

JACEK OSEK

Wykrywanie fimbrii F18 u szczepów *Escherichia coli* izolowanych od świń

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Osek J.

F18 fimbriae detection in *Escherichia coli* strains isolated from pigs

Summary

The aim of the study was to determine F18 fimbriae in *E. coli* strains isolated from pigs with diarrhea and with edema disease, respectively. Thirty nine strains were used in which the F18 antigen was tested by the slide agglutination and PCR tests. Expression of fimbriae was determined on blood agar and on Iso-Sensitest medium supplemented with eosin and alizarin. The strains were cultured in aerobic conditions and in an atmosphere with 10% CO₂ had positive influence on the results obtained in the slide agglutination test (61.5% positive strains) as compared to the cultures grown in aerobic conditions (51.3% F18⁺ strains). Using PCR 28 strains (71.8%) with the *fedA* genes encoding, F18 fimbriae were detected. The F18 antigen was shown in *E. coli* strains of different serogroups isolated from piglets with diarrhea and with edema disease.

Kolibakteriozy świń, wywołane przez patogenne szczepy *Escherichia coli*, są wciąż istotnym problemem zdrowotnym i ekonomicznym w hodowli. Infekcje powodowane przez te bakterie mogą najczęściej dotyczyć prosiąt w dwóch przedziałach wiekowych: bezpośrednio po urodzeniu oraz w okresie odsadzania od macior, zwykle w wieku 4-6 tygodni (4). Zakażenia prosiąt osesków są zwykle rezultatem chorobotwórczego działania enterotoksycznych (ETEC) bakterii, posiadających zdolność kolonizacji błony śluzowej jelita cienkiego i wytwarzających enterotoksyny – ciepłochwiejną LT i/lub ciepłostalą ST (19). Zasiedlanie nabłonka jelitowego odbywa się przy udziale fimbrii, oznaczonych antygenami F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F17 i F41 (3, 8, 13). W przypadku prosiąt w okresie odsadzania kolibakterioza może występować w dwóch postaciach: biegunkowej lub choroby obrzękowej (4, 5, 25). Szczepy *E. coli* izolowane z tych przypadków chorobowych nie zawsze posiadają wspomniane fimbrie adhezyjne. Patogeneza schorzenia, zwłaszcza pierwszy jej etap, tzn. zasiedlanie nabłonka błony śluzowej jelit, nie jest dokładnie poznana ale przypuszcza się, że również w tym wypadku biorą udział fimbrie adhezyjne (9, 10, 12, 18).

W 1990 r. Bertschinger i wsp. (1) opisali nowy typ fimbrialnego czynnika kolonizacyjnego szczepów *E. coli*, izolowanych z przypadków kolibakteriozy prosiąt odsadzonych, który oznaczyli F107. Tego typu antygen stwierdzono początkowo u szczepów należących do serotypu O139:K82. Późniejsze badania wykazały, iż może być on obecny również u bakterii innych grup serologicznych, izolowanych najczęściej od

prosiąt z objawami choroby obrzękowej (6) ale również biegunki (11, 22). Celem ujednolicenia nazewnictwa wprowadzanego dla różnych fimbrii szczepów ETEC, antygen F107 przemianowano na F18 i ta nazwa jest najczęściej obecnie używana.

