

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**Enteropathogen *Escherichia coli* (EPEC) baktériumok
genotípusa/fenotípusa és pathogenitása
választott malacokban**

PhD értekezés

Készítette:

Dr. Malik Anna

MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

2006

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....
Prof. Dr. Nagy Béla
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

Témabizottsági tagok:

.....
Dr. Tóth István
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

.....
Dr. Eric Oswald
Interactions Hotes-Agents Pathogenes, Ecole Nationale Veterinaire, Toulouse

Készült 8 példányban. Ez az 1. sz. példány.

.....
Dr. Malik Anna

Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	5
Összefoglalás.....	7
Bevezetés.....	9
Előszó.....	9
1. Irodalmi áttekintés.....	9
1.1. Enterotoxint termelő <i>E. coli</i> (ETEC).....	11
1.2. Verotoxikus <i>Escherichia coli</i> (VTEC).....	13
1.2.1. Enterohaemorrhagiát okozó <i>E. coli</i> (EHEC).....	15
1.3. Enteropathogen <i>E. coli</i> (EPEC).....	16
Célok.....	23
2. Választott malacokból izolált <i>eae</i> ⁺ <i>E. coli</i> baktériumok fenotípusos és molekuláris jellemzése.....	24
2.1. Anyagok és módszerek.....	24
2.1.1. Mintagyűjtés.....	24
2.1.2. Baktériumtörzsek és statisztika.....	24
2.1.3. Genotípusos jellemzés polimeráz láncreakcióval és DNS alapú telep- hibridizációval.....	25
2.1.4. Fenotipizálás.....	28
2.1.5. <i>In vitro</i> adhéziós tesztek.....	28
2.2. Eredmények.....	30
2.2.1. Választott malacokból izolált EPEC törzsek előfordulása, szero- és genotípusa ..	30
2.2.2. HeLa, PK15 és MDBK sejteken végzett <i>in vitro</i> adhéziós vizsgálatok.....	36
2.3. Megbeszélés.....	37
2.4. Képek.....	42
3. Az atipikus EPEC baktériumok tanulmányozása sertés bélkacs modellben és sertés vékonybél mikroboholy készítményekben.....	46
3.1. Bevezető.....	46
3.2. Anyagok és módszerek.....	47
3.2.1. Baktériumtörzsek.....	47
3.2.2. Lékötött csípőbél-kacsok fertőzése.....	49
3.2.3. Szövetteni, immunfluoreszcenciás vizsgálatok és statisztika.....	50
3.2.4. Sertés vékonybél mikrobolyhokkal végzett <i>in vitro</i> kísérletek.....	50
3.3. Eredmények.....	53
3.3.1. A sertésekből izolált atipikus EPEC, és a humán EHEC törzsek tapadása választott sertések vékonybél mikrobolyhjaihoz (<i>in vitro</i>) és vékonybél hámsejtjeihez (<i>in vivo</i>)	53

3.3.2. A humán EHEC törzsek adhéziójának vizsgálata	56
3.3.3. Az életkor szerepének tanulmányozása <i>eae-β</i> és <i>eae-γ</i> típusú sertés EPEC törzsek csípőbéli megtelepedésében és az AE lézió előidézésében.....	57
3.3.4. A vékony- illetve a vastagbél-nyálkahártyán előidézhető AE lézió <i>eae-β</i> és <i>eae-γ</i> típusú sertés EPEC törzs esetében.....	60
3.3.5. Kefeszegélyhez történő tapadás eredményei.....	61
3.4. Megbeszélés	62
3.5. Képek	66
4. Atipikus EPEC fertőzések által okozott bélboholy-károsító hatások (AE léziók) választott malacokban.....	71
4.1. Bevezető	71
4.2. Anyagok és módszerek.....	71
4.2.1. A baktériumtörzsek és a hajlamosító tényezők	71
4.2.2. Kísérleti elrendezés	74
4.2.3. Klinikai és kórbonctani vizsgálatok	77
4.2.4. Az EPEC baktériumok bélbeni megtelepedésének és az AE léziók kialakulásának vizsgálata.....	77
4.2.5. Az állatok származása, tartása és takarmányozása.....	78
4.3. Eredmények.....	80
4.3.1. Hasmenés, rektális hőmérséklet, relatív testtömeg-növekedés	80
4.3.2. Mortalitás	80
4.3.3. A hajlamosító tényezők szerepe és az AE léziók.....	81
4.4. Megbeszélés	82
4.5. Képek	86
5. Záró megbeszélés és következtetések	90
Irodalom	94
Tudományos publikációk	108
Köszönetnyilvánítás	111

Rövidítések

AE – attaching-effacing (mikroboholy elhalást okozó)

AFA – afimbriális adhezin

AF/R1 – adhezív faktor/nyúl1 (adhesive factor/rabbit1)

AF/R2 – adhezív faktor/nyúl2 (adhesive factor/rabbit2)

ATCC – amerikai szövettípus gyűjtemény (American Type Culture Collection)

BFP – köteg formáló pilus (bundle forming pilus)

bp – bázispár

cAMP – ciklusos adenzin-monofoszfát

cGMP – ciklusos guanozin-monofoszfát

CCL – sejtvonal (Cell culture)

CDT – citoletális duzzasztó (distending) toxin

CFU – telepképző egység (colony forming unit)

CNF – citotoxikus nekrotizáló faktor

DAEC – diffúzan adheráló *E. coli*

eae – *E. coli* attachment effacement gén

EAEC – enteroaggregatív *E. coli*

EAF – EPEC adhéziós faktor (plazmid)

EAST – enteroaggregatív hőstabil toxin

EHEC – enterohaemorrhagiás *E. coli*

EIEC – enteroinvazív *E. coli*

EM – elektronmikroszkóp

EPEC – enteropathogen *E. coli*

ETEC – enterotoxikus *E. coli*

ExPEC – extraintesztinális patogén *E. coli*

FITC – fluoreszcens izotiocianát konjugátum

Gb3 – globo-triazil-ceramid

Gb4 – globo-tetrazil-ceramid

HC – haemorrhagiás colitis

HE – hematoxin-eozin

Hly – hemolizin

HUS – haemolyticus uraemiás szindróma

IF – immunfluoreszcencia
Ig – immunglobulin
im – intramuszkuláris
iv – intravénás
K – burok (kapszula)
kb – kilobázis
kDa – kilodalton
lif A – limfocita inhibitor faktor
LEE – locus of enterocyte effacement (pathogenitási sziget)
LT – hőérzékeny toxin
MDa – megadalton
Nal – nalidixsav
NM – nem mozgó (non motile)
NTEC – nekrotoxikus *E. coli*
OI-122 – O-122 pathogenitási sziget (O island-122)
ORF – nyitott leolvasási keret (open reading frame)
paa – porcine attaching-effacing associated gene
PAI – pathogenitási sziget (pathogenicity island)
PBS – foszfát puffer (phosphate buffered saline)
PCR – polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction)
PEPEC – sertés EPEC (porcine EPEC)
p.o. – szájon át (per os)
Ral – rabbit EPEC adherence locus
SLT – Shiga like toxin
SPF – specifikus kórokozótól mentes (specified pathogen free)
ST – hőstabil toxin
STEC – Shiga toxikus *E. coli*
Stx – Shiga toxin
TAE – trisz-acetát-EDTA puffer
TEM – transzmissziós elektronmikroszkóp
Tir – translocated intimin receptor
TSB – tripton szója leves (Tryptical soy broth)
UPEC – uropathogen *E. coli*
VTEC – Verotoxikus *E. coli*

Összefoglalás

Az enteropathogen *Escherichia coli* (EPEC) baktériumok a gyermekek és kisnyulak jól ismert és megfelelően jellemzett enterális kórokozói, ugyanakkor igen keveset tudunk a malacokban előforduló EPEC baktériumok szerotípusáról, intimin (*eae*) típusáról, virulencia faktoraikról és kórtani jelentőségéről. A közelmúltig rendelkezésre álló publikációk többnyire csak az *eae*⁺ *E. coli* (EPEC) baktériumok szopós és választott malacokban való előfordulásáról adtak hírt, s csupán egy legfrissebb tanulmányt ismerünk, mely az egészséges vágósertésekből izolált *eae*⁺ *E. coli* törzsek O típusát és intimin típusát ismertette. A kórtani hatásokat illetően több publikációt is ismerünk, melyek egyes humán EPEC és Enterohemorrhagiás *E. coli* (EHEC) törzseket újszülött malacokban patogénnek találtak, de nincsenek részletes vizsgálatokon alapuló adataink a sertés EPEC törzsek választott malacokra vonatkozó patogenitásáról.

A jelen vizsgálatok alapvető céljai voltak:

1. hasmenéses és egészséges sertések EPEC hordozásáról statisztikailag értékelhető járványtani adatokat gyűjteni, összehasonlítva azok genotípusát és fenotípusát,
2. a választott sertésekből izolált EPEC törzsek potenciális kórokozó képességének vizsgálata céljából megfelelő *in vitro* és *in vivo* modelleket kidolgozni, s végül,
3. a választott sertések fertőzésével előidézhető bélboholy-károsító hatásukat — hajlamosító tényezőkkel ill. azok nélkül — vizsgálni.

Ad 1.:

Az *eae* gén PCR-es és a bélboholy károsító géncsoport DNS hibridizációs kimutatása alapján, 13 gazdaság 164 hasmenéses-, és 57 nem hasmenéses malacából: 20 béleredetű és 17 bélsár eredetű *eae*⁺ *E. coli* törzset izoláltunk és vetettünk részletes vizsgálat alá. Az izolált törzsek a hasmenéses malacok 12,8%-ából, s a nem-hasmenéses malacok 14,0%-ából származtak. Domináns típusként, az O123:H11, *eae*- β (a törzsek 40%-a) került — az irodalomban elsőként — megállapításra. A béleredetű törzsek 85%-a rendelkezett *eae*- β , 10% pedig *eae*- γ génnel, viszont szignifikánsan kevesebb (53%) bélsáreredetű törzs volt *eae*- β , míg 23%-uk volt *eae*- γ pozitív.

Ad 2.:

In vitro adhéziós próbákra a PK-15 sertésvese hámsejt tenyészet a sertés eredetű EPEC törzsek jelentős részénél alkalmasnak bizonyult (szemben az itt vizsgált HeLa, és a mások által vizsgált Hep2 sejtekkel). Ultrastrukturális vizsgálatok az EPEC törzsek intim adhézióját mutatták, melyet azonban a sertés EPEC törzsek esetén az emelvény (pedestal) képződésének hiánya jellemzett. A törzsek *in vivo* adhéziós és bélboholy károsító (ún. „attaching effacing = AE) hatásának vizsgálata céljából 4 hetes választott malacokra alapozott bélkacs modellt dolgoztunk ki, melynek segítségével a vizsgált EPEC törzsek közül az *eae-β* típusúak (többnyire béleredetűek) jobban, az *eae-γ* típusúak (többnyire bélsáreredetűek) pedig kevésbé jól tapadtak és idéztek elő jellegzetes AE léziót, mely különbségek mindkét vonatkozásban szignifikánsnak bizonyultak ($p < 0,001$). E tekintetben a két intimin csoport képviselői fiatalabb (1 és 2 hetes) malacokban a fenti különbséget kevésbé mutatták, s a korrallal egyenes arányban csökkenő fogékonyság sem volt egyértelműen kimutatható. A humán EHEC törzsek — a fenti bélkacs modellben — a sertés EPEC törzsekhez képest jóval kisebb adhéziós és megtelepedési készségeket mutattak.

Ad 3.:

A sertés EPEC törzsek által a gyakorlati körülmények között előidézhető kórokozó hatást 4-5 hetes választott sertések gyomorszondás fertőzése által vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy egyes társfertőzések (pl. ETEC), és dietetikus hajlamosító tényezők (pl. magas szójatartalmú takarmány) együttese mind a kísérletes EPEC fertőzést, mind a látens természetes fertőzöttséget aktiválni tudta, mely tényezők közül a dietetikus hajlamosítás (szója) látszott hatékonyabbnak. Ugyanakkor egyéb tényezők (pl. 5×10^3 PFU/ml TGE vírus, vagy 0,5mg/ttkg/nap FumonsinB₁ gombatoxin) kellő mértékű hajlamosságot – s ez által kimutatható mértékű EPEC tapadást és AE léziót – nem idéztek elő.

Összességében: járványtani adataink az izolált atipikus EPEC törzsek választott malacokra vonatkozó pathogenitását – az eddigi irodalmi feltételezésekkel ellentétben – kétségbe vonták, s primer kórokozó hatásukat a 4-5 hetes választott malacokon végzett fertőzési kísérleteink sem igazolták. Ugyanakkor a törzsek *in vitro* és *in vivo* adhéziójának vizsgálatára alkalmas modelleket dolgoztunk ki, s új, domináns típusú sertés EPEC törzsekre mutattunk rá.

Bevezetés

Előszó

Disszertációm szakmai részleteinek bevezetését és kifejtését megelőzően szeretném előrebocsátani, hogy írásmód tekintetében a Magyar Tudományos Akadémia Orvosi Tudományok Osztálya valamint az MTA Helyesírási Bizottsága és Anyanyelvi Bizottsága (Halász Béla, Lőrincze Lajos és Keresztúry Dezső nevével fémjelzett) állásfoglalását követtem, mely szerint, „ha a magyar szavak vagy kifejezések az idegennel azonos jelentésűek és tartalmúak, tehát nem veszélyeztetik a szakszerűséget, a már bevált magyar szavak használata részesüljön előnyben az idegenek helyett” (Orvosi Helyesírási Szótár, 1992). Itt kívánom tisztázni azt is, hogy a disszertációban szereplő eredmények döntően olyan dolgozatokon alapulnak, melyekben meghatározó szerepem volt, s így ezeket első szerzőként jegyezhetem, ugyanakkor az eredmények és a munka ismertetésére leggyakrabban a többes szám első személyt használom, s a hazai és külföldi társszerzők hozzájárulását ily módon is érzékeltetem.

1. Irodalmi áttekintés

Az *Escherichia* nemzetséget Theodor Escherich (1857-1911) után nevezték el, aki először izolált ilyen baktériumot újszülött gyermekek székletéből. Az *Escherichia coli* baktériumok az *Enterobacteriaceae* családba tartoznak, és természetes viszonyok között megtalálhatók az ember és az állatok bélcsatornájában, ahol a Gram-negatív, aerob, fakultatív anaerob normál baktériumflóra részét képezik, melyek a bélcsatornába a születéskor és az azt követő napokban szájon át jutnak be s telepsznek meg, elsősorban a vastagbélben (Varga és mtsai., 1999).

Az *E. coli* rövid, pálcika alakú, körülcsillós, ritkán csilló nélküli, 2-3 μm hosszú, 1 μm átmérőjű baktérium. A törzsek jelentős részének a felületén fimbrák (pilusok) is találhatóak, egy további részük tokot vagy vastag burkot képez. A telepek közönséges agaron vagy

szelektív táptalajon 37°C-on egy napon belül kinőnek, többnyire sima, néha durvább felületű (R telepeket) vagy mukoid telepeket képeznek. A törzsek egy része véresagaron béta-hemolízist okoz. A bélcsatornában előforduló többi enterobaktériumtól biokémiai sajátásaik alapján különíthetők el. Az *E. coli* törzsek 90%-a egy napon belül gázképzéssel bontja a lakózt, indolt képez és a metilvörös próbában pozitív eredményt ad. Tipizálásuk O (sejtfal-), K (burok-), H (csilló-), és F (fimbria-) antigénjeik alapján történik. Így az O antigének alapján szerocsoportokba, illetve az O:K:H antigének ismeretében szerotípusokba sorolhatók. Az egyes fertőző betegségek rendszerint meghatározott szerocsoportú törzsekhez köthetők, s a szerotipizálás diagnosztikai és járványkövetési szempontból ma is nagy jelentőségű.

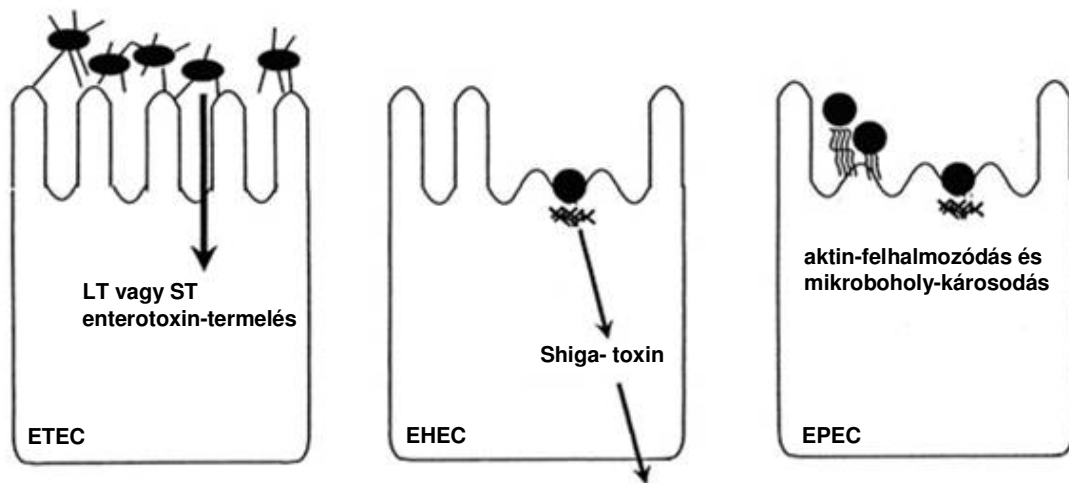
A patogén illetve a kommenzalista *E. coli* baktériumok genommérete 4,6 és 5,5 Mb között változik, melynek kb. 80%-a konzervatív, vagyis szinte valamennyi *E. coli* baktériumban megtalálható génekből áll. A kromozómából valamint plazmidokból álló genomiális struktúra által kódolt kórokozó mechanizmusok (virulenciafaktorok) révén képes a baktérium a túlélésre mind a bélben mind pedig az extraintesztinális környezetben (Kaper és mtsai., 2004). Ennek megfelelően a kórokozó *E. coli* baktériumokat intesztinális és extraintesztinális kórképeket okozó csoportokba sorolhatjuk.

Az extraintesztinális kórképet okozó csoport tagjai is a normál bélflóra lakói közül kerülnek ki, de olyan virulenciafaktorokkal rendelkeznek, melyek segítségével a bélcsatornán kívüli szervekbe (pl. húgyutakba vagy a vérpályán keresztül a lépbe, a csontvelőbe vagy az agyhártyába) kerülve ott elszaporodhatnak és a legkülönbözőbb fertőzéseket és gyulladással járó folyamatokat okozzák, pl.: csecsemőkori agyhártyagyulladás, szepszis, kórképek, sebfertőzések, húgyúti infekciók. (Gergely, 1999).

Ezzel szemben az enterális kórképekért felelős – korábban Neter (1965) által összefoglalóan „enteropathogennek” nevezett – *E. coli* törzsek a bélcsatornában képesek jelentős számban megtelepedni és a legkülönbözőbb morfológiai és funkcionális változások előidézésére által hasmenést (gyakran bélgyulladást) okozni.

Tekintettel arra, hogy disszertációmban a választott sertésekben előforduló Enteropathogen *E. coli* (EPEC) baktériumokra vonatkozó eredményeinket kívánom ismertetni, ennek megfelelően az irodalmi ismertetőm további részében elsősorban azon

enterális kórképekért felelős *E. coli* pathotípusokra kívánok összpontosítani, melyeknek a háziállatokban jelentősége van (1. ábra).



1. ábra Hasmenést okozó *E. coli* pathotípusok, és sajátos működésük az eukaryota sejtekkel való interakciójuk során. Nataro és Kaper (1998) után, módosítva (Malik Anna).

1.1. Enterotoxint termelő *E. coli* (ETEC)

Az ETEC törzseket először újszülött malacok elhullással végződő hasmenéses megbetegedéseiben figyelték meg. (Smith és Halls, 1967; Alexander, 1994). Ezek a baktériumok a vékonybél hámsejtjeinek mikrobolyhaihoz képesek tapadni és így közvetlenül a felszívó bélhámsejtekre hatnak, anélkül, hogy morfológiai változásokat okoznának (Smyth és mtsai., 1994). A hasmenést ún. enterotoxikus hatás révén idézik elő. Az ETEC baktériumok két jól elkülönülő, (hőlabilis és hőstabil) enterotoxincsoport közül legalább az egyiket termelik, (Levine, 1987), s ez által fejtik ki a bélhámsejtek folyadék és elektrolit szekrécióját serkentő hatásukat (1. ábra). Az alábbiakban röviden ismertetett enterotoxinokat minden esetben plazmidokon található gének kódolják.

- A hőlabilis (LT) enterotoxinok: nagy molekulatömegű (88 kDa) több alegységből álló 1A + 5B szerkezetet mutató proteintoxinok, melyeket elsőként a *Vibrio cholerae* toxinjaként (CT) írtak le. Az öt alegységből álló „B” kötő rész felelős a hámsejtek membránjában lévő receptorhoz való kapcsolódásért. A membránon átjutó „A” aktív alegység a sejten belüli adenilát-cikláz enzimet egy többlépcsős mechanizmuson keresztül aktiválja,

mely az intracelluláris cAMP-szint megemelkedéséhez, ez által a klorid-, kálium- és bikarbonátionok valamint a víz hiperszekréciójához, továbbá a folyadék (és a benne foglalt táplálék) felszívódásának csökkenéséhez vezet. Az LT toxinokat főleg az emberi és a sertés eredetű ETEC törzsek termelik (Seriwatana és mtsai., 1988). Az LT toxinok – nagy molekulájuknak és fehérje természetüknek köszönhetően – jó antigének. Két fő csoportjuk ismert: LTI és LTII toxinok, melyek közül anti-koleratoxin-savóval az LTI neutralizálható.

- A hőstabil (ST) enterotoxinok kis molekulatömegű (11-48 aminosav) hőstabil peptid toxinok, melyek gyenge antigének és 100°C-on legalább 15 percig megőrzik aktivitásukat. Az ST toxinokat humán-, sertés- és szarvasmarha eredetű enterotoxikus törzsek termelik. Két fő típusuk ismert: STa és STb (korábbi jelzés szerint STI és STII). Az STa toxint röviden jellemzi, hogy képes szopósegér és az újszülött malacok bélcsatornájában folyadékszekréciót kiváltani, miközben választott malacokban kevésbé aktív és metanolban oldódik. Ezzel ellentétben az STb toxin metanolban nem oldódik, nem aktív szopósegérben, viszont újszülött és választott malacokban egyaránt fokozza a bél folyadékszekrécióját. Az STa a guanilát-cikláz rendszert aktiválva fejt ki hatását. Az STb pontos hatásmechanizmusa ismeretlen, de annyi röviden itt is megemlíthető, hogy prosztoglandin-szerű hatása van (Nagy és Fekete, 2005). A hőstabil és hőérzékeny toxinok hatásának közös vonása, hogy a vékonybél nyálkahártyáján nem okoznak látható kóros elváltozást. A bélhámsejtek toxinhatásra bekövetkező változása lényegében: a víz, a Na⁺ és a Cl⁻ ionok fokozott kiválasztása valamint a bél folyadék visszaszívásának a csökkenése. Ennek eredményeképpen a szervezet folyadékot és NaHCO₃-ot veszít, mely kiszáradáshoz és metabolikus acidózishoz vezet (Nagy, 1992).

Az ETEC okozta hasmenés kórfejlődésében, az enterotoxinok mellett, kolonizációs faktor antigéneknek nevezett - plazmid által kódolt - fimbria (pilus) szerkezetű adhéziós faktorok is szerepet játszanak (Duguid és mtsai., 1955). A fimbriák egyenes, hajlott vagy görbült fehérjészálak, melyek a baktériumsejt külső membránjából erednek, s a baktériumokat a bélhámsejtek megfelelő receptorához kötve fejtik ki hatásukat. Az adhezin – receptor kölcsönhatás a bélhámsejtek mikrobolyhain játszódik le, mely a baktériumok erős tapadását teszi lehetővé, úgy, hogy a mikrobolyhok épek maradnak. Az újszülött és választott malacok ETEC fertőzéseit előidéző törzseken jelenleg öt fontosabb fimbriális adhezint ismerünk: F4(K88), F5(K99), F6(987P), F18 és F41. Az F4 fimbriának – szerológiai keresztreakción

alapuló vizsgálatok alapján – 3 főbb altípusát különítjük el: F4ab, F4ac, F4ad. Az F5(K99) fimbria a borjakban és bárányokban hasmenést okozó törzseken fordul elő, altípusairól egyelőre nincsenek adatok. Az F18 fimbriának két variánsa van: F18ab és F18ac (Ørskov és Ørskov, 1983; Rippinger és mtsai., 1995). Az F18ab fimbriát a sertés oedemabetegségét előidéző törzsek hordozzák (Bertschinger és mtsai., 1990), míg az F18ac fimbria a sertések választáskori hasmenésében játszik szerepet. Mivel az ETEC törzsek fimbriái a nekik megfelelő receptorokra kötődnek, mely receptorok viszont többnyire csak bizonyos emlős fajokban (általában korhoz kötötten) termelődnek, az ETEC törzsek hasmenést okozó képessége általában fajhoz (és korhoz) kötött.

Az emberi megbetegedéseket okozó ETEC törzsek a fejlődő országok lakosságában (főleg 2 éves kor alatti gyermekeknél) és az odautazó turisták között fellépő víz-szerű hasmenéses megbetegedésekkel hívták fel magukra a figyelmet, s felfedezésük óta ma is az ilyen kórképek legfontosabb kóroktani tényezői (Nataro és Kaper, 1998).

1.2. Verotoxikus *Escherichia coli* (VTEC)

A Verotoxikus *E. coli* (VTEC) néven azon törzseket tárgyalom, melyek tenyészetének felülúszója a zöld majom vesehámsejteket (Vero sejteket) irreverzibilisen károsítani (azok fehérjeszintézisét gátolni) képes. A meghatározást elsőként Konowalchuck és mtsai. (1977), emberi-, és állati eredetű törzsekre vonatkozóan használták. Ugyanezen évben O'Brien és mtsai. (1977), egér kísérleteik alapján egy konferencia közleményben hívták fel a figyelmet arra, hogy egyes humán *E. coli* törzsek - többek között a Konowalchuck és mtsai. által is vizsgált un. H30 jelű (O126-os) törzs – a *Shigella dysenteriae* 1-es típusú törzsek toxinja elleni specifikus savóval neutralizálható (Shigella-szerű) toxinokat (SLT) termelnek. Ők az ilyen SLT termelő törzseket STEC törzseknek nevezték el. A két elnevezés azóta egyaránt meghonosodott (Mainil, 1999).

Dolgozatomban az egyszerűbb követhetőség kedvéért a VTEC ill. VT toxin elnevezéseket használom, melyek minden esetben az egyes irodalmi adatokban fellelhető STEC vagy VTEC/STEC, ill. Shigella-szerű toxin (SLT) elnevezések szinonimáiként szerepelnek. Egyébként a verotoxikus *E. coli* (VTEC) meghatározást alkalmazza az Európai

Uniónak a kiemelt zoonózisok – laboratóriumi vizsgálatokon alapuló – folyamatos ellenőrzéséről szóló rendelete (2003) is.

Az emberi-, és állati eredetű törzsek által termelt verotoxinok (VT) antigenitási és biológiai tulajdonságai alapján már Konowalchuck és mtsai. (1977) is felismerték, hogy alapvetően két eltérő toxincsoportról van szó, melyek egymástól specifikus immunsavókkal elkülöníthetők: a VT1 és VT2. Az utóbbiak emberben igen gyakran okoznak hemolitikus uraemiás szindrómát (HUS). A VT2-termelők között szerepelnek a sertések oedemabetegségének eseteiből izolált törzsek is, melyek a humán VT2-es törzsektől a 70⁰C-os hőkezeléssel szembeni érzékenységük és a HeLa sejtekkel szembeni lényegesen kisebb, vagy hiányzó toxicitásuk alapján is megkülönböztethetők, s így a VT2v (ill. VT2e) jelölést kapták. Időközben számos további VT2 toxin-variánst mutattak ki, melyek csupán egy-két aminosavban különböznek, s kisebb különbségeket a receptor-affinitásban is mutatnak (Mainil, 1999). Közülük külön meg kell említeni a VT2c-t, melyet egyes humán O157:H7 törzsek fokozott pathogenitásáért tartanak felelősnek. A citotoxinokat egyébként a törzsek kromoszómájába integrálódott, temperált bakteriofágok kódolják. A toxintermelés tehát a VTEC törzsekben lizogén konverzió eredménye, mely – elvileg – a legkülönbözőbb genetikai vonalat képviselő törzsekben is létrejöhet. Ennek megfelelően ma kb. 100 különböző szerotípusú *E.coli* törzsről tudjuk, hogy több-kevesebb gyakorisággal VT termelő lehet (Mainil, 1999).

A verotoxinokra – az LT toxinhoz hasonlóan – jellemző, hogy 1A és 5B alegységből épülnek fel, melyek közül a sejtfelszíni receptorhoz a B alegységek kötődnek, mely receptor a VT1 és VT2 esetében az ún. Gb3 (globotriaozil ceramid), VT2v esetében pedig a Gb4 (globotetraozil ceramid). A VT toxinok erős fehérjeszintézist gátló hatással rendelkeznek, így testszerte (elsősorban a vesékben, agyvelőben, gyomor-bél traktus submucosájában) leginkább az arteriolák endothelsejtjeit károsítják. A biológiai aktivitásért az A alegység felelős, míg a B alegységek feladata a sejtmembrán-receptorokra való kapcsolódás. Jelenlegi ismereteink szerint STEC/VTEC törzseket, embereken kívül, borjakban, kecskében, juhokban, sertésekben, macskáknban, kutyákban és lovakban mutattak ki (Grif és mtsai., 1998.). A kórkép előterében, sertés kivételével, általában a hasmenés áll, míg a sertés esetében (oedemabetegség) rendszerint ennek épp ellenkezőjét (obstipáció, lassúbb bélperisztaltika) látjuk.

A VTEC fertőzések legsúlyosabb formája az emberben előforduló haemorrhagiás vastagbélgyulladás (HC), melyet előidéző VTEC baktériumokat ezért a szakirodalom külön névvel, enterohaemorrhagiát okozó *E. coli* (EHEC) névvel is jelöli.

1.2.1. Enterohaemorrhagiát okozó *E. coli* (EHEC)

Az első (nem kellően hőkezelt hamburger által terjesztett) 1982-es járvány óta az *E. coli* baktériumok között ez a kórokozócsoport kapta a legnagyobb figyelmet (Riley és mtsai., 1983). A járványokat O157:H7 típusú *E. coli* törzsek idézték elő, melyek a közelmúltban elsősorban az USA-ban, az Egyesült Királyságban és Ausztráliában, legutóbb pedig Japánban idéztek elő súlyos, vérömléses vastagbélgyulladással jellemzett kórképeket. A tünetek az esetek mintegy 10%-ában, főleg gyermekekben súlyos, életet is veszélyeztető hemolitikus uraemiás szindrómába (HUS) mehetnek át, melyet a microangiopathiás hemolitikus anaemia, thrombocytopaenia jellemez. Elsőként Karmali és mtsai. figyelték meg (1983), hogy a HUS egyes, citotoxint termelő *E. coli* (elsősorban O157:H7 típusú) törzsek székletben való megjelenésével és haemorrhagiás colitisszel (HC) van összefüggésben. Vizsgálataik alapján néhány ilyen *E. coli* tenyészet szűrlete feltűnő, irreverzibilis citopathogen hatást okozott Vero sejteken. Ezen, és a fent említett korábbi felfedezések (Konowalchuck és mtsai., 1977; O'Brien és mtsai., 1977) alapján vált világossá a Shiga-like azaz Shiga-szerű toxinok (SLT), vagy más néven Vero toxinok (VT) és az O157:H7-es típusú törzsek okozta ún. hamburger járványok valamint a HUS közötti összefüggés (Mead és mtsai., 1997), melyek kimutatását kezdetben megkönnyítette azon egységes tulajdonságuk, hogy a szóban forgó törzsek a szorbitot nem bontják.

Az O157:H7 típusú törzsek mellett azonban hamarosan felfigyeltek az elsősorban Európában fellépő ún. non-motile O157:NM törzsekre is (melyek a szorbitot nem bontják), s ugyancsak súlyos járványok okozói lehetnek. A későbbiekben felfigyeltek olyan EHEC törzsekre is, melyek egyéb (O26:H11, O103:H2, O111:NM, O113:H21) szerotípusokba tartoznak, de minden bizonnyal várható ezen szerotípusok listájának további bővülése is. Jelenlegi ismereteink szerint ilyen EHEC törzseket, embereken és szarvasmarhákon kívül, kecskében, juhokban, sertésekben, macskákban, kutyákban és lovakban is kimutattak (Grif és mtsai., 1998), de – mint kiderült, ezen törzsek elsődleges forrása a szarvasmarha tej és hús volt.

