

JACEK OSEK, MARIAN TRUSZCZYŃSKI,
ZYGMUNT PEJSAK*, KAZIMIERZ TARASIUK*

Wpływ profilaktyki swoistej na obecność w kale prosiąt enterotoksycznych szczepów *Escherichia coli*, zawierających fimbrie adhezyjne

Zakład Mikrobiologii oraz * Zakład Chorób Szwini Instytutu Weterynarii,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

The effect of immunoprophylaxis on the occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains with adhesive fimbriae in the faeces of piglets

Pregnant sows were immunized against colibacillosis with 3 different commercial vaccines containing K88, K99, F41, and 987P fimbriae. *E. coli* strains isolated from the faeces of the newborn piglets were subsequently investigated for the presence of the mentioned fimbrial adhesins by the use of hemagglutination and slide agglutination tests. LT and STa enterotoxins were determined by ELISA and inhibition ELISA, respectively, using monoclonal antibodies. The results were compared with non-immunized controls. It was shown that all 3 vaccines used, had significant effect on the reduction of enterotoxigenic *E. coli* strains, with adhesive fimbriae, in newborn piglets. Only 2 out of 89 strains tested possessed K88 fimbriae whereas 18 and 10 strains isolated from control piglets (out of 83 strains examined) had K88 and K99 fimbrial adhesins, respectively. Only 1 strain isolated from immunized piglets was enterotoxigenic as compared to 40 enterotoxin-positive strains from control animals. These results show that immunization of sows with vaccines containing *E. coli* strains with adhesive fimbriae is effective in reducing the number of pathogenic *E. coli* strains in faeces of newborn piglets.

Kolibakterioza prosiąt pozostaje główną przyczyną strat prosiąt noworodków oraz prosiąt w okresie okołodsadzeniowym. Czynnikiem etiologicznym tej choroby są patogenne szczepy *Escherichia coli*, które w odróżnieniu od występujących w przewodzie pokarmowym niechorobotwórczych szczepów pałeczki okrężnicy (kommensali), charakteryzują się obecnością czynników patogenności. Są nimi fimbrie swoiste oraz enterotoksyny (2, 3, 6). Szczepy o wymienionych właściwościach (szczepy enterotoksyczne — ETEC) z reguły należą do ograniczonej liczby serotypów (2, 11, 12).

W patogenezie kolibakteriozy istotne znaczenie ma zdolność kolonizacji nabłonka jelit cienkich przez pałeczkę okrężnicy. Podstawową rolę w tym procesie odgrywiają fimbrie swoiste, oznaczone jako K88 (F4), 987P (F6), K99 (F5), F 41, F1 656, CS 31 A i inne (2, 3). Decydujący wpływ na rozwój objawów kolibakteriozy mają uwalniane przez szczepy ETEC enterotoksyny: ciepłochwiejna LT i ciepłostąła ST (odmiany STa i STb). Wielokrotnie obserwowano równocześnie wytwarzanie enterotoksyny LT i/lub ST oraz obecność fimbrii K88 (F4) u tego samego szczepu, izolowanego od prosiąt z objawami biegunki (3).

W zapobieganiu kolibakteriozie prosiąt osesków skuteczne okazało się ich bierne uodpornienie przy pomocy siary matek, szczepionych w ostatnim trymestrze ciąży. Indukowane w wyniku immunizacji przeciwciała swoiste skierowane przeciwko fimbriom, jak również enterotoksynom, zwłaszcza LT, przekazywane są prosiętom z siarą i chronią je w znacznym stopniu przed rozwojem biegunki (3, 8). Odporność nowo narodzonych pro-

siąt zależy głównie od poziomu przeciwciał w siarze oraz od jej ilości, pobranej przez prosię; ważny jest też, licząc od porodu, czas jej pozyskania.

Celem prezentowanej pracy było określenie wpływu kilku szczepionek przeciw kolibakteriozie na występowanie w kale prosiąt pochodzących od uodpornianych macior — szczepów *E. coli* wytwarzających enterotoksyny LT i/lub STa oraz fimbrie swoiste.

