

A CAMPYLOBACTER JEJUNI MOLEKULÁRIS TIPIZÁLÁSA

PhD értekezés

Dr. Sonnevend Ágnes

Doktori Iskola vezetője: *Prof. Dr. Lénárd László*

Programvezető: *Prof. Dr. Emődy Levente*

Témavezető: *Prof. Dr. Pál Tibor*

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar**



Pécs

2009

BEVEZETÉS

A *Campylobacter jejuni* egyike a hasmenés leggyakrabban izolált bakteriális kórokozóinak. A fertőzést késői, autoimmun mechanizmusok révén kialakuló idegrendszeri komplikációk, elsősorban Guillain-Barré szindróma, is követhetik. A viszonylag alacsony fertőző dózis mellett meglepő, hogy bár élelmiszer és víz okozta járványok is jól ismertek, az esetek többsége sporadikus.

A fertőzések kezelésében sokáig a fluorokinolonok játszottak meghatározó szerepet, azonban a fluorokinolon rezisztencia növekedése miatt ez a terápiás lehetőség komoly veszélybe került. A fluorokinolon rezisztencia, jelenleg ismeretlen mechanizmussal, a mikroba fittségének, esetleg virulenciájának növekedését okozhatja. A fluorokinolon rezisztenciáért leggyakrabban a giráz enzim A alegységét kódoló *gyrA* génben létrejövő, a 86-os pozícióban lévő treonint (magas fokú rezisztencia), illetve a 90-aszparagint és 70-alanint érintő (alacsonyabb fokú rezisztencia) pontmutáció felelős. A génen belüli régiót, melyben a rezisztenciáért felelős mutációk találhatóak, Quinolone Resistance Determinant Region, QRDR –nek nevezzük.

A kórokozók járványtanának, a fertőzések terjedése dinamikájának megértéséhez elengedhetetlen a mikrobák összehasonlítása, tipizálása. A fenotípusos módszerek közül a *C. jejuni* esetében a szerotipizálás a leggyakrabban használt eljárás. A szerotipizáló eljárásokat kiterjedten alkalmazzák molekuláris módszerekkel kombinálva. Jóllehet általában ez utóbbi módszerek további csoportokra osztják a szerocsoportokon belüli izolátumokat, esetenként a fordítottja is igaz, azaz azonos PFGE vagy PCR-RFLP csoporton belül tudunk hőstabil (HS) antigén alapján további alcsoportokat elválasztani.

A HS meghatározás jelentős hátárnya, hogy nagy a nem tipizálható törzsek száma. Bár ezek a törzsek szerotipizálás alapján látszólag egységesek, azaz nem tipizálhatóak, feltételezhető, hogy valójában heterogén csoportot jelentenek. Munkánk során, a hazai humán izolátumok szerotípus megoszlásának vizsgálata mellett, e feltételezés igazolása volt egyik célunk.

A *C. jejuni* kiemelten fontos kóroki tényezője az utazók hasmenésének. Az Arab félsziget országai, különösen az Egyesült Arab Emírségek, egyre inkább kedveltek a turisták között. A közelmúltban a térséget a *Campylobacter* fertőzés szempontjából „high risk” területnek minősítették. Tekintve, hogy a régióra vonatkozó járványtani és a rezisztencia adatok meglehetősen korlátozottak, vizsgálataink közé felvettünk egy csoport, e területről származó izolátumot is.

Más kórokozókhoz hasonlóan, az elmúlt évtizedben számos molekuláris módszert dolgoztak ki a *C. jejuni* tipizálására. A pulzáló mezejű géll elektroforézis (PFGE), a flagellin gén tipizálás PCR-RFLP-vel, a random amplifikált DNS polimorfizmus (RAPD) vizsgálata, és legújabban az amplifikált fragmentum-hossz polimorfizmus tesztelés mindegyike a nukleotidok sorrendjében fellelhető variációkat vizsgálja. Munkánk megkezdésekor azonban közvetlen információink e faj genomjában meglévő változatosság tényleges mértékéről nem volt. Az un. multi-lókuszos szekvencia tipizálás (MLST) több, általában hét háztartási gén részleges szekvenciájának elemzésén alapul. A módszer során háztartási géneket és nem a virulenciával közvetlenül összefüggő géneket vizsgálunk, mivel ezekben a mutációk többsége szinonim háztartási gének termékeinek változatlanul tartása irányába ható szelekció miatt, és így jobban reprezentálják a törzsek filogenetikai összefüggéseit. MLST vizsgálatok számos kórokozó esetén igazolták, hogy azok jelentősen különböznek a bázis sorrend változás és variációk mértékét tekintve, eltérő populáció szerkezetűek, a változékonyságukban a mutációk és a

rekombináció szerepe eltérő. Tekintve, hogy – szemben más kórokozókkal – nagyon kevés információ állt rendelkezésre a *C. jejuni* esetén a bázis sorrend variációk gyakoriságáról, a fajon belüli rekombináció mértékéről, munkánk során kidolgoztunk egy MLST rendszert a *C. jejuni* vizsgálatára.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A *Campylobacter jejuni* populáció-genetikai jellemzése a nukleotid variabilitás és a fajon belüli rekombinációs szint tanulmányozása révén, különböző földrajzi területekről gyűjtött törzsei között
2. A hazai *C. jejuni* izolátumok szerotípus megoszlásának vizsgálata
3. A hő-stabil antigén alapján nem szerotipizálhatóként egységesnek mutakozó törzsek vizsgálata molekuláris tipizáló módszerekkel
4. Az Egyesült Arab Emírátsokban izolált *C. jejuni* törzsek antibiotikum rezisztencia és típusmegoszlás vizsgálata fenotípus-, és genotipizáló módszerekkel
5. A fluorokinolon rezisztencia genetikai hátterének tisztázása az Egyesült Arab Emírátsokban izolált magas százalékban fluorokinolon rezisztens *C. jejuni* törzsekben

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

TÖRZSEK ÉS TENYÉSZTÉSI KÖRÜLMÉNYEK. A *C. jejuni* fajon belüli allelikus diverzitás mértékének megállapításához 33 törzset vizsgáltunk, melyek közül 18 származott Németországból (13 Freiburgból és 5 Würzburgból), 6 Magyarországról, 5 Thaiföldről, 3 az USA-ból és egy az Egyesült Királyságból. A hazai törzsek vizsgálatához 92, random módon kiválasztott *C. jejuni* törzset használtunk, melyeket 1999 és 2000 között izoláltak Veszprém megyében (59 törzs), Pest megyében vagy Budapesten (33 törzs). Az emírátsusi törzsek vizsgálata során 41 törzset használtunk, melyeket különböző betegekből izoláltak a Tawam Kórházban (Al Ain, Abu Dhabi, UAE) 2002 szeptembere és 2004 szeptembere között.

