

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**A tularaemia ökológiájának vizsgálata és
a *Francisella tularensis* törzsek
összehasonlító elemzése**

Ph.D. értekezés tézisei

dr. Gyuranecz Miklós

2011

Témavezetők és témabizottsági tagok:

Prof. Dr. Fodor László, C.Sc.
Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
témavezető

Dr. Makrai László, Ph.D.
Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
társ-témavezető

Dr. Dán Ádám, Ph.D.
Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal
Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
Molekuláris Biológiai Laboratórium
témabizottsági tag

Dr. Dénes Béla, C.Sc.
Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal
Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
Immunológiai Laboratórium
témabizottsági tag

Dr. Erdélyi Károly, Ph.D.
Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal
Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
Emlős Kórbonctani Laboratórium
témabizottsági tag

Dr. Földvári Gábor, Ph. D.
Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar
Parazitológiai és Állattani Tanszék
témabizottsági tag

Prof. Dr. Paul S. Keim, Ph.D.
Northern Arizona University
Center for Microbial Genetics and
Genomics
témabizottsági tag

Dr. Szeredi Levente, Ph.D.
Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal
Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
Emlős Kórbonctani Laboratórium
témabizottsági tag

Bevezetés

A tularaemia kórokozója a *Francisella tularensis* egy Gram-negatív, obligát aerob, zoonotikus baktérium, amely állatban és emberben akár kevesebb, mint 10 baktérium révén is életveszélyes megbetegedést okozhat (Ellis és mtsai., 2002).

F. tularensis elsődlegesen a Föld északi féltekén fordul elő. Az elmúlt évtizedben, számos országban a tularaemia megjelenését, illetve ismételt tömeges felbukkanását figyelték meg, amely tények újonnan e betegségre irányították a figyelmet (Petersen és Schriefer, 2005). Az egyes *F. tularensis* törzsek virulenciája és földrajzi elterjedtsége nagyban összefügg genetikai állományukkal, amely alapján alfajokat, s ezeken belül pedig genetikai csoportokat különböztetünk meg (Keim és mtsai., 2007).

A *F. tularensis* nagyszámú gerinctest (emlősök, madarak, kétélűek, halak) képes megfertőzni, de gerinctelenekben is kimutatták már. Ökológiai ciklusában a nyúlalakúak és rágcsálók játsszák a legfontosabb gazdaállat szerepét, és kullancsok, valamint vérszívó rovarok szolgálnak biológiai (kullancs) és mechanikai vektorként (Mörner és Addison, 2001). A tularaemia kórbonctana igen eltérően alakulhat a különböző állatfajokban. Heveny fertőzés esetén általában a lép megnagyobbodása látható, míg elhúzódóbb esetben gyulladással elhalásos góccok megjelenése a jellemző a különböző szervekben. A tularaemia diagnosztikája több módszer együttes alkalmazásán alapul, a kórbonctani vizsgálatok mellett, a *F. tularensis* izolálására, valamint molekuláris biológiai és szerológiai módszerek alkalmazására támaszkodunk (OIE, 2008).

Az ember nagyon fogékony a *F. tularensis* fertőzésre. Megbetegedések elsősorban nyúzás során történő kézsérülés révén, rovarok vérszívásához kapcsolódóan következnek be, de történhet fertőződés kötőhártyán át, inhalációs úton, rágcsálók és nyulak vizeletétől, tetemétől szennyezett szénától, takarmánytól, vagy akár elégtelenül átsütött hús fogyasztásától, valamint fertőzött ivóvíztől is (Dennis és mtsai., 2001). Mindemellett a *F. tularensis* egy A kategóriás potenciális biológiai fegyver is (Dennis és mtsai., 2001).

Magyarországon az első emberi tularaemia eseteket 1951-ben figyelték meg, és ettől az időponttól kezdődően jelenlétét minden évben megállapították. Az emberi tularaemia esetek többségében a kórelőzményben kullancscsípés, mezei nyúllal (*Lepus europaeus*), mezei hörcsöggel (*Cricetus cricetus*) vagy patkánnyal (*Rattus* spp.) történt közvetlen kontaktus szerepel (Epinfo). Hazánk évente több tízezer élő mezei nyulat exportál Olaszországba és Franciaországba, melynek feltétele a *F. tularensis*-mentes mezei nyúl (Somogyi, 2006).

