

## A Pasteurellaceae család egyes emlőspatogén fajainak összehasonlító vizsgálata

A Pasteurellaceae család számos tagja képes az embert és különféle állatfajokat megbetegíteni, és alkalmanként jelentős gazdasági kártétellel járó megbetegedést okozni. Vizsgálataink során a család három, állategészségügyi szempontból kiemelkedően fontos fajának, a *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-nak, a *Histophilus somni*-nak (*Haemophilus somni*-nak) és az *Actinobacillus pleuropneumoniae*-nak az összehasonlító vizsgálatát tűztük ki munkánk céljaként. A *M. haemolytica* törzsek különféle kérődző fajokban és minden korú állatban tüdőgyulladást, szopósbárányban septikaemiát és anyajuhokban tőgygyulladást okoznak. A *H. somni* törzsek borjak tüdőgyulladásában, throboemboliás meningoencephalitisében vagy kosbárányok mellékhere- és heregyulladásában játszanak kórtani szerepet, míg az *A. pleuropneumoniae* törzsek a sertések vérzéses-elhalásos tüdőgyulladását és fibrines mellhártya-gyulladását okozzák. Mindhárom baktériumfaj jelen van az egészséges, tünetmentes állatok légútjainak vagy nemi útjainak nyálkahártyáján, feltételesen kórokozók, az általuk okozott megbetegedés csak hajlamosító körülmények esetén alakul ki. megbetegedést okoznak állatokban.

Vizsgálataink kétirányúak voltak, vizsgáltuk a baktérium szénforrás-hasznosításon alapuló anyagcsere-ujjlenyomatát és a teljes genom makrorestrikciós mintázatát pulzáló mezejű gélelektroforézis (pulsed field gel electrophoresis: PFGE) segítségével.

A törzsek szénforrás-hasznosító képességét a BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM (Biolog Inc. Hayward, Kanada) rendszerével végeztük el. A rendszer 96 lyukú lemezen (GN2/GP2 MICROPLATE™), egy negatív kontroll mellett vizsgálja 95-féle szénforrás hasznosítását és az eredmények alapján anyagcsere-ujjlenyomatot készít a vizsgált baktériumtörzsről. A rendszert sikeresen alkalmazták más állatorvosi patogén baktériumok jellemzésére, de a jelen vizsgálatba vont baktériumfajok tulajdonságainak összehasonlítására még nem használták. A  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolt baktériumtörzseket 10% juhvért tartalmazó egységesített BIOLOG agarból vagy kazein-szója agarból készített csokoládéagar lemezekre oltottuk és a vizsgált baktériumfaj igényeinek megfelelően inkubáltuk. A tenyészetből készített szuszpenzióból, a GN2 MICROPLATE™ 1 negatív kontrollt és 95-féle szénforrást vízmentes formában tartalmazó vájulataiba 150  $\mu\text{l}$ -eket mértünk, majd a lemezeket  $37^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. Az inkubációs idő 16. és 24. órája között a MICROPLATE™ vájulataiban kialakult színváltozás meglétét vagy

hiányát szemmel bíráltuk el, majd a BIOLOG rendszerhez tartozó MicroLog3 (4.20.05) szoftver adatlapjain törzsenként rögzítettük az eredményeket.

A vizsgált baktériumtörzseket hazai szarvasmarha-, juh-, kecske- és sertésállományokban előforduló megbetegedések kapcsán, klinikai tüneteket mutató élő állatokból vagy jellegzetes klinikai tüneteket követően elhullott állatok szerveiből izoláltuk. Összehasonlítási célból a mindhárom vizsgált baktériumfaj esetében típustörzseket is bevontunk a vizsgálatba.

