

**Kórtani elváltozásokból és környezeti mintákból származó
Rhodococcus equi törzsek összehasonlító vizsgálata**

Doktori értekezés

Készítette:

Dr. Makrai László

Budapest

2003

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető: **Dr. Varga János**, egyetemi tanár, az MTA levelező tagja
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar,
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Témabizottsági tagok: **Dr. Vetési Ferenc**, egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány kandidátusa
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar,
Kórbonctani és Igazságügyi-állatorvostani Tanszék

Dr. Fodor László, egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány kandidátusa
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar,
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Készült 8 példányban. Ez az 8. példány.

.....
Dr. Makrai László

„... Hogy a kitenyésztett mikroorganizmus a pyogen streptococcus-féleségeknek melyikével azonos, azt az eddigi differenciális vizsgálataim alapján még eldönteni nem tudtam. Annyit azonban már most is határozottan mondhatok, hogy a csikóbetegség kórokozója nem azonos a Schütz-féle *Streptococcus equi*-vel, vagyis, hogy a szóbanforgó járvány nem mirigykór. Lényegesebb morfológiai, biológiai és tenyésztési különbségeket eddigelé nem találtam; annál nagyobb eltérést konstatáltam kórnemző hatásuk tekintetében. Amíg ugyanis a mirigykór okozója, mint ismeretes, leginkább a ½–5 éves csikókat betegíti meg s a fiatalabbakat csak nagyon kivételesen, addig az általam kitenyésztett törzs kifejezetten a szopós csikókra pathogen ...”

Schmiedhoffer Gyula,
Állatorvosi Lapok, Budapest, 1922. február 28.

TARTALOM

1.	ÖSSZEFOGLALÁS	6
2.	BEVEZETÉS	8
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
	3.1. Történeti áttekintés és rendszertani besorolás	9
	3.2. A rhodococcusok identifikálása	10
	3.3. A <i>R. equi</i> előfordulása	11
	3.4. A <i>R. equi</i> izolálása	12
	3.5. Morfológiai tulajdonságok	16
	3.5.1. Telepmorfológia és pigmenttermelés	16
	3.5.2. A baktérium alakja és festődése	16
	3.6. Hemolitikus aktivitás	17
	3.7. Equi-faktorok	17
	3.8. Biokémiai tulajdonságok	18
	3.9. Enzimaktivitás	19
	3.10. Szénforrás-hasznosítás	20
	3.11. Antibiotikum-érzékenység	20
	3.12. Szerológiai tulajdonságok	22
	3.13. A <i>R. equi</i> virulenciája	25
	3.14. Immunitás a <i>R. equi</i> -vel szemben	27
	3.14.1. A humorális immunválasz szerepe	27
	3.14.2. A sejt közvetítette immunválasz szerepe	27
	3.15. A <i>R. equi</i> patogenitása	29
	3.15.1. A csikók megbetegedése	29
	3.15.1.1. Előfordulás	29
	3.15.1.2. Járványtan	29
	3.15.1.3. Kórfejlődés	30
	3.15.1.4. Klinikai tünetek	30
	3.15.1.5. Kórbonctani elváltozások	32
	3.15.1.6. Kórjelzés	32
	3.15.1.7. Kórjóslat	34
	3.15.1.8. Gyógykezelés	34
	3.15.1.9. Megelőzés	35
	3.15.2. A betegség előfordulása felnőtt lovakban	37
	3.15.3. A sertés <i>R. equi</i> fertőzöttsége	38
	3.15.4. Az ember <i>R. equi</i> fertőzöttsége	38
	3.15.5. <i>R. equi</i> fertőzések más állatfajokban	39
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	40
	4.1. Baktériumtörzsek	40
	4.2. Szelektív táptalajok összehasonlító vizsgálata	40
	4.3. Morfológiai, tenyésztési és biokémiai vizsgálatok, a törzsek DNS-alapú azonosítása	43
	4.4. Enzimaktivitás vizsgálata	44
	4.5. Szénforrás-hasznosítás vizsgálata	45
	4.6. Antibiotikum-érzékenység vizsgálata	45
	4.7. Szerológiai vizsgálatok	45
	4.8. A 16S riboszomális RNS gén vizsgálata	47
	4.9. Plazmidprofil-vizsgálatok	49
	4.10. Immun-hisztokémiai vizsgálatok	50
	4.11. Vakcinázási kísérletek	52

5.	EREDMÉNYEK	55
	5.1. <i>R. equi</i> törzsek izolálása	55
	5.2. Szelektív táptalajok összehasonlító vizsgálata	58
	5.3. Morfológiai, tenyésztési és biokémiai sajátosságok, a törzsek DNS-alapú azonosítása	62
	5.4. Enzimaktivitás	66
	5.5. Szénforrás-hasznosítás	67
	5.6. Antibiotikum-érzékenység	71
	5.7. Szerológiai vizsgálatok	73
	5.8. A 16S riboszomális RNS gén vizsgálata	80
	5.9. Plazmidprofil	83
	5.10. Immun-hisztokémiai vizsgálatok	89
	5.11. Vakcinázási kísérletek	92
6.	ÉRTÉKELÉS, KÖVETKEZTETÉSEK	97
	6.1. A törzsek eredete	97
	6.2. Szelektív táptalajok összehasonlító vizsgálata	98
	6.3. Morfológiai, tenyésztési és biokémiai sajátosságok, a törzsek DNS-alapú azonosítása	99
	6.4. Enzimaktivitás	101
	6.5. Szénforrás-hasznosítás	101
	6.6. Antibiotikum-érzékenység	102
	6.7. Szerológiai vizsgálatok	103
	6.8. A 16S riboszomális RNS gén vizsgálata	105
	6.9. Plazmidprofil	105
	6.10. Immun-hisztokémiai vizsgálatok	106
	6.11. Vakcinázási kísérletek	108
7.	IRODALOM	111
8.	A TÉMÁBAN MEGJELENT SAJÁT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK	129
9.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	130
10.	MELLÉKLETEK	131

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A fiatal csikók *R. equi* okozta megbetegedése világszerte, így hazánkban is gyakran előforduló fertőző betegség. A csikókban leggyakrabban tályogképződéssel járó bronchopneumoniát, ritkábban bélgyulladást és egyéb kórképeket idéz elő. Alkalmanként megtelepszik sertésekben és néhány más állatfajban, de fogékony iránta az immunszuppresszált állapotban lévő ember is.

Vizsgálataink célja volt a *R. equi* törzsek előfordulási gyakoriságának a megállapítása lovakból, és néhány más fajból származó klinikai anyagokban, valamint környezeti mintákban; új szelektív táptalaj előállítás; a törzsek morfológiai, tenyésztési és biokémiai tulajdonságainak a vizsgálata és összehasonlítása, beleértve az enzimaktivitás és a szénforrás-hasznosítás (anyagcsere ujjlenyomat), valamint az antibiotikum-érzékenység vizsgálatát; a *R. equi* törzsek szerotipizálása; a 16S riboszomális RNS gén és a plazmidprofil vizsgálata; immun-hisztokémiai módszer kidolgozása és használata a kórjelzés javítására, továbbá vakcinázási kísérletek végzése a betegség megelőzése érdekében.

Magyarország 43 településéről izolált összesen 379 *R. equi* törzs vizsgálata alapján megállapítható volt, hogy ez a baktérium a lóállományokban széles körben, gyakorlatilag minden ménesben előfordul. A *R. equi* a tüdőgyulladásban elhullott csikók mindegyikéből (100%) kitenyészthető volt, míg a ló orrtamponmintákban 14,4%-os, a végbélből vett tamponmintákban 28,4%-os, a talajmintákban 68,6%-os, a sertés áll alatti nyirokcsomóiban pedig 14,9%-os gyakorisággal fordult elő.

Az új (trimetoprimet, cefoperazont, polimixin B-t, cikloheximidet és kálium-telluritot is tartalmazó) szelektív táptalaj az eddig ismertekhez képest jobb hatásfokkal volt használható a *R. equi* törzsek erősen szennyezett mintákból (talajból, bélsárból) történő izolálására.

A különböző eredetű *R. equi* törzsek biokémiai tulajdonságaiban és enzimprofiljában (19 különféle enzim, API ZYM) csak kisebb eltérések voltak kimutathatók, a szénforrás-hasznosítás vizsgálata (BIOLOG) azonban alkalmas a törzsek gyors azonosítására, és az eredményekből felállított törzsfaj alapján következtetések vonhatók le a törzsek eredetére vonatkozóan is.

A hazai izolálású *R. equi* törzsek is a rifampicinre (MIC (minimális gátló koncentráció): 0,125-0,25 µg/ml) és az eritromicinre (MIC: 0,125-0,5 µg/ml) a legérzékenyebbek.

A 7 típusú törzssel, továbbá 30, korábban be nem sorolt *R. equi* törzssel szemben nyulakban termelt hiperimmun savókat agargél-precipitációs próbában használva a megvizsgált 379 *R. equi* törzs egy kivételével szerotipizálható volt. Az eddig ismert 7 szerotípus mellett, további négy, csak a homológ törzssel reakciót adó, új szerotípus létezését állapítottuk meg. Állatfaj, illetve származási hely szerinti eltérésekkel ugyan, a törzsek 45,6%-a az 1-es, 28,2%-a a 2-es szerotípusba, néhány törzs további szerotípusokba, a törzsek 23,75%-a pedig az általunk megállapított négy új („8”-as, „9”-es, „10”-es és „11”-es) szerotípus valamelyikébe tartozott. A lovakból izolált törzsek túlnyomó többsége (74,4%-a) az 1-es szerotípusba volt besorolható. Az emberekből izolált 8 *R. equi* törzs közül 6, valamint a sertésekből izolált törzsek többsége (56,9%) 2-es szerotípusúnak bizonyult.

A 16S riboszomális RNS-t kódoló gént polimeráz lánreakcióval megsokszorozva, az amplifikált szakasz RFLP (restriction fragment length polymorphism, restrikciós fragmentumhosszúság polimorfizmus) vizsgálatával, és ugyanezen gén egy szakaszának a szekvencia-analízisével sem tudtunk a különböző eredetű *R. equi* törzsek között különbséget kimutatni. A 16S riboszomális RNS-t kódoló gén PCR (polymerase chain reaction, polimeráz lánreakció) vizsgálata alkalmas a *R. equi* törzsek azonosítására.

A virulenciagének kimutatását szolgáló PCR alapján a törzsek 41,5%-ban a vapA gén (virulens törzsek), 13,6 %-ban a vapB gén (mérsékelten virulens törzsek) volt kimutatható, míg a többi vizsgált törzs virulenciaplazmidot nem hordozott (avirulens törzsek). A lovakból származó törzsek túlnyomó többsége (88,4%) virulens volt, az emberből származó törzsek többnyire a mérsékelten virulens közé, a sertésekből származóké pedig az avirulens (71,9%), illetve a mérsékelten virulens (27,5 %) törzsek közé tartozott.

A kidolgozott immun-hisztokémiai eljárás megkönnyíti és gyorsabbá teszi a *R. equi* okozta megbetegedések diagnosztikáját, mivel különböző kórtani anyagokból, kenetektől, szövettani metszetektől néhány óra alatt specifikus reakció segítségével mutatja ki a *R. equi* baktériumokat.