Célok

- Ad 1.** Retrospektív adatgyűjtés hazánk *F. tularensis*-fertőzöttségéről és a tularaemia előfordulásáról a mezei nyúl állomány szeropozitivitásának és az emberi megbetegedések abszolút számának elemzése révén az 1984 és 2009 közötti időszakban.
- Ad 2.** A *F. tularensis* ökológiai ciklusában, fenntartásában szereplő emlős és ízeltlábú fajok szerepének vizsgálata egy endemiás területen, járványmentes időben.
- Ad 3.** A mezei hörcsög járványtani szerepének vizsgálata a *F. tularensis* ökológiájában, valamint a klinikai tünetek, a kórbonctani és a kórszövettani elváltozások leírása két élve befogott hörcsög természetes fertőződést modellező, mesterséges fertőzése során.
- Ad 4.** *F. tularensis* ssp. *holarctica*-fertőzés hatására kialakuló makroszkópos, mikroszkópos és immunhisztokémiai elváltozások leírása mezei nyúlban.
- Ad 5.** Leírjuk egy huszármajom (*Erythrocebus patas*) és egy savanna cercóf (*Chlorocebus aethiops*) kórbonctani és bakteriológiai vizsgálatának eredményét, melyek tularaemiában hullottak el a Szegedi Vadasparkban.
- Ad 6.** Magyarország különböző területeiről és különböző gazdafajokból származó *F. tularensis* izolátumok összegyűjtése révén egy hazai törzsgyűjtemény felállítása.
- Ad 7.** Reprezentatív számú és eredetű hazai *F. tularensis* törzs anyagcsere-ujjlenyomatásnak vizsgálata 95 különböző szénforrás hasznosítása révén.
- Ad 8.** Egy magyar *F. tularensis* ssp. *holarctica* törzs teljes genomszekvenciájának meghatározása és összehasonlítása az elérhető genomszekvenciákkal, 19 magyar és olasz izolátum filogenetikai vizsgálatának elvégzése, valamint a magyar és 100 különböző európai törzs genetikai állományának összehasonlítása és ezáltal következtetések levonása, hogy a magyar mezei nyúl export milyen hatással lehet Európa *F. tularensis*-fertőzöttségére.

Anyag és Módszer

Retrospektív adatgyűjtés

A mezeinyúl-állomány szeropozitivitására vonatkozó adatokat az megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatalok és az élő mezei nyúl export telepek adatbázisaiból gyűjtöttük. Az emberi megbetegedések számai az Országos Epidemiológiai Központ nyilvántartásából származtak.

Szerológiai módszerek

Tárgylemez- és csőagglutinációs vizsgálatokat végeztünk előlt baktériumot használva, a diagnosztikumot gyártó cég (Bioveta Inc., Ivanovice na Hané, Czech Republic) utasításait követve.

Kórbonctani módszerek

A tetemeket (mezei nyúl, majom, rágcsáló) a mintagyűjtés napján boncoltuk. A szervmintákból 4 µm vastagságú, hematoxin-eozinnal festett metszeteket készítettünk. Immunhisztokémiai módszert alkalmaztunk a *F. tularensis* lipopoliszacharid (LPS) antigénjének kimutatására, melyhez LPS specifikus egér monoklonális ellenanyagot használtunk (FB11 és T14 klónok, MAB8267; Chemicon International Inc., Southhampton, UK). Az antigén-ellenanyag kapcsolódás kimutatását tormaperoxidázzal jelölt polimerrel (EnVisionTM+Kit; Dako, Glostrup, Denmark) végeztük.

Bakteriológiai módszerek

A gyulladással-elhalással góccok dörzsölékéből készített szuszpenziót egerekbe, bőr alá oltottuk. A fertőzést követően az egerek 5-7 nap múlva hullottak el. Ezután a szívből vett vérből és a csontvelőből módosított Francis-féle táptalajra (1% glükózzal és 0,1% ciszteinnel dúsított csokoládéagar) oltva izoláltuk a *F. tularensis* törzseket. A táptalajokat 37 °C-on, 6,5% CO₂ jelenlétében 3 napig inkubáltuk. A törzsek elsődleges morfológiai, tenyésztési és biokémiai tulajdonságait standard módszerekkel vizsgáltuk (Barrow és Feltham, 1993). A 95 különböző szénforrás vizsgálatát lehetővé tevő automata MicroLog MicroStation rendszert használtuk GN2-es lemezekkel (Biolog Inc., Hayward, CA) a törzsek anyagcsere-ujjlenyomatának vizsgálatához a gyártó utasításait követve. A szénforrás-hasznosításon alapuló törzsfák elkészítéséhez módosított „unweighted pair group method with arithmetic mean” elemzést használtunk (Biolog program).

