

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**EMLŐSÖKBŐL IZOLÁLT  
*PASTEURELLA MULTOCIDA* TÖRZSEK  
ÖSSZEHASONLÍTÓ JELLEMZÉSE**

Ujvári Barbara

Témavezető: Dr. Magyar Tibor



**ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM**

**Állatorvostudományi Doktori Iskola**

Budapest, 2021

Témavezető:

.....

Dr. Magyar Tibor

Agrártudományi Kutatóközpont

Állatorvos-tudományi Intézet

.....

Ujvári Barbara

## Előzmények és célkitűzések

A *Pasteurella multocida* egy világszerte előforduló, Gram-negatív baktériumfaj, mely számos madár- és emlősfaj megbetegítésére képes. A légutak nyálkahártyáján megtelepedve változatos, sokszor a gazdafajra jellemző betegségek kialakításáért felelős. Az általa okozott legismertebb kórképek közé tartozik a baromfikolera, a sertések torzító orrgyulladása, valamint a szarvasmarha és a bivaly vérzések vérfertőzése. Opportunista kórokozóként gyakran szerepel a kérődzők (szarvasmarha, juh, kecske), a ló és a sertés tüdőgyulladással járó megbetegedéseiben, valamint a nyulak pasteurellosisának kialakításában. A kórokozó a hazai állatállományokban jelentős gazdasági károkat idéz elő napjainkban is, ezért a betegségek megelőzésében a hajlamosító tényezők minimalizálása, továbbá az adott régióban előforduló virulens *P. multocida* törzsek részletes ismeretén alapuló vakcina választás is kiemelt jelentőségű.

A *P. multocida* törzsek nagyfokú változatosságot mutatnak fenotípusos és genotípusos jellemzőik tekintetében is. A baktériumtörzsek jellemzésének első lépését a

hagyományos biokémiai módszerekkel való fajazonosítás, a cukrok és cukoralkoholok fermentációján alapuló biotípus elkülönítés, illetve a burok és a sejtfal antigének alapján történő szerológiai besorolás képezi. Munkánk elsődleges céljaként hazai izolálású törzsek részletes jellemzését választottuk, szerológiai, biokémiai és molekuláris biológiai eljárások segítségével. A kórokozó azonosítása fajspecifikus polimeráz láncreakcióval (PCR), az egyedi (*kmt1*) génszekvenciára tervezett oligonukleotidok segítségével gyors és biztos módszert jelent. További, PCR és szekvencia alapú módszerekkel a törzsek differenciálása, a köztük lévő filogenetikai kapcsolatok feltárása és járványtani nyomozás is megvalósítható. A törzsek diverzitásának vizsgálata mellett a különböző kórképekből származó izolátumok közötti különbségeket is szeretnénk volna feltárni. További célunk volt a betegség kialakításáért felelős virulens törzstípus(ok) azonosítása.

Napjainkban egyre aggasztóbb méreteket ölt az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia terjedése, ezért a *P. multocida* törzsek antibiotikum-rezisztencia vizsgálata és a mögötte álló genetikai háttér felderítése is szerepelt a terveink között. A *P. multocida* számos virulenciafaktorral rendelkezik, melyek között a sertések

torzító orrgyulladásáért felelős toxintermelés, valamint a gazdaszervezet kolonizációjában kiemelkedő szerepű adhezinek is megtalálhatók. Az adhézióért felelős struktúrák feltárása napjainkban a *P. multocida* kutatások egyik alapvető irányvonalát jelenti, így munkánkban a fenti folyamatokkal kapcsolatba hozható virulencia gének vizsgálatára is nagy figyelmet fordítottunk.

Eredményeink hasznos információkat nyújthatnak a hazai sertés és szarvasmarha állományokban jelen lévő főbb törzstípusok virulenciafaktorainak és gazdafaj-specifitásának tekintetében is. A kutatás eredményei a tudományos ismeretek bővítése mellett a számottevő gazdasági veszteségeket okozó megbetegedések korszerűbb és hatékonyabb diagnosztikájának, valamint új, a törzsek részletes ismeretén alapuló védekezési eljárások kidolgozásának is alapfeltételét jelenthetik.

