

Współzależność między obecnością fimbrii adhezyjnych F4, F5, F6, F17, F18 i F41 a profilem toksycznym u szczepów *Escherichia coli* izolowanych od prosiąt z biegunką

MARCIN WEINER, JAN DACKO*, JACEK OSEK

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Zakład Higieny Weterynaryjnej w Krośnie Oddział w Przemyślu, ul. Lwowska 7, 37-700 Przemyśl

Weiner M., Dacko J., Osek J.

Correlation between the presence of F4, F5, F6, F17, F18, F41 fimbriae and the toxicity profile in *Escherichia coli* strains isolated from piglets with diarrhea

Summary

E. coli strains isolated from piglets suffering from diarrhea were tested using phenotype and genotype methods for the presence of fimbrial antigens and virulent genes, respectively. The slide agglutination test was used to determine F4, F5, F6, F17 and F41 fimbriae, whereas the prevalence of fimbrial *fedA* and toxicity profiles were recorded by means of PCR. The agglutination method indicated that 206 of 240 isolates (85.8%) were positive for the examined fimbrial adhesins. 50% of the recovered isolates were positive for F4. Thirty nine of 240 isolates (16.3%) possessed F5 fimbriae. A strong correlation was found between fimbrial adhesins and the presence of enterotoxin genes: 75.8% of F4-positive strains were also enterotoxin-positive and amongst these, 25 isolates were able to produce LTI toxin only or in combination with STI or STII toxins (66 strains). The *fedA* fimbrial gene was mainly associated with the *Stx2e*-positive isolates (17 of the 21 *Stx2e*⁺ strains). In addition, one of the F18-positive *E. coli* was also *Stx1*-positive. Moreover, a correlation was also observed between the presence of F4 fimbriae and the *astA* gene of EAST1 toxin: 83 of 120 (69.2%) *astA*⁺ possessed the F4 antigen. A close association was also indicated between the presence of F4 fimbriae and the ability to produce LTI or STI enterotoxins. On the other hand, 31 of the strains in the study which had been isolated from the piglets having diarrhea were negative for the fimbrial antigens (genes). The results indicate that ETEC strains producing F4 fimbriae and LTI enterotoxin are the most important etiological factor of diarrhea in suckling piglets and that, in addition, the *fedA* gene encoding F18 fimbrial adhesin should be taken into consideration when diagnosing porcine colibacillosis.

Keywords: *E. coli*, diarrhea, piglets

W hodowli świń schorzenia biegunkowe na tle zakażeń *Escherichia coli* stanowią poważny problem diagnostyczny, związany z prawidłowym oznaczeniem szczepów chorobotwórczych oraz problem ekonomiczny, wiążący się z gorszymi przyrostami masy ciała prosiąt, jak też padnięciami zwierząt. Badania dotyczące *E. coli* pochodzących od prosiąt z biegunką koncentrują się przede wszystkim nad szczepami enterotoksycznymi (ETEC) oraz, zwłaszcza ostatnio, nad izolatami posiadającymi zdolność uwalniania toksyn Shiga – shigatoksycznymi *E. coli* (STEC) (10, 19, 24-27, 33, 35). Bardzo nieliczne są natomiast doniesienia o możliwości występowania u prosiąt z jelitową formą kolibakteriozy szczepów *E. coli* należących do innych grup chorobotwórczych, np. enteroagregacyjnych EAEC lub enteropatogennych (EPEC) (4, 10).

Enterotoksyczne *E. coli* posiadają zdolność przyczepiania się do komórek nabłonka jelitowego oraz uwalniania substancji toksycznych zwanych enterotoksy-

nami (14, 16). Zdolność ta uwarunkowana jest wytwarzaniem przez drobnoustroje chorobotwórcze białkowych struktur powierzchniowych o średnicy 3-7 nm, określonych jako fimbrie lub pili (8, 14). Wykazano, że fimbrie szczepów ETEC odpowiedzialnych za rozwój jelitowej formy kolibakteriozy prosiąt, występują w różnych odmianach antygenowych. Najczęściej są to adhezyny określane pierwotnie jako antygen K88 (22), a według obecnie używanego nazewnictwa jako F4 (21). Przyczepność szczepów *E. coli* F4⁺ do komórek nabłonka jelitowego prosiąt warunkowana jest obecnością we frakcji glikoproteinowej enterocytów swoistych receptorów fimbrialnych (31). Innym, stosunkowo powszechnie występującym antygenem fimbrialnym szczepów ETEC wywołujących biegunkę u prosiąt osesków, jest czynnik kolonizacyjny F6, oznaczony początkowo jako 987P (17). Za jego funkcje adhezyjne odpowiada podjednostka strukturalna FasG (13), warunkująca przyczepność do frakcji glikolipi-