A vakcinázási kísérletek (1-es szerotípusú, inaktivált *R. equi*-t – alumínium-gélhez adszorbeálva, vagy inkomplett Freund adjuvánssal keverve – tartalmazó monovalens, továbbá EHV-2-t (equine herpes virus) is tartalmazó, bivalens vakcinákat használva) csak részben voltak eredményesek. Mind a vemhes kancák, mind pedig a csikók ismételt vakcinázása ellenére az ellenanyagválasz mértéke mind a colostrumban, mind pedig a csikók vérsavóiban alacsony maradt. A *R. equi* vakcinák használatával kapott eddigi eredmények egyelőre nem teszik lehetővé a vakcinák gyakorlati alkalmazását.

2. BEVEZETÉS

A *Rhodococcus* genus a nocardioform *Actinomyces*-ek csoportjába, ezen belül pedig a mikolsavat tartalmazó baktériumok alcsoportjába tartozik. A genusban jelenleg 12 fajt különböztetünk meg. Ezen fajok mindegyike szaprofitának tekinthető, a *R. equi* kivételével, amely viszont fakultatív patogén, és mind állatorvosi, mind pedig humánegészségügyi szempontból fontos (Bell és mtsai., 1998).

A kórokozót először 1923-ban Magnusson írta le, aki gennyes tüdőgyulladásban elhullott csikókból izolálta a baktériumot, és *Corynebacterium equi* névvel illette, később azonban a sejtfalösszetétel, a biokémiai és a genetikai vizsgálatok alapján a *Rhodococcus* nemzetségbe sorolták át (Magnusson, 1923; Bell és mtsai., 1998).

A csikók *R. equi* okozta megbetegedése világszerte előfordul. Elsősorban 1-4 hónapos csikókban okoz tályogképződéssel járó gennyes tüdőgyulladást, fekélyes bélgyulladást, illetve az esetek egy részében főként a bélfodri nyirokcsomókra kiterjedő elváltozásokat, ízületgyulladást, illetve ritkán vetélést. Egyes irodalmi adatok alapján a csikókban az elhullások 10%-át, a tüdőgyulladások 45%-át a *R. equi* okozza (Zink és mtsai., 1986).

A kórokozó és a megbetegedés Magyarországon is széleskörben előfordul, gyakorlatilag minden ménesben, de a kisebb lóállományokban is (Szeredi és mtsai., 1996; Varga és mtsai., 1999).

A *R. equi* okozta kórkép csikókon kívül ritkábban sertésben, szarvasmarhában, juhban és kecskében is előfordul. Ezekben a fajokban a nyirokcsomó-elváltozásokkal járó formával találkozhatunk, de a sertések az áll alatti nyirokcsomóban néhány százalékban tünetmentesen is hordozzák a baktériumot (Katsumi és mtsai., 1991; Barton és Hughes, 1980; Rao és mtsai., 1982; Takai és mtsai., 1996b).

Az utóbbi 15 évben a *R. equi* humánkórtani jelentősége is egyre inkább előtérbe került. Emberi megbetegedést a szervezet védekezőképességének jelentős csökkenésekor, így szervtranszplantációt követő immunszuppresszív kezelés után, illetve HIV-fertőzöttséghez társultan idéz elő (Prescott, 1991; Takai és mtsai., 1995c).

Vizsgálataink célja volt:

- a *R. equi* előfordulási gyakoriságának a megállapítása lovakból és más fajokból származó klinikai anyagokban és környezeti mintákban,
- az irodalomban leírt, a *R. equi* izolálására szolgáló szelektív táptalajok összehasonlítása, illetve új, a korábbiaknál jobb szelektív táptalaj összeállítása,
- a különböző eredetű *R. equi* törzsek morfológiai, tenyésztési és biokémiai tulajdonságainak vizsgálata és összehasonlítása,
- különböző eredetű törzsek anyagcsere-ujjlenyomatának (enzimaktivitás, szénforrás-hasznosítás) és antibiotikum-érzékenységének a vizsgálata,
- a *R. equi* törzsek szerológiai besorolása,
- a törzsek plazmidprofiljának jellemzése és a 16S riboszomális RNS gén összehasonlító vizsgálata,
- a betegség diagnosztikájában felhasználható immun-hisztokémiai módszer kidolgozása,
- továbbá vakcinázási kísérletek végzése a betegség megelőzése érdekében.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Történeti áttekintés és rendszertani besorolás

A csikók *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* okozta tüdőgyulladását az irodalmi adatok szerint elsőként Magnusson írta le 1923-ban, a svédországi Malmöben (Magnusson, 1923), bár a csikók e betegségének magyarországi széleskörű előfordulásáról, klinikumáról és kórbonctanáról a hazai Állatorvosi Lapokban Schmiedhoffer Gyula már egy évvel korábban közölt részletes leírást, a kórokozót azonban *Streptococcus*-nak vélte. Az „első” leírást követően a kórokozó előfordulását megállapították Ausztráliában (Bull, 1924), az Amerikai Egyesült Államokban (Dimock és Edwards, 1931), Indiában (Rajagopalan, 1936) és Angliában (Craig és Davies, 1940) is.

Holt és Amundsen (1936) írtak először saválló coccobacillusról, amelyet Norvégiában sertések gümőkórra emlékeztető nyirokcsomó-elváltozásából izoláltak. Ebben a leírásban már valószínűleg a *R. equi* baktériumokról volt szó. Ezt követően a *R. equi* sertések nyirokcsomóiban való előfordulását az Amerikai Egyesült Államokban (Karlson és mtsai., 1940), Franciaországban, Svájcban (Verge és Senthille, 1942) és Ausztráliában (Woodrooffe, 1950) is megállapították.

A *R. equi* fertőzés emberben való előfordulását Golub és mtsai. írták le először 1967-ben.

A baktérium rendszertani besorolása a felfedezése utáni kezdeti időszakban meglehetősen vitatott volt. Míg Magnusson (1923) a kórokozót festődési, morfológiai, tenyésztési és biokémiai tulajdonságai alapján a *Corynebacterium* genusba tartozónak vélte és a *Corynebacterium equi* névvel illette, addig Miessner és Wetzel (1923) a baktériumot *Corynebacterium pyogenes equi*-nek nevezte. A kórokozónak a mycobacteriumokhoz való hasonlósága miatt Jensen (1934) a *Mycobacterium equi*, Holtman (1945) pedig egy borjú tüdőgyulladásából való izolálását követően a *Corynebacterium purulentus* nevet tartotta megfelelőnek, míg Gordon (1966) a *Mycobacterium rhodochrous* névre tett javaslatot.

Davis és Newton (1969) felhívták a figyelmet arra, hogy a *C. equi* típus törzs és más *Corynebacterium* fajok között lényeges különbségek vannak. A *Corynebacterium equi* más coryneform baktériumoktól való elkülönítése Bousfield (1972) és Jones (1975) nevéhez fűződik. Bousfield és Goodfellow (1976), valamint Goodfellow és Alderson (1977) egy új genus, a *Rhodococcus* genus létrehozására tettek javaslatot, az ún. „rhodochrous komplex” baktériumai számára, amely olyan baktériumtörzseket tartalmazott, amelyek ugyan hasonlítottak a *Nocardia*, a *Corynebacterium* és a *Mycobacterium* nemzetség tagjaihoz, de mégsem voltak ezekbe a genusokba besorolhatók. A „Rhodococcus” elnevezést először Zopf használta 1891-ben, ami a baktérium különböző növekedési szakaszaiban megfigyelhető morfológiai eltéréseire (pálca, coccus) utal (Prescott, 1991). A rhodococcusok obligát aerob, Gram-pozitív, nem mozgó, mikolsav-tartalmú nocardioform *Actinomyces*-ek.

A nocardioform *Actinomyces*-ek csoportjába a rhodococcusok mellett a *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Tsukamurella*, *Gordona* és a *Dietzia* genusok tartoznak (Bell és mtsai., 1998). A rendszertani besorolás alapját a numerikus taxonómia, a kemotaxonómia és a molekuláris taxonómia eszköztárával megállapítható tulajdonságok képezik (Bell és mtsai., 1998). A *Rhodococcus* genus tagjai sejtfalszerkezetük alapján is különböznek a nocardioform *Actinomyces*-ek más csoportjaitól. A rhodococcusok IV-es kemotípusú sejtfallal rendelkeznek, mivel a peptidoglikánjukban a diaminosavak közül csak a mezo-diamino-pimelinsav fordul elő, és a sejtfal fő szénhidrát komponensei az arabinóz és a galaktóz (Lechevalier és Lechevalier, 1970). Jellemző a rhodococcusok sejtfalára, hogy tuberkulo-sztearinsavat és olyan mikolsavakat tartalmaz, amelyek 30-54 szénatommal rendelkeznek, és maximálisan két telítetlen kötésük van. A sejtfal fő menakinontípusai pedig a dihidrogénezett menakinonok, amelyek 8 izoprénegységet tartalmaznak ciklikus elemek nélkül (Goodfellow és mtsai., 1998). A mikolsavak kromatográfiás vizsgálata lehetővé tette a *Corynebacterium*, a *Nocardia*, a *Rhodococcus* és a *Mycobacterium* genus tagjainak elkülönítését (Butler és mtsai., 1987; De Briel és mtsai., 1992). A sejtfalban található különböző lipidek aránya felhasználható a genuson belüli fajok elkülönítésére (Klatte és mtsai., 1994).

Jelenleg a leghatékonyabb módszer a rhodococcusok taxonómiájában a 16S riboszomális RNS gén vizsgálata (Bell és mtsai., 1998). A rRNS gén RFLP vizsgálatával Vaneechoutte és mtsai.

(1995) képesek voltak a *R. equi*-t a *Corynebacterium* genusba tartozó fajoktól elkülöníteni. A 16S rRNS gén szekvencia elemzése alapján az 1912-ben leírt *Corynebacterium hoagii* fajt 1995-ben a *R. equi* fajba sorolták (Ruimy és mtsai., 1995). A molekuláris biológiai, valamint a sejtfalösszetétel vizsgálatok eredményei végső soron a *C. equi* *R. equi*-vé való átnevezéséhez vezettek (Yamada és Komogata, 1970; Mordarski és mtsai., 1980; Suzuki és mtsai., 1981).

A *Rhodococcus* genus 1977-es első leírása óta oda már több fajt besoroltak, és több fajt ki is zártak onnan, aminek a következtében a genuson belüli fajok száma időről időre változott. A „Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Goodfellow, 1989) 20 fajt sorol fel a genuson belül. Az újonnan létrehozott genusokba (*Tsukamurella* és *Gordona*) (Collins és mtsai., 1988; Stackebrandt és mtsai., 1988) történő néhány korábban rhodococcusnak vélt faj átsorolása eredményeként a visszamaradt *Rhodococcus* genus sokkal homogénebbé vált (Goodfellow, 1990). A „Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (Goodfellow, 1994) kiadványban 14 fajt sorolnak a *Rhodococcus* genusba, amelyből azóta 1 fajt a *Dietzia* genusba soroltak át, egy fajról, a *R. roseus*-ról pedig megállapították, hogy a *R. rhodochrous* fajjal azonos (Rainey és mtsai., 1995a, 1995b). Jelenleg 12 faj tartozik a nemzetségbe: *R. coprophilus*, *R. equi*, *R. fascians*, *R. erythropolis*, *R. globerulus*, *R. marinonascens*, *R. opacus*, *R. percolatus*, *R. rhodnii*, *R. rhodochrous*, *R. ruber* és a *R. zopfii* (Bell és mtsai., 1998). E baktériumok zömében a talajban élő szaprofiták, amelyeknek állat- és humánegészségügyi jelentőségük nincs.