A tünetek kialakulásáért a fenti O157 és nem-O157 típusú EHEC törzsek esetében egy komplex adhézios mechanizmus és a már fent ismertett toxinhatás együttesen felelős (1. ábra). Jelenlegi ismereteink szerint a baktériumok elsődleges tapadását a bélhámsejteken egy 94-104 kb tömegű, ún. EHEC-virulenciaplazmid által kódolt fehérje hozza létre. Ez az ún. EHEC plazmid (melynek prototípusa a pO157 plazmid) kódolja az enterohemolizint is, melynek pontos kórtani szerepe jelenleg még nem ismert, de az eddigiek alapján úgy tűnik, hogy jelenléte a HC kifejlődésének egyik fontos feltétele. Az adhézió második lépése a bél mikrobolyhokat károsító (attaching-effacing) (ún. AE) hatás, melyet korábban a kutatók enteropathogen *E. coli* (EPEC) okozta elváltozásként ismertek meg (ld. alább).

1.3. Enteropathogen *E. coli* (EPEC)

A legrégebb óta ismert enterális pathogén *E. coli* csoport, mely „megörökölte” a régebben valamennyi enterális kórokozóra alkalmazott nevet (Neter, 1965), s melyet hazánkban a korábban domináló német irodalom alapján még ma is „dyspepsia coli” néven emlegetnek. Ezek, a többi enterális *E. coli* pathotípustól jól elkülönülő törzsek, az 50-es, 60-as években súlyos járványokat okoztak a fejlett országokban is, míg mára – valószínűleg a higiénés viszonyok lényeges javulása miatt – itteni jelenlétük sporadikussá vált. Változatlanul nagy azonban a jelentőségük a kevésbé fejlett országokban, ahol főleg az egy éven aluli csecsemők hasmenését és bélgyulladását okozzák (Nataro és Kaper, 1998; Trabulsi és mtsai., 2002). Az EPEC fertőzöttséget klinikailag a víz-szerű, változó súlyosságú, esetleg krónikus hasmenés jellemzi. Szöveti és ultrastrukturális vizsgálatok során a vékonybél hámsejtjein található mikrobolyhoknak a baktériumok általi elhajlítását, majd a baktériumnak a bélhámsejt mikromembránjára való tapadását, a tapadás helyén pedig a sejtmembrán dobogó-szerű kiemelkedéseinek (pedestal) képződését észleljük (1. és 2. ábra).



2. ábra EPEC (és EHEC) a gazdasejt felületén, mely által kialakul a jellegzetes pedestal- (emelvény) képződés (Brett Finlay által készített kép).

Ezen jellegzetes morfológiájú adhéziót „attaching-effacing” (AE) típusú adhézióknak (Moon és mtsai., 1983) nevezzük. Az AE lézióról elsőként Staley és mtsai. (1969) számoltak be, bár ekkor még ezt a kifejezést nem használták. A kutatócsoport ezt a szövettani elváltozást az O55 szerocsoportú humán EPEC baktériummal mesterségesen fertőzött, kolosztrum mentes újszülött malacokon figyelte meg (Staley és mtsai., 1969). Később nyulakban és emberekben is leírtak AE léziókat (Takeuchi és mtsai., 1978; Ulshen és Rollo, 1980; Moon és mtsai., 1983). Az AE lézió következtében a sejthez tapadó baktérium alatt a felszívó felületet biztosító mikrobolyhok eltűnnek s a baktériumok közvetlenül a bélhámsejtek mikromembránjára tapadnak. Az EPEC és EHEC törzsekre jellemző, a fenti, sajátos bélmikrobolyh károsodást előidéző *E. coli* baktériumokat gyűjtő néven „attaching-effacing”, *Escherichia coli* (AEEC) baktériumoknak nevezzük (Moon és mtsai., 1979, 1983). Az EHEC és EPEC baktériumok tehát közös genetikai alapon szervezett AE típusú adhézió révén tapadnak a bél hámsejtjeihez, de míg az EPEC törzsek elsődleges tapadási helye a vékonybél, addig az EHEC törzsek elsődlegesen a vastagbél hámsejtjeit támadják meg. Ezen túl eltérő a két pathocsoportban az, hogy míg az EHEC törzsek VT toxinokat termelnek, addig az EPEC törzsek esetében ez a képesség hiányzik. A fentiekkel összhangban, 1995-ben a Sao Paulóban tartott Második Nemzetközi EPEC Szimpóziumon egységesen elfogadták, hogy EPEC-nek tekinthető minden olyan hasmenést okozó *E. coli*, amely a jellegzetes AE léziót hozza létre a vékonybélben és nem termel Shiga-szerű vagy verocytotoxint. Ezen belül az ún. „tipikus EPEC” vagy más néven „EPEC I” csoportba tartoznak azok a törzsek, melyek rendelkeznek egy ún. EAF (EPEC adhéziós faktor) virulenciaplazmiddal, mely a hámsejttenyészeteken (Hep-2) okozott ún. lokalizált adhézióért felelős géneket hordozza. Ez

az adhézió a *bfp* gén által kódolt ún. bundle-forming-pilusok (BFP) közvetítésével jön létre. Ezzel szemben az „ún. atipikus EPEC” („EPEC II”) csoportba tartozó törzsek az EAF virulenciaplazmiddal nem rendelkeznek (Kaper, 1996). A tipikus virulens törzsek többsége meghatározott O csoportba tartozik. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 12 olyan O szerocsoportot fogadott el, melyek a humán EPEC-re jellemzőek: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 és O158. Ezen a szerocsoportokban mindkét EPEC típus képviselői előfordulhatnak, de esetenként ilyen szerocsoportú, egyéb *E. coli* pathocsoportba (pl. EAEC) tartozó törzsekkel is találkozhatunk (Trabulsi és mtsai., 2002).

A tipikus és atipikus EPEC törzsek előfordulását különböző földrajzi helyekről jelentették. A legtöbb tipikus EPEC törzset Sao Paolo-ban és Rio de Janeiro-ban, míg az atipikus törzseket az Egyesült Királyságban és Olaszországban izolálták. Ugyanilyen földrajzi különbségek adódnak az egyes szerotípusok előfordulása között (Trabulsi és mtsai., 2002). A virulencia tulajdonságokat tekintve a tipikus EPEC törzsek tulajdonságai homogénebbek: csak azokat a virulenciafaktorokat termelik, amelyek az EAF plazmidon vagy a LEE (locus of enterocyte effacement) pathogenitási szigeten kódolódnak. (A LEE pathogenitási szigetről bővebben egy külön fejezetben szólok.) Ezzel szemben az atipikus EPEC törzsek gyakran termelnek EAST1 (enteroaggregatív hőstabil) toxint vagy AFA (afimbriális adhezin)-t, illetve egyéb olyan virulenciafaktorokat, amelyeket nem a LEE régió kódol (Trabulsi és mtsai., 2002). A két csoport a sejtenyészeten mutatott adhéziós tulajdonságokban is különbözik. A tipikus törzsek csak LA (lokalizált adhézió) adhéziót mutatnak (Rodrigues és mtsai., 1996), míg az atipikus törzsek egyéb: LAL (localized-like adherence), DA (diffúz adhézió) vagy AA (aggregatív adhézió) adhézió-mintázatot is mutathatnak (Scaletsky és mtsai., 1984).

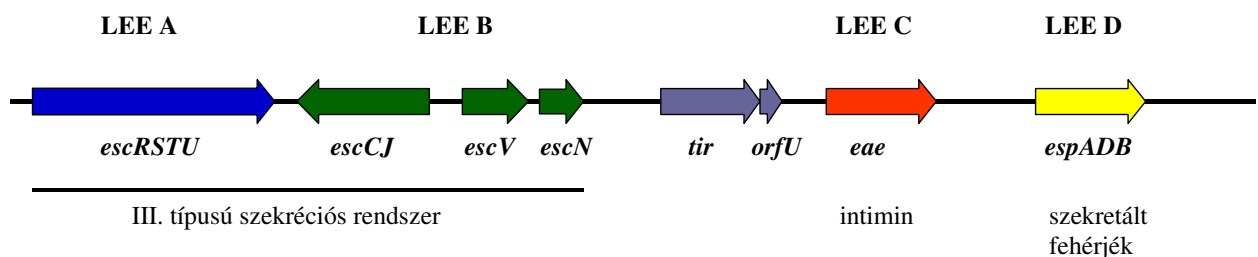
A kórkép kialakulásában nagyon fontos szerepe van egy külső membránfehérjének (intimin), amely létrehozza a baktérium és a bélhámsejt közötti szoros, visszafordíthatatlan tapadást. Ezt a fehérjét a LEE lókuszon lévő *eae* (*E. coli* attachment effacement) gén kódolja. Az *eae* gén N terminális szakasza konzervatív, míg a C terminálisa variábilis, mely alapján ez idáig 10 *eae* (intimin) típust azonosítottak (ld.: később). Az egyes EPEC csoportba tartozó szerotípusokhoz gyakran meghatározott intimintípus tartozik (Trabulsi és mtsai., 2002).

Mint az eddigiekből is kitűnt, az AE lézió kialakulásában számos gén játszik szerepet. Ezen folyamat egy – ma leginkább elfogadott – modell szerint három lépcsőben zajlik le (Nataro és Kaper, 1998). Elsőként a baktérium és az eukaryota sejt között egy laza tapadás jön

létre. Ezt az EPEC törzsek egy részénél korábban említett „köteges fimbria vagy bundle-forming-pilus” (BFP) eredményezi. A BFP-t kódoló operon a 60 MDa tömegű plazmidon, az ún. tipikus EPEC törzsek esetében, az EPEC adherens faktoron (EAF), helyezkedik el. /Az atipikus EPEC törzsek között ilyen faktoroknak tekinthetjük a nyúl-EPEC törzsek jellegzetes fimbriáit (Dow és mtsai., 2005)./

A második lépés a szignál transzdukció, melynek során a baktérium a célsejtet a saját tapadására előkészíti azáltal, hogy a tapadását elősegítő receptort (transzlokált intimin receptor=Tir) a gazdasejtnek átadja, s annak membránján megjeleníti. A folyamatot további bakteriális gének (*espA*, *espB*, *espD*) vezérlik, melyek együttese egy kromoszómáisan elhelyezkedő, 35,5 kb méretű géncsoporton az ún. „LEE (locus of enterocyte effacement) pathogenitási szigeten” található (McDaniel és mtsai., 1995; Perna és mtsai., 1998) (3. ábra). Ezen folyamat lényegét illetően a tipikus és atipikus EPEC törzsek között különbség nincs.

A pathogenitási sziget meghatározás (Hacker és mtsai., 1997) létrejöttéhez – egyébként – az a megfigyelés vezetett, hogy egyes kórokozó baktériumok virulenciához köthető génjei a kromoszóma meghatározott részén a horizontális terjedést lehetővé tevő génekkel egy külön mobilis régiót alkotnak. A pathogenitási szigeteket először extraintestinális (uropathogen) *E. coli* törzsekből írtak le, később több patogén baktériumról kiderült, hogy a virulenciagénjeik a kromoszómán ilyen szigeteket alkotva helyezkednek el.



3. ábra A LEE lókus (Nataro és Kaper, 1998)

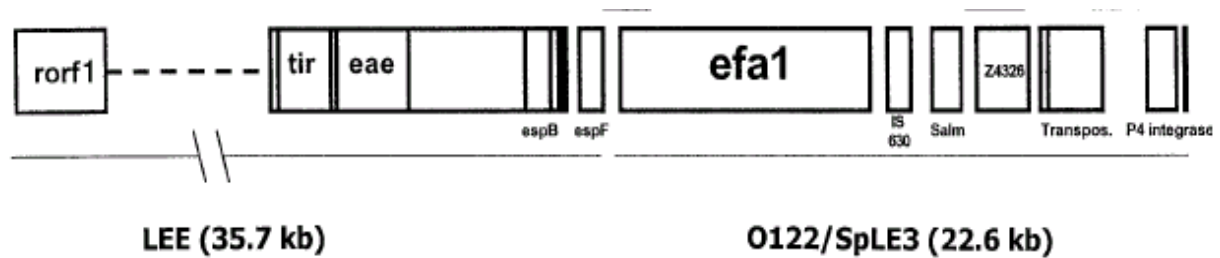
A LEE pathogenitási sziget 4 nagyobb funkcionális régióra osztható (LEE-A, -B, -C, -D). A LEE-A és -B régiók a III. típusú szekréciós rendszer fehérjéihez szükséges géneket valamint a *ler* (LEE-encoded regulator) gént kódolják. A Ler fehérje a LEE-n valamint néhány LEE-n kívül elhelyezkedő géneket is regulál (Elliott és mtsai., 2000). Az egyes LEE régiókat reprezentáló kulcsgéneket a 3. ábra mutatja be. A LEE-C régió található az *eae* (*E. coli* attachment effacement) gén (melynek terméke az intimin), amely a szoros tapadást hozza

létre a baktérium és az eukaryota sejt között. Ennek a sejten megjelenő receptora a Tir, melyet a LEE-C régió *tir* génje szabályoz. A LEE-D operon olyan fehérjéket kódol, amelyek a III. típusú szekréción rendszer által termelődtek (Frankel és mtsai., 1998). A folyamat végső stádiumában kialakul a baktérium és az általa termelt, transzportált majd az eukaryota sejt külső membránjába beépült receptor (Tir= translocated intimin receptor) közötti szoros kapcsolat (Kaper, 1998). A szoros tapadást egy 94-97 kDa tömegű külső membránprotein, az intimin alakítja ki, melyet az előbb említett *eae* gén kódol (Jerse és mtsai., 1990). E fehérjének N terminálisa változatlan (konzervatív), míg a C terminálison az utolsó 280 aminosav, amely a kötődésért közvetlenül felelős, variábilis. Ez a variábilis régió lett az alapja az intimin molekuláris tipizálásának, melynek eredményeként ez idáig 10 intimin típust határoztak meg. Ezek jelölése a görög abc betűit követi: α , β , γ , δ , ϵ (Oswald és mtsai., 2000), ξ , ι , η , κ és θ (Zhang és mtsai., 2002; Krause és mtsai., 2005). Az α -intimin a tipikus EPEC törzsekre, míg a γ -intimin az EHEC törzsekre jellemző (Nataro és Kaper, 1998).

Tipikus EPEC törzset még nem találtak állatokban (Nataro és Kaper, 1998), ami arra enged következtetni, hogy ezen baktériumoknak egyedüli rezervoárja maga az ember. Az O26:H11 szerotípusú atipikus EPEC törzs szarvasmarhában való előfordulása viszont már régóta jól ismert (Gyles, 1994). Az O128:H2 szerotípus nyulakban, kutyákban és macskákban gyakori, mely törzseket főleg Brazíliában izolálták (Trabulsi és mtsai., 2002). Választás korú nyulakban ezen kívül az O15 és az O103 csoportok is képesek hasmenést okozni (Cantey és Blake, 1977; Dow és mtsai., 2005). Nyugat-Európában gyakran izoláltak EPEC-szerű *E. coli* törzseket hasmenéses nyulakból. Ezek az O109, O103 és az O26 szerocsoportokba tartoztak (Milon és mtsai., 1999). A legrészletesebben vizsgált nyúl EPEC törzs a RDEC-1 nevű, O15 szerocsoportú *E. coli* törzs, melynek a hámszejthez való tapadásában illetve a kolonizációjában szerepet játszó, plazmidon kódolt fimbriális adhezinekét írtak le: AF/R1 (adhesive factor/rabbit1) (O'Hanley és mtsai., 1978; Berendson és mtsai., 1983). További ilyen, a nyúl EPEC törzsekre jellemző adhezív fimbriák az AF/R2 (Milon és mtsai., 1990; Fiederling és mtsai., 1997) és a Ral fimbria (rabbit EPEC adherence locus) (Adams és mtsai., 1997).

A 22,6 kb méretű OI-122 PAI jelen van majdnem minden EHEC és tipikus EPEC törzsben (4. ábra). Az OI-122 26 ORF-et tartalmaz, melyek közül több, más baktériumfaj patogén törzseit is jellemzi. Így, pl a *pagC*, mely a *Salmonella enterica* serovar Typhimuriumban került először kimutatásra (Pulkinnen és Miller, 1991), illetve a *sen*, mely a

Shigella flexneri enterotoxin 2-vel (Nataro és mtsai., 1995) homológ. A szintén ezen sziget által kódolt *efa1* (Nicholls és mtsai., 2001) gén terméke a kolonizációs folyamatokban játszik szerepet. Az *efa1* génben bekövetkező mutáció közvetett módon befolyásolja a kolonizációs folyamatokat azáltal, hogy a LEE által kódolt effektor fehérjéknek a szekréciónak a csökkenti (Stevens, 2004).



4. ábra Az OI-122 pathogenitási sziget (Morabito és mtsai., 2003)

Az EDL933 és Sakai *E. coli* O157:H7 EHEC törzsek esetében a *PheV* tRNS lókuszból integrálódva fordul elő, és az OI-122 pathogenitási sziget 5' végén elhelyezkedő *efa/lifa* gének a LEE pathogenitási szigettől mindössze 0,7 Mb-ra helyezkednek el. Számos törzs esetében az OI-122 és a LEE egy PAI-t alkotnak (Morabito, 2003).

Az EPEC pathogenezisének illetve az AE lézió kialakulásának a tanulmányozására számos sikeres modellkísérletet végeztek nyulakban, malacokban, csirkékben valamint *in vitro* szövettenyészeteken (Knutton és mtsai., 1989; Potter és mtsai., 1985; Shermann és mtsai., 1988; Tzipori és mtsai., 1987). Gnotobiotikus újszülött malacokon végzett kísérletek (Helie és mtsai., 1991) során kimutattak AE léziókat a duodenumban, jejunumban és az ileumban, de a vastagbélben (caecum és colon) még a fertőzést követő második napon sem, bár a kolonizáció megtörtént. A fenti kutatók egy kezdeti tapadásról is beszámoltak, mely során a bélnyálkahártya hámsejt apikális része és a bakteriális sejtfal oly módon rendeződik át, hogy egymáshoz igazodnak, de egy szűk rés marad köztük. Ilyen fenotípust az emberi eredetű EPEC törzsek által okozott AE lézió esetében nem figyeltek meg.

Sertések esetében az EPEC előfordulását főleg a választáskori hasmenéssel kapcsolatban figyelték meg. A pathomechanizmus jó néhány részlete, mely révén a hasmenés esetleg kialakul, pontosan még nem ismert. Eddigi ismereteink szerint sertésekben

leggyakoribb szerocsoportok: O26, O45, O108, O141 (Gyles, 1994; Janke és mtsai., 1989; Helie és mtsai., 1991).

A sertés EPEC további tanulmányozása során egy új virulenciagént, a *paa* (porcine attaching effacing) gént írtak le, amely – úgy tűnik –, hogy a bélnyálkahártyához való tapadás korai stádiumában játszik szerepet (An és mtsai., 1999). Ezt a gént először egy kanadai – választási hasmenéses esetből izolált – sertés EPEC törzsben (O45, *eae-β*) (An és mtsai., 2000), később pedig EHEC és ETEC izolátumokon is kimutatták (An és mtsai., 1999; Dow és mtsai., 2005). Lengyelországi és szélesebb körű kanadai vizsgálatok a választott sertésekből mutattak ki intimin génnel rendelkező (*eae*⁺) *E. coli* törzseket, azok részletesebb vizsgálata nélkül. A fent említett kanadai törzs EPEC csoportba sorolása a kolosztrum mentes újszülött malacok belében észlelt AE léziók alapján történt, s a szerzők úgy vélték, hogy a sertés EPEC törzseknek a választási hasmenés előidézésében szerepe van (Helie és mtsai., 1991; An és mtsai., 2000). Legutóbb Németországban, Krause és mtsai. vágóhídi, egészséges sertésekből származó *E. coli* törzsek intimintípusát vizsgálták: az előforduló típusok: β, ε, γ és θ (Krause és mtsai., 2005) voltak. A szerzők a *paa* gén előfordulását viszont nem nézték.

A fenti tanulmányokból összefoglalhatóan megállapítható, hogy a választott malacokból az *eae*⁺ *E. coli* törzsek több-kevesebb gyakorisággal kimutathatók, s a néhány részletesebben vizsgált törzs többsége az O45-ös szerotípusú, β-intiminnel rendelkező EPEC csoportba sorolható. Nem talákoztunk viszont olyan tanulmánnyal, mely ilyen *E. coli* törzseket egészséges és választott malacokban járványtani szempontból, illetve a bélcsatorna különböző szakaszain, szisztematikusan igyekezett volna izolálni, genetikailag és fenotípusosan jellemezni, majd összehasonlítani.

Vizsgálataink kezdetén ugyancsak hiányát láttuk olyan adatoknak, mely az ilyen *eae*⁺ törzsek adhézióját széles körben elérhető sejtvonalon (pl. HeLa) vagy közvetlenül a választott malacok belében vizsgálta volna.

Célok

Mivel tehát az *eae*⁺ illetve EPEC baktériumok járványtani sajátosságát és pathogenezisét választott malacokban ez idáig alig vizsgálták, munkánk során a választott malacok EPEC baktériumainak tanulmányozását tűztük ki célul az alábbi részfeladatok megjelölésével.

1. Munkánk elsődleges célja volt, hogy *eae*⁺ törzseket mind egészséges mind hasmenéses állatokból járványtani – statisztikai elemzésre alkalmas módon – gyűjtsünk, s az izolált törzseket fenotípus- illetve genotípusosan jellemezzük.
2. Különböző sejtenyészetek fertőzése révén az általunk gyűjtött törzsek *in vitro* adhéziónak képességét vizsgáljuk.
3. Kidolgozzunk egy olyan *in vivo* adhéziónak modell-rendszert, melynek segítségével az AE léziót immunhisztokémiai, szövettani és ultrastrukturális eszközökkel sikeresen vizsgálhatjuk.
4. Kísérletesen előidézett betegségekkel tanulmányozzuk a fertőzés pathogenezisét, mely választott malacokban, az eddig újszülött malacokban leírtakhoz képest, eltérő lehet.

2. Választott malacokból izolált *eae*⁺ *E. coli* baktériumok fenotípusos és molekuláris jellemzése

2.1. Anyagok és módszerek

2.1.1. Mintagyűjtés

A bélboholy károsító baktériumokat hasmenéses kórelőzménnyel elhullott, választás korú sertések bélnyálkahártya-kaparékaiból gyűjtöttük az ország különböző területeiről. A Debreceni, a Kaposvári és az Országos Állategészségügyi Intézetek Kórbonctani Osztályainak segítségével összesen 137, választási hasmenésben elhullott 4-6 hetes választott malac bélnyálkahártya-kaparékát (kb. 0,5 g) vizsgáltuk meg. Minden állatból két helyről: csípőbél (ileum) és a remesebél (colon) nyálkahártyájáról gyűjtve kaparékot. Az állatok összesen 11 különböző gazdaságból származtak. Ezen kívül végbéltamponokat is gyűjtöttünk, melyek 3 gazdaság 27 hasmenéses és 57 nem hasmenéses választási, 4-8 hetes malacából származtak. Összesen 13 gazdaság mintáit vizsgáltuk meg, úgy, hogy 1 gazdaság esetében kórbonctani (csípő- és remesebél) valamint bélsár mintákkal is rendelkezünk.

2.1.2. Baktériumtörzsek és statisztika

A bélnyálkahártya-kaparékokból illetve a bélsártamponokból 10-es alapú hígítási sort készítettünk. A 10⁻⁶-os, 10⁻⁷-es és a 10⁻⁸-as hígításokból 100 µl-t szélesztettünk üvegbot segítségével brómtimolkék-laktóz tartalmú indikátor táptalajra (Merck). Minden mintából 3-12 különálló *E. coli* telepet továbboltottunk, így összesen 2237 izolátumot kaptunk. Ezek közül az *eae*⁺ *E. coli* baktériumokat az *eae* génre tervezett PCR-rel, (általában 5-8 telepet egybevonva) szűrtük ki. A pozitív telepeket tisztítás (klónozás) után glicerines TSB-be oltottuk és a további vizsgálatokig -80°C-on tároltuk.

A különböző PCR-ekhez használt referenciatörzsek az I. táblázatban vannak feltüntetve. A 103 és 113 sz. *E. coli* törzseket (béleredetű, intimin-negatív vad izolátum) negatív kontrollként használtuk. A C600-as jelű K12-es törzset „abszolút” negatív kontrollnak tekintettük (II. táblázat). A pozitív kontrollként szolgáló sertés EPEC törzset (86-1390) John

Fairbrother-től (Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada), míg a humán EPEC törzset (E2348/69) Herbert Schmidt-től (Department of Microbiology and Hygiene, Medical Faculty Carl Gustav Carus, Technical University of Dresden, Germany) kaptuk.

A bél- illetve a bélsáreredetű *eae-β* törzsek előfordulásának statisztikai kiértékeléséhez a Fischer-féle próbát alkalmaztuk (Houe és mtsai., 2004).

2.1.3. Genotípusos jellemzés polimeráz láncreakcióval és DNS alapú telep- hibridizációval

A különböző virulenciagének előfordulását PCR reakciókkal, T3 Thermocycler (Biometra) készülékkel vizsgáltuk. A PCR primereket a Creative Labor Kft.-vel (Szeged) szintetizáltattuk. Az egyes primerek szekvenciáit, a termékek méreteit valamint a referenciákat az I. táblázat tartalmazza. A PCR termékeket 1,5%-os TAE agarózgélben futtattuk. A gélhez a kiöntés előtt a DNS láthatóvá tétele érdekében etídium-bromidot adtunk 0,5 µg/ml végkoncentrációban. Az elektroforézis horizontális gélrendszerben, 1-szeres töménységű TAE pufferben (0,04 M tris-acetát, 0,001 M EDTA) történt, 90-120 V feszültséggel. Az elektroforézist követően a géleket 302 nm hullámhosszú UV átvilágító asztalon digitális kamerával (Kodak Digital Science DC120) fényképeztük és a gélfotók archiválásához a Kodak Digital Science 1D programot alkalmaztuk.

I. táblázat A vizsgálatokhoz használt PCR primerek, kontroll törzsek és a PCR ciklusok referenciái

Primer	Gén	Szekvencia (5'-3')	Amplikon mérete (bp)	Kontroll törzsek	Referencia
B52/B53	<i>eaeA</i>	AGG CTT CGT CAC AGT TG CCA TCG TCA CCA GAG GA	570	EDL933	China és mtsai., 1996
EAF1/EAF2	<i>EAF</i>	CAG GGT AAA AGA AAG ATG ATA A TAT GGG GAT CAT GTA TTA TCA	392	E2348/69	Franke és mtsai., 1994
EP1/EP2	<i>bfp</i>	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	747	E2348/69	Gunzburg és mtsai., 1995
B54/B55	<i>stx1</i>	AGA GCG ATG TTA CGG TTT G TTG CCCCCA GAG TGG ATG	388	EDL 933	China és mtsai., 1996
B56/B57	<i>stx2</i>	TGG GTT TTT CTT CGG TAT C GAC ATT CTG GTT GAC TCT CTT	807	EDL933	China és mtsai., 1996
155-F1/155-R1	<i>paa</i>	ATG AGG AAC ATA ATG GCA GG TCT GGT CAG GTC GTC AAT AC	350	86-1390	Batissou és mtsai., 2003
B213/B214	<i>espD</i>	GCT GGA TTT ACA ACT GG NTT TCT CTT CGG CTT TY	417	E2348/69	Goffaux és mtsai., 2000
AF/R1-F/AF/R1-R	<i>afr1</i>	TAC CGT TAC TGC GAA GAC CT CGT GCT GTT AAT CGC CAC TA	280	RDEC-1	Dow és mtsai., 2005
AF/R2-F/AF/R2-R	<i>afr2</i>	AAG TTA GGG GAC GCC ATT AC CCA GGA CTT ATT CTG ACC AG	518	E22	Dow és mtsai., 2005
ralG-F/ralG-R	<i>ral</i>	GAT CTT TGG CAG TGG ACA C CGG CAA CAG TTC CTT TTG AA	577	83/39	Dow és mtsai., 2005
cnfs-A/cnfs-B	<i>cnf</i>	CTG GAC TCG AGG TGG TGG CTC CTG TCA ACC ACA GCC	533	J96	Blanco és mtsai., 1996
CDT-s1/CDT-as1	<i>cdtB</i>	GAA AGT AAA TGG AAT ATA AAT GTC CG GAA AAT AAA TGG AAC ACA CAT GTC CG	466	1404	Tóth és mtsai., 2003a
CDT-s2/CDT as2		AAA TCA CCA AGA ATC ATC CAG TTA AAA TCT CCT GCA ATC ATC CAG TTA			
PCVD432 start/stop	<i>PAA</i>	CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T	630	17-2	Schmidt és mtsai., 1995
EAST-1S/EAST-1AS	<i>astA</i>	GCC ATC AAC ACA GTA TAT CC GAG TGA CGG CTT TGT AGT CC	106	17-2	Yatsuyanagi és mtsai., 2002
SK1/LP2	<i>eae-α</i>	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC CCC GAA TTC TTA TTT TAC ACA AGT GGC	2807	E2348/69	Schmidt és mtsai., 1993

SK1/LP3	<i>eae-γ</i>	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC	2792	EDL933	Schmidt és mtsai., 1993
SK1/LP4	<i>eae-β</i>	CCC GAA TTC TTA TTC TAC ACA AAC CGC	2287	RDEC-1	Oswald és mtsai., 2000
SK1/LP5	<i>eae-ε</i>	CCC GTG ATA CCA GTA CCA ATT ACG GTC	2608	PMK5	Oswald és mtsai., 2000
SK1/LP6B	<i>eae-ξ</i>	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC AGC TCA CTC GTA GAT GAC GGC AAG CG	2430	4795/97	Zhang és mtsai., 2002
SK1/LP7	<i>eae-ι</i>	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC TAG TTG TAC TCC CCT TAT CCC	2685	7476/97	Zhang és mtsai., 2002
SK1/LP8	<i>eae-η</i>	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC TTT ATC CTG CTC CGT TTG CT	2590	CF 11201	Zhang és mtsai., 2002
SK1/LP10	<i>eae-κ</i>	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC TAG ATG ACG GTA AGC GAC	2769	6044/95	Zhang és mtsai., 2002
SK1/LP11B	<i>eae-θ</i>	GGC ATT GTT ATC TGT TGT CT CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC GTT GAT AAC TCC TGA TAT TTT A	2686	CL-37	Zhang és mtsai., 2002
sta1/sta2	<i>sta</i>	TTT CTG TAT TAT CTT TCC CC ATT ACA ACA AAG TTC ACA GC	167	2173	Alexa és mtsai., 1997
stb1/stb2	<i>stb</i>	TCT TCT TGC ATC TAT GTT CG TCT CTA ACC CCT AAA AAA CC	138	2173	Alexa és mtsai., 1997
lt1/lt2	<i>lt</i>	TTA CGG CGT TAC TAT CCT CTC TA GGT CTC GGT CAG ATA TGT GAT TC	275	263	Alexa és mtsai., 1997
AM005/AM006	<i>f4</i>	GGT GAT TTC AAT GGT TCG GTC AAT GCT ACG TTC AGC GGA GCG	764	263	Choi és Chae, 1999
K99A/K99B	<i>F5</i>	TAT TAT CTT AGG TGG TAT GG GGT ATC CTT TAG CAG CAG TAT TTC	314	431	Franck és mtsai., 1998
fedA-F/fedA-R	<i>fl8</i>	GTG AAA AGA CTA GTG TTT ATT TC CTT GTA AGT AAC CGC GTA AGC	509	2173	Imberechts és mtsai., 1994
hlyA1/hlyA4	<i>ehly</i>	GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G TCT CGC CTGATA GTG TTT GGT A	1550	EDL-933	Hess és mtsai., 1986
Z4321-a/Z4321-b	<i>pagC</i>	ATG AGT GGT TCA AGA CTG G CCA ACT CCA ACA GTA AAT CC	521	E2348/69	Karmali és mtsai., 2003
Z4326-a/Z4326-b	<i>sen</i>	GGA TGG AAC CAT ACC TGG CGC AAT CAA TTG CTA ATG C	551	E2348/69	Karmali és mtsai., 2003
Z4332-a/Z4332-b	<i>efa1</i>	CTC CCA GAG ATA ATT TTG AGG CAA CTG TAT GCG AAT AGT ACT C	504	E2348/69	Karmali és mtsai., 2003
Z4333-a/Z4333-b	<i>efa1</i>	CTG TCA GAC GAT GAC ATT GG GAA GGA TGG GCA TTG TGT C	547	E2348/69	Karmali és mtsai., 2003

A LEE régió feltérképezéséhez három DNS hibridizációs próbát (LEE-A, -B, -D) használtunk. A LEE-C próbát nem végeztük el, mert az *eae* génre való pozitivitás egyben LEE C pozitivitást is jelent. A LEE-A próba a pCVD453 plazmid *SphI-EcoRI* emésztéséből származó 2870 bázispár hosszúságú fragment. A LEE-B próba a pCVD461 plazmid *EcoRI-SalI-PvuII* emésztéséből származik és 2948 bp, míg a LEE-D a pCVD460 plazmid *SmaI-XbaI* emésztéséből származó, 2300 bp hosszúságú DNS szakasz. A próbákat [α -³²P] dCTP foszforizotóppal jelöltük és a jelölést ún. „random priming” módszerrel végeztük, a forgalmazó előírása szerint (Ready to go, Pharmacia). Az agartáptalajon megfelelő elrendezésben kitenyésztett *E. coli* telepek DNS-hibridizációját Jacques Mainil laboratóriumában (Bacteriology Department of Infectious and Parasitic Diseases, Veterinary Faculty, University of Liege, Belgium), Goffaux és mtsai. (1997) szerint végeztük.

