

## Különböző eredetű *Francisella tularensis* törzsek összehasonlító vizsgálata (PD 78139)

### Témavezető: Dr. Makrai László

Vizsgálataink során Magyarország közel 30 településéről összesen 67 *Francisella tularensis* törzset gyűjtöttünk, amely révén létrehoztunk egy hazai törzsgyűjteményt, amelyet a SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékének mélyhűtőjében tárolunk.

A törzsgyűjtés során a következő vizsgálati területekre összpontosítottunk:

- A hazai mezei nyúl export során, a különböző hazai vadásztársaságok által befogott és karantén-telepekre (Szajol, Tiszanána) szállított, majd tárgylemez-agglutinációval szeropozitívnak talált, és ezt követően kiirtásra kerülő állatok diagnosztikai boncolása.
- A Vadex Mezőföldi Zrt. soponyai Vadfeldolgozó Üzemében a vadászatokról beérkezett, nyúzást követő zsigerelés alkalmával lehetőség nyílt a technológia során a zsigerek kórtani vizsgálatára és a gyanút keltő elváltozások részletes bakteriológiai vizsgálatára.
- Vadászatok alkalmával (Körös-Maros Nemzeti Park, Dévaványa) elejtett, majd a szerológiai vizsgálattal szeropozitívnak talált mezei nyulak kórbonctani vizsgálata.
- Az MGSZH központ Diagnosztikai Igazgatóságára beküldött minták vizsgálata az Emlőskórbonctani Osztállyal együttműködésben.
- A Körös-Maros Nemzeti park területén ökológiai vizsgálatok során begyűjtött mezei pocok és sárganyakú egerek szerológiai vizsgálatát is elvégeztük, hogy az esetleges szeropozitív egyedekből baktériumizolálást végezzünk, de a vizsgálatok minden esetben negatív eredménnyel zárultak.
- A hazai mezei hörcsög (*Cricetus cricetus*) populáció gyérítése során Békés megyében csapdázott 1500 állat kórtani vizsgálatát elvégezve szintén nem talákoztunk tularemiára utaló kórtani elváltozásokkal és valamennyi megvizsgált állat vérsavója szeronegatív lett, ami nem tette lehetővé hörcsög eredetű törzsek izolálását.

Az összegyűjtött *Francisella tularensis* törzsek vizsgálata során a következő területeket vizsgáltuk:

#### 1./ *F. tularensis* ssp. *holarctica* törzsek fenotípusos tulajdonságainak (anyagcsere-ujjlenyomatának) vizsgálata

A 95 különböző szénforrás vizsgálatát lehetővé tevő automata MicroLog MicroStation rendszert használtuk GN2-es lemezekkel (Biolog Inc., Hayward, CA) a törzsek anyagcsere-ujjlenyomatának vizsgálatához a gyártó utasításait követve. A szénforrás-hasznosításon alapuló törzsfelfelkészítéséhez módosított „unweighted pair group method with arithmetic mean” elemzést használtunk.

A Biolog rendszer nemcsak 24 óra inkubáció, de már 4 óra inkubáció után is egyértelműen képes volt a vizsgált 67 *F. tularensis* (2 majom, 65 nyúl eredetű) törzs azonosítására. Ugyanakkor a Microlog program nem tudta elkülöníteni egymástól az erősen virulens *F. tularensis* ssp. *tularensis* és a mérsékelten virulens *F. tularensis* ssp. *holarctica* alfajokat. Mivel egyetlen törzs sem hasznosította a glicerint, így a manuális leolvasás alapján *F. tularensis* ssp. *holarctica*-ként azonosítottuk az izolátumokat. A szénforrás hasznosításon alapuló törzsfelfelkészítés az izolátumok szoros rokonságát mutatta.

Eredményeink alapján a szénforrás-hasznosítás vizsgálata egy megbízható módszer a *F. tularensis* törzsek azonosítására és meghatározott szintű tipizálására. Javasoljuk a Biolog program adatbázisának bővítését, mert a glicerint-hasznosítás alapján *F. tularensis* ssp. *tularensis* és *F. tularensis* ssp. *holarctica* alfajok elkülöníthetőek lennének egymástól, amire tekintettel a jelentős virulenciabeli különbségükre, szükség lenne. A különböző földrajzi helyekről és állatfajokból (mezei nyúl, majom) izolált törzsek szénforrás-hasznosítási profilja

nagyon hasonló volt, amit magyarázhat a *F. tularensis ssp. holarctica* alfaj rendkívül konzervatív genetikai jellege.

