

# Zakażenie $\beta$ -hemolitycznym szczepem *Escherichia coli* przyczyną ronień i padnięć ciężarnych samic lisów polarnych

KRZYSZTOF KOSTRO, JACEK OSEK\*\*\*, ZBIGNIEW NOZDRYN-PŁOTNICKI\*, LESZEK KRAKOWSKI\*\*

Zakład Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych,

\*Katedra Anatomii Patologicznej, \*\*Zakład Andrologii i Biotechnologii Rozrodu Katedry i Kliniki Rozrodu Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

\*\*\*Państwowy Instytut Weterynaryjny–Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Kostro K., Osek J., Nozdryn-Płotnicki Z., Krakowski L.

## $\beta$ -haemolytic *Escherichia coli* as a cause of abortions and losses in pregnant polar foxes

### Summary

The infections of pathogenic strains of *Escherichia coli* are characterized in young foxes mainly by disturbances of the alimentary tract and/or in the central nervous system. However, in pregnant females *E. coli* is responsible for abortions, and even results in death. It was found that in adult pregnant foxes under risk, factors might lead to the development of a clinical form of colibacillosis of a septic character causing abortions and losses of females during the last week of pregnancy. The disease was diagnosed on the basis of the epizootiological situation, clinical signs, gross lesions, and isolation of *E. coli* in pure culture from pathologically changed internal organs of dead females and fetuses. *E. coli* was identified biochemically using the commercial API 20E test and by PCR method on the presence of the typical-for-*E. coli* gene *uspA* encoding production of a universal stress protein (USP). By using PCR and an appropriately selected pair of starters the following were identified in the isolated *E. coli*: genes encoding an expression of enterotoxins LTI, STI and STII, Shiga toxin adhesive protein intimine, enterohaemolysin Ehly, cytotoxic necrotic factor CNF1 and CNF2 and cell dilatation toxin (CDT). Because the isolate possessed a *uspA* gene and was deprived of other determined virulence markers it could be classified in the group of enteroinvasive strains of *E. coli* (EIEC).

**Keywords:** colibacillosis, abortion, polar foxes

Ochrona zdrowia mięsożernych zwierząt futerkowych w warunkach intensywnego chowu i produkcji stwarza wiele nowych problemów zdrowotnych. Jednym z nich są zaburzenia w reprodukcji lisów, będące główną przyczyną największych strat ekonomicznych w fermach hodowlanych w Polsce (3). Zaburzenia w rozrodzie samic lisów hodowlanych są uwarunkowane wieloma czynnikami. Wśród nich istotną rolę odgrywają zakażenia bakteryjne, zwłaszcza wywołane przez drobnoustroje oportunistyczne. Od samic, które poroniły lub urodziły szczenięta słabo żywotne oraz od poronionych płodów i padłych w pierwszych 3-4 dniach życia osesków izolowano między innymi  $\beta$ -hemolityczne szczepy *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equi* subsp. *equisimilis*, *Campylobacter* sp., *Corynebacterium* sp. i  $\beta$ -hemolityczny *Enterococcus faecalis* 1 (5, 8, 16, 17). Zasadnicze źródło infekcji bakteryjnych dla lisów stanowią skażone pasze przemysłowe i karma pochodzenia zwierzęcego i roślinnego,

nieodpowiednie warunki jej przechowywania oraz nieprzestrzeganie zasad sanitarno-weterynaryjnych. U lisów młodych zakażenia wywołane przez patogenne szczepy *E. coli* przebiegają najczęściej wśród zaburzeń ze strony przewodu pokarmowego i/lub ośrodkowego układu nerwowego. Natomiast u samic ciężarnych następstwem zakażenia są ronienia, niekiedy nawet zejścia śmiertelne (3).

Celem badań było określenie czynnika przyczynowego padnięć ciężarnych samic lisów polarnych, będących w ostatnim tygodniu ciąży oraz oznaczenie markerów patogenności wyizolowanego w czystej hodowli z narządów wewnętrznych oraz martwych płodów szczepu *E. coli*.