dowej rąbka szczoteczki nabłonka błony śluzowej jelita cienkiego (6). Wykazano również, że receptor ten u prosiąt starszych uwalniany jest do warstwy śluzowej, powodując, że wrażliwość na zakażenie szczepami ETEC F6⁺ maleje z wiekiem zwierząt (4, 6).

Fimbrie, określane obecnie jako antygen F18, opisane po raz pierwszy w 1990 r. przez Bertschingera i wsp. (1) u szczepów *E. coli* odpowiedzialnych za rozwój choroby obrzękowej (czynniki F107), mogą również występować u izolatów wywołujących formę biegunkową kolibakteriozy, zwłaszcza prosiąt w okresie odsadzania od macior (5, 11, 16, 23, 26). Brak jest bliższych informacji dotyczących receptorów nabłonkowych dla adhezyn F18, ale wiadomo, że występują one na powierzchni enterocytów zarówno prosiąt osesków, jak i odsadzonych od macior (18).

Oprócz wymienionych fimbrii adhezyjnych, u szczepów ETEC odpowiedzialnych za biegunkę prosiąt, mogą też występować inne fimbrialne czynniki kolonizacyjne: F5, F17 i F41. Antygen F5, oznaczany początkowo jako K99, został wykazany po raz pierwszy przez Orskov i wsp. (20) u izolatów pochodzących od cieląt z jelitową formą kolibakteriozy. Fimbrie te stwierdzono następnie u szczepów ETEC wyosobnionych od prosiąt, zwłaszcza osesków (15). Fimbrie F17 występują również zwykle u szczepów *E. coli* pochodzących od cieląt i jagniąt z biegunką, a tylko sporadycznie są identyfikowane u izolatów odpowiedzialnych za jelitową postać kolibakteriozy prosiąt (26, 29). Podobne cechy posiadają adhezyny F41, obecne najczęściej u szczepów *E. coli* patogennych dla cieląt, a stosunkowo rzadko u bakterii izolowanych od prosiąt (29). Jak wynika z badań To (30), izolaty F41⁺, odpowiedzialne za rozwój biegunki u prosiąt osesków, cechują się zwykle dużego stopnia chorobotwórczością, związaną z intensywną kolonizacją nabłonka jelitowego. W przeciwieństwie do pozostałych opisanych wyżej czynników fimbrialnych, determinowanych przez materiał genetyczny plazmidów, F17 i F41 kodowane są przez chromosomalne odcinki DNA (8, 16).

Celem badań było określenie występowania fimbrii adhezyjnych oraz ocena współzależności pomiędzy ich występowaniem a stwierdzonymi we wcześniejszych badaniach (3) profilami toksycznymi szczepów *E. coli* izolowanych od prosiąt z biegunką.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Do badań użyto 240 szczepów *E. coli* wyizolowanych od 240 prosiąt osesków (w wieku 1-14 dni) z objawami biegunki (2). Bakterie izolowano przez pobranie od zwierząt jałowym wacikiem wymazów z prostnicy, które posiewano następnie na podłoże MacConkeya oraz agar z krwią i inkubowano w 37°C przez 18 h.

