

ZÁRÓJELENTÉS

2007. évi tervezet

Az EC2173 törzsben található pTC virulenciaplazmid teljes szekvenciájának meghatározása shotgun szekvenálással, a szekvenciaadatok annotációja és bioinformatikai analízise valamint az egyes gének funkcióinak részletes jellemzése az NCBI BLAST szoftvercsomagját és a Sanger Center ARTEMIS és ACT szoftvereivel.

Sertés-, és/vagy baromfi eredetű *E. coli* törzsek virulenciaplazmidjainak izolálása és átjuttatása K12 recipiens törzsekbe konjugációval vagy transzformációval.

A virulenciagének környezetében új plazmidkódolt pathogenitási szigete(i)nek felderítése sertés eredetű törzsek esetében a pTC genetikai szerveződése alapján tervezett PCR eljárásokat alkalmazva, valamint a PCR termékek szekvenálásával. Baromfi eredetű törzseken a virulencia génektől induló „primer walking” szekvenálással kívánok elindulni.

Várható: pTC plazmid teljes szekvenciájának meghatározása. Sertés és baromfipatógén *E. coli* törzsek virulenciaplazmidjainak azonosítása. Patogenitási szigetek keresésének megkezdése.

2008. évi tervezet

Patogenitási szigetek jellemzése sertés eredetű K88 illetve F18 fimbriával rendelkező ETEC(VTEC) törzseken, esetleges patogenitási sziget polimorfizmusok felderítése.

Baromfi eredetű (extra-intesztinális és/vagy intesztinális) *E. coli* törzsek virulenciaplazmidjainak valamint patogenitási szigeteinek jellemzése.

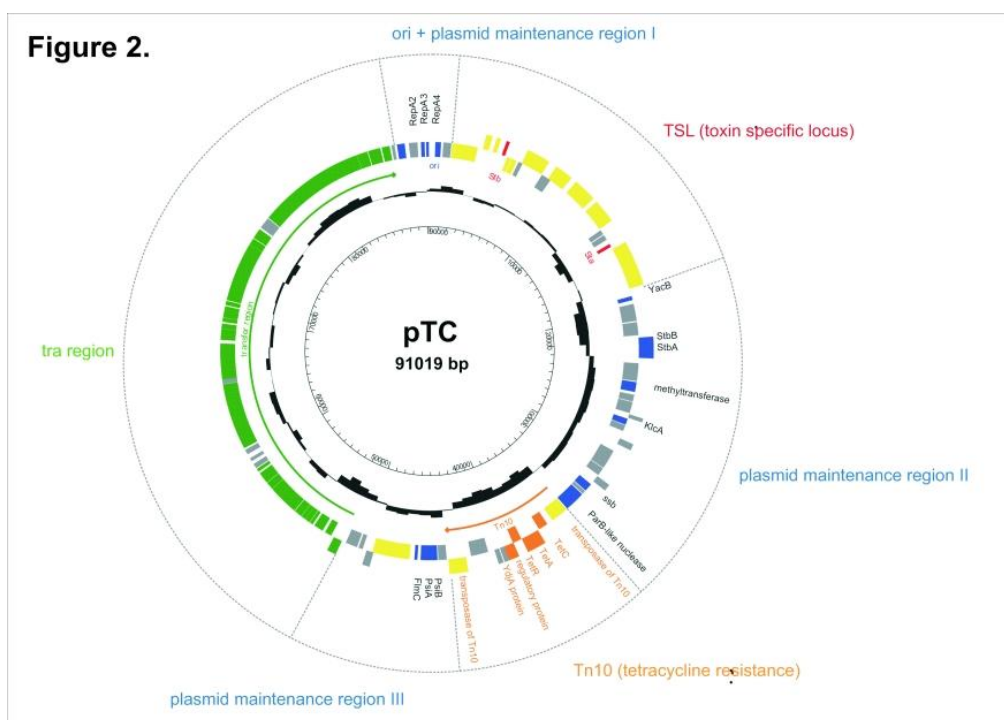
A kromoszomális valamint plazmidkódolt virulenciagének esetleges genetikai kapcsolatainak feltárása.

