

# Czynniki wirulencji *E. coli* izolowanych od prosiąt z objawami biegunki

STANISŁAW WINIARCZYK, ROBERT PANEK

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Winiarczyk S., Panek R.

## Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic piglets

### Summary

The purpose of the study was to determine particular virulence factors and sensitivity to antimicrobial agents of *E. coli* strains isolated from diarrhoeic pigs in north-east Poland. The isolated strains were investigated for the presence of fimbriae with the following antigenic specificity: F4, F5, F6, F17, F18 and F41. Out of 204 strains only four possessed fimbriae F41, two – F17 strains and two – F4 strains. None of the genetic element coding for LT, STa, STb enterotoxins and shiga variant toxin was detected in any of the studied strains. More than 90% of the *E. coli* strains were sensitive to gentamycin, excenel, enrofoxacin, amoxycillin, lincospectin, flumequine and apramycin. The range of strains that were sensitive to neomycin, nitrofurantoin, colistin and chloramfenicol was less and amounted to 87.25%, 75.5%, 75.48% and 65.6% respectively. Only 53.92%, 51%, and 50% of the strains were sensitive to coliprim, streptomycin and ampicillin. Tetracycline showed the least antimicrobial activity in the present study. Only 8.8% of the strains were susceptible to the above antibiotic.

**Keywords:** porcine diarrhoea, *E. coli*, virulence factors

Objawy kliniczne, wywołane zakażeniem *E. coli* u prosiąt i innych zwierząt, mogą ograniczać się do przevodu pokarmowego lub też przyjąć postać bakteriemii albo enterotoksemii. Biegunka, najlepiej poznana dotychczas postać zakażenia tymi bakteriami u prosiąt, występuje najczęściej w pierwszych 3-5 dniach po urodzeniu. Straty ekonomiczne wynikające z chorobotwórczego działania enterotoksycznych *E. coli* są wypadkową gorszych przyrostów masy ciała, śmiertelności prosiąt i kosztów podjętego leczenia (6).

Wirulencja enterotoksycznych pałeczek *E. coli* (ETEC) warunkowana jest przede wszystkim obecnością na powierzchni ich komórek adhezyn i zdolnością uwalniania toksyn (9). Kolonizacja jelita cienkiego jest pierwszym etapem infekcji wywoływanej przez te drobnoustroje. Czynniki adhezyjnymi, dzięki którym dochodzi do kolonizacji są fimbrie. Posiadają one antygeny, które cechują się zdolnością swoistego łączenia z receptorami nabłonka jelitowego bez wywoływania w nim zmian patomorfologicznych. W ten sposób komórki bakteryjne chronią się przed mechanicznym usunięciem z organizmu zwierzęcia podczas ruchów perystaltycznych (cyt. 12). Fimbrie szczepów kolonizujących jelita prosiąt posiadają najczęściej antygen F4 (K88). Drugim co do częstotliwości jest F6 (987P). Antygen F4, zwany dawniej K88 występuje w postaci trzech form: K88ab, K88ac oraz K88ad (16). Czasami

izoluje się od prosiąt szczepy z antygenami F5 (K99) i F41, które głównie występują u cieląt i jagniąt. Fimbrie mogą występować na komórkach *E. coli* o różnych typach antygeny somatycznego O. Najczęściej jednak związane są z serotypami O8, O138, O147, O149, O157.

Samo zasiedlenie błony śluzowej jelita cienkiego przez enteropatogenne szczepy *E. coli* nie zawsze wywołuje objawy biegunki. Dopiero uwalnianie przez te szczepy enterotoksyn indukuje pojawienie się choroby. Największe znaczenie etiopatogenetyczne w biegunkach u prosiąt mają enterotoksyna ciepłostała ST (stable), która występuje w dwu odmianach, jako STI (STIa i STIb) i STII oraz ciepłochwiejna LT (labile) (5, 13). W wyniku lokalnego oddziaływania tych toksyn na enterocyty i wywoływania zaburzeń osmotycznych w jelitach, dochodzi do zwiększonego wydzielania wody wraz z elektrolitami, zmniejszonej resorpcji i powstawania biegunki (2, 5).

