

Phenotypic characterisation
of virulence factors of
Bordetella bronchiseptica
from rabbits

B. Khayer^{1,2}
K. M. Görföl-Sulyok¹
E. Wehmann¹
R. Szabó¹
T. Magyar^{1*}

1. Magyar Tudományos Akadémia
Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézete,
H-1143 Budapest, Hungária krt. 21.

2. Országos Közegészségügyi Intézet,
H-1097 Budapest, Albert Flórián út 2-6.

*e-mail: magyar.tibor@agrar.mta.hu

Nyúl eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek virulencia-faktorainak fenotípusos vizsgálata

Khayer Bernadett^{1,2}, Görföl-Sulyok Kinga Mária¹, Wehmann Enikő¹, Szabó Réka¹, Magyar Tibor^{1*}

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők jelen tanulmányukban bemutatják az emlősökben különböző légúti kórképeket előidéző *B. bronchiseptica*-val kapcsolatos vizsgálataikat. A kórokozóval való fertőződés egyes szakaszait *in vitro* tanulmányozták nyúl eredetű *B. bronchiseptica* törzseken. A gazdához való eljutást motilitásvizsgálattal, az adhéziót a hemagglutináló képesség vizsgálatával, a toxintermelést hemolízis-vizsgálattal modellezték. Megállapították, hogy a hazai és a külföldi nyúl eredetű törzsek között nincs számottevő különbség, azonban a törzsek viselkedését és virulenciáját nagymértékben befolyásolják a környezeti feltételek.

SUMMARY

Background: *Bordetella bronchiseptica* is a widespread pathogen bacterium causing various respiratory diseases in mammals. Little is known about the background of infection of rabbits by *B. bronchiseptica*, although both asymptomatic carriage and clinical manifestation of the disease generate economic losses for breeders. Moreover, rabbits as companion animals imply zoonotic risk, as well.

Objectives: In this work, the phases of infection by *B. bronchiseptica* strains were investigated.

Materials and methods: 40 *B. bronchiseptica* strains, isolated between 1984 and 2011 from rabbits in Hungary and other countries, were used in this study. The reach of the host was examined by motility assay under various circumstances (LB-37; LB-24; LB+MgSO₄-37; LB+MgSO₄-24). Adhesion was modelled by haemagglutination using rabbit, cattle and sheep erythrocytes, and the production of adenylate cyclase-haemolysin toxin was studied by haemolysis.

Results and Discussion: Most of the strains proved to be motile under all examined circumstances, but the greatest motility zones were measured after incubation at 37 °C on LB agar. Only one of the strains did not agglutinate any of the four types of erythrocytes. Rabbit erythrocytes were agglutinated by the highest number of strains. The lowest number of reactions were seen with cattle erythrocytes. Haemolysis was strongest on Columbia agar supplemented with 5% sheep blood. Supplementation with 5% horse blood resulted in weaker haemolysis. Haemolytic activity was not consistent between different passages of any strain.

Results have shown that there are no significant differences between Hungarian and foreign *B. bronchiseptica* strains. However, the behaviour and virulence of the strains is considerably influenced by environmental parameters.

A *Bordetella bronchiseptica* széles gazdaspektrummal rendelkező, világszerte előforduló Gram-negatív baktérium. Az általa okozott legismertebb kórképek közé tartozik a sertések torzító orrgyulladására és a kutyák kennekőhögése. A légutak megbetegedését idézheti elő nyúlban, macskában, tengerimalacban, emellett számtalan egyéb házi, laboratóriumi és vadon élő emlősállat légutai-ból is izolálták már (12). Az egyedileg vagy kis csoportban tartott házi kedvencek fertőződése az egyre gyakoribb emberi megbetegedések miatt is fontossá válik, ami felhívja a figyelmet a *B. bronchiseptica* zoonotikus jelentőségére.

A *Bordetella bronchiseptica* széles gazdaspektrummal rendelkező, világszerte előforduló Gram-negatív baktérium

A *B. bronchiseptica* előfordulása mind egészséges, mind beteg nyulakban általános

Nyulakban a fertőzés során orr- és szemváladékozás, tüszögés és esetenként láz jelentkezik

A kórokozó számára kedvezőtlen környezeti környezetben avirulenssé válik

Nyulak bakteriális eredetű légúti fertőzéseit többek között *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Chlamydomydia* és *Mycoplasma* fajok is előidézhetik, de leggyakrabban *B. bronchiseptica* és/vagy *Pasteurella multocida* izolálható az ilyen elváltozásokból. Egyes szerzők (7) úgy vélik, hogy a *B. bronchiseptica* egyedül nem képes klinikai formában is megnyilvánuló megbetegedést előidézni nyúlban, mások GLÁVITS és MAGYAR (1990) viszont arról számoltak be, hogy kísérletesen fertőzött laboratóriumi nyulaknál a *B. bronchiseptica* fertőzés önmagában is súlyos betegséget eredményez (10).

A *B. bronchiseptica* előfordulása mind egészséges, mind beteg nyulakban általánosnak mondható. A légutakban megjelenő baktérium betegséget általában nem okoz, viszont hajlamosít a *Pasteurella* fajokkal való fertőződésre, amelyek súlyos megbetegedést válthatnak ki. DEEB és mtsai (1990) szerint a nyulak nagy része már fiatal korban fertőződik *B. bronchiseptica*-val, míg a *P. multocida* fertőzöttség valószínűsége a nyulak életkorával emelkedik, és így a felső légúti megbetegedések kockázata is nő az idősebb állatokban (7). Kedvtelésből tartott nyulak leggyakrabban a velük egy háztartásban élő tengerimalacoktól fertőződhetnek meg, míg tenyészetekben a felnőtt nyulak tekinthetők rezervoárnak. A *B. bronchiseptica* terjedését az anyától való fertőződés indítja el, majd az elválasztott (1–4 hónapos) állatok között testvérről testvérré terjed szét a populációban (18).

