

Állatorvostudományi Egyetem
Aujeszky Aladár Elméleti Állatorvostudományok Doktori Iskola

**Sertésekből izolált *Actinobacillus pleuropneumoniae*
törzsek összehasonlító vizsgálata**

PhD értekezés

dr. Sárközi Rita

2017

Témavezetők és témabizottsági tagok:

.....
Dr. Fodor László
Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
témavezető

.....
Dr. Makrai László
Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
társtémavezető

Dr. Varga János
Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
témabizottság tagja

Dr. Dán Ádám
NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Intézet
Molekuláris Biológiai Laboratórium
témabizottság tagja

Készült 10 példányban. Ez a n. sz. példány.

.....
dr. Sárközi Rita

Tartalomjegyzék és rövidítések

1. Összefoglalás.....	7
2. Bevezetés és célok.....	11
3. Irodalmi áttekintés	13
3.1. Az <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> rendszertani besorolása	13
3.2. Földrajzi elterjedés	14
3.3. Járványtan	15
3.4. A baktérium tenyésztése és azonosítása	16
3.5. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> virulenciafaktorai.....	18
3.6. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> által előidézett kórképek	22
3.7. Kórfejlődés	22
3.8. Kórbonctani és kórszövettani elváltozások	23
3.9. Szerotipizálás.....	24
3.10. Szerotípusok előfordulási gyakorisága	27
3.11. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> genomjának vizsgálata	28
3.12. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> elleni ellenanyagok kimutatása	29
3.13. Gyógykezelés, védekezés.....	29
4. Anyag és módszer	34
4.1. Mintagyűjtés.....	34
4.2. A minták eredete	34
4.3. A szervminták feldolgozása.....	36
4.4. A kórokozó azonosítása tenyésztési, morfológiai és biokémiai tulajdonságai alapján	36
4.5. A baktérium azonosítása a 16S rRNS gén részletének vizsgálatával	37
4.5.1. DNS-kivonás	37
4.5.2. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek 16S rRNS gén részletének amplifikálása.....	37
4.5.3. Agarózgél elektroforézis	38
4.5.4. A PCR termékek kivonása az agarózgélből.....	38
4.5.5. A 16S rRNS génrészlet bázissorrendjének meghatározása, vizsgálata ...	39
4.6. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek szerotipizálása	39
4.7. Genomvizsgálatok (PCR).....	40
4.8. A törzsek szénforrás-hasznosításának jellemzése	43
4.8.1. A vizsgált törzsek.....	43
4.8.2. A törzsek tenyésztése és előkészítése a vizsgálathoz.....	43
4.8.3. A Biolog vizsgálatok eredményei és kiértékelése.....	43
4.9. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek pulzáló mezejű gélelektroforézissel (PFGE) történő vizsgálata	44
4.9.1. A vizsgált törzsek.....	44
4.9.2. A törzsek emésztése <i>Apal</i> restrikciós endonukleázzal.....	44
4.9.3. Pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE)	45
4.9.4. Az eredmény dokumentálása és kiértékelése.....	45
4.10. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata	46
4.10.1. A vizsgált <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek	46
4.10.2. Az antibiotikum-érzékenység meghatározása korongdiffúziós módszerrel.....	46
4.10.3. Az antibiotikum-érzékenység meghatározása leveshígításos mikromódszerrel.....	47
4.10.4. A vizsgálatba bevont antibiotikumok és alkalmazott hígításuk	48

4.10.5. Az eredmények elbírálása, a minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása.....	50
4.10.6. Rezisztenciagének vizsgálata PCR módszerrel.....	50
4.10.7. Antibiotikumok vizsgálata (a szelektív táptalaj készítéséhez)	54
4.11. A szelektív táptalaj összeállítása	54
4.11.1. Korongdiffúziós módszer és a MIC-értékek meghatározása	54
4.11.2. NAD-függő <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek tenyésztési vizsgálata	55
4.11.3. A szelektív táptalaj összeállítása	55
5. Eredmények	56
5.1. A vizsgálatba vont állatok kora, a kórbonctani elváltozások, a törzsek földrajzi eredete	56
5.2. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek azonosítása tenyésztési, morfológiai és biokémiai vizsgálatok alapján	59
5.3. Szerotípusok	60
5.3.1. Passzív hemagglutinációs próbával kapott eredmény	60
5.3.2. A törzsek szerotipizálása molekuláris biológiai módszerrel.....	61
5.3.3. Szekvenálás eredménye	63
5.4. Nem besorolható törzsek.....	63
5.5. A törzsek azonosítása Biolog rendszerrel, szénforrás-hasznosítás alapján ...	64
5.6. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek vizsgálata pulzáló mezejű gélelektroforézissel.....	70
5.7. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek antibiotikum-érzékenysége	73
5.7.1. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek antibiotikum-érzékenysége korongdiffúziós próbával vizsgálva	73
5.7.2. A vizsgált antibiotikumok minimális gátló koncentrációja (MIC).....	74
5.7.3. 2012 előtt izolált törzsek antibiotikum-érzékenysége	74
5.7.4. Antibiotikum-rezisztenciagének	77
5.8. Szelektív táptalaj fejlesztése	77
5.8.1. Az antibiotikum vizsgálatok eredménye	77
5.8.2. A szelektív táptalaj összetevőinek hatékonysága	81
5.8.3. A sertés-tonsillák vizsgálata	81
5.9. Vaddisznóból izolált törzs vizsgálata	81
6. Következtetések.....	83
6.1. A vizsgálatba vont állatok kora, a törzsek földrajzi eredete	83
6.2. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek azonosítása.....	84
6.3. A szerotípusok előfordulási gyakorisága	84
6.3.1. Passzív hemagglutinációs próba 2012 előtt és után	84
6.3.2. A passzív hemagglutinációs próbával és PCR-rel végzett szerotipizálás eredményeinek összehasonlítása.....	85
6.3.3. Szekvenálás	85
6.4. Új szerotípusok	86
6.4.1. 16-os szerotípus és a 16-os szerotípus teljes genom vizsgálata.....	86
6.4.2. Meg nem erősített új szerotípus.....	86
6.5. A törzsek azonosítása szénforrás-hasznosítás alapján	87
6.6. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek vizsgálata PFGE-vel.....	88
6.7. Az <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek antibiotikum-érzékenysége	89
6.7.1. A MIC és a korongdiffúziós vizsgálat eredményeinek összehasonlítása ..	89
6.7.2. A vizsgált antibiotikumok MIC eredményei	90
6.7.3. A 2012 előtt és után izolált törzsek antibiotikum-érzékenységének összehasonlítása.....	92
6.7.4. Az antibiotikum-rezisztenciagének előfordulásának feltérképezése	92
6.8. Szelektív táptalajok	93
6.8.1. A szelektív táptalajok hatékonysága	93

6.8.2. Sertés-tonsillából izolált <i>A. pleuropneumoniae</i> törzsek	93
6.8.3. Vaddisznó-tonsillából izolált <i>A. pleuropneumoniae</i> törzs jellemzése	94
7. Új tudományos eredmények	95
8. Irodalom	96
9. A doktori kutatás eredményeinek tudományos közlései	110
10. Köszönetnyilvánítás	111
11. Függelékek	112

Rövidítések jegyzéke

AGP - agargél-precipitációs próba
Apx - *Actinobacillus pleuropneumoniae* által termelt toxin
apx - *Actinobacillus pleuropneumoniae* toxint kódoló gén
ÁTE - Állatorvostudományi Egyetem
CAMH - kationnal beállított Müller-Hinton táptalaj
Co-A - koagglutinációs próba
CPS - burokpoliszacharid
DNS - deoxiribonukleinsav
EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA - enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok
IF - immunfluoreszcencia
LPS - lipopoliszacharid
MH - Müller-Hinton
MIC - minimális gátló koncentráció
NAD - nikotinamid-adenin-dinukleotid
OmlA - külső membrán protektív lipoprotein
OMP - külsőmembrán-fehérje
PalA - peptidoglikán-egyesített lipoprotein
PBS - foszfáttal pufferolt sóoldat
PCR - polimeráz láncreakció
PFGE - pulzáló mezejű gélelektroforézis
PRDC - sertések légzőszervi tünetegyüttese
PGA - poli-N-acetil-D-glükózamin
PHA - passzív hemagglutináció
QC - minőségellenőrzés
RNS - ribonukleinsav
SXT - szulfametoxazol + trimetoprim
TE - 100 mM Tris + 250 mM EDTA puffer
TfbA/B - transferrin-kötő fehérje
TFE - telepformáló egység
TSA - tripton szója agar
VFM - állatorvosi tápigényes baktériumok táptalaja
V-faktor - vitamin faktor (NAD)

1. Összefoglalás

A szerző vizsgálatai során sertésekből és vaddisznókból izolált *Actinobacillus pleuropneumoniae* törzsek összehasonlító vizsgálatát végezte el. Magyarország 18 megyéjének 70 sertésállományából 634 sertéstüdőt gyűjtött, és ezekből 255 törzset tenyésztési, morfológiai és biokémiai tulajdonságai alapján *A. pleuropneumoniae*-ként határozott meg. Heveny esetekben az elhullott állatok kora legtöbbször 12-16 hét közé esett, de a szerző elsőként írt le hazánkban egyhónapos választás körüli malacokban heveny actinobacillus pleuropneumoniát. A törzsek között 227 törzs az I-es, 28 törzs a II-es biotípusba tartozott.

A törzsek szerotipizálását passzív hemagglutinációs próbával végezte el, amelynek során hét állományból egyidőben két-két különböző szerotípust is izolált. Ezek alapján meghatározta a Magyarországon előforduló szerotípusok gyakoriságát és összehasonlította a 2012 előtt izolált szerotípusok gyakoriságával. Napjainkban a 2-es szerotípus a leggyakoribb (38,9%). Megjelent a 8-as és a 16-os szerotípus (10,4-10,4%), valamint a korábbi eredményekhez képest visszaszorult a 13-as szerotípus (10,4%). Előfordul még Magyarországon a 9-es, a 11-es, a 12-es és az 5-ös szerotípus is. Nem besorolható törzsek közül három a II-es biotípusba tartozott, kilenc pedig NAD-ot igényel tenyésztésekor.

Munkája során az összes vizsgált törzs közül 56 törzset egyik ismert szerotípusba sem tudott besorolni. Ezek közül hattal szemben hiperimmun savót termeltetett nyulakban, és ennek eredményeként öt törzset a 16-os szerotípusba sorolt. 16S rRNS gén PCR vizsgálattal igazolta, hogy a törzsek az *A. pleuropneumoniae* fajba tartoznak. A hatodik törzs is egy új szerotípust képviselhet, de azt még nem besorolhatóként ismerteti.

A szerotipizálást toxingénekben alapuló PCR próbával is elvégezte hatvan *A. pleuropneumoniae* törzs esetében. Ennek eredményeként igazolta, hogy bár valóban szoros korreláció van a szerotípusok és a toxintermelés között, a szerotípus egy fenotípusos tulajdonság, aminek kifejeződése nem a toxingénekben kódolt. Az új 16-os szerotípus törzseinek, valamint kettő, még nem publikált szerotípusba tartozó törzsnek a toxingén mintázatát is leírta.

A Biolog Microstation™ ID System rendszerével elvégezte 67, az Állatorvostudományi Egyetem Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében található *A. pleuropneumoniae* törzs, valamint a 16-os típus-törzsként leírt törzs szénforrás-hasznosításon alapuló azonosítását, amelynek során a rendszer az *A. pleuropneumoniae* törzsek 44,8%-nak fajszintű meghatározását tette lehetővé. A Biolog Microstation™ ID System rendszerével végzett anyagcsere-ujjlenyomat vizsgálatok eredményeit valamennyi törzs esetében elemezte, és 20 különböző szénforrást a törzsek 100%-a képes volt hasznosítani.

A pulzáló mezejű gélelektroforézis vizsgálat eredményeinek összehasonlító elemzése során a II-es biotípusba tartozó törzsek genetikai zártságát, és a 2-es szerotípusba tartozó törzsek diverzitását igazolta. A 9-es, a 16-os és még a nem publikált új szerotípusba tartozó törzsek különálló csoportot alkotnak.

A minimális gátló koncentráció meghatározása során az *A. pleuropneumoniae* törzsek érzékenységét tapasztalta a béta-laktám, a fluorokinolon, a fenikol, a makrolid és a tiamulin antibiotikumokra. A törzsek 40-50%-a rezisztens volt aminoglikozidokkal, a penicillinnel, az eritromicinnel, az oxitetraciklinnel és a szulfametoxazol-trimetoprimmel szemben. Az összes törzs rezisztens volt szulfametoxazollal szemben.

A korongdiffúziós vizsgálat eredményét összehasonlítva a MIC-értékekkel, a szerző azt találta, hogy a korongdiffúziós vizsgálat során kapott eredményeket csak tájékoztató jellegűnek szabad tekinteni.

Két szelektív táptalajt vizsgált munkája során és vaddisznó- és sertés-tonsillákból a szakirodalomban leírt összetevőket tartalmazó szelektív táptalajon izolált *A. pleuropneumoniae* baktériumot.

A vaddisznóból izolált törzset a 12-es szerotípusba sorolta, és antibiotikum-érzékenységi profilja hasonlóságot mutatott a sertésből izolált *A. pleuropneumoniae* törzsek érzékenységével.

Summary

Comparative examination of 255 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from swine in Hungary was carried out between 2012 and 2016. Bacterial cultures were made from 634 swine lungs collected from 70 herds representing different parts of the country and 255 strains isolated from them were identified as *A. pleuropneumoniae* according to their cultural, morphological and biochemical characteristics.

The animals were generally older than 12-16 weeks of age and showed clinical signs of acute pleuropneumonia before they died. In some cases similar clinical signs and post mortem lesions were seen in young piglets around weaning age and the aetiological role of *A. pleuropneumoniae* in these cases was described by us. Out of the 255 *A. pleuropneumoniae* strains 227 strains belonged to biotype 1 and 28 could be allocated into biotype 2.

Serotyping of the strains was done using the indirect haemagglutination test and frequency of the serotypes was compared with that of isolated before 2012. Nowadays serotype 2 is the most common serotype (38.9%). Serotype 8 and 16 became more frequent (10.4-10.4%), and prevalence of serotype 13 (10.4%) decreased compared to previous data. Serotypes 9, 11, 12 and 5 have also been found in Hungary in the recent years. A total of 56 strains proved to be untypable. Hyperimmun sera were produced against six of them, five strains could be serotyped and they were described as serovar 16 by us recently. Their identity was proved by examination of 16S rRNA, too. The sixth examined strain can represent an other new serotype. Out of the remaining 12 untypable strains 3 belonged to biotype 2 and nine of them needed nicotine amide adenine dinucleotide to growth.

Serotypes of 60 *A. pleuropneumoniae* strains were defined by detecting toxin genes with PCR. The results confirmed close correlation between serotypes and toxin production, however new serotypes could not have been recognised without using IHA because toxin gene profiles of serotype 16 and serotype 5 are identical. According to our results the new serotype has moderate virulence and the protective effect of a toxoid vaccine against it was proved in a Hungarian swine farm.

Utilization of carbon sources of 68 field strains and 6 reference strains was characterised with the Biolog MicrostationTM ID System. Altogether 44.8% of the strains were identified as *A. pleuropneumoniae* by the system and the strains were able to metabolize 20 different carbon sources.

Genetic relationship of *A. pleuropneumoniae* strains was analysed using pulse field gel electrophoresis. *A. pleuropneumoniae* serotype 2 strains proved to be highly diverse, while strains of biotype 2 were really closely related. Serotype 9, 16 and the untypable strains formed separated clusters.

Antibiotic resistance of 60 *A. pleuropneumoniae* strains was tested using the broth dilution and the disc diffusion methods. On the basis of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the different antibacterials most strains were susceptible to beta-lactams, fluorokinolons, phenicols, macrolides and tiamulin. Forty-fifty % of strains were resistant against gentamycin, spectinomycin, penicillin, erythromycin, oxitetracyclin and sulphametoxazole-trimetoprim. All of strains were resistant against sulphametoxazole. Examination of the antibiotic susceptibility of *A. pleuropneumoniae* with the disc diffusion method proved to be less sensitive, so the results of the disc diffusion test have to be interpreted carefully.

Two selective media were compared; medium "A", the reference one, contained bacitracin, lincomycin, crystal violet and nystatin while in medium "B" vancomycin, polymyxin-B, cycloheximid and crystal violet were the inhibitory agents. A total of 68 tonsils of wild boars were inoculated on both selective media and one *A. pleuropneumoniae* strain was isolated on medium "A". The strain belonged to serotype 12 and its MIC profile was similar to that of *A. pleuropneumoniae* strains isolated from domesticated pigs.

2. Bevezetés és célok

A világ számos országában a háztáji sertéstartást részben, vagy teljesen felváltotta a nagyüzemi tartástechnológia. Gazdasági szempontból a legfontosabb az, hogy a termelés hatékony és gyors legyen. Az intenzív tartástechnológiának köszönhetően számolni kell a sertés légzőszervi tünetegyüttesének (Porcine respiratory disease complex, PRDC) kialakulásával (Brockmeier és mtsai., 2002), melyben igen fontos kóroktani szerepet játszik az *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) baktériumfaj. A baktérium okozhat heveny járványkitörést, amely nagyszámú állat elhullásával és magas gyógyszerköltségekkel jár, míg krónikus esetben a csökkent étvágy és a csökkent testtömeggyarapodás miatt a hizlalási időszak megnyúlik, az állományban szétnövés figyelhető meg, és ennek következtében jelentős gazdasági kárral számolhatunk. A baktérium szubklinikai jelenlétének diagnosztizálása is fontos, hiszen ennek ismeretében elkerülhető a heveny vagy idült kórkép kialakulása. A kórokozó iránt kizárólag a sertés fogékony, főként 12-16 hetes korban okoz heveny megbetegedést, ami a tüdőben savós-vérzéses, majd vérzéses-elhalásos tüdőgyulladással és fibrines mellhártyagyulladással jár. Fakultatív patogén baktériumról lévén szó, a hajlamosító tényezőknek igen nagy szerepük van a jellegzetes betegség kialakulásában. Az actinobacillus pleuropneumonia nagy problémát jelent világszerte a sertéstartásban (Gutiérrez-Martin és mtsai., 2006).

A baktériumfajnak két biotípusát és 16 szerotípusát különböztetjük meg (Sárközi és mtsai., 2015). Hazánkban az elmúlt 30 évben főleg az I-es biotípusba tartozó szerotípusok fordultak elő, de a II-es biotípus is nagy jelentőséggel bír, hiszen a 13-as szerotípust először Magyarországon izolálták (Fodor és mtsai., 1989a és 1989b) és jelenleg is elég gyakran találkozunk ezzel a szerotípussal, míg más országokban nagyon ritkán fordul elő (Gottschalk és mtsai., 2003).

Az *A. pleuropneumoniae* törzsek négyféle toxint termelnek (ApxI-II-III-IV), melyek hemolítikus és citotoxikus hatású fehérjék, a baktérium virulenciafaktorai, jelentős szerepük van a tüdőben megtalálható vérzések és elhalások kialakításában. Az ApxIV toxint kizárólag ez a baktériumfaj termeli, az ellene képződött ellenanyag kimutatásával igazolható, hogy az állat *A. pleuropneumoniae* baktériummal fertőzött.

A betegség gyógykezelésére leggyakrabban béta-laktám, fluorokinolon, pleuromutilin, makrolid és tetraciklin antibiotikumokat használnak, míg megelőzésre kereskedelmi forgalomban lévő inaktivált bakterin vagy toxin-alapú vakcinákat valamint telepspecifikus vakcinákat alkalmaznak. Nagyon fontos emellett a hajlamosító tényezők (zsúfoltság, a kedvezőtlen istállóklíma, a takarmányozási hibák, és szövődményként más baktériumok és vírusok okozta megbetegedések) kiiktatása.

Célok

Munkánk elsődleges célja volt, hogy az *A. pleuropneumoniae* elterjedtségét és különböző szerotípusainak előfordulását vizsgáljuk hazai sertésállományokból gyűjtött tüdő- és tonsillamintákból.

Célunk volt, hogy a mintagyűjtés során izolált, valamint az Állatorvostudományi Egyetem Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében megtalálható *A. pleuropneumoniae* törzsek szerotipizálását a klasszikus módszerek közül passzív hemagglutinációval és toxingénekre alapuló molekuláris biológiai módszerrel (polimeráz láncreakció, PCR) elvégezzük.

A tanszéki törzsgyűjteményben lévő *A. pleuropneumoniae* törzsek szénforrás-hasznosításon alapuló fajsztípusú azonosítását, a Biolog Microstationtm ID System rendszerének segítségével terveztük elvégezni. Az anyagcsere-ujjlenyomat vizsgálatok eredményei alapján a vizsgált törzsek hasonlóságát, a biotípusok és szerotípusok közötti lehetséges eltérést kívántuk meghatározni. Célunk volt, hogy kiderítsük, megbízhatóan működik-e ez a módszer az *A. pleuropneumoniae* azonosításában, más *Actinobacillus* fajoktól elkülöníti-e a rendszer, és alkalmazható-e a diagnosztikában.

Céljaink között szerepelt, hogy a szénforrás-hasznosítás alapján vizsgált és az általunk izolált *A. pleuropneumoniae* törzsek egy részének a teljes genom makrorestrikciós mintázatát a törzsek eredete szerint, valamint összesített elemzésével jellemezzük.

A vizsgálataink során gyűjtött, az ország különböző sertésállományaiból izolált *A. pleuropneumoniae* törzsek antibiotikum-érzékenységét korongdiffúziós és leves-mikrohígítós módszerrel kívántuk vizsgálni, és az eredményeket a módszerek összehasonlításával terveztük elemezni.

A kórokozó tonsillából történő izolálása céljából szelektív táptalajok készítését terveztük és sertésekből származó tonsillák vizsgálatával kívántuk a táptalajok hatékonyságát tesztelni. Célul tűztük ki, hogy vaddisznókból gyűjtött tonsillamintákból *A. pleuropneumoniae*-t izoláljunk szelektív táptalajon, a törzsek szerotípusát és antibiotikum-érzékenységét meghatározzuk és a sertésből izolált törzsek tulajdonságaival összehasonlítsuk.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* rendszertani besorolása

Az *A. pleuropneumoniae* rendszertani besorolása és elnevezése hosszú időn át kérdéses volt, egészen az 1980-as évek második feléig a Bergey-féle baktérium rendszertanban is a *Haemophilus* nemzetség tagjai között találjuk (Kilian és Biberstein, 1984). Shope 1964-ben írta le azt az ismeretlen baktériumfajt, ami patogenitását tekintve alapvetően különbözött a *Haemophilus influenzae suis*-tól, amely kizárólag a sertésinfluenza vírusával együtt volt képes klinikai képet kialakítani. A jellegzetes kórkép miatt Shope a *Haemophilus pleuropneumoniae* nevet javasolta. Ugyanakkor 1978-ig a kórokozó megjelölésére a *Haemophilus paraahaemolyticus* nevet is használták, mivel a kórokozó tulajdonságai lényegében megegyeztek a korábban sertésekből és más állatfajokból, illetve emberből izolált *H. paraahaemolyticus* törzsekével (Százados és Kádas, 1979; Molnárné és Glávits, 1981). 1978-ban biokémiai és szerológiai vizsgálatokkal sikerült a rendszertani besorolást elvégezni és a nevezéktanba hivatalosan is a Shope által javasolt *H. pleuropneumoniae* került (Kilian és mtsai., 1978).

Az 1970-es évek végén Svájcban, majd az 1980-as évek elején Németországban olyan tüdőgyulladásos eseteket észleltek sertésekben, amelyek kórbonctani elváltozásai azonosak voltak a *H. pleuropneumoniae* okozta tüdő- és mellhártyagyulladás esetén tapasztaltakkal. A megbetegedett tüdőterületekről izolált baktériumot azonban a tenyésztési és morfológiai sajátosságai alapján *Pasteurella haemolytica*-szerű, illetve közelebbről be nem sorolt *Actinobacillus* fajként írták le. 1983-ban a számos közös biokémiai tulajdonság, valamint a DNS-hibridizáció eredményeként a *H. pleuropneumoniae*-val való genetikai rokonság miatt javasolták a *P. haemolytica*-szerű törzsek besorolását a *H. pleuropneumoniae* fajba, ez utóbbi nevét pedig *Actinobacillus pleuropneumoniae*-ra változtatták. Ez az újonnan elnevezett faj egy, a növekedéséhez V-faktort igénylő I-es (a korábbi *H. pleuropneumoniae*) és egy V-faktort nem igénylő II-es (a korábbi *P. haemolytica*-szerű törzseket magukba foglaló) biotípusból áll (Pohl és mtsai., 1983).

Az *A. pleuropneumoniae* jelenlegi rendszertani besorolása a következő:

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=715&lvl=3&lin=s&keep=1&srchmode=1&unlock&log_op=lineage_toggle)

Ország	Baktériumok országa
Törzs	Proteobaktériumok törzse
Osztály	Gammaproteobaktériumok osztálya
Rend	Pasteurellales
Család	Pasteurellaceae
Nemzetség	Actinobacillus
Faj	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>

3.2. Földrajzi elterjedés

A kórokozó által okozott megbetegedés világszerte előfordul. Járványszerű, légzőszervi megbetegedések voltak megfigyelhetők az 1960-as években Nagy-Britanniában, Kaliforniában és Argentínában is, ahol Shope 1961-ben egy súlyos, nagy elhullással és gazdasági veszteséggel járó tüdő- és mellhártyagyulladás járványt tanulmányozott. A betegséget - elsősorban a járvány jellege miatt - sertésinfluenzának gondolták. A sertésinfluenza vírusának kórtani szerepét kizárták, majd egy *Haemophilus*-szerű baktériumot izoláltak, amellyel a betegség tipikus klinikai tüneteit és kórbonctani elváltozásait elő tudták idézni, és a mesterségesen fertőzött sertéseknek a fele elhullott (Shope, 1964; Molnárné és Glávits, 1981).

Ugyanezekben az években, Svájcban is volt hasonló járványkitörés (Nicolet és König, 1966), majd Dániában (Nielsen, 1973), Nagy-Britanniában (Little és Harding, 1980), Kanadában (Thomson és Ruhnke, 1963), Ausztráliában (Mylrea és mtsai., 1974), és Észak-Amerikában (Biberstein és Spencer, 1962) írtak le *Haemophilus* okozta tüdő- és mellhártyagyulladást. Hazánkban Százados és Kádas (1979) izolálta és írta le az akkor még *H. parahaemolyticus* néven ismert kórokozót, majd Molnár Lászlóné és Glávits Róbert (1981) kísérleti állatfertőzés során kapott kórbonctani eredményeiket publikálták.

A II-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae*-t először az 1970-es évek végén Svájcban, majd az 1980-as évek elején Németországban izolálták. Hazánkban a 13-as szerotípusba tartozó kórokozót Fodor és munkatársai (1989a) írták le először, míg az USA-ban 1992-ben számoltak be erről a biotípusról (Frank és mtsai., 1992). A baktérium napjainkban világszerte ismert (Gottschalk, 2012).

3.3. Járványtan

Az *A. pleuropneumoniae* iránt kizárólag a sertés fogékony, a betegség minden korú sertést érinthet (Chiers és mtsai., 2010). A kórokozó széles körben jelen van a sertésállományokban, a konvencionális sertéstelepek egy vagy több szerotípussal fertőzöttek, ennek köszönhetően az endémiásan fertőzött állományokban az újszülött malacok anyjuktól vagy társaiktól fertőződnek közvetlen érintkezés során (Gottschalk, 2012). Az ellenanyagokat tartalmazó főcstej felvételével a malacok passzív védettséghez jutnak, amely nagyjából 5-9 hetes korukig tart. Ilyen állományokban rendszerint a 4 hetesnél fiatalabb malacok tonsilláiról is kimutatható a baktérium, de tüdőelváltozásokat többnyire csak 12 hetes kortól okoz.

Ahogy csökken a védelem, úgy nő a fertőzött malacok aránya (Tobias és mtsai., 2014a és 2014b), majd hajlamosító tényezők hatására általában 3-4 hónapos kortól kezdődően enyhébb vagy súlyosabb formában megjelenhetnek az *A. pleuropneumoniae* okozta tüdő- és mellhártyagyulladás tünetei, amelyek a törzsek virulenciájától is függenek (Crujisen és mtsai., 1995; Chiers és mtsai., 2002; Vigre és mtsai., 2002). A hizlalás alatt álló 12-16 hetes sertések bizonyulnak a legfogékonyabbnak (Marsteller és Fenwick, 1999), a szopós vagy választás körüli malacokban kialakult pleuropneumonia nagyon ritka (Takács és mtsai., 2015). A tonsillák kriptáiban hordozott baktérium tüdőbeli kolonizációját kiváltó okok nem teljesen tisztázottak, de a stressz, a zsúfoltság, az átcsoportosítások, a környezet- és klímaváltozások hozzájárulhatnak a klinikai tünetek kialakulásához. Egyéb társfertőzéseknek, például *Mycoplasma hyopneumoniae* fertőzésnek szintén szerepe lehet a folyamatban (Chiers és mtsai., 2010).

A betegséget átvészelt állatok baktérium-hordozókká válnak, és a környezeti változások okozta stressz újabb heveny kitörést válthat ki. Krónikus esetben elváltozást mutató tüdővel a vágóhídon találkozhatunk (Bossé és mtsai., 2002; Yoshurima és mtsai., 2002).

Az *A. pleuropneumoniae* vaddisznó-populációbeli előfordulásáról kevés szerző számol be, habár a vaddisznó szintén fogékony a kórokozóra, és annak potenciális rezervoárja. A vaddisznó (*Sus scrofa*) igen elterjedt európai nagyvad faj, állománya hazánkban is intenzíven növekszik. Háziasított rokonától szaporasága és súlygyarapodása messze elmarad, a zárttéri tartására és tenyésztésére tett kísérletek komoly nehézségekről számolnak be (Újváry és Szemethy, 2011). Németországban végzett vizsgálatok során a helyi vaddisznóállomány 35,8%-ából mutatták ki PCR vizsgálattal a kórokozót, elsősorban a garatmandulákból (Reiner és mtsai., 2010). Görögországban extenzíven tartott vaddisznók vizsgálata során azt az eredményt kapták, hogy az állatok 90,5%-a szeropozitív *A. pleuropneumoniae*-ra (Marinou és mtsai., 2015). Észak-amerikai vizsgálatok eredményei szerint az *A. pleuropneumoniae*-ra vizsgált vaddisznók majdnem 70%-a volt szeropozitív,

ami szinte megegyezik a Kanadában vizsgált sertések fertőzöttségének arányával (Baroch és mtsai., 2015). Magyarországon még nem végeztek vaddisznók *A. pleuropneumoniae* hordozását felmérő vizsgálatot.

3.4. A baktérium tenyésztése és azonosítása

Az *A. pleuropneumoniae* igényes, mezofil mikroorganizmus. A baktérium izolálható az orrüregből, a tonsillákból, a felső légutak nyálkahártyájáról és a fertőzött állat tüdejéből (Bossé és mtsai., 2002). Újabb kutatások szerint szájból vett mintából is ki lehet mutatni az *A. pleuropneumoniae* törzseket (Costa és mtsai., 2012). A kórokozó a heveny megbetegedést átvészelt állatokban, vagy a kevésbé virulens törzsek esetében eleve a tonsilla kriptáiban telepsznek meg, ennek köszönhetően a fertőzött sertés élete végéig hordozza és üríti a kórokozót (Bossé és mtsai., 2002).

Tenyésztése csokoládé- vagy véresagaron történhet, utóbbin a virulens törzsek béta-hemolízist okoznak (Marsteller és Fenwick, 1999). A legtöbb *A. pleuropneumoniae* törzs ureáz-pozitív, de 1993-ban már írtak le ureáz-negatív törzseket is (Blanchard és mtsai., 1993).

Két biotípust különböztetünk meg a baktériumtörzs V-faktor igényének megfelelően. A V-faktor nikotinamid-adenin-dinukleotidot (NAD), nikotinamid-mononukleotidot és nikotinamid-ribozidot tartalmaz (Niven és Levesque, 1988.). Az I-es biotípusba tartoznak azok a törzsek, amelyek NAD-ot igényelnek növekedésükhöz, II-es biotípusba pedig a (korábban *Pasteurella haemolytica*-szerű törzseknek nevezett) NAD-ot nem igénylő *A. pleuropneumoniae* törzsek (Fodor és mtsai., 1989a és 1989b; Tuboly és mtsai., 1998). A tenyésztés során a NAD-igényt figyelembe kell venni. Diagnosztikai minta esetén célszerű *Staphylococcus aureus* dajkatenyésztéssel keresztbe oltani a kioltást, hogy a dajkavonal mellett látható legyen a NAD-függőség és a béta-hemolízis.

Az *A. pleuropneumoniae* csilló nélküli, Gram-negatív kokkoid, rövid pálcika, vékony, poliszacharid burokkal rendelkező igényes, fakultatív anaerob baktérium. Az *A. pleuropneumoniae* törzsek kataláz-negatívak, oxidáz-pozitívak, szénhidrát-bontásuk fermentatív, a nitrátot nitritté redukálják és ureáz-pozitívak (Tuboly és mtsai., 1998).

Az *A. pleuropneumoniae* a környezetben rendkívül érzékeny, éppen ezért a sertések közötti fertőződés közvetlen úton, orrváladékkal vagy aeroszol formájában, belégzéssel történik (Velthuis és mtsai., 2002). Fiziológiás konyhasóoldatban a baktérium alacsony hőmérsékleten (5 °C vagy 25 °C) több mint 8 órán keresztül életképes. A hőmérséklet emelkedésével a túlélés csökken (Morozumi és Hiramune, 1982). Vizes közegben jobban túlél a kórokozó, mint beszáradva, de a túlélést nagyban befolyásolja a hőmérséklet. Ugyanígy a sók és a nyálka is befolyásolják a túlélést (Assavacheep és Rycroft, 2013). A kórokozó a sertések itatóvizében is jól túlél, klinikai tüneteket nem mutató, de PCR-rel

pozitív sertések itatóvizéből is kimutatták a baktériumot, amely még biofilm-képzésre is képes volt, ezzel is növelve a túlélés esélyeit (Loera-Muro és mtsai., 2013).

Szelektív táptalaj

Az *A. pleuropneumoniae* kimutatása hagyományosan az elváltozott tüdőterületekből történik. Ez az eljárás nem igényel szelektív táptalajt, mert ezeken a területeken a baktérium jellemzően nagy számban, szennyező flóra nélkül van jelen (Jacobsen és Nielsen, 1995). A szubklinikai fertőzést okozó alacsony virulenciájú törzsek megtalálhatók a tonsillák kriptáiban is, ezért a tünetmentes hordozók és a szerológiailag negatív sertések kiszűrése érdekében célszerű a tonsillát vizsgálni, és onnan izolálni a baktériumot (Møller és mtsai., 1993; Sidebé és mtsai., 1993). A tonsillában nagy számban találkozunk más, az *A. pleuropneumoniae* baktériumnál gyorsabban növekvő mikroorganizmussal (Gilbride és Rosendal, 1983), ezért a szelektív táptalaj használata elkerülhetetlen a baktérium izolálása érdekében (Jacobsen és Nielsen, 1995). Magas fokú rezisztenciát mutat az *A. pleuropneumoniae* linkomicinnel szemben (Nadeau és mtsai., 1988.; Eaves és mtsai., 1989), míg a tonsillában megtalálható Gram-pozitív baktériumok érzékenyek bacitracinra (Shimizu és mtsai., 1982). Ezeket az antibiotikumokat külön-külön vagy együttesen kristályibolyával kombinálva használták a korábbi leírások szerint (Csukás, 1980.; Gilbride és Rosendal, 1983.; Sidebé és mtsai., 1993).

Lowe és munkatársai (2011) a sertések tonsillájának kolonizáló flóráját elemezték, vizsgálataikhoz különböző állományokból választottak 18-20 hetes, egészséges (légzőszervi tüneteket korábban nem mutató) egyedeket. Megállapították, hogy az állatok 50%-ának mintájából izolálható volt *Pasteurella multocida*, különböző *Actinobacillus* fajok, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus dysgalactiae* és *Escherichia coli*. A tonsillát kolonizáló alapflórát az állományra jellemzőnek találták.

Møller és munkatársai orrüregből, valamint a tonsilla felületéről és metszéspapjából vett mintát oltottak bacitracin tartalmú csokoládéagarra és 10% borjúvérrel, NAD-ot és bacitracint tartalmazó véresagarra *A. pleuropneumoniae* izolálása céljából. A tonsillák metszéspapjából származó mintákból történő izolálást találták a legeredményesebbnek, a táptalajok közül a csokoládéagar bizonyult megfelelőbbnek (Møller és mtsai., 1993).

Jacobsen és Nielsen (1995) négyféle táptalajon tenyésztették az *A. pleuropneumoniae* baktériumot, és a tenyésztés eredményeit hasonlították össze. Munkájuk során a baktérium növekedését szelektív és nem szelektív véresagaron, valamint szelektív és nem szelektív csokoládéagaron vizsgálták. Megfigyeléseik szerint a szelektív véresagar bizonyult a legkedvezőbbnek tenyésztési és szelektivitási szempontokból is. Az 5% borjúvérrel tartalmazó táptalajhoz a szelektivitás elérése érdekében bacitracint (100 µg/ml), kristályibolyát (1 µg/ml) és linkomicint (1 µg/ml) adtak a Gram-pozitív baktériumok gátlása

miatt, és nisztatint (50 µg/ml) a gombák növekedésének gátlása érdekében. A négy vizsgált táptalajra PBS oldatban homogenizált tonsillaszövetet oltottak, melyet szélesztés után 37 °C-on 24 órán keresztül inkubáltak. A telepek közül az 1 mm-es, domború és sima felszínű, éles szélű, szürkésfehér telepeket válogatták ki, amelyek véresagaron hemolizáltak és NAD-függőnek bizonyultak, ezután Gram-szerint festették és különböző biokémiai vizsgálatok segítségével azonosították a baktériumtörzseket. Az *A. pleuropneumoniae* fajba sorolták az oxidáz-, glükóz-, xilóz-, mannit- ureáz- és béta-galaktozidáz-pozitivitást, és kataláz-, indol-, arabinóz-, raffinóz-, melibióz-, szorbit- és inozit-negativitást mutató törzseket. A szerotipizálást passzív hemagglutinációs próbával végezték.

A szénforrás-hasznosítás vizsgálata - anyagcsere-ujjlenyomat

A Biolog MicroStation™ ID System (Biolog Inc, California, USA) rendszere egyidőben 95-féle egyedüli szénforrás hasznosítását elemzi és ez alapján a vizsgált baktériumtörzsről anyagcsere-ujjlenyomatot készít.

A rendszert sikeresen alkalmazták az állatorvosi patogén baktériumok jellemzésére és fajszerű azonosítására (Wong és mtsai., 1992; Jánosi és mtsai., 2009; Gyuranecz és mtsai., 2010), de *A. pleuropneumoniae* törzsekre vonatkozó szénforrás-hasznosítási mintázatról adatok nem állnak rendelkezésre.

3.5. Az *A. pleuropneumoniae* virulenciafaktorai

Az *A. pleuropneumoniae* törzsek megbetegítő képessége virulenciafaktorokra vezethető vissza. A virulenciafaktorok közé tartoznak az *A. pleuropneumoniae* által termelt exotoxinok (ApxI-II-III-IV), az adhézión faktorok, a membránproteinek és a biofilmképzés-képessége (Sthitmatee és mtsai., 2003; Chiers és mtsai., 2010).

Exotoxinok

A baktérium citotoxinjai sejtkárosító fehérjék, az RTX, ún. pórusképző (pore-forming) toxincsaládba tartoznak, melyek számos Gram-negatív baktériumban megtalálhatók (Frey, 1995). Jelentős membránkárosító, hemolizáló, endothelt, makrofágokat, fagocitákat károsító hatásuk van, valamint jelentős szerepet játszanak a tüdőbeli elváltozások kialakításában (Varga és mtsai., 2007). A szerotípusok négy különböző Apx toxint termelnek (ApxI, ApxII, ApxIII és ApxIV), melyeket különböző kombinációban képesek az egyes szerotípusok előállítani (Beynon és mtsai., 1993; Frey, 1995; Frey és Kuhnert, 2002; Sthitmatee és mtsai., 2003) (1. táblázat).

