

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Baromfi eredetű enteropatogén *Escherichia coli*
(EPEC) törzsek epidemiológiája, antibiotikum
rezisztenciája és virulencia profilja.**

Dr. Adorján András

Témavezető: Dr. Tóth István
Társtémavezető: Dr. Könyves László



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2022

Bevezetés

Az *E. coli* egy széles körben előforduló többnyire kommenzalista baktérium, amely a normál bélflóra részeként részt vesz annak harmonikus egyensúlyának fenntartásában. Azonban léteznek patogén *E. coli* törzsek is, amelyek mind az emberben, mind az állatokban fertőzéseket tudnak létrehozni.

A fertőzés kialakulásának helye szerint az *E. coli* törzsek két nagy csoportba oszthatók, úgymint extraintesztinális és intesztinális törzsek, amelyekben belül további alcsoportok léteznek. Az extraintesztinális *E. coli* törzsek agyhártyagyulladás és vérfertőzéssel (meningitis-associated *E. coli*, MNEC), valamint húgyúti fertőzéssel járó (uropathogenic *E. coli*, UPEC) és madárpatógén *E. coli* (avian pathogenic *E. coli*, APEC) törzsekre, az intesztinális *E. coli* törzsek pedig enteropatógén *E. coli* (enteropathogenic *E. coli*, EPEC), enterohemorragiás *E. coli* (enterohaemorrhagic *E. coli*, EHEC), enterotoxikus *E. coli* (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), enteroaggregatív *E. coli* (enteroaggregative *E. coli*, EAEC), enteroinvazív *E. coli* (enteroinvasive *E. coli*, EIEC), diffúzan tapadó *E. coli* (diffusely adherent *E. coli*, DAEC) és tapadó-invazív *E. coli* (adherent-invasive *E. coli*, AIEC) törzsekre osztható.

Állatorvosi szempontból az intesztinális patogén *E. coli* törzsek esetében, az emberben okozott elváltozások alapján beazonosított EPEC, EHEC, ETEC, EAEC, EIEC patotípusoknak van, illetve lehet megbetegítő szerepe. Az utóbbi évek kutatásainak eredményeképp a fenti, elsősorban humán enterális *E. coli* patotípusok mindegyikének a baromfiban való előfordulásáról is több kevesebb adat került napvilágra (Alonso és mtsai., 2011; Dorigerae és mtsai., 2016; Krause és mtsai., 2005; Lee és mtsai., 2009; Wang és mtsai., 2017).

Élelmiszer előállítás céljából tartott baromfifajok esetében ezen enterális patogén *E. coli* patotípusok akár potenciális vagy valódi zoonotikus kórokozóként, közegészségügyi veszélyeket is jelenthetnek. Ezek közül is külön kiemelendők az EPEC törzsek, amelyeket első human enterális kórokozóként írtak le az úgynevezett csecsemő diszpepsiát okozó *E. coli*-ként (Neter, 1965). Az említett EPEC törzsek közeli rokonságban állnak az EHEC törzsekkel, amelyek fontos zoonotikus törzseknek számítanak. Ugyanis az EHEC törzsek az EPEC törzsekből jöhettek létre

az stx toxin géneket hordozó bakteriofágok felvételével (Tóth és mtsai., 2003). Ezért ezen törzsek elkülönítése mindenképpen fontos egymástól a lehetséges következmények mérlegelése szempontjából.

Az EPEC törzsek között további változatok fordulnak elő, amely a patomechanizmusban fontos szerepet játszó, ún. köteggépző pilus (BFP) termelődéssel van összefüggésben. Így megkülönböztetünk tipikus EPEC (tEPEC) törzseket, amelyek képesek a köteggépző pilust termelni és atipikus EPEC (aEPEC) törzseket, amelyekből ezen tulajdonság hiányzik és így más adhezinek segítségével jön létre a sejt, baktérium kapcsolat. A tEPEC törzsek elsősorban emberben és nyulakban fordulnak elő. Ellenben az aEPEC törzsek széles körben előfordulnak, így emberben is, és lehetnek megbetegedések forrásai mind emberben, mind állatokban. Az elmúlt évtizedek során a tEPEC okozta emberi megbetegedések számának csökkenése és a helyette megjelenő növekvő számú aEPEC okozta hasmenéses bántalmaknak, nem csak a fejlődő, hanem a fejlett világban is fontos emberi kórokozójává vált.

