

Zárójelentés

az

OTKA/NKFI Hivatal által támogatott, 83332 azonosító
számú

„*Bordetella bronchiseptica* virulencia tényezői és
gazdafaj adaptációja” című kutatásról

Wehmann Enikő
(MTA ATK ÁOTI)

2016

Kitűzött célok

A *Bordetella bronchiseptica* világszerte elterjedt Gram-negatív baktérium, széles gazdaspektruma egyedülálló a *Bordetella* nemzetségen belül. Kiemelkedő szerepe van a sertések torzító orrgyulladásának és a kutyák kennel köhögésének kóroktanában, számos házi és vadon élő állatfaj légúti megbetegedéseiben (pl. macska, nyúl, tengerimalac). A *B. bronchiseptica* fertőzés többnyire nem jár súlyos klinikai tünetekkel vagy nagyarányú elhullásokkal, de tetemes gazdasági veszteségeket okozhat az állattartó telepeknek és a tenyésztőknek. Az egyedileg vagy kis csoportban tartott házi kedvencek fertőződése az egyre gyakoribb emberi megbetegedések miatt válhat fontossá; a megnövekedett humán esetek száma a *B. bronchiseptica* zoonotikus jelentőségére hívja fel a figyelmet.

Munkánk célja különböző gazdafajokból izolált és eltérő földrajzi területekről származó *B. bronchiseptica* törzsek fenotípus- és genotípusjellemzőkkel történő jellemzése volt, különös tekintettel a *B. bronchiseptica* virulencia tényezőinek pontosabb megismerésére és gazdaadaptációra utaló jelek keresésére.

Vizsgálataink nemcsak az alapkutatás számára szolgálhatnak új eredményekkel, de fontosak lehetnek az állattartók igényeit kielégítő gyorsdiagnosztikában és a betegségek elleni célzott kezelésben és a prevencióban is. Eredményeink a humán gyógyászat számára is értékesek lehetnek, mivel a *B. bronchiseptica* a *B. pertussis* (a szamárköhögés kórokozója) modelljeként is használható mikroorganizmus.

Eredmények

Vizsgálatainkban újonnan izolált (206 mintából az azonosítási vizsgálatokat követően 23 sertés, 30 nyúl és 24 kutya eredetű törzset izoláltunk) és az MTA ATK ÁOTI törzsgyűjteményében megtalálható, hazai és külföldi eredetű, különféle gazdafajokból (sertés, kutya, nyúl, macska, tengerimalac, ló, koala, pulyka és ember) származó, összesen 152 db reprezentatív *B. bronchiseptica* törzset használtunk fel.

Fenotípusjellemzőkkel történő vizsgálatok

Biokémiai vizsgálatok. A törzsek biokémiai tulajdonságainak vizsgálata (glükóz-, szacharóz-, laktóz-, urea-, indol- és nitrát-próbában) azok egységességét, az irodalmi adatokkal való egyezőségét mutatta ki. Egyedi különbségeket (8%) csupán a nitrát redukciós próbában tapasztaltunk, de e tulajdonság nem mutatott összefüggést a gazdafajjal.

B. bronchiseptica törzsek hemolizáló képességének vizsgálata. A törzsek hemolitikus tulajdonságainak vizsgálatára 6 különböző összetételű (5 vagy 15%-os juh- vagy lóvéres agar) és pH-jú (6,8 vagy 7,2) táptalajt használtunk fel. Az alacsonyabb pH-jú véres agaron határozottabb β -hemolízist tapasztaltunk, akárcsak a lóvér tartalmú táptalajon a juhvérhez képest. A különböző gazdafajokból származó törzsek közel 90 %-a β -hemolízist mutatott, azonban 40 db kutyából származó törzs (38 hazai és 2 külföldi) esetén azonban nem láttunk feltisztulást semelyik táptalajon.

B. bronchiseptica törzsek hemagglutinációs képességének vizsgálata. A hemagglutinációs vizsgálatokat 9 gazdafajból származó, összesen 79 (hazai és külföldi) *B. bronchiseptica* törzssel végeztük el alvadásban gátolt szarvasmarha-, sertés-, ló-, juh-, kutya- és csirkevér, illetve humán „A”, „B” és „0” vércsoportú vérek felhasználásával. A három eltérő típusú (A, B és 0) humán vérrel kapott reakciók között számottevő különbséget nem találtunk. Legerősebb reakciókat kutya és sertés eredetű

vt-vel adták a baktériumok, a hemagglutináció hiányát szarvasmarha-, ló- és csirkevér mellett tapasztaltuk nagy számban. Szarvasmarha, juh és ló vt-k mellett a törzsek egy része változó hemagglutinációs képességgel rendelkezett.

