

Shigatoksyczne szczepy *Escherichia coli* w infekcjach gruczołu mlekowego u krów

ANNA KŁOSSOWSKA, EDWARD MALINOWSKI

Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego, AL. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Kłossowska A., Malinowski E.

Presence of Shiga toxin genes in *Escherichia coli* strains from cows' colimastitis

Summary

A hundred of *E. coli* strains from 86 cows with colimastitis were screened using the PCR method for the presence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) genes. The procedure involved amplifying the *stx* gene (*stx1*, *stx2*) and its variants (*stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*) with primers described earlier by other authors. The amplification reaction generated PCR products of molecular masses 348, 584, 124, 175, 303, 428 bp, respectively, and 798 bp for 16S rRNA *E. coli* as an internal control. The presence of shiga toxin genes was found in four strains (4%) and *stx2*, *stx2c* and *stx2e* genes were stated. The study indicates that mastitis milk can be potentially risky for human since it is an important source of shiga toxin-producing *E. coli* strains.

Keywords: colimastitis, STEC

Escherichia coli należy do tzw. patogenów środowiskowych i wywołuje zapalenia gruczołu mlekowego, które ze względu na charakterystyczny, ostry przebieg, określono nazwą *colimastitis* (6). Oprócz *E. coli*, do coliforms zalicza się gatunki z rodzaju *Klebsiella* i *Enterobacter*, a także inne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. Bakterie te wywołują około 30-50% ostrych zapaleń wymienia w stadzie (2, 12, 17, 18, 26, 27). Mogą one bytować w oborniku, ściółce, glebie i zanieczyszczonej wodzie (7, 24). Najczęściej do zakażeń na drodze galaktogennej dochodzi pod koniec zasuszenia oraz w okresie porodu. Z tego powodu bezpośrednio po porodzie oraz w okresie pierwszych 6 tygodni laktacji obserwuje się najwięcej przypadków *colimastitis*. Ostre postacie częściej występują w miesiącach letnich, kiedy krowy podlegają wpływom stresu termicznego. Bardziej podatne na zakażenia są krowy o wysokiej wydajności (6, 18, 22).

Około 10% przypadków *colimastitis* cechuje się nadostrym przebiegiem z silnie wyrażonymi objawami ogólnymi (gorączka, drgawki, utrata apetytu, porażenia) i miejscowymi, co często kończy się ograniczeniem wydzielniczości lub nawet śmiercią zwierzęcia (5, 26, 31). Opisane zmiany spowodowane są przez uwolnioną endotoksynę oraz mediatory stanu zapalnego, w tym TNF-alfa. Ostatnio coraz częściej obserwuje się zapalenia przewlekłe, a nawet podkliniczne (2, 18).

Obecność bakterii oraz mediatorów procesu zapalnego w wydzielinie gruczołowej z ćwiartek objętych ostrą postacią *colimastitis* nie stanowi zagrożenia dla człowieka ze względu na przestrzeganie przez producentów zakazu odstawiania (sprzedawania) mleka zmie-

nionego makroskopowo. Problemem jednak mogą stać się zapalenia podkliniczne, spowodowane przez szczepy shiga-toksyczne (STEC – shiga toxin-producing *E. coli*) nazywane również verotoksycznymi (VTEC – verotoxin *E. coli*). Szczepy te obok innych cech zjadliwości, jak zdolność do adherencji czy produkcji enterohemolizyn, charakteryzują się przede wszystkim wytwarzaniem cytotoksyn. Wyróżnia się zasadniczo trzy cytotoksyny wytwarzane przez vero-cytotoksyczne szczepy *E. coli*: VT1 czyli SLT-I (shiga-like toxin I); VT2 czyli SLT-II (shiga-like toxin II) i VT2e czyli SLT-IIv (shiga-like toxin II variant), które strukturalnie tworzą holotoksyny AB5 (toksyny kompletne). Geny determinujące ich syntezę występują w genomie pojedynczo lub w układach, tworząc różne kombinacje. To znaczy, że szczepy enterotoksyczne (EHEC – enterohemorrhagic *E. coli*) mogą wytwarzać wszystkie trzy toksyny jednocześnie. Szczepy, które produkują cytotoksyny są chorobotwórcze zarówno dla ludzi, jak i dla zwierząt (8, 19, 20, 28). Cytotoksyczne szczepy *E. coli* wywołują u ludzi groźne zespoły chorobowe, takie jak: krwotoczne zapalenie jelita grubego (HC – *Haemorrhagic colitis*), hemolityczny zespół mocznicowy (HUS – *Haemolytic uraemic syndrome*) i małopłytkowa plamica zakrzepowa (TTP – *Thrombotic thrombocytopenic purpura*) (20, 28). Do tej pory nie brano pod uwagę związku *colimastitis* z zachorowaniami ludzi. Występowanie shiga-toksycznych szczepów *Escherichia coli* w kale bydła mlecznego stwierdzono w wielu krajach – między innymi w Japonii, Kanadzie, Wielkiej Brytanii, Włoszech, Hiszpanii, Finlandii, Dani, Australii oraz Brazylii (7, 8, 11, 13, 21, 28). Szczepy takie izolowano

