

Állatorvostudományi Egyetem  
Belgyógyászati Tanszék és Klinika

**Kutyák és macskák garatüregi és légúti baktérium flórájának vizsgálata, különös tekintettel a *Pasteurellaceae*- és a *Neisseriaceae* család tagjainak előfordulására**

Készítette: Incze Zsuzsanna

Témavezetők:

dr. Magyar Tibor, ATK Állatorvos-tudományi Intézet, igazgató

dr. Psáder Roland ÁTE Belgyógyászati Tanszék és Klinika,  
egyetemi adjunktus

Budapest, 2019.

## TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések jegyzéke.....	2
2. Bevezetés.....	3
3. A vizsgálatok célja .....	3
4. Irodalmi áttekintés.....	4
4.1. A mikrobiom.....	4
4.2. Kutya és macskák nazális és orális mikrobiomja .....	4
4.3. <i>Pasteurellaceae</i> család.....	5
4.3.1. <i>Pasteurella</i> genus .....	6
4.3.2. <i>Frederiksenia</i> genus .....	7
4.3.3. <i>Haemophilus</i> genus .....	8
4.4. <i>Neisseria</i> genus .....	9
4.5. <i>Bordetella bronchiseptica</i> .....	10
5. Anyag és módszer .....	12
5.1. A kutatásban részt vevő állatok .....	12
5.2. Endoszkópos vizsgálat, mintavétel .....	12
5.3. Baktériumizolálás .....	13
5.4. PCR, agaróz gélelektroforézis .....	14
5.4.1. PCR-termék előállítás .....	14
5.4.2. Elektroforézis.....	16
5.5. 16S rRNS szekvenenciaanalízis .....	17
5.6. Filogenetikai vizsgálat .....	17
6. Eredmények.....	18
6.1. Összesített mintaeredmények.....	18
6.2. Macskákból származó minták eredményei .....	21
6.3. Kutyaiból származó minták eredményei.....	22
6.4. Filogenetikai vizsgálatok eredményei.....	24
7. Megbeszélés .....	26
8. Összefoglalás.....	30
9. Summary .....	31
10. Irodalom .....	32
11. Köszönetnyilvánítás .....	38

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ÁTE	Állatorvostudományi Egyetem
ATK	Agrártudományi Kutatóközpont
BAL	Bronchoalveolaris lavage (bronchialis mosás)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Bázispár
CDC	Center for Disease Control
CO <sub>2</sub>	Szén-dioxid
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	Dezoxiribonukleinsav
EDTA	Etiléndiamin-tetraecetsav
dNTP	Dezoxiribonukleotid-trifoszfát
HH-csoport	Haemophilus-Histophilus csoport
MgCl <sub>2</sub>	Magnézium-klorid
PCR	Polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
rpm	Percenkénti fordulatszám (revolutions per minute)
<i>rpoB</i>	RNS polimeráz béta-alegységét kódoló génszakasz
TBE	Tris-bórsav-EDTA
V/V%	Térfogatszázalék
16S rRNS	16S riboszómális ribonukleinsav

## 2. BEVEZETÉS

A mikrobiom a mikrobák összessége, amelyek velünk, bennünk, rajtunk élnek, táplálnak, védenek, de időnként ártanak is nekünk. Az eddig ismert magyarországi kutatások során a hazai kutya és macskapopulációk légúti és orális mikrobiomját kevésbé ismerhettük meg, pedig a szorosabb ember-állat kapcsolat, az állatainkkal egy légtérben való tartózkodás, már-már gyermekként való kezelésük és a napi szinten előforduló testi kontaktus miatt az állatok által hordozott mikroorganizmusok egyre nagyobb eséllyel kerülhetnek be az emberi szervezetbe is, ez a folyamat pedig esetenként súlyos következményekkel járhat. Különösen kockázatos ez gyerekek körében, akik a higiénia koruknál fogva kevésbé figyelnek oda. Továbbá több olyan baktérium is képes szaporodni a társállataink légúti nyálkahártyáin, melyek magas virulenciájú törzsei haszonállatokba közvetlen, vagy ember által közvetített úton kerülve súlyos gazdasági kárral járó járványokat okozhatnak.

A bakteriológia fejlődésének köszönhetően az eddig ismert baktériumok mellett folyamatosan azonosítanak új fajokat is. Ilyen tekintetben különösen érintett a *Pasteurellaceae* család, mely egyébként is az egyik legnépesebb ismert baktériumcsalád, valamint a szintén *Proteobacteria* törzsbe tartozó *Neisseria* genus. Ezen taxonokat képviselő baktériumok egyébként külföldön végzett kutatások alapján meglehetősen gyakran izolálhatók emlősök nyálkahártyáiról

A fentebb sorolt tények miatt állatgyógyászati és humán orvoslási szempontból egyaránt fontos feladatunk, hogy ezen fajok elterjedtségéről, filogenetikájáról, gazdaspecificitásáról, fertőzési módjairól, kórokozó képességéről és ellenálló képességéről minél rövidebb idő alatt jussunk információhoz.

## 3. A VIZSGÁLATOK CÉLJA

Vizsgálataink alapvető célja a hazai kutya- és macskapopulációk orális és légúti mikrobiom-összetételének általános felmérése volt. Különös figyelmet fordítottunk az utóbbi évtizedben újonnan leírt fajokkal jelentősen bővülő *Pasteurellaceae* család és *Neisseria* genus tagjaira. E csoportokba tartozó baktériumfajok esetében az izolált törzsek filogenetikai kapcsolatának meghatározása is célunk volt, melyre Magyarországon eddig még nem került sor. A klinikai szempontból fontos *Bordetella bronchiseptica* elterjedtségét szintén vizsgáltuk.

## 4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 4.1. A mikrobiom

A különböző mikroorganizmusok (vírusok, gombák, baktériumok) az egész szervezetet benépesítik (Li és mtsai., 2012). Ezek a mikroorganizmusok szimbiontaként, kommenzalistaként, vagy kórokozóként lehetnek jelen (Hasewaga és Camargo, 2015), de alapvetően a legtöbb mikroorganizmus harmóniában él a gazdaszervezettel (Grice és Segre, 2012). Az egyes szervek mikrobiológiai diverzitásának kutatása a mai napig fontos tudományterület annak érdekében, hogy ezen kolóniák összetételét, biológiáját, a szervezetre gyakorolt hatását megismerjük (Li és mtsai., 2012). A baktériumkolóniák szervezetre gyakorolt jótékony hatásai között bizonyított tény, hogy elősegítik az immunrendszer fejlődését, modulációját (Cash és mtsai., 2006), valamint gátolják a patogén mikrobák elszaporodását (Wanke és mtsai., 2011).

### 4.2. Kutyák és macskák nazális és orális mikrobiomja

A szájüreg mikroflóráját számos mikroorganizmus, legnagyobb arányban baktériumok alkotják, melyek egyik legfontosabb szerepe, hogy megakadályozzák a külvilágból bejutott kórokozó baktériumok kolonizációját, ezzel az egészség fenntartásában vesznek részt (Marsh, 1994). Másrészt, ezek a fiziológiásan is jelenlévő baktériumok számos esetben kóros állapotokat idézhetnek elő, a fogászati rendellenességeken, légzőszervi problémákon túl akár cardiovascularis megbetegedést is (Fowler, 2001; Seymour és mtsai., 2007). Az elmúlt években intenzív kutatást folytattak, hogy gyarapítsuk ismereteinket az emlősök orális és nazális mikrobiomjának összetételéről, annak hatásáról, befolyásoló tényezőiről. Isaiah és mtsai. (2017) Alabama, Kalifornia, Georgia és Texas államokból származó kutyákból gyűjtöttek orr- és garattampon mintákat, és 16S rRNS szekvenciaanalízissel azonosították a mintákban található baktériumokat. Úgy találták, hogy az állatok orr- és szájüregi mikroflórája között szignifikáns különbség van. Az orrüregi mintákban domináló baktériumcsoportok a *Proteobacteria* és *Bacteroidetes* törzsek voltak, meglehetősen nagy egyedi változatosságot mutatva. Ezeken kívül megjelentek *Firmicutes*, *Tenericutes* törzsek is. A szájüregi mikroflóra alkotói elsősorban *Bacteroidetes*, *Proteobacterium*, *Firmicutes*, és *Fusobacterium* törzsek voltak. Genus szinten az orrtampon mintáknál meghatározók

voltak a *Moraxella*, *Mycoplasma*, *Prevotella*, *Helcococcus* *Cardiobacterium*, míg a garatminták közt szignifikánsan magasabb volt a *Porphyromonas*, *Capnocytophaga*, *Mycoplasma* genusokhoz, valamint a *Neisseriaceae* és *Pasteurellaceae* családhoz tartozó baktériumok száma.

Egy 2012-ben végzett kutatás során kutyák szájüregéből vett mintákból összesen 353 volt pozitív, melyekből 148 különböző genusba sorolható baktériumot izoláltak, ebből 52 a *Proteobacterium* törzs képviselője volt. Ezek közül 22 a *Betaproteobacteriumok* közé tartozó *Neisseria*, *Eikenella* és *Conchiformibius*, 18 pedig a *Gammaproteobacteriumok* közé tartozó *Cardiobacterium*, *Moraxella*, valamint *Pasteurellaceae* és *Enterbacteriaceae* családokba tartozó genusok voltak (Dewhirst és mtsai., 2012).

A macskák orális mikrobiomjának vizsgálatáról kevesebb publikációt lehet találni, de egy 2014-ben végzett kutatás során a domináns törzsnek a *Proteobacterium* bizonyult, mivel leginkább *Pasteurellaceae* és *Moraxellaceae* családba, illetve *Moraxella*, *Thermomonas*, *Neisseria* és *Pasteurella* genusba tartozó fajokat tartalmaztak a minták. Gyakoriak voltak továbbá a *Bacteroidetes* (pl. *Porphyrimonas*) és *Firmicutes* (pl. nem besorolt *Clostridiales*) törzsek képviselői (Sturgeon és mtsai., 2014).

Egy másik kutatásban egészséges és beteg macskák orrüregi mikroflóráját vizsgálták, melynek során az egészséges állatok orrából főként *Moraxella*, *Bradyrhizobiaceae*, *Sediminibacterium*, *Alloiococcus*, és *Neisseria* fajokat, míg a felső légúti betegségben szenvedő állatok orrüregéből *Moraxella*, *Bradyrhizobiaceae*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Chlamydia* és *Streptococcus* fajokat izoláltak leggyakrabban (Dorn és mtsai., 2017).

### **4.3. Pasteurellaceae család**

A *Pasteurellaceae* Pohl 1981 család eredetileg egy három genust számláló család volt, mely az *Actinobacillus*, *Haemophilus* (Winslow és mtsai., 1917) és *Pasteurella* (Trevisan, 1887) genusokból állt. Ezek a baktériumok főként a madarakban, emlősökben (köztük az emberben) és hüllőkben a betegséget előidéző tulajdonságaikról voltak ismertek (Bisgaard, 1993). Az évek során elvégzett filogenetikai vizsgálatoknak köszönhetően ez a szám azonban mára jelentősen megnőtt. Ma a *Pasteurellaceae* család 29 nemzetséget foglal magába, melyek között számos állatra és emberre veszélyes kórokozó található. A család tagjai között obligát, fakultatív patogén és kommenzalista baktériumok egyaránt megtalálhatók, melyek a gazdaszervezetek felső légutaiban, az orr-garatüregben, a nemi

traktusban vagy az emésztő traktus egyes részein élnek (Olsen és mtsai., 2005). A családba tartozó patogén baktériumok mind lokális, mind szisztémás fertőzésekben szerepet játszhatnak (Bisgaard, 1993; Olsen és mtsai., 2005). A *Pasteurellaceae* család tagjai sok esetben nem egyedül, hanem egyéb baktériumokkal és vírusokkal együtt, másodlagos- vagy társfertőzőként okoznak betegséget. Jó példa erre a brojlerek megnövekedett mortalitása, melyben alapvető szerepe van az *Avibacterium paragallinarum* és *Mycoplasma synoviae* fertőzésnek (Droual és mtsai., 1992). Sertések torzító orrgyulladásában is az a jellemző, hogy a kóros állapotot a *Bordetella bronchiseptica* és a *Pasteurella multocida* együttes jelenléte idézi elő (Magyar és Lax, 2002). Mindenképpen figyelembe kell venni a hajlamosító tényezők szerepét is. Az állatok tartási körülményei, a baktériumoknak élőhelyet biztosító nyálkahártyák épsége és az immunállapot különösen fontosak a betegségek kialakulása szempontjából, sőt, egyes *Pasteurellaceae* fajok okozta fertőzések összefüggésbe hozhatók élővírusos vakcinák előzetes alkalmazásával is (Droual és mtsai., 1992). A betegségek kialakulásánál sok esetben a beteg állat klinikai tünetei alapján jól behatárolható a kórokozó, de jellemzően ezek alapján nem lehet a biztos diagnózist kimondani, így mikrobiológiai vizsgálatok szükségesek a pontos meghatározáshoz. A tesztek emellett az egészséges hordozók kiszűrésére is alkalmasak, ami mindenképpen szükséges, hiszen a legfontosabb járványtani tényezők mindig a fertőzött, de tüneteket nem mutató állatok.

