



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

PhD értekezés

Készítette:

Dr. Malik Anna

MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

2006

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.

A pathogén 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. Az enterális kórképekért felelős – korábban összefoglalóan „enteropathogénnek” nevezett – *E. coli* törzsek a bélcsatornában képesek jelentős számban megtelepedni és a legkülönbözőbb morfológiai és funkcionális változások előidézése által hasmenést (gyakran bélgyulladást) okozni.

A kórkép pathomechanizmusa és klinikai tünetei alapján a szakirodalom az enterális kórokozó *E. coli* törzsek hat fő csoportját különíti el, melyek bizonyos kórokozó képességek (mint pl. adhézión-, inváziós képesség és toxintermelés) tekintetében egymástól lényegesen különböznek. Az háziállatokban előforduló csoportok: EPEC (Enteropathogén *E. coli*), ETEC (Enterotoxikus *E. coli*), EHEC/VTEC (Enterohaemorrhagiás/Verocitotoxikus *E. coli*).

Az ETEC okozta hasmenés kórfejlődésében, az enterotoxinok (LT, ST toxinok) mellett, kolonizációs faktor antigéneknek nevezett - plazmid által kódolt - fimbria (pilus) szerkezetű adhézión faktorok is szerepet játszanak. 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 F5(K99) fimbria a borjakban és bárányokban hasmenést okozó törzseken fordul elő. Az F18 fimbriának két variánsa van: F18ab és F18ac.

Az F18ab fimbriát a sertés oedemabetegségét előidéző törzsek hordozzák míg az F18ac fimbria a sertések választáskori hasmenésében játszik szerepet.

Az emberi-, és állati eredetű törzsek által termelt verotoxinok (VT) antigenitási és biológiai tulajdonságai alapján két eltérő toxincsoportról van szó, melyek egymástól specifikus immunsavókkal elkülöníthetők: a VT1 (stx1) és VT2 (stx2). 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. A citotoxinokat egyébként a törzsek kromozómájába integrálódott, temperált bakteriofágok kódolják. A toxintermelés tehát a VTEC törzsekben lizogén konverzió eredménye, mely – elvileg – a legkülönbözőbb genetikai vonalat képviselő törzsekben is létrejöhet.

Az EPEC a legrégebb óta ismert enterális pathogén *E. coli* csoport. 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 bélhámsejtek mikromembránjára való tapadását, a tapadás helyén pedig a sejtmembrán dobogó-szerű kiemelkedéseinek (pedestal) képződését észleljük. Ezen jellegzetes morfológiájú adhéziót „attaching-effacing” (AE) típusú adhéziónak nevezzük. 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 ez a sajátos bélmikrobolyh károsodást előidéző hatás, így ezen törzseket gyűjtő néven „attaching-effacing”, *Escherichia coli* (AEEC) baktériumoknak nevezzük

Az ún. „tipikus EPEC” vagy más néven „EPEC I” csoportba tartoznak azok a törzsek, melyek rendelkeznek egy ún. EAF (EPEC adhézión 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. A tipikus virulens törzsek többsége meghatározott O csoportba tartozik.

A bélmikrobolyh károsodás 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 pathogenitási szigeten lévő *eae* (*E. coli*

attachment effacement) gén kódolja. Az *eae* gén N terminális szakasza konzervatív, míg a C terminális variábilis, mely alapján ez idáig 10 *eae* (intimin) típust azonosítottak. Az egyes EPEC csoportba tartozó szerotípusokhoz gyakran meghatározott intimintípus tartozik

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.

Célok

Mivel az *eae*⁺ *E. coli* illetve EPEC baktériumok járványtani sajátosságát és pathogenezisét választott malacokban ez idáig alig vizsgálták, munkánk során a választott malacok EPEC baktériumainak vizsgálatát 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.

Anyagok és módszerek

Mintagyűjtés

A bélboholy károsító baktériumokat hasmenéses kórelőzménnyel elhullott, választás korú sertések bélnyálkahártya-kaparékaiból gyűjtöttük az ország különböző területeiről. 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.

Baktérium törzsek és egyes fertőzési kísérletekben előforduló hajlamosító tényezők

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 μ l-t szélesztettünk üvegbot segítségével brómtimolkék-laktóz tartalmú indikátor táptalajra (Merck). 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.