A törzseket azonosítását laboratóriumunkba érkezésükkor minden esetben megerősítettük a standard biokémiai tesztek mellett API Campy kittel (bioMérieux) illetve a MAST-ID CAMP azonosító rendszerrel (MAST Group Ltd., Merseyside, UK). A törzseket rutinszerűen 10% birkavért tartalmazó Columbia agaron (Oxoid, Basingstoke, UK) tenyésztettük CampyGen (Oxoid, Basingstoke, UK) gázfejlesztő tasakokkal 36 °C-on, 48 órán át. A törzsek tárolása 10% glicerint tartalmazó Tryptic szója levesben (TSB) történt -80 °C-on.

AZ ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉG VIZSGÁLATA. Az érzékenység vizsgálatát – tájékozódási céllal – korong diffúziós módszerrel végeztük. A minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározás céljából 0,25 – 512 mgL⁻¹ koncentrációban nalidixsavat, ciprofloxacint vagy erythromicint tartalmazó lemezeket használtunk a *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, korábbi NCCLS)* javaslata szerint. Minden kísérlethez standardként az érzékeny *C. jejuni* ATCC 33560 törzset használtuk.

SZEROTIPIZÁLÁS. A törzsek hő-stabil, tok-jellegű antigénjének meghatározását *Penner és Hennessy* passzív hemagglutinációs módszerével végeztük kereskedelmi forgalomban kapható savók és kit (Denka Seiken, Tokyo, Japan) felhasználásával a gyártó utasításai szerint.

DNS TISZTÍTÁS. A genomiális DNS-t QiaAmp DNA Tissue kittel (Qiagen) tisztítottuk a gyártó útmutatásai szerint.

MULTI LÓKUSZ SZEKVENCIA TIPIZÁLÁS (MLST). A *C. jejuni* genomjának rendelkezésre álló szekvenciája alapján a genom hét gén-fragmentjét választottuk ki a vizsgálat céljaira (**1. táblázat**). A kiválasztott géneknek a következő feltételeknek kellett megfelelnie: legyenek un. háztartási gének (housekeeping genes), legyenek a kromoszómán egymástól minél nagyobb távolságra, közelükben ne legyenek (feltételezett) virulencia, vagy külső membrán fehérje gének. A fragmentumok amplifikálását a **2. táblázatban** professzor Suerbaum által tervezett primerekkel végeztük a korábban leirt paraméterekkel. Az ampikonokat közvetlenül szekvenáltuk mindkét szálon ABI 377 automata szekvenálóval (Perkin-Elmer).

FILOGENETIKAI VIZSGÁLATOK. A szekvenciák összehasonlítását a SEQLAB és PILEUP szoftverekkel (Genetics Computer Group, Madison, Wis., Wisconsin Package, 9.1. verzió) végeztük. Egy adott gén esetében minden szekvenciát egy közös hosszra redukáltunk a vizsgálatokhoz. A nem-szinonim (K_A) és szinonim (K_S) mutációk frekvenciáját jelző értékeket a Jukes-Cantor korrekció után a DNASP 3.0 programmal számítottuk. A homoplázia vizsgálatát a HOMOPLASY programmal végeztük. Az UPGMA (unweighted pair group mean average) fát a START programmal rajzoltuk.

1. Táblázat A szekvenált gén-fragmentumok

Gén	Gén számozás*	Pozíció*	Hossz (bp)	Termék	GenBank kód
<i>asd</i>	Cj1023c	954448	564	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	AJ292175–AJ292188
<i>atpA</i>	Cj0105	111788	660	ATP synthase, F1a	AJ292166–AJ292174
<i>ddlA</i>	Cj0798c	748473	480	D-Alanine-D-alanine-ligase	AJ290352–AJ290363
<i>eftS (tsf)</i>	Cj1181c	1108052	444	Elongation factor TS	AJ290337–AJ290351
<i>fumC</i>	Cj1364c	1296454	645	Fumarate hydratase	AJ290322–AJ290336
<i>nuoH</i>	Cj1572c	1502750	423	NADH dehydrogenase H	AJ290377–AJ290387
<i>yphC</i>	Cj0386	352112	570	GTP-binding protein	AJ290364–AJ290476

* Számozás és pozíció a *C. jejuni* NCTC 11168 törzs Sanger Centre által publikált adatai szerint (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_jejuni/).

MISMATCH AMPLIFICATION MUTATION ASSAY (MAMA) PCR. A *gyrA* gén QRDR –jében fellelhető, a Thr86→Ile aminosav helyettesítést eredményező ACA→ATA mutációt Zirnstein és mtsai módszerével vizsgáltuk.

2. táblázat Amplifikációra és szekvenálásra használt primerek

Primer	Felhasználás*	Szekvencia
<i>Asd</i>		
CJasd1(1)	A, S	GCA-GGT-GGA-AGT-GTG-AGT-G
CJasd2(2)	A, S	TTT-GTT-GCA-GCA-CCT-ACA-CG
CJasd3(2)	A	ACG-AAT-TTG-ATC-CGC-CAC-AC
CJasd4	A, S	GCC-ATT-GTG-GGT-GCT-ACT-GG
CJasd5	A, S	CGC-TAG-TCA-TTA-AAG-GCA-TAG-G
<i>atpA</i>		
CJatpA1(1)	A, S	GAG-AAG-GTT-TAA-AAG-AAG-GTG-C
CJatpA2(2)	A, S	TGT-AGC-TTT-AAT-TTG-AGC-AGC
<i>ddlA</i>		
CJddlA1(1)	A, S	GAT-CAA-TCT-TAT-CCA-TGG-TAG
CJddlA2(2)	A, S	AGC-CAA-AGA-ACC-AGG-GTT-TG
<i>eftS (tsf)</i>		
CJefts1(1)	A, S	AAA-GCA-GAT-AGA-CTT-GCT-GC
CJefts2(2)	A, S	TTT-TCA-GGT-TTA-CCT-TGA-GC
<i>fumC</i>		
CJfumC1(1)	A, S	TCG-TGC-CAC-TGA-AAT-CAT-GG
CJfumC2(2)	A, S	ACC-TAT-GTG-TGG-ATT-TAG-AGC
<i>nuoH</i>		
Cjnadh1(1)	A, S	GCA-GCT-ATT-CCT-ATG-CTA-CC
CJnadh2(2)	A, S	TTG-ATC-TGG-ACG-CAA-TTG-CG
<i>yphC</i>		
CJyphc1(1)	A, S	TAT-CAG-AGT-GGG-TAT-TGT-AGG
CJyphc2(2)	A, S	AAT-CAC-TAA-AGG-CAC-ACC-TTC

* A, amplifikáció; S, szekvenálás

A QRDR SZEKVENÁLÁSA. A GZgyrA5 és GZgyrA6 primerek segítségével amplifikáltuk a *gyrA* gén egy, a QRDR –t is tartalmazó 673 bp hosszúságú szakaszát. Az ampikon bázis-sorrendjét közvetlenül fluoreszcencia alapú direkt szekvenálással állapítottuk meg ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer) segítségével ABI Prism 310 Genetic Analyser Automated Sequencing System (Perkin-Elmer) berendezést alkalmazva. A szekvencia analíziseket Align Plus 5 (Scientific & Educational Software, NC, USA) és MEGA 3.1 programokkal végeztük

PCR-RFLP. A *flaA* gén amplifikációját a Wassenaar és Newell által javasolt konszenzus primerekkel végeztük a szerzők által leírt paraméterekkel. Ezt követően az ampikont DdeI enzimmal (Sigma-Aldrich, MO, USA) emésztettük, majd az emésztett terméket 2,5% -os agaróz gélben (Sigma-Aldrich, MO, USA) futtattuk 120 percig 10 Vcm⁻¹ feszültség mellett.

