

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

***Bordetella bronchiseptica* törzsek összehasonlító feno- és
genotípusos vizsgálata, különös tekintettel a baktérium
virulencia tényezőire és gazdaadaptációjára**

PhD értekezés tézisei

Khayer Bernadett

2015

Témavezető:

.....

Dr. Magyar Tibor

MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézet

Bevezetés

A *Bordetella bronchiseptica* széles gazdaspektrummal rendelkező, világszerte előforduló Gram-negatív baktérium. Az általa okozott legismertebb kórképek közé tartozik a sertések torzító orrgyulladás és a kutyák kennekőhögése. A légutak megbetegedését idézheti elő még nyúlban, macskában, tengerimalacban, emellett számos egyéb házi, laboratóriumi és vadon élő emlős állatfajból izolálták már. A *B. bronchiseptica* fertőzés többnyire nem jár súlyos klinikai tünetekkel vagy nagyarányú elhullásokkal, de tetemes gazdasági veszteségeket okozhat a tenyésztőknek és az állattartó telepeknek. Az egyedileg vagy kis csoportban tartott házi kedvencek fertőződése az egyre gyakoribb emberi megbetegedések miatt válhat fontossá; a megnövekedett humán esetek száma a *B. bronchiseptica* zoonotikus jelentőségére hívja fel a figyelmet.

A *B. bronchiseptica* főbb virulencia tényezői a gazdaszervezet nyálkahártyáján való megtapadásban és annak kolonizációjában szerepet játszó adhezinek, valamint a betegség jellemző tüneteinek kialakításában résztvevő toxinok. A *B. bronchiseptica* aktuális virulenciáját egy kétkomponensű szabályozó rendszer, a BvgAS határozza meg. A BvgAS különböző környezeti paraméterek (pl. hőmérséklet, szulfát-ion) változásának hatására génexpresszió szintjén aktiválja vagy gátolja számos enzim, felszíni fehérje és toxin mennyiségét és működését.

Jelen kutatás célja, hogy a különböző gazdafajokból és eltérő földrajzi környezetből származó *B. bronchiseptica* törzseket feno- és genotipizáló módszerek segítségével jellemezzük, és feltárjuk a törzsek közötti esetleges különbségeket, valamint filogenetikai kapcsolatokra is fényt derítsünk. Munkánk során a fertőzés egyes fázisaiban lényeges virulenciafaktorokat (motilitás, adhezinek és toxinok) elemeztük. Vizsgálataink középpontjában annak felderítése állt, hogy a *B. bronchiseptica* virulenciáját meghatározó tényezőknek létezik-e gazdafaji specifikussága (gazdaadaptáció), és hogy ezek a tényezők mennyire állandóak térben és időben.

Annak ellenére, hogy a szakirodalomban számos példát találunk a *B. bronchiseptica*-val kapcsolatos célzott kutatásokra, meglehetősen kevés a nagyszámú, elsősorban állati eredetű törzset többféle szempontból vizsgáló, összehasonlító tanulmány. Magyarországon hagyománya van a sertés eredetű *B. bronchiseptica* törzsekkel végzett kutatásoknak, de több gazdafajból származó törzsek összehasonlító vizsgálatára eddig nem került sor. Hazai és nemzetközi viszonylatban is hiánypótlónak tekinthető munkánk nemcsak az általános alap kutatás számára szolgáltat új ismereteket, de fontos lehet a nagy- és kisállattartók igényeit kielégítő gyorsdiagnosztikában, a célzottabb terápiás kezelésben és vakcinák fejlesztésében is.

Anyag és módszer

A felhasznált *B. bronchiseptica* törzsek

Munkánkhoz frissen izolált és az MTA ATK ÁOTI törzsgyűjteményében megtalálható, hazai és külföldi eredetű, különféle gazdafajokból (sertés, kutya, nyúl, macska, tengerimalac, ló, koala, pulyka és ember) származó *B. bronchiseptica* törzseket használtunk fel. A baktériumok azonosításához telepmorfológiai, biokémiai (ureáz, nitrát, indol, glükóz, laktóz és szacharóz teszt), valamint molekuláris (fajspecifikus PCR) vizsgálatokat végeztünk. A tenyésztéshez 5% juhvért tartalmazó Columbia agart használtunk 37°C-os és 24 órás inkubáció mellett, a törzsek fenntartása -70°C-on fagyasztott formában történt.

A *B. bronchiseptica* törzsek fenotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok

Hemolizáló képesség vizsgálata

Az azonosítás és a tenyésztés során a törzsek nem mindig mutatták a *B. bronchiseptica*-ra jellemző β -hemolízist. Mivel ezt a sajátságot befolyásolhatják a tenyésztési körülmények is, a törzsek hemolitikus tulajdonságainak vizsgálatára további 6, különböző összetételű (5 vagy 15%-os juh- vagy lóvéres agar) és pH-jú (6,8 vagy 7,2) táptalajt használtunk fel. Valamennyi elrendezésben aerob körülmények között, 37°C-on és 24 óráig tartott az inkubáció.