Az ApxIV toxint minden *A. pleuropneumoniae* szerotípus termeli (Schaller és mtsai., 1999), de csak *in vivo*, az állatok fertőződése során termelődik az exotoxin (Schaller és mtsai., 2001). A többi toxint egyéb *Actinobacillus* fajok (*A. rossii*, *A. suis*) is képesek

előállítani (Schaller és mtsai., 2000; Cho és Chae, 2003; Gottschalk és mtsai., 2003; Rayamajhi és mtsai., 2005), ezért a velük szemben megjelenő szeropozitivitás nem mindig jelent *A. pleuropneumoniae* fertőzöttséget.

1. táblázat: A toxintermelés szerotípusonkénti eloszlása (Sthitmatee és mtsai., 2003)

Szerotípus	Toxintermelés			
	ApxI	ApxII	ApxIII	ApxIV
1, 5, 9, 11	+	+	-	+
2, 3, 4, 6, 8, 15	-	+	+	+
10, 14	+	-	-	+
7, 12, 13	-	+	-	+

A különböző szerotípusokba tartozó *A. pleuropneumoniae* törzsek a toxinok változatos kombinációit termelik, eltérő virulenciájuk is ezen alapul. Az ApxI toxin a legtoxikusabb, azonban azok a szerotípusok, amelyek több különböző Apx toxint termelnek (az ApxIV-en felül), még virulensebbek (Frey, 1995). Az ApxI és az ApxII toxin okozza az ún. oxidatív stresszt a neutrofil granulocitákban (Jansen és mtsai., 1995).

Az Apx exotoxinokat az *A. pleuropneumoniae* törzsek elsődleges virulenciafaktoraként tartják számon, amelyet avirulens mutánsok létrehozásával bizonyítottak. A kísérleti úton előállított 5a szerotípusú törzs elvesztette az egész *apxI* operonját, így ApxII toxint sem volt képes termelni *apxIBD* gén hiányában. Ezzel a törzssel fertőzve a sertést, nem alakult ki az ApxII elleni immunválasz és megbetegedés, tehát a toxinok jelenléte szükséges a kórfolyamat kialakulásához és az élő szervezet immunrendszerének aktiválódásához, az ellenanyag termeléséhez is (Frey, 1995). Az Apx toxinok kiváló antigének, ezért erős ellenanyagválaszt váltanak ki a fertőzött állatokban. Az Apx toxinok okozzák a betegség jellegzetes vérzéses elváltozásait a tüdőben, illetve fontos szerepet játszanak a kórfejlődésben is (Bossé és mtsai., 2002). A különböző toxinok sejtkárosító tulajdonsága eltérő (Tascón és mtsai., 1994; Sthitmatee és mtsai., 2003) (2. táblázat).

2. táblázat: Az Apx toxinok hemolizáló és sejtkárosító aktivitása (Sthitmatee és mtsai., 2003).

Toxinok	Aktivitás	
	Hemolízis	Citotoxicitás
ApxI	erős	erős
ApxII	gyenge	mérsékelt
ApxIII	nincs	erős
ApxIV	gyenge	nem meghatározott

Spontán mutáció a természetben bármikor megtörténhet, ennek során létrejött például egy olyan 7-es szerotípusú *A. pleuropneumoniae* törzs, amely elvesztette az ApxII toxintermelő képességét, ezáltal apatogénné vált (Anderson és mtsai., 1991). Gottschalk és munkatársai 2003-ban olyan 2-es szerotípusú törzseket írtak le, melyek csak ApxII toxint képesek előállítani, csak *apxII*CA gént hordoznak, amely nagyon ritka az *A. pleuropneumoniae* törzsekben belül. Ezek a 2-es szerotípusú törzsek nem vagy alig virulensek, míg az Európában előforduló és gyakori 2-es szerotípusú törzsek ApxII és ApxIII toxint termelnek, és magas virulenciát mutatnak (Gottschalk és mtsai., 2003, Gottschalk, 2012).

Adhéziós faktorok/felületi poliszacharidok

A baktérium az alsóbb légutak nyálkahártyájához, fehérjeihez és sejtjeihez kötődik, beleértve a véghörgöcskéket és az alveoláris epithelsejteket is (Dom és mtsai., 1994a). Ebben különböző adhéziós faktorok nyújtanak segítséget (fimbriák, lipopoliszacharidok, burokpoliszacharidok). Az adhéziós faktorok fehérjék, amelyek a gazdasejt szénhidrát-receptoraihoz kötődhetnek (Sauer, 2000).

Négy különböző típusú fimbria található az *A. pleuropneumoniae* baktérium felületén. Bebizonyították, hogy a négy különböző fimbria termelődése elősegíti a kapcsolódást *in vitro* körülmények között, és ugyanennek köszönhetően képes kapcsolódni *in vivo* a tüdő sejtjei elemeihez is (Chiers és mtsai., 2010). Dom és munkatársai (1994a) fertőzések kísérlet során rámutattak arra, hogy az *A. pleuropneumoniae* megtelepedése az alsóbb légutakban (hörgöcskék, alveolusok) nagyon gyors, és gyakoribb, mint a felső légutakban.

A lipopoliszacharidok (LPS) a Gram-negatív baktériumok külső membránját alkotják, melyek O-specifikus oldalláncból, oligoszacharidból és egy úgynevezett Lipid A-ból állnak (Jacques, 1996; Jacques, 1998). A poliszacharid résznek köszönhetően az LPS vízzel oldékony, valamint immunválaszt indukál. Kísérletek bizonyítják, hogy az LPS lipid része felelős a toxicitásért és a Lipid A részt vesz a hemoglobinhoz történő kötődésben, ezáltal az *A. pleuropneumoniae* vas ellátásában is szerepet játszik. A Gram-negatív baktériumok szétesésekor felszabaduló LPS, mint endotoxin, okozza a szeptikus sokkot. A légcső nyálkahártyájához, valamint a légcsőgyűrűkhöz ezen anyagok segítségével kötődik a baktérium, receptorként a glükoszfingolipideket írták le (Chiers és mtsai., 2010).

Az *A. pleuropneumoniae* burka főleg poliszacharidokból áll, és egy védőréteget képez a baktériumsejt körül. A burokpoliszacharidok (CPS) nagy része hidrofil, és negatív felületi töltéssel rendelkezik, ami segít megakadályozni a fagocitózist (Haas és Hacker, 2000). A különböző szerotípusok virulenciája nagyban függ a burok szerkezetétől, és így hozzájárul a szerotípus-specifikus védelem kialakulásához. Több szerző megállapította, hogy a vastagabb burokkal rendelkező *A. pleuropneumoniae* törzsek virulensebbek, mint a

vékonyabb burokkal rendelkező törzsek (Jensen és Bertram, 1986; Rosendal és MacInnes, 1990).

Egy harmadik felületi poliszacharidot is leírtak, amely mint biofilm mátrix játszik szerepet a baktériumok befedésében és összeköttetésében (Kaplan és mtsai., 2004). Anyaga a poli-N-acetil-D-glükózamin (PGA), és ezt a polimer mátrixot a baktérium nagyon rövid idő alatt képes kialakítani (Labrie és mtsai., 2010). A biofilmben lévő baktériumsejtek antibiotikum-rezisztenciája 100-szorosa, de akár 30.000-szerese is lehet a normál planktonikus formának (Archambault és mtsai., 2012). Az *A. pleuropneumoniae* törzsek ma még nem teljesen ismert mechanizmus révén képesek biofilmképzésre, de a közelmúltban egy 1-es szerotípusú törzsön bizonyították, hogy létrejöttét a lipopoliszacharidok és burokpoliszacharidok is szabályozzák (Hathroubi és mtsai., 2015).

Külsőmembrán-fehérjék (OMP)

Számos külsőmembrán-fehérjét azonosítottak, és néhány közülük szerotípus-specifikus (Rapp és mtsai., 1986), de több tanulmány is rámutat arra, hogy néhány OMP mindegyik szerotípusban megtalálható. Ide tartoznak a transzferrinkötő fehérjék (TfbA vagy B) (Rapp és Ross, 1986; Gerlach és mtsai., 1992; Gonzales és mtsai., 1995; Wilke és mtsai., 1997), a maltóz indukálható fehérje (Deneer és Potter, 1989), a peptidoglikán-asszociált lipoprotein (PalA) (Frey és mtsai., 1996), valamint a protektív lipoprotein OmlA (Gerlach és mtsai., 1993).

Egy fajspecifikus PCR rendszer ennek a protektív lipoproteinnek az *omlA* génjének kimutatására épül, amely segítségével azonosítani lehet az *A. pleuropneumoniae* törzseket, valamint a 15 szerotípust kilenc csoportba tudja besorolni (Rossi és mtsai., 2013).

Vaskötő-rendszer

A baktériumnak a gazdaszervezetben való szaporodásához elengedhetetlen a vas megkötése, amely egyben más virulenciafaktorok termeléséhez is szükséges (Jacques, 2004). Az *A. pleuropneumoniae* megköti a gazdaszervezet transzferrinjét (Gerlach és mtsai., 1992, Gonzales és mtsai., 1995, Wilke és mtsai., 1997) a transzferrin-kötő receptorai segítségével (TbpA/TbpB), amelynek 60 kDa lipoproteinje a szerotípusokon belül igen nagy eltérést mutat, és ez által a szerotípus-specifikus védelemhez hozzájárul (Wilke és mtsai., 1997). A külső membránon található a hemoglobin-kötő fehérjék (Hgbp) is (Jacques, 2004), amelyek nagy hasonlóságot mutatnak más, a Pasteurellaceae családba tartozó baktériumfaj hemoglobin-kötő fehérjéivel (Srikumar és mtsai., 2004).

3.6. Az *A. pleuropneumoniae* által előidézett kórképek

Egy konvencionális telepen a kocák általában szeropozitívak, ezáltal a főcstej és az anyatej nagy mennyiségben tartalmaz *A. pleuropneumoniae* specifikus ellenanyagot, amely a választásig védi a malacokat. A malacok nagyjából 4 hetes korban veszítik el az anyai ellenanyag nyújtotta védelmet, és 9 hetes korukra kimutathatatlaná válik az anyai ellenanyag a vérükből. Az újszülött malacok légutaiban már megtelepedhet az *A. pleuropneumoniae*, ha az anya fertőzött volt, de gyakoribb a horizontális fertőződés a választást követően (Marsteller és Fenwick, 1999).

A fertőződés aerogén úton történik, de a megbetegedéshez hajlamosító tényezők szükségesek, így a zárt tartástechnológia, a zsúfoltság, a rossz szellőzés, a tartási és a takarmányozási hiányosságok mind közrejátszhatnak a betegség megeredésében. A betegség megjelenési formája lehet szubklinikai, idült, félheveny, heveny és túlheveny. A betegség lefolyását az állat immunállapota, a baktérium szerotípusa (virulenciája), és a baktérium mennyisége határozza meg (Sebunya és mtsai., 1983).

Túlheveny esetben a leggyakoribb a 4-12 órán belüli elhullás, míg heveny lefolyás esetén magas láz, súlyos, nehezített légzés, cianosis, köhögés, ataxia, hasmenés és étvágytalanság jelei láthatóak. Az állatok kutyamódra ülnek, majd elfekszenek és néhány nappal a klinikai tünetek megjelenését követően elpusztulnak (Molnárné és Glávits, 1981). A betegséget átvészelt állatok baktérium-hordozókká válhatnak, ezeket nagyon nehéz észrevenni, ugyanis a tünetmentes baktérium-hordozók nem mutatnak nyilvánvaló klinikai tüneteket (Bossé és mtsai., 2002; Yoshurima és mtsai., 2002). A heveny megbetegedések nagyszámú elhullást okoznak és magas gyógykezelési költséggel járnak, míg krónikus esetben a csökkent étvágy és testtömeg-gyarapodás miatt a hizlalási időszak megnyúlik, az állományban szétnövés figyelhető meg, ezáltal jelentős gazdasági kárral számolhatunk (Ózsvári és Búza, 2015).

3.7. Kórfejlődés

A megtelepedés a kórokozó azon képessége, amely lehetővé teszi, hogy a gazdaszervezet sejtjeihez kötődjön és elkezdhesse szaporodását, így a kórképet kialakítsa (Bossé és mtsai., 2002). Az *A. pleuropneumoniae* baktérium gyorsan szaporodik fogékony állatban. Annak ellenére, hogy a tonsilla kriptáinak epithel sejtjein is megtelepedik és onnan kimutatható, a megbetegedés során az alsóbb légutak nyálkahártyájához kötődik (Bossé és mtsai., 2002). Ott citotoxinokat (ApxI-II-III-IV) termel, és LPS tartalmú membránrészecskék szabadulnak fel a baktériumsejt szétesése során, amelyek külön is sejtkárosító hatással bírnak (Chiers és mtsai., 2010). A baktérium fimbriáknak köszönhetően tapad meg a nyálkahártyákon és az alsóbb légutak sejtjeiben (Utrera és mtsai., 1991; Dom és mtsai., 1994a; van Overbeke és mtsai., 2002).

Minden légzőszervi bakteriális fertőzés elleni védekezés a gazdaszervezet részéről azon múlik, hogy milyen gyorsan képes a baktériumot megsemmisíteni a légutakban (Bossé és mtsai., 2002). Az *A. pleuropneumoniae* proteázokat választ ki, melyek lebontják a sertés IgA és IgG ellenanyagait (Negrete-Abascal és mtsai., 1994; Negrete-Abascal és mtsai., 1998). Az Apx toxinok a neutrofil granulocitákat és a makrofágokat ölik meg, az alveoláris makrofágok apoptózisát okozzák, károsítják a makrofágok kemotaktikus és antigénfelismerő képességét és a fagocitotikus tulajdonságukat is (Cruisen és mtsai., 1992; Dom és mtsai., 1992; Tarigan és mtsai., 1994; Chien és mtsai., 2009).

A sejten belüli túlélést segíti az ureáz-aktivitás, mert ezzel gyengítik a makrofágokat, köszönhetően az ammónia-termelésnek, amely gátolja a fagoszóma-lizoszóma kapcsolódást a makrofágokban (Klitgaard és mtsai., 2012).

A burokban található szénhidrátok és az LPS-ek is segítik még a sejten belüli túlélést (Bilinski, 1991), valamint a hő-sokk fehérje (Fuller és mtsai., 2000) és a réz-cink szuperoxid-dizmutáz termelése is (Langford és mtsai., 1996). A burok poliszacharidoknak antifagocita hatásuk van (Bandara és mtsai., 2003), valamint a biofilm-képződéssel is védi magát a baktérium (Donlan és mtsai., 2002).

3.8. Kórbonctani és kórszövettani elváltozások

A kórbonctani vizsgálatkor a legsúlyosabb elváltozások a rekeszi lebenyben láthatók, de időnként a csúcs- és szívlebenyben is, valamint a tompaszél mentén sötétvörös vagy feketevörös, tömött tapintatú gyulladással góccok észlelhetők, amelyeket általában fibrinréteg borít. Előfordulhat lokálisan vagy multifokálisan az egész tüdőre kiterjedve. A tüdő a fibrinkiválás miatt a mellkas falához tapadhat, és fibrines mellhártya-gyulladás alakul ki (Fodor és mtsai., 1989a). A légcsőben és a tüdőben habos, véres exsudatum látható (Molnárné és Glávits, 1981; Fodor és mtsai., 1989a). A nyirokcsomók megnagyobbodnak és a vörösvérsejt infiltráció miatt bővérűek.

A kórszövettani vizsgálat esetén erősen megszélesedett interlobularis sővényeket láthatunk, amelyek kötőszövettel átszőttek. Az interstitium vérerei körül is kifejezett savós beszűrődés látható, az erekben pedig trombus-, illetve embólusképződés figyelhető meg. Az alveolusokban vérezéseket, ödémát, gyakran gyulladással sejteket találunk (Fodor és mtsai., 1989a; Varga és mtsai., 2007). A tüdőben vérezések, elhalásos területek, neutrofil beszűrődés és makrofágok, valamint fibrines exsudatum látható (Marsteller és Fenwick, 1999).

3.9. Szerotipizálás

Klasszikus módszerek

A szerotipizálási vizsgálatok a felületi oldható burokpoliszacharid antigének elkülönítése alapján történnek (Perry és mtsai., 2005; Gottschalk és Lacouture, 2014). A kórokozónak 15 szerotípusa volt sokáig ismert, a 16-os szerotípus a közelmúltban került leírásra (Sárközi és mtsai., 2015). Az 5-ös szerotípus 5a és 5b altípusokra osztható (Nielsen, 1986b). A II-es biotípus törzsei Európában jellemzőek, hagyományosan kevésbé virulensnek tekintik őket (Gottschalk, 2012; Frey, 1995; Fodor és mtsai., 1989a).

A burokantigén virulenciafaktornak számít, de a virulencia és a klinikai tünetek *A. pleuropneumoniae* törzsenként is változhatnak (Marsteller és Fenwick, 1999). Virulencia szempontjából a következőképpen lehet csoportosítani az I-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* szerotípusokat:

- legvirulensebb: 1
- közepesen virulens: 2, 5, 9, 10, 11
- legkevésbé virulens: 3, 6, 7, 12 szerotípusok (Marsteller és Fenwick, 1999).

A szerotipizálási próbák elbírálását megnehezíti, hogy egyes *A. pleuropneumoniae* törzsek között keresztreakciók jöhetnek létre. Ha az egyébként egyedi szerkezetű antigének (O-antigén) túlságosan hasonlítanak egymásra két szerotípus között, akkor tapasztalhatunk immunológiai keresztreakciókat (Tuboly és mtsai., 1998). Ezeket már több szerotípus között is igazolták: 1-9-11, 3-6-8 és 4-7 szerotípusok között (Marsteller és Fenwick, 1999).

Az *A. pleuropneumoniae* törzsek szerotipizálásához többféle módszer alkalmazható: a tárgylemez-agglutinációs, a gyűrűprecipitációs, az immundiffúziós, a komplementkötési próba, az immunelektroforézis és a passzív hemagglutinációs (PHA) próba (Mittal és mtsai., 1983b; Nielsen, 1986a és 1986b; Kucerova és mtsai., 2005; Perry és mtsai., 2011). A szerzők többsége a passzív hemagglutinációs próbát találta a legalkalmasabb eljárásnak specificitás és érzékenység szempontjából (Mittal és mtsai., 1983a; Mittal és mtsai., 1983b; Molnár, 1990; Nielsen és mtsai., 1997).

A PHA próba lényege, hogy oldott CPS antigéneket kötnek vörösvértestek felületéhez, és pozitív próba esetén az ellenanyagoknak a vörösvértestekhez kötött antigénekhez történő kapcsolódása agglutinációt eredményez. Ellenkező esetben a vörösvértestek éles határral jelzetten leülnek a cső aljára (Nielsen, 1986a és 1986b). Több korábbi vizsgálatban is nyulak által termelt hiperimmun savóval dolgoztak (Mittal és mtsai., 1983a; Nielsen, 1986a és 1986b; Fodor és mtsai., 1989a és 1989b; Dom és mtsai., 1994b; Nielsen és mtsai., 1997; Aarestrup és Jensen, 1999; Kucerova és mtsai., 2005; Yang és mtsai., 2011). Figyelembe kell venni, hogy különböző tesztek egymás mellett végezve sosem kapunk teljesen

egységes eredményt. A koagglutinációs próba (Co-A), a direkt immunfluoreszcenciás módszer (IF) és az agargél-precipitációs próba (AGP) összehasonlításakor a Co-A teszt bizonyult a leginkább érzékeny eljárásnak (Molnár, 1990).

Nem szerotipizálható törzseket gyakorta izolálnak kórtani esetekből, aminek oka lehet az, hogy ezek a törzsek elvesztik a burok poliszacharidjukat, viszont a genetikai mintázatuk egyezik az adott típustörzsszel, és így besorolhatóak molekuláris biológiai módszerekkel (Kokotovic és Angen, 2007). Másik gyakori ok, hogy ezek a törzsek nem kerülnek leírásra.

Molekuláris biológiai módszerek

A klasszikus szerotipizáló módszereknél tapasztalt keresztreakciók előfordulásán kívül, a laboratóriumi körülmények megléte, az időigényesség és a specifikus antitestek jelenlétének szüksége miatt egyre inkább előtérbe kerülnek a molekuláris biológiai módszerek (Klausen és mtsai., 2002; Sthitmatee és mtsai., 2003; Rayamajhi, és mtsai., 2005; Broes és mtsai., 2007; Perry és mtsai., 2011). Különböző gének felhasználásán alapuló szerotipizáló PCR technikák ismertek a szakirodalomban (Zhou és mtsai., 2008a).

Az *omIA* gén alapján történő szerotipizálás eredményeként az 1-9-11-es, az 5a-5b-10, 3-4-6, valamint a 2-8-as szerotípus nem különíthető el egymástól, viszont az egyéb szerotípusok azonosíthatók (Cho és Chae, 2003; Rossi és mtsai., 2013). A gyakran előforduló, a toxin termelése miatt legvirulensebb szerotípusként számon tartott 1-es szerotípus (Gram és Ahrens, 1998) elkülönítése rendkívül fontos a diagnosztikai munkában. A később kifejlesztett *omIA* gén és az *apx* toxingének kimutatásának kombinációjára készített rendszer eredményeként az 1-9-11-es és a 2-8-as szerotípus nem különíthető el (Jessing, és mtsai., 2003). A *cps* gén (burokpoliszacharidok) és az *omIA* gén kombinációban történő felhasználásával multiplex PCR próba kifejlesztésével a 2-5-6-os szerotípust határozták meg és különítették el. Később a 3-6-8-as és 1-7-12-es szerotípusra is kibővítették a rendszert, a 3-6-8-as szerotípusok elkülönítésére a 3-as szerotípus *cps* génjére specifikus PCR-t kombináltak az *apxIV* toxingén kimutatásával (Zhou és mtsai., 2008a és 2008b). A rendszer specifikusságát kérdőjelezi meg az a tény, hogy egyes esetekben *A. lignieresii*-re pozitív eredményt hozott a rendszer (Angen és mtsai., 2008).

Szintén *cps* gén kimutatásán alapuló PCR felhasználásával 1-2-8-as szerotípus elkülönítése során nem mutattak ki más Pasteurellaceae családból származó törzsek pozitív reakcióját (Schuchert és mtsai., 2004). Az *aroA* gén (egy szintázt kódoló gén) alapján történő szerotipizálással mind a 12 szerotípus megkülönböztethető az I-es biotípusból. A nemzetség tagjai közül egyedül az *Actinobacillus equuli* reagált, viszont ez a baktériumfaj nem igényel NAD-ot *in vitro* tenyésztése során, így könnyen elkülöníthető az I-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* törzsektől (Moral és mtsai., 1999). Egy másik lehetőség az *Apx* exotoxinokat kódoló gének segítségével történő szerotipizálás. Az *ApxI* és *ApxIII* exotoxinok

operonja 4 gént tartalmaz. A C gén egy aktivátor gén, az A gén egy inaktív pretoxint kódoló struktúrgén, a B és a D gén pedig membránhoz kötődő fehérjéket kódoló gének, amelyek az exotoxin sejtől való kijutását segítik. Az ApxII toxin operonjáról hiányzik a B és a D gén, expresszáálásához szükséges fehérjéket az ApxI-es operonon jelen lévő B és D gének kódolják (Frey, 1995).

Rayamajhi és mtsai (2005) 15 szerotípusból 11-et tudtak elkülöníteni 5 különböző primerpár felhasználásával. Az ApxIA és ApxIB primerpár használata azért szükséges, mert majdnem mindegyik szerotípusban megtalálható az *apxIB* szekvencia, így nem ad elegendő információt, hogy a szerotípusokat elkülönítsük, viszont az *apxIA* fragmentumok sok esetben nem láthatóak agarózgélben futtatva (Frey, 1995). Az ApxII és ApxIII primerpárok az ApxII és az ApxIII toxinok jelenlétét mutatják meg. Az Apx4DWN-L/ApxIVA1R primerpár az operon középső és '3 végét tartalmazza, mivel a DNS '3 vége adja a toxingén fajspecifikusságát (Schaller és mtsai., 2001). Ez az egyetlen *apxIV* toxingénre specifikus primerpár, amely négy különböző molekulatömegű fragmentumot amplifikál, ezáltal a szerotípusonkénti eltérés megfigyelhető. Az öt különböző primerpárból álló rendszer a 2-8-15-ös, az 5a-5b, a 9-11-es és a 12-13-as szerotípust nem tudja elkülöníteni egymástól, viszont multiplex PCR rendszerben is működik (3. táblázat) (Rayamajhi és mtsai., 2005).

3. táblázat: A 15 *A. pleuropneumoniae* típus törzs *apxI*, *apxII*, *apxIII* és *apxIV* gének PCR-rel történt amplifikálása során kapott eredmény (Rayamajhi és mtsai., 2005)

Sero- types	<i>apxIA</i>	<i>apxIB</i>	<i>apxII</i>	<i>apxIII</i>	<i>apxIV</i>	<i>apxIV</i>	<i>apxIV</i>	<i>apxIV</i>
	723bp	811bp	965bp	396bp	1600bp	2000bp	2400bp	2800bp
1	+	+	+				+	
2		+	+	+				+
3			+	+			+	
4		+	+	+	+			
5a	+	+	+					+
5b	+	+	+					+
6		+	+	+		+		
7		+	+					+
8		+	+	+				+
9	+	+	+		+			
10	+	+						+
11	+	+	+		+			
12		+	+				+	
13		+	+				+	
14	+	+					+	
15		+	+	+				+

A toxingéneken alapuló multiplex PCR technikával egyszerre lehet meghatározni és szerotipizálni az adott törzseket, ugyanis szoros korrelációt figyeltek meg a szerotípusok és a toxintermelés, és az ebből adódó virulencia között (Bossé és mtsai., 2002; Jessing és mtsai., 2003) (4. táblázat). Lehetőség van az adott szerotípus virulenciáját megbecsülni, esetleges

mutációval létrejött atípusos törzseket kimutatni, amelyek elveszthették egyes *apx* toxingénjeiket, így akár avirulensekké is válhattak (Frey, 1995).

4. táblázat: A szerotípusok által termelt Apx toxinok és azok operonjában található különböző funkcióval bíró génszakaszok és méreteik (Bossé és mtsai., 2002).

	Operon			Molekulatömeg (kDa)	Szerotípus
	Aktivátor	Strukturális	Export		
ApxI	<i>apxC</i>	<i>apxA</i>	<i>apxBD</i>	105-110	1, 5a, 5b, 9, 10, 11
ApxII	<i>apxIIc</i>	<i>apxIIA</i>	-	103-105	mind, kivéve 10
ApxIII	<i>apxIIIC</i>	<i>apxIIIA</i>	<i>apxIIIBD</i>	120	2, 3, 4, 6, 8
ApxIV	<i>ORF1</i>	<i>apxIVA</i>	-	200	Mind

A DNS-polimorfizmus meghatározása során (AFLP vizsgálatot alkalmazva) húsz csoportot különítettek el és a 15 korábban ismert szerotípus külön csoportokba lett besorolva, míg a nem tipizálható törzsek is alkottak egy-egy csoportot (Kokotovic és Angen, 2007).

3.10. Szerotípusok előfordulási gyakorisága

Az *A. pleuropneumoniae* szerotípusok rendkívül változatos módon oszlanak meg a világban. Húsz éve Európában a 2-es és a 9-es szerotípusok domináltak, ezzel szemben Észak-Amerikában az 1-es, az 5-ös és a 7-es szerotípusok fordultak elő leggyakrabban (Marsteller és Fenwick, 1999). Észak-Amerikában az 1-es szerotípus visszaszorult, helyette megnőtt a 8-as és a 12-es szerotípus gyakorisága, de továbbra is az 5-ös és a 7-es a leggyakoribb (Gottschalk és Lacouture, 2015). Németországban a 2-es, 7-es és a 9-es szerotípusok dominálnak (Dubreil és mtsai., 2000). Belgiumban a leggyakoribb szerotípusok a 2, 3, 5b, 8 és 10 (Chiers és mtsai., 2002), amely azért érdekes, mert egy szintén belga, de 10 évvel korábbi vizsgálatban, még elég gyakorinak számított a 9-es szerotípus is (Dom és mtsai., 1994b). Dániában a 2-es szerotípus tűnt a leggyakoribbnak, azonban itt készült publikáció az 5a és 5b szerotípusok megkülönböztetéséről, valamint foglalkoztak a II-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* törzsekkel is (Nielsen 1986b; Nielsen és mtsai., 1997).

Csehországban ezzel szemben a 9-es szerotípus a leggyakoribb (46,5%), ezt követi a 2-es és a 11-es (Kucerova és mtsai., 2005). Spanyolországban a 2-es, 4-es és 7-es szerotípusok okoznak megbetegedéseket (Gutiérrez-Martín és mtsai., 2006, Maldonado és mtsai., 2009). Nagy-Britanniában és Brazília dél-keleti részén a 8-as szerotípus dominál (Bossé és mtsai., 2016). Taiwanon az 1-es szerotípus fordul elő döntő többségben (Yang és mtsai., 2011). Ausztráliában harminc évvel ezelőtt az 1-es, 2-es, 3-as és 7-es szerotípusok domináltak (Eaves és Blackall, 1988), később a 12-es szerotípus terjedt el (Blackall és mtsai.,

1999), és ahhoz hasonlított, de nem volt egyértelműen szerotipizálható a 15-ösként leírt új szerotípus, amelyet eddig csak Ausztráliában izoláltak (Blackall és mtsai., 2002).

Magyarországon az 1990-es években történt vizsgálatok azt mutatták, hogy a 2-es, a 8-as, a 10-es és a 11-es szerotípusok voltak a leggyakoribbak (Molnár, 1990). Ezen kívül hazánkban sikerült elsőként szerotipizálni a II-es biotípusba tartozó 13-as szerotípust (Fodor és mtsai., 1989a és 1989b).

3.11. Az *A. pleuropneumoniae* genomjának vizsgálata

A teljes genom vizsgálata pulzáló mezejű gélelektroforézissel (PFGE) és a teljes genomszekvencia

A PFGE módszernek köszönhetően vizsgálható a teljes baktérium genom makrorestrikciós mintázata (Chevallier és mtsai., 1998). Az izolátumok genetikai hasonlóságát a PFGE prokarióták esetében a genomban megtalálható restrikciós hasítási helyek megléte vagy hiánya alapján vizsgálja (Kardos és Kiss, 2005). Filogenetikai és rendszertani következtetések ugyan nem vonhatóak le, de a PFGE-vel történő tipizálás, mint molekuláris biológiai módszer, kiválóan alkalmas a vizsgált izolátumok közti genetikai rokonság vizsgálatára a kapott mintázatok hasonlóságai és különbségei alapján (Riley, 2005).

Foote és mtsai. (2008) az 5b típusörzs teljes genomszekvenciájának vizsgálata során nem találtak DNS plazmidot, amely más *A. pleuropneumoniae* törzsben előfordul, és a kromoszóma nem tartalmazott duplikáló régiókat. Bossé és mtsai. (2016) egy kórtani mintából izolált törzs teljes genomszekvenciáját írták le (8-as szerotípus), és ebben a törzsben sem találtak plazmidot. Előzetesen megvizsgálták, hogy a referenciatörzsek milyen mértékben képesek a természetes átalakulásra és a 8-as típusörzs igen alacsony hajlandóságot mutatott erre. Az 5b típusörzshöz hasonlóan ez a saját izolátum is tartalmazza a teljes génekészletet, ami az átalakulást kódolja, de a természetes átalakulás mégsem hatékony az izolátum esetében.

A 16S rRNS gén

A 16S rRNS gén szekvenálása kiváló eszköz a baktériumok filogenetikai rokonságának feltérképezésére, a különböző forrásokból, környezeti mintákból vagy klinikai anyagokból származó baktériumok azonosítására. Napjainkban a laboratóriumok rutinszerűen alkalmazzák, főleg, ha az azonosítandó baktérium igényes, nehezen tenyészthető és lassan növekszik, hagyományos módszerekkel nehezen azonosítható. A 16S rRNS gén egy konzervatív régió, jellemző sok baktériumra és az erre tervezett univerzális primer lehetővé teszi, hogy a baktériumot fajszinten azonosítsuk (Vandamme és mtsai., 1996). Relman által 1993-ban leírt *Escherichia coli* konzervatív régióra (egy 440 bp-

ból álló génszakasz (930-1370)) tervezett primerpár jól alkalmazható a baktériumok, így az *A. pleuropneumoniae* fajsztíntű meghatározására is. Univerzális primerpárt terveztek (16S-up és 16S-do), melyek az Actinobacillus nemzetségre specifikusak (da Costa és mtsai., 2004), de nem csak nemzetségekre, hanem baktériumfajokra, mint pl. a *Histophilus somni*-ra is terveztek specifikus primert (Angen és mtsai., 1998).

3.12. Az *A. pleuropneumoniae* elleni ellenanyagok kimutatása

A szubklinikai fertőzés vizsgálatára alkalmas a vérből történő ellenanyag kimutatása ELISA módszerrel. A negatív állományok rendszeres szűrése is nagyon fontos, mert így elkerülhető, hogy pozitív állatok kerüljenek be egy mentes állományba (Gottschalk, 2015). Kereskedelmi forgalomban többféle ELISA kit kapható. A szerotípus-specifikus ELISA rendszerek, amelyek a hosszú láncú lipoliszacharidok elleni specifikus ellenanyagokat mutatják ki, a leggyakrabban előforduló szerotípusokra készültek (Costa és mtsai., 2011). Az ApxIV toxin ellen termelt ellenanyag kimutatása is lehetséges ELISA rendszerrel, de ebben az esetben csak azt tudjuk, hogy *A. pleuropneumoniae*-val fertőzött az állomány, az hogy milyen szerotípus lehet, arról nem kapunk információt. A legtöbb hagyományos állományban egy vagy több, általában alacsony virulenciával rendelkező *A. pleuropneumoniae* törzs fordul elő (Gottschalk, 2012).

3.13. Gyógykezelés, védekezés

Antibiotikum-érzékenység

A betegség gyógykezelésére egyedi és állományszinten adott különféle antibiotikumokat alkalmaznak. Az *A. pleuropneumoniae* a Pasteurellaceae családba tartozó többi baktériumfajhoz hasonlóan különböző mértékben rezisztens egyes antibiotikumokkal szemben (Dom és mtsai., 1994b; Yoshimura és mtsai., 2002; Nedbalcova és mtsai., 2005; Kucerova és mtsai., 2011). A gyógykezelésnél mindig szem előtt kell tartani, hogy az antibiotikum-rezisztencia országonként, de még sertésállományonként is változhat a felhasznált hatóanyagoknak megfelelően, éppen ezért a kórtani esetekből a kórokozó izolálása és az antibiotikum-érzékenység meghatározása elengedhetetlen a helyes kezelés kiválasztásához.

Az *A. pleuropneumoniae* okozta pleuropneumonia kezelésére többféle antibiotikumot használnak, amelyek osztályozása humángyógyászati fontossági sorrend alapján történik.

Bizonyos antibiotikumokra az *A. pleuropneumoniae* törzsek közel 100%-ban érzékenyek (pl. ceftiofur, amoxicillin-klavulánsav, florfenikol, enrofloxacin). Humángyógyászati érdekeket is szem előtt tartva az elsődlegesen alkalmazott szerek azok az antibiotikum csoportok, amelyek humán felhasználásra nem, vagy alig kerülnek (pl. florfenikol, spektinomycin, szulfonamidok). Ide sorolják a tetraciklineket is, amikkel

szemben az *A. pleuropneumoniae* törzsek szerte a világban egyre fokozódó rezisztenciát mutatnak. Második vonalbeli szerek közé azokat a csoportokat soroljuk, amelyeket csak rezisztencia-vizsgálatot követően lenne szabad alkalmazni, de ennek ellenére gyakorta történik velük kezelés egyedileg, ill. állományszinten. Ebbe az osztályba tartoznak a makrolidok (tilmikoazin, tulatromicin, tildipirozin), amelyek a tüdőben baktericiddé alakulnak, a penicillinek (penicillin, amoxicillin, ampicillin), az 1. és 2. generációs cefalosporinok, valamint a gentamicin és linkomicin.

Harmadik vonalbeli szerek osztályába azokat a hatóanyagokat soroljuk, amelyek kizárólag diagnosztikai és rezisztencia-vizsgálatot követően kerülhetnek felhasználásra, ezzel is óvva a humángyógyászati érdekeket. Idetartoznak a fluorokinolonok (enrofloxacin, marbofloxacin) és a 3. és 4. generációs cefalosporinok (cefquinom).

Az izolált *A. pleuropneumoniae* törzsek a világ legnagyobb részén a tetraciklinekkel szemben mutatnak rezisztenciát, ez alól kivételt Japán és Taiwan képez (Nedbalcova és mtsai., 2005, Yoshimura és mtsai., 2002). A tiamulinnal szemben az izolált törzsek 72,7%-a mutatott rezisztenciát (Nedbalcova és mtsai., 2005). Több kutató állítja, hogy nincs kapcsolat az antibiotikum-érzékenység és a szerotípusok között, de néhányan véltek felfedezni némi összefüggést az antibiotikum-rezisztencia és néhány *A. pleuropneumoniae* szerotípus között (Yoshimura és mtsai., 2002).

Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokra két alapvető módszert használnak: a gyakorlati szempontból érdekes és gyors eredményt adó korongdiffúziós eljárást, valamint az ún. legkisebb gátló koncentráció (MIC) meghatározására irányuló leves- vagy agarhígításos módszert.

Taiwanban korongdiffúziós vizsgálat során összesen 10 antibiotikumot vizsgáltak (amoxicillin, ampicillin, ceftiofur, cefalotin, klóramfenikol, doxiciklin, gentamicin, lincospektin, nitrofurantoin, oxitetracliklin). A vizsgálat eredményeként a ceftiofurra mutatott érzékenység 100%-os, míg az oxitetracliklinre mutatott érzékenység 47,4%-os lett. Komoly problémát jelent, hogy az eredmények ellenére az oxitetracliklint országában prevencióra használják, pedig a nagyfokú rezisztencia miatt nem szabadna (Yang és mtsai., 2011).

A 2000-es évek elején Csehországban korongdiffúziós vizsgálatok alapján kismértékben növekvő rezisztencia volt megfigyelhető amoxicillin-klavulánsavval szemben, de erőteljesen nőtt a rezisztencia tetraciklinekkel, norfloxaccinnal és tiamulinnal szemben. Az eritromicinnal szemben a vizsgálatba vont törzsek, az izolálás évétől függetlenül közel 100%-ban rezisztensek voltak (Nedbalcova és mtsai., 2005).

Ugyanez a kutatócsoport 2007 és 2011 között izolált *A. pleuropneumoniae* törzsekre célzottan a béta-laktám antibiotikumokat vizsgálta. A MIC-érték meghatározása után kis mértékű rezisztenciát találtak az izolált törzsek között ampicillinnel és amoxicillin-klavulánsavval szemben, míg ceftiofurra és cefquinomra a törzsek közel 100%-a érzékeny

volt, rezisztenciát nem találtak (Nedbalcova és mtsai., 2014). Ceftiofurra régóta nagyon magas érzékenységről számolnak be különböző országokban izolált *A. pleuropneumoniae* törzsek esetében (Chang és mtsai., 2002). 2002 és 2006 közötti *A. pleuropneumoniae* izolátumok érzékenységét vizsgálták egy nagy páneurópai monitoring MIC-vizsgálat keretében. Minden törzs érzékeny volt amoxicillin-klavulánsavra, ceftiofurra, florfenikolra, tiamulinra és tilmikozinra, enrofloxacinnal szemben kevesebb, mint 1% volt rezisztens. Potencionált szulfonamiddal (SXT) szemben a törzsek 4,5%-a rezisztens volt, míg tetraciklin-rezisztencia elérte a 14,7%-ot (de Jong és mtsai., 2014).

2009 és 2012 között hasonló vizsgálatot végeztek tíz európai országból izolált, 158 *A. pleuropneumoniae* törzs esetében. A kapott eredmények alapján továbbra is minden vizsgált törzs érzékeny amoxicillin-klavulánsavra és ceftiofurra, míg florfenikollal és tilmikozinnal szemben a törzsek kevesebb, mint 1%-a volt rezisztens. Enrofloxacinnal szemben 0,4%-ról 1,3%-ra nőtt a rezisztencia. Potenciált szulfonamiddal szemben (SXT) viszont csökkent a rezisztencia, valamint tetraciklinekkel szemben az elmúlt tíz évben a rezisztencia növekedését állapították meg. Ebbe a vizsgálatba már a tularomicint is bevonták, amire minden törzs érzékenynek bizonyult (El Garch és mtsai., 2016).

A korongdiffúziós módszer és a leveshígítási mikromódszer eredményeit összehasonlítva Dániában szoros korrelációt állapítottak meg penicillin, enrofloxacin, spektinomycin, tiamulin és tilozin esetében, viszont ceftiofurral és SXT-vel szemben több törzs is rezisztens volt korongdiffúziós vizsgálat során. Ezt a nem megfelelően beállított standard zónahatárértékekkel magyarázták, hiszen a MIC-értékek ezekre az antibiotikumokra jóval a határérték alatt voltak (Aarestrup és Jensen, 1999).