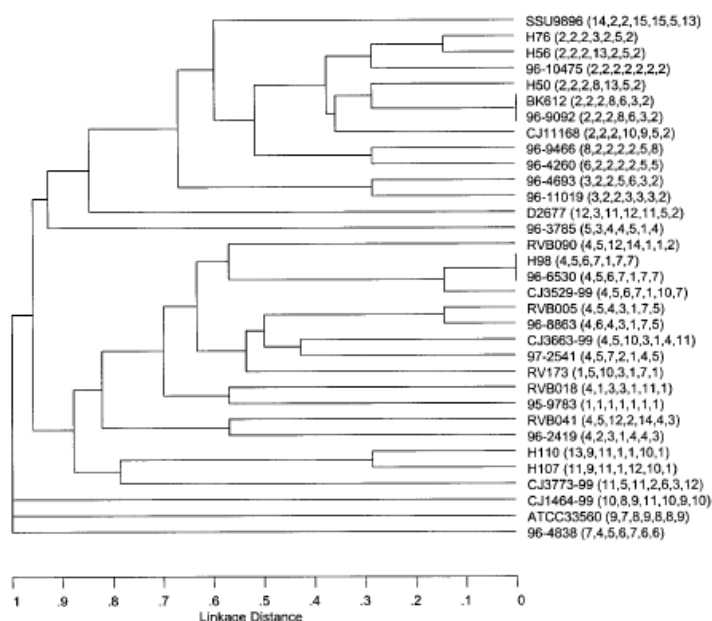
MAKRO-RESTRIKCIÓS VIZSGÁLAT ÉS PULZÁLÓ MEZEJŰ GÉL ELEKTROFORÉZIS (PFGE). A törzsek genomális DNS -ét SmaI enzimmal (Sigma-Aldrich, MO, USA) emésztettük a „Campynet” PFGE Subtyping group protokollja alapján. A fragmentumok elválasztását a fenti protokollban megfogalmazott paraméterek szerint CHEF DRII apparátussal (BioRad) végeztük.

GÉL MINTÁK SZÁMÍTÓGÉPES ÉRTÉKELÉSE. A PCR-RFLP és PFGE géleket etidiumbromidos festést követően UV fénybe fotóztuk, a képet .tif file-ként mentettük. A gélek analízisét GelCompare II szoftverrel (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) végeztük. A minták összehasonlítása a nem súlyozott pár csoport módszerrel (un-weighted pair grouping method with arithmetic mean, UPGMA), a Dice hasonlósági index (1% -os tolerancia intervallummal) alapján történt. A PCR-RFLP és PFGE csoportokat – önkényesen – 95% hasonlóság alapján definiáltuk. A PCR-RFLP esetén a 100 kb-nál kisebb fragmentumokat nem vettük figyelembe.

EREDMÉNYEK

A CAMPYLOBACTER JEJUNI POPULÁCIÓ-GENETIKAI JELLEMZÉSE. Harminchárom, különböző kontinenseken gyűjtött *C. jejuni* izolátum hét háztartási génjének multi-lókuszos szekvencia analízisét végeztük el. Míg az egyes génekre kapott allélek száma 9 és 15 között változott (**3. táblázat**), a 33 törzs kombinált allélikus variánsainak száma 31 volt, mindössze két párral. A törzsek között cluster képződés nem volt megfigyelhető (**1. ábra**).

1. ábra *C. jejuni* törzsek genetikai rokonsága hét háztartási gén részleges szekvenciája alapján



Zárójelben a hét gén (*asd*, *atpA*, *ddlA*, *eftS*, *fumC*, *nuoH*, és *yphC* sorrendben) megadott allél szám jele.

Amint az háztartási gének esetén várható volt, a nem szinonim mutációk aránya lényegesen elmaradt a szinonim mutációk arányától. Egy gén (*atpA*) esetén ezt módunk volt a *H. pylori* hasonló génjének részleges szekvenciájához hasonlítani. Ott a 20 vizsgált törzs 20 allél variációt jelentett az *atpA* génre nézve, és úgy a szinonim ($K_S = 12,3$), mint a nem szinonim mutációk aránya ($K_A = 0,26$) lényegesen magasabb volt.

Hogy a fajon belüli rekombináció mértékéről felvilágosítást kapjunk, a homoplázia teszttel öt gén szekvenciáját tudtuk megvizsgálni. A kapott H arányokat összehasonlítva más fajok hasonló értékeivel (*Borrelia burgdorferi* 0,06, *Escherichia coli* 0,26, *Streptococcus pneumoniae* 0,3, *Neisseria meningitidis* 0,34, *H. pylori* 0,65) a vizsgált *C. jejuni* géneken belüli homoplázia kis szórással relatíve magas értékeket adott, bár nem érte el a *H. pylori* –nál tapasztaltakat (**3. táblázat**).

3. táblázat Allél variációk száma, mutációs ráta és homoplázia arány *C. jejuni* ($n=33$) háztartási génjeiben

Gén	Allélek száma	K_S *	K_A	H arány**
<i>asd</i>	14	3,8	0,4	0,4
<i>atpA</i>	9	0,86	0,01	
<i>ddlA</i>	12	8,9	0,8	0,42
<i>eftS(tsf)</i>	15	7,1	0,2	0,36
<i>fumC</i>	15	6,4	0,14	0,48
<i>nuoH</i>	11	3,18	0,6	
<i>yphC</i>	13	1,9	0,1	0,47

* Szinonim (K_S) és nem szinonim (K_A) mutációk %-os aránya

** Homoplázia arány

A HAZAI C. JEJUNI IZOLÁTUMOK SZEROCSOPORT MEGOSZLÁSA. A 92 vizsgált *C. jejuni* törzs 69,5 %-a, azaz 64 izolátum volt szerotipizálható, a törzsek 17 szerocsoportba voltak sorolhatóak (**4. táblázat**). A leggyakrabban előforduló szerocsoportok (HS3, HS2, HS1, 44 and HS 4, 13, 16, 43, 50) a tipizálható törzsek közel felét (30 izolátum, 46,8 %) felölelték.