### Material i metody

Badania przeprowadzono w fermie, w której wystąpiły liczne padnięcia samic lisów polarnych będących w ostatnim tygodniu ciąży. Stado podstawowe stanowiło 80 samic i 20 samców lisów w wieku 1-4 lat. Zwierzęta były utrzy-

mywane indywidualnie, systemem klatkowym. Warunki sanitarno-higieniczne fermy oceniono jako niezadowalające. Lisy były żywione systemem tradycyjnym z uwzględnieniem dużej ilości surowego mięsa, pochodzącego od zwierząt padłych oraz gotowanej śruty jęczmiennej. Przygotowana na bazie tych surowców karma nie zawierała dodatków mineralno-witaminowych. W okresie przygotowawczym do rozrodu lisom stada podstawowego podano preparat przeciw pasożytniczy Foxverm oraz uodporniono przeciwko nosówce i zakaźnemu zapaleniu mózgu i rdzenia przy użyciu skojarzonej szczepionki Canivac FH (Bio-wet Puławy) oraz parwowirusie, jadowi kielbasianemu i pałeczce ropy błękitnej, stosując poliwalentną szczepionkę Febrivac 3-plus (Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH, Germany).

W drugiej połowie kwietnia u ciężarnych samic lisów polarnych, będących w ostatnim tygodniu ciąży, wystąpiły liczne padnięcia poprzedzone wzrostem temperatury wewnętrznej ciała do 41,5°C, dusznością, osowieniem, silną depresją i niedowładem kończyn tylnych. Spośród 80 ciężarnych samic kliniczne objawy choroby wystąpiły u 39 (48,7%) zwierząt i po 24-48 godzinach trwania procesu chorobowego nastąpiło ich zejście śmiertelne. U pozostałych 41 ciężarnych samic nie wykazujących klinicznych objawów choroby obserwowano późne ronienia oraz przedwczesne porody lub rodzenie słabo żywotnych szczeniąt, które padały w pierwszych 4-5 dniach po urodzeniu.

**Badania anatomo- i histopatologiczne.** Padłe samice ciężarne poddano badaniu anatomopatologicznemu, a następnie od 8 losowo wybranych zwierząt pobrano do badań bakteriologicznych wycinki chorobowo zmienionych narządów wewnętrznych i obecne w macicy martwe płody oraz do badań histopatologicznych wycinki chorobowo zmienionej wątroby, nerki i płuc. Z materiału utrwalonego w 10% zbuforowanej formalinie sporządzono preparaty histologiczne metodą parafinową i mrożeniową. Preparaty zostały wybarwione rutynową metodą z użyciem hematoksyliny i eozyny, a w przypadku wątroby i nerek dodatkowo skrawki wykonane metodą mrożeniową zabarwiono Sudanem IV na obecność tłuszczów obojętnych wg metody Daddiego.

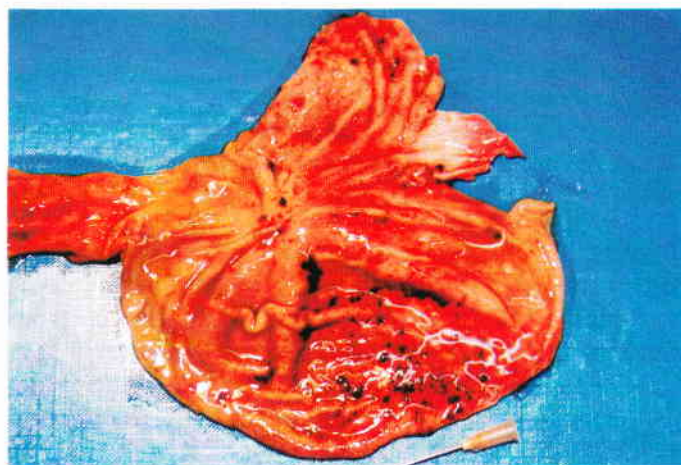
**Badania bakteriologiczne.** Pobrany materiał posiewano na bulion z glukozą, agar odżywczy, agar z krwią oraz selektywne podłoże MacConkeya i inkubowano w temperaturze 37°C przez 18 godzin. Kolonie bakterii podejrzane o przynależność do gatunku *E. coli* poddawano identyfikacji biochemicznej przy pomocy komercyjnego testu API 20E (Bio-Merieux).

