

Identification of serotype 16
of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Short secondary communication

Sárközi Rita*
Makrai László
Fodor László

R. Sárközi*
L. Makrai
L. Fodor

SZIE ÁOTK Járványtani és
Mikrobiológiai Tanszék
H-1143 Budapest, Hungária krt. 23-25.

* e-mail: sarkozi.rita@aoatk.szie.hu

Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* 16-os szerotípusának azonosítása

Rövidített másodközlés*

SERTÉS

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők öt *Actinobacillus pleuropneumoniae* törzset izoláltak kórbonctani elváltozásokat mutató sertéstüdőkből, amelyeket passzív hemagglutinációs vizsgálattal az ismert 15 szerotípus egyikébe sem tudtak besorolni. E törzsekkel szemben nyulakban termelt hiperimmunsavók pozitív reakciót adtak a saját és a másik négy nem besorolható törzssel, ugyanakkor nem reagáltak a típustörzsekkel. Mind az öt törzs rendelkezett *apxIA*, *apxIB*, *ApxII* és *ApxIV* génnel. A szerzők az *A. pleuropneumoniae* egy új, 16-os szerotípusának elfogadását javasolják az A-85/14 törzssel mint típustörzssel.

SUMMARY

Five *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pathological lesions could not be assigned into any of the 15 serotypes using the indirect haemagglutination test. Hyperimmune sera raised in rabbits against them gave positive reactions with the homologous and the other four strains but did not react with the type strains. All five strains harboured *apxIA*, *apxIB*, *ApxII* and *ApxIV* genes. A new serovar of *A. pleuropneumoniae* – serovar 16 – is proposed with *A. pleuropneumoniae* A-85/14 as reference strain.

* Az eredeti közlemény az *Acta Veterinaria Hungarica* folyóiratban jelent meg 2015-ben (63. 444-450).

Hagyományos módszereket használva öt 1-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* törzset izoláltunk. A 15 típusú törzs egyike sem adott reakciót a nem besorolható *A. pleuropneumoniae* törzsek savójával, így ezek alapján az öt nem besorolható törzs egy közös és eltérő *A. pleuropneumoniae* szerotípust képviselnek.

Az *A. pleuropneumoniae* esetében eddig 15 szerotípust különítettek el

Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* az egyik legfontosabb olyan baktériumfaj, amely kóroktani szerepet játszik a sertés légzőszervi tünetegyüttesének (Porcine respiratory disease complex, PRDC) kialakulásában (18). Az *A. pleuropneumoniae* világszerte előforduló, fakultatív patogén kórokozó, vérzéses-elhalásos tüdőgyulladás és fibrines mellhártyagyulladást okoz sertésekben. A baktériumnak két biotípusa és számos virulenciafaktora van (4, 8). A felületi oldható burok poliszacharid (CPS) és lipopoliszacharid (LPS) antigének alapján eddig 15 szerotípust különítettek el (2, 5). Számos módszer áll rendelkezésre a szerotípusok meghatározására (12, 14, 15), köztük a passzív hemagglutináció, amelyet több szerző a legspecifikusabb és legérzékenyebb módszernek tart (13, 16, 17). Az egyes szerotípusok eltérő virulenciát mutatnak, amelyet a szerotípusok és a toxintermelésük közötti összefüggés magyaráz (6, 9, 11).

Vizsgálatunk során öt olyan *A. pleuropneumoniae* törzset izoláltunk 2012 és 2014 között ötven sertéstüdőből, amelyek passzív hemagglutinációs próbával egyik típusú törzssel szemben termelt hiperimmunsavóval sem mutattak reakciót, így őket egyik szerotípusba sem tudtuk besorolni.

A jelen munka célja az volt, hogy ezeket a nem besorolható törzseket megvizsgáljuk és az adatok alapján bizonyítsuk, hogy a vizsgált törzsek egy új *A. pleuropneumoniae* szerotípusba, a 16-os szerotípusba tartoznak.