Molekuláris biológiai módszerek

F. tularensis-törzsekből történő DNS kivonására a QIAmp DNA Mini Kit-et (Qiagen Inc., Valencia, CA), míg a szövet és ízeltlábú mintákból az X-tractor Gene (Corbett Robotics Pty. Ltd., Queensland, Australia) automata nukleinsavfeltáró robotot vettük igénybe az RNS-kivonó kittel (Total RNA Isolation Kit, Nucleospin 96 RNA (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany)) a gyártó utasításait követve, elhagyva az utolsó DNS-elbontó lépést.

A *F. tularensis*-törzsek azonosításához a 16S rRNS génjének egy 1000 bázispár nagyságú szakaszát erősítettük fel polimeráz láncreakcióval (PCR) (Relman, 1993). A 17 kDa tömegű, nagy membránfehérje (*tul4*) prekursor génjének egy 100 bázispár nagyságú darabját TaqMan-típusú real-time PCR-rel amplifikáltuk a szövet-, víz- és ízeltlábúminták szűrése során (Versage és mtsai., 2003). A real-time PCR-rel pozitívnak talált minták esetében, a *tul4* gén egy 400 bázispár hosszú szakaszát konvencionális PCR-rel erősítettük fel (Sjöstedt és mtsai., 1997). Automata DNS szekvenátorral (ABI 373A, Applied Biosystems, Foster City, CA.) direkt szekvenálást végeztünk.

Solexa (Illumina Inc., San Diego, CA) next-generation szekvenálást használtunk egy magyar törzs (TUL07/2007, SRP003185.3) teljes genom-szekvenciájának meghatározásához, majd az elérhető 5 korábbi teljes genom-szekvenciákkal összehasonlítva egy saját fejlesztésű bioinformatikai programmal válogattuk ki az egyponos nukleotid polimorfizmusokat (SNP) (Auerbach, 2006; Vogler et al., 2009a). Maximum-parsimony elemzést végeztünk a teljes genom SNP törzsfá készítése során melyhez a PAUP 4.0b10 programot használtuk (D. Swofford, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA). Első lépésben elvégeztük a vizsgált 15 magyar és 4 olasz törzs tipizálását a korábban publikált canonical SNP (canSNP) rendszerekkel hogy az ismert filogenetikai csoportokba történő besorolásukat meghatározzuk (Svensson et al., 2009; Vogler et al., 2009a). Továbbiakban a magyar teljes genom-szekvencia által meghatározott új filogenetikai ág (B.Br.TUL07/2007) SNP-ire terveztünk melt mismatch amplification mutation assay-et (melt-MAMA) korábban leírt módszer alapján (Papp és mtsai., 2003), majd a tervezett új assay-kkel elvégeztük 100 európai törzs tipizálását korábban leírt körülmények között (Vogler et al., 2009a). Az egyes canSNP csoportokon belül multilocus variable-number tandem repeat analysis-t alkalmaztuk a magyar izolátumok finomabb tipizálására (Vogler et al., 2009b) .

Eredmények

Retrospektív adatgyűjtés

A *F. tularensis*-szeropozitív nyulak százalékos aránya 0,31% és 20,2% volt az exportra befogott mezei nyulak között (2,8 – 40 ezer exportált nyúl/év). Az emberi megbetegedések abszolút száma 20 és 148 között változott 1984 – 2009-es időszakban hazánkban.

F. tularensis ssp. *holarctica* ökológia ciklusának vizsgálata

A *F. tularensis* szeroprevalenciája a mezeinyúl-populációban 5,1%-os (10/197) volt, alacsony ellenanyag-titerekkel (1/10 és 1/20). Négy állatból *F. tularensis* ssp. *holarctica*-t izoláltunk. Nem tudtuk kimutatni a baktérium jelenlétét real-time PCR-rel, illetve szerológiai áthangolódást, az erdei és a mezei biotópban csapdázott 38 mezei pocokban (*Microtus arvalis*), 110 sárganyakú erdei egérben (*Apodemus flavicollis*) és 15 pirókegérben (*Apodemus agrarius*), illetve a véletlenül csapdába került és abban elpusztult 8 törpe cickányban (*Sorex minutus*) és 6 erdei cickányban (*Sorex araneus*). 1106 *Ixodes ricinus* és 476 *Haemaphysalis concinna* kullancsot gyűjtöttünk a növényzetről, 404 *I. ricinus*-t, 28 *H. concinna*-t, valamint 15 *Ctenophthalmus assimilis* és 10 *Nosopsyllus fasciatus* bolhát pedig a kisemlősökről gyűjtöttünk be. A növényzetről származó kullancsok közül egy *H. concinna* nőstény és egy nimfa volt *F. tularensis* ssp. *holarctica*-val fertőzött, ezzel 0,42% (2/476) incidenciát mutatva. A természetes vízfolyásokból a baktérium nem volt kimutatható, valamint a területen legelő 50 racka és 50 cigája juh, 50 magyar szürkemarha és 50 bivaly szeronegatívnak bizonyult.