Ureum-bontó képesség vizsgálata

Az ureum-bontásért felelős gének aktivitása alacsony hőmérsékleten, valamint $MgSO_4$ jelenlétében megemelkedik, ezért 24°C-os inkubáció mellett is elvégeztük a hagyományos biokémiai tesztet. A $MgSO_4$ mennyiségétől való függés vizsgálatához különböző, 0, 40, 100 és 150 mM $MgSO_4$ tartalmú Luria-Bertani (LB) táplevesbe oltottunk egy kacsnyi friss baktériumot, majd az inkubáció után (37°C, 24 h) 30 μ l szuszpenziót pipettáztunk a hagyományos ureum levesbe. A tesztet 37°C-os, 24 órás inkubáció után értékeltük ki. Az ureum-bontó képességet Diatabs diagnosztikai tabletták, valamint API 20 NE lemez segítségével is teszteltük a gyártók utasításai szerint.

Hemagglutinációs próba

A *B. bronchiseptica* törzsek adhéziós képességének vizsgálatához tárgylemez-hemagglutinációs vizsgálatokat végeztünk, amelyekhez alvadásban gátolt szarvasmarha-, sertés-, ló-, juh-, kutya- és csirkevért, illetve humán „A”, „B” és „0” vércsoportú véreket használtunk. A mosott vörösvértestekből (vvt) PBS-sel 10%-os szuszpenziót készítettünk, melynek 20 μ l-ében egyenletesen eloszlattunk egy kacsnyi friss baktériumot. A reakciók eredményét egy perc elteltével olvastuk le, és ötfokozatú skálán (0-4) értékeltük. A 0 hemagglutinációs szint a hemagglutináció hiányát jelölte, a 4 pedig a teljes hemagglutinációt. A vizsgálatot szobahőmérsékleten végeztük és a vérek mennyiségétől függően (akár több alkalommal is), alkalmanként legalább háromszor ismételtük meg.

A mozgásképeség vizsgálata

A különböző környezeti tényezők *B. bronchiseptica* törzsek mozgásképeségére gyakorolt hatását kétféle, 0,4% agart tartalmazó félfolyékony Luria-Bertani (LB) és 40 mM $MgSO_4$ -tal dúsított LB (LB+ $MgSO_4$) táptalajon vizsgáltuk 24°C-on, illetve 37°C-on. A különböző környezeti feltételek mellett (LB-37; LB-24; LB+ $MgSO_4$ -37; LB+ $MgSO_4$ -24) 24 órára keletkezett motilitási zónákat milliméter pontossággal olvastuk le.

Antibiotikum-érzékenység meghatározása

A *B. bronchiseptica* antibiotikum-rezisztenciájának vizsgálatához Kirby-Bauer korongdiffúziós módszert alkalmaztunk. Egy kacsnyi friss tenyészetből származó

baktériumot 5 ml fiziológiás sóoldatban szuszpendáltunk, az elegy sűrűségét 0,5 McFarland-re állítottuk be, majd a szuszpenziót Müller-Hinton táptalajra szélesztettük. A vizsgálat során 14 különböző antibiotikum korongot használtunk fel. A vizsgálatok kiértékelésekor a Clinical and Laboratory Standards Institute ajánlott határértékei alapján, a NÉBIH Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság által kidolgozott határértékeket vettük figyelembe.

A *B. bronchiseptica* törzsek genotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok

Polimeráz láncreakció

A molekuláris fajazonosításhoz (Bb PCR), valamint az egyes génszakaszok (ureáz [*ureC*], dermonekrotoxin [*dnt*], fimbria [*fimA*], flagellin [*flaA*], adenilát cikláz-hemolizin toxin [*cyaA*] és peptid transzport protein [*ptp*]) felsokszorozásához szükséges primereket vagy a szakirodalom alapján választottuk ki, vagy magunk terveztük OLIGO 5 Primer Analysis Software segítségével. A DNS-templátot friss baktérium tenyészetből, forralásos módszerrel nyertük, a reakciókat ESCO Swift Mini készülékben hajtottuk végre. A PCR termékeket 1,5%-os SeaKem agaróz gélben 1×TBE pufferben ellenőriztük 9 V/cm elektromos térerősségű gélelektroforézissel. Az elektroforézis után a gélt 2 µg/ml töménységű etídium-bromid oldatban festettük meg. A termékek detektálása és dokumentálása UV fényben történt Kodak Gel Logic 212 Imaging System segítségével.

Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus

A *fimA* gén vizsgálatához *HincII* és *SaI* enzimeket, a *flaA* génszakasz hasításához *HincII*, *BglI* és *MspI* endonukleázokat alkalmaztunk. A *cyaA* génszakaszt *NarI* és *SaI*, a *ptp* operont *NarI* és *BglI* enzimek használatával vizsgáltuk. A reakcióelegyek összemérésénél és az egyéb reakciókörülmények megválasztásánál a gyártók ajánlása alapján jártunk el. Az enzimek hatására létrejött fragmenteket 2,5%-os MetaPhor agaróz gélben 1×TBE pufferben gélelektroforézissel (7 V/cm) ellenőriztük. A gélt elektroforézis után 2 µg/ml töménységű etídium-bromid oldatban festettük meg. A termékek detektálása és dokumentálása UV fényben történt Kodak Gel Logic 212 Imaging System segítségével, a fragmentek hosszának megállapításához a Kodak Molecular Imaging Software-t használtuk.