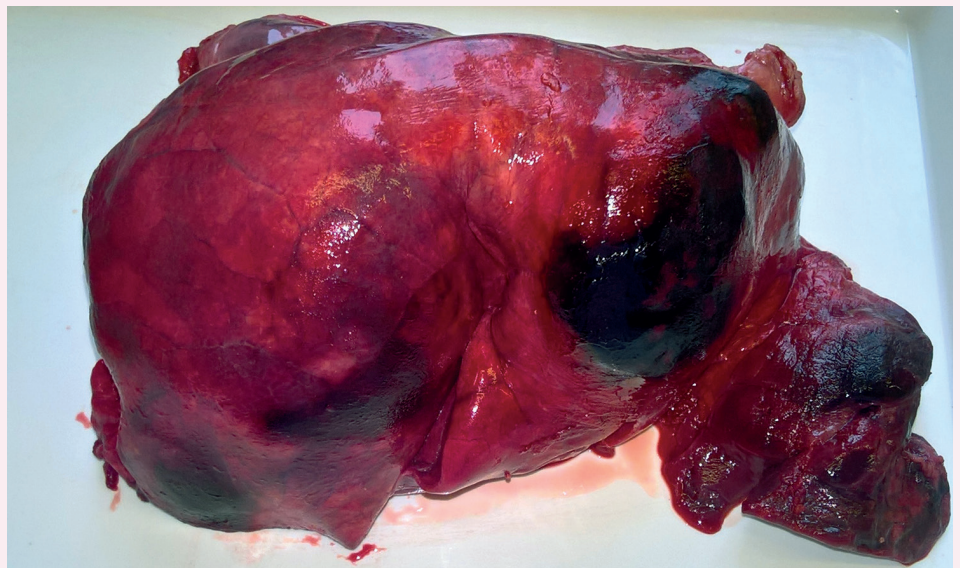
ANYAG ÉS MÓDSZER

BAKTÉRIUMOK

Öt, 1-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* izolátumot vontunk be vizsgálatunkba. Két törzset vágóhídról származó, az *A. pleuropneumoniae* okozta idült elváltozást mutató sertéstüdőből izoláltunk, míg három törzset a laboratóriumi munkba küldött, heveny légzőszervi tünetek között elhullott sertések tüdejéből

1. ÁBRA. Heveny, 16-os szerotípusú *A. pleuropneumoniae* által okozott vérzéses-elhalásos tüdőgyulladás, kezdődő fibrines mellhártyagyulladás

FIGURE 1. Acute haemorrhagic-necrotic pneumonia with fibrinous pleuritis caused by *A. pleuropneumoniae* strain serotype 16



tenyésztettünk ki (1. ábra). Mind az öt törzs más állományból és Magyarország különböző területeiről származott. Járványtani kapcsolat csak két törzs esetében állt fenn (kocasüldőket szállítottak a tenyésztelpről a hizlalótelepre).

Az *A. pleuropneumoniae* 15 típus-törzsét DR. O. ANGEN professzor bocsátotta rendelkezésünkre (Danish Veterinary Laboratory, Copenhagen). A törzsek izolálása, tenyésztése és azonosítása a szokásos eljárásokkal történt (21).

SZEROLÓGIAI VIZSGÁLATOK

A 15 típus-törzssel és az 5 friss izolátummal szemben nyulakban hiperimmunsavót termeltünk, majd a törzsek szerotípusának meghatározására a passzív hemagglutinációs módszert használtuk (1). Mind a 15 típus-törzset és az általunk izolált 5 törzset minden, velük szemben termelt immunsavóval reagáltattuk.

BAKTERIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

Az *apxIA*, *apxIB*, *apxII*, *apxIII* és *apxIV* gének jelenlétét PCR-módszerrel vizsgáltuk (19). A szerotipizálás után 95-féle szénforrás felhasználásának vizsgálatával Biolog módszerrel (BIOLOG Inc., California) meghatároztuk a típus-törzsnek javasolt A-85/14 *A. pleuropneumoniae* törzs szénforrás-hasznosítását, és megvizsgáltuk a 16S rRNS nukleotid szekvenciáját. Az *rrs* gén amplifikálására alkalmas 16S rRNS PCR-rendszerhez univerzális primereket használtunk (20), majd az *rrs* génszekvenciát feltöltöttük a GénBank adatbázisába.

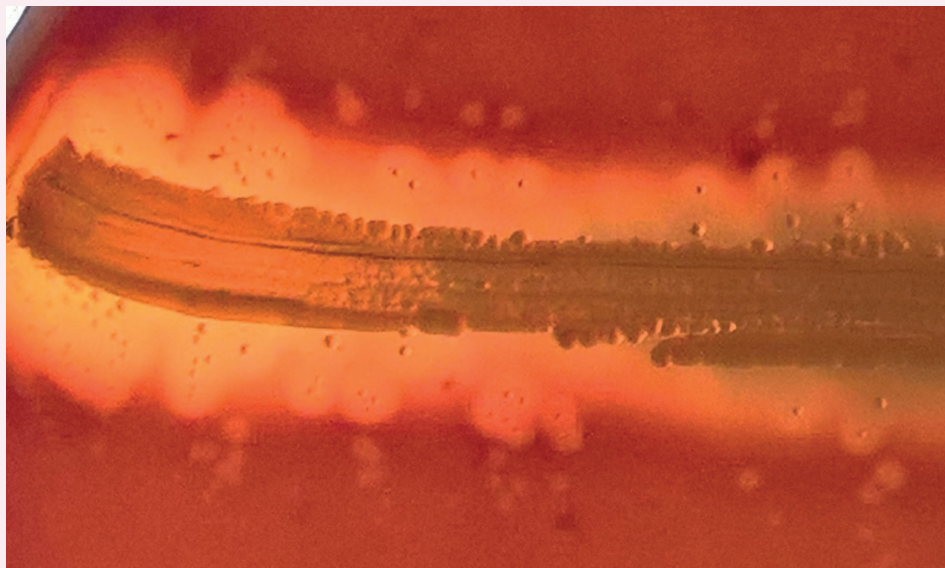
EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS

Hagyományos módszereket használva öt 1-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* törzset izoláltunk (2. ábra). A törzsek a passzív hemagglutinációs vizsgálat során semmilyen reakciót nem adtak a 15 elfogadott típus-törzssel szemben termelt hiperimmunsavóval, de a velük szemben termelt homológ savók 1 : 2560 és 1 : 5120 hígításban is agglutinálták őket. Mind az öt törzs heterológ reakciót is adott a másik négy törzs savójával, a homológ reakcióval megegyező nagy titerértékkel. A 15 típus-törzs egyike sem adott reakciót a nem besorolható *A. pleuropneumoniae* törzsek savójával. Ezek alapján az öt nem besorolható törzs egy közös és eltérő *A. pleuropneumoniae* szerotípust képviselnek.

A szerzők 5 olyan törzset izoláltak, amelyek nem reagáltak a 15 típus-törzssel szemben termelt hiperimmunsavóval

2. ÁBRA. Dajkatenyészet, NAD-függő 1-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* törzs

FIGURE 2. Satellitism, NAD-dependent *A. pleuropneumoniae* strain biotype 1



A szénforrás-hasznosítás és a szekvenálási vizsgálatok alapján a törzsek az *A. pleuropneumoniae* fajba tartoznak