**Identyfikacja genów kodujących czynniki patogenności *E. coli*.** Występowanie typowego dla *E. coli* genu *uspA*, kodującego wytwarzanie uniwersalnego białka stresowego (USP) określono przy użyciu testu PCR wg metody opisanej przez Chen i Griffiths (1). Oznaczenie genu *eaeA* dla białka adhezyjnego intyminy wykonano wg metody opisanej przez Oska (13), używając starterów Int-Fc (5'-GGGATCGATTACCGTCAT-3') i Int-Rc (5'-TTTATCAGCCTTAATCTC-3'), umożliwiających amplifikację różnych wariantów genotypowych *eaeA*. Geny kodujące enterotoksynę ciepłochwiejną LTI (gen *eltI*) oraz ciepłotałą STI (gen *estI*) i STII (gen *estII*) wykrywano testem

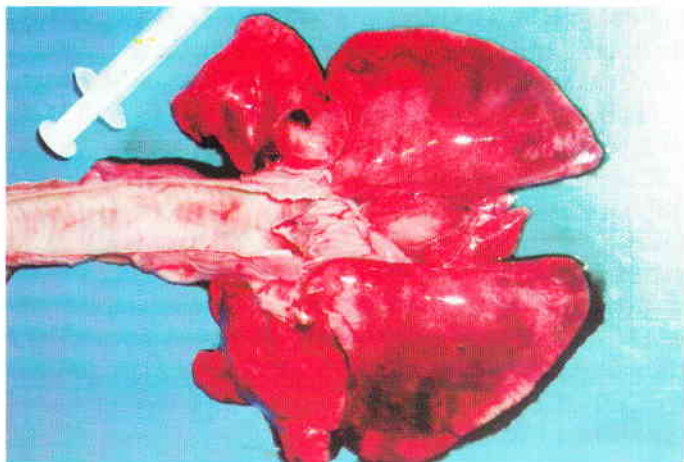
multiplex PCR wg Oska i wsp. (11). Natomiast gen toksyny Shiga Stx *E. coli* (gen *stx*) z jego odmianami (gen *stx1* i *stx2*) identyfikowano metodą PCR (12), używając w tym celu uniwersalnej pary starterów LIN3 (5'-TTTGATTGT-TACAGTCAT-3') i LIN5 (5'-AACGAAATAATTTA-TATGT-3') (12). Gen enterohemolizyny Ehly *E. coli* (gen *ehly*) wykrywano metodą PCR wg metody opisanej przez Oska (13). Oznaczenie genów dla cytotoksycznych czynników martwicowych CNF1 i CNF2 (geny *cnf1* i *cnf2*) wykonano według metody opisanej we wcześniejszej pracy (14). Występowanie genu *cdt* kodującego wytwarzanie toksyny powiększającej komórki CDT wraz z jej odmianami CDTI, CDTII i CDTIII określono wg metody opisanej przez Oska i Weinerja (15).