2.1.4. Fenotipizálás

Az *eae*⁺ *E. coli* törzsek szerotipizálását (O- és H típusuk meghatározását) Lothar Beutin (Division of Emerging Bacterial Pathogens, Robert Koch Institute, Berlin, Germany) végezte (Ørskov és Ørskov, 1984; Bettelheim és Thompson, 1987 módszerei alapján). A hemolízist 5% juhvért tartalmazó agaron végeztük, egyéjszakás, 37°C-on történő inkubációt követően kialakuló hemolitikus zóna alapján állapítottuk meg. Az antibiotikum rezisztenciát standard korong diffúziós módszerrel (CLSI, 2005) határoztuk meg a következő antibiotikumokra: sztreptomycin, gentamicin, klóramfenikol, nalidixsav, enrofloxacin, ampicillin, tetraciklin és kotrimoxazol.

2.1.5. *In vitro* adhéziós tesztek

Az összes *eae*⁺ *E. coli* törzs fenotípusos jellemzése az *in vitro* sejtadhéziós tesztet is magába foglalta. Pozitív kontrollként egy sertés eredetű (PEPEC 86-1390), valamint egy emberből izolált EPEC (E2348/69) törzset használtunk; negatív kontrollként pedig a két *eae*-negatív béleredetű vad és a C600 K12 törzset alkalmaztuk (III. táblázat). A HeLa (ATCC: CCL-2) és PK15 (sertés vese sejtvonal, ATCC: CCL-33) sejteket 5 ml-es mini petricsészében (NUNC) növesztettük egy éjszakán át. Másnap a sejttenyészeteket háromszor mostuk PBS-sel, majd 3 ml ún. „interakció oldatot” tettünk a sejtekre (85% Dulbecco Minimal Essential Medium, 5% foetal borjúsavó, 0,25% glutamin, 1% D-mannóz) (De Rycke és mtsai., 1997). Az így előkészített sejttenyészetekhez 50 µl 18 óráig, stacioner, TSB-be oltott

baktériumtenyészetet adtunk, majd 5% CO₂-ot tartalmazó termosztátban, 1 illetve 6 órán át 37°C-on inkubáltuk. Az adhézió leállítása háromszori, PBS-sel való mosás után metanollal történt. A megszáradt készítményeket 10%-os Giemsa oldattal festettük. Az adhéziós vizsgálatokat minden esetben 2-4 alkalommal ismételtük. A humán EPEC törzsek hatásaként HeLa sejteken, ahol a baktérium tapadt, sokszor aktin felhalmozódás (átrendeződés) mutatható ki (Knutton és mtsai., 1989). Ennek felderítésére a PK15 – és a humán EPEC törzs esetében HeLa sejteken is –, aktin festést végeztünk fluoreszcens izotiocianát-falloidinnel (Sigma) (Knutton és mtsai., 1989), melynek értékelése fluoreszcens és fázis kontraszt mikroszkóppal történt.

In vitro vizsgálatokat MDBK (ATCC: CCL-22) valamint bovin primer bélhámsejtvonalon (jejunum és colon) is végeztünk. Ezek a vizsgálatok Jacques Mainil laboratóriumában készültek. A sejteket 24 lyukú szövettenyésztő lemezben növesztettük. Az adhéziós vizsgálatot ugyanígy végeztük, de a fixálás paraformaldehiddel, majd a festés pedig hematoxilinnel (Mayer-oldat) és eozinnal történt.

Szelektált esetekben a PK15 sejtek és a baktériumok kapcsolatának vizsgálatára transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk. Ezen esetekben a szövettenyészetet a megfelelő törzsekkel végzett 8 órás inkubációt követően a PBS-sel mostuk, majd 5%-os tripszinnel emésztettük maximum 10 percen át, 37°C-on. A sejteket 1000 rpm fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszó leöntése után 10%-os pufferolt formalinnal fixáltuk, majd beágyazás és metszés után Hitachi H7100 típusú elektronmikroszkóppal a következő baktériumok PK15 sejteken történő adhéziójának 0,5 µm vékonyságú blokkjait vizsgáltuk: #5 (O45:H11, *eae-β*), #22 (O123:H11, *eae-β*), #42 (O145:H28, *eae-γ*), sertés EPEC 86-1390 (O45, *eae-β*), humán EPEC E2348/69 (O127:H7, *eae-α*) (I. és II. táblázat).

2.2. Eredmények

2.2.1. Választott malacokból izolált EPEC törzsek előfordulása, szero- és genotípusa

Az összesen 137 állatból származó ileum és colon bélnyálkahártya-kaparékból 1722 *E. coli* baktériumot izoláltunk, amelyeket PCR-rel *eae* gén jelenlétére vizsgáltunk. Az *eae*⁺ minták összesen 16, hasmenéses kórelőzménnyel rendelkező állatból származtak (11,7%), amelyek összesen 11 gazdaságot képviseltek (II. táblázat). Az állatok elhullásának diagnózisa 4 gazdaság esetében *E. coli* okozta hasmenés volt. Ez a megállapítás azon alapult, hogy a csípőbélből felkent nyálkahártya-kaparékból 10⁶-10⁸ CFU/g mennyiségű hemolizáló *E. coli* nőtt ki. Két gazdaságból az állatokban vírusos megbetegedéseket (circovírus, Aujeszky betegség) diagnosztizáltak (Országos Állategészségügyi Intézet, Kórbonctani Osztály); míg 5 gazdaságból érkező hullákból semmilyen specifikus, elhullást okozó betegséget nem tudtak megállapítani.

II. táblázat A hasmenéses és a nem hasmenéses választott malacokban előforduló *eae*⁺ *E. coli* izolátumok gyakorisága

Minták	Sertések száma (n)	<i>E. coli</i> izolátumok száma (n)	<i>eae</i> ⁺ <i>E. coli</i> izolátumok száma n (%)	<i>eae</i> ⁺ <i>E. coli</i> törzsek száma (n)	<i>eae</i> ⁺ sertések száma n (%)
Bél (hasmenéses)	137	1722	50 (2,9%)	20	16 (11,7%)
Bélsár (hasmenéses)	27	209	6 (2,9%)	5	5 (18,5%)
Bélsár (nem hasmenéses)	57	306	26 (8,5%)	12	8 (14,0%)
Összesen	221	2 237	82	37	29

A továbbiakban 3 gazdaságból származó, 27 hasmenéses és 57 nem hasmenéses választási malacból vett bélsártamponból összesen 209 illetve 306 *E. coli* izolátumot vizsgáltunk, melyekből összesen 32 *eae*⁺ izolátumot nyertünk. Ezek 5 hasmenéses (18,5%) és 8 egészséges (14%) állatból származtak (II. táblázat). Statisztikai analízis során a hasmenéses illetve egészséges malacokban előforduló *eae*⁺ izolátumok gyakoriságát illetően szignifikáns különbséget megállapítani nem tudtunk.

Az 50 béleredetű és a 32 bélsáreredetű izolátumot szerotipizáltuk és az I. táblázatban feltüntetett, különböző virulenciagének jelenlétére PCR segítségével tovább vizsgáltuk, valamint az intimintípusukat is meghatároztuk. A 82 *eae*⁺ izolátum analízise során kiderült, hogy néhányuk, amelyek egyazon állatból származtak, – azonos fenó- és genotípusos tulajdonsággal rendelkeztek. Azokat az izolátumokat tekinthettük különálló törzsnek, amelyek különböző állatból származtak és/vagy különböző fenó-és genotípusos tulajdonságokkal rendelkeztek. Így a 82 izolátumból álló gyűjteményt, ezen kritériumok alapján, 37 *eae*⁺ törzsre csökkentettük. A 37 törzs közül 20 béleredetű, míg 17 bélsáreredetű volt.

A szerotípusok, intimintípusok és a *paa* lókuszt jelenlétére vonatkozó adatokat a III. táblázatban tüntettük fel. Az intesztinális törzsek domináns szerotípusa az O123:H11 (40%) volt, míg a bélsárból származó törzsek között az O108:H9 szerotípus volt a leggyakoribb (23%). A H típusok közül a H10 és a H11 fordult elő leginkább. Az összes O45, O49 és az O123 törzs, csakúgy, mint az egyedüli O157:H2 törzs, β típusú intiminnel rendelkezett. A hullákból származó törzsek 85%-a (17/20) β -*eae* típusú, míg 10%-a (2/20) γ -*eae* típusú volt. Ugyanez az arány a bélsártamponokból izolált törzseknél 53% (9/17) és 23,5% (4/17) volt ($p < 0,025$). Egy remesebélből és négy bélsárból származó törzs az eddig *eae*- α -tól *eae*- θ -ig leírt intimintípusok primereivel nem volt tipizálható (I. táblázat).

III. táblázat Választott malacokból izolált 37 db *eae*⁺ *E. coli* törzs szero- és genotípusa valamint az *in vitro* tapadási tulajdonságuk

Törzs száma	Minta	O-típus	H-típus	<i>eae</i> típus	<i>paa</i>	HeLa 6 h	PK15 6 h
#5	ileum	O45	H11	β	+	–	++
#18	ileum	O45	H11	β	+	–	++
#27	ileum	O45	H11	β	+	–	–
#1	colon	O49	H10	β	+	–	–
#2	colon	O49	H10	β	+	–	–
#29	ileum	O49	H10	β	–	–	–
#31	ileum	O49	NM	β	+	–	–
#15 ^a	colon	O123	H11	β	+	–	+/-
#17 ^a	ileum	O123	H11	β	+	–	++
#22 ^a	colon	O123	H11	β	–	–	++
#32 ^a	colon	O123	H11	β	+	–	+/-
#41 ^a	colon	O123	H11	β	–	–	+
#76 ^a	colon	O123	H11	β	–	–	–
#84 ^a	colon	O123	H11	β	–	–	+/-
#4	colon	O153	H11	β	–	–	–
#10 [*]	ileum	O84	H7	γ	–	–	++
#13	ileum	O28	H28	γ	+	–	+/-
#14	colon	O28	H28	UT	+	–	–
#85	colon	R típusú	H11	β	–	–	–
#88	ileum	R típusú	H11	β	–	+	++
#73 ^b	bélsár	O76	H7	γ	+	–	–
#69 ^b	bélsár	O103	H11	β	+	–	–
#72 ^{b,*}	bélsár	O157	H2	β	–	–	+
#70 ^{a,b}	bélsár	O123	H11	β	+	+/-	++
#71 ^b	bélsár	R típusú	H11	β	–	+	++
#75	bélsár	O28	H28	UT	+	–	–
#46	bélsár	O28	H28	β	+	–	–
#58	bélsár	O76	H7	γ	+	–	–
#50	bélsár	O108	H9	β	–	–	+/-
#59	bélsár	O108	H9	UT	–	–	–
#60	bélsár	O108	H9	β	–	–	+
#65 [*]	bélsár	O108	H9	UT	–	–	+/-
#42	bélsár	O145	H28	γ	+	–	+

#53	bélsár	ONT	H7	β	+	-	-
#48	bélsár	R típusú	H28	γ	+	-	+/-
#61	bélsár	R típusú	H9	β	-	-	+/-
#68 ^c	bélsár	R típusú	H10	UT	-	-	-
86-1390	bél	O45	NT	β	+	-	++
E2348/69	bélsár	O127	H6	α	-	++	++
#103	ileum	NT	NT	-	NV	-	-
#113	ileum	NT	NT	-	NV	-	-
C600		K12	NT	-	-	-	-

NT: nem tipizált

UT: nem tipizálható

ONT: O típus nem tipizálható

NV: nem vizsgált

* hemolizáló törzsek: #10, 72 és 65

^a az összes O123 szerocsoporttal rendelkező törzs szerológiai keresztreakciót mutatott az O4-es antiszérummal szemben. Ezt az O123-as referenciatörzsről (W43) nem írták le (Edwards and Ewing's, Identification of Enterobacteriaceae, Fourth edition, William H. Ewing ed., Elsevier, New York, 1986)

^b hasmenéses malacokból származó törzsek

^c #68-as számú törzs *astA* génnel rendelkezik

Hemolitikus aktivitás csak egy intesztinális és két bélsáreredetű törzsnél volt megfigyelhető. Itt szeretnék külön rámutatni arra, hogy a vizsgált 37 *eae*⁺ *E. coli* törzs közül PCR-rel 4 törzs enterohaemolysin gén-hordozónak bizonyult (1. kép), mely lelet felveti annak gyanúját, hogy ezek a törzsek az EHEC virulenciaplazmidhoz hasonló plazmiddal jelentkeznek. A törzsek antibiotikum rezisztencia tulajdonságai a következőképpen összegezhetőek: 68%-uk volt rezisztens tetraciklinre, 43% sztreptomycinre, és 5%-uk nalidixsavra. A törzsek nem mutattak rezisztenciát enrofloxacinre, gentamicinre, klóramfenikolra, ampicillinre és kotrimoxazolra. Figyelemre méltó, hogy a törzsek 37,8%-a mutatott multirezisztenciát (3-6 antibiotikummal szembeni rezisztencia alapján).

Az egyéb virulenciagénekre irányuló vizsgálatok során kiderült, hogy egyik törzs sem hordozza a humán EPEC-re vagy az EAEC-ra (*EAF*, *bfp*, *pAA*) vagy az állatokban és emberben honos NTEC-re (necrotoxikus *E. coli*) (*cdt*, *cnf*) illetve ETEC- és EHEC-re (*sta*, *stb*, *lt*, *f4*, *f5*, *f18*, *stx1*, *stx2*) jellemző virulenciagéneket. Gyűjteményünkben a nyúl EPEC fimbriális adhezinek kódoló gének (*afr1*, *afr2*, *ral*) sem fordultak elő. Ezzel szemben az *astA* gén, amely a hőstabil EAST1 enterotoxint kódolja, egy béleredetű törzsben (*eae*⁺ R-típusú:H11) kimutatható volt.

A *paa* gén a törzsek 54%-ában (20/37) fordult elő, még pedig egyforma arányban mindkét (bél- és bélsáreredetű) csoportban.

A LEE régiók kimutatására irányuló DNS hibridizációs vizsgálatok során valamennyi törzs mindhárom LEE próbával (A, B és D) pozitív eredményt adott. Ez – az intiminre irányuló PCR vizsgálatok eredményeit is figyelembe véve – azt mutatja, hogy az *eae*⁺ kollekció minden tagja lényegében a LEE lókuszt valamennyi régiójával (A, B, C, D) rendelkezik.

Az EPEC és EHEC törzsek másik újonnan megismert pathogenitási szigetére (OI-122) vonatkozó PCR vizsgálataink eredményeit a IV. táblázatban tüntettük fel. A pathogenitási sziget jelenlétének monitorozása során meghatároztuk az *efal*, *sen* és *pagC* gének jelenlétét. A vizsgált törzsek egyikében sem fordult elő egyszerre mind a négy marker gén. Az OI-122 virulencia génjei közül leggyakrabban az *efal* gént mutattuk ki (2. kép). Néhány törzs hordozta a *sen* gént is, azonban a *pagC* egyetlen törzset sem jellemezett (IV. táblázat).

IV. Táblázat OI-122 specifikus virulencia gének előfordulása *eae*⁺ *E. coli* törzsekben

Törzs / Eredet		OI-122			
		<i>efal</i> Z4332	<i>efal</i> Z4333	<i>pagC</i> Z4321	<i>sen</i> 4326
#5	bél	-	-	-	-
#18	bél	+	-	-	-
#27	bél	-	-	-	-
#1	bél	-	+	-	+
#2	bél	-	-	-	-
#29	bél	-	-	-	-
#31	bél	-	-	-	-
#15	bél	+	+	-	+
#17	bél	+	-	-	-
#22	bél	+	+	-	+
#32	bél	-	-	-	-
#41	bél	-	-	-	-
#76	bél	+	-	-	-
#84	bél	+	+	-	+
#4	bél	-	-	-	-
#10	bél	-	-	-	-
#13	bél	-	-	-	-
#14	bél	-	-	-	-
#85	bél	-	-	-	-
#88	bél	-	-	-	-
#73	bélsár	-	-	-	-
#69	bélsár	-	-	-	-
#72	bélsár	-	-	-	-
#70	bélsár	-	-	-	-
#71	bélsár	-	-	-	-
#75	bélsár	-	-	-	-
#46	bélsár	-	-	-	-
#58	bélsár	-	-	-	-
#50	bélsár	+	-	-	-
#59	bélsár	+	-	-	+
#60	bélsár	-	-	-	-
#65	bélsár	-	-	-	-
#42	bélsár	-	-	-	-
#53	bélsár	-	-	-	-
#48	bélsár	-	-	-	-
#61	bélsár	-	-	-	-
#68	bélsár	-	-	-	-
E2348/69 (+ kontroll)		+	+	+	+

2.2.2. HeLa, PK15 és MDBK sejteken végzett *in vitro* adhéziós vizsgálatok

A törzsgyűjtemény összes tagjának *in vitro* adhéziós képességét megvizsgáltuk HeLa és PK15 sejteken 1 órás valamint 6 órás inkubációt követően. Egy órás inkubáció esetén egyetlen törzs sem mutatott adhéziót egyik sejttenyészetben sem, mely eredmény arra enged következtetni, hogy ezek a törzsek mannóz-rezisztens, ún. kezdeti adhezinekkal nem rendelkeznek. A 6 órás inkubációt követően csak három törzs mutatott adhéziót HeLa sejteken. Ezzel szemben a PK15 sejteken 6 béleredetű és 2 bélsáreredetű *eae*⁺ törzs (minden esetben hasmenéses állatokból származtak) erős diffúz tapadást mutatott. További 12 törzs szintén tapadt PK15 sejttenyészetben, bár kisebb mértékben vagyis kevesebb számú baktérium tapadt egy-egy sejthez. Az adhézió az intesztinális törzsek közül különösen az O45, O123 és az O84 szerotípusokra volt jellemző (III. táblázat és 3a. kép). Ezek közül a 10-es számú törzs, 6 órás inkubációt követően, (O84:H7, Hly⁺, *eae*- γ) jelentős toxicitást mutatott a sejtekre, mely nagy valószínűséggel az α -hemolizinnak tudható be. Ezért, a következő kísérletek során ezen törzsnél, az inkubációt 4 óra múlva leállítottuk, s mosás, fixálás és festést követően a törzs tapadónak bizonyult. A két *eae*-negatív, intesztinális illetve bélsáreredetű törzs viszont egyáltalán nem mutatott tapadást. Ebben a vonatkozásban ugyanúgy viselkedtek mint a laboratóriumi K12-es törzs, amit negatív kontrollnak használtunk (III. táblázat és 3b. kép).

A sertés *eae*⁺ *E. coli* törzsek esetében a PK15 sejtekhez való tapadása helyén nem lehetett lokalizált aktin felhalmozódást kimutatni. Ezzel ellentétben a pozitív kontrollként használt humán EPEC E2348/69 törzs a PK15-ön gyenge, míg a HeLa sejteken jól kivehető aktin akkumulációt okozott. A PK15 sejtek membránjához tapadt törzsek ultrastrukturálisan szoros adhéziót mutattak. A vizsgált törzsek a következők voltak: O45: *eae*- β , *paa*⁺ (#5. számú), O123: *eae*- β , *paa*⁻ (#22. számú) és O145: *eae*- γ , *paa*⁺ (#42. számú). Ugyanígy szoros tapadás jellemezte a kontrollként használt sertés EPEC (O45: *eae*- β , *paa*⁺) törzset is (4a., 4b. és 4c. kép). A sertés EPEC törzsek által okozott szoros tapadást ún. pedestal (emelvény) képződés nem jellemezte. Ezzel ellentétben a humán EPEC O127: *eae*- α , *paa*⁻ törzs néhány sejtet emelvény képződésre serkentett (4d. kép). Esetenként a baktériumok bejutottak a sejtbe is.

2.3. Megbeszélés

Az köztudott, hogy az emberben és néhány állatfajban az enteropathogen *E. coli* (EPEC) – rendszerint hasmenést okozva – előfordul (Nataro és Kaper, 1998; Krause és mtsai., 2005). A hasmenéses újszülött és választási malacról is leírták, hogy EPEC vagy *eae*⁺ *E. coli* hordozó lehet (Janke és mtsai., 1989; Mainil és mtsai., 1995; Osek, 2001; Frydendahl, 2002). Az újszülött malacokat sikeresen fertőzték kísérletesen választási malacból izolált EPEC (Helie és mtsai., 1991; Zhu és mtsai., 1994) valamint humán EHEC baktériummal (Moon és mtsai., 1983; Tzipori és mtsai., 1995; Dean-Nystrom és mtsai., 2003), amely segítségével sikerült mélyebben tanulmányozni az általa okozott AE léziót. Ettől függetlenül az *eae*⁺ törzsek kórokozó képessége választási malacokban még tisztázatlan maradt.

Kutatásaink során kiderült, hogy ezen törzsek előfordulása hasmenéses (18,5%) illetve nem-hasmenéses (14,0%) választott malacokból származó bélsármintákban nem mutatott szignifikáns különbséget. Ez azt jelzi, hogy az *eae*⁺ *E. coli* jelenléte a bélsárban nem feltétlenül jelzi ezen baktériumok szerepét a választási hasmenésben. Ezen megfigyelésünktől függetlenül, fontosnak tartottuk, hogy az általunk gyűjtött törzsek *in vitro* fenotípusos tulajdonságait meghatározzuk, hogy választási hasmenésben játszott szerepükről teljesebb képet kapjunk. Az általunk gyűjtött adatok, a németországi egészséges vágóhídi sertések bélsármintáiban előforduló *eae*⁺ *E. coli*-hoz hasonló gyakoriságot mutattak, ahol ez az arány 17-20% volt (Krause és mtsai., 2005). Ehhez hasonló arányú *eae*⁺ *E. coli* előfordulást észleltek, tünetmentes, két évnél idősebb gyermekekben is (Nataro és Kaper, 1998). A fenti adatok arra engednek következtetni, hogy az EPEC patogenetikai jelentősége nem feltétlenül áll összefüggésben az ürítés gyakoriságával. Irodalmi adatok szerint a hasmenéses választási malacokban előforduló *eae*⁺ *E. coli* gyakorisága, az általunk észleltekhöz képest, sokkal alacsonyabbnak látszik Kanadában (9,3%), Lengyelországban (2,7%) és Dániában (1,3%) (Fairbrother és mtsai., 1994; Osek, 2001; Frydendahl, 2002). Az eltérés egyik egyszerű oka lehet, hogy az előbb említett tanulmányok ugyanabból az állatból több izolátumot vizsgáltak. Elsődleges „nyers” eredményeink ugyanilyen random izoláláson alapultak és a hasmenéses választási malacok bélsármintáiból hasonlóan alacsony (2,3%) előfordulási arányt kaptunk. Amikor az eredményeket viszont az egyes állatokban való előfordulásokra kalkuláltuk, akkor jóval nagyobb előfordulási arányt állapítottunk meg (a malacok 18,5%-a) (II. táblázat). Sajnos az említett tanulmányokban izolált *eae*⁺ törzseket nem jellemezték részletesebben. Egy

nemrég készült németországi felmérés szerint – amelyben vágóhídi sertések bélsáreredetű törzseit vizsgálták –, már az O típust és az intimintípust is meghatározták, de a *paa* gén jelenlétét ott sem vizsgálták. Az O123 szerocsoportú *eae*⁺ *E. coli* nem fordult elő (Krause és mtsai., 2005). Így kutatásaink során megállapított domináns szerotípus (O123:H11, *eae*- β) hasznos és új információnak tűnik.

Itt említjük meg, hogy egy, a jelen disszertációs munkával párhuzamosan végzett vizsgálsorozatban választott nyulak valamint 3 év alatti gyermekekből izolált *E. coli* törzseket is vizsgáltunk, melynek során ugyancsak a hasmenéses illetve nem hasmenéses esetekből izolált törzsek tulajdonságait hasonlítottuk össze. Érdekes módon mindkét vizsgálsorozat azt mutatta, hogy a hasmenéses esetekből jóval gyakrabban lehetett EPEC baktériumokat kimutatni, melyek intimin típusa (nyulak esetében β , humán esetekben α és γ) a klinikai tünetekkel összefüggést nem mutatott (Dow és mtsai., 2005; Dow és mtsai., 2006).

A sertés eredetű EPEC törzsek között a legintenzívebben vizsgált választási hasmenésből izolált, kanadai 86-1390 sz. törzs az O45:K”E65” szerocsoportoz tartozik és β típusú *eae* gént hordoz (Zhu és mtsai., 1994; An és mtsai., 1999, 2000). Kanadában a hasmenéses esetekből származó sertés EPEC törzseknél az O45, a leggyakrabban előforduló szerocsoport (Helie és mtsai., 1991; Zhu és mtsai., 1994; An és mtsai., 2000). Ettől eltérően jelen munkánkban egy másik szerotípus (O123: H11) volt a leggyakrabban azonosított, ami arra enged következtetni, hogy az *eae*⁺ *E. coli* egyes szerocsoportjainak gyakoriságát a földrajzi helyük is meghatározhatja.

A béleredetű törzsek leggyakrabban megfigyelt intimin típusa β -nak bizonyult, hasonlóan a kanadai O45 sertés EPEC (86-1390) törzshöz és a nyúl EPEC törzsekhez (An és mtsai., 2000; Oswald és mtsai., 2000; Dow és mtsai., 2005). Ez az intimin típus a legelterjedtebb a különböző állatfajból származó EPEC törzsek között (Oswald és mtsai., 2000; Krause és mtsai., 2005). Érdekes, hogy azon intimin típusok, amelyeket a sertések bélnyálkahártya kaparékjaiból izoláltunk, megoszlási tendenciájukat illetően, különböznek azon törzsek intimin típusaitól, amelyeket a bélsárból gyűjtöttünk (III. táblázat). Az intesztinális törzsek *eae*- β előfordulása (85%) szignifikánsan nagyobb volt ($p < 0,025$) mint a bélsáreredetűeké (53%). A bélsáreredetű törzsek gyakrabban rendelkeztek *eae*- γ -val. Ezek az eredmények támogatják azt a feltételezést, hogy az *eae*- β törzsek elsődlegesen a sertések

csípő- és a remesebelében telepednek meg, míg az *eae-γ* törzsek főleg a rektális nyálkahártyán fordulhatnak elő. Fitzhenry és mtsai. (2002a, b) a humán EPEC (O55) és EHEC (O157) törzsek szöveti tropizmusát vizsgálva megállapították, hogy az *eae-γ* törzsek elsősorban a Peyer plakkok felületén tapadtak, míg az *eae-α* törzsek a Peyer plakkokon kívül, a bélbolyhok felszívó hámsejtjeinek felületét is kolonizálták. Előfordulhat, hogy a sertés *eae⁺ E. coli* törzsek esetében is hasonló jelenséggel kell számolnunk. A sertés *eae⁺ E. coli*-ből álló törzsgyűjteményünkben nem fordult elő α , ϵ , ξ , ι , κ , η vagy θ típusú intimin. Bár 4 (remesebélből származó illetve egy bélsárból izolált) törzs *eae* génje nem volt tipizálható, úgy tűnik, hogy gyűjteményünkben új intimin variánsok létezése – különösen a bélsáreredetű törzseink között – nem kizárható. Érdekes, hogy Krause és mtsai. (2005) igen gyakran határoztak meg *eae-θ* típust, amelyet mi egyáltalán nem találtunk. Ennek valószínű magyarázata, hogy az *eae-θ* típusra jellemző szerotípusok a gyűjteményünkben egyáltalán nem fordultak elő.

Az E2348/69 O127:H7 EPEC prototípus törzs az *E. coli* O157 EHEC törzsekhez hasonlóan hordozza a vizsgált OI-122 sziget virulencia génjeit. Viszont az általunk izolált *eae⁺* törzsek ebben a vonatkozásban sem tekinthetők tipikus EPEC-nek, hiszen egyetlen vizsgált törzs sem rendelkezett komplett OI-122 patogenitási szigettel. Az a tény azonban, hogy az általunk izolált és jellemzett bél- illetve bélsáreredetű *eae⁺* törzsek közül néhány hordozta az *efa* és *sen* géneket azt mutatja, hogy ezen nemrég megismert virulenciagénekkel már egyes atipikus EPEC törzsek is rendelkezhetnek, melyek ilyen alapon, valószínűleg a ma ismert virulens EPEC és EHEC törzsek evolúciós elődeinek tekinthetők.

Az esetleges egyéb EPEC illetve sertés ETEC virulenciafaktorok jelenlétét mindenre kiterjedő és szisztematikus PCR vizsgálatokkal igyekeztünk tisztázni, de negatív eredményt kaptunk. Ez alól kivétel a *paa* gén volt, mely a törzsek közel felében volt jelen. Az előfordulás megoszlása a bél- illetve a bélsáreredetű törzsek között szignifikáns különbséget nem mutatott. Emellett úgy tűnik, hogy a *paa* lókusztól nem függ a PK15 sejtekhez való tapadási képesség sem. Ugyancsak független volt a *paa* gén jelenléte a klinikai háttértől. Ebben a vonatkozásban eredményeink ellentétében állnak Batisson és mtsai. (2003) megállapításaival. Ők ugyanis sertés csípőből „explant” modellen (*in vitro* túlélő csípőből szövet) megállapították, hogy a sertés O45 törzs kromoszómájának *paa* régiójába beépült *TnphoA* inszerció az AE fenotípus kialakulását csökkentette. Emellett azonban ők is

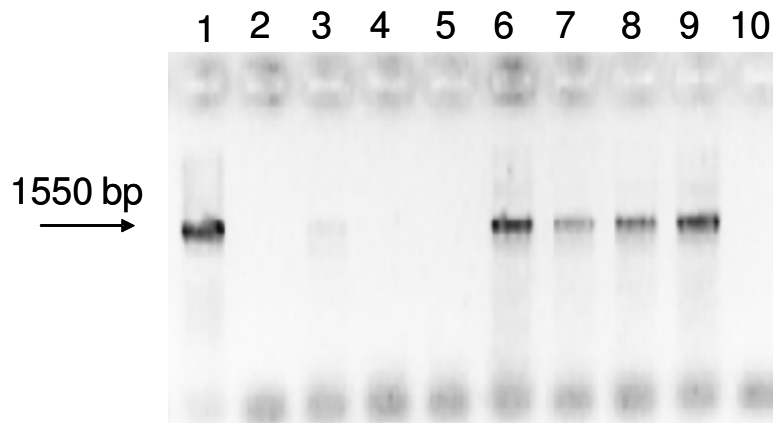
beszámoltak olyan esetekről, melyekben a *paa* gént nem tartalmazó sertés O45 törzs is AE léziót okozott. An és mtsai. (1999) megfigyelései egyébként arra utalnak, hogy az EHEC és a kutyákban előforduló EPEC törzsek által okozott AE lézió sokkal inkább függ a Paa fehérje jelenlététől, mint a nyúl, sertés vagy a humán EPEC esetében. Ezt megerősíti az a tény, hogy *paa* gént a pozitív kontrollként használt humán E2348/69 EPEC törzsben sem találtunk. A PK15 sejteken történt tapadási vizsgálatok során a *paa* gén jelenléte nem befolyásolta a sertés eredetű *eae*⁺ *E. coli* törzsek által okozott AE lézió ultrastrukturális jellemzőit (pl. a szoros tapadást), beleértve a 86-1390 referenciatörzset is. Úgy tűnik tehát, hogy a Paa fehérje jelenléte nem általánosan szükséges az AE aktivitás kifejtéséhez (An és mtsai., 1999). Ami a sertések választási hasmenése kapcsán gyakran észlelt hemolizáló képességet illeti, a Zhu és mtsai. (1994) által megfigyeltekkel összhangban, az általunk vizsgált törzsek közül csak kevés okozott hemolízist véres agaron (3/37). Érdekes módon ezek közül csak az egyik törzs (#10 sz. törzs O84:H7, *eae*- γ) okozott citotoxikus hatást. Itt kell megemlíteni, azon korábbi vizsgálatainkat, melyeket 204, választási hasmenés (és oedemabetegség) eseteiből izolált, hemolizáló enterotoxikus és verotoxikus (ETEC/VTEC) törzsekre kiterjedően végeztünk, s melyek során *eae*⁺ *E. coli* törzset egy esetben sem találtunk. Úgy tűnik tehát, hogy a sertés ETEC/VTEC csoport lényegesen elkülönül az EPEC csoporttól, ellentétben a humán adatokkal, melyek bizonyos gének közös jelenléte alapján a két csoport közötti rokonságra utalnak (Malik és mtsai., 2006).