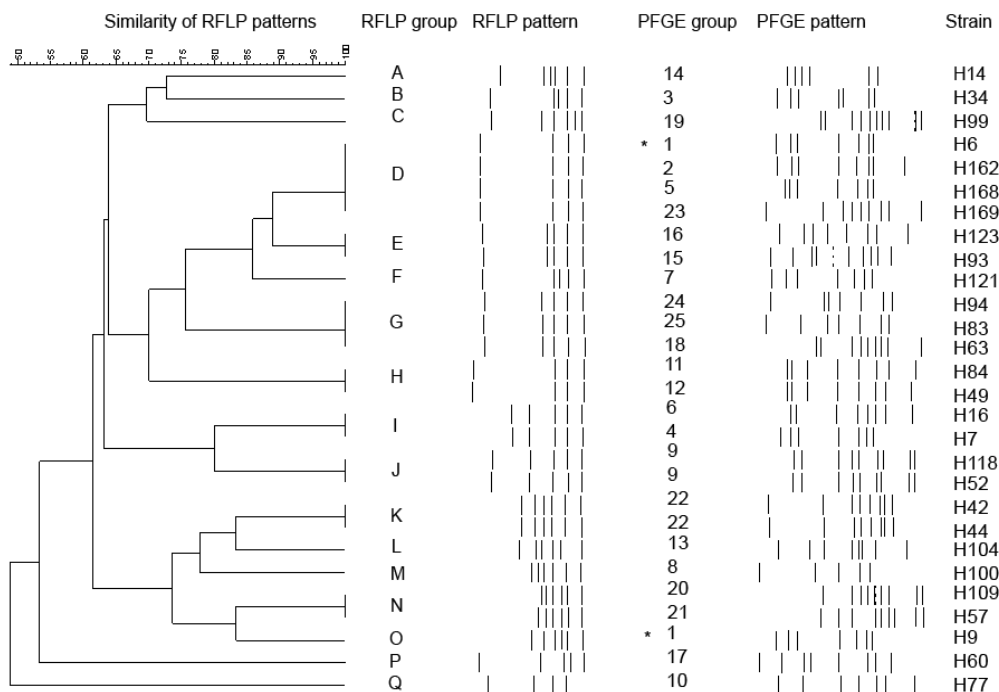
4. táblázat A hazai *C. jejuni* izolátumok szerocsoport megoszlása

Szerocsoport	Izolátumok száma	Az összes törzs (n=92) százalékában	A tipizálható törzsek (n=64)
HS3	9	9.8	14.0
HS2	8	9.7	12.5
HS1,44	8	9.7	12.5
HS4,13,16,43,50	5	5.4	7.8
HS15	4	4.3	6.3
HS31	4	4.3	6.3
HS37	4	4.3	6.3
HS41	4	4.3	6.3
HS5	3	3.3	4.7
HS6,7	3	3.3	4.7
HS18	3	3.3	4.7
HS8	2	2.2	3.1
HS12	2	2.2	3.1
HS23,36,53	2	2.2	3.1
HS11	1	1.1	1.6
HS19	1	1.1	1.6
HS38	1	1.1	1.6
NT*	28	30.4	-

* NT – nem tipizálható

A HŐ-STABIL ANTIGÉN ALAPJÁN NEM SZEROTIPIZÁLHATÓ CAMPYLOBACTER JEJUNI TÖRZSEK VIZSGÁLATA. A legnagyobb, 28 törzset tartalmazó, látszólag homogén csoport a nem tipizálható izolátumok csoportja volt (**4. Táblázat**), mely arány kissé magasabb volt a nemzetközi adatokban szereplőknél. Ez az izolálás helyétől független volt, a Veszprém megyei törzsek 27,1, míg a Pest megyei és budapesti törzsek 36,3 %-a nem volt szerotipizálható (az adatokat nem ábráztuk). A törzsek 17 RFLP csoportba (A-Q) és 25 PFGE csoportba voltak sorolhatóak. Ha a két molekuláris tipizáló módszer eredményeit kombináltuk, a 28 szerológiailag nem azonosítható törzs 26 molekuláris típusnak felelt meg (**2. ábra**).

2. ábra Nem szerotipizálható *C. jejuni* törzsek PCR-RFLP és PFGE mintája



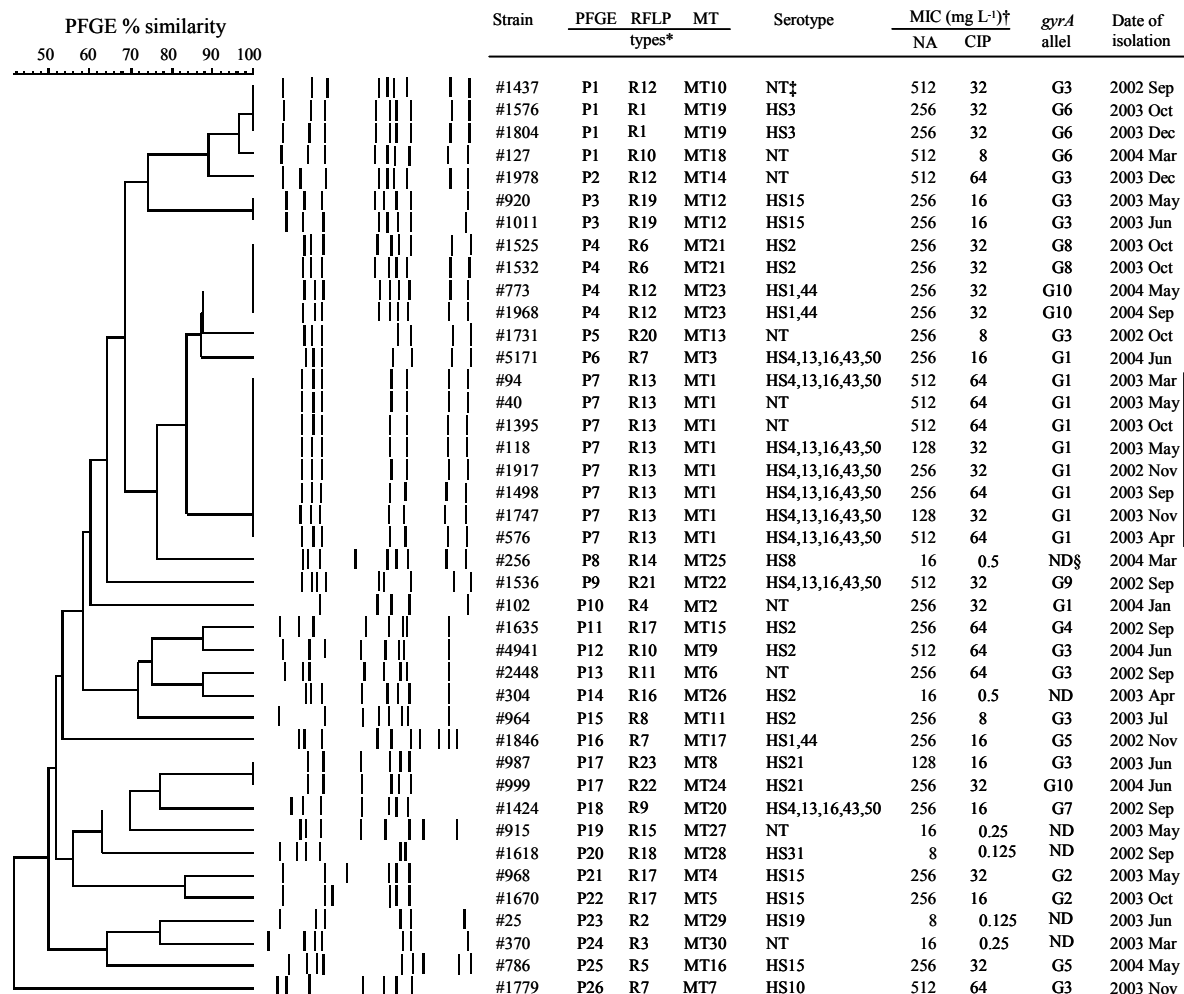
* Törzspárok különböző PCR-RFLP, de azonos PFGE mintával

