

Przydatność testu agregacji komórek bakteryjnych (SAT) do wykrywania fimbrii *Escherichia coli*

Zakład Mikrobiologii, Instytut Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

The usefulness of cell aggregation test (SAT) to detect of *Escherichia coli* fimbria

The aim of the work was to determine by the use of the haemagglutination test and slide agglutination test specific and unspecific fimbria of *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and normal piglets. The obtained results were compared with the cell aggregation test (SAT) in order to evaluate its efficiency to determine fimbria of *E. coli*. It was found a close relationship between a hydrophobic properties of bacterial cell surface (positive SAT) and the presence of fimbrial antigens K88 and 987P (95.7% and 83.6% of agreement of the SAT with the agglutination test). Only 33.7% of strains having unspecific fimbria F₁ possessed hydrophobic properties. It was found that the SAT test may be applied for screening of the specific fimbria of *E. coli*.

Fimbrie swoiste (3), a być może również nieswoiste (9, 10, 19) *Escherichia coli* odgrywają, obok enterotoksyn (16, 17, 23), ważną rolę w patogenie enterotoksycznej postaci kolibakteriozy prosiąt osesków (24) i prosiąt odsadzonych od macior (17).

W większości przypadków obecność fimbrii swoistych od nieswoistych odróżnia się na podstawie wyniku testu hemaglutynacji czynnej z dodatkiem mannozy. Szczepy *E. coli*, posiadające fimbrie swoiste, mimo obecności mannozy powodują aglutynację krwinek czerwonych, w przeciwieństwie do szczepów z fimbriami nieswoistymi, których właściwości hemaglutynacyjne są zahamowane przez wspomniany cukier (3).

Fimbrie swoiste, zawierające antygeny K88 (18), 987P (15), K99 (13), F41 (14), F17 (8), F165 (2) lub inne, określa się przy pomocy aglutynacji ze swoistymi surowicami.

Z badań Wadströma i wsp. (22) oraz Smytha i wsp. (20) wynika, iż szczepy *E. coli* posiadające fimbrie swoiste, a znacznie rzadziej też nieswoiste, odznaczają się hydrofobowymi właściwościami powierzchni komórki bakteryjnej. Cecha ta może być wykryta prostym testem „wysalania” (Saltink Out Test), najczęściej w obecności siarczanu amonu (Salt Aggregation Test, SAT).

W pracy obecnej zbadano, używając testów hemaglutynacji i aglutynacji szkiełkowej, występowanie fimbrii swoistych i nieswoistych u szczepów *E. coli*, izolowanych od prosiąt z biegunką i od prosiąt zdrowych, a uzyskane wyniki porównano z rezultatami otrzymanymi w teście SAT. Celem była zatem ocena wymienionego testu pod kątem jego przydatności do oznaczania fimbrii swoistych i nieswoistych szczepów *E. coli*.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Do badań użyto szczepów *Escherichia coli*, wyizolowanych od prosiąt z biegunką i od prosiąt zdrowych. Materiał uzyskano od 331 prosiąt osesków (w wieku 1–9 dni), 361 prosiąt odsadzonych od macior (prosiąt w wieku 6–8 tygodni), padłych z powodu biegunki oraz 195 prosiąt zdrowych, w różnych grupach wiekowych (1–8 tygodni). Dysponowano w sumie wyosobnionymi z przypadków chorobowych 1125 szczepami, pochodzącymi od prosiąt osesków i 1146 szczepami od prosiąt odsadzonych od macior. Posiadano też 724 szczepy wyosob-

nione od prosiąt zdrowych. Użyto również szczepów kontrolnych, posiadających fimbrie K88, K99, 987P, F41 i F1 oraz bez tych czynników adhezyjnych.

Odczyn hemaglutynacji czynnej. Odczyn hemaglutynacji czynnej wykonano z krwinkami czerwonymi cielęcia, konia, kury, prosięcia i świnki morskiej. Test przeprowadzono metodą probówkową, używając równych objętości (0,2 ml) 1% zawiesiny krwinek czerwonych w PBS oraz zawiesiny bakteryjnej (5×10^{10} CFU/ml), stosując współczynnik rozcieńczeń 2. Odczyn wykonano z dodatkiem 1% D-mannozy oraz bez tego cukru. Za wynik dodatni, tzn. wskazujący na obecność u badanych szczepów fimbrii hemaglutynacyjnych, uznawano wystąpienie aglutynacji krwinek czerwonych w rozcieńczeniu bakterii powyżej 1:8. W przypadku zahamowania odczynu przez mannozę przyjmowano, iż badany szczep posiada fimbrie nieswoiste, typu 1 (F1).