Irodalmi adatok szerint a sertés *eae*⁺ baktériumok nem kötődtek Hep-2 sejtekhez (Zhu és mtsai., 1994), ellentétben az emberi eredetű EPEC törzsekkel (Jerse és mtsai., 1990). Itt viszont rámutattunk arra, hogy a sertés törzsek tapadási tulajdonságainak vizsgálatára egy másik emberi hámsejtvonal (HeLa) sem alkalmas. További tenyésztett sejteken (MDBK és primer borjú vékonybélhámsejt) az adhéziós vizsgálatok szinte valamennyi törzs esetében mutattak több-kevesebb tapadást (beleértve a negatív kontroll törzseket is) (5. kép). Ezért további tanulmányozásukkal felhagytunk. Sikerült azonban egy olyan sejtvonalat találnunk (PK15) és ennek alapján egy *in vitro* rendszert kidolgoznunk, amely alkalmas volt ezen adhéziós vizsgálatok elvégzéséhez. Néhány, hasmenéses esetből izolált *eae*⁺ *E. coli* törzs ugyanis a PK15 sejtekhez jól tapadt, de elektronmikroszkópos vizsgálatok során kiderült, hogy ez a szoros tapadás nem hasonlít az irodalomban korábban leírt klasszikus AE lézióhoz (Jerse és mtsai., 1990). Az általunk vizsgált 4 *eae*⁺ törzs valamint a 86-1390 kanadai referens törzs egyike sem okozott pedestal képződést az eukaryota sejten és egyikük sem jutott be a sejtek cytoplazmájába. Ezzel megegyezően a tapadás helyén egyik törzs sem okozott aktin

felhalmozódást a PK15 sejteken. Az *eae-β* törzsek intimin β fehérje termelését specifikus nyúlsavó használata segítségével immunfluoreszcens technikával sikerült kimutatni. Érdekes megfigyelés, hogy a humán EPEC E2348/69 refenciatörzs szintén tapadt a PK15 sejtekhez, sőt jellegzetes pedestal képződésre serkentette azokat és internalizálódott; a tapadás helyén pedig gyenge aktin felhalmozódást okozott. A sertés és a humán *eae*⁺ törzsek közötti tapadási különbség oka az lehet, hogy maga a tapadás kapcsolatban van az EAF plazmid illetve a BFP (fimbriák) jelenlétével, mely plazmiddal illetve fimbriával a sertés eredetű *eae*⁺ *E. coli* törzsek nem rendelkeztek. Továbbá az is lehet, hogy *in vitro* körülmények között a sertés *eae*⁺ törzsekben a LEE gének funkciója hiányos. Ezen kívül meg kell említeni, hogy a PK15 sejtek – mint vese tubulus hámsejtek – az *eae*⁺ *E. coli* kezdeti illetve szoros tapadásához szükséges receptorokat nem termelik, ezért nem képviselhetnek oly mértékben specifikus rendszert, mint a sertés csípőbél explantátumok sejtjei (Zhu és mtsai., 1995). A PK15 sejt vonal alkalmazásának előnye viszont mégiscsak az, hogy sertés eredetű sejt vonal, mely olyan, viszonylag jól reprodukálható *in vitro* körülményeket teremt, amelyek közelebb állnak magához a sertés fajhoz, mint az előttünk (és általunk is) sikertelenül próbált humán eredetű hámsejtek (Hep2 és HeLa). Ezért úgy tűnik, hogy a sertés *eae*⁺ *E. coli* *in vitro* tapadási vizsgálataira a PK15 sejt vonal megfelelő, csakúgy, mint a humán és a nyúl eredetű EPEC törzsek vizsgálatára az emberi hámsejt vonalak (HeLa, Hep2) (Knutton és mtsai., 1989; De Rycke és mtsai., 1997). A PK15 sejt adhéziós vizsgálatok rámutattak továbbá arra, hogy *in vitro* körülmények között, a különböző sertés *eae*⁺ *E. coli* törzsek illetve a klasszikus humán EPEC által okozott tapadás fenotípusa különböző. A különbségek pontos felderítése érdekében további vizsgálatok szükségesek, úgy, mint, a LEE lókuszt részletesebb genetikai analízise és a tapadás *in vivo* vizsgálata (szájon át történő fertőzések illetve lekötött bélkacsok fertőzése).

Eddigi megfigyeléseink illetve az itt vázolt megállapítások alapján kijelenthetjük, hogy az általunk gyűjtött *eae*⁺ *E. coli* törzsek különböznek az emberi eredetű tipikus EPEC-től és az ún. atipikus EPEC csoportba tartoznak, melyek ún. iniciális (kezdeti) adhezinjeinek létezése – a többi atipikus EPEC-hez hasonlóan – egyelőre kérdéses. Erre utalnak egyébként a sertés vékonybél mikrobolyhokkal (brush border) végzett *in vitro* adhéziós vizsgálataink is, melyek szerint a sertés EPEC törzsek a mikrobolyhokhoz – *in vitro* – nem tapadnak (ld. később).

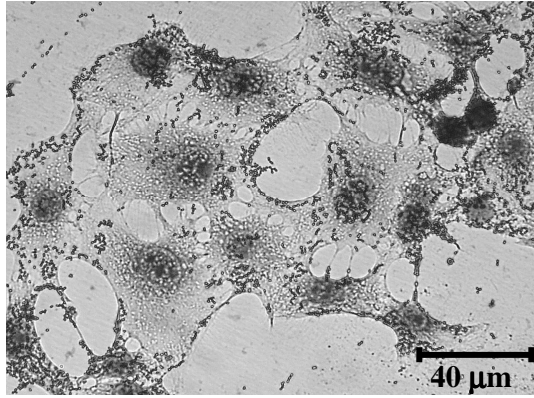
2.4. Képek



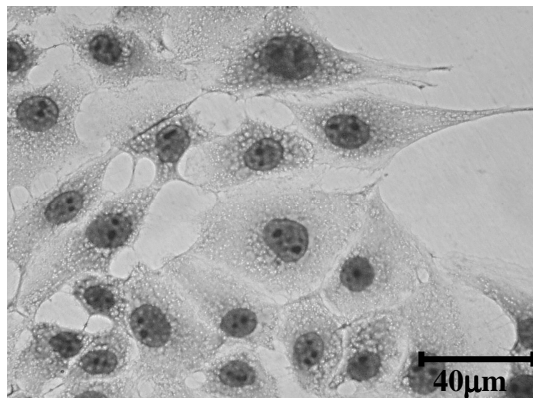
1. kép Enterohaemolysin (*eHly*)-specifikus PCR termékek gélelektroforézise
Minták: 1. *E. coli* O157:H7 7785 (*ehly*⁺), 2. *E. coli* C600, 3. #13, 4. #42, 5. #50, 6. #58 (*ehly*⁺), 7. #59 (*ehly*⁺), 8. #61 (*ehly*⁺), 9. #65 (*ehly*⁺), 10. DNS nélküli minta.



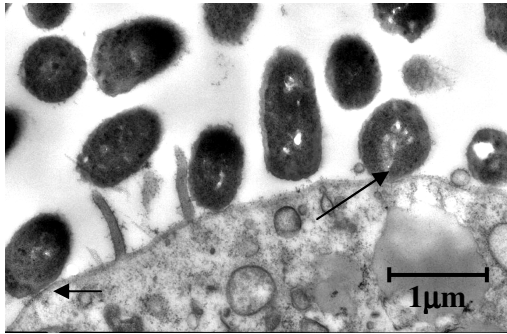
2. kép *efa*-specifikus PCR termékek gélelektroforézise
Minták: 1. #1, 2. #2, 3. #5, 4. #15, 5. #17, 6. #18, 7. #22, 8. #27, 9. #29, 10. #31, 11. #32, 12. #41, 13. #70, 14. #71, 15. #84, 16. E2348/69, 17. *E. coli* C600, 18. Nincs DNS



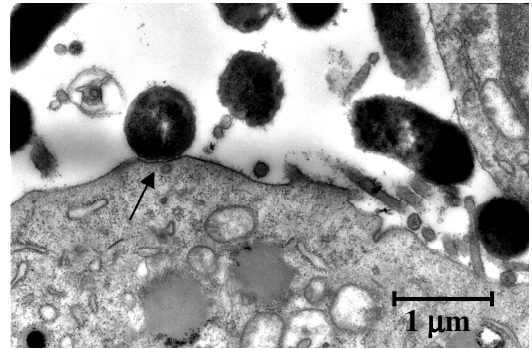
3a. kép A #22 sz. törzssel (O123:H11, *eae*- β , *paa*⁻) fertőzött PK15 sejtek (6 órás inkubáció, Giemsa). A baktériumok nagy számban tapadnak a sejtekhez. (A skála 40 μ m-nek felel meg.)



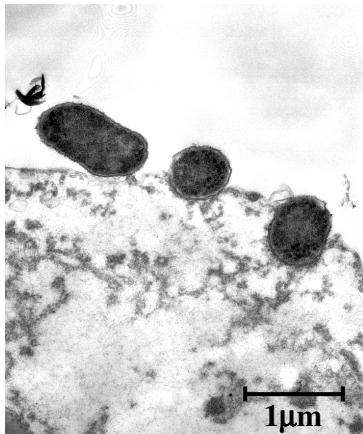
3b. kép A #103 sz. *eae*-negatív sertés intesztinális *E. coli* törzssel fertőzött PK15 sejtek. Nem látható bakteriális tapadás. (6 órás inkubáció, Giemsa-festés) (A skála 40 μ m-nek felel meg.)



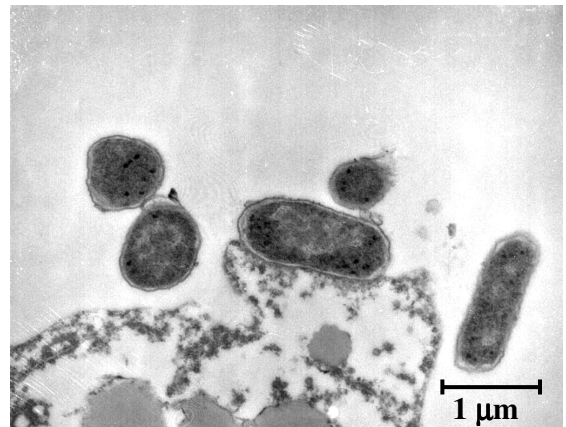
4a. kép



4b. kép



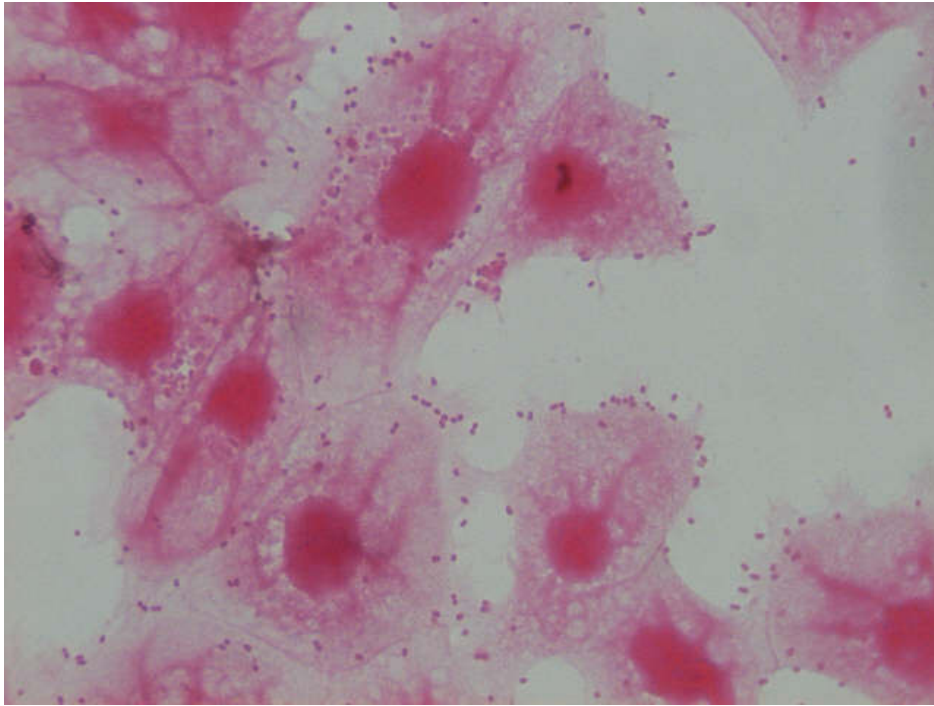
4c. kép



4d. kép

4a., b., c. d kép

Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel a PK15 sejtek felületéhez tapadt baktériumokról (6 óra inkubációt követően: 4a. és 4b. képek; 8 órás inkubációt követően 4c. és 4d. képek). Néhány baktérium kezdeti kötődést mutat a sejtek membránjához, néhányuk pedig szorosan kötődik a sejtmembránhoz, úgy, hogy egy keskeny rés marad a baktérium és a hámszefal között (nyíl). **4a.**: #22 sz. törzs (O123:H11, *eae-β*, *paa⁻*) **4b.**: A kanadai sertés EPEC referencia törzs (O45, *eae-β*, *paa⁺*) **4c.**: #5 sz. törzs (O45:H11, *eae-β*, *paa⁺*) **4d.**: A humán EPEC törzs (O127:H7, *eae-α*, *paa⁻*), amely kezdeti pedestal-képződést mutat. (A skála 1 μm-nek felel meg.)



5. kép A #29 sz. törzs (O49:H10, *eae-β*, *paa*⁻) adhéziója az MDBK sejtekhez (hematoxilin-eozin festés).

3. Az atipikus EPEC baktériumok tanulmányozása sertés bélkacs modellben és sertés vékonybél mikroboholy készítményekben

3.1. Bevezető

Mint az előző fejezetben kifejtettem az *eae*⁺ *E. coli* baktériumok kórokozónak számítanak mind humán mind állategészségügyi vonalon. Irodalmi adatok szerint sertésekben főleg a választási hasmenés kialakításában lehet szerepük, bár a pathomechanizmus pontos folyamata még tisztázatlan és a bélbeni kolonizáció részleteiről is keveset tudunk. A kórokozó *in vitro* adhéziójának vizsgálata céljából Zhu és mtsai. (1995) fejlesztettek ki egy ún. csípőbél explantátum technikát, mely a választott malacok túlélő csípőbél-darabkáin a sertés eredetű EPEC (pl.: O45, *eae*- β) törzsek tapadását és tipikus bélboholy-károsító hatását bizonyította. A rendszer azonban meglehetősen bonyolult és az így kapott eredmények nem minden esetben vannak az egyéb *in vitro* módszerek eredményeivel összhangban.

Korábbi *in vitro* kísérleteink alapján – többek között – megállapítottuk, hogy feltétlenül szükség van egy megfelelő modell rendszer kidolgozására, melynek segítségével az *eae*⁺ *E. coli* baktériumok által okozott léziókat *in vivo* is vizsgálhatjuk, illetve a különböző pathotípusok tapadási képességét a választási malacokra vonatkozóan is össze tudjuk hasonlítani. Ezért a választott sertésekben kialakítandó bélkacs modellre gondoltunk. Az AE lézió tanulmányozására a bélkacs műtetet nemrég alkalmazták főleg O157:H7 szerotípusú EHEC baktériumok esetében; fiatal kerdőzökön (juhok, bárányok) és nyulakon végezve a műtétet (Stevens és mtsai., 2002; de la Fuente és mtsai., 2004., China és mtsai., 1997). Jelenlegi ismereteink szerint ez idáig választás korú sertésekben EPEC vagy EHEC baktériumok vizsgálatára bélkacs modellt nem alkalmaztak.

Az alábbiakban ismertetendő munka célja az volt, hogy kiderítsük, lehet-e – és milyen feltételekkel – a választott malacok lekötött vékonybél-szegmentjeiben a sertés EPEC és a humán EHEC *in vivo* adhéziós és bélboholy elhajtító (attaching effacing) képességét vizsgálni, továbbá, hogy ezen módszerrel lehet-e a különböző szerotípusú és intimin típusú sertés EPEC törzsek között jellegzetes eltéréseket találni. Végül pedig célunk volt vizsgálni,

hogy a humán EHEC törzsek ezen sertés *in vivo* modellben a sertés EPEC törzsekhez hogyan hasonulnak.

3.2. Anyagok és módszerek

3.2.1. Baktériumtörzsek

Összesen 15 sertés eredetű atipikus EPEC törzset vizsgáltunk meg sertés-bélkacsbán. Negatív kontroll törzsünk, mint a korábbi *in vitro* fertőzésekénél, szintén a 123 *E. coli* volt (Moon és mtsai., 1968), míg a pozitív kontrollként a Kanadában izolált EPEC 86-1390 jelzésű *E. coli* törzset (Batisson és mtsai., 2003) használtuk. A kísérleti törzseink az általunk választás korú sertésekből, Magyarországon izolált *eae*⁺ *E. coli* törzsek voltak. Ezenkívül további kanadai izolátumok, valamint három emberi eredetű EHEC törzs is szerepeltek a kísérleteinkben. Ezek közül a 2409 jelzésű O157:H7 EHEC törzset Dr. Richard Wilson-tól (*E. coli* Reference Center, Pennstate University, Pennsylvania, USA) kaptuk. További két O157:H7 EHEC törzset, a 7785-öt (Riley és mtsai., 1983) és az EDL933-at (O'Brien és mtsai., 1983) pedig Dr. Herbert Schmidt-től (Department of Microbiology and Hygiene, Medical Faculty Carl Gustav Carus, Technical University of Dresden, Germany) szereztük be. Az egyes törzsek származását, szerotípusát illetve genotípusos jellemzését az V. táblázatban tüntettem fel.

V. táblázat A sertés-bélcacs modellben vizsgált *E. coli* törzsek főbb jellemzői

Törzs	Pathotípus	Szerotípus	Genotípus	Izolálás helye
86-1390	EPEC (pozitív kontroll)	O45:K”E65“	<i>eae-β, paa, espD</i>	Kanada, sertés bél
123	negatív kontroll	O43:H28		USA, sertés bél
2409	EHEC	O157:H7	<i>stx1, stx2, eae-γ</i>	USA, széklet
7785	EHEC	O157:H7	<i>stx1, stx2, eae-γ</i>	USA, széklet
EDL-933	EHEC	O157:H7	<i>stx1, stx2, eae-γ</i>	USA, húspogácsa
P87-4725	EPEC	O45:K”E65“	<i>eae, paa</i>	Kanada, sertés bél
P01-F103	EPEC	O123:H11	<i>eae-β, espD</i>	Kanada, sertés bél
P01-9092	EPEC	Nem vizsgált	<i>eae, paa, East1</i>	Kanada, sertés bél
#5	EPEC	O45:H11	<i>eae-β, paa, espD</i>	Magyarország, bélnyálkahártya
#10	EPEC	O84:H7	<i>eae-γ</i>	Magyarország, bélnyálkahártya
#17	EPEC	O123:H11	<i>eae-β, paa, espD</i>	Magyarország, bélnyálkahártya
#27	EPEC	O45:H11	<i>eae-β, paa, espD</i>	Magyarország, bélnyálkahártya
#31	EPEC	O49:NM	<i>eae-β,, paa, espD</i>	Magyarország, bélnyálkahártya
#42	EPEC	O145:H28	<i>eae-γ, paa, espD</i>	Magyarország, bélsár
#60	EPEC	O108:H9	<i>eae-β, espD</i>	Magyarország, bélsár
#72	EPEC	O157:H2	<i>eae-β, espD</i>	Magyarország, bélsár
#75	EPEC	O28:H28	<i>NT, paa, espD</i>	Magyarország, bélsár

3.2.2. Lekötött csípőbél-kacsok fertőzése

A fenti 17 baktériumtörzs vizsgálata céljából összesen 47 állatot operáltunk, melyekben összesen 381 bélkacsot fertőztünk (Fővárosi Állategészségügyi és Élelmiszerellenőrző Állomás által kiadott engedély száma: 23/99, speciális engedély száma: 25-4-2/2000). Az állatokon a műtéti előkészítést diazepam (1 mg/ttkg), xylazin (4 mg/ttkg) és ketamin (2 mg/ttkg) injekciókkal végeztük. A műtét, teljes analgézia mellett, altatásban történt. A jobb oldali hasfal felnyitása után megkerestük a ligamentum ileocaecale-t. Innen kb. 15-20 cm-rel visszafele haladva a csípőbél alsó szakaszán kezdtük el az első lekötést. Egy kísérletsorozatban a csípőbéli szegmens mellett az éhbélben (kb. 1 méterrel a Trietz-f. ligamentumtól caudálisan) is készítettünk lekötött (10 cm-es) bélkacsokat, melyeket a csípőbéli kacsokkal azonos törzsekkel, azonos dózisban (1ml, 10^9 CFU/ml) fertőztünk. Az egyes kacsok között rövid, 2-5 cm-es lekötött, határoló szakaszokat hagytunk. A hasfal visszazárását követően a malacokat puha alomra tettük, éjszakai nyugalomukról Nembutal inj. (Ceva-Phylaxia Rt., 1 ml/4 ttkg) im. adásával gondoskodtunk, majd másnap reggel (kb. 16-18 óra múlva) Nembutal adagolásával a malacokat túllattattuk, illetve – a kísérletek későbbi folyamán – xylazin és ketamin anaestheziában embutramid hatóanyag-tartalmú (T-61, Intervet International B.V., 6-8 ml/állat intracardiálisan) injekcióval euthanáziát alkalmaztunk. Ezt követően az egyes lekötött béldarabokat PBS-sel átmostuk és immunfluoreszcenciás valamint szövettani, néhány esetben pedig elektronmikroszkópos vizsgálatokra is, megfelelő mintákat vettünk. A bélkacs próbákra általában 4-5 hetes malacokat alkalmaztunk, különböző állományokból. Egy külön kísérletsorozatban viszont ugyanazon állományból vizsgáltunk 4 hetes valamint 1 és 2 hetes malacokat, ugyanazon β illetve γ típusú intiminrel rendelkező sertés EPEC törzsek adhéziójának tanulmányozására, a fertőző dózist a bélátmérőkkel arányosan csökkentve.

A vékony- illetve a vastagbél-nyálkahártyán előidézhető AE léziót egy β - és egy γ típusú intimint termelő sertés eredetű EPEC (a kanadai 86-1390 jelű O45, *eae- β* és a magyar #10 jelű O84, *eae- γ*) törzs esetében hasonlítottuk össze egy 4 hetes malacban, 3-3 bélkacsot a törzsek 2-2 ml-nyi TSB tenyészetével (kb. 5×10^8 CFU/ml) fertőzve.

3.2.3. Szövetteni, immunfluoreszcenciás vizsgálatok és statisztika

Az immunfluoreszcenciás vizsgálatokhoz a metilcellulózba (Cryomatrix, ThermoShandon) ágyazott csípőbél mintákból Cryostat (1800 Leica) készülékkel 4 µm vékonyságú metszeteket vágunk. Metanolos fixálást követően a metszeteket 1:50 higítású, az adott baktériumtörzs ellen nyúlban termelt savóval fedtük le és nedves kamrában, 37°C-on 30 percig inkubáltuk. A metszeteket PBS-sel történő háromszori mosás után, anti nyúl IgG FITC konjugátummal (Sigma) lefedtük és nedves kamrában, 37°C-on 30 percig inkubáltuk. A metszeteket újból PBS-sel mostuk, és Evans késsel kontrasztfestést végeztünk. Mosás és szárítást követően a metszeteket fluoreszcenciás mikroszkóppal a specifikusan festődő baktériumok jelenlétére, a bélbolyhokon képződő baktériumréteg kiterjedtségére (kolonizációra) és a baktériumok tapadásának intenzitására vonatkozóan bíráltuk (Bertschinger és mtsai., 1972).

A hematoxin-eozinnal festett metszeteken a bélnyálkahártyához kötődött baktériumokat valamint a mikrobolyhok jellegzetes „szakadozottságát” vizsgáltuk.

A hematoxin-eozinnal festett metszetekben a baktériumok AE lézióval járó tapadási intenzitását metszetenként 50 bélbolyg vizsgálatára alapján ítéltük meg (AE léziót mutató bélbolygok %-os aránya). Az így nyert adatok statisztikai értékelését a Student-féle t-próbával végeztük (Sváb, 1973).

Az anti-β-intimin nyúlban termelt, specifikus immunszérumot Gad Frankeltől (Centre for Molecular Microbiology and Infection, Department of Biological Sciences, Imperial College London, UK) kaptuk. A kísérleti törzsekre specifikus immunsavót, melyeket a bélkacs-kísérleteinkben vizsgált törzsek kimutatására használtunk, ismételt intravénás oltásokkal nyulakban termeltettük (Ørskov és Ørskov, 1983).

3.2.4. Sertés vékonybél mikrobolyhokkal végzett *in vitro* kísérletek

A vékonybél kefeszegély készítését és e készítménnyel a baktérium adhézio tanulmányozását Sellwood és mtsai. (1975) módszereinek módosításával végeztük, az alábbiak szerint.

3.2.4.1. Kefeszegély (brush border) kinyerése sertés vékonybélből

Felhasznált oldatok:

PBS-EDTA puffer (pH= 6,8)

-	EDTA diNatrium 2 hidrát:	18,61 g
-	KCl	: 558,75 mg
-	NaCl	: 27,8 g
-	Na ₂ HPO ₄	: 3,975 g
-	KH ₂ PO ₄	: 5 g
-	Desztillált H ₂ O	: 5 l

Hipotóniás EDTA pH= 7,4 (a pH-t 0,5 M-os Na₂CO₃ oldattal állítjuk be)

-	EDTA diNatrium 2 hidrát:	1,861 g
-	Desztillált H ₂ O	: 1 l

Az állatok csípő- vagy az éhbél szakaszát (kb. 1 méter hosszú) átmosás után hideg PBS-EDTA oldatba helyezzük. A bélszakaszt jégre kihelyezett tálcán felnyitjuk és a fölösleges nyálka eltávolítása után egy tárgylemez segítségével a bélhámsejteket óvatosan lekaparjuk. A kaparékot friss PBS-EDTA-ba, 250 ml-es centrifugacsöbe gyűjtjük, majd három alkalommal 1000 rpm-en, 4°C-on, 10 percig centrifugáljuk (Sorvall centrifuga, kilendülőfejes rotor). Az utolsó mosás után a felülúszót elöntjük, majd az üledéket 250 ml hipotóniás EDTA-ban vesszük fel, alaposan összerázzuk és 30 percig jégen tartjuk. Az így kapott oldatot 2000 rpm fokozaton 10 percig centrifugáljuk. Az üledéket 30 ml hipotóniás EDTA-ba vesszük fel és szövetdörzsölővel 2-3-as fokozaton tízszer átmozgatjuk, majd 250 ml-re feltöltjük és sűrű üveggyapoton kétszer átszűrjük. Közben mikroszkóppal ellenőrizzük, és ha sok a törmelék és a kötőszöveti sejt, akkor újrászűrjük. A brush bordert tartalmazó oldatunkat 2500 rpm-en, 10 percig centrifugálva, a kefeszegély töménységét beállítjuk (látóterenként 20-40 kefeszegély), majd a készítményt felhasználásig 0,01% NaN₃-ot tartalmazó PBS-ben, 4°C-on tároljuk.

3.2.4.2. A baktérium és a kefeszegély (brush border) közötti adhézió vizsgálata

A vizsgálandó baktériumot tartalmazó stationer levestenyészetet háromszor ülepítjük (3000 rpm, 30 perc), úgy, hogy a harmadik reszuszenzió esetén a PBS 1% D-mannózt tartalmaz. A kapott baktériumszuszenziót a McFarland skála segítségével 1×10^9 sejtsűrűsége állítjuk be.

200 µl kefeszegélyt tartalmazó nátrium-azidos PBS-t egy Eppendorf csőbe mérünk, melyhez 200 µl 1% D-mannózt tartalmazó fenti baktérium szuszpenziót adunk. A kefeszegélyek és a baktériumok keverékét folyamatos lassú forogással 37°C -on 15 percig inkubáljuk, majd 1500 rpm fordulaton, 5 percig ülepítjük. Az üledéket az eredeti térfogatra szuszpendálva PBS-sel háromszor mossuk. Az így mosott kefeszegély/baktérium szuszpenziót tárgylemezre csöppentve, fedőlemez alatt, fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáljuk. Pozitív kontrollként K88⁺ (F4⁺) és F18⁺ ETEC baktériumokat, negatív kontrollként pedig az *E. coli* 123-as (nem pathogén) törzset használjuk.

3.3. Eredmények

3.3.1. A sertésekből izolált atipikus EPEC, és a humán EHEC törzsek tapadása választott sertések vékonybél mikrobolyhaihoz (*in vitro*) és vékonybél hámsejtjeihez (*in vivo*)

Az irodalomból ismeretes, hogy humán EPEC törzsek esetében a kolonizáció helye a csípőbél illetve az éhbél. Így először azt kívántuk tisztázni, hogy választott sertések esetében a vékonybél mely szegmense megfelelőbb a további vizsgálatokra. Ehhez a kísérlethez két kanadai (1390, P01-F103) és 2 magyar (#5 és #27) EPEC törzset választottunk ki. Az egyes törzsek tapadását összesen 21 lekötött bélkacsban vizsgáltuk. A vizsgált törzsek által okozott tapadás immunfluoreszcenciás eredményeit a VI. táblázat tartalmazza. Adataink alapján szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbség van a kapott értékek között. Az eredmények azt mutatják, hogy a csípőbél alkalmasabb a további vizsgálatokra, hiszen ugyanazokkal a baktériumtörzsekkel a csípőbélben majdnem kétszer annyi bélkacsban tudtunk tapadást kimutatni, mint az éhbélben (6. kép). A nem fertőzött bélkacsok (összesen 5) minden esetben negatívak lettek, jelezvén, hogy a vizsgált sertéseknek spontán, saját EPEC fertőzöttségük nem volt.

VI. táblázat A 6 hetes sertések csípőbelében és éhbélében sertés eredetű EPEC baktériumok tapadása (immunfluoreszcenciás festéssel vizsgálva)

Törzs/ szerocsoport	Ileum +/- összes loop	Jejunum +/- összes loop
P86-1390/ O45	6/6	3/6
P01-F103/ O123	4/5	1/5
#5/ O45	5/5	4/5
#27/ O45	5/5	3/5
Összesen	20/21	11/21

Ezen vizsgálatok alapján, az általunk izolált és jellemzett bélnyálkahártya-eredetű (#5, #10, #17, #27, #31) illetve bélsáreredetű (#42, #60, #72, #75) atipikus sertés EPEC törzseket teszteltük. Az immunfluoreszcenciás készítményekben a bélbolyhok felületén mikrokolóniák, esetenként pedig folyamatos, tapadó réteget képező baktériumok láthatók (7. kép). A

hematoxilin-eozinnal festett metszeteken a baktérium-tapadást és kolonizációt valamint a tapadó baktériumok sejtmembrán károsító hatását, tipikus AE lézió kialakulását vizsgáltuk (8a., b. kép).