Szekvencia-meghatározás és filogenetikai elemzés

A nukleinsav sorrendek meghatározását négy gén kijelölt szakaszán végeztük el (*fimA*, *flaA*, *cyaA* és *ptp*). A szekvenáló primerek minden esetben megegyeztek a PCR során alkalmazott primerekkel, azonban a *cyaA* 2151 bp hosszú szakaszának vizsgálatához egy további, saját tervezésű belső primerre is szükség volt. A PCR termékek tisztítását és a szekvenáló reakció összemérését a MacroGen Europe Ltd. hajtotta végre hagyományos Sanger-féle dideoxinukleotid módszerrel. A kapott kromatogramokat Chromas LITE 2.01 programmal értékeltük ki, a két irányból leolvasott szekvenciákat a SeqMan – Lasergene 7.1.0. (DNASTAR) programmal illesztettük össze.

Az általunk vizsgált törzsek szekvenciáit a GenBank adatbázisában szereplő *B. bronchiseptica* szekvenciákkal hasonlítottuk össze BioEdit 7.1.3.0 és MegAlign – Lasergene 7.1.0. (DNASTAR) programok segítségével. A nukleotid és az ebből származtatott aminosav szekvencia hasonlóságokat Clustal W algoritmussal számoltuk ki. Az illesztés eredményeként filogenetikai dendrogramot készítettünk, a filogenetikai analízist a MEGA 6.06 szoftver Neighbor-Joining módszer alkalmazásával hajtottuk végre. Az evolúciós távolságokat Jukes-Cantor korrekciós ráta figyelembevételével számítottuk ki, a törzsfa topológiáját 1000 ismétléses bootstrap analízissel vizsgáltuk.

Eredmények

A fajazonosítás eredményei

A törzsgyűjteményünkéből és saját izolátumaink közül összesen 164 törzset választottunk ki. A *B. bronchiseptica*-ra jellemzően egyetlen törzs sem hasznosította a felkínált szénhidrátokat (glükóz, laktóz és szacharóz), és a triptofán bontását jelző indol tesztben is negatív eredményt kaptunk. A nitrát-redukció tesztelésekor a törzsek csupán 92%-a lett pozitív, és találtunk 4 darab ureáz-negatív izolátumot is. A molekuláris azonosítás során a fajspecifikus PCR-rel felszorzosított 237 bp hosszúságú DNS szakaszt – a biokémiai próbák eredményétől függetlenül – minden mintánál kimutattuk.

A fenotípusos vizsgálatok eredményei

A törzsek hemolizáló képessége

A törzsek hemolizáló képességének vizsgálatokor változatos eredményeket kaptunk, a leoltások során a törzsek eltérő hemolitikus aktivitást mutattak. Ettől függetlenül kijelenthető, hogy a friss izolátumok hemolizáló képessége nagyobb, mint a régi, többszörös átoltáson és tartósítási eljárásen átesett törzseké. Az alacsonyabb pH-jú (7,2 helyett 6,8) véres agaron határozottabb β -hemolízist tapasztaltunk, akárcsak a lóvér tartalmú táptalajon a juhvérhez képest. Negyven, kutyákból származó törzs (38 hazai és 2 külföldi) esetén azonban nem láttunk feltisztulást egyik vizsgált véres agaron sem.

A hemagglutinációs képesség vizsgálata

A hemagglutinációs vizsgálatokat 9 gazdafajból származó, összesen 79 (hazai és külföldi) *B. bronchiseptica* törzssel végeztük el. Általánosságban elmondható, hogy a vizsgált törzsek a különböző típusú vvt-eket agglutinálták, és a legtöbb vérnél valamennyi hemagglutinációs szint megjelent. A három eltérő típusú (A, B és 0) humán vérrel kapott reakciók között számottevő különbséget nem találtunk. Legerősebb reakciókat kutya és sertés eredetű vvt-ek adták a baktériumok, a hemagglutináció hiányát szarvasmarha-, ló- és csirkevér mellett tapasztaltuk nagy számban. Szarvasmarha, juh és ló vvt-k mellett a törzsek egy része változó hemagglutinációs képességgel rendelkezett. Magyarországi és külföldi eredetű törzsek között a vizsgálatok során eltérést nem tapasztaltunk, mindkét csoportban megjelent valamennyi hemagglutinációs szint, és változó hemagglutinációt mutató törzseket is találtunk.

A törzsek antibiotikum-érzékenysége

A *B. bronchiseptica* antibiotikumokkal szembeni érzékenységét nyúl (n=40) és sertés (n=15) eredetű törzseken vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a törzsek rezisztensek penicillinre, ceftiofurra, vankomicinre és linkomicinre, de érzékenyek kolisztinre, neomicinre, valamint az alkalmazott quinolonokra. Ampicillinnel és eritromicinnel szemben mindkét gazdafajból származó törzsek esetén változatos eredményeket kaptunk. Tetraciklinre és szulfonamidokra a törzsek többsége érzékenyen reagált, de a nyúl eredetű törzsek 5%-a, a sertés eredetű törzseknek pedig egyharmada szulfonamid-rezisztens volt, és találtunk egy sertés eredetű tetraciklin-rezisztens *B. bronchiseptica* törzset is.

