



Автори: Д.М. Масюк, П.М. Гаврилін, Н.Ю. Неверковець, К.С. Трощій
НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК ДДАЕУ

Діагностика колібактеріозу поросят з використанням сучасних та класичних лабораторних методів

Е*scherichia coli* – найбільш розповсюджений збудник бактеріальних ентеритів поросят у підсисному періоді, що обумовлено особливостями становлення кишкової мікрофлори у новонароджених тварин: в період від народження до 2-3 тижневого віку, кількість ешерихій в кишковому каналі сягає 50% і більше. В той час, як більшість бактерій цієї групи є непатогенними, деякі з

них мають гени, що надають ешерихіям вірулентності та, відповідно, здатності викликати характерні ураження кишечнику поросят: геморагічний ентероколіт і, як наслідок, діарею.

Відомо, що патогенність *Escherichia coli* визначається певними генами, які кодують адгезини і токсини, що, як правило, організовані у великі блоки в хромосомах, плазмідах та фагах, і часто передаються горизонтально

(тобто, від одних штамів ешерихій іншим). Патогенні штами кишкової палички викликають значні втрати підсисних поросят, загибель яких може сягати 90%. За останні роки, наукові відомості про генетику та фактори вірулентності зазначених бактерій значно поглибились та розкривають чисельні механізми патогенезу, що викликають різні види кишкових паличок. Патогенні штами *Escherichia coli*,

що виділяються з кишечника загиблих поросят, розподіляються на основні категорії: ентеротоксигенні, ентеропатогенні, ентерогеморагічні та некротоксигенні. Дві інші групи ешерихій, ентероінвазивні та ентероагрегуючі, у тварин не реєструються.

Ентеротоксигенні штами кишкових паличок є основною причиною загибелі та вибракування молодняку сільськогосподарських тварин. Характерним для цієї групи є продукція цитотоксичного токсину, внаслідок дії якого виникає гостра водяниста діарея новонароджених і відлучених поросят та телят. У ентеротоксигенних кишкових паличок виділяють два основні фактори вірулентності: токсини і адгезини. Ентеротоксини – це позаклітинні білки або пептиди двох типів: термолабільні (TL) та термостабільні (TS). Фімбріальні адгезини (бахромка) – крупні агрегати білкових субодиниць, розташовані нитями, призначені для зв'язування бактерій з ентероцитами. У ентеротоксигенних ешерихій розрізняють фімбріальні адгезини K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F17, F18, F41, F42 і F165. Саме термолабільні токсини та фімбріальні адгезини володіють вираженою імуногеною властивістю, легко ініціюють продукцію специфічних антитіл. Дану властивість LT-токсинів та F-антигенів використовують при виробництві сучасних вакцин проти колібактеріозу провідні компанії світу.

Ентеропатогенні кишкові палички відрізняються відсутністю продукції токсинів та майже не проникають в слизову кишечника. Головна їх особливість полягає в ураженні та реорганізації структури ентероцитів, в тому числі, руйнуванні щіткової облямівки і формуванні п'єдестал-структур, на верхівці яких бактерії залишаються в тісному контакті з ентероцитами. Ентеропатогенні кишкові палички, на відміну від ентеротоксигенних, уражують здебільшого поросят після відлучення та викликають клінічні ознаки іншого характеру: тварини відстають в рості, чахлі, діарея слизова та часто хронічна.

Ентерогеморагічні штами кишкових паличок виробляють дуже сильні шигатоксини (Stx1 і Stx2) та веротоксини (VT). Штами, що продукують шигатоксин, викликають діарею телят та набрякову хворобу поросят. Ця група

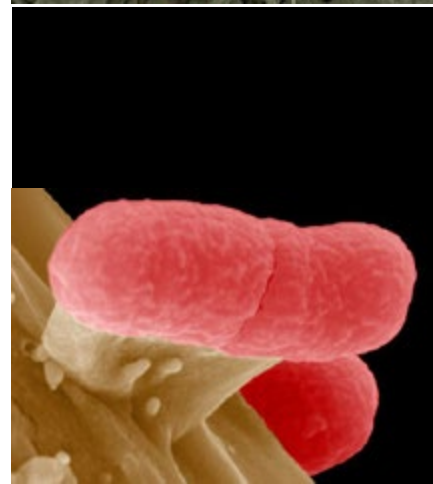
кишкових паличок викликає ряд захворювань у людей, в тому числі, з летальним кінцем. Більшість харчових токсикоінфекцій у людей спричинена серогрупами *Escherichia coli* O157: H7, O157: H-, O26, O103, O111, O113 та O145. У поросят відлученого віку бактерії викликають ентеротоксемію, набряк підшкірної клітковини, мезентеріальних лімфовузлів та головного мозку і, відповідно, нервові явища. Набряк є наслідком дії токсинів на ендотеліальні клітини кровоносних судин в різних органах.