A vizsgálatok számszerű eredményeit a VII. táblázat mutatja. Egyes törzsek, mint az #5, #17, #31, #42 és a #60 számú *E. coli* törzsek jellegzetes tapadást mutattak a vékonybél hámsejtjeihez. Ez a tapadás a legtöbb esetben mind az immunfluoreszcenciás mind pedig a hematoxilin-eozinos metszeteken kimutatható volt, de tipikus AE léziók (mikrobolyhok közé beágyazódott baktériumok, lekerekedett vagy kagylóhély-szerű behúzódasokat mutató bélhámsejt-szegélyek) csak a HE metszeteken voltak jól megfigyelhetők. Az itt vizsgált jól tapadó törzsek nagy részére jellemző, hogy β -típusú intiminnel rendelkeznek, mely intimin *in vivo* expresszióját az anti- β -intimin savóval végzett indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálattal is igazoltuk (ld. később). Az eredmények azt mutatják, hogy a *paa* illetve az *espD* gén jelenléte nem befolyásolta a tapadást. Ezen gének által termelt fehérjék főleg a kezdeti adhézióban vesznek részt.

A statisztikai kiértékelés szerint a két *eae- γ* típusú törzs (#10 és #42) adhéziója szignifikánsan ($p < 0,001$) alacsonyabb volt mint a két legjobb *eae- β* típusú törzs (#1390 és #17) adhéziója, vagy mint az *eae- β* törzsek összességének átlaga ($p < 0,01$). Az *eae- β* típusú intiminnel rendelkező törzsek adhéziós készsége tehát, egyértelműen jobb volt mint az *eae- γ* típusúaké. Kivételt csupán a #60-as (bél-eredetű) *eae- β* törzs jelentett (VII. táblázat). Ennek kapcsán elvégeztük a bél- (I) és a bélsár- (F) eredetű EPEC törzsek adhéziójának összehasonlítását is, melynek eredménye szerint béleredetű EPEC törzsek szignifikánsan jobban tapadtak a csípőbélsejtekben ($p < 0,001$) mint a bélsáreredetűek.

VII. táblázat Sertés EPEC törzsek tapadási készsége és a tapadás intenzitása (%) a választott (4 hetes) sertésekben kialakított csípőbélkacsokban (immunfluoreszcenciás és HE vizsgálatának összesítése)

Törzs/ szerocsoport, intimintípus, eredet	Immunfluoreszcenciával kimutatott tapadás (+/össz.)	Szövettani vizsgálattal kimutatott tapadás (+/összes)	HE tapadás intenzitása ** %
#5/ O45, <i>eae-β</i> , I	12/13	12/13	35,1%
#27/ O45, <i>eae-β</i> , I	10/13	12/13	25%
#17/ O123, <i>eae-β</i> , I	7/7	7/7	44,6%
#31/ O49, <i>eae-β</i> , I	6/7	4/7	16,6%
#72/ O157, <i>eae-β</i> , F	3/7	3/7	19,4%
#60/ O108, <i>eae-β</i> , F	3/7	3/7	1,4%
#10/ O84, <i>eae-γ</i> , I	5/7	7/7	20,6%
#42/ O145, <i>eae-γ</i> , F	3/7	2/7	2,3%
#75/ O28, <i>eae-NT*</i> , F	3/7	3/7	4,3%
1390/ O45, <i>eae-β</i> , I	7/7	7/7	71,1%
123 (negatív kontroll), I	0/7	0/7	–

*eae-NT** intimin nem tipizálható

I: béleredetű

F: bélsáreredetű

**Tipikus AE léziót mutató bélbolyhok átlagos %-os gyakorisága (metszetenként 50 bélbolyh vizsgálatára alapján)

Megjegyzés: A kísérletek a VIII. táblázatban feltüntetett vizsgálatokkal egyidejűleg történtek. Ezért a negatív és a pozitív kontroll törzsekre vonatkozó nagyszámú eredményeket ott tüntettük fel.

3.3.2. A humán EHEC törzsek adhéziójának vizsgálata

A továbbiakban három humán O157:H7 EHEC törzset tanulmányoztunk lekötött csípőbélkacsokban (2409-es, 7785 és EDL933 jelzésű törzsek). Ezek mellett kontrollként kanadai EPEC törzseket vizsgáltunk. Az eredmények azt mutatják, hogy a β -intimin típusú (és többnyire O45 szerotípusú) törzsek erősebben és specifikusabban kötődnek a mikrobolyhokhoz (VIII. táblázat). A tapadás specificitása és a β intimin kifejeződése anti β intimin immunsavóval is kimutatható volt (9. kép). A γ -intiminnel rendelkező emberi eredetű EHEC törzsek AE léziót okozó tapadása viszont jóval ritkábban és kisebb plakkokban volt kimutatható.

VIII. táblázat A humán eredetű EHEC törzsek AE léziót okozó tapadása választott, 4 hetes malacok csípőbelében, sertés eredetű EPEC törzsekkel összehasonlítva

Törzs/ szerocsoport, intimintípus	Immunfluoreszcenciával kimutatott tapadás (+/összes)	Szövettani vizsgálattal kimutatott tapadás (+/összes)	HE tapadás intenzitása ** %
1390/ EPEC O45, <i>eae-β</i>	8/10	7/10	70,6%
4725/ EPEC O45, <i>eae-NT</i>	3/4	2/2	NV
P01-F103/ EPEC O123, <i>eae-β</i>	5/10	6/10	23,6%
2409/ EHEC O157:H7, <i>eae-γ</i>	3/6	4/6	2%
7785/ EHEC O157:H7, <i>eae-γ</i>	0/4	1/4	1%
EDL 933/ EHEC O157:H7, <i>eae-γ</i>	0/4	4/4	4,5%
123 (negatív kontroll)	0/6	0/6	–

**Tipikus AE léziót mutató bélbolyhok átlagos %-os gyakorisága (metszetenként 50 bélbolyh vizsgálat alapján)

NV: nem vizsgáltuk

A bélhámsejtek mikrobolyhainak és a sejtmembránnak jellegzetes elváltozását, valamint a vizsgált sertés EPEC baktériumoknak tapadását (AE lézió) a transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok is bizonyították. A baktériumok szorosán tapadtak a bélhámsejtek membránjához, a tapadási helyek szomszédságában jellegzetesen megnyújtották a mikrobolyhokat és voltak olyan területek, ahol teljesen lepusztították azokat. Emellett a

bélműsejteknek a tapadási helyen képződő talpszerű alakzatát (pedestal) is sikerült kimutatni (10a., b. és c. képek). Ezzel szemben a humán EHEC O157:H7 törzsek, amelyek γ -intiminnel rendelkeznek, ritkábban, de jól kimutathatóan jellegzetes AE léziót okozva kötődtek a bélműsejtekhez. A ritka előfordulás miatt elektronmikroszkópos vizsgálatokkal nem voltak kimutathatók. Ahol szövettani vizsgálattal jellegzetes tapadás volt megfigyelhető, ott is csupán 1-2 bélbolyhon okoztak tipikus AE léziót. (VIII. táblázat).

3.3.3. Az életkor szerepének tanulmányozása *eae- β* és *eae- γ* típusú sertés EPEC törzsek csípőbeli megtelepedésében és az AE lézió előidőzésében

Az eddig bemutatott eredmények alapján úgy tűnt, hogy a 4 hetes malacok csípőbelében elsősorban az *eae- β* típusú sertés EPEC törzsek tapadnak megfelelően és idéznek elő AE léziót, míg az *eae- γ* típusú sertés EPEC törzsek e tekintetben kevésbé voltak virulensek. Mivel ismert, hogy a többnyire *eae- α* típusú intimint termelő humán EPEC törzsek az életkor előrehaladtával egyre csökkenő kórtani jelentőségűek, indokoltnak tartottuk megvizsgálni, hogy vajon a 4 hetesnél fiatalabb malacok csípőbelében a fenti két típusú intiminnel (β és γ) jellemzett sertés EPEC törzsek két-két képviselője mutat-e a kor előrehaladtával csökkenő pathogenitást. Idevonatkozó eredményeinket a IX. táblázatban foglaltuk össze. Kiegészítésként megvizsgáltuk a kanadai referenciatörzs 86-1390 (O45, *eae- β*) 8 hetes malacok lekötött bélszegmentjeiben mutatott adhézióját is, mely alap dózisban, három malacra vonatkozóan, 46,0%-os tapadási intenzitást mutatott. A negatív kontrollként használt *E. coli* 123-as törzs ugyanakkor ilyen adhéziót nem mutatott.

IX. táblázat Különböző korú malacokban kialakított csípőbélkacsokba **alap dózisban**[‡] beoltott EPEC törzsek immunfluoreszcenciával és hematoxin-eozinos szövettani vizsgálattal kimutatott tapadása illetve a tapadás intenzitása

Törzs/ szerocsoport, intimintípus	IF tapadás (+/össz. loop)			IF tapadás intenzitása* átlag			HE tapadás (+/össz. loop)			HE tapadás intenzitása** %		
	1 hetes	2 hetes	4 hetes	1 hetes	2 hetes	4 hetes	1 hetes	2 hetes	4 hetes	1 hetes	2 hetes	4 hetes
#10/ O84, <i>eae-γ</i>	2/4	4/4	5/7	1,0	2,25	1,57	1/4	4/4	7/7	1,5%	17,5%	20,6%
#17/ O123, <i>eae-β</i>	2/4	4/5	5/7	0,75	2,2	1,5	2/4	3/3	7/7	27,5%	63,3%	44,6%
#42/ O145, <i>eae-γ</i>	2/3	3/4	2/7	1,0	1,75	0,57	3/4	3/3	2/7	16,5%	8,0%	2,3%
1390/ O45, <i>eae-β</i>	4/4	3/4	6/7	3,5	1,75	2,0	4/4	3/3	7/7	65,5%	34,0%	71,1%
123/ O43, <i>eae⁻</i>	2/4	1/5	0/7	0,5	0,2	–	0/4	2/4	0/7	–	3,0%	–

[‡]Alap dózis: 1 hetes malacoknál 0,2 ml TSB tenyészet/10 cm bélkacs

2 hetes malacoknál 0,3 ml TSB tenyészet/10 cm bélkacs (a bél méretek alapján)

* A baktériumok tapadásának mértéke (hámsejtek fedése) és folyamatos rétege alapján (metszetenként 0,5-től 4-ig terjedő számok átlaga)

**Tipikus AE léziót mutató bélbolyhok átlagos %-os gyakorisága (metszetenként 50 bélbolyh vizsgálat alapján)

Az immunfluoreszcenciával (IF) kimutatható baktériumtapadás átlagos intenzitása, valamint a szövettani (HE festett) metszetekben észlelt AE lézió gyakorisága (HE tapadás intenzitása) korrallal csökkenő mértéket csak az O145-ös *eae-γ* típusú EPEC esetében mutatott, melynek viszont a másik, O84-es, *eae-γ* törzs esetében épp az ellenkezőjét tapasztaltuk. Az *eae-β* típusú törzsek általában jobban (intenzívebben) tapadtak és okoztak AE léziót, bár ez esetben a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. Röviden megállapítható, hogy az 1 illetve a 2 hetes malacokban a 4 hetesekhez képest lényeges különbséget sem egyik, sem másik intimin típus nem mutatott (IX. táblázat).

A fertőző dózisonak az EPEC baktériumok csípőbélbeni megtapadására gyakorolt hatását 1 és 2 hetes malacokban külön is vizsgáltuk, mivel a humán analógia alapján ezt a

korosztályt az EPEC baktériumok megtapadása valamint AE léziók kialakulására (ún. „dose/response” vizsgálatra) a leginkább alkalmas (fogékony) csoportnak véltük. A X. táblázatban, az ún. emelt (általában négyszeres) dózisu fertőzésre vonatkozóan, összefoglalt eredményeink az IX. táblázat megfelelő eredményeivel összehasonlítva, ilyen egyirányú (az emelt dózissal minden esetben együtt járó, növekvő arányú és intenzitású AE léziót és tapadást mutató) hatást nem lehetett kimutatni. Ezt az eredményt az is alátámasztja, ami egyébként az adatokból is kiolvasható, hogy az 1 és 2 hetes szopós malacok a négy hetes választott malacokhoz képest, a sertés eredetű EPEC törzsek megtelepedésére és általuk előidézett AE lézió kifejlődésére alapvetően nem hajlamosabbak.

X. táblázat Egy illetve két hetes malacokban kialakított csípőbélkacsokba **emelt dózisban**[‡] beoltott EPEC törzsek immunfluoreszcenciával és hematoxilin-eozinos szövettani vizsgálattal kimutatott tapadása illetve a tapadás intenzitása

Törzs/ szerocsoport, intimintípus	IF tapadás (+/össz. loop)		IF tapadás intenzitása * átlag		HE tapadás (+/össz. loop)		HE tapadás intenzitása ** %	
	1 hetes	2 hetes	1 hetes	2 hetes	1 hetes	2 hetes	1 hetes	2 hetes
#10/ O84, <i>eae-γ</i>	4/4	4/5	1,75	2,0	2/4	2/4	11,0%	15,5%
#17/ O123, <i>eae-β</i>	4/4	5/6	2,25	1,83	4/4	4/5	57,5%	46,4%
#42/ O145, <i>eae-γ</i>	4/4	6/6	1,5	2,5	4/4	2/5	21,5%	5,2%
86-1390/ O45, <i>eae-β</i>	4/4	6/6	3,0	2,3	4/4	4/5	39,0%	33,2%
123/ O43, <i>eae</i> ⁻	0/4	3/6	–	0,6	0/4	0/4	–	–

[‡]Emelt dózis: 1 hetes malacoknál 0,8 ml TSB tenyészet/10 cm bélkacs

2 hetes malacoknál 1,3 ml TSB tenyészet/10 cm bélkacs

* A baktériumok tapadásának mértéke (hámsejtek fedése) és folyamatos rétege alapján (metszetenként 0,5-től 4-ig terjedő számok átlaga)

** Tipikus AE léziót mutató bélbolyhok átlagos %-os gyakorisága (metszetenként 50 bélbolyh vizsgálat alapján)

Ezt követően az alap és emelt EPEC dózissal végzett kísérletet elvégeztük 8 hetes választott malacokban is a kanadai 86-1390 (O45, *eae-β*) pozitív kontroll és az *E. coli* 123-as negatív kontroll törzsek alkalmazásával. Eredményeinket a XI. táblázatban foglaltuk össze, s ezeket az 1-, 2- és 4 hetes malacokban ugyanezen törzsek alap dóziséra viszonyítva

megállapíthatjuk, hogy a sertés eredetű EPEC (O45, *eae-β*) törzs szignifikánsan intenzívebben (65,5% és 71,1%) tapadt az 1 hetes és 4 hetes malacok csípőbél-nyálkahártyához mint a 8 hetes malacokéhoz (46%). Az emelt dózis alkalmazása esetén a vizsgált korcsoportok (1, 2 és 8 hetes) között szignifikáns különbséget nem találtunk (39,0%, 33,2% és 31,7%).

XI. táblázat Nyolchetes malacokban kialakított csípőbélkacsokba **alap és emelt dózisban**[‡] beoltott *Escherichia coli* törzsek immunfluoreszcenciával és hematoxin-eozin szövetteni vizsgálattal kimutatott tapadása illetve a tapadás intenzitása

Törzs/ szerocsoport, intimintípus	IF tapadás (+/össz. loop)		HE tapadás (+/össz. loop)		HE tapadás intenzitása** %	
	alap dózis	emelt dózis	alap dózis	emelt dózis	alap dózis	emelt dózis
86-1390/ O45, <i>eae-β</i>	3/3	3/3	3/3	3/3	46%	30,6%
123/ O43, <i>eae</i> ⁻	3/3	2/3	0/3	0/3	–	–

[‡]Alap dózis: 1 ml TSB tenyészet/10 cm bélkacs

Emelt dózis: 5 ml TSB tenyészet/10 cm bélkacs

3.3.4. A vékony- illetve a vastagbél-nyálkahártyán előidézhető AE lézió *eae-β* és *eae-γ* típusú sertés EPEC törzs esetében

Tekintettel az előző fejezetben közölt adatainkra (miszerint *eae*⁺ *E. coli* baktériumokat a remesebélből is lehetett izolálni) továbbá a 2. fejezetben észlelt tendenciára (miszerint az *eae-γ* típusú törzsek gyakorisága a bélsárban szignifikánsan magasabb volt mint a bélben, 2. fejezet III. táblázat), fölmerült a kérdés, hogy vajon a csípőbélben nem telepednek-e meg jobban az *eae*⁺ *E. coli* baktériumok, illetve, hogy az *eae-β* és az *eae-γ* elkülönítési tendencia a csípőbél és a remesebél vonatkozásában bizonyítható-e. A kérdés vizsgálatára egy 4 hetes malacot áldoztunk, melynek csípő- és remesebélében egy-egy *eae-β* és *eae-γ* törzs számára törzsenként 3-3 lekötött bélkacsot készítettünk. A bélkacsokat azonos dózissal fertőzve (2-2 ml/bélkacs) azt tapasztaltuk, hogy a remesében szinte egyáltalán nem tudtak a baktériumok

AE léziót és tapadást mutatni (XII. táblázat). A csípőbélben – a korábbi eredményekhez hasonlóan – az *eae-β* típusú törzs az *eae-γ*hoz képest jobb tapadási értékeket mutatott.

XII. táblázat 4 hetes malacok csípő- illetve remesebelében kialakított bélkacsokba beoltott EPEC törzsek immunfluoreszcenciával és hematoxinin-eozinos szövettani vizsgálattal kimutatott tapadása, illetve a tapadás intenzitása

Törzs/ szerocsoport, intimintípus	IF tapadás (+/össz. loop)		IF tapadás intenzitása*		HE tapadás (+/össz. loop)		HE tapadás intenzitása**	
	ileum	colon	ileum	colon	ileum	colon	ileum	colon
86-1390/ O45, <i>eae-β</i>	2/3	0/3	1,67	–	3/3	0/3	6,7%	–
#10/ O84, <i>eae-γ</i>	2/3	0/3	0,7	–	1/3	0/3	4,0%	–

* A baktériumok tapadásának mértéke (hámsejtek fedése) és folyamatos rétege alapján (metszetenként 0,5-től 4-ig terjedő számok átlaga).

** Tipikus AE léziót mutató bélbolyhok átlagos %-os gyakorisága (metszetenként 50 bélbolyh vizsgálat alapján).

3.3.5. Kefeszegélyhez történő tapadás eredményei

A vékonybélhámsejt mikrobolyhaihoz való tapadási vizsgálatokkal az EPEC baktériumok kezdeti tapadásban részt vevő adhezinek jelenlétére vonatkozóan szeretnénk volna adatokat nyerni. Ezekhez a vizsgálatokhoz pozitív kontrollként a 2134, 2173, 263 és a 2150 ETEC törzseket alkalmaztuk. Az első két törzs F18 fimbriával, míg a 263-as K88ab (F4ab), a 2150-es pedig K88ac (F4ac) fimbriával rendelkezik. Bizonyos sertés genetikai vonalak bélhámsejtjeiben egyik vagy másik ETEC-fimbria receptorok (esetleg együttesen) fordulnak elő. Így az egyes állatokból készített kefeszegély szuszpenzióhoz (külön-külön vizsgálva) mind a négy ETEC baktériumot illetve néhány atipikus EPEC baktériumot (86-1390, #10, #42, #72, #75) adtunk (XIII. táblázat). Negatív kontroll a 123-as nem patogén *E. coli* volt. A vizsgált atipikus EPEC baktériumok a bélkacs-próbában megfelelő adhéziót mutató 4 hetes malacok felsőbb bélszakaszából készített bélmikrobolyh készítményekhez egyetlen esetben sem tapadtak. Ugyanakkor az F18⁺ és a K88⁺ ETEC törzsek tapadása azt jelezte, hogy az *in vitro* adhéziós rendszer működik. Az ETEC törzs tapadását a 11a. kép mutatja, míg a

szabadon úszkáló kefeszegélyek, amelyekhez az EPEC baktériumok nem tapadtak, a 11b. képen látható. A biztonság kedvéért a vizsgálatokat elvégeztük egyhetes malacok vékonybéli kefeszegély készítményeinél is, mely malacok vékonybelében – a bélkacs-próbák tanúsága szerint – egyidejűleg igen nagy intenzitással tapadtak meg az EPEC baktériumok. Az EPEC baktériumok tapadását ez esetben sem észleltük (XIII. táblázat).

XIII. táblázat A sertés EPEC törzsek *in vitro* adhéziójának hiánya 4 hetes és 1 hetes malacok vékonybél-mikroboholy készítményeiben

Vizsgált baktérium	Kefeszegélyhez való tapadás (+/összes) (4 hetes malacok)	Kefeszegélyhez való tapadás (+/összes) (1 hetes malacok)
#10 (EPEC)	0/4	0/4
#42 (EPEC)	0/6	0/4
#72 (EPEC)	0/4	NV
#75 (EPEC)	0/10	NV
86-1390 (EPEC)	0/22	0/4
123 (negatív kontroll)	0/16	0/4
263 (ETEC, K88ab)	18/22	0/4
2150 (ETEC, K88ac)	16/22	NV
2134 (ETEC, F18)	20/22	3/4
2173 (ETEC, F18)	15/22	NV

NV: nem vizsgált

3.4. Megbeszélés

Eredményeink arra utalnak, hogy 4 hetes választási malacokban alkalmazott csípőbélkacs-modell a bélmikroboholy károsodást előidéző AE fenotípus tanulmányozására megfelelő *in vivo* rendszerként alkalmazható. Ezáltal összehasonlíthatjuk a különböző pathotípusú (pl. ETEC és EPEC), valamint az EPEC csoporton belül, különböző intimintípusú *E. coli* törzsek adott korú sertésekre vonatkozó tapadási jellegzetességeit. Az általunk vizsgált atipikus EPEC baktériumok esetében a β típusú intiminnel illetve az O45 szerocsoporttal rendelkező törzsek *in vivo* tapadási készsége az immunfluoreszcenciás,

szöveti és az elektronmikroszkópos vizsgálatokkal egyértelműen bizonyítható volt, annak ellenére, hogy *in vitro* a kefeszegélyhez nem tapadtak. Azt, hogy az adhézióban a *paa* és az *espD* gének jelenléte esszenciális lenne, vizsgálatainkkal nem tudtuk bizonyítani. Az viszont kiderült, – amit az epidemiológiai vizsgálatok eredményei is jeleztek – hogy az *eae-γ* típusú sertés EPEC törzsek az *eae-β* törzsekhez képest, a malacok csípőbél-nyálkahártyájához jóval kevesebb affinitást mutatnak. A remese-bélkacsok nyálkahártyához való tapadási készsége – legalábbis a lekötött bélszegmentekben – mindkét intimin típusú törzsre nézve alacsonyabb volt annál, hogy az adott rendszerben mérni tudjuk. Vizsgálataink ezen tanulságát a következő fejezetben tárgyalt orális fertőzési kísérletekben igyekeztük ellenőrizni (s mint később látni fogjuk a vakbélben való adhéziós és AE léziót előidéző készség ott ugyan igazolható volt, de a csípőbélhez képest általában csökkent mértékben).

Az AE fenotípus tanulmányozására eddig csak az irodalomban jól jellemzett – és főleg humán eredetű – *E. coli* baktériumtörzseket használták. Mindenképpen új eredményekről számolunk be, amikor a választott sertésekből izolált atipikus EPEC baktériumok *in vivo* tapadási képességét választott sertések lekötött csípőbél-szegmentjein vizsgáljuk. Különösen az ultrastrukturális vizsgálatok mutattak rá, hogy a mikrobolyhok elhajlása, lesöprése majd az emelvény- (pedestal) képződés ezen EPEC törzsekkel végzett fertőzés eredményeként ugyanúgy kimutatható, mint ahogyan azt a tipikus humán EPEC és az EHEC törzsek vonatkozásában, egyéb *in vivo* modellekben leírták (Staley és mtsai., 1969; Knutton és mtsai., 1989; Helie és mtsai., 1991; Dean-Nystrom és mtsai., 2003; Booher és mtsai., 2002).

A bélkacs modellben végzett vizsgálataink szerint az O157:H7 szerotípussal rendelkező emberből izolált EHEC törzsek tapadása a csípőbélben részleges volt. A vizsgált három törzs közül kettő mutatott esetenkénti tapadást és mikrobolyh károsítást. Igaz, ezekben az esetekben a tapadás specifikus volt, és a jellegzetes AE fenotípust is megfigyeltük. Az O157:H7 szerotípusú EHEC törzsek által okozott megbetegedések az egyik legismertebb zoonózis csoportba tartoznak, mely fertőzések szarvasmarháról emberre történő terjedése jól ismert (Riley és mtsai., 1983). Arra vonatkozó adataink viszont nincsenek, hogy sertésről emberre terjedhet-e a kórokozó. Mivel ezek a törzsek képesek megtapadni a sertés (legalábbis az újszülött malac illetve 3 hónapos malacok száján át való fertőzése kapcsán) vékonybél hámsejtjein, ezért a sertésnek, mint potenciális vektornak a szerepe felmerült. Ilyen irányú adatokat és konklúziókat Dean-Nystrom és munkatársai (2003), valamint Booher és

munkatársai (2002) közöltek. Adataink minden esetre azt jelzik, hogy a humán EHEC törzsek a sertés EPEC törzsekhez képest, a sertés csípőbelében jóval kevésbé tudnak megtelepedni, s ezzel összhangban van az, hogy természetes körülmények között a sertések O157 EHEC hordozása is jóval ritkább (Booher és mtsai., 2002).

A fent észlelték is arra indítottak bennünket, hogy a választott malacokból izolált, és a 4 hetes malacok csípőbelében viszonylag jól vizsgálható EPEC törzseket fiatalabb (1 és 2 hetes, szopós) malacok lekötött csípőbél-szegmentjeiben is megvizsgáljuk. Mint kiderült, a fiatalabb kor, az itt vizsgált EPEC baktériumok megtelepedése iránt, nem jelentett egy lineárisan érvényesülő és következetesen kimutatható nagyobb hajlamosságot, de a fiatalabb korról összefüggő, esetlegesen nagyobb hajlamosság meglétét alátámasztották (legalábbis az 1-2 hetes és a 8 hetes malacok vonatkozásában) az ún. alap dózissal végzett vizsgálatok. A szopós és a 4 hetes választott malacokban észlelt – lényegében egyező intenzitású – *in vivo* eredmények arra is rámutattak, hogy az itt vizsgált, választott malacokból származó EPEC törzseink csípőbéli tapadását (1-4 hetes kor között), a receptorok hiánya nem befolyásolja. Ilyen receptorokra utaló adhézióbeli különbséget ugyanis *in vivo* nem tudtunk kimutatni az 1-4 hetes kor között. Ebből eredően feltételezhetjük, hogy a vizsgált törzsek humán- vagy nyúl EPEC törzsekhez hasonló ún. iniciális adhezinekkel vagy nem rendelkeznek, vagy csak az 1-4 hetes kor között a csípőbéli szakaszokon nagyjából egyformán találhatóak. A 8 hetes malacok csípőbelében észlelt csökkent intenzitású tapadás esetleg jelezheti a kezdeti (vagy egyéb) adhéziós receptorok csökkenő termelődését is.

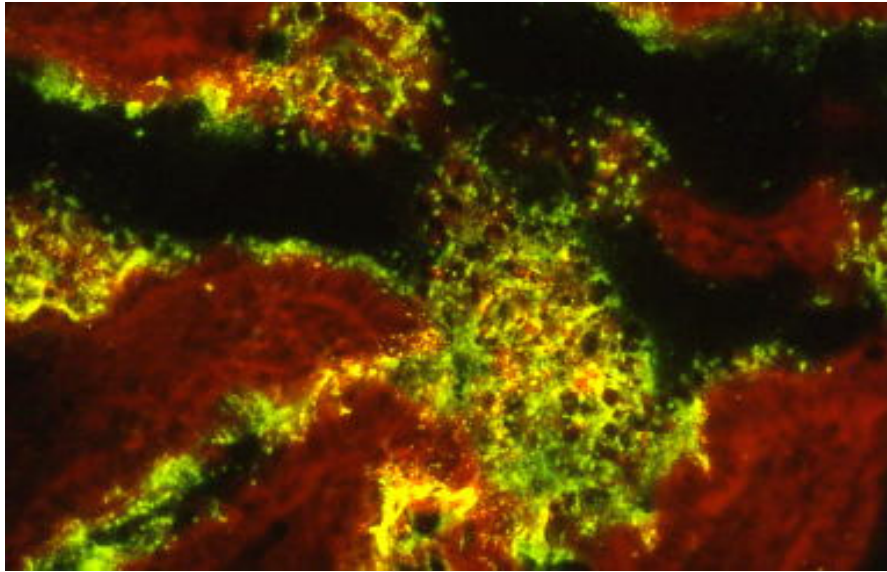
A vékonybél kefeszegélyeken, az *in vivo* kísérletekkel párhuzamosan elvégzett, *in vitro* adhéziós vizsgálatok lényegében a fentieket erősítették meg. A kefeszegélyhez való tapadási eredményeink minden esetben (kontrollok jelenlétében) negatívak lettek, annak ellenére, hogy az EPEC törzsekkel szembeni legérzékenyebbnek vélt (egy hetes korú) malacok kefeszegélyét is vizsgáltuk, melyek lekötött bélszegmentjeiben (*in vivo*) az itt vizsgált törzsek jól tapadtak. Az itt vizsgált sertés eredetű atipikus EPEC baktériumok esetében a negatív eredmény arra utal, hogy e baktériumok kezdeti adhezinjai az *in vitro* rendszerben nem fejeződtek ki, vagy esetleg ilyenekkel a vizsgált törzseink nem is rendelkeznek.

Az *in vitro* és az *in vivo* rendszerek eltérő eredményeivel kapcsolatban, itt jegyezzük meg, hogy az általunk alkalmazott választott malac csípőbélkacs modell nemcsak az *in vivo*

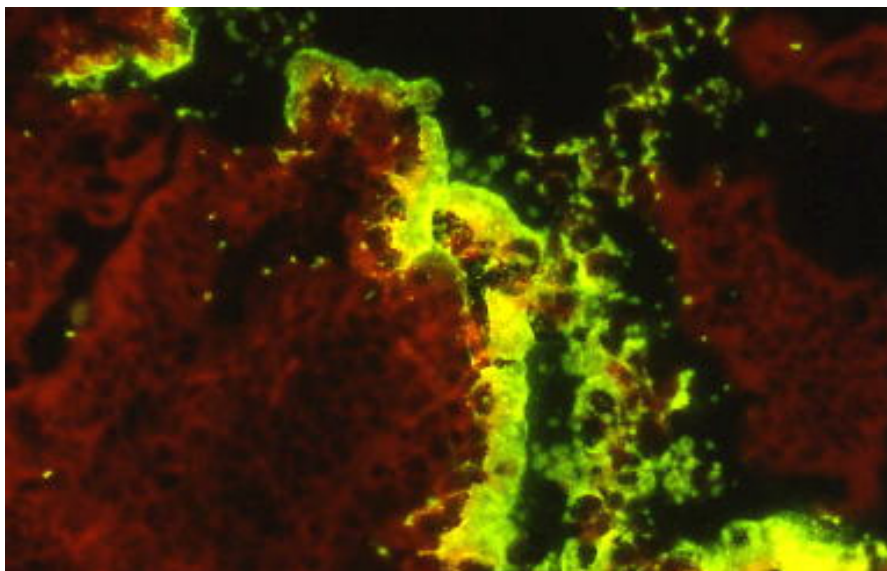
adhéziós tulajdonságok tanulmányozására alkalmas, hanem azt az *in vivo* génátvitel (fág transzdukció) hatékonyabb voltának bizonyítására is sikeresen használtuk olyan esetekben, amikor az *in vitro* génátvitel sorozatosan negatív eredményekre vezetett (Tóth és mtsai., 2003b).

Az itt tárgyalt bélkacs kísérletek minden esetre rámutattak arra, hogy az általunk izolált, választott malacokból származó, *eae-β* típusú EPEC törzsek némelyike a kanadai sertés EPEC törzshöz hasonló intenzitással képes a választott malac csípőbelében megtapadni és ott jellegzetes AE léziót előidézni. Ennek alapján fölmerült a kérdés, hogy az itt vizsgált sertés EPEC törzsek (vagy azok referencia törzsének elfogadott 86-1390-es törzs) képes-e és milyen feltételek mellett választott sertések orális fertőzése révén hasonló bél-elváltozásokat és esetleges megbetegedéseket okozni.