## Wyniki i omówienie

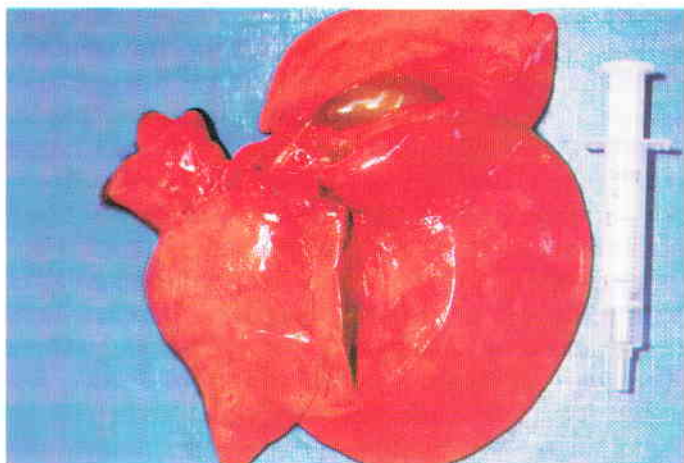
**Badanie anatomopatologiczne.** Zmiany sekcyjne u 39 padłych ciężarnych samic lisów polarnych miały charakter zakażenia posoczniczowego. Stwierdzono silne zażółcenie tkanki podskórnej, błon śluzowych, surowicznych i narządów wewnętrznych oraz liczne punkcikowate wybroczyny w błonach śluzowych oraz pod błonami surowicznymi. U sekcjonowanych lisów najbardziej charakterystyczne zmiany stwierdzono w przewodzie pokarmowym. Błona śluzowa żołądka była na całej powierzchni płamście przekrwiona, obrzękła i pokryta nadmierną ilością ciągliwego śluzu zmieszanego z krwią. Ponadto w błonie śluzowej widoczne były powierzchniowe ubytki i nadżerki (ryc. 1). Podobne zmiany zapalne o charakterze nieżytowo-krwotocznym obserwowano również na błonie śluzowej jelit cienkich i w mniejszym nasileniu w jelitach grubych. Krezkowe węzły chłonne były zwykle obrzękłe i przekrwione, soczyste na przekroju. Śledziona wykazywała powiększenie. Wątroba była silnie przekrwiona i obrzękła, o gliniastożółtej barwie miąższu oraz wykazywała pod torebką obecność drobnych ognisk barwy szarozółtej (ryc. 3). Nerki były obrzękłe i przekrwione, o konsystencji ciastowatej, blade, w dotyku najczęściej kruche, niekiedy o lekko żółtawym zabarwieniu. Pod torebką i w warstwie korowej obserwowano liczne wybroczyny i wylewy krwawe



Ryc. 1. Zapalenie nieżytowo-krwotoczne błony śluzowej żołądka z obecnością nadżerek



Ryc. 2. Obrzęk i przekrwienie płuc



Ryc. 3. Zwyródnienie tłuszczowe wątroby z widocznymi ogniskami martwicowymi

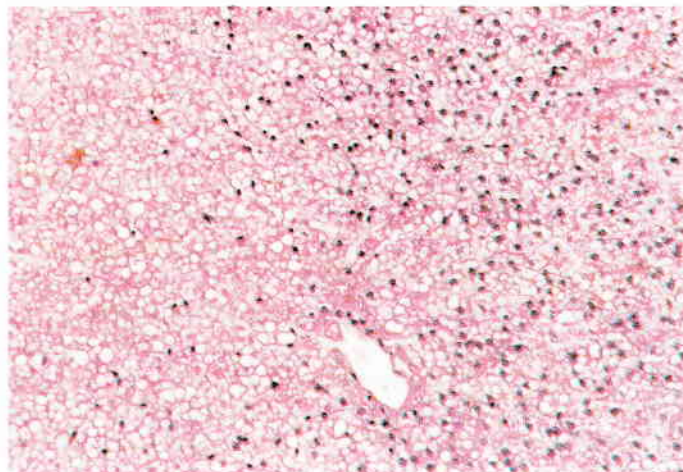


Ryc. 4. Wybroczyny i wylewy krwawe w warstwie korowej nerek

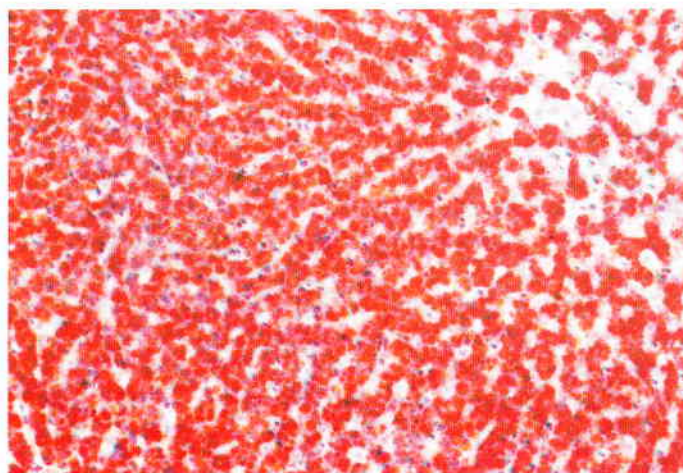
(ryc. 4). Zaawansowane zmiany w postaci przekrwienia żylnego (zastoinowego) i obrzęku dotyczyły wszystkich płatów płucnych (ryc. 2). Z powierzchni przekroju płuc o konsystencji ciastowatej wypływał w dużej ilości pienisty płyn typowy dla obrzęku płuc. W jamie opłucnowej widoczny był klarowny płyn o charakterze przesiękowym.

