

N. N. ACHMETSADYKOV*, K. K. MUKANOV, S. K. SAGINOVA, K. S. MEJRAMKUŁOVA

Właściwości morfologiczno-funkcjonalne antygenów adhezyjnych *E. coli*

Almatyński Instytut Zooweterynaryjny, *Akmoliński Instytut Rolniczy Kazachskiego Uniwersytetu Rolniczego,
ul. Abaja 8, 480021 Almaty, Kazachstan

Summary

Morphological and functional properties of *Escherichia coli* adhesive antigens

The morphology of fimbriae of pathogenic strains of *Escherichia coli* cultivated on the Minc and MPA media was studied under an electron microscope. Fimbriae are synthesized during incubation of bacterial culture at 37°C. The diameter of fimbriae of type K99 was 5+0,25 nm ranged from 3.5 to 7.0 nm; the overall length ranged from 0.4 to 2.5 nm. The diameter of fimbriae of type F-41 was 3+0,5 nm and ranged from 2.1 to 4.0 nm, and its length ranged from 0.5 to 3.0 nm. The diameter of fimbriae of type K88 was 2+0,5 nm and ranged from 1.5 to 3.5 nm, and its length ranged from 0.5 to 2.0 nm. Generally, the morphology of the fimbriae was identical, and their base was situated under the cytoplasmic bacterial membrane.

Chorobotwórczość pałeczki *Escherichia coli*, wywołującej zachorowania zwierząt i ludzi, jest uwarunkowana strukturą powierzchni komórki (fimbrialnymi adhezynami, antygenami otoczkowymi, kompleksem lipowielocukrowo-białkowym w ścianie komórki), wytwarzaniem ektotoksyn i hemolizyn oraz niektórymi właściwościami metabolizmu komórki bakteryjnej umożliwiającymi jej przeżywanie w zmieniających się warunkach środowiska. Przyjmuje się, że istotnym czynnikiem chorobotwórczości jest adhezyjność – zdolność syntezy antygenów adhezyjnych, przy pomocy których bakterie przyczepiają się do komórek epitelialnych makroorganizmu i uczynniają swój potencjał chorobotwórczy (1, 2). Adhezyny są to makromolekularne struktury na powierzchni bakterii, za pomocą których łączą się one z receptorami enterocytów jelitowych. Większość adhezyn stanowią nitkowate wypustki, składające się z podjednostek białkowych, które Duguid i Gillies (5) nazwali fimbriami (od łacińskiego słowa – nić, włókno), a Brinton (3) pili (od łacińskiego – włos). Termin adhezyny fimbrialne jest używany dla podkreślenia tak ich morfologii, jak i funkcji.

W rozpoznawaniu i kolonizacji enterocytów biorą udział adhezyny *E. coli*, oznaczone jako CFA1, CFA11, K99, K88, F41 i 987P. Adhezyny CFA1 i CFA11 są swoiste dla szczepów wywołujących enterotoksemię u ludzi (6, 7). Adhezynę K99 wykryto u

szczepów enterotoksynogennych dla cieląt, jagniąt i prosiąt (8, 12). Adhezyny K88 i 987P są swoiste dla szczepów wywołujących biegunki u prosiąt (11). Adhezynę F41 wykryto u szczepów patogennych dla cieląt (4).

Przy badaniu ultracienkich skrawków *E. coli* w mikroskopie elektronowym stwierdza się na powierzchni bakterii rzęski i pili. Średnica rzęsek wynosi 22-23 nm. Posiadają one osłonki i tworzą na powierzchni komórki bakteryjnej nieregularne spirale. Fimbrie w odróżnieniu od rzęsek umocowane są pod błoną cytoplazmatyczną i dlatego zachowują się w bakteriach pozbawionych ściany komórkowej. Fimbrie typu F mają kanał średnicy 2,0-2,5 nm i zdolne są adsorbować cząsteczki fagowe na swojej powierzchni (3, 10).

Większość fimbrii jest dobrze widoczna przy badaniu bakterii w mikroskopie elektronowym w preparatach negatywnie kontrastowanych (9). Fimbrie mogą występować na biegunach lub na obrzeżach bakterii, a ich liczba waha się od kilku do kilkuset. Średnica fimbrii waha się od 2 do 7 nm, a ich długość dochodzi do 4 μm.

Celem pracy było zbadanie metodą mikroskopii elektronowej zdolności syntezy oraz morfologii fimbrii przez adhezyno-pozytywne szczepy *E. coli* w zależności od składu podłoża odżywczego oraz temperatury inkubacji hodowli.