Az állomány szinten elengedhetetlen a takarmányba, illetve ivóvízbe kevert antibiotikus kezelés, de heveny megbetegedés esetén célszerű az antibiotikumot injekciós formában adni az állatoknak, ugyanis egy súlyosan beteg, lázas sertés valószínűleg nem tud elegendő gyógyszert a takarmánnyal vagy a vízzel magához venni (Yang és mtsai., 2011).

Antibiotikum-rezisztenciagének

Az *A. pleuropneumoniae* antibiotikum-rezisztenciájának hátterében számos tényező mellett sokszor rezisztenciagének állnak. A béta-laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztenciáért a béta-laktamáz enzim termelését szabályozó gének a felelősek (pl. *bla_{ROB-1}*). A tetraciklin rezisztencia kialakulásában is többféle gén szóba jöhet (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetL*, *tetK*, *tetH*, *tetO*), amelyek más-más rezisztenciáért felelős részt kódolnak és ezek a gének nem csak az *A. pleuropneumoniae* fajban találhatóak meg (Levy és mtsai., 1999). A makrolidokkal szembeni rezisztencia hátterében is sokszor kimutathatók a

rezisztenciagének (*ErmA*, *ErmC*) (Wasteson és mtsai., 1996; Dayao és mtsai., 2016a és 2016b).

Vakcinák használata

A betegség megelőzésére különböző törzskönyvezett, kereskedelmi forgalomban lévő vakcinák használhatók. Vakcinázáskor figyelembe kell venni, hogy a felületi antigénekre alapozott esetben a védelem szerotípus-specifikus. Endémiásan fertőzött nagyobb tenyészetekben a betegség kártételeinek megelőzésére érdemes az adott állományban előforduló leggyakoribb szerotípusú törzseket tartalmazó inaktivált telepspecifikus vakcinát használni, de a forgalomban lévő oltóanyagok is alkalmasak, ha tartalmazzák az adott állományban előforduló szerotípust, szerotípusokat (Haesebrouck és mtsai., 2004).

Az inaktivált bakterin típusú vakcinák hővel vagy formalinnal előlt teljes baktériumsejtet tartalmazzák. Nagy előnye ennek a típusú vakcinának, hogy sejtes antigéneket és immunogéneket nagy számban tartalmaz, de nem okoz károsodást a szövetekben. Hátránya, hogy csak a homológ szerotípussal szemben ad védelmet, más szerotípusokkal szemben nem (Thacker és Mulks, 1988; Fenwick és Henry, 1994; Šatrán és mtsai., 2003).

Az aleggységvakcinák olyan specifikus fehérjéit vagy szénhidrátjait tartalmazzák a baktériumnak, amelyek a protektív immunitásért felelnek. Az *A. pleuropneumoniae* esetében ezek a felületi összetevők a burookban találhatóak, ide tartoznak a lipopoliszacharidok és a membránfehérjék.

A legnagyobb probléma az, hogy a szerotípusok rendkívül nagy heterogenitást mutatnak a burok- és a lipopoliszacharidokat illetően (Perry és mtsai., 1990; Dubreuil és mtsai., 2000), emiatt az ilyenfajta aleggységvakcinák nem biztosítanak heterológ védelmet (Rioux és mtsai., 1997). A PalA külsőmembrán-fehérje vakcinában való alkalmazásához nagy reményeket fűztek (Frey és mtsai., 1996), de később kiderült, hogy az immunrendszer *A. pleuropneumoniae*-val szembeni védekezését negatív irányba befolyásolja (van den Bosch és Frey, 2003).

Az Apx toxinok rendkívül jó immunogének, így a belőlük készült, inaktivált toxinokat tartalmazó, ún. toxoid vakcinák jó ellenanyagválaszt indukálnak a szervezetben (Byrd és Kadis, 1992; van den Bosch és mtsai., 1992; Madsen és mtsai., 1995). A toxoid vakcinák standardizált mennyiségben tartalmazzák ApxI, ApxII és/vagy ApxIII inaktivált toxint (Chiers és mtsai., 1998; van Overbeke és mtsai., 2001; Habrun és mtsai., 2002; van den Bosch és Frey, 2003; Tumamao és mtsai., 2004; Meeusen és mtsai., 2007). Az *A. pleuropneumoniae* 1-es szerotípusa ApxI és ApxII toxint is termel. Egy egerekkel végzett kísérlet során azt találták, hogy az ApxI toxin N-terminális része jó védelmet biztosít heterológ törzsekkel szemben is (Seah és mtsai., 2002). Későbbi vakcinázási kísérletekben az ApxIII N- és C-

termináljai szintén magas védelmet biztosítottak, ami azzal magyarázható, hogy ezek a részek felelősek a citotoxin-neutralizáló aktivitásért (Seah és Kwang, 2004).

Az élő, attenuált vakcinák mindig magukban rejtik azt a veszélyt, hogy teljes virulenciával bíró fenotípussá alakulhatnak. Viszont a gyengített, de élő baktérium sokkal nagyobb keresztvédelmet képes kiváltani, aminek az oka az, hogy a legtöbb protektív antigén *in vivo* expresszálódik. Viszont ha ez elegendő lenne a teljes védelemre, akkor azt is gondolhatnánk, hogy egy vadvirulens törzssel való fertőződés elegendő ahhoz, hogy az ellene termelt ellenanyagok a későbbiekben megvédjék a sertést a homológ és heterológ *A. pleuropneumoniae* szerotípusokkal szemben (Nielsen, 1984; Crujisen és mtsai., 1995; Haesebrouck és mtsai., 1996).

A telepspecifikus vakcina egyszerre több bakteriális betegség kórokozójával szemben tudja emelni az egyedek és így az állomány védettségét és az adott földrajzi területen (telepen, településen) előforduló szerotípusú kórokozókkal szembeni immunválasz kialakulását szolgálja. Ennek köszönhető, hogy az *A. pleuropneumoniae* szerotípusokkal szemben esetleg jobb védelmet biztosíthat a kereskedelmi forgalomban lévő, törzskönyvezett vakcinákhoz képest. A módszert (autovakcina) a humán gyógyászatban is nagy sikerrel alkalmazzák (Zagólski és mtsai., 2015).

Jelenleg nincs olyan alegységvakcina a piacon, amely teljes és teljesen kielégítő védelmet nyújtana a 16 *A. pleuropneumoniae* szerotípussal szemben. Ennek oka abban keresendő, hogy a legtöbb virulenciafaktor csak az állatban expresszálódik (Schaller és mtsai., 1999).

Magyarországon jelenleg kereskedelmi forgalomban törzskönyvezett, inaktivált, bakterin típusú, valamint inaktivált, standardizált mennyiségben *A. pleuropneumoniae* toxinokat és külső membrán fehérjét tartalmazó vakcinák vannak. Ezekon kívül elérhetők az állatállományra szabott, az adott állatállományban megtalálható, kórtani esetekből származó szerotípusú törzseket tartalmazó telepspecifikus vakcinák is. Új *A. pleuropneumoniae* szerotípus felbukkanása és az általa okozott heveny kórkép egy állományban mindig kihívást jelent az állatorvos számára, hiszen a vakcinázási protokoll ennek megfelelően kell alakítani.

4. Anyag és módszer

4.1. Mintagyűjtés

Az *A. pleuropneumoniae* törzsek gyűjtése során arra törekedtünk, hogy törzseink az ország minél több sertésállományából származzanak. A mintagyűjtés telepi kiszállások és vágóhídi vizsgálatok keretében 2012. január és 2016 júniusa között történt. Magyarország két nagy vágóhídján többször is gyűjtöttünk tonsilla- és tüdőmintát (1. ábra). Több gyógyszerforgalmazó cég területi képviselője, valamint sertéstelepeket ellátó állatorvosok segítettek, hogy azokról a sertéstelepekről, ahol heveny járványkitörés miatt pleuropneumonia tüneteit követően elhullás történt, a tüdőminta laboratóriumunkba érkezzen.



1. ábra: Tüdővizsgálat vágóhídon, (nyíl: idült actinobacillus pleuropneumoniás góc)

4.2. A minták eredete

Tüdő és tonsilla

A mintagyűjtés négy és fél éve alatt 18 megyéből 70 sertésállományból gyűjtöttünk tüdőt. Összesen 634 tüdőminta alapján vizsgáltuk az *A. pleuropneumoniae* előfordulását. Egy-egy állományból gyakran több tüdőt is gyűjtöttünk, illetve több telepről egy éven belül többször érkezett be tüdőminta, ahogy vágóhídi gyűjtések során is előfordult, hogy ugyanabból az állományból többször vettünk mintát. Ha a szerotípus a mintagyűjtések időpontjaiban nem változott, akkor csak egy izolátumot vizsgáltunk a továbbiakban egy állományból.

Munkánk során 40 sertés tonsilláját vizsgáltuk meg, melyek közül 6 Hajdúszoboszlóról (4 tonsilla vágóhídi gyűjtésből, 1 hízó telepi elhullásból beküldve, 1 tonsilla 28 napos malacból, telepi elhullás), 14 Ormándlaktól (mind heveny actinobacillus

pleuropneumoniában elhullott hízó mandulája) és 20 Derecskéről (selejt kocák tonsillája) lett vizsgálatra küldve. A Derecskéről származó minták kivételével a tüdőt is vizsgáltuk, és azokból *A. pleuropneumoniae* baktériumot izoláltunk.

2016 februárjában Soponyáról, egy vadbegyűjtő helyről 68 vaddisznóból származó tonsillát gyűjtöttünk. A minták 8 különböző megyéből (Baranya, Fejér, Győr-Moson-Sopron, Komárom-Esztergom, Somogy, Szabolcs-Szatmár-Bereg, Tolna, Veszprém) származtak. A tonsillákat külön-külön csomagolva hűtőtáskában szállítottuk a tanszék laboratóriumába, ahol azonosítószámuk feljegyzését követően egyedi sorszámmal láttuk el őket és egyenként csomagolva fagyasztóládában -20 °C-on tároltuk a bakteriológiai vizsgálat megkezdéséig.

Egy Hajdú-Bihar megyei sertésstelepen a heveny actinobacillus pleuropneumoniát egy nem besorolható szerotípusba tartozó törzs okozta, és emiatt felmerült a gyanú, hogy az addig alkalmazott bakterin típusú vakcina nem alkalmas a betegség megelőzésére. Toxoid típusú vakcinára váltottak, és fél évvel később vágóhídon gyűjtött, idült elváltozásokat mutató tüdőmintákat hoztak a laboratóriumunkba a kórokozó izolálása céljából.

Korábban izolált *A. pleuropneumoniae* törzsek

Vizsgálatainkba bevontuk azt a 47, I-es biotípusba és 28, II-es biotípusba sorolt *A. pleuropneumoniae* törzset, amelyeket tanszékünkön 1995 és 2010 között izoláltak és a tanszék törzsgyűjteményében -80 °C-on tároltak. Csak 28 törzs pontos eredete ismert, ezek 9 megyéből 12 sertésállományból származnak, két állományból izoláltak két-két különböző szerotípust. Így összesen 14 izolátumot hasonlítottunk az általunk izolált törzsek szerotípusához. A törzsek az elsődleges biokémiai tulajdonságaik alapján lettek *A. pleuropneumoniae* fajként meghatározva.

Típustörzsek

A hiperimmun savó előállításához, valamint vizsgálómódszereink minőségellenőrzéséhez a típustörzseket Dr. O. Angen bocsátotta felhasználásra (Dán Állategészségügyi Intézet, Mikrobiológiai Osztály, Koppenhága) (5. táblázat).

5. táblázat: A 15 típustörzs referencia száma

Referencia szám	Szerotípus	Referencia szám	Szerotípus
Shope 4074	1	405	8
S1536	2	CVI13261	9
S1421	3	D13039	10
M62	4	56153	11
K17	5a	8329	12
L20	5b	N273	13
FemØ	6	3906	14
WF83	7	HS143	15

4.3. A szervminták feldolgoása

A telepi és vágóhídi kiszállások alkalmával a tüdőmintákat hűtőtáskában szállítottuk az ÁTE Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék bakteriológiai laboratóriumába. Abban az esetben, ha a telepen elhullás történt, a beküldő állatorvosok a szerveket 4 °C-ra hűtve, vagy -20 °C-on tárolták a beküldésig. A laboratóriumban az elváltozást mutató tüdőrészt forró szikepengével leégettük, majd steril szikével megnyitva egy kacsnyi mennyiséget vettünk a metszészlapra ömlő véres váladékból és a tüdő állományából. A mintát 10% juhvért tartalmazó tripton-szója agarra (TSA, Biolab Zrt.) oltottuk. A lehetséges NAD-függőség miatt a szélesztést követően *S. aureus*-szal történő áthúzással dajkatenyészetet készítettünk. A leoltás után a táptalajokat aerob körülmények között 24 órán át 5% CO₂ jelenlétében 37 °C-os termosztátban inkubáltuk, majd szintenyészetet állítottunk elő. A morfológiai, tenyésztési és biokémiai tulajdonságai alapján *A. pleuropneumoniae* I-es vagy II-es biotípusnak bizonyult törzseket további felhasználásukig 25% steril glicerint tartalmazó táplevesbe szuszpendálva mélyhűtőben (-80 °C-on) tároltuk (Barrow és Feltham, 2003).

A tonsillát forró szikepengével leégettük, majd steril szikepengével rámetsettünk és az állományából kb. 100 µl mennyiséget kikapartunk és 600 µl fiziológiás konyhasóoldatba szuszpendáltuk. A Jacobsen és Nielsen (1995) által leírtak alapján a szuszpenzióból 50 µl-t tettünk a táptalajra, ezt steril üvegbottal szélesztettük, majd az üvegbottal egy második táptalajra is oltottunk. A tenyészeteket 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. A telepek elbírálását, morfológiai, biokémiai és tenyésztési sajátosságainak vizsgálatát standard leírások alapján végeztük (Barrow és Feltham, 2003).

4.4. A kórokozó azonosítása tenyésztési, morfológiai és biokémiai tulajdonságai alapján

Az *A. pleuropneumoniae*-ra emlékeztető törzsek esetében vizsgáltuk a NAD-függőséget, a hemolízist, majd a biokémiai és a morfológiai tulajdonságaikat klasszikus, standard bakteriológiai módszerek segítségével vizsgáltuk. A baktérium alakját és festődését 24 órás baktériumtenyészetekből készített Gram-szerint festett kenetek 1000x-es nagyításának fénymikroszkópos vizsgálatával határoztuk meg.

Az izolált törzseknél elvégeztük zsírtalanított tárgylemezen a kataláz-próbát. Kacsnyi mennyiségű baktériumra 3%-os hidrogén-peroxidot (H₂O₂) cseppentettünk és az elbírálást szabad szemmel végeztük a gázképződés (O₂) megindulása vagy hiánya alapján.

A citokróm-oxidáz C enzim kimutatását (oxidáz próba) szűrőpapíron, steril műanyag Petri-csészében végeztük. A 4-5 telepnyi baktériumot steril, műanyag kaccsal vettük fel és kentük a szűrőpapír felületére, majd tetrametil-parafenilén-diamin (Sigma) vizes oldatát tettük rá, amelyet mindig frissen készítettünk, és 10 másodpercen belül szabad szemmel elbíráltuk

a pozitív eredményt jelző kék színváltozás meglétét vagy hiányát. (Barrow és Feltham, 2003).

4.5. A baktérium azonosítása a 16S rRNS gén részletének vizsgálatával

Egyes klasszikus szerotipizálható módszerrel nem besorolható törzsek (2. függelék) vizsgálatát 16S rRNS génszakasz kimutatásán alapuló PCR módszerrel végeztük el.

4.5.1. DNS-kivonás

A DNS-kivonás során a kereskedelmi forgalomban kapható QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit, DNS-kivonót használtuk (Qiagen Inc., USA) és a gyártó ajánlásait (Protocol C és Tissue protocol) követtük. A friss izolátumból szintenyészetet hoztunk létre, vagy a -80 °C-on tárolt baktériumtörzseket véresagarra vagy NAD-ot tartalmazó csokoládéagarra oltottuk, majd 24 órás inkubáció elteltével kivontuk a DNS-t. Egy-egy oltókacsnyi telepet 180 µl ATL pufferbe (szövetoldó puffer) szuszpendáltuk, hozzáadtunk 20 µl Proteináz K-t (Fermentas, Litvánia), majd összerázás után 56 °C-on a teljes feloldódásig inkubáltuk (2-3 óra) őket. Az inkubációt követően a cső kupakjáról centrifugálással távolítottuk el a cseppeket, majd 200 µl Buffer AL-t (oldó puffer) adtunk a mintához, 15 másodpercig kevertük és 70 °C-on 10 percig inkubáltuk. A centrifugálást követően 200 µl etil-alkoholt (96%) adtunk az elegyhez, 15 másodpercig kevertük, majd lecentrifugáltuk és áthelyeztük egy speciális szűrőből és gyűjtőcsőből álló 2 ml-es csőbe (QIAamp Spin Column). A mintákat 6000 g-vel (8000 rpm) centrifugáltuk 1 percig, a szűrletet tartalmazó gyűjtőcsövet újra cseréltük, 500 µl Buffer AW1 (víz puffer1) oldatot pipettáztunk a szűrős csőbe és megismételtük a centrifugálást. A gyűjtőcső cseréjét követően 500 µl Buffer AW2 (víz puffer2) oldatot adtunk a mintához és 20000 g-vel (14000 rpm) 3 percig centrifugáltuk. A gyűjtőcsövet 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőre cseréltük és a mintához 100 µl Buffer AE (kivonó puffer) oldatot adtunk, szobahőmérsékleten 1 percig inkubáltuk és centrifugáltuk. A műveletsor befejeztével 100 µl kivont DNS-t kaptunk, melyet további felhasználásig -20 °C-on tároltunk.

4.5.2. Az A. pleuropneumoniae törzsek 16S rRNS gén részletének amplifikálása

A PCR során egy 440 bp méretű 16S rRNS génszakaszt amplifikáltunk, amely az *E. coli* DNS-ének 930-1370 helyeződésének felel meg. A 91E forward primert (5'-GGAATTCAAAGAATTGACGGGGGC-3') és a 13B reverz primert (5'-CGGGATCCCAGGCCCGGGAACGTATTAC-3') használtuk (Mignard és Flandrois, 2006). A PCR elegy összetevőit a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: A PCR reakcióelegy összetétele:

Reakcióelegy	Térfogat (µl)
H ₂ O: MilliQ	27,5
Puffer: GoTaq	10
MgCl ₂ (25 mM)	5
dNTP (10 mM)	1
(10 µM) primer F1	2
(10 µM) primer R1	2
Taq: GoTaq (5 U/µl)	0,5
DNS	2
Végő térfogat	50

A PCR során használt vegyszerek eredete: Taq puffer, dNTP, MgCl₂ (Fermentas, Litvánia), primerek (Sigma), polimeráz (Thermo Scientific).

A PCR reakciót a Biometra T-personal 48 Thermal Cycler (Biocompare®, USA) készülékkel végeztük. A PCR programot az 7. táblázatban foglaltuk össze.

7. táblázat: A 16S rRNS gén PCR során alkalmazott program:

95 °C	2 perc	} 40x
95 °C	30 másodperc	
55 °C	30 másodperc	
72 °C	1 perc	
72 °C	5 perc	

4.5.3. Agarózgél elektroforézis

A PCR termékeket agarózgél elektroforézissel mutattuk ki. DNS-hez kötődő GRGreen Nucleic AcidGel Stain festéket (Thermo Scientific, USA) használtunk. A 2%-os agarózgél dermedését követően a zsebekbe 15-15 µl terméket, a kiértékelés segítésére a legszélső zsebbe pedig 3,5 µl molekulatömeg-markert (GeneRuler 1kb DNA ladder, Thermo Scientific, USA) pipettáztunk. A gélelektroforézis TAE (40 mM Tris-acetát és 1 mM EDTA; pH 8,3) pufferben 100 V-os feszültségen 30 percen keresztül tartott. A termékeket UV fény segítségével tettük láthatóvá, és egy digitális kamera (Kodak, USA) segítségével elektronikusan rögzítettük és leolvastuk az eredményeket.

4.5.4. A PCR termékek kivonása az agarózgélből

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., USA) DNS tisztító kit segítségével tisztítottuk ki a gyártó ajánlása szerint.

Az agarózgélből egy steril szikepengével kivágtuk azt a legkisebb géldarabot, ami tartalmazta a PCR terméket és meghatároztuk a tömegét - 100 mg ~ 100 µl összefüggést alkalmazva - és ezt követően háromszoros QG oldópuffert adtunk hozzá. A géldarabot az oldópufferben 50 °C-on inkubáltuk a gél feloldódásáig (általában 10 perc), amikor az

oldatunk sárga színűvé vált. Ezután egyszeres mennyiségű izopropil-alkoholt adtunk az elegyhez és alaposan elkevertük. A homogén keveréket 2 ml-es gyűjtőcső szűrővel ellátott centrifugacsövébe pipettáztuk és 1 percig ≥ 10.000 g-n (~ 13.000 rpm) centrifugáltuk. A centrifugázott és így átszűrt folyadékot előntöttük, majd 500 μ l QG mértünk rá és újból 1 percen keresztül centrifugáltuk. Elöntve az átszűrt folyadékot a szűrőre 750 μ l PE mosópuffert pipettáztunk, 5 percen keresztül szobahőn inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk 10.000 g-n (~ 13.000 rpm). Elöntöttük a szűrletet és újabb egy percig centrifugáltuk. Ezután a centrifugacsövet 1,5 ml űrtartalmú mikrocentrifugacsőbe helyeztük 50 μ l EB kioldó puffert (10 MmTris-Cl; pH 8,5) mértünk rá, 5 percet szobahőn inkubáltuk és 1 percen keresztül a legmagasabb fordulatszámon ~ 20.000 g (~ 15.000 rpm) centrifugáltuk, amelynek során a DNS a szűrő membránjáról a folyadékfázisba került. Az agarózgélből kitisztított PCR termékeket -20 °C-on tároltuk.

4.5.5. *A 16S rRNS génrészlet bázissorrendjének meghatározása, vizsgálata*

A kitisztított PCR termékek bázissorrendjét a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában határoztattuk meg. A BLAST algoritmuson (Altschul és mtsai., 1997) alapuló elemzőprogramok segítségével összevetettük a 16S rRNS génrészlet szekvenciáját az NCBI honlapján elérhető adatbázissal.

4.6. **Az *A. pleuropneumoniae* törzsek szerotipizálása**

Hiperimmun savó termelése

Az *A. pleuropneumoniae* 15 típus törzsével, valamint 6 általunk izolált nem besorolható törzsszel szemben nyulakban hiperimmun savót termeltettünk Biberstein (1978) módszerével. Az eljárás során az I-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* törzseket 67 μ g/ml koncentrációjú NAD-ot tartalmazó csokoládéagarra, a 13 és 14-es típus törzseket pedig TSA alapú véresagarra oltottuk, és 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően 40 ml fiziológiás konyhasóoldatba szuszpendáltuk a baktériumokat (nagyjából 3×10^{10} telepformáló egység/ml (TFE/ml)) és 0,5% formaldehidet adtunk hozzá.

A szuszpenziót 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd az inaktivált baktériumokat centrifugálás után fiziológiás konyhasóoldatban szuszpendáltuk és 4 °C-on tároltuk a felhasználásig. Mind a 15 típus törzs antigénjével három-három, míg a 6 nem besorolt törzs antigénjével két-két, kb 3 kg-os nyulat oltottunk. Az első oltás alkalmával 0,5 ml-t injektáltunk bőr alá, majd 3-4 napos időközökkel 1,0; 2,0; 3,0; 3,0; 3,0 ml következett intravénásan beadva. Az utolsó oltást követően egy hét elteltével került sor a nyulak elvéreztetésére, amely teljes anesztézia mellett történt (kísérleti engedély száma: 22.1/2703/003/2009). A savót kis adagokban -20 °C-ra fagyasztottuk a későbbi felhasználásig.

A passzív hemagglutinációs próbába bevont *A. pleuropneumoniae* törzsek

2012 és 2016 között izolált *A. pleuropneumoniae* baktériumtörzseket, egy telepről akár több izolátumot is, passzív hemagglutinációs próbával szerotipizáltunk. Ezzel kívántuk vizsgálni, hogy egy telepen belül milyen szerotípusok fordulnak elő.

A passzív hemagglutinációs próba (PHA)

A szerotipizálási vizsgálatokat 96-vályulatú U-aljú mikrotitráló lemezekben (Kartell Labware, Olaszország) végeztük. Az *A. pleuropneumoniae* minden típusú törzsét mindegyik hiperimmun savóval reagáltattuk.

A PHA lépései:

- 5 ml fiziológiás konyhasóoldatba szuszpendáltuk a baktériumtörzseket (antigén), majd 56 °C-os vízfürdőben 30 percig inkubáltuk
- 50 µl mosott (háromszor fiziológiás konyhasóoldattal) juh vörösvértest szuszpenzióját adtunk a fiziológiás konyhasóoldat-baktérium szuszpenzióhoz
- 60 percre 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük,
- háromszor 15 percig centrifugáltuk és a felülúszót elöntve a vörösvértesteket fiziológiás konyhasóoldattal mostuk
- az utolsó mosás után az érzékenyített vörösvértesteket 10 ml fiziológiás konyhasóoldatban szuszpendáltuk.

A lemez minden mélyedésébe mértünk 50 µl fiziológiás konyhasóoldatot, majd a típusú törzsekkel szemben termelt savókból 50-50 µl-t adtunk az első oszlopokba, amelyet felező hígítással (\log_2 alapú hígítási sor) hígítottunk. Ezt követően tettük bele a 96 mikrocsőbe az 50 µl érzékenyített vörösvértest szuszpenziót. Az utolsó oszlopot kontrollként használtuk, abba nem tettünk savót, csak antigént. A lemezeket 2 órán át szobahőmérsékleten tároltuk, majd 24 órára hűtőbe (+4 °C) tettük, és csak 24 óra elteltével bíraltuk el. Kiválasztottuk a legmagasabb titerértékeket adó savókat és a továbbiakban a kórtani esetekből izolált törzseket ezekkel a savókkal vizsgáltuk.

4.7. Genomvizsgálatok (PCR)

Toxingének meghatározása

A molekuláris biológiai módszerek közül a toxingének kimutatásán alapuló PCR-rel tettünk kísérletet 60, általunk izolált törzs szerotípusának (2. függelék) meghatározására. A módszer működését a típusú törzsek PCR vizsgálatával ellenőriztük. A PFGE vizsgálatokba bevont I-es biotípus 2-es szerotípusba és II-es biotípusba tartozó törzsek toxingén mintázatát is ezzel a PCR módszerrel vizsgáltuk (1. függelék).

DNS-kivonás az *A. pleuropneumoniae* törzsekből és a PCR reakció lépései

A módszer megegyezik a 4.5.1. pontban leírtakkal. A PCR-es vizsgálat során 5 primerpárt használtunk a 4 *apx* gén amplifikálására (Rayamajhi és mtsai., 2005) (8. táblázat).

8. táblázat: A szerotipizáláshoz felhasznált primerek és nukleotid szekvenciájuk (Rajamayhi és mtsai., 2005)

Primer név	Szekvencia (5'-3')	GénBank	Helyeződés
ApxIAF	ATC GAA GTA CAT CGC TCG GA	X52899	275-295
ApxIAR	CGC TAA TGC TAC GAC CGA AC	X52899	968-998
ApxIBF	TTA TCG CAC TAC CGG CAC TT	X68595	4102-4121
ApxIBR	TGC AGT CAC CGA TTC CAC TA	X68595	4893-4913
ApxIIF	GAA GTA TGG CGA GAA GAA CG	AY736188	973-993
ApxIIR	CGT AAC ACC AGC AAC GAT TA	AY736188	1918-1938
ApxIIIF	GCA ATC AGT CCA TTG GCG TT	X80055	9558-9578
ApxIIIR	GAC GAG CAT CAT AGC CAT TC	X80055	9934-9954
Apx4DWN-L	GCG AAA CAA TTC GAA GGG	AF021919	6459-6442
ApxIV-IR	GGC CAT CGA CTC AAC CAT	AF021919	4111-4128

A Rajamayhi és munkatársai által leírt közleménytől eltérően két PCR programot használtunk az ApxIA, ApxIB, ApxII, ApxIII-as primereknél (8 primer) és az ApxIV primerpárnál (9. táblázat).

9. táblázat: A reakcióelegyek összetevői az egyszerű (1.) és multiplex (2.) PCR-hez

1. Reakcióelegy (ApxIV)		2. Reakcióelegy (ApxI, ApxII, ApxIII)	
Összetevők	µl	Összetevők	µl
H ₂ O: MilliQ	39,4	H ₂ O: MilliQ	33,35
10x dream Taq puffer	5	10x dream Taq puffer	5
dNTP (10 mM)	1	dNTP (10 mM)	1,25
primer F (10 µM)	1	primerek F (10 µM)	1-1
primer R (10 µM)	1	primerek R (10 µM)	1-1
Taq: GoTaq (5 U/µl)	0,6	Taq: GoTaq (5 U/µl)	0,4
templát DNS	2	templát DNS	2
Végző térfogat	50	Végző térfogat	50

A PCR során használt vegyszerek eredete: Taq puffer és a dNTP (Fermentas, Litvánia), primerek (Sigma), polimeráz (Thermo Scientific).

Az Apx4DWN-L és az ApxIV-IR primerek 4 különböző méretű DNS-szakaszt képesek amplifikálni, melyek egy-egy szakaszai az *apxIV* génnek (1600 bp, 2000 bp, 2400 bp, 2800 bp). A specifikusság javítása érdekében gradiens PCR segítségével (52,2 °C és 62 °C között vizsgáltuk) meghatároztuk a primer optimális tapadási hőmérsékletét, valamint a cikktől

eltérően 0,1 mM MgCl₂ helyett 1.2 mM MgCl₂ koncentrációt használtunk és még ilyenkor is láttunk aspecifikus termékeket.

Az ApxIA primer által amplifikált génszakasz mérete (723 bp), az ApxIB (811 bp), ApxII (965 bp) és az ApxIII (396 bp). A PCR programokat a 10. és a 11. táblázat tartalmazza.

10. táblázat: PCR program (primer: ApxIV)

94 °C	5 perc	} 35x
94 °C	30 másodperc	
62 °C	30 másodperc	
72 °C	2,5 perc	
72 °C	10 perc	

11. táblázat: PCR program (multiplex 4 primerpár)

95 °C	10 perc	} 35x
95 °C	30 másodperc	
55 °C	45 másodperc	
72 °C	60 másodperc	
72 °C	10 perc	

A PCR termékek kimutatása agarózgél elektroforézissel a 4.5.3. pont alapján történt, annyi különbséggel, hogy 1%-os gélt készítettünk az ApxIV primerekkel készített és 2%-os gélt a négy primerpár PCR termékeinek futtatásához. A gélelektroforézis TAE (40 mM Tris-acetát és 1 mM EDTA; pH 8,3) pufferben 100 V-os feszültségen 50 percen keresztül tartott a nagyméretű termékek esetében, míg 35 perc elég volt a multiplex rendszer termékeinek futtatásához.

Abban az esetben, ha az *apxIV* toxingén amplifikációk nem voltak besorolhatóak egyik Rayamajhi és mtsai. (2005) által megadott csoportba sem, akkor a kapott PCR reakció termékeket a 4.5.4. pontban leírtak szerint kitisztítottuk.

Az *apxIV* génrészlet bázissorrendjének meghatározása, vizsgálata

Az agarózgélből kitisztított PCR termékek szekvenálása és a kapott szekvenciák leolvasása a 4.5.5. pontban leírtak szerint történt.

Teljes genomszekvenálás

Új szerotípusba tatózó törzseink tejes genomjának szekvenálása együttműködés keretében a Section of Paediatrics, Imperial College intézetében történt. A teljes genom a Microbes NG Sequencing Facility (www.microbesng.uk) szerint történt. A buroktermelésért felelős lókuszt tartalmazó részt a BLASTn program segítségével vetettük össze a *cpxD*

génnel (accession AIA09380) amely minden szerotípusban megtalálható. Szerotípus-specifikus primerpár készült az új szerotípusra (Bossé és mtsai., 2014 és 2017).

4.8. A törzsek szénforrás-hasznosításának jellemzése

A törzsek szénforrás-hasznosítását 96-vályulatú Biolog MicroLog MicroStation™ ID System GN2 mikrolemezekon vizsgáltuk (Biolog Inc, California, USA). A rendszer 95-féle szénforrás hasznosítását képes egyidőben vizsgálni, ezáltal baktériumok fajszerű azonosítására alkalmas. A szoftver saját adatbázissal rendelkezik, amelyet összevet az általunk bevitt adatokkal, és ez alapján százalékos valószínűséggel megad 10 lehetséges fajt, mely a vizsgált törzshöz a legközelebbi hasonlóságot mutatja, és benne van az adatbázisában.

4.8.1. A vizsgált törzsek

Az anyagcsere-ujjlenyomat vizsgálatokba 68 *A. pleuropneumoniae* törzset vontunk be, melyek közül 67 a tanszék törzsgyűjteményéből származott, egyet pedig frissen izoláltunk. Ezek közül 41 törzs az I-es biotípusba, 27 pedig a II-es biotípusba tartozott. Elvégeztük még 6 típus-törzs (5a, 5b, 9, 10, 11, 13) vizsgálatát is (1. függelék).

4.8.2. A törzsek tenyésztése és előkészítése a vizsgálatához

A vizsgálatba vont törzsek színtenyészetéből a törzsek biotípusától függően 2-2 telepet oltottunk át NAD-os csokádé vagy véresagarra úgy, hogy a táptalaj teljes felszínén legyen növekedés. A tenyészeteket 37 °C-on, 5% CO₂-os közegben 24 órán keresztül inkubáltuk. Az inkubációs idő után a táptalajok felszínén kialakult vékony összefüggő baktériumtelepekből álló rétegből egy steril tampon segítségével a telepeket összegyűjtöttük és 18 ml oltófolyadékba (GN/GP IF) szuszpendáltuk, és alaposan összerázva egy homogén szuszpenziót hoztunk létre. A baktérium szuszpenzió töménységét Biolog turbidiméterrel mértük és 20±2%-ra állítottuk be. A GN2 lemezek mélyedéseibe (MicroPlate) 150-150 µl baktériumsuszpenziót mértünk és 37 °C-on, 5% CO₂ közegben inkubáltuk.

4.8.3. A Biolog vizsgálatok eredményei és kiértékelése

A törzsek anyagcsere aktivitását 24 órával később szabad szemmel olvastuk le. A pozitív eredményeket manuálisan vittük be a Biolog MicroLog2 (release 5.20) szoftver (Biolog Inc, Hayward, CA, USA) munkafelületére. Előzetesen kiválasztottuk a lemeztípust (GN2), megadtuk a törzs típusát (GN-FAS) és a tenyésztési időt (16–24 h). A baktériumtörzs azonosítását a szoftver végezte. A Biolog adatbázisban megtalálható az *A. pleuropneumoniae*, *A. lignieresii*, *A. hominis*, *A. equuli*, *A. suis*, de nem képes

megkülönböztetni az *A. pleuropneumoniae* biotípusokat és szerotípusokat. A Biolog rendszer adatbázisa alapján a GN2 lemez 95-féle szénforrása közül az *A. pleuropneumoniae* törzsek 45 különböző szénforrást képesek hasznosítani (3. függelék).

A törzsfát a szoftver a törzsek anyagcsere rokonsága alapján készíti egy módosított UPGMA analízis segítségével (Microlog software).

4.9. Az *A. pleuropneumoniae* törzsek pulzáló mezejű gélelektroforézissel (PFGE) történet vizsgálata

4.9.1. A vizsgált törzsek

A vizsgálatba bevontuk három kivételével azokat a korábban izolált törzseket, amelyek anyagcsere-ujlenyomatát (Biolog) vizsgáltuk (4.8.1.), valamint még öt 2012 előtt izolált törzset és 40 *A. pleuropneumoniae* törzset, amelyeket 2012 és 2014 között izoláltunk (1. és 2. függelék). Ötven 2-es szerotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* törzset vizsgáltunk meg, amely törzsek 26 földrajzilag különálló telepről származtak. A 13-as szerotípusba 25 izolátum tartozott 11 különböző telepről, a 9-es szerotípusba 7 izolátum 4 sertéstelepről származott. Hét törzs a 16-os szerotípust képviselte 6 állományból. Sporadikusan előforduló szerotípusokat (8, 12 és 14) is bevontunk a vizsgálatba, valamint két nem tipizálható törzset, amelyek ugyanabból az állományból lettek izolálva, de két év különbséggel.

4.9.2. A törzsek emésztése *Apal* restrikciós endonukleázzal

A felhasznált törzseket a 4.8.2. pontban leírtak szerint kioltottuk táptalajokra, melyekről egy nagy steril műanyag kaccsal lekapartuk az összes baktérium telepet, azt 300 µl TE (100 mM Tris, 250 mM EDTA) pufferbe (pH 8,0) szuszpendáltuk és keveréssel homogenizáltuk. Ebből a baktériumszuszpenzióból 50 µl-t 450 µl fotométerhez való oldathoz tettünk egy 2 ml-es műanyag csőbe. Ezt az 500 µl-t lemértük spektrofotométerrel, majd a végső csíraszámot 4×10^8 TFE/ml állítottuk be.

A szuszpenzióból kivettünk 100 µl-t egy Eppendorf csőbe és hozzáadtunk 100 µl 2% SeaPlaque agarózt (Cambrex). A keverék 1 mg/ml Proteináz K-t (Sigma) és 1% nátrium-lauril-szarkozil-szulfátot is tartalmazott. A baktérium-agaróz szuszpenziót 2 mm x 4 mm x 8 mm-es öntőformába pipettáztuk buborékmentesen és 4 °C-on 30-40 percen keresztül hagytuk dermedni. Közben reakció/lízispuffert készítettünk (100 mM EDTA, 1% nátrium-lauril-szarkozil-szulfát, 0,2% nátrium-dezoxikolat, 1 mg/ml Proteináz-K, pH 8,0), amelynek 1-1 ml mennyiségébe 1-1 dermedt agaróz „dugót” tettünk és 20 órán keresztül 50 °C-on emésztettük. Az emésztést követően szobahőmérsékleten, 15 percen keresztül steril duplán desztillált vízzel mostuk az agaróz „dugókat”, majd ezt további négy, egy-egy órással, 37 °C-on végzett TE pufferes mosás követte. Az első TE pufferes mosás alkalmával a

Proteináz-K inaktiválása miatt a mosópufferhez 0,35 mg/ml fenil-metil-szulfonilfluoridot adtunk.

A négyeszeri mosás után az agaróz „dugókat” azonnal emésztettük, vagy friss mosópufferben 4 °C-on tároltuk őket, és egy héten belül feldolgoztuk. Az emészteni kívánt agaróz „dugó” felét 1 órán keresztül, 37 °C-on TE pufferben ismételten mostuk, majd az alkalmazni kívánt enzimhez a gyártó által ajánlott restriktív pufferben 1 órán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk. Ezután a dugókat 20 NE restriktív enzimet és 150 µl restriktív puffert tartalmazó 2 ml-es mikrocentrifuga csövekbe tettük, majd az enzimnek megfelelő hőmérsékleten 15 órán keresztül inkubáltuk. *ApaI* restriktív enzimet használtunk az *A. pleuropneumoniae* törzsek kromoszómáinak izolálására és emésztésére.

Az emésztés után az agaróz „dugókat” TE mosópufferben szobahőmérsékleten 30 percen keresztül újra mostuk, aminek köszönhetően a pufferben lévő EDTA megszüntette a restriktív enzim hatását.

4.9.3. *Pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE)*

Emésztés után a futtatást azonnal megkezdjük, amihez SeaKem (Cambrex) 1-1,2% töménységű agarózt használtunk. A futtatást CHEF DRIII PFGE (BioRad) készülékben, 0,5xTBE pufferben, 14 °C-on végeztük. A futtatás 6 V/cm feszültség mellett, 120°-os reorientációs szöggel, 24 órán keresztül zajlott és a pulzusidő 2 másodpercről 15 másodpercre emelkedett az elektroforézis ideje alatt.

4.9.4. *Az eredmény dokumentálása és kiértékelése*

A 24 órás futtatás után az agarózgélt 30 percen keresztül etídium-bromiddal festettük, majd legalább 2 órán keresztül desztillált vízzel mostuk. A futtatás eredményeként kapott mintázatokat UV fényben hívtuk elő, és egy digitális kamera (Kodak, USA) segítségével rögzítettük az eredményeket a számítógépes rendszerben.