**Badanie histopatologiczne.** Po zabarwieniu preparatów histologicznych hematoksyliną i eozyną w wąt-

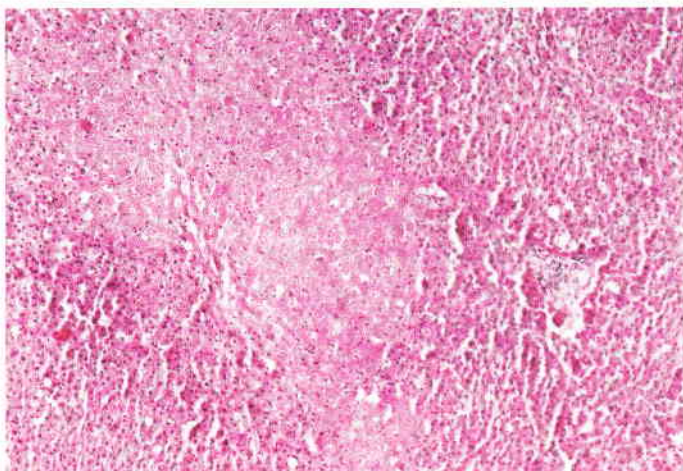
robie, obok przekrwienia i obrzęku obserwowano cechy zwyrodnienia tłuszczowego, wyrażającego się dysocjacją beleczkowego układu komórek wątrobowych oraz występowaniem w cytoplazmie hepatocytów licznych wakuoli nadających zmienionym komórkom wygląd piankowaty (ryc. 5). Barwienie Sudanem IV uwidocznilo nagromadzenie w tych komórkach związków tłuszczowych powodujących spychanie jądra komórkowego na obwód lub jego zanik (ryc. 6). W niektórych przypadkach w wątrobie obecne były ogniska martwicy denaturacyjnej, wybarwiającej się bialo, o zatartej budowie komórkowej i mającej wygląd jednostajnych, bezpostaciowych mas (ryc. 7). W nerkach, obok przekrwienia żylnego, u wszystkich zwierząt widoczne były zmiany zwyrodnieniowo-martwicowe nabłonka części wydzielniczej nerek, szczególnie komórek cewek krętych I rzędu. Obok cewek krętych, ulegających zwyrodnieniu miąższowemu, obserwowano również stłuszczenie wielu komórek nabłonka cewkowego mające charakter wybiórczy, co ujawniono barwieniem Sudanem IV. Gromadzący się w komórkach tłuszcz powodował obwodowe ułożenie jądra komórkowego. Zwyródniały nabłonek cewkowy ulegał często martwicy denaturacyjnej. Zmia-



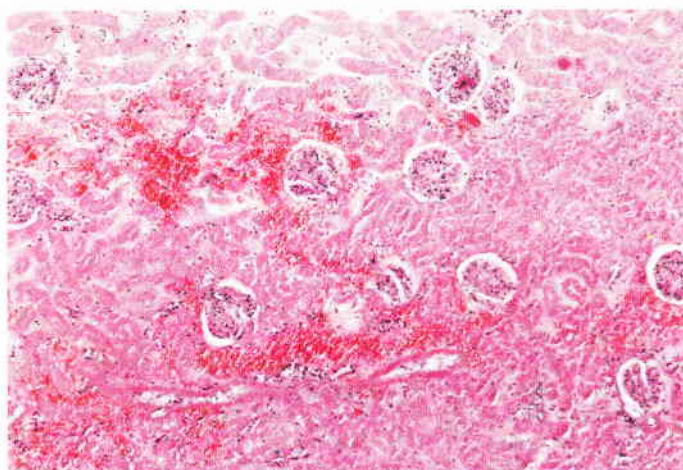
Ryc. 5. Zwyródnienie tłuszczowe drobnokropelkowe wątroby. Barwienie HE. Pow. ok. 200 ×



