

SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

Előtérbe nyomuló multirezisztens Salmonella Infantis evolúciója és pathogenetikai profilja

Kutatási időszak: 2012-2016

Bevezetés és célok

A broiler (húscsirke) állományok *Salmonella Infantis* fertőzöttsége a legtöbb európai országban komoly gondot jelent, főként Magyarországon, ahol az utóbbi másfél évtizedben a *S. Infantis* fertőzöttség jelentős méreteket ölt. Bár a hazai tojó- és tenyészállományok fertőzöttsége e tekintetben elhanyagolható, broilerek (vágóbaromfi) fertőzöttsége a 2000-es évek elejétől kezdve egyre magasabb arányú, vágás előtti fertőzöttséget mutatva, 2006-ra gyakran 60% fölötti arányban bizonyultak fertőzöttnek (EFSA 2007, EFSA-ECDC 2015). A közegészségügyi járványügyi adatok szerint is újabban a *S. Infantis* a salmonellosisok második leggyakoribb okozója a *S. Enteritidis* mögött (EPINFO, 2016). Korábbi adataink szerint, a *S. Infantis* törzseknek az emberek és a broilerek közötti hazai előretörése egy multirezisztens (MDR) klóncsoport, és azzal együttjáró konjugatív MDR nagyplazmid megjelenésével lehetett összefüggésben (Nógrády és mtsai., 2007, 2008).

Mivel a fenti sajnálatos járványhelyzet hazánkban stabilizálódott és mivel a *S. Infantis* az EU által, zoonózis szempontból legfontosabbnak minősített 5 *Salmonella* szerocsoport egyike, fontosnak véltük, hogy kutatásaink néhány, tudományos igénnyel megválaszolható, de a gyakorlat számára is fontos kérdést ill. feladatot célozzanak meg.

Kitűzött feladataink két fő kérdéskörre („Evolúció” és „Pathogenetika”) irányultak

I. Evolúciós témakör

1. Az elmúlt 10-15 évben Magyarországon és az EU országokban dominánssá vált *S. Infantis* törzsek fenotípusos és genetikai jellemzése. Molekuláris epidemiológiai és összehasonlító genomikai vizsgálatok (WP1)

2. Evolúciós folyamatok több évtizedes WGS alapú nyomonkövetése, valamint plazmid profilok, és nagy plazmidok, összehasonlító genom analízise (WP2)

II. Pathogenetikai témakör

1-2-ig: A pre-emergens (1995. előtti) és azt követően előretörő (2000. utáni) emergens törzsek pathogenetikai és adaptációs tulajdonságai egymástól mennyiben különböznek?

A Salmonella pathogenitási szigetek (SPI1 – SPI2) vizsgálata, eliminációja és ezek hatása, a genom átrendeződést elősegítő eszközzrendszer létrehozása (WP3)

3-6-ig: Mely feno-, és genotípusok lehetnek a terjedésért és előretörésért felelősek? Kromoszómáisan kódolt egyéb virulencia faktorok analízise, plazmid elimináció és transzfer, *in vitro* és *in vivo* pathogenitási vizsgálatok (WP4)

Az 1-2., ill. 3-6. alpontokon belüli további részletekre az Eredmények fejezetben térünk ki.

Az eredeti munkaterv megvalósítása

Szakmai tartalom tekintetében az eredeti munkatervhez képest eltérés nem volt. A munka a fentieknek megfelelő fő-, és altémákban (WP1 - 4.) folyt. Időben viszont - akadályoztatás miatt - a témavezető, 2013-ban egy éves menetközi felfüggesztésre kért és kapott engedélyt. Itt jegyezzük meg, hogy a projekt szekvencia analízissel kapcsolt feladataihoz, NAIK-MBK részéről további négy, a Sanger Intézet (Cambridge) és a Nottingham Egyetem, részéről (UK) pedig további két vezető kutató csatlakozott (l. Genome Announcement 2015, 2016, 2017 publikációk szerzői).

Eredmények és megbeszélés

I. Evolúció témakörében végzett vizsgálatok.

1. Epidemiológiai és molekuláris epidemiológiai alapadatok: hazai és EU eredetű *S. Infantis* utóbbi 10-15 évi izolátumainak feno- és genotípusa

Eredeti munkatervünknek megfelelően, a korábbi vizsgálatok (Nógrády és mtsai., 2007) eredményeként kimutatott, előtérbe nyomuló multirezisztens *S. Infantis* klóncsoport nemzetközi (elsősorban közép európai) és hazai terjedését és evolúcióját, három vizsgálat-sorozatban tanulmányoztuk. Az első sorozatban (A) a 2000-2008 közötti, majd pedig (B) a 2011-2013 között izolált, hazai broiler és humán eredetű törzseket analizáltuk. Ezt követően (C) kerülhetett sor a 2011-2016 között izolált külföldi törzsek molekuláris epidemiológiai vizsgálatára. Összességében, 10 európai ország 380 *S. Infantis* törzsét vizsgáltuk. A *S. Infantis* törzsek genomevolúciójának epidemiológiai hátterét ezen vizsgálatok által kívántuk megismerni.

A) Az első vizsgálat-sorozatban kilenc EU országból származó 76 broiler eredetű *S. Infantis* törzset vizsgáltunk, további öt kontroll törzs beiktatásával. A törzsek fenotípusos és molekuláris jellemzésére a korábbiaknak (Nógrády és mtsai., 2007) megfelelően antibiotikum rezisztencia fenotípus és PCR-alapú génmintázat meghatározás mellett pulzáló gél-elektroforézist (PFGE) és plazmid profil analízist használtunk. Ezek eredményeként a törzseket két nagy (A és B) PFGE klaszterbe és számos klónba lehetett sorolni. Az „A” klaszter (n=39) törzsei (német, olasz, UK, valamint a korai magyar izolátumok) jellemzően érzékenyek voltak a vizsgált antibiotikumokra és nem rendelkeztek plazmidokkal vagy integronokkal. Ezzel ellentétben a „B” klaszter (n=33) törzseit többségükben a Nal-Tet-Str-Sul (nalidixin-tetraciklin-streptomycin-szulfonamid) rezisztencia mintázat jellemezte, mely rezisztencia részben egy 1-es típusú integront is hordozó, akkor még >168 kb méretűnek becsült konjugatív plazmidhoz kötött. A MDR „B” klaszter törzsei tehát a korábban előtérbe nyomult és jelenleg domináns magyar *S. Infantis* törzsekkel azonos, vagy azokhoz hasonlóak voltak (Nógrády és mtsai., 2007, 2008). Ezen „B” klaszterbe tartozott valamennyi osztrák izolátum, a lengyel törzsek fele és egy-egy román ill. török törzs, melyek mindegyike rendelkezett a fenti MDR plazmiddal (Nógrády és mtsai., 2012).

B) Munkatervünknek megfelelően, ezt követően került sor a 2011-2013 közötti magyarországi humán és broiler eredetű *S. Infantis* törzsek molekuláris epidemiológiai vizsgálatára. Ennek első lépéseként, a teljes genomanalízisnek alávetett, hazai emergens MDR törzseket reprezentáló SI54/04 törzs fentiekben még >168 kb plazmidjának méretét 277 kb-ra pontosítottuk s pSI54/04 neveztük el, majd ezen plazmidnak ill. variánsainak endémiás jelentőségét, genetikai sajtságait vizsgáltuk (Szmolka és mtsai., 2017). Adataink szerint, a 186 *S. Infantis* törzset reprezentáló 78, molekuláris analízisnek alávetett törzs közül 71 a „B” klaszterbe tartozó pSI54/04 konjugatív MDR plazmidot vagy annak variánsát hordozó MDR *S. Infantis* törzs volt. Korábbi adatainkat is figyelembe véve megállapítottuk, hogy a ezen,