A baktériumtörzsek antibiotikumokkal szembeni érzékenységének vizsgálata.

Munkánk során Kirby-Bauer korongdiffúziós módszert alkalmaztunk, az eredmények értékelésére a Clinical and Laboratory Standards Institute ajánlott határértékei alapján, a NÉBIH ÁDI által kidolgozott határértékeket vettük figyelembe. Nyúl (n=40) és sertés (n=15) eredetű törzsek elemzésével kimutattuk, hogy a törzsek rezisztensek penicillinre, ceftiofurra, vankomicinre és linkomicinre, de érzékenyek kolisztinre, neomicinre, valamint az alkalmazott quinolonokra. Ampicillinnel és eritromicinnel szemben mindkét gazdafajból származó törzsek esetén változatos eredményeket kaptunk. Tetraciklinre és szulfonamidokra a törzsek többsége érzékenyen reagált, de a nyúl eredetű törzsek 5%-a, a sertés eredetű törzseknek pedig egyharmada szulfonamid-rezisztens volt, és találtunk egy sertés eredetű tetraciklin-rezisztens *B. bronchiseptica* törzset is. A különböző gazdafajból származó törzsek között számottevő különbséget csak neomicin és flumequin antibiotikumokkal szembeni viselkedésükben találtunk. Nyúl eredetű törzseknél az érzékenység aránya rendre 100% és 92,5% volt, viszont a sertésekből izolált törzseknél mindkét antibiotikumra nézve a mérsékelten érzékeny törzsek aránya volt a legmagasabb (67%).

Genotipizáló módszerekkel történő vizsgálatok

A dermonekrotoxin [*dnt*], a flagellin [*flaA*], a fimbria [*fimA*], az adenilát cikláz-hemolizin toxin [*cyaA*] és a peptid transzport protein [*ptp*] adott génszakaszának polimeráz láncreakcióval (PCR) történő vizsgálatára részben a szakirodalomból vett, részben saját tervezésű primereket használtunk fel. A *fimA* gén PCR-RFLP vizsgálatához *HincII* és *SalI* enzimeket, a *flaA* génszakasz hasításához *HincII*, *BglI* és *MspI* endonukleázokat alkalmaztunk. A *cyaA* génszakaszt *NarI* és *SalI*, a *ptp* operont *NarI* és *BglI* enzimek használatával vizsgáltuk. Eredményeinket az 1. táblázatban mutatjuk be. A nukleinsav sorrendek meghatározását négy gén kijelölt szakaszán végeztük el (*fimA*, *flaA*, *cyaA* és *ptp*). A kapott kromatogramokat Chromas LITE 2.01 programmal értékeltük ki, a két irányból leolvasott szekvenciákat a SeqMan – Lasergene 7.1.0. (DNASTAR) programmal illesztettük össze. Az általunk vizsgált törzsek szekvenciáit a GenBank adatbázisában szereplő *B. bronchiseptica* szekvenciákkal hasonlítottuk össze BioEdit 7.1.3.0 és MegAlign – Lasergene 7.1.0. (DNASTAR) programok segítségével. A nukleinsav sorrend és az ebből származtatott aminosav szekvencia távolságokat Clustal W algoritmussal számoltuk ki. Az illesztés eredményeként filogenetikai fát készítettünk, a filogenetikai analízist a MEGA 6.06 szoftver NeighborJoining módszer alkalmazásával hajtottuk végre. Az evolúciós távolságokat JukesCantor korrekciós ráta figyelembevételével számítottuk ki, a törzsfá topológiáját 1000 ismétléses bootstrap analízissel vizsgáltuk.

Dermonekrotoxin. A vizsgálatokba bevont törzsek 97%-ánál kimutattuk a 224 bp hosszúságú DNT-génszakaszt PCR segítségével. Az 5 darab *dnt*-negatív törzs közül 3 humán (5390, Bb VAL és MBORD 675), 1 sertés (PV6), 1 pedig pulyka (MBORD 901) gazdafajból származott.