Szájon át történő fertőzési kísérleteinkhez különböző hajlamosító tényezőket alkalmaztunk. 2134 jelzésű ETEC törzs (O157:H8, F18ac, STa, STb), amelyet az „E1” kísérletben használtunk, egy magyarországi választási hasmenéses esetből származik. 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. A fertőzés utáni 2-5 nap között (az egyes kísérleteknél megadott feldolgozási időpontban) a malacokat alkalmazásával túlaltattuk, s csípőbelükből (egyes esetekben vakbelükből is) mintát vettünk.

A „D” kísérletben a fumonizin B₁ mikotoxint alkalmaztuk hajlamosító tényezőként. A nyers kivonatot hígítatlanul (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 azt követő 6 napra esett. A fumonizin B₁ mellett, a fertőzés napjaiban, dexametazon tartalmú injekciót (Dexadreson inj., 2 mg/ml) 2,5 ml/állat koncentrációban, mint immunszuppresszív hatású gyógyszer alkalmaztuk csoportonként az állatok felében.

Az „E1” kísérletben TGE (transmissibilis gastroenteritis) vírust (Miller No. 6. törzs) alkalmaztunk hajlamosító tényezőként. Az állatokat, az EPEC fertőzést megelőző napon, egyszer perorálisan fertőztük (5×10^3 PFU/állat).

Genotípusos jellemzés polimeráz lánreakcióval 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. 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.

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).

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. A hemolízist 5% juhvért tartalmazó agaron végezték, egyéjszakás, 37°C-on történő inkubációt követően kialakuló hemolitikus zóna alapján állapítottuk meg. Az antibiotikum rezisztenciát standard korong diffúziós módszerrel határoztuk meg a következő antibiotikumokra: sztreptomycin, gentamicin, klóramfenikol, nalidixsav, enrofloxacin, ampicillin, tetraciklin és kotrimoxazol.

***In vitro* adhéziós tesztek**

Az összes *eae*⁺ *E. coli* törzs fenotípusos jellemzése az *in vitro* sejtheadhéziós tesztet is magába foglalta. Pozitív kontrollként egy sertés eredetű (PEPEC 86-1390), valamint egy emberből izolált EPEC (E2348/69) törzset használtunk; negatív kontrollként pedig két *eae*-negatív béleredetű vad és a C600 K12 törzset alkalmaztuk. A HeLa és PK15 (sertés vese sejtvonal) sejteket 5 ml-es mini petricsészében 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). Az így előkészített sejttenyészetekhez 50 µl 18 órás, stationer, TSB-be oltott baktériumtenyészetet adtunk, majd 5% CO₂-ot tartalmazó termosztátban, 1 illetve 6 órán át 37°C-on inkubáltuk. Az adhézió leállítására 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. Szelektált esetekben a PK15 sejtek és a baktériumok kapcsolatának vizsgálatára transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk.

Lekötött csípőbél-kacsok fertőzése

Tizenhét baktériumtörzs vizsgálata céljából összesen 47 állatot operáltunk, melyekben összesen 381 bélkacsot fertőztünk. Az állatokon a műtéti előkészítést diazepam (1 mg/ttkg), xylazin (4 mg/ttkg) és ketamin (2 mg/ttkg) injekciókkal végeztünk. A műtét, teljes analgészia 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) 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.

Szövettani, immunfluoreszcenciás és elektronmikroszkópos vizsgálatok

Az immunfluoreszcenciás vizsgálatokhoz a metilcellulózból (Cryomatrix, ThermoShandon) ágyazott csípőbél mintákból Cryostat (1800 Leica) készülékkel 4 μ m vékonyságú metszeteket vágunk. Metanolos fixálást követően a metszeteket 1:50 hígítású, 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. A hematoxilin-eozinnal festett metszeten a bélnyálkahártyához kötődött baktériumokat valamint a mikrobolyhok jellegzetes „szakadozottságát” vizsgáltuk. Elektronmikroszkópos vizsgálatokra a mintákat 10%-os pufferolt formalinnal fixáltuk, majd beágyazás és metszés után Hitachi H7100 típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

A baktérium és a kefeszegély közötti adhézio 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 forgatással 37°C-on 15 percig inkubáljuk, majd 1500 rpm fordulaton, 5 percig üleptjük. 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 patogén) törzset használjuk.