„B” klónok a 2000-es évek elejétől észlelt előtérbe kerülésük óta a hazai broiler állományokban endémiássá váltak. Megjegyezzük, hogy ezzel párhuzamosan, a 2015-ös évre a humán salmonellosisok okozói között a *S. Enteritidis* (66.1%) mögött a *S. Infantis* a második leggyakoribb (8.6%) szerotípus lett (EPINFO, 2016). Eredeti feltételezésünk szerint a „B” klaszterbe tartozó MDR *S. Infantis* törzseknek a broiler állományokban való elterjedése jelentős részben a pSI54/04 és azzal rokon plazmidoknak köszönhető. Eredményeink ezen feltételezést igazolták: a Nal-Sul-Tet fenotípusú pSI54/04 plazmidot hordozó *S. Infantis* törzsek 2011-2013. között mind a vizsgált humán (n=95), mind broiler (n=91) izolátumok között dominánsak voltak. A humán izolátumok között, a pSI54/04 plazmidot hordozó „B” klaszterre jellemző Nal-Sul-Tet fenotípus ezen idő alatt 36%-ról 66%-ra, míg a broiler izolátumok között 64%-ról 72%-ra növekedett. A genom szekvencia adatok alapján megállapítottuk, hogy a pSI54/04 plazmid számos virulencia (pl: yersiniabactin, K88-szerű fimbriák) és rezisztencia [pl: 1-es típusú integron által hordozott kazetták, tetraciklin rezisztencia (*tetA*), valamint nehézfém rezisztencia (Hg, Te) génnel rendelkezik, s az Izraelben domináns humán eredetű pESI *S. Infantis* plazmiddal nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutat. A prototípus pSI54/04 plazmid és változatainak azonosítására, a jellemző rezisztencia- és virulencia marker génekre (*int1*, *tetA*, *aadA1*, *merA*, *tehA*, *repA*, *irp1*, *fyuA*, *pefC*, *fae1*, *htrE*) specifikus PCR-tipizáló rendszert dolgoztunk ki, melyet az egyéb, kromozómális és plazmidon kódolt rezisztencia gének detektálása céljából az AMR05 PCR microarray-el (Alere-Technologies) egészítettünk ki. A rezisztencia génpanel alapján, a hazai humán és broiler eredetű törzsek többségében a prototípus pSI54/04 plazmidot (esetenként egyéb rezisztencia plazmidok társaságában), máskor pedig annak három különböző deléciós változatát mutattuk ki. A vizsgált törzsek 90%-ban a „B” klónba tartoztak. A pSI54/04 plazmidra jellemző virulencia génekkel (*repA*, *irp1*, *fyuA*, *pefC*, *fae1*, *htrE*) a prototípus és variáns plazmidok egyaránt rendelkeztek. A pSI54/04 társplazmidjain egyéb, a jövőt illetően figyelmet érdemlő rezisztencia géneket (*qnrB*, *qnrS*, *bla_{TEM-1}*) azonosítottunk (Szmolka és mtsai., 2017).

C) Az epidemiológiai és molekuláris epidemiológiai munkák harmadik fázisában került sor az időközben (2013-2016) hat közép európai országból gyűjtött, túlnyomóan broiler eredetű *S. Infantis* törzsek (n=117) vizsgálatára. Az eredmények részben a MDR „B” klóncsoport dominanciájára vonatkozó, korábbi adatainkat (Nógrády és mtsai., 2012, Szmolka és mtsai., 2017) erősítették meg, részben pedig kiegészítették azokat. A hazai törzsektől eltérően a külföldi broiler eredetű törzsek között a domináns Nal-Sul-Tet rezisztencia mintázat a gyakran társult trimethoprim (Tmp) rezisztenciával, mely vélhetően 2-es típusú

integronhoz, s annak *dfr14* kazettájához kötött. Ennek megfelelően a domináns „B” kló csoporton belül, a fentiekben jellemzett pSI54/04 prototípus plazmid mellett további variáns plazmidokat valamint újabb rezisztencia géneket (*qnrS*, *bla*_{TEM-1}, 2-es típusú integron) hordozó társplazmidokat mutattunk ki, egyes országokra jellemző antibiotikum rezisztencia ill. plazmid mintázat mellett (Szmolka és mtsai., 2017, kézirat-előkészítés Acta Microbiol. Immunol. Hung). Egyébként, a broiler törzseket kiegészítő néhány tojó eredetű *S. Infantis* izolátum a pánszenzitív vagy nem-multirezisztens törzsek csoportjába tartozott.

Eddigi epidemiológiai és molekuláris epidemiológiai vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy az utóbbi másfél évtizedben Magyarországon és Közép-Európa jelentős részén egyre nagyobb gyakorisággal és nagyobb arányban előforduló MDR *S. Infantis* törzsek egy, meglehetősen közeli vonalaktól álló „B” klasztert alkotnak, melynek jellemző plazmidja az általunk részletesen jellemzett pSI54/04 prototípus plazmid (277 kb, MDR és virulencia géneket hordozó), mely itthon és a környező országokban domináló két nagy broiler tenyész vonalból (Ross308 és Cobb 500) származó végtermék állományokra általában jellemző. Következésképpen, a „B” klaszterbe tartozó MDR *S. Infantis* törzsek nem kizárólagosan magyar klónt képviselnek, hanem feltehetően a nemzetközi broiler tenyészvonalakkal behozott és a térségben terjedő, egyre több rezisztencia plazmidot és gént fölvenni képes „B” klaszter törzsei. Ezek főntiekben vázolt evolúciója, minden bizonnyal, a térségre jellemző broiler tartási és antibiotikum használati viszonyokat tükrözheti. További feladatunk elsősorban a hazai broiler állományokban honos *S. Infantis* törzsek evolúciójának nyomkövetése volt.

2. *S. Infantis* törzsek teljes genomjának és plazmidjainak szekvencia szintű jellemzése

2.a. Teljes genom szekvencia analízisek: összehasonlító genomikai vizsgálatok

Az itt ismertetett, elsősorban a teljes genom szekvenálásra (WGS) alapozott vizsgálatok során kerestünk választ arra a kérdésre, hogy a fenti molekuláris epidemiológiai adatok alapján mely törzsekre alapozhatunk, s milyen evolúciós folyamatok rajzolhatók ki?

A törzsek kiválasztásában tekintettel voltunk arra, hogy Európában és így Magyarországon is a 80-as évek közepén már volt egy a *S. Infantis* dominancia, melyet akkor még csak a közegészségügyi vizsgálatok támasztottak alá. Ekkor a *S. Infantis* a megbetegedéseket okozó szerocsoportok között a 2., 3. helyen volt (Gadó s mtsai., 1998).

Majd ez, a 90-es években alábbhagyva a broiler (és ezt követően a humán) fertőzöttség a 2000-es évek első felétől emelkedett ismét a jelenlegi szintre (Nagy B., 2010, Derzsy Nap, Siófok). Így az elmúlt három évtizedben két, *S. Infantis* dominanciával jellemezhető időszakot és a közöttük lévő „nyugalmi periódust” igyekeztünk evolúciós szempontból vizsgálni. Ezek reprezentánsai mellé, kontrollként egy, mérsékelt pathogenitással jellemezhető angol (UK), egészséges baromfiból az 1980-es évek elején izolált, pánsszenzitív, plazmid mentes, mérsékeltén pathogén *S. Infantis* törzset választottunk (Barrow és mtsai, 1989, és Barrow személyes közlés).

A teljes genom szekvenálásra ezen szempontok alapján kiválasztott UK (baromfi) és magyar (két, 80-as évek klinikai eseteiből származó humán és 5 korai és recens, baromfi eredetű) *S. Infantis* törzsek és főbb WGS adatait, izolálási idejüket figyelembe véve, az alábbi táblázat ismerteti:

Törzs	Származás/év	PFGE	Annotált gén	rRNS	tRNS	Plazmid (kb)
1326/28	UK (1980)	T	4671	44	168	-
SI15023h	HU (1980)	R	4758	49	159	-
SI220h	HU (1982)	Z	4716	52	181	-
SI69/94	HU (1994)	A1	4664	44	170	-
SI54/04	HU (2004)	B2	4623	44	172	277
SI3337/12	HU (2012)	B2	4670	51	221	277+45
SI757/13	HU (2013)	B2	4682	52	223	277
SI786/13	HU (2013)	B1	4674	54	220	210
SI240/16	HU (2016)	B10	5048	48	159	277+49
SI1070/16	HU (2016)	B11	4985	49	160	268

A virulenciában és a terjedésben szerepet játszó funkciók azonosítása érdekében kilenc *S. Infantis* törzs genomszekvencia meghatározását végeztük el. Ezen túl, közös publikáció alapján bevonásra került a genom analízisbe az Egyesült Királyságban izolált 1326/28 törzs, melynek szekvencia meghatározását a Sanger Intézet (Cambridge) végezte. A törzsek draft genom szekvenciáit elhelyeztük a GenBank-ban. Ezen 10 törzs szekvenciájából álló kollekción kiemelkedik a publikált *S. Infantis* genomszekvenciák közül, mivel egy japán kutatócsoport kivételével senki sem végzett el hasonló mennyiségű vizsgálatot. Az is kiemelendő, hogy a törzsek kiválasztása szisztematikusan történt, támaszkodva az előzetes jellemzésekre (PFGE

analízis), továbbá egy meghatározott időskálára, ami lehetővé teszi a törzsek evolúciójának analízisét is. Az időskála a korai 80-as évektől terjedt „napjaink” (2016) izolátumáig.