3.5. Képek



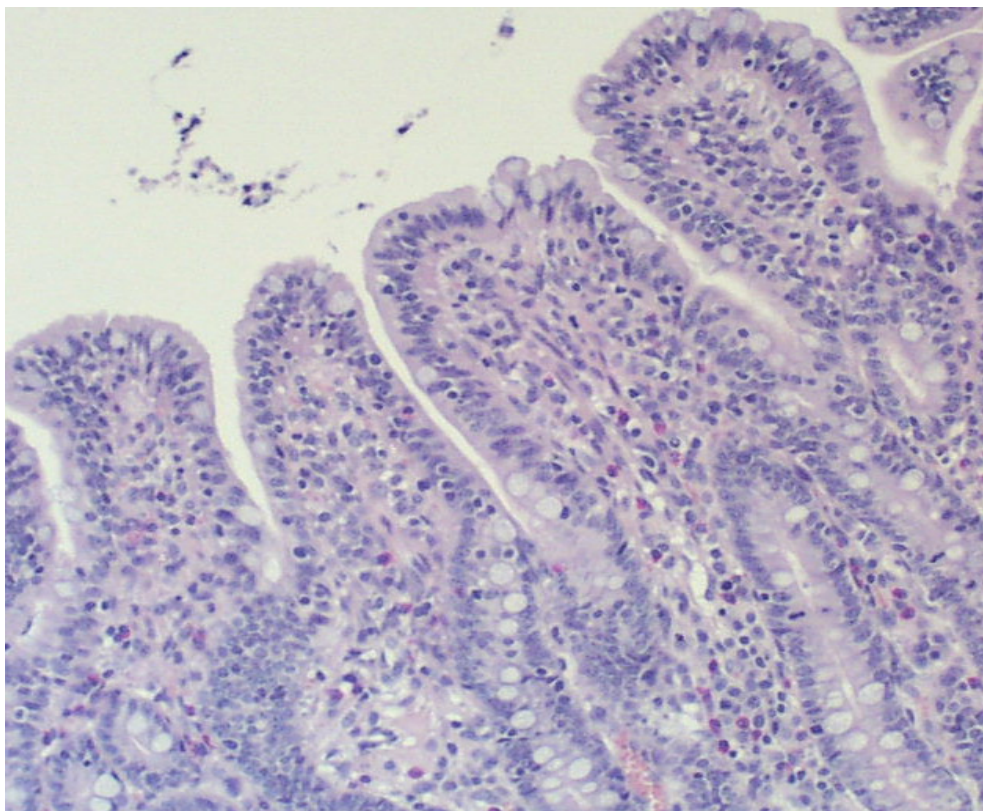
6. kép 1390 EPEC törzssel (O45, *eae-β*) fertőzött bélkacs. Fluoreszkáló baktériumok tapadása a csípőbélben. (Immunfluoreszcenciás mikroszkóp, 40x)



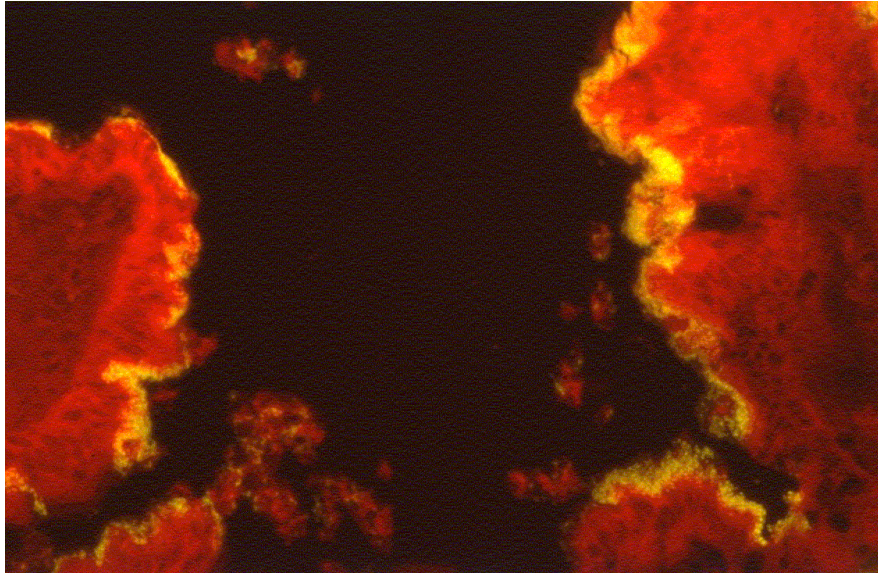
7. kép #17. sz. törzssel (O123, *eae-β*) fertőzött bélkacs. Fluoreszkáló baktériumok tapadása a csípőbélben. (Immunfluoreszcenciás mikroszkóp, 40x)



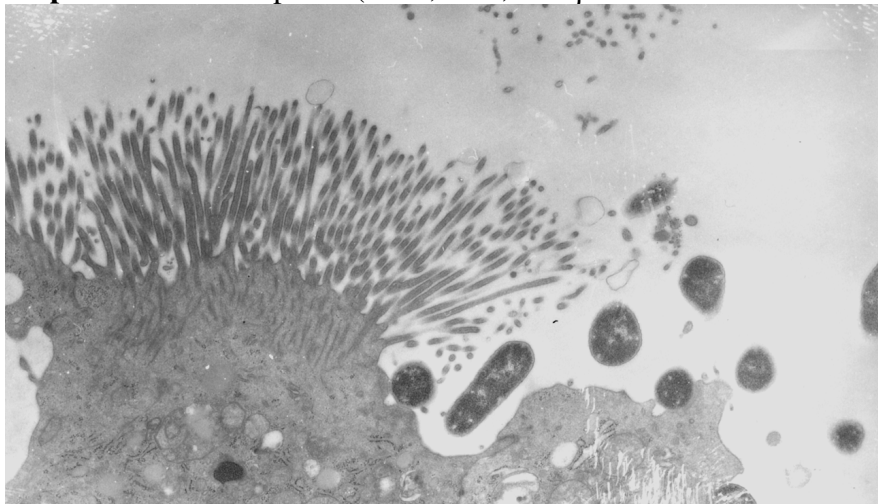
8a. kép Szövetteni készítmény a 1390-es (O45, *eae-β*) baktériummal fertőzött bélkacsból (HE, 100x) A mikrobolyhok rétegére erősen tapadó, a mikrobolyhok közé is beékelődő mikrokolóniák (nyilak) valamint esetenként kialakuló kagylószerű behúzódsok a vékonybél hámsejtek apikális felületén (szaggatott nyíl).



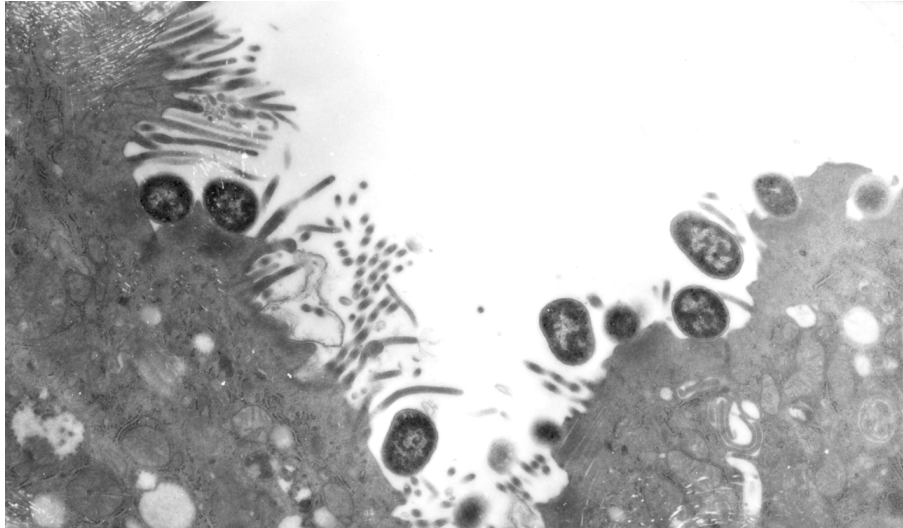
8b. kép Szövetteni készítmény a 123-as *E. coli* (negatív kontroll) baktériummal fertőzött bélkacsból. Baktériumtapadás nincs (HE, 100x).



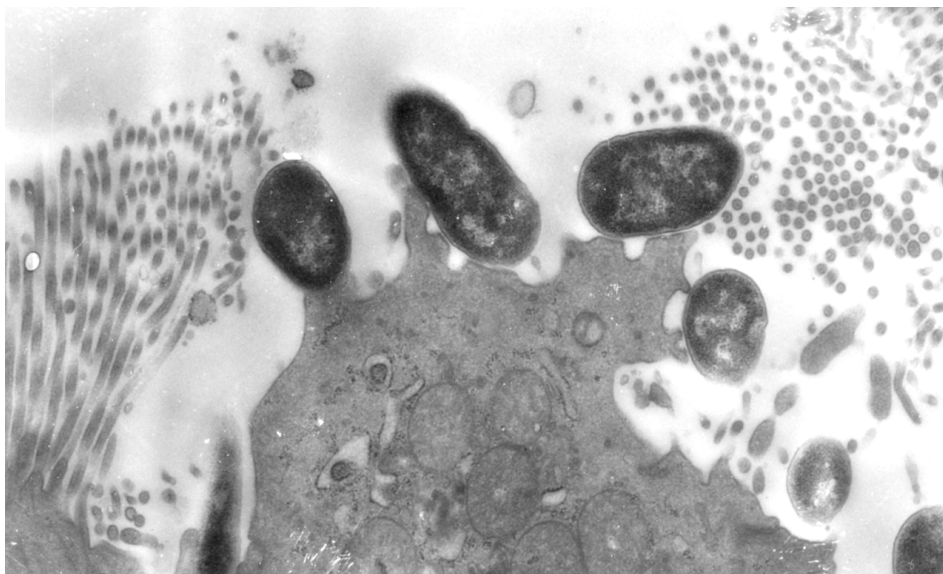
9. kép Fluoreszcens tapadás (1390, O45; anti- β -*eae* immunszérummal)



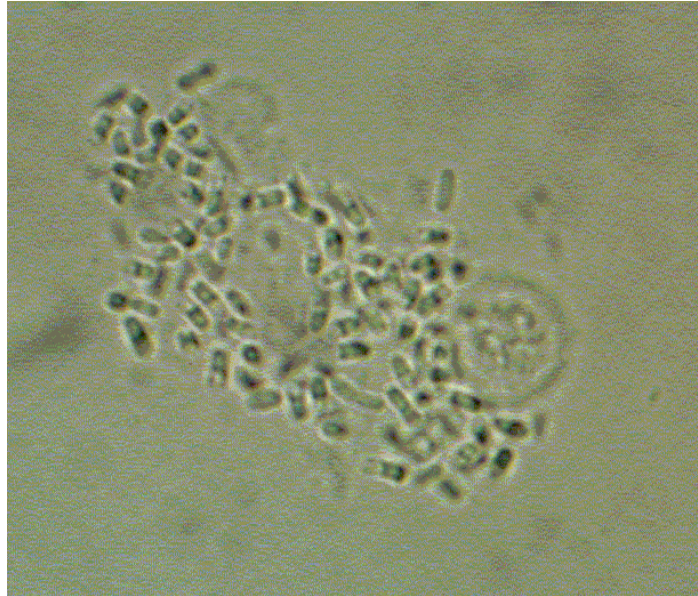
10a. kép A választott malac (4 hetes) lekötött csípőbelében a bélhámsejt mikromembránjához tapadó és ahhoz közelítő sertés EPEC (O45, *eae- β*) baktériumok a bél mikrobolyhokat a tapadás helyén lepusztították, annak közelében pedig eltorzították (attaching effacing lézió = AE). Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel (10000x)



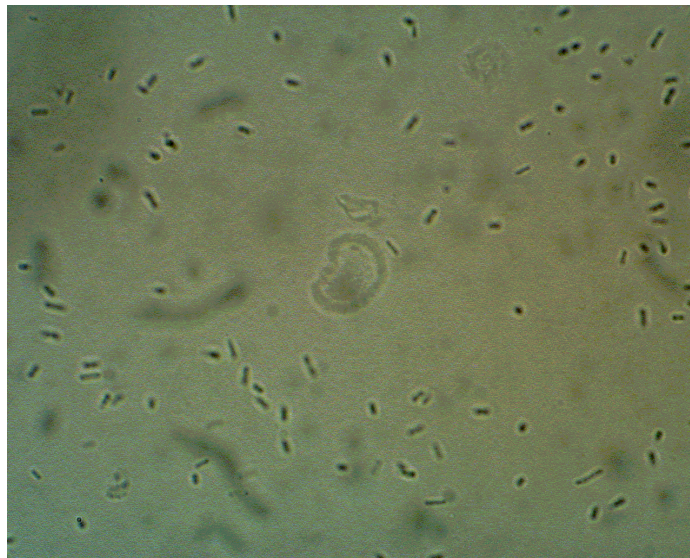
10b. kép Képmagyarázat mint a 10a. képnél. Az EPEC baktériumok többsége már a bélhámsejt mikromembránhoz szorosan tapad. Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel (12000x)



10c. kép Képmagyarázat mint a 10a. képnél. Az EPEC baktériumok szoros tapadásának hatására a bélhámsejt magas emelvények (pedestal) képzéssel válaszol (20000x)



11a. kép. ETEC törzs (2041) tapadása a vékonybél kefeszegélyhez (fáziskontraszt technika, 40x).



11b. kép. Sertés eredetű EPEC törzs (1390), amely a vékonybél kefeszegélyhez nem tapadt (fáziskontraszt technika, 20x).

4. Atipikus EPEC fertőzések által okozott bélboholy-károsító hatások (AE léziók) választott malacokban

4.1. Bevezető

A nemzetközi és a közelmúltban megjelent illetve megjelenés alatt álló hazai tanulmányok azt mutatták, hogy a választott malacokból izolált *eae*⁺ *E. coli* törzsek, EAF plazmival nem rendelkező, atipikus EPEC-nek tekinthetők (Malik és mtsai., 2004, 2005; Krause és mtsai., 2005), melyek választási hasmenésben játszott szerepe ez idáig tisztázatlannak látszik. Bár egyértelmű és mindent kizáró bizonyíték erre nem áll rendelkezésünkre, munkahipotézisként feltételeztük, hogy olyan hajlamosító tényezők segítségével, amelyek a választáskor lépnek fel, potenciális kórokozó képességüket kifejthetik. Ezt látszanak alátámasztani azon eredményeink is, miszerint választott (4 hetes) sertések lekötött csípőbél szegmentjeiben a vizsgált atipikus EPEC baktériumok többsége igen gyakran és megfelelő intenzitással tapad és okoz tipikus AE léziókat (ld. előző fejezet). Feltételezésünk igazolására szájon át történő fertőzéseket végeztünk 4-6 hetes korú sertéseken (összesen 96 kísérleti és 36 kontroll állatot használva).

A fertőzési kísérleteket különféle hajlamosító tényezőkkel illetve azok nélkül végeztük el, azon kérdés megválaszolása céljából, hogy az atipikus sertés EPEC törzsek önmagukban vagy társfertőzésekkel, illetve egyéb hajlamosító tényezők segítségével okoznak-e megbetegedést és/vagy AE léziót. E célból igyekeztünk a legmegfelelőbb – és lehetőség szerint nemzetközileg is ismert – sertés EPEC törzset kiválasztani, majd ezzel különböző körülmények között fertőzési kísérleteket végezni.

4.2. Anyagok és módszerek

4.2.1. A baktériumtörzsek és a hajlamosító tényezők

Az „A” – „G” betűkkel jelzett kísérletekhez használt, sertésből izolált atipikus EPEC illetve a kontroll törzseket a XIV. táblázatban tüntettük fel. A Kanadában izolált, vad típusú,

pathogén 86-1390 *E. coli* (O45, *eae-β*) választási hasmenéses esetből származik, és tipikus AE léziót okozott mind *in vitro* mind *in vivo*. Ezen kívül a humán EPEC törzseknek megfelelő – azok LEE régióival azonos – LEE szekvenciát hordoz (Batisson és mtsai., 2003). Kísérleteinkben ezt a törzset, mint referens sertés EPEC törzset használtuk, míg a nem pathogén, sertés béleredetű 123 jelű *E. coli* törzs (O43:H28) negatív kontrollként szerepelt (Moon és mtsai., 1968). Néhány kísérletben ezen törzsek spontán nalidixsav-rezisztens mutánsait használtuk („A”, „B1”, „B2” kísérletek). A tanulmányozni kívánt törzsek (P91-19-172, 86-1390, P87-4725, P01-F103; Helie és mtsai., 1991) Kanadából (John Fairbrother-nek köszönhetően), illetve Magyarországról származtak (#5, #10, #27, #31, #42, #60, #72, #75, #22; Malik és mtsai., 2005) (XIV. táblázat).

A 2134 jelzésű ETEC törzs (O157:H8, F18ac, STa, STb), amelyet az „E1” kísérletben használtunk, egy magyarországi választási hasmenéses esetből származik (Nagy és mtsai., 1990). A baktériumtörzseket -70°C -on 25% glicerolt és 75% tripton-szója (TSB) levest tartalmazó tápoldatban tároltuk és a felhasználáshoz brómtimolkék lemezekon vagy tripton-szója levesten 37 $^{\circ}\text{C}$ -on növesztettük. A fertőző dózis $1-5 \times 10^9$ CFU/ml koncentrációjú levestenyészet volt, amelyből 10 ml-t adtunk egy állatnak. Az „F” és a „G” kísérletekben 800 ml levestenyészetet 4000 rpm-en 30 percig centrifugáltunk, majd a felülúszót elöntve az üledéket 80 ml PBS-be felvettük és szájon át 10 ml-rel fertőztük az egyes állatokat ($1-5 \times 10^{11}$ CFU/állat). A fertőzést gyomorszondán keresztül 2-3 egymást követő napon, ad libitum etetés mellett végeztük (Fővárosi Állategészségügyi és Élelmiszerellenőrző Állomás által kiadott engedély száma: 23/99). A fertőzés utáni 2-5 nap között (az egyes kísérleteknél megadott feldolgozási időpontban) a malacokat Nembutal illetve T61 injekció alkalmazásával (az előző fejezetben leírottak szerint) túlaltattuk, s csípőbelükből (egyres esetekben vakbelükből is) mintát vettünk, melyeket minden esetben immunfluoreszcenciás és HE festéses szövettani vizsgálatnak, néhány esetben pedig transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatoknak vetettünk alá. A módszerekre vonatkozó egyéb részleteket illetően a 3.2.3. és a 4.2.3. fejezetekre utalunk.

XIV. táblázat Az állatfertőzésekhez használt *Escherichia coli* törzsek

Törzs	Szerotípus	eae gén	Megjegyzés
86-1390	O45:K”E65“	+	EPEC kontroll, Kanadai pool
2134	O157: H19, F18ac	-	ETEC kontroll
123	O43:H28	-	Nem patogén kontroll
P91-19-172	O45:K”E65“	+	Kanadai pool
P87-4725	O45:K”E65“	+	Kanadai pool
P01-F103	O123:H11	+	Kanadai pool
#5	O45:H11	+	Magyar-1 pool
#10	O84:H7	+	Magyar-1 pool
#27	O45:H11	+	Magyar-1 pool
#31	O49:NM	+	Magyar-1 pool
#42*	O145:H28	+	Magyar-2 pool
#60	O108:H9	+	Magyar-2 pool
#72	O157:H2	+	Magyar-2 pool
#75	O28:H28	+	Magyar-2 pool
#22	O123	+	Önálló fertőzés (G kísérlet)

* „G” kísérletben önálló fertőzésre is felhasznált törzs

A „D” kísérletben a fumonizin B₁ mikotoxint hajlamosító tényezőként alkalmaztuk. Ezt a mikotoxint Isabelle Oswald laboratóriumában állították elő (Toulouse) (Fournout és mtsai., 2000). A nyers kivonat egy *in vitro* kultúrából származik, mely 50% vizet tartalmaz. A sterilizált, kipréselt kukoricát, befertőzték *Fusarium verticillioides* törzsszel (NRRL 34281) és négy hétig 25°C-on inkubálták. Ezt a gombatörzset magas FB₁ termelés jellemzi. Acetonitril és víz 1:1 arányú keverékével a nyers toxint kivonták, leszűrték majd egy rotációs bepárlóval (evaporátorral) bekonzentrálták. Az így kapott kivonat 1,4 g FB₁ mikotoxint tartalmazott literenként. Az FB₁ koncentrációt fél-kvantitatív horizontális kromatográfiával mérték (Oswald és mtsai., 2003). A nyers kivonatot higítatlanul (0,5 mg fumonizin B₁/ttkg/nap) adtuk az állatoknak, amely megfelel 5-8 ppm mennyiségű FB₁ toxint tartalmazó takarmány fogyasztásának. Ezt a mennyiséget 12 napon át kapták az állatok, melyből 3 nap a fertőzés előtti, a többi pedig a fertőzés alatti 3 napra és az azt követő 6 napra esett.

A fumonizin B₁ mellett, a fertőzés napjaiban, a „D” kísérletben dexametazon tartalmú injekciót is adtunk (Dexadreson inj., 2 mg/ml; Intervet International B. V.) 2,5 ml/állat koncentrációban. Az immunszuppresszív hatású gyógyszerrel a csoportok egyik felét kezeltük, a másik felét kezeletlenül hagytuk.

Az „E1” kísérletben TGE (transmissibilis gastroenteritis) vírust (Miller No. 6. törzs) alkalmaztunk hajlamosító tényezőként. A sejtenyészetben növesztett vírust Tuboly Tamástól, a SZIE Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékéről kaptuk. Az állatokat, az EPEC fertőzést megelőző napon, egyszer perorálisan fertőztük (5×10^3 PFU/állat).

4.2.2. Kísérleti elrendezés

Összesen kilenc, egymást követő gyomorszondás fertőzési kísérletet végeztünk, mely kísérletek egyenként 2-6 fertőzési csoportot tartalmaztak. Az egyes kísérleteket „A”-tól „G”-ig terjedő betűkkel jelöltük (XV. táblázat). A „B1” kísérletben gyomorsav neutralizálása céljából, az állatokat fertőzés előtt 20 ml pufferolt peptonvízzel (1000 ml desztillált H₂O, 20 g pepton és 5 g NaCl, pH: 7,2) itattuk. A többi kísérletben – hatástalanság miatt – ettől eltekintettünk. Az „A” kísérletben a fertőző anyag egyszerre több levestenyészetet (37°C, 16 óra, TSB) tartalmazott, mivel ezek az ún. kevert („poolozott”) törzsek voltak, melynek mindegyikéből 5 ml levestenyészetet adtunk egy állatnak.

Az „A” kísérletben használt EPEC-keverék csoportok („poolok”) a következők voltak: *kanadai* (86-1390, P91-19-172, P87-4725, P01-F103); *magyar-1* (bélizolátumok) (#5, #10, #27, #31) és *magyar-2* (bélisárizolátumok) (#42, #60, #72, #75) (XIV. táblázat).

A kísérletekben összesen 132 állatot használtunk, úgy, hogy egy-egy fertőzési csoport 3-8 malacot tartalmazott. A választás napján az állatokat intézetünk kísérleti állatházába szállítottuk, s ad libitum etettük (kivétel a szállítás napján). A fertőzés előtt pár órával az állatokról, az ivóvízellátás folyamatos fenntartása mellett, a táplálékot megvontuk.

XV. táblázat Kísérleti elrendezések és bélbolygó-károsító hatások (AE léziók) EPEC* baktériumokkal valamint nem pathogén kontroll törzssel fertőzött választott malacokban hajlamosító tényezőkkel és azok nélkül.

Kísérlet/Telep	Kezelési csoportok	Hajlamosító tényezők (HT)	Hasmenés (+/ összes)	AE lézió és tapadás HE metszeteken (i, c)		Tapadás fluoreszcens metszeteken(i)	
„A” / I.	1. kanadai pool		2/4	1/4		1/4	
	2. magyar-1 pool	–	2/4	0/3 (‡)		0/3	
	3. magyar-2 pool	–	2/4	0/3 (‡)		1/3	
	4. C		1/4	0/3 (‡)		0/3	
„B1” / II.	1. (1390)	–	0/6	1/6		0/6	
	2. C		0/4	0/4		0/4	
„B2” / II.	1. (1390)	természetes ETEC fertőzés	6/6	2/5 (‡)		5/5	
	2. C		4/4	0/3 (‡)		0/3	
„D” / III.	1. (1390)		3/6	0/6		0/6	
	2. C	fumonizin B ₁ dexametazon	1/4	0/4		0/4	
	3. (1390 + HT)	(valamennyi csoport felénél)	2/6	0/5 (‡)		0/5	
	4. (C + HT)		2/4	0/4		0/4	
„E1” / IV.	1. (1390)		2/6	0/6		1/6	
	2. (ETEC)		1/6	0/6		0/6	
	3.(1390+ETEC)	TGE vírus	5/6	0/6		0/6	
	4. 1390+TGE	2134(ETEC)	4/6	0/6		0/6	
	5. TGE		2/3	0/3		0/3	
	6. C		2/3	0/3		0/3	
„E2” / IV.	1. (1390+F103)	–	2/6	1/6 i	1/6 col	1/6	
	2. C		1/4	0/4 i	0/4 col	0/4	
„F” / V. **	1. (1390+F103)	szója természetes ETEC fertőzés	5/8	0/8 i	0/8 cae	0/8 i	0/8 cae
	2. C		5/8	0/8 i	1/8 cae	0/8 i	0/8 cae
„G” / VI. **	1. (#22)	szója természetes ETEC fertőzés	0/3	2/3 i	1/3 cae	1/3 i	2/3 cae
	2. (#42)	szója természetes ETEC fertőzés	0/3	0/3 i	2/3 cae	2/3 i	1/3 cae
	3. C	az 1. csoportban	0/2	0/2 i	2/2 cae	0/2 i	0/2 cae

„C” kísérlet: ugyanazon kísérleti elrendezést és malacszámot alkalmaztuk, mint a „B1” és a „B2” kísérleteknél, de sem a fertőző törzs okozta, sem spontán fertőzés nem lépett fel, így az eredményeket külön nem tüntettük fel

Rövidítések:

*Enteropathogen *E. coli* törzsek jelzése: 1390 (kanadai referens O45), #42 (magyar izolátum O14), #22 (magyar izolátum O123), „pool”-ok (ld. XIV. táblázat)

C: negatív kontroll törzs (*E. coli* 123)

i: ileum, cae: caecum, col: colon

HT: hajlamosító tényezők

HE: hematoxilin-eozin *Tapadás nem volt megfigyelhető a colon szövettani HE mintáiban (kivétel „E2” kísérlet)*

‡: 1 állat elhullott

** : emelt szójatartalmú takarmánnyal etettük az állatokat

4.2.3. Klinikai és kórbonctani vizsgálatok

A kísérletek 7-11 napig tartottak. Az állatok 21-28 napos korukban, a választás napján érkeztek az állatházba, s érkezésük utáni 2.-3. napon fertőztük általában három egymást követő napon, kivétel az „F” kísérletben, amikor ez 2 nap volt. Az állatokat naponta klinikailag vizsgáltuk, megmértük a rektális hőmérsékletet és az esetleges hasmenést feljegyeztük. A kísérlet indításakor valamint annak tartama alatt 2-3 naponta bélsármintákat gyűjtöttünk és juh-véres - valamint brómtimolkék-agaron, 37°C-on *E. coli* jelenlétére megvizsgáltuk. Az állatok testtömegét naponta megmértük (kivétel „C”, „E1” és „E2” kísérletek). Az állatokat legkésőbb a kísérlet hatodik-nyolcadik napján pentobarbitállal (Nembutal inj., Ceva-Phylaxia Rt.) túlaltattuk, s a különböző irányú vizsgálatokra mintát vettünk.

Szövetteni vizsgálatokra minden esetben ileum-mintákat (emellett az „F” és a „G” kísérletekben colon és caecum mintákat is) vettünk. Egyes mintákat ultrastruktúráisan is vizsgáltunk. Ezenkívül valamennyi béldarabot metilcellulózból ágyazva fagyasztott metszetek készítéséig -80°C-on tároltuk. A szövetteni metszetek paraffin beágyazással, hematoxilín-eozin festéssel készültek. Csípőbélmintákat bakteriológiai vizsgálatok céljából is gyűjtöttünk. A hemolizáló *E. coli* telepeket, az esetleg előforduló ETEC fertőzés kiderítésére, K88(F4) és F18 savóval tárgylemez-agglutinációval vizsgáltuk. A „B2” kísérletben az így kapott telepeket *f4*, *f18*, *sta*, *stb*, *stbfl* és *lt* gének jelenlétére PCR-rel is megvizsgáltuk. Az „A”, „B1”, „B2”, „E1” és „E2” kísérletekben a csípőbelek egy 10 cm-es szakaszát homogenizáltuk (Heidolph DIAX 900 készülék), majd tízes alapú hígítási sorozatot készítve *E. coli* telepeket számoltunk. Ezen esetekben a fertőzésre használt *E. coli* törzsek nalidixsav rezisztens mutánsaival dolgoztunk, és az egyes hígítási sorozatokból 100 µl-t 10 mg/ml koncentrációjú naladixsavas brómtimolkék táptalajra oltottunk.

4.2.4. Az EPEC baktériumok bélbeni megtelepedésének és az AE léziók kialakulásának vizsgálata

Az alkalmazott módszerek (IF, HE, EM metszetek vizsgálata) megegyeztek a 3.2.3. pontban leírtakkal.

4.2.5. Az állatok származása, tartása és takarmányozása

A választott malacokat 6 sertésenyészetből (Duroc × lapály illetve Hungahyb) az ország különböző telepeiről vásároltuk (XV. táblázat). Az egyes kísérletekhez használt vegyes ivarú malacok 2-5 kocától származtak és a különböző fertőzési csoportokba random módon kerültek. Az eltérő fertőzésnek kitett csoportokat külön szobákban tartottuk (kutricánként 3-5 malac). A kutricákat minden nap a szokásos klinikai vizsgálat után kitakarították. Egy kutricában kb. 0,6-1 m² hely, míg az etetővályúnál kb. 30-40 cm jutott egy malacra. Automata önitató rendszeren keresztül a víz ad libitum állt rendelkezésre. A szobahőmérséklet 22 ± 1 °C, a páratartalom 40-44% volt.

A kísérletek során az állatok antibiotikum mentes prestarter malactápot kaptak. Az „E1”, „F” és a „G” kísérletekben a takarmány nem tartalmazott cink-oxidot sem. Az „F” és a „G” kísérletekben pedig megnöveltük a takarmány szója-koncentrációját (26,27% nyersfehérje tartalom) (XVI. táblázat). A takarmányt pellet vagy granulátum formában ettük, melynek számított átlagos energiatartalma 3630 kcal DE/ttkg volt.

III. táblázat Az „F” és a „G” kísérletekben használt antibiotikum- és cink-kiegészítéstől mentes prestarter takarmány receptúrája (emelt szójatartalommal)

Komponensek	%
Búza	22,3
Rozsliszt	25,0
Szója (46%-os)	18,0
Full-fat szója	10,0
Takarmánymész	3,0
MCP	0,9
NaCl	0,3
Malac I. 0,5% (HPIG 422-505-03)	0,5
Számított beltartalmi paraméterek	%
Szárazanyag	88
Nyersfehérje	26,27
Em. nyfeh. sertés	23,6
Nyers zsír	3,31
Nyers rost	3,96
Nyers hamu	7,84
DE sertés	14,34 MJ/kg
ME sertés	13,5 MJ/kg
Lizin	1,506
Methionin	0,4
Meth + cisztin	0,84
Treonin	1,01
Triptofán	0,33
Ca	1,4
P	0,63
Na	0,116
Fe	236,76 mg/kg
Mn	72,91 mg/kg
Cu	41,5 mg/kg
Zn	177,83 mg/kg
Se	0,29 mg/kg
Co	0,19 mg/kg
I	0,76 mg/kg
A-vitamin	13441,5 NE/kg
D ₃ -vitamin	1000 NE/kg
E-vitamin	42,35 NE/kg
K ₃ -vitamin	2,17 mg/kg
B ₁ -vitamin	1,35 mg/kg
B ₂ -vitamin	4,09 mg/kg
B ₆ -vitamin	3,67 mg/kg
B ₁₂ -vitamin	0,03 mg/kg
Pantoténsav	14,87 mg/kg
Folsav	0,37 mg/kg
Biotin	0,12 mg/kg
Niacin	26,89 mg/kg
Kolinklorid	360,5 mg/kg
C-vitamin	9,14 mg/kg
Linolsav	1,63

4.3. Eredmények

4.3.1. Hasmenés, rektális hőmérséklet, relatív testtömeg-növekedés

A kísérletekben szereplő, összesen 132 állat közül 54-nél fordult elő legalább egyszer hasmenés, ami általában a fertőzést követő egy napon belül jelentkezett. Hasmenés a kontroll csoportokban is előfordult (38,8%-ban), míg az EPEC törzsekkel fertőzött csoportokban összességében a hasmenés gyakorisága 41,6% volt, szignifikáns különbség nélkül.