## **Anyag és módszer**

### **A felhasznált baktériumtörzsek**

Összesen 185 db *P. multocida* törzset vontunk be a vizsgálatba, melyek szarvasmarha, juh, kecske, sertés, macska gazdafajból és humán esetekből kerültek izolálásra Magyarországon, 1988 és 2018 között. A humán esetekből izolált törzseket a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ bocsátotta rendelkezésünkre.

### **A törzsek tenyésztése és azonosítása**

A törzseket 20% zsírszegény tejpor oldatban (Skim milk powder, BD Difco), -70°C-on tároltuk. A vizsgálatokhoz a mélyfagyasztott baktérium kultúrából kioltott, 5% birkavérrel kiegészített táptalajon (Columbia agar, LAB M) 37°C-on 24 órán át inkubált tenyészeteket használtuk. A telepeket a biokémiai vizsgálatokhoz marha agy-szív kivonatot (Brain-heart infusion, Merck) tartalmazó táplevesbe oltva szaporítottuk, a szerológiai vizsgálatokhoz pedig burgonya-keményítő táptalajon (Dextrose Strach agar, BD Difco) készítettünk

pázsittenyészetet. A lemezeket 37°C-on, 24 órán keresztül inkubáltuk.

## **A törzsek fenotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok**

Az izolátumok fenotípusos jellemzéséhez biokémiai próbákat végeztünk. A baktériumok ornitin-dekarboxiláz aktivitását hagyományos levestáptalajok alkalmazásával (Millipore, Ornithine Decarboxylase Broth), szénhidrát hasznosító képességét pedig laktóz, arabinóz, maltóz, xilóz, trehalóz, dulcitol és szorbit tartalmú táplevesekben vizsgáltuk.

A *P. multocida* törzsek szerotípusát agargél-precipitációs (AGP) próbában határoztuk meg. A tesztben használt hőstabil antigéneket Heddleston és mtsai. (1972) módszere alapján állítottuk elő.

Az antibiotikum-érzékenységet az összes vizsgált *P. multocida* törzs esetében meghatároztuk korongdiffúziós módszerrel. A törzseket a CLSI által kiadott ajánlásnak megfelelően vizsgáltuk (CLSI, 2018a). A részletes vizsgálatba vont Pm238 azonosítóval ellátott törzs esetében az antibiotikum rezisztencia viszonyokat minimális gátló koncentráció (MIC – minimal inhibitory concentration) meghatározással is felmértük, melyhez

MIC tesztcsíkokat alkalmaztunk (Liofilchem, Roseto, Italy).

### **A törzsek genotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok**

A törzsek faji besorolásának megerősítésére multiplex PCR reakciót alkalmaztunk. A módszer segítségével a fajspecifikus régió (*kmt1*), a toxingén, valamint az A buroktípusra jellemző génszakasz egyidejű kimutatását tudtuk elvégezni. (Townsend és mtsai., 1998b; Gautam és mtsai., 2004; Register és DeJong, 2006). Az A buroktípus meghatározásához a fent leírt kombinált multiplex PCR reakciót alkalmaztuk. Az egyéb buroktípusok (B, D, E, F) detektálására buroktipizáló PCR-t használtunk (Townsend és mtsai., 2001). A törzsek LPS genotípusát az LPS PCR segítségével határoztuk meg (Harper és mtsai., 2015).

A *P. multocida* fajon belül a két fő leszármazási vonalat a 16S riboszómális RNS génjének PCR-RFLP (polimeráz láncreakciót követő restrikciós hasításon alapuló fragmenthossz polimorfizmus) módszerrel különítettük el egymástól (Sellyei és mtsai., 2012).



Az I és IV típusú fimbria alegység gének (*fimA*, *ptfA*), autotranszporter adhezinek (*hsf1*, *hsf2*), az FliP fimbria összeállításáért felelős szekréciós apparátus alkotóeleme (*tadD*), és a filamentózus haemagglutinin (*pfhA*) génjének azonosítására az irodalomban leírt PCR reakciókat használtuk (Sellyei és mtsai., 2010; Tang és mtsai., 2009). A vaskötő fehérjéket kódoló gének (*hgbA*, *hgbB*, *tbpA*) és a *nanH* neuraminidáz génjének kimutatását Ewers és mtsai. (2006) és Atashpaz és mtsai. (2009) által leírtak szerint végeztük el.