Fimbria. A *fimA* génre saját tervezésű primereket alkalmazva, PCR segítségével kimutattuk az 549 bp-nyi szakaszt minden vizsgált törzsnél. A PCR-RFLP analízis során az összes törzs – eredetüktől függetlenül –, azonos hasítási mintázatot adott. A

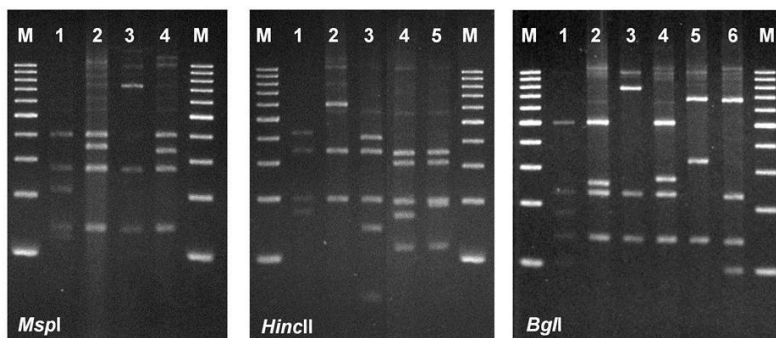
szekvencia elemzéshez 21 törzset választottunk ki, melyeknek 456 bp hosszú *fimA* szakaszát a GenBank adatbázisba KF211375-KF211395 kódszámmal helyeztük el. A 29 saját és génbanki *fimA* szekvencia egymáshoz illesztésekor a páronkénti genetikai távolság nukleotid és aminosav szinten is 0,0% és 3,0% között mozgott, a legnagyobb értéket két humán eredetű törzs (Bb DEL és 5390) között találtuk.

1. táblázat: *Bordetella bronchiseptica* törzsek virulencia génjeivel kapcsolatos vizsgálataink eredménye

Gazdafaj (n)	Eredet (n)	PCR-RFLP típusok (n)			PCR (n)	
		<i>fimA</i>	<i>flaA</i>	<i>cyaA</i>	<i>ptp</i>	<i>dnt</i>
sertés (36)	H(23)	A (23)	B (22); G (1)	A (22); B (1)	– (23)	+ (23); – (1)
	K (13)	A (13)	B (13)	A (13)	– (13)	+ (13)
kutya (47)	H (38)	A (38)	A (38)	– (38)	+ (38)	+ (38)
	K (9)	A (9)	A (5); B (2); D (2)	A (5); B (1); C (1); – (2)	+ (2); – (7)	+ (7)
nyúl (43)	H (37)	A (37)	A (13); B (24)	A (37)	– (37)	+ (37)
	K (6)	A (6)	A (4); B (2)	A (6)	– (6)	+ (6)
tm (6)	H (3)	A (3)	C (3)	A (3)	– (3)	+ (3)
	K (3)	A (3)	C (3)	A (2); D (1)	– (3)	+ (3)
macska (4)	H (2)	A (2)	C (2)	A (2)	– (2)	+ (2)
	K (2)	A (2)	A (1); C (1)	A (2)	– (2)	+ (2)
ló (5)	H (0)	◻	◻	◻	◻	◻
	K (5)	A (5)	A (5)	A (5)	– (5)	+ (5)
koala (2)	H (0)	◻	◻	◻	◻	◻
	K (2)	A (2)	C (2)	A (2)	– (2)	+ (2)
pulyka (2)	H (0)	◻	◻	◻	◻	◻
	K (2)	A (2)	E (1); G (1)	B (1); C (1)	– (2)	+ (1); – (1)
ember (7)	H (1)	A (1)	F (1)	B (1)	– (1)	– (1)
	K (6)	A (6)	A (1); C (1); D (3); H (1)	A (2); B (3); D (1)	– (6)	+ (4); – (2)