Ryc. 6. Nacieczenie tłuszczowe hepatocytów. Barwienie Sudanem IV. Pow. ok. 200 ×



Ryc. 7. Ognisko martwicy denaturacyjnej w wątrobie lisa. Barwienie HE. Pow. ok. 200 ×



Ryc. 8. Wynaczynienia krwi w części korowej nerek. Barwienie HE. Pow. ok. 200 ×

nom zwyrodnieniowo-martwicowym towarzyszyły również zaburzenia w krążeniu, występujące w postaci wynaczynień krwi zarówno pod torebką nerek, jak i w jej części korowej (ryc. 8). W płucach obserwowano oznaki obrzęku i przekrwienia zastoinowego. Naczynia ścian pęcherzyków płucnych były poszerzone i wypełnione dużą ilością krwi. Pęcherzyki płucne, wyścielone nieuszkodzonym nabłonkiem oddechowym, wypełnione były płynem surowiczym.

Badaniem bakteriologicznym, poszerzonym o biochemiczną identyfikację za pomocą systemu API 20E, z wycinków pobranych z chorobowo zmienionej wątroby, płuc, nerki, śledziony, krezkowych węzłów chłonnych oraz martwych płodów wyizolowano w czystej kulturze szczepy *E. coli*. Wszystkie wyizolowane szczepy w warunkach *in vitro* wytwarzały  $\beta$ -hemolizę w użytym podłożu wzrostowym krwią baranią. Wytwarzanie hemolizy przez niektóre szczepy *E. coli* izolowane z przypadków kolibakteriozy u zwierząt uznawane jest za istotny wskaźnik chorobotwórczości (9).

Następny etap pracy miał na celu wykazanie w wybranych losowo izolacie *E. coli*, przy użyciu metody PCR, obecności genów kodujących ekspresję uniwer-

salnego białka stresowego USP, enterotoksyn LTI, STI i STII, toksyny Shiga Stx, białka adhezyjnego intyminy, enterohemolizynę Ehly, cytotoksyczny czynnik martwicowy CNF1 i CNF2 oraz toksyny powiększającej komórki CDT wraz z jej odmianami CDTI, CDTII i CDTIII. Stwierdzono, że wyizolowany od padłych samic lisów polarnych i martwych płodów szczep *E. coli* posiadał gen *uspA*, kodujący wytwarzanie typowego dla tego gatunku bakterii białka USP. Izolat ten nie posiadał natomiast pozostałych określanych w pracy czynników wirulencji, warunkujących zwykle podstawowe mechanizmy działania chorobotwórczego szczepów *E. coli* (11, 14, 15).

Kolibakteriozę lisów mogą wywoływać różne serotypy pałeczek *E. coli*, jednakże izolowane z przypadków chorobowych szczepy patogenne nie były dotychczas badane pod względem obecności czynników adhezyjnych oraz innych markerów wirulencji (3). Geny kodujące znane czynniki patogenności zostały oznaczone w badanym izolacie *E. coli* (11, 14, 15). Wykazano, że nie posiada on żadnego z badanych markerów wirulencji, co wskazuje, że w rozwoju oraz patogenie zakażenia na tle *E. coli* u samic ciężarnych uczestniczyły inne mechanizmy determinujące działanie chorobotwórcze badanego izolatu.

Na podstawie uzyskanych wyników badań bakteriologicznych, które wykazały obecność czystej kultury *E. coli* we wszystkich narządach wewnętrznych oraz w martwych płodach, przy jednoczesnym braku oznaczanych markerów wirulencji, badany izolat *E. coli* można prawdopodobnie zakwalifikować do grupy szczepów enteroinwazyjnych (EIEC). Szczepy EIEC występują u bydła, którego mięso i odpady poubojowe oraz mięso stosowane często z padłych zwierząt, stanowi jeden z głównych składników karmy, a tym samym jest potencjalnym źródłem zakażenia dla mięsożernych zwierząt futerkowych (3). W fermie, w której wystąpiły nagle padnięcia samic ciężarnych, w skład dawki pokarmowej wchodziło wyłącznie surowe mięso włókniste pochodzące od padłych krów z dodatkiem gotowanej śruty jęczmiennej.