#### **4.3.1. *Pasteurella* genus**

A *Pasteurella* genussal kapcsolatos kutatások 1880 környékén kezdődtek, amikor a baromfikolerával és az emlősök vérvészes septicaemiájával hoztak kapcsolatba egyes mikroorganizmusokat, melyeket Kitt 1885-ben izolált (Kitt, 1885). A baktériumok első tudományos nevét Burrill adta, aki a *Micrococcus gallicidus* nevet használta (Burrill, 1883). Végül a mostani *Pasteurella* nevet Trevisan javaslatára, Pasteur tiszteletére kapta a genus (Trevisan, 1887).

A *Pasteurella* genusba tartozó baktériumok Gram-negatív, nem motilis, coccoid pálcá alakú baktériumok, melyek gyakran izolálhatók egészséges kutyák szájüregéből (Baldrias és mtsai., 1988), valamint állati harapásokból. Ezekről a területekről legtöbbször *P. multocida* *subsp. multocida*, *P. multocida subsp. septica*, *P. canis*, *P. dagmatis*, és *P. stomatis* fajok izolálhatók (Talan és mtsai., 1999). A *P. canis* kutyában összefüggésbe hozható különböző

fertőzésekkel (Talan és mtsai., 1999; Haraa és mtsai., 2002), esetenként akár súlyos endocarditissel is (Kern és mtsai., 2019). Dolieslager és mtsai. (2011) macskában írtak le *P. multocida subsp. multocida* és *P. pneumotropica* okozta gingivostomatitist.

Egyre lényegesebbnek tűnik a *P. canis* potenciálisan zoonotikus tulajdonsága is. Ez a faj sokféle kórképet okozhat emberben, a felületes sebfertőzések mellett akár alsó légúti megbetegedést (Bhat és mtsai., 2015), osteomyelitist (Haraa és mtsai., 2002), arthritist (Hazelton és mtsai., 2013), de akár bacteraemiát is (Albert és Stevens., 2010).

*P. multocida* által okozott endocarditis szintén ismert kutyákban, de ritkán, bizonyos körülmények között előfordulhat emberekben is (Hombal és Dincsoy, 1992; Khan és mtsai., 2012; Mikaberidz és mtsai., 2013). A fertőzés leggyakrabban állati harapásokkal vagy inhalációval történik, de állatokkal való egyéb kontaktus, például ha a kedvenc állatok nyála, vagy légutainak váladéka nyálkahártyát, sebeket érint, szintén elősegíti az ember fertőződését (Myers és mtsai., 2012). A *P. multocida* majd minden gazdasági haszonállatban képes nagy morbiditással és mortalitással járó megbetegedést okozni. A baromfikolera (Rhoades és Rimler, 1989), a sertések torzító orrgyulladás (Magyar és Lax, 2002) a kérődzők légzőszervi pasteurellosis és a nyulak ragadós náthája (Boyce és mtsai., 2010), valamint a - főként Indiában és Ázsia déli területein előforduló - szarvasmarha vérzéses vérfertőzése (De Alwis, 1992) mind óriási gazdasági kárral fenyegető betegségek, melyek hátterében a *P. multocida* nagy virulenciájú törzsei állnak. Itt is szükséges megemlíteni, hogy a *P. multocida* ezekben az állatokban is jellemzően valamilyen hajlamosító tényező hatására önmagában, vagy egy másik kórokozóval együtt okoz betegséget (Boyce és mtsai., 2010).

A *Pasteurella* genusba tartozó baktériumok telepei 24 órás inkubáció után véres agaron a táptalajhoz tapadnak, gyakran nyálkásak, szürkés színűek, változatos formájúak (1. ábra). A törzsek az oxidáz, kataláz és indol tesztben pozitívak, a nitrátot nitritté redukálják és a legtöbb faj ureáz negatív. MacConkey agaron nem képesek növekedésre. A sejtek Gram-negatív, nem motilis rövid pálcák, melyek állhatnak magányosan, párokban, vagy akár láncokat is alkothatnak (Mutters és mtsai., 2005).

#### **4.3.2. *Frederiksenia* genus**

Ez a baktérium genus a *Pasteurellaceae* családon belül sokáig Bisgaard taxon 16 megnevezéssel volt ismert. A csoport fenotípusában, DNS-szerkezetében, genom méretében és zsírsavösszetételében is nagyon hasonlít a *Pasteurella* genushoz, így izolálása során



esetenként tévesen *P. canis*, *P. stomatis* és *P. dagmatis* fajként azonosíthaták (Bisgaard és Mutters 1986; Forsblom és mtsai., 2002). Korczak és mtsai. (2014) 24 Bisgaard taxon 16-ként azonosított törzset vetettek alá részletes biokémiai, genetikai és filogenetikai vizsgálatnak, melynek eredményeképpen a törzsek elkülöníthetők voltak a *Pasteurellaceae* család meglévő nemzetségeitől. Mindezek alapján egy új genus és faj létrehozását javasolták *Frederiksenia canicola* néven. A *Pasteurellaceae* családba tartozó *Frederiksenia* genus egyetlen tagja jelenleg a *F. canicola*. A baktérium izolálható egészséges és légzőszervi vagy genitális fertőzéssel küzdő kutya felső légúti és nemi nyálkahártyájáról, kutyaharapásokból, de macska, oroszlán és sün eredetű mintákból is kimutatták (Korczak és mtsai., 2014), újabb vizsgálatok során pedig tasmán ördög és egyéb erszényesek *F. canicola* hordozását is bizonyították (Brix és mtsai., 2015; Hansen és mtsai., 2017).

A *F. canicola* 24 órás aerob inkubáció után véres agaron 1,5-2 mm átmérőjű kerek, -nem hemolizáló telepeket alkot, melyek enyhén domborúak és nem tapadnak a médiumhoz. A telepek fényesek, átlátszóak, szürkés, vagy ritkán sárgás árnyalattal, felszínük sima (1. ábra). A sejtek Gram-negatív, nem motilis egyenes vagy görbült pálcák. Az oxidáz, kataláz és indol próbában pozitívak, ureáz próbában negatívak (Korczak és mtsai., 2014).

#### 4.3.3. *Haemophilus* genus

A *Haemophilus* (Winslow és mtsai., 1917) a *Pasteurellaceae* családba tartozó genus, melyet gyakran említünk az egyébként szintén ebbe a családba tartozó *Histophilus* genussal együtt (Angen és mtsai., 2003), a genusok egyes tagjai között felfedezhető hasonlóságok miatt. Az említett genusokba tartozó fajok jól ismertek a haszonállatokban jellegzetes betegséget előidéző fakultatív kórokozóként. A *Histophilus somni* például tünetmentesen is gyakran van jelen bika spermájában (Humphrey és mtsai., 1982), de okozhat szarvasmarhában nagy mortalitással járó thromboemboliás meningoencephalitist, továbbá jelentős szerepe van pneumonia, abortus, vaginitis és endometritis kialakításában is (Kennedy és mtsai., 1960; Stephens és mtsai., 1981). A *H. somnival* közeli rokonságban álló *Haemophilus agnit* bárányok septicaemiáját okozó mikroorganizmusként írták le 1958-ban (Kennedy és mtsai., 1958). A *Histophilus ovis* nevű baktérium változatos kórképeket okozhat juhokban (Rahaley és mtsai., 1977; Dodd és mtsai., 1955).

A fent említett három baktérium faj meglehetősen hasonló elváltozásokat okoz, jellegzetesen necrotizáló vasculitist, thrombosit, septicus infarctust. Bár külön genusokba tartoznak, szoros rokonsági kapcsolatuk miatt ezeket a baktérium fajokat *Haemophilus-*

*Histophilus (HH)*- csoport tagjaiként emlegetik. A csoport egyik lényeges tulajdonsága, hogy tagjai legalább két közös antigénnel rendelkeznek (Stephens és mtsai., 1983).

A *HH*-csoporttal csak egy közös antigént mutató, így a csoportba nem tartozó *Haemophilus haemoglobinophilus* főként kutyák nemi nyálkahártyáin jelenlévő fakultatív patogén mikroorganizmus, mely ritkán, bizonyos körülmények között kóros nemi szervi elváltozásokban és kölykök megnövekedett korai mortalitásában játszhat szerepet (Maclachlan és Hopkins, 1978). A *H. haemoglobinophilus* Friedberger írta le először, aki kutyák praeputiumából izolálta a baktériumot (Friedberger, 1903), majd 1972-ben Joyce Frazer és K. B. Rogers elsőként publikált olyan esetet, melyben a *H. haemoglobinophilus* humán megbetegedést, otitis mediát okozott (Frazer és Rogers, 1972).

#### **4.4. *Neisseria* genus**

A *Neisseria* genus a *Neisseriaceae* családba tartozó, Gram-negatív, kis méretű coccoid baktériumokat magába foglaló csoport. A genus tagjai közül az első fajt, a *Neisseria gonorrhoeae*-t Albert Neisser írta le, aki gonorrhoeás férfiak és nők húgyúti exsudatumából izolálta a baktériumot (Neisser, 1879). A következő leírt *Neisseria* faj a *N. meningitidis* volt, amelyet Weichselbaum (1887) izolált meningitises betegek cerebrospinális folyadékából. A *N. meningitidis*, a rendelkezésre álló vakcinák ellenére gyakran áll a meningitis és septicaemia háttérében, míg a *N. gonorrhoeae* az utóbbi évtizedben egyre szélesebb körű antibiotikumrezisztenciát mutat, ezért már felkerült az emberiségre legnagyobb fenyegetést jelentő kórokozókat számontartó CDC urgent threats listára is (<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>).

Azóta kiderült, hogy az állatvilágban is széles körben előfordulnak *Neisseria* fajok. Förster és mtsai. (2007) például legyekből mutatták ki a genus tagjait. Murphy és mtsai. (2005) két kacsafaj bélsarából izoláltak *Neisseria* fajokat. Emlősökön végzett vizsgálatok során pedig egészséges rhesusmajmok oropharyngealis mintájából volt kimutatható több *Neisseria* faj (Carrier és mtsai., 2009).

A kutatások természetesen kiterjedtek kutyákra és bár ritkábban, de macskák *Neisseria* hordozását is vizsgálták. Beagle kutyák orr- és garatmintáiból izoláltak *Neisseria flavescens* és *Neisseria sicca* baktériumot (Clapper és Meade, 1963), és egy felmérés során kilenc egészséges kutya foglepedékéből azonosítottak *Neisseria weaveri* és *Neisseria canis* (Elliott és mtsai., 2005). A *N. weaveri* faj a kutyák orális mikroflórájának természetes lakója

(Holmes és mtsai., 1993), de különböző humán megbetegedésekből is izolálták már (Panagea és mtsai., 2002; Capitini és mtsai., 2002). Macskák esetében kevesebb vizsgálatról számoltak be (Dolieslager és mtsai., 2011).

A *Neissériák* hordozása azonban állatokban sem mindig tünetmentes. Több vizsgálat bizonyítja például, hogy a *Neisseria animalis* és *Neisseria zoodegmatis* baktériumfajok betegséget okozhatnak házimacskában (Corboz és mtsai., 1993; McParland és mtsai., 1982) és nagymacskafélékben egyaránt (Lloyd és Allen, 1980), de kutyák körében is írtak már le *Neisseria* fajok által okozott megbetegedést (Cantas és mtsai., 2011; Corboz és mtsai., 1993; McParland és mtsai., 1982). Az utóbbi években több új fajt is leírtak: a *Neisseria shayeganiit* és *Neisseria wadsworthiit* (Wolfgang és mtsai., 2011) és a *Neisseria dumasianat* (Wroblewski és mtsai., 2017).

A *Neisseria* fajok véres agaron 1-2 mm átmérőjű, lapos, nedves, változatos pigmenttermelési képességüktől függően szürke, sárgás vagy narancssárgás, nem hemolizáló telepeket alkotnak. MacConkey táptalajon nem, vagy gyengén képesek növekedésre (1. ábra). A sejtek Gram-festéssel való megfestése után Gram-negatív, nem motilis coccoid pálcákat láthatunk, melyek egyedül, párban vagy rövid láncokban helyezkedhetnek el. A kataláz és oxidáz tesztben jellemzően pozitívak, indoltesztben negatívak, a nitrátot nitritté redukálják (Wroblewski és mtsai., 2017; Wolfgang és mtsai., 2011; Panagea és mtsai., 2002).