Oznaczanie serologiczne fimbrii hemaglutynacyjnych. Wszystkie szczepy, wykazujące obecność fimbrii w odczynie hemaglutynacji z mannozą, zbadano przy pomocy testu aglutynacji szkiełkowej z surowicami swoistymi K88, K99 i F41. Dodatkowo, u wszystkich 2995 szczepów *E. coli* oznaczano występowanie niehemaglutynacyjnych fimbrii 987P. Swoiste surowice antyfimbrialne uzyskano według metodyki opisanej poprzednio (21). Szczepy do odczynu aglutynacji hodowano na podłożach: CFA agar (1) — dla oznaczania fimbrii K88, Minca (5) — celem określenia fimbrii K99 i F41 oraz agarze z krwią (fimbrie 987P). Wszystkie hodowle inkubowano przez 20 h w 37°C.

Określanie właściwości hydrofobowych powierzchni komórki bakteryjnej. Cechy hydrofobowe komórki bakteryjnej badano testem SAT, używając następujących stężeń siarczanu amonu: 0,062 M, 0,125 M, 0,2 M, 2,0 M i 3,2 M w 0,002 M fosforanie sodowym, o pH 6,8. Odczyn wykonano na szkiełkach mikroskopowych, mieszając po jednej kropli zawiesiny bakteryjnej w 0,002 M fosforanie sodowym i siarczanu amonu o podanych stężeniach. Wystąpienie agregacji komórek bakteryjnych odczytywano w ciągu 2 minut, mieszając delikatnie szkiełkiem w temperaturze pokojowej. Na właściwości hydrofobowe powierzchni komórki bakteryjnej wskazywało wystąpienie agregacji bakterii w stężeniu siarczanu amonu poniżej 2,0 M. W przypadku reakcji dodatniej w wyższych stężeniach soli uznawano, iż powierzchnia bakterii posiada cechy hydrofilne.

Wyniki i omówienie

Jak wynika z danych tabeli 1, większość szczepów (62,2%), izolowanych od prosiąt z biegunką, posiadała fimbrie swoiste, aglutynujące użyte w pracy krwinki czerwone. Dodatkowo 15,8% szczepów, pochodzących od prosiąt chorych wykazywało obecność fimbrii nieswoistych F1 (odczyn hemaglutynacji zahamowany przez mannozę).

W przypadku szczepów izolowanych od prosiąt zdrowych, występujące fimbrie były najczęściej typu F1 (27,1% szczepów), a tylko 5 szczepów (0,7%) aglutynowało krwinki czerwone w obecności mannozy (fimbrie swoiste).

Ogółem wykazano, iż spośród 2995 badanych szczepów, 1418 (47,3%) posiadało swoiste fimbrie hemaglutynacyjne, a 554 szczepy (18,5%) wykazywały obecność fimbrii nieswoistych, F1.

Celem oznaczenia rodzaju antygeny fimbrii swoistych posiadane szczepy badano odczynem aglutynacji szkiełkowej z użyciem surowic antyfimbrialnych. Rezultaty tych badań są zebrane w tabeli 2. Wynika z niej, iż najczęściej wykazano antygen K88, a w kolejności 987P

i K99. Niektóre badane szczepy, pochodzące zarówno od prosiąt z biegunką (5 szczepów), jak też od prosiąt zdrowych (4 szczepy), posiadały fimbrie swoiste, których antygenów nie udało się określić użytymi w pracy suhowicami antyfimbriálnymi. Fimbrie te oznaczono F?. U żadnego badanego szczepu *E. coli* nie stwierdzono obecności fimbrii z antygenem F41.

Dalszym etapem pracy było określenie współzależności między obecnością lub brakiem fimbrii a właściwościami hydrofobowymi lub hydrofilnymi powierzchni komórki bakteryjnej oraz porównanie uzyskanych wyników z rezultatami testów hemaglutynacji i aglutynacji szkiełkowej.

Jak wynika z danych tabeli 3, stwierdzono ścisłą zależność między właściwościami hydrofobowymi powierzchni komórki bakteryjnej a obecnością swoistych fimbrii, zwłaszcza z antygenami K88, 987P i K99. Z większością szczepów, posiadających tego typu fimbrie, uzyskiwano dodatni wynik odczynu agregacji komórek bakteryjnych z siarczanem amonu o stężeniu poniżej 2,0 M. Tylko 8,3% szczepów, u których nie stwierdzono ani fimbrii swoistych, ani nieswoistych, odznaczało się właściwościami hydrofobowymi. Cechy hydrofilne zaznaczały się najwyraźniej u szczepów bez fimbrii (91,7% szczepów), jak również w przypadku szczepów z fimbriami nieswoistymi F1 (66,3% szczepów o cechach hydrofilnych).