Az aEPEC törzseket számos állatfajban vizsgálatnak vetették már alá. Így társállatok közül macskában és kutyában több kutatási eredmény alapján összefüggést tudtak találni az aEPEC fertőzés és a hasmenéses esetek kimenetele között ezekben az állatfajokban. Továbbá az emberi fertőzések lehetséges forrásaiként is számba veszik ezeket az állatfajokat, amit a két faj (ember és állat) közötti szoros fizikai kontaktus még jobban elősegít.

A haszonállatokban végzett kutatások alapján bárányokban is gyakran izolálhatók az aEPEC törzsek, amelyek előfordulása az életkor előrehaladásával csökken. A bárányokban nagy gyakorisággal fordulhatnak elő EHEC-szerű törzsek is, amelyek létrejöhetnek egyes aEPEC törzsek Shiga toxint hordozó bakteriofágok felvételével. Ennek gyakorlati lehetőségét magyar kutatócsoport is kísérletesen bizonyította (Tóth és mtsai., 2003). A sertések hasmenéses eseteiből is gyakran kimutathatók speciális adhezineket hordozó aEPEC törzsek, amelyek hajlamosító tényezők mellett fokozottabban fordulhatnak elő magyar vizsgálatok alapján is (Malik és mtsai., 2006; Malik és mtsai., 2012).

A baromfiban végzett kutatások is hasonló eredménnyel jártak világszerte. Ennek megfelelően gyakori és változatos aEPEC törzsek előfordulását mutatták be, aminek fontos szerepe lehet a virulencia és antibiotikum rezisztencia gének hordozásában és továbbadásában is (Szmolka és mtsai., 2012; Malik és mtsai., 2017).

Célkitűzések

Az állatokban előforduló EPEC és főként aEPEC törzsek magyarországi gyakoriságát illetően kevés adattal rendelkezünk. Baromfifélék esetében pedig elmondható, hogy kutatásunkat megelőzően ilyen irányú vizsgálatok vagy adatok nem voltak.

Ezért célul tűztük ki, hogy a főbb haszonállatként tartott baromfifélék (házi tyúk, pulyka, kacska, lúd, galamb) esetében megvizsgáljuk az előforduló enterális *E. coli* patotípusokat, hogy a kapott eredményeink alapján további megállapításokkal gyarapítsuk a baromfival kapcsolatos ismereteket.

Így az alábbi célokat tűztük ki a PhD munkám során:

1. A házi tyúk esetében megvizsgálni, adatot gyűjteni a hordozott *E. coli* patotípusokról saját gyűjtésű mintákon és referencia törzsgyűjteményen.
2. A feltételezhetően enterális patogén *E. coli* törzsek fenotípusát (antibiotikum rezisztenciáját és szerocsoportját), valamint filogenetikai hovatartozását meghatározni.
3. Az azonosított potenciális kórokozók rezisztencia vizsgálatával célunk volt meghatározni a törzsek antibiotikum rezisztencia hordozását és elterjedtségét.
4. Az öt leggyakrabban tartott baromfi faj esetében összehasonlító vizsgálatot végezni a hordozott enterális *E. coli* patotípusokkal kapcsolatosan, külön hangsúlyt fektetve az esetleges életkori különbségekre.

Elsőként brojlercsirke kapcsán végeztünk vizsgálatot, aminek során multirezisztens aEPEC törzseket izoláltunk elsőként Magyarországon brojlerekből.

Ezt követően a további öt baromfi faj esetében végeztünk összehasonlítást, különös hangsúllyal az életkori eltérésekre, aminek eredményeképpen megtehettük az első aEPEC leírását ludakból, valamint az első hazai aEPEC leírását pulykából és galambból.

