
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. XXIII, 38

SECTIO EE

2005

Ustav Mikrobiologie a Imunologie Potravín, Univerzita Veterinárskeho Lekárstva,
Košice, Slovakia

Pracownia Biologii i Rozrodu Zwierząt Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt
Akademii Rolniczej w Lublinie

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk
Oddelenie Bakteriologie, Statny Veterinarny Ustav, Zvolen, Slovakia

HAHAC VU-KHAC, EMIL HOLODA, HANNA BIS-WENCEL,
EMIL PILIPČINEC, ADRIANA WANTRUBOVA,
AGNIESZKA SROKA, SAMUEL NOVAK

*Identyfikacja fimbrii adhezyjnych w szczepach Escherichia coli
za pomocą PCR oraz metody aglutynacji szkiełkowej**

Identification of Fimbrial Adhesins in *Escherichia Coli* Strains by PCR and
Slide Agglutination Methods

Escherichia coli jest nie tylko normalnym składnikiem flory jelitowej u zwierząt, ale również czynnikiem chorobotwórczym. Wśród szczepów patogen-nych dla świń wyróżnia się wywołujące infekcje jelitowe, takie jak biegunka czy choroba obrzękowa i enterotoksyczne (ETEC). Szczepy ETEC, aby indukować biegunkę, muszą najpierw skolonizować jelito cienkie. Kolonizacja jelita odby-
wa się poprzez bakterie chorobotwórcze, posiadające zdolność adhezji do jelita
cienkiego za pomocą fimbrii [3]. Pierwszą fimbrią adhezyjną opisaną dla szcz-
pów ETEC wyosobnionych od prosiąt z biegunką była F4 (K88). Później stoso-
wano testy serologiczne, różnicujące trzy typy fimbrii : K88-K88ab, K88ac i
K88ad [1]. Oprócz antygenów fimbrii F4 zidentyfikowano inne fimbrie adhe-
zyjne ETEC, izolowane od prosiąt z objawami biegunki, m.in. F5, przy czym
typ F4 jest często kojarzony z biegunką prosiąt osesków i okresu odsadzania od
macyory, natomiast F5, F6 i F41 są zwykle wyosobnione od prosiąt osesków z
objawami biegunkowymi. Większość szczepów *E. coli* z fimbriami adhezyjnymi
F5, F6 i F41 wykazuje charakter niekrwotoczny, zaś szczepy F4+ są zazwyczaj
krwotoczne. Szczepy *E. Coli*, posiadające zdolność ekspresji antygeny F4, wy-

* Niniejsza praca została wykonana w ramach stypendium VEGA 1/8025/01 Słowackiej Agencji Stypendiów
oraz wewnętrznego stypendium Uniwersytetu Medycyny Weterynaryjnej w Koszycach (Słowacja).

wołują dotkliwsze objawy biegunkowe u osobników młodszych (w wieku 1–5 dni), natomiast szczepy nie-F4 wywołują łagodniejsze biegunki u starszych prosiąt, tj. w wieku 4–14 dni [6].

W celu wykrycia fimbrii adhezyjnych stosuje się różne testy, m.in. metodę aglutynacji szkiełkowej lub lateksowej, test ELISA, a także metodę immunofluorescencyjną z użyciem adsorbowanych, poliklonalnych i monoklonalnych przeciwciał antyfimbriowych [8]. Metoda aglutynacji szkiełkowej jest najprostsza, najczęściej stosowana i zależy od ekspresji fimbrii. Ostatnio, w sytuacji łatwego dostępu do ich sekwencji genowych, powszechnie i w coraz większym stopniu do wykrywania obecności czynnika zjadliwości szczepów *E. coli* stosuje się metody genetyczne. Wśród tych metod test PCR wyróżnia się czułością i szybkością, umożliwiającymi dokonanie identyfikacji genów fimbrii w ciągu kilku godzin.

Celem niniejszych badań było określenie zastosowania testu PCR do wykrywania genów kodujących fimbrie F4, F5, F6 i F41 w szczepach *E. coli*, wyosobnionych od prosiąt z biegunką w różnych regionach Słowacji. Równocześnie określono zdolności tych szczepów do ekspresji hemolizyn.