Klasyfikacja szczepów *E. coli*. Klasyfikację badanych izolatów do określonych grup chorobotwórczych, tzn. enterotoksycznych (ETEC), shigatoksycznych (STEC), enteroagregacyjnych (EAEC), enteropatogennych (EPEC) i martwicowych (NTEC) wykonano poprzez identyfikację

Tab. 1. Klasyfikacja badanych szczepów *E. coli* na podstawie ich markerów chorobotwórczości

Grupa <i>E. coli</i>	Typowy marker patogenności	Liczba (%) szczepów dodatnich (n = 240)
Enterotoksyczne (ETEC)	Enterotoksyny	143 (59,6)* ** ***
Shigatoksyczne (STEC)	Toksyny Shiga	22 (9,2)*
Enteroagregacyjne (EAEC)	Toksyna EAST1	83 (34,6)**
Nekrotyczne (NTEC)	Toksyny CNF	3 (1,3)***
Enteropatogenne (EPEC)	Białko intymina	11 (4,6)
Nieoznaczone	Nieokreślony	86 (35,8)

Objaśnienia: * – jeden szczep posiadał równocześnie cechy ETEC i STEC; ** – 81 izolatów było równocześnie AECC i ETEC; *** – 2 szczepy były równocześnie NTEC i ETEC

metodą PCR genotypowych markerów patogenności, charakterystycznych dla poszczególnych grup *E. coli*. W przypadku ich braku u badanych izolatów uznano, że mechanizm chorobotwórczości tych szczepów jest nieznan i nie zostały one zaliczone do żadnej z wyżej wymienionych patogennych grup *E. coli* (tab. 1). Szczegółowe kryteria klasyfikacji izolatów, profile toksyczności badanych szczepów oraz parametry reakcji PCR zastosowane do ich wykonania zostały przedstawione w poprzedniej pracy (2).

Oznaczanie fimbrii adhezyjnych szczepów *E. coli*. Fimbrie F4, F5, F6, F17 i F41 *E. coli* oznaczano testem aglutynacji szkiełkowej wg metodyki podanej przez Oskę i Truszczyńskiego (29). Poliklonalne surowice antyfimbrialne uzyskiwano na królikach, immunizowanych izolowanymi i oczyszczonymi fimbriami F4, F6 i F41 lub komórkami bakteryjnymi z powierzchniową ekspresją antygenów fimbrialnych (fimbrie F5 i F17) (26). Surowice anti-F5 i anti-F17 następnie wysycano, celem usunięcia przeciwciał anti-LPS *E. coli*, homologicznymi szczepami referencyjnymi (odpowiednio 1547 i Att25), inkubowanymi na agarze odżywczym w temperaturze 18°C. Optymalne rozcieńczenia wszystkich surowic antyfimbrialnych, używanych do testu aglutynacji szkiełkowej, oznaczano eksperymentalnie, z użyciem referencyjnych szczepów *E. coli* i wynosiły one odpowiednio: 1 : 20 (F4 i F5), 1 : 400 (F6) oraz 1 : 100 (F17 i F41).

Oznaczanie genu *fedA* fimbrii F18 *E. coli*. Zdolność wytwarzania przez badane szczepy *E. coli* fimbrii F18 określano metodą PCR, poprzez amplifikację genu *fedA* kodującego powierzchniową ekspresję podjednostki FedA fimbrii F18 (12). Matrycowy bakteryjny DNA uzyskano poprzez zawieszenie w jałowej wodzie redestylowanej, wolnej od DNaz (ICN Biomedicals, USA) 1 kolonii badanego szczepu *E. coli*, inkubacji w 99°C przez 5 min. a następnie odwirowanie zawiesiny (13.000 g, 1 min.). Otrzymany supernatant (2,5 µl) stanowił źródło matrycowego DNA. Test PCR wykonano w mieszaninie o objętości 25 µl, zawierającej: bufor enzymatyczny (10 × skoncentrowany) – 2,5 µl, mieszaninę deoksynukleotydów (dATP, dCTP, dGTP i dTTP, końcowe stężenie 200 µM każdego) – 2,5 µl, startery FedA1 (GTGAAAAGACTAGTGTTTTATTC) i FedA2 (CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC) (10 µM) – po 0,5 µl, MgCl₂ (25 mM) – 5,0 µl, termostabilną polimerazę Taq DNA (1 U/µl; Fermentas, Litwa) – 1,0 µl oraz wodę

(ICN) do końcowej objętości 22,5 µl. Do mieszaniny dodawano następnie 2,5 µl matrycowego DNA i wykonywano amplifikację w termocyklerze PTC-100 (MJ Research, USA), używając następujących parametrów: 94°C 5 min. (denaturacja wstępna), a następnie 30 cykli składających się z 94°C (1 min.), 72°C (2 min.) i 55°C (1 min.). Końcowy etap wydłużania przeprowadzono w 72°C przez 5 min. Analizę elektroforetyczną produktów amplifikacji genowej wykonano w 1,5% żelu agarozowym w buforze TAE przy stałym napięciu 100 V. Żele barwiono w bromku etydyny (5 µg/ml) przez 1 min., odbarwiano w wodzie redestylowanej i fotografowano w świetle UV przy użyciu zestawu Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, USA).