Celem badań było określenie wybranych antygenów fimbrialnych i toksyn oraz antybiotykowrażliwości szczepów *E. coli* izolowanych od prosiąt z objawami biegunki w fermach przemysłowych.

### Materiał i metody

Materiałem do badań były 204 próbki kału zebrane w 5 fermach typu Agrokompleks Agard, w których stado pod-



stawowe liczyło 900-1000 loch i knurów, i 4 fermach typu Bispol ze stadem podstawowym 400-600 loch i knurów. Fermy, z których uzyskano materiał do badań zlokalizowane były na terenie województw Polski północno-wschodniej i wschodniej. We wszystkich obiektach, wśród prosiąt ssących stwierdzono objawy nieżytowej biegunki o zmiennym nasileniu. W żadnym przypadku nie obserwowano obecności krwi w wydalanych kale. W każdym z gospodarstw pobierano próbki kału bezpośrednio z prostnicy od 10 do 30 prosiąt w wieku 1-10 tyg. Próbkę kału posiewano na agar z krwią i selektywne podłoże MacConkeya. Do dalszych badań wybierano gram-ujemne bakterie rozkładające laktozę i tworzące kolonie o morfologii charakterystycznej dla *E. coli*. Różnicowanie *E. coli* z innymi pałeczkami z rodz. *Enterobacteriaceae* wykonano w oparciu o komercyjny test API 20 E. Wyosobnione izolaty przechowywano na skosach agarowych i pasażowano tylko jeden raz bezpośrednio przed badaniami. Do oznaczeń pobierano pięć różnych kolonii z każdego izolatu, które stanowiły próbkę zbiorczą. W badaniach własnych użyto kolekcji wzorcowych szczepów *E. coli* otrzymanych z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach. W jego skład wchodziły szczepy wytwarzające fimbrie i enterotoksyny: 1153 (F4ab), 491 (F4ac), 1547 (F5), 1500 (F6), 1540 (F17), 1541 (F41), 108/87 (F18), 286C2 (LT), 64111 (STI), 215/026 (STII), E57 (Stx2e) oraz szczep pozbawiony tych właściwości C600 stanowiący kontrolę negatywną. Wszystkie próbki kału zostały uprzednio przebadane testem ELISA na obecność antygenu rotawirusowego (15).

Wykrywanie antygenów fimbrialnych *E. coli* wykonano testem aglutynacji szkiełkowej (12); wykrywanie genu toksyny Shiga 2-variant *E. coli* (Stx2e) metodą PCR wykonano wg metody Imberechts i wsp. (7); wykrywanie genów enterotoksyn LT, STa i STb *E. coli* metodą PCR wykonano wg Alexa i wsp. (1); wykrywanie genu fimbrii F18 metodą PCR wykonano wg Osek (14). Wrażliwość szczepów *Escherichia coli* określono metodą dyfuzyjną (krążkową) na podłożu Mueller-Hinton w stosunku do: enrofloksacyliny, flumechiny, oksytetracykliny, gentamycyny, streptomycyny, lincospectinu, apramycyny, kolistyny, ampicyliny, amoksyliny, nitrofurantoiny, coliprimu 25, erytromycyny, neomycyny, ekscenelu i chloramfenikolu. Użyto komercyjnych krążków.

### Wyniki i omówienie

Izolaty *E. coli*, w liczbie 204, zostały przebadane testem aglutynacji na obecność fimbrii o następujących swoistościach antygenowych: F4, F5, F6, F17 i F41. Użyte surowice antyfimbrialne aglutynowały komórki wzorcowych bakterii o odpowiadających im fimbriach. Reakcje PCR dla identyfikacji materiału genetycznego enterotoksyn LT, STa, STb, toksyny shiga-variant (Stx2e) i fimbrii F18 przeprowadzone na wytwarzających je szczepach wzorcowych wypadły również dodatnio. Uzyskane produkty amplifikacji posiadały oczekiwane wielkości, które wynosiły odpowiednio 275, 167, 138 i 267, 510 par zasad (ryc. 1. i 2).

