

**Szent István Egyetem**  
**Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**Termofil *Campylobacter*-fajok genetikai és epidemiológiai  
jellemzése**

PhD értekezés tézisei

Készítette:  
**Dr. Schweitzer Nóra**

**2011**

Témavezetők és témabizottsági tagok:

Dr. Varga János, DSc, az MTA tagja  
SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék  
Témavezető

Dr. Dán Ádám, PhD  
MgSzH ÁDI, Molekuláris Biológiai Laboratórium  
Témavezető

Juhászné Dr. Kaszanyitzky Éva, PhD  
MgSzH ÁDI, Higiénés bakteriológiai Laboratórium  
a témabizottság tagja

Dr. Makrai László, PhD  
SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék  
a témabizottság tagja

## Bevezetés, célok

Az emberekben előforduló, bakteriális eredetű hasmenések leggyakoribb okozói a termofil campylobacterek - a salmonellák mellett - Magyarországon és szerte a világon. Ezek a fajok a normál bélflóra tagjaként, természetes körülmények között is megtalálhatók mind a különféle emlős fajok, mind pedig a madarak bélcsatornájában. Ugyanakkor kevés adattal rendelkezünk e zoonotikus kórokozók előfordulásáról a hazai állatállományokban. Munkánk célja volt, hogy egy komplex, átfogó képet kapjunk a magyarországi haszonállatok *Campylobacter*-fertőzöttségéről, fajonkénti eloszlásáról, és a fertőzést okozó *Campylobacter*-fajok molekuláris biológiai jellemzőiről.

Az Európai Parlament és a Tanács 2003/99/EK irányelve a zoonózisok és zoonózis-kórokozók monitoringjáról javasolja az adatok gyűjtését a zoonózisok és a zoonózis-kórokozók előfordulásáról a takarmányokban, az állatokban, az élelmiszerben, és az emberben annak érdekében, hogy meghatározza a kórokozók forrását, és adatokat kapjon a terjedés mértékére, irányára, stb.. Javasolja továbbá a rezisztens törzsek fokozott előfordulása miatt egy harmonizált, antibiotikum-rezisztenciát figyelő rendszer felállítását *Campylobacter* és egyéb zoonotikus baktériumokra vonatkozóan.

Intézetünkben, az MgSzH Állategészségügyi és Diagnosztikai Igazgatóságán (korábban Országos Állategészségügyi Intézet) 2001 óta folyik *Campylobacter* kimutatására és antibiotikum-rezisztencia vizsgálatára irányuló országos monitoring vizsgálat. Az ország minden megyéjéből, különböző vágóhidakról havonta kapunk 3-3 lekötött bélkacsot a fő élelmiszer-termelő állatokból, azaz szarvasmarhából, sertésből, tyúkból és néha pulykából. Ezen mintaküldésre alapozva munkánk céljai az alábbiak voltak:

1. A termofil campylobacterek izolálása szelektív tenyésztéssel és annak megállapítása, hogy azok milyen gyakorisággal fordulnak elő jelenleg a különböző állatfajokban.
2. Mivel a fajok meghatározása a hagyományos tenyésztési és biokémiai tulajdonságok alapján nehézkes, ezért célunk volt egy gyors és hatékony real-time PCR módszer kidolgozása a leggyakrabban előforduló fajok, a *C. jejuni* és a *C. coli* azonosítására, hogy megkönnyítsük a monitoring vizsgálatokat.
3. A törzsek hagyományos módszerrel történő meghatározása azok tenyésztési és biokémiai tulajdonságaik alapján, és összehasonlítása a PCR-el kapott eredményekkel.
4. A tenyésztés és a PCR módszer érzékenységének összehasonlítása a campylobacterek kimutatására a bélminták közvetlen vizsgálata esetén.
5. Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatokkal célunk volt felderíteni a különböző antibiotikumokra rezisztens törzsek arányát, és a tendenciákat, melyek az

esetlegesen szükséges humán gyógykezelés és a rezisztencia terjedés szempontjából kiemelkedően fontosak.

6. A *Campylobacter* törzsek genetikai jellemzése *flaA* SVR szekvenálás, PFGE és MLST módszerekkel a törzsek besorolása, egymástól való megkülönböztethetősége és szóródásuk nyomon követhetősége érdekében, illetve a módszerek összehasonlítása.
7. Csirkeállományok *Campylobacter* mentes felnevelése lehetőségének a vizsgálata, a közegészségügyi kockázat csökkentése érdekében.

A felmérő és járványügyi vizsgálatok, illetve a laboratóriumi kutatások elsősorban a *C. jejuni* és *C. coli* fajokra, mint a fertőzések elsődleges okozóira, és a baromfiállományokra, mint a fő fertőzési forrásra koncentrálnak. Azonban számos kevésbé gyakori *Campylobacter*-fajt is azonosítottak emberi megbetegedésekből. Ezen egyéb fajokat általában ritkábban izoláljuk nem csak a ritkább előfordulásuk miatt, hanem azért is, mert az általánosan használt módszereket a *C. jejuni* kitenyésztésére optimalizálták. Így ezeknek a fajoknak a jelentősége valószínűleg alulbecsült.

Az általunk használt tenyésztési módszer is elsősorban a termofil campylobacterek izolálására alkalmas, mégis ahogy elkezdtek felmérni a magyarországi haszonállatok *Campylobacter*-fertőzöttségét, azok faj szerinti eloszlását, fény derült egy eddig hazánkban ki nem mutatott faj, a *C. lanienae* széleskörű előfordulására a sertésállományokban.

Megvizsgáltuk ezeknek a törzseknek a genetikai sajátosságait a 16S rRNS-t kódoló gén szekvenálásával és PFGE módszerekkel, annak érdekében, hogy összehasonlíthassuk azokat az irodalomban eddig leírt törzsekkel, illetve hozzájáruljunk a faj jobb megismeréséhez.