#### **4.5. *Bordetella bronchiseptica***

A múlt század derekáig a *Bordetella* genus tagjai között a humán szempontból nagy jelentőségű *Bordetella pertussis*, a szamárköhögés kórokozója volt a leginkább tanulmányozott faj. A *Bordetella bronchiseptica* vizsgálata az állati légzőszervi betegségekben játszott szerepének felismerésével vált intenzívebbé, miután ezek a betegségek egyre nagyobb jelentőségűnek bizonyultak kutyában, sertésben és laboratóriumi állatokban is. A *B. bronchisepticát* első alkalommal Ferry izolálta szopornyicás kutya légutaiból, és *Bacillus bronchicanisként* írta le (Ferry, 1910). Ezt több név- és genusváltás követte, melyek közül megemlítenéd, hogy a biokémiai, morfológiai és növekedési jellemzői miatt egy időben *Haemophilus bronchisepticus* néven a *Pasteurellaceae* családba tartozó *Haemophilus* genusba sorolták (Goodnow, 1980). A mai nevét és besorolását Moreno-López (1952) javasolta.

A baktériumot számos állatfajból izolálták már, többek között kutyákból (Ferry, 1910), macskákból (Snyder és mtsai., 1973), majmokból (Graves, 1968), tengerimalacokból, nyulakból (M'Gowan, 1911) és erszényesekből (McKenzie és mtsai., 1979). Néhány alkalommal emberben diagnosztizáltak bordetellosist, azonban az ember nem mondható a baktérium természetes gazdájának (Hemsworth és mtsai., 2006; Winsser, 1960).

Sertéseknél jól ismert betegség a torzító orrgyulladás, melyet először Franque írt le olyan sertéseken, melyeken atrofizált és jelentősen torzult orrcsontokat és ethmoid turbinákat lehetett látni (Franque, 1830). A *B. bronchiseptica* betegségben való szerepét azonban csak később sikerült bizonyítani (Switzer, 1956).

Kutyákban a *B. bronchiseptica* a nagyon ragályos, bármilyen korú kutyát megbetegíteni képes fertőző tracheobronchitis, vagyis a kennelköhögés komplex leggyakrabban izolált kórokozója (Keil, 1998). Fontos hangsúlyozni, hogy ezt a betegséget is általában több vírus és baktérium légutakban való együttes jelenléte idézi elő (Appel, 1976). Macskákbán a *B. bronchiseptica* ritkán található meg kórokozóként. Egy kutatás szerint a megvizsgált macskák 10%-a szenvedett *B. bronchiseptica* által okozott pneumoniában, vagy volt hordozója a baktériumnak (Fisk és Soave, 1973), egy másik tanulmányban pedig 127 légzőszervi betegség tüneteit mutató macska 10%-ból mutattak ki *B. bronchisepticát* (Snyder és mtsai., 1973), de a baktérium macskákbán való jelenléte és megbetegítő képessége máig nem teljesen tisztázott.

A baktérium véres agaron 1-2 mm nagyságú, kerek, fénylő, szürke színű, különböző mértékben hemolizáló telepeket képez (1. ábra). A *B. bronchiseptica* MacConkey táptalajon is képes növekedésre, melyen nagyon kicsi, laktózt nem fermentáló sárga telepekben nő. A sejtek gram-negatív, nem motilis rövid pálcák. A kataláz, oxidáz, valamint ureáz próbában pozitív eredményt ad, a nitrátot nitritté redukálja (Vaid és mtsai., 2018).

## 5. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 5.1. A kutatásban részt vevő állatok

A kutatás keretein belül 2018.04.09. és 2019.05.07. között 8 macskától és 48 kutyától vettünk összesen 130 mintát. Kutyák esetében 50 orrtampon mintát vizsgáltunk, tekintve, hogy két esetben ismételt mintavétel is történt. A kutyák garatmintáinak száma 44, bronchoalveolaris mosófolyadék (bronchoalveolar lavage, BAL) mintáinak száma 17 volt. Macskák között 8 esetben vettünk orr- és garattampon mintát, valamint 3 esetben BAL mintát is. Az állatok kiválasztása véletlenszerűen történt, fajtától, kortól, ivartól és tartási körülményektől függetlenül. Köztük egyaránt fordultak elő krónikus légzőszervi betegséggel küzdő, valamint ilyen szempontból egészséges kutyák és macskák. A beteg állatok között fertőző és nem fertőző betegségek, mint brachycephal szindróma, daganatos megbetegedés, fejlődési rendellenességek is diagnosztizálhatók voltak.

### 5.2. Endoszkópos vizsgálat, mintavétel

A munkámhoz szükséges mintavételeket az Állatorvostudományi Egyetem Belgyógyászati Tanszék és Klinika Endoszkóp Laboratóriumába érkezett kutyákból és macskákból végeztük. Az állatok altatásához intravénásan 0,25 mg/kg dózisban diazepamot (Seduxen® 5 mg/ml oldatos injekció, Richter Gedeon, Budapest, Magyarország), 0,05 mg/10 kg dózisban dexmedetomidin- hidrokloridot (Sedadex 0,5 mg/ml oldatos injekció A.U.V., Le Vet Beheer B.V., Oudewater, Hollandia) és 2-3 mg/kg dózisban propofolt használtunk (Propofol 1% MCT/LCT Fresenius emulzió injekcióhoz vagy infúzióhoz, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Németország). Az orr- és garattampon minták levételéhez endoszkópra nem volt szükség. Az orrtampon minta levételéhez a bódított állatok orrtükrének felszínét alkoholos fertőtlenítővel (BradoDerm Soft műtési kézfertőtlenítő szer, Florin Vegyipari és Kereskedelmi Rt., Magyarország) átitatott gézzel fertőtlenítettük, majd a transzport táptalajhoz tartozó tampont (Sterile transport swab, COPAN ITALIA Spa, Italy) az alsó orrjáratba vezetve vettünk mintát. A garattampon levételénél a bódított állatok száját szájterpesztővel tartottuk megfelelő mértékben nyitva, majd a tampont a plica semilunaris alá vezetve vettünk mintát a tonsilla felszínéről, ügyelve arra, hogy a mintavevő a szájnyálkahártya más területeihez ne érjen

hozzá. A váladékmintát tartalmazó tamponokat ezután steril transzport táptalajokba helyeztük. A BAL minták vételéhez legtöbb esetben videobronchoszkópot (Karl Storz 11900BP, Tuttlingen, Germany), 5 kg alatti kutyák és macskák esetében pedig fiberoszkópot (Karl Storz 60003VB1, Tuttlingen, Germany) használtunk. A mintavételhez az alsó légutakba endoszkóppal 5-10 ml steril sóoldatot (SALSOL oldatos infúzió, TEVA Gyógyszergyár Zrt., Debrecen, Magyarország) juttattunk, majd a folyadékot visszaszívva a steril transzport táptalajra fecskendeztük azt. A transzport táptalaj előzetes gyógyszeres kezeléstől függően lehetett aktív szén-tartalmazó, vagy anélküli médium.

### 5.3. Baktériumizolálás

A transzport táptalajon szállított minták az Agrártudományi Kutatóközpont Állatorvostudományi Intézet légzőszervi bakteriológiai csoport laboratóriumában 24 órán belül kerültek feldolgozásra. Ennek első lépéseként a tamponmintákat háromféle táptalajra oltottuk le. Az 5% defibrinált juhvérrel kiegészített Columbia agar (LAB M Ltd., Bury, UK), mint általános táptalaj, a legtöbb baktérium izolálására alkalmas. A vankomicinnel, amfotericin B-vel, klindamicinnel és gentamicinnel kiegészített antibiotikus véres Columbia agart a *Pasteurellaceae* családba tartozó baktériumok szelektív izolálására alkalmas táptalajként, míg a vankomicinnel, amfotericin B-vel, linkomicinnel és cefalexinnel kiegészített MacConkey táptalajt a *B. bronchiseptica* szelektív izolálására alkalmas táptalajként használtuk a baktériumok tenyésztésére. A Columbia agar táptalajokra felvitt mintákat 24, a MacConkey táptalajra felvitt mintákat pedig 48 órán keresztül 37 °C-on 5 V/V% CO<sub>2</sub> koncentráció mellett inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után telep morfológia alapján értékeltük a tenyészeteket. Az ekkor általában jellemző vegyes tenyészetek esetében a különböző morfológiájú egyes telepekből vérrel kiegészített Columbia agarra történő továbboltással szintenyészeteket alakítottunk ki, melyeket a fent leírt módon történő inkubáció után értékeltünk. A további vizsgálatokat minden esetben szintenyészetekből végeztük.

## 5.4. PCR, agaróz gélelektroforézis

### 5.4.1. PCR-termék előállítás

A tenyésztést követő PCR-vizsgálat első lépéseként vizsgálható templátot állítunk elő az ismeretlen baktériumtenyészetből. A folyamat során minden vizsgált törzs friss szintenyészetéből egy kacsnyi baktériumot 50 µl PCR vízben (VWR) szuszpendáltunk, vortexeltünk, majd 20 percig 99 °C-on PCR gépben (Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler, Hercules, CA, USA) forraltunk. Ezt követően a baktériumszuszpenziót 12500 rpm-en 5 percig centrifugáltuk, hogy a forralásos módszer során keletkezett sejttörmelék elváljon a felülúszóban található DNS-től. A felülúszót steril csövekbe pipettáztuk át és a PCR reakciókban ezt használtuk templát DNS-ként. A laboratóriumban a *F. canicola*, *P. multocida* és *B. bronchiseptica* azonosítására alkalmas PCR reakciókat alkalmaztuk (1. és 2. táblázat). A *F. canicola* fajazonosító PCR esetében a multiplex rendszer összeállítását és a hőprofil beállítását Korczak és mtsai. (2014) publikációja alapján végeztük el. A *P. multocida* fajazonosító PCR-vizsgálatához szükséges beállításokat Townsend és mtsai. (1998), a *B. bronchiseptica* PCR- vizsgálatához szükséges beállításokat pedig Hozbor és mtsai. (1999) publikációja alapján végeztük.

	<i>Pasteurella multocida</i>			<i>Frederiksenia canicola</i>			<i>Bordetella bronchiseptica</i>			16S rRNS szekvencia-analízis			<i>rpoB</i> szekvencia-analízis		
	T	t	i	T	t	i	T	t	i	T	t	i	T	t	i
<b>Kezdeti denaturálás</b>	95	5'	1	94	3'	1	94	3'	1	94	10'	1	94	3'	1
<b>Denaturálás</b>	95	1'	35	94	30"	35	94	30"	30	94	30"	30	94	30"	35
<b>Primer kötődés</b>	55	1'		50	30"		53	30"		55	45"		54	30"	
<b>Elongáció</b>	72	1'		72	1'		72	30"		72	90"		72	30"	
<b>Végső elongáció</b>	72	10'	1	72	7'	1	72	5'	1	72	7'	1	72	7'	1

**1. táblázat:** A PCR vizsgálatok hőprofilja

ahol T = hőmérséklet °C-ban, t = idő percben ('), illetve másodpercben (''), i= ciklusszám

	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Frederiksenia canicola</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	16S rRNS szekvenciaanalízis	<i>rpoB</i> szekvenciaanalízis
Desztillált víz	15,7 µl	18,0 µl	16,5 µl	17,0 µl	18,4 µl
10X PCR puffer	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0,5 µl	0,5 µl	1,2 µl	1,2 µl	0,5 µl
10 mM dNTP	0,5 µl	0,5 µl	1,0 µl	1,0 µl	0,5 µl
5U/µl DreamTaq	0,3 µl	0,3 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,3µl
DMSO	-	-	2,0 µl	1,3 µl	-
Templát DNS	5,0 µl	2,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	2,0 µl
Primerek	0,25 µl 50 µM KMT1T7 primer	0,4 µl 10 µM recN_Fred-1 primer	0,3 µl 50 µM fwd primer	0,4 µl 10 µM 27F primer	0,4 µl 10µM Pasrpob-L primer
	0,25 µl 50 µM KMT1SP6 primer	0,4 µl 10 µM recN_first-L primer	0,2 µl 50 µM rev primer	0,4 µl 10 µM 1512R primer	0,4 µl 10µM Rpob-R primer
	-	0,4 µl 10 µM recN_first-R primer	-	-	-

2. táblázat: PCR vizsgálathoz szükséges Master mixek összetétele



### 5.4.2. Elektroforézis

A PCR-termékeket végül agaróz gélelektroforézissel tettük láthatóvá. Ehhez először 50 ml 1,5%-os agarózgélt készítettünk por állagú agaróz (SeaKem® LE Agarose, Lonza) és egyszeres hígítású Tris-Bórsav-EDTA (AccuGENE™ TBE) puffer felhasználásával, amihez DNS-festéket (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, Biotum) adtunk. Az elektroforézist az egyes baktériumok esetében különböző feszültségen és ideig, eltérő méretű DNS-szakaszok kimutatására alkalmas molekulásúly marker mellett végeztük (3. táblázat). A *P. multocida* és *F. canicola* vizsgálatánál Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (100 – 3000 bp), míg *B. bronchiseptica* PCR esetében Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder (100 – 1000 bp) molekulásúlymarkert használtunk. A művelet végeztével a PCR-termékeket UV-megvilágítás alatt detektáltuk a markerhez viszonyítva (2. ábra). A fajspecifikus PCR-termék mérete *F. canicola* esetében 749 bp (Korczak és mtsai., 2014), a *P. multocidánál* 460 bp (Townsend és mtsai., 1998) és a *B. bronchisepticánál* 237 bp (Hozbor és mtsai., 1999).