Materiał i metody

Szczepionki. Do immunizacji macior używano następujących preparatów:

— Enterit 1 (prod. Solco-Ambico, USA), zawierający zawieszinę szczepów *E. coli* z antygenami fimbrialnym K88, K99, F41 i 987P, z dodatkiem wodorotlenku glinu jako adiuwantem. Szczepionkę w dawce à 2 ml podawano samicom próśnym domięśniowo (i.m.), dwukrotnie w okresie 5 i 2 tygodni przed porodem.

— Enterit 2 (prod. Solco-Ambico, USA), szczepionka wieloważna, zawierająca zawieszinę szczepów *E. coli* z podanymi wyżej antygenami oraz atenuowane serotypy A₁ i A₂ rotawirusa. Jako adiuwant zastosowano wodorotlenek glinu. Szczepionkę podawano w sposób taki sam, jak Enterit 1.

— Nobi-Vac-Porcoli (Intervet, Holandia), zawiesina inaktywowanych szczepów *E. coli* z antygenami fimbrialnymi K88ab, K88ac, K88ad, K99, F41 i 987P, z dodatkiem oleju mineralnego jako adiuwantu. Szczepionkę w dawce à 2 ml podawano samicom próśnym i.m., dwukrotnie, w okresie 8 i 2 tygodni przed porodem.

Szczepy bakteryjne. Do badań bakteriologicznych pobierano kał z odbytu od prosiąt 1—7-dniowych, pochodzących od macior immunizowanych podanymi uprzednio szczepionkami oraz od prosiąt pochodzących od macior nie uodpornionych. Kał posiewano na podłożu MacConkey'a i agar z krwią. Kolonie o typowym dla szczepów *E. coli* wyglądzie badano biochemicznie i po 3 szczepy, z każdej badanej próbki kału, zaliczone do gatunku *E. coli*, używano do dalszych badań.

Oznaczanie antygenów fimbrialnych. Fimbrie K88, K99, F41 i 987P identyfikowano testem aglutynacji szkiełkowej z surowicami swoistymi (12). Obecność fimbrii F1 określano testem hemaglutynacji czynnej z mannozą z udziałem krwinek czerwonych świnki morskiej (2, 12).

Określanie enterotoksyn LT i STa. Wytwarzanie enterotoksyn LT i STa przez izolowane szczepy *E. coli* oznaczano testem ELISA z udziałem przeciwciał monoklonalnych* (10). Szczepy do badań hodowano w mikropłytkach opłaszczonych uprzednio swoistym dla enterotoksyn receptorem GM₁ (Sigma, USA). Związaną z receptorem enterotoksynę LT oznaczono na drodze reakcji enzymatycznej, używając przeciwciał monoklonalnych anti-LT i swobodnego koniugatu z peroksydazą chrzanową (Jackson, USA). Reakcję barwną wywoływano przez dodanie substratu enzymatycznego (ortofenylodwuaminy OPD, w obecności H₂O₂, w buforze cytrynianowym, pH 4,5) a wynik odczytywano spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm.

Do oznaczania enterotoksyny STa zastosowano test ELISA w odmianie „blocking”. Do opłaszczonych GM₁ mikropłytek dodawano kompleks enterotoksyny STa z podjednostką B enterotoksyny *Vibrio cholerae* (STa-CTB). Po 60 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej i przepłukaniu płytek PBS, dodawano hodowlę badanych szczepów *E. coli* (z płytek używanych do oznaczania enterotoksyny LT, po 50 µl) i równocześnie taką samą objętość przeciwciał mo-

* Przeciwciała monoklonalne anti-LT, anti-CT i anti-STa oraz kompleks STa-CTB uzyskano od Profesora A. M. Svennerholm, Göteborg, Szwecja, za co autorzy wyrażają podziękowanie.