3.2. A rhodococcusok identifikálása

A rhodococcusok genus szinten való meghatározása a morfológiai tulajdonságok figyelembe vétele mellett a sejtfalkomponensek kémiai analízisével (kromatográfia) lehetséges (Goodfellow, 1989). Nem létezik azonban egyetlen olyan morfológiai vagy kémiai tulajdonság, amely egyértelműen elkülönítené a rhodococcusokat más mikolsav tartalmú baktériumoktól (Klatte és mtsai., 1994). A fajok elkülönítése a genuson belül hagyományos módszerekkel meglehetősen bonyolult (Goodfellow, 1989). Újabban azonban leírtak bizonyos egyszerűsített biokémiai próbákat, sejtfalkomponenseket vizsgáló, szerológiai, és molekuláris biológiai módszereket, amelyek alkalmasak lehetnek erre a célra (Bell és mtsai., 1998). A *Rhodococcus* fajok pontos fajsztintú azonosítása biokémiai, tenyésztési és morfológiai alapon nagyon munkaigényes és nehéz feladat, még a fejlettek számító fluoreszcenciás enzimikus módszerekkel is. A Goodfellow és mtsai. (1990) által alkalmazott nagy számú vizsgáló módszer alkalmatlan a rutinvizsgálatokra, más szerzők szerint pedig néhány biokémiai próba eredménye alapján nem lehet a fajokat meghatározni (McNeil és Brown, 1994).

Az API Coryne (bioMérieux, Franciaország) rendszer adatbázisa tartalmazza a *R. equi*-t, és egyes szerzők szerint sikeresen használható a rendszer a *R. equi* identifikálására (Bern és Lämmler, 1994). Soto és mtsai. (1994) szerint viszont a rendszer megbízhatatlan, mivel a *R. rhodochrous*-t is *R. equi*-nek határozta meg.

A BIOLOG rendszert (Biolog Inc., Hayward, Kanada) is használták már egyes rhodococcus fajok meghatározására, de az irodalomban még nincs elegendő adat arra vonatkozóan, hogy mennyire pontos és megbízható erre a feladatra (Wang és Krawiec, 1994; Harris-Baldwin és Gudmestad, 1996).

A sejtfalösszetétel alapján történő azonosításhoz különböző modern módszereket (mikolsav-profil meghatározás HPLC-vel, zsírsav-metil-észter meghatározás gázkromatográfiával, tömeg spektroszkópia stb.) közöl a szakirodalom (Bell és mtsai., 1998), ezek azonban meglehetősen költséges eszközöket és speciális laboratóriumokat igényelnek, így a rutindiagnosztika számára nem elérhetőek.

A virulens *R. equi* meghatározására specifikusnak tekinthető szerológiai módszereket fejlesztettek ki (Takai és mtsai., 1994a; Lämmler, 1995; Prescott és mtsai., 1996).

Az utóbbi években számos DNS alapú módszert is kidolgoztak a rhodococcusok faji meghatározására. Steingrube és mtsai. (1997) egy PCR-alapú azonosító rendszert írtak le a nocardia és rokon baktériumok azonosítására, amely segítségével egy 65 kDa molekulatömegű hősokkprotein-gént amplifikáltak, és RFLP vizsgálatnak vetették alá. Ennek a módszernek a

segítségével a *R. equi* elkülöníthető a *Nocardia*, a *Gordona*, a *Tsukamurella* és más nemzetségek fajaitól. Ebben a kísérletben azonban más *Rhodococcus* fajokat nem vizsgáltak. Specifikus DNS régiókat célba vevő PCR-alapú vizsgáló módszereket is kidolgoztak a virulenciaplazmidot hordozó *R. equi* és a *R. fascians* meghatározására (Takai és mtsai., 1995a; Stange és mtsai., 1996). A *R. equi* és más *Rhodococcus* fajok meghatározására a 16S rRNS gén fajspecifikus régióit megcélzó PCR alapú módszereket is sikeresen alkalmazták (Bell és mtsai., 1996; Soedarmanto és mtsai., 1998). A 16S rRNS gén teljes amplifikációját és szekvenálását követően a génbank adatbázisában lévő szekvenciákhoz való hasonlítása az egyik legmegbízhatóbb módszer a fajmeghatározásban (Blackall, 1994; Schuppler és mtsai., 1995).

3.3. A *R. equi* előfordulása

A nocardioform *Actinomyces*-ek széleskörűen előfordulnak környezetünkben, elsősorban a trágyában, a talajban és a természetes vizekben. Egyes szerzők a *R. equi*-t talajlakó szaprofitaként írták le (Jensen, 1934; Rooney, 1966; Knight, 1969), mások azonban azt feltételezték, hogy a baktérium elsősorban a különböző állatfajok gyomor- és bélsatarnájában (Karlson és mtsai., 1940) van jelen, és innen szóródva jut az állatok közvetlen környezetébe (Wilson, 1955).

A *R. equi* baktériumokat talajmintákból, különböző állatfajok bélsármintáiból (Woolcock és mtsai., 1979, 1980; Woolcock és Mutimer, 1981; Barton és Hughes, 1981, 1984; Prescott és mtsai., 1984b; Takai és Tsubaki, 1985) és sertések áll alatti nyirokcsomóiból is kitenyészették (Takai és Tsubaki, 1985; Katsumi és mtsai., 1991). A leggyakrabban lovak és más háziállatok bélsármintáit vizsgálták.

Carman és Hoghes (1987) különböző állatfajokból (lóból, szarvasmarhából, kecskéből, juhból, sertésből, nyúlból, macskából, kutyából, szarvasból, oposszumból, házi szárnyasokból, galambból és más madarakból) származó bélsármintákból próbálták a *R. equi* baktériumokat kitenyészteni. A macskák és az oposszumok kivételével valamennyi állatfaj bélsarából izolálni tudták, bár a megvizsgált kutya bélsárminták közül csak egy volt pozitív. A háziszárnyasok bélsarának 4%-ából, galambok bélsarának 64%-ából, más madarak esetén pedig a minták 100%-ból volt kitenyészthető a baktérium. Mutimer és mtsai. (1979) 521 emberi székletminta közül csak kettőből (0,38%) tudták a *R. equi*-t kitenyészteni.

Woolcock és mtsai. (1979) szelektív táptalajt használva 127 ló bélsármintájából 90 (70,87%) esetben ki tudták a baktériumot tenyészteni. Woolcock és mtsai. (1980) 12 ménésben lévő különböző korú lovak bélsármintáit megvizsgálva, valamennyi ménésben ki tudták mutatni a kórokozó jelenlétét, annak ellenére, hogy a megelőző években a *R. equi* okozta tüdőgyulladás a 12 ménés közül csupán kettőben fordult elő (1, illetve 3 évvel a vizsgálatot megelőzően). A lovakkal együtt tartott szarvasmarhák bélsarából, és hónapok óta legeltetésre nem használt legelők talajából is ki lehetett a baktériumot tenyészteni.

A baktérium kérődzők és sertések bélsarából is magas arányban (50%, 35%) izolálható (Mutimer és Woolcock, 1980). Takeuchi és mtsai. (1967) klinikailag tünetmentes sertések vérében *R. equi* specifikus ellenanyagokat mutattak ki, és ez alapján feltételezték, hogy a baktérium a sertések normál bélflórájához tartozik.

Barton és Hughes (1981), valamint Rowbotham és Cross (1977) lényegesen alacsonyabb arányban tudták a végbélből vett bélsármintákban a baktériumot kimutatni. A szerzők ezt azzal magyarázták, hogy a baktérium a külvilágba kikerült bélsárban nagy valószínűséggel elszaporodik, és a Woolcock és mtsai. (1980) az előbb említett munkájukban nem tettek különbséget a végbélből vett és a környezetől összegyűjtött bélsárminták között.

Barton és Hughes (1984) vizsgálatuk során kimutatták, hogy a külvilágban gyűjtött bélsárminták esetén az izolálás gyakorisága nagyobb, a végbélből vett bélsármintákhoz viszonyítva. Kísérletesen igazolták, hogy a környezetbe kikerült bélsárban megfelelő körülmények esetén 1-2 hét alatt 1000-szeresére nő a baktériumszám.

A *R. equi* egyes tulajdonságai (obligát aerob, 28-30°C-os hőoptimum, az epesavas sók iránti érzékenység), illetve az a képessége, hogy egyszerű szerves molekulákat is képes szénforrásként

hasznosítani, nem valószínűsíti azt, hogy e baktérium természetes közege a bélcsatorna lenne (Barton és Hughes, 1982).

Prescott és mtsai. (1984b) különböző méneseekben a legelők talajának és a friss bélsárnak a vizsgálatával megállapították, hogy a kórokozó a talajmintákban nagyobb számban van jelen, mint a friss bélsárban. Ezek a vizsgálatok rámutattak arra, hogy a *R. equi* a bélcsatornán kívül, a bélsárral szennyezett talajban is szaporodik.

Takai és Tsubaki (1985) vizsgálatai szerint a legmagasabb az izolálási arány a legelőn gyűjtött talajmintákban (egészen 100%-ig terjedt), míg a ló bélsárban ezt az arányt a kancákban 46,7%-nak, a csikók esetén pedig 24,7%-nak találták. Két szarvasmarhaállomány esetén ez az arány tehének bélsarában 24%, borjakéban pedig 30,8% volt.

Takai és mtsai. (1986c) bizonyították, hogy a *R. equi* a talajban képes szaporodni. A szerzők 10 hónapon keresztül minden hónapban talajmintákat gyűjtöttek különböző méneseekben, és kimutatták, hogy a baktériumszám a talajmintákban áprilisban és májusban éri el a maximumot és ezt követően lassan csökkenni kezd. A baktériumokat hasonló mennyiségben tudták a talajban és a lovak bélsarában kimutatni. A felnőtt lovak valószínűleg csak passzív módon hordozzák a kórokozót, és bennük nem szaporodik, de a baktérium a csikók bélcsatornájában 2 hónapos korukig szaporodni képes. A talajban való szaporodás mértéke annak szervesanyag tartalmától függ. A legnagyobb számban a *R. equi* a talaj felső rétegében fordul elő, 30 cm-rel a felszín alatt már nem található meg.

Hughes és Suleiman (1987) szerint a baktériumot olyan talajmintákból is ki lehet tenyészteni, ahol soha nem tartottak lovakat, de a lovak környezetében sokkal nagyobb számban fordul elő a talajban, mivel szaporodásukat a bélsárban lévő illózsírsavak ill. acetát jelentősen serkentik.