AZ EGYESÜLT ARAB EMIRÁTUSOKBAN IZOLÁLT CAMPYLOBACTER JEJUNI TÖRZSEK ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIA-, ÉS TÍPUSMEGOSZLÁSA. A vizsgált 41 törzs mindegyike érzékeny volt erythromicinre (MIC 0.5-4 mg L⁻¹), azonban 85,4 % nalidixsavra és ciprofloxacinnra rezisztens volt 128-512 mg L⁻¹ és 8-64 mg L⁻¹ között változó MIC értékekkel. Harmincegy törzs (75,6 %) volt szerotipizálható, melyek 10 szerocsoportot reprezentáltak. A HS4,13,16,43,50 komplex volt a leggyakrabban előforduló csoport (22 %), melyet a H2 (14,6%) követett. Minden törzs tipizálható volt PFGE és PCR-RFLP módszerrel (3. ábra). A 41 törzs 26 PFGE csoportba (P1-P26) volt osztható, közülük 21 csak egy izolátumot tartalmazott. A 23 RFLP típus (R1-R23) közül 15-ben volt csak egy törzs szerepelt. A két tipizáló módszerrel kapott eredményeket kombinálva a 41 izolátum harminc különböző molekuláris típust képviselt (MT1-30). Megjegyzendő, hogy a P7-es PFGE típus mind a nyolc tagja azonos RFLP mintát is adott ezzel a törzsek közel egy ötödét jelentő (19,5 %) molekuláris típust (MT1) alkotva (3. ábra).

A rezisztens törzsek *gyrA* génjének a 64 és 654 nukleotid közé eső szakaszát (22 – 218 kodonok) szekvenálva minden esetben valóban kimutatható volt a ACA→ATA mutáció (Thr-86 → Ile), mely az egyetlen nem szinonim mutáció volt a QRDR –en belül. A 35 fluorokinolon rezisztens törzs *gyrA* génje a részleges szekvenciák alapján 10 allél variációt mutatott (G1-G10) (3. ábra).

A GenBankban mindössze a G3 és G10 allélikus variációnak megfelelő szekvenciákat (AJ567826.1 és AJ567825.1) találtunk, a további alléleket DQ449657-64 számon tettük hozzáférhetővé. A G1 és G3 csoporton belül 10-10 törzs foglalt helyet, további két csoport (G6 és G10) három, három csoport pedig (G2, G5, G8) két izolátumot tartalmazott. Az MT1 molekuláris típusba tartozó mind a nyolc törzs a *gyrA* gén azonos (G1) alléljét hordozta (3. ábra).

3. ábra Az Egyesült Arab Emírátsokban izolált *C. jejuni* törzsek molekuláris-, szero-, *gyrA* allél típusa, antibiotikum érzékenysége



* PFGE: pulsed-field gel electrophoresis, RFLP: restriction fragment length polymorphism (*flaA* gén), MT: molekuláris típus (a PFGE és RFLP típusok kombinációja alapján); † MIC: minimális gátló koncentráció, NA: nalidixsav, CIP: ciprofloxacín; ‡ NT: nem tipizálható; § ND: nem elvégzett; A fekete csíkkal jelzett törzsek egy feltételezett klón tagjai.

MEGBESZÉLÉS

A CAMPYLOBACTER JEJUNI POPULÁCIÓ-GENETIKAI JELLEMZÉSE. A *C. jejuni* populáció genetikai vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy a fajra a viszonylag kis számú allél és relatíve kevés polimorf nukleotid a jellemző (3. táblázat). Ugyanakkor e szekvencia variációk kombinációja igen változatos szekvencia típusokat alkot: a 33 törzs 31 változatba volt besorolható (1. ábra). A homoplázia teszt egyértelműen jelezte, hogy a fajon belüli rekombináció meghatározó a *C. jejuni* törzsek genetikai heterogenitásának létrehozásában. Az átlagos homoplázia arány jelentősen meghaladta más, nagymértékben (*B. burgdorferi*) vagy részben klonális (*E. coli*, *S. pneumoniae*) fajoknál tapasztalt értékeket és közelített az ez ideig ismert legmagasabb homopláziával rendelkező kórokozónál, a *H. pylori* –nál tapasztalt érték felé.

Eredményeink összhangban vannak a kórokozó két, tandem módon elhelyezkedő csilló génjének vizsgálata során tett megfigyelésekkel, melyek úgy intragenomiális, mint a törzsek közötti rekombinációt kimutattak. A *C. jejuni* és *H. pylori* filogenetikailag közel állnak egymáshoz. Mindkettőnek relatíve kicsi, adeninban és timinben gazdag genomja van, természetes kompetenciával rendelkeznek a DNS felvétel tekintetében, és nagy számban tartalmaznak hipermutábilis egyszerű bázis ismétlődéseket mely lehetővé teszi gének be-, és kikapcsolását. Azonban a *C. jejuni* néhány alapvető ponton jelentősen különbözik a *H. pylori* – tól. Ezen utóbbi kórokozó esetén alig található két független törzs, mely egy vizsgált génre nézve azonos szekvenciát mutatna. Húsz *H. pylori* törzs esetén a vizsgált hét háztartási gén alléljainak száma 18 és 20 között változott míg ennél a változatok száma a *C. jejuni*-nál lényegesen kisebb volt (**3. táblázat**). Hogy a fellelhető változatok alacsonyabb száma a *C. jejuni* esetén annak tudható-e be, hogy alacsonyabb a rekombinációs események száma (pl. ritkább DNS felvétel miatt), vagy a *C. jejuni*-t érő környezeti hatások kevésbé megengedők-e a változatok populációban való megtartása tekintetében, mint a *H. pylori* esetén, ez nem ismert. Az azonban egyértelmű, hogy a rekombinációs frekvencia elég magas ahhoz, hogy igen nagyszámú szekvencia típust eredményezzen a fajon belül (**1. ábra**).