Anyagok és módszerek

Vágóhidakról (brojler, pulyka, kacsa, lúd) a vágott állatok vakbeléből és testfelületéről (brojlereknél) steril tampon mintákat gyűjtöttünk, valamint a Nébih-ÁDI baromfi osztályán az elhullott baromfik vakbeléből szintén tampon mintákat vettünk. Élő baromfik esetében kloáka tampon mintákat készítettünk. Továbbá a Nébih-ÁDI baromfi *E. coli* törzsgyűjteményét is bevontuk vizsgálatunkba.

A tampon mintákból táptalaj (brómtimolkék és MacConkey) felületén baktérium izolálást végeztünk. Amelyekből egy laktóz pozitív telepet tovább oltva törzstenyészetet állítottunk elő. Az izolált baktériumokat MALDI-TOF módszerrel, illetve biokémiai tesztekkel *E. coli* törzseknek azonosítottunk be.

A feltehetőleg patogén *E. coli* törzsek esetében a szerotipizálást a Nemzeti Népegészségügyi Központban végeztük el O és H antigén specifikus savókkal végzett agglutinációs próbákkal.

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatokat a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) előírásai alapján végeztük el Mueller-Hinton táptalaj felületén, amelynek során 15 féle antibiotikum elleni rezisztenciát vizsgáltunk meg. A transzferábilis kolisztin rezisztencia gén jelenlétét molekuláris genetikai módszerrel az *mcr-1* génre leírt primerrel végeztük el.

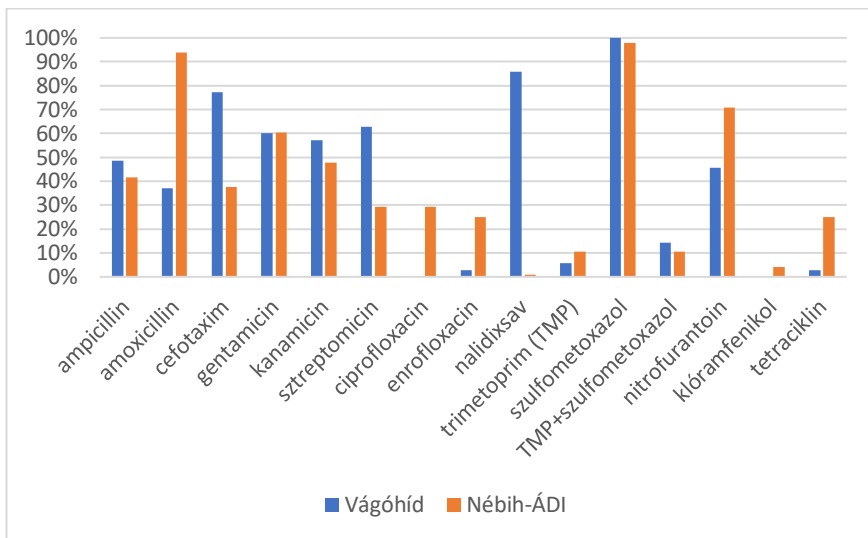
Az izolátumainkban fellelhető intesztinális patogén *E. coli* törzsekre jellemző virulencia géneket, a törzsek filogenetikai besorolását és a patogén törzsek további jellemzését PCR segítségével hajtottuk végre.

Az eredmények statisztikai elemzésére a 95%-os konfidencia intervallum és várt gyakoriság meghatározást, Fisher-egzakt tesztet és ANOVA-t alkalmaztunk.

Eredmények

Munkánk során csak az EPEC törzsekre jellemző *eae* (intimint kódoló) virulencia gént sikerült kimutatni. Más intesztinális patotípusra jellemző virulencia gén nem fordult elő a vizsgált törzsek között. Az EPEC törzsek vizsgálatai alapján elmondható, hogy mindegyik törzs atipikus EPEC (aEPEC) törzsnek bizonyult, az EAF plazmid és az azon kódoló *bfpA* (köteggépző pilust kódolja) gén hiánya alapján. Ellenben mindegyik aEPEC törzs tartalmazta a patomechanizmusban fontos *tir* (translocated intimin receptor) fehérjét kódoló génszakaszt. Az *mcr-1* gént és így a transzferábilis rezisztencia gén hordozását nem mutattuk ki egyik mintában sem.