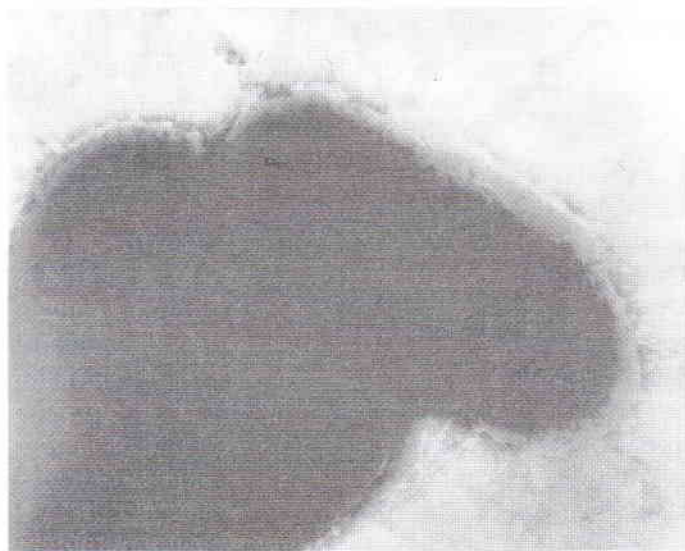
Materiał i metody

Do badania użyto 16-godzinnych hodowli wytypowanych chorobotwórczych i niechorobotwórczych szczepów *E. coli* namażanych na półsyntetycznym podłożu Minca oraz agarze MPA w temperaturach 37 i 18°C. Za pomocą ezy pobierano zeszkobinę z powierzchni kolonii i rozpuszczano w kropli 0,01 M FBR o pH 7,2. Następnie na zawiesinę nakładano siatkę pokrytą parlodionową błoną i preparat kontrastowano 2% roztworem fosforo-wolfromianu potasu. Tak przygotowane preparaty badano w mikroskopie elektronowym EM – 125K przy przyspieszającym napięciu 75 kilowolt, stosując powiększenia 8000–41 000. W pracy posługiwano się błonami fotograficznymi do badań jądrowych o grubości emulsji 10-15 mikronów. Z każdego szczepu badano po 50 komórek bakteryjnych.

Wyniki i omówienie

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że na stopień wytwarzania antygenów adhezyjnych K99 i F41 wpływa tak skład podłoża, jak i temperatura inkubacji hodowli testowanych szczepów *E. coli*. Najsilniejszą produkcję uzyskano na podłożu Minca przy inkubacji w 37°C. Spośród 50 zbadanych komórek bakteryjnych szczepu O9:K99 fimbrie na całej powierzchni stwierdzono u 41 (82%), a szczepu O141:F41 u 45 (90%) komórek. Liczby fimbrii nie udało się jednak ustalić, gdyż na niektórych fragmentach komórek były one ułożone bardzo gęsto i niekiedy się ze sobą przeplatały. Oprócz komórek całkowicie pokrytych fimbriami występowały również takie, na których liczba tych elementów wahała się od 10 do 30 sztuk. Prawdopodobnie było to związane z różnymi fazami wzrostu bakterii, choć nie można wykluczyć uszkodzeń fimbrii przy przygotowaniu preparatów. W hodowlach tych samych szczepów namnożonych na agarze MPA tylko u 25-28% komórek stwierdzono obecność fimbrii. Wyniki te korelowały z odczynem hemaglutynacji. Zawiesiny bakteryjne uzyskane z hodowli na podłożu Minca dawały odczyny silnie dodatnie (++++), natomiast z kultur na podłożu agarowym słabo-dodatnie lub nawet ujemne. Prawdopodobnie skład podłoża Minca wpływał na silniejszą syntezę adhezyn K99 i F41, mimo iż to półsyntetyczne podłoże nie zawiera alaniny i innych składników występujących w podłożu MPA. W preparatach kontrolnych przygotowanych z hodowli inkubowanych w 18°C na 50 badanych stwierdzono pojedyncze fimbrie u 1-1,5% komórek.

Pomiary 50 fimbrii szczepu *E. coli* O9:K99 wykazały, że średnica fimbrii K99 wynosi $5 \pm 0,25$ nm i waha się od 3,5 do 7,0 nm. Długość tych fimbrii była zróżnicowana i wahała się od 0,4 do 2,5 μ m, dlatego też nie udało się ustalić wartości średniej (ryc. 1).