A kloramfenikol (*catAIII*), szulfonamid (*sulIII*), és sztreptomycin (*strA*) rezisztencia géneket Kehrenberg és mtsai. (2001), a tetraciklin (*tetB*) rezisztencia kialakításáért felelős génszakaszt Aminov és mtsai. (2002) munkája alapján mutattuk ki. A *parC* génszakaszt célzó PCR reakciót Katsuda és mtsai. (2009) közleménye alapján végeztük el. A Klima és mtsai. (2014) által kidolgozott ICEPmu1 mobilis genetikai elemmel asszociált géneket célzó PCR reakciókat is elvégeztük. A plazmid izolálást Quiagen Plasmid Mini kit (Hilden, Németország) használatával végeztük el.

Az *ompA* külső membrán fehérje génjének filogenetikai elemzését 94 db *P. multocida* törzs esetében végeztük el, melyeket földrajzi elterjedésük, szerotípusuk

és virulenciagén profiljuk alapján választottunk ki. Az *ompA* génszakasz amplifikálását Katoch és mtsai. (2014) munkája alapján végeztük el. A PCR termékek szekvenálását a Macrogen Europe cég végezte (Amszterdam, Hollandia). A részleges *ompA* gén szekvenciák illesztését a BioEdit programmal (7.2.3. verzió) végeztük el (Hall, 2011). A nukleotid szekvencia adatokat a MEGA7 szoftverrel elemeztük tovább (Kumar és mtsai, 2016). A távolságokat a Neighbour-Joining algoritmus segítségével állapítottuk meg (Saitu és Nei, 1987).

A vérzésemes vérfertőzés esetekből izolált törzseket a Multi-host MLST séma alkalmazásával jellemeztük (Davies és mtsai., 2004). A macska eredetű és a humán esetekből izolált törzsek MLST vizsgálatát Subaaharan és mtsai. (2010) munkájában leírt RIRDC MLST séma szerint végeztük el. A PCR termékek szekvenálását a Macrogen Europe cég végezte (Amszterdam, Hollandia). A DNS szekvenciák illesztését a BioEdit programmal (7.2.3. verzió) végeztük el (Hall, 2011). A nukleotid szekvencia adatokat a MEGA7 szoftverrel elemeztük tovább (Kumar és mtsai, 2016). A távolságokat a Neighbour-Joining algoritmus segítségével állapítottuk meg (Saitu és Nei, 1987).

## Eredmények

### **A baktériumok fenotípusos vizsgálatainak eredményei**

A szarvasmarha, juh, kecske és sertés eredetű törzsek esetében az A és D biotípust azonosítottuk. A humán megbetegedésekből származó törzseket az A és F biotípusba soroltuk, míg a macska eredetű izolátumok mindegyike az A típust képviselte.

Az LPS tipizálás során az L3 és L6 LPS genotípust azonosítottunk a szarvasmarha és a juh eredetű izolátumokban. A kecske és sertés eredetű törzsek esetében csak az L3 LPS genotípus fordult elő. A humán esetekből izolált *P. multocida* törzsek esetében öt különböző LPS genotípus is azonosítható volt (L1, L3, L4, L5 és L7). A macska eredetű *P. multocida* izolátumokra az L1 (72,7%), az L3 (9,1%) és az L7 (18,2%) LPS genotípus volt jellemző.

A biotípusokat az LPS genotípusokkal kombinálva a szarvasmarha, juh és sertés eredetű izolátumok esetében az A:L3 volt a leggyakoribb. A kecske eredetű törzsek esetében a D:L3 kombináció volt a leggyakoribb, míg a humán és macska gazdafajból

származó izolátumokra az A:L1 volt a legnagyobb számban jellemző.