A kilenc hazai *S. Infantis* törzsből készített genomi könyvtárak 2×300 bp paired-end szekvenálása Illumina MiSeq platformon zajlott (Enviroinvest Zrt., Pécs, illetve UDGenomed Zrt., Debrecen). Ennek eredményeként kapott legalacsonyabb reads szám 1,6 millió, míg a legmagasabb 19,9 millió read volt, ami nagyon nagy lefedettséget jelentett (95-1274-szeres), ami a genomok további analíziséhez megbízható háttérrel biztosított (genom mérettől és fajtól függően 30-50x lefedettség szükséges baktériumok esetében). A read-ek de novo összeszerelése A5-MiSeq nevű pipeline-nal készült (Coil és mtsai., 2015). A GC tartalom 53 és 51% között alakult, ami megfelel a *Salmonella* törzsek GC tartalmának. A kromoszóma méret is megfelelt a *Salmonella* genomok méretének, a két szélső érték 4690379 bp és 4983448 bp volt. Ez a méretbeli eltérés nem szokatlan bakteriális genomok esetében, sőt ennél nagyobb szórások is előfordulnak. Ezeket a jelenségeket általában horizontális géntranszferrel lehet magyarázni. A genomok annotációját a Rast annotáló szerveren végeztük el (Aziz és mtsai., 2008). Az egyes törzsekre jellemző annotált gén, tRNS, és rRNS-számokat a fenti táblázat tartalmazza.

A projekt keretében elvégzett szekvencia analízis eredményeinek bioinformatikai feldolgozása.

Az analízis során a Magyarországról származó broiler (SI1070/16, SI240/16, SI3337/12, SI54/04, SI69/94, SI757/13, SI786/13), humán (SI220h, SI15023h), illetve az Egyesült Királyságból származó broiler (1326/28) teljes genom adatait analizáltuk. Ezek a törzsek több mint három évtizedes időtávot fognak át. Az analízis során csak a kromoszómális DNS-t vettük alapul, azaz a plazmidok szekvenciáit kivettük a vizsgálatból, hogy az analízis csak a kromoszómák analízisét mutassa.

Összehasonlítva a Magyarországról származó, valamint az Egyesült Királyságból származó broiler (1326/28) izolátumban található genom átrendeződéseket, a következőket állapíthatjuk meg:

- A 9 hazai törzset egymáshoz hasonlítva legalább 99.91% hasonlóságot figyeltünk meg.
- A különbségek két fő összetevőből adódtak: egyrészt indel átrendeződések, másrészt SNP-k. A két kategória közül az SNP, jelentették a legnagyobb hányadot, s ezek sem egyenletesen oszlottak meg a genomok mentén.
- A genom átrendeződések elsősorban az időbeliséget tükrözik: azaz, időben egybeeső

izolátumokban a genom szerveződés nagyon hasonló, annak ellenére, hogy a törzsek szignifikáns különbségeket mutatnak.

- A mintákban kevés egyedi contig található (a plazmidok kivételével, de ezeket kivontuk az analízisből). Ebből adódóan a genomon belül csak az egyes contigok, szekvenciák sorrendje változik.
- A fenti megállapítás nem feltétlenül vonatkozik a mobilis elemekre.
- Az átrendeződések nagyon nagy számban vannak jelen, azok minden típusa reprezentált (inszerció, inverzió, delécio).
- Magát az átrendeződések számát tekintve nincs különbség a magyarországi és az Egyesült Királyságból származó *S. Infantis* genomok között. Természetesen ez csak számbeli különbséget jelent, s nem vonatkoztatható a szekvencia hasonlóságokra.

A genom szekvenciákat ismertető munkáink eddigi eredményeit három Genome Announcement publikációban összegeztük: Olasz és mtsai. (2015), Wilk és mtsai. (2016), valamint Wilk és mtsai. (2017).

2.b. *S. Infantis* nagyplazmidok jellemzése: plazmid szekvenciák mint az evolúció részei

Az emergens multirezisztens B klónsoportot reprezentáló SI54/04 törzs pSI54/04 plazmidjának szekvencia analízise

A fenti WGS analízisre bocsátott 10 *S. Infantis* törzs közül az „A” klónsoportoz tartozó pán-szenzitív 1326/28 (1980 – UK) valamint a SI69/94 (1994 - HU) törzsek, plazmid mentes referencia genomként is szerepeltek. Ezek szekvenciáihoz a „B” klónsoportot képviselő MDR törzsek teljes genomszekvenciáit hasonlítva, először a SI54/04 törzs esetében egy 277 kb méretű plazmidot azonosítottunk (GenBank Assembly ID: JRXC000000000), mely a további analízisek szerint az Izraelben endémiás humán MDR *S. Infantis* törzsek genomjában leírt pESI megaplazmiddal (Aviv és mtsai., 2014) azonos méretűnek bizonyult (Olasz és mtsai., 2015). A hazai SI54/04 jelű MDR *S. Infantis* törzs plazmidját a továbbiakban pSI54/04 jelöléssel illettük. A két plazmid egyes rezisztencia, virulencia valamint replikációs és transzfer régióit illetően különböző mértékű de jelentős hasonlóságot észleltünk (Szmolka és mtsai., 2017). A későbbiek során WGS analízisnek alávetett „B” törzsek mindegyikében találtunk olyan contigokat, melyek a pSI54/04 prototípus plazmidra, vagy annak variánsaira,

esetenként pedig további, kisebb méretű társplazmidok jelenlétére utaltak (Olasz és mtsai, 2015, Wilk és mtsai, 2016, 2017).

Egyéb MDR *S. Infantis* nagyplazmidok szekvenciái és társplazmidjai

A genomszekvenciák összehasonlítása alapján az SI3337/12 törzs esetében egy 277 kb és egy 45 kb nagyságú plazmidot, a SI757/13-ban egy 277 kb nagyságút, míg SI786/13 esetében egy 210 kb nagyságú plazmidot prediktáltunk. A SI3337/12 és SI757/13 törzsek 277 kb méretű plazmidjai a pSI54/04 plazmiddal azonosnak bizonyultak, s attól mindössze 10-12 SNP eltérést mutattak, amely egyértelműen ezen plazmidok közös eredetére utal. Kimutattuk, hogy az SI786/13 törzsben található 210 kb plazmid a pSI54/04 megaplazmidból keletkezett a plazmidon két kópiában megtalálható IS26 elem egyikének transzpozíciója révén. A transzpozíciós deléció érintette az antibiotikum- és nehézfém rezisztencia géneket (tetraciklin, streptomycin/spektinomycin, higany), valamint a konjugatív transzfer gének egy részét. A fentiekben leírt plazmid tipizáló rendszerben ezt a pSI54/04 plazmid deléciós változataként azonosítottuk (Szmolka et al., 2017). Az SI3337/12 törzsben a pSI54/04 társplazmidjaként azonosított 42 kb *bla*_{TEM-1} plazmid a *S. Typhimurium*ban leírt YU39_IncX plazmiddal mutatta a legnagyobb homológiát.

A két legfrissebb MDR *S. Infantis* izolátum közül, a SI240/16 esetében egy 49 kb és egy 277 kb nagyságú plazmidot, míg SI170/16-ban egy 268 kb nagyságú plazmidot prediktáltunk. Az SI240/16 törzsekben azonosított 277 kb méretű plazmid azonosnak bizonyult a pSI54/04 plazmiddal, s attól mindössze 11 SNP eltérést mutat. A SI1070/16 törzs 268 kb plazmidja 92-99%-os azonosságot mutatott a pSI54/04 plazmiddal. Az SI786/13 plazmidjához hasonlóan elvesztette a tetraciklin, streptomycin/spektinomycin és higany rezisztencia géneket hordozó régiót, ugyanakkor ~ 20 kb nagyságú új, a pSI54/04 plazmidtól eltérő szekvenciát is tartalmaz, mely egy *bla*_{CTX-M} gént hordoz. Ez a tény arra utal, hogy a MDR plazmid újabb antibiotikum rezisztencia kódoló DNS szakaszokat is képes felvenni, magába integrálni. Ennek feltehető oka, hogy a pSI54/04 MDR plazmidon számos inszerciós szekvencia (pl. több IS26 kópia) található, melyek egyrészt homológ rekombináció, másrészt transzpozíció révén genom átrendeződéseket (deléció, inverzió, fúzió, áthelyeződés) képesek okozni. Az SI240/16 törzsben prediktált 49 kb kisebb plazmid 61%-a mutat 99%-os azonosságot a korábban szekvenált SI3337/12 törzsben meghatározott 45 kb *bla*_{TEM-1} plazmiddal. Legnagyobb hasonlóságot az *E. coli*-ból izolált pEQ2 plazmiddal mutatja, annak részét képezi (119858-167550 bp).