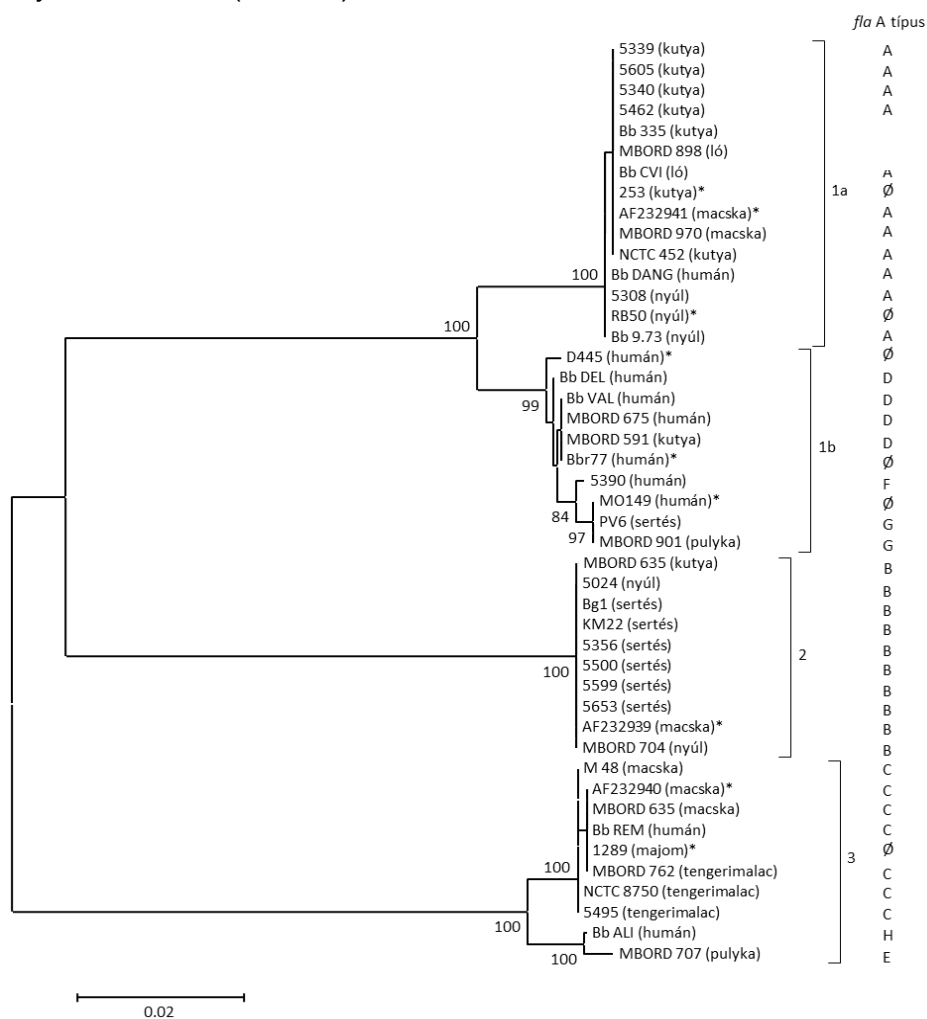
tm: tengerimalac; n= a törzsek darabszáma; H = Magyarország, K = Külföld; +: pozitív reakció; –: negatív reakció; A-H: az egyes géneknél talált hasítási típusok; ◻: nincs adat

Flagellin. A flagellint kódoló *flaA* gén 1165 bp hosszú szakaszát az összes törzsnél kimutattuk. A PCR-RFLP-vel 8 különböző típust (A-tól H-ig) írtunk le. Leggyakoribb hasítási típus az A típus volt (44%), majd a B (41%) és a C (8%), ezeket hazai és külföldi törzseknél is kimutattuk, viszont a D, az E és a H típus kizárólag külföldi törzseknél fordult elő. Az E, az F és a H típust csupán 1-1 törzs reprezentálta, a G típushoz egy külföldi pulyka (MBORD 901) és egy hazai sertés (PV6) eredetű törzs tartozott. Az egyes hasítási típusok hazai törzsek esetén összefüggést mutattak a gazdafajjal; kutya eredetű törzsek A, sertés eredetű törzsek B, macskák és tengerimalacok C típusú mintázatot adtak. Nyúl eredetű törzseknél A és B típust is kimutattunk, a humán törzsek (n=7) viszont változatos RFLP-típussal rendelkeztek (A, C, D, F, H). (1. ábra).