## Anyagok és módszerek

A nemzeti antibiotikum-rezisztencia monitoring program keretében termofil *Campylobacter*-fajokat kerestünk vágóhidakról származó lekötött bélkacsokból. Három egyedből származó 3 bélmintát vizsgáltunk egy-egy szarvasmarha-, sertés- vagy baromfiállományból. A 3 mintát nem külön-külön, hanem egységes mintaként kezeltük, mely az állományt jellemezte. A baktériumok izolálását a béltartalomból közvetlen kioltással végeztük mCCDA (Oxoid, Drogen, Belgium) lemezre. *Campylobacter*-nek tekintettük az izolátumot, amennyiben 25 °C-on és aerob körülmények között nem nőtt, 41,5 °C-on, mikroaerob környezetben tipikus telepekben fejlődött, oxidáz pozitív volt, és sötétlátóteres mikroszkópos vizsgálattal tipikus sejtmorfológiát és mozgást tapasztaltunk.

A DNS feltáráshoz a Total RNA Isolation Kit Nucleospin 96 RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany) bizonyult a leghatékonyabbnak, ezért ezt használtuk a vizsgálatainkhoz.

A *C. jejuni* és *C. coli* azonosítására kidolgoztunk egy új real-time PCR módszert. A *C. jejuni* *hipO* génjére magunk terveztünk primereket. Az általunk tervezett primerekkel hagyományos agarózgél alapú PCR optimalizálási kísérleteket végeztünk, majd összehasonlítottuk a saját módszerünket néhány az irodalomban leírt, a fajok elkülönítésére alkalmas hagyományos PCR módszerrel. Végül a *C. coli* kimutatására a Wang et al. (2002) által leírt, *glyA* génre tervezett primereket, a *C. jejuni* kimutatására pedig a *hipO* génre, általunk tervezett primereket választottuk, mert ezt a két rendszert tudtuk real-time PCR-rel azonos hőmérsékleti profillal, jó érzékenységgel futtatni. A rendszer EvaGreen (Biotium, California, USA) zöld fluoreszcens jelölőfestékkel működik, a két faj az olvadási görbék alapján különíthető el.

A monitoring programból származó izolátumokat először real-time PCR-rel vizsgáltuk a *C. jejuni* és *C. coli*, mint leggyakrabban előforduló fajok azonosítása céljából. A *C. jejuni* és *C. coli* negatív eredményt adó törzseket tovább vizsgáltuk a 16S rRNS génre tervezett genus specifikus primerekkel (C412F és C1228R) (Linton et al., 1996). A 45 ilyen *Campylobacter* genusba tartozó izolátumot ezekkel a primerekkel megszekvenáltuk a faj meghatározása érdekében.

Előzetes filogenetikai vizsgálatok során kiválasztottunk a 43 *C. lanienae* törzsből 15-öt a törzsfa fő csoportjaiból. Ezek amplifikációját Logan et al. (2000) által leírt, szintén a 16S rRNS génre tervezett fajspecifikus primerekkel (CLAN76F és CLAN1021R) is elvégeztük. A nemzetség- és a fajspecifikus primerek által közrefogott szakaszok átfedik egymást a 16S rRNS génen (a 816 és 920 bp méretű termékek együtt 1152 nukleotid hosszúságú részt fednek le). Az így kapott szekvenciákat használtuk a további vizsgálatokhoz. A részleges 16S rRNS gén szekvenciákat benyújtottuk a GenBank-ba, és az alábbi azonosító számokat kaptuk: HM462449-től HM462455-ig, HM462460 és HM462464-től HM462470-ig.

A kapott termékeket szekvencia-analízisnek vetettük alá. Gorkiewicz et al. (2003) az egyes variábilis szakaszok (Vc1, Vc2, Vc5 és Vc6) típusait szekvencia mintázatuk alapján külön betűkkel jelölték (1A-H, 2A-L, 5A-G, 6A-E), és meghatározták, hogy az egyes *Campylobacter*-fajokra mely kombinációk a jellemzők. Az első, Vc1-es régiót a mi szekvenciáink nem tartalmazták, ezért az kimaradt a vizsgálatból.

Összesen 73 *C. jejuni* és *C. coli* törzset vizsgáltunk meg az *flaA* SVR szekvenálásával. Az *flaA* gén SVR felerősítéséhez a FLA4F és FLA1728 primereket, a szekvenálásához az FLA242FU forward és az FLA625RU reverz primereket használtuk. A szekvenciák javítása után az *flaA* alléltípusokat a *C. jejuni* MLST weblap (<http://pubmlst.org/campylobacter/>, 2010-06-12.) segítségével azonosítottuk.

A filogenetikai törzsfák készítéséhez (részlegesen 16S rRNS gén és *flaA* gén SVR alapján) a Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 4.0 szoftvert alkalmaztuk és a Neighbour-Joining módszert használtuk, az evolúciós távolságok meghatározását a Maximum Composite Likelihood modell segítségével végeztük. A bootstrap mintázást 1000 megismételt törzsfá rekonstrukció adatai alapján kaptuk meg.

122 *C. jejuni* és *C. coli*, továbbá 9 *C. lanienae* és 1 *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* törzs PFGE vizsgálatát végeztük el. A *C. jejuni* és *C. coli* törzsek esetében *SmaI* restriktációs enzimet, majd az azonos profilú törzseken *KpnI*-et, míg az egyéb *Campylobacter* törzsek esetében három különböző enzimet, *SmaI*-et, *Sall*-et és *KpnI*-et (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) használtunk. A DNS restriktációs sávok elemzését Fingerprinting II (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) szoftver segítségével végeztük, a hasonlósági együttható számítása és a dendrogram készítése Dice-együttható alkalmazásával, és a számtani átlagok nem súlyozott pár csoport módszerének (UPGMA) alkalmazásával történt. Az optimalizálási érték és a pozíció tolerancia 1% volt. A klaszterek kialakítása a genomiális DNS emésztési profiljának 95%-os (*C. jejuni* és *C. coli*) illetve 90%-os (egyéb *Campylobacter*) azonosságig szintje felett történt. Kontrollnak a *C. jejuni* ATCC 33560 referens törzset használtuk.