Tab. 1. Występowanie fimbrii oraz wytwarzanie enterotoksyn przez szczepy *E. coli* izolowane od prosiąt pochodzących od macior immunizowanych oraz kontrolnych

Stosowana szczepionka	Liczba szczepów	Liczba szczepów z fimbriami							Liczba szczepów wytwarzających enterotoksyny	
		K88	K99	987P	F41	F1	ogółem	swoistymi	LT	STa
Enterit 1	30	2	0	0	0	6	8	2	1	—
Enterit 2	30	0	0	0	0	8	8	0	0	0
Nobi-Vac-Porcoli	A 29	0	0	0	0	14	14	0	0	0
Kontrola	A 83	18	10	0	0	9	37*	28*	14*	26*

Objaśnienie: * — różnice statystycznie istotne przy $p < 0,05$.

noklonalnych anty-STa. W przypadku, gdy badany szczep wytwarzał enterotoksynę STa — reagowała ona z badanymi przeciwciałami anty-STa. Kompleks ten (toksyna — przeciwciało), jako nie związany z receptorem GM_1 , był następnie wypłukiwany przy pomocy PBS i enzymatyczna reakcja barwna nie mogła być oznaczona. Natomiast, gdy badany szczep *E. coli* nie wytwarzał STa, przeciwciała anty-STa reagowały z enterotoksyną STa związanego z GM_1 kompleksu STa-CTB, a reakcja mogła być wykazana barwnie przy pomocy wspomnianego uprzednio koniugatu z substratem enzymatycznym.

Obliczenia statystyczne. Uzyskane wyniki podano analizie statystycznej przy pomocy testów t-Studenta oraz chi-kwadrat z poprawką Yatesa.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań dotyczących występowania fimbrii oraz wytwarzania enterotoksyn przez szczepy *E. coli* izolowane od prosiąt, urodzonych przez samice immunizowane szczepionkami przeciw kolibakteriozie oraz maciory kontrolne, zebrano w tab. 1.

Z przedstawionych danych wynika, że tylko u 2 szczepów (z 30 badanych) wyosobnionych od prosiąt pochodzących od macior szczepionych preparatem Enterit 1, stwierdzono fimbrie swoiste typu K88. W pozostałych grupach prosiąt, pochodzących od samic immunizowanych nie wykazano szczepów mających fimbrie swoiste. Stwierdzono, że niektóre szczepy *E. coli*, pochodzące od prosiąt urodzonych przez samice immunizowane, posiadały fimbrie typu F1, których rola w patogeniezie biegunki nie jest, w aspekcie patogenyzy kolibakteriozy, jednoznacznie określona. W grupie kontrolnej (prosiąt od macior nie udopornionych), spośród 83 izolowanych szczepów *E. coli* 28 charakteryzowało się obecnością fimbrii swoistych (z antygenami: K88 — 18 szczepów i 987 P — 10 szczepów). Stanowi to różnicę statystycznie istotną ($p < 0,05$) w stosunku do szczepów izolowanych od prosiąt grup doświadczalnych. Ogółem, na 83 szczepy *E. coli* wyosobnione od zwierząt kontrolnych aż 37 posiadało fimbrie, w tym 28 fimbrie swoiste i 9 fimbrii F1.

W tab. 1 przedstawiono również wyniki badań dotyczących wytwarzania przez badane szczepy *E. coli* enterotoksyn LT i STa. Wśród szczepów izolowanych od prosiąt pochodzących od macior immunizowanych, stwierdzono tylko jeden enterotoksyczny szczep *E. coli* (wytwarzający enterotoksynę LT). W grupie kontrolnej (maciory nie immunizowane) wśród 83 szczepów badanych aż 40 było enterotoksycznych. Wytwarzały one enterotoksyny LT (14 szczepów) oraz STa (26 szczepów). Wskazuje to na różnicę statystycznie istotną ($p < 0,05$) w porównaniu do wyników grupy doświadczalnej.

Uzyskane wyniki potwierdzają celowość uodporniania ciężarnych macior przeciw kolibakteriozie jako skutecznej metody zapobiegania jej występowania u prosiąt.

