub>2</sub> S, acetoiny			
Dezaminacja tryptofanu			
Fermantacja amygdaliny			86,6
Dekarboksylacja ornityny			
Fermentacja:	inozytolu	1	
	sorbitolu	98,4	
	ramnozy	96,1	
	sacharozy	17,2	
	melibiozy	90,6	

DeLaselle i wsp. (12), w których oba biotypy stanowiły największą grupę szczepów *E. coli* izolowanych od psów i kotów. Ponadto, wśród szczepów izolowanych od koni, świń, owiec, bydła oraz psów i kotów, biotypy te były najliczniej reprezentowane u zwierząt mięsożernych. W podobnych badaniach oceniających populację 514 szczepów *E. coli* izolowanych z przypad-

Tab. 3. Profile enzymatyczne *E. coli*

Enzym	Liczba reakcji dodatnich	Profil						
		1	2	3	4	5	6	7
Esteraza	122	+	+	-	+	+	-	+
Lipaza esterazowa	46	+	+	-	-	-	-	-
$\beta$ -glukuronidaza	110	+	-	-	+	+	+	-
$\alpha$ -glukozydaza	119	+	+	+	-	+	+	+
Razem		32	14	1	9	64	5	3

Objaśnienia: - reakcja ujemna, + reakcja dodatnia (aktywność enzymatyczna  $\geq 5$  mmol)

Tab. 4. Wrażliwość na antybiotyki 128 izolatów *E. coli*

Chemioterapeutyk	Liczba (%) szczepów		
	wrażliwych	średnio wrażliwych	opornych
Erytromycyna	0	0	128 (100)
Ampicylina	109 (85,2)	0	19 (14,8)
Tetracyklina	95 (74,2)	1 (0,8)	32 (25,0)
Streptomycyna	93 (72,7)	3 (2,3)	32 (25,0)
Kanamycyna	119 (93,0)	0	9 (7,0)
Neomycyna	104 (81,3)	15 (11,7)	9 (7,0)
Trimethoprim sulfamethoxazol	120 (93,8)	1 (0,8)	7 (5,5)
Kwas nalidyksowy	122 (95,3)	0	6 (4,7)
Chloramfenikol	90 (70,3)	32 (25,0)	6 (4,7)
Amoksycylina/kwas klawulonowy	118 (92,2)	0	10 (7,8)
Tobramycyna	123 (96,1)	0	5 (3,9)
Amikacyna	123 (96,1)	0	5 (3,9)
Cefiksym	120 (93,8)	3 (2,3)	5 (3,9)
Kolistyna	122 (95,3)	1 (0,8)	5 (3,9)
Cefalotyna	121 (94,5)	7 (5,5)	0
Gentamycyna	124 (96,9)	3 (2,3)	1 (0,8)
Nitrofurantoina	128 (100)	0	0

ków zakażeń układu moczowego ludzi, ustalono także najwyższy udział szczepów charakteryzujących się kodem 5144552 (25%), 5144572 (21%) oraz 5044552 (15%) (11).

Spośród 20 cech biochemicznych ocenionych w teście API 20E, tylko 6 reakcji warunkowało zróżnicowanie

izolatów na określone biotypy (tab. 2). Były to reakcje dekarboksylacji ornityny, fermentacji inozytolu, sorbitolu, ramnozy, sacharozy i melibiozy. W 14 pozostałych reakcjach uzyskano identyczne rezultaty dla wszystkich izolatów *E. coli*. Hydroliza o-nitrofenylo-galaktozy, dekarboksylacja lizyny, wytwarzanie indolu, fermentacja glukozy, mannitolu i arabinozy były zawsze pozytywne. Natomiast rozkładanie argininy, cytrynianu sodu, mocznika, wytwarzanie siarkowodoru, acetoiny, dezaminacja tryptofanu, wytwarzanie enzymów proteolitycznych rozkładających żelatynę i fermentacja amygdaliny we wszystkich analizowanych przypadkach były negatywne.

Odsetek poszczególnych reakcji biochemicznych dla badanej kolekcji szczepów nie odbiegał od wyników otrzymanych przez innych autorów (4, 12). Uzyskane dane wskazują na niewielką przydatność podstawowych reakcji biochemicznych dostępnych w zestawach API 20E w różnicowaniu szczepów *E. coli* uczestniczących w ropomaciczu suk od izolatów uzyskiwanych z innych miejsc infekcji. W ocenie Wadas i wsp. (23) *E. coli* izolowane z przypadków zakażeń układu moczowego oraz macic tych samych zwierząt, w 88% przypadków wykazują zgodność fenotypów biochemicznych. Autorzy ci uważają, że *E. coli* związana z ropomaciczem suk oraz infekcjami układu moczowego wywodzi się z flory bakteryjnej przewodu pokarmowego. Podobną opinię opartą na analizie fenotypowych oraz genotypowych właściwości *E. coli* izolowanych z przypadków zakażeń układu moczowego psów oraz ludzi prezentuje także Low i wsp. (16).