Wykrywanie obecności fimbrii F18 *in vitro* jest często ograniczone warunkami hodowlanymi i stosowanymi podłożami bakteriologicznymi. Wittig i wsp. (23) uważają, iż stwierdzenie antygeny F18 testami serologicznymi (np. odczynem aglutynacji) wymaga wzrostu bakterii w warunkach mikroaerofilnych (z dodatkiem 10-40% CO₂), użycia specjalnych pożywek jak też odpowiednio przygotowanych surowic diagnostycznych. Imberechts i wsp. (6) sklonowali fragment genomu bakteryjnego, odpowiedzialnego za wytwarzanie podjednostki *fedA* fimbrii F18 i badali ich występowanie u szczepów *E. coli* testem polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR). W Polsce nie wykonywano do tej pory badań nad obecnością fimbrii F18 u patogennych szczepów *E. coli* izolowanych od świń. Ponieważ stosowane metody (serologiczne, PCR) nie zawsze dają jednakowe wyniki, w obecnej pracy wykonano równoległe badania 39 szczepów *E. coli* używając testu aglutynacji, z uwzględnieniem różnych warunków hodowlanych i porównano uzyskane rezultaty z wynikami testu PCR. Celem pełniejszej charakterystyki badanych szczepów, oznaczano również ich przynależność serotypową, zdolność wytwarzania fimbrii F4, F5, F6, F17 i F41 oraz właściwości hemolityczne. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do szerszej charakterystyki patogennych szczepów *E. coli* izolowanych od prosiąt z kolibakteriozą okresu odsadzenia.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Do badań użyto łącznie 39 szczepów *E. coli* izolowanych od prosiąt z biegunką (20 szczepów) oraz z objawami choroby obrzękowej (19 szczepów). Identyfikację szczepów wykonano przy pomocy rutynowych metod biochemicznych. Szczep referencyjny wytwarzający fimbrie F18 (*E. coli* 107/86, serotyp O139:K82) uzyskano od prof. H. Bertschinger, Zurich, Szwajcaria.

Badania serologiczne. Oznaczanie antygenów O i K *E. coli* przeprowadzono metodą aglutynacji probówkowej, używając własnego zestawu surowic diagnostycznych anty-O i anty-OK.

Oznaczanie hemolizy. Właściwości hemolityczne badanych szczepów *E. coli* oznaczano na agarze z dodatkiem 5% krwi owczej, wykonując inkubację w 37°C przez 18 h.

Oznaczanie fimbrii F4, F5, F6, F17 i F41. Obecność antygenów fimbrialnych określano testem aglutynacji szkiełkowej i/lub ELISA wg metod opisanych w poprzednich pracach (14-17).

Surowice anty-F18. Surowice diagnostyczne anty-F18 uzyskano na królikach immunizowanych szczepem *E. coli* 107/86, inkubowanym na agarze z krwią w 37°C przez 18 h w atmosferze z dodatkiem 10% CO₂. Uzyskany wzrost bakteryjny splukiwano jałowym PBS, odwirowano i zawieszano w PBS do gęstości 5×10⁸ bakterii/ml, którą oznaczano fotometrycznie przy długości fali 600 nm. Tak przygotowane bakterie używano do immunizacji królików, którą wykonano dwiema metodami: a) dożylnie, w odstępach 3-4 dni, używając wzrastających dawek antygeny (od 0,2 do 1,6 ml); pierwsze dwie iniekcje wykonano z użyciem bakterii inaktywowanych formaliną (0,5%) oraz b) podskórną (1 ml), w odstępach 2-1 tyg., z równą objętością kompletnego (pierwsza iniekcja) i niekompletnego (druga iniekcja) adiuwantu Freund (Sigma) oraz PBS (dwie kolejne iniekcje). Po 7 dniach od ostatniego podania antygeny króliki skrwawiano i uzyskane surowice wysycano dwukrotnie szczepem homologicznym (serotyp O139:K82), nie wytwarzającym fimbrii F18. Tak przygotowane surowice diagnostyczne rozcieńczano jałowym PBS i ustalano doświadczalnie optymalne stężenie dla testu aglutynacji szkiełkowej. Dla celów kontrolnych używano referencyjnej surowicy anty-F18 uzyskanej od dr H. Klie, Dessau, Niemcy.