MATERIAŁ I METODY

W pracy wykorzystano następujące szczepy referencyjne *E. coli*: *E. coli* 298: K88+ (F4), 329:K99 (F5), 318:987P₊ (F6) oraz 320: F41+ otrzymane z PIWet w Puławach; *E. coli* G491:K88ac+, *E. coli* K88ad+ otrzymane z VRI, Brno, Rep. Czeska; *E. coli* M1:K88ab+. Apatogennego szczepu laboratoryjnego *E. coli* HB101 użyto jako szczepu ujemnego [3].

Badanie obejmowało sto osiemdziesiąt cztery szczepy *E. coli*, wyosobnione od prosiąt ośsków (w wieku 1–28 dni) pochodzących z nieszczepionych stad z różnych rejonów Słowacji. Szczepy wyizolowano z treści jelitowej martwych zwierząt oraz wymazów z odbytnicy prosiąt ze schorzeniem biegunkowym. Badania prowadzono w Państwowych Instytutach Weterynaryjnych w Bratysławie, Nitrze i Zwoleniu, Katedrze Higieny Żywności i Technologii Uniwersytetu w Koszycach w latach 2001–2002. Próbkę posiewano bezpośrednio na agar MacConkeya (Oxoid, Anglia), zaś otrzymane kolonie identyfikowano przy użyciu standardowego zestawu biochemicznego. Pojedyncze kolonie przeznaczone do testu PCR posiano na agar LB i inkubowano w 37°C przez 18 h.

Uzyskane kolonie posiano na agar z krwią (Oxoid, Anglia), uzupełniony erytrocytami owcy do uzyskania stężenia 5% i inkubowano w 37°C przez 18h. Aktywność hemolityczna została określona wzrokowo. Surowice przeciwko antygenom fimbriowym F4ab, F4ac, F4ad, F5, F6 i F41 zostały uzyskane z królików według metody Edwardsa i Ewinga, cyt. za [3].

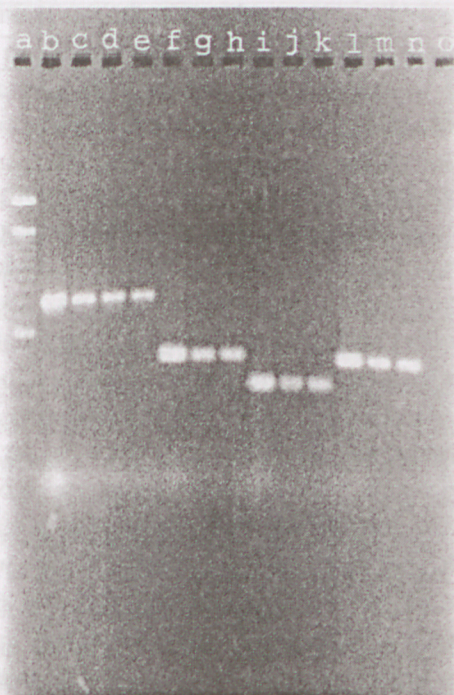
Izolaty terenowe *E. coli* badano w kierunku fimbrii adhezyjnych F4ab, F4ac, F4ad, F5, F6 i F41, stosując aglutynację szkiełkową opisaną przez Holodę i wsp. [3]. Testy na F4 i F6 wykonano na koloniach wyhodowanych na agarze z dodatkiem 5% krwi owcy, natomiast F5 i F41 na agarze Minca z Isovitalex cyt. za [3].

Wykonano wykrywanie fimbrii adhezyjnych F4, F5, F6 i F41 przy użyciu polimerazowej reakcji łańcuchowej, a także amplifikację bakteryjnego DNA według opisu Ojienyi i wsp. [7], Holody i wsp., [3] oraz Vu-khac i wsp. [10]. Produkty PCR określono testem elektroforezy, stosując 1,5 lub 2% żel agarozowy w buforze TAE. DNA było analizowane w świetle UV po uprzed-

nim zabarwieniu bromkiem etydy (stężenie 0,5 µg/ml). Jako standardu masy molekularnej użyto markera DNA – 100 pb DNA. Ocenę produktów PCR na żelu przeprowadzono za pomocą systemu Kodak Digital Science.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Hodowle na agarze z krwią 184 izolatów terenowych *E. coli* uzyskanych od prosiąt ze schorzeniem biegunkowym wykazały, że u 129 (70,1%) z nich wystąpiła beta-hemoliza. Hemolizę stwierdzono we wszystkich 65 izolatach pozytywnych na fimbrie adhezyjne F4, natomiast wszystkie szczepy pozytywne na F5+ i F6+ nie wykazywały charakteru hemolizyny. Brak hemolizy został również potwierdzony w dwóch szczepach wytwarzających adhezyny F5 i F41.