Właściwości patogenne szczepów enteroinwazyjnych są stosunkowo mało poznane. Posiadają one zdolność wnikania do wnętrza i destrukcji komórek nabłonka błony śluzowej przewodu pokarmowego, powodując zaburzenia we wchłanianiu wody i elektrolitów, a w konsekwencji biegunkę. Czynniki patogenności, odpowiedzialne za inwazyjność szczepów EIEC, kodowane są przez materiał genetyczny plazmidu pInV o masie ok. 140 kDa, do którego należą białka sekrecyjne Ipa (Ipa A do Ipa D). W patogenie biegunek wywołanych przez enteroinwazyjne szczepy *E. coli* istotną rolę przypisuje się również białku Sen o masie 63 kDa (10). Natomiast w rozwoju i przebiegu postaci posocznicy kolibakteriozy wywołanej szczepami EIEC główną rolę spełnia endotoksyna, która jest istotnym elementem lipopolisacharydu (LPS) zlokalizowanego na zewnętrznej powierzchni ściany komórki bak-

teryjnej (3, 7). Endotoksyna odgrywa ważną rolę zarówno w procesie adherencji i kolonizacji nabłonka jelitowego, jak i warunkuje zdolności inwazyjne niektórych szczepów *E. coli*. W przypadku wystąpienia czynników usposabiających, szczepy EIEC po namnożeniu się w przewodzie pokarmowym przedostają się do krwi, powodując bakteremię, a następnie – po osiągnięciu narządów wewnętrznych – wywołują w nich zmiany posocznicowe. Zawarty w ścianie komórki bakteryjnej lipopolisacharyd, wywołując procesy zapalne w narządach mięsnych zakażonego organizmu, prowadzi do zespołu niewydolności wielonarządowej, a w efekcie do zejść śmiertelnych (3). Pod wpływem LPS uwolnionego w nadmiernej ilości do krwi przez te bakterie dochodzi również do zaburzeń czynności makrofagów w postaci zahamowania lub nadmiernej syntezy i uwalniania cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8) oraz wtórnych mediatorów zapalnych (wolne rodniki tlenowe, tlenek azotu, prostaglandyny, leukotrieny, tromboksan, czynnik aktywujący płytki krwi) jako jednego z głównych mechanizmów nadmiernej odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Syntezę i wydzielanie cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) LPS stymuluje poprzez ekspresję receptorów CD14 i CD11/18 na powierzchni komórek jednojądrzastych. TNF- $\alpha$  wraz z IL-1 wywołuje gorączkę, spadek ciśnienia i zmniejszenie obwodowego oporu naczyniowego. Ponadto TNF $\alpha$ , IL-1 i IL-6 są głównym induktorem zwiększonej biosyntezy pozytywnych białek ostrej fazy, jako nieswoistych wskaźników natężenia procesów zapalnych. Niekontrolowane, nadmierne wytwarzanie mediatorów zapalenia w przebiegu posocznicowej postaci kolibakteriozy uważa się za jedną z głównych przyczyn nieodwracalnego procesu uszkodzenia narządów wewnętrznych lub wstrząsu septycznego, prowadzących w efekcie do zejść śmiertelnych (2, 4, 7). W zakażeniach przewodu pokarmowego cieląt i koni wywołanych przez pałeczki Gram-ujemne zwiększone i ciągłe uwalnianie TNF- $\alpha$  i IL-1 oraz wtórnych mediatorów zapalnych przez makrofagi pod wpływem LPS uwalnianego przez bakterie uznawane jest za główną przyczynę endotoksemii. Wykazano ścisłą zależność pomiędzy nasileniem objawów endotoksemii u koni i wzrostem aktywności surowiczego TNF- $\alpha$  i wysoką śmiertelnością zwierząt (6).