także z mleka surowego w Kanadzie, Niemczech, Wielkiej Brytanii, Belgii, USA (8, 9, 30) oraz z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego w Holandii, Finlandii, Izraelu, Nowej Zelandii i Brazylii (1, 13-15, 23).

Celem badań było określenie genów odpowiedzialnych za wytwarzanie toksyn Shiga w szczepach *E. coli*, wyizolowanych z wydzieliny gruczołu mlekowego u krów.

Materiał i metody

Badaniom poddano 100 szczepów *Escherichia coli*, które wyizolowano z wydzieliny 100 ćwiartek wymienia wykazujących kliniczne objawy *mastitis* lub dodatni wynik TOK u 86 krów. Badania bakteriologiczne wykonano przy użyciu metod fenotypowych, które uwzględniały morfologię kolonii na agarze z krwią, barwienie metodą Grama oraz posiewy na podłożu agarowe McConkeya z sorbitolem (16). Do szczegółowego rozpoznania *E. coli* zastosowano testy API 20E (bioMérieux). Objawy kliniczne i zmiany w mleku opisywano w czasie pobierania próbek wydzieliny. Przypadki zapaleń klasyfikowano jako kliniczne lub podkliniczne. Liczbę komórek somatycznych (lks) określano przy użyciu aparatu Fossomatic (Foss-Electric, Hillerød, Dania).

Wykrywanie shiga-toksycznych szczepów *E. coli* przeprowadzono przez amplifikację klasyczną techniką PCR fragmentów genów stx odpowiedzialnych za ekspresję różnych odmian (Stx1, Stx2) i wariantów (Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f) toksyny Shiga. Szczepy kontrolne dodatnie otrzymano z Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIWet – PIB w Puławach, nr: 389 dla Stx1, 391 – Stx2, 414 – Stx2c, 415 – Stx2d, 417 – Stx2e, 432 – Stx2f, a kontrolę ujemną stanowił szczep *E. coli* O157:H7 – VT(N) – NCTC 12900.

Bakterie do izolacji DNA inkubowano na agarze LB w temp. 37°C przez 18 h. Do PCR użyto DNA uzyskanego przez zawieszenie 4 kolonii w 100 µl wody redestyloowanej wolnej od DNaz i RNaz (Promega). Następnie zawiesinę ogrzewano w temp. 96°C przez 10 min. i odwirowywano. Otrzymany supernatant stanowił źródło matrycowego DNA.

Reakcję łańcuchową polimerazy wykonano w 20 µl mieszaniny składającej się z: 0,4 µl mieszaniny nukleotydów dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) każdego w koncentracji 10 mM; 2,0 µl buforu optymalizującego reakcję (5 × Green GoTag®Flexi Buffer – Promega); 0,5 U termostabilnej polimerazy (Promega); 1,2 µl 25 mM MgCl₂; 0,1 µl starterów (stx1, stx2, stx2c, stx2d, stx2f i 16S rRNA) lub 0,2 µl starterów stx2e; 1,0 µl matrycowego DNA, uzupełnionej wodą do końcowej objętości. Charakterystykę użytych starterów podano w tab. 1. Dla wewnętrznej kontroli przebiegu PCR zastosowano startery dla genu 16S rRNA *E. coli*. Reakcję amplifikacji wykonano w automatycznym termocykle-

