

JERZY MOLENDĄ, ADAM SKURSKI, JAN ZWIERZ CHOWSKI, JOLANTA KOZYRCZAK

## Badania nad przydatnością królików do testowania aktywności enteropatogennej pałeczek okrężnicy wyosobnionych od świń

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Rodakowskiego 6, 50-966 Wrocław  
Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych AR, Plac Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Wytwarzanie enterotoksyny oraz zdolność adherencji do komórek nabłonka błony śluzowej jelit cienkich — to podstawowe właściwości pałeczek okrężnicy, umożliwiające im patogenne działanie w przebiegu kolibakteriozy. Posiadanie odpowiednich antygenów powierzchniowych umożliwia pałeczkom okrężnicy trwałą kontakt z powierzchniową komórką nabłonkowych, natomiast wytworzona enterotoksyna powoduje wystąpienie biegunki. Nagromadzenie jej w jelitach wzmaga stężenie cyklicznego monofosforanu adenozy (cAMP), będącego stymulatorem sekrecji jelitowej. Badania nad strukturą enterotoksyny wykazały, że nie jest ona substancją jednorodną, składa się bowiem z dwóch frakcji różniących się między sobą wrażliwością cieplną, ciężarem cząsteczkowym, immunogennością oraz charakterem odczynu sekrecyjnego. Stwierdzono, że po podaniu prosiętom frakcji ciepłowrażliwej biegunka występuje później i trwa dłużej niż po wprowadzeniu frakcji ciepłoopornej, powodującej natychmiastowy, lecz krótkotrwały odczyn biegunkowy (11).

Jedną z metod oceny enteropatogennej aktywności pałeczek okrężnicy jest test podwiązanych pętli jelitowych (loop dilating test). Panuje przekonanie, że najbardziej miarodajne wyniki uzyskuje się przeprowadzając badania na zwierzętach tego samego gatunku jak te, z których badany szczep wyosobniono (9).

Celem badań własnych było określenie enteropatogennego działania na nabłonek jelitowy prosiąt i królików pałeczek okrężnicy wyosobnionych od prosiąt z żołądkowo-jelitową formą kolibakteriozy, od prosiąt padłych na chorobę obrzękową oraz pałeczek okrężnicy wyizolowanych z kału prosiąt zdrowych. Ponadto przez porównanie wyników uzyskanych u prosiąt i królików zamierzano określić przydatność tych ostatnich do testowania aktywności enteropatogennej pałeczek okrężnicy patogennych dla świń.

### Materiał i metody

Badaniom poddano 34 szczepy *Escherichia coli* wyosobnione od prosiąt w wieku od 3 dni do 3 tygodni, padłych na żołądkowo-jelitową postać kolibakteriozy; 9 szczepów wyosobnionych od 8—12-tygodniowych prosiąt padłych z rozpoznaniem choroby obrzękowej; 15 szczepów pochodzących z kału prosiąt zdrowych. Ogółem zbadano 58 szczepów.

Testowanie serologiczne większości wyosobnionych szczepów wykonano przy pomocy posiadanych surowic diagnostycznych. Szczepy, których przynależności serotypowej nie udało się określić we własnym zakresie (m.in. nie opisywanego dotąd w Polsce *E. coli* O157:K88:H19) zostały zbadane w Międzynarodowym Ośrodku *Escherichia coli* i *Klebsiella* w Kopenhadze.

Aktywność enteropatogenną wymienionych szczepów określano przy pomocy testu podwiązanych pętli jelitowych, przeprowadzonego na 14 królikach w wieku 6—8 miesięcy i wadze 2—3 kg oraz 11 prosiąt w wieku 6—8 tygodni o wadze 8—10 kg. Każdy szczep badano co najmniej czterokrotnie na 4 różnych królikach i 4 prosiątach. Test wykonano posługując się metodą opisaną przez Smitha i Halls (9) używając do narkozy Vetbutal (Biovet) rozcieńczony a.a. w PBS, stosując dawkę 1 ml rozcieńzonego preparatu/kg wagi ciała oraz znieczulając powłoki brzuszne 2% roztworem chlorowodoru polokainy z adrenaliną. Pierwsze podwiązki zakładano na jelicie cienkim w odległości około 70 cm od odźwiernika. U królików wykonano od 17 do 20 pętli, a u prosiąt 20 do 23 pętli o długości odpowiednio około 7 i 10 cm. Do poszczególnych pętli wstrzykiwano po 1 ml 18-godzinnej hodowli bulionowej badanych szczepów o gęstości równej wartości ekstynkcji 0,13—0,14 przy długości fali 650 nm (fotokolorometr Specol), co odpowiada ilości  $1,2 \times 10^7$  bakterii w 1 ml. Po 20 godzinach zwierzęta uśmiercano i odczytywano wyniki. Nasilenie reakcji dodatnich określano przez stosunek objętości płynu wysiękowego przypadającej na 1 cm długości pętli.