Wskazują one dodatkowo, że w ten sposób eliminowane są ze środowiska bytowania świń szczepy *E. coli*, które wytwarzają enterotoksyny i fimbrie adhezyjne — istotne w powstawaniu kolibakteriozy.

Reasumując, nie stwierdzono zasadniczych różnic, zależnie od stosowanej szczepionki, w stopniu eliminowania z kału prosiąt osesków szczepów *E. coli*, cechujących się obecnością fimbrii adhezyjnych i zdolnością wytwarzania enterotoksyn. Na nieznaczną różnicę może wskazywać fakt izolowania 2 takich szczepów wyosobnionych z kału prosiąt, których matki immunizowane były szczepionką o nazwie Enterit 1. Mogłoby to ewentualnie przemawiać za jej mniejszą skutecznością niż pozostałych porównywanych szczepionek.

Piśmiennictwo

1. Awad-Masalmah M., Moon H. W., Runnels P. L., Schneider R. A.: Infect. Immun. 35, 305, 1982.
2. Gastra W., De Graaf F. K.: Microbiol. Rev. 46, 129, 1982.
3. Holland R. E., Clin. Microbiol. Rev. 3, 345, 1990.
4. Jayappa H. G., Goodnow R. A., Geary S. J.: Infect. Immun. 48, 350, 1985.
5. Kaper J. B., Levine M. M.: Vaccine 6, 197, 1988.
6. Levine M. M.: J. Infect. Dis. 155, 377, 1987.
7. Levine M. M., Kaper J. B., Black R. E., Clements M. L.: Microbiol. Rev. 47, 510, 1983.
8. Mestecky J.: J. Clin. Immunol. 7, 235, 1987.
9. Monckton R. P., Hasse D.: Vet. Microbiol. 16, 273, 1988.
10. Osek J., Svennerholm A. M.: Vet. Microbiol. 29, 299, 1991.
11. Sojka W. J.: Vet. Bull. 41, 509, 1971.
12. Truszczyńska M., Osek J.: Comp. Immun. Microbiol. Inf. Dis. 10, 117, 1987.
13. Wilson R. A., Francis D. H.: Am. J. Vet. Res. 47, 213, 1986.

Adres autora: dr Jacek Osek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

SAVINI G., DUNSMORE J. D., ROBERTSON I. D., SEBEVIRATNA P.: Sarcocystis spp. u bydła w zachodniej Australii. (Sarcocystis spp. in Western Australia cattle). Aust. Vet. J. 69, 201—202, 1992 (8)

Co najmniej trzy gatunki Sarcocystis występują u bydła (*S. cruzi*, *S. hirsuta* i *S. hominis*). Najczęściej u bydła występuje *S. cruzi*, który przy masowej inwazji prowadzi do padania zwierząt. Najodpowiedniejszym sposobem rozpoznania choroby jest trawienie materiału przesłanego do badania, zaś określenie przynależności gatunkowej pasożyta jest możliwe wyłącznie na podstawie morfologii cyst. Badając 202 sztuki bydła poddane ubojowi u 125 (62%) stwierdzono cysty Sarcocystis. Odsetek wyników pozytywnych zależał od rodzaju materiału poddawanego badaniu. Stosując przeponeę uzyskano 53% wyników dodatnich, przelyk 57%, mięśnie żuchwy 52% (średnio 60%). Stosując badanie histologiczne wyniki pozytywne uzyskano badając przeponeę w 12%, przelyk w 22% i mięsień żuchwy w 25% (ogółem 36%). Nasilenie inwazji mierzone liczbą cyst przypadającą na cm^2 badanego narządu wynosiło w mięśniach żuchwy średnio 1,6/ cm^2 , w przelyku 1/ cm^2 i w przeponie 0,6 cysty/ cm^2 . Największa ilość cyst przypadająca na cm^2 badanego narządu wynosiła 13,8/ cm^2 . Nasilenie zarażeń spowodowanych przez *S. cruzi* jest w Kanadzie niewielkie i przebiega z reguły w formie chronicznej.