Az ureáz-negatív törzsek

Négy darab, sertés eredetű izolátum a hagyományos biokémiai tesztben ureáz-negativitást mutatott mind 37°C-os, mind pedig 24°C-os inkubáció mellett. A tenyésztés során hozzáadott MgSO₄ sem változtatott a baktériumok ureum-bontó képességén. Izolátumaink az ureáz diagnosztikai tablettával végzett vizsgálatban és az API 20 NE rendszerben szintén kétes eredményt adtak, 48 óra inkubációt követően is.

A fenotípusos vizsgálatokkal párhuzamosan genetikai próbákban is teszteltük a tenyészeteket. Az ureáz operon fő tagjára, az *ureC*-re tervezett molekuláris vizsgálat (PCR) során az ureáz-negatív törzsekből kimutattuk a 323 bp hosszú génszakaszt. A további genetikai vizsgálatokban (*dnt*-, *fimA*-, *flaA*- és *cyaA*-PCR és -RFLP) az ureáz-negatív törzsek a többi sertés eredetű törzsszel megegyező eredményt adtak.

Virulenciagének jellemzése

Dermonekrotoxin

A genetikai vizsgálatokba bevont 152 *B. bronchiseptica* 97%-ánál kimutattuk a keresett 224 nukleotid hosszúságú génszakaszt. Az 5 darab *dnt*-negatív törzs közül 3 humán (5390, Bb VAL és MBORD 675), 1 sertés (PV6), 1 pedig pulyka (MBORD 901) gazdafajból származott.

Fimbria

A *fimA* gén 549 bp hosszú szakaszát minden vizsgált törzsnél kimutattuk, RFLP analízis során az összes törzs – eredetüktől függetlenül –, azonos hasítási mintázatot adott. A szekvencia elemzéshez 21 törzset választottunk ki, melyeknek 456 bp hosszú *fimA* szakaszát a GenBank adatbázisba KF211375-KF211395 kódszámmal helyeztük el.

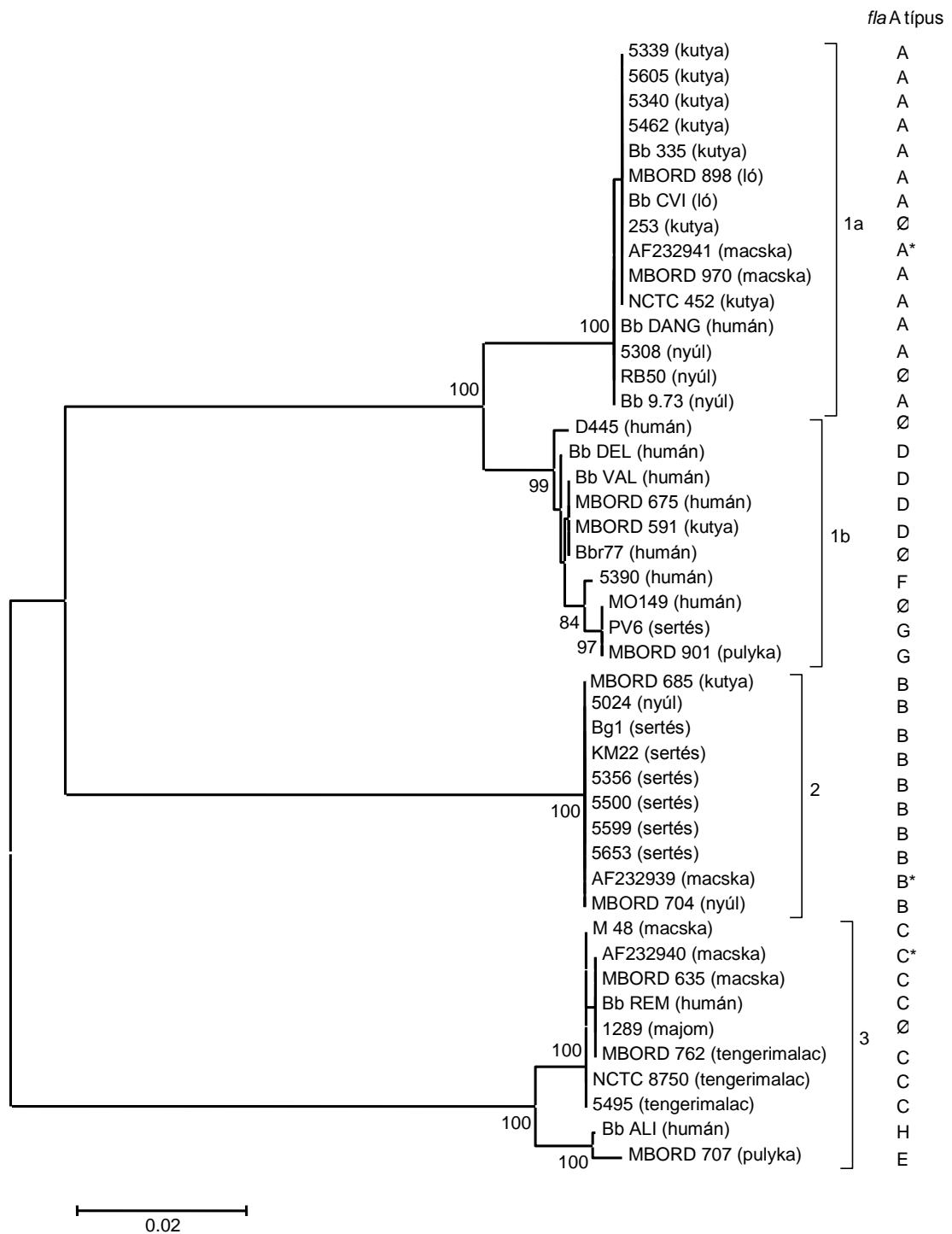
A 29 saját és génbanki *fimA* szekvencia egymáshoz illesztésekor a páronkénti genetikai távolság nukleotid és aminosav szinten is 0,0% és 3,0% között mozgott, a legnagyobb értéket két humán eredetű törzs (Bb DEL és 5390) között találtuk. A filogenetikai