A *Campylobacter* MLST 7 háztartási gén vizsgálatán alapszik. Az ezekre a génekre tervezett primerek a *C. jejuni* esetében egy kb. 1000 bp nagyságú szakaszt erősítenek fel. A szekvenáláshoz használt primerek ezeken belül egy-egy kb. 400-600 bp nagyságú szakaszt fognak közre. A *C. coli* esetében azonos primerekkel történt az amplifikáció és a szekvenálás. A szekvenciák javítása után a szekvencia típus (ST) és klón komplex (CC) azonosítását az Interneten hozzáférhető *C. jejuni* MLST weblap (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) segítségével végeztük.

Az alábbi fenotípusos tulajdonságokat vizsgáltuk a campylobacterek azonosítása érdekében: kataláz (3%-os hidrogén-peroxid-oldat) és H<sub>2</sub>S termelés (TSI agar), hippurát és

indoxil acetát hidrolízis (Rosco), növekedés 1% glicin tartalmú talajon és cefalotin, nalidixsav érzékenység (30 µg korong; Oxoid).

Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokat leveshígítási módszerrel végeztük mikrotiter lemezekon (EUCAMP plates, TREK Diagnostic Systems Ltd., Cleveland, USA) az antibiotikum-rezisztencia közösségi referencia laboratórium ajánlása szerint (DTU, Koppenhága). Abban az esetben, amikor nem állt rendelkezésünkre EUCAMP mikrotiter lemez, a minimális gátló koncentrációt (MIC; µg/ml) E-teszt csíkokkal (AB Biodisk, Solna, Sweden) határoztuk meg. Az eredmények értékelésénél az EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) által közzétett epidemiológiai, ennek hiányában az EUCAST vagy NARMS által meghatározott klinikai határértékeket vettük alapul. A különböző antibiotikumokra rezisztens törzsek arányának összehasonlításához Pearson-féle Chi-négyzet statisztikai próbát alkalmaztunk.

Takarmányozási vizsgálatokban az Immunofort illetve a Sangrovit természetes alapú takarmány-kiegészítők *Campylobacter* ellenes hatását teszteltük kísérleti és telepi körülmények közt.

## Eredmények

A 2008-2009-ben megvizsgált összesen 1110 bélmintából 441 (39,7%) volt *Campylobacter* spp. pozitív tenyésztéssel. Az általunk kifejlesztett real-time PCR rendszerrel vizsgálva a 441 pozitív minta közül 266 volt *C. coli* (60,3%) és 143 volt *C. jejuni* (32,4%) pozitív. A 45 *C. jejuni* és *C. coli* negatív törzsből a nemzetség specifikus primerekkel szekvenálva 43 *C. lanienae*, 1 *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* és 1 *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* lett. Az előfordulás gyakoriságát állatfajonként az 1. Táblázat tartalmazza. Csak sertésből izoláltunk *C. jejuni*-től vagy *C. coli*-től eltérő *Campylobacter*-fajt. Szarvasmarhából egy mintában, sertésből négy esetben, tyúkból 8 mintában találtunk vegyes fertőzést.

Néhány minta párhuzamos vizsgálatával összehasonlítottuk a tenyésztés és a közvetlen PCR vizsgálat érzékenységét, de a PCR messze elmaradt a tenyésztéses módszer mögött. Ugyanakkor a hagyományos biokémiai tesztek alapján bizonytalan eredményt adó tenyészeteket (69-ből 23) a PCR-rel sikerült azonosítani.

1. Táblázat. *Campylobacter*ek előfordulására vizsgált minták száma állatfajonként. A pozitív minták száma és az izolátumok száma és százalékos aránya.

2008-2009	Minta-szám (db)	Pozitív minták száma (%)	Izolátumok száma (db)				
			<i>C. jejuni</i> (%)	<i>C. coli</i> (%)	<i>C. lanienae</i> (%)	<i>C. hyoint.</i> subsp. <i>hyoint.</i> (%)	<i>C. hyoint.</i> subsp. <i>lawsonii</i> (%)
Szarvasmarha	267	18 (6,7)	14 (77,8)	5(27,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Sertés	480	208 (43,3)	11 (5,3)	156 (75,0)	43 (20,7)	1 (0,5)	1 (0,5)
Brojlercsirke	348	209 (60,1)	115 (55,0)	102 (48,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Pulyka	15	6 (40,0)	3 (50,0)	3 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Összesen	1110	441 (39,7)	143 (32,4)	266 (60,3)	43 (9,8)	1 (0,2)	1 (0,2)

A *Campylobacter*-fertőzöttségre jellemző a szezonális. A *Campylobacter*-pozitív minták időbeli előfordulását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a pozitív minták száma növekszik áprilistól októberig és az őszi-téli hónapokban magasabb. Pearson-féle korreláció analízissel szignifikáns kapcsolatot találtunk a relatív páratartalom és a *Campylobacter*-pozitív minták előfordulása között ( $p=0,00161$ ).

A *C. lanienae* országszerte előfordul a sertésállományokban. A PCR termékek a *C. lanienae* fajspecifikus primerekkel többnyire a várt nagyságban (920 bp) jelentek meg. Egy törzs (6555) esetében egy kb. 200 bp-ral nagyobb terméket kaptunk, három esetben (5172, 24639, 17459) pedig mindkét nagyságú amplikon felerősödött.



