

ZÁRÓJELENTÉS

A pályázat címe: Állatorvosi jelentőségű Pasteurellaceae fajok antibiotikum-érzékenységének és a mögötte álló genetikai háttér vizsgálata

A pályázat azonosítója: K 84220

Futamidő: 2011.02.01-2015.01.15.

Témavezető: Fodor László

A pályázati munka összefoglalása

A pályázat 2011. február 1-én indult, és a munka során felmerült szakmai és egyéni problémák miatt hosszabbítást kérve 2015. január 31-én zárult. Az elvégzett kutatási munka a pályázati anyagban beadott munkatervet követte, a kisebb hangsúlyeltolódások a kapott eredmények tükrében történt apróbb módosításokból adódtak. A pályázatban részvevő kutatók személye a terveknek megfelelően alakult, nem módosult. A pályázat keretében beszerezni tervezett eszközök listája némiképp változott, mivel egyes műszereket más forrásokból sikerült beszerezni. A módosításhoz az OTKA az engedélyt megadta.

Bevezetés

A Pasteurellaceae család baktériumai állatorvosi szempontból kiemelkedő jelentőségűek, számos, az e családba tartozó baktérium súlyos megbetegedéseket tud okozni különféle állatfajokban, és ritkán az ember megbetegedéseiben is szerepük van. Mivel az e családba tartozó baktériumok gyengén immunogének, súlyos hajlamosító hatások esetén a vakcinák által kialakított védelem áttörhető. Az egyes baktériumfajokon belül főként csak típus-specifikus védelemre lehet számítani, a vakcinákra alapozott megelőzés nem tud tökéletes védelmet nyújtani. A veszteségek csökkentése érdekében, a megbetegedett állatok gyógykezelésére széles körben használunk antibiotikumokat. A nagyarányú antibiotikum-felhasználás és a baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája miatt folyamatosan szükséges vizsgálni a baktériumok, különösen a kórtani szempontból kiemelten fontos baktériumok antibiotikum-rezisztenciáját, valamint a baktériumok rezisztenciája mögötti genetikai hátteret. Az egyes antibiotikumokkal szembeni rezisztenciáért felelős gének kimutatása a rezisztencia-mechanizmusok jobb megismerését is segíti. Munkacsoportunk több éves, egyes vizsgált baktériumfajok vonatkozásában több évtizedes tapasztalatokkal rendelkezik. Számos, a Pasteurellaceae családba tartozó baktériumfaj morfológiai, biokémiai, szerológiai, genomszerkezeti és kórtani tulajdonságát vizsgáltuk korábban. Különböző szempontból vizsgáltuk a Pasteurellaceae család állatorvosi szempontból kiemelkedő 3 fajtát, az *Actinobacillus pleuropneumoniae*-t, a *Histophilus somni* -t és a *Mannheimia haemolytica*-t is. Jelen munkánk célja az volt, hogy az *A. pleuropneumoniae*, a *H. somni* és a *M. haemolytica* különféle antibiotikumokkal szembeni érzékenységét, és a mögötte álló genetikai hátteret vizsgáljuk.

Anyag és módszer

Baktériumok

A vizsgálatokba vont *A. pleuropneumoniae*, *H. somni* és *M. haemolytica* törzsek egyik részét gazdasági haszonállatok megbetegedései kapcsán frissen izoláltuk, másik része korábbi hasonló esetekből származott. Ez utóbbi esetben az izolált törzseket hagyományos

módszerekkel történt azonosítás után törzsgyűjteményünkben, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztóban helyeztük el, majd a vizsgálatokhoz elszaporítottuk őket. Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokhoz kontrollként a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 számú referenciatörzset használtuk.