Eredmények

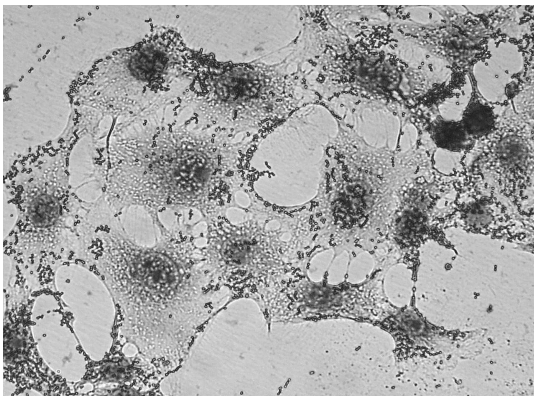
Választott malacokból izolált EPEC törzsek előfordulása, sero- és genotípusa

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. 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. Statisztikai analízis során a hasmenéses illetve egészséges malacokban előforduló *eae*⁺ izolátumok gyakoriságát illetően szignifikáns különbséget megállapítani nem tudtunk. Az intesztinális törzsek domináns serotípusa az O123:H11 (40%) volt, míg a bélsárból származó törzsek között az O108:H9 serotípus 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. Egyik törzs sem hordozta 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 (*stx*, *stb*, *lt*, *f4*, *f5*, *f18*, *stx1*, *stx2*) jellemző virulenciagéneket.. valamennyi törzs mindhárom LEE

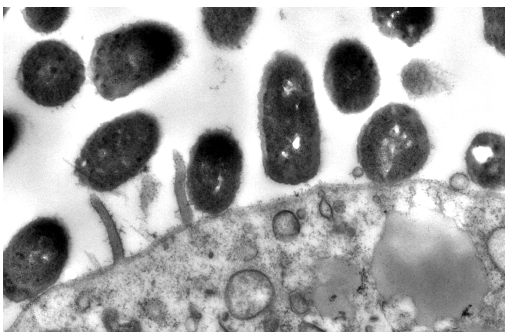
próbával (A, B és D) pozitív eredményt adott. Ez – az intiminre irányuló PCR vizsgálatok eredményeit is figyelembe véve – azt mutatja, hogy a kollekció minden tagja a LEE lókuszt valamennyi régiójával (A, B, C, D) rendelkezik. Genotípusos vizsgálatok alapján a törzsgyűjtemény valamennyi tagja az atipikus EPEC csoportba tartozik.

***In vitro* adhéziós vizsgálatok**

6 órás inkubációt követően csak három törzs mutatott adhéziót HeLa sejteken. Ezzel szemben a PK15 sejteken 6 bél eredetű és 2 bélsár eredetű *eae*⁺ törzs (minden esetben hasmenéses állatokból származtak) erős diffúz tapadást mutatott. További 12 törzs szintén tapadt PK15 sejtenyészeten, 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. A PK15 sejtek membránjához tapadt törzsek ultrastrukturálisan szoros adhéziót mutattak (1., 2. kép).



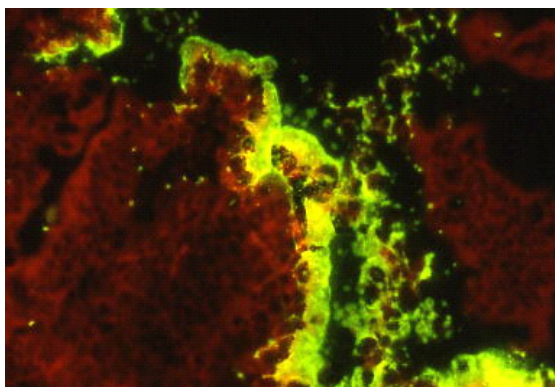
1. kép A #22 sz. törzssel (O123:H11, *eae*- β , *paa*⁻) fertőzött PK15 sejtek (6 órás inkubáció, Giemsa). A baktériumok nagy számban tapadnak a sejtekhez.



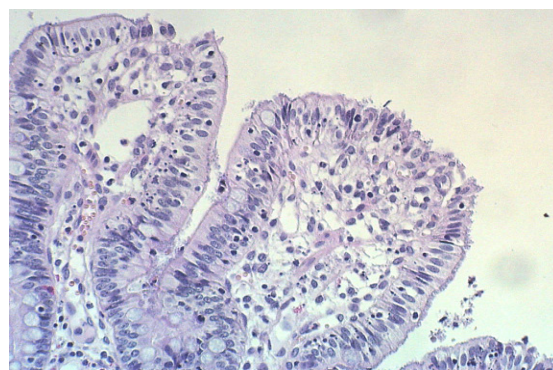
2. kép Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel a PK15 sejtek felületéhez tapadt baktériumokról (#22 sz. törzs tapadása).