A kapott PFGE mintázatok elemzését a Fingerprinting II szoftver (BioRad) segítségével végeztük. A hasonlóságok leírására a Dice koefficiens, a csoportanalízisre UPGMA-módszert alkalmaztuk. A pozíció-tolerancia és az optimalizáció értéke 1% volt. Az eredmények elemzőprogrammal történő statisztikai elemzését független szakértő végezte. A 80%-os vagy annál közelebbi hasonlóságot mutató izolátumokat tekintettük egy rokonsági csoportba tartozónak, míg az alcsoportokat a legalább 85% hasonlóságot mutató izolátumok adták.

4.10. Az *A. pleuropneumoniae* törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata

4.10.1. A vizsgált *A. pleuropneumoniae* törzsek

2012 és 2015 között, 55 különböző állományból származó 60 *A. pleuropneumoniae* törzs antibiotikum-érzékenységét vizsgáltuk leveshígításos mikromódszerrel és korongdiffúziós eljárással húsz különböző antibakteriális szer felhasználásával. A vizsgált törzsek közül 52 törzs az I-es biotípusba, 8 törzs a II-es biotípusba tartozott. A vizsgált törzsek adatait az 2. függelék tartalmazza. Megvizsgáltuk 40, 2012 előtt izolált törzs antibiotikum-érzékenységét is nyolc antibiotikumra nézve (1. függelék). A vizsgálatba vont baktériumok tenyésztése a 4.8.2. pontban leírtak szerint történt azzal a különbséggel, hogy nem a táptalaj teljes felszínére oltottunk, hanem önálló telepek létrehozására törekedtünk. Minden esetben 24 órás baktériumtenyészeteket használtunk.

4.10.2. Az antibiotikum-érzékenység meghatározása korongdiffúziós módszerrel

A korongdiffúziós vizsgálatainkhoz a CLSI VET01-A4 (2013a) ajánlása alapján MH alapú csokoládéagart készítettünk, amely 0,06 mg/ml NAD-ot tartalmazott. A baktériumtörzseket MH csokoládéagarra oltottuk és 24 óra inkubációt követően néhány telepet 1 ml fiziológiás konyhasóoldatba szuszpendáltunk, így 0,5 McFarland sűrűségű oldatot hoztunk létre. A vizsgálatok kalibrálásához csíraszámot számoltunk, mert a szuszpenziókat egységesen $1-2 \times 10^8$ TFE/ml állítottuk be. Az elkészítést követően 15 percen belül felhasználtuk az inokulumot, egy steril vattapálcával a táptalajok teljes felszínét beoltottuk a mintával. A Petri-csészék méretéből adódóan hat antibiotikum-korongot tettünk egy táptalajra és egymástól legalább 24 mm-re helyeztük a korongokat. Ezután 37 °C-on 16-18 órán keresztül inkubáltuk a tenyészeteket. Az inkubációs idő után vonalzóval lemértük a gátlási zónákat

Az S1536 számú *A. pleuropneumoniae* típus törzset alkalmaztuk a korongdiffúziós módszernél minőségellenőrzésre (QC) standard rendszerekben, és a kialakult gátlási gyűrűket a CLSI VET01-S2 számú dokumentum iránymutatása alapján értékeltük (CLSI, 2013a). Az eredmények értékelését a CLSI által sertés *A. pleuropneumoniae*, ennek hiányában a hasonló kórfejlődése miatt szarvasmarha *Mannheimia haemolytica* légzőszervi kórokozókra megadott gátlási zónák alapján végeztük, kivéve a gentamicint, mert ott csak lóra megadott értéket tudtunk használni. Eritromicin esetében a *Staphylococcus spp.*-re vonatkozó értékeket vettük figyelembe. A szulfonamidok esetében a *Haemophilus influenzae*-re vonatkozó határértékeket használtuk (12. táblázat).

12. táblázat: A CLSI VET01-S2 sz. dokumentumban megadott határértékek

Antibiotikum	É	MÉ	R	CLSI
gentamicin	≥16	13-15	≤12	Ló, <i>Actinobacillus spp.</i>
spektinomycin	≥14	11-13	≤10	<i>M. haemolytica</i>
penicillin	≥18	15-17	≤14	<i>M. haemolytica</i>
amoxicillin	≥17	14-16	≤13	<i>A. pleuropneumoniae</i>
amoxicillin-klavulánsav	≥18	15-17	≤14	<i>A. pleuropneumoniae</i>
ampicillin	≥17	14-16	≤13	<i>A. pleuropneumoniae</i>
ceftiofur	≥21	18-20	≤17	<i>A. pleuropneumoniae</i>
cefoperazon	≥21	18-20	≤17	<i>A. pleuropneumoniae</i>
enrofloxacin	≥23	19-22	≤18	<i>A. pleuropneumoniae</i>
marbofloxacin	≥23	19-22	≤18	<i>A. pleuropneumoniae</i>
kloramfenikol	≥18	13-17	≤12	Enterobaktérium
florfenikol	≥22	19-21	≤18	<i>A. pleuropneumoniae</i>
eritromicin	≥23	14-22	≤13	<i>Staphylococcus spp.</i>
tilmikozin	≥11	-	≤10	<i>A. pleuropneumoniae</i>
tulatromicin	≥10	-	-	<i>A. pleuropneumoniae</i>
szulfametoxazol	≥17	13-16	≤12	<i>H. influenzae</i>
SXT	≥17	13-16	≤12	<i>H. influenzae</i>
doxiciklin	≥19	15-18	≤14	<i>A. pleuropneumoniae</i>
oxitetraciklin	≥19	15-18	≤14	<i>A. pleuropneumoniae</i>
tiamulin	≥9	-	≤8	<i>A. pleuropneumoniae</i>

É: érzékeny; MÉ: mérsékelten érzékeny; R: rezisztens

4.10.3. Az antibiotikum-érzékenység meghatározása leveshígítós mikromódszerrel

Antibiotikum-érzékenységi vizsgálataink során a CLSI „Eljárási szabványok állatokból izolált baktériumok antibiotikumokkal szembeni érzékenységének korongdiffúziós és hígítós vizsgálatához” című VET01-A4 jelzésű kiadványában megadott, standard leves-mikrohígítós eljárásra, valamint korongdiffúziós módszerre vonatkozó ajánlásokat követtük (CLSI, 2013a és 2013b).

A vizsgálat elvégzéséhez a CLSI VET01-A4 dokumentum által ajánlott, igényes kórokozók tenyésztéséhez szükséges levestáptalajt (VFM) állítottunk össze, melynek alapja Müller-Hinton tápleves volt. A levest felhasználásig 4 °C-on tároltuk. A VFM levestáptalaj kationkiegészítést igényel, amihez 10 mg/ml végkoncentrációjú Ca⁺⁺- és Mg⁺⁺-törzsoldatokat készítettünk (CaCl₂x2H₂O Spektrum-3D Kft. és MgCl₂x6H₂O Scharlab Magyarország Kft.), amelyeket membránszűrővel baktériummentessé tettük és felhasználásukig 4 °C-on tároltuk. A MH levestáptalaj 1000 ml-hez 1,9 ml Ca⁺⁺ és 0,81 ml Mg⁺⁺ törzsoldatot adtunk és így CAMH táplevest kaptunk. Az I-es biotípusú törzsek növekedése NAD-ot igényel, ezért 1000 ml CAMH leveshez 67 µg/ml koncentrációjú szűrt NAD-ot adtunk.

4.10.4. A vizsgálatba bevont antibiotikumok és alkalmazott hígításuk

Az *A. pleuropneumoniae* törzsek antibiotikum-érzékenységét 20, az állatorvosi gyakorlatban használt antibiotikum felhasználásával vizsgáltuk, melyeket a 13. táblázatban foglaltunk össze.

13. táblázat: A vizsgálatokba bevont antibiotikum-csoportok és hatóanyagok (*a törzsgyűjteményben lévő törzsek MIC vizsgálatához felhasznált antibiotikumok)

Csoport	Antibiotikum
Aminoglikozidok	gentamicin spektinomycin
Béta-laktám antibiotikumok	amoxicillin-klavulánsav amoxicillin* penicillin* ampicillin ceftiofur cefoperazon*
Fluorokinolonok	enrofloxacin* marbofloxacin
Fenikolok	klóramfenikol florfenikol*
Makrolidok	eritromicin tilmikozin tulatromicin
Folsavsintézist gátlók	szulfametoxazol SXT
Tetraciklinek	doxiciklin* oxitetraciklin*
Pleuromutilin	tiamulin*

Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokhoz kiválasztott antibiotikumok oldhatósági tulajdonságait és tisztaságának adatait a katalógusszám és tételszám alapján, a gyártó honlapjáról letölthető analitikai műbizonylat tartalmazta (14. táblázat).

14. táblázat: A vizsgált antibiotikumok kereskedelmi adatai

Antibiotikum	Katalógusszám	Gyártó	Tételszám
amoxicillin	8523	Sigma	84H0450
amoxicillin-klavulánsav	OGYI-T-5063/09	Richter Gedeon Nyrt.	
ampicillin	60977	Alfa Aesar	125Z044
penicillin-G	PENNA	Sigma	086K1286
ceftiofur	11065000	Dr. Ehrenstorfer GmbH	30204
cefoperazon	4292	Sigma	17H0873
enrofloxacin	17849	Fluka	19782
eritromicin	6376	Sigma	128H1232
marbofloxacin	14755000	Dr. Ehrenstorfer GmbH	10405
florfenikol	1427	Sigma	081K1680
klóramfenikol	0378	Sigma	110K1606
doxiciklin	44577	Fluka	20355
oxitetraciklin	4875	Sigma	77H1531
spektinomycin	85555	Fluka	12741
szulfametoxazol	7507	Sigma	50K1144
trimetoprim	7883	Sigma	80K1401
tilmikozin	33864	Vetranal	7045x
tulatromicin	110229-QCS-5	Pfizer Global Supply	TULA11016K
gentamicin	1264	Sigma	1405410
tiamulin	46959	Fluka	SZBC026XV

Az *A. pleuropneumoniae* S1536 törzset alkalmaztuk minőségellenőrzésre (QC) standard rendszerekben.

Az antibiotikum-törzsoldatok koncentrációja 12,8 mg/ml volt. 200 µl-es egységekben -80 °C-on tároltuk a felhasználásukig, de maximum 6 hónapig. Az egyszer felolvasztott törzsoldatból a szükséges mennyiséget kivettük, és ezekből a különböző antibiotikumok esetében eltérő koncentrációjú munkaoldatokat készítettünk, majd a felolvasztott törzsoldatok maradékát kiöntöttük.

4 ml táplevesbe 4-5 baktériumtelepet oltottunk, mellyel 5×10^5 TFE/ml szuszpenziót kaptunk. A csíraszámot minden alkalommal meghatároztuk. Az antibiotikum-hígítás után minden mélyedésbe 50-50 µl-t mértünk a baktérium szuszpenzióból és a lemezeket 37 °C-on 24 órán keresztül 5% CO₂ jelenlétében inkubáltuk.

Egy U-aljú mikrotiter lemezen (Kartell Labware, Olaszország) nyolc *A. pleuropneumoniae* törzs rezisztenciáját egy antibiotikummal szemben vizsgáltuk. A 96-lyukú lemez mélyedéseibe 50-50 µl VFM táplevest mértünk, majd az első oszlop mélyedéseibe a lemezeknek megfelelően 50-50 µl munkaoldatot mértünk a vizsgálatba vont 20 antibiotikumból. Az antibiotikum koncentrációját felező hígítással (log₂) csökkentettük, az utolsó, 12. oszlopba nem mértünk antibiotikumot, azt pozitív kontrollként használtuk.

Az antibiotikumokat tartalmazó lemezeket és a törzs-, ill. munkaoldatokat felhasználásuk során óvtuk az erős fénytől, napsugárzástól.

4.10.5. Az eredmények elbírálása, a minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása

A 24 órás inkubációs időt követően az eredményeket ELISA (Multiskan EX, Labsystems, MTX Lab Systems Inc.) leolvasóval értékeltük. Meghatároztuk az egyes antibiotikumok azon legkisebb koncentrációját, amely képes gátolni a baktérium növekedését (MIC). Eredményeink alapján meghatároztuk a vizsgált *A. pleuropneumoniae* törzsek 50%-ának (MIC₅₀) és 90%-ának (MIC₉₀) növekedését gátolni képes antibiotikum-koncentrációt (µg/ml) is.

Az eredmények értékelését a 4.10.2. pont alapján végeztük a CLSI által megadott MIC-értékek alapján (CLSI VET01-S2, CLSI 2013a) (15. táblázat).

15. táblázat: A CLSI által megadott standard MIC adatok a felhasznált antibiotikumokra

Antibiotikum	É	MÉ	R	CLSI
gentamicin	≤2	4	≥8	Ló, <i>Actinobacillus spp.</i>
spektinomycin	≤32	64	≥128	<i>M. haemolytica</i>
penicillin	≤0,25	0,5	≥1	<i>M. haemolytica</i>
amoxicillin	≤0,5	1	≥2	<i>A. pleuropneumoniae</i>
amoxicillin-klavulánsav	≤0,5	1	≥2	<i>A. pleuropneumoniae</i>
ampicillin	≤0,5	1	≥2	<i>A. pleuropneumoniae</i>
ceftiofur	≤2	4	≥8	<i>A. pleuropneumoniae</i>
cefoperazon	≤2	4	≥8	<i>A. pleuropneumoniae</i>
klóramfenikol	≤2	4	≥8	<i>A. pleuropneumoniae</i>
florfenikol	≤2	4	≥8	<i>A. pleuropneumoniae</i>
enrofloxacin	≤0,25	0,5	≥1	<i>A. pleuropneumoniae</i>
marbofloxacin	≤0,25	0,5	≥1	<i>A. pleuropneumoniae</i>
eritromicin	≤0,5	1-4	≥8	<i>Staphylococcus spp.</i>
tilmikozin	≤16	-	≥32	<i>A. pleuropneumoniae</i>
tulatromicin	≤64	-	-	<i>A. pleuropneumoniae</i>
szulfametoxazol	≤256	-	≥512	<i>H. influenzae</i>
SXT	≤0,5	1-2	≥4	<i>H. influenzae</i>
doxiciklin	≤0,5	1	≥2	<i>A. pleuropneumoniae</i>
oxitetraciklin	≤0,5	1	≥2	<i>A. pleuropneumoniae</i>
tiamulin	≤16	-	≥32	<i>A. pleuropneumoniae</i>

É: érzékeny; MÉ: mérsékelten érzékeny; R: rezisztens

4.10.6. Rezisztenciagének vizsgálata PCR módszerrel

PFGE vizsgálatokba bevont 115 *A. pleuropneumoniae* törzs közül nyolcvanban vizsgáltuk a tetraciklin rezisztenciáért (*tetA*, *tetB*, *tetL*, *tetH*, *tetK*) és a béta-laktám rezisztenciáért felelős géneket (*bla_{rob}*, *bla_{bro}*).

A DNS-kivonás a 4.5.1. pontban leírtak alapján történt. A PCR vizsgálatok során hét primerpárt használtuk (16. táblázat).

16. táblázat: A felhasznált tetraciklin és a béta-laktám rezisztenciáért felelős génekre specifikus primerek adatai.

gén	primer	Szekvencia 5'-3'	hossz	termék	forrás	
<i>tet(A)</i>	tet(A)-F	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	20	210 bp	Ng és mtsai., 2001	
	tet(A)-R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	20			
<i>tet(B)</i>	tet(B)-F	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG	20	659 bp		
	tet(B)-R	GTAATGGGCCAATAACACCG	20			
<i>tet(K)</i>	tet(K)-F	TCGATAGGAACAGCAGTA	18	169 bp		
	tet(K)-R	CAGCAGATCCTACTCCTT	18			
<i>tet(L)</i>	tet(L)-F	TCGTTAGCGTGCTGTCATTC	20	267 bp		
	tet(L)-R	GTATCCCACCAATGTAGCCG	20			
<i>tet(H)</i>	tet(H)-F	ATA CTG CTG ATC ACC GT	17	1076 bp		Blanco és mtsai., 2006
	tet(H)-R	TCC CAA TAA GCG ACG CT	17			
<i>bla(rob)</i>	rob-1F	TGTTGCAATCGCTGCC	16	821 bp	Moleres és mtsai., 2015	
	rob-1R	TTATCGTACACTTTCCA	16			
<i>bla(bro)</i>	bro-bla-F	TTTGGATTGGGGTGAATGAT	20	235 bp	Levy és Walker, 2004	
	bro-bla-R	TGGGGCTGGGTGATAAATAG	20			

A 17. és 18. táblázat a tetraciklin rezisztenciáért felelős gének közül a *tetA*, *tetK* és *tetL* kimutatására szolgáló PCR elegy összetevőit és a PCR programot tartalmazza.

17. táblázat: PCR reakcióelegy összetétele (*tet(A)*, *tet(K)*, *tet(L)*), Fermentas Taq KCl pufferrel

Reakcióelegy	Térfogat (µl)
H ₂ O: MilliQ	14,4
Puffer: GoTaq	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTP (10 mM)	0,5
BSA (1 mg/ml)	2,5
(25 pmol/µl) primer F	0,25
(25 pmol/µl) primer R	0,25
Taq: GoTaq (5 U/µl)	0,1
DNS	2,5
Végő térfogat	25

18. táblázat: A PCR során alkalmazott program:

95 °C	2 perc	} 35x
94 °C	30 másodperc	
55 °C	30 másodperc	
72 °C	30 másodperc	
72 °C	5 perc	

A 19. és 20. táblázat a *tetB* gén kimutatására szolgáló PCR reakcióelegy összetevőit és a PCR programot tartalmazza.

19. táblázat: PCR reakcióelegy összetétele (*tet(B)*), Fermentas Taq (NH₄)SO₂ pufferrel

Reakcióelegy	Térfogat (μl)
H ₂ O: MilliQ	15
Puffer: GoTaq	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTP (10 mM)	0,5
BSA (1 mg/ml)	2,5
(25 pmol/μl) primer F	0,2
(25 pmol/μl) primer R	0,2
Taq: GoTaq (5 U/μl)	0,1
DNS	2
Végső térfogat	25

20. táblázat: A PCR során alkalmazott program:

95 °C	2 perc	} 35x
94 °C	60 másodperc	
55 °C	60 másodperc	
72 °C	90 másodperc	
72 °C	5 perc	

A 21. táblázatban a *tetH* rezisztencia gén kimutatását szolgáló PCR elegy összetevőit tüntettük fel és a hozzá tartozó PCR programot (22. táblázat).

21. táblázat: A PCR reakcióelegy összetétele (*tet(H)*), Fermentas Taq (NH₄)SO₂ pufferrel

Reakcióelegy	Térfogat (μl)
H ₂ O: MilliQ	12,5
Puffer: GoTaq	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP (10 mM)	0,5
BSA (1 mg/ml)	2,5
(25 pmol/μl) primer F	0,2
(25 pmol/μl) primer R	0,2
Taq: GoTaq (5 U/μl)	0,1
DNS	2,5
Végső térfogat	25

22. táblázat: A PCR során alkalmazott program:

95 °C	2 perc	} 35x
94 °C	60 másodperc	
48 °C	60 másodperc	
72 °C	60 másodperc	
72 °C	5 perc	

A béta-laktám antibiotikum-rezisztenciáért felelős *Rob1* gén kimutatására szolgáló PCR elegy összetevőit a 23. táblázat, míg a *Bro-bla* gén kimutatását szolgáló PCR elegy komponenseit a 25. táblázat tartalmazza. A két PCR program a 24. és 26. táblázatban található.

23. táblázat: PCR reakcióelegy összetétele (*Rob1*), Fermentas Taq KCl pufferrel

Reakcióelegy	Térfogat (µl)
H ₂ O: MilliQ	6,5
Puffer: GoTaq	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	5
dNTP (10 mM)	0,5
BSA (1 mg/ml)	2,5
(25 pmol/µl) primer F	2,7
(25 pmol/µl) primer R	2,7
Taq: GoTaq (5 U/µl)	0,1
DNS	2,5
Végső térfogat	25

24. táblázat: A PCR során alkalmazott program:

95 °C	2 perc	} 35x
94 °C	30 másodperc	
50 °C	60 másodperc	
72 °C	40 másodperc	
72 °C	5 perc	

25. táblázat: PCR reakcióelegy összetétele (*Bro-bla*), Fermentas (NH₄)SO₂ pufferrel:

Reakcióelegy	Térfogat (µl)
H ₂ O: MilliQ	13,4
Puffer: GoTaq	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTP (10 mM)	0,5
BSA (1 mg/ml)	2,5
(25 pmol/µl) primer F	0,75
(25 pmol/µl) primer R	0,75
Taq: GoTaq (5 U/µl)	0,1
DNS	2,5
Végső térfogat	25

26. táblázat: A PCR során alkalmazott program:

95 °C	2 perc	} 35x
94 °C	30 másodperc	
55 °C	60 másodperc	
72 °C	40 másodperc	
72 °C	5 perc	

A gélelektroforézis a 4.5.3. pont alapján történt, annyi különbséggel, hogy etidium-bromidot használtunk DNS festékként és 8-8 µl terméket kevertünk el 2-2 µl gel loading pufferrel (Fermentas, Litvánia). A gélelektroforézis TAE pufferben 100 V-os feszültségen 40-60 percen keresztül tartott. A felhasznált vegyszerek eredete: agaróz (SeaKem LE Agarose, Lonza), dNTP, Taq Polymerase (Thermo Scientific), BSA, primerek (Sigma-Aldrich).

4.10.7. Antibiotikumok vizsgálata (a szelektív táptalaj készítéséhez)

A szelektív táptalaj összeállításához tíz I-es és öt II-es biotípusba tartozó, 2006 és 2012 között izolált *A. pleuropneumoniae* törzs érzékenységét vizsgáltuk meg 90 különböző antibiotikummal korongdiffúziós módszer segítségével (a módszer leírása a 4.10.5. pontban olvasható). A vizsgált antibiotikumcsoportokat és hatóanyagokat a 4. függelék tartalmazza.

4.11. A szelektív táptalaj összeállítása

4.11.1. Korongdiffúziós módszer és a MIC-értékek meghatározása

A szelektív táptalaj összeállításához a 4. függelékben szereplő antibiotikumok közül kiválasztottunk huszonötöt, és megvizsgáltuk hat, sertés felső légutából izolált Gram-negatív baktériumfaj rezisztenciáját velük szemben korongdiffúziós próbával (ld. 4.10.5. pontban leírt módszertant és CLSI határértékeit használtuk).

Sertésekből izolált két *A. pleuropneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida* és *Proteus mirabilis* törzs érzékenységét néztük meg amikacinra, apramicinre, bacitracinra, klaritromicinre, klindamicinre, doxiciklinre, eritromicinre, klórtetraciklinre, linkomicinre, meticillinre, minociklinre, neomicinre, oxacillinre, oxitetraciklinre, pirlimicinre, polimixin B-re, polimixin E-re, rifampinra, rifamicin SV-re, spektinomycinre, spiramicinre, sztreptomycinre, szulfiszoxazolra, tilozinra és vankomicinre.

A szelektív táptalaj készítéséhez kiválasztott antibiotikumok és gombaellenes szerek oldhatósági tulajdonságait és tisztaságának adatait a katalógusszám és tételszám alapján, a gyártó honlapjáról letölthető analitikai műbizonylat tartalmazta (27. táblázat)

27. táblázat: A vizsgált antibiotikumok kereskedelmi adatai

Antibiotikum	Katalógusszám	Gyártó	Tételszám
bacitracin	0125	Sigma	60K0828
vankomicin	2002	Sigma	118H0955
linkomicin	62143	Fluka	0876
polimixin-B	81334	Sigma	
cikloheximid	7698	Sigma	78H3431
nisztatin	3503	Sigma	77H1531

Meghatároztuk a MIC-értéket (módszer leírása a 4.10.2. pontban olvasható) linkomicinre, polimixinre és vankomicinre 12 *A. pleuropneumoniae* törzs, valamint Gram-negatív (*E. coli*, *E. cloacae*, *Salmonella Typhimurium*, *P. mirabilis*, *P. multocida*) és Gram-pozitív (*S. aureus*, *Streptococcus suis*) baktériumok esetében.

4.11.2. NAD-függő *A. pleuropneumoniae* törzsek tenyésztési vizsgálata

A Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék gyűjteményéből származó öt NAD-függő *A. pleuropneumoniae* törzs növekedését, valamint az S1536 típus törzset vizsgáltuk 67 µg/ml koncentrációjú NAD-ot különböző mennyiségben tartalmazó Müller-Hinton (MH) (Biolab Ltd., Magyarország), Brain-Heart Infusion (BHI) (Biolab Ltd., Magyarország) és tripton szója agar (TSA) (Biolab Ltd., Magyarország) alapú véresagarokon élesztőkivonat (Biolab Ltd., Magyarország) hozzáadásával és anélkül (28. táblázat). Mindegyik táptalajhoz 5% alvadásban gátolt juhvért adtunk.

28. táblázat: A szelektív táptalajok alapjául szolgáló véresagarok összetevői

Alap 100 ml	Élesztőkivonat (g)	NAD (mg/ml)		
MH	1	0,004	0,06	0,3
BHI	1	0,004	0,06	0,3
TSA	1	0,004	0,06	0,3
MH	-	0,004	0,06	0,3
BHI	-	0,004	0,06	0,3
TSA	-	0,004	0,06	0,3

4.11.3. A szelektív táptalaj összeállítása

Mivel a NAD-függő *A. pleuropneumoniae* a legjobb növekedést a 0,3 mg/ml mennyiségű NAD-ot és 0,01 g/ml élesztőkivonatot tartalmazó Müller-Hinton véresagaron mutatta (l. később 5.6. pont), a szelektív táptalajok alapja is ez lett. Az „A” szelektív táptalaj Jacobsen és Nielsen (1995) nyomán készült, a „B” szelektív táptalajt előzetes vizsgálataink eredménye alapján állítottuk össze (29. táblázat).

29. táblázat: A szelektív táptalajok összetétele

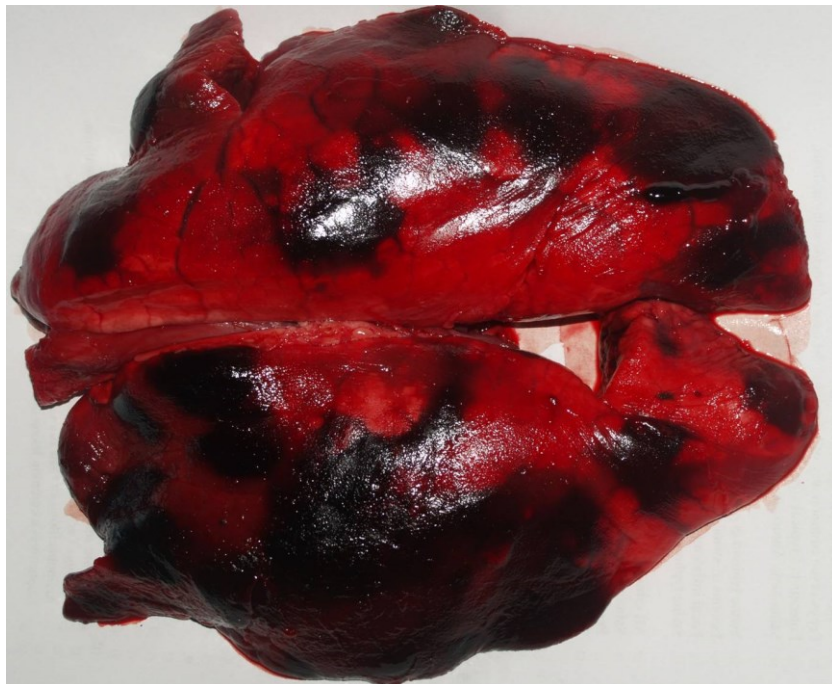
„A” szelektív táptalaj		„B” szelektív táptalaj	
bacitracin	100 µg/ml	vankomicin	32 µg/ml
linkomicin	1 µg/ml	polimixin-B	0,5 µg/ml
kristályibolya	1 µg/ml	kristályibolya	1 µg/ml
nisztatin	50 µg/ml	cikloheximid	50 µg/ml

A táptalajok hatékonyságának vizsgálata céljából az *A. pleuropneumoniae* S1536 típus törzset és 5, általunk izolált *A. pleuropneumoniae* törzset, valamint Gram-negatív (*E. coli*, *E. cloacae*, *P. multocida*, *P. mirabilis*) és Gram-pozitív (*S. aureus*, *S. suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Rhodococcus equi*), sertések garatüregében megtalálható baktériumokat oltottunk a táptalajokra.

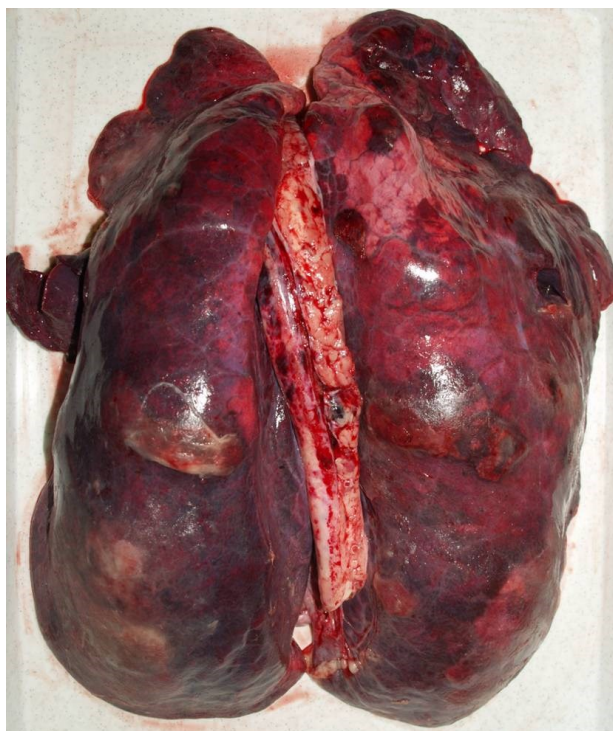
5. Eredmények

5.1. A vizsgálatba vont állatok kora, a kórbonctani elváltozások, a törzsek földrajzi eredete

Leggyakrabban a hízlaldába átkerült állatoknál (12-16 hetes) történt az elhullás, de sokszor találkoztunk a hizlalás vége felé kialakult heveny actinobacillus pleuropneumoniával. Heveny esetben multifokális vérzéses tüdőgyulladást és kezdődő fibrines mellhártyagyulladást láttunk (2. ábra), vagy az egyik, esetleg mindkét tüdőfélre kiterjedő diffúz vérzéses-elhalásos tüdőgyulladást és fibrines mellhártyagyulladást (3. ábra).

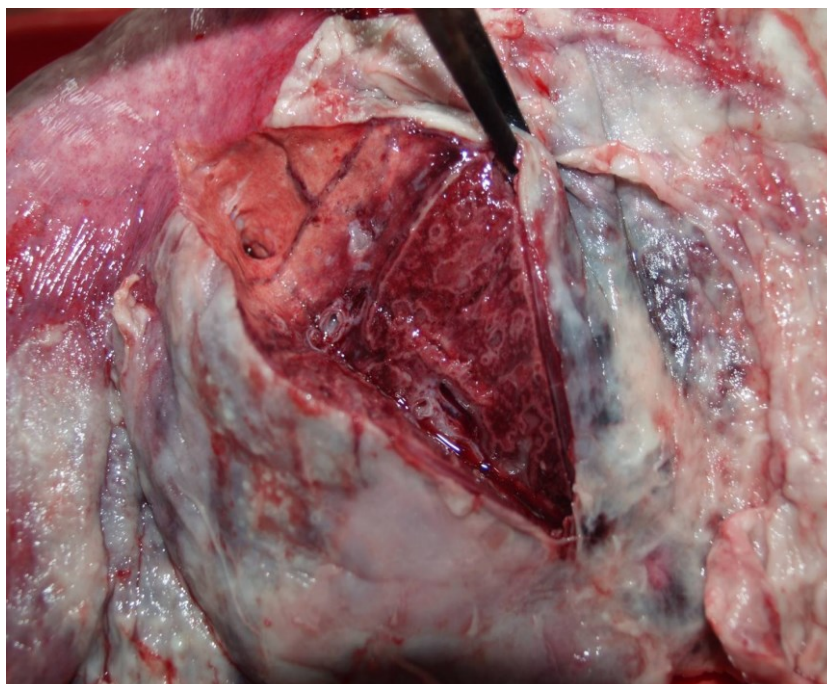


2. ábra: *A. pleuropneumoniae* okozta heveny vérzéses-elhalásos tüdőgyulladás 12 hetes sertésben, tömött tapintatú gyulladásos góccok, fibrinkiválás



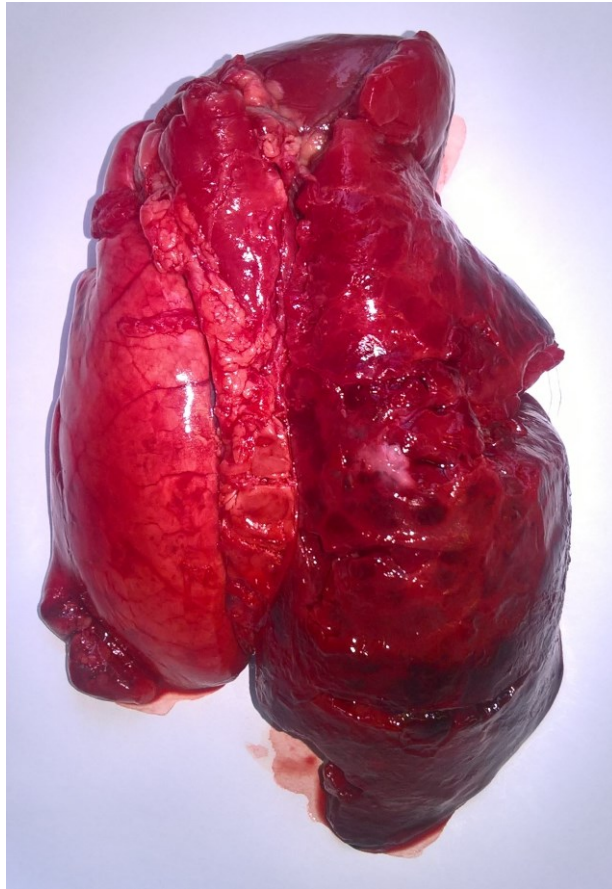
3. ábra: Heveny diffúz vérzéses-elhalásos tüdőgyulladás és fibrines mellhártyagyulladás, vágóhidra szállítást követően elhullott

A vágóhídon kötőszövetes tokkal elhatárolt, idült vérzéses-elhalásos tüdőgyulladás elváltozásait mutató tüdőket gyűjtöttünk (4. ábra). A megvastagodott mellhártya miatt sokszor ezen tüdők egy része a mellüregben maradt a tüdő kivtele során.



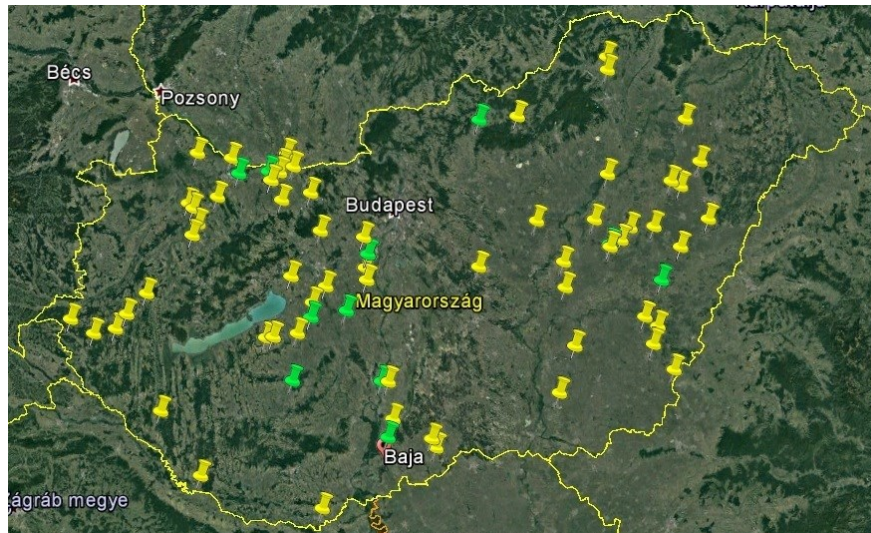
4. ábra: Vágóhídon gyűjtött tüdő, vastag fibrinréteggel borított eltokolt elváltozás (idült actinobacillus pleuropneumonia)

2016 januárjában egy Hajdú-Bihar megyei 3000 kocás sertéstelepen 28 és 31 napos malacok hullottak el heveny actinobacillus pleuropneumonia tüneteit mutatva (5. ábra). NAD-függő *A. pleuropneumoniae* törzseket (5 törzs) izoláltunk ezekből a tüdőkből.



5. ábra: Heveny actinobacillus pleuropneumonia, egyhónapos malacban

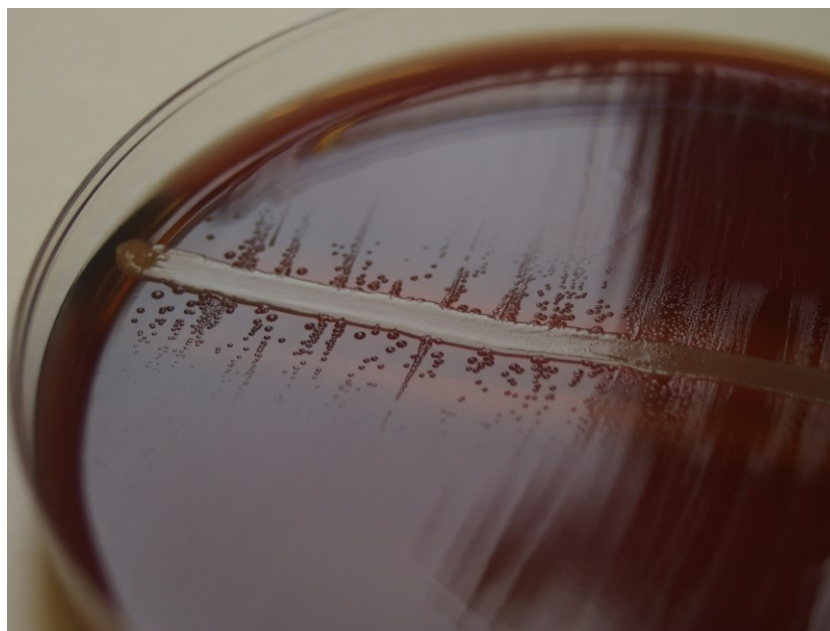
A mintagyűjtés évei alatt 18 megyéből 634 sertéstüdőt gyűjtöttünk és 255 *A. pleuropneumoniae* törzset izoláltunk. Az izolált és a tanszéki törzsgyűjteményből származó törzsek eredete a térképen látható (6. ábra).



6. ábra: A 2012 előtt izolált törzsek (zöld) és a 2012 után izolált törzsek (sárga) földrajzi eloszlása

5.2. Az *A. pleuropneumoniae* törzsek azonosítása tenyésztési, morfológiai és biokémiai vizsgálatok alapján

A NAD-függés vizsgálata során a *S. aureus* dajkatenyészet mellett 2 cm-es sávban növekedtek az I-es biotípusba tartozó törzsek (7. ábra).



7. ábra: NAD-függő *A. pleuropneumoniae* telepek dajkatenyészet mellett

Erős béta-hemolízis volt megfigyelhető a MH alapú véresagaron, de a TSA alapú véresagaron nem volt erős a béta-hemolízis. A MH és TSA táptalajokon nagy fényes telepek voltak láthatók, mint a NAD nélküli véresagarokon II-es biotípusba tartozó törzsek esetében.

Tapasztalatunk szerint a szén-dioxid jelenléte javít a telepek növekedésén, de nem

szükségszerű a tenyésztés során.

A NAD-os csokoládéagaron több szerotípus törzse is táptalajhoz tapadó telepeket képzett, köztük az S1536 típusú törzs is, viszont NAD-ot tartalmazó MH véresagaron nem volt megfigyelhető a telepek tapadása. NAD nélküli véresagaron egyik II-es biotípusba tartozó törzs telepe sem tapadt a táptalajhoz. Az I-es biotípusba tartozó törzsek nagy része többszöri átoltás után különböző méretű telepeket képzett.

A törzsek morfológiai és biokémiai tulajdonságaik alapján egységesen viselkedtek, kivételt képezett a NAD-igény (30. táblázat).