### **Szénforrás-hasznosítás vizsgálata**

#### ***H. somni***

Összesen 100 *H. somni* törzs, ezen belül 60 szarvasmarha-eredetű, 27 juhból származó, 11 kecskéből izolált és 2 típustörzs szénforrás-hasznosítását vizsgáltuk. A BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM a vizsgált törzsek 83%-át fajszinten azonosította, 56%-ban a *H. somni*-t jelölte meg legvalószínűbb fajként, a törzsek további 21%-át második legvalószínűbb fajként azonosította, míg 6%-ban a harmadik helyen vagy ennél hátrébb helyezte el a rendszer a baktériumot. A vizsgálatokba vont ATCC-43625 és ATCC-700025 számú *H. somni* típustörzseket a rendszer 100%-os valószínűséggel, fajszinten azonosította. A fennmaradó 17 baktériumtörzset (17%) 8 esetben (8%) genus-szinten azonosította a rendszer, míg további 8 törzset (8%) nem ismert fel, de a *H. somni*-t adta meg a legvalószínűbb törzsek listáján az első (5%) vagy második (3%) helyen. A törzsek 1%-ának szénforrás-hasznosítási mintázata alapján a rendszer nem jelölte meg a *H. somni*-t a lehetséges törzsek listáján. Az anyagcsere-ujjlenyomat vizsgálatok során, a 100 *H. somni* törzs összesen 40-féle szénforrás hasznosítására volt képes, amelyek közül 16-ot a törzsek több mint 50%-a tudott metabolizálni, míg 55 szénforrást a törzsek egyike sem volt képes hasznosítani. A törzsek 100%-a tudta hasznosítani a dextrint és az  $\alpha$ -D-glükózt, míg az N-acetil-glükóزامint, a D-fruktózt, a D-mannitot, a D-szorbitot és a turanózt a törzsek legalább 90%-a volt képes metabolizálni. A szarvasmarha légzőszervi eredetű 40 *H. somni* törzs 28 különböző szénforrást tudott hasznosítani. A dextrint és az  $\alpha$ -D-glükózt ebben a csoportban is törzsek 100% bontotta, a többi szénforrást hasznosítani képes törzsek aránya azonban nem haladta meg a 90%-ot. A nem hasznosítható szénforrások száma ebben a csoportban 67 volt. A szarvasmarha hüvely eredetű *H. somni* törzsek 35-féle szénforrást metabolizáltak, amelyek közül a dextrint, a D-fruktózt, az  $\alpha$ -D-glükózt, a D-mannitot, a D-szorbitot és a D, L-tejsavat,

azaz összesen 6 szénforrást a törzsek 100%-a hasznosított. A juh genitális eredetű törzsek 100%-a négy (dextrin,  $\alpha$ -D-glükóz, mannóz, turanóz), míg a törzsek 90%-a az előbbieken kívül további négy (N-acetil-glükózamin, D-mannit, D-szorbit,  $\alpha$ -keto-vajsav) szénforrást metabolizált. A csoportba tartozó törzsek által hasznosított 32 különböző szénforrás közül kilencet a törzsek legfeljebb 10%-a hasznosította. A 11 kecske eredetű *H. somni* törzs 22 különböző szénforrás hasznosítására volt képes, ebből a dextrint, az N-acetil-D-glükózamint, a D-cellobiózt, a D-fruktózt, az  $\alpha$ -D-glükózt, a D-mannitot, a D-mannózt, a D-szorbitot, a turanózt, az  $\alpha$ -keto-vajsavat, a D, L-tejsavat és a D-glükóz-6-foszfátot a törzsek 100%-a, míg a D-trehalózt 90%-uk metabolizálta.

### ***M. haemolytica***

Összesen 56, 15 szarvasmarhából izolált, 40 juhból származó és egy sertés eredetű *M. haemolytica* törzs került vizsgálatra. A *M. haemolytica* törzsek 51 szénforrást tudtak hasznosítani, 5 szénforrást (dextrin, D-fruktóz,  $\alpha$ -D-glükóz, D-szorbit, szacharóz) valamennyi törzs fel tudott használni, 13 további szénforrást (N-acetil D-glükózamin, D-cellobióz, D-galaktóz, D-mannit, D-pszikóz, D-raffinóz, turanose, piroszőlősav metilészter,  $\alpha$ -ketovajsav, inozin, uridin, timidin, D,L, $\alpha$ -glicerolfoszfát), a törzsek 90%-a hasznosított, így a metabolikus ujjlenyomat-technika is igazolta a *M. haemolytica* törzsek egységességét. A különböző állatfajokból izolált *M. haemolytica* törzsek között a szénforrás-hasznosítás alapján nem tudtunk különbséget tenni.