Eredményeik alapján a szerzők egy új, 16. szerotípus elfogadását javasolják

Mind az öt törzsből kimutattuk az ApxI toxin termeléséért (*apxIA*) és elválasztásáért (*apxIB*), az ApxII toxin kifejeződéséért felelős gént, valamint a legnagyobb méretű (2800 bp) *apxIV* gént. Az 5a és 5b *A. pleuropneumoniae* szerotípusok is ezzel a toxingén mintázattal rendelkeznek (19). Passzív hemagglutinációs tesztben azonban az 5a és 5b *A. pleuropneumoniae* szerotípusok nem adtak reakciót az öt nem besorolható törzssel szemben termelt savóval, ezért ezek alapján a vizsgált 5 törzset nem tekinthetjük 5a vagy 5b szerotípusba tartozónak. A passzív hemagglutinációs próba és a toxingének kimutatására alapozott szerotipizálás eredménye eltérhet, mivel az utóbbi nem az antigéntermelésben felelős gént mutat ki, hanem a szerotípus és a toxintermelés közötti korrelációt használja ki (3, 7, 10, 19, 22).

A 95-féle szénforrás-hasznosítás eredménye alapján az A-85/14 törzset típusos *A. pleuropneumoniae*-ként határoztuk meg, ahol a szénforrás-hasznosítási minta 99%-os hasonlóságot mutatott a rendszer adatbázisával. A 16S rRNS szekvenálási vizsgálata alapján a törzs 99%-ban megegyezik az *A. pleuropneumoniae* baktériummal. Ezek alapján az A-85/14 *A. pleuropneumoniae* törzs egy tipikus *A. pleuropneumoniae* törzs.

Az öt 1-es biotípusba tartozó, egyik ismert szerotípusba sem besorolható *A. pleuropneumoniae* törzs közül az A-85/14-es törzset javasoltuk a 16-os szerotípus típus törzskének, amelyet elhelyeztünk az Országos Epidemiológiai Központban található Orvosi Baktériumok Magyar Nemzeti Gyűjteményében (Hungarian National Collection of Medical Bacteria HNCMB) HNCMB 96705 regisztrációs szám alatt. A törzs *rrs*-génszekvenciáját feltöltöttük a GenBankba (Accession No. SUB1098860 A-85/14 KT763387).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A munka az OTKA 84220 és 112826 pályázatok segítségével valósult meg.

IRODALOM

- BIBERSTEIN, E. L.: Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In: BERGAN, T. – NORRIS, J. R. (eds.): *Methods in Microbiology* 10. Academic Press, London, 1978. 253–269.
- BLACKALL, P. J. – KLAASEN, H. L. B. M. et al.: Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet. Microbiol.*, 2002. 84. 47–52.
- BOSSÉ, J. T. – LI, Y. et al.: Multiplex PCR assay for unequivocal differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1 to 3, 5 to 8, 10 and 12. *J. Clin. Microbiol.*, 2014. 52. 2380–2385.
- CHIERS, K. – DE WAELE, T. et al.: Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonisation, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet. Res.*, 2010. 41. 65.
- FODOR, L. – VARGA, J. – MOLNÁR, É. – HAJTÓS, I.: Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine. *Vet. Microbiol.*, 1989. 20. 173–180.
- FREY, J. – BECK, M. et al.: Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Mol. Cell Probes*, 1995. 9. 277–282.
- GOTTSCHALK, M.: The challenge of detecting herds sub-clinically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. J.*, 2015. 206. 30–38.
- GRASTEAU, A. – TREMBLAY, Y. D. N. et al.: Novel genes associated with biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 2011. 153. 134–143.
- KAMP, E. M. – VERMEULEN, T. M. M. et al.: Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infect. Immun.*, 1994. 62. 4063–4065.
- MARQUIS-CREHAN, C. – LACOUTURE, S. et al.: Development of two real-time polymerase chain reaction assays to detect *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1–9–11 and serovar 2. *J. Vet. Diag. Invest.*, 2014. 26. 146–149.
- MARSTELLER, T. A. – FENWICK, B.: *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. *Swine Health Prod.*, 1999. 7. 161–165.
- MITTAL, K. R. – HIGGINS, R. – LARIVIÈRE, S.: Detection of type-specific antigens in the lungs of *Haemophilus pleuropneumoniae*-infected pigs by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 1983a. 18. 1355–1357.
- MITTAL, K. R. – HIGGINS, R. – LARIVIÈRE, S.: Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect hemagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 1983b. 17. 787–790.
- MITTAL, K. R. – HIGGINS, R. – LARIVIÈRE, S.: An evaluation of agglutination and coagglutination techniques for serotyping *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates. *Am. J. Vet. Res.*, 1987. 48. 219–226.
- MOLNÁR, É.: Survey of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection in swine by different methods. *Acta Vet. Hung.*, 1990. 38. 231–238.