Takai és mtsai. (1986a) megállapították, hogy a *R. equi* csikók bélcsatornájában való megtelepedése olyan ménesben, ahol a betegség csak sporadikusan fordul elő, az ellést követő második hétre, ahol viszont endémiásan van jelen, ott az ellést követő első hétre tehető. A 6., ill. a 7. hétre a csikók bélsarában az izolálhatóság aránya eléri a 100%-ot, majd ezt követően lassan csökkenni kezd. A csikók kórokozóval való fertőződése nagy valószínűséggel a kontaminálódott talajtól, illetve a kancák bélsarától következik be, amihez a csikók esetén gyakran megfigyelt viselkedésforma, a koprofágia is hozzájárulhat (Takai és mtsai., 1987). A kancák bélsarában a *R. equi* izolálhatósági aránya március végén hirtelen 80%-ra ugrik, és 2 hónapon keresztül ezen a szinten marad, ezzel az emelkedéssel egyidőben a talajban is növekszik a baktériumszám.

Mivel a februárban és a márciusban született csikók bélcsatornájának *R. equi*-vel való kolonizációja később következik be, mint az áprilisban és májusban született csikóké, arra enged következtetni, hogy összefüggés van a talaj és a kancák bélsarának *R. equi*-vel való fertőzöttsége és a csikók bélcsatornájának kolonizációja között. Ilyen jellegű összefüggést a *R. equi*-vel erősen kontaminálódott környezetben felnövekvő csikók kivételével minden esetben ki lehetett mutatni. A *R. equi* baktériumok egy sajátos ciklus szerint élnek a háziállatokban és azok közvetlen környezetében lévő talajban (Takai és mtsai., 1986c). Takai és mtsai. (1996c) Japánban közterületeken, parkokban és utcákon gyűjtött összesen 234 talajminta 73,9%-ából ki tudták a baktériumot tenyészteni. A *R. equi* elsődleges előfordulását illetően még nem minden kérdés tisztázott, de az idáig fellelhető adatok többsége arra utal, hogy a *R. equi* alapvetően egy talajlakó baktérium, amelynek bizonyos törzsei, virulenciafaktorai révén, képessé váltak a csikók megbetegítésére.

3.4. A *R. equi* izolálása

A *R. equi* oxigén jelenlétében 10 és 40°C között képes szaporodni. Tenyésztésének az optimális hőmérséklete 30°C (Prescott, 1991), de növekedésének üteme 37°C-on csak jelentéktelen mértékben csökken az optimálishoz viszonyítva (Hughes és Suleiman, 1987). Anaerob körülmények között növekedni nem képes (Barton és Hughes, 1980), bár Prescott és Hoffman (1993) szerint egyes esetekben csak anaerob körülmények között tenyészthető. A baktérium ezen utóbbi tulajdonságát azonban idáig senki sem erősítette meg. Nem támaszt különösebb igényeket a

táptalaj összetételével szemben, így jól nő közönséges agaron is. Az enyhén savas táptalaj előnyösebb számára, mint a lúgos (Barton és Hughes, 1980; Prescott, 1991). Nitrogénforrásként többek között az ammónium-szulfátot (Pradip és mtsai., 1966) és a KNO₃-ot (Rowbotham és Cross, 1977) tudja jól hasznosítani. Emmons és mtsai. (1991), valamint Drancourt és mtsai. (1992) szerint a *R. equi* a citrátot nem képes hasznosítani.

A *R. equi* előfordulásának meghatározásához, ökológiájának pontos megértéséhez megfelelő szelektív táptalajokra volt szükség (Barton és Hughes, 1981). A szelektív táptalajok kifejlesztéséig nem volt hatásos módszer e baktériumfaj szennyezett mintákból (talajból, orrtamponból, bélsárból) való kitenyésztésére. Ezen táptalajok tették lehetővé olyan járványtani és ökológiai kutatások elvégzését, amelyek nagyon fontos információkkal szolgáltak a *R. equi* okozta kórképek jobb megértéséhez. A szelektív táptalajok révén a *R. equi* baktériumokat kitenyésztették a talajból, a bélsárból, a nyirokcsomókból és különböző állatfajok bélsatornájából (Woolcock és mtsai., 1979; Takai és mtsai., 1986a, 1986b, 1986c; Carman és Hoghes, 1987).

A Tinsdale-táptalajt (**1. táblázat**) Tinsdale fejlesztette ki 1947-ben a *Corynebacterium diphtheriae* szelektív izolálására, később azonban sikeresen használták a *R. equi* szelektív tenyésztésére is (Barton és Hughes, 1981; Graevenitz és Pünter-Streit, 1995).

Az M3T táptalajt (**1. táblázat**) eredetileg a *R. coprophilus* szelektív izolálására használták M3 táptalaj néven (Rowbotham és Cross, 1977), Barton és Hughes (1981) azonban 0,005% K-tellurit hozzáadásával módosította összetételét és M3T-nek nevezte.

A NANAT táptalajt (**1. táblázat**) Woolcock és mtsai. (1979) írták le és használták *R. equi* baktériumok bélsármintákból való izolálására. Ezt a táptalajt széleskörűen használják a *R. equi* szennyezett mintákból való szelektív izolálására (Carman és Hoghes, 1987; Debey és Bailie, 1987; Takai és mtsai., 1987, 1991b, 1996c, 2001a). Ennek a táptalajnak az egyik hátránya, hogy az antimycotikus hatása nem kielégítő, így különböző gombák (főként *Mucor* és *Rhizopus*) túlnövik a baktériumtelepeket a tenyésztési idő alatt. A másik hátránya, hogy a szelektív komponensei egyes *R. equi* törzsek növekedését nagymértékben gátolhatják (Graevenitz és Pünter-Streit, 1995).

Barton és Hughes 1981-ben kifejlesztettek a *R. equi* szelektív izolálására egy TANP-levesnek nevezett szelektív táptalajt. A táptalaj alapja TSB (trypticase soy broth, kazein-szója leves) talaj (BBL) (30 g/l), szelektív kiegészítőként pedig cikloheximidet (50 mg/l), penicillint (10 000 NE/l) és K-telluritot (0,005%) tartalmaz.

1995-ben Graevenitz és Pünter-Streit egy új szelektív szilárd táptalajt írtak le (CAZ-NB). Ennek a táptalajnak az alapját a Mueller-Hinton agar képezte, gátlóanyagként pedig ceftazidimet és novobiocint tartalmazott (**1. táblázat**). A ceftazidim képes a Gram-negatív kórokozók, így a *Pseudomonas aeruginosa* növekedésének gátlására. Ezen a táptalajon a *Nocardia brasiliensis* és a *N. farcinica* is képes növekedni, ezek azonban a *R. equi*-től telep morfológia alapján könnyen elkülöníthetők. A szerzők szerint ez a táptalaj hatékonyabb a *R. equi* szelektív izolálására, mint a NANAT táptalaj. A szakirodalomban nem találtunk e táptalaj használatával kapcsolatos tapasztalatokat közlő más leírást.

Barton és Hughes (1981) *R. equi* izolálására szolgáló különböző szelektív táptalajokat hasonlítottak össze talaj és bélsárminták felhasználásával. Ebből a célból folyékony TANP táptalajt használtak, egyedül, illetve különböző szilárd táptalajokkal kombinálva. A NANAT táptalajon kívül, cikloheximid hozzáadásával módosított Tinsdale táptalajt, illetve K-tellurit hozzáadásával módosított M3-táptalajt (M3T) (Rowbotham és Cross, 1977) is alkalmaztak. Az M3T táptalajt találták a legjobbnak a talaj- és a bélsármintákból történő közvetlen ráoltással való tenyésztésre. A talaj- és bélsárminták TANP-levesben való elődúsítást követően alkalmazott szilárd M3T talajra való kioltást alkalmas módszernek találták a *R. equi* szennyezett mintákból történő izolálásra.

Smith és Robinson (1981) polimixin B-vel kiegészített TANP-levesbe a beoltott mintát 37°C-on 48 óráig tenyésztették, majd centrifugálást követően az üledéket 2,5%-os oxálsavval 60 percig kezelték a kísérőflóra elpusztítása érdekében. A Na-foszfáttal történő neutralizálást követően ismételt centrifugálás után amfotericin-B-t és telluritot tartalmazó szilárd táptalajra oltották. A szilárd táptalaj alapját pepton és defibrinált szarvasmarhavér képezte.

Takai és Tsubaki (1985), valamint Takai és mtsai. (1986a, 1986b) a *R. equi* bélsár- és talajmintákból való izolálására olyan NANAT táptalajt használtak, amelynek az alapját élesztő, kazein és cisztin képezte (YCC-agar). A szerzők szerint ez a táptalaj előnyösebb tulajdonságokkal rendelkezik, mint a tripszinnel emésztett szójafehérje-tartalmú NANAT.

Bauwens és mtsai. (1987) bélsármintákat és haltápszert vizsgáltak olyan NANAT táptalajon, amelyet 5% lóvérrel egészítettek ki. A steril vízzel megnedvesített bélsármintát szilárd táptalajra oltották és 48 óráig 36°C-on tenyésztették. Carman és Hoghes (1987) a nedves bélsármintákat közvetlenül a NANAT táptalajra oltották, míg száraz minták esetén leoltás előtt steril fiziológias konyhasóoldattal szuszpenziót (1 g / 10 ml) készítettek, 24 óráig tartó állás után a mintát centrifugálták és a felülúszóból oltottak NANAT táptalajra, amit 37°C-on 48 óráig tenyésztettek. A *R. equi* istálló levegőjéből való kitenyésztéséhez szintén NANAT táptalajt használtak. Ehhez NANAT táptalajt tartalmazó nyitott Petri-csészét 15 percre 1 m magasságban helyeztek el. A tenyésztés 3 napig 37°C-on történt (Takai és mtsai., 1987). Juhok és szarvasmarhák itatóvizéből való baktérium-izoláláshoz a vályúkból 30 ml vizet vettek és centrifugálás után az üledéket oltották NANAT táptalajra. A mintákat 48 órán át 37°C-on tenyésztették (Carman és Hoghes, 1987).

Tammemagi (1953) a *R. equi* nyirokcsomókból való izolálása során 5%-os oxálsavat használt a háttérflóra gátlására. Katsumi és mtsai. (1991) a *R. equi* nyirokcsomókból történő izolálására NANC táptalajt (tripszinnel emésztett szójafehérje, nalidixsav, novobiocin, cikloheximid) használt. Dürrling (1991) a nyirokcsomókat savas kezelésnek vetette alá, és ezt követően oltotta azokat közönséges agarra. Mutimer és Woolcock (1980) a leoltani kívánt nyirokcsomókat forrásban lévő vízbe tette 3 másodpercre és ezt követően oltották le juhvéres agarra.

A vérből való baktériumizolálás során Martens és mtsai. (1982) a vénás vért para-aminobenzoésavat tartalmazó folyékony táplevesbe oltották és 37°C-on 10 napig inkubálták. Le Bar és Pensler (1986) mellúri izzadmányt vizsgáltak és a *R. equi* baktériumokat Löwenstein-Jensen táptalajon, valamint Bactec 7H12 talajon tenyésztették ki. Magnani és mtsai. (1992) szerint az agyvelőből és szívizomból készített szilárd táptalaj alkalmas az emberi széklet- és köpetminták közvetlen leoltására és a *R. equi* izolálására.

Az általánosan használt szelektív táptalajok hátránya az, hogy a *Candida*- és a *Pseudomonas*-fajok nőnek rajtuk, egyes *R. equi* törzsek viszont nem (Woolcock és mtsai., 1979; Barton és Hughes, 1981).