Antibiotikum-érzékenységi vizsgálat

A baktériumok antibiotikum-érzékenységének vizsgálata során a célunk a minimális gátló koncentráció (minimum inhibitory concentration, MIC) meghatározása volt. A tesztelt antibiotikumok a következők voltak: penicillin, amoxicillin, ampicillin, ceftiofur, cefoperazon, gentamicin, spektinomycin, oxitetraciklin, doxiciklin, eritromicin, tilmikozin, tiamulin, kloramfenikol, florfenikol, szulfametoxazol, szulfametoxazol+trimetoprim, enrofloxacin, marbofloxacin. A MIC érték meghatározása mikrohígítási módszerrel történt a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; Wayne, Pennsylvania, USA) útmutatása alapján. Az eredmények értékelésénél a CLSI által ajánlott határértékeket fogadtuk el. Amennyiben az adott antibiotikumra vonatkozó érzékenységi határértéket nem tartalmaztak a CLSI kiadványai a *M. haemolytica*, a *H. somni* és az *A. pleuropneumoniae* esetében, akkor egy, a betegség kórfejlődését tekintve hasonló baktériumfajra vonatkozó értéket tekintettünk iránymutatónak. A vizsgálatok során meghatároztuk a törzsek MIC értékeinek tartományát, továbbá megállapítottuk az antibiotikumnak azt a koncentrációját, amely a vizsgált törzsek legalább 50%-t (MIC_{50}), 90%-t (MIC_{90}) illetve 100%-t (MIC_{100}) gátolta.

Passzív hemagglutinációs próba, hiperimmun savó termelése

Az *A. pleuropneumoniae* törzsek szerotipizálása során öt, szerotípusba be nem sorolható *A. pleuropneumoniae* törzssel nyulakban hiperimmun savót termeltünk. Az inaktivált baktériumokból készült szuszpenzió 0,5; 1; 2; 3; 3; és 3 ml-ével 3-4 napos időközzel nyulakat oltottunk vénába, majd az utolsó oltást követő 1 hét múlva elvéreztettük az állatokat. Az így nyert savóval passzív hemagglutinációs próbában reagáltattuk a savótermelésre használt törzseket, valamint az *A. pleuropneumoniae* 15 típusú törzset Biberstein (1978) módszerét követve.

Rezisztencia gének vizsgálata

A vizsgált rezisztenciagének kimutatását minden esetben irodalomból adaptált polimeráz láncreakcióval (PCR) végeztük. A béta-laktamáz gének közül a bla_{ROB} , a bla_{BRO} és a bla_{TEM} gének, a tetraciklin rezisztencia gének közül a tetA, tetB, tetH, tetK, tetL, tetM és tetO gének, a makrolid rezisztencia gének közül a ermA, msrE, mphE gének és a fenikolrezisztencia gének közül a fexA és cfr gének kimutatását tűztük ki célul.

A makrolid és fenikol rezisztenciagének esetében a kipróbált irodalmi PCR-k nem adtak értékelhető eredményt, így a tetraciklin és a béta-laktám rezisztenciát okozó gének kimutatására koncentráltunk.

A rezisztenciagének gyűjtőhelyeként működő integronok előfordulását az I., II. és III. osztályú integronok integráz génjére specifikus PCR-val vizsgáltuk.

Pulzáló mezejű gélelektroforézis

A korábbi OTKA pályázatok során optimalizált módszert alkalmaztunk az izolátumok tipizálására, majd a kapott elektroferogramokat a FingerprintingII szoftverrel elemeztük.

Eredmények, megbeszélés

Vizsgálataink kezdetén gazdasági haszonállatok kórtani folyamataiból korábban izolált és törzsgyűjteményünkben elhelyezett, *A. pleuropneumoniae*, *H. somni* és *M. haemolytica*

törzsek tenyésztési, morfológiai, biokémiai és antigénszerkezeti tulajdonságait vizsgáltuk meg és további friss törzseket izoláltunk és jellemeztünk. Kidolgoztuk az antibiotikumok minimális gátló koncentrációjának mérésére alkalmas mikrohígítós módszert mindhárom baktériumfaj vizsgálatára. A mikrohígítós MIC meghatározást jól lehet alkalmazni a kevésbé igényes baktériumfajok, így enterobaktériumok, Pseudomonasok vagy Staphylococcusok esetében, de a különféle kiegészítő anyagokat (vitaminok, nikotinsavamid-adenin dinukleotid stb.) vagy különleges tenyésztési körülményeket igénylő és igényes baktériumfajok esetében a módszer alkalmazása nehézségekkel jár. Kiegészített Müller-Hinton leves alkalmazásával a módszer megbízhatónak és jól reprodukálhatónak bizonyult.

