

The aim of this study was to prepare a modification of a diluent used for preservation of boar semen using two antibiotics: florfenicol and polymyxin B. The experiment was performed in order to obtain a diluent maintaining high biological value of semen preserved in liquid storage for six days. Semen from five boars (23 ejaculates) was diluted in a control extender (R0) and in extenders R1 and R2, containing florfenicol and polymyxin B, respectively. The quality of the stored semen was verified using the CASA system, evaluating total and progressive motility, and on the basis of apoptotic changes, by determining the percentage of viable spermatozoa (YO-PRO-1/PI⁻), spermatozoa with apoptotic changes (YO-PRO-1⁺/PI⁻) and spermatozoa with high mitochondrial activity (JC-1⁺). The fertilizing capacity of the preserved spermatozoa was verified on the basis of the quality of preimplantation embryos. The study showed that the addition of florfenicol to the extender as antibacterial protection ensures the high quality and fertilizing capacity of boar spermatozoa.

KEY WORDS: boar, semen, antibiotics, embryos, apoptosis

Patogeneza zakażeń *Escherichia coli* u prosiąt

Anna Rząsa, Artur Zyzak, Olga Urbaniak

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Escherichia coli, zwana pałeczką okrężnicy, należy do rodzaju *Escherichia* i wchodzi w skład rodziny *Enterobacteriaceae*, która została zaklasyfikowana do rzędu bakterii właściwych *Enterobacteriales*. Bakterie z gatunku *E. coli* zostały po raz pierwszy opisane w 1885 roku przez Theodora Eschericha, który wyizolował je z kału niemowlęcia i nazwał *Bacterium coli commune* [58]. Bakterie te wchodzi w skład fizjologicznej flory bakteryjnej jelita grubego człowieka oraz zwierząt stałocieplnych [25]. Pełniące funkcję symbiontów i komensali *E. coli* odgrywają znaczącą rolę w rozkładzie substancji pokarmowych oraz w syntezie związków egzogennych – aminokwasów i witamin, głównie witaminy C oraz witamin z grupy B i K [6, 41]. Ponadto, dzięki zdolności do wytwarzania bakteriocyn – kolicyn, stanowią konkurencyjną mikroflorę dla mikroorganizmów chorobotwórczych [3, 7]. Przy obniżonej odporności organizmu obecne w jelicie niepatogenne szczepy pałeczki okrężnicy, w momencie przejścia do tkanek poza przewodem pokarmowym, mogą stać się przyczyną wystąpienia wielu poważnych infekcji. Patogenne szczepy *E. coli* powodują zaburzenia allostazy przewodu pokarmowego z powodu wzrostu sekrecji i osłabienia absorpcji jelitowej, co skutkuje rozwojem biegunek, którym towarzyszą objawy kliniczne wynikające z utraty wody, elektrolitów, zaburzenia równowagi kwasowo-zasadowej oraz obniżenia temperatury ciała. Patogenne szczepy *E. coli* mogą też stać się przyczyną krwotocznego niezłytu jelita grubego, infekcji pęcherza moczowego, infekcji nerek, wystąpienia zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS), małopłytkowej plamicy zakrzepowej, zapalenia płuc i opon mózgowych, a także zapalenia woreczka żółciowego i dróg żółciowych oraz posocznicy [10, 28, 34, 39, 40, 63].

U świń kolibakterioza wywołana przez *E. coli* może przebiegać w postaci jelitowej (czyli biegunki), zakażenia ogólnego bądź intoksykacji. W zależności od wieku zwierząt, w jakim ten zespół chorobowy się pojawia, można wyróżnić: kolibakteriozę prosiąt noworodków (do 3. dnia życia), kolibakteriozę adaptacyjną (okres wystąpienia tzw. siodła immunologicznego, tj.

między 2. a 4. tygodniem życia) oraz kolibakteriozę okresu odsadzeniowego (1.-2. tydzień po odsadzeniu od lochy). Straty bezpośrednie i pośrednie generowane przez biegunki stanowią jeden z najpoważniejszych ekonomicznie problemów okresu odchowu prosiąt [35]. Znajomość patogenyzy, jak i szybkiej identyfikacji drobnoustrojów wywołujących choroby, stwarza szansę znacznego ograniczenia zachorowań, wprowadzenia skutecznej immunoprofilaktyki, a tym samym ograniczenia stosowania chemioterapeutyków.

Etiologicznym czynnikiem inicjującym powstanie biegunki wywołanej przez bakterie *E. coli* jest obecność w przewodzie pokarmowym szczepu bądź szczepów posiadających na powierzchni komórki tak zwane czynniki patogenności, warunkujące stopień zjadliwości. Zależy on od: obecności fimbrii umożliwiających adhezję do komórek gospodarza, obecności otoczki o właściwościach antyfazagocytarnych oraz od zdolności do wytwarzania substancji toksycznych.

Kolibakterioza rozpoczyna się w momencie adhezji patogennych szczepów *E. coli* do charakterystycznych dla nich receptorów zlokalizowanych na powierzchni komórek jelita cienkiego lub grubego, budujących nabłonek błony śluzowej jelita [4]. Kolejny etap rozwoju kolibakteriozy różni się w zależności od charakterystycznych dla określonego szczepu markerów patogenności.

Escherichia coli jest Gram-ujemną, względnie beztlenową, nieprzetrawiającą, zdolną do ruchu pałeczką o przeciętnej długości 1,5 µm oraz średnicy 0,5 µm, z ułożonymi perytrychalnie wiciami, warunkowo wytwarzającą otoczkę i wykazującą obecność fimbrii [29, 57]. Ze względu na optymalną temperaturę wzrostu (37°C) pałeczki te są klasyfikowane jako mezofile. Charakteryzują się prawidłowym rozwojem w zakresie temperatur od 21°C do nawet 48,5°C, giną już po 20 minutach ogrzewania w temperaturze 60°C, ale np. w kale mogą przeżyć nawet do roku w temperaturze bliskiej 0°C [51]. Ponadto są prototrofami, tolerującymi środowisko o pH w granicach 4,5-9,0 (optymalnie 6,0-8,0).

