

**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Belgyógyászati Tanszék és Klinika**

Az enteropatogén *Escherichia coli* előfordulása kutyák hasmenéssel járó bélbetegségeiben

Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in gastrointestinal diseases of dogs with diarrhea

Gergely Orsolya Boglárka

Témavezetők: Dr. Pápa Kinga, egyetemi adjunktus

Belgyógyászati Tanszék és Klinika

Dr. Adorján András, egyetemi tanársegéd

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

2022



## **Absztrakt**

Kutatásunk során az enteropatogén *E. coli* (EPEC) jelenlétét és szerepét tanulmányoztuk kutyák hasmenéssel járó gastrointestinalis betegségeiben. Összesen 54 kutyából vettünk 55 bélsármintát végbélbe helyezett tampon segítségével. Ezekből 27 *E. coli* törzset tudtunk izolálni baktériumtenyésztés során. Az egyes csoportok elkülönítéséhez PCR-eljárást alkalmaztunk, emellett korongdiffúziós módszerrel antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat végeztünk a kitenyésztett törzsekre. A 27 *E. coli* törzsből 4 bizonyult atipikus enteropatogén *E. coli* (aEPEC) pozitívnak, és a törzsek mindegyikét multirezisztensnek minősítettük. A kapott eredményeket összevetettük az előzetes terápiával, társbetegségekkel, valamint a bélsárvizsgálatokkal. Tudomásunk szerint elsőként izoláltunk hasmenéses kutyákból aEPEC törzset Magyarországon. Vizsgálataink alapján felmerül az aEPEC kóroki szerepe gastrointestinalis megbetegedésekben, azonban ennek igazolásához további, nagyobb esetszámot magába foglaló vizsgálatra van szükség.

## **Abstract**

During our research we overviewed the prevalence of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains in companion animals in Hungary. We also tried to get some relevant information about the role of aEPEC in dogs with diarrhea. We collected 55 rectal swab samples from 54 dogs with intestinal diseases accompanied by diarrhea. We could isolate 27 *E. coli* strains by bacteriological examinations. We differentiated the pathotypes by PCR technique and we assessed the antibiotic resistance using disk diffusion method. From the 27 *E. coli* strains 4 proved to be atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC) and all the strains were considered multiresistant. We compared the results with previous therapy, diseases and fecal examinations. To our best knowledge this is the first study to detect aEPEC strains from dogs with diarrhea in Hungary. Further studies are warranted with higher number of cases to clarify the pathogenic role of aEPEC in dogs with gastrointestinal diseases.

## Tartalom

|   |    |
|---|----|
| 1. Rövidítések jegyzéke .....                       | 5  |
| 2. Bevezetés.....                                   | 6  |
| 2.1 Célkitűzések .....                              | 7  |
| 3. Szakirodalmi áttekintés .....                    | 8  |
| 3.1 Enteropatogén <i>E. coli</i> előfordulása ..... | 8  |
| 3.2 A/E adhézió .....                               | 9  |
| 3.3 A tipikus és atipikus <i>E. coli</i> .....      | 11 |
| 3.3.1 A tipikus <i>E. coli</i> .....                | 11 |
| 3.3.2 Az atipikus <i>E. coli</i> .....              | 12 |
| 4. Anyag és módszer .....                           | 14 |
| 4.1 Betegcsoport.....                               | 14 |
| 4.2 Mintavétel .....                                | 14 |
| 4.3 Bakteriológiai vizsgálat.....                   | 14 |
| 4.4 Molekuláris genetikai vizsgálat.....            | 15 |
| 4.4.1 Polimeráz láncreakció (PCR) ismertetése ..... | 15 |
| 4.4.2 Templát készítés.....                         | 16 |
| 4.4.3 PCR reakció menete.....                       | 16 |
| 4.4.4 Gélelektroforézis .....                       | 17 |
| 4.5 Antibiotikum érzékenység vizsgálata .....       | 19 |
| 5. Eredmények.....                                  | 20 |
| 5.1 Bakteriológia vizsgálatok.....                  | 20 |
| 5.2 Molekuláris genetikai vizsgálatok.....          | 20 |
| 5.3 Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok .....     | 20 |
| 5.4 Betegcsoport.....                               | 24 |
| 5.4.1 Az aEPEC pozitív esetek .....                 | 25 |
| 6. Következtetések .....                            | 28 |
| 7. Összefoglalás.....                               | 33 |
| 8. Irodalom .....                                   | 34 |
| 9. Köszönetnyilvánítás .....                        | 39 |

## 1. Rövidítések jegyzéke

*E. coli* – *Escherichia coli*

EPEC – enteropatogén *E. coli*

PCR – polimeráz-lánreakció (polymerase-chain-reaction)

ExPEC – extraintestinalis *E. coli* (extraintestinal pathogenic *E. coli*)

DEC – intestinalis *E. coli* (diarrheagenic *E. coli*)

MNEC – meningitis-asszociált *E. coli*

UPEC – uropatogén *E. coli*

APEC – madár patogén *E. coli*

ETEC – enterotoxikus *E. coli*

STEC – Shiga-toxin termelő *E. coli*

EHEC – enterohaemorrhagiás *E. coli*

EIEC – enteroinvazív *E. coli*

EAEC – enteroaggregatív *E. coli*

DAEC – diffúzan tapadó *E. coli*

AIEC – tapadó-invazív *E. coli*

A/E adhézió – Attaching and Effacing adhesion

LEE – patogenitási sziget (Locus of enterocyte effacement)

kDa – kilodalton

Tir – áttelepített intimin receptor (translocated intimin receptor)

tEPEC – tipikus enteropatogén *E. coli*

aEPEC – atipikus enteropatogén *E. coli*

EAF – EPEC adhéziós faktor (EPEC adherence factor)

BFP – köteg képző pilus (bundle-forming pilus)

LA – helyi adherencia (localized adherence)

LAL – helyi adherencia-szerű (localized adherence like)

Esp – EPEC szekretált fehérje (EPEC-secreted protein)

*eae* gén – intimint kódoló génszakasz (attaching and effacing gene)

*stx* – Shiga-toxin

AMR – antimikrobiális rezisztencia (antimicrobial resistance)

MDR – multidrog-rezisztencia (multidrug resistance)

ESBL – extended-spectrum  $\beta$ -lactamase

BCS – kondíció pontozás (body condition score)

## 2. Bevezetés

Az *Escherichia coli* egy igen széles körben elterjedt baktériumfaj, mely megtalálható mind a környezetben, mind az élőlényekben, többnyire emlősök szervezetében. A Gram-negatív, pálcá alakú mikroorganizmus a tápcsatorna alsó szakaszának kommenzalista lakója, a normál bélflóra egyik tagja. Előfordulnak azonban olyan törzsei is, melyek képesek megbetegedéseket okozni az élőlényekben a tápcsatornán belül és kívül egyaránt. Emberi megbetegedések kapcsán egyes típusok a fejlődő országokban a hasmenéses járványokért tehetősek felelőssé, míg más csoportjai megtalálhatóak a fejlett térségekben is. Állatokban főleg a fiatal, szopós egyedek betegednek meg a kórokozó *E. coli* törzsektől, azonban tápcsatornán kívül egyes *E. coli* törzsek képesek szepszist, húgyúti fertőzéseket, teheneknél tüdőgyulladást, sertésben méhgyulladást, baromfiban légúti megbetegedéseket létrehozni.

Az *E. coli* nemcsak elterjedését tekintve változatos, de jelentős eltérések figyelhetők meg a fajon belül is. Az egyes baktériumok eltérő antigén szerkezetekkel, virulencia faktorokkal rendelkeznek, melyeknek köszönhetően különböző patogenitású csoportokat különböztetünk meg a fajon belül. Ezek alapján különböző patotípusokba lehet az *E. coli* törzseket besorolni.

Jelen kutatás az enteropatogén *E. coli* előfordulásával foglalkozik, mely bélhámsejt károsító hatásával képes hasmenést okozni. Ezen törzsek megjelenése az élelmiszertermelő állatokban bizonyított, azonban társállatainkról ez idáig még hiányosak az ismereteink, nem található utalás ezek elterjedtségére hazánkban. Az EPEC törzsek lehetséges zoonotikus tulajdonsága, valamint a tény, hogy kedvenceink napjainkban szoros közelségben élnek velünk, indokolja ezen törzsek előfordulásának részletesebb vizsgálatát kutyákban. A hasmenéses állatok nem elhanyagolható forrásai lehetnek a környezet bakteriális kontaminációjának, ami akár megbetegedéseket alakíthat ki az emberek esetében is. Ebben nagy szerepet játszik az EPEC törzsek atipikus formája, mivel ebbe az alcsoportba tartozó törzseknek a terjesztői lehetnek az emberek és az állatok egyaránt, amellett, hogy mindkét csoportban megbetegedéseket is okozhatnak. Ugyancsak fontos információkat szereznünk ezen kórokozók antibiotikum érzékenységéről is, specifikusan az enteropatogén *E. coli* (EPEC) törzsek által okozott rezisztenciával, valamint annak mértékével kapcsolatosan.

## 2.1. Célkitűzések

Kutatásunk során a társállatainknál előforduló EPEC törzsek előfordulását vizsgáltuk, különös tekintettel annak atipikus formájára. Emellett igen fontos szerepet kapott az EPEC törzsek előfordulása és a klinikum közötti összefüggések feltérképezése is. Az esetlegesen izolált *E. coli* törzsek esetében fontosnak tartottuk az antibiotikum rezisztenciájukat is meghatározni, ami hasznos összefüggéseket tárhat fel a klinikummal kapcsolatban, valamint a patogén törzsek közé besorolható *E. coli* törzsek esetében hiánypótló adatokhoz juthatunk. A rezisztenciát több kutatás is vizsgálta hasmenéses kutyákból izolált *E. coli* baktériumra nézve, azonban specifikusan EPEC törzsekre eddig kevés felmérés történt.

### 3. Szakirodalmi áttekintés

Az *Escherichia coli* az Enterobacteriaceae családba tartozó Gram-negatív baktérium. Morfológiáját tekintve néhány mikrométeres nagyságú, pálcika alakú, valamint csillóval rendelkezik, így képes az aktív mozgásra is. Rendkívül széles körben előfordul, megtalálható a környezetben, főleg emlősökben, így az emberben is. Kommenzalista törzsei a vastagbélben részt vesznek a természetes bélflóra kialakításában és hozzájárulnak a mikrobióta egyensúlyának fenntartásához. A kommenzalista törzsek igen ritkán okoznak megbetegedést, a bélcsatorna ártalmatlan lakóinak tekintjük őket [1].

Előfordulnak azonban olyan fakultatív, továbbá obligát patogén *E. coli* törzsek is, melyek az eltérő virulencia faktoroknak köszönhetően képesek számos betegséget okozni a gazdaszervezetben. Ezeket a törzseket két csoportba soroljuk a fertőzés helye szerint: extraintestinalis (ExPEC, extraintestinal pathogenic *E. coli*), azaz a tápcsatornán kívüli, valamint intestinalis (DEC, diarrheagenic *E. coli*), azaz a tápcsatornán belül tüneteket okozó *E. coli* baktériumok. Az ExPEC-be tartozó fajok további három kategóriába sorolhatók: szepszist/meningitist okozó meningitis-asszociált *E. coli* (MNEC), húgyúti fertőzés okozó uropatogén *E. coli* (UPEC), valamint a madár patogén *E. coli* (APEC) [1].

A DEC kategórián belül szintén további csoportokat különböztetünk meg: enteropatogén *E. coli* (EPEC), enterotoxikus *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin termelő *E. coli* (STEC) [beleértve az enterohaemorrhagiás *E. coli*-t (EHEC)], enteroinvazív *E. coli* (EIEC), enteroaggregatív *E. coli* (EAEC), diffúzan tapadó *E. coli* (DAEC), valamint a tapadó-invazív *E. coli* (AIEC) [1].