30. táblázat: A 255 *A. pleuropneumoniae* törzs morfológiai és biokémiai vizsgálatának eredménye

Vizsgált tulajdonságok	Eredmény
Hemolízis	béta
NAD-függőség	227 (89%)
Festődés Gram szerint	negatív
Alak	rövid, kokkoid pálcák
Méret	<2 µm
Mozgás	negatív
Kataláz enzim termelés	negatív
Citokróm oxidáz C termelés	pozitív

5.3. Szerotípusok

5.3.1. Passzív hemagglutinációs próbával kapott eredmény

Az összes izolált *A. pleuropneumoniae* törzset szerotipizáltuk, és ennek során talákoztunk olyan sertésállománnyal, ahol egy időben két különböző szerotípus is előfordult, vagy néhány év különbséggel eltérő szerotípusokkal talákoztunk. Volt ahonnan pár hónapon belül többször kaptunk mintát, valamint vágóhídi mintagyűjtésünk két hullámában (2012 ősz és 2014 ősz) is sikerült néhány állományból mindkét esetben mintát gyűjtenünk.

A vizsgált 255 *A. pleuropneumoniae* törzs közül 227 az I-es biotípusba, 28 törzs pedig a II-es biotípusba tartozott (31. táblázat).

31. táblázat: A vizsgált 255 *A. pleuropneumoniae* törzs szerotípusainak megoszlása

Szerotípus	2012-2016	%
2	101	39,6
5a/5b	1	0,4
8	18	7
9	53	20,8
11	7	2,8
12	4	1,5
13	15	6
16	20	7,9
NB (I-es biotípus)	23	9
NB (II-es biotípus)	13	5
Összesen	255	(100%)

NB: nem besorolható

Ha a szerotípus nem változott, akkor a szerotípusok megoszlására vonatkozó értékelésünkbe csak egy törzset emeltünk be. Hét állományban izoláltunk különböző szerotípusokat, így összesen 70 állomány 77 törzse alapján állapítottuk meg a hazánkban előforduló szerotípusok gyakoriságát (32. táblázat).

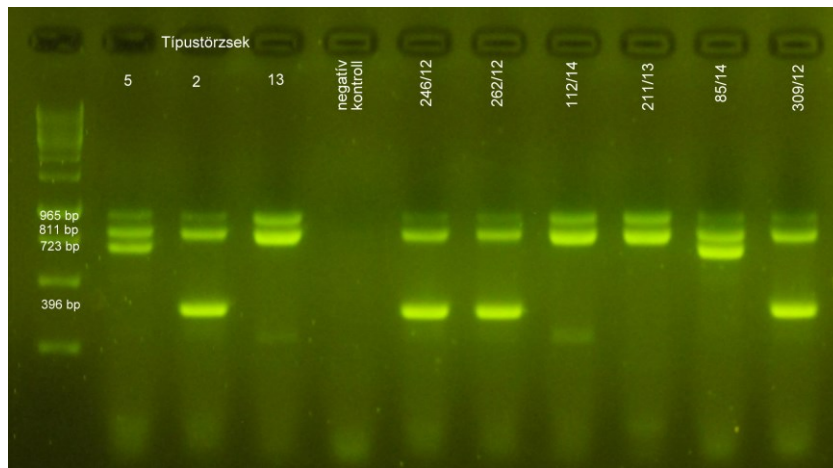
32. táblázat: *A. pleuropneumoniae* szerotípusok előfordulási gyakorisága Magyarországon (passzív hemagglutinációs próba)

Szerotípus	2012 előtt		2012-2016		Összesen	
	törzs	%	törzs	%	törzs	%
2	6	43	30	38,9	36	39,5
5a/5b	0	0	1	1,3	1	1,1
8	0	0	8	10,4	8	8,8
9	1	7	4	5,2	5	5,5
11	0	0	3	3,9	3	3,3
12	0	0	3	3,9	3	3,3
13	6	43	8	10,4	14	15,4
14	1	7	0	0	1	1,1
16	0	0	8	10,4	8	8,8
NB	0	0	12	15,6	12	13,2
Összesen	14	100	77	100	91	100

NB: nem besorolható

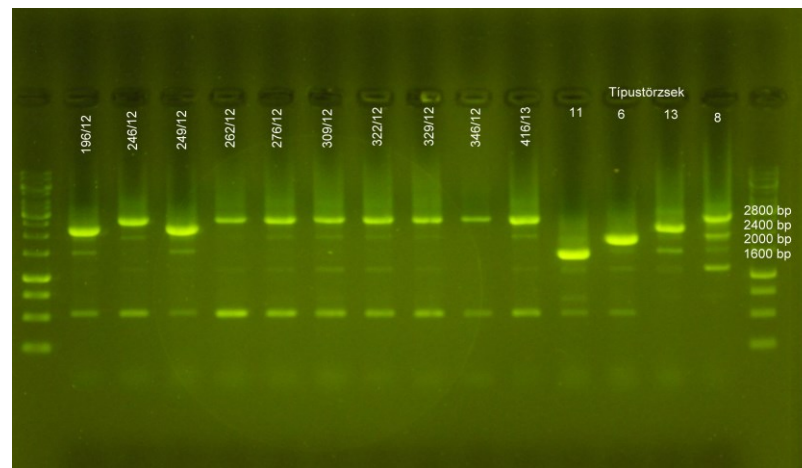
5.3.2. A törzsek szerotipizálása molekuláris biológiai módszerrel

A toxingének kimutatásán alapuló multiplex PCR rendszer munkánk során nem működött, ezért két PCR rendszerre bontottuk a vizsgálatot. Az ApxI-II-III toxinokért felelős négy különböző méretű, de 1000 bázispárnál kisebb termékeket amplifikáló primerpárokat egy multiplex PCR rendszerben használtuk (8. ábra).



8. ábra: Az ApxI-II-III PCR amplifikációi multiplex rendszerben

Az ApxIV toxint kódoló *apxIV* toxingén négy különböző méretéhez (1600 bp, 2000 bp, 2400 bp, 2800 bp) kötődő primerpárokat egy rendszerbe tettük (9. ábra).



9. ábra: Az ApxIV PCR különböző méretű amplifikációi

A primer kötődés optimalizálása során a hőmérsékletet 62 °C-ra állítottuk be. A Rayamajhi és mtsai. (2005) által leírt multiplex PCR módszer primerpárjaival végzett PCR vizsgálat során kapott eredményeket a 31. táblázatban foglaltuk össze és ugyanezen törzsek passzív hemagglutinációval kapott eredményét is feltüntettük (33. táblázat).

33. táblázat: A PCR-rel kapott szerotípusok és az eredmény összehasonlítása a PHA vizsgálat során kapott eredménnyel

Szerotípusok (PCR)		Szerotípusok (PHA)						
	db	2	8	9	12	13	16	NB
1	2			2				
2/8/15	22	14	8					
5a/5b	11						9	2
7	3	1	1					1
9/11	1			1				
12/13	11				2	9		
NB	10	8						2
Összesen	60	23	9	3	2	9	9	5
	(100%)	(38%)	(15%)	(5%)	(3,5%)	(15%)	(15%)	(8,5%)

NB: nem besorolható

A PCR-rel nem besorolható törzsek közül kettőben nem találtunk *apxIV* gént, azok PHA vizsgálatlaltal sem voltak egyik szerotípusba sem volt besorolhatóak.

A PCR-rel nem besorolható másik nyolc törzsben találtunk *apxIV* gént, de nem abban a méretben, ami alapján besorolhatóak lettek volna. Mind a nyolc a 2-es szerotípusba tartozott a PHA vizsgálat szerint.

5.3.3. Szekvenálás eredménye

Azt a nyolc törzset, amelyekben a 2400 bp termék volt látható a PCR-es vizsgálat eredményeként a 2800 bp helyett, mindet *A. pleuropneumoniae*-ként határoztuk meg.

5.4. Nem besorolható törzsek

A mintagyűjtés évei alatt összesen 56, 17 különböző állományból származó, passzív hemagglutinációval nem besorolható törzset izoláltunk. 2012-ben és 2014-ben hat olyan törzset tenyésztettünk ki, amelyek egyik típus-törzs savójával sem mutattak reakciót, ezért ezekkel szemben hiperimmun savót termeltettünk. Öt törzs a homológ savóval 1:2560 és 1:5120 titerértéket adott, és mind az öt törzs a másik négy heterológ savóval is ugyanezt a magas értéket mutatta.

Ezeket a törzseket 16-os szerotípusként írtuk le és típus-törzsnek az A-85/14 törzset javasoltuk, amely a Biolog rendszer alapján is *A. pleuropneumoniae*-ként lett meghatározva, és a 16S rRNS szekvencia analízis szerint pedig 99%-os hasonlóságot mutatott az *A. pleuropneumoniae*-vel (GénBank Accession No. SUB1098860 A-85/14 KT763387). Mintagyűjtésünk során három másik állományból is izoláltuk a 16-os szerotípust.

A 16-os típus-törzs teljes genomszekvenciájának meghatározása is igazolta, hogy valóban *A. pleuropneumoniae* baktériumról van szó, amelynek a burokképzésért felelős lókus helyeződése teljesen eltér a korábban leírt 15 típus-törzs burokképzésért felelős

lókuszától, és nem mutat hasonlóságot más Pasteurellaceae család tagjának ezen lókuszával sem. Tartalmaz géneket, amik hasonlóságot mutatnak az *Actinobacillus ureae*, *P. multocida*, *Haemophilus parainfluenzae* és *E. coli cps* génjeivel. A csoport utolsó génje hasonlít az 5-ös szerotípus burokképzésért felelős lókuszához, de a 16-os szerotípus ezen génje csonkolt. Mindegyik 16-os izolátumunk hordozza az *apxIA*, az *apxIB*, az *apxII* és *apxIV* gént, és ezt a teljes genomszekvenálás is megerősítette. A burokképzésért felelős lókusz eltérése miatt és az emiatti sajátos szekvenciának köszönhetően specifikus primert lehetett tervezni a 16-os szerotípusra.

A hatodik törzs a homológ savóval 1:640 titerértéket adott, de a heterológ savókkal nem reagált. Az ez ellen termelt hiperimmun savó a 16-os szerotípusként leírt törzzsel is 1:640 titerértéket adott, de az a homológ savójával magasabb titerértékben reagált. Emiatt ez a törzs nem a 16-os szerotípusba sorolandó, hanem valószínűleg egy új szerotípusba tartozó törzset izoláltunk.

A másik 11 törzs közül nyolc NAD-ot igényelt tenyésztése során, míg három törzs a II-es biotípusba tartozott.

Az öt, 16-os szerotípusba sorolt törzsek egyikét 2014 tavaszán egy 1350 kocás Hajdú-Bihar megyei sertéstelepen lezajló heveny járványkitörés okozta elhullásokból, valamint vágóhídi mintavétel során izoláltuk. A telepen régóta kereskedelmi forgalomban lévő, törzskönyvezett bakterin típusú vakcinát alkalmaztak, de az csak az 1-es és 2-es szerotípusokat tartalmazta inaktivált formában. Javaslatunkra standardizált mennyiségben inaktivált toxinokat tartalmazó vakcinára való váltás történt, ezt követően a heveny légzőszervi tünetek megszűntek. 2014 őszén már csak idült actinobacillus pleuropneumonia elváltozásai voltak láthatók vágóhídi vizsgálatkor, amely góccokból ismét a 16-os szerotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* törzset izoláltuk.

5.5. A törzsek azonosítása Biolog rendszerrel, szénforrás-hasznosítás alapján

A Biolog rendszer általi vizsgálatainkba bevont 68 kórtani esetből származó törzs és 6 *A. pleuropneumoniae* típusú törzs anyagcseremintázatát elemeztük. A hat típusú törzs közül a 9-es szerotípust a hasonlósági listán az első helyen az *A. pleuropneumoniae* fajba sorolta a rendszer, míg az 5a, a 10 és 13-as referenciatörzsek esetében az *A. pleuropneumoniae* faj a 2. helyen szerepelt. Az *A. pleuropneumoniae* faj a hasonlósági listán a harmadik helyen szerepelt a 11-es típusú törzs esetében. Ezt a négy törzset a Biolog rendszer első helyen *A. lignieresii*-ként azonosította. Az 5b típusú törzset *Haemophilus paraphrohaemolyticus* fajként határozta meg, de a hasonlósági listán a második helyen az *A. pleuropneumoniae* állt. Harminc kórtani mintából izolált törzset határozott meg *A. pleuropneumoniae* fajként a Biolog rendszer 24 órás inkubációs időt követően. Negyven izolátumot az *A. lignieresii*, háromat a *Haemophilus paraphrohaemolyticus* és egy izolátumot pedig az *A. equuli* baktérium fajba

sorolt. Azt, hogy a hasonlósági listán hányadik helyen szerepel az *A. pleuropneumoniae* 34. táblázatban látható.

34. táblázat: Az *A. pleuropneumoniae* törzsek száma a hasonlósági listán.

	Az <i>A. pleuropneumoniae</i> helyeződése a listán							
App törzsek	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Összes
I-es biotip	18	17	8	2	1	0	0	46
II-es biotip	12	12	1	1	0	1	1	28
Összesen	30	29	9	3	1	1	1	74

Az általunk vizsgált törzsek 100%-a 20 különböző szénforrás hasznosítására volt képes. A törzsek 1–99%-a 27 további szénforrás felhasználására volt képes 24 órás inkubáció során. A vizsgálatba vont törzsek szénforrás-hasznosításának összehasonlítását a 35. táblázat tartalmazza.

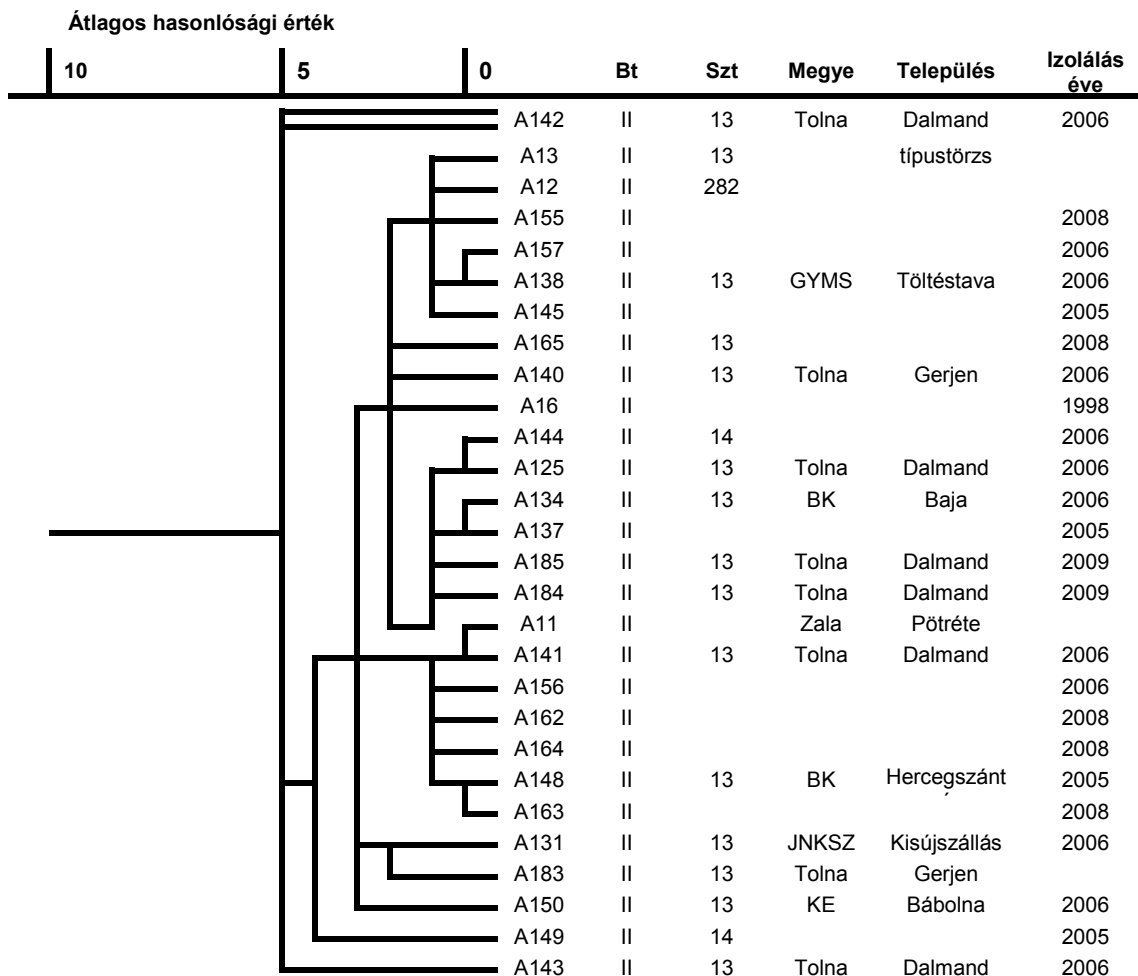
35. táblázat: A vizsgált 68 *A. pleuropneumoniae* törzs által felhasznált szénforrások, lebontva I-es és II-es biotípusra, valamint a típustörzsekre

Szénforrás	Összes (68)	I-es biotípus (41)	II-es biotípus (27)	Típustörzsek (6)
Dextrin	100*	100	100	100
Tween 40	0	0	0	0
N-Acetil-D-glükózamin	99	98	100	100
L-Arabinóz	99	98	100	100
D-Arabitol	4	5	4	0
D-Cellobióz	100	100	100	100
D-Fruktóz	100	100	100	100
L-Fruktóz	97	98	96	100
D-Galaktóz	100	100	100	100
Genciobióz	10	12	7	0
α -D-Glükóz	100	100	100	100
m-Inozitol	7	7	7	0
α -D-Laktóz	100	100	100	100
Laktulóz	100	100	100	100
Maltóz	100	100	100	100
D-Mannitol	100	100	100	100
D-Mannóz	100	100	100	100
D-Melibióz	3	2	4	0
β -Metil-D-Glükózid	0	0	0	0
D-Pszikóz	100	100	100	100
D-Raffinóz	100	100	100	100
L-Ramnóz	94	98	89	100
D-Szorbitol	100	100	100	100
Szukróz	100	100	100	100
D-Trehalóz	38	46	26	50
Turanóz	97	100	93	100
Xilitol	1	0	4	17
Piroszólósav-metil-észter	94	90	100	100
Borostyánkősav mono-	56	71	33	83
Ecetsav	71	71	70	17
Hangyasav	100	100	100	100
D-Galakturonsav	54	54	56	33
D-Glükonsav	93	90	96	83
D-Glükózaminsav	19	17	22	17
D-Glükuronsav	50	59	37	33
α -Hidroxivajsav	97	98	96	100
p-Hidroxi-fenilecetsav	1	0	4	17
α -Ketovajsav	99	100	96	83
α -Ketoglutársav	40	41	37	50
α -Ketovaleriánsav	1	0	4	0
D,L-Tejsav	100	100	100	100
Propionsav	1	0	4	0
Kínsav	1	0	4	0
Borostyánkősav	99	98	100	83
Brómborostyánkősav	49	51	44	17
Glükuronamid	74	76	70	33
L-Aszparagin	68	68	67	67
L-Aszparaginsav	79	78	81	83
Glicil-L-aszparaginsav	1	2	0	0
L-Prolin	75	71	81	67
L-Treonin	84	83	85	83
Urokánsav	68	61	78	50
Inozin	100	100	100	100
Uridin	100	100	100	100
Timidin	100	100	100	100
Feniletil-amin	4	7	0	0
Putreszcin	1	0	4	0
D,L, α -Glicerol foszfát	1	0	4	0
α -D-Glükóz-1-foszfát	57	49	70	83
D-Glükóz-6-foszfát	100	100	100	83

(*a szénforrás hasznosítási aránya százalékban kifejezve)

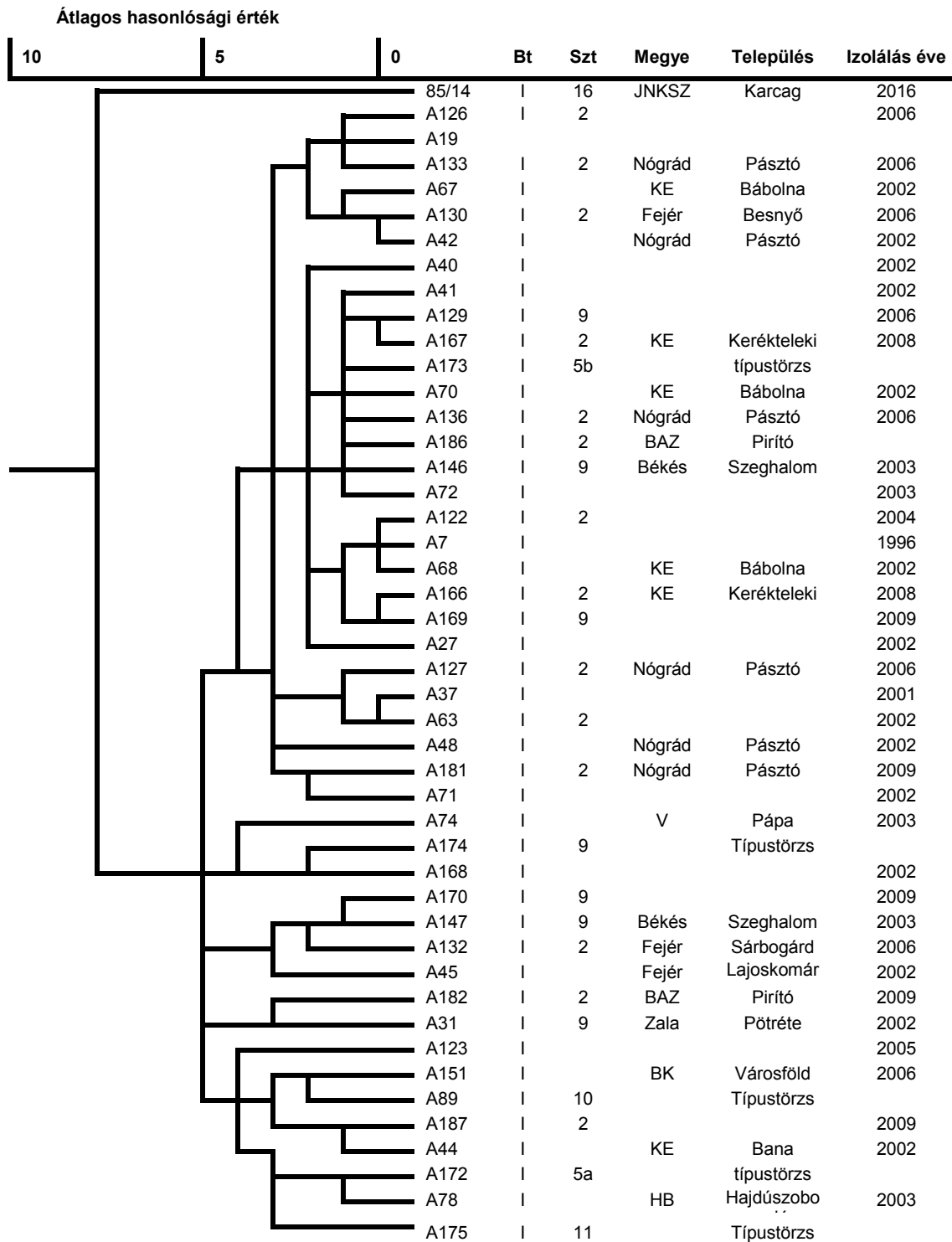
Az I-es biotípusba tartozó törzsek 100%-a 22 különböző szénforrást, míg a II-es biotípusba tartozó törzsek 24 különböző szénforrást tudtak hasznosítani. A Biolog adatbázisában található standard adatokhoz képest a vizsgált *A. pleuropneumoniae* törzsek tíz plusz szénforrást hasznosítottak (35. táblázat, sárga szín), viszont nem hasznosították a tween 40 és béta-metil-D-glükózid szénforrást 24 órás inkubációt követően.

A vizsgált II-es biotípusba tartozó törzsek rokonsági fokát az anyagcsereprofil alapján készített törzsfa mutatja (10. ábra).



10. ábra: A II-es biotípusba tartozó törzsek anyagcsereprofilja alapján készített törzsfa

A vizsgált I-es biotípusba tartozó törzsek rokonsági fokát az anyagcsereprofil alapján készített törzsfá mutatja (11. ábra).



11. ábra: Az I-es biotípusba tartozó törzsek anyagcsereprofilja alapján készített törzsfá

Az összes vizsgált törzs anyagcsereprofilja alapján készített törzsfát a 12. ábra mutatja be.

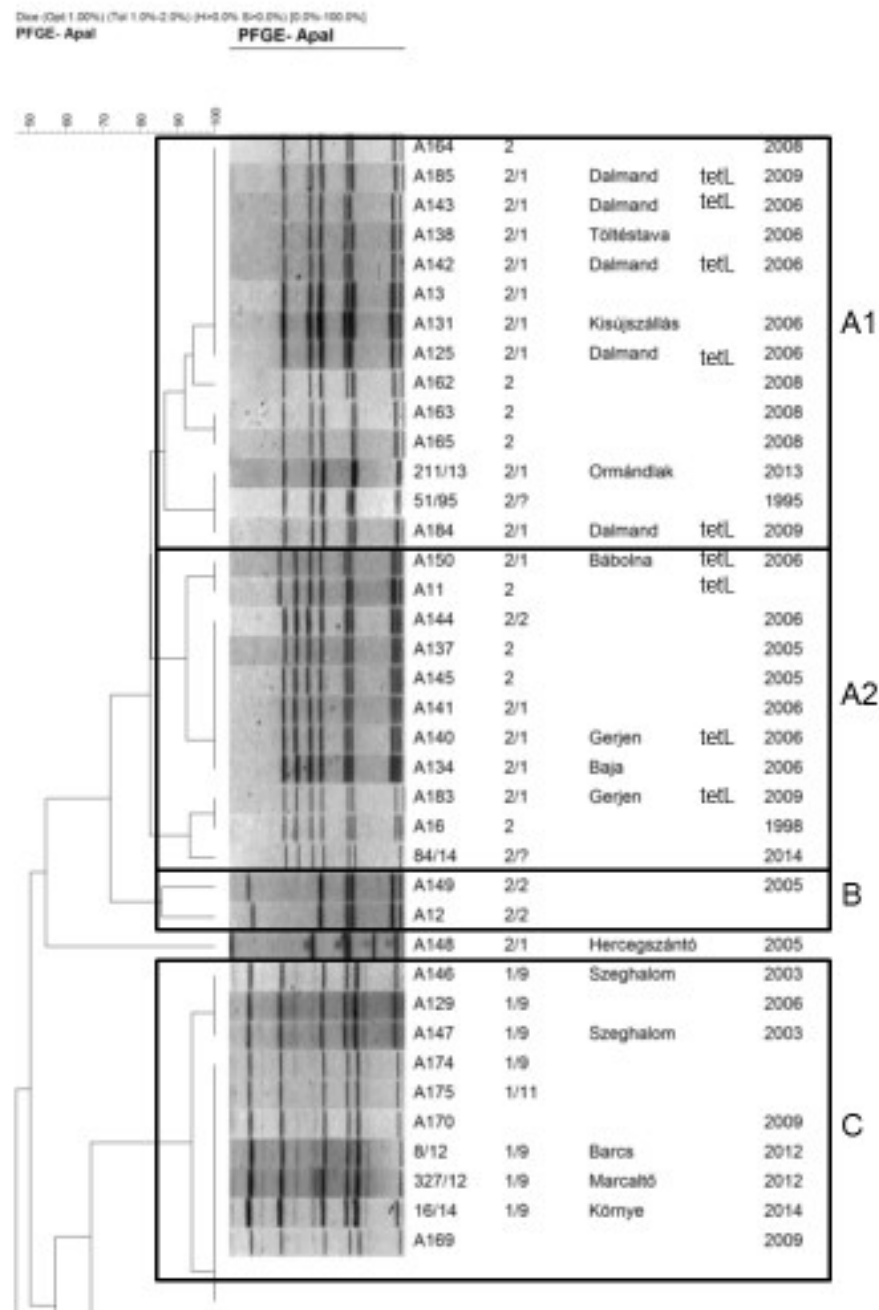
10	5	0	Bt	Szt	Megye	Település	Izolálás éve
		A170		9			2009
		A166		2	KE	Kerékteleki	2008
		A163					2008
		A78			HB	Hajdúszoboszló	2003
		A165		13			2008
		A168					2002
		A187		2			2000
		A173		5b		típustörzs	
		A67			KE	Bábolna	2002
		A142		13	Tolna	Dalmand	2006
		A70			KE	Bábolna	2002
		A122		2			2004
		A172		5a		típustörzs	
		A169		9			2009
		A140		13	Tolna	Gerjen	2006
		A134		13	BK	Baja	2006
		A127		2	Nógrád	Pásztó	2006
		A186		2	BAZ	Pirító	
		A89		10		Típustörzs	
		A131		13	JNKSZ	Kisújszállás	2006
		A156					2006
		A71					2002
		A42			Nógrád	Pásztó	2002
		A37					2001
		A182		2	BAZ	Pirító	2009
		A13		13		típustörzs	
		A31		9	Zala	Pötréte	2002
		A146		9	Békés	Szeghalom	2003
		A68			KE	Bábolna	2002
		A125		13	Tolna	Dalmand	2006
		A162					2008
		A11			Zala	Pötréte	
		A157					2006
		A16					1998
		A145					2005
		A136		2	Nógrád	Pásztó	2006
		A181		2	Nógrád	Pásztó	2009
		A138		13	GYMS	Töltéstava	2006
		A12		282			
		A133		2	Nógrád	Pásztó	2006
		A48			Nógrád	Pásztó	2002
		A72					2003
		A45			Fejér	Lajoskomárom	2002
		A164					2008
		A151			BK	Városföld	2006
		A167		2	KE	Kerékteleki	2008
		A144		14			2006
		A7					1996
		A130		2	Fejér	Besnyő	2006
		A123					2005
		A44			KE	Bana	2002
		A155					2008
		A148		13	BK	Hercegszántó	2005
		A137					2005
		A149		14			2005
		A183		13	Tolna	Gerjen	
		A129		9			2006
		A175		11		Típustörzs	
		A27					2002
		A174		9		Típustörzs	
		A150		13	KE	Bábolna	2006
		A19					
		A141		13	Tolna	Dalmand	2006
		85/14		16	JNKSZ	Karcag	2016
		A126		2			2006
		A74			V	Pápa	2003
		A143		13	Tolna	Dalmand	2006
		A63		2			2002
		A41					2002
		A147		9	Békés	Szeghalom	2003
		A132		2	Fejér	Sárbogárd	2006
		A40					2002
		A185		13	Tolna	Dalmand	2009
		A184		13	Tolna	Dalmand	2009

12. ábra: A 74 A. *pleuropneumoniae* törzs anyagcsere-ujjlenyomata alapján készült

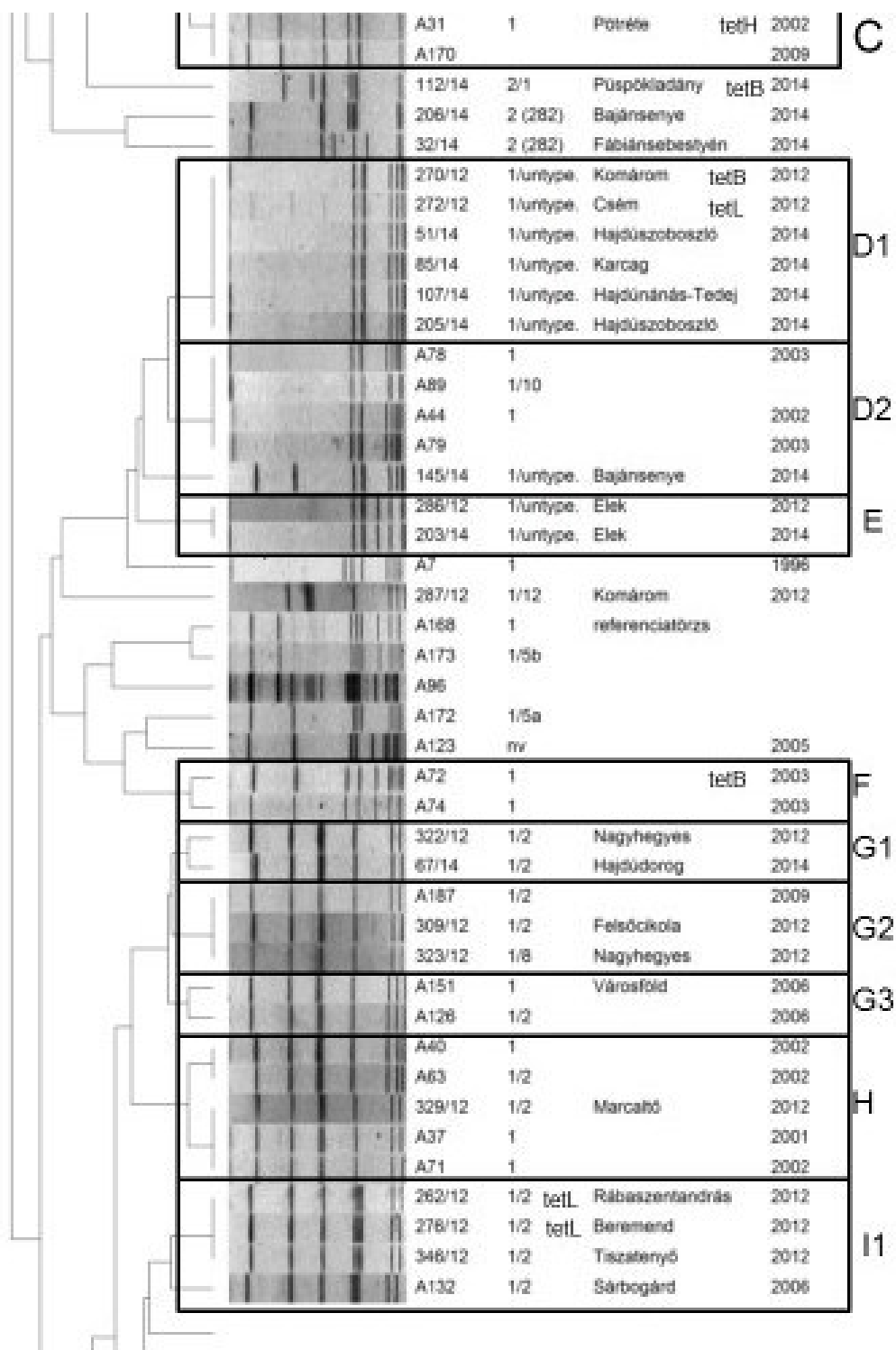
törzsf

5.6. Az *A. pleuropneumoniae* törzsek vizsgálata pulzáló mezejű gélelektroforézissel

A törzsek 41 állományból származtak és valamennyi izolátum tipizálható volt az *Apal* restrikciós enzimmel. A szerotípusok határozott különbséget mutattak a makrorestrikciós mintázatokban (13/a-b-c. ábra).



13/a ábra: A II-es biotípusba tartozó törzsek makrorestrikciós mintázata zárt (A és B csoport)



13/b. ábra: A 16-os szerotípusba (D1-D2) és a feltehetően új szerotípusba (E) tartozó törzsek makrorestrikciós mintázata

	A78		Nagyigmánd	2003	J2
	A130	1/2	Besenyő	2008	
	66/14	1/2	Derecska	2014	J1
	198/14	1/2	Nagyigmánd	2014	
	202/14	1/2	Küngös	2014	
	246/12	1/2	Gyömöre	1etL 2012	
	320/13	1/2	Hódmezővásárhely	2013	
	200/14	1/2	Lébény	2014	
	209/14	1/2	Csillagpuszta	2014	
	A48	1	Pásztó	2002	
	A45	1	Lajoskomárom	2002	
	A41	1		2002	
	A133	1/2	Pásztó	2006	
	A136	1/2	Pásztó	2006	
	A122	1/2		2004	
	A127	1/2	Pásztó	2008	
	A42	1		2002	
	A109	1		2002	
	A27	1		2002	
	A167	1	Kerézteleki	2008	
	A166	1	Kerézteleki	2008	
	A186	1/2	Pirító	2009	
	A182	1/2	Pirító	2009	
	A181	1/2	Pásztó	2009	
	202/14	1/2	Küngös	2014	
	66/14	1/2	Derecska	2014	
	249/12	1/2	Mocsa	2012	
	208/14	1/2	Tárnány	2014	
	198/12	1/2	Küngös	1etB 2012	
	26/14	1/2	Hajdúbozormény	2014	
	A19	1		1998	
	416/13	1/2	Tab	2013	J2
	A171	1/2			
	A68	1	Bábolna	2002	K
	A70	1	Bábolna	2002	
	A67	1	Bábolna	2002	

13/c. ábra: A 115 törzs PFGE vizsgálatának eredményeként kapott teljes genom mintázata alapján kirajzolódott csoportok (13/a és 13/b)

A 2-es szerotípusú törzseknél kilenc csoportot különítettünk el (G1-től K-ig), és ezen szerotípus csoportjain belül a J1 alkotta a legnagyobb csoportot, amelybe 14 különböző állományból 27 izolátum tartozott. 8-as szerotípusú törzset a PFGE vizsgálatokig csak egyet izoláltunk, melyet bevontunk a vizsgálatba és ezt a rendszer a G2 csoportba sorolta, amely ezen kívül 2-es szerotípusú törzseket tartalmazott.

A 13-as szerotípus törzsei két alcsoportba kerültek, 14 és 11 törzs található a két alcsoportban, amelyek négy-négy különböző állományból származtak. A 9-es szerotípus törzsei egy csoportba kerültek, nem volt alcsoportra tagolódás, míg a 16-os szerotípusba

tartozó törzsek nagy része a D1-es csoportba került, egy törzs pedig a D2-es csoportba. Az alcsoportra tagolódás ellenére genetikai zártság figyelhető meg és látható, hogy a nem besorolható törzsek külön csoportba (E) kerültek.

Az összes PFGE vizsgálatba bevont törzs hordozta a fajspecifikus *apxIV* gént, ami megerősíti azt, hogy a törzsek valóban *A. pleuropneumoniae* baktériumok.

5.7. Az *A. pleuropneumoniae* törzsek antibiotikum-érzékenysége

5.7.1. Az *A. pleuropneumoniae* törzsek antibiotikum-érzékenysége korongdiffúziós próbával vizsgálva

Az összes törzs érzékeny volt tularomicinre és tiamulinra, nagymértékben érzékenyek voltak amoxicillinre, penicillinre, ampicillinre, ceftiofurra, cefoperazonra, enrofloxacinra és marbofloxacinra, klóramfenikolra és florfenikolra, valamint szulfametoxazol-trimetoprimra. A törzsek hasonló arányban voltak mérsékelten érzékenyek és rezisztensek gentamicinre, spektinomicinre, penicillinre és ampicillinre. Nagymértékű mérsékelt érzékenységet mutattak törzseink eritromicinre, valamint nagyfokú rezisztenciát találtunk szulfametoxazollal szemben (36. táblázat).

36. táblázat: A korongdiffúziós vizsgálat eredményei

Antibiotikum	É	MÉ	R
gentamicin	7%	47%	46%
spektinomicin	24%	41%	35%
amoxicillin-klavulánsav	95%	5%	0
amoxicillin	88%	0	12%
penicillin	76%	12%	12%
ampicillin	86%	7%	7%
ceftiofur	91%	9%	0
cefoperazon	85%	15%	0
enrofloxacin	74%	21%	5%
marbofloxacin	83%	17%	0
klóramfenikol	98%	2%	0
florfenikol	95%	0	5%
eritromicin	0	72%	28%
tilmikozin	65%	0	35%
tularomicin	100%	0	0
szulfametoxazol	0	17%	83%
SXT	91%	9%	0
doxiciklin	51%	38%	11%
oxitetraciklin	60%	16%	24%
tiamulin	100%	0	0

É: érzékeny; MÉ: mérsékelten érzékeny; R: rezisztens

5.7.2. A vizsgált antibiotikumok minimális gátló koncentrációja (MIC)

A vizsgálatok során az S1536 számú *A. pleuropneumoniae* típus törzs MIC-értéke minden antibiotikum esetében a CLSI dokumentumában meghatározott MIC-intervallumba esett. A vizsgálatba vont *A. pleuropneumoniae* törzsek MIC-értékeit a vizsgált antibiotikumokra nézve a 37. táblázat tartalmazza.