1. táblázat: A szakirodalomban leírt fontosabb szelektív táptalajok összetétele.

A táptalaj neve	TINSDALE	M3T	NANAT	CAZ-NB
A publikáció éve	1947	1977	1979	1995
Szerző(k)	Tinsdale	Rowbotham és Cross	Woolcock és mtsai.	Graevenitz és Pünter-Streit
Összetétel	proteóz pepton (20 g/l), élesztőkivonat (5 g/l), NaCl (5 g/l), L-cisztin (0,24 g/l), agar (15 g/l), vérsavó (100 ml/l), K-tellurit (0,345 g/l), Na-tioszulfát (0,425 g/l), cikloheximid (50 mg/l), pH: 8,0	KH ₂ PO ₄ (0,466 g/l), Na ₂ HPO ₄ (0,732 g/l), KNO ₃ (0,1 g/l), NaCl (0,9 g/l), MgSO ₄ ×7H ₂ O (0,1 g/l), CaCO ₃ (0,02 g/l), Na-propionát (0,2 g/l), FeSO ₄ ×7H ₂ O (0,2 mg/l), ZnSO ₄ ×7H ₂ O (0,18 mg/l), MnSO ₄ ×4 H ₂ O (0,02 mg/l), agar (18 g/l), cikloheximid (50 mg/l), tiamin-HCl (4 mg/l), K-tellurit (0,005%)	TSB talaj, élesztőkivonat (5 g/l), nalidixsav (20 mg/l), novobiocin (25 mg/l), cikloheximid (40 mg/l), K-tellurit (0,005%), agar (20 g/l)	Mueller-Hinton agar alap, ceftazidim (20 mg/l), novobiocin (25 mg/l), cikloheximid (50 mg/l)

3.5. Morfológiai tulajdonságok

3.5.1. Telepmorfológia és pigmenttermelés

Ha a *R. equi* baktériumokat gátlóanyagot nem tartalmazó, szilárd táptalajon 48 órán át aerob viszonyok között tenyésztjük, az agar felületén szabálytalan, kerek, 2-4 mm átmérőjű, sima, fénylő, enyhén áttetsző, összefolyásra hajlamos, nyálkás, vízcseppszerű telepek jelennek meg (Prescott, 1991). Egyes izolátumok telepmorfológiája eltérhet ettől. Jones és mtsai. (1989) emberi tüdőátlyogból véresagaron, 4 napig tartó tenyésztést követően izolált egy *R. equi* törzset, amely R-teleptípusban nőtt (rögös felületű, száraz, ráncos telepek). Prescott szerint (1991) fiatal tenyészet esetén a telepmorfológia a jellegzetestől eltérhet, és ilyenkor kisebb (≤ 1 mm), kevésbé nyálkás telepek jelenhetnek meg. Mutimer és Woolcock (1981) a jellegzetes nyálkástól a száraz telepekig 4 kategóriába sorolta a rendszeresen előforduló teleptípusokat.

Prescott (1991) szerint egyes tenyészeteknek jellegzetes földszaguk van.

A legtöbb törzs, szelektív anyagot nem tartalmazó táptalajon 4-7 napi tenyésztést követően jellegzetes „lazac színű” telepeket képez. Ritkábban a telepek színe a sárgástól a téglavörösről keresztül a barnáig terjedhet (Barton és Hughes, 1980).

Emmons és mtsai. (1991) egy HIV-fertőzött betegből izoláltak egy *R. equi* törzset, amely véresagaron jellegzetes pigmentképzést mutatott, e tulajdonság azonban az átoltást követően megszűnt. A törzset azonban Löwenstein-Jensen agarra oltva a pigmenttermelés visszatért.

McNeil és Brown (1994) a BHI-agaron megfigyelhető 3 teleptípust írtak le:

a./ klasszikus telepmorfológia, halványrózsaszín és nyálkás telepek, b./ korallszínű és nem nyálkás telepek, c./ halványsárga, nem nyálkás és kevésbé áttetsző telepek. A szerzők ennek a harmadik telepmorfológiájú törzsnek határozták meg az ATCC 6939-es típus törzset, amelyet egyébként Prescott (1991) szintén kevésbé nyálkás, de erősen pigmenttermelő törzsnek írt le.

Pradip és mtsai. (1966) a *R. equi* pigmentjét karotinoid típusú pigmentnek tartották, aminek a termeléséhez tiamin szükséges. Azt feltételezték, hogy a tiamin a karotinoid szintézishez szükséges enzimrendszert indukálja és ennek megfelelően a pigmenttermelés függ a táptalaj összetételétől. A Fuhrmann és Lämmler (1997), valamint a Soedarmanto és mtsai. (1998) által megvizsgált valamennyi (41 és 21) *R. equi* törzs nyálkás telepmorfológiában nőtt és rózsaszínű pigmentet termelt.

A *R. equi* folyékony táptalajban egyetlen zavarosodást okoz, gyakran azonban pigmentált üledékképződést és a felületen képződő finom hártát is meg lehet figyelni (Jensen, 1934; Karlson, 1940; Woodroffe, 1950; Cobb, 1963).

3.5.2. A baktérium alakja és festődése

A *R. equi* spóráképzésre nem képes, csillóval nem rendelkező pleomorf baktérium, amelynek alakja függ a tenyésztés körülményeitől (Prescott, 1991). Fiatal, 4-6 órás tenyészetekben a pálcika alakú baktériumok dominálnak, míg a 24 óráig tartó, vagy hosszabb tenyésztés után már csak a coccoid formával találkozhatunk (McNeil és Brown, 1994). Főként folyékony táptalajban a pálcika alakú baktériumok időnként részlegesen elágazódó formákat képezhetnek (Goodfellow, 1989; Prescott 1991). Leves táptalajban tenyésztve 24 órán belül a pálcika alakú baktériumok feltöredezésével jönnek létre a coccoid formák (Goodfellow, 1989). A Fuhrmann és Lämmler (1997) által megvizsgált, lóból származó törzsek mindegyike, az emberekből izolált törzsek többsége (86%-a) szabályos pálcika-coccoid ciklust mutatott. Klinikai mintákban, különösen gennyes váladékokban és szövetekben a coccoid forma az uralkodó, de időnként a pálcika alakú változattal is lehet találkozni (McNeil és Brown, 1994). Weingarten és mtsai. (1988) mellúri izzadmányból, bronchusmosó folyadékból, köpetből és vérből pálcika alakú *R. equi* baktériumokat mutattak ki.

A *R. equi* Gram-pozitív baktérium, idősebb tenyészetekben azonban Gram-negatív formákkal is találkozhatunk (Barton és Hughes, 1980). A Ziehl-Neelsen festés során a tenyészetek különböző módon viselkedhetnek. Egyes szerzők egyáltalán nem találták savállóknak a *R. equi* izolátumokat (Prescott, 1991). Tammemagi (1953) csak 48 óra tenyésztést követően találkozott saválló formákkal. Barton és Hughes (1980) a szilárd táptalajon történő tenyésztést követően több saválló alakot látott, mint a folyékony táptalajban történő tenyésztés után. Emmons és mtsai. (1991) véresagaron és főtt vért tartalmazó agaron való tenyésztést követően nem találtak saválló alakokat, ugyanazon törzs Löwenstein-Jensen táptalajon történő tenyésztését követően azonban a baktériumokat a Kinyoun által módosított Ziehl-Neelsen festés szerint savállóknak találták.

McNeil és Brown (1994) valamennyi klinikai mintából izolált *Rhodococcus* törzset enyhén savállóknak találta a Kinyoun által módosított Ziehl-Neelsen festés szerint. Scott és mtsai. (1995) a friss izolátumokat változó mértékben találták savállóknak, néhány átoltás után viszont már csak ritkán kaptak pozitív eredményt. A savállóság nem állandó tulajdonsága a *R. equi*-nek, aminek a kimutathatósága függ a tenyészet korától, a felhasznált táptalajtól és a festési technikától (Barton és Hughes 1980; Prescott, 1991).

A *R. equi* baktériumok citoplazmájában már Magnusson leírta a Neisser-féle festést követően megfigyelhető nagyszámú, gyengén festődő metakrómás szemcsét. Prescott (1991) szerint ezeknek a metakrómás szemcséknek a kimutatása szintén függ a festési technikától és a tenyésztés körülményeitől, és így nem állandó tulajdonsága a baktériumnak.

3.6. Hemolitikus aktivitás

Smola és mtsai. (1994) a *R. equi* hemolitikus aktivitását különböző állatfajok (szarvasmarha, juh, kecske, ló, nyúl, kutya, ember) teljes vérére, illetve mosott vörösvérsejtjeit tartalmazó szilárd táptalajokon vizsgálták meg. Ezen vizsgálatok során kiderült, hogy az izolátumok teljes vért tartalmazó agar esetén egyáltalán nem vagy csak nagyon gyenge hemolízist okoztak. Ezzel szemben a 14 *R. equi* törzs közül 13 hemolizált a mosott vörösvérsejteket tartalmazó véresagaron. A kérődzők mosott vörösvérsejtjeit tartalmazó agaron csak gyenge hemolízist lehetett megfigyelni, a ló, nyúl, kutya és az ember mosott vörösvérsejtjei esetén azonban jelentős mértékű hemolízis alakult ki. A hemolitikus aktivitást a Ca^{2+} ionok jelenléte segítette, a Zn^{2+} és Mg^{2+} ionok viszont nem befolyásolták. A 30°C-on történő tenyésztés során a hemolízis kifejezettebb volt, mint 37°C-on végzett tenyésztés során.

Smola vizsgálatai szerint (1994) a hemolitikus aktivitás főként a foszfatidil-inozitol specifikus foszfolipáz C (PI-PLC), kisebb mértékben pedig a lecitináz aktivitással van összefüggésben. A Soedarmanto és mtsai. (1997, 1998) által megvizsgált szarvasmarhanyirokcsomókból (10), egészséges lovak és szarvasmarhák bélsarából, valamint a Fuhrmann és Lämmler (1997) által lovakból és emberekből izolált törzsek (21 és 41) egyike sem hemolizált juhvéres agaron, de erős β -hemolízist mutattak mosott vörösvérsejteket tartalmazó nyúlvéres agaron.

3.7. Equi-faktorok

A *R. equi* törzsek különböző extracelluláris enzimeket, ún. „equi-faktorok”-at termelnek, amelyek a *Corynebacterium pseudotuberculosis* foszfolipáz D exotoxinjával, a *Staphylococcus aureus* β -toxinjával, vagy a *Listeria monocytogenes* hemolizinjével együtt teljes hemolízist képesek előidézni (Fraser, 1964; Berheimer, 1980; Bern és Lämmler, 1994; Fuhrmann és Lämmler, 1997).

Az equi-faktorok több összetevőből álló membránoldó tulajdonsággal rendelkező exoenzimek. Linder és Bernheimer (1982), valamint Machang'u és Prescott (1991a) kimutatták az equi-faktorok egyik összetevőjét, a 60 kDa molekulatömegű koleszterol-oxidáz

enzimet. Kreit és mtsai. (1994) szerint a koleszterol-oxidáz egy integrális membránfehérje, aminek az aktív központja a membrán felületén lokalizálódik. Juhok vörösvérsejtjeinek *Staphylococcus* β -toxinnal, vagy *C. pseudotuberculosis* foszfolipáz D-vel történő előkezelése után, a koleszterol-oxidáz a vörösvérsejtek membrán-koleszterinjét oxidálja, amely során H_2O_2 szabadul fel.