W obrębie gatunku *E. coli*, w zależności od typu oddziaływania na organizm gospodarza, wyróżnia się cztery podstawowe grupy tych bakterii: 1) komensale i bakterie symbiotyczne naturalnej mikroflory jelitowej; 2) szczepy będące fakultatywnymi symbiontami; 3) niepatogenne szczepy potencjalnie chorobotwórcze oraz 4) szczepy patogenne wywołujące infekcje i zatrucia pokarmowe [25].

Chorobotwórcze szczepy *E. coli* dzieli się ze względu na strukturę antygenową (serotypy) oraz syntetyzowane czynniki wirulencji, zwane też czynnikami patogenności (patotypy).

Struktura antygenowa *E. coli* jest złożona. Identyfikuje się trzy podstawowe rodzaje antygenów: somatyczne – O (stanowiące część LPS), powierzchniowe/otoczkowe – K oraz rzęskowe – H. Dodatkowo niektóre szczepy *E. coli* wytwarzają antygeny śluzowe – M. Udowodniono istnienie korelacji pomiędzy właściwościami antygenowymi a właściwościami chorobotwórczymi *E. coli*, dzięki czemu na podstawie serotypu można określić stopień zjadliwości danej bakterii [52].

Antygen O jest polisacharydem zbudowanym z wielu powtarzających się sekwencji oligosacharydowych (1-40 jednostek O) i stanowi najbardziej zewnętrzny komponent lipopolisacharydu budującego ścianę komórkową bakterii Gram-ujemnych [50]. Przeciwciałami dla tego antygeny są głównie immunoglobuliny klasy M (IgM). Każdy szczep *E. coli* charakteryzuje się występowaniem jednej określonej formy antygeny somatycznego, która ma za zadanie zapewnić mu przewagę w kolonizowaniu danej niszy środowiskowej [51]. Rodzaj antygeny somatycznego definiuje zatem grupę serologiczną *E. coli*, a ponieważ obecnie wyróżnia się 166 odmian tego antygeny, możliwe jest ulokowanie bakterii w 166 serogrupach [18, 19].

Do tej pory opisano około sto różnych antygeny powierzchniowych. Na podstawie izolacji i chemicznej analizy niektórych K-specyficznych substancji, antygeny te opisano jako rozpuszczalne w wodzie kwaśne polisacharydy [45], a niektóre, jak na przykład antygen fimbrialny K88, zidentyfikowano jako białka [22]. Ze względu na antyfogocytarne właściwości otoczki, antygeny K uważane są za podstawowy czynnik wirulencji *E. coli*. Szczepy wytwarzające otoczkę osłabiają zdolność przeciwciał i składowych dopełniacza do przylegania do powierzchni komórki bakteryjnej, jak również utrudniają komórkom fagocytarnym możliwość jej rozpoznania i pochłonięcia. Najlepiej poznanym antygenem otoczkowym jest antygen K1, będący polimerem kwasu sialowego [61].

Antygeny H zlokalizowane są na rzęskach, czyli występują tylko u ruchliwych form pałeczki okrężnicy. Rzęski zbudowane są z białka – flagelliny, dlatego też białkowe antygeny H stosunkowo łatwo ulegają zniszczeniu w podwyższonej temperaturze i alkoholu. Obecnie wyróżnia się 50 różnych antygeny rzęskowych [50].

W zależności od sposobu interakcji z komórkami gospodarza można wyróżnić 7 różnych patotypów *E. coli*:

- EPEC – enteropatogenne *E. coli*,
- DAEC – przylegające dyfuzyjnie *E. coli*,
- EHEC (VTEC) – enterokrwotoczne (werotoksyczne) *E. coli*,
- EIEC – enteroinwazyjne *E. coli*,
- EAEC (EAggEC) – enteroagregujące *E. coli*,
- AIEC – adherencyjno-inwazyjne *E. coli*,
- ETEC – enterotoksyczne *E. coli*.

U świń najczęściej izoluje się szczepy ETEC, rzadziej EPEC oraz EHEC. Poniżej przedstawiono charakterystykę poszczególnych patotypów oraz mechanizm powstawania biegunek sekrecyjnych.

Enteropatogenne *Escherichia coli* (EPEC)

Pod koniec lat 70. XX wieku na podstawie przeprowadzonych obserwacji opisano, że szczepy należące do niektórych serotypów enteropatogennych przylegają w teście *in vitro* do komórek nabłonkowych linii Hep-2 oraz komórek raka szyjki macicy HeLa w postaci charakterystycznych skupisk [54]. Zjawisko to określono mianem zlokalizowanej adherencji (LA). Pozostałe serotypy EPEC oraz wiele niepatogennych *E. coli* wykazują *in vitro* rozsiany typ adhezji (SA) [37]. Zlokalizowany typ adhezji warunkuje obecność plazmidu EAF (czynnika adherencji *E. coli*), który jest odpowiedzialny za kodowanie fimbrii BFP [14]. Późniejsze badania przeprowadzone *in vivo* potwierdziły obserwacje *in vitro*, ujawniając zależność pomiędzy obecnością czynnika EAF a zdolnością do wywoływania kolibakteriozy [27].