Ryc. 1. Mikrofotografia komórki *E. coli* szczepu O9:K99 z hodowli na podłożu Minca inkubowanej w 37°C. Powierzchnia i obrzeża komórki pokryte są fimbrialnymi adhezynami. Preparat negatywnie kontrastowany – powiększenie 100 000x

Średnia wartość średnicy fimbrii F41 wynosiła $3 \pm 0,5$ nm i wahała się od 2,1 do 4,0 nm, natomiast długość od 0,5 do 3,0 μ m. Na otrzymanych zdjęciach mikroskopowych widoczne było, że podstawa fimbrii znajduje się pod błoną cytoplazmatyczną bakterii. Według własnych obserwacji, fimbrie są ściśle i trwale związane z komórką bakteryjną. Stwierdzaliśmy bowiem ich obecność u bakterii z uszkodzoną ścianą komórkową, a nawet u pozbawionych całkowicie tego elementu. Na ryc. 1 widać, że komórka bakteryjna jest pokryta fimbriami różnej długości. Jest to wynikiem niewielkiej ich średnicy i związanej z tym możliwością łamania się fimbrii w różnych miejscach. Natomiast średnice fimbrii K99 i F41 były jednakowe na całej zachowanej długości, co wskazuje na ich strukturalną identyczność.

Do badania morfologii fimbrialnej adhezyny K88 użyto szczepów *E. coli* K12, K88ab, K12, K88ac i K12, K88ad. Szczepy te namnażano na agarze mięsno-peptonowym w 37°C przez 16 godzin i przygotowywano preparaty do badania w mikroskopie elektronowym w opisany sposób. W uzyskanych hodowlach potwierdzono obecność antygeny K88 odczynem aglutynacji przy użyciu swoistych przeciwciał monoklonalnych. Spośród 50 badanych fimbrii stwierdzono u 36 (72%) komórek, przy czym występowały one na całej powierzchni i były znacznie liczniejsze niż u szczepów *E. coli* zawierających adhezyny K99 i F41. Średnica fimbrialnej adhezyny K88 wynosiła $2 \pm 0,5$ nm i wahała się od 1,5 do 3,5 nm, natomiast długość od 0,5 do 2,0 μ m. Podstawa tych fimbrii znajdowała się również pod błoną cytoplazmatyczną bakterii. Negatywną kontrolę stanowiły preparaty przygotowane z niechorobotwórczych szczepów *E. coli*, wyizolowanych od zdrowych prosiąt i reagujących ujemnie z monoklonalnymi przeciwciałami dla antygeny K88. W komórkach tych bakterii fimbrii nie stwierdzono.

Przeprowadzone badania adhezyjno-pozytywnych szczepów *E. coli* w mikroskopie elektronowym wykazały, że fimbrialne adhezyny mają ściśle określoną strukturę. Jednocześnie stwierdzono, że synteza fimbrialnych adhezyn K99 i F41 jest najsilniejsza przy namnażaniu odnośnych szczepów na półsyntetycznym podłożu Minca, natomiast obniża się przy hodowli na agarze mięsno-peptonowym. Struktura morfologiczna fimbrii K99, F41 i K88 jest w zasadzie identyczna. Są one ściśle związane z komórką bakteryjną, a ich podstawy znajdują się pod błoną cytoplazmatyczną. Wykazano, że najwięcej bakterii pokrytych fimbriami występuje u szczepów z adhezyną F41, natomiast mniej u szczepów z adhezynami K99 i K88. Prawdopodobnie jest to związane z faktem, że synteza adhezyny F41 jest determinowana przez DNA chromosomu, a synteza adhezyn K99 i K88 przez DNA plazmidów. Autorzy wyrażają pogląd, że nieco niższy odsetek bakterii z wykształconymi fimbriami u szczepów z adhezyną K88 jest

kompensowany znacznie większą liczbą tych elementów na poszczególnych komórkach w porównaniu do szczepów z adhezyną F41.

Piśmiennictwo

1. Zaroza V. G.: Escherichioz teljat, Agropromizdat 1991, s. 238.
2. Petrovskaja V. G., Bondarenko V. M.: Ž. Mikrobiol. Epidem. Immunobiol. nr 5, 110, 1990.
3. Brinton C. C.: Nature, Lond. 183, 782, 1959.