### Wyniki i omówienie

Wśród badanych szczepów wyróżniono 13 serotypów. Najliczniej reprezentowanymi były *E. coli* O149:K91, K88a, c:H10 (28 szczepów) oraz O115:K88:H39 (6 szczepów), natomiast 5 serotypów było reprezentowanych tylko przez 1 szczep (tab. 1).

Ogólnie pałeczki okrężnicy wyosobnione z żołądkowo-jelitowej formy kolibakteriozy prosiąt w zdecydowanej większości przypadków stymulowały gromadzenie się wysięku w pętlach jelitowych zarówno prosiąt, jak i królików, natomiast szczepy pochodzące od prosiąt z chorobą obrzękową zwykle nie wykazywały działania enteropatogennego w ogóle lub tylko w nieznacznym stopniu (tab. 1). Wśród pałeczek okrężnicy wyosobnionych z kału prosiąt zdrowych wyodrębniono dwie grupy szczepów różniących się zdolnością pobudzania wzmoczonej sekrecji płynu w pętlach jelitowych. Serotypy uznawane za czynnik etiologiczny biegunek u prosiąt posiadały zwykle silne działanie enteropatogenne, natomiast pozostałe z reguły nie powodowały kumulacji płynu wysiękowego (tab. 1).

Tab. 1. Test izolowanych pętli jelitowych. Wyniki uzyskane u królików i prosiąt z uwzględnieniem serotypu pałeczek okrężnicy oraz pochodzenia szczepu

Jzolacja <i>E. coli</i>	Serotyp	Liczba szczepów	Liczba pętli o nasileniu odczynów								Szczepy powodujące we wszystkich testach odczyn:			
			królik				prosię				królik		prosię	
			+++	++	+	-	+++	++	+	-	+	ujemne	+	ujemne
Forma żołądkowo-jelitowa kolibakteriozy	O115:K88:H39	6	13	6	3	2	15	0	9	0	4	5	-	-
	O149:K91,K88ac:H10	22	44	17	14	13	63	8	9	8	13	17	-	-
	O9: :H9	1	3	1	0	0	4	0	0	0	1	1	-	-
	O16: :H <sup>-</sup>	1	0	3	1	0	2	2	0	0	1	1	-	-
	O157:K88:H16	1	4	0	0	0	4	0	0	0	1	1	-	-
	O45: :H <sup>-</sup>	1	3	1	0	0	4	0	0	0	1	1	-	-
	O149:K91	1	0	0	1	3	0	1	1	2	-	-	-	-
	O147:K89,K88ac	1	0	0	0	4	2	2	0	0	-	1	1	-
Razem	34	67	28	19	22	94	13	19	10	21	27	1	0	
Choroba obrzękowa	O141:K85ac	1	0	0	0	4	0	0	4	-	-	1	1	
	O149:K91	1	0	0	1	3	0	2	0	2	-	-	-	
	O147:K89	1	0	0	1	3	0	1	0	3	-	-	-	
	O139:K82	3	0	0	0	12	0	0	3	9	-	-	3	
	O138:K91	3	0	0	2	10	1	1	2	8	-	-	2	
	Razem	9	0	0	4	32	1	4	5	26	0	0	6	
Wymazy rektalne	O11: :H <sup>-</sup>	4	0	0	2	14	0	0	16	-	-	3	4	
	O149:K91	1	0	0	1	3	0	0	1	3	-	-	-	
	O45: :H9	2	0	0	0	8	0	0	8	-	-	2	2	
	Razem	7	0	0	3	25	0	0	1	27	0	0	5	
	O16: :H <sup>-</sup>	2	3	4	1	0	3	5	0	0	2	2	-	
	O149:K91,K88ac:H10	6	14	6	4	0	19	4	1	0	6	6	-	
Razem	8	17	10	5	0	22	9	1	0	8	8	-		

Objaśnienia: +++ > 3 ml płynu/1 cm długości pętli, ++ 2-3 ml/cm, + 1-2 ml/cm, - < 1 ml/cm.