1. ábra: Különböző gazdafajból származó *B. bronchiseptica* törzsek *flaA* génjének PCR-RFLP mintázata. M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); a számok az egyes endonukleázok által kialakított fragmentmintázatokat jelölik, a mintázatok alapján összesen 8 RFLP típust találtunk (A: 1-1-1, B: 2-2-2, C: 3-3-3, D: 1-4-4, E: 3-3-5, F: 1-5-4, G: 4-5-4, H: 3-3-6).

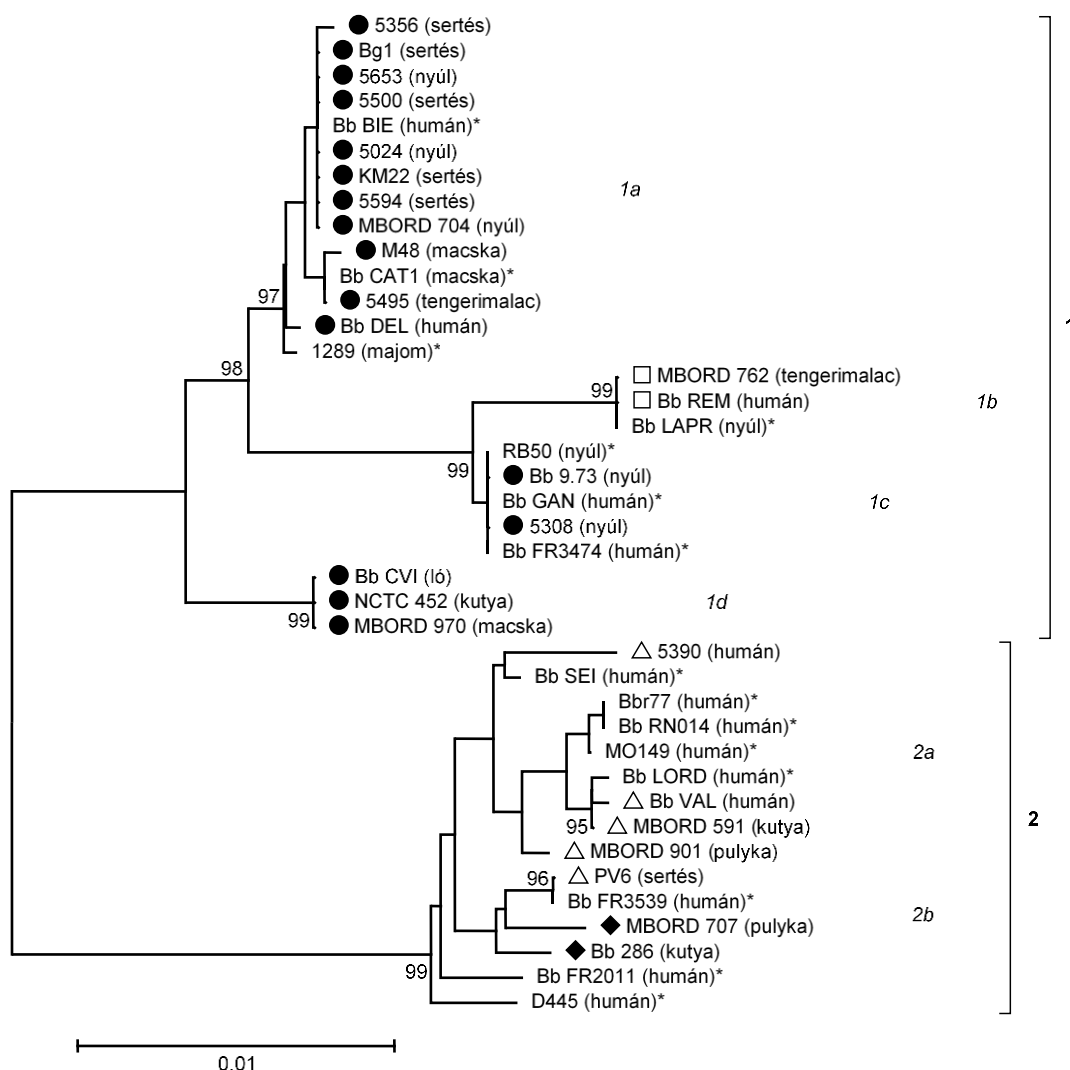
A *flaA* szekvencia elemzéséhez összesen 36 darab törzset választottunk, a szekvenciákat JX673952-JX673981 és KF211396-KF211401 számokon helyeztünk el Génbankba. A *flaA*-gén közbűlső, hipervariábilis régiójában (kb. 500 bp) több nukleotidára kiterjedő szubsztitúciókat, inszerciákat és deléciókat detektáltunk, amelyek aminosav szinten több nem-szinoním változást is létrehozottak. Az egyes szekvenciák közti páronkénti távolság max. 15% volt. A *flaA* gén változatai és a törzsek gazdafaja közötti összefüggés a nukleinsav alapú filogenetikai fán is nyomon követhető, ugyanis a különböző RFLP-típusok (gazdafajok) különböző klaszterekben helyezkednek el (2. ábra).