### **A baktériumok genotípusának meghatározása**

A *P. multocida* toxint kódoló *toxA* génszakasz minden juh eredetű törzsben azonosítható volt, és jelentős arányban fordult elő a kecske (40%) és sertés (55%) eredetű izolátumokban is. Humán, macska és szarvasmarha eredetű törzsekben viszont nem volt kimutatható. A kecske eredetű *P. multocida* törzsekben a *toxA* génszakasz csak tüdőgyulladásos esetekből izolált, D buroktípusú törzsekben volt detektálható. Tüdőgyulladásos esetekből származó sertés eredetű izolátumok esetében a *toxA* génszakasz alacsonyabb százalékban volt jelen (38,8%), mint az orrtampon mintákból izolált törzsekben (68,2%). A buroktípussal összevetve megállapítottuk, hogy a *toxA* génszakasz nagyobb gyakorisággal fordult elő A buroktípusú törzsekben, mint a D buroktípusú izolátumokban, a tüdő (40%) és orrtampon (71,4%) eredetű mintákban egyaránt.

Az I. típusú fimbria alegységét kódoló *fimA* génszakasz minden *P. multocida* törzsben megtalálható volt, ezért a további adatelemzésből kihagytuk. A további kilenc virulenciagén megléte vagy hiánya alapján 13

különböző virulenciagén profilt (VGP) állítottunk fel. Kevés kivétel mellett megállapítottuk, hogy minden VGP csak egy gazdafajra volt jellemző. A szarvasmarha eredetű *P. multocida* törzsek a VGP 1, 2, vagy 3 csoportba tartoztak, melyek közül a VGP 1 volt a legnépesebb (61,7%). A juh eredetű izolátumokra a VGP 4 és 5 volt jellemző, melyek közül a VGP 5 volt a gyakoribb (67%), a kecske eredetű törzsek mindegyike a VGP 5 virulenciagén profiljával rendelkezett. A sertés eredetű izolátumok összesen négy virulenciagén profilba voltak besorolhatók (VGP 6-9). A macska eredetű izolátumok a VGP 12 (82%) és a VGP 13 (18%) profilokba kerültek. A humán esetekből származó törzsek viszont nagyobb változatosságot mutattak, összesen hatféle virulenciagén profil volt rájuk jellemző (VGP 6, 9-13). A hatból négy esetben más gazdafajok (sertés, macska) társaságában helyezkedtek el.

Az *ompA* génszakasz szekvencia analízise során a 94 törzsben összesen 25 egyedi, de közeli rokonságot mutató szekvencia típus volt elkülöníthető, melyek kilenc klasztert alkottak (*ompA* klaszter A-I). Az *ompA* klaszterek és a virulenciagén profilok között korrelációt lehetett felfedezni.

## Humán esetekből származó *P. multocida* izolátumok

Összesen 15 db, humán esetekből származó izolátumot vizsgáltunk. Az izolátumok többsége A buroktípussal rendelkezett (14/15), míg egy esetben az F buroktípus bioszintézis génjét (*fcbD*) azonosítottuk. A humán megbetegedésekből izolált törzseket általában a Heddleston 1-es (53%) és 3-as (40%) szerotípusba soroltuk be, de egy esetben a 6-os szerotípust is azonosítottuk. A *P. multocida* toxint kódoló génszakaszt egyik esetben sem tudtuk kimutatni.

A törzsek nagy többsége a *septica* alfajba tartozott (12/15 törzs, 80%). Összesen hat különböző biotípusba tudunk besorolni a vizsgált *P. multocida* izolátumokat. A 2-es, 3-as és 7-es biotípust azonosítottuk a leggyakrabban, de egyedi esetekben a 6-os, 9-es és 10-es biotípust is detektálni tudtuk.

A RIRDC MLST adatok alapján összesen 9 új szekvencia típust határoztunk meg, közülük három ST-t (ST 333, 334 és 336) több törzs esetében is azonosítani tudtuk. Megállapítottuk, hogy a *P. multocida* subsp. *septica* és subsp. *multocida* törzsek a fajon belül két jól elkülönülő leszármazási vonalat képviseltek.

## **B:2 típusú *P. multocida* törzsek**

2013 augusztusában egy eddig hazánkban nem tapasztalt megbetegedést észleltek háztáji sertésállományokban. Az esetekből három, különböző sertésállományból származó baktériumtörzset izoláltunk, melyeket *P. multocida* ssp. *multocida*ként azonosítottunk. A törzsek mindegyike a 3-as biotípusba tartozott. A törzsek mindegyike B buroktípusúnak és 2-es szomatikus szerotípusúnak bizonyult. A Multi-host MLST vizsgálat során kapott adatok alapján egy új szekvencia típust (ST61) írtunk le. A RIRDC MLST séma alkalmazásával a vizsgált törzseket a vérzésem vérfertőzést okozó törzsekre jellemző 122-es szekvencia típusba soroltuk be.