Várható: Mind a sertés, mind a baromfi eredetű törzseken új mobilis virulencia elemek (patogenitási szigetek) azonosítása.

Eredmények

Sertés enterotoxikus *E. coli* (ETEC) törzsek virulenciaplazmidjainak vizsgálata

Az EC2173 jelű sertés ETEC törzs pTC virulencia- és rezisztencia-plazmidjának szekvenálását egyrészt az általunk korábban előállított pAKR2 fúziós plazmidon másrészt a pTC tetraciklin rezisztenciájáért felelős, „long-distance” PCR módszerrel felerősített, mintegy 9kb nagyságú Tn10 transzpozonján végeztük ún. „shot-gun” módszerrel, majd az így nyert szekvenciadatokból építettük fel a pTC teljes szekvenciáját, mely 91019 bázispár nagyságúnak bizonyult.



A pTC plazmidon 5 fő funkcionális régiót különíthettünk el:

1. a plazmid stabilitásáért felelős ún. „maintenance” régió, melyet a toxin specifikus lókuszt, a Tn10 tetraciklin rezisztencia transzpozon és a plazmidátvitelért felelős „tra” régió (a replikációs origóval együtt) inszerciója 3 alrégióra (maintenance I., II. és III.)
2. a virulenciáért felelős, az STa és STb enterotoxinok génjeit hordozó toxin specifikus lókuszt (TSL),
3. a *tetB* tetraciklin rezisztenciagént hordozó Tn10 transzpozont
4. a virulenciaplazmid átviteléért felelős transzfer „tra” régiót. A szekvencia adatok további vizsgálata során megállapítottuk, hogy a már előző évben meghatározott 3 fő régió mellett különálló funkcionális egységként jelenik meg még.
5. a plazmid replikációs origóját, mely 99%-os nukleotid hasonlóságot mutat a *colE1* origóval

A pTC szekvenciáját az NR1 valamint a pC15-1 *E. coli* plazmidokéval összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a pTC azon nagy virulencia- és rezisztencia plazmidok csoportjába tartozik melyek egy közös transzfer régióval rendelkezve (és így nem igényelve más transz faktort a gazdabaktériumtól) képesek saját átvitelüket kódolni. Ezen adatok alapján feltételezhető az „önátvivő” pTC szerű plazmidok közös evolúciós eredete.

A TSL elterjedésének vizsgálata céljából különböző földrajzi eredetű sertés-, szarvasmarha-, valamint human ETEC izolátumokat vizsgáltunk meg a pTC plazmid szekvenciája alapján tervezett, a TSL 5' valamint 3' határoló régiójára specifikus PCR módszerekkel. A TSL5fw2-TSL3rev1 primerpár által felismert szakasz 772bp, míg a TSL3fw1-TSL3rev2 primerpár felismert szakasz 2572bp nagyságú volt.

A szekvenciaadatok alapján tervezett, a TSL-re specifikus, valamint irodalmi sta és stb toxingénekre specifikus PCR primerekkel 32 sertés eredetű (Magyarország, Ausztria és Egyesült Államok) 6 szarvasmarha eredetű (Magyarország és Egyesült Államok) valamint 52 humán (Egyiptom, Mexikó és Thaiföld) ETEC törzset vizsgáltunk meg, hogy rendelkeznek-e pTC analóg plazmiddal. Megállapítottuk, hogy a pTC-típusú plazmidok előfordulására sertésekből származó ETEC törzsek esetében lehet számítani. Eredményeink alapján a TSL az F18 fimbria hordozó törzsek körében volt szignifikánsan kimutatható:

A K88 (F4) fimbriát hordozó törzsek egyike sem hordozott teljes TSL-t, azonban a vizsgált 7 törzs közül 3-ban megtalálható volt a TSL 3' határoló régiója, mely eredmény felveti az esetleges közös eredet lehetőségét. Ezzel szemben az F18 fimbriát hordozó törzsek 83%-a (19/23) volt pozitív a 3' határoló régióra, 65%-uk (15/23) pedig a teljes TSL-t is hordozta (mindkét határoló régióval rendelkezett). Ennek alapján kijelenthető, hogy létezik a sertés eredetű ETEC törzsekre jellemző jellegzetes plazmid populáció. Sem a 6 -K99(F5) fimbriát hordozó- szarvasmarha eredetű, sem pedig az (egyiptomi, mexikói és thaiföldi eredetű) 58 humán ETEC törzs nem hordozott TSL-t.