2. ábra: *B. bronchiseptica* törzsek 1042 bp hosszú *flaA* génszakaszára Neighbor-Joining módszerrel, szerkesztett filogenetikai fa.

A filogenetikai fa csomópontjaiban a 80%-nál magasabb bootstrap értékek láthatók. A fa mellett a törzsek RFLP típusát is feltüntettük. *: ismert RFLP típusú macska eredetű génbanki szekvenciák; Ø: génbanki szekvenciák

Adenilát cikláz-hemolizin. Az adenilát cikláz-hemolizin toxint kódoló *cyaA* gén vizsgálatakor a törzsek 73,5%-ánál (n=112) kimutattuk a saját tervezésű primerekkel a 2151 bp-nyi PCR terméket, de a fennmaradó 40 törzs esetében nem kaptunk specifikus terméket. A *cyaA*-negatív törzsek kivétel nélkül kutya eredetű mintákból származtak, és megegyeztek a nem-hemolizáló törzsekkel. A *cyaA* PCR-RFLP 4 típusba (A, B, C és D) sorolta a törzseket, melyek 90%-a A típusú hasítási mintázatot mutatott. A második leggyakoribb (6%) B típus a humán törzsekre volt jellemző (57%), míg a C és a D típust csak 2-2 külföldi törzs képviselte. A szekvencia meghatározást 25 törzsön végeztük el, ennek eredménye (2007 bp) a Génbankban KF220450-KF220474 adatsorokban érhető el. A nukleotida és a származtatott aminosav szekvenciák páronkénti illesztésekor 0,0% és 3,8% közötti különbségeket találtunk, néhány törzs egyedi hasítási mintázattal rendelkezett. A *cyaA* génszakasz filogenetikai elemzése során két különálló csoportot kaptunk, az 1. csoportba inkább állati, míg a 2. csoportba inkább humán eredetű törzsek kerültek (3. ábra).



3. ábra: *B. bronchiseptica* törzsek 2007 bp *cyaA* szakaszára Neighbor--Joining módszerrel készült filogenetikai fája.

A filogenetikai fa csomópontjaiban a 80%-nál magasabb bootstrap értékek láthatók.

*: génbanki adatok; ●: A hasítási típus; △: B hasítási típus; ◆: C hasítási típus; □: D hasítási típus

Peptid transzport protein. A *ptp* operon vizsgálatakor csupán 40 törzsnél tudtuk kimutatni a keresett 958 bp nagyságú terméket. A *ptp*-pozitív törzsek mindegyike kutya eredetű mintákból származott, és ezek azonosak voltak a *cyaA*-negatív törzsekkel. A *ptp* PCR-RFLP során homogénnek bizonyult a vizsgált törzsek körében. Szekvencia analízisre 3 magyarországi, és a 2 külföldi törzset választottunk ki, GenBank adatbázisába azokat KF220475–KF220479 számmal helyeztük el. Az általunk vizsgált *ptp* szekvenciák teljes mértékben megegyeztek egymással és a génbanki adatbázisban egyedülként elérhető, 253 (HE965806) szekvenciával is.