37. táblázat: A vizsgált antibiotikumok MIC, MIC₅₀ és MIC₉₀ (µg/ml) értékei

Antibiotikum	Törzsszám	MIC	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Rezisztencia (%)
gentamicin	60	0,25-32	4	16	46,7
spektinomycin	58	4-128	128	128	51
amoxicillin-	56	0,25-16	0,5	2	14,3
amoxicillin	57	0,125-32	0,5	2	12,3
penicillin	58	0,06-8	1	4	50
ampicillin	55	0,03-16	0,5	2	25,4
ceftiofur	58	0,06-8	1	4	1,7
cefoperazon	57	0,06-16	1	4	1,7
enrofloxacin	59	0,015-1	0,06	1	12
marbofloxacin	59	0,008-2	0,06	0,5	3,4
klóramfenikol	59	0,25-64	0,5	2	1,7
florfenikol	59	0,25-64	0,5	1	1,7
eritromicin	59	2-16	4	16	50,8
tilmikozin	59	2-32	8	16	3,4
tulatromicin	53	0,25-128	64	128	22,6
szulfametoxazol	58	100-1600	800	1600	100
SXT	58	0,015-16	2	4	43,1
doxiciklin	59	0,125-8	0,5	4	18,6
oxitetraciklin	55	0,25-64	1	32	38,2
tiamulin	59	4-64	16	32	13,6

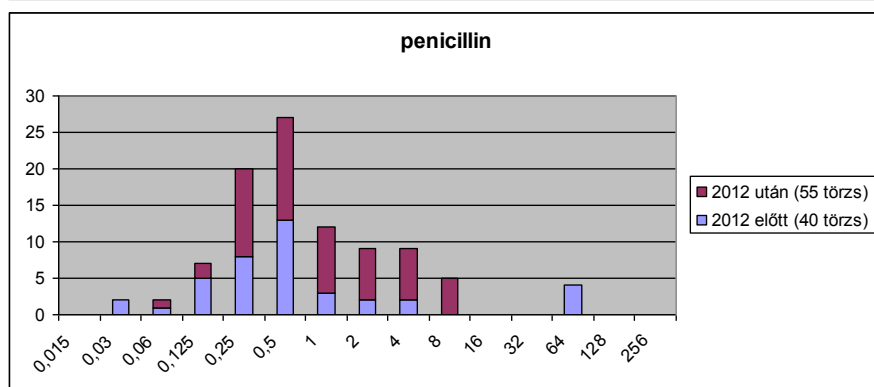
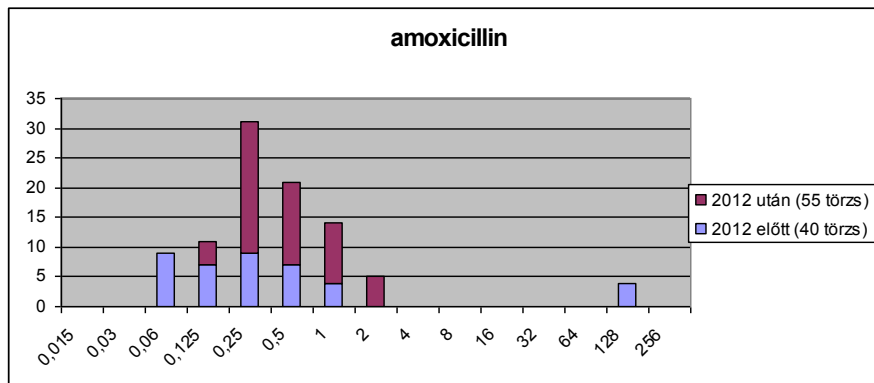
5.7.3. 2012 előtt izolált törzsek antibiotikum-érzékenysége

A negyven, 2012 előtt izolált, törzsgyűjteményben elhelyezett *A. pleuropneumoniae* törzs MIC-értékeit a vizsgált nyolc antibiotikummal szemben a 38. táblázat tartalmazza.

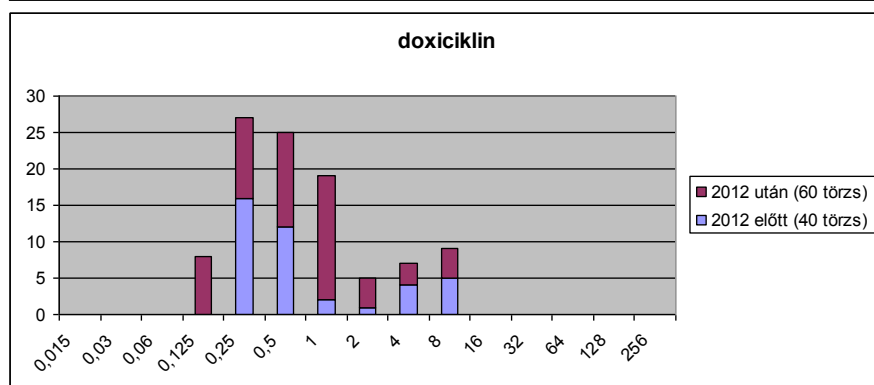
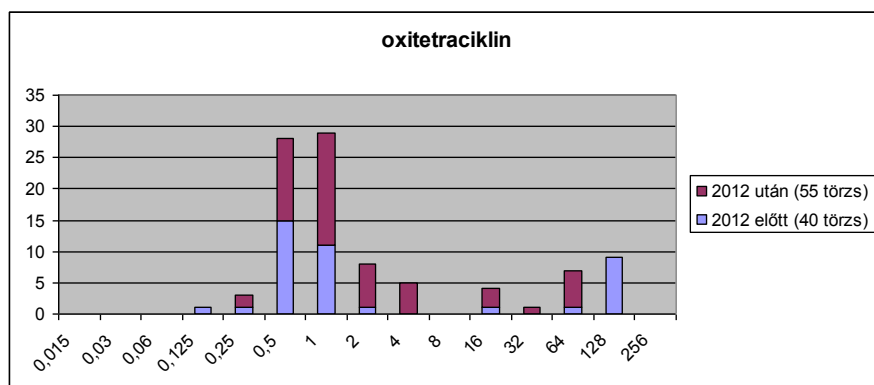
38. táblázat: A MIC-értékek, MIC₅₀ és MIC₉₀ (µg/ml) a negyven 2012 előtt izolált törzsre nézve

Antibiotikum	Törzsszám	MIC	MIC ₅₀	MIC ₉₀	rezisztencia (%)
amoxicillin	40	0,06-128	0,25	1	2,5
penicillin	40	0,03-64	0,5	4	27,5
cefoperazon	40	0,06-4	1	4	0
enrofloxacin	40	0,015-1	0,06	1	20
florfenikol	40	0,125-1	0,5	0,5	0
doxiciklin	40	0,25-8	0,5	4	25
oxitetraciklin	40	0,125-128	1	128	30
tiamulin	40	1-32	8	16	5

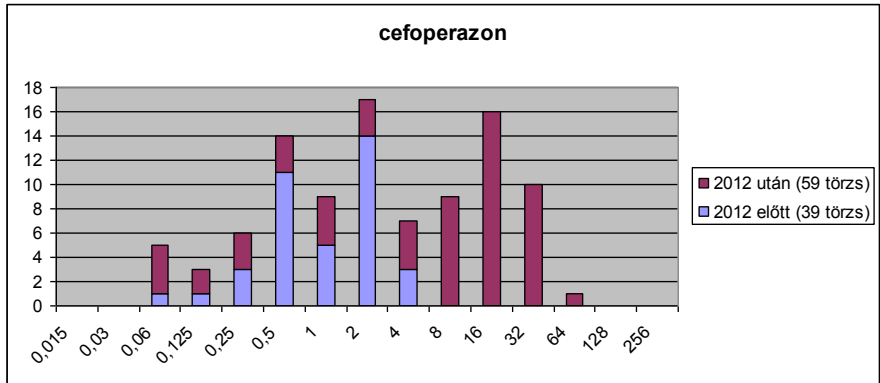
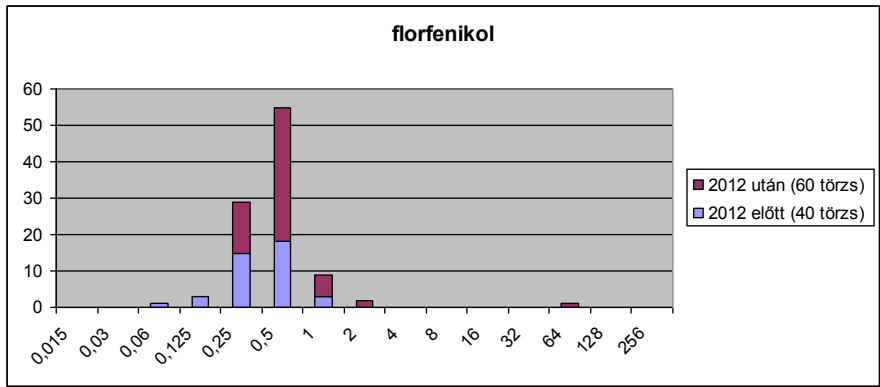
A vizsgált nyolc antibiotikumra mutatott érzékenység megoszlása és változása az elmúlt 20 évben izolált törzsre nézve (14-21. ábra). A tetraciklinek között keresztrezisztenciát tapasztaltunk.



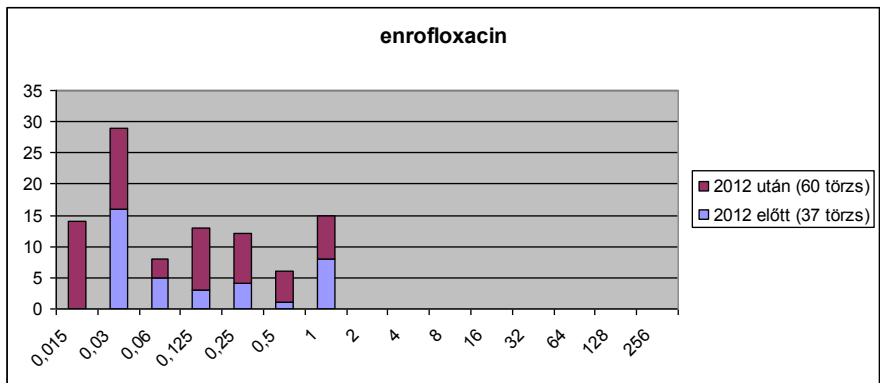
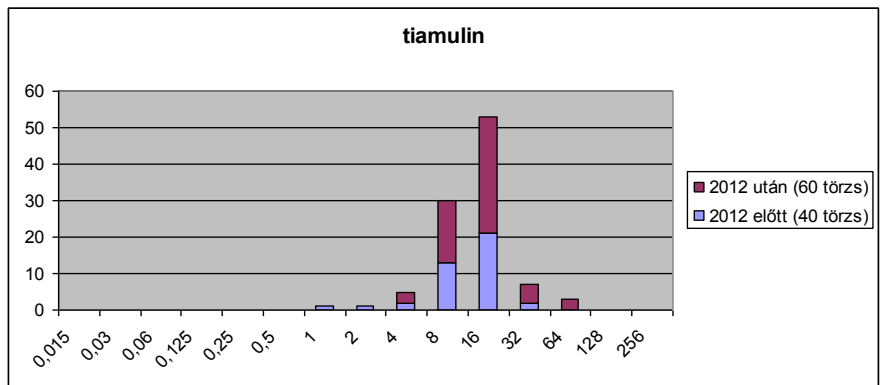
14-15. ábra: A béta-laktámokra kapott érzékenységi eredmények változása



16-17. ábra: A tetraciklinekre kapott érzékenységi eredmények változása



18-19. ábra: A florfenikolra és cefoperazonra kapott érzékenységi eredmények változása



20-21. ábra: A tiamulinra és az enrofloxacinra kapott érzékenységi eredmények változása

5.7.4. Antibiotikum-rezisztenciagének

A PFGE vizsgálatokba bevont 115 törzs közül nyolcvanban antibiotikum-rezisztenciagéneket is kerestünk. Béta-laktám rezisztenciagént nem találtunk egyik törzsben sem, pedig fenotípusos rezisztenciával találkoztunk (36., 37. és 38. táblázat).

A tetraciklin-rezisztenciagéneket hordozó törzseket a PFGE törzsfán tüntettük fel (13a., 13b. és 13c. ábra). Azok a törzsek, amelyek csak oxitetraciklinnel mutattak rezisztenciát, de doxiciklinre érzékenyek voltak, viszonylag alacsony MIC-értékkel rendelkeztek (16 µg/ml) és sem a *tetL* gént, sem más, általunk vizsgált tetraciklin rezisztenciáért felelős gént nem hordoztak.

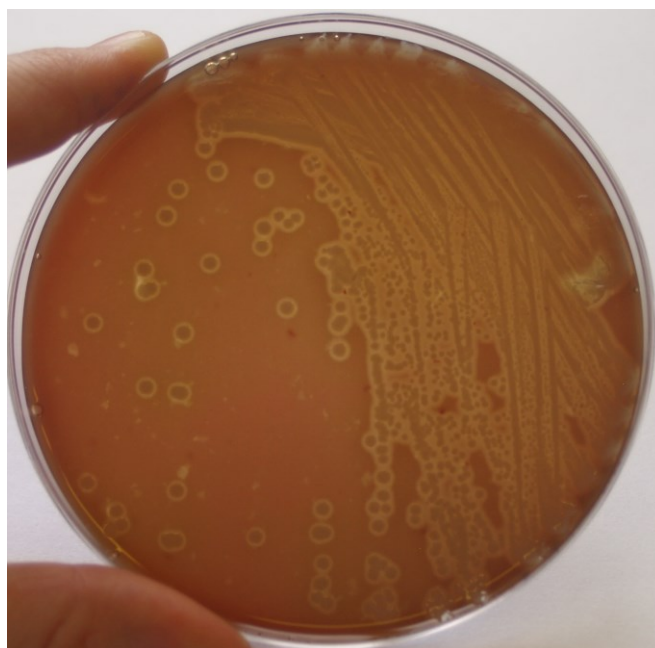
Az A2-es csoport tagjait (13-as szerotípus) a béta-laktámokkal szembeni rezisztencia gyakoribb előfordulása jellemezte, 11 izolátumból 4 törzs volt rezisztens penicillin G-re és amoxicillinre, míg 2 volt rezisztens cefoperazonra. Ugyanezen A2-es csoport tagjai nagy arányban mutattak rezisztenciát oxitetraciklinnel (11-ből 6 törzs, amelyek két állományból származtak) és doxiciklinnel szemben (11-ből 5 törzs). A doxiciklin rezisztens törzsek hordozták a *tetL* gént. A tetraciklin rezisztencia az A1-es csoport tagjain belül is megfigyelhető volt, a 14 izolátumból hat volt rezisztens oxitetraciklinnel és doxiciklinnel szemben. Öt, ugyanabból az állományból származó izolátum hordozta a *tetL* gént, a *tetB* gén egy sporadikus 13-as izolátumban volt megtalálható.

Az 1-es biotípusú törzsek közül, a C csoportban (9-es szerotípus) lévő egyik izolátum hordozza a *tetH* gént, a D1-es csoport (16-os szerotípus) egyik izolátuma a *tetB*-t, míg egy másik a *tetL* gént hordozta. Az F csoport egyik izolátumából a *tetB* gént, az I1-es csoportban lévő, különböző állományból izolált két törzs a *tetL* gént hordozza. A J1-es csoport törzsei közül egy hordozta a *tetB* gént, egy másik pedig a *tetL* gént. A K csoportban lévő három izolátumból egy mutatott penicillin rezisztenciát, amely mérsékelten érzékeny volt amoxicillinre is. A többi törzs érzékenynek bizonyult a vizsgált antibiotikumokra.

5.8. Szelektív táptalaj fejlesztése

5.8.1. Az antibiotikum vizsgálatok eredménye

A szelektív táptalajok alapjául szolgáló különböző NAD-koncentrációjú véresagarok közül a 0,3 mg/ml mennyiségű NAD-ot, 5% juhvért és 1 g/ml élesztőkivonatot tartalmazó Müller-Hinton táptalaj bizonyult a legeredményesebbnek (22. ábra).



22. ábra: NAD-függő *A. pleuropneumoniae* törzs növekedése a 0,3 mg/ml mennyiségű NAD-ot tartalmazó MH véresagaron

A 90 különböző hatóanyagtartalmú antibiotikum korongdiffúziós vizsgálatának eredménye, 15 *A. pleuropneumoniae* törzssel vizsgálva, a 39. táblázatban található.

39. táblázat: A 90 hatóanyag korongdiffúziós vizsgálatának eredménye

	Csoport	Antibiotikum	Érzékeny	Mérsékelten érzékeny	Rezisztens
1.	Aminoglikozidok	amikacin	80%	13%	7%
2.		aminozidin	100%	0	0
3.		apramicin	27%	60%	13%
4.		gentamicin	100%	0	0
5.		izepamicin	93%	7%	0
6.		kanamicin	93%	7%	0
7.		neomicin	20%	27%	53%
8.		netilmicin	100%	0	0
9.		sisomicin	87%	13%	0
10.		spectinomycin	100%	0	0
11.		sztreptomycin	100%	0	0
12.		tobramicin	100%	0	0
13.	Cefalosporinok	cefadroxil	100%	0	0
14.		cefoperazon	100%	0	0
15.		ceftiofur	100%	0	0
16.		cefuroxim	100%	0	0
17.		cefalexin	100%	0	0
18.		cefalotin	100%	0	0
19.		lorakarbef	100%	0	0
20.		moxalaktám	100%	0	0
21.	Diamino-pirimidin	trimetoprim	93%	7%	0
22.	Glikopeptidek	vancomicin	0	0	100%
23.		teicoplanin	0	0	100%
24.		novobiocin	0	0	100%
25.	Hidrokinon	optochin	87%	0	13%
26.	Karbapenemek	imipenem	100%	0	0
27.		meropenem	100%	0	0
28.		ciprofloxacín	100%	0	0

29.		enrofloxacin	100%	0	0
30.		flumequin	100%	0	0
31.		levofloxacin	100%	0	0
32.		lomefloxacin	100%	0	0
33.		marbofloxacin	100%	0	0
34.	Kinolonok	moxifloxacin	100%	0	0
35.		nalidixsav	100%	0	0
36.		norfloxacin	100%	0	0
37.		ofloxacin	100%	0	0
38.		oxolin sav	100%	0	0
39.		perfloxacín	93%	7%	0
40.		sparfloxacín	100%	0	0
41.		klóramfenikol	27%	46%	27%
42.	Klóramfenikolok	florfenikol	100%	0	0
43.		tiamfenikol	93%	0	7%
44.		klindamicin	0	40%	60%
45.	Linkóزامidok	linkomicin	20%	27%	53%
46.		linkomicin+ spectinomycin	100%	0	0
47.		azitromicin	100%	0	0
48.		klaritromicin	100%	0	0
49.		eritromicin	20%	80%	0
50.		oleésomicin	0	7%	93%
51.		pirlimicin	87%	0	13%
52.	Makrolidok	pristinamicin	0	93%	7%
53.		roxitromicin	7%	93%	0
54.		spiramicin	0	80%	20%
55.		tilmikozin	100%	0	0
56.		tilozin	67	0	33
57.		tulatromicin	100%	0	0
58.	Nitrofurán	nitrofurantoin	100%	0	0
59.	Nitroimidazol	metronidazol	0	0	100%
60.	Oxazolidin	linezolid	7%	7%	86%
61.		amoxicillin-klavulánsav	100%	0	0
62.		amoxicillin	100%	0	0
63.		ampicillin	93%	0	7%
64.		azlocillin	100%	0	0
65.		karbenicillin	93%	0	7%
66.		mecillinam	87%	0,07	7%
67.		meticillin	0	0,33	67%
68.	Penicillinek	mezlocillin	100%	0	0
69.		nafcillin	7%	0	93%
70.		oxacillin	33%	40	27%
71.		penicillin	93%	0	7%
72.		piperacillin	93%	0	7%
73.		piperacillin+ tazobactam	100%	0	0
74.		ticarcillin	87%	7%	7%
75.		ticarcillin+klavulánsav	100%	0	0
76.	Pleuromutilinek	tiamulin	100%	0	0
77.		bacitracin	0	46%	54%
78.	Polipeptidek	polimixin E	87%	13%	0
79.		polimixin B	100%	0	0
80.	Rifamicin	rifampin	0	7%	93%
81.		szulfiszoxazol	13%	40%	47%
82.		szulfametoxazol	0	20%	80%
83.	Szulfonamidok	trimethoprim+ szulfonamid	93%	7%	0
84.		triple/szulfonamidok	0	0	0
85.		doxiciklin	0%	53%	47%
86.		klórtetraciklin	46%	27%	27%
87.	Tetraciklinek	minociklin	27%	73%	0
88.		oxitetraciklin	34%	20%	46%
89.		tetraciklin	27%	27%	46%
90.	Egyéb	foszfomicin	100%	0	0

A tetraciklinek között keresztrezisztencia volt megfigyelhető.

A 90 hatóanyag közül kiválasztott huszonöttel végzett korongdiffúziós vizsgálat eredményét a 40. táblázatban tüntettük fel.

40. táblázat: A korongdiffúziós vizsgálat során kapott eredményeink a 25 különböző hatóanyagra nézve

	Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>P. multocida</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>App I</i>	<i>App II</i>
1.	amikacin	MÉ	É	R	É	R	É
2.	apramicin	MÉ	É	R	R	R	É
3.	doxiciklin	R	MÉ	R	R	MÉ	É
4.	eritromicin	R	MÉ	R	R	MÉ	É
5.	fusidic sav	É	MÉ	MÉ	R	MÉ	É
6.	klaritromicin	R	MÉ	R	R	R	É
7.	klindamicin	R	MÉ	R	R	R	R
8.	klórtetraciklin	R	MÉ	R	R	É	É
9.	linkomicin	R	R	R	R	R	R
10.	meticillin	R	R	R	R	R	R
11.	minociklin	R	MÉ	R	R	R	É
12.	neomicin	R	É	R	É	R	É
13.	oxacillin	R	R	R	É	R	R
14.	OTC	R	MÉ	R	R	MÉ	É
15.	pirlimicin	R	R	R	R	R	R
16.	polimixin E	É	É	É	R	É	É
17.	polimixin B	É	É	É	R	É	É
18.	rifampin	R	R	MÉ	R	R	É
19.	rifamicin SV	R	R	R	R	R	R
20.	spektinomycin	É	É	R	R	MÉ	É
21.	spiramicin	R	MÉ	R	R	R	É
22.	sztreptomycin	MÉ	É	R	R	R	É
23.	szulfisoxazol	R	MÉ	R	R	R	MÉ
24.	tilozin	R	R	R	R	R	MÉ
25.	vankomicin	R	R	R	R	R	R

É: érzékeny; MÉ: mérsékelten érzékeny; R: rezisztens

A szelektív táptalajba szánt három antibiotikum különböző Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal végzett MIC vizsgálatnak eredményeit a 41. táblázat tartalmazza.

41. táblázat: MIC-értékek meghatározása a szelektív táptalaj összeállításához

Baktérium fajok	linkomicin (µg/ml)	polimixin-B µg/ml	vankomicin µg/ml
<i>A. pp.</i> MIC ₅₀	32	4	128
<i>A. pp.</i> MIC ₉₀	64	16	128
<i>E. coli</i>	128	2	128
<i>E. cloacae</i>	32	4	128
<i>P. mirabilis</i>	128	128	128
<i>S. Typhimurium</i>	128	0.5	128
<i>P. multocida</i>	32	64	64
<i>S. suis</i>	0.06	0.06	4
<i>S. aureus</i>	0.06	0.06	8

5.8.2. A szelektív táptalaj összetevőinek hatékonysága

A saját fejlesztésű szelektív táptalajra oltott *A. pleuropneumoniae* törzsek növekedtek, erőteljes hemolízisnek köszönhetően megkülönböztethetőek voltak más Gram-negatív baktériumtól. Mindkét szelektív táptalaj („A” és „B”) alkalmas volt *A. pleuropneumoniae* tenyésztésére, de tonsillából csak az „A” táptalajon izoláltunk *A. pleuropneumoniae* baktériumot.

5.8.3. A sertés-tonsillák vizsgálata

Az „A” táptalajon negyven sertés-tonsilla közül háromból izoláltunk *A. pleuropneumoniae* törzset (kettő 16-os szerotípus Hajdúszoboszlóról (egy heveny telepi elhullás, egy vágóhídi minta), egy 13-as szerotípus Ormándlakról (heveny elhullás)). Mindhárom esetben a tüdőkből is izoláltuk a kórokozót.

A selejtkoca-tonsillákból nem sikerült izolálnunk egyik szelektív táptalajon sem *A. pleuropneumoniae* baktériumot.

5.9. Vaddisznóból izolált törzs vizsgálata

A vaddisznó-tonsillákból a Keselyűsről (Tolna megye) származó mintából izoláltunk egy NAD-függő *A. pleuropneumoniae* törzset, amelyet passzív hemagglutinációval a 12-es szerotípusba soroltunk.

A vaddisznóból izolált *A. pleuropneumoniae* törzs érzékenynek bizonyult ampicillinre, amoxicillinre, amoxicillin-klavulánsavra, cefoperazonra, enrofloxacinra, tiamulinra, doxiciklinre, klóramfenikolra és florfenikolra, mérsékelten érzékeny oxitetra-ciklinre, valamint rezisztens penicillinnel, gentamicinnel, spektinomocinnel, tulatromocinnel és tilmikozinnal szemben (42. táblázat).

42. táblázat: A vaddisznóból izolált *A. pleuropneumoniae* törzs MIC vizsgálat eredménye és érzékenysége

Antibiotikum	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	érzékenység
penicillin	1	R
amoxicillin	0.5	É
amoxicillin-klavulánsav	0,5	É
ampicillin	0.125	É
cefoperazon	1	É
gentamicin	16	R
spektinomycin	128	R
oxitetraciklin	1	MÉ
doxiciklin	0.5	É
tilmikozin	32	R
tiamulin	16	É
klóramfenikol	2	É
florfenikol	0.5	É
enrofloxacin	0,06	É
tulatromicin	128	R

É: érzékeny; MÉ: mérsékelten érzékeny; R: rezisztens

6. Következtetések

6.1. A vizsgálatba vont állatok kora, a törzsek földrajzi eredete

Heveny megbetegedést leggyakrabban a szakirodalomnak megfelelően, 12-16 hetes korú, hízlaldában elhelyezett állatokban láttunk (Crujisen és mtsai., 1995; Chiers és mtsai., 2002; Vigre és mtsai., 2002), de az idősebb korosztályban is igen gyakran előfordult a heveny *actinobacillus pleuropneumonia*. A szubklinikailag fertőzött kocák maternális védelmet biztosítanak a malacoknak az adott szerotípussal szemben, emiatt a szopós vagy választás körüli malacokban kialakult pleuropneumonia nagyon ritka (Takács és mtsai., 2015). Ez a védelem 5-9 hetes korig tart, majd ahogy csökken a vérben az ellenanyag, úgy nő a fertőzött malacok aránya (Tobias és mtsai., 2014a és 2014b).

Vizsgálataink során a 11-es szerotípusú *A. pleuropneumoniae* kóroktani szerepét igazoltuk választás körüli (28-31 nap) malacok tüdő- és mellhártyagyulladás esetén. Valószínűsíthető, hogy ez a szerotípus a közelmúltban került behurcolásra a sertéstelepre, ezért a maternális védelem csak a telepen régóta megtalálható és többször izolált 16-os szerotípussal szemben volt meg. Ennek hiányában, ezzel a szerotípussal szemben a malacok védtelenek voltak és a megszokottnál fiatalabb korban jelentek meg a betegsége jellemző klinikai tünetek és kórbonctani elváltozások. Ez a megfigyelés megerősíti a szerotípus-specifikus védelem létét.

Idült elváltozásokat vágóhídon gyűjtött tüdőkben láttunk, ami megerősíti a szakirodalomban leírtakat, hogy az idült pleuropneumoniás elváltozásokat csak vágóhídi vizsgálat során láthatjuk, hiszen általában nincs elhullás, így a veszteség sem az elhullás miatt alakul ki, hanem az elhúzódó hízlalási idő és a megnövekedett takarmányköltség miatt. A mintagyűjtésünk éve alatt törekedtünk arra, hogy lehetőleg különböző állományokból izoláljuk a kórokozót, bár egy-egy telepről néhány hét, hónap vagy év különbséggel újra kaptunk vagy gyűjtöttünk mintát, mert a betegség időről időre fellángolt. Ennek is köszönhető, hogy minden vizsgálatba bevont sertéstelepről izoláltuk az *A. pleuropneumoniae* kórokozót, és így nyomon követhettük a szerotípusok változását vagy fennmaradását egy-egy állományban, illetve megerősítettük a szakirodalomban leírtakat, miszerint a konvencionális sertésállományok fertőzöttek *A. pleuropneumoniae*-vel és egyszerre több szerotípus is jelen lehet az állományban (Gottschalk, 2012).

A törzsek földrajzi eredete jól szemlélteti, hogy hazánk mely részein folyik intenzív sertéstenyésztés.

6.2. Az *A. pleuropneumoniae* törzsek azonosítása

A kórtani mintákból izolált *A. pleuropneumoniae* törzsek 89%-a az I-es biotípusba, míg 11%-a a II-es biotípusba tartozott, amely korrelál a korábbi hazai és a jelenlegi európai adatokkal (Fodor és mtsai., 1989a; Molnár, 1990; Bossé és mtsai., 2016, Gottschalk és Lacourite, 2015). Pontosán nem ismert, hogy Európában, azon belül is Magyarországon miért fordul elő gyakrabban II-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* törzs.

A tenyésztési, morfológiai és elsődleges biokémiai vizsgálatok eredménye is megegyezik a szakirodalomban leírtakkal (Tuboly és mtsai, 1998).

6.3. A szerotípusok előfordulási gyakorisága

6.3.1. Passzív hemagglutinációs próba, 2012 előtt és után

A szerotipizáláshoz a klasszikus módszerek közül a passzív hemagglutinációs próbát választottuk, mert a szerzők többsége ezt tartotta leginkább specifikusnak és érzékenynek (Mittal és mtsai., 1983a; Mittal és mtsai., 1983b; Molnár, 1990; Nielsen és mtsai., 1997), bár keresztreakciókra itt is számítani kell, de azok megléte sokszor segíti a pontos diagnózist.

A 2012 előtti vizsgálatok szerint a 2-es szerotípus volt a domináns (43%), ami jelenleg is a leggyakrabban izolált szerotípus (38,9%). Az elmúlt évek során nem történt számottevő változás a 2-es szerotípus gyakoriságában. Azokban az országokban, ahonnan a legtöbb sertést importáljuk a 2-es (Marsteller és Fenwick, 1999; Chiers és mtsai., 2002; Nielsen és mtsai., 1997, Dubreil és mtsai., 2000) és a 9-es szerotípus dominál (Dubreil és mtsai., 2000; Kucerova és mtsai., 2005). Magyarországon a 9-es szerotípus gyakoriságában nem látni jelentős változást az elmúlt húsz év eredményei alapján, hiszen 2012 előtt a törzsek 7%-a tartozott a 9-es szerotípusba, a napjainkban történt vizsgálatok alapján pedig a törzsek 5,2%-a.

A 8-as szerotípus megjelent hazánkban is, amely Nagy-Britanniában a leggyakoribb szerotípus (Bossé és mtsai., 2016), valamint leírtuk a 16-os szerotípust, amelyet eddig csak Magyarországon mutattak ki (Sárközi és mtsai., 2015; Bossé és mtsai., 2017).

A 13-as szerotípus nagyon gyakori volt (43%) 2012 előtt. Az első leírások sporadikus megjelenésről számolnak be (Fodor és mtsai., 1989a), de a circovírus (PCV2) és a PRRS megjelenésével egyidőben gyakrabban jelentkezett a kórokozó. Napjainkban a PCV2 elleni vakcinázásnak köszönhetően a II-es biotípus visszaszorulását vártuk, és valóban az izolátumoknak csak a 10,4%-a tartozott a 13-as szerotípusba, 14-es szerotípusba tartozó törzset pedig nem izoláltunk. Ez még mindig magas aránynak számít az európai és az amerikai előforduláshoz képest (Fodor és mtsai., 1989a; Frey, 1995; Gottschalk, 2012). Mind a nyolc, 13-as szerotípusba tartozó törzset heveny járványkitörésekből izoláltuk, amely telepeken a PRRSV vagy *Mycoplasma* kóroktani háttere volt igazolható.

6.3.2. A passzív hemagglutinációs próbával és PCR-rel végzett szerotipizálás eredményeinek összehasonlítása

Szoros korreláció figyelhető meg a szerotípusok, és a bennük megtalálható toxingének között, és ezt a korrelációt használja ki a Rayamajhi és munkatársai által 2005-ben leírt multiplex PCR rendszere.

Hatvan törzset szerotipizáltunk ezzel a módszerrel is, és figyelembe vettük, hogy a rendszer nem tud különbséget tenni a 2-8-15, 5a-5b, 9-11, 12-13 szerotípusok között. A 16-os szerotípus hordozta azokat a toxingéneket (*apxIA*, *apxIB*, *apxII*, *apxIV*), amelyeket az 5a/5b szerotípusok (Sthitmatee és mtsai., 2003). Ha csak ezzel a rendszerrel történik a szerotipizálás, az hibás eredményt adhat, nem derül ki, hogy a burok poliszacharid és lipopoliszacharidok alapján egy más, esetünkben például egy új szerotípust izoláltunk. Két törzset szintén 5a/5b szerotípusként határozott meg a PCR rendszer, és az ellenük termelt hiperimmun savó alapján nem a 16-os szerotípusba tartoztak. Ezt megerősítette a makrorestrikciós mintázatuk eltérése is, ugyanis ezt a két törzset a PFGE az E csoportba tette, míg a D1 és D2 csoportba kerültek a 16-os szerotípusok.

6.3.3. Szekvenálás

Nyolc *A. pleuropneumoniae* törzset a 2-es vagy 8-as szerotípusba kellett volna sorolnia a PCR rendszernek, mert azokat 2-es szerotípusnak határoztunk meg PHA teszttel, és az *ApXI-II-III* termelésért felelős toxingén mintázat ezzel meg is egyezett (Rayamajhi és mtsai., 2005). Ahhoz viszont, hogy ezekbe a szerotípusokba soroljuk az *apxIV* génszakaszból 2800 bp terméket kellett volna amplifikálnia. Vizsgálatunk során mind a nyolc törzsnél 2400 bp terméket kaptuk, és ilyen toxingén mintázattal egyik szerotípusba sem tudtuk besorolni. Ezeket a szakaszokat megszekvenáltattuk és *A. pleuropneumoniae* fajként határoztuk meg őket, ami rámutat arra, hogy bizonyos törzseket a toxingén mintázat alapján nem lehet szerotipizálni.

Kettő, PCR-rel nem besorolható törzsből nem találtunk *apxIV* gént. Ezt a két törzset egyik szerotípusba sem tudtuk besorolni. A morfológiai és biokémiai tesztek alapján az *A. pleuropneumoniae* fajba tartoztak. Ezek alapján mindkét törzs esetében az *apxIV* gén megléte feltételezhető volt. Elképzelhető, hogy primer kötődési hibával találkoztunk, de az is, hogy nem minden *A. pleuropneumoniae* törzs *apxIV* génjének kimutatására alkalmas ez a rendszer.

6.4. Új szerotípusok

6.4.1. 16-os szerotípus és a 16-os szerotípus teljes genom vizsgálata

Munkánk során 56 nem besorolható törzset izoláltunk, amelyek 17 állományból származtak és a 15 típustörzzsel szemben termelt hiperimmun savó közül egyikkel sem reagáltak. Ezen törzsek közül ötöt soroltunk a 2015-ben leírt 16-os szerotípusba. Ezek a törzsek különböző állományból származtak, csak két törzs között állt fenn járványtani kapcsolatot, mivel az egyik telepről kocasüldőket szállítottak a másik telepre. A 16-os szerotípus leírása után még három törzset izoláltunk más telepekről, amelyek szintén a 16-os szerotípusba tartoztak.

A teljes genom szekvenálása során megállapítást nyert, hogy a 16-os szerotípusba tartozó törzsek burokképzéséért felelős lókuszában utolsó génje hasonlít az 5-ös szerotípus burokképzéséért felelős lókuszához, de az előbbinek ez a génje csonkolt (Bossé és mtsai., 2017). A Rayamajhi és munkatársai (2005) által leírt toxingének alapján ezeket a törzseket az 5-ös szerotípusba soroltuk, így ez is megerősíti az eredményeket. A toxingén mintázata megegyezik a két szerotípusnak, ezért feltételezzük, hogy ez az új szerotípus képes termelni az ApxI és ApxII toxint, de az ApxIII toxint nem.

Az egyik Hajdú-Bihar megyében található sertéstelepen a 16-os szerotípus által okozott heveny járványkitörés ráirányította a figyelmet a vakcinázási problémákra, amelyet az új szerotípusok megjelenése okozhat. Az *A. pleuropneumoniae*-vel szembeni védelem szerotípus-specifikus, ezért csak azok a bakterin típusú vakcinák alkalmasak védelem kialakítására, amelyek tartalmazzák az állományban megtalálható és tüneteket okozó szerotípusokat (Jolie és mtsai., 1995; Šatrán és mtsai., 2003). A toxoid vakcinák a törzsek által termelt toxinokat tartalmazzák inaktivált formában. Ez az új szerotípus hordozza a toxingéneket és termeli az ApxI és ApxII toxint, így feltételezhető, hogy a toxoid típusú vakcina védelem nyújthat ezzel és akár más új szerotípusokkal szemben is. A vakcinaváltást követően az állományban a heveny actinobacillus pleuropneumoniás légzőszervi klinikai tünetek megszűntek, de a 16-os szerotípusú *A. pleuropneumoniae* idült elváltozásokat okozott, melyek vágóhídi vizsgálat során voltak láthatók.

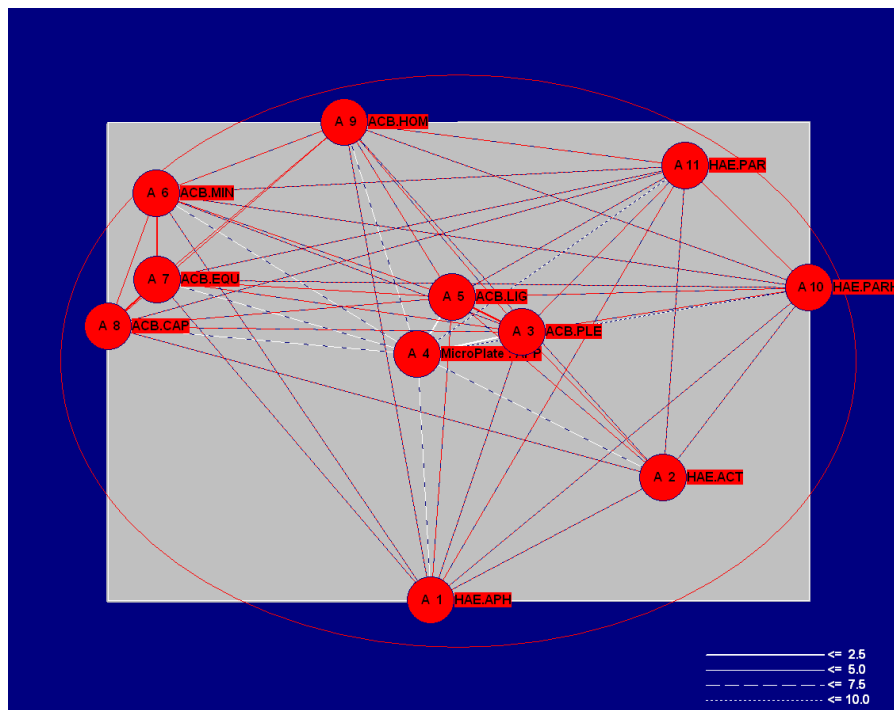
6.4.2. Meg nem erősített új szerotípus

A hatodik nem besorolható törzzsel szemben is termeltünk hiperimmun savót 2014-ben, amelynek eredményeként láttuk, hogy a törzs nem a 16-os szerotípusba tartozik. Ilyen törzset először 2012-ben, majd 2014-ben és utána 2015-ben izoláltunk, és feltételezésünk szerint egy újabb szerotípust képviselnek.

6.5. A törzsek azonosítása szénforrás-hasznosítás alapján

A 68 vizsgált *A. pleuropneumoniae* törzs közül csak 30 törzset sorolt a rendszer első helyen *A. pleuropneumoniae* fajba. Ennek oka az lehet, hogy a Biolog adatbázisát kevés törzs szénforrás-hasznosítása alapján készítették (szóbeli közlés). A szervmintákból izolált törzsek több szénforrást hasznosítottak, mint amit az adatbázisban feltüntettek, ami azzal magyarázható, hogy a típustörzseket gyakrabban átoltják glükóz és aminosavakat tartalmazó táptalajokra, és emiatt csökken a szénforrás-hasznosítási képességük.