A kiválasztott 15 *C. lanienae* törzssel, melyeket a fajspecifikus primerekkel is megszekvenáltunk, filogenetikai vizsgálatokat végeztünk. A saját szekvenciáinkhoz hozzáillesztettük a GenBankban fellelhető összes *C. lanienae*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* hasonló szakaszára vonatkozó szekvenciákat és egy-egy *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. fetus*, *C. jejuni* és *C. coli* szekvenciát is. A *C. lanienae* törzsek elkülönültek a *C. hyointestinalis* szekvenciáktól. Legközelebbi rokonságot a *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* törzsekkel mutattak.

A magyar *C. lanienae* törzsek a Gorkiewicz et al. (2003) által jellemzett 4 variábilis szakaszból 3-at (Vc2, Vc5 és Vc6) tartalmaztak. A Vc2-es variábilis szakaszon a törzsek többsége a 2C szekvencia mintázatot mutatta, azonban 4 törzs 2A mintázattal rendelkezett, amely a *C. hyointestinalis*-ra vagy a *C. fetus*-ra jellemző. A Vc5-ös variábilis szakaszon 11 törzs 5C, 4 törzs 5B szekvencia mintázatot mutatott, mindkét változat jellemző a *C. lanienae*-re. A Vc6-os variábilis szakaszon a 6D mintázaton belül két változatot figyeltünk meg: 5 izolátum a Gorkiewicz et al. (2003) által leírt szekvencia mintázatot mutatta, ezt 6Da-nak neveztük el, míg 10 törzs 3 nukleotidban eltért, és 6Db-vel jelöltük.

Egy *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* és 9 *C. lanienae* törzset választottunk PFGE tipizálásra 3 különböző restrikciós enzimmel. A *Sma*I restrikciós enzimmel 6, a *Kpn*I-el 5 *C. lanienae* izolátumot sikerült tipizálni. A *Sal*I enzimmel végzett hasítási kísérletek nem jártak sikerrel. A tipizálható izolátumok legalább 8, jól megkülönböztethető restrikciós fragmentumot eredményeztek. Minden izolátum egyedi mintázatot adott.

Összesen 73 brojlercsirkéből, pulykából, sertésből és szarvasmarhából származó 37 *C. jejuni* és 36 *C. coli* izolátum *flaA* SVR szekvenálását végeztük el. Összesen 47 különböző *flaA* SVR szekvenciát azonosítottunk, melyek 18 különböző fehérje allélt képviseltek. A 47-ből 35 *flaA* típus csak egyszer fordult elő. Az azonos nukleotid allél típusú törzsek 12 különálló csoportot képeztek a törzsfán, – amelyekbe különböző állatfajból származó törzsek is tartoztak – de nem minden fehérje típus volt azonos ágán a filogenetikai fának. A *C. jejuni* és *C. coli* törzsek sem képeztek egységes csoportokat. A 12 csoportból összesen 7 esetben találtunk járványügyi összefüggést az azonos csoportba tartozó törzsek közt.

Összesen 122 szarvasmarhából, sertésből, brojlercsirkéből és pulykából származó izolátumon (60 *C. jejuni* és 62 *C. coli*) végeztünk PFGE tipizálást *Sma*I hasító enzim segítségével. 40 *C. jejuni* és 40 *C. coli* törzs egyedi PFGE mintázatot mutatott, a fennmaradó 42 izolátum 2-3 törzset tartalmazó, azonos makrorestrikciós profilú klasztert (18 db) alkotott. Előfordultak azonos PFGE mintázatú törzsek, amelyek különböző állatfajból származtak. Ezt a 42 izolátumot *Kpn*I enzimmel is megvizsgáltuk. A hasítás eredményeként 24 törzs 10 különböző, 2-4 azonos profillal rendelkező törzset tartalmazó klaszterbe csoportosult. A *Kpn*I enzimmel történt emésztés után már nem találtunk azonos PFGE mintázatú törzseket

különböző állatfajból. A 10-ből összesen 7 esetben találtunk járványügyi összefüggést a törzsek közt.

Öt esetben (*KpnI* klaszter 1, 3, 5, 6, és 9) a brojlercsirke különböző állományból származott, de azonos állattartó telepről. A 10-es *KpnI* klaszter esetében a sertések azonos helyről származtak, de különböző telepen nevelkedtek. A 4-es *KpnI* klaszter törzsei szarvasmarhából származtak, amelyek földrajzilag távoli telepekről származtak, de ugyanarra a vágóhidra azonos szállítójármű vitte. Azokban az esetekben, ahol a PFGE mintázat vagy az *flaA* típus eltért, nem találtunk járványügyi kapcsolatot.

Meghatároztunk egy-egy *C. jejuni* és *C. coli* MLST profilt. A *C. jejuni* törzset szarvasmarhából izoláltuk, és az MLST szekvencia eredményeink alapján a 42-es klón komplexbe tartozott (ST 42). A *C. coli* törzset sertésből izoláltuk, és a 828-as klón komplexbe tartozott (ST 899).

A nalidixsav rezisztencia ( $p=0,0465$ ) és az enrofloxacin/ciprofloxacin rezisztencia ( $p=0,0114$ ) növekedett 2008-2009 folyamán. A nalidixsav rezisztens ( $p=4,626e-05$ ) és a fluorokinolon-rezisztens ( $p=3,403e-07$ ) *Campylobacter* törzsek aránya magasabb volt brojlercsirkében mint sertésben 2009-ben. A fluorokinolonokra a legnagyobb arányban a brojlercsirke-állományokból származó *C. coli* törzsek rezisztensek, mintegy 89,0%-uk 2009-ben. Az eritromicin rezisztencia előfordulása csökkenő tendenciát mutat. Alacsonyabb eritromicin ( $p=0,02509$ ) rezisztenciát találtunk *C. jejuni*-ban, mint *C. coli*-ban, sertésben gyakoribb. A tetraciklin rezisztens *C. coli* törzsek aránya sokkal magasabb volt sertésben, mint brojlercsirkében 2009-ben ( $p=1,046e-08$ ). A tetraciklin rezisztencia a sertésállományokból származó *C. coli* törzsek közt 90,7% volt. Jelentős mértékű streptomycin rezisztenciát találtunk a sertésből származó *C. coli* törzsek közt, amely 75,9% 2009-ben, míg brojlercsirkében ez az érték csak 8,5%. A klindamicin rezisztencia szintén növekedett a sertésekből származó *C. coli* törzsek közt. A vizsgált törzsek mindkét fajból többnyire kloramfenikol és gentamicin érzékeny volt.