#### 3.1 Enteropatogén *E. coli* előfordulása

Az intestinalisan fertőző *E. coli* törzsek között az enteropatogén *E. coli* (továbbiakban EPEC) fontos szerepet kap. Számos adatgyűjtésnek köszönhetően kijelenthetjük, hogy habár a csecsemők életének első óráiban megtelepedő baktérium az egészséges bélflóra kialakításáért felelős, mégis egyes törzsei képesek emésztőszervi megbetegedést okozni. Az 1975 óta dokumentált esetek kimutatták, hogy az EPEC lehet az egyik fő kiváltója a járványszerűen előforduló hasmenéses megbetegedéseknek, melyek főleg a fejlődő országok csecsemőit sújtják. Még napjainkban is igen komoly problémát jelent az előfordulásuk, nemcsak az elmaradottabb térségekben [2,3]. Az EPEC törzsek a tünetek lefutása szerint akut hasmenést okoznak, de jelentettek már két hétnél tovább tartó enterális



betegséget is, többnyire egyéb kórokozóval (adeno-, rotavírus, Campylobacter, Salmonella) együtt előfordulva [4].

1944-ben Kauffman kidolgozott egy rendszert, mely ma is alapját képezi az *E. coli* szerotipizálásának. E szerint a baktérium sejt falán lévő ('O'), és csilló ('H') antigének kombinációja lehetővé teszi a különböző törzsek megkülönböztetését. Ez igen nagy jelentőséggel bír, ugyanis az egyes megbetegedések különböző kórformáit eltérő szerotípusba tartozó törzsek fogják létrehozni. Ma már szélesebb körű ismeretekkel rendelkezünk az adott témát illetően, mely lehetővé teszi a pontosabb, teljesebb diagnosztikát is. Így a hagyományos szerotipizálás mellett az újabb PCR technikának köszönhetően el tudjuk különíteni az egyes patotípusokat az eltérő virulencia faktoraiknak megfelelően [5].

### 3.2 A/E adhézió

Az EPEC megbetegedés patofiziológiája az úgynevezett „attaching and effacing” (A/E) adhéziónak köszönhető, mely során a baktérium szorosán megtapad a bélnyálkahártyán, és azt károsítja. Így csökken a bélben az abszorpciós felület, következményes felszívódási zavar keletkezik. Az ozmotikus viszonyok megváltozásának következményeként hasmenés alakul ki, az elpusztított bélhámsejtek csúcsán pedig egy talapzat keletkezik a baktériumok számára [6,7]. A megtapadás bizonyos lépéseknek köszönhetően valósul meg. Az EPEC törzsek pontos patomechanizmusát Moon és mtsai. állapították meg és írták le egy három lépcsős modellel (1. ábra). Ez alapján az EPEC törzsek megtapadása a bélhámsejteken három lépésben valósul meg: 1. helyi megtapadás (localized adherence), 2. jelátvitel (signal transduction), 3. tartós megtapadás (intimate adherence) [6,8].

Az A/E képesség kifejeződése egy patogenitás szigeten van kódolva (LEE, Locus of enterocyte effacement), mellyel az összes EPEC és valamennyi EHEC törzs rendelkezik, (így a két csoport pontosabb megkülönböztetése további vizsgálatokat is igényel), azonban az egészséges bélflórában lévő *E. coli* baktériumok mentesek ettől. A LEE szigeten számos, az adhéziónak szükséges fehérje kódolódik. Az egyik az intimin nevű fehérje, aminek nagy jelentőség van az enteropatogén *E. coli* elkülönítésében és laboratóriumi diagnosztikájában. Ennek a 94 kDa nagyságú fehérjének a segítségével fog ugyanis megvalósulni a baktérium epithel sejthez való állandósult tapadása. Emellett ugyancsak a LEE szigeten kódolódik a

patomechanizmusban lényeges szerepet játszó III-as típusú szekréciós rendszer, valamint a Tir (translocated intimin receptor) fehérje is [5, 9].

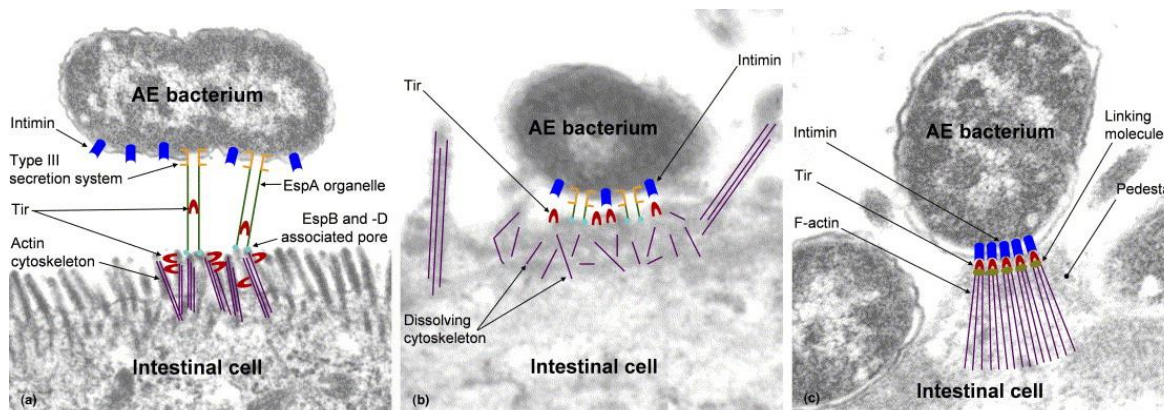
A három lépcsős modell kidolgozása jelentős mértékben bővítette ismereteinket az EPEC törzsek patogenezisét tekintve. Így ezen törzseket az eltérő virulencia faktorjaiknak megfelelően két további nagy csoportra tudjuk osztani: tipikus EPEC (tEPEC) és atipikus EPEC (aEPEC) törzsekre. A fő különbség a két csoport között az első lépcső, azaz a helyi megtapadás során kialakított kapcsolódási formában nyilvánul meg. A tipikus enteropatogén *E. coli* törzsek rendelkeznek egy plazmiddal (EAF, EPEC adherence factor), melyen a *bfp* gén is megtalálható, amely a IV-es típusú pilust (BFP, bundle-forming pilus) kódolja. Ezen BFP pilus segítségével valósul meg a tEPEC törzsek esetében a helyi megtapadás [10].

Először Giron és mtsai. írták le a jelenséget, mely során bizonyos baktérium törzsek nyúlványokat (fimbriákat) képeztek, majd összeálltak egy köteggé (pilussá). Ez a kapcsolat tette lehetővé a baktériumok egymás közötti megtapadását, illetve a baktériumnak a bélhámsejt epitheljéhez való rögzülését [11]. Az így kialakult jellegzetes sejtfelszíni minta (LA, localized adherence) jellemző a tEPEC törzsekre. Az atipikus EPEC ellenben nem rendelkezik BFP pilussal és azt kódoló gént hordozó EAF plazmiddal, ezért a sejtek közötti kapcsolat létrehozása más adhezinekkal történik, így a kialakult sejtfelszíni mintázat eltérő a tipikus formától (LAL, localized adherence like) [5,12].

A modell második és harmadik lépésének a létrejöttében nagy szerepe van a LEE patogenitási szigetnek. Az EPEC törzsek képesek bizonyos fehérjék (Esp, EPEC-secreted protein) kiválasztására a III-as típusú szekréciós rendszer segítségével. Legalább négy ilyen fehérje kódolódik a LEE-szigeten, s ezekből három (EspA, EspB, EspD) nélkülözhetetlen az A/E mechanizmusához. A folyamat során az Esp fehérjék segédkeznek egy transzlokációs komplex rendszer létrehozásában, mely segíteni fogja bizonyos effektor molekulák sejtbe juttatását. Az így belépett anyagok károsítják a sejtet, roncsolják a citoskeletális vázat [13,14]. Az ugyancsak LEE-szigeten kódolt Tir (áttelepített intimin receptor, translocated intimin receptor) ennek a roncsolásnak köszönhetően tud beágyazódni a fogadó bélhámsejt plazmamembránjába, lehetővé téve az intimin számára a megtapadást. A baktériumsejt így előállítja nemcsak a saját maga rögzítéséhez szükséges fehérjét, de ugyanakkor a fogadó sejt számára is a receptort [5,15].

Az intimint az *E. coli* attaching and effacing gén (röviden: *eae*) kódolja, mellyel csak a patogén törzsek rendelkeznek, s melynek jelenléte lehetővé teszi a potenciális kórokozó

képesség diagnosztikáját. Az intimin a baktérium saját sejt falán rögzül és a Tir-hez kötődik ki a tartós adhézió létrejötte során, így nélkülözhetetlen komponense az A/E lézióknak [16].



1. ábra: Három lépcsős modell lépéseinek ábrázolása Wales és mtsai. nyomán, 2005

A LEE szigeten lévő gének által kódolt fehérjék segítségével történik az EPEC törzs diagnosztikája. Az egyes törzseket az általuk expresszált virulencia faktorjaik segítségével egyszerűen elkülöníthetjük egymástól a molekuláris genetikai módszerek igénybevételével, PCR segítségével. Az enteropatogén *E. coli* kimutatása a kifejezetten az *eae* génre és *Tir*-re tervezett primer párokkal valósulhat meg. Az EPEC-re jellemző *eae* gén ugyancsak megjelenik egy másik csoportnál, az EHEC-nél is, ezért a két törzs szétválasztásában egy további tulajdonság figyelembevétele szükséges. Az EHEC bélhámsejt károsítását a Shiga-toxin révén fejt ki, melynek génjét (*stx*) egyedül ennek a csoportnak a tagjai hordozzák.

### 3.3 A tipikus és atipikus *E. coli*

Az EPEC törzset két további csoportra oszthatjuk a már említett EAF (EPEC adherence factor) plazmid jelenléte, vagy éppen hiánya alapján.

#### 3.3.1 A tipikus *E. coli*

A tipikus enteropatogén *E. coli* baktérium az EAF plazmidja révén egy speciális pilus kapcsolatot hoz létre a bélhámsejttel a megtapadás során, s így kialakít egy jellegzetes sejtfelszíni mintázatot. Genetikailag viszonylag homogén virulencia faktorokat hordoz, melyek a LEE szigeten expresszálódnak. Emberben gyakran okoz megbetegedéseket, ami főképp a fejlődő országok térségeiben élő egy évnél fiatalabb csecsemőket sújtja. Előfordulása az életkor növekedésével ellentétesen csökkenő tendenciát mutat, s felnőttekben elvétve jelentettek eseteket. Ez valószínűsíthetően az immunrendszer

fejlődésének és a specifikus EPEC receptorok számának csökkenésének köszönhető. Az utóbbi években a baktérium által okozott megbetegedések visszaszorultak [17].

### 3.3.2 Az atipikus *E. coli*

Az általunk is vizsgált atipikus *E. coli* egy genetikailag heterogénebb csoportot képez a tEPEC-el szemben, mivel változatosabbak a szerotípusaik. Nem rendelkeznek EAF plazmiddal, ezáltal nem jön létre pilus kapcsolat sem, a kapcsolódás egyéb változatos adhezinek segítségével történik. Virulencia faktorjai nem csak a LEE-szigeten kódolódhatnak, hanem egyéb helyeken is, így képezve genetikai sokszínűséget [18].

A baktérium közegészségügyi szerepe az utóbbi időben felértékelődött. Az emberek és állatok az aEPEC-t tünetmentesen is hordozzák, azonban az évek során növekvő számban diagnosztizáltak aEPEC által okozott súlyos hasmenéses megbetegedéseket a fejlődő és fejlett országokban egyaránt. Emellett a törzs rezervoárja nem csak az ember lehet, előfordulását kimutatták számos állatfajban is, köztük élelmiszertermelő állatokban [18,19,20]. Habár jelenleg nincs bizonyíték állatok és emberek közötti direkt fertőzésről, azonban potenciálisan zoonotikus patogénnek tekintjük a törzset, mert némelyik jószágból izolált aEPEC olyan szerocsoportba tartozik, amelyik bizonyítottan felelős humán betegségek kialakításáért. Emellett ugyancsak potenciális fertőzési források lehetnek az így elfogyasztott állati termékek is [20].