2016 júliusában borjakat érintő haemorrhagiás szeptikémia esetekből származó *P. multocida* törzseket mutattunk ki. Két, az állományból származó baktériumtörzset *P. multocida* ssp. *multocida*ként határoztunk meg, és részletesen megvizsgáltunk. A törzseket a 3-as biotípusba soroltuk be, melyek a haemorrhagiás szeptikémia esetekre jellemző B buroktípussal és 2-es szerotípussal rendelkeztek. A Multi-host MLST vizsgálat során kapott adatok alapján egy új szekvencia típust (ST64) írtunk le, mely egy allélban tér el (*aroA*) a háztáji sertésekben azonosított ST61-től. A

filogenetikai vizsgálatok során a Multi-host MLST adatbázisban fellelhető törzsek szekvencia adataival vetettük össze saját adatainkat. Az elemzés során a B:2 szerotípusú vérzésemis vérfertőzést okozó törzsek egy jól elkülönülő klasztert alkottak.

### **Az antibiotikum-érzékenység vizsgálata**

Vizsgálataink alapján a törzsek nagy többsége érzékeny volt florfenikolra (98,7%), kloramfenikolra (93,7%), ampicillinre (91,8%), penicillinre (91,1%), enrofloxacinra (88,6%) ceftiofurra (88%), tulatromicinre (79,1%), tetraciklinre (86,7%), tilmikozinra (86,1%), és doxiciklinre (82,9%). A gentamicin, eritromicin, sztreptomycin, és nalidixsav kevésbé bizonyultak hatékonyaknak (44,9%, 23,4%, 27,2% és 13,9% rezisztencia), ugyanakkor a mérsékelten érzékeny törzsek aránya magas volt eritromicinre (71,5%) és gentamicinre (32,3%) is. A törzsek nagy számban rezisztensek voltak apramicinnel (87,3%), klindamicinnel (97,5%) és szulfonamidokkal (97,5%) szemben.

A részletes vizsgálatba vont Pm238 azonosítóval ellátott *P. multocida* törzset az A buroktípusba és a 3-as Heddleston szerotípusba soroltuk be. A törzset a 9-es biotípusba soroltuk be. A RIRDC MLST vizsgálatban a



törzs 79-es szekvencia típusúnak bizonyult. A MIC tesztek alapján megállapítottuk, hogy a Pm238 rezisztenciát mutatott sztreptomocinnal, tetraciklinnel, doxiciklinnel, eritromocinnal, klindamicinnal, kloramfenikollal, szulfametoxazollal, enrofloxaccinnal, és nalidixsavval szemben. A Pm238 nem rendelkezett plazmiddal. Másrészt, összhangban a fent ismertetett antibiotikum rezisztencia fenotípussal, PCR reakciók segítségével sikeresen ki tudtuk mutatni a kloramfenikol (*catAIII*), szulfonamid (*sulII*), sztreptomocin (*strA*), és tetraciklin (*tetB*) rezisztencia kialakításáért felelős génszakaszokat. A Klima és mtsai. (2014) által kidolgozott ICEPmu1 mobilis genetikai elemmel asszociált géneket célzó PCR reakciókban is negatív eredményt kaptunk. A kinolon rezisztencia kialakításáért felelős pontmutációkat is azonosítottunk a topoizomeráz IV (*parC*) génszakasz szekvencia analízisével, mely a 84-es kodon aminosav cseréjét jelentette (Glu → Lys).

## Megbeszélés

### Virulenciagén profil meghatározás és *ompA* szekvencia elemzés

Munkánk során változatos gazdafajokból izolált *P. multocida* törzseket vizsgáltunk, és részletesen jellemeztük a buroktípusuk és LPS genotípusuk meghatározásával. Összesen nyolc buroktípus-LPS genotípus kombinációt tudtunk azonosítani, melyek közül az A:L3 volt a leggyakoribb.