Az itt ismertetett genom- és plazmid szekvencia analízisek eredményeinek evolúciós és filogenetikai szempontból való bioinformatikai értékelése valamint publikációs előkészítése folyamatban van, de az itt is megállapítható, hogy a hazai recens MDR *S. Infantis* törzsek egymással szorosabb szekvencia hasonlóságot mutatnak, míg az un. korai „pre-emergens” szenzitív, magyar és UK izolátumok szekvencia alapon ezektől elkülönülnek.

A fentieket erősítik meg a 10 szekvenált törzs időközben elvégzett PFGE vizsgálata is (1. ábra). A törzsek *XbaI* enzimmel nyert, genomiális fragment mintázata szerint ugyanis a hat hazai „emergens” (2004-2016 között izolált) MDR *S. Infantis* törzs >95%-os hasonlóságot mutatva, mind a „B” klaszterbe tartozik, de azon belül három PFGE klónt (B1, B2, B11) képvisel. Ugyanakkor az un. korai „pre-emergens” (1980—1994 között izolált) szenzitív, magyar és UK izolátumok, fragment mintázata csupán 80-90% közötti hasonlóságot mutatva, mind eltérő klónokat (A1, R1, T1, Z1) képviseltek (1. ábra).

1. ábra. A teljes genom szekvencia analízisnek alávetett 10 *S. Infantis* törzs PFGE (*XbaI*) törzsfája.



A vizsgált törzsek összehasonlítása nagyon fontos következtetések levonására nyújt lehetőséget. Alapvetően ketté kell választani az extrakromoszómális elemek és a kromoszóma evolúcióját.

Az extrakromoszómális elemek között a plazmidok megjelenése feltételezhetően horizontális géntranszfer révén jött létre, s ez összefüggésben lehet a broiler tenyésztésben kezdetekben alkalmazott antibiotikum kezeléssel. Ez a megállapítás különösen igaz a pSI54/04 plazmidra, amely multirezisztenciát hordoz. A horizontális transzfer lehetőségét

megerősíti az is, hogy a pSI54/04 plazmidot kísérletesen is bizonyítottuk, hogy konjugatív, így pl. átvihető laboratóriumi *E.coli* törzsekbe.

Maga az MDR pSI54/04 plazmid sem volt stabil a vizsgált törzsekben, benne átrendeződések zajlottak (deléció, inverzió, fúzió, áthelyeződés), mely egyrészt gének/funkciók elvesztésével jártak (pl. antibiotikum determinánsok), másrészt inszerciók megjelenésével, melyekre az volt jellemző, hogy más plazmidokból történt egyes régiók áthelyeződése. Mindezek háttérében a mobilis elemek állnak, melyek több kópiában is jelen vannak a pSI54/04 plazmidon. Az mobilis elemek vagy transzpozíció, vagy a különböző kópiák között létrejövő homológ rekombináció szolgál magyarázatul. A plazmidon belüli változásokra az SNP-k megjelenése nem volt jellemző, azokat elenyésző számban lehetett kimutatni. A törzsek egy részében megtalálható volt egy-egy kisebb (40-49 kb) nagyságú plazmid is, melyek már korábban jellemzett plazmid szekvenciákkal mutattak hasonlóságot, s feltehetően horizontális géntranszfer révén kerültek be az izolátumokba. Esetükben is megfigyelhetők voltak bizonyos átrendeződések.

Az SI törzsek kromoszómája is jelentős átrendeződéseken ment keresztül, melyek során elsősorban egyes régiók helye és irányultsága változott az egyes izolátumokban. Maga a genomok szekvenciája is legalább 99.91%-ban volt egymáshoz illeszthető. Az evolúció szempontjából fontos kérdés az időbeliség és az egyes törzsek egymáshoz való rokonsági kapcsolatainak tisztázása. A vizsgálat az időbeliség szempontjából is célzott volt, hiszen az izolátumok a korai nyolcvanas évektől terjedtek a 2016-os évig. Ezzel kapcsolatban azt a fontos megállapítást tehetjük, hogy az „ősi” törzsek nagyobb diverzitást mutattak, mint a recens izolátumok. Ez a diverzitás alapvetően szűkült, s napjaink izolátumaira kevésbé jellemző, mindezek arra utalnak, hogy az SI törzsek adaptálódtak, s közülük a környezeti feltételeknek leginkább megfelelőek szelektálódtak ki.

II. Pathogenetika témakörében végzett vizsgálatok

Előkísérletek a korai (A klaszter) és a későbbi (B klaszter) *S. Infantis* törzsek pathogenitási potenciáljának felmérésére.

A részletesebben vizsgálandó törzseink pathogenetikai potenciálját első megközelítésben a hazai broilerekből izolált *S. Infantis* szerocsoport régebbi (pánszenzitív) és újabb (MDR), korábban részletesen vizsgált (Nógrády és mtsai., 2007) törzsek

összehasonlítása céljából, p.o. fertőzött napos csibéken végeztük, lényegében a későbbiekben ismertető modell (Imre és mtsai., 2015) szerint. Azt tapasztaltuk, hogy a *S. Infantis* korai (A klaszter) és későbbi (B klaszter) izolátumainak pathogenitási potenciálja lényegében nem különbözött. Eredményeink sem a két csoport, sem az egyes törzsek között szignifikáns eltérést, sem vakbél kolonizáció, sem szerv invázió tekintetében nem mutattak. Így az alább ismertető (a pathogenitási szigetek és a nagy plazmid jelentőségét vizsgáló), részletes pathogenetikai analízis céljából az „A” és „B” klasztert képviselői közül egy-egy izolátumot választottunk ki. Ezekből előbb izogén *Salmonella* pathogenitási sziget (SPI) deléciós mutánsokat állítottunk elő, majd a nagy MDR plazmid (pSI54/04) eliminációját és plazmid mentes *S. Infantis* törzshe átvitelét célzó kísérleteket végeztünk, s a sikeresen előállított plazmid-transzkonjugánsokat a fentiekkel egyetemben *in vitro* (CEF) és *in vivo* (naposcsibe) fertőzési modellekben, az alábbiak szerint vizsgáltuk.

Itt jegyezzük meg, hogy a fenti SPI deléciókra és plazmid transzferre kijelölt törzsek azonosak voltak a teljes genom szekvenálásnak alávetett törzsekkel.

1. A *Salmonella* pathogenitási szigetek (SPI1 és SPI2) vizsgálata

Ilyen irányú korábbi kísérleteink (Rychlik és mtsai., 2009, Imre és mtsai., 2011) itt nem részletezhető eredményei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a két különböző klasztert képviselő *S. Infantis* törzseinken („A” klaszter: SI69/94 és „B” klaszter SI54/04) első lépésben, a virulenciájukban legvalószínűbben szerepet játszó első két pathogenitási sziget (SPI1 és SPI2) deléciójának hatását célszerű vizsgálnunk.

Az SPI1 és SPI2 deléciós SI69/94 és SI54/04 *S. Infantis* törzsek előállításához egy homológ rekombináción alapuló módszert használtunk. A kiejteni kívánt SPI1 és SPI2 pathogenitási szigeteket határoló régiókból a homológ rekombinációhoz szükséges, kb. 500-500 bp-os DNS szakaszokat klónoztuk, gentamicin rezisztencia (GmR) gén két oldalára. A klónozáshoz használt R6K plazmidok csak speciális törzshe képesek replikálódni. A plazmidok tartalmaznak egy szelektálható markergént (CmR), I-SceI homing endonukleáz hasítóhelyét, valamint az RP4 transzfer régióját (oriT). A plazmidokat konjugációval juttattuk a *S. Infantis* törzsekbe. Mivel a plazmidok nem képesek replikálódni a *Salmonella* törzsekben, így csak azok a baktériumok képezhettek kolóniát a Cm tartalmú szelektív táptalajon, melyekben a plazmid az egyik homológ régió keresztül integrálódott a genomba. Ezt PCR reakciókkal igazoltuk a plazmidhoz és a *Salmonella* genomhoz csatoló primerek felhasználásával. A következő lépésben a genomi integráns törzsekbe bejuttattuk az I-SceI

endonukleáz gént tartalmazó hőérzékeny plazmidot és az I-SceI expresszióját indukáltuk. A felszaporodó enzim igen hosszú hasító hellyel rendelkezik, amely gyakorlatilag csak az általunk bevitt és integrálódott plazmidokon található meg. A hasítás következtében a kromoszómán egy kettősszalú DNS törés keletkezik, amit a „repair enzimek” javítanak. A javításnak, nagyjából azonos eséllyel kétféle kimenetele lehet. Vagy az eredeti szekvencia áll helyre, vagy a pathogenitási szigetek helyett bevitt GmR gént tartalmazó kromoszóma keletkezik. A CmS GmR kolóniák genotípusát, s így a SPI1- és SPI2 deléciós mutánsok létrejöttét PCR reakciókkal és szekvenálással ellenőriztük. A SI69/94 és SI54/04 törzsekből létrehozott *S. Infantis* Δ SPI1 és Δ SPI2 mutánsok pathogenitását *in vitro* (CEF) és *in vivo* (napos csibe) modellekben vizsgáltuk.