Porównując wyniki uzyskane testem SAT z rezultatami odczynu aglutynacji, określającego antygeny fimbrii swoistych wykazano, iż reakcja dodatnia w stężeniu poniżej 2,0 M (właściwości hydrofobowe) występowała najczęściej przy szczepach z fimbriami K88 (95,7% wyników dodatnich) oraz 987P (83,6% wyników dodatnich). Znacznie niższa zgodność wyników została stwierdzona przy fimbriach swoistych o nieoznaczonym antygenie (22,2%) oraz w przypadku szczepów posiadających fimbrie nieswoiste F1 (33,7% zgodności testów hemaglutynacji i aglutynacji z siarczanem amonu w stężeniu poniżej 2,0 M).

Podobne rezultaty, w odniesieniu do testu SAT, uzyskali Wadström i wsp. (22) oraz Gonzalez i wsp. (4). Z ich danych wynika, iż największa korelacja między hydrofobowymi właściwościami powierzchni komórki bakteryjnej a testem aglutynacji występowała w przypadku fimbrii K88 i 987P. Lindahl i wsp. (12), podobnie jak w przedstawionych wynikach własnych, najmniej szczepów dodatnich w teście SAT oznaczyli w przypadku fimbrii nieswoistych F1. Fimbrie te zbudowane są bowiem z większej liczby, w porównaniu z fimbriami swoistymi, apolarnych aminokwasów, odpowiedzialnych za cechy hydrofilne. Z tego też względu do wykrywania obecności fimbrii nieswoistych, test hemaglutynacji zahamowany przez mannozę daje najlepsze rezultaty. Wykazano to również w obecnej pracy.

Ogółem, szczepy u których testami hemaglutynacji i/lub aglutynacji wykazano fimbrie swoiste, w 94,8% przypadków posiadały cechy hydrofobowe (tabela 3), wykrywane testem SAT. Właściwości takie wykazano dodatkowo u niektórych szczepów, u których fimbrie nie były wykryte przy pomocy aglutynacji swoistej, w związku z czym uzyskany wynik może wskazywać na obecność fimbrii swoistych o nieokreślonym antygenie. Podobne sugestie, odnośnie przydatności testu SAT do wykazania bliżej nieokreślonych fimbrii o cechach hydrofobowych, wysuwają Gonzalez i wsp. (4) oraz Lindahl i wsp. (12).

Na podstawie uzyskanych w pracy wyników można wnioskować, że: test SAT jest prostą metodą oznaczania

Tab. 1. Występowanie fimbrii swoistych i wspólnych u szczepów *E. coli* badanych odczynem hemaglutynacji

Pochodzenie szczepów	Liczba szczepów badanych	Liczba (%) szczepów dodatnich w odczynie hemaglutynacji		Liczba (%) szczepów ujemnych w teście hemaglutynacji
		z mannozą (fimbrie swoiste)	bez mannozy (fimbrie wspólne)	
Prosięta z biegunką	2271	1413 (62,2)	358 (15,8)	500 (22,0)
Prosięta zdrowe	724	5 (0,7)	196 (27,1)	523 (72,2)
Razem	2995	1418 (47,3)	554 (18,5)	1023 (34,2)

Tab. 2. Rodzaje antygenów fimbrii swoistych u szczepów *E. coli* badanych testem aglutynacji szkiełkowej

Pochodzenie szczepów	Liczba szczepów dodatnich w teście hemaglutynacji z mannozą (ogólna liczba szczepów)	Liczba (%) szczepów z fimbriami				Liczba (%) szczepów z fimbriami 987P
		K88	K99	F41	F? *	
Prosięta z biegunką	1413 (2271)	1382 (97,3)	26 (1,8)	—	5 (0,4)	165 (7,3)
Prosięta zdrowe	5 (724)	—	1 (20,0)	—	4 (80,0)	—
Razem	1418 (2995)	1382 (97,5)	27 (1,9)	—	9 (0,6)	165 (5,5)

Objaśnienie: * — szczepy z fimbriami swoistymi o nieustalonym antygenie.