Wyniki i omówienie

Zakażenia prosiąt ssących, wywołane przez chorobotwórcze szczepy *E. coli*, są jedną z bardziej istotnych przyczyn biegunk, związanego z nimi odwodnienia, zaburzeń równowagi kwasowo-zasadowej i w konsekwencji – częstych padnięć zwierząt. Jak wynika z szeroko prowadzonych badań (10, 14, 16, 19, 29, 32-35), od prosiąt osesków izoluje się zwykle szczepy należące do grupy ETEC, cechujące się zdolnością wytwarzania enterotoksyn oraz dodatkowo – fimbrii adhezyjnych, warunkujących zasiedlanie błony śluzowej jelita cienkiego. W obecnych badaniach adhezyny F4, F5, F6, F17 i F41 oznaczano metodą aglutynacji oraz dodatkowo, w przypadku czynnika F18, testem PCR amplifikującym gen *fedA*.

Wykazano (tab. 2), że izolaty pochodzące od prosiąt z biegunką posiadały zdolność ekspresji wszystkich badanych w pracy fimbrialnych czynników adhezyjnych. Stwierdzono, że ogółem 206 spośród 240 (85,8%) analizowanych szczepów wytwarzało fimbrie *in vitro* lub też, jak w przypadku F18, posiadało marker genotypowy *fedA* warunkujący ekspresję tej adhezyny. Najwięcej izolatów dodatnich w teście aglutynacji szkiełkowej było z fimbriami F4 (120 szczepów, 50,0%). Jak wynika z wcześniejszych danych (10, 16, 19, 29, 32-35), tego rodzaju fimbrie są zwykle odpowiedzialne za adhezję szczepów ETEC, będących czynnikiem etiologicznym jelitowej postaci kolibakteriozy prosiąt osesków. Dominacja szczepów F4⁺ u prosiąt noworodków wynika prawdopodobnie z dostępności dla *E. coli* receptora dla tego typu fimbrii, znajdującego się na powierzchni nabłonka błony śluzowej jelita cienkiego, który umożliwia kolonizację

i uniemożliwia mechaniczne usunięcie komórek bakteryjnych przez ruchy perystaltyczne i przesuwaną się płynną treść pokarmową (8, 31).

W przedstawionych badaniach własnych wykazano również obecność innych niż F4 fimbrialnych czynników kolonizacyjnych, zwłaszcza typu F5 (16,3% izolatów) i F18 (12,9% szczepów) oraz – w mniejszym odsetku – F6, F17 i F41. Fimbrie F5, F17 i F41 uznawane są zwykle za typowy czynnik adhezyjny szczepów ETEC odpowiedzialnych za rozwój jelitowej kolibakteriozy cieląt (8), ale wykazywano je też niekiedy u izolatów enterotoksycznych *E. coli*, wyosobnionych z przypadków biegunk prosiąt osesków (15, 29, 32). Zwraca uwagę stosunkowo niewielki odsetek (5,0%) szczepów posiadających fimbrie F6, uważanych za jeden z głównych (obok F4) czynników adhezyjnych szczepów ETEC odpowiedzialnych za jelitową formę kolibakteriozy prosiąt osesków (17). Jak wynika z badań Dean i wsp. (4, 6), szczepy F6⁺ zwykle kolonizują jelita cienkie prosiąt w wieku do 3 tygodni, z uwagi na występującą w tym okresie stosunkowo niewielką ilość śluzu pokrywającego rąbek szczoteczki i ułatwiony dostęp bakterii do swoitych receptorów glikolipidowych (13). Z drugiej strony, niespodziewanie dość wysoki odsetek (12,9%) analizowanych izolatów posiadał zdolność wytwarzania adhezyny F18. Tego typu fimbrie występują najczęściej u szczepów *E. coli* odpowiedzialnych za rozwój biegunki w okresie odsadzania od macior oraz w przypadkach choroby obrzękowej (1, 5, 11, 18, 28). Jak wynika z uzyskanych obecnie wyników, prawdopodobnie możliwa jest jednak również kolonizacja przez szczepy *E. coli* F18⁺ jelit prosiąt osesków. Obserwacja ta ma niezwykle istotne znaczenie z punktu widzenia immunoprofilaktyki swoistej jelitowej postaci kolibakteriozy, której wzrost skuteczności może być osiągnięty poprzez włączenie w skład szczepionek fimbrii F18 lub też całych komórek bakteryjnych z powierzchniową ekspresją tego antygeny. Dodatkowo, wykazanie u dość dużego odsetka badanych izolatów tego typu adhezyn, a ściślej ich markera genotypowego *fedA* warunkującego wytwarzanie i powierzchniową ekspresję, stanowi cenną informację użyteczną dla poprawy metod diagnostyki tej formy kolibakteriozy. Rutynowe badania chorobotwórczych szczepów *E. coli* wyosobnionych od prosiąt osesków z biegunką zwykle nie obejmują bowiem diagnostyki fimbrii F18, które są uważane za czynnik kolonizacyjny izolatów pochodzących od prosiąt w okresie odsadzania od macior. Na podstawie obecnych badań można jednak przyjąć, że adhezyny F18 mogą brać udział w patogenezie jelitowej postaci kolibakteriozy osesków i celem prawidłowej identyfikacji czynnika etiologicznego powinny być oznaczane, najlepiej testem PCR, który umożliwia wykazanie ich materiału genetycznego niezależnie od warunków hodowlanych *in vitro* szczepów *E. coli*.