Az *A. pleuropneumoniae* törzsek esetében az antibiotikum-érzékenységre vonatkozó vizsgálataink kétirányúak voltak. Részben az *A. pleuropneumoniae* törzsek antibiotikum-érzékenységi spektrumának megismerése érdekében hazai kórtani esetekből izolált 15 törzs érzékenységét vizsgáltuk korongdiffúziós módszerrel 107 antibiotikummal szemben, részben 30 frissen izolált törzs esetében meghatároztuk a gyakorlatban leggyakrabban alkalmazott 5 antibiotikum MIC és MIC₅₀ értékét. A béta-laktám antibiotikumok közül a penicillin, a cefalosporinok hatékonyan gátolták az *A. pleuropneumoniae* törzseket, mindössze egyes szűk spektrumú béta-laktám antibiotikumok, így a meticillin és a nafcillin esetében mutatkozott rezisztencia. Az aminoglikozidokra, a karbapenemekre, a fenikolokra, potenciált szulfonamidokra, polipeptid antibiotikumokra, tiamulinra és a makrolidokra általában érzékenyek voltak az *A. pleuropneumoniae* törzsek. Jelentősebb arányú rezisztencia csak a tetraciklinek esetében mutatkozott. A kórtani esetekből frissen izolált 30 *A. pleuropneumoniae* törzs esetében a ceftiofurra, az enrofloxacinra, a penicillin G-re és a tiamulinra a törzsek többsége érzékenynek bizonyult, bár néhány, ceftiofurra vagy enrofloxacinra mérsékeltén érzékeny, továbbá egy enrofloxacinnal és két penicillinnel szemben rezisztens törzset is találtunk. Az oxitettraciklinre érzékeny, mérsékeltén érzékeny és vele szemben rezisztens törzsek aránya nagyjából azonos volt. A frissen izolált *A. pleuropneumoniae* törzseket levehígítós módszerrel vizsgálva az antibiotikumok minimális gátló koncentrációja tág határok között mozgott, ezek alapján minden törzs érzékeny volt ceftiofurra, 26 (86,7%) enrofloxacinra és 19 (63,3%) tiamulinra is. A törzsek közül 16 (53,3%) csak mérsékeltén érzékenynek bizonyult penicillin G-re, és 6 (20%) pedig rezisztens volt vele szemben. Csak egy frissen izolált *A. pleuropneumoniae* törzs mutatott érzékenységet, 5 (16,7%) pedig mérsékelt érzékenységet oxitettraciklinre, 24 (80%) viszont rezisztens volt vele szemben. Az *A. pleuropneumoniae* antibiotikum-érzékenységének korongdiffúziós próbával történő meghatározása kevésbé pontosnak bizonyult, így az ilyen módon nyert eredmények gondos értékelést igényelnek. Az eredmények egy része megjelent a Magyar Állatorvosok Lapjában (Sárközi R., Makrai L., Tóth A., Fodor L.: Hazai *Actinobacillus pleuropneumoniae* törzsek antibiotikum-érzékenysége a gyakorlatban alkalmazott antibiotikumokra. Magy. Áo Lapja 2014. 136: 643-649.), és egy további közleményt tervezünk megjelentetni.