A brojlerek esetében kimagasló gyakorisággal voltak kimutathatók az aEPEC törzsek mind a vágóhídi (28% - 35 aEPEC) és a Nébih-ÁDI (30% - 48 aEPEC) törzsgyűjteményében is. A B2 filogenetikai csoport nagy számban képviseltette magát az aEPEC törzsek (25,5%) esetében, ellentétben a nem EPEC törzsekkel (2,5%), amely Fisher-egzakt teszttel szignifikáns eltérésnek bizonyult. A brojlerekből izolált aEPEC törzsek szerocsoportjai eltérőek voltak az állományok között (O108 és O14), azonban egy állomány belül egységesnek volt mondható. Az antibiotikum rezisztencia a vágóhídi minták esetében 15, a Nébih-ÁDI törzsgyűjteménye esetében 41 rezisztencia mintázatot mutatott és 94% (vágóhíd) illetve 98%-a (Nébih-ÁDI) az aEPEC törzseknek multirezisztens volt. Az antibiotikumok széles körére volt kimutatható rezisztencia, amely akár 100%-os is lehetett. (1. Ábra)



1. Ábra Antibiotikum rezisztencia gyakoriságok a vágóhídon és a Nébih-ÁDI által gyűjtött mintákból származó aEPEC törzsek esetében.

A brojlereken kívül végzett mintagyűjtés során összesen 7 aEPEC törzs jelenlétét sikerült kimutatni a 319 mintában. Az így gyűjtött izolátumok eltérő életkorú és hasznosítású baromfikból származtak vágóhidakról, háztáji állományokból és elhullott állatokból. (1. táblázat)

1. táblázat Gyűjtött minták és eae (intimin) pozitív törzsek életkori és faji megoszlása.

	Életkor	Galamb	H. tyúk*	Kacsa	Lúd	Pulyka	Összesen
Nébih-ÁDI	0-1 hetes		14	27			41
	1-6 hetes			4	26	*2/4	34
	7-16 hetes				13		13
	15 hetes			4			4
	17 hetes-6 hónapos				3		3
	6 hónapos	*1/1					1
	6-12 hónapos				11		11
	1 év feletti		15	1			16
Összesen		1	29	36	53	4	123
Háztáji	Életkor	Galamb	H. tyúk*	Kacsa	Lúd	Pulyka	Összesen
	Fióka	*2/12					12
	3-4 hónapos	8					8
	6 hónapos	4					4
	2-3 éves	10	13				23
Összesen	34	13				47	
Vágóhid	Életkor	Galamb	H. tyúk*	Kacsa	Lúd	Pulyka	Összesen
	14 hetes			51			51
	16 hetes				*2/48		48
	20 hetes					50	50
Összesen			51	48	50	149	
Összegzés		35	42	87	101	54	319

*n/n= eae (intimin) pozitív minták/összes minta

H. tyúk* = Házi tyúk (*Gallus gallus domesticus*)

A pulykából, lúdból és galambból kimutatott 7 aEPEC törzzsel kapcsolatos tudnivalókat, szerotípusukat és antibiotikum rezisztencia mintázatukat a 2. táblázatban összesítettük.

2. Táblázat Az izolált aEPEC törzseink eredete, filogenetikai és szerocsoportjaik, valamint antibiotikum rezisztencia mintázatuk.