Ponadto wykazano, iż szczepy zawierające plazmid EAF nie tylko tworzą na błonie śluzowej jelita skupiska identyczne z obserwowanymi *in vitro*, ale dodatkowo wywołują w enterocytach zmiany histopatologiczne – przyleganie i zacieranie charaktery-

stycznej struktury kosmków jelitowych [27]. Połączenie bakterii z enterocytem jest skomplikowanym procesem, w którym biorą udział obecne na powierzchni kosmka komórki nabłonka oraz na powierzchni komórki bakteryjnej receptory. W przypadku EPEC za ścisły kontakt *E. coli* z enterocytem odpowiada intimina – bakteryjne białko błony zewnętrznej kodowane przez chromosomalny gen *eae* [24]. Gen ten zlokalizowany jest na tzw. wyspie patogennej LEE, gdzie znajdują się geny umożliwiające kodowanie aparatu sekrecji, który ma na celu wprowadzenie w błonę cytoplazmatyczną komórki nabłonka jelita intyminy [26]. Białko to, po wprowadzeniu do komórki gospodarza staje się swoistym receptorem dla białek Tir, umiejscowionych w bakteryjnej błonie komórkowej [26]. W miejscu adhezji dochodzi do reorganizacji struktury cytoszkieletu komórki nabłonka. Skutkiem powstałych zmian jest deformacja błony cytoplazmatycznej i utworzenie struktury zbliżonej kształtem do piedestału, wewnątrz którego gromadzą się aktyna i inne białka cytoszkieletu. Powstały piedestał stanowi płaszczyznę ułatwiającą przyleganie bakterii do nabłonka jelita i jest przyczyną zaniku mikrokosmków na powierzchni enterocyty, co w konsekwencji prowadzi do zaburzeń transportu elektrolitów [31]. Szczepy EPEC dzieli się na dwie podstawowe grupy obejmujące: klasyczne – zdolne do wywoływania zmian w strukturze kosmków jelitowych i wykazujące zlokalizowany typ adhezji szczepy *Escherichia coli*, oraz nieklasyczne – nie posiadające genu *eae* i wykazujące adhezję typu SA [59]. Rola szczepów SA w etiologii biegunek jest obecnie szeroko dyskutowana. Wielu badaczy uważa za wysoce wątpliwy wpływ bakterii wykazujących rozsiany typ adhezji na wywoływanie biegunki, ponieważ szczepy te równie często izolowane są od zdrowych, jak i chorych osobników. Istnieją jednakże doniesienia wskazujące na ich chorobotwórcze działanie [20, 23].

Przylegające dyfuzyjnie *Escherichia coli* (DAEC)

Niektóre typy enteropatogennych *E. coli*, ze względu na charakterystyczny sposób przylegania do komórek jelita, nazywane są dyfuzyjnie przylegającymi. Zjawisko przylegania, podczas którego bakterie równomiernie pokrywają całą powierzchnię komórek nabłonka jelita nosi miano dyfuzyjnej adherencji (DA) i jest zależne od obecności klastera genów *daa*, odpowiedzialnego za kodowanie fimbrialnej adhezyny F1845 [54]. DAEC zostały podzielone na dwie podgrupy: przejawiające ekspresję adhezyn Afa/Dr (Afa/Dr DAEC) oraz nie przejawiające takiej ekspresji [53]. Warto zauważyć, iż niektóre szczepy DAEC (przejawiające ekspresję genu *aidA*) należy przyporządkować do nowo zdefiniowanej podgrupy szczepów EPEC, nazywanej „atypowymi szczepami EPEC” (aEPEC) [12]. W związku z obecnością szczepów Afa/Dr DAEC obserwuje się u ludzi zakażenia układu moczowego, komplikacje przebiegu ciąży oraz biegunki u dzieci w wieku od 18 miesięcy do 5 lat. Szczepy te mogą również występować jako flora oportunistyczna przewodu pokarmowego dzieci i dorosłych [53].

Enterokrwotoczne *Escherichia coli* (EHEC, VTEC)

Poza EPEC charakterystyczne zmiany histopatologiczne związane z obecnością genu *eae* (przyleganie do kosmków jelitowych i zacieranie ich struktury) wykazują również enterokrwotoczne szczepy [59]. Szczepy tego typu zdolne są do produkcji toksyn (Shiga-like toxins), praktycznie identycznych z produkowanymi przez bakterie *Shigella spp.*, nazywanych zwyczajowo werotoksynami [2]. Większość EHEC charakteryzuje również obecność plazmidu p0157, o podobnym do EAF ciężarze cząsteczkowym, który zawiera geny odpowiedzialne za kodowanie wirulentnych cech bakterii. Plazmid ten koduje między innymi fimbrie odpowiedzialne za adhezję i ekspresję enterohemolizyny – toksyny wywołującej lizę erytrocytów [32, 38]. Wszystkie te cechy powodują, iż EHEC uważane są za rodzaj genetycznej modyfikacji pałeczki czerwonki (od której uzyskały gen odpowiedzialny za syntezę toksyny Shiga-Stx) oraz enteropatogennych szczepów *E. coli* posiadających gen *eae* odpowiedzialny za syntezę intyminy i geny odpowiedzialne za reorganizację cytoszkieletu enterocytów. Szczepy EHEC kolonizują jelito grube,