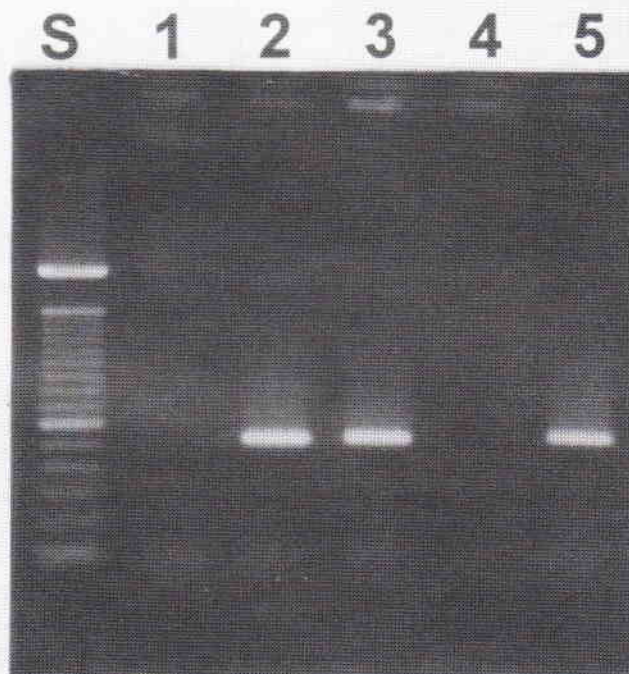
Identyfikacja fimbrii F18. Powierzchniową ekspresję fimbrii F18 oznaczano u szczepów *E. coli* inkubowanych na podłożach: agar z krwią oraz Iso-Sensitest (Oxoid) z dodatkiem 5% krwi oraz 0,062% alizaryny 2G (Fluka) i 0,125% eozyny (Laborchemie, Apolda, Niemcy) wg metody opisanej przez Wittiga i wsp. (23). Inkubację posianych podłoży agarowych przeprowadzono w 37°C przez 18 h, równolegle w warunkach tlenowych oraz w atmosferze wzbogaconej w 10% CO₂. Aglutynację szkiełkową wykonywano z kroplą surowicy anty-F18 (rozcieńczenie 1:10 – 1:50) oraz zawiesiną bakterii w kropli płynu fizjologicznego.

Identyfikacja genów kodujących fimbrie F18 (test PCR). Szczepy *E. coli* badano testem PCR używając par starterów FedA 1 i FedA 2 o następujących sekwencjach (5'→3'): GTG AAA AGA CTA GTG TTT ATT TC oraz CTT GTA AGT AAC CGC GTA AGC (7). Skład mieszaniny do reakcji PCR był następujący: 33 µl wody redestyl-

owanej, 5 µl buforu do PCR (10× skoncentrowany) (Primezym), 4 µl mieszaniny nukleotydów dATP, dCTP, dGTP i dTTP (koncentracja po 200 pM/ml), po 1 µl starterów FedA 1 i FedA 2 (koncentracja po 50 pM/ml) oraz 1 µl termostabilnej Taq polimerazy DNA (Primezym, 1,6 U). Do końcowej objętości 45 µl mieszaniny PCR dodawano następnie 5 µl matrycy DNA *E. coli*, uzyskanej przez zawieszenie 2-3 kolonii badanego szczepu w 50 µl wody redestylowanej. Reakcję PCR wykonywano w termocyklerze (MJ Research, USA) używając następujących parametrów: 94°C 5 min. (denaturacja matrycowego DNA), 25 cykli składających się z następujących temperatur: 55°C 1 min, 72°C 2 min. i 94°C 1 min; końcowy proces wykonano w 55°C 2 min. oraz 72°C 5 min. Rezultatem amplifikacji DNA był produkt zawierający 510 par zasad (bp), oznaczany w 2% żelu agarozowym, barwionym bromkiem etydyny (5 µg/ml) przez 2 min. Kontrolę dodatnią stanowił szczep 107/86 a ujemną szczep C600.

