



Marosvásárhelyen izolált *Bacteroides* törzsek enterotoxingén- és plazmidhordozásának felmérése

Sóki József¹, Székely Edit^{2,3}, Molnár Szabolcs³, Szász Izabella², Bilca Doina², Nagy Erzsébet¹, Urbán Edit¹

¹Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged

²Maros Megyei Sürgősségi Kórház, Marosvásárhely

³Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Mikrobiológiai Tanszék, Marosvásárhely

Kivonat

Jelen tanulmányban a Marosvásárhelyen 2010–2013 folyamán izolált klinikai *Bacteroides* törzsek genetikai vizsgálatáról (plazmidok, *bft*-gén) számolunk be. A kis molekulatömegű, kriptikus plazmidok (2,7, 4,1 és 5,6 kb) előfordulása a magyarországi adatokhoz állt közel, és az 5,6 kb-os plazmid a *B. fragilis* törzsekhez mutatott asszociációt. Az enterotoxint kódoló *bft*-gének gyakorisága az európai csoportokban észlelt génarányoknak felelt meg.

Kulcsszavak: : *Bacteroides*, *bft*, kriptikus plazmidok

Assessment of the prevalence of enterotoxin genes and plasmids among *Bacteroides* strains isolated at Targu-Mures

In this study we report the genetic analysis (plasmids and *bft* genes) of clinical *Bacteroides* strains isolated during 2010–2013 at Targu-Mures. The prevalence of small molecular weight, usually cryptic, plasmids (2.7, 4.1 and 5.6 kb) showed similar figure to that in Hungary and the 5.6 kb plasmid type displayed an association to *B. fragilis* strains. The prevalence of the enterotoxin-coding *bft* gene corresponded to that of in other European populations.

Keywords: *Bacteroides*, *bft*, cryptic plasmids

A normál bélflórában gyakori szigorúan anaerob *Bacteroides* fajok (a béltartalom összcseírászámának 30%-át adják) fontos szimbionta szerepük mellett fontos opportunistáknak – megfelelő predisponáló körülmények között enterális, felületi, lágy szöveti fertőzéseket, tüdő- és agytályogot, hasüregi tályogot és vérfermentációt okozhatnak. Ilyenkor az egyébként a bélflórában ritka (cca. 1%) *Bacteroides fragilis* faj válik dominánssá, az összes *Bacteroides* okozta fertőzések mintegy 80%-át adva. A *B. fragilis* fő patogenitási faktorai az abscessus- és interleukinindukáló ikerionos szerkezetű kapszularis polisacharidok (CPS A-H), az oxidatív stressz ellenes mechanizmusok és az enterotoxikus hatású fragilizin-proteáz [1]. Ezt az enterotoxint az 1980-as években mutatták ki először bányások és fiatal emlősök hasmenéses mintáiból [2, 3]. A génjének (*bft*) klónozását és a gyorsabb laboratóriumi kimutatását HT29 kolonkarcinóma szövettenyésztetre gyakorolt citopátiás hatása tette lehetővé [4, 5]. A *bft*-génnek három altípusa ismert (*bft1-3*), amelyek közül a 2-es inkább gyermekekben okoz hasmenést

[6], a 3-as pedig inkább a Távol-Keleten elterjedt [7]. A hatásmechanizmusa a bélepitél sejtek zonula adherens kapcsolataiban fontos szerepet játszó E-cadherin protein hasításán alapul, amely β -catenin-felszabadulással, aktindezorganizációval és a c-myc aktiválásával jár [8]. A *bft1*-gén egy kisebb kromoszomális szigeten lokalizálódik, amely egy konjugatív transzpozonba inszertált, lehetővé téve a vertikális transzmissziót [9, 10]. A klinikai mintákból izolált *Bacteroides* törzsekre jellemző, hogy körülbelül 50%-uk a kis plazmidok három típusát (2,7, 4,1 és 5,6 kb) hordozza, amelyeknél az azonos molekulaméret homológ DNS-szekvenciát is jelent. Elterjedtségük ellenére szerepük nem ismert, így crypticusnak tekintjük őket. Mindhárom típus szekvenciája ma már ismert, és a legnagyobb, 5,6 kb-os típus esetén a szokásos plazmidfunkciók mellett (replikációs, mobilizációs és stabilitási) egyéb géneket is hordoznak (*orf1*, *orf2*) [11].