A mezei hörcsög szerepének vizsgálata a *F. tularensis* ökológiájában

A 900 befogott hörcsög szerológiai vizsgálata negatív eredménnyel zárult. Az állatokról gyűjtött 374 *I. acuminatus* kullancsból és 100 hörcsög egyesített szervmintából sem lehetett kimutatni a *F. tularensis*-t real-time PCR-rel. A két mesterségesen fertőzött hörcsög rövid bágyadtság után a 8. illetve 9. napon pusztult el. A kórbonctani, kórszövettani és immunhisztokémia vizsgálatok során mindkét esetben vérfertőzést állapítottunk meg.

Tularaemia kórbonctanának leírása mezei nyúlban

Ötven, az ország különböző területéről származó, *F. tularensis* szeropozitív mezei nyulat vizsgáltunk. A makroszkópos vizsgálat során 44 esetben (88%) találtunk 0,1-1 cm átmérőjű, szürkésfehér, gyulladáshalásos gócot a különböző szerveken, ebből 24 esetben egy, további 20 esetben több szerv volt érintett. Elváltozások leggyakrabban a tüdőben (80%), a szívburkon (28%) és a vesékben (20%) voltak. Szövettani vizsgálattal a gócok granulomaképződéssel járó gyulladásoknak bizonyultak, és bennük gyakran elhalt területeket

lehetett megfigyelni. Szövetteni és immunhisztokémiai vizsgálattal 46 esetben (92%) találtunk elváltozást, illetve mutattunk ki *F. tularensis* antigént. *F. tularensis* ssp. *holarctica* törzseket 35 esetben (70%) tudtunk bakteriológiai módszerekkel kitenyészteni és PCR-rel azonosítani.

Generalizált tularaemia leírása huszármajomban és szavanna cercófban

Makroszkópos vizsgálat során mindkét állat esetében szürkésfehér elszórt gócot találtunk a tüdőben, nyirokcsomókban, lépben, májban és a vesékben. Szövettanilag a gócot granulómaképződéssel és elhalással járó gennyes gyulladásnak bizonyultak. A szövetekből *F. tularensis* ssp. *holarctica*-t sikerült izolálni, s szénforrás hasznosítás vizsgálattal és PCR-rel azonosítani.

***F. tularensis* törzsgyűjtemény felállítása**

Hatvanhárom törzset izoláltunk Magyarország különböző területeiről származó mezei nyulakból, s további kettőt osztrák állatokból. A huszármajomból és a szavanna cercófból is sikerült további egy-egy törzset kitenyészteni.

***F. tularensis* ssp. *holarctica* törzsek anyagcsere-ujjlenyomatának vizsgálata**

A Biolog rendszer nemcsak 24 óra inkubáció, de már 4 óra inkubáció után is egyértelműen képes volt a vizsgált 15 *F. tularensis* (2 majom, 13 nyúl eredetű) törzs azonosítására. Ugyanakkor a Biolog program nem tudta elkülöníteni egymástól az erősen virulens *F. tularensis* ssp. *tularensis* és a mérsékelten virulens *F. tularensis* ssp. *holarctica* alfajokat. Mivel egyetlen törzs sem hasznosította a glicerolt, így a manuális leolvasás alapján *F. tularensis* ssp. *holarctica*-ként azonosítottuk az izolátumokat. A szénforrás hasznosításon alapuló törzsfaj az izolátumok szoros rokonságát mutatta.