Az aEPEC nemcsak gazdasági haszonállatoknál fordul elő, hanem a kedvtelésből tartott kiskedvenceinknél is, kutyában [22,23] és macskában egyaránt [24]. Az *E. coli* kommenzalista törzsei a normál bélflóra tagjaként a bélmikrobióta alkotórészei, azonban virulens törzsei képesek hasmenéses megbetegedéseket okozni, illetve egyéb, hasmenéssel járó kórkép lefolyását súlyosbítani. Az egészséges élőlények bélflórájában ugyanúgy megtalálhatóak nemcsak a kommenzalista, de a virulens géneket hordozó törzsek is, mint a beteg társaikéban. A hasmenéses kórképeket mutató állatokban emellett jelentősen nagyobb számú virulens törzset detektáltak, ezáltal arra következtethetünk, hogy az enteropatogén *E. coli* kedvenceinkben is okozhat hasmenést, akárcsak az emberek esetében [25,26,27]. Bizonyos kutatások kimutatták, hogy a kölyök macskák megbetegedését okozó aEPEC törzsek genetikailag közel azonosak az egyes csecsemőknél előforduló aEPEC törzsekkel [28]. Ez a megfigyelés is megerősíti a feltételezést, miszerint az állatok, ez esetben macskák, rezervoárjai lehetnek a humán megbetegedéseket okozó enteropatogén *E. coli*-nak.

Az EPEC törzsekkel kapcsolatos kutatások másik fontos területe az antibiotikum rezisztencia feltérképezése. Az antibiotikum rezisztens (AMR, antimicrobial resistance) baktériumok elterjedése egyre nagyobb problémát jelent a humán- és állatgyógyászatban egyaránt. Bizonyos fajok három, vagy annál több antibiotikumra is rezisztensnek minősülnek, ezeket multidrog-rezisztens (MDR, multidrug resistance) baktériumoknak hívjuk [25]. A társállatainknál előforduló *E. coli* gyakran ez utóbbi csoportba tartozik, ezért igen fontossá vált az antibiotikum érzékenység további vizsgálata. Az antibiotikum rezisztenciát feltérképező kutatások során egészséges, valamint hasmenéses állatokból vett bélsármintából tenyésztettek ki *E. coli* törzseket, majd vizsgálták az így kinyert törzsek antibiotikum rezisztenciáját. A hasmenéses egyedek nagyobb százalékánál fordult elő rezisztencia, mint az egészségeseknél [25,29,30], illetve a mintavételezés előtt történő antibiotikum terápia is jelentős szerepet játszott a rezisztencia kialakulásában [31]. A gyakori, szisztémásan alkalmazott antibiotikumok használata hatással volt a vizsgált kutyák bélflórájára [31], egy még rezisztensebb *E. coli* populációt eredményezve. Emellett nagy számban fordult elő AMR, illetve MDR. Az AMR egyik fontos forrása az ESBL (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase) -termelő *E. coli*, emberben és állatokban egyaránt. A széles spektrumú cefalosporinok elsődleges alkalmazása a kisállatgyógyászatban az utóbbi 20 évben jelentősen növelte az multirezisztens törzsek számát társállatainknál [32]. A potenciális *E. coli* zoonózis miatt ezen fajok átvitele veszélyt jelenthet a humán gyógyászatban.

## 4. Anyag és módszer

### 4.1 Betegcsoport

Kutatásunkhoz 54 kutyából vettünk bélsármintákat az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatklinikáján, valamint egy Pest megyei rendelőben, a Kedvencdoktor Állatorvosi Rendelőben 2021 áprilistól 2022 februárig. A mintavétel a betegvizsgálat során történt a tulajdonosok beleegyezésével. A mintákat (n=55) specifikusan csak akut (n=22), vagy krónikus (azaz két hétnél tovább tartó, vagy hosszabb ideje visszatérő) (n=33) hasmenést mutató állatokból vettünk, így szűkítve a célcsoportot. A kutatásban részt vett állatokat rendszereztük továbbá életkor és táplálási irány (kutyatáp/nyerszetetés) szerint. Rutin bélsárvizsgálat 33 esetben volt, amelynek során citológiai és parazitológiai vizsgálat történt. Emellett vizsgáltuk azt is, hogy a mintavételezés előtti egy hónapban volt-e antibiotikum kezelés, ha igen, az milyen hatóanyag volt. Egyik kutyából két mintavételezés is volt 3 hónap különbséggel.

### 4.2. Bélsárminta vétel

A mintavételezés steril tampon használatával történt. A mintavevőt az állatok végbélnyílásán keresztül bevezettük, majd néhányszor megforgatva hozzádörzsöltük a bélhámhoz is, ezáltal minél több mikroorganizmust nyerve a vizsgálathoz. A tamponokat ezután a további laboratóriumi feldolgozásig mélyhűtőben tároltuk -20 °C fokon.

### 4.3 Bakteriológiai vizsgálat

Az összegyűjtött mintákat a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszéken dolgoztuk fel, ahol a mélyhűtőből kivett tamponmintákat egy szelektív táptalajra, MacConkey agarra oltottuk ki, majd szélesztettük el. A szélesztést követően 24 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on a táptalajokat.

A MacConkey agar egy szelektív és differenciáló táptalaj, amely a Gram-negatív *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumok elkülönítésére alkalmas. A szelekció abban nyilvánul meg, hogy különböző gátló anyagokat tartalmaz, úgy, mint az epesavas sók és a kristályibolya. Ezek megakadályozzák, hogy a táptalajon egyéb, nem *Enterobacteriaceae* családba tartozó mikroorganizmusok is kinőjenek. A kristályibolya a Gram-pozitív baktériumok szaporodását gátolja, míg az epesavas sók a *Proteus* fajok rajzását akadályozzák meg. A MacConkey agar differenciáló képessége a különböző fajok eltérő laktózbontási tulajdonságán alapszik. Egyes baktériumok ugyanis képesek lebontani

a tejcukrot, míg mások nem rendelkeznek ezzel a sajátossággal. Az előbbi csoportba tartozik az általunk vizsgált *E. coli* is. A táptalaj a gátló anyagokon kívül ennek megfelelően tartalmaz laktózt és egy indikátort, mely ez esetben a neutrálvörös. A laktóz bontásakor a baktériumok anyagcseréjük során tejsavat termelnek, melyek eltolják a pH irányát 7 alá. Ezt a változást a neutrálvörös indikátor piros színváltozással jelzi, a táptalajon rózsaszín telepek képződnek, melyeknek a széle elhalványodik az epesav kiválás miatt. A laktóz negatív mikroorganizmusok színtelen telepeket hoznak létre.

A MacConkey táptalajon lévő *E. coli* baktériumtelepeket tovább oltottuk véres agarra és ismételten 24 órán keresztül inkubáltuk őket 37 °C-on. Az így szintenyészetben kinőtt *E. coli* törzstenyészeteket -80 °C-on tároltuk tovább későbbi felhasználásukig. A véres agarra való kioltásra azért volt szükség, hogy megakadályozzuk a szelektív táptalajról származó gátlóanyagok fellépését a PCR reakció során. Az így véres agarra kioltott, majd később lefagyasztott baktériumok akár évtizedekig megőrizhetőek, felhasználhatóak további kísérletekhez. A fagyaszthatóság eléréséhez a következőket hajtottuk végre. A táptalaj felszínéről egy steril vattapálca segítségével telepeket vettünk le, majd egy krio csőbe szuszpendáltuk őket, 700 µl Mueller-Hinton levesbe, mely egy nutritív tápleves, nem tartalmaz gátlószereket. Ezt követően krioprotektív (fagyástól védő) glicerint adtunk hozzá a baktérium szuszpenzióhoz 300 µl mennyiségben, amely biztosította a legalább 15%-os glicerinnel való koncentrációt. A fagyasztócsövet vortex-el homogenizáltuk, így a sejtekbe integrálódott a glicerines tápoldat, s a fagyasztás során is rugalmas maradt a sejt. Ez a minta későbbi felhasználhatóságát tette lehetővé.

#### 4.4 Molekuláris genetikai vizsgálat

##### 4.4.1 Polimeráz láncreakció (PCR) ismertetése

A polimeráz láncreakció egy igen gyakran használt molekuláris genetikai technológia, melynek révén az EPEC törzsek kimutatása egyszerűen megvalósítható laboratóriumi körülmények között is. A folyamat során az *E. coli* DNS-ének egy meghatározott szekvenciáját amplifikáljuk, azaz megsokszorozítjuk az azonosíthatóság érdekében, ez esetben a LEE patogenitási szigeten kódolt *eae* génszakaszt, ami az intimin kódolásáért felelős. Ehhez szükségünk van egy templátra, mely tartalmazza az amplifikálni kívánt génszakaszt, azaz a baktérium DNS-ét. Emellett fontos komponensek még az *eae* és más génekre készített egyedi primer párok (1. táblázat), melyek révén kijelölhetjük a

megsokszorozni kívánt szekvenciát. A reakció a PCR-készülékben több lépésben, eltérő hőmérsékleten zajlik le, enzimátikus segítséggel.

#### 4.4.2 Templát készítés

A PCR vizsgálathoz szükséges templátokat elkészítettük. Ehhez a szintenyészetben nőtt *E. coli* törzseket 500 µl PCR vízbe szuszpendáltuk. Ez utóbbi reagens steril, szűrt desztillált víz, nem tartalmaz semmilyen örökítőanyagot, enzimeket, így biztosítva a reakció tisztaságát. A szuszpendált baktériumokat, illetve PCR vizet tartalmazó elegyet 1,5 ml-es eppendorf csőben centrifugáltuk 9000 rpm (fordulat/perc, round per minute) fordulatszám 2 percen keresztül. Ennek köszönhetően a cső aljára leülepedtek a baktériumok. A továbbiakban 96 °C-on 10 percig forraltuk a mintát, majd 1 másodpercre újra centrifugáltuk annak érdekében, hogy a cső falán keletkezett vízpára lecsapódjon. Az így elkészített mintából 100 µl felülúszót kipipettáztunk egy 200 µl-es eppendorf csőbe, majd további felhasználásig -20 °C-on tároltuk a templátokat.

#### 4.4.3 PCR reakció menete

A PCR működéséhez egy speciális reakciókeverékre volt szükség, az úgynevezett Master mixre. Ennek komponensei a következők voltak: a templát DNS (1 µg), a felsokszorozandó DNS szekvenciát jelölő primer pár (0,5 µM mindegyikből), az új DNS szálakba beépülő dezoxinukleotid-trifoszfátok (dNTP-mix) (0,2 mM mindegyikből), 72°C-on működő hőrezisztens Taq polimeráz enzim (1,25 egység), valamint az enzim működését segítő, festékkel jelölt puffer (5 µl), DNáz mentes, bidesztillált víz.

A reakcióhoz szükséges mennyiségű Master mixeket (23-23 µl) kimértük PCR mikrocsővekbe, majd mindegyikbe mintánként külön-külön 2 µl templátot adtunk. Emellett egy negatív kontrollt is készítettünk, az eredmények megbízhatóságának növelése érdekében. Ez a minta nem tartalmazott templát DNS-t, így nem tartalmazott megsokszorozható DNS-t sem. Nélkülözhetetlen volt egy pozitív kontroll (az adott génre pozitív baktériumból készített templátot tartalmazta) alkalmazása is, mellyel össze lehetett hasonlítani a kapott eredményeket. Az EPEC törzsek kimutatására az *eae* génszakaszra speciálisan tervezett primer párt alkalmaztunk [33,34,35,36].

A PCR-készülékben lezajló reakcióban a folyamat különböző hőmérsékleten és több ciklusban zajlott. Mindegyik ciklus három fő lépésből állt: először az inicializáció során a DNS szál felhevítése történt 94-96°C-on, mely denaturációs hőmérsékleten a két szál közötti



hidrogénkötések felbomlottak, a szálak szétváltak egymástól. Ez 5 percig tartott. A következő lépés, az annealing (kapcsolódás) során 50-60°C-ra hűtöttük a mintát 30 másodpercen keresztül, lehetővé téve a primerek hozzákapszolódását a kettévált szálakhoz. Ezek a rövid, mesterséges DNS szálak komplementerek a megsokszorozandó DNS szakasszal, saját olvadási hőmérséklettel rendelkeznek, mely nem összekeverendő a DNS-ével (96 °C). A primerek olvadási hőmérséklete függ a primer hosszától. Minden PCR reakcióhoz minimum két primer szükséges, a templát kezdő- és végpontjához. A harmadik lépés során (elongáció) 72 °C-on megkezdte működését a Taq polimeráz enzim, a primerhez bekötődve felépítette az új, komplementer DNS szálát a rendelkezésre álló nukleotidokból. Ennek a lépésnek az időtartama a lemásolandó DNS szál hosszától függött, majd ezután egy új ciklus indult újból 96 °C-ra történő felhevítéssel. Minden ciklusban ez a három lépés ismételte önmagát, összesen 30-szor. A legutolsó ciklus után a gép 4 °C-ra hűtötte magát.