Wzajemną korelację między obecnością fimbrii adhezyjnych F4, F5, F6, F17, F41 lub genu *fedA* fimbrii

Tab. 2. Występowanie fimbrii adhezyjnych u badanych szczepów *E. coli* izolowanych od prosiąt z biegunką

Liczba szczepów (ogółem)	Liczba (%) szczepów posiadających fimbrie*						
	F4	F5	F6	F17	F18 (<i>fedA</i>)	F41	Brak
240	120 (50,0)	39 (16,3)	12 (5,0)	2 (0,8)	31 (12,9)	2 (0,8)	34 (14,2)

Objaśnienia: * – obecność fimbrii określano metodą aglutynacji szkiełkowej z wyjątkiem fimbrii F18, których marker genotypowy *fedA* oznaczano testem PCR

Tab. 3. Współzależność między zdolnością wytwarzania fimbrii adhezyjnych a obecnością markerów genotypowych enterotoksyn u badanych szczepów *E. coli* izolowanych od prosiąt z biegunką

Fimbrie	Liczba szczepów z fimbriami	Liczba szczepów wytwarzających enterotoksyny*							
		LTI	STI	STII	LTI+STI	LTI+STII	LTI+STI+STII	STI+STII	Brak
F4	120	25	0	0	57	9	0	0	29
F5	39	1	6	3	4	1	1	1	22
F6	12	2	0	8	1	0	0	0	1
F17	2	0	0	1	1	0	0	0	0
F18	31	0	0	0	0	0	0	0	31
F41	2	1	0	0	0	1	0	0	0
Brak	34	1	3	3	11	0	2	0	14

Objaśnienia: * – profil toksyczny szczepów *E. coli* oznaczono w poprzedniej pracy (2)

F18 a występowaniem u badanych szczepów *E. coli* markerów genotypowych dla enterotoksyn LTI, STI i STII przedstawiono w tab. 3. Wykazano ścisłą współzależność między tymi dwoma podstawowymi wskaźnikami chorobotwórczości szczepów ETEC: większość izolatów z fimbriami posiadała zdolność uwalniania badanych w pracy toksyn. Najsilniej korelacja ta była wyrażona w przypadku szczepów z adhezynami F4 (120 izolatów), z których 91 (75,8%) posiadało geny enterotoksyn, najczęściej LTI (25 izolatów) lub LTI w połączeniu z genami toksyn STI lub STII (łącznie 66 szczepów). Równocześnie 29 izolatów (24,2%) z fimbriami F4 było ujemnych w testach PCR analizujących obecność genów toksyn LTI, STI i STII (tab. 3). Z drugiej strony, 31 szczepów posiadających gen *fedA* fimbrii F18 nie posiadało markerów genotypowych dla jednej z badanej w pracy enterotoksyn.