fán a törzsek két fő csoportban helyezkedtek el, 2. főcsoport humán és atipikus állati eredetű törzseket (PV6, MBORD 591 és MBORD 707) tartalmazott, melyek eltértek a többi állati eredetű törzstől.

Flagellin

A flagellint kódoló *flaA* gén 1165 bp hosszú szakaszát mind a 152 vizsgált *B. bronchiseptica* törzsnél megtaláltuk. A PCR termékek restrikciós hasítását követően összesen 8 különböző RFLP-típust (A-tól H-ig) írtunk le. Leggyakoribb hasítási típus az A típus volt (44%), majd a B (41%) és a C (8%), ezeket hazai és külföldi törzseknél is kimutattuk, viszont a D, az E és a H típus kizárólag külföldi törzseknél fordult elő. Az E, az F és a H típust csupán 1-1 törzs reprezentálta, a G típushoz egy külföldi pulyka (MBORD 901) és egy hazai sertés (PV6) eredetű törzs tartozott. Az egyes hasítási típusok hazai törzsek esetén összefüggést mutattak a gazdafajjal; kutya eredetű törzsek A, sertés eredetű törzsek B, macskák és tengerimalacok C típusú mintázatot adtak. Nyúl eredetű törzseknél A és B típust is kimutattunk, a humán törzsek (n=7) viszont változatos RFLP-típussal rendelkeztek (A, C, D, F, H).

A *flaA* szekvencia elemzéséhez összesen 36 darab törzset választottunk, a szekvenciákat JX673952-JX673981 és KF211396-KF211401 kódszámokon helyeztünk el az adatbázisba. A többszörös szekvencia illesztés során megfigyeltük, hogy a vizsgált *flaA* génszakasz N- és C-terminális része teljes mértékben megegyező, konzervatív régió. Ezzel ellentétben a közbülső, hipervariábilis régióban (kb. 500 bp) akár több nukleotidra kiterjedő szubsztitúciókat, inszerciókat és deléciókat találtunk, amelyek aminosav szinten több nem-szinoním változást is létrehozhatnak. Ezáltal akár a páronkénti különbség 15% is lehet a törzsek között az adott génszakaszon. A *flaA* gén változatai és a törzsek gazdafaja közötti összefüggés a nukleinsav alapú filogenetikai fán is nyomon követhető, ugyanis a különböző RFLP-típusok (gazdafajok) különböző klaszterekben helyezkedtek el (1. ábra).



1. ábra: *B. bronchiseptica* törzsek 1042 bp hosszú *flaA* génszakaszára Neighbor-Joining módszerrel, MEGA 6.06 programmal szerkesztett filogenetikai fa

A fán a 80%-nál nagyobb bootstrap értékek szerepelnek. A fa mellett a törzsek RFLP típusát is feltüntettük. *: ismert RFLP típusú macska eredetű génbanki szekvenciák; ∅: génbanki szekvenciák

Adenilát cikláz-hemolizin

Az adenilát cikláz-hemolizin toxint kódoló *cyaA* gén vizsgálatakor a törzsek 73,5%-ánál (n=112) megtaláltuk a keresett 2151 bp hosszú PCR terméket, de a fennmaradó 40 törzs esetében nem kaptunk specifikus terméket. A *cyaA*-negatív törzsek kivétel nélkül kutya eredetű mintákból származtak, és megegyeztek a nem-hemolizáló törzsekkel. A *cyaA* PCR termékek endonukleázos hasítását követően 4 *cyaA* RFLP típusba (A, B, C és D) tudtuk besorolni törzseinket, melyek 90%-a A típusú hasítási mintázatot mutatott. A második leggyakoribb (6%) B típus a humán törzsekre volt jellemző (57%), míg a C és a D típust csak 2-2 külföldi törzs képviselte.

A szekvencia meghatározást 25 törzsen végeztük el, ennek eredménye (2007 bp) a GenBank adatbázisban KF220450-KF220474 kódszámok alatt érhető el. A nukleotid és a származtatott aminosav szekvenciák páronkénti illesztésekor 0,0% és 3,8% közötti különbségeket találtunk, néhány törzs egyedi hasítási mintázattal rendelkezett. Az egyedi különbségek a teljes szakaszon elszórtan jelentek meg. A *cyaA* génszakasz filogenetikai elemzése során két különálló klasztert kaptunk, az 1. klaszterbe inkább állati, míg a 2. klaszterbe inkább humán eredetű törzsek kerültek.

Peptid transzport protein

A *ptp* operon vizsgálatakor csupán 40 törzsnél tudtuk kimutatni a keresett 958 bp nagyságú terméket. A *ptp*-pozitív törzsek mindegyike kutya eredetű mintákból származott, és ezek azonosak voltak a *cyaA*-negatív törzsekkel. A *ptp* PCR termékeket *NarI* és *BglI* endonukleázos hasítása során az összes törzsnél azonos hasítási mintázatot kaptunk.