#### 4.4.4 Gélelektroforézis

Az elektroforézis alapja, hogy a töltéssel rendelkező DNS részecskék az elektromos térben töltésüknek megfelelő irányba mozognak. Így a pozitív töltésű kationok a negatív katód irányába, a negatív töltésű DNS fragmentumok a pozitív anód irányába mozdulnak el. A nagyobb méretű molekulák lassabban, a kisebbek gyorsabban vándorolnak az agar gélben.

A gélelektroforézishez szükséges hordozó gélt 1,8 g agaróz (1,5 %-os gélhez), valamint 120 ml TAE puffer összekeverésével állítottuk elő. A TAE puffer tartalmazott trisz bázist, ecetsavat a savas pH biztosításához, és EDTA-t, mely a  $Mg^{2+}$  és  $Ca^{2+}$  ionok megkötése révén megakadályozza az esetlegesen előforduló DNázok működését. Az így kapott elegyet meleg vízfürdőben forralva homogenizáltuk, majd 50-60 °C-ra lehűtve DNS-hez kötődni képes színyanyagot (etidium-bromid) kevertünk hozzá. A gélt a futtatókádba öntöttük, majd zsebeket kialakító "mintafelvívő fésűt" helyeztük bele és hagytuk megdermedni. Miután az agar kihűlt 20-25°C-ra, a fésűt kivettük, a gélt pedig áthelyeztük az elektroforetikus kádba, ahol ismételten felöntöttük TAE pufferrel úgy, hogy fél cm-re lepje el a gélt. A zsebekbe 10 µl-nyi, a PCR-rel lefuttatott amplikonokat mértük be mintánként, emellett a pozitív és negatív kontrollt, illetve 8 µl-nyi DNS gradiens markert. A minták pipettával történő bemérését a zsebekbe segítette az előzőleg hozzáadott puffer. Az általunk használt Master mix már tartalmazza a gélelektroforézishez szükséges ülepítőanyagot is, így a gél zsebeibe mérve a mintákat, azok lesüllyednek a zseb aljára, nem folynak ki és szennyezik a szomszédos vizsgáló anyagokat. Ezután az elektroforézist 110

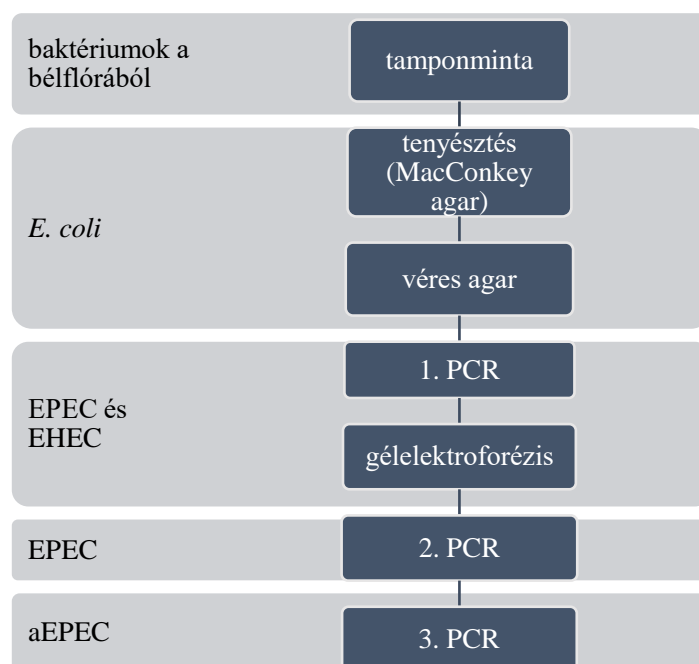
Volt állandó feszültség mellett végeztük 30 percen keresztül változó ellenállás és áramerősség mellett. A Master mixben jelenlévő színyanyag a kis molekula súlya miatt az elektroforézis során gyorsabban futott, mint a nagyobb molekulák, így a színyanyag a gél a frontvonalában haladva jelezte számunkra, hogy meddig szükséges a mintákat futtatni. A keletkezett termékeket ultraibolya fény mellett tettük láthatóvá és dokumentálhatóvá fényképezéssel, a táptalajba öntött etídium-bromid ugyanis a DNS nukleotidjai közé beépülve megfestette az örökítőanyagot.

Mivel az EPEC törzseken kívül az EHEC törzsek is rendelkeznek a PCR során megsokszorosított DNS szakasszal, így az intimin pozitív törzseknél szükséges volt egy ismételt PCR vizsgálat. Ennek során a mintához adandó Master mix specifikusan az *stx* génszakaszra tervezett primer párt tartalmazott. Ezzel a génszakasszal az EPEC törzsek nem rendelkeznek, így az elbírálás is ennek megfelelően történt. Az *eae* és *stx* génre is pozitív törzsek az EHEC-hez tartoztak, míg az *eae* pozitív, de *stx* negatív törzsek az EPEC törzsek közül kerültek ki. Az intimin pozitív törzsek a további vizsgálatok során a tipikus törzsekre jellemző EAF plazmidra és a rajta kódoló *bfpA* gén jelenlétére negatívnak bizonyultak. Ez utóbbi gén és plazmid a kórfolyamat során fontos géneket kódoló szakasz, a baktérium bélhámsejthez való kapcsolódásában szerepet játszó köteggépző pilus termelődése is ezen kódoló *(bfpA* gén). Így az ezen gént nem hordozó, de intimin termelődésére képes törzseket atipikusnak minősítettük. Mindegyik aEPEC törzs esetében a genomban megtalálható volt a patomechanizmusban szintén fontos szerepet játszó *tir* gén is (2. ábra).

### 1. táblázat. A PCR vizsgálathoz szükséges primerek listája

| Génszakasz   | Primer neve és szekvenciája (5'-3')                         | Referencia               |
|--------------|---|--------------------------|
| <i>eae</i>   | B52: AGGCTTCGTCACAGTTG<br>B53: CCATCGTCACCAGAGGA            | China és mtsai., 1996    |
| <i>stx 1</i> | B54: AGAGCGATGTTACGGTTTG<br>B55: TTGCCCCCAGAGTGGATG         | China és mtsai., 1996    |
| <i>stx 2</i> | B56: TGGGTTTTTCTTCGGTATC<br>B57: GACATTCTGGTTGACTCTCTT      | China és mtsai., 1996    |
| <i>bfpA</i>  | EP1: AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC<br>EP2: GCCGCTTTATCCAACCTGGTA    | Gunzburg és mtsai., 1995 |
| <i>eaf</i>   | Eaf1: CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA<br>Eaf2: TATGGGGACCATGTATTATCA | Franke és mtsai., 1994   |

|            |   |                               |
|------------|---|-------------------------------|
| <i>tir</i> | tirY474-F:<br>CATATTTATGATGAGGTCGCTC<br>tirS478-F:<br>TCTGTTTCAGAATATGGGGAATA<br>tirR: TAAAAGTTCAGATCTTGATGACAT | Fröhlicher és mtsai.,<br>2008 |
|------------|---|-------------------------------|



2. ábra: Az aEPEC izolálásának folyamata

#### 4.5 Antibiotikum érzékenység vizsgálata

A kimutatott *eae*-pozitív törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatához a korongdiffúziós módszert alkalmaztuk. Ehhez a már előzőleg lefagyasztott, -80 °C-on tárolt EPEC törzstenyészetekből készített 0,5 McFarrland sűrűségű levesekből 50 µl mennyiséget szélesztettük ki Mueller-Hinton táptalajra, annak teljes felületén egyenletesen elosztatva. Az *in vitro* vizsgálat során ezután megadott koncentrációjú antimikrobiális szerrel átitatott korongokat helyeztünk el egymástól egyforma távolságra a táptalajra. Összesen 13-féle antibiotikum érzékenységét vizsgáltuk. A 24 órás inkubációt követően megvizsgáltuk a korongok körül mutatkozó gátlási zónákat, melyek olyan területek, ahol nem volt látható baktérium növekedés. A gátlási zónáknak az átmérőjét lemértük, majd a kapott értékek alapján meghatároztuk az érzékenységi kategóriát (rezisztens, mérsékelt érzékeny, érzékeny). A három, vagy annál több antibiotikumra rezisztens törzset multirezisztensnek tekintettük.

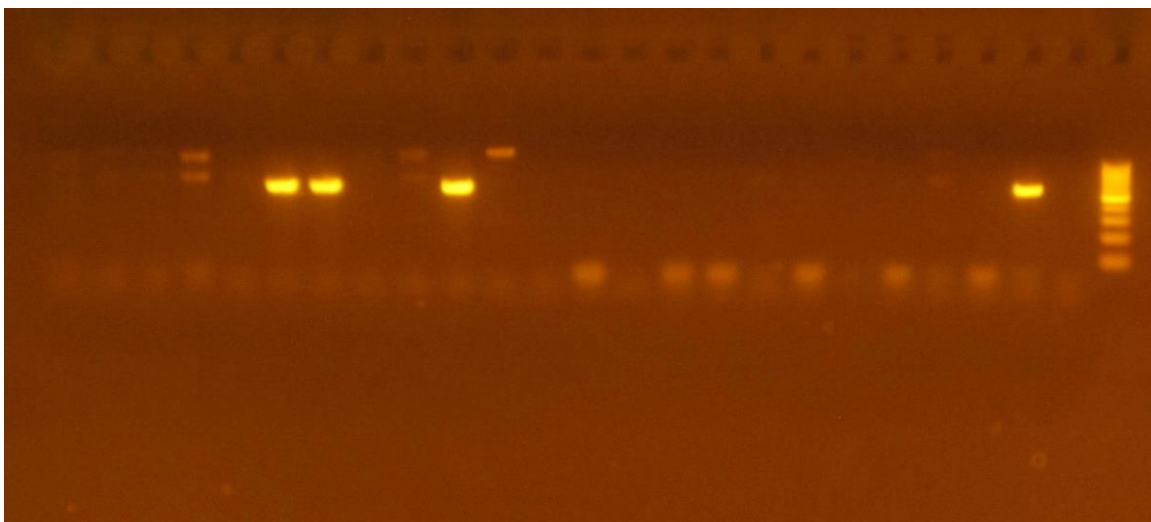
## 5. Eredmények

### 5.1 Bakteriológia vizsgálatok

Összesen 55 tampon mintát dolgoztunk fel hasmenéses bélbetegséggel diagnosztizált kutyákból, amelyekből a bakteriológia tenyésztés során 27 *E. coli* törzset sikerült izolálnunk. Az elkülönített *E. coli* törzseket tovább vizsgáltuk PCR reakcióval.

### 5.2 Molekuláris genetikai vizsgálatok

A PCR vizsgálatok során először az intimin fehérjét kódoló *eae* génszakaszt mutattuk ki (3. ábra). Ezután az *stx* génszakasz feltérképezése történt, mellyel az EPEC törzsek nem rendelkeznek. Az így elvégzett vizsgálatok során a 27 kitenyésztett *E. coli* törzsből összesen 4 intimin pozitív, *stx* negatív törzset sikerült izolálnunk. Ezeket EPEC-nek minősítettük.