Tab. 1. Charakterystyka starterów zastosowanych w PCR do identyfikacji genów STEC

Nazwa	Sekwencja (5' → 3')	Amplifikowany gen	Lokalizacja w genomie	Wielkość amplitonu PCR (pz)	Dostęp do Banku Genowego	Piśmiennictwo
LP30 LP31	CAGTTAATGTCGTGGCGAAGG CACCAGACAATGTAACCGCTG	stx1	213-232 559-538	348	JM19473	Cebula i wsp. (3)
LP43 LP44	ATGCTATTCCCGGGAGTTTACG GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C	stx2	295-316 881-859	584	X07865	Cebula i wsp. (3)
Stx2c-a Stx2c-b	GCGGTTTTATTGTCATTAGT AGTACTCTTTCCGGCCACT	stx2c	1186-1205 1309-1290	124	M59432	Wang i wsp. (29)
Stx2d-a Stx2d-b	GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT CAGCAAATCCTGAACCTGACG	stx2d	1221-1244 1395-1375	175	AF043627	Wang i wsp. (29)
Stx2e-a Stx2e-b	ATGAAGTGATATTGTTAAAGTGGGA AGCCACATATAAATTATTCGT	stx2e	204-228 506-485	303	M36727	Wang i wsp. (29)
128-1 128-2	AGATTGGGCGTCACTACTGGTTG TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC	stx2f	519-543 946-923	428	AJ010730	Schmidt i wsp. (25)
16S-F 16S-R	AGAGTTTGATCATGGCTCAG GGACTACCAGGGTATCTAAT	16S rRNA	8-27 805-798	798	J01859	Ehresmann i wsp. (4)

rze (Biometra), stosując następujące parametry: denaturacja wstępna w 94°C przez 5 min., następnie 30 cykli składających się z 94°C – 1 min., 55°C – 1 min. i 72°C – 2 min. oraz wydłużanie końcowe w temp. 72°C w ciągu 5 min.

Produkt amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym w buforze TBE z dodatkiem bromku etydy. Wizualizacji dokonano w systemie video ImageMaster™ VDS (Amersham Pharmacia Biotech). W przypadku ekspresji jednej z badanych toksyn, obserwowano obecność dwóch produktów amplifikacji, tj. charakterystycznego dla danej toksyny Shiga (jej odmiany czy wariantu) oraz drugiego typowego dla genu 16S rRNA *E. coli* w postaci prążka o masie 798 pz.

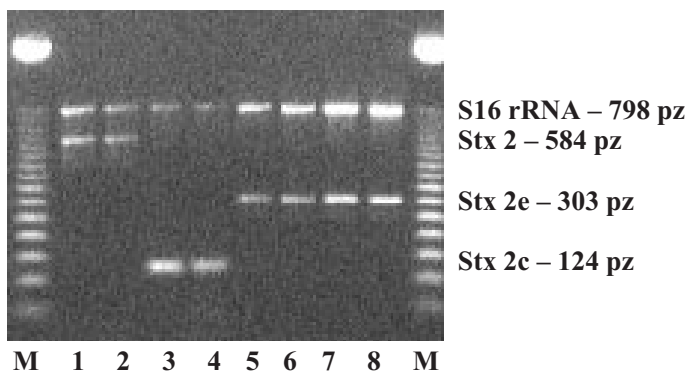
Wyniki i omówienie

Badane szczepy *Escherichia coli* pochodziły z klinicznych (86%) i podklinicznych (14%) przypadków *mastitis* u krów (tab. 2). U 4 szczepów stwierdzono obecność genów stx. Dwa szczepy były przyczyną ostrych zapaleń, z których: jeden zawierał dwa geny; stx2 i stx2c, a drugi gen stx2e. Dwa izolaty pochodziły z podklinicznych zapaleń wymienia (304 tys. i 443 tys. komórek somatycznych/ml) i zawierały gen stx2e. W wewnętrznej kontroli gen 16S rRNA *E. coli* był obecny we wszystkich badanych szczepach, co potwierdza jakość amplifikowanego DNA, jak również prawidłowość warunków PCR.