przylegając do komórek nabłonka (LA), a następnie rozpoczynają wydzielanie werotoksyny, powodującej uszkodzenia enterocytów i naczyń krwionośnych. Prowadzi to do wystąpienia krwawienia wewnątrzjelitowego, zwykle związanego z biegunką [38]. W obrębie EHEC istnieje grupa szczepów wytwarzających werotoksynę, ale nieposiadających genów kodujących intyminę, określaną mianem STEC (Shiga-toksyczne *E. coli*). Głównym czynnikiem wirulencji bakterii STEC są produkowane przez nie toksyny Shiga. Geny kodujące te toksyny (Stx1 i Stx2) zlokalizowane są w genomach bakteriofagów, występujących w bakteriach w postaci profagów. Rodzaj produkowanej toksyny ma znaczący wpływ na kliniczny przebieg zakażenia. Białko Stx1 enterohemolitycznych *Escherichia coli* jest identyczne do toksyny Shiga, pochodzącej ze szczepu *Shigella dysenteriae* I. Natomiast białko Stx2 jest homologiczne z Stx1 w 55% w podjednostce A i w 57% w podjednostce B. Do tego można wyróżnić kilka wariantów toksyny Stx2 różniących się od siebie sekwencją aminokwasową: Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2v i inne. Komórka bakteryjna szczepu EHEC może kodować tylko toksynę Stx1 lub Stx2, może kodować też obie toksyny lub różne warianty białka Stx2 [32, 38].

Do najbardziej patogennych szczepów EHEC zalicza się *E. coli* o serotypie O157:H7 [36]. Szczep ten najczęściej koduje toksynę Stx2, która jest bardziej toksyczna dla komórek nabłonka jelita i nerek oraz częściej powoduje HUS (zespół hemolityczno-mocznicowy) niż toksyna Stx1 [36, 59]. Receptory dla toksyny Shiga (Gb3Cer) znajdują się głównie na powierzchni śródbłonka drobnych naczyń krwionośnych nerek, co czyni te narządy wrażliwymi na działanie toksyny, a skutkiem jej działania jest zaburzenie krążenia nerkowego prowadzące do wystąpienia zespołu hemolityczno-mocznicowego, poprzedzonego krwotocznym zapaleniem jelit i krwawymi biegunkami.

Enteroinwazyjne *Escherichia coli* (EIEC)

Szczepy tego typu pod względem mechanizmów patogenności bardzo przypominają bakterie *Shigella spp.* i wywołują zakażenia klinicznie przypominające czerwonkę bakteryjną. Podobnie jak *Shigella* posiadają wirulentny plazmid pINV, zawierający gen *ipaH*, warunkujący zdolność do wnikania do wnętrza komórek nabłonka jelit (głównie jelita grubego), jak również do przemieszczania się z komórki do komórki [33, 47]. Skutkiem inwazji EIEC są uporczywe czerwonko-podobne biegunki, charakteryzujące się obecnością krwi i śluzu w stolcu.

Enteroagregujące *Escherichia coli* (EAEC)

Bakterie te kolonizują zarówno jelito cienkie, jak i jelito grube. Najważniejszą cechą wirulencji EAEC jest ich zdolność do agregacyjnej adhezji (AA) do nabłonka jelita oraz stymulacji enterocytów do produkcji grubej warstwy śluzu [22]. Właściwości te warunkowane są obecnością genu *aggR* – podstawowego regulatora wirulencji EAEC i aktywatora transkrypcji. Jego rola polega między innymi na regulacji ekspresji genów: *aggA*, *aafa* oraz *agg-3*, odpowiedzialnych za tworzenie agregacyjnie adhezyjnych fimbrii mannozopodobnych (AAF) [8]. Fimbrie te umożliwiają charakterystyczne dla EAEC przyleganie komórki bakteryjnej do komórki nabłonka jelit [15]. Przyłączone komórki bakteryjne agregują tworząc biofilm, składający się z prokariotycznych komórek otoczonych przez macierz wydzielanych przez nie biomoalekuł. Obecność biofilmu na powierzchni enterocytów znacznie upośledza ich zdolność do wchłaniania wody i składników odżywczych, co jest przyczyną powstawania biegunki. W tworzeniu biofilmu istotną rolę odgrywa białko dyspersyna, kodowane przez gen *aap*, będący pod kontrolą *aggR* [56]. Szczepy EAEC posiadają również geny kodujące toksyny: ciepłostabilną enterotoksynę EAST-1, enterotoksynę Pet oraz toksynę ShET1 [9, 62].

Adherencyjno-inwazyjne *Escherichia coli* (AIEC)

Szczepy te łączą cechy wirulencji adherentnych oraz inwazyjnych *E. coli*. Najczęściej opisywane są jako patotyp powiązany z występowaniem choroby Leśniowskiego-Crohna. AIEC charakteryzują się zdolnością do przylegania i wnikania do wnętrza enterocytów, jak również są w stanie, podobnie jak EIEC, prze-

trwać i przeprowadzać proces replikacji wewnątrz komórek makrofagów [13]. Obecnie ten patotyp można zidentyfikować tylko na podstawie cech fenotypowych, gdyż do tej pory nie odkryto genów kodujących cechy wirulencji [40]. Ponadto, ponieważ identyczne szczepy identyfikowano i izolowano z przewodu pokarmowego kotów, psów czy świń, postawiono tezę, iż AIEC są patogenami specyficznymi względem wywoływanej choroby, a nie infekowanego organizmu gospodarza.