Korelację LTI i F4 opisali również inni autorzy we wcześniejszych badaniach dotyczących biegunek prosiąt na tle enterotoksycznych *E. coli* (8, 28, 29, 32-34). Wiąże się to niewątpliwie z częstą lokalizacją genów kodujących te czynniki patogenności na tym samym plazmidzie (9), chociaż wykazano też, że determinanty te obecne były na oddzielnych plazmidach i ich ekspresja nie jest wtedy równoczesna (7). Podobnie silna współzależność między wytwarzaniem fimbrii F5 a enterotoksyny STI warunkowana jest także koekspresją ich genów plazmidowych (9, 19).

Wzajemne korelacje między obecnością badanych fimbrii a występowaniem genów *stx*, kodujących wytwarzanie toksyn Shiga u wyosobnionych od prosiąt z biegunką szczepów *E. coli* przedstawiono w tab. 4. Stwierdzono ścisłą współzależność między zdolnością uwalniania toksyny *Stx2e* (łącznie 21 szczepów dodatnich) a obecnością genu *fedA*, charakterystycznego dla fimbrii adhezyjnych F18 (17 izolatów *fedA*⁺). Dodatkowo, 1 szczep *E. coli* posiadający gen toksyny *Stx1*, posiadał materiał genetyczny odpowiedzialny za ekspresję adhezyny F18. Pozostałe 3 izolaty *stx*-dodatnie (2 szczepy *stx2e*⁺ i 1 szczep *stx1*⁺/*stx2e*⁺) nie

wytwarzały badanych w pracy fimbrii F4, F5, F6, F17, F18 i F41.

W kolejnym etapie pracy określono też wzajemną współzależność między toksyną EAST1 a fimbriami F4 i enterotoksyną LTI (tab. 5). Stwierdzono, że na 120 izolatów F4⁺, 83 szczepy (69,2%) posiadały jednocześnie gen *astA* kodujący ciepłostabilną enterotoksynę EAST1. Szczególnie silną korelację obserwowano w przypadku szczepów F4⁺/LTI⁺, z których 92,0% charakteryzowało się obecnością markera *astA* oraz przy izolatach F4⁺/LTI⁺/STI⁺, które w 89,5% posiadały dodatkowo potencjalną zdolność uwalniania toksyny EAST1. Spośród 29 szczepów nieenterotoksycznych i nieposiadających zdolności wytwarzania toksyn Shiga, u których

stwierdzono fimbrie F4, tylko 2 izolaty (6,9%) posiadały gen *astA* amplifikowany testem PCR (tab. 5).

Stosunkowo duża liczba izolatów *E. coli* (34 szczepy, 14,2%), wyosobnionych od prosiąt z biegunką, nie wytwarzała badanych w pracy fimbrii F4, F5, F6, F17, F18 lub F41, ale cechowała się obecnością markerów genotypowych dla enterotoksyn, najczęściej LTI i STI (11 szczepów), STI lub STII (po 3 izolaty) lub też ich wzajemnych kombinacji (łącznie 3 szczepy). Taki wynik może być efektem niedoskonałości stosowanych

Tab. 4. Współzależność między zdolnością wytwarzania fimbrii adhezyjnych a obecnością markerów genotypowych toksyn Shiga u badanych szczepów *E. coli* izolowanych od prosiąt z biegunką

Fimbrie	Liczba szczepów z fimbriami	Liczba szczepów z genami kodującymi toksyny Shiga			
		Stx1	Stx2e	Stx1+Stx2e	Brak
F4	120	0	0	0	120
F5	39	0	0	0	39
F6	12	0	0	0	12
F17	2	0	0	0	0
F18	31	1	15	2	13
F41	2	0	0	0	2
Brak	34	0	2	1	31

Tab. 5. Współzależność między obecnością fimbrii i enterotoksyn a zdolnością wytwarzania toksyny EAST1 u badanych szczepów *E. coli* izolowanych od prosiąt z biegunką