16. NICOLET, J.: Taxonomy and serological identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.*, 1988. 29. 578–580.
17. NIELSEN, R. – O’CONNOR, P. J.: Serological characterization of 8 *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 8. *Acta Vet. Scand.*, 1984. 25. 96–106.
18. ÓZSVÁRI L. – BÚZA L.: Sertéshizlaló telepek technológiai színvonalának, főbb termelési mutatóinak és légzőszervi tünetegyüttese (PRDC) menedzsmentjének összehasonlító vizsgálata. *Magy. Állatorv. Lapja*, 2015. 137. 79–92.
19. RAYAMAJHI, N. – SHIN, S. J. et al.: Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2005. 17. 359–362.
20. RELMAN, D. A.: Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. In: PERSHING, D. H. – SMITH, T. F. – TENOVER, F. C. – WHITE, T. J. (eds.): *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. *Am. Soc. Microbiol.*, 1993. 489–495.
21. SÁRKÖZI R. – MAKRAI L. – TÓTH A. – FODOR L.: Hazai *Actinobacillus pleuropneumoniae* törzsek antibiotikum-érzékenysége. *Magy. Állatorv. Lapja*. 2014. 136. 643–649.
22. TURNI, C. – SINGH, R. et al.: Evaluation of a multiplex PCR to identify and serotype *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 5, 7, 12 and 15. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2014. 59. 362–369.

Közlésre érck.: 2016. ápr. 5.

RENDEZVÉNY

MEGHÍVÓ

A Magyar Országos Állatorvos Egyesület, a Magyar Állatorvosi Kamara és a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Kar **2016. május 27-én, pénteken 11 órakor a HŐSÖK NAPJA** alkalmából az Állatorvostudományi Kar Gyógyszertani Tanszékének, Kémiai Tanszékének, valamint Központi Könyvtárának falán elhelyezett emlékművek előtt megemlékezést tart.

A Hősök Napján nemcsak az 1000 év harcaiban hősi halált halt katonák emlékét őrizzük, hanem mindazokat, akik az önkényuralom és az elnyomás ellen hazánk függetlenségéért életüket áldozták – emlékeztetett: DR. PADÁNYI MÁRIUS.

A megemlékezésre minden kollégát és állatorvos-tan-hallgatót tisztelettel vár: a Magyar Országos Állatorvos Egyesület elnöke, a Magyar Állatorvosi Kamara elnöke, a SZIE Állatorvostudományi Kar dékánja

Program

- Himnusz
- Vers – EPERJES KÁROLY
Kossuth-díjas színművész
- Emlékbeszéd – DR. BOROSS PÉTER
ny. miniszterelnök
- Koszorúzás
- Szózat

(A menzán 11.30 órától önköltségi áron kaphatnak ebédet, akik a pénztárnál bemondják: „Baráti Kör”.)

MEGHÍVÓ

A Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karának Baráti Köre **2016. május 27-én, pénteken 12.45 órakor** tartja következő találkozóját a szülészeti tanteremben (Budapest, VII. István u. 2., J ép. földszint)

Az összejövetelre minden érdeklődőt, vendégeket is tisztelettel vár a Baráti Kör vezetősége.

Program

- A Tatay Zoltán emlékérem átadása
- A szerzői jogi védelem kialakulása

Előadó: DR. VÉKÁS LAJOS akadémikus, az ELTE ÁJK professor emeritusa