Enterotoksyczne *Escherichia coli* (ETEC)

Szczepy te stanowią najczęstszą przyczynę kolibakteriozy u prosiąt. Izolowane z przewodu pokarmowego świń szczepy ETEC produkują pięć rodzajów antygenowych czynników kolonizacji (CFA) zaliczanych do adhezyj fimbrialnych: F4 (dawniej K88), F5 (dawniej K99), F6 (dawniej 987P), F41 i F18 [42, 45, 66]. Enterotoksyny wytwarzane przez ETEC to najczęściej zewnątrzkomórkowe proteiny lub peptydy klasyfikowane do trzech podstawowych grup: termostabilne enterotoksyny typu A, B, 1 (STa, STb, EAST1), termolabilne enterotoksyny (LTh-I, LTp-I, LTIIa, LTIIb) oraz toksyny Shiga typu 2e (Stx2e) [9, 21, 33, 45]. ETEC wytwarzają fimbrie typu I (CFA/I), które są niezbędne w procesie adhezji do enterocytów i kolonizacji jelita cienkiego [44, 64]. Długie cienkie filamenty powierzchniowe fimbrii CFA/I pośredniczą w tworzeniu wiązania ETEC-receptor na powierzchni enterocyta, co nie pozwala na mechaniczne usunięcie tych bakterii z jelita cienkiego, zgodnie z ruchami perystaltycznymi wraz z treścią pokarmową [16]. Następuje wówczas szybkie namnażanie się bakterii oraz wytwarzanie toksyn bakteryjnych. U świń wykazano, że nie u wszystkich osobników występują takie receptory. Te prosięta, które są ich pozbawione są niewrażliwe na zakażenia ETEC z określonymi fimbriami [55]. Enterotoksyny wzmagają sekrecję jonów chloru do światła jelita (LT), hamują sekrecję jonów sodu (LT, STa, EAST-1), a także aktywują zakończenia nerwowe w jelitach (Stb).

Cząsteczki enterotoksyn LT i ST składają się z komponent A i B. Komponenta A wykazuje działanie toksyczne na enterocyty śluzówki jelita, natomiast komponenta B jest białkiem łączącym bez działania toksycznego. W przypadku toksyny LT mechanizm działania opiera się na stymulacji cyklu adenylowej poprzez przyłączony przez enterocyt komponent A. Efektem stymulacji jest wzrost ilości cAMP. Natomiast enterotoksyna ST aktywuje cyklazę guanylową, stymulując powstawanie cGMP. Wzmoczone powstawanie cAMP jak i cGMP stymuluje wzmoczoną sekrecję Cl⁻ w kryptach Lieberkuhna w jelicie oraz hamuje resorpcję NaCl w obszarze kosmków jelitowych. Aniony chloru koncentrują się w świetle jelita, generując przepływ kationów sodowych i wody w tymże kierunku. Częściowe zastąpienie chlorków przez nabłonkowy mechanizm wymiany jonów Cl⁻/HCO₃ powoduje wzrost koncentracji wodorowęglanów w świetle jelita. Gromadzący się w nadmiarze płyn, rozciągając ściany jelit, generuje wzmoczoną perystaltykę. Jeżeli zwrótna zdolność resorpcji jelita grubego dla elektrolitów i wody zostanie przekroczona dochodzi do wystąpienia biegunki sekrecyjnej o charakterze zasadowym [30, 65].

Mechanizm powstawania biegunki sekrecyjnej wywołanej przez *E. coli* składa się zatem z dwóch podstawowych etapów: kolonizacji jelita cienkiego przy udziale CFA oraz hipersekrecji wody i elektrolitów wywołanej działaniem enterotoksyn ST i/lub LT. Enterotoksyczne *Escherichia coli* posiadające adhezyjne fimbrialne K88, wywołujące biegunki wśród nowo narodzonych i wcześniej odsadzonych prosiąt, są przyczyną największej ilości upadków prosiąt rocznie [43]. Wyróżnia się trzy rodzaje adhezyj K88: adhezyjne K88ab oraz K88ac występują głównie w jelicie czczym, zaś K88ad znaleźć można w jelicie krętym [5]. Opisanie powyżej szczepy są zdolne do wytwarzania wszystkich charakterystycznych dla ETEC enterotoksyn: LT, ST, Stx [46, 65].

Enterotoksyczne szczepy posiadające adhezyjne fimbrialne K99 również są częstym czynnikiem etiologicznym biegunek u świń. Wykazano jednak, że szczepy K99 charakteryzują się 4-8-krotnie bardziej ograniczoną adhezją do enterocyta niż K88 [11]. Ponadto, po związaniu się z komórkami nabłonka ETEC K99 są zdolne do wytwarzania jedynie toksyn termostabilnych [34].

Podsumowanie

Biegunki sekrecyjne o podłożu bakteryjnym są uznawane za najczęstszą infekcyjną przyczynę upadków prosiąt [1, 17, 44]. Rozwojowi choroby sprzyja uwarunkowana genetycznie wrażliwość osobnicza, niedojrzałość przewodu pokarmowego, w tym przede wszystkim brak wydzielania dostatecznej ilości enzymów trawiennych oraz wysokie pH soku żołądkowego. Po odsadzeniu od matki te niekorzystne predyspozycje potęgowane są stresem związanym ze zmianą warunków utrzymania (brak mleka lochy, często utrudniony dostęp do paszy, a przede wszystkim przegrupowywanie), a to z kolei sprzyja obniżeniu odporności [60].

W diagnostyce bakteriologicznej u prosiąt ssących, u wyizolowanych bakterii należy potwierdzić występowanie fimbrii F4, F5, F6, F41 oraz toksyn LT bądź ST, a u prosiąt odsadzonych przede wszystkim F18 oraz Stx2e, mogą też występować fimbrie F4 i F5 oraz toksyny LT i ST.