Mivel a hasítási mintázatok megegyeztek, és a *ptp*-pozitív törzsek 95%-ban hazai kutyákból származtak, szekvencia analízisre 3 magyarországi, és a 2 külföldi (Bb 335 és MBORD 843) törzset választottunk ki. Az *in silico* összeillesztés után az öt darab 909 bp hosszú szekvenciát a GenBank adatbázisába KF220475–KF220479 kódszámmal helyeztük el. Az általunk vizsgált *ptp* szekvenciák teljes mértékben megegyeztek egymással és a génbanki adatbázisban egyedülként elérhető, 253 (HE965806) szekvenciával is, eltérést egyetlen nukleotidban sem találtunk.

Következtetések

A *B. bronchiseptica* törzsek antibiotikum-érzékenységi vizsgálatai során tapasztalt egyedi különbségek háttérében a plazmidon kódolt rezisztencia állhat, valamint az, hogy az egyes területeken, állattartó telepeken más-más tulajdonságokkal rendelkező törzsek terjedhettek el, feltehetőleg az eltérő antibiotikum használati gyakorlat miatt.

Az ureáz-negativitás a *B. bronchiseptica* törzsek körében egyedi és rendkívüli fenotípusos tulajdonság. Az ureáz enzimet kódoló *ureC* génszakasz jelenléte azonban arra utal, hogy az ureáz aktivitás hiányának oka transzkripciós szinten és/vagy a járulékos fehérjék megváltozásában keresendő.

A *B. bronchiseptica* virulenciafaktorainak tanulmányozásához különböző fenotípusos vizsgálatokat alkalmaztunk, és a legtöbb vizsgálatban a törzsek heterogenitását mutattuk ki. A fenotípusos vizsgálatokban (hemolizáló képesség, hemagglutináció és mozgásképesség) kapott eredmények arra utalnak, hogy törzseink többnyire avirulens fázisban voltak. Mivel a tenyésztés során nem használtunk a BvgAS rendszerre ható moduláló szignálokat, ezért feltételezhető, hogy más extra- és/vagy intracelluláris körülmények indukálták a fázisváltást. Ide sorolhatók többek között olyan tényezők, mint az átoltások száma, a sejtek életkora, a sejtsűrűség, de természetesen számtalan, eddig még nem ismert befolyásoló tényező is szerepet játszhatott abban, hogy standard körülmények között is eltérő eredményeket kaptunk az ismétlések során.

A genotipizáló módszerek (PCR, RFLP, szekvencia- és filogenetikai analízis) eredményeit már nem befolyásolhatták sem a külső, sem a belső tényezők, ennek ellenére itt is változatosságot tapasztaltunk a törzsek között, mely alapján viszont egyértelmű csoportokat tudtunk megalkotni. A talált genetikai heterogenitást sokszor gazdafajspecifikus jegynek lehetett tekinteni, mint például a *cyaA* gén hiányát a kutya eredetű törzseknél. Szintén a gazdaadaptációra utal a *flaA*-típusok eloszlása is, melyben az A típus a kutya, a B típus pedig a sertés eredetű törzsekre volt jellemző, amiből szintén a *B. bronchiseptica* klonális struktúrájára lehet következtetni.

Genotipizáló vizsgálataink során azonban feltűnt egy sertés eredetű törzs, amely eltért a többitől (*dnt*-negatív és G *flaA*-típus). A PV6 *flaA* PCR-RFLP és szekvencia analízis eredménye arra utal, hogy a PV6 szokatlan és atipikus a sertés eredetű *B. bronchiseptica* törzsek között, ezért a fertőzés forrása minden bizonnyal egy másik gazdafaj lehetett. Azon génszakaszoknál, ahol változatosságot mutattunk ki a törzsek között, a PV6 azokkal a törzsekkel mutatta a legnagyobb hasonlóságot, melyek a *B. bronchiseptica* humán-adaptált vonalát képviselték, ezért az sem tartható kizártnak, hogy a fogékony állatok fertőzési forrása maga az ember legyen.

Új tudományos eredmények

1. Elsőként végeztük el nagyszámú magyarországi (n=107) és külföldi (n=45) eredetű, eltérő gazdafajokból származó *B. bronchiseptica* törzsek átfogó fenotípusos összehasonlító vizsgálatát.
2. A világon elsőként izoláltunk és jellemeztünk ureáz-negatív mezei *B. bronchiseptica* törzseket.
3. Elsőként végeztük el hazai nyúl és sertés eredetű *B. bronchiseptica* törzsek széles körű antibiotikum-érzékenységi vizsgálatát, melynek során néhány esetben tetraciklin és/vagy szulfonamid rezisztenciát mutató törzseket is találtunk.
4. A világon első ízben végeztük el *B. bronchiseptica* törzsek *fimA* génszakaszának PCR-RFLP analízisét, a módszer segítségével a törzsek egységességét mutattuk ki.
5. A *B. bronchiseptica flaA* génszakaszát elemző PCR-RFLP vizsgálat során az eddig ismert 3 RFLP-típuson túl 5 darab új RFLP-típust írtunk le. A *flaA* génszakaszon alapuló genotipizáló módszerek segítségével a *B. bronchiseptica* törzsek gazdafaj adaptációjára utaló jeleket mutattunk ki, különösen a magyarországi törzsek esetében.
6. PCR módszerrel kimutattuk, hogy a magyarországi kutya eredetű *B. bronchiseptica* törzsekből a *cyaA* génszakasz hiányzik, a helyére beépülő *ptp* operon jelenlétét mindegyik törzsnél igazoltuk. A *cyaA* jelenlétét más gazdafajokból származó, hazai izolálású törzseknél minden esetben kimutattuk, ezért a *cyaA* gén hiányát kutya eredetű hazai törzseknél gazdaspecifikus tulajdonságként írtuk le.
7. Szekvencia-elemzést követően a szakirodalomban is megtalálható, 14 *cyaA* alléltípuson túl egy újabb, 15. alléltípust írtunk le egy magyarországi humán eredetű törzsből.