Állatfaj	Életkor	ECOR	Szerotípus	Antibiotikum rezisztencia mintázat
Pulyka	4 hetes	B1	O NT : NM	AMC, AMP, CHL, CIP, ENR, FOX, KAN, NAL, NIT, SMX, STR, SXT, TET, TMP
Pulyka	4 hetes	F	O76 : NM	AMC, AMP, CHL, CIP, ENR, NAL, SMX, STR, SXT, TET, TMP
Lúd	16 hetes	B2	O145 : H SP	AMC, AMP, NAL, NIT, SMX, STR, SXT, TET, TMP
Lúd	16 hetes	B2	O145 : H SP	AMC, AMP, CIP, ENR, NAL, NIT, SMX, STR, SXT, TET, TMP
Galamb	fióka	B1	O109 : H21	AMP, NIT, SMX
Galamb	fióka	B1	O109 : H21	AMC, SMX
Galamb	6 hónapos	B1	O NT : H35	AMC, AMP, SMX, STR

Rövidítések: ECOR (filogenetikai csoport); szerotípus: NT (Not typable/nem tipizálható), NM (nem mozgó), SP (spontán agglutináció); AMC (amoxicillin-klavulánsav), AMP (ampicillin), CHL (klóramfenikol), CIP (ciprofloxacín), ENR (enrofloxacin), FOX (cefoxitin), KAN (kanamicin), NAL (nalidixsav), NIT (nitrofurantoin), SMX (szulfometoxazol), STR (sztreptomicin), SXT (szulfometoxazol+trimetoprim), TET (tetraciklin), TMP (trimetoprim)

Megbeszélés

A jelen munkánkat megelőzően magyarországi adatok nem léteztek a baromfi aEPEC hordozása kapcsán, amelyet széles körben és nagy gyakorisággal sikerült munkánk során kimutatni brojlerekben és a rendelkezésünkre álló reprezentatív baromfi *E. coli* törzs gyűjteményen belül is. A kutatásunk megerősítette, hogy ezen törzsek nagy gyakorisággal hordoznak magukban számos antibiotikum rezisztencia gént is. Az irodalomban aEPEC törzsekkel kapcsolatos információk nem léteztek házi ludakban (*Anser anser domestica*), így nekünk sikerült elsőként ennek a patotípusnak az előfordulását kimutatni és leírni ebben a madárfajban. A pulykában és galambban adatok eddig szintén nem voltak elérhetők az aEPEC törzsekkel kapcsolatosan Magyarországról, amit a jelen munka eredményeképpen szintén be tudtunk mutatni.

A kutatásunk előremutató eredménye volt, annak felvetése a saját eredményeinken alapulva és az irodalmi adatokkal összevetve elsőként, hogy a baromfi fajok esetében az életkornak, valamint tartási körülményeknek, betegségeknek fontos szerepe lehet az aEPEC előfordulási gyakoriságában, annak befolyásolásában.

Bár a munkánk számos új, eddig nem ismert információval, adattal szolgált a tudományos élet számára és ezeket rangos, nemzetközileg is elismert külföldi folyóiratokban sikerült leközzölnünk. Azonban elmondható, hogy vizsgálataink nem lehettek teljeskörűek, az ehhez szükséges technikai és anyagi háttér szűkös volta miatt. Így a továbbiakban a hordozott intimin típusok, valamint az aEPEC törzsek *in vitro* és *in vivo* patogenitásának vizsgálata és az aEPEC törzseink esetleges fajspecifitásának tisztázása további munkákat igényel majd a jövőben.

Ennek ellenére a fentiek alapján reményünket tudjuk kifejezni, hogy az elvégzett és a fentiek szerint ez alapján a jövőben elvégzendő kutatások, jó alapját teremthetnek meg a hazai- és nemzetközi enterális mikrobiológiai kutatásokban való részvételnek. Ezek eredményei az oktatásban (járványtan és élelmiszerbiztonság) is hasznosítható modern tudásanyagként szerepelhetnek.

Új tudományos eredmények

Céljainknak megfelelően kialakítottunk egy 437 izolátumból álló baromfi eredetű *E. coli* törzs gyűjteményt. Elvégeztük a kollektció humán enterális *E. coli* patotípusok virulencia marker géneire való szűrését és nagyszámú aEPEC törzset azonosítottunk.