Tab. 3. Porównanie wyników testów hemaglutynacji i aglutynacji z właściwościami hydrofobowymi/hydrofilnymi powierzchni komórki bakteryjnej

Test	Liczba (%) szczepów dodatnich	Liczba szczepów o cechach hydrofobowych *	Liczba szczepów o cechach hydrofilnych **
Hemaglutynacji			
— z mannozą (fimbrie swoiste)	1418 (47,3)	1344 (94,8) ***	74 (5,2)
— bez mannozy (fimbrie F1)	554 (18,5)	187 (33,7)	367 (66,3)
— ujemny (fimbrie F-)	1023 (34,2)	85 (8,3)	938 (91,7)
Agglutynacji			
K88	1382 (46,1)	1322 (95,7)	60 (4,3)
K99	27 (0,9)	20 (74,1)	7 (25,9)
F?	9 (0,3)	2 (22,2)	7 (77,8)
987P	165 (5,5)	138 (83,6)	27 (16,4)

Objaśnienia: * — agregacja bakterii przy stężeniu siarczanu amonu poniżej 2,0 M, ** — agregacja bakterii przy stężeniu siarczanu amonu powyżej 2,0 M, *** — wartości określające swoistość odczynu SAT w stosunku do testów hemaglutynacji i aglutynacji.

nia cech hydrofobowych powierzchni komórki bakteryjnej szczepów *E. coli*, związanych z obecnością fimbrii. Wysoka zgodność testu SAT z wynikami odczynu aglutynacji szkiełkowej, szczególnie w przypadku fimbrii K88, ale również 987P i K99, pozwala na użycie tego odczynu w screeningowych badaniach szczepów *E. coli* w kierunku obecności fimbrii swoistych.

Piśmiennictwo

1. Evans D. G., Evans D. J., Tjoa W.: Infect. Immun. 18, 330, 1977.
2. Fairbrother J. M., Larivière S., Lallier R.: Infect. Immun. 51, 10, 1986.
3. Gaastra W., De Graef F. K.: Microbiol. Rev. 46, 129, 1982.
4. Gonzalez E. A., Blanco J., Baloda S. B., Wadström T.: Zbl. Bact. Hyg. A 269, 218, 1988.
5. Guinee P. A. M., Veldkamp M. J., Jansen W. H.: Infect. Immun. 15, 676, 1977.
6. Honda T., Arita M., Miwatani T.: Infect. Immun. 43, 959, 1984.
7. Honda T., Khan M. M. A., Takeda Y., Miwatani T.: FEMS Microbiol. Lett. 17, 273, 1983.
8. Ike K., Himura M., Iole S. J.: Vet. Sci. 50, 267, 1988.
9. Isaacson R. E., Fusco P. C., Brinton C. C., Moon H. W.: Infect. Immun. 21, 392, 1978.
10. Jayappa H. G., Goodnow R. A., Geary S. J.: Infect. Immun. 48, 350, 1985.
11. Jonsson P., Wadström T.: Current Microbiol. 10, 203, 1984.
12. Lindahl M., Faris A., Wadström T., Hjerten S.: Bioch. Biophys. Acta 677, 471, 1981.
13. Moon H. W., Kohler E. M., Schneider R. A., Whipp S. C.: Infect. Immun. 27, 222, 1983.
14. Morris J. A., Thorns C. J., Sofka W. J.: J. Gen. Microbiol. 118, 107, 1980.
15. Nagy B., Moon H. W., Isaacson R. E.: Infect. Immun. 13, 1214, 1976.
16. Niemiatowski M., Szymkiewicz Z., Binek M., Klimuszko D., Ciosek D., Jakubowski T.: Acta Microbiol. Pol. 35, 237, 1986.
17. Olsson E.: E. coli diarrhea in neonatal piglets. A study of virulence factors and immunity. Uppsala 1984.
18. Ørskov L., Ørskov F., Sofka W. J., Leach J. M.: Acta Pathol. Microbiol. Scand. 53, 404, 1961.
19. Sherman P. M., Houston W. L., Boedeker E. C.: Infect. Immun. 49, 797, 1985.
20. Smyth C. J., Jonsson P., Olsson E., Söderlind O., Rosengren J., Hjerten S., Wadström T.: Infect. Immun. 22, 452, 1978.
21. Truszczyński M., Osek J.: Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis. 10, 117, 1987.
22. Wadström T., Faris A., Freer J., Habte D., Hallberg D., Ljungh A.: Scand. J. Inf. Dis. Suppl. 24, 148, 1980.
23. Wilson R. A., Francis D. H.: Am. J. Vet. Res. 47, 213, 1986.
24. Wray C., Morris J. A.: J. Hyg. (Cambridge) 95, 577, 1985.