A nyulak *B. bronchiseptica* okozta felső légúti megbetegedéseire orr- és szemváladékozás, tüszögés és esetenként láz jellemző. Az alsó légutak érintettsége esetén étvágytalanság, lehangoltság, nehézlégzés, cianózis és láz vagy éppen túl alacsony testhőmérséklet a jellemző tünet (24).

Nyulak légúti fertőzéseinek kezelésére legsikeresebben különféle antibiotikum-kombinációk használatosak. A leggyakoribb az enrofloxacin/ciprofloxacin gentamicinnel kísérve, vagy az enrofloxacin doxiciklinnel kombinálva. Kis adagban, hosszú távon alkalmazható a trimetoprim-szulfadiazin antibiotikum-kombináció, valamint az eritromicin és annak módosultai is (24).

A kórokozó baktériumok virulenciafaktoraik segítségével képesek a betegségek kialakítására. A *B. bronchiseptica* csillói segítségével aktív mozgásra képes, ezáltal könnyebben jut el a gazdához. A gazdaszervezet nyálkahártyáján való megtapadásban és annak kolonizációjában az adhezinek (fimbriák, filamentózus hemagglutinin, pertaktin) játszanak szerepet, a betegség jellemző tüneteinek kialakításában a különböző toxinok (adenilát-cikláz hemolizin, dermonekrotoxin, tracheális citotoxin) vesznek részt. A *B. bronchiseptica* virulenciafaktorait génexpressziós szinten a BvgAS-rendszer szabályozza a környezeti feltételek változásának megfelelően. Kedvezőtlen körülmények között, mint például alacsony hőmérséklet (26 °C alatt) vagy bizonyos kémiai anyagok (szulfát-ion és/vagy nikotinsav) hatására a rendszer inaktiválódik, ekkor Bvg⁻, avirulens fázisról beszélünk. Testhőmérsékleten (37 °C) és moduláló jelek hiányában viszont kifejeződnek az adhezinek és a toxinok, ekkor a baktérium virulens, Bvg⁺ fázisban van (6). A Bvg⁺ és Bvg⁻ fázisok között környezeti hatásra létrejövő reverzibilis szabályozási mechanizmus, az ún. fenotípusos (antigén) moduláció már régen ismert jelenség (8, 17).

Munkánk során a környezeti paraméterek változtatása mellett a baktérium egyes, a virulenciában szerepet játszó tényezőinek viselkedését tanulmányoztuk.

TÁBLÁZAT. A vizsgált nyúl eredetű *B. bronchiseptica* törzsek néhány tulajdonsága

*: külföldi törzsek; NA: nincs adat; LB: Luria-Bertani tápagar; 37 és 24: az inkubáció hőfoka (°C)

TABLE. Description of examined *B. bronchiseptica* strains

*: Non-Hungarian strains; NA: data not available; LB: Luria-Bertani agar; 37 and 24: temperature of incubation (°C)

Törzs	Az izolálás		Motilitási zóna nagysága (mm)				Hemagglutináció erőssége különböző vörösvértestekkel			
	helye	ideje	LB-37	LB-24	LB+ MgSO ₄ - 37	LB+ MgSO ₄ - 24	nyúl	juh	szarvas- marha	humán
RBK-1	Budapest	1984	8	5	5	2	3	2	4	3
RB 4032	Ráckeve	1987	7	3	4	3	3	2	4	3
5002	Budapest	1988	6	3	4	3	4	3	0	3
5008	Ráckeve	1988	5	6	4	3	3	3	2	4
5020	Dunavarsány	1988	7	4	4	2	4	3	3	3
5023	Jászapáti	1988	9	6	5	1	4	2	0	3
5024	Jászapáti	1988	7	3	4	2	3	2	4	3
5045	Környe	1988	7	4	5	4	3	2	4	3
5092	Ócsa	1990	7	5	5	3	3	3	1	3
5100	Ócsa	1990	6	2	4	3	3	3	2	3
5117	Ócsa	1990	5	2	4	1	3	3	3	3
5126	Ócsa	1990	5	2	3	3	3	3	4	3
5137	Ócsa	1990	7	2	5	2	3	2	4	3
5308	Ócsa	2005	7	3	4	2	1	0	4	0
5309	Ócsa	2005	4	2	3	1	2	1	4	2
5601	Gödöllő	2010	0	0	0	0	3	3	4	4
5602	Gödöllő	2010	6	2	4	2	2	1	4	3
5603	Gödöllő	2010	0	0	0	0	3	2	4	4
5604	Gödöllő	2010	0	0	0	0	3	3	4	4
5612	Gödöllő	2010	5	2	4	2	2	1	2	2
5613	Isaszeg	2010	6	2	3	2	2	2	2	2
5615	Isaszeg	2010	5	2	4	1	1	0	0	0
5617	Isaszeg	2010	7	3	5	2	2	2	4	2
5622	Isaszeg	2010	7	4	6	3	0	0	0	0
5630	Zagyvarékas	2007	6	3	2	2	3	2	3	3
5631	Litke	2006	4	3	3	2	2	3	4	3
5633	Kerekegyháza	2006	0	0	0	0	2	2	3	3
5634	Zsámbok	2006	0	0	0	0	4	3	4	3
5636	Litke	2006	1	0	1	0	2	3	3	4
5637	Etyek	2006	8	4	5	2	2	2	3	3
5648	Gyál	2011	8	3	5	3	2	2	2	2
5652	Szentmártonkáta	2011	5	2	4	2	2	2	3	3
5653	Szentmártonkáta	2011	5	2	3	2	3	2	4	3
5654	Szentmártonkáta	2011	9	3	5	2	3	3	2	3
Bb LC 2*	NA	NA	8	4	4	3	2	2	2	2
Bb LC 3*	NA	NA	8	5	5	3	3	3	2	3
Bb 9.73*	Franciaország	NA	9	4	4	2	2	2	2	2
CIP 52125*	Franciaország	NA	7	3	4	2	3	0	4	0
MBORD 704*	USA	NA	6	3	5	4	2	1	0	2
MBORD 730*	Dánia	NA	6	2	5	3	3	4	0	3