Ezen törzsek jellemzése során a következő új eredményeket értük el:

1. Magyarországon elsőként azonosítottunk házi tyúkból, pulykából, galambból aEPEC törzseket.
2. A kutatómunkánk során az irodalomban elsőként sikerült aEPEC törzseket ludakból (*Anser anser domestica*) izolálni és jellemezni.
3. Kutatásaink során elsőként sikerült olyan összehasonlító munkát végezni, ami felveti az aEPEC törzsek életkor szerinti előfordulási gyakoriságának eltérését.
4. A brojler EPEC törzsek feltűnően gyakori (25%-os) B2 filogenetikai reprezentációjára elsőként hívtuk fel a nemzetközi figyelmet.
5. Az aEPEC törzsek esetében változatos és nagymértékű antibiotikum rezisztenciát és szerocsoportokat sikerült kimutatnunk.
6. Az eltérő baromfi fajták esetében sikerült bemutatnunk, hogy a gazda állatfaj befolyásolhatja az izolált aEPEC törzsek antibiotikum rezisztenciáját.
7. Az eredményeink alapján a baromfiban leginkább az aEPEC előfordulását tartjuk valószínűnek, egyéb patotípus megjelenése inkább más forrásból történő szennyeződésnek tudható be.

A doktori kutatás eredményeinek közlései

Adorján A, Makrai L, Mag T, Jánosi S, Könyves L, Tóth I (2020) High frequency of multidrug-resistant (MDR) atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) in broilers in Hungary. *Front Vet Sci* 7:511 doi:10.3389/fvets.2020.00511 Tudományosmetria: D1 – Impakt faktor: 3,412

Adorján, A, Makrai, L, Könyves, L, Tóth, I (2021) Enteropatogén *Escherichia coli* (EPEC). Rövid irodalmi összefoglaló. *MÁL* 143(7):429-438 Tudományosmetria: Q4 – Impakt faktor: 0,22

Adorján A, Thuma Á, Könyves L, Tóth I (2021) First isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from geese (*Anser anser domestica*) and first description of atypical EPEC from turkeys and pigeons in Hungary. *BMC Vet Res* 17(1):263 doi:10.1186/s12917-021-02968-w Tudományosmetria: Q1 – Impakt faktor: 2,741

Irodalom

1. Alonso MZ, Padola NL, Parma AE, Lucchesi PMA (2011) Enteropathogenic *Escherichia coli* contamination at different stages of the chicken slaughtering process. *Poult Sci* 90(11):2638-2641 doi:10.3382/ps.2011-01621
2. Doregirae F, Alebouyeh M, Fasaei BN, Charkhkar S, Tajedin E, Zali MR (2016) Isolation of atypical enteropathogenic and shiga toxin encoding *Escherichia coli* strains from poultry in Tehran, Iran. *Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench* 9(1):53-57
3. 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(1-2):87-95 doi:10.1016/j.vetmic.2004.11.012
4. Lee GY, Jang HI, Hwang IG, Rhee MS (2009) Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *Int J Food Microbiol* 134(3):196-200 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.013
5. Malik A, Tóth I, Beutin L, Schmidt H, Taminiu B, Dow MA, Morabito S, Oswald E, Mainil J, Nagy B (2006) Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of *eae+* *Escherichia coli* from weaned pigs. *Vet Microbiol* 114(1-2):82-93 doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.044
6. Malik A, Tóth I, Nagy B (2012) Colonisation of conventional weaned pigs by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and its hazard potential for human health. *Acta Vet Hung* 60(3):297-307 doi:10.1556/AVet.2012.025
7. Neter E (1965) Enteritis due to enteropathogenic *Escherichia coli*. *Amer J Dig Dis* 10:883-890
8. Szmolka A, Anjum MF, La Ragione RM, Kaszanyitzky EJ, Nagy B (2012) Microarray based comparative genotyping of gentamicin resistant *Escherichia coli* strains from food animals and humans. *Vet Microbiol* 156(1-2):110-118 doi:10.1016/j.vetmic.2011.09.030
9. Tóth I, Schmidt H, Dow M, 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(12):7242-7247 doi:10.1128/AEM.69.12.7242-7247.2003
10. Wang L, Nakamura H, Kage-Nakadai E, Hara-Kudo Y, Nishikawa Y (2017) Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. *Int J Food Microbiol* 249:44-52 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.003