Adres autora: dr Jacek Osek, ul. Kościuszki 12/24, 24-100 Puławy

STANISŁAW KLIMENTOWSKI

Zakażenia prenatalne BLV (Bovine Leukemia Virus) u bydła

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR,
Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Summary

Prenatal infection with bovine leukaemia virus (BLV) in cattle

The aim of the work was to determine the frequency of prenatal infection with BLV and assessment of selected diagnostic methods. Blood and colostrum collected from 74 cows and 74 calves were taken before colostrum administration and 24 hours after feeding colostrum. The animals derived from the herds W and B infected with BLV in 90%. Serological examinations for antibodies against BLV were carried out by the AGID test and ELISA. On the W and B farms positive results were found in 10% and 13% of calves by means of the AGID and 15% and 22% by ELISA, respectively. The findings indicated that ELISA was much more useful compared with the AGID for serological examinations of new-born calves. In addition, one should anticipate that prenatal infection with BLV constituted an essential epizootiological problem expressing the danger of virus spreading by calves housed together in the first six months of life i.e. when first serological tests took place.

(3). Straub (20) podaje, że *zona pellucida* jest nieprzepuszczalna dla BLV i chroni zarodek przed zakażeniem. Ta cecha błony przejrzystej pozwala na wykorzystanie zarodków pochodzących od matek zakażonych do transplantacji u nie zakażonych biorecipientów celem pozyskania wartościowego potomstwa wolnego od zakażeń BLV.

Celem pracy było określenie istoty i częstotliwości prenatalnych zakażeń BLV u bydła oraz ocena przydatności wybranych metod diagnostycznych.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiła krew i siara pobrana od 74 krów oraz krew od 74 cieląt pobrana przed podaniem i 24 godz. po napojeniu siarą. Zwierzęta pochodziły ze stada „W” i „B” o odsetku zakażeń BLV wynoszącym ponad 90%.

Do badań serologicznych w kierunku EBB wykorzystano powszechnie stosowany w świecie test AGID, używając antygenu gp-51 firmy Behringwerke oraz test ELISA, używając gotowych zestawów tej samej firmy. Oba testy wykonano zgodnie z obowiązującymi zasadami i zaleceniami producenta.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań testem AGID i ELISA surowicy krwi i siary krów oraz surowicy krwi ich potomstwa przed podaniem i po napojeniu siarą w gospodarstwie „W” i „B” przedstawiono w tabeli 1. U badanych 20 cieląt w gospodarstwie „W”, pochodzących w 90% od matek zakażonych BLV, stwierdzono przed podaniem siary u dwóch z nich (10%) swoiste przeciwciała w teście AGID, a u trzech (15%) w teście ELISA. W analogicznych badaniach 54 cieląt w gospodarstwie „B”, pochodzących od krów w 87% zakażonych BLV, wykazano przed podaniem siary obecność swoistych przeciwciał testem AGID u 7 (13%), a testem ELISA u 12 (22%) cieląt. Warto także podkreślić, że w gospodarstwie „W” tylko u 1 cielęcia (5%), natomiast w gospodarstwie „B” u 10 cieląt (18,5%) odnotowano ujemne wyniki badań serologicznych po podaniu siary zawierającej przeciwciała anty-BLV, co mogło być związane z czasem i sposobem odpajania siarą oraz stanem przewodu pokarmowego.

Rozwinięcie w latach siedemdziesiątych badań wirusologicznych i serologicznych pozwoliło bliżej poznać sposoby przenoszenia się BLV w okresie prenatalnym i postnatalnym.

Badania przeprowadzone przez Ferrera i wsp. (4), Olsona i wsp. (13) wykazały przed podaniem siary obecność przeciwciał anty-BLV u nowo narodzonych cieląt pochodzących od zakażonych krów. Odsetek cieląt zakażonych w życiu płodowym wyniósł w badaniach Ferrera i wsp. (5) — 25%, Ferrera i wsp. (4) oraz Pipera i wsp. (18) — 14—18%, Łosieczki (11) — 14%, Libermann i wsp. (10), Müllera i wsp. (12) oraz Perlberga i wsp. (17) — 8—10%. Uogólniając wyniki powyższych autorów oraz innych badaczy (9, 15, 19, 21, 22) zakażenia transplacentarne wynosiły średnio 15%, nie przekraczając jednak 30%.

Z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że zakażenia śródmaciczne nie występują w pierwszych tygodniach, czego dowodem są badania zarodków na obecność BLV przeprowadzone przez Olsona i wsp. (14), Bouillanta i wsp. (1) oraz Eaglesome i wsp.