	Molekulásúly marker	Futtatás körülményei		PCR termék mérete
		Feszültség	Idő	
<i>Pasteurella multocida</i>	100-3000 bp GeneRuler	90V	50 perc	460 bp
<i>Frederiksenia canicola</i>	100-3000 bp GeneRuler	90V	50 perc	749 bp
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	100-1000 bp GeneRuler	90V	45 perc	237 bp
16S rRNS szekvenciaanalízis	100-3000 bp GeneRuler	90V	60 perc	~1500 bp
<i>rpoB</i> szekvenciaanalízis	100-1000 bp GeneRuler	90V	60 perc	560 bp

3. táblázat: Az agaróz gélelektroforézis fontosabb paraméterei

A PCR-vizsgálat eredményeit Microsoft Excel 2007 programmal táblázatos formában rögzítettük. A táblázatban feltüntettük a minta sorszámát, a mintavétel dátumát, az állat fajtát, illetve kórházi törzsszámát, a minta típusát (orr, garat vagy BAL), valamint az egyes táptalajokról izolált baktériumokat.

## 5.5. 16S rRNS szekvenanciaanalízis

Amennyiben a laboratóriumban végzett vizsgálat eredménye negatív lett, vagy a telepmorfológia alapján eleve nem volt valószínű, hogy a laboratóriumban azonosítható baktériumról van szó, további vizsgálatokat végeztünk. Ehhez először a fentebb leírtakkal megegyezően templátot állítottunk elő az ismeretlen baktériumtenyészetből, majd elvégeztük a 16S riboszómális RNS génjére specifikus PCR reakciót (1. és 2. táblázat). A PCR-termék tisztaságát agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (3. táblázat), a megfelelő tisztaságú mintákat pedig a Macrogen Europe szekvenáló cégnek továbbítottuk.

A szekvenálási eredmény elemzése utáni besorolás alapja az volt, hogy az adott szekvenciához hasonló, ismert organizmusokból származó szekvenciákat kerestünk egy annotált referencia-adatbázisban lokális szekvencia illesztéssel, az online elérhető Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) program felhasználásával (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

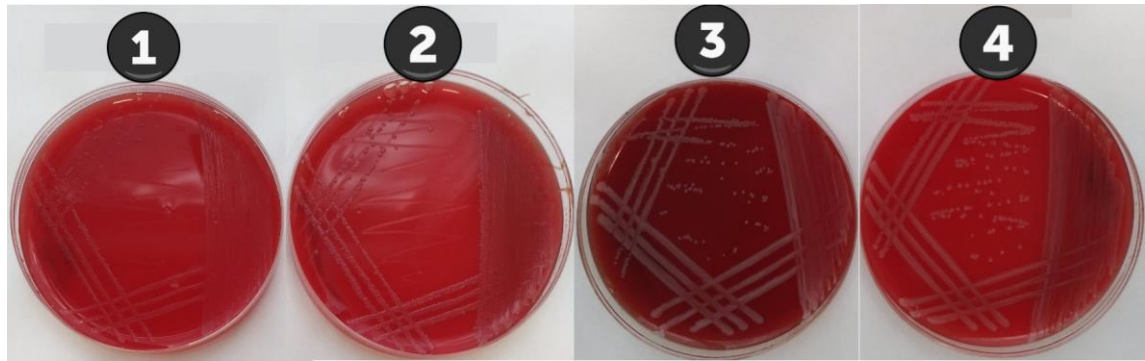
## 5.6. Filogenetikai vizsgálat

A *Pasteurellaceae* és *Neisseriaceae* családba tartozó baktérium izolátumokat végül az RNS polimeráz béta alegységét kódoló génszakasz (*rpoB*) szekvenanciaanalízisével is megvizsgáltuk. A 560 bp hosszúságú génszakasz vizsgálatát a Korczak és mtsai. (2004) publikációjában leírtak alapján végeztük. A folyamat során a 16S rRNS szekvenanciaanalízishez hasonlóan PCR reakciót végeztünk (1. és 2. táblázat), a PCR-termékeket gél elektroforézissel mutattuk ki (3. táblázat), majd a Macrogen Europe szekvenáló cégnek továbbítottuk azokat. A kapott szekvenciákon hasonlóság vizsgálatot végeztünk, mely során a nukleinsav szekvenciákat egymás alá illesztettük úgy, hogy a lehető legtöbb pozícióban azonos nukleotidok legyenek. Az illesztést a Geneious Prime programmal végeztük el, a Clustal W algoritmus használatával. Az illesztett szekvenciákkal a MEGA7 program segítségével egy filogenetikai fát készítettünk, távolság alapú fát számító Neighbor-Joining módszerrel.

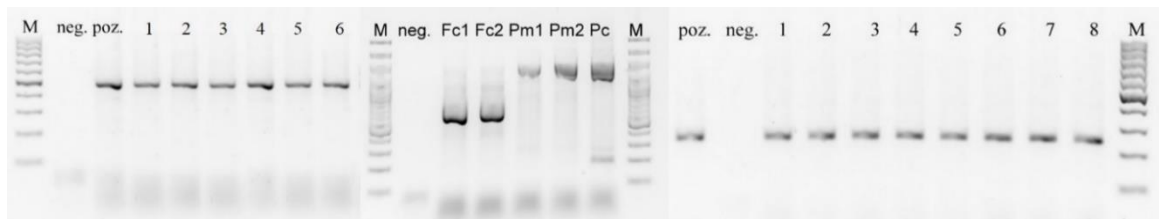
## 6. EREDMÉNYEK

### 6.1. Összesített mintaeredmények

A vizsgálatok során a 48 kutyától és 8 macskától összegyűjtött 130 mintából összesen 35 különböző baktériumot sikerült faj szinten azonosítani. Az izolált mikroorganizmusok közül a vizsgálataim alapját képező *Pasteurellaceae* és *Neisseriaceae* családba 5-5 faj tartozott (4. táblázat). A munkám szempontjából lényeges baktériumok közül legnagyobb arányban a *F. canicolát*, összesen 19 kutyából származó 21 mintából mutattuk ki. Legnagyobb számban, összesen 18 esetben a minta a garatból származott, ezek közül két kutyánál a garat mellett az orrüregből is kimutatható volt, egy esetben pedig csak a BAL mintából izoláltuk a baktériumot. A *Pasteurellaceae* családból a második leggyakrabban kimutatott baktérium a *P. multocida* volt, melyet összesen 8 mintából izoláltunk. Ezek közül 4 kutyában a garatból, 2 kutya orrából és 2 macska garatjából származott. *P. canis* összesen 5 kutya garat, *P. dagmatis* pedig 1 kutya orrmintából volt izolálható. A szintén *Pasteurellaceae* családba tartozó *H. haemoglobinophilus* baktériumot csak kutya garatból származó mintákból tudtuk kimutatni, összesen 7 esetben. *B. bronchisepticát* 6 mintából izoláltunk, melyeket összesen 4 kutyából gyűjtöttünk. Egy kutya esetében az orr, garat és BAL mintából is izolálható volt a baktérium, 3 kutyának csak az orrából volt kimutatható a mikroorganizmus. A *Neisseria* genus tekintetében a leggyakrabban izolált faj a *N. weaveri* volt, ami 8 garatmintából volt kimutatható, melyek közül 1 minta macskából, 7 minta pedig kutyából származott. *N. dumasianát* 5, *N. canist* 1 kutya garatmintából, *N. shayeganiit* 1 macska garatmintából mutattunk ki, míg a *N. zoodegmatist* egy kutya és egy macska garatmintából is izoláltuk (5. táblázat).



1. ábra: 1: *P. multocida* 2: *F. canicola* 3: *B. bronchiseptica* 4: *N. weaveri* tenyészetek véres agaron



2. ábra: Elektroforézis eredmények sorban *P. multocida*, *F. canicola* és *B. bronchiseptica* vizsgálatokor

Ezen baktérium családok mellett számos más baktérium is izolálható volt. Legtöbb esetben valamilyen *Enterobacterium*, főként *Escherichia coli* nőtt ki a táptalajon, de 11 esetben *Streptococcus* törzsek is megjelentek az izolátumban. Ezek között 7 esetben *Streptococcus canis*, 3 esetben *Streptococcus fryit*, egy esetben pedig egyéb *Streptococcus* törzset azonosítottunk. *Staphylococcus* törzsek közül a *Staphylococcus pseudintermedius* 6 esetben, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri* 1-1 esetben nőtt ki a médiumon. *Pseudomonas aeruginosa* baktériumot 1 macska orrmintájából és 7 kutya mintából izoláltunk. A baktériumhordozó kutyák között 4-nél csak garatból, 1-nél csak orrból volt izolálható a baktérium, két esetben azonban az orrból és a garatból egyaránt kimutattuk. További *Pseudomonas* törzseket kutya garatból izoláltunk, egy esetben *Pseudomonas mendocinát*, egy esetben pedig *Pseudomonas parafulvát* (4. és 5. táblázat). Ezeken a törzseken kívül egy-egy esetben kevésbé ismert baktériumok is megjelentek, melyeket fajok szerint csoportosítva mutatok be.

	Kutya		Macska		Összesen	
	db	%	db	%	db	%
<i>Frederiksenia canicola</i>	21	18,9	0	0	21	16,2
<i>Streptococcus species</i>	11	9,9	1	5,3	12	9,2
<i>Escherichia coli</i>	11	9,9	0	0	11	8,5
<i>Pseudomonas species</i>	9	8,1	1	5,3	10	7,7
<i>Staphylococcus species</i>	8	7,2	1	5,3	9	6,9

Egyéb <i>Enterobacterium species</i>	9	8,1	0	0	9	6,9
<i>Pasteurella multocida</i>	6	5,4	2	10,5	8	6,2
<i>Neisseria weaveri</i>	7	6,3	1	5,3	8	6,2
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>	7	6,3	0	0	7	5,4
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	6	5,4	0	0	6	4,6
<i>Pasteurella canis</i>	5	4,5	0	0	5	3,8
<i>Neisseria dumasiana</i>	5	4,5	0	0	5	3,8
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	3	2,7	0	0	3	2,3
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0,9	2	10,5	3	2,3
<i>Raoultella planticola</i>	1	0,9	2	10,5	3	2,3
<i>Rothia nasimurium</i>	3	2,7	0	0	3	2,3
<i>Neisseria zoodegmatis</i>	1	0,9	1	5,3	2	1,5
<i>Bacillus cereus</i>	2	1,8	0	0	2	1,5
<i>Pasteurella dagmatis</i>	1	0,9	0	0	1	0,8
<i>Neisseria shayegani</i>	0	0	1	5,3	1	0,8
<i>Neisseria canis</i>	1	0,9	0	0	1	0,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0,9	0	0	1	0,8
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	0	0	1	5,3	1	0,8
<i>Delftia lacustris</i>	0	0	1	5,3	1	0,8
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	1	0,9	0	0	1	0,8
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	0,9	0	0	1	0,8
<i>Acinetobacter radiotolerans</i>	1	0,9	0	0	1	0,8
<i>Cardiobacterium canine oral taxon</i>	1	0,9	0	0	1	0,8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0,9	0	0	1	0,8
<i>Macrococcus canis</i>	1	0,9	0	0	1	0,8
<i>Moraxella canis</i>	1	0,9	0	0	1	0,8
Vizsgált állat	<b>48</b>		<b>8</b>		<b>56</b>	
Minták száma összesen	<b>111</b>		<b>19</b>		<b>130</b>	

4. táblázat: Az izolált baktériumok fajok szerint csoportosítva

	Orr		Garat		BAL		Összesen
	db	%	db	%	db	%	
<i>Frederiksenia canicola</i>	2	3,4	18	34,6	1	5,0	<b>21</b>
<i>Streptococcus species</i>	1	1,7	10	19,2	1	5,0	<b>12</b>
<i>Escherichia coli</i>	2	3,4	9	17,3	0	0	<b>11</b>
<i>Pseudomonas species</i>	6	10,3	4	7,7	0	0	<b>10</b>
<i>Staphylococcus species</i>	8	13,8	1	1,9	0	0	<b>9</b>
Egyéb <i>Enterobacterium species</i>	2	3,4	6	11,5	1	5,0	<b>9</b>
<i>Pasteurella multocida</i>	2	3,4	6	11,5	0	0	<b>8</b>
<i>Neisseria weaveri</i>	0	0	8	15,4	0	0	<b>8</b>