Wyniki i omówienie

Szczepy *E. coli* izolowane od prosiąt odsadzonych od macior, pochodziły z przypadków biegunki (20 szczepów) lub choroby obrzękowej (19 szczepów). Na podstawie badań serologicznych zaliczono je do kilku grup serologicznych (tab. 1). Od prosiąt z jelitową postacią kolibakteriozy wyosobniono szczepy należące do dwóch serotypów: O157:K? (11 szczepów) oraz



Ryc. 1. Wyniki testu PCR szczepów *E. coli* badanych z parą starterów FedA 1 i FedA 2, uzyskane po rozkładzie elektroforetycznym w 2% żelu agarozowym i barwieniu bromkiem etydyny. Poszczególne ścieżki: S – standard masy molekularnej; 1 – kontrola ujemna reakcji PCR (bez matrycy DNA); 2 i 3 – szczepy *E. coli* F18⁺ (odpowiednio: hemolityczny i niehemolityczny); 4 – szczep C600 (kontrola ujemna); 5 – szczep 107/86 (kontrola dodatnia)

Tab. 1. Charakterystyka szczepów *E. coli* użytych do badań na obecność fimbrii F18

Serotyp	Liczba szczepów izolowanych	Hemoliza	Antygen fimbrialny					Pochodzenie szczepów
			F4	F5	F6	F17	F41	
O149:K91	9	+	+	-	-	-	-	biegunka
O157:K?	9	+	-	-	-	-	-	biegunka
O157:K?	2	-	-	-	-	-	-	
O138:K81	9	+	-	-	-	-	-	choroba obrzękowa
O138:K81	1	-	-	-	-	-	-	
O139:K82	3	+	-	-	-	-	-	choroba obrzękowa
O139:K82	2	-	-	-	-	-	-	
O141:K85	3	+	-	-	-	-	-	choroba obrzękowa
O141:K85	1	-	-	-	-	-	-	

Tab. 2. Wyniki badań szczepów *E. coli* w kierunku obecności fimbrii F18, wykonane testami aglutynacji i PCR

Serotyp	Liczba szczepów badanych	Hemoliza	Liczba szczepów dodatnich w testach:		
			Aglutynacji		PCR
			CO ₂ ⁺¹	CO ₂ ⁻¹	
O149:K91	9	+	2	2	2
O157:K?	9	+	6	5	8
O157:K?	2	-	2	1	2
O138:K81	9	+	7	6	8
O138:K81	1	-	0	0	0
O139:K82	3	+	3	2	3
O139:K82	2	-	2	2	2
O141:K85	3	+	2	2	3
O141:K85	1	-	0	0	0
Razem	39		24	20	28

Objaśnienie: 1 – szczepy do badań inkubowano w atmosferze wzbogaconej w 10% CO₂ lub w warunkach tlenowych (CO₂)

O149:K91 (9 szczepów). Wśród izolatów uzyskanych od prosiąt z objawami choroby obrzękowej stwierdzono szczepy 3 grup serologicznych: O138:K81, O139:K82 oraz O141:K85. Serotypy te, izolowane przez innych autorów (20-22, 24) są uznawane zwykle za podstawowy czynnik etiologiczny tego schorzenia. U wszystkich użytych w obecnej pracy szczepów oznaczano występowanie fimbrii adhezyjnych F4, F5, F6, F17 i F41, używając testu aglutynacji szkiełkowej i/lub ELISA. Stwierdzono obecność fimbrii F4, występujących tylko u wszystkich badanych szczepów serotypu O149:K91, pochodzących od prosiąt z biegunką (tab. 1). Nie wykazano innych określanych w pracy rodzajów fimbrii, zarówno u szczepów izolowanych od prosiąt z biegunką jak też wyosobnionych z przypadków choroby obrzękowej.