Teljes vagy részben teljes (contigokból álló ún. draft) genomszekvenciák elemzése

Munkánk kezdetekor egyetlen teljes genomszekvencia (RB50) állt rendelkezésünkre, melyről később kiderült, hogy valójában nem is tekinthető a *B. bronchiseptica* referencia szekvenciájának. Azóta az adatbázis, egy konzorciális kutatás eredményeként, közel 60 ún. draft genomszekvenciával bővült. Mivel az általunk vizsgált gének közül csak a *flaA* és (részben) a *cyaA* hordozott gazdafaj adaptációra utaló jegyeket, és az újabb irodalmi adatokból valószínűsíthető, hogy ezeknek protektív hatásuk önállóan nincs, kutatásainkat genomszekvenciák *in silico* elemzésével folytattuk a MAUVE genome alignment program segítségével. Ezekből az elemzésekből újabb, feltehetően a gazdafajhoz való adaptálódásban kulcsfontosságú gént, géneket szeretnénk volna megtalálni. Azonban újabb, funkcióval is ellátott géneket nem tudtunk bevonni a vizsgálatainkba, mert a „draft” genomszekvenciák (100 vagy afölötti contig-ot tartalmazva) esetében sokszor hiányzott egy adott génről származó fehérjetermék („putative protein”), és azok BLAST-al történő azonosítása sem adott megfelelő találatot. A másik tévedési lehetőség abban rejlett, hogy ha a nukleinsav szekvencia adatok alapján megállapítható volt a származtatott aminosav sorrendje, nem biztos, hogy arról egy aktív fehérjetermék is keletkezik a transzláció folyamán. Éppen ezért célszerű lenne egy esetleges következő projektben a *B. bronchiseptica* törzsek gazdafaj adaptációs vizsgálatait transzkriptum analízisekkel folytatni (*de novo* szekvenálással), annak eldöntésére, hogy léteznek-e különbségek a különböző gazdafajokból származó törzsek mRNS állományai, a gének kifejeződésai között.

Összegzés

A széles gazdaspektrum, melyhez feltehetően a virulencia faktorok (adhezinek és toxinok) is hozzájárulnak, a *Bordetella* nemzetségen belül kizárólag a *B. bronchiseptica* jellemzője. A különböző gazdafajokból, eltérő időszakból és földrajzi területekről származó *B. bronchiseptica* törzsek biokémiai próbákban, néhány kivételtől eltekintve, homogénnek bizonyultak. A hemagglutinációs képességük különböző vérekkel szemben eltérő volt. A hemolízist nem mutató törzsek kizárólag kutya eredetűek voltak. Munkánk során két adhezin (*fimA*, *flaA*), valamint két toxin (*cyaA*, *dnt*) tulajdonságait vizsgáltunk. A *dnt* jelenlétét néhány törzs kivételével kimutattuk a vizsgált törzsek között. A legnagyobb eltéréseket a vizsgált törzsek között a flagellint kódoló génszakasz (*flaA*) elemzésekor mutattuk ki: PCR-RFLP-vel nyolcféle mintázatot kaptunk. A humán törzsek esetében nagyfokú változatosságot tapasztaltunk, ami arra utal, hogy az ember különböző állatfajoktól fertőződhet (zoonózis veszélye). A hazai törzsek közül a sertés (B-típus), kutya (A-típus) és tengerimalac eredetű törzsek (C-típus) tűntek egységesnek, és egy szűkebb földrajzi környezetben a

gazdaadaptáció jegyei felismerhetők voltak. A *flaA* gén hipervariábilis szakaszán az egyes csoportokra jellemző egyedi aminosav mintázatokat mutattunk ki. A *cyaA* gén PCR-RFLP vizsgálatában négy hasítási típust tártunk fel, azonban a gazdafajhoz való kapcsolat nem volt igazolható. Kivételt jelentettek a főképpen kutya és humán eredetű törzsek, melyeknél a *cyaA* gén hiányzott, melynek helyére egy ún. peptid transzportért felelős gén épült be. A fimbriát kódoló génszakasz (*fimA*) PCR-RFLP és szekvencia vizsgálata a törzsek homogenitását mutatta ki.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált virulencia faktorok közül a *flaA* bizonyult legalkalmasabbnak a gazdaadaptáció vizsgálatára. Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy a flagellin nemcsak a mozgásképességhez nélkülözhetetlen a baktérium számára, hanem az adhézió folyamatában is aktívan részt vesz. Módszerünk alkalmas továbbá *B. bronchiseptica* törzsek közötti finomabb differenciálásra, ami segítséget nyújthat epidemiológiai vizsgálatok elvégzéséhez.

Budapest, 2016. február 26.

Wehmann Enikő, témavezető