2. Kromoszómáisan kódolt SPI és egyéb virulencia faktorok, inszerciós platformok

Ezen munkafázis első lépéseként elvégeztük 30, baromfi és humán eredetű *S. Infantis* törzsnek a Salmonella pathogenitási szigetekre (SPI1- SPI5), valamint néhány, profágon kódolt, virulencia génre (*avrA-ssaQ-mgtC-siiD-sopB-gipA-sodC1-sopE1-spvC-bcfC*) irányuló virulotipizálását Huehn és mtsai. (2010) szerint. Ezen PCR próbák közül a kövérrel szedett gének (1-5. gén) az SPI1, -2, -3, -4, és SPI5 Salmonella pathogenitási szigetekre nézve specifikusak. Eredményeink szerint az öt SPI a vizsgált *S. Infantis* törzsekben jelen van, a többi, pl. a *sodC*, és *sopE* *Salmonella* virulencia gén a vizsgált *S. Infantis* törzseinkben nem fordult elő. Ez alól kivétel volt a *bcfC* (bovin kolonizációs faktor) gén, melyre vonatkozóan a törzsek egy részénél pozitív, ill. bizonytalan reakciókat kaptunk. Ezek alapján elsősorban az SPI1 és SPI2 géncsoportokat, mint teljes szigeteket vettük célba, s azok cseréjét kíséreltük meg.

E téren mélyebb analízist a későbbiekben, három olyan, hazai broiler eredetű recens *S. Infantis* törzsön (SI3337/12, SI757/13, és SI786/13) végeztünk, melyek teljes genom szekvenálási eredményei is rendelkezésre álltak. A fenti, PCR-el vizsgált és a korábban szekvenált törzsekben már vizsgált *avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *siiD* (*spi4_D*), *sopB* (SPI1-5 markerek), és a *gipA*, *sodC1*, *sopE1*, *spvC*, *bcfC* virulencia/pathogenitási faktorok jelenlétét ezen három recens genom szekvenciájában is kerestük. Megállapítottuk, hogy mind az öt broiler izolátum hordozza az 1-5 SPI-hez kötött géneket, míg az SPI-ken kívüli kromoszómális faktorok közül csupán a *bcfC* van jelen minden törzsben és egyedül a korai izolátum (SI69/94) hordozza még a *sopE1*-t is. A *gipA*, *sodC1* és *spvC* géneket egyik törzs szekvenciájában sem találtuk meg. A gének keresése egyrészt a Huehn és mtsai, (2010) szerint megadott primer szekvenciákkal,

másrészt a gén nevek alapján az adatbázisban talált teljes génszekvenciák alapján történt. A *bcfC* gén előfordulását a primer-szekvenciák hiányában csak a második megközelítéssel vizsgáltuk. Vizsgáltunk továbbá az 1994-ben izolált, SI69/94 törzs genomjához viszonyítva a három recens törzsben található addicionális szekvenciákat, melyek között további potenciális virulencia faktorok lehetnek. Úgy véltük, hogy amennyiben a törzsek a pSI54/04 plazmid jelenlétéhez nem köthető fenotípusos (invázió, pathogenitás) tulajdonságai egymástól vagy a korai törzstől eltérést mutatnak, célszerű lehet az egyedi szekvencia szakaszok részletes bioinformatikai feldolgozása (annotált és nem annotált gének potenciális fehérjetermékeinek elemzése). Ez az eset azonban nem állt fenn, így ezen a vonalon további munkákat nem látszott célszerűnek végezni. Ehelyett az egyes pathogenitási szigetek cseréjének technikájával próbáltunk további adatokhoz jutni.

A fentiek értelmében, az SPI deléciókat követően, további SPI inszerciós platformok kidolgozásával is próbálkoztunk, melynek célja az volt, hogy az alábbiakban ismertetendő genommanipulációs rendszerünkkel a deléció mellett egyes szigetet cserélni is tudjunk. Ennek lényege, hogy egy itt nem részletezett „genom puzzle” módszerrel, a kérdéses szigetet az adott a következők szerint törzsből kinyerjük, majd egy „fenntartó” baktériumba (pl. *E. coli* labortörzs), átvisszük, s onnan egy olyan *S. Infantis* törzsbe építjük be, melyet előzőleg a kérdéses eredeti szigetetől megfosztottunk. Ily módon a szigetek különböző kombinációját állíthatjuk elő, rákérdezve azok funkciójára, a virulenciában játszott szerepére. Az inszerciós platform kiindulásaként olyan törzset használunk, melynek kromoszómájára homológ DNS szekvenciák segítségével a rekombinációs plazmidot a szigetet határoló régióba beépítettük, majd ebbe a törzsbe juttatjuk be a konjugációs helper plazmidot (pl. pRK2013). A sziget kivágódása spontán módon, homológ rekombináció útján történik, s a törzsbe juttatott konjugációs helper plazmid segítségével képes átjutni a fenntartó baktériumba, ahol az R6K kondicionális replikációs origó működése biztosított. Itt a sziget egy mobilizálható plazmidként fenntartható és a későbbiek folyamán más baktériumba átjuttatható. A cél törzsbe való bejuttatás és integráció hasonlóképpen zajlik, mint azt korábban az SPI1 és SPI2 szigetek deléciója során kifejtettük. Ezáltal megvalósíthatjuk a szigetek kombinálását. A módszer alkalmazása során az SI69/94 és SI54/04 törzsek SPI1 és SPI2 patogenitási szigeteinek környezetében sikerült a tervezett inszerciókat létrehozni, melyeket PCR-rel azonosítottunk, majd megkezdtük a szigetek mobilizálását. Ezek a kísérletek azonban többszörös próbálkozás ellenére sem jártak sikerrel, mert az *E. coli* fenntartó törzsbe átvitt rekombináns plazmid vagy nem tartalmazta a szigetet, vagy annak csak egy csonkolt változatát hordozta. Időközben az SI 69/94 és SI 54/04 törzsek bioinformatikai analízisének eredményeként világossá vált, hogy a

két törzsben az SPI1 és SPI2 patogenitási szigetek csupán néhány olyan bázispozícióban hordoznak eltérést (SNP), melyek egyike sem okoz aminosavakat érintő különbségeket. A két izolátum közötti eltérések tehát nem származhatnak ezen szigetek szekvencia különbségeiből. Ennek következtében az SPI1 és SPI2 szigetek felcserélésére irányuló további kísérletek helyett a WP1 terén újonnan felmerült feladatokra (recens klónok genom szekvenálása) koncentráltunk.

3. Plazmid elimináció és plazmid transzfer

Ezen munkaprogram célja az volt, hogy információt kapjunk a *S. Infantis* pSI54/04 MDR plazmidon kódolt fenotípusos tulajdonságokról, ezért a széles körben elterjedt *S. Infantis* B2 klónt képviselő, SI54/04 törzs pSI54/04 plazmidját (>277 kb) több új megközelítéssel is próbáltuk eltávolítani, de sajnos sikertelenül. Ezen próbálkozások lényege, hogy homológ rekombinációval antibiotikum rezisztencia markerrel jelölt *I-SceI* hasítóhelye(ke)t építettünk a plazmid alapvázába a replikációhoz (rep) és a plazmid megosztáshoz (par) szükséges gének közé, majd az *I-SceI* homing endonukleáz egy hőérzékeny plazmidról expresszáltatva az átalakított megaplazmidunkat kettévágjuk, így nagy valószínűséggel elveszhet a baktérium sejtekből. Ezzel a módszerrel korábban az *E. coli* ETEC O147 nagyméretű (90 kb) virulencia plazmidját (pTC) már sikerült eltávolítanunk, azonban a pSI54/04 plazmid eltávolítására tett kísérleteink nem jártak sikerrel. Összességében elmondható, hogy a pSI54/04 plazmid eliminálására kifejlesztett technikánkkal más plazmidok más törzsekből sikeresen kiűzhetők voltak, azonban az SI54/04 izolátum esetében eddig nem jártak eredménnyel.