ANYAG ÉS MÓDSZER

A szerzők 34 hazai és 6 külföldi izolátumot vizsgáltak

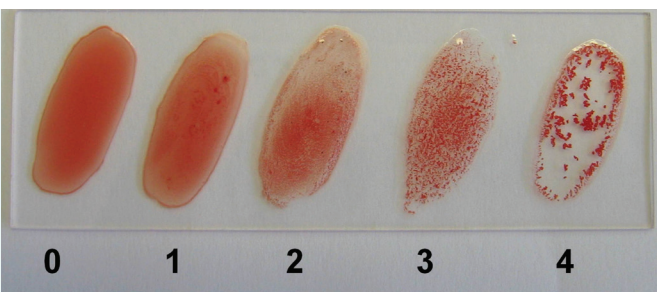
A törzsek mozgását, hemagglutináló és hemolizáló képességét vizsgálták különböző környezeti feltételek mellett

A FELHASZNÁLT *B. BRONCHISEPTICA* TÖRZSEK

Munkánkhoz az MTA ATK ÁOTI törzsgyűjteményében megtalálható, 1984 és 2011 között izolált hazai ($n = 34$) és külföldi ($n = 6$) nyúl eredetű *B. bronchiseptica* törzseket használtunk fel (Táblázat). A törzsek fenntartása -70 °C -on fagyaszott formában történt, a vizsgálatok során a tenyésztés 5% juhvért tartalmazó Columbia agar táptalajon (Lab M; Bury, UK) zajlott 37 °C -on 24 órás inkubáció mellett. A törzsek ellenőrzéséhez telepmorfológiai, biokémiai (12, 16, 23) és fajspecifikus molekuláris (14) vizsgálatokat végeztünk.

A MOZGÁSKÉPESSÉG VIZSGÁLATA

A különböző környezeti tényezők *B. bronchiseptica* törzsek mozgásképeségére gyakorolt hatását PASSERINI DE ROSSI és MTSAI (1997) módszere alapján végeztük el (21). Kétféle, 0,4% agart tartalmazó félfolyékony táptalajt használtunk: Luria–Bertani (LB) és 40 mM MgSO_4 -tal dúsított Luria–Bertani (LB+ MgSO_4) táptalajt. Két sorozatot oltottunk a talajokra pontoltással, és egy-egy sorozatot 24 °C -on, ill. 37 °C -on 24 óráig inkubáltuk. A különböző környezeti feltételek mellett (LB-37; LB-24; LB+ MgSO_4 -37; LB+ MgSO_4 -24) keletkezett motilitási zónákat milliméter pontossággal olvastuk le. A vizsgálatot háromszori ismétléssel végeztük el.



1. ÁBRA. A *B. bronchiseptica* hemagglutinációs aktivitásának fokozatai

0: negatív reakció; 1: gyenge reakció; 2: közepesen erős reakció; 3: erős reakció; 4: teljes hemagglutináció

FIGURE 1. Grades of haemagglutination activity of *B. bronchiseptica*

0: negative reaction; 1: weak reaction; 2: medium reaction; 3: strong reaction; 4: full haemagglutination

HEMAGGLUTINÁCIÓS PRÓBA

A *B. bronchiseptica* törzsek adhéziós képességének vizsgálatához tárgylemez-hemagglutinációs vizsgálatokat végeztünk. A vizsgálatokhoz alvadásban gátolt nyúl-, szarvasmarha- és juhvért, valamint humán „0” vércsoportú vért használtunk. A véreket centrifugáltuk ($3000 \times g$, 5 perc), a vörösvértesteket (vvt) mostuk, majd PBS- (foszfáttal puffertelt sóoldat) oldatban 10%-os szuszpenziót készítettünk. A szuszpenzió 20 μl -ét tárgylemezre cseppentettük, amelyben 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 (1. ábra). A vizsgálatot szobahőmérsékleten végeztük el és négy alkalommal ismételtük meg. A végső értékeléskor az ismétlések eredményeit átlagoltuk, majd a kapott értékeket egész számokra kerekítettük.

