

Citrobacter freundii septicaemia in a new-born calf

Case report

Szeredi Levente^{1*}
 Lipovszky András Dénes²
 Rónai Zsuzsanna¹
 Jánosi Szilárd¹

L. Szeredi^{1*}
 A. D. Lipovszky²
 Zs. Rónai¹
 Sz. Jánosi¹

1. NÉBIH Állat-egészségügyi
 Diagnosztikai Igazgatóság
 H-1149 Budapest, Tábornok u. 2.

* e-mail: szeredil@oai.hu

2. Szolgáltató állatorvos,
 Gyöngyöstarján

Citrobacter freundii okozta vérfertőzés újszülött borjában

Esetismertetés

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők közleményükben egy gyenge életképességű újszülött borjúról számolnak be, amely a születés után 2 nappal *Citrobacter freundii* okozta vérfertőzés következtében elhullott. Savós lágyagyburok-gyulladás mellett a legkifejezettebb elváltozás a testszerte kialakult fröcskölésszerű vérzések voltak. A baktériumot a tüdőből és a májból dús szintenyészetben izolálták. A kórszövettani és az immunhisztokémiai vizsgálattal a *C. freundii*-hez hasonló rövid pálca alakú baktériumokat találtak az agyvelőben, tüdőben, vesében és lépben. Más, szóba jöhető baktériumos vagy vírusos fertőzést nem mutattak ki. A nemzetközi állatorvosi szakirodalomban ez az első alkalom, hogy borjában *C. freundii* okozta vérfertőzés került leírásra.

SUMMARY

Background: Septicaemia is a dangerous often fatal disease of new-born calf, which is induced by *Escherichia coli* bacterium in majority of the cases.

Objectives: The authors report the first case of *Citrobacter freundii* induced septicemia in a new-born calf.

Materials and Methods: Two calves died in a small herd presenting weakness and anorexia in age of 2 days. One of these animals was presented for laboratory examination. After gross pathological investigation bacteriological examinations were performed from the joint, lungs and liver. The disk diffusion test was used for antibiotic sensitivity of the isolated bacterium strain. Tissue samples were collected from brain, lungs, spleen, liver, and kidney for histological and immunohistochemical (IHC) examinations. A rabbit anti-*Mycobacterium bovis* (BCG) antibody was used for IHC test, which detects several different bacterial species.

Results and Discussion: Mild icterus and suffusion haemorrhages on serous membranes were observed. Histological examination revealed acute haemorrhages in meninges, kidney, spleen and lungs. Serous meningitis, acute degeneration of liver and kidney and mild interstitial pneumonia was also present. Additionally coccobacilli were found in the brain, lungs, kidney, and spleen with histological examination and with IHC methods. Coliform bacterium was cultured from lungs and liver, which was identified as *C. freundii*. The strain was sensitive to gentamycin, streptomycin, colistin, marbofloxacin, tetracycline, doxycycline, sulphonomide+trimethoprim, ceftiofur and cefquinome. The bacterium strain was moderate resistant to neomycin, spectinomycin, enrofloxacin, flumequine, florfenicol, and it was resistant to ampicillin, amoxicillin, amoxicillin+clavulanic acid, sulphonomide and cephalixin. Other bacteria (including *Brucella* and *Campylobacter*) or viruses (including Schmallenberg virus, bluetongue virus and bovine virus diarrhoea virus) were not detected.

A borjak vérfertőzése egy hirtelen fellépő, súlyos fokú megbetegedés, amely elsősorban a két hétnél fiatalabb egyedekben fordul elő, és az esetek nagy részében a gondos gyógykezelés ellenére is elhullással végződik.