Újabb pTC-szerű virulenciaplazmidok izolálása céljából sertés ETEC törzsekből a J5-3 jelű (rifampicin rezisztens) K12 *E. coli* törzsbe végeztünk konjugációkat, a transzkonjugánsok szelekciója a (pTC plazmidra is jellemző) tetraciklin rezisztencia alapján történt.

A transzkonjugánsok gyűjtését lezártuk, jelenleg 152 izolátummal rendelkezünk, melyek 5 hazai, 7 cseh és 9 osztrák ETEC törzs tetraciklin rezisztens (és várakozásunk szerint hőstabil enterotoxingénekkal rendelkező) plazmidjait tartalmazzák.

Kísérleti tervünk szerint plazmidprofil vizsgálatokkal tervezzük ellenőrizni, hogy milyen molekulatömegű plazmid/ok jutottak át a recipiensbe, majd toxingén- és TSL-specifikus PRC-ekkel fogjuk azonosítani a virulenciaplazmidokat. Az esetleges toxingén valamint teljes TSL polimorfizmusokat szekvenálással kívánjuk azonosítani.

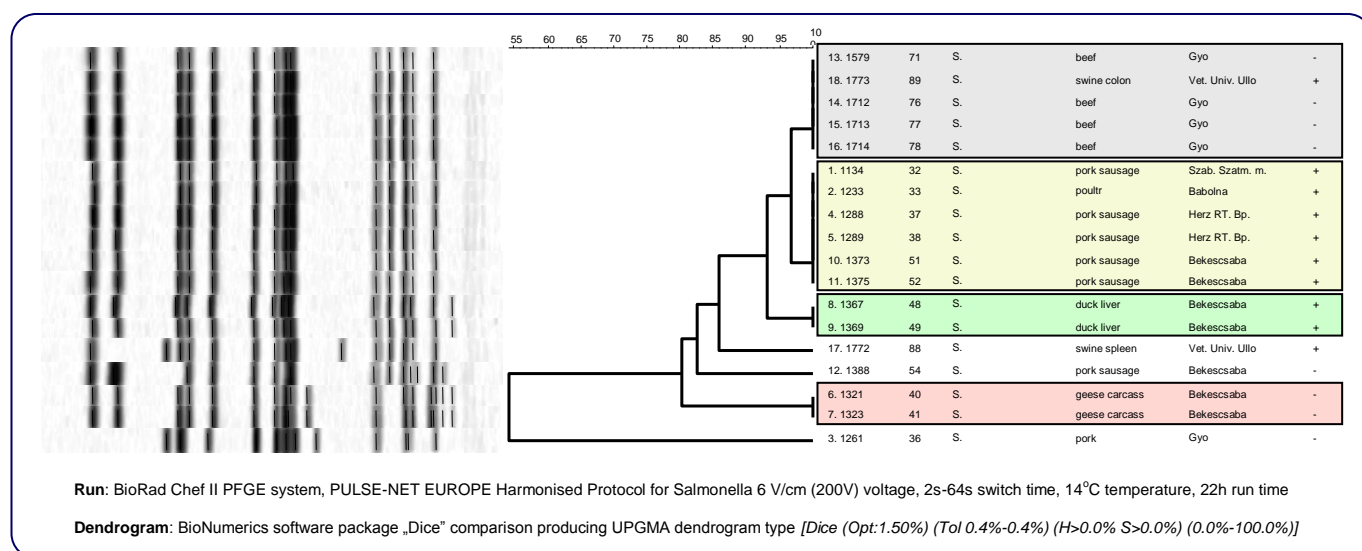
Munkánk eredményeként az ETEC törzsek virulenciaplazmidjainak kilakulásáról, a toxingének horizontális terjedési mechanizmusairól kívánunk képet kapni.