HEMOLIZÁLÓ KÉPESSÉG VIZSGÁLATA

A *B. bronchiseptica* toxinjai közül a baktérium hemolitikus tulajdonságáért (β -hemolízis) felelős adenilát-cikláz hemolizin toxint vizsgáltuk. Mivel a hemolizáló képességet tenyésztési körülmények nagymértékben befolyásolhatják, vizsgálatainkhoz többféle táptalajt használtuk fel. Ezek a következők voltak:

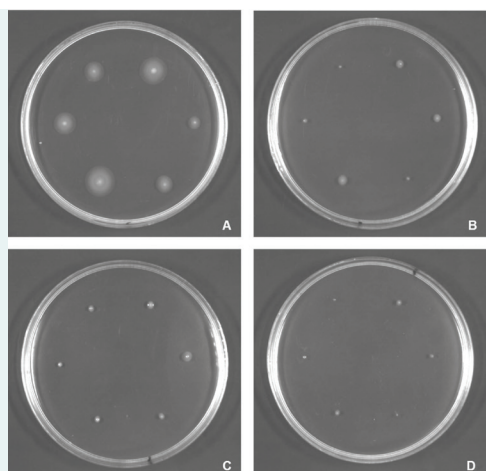
- 5% juhvért tartalmazó Columbia véres agar, pH 7,2 (Lab M)
- 5% juhvért tartalmazó Columbia véres agar, pH 6,8 (Lab M)
- 5% juhvért tartalmazó Columbia véres agar, pH 7,2 (Bio-Rad; Hercules, USA)
- 5% lóvért tartalmazó Columbia véres agar, pH 7,2 (Bio-Rad)
- 15% lóvért tartalmazó Bordet Gengou (BG) agar, pH 6,8 (Becton, Dickinson and Company; New Jersey, USA)
- 15% juhvért tartalmazó BG agar, pH 6,8 (Becton, Dickinson and Company)

- Luria-Bertani (LB) (Lab M) táplevesből való kioltás véres agarra.

A vizsgálatokat legalább háromszori ismétléssel hajtottuk végre, valamennyi elrendezésben aerob körülmények között, 37 °C-on és 24 óráig tartott az inkubáció.

EREDMÉNYEK

A *B. bronchiseptica* fajra jellemző módon egyetlen törzs sem hasznosította a felkínált szénhidrátokat (glükóz, laktóz és szacharóz), és a triptofán bontását jelző indolesztben is negatív eredményt kaptunk. Ureázaktivitást az összes törzsnél kimutattunk, a nitrátot egy külföldi eredetű törzs (MBORD 704) kivételével valamennyi törzs redukálta. A molekuláris azonosítás során a fajspecifikus PCR-rel felszorzosított 237 bp hosszúságú DNS szakaszt – a biokémiai próbák eredményétől függetlenül –, minden mintánál kimutattuk.



2. ÁBRA. Nyúl eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek motilitási zónái

A: Luria-Bertani (LB) táptalaj – 37°C; B: LB táptalaj – 24 °C; C: 40 mM MgSO₄-tal kiegészített LB táptalaj – 37 °C; D: 40 mM MgSO₄-tal kiegészített LB táptalaj – 24 °C

FIGURE 2. Motility zones of *Bordetella bronchiseptica* strains from rabbits

A: Luria-Bertani (LB) soft agar – 37 °C; B: LB soft agar – 24 °C; C: 40 mM MgSO₄ containing LB soft agar – 37 °C; D: 40 mM MgSO₄ containing LB soft agar – 24 °C

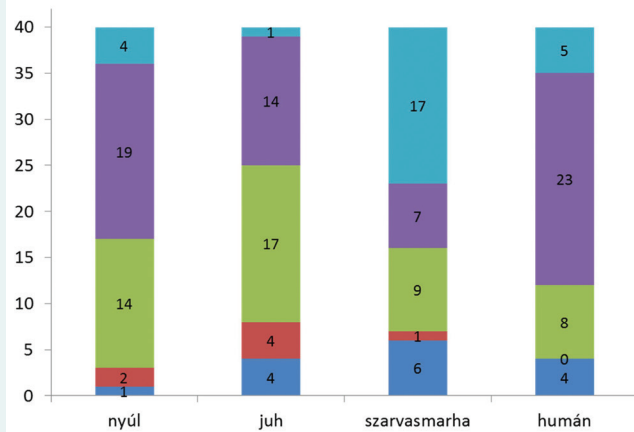
A MOTILITÁS VIZSGÁLATA

A nyúl eredetű *B. bronchiseptica* törzsek valamennyi elrendezésben aktív mozgást mutattak. A legnagyobb motilitási zónákat LB-táptalajon, 37 °C-os inkubáció mellett mértük. Az alacsonyabb hőmérséklet vagy MgSO₄ hatására kisebb aktivitást láttunk, a legkisebb mozgást pedig mindkét változó együttes jelenléte mellett jegyeztük fel. A 24 °C-on tenyésztett törzseknél nagy különbséget nem találtunk a MgSO₄-tal dúsított és a sima LB agaron megfigyelt mozgásképeség között. A vizsgálat során azonban törzseink nem viselkedtek egységesen, néhány törzsre az alacsonyabb hőmérséklet, másokra a MgSO₄ volt nagyobb hatással. Kiugró értékeket azonban több összehasonlításban is találunk: az 5008 jelű törzsnél nagyobb motilitási zóna alakult ki 24 °C-on, mint 37 °C-on, az 5023 számú törzs mozgására pedig kifejezetten gátló hatással volt a MgSO₄. Öt törzsnél (5601, 5603, 5604, 5633, 5634) motilitást egyik elrendezésben sem tapasztaltunk, az 5636 jelű törzs pedig csak minimális mozgást mutatott (1-3 mm átmérő), azt is csak 37 °C-on (2. ábra).