A magyar *F. tularensis* ssp. *holarctica* törzsek filogenetikai vizsgálata

A teljes genomszekvencia-vizsgálatok során ~820 SNP-t határoztunk meg a vizsgált 6 genom között. A magyar törzs (TUL07/2007) egy svéd törzssel (FSC 200) állt a legközelebbi rokonságban. Hatvan SNP-ben különbözött tőle, mely közül 20 SNP volt specifikus a magyar izolátumra. A vizsgált 15 magyar törzs és a közép-európai mezei nyulból az olasz karanténtelegen izolált törzs a B.Br.013 kládba (Közép- és Kelet-Európában előforduló csoport), míg a természetben izolált 3 olasz törzs a B.Br.FTNT002-00 kládba (Nyugat-Európában előforduló csoport) tartoztak. Sikerrel terveztünk meltMAMA rendszereket a 20 magyar törzs specifikus SNP-re, amelyekkel 100 európai törzset vizsgáltunk meg, s eredményeink alapján 6 bizonyult canSNP-nek, melyek új alcsoportokat határoztak meg. Az MLVA módszerrel további genocsoportokat állapítottunk meg az egyes alcsoportokon belül.

Megbeszélés

Retrospektív adatgyűjtés

A közegészségügyi szolgálat hivatalos jelentése a hazai emberi tularaemia-megbetegedések számáról (Epinfo) összhangban áll az Országos Epidemiológiai Központ adatbázisának nyilvántartásával. A szeropozitív nyulak arányát viszont a hivatalos állategészségügyi adatok (2002: 14 eset, 2003: 2 eset, 2004: 6 eset /WAHID/) nem tükrözik teljes mértékben.

F. tularensis ssp. *holarctica* ökológia ciklusának vizsgálata

Feltételezésünk szerint járványmentes időben a *F. tularensis* ssp. *holarctica* a mezei nyúl – *H. concinna* ciklusban perzisztál a vizsgált mintaterületen. *H. concinna* azonban nem csak mint ízeltlábú vektor játszik szerepet, hanem 3-4 éves fejlődési ciklusa révén fontos *F. tularensis* rezervoár is. A mezei nyulak a vizelettel történő baktériumürítés révén egy további, nyulak közötti ciklust is fent tartanak. Eredményeink alapján a rágcsálók nem töltenek be fontos szerepet a *F. tularensis* környezetben történő fenntartásában. Javasoljuk a használt diagnosztikum 1/80-as cső agglutinációs diagnosztikai határértékének módosítását mezei nyulak szűrésénél.

A mezei hörcsög szerepének vizsgálata a *F. tularensis* ökológiájában

Eredményeink megerősítették azokat a korábbi tapasztalatokat miszerint a mezei hörcsög erősen érzékeny a *F. tularensis*-fertőzésre. Feltételezéseink szerint a vérfertőzött egyedek járványok esetén potenciális fertőzési forrást jelenthetnek az emberek számára, ugyanakkor járványmentes időben nem tölthet jelentős rezervoárszerepet a faj.

Tularaemia kórbonctanának leírása mezei nyúlban

A légúti fertőződés jelentőségét feltételezzük mezei nyúlban az alapján, hogy a mellúri szervek érintettségét találtuk az állatok 88%-ban. Az elváltozások félheveny jellege a mezei nyúl *F. tularensis*-rezervoár szerepét támasztja alá.

Generalizált tularaemia leírása huszármajomban és szavanna cercófban

A kórbonctani elváltozások jellege légúti fertőződésre utal. Állatkerti főemlősök gyakran vadásznak és fogyasztják el a kifutójukba került rágcsálókat, madarakat, amik fertőződési forrást jelenthetnek a számukra. Esetismertetésünk felhívja a figyelmet arra, hogy állatkerti főemlősök zoonotikus betegségeket közvetíthetnek a gondozóik és a látogatók felé, ezért fontos a megfelelő higiénias megelőző rendszabályok betartása.

***F. tularensis* törzsgyűjtemény felállítása**

Az összegyűjtött *F. tularensis*-törzsgyűjtemény teremtette meg a további bakteriológiai és molekuláris biológiai vizsgálatok alapját.

***F. tularensis* ssp. *holarctica* törzsek anyagcsere-ujjlenyomatának vizsgálata**

Eredményeink alapján a szénforrás-hasznosítás vizsgálata egy megbízható módszer a *F. tularensis* törzsek azonosítására és meghatározott szintű tipizálására. Javasoljuk a Biolog program adatbázisának bővítését, mert a glicerol hasznosítás alapján *F. tularensis* ssp. *tularensis* és *F. tularensis* ssp. *holarctica* alfajok elkülöníthetők lennének egymástól, amire tekintettel a jelentős virulenciabeli különbségükre szükség lenne. A különböző földrajzi helyekről és állatfajokból (mezei nyúl, majom) izolált törzsek szénforrás-hasznosítási profilja nagyon hasonló volt, amit magyaráz a *F. tularensis* ssp. *holarctica* alfaj rendkívül konzervatív genetikai jellege.