Optimalizáltunk és alkalmaztunk egy *A. pleuropneumoniae* PCR-t, amellyel minden izolátum *A. pleuropneumoniae*-nak bizonyult. Béta-laktamáz géneket az *A. pleuropneumoniae* izolátumokban nem találtunk, a talált hat rezisztens izolátum esetében a penicillinkötő proteinek megváltozása állhat a rezisztencia hátterében. A tetraciklin rezisztens izolátumok között 9 tetL, 3 tetB és 1 tetH gént hordozó izolátumot mutattunk ki, a többi vizsgált gén nem fordult elő. Integronhordozó izolátumot sem találtunk. A PFGE-sel legalább 20 független genotípust azonosítottunk az 1-es biotípusú izolátumok között, míg a 2-es biotípusú izolátumok öt pulzotípusba tartoztak. A genetikai diverzitás tehát alacsonyabb a 2-es biotípusú izolátumok között. A rezisztenciagének előfordulása is sokkal gyakoribb volt a 2-es

biotípusú izolátumok körében, mind a 9 tetL gént hordozó izolátum két egymással valószínűleg rokon genotípus izolátumaiban fordult elő. Egységesen rezisztens genotípust viszont nem találtunk, ami a rezisztenciagének horizontális géntranszferrel való terjedésére utal.

A *H. somni* törzsek esetében a kórokozó által okozott betegségek gyógykezelése szempontjából fontos 6 antibiotikumra, az enrofloxacinra, a florfenikolra, a gentamicinre, a penicillin-G-re, a tetraciklinre és a tilmikozinra való érzékenységet vizsgáltuk a mikrohígítós módszerrel. Az enrofloxacin MIC értéke 0,015-0,06 µg/ml közé esett. A törzsek 100%-át gátolni képes koncentráció (MIC₁₀₀) 0,06 µg/ml volt, míg a MIC₉₀ és MIC₅₀ érték egyaránt 0,03 µg/ml volt. A florfenikol legkisebb gátló értékeinek tartománya 0,125-0,5 µg/ml volt. A törzsek 100%-ának növekedését a 0,5 µg/ml florfenikol gátolta, mind a MIC₅₀ mind a MIC₉₀ érték 0,25 µg/ml volt. A gentamicin MIC értékei 1-8 µg/ml között mutatkoztak, a MIC₅₀ 4 µg/ml, a MIC₉₀ 8 µg/ml volt. A penicillin-G MIC intervalluma a *H. somni* törzsek esetében 0,002-0,125 µg/ml volt, a MIC₅₀ 0,008 µg/ml, a MIC₉₀ 0,06 µg/ml koncentráció volt. A tetraciklin 0,25-0,5 µg/ml közötti értékben gátolta a *H. somni* törzseket, 0,5 µg/ml koncentráció a törzsek 90%-t, 0,25%-t akadályozta a szaporodásban. A tilmikozin MIC tartománya 0,5-16 µg/ml volt, a MIC₅₀ 2 µg/ml, a MIC₉₀ pedig 4 µg/ml volt. A vizsgált *H. somni* törzsek mindegyike érzékenynek bizonyult enrofloxacinra, florfenikolra, penicillin-G-re, tetraciklinre és tilmikozinra. A gentamicinre a törzsek közel 30%-a csak mérsékelten volt érzékeny. A törzsek eredete (állatfaj, kórforma) általában nem befolyásolta az antibiotikum-érzékenységet, bár a nemi utakból származó *H. somni* törzsek penicillin- és tilmikozin-érzékenysége nagyobbak mutatkozott. Mint az a fenotípusos érzékenység adataiból már sejthető, egyetlen vizsgált rezisztenciagént sem mutattunk ki a *H. somni* izolátumokból, illetve integront sem hordoztak az izolátumok. Az eredményeket összefoglaló közleményt az Acta Veterinaria Hungarica-ban tervezzük megjelentetni (Jánosi K., Kardos G., Makrai, L., Fodor L.: Susceptibility of *Histophilus somni* to some antibiotics. Acta Vet. Hung, 2015).