Różne geny związane z wirulencją szczepów *E. coli*, izolowanych z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego były już opisane w innych krajach. Kaipainen i wsp. (10), badając 273 szczepy wyizolowane z klinicznych *mastitis* na fermach krów mlecznych w Finlandii i Izraelu, stwierdził obecność genów odpowiedzialnych za

Tab. 2. Występowanie genów STEC w izolatach *E. coli* z wymienia

Postać <i>mastitis</i>	Liczba szczepów	Wykazane geny						
		stx1	stx2	stx2c	stx2d	stx2e	stx2f	stx2, stx2c
Kliniczna	86	0	0	0	0	1	0	1
Podkliniczna	14	0	0	0	0	2	0	0
Razem	100	0	0	0	0	3	0	1



Ryc. 1. Szczepy *E. coli* zawierające geny toksyn Shiga

Objaśnienia: 1 – szczep nr 41 (dodatni stx2); 2 – szczep kontrolny stx2; 3 – szczep nr 41 (dodatni stx2c); 4 – szczep kontrolny stx2c; 5 – szczep nr 59 (dodatni stx2e); 6 – szczep nr 60 (dodatni stx2e); 7 – szczep nr 144 (dodatni stx2e); 8 – szczep kontrolny stx2e; M – standard masy molekularnej – 50 pz

takie czynniki wirulencji, jak fimbrie (f17, afa, pap, cnf, sfa), aerobaktyna (aer), lipoproteina TraT (traT) oraz cytotoksyczny czynnik martwicy (cnf). W Nowej Zelandii (1) najczęściej wykrywanym genem wirulencji był stx1 (31% szczepów) i kolejno cnf2 (7,5%), stx2e (6,25%) oraz eaeA – kodujący intyminę (4%). W Brazylii STEC szczepy stanowiły 12,8% wśród izolatów *E. coli* z wydzieliną zapalnej i zawierały następujące geny: stx1, stx2 i eaeA (15).

W badaniach epidemiologicznych w Holandii szczepy izolowane z przypadków klinicznych *mastitis* charakteryzowały się dużą zmiennością genotypową. Według Lipmana i wsp. (14), różnorodność obserwowanych fenotypów i genotypów wskazuje na zakażenia krów szczepami pochodzącymi ze środowiska zwierzęcia, a nie wskutek przenoszenia się z zakażonego gruczołu na zdrowy. Przyjęto, że źródłem szczepów patogennych dla człowieka jest kał zwierząt, a bydło uważane jest za główny rezerwuuar shiga-toksycznych szczepów *E. coli* (3, 30). Szczepy zawierające geny eae, stx1 i stx2 izolowano z kału bydła na fermach w Finlandii (13).

Przeprowadzone badania wskazują na występowanie szczepów shiga-toksycznych w mleku od krów z zapaleniami wymienia, co stanowi potencjalne źródło zakażenia ludzi. Stąd potrzebna jest stała kontrola występowania szczepów STEC w mleku w celu przygotowania działań zapobiegawczych. Szczegółowe i szybkie rozpoznanie tych szczepów jest też niezbędne dla postępu w strategii profilaktyki i leczenia *colimastitis*.

Piśmiennictwo

1. Bean A., Williamson J., Cursons R. T.: Virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from mastitic milk. *J. Vet. Med. B.* 2004, 51, 6, 285-287.
2. Bradley A. J., Green M. J.: Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 1845-1849.
3. Cebula T. A., Payne W. L., Feng P.: Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 248-250.
4. Ehresmann C., Stiegler P., Fellner P., Ebel J. P.: The determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. 2. Nucleotide sequences of products from partial enzymatic hydrolysis. *Biochimie* 1972, 54, 901-967.