A „B1”, „C” és a „G” kísérletek során, ahol egyáltalán nem alkalmaztunk hajlamosító tényezőket, hasmenés nem jelentkezett. Ennek ellenére a „B2”, „F” és a „G” kísérletekben, ahol szintén nem szerepelt hajlamosító tényező, a hasmenéses állatok száma magas volt (XV. táblázat). Ezekben a kísérleteken a bélsártamponokból hemolizáló *E. coli* baktériumokat izoláltunk, amelyek F18 ill. K88 (F4) fimbriák ellen termelt savóval pozitív reakciót adtak, jelezvén, hogy egy természetes ETEC fertőzés lépett fel, amelyet – úgy tűnik –, hogy az állatok a gazdaságból hurcoltak magukkal.

Azokban a kísérletekben, amelyekben a csípőbelet vortex-szel homogenizálva feldolgoztuk („A”, „B1”, „B2”, „E1” és „E2” kísérletek), az EPEC és a kontroll baktériumok csíraszámára lényeges különbséget nem mutatott: átlagosan $1-5 \times 10^3$ CFU/g bél volt.

4.3.2. Mortalitás

A „B1”, „C”, „E1”, „E2”, „F” és „G” kísérletekben elhullás nem volt. Az „A” és „B2” kísérletekben a kísérleti és a kontroll csoportokból egy-egy malac hullott el, s a „D” kísérlet 3. csoportjából szintén egy állat. Az elhullások oka (tüdő-, mellhártya-, szívburokgyulladás) az EPEC fertőzéssel nem volt összefüggésbe hozható. A kísérletek alatt elhullott állatokból a fertőzéshez használt egyik *E. coli* törzset sem tudtuk a béltartalomból izolálni (morfológiai bírálatra a hullák nem voltak alkalmasak). A kórbonctani tünetek között szerepelt pneumonia, tüdőoedema, májelfajulás. A vastagbelekből *Pseudomonas* és/vagy *E. coli* nőtt ki. A „B2” kísérletben kettő állat (az egyik a kontroll csoportból) hullott el a fertőzést követő első illetve a második napon. Hemolizáló *E. coli* nőtt ki mind a bélsártamponból mind pedig a csípőbélből, melyek ismert ETEC adhéziós faktort nem hordoztak. A „D” kísérletben egy

állat hullott el, amely boncolásakor heveny bélgyulladás és heveny tüdőgyulladás volt megállapítható (XV. táblázat).

4.3.3. A hajlamosító tényezők szerepe és az AE léziók

Az „A” kísérlet során csupán két pool esetében találtunk (egy-egy állatnál) immunfluoreszcenciás vizsgálattal kimutatható specifikus baktériumtapadást (13., 14., 15. képek). A „B2”, „F” és a „G” kísérletek során természetes ETEC társfertőzés lépett fel. Ennek megfelelően a „B2” kísérletben valamennyi állatnál vízszerű hasmenés jelentkezett, s a bélsártamponokból kitenyésztett hemolizáló *E. coli* baktériumok mindkét esetben F18⁺ ETEC-nek bizonyultak. ETEC-re jellemző virulenciagének jelenlétére PCR-es vizsgálatokat is végeztünk. A törzsek pozitívak voltak *f18*, *sta*, *stb*, *stbfl* génekre, míg *k88* és *lt* génekre negatívnak bizonyultak.

Az „E1” kísérletben a 2134 ETEC törzset illetve a TGE vírust, mint hajlamosító faktort alkalmaztuk az állatok AEEC fertőzésének kialakításához. Ennek ellenére a szövettani metszeteken AE léziót nem tudtunk megállapítani, de ugyancsak elmaradt az ETEC által előidézhető baktérium kolonizáció és hasmenés is. Egyedül egy állat remesebeléből származó metszeten fedeztünk fel ETEC-re jellemző, IF vizsgálattal specifikus fluoreszcenciát mutató sporadikus mikrokolóniákat. Egy állatban az anti-TGE konjugátum segítségével a TGE vírus jelenlétét tudtuk igazolni (12. kép). Az „E2” kísérletben viszont egy sertés csípő- és remesebelében jellegzetes AE léziót és specifikus baktériumtapadást tudtunk kimutatni (16a. és b. képek).

A „D” kísérletben használt fumonizin B₁ és dexametazon esetleges hajlamosító hatásait az EPEC fertőzésre, szövettani és immunfluoreszcenciás módszerekkel nem tudtuk bizonyítani, bár a fertőzést követően minden állatnál hasmenés lépett fel, melynek oktanában az ETEC fertőzést ki tudtuk zárni. Ugyanakkor az egyéb irányú (vér enzim) vizsgálatok (Dr. Sályi Gábor, OÁI) a fumonizin B₁ hatására visszavezethető enyhe változásokat mutattak.

Az „F” kísérletben, ahol a takarmány emelt szójakoncentrációt tartalmazott, 16 állatból 10 állatnál volt hasmenés (5 a kontroll, míg 5 állat a fertőzési csoportokból). Az ileumból és a mesenterialis nyirokcsomókból kinőtt hemolizáló *E. coli* telepek F18 és K88

(F4) ellen termelt szérummal is agglutináltak. Ezen kísérlet során egy állatból származó vakbélben láttunk AE jellegű tapadást, mely állat viszont a kontroll csoportból származott.

A „G” kísérletben, ahol szintén emelt szójatartalmú takarmányt etettünk, hasmenést egyáltalán nem figyeltünk meg. Ennek ellenére az 1-es kezelési csoportban két állat csípőbéléből hemolizáló *E. coli* nőtt ki. Ezek az izolátumok F18⁺ ETEC-nek bizonyultak. A természetes ETEC fertőzést szövettani és ultrastrukturális vizsgálatokkal is megerősítettük. Ezen túl, a csípőbélben és a vakbélben is mind az immunfluoreszcenciás mind a szövettani metszeteken, mind a fertőzött, mind a kontroll csoportban, jellegzetes AE léziót és ezzel járó baktériumtapadást tudtunk megállapítani. Ez utóbbi kontroll csoportbeli AE lézió olyan malacok vakbelében is megjelent, melyek csípőbélében egyidejűleg ETEC fertőzést mutattunk ki (17. és 18. képek).

4.4. Megbeszélés

Az EPEC O45, választott malacokra vonatkozó, feltételezett pathogenitásáról már korábban beszámoltak (Helie és mtsai., 1991; Janke és mtsai., 1989; Zhu és mtsai., 1994) és e szerocsoport kórokozó képességét újszülött malacokban kísérletesen is bizonyították (Helie és mtsai., 1991). Azonban még mindig nyitott maradt a kérdés, hogy a pathogenitás választott malacokban megismételhető-e és kétséget kizáróan bizonyítható-e. Sonnenberg és munkatársainak (1993) EHEC fertőzéssel sikerült ugyancsak újszülött malacokban AE léziót előidézni és megállapították, hogy az *eae* gén feltétlenül szükséges a lézió kialakításában. Ugyanakkor rámutattak arra is, hogy a szövettényezeteken végzett *in vitro* eredmények nem feltétlenül egyeznek az *in vivo* eredményekkel. Ez a megfigyelés a saját, PK15 sejten végzett *in vitro* adhézios kísérleteink eredményeit is figyelembe véve bennünket arra készítetett, hogy a szájon át történő EPEC fertőzési kísérleteket választott malacokban is elvégezzük.

Ez a modell ETEC vonatkozásában már viszonylag jól ismert (Sarmiento és mtsai., 1988). Legutóbb Madec és munkatársai (2000) 25-28 napos SPF (specified pathogen free) állatokat K88 (F4) fimbriával rendelkező *E. coli* törzsekkel fertőztek. Annak ellenére, hogy a sikeres fertőzés érdekében különböző kondíciókat, ún. rásegítő beavatkozásokat alkalmaztak (pl. takarmány- vagy ivóvízelvonás a fertőzés előtti 3-4 órában; NaHCO₃-oldat adása a

fertőzést követően; intragasztrikus fertőzés az orális fertőzés helyett; a fertőző anyaghoz tehetően vagy mucin adása, melyek K88 receptor-specifikus fehérjéket és glikolipideket tartalmaznak), nem volt egyértelmű, hogy a hasmenést csak az ETEC baktériumok okozhatták. Választási hasmenés kialakításában ugyanis több tényező jelenlétére van szükség, hiszen multifaktoriális betegségről van szó, melyben az ETEC baktériumoknak és egyes enterális vírusoknak (TGE, rotavírus) is meghatározó szerep jut (Nagy és mtsai., 1996). Választott malacokban előforduló EPEC és ETEC közös fertőzéséről Wada és munkatársai (1996) adtak hírt először, akik egy gazdaságban elhullott sertések szövettani bélmetszeteiben találtak AE léziókat. Az elhullás előtt az állatok a hasmenés tüneteit mutatták. Kiderült, hogy az AE léziókat O45 szerocsoporttal rendelkező *E. coli* (EPEC) okozta, ugyanakkor O149 szerocsoporttal rendelkező baktérium (ETEC) is kolonizálta a bélnyálkahártya felületét.

A fent említett kísérletek is rámutatnak arra, hogy a malacok ETEC okozta választási hasmenésének hátterében komplex kóroktan áll (Nagy és mtsai., 1996), melyben esetleg az EPEC baktériumok is részt vehetnek. Kísérleteinkben megpróbáltunk fényt deríteni arra, hogy e kórkép kialakításában az atipikus EPEC baktériumoknak lehet-e valóban szerepe. Ennek érdekében egy nemzetközileg ismert, kanadai, O45 típusú EPEC baktériummal (esetenként pedig ennek társizolátumaival, valamint hazai sertések beléből illetve bélsarából izolált EPEC baktériumokból képzett kevert izolátumokkal) fertőztünk különböző gazdaságokból származó választott malacokat, prediszponáló tényezőnek TGE vírus- illetve ETEC fertőzést valamint fumonizin B₁ toxint és magas szójatartalmú takarmány etetését választva.

A fenti kísérleteinkben fontos szempont volt, hogy a választási malacokból izolált *eaec*⁺ *E. coli* törzsek pathogenitását a természetes állapotokhoz közelítő fertőzési modellben tanulmányozzuk. Mint az előzőekben ismertetett kísérleteink során kiderült, hogy a törzseink vélhetően funkcionálisan ép LEE pathogenitási szigettel rendelkeznek, ugyanakkor néhány, a tipikus EPEC-re jellemző egyéb gén (*bfp*, *EAF*) hiányzik belőlük. Szerotípusuk is többnyire „szokatlan” a választási malacokból eddig leggyakrabban leírt EPEC szerotípussal (O45) szemben. A PK15 sejtekkel végzett *in vitro* kísérletek során a vizsgált EPEC baktériumok többsége *in vitro* tapadási készséget mutatott. Ezek közül az egyik legjobban tapadó törzs a nemzetközi referens sertés EPEC törzsnek tekintett 86-1390-es (O45:H⁻) törzs volt. Ugyanezt észleltük a választott malacokon végzett bélkacs próbák eredményeként is. Ezért a 4-6 hetes választott malacok orális fertőzésére elsősorban ezt a törzset használtuk.

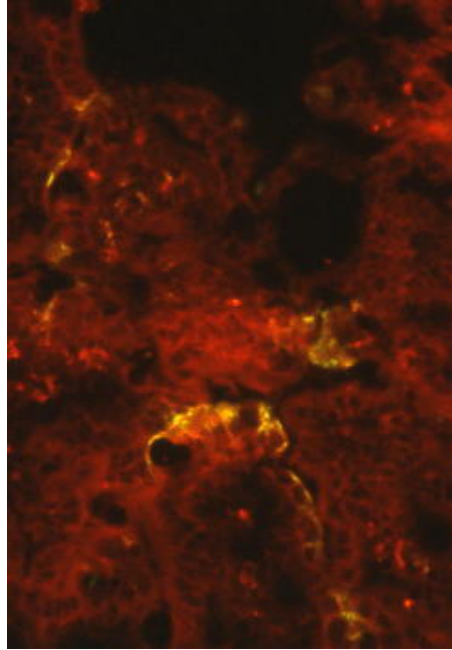
Kísérleteink során először az egyes EPEC baktériumtörzsekből készült levestenyészeteket összevontan („poolozva”) adtuk az állatoknak („A” kísérlet). Az egyes „poolokat” úgy állítottuk össze, hogy azok eredetükre nézve bizonyos geográfiai (kanadai, magyar) valamint anatómiai (bél­sár illetve bélnyálkahártya) különbséget képviseljenek. A klinikai és a szövettani eredmények az egyes „poolok” megbetegítő képességét nem bizonyították. Ezért a további két kísérletben („B1” és „B2”) azonos helyről származó állatokban csak a pozitív kontrollként alkalmazott 86-1390-es törzs hatását figyeltük meg. Míg a „B1” kísérletben sem hasmenés, sem AE lézió nem jelentkezett, addig a „B2” kísérletben majdnem minden állatnál víz­szerű hasmenés lépett fel. Itt a csípőbelek immunfluoreszcenciás metszetein láttunk kolonizációt és AE jellegű adhéziót. Kiderült viszont, hogy a kísérleti és a kontroll állatokban egy ETEC társfertőzés lépett fel, s így nem tudtuk az AE léziók kialakulását egyértelműen az általunk végzett EPEC fertőzésnek tulajdonítani.

A „C” kísérletben a „B” kísérleti fertőzési protokollt újból alkalmazva más helyről rendeltük az állatokat. Választási hasmenés illetve szövettani elváltozás ezúttal egyáltalán nem lépett fel (az eredményeket a táblázatban nem tüntettük fel). Így fordultunk a hajlamosító tényezők alkalmazása felé. A „D” kísérletben fumonizin B₁ valamint a dexametazon immunszuppressziót okozó hatását igyekeztünk kihasználni. Statisztikailag értékelhető, egyértelmű EPEC-hatást azonban semmilyen módszerrel nem tudtunk kimutatni. Az „E” kísérletekben („E1” és „E2”) ismét újabb helyről rendeltük az állatokat. Az „E1” kísérletben az EPEC fertőzés kialakításhoz – hajlamosító tényezőként – TGE vírust illetve ETEC törzset is (O157:H8, Sta⁺, Stb⁺, F18ab) igénybe vettünk. Az „E2” kísérletben a takarmányba nem tettünk cink-oxidot. Ennek ellenére csupán egy esetben tudtunk fluoreszcenciás tapadást kimutatni (18. kép). Az „F” kísérletnél emeltük a takarmány szó­jatar­ta­l­mát és két kanadai törzsszel (1390, P01-F103) fertőztünk. A malacokban itt is egy ETEC társfertőzés lépett fel, AE léziót viszont nem tudtunk kimutatni. A „G” kísérletben az állatok ismét egy újabb telepről származtak. A fertőző baktériumok az általunk izolált #22 és #42 számú törzsek voltak. Bár hasmenés és láz nem jelentkezett, szövettani és ultrastrukturális módszerekkel mind AE léziót mind pedig ETEC-re jellemző elváltozást mutattunk ki. Mint kiderült ez esetben is spontán F18ac ETEC fertőzés által előidézett hajlamosító tényezővel állhattunk szemben.

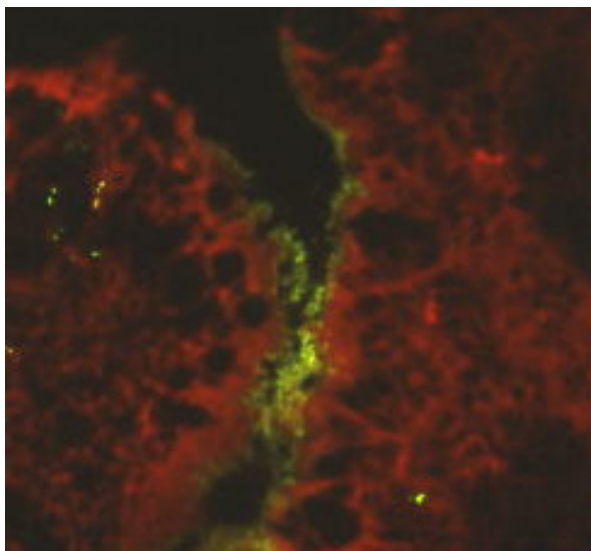
Mint a fentiekből kiderül, kísérleteink során számos variációval próbálkoztunk, s ezek eredménye alapján megállapítható, hogy a hazai sertéstartási gyakorlat szerint választott (4-5 hetes korú) malacokban önállóan atipikus EPEC baktériumok a választási hasmenés kóroktanában nem játszanak szerepet. Az mindenképpen figyelemre méltó, hogy ha ETEC társfertőzés lépett fel, akkor amellet, hogy természetesen megnőtt a hasmenéses esetek száma, megjelent a szövettanilag kimutatható AE lézió is. Ez arra enged következtetni, hogy az *eae*⁺ *E. coli* baktériumoknak a választási hasmenésben esetenként társult szerepe lehet, de ilyen esetekben is szükséges az etetett takarmányok hajlamosító szerepét (pl. emelt szójatartalom) figyelembe venni. Eredményeink látszólag ellentmondásban vannak Girard és mtsai. (2005) közelmúltban megjelent közlésével, mely szerint 19% szójafehérjét tartalmazó táppal etetett 3 hetes malacokat sikeresen fertőztek az általunk is alkalmazott 86-1390-es (O45, *eae*- β , kanadai) törzssel. Az általuk sikeresnek vélt fenti választási malac modell azonban – szerintünk – túlzottan mesterséges és a mindennapi gyakorlattól nemcsak a malacok lényegesen fiatalabb kora tekintetében tér el, hanem abban is, hogy a malacoknak 3 mg/ttkg dexametazont is adtak (p.o.), mely a mi „D” kísérletünkben alkalmazott dózissal kb. tízszerese.

Ezzel szemben úgy véljük, hogy az általunk elvégzett kísérletek eredményei a sertés EPEC törzseknek a választási hasmenésben vélt esetleges szerepét jobban és életszerűbben világítják meg. Ezek szerint az EPEC baktériumok (mint társ kórokozók) esetleg akkor juthatnak szerephez, ha egyidejűleg ETEC fertőzés is fellép az állományban, s mindezt egyes dietetikus hajlamosító tényezőkkel (pl. magas szójatartalmú takarmány) is elősegítjük. Ezt támasztja alá azon megfigyelésünk is („G” kísérlet), mely szerint ilyen prediszponált állatokban a korábbi spontán EPEC fertőzések kiújulásával (az EPEC baktériumoknak például a csípőbélben való elszaporodásával is) számolni kell.

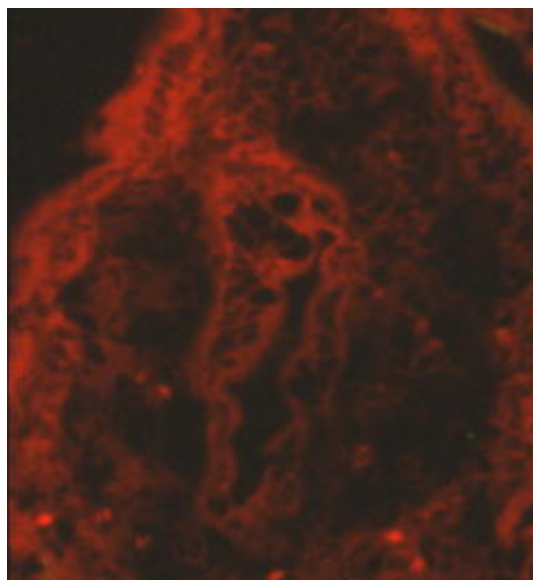
4.5. Képek



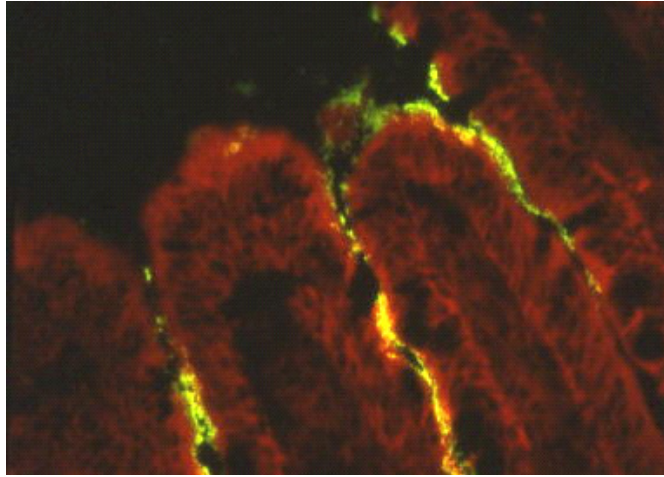
12. kép EPEC + TGE közös fertőzés („E1” kísérlet) (Immunfluoreszcenciás vizsgálat, 40x)
TGE víruszárványok a bélhámsejtekben.



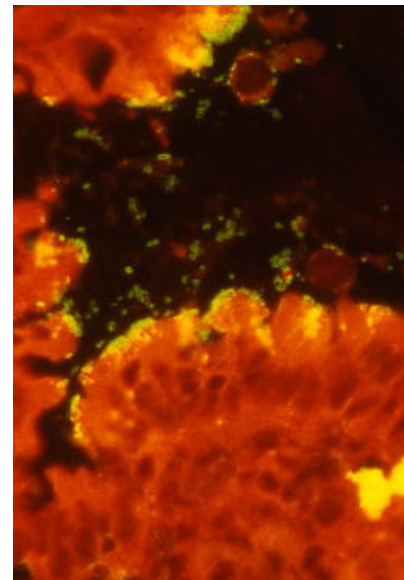
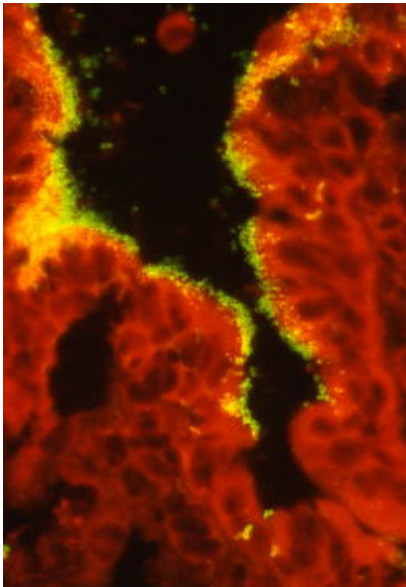
13. kép „Kanadai pool”-al fertőzött malac csípőbele. („A” kísérlet) (Immunfluoreszcenciás vizsgálat, 60x)



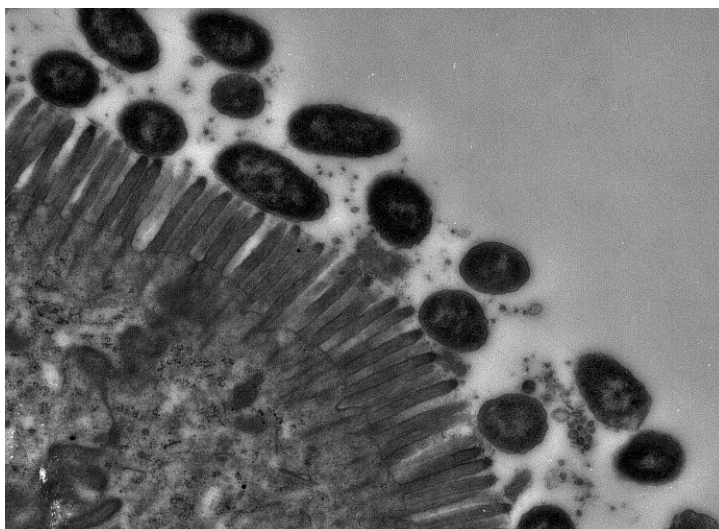
14. kép Magyar-1 „pool”-al fertőzött állat csípőbele. Flureszcens tapadás nem látható. („A” kísérlet) (Immunfluoreszcenciás vizsgálat, 60x)



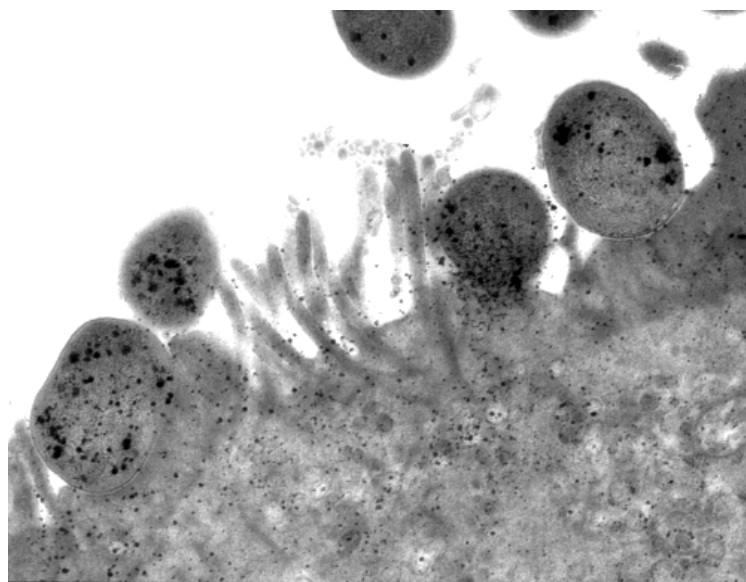
15. kép Magyar-2 „pool”-al fertőzött állat csípőbele. („A” kísérlet) (Immunfluoreszcenciás vizsgálat, 40x)



16a. és b. kép 86-1390 EPEC törzs fluoreszcenciás tapadása a csípőbélben („E2” kísérlet) (Immunfluoreszcenciás vizsgálat, 60x)



17. kép Spontán ETEC fertőzés a csípőbélben („G” kísérlet) (Kontroll csoport) Az ETEC baktériumok az ép mikrobolyhokhoz tapadnak. Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel (15000x).



18. kép EPEC fertőzés a vakbélben. („G” kísérlet) (Kontroll csoport) Tipikus AE lézió. Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel (20000x).

5. Záró megbeszélés és következtetések

Mint korábban megfogalmaztuk, munkánk elsődleges célja volt hogy *eae*⁺ *E. coli* (EPEC) törzseket mind egészséges mind hasmenéses állatokból járványtani, statisztikai elemzésre alkalmas módon – gyűjtsünk, s az izolált törzseket feno- illetve genotípusosan jellemezzük. Az ilyen irányú molekuláris epidemiológiai vizsgálataink során a hasmenéses és nem hasmenéses állatok bélsártamponjaiban valamint a bélnyálkahártya kaparékokban az *eae*⁺ *E. coli* törzseket nagyjából hasonló gyakorisággal találtuk. Ugyanakkor megállapítottuk, hogy ezek a törzsek egyéb ismert kórokozók jelenléte nélkül is izolálhatók. Ezért úgy tűnt, hogy az *eae*⁺ *E. coli* törzsek jelenléte ezekben az állatokban esetenként a hasmenéssel oktani összefüggésben is lehetett.

Kutatásaink során kiderült, hogy a Magyarországon izolált hasmenéses állatokból valamint a bélnyálkahártya kaparékokból egy új szerotípus (O123:H11, *eae*- β) igen gyakran izolálható. Adataink arra utalnak, hogy az *eae*- β típus választási malacokban inkább a csípő- és remesebélben, míg az *eae*- γ inkább a végbélben fordul elő gyakrabban. Mindkét csoportot egyformán jellemezte a „tipikus humán EPEC” törzsekre jellemző EAF plazmid hiánya.

A törzsek AE jellegű tapadásáért elsősorban felelős LEE pathogenitási sziget – a hibridizációs próbák alapján – valamennyi törzsben (valamennyi régiót tartalmazva) jelen volt. Ugyanakkor az EHEC és a tipikus EPEC törzseket jellemző (nemrég felfedezett) OI-122-es pathogenitási sziget egészét törzseinken nem tudtuk kimutatni. Ezen sziget egyes génjeinek jelenlétét igazoló PCR eredményeink viszont azt jelzik, hogy némelyik törzsünk rendelkezik az OI-122-es sziget bizonyos elmeivel, s ilyen alapon, a valószínűleg a később kialakult EPEC és EHEC törzsek evolúciós rezervoárjainak tekinthetők.

A törzsek molekuláris jellemzésén túl célunk volt az is, hogy - különböző sejtenyészetek fertőzése révén - az általunk gyűjtött törzsek *in vitro* adhéziós képességét vizsgáljuk, s erre megfelelő rendszert dolgozzunk ki. Eredményeink alapján számos sertés és humán EPEC törzs *in vitro* adhéziós vizsgálataira a PK15 sertés vese sejtvonalat javasoljuk. Az itt tanulmányozott EPEC törzsek a sertés vese sejtvonalon emelvény (pedestal) képződés nélkül tapadnak és okoznak intimin típusú adhéziót.

Az EAF plazmid fent említett hiányát is figyelembe véve a vizsgált sertés eredetű *eae*⁺ *E. coli* törzsek ún. „atipikus EPEC”-nek tekinthetők.

A továbbiakban célunk volt az is, hogy kidolgozzunk egy olyan *in vivo* adhéziós modell-rendszert, melynek segítségével a baktériumtapadást és az AE léziót immunhisztokémiai, szövettani és ultrastruktúrális eszközökkel vizsgálhatjuk. Eredményeink arra utalnak, hogy 4 hetes választási malacokban alkalmazott csípőbélkacs-modell — szemben az éhbél szegmentekkel — a bélmikroboholy károsodást előidéző AE fenotípus tanulmányozására megfelelő *in vivo* rendszerként alkalmazható. Ezáltal összehasonlíthatjuk a különböző pathotípusú (pl. ETEC és EPEC), valamint az EPEC csoporton belül, különböző intimin-típusú (pl. *eae-β* vs *eae-γ*) *E. coli* törzsek adott korú sertésekre vonatkozó adhéziós tulajdonságait. Idevonatkozó vizsgálataink során megállapíthattuk, hogy az *eae-γ* típusú sertés EPEC törzsek az *eae-β* törzsekhez képest, a 4 hetes malacok csípőbél-nyálkahártyájához szignifikánsan ($p < 0,001$) alacsonyabb intenzitással tapadnak, s szignifikánsan alacsonyabb volt a bélsáreredetű EPEC törzsek által előidézett AE léziók gyakorisága is. A bélkacs modellben végzett további vizsgálataink szerint az O157:H7 szerotípusú, emberből izolált EHEC törzsek a 4 hetes választott malacok csípőbelében jellegzetes, de ritkán előforduló AE léziót mutattak, mely egyezik azon adatokkal, mely szerint a sertés, a humán EHEC törzsek hordozásában, nem játszik döntő szerepet. Vizsgálataink ugyanakkor rámutattak arra is, hogy a sertés EPEC törzsek *in vivo* tapadása nem jár együtt az ugyanazon malacok bél mikroboholy készítményeihez való *in vitro* tapadás készségével, ami ezen törzsek kezdeti adhezinjeinek (ill. azok *in vitro* termelődésének) hiányát jelzi.

Az itt tárgyalt bélkacs kísérletek minden esetre rámutattak arra, hogy az általunk izolált, választott malacokból származó, *eae-β* típusú EPEC törzsek némelyike (pl. #17-es O123, *eae-β*, #5-ös O45, *eae-β*) a referens (O45, *eae-β*) kanadai sertés EPEC törzshöz hasonló intenzitással képes a választott malacok csípőbelében megtapadni és ott jellegzetes AE léziót előidézni. Ennek alapján fölmerült a kérdés, hogy az itt vizsgált sertés EPEC törzsek (elsősorban azok referencia törzsének elfogadott kanadai O45, *eae-β* típusú EPEC -es törzs) képes-e és milyen feltételek mellett választott sertések orális fertőzése révén hasonló bél- elváltozásokat és esetleges megbetegedéseket okozni ?

A fertőzési kísérleteket különböző hajlamosító tényezők közbeiktatásával, ill. azok nélkül végezve, az eredményekből kiderült, hogy a hazai sertéstartási gyakorlat szerint választott (4-5 hetes korú) malacokban az atipikus EPEC baktériumok a választási hasmenés kóroktanában önállóan nem játszanak közvetlen szerepet. Az viszont mindenképpen figyelemre méltó, hogy ha ETEC társfertőzés lépett fel, akkor amellett, hogy természetesen megnőtt a hasmenéses esetek száma, megjelent a szövettanilag kimutatható AE lézió is. Ez arra enged következtetni, hogy az *eae*⁺ *E. coli* baktériumoknak a választási hasmenésben esetenként társult szerepe lehet, de ilyen esetekben is szükséges az etetett takarmányok hajlamosító szerepét (pl. emelt szójatartalom) figyelembe venni.