Некротоксигенні штами кишкової палички продукують токсини, що називається цитотоксичним некротизуючим фактором CNF типу 1 і 2. Про патогенез коліінфекції, викликаній цими штамами відомо мало, але клінічні ізоляти від людей та тварин викликають некротичні явища в кишечнику та летальний ефект.

Таким чином, серед чисельних типів кишкових паличок, основне значення в свинарстві мають ентеротоксигенні штами, що викликають неонатальні діареї, та ентерогеморагічні – збудники набрякової хвороби [1].

Останнім часом все більшого значення у виникненні та розвитку неонатальних діарей відіграє умовно-патогенна мікрофлора. Основними чинниками, що призводять до розвитку секундарної колібактеріозної інфекції є такі, що в першу чергу впливають на стан та опірну функцію слизової оболонки кишечника та імуносупресуючі фактори: заразні (цирковірус, ротавірус, кокцидіоз та ін.), незаразні (нестача вітаміну А, низький рівень глобулінів), мікотоксини (ДОН і афлатоксин).

Таким чином, в свинарстві спостерігається збільшення числа випадків діареї у новонароджених поросят, у яких на фоні позначених інфекційних та/або кормових чинників відбувається приєднання умовно-патогенних кишкових паличок. Багато дослідників реєструють в господарствах у поросят 3-7 доби життя діарею невідомої етіології: лабораторними дослідженнями була виключена низка збудників (ентеротоксигенні *E. coli*, *Cl. perfringens*, *Cl. difficile*, ротавіруси, корона віруси, *Cryptosporidium*, *Giardia spp.*, *Cystoisospora* і *Strongyloides ransomi*). Хворі тварини погано реагували на антибіотикотерапію. Бактеріологічні



дослідження патологічних матеріалів (паренхіматозних органів та вмісту кишечнику), показали, що у переважній більшості хворих поросят серед кишкової мікрофлори домінували умовно-патогенні *E. coli*. Крім того, у поросят спостерігали адгезію кишкової палички до поверхні епітелію товстої кишки та відмічено суттєву позитивну кореляцію між прикріпленням цих бактерій та діареєю.

Встановлено, що більша кількість *E. coli* були виявлені у поросят, в яких спостерігалась діарея, порівняно з недіарейними тваринами. На думку авторів, це пов'язано зі зростанням кількості і колонізацією поверхні слизової оболонки *E. coli*. Оскільки поросят, включених до цього дослідження, вважали вільними від інфікування загальновідомими збудниками, на цьому етапі дослідження встановлено, що переростання та колонізація слизової оболонки *E. coli* було первинною подією в патогенезі атрофії ворсинок, або було вторинним до зараження іншими, але не ідентифікованими мікроорганізмами чи незаразними чинниками, які викликають зміну кишкових ворсинок [3].

Отже, умовно-патогенні штами *Escherichia coli* дійсно здатні викликати розвиток ентеритів з подальшою діареєю за рахунок індукованої атрофії епітеліальних ворсинок кишечника.

Як було згадано вище, діареї поросят, асоційовані з умовно-патогенними штамами кишкових паличок, погано корегуються антибактеріальними препаратами. Таке явище пояснюється наявністю мультирезистентності у більшості мікроорганізмів, що виділені в результаті бактеріологічних досліджень матеріалів від хворих поросят. Так, частіше за все, ізоляти *Escherichia coli* були резистентні до амоксициліну, тетрациклінів та до триметоприму.