Alternatív megoldásként, a plazmid által esetlegesen hordozott virulencia gének hatásának vizsgálatára a plazmidot konjugációval átjuttattuk a plazmid mentes, korai izolátumokat (A1 klón) képviselő, kevésbé elterjedt SI69/94 *S. Infantis* törzsbe. Ennek módszertani részleteit Szmolka és mtsai. (2017) közleményében ismertettük. A sikeres konjugációval a kromoszómális alap-virulencia hátteret s a plazmid *in vitro* és *in vivo* hatásának beméréséhez szükséges rendszert létrehoztuk.

A fentiek szerint előállított HP1834 transzkonjugánssal (SI69/94:pSI54/04) végzett *in vitro* és *in vivo* patogenitási kísérletek eredményeiről, a SPI mutánsokkal együtt, az alábbiakban számolunk be.

4. *In vitro* patogenitás: inváziós készség vizsgálata csirke embrió fibroblaszt (CEF) sejteken

Az SPI-ok sejtinváziós pathogenitási szerepének vizsgálatát és in vitro gazdaválaszt indukáló képességét a SI69/94 alaptörzs SPI1⁻ és SP2 deléziós izogénikus SPI1⁻ és SP2 deléziós mutánsain CEF sejteken két ismétlésben, duplikált mintafelvitelekkel, Szmolka és mtsai (2017) szerint teszteltük. A pSI54/04 MDR megaplazmid pathogenitási szerepének és in vitro gazdaválaszt indukáló képességének vizsgálata céljából a plazmidot az eredetileg plazmid mentes SI69/94 alaptörzsbe vittük át, s az így előállított plazmidos transzkonjugáns HP1834 invázióját, a plazmid donor SI54/04 és a recipiens SI69/94 kontroll törzsekkel összehasonlításban vizsgáltuk. A sejtinváziós vizsgálatokat Szmolka és mtsai. (2017) szerint végeztük, a fertőzött CEF sejtekből a korai inváziós szakban feltárt baktériumok számának meghatározásával.

Ezt követően az SPI deléciók és a pSI54/04 plazmid transzfer *in vitro* (CEF sejteken történő) hatását, elemzését és ezáltal az SPI illetve a megaplazmid funkciókat indirekt módon célzó vizsgálatainkat, a gazdasejtek gén expressziójának irányában, kvantitatív reverz transzkriptáz PCR (qPCR) rendszerben, a már publikált módszerekkel folytattuk (Szmolka és mtsai., 2015). A korábbiakban *S. Enteritidis* fertőzés során indukált CEF génekre bevált, összesen 19, immun-, transzkripciós faktor, metabolikus gén, illetve további CEF-specifikusnak tűnő gének mintázatát vizsgáltuk (Szmolka és mtsai., 2015). A törzsek és mutánsok hatását két kísérletben, duplikált mintafelvitelekkel teszteltük.

Az ismételten elvégzett sejtinváziós vizsgálatok eredménye szerint a SPI1 és SPI2 deléciója a korai sejtinvázió szignifikáns ($p < 0.05$) csökkenését okozta (pl. a vad SI69/94 törzs: $5.08 \times \log_{10}$ CFU/ml intracelluláris csíraszám, a Δ SPI1 mutáns: $4.19 \times \log_{10}$ CFU/ml intracelluláris csíraszámával szemben), mely virulencia csökkenés a *S. Enteritidis*re vonatkozó eddigi ismereteink alapján várható volt (Rychlik és mtsai. 2009, Imre és mtsai. 2013), melyre azonban a *S. Infantis*-t illetően eddig nem voltak adataink.

A pSI54/04 plazmid pathogenetikai szerepét célzó *in vitro* (CEF sejteken végzett) vizsgálatok módszere megegyezett a fentiekkel (Szmolka és mtsai, 2017). Az ismételten elvégzett sejt inváziós vizsgálatok eredménye szerint mindkét, a plazmidot hordozó törzs (SI54/04 donor és HP1834 transzkonjugáns) szignifikánsan ($p < 0.04$) alacsonyabb inváziós készséget mutatott CEF sejteken mint a plazmid-mentes („A” klaszterbe tartozó) SI69/94-es régebbi, pánszenzitív, recipiens *S. Infantis* alaptörzs (részletek: Szmoka és mtsai., 2017).

A pSI54/04 plazmid bevitel az alaptörzs sejt-inváziós képességét CEF sejteken nem emelte meg, ugyanakkor kiegészítő vizsgálataink arra utalnak, hogy a pSI54/04 hordozás az őt

hordozó törzsek planktonikus növekedési képességére nézve előnyösnek tűnik (nem publikált adatok).

Az *in vitro* (CEF) citokin választ illetően, a *S. Enteritidis*hez hasonlóan, a vizsgált vad típusú *S. Infantis* törzsekkel való fertőzés a csirke embrió fibroblaszt sejtek IL8L1 és CSF3 immungénjeinek >10×es indukcióját eredményezte. Ehhez képest viszont, sem a SPI1 vagy SPI2 deléciója sem pedig a pSI54/04 plazmid felvétele a vad törzsekkel összehasonlításban nem okozott szignifikáns eltérést (Szmolka és mtsai., 2016, Int. Symp. Salmonella, StMalo, S3Post).

5. *In vivo* pathogenitási vizsgálatok naposcsibéken (gén expresszió és kórszövetten)

Az SPI-ok illetve a pSI54/04 plazmid *in vivo* pathogenitási szerepét az előzőekben ismertett vad- és mutáns *S. Infantis* törzsekkel szájon át fertőzött napos csibékben vizsgáltuk.

A vakbél-kolonizáció és szerv (lép, máj) invázió képességét a fertőzést követő 5. napon csíraszámolással határoztuk meg (Szmolka és mtsai. 2017, Szmolka és mtsai., MS-submitted) Kórszövetteni vizsgálatokat a paraformalinnal fixált, paraffinba ágyazott, vakbél minták hematoxilin-eozinnal festett metszetein, hisztometriai mérésekkel kiegészítve végeztünk.

Ezzel párhuzamosan a vakbél *S. Infantis* fertőzésre adott génexpressziós változásait a csirke embrió fibroblasztnál leírtak szerint qPCR segítségével mértük (Szmolka és mtsai., 2015).

A törzsek pathogenitását két kísérletben, kísérleti csoportonként 6-6 állaton vizsgáltuk. Naposcsibéken végzett kísérleteinket a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága XIV-I-001/2291-4/2012. sz. ügyiratban engedélyezte.

Az *in vitro* (CEF) eredményektől eltérően az SPI1 és SPI2 deléció hatására a fertőzött napos csibékben szignifikáns vakbél- illetve szerv-kolonizációs csökkenés nem volt kimutatható. A pSI54/04 plazmid bevitele, az *in vitro* sejtinváziós eredményekhez hasonlóan, a SI69/94 alaptörzs vakbél-kolonizáció képességének csökkenését okozta, bár ez a különbség nem volt szignifikáns (Szmolka és mtsai., 2016, iS3 poszte). Kórszövetteni vizsgálattal a SI69/94 alaptörzs esetében észleltünk a normálhoz képes kb 10x-es vakbél nyálkahártya megvastagodást és a lamina propriában fokozott gyulladós sejtes beszűrődést, mely a SPI1 és SPI2 deléciós mutáns valamint a pSI54/04 plazmid transzkonjugáns (HP1384) hatására, a fenti kolonizációs eredményekkel összhangban, mérsékelten, ill. lényegesen enyhébb fokú

volt. A napos csibék vakbelének génexpressziós válasza tekintetében általánosan elmondható, hogy a CEF esetében indukált változásokkal azonos irányú, de annál sokkal alacsonyabb mértékű génexpresszió változásokat észleltünk, melyek a *S. Infantis* alap törzs és SPI deléciós mutánsai ill. a pSI54/04 transzkonjugánsa között lényeges eltérést nem mutattak.

Konklúziók

A pályázati kutatás fő céljai a következők voltak: i) a broiler állományokban fennálló jelentős fertőzöttség okát és eredetét egyes *S. Infantis* klónok genetikai sajátosságai alapján keresni, valamint, ii) a hazai és/vagy külföldi klónok terjedése által okozott kockázatok csökkentéséhez *in vitro* és *in vivo* modell kísérletek és genom analízisek adataival szolgálni.