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 a vékonybél mely szegmense megfelelőbb a további vizsgálatokra. Ehhez a kísérlethez két kanadai (86-1390, P01-F103) és 2 magyar (#5 és #27) EPEC törzset választottunk ki. 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. Ezen vizsgálatok alapján, az általunk izolált és jellemzett bélnyálkahártya- (#5, #10, #17, #27, #31) illetve bélsár- (#42, #60, #72, #75) eredetű atipikus sertés EPEC törzseket teszteltük. 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 hematoxin-eozinos metszeteken kimutatható volt (3., 4. kép). Az itt vizsgált jól tapadó törzsek nagy részére jellemző, hogy O45 szerotípussal illetve β -típusú intiminnel rendelkeznek, mely in vitro expresszióját az anti- β -intimin savóval végzett indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálattal is igazoltuk.



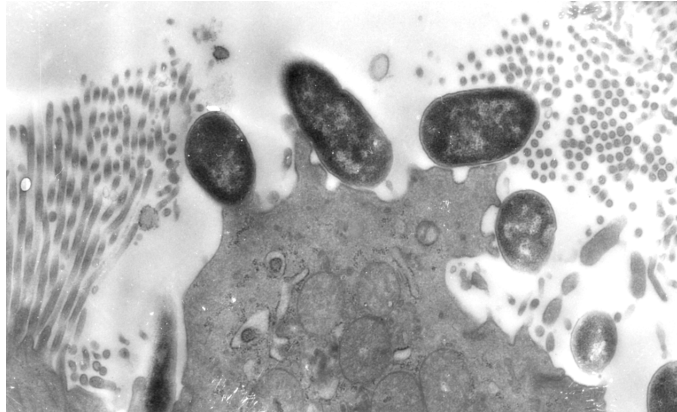
3. kép #17. sz. törzssel fertőzött bélkacs. Fluoreszcenciás tapadás a csípőbélben.



4. kép Hematoxin-eozinnal festett szövettani készítmény a 1390-es baktériummal fertőzött bélkacsból.

A nemzetközi sertés EPEC referenciatörzs (86-1390: O45, eae- β) mellett további kanadai EPEC törzseket is vizsgáltunk. Ezen kívül három humán O157:H7 EHEC törzset is tanulmányoztunk lekötött csípőbélkacsokban (2409-es, 7785 és EDL933 jelzésű törzsek). A γ -intiminnel rendelkező emberi eredetű EHEC törzsek AE léziót okozó tapadása jóval ritkábban és kisebb plakkokban volt kimutatható mint a 86-1390-es kanadai sertés EPEC törzsé. A bélhámsejtek mikrobolyhainak és a sejtmembránnak jellegzetes elváltozását, valamint a vizsgált EPEC baktériumoknak tapadását (AE lézió) az elektronmikroszkópos vizsgálatok is

bizonyították. A baktériumok szorosan tapadtak a bélhámsejtek membránjához, a tapadási helyek szomszédságában jellegzetesen megnyújtották a mikrobolyhokat és voltak olyan területek, ahol teljesen lepusztították azokat. Emellett a bélhámsejteknek a tapadási helyen képződő talpszerű alakzatát (pedestal) is sikerült kimutatni (5. kép).



5. kép Az EPEC baktériumok szoros tapadásának hatására a bélhámsejt magas emelvények (pedestal) képzéssel válaszol (1390-es baktériummal fertőzött bélkacs (O45, *eae-β*).

A többnyire *eae-α* típusú intimint termelő humán EPEC törzsek az életkor előrehaladtával egyre csökkenő kórtani jelentőségűek. Ezért indokoltnak tartottuk megvizsgálni, hogy vajon a 4 hetesnél fiatalabb malacok csípőbelében (1 és 2 hetes) a sertés EPEC törzsek mutatnak-e a kor előrehaladtával csökkenő pathogenitást. Az adatokból 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.