Z 204 badanych izolatów *E. coli* tylko cztery posiadały fimbrie F41, dwa szczepy F17 i dwa kolejne szczepy F4. Z każdego pozytywnego na obecność fimbrii

Tab. 1. Wrażliwość szczepów *E. coli* izolowanych od prosiąt z objawami biegunki na badane antybiotyki i chemioterapeutyki

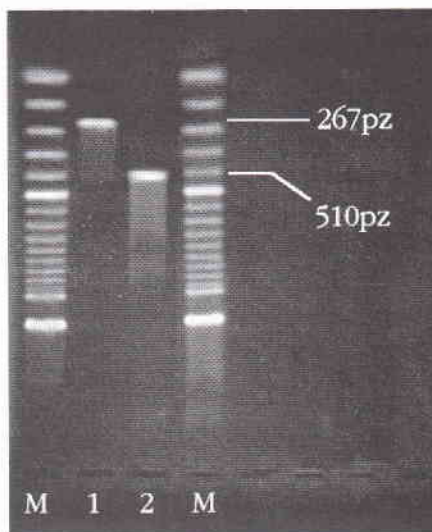
Preparat przeciwbakteryjny	Stopień wrażliwości		
	Wrażliwe (%)	Średnio wrażliwe (%)	Niewrażliwe (%)
Enrofloksacylna	198 (97,06)	–	6 (2,94)
Flumechina	158 (77,45)	30 (14,7)	16 (7,85)
Oksytetracyklina	10 (4,9)	8 (3,9)	186 (91,2)
Gentamycyna	194 (95,1)	4 (1,96)	6 (2,94)
Streptomycyna	50 (24,5)	54 (26,5)	100 (49)
Lincospectin	184 (90,2)	6 (3)	14 (6,8)
Apramycyna	182 (89,2)	2 (0,98)	20 (9,82)
Kolistyna	152 (74,5)	2 (0,98)	50 (24,52)
Ampicylina	64 (31,4)	38 (18,6)	102 (50)
Amoksylicyna	194 (95,1)	4 (1,9)	6 (3)
Nitrofurantoina	94 (46,1)	60 (29,4)	50 (24,5)
Coliprim 25	56 (27,45)	54 (26,47)	94 (46,08)
Erytromycyna	4 (1,9)	54 (26,5)	146 (71,6)
Neomycyna	152 (74,5)	26 (12,75)	26 (12,75)
Excenel	198 (97,06)	–	6 (2,94)
Chloramfenikol	76 (37,2)	58 (28,4)	70 (34,4)

izolatów *E. coli* wybierano losowo po pięć indywidualnych kolonii i badano je tymi samymi testami. We wszystkich badanych przypadkach fenotyp badanych kolonii był identyczny z fenotypem izolatu, z którego pochodziły. Amplifikacja materiału genetycznego wszystkich szczepów z parą starterów swoistych dla genu *fedA*, kodującego strukturalną podjednostkę *fedA* fimbrii F18 wypadła ujemnie. W żadnym z badanych szczepów terenowych nie stwierdzono również elementów genetycznych kodujących enterotoksyny LT, STa, STb i toksynę shiga-variant (Stx2e). Wrażliwość szczepów *E. coli*, wyizolowanych od prosiąt z objawami biegunki, na wybrane chemioterapeutyki i antybiotyki zebrano w tabeli 1. Analiza uzyskanych wyników wykazała, że ponad 90% badanych szczepów było wrażliwych na gentamycynę, ekscenel, enrofloksacylinę, amoksylicynę, lincospectin, flumechinę i apramycynę. Nieco mniejszą siłą hamowania wzrostu *E. coli* poddanych testowaniu cechowały się neomycyna, nitrofurantoina, kolistyna i chloramfenikol, na które wrażliwość wykazywało odpowiednio 87,25%, 75,5%, 75,48% i 65,6% szczepów. Tylko 53,92%, 51%, 50% szczepów było wrażliwych odpowiednio na coliprim, streptomycynę i ampicylinę. Najśłabszą aktywnością przeciwbakteryjną odznaczały się erytromycyna i





**Ryc. 1. Identyfikacja enterotoksyn LT, STa i STb wzorcowych szczepów *E. coli*.** Elektroforeza w 1,5% żelu agarozowym: 1 – produkt PCR szczepu 286C2 odpowiadający enterotoksynie LT, 275pz; 2 – produkt PCR szczepu 64111 odpowiadający enterotoksynie STa, 167 pz; 3 – produkt PCR szczepu 215/026 odpowiadający enterotoksynie STb, 138pz. M – wzorzec masowy DNA 100pz Gibco BRL