Ryc. 1. Test elektroforezy na żelu agarozowym – PCR do wykrywania genów kodujących fimbrie w szczepach *E. coli*. Od lewej do prawej: a – 100 bp drabinka; b – F4 kontrola dodatnia; c, d, e – F4 pole dodatniej izolacji; f – F5 kontrola dodatnia; g, h – F5 pole dodatniej izolacji; i – F6 kontrola dodatnia; j, k – F6 pole dodatniej izolacji; l – F41 kontrola dodatnia; m, n – F41 pole dodatniej izolacji; o – kontrola ujemna

Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified *E. Coli* DNA products. From left to right line: a – 100 bp ladder; b – F4 positive control; c, d, e – F4 positive field isolates; f – F5 positive control; g, h – F5 positive field isolates; i – F6 positive control; j, k – F6 positive field isolates; l – F41 positive control; m, n – F41 positive field isolates; o – negative control

Tabela. 1. Porównanie aglutynacji szkiełkowej i PCR do wykrywania fimbrii adhezyjnych wśród szczepu *E.coli* 184 wyizolowanego od prosiąt z biegunką
 A comparison of slide agglutination and PCR for detection of fimbrial adhesins among 184 *E. coli* strain isolated from diarrhoeic piglets

Fimbrie	Liczba szczepów	
	aglutynacyjno-pozytywne	PCR - pozytywne
F4ab	1	3
F4ac	53	62
F4ad	0	0
F5 (tylko)	4	4
F6 (tylko)	4	9
F41 (tylko)	0	0
F41+F5	1	2
F**	121	105
Razem	184	184

*Negatywne dla F4, F5, F6 i F41

Wykonano analizę 184 szczepów *E. coli*, wyosobnionych od prosiąt z objawami biegunkowymi na obecność antygenów fimbriowych F4, F5, F6 i F41, stosując test PCR (ryc. 1) i aglutynację szkiełkową. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 1. Stwierdzono, że w wykrywaniu wszystkich badanych fimbrii PCR jest o wiele bardziej czuła niż test aglutynacji szkiełkowej. Stwierdzono, że szesnaście szczepów było PCR-pozytywnych i aglutynacyjno-ujemnych, natomiast żaden ze szczepów nie okazał się aglutynacyjno-pozytywny, a PCR-ujemny. Metodą PCR antygen fimbriowy F4 został wykryty w 65 ze 184 badanych szczepów, a jedynie 55 szczepów wykazało reakcję z surowicą odpornościową F4.

Analiza produktów amplifikacji PCR, przeprowadzona za pomocą endonukleaz restrykcyjnych, wykazała, że trzy spośród 65 F4+ pozytywnych izolatów posiadały cechy charakterystyczne genotypu F4ab, zaś 62 – cechy genotypu F4ac. Co więcej, żaden z izolatów nie został określony jako genotyp F4ad. W przypadku antygeny fimbriowego F6 dziewięć z 184 izolatów amplifikowano z użyciem pary starterów dla F6, zaś stosując aglutynację szkiełkową tylko cztery szczepy okazały się pozytywne dla F6. Spośród badanych 184 szczepów cztery wytwarzające antygen fimbriowy F5 dały wynik pozytywny w reakcji PCR i aglutynacji szkiełkowej. Dwa szczepy posiadały geny dla antygenów fimbriowych F5 i F41, ale tylko jeden szczep reagował wyłącznie z surowicą odpornościową, zaś już żaden z nich nie wchodził w reakcje z surowicą F41.

Biorąc pod uwagę czynnik chorobotwórczości czterech fimbrii adhezyjnych, antygen fimbriowy F4 uznano za najbardziej chorobotwórczy. Jego obecność stwierdzono w 65 szczepach, co stanowiło 35.5%, natomiast fimbrie adhezyjne

F6, F5 i F41+F5 wykryto metodą PCR w dziewięciu szczepach, tj. 5%, i w dwa izolatach metodą aglutynacji szkiełkowej, co stanowiło 1%.