A vizsgálataink során 145, hazai eredetű *M. haemolytica* törzs antibiotikum-érzékenységét vizsgáltuk mikrohígítós módszerrel. A vizsgálatokba 9 antibiotikum-osztályba tartozó összesen 18 antibiotikum MIC értékét határoztuk meg, megadva a MIC tartományon túl a MIC₅₀ és a MIC₉₀ értékét is. Így meghatároztuk egyes penicillinek (penicillin, amoxicillin, ampicillin), cefalosporinok (ceftiofur, cefoperazon), aminoglikozidok (gentamicin, spektinomycin), tetraciklinek (oxitetraciklin, doxiciklin), makrolidok (eritromicin, tilmikozin), diterpenek (tiamulin), fenikolok (kloramfenikol, florfenikol), fluorokinolonok (enrofloxacin, marbofloxacin) és folsavszintézist gátlók (szulfametoxazol, szulfametoxazol-trimetoprim) antibakteriális hatását. A penicillinek esetében jó antibakteriális hatás mutatkozott, a penicillin MIC₅₀ értéke 0,125 µg/ml, a MIC₉₀ értéke pedig 0,5 µg/ml volt, vagyis a *M. haemolytica* törzsek többsége érzékeny vagy mérsékelten érzékeny volt a penicillinre. Hasonló érzékenységet lehetett látni az amoxicillin (MIC₅₀ 2 µg/ml, MIC₉₀ 32) és az ampicillin (MIC₅₀ 0,25 µg/ml, MIC₉₀ 2 µg/ml) esetében is. Kiváló antibakteriális hatást mutattak a cefalosporinok, mind a ceftiofur, mind a cefoperazon MIC₉₀ értéke az érzékenységi kategóriába esett (1 µg/ml illetve 8 µg/ml). Az aminoglikozidok közül a gentamicin MIC₅₀ értéke (2 µg/ml) még az érzékenységi tartományba esett, de a MIC₉₀ értéke már rezisztenciára utalt. Hasonlóképpen rezisztens volt a *M. haemolytica* törzsek többsége a spektinomycinrel szemben is. Bár a törzsek többsége érzékeny volt oxitetraciklinre, több rezisztens törzs miatt a MIC₉₀ 16 µg/ml-nek adódott. A doxiciklin esetében csak 3 rezisztens törzset találtunk, a többi *M. haemolytica* törzs érzékenynek bizonyult. A makrolid antibiotikumok közül az eritromicin gyenge antibakteriális hatást mutatott a *M. haemolytica* törzsek esetében, a tilmikozin MIC₅₀ értéke 2 µg/ml, a MIC₉₀ értéke pedig 8 µg/ml volt,

mindkét érték az érzékenységi kategóriába esik. A tiamulinnal szembeni rezisztencia alacsony szintű volt, a törzsek 88%-a érzékeny volt tiamulinra, 12%-a pedig rezisztens volt vele szemben. Mind a kloramfenikol, mind a florfenikol hatékonyan tudta gátolni a *M. haemolytica* törzseket, mindösszesen 7 törzs volt rezisztens kloramfenikollal, 2 pedig florfenikollal szemben. A fluorokinolon antibiotikumok hatékonyak bizonyultak, az enrofloxacin MIC₅₀ értéke 0,03 µg/ml, a marbofloxacin MIC₅₀ értéke pedig 0,06 µg/ml. A szulfametoxazol 1600 µg/ml koncentrációban gátolta a törzsek többségét (MIC₅₀), a szulfametoxazol-trimetoprim kombináció esetében a MIC₅₀ 2,375±0,125 µg/ml volt, a törzsek közül csak 14% volt rezisztens. Az izolátumok között 2 tetM, 3 tetL és 2 tetH gént hordozó izolátumot találtunk, de genetikai rokonságra utaló pulzotípus hasonlóság csak két 1-es szerotípusú tetL hordozó izolátum között volt. Integron hordozás nem fordult elő. A genetikai diverzitás magas volt, a kimutatott rezisztenciagének halmozódása egyes genotípusokban nem volt jellemző. Az e vizsgálatok eredményeire alapozott közleményt a közeljövőben nyújtjuk be közlésre (Fodor, L., Makrai, L., Kardos, G.: Antibiotic susceptibility of *Mannheimia haemolytica* strains. Antimicrob. Agents Chemother., 2015).