**Ryc. 2. Identyfikacja toksyny Stx2e i fimbrii F18 wzorcowych szczepów *E. coli*.** Elektroforeza w 1,5% żelu agarozowym: 1 – produkt PCR szczepu E57 odpowiadający toksynie Stx2e, 267 pz; 2 – produkt PCR szczepu 108/87 odpowiadający fimbriom F18, 510 pz. M – wzorzec masowy DNA 100pz Gibco BRL

oksytetracyklina, jedynie 28,4% i 8,8% badanych szczepów wykazywało pełną lub średnią wrażliwość. Wykonane uprzednio oznaczenia badanych próbek kału testem ELISA w kierunku obecności rotawirusów wykazały obecność ich antygenów w 49,5% przypadków (15).

Enterotoksyczne szczepy *E. coli* (ETEC) różnią się od fizjologicznej flory bakteryjnej pałeczek okrężnicy zdolnością adhezji do kosmków jelit cienkich i produkcji enterotoksyn, które oddziałują miejscowo na enterocyty. Cechy te, z nielicznymi wyjątkami są kodowane i przenoszone przez plazmidy lub bakteriofagi. Usunięcie z prosięcych ETEC plazmidu kodującego antygen F4 pozbawia te bakterie zdolności kolonizacji i efektu wywoływania biegunki. Oznacza to, że *E. coli*, która nie posiada genetycznych elementów wirulencji pozostaje komensalem błony śluzowej jelita oraz przestaje nim być w wyniku transfekcji bakteriofagiem albo transformacji plazmidem kodującym enterotoksyny oraz fimbrie adhezyjne determinujące przyczepność do nabłonka jelitowego (9).

Przeprowadzone w 1992 r. badania w Polsce wykazały, że 51,7% szczepów *E. coli* izolowanych od prosiąt posiadało na swojej powierzchni fimbrie typu F4 (11). W kilka lat później ilość szczepów wyposażonych w fimbrie spadła do 28% z tym, że nadal adhezywny F4 były dominującym czynnikiem chorobotwórczości warunkującym kolonizację nabłonka jelitowego (12). W tych samych badaniach Osek (12) wykazał, że 80,1% szczepów pochodzących od prosiąt z biegunką posiadało zdolność produkcji enterotoksyn LT, STI, STII i Stx2e. W badaniach własnych w żadnym z testowanych szczepów nie stwierdzono elementów ge-

netycznych kodujących którykolwiek z wymienionych czynników toksycznych. Dwa szczepy z antygenami F4 izolowano z próbek zawierających dodatkowo rotawirusy, natomiast pozostałe cztery z fimbriami F41 i dwa z F17 występowały bez tych zarazków. W tym miejscu należy podkreślić, że badania przesiewowe nad rozprzestrzenieniem zakażeń rotawirusowych w fermach przemysłowych u prosiąt chorujących z objawami biegunki prowadzone w ramach badań własnych wskazują na ciągły wzrost udziału tych drobnoustrojów w etiologii biegunki. W 1993 r. antygen rotawirusów stwierdzono średnio w 32% badanych próbek (18), w dwa lata później wynosił on 37%, natomiast w tej partii badanego materiału

około 50%. Analizując wyniki uzyskane w badaniach własnych można wysnuć przypuszczenie, że izolowane szczepy *E. coli* były niepatogenne, a proces chorobowy wywoływany był zakażeniem rotawirusami i innymi czynnikami. Było to prawdopodobnie związane z tym, że w ostatnich kilku latach w fermach, z których pobierano próbki kału była systematycznie prowadzona immunoprofilaktyka przy użyciu inaktywowanej szczepionki zawierającej w swym składzie enterotoksynę LT oraz antygeny *E. coli* F4, F5 i F6. Można domniemywać, że presja selekcyjna swoistej odpowiedzi immunologicznej u zwierząt w tych stadach wywołana stosowaniem tego preparatu mogła doprowadzić do zniknięcia szczepów *E. coli* o tych cechach patogenności. To, że nie wykryto przy pomocy zastosowanych metod poszukiwanych struktur powierzchniowych bakterii nie wyklucza jednak u nich obecności innych czynników kolonizacyjnych, takich jak mikrokroczki. Cechą, która może np. umożliwiać przyleganie *E. coli* pozbawionych fimbrii adhezyjnych do nabłonka jelitowego jest ich ładunek elektryczny (8). W niektórych rejonach świata biegunka u prosiąt wywoływana jest przez szczepy *E. coli* nie wytwarzające fimbrii. Dane te wskazują na to, że ich patogenność może być związana z typem antygeny somatycznego.