A borjak vérfertőzése során a kórokozó legtöbbször a gyomor-bélcsatornán át, ritkábban a köldökön, vagy az orr és a garat nyálkahártyáján keresztül jut a keringésbe a születést követő 2–5 napon belül

Az érintett borjak sárgaság és láz tüneit mutató tehenektől születtek, és két napon belül elpusztultak

Az egyik tetemből részletes patológiai, immunhisztokémiai és bakteriológiai vizsgálatokat végeztek

A vérfertőzést többnyire olyan, a környezetben előforduló szennyező baktériumok okozzák, amelyek kifejezett, egészséges egyedeket önmagukban nem képesek megbetegíteni. Az ilyen elhullott borjából a leggyakrabban izolálható baktérium az *Escherichia coli*, de alkalmanként számos más fajt is ki lehet mutatni (3). A fertőzés legtöbbször a gyomor-bélcsatornán át, ritkábban a köldökön, vagy az orr és a garat nyálkahártyáján keresztül jut el a nyirok-, ill. a vérrendszerbe a születést követő 2–5 napon belül (4). A fertőzés kialakulásában fontos szerepe van az erősen szennyezett környezetnek és a főcstejítetés hibáinak (3). Ezek a hiányosságok együttesen meggátolják az újszülöttben az egészséges bélflóra és a környezeti fertőzésekkel szembeni megfelelő ellenálló képesség kialakulását.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Egy 30 egyedből álló, legelőn tartott, vegyes hasznosítású szarvasmarha-állományban 1 héten belül két tehén enyhe fokú sárgaság és láz kíséretében egy-egy gyenge életképességű borjat hozott a világra, amelyek az ellés után 2 nappal elpusztultak. A gazda ebben az időszakban néhány más tehénnél is 3–4 napig tartó enyhe fokú sárgaságot és alkalmanként lázra utaló zihálást és izzadást figyelt meg. A két elhullott borjú közül az egyik laboratóriumi vizsgálatra került. Ez az állat nem tudott föllállni, de szopási reflexe volt, így sikerült főcstejjel megitatni. A kórboncolását követően az agyvelőből, tüdőből, lépéből, májból és veséből mintát vettünk kórszövettani vizsgálat céljára. A 4%-os formaldehidoldatban fixált, paraffinba ágyazott szervekből 4 µm vastag metszeteket készítettünk, amelyeket hematoxilinal és eozinnel (HE), Giemsa-festéssel, továbbá Warthin–Starry-féle ezüstimpregnációval festettünk meg. Sorozatmetszeteken immunhisztokémiai (IH) vizsgálatot végeztünk a *Mycobacterium bovis* (BCG) ellen termelt ellenanyag felhasználásával a korábban leírt módon (6). Ezzel a módszerrel a szöveti elváltozásokban jól feltűntethetők a legkülönfélébb baktériumfajok, számos gomba, sőt néhány egysejtű parazita is. Mintát vettünk bakteriológiai vizsgálat céljára a tüdőből, a májból és az ízületi folyadékból, amelyet 5% juhvérrel kiegészített Columbia-agarra, valamint Drigalski-agarra oltottunk ki, és 37 °C-on 24 órán át inkubáltunk. Szelektív táptalajokon megkíséreltük kimutatni a *Brucella* spp. és *Campylobacter* spp. törzseket is. A kitenyésztett törzsek meghatározása QUINN és mtsai szerint történt (5), amit rapid ID32E (bioMérieux SA, Lyon, Franciaország) lemezen való megerősítés követett, míg a baktérium gyógyszerérzékenységi vizsgálatát korongdiffúziós módszerrel végeztük.

EREDMÉNYEK

A külső vizsgálat során a kültakaró, a köldök és a lábvégek épek voltak. Az ízületek nem voltak láthatóan duzzadtak, de az üregükben kissé megszaporodott, vörhenyes ízületi folyadékot találtunk. A belső vizsgálatnál enyhe fokú sárgaságot, valamint a köldökben, a vesék körüli kötőszövetben, a lép és az oltó savóshártyája alatt, továbbá a lágyagyburokban kiterjedt, fröcskölésszerű vérzéseket láttunk. A máj megnagyobbodott, okkerságán elszíneződött és a normálisnál könnyebben szakítható volt. Az oltógyomor részben alvadt tejjel középe-