<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>	0	0	7	13,5	0	0	7
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4	6,9	1	1,9	1	5,0	6
<i>Pasteurella canis</i>	0	0,	5	9,6	0	0	5
<i>Neisseria dumasiana</i>	0	0	5	9,6	0	0	5
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2	3,4	1	1,9	0	0	3
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	2	3,8	1	5,0	3
<i>Raoultella planticola</i>	0	0	2	3,8	1	5,0	3
<i>Rothia nasimurium</i>	2	3,4	1	1,9	0	0	3
<i>Neisseria zoodegmatis</i>	0	0	2	3,8	0	0	2
<i>Bacillus cereus</i>	2	3,4	0	0	0	0	2
<i>Pasteurella dagmatis</i>	1	1,7	0	0	0	0	1
<i>Neisseria shayeganii</i>	0	0	1	1,9	0	0	1
<i>Neisseria canis</i>	0	0	1	1,9	0	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1,7	0	0	0	0	1
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	1	1,7	0	0	0	0	1
<i>Delftia lacustris</i>	0	0	0	0	1	5,0	1
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	0	0	1	1,9	0	0	1
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	1,7	0	0	0	0	1
<i>Acinetobacter radiotolerans</i>	1	1,7	0	0	0	0	1
<i>Cardiobacterium canine oral taxon</i>	1	1,7	0	0	0	0	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	0	0	1	5,0	1
<i>Macrococcus canis</i>	1	1,7	0	0	0	0	1
<i>Moraxella canis</i>	0	0	1	1,9	0	0	1
<b>Vizsgált állat</b>	<b>56</b>		<b>52</b>		<b>20</b>		<b>56</b>
<b>Minták száma összesen</b>	<b>58</b>		<b>52</b>		<b>20</b>		<b>130</b>

5. táblázat: Az izolált baktériumok mintatípusok szerint csoportosítva

## 6.2. Macskákból származó minták eredményei

A macskákból származó orrmintákból egy esetben *P. aeruginosát*, egy esetben *S. hominist*, egy esetben pedig *Brevibacterium frigoritoleranst* mutatott ki a szekvenálási eredmény.

Garatmintákból két esetben PCR-rel azonosítottunk *P. multocida* baktériumot. Szekvenálással egy esetben *N. weaveri*, egy esetben pedig *N. shayeganii* és *N. zoodegmatis* került kimutatásra. További egy esetben *Citrobacter freundii* és *Raoultella planticola* baktériumokat izoláltunk, melyek az érintett macska BAL-mintájában is megjelentek *Delftia*

*lacustris* baktériummal együtt. Macskákból származó BAL-minták között ez volt az egyetlen minta, amelyből mikroorganizmust tudunk kimutatni (6. táblázat).

	Orr		Garat		BAL		Összesen
	db	%	db	%	db	%	db
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	1	12,5	1	33,3	2
<i>Raoultella planticola</i>	0	0	1	12,5	1	33,3	2
<i>Neisseria weaveri</i>	0	0	1	12,5	0	0	1
<i>Neisseria shayegani</i>	0	0	1	12,5	0	0	1
<i>Neisseria zoodegmatis</i>	0	0	1	12,5	0	0	1
<i>Pseudomonas species</i>	1	12,5	0	0	0	0	1
<i>Staphylococcus species</i>	1	12,5	0	0	0	0	1
<i>Streptococcus species</i>	0	0	1	12,5	0	0	1
<i>Brevibacterium frigiditolerans</i>	1	12,5	0	0	0	0	1
<i>Delftia lacustris</i>	0	0	0	0	1	33,3	1
<b>Minták száma összesen</b>	<b>8</b>		<b>8</b>		<b>3</b>		<b>19</b>
<b>Vizsgált állat</b>	<b>8</b>		<b>8</b>		<b>3</b>		<b>8</b>

6. táblázat: Macskákból izolált baktériumok mintatípusok szerint csoportosítva

### 6.3. Kutyákból származó minták eredményei

Kutyákból származó orrmintákból a laboratóriumban végzett PCR módszerével 4 mintából *B. bronchisepticát*, 2 mintából *F. canicolát*, 2-ből pedig *P. multocidát* mutattunk ki. A szintén ebbe a genusba tartozó *P. dagmatist* egy mintából izoláltuk. A MacroGen szekvenáló cég közreműködésével további két mintából *Acinetobacter lwoffii*, egy mintából pedig *Acinetobacter radiotolerans* került kimutatásra. Két esetben *E. coli*, egy esetben *Klebsiella pneumoniae*, további egy esetben pedig nem fajszíntén meghatározott *Enterobacterium* lett kimutatva. A *Pseudomonas* genus tagjai közül legtöbbször *P. aeruginosa* fordult elő, mindösszesen 3 esetben, további egy-egy mintából *P. parafulva* és *P. mendocina* izolátumot azonosítottunk. A Gram-pozitív baktériumok közül 5 mintából sikerült *S. pseudointermediust*, további 1-1 mintából pedig *S. hominist*, *S. warnerit*, *S. canist* és *Macrococcus canist*, valamint két mintából *Bacillus cereust* izolálni. További 1-1 mintából *Pantoea agglomerans* és *Cardiobacterium*, két esetben pedig *Rothia nasimurium* nőtt ki (7. táblázat).

A kutya garatmintákból legtöbb esetben *F. canicolát* izoláltunk, összesen 18 mintából. *P. multocidát* 4, *B. bronchisepticát* 1 esetben mutattunk ki a laboratóriumban. *P. canis* 5 mintából volt izolálható. *H. haemoglobinophilust* 7, *P. aeruginosát* 6 mintából lehetett egyértelműen azonosítani. *E. colit* összesen 9, további egy mintából pedig *Escherichia hermanniit* azonosítottunk. *Neisseria* fajok közül legnagyobb arányban a *N. weaveri*, összesen 7 mintában volt jelen. Ezt követte a *N. dumasiana*, melyet 5 mintából izoláltunk, további 1-1 mintából pedig *N. canis* és *N. zoodegmatis* volt kimutatható. A garatmintáknál a Gram-pozitív baktériumok közül legnagyobb számban a *S. canis* 5 mintából, a *S. fryi* 3 mintából lett izolálva. További 1-1 esetben mutattunk ki *A. lwoffii*, *Delftia tsuruhatensis*, *R. nasimuriumot*, *R. planticolat*, *C. freundii*, *S. pseudointermediust* és *Moraxella canis* (7. táblázat).

A kutyákból vett BAL-minták közül egy-egy esetben izoláltunk *B. bronchiseptica*, *F. canicola*, *S. canis* és *Enterococcus faecalis* baktériumot, két-két esetben pedig *P. aeruginosát* és *Stenotrophomonas maltophiliát* (7. táblázat).

	Orr		Garat		BAL		Összesen	
	db	%	db	%	db	%	db	%
<i>Frederiksenia canicola</i>	2	4,0	18	40,9	1	5,9	21	18,9
<i>Streptococcus species</i>	1	2,0	9	20,5	1	5,9	11	9,9
<i>Escherichia coli</i>	2	4,0	9	20,5	0	0	11	9,9
<i>Pseudomonas species</i>	2	4,0	7	15,9	0	0	9	8,1
Egyéb <i>Enterobacterium species</i>	2	4,0	6	13,6	1	5,9	9	8,1
<i>Staphylococcus species</i>	7	14,0	1	2,3	0	0	8	7,2
<i>Neisseria weaveri</i>	0	0	7	15,9	0	0	7	6,3
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>	0	0	7	15,9	0	0	7	6,3
<i>Pasteurella multocida</i>	2	4,0	4	9,1	0	0	6	5,4
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4	8,0	1	2,3	1	5,9	6	5,4
<i>Pasteurella canis</i>	0	0	5	11,4	0	0	5	4,5
<i>Neisseria dumasiana</i>	0	0	5	11,4	0	0	5	4,5
<i>Rothia nasimurium</i>	2	4,0	1	2,3	0	0	3	2,7
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2	4,0	1	2,3	0	0	3	2,7
<i>Bacillus cereus</i>	2	4,0	0	0	0	0	2	1,8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	0	0	1	5,9	1	0,9
<i>Raoultella planticola</i>	0	0	1	2,3	0	0	1	0,9
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	2,0	0	0	0	0	1	0,9
<i>Pasteurella dagmatis</i>	1	2,0	0	0	0	0	1	0,9
<i>Neisseria zoodegmatis</i>	0	0	1	2,3	0	0	1	0,9

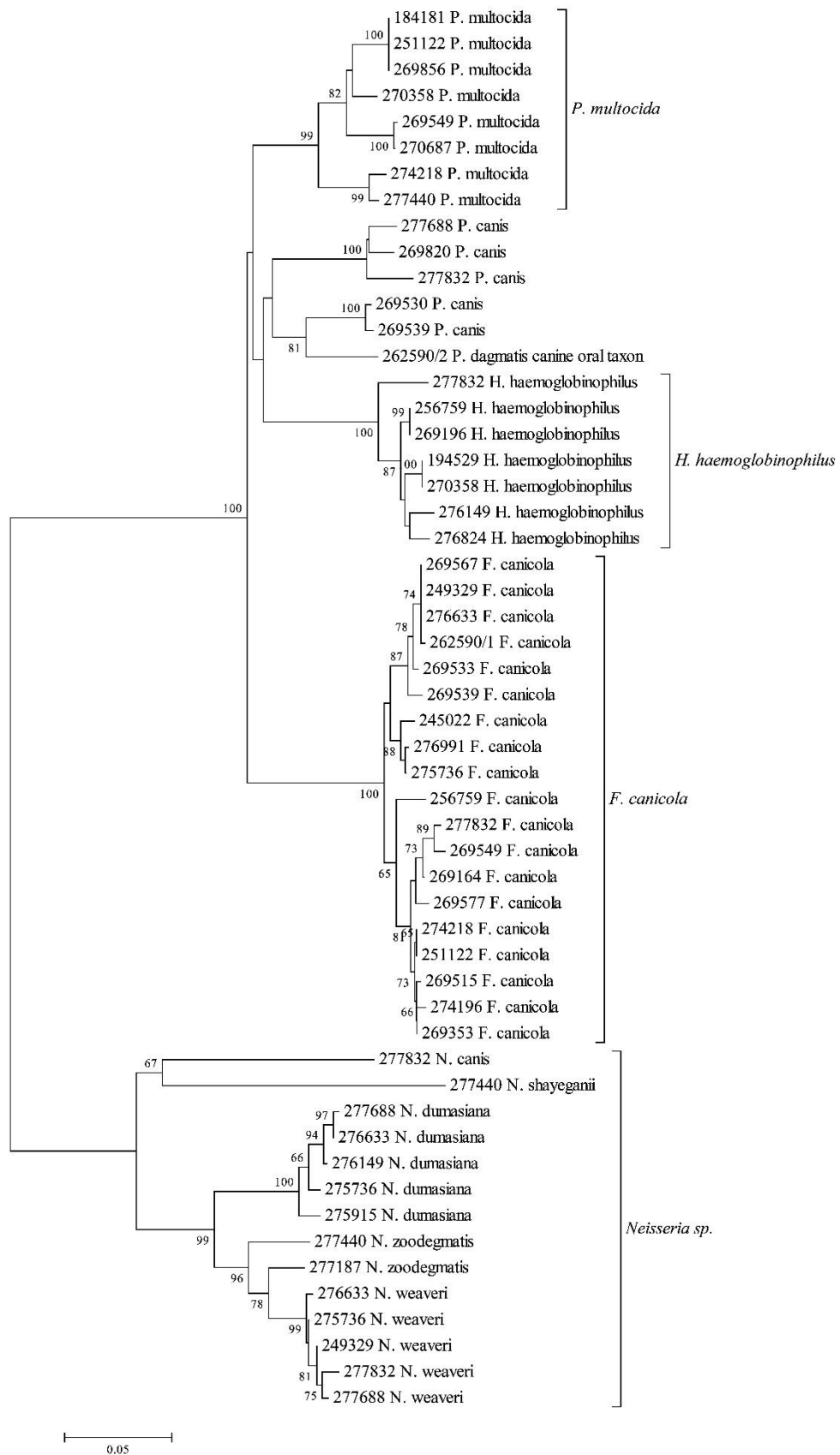


<i>Neisseria canis</i>	0	0	1	2,3	0	0	1	0,9
<i>Moraxella canis</i>	0	0	1	2,3	0	0	1	0,9
<i>Macrococcus canis</i>	1	2,0	0	0	0	0	1	0,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	2,0	0	0	0	0	1	0,9
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	0	0	1	2,3	0	0	1	0,9
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	1	2,3	0	0	1	0,9
<i>Cardiobacterium canine oral taxon</i>	1	2,0	0	0	0	0	1	0,9
<i>Acinetobacter radiotolerans</i>	1	2,0	0	0	0	0	1	0,9
<b>Vizsgált állat</b>	<b>48</b>		<b>44</b>		<b>17</b>		<b>48</b>	
<b>Minták száma összesen</b>	<b>50</b>		<b>44</b>		<b>17</b>		<b>111</b>	

7. táblázat: Kutyákból izolált baktériumok mintatípusok szerint csoportosítva

#### 6.4. Filogenetikai vizsgálatok eredményei

Az *rpoB* szekvenenciaanalízis során létrehozott filogenetikai fán a különböző fajok egymástól elkülönülő klasztereket alkottak (3. ábra). Az általunk felhasznált módszer (Korczak és mtsai., 2004) a *Pasteurellaceae* családba tartozó baktériumfajok *rpoB* génjének szekvenencia analízisére dolgozták ki, de munkánk során sikeresen alkalmaztuk a *Neisseriaceae* családba tartozó baktériumfajokra is. Vizsgálataink során több olyan baktériumfajt is azonosítottunk, melyek az elmúlt évtizedben kerültek leírásra, hazánkban pedig legjobb tudásunk szerint korábban nem azonosították őket, köztük a *F. canicolát* (Korczak és mtsai., 2014), *N. shayeganiit* (Wolfgang és mtsai., 2011), *N. dumasianát* (Wroblewski és mtsai., 2017).