Uszkodzenie narządów wewnętrznych może też być wynikiem działania inwazyjnego samych bakterii (*sepsis*) oraz zaburzeń troficznych (*ischaemia*) na skutek uszkodzenia naczyń krwionośnych (*thrombosis*) (3). Obserwowana w preparatach histologicznych wątroby i nerek padłych lisów wakuolizacja cytoplazmy hepatocytów i komórki nabłonka cewkowego jest typowa dla zwyrodnienia tłuszczowego i związana z nadmiernym gromadzeniem się lipidów, co potwierdzono w preparatach barwionych Sudanem IV. Zaleganie lipidów wiąże się zwykle z nadmiernym dowozem kwasów tłuszczowych, niedostatecznym spalaniem tłuszcz-

czów, upośledzonym ich wydalaniem przez komórki wątrobowe oraz niedoborem pewnych aminokwasów. Zmianom zwyrodnieniowo-martwicowym towarzyszyły zaburzenia w krążeniu w postaci wynaczynień krwi zarówno pod torebką nerek, jak i w jej części korowej.

Na podstawie oceny sytuacji epizootologicznej, objawów klinicznych oraz zmian anatomo- i histopatologicznych, a także izolacji z narządów wewnętrznych samic oraz martwych płodów czystej hodowli *E. coli* uznano, iż przyczyną licznych ronień i padnięć ciężarnych samic lisów polarnych w badanej fermie była posocznicowa postać kolibakteriozy prawdopodobnie na tle masowego zakażenia karmą zanieczyszczoną *E. coli*. Mając na uwadze możliwość występowania ronień, a nawet padnięć ciężarnych samic zakażonych patogennym szczepem *E. coli* należy przestrzegać zasad sanitarno-weterynaryjnych, zwracając szczególną uwagę na higienę żywienia. Karma mięsna, zwłaszcza pochodząca z padłych krów, może być potencjalnym źródłem patogennych dla lisów szczepów *E. coli*.

## Piśmiennictwo

1. Chen J., Griffiths M. W.: PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998, 27, 369-371.
2. Dobrowolska M. A., Vogel S. N.: Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect.* 2002, 4, 903-914.
3. Gliński Z., Kostro K. (red.): Podstawy hodowli lisów i nerek. Profilaktyka i zwalczanie chorób. PWRiL, Warszawa 2002.
4. Henderson B., Wilson M.: Cytokine induction by bacteria: beyond lipopolysaccharide. *Cytokine* 1996, 8, 269-282.
5. Kostro K., Majer-Dziedzic B., Wawrzkiwicz J.: *Corynebacteria* of group A: A frequent pathogen of breeding foxes in the perinatal period. *Scientificur* 1997, 21, 215.
6. Kostro K., Gliński Z. (red.): Białka ostrej fazy u zwierząt. WAR, Lublin 2003.
7. Kübler-Kielb, Adamik B.: Wskaźniki prognostyczne posocznicy i wstrząsu septycznego. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2000, 54, 119-132.
8. Mizak B., Rzeżutka A., Matras J.: Potencjalne czynniki zaburzeń w rozrodzie samic lisów hodowlanych. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 271-275.
9. Osek J.: Wykrywanie fimbrii F18 u szczepów *Escherichia coli* izolowanych od świń. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 470-473.
10. Osek J.: *Escherichia coli* jako czynnik zakażeń jelitowych u psów i kotów. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 547-551.
11. Osek J., Gallien P., Protz D., Truszczyński M.: Rapid and specific differentiation of enterotoxin-producing *Escherichia coli* strains from other Gram-negative enteric bacteria using multiplex PCR. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 2000, 113, 265-270.
12. Osek J.: Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 95, 1217-1225.
13. Osek J.: Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated in Poland. *Res. Vet. Sci.* 2001, 70, 75-177.
14. Osek J.: Characterization of necrotogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from healthy calves in Poland. *J. Vet. Med. B.* 2001, 48, 641-646.
15. Osek J., Weiner M.: Prevalence of *cdt-III* gene encoding cytotoxin distending toxin (CDT) among *Escherichia coli* strains isolated from pigs with diarrhea. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 2003, 47, 17-23.
16. Śmiełowska-Łoś E.: Analiza zakaźnych przyczyn zaburzeń w rozrodzie lisów hodowlanych. *Zesz. Nauk, AR Wrocław. Weterynaria* 1998, 344, 55-67.
17. Wawrzkiwicz J., Majer-Dziedzic B., Kostro K.: Streptococcal infection of foxes during the perinatal period: Specific immunoprophylaxis. *Scientificur* 1997, 21, 220-226.