A fluorokinolon, makrolid és tetraciklin rezisztenciát együtt tekintve a *C. coli* törzsek 55,2%-a, a *C. jejuni* törzsek 21,6%-a volt rezisztens több mint egy csoportra. Mindhárom antibiotikum csoportra rezisztens törzs ritkán fordult elő: 2009-ben a *C. jejuni* törzseknek a 1,4%-ában, a *C. coli* törzseknek pedig a 4,1%-ában.

Az antimikrobiális érzékenységre megvizsgált 23 *C. lanienae* törzs hasonló tendenciát mutatott, mint az előbbi fajok. Az 5 eritromicin rezisztens törzsből 4 volt tetraciklin rezisztens is, és mindegyik enrofloxacin/ciprofloxacin rezisztens törzs tetraciklin rezisztens is volt. Egy törzs (3894) rezisztens volt eritromicinre, enrofloxacinra, nalidixsavra, tetraciklinre és klindamicinre is.

A takarmányozási kísérletek során sem az Immunofort, sem a Sangrovit *Campylobacter* ellenes hatását nem sikerült igazolni.

## Megbeszélés

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a magyarországi brojlercsirke- (60,1%) és sertésállományok (43,3%) nagy arányban fertőzöttek termofil *Campylobacter*-rel a vágás idején. Ezzel ellentétben a szarvasmarha-állományok (6,7% pozitív) nem gyakori hordozói a kórokozónak. Ezek az arányok valószínűleg valamivel magasabbak lennének, ha használtunk volna dúsító folyadékot is a tenyésztés során, az elődúsítást azonban kihagytuk a rutin munka egyszerűsítése érdekében. A brojlercsirkék magas csíraszámban hordozzák a baktériumot, ezért valószínűleg a módszer érzékenysége kevésbé befolyásolta az eredményt, de sertés és szarvasmarha esetében a különbség nagyobb lehet.

A brojlercsirke-állományok fertőzöttsége szezonalitást mutatott néhány országban, nyáron, kora ősszel (június-szeptember) nagyobb a campylobacterek előfordulása. Érdekes, hogy Magyarországon magasabb fertőzöttséget a hideg őszi-téli hónapokban állapítottunk meg október-novemberi csúccsal. A szezonális okait vizsgálva szoros korrelációt találtunk a relatív páratartalom és a *Campylobacter*-fertőzöttség között.

Az általunk használt izolálási módszer elsősorban *C. jejuni*, *C. coli* és *C. lari* tenyésztésére szolgál, mégis sikerrel izoláltunk *C. lanienae* törzseket is. A *C. lanienae* normál bélflóra alkotónak tűnik sertésben, mivel a sertés bélmintákból egész évben, az ország majd teljes területéről rendszeresen izoláltuk ezt a fajt. Különösen figyelemre méltó, hogy a *C. lanienae* a sertésekből izolált 2. leggyakoribb faj (20,7%) volt ebben a munkában. *C. jejuni*-val a pozitív sertés bélmintáknak csak 5,3%-a volt fertőzött.

Csak sertésekből tudtuk izolálni a *C. lanienae*-t. Ennek egyik lehetséges oka az, hogy a magyarországi szarvasmarhákban nincs is jelen a baktérium, vagy magyarázható azzal, hogy a szarvasmarhákat fertőző *C. lanienae* más tenyésztési körülményeket kíván. Inglis et al. (2003) Kanadában kitenyésztettek *C. lanienae*-t szarvasmarhából Karmali táptalajon, 40 °C-on. A CCDA nem volt megfelelő ugyanabban a vizsgálatban. Érdekes megjegyezni, hogy Európában még nem számoltak be *C. lanienae* izolálásáról, vagy kimutatásáról szarvasmarhából.

A biokémiai tulajdonságok alapján történő hagyományos fajmeghatározás hátránya, hogy sok esetben bizonytalan eredményt ad. Ezért szükségesnek tartottunk a monitoring vizsgálataink megkönnyítésére kifejleszteni egy real-time PCR módszert, amelynek megbízhatósága és pontossága jobb. Az általunk kifejlesztett PCR módszer alkalmas a *C. jejuni* és *C. coli* azonosítására egyidőben, mivel a két rendszer azonos hőmérsékleti profillal működik, de a primerek kompetíciójának elkerülése érdekében nem multiplex PCR-ként. A folyamatok automatizálása révén 45 tenyészetet tudtunk megvizsgálni 4 órán belül mind a két fajra. A minták közvetlen PCR vizsgálatának érzékenysége ugyan messze elmaradt a tenyésztéses módszertől, de az antibiotikum-rezisztencia vizsgálat érdekében a baktérium

kitenyésztése nélkülözhetetlen. Ugyanakkor a PCR a tenyésztés utáni biokémiai vizsgálatokat helyettesíti, pontosabbá és gyorsabbá teszi a fajmeghatározást.

A PCR, szekvencia meghatározás és filogenetikai analízis a legszélesebb körben alkalmazott molekuláris biológiai módszerek, amelyeket a *Campylobacter*-fajok kimutatására, elkülönítésére és további genetikai jellemzésre használnak. A genetikai vizsgálatok alapján kiderült, hogy a *Campylobacter* spp. genomja nagy változatosságot mutat, ami a fertőzési ciklus során gyors adaptációt tükrözhet. Az új variációk kialakulásában több mechanizmus szerepet játszhat, mint a transzformáció, intra- és intergenomikus rekombináció, genom átrendeződés és kromoszóma pont mutációk.