Romániában az anaerob mikrobiológia terén inkább az orális patogének kimutatása és diagnosztikája fejlett [12–16]. A *Bacteroides*ek diagnosztikájában viszont jelentős

Dr. Sóki József

Szegedi Tudományegyetem

Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet

6725 Szeged, Semmelweis u. 6., Magyarország

Tel/fax: +36 62 545712

e-mail: soki.jozsef@med.u-szeged.hu

előrelépést tett a Maros Megyei Klinikai Sürgősségi Kórház Mikrobiológiai Laboratóriuma: 2011 és 2013 között súlyos anaerob fertőzésekben izolált *Bacteroides* törzsek ($n=53$) esetén felmértük az antibiotikumrezisztencia-szinteket és rezisztenciagének előfordulását [17]. Jelen tanulmány ezen törzsek esetén vizsgálta a *bft* enterotoxingén és a crypticus plazmidok hordozását.

Anyagok és módszerek

Baktériumtörzsek és tenyésztésük

Összesen 53, a *Bacteroides fragilis* csoportba tartozó törzs (37 *B. fragilis*, 7 *B. thetaiotaomicron*, 7 *B. ovatus* és 2 *B. vulgatus*) került izolálásra a 2010–2013-as időszakban a Maros Megyei Sürgősségi Klinikai Kórház Diagnosztikai Laboratóriumában Marosvásárhelyen. A törzsek klinikai jelentőséggel bíró mintákból származtak, amelyek főleg abdominális és sebváladékok voltak, illetve hemokultúrákból származtak. A törzsek izolálása a nemzetközileg elvárt klinikai mikrobiológiai rutin diagnosztikai módszereknek megfelelően történt, a törzseket ezt követően MALDI-TOF tömegspektrometriai módszerrel is azonosítottuk [18]. A törzseket 20% glicerintartalmú agy-szív kivonat (Brain-Heart Infusion, BHI) tápfolyadékban tároltuk -70°C -on, növesztésük pedig kiegészített BHI-tápfolyadékban (0,5% élesztőkivonat, 5 g/l haemin és 1 g/l K1-vitamin) vagy kiegészített Columbia agaron (5% birkavér, 5 g/l haemin és 1 g/l K1-vitamin) anaerob kamrában (oxigénmentes közegben) történt 37°C -on 48 órán át.

Genetikai analízis

A fragilizin-proteáz kódozó *bft*-gén kimutatását a korábban leírtak szerint végeztük [10]. A plazmidanalízis a módosított, Birnboim és Doly által leírt alkalikus lízis módszerrel történt [19]. A plazmidokat 0,7%-os agaróz gélelektroforézissel detektáltuk 0,5 $\mu\text{g/ml}$ etidium-bromid alkalmazása mellett, 0,5x TBE (22,5 mM Trisz-borát, 1 mM EDTA pH 8,2) pufferben és 5 V/cm feszültséggradienst alkalmazva. A plazmidok molekulatömegének meghatározását az *Escherichia coli* V517 törzs markerplazmidjaival való összehasonlítással végeztük [11].

Statisztikai elemzés

χ^2 -próbát a Sigmaplot 12 alkalmazással (Systat Software, Németség) végeztük a szignifikanciaküszöb 0,05 értéken való rögzítése után.