Як правило, мультирезистентність у ентеробактерій пов'язана з зовнішньохромосомним фактором – R-плазмідами, які несуть в собі відразу декілька генів, відповідальних за резистентність до кількох антибіотиків. Бактеріальна клітина може мати декілька різних R-плазмід, що й обумовлює виникнення полірезистентних штамів. R-плазміді можуть передаватися від однієї бактерії до іншої за допомогою кон'югації або трансдукції. Така передача можлива не тільки всередині

одного виду, але й між видами ентеробактерій. Таким чином, при поширенні коліінфекції, викликаної умовно-патогенними видами *E. coli* є небезпека розповсюдження мультирезистентних штамів.

Діагностика

Клінічні ознаки у поросят, інфікованих ентеротоксигенними штамами *E. coli*, варіюють від незначних уражень, пов'язаних зі зневодненням та водянистою діареєю до інтенсивного ураження кишечнику (геморагічного ентероколіту) з високою летальністю. При гістологічному дослідженні тонкого відділу кишечнику виявляються бацили, розташовані дифузно або багаточисельно на поверхні ворсинок.

Бактеріологічне дослідження – основний метод діагностики колібактеріозу поросят, що є доступним та інформативним водночас. Метод полягає в ізоляції штамів *E. coli* з тканин від інфікованих тварин та послідовним аналізом біологічних властивостей культур: біохімічні показники, антигенний склад, наявність гемолізину і визначення чутливості до антибіотиків. Визначення гемолітичних властивостей кишкових паличок є основоположним фактом при постановці діагнозу на набрякову хворобу поросят.

Підтвердження того, що ізоляти кишкової палички є патогенними, може бути проведено фенотиповими або генотиповими аналізами. Фенотиповий аналіз спрямований на виявлення фімбріальних адгезинів, за допомогою прямого ELISA або опосередкованого імунофлуоресцентного аналізу.

Сучасні тест-системи для ІФА не потребують попереднього культивування збудника з патологічного матеріалу, тобто діагностика може бути проведена як напряму з інфікованих тканин (вмістимого кишечнику, фекалій), так і безпосередньо з культурами ешерихій, що виділені при бактеріологічному дослідженні. Можливість визначення фімбрій у кишкових паличок безпосередньо з біоматеріалів є дуже важливою за лабораторної діагностики ентеротоксигенних штамів, оскільки при культивуванні *in vitro* можлива експресія генів, яка проявляється відсутністю тих чи інших адгезинів (особливо 987P і F18). Тобто,

феномен експресії може призвести до хибних даних.

Генотиповий аналіз – мультиплексний ПЛР – тест дає можливість ідентифікувати у *Escherichia coli* як фімбріальні адгезини, так і токсини LT, STa, STb и Stx2e. Дослідження зразків інфікованих матеріалів методом ПЛР усуває складнощі, пов'язані з експресією генів в лабораторних умовах і складних аналізів для ідентифікації ентеротоксинів. Однак, і для мультиплексного ПЛР-тесту є деякі факти, що можуть призвести до хибної інтерпретації результатів. Наявність гену або фрагменту гену на агарозному гелі не обов'язково свідчить про експресію гену як вірулентного фактору.

Отже, в сьогоденні лабораторної діагностики захворювань поросят, які викликані різноманітними типами кишкових паличок, доступний широкий арсенал методів. Так, окрім класичного виділення мікроорганізмів бактеріологічним методом з подальшою оцінкою резистентності к антибіотикам, можливе визначення основних факторів вірулентності *Escherichia coli* (фімбріальних адгезинів та токсинів) за допомогою ІФА чи ПЛР-тестів. Так як позначені фактори вірулентності *Escherichia coli* використовуються при конструюванні вакцин проти колібактеріозу поросят провідними компаніями світу, за відсутності чи виявленні їх в інфікованому матеріалі можна зробити висновки щодо ефективності вакцинації в господарстві [2].

Перелік літератури:

1. DedRoy C., Maddox C. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Journal of Anim Health Res Rev*, 2001 Dec; 2 (2): 129-40.
2. Francis DH. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *J Swine Health Prod*. 2002;10(4):171-175
3. Jonach, B. R., Jensen, T. K., & Boye, M. (2014). New Neonatal Porcine Diarrhea Syndrome in Denmark Characterization of the intestinal lesions and identification of the etiology. / Jonach, Kgs. Lyngby : Technical University of Denmark, 2014. 162 p.