Azt tapasztaltuk, hogy hasonlóan más fajokhoz, bizonyos *C. lanienae* törzsek is rendelkezhetnek megnagyobbodott génnel. A jelenség a 16S rRNS génen különböző hosszúságú beékelődött szekvenciák (intervening sequences, IVS) előfordulására vezethető vissza a 213. nukleotidnál (*C. jejuni*, ATCC 43431 szerinti számozás). A 6555 számú törzs csak a megnagyobbodott gént hordozta, míg az 5172, 24639 és 17459 jelzésű törzsek mindkét féle géntípussal rendelkeztek, ami miatt kettős csíkot adtak a gélelektroforézis vizsgálat során. Az összes többi törzs csak az IVS nélküli gént tartalmazta. A 16S rRNS IVS előfordulásának a szerepe nem tisztázott.

A részleges 16S rRNS génen alapuló filogenetikai fán *C. lanienae* faj csoportján belül sok alcsoport különül el megerősítve a faj nagyfokú genetikai diverzitását. Az emberből származó törzsek nem alkotnak külön csoportot, hanem különböző sertésből származó törzsekkel együtt képeznek csoportokat. Ugyanakkor a szarvasmarhából és juhból származó törzsek egy egységes, külön csoportba tartoznak. A szarvasmarha és sertés eredetű törzsek nem csak genotípusosan, hanem fenotípusosan is különböznek. Az összes Inglis et al. (2003) által izolált szarvasmarha eredetű *C. lanienae* törzs cefalotin érzékeny volt, nem úgy, mint az emberből származó referencia törzs, vagy a magyar sertésből származó törzsek, amelyek cefalotin rezisztensek voltak.

Jelentős genetikai változatosságot figyeltünk meg a sertésből származó izolátumok között, míg az összes kérődzőből származó törzs egyforma 16S rRNS gén mintázatot mutatott a három vizsgált variábilis régió: 2A/5C/6Db. Ez a mintázat három sertés eredetű *C. lanienae* törzsre is jellemző volt (25491, 31051 és FK176), ugyanakkor a sertés törzsek nagyobb változatosságot mutattak a három vizsgált variábilis régió. Ezek alapján felmerül annak a lehetősége, hogy a szarvasmarhában megtelepedő törzsek a sertés törzsekből származnak. Az eredendően a *C. hyointestinalis* és a *C. fetus* törzsek jellemzőjének tartott 2A mintázatot megtaláltuk *C. lanienae*-ben is, ami arra enged következtetni, hogy további változatok fordulnak elő a *C. lanienae* törzsek közt ezen a régió. A Vc6 régió két jól elkülönülő, 3 nukleotidban különböző mintázatot találtunk, ezért a 6D mintázaton belül a törzsek elkülönítésére bevezettük a 6Da és 6Db jelölést.

A *C. jejuni* és *C. coli* törzsek filogenetikai vizsgálatához az *flaA* gén SVR szekvenciáját használtuk. Az SVR rövid (321 bp), a szekvenálása gyors, pontos, robosztus és összehasonlítható a laboratóriumok között. Az *flaA* SVR szekvenálását alkalmazták a *Campylobacter*-populáció vizsgálatára a baromfi iparban, hogy vizsgálják a törzsek elterjedtségét, és különbséget tegyenek környezeti és állatból származó törzsek közt.

A *C. jejuni* rutinszerű tipizálására a PFGE terjedt el, amely az egyes törzsek között meglévő igen kis különbségeket is képes kimutatni. Az általunk vizsgált *C. jejuni* és *C. coli* törzsek *SmaI* enzimmel történő hasításával létrejött 18, több törzset is magába foglaló csoportból 10 még tartalmazott olyan izolátumokat, amelyek különböző állatfajból származtak és/vagy különböző *flaA* SVR típusúak. Ezzel ellentétben a *KpnI* enzimmel való hasítás után az izolátumok, melyek azonos hasítási képet mutattak, azonos *flaA* SVR típusba tartoztak, és azonos állatfajból származtak, tehát valódi genetikai klónokat képviseltek.

Az *flaA* és PFGE tipizálásokkal végzett vizsgálatok eredményeképpen különböző járványügyi kapcsolatokat fedeztünk fel. A baromfi izolátumok esetében találtunk 2-3 különböző állományból, azonos telepről származó azonos törzseket, ami stabil *C. jejuni* és *C. coli* klón jelenlétét igazolta akár 8 hónapon keresztül. Valószínűleg az állomány cserék közötti nem megfelelő takarítás, fertőtlenítés tette lehetővé az azonos törzsszel való fertőződést. Azonos helyről származó, de különböző telepen nevelkedett sertésekből izolált genetikai klónok jelenléte utalhat arra, hogy a sertések még szopós korban fertőződtek ugyanazzal a törzsszel. A földrajzilag távoli telepekről ugyanarra a vágóhidra szállított szarvasmarhákban talált törzsek lehettek az országban előforduló stabil klónok, vagy az állatok az azonos szállítójárművön fertőződtek. Továbbá találtunk a baromfiállományokban olyan klónokat is, amelyek között járványügyi kapcsolat nem volt, ami azt mutatja, hogy az országban előfordulnak nagyon stabil *C. jejuni* és *C. coli* törzsek is. Mások is leírtak különböző fajokban és területeken jelen lévő bizonyos stabil genomú *C. jejuni* törzseket. További vizsgálatok szükségesek brojlercsirke és humán törzsekkel annak érdekében, hogy ezen stabil klónok szerepe a humán fertőzésben kiderüljön.