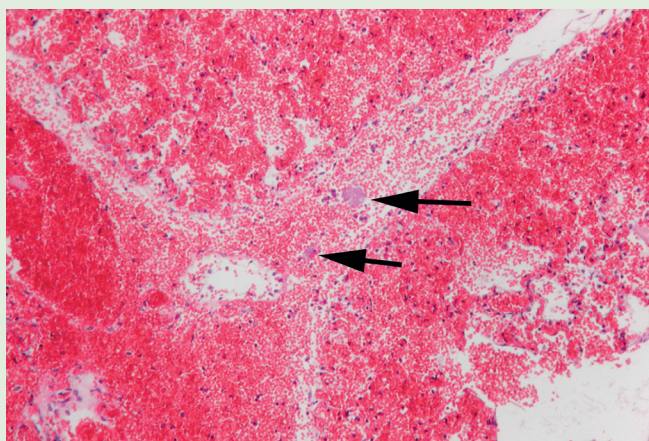
A patológiai vizsgálat során enyhe fokú sárgaságot, testszerte vérzéseket, valamint savós lágyagyburok-gyulladást figyeltek meg

A bakteriológiai vizsgálattal a májból és a tüdőből színtenyészetben, nagy csíraszámban coliform baktériumot izoláltak, amely *C. freundii*-nek bizonyult

sen telt volt. Egyéb kórjelző értékű elváltozást nem találtunk. A kórszövettani vizsgálattal a máj szerkezetének felbomlását és a májsejtek vacuolás elfajulását, valamint epepangást, a vesében friss keletű vérzések mellett a tubulusokban heveny hámsajtelfajulást, a lépben pedig ugyancsak kiterjedt vérzések mellett a lymphoid sejtek kiürülését figyeltük meg. A tüdőben súlyos fokú friss keletű vérzést (1. ábra), továbbá elszórtnan enyhe fokú szövetközi gyulladást, végül az agyvelő állományában és az lágyagyburokban kiterjedt heveny vérzéseket, valamint heveny savós lágyagyburok-gyulladást állapítottunk meg (2. ábra). A HE-, valamint, a Giemsa-festéssel rövid pálcákból álló baktériumembólusokat találtunk a lépben, a tüdőben (vö. 1. ábra), a vese glomerulusaiban (3. ábra) és az agyvelőben (4. ábra). Leptospirákat a WS-festéssel nem mutattunk ki. A baktériumokat az IH-módszerrel a lépben, tüdőben, vesében és agyvelőben ugyancsak sikerült megtalálni. Az immunfestődés a rövid pálcák mellett különböző méretű rögök formájában is megfigyelhető volt (5., 6. és 7. ábrák).

A bakteriológiai vizsgálattal a májból és a tüdőből színtenyészetben, nagy csíraszámban coliform baktériumot izoláltunk, amely *C. freundii*-nek bizonyult. Az ízületi folyadékból csupán vegyes baktériumflórát tenyésztettünk ki. *Brucella* spp. és *Campylobacter* spp. baktériumokat nem mutattunk ki. Az izolált *C. freundii* törzs a gentamicin, a streptomycin, a colistin, a marbofloxacin, a tetracyclinek, a doxycyclin, a szulfonamidok + trimethoprim, a ceftiofur (3. generációs cefalosporinok) és a cefquinome (4. generációs cefalosporinok) iránt érzékenynek bizonyult. Mérsékelten érzékeny volt a neomycin, a spectinomycin, az enrofloxacin, a flumequine (1. generációs kinolonok) és a florfenicol iránt, míg rezisztens az ampicillin, az amoxicillin, az amoxicillin + klavulánsav, a szulfonamidok és a cefalexinnel (1. generációs cefalosporinokkal) szemben.

Az esetleges vírusos fertőzések kizárása céljából elvégzett virológiai vizsgálatok a szarvasmarha vírusos hasmenése, a Schmallerberg-vírus, valamint a kéknyelvbetegség vírusa szempontjából negatívak lettek. A két gyenge életképességű borjút ellett tehén közül az egyikben ellenanyagokat mutattunk ki a Schmallerberg- és a kéknyelvbetegséget okozó vírusokkal szemben, míg a