Występowaniu biegunek u prosiąt wywoływanych przez enterotoksyczne szczepy *E. coli* zapobiega się doraźnie poprzez stosowanie antybiotyków i chemioterapeutyków, co odznacza się wysoką skutecznością, ale i potencjalnym zjawiskiem narastania oporności [49]. By ograniczyć straty powodowane przez kolibakteriozę prosiąt oseseków wprowadza się immunizację ciężarnych macior szczepionką parenteralną, zawierającą inaktywowane pałeczki okrężnicy, posiadające antygeny i wytwarzające enterotoksyny. W efekcie uzyskuje się wzrost miana swoistych przeciwciał w sianie i mleku lochy, które tą drogą pobierane są przez oseski. W ten sposób prosięta chronione są przed namnażaniem się chorobotwórczych szczepów *E. coli*, ich oddziaływaniem w świetle jelit i w dalszej konsekwencji przed występowaniem biegunek do końca okresu przebywania z matką [48, 49, 66]. Ze względu na stałą obecność w środowisku patogennych szczepów *E. coli* wskazane jest dalsze uodpornianie prosiąt. Specyfika rozwoju odpowiedzi immunologicznej wymaga, by te zabiegi były przeprowadzane jeszcze na 7-10 dni przed odsadzeniem. Na ten okres proponowane są doustne szczepionki żywe lub podjednostkowe przeciw kolibakteriozie prosiąt. Pobudzają one GALT (gut associated lymphoid tissue), czyli tkankę limfatyczną błon śluzowych przewodu pokarmowego. Stymuluje to miejscową odpowiedź immunologiczną manifestującą się przede wszystkim produkcją sekrecyjnych immunoglobulin SIgA oraz w mniejszej ilości SIgM. Oprócz typowych szczepionek, obiecującą alternatywą wobec stosowania antybiotyków i chemioterapeutyków w walce z biegunką u prosiąt i obniżonym tempem wzrostu jest immunizacja bierna przy użyciu podawanych doustnie przeciwciał pochodzących z surowicy, siary lub żółtka jaj. Szczególnie dużo uwagi poświęca się ostatniemu z wymienionych, żółtko jest bowiem bogatym źródłem immunoglobulin, które w prosty sposób mogą być pozyskane w dużej ilości [60].

Literatura: 1. Amezcuca R., Friendship R.M., Dewey C.E., Gyles C.L., Fairbrother J.M., 2002 – Presentation of postweaning *E. coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved and their antimicrobial resistance patterns. *Can. J. Vet. Res.* 66, 73-78. 2. Beutin L., Geier D., Steinrück H., Zimmermann S., Scheutz F., 1993 – Prevalence and some properties of Verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microb.* 31, 2483-2488. 3. Branche W.C., Young V.M., Robinet C.G., Massey E.D., 1963 – Effect of Colicine Production on *Escherichia coli* in the Normal Human Intestine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 114, 198-201. 4. Boland T., Latour A., Stutzenberger F.J., 2000 – Molecular Basis of Bacterial Adhesion. W: *Handbook of Bacterial Principles, Methods, and Applications* (red. H. Yuehwei, R.J. Friedman). Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 29-24. 5. Bosi P., Casini L., Finamore A., Cremokolini C., Merialdi G., Trevisi P., Nobili F., Mengheri E., 2004 – Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J. Anim. Sci.* 82, 1764-1772. 6. Cai X-Y., Maxon M.E., Redfield B., Glass R., Brot N., Weissbach H., 1989 – Methionine synthesis in *Escherichia coli*: Effect of the MetR protein on metE and metH expression. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86, 4407-4411. 7. Cascales E., Buchanan S.K., Duche D., Kleanthous C., Lloubes R., Postle K., Ri-