A magyar *F. tularensis* ssp. *holarctica* törzsek filogenetikai vizsgálata

Genotipizálási vizsgálataink eredménye cáfolni látszik azt a hipotézist miszerint Közép-Európa Nyugat-Európa *F. tularensis*-fertőzöttségének a forrása lehet a mezei nyúl exportja révén. Egy olaszországi karanténtelepen egy közép-európai mezei nyúlból izolált *F. tularensis* törzs genetikai profilja a Közép- és Kelet-Európában előforduló izolátumok genetikai állományával egyezett meg. Ez igazolja, hogy az exportot megelőző szigorú karantén és szűrési vizsgálatok ellenére kijuthat fertőzött egyed. Ugyanakkor arra nem találtunk bizonyítékot, hogy a mezei nyulakkal kijutott *F. tularensis* törzsek fenn maradnának és cirkulálnának a természetben, Nyugat-Európában. Javasoljuk a miénkhez hasonló filogenetikai vizsgálatok elvégzését más közép- és kelet-európai országokban, hogy minél teljesebb képet kaphassunk a *F. tularensis* ssp. *holarctica* evolúciójáról, terjedésének lehetséges irányvonalairól.

Új tudományos eredmények

- Ad 1.** Retrospektív adatgyűjtés során megállapítottuk, hogy az emberi tularaemia megbetegedések száma 20 és 148 között ingadozott az elmúlt 20 évben (1984-2009), míg a mezei nyúl állomány *F. tularensis*-fertőzöttsége 0,31 és 20,2% között változott (2,8-40 ezer exportált mezei nyúl/év). Felállítottunk egy hazai *F. tularensis* törzsgyűjteményt; 63 magyar mezei nyúl eredetű, 2 osztrák mezei nyúl eredetű és 2 állatkerti majom eredetű izolátumot gyűjtöttünk össze.
- Ad 2.** Egy vizsgált endemikus mintaterületen azt valószínűsítettük, hogy a *F. tularensis* ssp. *holarctica* a mezei nyúl – *H. concinna* járványtani ciklusban perzisztálhat. A *H. concinna* vektor szerepe mellett 3-4 éves fejlődési ciklusa révén fent is tartja a fertőzést, míg a mezei nyulak a vizelettel történő baktériumürítés révén egy további, nyulak közötti ciklust tartanak fent. Eredményeink alapján a rágcsálók nem töltenek be fontos szerepet a *F. tularensis* környezetben történő fenntartásában.
- Ad 3.** Kimutattuk, hogy a mezei hörcsög a járványok során fertőzési forrást jelenthet az emberek számára, de járványmentes időben feltételezhetően nem töltenek be rezervoár szerepet.
- Ad 4.** Javasoljuk a használt antigén 1/80-as cső agglutinációs diagnosztikai határértékének módosítását mezei nyulak szűrésénél.
- Ad 5.** Elsőként írtunk el generalizált tularaemiát szavanna cercófban és huszármajomban.
- Ad 6.** Elsőként vizsgáltuk összetetten a mezei nyúl tularaemiáját kórbonctani, kórszövettani és immunhisztokémiai módszerekkel. A mellúri szervek elsődleges érintettségét mutattuk ki, ami alapján jelentősnek tartjuk a légúti fertőződés lehetőségét e fajban. Az elváltozások félheveny jellege alapján arra következtetünk, hogy a mezei nyúl rezervoár szerepet tölthet be a *F. tularensis* járványtani ciklusában.