Eredményeink gyakorlati alkalmazhatósága tekintetében úgy tűnik, a kidolgozott MLST rendszer alkalmas a *C. jejuni* tipizálására. Az MLST típusok nem mutattak semmilyen összefüggést a törzsek földrajzi régiók szerinti megoszlásával. A vizsgált törzsek kis száma nem tette lehetővé a szekvencia típusok egyéb bélyegekkel, pl. a szerotípussal való kapcsolatának vizsgálatát. Egy, az Egyesült Királyságból származó tanulmány, mely nagyszámú (154), de többnyire helyi törzset vizsgált, talált összefüggést a törzsek szero-, és MLST típusa között.

Az egy génre vonatkozó relatíve kevés szekvencia változatra egy lehetséges magyarázat, hogy a *C. jejuni* viszonylag fiatal faj lehet, és kialakulásától kezdve még nem volt elég idő a változatok kialakulásához. Ez alapján a jelenség hasonló lehet a *Yersinia pestis* esetéhez, ahol a szekvencia diverzitás teljes hiányát figyelték meg úgy magyarázva azt, hogy ez a kórokozó nem önálló faj, hanem a *Y. pseudotuberculosis* egy újonnan kialakult egységes klónja lenne.

Egy alternatív magyarázat lehet, hogy a faj a közelmúltban esett (esik) át egy jelentős expanzió, melynek okai a baromfi tartás körülményeinek az elmúlt száz-kétszáz évben történő megváltozásban kereshetők. Ez a hirtelen elszaporodás magyarázhatja az allél variációk korlátozott számát és a szinonim mutációk alacsony frekvenciájú polimorfizmusát. A törzsek közötti gyakori rekombináció ugyanakkor jelentősen segítheti az előnyös tulajdonságok, pl. az antibiotikum rezisztencia terjedését.

A HAZAI C. JEJUNI IZOLÁTUMOK VIZSGÁLATA. A korábbi hazai, humán izolátumokon saját készítésű savókkal végzett szerotípus vizsgálatok a törzsek egy harmadát nem találta tipizálhatónak, mely magasabb volt a más országokban tapasztaltaknál. A korábbi vizsgálatban használt 60 savóval kapott eredmények nem hasonlíthatóak közvetlenül a mi, kereskedelmi forgalomban beszerezett, kombinált csoportokat is tartalmazó kittel kapott eredményeinkhez. Azonban nyilvánvaló volt, hogy egyes szerocsoportok (pl HS2) mindkét vizsgálatban gyakran fordultak elő (**4. táblázat**). Ez összhangban van mások megfigyelésével, hogy bár adott földrajzi területeken típus változás előfordulhat, egyes, domináló szerocsoportok meglehetősen stabilak maradhatnak.

A két hazai vizsgálat eredményei közti legfigyelemreméltóbb hasonlóság a nem tipizálható törzsek magas, 30% feletti aránya (**4. táblázat**). Ez mindenképpen indokolta e látszólag homogén csoport részletes vizsgálatát. Eredményeink igazolták, hogy e csoport nem homogén, benne molekuláris módszerekkel nagyszámú típus különíthető el (**2. ábra**). A tény, hogy vizsgált törzseinket a PFGE több csoportra osztotta, mint a PCR-RFLP, nem meglepő. A

makro-restríciót követő PFGE a teljes genomról ad felvilágosítást, míg a PCR-RFLP egy viszonylag rövid amplikonon belül elhelyezkedő bázis-változásokra érzékeny. A PFGE mintát befolyásoló genomiális változások nem kell, hogy feltétlenül érintsék az RFLP-vel vizsgált *flaA* gént.

A szerotipizálás, amellyel, hogy eredményei klinikai relevanciával bírhatnak, változatlanul hasznos kiegészítője a járványtani munkának, különösen molekuláris módszerekkel kombinálva. Eredményeink egyértelműen igazolják, hogy erre a hazánkban különösen magas arányban előforduló NT törzsek esetén feltétlenül szükség is van e csoport rendkívül heterogén mivolta miatt.

AZ EGYESÜLT ARAB EMIRÁTUSOKBAN IZOLÁLT CAMPYLOBACTER JEJUNI TÖRZSEK JELLEMZÉSE. AZ Emirátusokból származó törzsek vizsgálatokor nemzetközi összehasonlításban is kimagasló fluorokinolon rezisztencia értékeket találtunk. Hasonlóan magas értékeket eddig csak Spanyolországból (88 és 75 %), Hong Kongból (85,9%) és Indiából (77,1 %) jelentettek.

A Közel-Keletről kevés adat áll csak rendelkezésre. 1998-ban Libanonból 39 % rezisztenciát jelentettek, míg a közelmúltban a kuvaiti törzsek 53 % volt rezisztens. Lényeges, hogy ez utóbbi, illetve a saját vizsgálataink is egy-egy kórházban gyűjtött törzseken történtek. További, részletesebb vizsgálatok szükségesek annak felderítésére, hogy a rezisztencia prevalenciában talált különbségek az Arab félsziget északi és dél-keleti része között valóban fennáll-e. Korábban Jumaa és Neringer az általunk is vizsgált kórház, 1999 és 2002 között izolált törzseinél mintegy 50 %-os fluorokinolon rezisztenciát észlelt. Megjegyzendő azonban, hogy az általunk használt korongdiffúziós módszer nem validált, szemben az általunk használt kvantitatív eljárással. Ez természetesen elvileg nem zárja ki, hogy a két vizsgálat időpontja között jelentős, valós rezisztencia emelkedés is történt.

A régióban talált leggyakoribb szerocsoportok a HS4,13,16,43,50 komplex, és a HS2 voltak, mindkettő gyakran előfordul úgy hazánkban (**4. táblázat**), mint egyéb földrajzi területeken. Másokhoz hasonlóan mi is megfigyeltük, hogy a szero-, és molekuláris tipizálás eredményei nem feltétlenül fedik egymást. Azonos szerocsoportok különböző PFGE és RFLP típusokon belül előfordultak: pl. a HS2 a P4, P11, P12, P14 és P16 PFGE csoporton vagy az R6, R8, R10, R16 és R17 RFLP típuson belül. Ugyanakkor különböző szerocsoportok is előfordultak azonos geno-csoporton belül: pl. a HS2 és HS1,44 a P4-en, és a HS10, HS1,44 és a HS4,13,16,43,50 az R7-en belül (**3. ábra**). A hat érzékeny izolátum semmilyen módszerrel nem mutatott csoport-képzést.