Tekintettel az általunk észlelt tendenciára, miszerint az *eae-γ* típusú törzsek gyakorisága a bélsárban szignifikánsan magasabb volt mint a bélben, fölmerült a kérdés, hogy vajon ez az elkülönítési tendencia a csípőbél és a remesebél vonatkozásában bizonyítható-e. A kérdés vizsgálatára egy 4 hetes malacot áldoztunk, melynek csípő- és remesebelében az *eae-β* és az *eae-γ* törzs számára 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. A csípőbéli tapadás tekintetében az *eae-β* és az *eae-γ* típusú törzsek között lényeges különbség volt: a csípőbélben – a korábbi

eredményekhez hasonlóan – az *eae-β* típusú törzs szignifikánsan jobb tapadási értékeket mutatott.

A vékonybél kefeszegélyeken, az *in vivo* kísérletekkel párhuzamosan elvégzett, *in vitro* adhézios 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 adhezinjei az *in vitro* rendszerben nem fejeződtek ki, vagy esetleg ilyenekkel a vizsgált törzseink nem is rendelkeznek.

Perorális kísérletek eredményei

Három kísérletben, ahol egyáltalán nem alkalmaztunk hajlamosító tényezőket, hasmenés nem jelentkezett. Ennek ellenére két másik kísérletben, ahol szintén nem szerepelt hajlamosító tényező, a hasmenéses állatok száma magas volt. Ezekben az esetekben a bélsáramponokból hemolizáló *E. coli* baktériumokat izoláltunk, amelyek F18 és 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.

A kísérletek alatt elhullott állatokból a fertőzéshez használt egyik *E. coli* törzset sem tudtuk a béltartalomtól izolálni. A kórbonctani tünetek között szerepelt pneumonia, tüdőoedema, májelfajulás.

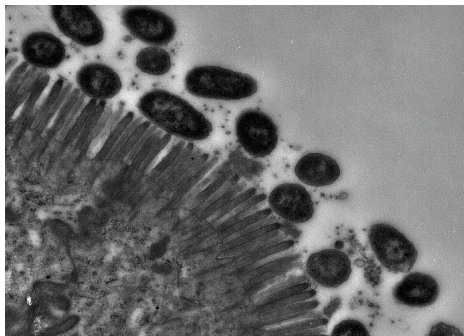
Ahol a takarmány emelt szójakoncentrációt tartalmazott, 16 állatból 10 állatnál volt hasmenés (5 a kontroll, míg 5 állat a fertőzési csoportokból). Az ileumból és a mesenteriális nyirokcsomókból kinőtt hemolizáló *E. coli* telepek F18 és K88 (F4) ellen termelt szérummal is agglutináltak. Ezen kísérlet során egy állatból származó vakbélben láttunk tapadást, mely állat viszont a kontroll csoportból származott.

A 2134 ETEC törzset illetve a TGE vírust, mint hajlamosító faktort alkalmaztuk az állatok EPEC fertőzésének kialakításához. Ennek ellenére a szövettani metszeteken AE léziót nem

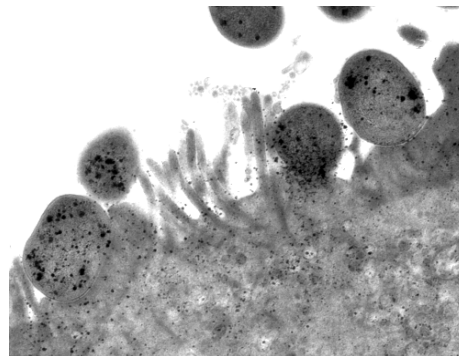
tudtuk megállapítani, de ugyancsak elmaradt az ETEC által előidézhető baktérium kolonizáció és hasmenés is.

A fumonizin B₁ és a 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.

Egy kísérletben, ahol szintén emelt szójatartalmú takarmányt etettünk, hasmenést egyáltalán nem figyeltünk meg. Ennek ellenére két állat csípőbeléből 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 csípőbelben 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 tudtuk megállapítani. Ez utóbbi kontroll csoportbeli AE lézió olyan malacok vakbelében is megjelent, melyek csípőbelében egyidejűleg ETEC fertőzést mutattunk ki (6., 7. kép).



6. kép Spontán ETEC fertőzés a csípőbelben (kontroll csoport) Az ETEC baktériumok az ép mikrobolyhokhoz tapadnak.



7. kép EPEC fertőzés a vakbélben. (kontroll csoport) Tipikus AE lézió.

Következtetések, Új tudományos eredmények

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 vastagbeléből izolált törzsek 85%-a β típusú intiminnel rendelkezik, míg a bélsár eredetű törzseknek 53%-a β -, 23%-a γ - intimin típusú.