Marker patogenności	Liczba szczepów ogółem	Liczba (%) szczepów z genem <i>astA</i> toksyny EAST1
LTI+F4	25	23 (92,0)
LTI+STI+F4	57	51 (89,5)
LTI+STII+F4	9	7 (77,8)
F4	29	2 (6,90)
Razem	120	83 (69,2)

metod diagnostycznych a zwłaszcza użytego do identyfikacji fimbrii testu aglutynacji. Wykazano bowiem wcześniej, że analiza obecności tego typu adhezyn tylko za pomocą odczynu aglutynacji szkiełkowej może prowadzić do uzyskania pewnego odsetka wyników fałszywie ujemnych (23). Dotyczy to zwłaszcza fimbrii F6, których ekspresja powierzchniowa *in vitro* zależna jest w dużym stopniu od użytych podłoży bakteriologicznych, warunków hodowlanych i zmienności fazowej inkubowanych szczepów *E. coli* (8, 17). Z badań wykonanych przez Oskę metodą Western blot (23) wynika, że niektóre izolaty, nie posiadające powierzchniowo wykrywalnych antygenów fimbrialnych, wykazywały jednak ich wewnątrzkomórkowe podjednostki strukturalne, które prawdopodobnie były aktywne biologicznie tylko w warunkach *in vivo*. Należy więc również uwzględnić, że możliwość taka dotyczyła pewnych szczepów *E. coli* analizowanych w obecnych badaniach.

W podsumowaniu można stwierdzić, że głównym czynnikiem jelitowej formy kolibakteriozy u prosiąt osesków są najczęściej szczepy enterotoksyczne (ETEC), wytwarzające zwykle fimbrie F4 oraz enterotoksynę LT1, często również w połączeniu z enterotoksyną ST1. Wykazanie u dość dużego odsetka badanych izolatów adhezyn F18, a ściślej ich markera genotypowego *fedA*, stanowi cenną informację użyteczną dla poprawy metod diagnostyki kolibakteriozy prosiąt osesków, bowiem rutynowe badania laboratoryjne zwykle nie obejmują fimbrii F18, uważanych dotychczas za czynnik kolonizacyjny izolatów pochodzących wyłącznie od prosiąt w okresie odsadzania od macior.