Minden fluorokinolon rezisztens törzs hordozta a Thr-86 → Ile mutációt, amit itt minden esetben a *gyrA* gén részleges szekvenciájának meghatározásával is megerősítettünk. Ez a megfigyelés igazolja, hogy más régiókhoz hasonlóan e mutáció a leggyakoribb a fluorokinolon rezisztencia hátterében.

Úgy a QRDR régióon belül, mint azon kívül, másokhoz hasonlóan, mi is jelentős polimorfizmust figyeltünk meg. A 35 fluorokinolon rezisztens törzsben tíz különböző *gyrA* allél volt jelen, melyek közül mindössze kettő volt megtalálható a GenBankban. A törzsek 19,5 % -át kitevő, azonos PFGE és RFLP, tehát egy molekuláris típusba (MT1) tartozó törzsek homogén voltát az is igazolta, hogy mind azonos *gyrA* allélt hordoztak (**3. ábra**). Nem tudjuk kizárni vagy igazolni, hogy az esetek – e tekintetben sajnos semmilyen járványtani adat nem áll rendelkezésünkre – mind egy közös forrásból származnak-e. Még ha így is van, figyelembe véve azt a tényt, hogy e törzseket egy év alatt izoláltuk, ez a klón rendkívül stabil voltát igazolja. Egy jelentős változékonysággal bíró faj (lásd saját, fentebb ismertett eredményeinket) ezen reprezentánsai még az egyébként szelekciós nyomás alatt nem lévő szinonim mutációk tekintetében is azonosak voltak. Klonális komplexek kapcsolódhatnak bizonyos rezervoárokhoz, pl. baromfihoz, de stabil, hosszú időn át független forrásból

származó klónt szintén leírtak. A stabilitás oka e ritka, a fajra egyébként nem jellemző klónokban, komplexekben ismeretlen.

Eredményeink igazolják, hogy az idegenek, turisták által egyre fokozottabb mértékben látogatott országban az utazók hasmenéséért is gyakran felelőssé tehető *C. jejuni* törzsek között kimagasló a fluorokinolon rezisztens törzsek aránya. Tekintve, hogy az országban a mezőgazdaságban felhasznált szerekről sem tényszerű, sem mennyiségi adatok nem állnak rendelkezésre, a jelenség magyarázatára nem vállalkozhatunk.

ÚJ EREDMÉNYEK

1. Kidolgoztunk egy, a *Campylobacter jejuni* vizsgálatára alkalmas, hét háztartási gén részleges szekvenálásán alapuló Multi-Lókuszos Szekvencia Tipizálási módszert, és sikerrel alkalmaztuk azt különböző földrajzi területekről származó törzsek vizsgálatára, létrehozva egy, a gyakorlatban úgy tipizálási, mint populáció genetikai vizsgálatokra alkalmazható eljárást.
2. Megállapítottuk, hogy bár a fajban a hét vizsgált gén allélikus változatainak száma korlátozott, a kombinációik alapján felállítható szekvencia típusok megközelítik a vizsgált törzsek számát.
3. Igazoltuk öt háztartási gén esetén fellelhető homoplázia vizsgálatával, hogy a *C. jejuni* fajon belüli rekombináció messze meghaladja a legtöbb kórokozó esetén talált értéket és megközelíti, bár el nem éri a rokon, *Helicobacter pylori* esetén megfigyeltekét.
4. Eredményeink igazolták, hogy a hazai *C. jejuni* izolátumok mintegy harmada nem szerotipizálható. Igazoltuk, hogy egyes szerocsoportok évek óta jelentős, nem csökkenő arányban vannak jelen az országban.
5. Kimutattuk, hogy a nem szerotipizálható csoport csak látszólag homogén. Valójában egy, molekuláris módszerekkel rendkívül heterogénnek mutató csoportról van szó, így járványtani jellemzésükre az antigén-specifitás meghatározása semmiképpen nem elegendő.
6. Megállapítottuk, hogy ezen, utazók hasmenését is gyakorta okozó pathogén a fokozódó mértékben turista-célpontként szereplő Egyesült Arab Emírátságokban, illetve annak vizsgált kórházában, rendkívül gyakran rezisztens fluorokinolonokra.
7. A fluorokinolon rezisztencia hátterében a *gyrA* gén részleges szekvenciájának meghatározásával igazoltuk az enzim Thr-86 → Ile mutációját.
8. Molekuláris tipizáló eljárásokkal, illetve a *gyrA* gén szekvenálásán alapuló allél szám meghatározással azt találtuk, hogy a ciprofloxacinnal rezisztens törzsek közel 20 %-a azonos törzs komplexbe, feltehetően klónba tartozik. Egy nagymértékben változékonyságú faj esetén egy ilyen, legalább egy éven át stabil csoport megléte meglepő és ritka lelet.

A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

(Összesített impakt faktor: 6.302)

1. Suerbaum S, Lohrengel M, **Sonnevend A**, Ruberg F, Beuerle B, Kist M: Allelic diversity and recombination in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriology* 2001. **183**:2553-2559 (**3,984**)
2. **Sonnevend A**, Pál T: Heterogeneity of non-serotypable *Campylobacter jejuni* isolates *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2006. **53**:171-181
3. **Sonnevend A**, Rotimi VO, Kolodziejek J, Usmani A, Nowotny N, Pál T: High level of ciprofloxacin resistance and its molecular background among *Campylobacter jejuni* strains isolated in the United Arab Emirates. *J Med Microbiol.* 2006. **55**:1533-8. (**2,318**)

A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KONFERENCIA SZEREPLÉSEK

1. **Sonnevend A**, Pál T: Typing of *Campylobacter jejuni* by heat stable antigen and protein profile. 2000 Congress of the Hungarian Society of Infectology, Budapest, Hungary
2. **Sonnevend A**, Czirók É, Pál T: Molecular, sero-, and antibiotic susceptibility typing of *Campylobacter jejuni* strains isolated in Hungary, 2003 Congress of the Hungarian Society of Microbiology, Balatonfüred, Hungary
3. **Sonnevend A**, Pal T: Phenotypic and genotypic typing of *Campylobacter jejuni* strains isolated in the United Arab Emirates 2005, UAEU Research Conference, Al Ain, UAE

A TÉZISEKTŐL FÜGGETLEN PUBLIKÁCIÓK

(Összesített impakt faktor: 50.683)