Ocena wrażliwości izolowanych szczepów *E. coli* wykazała wysoką częstotliwość występowania oporności w odniesieniu do oksytetracykliny. Niewiele niższy odsetek, bo w granicach 50% badanych izolatów wykazywał oporność w stosunku do streptomycyny i ampicyliny. Według danych z ostatnich dwu lat oporność na tetracyklinę, streptomycynę i ampicylinę jest powszechnie notowana u szczepów *E. coli* izolowa-

nych od zdrowych świń w dużych fermach na terenie Europy i kontynentu północnoamerykańskiego (3, 4, 10, 17).

W podsumowaniu można stwierdzić, że jedynie pojedyncze izolowane szczepy *E. coli* od prosiąt z bieżącą posiadały znane czynniki kolonizacyjne i nie produkowały toksyn. Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną wobec wyizolowanych szczepów *E. coli* wykazywały gentamycyna, ekscenel, enrofloksacyna i amoksylicyna.

### Piśmiennictwo

1. *Alexa P., Rychlik I., Nejezchleb A., Hamrik J.*: Identification of enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli* by PCR and biological methods. *Vet. Med.* 1997, 42, 97-100.
2. *Alexander T. J. L.*: Neonatal diarrhoea in pigs, w: *Escherichia coli* in domestic animals and humans, red. Gyles C. L. 151-170, CAB International, 1994.
3. *Dunlop R. H., McEwen S. A., Meek A. H., Black W. D., Friendship R. M., Clarke R. C.*: Prevalence of resistance to seven antimicrobials among fecal *Escherichia coli* of swine on thirty-four farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. *Prev. Vet. Med.* 1998, 34, 265-282.
4. *Dunlop R. H., McEwen S. A., Meek A. H., Clarke R. C., Black W. D., Friendship R. M.*: Association among antimicrobial drug treatments and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* of swine on 34 farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. *Prev. Vet. Med.* 1998, 34, 283-305.
5. *Gyles C. L.*: *Escherichia coli* enterotoxins, w: *Escherichia coli* in domestic animals and humans, red. Gyles C. L. 337-364, CAB International, 1994.
6. *Holland R. E.*: Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990, 345-375.
7. *Imberechts H., De Greve H., Schlicker C., Bouchet H., Pohl P., Charlier G., Bertschinger H., Wild P., Venderkechhove J., Van Damme J., Van Montagu M., Lintermans P.*: Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86, which causes edema disease in pigs, and nucleotide sequence of the F107 major fimbrial subunit gene, *fedA*. *Infect. Immun.* 1992, 60, 1963-1971.
8. *Lindhal M., Faris A., Wadstrom T., Hjerten S.*: A new test based on „salting out” to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim. Acta.* 1981, 677, 471-476.
9. *Morris J. A., Sojka W. J.*: *Escherichia coli* as a pathogen in animals, w: *The virulence of Escherichia coli: reviews and methods*, red. Sussman M. s. 47-77, Academic Press London 1985.
10. *Nijsten R., London N., van den Bogaard A., Stobberingh E.*: Antibiotic resistance of Enterobacteriaceae isolated from the faecal flora of fattening pigs. *Vet. Q.* 1993, 15, 152-157.
11. *Osek J., Truszczyński M.*: Occurrence of fimbriae and enterotoxins in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in Poland. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1992, 15, 285-292.
12. *Osek J.*: Czynniki chorobotwórczości szczepów *Escherichia coli* izolowanych od prosiąt w okresie po odsadzeniu od macior oraz ich rola w patogenezie i immunoprofilaktyce kolibakteriozy. Rozprawa habilitacyjna, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Puławy 1998.
13. *Osek J.*: Test ELISA do wykrywania enterotoksyny LT szczepów *Escherichia coli*. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 705-707.
14. *Osek J.*: Wykrywanie fimbrii F18 u szczepów *Escherichia coli* izolowanych od świń. *Med. Wet.* 1998, 54, 470-473.
15. *Panek R.*: Badania nad epidemiologią molekularną zakażeń rotawirusowych u świń. Rozprawa doktorska, Lublin, 1999.
16. *Smyth C. J., Marron M., Smith S. G. J.*: Fimbriae of *Escherichia coli*, w: *Escherichia coli* in domestic animals and humans, red. Gyles C. L., s. 339-435, CAB International, 1994.
17. *Sunde M., Fossum K., Solberg A., Sorum H.*: Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. 1998, 4, 289-299.
18. *Winiarczyk S., Grądzki Z., Pejsak Z.*: Występowanie zakażeń rotawirusowych u prosiąt w krajowych gospodarstwach wielkotowarowych. *Medycyna Wet.* 1993, 49, 359-360.