A foszfolipáz C egy 74 kDa molekulatömegű enzim, amelynek membránoldó hatása a vörösvérsejtek falában helyeződő szfingomielin ceramiddá történő átalakulásának a hatására jön létre, ami a sejtmembrán stabilitásának elvesztéséhez vezet (Bernheimer és mtsai., 1980).

Ezen a két enzimen kívül a *R. equi* két további foszfolipáz aktivitással rendelkező enzimet termel, a szfingomielináz C-t és egy kolin-foszfohidrolázt (Machang'u és Prescott, 1991a). A kolin-foszfohidroláz 65 kDa molekulatömegű és gyengébb hemolitikus aktivitással rendelkezik. A szerzők rámutattak arra, hogy a koleszterol-oxidáz és a kolin-foszfohidroláz additív (nem szinergista) hemolitikus hatással rendelkeznek.

Prescott és mtsai. (1982) szerint az equi-faktorokat a juh, a szarvasmarha, a kecske, a nyúl és a tyúk vörösvérsejtjeinek felhasználásával lehet kimutatni, a ló vörösvérsejtek azonban nem működnek következetesen ebben a vizsgálatban. Az általuk megvizsgált valamennyi (173) törzs termelt equi-faktorokat. A Bern és Lämmler (1994) által megvizsgált 45 törzs esetén is ugyanilyen eredményt kaptak. Prescott és mtsai. (1982) az equi-faktorok jelenlétét a *R. equi* identifikálásában használható, állandó és megbízható tulajdonságnak tartják. Ennek ellenére a szakirodalomban találkozhatunk néhány leírással, amikor az equi-faktorok jelenlétét nem minden törzs esetén tudták kimutatni. Nakazawa és Nemoto (1980) a 41 megvizsgált *R. equi* törzs közül csak 26 esetén tudta a *L. monocytogenes* hemolizinjével kialakuló szinergista hemolitikus hatást kimutatni. A Quinn és mtsai. (1994) által írt kézikönyv szerint a *L. monocytogenes* nem, hanem csak a *L. ivanovii* ad pozitív CAMP-reakciót a *R. equi*-vel.

Az equi-faktorokkal szembeni ellenanyagok vérsavóban való megjelenését a lovak *R. equi* fertőzöttségének diagnosztizálására is felhasználták (Prescott és mtsai., 1984a; Skalka és Svastová, 1985a, 1985b).

3.8. Biokémiai tulajdonságok

A *R. equi*-t biokémiai szempontból inaktív baktériumként tartják számon, mivel nem termel proteázokat, a szénhidrátokat és az alkoholokat nem bontja (Prescott, 1991). McKenzie és Donald (1979) szerint a *R. equi* glükózból, maltózból, mannitból savat nem képez. Egyes szerzők szerint egy *R. equi* típus-törzs a glükózt oxidálni (Gordon, 1966; Goodfellow és Alderson, 1977) vagy fermentálni tudta (Davis és Newton, 1969), de ezeket az eredményeket a későbbiekben senki nem tudta reprodukálni (Barton és Hughes, 1980). McNeil és Brown (1994) azt tapasztalta, hogy a *R. equi* Gordon alaptáptalajban 14 napon belül oxidáció révén a glükózból kimutatható mennyiségű savat termelt, és további törzsek hosszabb inkubációs idő után a maltózt savtermelés közben elbontották.

A legtöbb szerző szerint a *R. equi* kataláz pozitív, oxidáz negatív, kb. 95%-uk ureáz enzimet termel, a törzsek 88%-a a nitrátot nitritté redukálja, a zselatint, a hippurátot, és az eszculint nem hidrolizálja (Goodfellow és Alderson, 1977; Mutimer és Woolcock, 1981; Goodfellow és mtsai., 1982; Prescott, 1991). Kivételesen ezektől a tulajdonságoktól eltérően kataláz negatív (Kunke, 1987) és oxidáz pozitív (Prescott és mtsai., 1982) törzsekről szóló leírásokkal is találkozhatunk. Davis és Newton (1969) az NCTC 1621-es típus-törzset oxidáz pozitívnak találták, de ezt az eredményt Barton és Hughes (1980) nem tudták reprodukálni. Marsh és Graevenitz (1973), Barton és Hughes (1980), Takai és Tsubaki, (1985), valamint Drancourt és mtsai. (1992) a *R. equi* törzseket oxidáz negatívnak találták, ezzel szemben azonban Davis és Newton (1969) a *R. equi*-t oxidáz pozitívnak tartotta. Ritkán nitrát negatív törzsekről is olvashatunk, amelyek többsége egyidejűleg az ureáz-próbában is negatív (van

Etta és mtsai., 1983; Müller és mtsai., 1988; Novak és mtsai., 1988; Nordmann és mtsai., 1992). Prescott és mtsai. (1982) 173 megvizsgált törzs között egy ureáz negatív izolátumot találtak, amelyik egyben az eszkulint is hidrolizálta. Ugyanebben a kísérletben két további törzs az eszkulint, egy pedig a Na-hippurátot gyengén hidrolizálta.

A H₂S-termelésben különbségek vannak a törzsek között (Barton és Hughes 1980; Prescott, 1991). Kaura és Mutimer (1987) által megvizsgált 24 törzs 62,5%-a termelt H₂S-t.

Míg McGowan és Mangano (1991), valamint Soedarmanto és mtsai. (1997, 1998) vizsgálataik alapján azt állapították meg, hogy a *R. equi* 6,5% NaCl jelenlétében nem képes növekedni, addig Emmons és mtsai. (1991) ennek éppen az ellenkezőjét tapasztalták.

A Bern és Lämmler (1994) által megvizsgált összesen 30 törzs mindegyike kataláz pozitív volt, az állati eredetű törzsek 94%-a, az emberi eredetűeknek pedig 77%-a a nitrátot nitritté redukálta, az állati eredetűeknek 6%-a, az emberi eredetűeknek pedig 31%-a volt ureáz pozitív. A megvizsgált törzsek közül egyik sem hidrolizálta a zselatint és az eszkulint, és nem volt képes fermentálni a különböző szénhidrátokat. A szerzők nem találtak szignifikáns különbséget az állati és az emberi törzsek között.

A Fuhrmann és Lämmler (1997) által megvizsgált lovakból és emberekből izolált *R. equi* törzsek mindegyike termelt katalázt és lipázt, és a nitrátot nitritté redukálták, a törzsek 95%-a volt ureáz pozitív.

Soedarmanto és mtsai. (1997, 1998) az általuk megvizsgált szarvasmarhanyirokcsomókból (10 törzs), valamint lovak és szarvasmarhák bélsarából izolált 21 *R. equi* törzset kataláz- és ureáz-pozitívnak találták. A törzsek egyike sem termelt savat arabinózból, glükózból, laktózból, maltózból, mannitból, raffinózból, ramnózból, szalicinből, szorbitból, szacharózból, trehalózból, valamint xilózból és nem hidrolizálták az eszkulint és a Na-hippurátot.

3.9. Enzimaktivitás

Barton és Hughes (1980), Mutimer és Woolcock (1980), valamint Prescott (1991) az általuk megvizsgált *R. equi* törzseket lipáz- és foszfatáz-pozitívnak találták, azonban dezoxi-ribonukleázt, elasztázt, lecitinázt és indolt nem termeltek. Smola és mtsai. (1994) ezzel szemben a lipáz-aktivitás mellett lecitinázt is kimutattak, és 13 törzs esetén egy extracelluláris foszfatidil-inozitol specifikus foszfolipáz-C (PI-PLC) jelenlétét is megállapították.

Mutimer és Woolcock (1983) 105 *R. equi* törzsben 11 extracelluláris enzim aktivitását vizsgálta, amely során a foszfatázon kívül egyedül a lipázt tudták minden törzsben kimutatni, dezoxi-ribonukleáz aktivitással pedig 12 törzs rendelkezett. A megvizsgált törzsek kondroitin-szulfatáz-, kollagenáz-, elasztáz-, fibrinolizin-, zselatináz-, hialuronidáz-, lecitináz- és proteáz-aktivitással nem rendelkeztek.

Kaura és Mutimer (1987) által megvizsgált valamennyi törzs (24) rendelkezett eszteráz (C4), foszfoamidáz, leucin-arilamidáz, α -glükozidáz és savanyú foszfatáz aktivitással. Alkalikus foszfatázt a törzsek 84%-a termelt. A Goodfellow és mtsai. (1990) által megvizsgált 10 törzs egyike sem mutatott alkalikus foszfatáz aktivitást, de 9 törzs rendelkezett savanyú foszfatáz aktivitással. Bern és Lämmler (1994) által megvizsgált 17, főként lóból, és 13, emberekből izolált törzs közül mindegyik termelt alkalikus foszfatázt, az állati eredetű törzsek 88%-a, az emberi eredetűeknek pedig a 85%-a α -glükozidázt, de egyik törzs sem mutatott β -glükuronidáz-, β -galaktozidáz- és β -glükozidáz-aktivitást. Pirazinamidáz és pirrolidonil-arilamidáz aktivitással csak az emberi törzsek egy része (69%, 23%) rendelkezett.

De La Pena-Moctezuma és mtsai. (1996) az API ZYM (bioMérieux, Franciaország) rendszert használták 5 *R. equi* törzs enzimprofiljának jellemzésére, illetve annak megállapítására, hogy van-e különbség a virulenciaplazmidaal rendelkező és az avirulens törzsek enzimaktivitása között. Ilyen különbséget a szerzők nem találtak. Valamennyi általuk vizsgált törzs rendelkezett cisztin-arilamidáz-, eszteráz lipáz-, savanyú foszfatáz-, alkalikus

foszfatáz-, naftol-AS-BI-foszfohidroláz- és valin-arilamidáz-aktivitással. A törzsek nem mutattak eszteráz (C4)-, lipáz (C14)-, N-acetil- β -glükózaminidáz- és tripszin-aktivitást.

A Soedarmanto és mtsai. (1997, 1998) által megvizsgált szarvasmarha nyirokcsomókból, valamint lovak és szarvasmarhák bélsarából izolált törzsek nem termeltek α -galaktozidázt, β -galaktozidázt, β -glükuronidázt.

3.10. Szénforrás-hasznosítás

A Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Goodfellow, 1994) szerint a *R. equi* törzsek egy része képes hasznosítani a mannózt, az androszteront, a benzoésavat, a DL-norleucint, a pimelinsavat, a spermint és a tesztoszteront. Nem képesek azonban a törzsek szénforrásként hasznosítani a laktózt, maltózt, a bután-3-diolt, a citrakonsavat, a citromsavat és a D-mandulasavat.