Należy podkreślić, że obserwowano pewne zróżnicowanie nasilenia reakcji, jaką stymulowały te same szczepy u różnych osobników tego samego gatunku zwierząt. Zawsze jednak dominował jeden typ reakcji. Szczepy powodujące żołądkowo-jelitową postać kolibakteriozy w większości powodowały odczyn dodatni, wśród których z kolei przeważały odczyny o największym nasileniu. Z drugiej strony, szczepy pochodzące od prosiąt z chorobą obrzękową w większości testów reagowały ujemnie. Reakcje dodatnie stanowiły niewielki procent ogółu wykonanych testów (tab. 2).

Rozpatrując ilość szczepów w poszczególnych grupach izolacji, reagujących podobnie we wszystkich powtórzeniach testu i wykonanych na różnych osobnikach tego samego gatunku stwierdzono, że 80% szczepów wyosobnionych od prosiąt z żołądkowo-jelitową postacią kolibakteriozy reagowało dodatnio we wszystkich powtórzeniach testu wykonanego u prosiąt. Znacznie mniejszy natomiast odsetek (61,7%) szczepów powodował odczyn dodatnie w takich samych badaniach przeprowadzonych na królikach. Odwrotnie zachowywały się szczepy wyosobnione od prosiąt z

chorobą obrzękową, które w niemal 45% u prosiąt oraz w 66% u królików reagowały ujemnie we wszystkich powtórzeniach testu (tab. 2).

Żaden ze szczepów pochodzących od prosiąt z formą żołądkowo-jelitową kolibakteriozy nie reagował ujemnie we wszystkich powtórzeniach testu wykonanego u prosiąt, natomiast u królików zachowanie takie stwierdzono u jednego szczepu. Podobnie w badaniach szczepów wyosobnionych z przypadków choroby obrzękowej, wykonanych tak na prosiętach, jak i na królikach nie stwierdzono ani jednego reagującego dodatnio we wszystkich powtórzeniach. Jeszcze bardziej jednoznaczne wyniki uzyskano w badaniach szczepów z wymazów rektalnych (tab. 3).

Oceniając przydatność królików jako zwierząt testowych dla oceny aktywności enteropatogennej szczepów *Escherichia coli* wyosobnionych od świń wydaje się, że mogą one być używane do tego celu. Przemawiają za tym zbliżone reakcje powodowane przez te same szczepy zarówno u prosiąt, jak i królików. Obserwowano jednak nieco większą wrażliwość prosiąt, zwłaszcza na szczepy powodujące żołądkowo-jelitową postać kolibakteriozy.

Tab. 2. Test izolowanych pętli jelitowych. Ilość odczynów dodatnich (bez względu na nasilenie reakcji) stymulowanych przez szczepy pochodzące z poszczególnych grup izolacji.

Pochodzenie szczepu	Liczba szczepów	Liczba testów	Ilość odczynów dodatnich prosię	królik
Forma żołądkowo-jelitowa	34	136	127 (93,4%)	116 (85,3%)
Choroba obrzękowa	9	36	10 (27%)	4 (11%)
Wymazy rektalne *	7	28	1 (3%)	3 (11%)
Wymazy rektalne **	8	32	32 (100%)	32 (100%)

Objaśnienia: \* szczepy o słabym działaniu enteropatogennym, \*\* szczepy o silnym działaniu enteropatogennym.

Tab. 3. Test izolowanych pętli jelitowych. Odsetek szczepów *E. coli* reagujących dodatnio lub ujemnie we wszystkich powtórzeniach testu przy uwzględnieniu pochodzenia szczepu.