A következő években ezen törzsek egy-egy képviselőjét terveztük részletesebb vizsgálat alá vonni (plazmid analízis, plazmid transzfer, PCR, szekvenálás) mely tervünk a pályázati támogatás megszűnése miatt egyelőre meghiúsul.

Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) hazai előfordulása és jellemzése:

A sertés enterotoxikus *E. coli* törzsek mobilis virulencia elemeinek vizsgálata mellett az antibiotikum rezisztenciagének genetikai átvitele is érdeklődésünk középpontjába került. Ezért hazai élelmiszer eredetű *E. coli* és *Salmonella* törzseken megkezdtük az SGI1 (Salmonella Genomic Island 1) mobilis antibiotikum rezisztenciaelem vizsgálatát.

Az eredetileg multirezisztens DT104 *S. Typhimurium*ból leírt *Salmonella* genomic island I pentarezisztens fenotípust kódol (ampicillin, kloramfenikol, streptomycin, szulfonamid, tetraciklin – ACSSuT), de előfordulhat más *Salmonella* szerotípusokban valamint *E. coli*-ban is. Florfenikol rezisztens fenotípust mutató hazai *Salmonella* (31 *S. Enteritidis*, 20 *S. Hadar*, 30 baromfi eredetű *S. Infantis* 59 élelmiszereredetű *S. Typhimurium*) és *E. coli* (61 szarvasmarha eredetű enterohemoragiás, verotoxikus és enteropatogén valamint 17 sertés eredetű enteropatogén) törzseket vizsgáltunk meg az SGI1 jelenlétére a *tetG* tetraciklin rezisztencia génre valamint az SGI1 mindkét határoló régióra specifikus PCR módszerrel. 17 különböző állati élelmiszereredetű *S. Typhimurium* törzs esetében találtunk SGI1 hordozást melyeknél PFGE (pulsed field gel electrophoresis) vizsgálatokkal határoztuk meg a köztük fennálló genetikai kapcsolatot. Eredményeink alapján a Magyarország különböző területéről származó törzsek között 4 csoportot tudunk felállítani a törzsek élelmiszer/állat eredete szerint, ezzel szemben a földrajzi eredettel nem találtunk kapcsolatot.



A következőkben az SGI1 gazdakromozómából való kivágódását az attB szekvenciára integrációs hely kimutatásával végeztük. Az attB felerősítése az SGI1-től upstream irányban elhelyezkedő *thdF* génre, valamint a szigetet upstream határoló ún. „cryptic retron phage” –ra specifikus PCR primerekkel történt. PCR terméket abban az esetben kaptunk, ha az attB integrációs hely az SGI1 kivágódása után „helyreállt”. Mind a 17 törzs esetében tapasztaltunk SGI1 vesztést, mindazonáltal igen kis gyakorisággal.

További kísérleteink során a fenti 17 *Typhimurium* törzs 5464 telepét vizsgálva 5 törzsben 9 szegregánst találtunk: 2 $Amp^R Sm^S Cm^S Tc^S$, 7 pedig $Amp^R Sm^R Cm^S Tc^S$.

43 overnight passzálás (mintegy 430 osztódás) után 4021 telep vizsgálata 3 törzsből 7 szegregánst eredményezett, melyek közül 6 $Amp^R Sm^S Cm^S Tc^S$, egy pedig $Amp^R Sm^R Cm^S Tc^R$ rezisztencia képet mutatott.

Mindegyik szegregánsban az SGI1 bal- és jobb határoló régiója PCR vizsgálatokban ép volt, jelezve, hogy a rezisztencia háttér változásai az SGI1 szigeten belüli deléciós események következményei lehetnek.