3. Az *eae*⁺ *E. coli* törzsek több mint fele tapadt a PK15 (sertésvese) sejtekhez, míg a HeLa (humán epithelium) sejtekhez nem tapadtak. Az adhézió ultrastruktúrája szoros (intimin típusú) tapadásra utalt, emelvény (pedestal) formálódás nélkül, mely utóbbi megfigyelést a tapadás helyén észlelhető aktin akkumuláció hiánya is alátámasztott.

4. 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) kevésbé jól tapadtak és idéztek elő jellegzetes AE léziót. E tekintetben a két intimin csoport képviselői fiatalabb (1 és 2 hetes) malacokban is a fenti különbséget mutatták, anélkül, hogy a korrallal egyenes arányban csökkenő fogékonyságot határozottan ki lehetett volna mutatni. Az fenti modellben végzett elővizsgálat (egy-egy *eae*- β és *eae*- γ típusú törzs csípőbél- és remesébél kacsokban) alapján, a remesében - intimin típustól függetlenül – igen csekély tapadást és bélboholy károsodást lehetett kimutatni, míg a csípőbél a már ismertett különbséget mutatta.

5. A járványtani (case control) adatok, az izolált atipikus EPEC törzsek pathogenitását – az eddigi irodalmi feltételezésekkel ellentétben – kétségbe vonták. A közvetlen kórokozó hatást a 4-5 hetes választási malacokon végzett orális fertőzési kísérletek eredményei sem igazolták.

6. Egyes társfertőzések (pl. ETEC) és dietetikus hajlamosító tényezők (pl. magas szójatartalmú takarmány) együttese azonban mind a kísérletes EPEC fertőzést, mind a látns természetes fertőzöttséget aktiválni tudta, mely tényezők közül a dietetikus hajlamosítás látszott hatékonyabbnak.

Tudományos publikációk

Tóth I., Schmidt H., Dow M., **Malik A.**, Oswald E., Nagy B.: 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. 2003., 69, 7242-7.

Mohamed A. Dow, István Tóth, Pavel Alexa, Michael Davies, **Anna Malik**, Eric Oswald, Béla Nagy: 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., 2005., 43, 1366-71

Anna Malik, István Tóth, Lothar Beutin, Herbert Schmidt, Bernard Taminiau, Mohamed A. Dow, Stefano Morabito, Eric Oswald, Jacques Mainil, Béla Nagy: Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of *eae*⁺ *Escherichia coli* from weaned pigs

Vet. Microbiol., elfogadva: 2005. (nyomtatás alatt)

Dow, M.A., Tóth, I., **Malik, A.**, Herpay, M., Nógrády, N., Ghenghesh, K.S., Nagy, B. 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., 2006. (nyomtatás alatt). IF: 1,015

Proceeding

Anna Malik, István Tóth, Lothar Beutin, Herbert Schmidt, Béla Nagy: New serotypes and intimin types of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from diarrhoeal and non-diarrhoeal weaned pigs

BlaHa, 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.

István Tóth, Herbert Schmidt, Mohamed A. Dow, **Anna Malik**, Eric Oswald, Béla 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 Anna, Tóth István, Lothar Beutin, Nagy Béla: 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 Anna, Nagy Béla: Bélmikroboholy-károsodást okozó *Escherichia coli* (AEEC) baktériumok sertés bélkacs modellben

Akadémiai beszámoló (2003), Bakteriológia szekció, Előadás

Malik Anna, Tóth István, Nagy Béla: Bélmikroboholy-károsodást okozó *Escherichia coli* (AEEC) baktériumok választott sertésekben

Akadémiai beszámoló (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

Anna Malik, Béla Nagy: *E. coli* O157:H7 in ligated intestinal loops of weaned pigs.

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

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

Malik Anna: Bélmikroboholy-károsodást okozó *Escherichia coli* baktériumok (AEEC) sertésben.

Sertés egészségügyi Konferencia, Stefánia Palota (2004. szept.), Előadás

Anna Malik, István Tóth, Lothar Beutin, Hervert Schmidt, Stefano Morabito, Jacques Mainil, Béla 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 legmesszebbmenőig 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 és a molekuláris biológiai módszerek elsajátításában segített.

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.

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

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

Külön köszönöm az Országos Állategészségügyi Intézet Kórszövettani Osztályának munkáját, valamint a Virologiai Osztályon dolgozó asszisztensnők, Kovács Imréné és Kottász Tamásné, sokévi munkáját.

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