Na podstawie reakcji enzymatycznych uzyskanych w teście APIZYM ustalono, że wszystkie badane izolaty *E. coli* wytwarzały fosfatazę kwaśną i zasadową,  $\beta$ -galaktozydazę, tripsynę, fosfoamidazę oraz aminopeptydazę leucynową i walinową. Negatywny wynik stwierdzono natomiast w przypadku lipazy (C14), aminopeptydazy cysteinowej, chymotrypsyny,  $\alpha$ -galaktozydazy,  $\beta$ -glukozydazy,  $\beta$ -glukozamidazy,  $\alpha$ -mannozydazy i  $\alpha$ -fukozydazy. Wśród badanych szczepów 122 wytwarzało esterazę (C4), 46 syntetyzowało lipazę esterazową (C8), 110 izolatów  $\beta$ -glukuronidazę natomiast 111 charakteryzowało się pozytywną reakcją na  $\alpha$ -galaktozydazę. Uwzględniając zróżnicowanie w wytwarzaniu czterech wymienionych enzymów w badanej kolekcji *E. coli*, wyodrębniono 7 profili enzymatycznych (tab. 3).

Lekooporność badanych szczepów na 17 wybranych chemioterapeutyków przedstawiono w tab. 4. Pełną oporność wszystkich izolatów stwierdzono jedynie w stosunku do erytromycyny, natomiast żaden ze 128 szczepów nie wykazywał oporności na nitrofurantoinę i cefalotynę. W przypadku pozostałych antybiotyków, odsetek szczepów opornych w żadnym przypadku nie przekraczał 25%. W tej grupie izolatów najwyższy odsetek szczepów opornych zanotowano w przypadku streptomycyny, tetracykliny oraz ampicyliny. Nieco niższy odsetek szczepów opornych tj. od 4,7

Tab. 5. Profile opornościowe 128 izolatów *E. coli*, w stosunku do wybranych substancji chemicznych

Profil		Liczba (%) szczepów
1. ABEH		80 (62,5)
w tym:	ABEH	72 (56,3)
	A(B)EH	4 (3,1)
	AB(E)H	2 (1,6)
	(A)BEH	1 (0,8)
	ABE(H)	1 (0,8)
2. BEH		38 (29,7)
w tym:	BEH	37 (28,9)
	(B)EH	1 (0,8)
3. AEH		3 (2,3)
4. EH		3 (2,3)
5. BE		2 (1,6)
6. E		1 (0,8)
7. ABH		1 (0,8)

Objaśnienia: A – arsenian sodu, B – azotan fenylortęciowy, D – kwas borny, E – akrylawina, F – 4-chlororezorcyna, G – siarczan miedzi, H – zieleń malachitowa; w nawiasach oznaczono substancje, w stosunku do których uzyskano niecałkowitą oporność szczepów.

do 7,8% wykazano w stosunku do chloramfenikolu, kwasu nalidyksowego, trimetoprimu oraz kanamycyny i neomycyny. Najmniejszą liczbę szczepów opornych stwierdzono natomiast w przypadku gentamycyny, tobramycyny, amikacyny, cefiksymu oraz kolistyny. Bardzo zbliżone wyniki uzyskane na podstawie analizy lekooporności szczepów *E. coli* izolowanych w kraju uzyskał Birger i wsp. (2), oraz Wawron i wsp. (25). Znaczny odsetek szczepów charakteryzujących się wrażliwością na powszechnie wykorzystywane w lecznictwie weterynaryjnym chemioterapeutyki świadczy o dobrych perspektywach terapii zachowawczej.

Wśród szczepów opornych na poszczególne antybiotyki wykazano występowanie zjawiska wielooporności. W przypadku 47 szczepów (36,7%) dotyczyła ona 2 i więcej antybiotyków, natomiast 5 szczepów (3,9%) charakteryzowało się opornością w stosunku do 12 i więcej chemioterapeutyków.

119 badanych szczepów (93%) charakteryzowało się opornością na działanie surowicy. W przeciwieństwie do szczepów izolowanych z przypadków chorób przewodu pokarmowego, cecha oporności na surowicę wśród *E. coli* uczestniczących w chorobach układu moczowo-płciowego ludzi i zwierząt jest charakterystyczna dla znacznego odsetka izolatów (14, 19).