**3. ábra:** A vizsgálataink során izolált *Pasteurellaceae* és *Neisseriaceae* családba tartozó baktériumtörzsek filogenetikai kapcsolatait ábrázoló törzsfá

## 7. MEGBESZÉLÉS

A magyarországi kutya- és macskapopulációk orr- és szájüregi mintáinak vizsgálata során kimutattuk, hogy ezeken a területeken bakteriológiai szempontból rendkívüli a diverzitás. 56 állattól levett 130 mintából összesen 35 különböző, véres agaron tenyésztethető baktériumfajt mutattunk ki, melyek között több faj is az elmúlt évtizedben írtak le (Korczak és mtsai., 2014; Wolfgang és mtsai., 2011; Wroblewski és mtsai., 2017). Ezek a fajok jellemzően Magyarországon még egyáltalán nem kerültek kimutatásra. Sajnálatos módon a közelmúltban történő leírás miatt kevés irodalmi adat áll rendelkezésre ezekről a fajokról. Kutatásunk bebizonyította, hogy ezek a nem rég leírt baktériumok jelen vannak a hazai társállatok orr- és szájüregében is, sőt egyes fajok kifejezetten elterjedtnek mondhatók. Ezt támasztja alá, hogy a legtöbb esetben, a minták 16,2%-ából egy 2014-ben leírt baktériumfajt, a *F. canicolát* izoláltuk, melyről csupán néhány publikáció áll rendelkezésünkre (Korczak és mtsai., 2014; Brix és mtsai., 2015; Hansen és mtsai., 2017). Hasonlóan a *F. canicolához*, a 2011-ben leírt *N. wadsworthii* és *N. shayeganii*, valamint a 2017-ben leírt *N. dumasiana* esetében is kevés információval rendelkezünk (Wolfgang és mtsai., 2011; Wroblewski és mtsai., 2017). Esetünkben *N. dumasianát* a kutya garatminták 11,4%-a tartalmazott, *N. shayeganii* a macska garatminták 12,5%-ban volt jelen, *N. wadsworthiit* azonban egy mintából sem tudtunk kimutatni.

Az állatok orrából származó minták esetében mind kutyák, mind macskák körében kisebb diverzitás és ritkább előfordulás volt jellemző, mint a garatminták közt, valamint jóval kisebb arányban jelentek meg a *Pasteurellaceae* és *Neisseriaceae* családok tagjai. Az 58 orrtampon mintából összesen 22 baktériumfajt izoláltunk 40 alkalommal, míg 52 garattampon mintából 24 baktériumfajt 93 esetben izoláltunk. Az orrüreg-mintákban leggyakrabban *Staphylococcus* (13,8%) és *Pseudomonas* (10,3%) genusba tartozó fajok voltak megtalálhatóak, míg a *Pasteurellaceae* és a *Neisseriaceae* család tagjai közül csupán a *F. canicola* (3,4%), *P. multocida* (3,4%) és *P. dagmatis* (1,7%) jelent meg igen kis arányban. Noha a garatmintáinkban a *Streptococcus* fajok jelentős arányban voltak jelen (19,2%), elsősorban *Pasteurellaceae* és *Neisseria* fajokat izoláltunk, mint a *F. canicola* (34,6%), a *H. haemoglobinophilus* (13,5%), a *P. multocida* (11,5%), a *P. canis* (9,6%), a *N. weaveri* (15,4%) és a *N. dumasiana* (9,6%).

Baktériumok legkevésbé az alsó légutakban fordultak elő. A 20 BAL mintából 8 fajt sikerült azonosítani, melyek közül a *F. canicola* és *B. bronchiseptica* fajokat ítéltük jelentősebbnek.

Az irodalmi adatokkal összevetve macskák esetében a Sturgeon és mtsai. (2014) által végzett vizsgálatokhoz hasonlóan itt is a *Proteobacteria* törzs tagjai domináltak a garatmintákban, 6 izolált baktériumfajból 5 ebbe a törzsbe tartozott (*N. weaveri*, *N. shayegani*, *N. zoodegmatis*, *R. planticola*, *C. freundii*), ám a törzsen belül kifejezetten nagy diverzitás nem volt megállapítható: az 5 faj közül 3 a *Neisseriaceae*, 2 az *Enterobacteriaceae* családba tartozott.

A macska orrüregi minták kis száma miatt nem lehet messzemenő következtetéseket levonni. A 8 mintából összesen 3 baktériumfajt izoláltunk. A Dorn és mtsai. (2017) által végzett vizsgálatokkal összehasonlítva csak egy esetben azonosítottunk az említett publikációban nagy arányban izolált *Staphylococcus*, azonban ezen kívül jelentősen eltérő baktériumfajok kerültek izolálásra a két vizsgálat során. A mi esetünkben például a macska orrüregi mintákból *Moraxella*, *Neisseria*, *Streptococcus* és *Pasteurella* baktériumokat egy esetben sem tudtunk kitenyészteni, pedig a 2017-ben végzett vizsgálatok során az egészséges macska orrüregi minták nagy részénél izoláltak *Moraxella* és *Neisseria*, beteg macskák orrüregi mintáiból pedig több esetben *Streptococcus* és *Pasteurella* fajokat.

A macskákból vett minták eredményei a munkám szempontjából lényeges baktériumfajok macskákban való előfordulásának megállapítására alkalmas volt, hiszen egy esetben egy hazánkban még nem izolált fajt, a *N. shayegani*-t (Wolfgang és mtsai., 2002) is kimutattunk, azonban az egyes baktériumok magyarországi elterjedtségéről helyes következtetéseket a kis mintaszám miatt nem lehet levonni. Ily módon ezek az eredmények további, a baktériumok hazai macskákban való elterjedtségének vizsgálatát célzó kutatások alapját képezhetik.

Kutyák között Dewhirst és mtsai. (2012) 148 különböző genusba sorolható baktériumot izoláltak, melyből 52 volt *Proteobacterium* (35,1%). Az 52 genusból 22 (42,3%) *Betaproteobacterium*, 18 pedig (34,6%) *Gammaproteobacterium* volt. Jelen kutatásban a kutyák szájüregéből 21 féle baktériumfajt izoláltunk, melyeket 15 genusba sorolhattunk. A munkánk során lényegesen kevesebb baktériumfajt izoláltunk, melynek feltehetően a szelektív táptalajon való tenyésztés az oka. Előfordulhat azonban, hogy az általunk vizsgált állatok légzőszervi baktériumainak diverzitása valamely okból kisebb, mint az említett felmérésben (pl. korábbi antibiotikumos kezelés). Ezt a kérdést azonban ebből a kísérleti elrendezésből kétséget kizáróan nem lehet megválaszolni. A 15 genus közül 12 (80%) a

*Proteobacteria* törzsbe tartozik, tehát jóval nagyobb volt a *Proteobacteriumok* aránya, mint a 2012-es vizsgálatokban. A 12 *Proteobacterium* közül pedig 9 (75%) a *Gammaproteobacteriumok*, 3 (25%) pedig a *Betaproteobacteriumok* közé tartozik, tehát a mi kutatásunkban, ellentétben a 2012-ben végzett vizsgálattal, jelentősen nagyobb arányban voltak jelen a *Gammaproteobacteriumok*, mint a *Betaproteobacteriumok*.

Isaiah és mtsai. (2017) által végzett vizsgálatokhoz hasonlóan jelen munkában is jelentős különbségek adódtak a kutyák orr- és garatmintái között. Az orrüregből származó mintákban, hasonlóan az említett szerzők által tapasztaltakhoz, legnagyobb arányban *Proteobacteriumok* jelentek meg: 15 különböző genusból 10 a *Proteobacterium*, 4 a *Firmicutes*, egy pedig az *Actinobacteria* törzsbe tartozott. A kutatás során a kutyák garatmintáiból is döntően *Proteobacteria* törzseket izoláltunk, azonban a két mintatípusból izolált fajok között jelentős különbségek adódtak. *F. canicola* például csupán 2 orr eredetű, viszont 18 garatmintából volt izolálható, ahogyan a *Neisseria*, a *Streptococcus* és az *Enterobacterium* fajok is nagyobb arányban jelentek meg a garatmintákban. A *Staphylococcus* fajok és a *B. bronchiseptica* azonban éppen az orrüregi mintákból voltak gyakrabban izolálhatók.

Olyan publikációk, melyek közelmúltban leírt fajok, mint például a *N. shayeganii*, *N. wadsworthii* (Wolfgang és mtsai., 2011), *N. dumasiana* (Wroblewski és mtsai., 2017) kutyákban és macskákban való előfordulási arányát vizsgálják, nem állnak rendelkezésünkre. A *F. canicola* előfordulási gyakoriságát is csak más állatfajokban vizsgálták (Brix és mtsai., 2015; Hansen és mtsai., 2017). Ezen baktériumok jelenlétének és elterjedtségének kimutatása a hazai kutya és macska populációkban egészen újszerű.

A BAL mintákból baktériumokat csak szórványosan lehetett izolálni, a 17 kutyától és 3 macskától származó mintából összesen 8 baktériumfajt azonosítottunk, vagyis mikrobiológiai szempontból az alsóbb légutak jelentősen fertőzéstől mentesebbnek bizonyultak a felső légutaknál, ami valószínűleg a felső légutak baktérium eliminációs mechanizmusainak köszönhető. A pozitív BAL mintát adó állatokban jellemzően a felső légutakból kerülhettek a baktériumok az alsóbb légutakba, tekintve, hogy a legtöbb esetben a felső légutakból is ugyanazt a baktériumfajt mutattuk ki. Egy macska esetében például mind a garat, mind a BAL mintából izolálható volt a *C. freundii* és a *R. planticola*. Azt, hogy ezek a baktériumok a normál szájüregi mikroflóra alkotóiként, vagy egy kiterjedt bakteriális légúti fertőzés során kerültek az alsóbb légutakba, a jelenlegi adataink alapján nem lehet biztosan megmondani. Ilyen célból érdemes lenne a mintákból csíraszám-vizsgálatot is végezni, ami alapján kiderülne, hogy csak elszórtan, vagy nagy mennyiségben kerültek

baktériumok az alsó légutakba. Egyedi esetekben azonban, ismerve a körülményeket már lehet következtetéseket levonni. Például egy súlyos, visszatérő légzőszervi tünetekkel küzdő kutya mindhárom mintatípusából *B. bronchiseptica* volt izolálható, mely – ismerve a baktérium megbetegítő képességét (Keil és Fenwick, 1998) – arra enged következtetni, hogy a légúti betegségben a mikroorganizmusnak lényeges szerepe volt.

Vizsgálataink során átfogó képet kaptunk az általunk izolált *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Frederiksenia*, valamint *Neisseria* törzsek, köztük a közelmúltban leírt *F. canicola*, *N. weaveri*, *N. shayegani* és *N. dumasiana* fajok közti filogenetikai viszonyokról is, melyhez az *rpoB* szekvenciaanalízis alkalmas módszernek bizonyult.

Vizsgálatainknak azonban voltak limitáló tényezői. A mintakiválasztás véletlenszerűen történt, így a fajta, kor, ivar, táplálkozási szokások, egyes betegségek és ezek előzetes kezeléseinek esetleges mikrobiom módosító hatását nem tudtuk figyelembe venni. A kutatás továbbá nem volt alkalmas az egyes baktériumfajok klinikumban való szerepének megállapítására, tekintve, hogy csak baktériumokat izoláltunk, így nem vettük figyelembe a vírusok, gombák vagy egyéb, az alkalmazott táptalajokon növekedni nem képes baktériumok okozta fertőzések lehetőségét, és nem vetettük össze az egyes baktériumok és a klinikai tünetek előfordulását sem. A viszonylag kis mintaszám szintén korlátozta a lehetőségeinket klinikai szempontból.