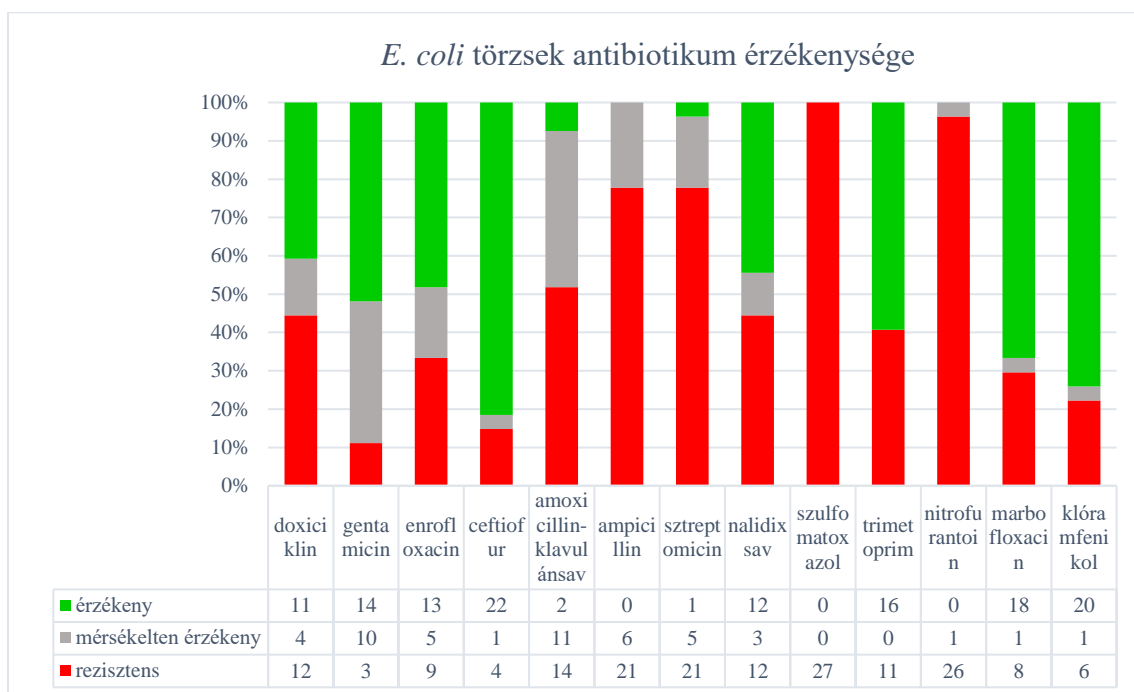
3. ábra: Kép a 9/21, 13/21 és 4/22-es minta *eae* (intimint kódoló génszakasz) PCR termékeinek demonstrálására gélelektroforézissel 100 bp (bázispár) marker mellett.

Mintasorrend: 1-22. zseb: vizsgált minták, pozitív kontroll, negatív kontroll, marker. Pozitív minta lett a 6-7, valamint a 10-es zsebben. 570 bp a keletkezett termék *eae* esetén.

### 5.3 Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok

A 27 kitenyésztett *E. coli* törzs antibiotikum érzékenységét korongdiffúziós módszerrel vizsgáltuk. Valamennyi, általunk kitenyésztett törzs multirezisztensnek bizonyult a 3, vagy több antibiotikummal szemben mutatott rezisztencia miatt (2. táblázat). Az átlag rezisztencia szám az *E. coli* törzsek között 6,37 (3-11) volt. Ennek kiszámítása során csak a rezisztens törzseket néztük, a mérsékelt rezisztens törzseket érzékenynek tekintettük, hiszen ebben az esetben nem beszélhettünk teljes rezisztenciáról. Ezen

eredmények változatosak voltak, bizonyos antibiotikumok esetében közel 100%-os rezisztenciát tapasztaltunk (szulfomatoxazolra 27, nitrofurantoinra 26 törzs rezisztens), míg más szereknél 20 % alatti volt a rezisztencia (gentamicinnél 3, ceftiofuránál 4 törzs bizonyult rezisztensnek a 27-ből) (1. diagram).



1. diagram: Az *E. coli* törzsek érzékenysége az egyes antibiotikumokra nézve

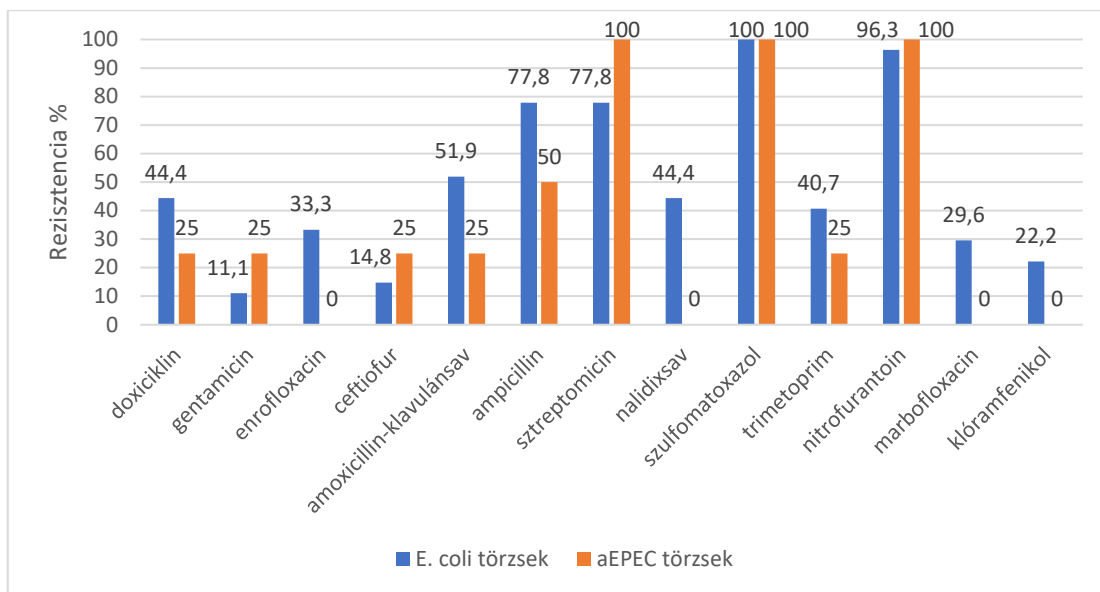
Összehasonlítva az előzetesen antibiotikummal kezelt (n=14), valamint az antibiotikumot nem kapott (n=11) kutyák *E. coli* törzseinek rezisztencia értékeit, az átlag rezisztencia szám magasabbnak bizonyult azoknál a kutyáknál, akik a mintavételezést megelőző egy hónapban kaptak valamilyen antibiotikumot. Az antibiotikummal előzetesen kezelt kutyáknál az átlag rezisztencia szám 7,43 (3-11) volt, az egész csoport esetében ez a szám 6,37, míg az antibiotikummal nem kezelték esetében az átlag 5,36 (3-10) lett. Két esetben nem volt feljegyzésünk arról, hogy történt-e előzetesen antibiotikum-kúra.

2. táblázat. Az *E. coli* törzsek rezisztencia száma

| Minta sorszáma | Rezisztencia szám | Előzetes antibiotikum-kúra |
|----------------|-------------------|----------------------------|
| 4/21           | 8                 | I                          |
| 5/21           | 8                 | I                          |
| 6/21           | 7                 | I                          |
| 7/21           | 4                 | I                          |
| 8/21           | 11                | I                          |
| 9/21 EPEC      | 6                 | I                          |
| 11/21          | 4                 | N                          |
| 12/21          | 5                 | I                          |
| 13/21 EPEC     | 4                 | I                          |
| 14/21          | 3                 | na                         |
| 15/21          | 9                 | N                          |
| 16/21          | 6                 | N                          |
| 18/21          | 6                 | N                          |
| 19/21          | 3                 | N                          |
| 20/21          | 3                 | N                          |
| 26/21          | 6                 | N                          |
| 27/21          | 6                 | na                         |
| 1/22           | 11                | I                          |
| 2/22           | 9                 | I                          |
| 3/22           | 10                | N                          |
| 4/22 EPEC      | 5                 | N                          |
| 5/22           | 9                 | I                          |
| 6/22           | 9                 | I                          |
| 10/22 EPEC     | 4                 | N                          |
| 12/22          | 3                 | N                          |
| 13/22          | 10                | I                          |
| 16/22          | 3                 | I                          |

Rövidítések. EPEC: enteropatogén *E. coli*, I: igen, N: nem, na: nem ismert adat

Az aEPEC törzsek esetében a többi törzstől nagyban eltérő, jellegzetes rezisztenciát nem tudtunk kimutatni. Megvizsgálva a rezisztencia alakulását az egyes antibiotikumokra nézve az *E. coli* és az aEPEC törzsek között, csak kismértékű eltéréseket fedeztünk fel (2. diagram). Az átlag rezisztencia szám az aEPEC törzsek között 4,75 (4-6) volt. Ebből az antibiotikummal előzetesen kezelték esetében az átlag rezisztencia szám 5,00 (4-6), a nem kezeltéknél pedig 4,50 (4-5). Négy antibiotikumot találtunk, melyekre az *E. coli* törzsek egy része (22,2% és 44,4% közötti értékkel) rezisztens volt, azonban az aEPEC minták mindegyike érzékenynek bizonyult: ezek az enrofloxacin, nalidixsav, marbofloxacin és a klóramfenikol. A gentamicin, ceftiofur, szulfomatoxazol és nitrofurantoin antibiotikumokkal szemben az aEPEC törzsek ugyan rezisztensebbek voltak, azonban ezt nem tekintettük számottevő különbségnek a kis mintamennyiség miatt.



2. diagram: Az *E. coli* és aEPEC törzsek rezisztenciájának összehasonlítása az egyes antibiotikumokra nézve

Az aEPEC törzsek változatos rezisztenciát mutattak az egyes antibiotikumokra nézve (3. táblázat). Közös jellemzőjük, hogy mind a négy törzs rezisztens lett a sztreptomicin, szulfomatoxazol és a nitrofurantoin antibiotikumokra, az *E. coli* törzsek döntő többségéhez hasonlóan. Továbbá mindegyik aEPEC törzs érzékeny volt az enrofloxacinra, nalidixsavra, marbofloxacinra és klóramfenikolra mindamellett, hogy a 9/21-es és a 13/21-es kutya a mintavételezés előtt 4 héten belül kapott enrofloxacint.

A kimutatott rezisztencia értékeket sorba rendezve az aEPEC törzsek a kevés rezisztenciát mutatók között voltak jelen (4 és 6 közötti értékkel) az egész *E. coli* csoporthoz képest (ahol 3-11 szélső értékek születtek). Csak kifejezetten rájuk jellemző rezisztenciát nem tudtunk kimutatni.

3. táblázat. Az aEPEC törzsek rezisztenciája az egyes antibiotikumokra

|                         | 9/21 | 13/21 | 4/22 | 10/22 |
|-------------------------|------|-------|------|-------|
| doxiciklin              | R    | S     | S    | S     |
| gentamicin              | S    | I     | S    | R     |
| enrofloxacin            | S    | S     | S    | S     |
| ceftiofur               | R    | S     | S    | S     |
| amoxicillin-klavulánsav | I    | I     | R    | I     |
| ampicillin              | R    | I     | R    | I     |

|                 |   |   |   |   |
|-----------------|---|---|---|---|
| sztreptomicin   | R | R | R | R |
| nalidixsav      | S | S | S | S |
| szulfomatoxazol | R | R | R | R |
| trimetoprim     | S | R | S | S |
| nitrofurantoin  | R | R | R | R |
| marbofloxacin   | S | S | S | S |
| klóramfenikol   | S | S | S | S |

Rövidítések. R: rezisztens, I: mérsékelten érzékeny, S: érzékeny

#### 5.4 Betegcsoport

55 mintából összesen 27 *E. coli* törzset izoláltunk, amelyből 4 aEPEC pozitív törzs volt. A mintákat 54 kutyából szereztük, egy állat esetében pedig két mintavételezés történt 3 hónap különbséggel. A kutatásban részt vett állatokat rendszereztük a hasmenés jellege, életkor, valamint táplálási irány (kutyatáp/nyerszetetés) szerint (4. táblázat). A páciensek 60%-a érkezett krónikus hasmenéssel (n=33), míg 40%-nak (n=22) akut tünetei voltak. Az átlag életkor 4,42 év volt. A legfiatalabb kutya, aki részt vett a mintavételezésben 2 hónapos volt, a legidősebb 14,5 éves.