A HEMAGGLUTINÁLÓ KÉPESSÉG VIZSGÁLATA

A vizsgálat során törzseink a különböző típusú vvt-eket az esetek többségében (91%) agglutinálták, a legtöbb vérnél valamennyi hemagglutinációs szint megjelent (3. ábra). Magyarországi és külföldi eredetű *B. bronchiseptica* törzsek hemagglutináló képessége között számottevő különbséget nem tapasztaltunk. Nem találtunk olyan törzset, amely mind a négy gazdafaj vvt-jeivel teljes hemagglutinációt mutatott volna. Egy törzs (5622) azonban minden elrendezésben negatív eredményt adott, az 5615 jelű törzsnél pedig csak a nyúlvér mellett láttunk gyenge (1-es szintű) agglutinációt. Két hazai (5002 és 5023) és két külföldi (MBORD 704 és MBORD 730) törzsnél általában erős és teljes reakciókat figyeltünk meg, kivéve a szarvasmarha vvt-eket, melyeket egyáltalán nem agglutinálták ezek a törzsek. A legtöbb reakciót (39%) 3-as szintűnek értékeltük, de 30%-os volt a közepesen erős reakciók aránya is.

A nyúl eredetű vvt-ekkel szemben csak három törzs (5308, 5615, 5622) mutatott negatív vagy gyenge reakciót, ezek a törzsek más vizsgált vvt-szuszpenzióval is gyenge vagy negatív eredményt adtak. Juhvér esetében a gyengébb (2-es, vagy alacsonyabb szintű) reakciók túlsúlyát tapasztaltuk. Mind a legtöbb teljes hemagglutinációt, mind a legtöbb negatív reakciót a szarvasmarha vvt-ek mellett kaptuk. Humán vvt-ek esetén 28 törzsnél erős, vagy teljes hemagglutinációt láttunk, ami arányaiban a legmagasabb (70%) a vizsgált vérek között.



3. ÁBRA. A hemagglutinációs próbák átlagolt eredménye különböző gazdafajokból származó vörösvértest szuszpenziókkal vizsgálva

0: negatív reakció; 1: gyenge hemagglutináció; 2: közepesen erős reakció; 3: erős reakció; 4: teljes hemagglutináció

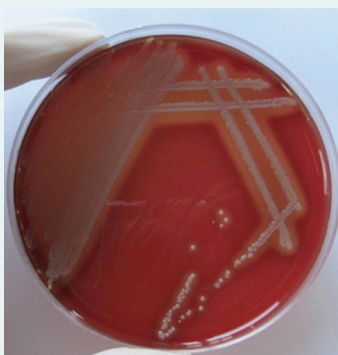
FIGURE 3. Average grades of haemagglutination tests by red blood cell suspension from different host species

0: negative reaction; 1: weak reaction; 2: medium reaction; 3: strong reaction; 4: full haemagglutination



4. ÁBRA. Juhvéres agaron nem hemolizáló nyúl eredetű *B. bronchiseptica* törzs

FIGURE 4. Non-haemolytic *B. bronchiseptica* strain from rabbit on sheep blood agar



5. ÁBRA. Juhvéres agaron β -hemolízist mutató nyúl eredetű *B. bronchiseptica* törzs

FIGURE 5. β -haemolytic *B. bronchiseptica* strain from rabbit on sheep blood agar

A TÖRZSEK HEMOLIZÁLÓ KÉPESSÉGE

A törzsek hemolizáló képességének vizsgálatakor változatos eredményeket kaptunk. A leggyengébb hemolitikus aktivitást a Bio-Rad típusú juhvéres Columbia talajon tapasztaltunk, ahol néhány, viszonylag friss izolátumon kívül nem volt feltisztulás a telepek körül. Ezzel ellentétben a lóvérrel kiegészített Bio-Rad táptalajon az esetek többségében gyenge β -hemolízist figyeltünk meg. A külföldi törzseknél nagyon gyenge, csak a baktériumtelepek alatt kialakuló feltisztulást láttunk ezen a táptalajon.

Vizsgálataink során legtöbbször LAB M típusú juhvéres Columbia-agart használtunk. A többszörös leoltás során a törzsek eltérő hemolitikus aktivitást mutattak, de nem volt olyan törzs, amely az összes leoltás során kifejezett β -hemolízist mutatott volna. A friss izolátumok esetében az izolálást követő 1–2 leoltásnál még széles hemolitikus zónát (4. ábra) láttunk a telepek körül, majd idővel ezeknél a törzseknél is leoltásonként változó hemolitikus aktivitást tapasztaltunk, akárcsak a régebbi izolálású magyarországi és a külföldi törzsek esetében. Az MBORD törzsgyűjteményből származó két törzs azonban nem oldotta fel a táptalajban található vvt-eket (5. ábra).

A véres agaron való hemolízist folyadékultúrában (LB-tápleves) való tenyésztéssel próbáltuk erősíteni, de a táplevesből történő kioltás után is változó eredményeket kaptunk. A véres agaron egyes törzsek gyengébb, mások erősebb hemolízist mutattak, mint a folyadékultúrák passzázst megelőzően. Az alacsonyabb (7,2 helyett 6,8) pH-jú véres agaron kifejezettebb hemolitikus aktivitást tapasztaltunk. A tápanyagokban dúsabb (15% juhvért tartalmazó) BG-agaron törzseink a véres agaron tapasztaltakhoz hasonlóan viselkedtek. A 15% lóvért tartalmazó BG-talajon viszont a törzsek kifejezett, akár 1 cm átmérőjű hemolitikus zónát is kialakítottak a telepek körül.