Eredmények és megbeszélés

A genetikai vizsgálatok egyes törzsenkénti eredményeit az 1. táblázat tartalmazza. Az 53 vizsgált törzsből 21 (12 *B. fragilis* és 9 nemfragilis *Bacteroides*, NFB) hordozott plazmidot. A többes plazmidhordozás (≥ 3) gyakorisága 7,5% (3 *B. fragilis* és 1 *B. thetaiotaomicron*) volt. A fajonkénti genetikai tulajdonságokat a 2. táblázatban foglaltuk össze. A *B. fragilis*eknél alacsonyabb volt a bármely plazmidot tartalmazó törzsek aránya (32,4%), mint az NFB törzseknél (56,3%). Viszont a *B. fragilis* törzseknél az 5,6 kb-os plazmidtípus gyakoribb volt (29,7%), mint az NFB-izolátumoknál (12,5%). Ezért feltehetjük, hogy az 5,6 kb-os plazmid lehet patogénitáshoz asszociált (direkten virulenciafaktort kódolva vagy indirekten, mivel a virulensebb *B. fragilis*eknél gyakoribb volt). De ez az asszociáció χ^2 -tesztel vizsgálva nem volt szignifikáns ($p=0,299$), ezért csak munkahipotézisként kezelhetjük a feltételezést. Ezen plazmid egy reprezentánsának (pBFP35) korábban meghatároztuk a nukleotidszekvenciáját, és a replikációs, mobilizációs és stabilitási funkciók mellett két egyéb ORF-et, gént is azonosítottunk (*orf1* és *orf2*). Az *Orf1* aminosavsorrendjének vizsgálata alapján egy lipoprotein, amely a szignálszekvencia lehasítása után lipid oldalláncot kap, és a periplazmába vagy az extracelluláris térbe vándorol [11]. A lipoproteinek számos patogén esetén virulenciafaktorok vagy a Toll-like receptorok által felismert immunogének [20]. Ezért a fenti munkahipotézisünket fenntarthatónak látjuk. A gyakori *Bacteroides* kis plazmidok megoszlása (2,7 kb 5,7%, 4,1 kb 4,1%, 5,6 kb 24,5%) az európai régiók közül a közép-európaihoz (Magyarország: 2,7 kb 9,3%, 18,6%, 5,6 kb 44,2%) állt legközelebb [11].

Az enterotoxint termelő *B. fragilis* törzsek aránya 19,4% volt, ami kicsit magasabb a különböző európai és más országoknál tapasztaltaknál [21–26]. Ennek magyarázata a kis elemszám miatti véletlen ingadozás is lehet. A *bft-1*- és *bft-2*-gén aránya a *bft*-pozitívak között 71,4% és 28,6% volt, ami a kaukázusi népcsoportok között található arányoknak felel meg [26, 27]. A Távol-Keleten jellemző *bft-3*-as szubtípus itt sem jelent meg. A megtalált *bft*-gének viszont hozzájárulhattak az izolált *B. fragilis* törzsek virulenciájához, mint ahogyan azt számos szerző feltételezi [23–25]. Érdekeség, hogy a *bft*-gének csak plazmidot nem hordozó *B. fragilis* törzsekben voltak megtalálhatóak tendenciaszerűen ($p=0,072$). Feltesszük, hogy az utóbbi, eddig le nem írt jelenségnek a *Bacteroides*ek különböző intesztinális életstílusainak (kommenzalizmus, patogénitás) szabályozásában lehet jelentősége.

1. táblázat: A vizsgált genetikai jellemzők a *Bacteroides* törzseinknél

Év	Törzs	Plazmidprofil ¹	bft ²
2011	<i>B. fragilis</i> 363	-	<i>bft</i> -2
	<i>B. fragilis</i> 662	5,6 kb	-
	<i>B. thetaiotaomicron</i> 562	-	-
	<i>B. fragilis</i> 732	-	<i>bft</i> -1
	<i>B. ovatus</i> 35	8 kb	-
	<i>B. ovatus</i> 187	-	-
	<i>B. thetaiotaomicron</i> 414	6 kb, ~40 kb	-
	<i>B. fragilis</i> 43	-	<i>bft</i> -1
	<i>B. fragilis</i> 137	5,6 kb, ~40 kb	-
	<i>B. fragilis</i> 632	5,6 kb	-
	<i>B. fragilis</i> 65	-	-
	<i>B. ovatus</i> 361	-	-
2012	<i>B. fragilis</i> 480	-	-
	<i>B. fragilis</i> 461	-	-
	<i>B. fragilis</i> 664	2,7, 4,1, 5,6	-
	<i>B. fragilis</i> 459	5,6	-
	<i>B. fragilis</i> 519	-	-
	<i>B. fragilis</i> 597	-	-
	<i>B. fragilis</i> 604	-	-
	<i>B. fragilis</i> 427	2,7	-
	<i>B. ovatus</i> 361	6	-
	<i>B. fragilis</i> 410	-	-
	<i>B. fragilis</i> 592	5,6	-
	<i>B. fragilis</i> 376	-	-
	<i>B. fragilis</i> 627	2,7, 4,1, 5,6, 8	-
	<i>B. ovatus</i> 251	4,2, 8	-
	<i>B. thetaiotaomicron</i> 414	10	-
	<i>B. fragilis</i> 423	-	<i>bft</i> -2
	<i>B. fragilis</i> 542	5,6	-
	<i>B. fragilis</i> 719	3,1, 4,1, 5,6, 5,8, 8	-
2013	<i>B. fragilis</i> 335	-	<i>bft</i> -1
	<i>B. fragilis</i> 345	-	-
	<i>B. fragilis</i> 516	-	-
	<i>B. fragilis</i> 690	-	-
	<i>B. fragilis</i> 742	-	-
	<i>B. fragilis</i> 690	-	-
	<i>B. ovatus</i> 742	-	-
	<i>B. thetaiotaomicron</i> 743	-	-
	<i>B. fragilis</i> 754	5,6	-
	<i>B. fragilis</i> 756	-	<i>bft</i> -1
	<i>B. thetaiotaomicron</i> 765	5	-
	<i>B. thetaiotaomicron</i> 768	-	-
	<i>B. fragilis</i> 65	-	-
	<i>B. fragilis</i> 100	-	-
	<i>B. vulgatus</i> 241	10	-
	<i>B. fragilis</i> 316	-	-
	<i>B. vulgatus</i> 419	-	-
	<i>B. thetaiotaomicron</i> 473	4,1, 5,6, ~40	-
	<i>B. fragilis</i> 378	4,1, 5,6	-
	<i>B. ovatus</i> 503	5,6, ~40	-
	<i>B. fragilis</i> 537	-	-
	<i>B. fragilis</i> 548	-	<i>bft</i> -1
	<i>B. fragilis</i> 560	-	-