E célok irányában elért kutatási eredményeink azt jelzik, hogy a hazai broiler állományok fertőzöttségének eredete legvalószínűbben nem egyetlen forrásra, hanem elsősorban arra a néhány tenyészvonalra vezethető vissza, melyekkel feltehetően, az elmúlt másfél évtizedben a hazai és más külföldi baromfi termelőket ellátták. Ezen törzsek elterjedésének mértékét és genetikai állományuk horizontális géntranszfer általi bővítését viszont a hazai broiler termelés gazdasági, igazgatási és üzemi (pl. higiénia, antibiotikum használati) viszonyai is befolyásolhatták. Ezzel összhangban, tapasztaltuk a külföldi *S. Infantis* törzseknek a hazaiaktól néha eltérő, máskor pedig hasonló vagy azonos geno-, és fenotípusainak országonként is változó dominanciáját.

A hazai *S. Infantis* klónok közül továbbra is legelterjedtebbek a „B” klaszter MDR plazmidot és variánsait hordozó *S. Infantis* törzsei, melyek a modell kísérletek és genom analízisek tanulsága szerint, broiler telepeinken és a feldolgozó vonalakon endémiássá vált pSI54/04 prototípus plazmidnak is köszönhetően honosultak.

Adataink ugyan a pSI54/045 plazmidnak a broiler izolátumok virulencia növelésére vonatkozó hipotézisünket nem támasztották alá, s így az, izraeli humán eredetű emergens *S. Infantis* törzsekben endémiás pESI jelű, nagy mértékben hasonló megaplazmidra vonatkozó adatokkal (Aviv és mtsai., 2014) sem harmonizálnak. Jól magyarázhatók viszont azzal, hogy specifikus antibiotikum szelekció híján, intracelluláris közegben, a hordozó törzs számára a mega plazmid fenntartása előnytelen lehet. Megfelelő szelekciós nyomás pl. bizonyos nehézfém tartalmú fertőtlenítőszeres környezet, vagy egyes antibiotikumokkal kezelt állat esetén viszont a MDR plazmid hordozástól jelentős előny várható.

Mivel az itt vizsgált *S. Infantis* törzsek ellen specifikus védekező vagy megelőző eszközökkel (vakcina vagy fágterápia) nem rendelkezünk, a jövőbeni kockázat csökkentés legfőbb kulcsa a broiler állományok és feldolgozó vonalak higiéniájának gyakorlatban is érvényesülő szigorítása és hatékonyabb ellenőrzése valamint az antibiotikum használat csökkentése lehet, mint ahogyan arra egyes országok biztató példát is mutatnak.

Új Megállapítások

Tíz európai országra kiterjedő, három jelentős molekuláris epidemiológiai analízisben igazoltuk, hogy az elsőként Magyarországon (Nógrády és mtsai, 2007) kimutatott, klonális terjedésű, broiler és humán eredetű, MDR *S. Infantis* törzsek a környező országok többségében is egyre inkább előtérbe kerültek és közöttük több, esetenként a hazaitól (B) eltérő klónok, klóncsoportok is megjelentek..

A MDR *S. Infantis* törzsek jellegzetes plazmidjának a pSI54/04 277 kb méretű plazmidnak részletes szekvencia analízisével megállapítottuk, hogy az az izraeli humán MDR *S. Infantis* törzsekre jellemző pESI megaplazmiddal (Aviv és mtsai, 2014) nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutat.

A pSI54/04 MDR plazmid molekuláris jellemzésére alkalmas virulencia és rezisztencia PCR rendszert dolgoztunk ki, melynek alkalmazását az AR microarray-el (Alere-Technologies) kiegészítve, a pSI54/04 plazmidnak és variánsainak a hazai és közép-európai broiler állományokban valamint humán populációkban, esetenként új klónokkal társult, széles körű előfordulását igazoltuk.

A pSI54/04 plazmidnak a *S. Infantis* pathogenitására vonatkozó hatását, a legfontosabb *Salmonella* pathogenitási szigetekkel (SPI1 és SPI2) összehasonlításban, *in vitro* (csirke embrió fibroblaszt) és *in vivo* (napos csibe fertőzés) elemezve megállapítottuk, hogy ez a MDR plazmid a *S. Infantis* törzsek baromfi pathogenitását nem növeli, de terjedésüket, antibiotikumokkal és fémtartalmú fertőtlenítőszerrel szembeni rezisztencia révén segítheti.

Az 1980 -2016 között izolált, kilenc hazai reprezentatív *S. Infantis* törzs és egy 1980-as Nagy-Britanniában izolált *S. Infantis* törzsnek teljes genom szekvencia analízise, valamint

PFGE fragment analízise alapján úgy tűnik, hogy a hazai „emergens” (2004-2016 között izolált) MDR *S. Infantis* törzsek egymással szorosabb genetikai rokonságot mutatnak, míg az un. korai „pre-emergens” (1980—1994 között izolált) szenzitív, magyar és UK izolátumok, közötti genetikai különbségek jól kimutathatók.

Az eddigi vizsgálatok arra is utalnak, hogy a hazai izolátumok evolúciója a kromoszóma vonatkozásában lelassult, ami a környezeti feltételekhez való adaptációt valószínűsíti. A pSI54/04 MDR plazmidon több, adott esetben evolúciós szempontból lényeges determinánsok pl. antibiotikum rezisztencia gének vesztese, illetve ennek ellenkezője, azaz antibiotikum rezisztencia determinánsok inszerciója is kimutatható volt.

Zárdék és Köszönetnyilvánítás

A fentiek alapján úgy véljük, hogy a pályázati munkatervben vállalt kutatási feladatoknak eleget tettünk, s ez úton is köszönetünket fejezzük ki a jelen pályázati munka támogatásáért.

Hivatkozott irodalom

Anonymous. National Center for Epidemiology, 2016. Epidemiology Report of Hungary for 2015 (in Hungarian). *Epinfo.* 23(27), 309-310.

Aviv G, Tsyba K, Steck N, Salmon-Divon M, Cornelius A, Rahav G, Grassl GA, Gal-Mor O. A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar *Infantis* strain. *Environ Microbiol.* 2014,16(4):977-94.

Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.

Barrow PA, Lovell MA. Invasion of Vero cells by *Salmonella* species. *J Med Microbiol.* 1989, 28(1):59-67.

Coil D, Jospin G, Darling AE. 2015. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics* 31:587–589. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu661>.

European Food Safety Authority (EFSA), 2007. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus gallus*, Part A. *European Food Safety Authority Journal* 98, 1–85.

European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014, *EFSA Journal* 13, 4329.

Gadó I, László VG, Nagy B, Milch H, Drin I, Awad-Masalmeh M, Horváth J. Phage restriction and the presence of small plasmids in *Salmonella enteritidis*. *Zentralbl Bakteriologie*. 1998, 287(4):509-19.

Huehn S, La Ragione RM, Anjum M, Saunders M, Woodward MJ, Bunge C, Helmuth R, Hauser E, Guerra B, Beutlich J, Brisabois A, Peters T, Svensson L, Madajczak G, Littrup E, Imre A, Herrera-Leon S, Mevius D, Newell DG, Malorny B. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathog Dis.* 2010, 7(5):523-35.

Imre A, Olasz F, Nagy B. Site-directed (IS30-FljA) transposon mutagenesis system to produce nonflagellated mutants of *Salmonella Enteritidis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2011, 317(1):52-9.

Imre A, Bukovinszki A, Lovell MA, Li H, Zhou X, Barrow PA. Gene expression analysis of *Salmonella enterica* SPI in macrophages indicates differences between serovars that induce systemic disease from those normally causing enteritis. *Vet Microbiol.* 2013, 167(3-4):675-9.

Imre A, Szmolka A, Olasz F, Nagy B. Vaccine potential of a nonflagellated, virulence-plasmid-cured (fliD-, pSEVΔ) mutant of *Salmonella Enteritidis* for chickens. *Acta Vet Hung.* 2015, 63(3):285-302.

Nagy B. A Salmonella fertőzöttség csökkentésének szakmai és mikrobiológiai alapjai broiler állományainkban. XVIII. Derzsy Napok. 2010, június 3-4, Siófok. MOÁE Baromfi-egészségügyi Társaság és az MTA Állatorvos-tudományi Bizottság zoonózis albizottsága, valamint a CEVA-Phylaxia által szervezett szakmai ülés és vitadélután előadása.

Nógrády N, Tóth A, Kostyák A, Pásztai J, Nagy B. Emergence of multidrug-resistant clones of *Salmonella* Infantis in broiler chickens and humans in Hungary. *J Antimicrob Chemother.* 2007, 60(3):645-8.

Nógrády N, Kardos G, Bistyák A, Turcsányi I, Mészáros J, Galántai Z, Juhász A, Samu P, Kaszanyitzky JE, Pásztai J, Kiss I. Prevalence and characterization of *Salmonella* infantis isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. *Int J Food Microbiol.* 2008, 127(1-2):162-7.