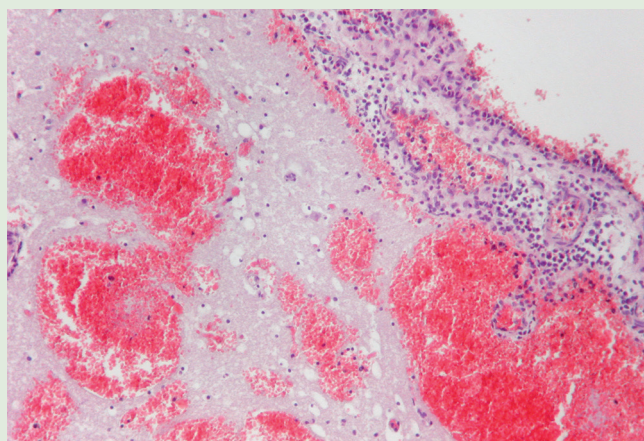


1. ÁBRA. Borjú, tüdő

Súlyos fokú friss keletű vérzés. A nyilak baktériumhalmazokat jelölnek. H.–E., 100×

FIGURE 1. Calf, lung

Severe, acute haemorrhage. The arrows indicate groups of bacteria

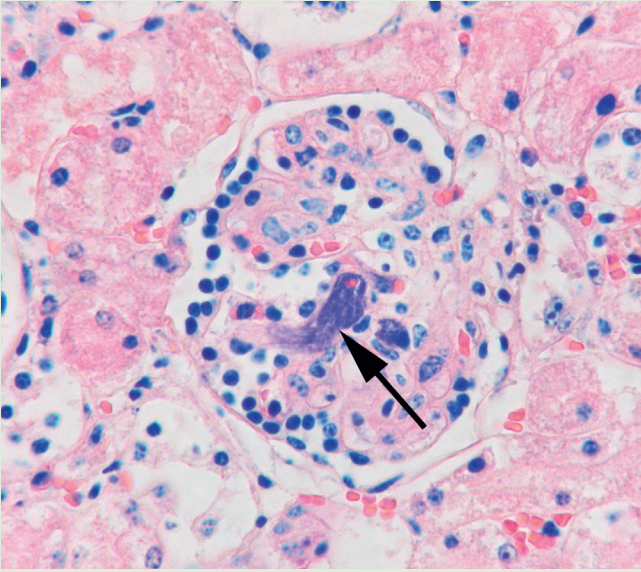


2. ÁBRA. Borjú, agyvelő

Savós lágyagyburok-gyulladás és súlyos fokú friss keletű vérzések az agyburokban és az agyvelő állományában. H.–E., 100×

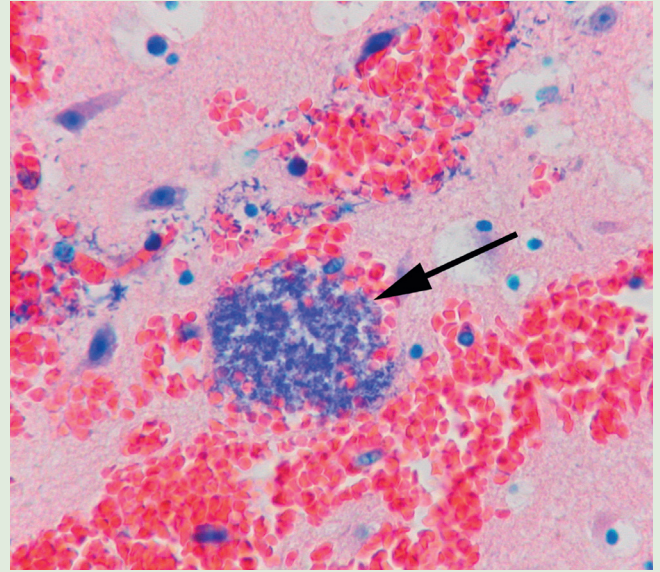
FIGURE 2. Calf, brain

Serous meningitis and severe, acute haemorrhages in the leptomeninges and in the brain