De La Pena-Moctezuma és mtsai. (1996) a BIOLOG (Biolog, Inc., Hayward, CA) rendszert használták 5 *R. equi* törzs szénforrás-hasznosításának jellemzésére, illetve annak megállapítására, hogy van-e különbség a virulenciaplazmidaal rendelkező és avirulens törzsek szénforrás-hasznosítása között. A szerzők mind a Gram-negatív, mind pedig a Gram-pozitív baktériumok identifikálására használt lemezre leoltották a törzseket és az eredményeket 24 óráig tartó tenyésztés után olvasták le. A szerzők által megvizsgált törzsek Tween 40-et, Tween 80-t, L-glutaminsavat, N-acetil-L-glutaminsavat, α -D-glükózt, dextrint, glikogént, szalicint, ecetsavat, hangyasavat, D-tejsavat, L-tejsavat, propionsavat, 2,3-butándiolt és a glicerolt tudták szénforrásként hasznosítani. A közlemény azonban csak pozitív és negatív reakciókról tesz említést nem részletezi a törzsek közötti különbségeket, és ellentmondás van a szöveges rész és a táblázat között.

Bizet és mtsai. (1997) „Biotype-100” lemezzel (bioMérieux, Franciaország) vizsgálták több más baktérium mellett 5, csikókból és 7, emberekből izolált *R. equi* törzs szénforrás-hasznosítását.

A vizsgált *R. equi* törzsek a következő szénforrásokat tudták hasznosítani (zárójelben a pozitív törzsek aránya): 4-aminobutirát (8%), 5-aminovalerát (8%), kaprilát (42%), m-kumarát (33%), fumarát (83%), D-glükóz (100%), L-glutamát (58%), 3-hidroxibenzoát (25%), 4-hidroxibenzoát (92%), 3-hidroxibutirát (92%), 2-ketoglukonát (8%), 2-ketoglutarárt (17%), DL-laktát (100%), D-malát (17%), L-malát (100%), malonát (8%), maltotrióz (8%), 3-fenilpropionát (100%), propionát (92%), protokatechuát (100%), D-ribóz (100%), szukcinát (100%), L-tirozin (8%).

Ugyanebben a vizsgálatban a megvizsgált 12 törzs egyike sem tudta hasznosítani a következő szénforrásokat: N-acetil-D-glükózamin, cisz-akonitát, transz-akonitát, D-alanin, L-alanin, L-arabinóz, D-arabitol, L-aszpartát, benzoát, betain, citrát, eszkulin, etanolamin, D-fruktóz, D-galaktóz, gentizát, D-glükonát, glutarát, glicerol, hisztamin, mio-inozitol, 5-ketoglukonát, laktóz, laktulóz, maltitol, maltóz, D-mannit, D-mannóz, D-melezitóz, D-melibióz, 1-o-metil- α -galaktozid, 1-o-metil- β -galaktozid, 1-o-metil- α -D-glükozid, palatinóz, fenilacetát, L-prolin, putreszcin, kvinát, D-raffinóz, L-ramnóz, D-szacharát, D-szorbitol, szacharóz, D-tartarát, D-trehalóz, triptamin, triptofán, D-turanóz, xilit.

Goodfellow és mtsai. (1998) vizsgálatai alapján a *R. equi* képes hasznosítani az inozitot, mannitot, ribózt, szorbitot, szacharózt, a törzsek között különbségek vannak a cellobióz és a mannóz hasznosítása tekintetében, nem képesek viszont hasznosítani a galaktózt, maltózt, turanózt és a xilózt.

3.11. Antibiotikum-érzékenység

Az irodalomban viszonylag sok adatot találunk a különböző eredetű *R. equi* törzsek antibiotikum-érzékenységével kapcsolatosan. Az esetek többségében a szerzők korongdiffúziós-módszerrel vizsgálták a törzsek antibiotikum-érzékenységét.

Falcon és mtsai. (1985) 17, csikókból izolált *R. equi* törzs antibiotikum-érzékenységének vizsgálata során az összes törzset érzékenynek találták gentamicinre és neomicinre, 16-ot eritromicinre, 15-öt pedig klóramfenikolra. Penicillinnel szemben 11 törzs volt rezisztens, a maradék 6-ot pedig mérsékelten érzékenynek minősítették.

Perdrizet és Scott (1987) által megvizsgált törzsek érzékenyek voltak eritromicinre, gentamicinre, neomicinre, sztreptomycinre, nitrofurantoinra és trimetoprim-szulfametoxazol kombinációra, rezisztensek voltak viszont ampicillinnel, penicillinnel, kanamicinnel és polimixin B-vel szemben. Oxenford és mtsai. (1987) egy kandúrból izolált *R. equi* törzset érzékenynek találtak eritromicinre, kanamicinre, neomicinre és gentamicinre.

Flepp és mtsai. (1989) az emberből izolált *R. equi* törzseket érzékenynek találtak amoxicillinre, klóramfenikolra, ciprofloxacina, gentamicinre, imipenemre és vankomicinre. A törzsek klindamicinre mérsékelten érzékenyek, flukloxacillinnel és penicillin G-vel szemben viszont rezisztensek voltak.

A Prescott (1991) által megvizsgált törzsek érzékenyek voltak eritromicinre, klindamicinre, amikacinra, gentamicinre, neomicinre, tobramicinre, valamint rifampicinre és vankomicinre.

A McNeil és Brown (1992) által megvizsgált 107 törzs kevesebb, mint 5%-a volt rezisztens eritromicinnel, rifampicinnel, gentamicinnel, tetraciklinnel és trimetoprim-szulfametoxazol kombinációval szemben.

Fuhrmann és Lämmler (1997) lóából (19) és emberekből (22) származó *R. equi* törzsek antibiotikum-érzékenységét korongdiffúziós módszerrel vizsgálták és valamennyi törzset érzékenynek találtak eritromicinre, gentamicinre, minociklinre, neomicinre, rifampicinre és vankomicinre. A törzseknek csak egynegyede volt érzékeny penicillin G-re és több mint a felük rezisztens volt tetraciklinnel szemben. A Soedarmanto és mtsai. (1997) által szarvasmarha nyirokcsomókból izolált 10 törzs mindegyike érzékeny volt ampicillinre, eritromicinre, gentamicinre, imipenemre, penicillinre, rifampicinre, tetraciklinre és vankomicinre.

Az irodalomban fellelhető néhány olyan közlemény is, amelyek a különböző antibiotikumok minimális gátló koncentráció (MIC) értékeit is megadják a megvizsgált *R. equi* törzsek vonatkozásában.

Prescott és Nicholson (1984) csikótüdőkből izolált 9 *R. equi* törzs MIC-értékét öt antibiotikumra vonatkozóan a következőnek határozták meg: penicillin (2,4 - 9,6 µg/ml), ampicillin (4 - 8 µg/ml), gentamicin (0,125 - 0,5 µg/ml), eritromicin (0,0625 - 0,25 µg/ml), rifampicin (0,0078 - 0,0625 µg/ml). A gentamicint a rifampicinnel antagonista hatásúnak találták.

Nordmann és Ronco (1992) négy emberi izolátum és egy referencia törzs *in vitro* antibiotikum-érzékenységét vizsgálták 36 antibiotikum esetében. *In vitro* a leghatásosabb antibiotikumok a következők voltak: amikacin (0,5 - 4 µg/ml), gentamicin (0,5 - 1 µg/ml), netilmicin, eritromicin (0,06 - 0,25 µg/ml), klaritromicin, roxitromicin, ciprofloxacina, sparfloxacina, rifampicin (0,03 - 0,25 µg/ml), vankomicin (0,12 - 0,25 µg/ml), teikoplanin, doxiciklin (0,5 - 1 µg/ml), minociklin (0,12 - 0,5 µg/ml), imipenem, meropenem és a trimetoprim-szulfametoxazol. A szerzők négy kombinációt találtak szinergista hatásúnak: rifampicin-eritromicin, rifampicin-minociklin, eritromicin-minociklin, imipenem-amikacin. Az eritromicin-amikacin kombináció viszont antagonista hatású volt.

Takai és mtsai. (1997) összesen 640, csikókból és talajból származó, valamint 39, emberi *R. equi* izolátum rifampicinnel szembeni érzékenységét vizsgálták meg. Három izolátum kivételével valamennyi érzékeny (MIC<12,5 µg/ml) volt rifampicinre. A béltartalomból izolált törzsek esetén 25 µg/ml, vagy ennél nagyobb MIC értéket mutató törzset tekintettek rezisztensnek.

Giguére és Prescott (1997) eritromicin esetén 0,25 µg/ml, vagy ennél kisebb MIC érték, míg rifampicin esetén 0,06 µg/ml, vagy ennél kisebb MIC érték esetén tekintették érzékenynek a törzset.

3.12. Szerológiai tulajdonságok

A *R. equi* törzsek szerológiai sajátosságainak vizsgálatára az 1930-as évek végétől kezdődően sokan kísérletet tettek.

Magnusson (1938) izolátumait szerológiailag egységesnek írta le, mivel az általa végzett agglutinációs próbák során az összes törzs reagált ugyanazzal az hiperimmun savóval. Ezek a törzsek azonban – kettő kivételével – azonos forrásból származtak, így járványtani rokonságuk valószínűsíthető.

Bruner és mtsai. (1939) elsőként tettek kísérletet különböző eredetű *R. equi* törzsek szerotipizálására. A 20 törzset agglutinációs és precipitációs próbák segítségével vizsgálták. Az általuk vizsgált 14 izolátumot felületi antigénjeik alapján 2 fő csoportba, a maradék 6 izolátumot pedig további 5 különálló csoportba sorolták.

Karlson és mtsai. (1940) agglutinációs próbával törzsspecifikus antigének, komplementkötési próbával pedig fajspecifikus antigének jelenlétét állapították meg sertések áll alatti nyirokcsomóiból kitenyészett törzsek vizsgálata során.

Bruner és Edwards (1941) 34 *R. equi* izolátum szerotipizálására tett kísérletet. A minták lóból, szarvasmarhából és sertésből származtak. A szerzők a baktériumot savas hőkezelésnek vetették alá, ily módon egy fajspecifikus sejtfalantigén jelenlétét tudták bizonyítani. Burokhoz kötődő csoport- és típuspecifikus antigének vizsgálatára is sor került. Mindezek alapján a vizsgált 34 izolátumból 29-et négy csoportba osztottak, a maradék 5 pedig külön-külön csoportba tartozott.

Woodrooffe (1950) 21 baktériumtörzsből 18-at csőagglutinációs és precipitációs próba segítségével 2 fő csoportba, a maradék 3-at pedig önálló csoportokba sorolta.

Carter és Hylton (1974) 16 törzset passzív hemagglutinációs próbával vizsgált. A baktérium-szuszpenziót 30 percig 56°C-on hőkezelték 0,15 mol/l koncentrációjú NaCl-oldatban, majd az extrahált antigéneket vörösvérsejtekhez kötötték. A vizsgálat során az összes törzs azonos módon viselkedett.

Prescott (1981) agargél-precipitációs próba alkalmazásával burokantigénjeik alapján 7 szerotípusba sorolta be az általa vizsgált 97 *R. equi* törzset. A törzseket beteg csikókból, szarvasmarhából, sertésekből, kutyákból, macskákból és emberekből izolálták. A vizsgálathoz 26 törzssel szemben nyulakban hiperimmun savókat termelt, és ezeket használta az agargél-precipitáció során. Az 1-es, 2-es, 3-as, 5-ös és 7-es szerotípusokkal szemben termelt hiperimmun savók csak a homológ törzsekkel reagáltak, míg a 4-es és a 6-os savó gyenge keresztreakciót adott a 2-es típusú antigénnel is. Az egyes izolátumok eredete és szerotípusuk között a szerző nem talált egyértelmű összefüggést, bár a lovakból származó törzsek többsége 1-es szerotípusú volt.