2./ Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok során 20 reprezentatív izolátumot vontunk vizsgálat alá, amely során 11 antibakteriális szerrel szembeni minimális gátló koncentráció (MIC) értéket határoztunk meg. A kapott eredmények jól hasznosíthatóak mind állatorvosi gyakorlatban, mind a humán gyógyászatban. Ezen eredményeinkből a publikáció előkészítése folyamatban van.

3./ Magyar *F. tularensis ssp. holarctica* törzsek filogenetikai vizsgálata és a mezei nyúl export hatása Európa tularemia fertőzöttségére

Hazánk évente 30 ezer élő mezei nyulat exportál Olaszországba és Franciaországba, melynek feltétele a *F. tularensis* mentes mezei nyúl. Célunk volt, hogy elvégezzük 19 magyar és olasz izolátum filogenetikai vizsgálatát, valamint összehasonlítsuk a magyar és különböző európai törzsek genetikai állományát, és ezáltal következtethessünk arra, hogy a magyar mezei nyúl export milyen hatással lehet Európa tularemia fertőzöttségére.

Elvégeztük 15 magyar és 4 olasz törzs tipizálását a korábban publikált canonical SNP (canSNP) rendszerekkel, hogy az ismert filogenetikai csoportokba történő besorolásukat meghatározzuk. Az egyes canSNP csoportokon belül multilocus variable-number tandem repeat analysis-t alkalmaztunk a magyar izolátumok finomabb tipizálására.

Genotipizálási vizsgálataink eredménye cáfolni látszik azt a feltételezést, miszerint Közép-Európa Nyugat-Európa *F. tularensis*-fertőzöttségének a forrása lehet a mezei nyúl exportja révén. Egy olaszországi karanténtelegen egy román mezei nyúlból izolált *F. tularensis* törzs genetikai profilja a Közép- és Kelet-Európában előforduló izolátumok genetikai állományával egyezett meg. Ez igazolja, hogy az exportot megelőző szigorú karantén és szűrési vizsgálatok ellenére kijuthat fertőzött egyed. Ugyanakkor arra nem találtunk bizonyítékot, hogy a mezei nyulakkal kijuttott *F. tularensis* törzsek fenn maradnának és cirkulálnának a természetben, Nyugat-Európában. Javasoljuk a miénkhez hasonló filogenetikai vizsgálatok elvégzését más közép- és kelet-európai országokban, hogy minél teljesebb képet kaphassunk a *F. tularensis ssp. holarctica* evolúciójáról, terjedésének lehetséges irányvonalairól.

4./ *Francisella tularensis*-szel fertőzött mezei nyulak (*Lepus europaeus*) kórbonctani, kórszövetteni és immunhisztokémiai vizsgálata

Munkánk során 50, az ország különböző területéről származó, tularemia szeropozitív, természetes úton fertőződött mezei nyúlon végeztük el makroszkópos, szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatot, a baktérium tenyésztését és azonosítását. A tetemeket a mintagyűjtés napján boncoltuk. A szervmintákból 4 µm vastag, HE festett metszeteket készítettünk. Immunhisztokémiai módszerrel a *F. tularensis* LPS antigénjének kimutatását végeztük el, melyhez specifikus egér monoklonális ellenanyagot használtunk. Az antigén-ellenanyag kapcsolódás kimutatását tormaperoxidázzal jelölt polimerrel végeztük. A gyulladáshoz vezető góccok dörzsölékéből készített szuszpenziót egerekbe, bőr alá oltottuk. A fertőzést követően az egerek 5-7 nap múlva hullottak el. Ezután a szívből vett vérből és a csontvelőből módosított Francis-féle táptalajra oltva izoláltuk a *F. tularensis* törzseket.

A makroszkópos vizsgálat során 44 esetben (88%) találtunk 0,1-1 cm átmérőjű, szürkésfehér, gyulladáshoz vezető góccokat a különböző szerveken, ebből 24 esetben egy, további 20 esetben több szerv volt érintett. Szövettani vizsgálattal a góccok granulomaképződéssel járó gyulladásoknak bizonyultak, s középpontjukban sokszor elhalt területek voltak megfigyelhetők. Szövettani és immunhisztokémiai vizsgálat során 46 esetben (92%) találtunk elváltozást, illetve mutattunk ki *F. tularensis* antigént. *F. tularensis*

*ssp. holarctica* törzseket 35 esetben (70%) tudtunk bakteriológiai módszerekkel kitenyészteni és PCR-rel azonosítani.