¹A plazmidok mérete kilobázispárban van megadva.²*bft*-gén-szubtypusok

Plazmid (kb) ¹	<i>B. fragilis</i> (n=37)	<i>B. ovatus</i> (n=7)	<i>B. thetaiotaomicron</i> (n=7)	<i>B. vulgatus</i> (n=2)	Össz (n=53)
-	25 (67,6%)	3 (42,9%)	3 (42,9%)	1 (50,0%)	32 (60,4%)
2,7	3 (8,1%)	-	-	-	3 (5,7%)
3,1	1 (2,7%)	-	-	-	1 (1,9%)
4,1	4 (10,8%)	-	1 (14,3%)	-	5 (9,4%)
4,2	-	1 (14,3%)	-	-	1 (1,9%)
5	-	-	1 (14,3%)	-	1 (1,9%)
5,6	11 (29,7%)	1 (14,3%)	1 (14,3%)	-	13 (24,5%)
5,8	1 (2,7%)	-	-	-	1 (1,9%)
6	-	1 (14,3%)	1 (14,3%)	-	2 (3,8%)
8	2 (5,3%)	2 (28,6%)	-	-	4 (7,5%)
10	-	-	1 (14,3%)	1 (50,0%)	2 (3,8%)
~ 40	1 (2,7%)	1 (14,3%)	2 (28,6%)	-	4 (7,5%)
bármely	12 (32,4%)	4 (57,2%)	4 (57,2%)	1 (50,0%)	21 (39,6%)
bft	7 (19,4%)	-	-	-	7 (13,2%)

¹A plazmid nélküli, adott vagy bármely plazmidot tartalmazó és a bft-pozitív törzsek száma, illetve aránya.

Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy a Marosvásárhelyen izolált *Bacteroides* törzsek vizsgált genetikai jellemzői a régió adataihoz állnak közel, és magyarázhatják az egyéb ismert patogenitási faktorok mellett az izolált törzsek megbetegítőképességét.