5. Gonzalez R. N., Jasper D. E., Kronlund N. C., Farver T. B., Cullor J. S., Bushnell R. B., Dellinger J. D.: Clinical mastitis in two California dairy herds participating in Contagious Mastitis Control Programs. *J. Dairy Sci.* 1990, 73, 648-660.
6. Hogan J., Smith K. L.: Coliform mastitis. *Vet. Res.* 2003, 34, 507-519.
7. Hornitzky M. A., Vanselow B. A., Walker K., Bettelheim K. A., Corney B., Gill P., Bailey G., Djordjevic S. P.: Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 12, 6439-6445.
8. Hussein H. S., Sakuma T.: Invited Review: Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J. Dairy Sci.* 2005, 88, 450-465.
9. Jayarao B. M., Henning D. R.: Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* 2001, 84, 2157-2162.
10. Kaipainen T., Pohjanvirta T., Spigel N. Y., Shwimmer A., Pyörälä S., Pelkonen S.: Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 2002, 85, 37-46.
11. Kijima-Tanaka M., Ishihara K., Kojima A., Morioka A., Nagata R., Kawaniishi M., Nakazawa M., Tamura Y., Takahashi T.: A national surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food-producing animals in Japan. *J. Vet. Med. B.* 2005, 52, 5, 230-237.
12. Klossowska A., Malinowski E., Kuźma K.: Zależność liczby komórek somatycznych w mleku zatokowym krów z mastitis od bakteryjnego czynnika etiologicznego. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 53-57.
13. Lahti E., Keskimäki M., Kantala L., Hyvönen P., Siitonen A., Honkanen-Buzalski T.: Occurrence of *Escherichia coli* O157 in Finnish cattle. *Vet. Microbiol.* 2001, 79, 239-251.
14. Lipman L. J. A., de Nijs A., Lam T. J. G. M., Gaastra W.: Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. *Vet. Microbiol.* 1995, 43, 13-19.
15. Lira W. M., Macedo C., Marin J. M.: The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 2004, 97, 4, 861-866.
16. Malinowski E., Klossowska A.: Diagnostyka zakażeń i zapaleń wymienia. *Wyd. PIWet, Puławy* 2002.
17. Malinowski E., Klossowska A., Kaczmarowski M., Kotowski K., Nadolny M., Kuźma K.: Stan zdrowotny gruczołu mlekowego krów i czynniki etiologiczne mastitis w przypadkach wysokiej liczby komórek w mleku zbiorczym. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 128-132.
18. Malinowski E., Lassa H., Klossowska A., Smulski S., Markiewicz H., Kaczmarowski M.: Etiological agents of dairy cows' mastitis in western part of Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 2006, 3, 191-194.
19. Osek J., Gallien P.: Molecular analysis of *Escherichia coli* O157 strains isolated from cattle and pigs by the use of PCR and pulsed-field gel electrophoresis methods. *Vet. Med.-Czech* 2002, 47, 6, 149-158.
20. Paton J. C., Paton A. W.: Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 450-479.
21. Pearce M. C., Evans I., McKendrick I. J., Smith A. W., Knight H. I., Mellor D. J., Woolhouse M. E. J., Gunn G. J., Low J. C.: Prevalence and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, and O145 shed by cattle in Scotland. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 1, 653-659.
22. Philpot W. N., Nickerson S. C.: Winning the fight against mastitis. *Westfalia-Surge, Inc. Naperville USA* 2000.
23. Reinders R. D., Bijker P. G., Huis In't Veld J. H., Van Knapen F.: Use of 8-hydroxyquinoline-beta-D-glucuronide for presumptive identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. *Lett Appl Microbiol.* 2000, 305, 411-414.
24. Rice E. W., Johnson C. H.: Short communication: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle drinking water. *J. Dairy Sci.* 2000, 83, 2021-2023.
25. Schmidt H., Scheef J., Morabito S., Caprioli A., Wieler L. H., Karch H.: A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 1205-1208.
26. Shpigel N. Y., Winkler M., Ziv G., Saran A.: Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 1998, 35, 1, 1-9.
27. Smith K. L.: Mastitis control in member countries, United States of America. *Mastitis Newsletter, IDF* 2001, 24, 42-45.
28. Sobieszkańska B. M., Franiczek R.: Mechanizmy chorobotwórczego działania verotoksycznych szczepów *Escherichia coli*. *Post. Microbiol.* 1997, 2, 207-224.
29. Wang G., Clark C. G., Rodgers F. G.: Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 3613-3619.
30. Wells J. G., Shipman L. D., Greene K. D., Sowers E. G., Green J. H., Cameron D. N., Downes F. P., Martin M. L., Griffin P. M., Ostroff S. M., Potter M. E., Tauxe R. V., Wachsmuth I. K.: Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29, 985-989.
31. Wenz J. R., Barrington G. M., Garry F. B., McSweeney K. D., Dinsmore R. P., Goodell G., Callan R. J.: Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2001, 219, 976-981.

Adres autora: dr Anna Klossowska, Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz; e-mail: vetri@logonet.com.pl