MEGVITATÁS

A *B. bronchiseptica* a nyulak körében széles körben elterjedt patogén baktérium. Súlyos kórképeket általában csak társfertőzőként okoz, ám a baktérium tünetmentes hordozása is az állományok leromlásához vezethet hosszútávon. A nyulak szerepe fokozatosan felértékelődik a táplálkozásban, mint fehérhús, a tudományban, mint modellállat és a családokban, mint hobbi- és társállat. A fertőzött, sokszor csak tünetmentes baktériumhordozó nyulak ezáltal nemcsak gazdasági veszteséget jelenthetnek, de humán megbetegedések rezervoárját is képezhetik (4, 13). A *B. bronchiseptica* által okozott kórképek kialakulása és súlyossága függ a gazdaszervezet fogékonyságától és a baktériumtörzs aktuális tulajdonságaitól, amelyeket a környezeti tényezők nagymértékben befolyásolhatnak.

A biokémiai próbákban törzsek nagy része egységesen és a szakirodalomban leírt módon viselkedett

A biokémiai próbákban törzsek nagy része egységesen és a szakirodalomban (12) leírt módon viselkedett. A Bergey's Manual szerint a *B. bronchiseptica* nitrát-redukáló képessége hagyományos biokémiai tesztekben változatos lehet, azonban API 20 NE rendszerrel történő azonosítás során minden törzs nitrát-pozitivitást mutatott (23). Ezzel ellentétben FRIEDMAN és mtsai (2006) API használata mellett is találtak nitrát-negatív törzseket, míg hagyományos tesztelés során minden törzsük redukálta a nitrátot (9). A nitrát-negatív törzsek előfordulása elsősorban kutya eredetű törzseknél gyakori (2, 9), az általunk vizsgált negyven, nyúl eredetű törzsből egy külföldi izolálású törzs kivételével mindegyik redukálta a nitrátot.

A *B. bronchiseptica* csillói segítségével képes kedvezőbb környezeti feltételekkel rendelkező térbe mozogni, ami biztosíthatja számára a megfelelő gazdához történő eljutást. PLOTKIN és BEMIS (1998) különböző gazdafajokból származó klinikai izolátumok motilitását vizsgálták függőcsepp-preparátumban. Megállapították, hogy a *B. bronchiseptica* mozgásképesége független az alkalmazott szénforrástól, de nem független a teleptípustól és a sejtek korától. Bvg⁺ fázisú izolátumok nem mozogtak és csillókat sem képeztek, a Bvg⁻ fázisú izolátumoknál azonban mindig tapasztaltak mozgást, és a csillózsűrűségi szint is legalább 95% volt (22). Saját vizsgálatainkhoz hasonló pontoltásos módszerrel különböző gazdafajokból (tengerimalac, nyúl, ember) izolált (21) és főleg laboratóriumi mutáns (1) törzseket tenyésztve azt tapasztalták, hogy a vad fenotípusú (Bvg⁺) törzsek 37 °C-on egyáltalán nem mozogtak. Azonban ezek a Bvg⁺ törzsek alacsonyabb hőmérsékleten (22 °C) és/vagy szulfation jelenlétében már akár 5-25 mm nagyságú motilitási zónát is képeztek 24 óra alatt. Ezzel ellentétben a Bvg⁻ állapotú törzsek a moduláló jel meglététől függetlenül, minden esetben mozogtak.

A vizsgált törzsek többsége valamennyi környezeti feltételnél aktív mozgást mutatott

A vizsgálatainkba bevont nyúl eredetű törzsek többsége (87,5%) valamennyi környezeti feltételnél aktív mozgást mutatott, és a MgSO₄-tal kiegészített táptalajon kevésbé reagált a hőmérsékleti különbségekre. A törzsek egyedi vizsgálata során tapasztalt kisebb-nagyobb eltérések hátterében a baktériumok aktuális fiziológiai jellemzői állhatnak. A törzsek izolálási helye és ideje nem befolyásolta a mozgási aktivitást. Ettől függetlenül a mozgásképeség tanulmányozása során kapott eredményeink arra utalnak, hogy törzseink a vizsgálatkor Bvg⁻ állapotúak voltak. Munkánk során azonban olyan törzsekkel is találkoztunk, amelyek egyik kísérleti elrendezésben sem mutattak aktív mozgást. Hasonló *B. bronchiseptica* törzsekről AKERLEY és mtsai (1992) tanulmányában is olvashatunk (1). Ezeket az apró, hemolizáló, de moduláló jel meglétére érzéketlen törzseket Bvg^c (c-konsztitutív mutáns) fenotípusúnak nevezték el. A Bvg^c fenotípust a *bvgAS* operonban keletkező ún. „missense” mutációval (Arg⁵⁷⁰→His) vagy UV-besugárással lehet irányítottan létrehozni, de a természetes fény hatására is kialakulhatnak Bvg^c spontán mutánsok.