Wyniki własne badań wskazują na stosunkowo wysoką wrażliwość polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) w porównaniu z częściej używaną metodą aglutynacji szkiełkowej do wykrywania każdego z antygenów fimbrialnych F4, F5, F6 i F41. W przypadku F41 ustalono, że antygen fimbrialny F41 nie był notowany w dwóch szczepach do czasu zastosowania testu PCR. To ustalenie potwierdziło obserwacje o braku wrażliwości testu aglutynacji szkiełkowej w kierunku antygeny fimbrialnego F41, spowodowanego maskowaniem przez materiał otoczkowy [4]. Takie rezultaty testu aglutynacji szkiełkowej wynikały prawdopodobnie ze słabej ekspresji fimbrii *in vitro*, natomiast pozytywność testu PCR odzwierciedlała się w genomowej strukturze szczepów. Podobnie czułość testu aglutynacji szkiełkowej w kierunku wykrywania F6 była niższa niż testu PCR. Jedynie około połowy szczepów F6 PCR-pozytywnych reagowała z surowicą odpornościową F6. Czułość testu aglutynacji szkiełkowej przy wykrywaniu F6 była prawdopodobnie bezpośrednio związana z proporcją komórek produkujących fimbrie, ale jako że proporcja komórek F6-pozytywnych rzadko była niższa niż 20%, większość ze szczepów F6-pozytywnych nie była wykrywana przez aglutynację szkiełkową. Według Nagy i wsp. [6] szczepy wytwarzające antygen fimbriowy F4 w jelicie świń stają się F6-ujemne po pasażowaniu *in vitro* z powodu zmienności. W odniesieniu do antygeny fimbriowego F4 85% szczepów F4 PCR-pozytywnych było również pozytywnych po zastosowaniu testu aglutynacji, natomiast najbardziej chorobotwórczym wariantem F4 okazał się F4ac. Taka różnica między aglutynacją szkiełkową a PCR przy wykrywaniu F4 może wynikać z ograniczeń samego testu aglutynacji. Wykazano, że często zdarza się, iż fimbrie adhezyjne nie są wytwarzane z taką łatwością *in vitro*, jak *in vivo*, dlatego też niektóre szczepy produkujące fimbrie *in vivo* mogą nie zachowywać się w ten sposób *in vitro*, chociaż zostały wyhodowane w warunkach optymalnych dla wytwarzania fimbrii.

Niniejsze badania wykazały wysoką chorobotwórczość fimbrii F4 w szczepach ETEC wyizolowanych od prosiąt z biegunką, pochodzących od nieszczepionych zwierząt z różnych rejonów Słowacji. Sześćdziesiąt pięć ze 184 (35,3%) szczepów określono jako pozytywne dla F4 przy użyciu testu PCR. Analiza produktów F4+ amplifikowanych przez endonukleazę restrykcyjną wykazała jednoznacznie, że F4ac jest wariantem dominującym, ponieważ 62 z 65 izolatów to były F4ac (95,3%). Wysoka zachorowalność prosiąt, spowodowana antygenem fimbriowym F4 w szczepach ETEC była również zauważona przez Westerman i wsp. [11] (71,1%), Osek i wsp. [8] (56,3%) oraz Ojieniyi i wsp. [7]

(30,9%), a także Alexa i wsp. [1], który opisał, że 233 z 238 F4-pozytywnych izolatów wyosobnionych w Republice Czeskiej było F4ac (97,9%).

Odwrotnie niż w doniesieniach innych autorów [2, 3], podkreślających wysoki stopień chorobotwórczości antygeny F6 w szczepach ETEC izolowanych od prosiąt z biegunką stwierdzono, że jedynie dziewięć szczepów (5%) było F6-pozytywnych. Niski stopień chorobotwórczości szczepów *E.coli* produkujących F6, wyosobnionych od prosiąt z biegunką, został również stwierdzony w Szwecji i Wielkiej Brytanii [13].

Chorobotwórczość szczepów ETEC wytwarzających fimbrie F5 i F41 różniła się w zależności od położenia geograficznego. Wysoki stopień chorobotwórczości fimbrii F5 i F41 zanotowano w czasie badań prowadzonych w Hiszpanii i w Szwecji [2]. Warto zaznaczyć, że szczepy *E. coli*, produkujące F5 i F41, nie były często izolowane od prosiąt z biegunką w Wielkiej Brytanii [13] oraz w Polsce [8], co zostało potwierdzone w niniejszych badaniach. Wykryto jedynie cztery szczepy pozytywne dla F5 oraz dwa szczepy pozytywne dla fimbrii F41 i F5. Wszystkie izolaty F4-pozytywne charakteryzowały się zdolnością wytwarzania beta-hemolizyny, co potwierdza fakt, iż wszystkie szczepy z antygenem F4 lub F18 wykazują aktywność hemolityczną [28]. Ostatnio Frydendahl [2] zaproponował, aby aktywność hemolityczną uznać jako marker potencjalnej patogenności, ponieważ jest ona określana na podstawie obecności lub braku genów czynnika zjadliwości.