A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Wehmann E., Khayer B., Magyar T.: Heterogeneity of *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase (*cyaA*) RTX domain, Arch. Microbiol., 197. 105-112, 2015.

IF₂₀₁₃: 1,861

Khayer B., Magyar T., Wehmann E.: Flagellin typing of *Bordetella bronchiseptica* strains originating from different host species, Vet. Microbiol., 173. 270-279, 2014.

IF₂₀₁₃: 2,726

Khayer B., Wehmann E., Demeter Z., Rónai Zs., Jánosi Sz., Rusvai M., Magyar T.: Kutya eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek molekuláris vizsgálata, Magyar Állatorv. Lapja, 133. 594-600, 2011.

IF: 0,201

Khayer B., Rónai Zs., Wehmann E., Magyar T.: Detection of urease-negative *Bordetella bronchiseptica* from the field, Acta Vet. Hung., 59. 289-293, 2011.

IF: 0,673

Konferencia prezentációk

Khayer B., Domokos J., Magyar T., Wehmann E.: Magyarországi sertés eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálata (poszter) [Antibiotic susceptibility of Hungarian *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from pigs; *Konferencia absztraktfüzet* p. 30.] Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése. Keszthely, 2014.10.15-17.

Domokos J., Khayer B.: Sertés eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálata (előadás) [*Konferencia absztraktfüzet* p. 74.] 15. Kolozsvári Biológus Napok. Kolozsvár, 2014.04.04-06.

Khayer B., Magyar T., Wehmann E.: Comparison of human and animal *Bordetella bronchiseptica* strains by PCR-RFLP and phylogenetic analysis (poszter) [No.: P1] 10th International Symposium on *Bordetella*. Dublin, 2013.09.08-11.

Khayer B., Sulyok K. M., Wehmann E., Magyar T.: Antibiotic susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from rabbits (poszter) [*Konferencia absztraktfüzet* p. 184.] EMBO/EMBL Symposium: New approaches and concepts in microbiology. Heidelberg, 2013.10.14-16.

- Khayer B, Sulyok K. M., Wehmann E., Magyar T.: Nyúl eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek antibiotikum érzékenysége (poszter) [Szerk.: Janda T., ISBN:978-963-8351-41-8, pp. 225-228.] II. ATK Tudományos Nap, Velünk élő tudomány. Martonvásár, 2013.11.08.
- Khayer B., Magyar T., Wehmann E.: Humán és állati eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek összehasonlító vizsgálata PCR-RFLP-vel és filogenetikai analízissel (előadás) [Szerk.: Janda T., ISBN:978-963-8351-41-8, pp. 50-53.] II. ATK Tudományos Nap, Velünk élő tudomány. Martonvásár, 2013.11.08.
- Magyar T., Khayer B., Wehmann E.: PCR-RFLP analysis of *Bordetella bronchiseptica* isolates from different animal species to detect the possible signs of host-adaptation (poszter) [Konferencia absztraktfüzet p. 22.] 2nd Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals. Prato, 2012.10.09-12.
- Khayer B., Magyar T., Wehmann E.: Phylogenetic analysis of *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from different host species (poszter) [Acta Microbiol. Imm. Hung. Supplement 60:32] Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése. Keszthely, 2012.10.24-26.
- Wehmann E, Magyar T, Khayer B: *Bordetella bronchiseptica* virulencia tényezői és gazdafaj adaptációja (poszter) [Szerk.: Janda T., ISBN: 978-963-8351-40-1, p. 69.] I. ATK Tudományos Nap, Felfedező kutatások az Agrártudományi Kutatóközpontban. Martonvásár 2012.11.14.
- Khayer B., Lukács L., Wehmann E., Magyar T.: Characterisation of *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from pet animals (poszter) [Acta Microbiol. Imm. Hung. Supplement 58:167] 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, 2011.07.20-22.
- Khayer B., Wehmann E., Magyar T.: PCR-RFLP analysis of *Bordetella bronchiseptica* strains originated from different hosts on *flaA* gene. (poszter) [Konferencia absztraktfüzet p. 57.] The Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals. Prato, 2010.10.06-09.
- Khayer B., Wehmann E., Magyar T.: *Bordetella bronchiseptica* gazdaadaptációjának vizsgálata PCR-RFLP módszerrel (előadás) [Identification of host adaptation markers of *Bordetella bronchiseptica* with PCR-RFLP analysis; Acta Microbiol. Imm. Hung. Supplement 58:51] Magyar Mikrobiológiai Társaság 2010. évi Nagygyűlése. Keszthely, 2010.10.12-15.