Adres autora: dr hab. Stanisław Winiarczyk, prof. AR, ul. Popieluski 26, 20-052 Lublin

## STAN ZAKAŻNYCH CHOROBY ZWIERZĄT W POLSCE,

według danych Głównego Inspektoratu Weterynarii w kwietniu 2001 r. \*)

- 1) **Wścieklizna zwierząt domowych** – wystąpiła w 11 województwach a mianowicie: dolnośląskim (1-1), kujawsko-pomorskim (3-4), lubelskim (7-9), małopolskim (2-6), mazowieckim (1-1), podkarpackim (3-6), podlaskim (1-1), pomorskim (1-1), świętokrzyskim (2-2), warmińsko-mazurskim (3-5), wielkopolskim (3-3). Wściekliznę stwierdzono u 13 psów, 19 kotów i 7 szt. bydła.
- 2) **Wścieklizna zwierząt dzikich** – wystąpiła w 12 województwach: dolnośląskim (1-5), kujawsko-pomorskim (10-16), lubelskim (14-50), łódzkim (5-8), małopolskim (7-26), mazowieckim (17-35), podkarpackim (14-44), podlaskim (9-21), śląskie (3-5), świętokrzyskie (10-18), warmińsko-mazurskim (14-42), wielkopolskim (12-34). Zanotowano ją u 269 lisów, 25 jenotów, 11 kun, 2 borsuków, 2 tchórzy, 2 saren i 2 dzików.
- 3) **Wirusowe zapalenie tętnic koni** – wystąpiło w województwie podkarpackim (2-2) i warmińsko-mazurskim (1-1).
- 4) **Zakaźne zapalenie nosa i tchawicy (otręt bydła)** – wystąpiło w województwie małopolskim (1-1) i mazowieckim (1-1).
- 5) **Choroba Aujeszkyego** – wystąpiła w województwie wielkopolskim (1-2).
- 6) **Salmonelozą świń** – wystąpiła w województwie kujawsko-pomorskim (1-1) i wielkopolskim (1-1).
- 7) **Myksomatoza królików** – wystąpiła w województwie opolskim (1-1)
- 8) **Zgnilec amerykański** – wystąpił w województwie podlaskim (1-1) i wielkopolskim (1-1).
- 9) **Wirusowa posocznica krwiotoczna ryb łososiowatych** – wystąpiła w województwie zachodniopomorskim (1-1).
- 10) **Choroba Mareka** – wystąpiła w województwie wielkopolskim (1-1)
- 11) **Salmonelozą drobiu** – wystąpiła w 10 województwach: dolnośląskim (1-1), kujawsko-pomorskim (2-2), lubuskim (4-9), małopolskie (2-2), mazowieckim (5-5), podkarpackim (1-1), śląskim (3-3), świętokrzyskim (3-9), warmińsko-mazurskim (1-1), wielkopolskim (10-13).

\*) w nawiasach podano liczbę powiatów i miejscowości, w których choroba została stwierdzona w okresie sprawozdawczym.