Analiza oporności szczepów w stosunku do wybranych substancji chemicznych umożliwiła wyodrębnienie w badanej populacji *E. coli* 7 podstawowych profili opornościowych (tab. 5). Największy odsetek szczepów charakteryzował się łączną opornością w stosunku do arsenianu sodu, azotanu fenylortęciowego, akrylawiny oraz zieleni malachitowej – profil ABEH (62,5% izolatów) oraz w stosunku do azotanu fenylortęciowego, akrylawiny i zieleni malachitowej – profil BEH (29,7% szczepów). W porównaniu do wyników uzyskanych przez Elek i Higney (8) oceniana kolekcja szczepów stanowi jednorodną grupę należącą w 92,2% do dwóch typów opornościowych.

Przeprowadzona charakterystyka kolekcji szczepów *E. coli* uzyskanych w czystej kulturze z przypadków ropomacicza suk wskazuje, na niewielkie zróżnicowanie izolatów w zakresie oporności na wybrane substancje chemiczne, wytwarzanie enzymów dostępnych do oznaczenia w systemie API ZYM oraz wrażliwości na wybrane antybiotyki. Znaczny odsetek ocenianych szczepów (93%) wykazuje ponadto oporność na bakteriobójcze działanie surowicy.

### Piśmiennictwo

1. Bauer A. W., Kirby J. C., Sherris J. C., Tenckhoff M.: Am. J. Clin. Pathol. 45, 493, 1966.
2. Birger M., Staroniewicz Z.: Medycyna Wet. 52, 245, 1996.
3. Broes A.: Ann. Méd. Vét. 137, 377, 1993.
4. Chaffaux S., Person J. M., Renault L.: Rec. Méd. vét. 154, 465, 1978.
5. Cosar G.: J. Hig. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 35, 303, 1991.
6. Crichton P. B., Old D. C.: J. Clin. Microbiol. 12, 473, 1979.
7. Crichton P. B., Old D. C.: J. Clin. Microbiol. 11, 635, 1980.
8. Elek S. D., Higney L.: J. Med. Microbiol. 3, 103, 1970.
9. Fierer J., Finley F., Braude A. I.: J. Immunol. 109, 1156, 1972.
10. Fransson B., Lagerstedt A., Hellmen E., Jonsson P.: Zentbl. Vetmed, A, 44, 417, 1997.
11. Gargan R., Brumfitt W., Hamilton-Miller J. M. T.: J. Clin. Pathol. 35, 1366, 1982.
12. Godbout-DeLasalle F., Higgins R.: Can. J. Vet. Res. 50, 418, 1986.
13. Grindlay M., Renton J. P., Remsay D. H.: Res. Vet. Sci. 14, 75, 1973.
14. Hughes C., Philips R., Roberts A. P.: Infect. Immun. 35, 270, 1982.
15. Hughes C., Hacker J., Roberts A., Goebel W.: Infect. Immun. 39, 546, 1983.
16. Low D. A., Braaten B., Ling G., Johnson D., Ruby A.: Infect. Immun. 56, 2601, 1988.
17. Nolan L. K., Wooley R., Brown J., Blue J., Camp M.: J. Vet. Int. Med. 1, 152, 1987.
18. Old D. C., Crichton P. B., Maunder A., Wilson M.: J. Med. Microbiol. 13, 437, 1980.
19. Pohl P., Mainil J., Devriese L. A., Haesebrouck F., Broes A., Lintermans P., Oswald E.: Ann. Med. Vet. 137, 21, 1992.
20. Premkumar B. D., Purushothaman V., Venkatesan R. A.: Vet. Rec. 129, 94, 1991.
21. Senior D. F., de Man P., Svanborg C.: Am. J. Vet. Res. 53, 494, 1992.
22. Ström B., Linde-Forsberg C.: Am. J. Vet. Res. 54, 891, 1993.
23. Wadas B., Kuhn I., Lagerstedt A. S., Jonsson P.: Vet. Microbiol. 52, 293, 1996.
24. Wasthuber U., Baljer G., Daimon H., Hubert P., Mayr A.: J. vet. Med. B 35, 218, 1988.
25. Wawron W., Gluszk J., Krzyżanowski J., Murawski J., Malinowski E., Sławomirski J., Wrona Z.: Mat. VII Kongresu PTNW, Lublin 2, 851, 1983.
26. Westerlund B.: Res. Vet. Sci. 42, 404, 1987.
27. Wilson R. A., Keefe T. J., Davis M. A., Browning M., Ondrusek K.: Am. J. Vet. Res. 49, 743, 1988.