A *B. bronchiseptica* törzsek adhéziós képességét hemagglutinációs próbában vizsgálták

A *B. bronchiseptica* törzsek adhéziós képességét hemagglutinációs próbában vizsgáltuk, 4 különböző gazdafaj vvt-jeivel. Mivel a baktérium vvt-megkötő képessége sokszor összefüggést mutat a mikroba gazdasejtéhez történő adhéziónak, valamint a virulens baktériumok erősebb adhéziós és hemagglutinációs képességgel rendelkeznek, a hemagglutinációs aktivitást sokáig használták a patogén izolátumok azonosítására (15). A *B. bronchiseptica* hemagglutinációs faktora jelentős protektív antigénnek is tekinthetőek, és egy 1991-ben íródott japán tanulmány (20) szerint a sertés eredetű és virulens fázisú törzsek között e tekintetben nincs eltérés. Különböző gazdafajú baktériumok és/vagy vvt-k együttes vizsgálatakor, akár a jelen munkában, a kép már korántsem ilyen egyértelmű. Ezt támasztja alá BEMIS és PLOTKIN (1982) beszámolója is, ahol kutya és sertés eredetű *B. bronchiseptica* törzsek hemagglutinációját vizsgálták mikro-hemagglutinációs módszerrel 5 különböző eredetű vvt-tel. A különböző gazdafajból származó izolátumok között nem tapasztaltak számottevő különbséget, a csirkevér

kivételével (10%) valamennyi vvt-nél 81-91%-ban tapasztaltak pozitív hemagglutinációt (3). Ez az érték munkánk során 85-98% közé volt tehető a 4 vizsgált vvt szuszpenzió mellett.

MAGYAR és mtsai (1987) sertésből frissen izolált, ill. sorozatos átoltásokon átesett *B. bronchiseptica* törzsek hemagglutinációs képességét vizsgálták 8 különböző emlős, köztük humán A vércsoportú vvt szuszpenziókkal. A frissen izolált törzsek teljes mértékben agglutinálták a ló és szarvasmarha vvt szuszpenziókat, míg a sorozatos átoltáson átesett (27-61 passzázs) törzsek elvesztették a szarvasmarha és ló vvt-eket agglutináló képességüket, viszont a többi vvt szuszpenzióval továbbra is erős reakciót mutattak. Egérfertőzési kísérletekben a ló és szarvasmarha vvt-eket nem agglutináló törzsek csökkent fertőző- és kórokozó-képességgel rendelkeztek (19).

Az általunk végzett hemagglutinációs próbakban a vizsgálatok közel 44%-ánál viszont 2-es, vagy annál gyengébb reakciót tapasztaltunk, ami a törzsek csökkent virulenciájára utal, aminek hátterében a (környezeti hatásokra kialakuló) fázisváltás is állhat. A vizsgálatba vont törzsek többszöri átoltáson és tartósítási eljárásokon (liofilizálás, fagyasztás) estek át, ennek ellenére a legtöbb esetben tapasztaltunk hemagglutinációs aktivitást törzseinknél. Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a *B. bronchiseptica* képes hozzátapadni nyulak, juhok, szarvasmarhák és az ember vvt-hez, de a kolonizációt és a betegség kialakulását nagy valószínűséggel befolyásolják a környezeti tényezők és a gazda aktuális immunológiai-fiziológiai állapota is.

Általánosan elfogadott, hogy a *B. bronchiseptica* β -hemolízist mutat véres agaron (12). Munkánk során azonban ezt a megállapítást nem tudtuk teljes mértékben igazolni. A hemolitikus aktivitást genetikai paraméterek és környezeti tényezők (inkubációs körülmények, a táptalaj összetevői) egyaránt befolyásolhatják (1). GONZÁLEZ és mtsaihoz (2006) hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy a táptalajba kevert vér minősége (gazdafaji eredete) is hatással van a baktérium hemolizáló képességére (11). BODADE és mtsai (2009) a pH, a hőmérséklet és a sejtek életkorának hemolízisre gyakorolt hatását vizsgálták *B. bronchiseptica* esetében. Megállapították, hogy a legnagyobb hemolitikus aktivitás akkor érhető el, ha a hőmérséklet 37 °C, a pH 7,5-8 közé esik és a baktériumsejtek friss izolátumokból származnak (5). Ennek ellenére azt tapasztaltuk, hogy az alacsonyabb pH (pH 6,8) pozitív hatással volt a hemolízisre. Vizsgálataink során mi is azt tapasztaltuk, hogy a frissen izolált baktériumok hemolizáló képessége idővel csökkent. A különböző hemolitikus aktivitások és a telepmorfológia vizsgálata során tapasztalt eltérő telepméreteket (tűszúrásnyitól a 1,5 mm nagyságúig) között párhuzamot lehet felállítani, amely a törzsek fázisváltására vezethető vissza. A legtöbb hasonló jellegű eltérés hátterében a Bvg⁻-mediált fenotípusos módosulás áll. Bvg⁺ fázisú törzsek aprók, hemolizálnak, és virulenciájuk nagyobb, mint a kedvezőtlenebb körülmények között növekvő, esetleg idősebb, Bvg⁻ avirulens törzseké, amelyekre nagyobb telepméret és a hemolízis hiánya jellemző (6).

A *B. bronchiseptica* virulenciafaktorainak tanulmányozásához különböző fenotipizáló módszereket alkalmaztunk, és a legtöbb vizsgálatban a törzsek heterogenitását mutattuk ki. A vizsgálatok (hemolizáló képesség, hemagglutináció és mozgásképesség) során kapott eredmények arra utalnak, hogy törzseink többnyire avirulens (Bvg⁻) fázisban voltak. Mivel a tenyésztéskor nem használtunk a BvgAS rendszerre ható faktorokat, ezért feltételezhető, hogy más extra- és/vagy intracelluláris körülmények okozták a fázisváltást. Ide sorolhatók többek között olyan tényezők, mint az átoltások száma, a sejtek életkora, a sejtsűrűség, a tartósítási eljárás vagy éppen a táptalaj és a levegő aktuális nedvességtartalma. De természetesen számtalan, eddig még nem ismert befolyásoló tényező is szerepet játszhatott abban, hogy standard – legalábbis általunk standardnak vélt – körülmények között is eltérő eredményeket kaptunk az ismétlések során.