A sertések torzító orrgyulladásának kialakításáért a *P. multocida* toxin (PMT) felelős (Magyar és Lax, 2002). Ezért, a PMT magas előfordulási aránya sertés eredetű izolátumokban (55%) nem meglepő. Az is logikusnak tűnik, hogy toxintermelő törzsek nagyobb arányban voltak izolálhatóak orrtampon mintákból (68,2%), ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy *toxA*-pozitív törzseket viszonylag nagy arányban tudtunk kimutatni tüdőgyulladásos esetekből is (38,8%). Ezen kívül a *toxA* génszakaszt jelentős mértékben tudtuk kimutatni juh és kecske eredetű törzsekben is (100% és 40%). Újdonság ugyanakkor, hogy 100%-os prevalenciáról korábban nem számoltak be (Ewers és mtsai., 2006; Shayegh és mtsai.,

2009; García-Alvarez és mtsai., 2017). A sertésekkel ellentétben, a PMT kiskérődző gazdafajokban játszott kórtani szerepének tisztázása továbbra is várat magára.

A *P. multocida* kórokozó képességének megértése szempontjából a virulenciagének tanulmányozása kiemelten fontos, és ígéretes eszköznek tűnik az izolátumok jellemzésére. A virulenciagének vizsgálata során virulenciagén profilokat (VGP) állítottunk fel a vizsgált *P. multocida* törzsek esetében. A *P. multocida* izolátumok virulenciagén profiljának összehasonlítása megerősítette a baktériumfaj diverzitásáról alkotott elképzeléseket, felfedve legalább 13 virulenciagén profil létezését, ráadásul ezek a csoportok figyelemre méltó összefüggéseket mutattak a gazdafaji eredettel. Számos korábbi publikáció említést tett már arról, hogy az *ompA* külső membrán fehérje génjének szekvencia variabilitása hatással van a *P. multocida* virulenciájára (Harper és mtsai., 2006; Katoch és mtsai., 2014; E-kobon és mtsai., 2017). Munkánk során az *ompA* szekvencia típusokra jellemző eltéréseket azonosítottunk a különböző gazdafaji eredetű és eltérő virulenciagén profillal rendelkező *P. multocida* törzsek között, ami a törzsek gazdafaj preferenciájára és az izolátumok klonalitására utal. Eredményeink alapján elmondható, hogy a virulenciagén

profilok meghatározása az *ompA* szekvenálással együtt értékes eszközként szolgálnak a *P. multocida* diverzitásának és gazdafaj adaptációjának vizsgálatához.

### **Humán esetekből izolált *P. multocida* törzsek jellemzése**

Az irodalmi adatokkal összhangban (Boyce és mtsai, 2010; Ewers és mtsai., 2006), a humán izolátumok esetében az A típus bizonyult leggyakoribb buroktípusnak, ugyanakkor, humán eredetű *P. multocida* esetében első alkalommal az F buroktípust is sikerült azonosítanunk az általunk vizsgált törzsek között. A leggyakrabban előforduló buroktípus - LPS genotípus kombináció az A:1 és A:3 voltak, melyek gazdafajtól függetlenül a legelterjedtebb típusok (Boyce és mtsai., 2010). De a ritkán előforduló 6-os Heddlestone szerotípust is azonosítottuk. A *P. multocida* törzsek alfaját fontos epidemiológiai markernek tekintik, és leggyakrabban a *multocida* alfaj előfordulásáról számolnak be a publikációk (Fegan és mtsai., 1995; Blackall és mtsai., 1997; Ekundayo és mtsai., 2008). Ez alól kivételt jelentenek a macska és kutya eredetű izolátumok, melyek általában a *septica* alfajba tartoznak (Kuhnert és mtsai., 2000). A humán izolátumokra vonatkozó vizsgálataink

során mi is a *septica* alfajt azonosítottuk a leggyakrabban. Az általunk elvégzett multi-lókuszos szekvencia tipizálás eredményei megerősítik azt a korábbi megállapítást (Blackall és mtsai., 1998), miszerint a *P. multocida* subsp. *septica* és subsp. *multocida/gallicida* törzsek két, egymástól jól elkülönülő leszármazási vonalat képviselnek a fajon belül.