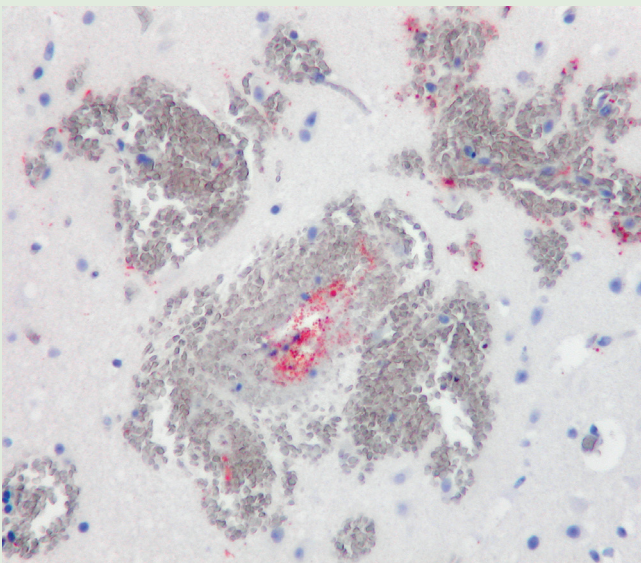
3. ÁBRA. Borjú, vese
Baktériumembolus egy glomerulusban (nyíl). Giemsa, 400×

FIGURE 3. Calf, kidney
Bacterium embolus in a glomerulus (arrow)



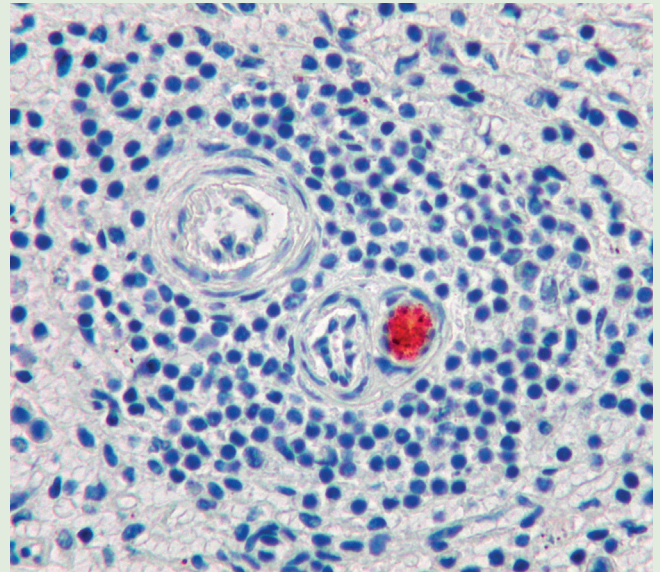
4. ÁBRA. Borjú, agyvelő
Rövid pálcá alakú baktériumok a vérerekben (nyíl) és a friss keletű vérzések környezetében. Giemsa, 400×

FIGURE 4. Calf, brain
Coccobacilli in the blood vessels (arrow) and next to the acute haemorrhages



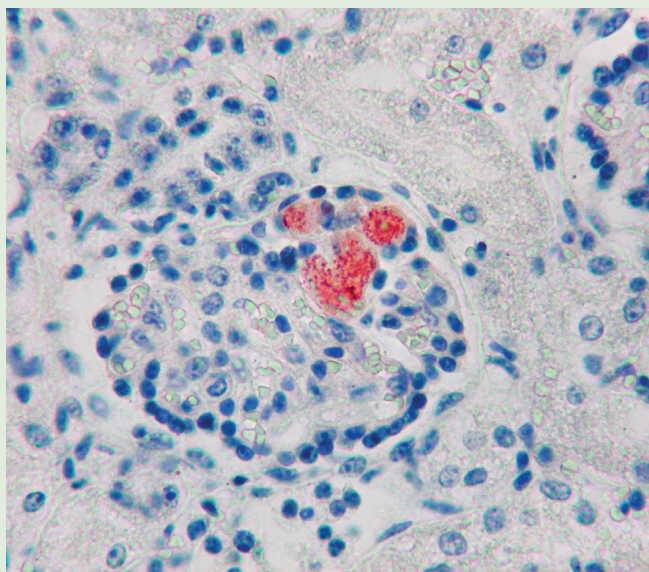
5. ÁBRA. Borjú, agyvelő
Piros immunfestődés jelzi a vérerekben és a friss keletű vérzések környezetében elhelyezkedő baktériumokat. IH, 200×