Pochodzenie szczepu	Liczba szczepów	Odczyn dodatni prosię	Odczyn dodatni królik	Odczyn ujemny prosię	Odczyn ujemny królik
Postać żołądkowo-jelitowa	34	80%	62%	0	3%
Choroba obrzękowa	9	0	0	45%	67%
Wymazy rektalne *	7	0	0	86%	72%
Wymazy rektalne **	8	100%	100%	0	0

Objaśnienia: \* szczepy o słabym działaniu enteropatogennym, \*\* szczepy o silnym działaniu enteropatogennym.

Króliki w takich wypadkach reagowały z re-  
gowały nieco słabiej.

Badania własne potwierdzają wcześniejsze  
sposzrzenia odnośnie silnej aktywności ente-  
ropatogennej pałeczek okrężnicy, powodują-  
cych żołądkowo-jelitową lub septyczną formę  
kolibakteriozy i na ogół braku tej właściwości  
u szczepów będących przyczyną choroby  
obrzękowej (6, 8, 10). Okazało się, że szczepy  
należące do serogrup O149 i O147, a nie po-  
siadające antygeny K88 zwykle nie wykazy-  
wały również działania enteropatogenego,  
właściwego serotypom ten antygen posiadają-  
cym. Zależność tę Smith i Lingood (12, 13)  
tłumaczy równoległym występowaniem pla-  
zmidów K88 i ENT w komórce bakteryjnej  
oraz łącznym ich przekazywaniem w proces-  
ach genetycznych.

Wśród enteropatogennych szczepów obser-  
wowano takie, które we wszystkich powtórze-  
niach testu powodowały silne reakcje oraz  
takie, których odczyny jakkolwiek regularnie  
dodatnie miały rozmaity stopień nasilenia.  
Prasad i wsp. (7) wprowadza określenie szcze-  
pów silnie i umiarkowanie enteropatogennych.  
Podobne różnice w nasileniu reakcji powodo-  
wanych przez niektóre szczepy stwierdzili  
Smith i Halls (9, 11). Wynika to zapewne z  
różnej wrażliwości na enterotoksynę różnych  
regionów jelit cienkich (9), z różnych właści-  
wości antygenowych szczepu (4, 14), a także  
z różnic w indywidualnej wrażliwości zwie-  
rzęcia użytego do testu (5).

W przedstawionych badaniach przy testo-  
waniu tych samych szczepów obserwowano u  
królików i prosiąt podobne reakcje. Wskazuje  
to na zbliżoną wrażliwość błony śluzowej jelit  
cienkich królików i prosiąt na enterotoksyny  
wytwarzane przez enteropatogenne dla świń  
pałeczki okrężnicy. Pozostaje to w sprzeczno-  
ści z ogólnie akceptowanym poglądem, że naj-  
bardziej miarodajne wyniki uzyskuje się prze-  
prowadzając test na zwierzętach tego samego  
gatunku, z którego wyosobniono badany  
szczep (9, 15, 16). Biorąc jednak pod uwagę  
wyniki badań wskazujących na znaczne podo-  
bieństwo struktury enterotoksyn wytwarza-  
nych przez *Escherichia coli* i *Vibrio cholerae*  
(1, 2, 3) można zakładać, że enterotoksyny  
produkowane przez pałeczki okrężnicy są  
substancjami podobnymi, jeśli nie identycz-  
nymi u wszystkich przedstawicieli tego ro-  
dzaju, niezależnie od stopnia ich patogenności  
dla poszczególnych gatunków zwierząt. W tej  
sytuacji uwalnianie enterotoksyn przez pato-  
genne serotypy byłoby zależne od ich gatun-  
kowego powinowactwa do komórek nabłonka  
jelitowego, które warunkuje ich namnażanie  
się w środowisku jelit cienkich. Niemniej je-  
dnak porównując wyniki uzyskane u prosiąt  
i królików trzeba stwierdzić, że komórki na-  
błonka jelit cienkich królików reagują w słab-  
szym stopniu na enterotoksynę patogennych  
dla prosiąt pałeczek okrężnicy. Pozostaje spr-

wą otwartą, czy te słabsze reakcje są wyni-  
kiem gatunkowo mniejszej wrażliwości króli-  
ków na enterotoksyny produkowane przez  
patogenne dla prosiąt *Escherichia coli*, czy też  
ogólnie mniejszej wrażliwości tego gatunku  
na enterotoksyny w ogóle.