### ***A. pleuropneumoniae***

A részletes anyagcsereprofil-vizsgálatokba 73 *A. pleuropneumoniae* törzset vontunk be, valamennyi sertés tüdőgyulladásából származott. A vizsgált *A. pleuropneumoniae* törzsek 61 szénforrást tudtak hasznosítani, 34 szénforrást egy törzs sem tudott felhasználni. Az *A. pleuropneumoniae* törzsek meglehetősen egységesnek mutatkoztak az anyagcsere-ujjlenyomat vizsgálata során, 20 olyan szénforrás volt, a melyet valamennyi törzsünk hasznosítani tudott, így valamennyi törzs felhasználta a dextrint, az L-arabinozt, a D-cellobiózt, a D-fruktózt, a D-galaktózt, az  $\alpha$ -D-glükózt, az  $\alpha$ -D-laktózt, a laktulózt, a maltózt, a D-mannitot, a D-mannózt, a D-pszikózt, a D-raffinózt, a D-szorbitot, a szacharózt, a hangyasavat, a D,L-tejsavat, az inozint, az uridint és a timidint. További 11 szénforrást hasznosított legalább a törzsek 90%-a. A szénforrás-hasznosítás és az *A. pleuropneumoniae* biotípusai között nem mutatkozott összefüggés.

## A genom makrorestrikciós mintázatának vizsgálata

*Histophilus somni* esetében a korábbi jelentésekben írtak alapján a PFGE beállításához 12, rDSN szekvenálással újraazonosított izolátumot használtunk. A dugókészítés és a sejtlízis optimalizálása után a SmaI enzimet alkalmaztuk, de ezzel az izolátumok egy része nem volt tipizálható. A kipróbált XmaI izoskizomer nem bizonyult jó megoldásnak, mert az emésztés hatásfoka változatos volt, így a kapott mintázatok nem voltak reprodukálhatóak. Emiatt egy másik izoskizomer, a Cfr9I (Fermentas) alkalmazására tértünk át, illetve párhuzamosan más szekvenciákat felismerő restriktív enzimeket (SpeI, Sall) is kipróbáltunk. (A felismert szekvencia alapján alkalmazhatónak tűnő ApaI és NotI enzimekről már korábban bebizonyosodott, hogy nem alkalmasak a *H. somni* tipizálására.) Végül a Cfr9I enzim mellett a SpeI enzim volt a legalkalmasabb, de az *A. pleuropneumoniae* esetén tapasztalhatóhoz hasonló okból, végül a SmaI és a vele ekvivalens mintázatot adó Cfr9I enzimmel kapott mintázatokot tekintettük az elemzés alapjának.

Összesen 98 hazai izolátum és 2 típusörzs esetében végeztük el a vizsgálatokat, ezek közül 18 nem volt tipizálható SmaI enzimmel, köztük a két típusörzs sem. A 82 törzs közül, amely mind SmaI mind Cfr9I enzimmel tipizálható volt, a mintázatok a legtöbb esetben 100%, néhány esetben >90% hasonlóságot mutattak. Ez alapján a két enzimmel kapott mintázatok, a vártnak megfelelően, egymással összehasonlíthatóak voltak.

A különböző állatfajból származó törzsek jól elkülönültek egymástól, de egy állatfajon belül a klonalitás általában nem volt jellemző. A klonális izolátumok általában egy állomány szekvenciális mintázásából származtak, egy ilyen esetben pl. egy Ostffyasszonyfai borjúállományból, beteg állatból 1997-től 2001-ig gyűjtött 5 izolátum mindegyike egy genetikai csoportba tartozott, tehát a törzs perzisztenciáját mutattuk ki. Egy esetben találtunk ettől eltérést, ahol összesen 6 állományból, 14 mintából, borjú tüdőből izolált izolátumok egy törzsbe tartoztak a két típusörzssel együtt. Ez annak lehetőségét veti fel, hogy a baktériumnak virulens klónjai létezhetnek, amely(ek) széles körben elterjedtek a még egy állományon belül is diverzitást mutató kommenzális törzsekkel ellentétben (lásd alább).