ley M., Slatin S., Cavard D., 2007 – Colicin biology. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 71, 158-229. 8. Cennimo D.J., Koo H., Mohamed J.A., Huang D.B., Chiang T., 2007 – Enterotoxigenic *Escherichia coli*: a review of trends, diagnosis, and treatment. *Infect. Med.* 3, 100-110. 9. Choi C., Cho W-S., Chung H-K., Jung T., Kim J., Chae C., 2001 – Prevalence of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene in isolates in weaned pigs with diarrhea and/or edema disease. *Vet. Microbiol.* 81, 65-71. 10. Cleary T.G., 2004 – The role of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 15, 260-265. 11. Cox E., Houvenaghel A., 1993 – Comparison of the in vitro adhesion of K88, K99, F41 and P987 positive *Escherichia coli* to intestinal villi of 4- to 5-week-old pigs. *Vet. Microbiol.* 34, 7-18. 12. Croxen M.A., Law R.J., Scholz R., Keeney K.M., Włodarska M., Finlay B.B., 2013 – Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 822-880. 13. Darfeuille-Michaud A., Boudau J., Bulois P., Neut C., Glasser A.L., Barnich N., Bringer M.A., Swidsinski A., Beaugerie L., Colombel J.F., 2004 – High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127, 412-421. 14. Donnenberg M.S., Giron J.A., Nataro J.P., Kaper J.B., 1992 – A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol. Microb.* 6, 3427-3437. 15. Elias C.F., Lee C.E., Kelly J.F., Aschkenasi C., Ahima R., Couceyro P., Kuhar M., Saper C., Elmquist J., 1998 – Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21, 1375-1385. 16. Evans D.G., Satterwhite T.K., Evans D.J., DuPont H.L., 1978 – Differences in serological responses and excretion patterns of volunteers challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* with and without the colonization factor antigen. *Inf. Imm.* 19, 883-888. 17. Fairbrother J.M., Nadeau É., Gyles C.L., 2005 – *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 17-39. 18. Feng L., Senchenkova S.N., Tao J., Shaskov A.S., Liu B., Shevelev S.D., Reeves P.R., Xu J., Knirel Y.A., Wang L., 2005 – Structural and Genetic Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 O Antigen and Development of an O145 Serogroup-Specific PCR Assay. *J. Bacteriol.* 187, 758-764. 19. Feng L., Wang W., Tao J., Guo H., Krause G., Beutin L., Wang L., 2004 – Identification of *Escherichia coli* O114 O-Antigen Gene Cluster and Development of an O114 Serogroup-Specific PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3799-3804. 20. Forestier C., De Champs C., Vatoux C., Joly B., 2001 – Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol.* 152, 167-173. 21. Francis D. H., 2002 – Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *J. Swine Health Prod.* 10, 171-175. 22. Franklin M.A., Francis D.H., Baker D., Mathew A.G., 1996 – A PCR-based method of detection and differentiation of K88+ adhesive *Escherichia coli*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 460-463. 23. Girón J. A., 1996 – Fimbriae of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Rev. Microbiol.* 27, 72-76. 24. Goosney D.L., Grado de M., Finlay B.B., 1999 – Putting *E. coli* on a pedestal: a unique system to study signal transduction and the actin cytoskeleton. *Trends Cell. Biol.* 9, 11-14. 25. Gritsenko V.A., Bukharin O.V., 2000 – The ecological and medical aspects of the symbiosis between *Escherichia coli* and man. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii* 3, 92-99. 26. Gyles C.L., 2007 – Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 85, 45-62. 27. Hicks S., Frankel G., Kaper J., Dougan G., Phillips A.D., 1998 – Role of intimin and bundle forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to paediatric intestine in vitro. *Inf. Imm.* 66, 1570-1578. 28. Holland I.B., Kenny B., Blight M., 1990 – Haemolysin secretion from *E. coli*. *Biochimie* 72, 131-141. 29. Jarosz D.F., Lindquist S., 2010 – Hsp 90 and environmental stress transform the adaptive value of natural genetic variation. *Science* 330, 1820-1824. 30. Jarosz L., Żmuda A., Kostro K., Lutnicki K., 2010 – Kolibakterioza u macior i tuczniczków. *Weterynaria w Terenie* 2, 8-15. 31. Jarzab A., Górska-Frączek S., Rybka J., Witkowska D., 2011 – Zakażenia pałeczkami jelitowymi – diagnostyka, oporność na antybiotyki i profilaktyka. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 65, 55-72. 32. Karch H., Heesemann J., Laufs R., 1987 – Phage-associated cytotoxin production by and enteroadhesiveness of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from infants with diarrhea in West Germany. *J. Infect. Dis.* 155, 707-710. 33. Khai L.T.L., Vuong P.Q., Kobayashi H., Phan T.T., Loc C.B., Yamasaki S., Taniguchi T., 2002 – Isolation, identification and treatment of piglets diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99, 987P in Cantho Province, Vietnam. The 2002 Annual Workshop of JIRCAS, pp. 210-215. 34. Kim K.S., 2012 – Current concepts on the pathogenesis of *Escherichia coli* meningitis: implica-

tions for therapy and prevention. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 273-278. **35. Lallès J.P., Bosi P., Smidt H., Stokes C.R.**, 2007 – Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc. Nutr. Soc.* 66, 260-268. **36. Law D.**, 2000 – Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J. Appl. Microbiol.* 88, 729-745. **37. Levine M.M.**, 1987 – *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155, 377-389. **38. Łoś J.M., Węgrzyn G.**, 2011 – Enterotoksyczne szczepy *Escherichia coli* (EHEC) i bakteriofagi kodujące toksyny Shiga. *Post. Mikrobiol.* 50, 175-190. **39. Marrie T.J., Fine M.J., Obrosky D., Coley C., Singer D., Kapoor W.**, 1998 – Community-acquired pneumonia due to *Escherichia coli*. *Clin. Microb. Infect.* 12, 717-723. **40. Martínez-Medina A., Roldán A., Pascual J.A.**, 2011 – Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low in put fertilization field condition in melon crops: growth response and *Fusarium wilt* biocontrol. *Appl. Soil. Ecol.* 47, 98-105. **41. Morris J.G.**, 1959 – The Synthesis of Vitamin B6 by some Mutant Strains of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 20, 597-604. **42. Mu X-Q., Savarino S.J., Bullitt E.**, 2008 – The Three-Dimensional Structure of CFA/I Adhesion Pili. *J. Mol. Biol.* 373, 614-620. **43. Nagy B., Fekete P.Z.**, 1999 – Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30, 259-284. **44. Nataro J.P., Kaper J.B.**, 1998 – Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol.* 11, 142-201. **45. Orskov I., Nyman K.**, 1974 – Genetic Mapping of the Antigenic Determinants of Two Polysaccharide K Antigens, K10 and K54 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 43-51. **46. Osek J., Svennerholm A.M.**, 1991 – Determination of K88 antigens and enterotoxins of *Escherichia coli* strains isolated from Polish piglets with diarrhea by the use of enzyme-linked immunosorbent assays. *Microb.* 29, 299-307. **47. Parsot C., Ageron E., Penno C., Mavris M., Jamoussi K., Hauteville H. de, Sansonetti P., Demers B.**, 2005 – A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 56, 1627-1635. **48. Pejsak Z., Truszczyński M.**, 2009 – Tematyka 20. Kongresu IPVS w Durbanie. Część III. Choroby bakteryjne przewodu pokarmowego. *Życie Weterynaryjne* 84, 13-16. **49. Pejsak Z., Truszczyński M.**, 2014 – Szczepionki w zwalczaniu zakaźnych chorób świń. *Weterynaria w Terenie* 2, 12-21. **50. Pupo G.M., Lan R., Reeves P.R., Baverstock P.R.**, 2000 – Population genetics of *Escherichia coli* in a natural population of native Australian rats. *Environ. Microbiol.* 2, 594-610. **51. Rudolph B., Gebendorfer K.M., Buchner J., Winter J.**, 2010 – Evolution of *Escherichia coli* for growth at high Temperatures. *J. Biol. Chem.* 285, 19029-19034. **52. Sa-**