FIGURE 5. Calf, brain
Red immunostaining indicates the presence of bacteria in the blood vessels and next to the acute haemorrhages. IH



6. ÁBRA. Borjú, lép
Piros immunfestődés jelzi az érpályában elhelyezkedő baktériumokat. IH, 400×

FIGURE 6. Calf, spleen
Red immunostaining indicates the presence of bacteria in a vessel. IH



7. ÁBRA. Borjú, vese

Piros immunfestődés jelzi a glomerulus kapillárisban elhelyezkedő baktériumokat. Immunohisztokémia, 400×

FIGURE 7. Calf, kidney

Red immunostaining indicates the presence of bacteria in the capillaries of the glomerulus. Immunohistochemistry

A *C. freundii* széles körben előfordul a természetben, kimutatták számos állatfaj és az ember bélcsatornájából, valamint talaj-, víz- és takarmánymintákból is

A *C. freundii* in vitro képes az emberi agyvelőből származó kapillaris endothelsejtekbe behatolni és ott szaporodni

Ez lehet az oka annak, hogy jelentősebb gyulladással elváltozás a vizsgált szervek közül csak az lágyagyburokban fordult elő

másik tehén ilyen irányú szerológiai vizsgálata negatív lett.

MEGVITATÁS

A közlemény első alkalommal ismerteti *C. freundii* okozta vérfertőzés előfordulását borjúban. A baktériumot két parenchymas szervből is (tüdő, máj) dús szintenyészetben izoláltuk, továbbá a *C. freundii*-hez hasonló rövid pálcá alakú baktériumokat a kórszövet-tani és IH-vizsgálatokkal csaknem valamennyi vizsgált szervben kimutattuk. *Citrobacter* okozta borjú vérfertőzésről eddig egyetlen eset kapcsán jelent meg közlemény, ahol a 4 napos korban elhullott holstein bikából a *C. koseri* fajt mutatták ki (4). Abban az esetben a kórbonctani vizsgálattal fibrines sokizületi gyulladást, gennyes lágyagyburok-gyulladást, belső szemgyulladást, lépgyulladást és a vesében mikrotályogokat találtak. A megbetegedés kialakulásáért a szerzők a hiányos főcstejellátást tették felelőssé. Esetünkben az agyvelőben csupán savós lágyagyburok-gyulladást találtunk, míg a vezető kórbonctani elváltozások a feltehetőleg a septicus sokk következtében testszerte kialakult súlyosfokú kiterjedt vérzések voltak.

A *C. freundii* széles körben előfordul a természetben. Kimutatták számos állatfaj és az ember bélcsatornájából, valamint talaj-, víz- és takarmánymintákból is (2). Lehetséges a személyről személyre való tovaterjedés, amelynek létrejöttét anya és csecsemője között

is leírták már (2). Csecsemőknél és újszülött állatoknál a baktériumos vérfertőzés kialakulásának különösen kedvez a csökkent védekezőképesség, ezen belül is a hiányos maternális immunitás. Ha a fölvetett főcstej mennyisége nem elegendő, vagy gyenge a minősége, esetleg a bélcsatornából történő felszívódása tökéletlen, az mind hajlamosít a vérfertőzés kialakulására. Esetünkben a főcstejellátás rendben megtörtént, hiányosság csak a főcstej minőségével vagy annak felszívódásával kapcsolatban fordulhatott elő.