Ez a munka összességében további kutatások alapját képezheti, melyek során érdemes lenne a Magyarországon eddig még soha, de eddig külföldön is csak ritkán leírt új fajoknak a klinikai jelentőségét, az egyes betegségekben betöltött szerepét vizsgálni. Érdekes lehet továbbá a baktériumok humán vonatkozású előfordulása, valamint humán előfordulás esetén az ember-állat kapcsolatok felderítése a fertőzési módok megismerése céljából. Természetesen, mint minden baktériumnál, klinikai vonatkozásban az egyes fajok antibiotikumokra való érzékenységének vizsgálata kardinális kérdés az esetleges megbetegedések minél gyorsabban végrehajtott, célzott kezelési lehetősége, valamint az antibiotikum rezisztencia terjedésének megelőzése miatt. Az irodalmi adatok bővítése mellett az új baktériumfajok gyakorlati életben való megjelenése is fontos lehet. A rutin ellátást nyújtó laboratóriumok időben történő felkészülése, a kimutatási módszerek fejlesztése és a kezelési protokollok kialakítása mindenképp előnyös lenne a klinikai munka könnyítése és gyorsítása céljából.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Magyarországon eddig a kutyák és macskák légúti és orális mikrobiomjának részletes vizsgálatát célzó kutatás nem történt, pedig az állattartási kultúra változásával ez állatgyógyászati és közegészségügyi szempontból is egyre lényegesebb kérdés. A tudományos fejlődés segítségével pedig a rég ismert baktériumok mellett folyamatosan azonosítanak újabb fajokat is, melyek elterjedtségéről, kórokozó képességéről azonban alig rendelkezünk információval.

Munkánk során összesen 48 kutyától és 8 macskától nyertünk orr-, garattampon és esetenként bronchoalveolaris lavage mintát. Ezeket a mintákat bakteriológiai vizsgálat alá vetettük szilárd táptalajon történő tenyésztéssel, PCR-vizsgálattal és 16S rRNS szekvenenciaanalízissel. Ezen kívül a mintákból izolált *Pasteurellaceae* családhoz és *Neisseria* genushoz tartozó baktériumtörzseken filogenetikai vizsgálatokat is végeztünk.

A vizsgálatok során 130 mintából összesen 35 baktériumfajt azonosítottunk. Az izolált baktériumok közül *Frederiksenia canicola*, *Neisseria shayeganii* és *Neisseria dumasiana* az előző évtizedben még ismeretlenek voltak, országunkban pedig még soha nem mutatták ki őket. Munkánk során bizonyítottuk ezen új fajok jelenlétét is a hazai társállatokban, valamint átfogó képet kaptunk egyes baktériumfajok elterjedtségéről is. Vizsgálatainkból kiderült, hogy az alsó légutak mikrobiológiai szempontból szegényebb területek, és az orrüreg mikrobiológiai összetétele meglehetősen eltér a garatétól. Vizsgálataink filogenetikát célzó részét *rpoB* szekvenenciaanalízis segítségével végeztük, mely során a *Pasteurellaceae* család vizsgálatára kidolgozott módszert sikeresen alkalmaztuk *Neisseria* törzseknél is. Ennek eredményeként a hazai kutyákból és macskákból izolált *Pasteurellaceae* családba és *Neisseria* genusba tartozó baktériumtörzseket egy, a genetikai kapcsolatukat szemléltető törzsfán tudtuk elhelyezni, mely Magyarországon eddig egyedülálló vizsgálatnak számít.

Jelen munka alapot szolgáltat olyan további tanulmányoknak, melyek nagyobb mintaszámmal vizsgálják a Magyarországon eddig még nem izolált baktériumok előfordulási arányát, valamint az állatok légúti és orális baktériumainak állat- és közegészségügyi jelentőségét, kockázat esetén pedig felméri a kezelési lehetőségeket. A következő évek kihívása lesz az is, hogy az így megszerzett tudást minél rövidebb idő alatt lehessen átültetni gyakorlatba.

## 9. SUMMARY

To date, no detailed study of the oral and respiratory microbiome of dogs and cats has been carried out in Hungary, however, due to the changes of the animal husbandry culture, it is getting more important in both veterinary and public health aspects. By the development of scientific approaches, new bacterial species have constantly been described beside the well-known bacteria. However, we have very poor information about the distribution and pathogenicity of these newly described agents.

In our study nasal and pharyngeal swab samples were obtained from 48 dogs and 8 cats. In some cases bronchoalveolar lavage samples were also taken. Bacteriological examinations of these samples were done by culturing on solid medium, PCR examination and 16S rRNA sequence analysis. In addition, bacterial strains belonging to the *Pasteurellaceae* family or *Neisseria* genus were also included in phylogenetic studies.

During our study a total of 35 bacterial species were identified from 130 samples. Among the isolated bacteria, *Frederiksenia canicola*, *Neisseria shayeganii* and *Neisseria dumasiana* were unknown in the last decade, and have never been isolated in our country. Our study demonstrated the presence of these bacteria in companion animals in Hungary, as well as we got comprehensive information about the distribution of certain bacterial species. Our examinations revealed that the lower respiratory tract is a microbiologically poor area, and the microbiological composition of the nasal and oral cavity are significantly different. Phylogenetic study was carried out by *rpoB* sequence analysis, and the method originally developed for testing *Pasteurellaceae* was also successfully applied for *Neisseria* genus. As a result, we could place the canine and feline *Pasteurellaceae* and *Neisseria* isolates on a phylogenetic tree which shows the genetic relationships of these bacterial species, which is a unique investigation in Hungary.

Present research may provide a basis for further studies examining the prevalence of bacteria that have not been isolated in Hungary earlier, as well the veterinary and public health significance of the oral and respiratory bacteria of our dogs and cats, and in case of any risk, assessing the treatment options. Additionally, it will be a challenge for the future to translate the knowledge acquired into practice in the shortest possible time.



## 10. IRODALOM

Albert, T. J., & Stevens, D. L. (2010). The first case of *Pasteurella canis* bacteremia: a cirrhotic patient with an open leg wound. *Infection*, 38(6), 483-485.

Angen, Ø., Ahrens, P., Kuhnert, P., Christensen, H., & Mutters, R. (2003). Proposal of *Histophilus somni* gen. nov., sp. nov. for the three species incertae sedis '*Haemophilus somnus*', '*Haemophilus agni*' and '*Histophilus ovis*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1449-1456.

Appel, M. J. G. (1976). Current status of canine respiratory disease (kennel cough). Laboratory Report Series 2, no. 6. Ithaca, NY: James A. Baker Institute for Animal Health, Cornell University, 19(6).

Baldrias, L., Frost, A. J., & O'Boyle, D. (1988). The isolation of *Pasteurella*-like organisms from the tonsillar region of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, 29(1), 63-68.

Bhat, S., Acharya, P. R., Biranthabail, D., Rangnekar, A., & Shiragavi, S. (2015). A case of lower respiratory tract infection with canine-associated *Pasteurella canis* in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(8), DD03.

Bisgaard, M. (1993). Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 279(1), 7-26.

Bisgaard, M., & Mutters, R. (1986). Characterization of some previously unclassified "*Pasteurella*" spp. obtained from the oral cavity of dogs and cats and description of a new species tentatively classified with the family *Pasteurellaceae* Pohl 1981 and provisionally called taxon 16. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology*, 94(3), 177-184.

Boyce, J. D., Harper, M., Wilkie, I. W. and Adler, B. (2010): *Pasteurella. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Fourth Edition*, 325–346.

Brix, L., Hansen, M. J., Kelly, A., Bertelsen, M. F., & Bojesen, A. M. (2015). Occurrence of *Pasteurellaceae* bacteria in the oral cavity of the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46(2), 241-245.

Burrill, T. J. (1883). New Species of *Micrococcus* (Bacteria). *American Naturalist*, 17:319

Cantas, H., Pekarkova, M., Kippenes, H. S., Brudal, E., & Sorum, H. (2011). First reported isolation of *Neisseria canis* from a deep facial wound infection in a dog. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5), 2043-2046.

Capitini, C. M., Herrero, I. A., Patel, R., Ishitani, M. B., & Boyce, T. G. (2002). Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite. *Clinical Infectious Diseases*, 34(12), e74-e76.

Carrier, C. A., Elliott, T. B., & Ledney, G. D. (2009). Resident bacteria in a mixed population of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) monkeys: a prevalence study. *Journal of Medical Primatology*, 38(6), 397-403.

Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L., & Hooper, L. V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, 313(5790), 1126-1130.

- Clapper, W. E., & Meade, G. H. (1963). Normal flora of the nose, throat, and lower intestine of dogs. *Journal of Bacteriology*, 85(3), 643-648.
- Corboz, L., Ossent, P., & Gruber, H. (1993). Isolation and characterization of Group EF-4 bacteria from various lesions in cat, dog and badger. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 279(1), 140-145.
- De Alwis, M. C. L. (1992). Haemorrhagic septicaemia—a general review. *British Veterinary Journal*, 148(2), 99-112.
- Dewhurst, F. E., Klein, E. A., Thompson, E. C., Blanton, J. M., Chen, T., Milella, L., ... & Marshall-Jones, Z. V. (2012). The canine oral microbiome. *PloS one*, 7(4), e36067.
- Dodd, D. C., & Hartley, W. J. (1955). A specific suppurative epididymitis of rams. *New Zealand Veterinary Journal*, 3(3), 105-110.
- Dolieslager, S. M., Riggio, M. P., Lennon, A., Lappin, D. F., Johnston, N., Taylor, D., & Bennett, D. (2011). Identification of bacteria associated with feline chronic gingivostomatitis using culture-dependent and culture-independent methods. *Veterinary Microbiology*, 148(1), 93-98.
- Dolieslager, S. M., Riggio, M. P., Lennon, A., Lappin, D. F., Johnston, N., Taylor, D., & Bennett, D. (2011). Identification of bacteria associated with feline chronic gingivostomatitis using culture-dependent and culture-independent methods. *Veterinary Microbiology*, 148(1), 93-98.
- Dorn, E. S., Tress, B., Suchodolski, J. S., Nisar, T., Ravindran, P., Weber, K., ... & Schulz, B. S. (2017). Bacterial microbiome in the nose of healthy cats and in cats with nasal disease. *PloS one*, 12(6), e0180299.
- Droual, R., Shivaprasad, H. L., Meteyer, C. U., Shapiro, D. P., & Walker, R. L. (1992). Severe mortality in broiler chickens associated with *Mycoplasma synoviae* and *Pasteurella gallinarum*. *Avian Diseases*, 803-807.
- Elliott, D. R., Wilson, M., Buckley, C. M., & Spratt, D. A. (2005). Cultivable oral microbiota of domestic dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5470-5476.
- Ferry, N. S. (1910). A preliminary report of the bacterial findings in canine distemper. *Am. Vet. Rev.*, 37, 499-504.
- Fisk, S. K., & Soave, O. A. (1973). *Bordetella bronchiseptica* in laboratory cats from central California. *Laboratory Animal Science*, 23(1), 33-35.
- Forsblom, B., Sarkiala-Kessel, E., Kanervo, A., Vaeisaenen, M. L., Helander, I. M., & Jousimies-Somer, H. (2002). Characterisation of aerobic gram-negative bacteria from subgingival sites of dogs—potential bite wound pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 51(3), 207-220.
- Fowler, E. B., Breault, L. G., & Cuenin, M. F. (2001). Periodontal disease and its association with systemic disease. *Military Medicine*, 166(1), 85-89.
- Förster, M., Klimpel, S., Mehlhorn, H., Sievert, K., Messler, S., & Pfeffer, K. (2007). Pilot study on synanthropic flies (eg *Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fannia*, *Lucilia*, *Stomoxys*) as vectors of pathogenic microorganisms. *Parasitology Research*, 101(1), 243-246.
- Franque. 1830. Was ist die Schnüffelkrankheit der Schweine? *Dtsch. Z. Tierheilkd.* 123, 75-77.
- Frazer, J., & Rogers, K. B. (1972). The isolation of an X-dependent strain of *Haemophilus* from otitis media identified as *H. haemoglobinophilus (canis)*. *Journal of Clinical Pathology*, 25(2), 179-180.