W kolejnym etapie pracy oznaczano zdolność badanych szczepów *E. coli* do wytwarzania hemolizy na

agarze z krwią. Badaniem makroskopowym wykazano, iż większość izolatów posiadała cechy hemolityczne *in vitro* (tab. 1). Wszystkie szczepy serotypu O149:K91, posiadające fimbrie F4, wytwarzały hemolizę na podłożu agarowym; również większość izolatów grupy O157:K? była hemolityczna (9 z 11 wyosobnionych szczepów). Bakterie o cechach hemolitycznych dominowały także wśród szczepów pochodzących z przypadków choroby obrzękowej (tab. 1). W grupie tej stwierdzono jednak 4 szczepy, które nie

wykazywały zdolności lizy krwinek czerwonych w użytym podłożu wzrostowym; szczepy te reprezentowały wszystkie 3 izolowane serotypy. Jak podają inni autorzy (2, 4, 25), hemolityczne szczepy *E. coli* są często izolowane z przypadków kolibakteriozy prosiąt, a wytwarzana przez nie hemolizyna, której rola w patogeniezie biegunki jak i choroby obrzękowej nie jest do końca wyjaśniona, uznawana jest za istotny wskaźnik chorobotwórczości. Również w obecnych badaniach stwierdzono, iż 33 spośród 39 wyosobnionych szczepów (84,6%) miała zdolność uwalniania hemolizyn *in vitro*.

Następny etap pracy, stanowiący istotę prezentowanych badań, dotyczył oznaczania zdolności powierzchniowego wytwarzania fimbrii F18 lub też obecności genów kodujących ekspresję tego antygeny, przy użyciu odpowiednio testów aglutynacji i PCR. Fimbrie F18 uważane są za istotny czynnik patogenności szczepów *E. coli* izolowanych od prosiąt z objawami choroby obrzękowej ale też bywają stwierdzane u bakterii wyosobnionych z przypadków biegunek na tle *E. coli*, zwłaszcza u prosiąt w okresie odsadzania od macior (22). Szczepy badano testem aglutynacji z surowicami anty-F18, używając dwóch podłoży (agar z krwią i Iso-Sensitest z dodatkiem barwników), inkubując posiewy w normalnej atmosferze jak też z dodatkiem 10% CO₂. Stwierdzono, iż oba zastosowane do badań podłoża bakteriologiczne wykazywały jednakową zdolność indukcji ekspresji antygeny F18 u badanych szczepów *E. coli*; zgodność wyników aglutynacji szkiełkowej wykonanej z bakteriami hodowanymi na tych podłożach wynosiła 100%. Do dalszych badań używano więc łatwiej dostępnego agaru z krwią. Różnice ilościowe w liczbie szczepów dodatnich występowały natomiast gdy posiewy do badań inkubowano w warunkach mikroaerofilnych i tlenowych. Stwierdzono, iż inkubacja w obecności CO₂ wpływała w korzystny sposób na wytwarzanie przez badane szczepy antygeny F18, a tym samym na jego wykrycie testem aglutynacji (tab. 2). W tym przypadku stwierdzono 24 (61,5%) szczepów dodatnich po wzroście w

środowisku CO₂ podczas gdy hodowle wykonane w warunkach tlenowych dały 20 (51,3%) szczepów z wykazaniem serologicznie antygenem F18; korelacja uzyskanych wyników wynosiła tylko 83,3%. Z badań Wittiga i wsp. (22) wynika, iż obecność CO₂ przy inkubacji jest niezbędna do prawidłowej ekspresji fimbrii F18 u szczepów *E. coli*. Autorzy podają, iż stężenie gazu powinno wahać się między 10-40%, w zależności od serotypu szczepu badanego w kierunku fimbrii F18. Również, przynajmniej w niektórych przypadkach, zastosowanie podłoża z alizaryną i eozyną miało korzystny wpływ na wykrywanie *in vitro* szczepów F18⁺. W obecnych badaniach wykazano dodatni wpływ warunków mikroaerofilnych na optymalną ekspresję fimbrii F18 jednak nie stwierdzono różnic w wykrywalności tego antygeny w zależności od użytego do badań podłoża bakteriologicznego.