A rendszer negyven törzset *A. lignieresii*-ként határozott meg első helyen, aminek oka az, hogy az *A. pleuropneumoniae* és az *A. lignieresii* szénforrás-hasznosítási anyagcsereprofilja nagyon hasonló (23. ábra). A két faj rendkívül szoros rokonsági kapcsolatban áll egymással, a 16S rRNS gén szekvenciái is szoros filogenetikai kapcsolatot mutatnak. AFLP vizsgálatok igazolják, hogy a két faj egyértelműen eltér egymástól (Kokotovic és Angen, 2007).



23. ábra: Az *A. pleuropneumoniae*, az *A. lignieresii* és a vizsgált törzs szénforrás-hasznosításon alapuló rokonsága

A Biolog rendszer által kapott diagnosztikai hiba a kórokozók részletes morfológiai, tenyésztési és biokémiai vizsgálatával kiküszöbölhető. A kórtani elváltozások, amelyekből a két baktériumot izolálhatjuk, igen fontos támpontja kell, hogy legyen a diagnosztikának (43. táblázat).

43. táblázat: Az *A. pleuropneumoniae* és az *A. lignieresii* elkülönítését szolgáló diagnosztikai szempontok

Diagnosztikai szempontok	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. lignieresii</i>
Kórtani elváltozások: sertés	vérzéses-elhalásos tüdőgyulladás, fibrines mellhártya-gyulladás	Ritkán granulomata képződéssel járó tüdőgyulladás (Markey és mtsai., 2013)
szarvasharha	nem betegíti meg	actinobacillosis, deszkanyelv
hemolízis	béta	nincs
NAD-függőség	I-es biotípusba tartozó törzsek	nincs
kataláz-teszt	negatív	pozitív
citokróm oxidáz-C	pozitív	pozitív

A Pasteurellaceae családon belül hasonló diagnosztikai nehézséget tapasztaltak *Pasteurella* fajok szénforrás-hasznosításának vizsgálata során (Sellyei és mtsai., 2011). Vizsgálataink alapján a Biolog rendszer adatbázisának bővítését javasoljuk, a nagyobb törzsszámmal készített adatbázis a pontosabb diagnosztikát szolgálja.

6.6. Az *A. pleuropneumoniae* törzsek vizsgálata PFGE-vel

A biotípusok, a szerotípusok és a csoportok közötti fő különbség a toxingének hordozásának mintázatában rejlik.

A PFGE vizsgálatokba vont törzsek közel fele (44%) a 2-es szerotípusba tartozott, ami jól tükrözi a 2-es szerotípus dominanciáját. Virulenciáját tekintve ez a szerotípus Európában kétféle toxint (ApxII és ApxIII) termel, aminek köszönhetően virulensnek tekinthető. A feltételezett genetikai zártság helyett a PFGE vizsgálat kilenc csoportot (G1-től K-ig) különített el, ami a szerotípuson belüli nagy diverzitásra hívja fel a figyelmet. Hazánkban viszonylag nagy arányban találkozunk 13-as szerotípussal, megjelenése sporadikus, emiatt nagy genetikai diverzitásra számítottunk. A vizsgálat eredményeként a 13-as szerotípus izolátumai két összefüggőnek tűnő alcsoportba kerültek, ami arra enged következtetni, hogy ebbe a szerotípusba tartozó törzsek genetikailag egymáshoz rendkívül közel állnak. Hasonló genetikai zártság jellemzi a 9-es és 16-os szerotípus törzseit, amelyek egy-egy csoportba kerültek. Hazánkban a 13-as, a 2-es és a 9-es szerotípusnak (melyek a fő genetikai csoportokat képezik) a története igen régre nyúlik vissza, hiszen az első izolálások az A1-es csoportból 1995-ös, az A2 és J1 csoportból 1998-as, míg a C csoport legrégebbi izolátuma 2003-as gyűjtés eredménye. Ezzel szemben a 16-os szerotípus csoportjából, ami szintén egy fő csoport, az első izolátum 2012-ből származik.

A szakirodalmi adatoknak megfelelően az összes II-es biotípusba tartozó törzsből

(13-as szerotípus az A1 és A2-es csoportban, valamint a 14-es szerotípus a B csoportban, mint sporadikusan előforduló törzsek) hiányzik az *apxIII* és *apxIA* gén, de hordozzák az *apxII* és *apxIB* géneket, ami arra enged következtetni, hogy ezek a törzsek csak az ApxII toxint képesek termelni. A 2-es szerotípusú törzsek hordozzák az *apxIB*, *apxII* és *apxIII* géneket (G1-K), tehát képesek ApxII és ApxIII toxinok termelésére, de nem tudnak ApxI toxint termelni, ami a legtoxikusabb a toxinok között. Az ApxIV toxinon felül több toxint is termelő *A. pleuropneumoniae* törzs virulensnek tekinthető (Frey, 1995).

A K csoport 2-es szerotípusaiban csak az *apxII* és *apxIB* géneket találtuk, ami arra enged következtetni, hogy csak ApxII toxint tudnak termelni, hasonlóan a II-es biotípus törzseihez. Ez azért érdekes, mert Észak-Amerikában és Kanadában olyan 2-es szerotípusú törzsek honosak, amelyek csak egyféle toxint, az ApxII-őt képesek termelni, és azok az *apxIIICA* gént hordozzák (Gottschalk és mtsai., 2003). A sporadikusan előforduló I-es biotípusba tartozó izolátumok (12-es szerotípus) hasonlóan viselkednek. Marsteller és Fenwick (1999) virulencia szerint csoportosította az I-es biotípus törzseit, amelynek alapját a toxintermelés adta. Ezt az eredményeink is megerősítik, mert a C (9-es szerotípus), a D1, a D2 (16-os szerotípus) és az E csoport (nem tipizálható) törzsei hordozzák az *apxIA*, *apxIB* és *apxII* géneket, így ezek a törzsek képesek termelni és kiválasztani az ApxI és az ApxII toxint. A közel 20 évvel ezelőtti cikkben még az új szerotípusok értelemszerűen nem szerepeltek, ugyanakkor eredményünk rámutat arra, hogy a toxingén és toxintermelési profil alapján az új szerotípusok is besorolhatók virulencia szerint egy-egy csoportba.

6.7. Az *A. pleuropneumoniae* törzsek antibiotikum-érzékenysége

Az *A. pleuropneumoniae* törzsek antibiotikum-érzékenységét a sertésállományokban leggyakrabban alkalmazott antibiotikum csoportokra vizsgáltuk. Aminoglikozidokat, béta-laktámokat, fluorokinolonokat, fenikolokat, makrolidokat, folsavszintézist gátlókat, tetraciklineket és egy pleuromutilint vontunk be kísérleteinkbe.

6.7.1. A MIC és a korongdiffúziós vizsgálat eredményeinek összehasonlítása

A korongdiffúziós próbával végzett és a minimális gátló koncentráció meghatározása alapján történő antibiotikum-érzékenység meghatározása kisebb-nagyobb mértékben eltérő eredményeket adott. A törzsek mindkét vizsgálati módszerrel közel 100%-ban érzékenyek voltak a ceftiofurra, a cefoperazonra, a klóramfenikolra, a florfenikolra, valamint a marbofloxacinra. A törzsek 80-90%-a érzékeny volt az amoxicillinre, az amoxicillin-klavulánsavra, az enrofloxacinra, valamint a tiamulinra mindkét módszer eredményeként. Hasonló mértékű rezisztenciát állapítottunk meg a két módszer eredményeként a gentamicinnel, a spektinomocinnel, az eritromocinnel, a szulfametoxazollal, a doxiciklinnel és az oxitetraciklinnel szemben.

Lényeges eltérést tapasztaltunk a két vizsgálati módszer eredményének kiértékelése során a penicillin, a tilmikozin, a tulatromicin, az SXT és a tiamulin esetében.

A leveshígítási és korongdiffúziós vizsgálatok eredményeit összehasonlítva igazoltuk, hogy a korongdiffúziós módszerrel végzett antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokat számos tényező befolyásolja, az így nyert eredményeket csak tájékoztató jellegűnek szabad tekinteni, mivel a módszer szemikvantitatív. A törzsek antibiotikum-érzékenységének pontos meghatározásához a fenti eredmények tükrében a hígítási eljárásokkal történő MIC-mérés elengedhetetlen.

6.7.2. A vizsgált antibiotikumok MIC eredményei

Saját vizsgálataink azt mutatják, hogy az antibiotikumok nagy részére mindkét vizsgált módszerrel az utóbbi évek során hazánkban izolált 60 *A. pleuropneumoniae* törzs legtöbbször érzékeny. A törzseket egymástól független állományokból izoláltuk, így jól reprezentálják a hazai *A. pleuropneumoniae* törzsek antibiotikumokra való érzékenységét. A vizsgált *A. pleuropneumoniae* törzsek többsége érzékeny volt az aminoglikozidokra, a béta-laktám antibiotikumokra, a fluorokinolonokra, a fenikolokra, a makrolidokra, a folsavsintézis-gátlókra és a tiamulinra. Jelentősebb arányú rezisztencia a tetraciklinekkel szemben mutatkozott.

Aminoglikozidok (gentamicin és spektinomycin): a gentamicinre a törzseink 50%-a mérsékelten érzékeny volt, míg a másik fele rezisztens. Az összes vizsgált törzs több mint felének a növekedésének gátlásához 4 µg/ml koncentrációjú antibiotikum-hígítás kellett, ami a MIC értékek módusza, így a törzsek gentamicin érzékenysége nem tekinthető egységesnek. A spektinomycinre a törzsek fele rezisztens (128 µg/ml), míg a másik fele mérsékelten érzékeny (64 µg/ml) lett. Aminoglikozidokra korábbi vizsgálat szerint az *A. pleuropneumoniae* törzsek érzékenyek voltak (Yoshimura és mtsai., 2002).

Béta-laktám antibiotikumok (penicillinek és cefalosporinok): a penicillin-G-vel szemben a törzseink 53,6%-a rezisztens lett, amit magyarázhat az, hogy a sertésállományokban a penicillin-G-t nagyon régóta és széles körben használják. Az ampicillin és az amoxicillin szerkezetileg megegyezik, de az amoxicillin kedvezőbb farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkezik, bár a takarmányból még ez a hatóanyag is csak kismértékben szívódik fel. Ampicillinre a törzsek 58,2%-a, amoxicillinre a 70,1%-a lett érzékeny. Amoxicillin-klavulánsavra a törzsek 93%-a érzékeny lett, viszont négy törzs rezisztensnek bizonyult.

A törzsek 90%-a érzékenynek bizonyult a vizsgált cefalosporinokra, de azok, amelyek amoxicillin-klavulánsavra rezisztensek voltak, azok a cefalosporinokra is. Az elmúlt években a béta-laktám antibiotikumok közül amoxicillinnel, ampicillinnel és penicillinnel szemben fokozódó rezisztencia látható (Dayao és mtsai., 2016a), amelyet saját vizsgálataink is

alátámasztanak. Amoxicillin-klavulánsavval és ceftiofurral kapcsolatban csak mérsékelt érzékenységről számoltak be, rezisztenciáról nem (Nedbalcova és mtsai., 2005; de Jong és mtsai., 2014; El Garch és mtsai., 2016).

Fluorokinolonok: törzseink 90%-a érzékeny lett enrofloxacinra, de 6 törzset (10%) csak a MIC-intervallum felső határához tartozó 1 µg/ml koncentráció tudta csak gátolni. Marbofloxacinra 96,6%-a a vizsgált törzseknek érzékeny volt. Két törzset gátolt csak a MIC-intervallum felső határánál több antibiotikum. Ezek az eredmények korrelálnak a nemzetközi szakirodalomban olvasható eredményekkel (El Garch és mtsai., 2016), tehát kismértékű rezisztencia-növekedés figyelhető meg enrofloxacinnal szemben a korábbi vizsgálatokhoz képest (Kucerova és mtsai., 2011; de Jong és mtsai., 2014). Ez a jelenség a fluokinolonok, azon belül is az enrofloxacin gyakori használatával magyarázható.

Fenikolok: már az 1990-es években egy fertőzési kísérletben bizonyították, hogy a florfenikol még a klóramfenikol rezisztens *A. pleuropneumoniae* törzs okozta gyógykezelésben is hatékony (Ueda és mtsai., 1995). A MIC vizsgálatunk eredményeként mindkét antibiotikumra minden törzs érzékeny volt, amely eredmény korrelál egy korábbi vizsgálat eredményével (Priebe és Schwarz, 2003), de felhívják a figyelmet arra, hogy a folyamatos felmérő vizsgálat nagyon fontos az *A. pleuropneumoniae* esetében is. Egy későbbi európai felmérésben már mérsékelt érzékenységről számolnak be (El Garch és mtsai., 2016).

Makrolidok: az eritromicinnal szemben tapasztalt nagyfokú rezisztencia megegyezik más országok felmérő vizsgálata során tapasztaltakkal (Dayao és mtsai., 2014 és 2016a).

Tilmikozin esetében a 16 µg/ml koncentrációjú leves még képes gátolni a baktérium szaporodását. A vizsgált törzseink 100% érzékenységet mutattak tilmikozinra. Ez igen hasonló az európai felmérések eredményeihez (Kucerova és mtsai., 2011; de Jong és mtsai., 2014; El Garch és mtsai., 2016), de eltérést mutat az Ausztráliában tapasztaltakkal, ahol a vizsgált törzsek negyede rezisztens tilmikozinnal szemben (Dayao és mtsai., 2016a).

A tularomicin gyakran alkalmazott hatóanyag sertés légzőszervi megbetegedései esetében. Más makrolidokhoz képest igen magas a CLSI-ben megadott MIC-érték (64 µg/ml), amely megegyezik azzal a legkisebb koncentrációval, aminél még érzékenynek számítanak a baktériumok. Törzseink egynegyede rezisztens volt tularomicinnal szemben, pedig a tularomicinnal végzett vizsgálat során minden szerző teljes érzékenységről számolt be (Godinho, 2008; Kucerova és mtsai., 2011; Dayao és mtsai., 2014 és 2016a; El Garch és mtsai., 2016), de a vizsgálatba vont összes törzs 2012 előtt lett izolálva. A vizsgált törzseinket később izoláltuk, 2010 óta a tularomicin gyakorlati felhasználása jelentősen nőtt hazánkban is, ezzel is magyarázható a nálunk megjelent rezisztencia.

Folsavszintézist gátlók (szulfonamidok és trimetoprim): a szulfametoxazollal szemben minden vizsgált *A. pleuropneumoniae* törzs rezisztens volt, míg a trimetoprim kombinációban

már a törzsek 27,6%-a érzékenynek bizonyult. A törzsek közel felét (43,1%) csak a MIC-határérték felső zónája (4 µg/ml) tudta gátolni. Ez az eredmény eltér a nemzetközi irodalomban leírtakkal, ugyanis az európai törzsek között alig tapasztaltak SXT rezisztenciát (de Jong és mtsai., 2014; El Garch és mtsai., 2016).

Tetraciklinek (doxiciklin és oxitetraciklin): doxiciklinre a törzsek 54,3%-a érzékeny, 27%-a pedig mérsékelten érzékeny volt. Oxitetraciklinre a törzsek 29%-a volt érzékeny, a törzsek felének gátlásához a MIC-határérték módusza (1 µg/ml) kellett. Oxitetraciklinnel szemben nagyobb rezisztenciát tapasztaltunk, mint doxiciklinnel szemben.

Ez a nagyfokú rezisztencia a tetraciklinek széles körben való alkalmazásával magyarázható, és szerte a világban tapasztalható, hogy évről évre növekszik a rezisztencia a tetraciklinekkel szemben (Yang és mtsai., 2011; Nedbalcova és mtsai., 2005; de Jong és mtsai., 2014; El Garch és mtsai., 2016).

Pleuromutilinek (tiamulin): a vizsgált törzseink 86,4%-a érzékeny tiamulinra. El Garch és munkatársai (2016) európai mintákra vonatkozó vizsgálatuk során azt tapasztalták, az *A. pleuropneumoniae* törzsek tiamulinra teljes mértékben érzékenyek, ugyanezt tapasztalták korábban izolált magyar és román *A. pleuropneumoniae* törzsek vizsgálata során is (Vaduva és mtsai., 2011).

6.7.3. A 2012 előtt és után izolált törzsek antibiotikum-érzékenységének összehasonlítása

Az *A. pleuropneumoniae* törzsek izolálásának ideje alapján történt összehasonlítás során látható, hogy a törzsek antibiotikum-érzékenysége csökken, ami jellemző Európa más országaiban izolált *A. pleuropneumoniae* törzsekre is (de Jong és mtsai., 2014; El Garch és mtsai., 2016).

6.7.4. Az antibiotikum-rezisztenciagének előfordulásának feltérképezése

A vizsgált 80 törzsből csak 16-ban találtunk tetraciklin rezisztenciát kódoló gént, ami nem feltételezi azt, hogy más, rezisztenciáért felelős gént ne hordozhatna a baktérium. Vizsgálataink során nem tudtuk az összes rezisztenciagénre vizsgálni a törzseket. A fenotípusos rezisztenciáért nem csak a rezisztenciagének a felelősek, hanem más mechanizmusok is, így abban az esetben, ha nem tudjuk kimutatni a rezisztenciagéneket, a baktérium még lehet rezisztens az adott antibiotikummal szemben (Dayao és mtsai., 2016).

6.8. Szelektív táptalajok

6.8.1. A szelektív táptalajok hatékonysága

Kétféle szelektív táptalajt használtunk, amelyekhez alaptáptalajt fejlesztettünk (Müller-Hinton alapú, 5% juhvért, 1% élesztőkivonatot és 0,3 mg/ml mennyiségű NAD-ot tartalmazó véresagar), amelyen az I-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* törzsek is jól nőnek és erősen hemolizálnak. Ez a véresagar jól hasznosítható lenne a mindennapi munka során, akár a tüdőből való kioltáskor (bár ebben az esetben nem lehet elkülöníteni a két biotípust, így célszerű ilyenkor a dajkatenyészet készítése mellett dönteni), akár a törzsek vizsgálatakor, szerotipizáláskor, DNS-kivonás során.

Az "A" szelektív táptalaj bacitracint, linkomicint, kristályibolyát és nisztatint (Jacobsen és Nielsen, 1995), míg a "B" táptalaj vankomicint, polimixin-B-t, cikloheximidet és kristályibolyát tartalmazott. A bacitracin vankomicinre történő cseréje eredményesnek bizonyult, hiszen a Gram-pozitív baktériumok a saját fejlesztésű szelektív táptalajunkon sem tudtak növekedni. A linkomicin is a Gram-pozitív baktériumokat, valamint a Mycoplasmákat gátolja, de a Gram-negatív baktériumok nagy része rezisztens vele szemben. A linkomicint polimixin-B-re cseréltük, mert a célunk az volt, hogy a tonsillában nagy számban megtalálható Enterobacteriaceae család tagjait gátoljuk, az *A. pleuropneumoniae*-t pedig nem vagy csak mérsékelten. A MIC vizsgálatok során azt az eredményt kaptuk, hogy az enterobaktériumok (a *Proteus* sp. kivételével), érzékenyebbek a polimixin-B-re, mint az *A. pleuropneumoniae*. A táptalajra oltáskor növekedtek és hemolizáltak az *A. pleuropneumoniae* törzsek.

6.8.2. Sertés-tonsillákból izolált *A. pleuropneumoniae* törzsek

A sertés tonsillákból izolált *A. pleuropneumoniae* szerotípusok megegyeztek a tüdőből izolált szerotípusokkal, és az eredmény alátámasztja azt, hogy amikor a tüdőben elváltozás (heveny esetben) látható, akkor nagyobb mennyiségben található a tonsillában is a kórokozó, így szelektív táptalajon is könnyebben izolálható.

A selejt kocák tonsilláiból nem izoláltuk a baktériumot, ami nem zárja ki, hogy nem hordozzák az állatok az *A. pleuropneumoniae* baktériumot. Viszont hasonlóan a vaddisznókhoz, nem volt a tüdőben elváltozás, idősebb állatokról volt szó, így ebben az esetben a hordozás mértékének felmérésére PCR-es vizsgálat lett volna alkalmasabb. A szerotípus megismeréséhez azonban mindenképp a baktérium izolálása szükséges. Az eredmények alapján elmondható, hogy a szelektív táptalaj lehetőséget ad arra, hogy a kórokozót izoláljuk és szerotípusát, antibiotikum-érzékenységét megvizsgáljuk.

6.8.3. Vaddisznó-tonsillából izolált *A. pleuropneumoniae* törzs jellemzése

Vaddisznó szeropozitivitását számos országban vizsgálták és mind a szerológiai, mind a PCR-es vizsgálatok megerősítik azt, hogy az európai és az észak-amerikai vaddisznók hordozzák az *A. pleuropneumoniae* baktériumot, de klinikai elváltozásokat, tüneteket eddig nem írtak le (Reiner és mtsai., 2010; Baroch és mtsai., 2015; Marinou és mtsai., 2015). A baktérium izolálásáról sem olvashatunk a szakirodalomban, valamint nem áll rendelkezésre magyarországi adat sem a vaddisznók *A. pleuropneumoniae* hordozásával kapcsolatban.

Elsőként izoláltunk szelektív táptalajon I-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae*-t vaddisznóból, amelyet a passzív hemagglutinációs próbával a 12-es szerotípusba soroltunk. A 12-es szerotípus alacsony virulenciával rendelkezik, az elmúlt években háromszor izoláltuk ezt a szerotípust sertéstüdőkből.

Feltételeztük, hogy a baktérium érzékenyebb lesz a gyakorlatban használt antibiotikumokra, mint a sertésekből izolált *A. pleuropneumoniae* törzsek, de eredményeink azt mutatják, hogy az izolált törzs antibiotikum-érzékenysége igen hasonló az általunk vizsgált, sertésekből származó törzsek rezisztencia eredményeivel. Egyezett a vizsgált törzsekkel a tiamulinra és enrofloxacinra mutatott érzékenység, az oxitetraciklinre mutatott mérsékelt érzékenység, valamint a penicillinre vonatkozó rezisztencia tekintetében.

A vizsgált törzs tilmikozinnal szemben rezisztenciát, oxitetraciklinre mérsékelt érzékenységet, tulatromicinnel szemben rezisztenciát mutatott, ami a legnagyobb eltérés az európai és a saját vizsgálataink eredményeihez képest (El Garch és mtsai., 2016). A törzs béta-laktám antibiotikumokra és tiamulinra kifejezett érzékenységet mutatott. Ez a rezisztenciaprofil azt feltételezi, hogy a vaddisznó sertéstől vette fel a kórokozót.

7. Új tudományos eredmények

1. Munkánk során elsőként izoláltuk és jellemeztük a toxingén mintázatát az *A. pleuropneumoniae* 16-os szerotípusának hazai sertésállományokban.
2. Megállapítottuk a hazánkban előforduló szerotípusok gyakoriságát és összehasonlítottuk a toxingének kimutatásán alapuló PCR-rel végzett szerotipizálás eredményét a passzív hemagglutinációs próba során kapott eredménnyel.
3. Igazoltuk, hogy az *A. pleuropneumoniae* előfordulhat választási korban lévő malacokban.
4. Igazoltuk, hogy a Biolog Microstation™ ID System alkalmas az *A. pleuropneumoniae* törzsek szénforrás-hasznosításának vizsgálatára, de a törzsek fajszintű meghatározására csak korlátozottan használható.
5. Igazoltuk, hogy a PFGE vizsgálat alkalmas az *A. pleuropneumoniae* törzsek, azon belül a szerotípusok csoportosítására és járványügyi nyomozásra. A PFGE vizsgálat eredményeként 11 csoportba soroltuk az *A. pleuropneumoniae* törzseket.
6. Meghatároztuk hatvan különböző állományból származó *A. pleuropneumoniae* törzs antibiotikum-érzékenységét vizsgáltuk meg standard eljárások alkalmazásával húsz, napjainkban alkalmazott antibiotikumra nézve.
7. Szelektív táptalajnak alkalmas alaptáptalajt fejlesztettünk és vaddisznó-, valamint sertés-tonsillából szelektív táptalajon izoláltuk az *A. pleuropneumoniae* baktériumot.
8. Vaddisznóból *A. pleuropneumoniae* törzset izoláltunk és jellemeztünk.

8. Irodalom

- Aarestrup, F. M., Jensen, N. E.: **Susceptibility testing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Denmark. Evaluation of three different media of MIC-determinations and tablet diffusion tests.** Vet. Microbiol. 64. 299-305. 1999.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** Category: Microbial Genetics and Molecular Biology Nucleic Acids Res. 25. 3389-3402. 1997.
- Anderson, C., Potter, A., Gerlach, G.: **Isolation and molecular characterization of spontaneously occurring cytolysin-negative mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7.** Infection and Immunity. 59. 4110-4116. 1991.
- Angen, Ø., Ahrens, P., Jessing, S. G.: **Development of multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7 and 12.** Vet. Microbiol., 132. 312-318. 2008.
- Angen, Ø., Ahrens, P., Tegtmeier, C.: **Development of a PCR test for identification of *Haemophilus somnus* in pure and mixed cultures.** Vet Microbiol. 63. 39-48. 1998.
- Archambault, M., Harel, J., Goure, J., Tremblay, Y. D., Jacques, M.: **Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of Canadian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Microb. Drug Resist. 18.198-206. 2012.
- Assavacheep, P., Rycroft, A. N.: **Survival of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outside the pig.** Res Vet Sci. 94. 22-26. 2013.
- Bandara, A. B., Lawrence, M. L., Veit, H. P., Inzana, T. J.: **Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs.** Infect. Immun. 71. 3320-3328. 2003.
- Baroch, J. A., Gagnon, C. A., Lacouture, S., Gottschalk, M.: **Exposure of feral swine (*Sus scrofa*) in the United States to selected pathogens.** Can. J. Vet. Res., 79. 74-78. 2015.
- Barrow, G. I., Feltham, R. K. A.: **Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria.** 3rd. Ed.,: Cambridge University Press. Cambridge, 2003.
- Beynon, L. M., Richards, J. C., Perry, M. B.: **Characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype K11:01 capsular antigen.** Eur. J. Biochem. 214. 209-214. 1993.
- Biberstein, E. L.: **Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*.** In: Methods in Microbiology 10. Szerk.: Bergan, T. és Norris, J. R. Academic Press, London. 253-269. 1978.
- Biberstein, E. L., Spencer, P.D.: **Oxidative metabolism of *Haemophilus* species grown at different levels of hemin supplementation.** J. Bacteriol. 84. 916-920. 1962.
- Bilinski T.: **Oxygen toxicity and microbial evolution.** Biosystems 24. 305-312. 1991.
- Blackall, P.J., Bowles, R. E., Pahoff, J. L., Smith, B. N.: **Serological characterisation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from 1993–1996.** Aust. Vet. J., 77. 39-43. 1999.

- Blackall, P. J., Klaasen, H. L. B. M., Bosch, H. V. D., Kuhnert, P., Frey, J.: **Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15**. *Vet. Microbiol.* 84. 47-52. 2002.
- Blanchard, P. C., Walker, R. L., Gardner, I.: **Pleuropneumonia in swine associated with a urease-negative variant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1**. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5. 279-282. 1993.
- Blanco, M., Gutiérrez-Martin, C. B., Rodríguez-Ferri, E. F., Roberts, M. C., Navas, J.: **Distribution of tetracycline resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from Spain**. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50. 702-708. 2006.
- Bossé, J. T., Janson, H., Sheehan, B. J., Beddek, A. J., Rycroft, A. N., Kroll, J. S., Langford, P. R.: ***Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection**. *Microbes. Infect.* 4. 225-235. 2002.
- Bossé, J. T., Li, Y., Angen, Ø., Weinert, L. A., Chaudhuri, R. R., Holden, M. T., Williamson, S. M., Maskell, D. J., Tucker, A. W., Wren, B. W., Rycroft, A. N., Langford, P. R.; BRaDP1T consortium: **Multiplex PCR assay for unequivocal differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1 to 3, 5 to 8, 10, and 12**. *J. Clin. Microbiol.* 52. 2380-2385. doi: 10.1128/JCM.00685. 2014
- Bossé, J.T., Chaudhuri, R. R., Li, Y., Leanse, L. G., Fernandez Crespo, R., Coupland, P., Holden, M.T., Bazzolli, D. M., Maskell, D.J., Tucker, A.W., Wren, B.W., Rycroft, A.N., Langford, P. R.: **Complete Genome Sequence of MIDG2331, a Genetically Tractable Serovar 8 Clinical Isolate of *Actinobacillus pleuropneumoniae***. *Genome Announc.* 4 pii: e01667-15. doi: 10.1128/genomeA.01667-15. 2016.
- Bossé, J., Li, Y., Sárközi, R., Gottschalk, M., Angen, Ø, Nedbalcova, K., Rycroft, A., Fodor L. és Langford, P.: **A unique capsule locus in the newly designated *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 16 and development of a diagnostic PCR**. *J. Clin. Microbiol.* 2017.
- Brockmeier, S. L., Halbur, P. G., Thacker, E. L.: **Porcine Respiratory Disease Complex. 13. fejezet**. In: Polymicrobial diseases. Szerk: Brogden, K. A., Guthmiller, J. M. ASM Press, Washington 2002.
- Broes, A., Martineau, G. P., Gottschalk, M.: **Dealing with unexpected *Actinobacillus pleuropneumoniae* serological results**. *J. Swine Health Prod.* 15. 264-269. 2007.
- Byrd, W., Kadis, S.: **Preparation, characterization, and immunogenicity of conjugate vaccines directed against *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence determinants**. *Infect. Immun.* 60. 3042-3051. 1992.
- Chang, C. F., Chang, L. C., Chang, Y.F., Chen, M., Chiang, T.S.: **Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella choleraesuis* recovered from Taiwanese swine**. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14. 153-157. 2002.
- Chevallier, B., Dugourd, D., Tarasiuk, K., Harel, J., Gottschalk, M., Kobisch, M., Frey, J.: **Chromosome sizes and phylogenetic relationships between serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae***. *FEMS Microbiology Letters* 160. 209-216. 1998.

Chien, M. S., Chan, Y. Y., Chen, Z. W., Wu, C. M., Liao, J. W., Chen, T. H., Lee, W. C., Yeh, K. S., Hsuan, S. L.: ***Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived Apxl induces apoptosis in porcine alveolar macrophages**, Vet. Microbiol.135. 327-333. 2009.

Chiers, K., De Waele, T., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F.: **Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host**. Vet. Res. 41. 65. 2010.

Chiers, K., Donné, E., van Overbeke, I., Ducatelle, R., Haesebrouck, F.: ***Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles**. Vet. Microbiol. 85. 343-352. 2002.

Chiers, K., van Overbeke, I., De Laender, P., Ducatelle, R., Carel, S., Haesebrouck, F.: **Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the APX toxins**. Vet. Quart. 20. 65-69. 1998.

Cho, W. S., Chae, C.: **Differentiation of twelve *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes by outer membrane lipoprotein gene-based restriction fragment length polymorphism**. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 50. 90-94. 2003.

CLSI: **Performance standards for antibacterial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**; Approved Standard - Fourth Edition. CLSI document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA. 2013a.

CLSI: **Performance standards for antibacterial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**; Second informational supplement. CLSI document VET01-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA. 2013b.

Costa, G., Oliveira, S., Torrison, J., Dee, S.: **Evaluation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* diagnostic tests using samples derived from experimentally infected pigs**. Vet. Microbiol. 148. 246-251. 2011.

Costa, G., Oliveira, S., Torrison, J.: **Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in oral-fluid samples obtained from experimentally infected pigs**. Swine Health Prod. 20. 78-81. 2012.

Crujisen, T. L. M., van Leengoed, L. A. M. G., Dekker-Nooren, T. C. E. M., Schoevers, E. J., Verheijden, J. H. M.: **Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs**. Infect. Immun. 60. 4867-4871. 1992.

Crujisen, T., van Leengoed, L. A. M. G., Ham-Hoffies, M., Verheijden, J. H.: **Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain**. Infect Immun. 63. 2341-2343. 1995.

Csukás, Z.: **New selective medium for the isolation of *Haemophilus* species**. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 27. 141-145. 1980.

da Costa, M. M., Klein, C. S., Balestrin, R., Schrank, A., Piffer, I. A., da Silva, S. C., Schrank, I. S.: **Evaluation of PCR based on gene apxIVA associated with 16S rDNA sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related species**. Curr. Microbiol. 48. 189-195. 2004.

Dayao, D. A., Gibson, J. S., Blackall, P. J., Turni, C.: **Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia.** Vet. Microbiol. 171. 232-235. 2014.

Dayao, D., Gibson, J.S; Blackall, P.J; Turni, C.: **Antimicrobial resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and *Pasteurella multocida* isolated from Australian pigs.** Aust. Vet. J. 94. 227-231. 2016a

Dayao, D. A., Seddon, J. M., Gibson, J. S., Blackall, P. J., Turni, C.: **Whole Genome Sequence Analysis of Pig Respiratory Bacterial Pathogens with Elevated Minimum Inhibitory Concentrations for Macrolides.** Microb. Drug Resist. 22. 531-537. 2016b

de Jong, A., Thomas, V., Simjee, S., Moyaert, H., El Garch, F., Maher, K., Morrissey, I., Butty, P., Klein, U., Marion, H., Rigaut, D., Vallé, M.: **Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the VetPath study.** Vet. Microbiol. 172. 202-215. 2014.

Deneer, H. G., Potter, A. A.: **Identification of a maltose-inducible major outer membrane protein in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*.** Microb. Pathogenesis. 6. 425-432. 1989.

Dom P., Haesebrouck F., De Baetselier P.: **Stimulation and suppression of the oxygenation activity of porcine pulmonary alveolar macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites.** Am. J. Vet. Res. 53. 1113-1118. 1992.

Dom P., Haesebrouck F., Ducatelle R., Charlier G.: **In vivo association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs.** Infect. Immun. 62. 1262-1267. 1994a.

Dom, P., Hommeez, J., Castryck, F., Devriese, L. A., Haesebrouck, F.: **Serotyping and quantitative determination of in vitro antibiotic susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated in Belgium (July 1991 - August 1992).** Vet. Quart. 16. 10-13. 1994b.

Donlan R. M., Costerton J. W.. **Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.** Clin. Microbiol. Rev. 15. 167-193. 2002.

Dubreuil, J. Daniel; Jacques, Mario; Mittal, K. R., Gottschalk, M.: ***Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity.** Anim. Health. Res. Rev. 1. 73-93. 2000.

Eaves, L. E., Blackall, P.J.: **Serological characterisation of Australian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Aust. Vet. J. 65. 379-381. 1988.

Eaves, L. E., Blackall, P. J., Fegan, M.: **Characterization and antimicrobial sensitivity of haemophili isolated from pigs.** Aust. Vet. J., 66. 1-4. 1989.

El Garch, F., de Jong, A., Simjee, S., Moyaert, H., Klein, U., Ludwig, C., Marion, H., Haag-Diergarten, S., Richard-Mazet, A., Thomas, V., Siegwart, E.: **Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe,2009-2012.** VetPath results. Vet. Microbiol. 194, 11-22. 2016.

Fenwick, B., Henry, S.: **Porcine pleuropneumonia.** J. Am. Vet. Med. Assoc. 204. 1334-1340. 1994.

Fodor, L., Hajtós, I., Glávits, R.: ***Actinobacillus pleuropneumoniae* 2-es biotípus törzsei okozta tüdőgyulladás sertés állományokban.** Magy. Állatorvosok. 44. 669-674. 1989a.

Fodor L., Varga J., Molnár É., Hajtós I.: **Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine.** Vet. Microbiol. 20. 173-180 1989b.

Foote, S. J., Bossé, J. T., Bouevitch, A. B., Langford, P. R., Young, N. M., Nash, J. H. E.: **The complete genome sequence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 (serotype 5b).** J. Bacteriol. 190, 1495–1496. 2008.

Frank, R. K., Chengappa, M. M., Oberst, R. D., Hennessy, K. J., Henry, S. C., Fenwick, B.: **Pleuropneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 in growing and finishing pigs.** J. Vet. Diagn. Invest. 4. 270-278. 1992.

Frey, J.: **Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins.** Trends Microbiol. 3. 257-261. 1995.

Frey, J., Kuhnert, P.: **RTX toxins in Pasteurellaceae.** Int. J. Med. Microbiol. 292. 149-158. 2002.

Frey, J., Kuhnert, P., Villiger, L., Nicolet J.: **Cloning and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane protein belonging to the family of PAL lipoproteins.** Res. Microbiol. 147. 351-361. 1996.

Fuller T. E., Martin S., Teel J. F., Alaniz G. R., Kennedy M.J., Lowery D.E.: **Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model.** Microb. Pathog. 29. 39-51. 2000.

Gerlach, G. F., Klashinsky, S., Anderson, C., Potter, A. A., Willson, P. J.: **Characterization of two genes encoding distinct transferrinbinding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates.** Infect. Immun. 60. 3253-3261. 1992.

Gerlach, G., Anderson, C., Klashinsky, S., Rossi-Campos, A., Potter, A. A., Willson, P. J.: **Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1.** Infect. Immun. 61. 565-572. 1993.

Gilbride, K. A., Rosendal, S.: **Evaluation of a selective medium for isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae*.** Can. J. Comp. Med. 47. 445–450. 1983.

Godinho, K. S.: **Susceptibility testing of tulathromycin: interpretative breakpoints and susceptibility of field isolates.** Vet. Microbiol. 129. 426-432. 2008.

Gonzales, G. C., Yu, R. H., Rosteck, P. R. Jr, Schryvers, A. B.: **Sequence analysis and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptor genes.** Microbiology. 141. 2405-2416. 1995.

Gottschalk, M., Broes, A., Mittal, K. R., Kobisch, M., Kuhnert, P., Lebrun, A., Frey, J.: **Non-pathogenic *Actinobacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a novel species?** Vet. Microbiol. 92. 87-101. 2003.

Gottschalk, M., Lacouture, S.: ***Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 3, 6, 8, and 15 isolated from diseased pigs in North America.** Vet. Rec. doi: 10.1136/vr.102470 174. 452. 2014.

Gottschalk, M., Lacouture, S.: **Canada: Distribution of *Streptococcus suis* (from 2012 to 2014) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (from 2011 to 2014) serotypes isolated from diseased pigs.** Can. Vet. J. 56. 1093-1094. 2015.

Gottschalk, M.: **The challenge of detecting herds sub-clinically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Vet. J. 206. 30-38. 2015.

Gottschalk, M.: **Actinobacillosis.** In: Diseases of swine. Szerk: Zimmerman, J. J. és mtsai.: Tenth edition. Wiley-Blackwell. 653-669. 2012.

Gram, T., Ahrens, P.: **Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane lipoprotein.** J. Clin. Microbiol. 36. 443-448. 1998.

Gutiérrez-Martin, C. B., Del Blanco, N. G., Blanco, M., Navas, J., Rodriguez Ferri, E. F.: **Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade.** Vet. Microbiol. 115. 218-222. 2006.

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

Haas, R., Hacker, J.: **Molekulare Infektionsbiologie.** Heidelberg [u.a.]: Springer Spektrum Akad. Verl. 51-82. 2000.

Habrun, B., Bilic, V., Cvetnic, A., Humski, A., Benic, M.: **Porcine pleuropneumonia: the first evaluation of field efficacy of a subunit vaccine in Croatia.** Vet. Med.-Czech. 47. 213-218. 2002.

Haesebrouck, F., van de Kerkhof, A., Dom, P., Chiers, K., Ducatelle, R.: **Cross-protection between *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotypes-serotypes in pigs.** Vet. Microbiol. 52. 277-284. 1996.

Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., Decostere, A.: **Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?** Vet. Microbiol. 100. 255-268. 2004.

Hathroubi, S., Hancock M. A., Bossé, J. T., Langford, P. R., Tremblay, Y.D., Labrie, J., Jacques, M.: **Surface polysaccharide mutants reveal that absence of O antigen reduces biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Infect. Immun. 84. 127-137. 2015.

Jacobsen, M. J., Nielsen, J. P.: **Development and evaluation of a selective and indicative medium for isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from tonsils.** Vet. Microbiol. 47. 191-197. 1995.

Jacques M.: **Role of lipooligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence.** Trends Microbiol. 4. 408-410. 1996.

Jacques, M., Paradis, S. E.: **Adhesin-receptor interactions in Pasteurellaceae.** FEMS Microbiol Rev. 22. 45-59. 1998.

Jacques, M.: **Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Can. J. Vet. Res. 68. 81-85. 2004.