1. Conlon JM, **Sonnevend A**, Patel M, Camasamudram V, Nowotny N, Zilahi E, Iwamuro S, Nielsen PF, Pal T. : A melittin-related peptide from the skin of the Japanese frog, *Rana tagoi*, with antimicrobial and cytolytic properties. 2003 *Biochem Biophys Res Commun.* **306**:496-500. (**IF:2.836**)
2. Conlon JM, **Sonnevend A**, Patel M, Davidson C, Nielsen PF, Pal T, Rollins-Smith LA: Isolation of peptides of the brevinin-1 family with potent candidacidal activity from the skin secretions of the frog *Rana boylei*. 2003 *J Pept Res.* **62**:207-13. (**IF:1.545**)
3. **Sonnevend A**, Knoop FC, Patel M, Pal T, Soto AM, Conlon JM. Antimicrobial properties of the frog skin peptide, ranatuerin-1 and its [Lys-8]-substituted analog. 2004 *Peptides* **25**:29-36. (**IF:2.511**)
4. Conlon JM, **Sonnevend A**, Patel M, Al-Dhaheri K, Nielsen PF, Kolodziejek J, Nowotny N, Iwamuro S, Pal T: A family of brevinin-2 peptides with potent activity against *Pseudomonas aeruginosa* from the skin of the Hokkaido frog, *Rana pirica*. 2004 *Regul Pept.* **118**:135-41. (**IF:2.531**)

5. Conlon JM, **Sonnevend A**, Davidson C, Smith DD, Nielsen PF.: The ascaphins: a family of antimicrobial peptides from the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. 2004 *Biochem Biophys Res Commun.* **320**:170-5. (IF:2.904)
6. Bevier CR, **Sonnevend A**, Kolodziejek J, Nowotny N, Nielsen PF, Conlon JM. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the mink frog (*Rana septentrionalis*). 2004 *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **139**:31-8. (IF:1.651)
7. Conlon JM, **Sonnevend A**, Davidson C, Demandt A, Jouenne T.: Host-defense peptides isolated from the skin secretions of the Northern red-legged frog *Rana aurora aurora*. 2005 *Dev Comp Immunol.* **29**:83-90. (IF:3.261)
8. Rollins-Smith LA, King JD, Nielsen PF, **Sonnevend A**, Conlon JM. : An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura: Leptodactylidae). 2005 *Regul Pept.* **124**:173-8. (IF:2.272)
9. Conlon JM, **Sonnevend A**, Jouenne T, Coquet L, Cosquer D, Vaudry H, Iwamuro S.: A family of acyclic brevinin-1 peptides from the skin of the Ryukyu brown frog *Rana okinavana*. 2005 *Peptides* **26**:285-90. (IF:2.231)
10. Kerényi, M., Allison, H.E., Bártai, I., **Sonnevend, Á.**, Emődy, L., Plavetczky, N., Pál, T., Occurrence of *hlyA* and *sheA* genes in extraintestinal *Escherichia coli* strains. 2005 *J Clin Microbiol.* **43**:2965-8. (IF:3.537)
11. Pál, T, **Sonnevend, A.**, Galadari, S., and Conlon, J.M. Design of potent, non-toxic antimicrobial agents based upon the structure of the frog skin peptide, pseudin-2. 2005 *Regul Pept.* **129**:85-91. (IF:2.272)
12. Szabó, E., Skedsmo, A., **Sonnevend. Á.**, Al-Dhaheri, K., Emődy, L., Usmani, A., Pál, T.: Curli expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* 2005 *Folia Microbiologica* **50**:40-6. (IF:0.918)
13. Conlon JM, Abraham B, Galadari S, Knoop FC, **Sonnevend A**, Pal T. : Antimicrobial and cytolytic properties of the frog skin peptide, kassinatuerin-1 and its l- and d-lysine-substituted derivatives. 2005 *Peptides.* **26**:2104-10. (IF:2.231)
14. Conlon JM, Abraham B, **Sonnevend A**, Jouenne T, Cosette P, Leprince J, Vaudry H, Bevier CR: Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the carpenter frog *Rana virgatipes* (Ranidae, Aquarana) 2005 *Regul Pept.* **131**:38-45. (IF:2.272)
15. King JD, Al-Ghaferi, Abraham B, **Sonnevend A**, Leprince J, Nielsen PF, Conlon JM: Pentadactylin: an antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus* 2005 *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **141**:393-7. (IF:1.458)
16. **Sonnevend A**, Czirók É, Pál T: Yersinia Yop-specific IgA antibodies in Hungarian blood donors 2005 *Folia Microbiologica* **50**:269-272 (IF:0.981)

17. Conlon JM, Al-Ghaferi N, Abraham B, **Sonnevend A**, Coquet L, Leprince J, Jouenne T, Vaudry H, Iwamuro S.: Antimicrobial peptides from the skin of the Tsushima brown frog *Rana tsushimensis*. 2006 *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **143**:42-49 (IF:1.991)
18. **Sonnevend A**, Al-Dhaheri K, Mag T, Herpay M, Kolodziejek J, Nowotny N, Usmani A., Sheikh AF, Pál T: CTX-M-15 producing multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli* in the United Arab Emirates 2006 *Clin Microbiol Inf* **12**:582-585 (IF:3.254)
19. Pál T, Abraham B, **Sonnevend A**, Jumaa P and Conlon JM: Brevinin-1BYa: a naturally occurring peptide from frog skin with broad spectrum anti-bacterial and anti-fungal properties. 2006 *Int.J.Antimicrob.Agents* **27**:525-529 (IF:2.221)
20. Conlon JM, Al-Ghaferi N, Abraham B, **Sonnevend A**, King JD, Nielsen PF: Purification and properties of laticiptin, an antimicrobial peptide from skin secretions of the Santa Fe frog *Leptodactylus laticeps* 2006 *Protein and Peptide Letters* **13**:355-359. (IF:1.13)
21. Jumaa PA, **Sonnevend A**, Pal T, El Hag M, Amith R, Trad O. The molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia in a tertiary referral hospital in the United Arab Emirates 2000-2004. 2006 *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* **28**:32.
22. Urban E, Nagy E, Pal T, **Sonnevend A**, Conlon JM. Activities of four frog skin-derived antimicrobial peptides (temporin-1DRa, temporin-1Va and the melittin-related peptides AR-23 and RV-23) against anaerobic bacteria. 2007 *Int J Antimicrob Agents.* **29**:317-21. (IF:2.338)
23. Rotimi VO, Jamal W, Pal T, **Sonnevend A**, Dimitrov TS, Albert MJ. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella spp.* and isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Kuwait and the United Arab Emirates. 2008 *Diagn Microbiol Infect Dis.* **60**:71-7. (IF:2.448)
24. Rotimi VO, Jamal W, Pal T, **Sonnevend A**, Albert MJ. Emergence of CTX-M-15 type ESBL producing *Salmonella spp.* in Kuwait and the United Arab Emirates 2008 *J Med Microbiol.* **57**:881-886 (IF:2.091)