- Ad 7.** Kimutattuk, hogy a Biolog program nem tesz különbséget az erősen virulens *F. tularensis* ssp. *tularensis* és mérsékelten virulens *F. tularensis* ssp. *holarctica* alfajok között, de a Biolog lemezek manuális leolvasása során, a glicerol hasznosítása alapján, a két alfaj elkülöníthető. A 15 vizsgált törzs szénforrás-hasznosítását megjelenítő törzsfá azt mutatta, hogy az egyes izolátumok nagyon hasonlóak egymáshoz.
- Ad 8.** Meghatároztuk egy magyar *F. tularensis* törzs teljes genom szekvenciáját és azt összehasonlítottuk 5 másik izolátum komplett genomjával, ami azt mutatta, hogy a magyar törzs egy svéd izolátummal áll a legközelebbi rokonságba, attól ~60 SNP-ben különbözve.
- Ad 9.** Húsz nagy érzékenységu SNP assay-t terveztünk, amik közül hat bizonyult olyannak, ami új alcsoportot határoz meg (canSNP), s ezzel jelentős, új módszereket hoztunk létre az európai *F. tularensis* törzsek tipizálására.
- Ad 10.** A genotipizálási vizsgálatok kimutatták, hogy a magyar *F. tularensis* ssp. *holarctica* törzsek más közép-európai, a skandináv és az orosz izolátumokkal állnak rokonságban, míg az olasz törzsek a francia, spanyol, svájci és német izolátumokkal mutatnak hasonlóságot. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a közép-európai (magyar) élő mezei nyúl export nem lehet a nyugat-európai (olasz, francia) *F. tularensis* ssp. *holarctica* törzsek forrása.

Tudományos közlemények

Az értekezés témakörében, lektorált folyóiratokban

Gyuranecz M., Birdsell, D.N., Beckstrom-Sternberg, S.M., Makrai L., Fodor L., Fabbí, M., Vicari, N., Busch, J.D., Wagner, D.M., Keim, P.S.: Phylogenetic population structure of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* from Hungary and the consequence of tularemia dispersal resulting from transcontinental relocation of the European brown hare (*Lepus europaeus*), *Emerg. Infect. Dis.*, [közlésre benyújtva]

Gyuranecz M., Rigó K., Dán Á., Földvári G., Makrai L., Dénes B., Fodor L., Majoros G., Tirják L., Erdélyi K.: Investigation of the ecology of *Francisella tularensis* during an inter-epizootic period, *Vector Borne Zoonotic Dis.*, [közlésre elfogadva]

Gyuranecz M., Dénes B., Dán Á., Rigó K., Földvári G., Szeredi L., Fodor L., Sallós A., Jánosi K., Erdélyi K., Krisztalovics K., Makrai L.: Susceptibility of the common hamster (*Cricetus cricetus*) to *Francisella tularensis* and its effect on the epizootiology of tularemia in an area where both are endemic, *J. Wildl. Dis.*, 46. 1316-1320, 2010.

Gyuranecz M., Szeredi L., Makrai L., Fodor L., Ráczné Mészáros Á., Szépe B., Füleki M., Erdélyi K.: Tularemia of European brown hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological and immunohistochemical study, *Vet. Pathol.*, 47. 958-963, 2010.

Gyuranecz M., Erdélyi K., Fodor L., Jánosi K., Szépe B., Füleki M., Szőke I., Dénes B., Makrai L.: Characterisation of *Francisella tularensis* strains, comparing their carbon source utilization, *Zoonoses Public Health*, 57. 417-422, 2010.

Gyuranecz M., Fodor L., Makrai L., Monse L., Krisztalovics K., Dénes B., Szépe B., Füleki M., Erdélyi K.: A tularemia járványtana, különös tekintettel a mezei nyúl (*Lepus europaeus*) fertőzésére, *Magy. Állatorvosok Lapja*, 132. 39-45, 2010.

Gyuranecz M., Fodor L., Makrai L., Szőke I., Jánosi K., Krisztalovics K., Erdélyi K.: Generalized tularemia in a vervet monkey (*Chlorocebus aethiops*) and a patas monkey (*Erythrocebus patas*) in a zoo, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 21. 384-387, 2009.

Az értekezés témakörében, lektorált könyvfejezet

Gyuranecz M.: Tularemia. In: Duff, J.P., Gavier-Wieden, D., Meredith, A.: Infectious diseases of wild birds and mammals in Europe, *Wiley-Blackwell Publishing* [nyomtatásban]

Nem az értekezés témakörében, lektorált folyóiratokban

Gyuranecz M., Erdélyi K., Makrai L., Fodor L., Szépe B., Ráczné Mészáros Á., Dán Á., Dencső L., Fassang E., Szeredi L.: Brucellosis of the European brown hare (*Lepus europaeus*), *J. Comp. Pathol.*, [közlésre elfogadva]

Gyuranecz M., Szeredi L., Rónai Zs., Dénes B., Dencső L., Dán Á., Pálmai N., Hauser Zs., Lami E., Makrai L., Erdélyi K., Jánosi Sz.: Detection of *Brucella canis* induced reproductive diseases in a kennel, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 23. 143-147, 2011.