Elsőként tettünk kísérletet a *C. lanienae* tipizálására PFGE módszerrel, három különböző enzimmel (*SmaI*, *KpnI* és *SalI*). A *SmaI* enzim alkalmasnak látszik a *C. lanienae* izolátumok tipizálására, ha epidemiológiai vizsgálatokra kerül sor.

Az eddigiekben tárgyalt módszerek közül a legérzékenyebb a PFGE, ugyanakkor problémát is okozhat, mert olyan törzsek között is jelentős különbséget mutathat ki, amelyek valójában rokonok és azonos klónba tartoznak. További hátránya, hogy nehezen standardizálható, ami akadályozhatja a különböző helyszíneken végzett vizsgálatok összehasonlítását. Ezen tulajdonságai miatt terjed helyette egyre inkább az MLST. Az MLST módszer nagy előnye, hogy a megfelelő technikával végzett szekvenálási vizsgálatok

minden laboratóriumban megbízható, egymással összevethető eredményt adnak a nukleotid sorrendre vonatkozóan. Ezért az MLST a legalkalmasabb eljárás országos, vagy nemzetközi összehasonlító tipizálási vizsgálatok végzésére, mind rövid, mind hosszú távú vizsgálatok esetében. Hátránya ugyanakkor, hogy drága, így az MLST vizsgálatot csak korlátozott számú, lehetőleg az epidemiológiai szempontból legfontosabb törzseknél szokták elvégezni.

A kinolon és makrolid rezisztens *Campylobacter* törzsek által okozott humán fertőzések száma jelentősen megnőtt az utóbbi években. A fertőzések kezelésében sokáig a fluorokinolonok játszottak meghatározó szerepet, azonban a fluorokinolon rezisztencia növekedése miatt ez a terápia lehetőség komoly veszélybe került.

Az élelmiszer-alapanyagként szolgáló állatokban a kinolon rezisztencia nagyon magas arányú (74,3% *C. jejuni* és 70,1% *C. coli* esetében 2009-ben) és növekvő tendenciát mutat. A kinolon-rezisztens *C. jejuni* ( $p=0,00159$ ) és *C. coli* ( $p=4,475e-06$ ) törzsek aránya magasabb brojlercsirkében, mint sertésben, összhangban azokkal az eredményekkel, melyeket Olaszországban, Máltán, Romániában, Lengyelországban és Hollandiában kaptak.

Magyarországon az utóbbi években mindkét *Campylobacter*-fajban, mind brojlercsirkében mind sertésállományokban nő a makrolidokkal szembeni érzékenység. Ennek magyarázata lehet, hogy a makrolid antibiotikumokat nem lehet hozamfokozóként használni az EU-ban 1999. július óta.

Habár a mi takarmányozási vizsgálataink nem voltak sikeresek, az antibiotikumok helyett a különböző természetes alapú takarmány-kiegészítők, probiotikumok kerülnek előtérbe a *Campylobacter* elleni védekezésben.

A *C. lanienae* törzsek közt szintén jelentős tetraciklin, eritromicin és enrofloxacin rezisztenciát, valamint multirezisztens törzseket is találtunk, ami felveti a kérdést, hogy a *C. lanienae*-nek van-e szerepe az antibiotikum-rezisztencia terjesztésében. Habár a *C. lanienae*-t nem patogén baktériumnak tekintik, a relatív magas előfordulási aránya sertésekben, és a tény, hogy emberekből is izolálták, a zoonózis lehetőségére utal.

## Új tudományos eredmények

1. Kidolgoztunk egy real-time PCR módszert, mellyel gyorsan azonosíthatók a leggyakrabban előforduló termofil *Campylobacter*-fajok (*C. jejuni* és *C. coli*) kevert tenyészetek esetében is. Az eljárás EvaGreen fluoreszcens jelölőfestéssel működik, és a fajok az olvadásgörbék alapján különíthetők el. A *C. jejuni* azonosítására magunk terveztünk új primereket. Ezzel az általunk kidolgozott real-time PCR vizsgálati módszerrel 4 óra alatt 45 tenyészet azonosítását, illetve elkülönítését tudjuk elvégezni. Ez annak is köszönhető, hogy mind a feltárási, mind a PCR reakciók pipettázási folyamatait robotok segítségével automatizáltuk.
2. Felmértük a háziállatokban előforduló *Campylobacter*-fajok gyakoriságát, területi, időbeli eloszlását. Megállapítottuk, hogy a magyarországi brojlercsirke- (60,1%) és sertésállományok (43,3%) nagy arányban fertőzöttek *Campylobacter*-rel a vágás idején. Ezzel ellentétben a szarvasmarha-állományok (6,7% pozitív) nem gyakori hordozói a kórokozónak. A fertőzöttség szezonálisát vizsgálva szoros korrelációt találtunk a pozitív minták aránya és a relatív páratartalom között.
3. Elsőként izoláltunk és azonosítottunk Magyarországon *C. lanienae*-t. Beszámoltunk a baktérium országos előfordulásáról sertésekben. Megállapítottuk, hogy a *C. lanienae* a sertésekből izolált 2. leggyakoribb faj (20,7%), míg *C. jejuni*-val a pozitív sertés bélmintáknak csak 5,3%-a volt fertőzött.
4. A részleges 16S rRNS génen alapuló szekvencia analízis során a Vc2 régió leírtuk a 2A mintázat előfordulását *C. lanienae*-ben is. A Vc6 régió két jól elkülönülő, 3 nukleotidban különböző mintázatot találtunk, ezért a 6D mintázaton belül a törzsek elkülönítésére bevezettük a 6Da és 6Db jelölést.
5. Elsőként végeztünk PFGE vizsgálatokat *C. lanienae* törzseken, és megállapítottuk, hogy az *Sma*I enzimmel való hasítás a legalkalmasabb egy esetleges epidemiológiai vizsgálat esetén.
6. PFGE és *flaA* SVR szekvenciák alapján meghatároztuk a hazánkban, háziállatokban előforduló *C. jejuni* és *C. coli* genotípusokat. Stabil *C. jejuni* és *C. coli* klónokat találtunk.
7. Magyarországon elsőként megvizsgáltunk háziállatokból származó 1-1 *C. jejuni* és *C. coli* törzset MLST módszerrel.
8. Megállapítottuk, hogy jelentős az enrofloxacin/ciprofloxacin és nalidixsav rezisztencia az izolált törzsek közt, különösen a brojlercsirkéből származó *C. jejuni*-ban (73,3%) és *C. coli*-ban (77,2%). Az eritromicin ( $p=0,043$ ) és tetraciklin ( $p=1,865e-14$ ) rezisztencia magasabb a *C. coli*-ban (9,7% és 74,1%), mint a *C. jejuni*-ban (3,1% és 36,6%), ezáltal sertésekben gyakoribb.