### **B buroktípusú *P. multocida* törzsek jellemzése**

2013 augusztusában egy eddig hazánkban nem tapasztalt, B buroktípusú *P. multocida* által okozott megbetegedést észleltünk háztáji sertésállományokban. Ezt követően, 2016 júliusában szarvasmarha vérvézéses vérfertőzés esetekből származó, ugyancsak B buroktípusú *P. multocida* törzseket azonosítottunk.

Az általunk izolált háztáji sertésállományokból származó *P. multocida* törzsek között a klasszikus és a molekuláris módszerek sem mutattak ki különbséget, ami arra utal, hogy a különböző portákon felbukkant kórokozók egy közös forrásból származhattak. Az MLST szekvencia analízis eredménye alapján továbbá elmondható, hogy a vizsgált B:2 típusú törzsek közeli rokonságban állnak a korábban már elemzett különböző gazdafajokból izolált vérvézéses vérfertőzést okozó

törzsekkel. Az Európában izolált törzsekkel összevetve megállapíthatjuk, hogy a spanyolországi megbetegedéseket okozó törzs (Cardoso-Toset és mtsai., 2013) nem azonos az itt ismertetett esetekből származó izolátumokkal. A Soike és mtsai. (2011) által publikált németországi járvány során talált vérzésem vérfertőzést okozó baktériumot a világszerte előforduló RIRDC 122-es szekvencia típusként írták le (Petersen és mtsai., 2014), amelybe a most bemutatott esetből izolált törzsek is tartoznak. Ebből következően a német és magyar esetek közti járványtani kapcsolat jelen eredmények alapján egyértelműen nem igazolható, de nem is zárható ki.

### **Antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok**

Az antibiotikum-rezisztencia terjedése miatt a patogén baktériumok vizsgálata kiemelt jelentőségű, így a *P. multocida* antibiotikumok iránti érzékenységét is számos korábbi vizsgálat elemezte. A szakirodalmi adatok az izolálás földrajzi helyétől függően változatosságot mutatnak. A *P. multocida* multirezisztenciájának terjedése miatt az izolátumok antibiotikum érzékenységének folyamatos monitorozására kiemelt figyelmet kell fordítani. A Pm238-

as törzshöz hasonló multirezisztens izolátumok megjelenése azt bizonyítja, hogy egyetlen klón akár többszörösen is szert tehet rezisztenciagénekre. Eredményeinkből az is következik, hogy a *P. multocida* többféle úton is multirezisztenssé válhat, ami egyre inkább veszélyeztetheti az antibiotikumok terápiás hatékonyságát, és támogathatja a kórokozó terjedését. A *P. multocida* multirezisztenciáját kialakító mechanizmusok jobb megismerése és a rezisztencia patogén baktériumfajok közötti terjedésének megakadályozása napjaink legfontosabb kihívásai között szerepel a humán- és állatgyógyászatban egyaránt.

## Új tudományos eredmények

1. Elsőként állapítottuk meg hazai kiskérődző állományokban a *P. multocida* toxint termelő törzseinek igen magas előfordulási arányát.
2. A virulenciát meghatározó gének előfordulását vizsgálva 13 különböző virulenciagén profilt írtunk le, melyek kevés kivétellel csak egy-egy gazdafajra voltak jellemzőek.
3. Az *ompA* génszakasz szekvencia elemzése során összesen 25 egyedi szekvencia típust különítettünk el, melyek kilenc klasztert alkottak. Ezek összefüggést mutattak a virulenciagén profilokkal és a törzsek gazdafaji eredetével.
4. Elsőként végeztük el magyarországi eredetű humán esetekből izolált *P. multocida* törzsek részletes összehasonlító vizsgálatát, melynek során kimutattuk a macska eredetű izolátumokkal való nagyfokú hasonlatosságot, utalva ezzel a zoonótikus eredetre.
5. Sertésben első alkalommal, szarvasmarhában pedig hosszabb szünet után újból igazoltuk a B:2 típusú



*P. multocida* törzsek hazai előfordulását. Elvégeztük az izolátumok részletes vizsgálatát, összevetve az adatokat az Európában az utóbbi időben felbukkant B:2 típusú *P. multocida* törzsek tulajdonságaival.