- Frederiksen, W. (1993). Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in man—an update. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 279(1), 27-34.
- Friedberger E. (1903). Ueber ein neues zur Gruppe des Influenzabacillus gehöriges hämoglobinophiles Bakterium ('*Bacillus haemoglobinophilus canis*'). *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. (Abteilung I)* 33, 401-407.
- Goodnow, R. A. (1980). Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiological Reviews*, 44(4), 722.
- Graves, I. L. (1968). *Bordetella bronchiseptica* isolated from a fatal case of bronchopneumonia in an African green monkey. *Laboratory Animal Care*, 18(3), 405.
- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2012). The human microbiome: our second genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 13, 151-170.
- Hansen, M. J., Bertelsen, M. F., Kelly, A., & Bojesen, A. M. (2017). Occurrence of *Pasteurellaceae* bacteria in the oral cavity of selected marsupial species. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 48(4), 1215-1218.
- Haraa, H., Ochiaia, T., Morishimaa, T., Arashimab, Y., Kumasakab, K., & Kawanob, K. Y. (2002). *Pasteurella canis* osteomyelitis and cutaneous abscess after a domestic dog bite. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 46(5), S151-S152.
- Hasegawa, K., & Camargo Jr, C. A. (2015). Airway microbiota and acute respiratory infection in children. *Expert Review of Clinical Immunology*, 11:7, 789-792.
- Hazelton, B. J., Axt, M. W., & Jones, C. A. (2013). *Pasteurella canis* osteoarticular infections in childhood: review of bone and joint infections due to *Pasteurella* species over 10 years at a tertiary pediatric hospital and in the literature. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, 33(3), e34-e38.
- Hemsworth, S., & Pizer, B. (2006). Pet ownership in immunocompromised children—a review of the literature and survey of existing guidelines. *European Journal of Oncology Nursing*, 10(2), 117-127.
- Holmes, B., Costas, M., Vandamme, P., Falsen, E., & Kersters, K. (1993). *Neisseria weaveri* sp. nov. (formerly CDC group M-5), from dog bite wounds of humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(4), 687-693.
- Hombal, S. M., & Dincsoy, H. P. (1992). *Pasteurella multocida* endocarditis. *American Journal of Clinical Pathology*, 98(6), 565-568.
- Hozbor, D., Fouque, F., & Guiso, N. (1999). Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Research in Microbiology*, 150(5), 333-341.
- Humphrey, J. D., Little, P. B., Barnum, D. A., Doig, P. A., Stephens, L. R., & Thorsen, J. (1982). Occurrence of "*Haemophilus somnus*" in bovine semen and in the prepuce of bulls and steers. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 46(2), 215.
- Isaiah, A., Hoffmann, A. R., Kelley, R., Mundell, P., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2017). Characterization of the nasal and oral microbiota of detection dogs. *PLoS one*, 12(9), e0184899.
- Keil, D. J. (1998). Role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 212, 200-207.

- Kennedy, P. C., Biberstein, E. L., Howarth, J. A., Frazier, L. M., & Dungworth, D. L. (1960). Infectious meningo-encephalitis in cattle, caused by a haemophilus-like organism. *American Journal of Veterinary Research*, 21, 403-409.
- Kennedy, P. C., Frazier, L. M., Theilen, G. H., & Biberstein, E. L. (1958). A septicemic disease of lambs caused by *Hemophilus agni* (new species). *American Journal of Veterinary Research*, 19(72), 645.
- Kern, Z. T., Swartley, O. M., Neupane, P., Balakrishnan, N., & Breitschwerdt, E. B. (2019). *Pasteurella canis* infective endocarditis in a dog. *Veterinary Microbiology*, 229, 14-19.
- Khan, M. F., Movahed, M. R., & Jung, J. (2012). *Pasteurella multocida* endocarditis. *The Journal of Heart Valve Disease*, 21(2), 260-262.
- Kitt, T. (1885). Über eine experimentelle, der Rinderseuche ähnliche Infektionskrankheit. *Sitzungsber. Ges. Morphol. Physiol. Muenchen*, 140-168.
- Korczak, B. M., Bisgaard, M., Christensen, H., & Kuhnert, P. (2014). *Frederiksenia canicola* gen. nov., sp. nov. isolated from dogs and human dog-bite wounds. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(4), 731-741.
- Korczak, B., Christensen, H., Emler, S., Frey, J., & Kuhnert, P. (2004). Phylogeny of the family *Pasteurellaceae* based on *rpoB* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1393-1399.
- Li, K., Bihan, M., Yooseph, S., & Methe, B. A. (2012). Analyses of the microbial diversity across the human microbiome. *PloS one*, 7(6), e32118.
- Lloyd, J., & Allen, J. G. (1980). The isolation of group EF-4 bacteria from a case of granulomatous pneumonia in a tiger cub. *Australian Veterinary Journal*, 56(8), 399-400.
- Maclachlan, G. K., & Hopkins, G. F. (1978). Early death in pups to *Haemophilus haemoglobinophilus* (canis) infection. *Veterinary Record*, 103(18), 409-410.
- Magyar, T., & Lax, A. J. (2002). Atrophic rhinitis. In *Polymicrobial diseases*. ASM Press.
- Marsh, P. D. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in Dental Research*, 8(2), 263-271.
- McKenzie, R. A., Wood, A. D., & Blackall, P. J. (1979). Pneumonia associated with *Bordetella bronchiseptica* in captive koalas. *Australian Veterinary Journal*, 55(9), 427-430.
- McParland, P. J., O'hagan, J., Pearson, G. R., & Neill, S. D. (1982). Pathological changes associated with group EF-4 bacteria in the lungs of a dog and a cat. *Veterinary Record*, 111(15), 336-338
- M'Gowan, J. P. (1911). Some observations on a laboratory epidemic, principally among dogs and cats, in which the animals affected presented the symptoms of the disease called "distemper". *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 15(3), 372-426.
- Mikaberidz, N., Li, E. Y., & Taub, C. C. (2013). *Pasteurella multocida* infective endocarditis in an immunocompetent patient complicated by rhabdomyolysis and permanent hearing loss. *Journal of cardiovascular disease research*, 4(1), 55-57.
- Moreno-Lopez, M. (1952). El genero *Bordetella*. *Mikrobiologia Espanola* 5:177-181

- Murphy, J., Devane, M. L., Robson, B., & Gilpin, B. J. (2005). Genotypic characterization of bacteria cultured from duck faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), 301-309.
- Mutters, R., Christensen, H., Bisgaard, M. (2005). Family *Pasteurellaceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. 857–866.
- Myers, E. M., Ward, S. L., & Myers, J. P. (2012). Life-threatening respiratory pasteurellosis associated with palliative pet care. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), e55-e57.
- Neisser A. (1879). Über eine der Gonorrhoe eigenthümliche Micrococcusform. *Centralblatt für medizinische Wissenschaft* 17: 497—500.
- Olsen I., Dewhirst F.E., Paster B.J., Busse H.J. (2005). Family *Pasteurellaceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2nd ed., Vol. 2., 851–856.
- Panagea, S., Bijoux, R., Corkill, J. E., Al Rashidi, F., & Hart, C. A. (2002). A case of lower respiratory tract infection caused by *Neisseria weaveri* and review of the literature. *Journal of Infection*, 44(2), 96-98.
- Rahaley, R. S., & White, W. E. (1977). *Histophilus ovis* infection in sheep in Western Victoria. *Australian Veterinary Journal*, 53(3), 124-127.
- Rhoades, K. R. & Rimler, R. B. (1989): Fowl cholera. *Pasteurella and Pasteurellosis*. 95–113.
- Seymour, G. J., Ford, P. J., Cullinan, M. P., Leishman, S., & Yamazaki, K. (2007). Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 3-10.
- Snyder, S. B., Fisk, S. K., Fox, J. G., & Soave, O. A. (1973). Respiratory tract disease associated with *Bordetella bronchiseptica* infection in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 163(3), 293-294.
- Stephens, L. R., Humphrey, J. D., Little, P. B., & Barnum, D. A. (1983). Morphological, biochemical, antigenic, and cytochemical relationships among *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Histophilus ovis*, and *Actinobacillus seminis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 17(5), 728-737.
- Stephens, L. R., Little, P. B., Wilkie, B. N., & Barnum, D. A. (1981). Infectious thromboembolic meningoencephalitis in cattle: a review. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 178(4), 378-384.
- Sturgeon, A., Pinder, S. L., Costa, M. C., & Weese, J. S. (2014). Characterization of the oral microbiota of healthy cats using next-generation sequencing. *The Veterinary Journal*, 201(2), 223-229.
- Switzer, W. P. (1956). Studies on infectious atrophic rhinitis. V. Concept that several agents may cause turbinate atrophy. *American Journal of Veterinary Research*, 17(64), 478.
- Talan, D. A., Citron, D. M., Abrahamian, F. M., Moran, G. J., & Goldstein, E. J. (1999). Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. *New England Journal of Medicine*, 340(2), 85-92.
- Townsend, K. M., Frost, A. J., Lee, C. W., Papadimitriou, J. M., & Dawkins, H. J. (1998). Development of PCR assays for species-and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 1096-1100.

- Trevisan, V. (1887). Sul micrococco della rabia e sulla possibilità di riconoscere durante il periodo d'incubazione, dall'esame del sangue della persona morsicata, se ha contratta l'infezione rabbica. *Rend Ist Lombardo Accad. Sci. Let.t Sez. (ser. 2)*, 20, 88-105.
- Vaid, R. K., Shanmugasundaram, K., Anand, T., Bera, B. C., Tigga, M., Dedar, R., ... & Singh, R. (2018). Characterization of isolates of *Bordetella bronchiseptica* from horses. *Journal of Equine Science*, 29(1), 25-31.
- Wanke, I., Steffen, H., Christ, C., Krismer, B., Götz, F., Peschel, A., ... & Schitteck, B. (2011). Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(2), 382-390.
- Weichselbaum A. (1887). Ueber die Aetiologie der akuten Meningitis cerebrospinalis. *Fortschr. Med.*, 5: 573—583.
- Winslow, C. E., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede Jr, C., Rogers, L. A., & Smith, G. H. (1917). The families and genera of the bacteria: preliminary report of the committee of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *Journal of Bacteriology*, 2(5), 505.
- Winsler, J. (1960). A study of *Bordetella bronchiseptica*. *Proceedings. Anim. Care Panel.*, 10, 87-104.
- Wolfgang, W. J., Carpenter, A. N., Cole, J. A., Gronow, S., Habura, A., Jose, S., ... & Spröer, C. (2011). *Neisseria wadsworthii* sp. nov. and *Neisseria shayegani* sp. nov., isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(1), 91-98.
- Wroblewski, D., Cole, J., McGinnis, J., Perez, M., Wilson, H., Mingle, L. A., Musser, K.A., Wolfgang, W. J. (2017). *Neisseria dumasiana* sp. nov. from human sputum and a dog's mouth. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(11), 4304-4310.

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni a témavezetőimnek, dr. Magyar Tibornak és dr. Psáder Rolandnak a kutatási lehetőséget és a tőlük kapott szakmai segítséget. Továbbá köszönet illeti Ujvári Barbarát a bakteriológiai laboratóriumi munkába való bevezetésemért és a dolgozatom írása során nyújtott rengeteg segítségért. Köszönet illeti továbbá az ÁTE Belgyógyászati Tanszék és Klinika, valamint az ATK Állatorvos-tudományi Intézet légzőszervi bakteriológiai csoport laboratóriumának munkatársait, akik a kutatásunkhoz biztosították a helyszínt és a tárgyi feltételeket. Végül pedig szeretném megköszönni Pogácsás Gábornak a számtalan informatikai jellegű problémám megoldását és ezek során tanúsított türelmét.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósul meg (a támogatási szerződés száma: AZ EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005, címe: Tudományos utánpótlás erősítése a hallgatók tudományos műhelyeinek és programjának támogatásával, a mentorálás folyamatának kidolgozásával).

4. melléklet

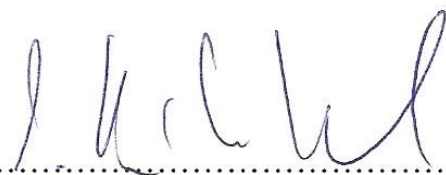
Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott DR. PSÁDER ROLAND ..... Igazolom, hogy

INCE ZSUZSANNA ..... (a hallgató neve)

Kutatási munkáit gasztróipari és légkörtéchnikai témákkal vizsgálta, különös tekintettel a Pasteurellaceae és Weissellaceae család tagjainak előfordulására című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. 11. 11. ....



a témavezető neve és aláírása

1078 Bp., István u. 2.

ATE Bejegyzési Titok és Kétség

tanszék





5. melléklet

Nyilatkozat TDK- és szakdolgozat azonosságáról

NYILATKOZAT

Alulírott INCZE ZSUZSANNA..... nyilatkozom, hogy szakdolgozatom,  
melynek címe Kulph és Warblak optikéi és légkő bakterium flórájának vizsgálata,  
különös tekintettel a Pasteurellaceae és Neisseriaceae nemzetségeinek előfordulására  
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2019.....  
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2019.....11. 14......

INCZE ZSUZSANNA

Incze Zsuzsa

.....  
a hallgató neve és aláírása

**HuVetA**  
**ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\***

Név: INCZE ZSUZSANNA  
Elérhetőség (e-mail cím): incze.zsuzsa@qmail.com  
A feltöltendő mű címe: Küpfel és munkái. Gratulációk. Képek. Kétféle fényképek. Képfelrakás, különböző technikával a Paskuné László és Neicséné Cecé által tagjainak előforduló...  
A mű megjelenési adatai: 2019  
Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2019. év .....11.....hó ....14...nap



aláírás  
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

*A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgálta, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*