A kutyák közül 30 kutyatápot kapott, 4 pedig nyers táplálékot. 21 kutya esetén nem volt ismeretünk arról, mivel táplálták előzetesen. Az aEPEC pozitív törzsek mindegyike az előzőleg kutyatáppal etetett csoportból került ki.

Az előzőleg említett pontok mellett felmértük azt is, hogy hány beteg kapott antibiotikumot és melyek voltak azok. 27 kutya (a betegcsoport 50%-a) kapott valamilyen antibiotikumot a mintavételt megelőző 1 hónapon belül, pontosabban enrofloxacint (n=5), amoxicillin-klavulánsavat (n=5), metronidazolt (n=7), tilozint (n=4), benzilpenicillint (n=8), illetve sztreptomicint (n=8). Két kutya kapott egyszerre kétféle antibiotikumot.



**4. táblázat.** Az egyes vizsgált paraméterek rendszerezése a csoportokon belül

|   | <b>Összes minta</b><br>(n=55)      | <b><i>E. coli</i> törzsek</b><br>(n=27) | <b>aEPEC pozitív törzsek</b><br>(n=4) |
|---|------------------------------------|---|---------------------------------------|
| Hasmenés jellege  | akut (n=22)                        | akut (n=11)                             | akut (n=0)                            |
|   | krónikus (n=33)                    | krónikus (n=16)                         | krónikus (n=4)                        |
| Életkor   | 0-2 év (n=29)                      | 0-2 év (n=16)                           | 0-2 év (n=4)                          |
|   | 2-5 év (n=5)                       | 2-5 év (n=1)                            | 2-5 év (n=0)                          |
|   | 5-10 év (n=14)                     | 5-10 év (n=8)                           | 5-10 év (n=0)                         |
|   | 10 < (n=7)                         | 10 < (n=2)                              | 10 < (n=0)                            |
| Táplálási irány   | kutyatáp (n=30)                    | kutyatáp (n=17)                         | kutyatáp (n=4)                        |
|   | nyerszetetés (n=4)                 | nyerszetetés (n=0)                      | nyerszetetés (n=0)                    |
|   | nem ismert (n=21)                  | nem ismert (n=10)                       | nem ismert (n=0)                      |
| Antibiotikum a<br>mintavételezés előtt<br>(1 hónapon belül) | nem (n=26)                         | nem (n=11)                              | nem (n=2)                             |
|   | igen (n=27)                        | igen (n=14)                             | igen (n=2)                            |
|   | nem ismert (n=2)                   | nem ismert (n=2)                        |                                       |
| Kapott antibiotikum   | enrofloxacin (n=5)                 | enrofloxacin (n=4)                      | enrofloxacin (n=2)                    |
|   | amoxicillin-<br>klavulánsav (n=5)  | amoxicillin-klavulánsav<br>(n=3)        | amoxicillin-klavulánsav<br>(n=1)      |
|   | metronidazol (n=7)                 | metronidazol (n=2)                      | metronidazol (n=0)                    |
|   | tilozin (n=4)                      | tilozin (n=0)                           | tilozin (n=0)                         |
|   | benzilpenicillin (n=8)             | benzilpenicillin (n=3)                  | benzilpenicillin (n=0)                |
|   | sztreptomycin (n=8)                | sztreptomycin (n=3)                     | sztreptomycin (n=0)                   |
|   |                                    |   |                                       |
| Bélsárvizsgálat   | nem történt (n=21)                 | nem történt (n=6)                       | nem történt (n=0)                     |
|   | negatív (n=17)                     | negatív (n=4)                           | negatív (n=1)                         |
|   | Giardia + (n=5)                    | Giardia + (n=3)                         | Giardia + (n=2)                       |
|   | Isospora + (n=1)                   | Isospora + (n=1)                        | Isospora + (n=1)                      |
|   | Clostridium<br>túlszaporodás (n=7) | Clostridium túlszaporodás<br>(n=4)      | Clostridium túlszaporodás<br>(n=2)    |
|   | Cyniclomyces (n=1)                 | Cyniclomyces (n=1)                      | Cyniclomyces (n=0)                    |
|   | Trichomonas (n=1)                  | Trichomonas (n=1)                       | Trichomonas (n=0)                     |
|   | Yersinia (n=1)                     | Yersinia (n=1)                          | Yersinia (n=0)                        |
|   | Ancylostoma (n=1)                  | Ancylostoma (n=1)                       | Ancylostoma (n=0)                     |
|   |                                    |   |                                       |

**5.4.1 Az aEPEC pozitív esetek**

A 9/21-es törzset egy 1 éves golden retriever fajtájú kutyából izoláltuk, akinek krónikus, 2 hónapja tartó hasmenése többnyire vékonybél eredetű, időnként kevert jellegű volt. A kondíció pontozás (body condition score, BCS) eredménye 2/5 volt. Előzőleg

többször is kapott fenbendazol-kúrát, illetve a mintavételezést megelőző egy hónapon belül amoxicillin-klavulánsavat és enrofloxacint probiotikum mellett. A véres bélsárból végzett bélsárvizsgálat *Isospora canis* és *Giardia duodenalis* fertőzöttséget mutatott ki, valamint felmerült a *Clostridium* túlszaporodás is. A diagnózis giardiosis, dysbiosis, isosporosis. A további kezelés ismételt fenbendazol adása volt, valamint hipoallergén diéta mellett tilozint és probiotikumot kapott, aminek hatására javult az állapota, így hasmenése is.

A 13/21-es törzset egy 1 éves közép uszkár fajtájú kutyából izoláltuk. A betegnek visszatérő jellegű, vastagbél eredetű, véres hasmenése volt, ami 5 hónapos korában kezdődött. Egy korábbi bélsárvizsgálat giardiosist és *Clostridium* túlszaporodást mutatott ki. Előzőleg kapott amoxicillin-klavulánsavat, enrofloxacint és metronidazolt is a hasmenésére. Az egyetemi vizsgálatot követően a hipoallergén diéta (szárastáp és főzött étrend), és probiotikum adása mellett egy időre javultak a panaszai, de a tünetek hirtelen visszaesését tapasztalták a tulajdonosok. Ekkor a hasmenéses panasz akut fellángolása miatt mintavétel történt rutin bélsárvizsgálatra és EPEC-vizsgálatra. A mintavételt megelőzően enrofloxacin-kúrát kezdtek el a betegnél. A kutya állapota javult az enrofloxacin, a hipoallergén diéta, probiotikum és a tüneti kezelés mellett. 3 hónappal az eredeti EPEC-mintavételt követően ismételten elvégzett mintavételezés során nem sikerült *E. coli* törzset izolálnunk.

A harmadik aEPEC pozitív, 4/22-es sorszámmal ellátott minta egy 10 hónapos német boxertől származott. A kutyának 5,5 hónapja tartó, kónikus, vastagbél eredetű hasmenése volt, időnként véres jelleggel. Előzőleg kapott antibiotikumot a hasmenésére, azonban a mintavételezést megelőző egy hónapon túl. A bélsárvizsgálat eredménye giardiosist mutatott ki. Endoszkópos és szövettani vizsgálat után a diagnózis granulomatosus colitis volt, melynek kapcsán megkezdte az enrofloxacin-kúrát. Ennek, illetve a hipoallergén diétának köszönhetően a tünetei javultak, hasmenése megszűnt.

Az utolsó, 10/22-es sorszámú mintánkat egy 2 éves német juhászkutyából izoláltuk, akinek visszatérő krónikus, vékonybél eredetű hasmenése volt. Tápváltásokra ideiglenesen javult az állapota, majd visszaromlott. Kölyökkorában előfordult giardiosis, campylobacteriosis, előzőleg kapott metronidazolt és potenciált szulfonamidot. Vizsgálatkor kórosan sovány, BCS 1-1,5/5. A laboratóriumi vérvizsgálat alapján a feltételezett diagnózis fehérjevesztéses enteropathia volt. Endoszkópos tükrözés során vett szövettani vizsgálat eredménye enyhe lymphocytás-plazmasejtes gyulladást mutatott a gyomorban, illetve villus

rövidülést a vékonybélben. Hipoallergén diéta, probiotikum és tilozin-kúra mellett a hasmenése javult, de nem szűnt meg teljesen.

Összefoglalva, valamennyi aEPEC pozitív kutyák esetében mindegyik mintát krónikus bélbetegséggel diagnosztizált kutyából nyertük (5. táblázat). Mindegyik beteg kapott előzetesen antibiotikumot, a négy kutyából kettő (9/21-es, 13/21-es aEPEC törzs) esetében ez a mintavételezést megelőző egy hónapon belül történt, a többinél régebben szerepelt a kórelőzmények között. Egy kivételével (9/21) mindegyik állatnál történt endoszkópos vizsgálat, melynek eredménye 2 esetben enyhe lymphocytás-plazmasejtes gyulladás, a boxernél pedig histiocytás-ulceratív colitis lett. Emellett mindegyiknél volt bélsárvizsgálat, ami változatos eredménnyel zárult: egy esetben negatív lett, 2 esetben Giardia-fertőzésre pozitív, 2 esetben Clostridium-túlszaporodásra utaló eltérést találtak és 1 esetben Isospora-petéket is láttak a mintában. Az akut hasmenéses betegek között nem izoláltunk aEPEC pozitív törzset.

Az életkort figyelembe véve azt tapasztaltuk, hogy az összes aEPEC törzset 2 évnél fiatalabb kutyából izoláltuk.

Az aEPEC pozitív kutyák mindegyike gyárilag előállított kutyatápot kapott előzőleg.

**5. táblázat.** Az aEPEC pozitív kutyák vizsgált paraméterei

| aEPEC törzs | Hasmenés jellege | Életkor  | Táplálási irány | Bélsárvizsgálat eredménye      | Antibiotikum terápia mintavételezés előtt | Kapott antibiotikum (1 hónapon belül)   |
|-------------|------------------|----------|-----------------|--------------------------------|---|---|
| 9/21        | krónikus         | 1 év     | kutyatáp        | Isospora, Giardia, Clostridium | igen                                      | amoxicillin-klavulánsav<br>enrofloxacin |
| 13/21       | krónikus         | 1 év     | kutyatáp        | Clostridium                    | igen                                      | enrofloxacin                            |
| 4/22        | krónikus         | 10 hónap | kutyatáp        | Giardia                        | nem                                       | -                                       |
| 10/22       | krónikus         | 2 év     | kutyatáp        | negatív                        | nem                                       | -                                       |

## 6. Következtetések

A kutatás célja az volt, hogy feltérképezzük az atipikus enteropatogén *E. coli* törzsek előfordulását kutyák hasmenéssel járó bélbetegégeinél. A külföldi szakirodalom már beszámolt az aEPEC törzsek megjelenéséről társállatainknál, azonban a hazai szakirodalomban eddig nem rendelkezünk ezzel az információval. Hazánkban egészen eddig nem történt meg ennek a törzsnek a vizsgálata specifikusan a hasmenéssel járó bélbetegégek megléte mellett kutyáknál. Ezért elmondható, hogy Magyarországon elsőként sikerült kutyákból aEPEC törzseket izolálnunk [22,23,25,26].

Összesen 4 esetben mutattuk ki az enteropatogén törzset, azaz a kitenyésztett 27 *E. coli* törzs 14,81 %-a aEPEC-nek bizonyult. A külföldi szakirodalomban változatos eredmények találhatók az aEPEC törzsek kutyákban való előfordulására nézve (10,1%-tól akár 31,7 %-ig). Egy kutatás csak az akut hasmenéssel járó bélbeteg kutyákat vizsgálja [22], és található néhány olyan tanulmány, melyeknél mintákat vettek mind egészséges, mind hasmenéses kutyákból [23,26,27]. Ezen kutatások eredménye alapján az aEPEC törzsek előfordulási aránya magasabb a beteg állatoknál, mint az egészségeseknél [25,26].