Irodalom

- Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad and the nitty-gritty. Clin Microbiol Rev. 2007;20(4):593-621.
- Myers LL, Firehammer BD, Shoop DS, Border MM. *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. Infection and immunity. 1984 May 1, 1984;44(2):241-4.
- Myers LL, Shoop DS, Stackhouse LL, Newman FS, Flaherty RJ, Letson GW, et al. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea. Journal of Clinical Microbiology. 1987 December 1, 1987;25(12):2330-3.
- Zhang G, Weintraub A. Rapid and sensitive assay for detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. Journal of Clinical Microbiology. 1998 December 1, 1998;36(12):3545-8.
- Kling JJ, Wright RL, Moncrief JS, Wilkins TD. Cloning and characterization of the gene for the metalloprotease enterotoxin of *Bacteroides fragilis*. FEMS Microbiology Letters. 1997;146(2):279-84.
- d'Abusco AS, Del Grosso M, Censini S, Covacci A, Pantosti A. The alleles of the *bft* gene are distributed differently among enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains from human sources and can be present in double copies. Journal of Clinical Microbiology. 2000 February 1, 2000;38(2):607-12.
- Kato N, Liu C-X, Kato H, Watanabe K, Tanaka Y, Yamamoto T, et al. A new subtype of the metalloprotease toxin gene and the incidence of the three *bft* subtypes among *Bacteroides fragilis* isolates in Japan. FEMS Microbiology Letters. 2000;182(1):171-6.
- Sears CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. Clinical Microbiology Reviews. 2009 April 2009;22(2):349-69.
- Buckwold SL, Shoemaker, N. B., Sears, C. L., Franco, A. A. Identification and characterization of conjugative transposons CTn86 and CTn9343 in *Bacteroides fragilis* strains. Applied and Environmental Microbiology. 2007;73:53-63.
- Sóki J, Eitel Z, Terhes G, Nagy E, Urbán E. Occurrence and analysis of rare *cfiA-bft* doubly positive *Bacteroides fragilis* strains. Anaerobe. 2013;23:70-3.
- Sóki J, Wareham DW, Rátkai C, Aduse-Opoku J, Urbán E, Nagy E. Prevalence, nucleotide sequence and expression studies of two proteins of a 5.6 kb, Class III, *Bacteroides* plasmid frequently found in clinical isolates from European countries. Plasmid. 2010;63(2):86-97.
- Radu I BJ, Macovei A, Costache L, Mihalache D, Munteanu V. Detection of *Bacteroides fragilis* group by immunofluorescence. Roum Arch Microbiol Immunol. 1991;50(2):95-108.
- Ali RW, Velcescu C, Jivanescu M-C, Lofthus B, Skaug N. Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. Journal of Clinical Periodontology. 1996;23(2):133-9.
- Stingu CS, Rodloff AC, Jentsch H, Schaumann R, Eschrich K. Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. Oral Microbiology and Immunology. 2008;23(5):372-6.
- Cosgarea R DB, Sculean A, Bran S, Rotaru H, Baciut G, Eick S. Bacterial and inflammatory behaviour of implants in the early healing phase of chronic periodontitis. Quintessence Int. 2012;43(6):491-501.
- Iordache FM BM, Turculet C, Vasilescu C, Surdeanu D. A clinical case of Fournier gangrene. Chirurgia (Bucur). 2012;107(4):524-8.
- Székely E, Eitel Z, Molnár S, Szász IÉ, Bilca D, Sóki J. Analysis of Romanian *Bacteroides* isolates for antibiotic resistance levels and the corresponding antibiotic resistance genes. Anaerobe. 2015;31:11-4.
- Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clinical Microbiology and Infection. 2009;15(8):796-802.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold spring Harbor Laboratory Press.
- Kovacs-Simon A, Titball RW, Michell SL. Lipoproteins of bacterial pathogens. Infection and immunity. 2011 February 1, 2011;79(2):548-61.
- Pantosti A, Cerquetti M, Colangeli R, apos, ambrosio F. Detection of intestinal and extra-intestinal strains of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* by the HT-29 cytotoxicity assay. Journal of Medical Microbiology. 1994;41(3):191-6.

22. Szöke I, Dósa E, Nagy E. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Hungary. *Anaerobe*. 1997 1997/04/01;3(2):87-9.
23. Claros MC, Claros ZC, Tang YJ, Cohen SH, Silva J, Goldstein EJC, et al. Occurrence of *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene-carrying strains in Germany and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000 May 1, 2000;38(5):1996-7.
24. Foulon I, Piérard D, Muyldermans G, Vandoorslaer K, Soetens O, Rosseel P, et al. Prevalence of fragilysin gene in *Bacteroides fragilis* Isolates from blood and other extraintestinal samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003 September 1, 2003;41(9):4428-30.
25. Claros MC, Claros ZC, Hecht DW, Citron DM, Goldstein EJC, Silva Jr J, et al. Characterization of the *Bacteroides fragilis* pathogenicity island in human blood culture isolates. *Anaerobe*. 2006;12(1):17-22.
26. Avila-Campos MJ, Liu C, Song Y, Rowlinson M-C, Finegold SM. Determination of *bft* gene subtypes in *Bacteroides fragilis* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007 April 1, 2007;45(4):1336-8.
27. Nagy E, Urbán E, Sóki J, Terhes G, Nagy K. The Place of molecular genetic methods in the diagnostics of human pathogenic anaerobic bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2006;53(2):183-94.