A leggyakrabban érintett szervek a mellkasi szervek (tüdő, szívburrok, gátor közti nyirokcsomók) voltak (88%), mely a mezei nyulak légúti fertőződésére utal. Az immunhisztokémiai vizsgálat a tularemia diagnosztizálásában a baktériumtenyésztéssel szemben sokkal érzékenyebbnek és hasonló specificitással rendelkezőnek bizonyult. A tárgylemez agglutinációs próba a makroszkópos elváltozások felismerésével kombinálva megfelelően érzékeny eszköznek látszik a tularemia előzetes diagnózisának felállításához.

#### 5./ A mezei hörcsög (*Cricetus cricetus*) szerepének vizsgálata a *F. tularensis* ökológiájában

A Kelet-Európában elterjedt mezei hörcsög (*C. cricetus*) az emberre is veszélyes, *F. tularensis* által okozott tularemiát terjeszti. Munkánk célja az volt, hogy megismerjük a mezei hörcsög *F. tularensis* ökológiai ciklusában betöltött szerepét, valamint feltárjuk a *F. tularensis ssp. holarctica* által okozott klinikai tüneteket, kórbonctani és kórszövettani elváltozásokat. Ennek érdekében egy békés megyei hörcsögpopulációból mintákat gyűjtöttünk egy interepizootikus időszakban, egy 80 km<sup>2</sup>-t átölelő, endémiás mezőgazdasági területen.

A terület *F. tularensis* fertőzöttségének felmérésére a helyi állategészségügyi hatóságtól és az Országos Epidemiológiai Központ adatbázisaiból gyűjtöttünk adatokat. A hörcsögpopuláció méretének megbecslése egy hörcsöglyuk/hektár arányszámon alapult. A tanulmányozott területen csapdákkal 900 hörcsögöt gyűjtöttünk be. A befogott hörcsögök vérére *F. tularensis* specifikus tárgylemez- és cső agglutinációs (1/10 titer) próbával vizsgáltuk meg. A befogott állatok közül 50-50 egyedből tüdő-, lép-, máj- és vesemintákat vettünk, majd az egyesített szervmintákat *F. tularensis* specifikus real-time TaqMan típusú PCR-rel vizsgáltuk. Ezen kívül 374 *Ixodes acuminatus* kullancsot gyűjtöttünk össze a befogott állatokról, melyeket szintén real-time TaqMan típusú PCR-rel vizsgáltunk. A klinikai tünetek, kórbonctani és kórszövettani elváltozásokat, 2 befogott hörcsög természetes fertőzést modellező, mesterséges fertőzése során írtuk le.

A tanulmányozott terület, figyelembe véve a helyi mezei nyúl populációk fertőzöttségi arányát és a környéken előforduló emberi megbetegedéseket, tularemia-endémiás területnek tekinthető, viszont az eredményeket látva valószínűsíthető, hogy kísérletünk egy interepizootikus időszakra esett. A 900 befogott hörcsög szerológiai vizsgálatai negatív eredménnyel zárultak. Egyik kullancsból és egyesített szervmintából sem lehetett kimutatni a *F. tularensis*-t. A két mesterségesen fertőzött hörcsög rövid bágyadság után a 8. illetve 9. napon pusztult el. A kórbonctani, kórszövettani és IH vizsgálatok eredményei mindkét esetben vérfertőzést állapítottak meg.

Az eredményeink megerősítették azokat a feltételezéseket, miszerint a mezei hörcsög fokozottan érzékeny a *F. tularensis* fertőzésre. Emellett valószínűsíthető, hogy a járványok során a fertőzött hörcsögök potenciális fertőző forrást jelenthetnek az emberek számára, ugyanakkor az interepizootikus időszakokban nem töltenek be fontos szerepet a tularemia ökológiai ciklusában, nem hordozzák és tartják fent a kórokozót, nem töltenek be rezervoár szerepet.

Vizsgálataink alapját képezte a társtémavezetésem alatt dr. Gyuranecz Miklós PhD hallgató PhD-értekezésének valamint két állatorvostan-hallgató diplomamunkájának.