Egy állományon belüli genetikai változatosság a nyálkahártyáról, tünetmentes állatból izolált izolátumok esetében több állományban (mind juh, mind szarvasmarha állományokban) volt jelentős, 4 állományban rendre 2/2, 3/9, 3/4, 7/18 genetikai csoportot találtunk az állományok

összes izolátuma között. Érdekes volt, hogy mindkét mintázott kecskeállományban egy-egy különböző törzs volt kimutatható.

Összefoglalva a *Histophilus* eredményeket, a kifejlesztett PFGE módszer jól alkalmazható a törzsek tipizálására. A genitális kommenzális törzsek genetikai diverzitása nagy mind juh mind szarvasmarha eredetű törzsek esetében. Ezzel szemben az invazív fertőzésből izolált szarvasmarha eredetű törzsek genetikai diverzitása kisebb, míg a kommenzalista törzsek esetében több állomány esetében is az izolált törzsek több különböző genetikai csoportba tartoztak, a szarvasmarha tüdőből izolált törzsek esetén olyan törzset is azonosítottunk, amely több időben és térben elkülönült állományból is kimutatható volt.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* esetén az *Histophilus somni* tipizálásra kidolgozott PFGE protokollból indultunk ki, a restrikciós analízishez az ApaI és a SpeI enzimeket alkalmaztuk. Összesen 79 izolátum tipizálását végeztük el, ebből 3 típus törzs, 5 Koppenhágából származó törzs, míg a többi izolátum hazai volt. A két alkalmazott enzim közül a SpeI fragmentumok mérete nagyon közel volt egymáshoz, így a SpeI enzimmel végzett analízis nehezebben elemezhető mintázatokat adott. Emiatt az eredmények alapjául az ApaI enzimmel kapott mintázatokat illetve a belőlük rajzolt törzsfát választottuk, amelynek eredményeit egyébként a SpeI enzimes analízis által kirajzolt törzsfá megerősítette. A három típus törzs a fán jól elkülönült. A 2 biocsoporton belül a genetikai diverzitás sokkal kisebb volt, mint az 1-es biocsoportba tartozó törzsek között, ide 2 nagyobb genetikai csoport és két, egymással genetikailag rokon izolátum tartozott. Ennek magyarázata kétféle lehet, egyrészt elképzelhető, hogy a hazai 1-es biocsoportba tartozó törzsek klonálisak, tehát egy-két törzs van jelen az ország sertésállományában. A típus törzsek besorolódása a genetikai csoportokba azonban inkább azt az alternatív magyarázatot sugallja, hogy a 2-es biotípusba tartozó törzsek genetikailag rokon csoportot alkotnak. Ennek ellentmond, hogy a 3 izolátum, amely ApaI enzimmel nem volt tipizálható, a SpeI dendrogramon teljesen elkülönült a többi 2-es biocsoportba tartozó törzstől. Az 1-es biotípuson belül a diverzitás sokkal jelentősebb volt, itt 7 genetikai csoportot tudtunk megkülönböztetni. Ezekbe a csoportokba általában egyazon szerotípusba sorolható törzsek tartoztak, felvetve, hogy az *A. pleuropneumoniae* esetében a szerotípusok, a Salmonella szerotípusokhoz hasonlóan, a PFGE útján csak alacsony határfokkal különíthetők el.

*Mannheimia haemolytica* vizsgálataink során összesen 86 izolátumot, 61 hazai klinikai izolátumot és 25 típus törzset vizsgáltunk meg. A módszer alapjául ismét a *Histophilus somni* tipizálásra kidolgozott PFGE protokoll szolgált, több enzim (SmaI, ApaI) kipróbálása után a SallI enzim alkalmazása mellett döntöttünk. A törzsfán a különböző szerotípusba tartozó izolátumok általában elkülönültek. Két szerotípus, az 1-es és a 2-es esetében állt rendelkezésre nagyobb számú izolátum, a típus törzseket nem számolva összesen mindkét szerotípusból 11-11 izolátum. Ezek vizsgálata alapján a beállított PFGE módszer a törzsek jó megkülönböztetését teszi lehetővé egy szerotípuson belül. Az egy forrásból származó izolátumok általában egy genetikai csoportba kerültek, tehát egy állományon belül a genetikai diverzitás nem jellemző a *M. haemolytica*-ra. Ellenpéldát egy Kaposvári juhállomány esetében találtunk.