Jánosi K., Hajtós I., Makrai L., **Gyuranecz M.,** Varga J., Fodor L.: First isolation of *Histophilus somni* from goats, *Vet. Microbiol.*, 133. 383-386, 2009.

Jánosi K., Stipkovits L., Glávits R., Molnár T., Makrai L., **Gyuranecz M.,** Varga J., Fodor L.: Aerosol infection of calves with *Histophilus somni*, *Acta Vet. Hung.*, 57. 347-356, 2009.

Jánosi K., Stipkovits L., Schreck O., Glávits R., Molnár T., Makrai L., **Gyuranecz M.,** Varga J., Szathmáry Zs., Fodor L.: A tüdő kórbonctani és kórszövetteni elváltozásai mesterséges *Histophilus somni* fertőzést követően borjakban, *Magy. Állatorvosok Lapja*, 131. 202-209, 2009.

Köszönetnyilvánítás

Legelőször prof. dr. **Fodor Lászlónak**, témavezetőmnek szeretnék hálás köszönetet mondani munkám irányításáért, bizalmáért és folyamatos támogatásáért. Köszönettel tartozom dr. **Makrai László** társ-témavezetőmnek aki a bakteriológiai laboratóriumi munka során mindig a segítségemre volt. Hálás köszönettel tartozom dr. **Erdélyi Károlynak** a munkám során kapott számtalan szakmai tanácsáért, valamint az ökológiai és kórbonctani vizsgálatokban nyújtott segítségéért.

Szeretném megköszönni dr. **Dán Ádámnak**, hogy a segítségemre volt a molekuláris biológiai vizsgálatokban. Köszönettel tartozom dr. **Dénes Bélának** a szerológiai vizsgálatokban nyújtott segítségéért. Dr. **Szeredi Leventének** köszönöm az immunhisztokémiai vizsgálatok során kapott segítséget. A parazitológiai vizsgálatokban dr. **Földvári Gábor**, **Rigó Krisztina** és dr. **Majoros Gábor** voltak a segítségemre. Hálás köszönettel tartozom prof. dr. **Paul S. Keimnek** és dr. **Dawn N. Birdsellnek**, hogy egy három hónapos tanulmányutatót tölthettem a Northern Arizona University-n és, hogy modern módszerekkel végezhettem a genotipizálási vizsgálatokat. Köszönöm dr. **Steven M. Beckstrom-Sternberg-nek** a teljes genom szekvencia meghatározásban és elemzésben nyújtott segítségét.

Dr. **Krisztalovics Katalinnak** az emberi, míg **Monse Lászlónak** a mezei nyúl tularaemia adatok gyűjtésében nyújtott pótolhatatlan segítségéért tartozom köszönettel. Köszönöm dr. **Szépe Bálintnak** és dr. **Füleki Miklósnak** a szeropozitív mezei nyulak gyűjtésében nyújtott segítségét. Dr. **Szöke Istvánnak** köszönöm a tularemiás majom mintákat. Szeretném megköszönni dr. **Massimo Fabbinak** az olasz törzsek vizsgálatra bocsájtását és szakmai tanácsait. Hálás köszönettel tartozom **Tirják Lászlónak** és **Lengyel Tibornak** a Körös-Maros Nemzeti Parkban végzett munkám során nyújtott segítségükért. **Lévai Zoltánnak**, **Lévai Miklósnak** és **Pösze Jánosnak** a mezei hörcsög mintagyűjtésben nyújtott segítségükért tartozom köszönettel. Dr. **Müller Zsófia** és dr. **Ozsvár Zsófia** az emberi savó minták gyűjtésében voltak a segítségemre.

Dr. **Jánosi Katalinnak** szeretném megköszönni, hogy munkám és a képzés során felmerült kérdéseimmel bizalommal fordulhattam hozzá. **Ráczné Mészáros Ágnesnek**, **Halasi Teréznek**, **Kolozsvári Évának**, **Juhász Ágnesnek** és **Ottinger Ernőné Máriának** köszönöm a laboratóriumi munkák során nyújtott segítségüket. Köszönöm **Oláh Editnek** a számtalan könyvtári segítségnyújtást.

Hálásan köszönöm **családomnak** a támogatásukat és türelmüket, ami lehetővé tette, hogy munkámat nyugodt körülmények között végezzem.

Az értekezés alapját képező kutatásokat **OTKA-78139** pályázat finanszírozta.