Az *A. pleuropneumoniae*, a *H. somni* és a *M. haemolytica* törzsek antibiotikum-érzékenységének és a mögötte lévő genetikai háttér vizsgálata, elsősorban a friss törzsek gyűjtése során számos olyan bakteriológiai vizsgálatot végeztünk, amely nem kapcsolódik szoros értelemben a tervezett munkához, de tudományos újdonsággal szolgált. Az *A. pleuropneumoniae* törzsek tipizálásakor öt olyan törzset találtunk, amelyeket nem lehetett besorolni az *A. pleuropneumoniae* jelenleg ismert 15 szerotípusának egyikébe sem. E törzsekkel szemben nyulakban hiperimmun savót termeltünk, és ezeknek a savóknak a segítségével a passzív hemagglutinációs próbával igazoltuk, hogy e törzsek egy egységes csoportot képeznek. Az ellenük termelt hiperimmun savókat az *A. pleuropneumoniae* 15 szerotípusának típus-törzsével reagáltatva reakció nem mutatkozott, így igazolást nyert, hogy e törzsek az *A. pleuropneumoniae* egy újabb szerotípusába tartoznak, amelyet 16-os szerotípusnak javasolunk elnevezni. Az ennek a vizsgálatnak az eredményeit tartalmazó szakcikket a közelmúltban nyújtottuk be közlésre (Sárközi, R., Makrai, L., Fodor, L.: Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 16. Acta Vet. Hung., 2015).

Vizsgálataink során egy komoly törzsgyűjteményt hoztunk létre, amely több mint 100 *A. pleuropneumoniae*, 100 *H. somni* és 200 *M. haemolytica* törzsből áll. A kórtani esetekből származó friss törzsek mellett a gyűjtemény számos külföldi és referenciatörzset is tartalmaz, így ez további, más irányú bakteriológia vizsgálatok lehetőségét teremti meg.

Publikációk

1. Kardos, G., Kecskeméti, S., Székely, É., Fodor, L.: Hazai *Actinobacillus pleuropneumoniae* izolátumok genetikai diverzitásának és tetraciklin-rezisztenciájának felmérése. MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai Beszámoló (2014. jan. 27-30, Budapest)
2. Kardos, G., Kecskeméti, S., Székely, É., Fodor, L.: Hazai *Mannheimia haemolytica* izolátumok genetikai diverzitásának és tetraciklin-rezisztenciájának felmérése. MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai Beszámoló (2014. jan. 27-30, Budapest)
3. Sárközi R., Makrai L., Horváth P., Fodor L.: Hazai *Actinobacillus pleuropneumoniae* törzsek szerotípusainak vizsgálata., MTA Állatorvos-tudományi Bizottság Akadémiai beszámoló., (2014. jan. 27-30, Budapest)

4. Fodor, L., Makrai, L., Kecskeméti, S., Kardos, G.: Susceptibility of *Mannheimia haemolytica* strains to different antibiotics. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése. 2014. október 15-17. Absztraktfüzet p18.
5. Kardos, G., Kecskeméti, S., Székely, É., Sárközi, R., Fodor, L.: Genetic diversity and tetracycline resistance mechanisms among Hungarian *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése. 2014. október 15-17. Absztraktfüzet p26.
6. Sárközi, R., Makrai, L., Tóth, A., Fodor, L.: Susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains to different antibiotics used for the treatment of porcine pleuropneumonia. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése. 2014. október 15-17. Absztraktfüzet p62.
7. Sárközi R., Makrai L., Tóth A., Fodor L.: Hazai *Actinobacillus pleuropneumoniae* törzsek antibiotikum- érzékenysége a gyakorlatban alkalmazott antibiotikumokra. Magy. Áo Lapja 2014. 136: 643-649.
8. Sárközi, R., Makrai, L., Fodor, L.: Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 16. Acta Vet. Hung., 2015 (Közlésre leadva)
9. Fodor, L., Makrai, L., Kardos, G.: Antibiotic susceptibility of *Mannheimia haemolytica* strains. Antimicrob. Agents Chemother., 2015. (Közlésre előkészítve)
10. Jánosi K., Kardos G., Makrai, L., Fodor L.: Susceptibility of *Histophilus somni* to some antibiotics. Acta Vet. Hung, 2015. (Közlésre előkészítve)