Wyniki uzyskane w odczynie aglutynacji porównano następnie z rezultatami testu PCR, którym można wykazać chromosomalne geny, odpowiedzialne za wytwarzanie podjednostki *fedA* fimbrii F18. Test PCR, niezwykle czuły i swoisty, pozwala stwierdzić odpowiednie geny, a tym samym wykazać szczepy dodatnie niezależnie od warunków inkubacji *in vitro* badanych bakterii *E. coli*. W badaniach PCR stwierdzono, iż 28 szczepów (71,8%) miało geny kodujące ekspresję podjednostki *fedA*, a tym samym posiadało potencjalną zdolność wytwarzania fimbrii F18. Na ryc. 1 przedstawiono przykładowo produkty amplifikacji genowej (510 bp) badanych i kontrolnych szczepów *E. coli*. Zgodność wyników testów aglutynacji, wykonanej ze szczepami inkubowanymi w warunkach tlenowych jak i w atmosferze z dodatkiem 10% CO₂ oraz badanymi metodą PCR wynosiła odpowiednio 71,4% i 85,7%. Wykazano, iż antygen F18 może być wytwarzany zarówno przez szczepy hemolityczne *E. coli* jak i nie posiadające cech hemolitycznych (tab. 2). Wittig i wsp. (22) stwierdzili równoczesne wytwarzanie hemolizyny i fimbrii F18 u szczepów *E. coli* izolowanych od prosiąt odsadzonych od macior; niektóre takie szczepy wykazywały jednak tendencję do utraty tych cech patogenności podczas przechowywania lub wzrostu *in vitro*. W obecnych badaniach stwierdzono, iż niektóre szczepy Hly⁻ posiadały zdolność powierzchniowej ekspresji fimbrii F18 (stwierdzane testem aglutynacji) lub też miały obecne geny kodujące ich wytwarzanie (stwierdzane testem PCR). Wykazano również, iż prawie wszystkie (10 z 11 szczepów badanych) izolaty serotypu O157:K⁻ jak też 2 szczepy grupy O149:K91, pochodzące od prosiąt z biegunką, posiadały zdolność wytwarzania antygeny F18. Jest to stosunkowo wysoki odsetek szczepów dodatnich, nie stwierdzany w badaniach innych autorów (5, 11, 22, 23). Należy jednak zaznaczyć, iż liczba przebadanych szczepów nie była duża i uzyskane wyniki mogą nie być reprezentatywne. Stwierdzono także, iż dwa hemolityczne szczepy serotypu O149:K91 wytwarzały równocześnie dwa rodzaje fimbrii: F4 i F18; informacji takich brak jest w pracach innych autorów.

Wnioski

1. Fimbrie F18 występują u szczepów *E. coli* izolowanych zarówno z przypadków choroby obrzękowej jak i biegunki prosiąt odsadzonych od macior.
2. Wykrywanie fimbrii F18 możliwe jest testem aglutynacji szkiełkowej oraz metodą PCR.
3. Identyfikacja antygeny F18 metodą serologiczną, zwłaszcza u szczepów inkubowanych w warunkach tlenowych, może dawać wyniki fałszywie ujemne.