A fentiek alapján az itt elvégzett munka legfontosabb új tudományos eredményeit az alábbiakban tudom összefoglalni:

1. Választott sertésekből jelentős számban izoláltunk intimin-pozitív (*eae*⁺) *E. coli* törzseket, s ezek között egy eddig az irodalomban nem szereplő új típust (O123:H11, *eae*-β), mint domináns típust írtunk le.
2. A törzsek genetikai és fenotípusos jellemzése alapján elsőként állapítottuk meg, hogy ezen *eae*⁺ *E. coli* törzsek atipikus EPEC törzsek, melyek elsősorban β és γ intiminnel jellemezhetők, s hogy a választott sertések vékony- és vastagbélből izolált törzsek túlnyomóan (85%-a) β típusú intiminnel rendelkeznek, míg a bélsár eredetű törzsek ettől szignifikánsan ($p < 0,02$) eltérnek (53%-a β-, 23%-a γ- intimin típusú).
3. A sertés EPEC törzsek *in vitro* adhéziójának vizsgálatára eddig nem állt rendelkezésre megfelelő, jól definiált sejtmodell. Vizsgálataink alapján a PK15 (sertésvese) hámsejtekhez törzseink több mint fele jól tapadt, míg a HeLa (humán epithel) sejtekhez nem tapadtak. Az adhézió ultrastruktúrája szoros (intimin típusú) tapadásra utalt, emelvény (pedestal) formálódás nélkül, mely utóbbi megfigyelést a tapadás helyén észlelhető aktin-akkumuláció hiányával — s a törzsek atipikus EPEC jellegével — összhangban volt.

4. A törzsek *in vivo* adhéziós és bélboholy károsító (ún. „attaching effacing = AE) hatásának vizsgálata céljából 4 hetes választott malacokra alapozott csípőbélkacs modellt dolgoztunk ki, melynek segítségével a vizsgált EPEC törzsek közül az *eae-β* típusúak (többnyire béleredetűek) jobban, az *eae-γ* típusúak (többnyire bélsáreredetűek) kevésbé jól tapadtak és idéztek elő jellegzetes AE léziót, mely különbségek mindkét vonatkozásban szignifikánsnak ($p < 0,001$) bizonyultak. E tekintetben a két intimin csoport képviselői fiatalabb (1 és 2 hetes) malacokban kevésbé tértek el, s a korrallal egyenes arányban csökkenő fogékonyságot sem lehetett határozottan kimutatni.

5. A bélkacs-próbában (*in vivo*) pozitív eredményt adó malacok vékonybelének megmaradó szakaszaiból készített kefeszegélyminták az *in vitro* próbában az EPEC baktériumokkal adhéziót nem mutattak, jelezvén, hogy a vizsgált sertés eredetű EPEC törzsek ún. iniciális adhezinekkal nem rendelkeznek vagy azokat *in vitro* nem termelik.

6. A bélkacs kísérleteink eredményei arra is rámutattak, hogy az emberi eredetű EHEC törzsek, a választott malacok csípőbelében, a sertés EPEC törzsekhez képest jóval kevésbé tudnak megtelepedni.

7. A járványtani (case control) adataink, az izolált atipikus EPEC törzsek pathogenitását – az eddigi irodalmi feltételezésekkel ellentétben – kétségbe vonták, s a közvetlen kórokozó hatást a 4-5 hetes választási malacokon végzett orális fertőzési kísérletek eredményei sem igazolták. Egyes társfertőzések (pl. ETEC) és dietetikus hajlamosító tényezők (pl. magas szójatartalmú takarmány) együttese azonban mind a kísérletes EPEC fertőzést, mind a látens természetes fertőzöttséget aktiválni tudta, mely tényezők közül a dietetikus hajlamosítás látszott hatékonyabbnak.

Irodalom

Adams, L.M., Simmons, C.P., Rezman, L., Strugnell, R.A., Robins-Browne, R.M., 1997. Identification and characterization of a K88- and CS31A-like operon of a rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* strain which encodes fimbriae involved in the colonization of rabbit intestine. *Infect. Immun.* 65, 5222-5230.

Alexa, P., Rychlík, I., Nejezchleb, A., Hamrik, J., 1997. Identification of enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli* by PCR and biological methods. *Vet. Med.-Czech.* 42, 97-100.

Alexander T.J.L., 1994. Neonatal diarrhoea in pigs. In: Gyles C.L. (Ed.) *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Wallingford, United Kingdom: CAB International, pp. 151-170.

An, H., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Harel, J., 1999. Distribution of a novel locus called paa (porcine attaching effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases 2*, edited by Paul and Francis. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 179-184

An, H., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Mabrouk, T., Dugourd, D., Dezfoulian, H., Harel, J., 2000. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of eae, espA, espB and espD genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. *Microb. Pathogenesis* 291-300.

Batissou, I., Guimond, M.P., Girard, F., An, H., Zhu, C., Oswald, E., Fairbrother, J.M., Jacques, M., Harel J., 2003. Characterization of the novel factor paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 71, 4516-4525.

Berendson, R., Cheney, C.P., Schad P.A., Boedeker E. C., 1983. Species-specific binding of purified pili (AF/R1) from the *Escherichia coli* RDEC-1 to rabbit intestinal mucosa. *Gastroenterology* 85, 837-845.

Bertschinger, H.U., Moon, H.W., Whipp, S.C., 1972. Association of *Escherichia coli* with the small intestinal epithelium. I. Comparison of enteropathogenic and nonenteropathogenic porcine strains in pigs. *Infect. Immun.* 5, 595-605.

Bertschinger, H.U., Bachmann, M., Mettler, C., Pospischil, A., Schraner, E.M., Stamm, M., Sydler, T., Wild, P., 1990. Adhesive fimbriae produced *in vivo* by *Escherichia coli* O139:K12(B): H1 associated with enterotoxaemia in pigs. *Vet. Microbiol.* 25, 267-281.

Bettelheim, K.A. and Thompson, C.J., 1987. New method of serotyping *Escherichia coli*: implementation and verification. *J. Clin. Microbiol.* 25, 781-786.

Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J., Alonso, M.P., Balsalobre, C., Mourino, M., Madrid, C., Juárez, A., 1996. Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). *J. Microbiol. Meth.* 26, 95-101.

Booher, S.L., Cornick, N.A., Moon, H.W, 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally infected swine. *Vet. Microbiol.* 89, 69-81.

Cantey, J.R. and Blake, R.K., 1977. Diarrhoea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J. Infect. Dis.* 135, 454-462.

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.

China, B., Pirson, V., Jacquemin, E., Pohl, P., Mainil, J.G. 1997. Pathotypes of bovine verotoxigenic *Escherichia coli* isolates producing attaching/effacing (AE) lesions in the ligated intestinal loop assay in rabbits. *Adv. Exp. Med. Biol.* 412, 311-316.

Choi, C. and Chae, C., 1999. Genotypic prevalence of F4 variants (ab, ac and ad) in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. *Vet. Microbiol.* 67, 307-310.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. Wayne, PA

Dean-Nystrom, E.A., Melton-Celsa, A.R., Pohlenz, J.F., Moon, H.W., O'Brien, A.D., 2003. Comparative pathogenicity of *Escherichia coli* O157 and intimin-negative non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* strains in neonatal pigs. *Infect. Immun.* 71, 6526-6533.

De Rycke, J., Comtet, E., Chalareng, C., Bourz, M., Tasca, C., Milon, A., 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* O103 from rabbit elicits actin stress fibers and focal adhesions in HeLa epithelial cells, cytopathic effects that are linked to an analog of the locus of enterocyte effacement. *Infect. Immun.* 65, 2555-2563.

Donnenberg, M.S., Tzipori, S., McKee, M.L., O'Brien, A.D., Alroy, J., Kaper, J.B., 1993. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model. *J. Clin. Invest.* 92, 1418-1424.

Dow, M.A., Tóth, I., Alexa, P., Davies, M., Malik, A., Oswald, E., Nagy, B., 2005. Predominance of *afr2* and *ral* fimbrial genes related to *f4(k88)/cs31a* in Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from rabbits with postweaning diarrhoea in Central Europe. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1366-1371.

Dow, M.A., Tóth, I., Malik, A., Herpay, M., Nógrády, N., Ghenghesh, K.S., Nagy, B., 2006. Phenotypic and genetic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC) from diarrhoeal and non-diarrhoeal children in Lybia. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* (nyomtatás alatt).

Duguid, J.P., Smith, I.W., Dempster, G., 1955. Nonflagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J. Pathol. Bacteriol.* 53, 335-355.

Elliott, S.J., Sperandio, V., Giron, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Wainwright, L., Hutcheson, S.W., McDaniel, T.K., Kaper, J.B., 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 68, 6115-6126.

Fábián, P., Magasi, P., 1992. Orvosi helyesírási szótár. Akadémiai kiadó, Budapest

Fairbrother, J.M., Harel, J., D'Allaire, S., Bonneau, M., 1994. Characterization of *E. coli* isolated from postweaning piglets with and without diarrhoea. in: Proceedings of the 13th IPVS Congress, Bangkok, Thailand, pp. 212.

Fiederling, F., Boury, M., Petit, C., Milon, A., 1997. Adhesive factor/rabbit 2, a new fimbrial adhesin and a virulence factor from *Escherichia coli* O103, a serogroup enteropathogenic for rabbits. *Infect. Immun.* 65, 847-851.

Fitzhenry, R.J., Pickard, D.J., Hartland, E.L., Reece, S., Dougan, G., Phillips, A.D., Frankel, G., 2002a. Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut* 50, 180-185.

Fitzhenry, R.J., Reece S., Trabulsi, L.R., Heuschkel, R., Murch, S., Thomson, M., Frankel G., Phillips, A.D., 2002b. Tissue tropism of Enteropathogenic *Escherichia coli* strains belonging to the O55 serogroup. *Infect. Immun.* 70, 4362-4368.

Fournout, S., Dozois, C.M., Odin, M., Desautels, C., Peres, S., Hérault, F., Daigle, F., Segafredo, C., Laffitte, J., Oswald, E., Fairbrother, J.M., Oswald, I.P., 2000. Lack of a role of cytotoxic necrotizing factor 1 toxin from *Escherichia coli* in bacterial pathogenicity and host cytokine response in infected germfree piglets. *Infect. Immun.* 68, 839-847.

Franck, S.M., Bosworth, B.T., Moon, H.W., 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin- producing *Escherichia coli* strains from calves. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1795-1797.

Franke, J., Franke, S., Schmidt, H., Schwarzkopf, A., Wieler, L. H., Baljer, G., Beutin, L. and 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.

Frankel G., Phillips A. D., Rosenshine I., Dougan G., Kaper J.B., Knutton S., 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. Mol Microbiol. 30, 911-921. Review.

Frydendahl, K., 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. Vet. Microbiol. 85, 169-182.

de la Fuente, R., Garcia, S., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Cid, D., Ordenm J.A., 2004. Investigation of attaching and effacing activity of ruminant eae-positive *Escherichia coli* using rabbit and lamb ligated ileal loop assays. Vet. Rec. 154, 565-568.

Gergely, L., 1999. Orvosi mikrobiológia. Semmelweis Kiadó, Budapest

Girard, F., Oswald, I.P., Taranu, I., Helie, P., Appleyard, G.D., Harel, J., Fairbrother, J.M., 2005. Host immune status influences the development of attaching and effacing lesions in weaned pigs. Infect. Immun. 73, 5514-5523.

Goffaux, F., Mainil, J., Pirson, V., Charlier, G., Pohl, P., Jacquemin, E., China, B., 1997. Bovine attaching and effacing *Escherichia coli* possess a pathogenesis island related to the LEE of the human enteropathogenic *Escherichia coli* strain E2348/69. FEMS Microbiol. Lett. 15, 415-421.

Goffaux, F., China, B., Janssen, L., Mainil, J., 2000. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. Res. Microbiol. 151, 865-871.

Grif, K., Dierich, M.P., Allerberger, F., 1998. Dynabeads plus 3M Petrifilm HEC versus Vitek immunodiagnostic assay system for detection of *Escherichia coli* O157 in minced meat. Lett. App. Microbiol. 26, 199-204.

Gunzburg, S.T., Tornieporth, N.G., Riley, L.W., 1995. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. J. Clin. Microbiol. 33, 1375-1377.

Gyles C.L. 1994. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Human. CAB International, Guilford, UK, p. 567-591.

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muehldorfer, I., Tschaepé, H., 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol. Microbiol. 23, 1089-1097.

Helie, P., Morin, M., Jacques, M., Fairbrother, J.M., 1991. Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45:K'E65" strain. Infect. Immun. 59, 814-821.

Hess, J., Wels, W., Vogel, M., Goebel, W., 1986. Nucleotide sequence of a plasmid-encoded hemolysin determinant and its comparison with a corresponding chromosomal hemolysin sequence. FEMS Microbiol. Lett. 34, 1-11.

Houe, H., Ersboll, A.K., Toft, N., 2004. Introduction to Veterinary Epidemiology. Biofolia, Frederiksberg, pp. 227-229.

Imberechts, H., Bertschinger, H.U., Stamm, M., Sydler, T., Pohl, P., De Greve, H., Hernalsteens, J.P., Van Montagu, M., Lintermans, P., 1994. Prevalence of F107 fimbriae on *Escherichia coli* isolated from pigs with oedema disease or postweaning diarrhoea. Vet. Microbiol. 40, 219-230.

Janke, B.H., Francis, D.H., Collins, J.E., Libal, M.C., Zeman, D.H., Johnson, D.D., 1989. Attaching effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs and dogs. J. Vet. Diagn. Invest. 1, 6-11.

Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., Kaper, J.B., 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching effacing lesions on tissue culture cells. P. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 7839-7843.

Kaper, J.B. 1996. Defining EPEC. Rev. Microbiol. Sao Paulo 27, 130-133.

Kaper, J.B., 1998. EPEC delivers the goods. Trends in Microbiology 6, 169-173.

Kaper J.B., Nataro J.P. és Mobley H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2, 123-40.

Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M., Lim, C., 1983. Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet 619-620.

Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K., Kaper, J. B., 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J. Clin. Microbiol. 41, 4930-4940.

Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H., McNeish, A.S., 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: Basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 57, 1290-1298.

Konowalchuck, J., Speirs, J.I. and Stavric, S., 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 18, 775-779.

Krause, G., Zimmermann, S., Beutin, L., 2005. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin – (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. Vet. Microbiol. 106, 87-95.

Levine, M.M., 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155, 377-389.

Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S., Cariolet, R., Duval-Iflah, Y., Hampson, D.J., Jestin, A., 2000. Experimental models of porcine post-weaning colibacillosis and their relationship to post-weaning diarrhoea and digestive disorders as encountered in the field. *Vet. Microbiol.* 72, 295-310.

Mainil, J.G., Daube, G., Jacquemin, E., Kaeckenbeeck, A., Pohl P., 1995. Typage des *Escherichia coli* isolees d'intestins de porcelets en Belgique au moyen de sondes genetiques: souches enterotoxinogenes, verotoxinogenes ou enteropathogenes. *Ann. Med. Vet.* 139, 5-13.

Mainil J., 1999. Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet. Res.* 30, 235–257.

Malik, A., Tóth, I., Beutin, L., Schmidt, H., Nagy, B., 2004. New serotypes and intimin types of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from diarrhoeal and non-diarrhoeal weaned pigs. In: Blaha, T., Pahlitzsch, C.: *Proceedings, 18th Congress, International Pig Veterinary Society Hamburg, Germany, Volume 1 p. 322.*

Malik, A., Tóth, I., Beutin, L., Schmidt, H., Taminiau, B., Dow, M.A., Morabito, S., Oswald, E., Mainil, J., Nagy, B., 2005. Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of *eae*⁺ *Escherichia coli* from weaned pigs. *Vet. Microbiol.* (Ahead of print)

Malik, A., Tóth, I., Beutin, L., Nagy, B., 2006. Bélmikrobóholy károsodást okozó enteropathogen *Escherichia coli* (EPEC) törzsek választott malacokban. *Magyar Állatorvosok Lapja* (közlés alatt)

McDaniel, T.K., Jarvis, G., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 1664-1668.

Mead, P.S., Finelli, L., Lambert-Fair, M.A., Champ, D., Townes, J., Hutwagner, L., Barrett, T., Spitalny, K., Mintz, E., 1997. Risk factors for sporadic infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Arch. Intern. Med.* 157, 204-208.

Milon, A., Esslinger, J., Camguilhem, R., 1990. Adhesion of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic weaned rabbits to intestinal villi and HeLa cells. *Infect. Immun.* 58, 2690-2695.

Milon, A., Oswald, E., De Rycke, J., 1999. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 30, 203-219.

Moon, H.W., Sorensen, D.K. és. Sautter J.H., 1968. Experimental enteric colibacillosis in piglets. *Can. J. Comp. Med.* 32, 493-497

Moon, H.W., Isaacson, R.E., Pohlenz, J., 1979. Mechanism of association of enteropathogenic *E. coli* with intestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 119-127.

Moon, H.W., Whipp, S.C., Argenzio, R.A., Levine, M.M., Gianella, R.A., 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* 53, 1340-1351.

Morabito, S., Tozzoli, R., Oswald, E., Caprioli, A., 2003. A Mosaic Pathogenicity Island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157: H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infect. Immun.* 71, 3343-3348.

Nagy, B., Casey, T.A., Moon, H.W., 1990. Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary. *J. Clin. Microbiol.* 28, 651-653.

Nagy, B., 1992. Borjak és malacok enterális fertőzéseinek kóroktana és specifikus megelőzése. Akadémiai doktori értekezés, MTA Állatorvostudományi Kutatóintézete

Nagy, B., Nagy, G., Meder, M., Mocsári, E., 1996. Enterotoxigenic *Escherichia coli*, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary. *Acta Vet. Hung.* 44, 9-19.

Nagy, B. és Fekete, P.Zs., 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J. Med. Microbiol.* 295, 443-54.

Nataro, J.P., Seriwatana, J., Fasano, A., Maneval, D.R., Guers, L.D., Noriega F., Dubovsky, F., Levine, M.M., Morris, J.G. Jr., 1995. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infect Immun.* 63:4721-4728.

Nataro, J.P. and Kaper, J.B., 1998. Diarrhoeagic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142-201.

Neter, E., 1965. Enteritis due to enteropathogenic *Escherichia coli*. *Amer. J. Dig. Dis.* 10, 883-890.

Nicholls, L., Grant, T.H., Robins-Browne, R. M., 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol.* 35, 275-288.

O'Brien, A.D., Thompson, M.R., Cantey, J.R., Formal, S.B., 1977. Production of a *Shigella dysenteriae*-like toxin by pathogenic *Escherichia coli*. Abstr. B-103. In: Abstracts of the 77th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 1977., American Society for Microbiology, Washington, D.C.

O'Brien, A.D., Lively, T.A., Chen, M.E., Rothman, S.W., Formal, S.B., 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. *Lancet* 702.

O'Hanley, P.D., Cantey, J.R., 1978. Surface structures of *Escherichia coli* that produce diarrhea by a variety of enteropathic mechanisms. *Infect. Immun.* 21, 874-878.

Ørskov, F. és Ørskov, I., 1983. Serology of *Escherichia coli* fimbriae. *Prog. Allergy* 33, 80-105.

Ørskov, F. és Ørskov, I., 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. In: Bergan T. (Ed.), *Methods in Microbiology*, Vol. 14. Academic Press, New York, pp. 43-112.

Osek, J., 2001. Identification of *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea. *Vet. Rec.* 148, 241-243.

Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O., Caprioli, A., 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterisation of a new intimin variant. *Infect. Immun.* 68, 64-71.

Oswald, I.P., Desautels, C., Laffitte, J., Fournout, S., Peres, S.Y., Odin, M., Le Bars, P., Le Bars, J., Fairbrother, J.M., 2003. Mycotoxin fumonisin B1 increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5870-5874.

Perna, N., Mayhew, G.F., Posfai, G., Elliott, S., Sonnenberg, M.S., Kaper, J.B., Blattner, F.R., 1998. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 66, 3810-3817.

Potter, M.E., Kaufmann, A.F., Thomason, B.M., Blake, P.A., Farmer, J.J., 1985. Diarrhea due to *Escherichia coli* O157:H7 in the infant rabbit. *Journal of Infectious Diseases* 152, 1341-1343.

Pulkkinen, W.S. és Miller S.I., 1991. A *Salmonella typhimurium* virulence protein is similar to a *Yersinia enterocolitica* invasion protein and a bacteriophage lambda outer membrane protein. *J. Bacteriol.* 173, 86-93.

Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.G., Wells, J.G., Davis, B.R., Herbert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308, 681-685.

Rippinger, P., Bertschinger, H.U., Imberechts, H., Nagy, B., Sorg, I., Stamm, M., Wild, P., Wittig, W., 1995. Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. *Vet. Microbiol.* 45, 281-295.

Rodrigues, J., Scaletsky, I.C.A., Campos, L.C., Gomes, T.A.T., Whittan, S.T., Trabulsi, L.R., 1996. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect. Immun.* 64, 2680-2686.

Sarmiento, J.I., Casey, T.A., Moon, H.W., 1988. Postweaning diarrhea in swine: experimental model of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1154-1159.

Scaletsky, I.C.A., Silba, M.L.M., Trabulsi, L.R. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* 45, 534-536.

Schmidt, H., Russmann, H., Karch, H., 1993. Virulence determinants in nontoxigenic *Escherichia coli* O157 strains that cause infantile diarrhea. *Infect. Immun.* 61, 4894-4898.

Schmidt, H., Knop, C., Franke, S., Aleksic, S., Heesemann, J., Karch, H., 1995. Development of PCR for Screening of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 701-705.

Sellwood, R., Gibbons, R.A., Jones, G.W., Rutter, J.M., 1975. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to pig intestinal brush borders: the existence of two pig phenotypes. *J. Med. Microbiol.* 8, 405-411.

Seriwatana, J., Echeverria, P., Taylor, D.N., Rasrinaul, L., Brown, J.E., Peiris, J.S.M., Clayton, C.L., 1988. Type II heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from animals and humans. *Infect. Immun.* 56, 1158-1161.

Shermann, P., Soni, R., Karmali, M., 1988. Attaching and effacing adherence of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* to rabbit intestinal epithelium in vivo. *Infect. Immun.* 56, 756-761.

Smith, H.W., Halls, S., 1967. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Pathol. Bacteriol.* 93, 531-543.

Smyth, C.J., Marron, M., Smith, S.G.J., 1994. Fimbriae of *Escherichia coli* In: Gyles, C.L. (Ed.) *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, UK, 399-436.

Staley, T.E., Jones, E.W., Corley, E.D., 1969. Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. *Am. J. Pathol.* 56, 371-392.

Stevens, M.S., Marchès, O., Campbell, J., Huter, V., Frankel, G., Phillips, A.D., Oswald, E., Wallis, T.S., 2002. Intimin, tir, and shiga toxin 1 do not influence enteropathogenic responses to shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine ligated intestinal loops. *Infect. Immun.* 70, 945-952.

Stevens M.P., Roe A.J., Vlisidou I., van Diemen P.M., La Ragione, R.M., Best, A., Woodward, M.J., Gally, D.L., Wallis, T.S., 2004. Mutation of *toxB* and a truncated version of the *efa-1* gene in *Escherichia coli* O157: H7 influences the expression and secretion of locus of enterocyte effacement-encoded proteins but not intestinal colonization in calves or sheep. *Infect. Immun.* 72, 5402-5411.

Sváb, J., 1973. Biometriai módszerek a kutatásban. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest

Takeuchi, A., Inman, L.R., O'Hanley, P.D., Cantey, J.R., Lushbaugh, W.B., 1978. Scanning and transmission electron microscopic study of *Escherichia coli* O15 (RDEC-1) enteric infection in rabbits. *Infect. Immun.* 19, 686-694.

Tóth, I., Herault, F., Beutin, L., Oswald, E., 2003a. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (Type IV) *J. Clin. Microbiol.* 41, 4285-4291.

Tóth, I., Schmidt, H., Dow, M., Malik, A., Oswald, E., Nagy, B., 2003b. Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7242-7247.

Trabulsi, L.R., Keller, R., Tânia, A., Gomes, T., 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 508-13.

Tzipori, S., Karch, H., Wachsmuth, I.K., Robins-Browne, R.M., O'Brien, A.L., Lior, H., Cohen, M.L., Smithers, J., Levine, M.M., 1987. Role of a 60-megadalton plasmid and shiga-

like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* 55, 3117-3125.

Tzipori, S., Gunzer, F., Sonnenberg, M.S., DeMontigny, L., Kaper, J., Donhue-Rolfe, A., 1995. The role of the *eaeA* gene in diarrhoea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.* 63, 3621-3627.

Ulshen, M.H. and Rollo, J.L., 1980. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man – another mechanism. *New Engl. J. Med.* 302, 99-101.

Yatsuyanagi, J., Saito, S., Sato, H., Miyajima, Y., Amano, K., Enomoto, K., 2002. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 40, 294-297.

Varga, J., Tuboly, S. és Mészáros, J., 1999. A háziállatok fertőző betegségei, Állatorvosi járványtan II. Budapest, Mezőgazda kiadó

Wada, Y., Nakaoka, Y., Kondo, H., Nakazawa, M., Kubo, M. 1996. Dual infection with attaching and effacing *Escherichia coli* and enterotoxigenic *Escherichia coli* in post-weaning pigs. *J. Comp. Pathol.*, 114, 93–99.

Zhang, W.L., Kohler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S., Schmidt, H., 2002. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4486-4492.

Zhu, C., Harel, J., Jacques, M., Desautels, C., Sonnenberg, M.S., Beaudry, M., Fairbrother, J.M., 1994. Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect. Immun.* 62, 4153-4159.

Zhu, C., Harel, J., Jacques, M., Fairbrother, J.M., 1995. Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* O45 isolates from swine with postweaning diarrhea. *Can. J. Vet. Res.* 59, 118-123.

Tudományos publikációk

Tóth I., Schmidt H., Dow M.A., **Malik A.**, Oswald E., Nagy B. 2003. Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7242-7247.

IF: 3,82

Dow, M.A., Tóth, I., Alexa, P., Davies, M., **Malik, A.**, Oswald, E., Nagy, B. 2005. Predominance of *afr2* and *ral* Fimbrial Genes Related to *f4(k88)/cs31a* in Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Isolated from Rabbits with Post Weaning Diarrhoea in Central Europe. J. Clin. Microbiol. 43, 1366-1371.

IF: 3,489

Malik, A., Tóth, I., Beutin, L., Schmidt, H., Taminiau, B., Dow, M.A., Morabito, S., Oswald, E., Mainil, J., Nagy, B. Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of *eae*⁺ *Escherichia coli* from weaned pigs. Vet. Microbiol. 2005. (nyomtatás alatt)

IF: 1,93

Dow, M.A., Tóth, I., **Malik, A.**, Herpay, M., Nógrády, N., Ghenghesh, K.S., Nagy, B. 2006. Phenotypic and genetic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC) from diarrhoeal and non-diarrhoeal children in Lybia. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. (nyomtatás alatt)

IF: 1,015

Malik A., Tóth I., Beutin L., Nagy B. 2006. Bélmikrobaholy károsodást okozó enteropathogen *E. coli* (EPEC). Magyar Állatorvosok Lapja (közlés alatt)

Proceeding

Malik, A., Tóth, I., Beutin, L., Schmidt, H., Nagy, B. 2004. New serotypes and intimin types of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from diarrhoeal and non-diarrhoeal weaned pigs.

Blaa, T., Pahlitzsch, C.: Proceedings, 18th Congress, International Pig Veterinary Society Hamburg, Germany, 2004 – Volume 1 p. 322.

Abstract

A. Malik, I. Tóth, L. Beutin, B. Nagy: Attaching effacing *Escherichia coli* (AEEC) bacteria in weaned pigs

Abstract Book FEMS Congress of European Microbiologists, *Ljubjana, Slovenia, p268 (p6-60)*. (2003), Poszter

A. Malik, B. Nagy: Ligated intestinal loop model to study Attaching-Effacing *E. coli* (AEEC) infection in weaned pigs

Abstracts of 14th Intern. Congr., Hung. Soc. Microbiol., Balatonfüred. (2003), Előadás, B-32.

I. Tóth, H. Schmidt, M. A. Dow, **A. Malik**, E. Oswald, B. Nagy: *In vivo* transduction of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with Shiga toxin 2-encoding bacteriophage

Abstracts of 14th Intern. Congr., Hung. Soc. Microbiol., Balatonfüred. (2003), Előadás, B-33.

Malik A., Tóth I., Beutin L., Nagy B.: Bélmikroboholy-károsodást okozó *Escherichia coli* (AEEC) baktériumok választott sertésekben

Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002. évi nagygyűlés előadásainak és posztereinek összefoglalói, Balatonfüred, okt. 8-10., Előadás, B-20

Egyéb hazai és nemzetközi előadások

Malik A. és Nagy B.: Bélmikroboholy-károsodást okozó *Escherichia coli* (AEEC) baktériumok sertés bélkacs modellben

Akadémiai beszámolók (2003), Bakteriológia szekció, Előadás

Malik A., Tóth I., Nagy B.: Bélmikroboholy-károsodást okozó *Escherichia coli* (AEEC) baktériumok választott sertésekben

Akadémiai beszámolók (2002), Bakteriológia szekció, Előadás

A. Malik, I. Tóth, B. Nagy: Partial characterisation of AEEC Strains in Hungarian Weaned Pigs

EU-AEEC tudományos ülés, Drezda, Németország, (2002), Előadás

A. Malik, I. Tóth, L. Beutin, B. Nagy: Porcine postweaning alimentary flora: a reservoir of unusual AEEC?

EU-AEEC tudományos ülés, Budapest, (2002), Előadás

A. Malik and B. Nagy: *E. coli* O157:H7 in ligated intestinal loops of weaned pigs

EU-AEEC tudományos ülés, Róma, Olaszország (2003), Előadás

A. Malik, I. Tóth, B. Nagy: Attaching-effacing *Escherichia coli* (AEEC) in ligated intestinal loop model of weaned pigs EU-AEEC tudományos ülés, Avignon, Franciaország (2003), Előadás

Malik A.: Bélmikrobahóly-károsodást okozó *Escherichia coli* baktériumok (AEEC) sertésben Sertéségszügyi Konferencia, Budapest, Stefánia Palota (2004. szept.), Előadás

A. Malik, I. Tóth, L. Beutin, H. Schmidt, S. Morabito, J. Mainil, B. Nagy: Porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from weaned pigs in Hungary: diverging types of intestinal and rectal isolates

Med-Vet-Net 1st General Scientific Meeting, University College Winchester, Anglia (2005. június), Előadás és Poszter

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt őszintén köszönöm témavezetőmnek, **Nagy Béla**, akadémikus úrnak, aki meghívott, hogy kapcsolódjak be az „Enterális Bakteriológiai és alimentáris zoonózis” témacsoport munkájába, majd a PhD tanulmányaimban mindvégig a legmesszebbmenőkig támogatott és tudásával, tapasztalatával és értékes tanácsaival segítette a munkámat, illetve a disszertáció elkészítését.

Hálával tartozom konzulenseimnek, elsősorban **Tóth Istvánnak**, aki bevezetett a molekuláris bakteriológia világába, végtelen türelemmel segített a molekuláris biológiai módszerek elsajátításában.

Köszönetet szeretnék mondani témacsoportunk összes munkatársának, **Puruczki Istvánnénak, Bartos Andreának, Mohamed A. Dow-nak, Fekete Péter Zsoltnak, Imre Arielnek, Szmolka Annamáriának**, akik önzetlen segítségükkel, áldozatos munkájukkal mellettem álltak.

Köszönet illeti az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézetének munkatársait, különösen az Állatház dolgozóit segítségükért, munkájukért.

Külföldi tanulmányutaim során rengeteg segítséget és technikai irányítást kaptam a Liege-i Egyetem Állatorvosi Kar Mikrobiológiai Tanszékének munkatársaitól, a toulouse-i Nemzeti Mezőgazdasági Intézet Gyógyszer-toxikológiai Laboratóriumának munkatársaitól valamint a római Országos Egészségügyi Intézet Élelmiszer- és Állategészségügyi Osztályának dolgozóitól.

Külön köszönöm az Országos Állategészségügyi Intézet Kórszövettani és Virologiai Osztályon dolgozó asszisztensnők, Kovács Imréné és Kottász Tamásné, sokévi munkáját. Köszönöm Prof. Zukál Endre statisztikai értékelő munkáját.

Köszönöm a Debreceni, a Kaposvári és az Országos Állategészségügyi Intézetek Kórbonctani Osztályainak a mintagyűjtésben nyújtott segítségüket.