Akadémiai beszámolók

- Khayer B., Sulyok K. M., Domokos J., Magyar T., Wehmann E.: Nyúl és sertés eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálata. Budapest, 2015.01.27.
- Khayer B., Magyar T., Wehmann E.: Különböző gazdafajokból származó *Bordetella bronchiseptica* törzsek virulencia faktorainak vizsgálata. Budapest, 2013.01.29.
- Khayer B., Wehmann E., Magyar T.: Különböző gazdafajokból származó *Bordetella bronchiseptica* törzsek flagellinjének vizsgálata hagyományos és molekuláris genetikai módszerekkel. Budapest, 2012.01.17.
- Khayer B., Rónai Zs., Wehmann E., Magyar T.: Ureáz-negatív *Bordetella bronchiseptica* izolátumok jellemzése. Budapest, 2011.01.25.
- Khayer B., Wehmann E., Magyar T.: *Bordetella bronchiseptica* adenilát cikláz-hemolizin toxinjának vizsgálata. Budapest, 2011.01.25.
- Khayer B., Wehmann E., Magyar T.: *Bordetella bronchiseptica* izolátumok flagellin génjének vizsgálata PCR-RFLP módszerrel. Budapest, 2010.01.26.

A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó publikációk

- Szabó G., Khayer B., Rusznyák A., Tátrai I., Dévai Gy., Márialigeti K., Borsodi A.: Seasonal and spatial variability of sediment bacterial communities inhabiting the large shallow Lake Balaton, *Hydrobiologia*, 663. 217-232, 2011. IF: 1,784
- Khayer B., Szabó G., Borsodi A.K., Márialigeti K.: Cultivation based bacterial diversity of the sediment of Lake Balaton. (poszter) [*Acta Microbiol. Imm. Hung. Supplement* 54:60] 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, 2007.07.18-20.
- Khayer B., Szabó G., Márialigeti K., Borsodi A. K.: Bakteriális eredetű polifoszfát felhalmozódás és foszfatáz aktivitás három magyarországi sekélyvizű tóban. (poszter) [Studies on bacterial polyphosphate accumulation and phosphatase activity in three Hungarian shallow lakes; *Acta Microbiol. Imm. Hung. Supplement* 53:292] Magyar Mikrobiológiai Társaság 2006. évi Nagygyűlése. Keszthely, 2006.10.18-20.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Magyar Tibornak, az MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézetének igazgatójának, aki lehetővé tette és biztosította, hogy az általa vezetett Légzőszervi bakteriológia témacsoportban foglalkozhassam értekezésem témájával. Köszönöm, hogy tudásával, tapasztalatával, türelmével és bizalmával segítette munkámat, köszönöm továbbá a munkámmal kapcsolatos publikációk értékének növelése érdekében tett észrevételeit.

Rendkívüli hálával tartozom Dr. Wehmann Enikőnek, aki kezdettől fogva támogatott, és akitől rengeteg hasznos tanácsot kaptam. Köszönöm bizalmát és megértését, valamint a különböző módszerek elsajátításában, a kutatás menetének irányításában, az eredmények kiértékelésében és a publikációk lektorálásában nyújtott sok segítségét.

Szeretném megköszönni Hegedűs Évának és Dr. Sellyei Boglárkának, valamint a témacsoport többi tagjának, hogy gyakorlati és elméleti kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Köszönet illeti Bartha Dánielt, az MTA ATK ÁOTI bioinformatikusát a mozgásképességgel kapcsolatos vizsgálatokban nyújtott segítségért, továbbá az Intézet valamennyi munkatársát, akik munkájukkal és biztatásukkal támogattak.

A NÉBIH ÁDI Bakteriológiai laboratóriumának munkatársai közül köszönettel tartozom Dr. Rónai Zsuzsannának az ureáz-negatív *B. bronchiseptica* törzsek vizsgálata során nyújtott segítségért, és a számtalan gondolatébresztő beszélgetésért. Az antibiotikum rezisztencia határértékek átadásáért Dr. Szentesi Katalinnak tartozom köszönettel.

Ez úton szeretném megköszönni elsősorban PhD évfolyamtársaimnak, és minden kollégámnak, gyakorló- és laboratóriumi állatorvosnak, hogy a munkám során felhasznált baktériumtörzseket, mintákat és véreket a rendelkezésemre bocsátották.

Köszönet illeti szakdolgozóimat (Hunyadi Krisztinát, Lukács Lillát, Sulyok Kinga Máriát és Domokos Juditot), hogy munkájukkal bővítették eredményinket, és a tanítva tanulás során én is új ismeretekkel gazdagodtam. Köszönöm Dr. Borsodi Andreának, Dr. Márialigeti Károlynak, Bognár Csabának, és valamennyi tanáromnak, hogy eljuthattam ideig.

Végül szeretném megköszönni páromnak, családomnak és barátaimnak, hogy mindvégig támogattak és bíztak bennem.

A vizsgálatok elvégzéséhez az OTKA K83332 számú pályázata és a SzIE ÁTK Doktori Iskolájának ösztöndíjkerete biztosította az anyagi feltételeket.