tora P., 2007 – *Escherichia coli* – charakterystyka i wykrywanie w żywności. Część I. *Laboratorium przemysłowe* 11, 20-23. **53. Servin A.L.**, 2005 – Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol.* 18, 264-292. **54. Scaletsky I.C.A., Fabbriotti S.H., Silva S.O.C., Morais M.B., Fagundes-Neto U.**, 2002 – HE-p-2adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, Sao Paulo, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 855-858. **55. Schroyen M., Goddeeris B.M., Stinckens A., Verhelst R., Janssens S., Cox E., Georges M., Niewold T., Buys N.**, 2013 – The effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ab,ac on early-weaned piglets: A gene expression study. *Vet. Immunol. Immunop.* 152, 87-92. **56. Shaikh N., Tarr P.I.**, 2003 – *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J. Bacteriol.* 185, 3596-3605. **57. Shiomi D., Mori H., Niki H.**, 2009 – Genetic mechanism regulating bacterial cell shape and metabolism. *Commun. Integr. Biol.* 3, 219-220. **58. Shulman S.T., Friedmann H.C., Sims R.H.**, 2005 – Theodor Escherich: The first Pediatric Infectious Diseases Physician? *Clin. Infect. Dis.* 45, 1025-1029. **59. Sobieszkańska B.M., Gryko R.**, 2001 – Typy adhezji szczepów *Escherichia coli* izolowanych z przypadków biegunek. *Przegl. Epidemiol.* 55, 287-297. **60. Stefaniak T., Rząsa A., Jawor P., Zyzak A., Niemczuk W., Kuczaj M., Popławski M., Borkowski J.**, 2014 – Field application of egg yolk immunoglobulin as the feed additive in prophylaxis of diseases in weaned piglets. *Med. Weter.* 70, 553-557. **61. Stevens P., Chu C.L., Young L.S.**, 1980 – K-1 Antigen Content and the Presence of an Additional Sialic Acid-Containing Antigen Among Bacteremic K-1 *Escherichia coli*: Correlation with Susceptibility to Opsonophagocytosis. *Inf. Imm.* 29, 1055-1061. **62. Vila J., Vargas M., Henderson I.R., Gascon J., Nataro J.P.**, 2000 – Enteroggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler's diarrhea strains. *J. Infect. Dis.* 182, 1780-1783. **63. Yusoff I.F., Barkun J.S., Barkun A.N.**, 2003 – Diagnosis and management of cholecystitis and cholangitis. *Clin. North Am.* 32, 1145-1168. **64. Weiner M., Dacko J., Osek J.**, 2004 – Correlation between the presence of F4, F5, F6, F17, F18, F41 fimbriae and the toxicity profile in *Escherichia coli* strains isolated from piglets with diarrhea. *Med. Weter.* 60, 1342-1346. **65. Wilson R.A., Francis D.H.**, 1986 – Fimbriae and enterotoxins associated with *E. coli* serogroups isolated from clinical cases of porcine colibacillosis. *Am. J. Vet. Res.* 47, 213-217. **66. Zhang W., Berberov E.M., Freiling J., He D., Moxley R.A., Francis D.**, 2006 – Significance of Heat-Stable and Heat-Labile Enterotoxins in Porcine Colibacillosis in an Additive Model for Pathogenicity Studies. *Inf. Imm.* 74, 3107-3114.

Problem osteochondrozy u koni – definicje i znaczenie hodowlane

Dorota Lewczuk¹, Andrzej Berezowski²

¹Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębku

²Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Selekcja koni osiąga limity w wielu aspektach fizjologicznych, a sportowy potencjał koni często nie może być uzewnętrzniony z powodu barier zdrowotnych. Przykładem choroby o takim wpływie na użyteczność koni jest osteochondroza, nazywana także martwicą chrzęstno-kostną. Obecnie populacje koni sportowych obciążone są tą chorobą w około 30% [4]. Dlatego też jest to jeden z bardziej istotnych problemów w selekcji koni sportowych. W wielu wiodących związkach sportowych selekcja w kierunku zwalczania osteochondrozy wydaje się jednak być niewystarczająca, ponieważ po 30 już latach jej stosowa-

nia nie odnotowuje się spadku liczby koni chorych. Istnieje wiele strategii hodowlanych mających na celu eliminację osteochondrozy z populacji, niezbędne jest jednak stworzenie klarownej definicji tej choroby.

Termin osteochondroza został wprowadzony po raz pierwszy w medycynie ludzkiej i oznaczał obecność luźnych fragmentów kostno-chrzęstnych w jamach stawowych. Zostały zdiagnozowane trzy różne stadia choroby: ostre – klasyfikowane jako ciężki uraz, przewlekłe – mogące prowadzić do złamań zmęczeniowych oraz trzecie – przebiegające bez widocznych uszkodzeń, ale będące zaburzeniem w kostnieniu śródchrzęstnym [15]. Według van Weerena [14] w medycynie weterynaryjnej tylko ostatnia kategoria jest traktowana jako problem wewnętrzchrzęstnego kostnienia i tylko ta kategoria nazywana jest osteochondrozą. Pozostałe formy są klasyfikowane jako złamania brzeżne lub pęknięcia kości. W angielskiej definicji choroby słowo „osteochondritis” – zapalenie kostno-chrzęstne, zostało zmienione na „osteochondrosis” – osteochondrozę, martwicę kostno-chrzęstną, gdyż stwierdzono, że proces zapalny nie jest konsekwencją pierwotnego uszkodzenia. Część naukowców zgadza się także, że dyschondroplazja wykazuje wiele podobieństw do osteochondrozy u ssaków, co może powodować także wiele nieporozumień [14]. Niektórzy autorzy sugerują, że osteochondroza może rozpocząć się jako ogólne