Nógrády N, Király M, Davies R, Nagy B. Multidrug resistant clones of *Salmonella* Infantis of broiler origin in Europe. *Int J Food Microbiol.* 2012, 157(1):108-12.

Olasz F, Nagy T, Szabó M, Kiss J, Szmolka A, Barta E, van Tonder A, Thomson N, Barrow P, Nagy B. Genome Sequences of Three *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Infantis Strains from Healthy Broiler Chicks in Hungary and in the United Kingdom. *Genome Announc.* 2015, 3(1). pii: e01468-14.

Rychlik I, Karasova D, Sebkova A, Volf J, Sisak F, Havlickova H, Kummer V, Imre A, Szmolka A, Nagy B. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. *BMC Microbiol.* 2009, 9:268.

Szmolka A, Wiener Z, Matulova ME, Varmuzova K, Rychlik I. Gene Expression Profiles of Chicken Embryo Fibroblasts in Response to *Salmonella* Enteritidis Infection. *PLoS One.* 2015, 10(6):e0127708.

Szmolka A, Szabó M, Kiss J, Olasz F, Nagy B. Chromosomal and plasmidic virulence determinants of *Salmonella* Infantis from broiler chicks, i3S, International Symposium

Salmonella and Salmonellosis. Abstract Book, p.20, Saint-Malo, France, 2016 (konferencia közlemény).

Szmolka A, Szabó M, Kiss J, Pászti J, Adrián E, Olasz F, Nagy B: Molecular epidemiology of the endemic multiresistance plasmid pSI54/04 of Salmonella Infantis in broiler and human population in Hungary. Food Microbiol. 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.011>.

Wilk T, Szabó M, Szmolka A, Kiss J, Barta E, Nagy T, Olasz F, Nagy B. Genome Sequences of Multidrug-Resistant Salmonella enterica subsp. enterica Serovar Infantis Strains from Broiler Chicks in Hungary. Genome Announc. 2016, 4(6). pii: e01400-16.

Wilk T, Szabó M, Szmolka A, Kiss J, Olasz F, Nagy B. Genome Sequences of Salmonella enterica subsp. enterica Serovar Infantis Strains from Hungary Representing Two Peak Incidence Periods in Three Decades. Genome Announc. 2017, 5(9). pii: e01735-16.

A projekt keretében 2017. márc. 31-ig született közlemények és független hivatkozásaik jegyzéke

Wilk T, Szabó M, Szmolka A, Kiss J, Olasz F, Nagy B. Genome Sequences of Salmonella enterica subsp. enterica Serovar Infantis Strains from Hungary Representing Two Peak Incidence Periods in Three Decades. Genome Announc. 2017, 5(9). pii: e01735-16.

Szmolka A, Szabó M, Kiss J, Pászti J, Adrián E, Olasz F, Nagy B: Molecular epidemiology of the endemic multiresistance plasmid pSI54/04 of Salmonella Infantis in broiler and human population in Hungary. Food Microbiol. 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.011>.

Wilk T, Szabó M, Szmolka A, Kiss J, Barta E, Nagy T, Olasz F, Nagy B. Genome Sequences of Multidrug-Resistant Salmonella enterica subsp. enterica Serovar Infantis Strains from Broiler Chicks in Hungary. Genome Announc. 2016, 4(6). pii: e01400-16.

Szmolka A, Szabó M, Kiss J, Olasz F, Nagy B. Chromosomal and plasmidic virulence determinants of Salmonella Infantis from broiler chicks, i3S, International Symposium

Salmonella and Salmonellosis. Abstract Book, p.20, Saint-Malo, France, 2016 (konferencia közlemény).

Olasz F, Nagy T, Szabó M, Kiss J, Szmolka A, Barta E, van Tonder A, Thomson N, Barrow P, Nagy B. Genome Sequences of Three *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar *Infantis* Strains from Healthy Broiler Chicks in Hungary and in the United Kingdom. *Genome Announc.* 2015, 3(1). pii: e01468-14.

1. Krewulak, K., Vogel, H., 2016. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*. Wiley.
2. Paixão, T., Coura, F., Malta, M., Tinoco, H., Pessanha, A., Pereira, F., Leal, C., Heinemann, M., Figueiredo, H., Santos, R., 2016. Draft Genome Sequences of Two *Salmonella enterica* Serotype *Infantis* Strains Isolated from a Captive Western Lowland Gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) and a Cohabitant Black and White Tegu (*Tupinambis merianae*) in Brazil. *Genome Announc* 4, e01590–15.

Szmolka A, Szabó M, Nagy T, Pászti J, Nógrády N, Adrián E, Olasz F, Nagy B. Insight into the molecular characteristics of new multiresistant clones and plasmids of *Salmonella infantis* in poultry and man, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 62, 2015. p224, 2015 (konferencia közlemény).

Nagy B, Füzi M, Szmolka A. Antimicrobial resistance: a touchy interface between human and veterinary medicine, 6th Congress of European Microbiologists, 7-11 June 2015, Maastricht, The Netherlands (Program p55), 2015 (konferencia közlemény).

Nógrády N, Király M, Davies R, Nagy B. Multidrug resistant clones of *Salmonella Infantis* of broiler origin in Europe. *Int J Food Microbiol.* 2012, 157(1):108-12.

1. Tezel, B., Akçelik, N., Yüksel, F., Karatuğ, N., Akçelik, M., 2016. Effects of sub-MIC antibiotic concentrations on biofilm production of *Salmonella Infantis*. *Biotechnology Biotechnological Equip* 1–8.
2. Shah, D.H., Paul, N.C., Sisco, W.C., Crespo, R., Guard, J., 2016. Population dynamics and antimicrobial resistance of the most prevalent poultry-associated *Salmonella* serotypes. *Poult. Sci.*
3. Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., Peixe, L., 2016. Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 110–21.
4. Yokoyama, E., Ando, N., Ohta, T., Kanada, A., Shiwa, Y., Ishige, T., Murakami, K., Kikuchi, T., Murakami, S., 2015. A novel subpopulation of *Salmonella enterica* serovar *Infantis* strains isolated from broiler chicken organs other than the gastrointestinal tract. *Vet. Microbiol.* 175, 312–8.
5. Sallach, B., Zhang, Y., Hodges, L., Snow, D., Li, X., Bartelt-Hunt, S., 2015. Concomitant uptake of antimicrobials and *Salmonella* in soil and into lettuce following wastewater irrigation. *Environ Pollut* 197, 269–277.

6. Rasetta, M., Djordjevic, V., Vidanovic, D., 2015. Contamination Routes of *S. Infantis* in Food Chain of Broiler Meat Production and it's Significance for Public Health. *Procedia Food Sci* 5, 254–257.
7. Doyle, M., 2015. Multidrug-Resistant Pathogens in the Food Supply. *Foodborne Pathog Dis* 12, 261–279.
8. Authority, E., (ECDC), E. for and, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *Efsa J* 13, 4329.
9. Chironna, Tafuri, Gallone, Sallustio, Martinelli, Prato, Germinario, 2014. Outbreak of *Salmonella infantis* gastroenteritis among people who had eaten at a hash house in southern Italy. *Public Health* 128, 438–443.
10. Yokoyama, E., Murakami, K., Shiwa, Y., Ishige, T., Ando, N., Kikuchi, T., Murakami, S., 2014. Phylogenetic and population genetic analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Infantis* strains isolated in Japan using whole genome sequence data. *Infect. Genet. Evol.* 27, 62–8.
11. Authority, E., Control, E. for and, 2014. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *Efsa J* 12, 3590.
12. Gnanadhas, D., Thomas, M., Elango, M., Raichur, A., Chakravorty, D., 2013. Chitosan–dextran sulphate nanocapsule drug delivery system as an effective therapeutic against intraphagosomal pathogen *Salmonella*. *J Antimicrob Chemoth* 68, 2576–2586.
13. Almeida, F., Pitondo-Silva, A., Oliveira, M., Falcão, J., 2013. Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella Infantis* isolated over 25years in São Paulo State, Brazil. *Infect Genetics Evol* 19, 145–151.
14. Wagenaar, J.A., Hendriksen, R.S., Carrique-Mas, J., 2013. Practical considerations of surveillance of *Salmonella* serovars other than *Enteritidis* and *Typhimurium*. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 32, 509–19.
15. Authority, E., Control, E. for and, 2013. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *Efsa J* 11, 3196.
16. Miller, T., Braun, P.G., Fehlhaber, K., Prager, R., Pfeifer, Y., Rabsch, W., 2014. Typing of *Salmonella enterica* serovar *Infantis* isolates from 51 outbreaks in Germany between 1974 and 2009 by a novel phage-typing scheme. *Epidemiol. Infect.* 142, 75–83.