## A témában megjelent tudományos publikációk

**Schweitzer N.**, Damjanova I., Kaszanyitzky É., Ursu K., Samu P., Tóth Á. Gy., Varga J., Dán Á.: Molecular characterization of *Campylobacter lanienae* strains isolated from food-producing animals. Foodborne Pathogens and Disease, 2011. In press.

**Schweitzer N.**, Dán Á., Kaszanyitzky É., Samu P., Tóth Á. Gy., Varga J., Damjanova I.: Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates of poultry, swine and cattle origin collected from slaughterhouses in Hungary. Journal of Food Protection, 2011. In press.

**Schweitzer N.**, Kaszanyitzky É., Samu P., Varga J.: A termofil *Campylobacter*-fajok jelentősége és helyzete hazánkban, a védekezés lehetőségei. Irodalmi összefoglaló. Magyar Állatorvosok Lapja, 2011. 133 (3). 165-173.

## A témában tartott előadások konferenciákon

Kaszanyitzky Éva, Samu Péterné, **Schweitzer Nóra**: Vágóhídi mintákból kitenyésztett *Campylobacter* izolátumok antibiotikum-érzékenysége. A Magyar Zoonózis Társaság, a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Központ Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatósága és az Országos Epidemiológiai Központ által rendezett konferencia 2008. október 7-9., Ráckeve.

**Schweitzer Nóra**, Dán Ádám, Ursu Krisztina, Kaszanyitzky Éva, Varga János: *Campylobacter jejuni* és *C. coli* azonosítása és elkülönítése real-time PCR-rel intézetünkben. Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottsága éves konferenciája 2009. január 27., Budapest.

Dán Ádám, **Schweitzer Nóra**, Ursu Krisztina, Kaszanyitzky Éva: *Campylobacter jejuni* és *C. coli* azonosítása és jellemzése molekuláris biológiai módszerekkel. Hungalimentaria 2009. április 22., Budapest.

**Schweitzer Nóra**, Kaszanyitzky Éva, Ursu Krisztina, Dán Ádám: Termofil *Campylobacter* törzsek elkülönítése EvaGreen alapú real-time PCR-el. Zoonózis Konferencia 2009. október 16., Tiszafüred.



**Schweitzer Nóra**, Dán Ádám, Kaszanyitzky Éva, Samu Péterné, Varga János: Élelmiszer-termelő állatokban előforduló termofil *Campylobacter*-fajok kimutatása, prevalenciája és antibiotikum-érzékenysége Magyarországon. Szent-Iványi – Binder napok 2010. augusztus 19., Budapest.

## Köszönetnyilvánítás

Tudományos munkám anyagi és infrastruktúrális feltételeinek biztosításáért köszönettel tartozom munkahelyemnek, a MgSzH-ÁDI-nak és mindenkori vezetésének.

Szeretném kifejezni köszönetemet munkám anyagi támogatásáért, a publikációim kéziratainak lektorálásáért, illetve azért, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy eredményeimet hazai tudományos konferenciákon előadhassam, témavezetőmnek, Dr. Varga Jánosnak.

Köszönettel tartozom Dr. Dán Ádámnak, társtémavezetőmnek, aki kivételes elhivatottságával, munkabíráásával nagymértékben segített az általam használt molekuláris biológiai és diagnosztikai módszerek elsajátításában, a kutatás menetének irányításában, a kapott eredmények értékelésében, a publikációim kéziratainak lektorálásában.

Köszönöm dr. Damjanova Ivelinának, az Országos Epidemiológiai Központ, Fágtipizálási és molekuláris epidemiológiai osztály munkatársának, hogy lehetőséget adott a PFGE vizsgálatok elvégzésére és köszönöm az eredmények kiértékelésében, és a publikációim kéziratainak lektorálásában nyújtott segítségét.

Köszönöm kollégáimnak, Juhászné Dr. Kaszanyitzky Évának és Samu Péterné dr-nak, hogy az általuk munkám kezdetéig, a témában elvégzett kutatásaik eredményeit önzetlenül átadták, és az osztályon izolált mintákat a rendelkezésemre bocsátották.

Dr. Tóth Ádám Györgynek köszönöm a kéziratok lektorálásában való részvételt.

Köszönöm a Higiénés bakteriológiai és Molekuláris biológiai laboratóriumok összes dolgozójának a segítségét.

Köszönöm Dr. Szigeti Gábornak, hogy részt vehettem a takarmányozási kísérletekben.

Dr. Reiczigel Jenőnek a statisztikában nyújtott segítségét köszönöm.

Dr. Bányai Krisztiánnak köszönöm a szekvenálásokban nyújtott segítségét.

Köszönöm családomnak, szeretteimnek és barátaimnak, hogy támogatásukkal és gondoskodásukkal lehetővé tették számomra, hogy minél több időt és energiát fordíthassak kutatásaimra.