6. Nagyszámú, különböző emlősfajokból származó *P. multocida* törzs antibiotikum-érzékenységét határoztuk meg. Az antibiotikum-rezisztencia genetikai hátterét vizsgálva egy multirezisztens *P. multocida* törzs esetében megállapítottuk, hogy a törzs valószínűleg több egymást követő géntranszfer lépésben halmozta fel a rezisztencia géneket, nem pedig plazmid vagy multirezisztens transzferálható elem konjugációs átvitelével.

## A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

### Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Ujvári, B., Szeredi, L., Pertl, L., Tóth, G., Erdélyi, K., Jánosi, S., Molnár, T., Magyar, T., 2015. First detection of *Pasteurella multocida* type B: 2 in Hungary associated with systemic pasteurellosis in backyard pigs. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63, 141-156.

IF: 0,871

Ujvári, B., Szeredi, L., Pertl, L., Erdélyi, K., Tóth, G., Jánosi, S., Molnár, T., Magyar, T., 2016. B: 2 típusú *Pasteurella multocida* törzsek okozta megbetegedés előfordulása sertésekben. Irodalmi összefoglaló és esetismertetés. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 138, 333-346.

IF: 0,189

Magyar, T., Ujvári, B., Szeredi, L., Virsinger, N., Albert, E., Német, Z., Csuka, E., Biksi, I., 2017. Re-emergence of bovine haemorrhagic septicaemia in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 65, 41-49.

IF: 1,042

Ujvári, B., Makrai, L., Magyar, T. 2018. Characterisation of a multiresistant *Pasteurella multocida* strain isolated from cattle. Acta Veterinaria Hungarica, 66, 12-19.

IF: 1,059

Ujvári, B., Weiczner, R., Deim, Z., Terhes, G., Urbán, E., Tóth, A. R., Magyar, T. 2019. Characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from human infections. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 63, 37-43.

IF: 1,573

Ujvári B., Makrai L., Magyar T. 2019. Virulence gene profiling and *ompA* sequence analysis of *Pasteurella multocida* and their correlation with host species. Veterinary Microbiology. 233, 190-195.

IF: 3,03

Ujvári B., Magyar T. 2020. A szarvasmarhák *Pasteurella multocida* okozta légzőszervi megbetegedése. Irodalmi összefoglaló. Magyar Állatorvosok Lapja, 142, 3-14.

IF: 0,107

**A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó publikációk**

Magyar, T., Gyuris, É., Ujvári, B., Metzner, M., Wehmann, E. 2019. Genotyping of *Riemerella anatipestifer* by ERIC-PCR and correlation with serotypes. Avian Pathology, 48, 12-16.

IF: 2,338

Nemes, Cs., Schauta, M., Simonyai, E., Turbók, J., Ujvári, B., Magyar T. 2020. *Riemerella anatipestifer* okozta agyburokgyulladás előnevelt pulyka állományban (esetismertetés). Magyar Állatorvosok Lapja, 142, 87-93.

IF: 0,107

Ujvári, B., Szeredi, L., Magyar, T. 2020. Detection of *Frederiksenia* sp. isolated from a cat with nephritis. Acta Veterinaria Hungarica, 68, 140–146.

IF: 0,991

Ujvári, B., Orbán, B., Incze, Zs., Psáder, R., Magyar, T. 2020. Occurrence of *Pasteurellaceae* and *Neisseriaceae* bacteria in the pharyngeal and respiratory tract of dogs and cats. Acta Veterinaria Hungarica, In Press.

IF: 0,991

## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Magyar Tibornak, az ATK Állatorvos-tudományi Intézet igazgatójának, aki lehetővé tette, hogy az általa vezetett Légzőszervi bakteriológia témacsoportban végezhessem a disszertációmmal kapcsolatos kutatómunkát, és biztosította ennek feltételeit. Köszönöm, hogy nagy tapasztalattal és szakértelemmel irányította a kutatás menetét, és segítette a publikációk megjelenését.

Köszönöm Dr. Wehmann Enikőnek, Hegedűs Évának és Schihlgruberné Oryszcsák Katalinnak, hogy tapasztalataikat és tudásukat megosztották velem, és elméleti és gyakorlati kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Ez úton szeretném megköszönni a gyakorló kollégáknak, hogy a munkánk során felhasznált törzseket rendelkezésünkre bocsátották.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak és barátaimnak a türelmüket és a támogatásukat.