Kutatásunk során a mintákat akut, vagy krónikus hasmenéssel járó bélbetegséggel diagnosztizált kutyából szereztük. A külföldi szakirodalom máig is igen kevés olyan kutatásról számol be, amelynél az aEPEC előfordulását csak hasmenéses kutyáknál mérték fel. Specifikusan a krónikus hasmenéssel járó bélbetegségre nézve ez idáig még kevesebb szakcikk számol be. Egy kutatás 2004-ben felmérte az említett törzs előfordulását akut és krónikus hasmenéses kutyáknál, azonban a törzsek elkülönítésére nem PCR-technikát alkalmazott [23].

Mind a 4 aEPEC pozitív mintánkat hasmenéssel járó krónikus bélbetegségben szenvedő kutyánál találtuk. Mindegyik páciens 2 évesnél fiatalabb volt, ebből 3 kutya 1 év alatti kölyök volt. Egy kivétellel egyéb bélpatogéneket, vagy dysbiosisra utaló Clostridium-túlszaporodást tapasztaltunk. Két esetben a mintavételt a krónikus betegség akut fellángolása előzte meg, egyik esetben az *E. coli* egy másik típusa, a tapadó-invazív *E. coli* okozta a megbetegedést. Ezek alapján az aEPEC kóroki szerepe felmerül a fiatal, éretlen immunrendszerű és károsodott, vagy legyengült lokális immunrendszerrel bíró bélbeteg állatoknál. Ugyan feltételezhető, hogy az aEPEC hozzájárult a fenti betegek esetében a betegség romlásához, vagy fellángolásához, azonban kóroki szerepe nem igazolható egyértelműen a kis esetszám és a nem standardizált körülmények miatt. Két beteg javult

enrofloxacin-kúra mellett, amire az utólagos vizsgálat alapján érzékenynek bizonyult az aEPEC törzsük. A két beteg közül az egyiknél a célzott antibiotikum-kúra hatására bekövetkező javulás kapcsán felmerül az aEPEC kóroki szerepe, mert krónikus betegségének akut fellángolását sikeresen kezeltük így. A másik betegnél azonban granulomás colitist is igazoltunk, amelynek kialakulásában egy másik patogén *E. coli* törzs (AIEC) játszik szerepet, ami szintén érzékeny lehet enrofloxacinra. Így a beteg nemcsak az aEPEC, hanem az AIEC törzs kezelése miatt is javulhatott, továbbá giardiás is volt, amit szintén kezeltünk. A további két kutya esetében az aEPEC kóroki szerepe még inkább bizonytalan. Adódik ez részben abból, hogy ezek a betegek tilozint kaptak, amire azonban nem vizsgáltuk a aEPEC törzseket, ezért ennek az antibiotikumnak hatékonysága ezekben az esetekben nem ismert. Másrészt kétségek merülnek fel az aEPEC kóroki szerepét tekintve azért is, mert a kettő kutya közül az egyik giardiás is volt, melyet célzottan kezeltünk, így állapotának javulása ennek is betudható. A negyedik beteg pedig csak részben javult tilozin adása mellett.

A négy aEPEC pozitív kutyából kettőnél fordult elő giardiosis, és clostridiosis, mely fertőzések hasmenést idézhetnek elő. Ezek alapján nem tudtuk megállapítani, vajon az aEPEC törzsek közrejátszanak-e a hasmenés kialakításában, vagy éppen a dysbiosis kapcsán szaporodtak el a bélben.

Fontos megjegyezni továbbá, hogy valamennyi aEPEC pozitív kutya tartós hipoallergén diétán volt, és hosszú távú probiotikum kúrában részesült az antibiotikum kezelésen túl. Javulásuk ennek is betudható, hiszen ismert, hogy az idült bélbetegek közel 70%-a javul önmagában egy megfelelő, azaz jól emészthető és hipoallergén diéta mellett [37].

A 4 beteg bemutatása alapján is látható, hogy az enteropatogének krónikus bélbetegségekben betöltött szerepének tisztázása komoly kihívásokkal jár a bélben zajló, meglehetősen összetett és sok szempontból nem teljesen ismert folyamatok miatt. Ezen folyamatok magukban foglalják a bél immunrendszerének, a bélflórának, valamint az esetlegesen jelen lévő bélpatógéneknek egymást szabályozó, szoros kapcsolatát és egymásra hatását.

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok során mind a 27 izolált *E. coli* törzs multirezisztensnek bizonyult a 3, vagy annál több antibiotikummal szemben mutatott rezisztencia miatt. Ez az eredmény a külföldi szakirodalomhoz képest meglehetősen magas.

Az Egyesült Királyságban, Kínában és Mexikóban végzett felmérések alapján 18-55%-ra tehető az MDR *E. coli* törzsek előfordulása hasmenéses kutyákban [25,27,29]. Kutatásunknál a 27 *E. coli* törzsből 4 törzs legalább 10 antibiotikummal szemben mutatott rezisztenciát. Bizonyos hatóanyagokkal szemben (nitrofurantoin, szulfomatoxazol) majdnem az összes törzs ellenálló volt, míg egyes antibiotikumok esetén (gentamicin, ceftiofur, klóramfenikol) jóval kedvezőbb eredmények születtek.

Összehasonlítottuk az *E. coli* törzsek között az előzetesen antibiotikummal kezelt, valamint az antibiotikumot nem kapott kutyák rezisztencia értékeit. A rezisztencia átlagosan magasabbnak bizonyult az antibiotikumot kapott állatoknál, amelynek háttérében állhatnak az előzetes antibiotikum terápiák. Ezen eredmények hasonlóak a külföldi szakirodalomban reprezentált adatokhoz [31]. Vizsgálatunk eredménye felhívja a figyelmet arra, hogy a sokszor feleslegesen, vagy nem megfelelően alkalmazott antibiotikum-kúra számottevő antibiotikum rezisztenciához vezet, melynek mind állat-, mind humánegészségügyi vonalon súlyos következményei lehetnek.

Az aEPEC törzsek is multirezisztensek voltak, azonban a rezisztencia számokat sorba rendezve a kevés (4-6) rezisztenciát mutatók között voltak jelen a teljes *E. coli* csoporthoz viszonyítva, ahol a rezisztencia jóval nagyobb méreteket öltött az egyes antibiotikumokra nézve (a szélső értékek 3-11 közé voltak tehetőek az összes *E. coli*-ra nézve). Ez az eredmény eltérő volt a külföldön publikált kutatásokhoz képest, ahol az aEPEC törzsek jóval nagyobb mértékű rezisztenciát mutattak [31].

Az aEPEC törzsek esetében a többi törzstől nagyban eltérő, jellegzetes rezisztenciamintát nem sikerült kimutatni. Összehasonlítva a rezisztencia alakulását az *E. coli* törzsekkel, négy antibiotikumot találtunk, melyekre az *E. coli* törzsek egy része rezisztens volt, azonban az aEPEC minták mindegyike érzékenynek bizonyult (enrofloxacin, nalidixsav, marbofloxacin és a klóramfenikol). Ezen antibiotikumok közül a nalidixsav és a klóramfenikol a kisállatgyógyászatban ritkán használt készítmények. A többi antibiotikum esetében hasonló eredmények születtek a két csoport között, bár az összehasonlítás pontosságát némileg nehezítette, hogy összesen 4 aEPEC törzsünk volt.

Kutatásunk során próbáltunk összefüggéseket találni az előzetes antibiotikum terápia, valamint az előforduló rezisztencia kapcsán, azonban az alacsony mintaszám ezt nem tette lehetővé. A négy pozitív aEPEC kutyából kettő kapott a mintavételezést megelőző 1 hónapon belül antibiotikumot (egyik amoxicillin-klavulánsavat és enrofloxacint, másik

enrofloxacin), mindemellett mindegyik antibiotikumra érzékenyek maradtak a rezisztencia vizsgálatok alapján. Az aEPEC törzsek antibiotikum rezisztenciája változatos volt. Az antibiotikum rezisztencia kiterjedt előfordulása és mértéke alapján érdemes lenne további mintákat gyűjteni és újra megvizsgálni a rezisztenciát nagyobb esetszámmal karöltve, hogy pontosabb képet kaphassunk a rezisztencia alakulásáról. Indokolt lehetne a mintavételezés előzetesen antibiotikummal kezelt állatokból.

Napjainkban a társállatainkkal lévő szoros testi kontaktus miatt fokozottan ki vagyunk téve a patogén kórokozónak, ugyanis a kutyák rezervoárjai lehetnek a humán megbetegedéseket okozó enteropatogén *E. coli*-nak. Ezen baktériumtörzs antibiotikum rezisztenciája, valamint a potenciális zoonózis megléte veszélyezteti az emberek egészségét is [25,27,28]. Kutatásunk során bebizonyítottuk, hogy a hasmenéses kutyáknál előfordul a kórokozó Magyarországon is, valamint, hogy ezen törzsek multirezisztensek voltak. A betegség során ürített bélsár fertőző közegként megbetegedéseket okozhat emberek esetében is.

Kutatásunk eredményeinek értékelését korlátozza, hogy viszonylag kevés mintát sikerült gyűjteni. A mintavételezés specifikusan csak a hasmenéses kutyákból történt és nem gyűjtöttünk egészséges állatokból mintát. Az egészséges kontroll csoport hiánya nehezíti az aEPEC kóroki szerepének értékelését. Hátráltatja a megfelelő következtetések levonását az is, hogy bizonyos kisállatgyógyászatban gyakran használt antibiotikumok nem szerepeltek a rezisztencia vizsgálatok során (például tilozin, metronidazol), ezáltal nem tudtuk összevetni az ilyen antibiotikumokat kapott kutyáknál a rezisztencia alakulását. Továbbá az aEPEC kóroki szerepének, rezisztenciájának feltérképezését limitálta, hogy összesen 4 aEPEC törzset tudtunk izolálni.

Az aEPEC egyértelmű kóroki szerepére a jelen tanulmányban tehát nem sikerült fényt derítenünk, azonban az ok-okozati összefüggések felmerülhetnek az előzőleg tárgyaltak alapján. További nagyobb számú és kiterjedtebb vizsgálatokra lenne szükség, hogy az aEPEC törzsek hasmenéssel járó gastrointestinalis megbetegedésekben betöltött szerepével kapcsolatban pontosabb információkat szerezhessünk.

Összegezve a kutatásunk eredményét, elmondhatjuk, hogy a hazai szakirodalmat áttekintve tudomásunk szerint Magyarországon elsőként sikerült izolálnunk és kimutatnunk az aEPEC törzsek jelenlétét kutyák hasmenéssel járó bélbetegégeiben. A külföldi szakirodalomban is kevés eredmény született ez idáig specifikusan a hasmenéses kutyákat

vizsgálva az aEPEC-re, így ezen a téren is egyedinek számít a tanulmányunk. A téma részletesebb tanulmányozása érdekében érdemes lenne hosszabb időintervallum alatt több mintát begyűjteni és vizsgálni, valamint az antibiotikum rezisztencia vizsgálatával további következtetéseket levonni. Indokolt lehet továbbá az egészséges kutyákból történő mintavételezés, és az így kapott eredmények összevetése a beteg állatokéval. Ezek mellett érdemes lenne vizsgálni az aEPEC szerepét a bélel szoros összefüggésben működő szervek betegsége kapcsán, különösen, amikor ascendáló fertőzés feltételezhető, így például epeúti betegségekben, valamint hasnyálmirigy-gyulladásban.



## 7. Összefoglalás

Az *Escherichia coli* egy széles körben előforduló Gram-negatív baktérium, az egészséges bélflóra kommenzalista lakója. Vannak azonban olyan fakultatív, vagy obligát patogén törzsei is, melyek képesek betegségeket okozni emberben és állatban egyaránt. Utóbbiak közé tartozik az EPEC, amelynek közegészségügyi szerepe felértékelődött az utóbbi években. Az emberi megbetegedések mellett nagy számban okoz fertőzést a haszonállatok (szarvasmarha, baromfi, sertés, juh) és társállatok (kutya, macska) körében is. A potenciális zoonózis, illetve az elterjedt antibiotikum rezisztencia miatt fokozottan fontossá vált a téma részletesebb vizsgálata. A kutatásunk célja volt, hogy felmérjük Magyarországon az aEPEC törzsek előfordulását társállatainkban, valamint ezen törzseknél előforduló antibiotikum rezisztencia mértékét, továbbá választ próbáltunk kapni a hasmenéssel járó bélbetegségekben betöltött szerepére kutyákban.