Az újszülöttkori baktériumos vérfertőzés gyakran jár együtt gennyes lágyagyburok-gyulladással és következményes idegrendszeri tünetek megjelenésével. Ennek pontos oka még nem ismert. Az egyik szóba jövő magyarázat az agyburkok közismerten bőséges vérellátása, amelyen keresztül nagy mennyiségben kerülhetnek baktériumok az lágyagyburokba majd az agyfolyadékba, ahol azután azok a gazdaszervezet immunrendszerétől jórészt védve élhetnek és szaporodhatnak (3). A *C. freundii* esetében *in vitro* kísérletben azt is igazolták, hogy a baktérium képes az emberi agyvelőből származó kapillaris-endothelsejtekbe behatolni és ott szaporodni. A *C. freundii* ezen képességével magyarázzák, hogy a fertőzés olyan gyakran jár együtt tályog kialakulásával az újszülött csecsemők agyvelejében (1). A most bemutatott esetben a fertőzéssel összefüggésbe hozható jelentősebb gyulladással elváltozás a vizsgált szervek közül csak az lágyagyburokban fordult elő, ami tovább erősíti a fenti kísérleti és gyakorlati megfigyeléseket. A vizsgált borjúban a legsúlyosabb elváltozás ugyanakkor a súlyos fokú vérzés volt, ami az agyvelőben és különösen a tüdőben volt kifejezett. Az állat elhullásának közvetlen kiváltó okai is feltehetően ezek voltak.

A tehének megbetegedésének okát és így a korallést kiváltó pontos körülményt sajnos nem sikerült kideríteni. Az egyik tehénben talált Schmallenberg-vírus és a kéknyelvbetegség vírusa ellen termelődött ellenanyagok csupán

A borjú fertőződése feltehetőleg még a méhen belül vagy a szülőútban, esetleg a fertőzött környezetből közvetlenül az ellés után következett be

A tehenek sárgasággal, lázzal járó megbetegedése hozzájárulhatott a borjak vérfertőzésének kialakulásához

az állat korábbi fertőződésére utalnak. A vizsgált borjában a közvetlen víruskimutatás az előbbi vírusok és a szarvasmarha vírusos hasmenése tekintetében is negatív lett, amivel kizártuk a szóba jöhető legfontosabb vírusok szerepét a megbetegedésben. A gyenge életképességre és a rövid, 2 napos kórlefordásra tekintettel a borjú fertőződése feltehetőleg még a méhen belül vagy a szülőútban, esetleg a fertőzött környezetből közvetlenül az ellés után következett be. A főcstej védőhatásának elmaradására ez is lehet egy magyarázat. A borjú ugyanis a főcstejhez ebben az esetben már csak a fertőzés kialakulása után juthatott, így az hatástalan maradt. A *C. freundii* eddigi ismereteink szerint ép immunrendszerrel rendelkező, kifejlett egyedeket, így teheneket nem betegít meg. Ezért azt feltételezzük, hogy az érintett tehenben a valamilyen ismeretlen okból kialakult sárgasággal járó lázas megbetegedés következtében nem sokkal a várható ellés előtt megnyílt a méhszáj, amelyen keresztül a *C. freundii* baktérium a méh üregébe jutott. A méh fertőződése vagy a tehen lázas megbetegedése, esetleg a kettő együtt azután az ellési folyamat idő előtti megindulását, és gyenge életképességű újszülött világra jövetelét eredményezte.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezik ki MÉSZÁROS ÁGNESNEK a vizsgálatokhoz nyújtott nélkülözhetetlen segítségért, valamint az ÁDI Virologiai Laboratóriumának a virológiai vizsgálatok elvégzésért.

IRODALOM

1. BADGER, J. L. – STINS, M. F. – KIM, K. S.: *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.*, 1999. 67. 4208–4215.
 2. GALARNEU, J. – FORTIN, M. et al.: *Citrobacter freundii* septicaemia in two dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2003. 15. 297–299.
 3. FECTEAU, G. – SMITH, B. P. – GEORGE, L. W.: Septicemia and meningitis in the newborn calf. *Vet. Clin. Food. Anim.*, 2009. 25. 195–208.
 4. KOMINE, M. – MASSA, A. et al.: *Citrobacter koseri* septicaemia in a Holstein calf. *J. Comp. Pathol.*, 2014. 151. 309–313.
 5. QUINN, P. – CARTER, M. – MARKEY, B. – CARTER, G.: *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby. 1993.
 6. SZEREDI, L. – GLÁVITS, R. – TENK, M. – JÁNOSI, Sz.: Application of anti-BCG antibody for rapid immunohistochemical detection of bacteria, fungi and protozoa in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. *Acta Vet. Hung.* 2008. 56. 89–99.
- Közlésre érk.: 2016. szept. 7.