WNIOSKI

Wykazano, że spośród metod diagnostycznych stosowanych w profilaktyce i rozpoznawaniu chorób zakaźnych, w tym chorób odzwierzęcych, metoda amplifikacji specyficznych sekwencji DNA jest bardziej swoista, czuła i szybsza w porównaniu z testem aglutynacji szkiełkowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Alexa P., Štouračová K., Hamřík J., Rychlík I.: Gene typing of the colonisation factors K88 (F4) in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic piglets. Vet. Med. – Czech. 46, 46–49 (2001).
2. Frydendahl K.: Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhea and edema disease in pigs and a comparison of diagnosis approaches. Vet. Microbiol. 85, 169–182, 2002.
3. Holoda E., Hungvukha C., Bergen H., Holečková B., Wantrubová A., Andrašková S., Pilipčinec E.: Primers for the detection of *Escherichia coli* K88ab⁺. Folia Veterinaria, 46, 119–122, 2002.

4. Moon H. W., Nagy B., Isaacson R. E., Oorskov I.: Occurrence of K99 antigen on *Escherichia coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99⁺ enterotoxigenic *E. coli* from calves and pigs. *Infect. Immun.*, 15, 614–620, 1977.
5. Morris J. A., Thron C. J., Well G. A., Scott A. C., Sojka W. J.: The production of F41 fimbriae by piglets strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* that lack K88, K99, and 987P fimbriae. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 2753–2759, 1983.
6. Nagy B., Fekete P. Z.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farms animals. *Vet. Res.* 30, 259–284, 1999.
7. Ojeniyi B., Arhens P., Meyling A.: Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. *J. Vet. Med. B.*, 41, 49–59, 1994.
8. Osek J., Truszczyński M.: Occurrence of fimbriae and enterotoxins in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in Poland. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 15, 285–292, 1992.
9. Thorn C. J., Bell M. M., Chasey D., Chesham J., Roeder P. L.: Development of monoclonal antibody ELISA for simultaneous detection of bovine coronavirus, rotavirus serogroup A, and *Escherichia coli* K99 antigen in feces of calves. *Am. J. Vet. Res.*, 53, 36–43, 1992.
10. Vu-Khac H., Holoda E., Wantrubová A., Andrašková S., Chomová Z., Čurlík J., Majerčíak M., Pilipčinec E.: Using for PCR detection of F18 fimbrial antigen in *E. coli* strains isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. *Folia Veterinaria*, 47, 102–106, 2003.
11. Westermen R. B., Mills K. M., Phillips R. M., Fortner G. W., Greenwood J. M.: Predominance of the ac variant in K88-positive *Escherichia coli* isolated from swine. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 149–150, 1988.
12. Wittig W., Klie H., Gallien P., Lehmann S., Timm M., Tschape H.: Prevalence of fimbrial antigens F18 and K88 and of enterotoxins and verotoxins among *Escherichia coli* isolated from weaned pigs. *Zentralbl. Bakt.* 283, 95–104, 1995.
13. Wray C., McLaren I. M., Carroll P. J.: *Escherichia coli* isolated from farm animals in England and Wales between 1986 and 1991. *Vet. Rec.*, 133, 439–442, 1993.

SUMMARY

The polymerase chain reaction (PCR) and slide agglutination tests for detection of fimbriae of *Escherichia coli* were compared. By using a slide agglutination test, fimbrial adhesins could be detected in 63 out of 184 *E. coli* strains isolated from diarrhoeic piglets while PCR tests were able to detect these fimbriae in 79 out of 184 strains. Of 79 strains detected by PCR tests sixty-five were F4+, nine F6+, four F5+, and two both F41+ and F5+. Haemolytic activity was detected in 129 isolates (70.1%). The polymerase chain reaction proved to be a more specific, sensitive and reliable method than the slide agglutination method.