Összesen 55 tamponmintát gyűjtöttünk hasmenéssel járó bélbetegséggel diagnosztizált 54 kutyából az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatklinikájáról, illetve a Kedvencdoktor Állatorvosi Rendelőből. Ezekből 22 kutyának akut, 32-nek pedig krónikus hasmenése volt. Összesen 27 *E. coli* törzset tudtunk izolálni bakteriológiai vizsgálatok segítségével. A 27 *E. coli* törzsből 4 bizonyult intimin pozitív aEPEC törzsnek, amelyek mindegyikét multirezisztensnek minősítettük.

A kutatás eredményeként elmondhatjuk, hogy Magyarországon elsőként sikerült hasmenéses kutyákból izolálni az aEPEC törzset. Vizsgálataink alapján feltételezzük a törzs szerepét a hasmenéssel járó idült bélbetegségekben. Kóroki szerepének egyértelmű igazolásához azonban további, nagyobb esetszámot magába foglaló vizsgálatra van szükség.

## 8. Irodalom

1. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
2. Levine MM, Edelman R (1984) Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* 6:31–51. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036274>
3. Rosa AC, Mariano AT, Pereira AM, Tibana A, Gomes TA, Andrade JR (1998) Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol* 47:781–790. <https://doi.org/10.1099/00222615-47-9-781>
4. Nguyen RN, Taylor LS, Tauschek M, Robins-Browne RM (2006) Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg Infect Dis* 12:597–603. <https://doi.org/10.3201/eid1204.051112>
5. Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11:142–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>
6. Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* 41:1340–1351. <https://doi.org/10.1128/iai.41.3.1340-1351.1983>
7. Rothbaum R, McAdams AJ, Giannella R, Partin JC (1982) A clinicopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. *Gastroenterology* 83:441–454
8. Donnenberg MS, Kaper JB (1992) Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 60:3953–3961. <https://doi.org/10.1128/iai.60.10.3953-3961.1992>

9. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1664–1668. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1664>
10. Tobe T, Hayashi T, Han C-G, Schoolnik GK, Ohtsubo E, Sasakawa C (1999) Complete DNA Sequence and Structural Analysis of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Adherence Factor Plasmid. *Infect Immun* 67:5455–5462
11. Girón JA, Ho AS, Schoolnik GK (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254:710–713. <https://doi.org/10.1126/science.1683004>
12. Hernandez RT, Elias WP, Vieira MAM, Gomes TAT (2009) An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 297:137–149. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x>
13. Jarvis KG, Girón JA, Jerse AE, McDaniel TK, Donnenberg MS, Kaper JB (1995) Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7996–8000
14. Wales AD, Woodward MJ, Pearson GR (2005) Attaching-effacing Bacteria in Animals. *Journal of Comparative Pathology* 132:1–26. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.09.005>
15. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91:511–520. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80437-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80437-7)
16. Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7839–7843

17. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB (2013) Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 26:822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
18. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA (2002) Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 8:508–513. <https://doi.org/10.3201/eid0805.010385>
19. Wani SA, Hussain I, Nabi A, Fayaz I, Nishikawa Y (2007) Variants of *eae* and *stx* genes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from calves. *Lett Appl Microbiol* 45:610–615. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02235.x>
20. Krause G, Zimmermann S, Beutin L (2005) Investigation of domestic animals and pet as a reservoir for intimin- (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. *Veterinary microbiology* 106:87–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.11.012>
21. Ishii S, Meyer KP, Sadowsky MJ (2007) Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol* 73:5703–5710. <https://doi.org/10.1128/AEM.00275-07>
22. Kjaergaard AB, Carr AP, Gaunt MC (2016) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection in association with acute gastroenteritis in 7 dogs from Saskatchewan. *Can Vet J* 57:964–968
23. Sancak AA, Rutgers HC, Hart CA, Batt RM (2004) Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. *Vet Rec* 154:101–106. <https://doi.org/10.1136/vr.154.4.101>
24. Watson VE, Jacob ME, Flowers JR, Strong SJ, DebRoy C, Gookin JL (2017) Association of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* with Diarrhea and Related Mortality in Kittens. *J Clin Microbiol* 55:2719–2735. <https://doi.org/10.1128/JCM.00403-17>

25. Vega-Manriquez XD, Ubiarco-López A, Verdugo-Rodríguez A, Hernández-Chiñas U, Navarro-Ocaña A, Ahumada-Cota RE, Ramírez-Badillo D, Hernández-Díaz de León N, Eslava CA (2020) Pet dogs potential transmitters of pathogenic *Escherichia coli* with resistance to antimicrobials. *Arch Microbiol* 202:1173–1179. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01828-9>
26. Puño-Sarmiento J, Medeiros L, Chiconi C, Martins F, Pelayo J, Rocha S, Blanco J, Blanco M, Zanutto M, Kobayashi R, Nakazato G (2013) Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Veterinary Microbiology* 166:676–680. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.007>
27. Cui L, Zhao X, Li R, Han Y, Hao G, Wang G, Sun S (2022) Companion Animals as Potential Reservoirs of Antibiotic Resistant Diarrheagenic *Escherichia coli* in Shandong, China. *Antibiotics* (Basel) 11:828. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060828>
28. Watson VE, Hazen TH, Rasko DA, Jacob ME, Eifenbein JR, Stauffer SH, Gookin JL (2021) Comparative Genomics of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* from Kittens and Children Identifies Bacterial Factors Associated with Virulence in Kittens. *Infect Immun* 89:e00619-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00619-20>
29. Wedley AL, Dawson S, Maddox TW, Coyne KP, Pinchbeck GL, Clegg P, Nuttall T, Kirchner M, Williams NJ (2017) Carriage of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in dogs: Prevalence, associated risk factors and molecular characteristics. *Vet Microbiol* 199:23–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.017>
30. Takagi H, Yamane K, Matsui M, Suzuki S, Ito K (2020) Pathotypes and Drug Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from Companion Dogs in Japan. *Jpn J Infect Dis* 73:253–255. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2019.122>
31. Schmidt VM, Pinchbeck G, McIntyre KM, Nuttall T, McEwan N, Dawson S, Williams NJ (2018) Routine antibiotic therapy in dogs increases the detection of antimicrobial-

- resistant faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 73:3305–3316.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dky352>
32. Salgado-Caxito M, Benavides JA, Adell AD, Paes AC, Moreno-Switt AI (2021) Global prevalence and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing-*Escherichia coli* in dogs and cats – A scoping review and meta-analysis. *One Health* 12:100236. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100236>
  33. China B, Pirson V, Mainil J (1996) Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Appl Environ Microbiol* 62:3462–3465. <https://doi.org/10.1128/aem.62.9.3462-3465.1996>
  34. Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW (1995) Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol* 33:1375–1377. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.5.1375-1377.1995>
  35. Franke J, Franke S, Schmidt H, Schwarzkopf A, Wieler LH, Baljer G, Beutin L, Karch H (1994) Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J Clin Microbiol* 32:2460–2463. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.10.2460-2463.1994>
  36. Fröhlicher E, Krause G, Zweifel C, Beutin L, Stephan R (2008) Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. *BMC Microbiol* 8:144. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-144>
  37. Dandrieux JRS (2016) Inflammatory bowel disease versus chronic enteropathy in dogs: are they one and the same? *J Small Anim Pract* 57:589–599. <https://doi.org/10.1111/jsap.12588>

## 9. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Pápa Kingának a lehetőséget, hogy részt vehettem a kutatásban és ezáltal elkészíthettem ezt a dolgozatot. Köszönöm a kísérlet során nyújtott támogatását, kiemelkedő szaktudását és tanítását, melyeknek hála létrejöhetett a munkám. Köszönet illeti másik témavezetőmet, Dr. Adorján Andrást, akinek segítségével és rengeteg befektetett munkája nélkül nem jöhetett volna létre ez a dolgozat. Köszönöm Nekik a sok hasznos tanácsot és útmutatást, hatalmas segítséget nyújtottak számomra.

Szeretném megköszönni a Belgyógyászati Tanszék és Klinika tanszékvezetőjének, Dr. Manczur Ferencnek és a klinika valamennyi munkatársának a mintagyűjtésben való segítséget, illetve a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék tanszékvezetőjének, Dr. Tenk Miklósnak és a tanszék munkatársainak a kedves fogadtatást és a segítségüket a diagnosztikai munka elvégzése kapcsán.

Továbbá köszönettel tartozom a Kedvencdoktor Állatorvosi Rendelő munkatársainak a mintagyűjtésben való segítségért, illetve a nyújtott támogatásért.

Végezetül köszönöm a családom és barátaim támogatását, biztatását.

**HuVetA**  
**ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\***

Név: ..... Gergely Orsolya Boglárka .....  
Elérhetőség (e-mail cím): ..... ogergely9@gmail.com .....  
A feltöltendő mű címe: ..... Az enteropatogén Escherichia coli előfordulása kutyák hasmenéssel járó bélbetegségeiben .....  
A mű megjelenési adatai: ..... Diplomamunka, 2022 .....  
Az átadott fájlok száma: ..... 1 .....

---

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédtől PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),



Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2022 év .....11.....hó .....13.....nap

*Gergely Orsoha*

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

---

***A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgálta, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.***

***A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén***

- ***a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;***
- ***a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;***
- ***az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;***
- ***a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,***
- ***a nyílt hozzáférés támogatása.***



## Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Gergely Orsolya Boglárka

Neptun-kódja: GN9YBQ

A témavezető neve és beosztása: Dr. Pápa Kinga, egyetemi adjunktus

Tanszék: Belgyógyászati Tanszék

A diplomadolgozat címe:

Az enteropatogén Escherichia coli előfordulása kutyák  
hasmenéssel járó bélbetegségeiben

## Konzultáció - 1. félév

|    | Időpont |     |     | Téma/Témavezető megjegyzése | Témavezető aláírása |
|----|---------|-----|-----|-----------------------------|---------------------|
|    | Év      | Hó  | Nap |                             |                     |
| 1. | 2021.   | 10. | 14. | Téma átbeszélése            | Pápa Kinga          |
| 2. | 2021.   | 12. | 08. | Formai követelmények        | Pápa Kinga          |
| 3. | 2022.   | 01. | 26. | Irodalmazás                 | Pápa Kinga          |
| 4. | 2022.   | 02. | 02. | Módszer átbeszélése         | Pápa Kinga          |
| 5. | 2022.   | 02. | 03. | Laboratóriumi munka         | Pápa Kinga          |

Érdemjegy az első félév végén: 5

## Konzultáció - 2. félév

|    | Időpont |     |     | Téma/Témavezető megjegyzése | Témavezető aláírása |
|----|---------|-----|-----|-----------------------------|---------------------|
|    | Év      | Hó  | Nap |                             |                     |
| 1. | 2022.   | 03. | 08. | Laboratóriumi munka         | Pápa Kinga          |
| 2. | 2022.   | 03. | 24. | Hivatkozás megbeszélése     | Pápa Kinga          |
| 3. | 2022.   | 05. | 02. | Eredmények összevetése      | Pápa Kinga          |
| 4. | 2022.   | 05. | 10. | Javítás                     | Pápa Kinga          |

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel datuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



|    |  |  |  |  |  |
|----|--|--|--|--|--|
| 5. |  |  |  |  |  |
|----|--|--|--|--|--|

Érdemjegy a második félév végén: ..... 5 .....

A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Utmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védeésre alkalmasnak találtam.

dr. Pápa Kinga  
témavezető aláírása

Hallgató aláírása: Gergely Orsolya

Tanszéki előadó aláírása: Wabele-Sóber Márk Átvétel dátuma: 2022-11-14

Alulírott Dr. Pápa Kinga igazolom, hogy Gergely Orsolya Boglárka

Az enteropathogen *Escherichia coli* előfordulása kutyák hasmenéssel járó bélbetegségeiben című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2022-11-16.



Dr. Pápa Kinga

Belgyógyászati Tanszék és Klinika