Piśmiennictwo

- Bertschinger H. U., Bachmann M., Mettler C., Pospischil A., Schraner E. M., Stamm M., Sydler T., Wild P.: Adhesive fimbriae produced *in vivo* by *Escherichia coli* O139:K12(B):H1 associated with enterotoxaemia in pigs. *Vet. Microbiol.* 1990, 25, 267-281.
- Dacko J., Osek J.: Analiza wybranych cech fenotypowych szczepów *Escherichia coli* izolowanych od prosiąt. *Medycyna Wet.* 2004, 60, w druku.
- Dacko J., Weiner M., Osek J.: Klasyfikacja chorobotwórczych szczepów *Escherichia coli* izolowanych od prosiąt z biegunką na podstawie amplifikacji genów patogenności metodą PCR. *Medycyna Wet.* 2004, 60, w druku.
- Dean E. A.: Comparison of receptors for 987P pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* in the small intestines of neonatal and older pigs. *Infect. Immun.* 1990, 58, 4030-4035.
- Dean-Nystrom E. A., Bukhardt D., Bosworth B. T., Welter M. W.: Presence of F18ac (2134P) fimbriae on 4P *Escherichia coli* isolates from weaned pigs with diarrhea. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997, 9, 77-79.
- Dean-Nystrom E. A., Samuel J. E.: Age-related resistance to 987P fimbria-mediated colonization correlates with specific glycolipid receptors in intestinal mucus in swine. *Infect. Immun.* 1994, 62, 4789-4794.
- Franklin A., Soderlind O., Mollby R.: Plasmids coding for enterotoxins, K88 antigen and colicins in porcine *Escherichia coli* strains of O-group 149. *Med. Microbiol. Immunol.* 1981, 170, 63-72.
- Gaastra W., De Graaf F. K.: Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* 1982, 46, 129-161.
- Gyles C. L., So M., Falkow S.: The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 1974, 130, 40-49.
- Holland R. E.: Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990, 3, 345-375.
- Imberechts H., Bertschinger H. U., Stamm M., Sydler T., Pohl P., De Greve H., Hernalsteens J. P., Van Montagu M., Lintermans P.: Prevalence of F107 fimbriae on *Escherichia coli* isolated from pigs with oedema disease or postweaning diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 1994, 40, 219-230.
- Imberechts H., Van Pelt N., De Greve H., Lintermans P.: Sequences related to the major subunit *fedA* of F107 fimbriae in porcine *E. coli* strains that express adhesive fimbriae. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994, 119, 309-314.
- Khan A. S., Johnson N. C., Goldfine H., Schifferli D. M.: Porcine 987P glycolipid receptors on intestinal brush borders and their congate bacterial ligands. *Infect. Immun.* 1996, 64, 3688-3693.
- Levine M. M.: *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 1987, 155, 377-389.
- Moon H. W., Nagy B., Isaacson R. E., Orskov I.: Occurrence of K99 antigen on *Escherichia coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99+ enterotoxigenic *E. coli* from calves and pigs. *Infect. Immun.* 1977, 15, 614-620.
- Nagy B., Fekete P. Z.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 1999, 30, 259-284.
- Nagy B., Moon H. W., Isaacson R. E.: Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli*: selection of piliated forms *in vivo*, adhesion of piliated forms to epithelial cells *in vitro*, and incidence of a pilus antigen among porcine enteropathogenic *E. coli*. *Infect. Immun.* 1977, 16, 344-352.
- Nagy B., Whipp S. C., Imberechts H., Bertschinger H. U., Dean-Nystrom E. A., Casey T. A., Salajka E.: Biological relationship between F18ab and F18ac fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs with oedema disease or diarrhoea. *Microb. Pathog.* 1997, 22, 1-11.
- Olsson E.: *E. coli* diarrhoea in neonatal piglets. A study on virulence factors and immunity. Ph.D. thesis, 1984, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Orskov I., Orskov F., Smith H. W., Sojka W. J.: The establishment of K99, a thermolabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called „Kco”, possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1975, 83, 31-36.
- Orskov I., Orskov F.: Serology of *Escherichia coli* fimbriae. *Prog. Allergy* 1983, 33, 80-105.
- Orskov I., Orskov F., Sojka W. J., Leach J. M.: Simultaneous occurrence of *E. coli* B and L antigens in strains from diseased swine. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1961, 62, 439-447.
- Osek J.: Czynniki chorobotwórczości szczepów *Escherichia coli* izolowanych od prosiąt w okresie odsadzania od macior oraz ich rola w patogeniezie i immunoprofilaktyce kolibakteriozy. Rozprawa habilitacyjna, 1998, PIWet, Puławy.
- Osek J.: Metody genotypowe różnicowania patogennych szczepów *Escherichia coli* stosowane w epidemiologii molekularnej. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 367-371.
- Osek J.: Prevalence of shiga toxin genes among *Escherichia coli* strains isolated from pigs. *Vet. Rec.* 1999, 145, 557-558.
- Osek J.: Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet. Microbiol.* 1999, 68, 209-217.
- Osek J.: Oznaczanie markerów genotypowych fimbrii F18 i toksyny Shiga Stx2e szczepów *Escherichia coli* testem multiplex PCR. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 510-512.
- Osek J., Gallien P., Truszczyński M., Protz D.: The use of polymerase chain reaction for determination of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs in Poland. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1999, 22, 163-174.
- 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.
- To S. C. M.: F41 antigen among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* strains lacking K88, K99, and 987P pili. *Infect. Immun.* 1984, 43, 549-554.
- Van den Broeck W., Cox E., Oudega B., Goddeeris B. M.: The F4 fimbrial antigens of *Escherichia coli* and its receptors. *Vet. Microbiol.* 2000, 71, 223-244.
- Wilson R. A., Francis D. H.: Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. *Am. J. Vet. Res.* 1986, 47, 213-217.
- Wittig W., Fabricius C.: *Escherichia coli* types isolated from porcine *E. coli* infections in Saxony from 1963 to 1990. *Zbl. Bakt. Hyg. Med.* 1992, 277, 389-402.
- Wray C., McLaren I. M., Carroll P. J.: *Escherichia coli* isolated from farm animals in England and Wales between 1986 and 1991. *Vet. Rec.* 1993, 132, 439-442.
- Wray C., Morris J. A.: Aspects of colibacillosis in farm animals. *J. Hygiene* 1985, 95, 577-593.