Piśmiennictwo

1. Bertschinger H. U., Bachmann M., Mettler C., Pospischil A., Schraner E. M., Stamm M., Sydler T., Wild P.: Vet. Microbiol. 25, 267, 1990.
2. Cavalieri S. J., Bohack A., Snyder I. S.: Microbiol. Rev. 48, 326, 1984.
3. Gastra W., De Graaf F. K.: Microbiol. Rev. 46, 129, 1982.
4. Holland R. E.: Clin. Microbiol. Rev. 3, 345, 1990.
5. Imberechts H., De Greve H., Lintermans P.: Vet. Microbiol. 40, 219, 1992.
6. Imberechts H., De Greve P., Schlicker C., Bouchet H., Pohl B., Charlier G., Bertschinger H., Wild P., Vandekerckhove J., Van Damme J., Van Montagu M., Lintermans P.: Infect. Immun. 60, 1963, 1992.
7. Imberechts H., Van Pelt N., De Greve H., Lintermans P.: FEMS Microbiol. Lett. 119, 309, 1994.
8. Moon H. W.: Curr. Top. Microbiol. Immunol. 151, 147, 1990.
9. Nagy B., Casey T. A., Moon H. W.: J. Clin. Microbiol. 28, 651, 1990.
10. Nagy B., Moon H. W., Isaacson R. E.: Infect. Immun. 13, 1214, 1976.
11. Ojeniyi B., Ahrens P., Meyling A.: J. Vet. Med. B 41, 49, 1994.
12. Okerman L.: Vet. Microbiol. 14, 33, 1987.
13. Orskov I., Orskov F.: Prog. Allergy 33, 80, 1983.
14. Osek J., Svennerholm A. M.: Vet. Microbiol. 29, 299, 1991.
15. Osek J., Truszczyński M.: Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 15, 285, 1992.
16. Osek J., Truszczyński M.: Medycyna Wet. 51, 337, 1995.
17. Osek J.: Pol. J. Immunol. 20, 276, 1995.
18. Salajka E., Salajkova Z., Alexa P., Hornick M.: Vet. Microbiol. 32, 163, 1992.
19. Sears C. L., Kaper J. B.: Microbiol. Rev. 60, 167, 1996.
20. Soderlind O., Thafvelin B., Mollby R.: J. Clin. Microbiol. 26, 879, 1988.
21. Wilson R. A., Francis D. H.: Am. J. Vet. Res. 47, 213, 1986.
22. Wittig W., Klie H., Gallien P., Lehmann S., Timm M., Tschape H.: Zbl. Bakt. 283, 95, 1995.
23. Wittig W., Prager R., Stamm M., Streckel W., Tschape H.: Zbl. Bakt. 281, 130, 1994.
24. Wray C., McLaren I. M., Carroll P. J.: Vet. Rec. 133, 439, 1993.
25. Wray C., Morris J. A.: J. Hyg. 95, 577, 1985.

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

BRON T., BELLI P., MADEC H., MOUTON F., VITAUD C., SAVEY M.: Gąbczasta encefalopatia mózgu u geparda importowanego do Francji. (Spongiform encephalopathy in an imported cheetah in France). Vet. Rec. 141, 270-271, 1997 (11)

U samca geparda (*Acinonyx jubatus*) urodzonego we wrześniu 1987 r. w Wild Animal Park w Wielkiej Brytanii, wyeksportowanego do Francji w kwietniu 1993 r., w grudniu 1996 r. stwierdzono gąbczastą encefalopatię mózgu. Pierwszym objawem było porażenie kończyn tylnych, drgawki mięśni głowy, które następnie objęły całe ciało, oraz nadwrażliwość na bodźce. Następnie wystąpiły trudności w poruszaniu się zwierzęcia, obniżyła się masa ciała przy zachowanym apetycie. W styczniu 1997 r. zwierzę poddano eutanazji. Zmiany patologiczne typowe dla gąbczastej encefalopatii występowały w części korowej i wzgórzu mózgu. Badanie immunochemiczne z użyciem przeciwciał monoklonalnych (3F4) wykazało nagromadzenie PrP w neuropilu. Metodą immunoblotingu stwierdzono obecność białka prionowego PrP^{res} o masie 27-30 kDa opornego na działanie proteiny K. Geparda karmiono mięsem bydła niezdatnym do konsumpcji oraz karmą z dodatkiem mączki mięsno-kostnej. Dieta nie zawierała elementów ośrodkowego układu nerwowego bydła.