A hemagglutinációs próbakban a vizsgálatok közel 44%-ánál gyenge reakciót tapasztaltak, ami a törzsek csökkent virulenciájára utal

A különböző hemolitikus aktivitások és a telepmorfológia vizsgálata során tapasztalt eltérő telepméreteket között párhuzamot lehet felállítani

A vizsgált törzsek többnyire avirulens fázisban voltak

IRODALOM

1. AKERLEY, B. J. – MONACK, D. M. et al.: The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.*, 1992. 174. 980–990.
2. BEMIS, D. A. – CARMICHAEL, L. E. – APPEL, M. J.: Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Cornell Vet.*, 1977. 67. 282–293.
3. BEMIS, D. A. – PLOTKIN, B. J.: Haemagglutination by *Bordetella bronchiseptica*. *J. Clin. Microbiol.*, 1982. 15. 1120–1127.
4. BEREGI A. – PAULINA A. – KRÖNINGER K.: Kedvtelésből tartott kismamák által terjesztett fontosabb zoonosisok. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 2010. 132. 651–658.
5. BODADE, R. G. – KHOBRAGADE, C. N. – AHMED, N.: Comparative study of hemolytic activity of *Bordetella* species. *Iran. J. Microbiol.*, 2009. 1. 26–31.
6. COTTER, P. A. – MILLER, J. F.: *Bordetella*. In: GROISMAN, E. A. (szerk.): *Principles of Bacterial Pathogenesis*. Academic Press. San Diego, 2001. 619–674.
7. DEEB, B. J. – DIGIACOMO, R. F. et al.: *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits. *J. Clin. Microbiol.*, 1990. 28. 70–75.
8. ÉLIÁS B. – KRÜGER M. – RÁTZ F.: Adatok a sertések torzító orrgyulladásának járványtanához – II. Sertésből izolált *Bordetella bronchiseptica*-törzsek biológiai tulajdonságai. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1983. 38. 215–217.
9. FRIEDMAN, L. E. – MESSINA, M. T. et al.: Characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains using phenotypic and genotypic markers. *Vet. Microbiol.*, 2006. 117. 313–320.
10. GLÁVITS, R. – MAGYAR, T.: The pathology of experimental respiratory infection with *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in rabbits. *Acta Vet. Hung.*, 1990. 38. 211–215.
11. GONZÁLEZ, G. M. – ROSALES, M. E. et al.: Isolation and characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains from canine origin. *Vet. Mex.*, 2006. 37. 313–325.
12. GOODNOW, R. A.: Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Rev.*, 1980. 44. 722–738.
13. GUEIRARD, P. – WEBER, C. et al.: Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J. Clin. Microbiol.*, 1995. 33. 2002–2006.
14. HOZBOR, D. – FOUQUE, F. – GUISSO, N.: Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.*, 1999. 150. 333–341.
15. ISHIKAWA, H. – ISAYAMA, Y.: Effect of antigenic modulation and phase variation on adherence of *Bordetella bronchiseptica* to porcine nasal epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.*, 1987. 48. 1689–1691.
16. KONKOLY-THÉGE M. – LÁNYI B.: Az aerob és anaerob baktériumok azonosítására használatos leggyakoribb vizsgálatok. In: CZIRÓK É. (szerk.): *Klinikai és járványügyi bakteriológia*. Melania. Budapest, 1999. 150–187.
17. LACEY, B. W.: Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *J. Hyg.*, 1960. 58. 57–93.
18. LONG, G. H. – SINHA, D. et al.: Identifying the age cohort responsible for transmission in a natural outbreak of *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS Pathog.*, 2010. 6. (12) e1001224.
19. MAGYAR T. – SEMJÉN G. – OSVÁTH Zs. – LENDVAI N. – RÉTHY L.: A *Bordetella bronchiseptica* virulenciáját meghatározó tényezők vizsgálata. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1987. 42. 603–607.
20. OHGITANI, T. – OKABE, T. – SASAKI, N.: Characterisation of haemagglutinin from *Bordetella bronchiseptica*. *Vaccine*, 1991. 9. 653–658.
21. PASSERINI DE ROSSI, B. N. – FRIEDMAN, L. E. et al.: Flagellin, a major protein present in SDS-PAGE profiles of Sarkosyl-OMP-enriched fraction from *Bordetella bronchiseptica* Bvg- or modulated Bvg+ strains. *Vet. Microbiol.*, 1997. 56. 65–77.
22. PLOTKIN, B. J. – BEMIS, D. A.: Carbon source utilisation by *Bordetella bronchiseptica*. *J. Med. Microbiol.*, 1998. 47. 761–765.
23. SANDEN, G. N. – WEYANT, R. S.: Genus III. *Bordetella*. Moreno-López 1952. In: GARRITY, G. M. (szerk.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer. New York, 2005. 662–671.
24. VAN PRAAG E.: Upper respiratory tract disease in rabbits. <http://www.medirabbit.com/EN/Respiratory/Bacterial/URI.htm>

Közlésre érck.: 2017. aug. 22.