4. De Graaf F. K., Roorda I.: Infect. Immun. 36, 751, 1982.
5. Dujuid J. P., Gillies R. R.: J. Path. Bact. 74, 397, 1957.
6. Evans D. G., Evans D. J.: Infect. Immun. 21, 638, 1978.
7. Evans D. J., Evans D. G., Dupont H. Z.: Infect. Immun. 23, 336, 1979.
8. Isaacson R. E.: Infect. Immun. 15, 272, 1977.
9. Jones G. W., Isaacson R. E.: Crit. Rev. Microbiol. 10, 229, 1983.
10. Lown A. M.: J. Gen. Microbiol. 45, 377, 1966.
11. Mooi F. R., De Graaf F. K.: FEMS Microbiol. Lett. 5, 17, 1979.
12. Morris J. A., Stevens A. E., Sojka W. J.: J. Gen. Microbiol. 99, 353, 1977.

Thumaczył – Stanisław Wołoszyn

JERZY GNYP, ZYGMUNT LITWIŃCZUK

Efektywność użytkowania krów w zależności od wieku przy pierwszym wycieleniu

Instytut Hodowli i Technologii Produkcji Zwierzęcej Wydziału Zootechnicznego AR, ul. Akademicka 13, 20-934 Lublin

Summary

Milk yield efficiency of cows in relation to their age at first calving

Life efficiency of 335 black-and white cows from a herd that was cultivated for milk production by means of HF breed was studied in relation to their age at first calving. Four groups of animals were distinguished according to their age (given in months) at which they started their milk production: below 24, 24-27, 27-30, and above 30. The highest efficiency of milk production was found in cows that calved for the first time at the age of up to 27 months, and especially in those that started their milk production at the age of 24 to 27 months. Cows from these two groups had the longest period of milk production, and the most favourable ratio of the number of milking days to rearing days. They also showed the highest FCM efficiency per day and per year of their lives the highest number of calvings, and the best fertility after the first, the first three, and all other calvings.

Wiek krów przy pierwszym wycieleniu jest czynnikiem środowiskowym, który oddziałuje istotnie na wydajność mleczną krów. Powoduje on 15-30% zmienności fenotypowej w zakresie wydajności mleka i tłuszczu (3). Wpływa on również w dużym stopniu – obok płodności i długości użytkowania krów – na opłacalność produkcji mleka (7, 11).

Przy przekształcaniu w Polsce części populacji krów czarno-białych (cb) na typ bardziej mleczny przy użyciu rasy holsztyńsko-fryzyjskiej (hf), ważnym problemem jest ustalenie optymalnego wieku rozpoczęcia użytkowania mlecznego mieszańców posiadających w genotypie duży udział genów rasy

hf. Dotychczasowe badania wykazały, że już u mieszańców F1 (hf × cb) występuje wyraźne obniżenie wieku przy pierwszym wycieleniu, spowodowane ich szybszym tempem wzrostu w okresie odchowu, co pozwala na wcześniejsze rozpoczęcie cyklu produkcyjnego (4, 8, 10).

Celem pracy była ocena efektywności użytkowania mlecznego w okresie całego życia mieszańców hf × cb z dużym udziałem genów rasy hf w genotypie w zależności od ich wieku przy pierwszym wycieleniu.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w Zakładzie Doświadczalnym w Bezku w stadzie krów czarno-białych doskonałych w kierunku mlecznym przy użyciu rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Materiałem doświadczalnym było 335 mieszańców hf × cb wycielonych po raz pierwszy w latach 1983-1991. Ponad 80% krów posiadało w genotypie udział genów bydła hf wyższy od 50%. Wyodrębniono 4 grupy zwierząt rozpoczynających użytkowanie mleczne w wieku: poniżej 24 ($\bar{x}=22,8$), 24,1-27 ($\bar{x}=25,6$), 27,1-30 ($\bar{x}=28,2$) i powyżej 30,1 ($\bar{x}=32,6$) miesięcy życia. W okresie całego życia krów zbierano informacje dotyczące wydajności mleka, tłuszczu, białka i FCM (wydajność mleka o 4% zawartości tłuszczu); płodności (masa ciała przy 1 zacieleniu, indeks unasiennienia, długość trwania okresu międzyciążowego i międzyocieleniowego); liczby wycieleń; długości życia i użytkowania oraz życiowej liczby dni doju. Produkcyjność życiową zwierząt obliczono sumując ich wydajności mleczne w kolejnych laktacjach pełnych skorygowane na sezon ocielenia (13). Efektywność użytkowania mlecznego krów oceniono przy pomocy następujących wskaźników: stosunku długości użytkowania do długości życia; stosunku życiowej liczby dni