- 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.
- Jansen, R., Briaire, J., Smith, H., Dom, P., Haesebrouck, F., Kamp, E. M., Gielkens, A. L., Smits, M. A.: **Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils.** Infect. Immun. 63. 27-37. 1995.
- Jensen, A., Bertram, T.: **Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5.** Infect. Immun. 51. 419-424. 1986.
- Jessing, S. G., Angen, Ø., Inzana, T. J.: **Evaluation of multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5 and 6.** J. Clin. Microbiol. 41. 4095-4100. 2003.
- Jolie, R. A. V., Mulks, M. H., Thacker, B. J.: **Cross-protection experiments in pigs vaccinated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* subtypes 1A and 1B.** Vet. Microbiol. 45. 383-391. 1995.
- Kaplan, J. B., Velliyagounder K, Ragunath C, Rohde H, Mack D, Knobloch J. K, Ramasubbu N.: **Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms.** J. Bacteriol. 186. 8213-8220. 2004.
- Kardos G., Kiss I.: **Molecular epidemiology investigation of outbreaks of fowl cholera in geographically related poultry flocks.** J. Clin. Microbiol. 43. 2959-2961. 2005.
- Kilian, M., Biberstein, E. L.: **Genus 11. *Haemophilus*** In: Bergey's Manual of systematic bacteriology, vol. 1, szerk: Holt, J. G. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD, p 558. 1984.
- Kilian, M., Nicolet, J., Biberstein, L.: **Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (Matthews and Pattison 1961) Shope 1964 and proposal of a neotype strain.** Int. J. Syst. Bacteriol. 28. 20-26. 1978.
- Klausen, J., Andresen, L. O., Barfod, K., Sørensen, V.: **Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological surveillance of infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 in pig herds.** Vet. Microbiol. 88 223-232. 2002.
- Klitgaard, K., Friis, C., Jensen, T. K., Øystein, A., Boye, M.: **Transcriptional portrait of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during acute disease - potential strategies for survival and persistence in the Host.** PlosOne, 7. e35549. 2012.
- Kokotovic, B., Angen, Ø.: **Genetic diversity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* assessed by amplified fragment length polymorphism analysis.** J. Clin. Microbiol. 45. 3921-3929. 2007.
- Kucerova, Z., Jaglic, Z., Ondriasova, R., Nedbalcova, K.: **Serotype distribution of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from porcine pleuropneumonia in the Czech Republic during period 2003-2004.** Vet. Med. - Czech. 50. 8. 355-360. 2005.
- Kucerova, Z., Hradecka, H., Nechvatalova, K., Nedbalcova, K.: **Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from clinical outbreaks of porcine respiratory diseases.** Vet. Microbiol. 150. 203-206. 2011.

- Labrie, J., Pelletier-Jacques, G., Deslandes, V., Ramjeet, M., Auger, E., Nash, J. H., Jacques, M.: **Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae***. Vet. Res. 41:3.<http://dx.doi.org/10.1051/vetres/2009051> 2010.
- Langford P. R., Loynds B.M., Kroll J. S.: **Cloning and molecular characterization of Cu, Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae***. Infect. Immun. 64. 5035-5041. 1996.
- Levy, S. B., McMurry, L. M., Barbosa, T. M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M. C., Rood, J. I., Taylor, D. E.: **Nomenclature for new tetracycline resistance determinants**. Antimicrob. Agents Chemother. 43. 1523-1524. 1999.
- Levy, F., Walker, E. S.: **BRO beta-lactamase alleles, antibiotic resistance and a test of the BRO-1 selective replacement hypothesis in *Moraxella catarrhalis***. J Antimicrob Chemother. 53. 371-374. 2004.
- Little, T. W., Harding, J. D.: **The interaction of *Haemophilus paraahaemolyticus* and *Pasteurella multocida* in the respiratory tract of the pig**. Br. Vet. J. 136. 371-83. 1980.
- Loera-Muro, V. M., Jacques, M., Tremblay, Y., D. N., Avelár-González, F. J., Loera Muro, A., Ramírez-Lopez, E. M., Medina-Figueroa, A., González-Reynaga, H. M., Guerrero-Barrera, A., L.: **Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in drinking water from pig farms**. Microbiology. 159. 536-544. 2013.
- Lowe, B. A., Marsh, T. L., Isaacs-Cosgrove, N., Kirkwood, R. N., Kiupel, M., Mulks, M. H.: **Microbial communities in the tonsils of healthy pigs**. Vet. Microbiol., 147. 346-357. 2011.
- Madsen, M. E., Carnahan, K. G., Thwaites, R. N.: **Evaluation of pig lungs following an experimental challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 and 5 in pigs inoculated with either hemolysin protein and/or outer membrane proteins**. FEMS Microbiology Letters. 131. 329-335. 1995.
- Maldonado, J., Valls, L., Martínez, E., Riera, P.: **Isolation rates, serovars, and toxin genotypes of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* among pigs suffering from pleuropneumonia in Spain**. J. Vet. Diagn. Invest. 21. 854-857. 2009.
- Marinou, K. A., Papatsiros, V. G., Gkotsopoulos, E. K., Odatzoglou, P. K., Athanasiou, L.V.: **Exposure of extensively farmed wild boars (*Sus scrofa scrofa*) to selected pig pathogens in Greece**. Vet. Quart. 35. 97-101. 2015.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., Maguire, D.: **Clinical Veterinary Microbiology** 2nd Edition, Mosby Ltd. 2013
- Marsteller, T. A., Fenwick, B.: ***Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology**. Swine Health Prod. 4. 161-165. 1999.
- Meeusen, E. N. T., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P. P., Jungersen, G.: **Current status of veterinary vaccines**. Clin. Microbiol. Rev. 20. 489-510. 2007.
- Mignard, S., Flandrois, J. P.: **16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment**. J. Microbiol. Methods. 67. 574-581. 2006.

- 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. 18. 1355-1357. 1983a.
- 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. 17. 787-790. 1983b.
- Molerés, J., Santos-López, A., Lázaro, I., Labairu, J., Prat, C., Ardanuy, C., González-Zorn, B., Aragon, V., Garmendia, J.: **Novel bla_{ROB-1}-bearing plasmid conferring resistance to β -lactams in *Haemophilus parasuis* isolates from healthy weaning pigs.** Appl. Environ. Microbiol. 81. 3255-3267. 2015.
- Møller, K., Andersen, L. V., Christensen, G., Kilian, M.: **Optimization of the detection of NAD dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of slaughterhouse pigs.** Vet. Microbiol. 36. 261-271. 1993.
- Molnár, L., Glávits R.: **A sertés *Haemophilus parahaemolyticus* okozta tüdő-mellhártyagyulladás.** Magy. Állatorvosok. 36. 86-98. 1981.
- Molnár, É.: **Survey of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection in swine by different methods.** Acta Vet. Hung. 38. 231-238. 1990.
- Moral, C. H., Soriano, A. C., Salazar, M. S., Marcos, J. Y., Rarnos, S. S., Carrasco, G. N.: **Molecular cloning and sequencing of the *aroA* gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its use in a PCR assay for rapid detection.** J. Clin. Microbiol. 37. 1575-1578. 1999.
- Morozumi, T., Hiramune, T.: **Effect of temperature on the survival of *Haemophilus parasuis* in physiological saline.** Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo). 22. 90-91. 1982.
- Mylrea, P. J., Fraser, G., Macqueen, P., Lambourne, D. A.: **Pleuropneumonia in pigs caused by *Haemophilus parahaemolyticus*.** Aust. Vet. J. 50. 255-259. 1974.
- Nadeau, M., Larivière, S., Higgins, R., Martineau, G. P.: **Minimal inhibitory concentrations of antimicrobial agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Can. J. Vet. Res. 52. 315-318. 1988.
- Nedbalcova, K., Satran, P., Jagliz, Z., Ondriasova, R., Kucerova, Z.: **Monitoring of antibiotic resistance in isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the Czech Republic between 2001 and 2003.** Vet. Med - Czech. 50. 181-185. 2005.
- Nedbalcova, K., Nechvatalova, K., Pokludova, L., Bures, J., Kucerova, Z., Koutecka, L., Hera, A.: **Resistance to beta-lactam antibiotics.** Vet. Microbiol. 171. 328-336. 2014.
- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V. R., Serrano, J. J., Garcia, C., de la Garza, M.: **Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A.** Can. J. Vet. Res. 58. 83-86. 1994.
- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V. R., Guerrero, A. L., García, R. M., Reyes, M. E., de la Garza M.: **Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes.** Can. J. Vet. Res. 62. 183-190. 1998.
- Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M., Mulvey, M.: **Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes.** Mol. Cell Probes. 15. 209-215. 2001.

- Nicolet, J., König, H.: **On haemophilus-pleuropneumonia in swine. Bacteriologic, patho-anatomic and histological findings. Preliminary report.** Pathol. Microbiol. (Basel). 29. 301-306. 1966.
- Nielsen R.: **An outbreak of pleuropneumonia among a group of baconers. Pathological and bacteriological observations.** Nord. Vet. Med. 25. 492-496. 1973.
- Nielsen, R., Andresen, L. O., Plambeck, T., Nielsen, J. P., Krarup, L. T., Jorsal, S. E.: **Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds.** Vet. Microbiol. 54. 35-46. 1997.
- Nielsen, R.: ***Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes--cross protection experiments.** Nord. Vet. Med. 36. 221-234. 1984.
- Nielsen, R.: **Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12.** Acta Vet. Scand. 27. 453-455. 1986a.
- Nielsen, R.: **Serology of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtypes A and B.** Acta Vet. Scand. 27. 49-58. 1986b.
- Niven, D. F., Lévesque, M.: **V-factor dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 (Bertschinger 2008/76).** Int. J. Syst. Bacteriol. 38. 319-320. 1988.
- Ózsvári, L., Búza, L.: **Sertéshízlaló telepek technológiai színvonalának, főbb termelési mutatóinak és légzőszervi tünetegyüttese (PRDC) menedzsmentjének összehasonlító vizsgálata.** Magy. Állatorvosok. 137. 79-92. 2015.
- Perry, M. B., Angen, Ø., MacLean, L. L., Lacouture, S., Kokotovic, B., Gottschalk, M.: **An atypical biotype I *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13 is present in North America.** Vet. Microbiol. 24. 1-8. 2011.
- Perry, M. B., MacLean, L. L., Vinogradov, E.: **Structural characterization of the antigenic capsular polysaccharide and lipopolysaccharide O-chain produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 15.** Biochem. Cell Biol. 83. 61-69. 2005.
- Perry, M. B., Altman, E., Brisson, J. R., Beynon, L. M., Richards, J. C.: **Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains.** Serodiagn. Immun. Inf. D. 4. 299-308. 1990.
- Pohl, S., Bertschinger, H. U., Frederiksen, W., Mannheim, W.: **Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-Like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 33. 510-514. 1983.
- Priebe, S., Schwarz, S.: ***In vitro* activities of florfenicol against bovine and porcine respiratory tract pathogens.** Antimicrob. Agents Chemother. 47. 2703-2705. 2003.
- Rapp, V., Munson, R., Ross, R.: **Outer membrane protein profiles of *Haemophilus pleuropneumoniae*.** Infect. Immun. 52. 414-420. 1986.

- Rapp, V., Ross, R.: **Antibody response of swine to outer membrane components of *Haemophilus pleuropneumoniae* during infection.** Infect. Immun. 54. 751-760. 1986.
- Rayamajhi, N., Shin, S. J., Kang, S. G., Lee, D. Y., Ahn, J. M., Yoo, H. S.: **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. 17. 359-362. 2005.
- Reiner, G., Fresen, C., Bronnert, S., Haack, I., Willems, H.: **Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany.** J. Wildlife Dis. 46. 551-555. 2010.
- Riley, L. W.: **Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Principles and Practices** Cent. Eur. J. Publ. Health. 13. 211. 2005.
- Rioux, S., Dubreuil, D., Begin, C., Laferrière, C., Martin, D., Jacques, M.: **Evaluation of protective efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 lipopolysaccharide-protein conjugate in mice.** Comp. Immunol. Microb. 20. 63-74. 1997.
- Rosendal, S., MacInnes, J. I.: **Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 1.** Am. J. Vet. Res. 51. 711-717. 1990.
- Rossi, C. C., De Araújo, E. F., De Queiroz, M. V., Bazzolli, D. M.: **Characterization of the *omlA* gene from different serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a new insight into an old approach.** Genet. Mol. Biol. 36. 243-251. 2013.
- Sárközi, R., Makrai, L., Fodor, L.: **Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 16.** Acta Vet. Hung. 63. 444-450. 2015.
- Šatrán, P., Nedbalcová, K., Kučerová, Z.: **Comparison of Protection Efficacy of Toxoid and Whole-Cell Vaccines Against Porcine Pleuropneumonia Caused by Endotracheal Infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Acta Vet. Brno. 72. 213-219. 2003.
- Sauer, F.: **Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis.** Curr. Opin. Microbiol. 3. 65-72. 2000.
- Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T. J., MacInnes, J. I., Segers, R. P., Frey, J.: **Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Microbiology. 145. 2105-2116. 1999.
- Schaller, A., Kuhnert, P., de la Puente-Redondo, V. A., Nicolet, J., Frey, J.: (2000): **Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals.** Vet. Microbiol. 74. 365-376. 2000.
- Schaller, A., Djordjevic, S. P., Eamens, G. J., Forbes, W.A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Gottschalk, M., Nicolet, J., Frey, J.: **Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*.** Vet. Microbiol., 79. 47-62. 2001.
- Schuchert, J. A., Inzana, T. J., Angen, Ø., Jessing, S.: **Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, and 8 by Multiplex PCR.** J. Clin. Microbiol. 42. 4344-4348. 2004.

- Seah, J. N., Frey, J., Kwang, J.: **The n-terminal domain of RTX toxin ApxI of *Actinobacillus pleuropneumoniae* elicits protective immunity in mice.** Infect. Immun. 70. 6464-6467. 2002.
- Seah, J. N., Kwang, J.: **Localization of linear cytotoxic and pro-apoptotic epitopes in RTX toxin ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Vaccine. 22. 1494-1497. 2004.
- Sebunya, T. N. K., Saunders, J. R., Osborne, A.D.: **Dose response relationship of *Haemophilus pleuropneumoniae* aerosols in pigs.** Can. J. Comparat. Med. 47. 54-56. 1983.
- Sellyei, B., Wehmann, E., Makrai, L., Magyar, T.: **Evaluation of the Biolog system for the identification of certain closely related *Pasteurella* species.** Diagn. Micr. Infect. Dis. 71. 6-11. 2011.
- Shimizu, M., Kuninori, K., Sakano, T., Terashima, T.: **Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* isolates from swine.** Jpn. J. Vet. Sci., 44. 359-363. 1982.
- Shope, R. E.: **Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology.** J. Exp. Med. 119. 357-368. 1964.
- Sidebé, M., Messier, S., Larivière, S., Gottschalk, M., Mittal, K. L.: **Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract as a complement to serological tests.** Can. J. Vet. Res. 57. 204-208. 1993.
- Srikumar, R., Mikael, L. G., Pawelek, P. D., Khamessan, A., Gibbs, B. F., Jacques, M., Coulton, J. W.: **Molecular cloning of haemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Microbiology. 150. 1723-1734. 2004.
- Sthitmatee, N., Sirinarumit, T., Makonkewkeyoon, L., Sakpuaram, T., Tesaprathep, T.: **Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based-*apx* genes.** Mol. Cell. Probe. 17. 301-305. 2003.
- Százados, I., Kádas, I.: **A *Haemophilus paraahaemolyticus* okozta tüdő-mellhártyagyulladás hazai előfordulása sertésekben.** Magy. Állatorvosok. 30. 681-685. 1979.
- Takács, N., Albert, E., Kiss, K., Németh, Z., Biksi, I.: **Sertések légzőszervi megbetegedéseinek elkülönítő kórjelzése I. Választás előtti kórképek.** Magy. Állatorvosok. 137. 15-24. 2015.
- Tarigan, S., Slocombe, R. F., Browning, G. F., Kimpton, W.: **Functional and structural changes of porcine alveolar macrophages induced by sublytic doses of a heat-labile, hemolytic, cytotoxic substance produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Am. J. Vet. Res. 55.1548-1557. 1994.
- Tascón, R. I., Vázquez-Boland, J. A., Gutiérrez-Martín, C. B., Rodríguez-Barbosa, I., Rodríguez-Ferri, E. F.: **The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis.** Mol. Microbiol. 14. 207-216. 1994.
- Thacker, B. J., Mulks, M. H.: **Evaluation of commercial *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines.** Proc. Int. Pig Vet. Soc. 10. 87. 1988.

- Thomson, R. G., Ruhnke, H. L.: **Haemophilus septicemia in piglets**. Can Vet J. 10. 271–275. 1963.
- Tobias, T. J., Bouma, A., van den Broek, J., van Nes, A., Daemen, A. J., Wagenaar, J. A., Stegeman, J. A., Klinkenberg, D.: **Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* among weaned piglets on endemically infected farms**. Prev. Vet. Med., 117. 207-214. 2014a.
- Tobias, T. J., Klinkenberg, D., Bouma, A., van den Broek, J., Daemen, A. J., Wagenaar, J. A., Stegeman, J. A.: **A cohort study on *Actinobacillus pleuropneumoniae* colonisation in suckling piglets**. Prev. Vet. Med. 114. 223-230. 2014b.
- Tuboly, S. (szerk.), Medveczky, I., Rusvai, M., Varga, J.: **Állatorvosi járványtan I. Állatorvosi mikrobiológia, Bakteriológia, virológia, immunológia**. Mezőgazda Kiadó. Budapest, 1998.
- Tumamao, J. Q., Bowles, R.E., van den Bosch, H., Klaasen, H. L., Fenwick, B. W., Storie, G.J., Blackall, P.J.: **Comparison of the efficacy of a subunit and a live streptomycin-dependent porcine pleuropneumonia vaccine**. Aust. Vet. J. 82. 370-374. 2004.
- Ueda, Y., Ohtsuki, S., Narukawa, N.: **Efficacy of florfenicol on experimental *Actinobacillus pleuropneumonia* in pigs**. J. Vet. Med. Sci. 57. 261-265. 1995.
- Újváry, D., Szemethy, L.: **Keeping and feeding problems of wild boars in captivity**. Hungarian Agricultural Research. 3. 18-21. 2011.
- Utrera V., Pijoan C.: **Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts**. Vet. Rec. 128. 357–358. 1991.
- Vaduva, I., Herman, V., Csuka, E., Biksi, I.: **Minimal Inhibitory Concentrations of Tiamulin against *Actinobacillus pleuropneumoniae***. Bullatin USVM, Veterinary Medicine 68 303-305. 2011
- van den Bosch, J. F., Jongenelen, I. M. C. A., Puben, A. N.B., van Vugt, F. G. A., Segers, R. P. A. M.: **Protection induced by a trivalent *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccine**. abst. 194. Proceedings of the 12th International Pig Veterinary Society. The Hague, the Netherlands. 1992.
- van den Bosch, H., Frey, J.: **Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs**. Vaccine. 21. 3601-3607. 2003.
- van Overbeke, I., Chiers, K., Ducatelle, R., Haesebrouck, F.: **Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins**. J. Vet. Med. B. 48. 15-20. 2001.
- van Overbeke, I., Chiers K., Charlier G., Vandenberghe I., Van Beeumen J., Ducatelle R., Haesebrouck F.: **Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells**. Vet. Microbiol. 88. 59-74. 2002.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J.: **Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics**. Microbiol. Rev. 60. 407-438. 1996.

- Varga, J. (szerk.), Tuboly, S., Mészáros, J.: **A háziállatok fertőző betegségei.** Állatorvosi járványtan II. Budapest. Mezőgazda Kiadó, 2. kiadás. 183-186. 2007.
- Velthuis, A. G., de Jong, M. C., Stockhofe, N., Vermeulen, T. M., Kamp, E. M.: **Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs is characterized by variation in infectivity.** Epidemiol. Infect. 129. 203-214. 2002
- Vigre, H., Angen, O., Barfod, K., Lavritsen, D. T., Sørensen, V.: **Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs under field-like conditions: emphasis on tonsillar colonisation and passively acquired colostral antibodies.** Vet. Microbiol. 89. 151-159. 2002.
- Wasteson, Y., Roe, D. E., Falk, K., Roberts, M. C.: **Characterization of tetracycline and erythromycin resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Vet. Microbiol. 48. 41-50. 1996.
- Wong, J. D., Janda, J. M., Duffey, P. S.: **Preliminary studies on the use of carbon substrate utilization patterns for identification of *Brucella* species.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 15. 109-113. 1992.
- Wilke M., Franz, B., Gerlach, G. F.: **Characterization of a large transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7.** J. Vet. Med. B. 44. 73-86. 1997.
- Yang, C. Y., Lin, C. N., Lin, C. F., Chang, T. C., Chiou, M. T.: **Serotypes, antimicrobial susceptibility, and minimal inhibitory concentrations of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from slaughter pigs in Taiwan (2002-2007).** J. Vet. Microbiol. 73. 205-208. 2011.
- Yoshurima, H., Takagi, M., Ishimura, M., Endoh, Y. S.: **Comparative in vitro activity of 16 antimicrobials agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Vet. Res. Commun. 26. 11-19. 2002.
- Zagólski, O., Stręk, P., Kasprończak, A., Białecka, A.: **Effectiveness of polyvalent bacterial lysate and autovaccines against upper respiratory tract bacterial colonization by potential pathogens: a randomized study.** Med. Sci. Monit. 21. 2997-3002. 2015.
- Zhou, L., Jones, S. C., Angen, Ø., Bossé, J. T., Nash, J. H., Frey, J., Zhou, R., Chen, H. C., Kroll, J. S., Rycroft, A. N., Langford, P.R.: **PCR specific for *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 3.** Vet Rec. 162. 648-652. 2008a.
- Zhou, L., Jones, S. C. P., Angen, Ø., Bossé, J. T., Nash, J. H. E., Frey, J., Zhou, R., Chen, H. C., Kroll, J. S., Rycroft, A. N., Langford, P. R.: **Multiplex PCR That Can Distinguish between Immunologically Cross - Reactive Serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* Strains.** J. Clin. Microbiol. 46. 800-803. 2008b.

9. A doktori kutatás eredményeinek közlései

Sárközi R., Makrai L., Fodor L.: Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 16. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63. 444-450. 2015.

Bossé, J., Li, Y, **Sárközi, R.**, Gottschalk, M., Angen, Ø., Nedbalcova, K., Rycroft, A., Fodor L., Langford, P.: A unique capsule locus in the newly designated *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 16 and development of a diagnostic PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2017.

Sárközi R., Makrai L., Tóth A., Fodor L.: Hazai *Actinobacillus pleuropneumoniae* törzsek antibiotikum-érzékenysége, *Magyar Állatorvosok Lapja*, 136. 643-649. 2014.

Sárközi R., Makrai, L., Fodor, L.: *Actinobacillus pleuropneumoniae* okozta heveny megbetegedés egy hónapos malacokban. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 138. 593-596. 2016.

Sárközi R., Búza L., Makrai L., Fodor L.: Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* 16-os szerotípusa által okozott légzőszervi megbetegedés tapasztalatai egy sertéstelepen. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 138. 713-720. 2016.

Poszterek, előadások konferenciákon:

Sárközi, R., Búza, L., Fodor, L. (poszter)

Vaccination in order to prevent Pleuropneumonia caused by a non typable *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain in Hungary. 7th European Symposium of Porcine Health Management, 22-24 April 2015. Nantes, France

Sárközi, R., Búza, L., Fodor, L. (poszter)

Vaccination prevents clinical signs és mortality caused by a non-typable *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain in Hungary. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases 2015 (ISERPD2015) Kyoto International Conference Center, 21-24 June 2015. Kyoto, Japan

Sárközi, R., Búza, L., Fodor, L. (poszter)

Confirmation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 8 in Hungarian swine farm via indirect haemagglutination and serological examination. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases 2015 (ISERPD2015) Kyoto International Conference Center, 21-24 June 2015. Kyoto, Japan

Sárközi, R., Makrai, L., Tóth, A., Fodor, L. (előadás)

Actinobacillus pleuropneumoniae törzsek érzékenysége a sertés tüdő- és mellhártyagyulladásának gyógykezelésére használt egyes antibiotikumokra. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése, 2014. október 15-17. Keszthely, Magyarország, Absztraktfüzet 2014.

10. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Fodor László** professzor úrnak, hogy olyan témát biztosított, amely igen sokszínű és fontos az állatorvosi területen. Kérdéseimre választ adott, teret engedett útkeresésemnek, munkámat kitartóan támogatta.

Köszönetet mondok **Makrai Lászlónak**, kiváló kollégámnak, aki a bakteriológia színes és érdekes világába már hallgató koromban bevezett, és ezzel egy életre "megfertőzött". Doktori munkámat kellő kritikával, építő hozzászólásokkal folyamatosan segítette, példát mutatott a precíz laboratóriumi munkavégzésben.

Köszönettel tartozom **Lőrincz Mártának** és **Cságola Attilának**, akik a molekuláris biológiai módszerek kivitelezésében mindig segítségemre voltak.

Hálásan köszönöm **Kardos Gábornak** a PFGE vizsgálatokban nyújtott pótolhatatlan segítségét, a szakmai beszélgetéseket.

Köszönettel tartozom **Varga János** és **Tuboly Sándor** professzor uraknak, akik egy-egy jó szóval, kitűnő meglátásokkal segítették munkámat.

Köszönöm **opponenseimnek**, hogy rendkívül alaposan olvasták és bírálták munkámat, ezzel is segítve, hogy az, a követelményeknek megfelelő legyen.

Köszönöm **Kovács Eszternek**, **Görföl-Sulyok Kingának**, **Gyuranecz Miklósnak**, **Kreizinger Zsuzsának**, **Rónai Zsuzsannának**, hogy kérdéseimmel bármikor bizalommal fordulhattam hozzájuk.

Hálás szívvel gondolok mindazon kollégámra, akik a mintagyűjtésem, PhD munkámat segítették. A teljesség igénye nélkül köszönet illeti **Kálmán Attilát**, **Búza Lászlót**, **Vágó Lászlót**, **Gombos Lászlót**, **Hankó-Faragó Emesét**, **Olajos Sándort**, **Tóth Gergelyt**, **Biksi Imrét**, **Végh Ákost** és **Csomán Ákost**.

Köszönöm szakdolgozatos hallgatóim szorgalmas és alapos munkáját.

Köszönettel tartozom **Cseh Erikának**, aki tanszékünk tündéréként engem is szárnyai alá vett, és sokszor megkönnyítette életemet a doktori munka éve alatt.

Segítő kezek kísérték utamat, mindig volt friss táptalaj, egy jó szó a laborban. Nagyon köszönöm mindezt **Halasi Terikének**, **Kolozsvári Vicának** és **Soós-Németh Evelinnek**. **Rendesné Évi** és **Labbancz Tibor** segítsége is pótolhatatlan volt munkám során.

Köszönettel tartozom könyvtárunk kiválói dolgozóinak, különösen **Oláh Editnek**, aki a szakirodalom összegyűjtésében hatalmas segítségemre volt.

Hálás vagyok **barátaimért**, akik türelmükkel, szakmai észrevételeikkel támogattak és hittek bennem.

Végül, de nem utolsó sorban hálával és köszönettel tartozom **Családomnak**, amiért nyugodt háttérrel biztosítottak munkámhoz, támogattak és bíztattak.

11. Függelékek

1. függelék: A 2012 előtt izolált törzsek adatai, a különböző vizsgálatokba bevont törzsek (n.v.: nem vizsgált, NT: nem tipizálható)

	2012 előtti izolátumok		Izolálás		Vizsgálatok			
	Biotípus	Szerotíp	Helye	Ideje	Biolog	Apal	apx gének	ATB
A11	II	n.v.	Pötréte		•	•	•	•
A12	II	NT			•	•	•	•
A122	I	2		2004	•	•	•	•
A123	I	n.v.		2005	•	•		
A125	II	13	Dalmand	2006	•	•	•	•
A126	I	2		2006	•	•	•	•
A127	I	2	Pásztó	2006	•	•	•	•
A129	I	9		2006	•	•		
A13	II	13	típustörzs		•	•	•	•
A130	I	2	Besnyő	2006	•	•	•	•
A131	II	1	Kisújszállás	2006	•	•	•	•
A132	I	2	Sárbogárd	2006	•	•	•	•
A133	I	2	Pásztó	2006	•	•	•	•
A134	II	13	Baja	2006	•	•	•	•
A136	I	2	Pásztó	2006	•	•	•	•
A137	II	n.v.		2005	•	•	•	•
A138	II	13	Töltéstava	2006	•	•	•	•
A140	II	13	Gerjen	2006	•	•	•	•
A141	II	13	Dalmand	2006	•	•	•	•
A142	II	13	Dalmand	2006	•	•	•	•
A143	II	13	Dalmand	2006	•	•	•	•
A144	II	14		2006	•	•	•	•
A145	II	n.v.		2005	•	•	•	•
A146	I	9	Szeghalom	2003	•	•		
A147	I	9	Szeghalom	2003	•	•		
A148	II	13	Hercegszán	2005	•	•		
A149	II	14		2005	•	•	•	•
A150	II	13	Bábolna	2006	•	•	•	•
A151	I	n.v.	Városföld	2006	•	•		
A155	II	n.v.		2006	•			
A156	II	n.v.		2006	•			
A157	II	n.v.		2006	•			
A16	II	n.v.		1998	•	•		•
A162	II	n.v.		2008	•	•	•	•
A163	II	13		2008	•	•	•	•
A164	II	13		2008	•	•	•	•
A165	II	13		2008	•	•	•	•
A166	I	2	Kerékteleki	2008	•	•		
A167	I	2	Kerékteleki	2008	•	•		
A168	I	n.v.		2002	•	•		
A169	I	9		2009	•	•		
A170	I	9		2009	•	•		
A172	I	5a	típustörzs		•	•		
A173	I	5b	típustörzs		•	•		
A174	I	9	típustörzs		•	•		
A175	I	11	típustörzs		•	•		
A181	I	2	Pásztó	2009	•	•		
A182	I	2	Pirító	2009	•	•		
A183	II	13	Gerjen		•	•		•
A184	II	13	Dalmand	2009	•	•	•	•
A185	II	13	Dalmand	2009	•	•	•	•
A186	I	2	Pirító		•	•		

A187	I	2		2009	•	•		
A19	I	2			•	•	•	•
A27	I	n.v.		2002	•	•		
A31	I	9	Pötréte	2002	•	•		
A37	I	n.v.		2001	•	•		
A40	I	8		2002	•	•	•	•
A41	I	2		2002	•	•	•	•
A42	I	2	Pásztó	2002	•	•	•	•
A44	I	n.v.	Bana	2002	•	•		
A45	I	n.v.	Lajoskomár	2002	•	•	•	•
A48	I	n.v.	Pásztó	2002	•	•	•	•
A63	I	2		2002	•	•	•	•
A67	I	2	Bábolna	2002	•	•	•	•
A68	I	2	Bábolna	2002	•	•	•	•
A7	I	n.v.		1996	•	•		
A70	I	2	Bábolna	2002	•	•	•	•
A71	I	n.v.		2002	•	•		
A72	I	n.v.		2003	•	•		
A74	I	n.v.	Pápa	2003	•	•		
A78	I	n.v.	HAGE	2003	•	•		
A89	I	10	típustörzs		•	•		
A109	I	n.v.		2002		•		
A171	I	2	típustörzs			•		
A76	I	n.v.	Nagyigmán	2003		•		
A79	I	n.v.	HAGE	2003		•		
A96	I	5b	típustörzs			•		

2. függelék: A 2012-ben és utána izolált törzsek adatai, a különböző vizsgálatokba bevont törzsek

(NT: nem tipizálható; az 51/95-ös törzs 1995-ben lett izolálva, de liofilizálást követően 2014-ben oltottuk ki újra)

2012 után izolált törzsek	Izolálás				Vizsgálatok			
	Biotíp	Szerotíp	Helye	Ideje	Biolog	Apal	apx gének	ATB
8/12	I	9	Barcs	2012		•	•	•
196/12	I	2	Küngös	2012		•	•	•
246/12	I	2	Gyömöre	2012		•	•	•
249/12	I	2	Mocsa	2012		•	•	•
262/12	I	2	Rábaszentandrás	2012		•	•	•
270/12	I	16	Komárom	2012		•	•	•
272/12	I	16	Csém	2012		•	•	•
276/12	I	2	Beremend	2012		•	•	•
286/12	I	NT	Elek	2012		•	•	•
287/12	I	12	Komárom	2012		•	•	•
309/12	I	2	Felsőcikola	2012		•	•	•
322/12	I	2	Nagyhegyes	2012		•	•	•
323/12	I	8	Nagyhegyes	2012		•	•	•
327/12	I	9	Marcaltó	2012		•	•	•
329/12	I	2	Marcaltó	2012		•	•	•
335/12	I	2	Magyarkeszi	2012		•	•	•
346/12	I	2	Tiszatenyő	2012		•	•	•
211/13	II	13	Ormándlak	2013		•	•	•
320/13	I	2	Hódmezővásárhely	2013		•	•	•
416/13	I	2	Tab	2013		•	•	•
16/14	I	9	Környe	2014		•	•	•
26/14	I	2	Hajdúböszörmény	2014		•	•	•

32/14	II	NT	Fábiánsebestyén	2014		•	•	•
51/95	II	NT	nem ismert	1995		•	•	•
51/14	I	16	Hajdúszoboszló	2014		•	•	•
67/14	I	2	Hajdúdorog	2014		•	•	•
84/14	II	13	nem ismert	2014		•	•	•
85/14	I	16	Karcag	2014	•	•	•	•
86/14	I	2	Derecske	2014		•	•	•
107/14	I	16	Hajdúnánás-Tedej	2014		•	•	•
112/14	II	13	Püspökladány	2014		•	•	•
145/14	I	16	Bajánsenye	2014		•	•	•
198/14	I	2	Nagyigmánd	2014		•	•	•
200/14	I	2	Lébény	2014		•	•	•
202/14	I	2	Küngös	2014		•	•	•
203/14	I	NT	Elek	2014		•	•	•
205/14	I	16	Hajdúszoboszló	2014		•	•	•
206/14	II	NT	Bajánsenye	2014		•	•	•
208/14	I	2	Tárkány	2014		•	•	•
209/14	I	2	Csillagpuszta	2014		•	•	•
267/14	I	2	Mátyásdomb	2014			•	•
273/14	II	13	Zalaegerszeg	2014			•	•
281/14	I	8	Sajóecseg	2014			•	•
311/14	I	16	Békéscsaba	2014			•	•
313/14	I	8	Sajóecseg	2014			•	•
323/14	I	NT	Tiszafüred	2014			•	•
359/14	I	2	Hódmezővásárhely	2014			•	•
1/15	II	13	Zalaegerszeg	2015			•	•
25/15	I	8	Nyárad	2015			•	•
42/15	I	8	Somogyicsó	2015			•	•
43/15	I	2	Somogyicsó	2015			•	•
53/15	I	12	Soponya	2015			•	•
60/15	I	12	Mezőberény	2015			•	•
108/15	I	2	Pórszombat	2015			•	•
132/15	I	12	Mezőberény	2015			•	•
161/15	I	11	Zámoly	2015			•	•
175/15	I	8	Ormándlak	2015			•	•
184/15	I	2	Likócs	2015			•	•
186/15	I	8	Kisújszállás	2015			•	•
189/15	II	13	Kunhegyes	2015			•	•
194/15	I	2	Vérteskethely	2015				
212/15	I	2	Mezőberény	2015				
227/15	I	2	Bodony	2015				
242/15	I	NT	Bácsalmás	2015				
244//15	I	9	Sükösd	2015				
248/15	I	2	Pásztó	2015				
249/15	I	8	Csemő	2015				
270/15	I	2	Tataháza	2015				
2/16	II	13	Bátya	2016				
7/16	I	2	Kapoly	2016				
129/16	I	5a/5b	Baracska	2016				
130/16	I	11	Jászládány	2016				
150/16	I	11	Hajdúszoboszló	2016				
151/16	I	16	Mezőhék	2016				

190/16	II	13	Perkáta	2016				
216/16	I	NT	Mátyusháza	2016				
286/16	II	NT	Ormándlak	2016				
370/16	I	NT	Borsodszirák	2016				
457/16	II	13	Tiszatenyő	2016				
462/16	I	NT	Tiszatenyő	2016				
472/16	I	NT	Békés	2016				
503/16	I	NT	Nagyrábé	2016				
594/16	I	8	Pakod	2016				

3. függelék: Biolog adatbázisában található standard értékek *A. pleuropneumoniae*-re
X: a szénforrás hasznosítása aránya százalékban kifejezve

Szénforrás	Adatbázis ^x	Szénforrás	Adatbázis ^x
Dextrin	100	Turanóz	100
Glikogén	0	Xilitol	0
Tween 40	10	Piroszőlősav-metil-észter	100
N-Acetil-D-Galaktózamin	0	Borostyánkősav mono-metil-észter	37
N-Acetil-D-Glükózamin	100	Ecetsav	3
Adonitol	0	Hangyasav	100
L-Arabinóz	73	D-Galakturonsav	3
D-Arabitól	0	D-Glükonsav	3
D-Cellobióz	93	D-Glükózaminsav	0
i-Eritritol	0	D-Glükuronsav	3
D-Fruktóz	100	α-Hidroxivajsav	100
L-Fruktóz	43	α-Ketovajsav	100
D-Galaktóz	93	α-Ketoglutársav	3
Genciobióz	87	D,L-Tejsav	100
α-D-Glükóz	100	Borostyánkősav	63
α-D-Laktóz	100	Brómborostyánkősav	0
Laktulóz	33	Glükuronamid	13
Maltóz	100	L-Aszparagin	3
D-Mannitol	100	L-Aszparaginsav	3
D-Mannóz	100	Glicil-L-Glutamátsav	0
D-Melibióz	0	L-Prolin	3
β-Metil-D-Glükózid	33	L-Treonin	7
D-Pszikóz	100	Urokánsav	23
D-Raffinóz	47	Inozin	87
L-Ramnóz	17	Uridin	100
D-Szorbitol	100	Timidin	100
Szukróz	100	D-Glükóz-6-foszfát	90
D-Trehalóz	67		

4. függelék: A 90 antibiotikum, melyeket a szelektív táptalaj előtanulmányában vizsgáltunk

	Csoport	Antibiotikum		Csoport	Antibiotikum
1.	Aminoglikozidok	amikacin	46.	Makrolidok	eritromicin
2.		aminozidin	47.		oleésomicin
3.		apramicin	48.		pristinamicin
4.		gentamicin	49.		roxitromicin
5.		izepamicin	50.		linkomicin+spectinomici
6.		kanamicin	51.		pirlimicin
7.		neomicin	52.		azitromicin
8.		netilmicin	53.		klaritromicin
9.		sisomicin	54.		spiramicin
10.		spektinomicin	55.		tilmikozin
11.		sztreptomycin	56.		tilozin
12.		tobramicin	57.		tulatromicin
13.	Cefalosporinok	cefadroxil	58.	Nitrofurán	nitrofurantoin
14.		cefoperazon	59.	Nitroimidazol	metronidazol
15.		ceftiofur	60.	Oxazolidinon	linezolid
16.		cefuroxim	61.	Penicillinek	amoxicillin-klavulánsav
17.		cefalexin	62.		amoxicillin
18.		cefalotin	63.		ampicillin
19.		lorakarbef	64.		azlocillin
20.		moxalaktám	65.		karbenicillin
21.	Diamino-pirimidin	66.	mecillinam		
22.	Glikopeptidek	vankomicin	67.		meticillin
23.		teikoplanin	68.		mezlocillin
24.		novobiocin	69.	nafcillin	
25.	Hidrokinon	70.	oxacillin		
26.	Karbapenemek	imipenem	71.	penicillin	
27.		meropenem	72.	piperacillin	
28.	Kinolonok	ciprofloxacín	73.	piperacillin+tazobaktám	
29.		enrofloxacin	74.	tikarcillin	
30.		flumequin	75.	tikarcillin+klavulánsav	
31.		levofloxacin	76.	Pleuromutilin	tiamulin
32.		lomefloxacin	77.	Polipeptidek	bacitracin
33.		marbofloxacin	78.		polimixin E
34.		moxifloxacin	79.		polimixin B
35.		nalidixsav	80.	Refamicin	rifampin

36.		norfloxacin	81.		szulfiszoxazol
37.		ofloxacin	82.	Szulfonamidok	szulfametoxazol
38.		oxolin sav	83.		trimetoprim+szulfonami
39.		perfloxacin	84.		triple/szulfonamidok
40.		sparfloxacin	85.		doxiciklin
41.	Klóramfenikolok	klóramfenikol	86.	Tetraciklinek	klórtetraciklin
42.		florfenikol	87.		minociklin
43.		tiamfenikol	88.		oxitetraciklin
44.	Linkóزامidok	klindamicin	89.		tetraciklin
45.		linkomicin	90.		Egyéb