#### Piśmiennictwo

1. Dafni Z., Sack R. B., Craig J. P.: Infect. Immunity 22, 852, 1978.
2. Gyles C. L.: J. Insect. Dis. 129, 277, 1974.
3. Moon H. W.: J. Am. Vet. Med. Ass. 172, 443, 1978.
4. Moon H. W., Kohler E. M., Schneider R. A., Whipp S. C.: Infect. Immunity 27, 222, 1980.
5. Olson E., Soderlind O.: J. Clin. Microbiol. 6, 11, 1980.
6. Pesti L., Semjen G.: Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 23, 227, 1973.
7. Prasad C. B., Mishra N. C., Deokouliyer U. K., Ehsan M. D.: Indian J. Anim. Sci. 48, 32, 1978.
8. Semjen G., Pesti L.: Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 23, 219, 1973.
9. Smith H. W., Halls S.: J. Path. Bacteriol. 93, 409, 1967.
10. Smith H. W., Halls S.: J. Path. Bacteriol. 93, 531, 1967.
11. Smith H. W., Gyles C. L.: J. med. Microbiol. 3, 387, 1970.
12. Smith H. W., Lingood M. A.: J. med. Microbiol. 4, 467, 1971.
13. Smith H. W., Lingood M. A.: J. med. Microbiol. 5, 243, 1972.
14. Smith H. W., Huggins M. B.: J. med. Microbiol. 11, 477, 1978.
15. Taylor J. M., Maltby P., Payne J. M.: J. Path. Microbiol. 76, 491, 1958.
16. Truszczyński M., Pilaszek J., Glasgow C. B.: Res. vet. Sci. 9, 539, 1968.

Adres autora: dr Jerzy Milenda, ul. Rodakowskiego 6, 51-637 Wrocław

Моленда Е., Скурский А., Звежковский Я., Козыр-  
чак И. — Исследования пригодности кроликов к  
тестированию enteropatогенной активности палочек  
ободочной кишки, изолированных от свиней.

Пользуясь тестом изолированных кишечных пет-  
лей у поросят и кроликов сравнивали enteropatо-  
генный эффект, стимулированный у этих живот-  
ных палочками ободочной кишки, изолированными  
от свиней. Для исследований применили 34 штам-  
ма *Escherichia coli*, изолированных от поросят с  
желудочно-кишечной формой колибактериоза, 9  
штаммов, происходящих от свиней падших на оте-  
чную болезнь, и 15 штаммов, изолированных из  
ректальных мазков здоровых поросят. Enteropatо-  
генный эффект каждого из исследуемых штаммов  
определяли на 4 поросятах и 4 кроликах. Обнару-  
жили, что явное большинство серотипов *Escherichia coli*,  
признаваемых этиологическим фактором же-  
лудочно-кишечной формы колибактериоза, вызыва-  
ло положительные реакции как у поросят, так и  
у кроликов. Штаммы, изолированные от поросят  
с отечной болезнью, зачастую не показывали эн-  
терopatогенного действия у обоих видов животных.  
Проведенные исследования показали пригодность  
кроликов как тестовых животных к определению  
enteropatогенной активности палочек ободочной  
кишки, болезнетворных для поросят.

Molenda J., Skurski A., Zwierzchowski J., Kozyr-  
czak J. — Studies on the usefulness of rabbits to test the  
enteropathogenicity of *Escherichia coli* isolated from  
pigs.

Using the loop diluting test performed on rabbits  
and piglets the enteropathogenicity of *E. coli* iso-  
lated from pigs was compared. To the examinations 34  
strains of *E. coli* isolated from pigs suffering from  
colienterotoxaemia, 9 strains derived from pigs with  
oedema disease and 15 strains isolated from rectal  
swabs of healthy piglets were tested. The ente-  
ropathogenic activity of each strain was exa-  
mined on 4 rabbits and 4 piglets. The most se-  
rotypes of *E. coli* recognized as the etiological agent  
of colienterotoxaemia elicited the positive reactions  
both in piglets and rabbits. In general, the strains  
isolated from pigs with oedema disease did not show  
the enteropathogenic effect in both of the animal  
species. The examination performed revealed the  
usefulness of rabbits to determine the enteropatho-  
genic activity of *E. coli* pathogenic for pigs.