A burok poliszacharidjainak későbbi vizsgálata során kiderült, hogy a Prescott-féle 1-es szerotípus poliszacharidja D-glükózból, D-mannózból és D-glükuronsavból áll (Leitch és Richards, 1990; Finnerty, 1992). A 2-es szerotípus burokantigénje ismétlődő tetraszacharid egységekből épül fel, amelyek D-glükózból, D-mannózból, D-glükuronsavból és karboxietil-L-ramnózból állnak (Severn és Richards, 1990). A 7-es szerotípus burokpoliszacharidja olyan piruvat-szubsztituensekből áll, amely nem tartalmaz glükuronsav-maradékot (Leitch és Richards, 1990; Finnerty, 1992; Masoud és Richards, 1994).

Nakazawa és mtsai. (1983b) tárgylemez-agglutinációs próba segítségével 27 *R. equi* szerotípust azonosítottak. A szerzők összesen 1195 törzset vizsgáltak, amelyek közül 821 lóvak bélsarából, 374 pedig a betegség klinikai tüneteit mutató csikókból származott. Vizsgálataik során a 7 Prescott-féle típus-törzset is besorolták az általuk felállított rendszerbe.

A Prescott-féle 1-es, 2-es, 3-as, 4-es, 5-ös, 6-os és 7-es típusú törzsek Nakazawa rendszerében 4-es, 16-os, 2-es, 12-es, 21-es, 1-es és 9-es szerotípusba tartozott. A szerzők itt sem tudtak egyértelmű összefüggést megállapítani a törzsek eredete és a szerotípusok megoszlása között.

Egyes kutatók eredményei alapján a Prescott-féle szerotípusokat nem lehet egyértelműen a Nakazawa-féle szerotípusoknak megfeleltetni (Katsumi és mtsai., 1991; Zimmermann, 1996; Lämmler és mtsai., 1997; Soedarmanto és mtsai., 1998).

Skalka és Svastová (1985a, b) egy másik tipizálási rendszerről számolt be, amelyik nem a burok-poliszacharidok antigénszerkezetén, hanem az equi-faktorok antigenitásán alapul.

A szakirodalomban a Prescott-féle szerotipizálási rendszer a legelterjedtebb.

Mutimer és mtsai. 1982-ben 100, túlnyomórészt egészséges állatok bélsarából, emberből, valamint talajból izolált *R. equi* törzset vizsgáltak meg a Prescott-féle szerotipizálási rendszert alkalmazva. A minták 16%-a nem volt besorolható Prescott rendszerébe, amely további szerotípusok létre utalhat.

Katsumi és mtsai. (1991) 216, sertések áll alatti nyirokcsomóiból származó törzset vizsgáltak Prescott rendszere szerint. A törzsek 51%-a a 2-es szerotípusba tartozott, 35%-uk pedig nem volt besorolható.

Bern és Lämmler (1994) összesen 30, lovakból és emberekből származó törzset vizsgált. A törzsek nagyobb része a Prescott-féle 1-es és 2-es, kisebb részük az 5-ös és 6-os szerotípusba tartozott, egy törzs pedig nem volt besorolható.

Zimmermann (1996) 57 *R. equi* törzset szerotipizált a Prescott-féle rendszer szerint. A törzsek nagyrészt növényevő állatok bélsarából, kisebb részben pedig sertések nyirokcsomóiból származtak. Összesen 39 törzset sikerült az 1-es, 2-es, 3-as és 6-os szerotípusokba besorolnia, 17 törzs pedig egyik szerotípusba sem volt besorolható.

Fuhrmann és Lämmler (1997) vizsgálatai során a lovakból és emberekből származó, összesen 41 törzsből a többség a Prescott szerinti 1-es és 2-es, kisebb rész pedig a 3-as, 5-ös és 6-os szerotípusba tartozott, ill. nem volt besorolható.

Lämmler és mtsai. (1997) összesen 98, különböző eredetű *R. equi* törzset vizsgáltak. A törzsek túlnyomó többsége az 1-es és a 2-es szerotípusba tartozott. A törzsek 12%-a nem volt besorolható.

Soedarmanto és mtsai. (1997) szarvasmarhák nyirokcsomóiból izolált 10 törzs vizsgálata során egyetlen törzset sem tudtak a Prescott-féle rendszerbe besorolni.

1998-ban Soedarmanto és mtsai. növényevő állatok bélsarából származó 21 törzset vizsgáltak. Ezek közül hét törzs a Prescott-féle 1-es, négy a 2-es, három törzs a 3-as, egy a 6-os szerotípusba tartozott, míg hat törzs nem volt besorolható.

A Prescott által kidolgozott szerotipizálási rendszert alkalmazó kutatók vizsgálatainak eredményeit a szakirodalomban fellelhető adatok alapján a **2. táblázat** tartalmazza.

A Magyarországon korábban izolált *R. equi* törzsek szerotipizálását passzív hemagglutinációs próbával végezték, amely során mind a 25 vizsgált törzs a Prescott-féle 1-es szerotípusba tartozott (Fodor és mtsai., 1996).

2. táblázat: A Prescott-féle szerotipizálási rendszerben vizsgált *R. equi* törzsek eredet és szerotípus szerinti megoszlása.

Szerző(k)	Törzsek eredete	Szerotípus a Prescott-féle tipizálási rendszerben							Nem besorolható	Összes törzs
		1	2	3	4	5	6	7		
Prescott, (1981)	ló (49), sertés (35), kutya (3), macska (2), szarvasmarha (1), ember (7)	58 (60%)	25 (26%)	1 (1%)	4 (4%)	3 (3%)	5 (5%)	1 (1%)	–	97
Mutimer és mtsai., (1982)	ló (47), szarvasmarha (20), sertés (12), juh (5), ember (2), kenguru (5), koala (1), talaj (7), NCTC 1621	44 (44%)	17 (17%)	1 (1%)	–	6 (6%)	15 (15%)	1 (1%)	16 (16%)	100
Katsumi és mtsai., (1991)	sertés áll alatti nycs. (219)	23 (10%)	112 (51%)	10 (5%)	–	2 (1%)	–	–	72 (33%)	219
Bern és Lämmler, (1994)	ló (17), ember (13)	17 (57%)	10 (34%)	–	–	1 (3%)	1 (3%)	–	1 (3%)	30
Zimmermann, (1996)	ló bélsár (19), szarvasmarha bélsár (12), juh bélsár (7), sertés bélsár (9), sertés nyirokcsomó (10)	14 (25%)	20 (35%)	4 (7%)	–	–	1 (2%)	–	18 (31%)	57
Fuhrmann és Lämmler, (1997)	ló (19), ember (22)	21 (51%)	14 (34%)	1 (2,5%)	–	1 (2,5%)	3 (7,5%)	–	1 (2,5%)	41
Lämmler és mtsai., (1997)	ló bélsár (19), ló (19), szarvasmarha bélsár (12), sertés bélsár (6), sertés nyirokcsomó (10), juh bélsár (10), ember (22)	34 (35%)	41 (42%)	5 (5%)	–	1 (1%)	5 (5%)	–	12 (12%)	98
Soedarmanto és mtsai., (1997)	szarvasmarha nyirokcsomó (10)	–	–	–	–	–	–	–	10 (100%)	10
Soedarmanto és mtsai., (1998)	ló bélsár (11), szarvasmarha bélsár (10)	7 (33%)	4 (19%)	3 (14%)	–	–	1 (5%)	–	6 (29%)	21

3.13. A *R. equi* virulenciája

Annak ellenére, hogy a *R. equi* gyakorlatilag mindenütt megtalálható a talajban, az általa okozott megbetegedések egyes állattartó telepeken endémiásan fordulnak elő, és nagy veszteségeket okoznak, máshol csak ritkán, egyes telepeken pedig egyáltalán nem találkoznak a megbetegedéssel (Rooney, 1966). Ez a jelenség összefüggésben állhat a baktériumtörzsek virulenciájával. A klinikai esetekből származó izolátumok sokkal virulensebbek, mint a környezeti izolátumok (Bowles és mtsai., 1987), és a virulens törzseket sokkal gyakrabban lehet izolálni olyan méneselekben, ahol előfordul a megbetegedés, mint ahol nem (Takai és mtsai., 1991b).

A *R. equi* izolátumok között meglévő virulenciabeli különbségeket többen is megállapították (Martens és mtsai., 1982; Hondalus és Mosser, 1994). A *R. equi* virulenciája azon képességétől függ, hogy mennyire tudja az immunrendszer elimináló mechanizmusait kikerülni, és így módon a makrofágokon belül túlélni, illetve ott szaporodni.

A *R. equi* feltételezett virulenciafaktorai közé tartozik a burok-poliszacharid, az extracelluláris enzimek (a koleszterol-oxidáz, a foszfolipáz C és a lecitináz), a sejtfalban található mikolsavak, és a virulenciaplazmidok által kódolt fehérjék (Yager, 1987; Prescott, 1991). Feltételezték, hogy a poliszacharid burok, több más burkos baktériumhoz hasonlóan, antifagocita hatású. A *R. equi* burka antigénszerkezetiileg meglehetősen heterogén, mégsem sikerült közvetlen összefüggést kimutatni a törzsek szerotípusa és a virulenciája között (Takai és mtsai., 1991a). Az extracelluláris enzimek ugyan képesek a vörösvérsejtek membránját károsítani, de ezeket az enzimeket mind a virulens, mind pedig az avirulens törzsek termelik. A mikolsav tartalmú glikolipideknek szerepe lehet az intracelluláris túlélésben és a granulómák kialakulásában (Prescott, 1991). Azok a *R. equi* törzsek, amelyeket sertések eltályogosodott nyirokcsomóiból izoláltak, hosszabb láncú mikolsavakat tartalmaztak, mint a makroszkópos elváltozást nem mutató nyirokcsomókból izolált törzsek (Gotoh és mtsai., 1991). Takai és mtsai. (1991a), valamint Tkachuk-Saad és Prescott (1991) kutatásai kimutatták a kapcsolatot a lovakra és a sertésekre nézve virulens *R. equi* törzsek plazmidjai és a felületükön kifejeződő virulenciához kötött fehérjéi között.

A virulenciához kötődő antigének és virulenciaplazmidok lehetővé teszik a *R. equi* törzsek virulencia szerinti csoportosítását (Takai, 1997; Takai és mtsai., 1999). A *R. equi* törzseknek jelen ismereteink szerint legalább három virulenciaváltozata van: virulens, mérsékelten virulens, és avirulens. A virulens *R. equi* törzseket a virulenciához kötődő, 15-17 kDa molekulatömegű felületi fehérje antigén (vapA) jelenléte jellemzi, amely antigént 85, 87 vagy 90 kbp méretű virulenciaplazmid kódol. Csak e törzsek képesek tályogképződéssel járó tüdőgyulladást előidézni csikókban, és ezeknek a törzseknek az egérre vonatkoztatott LD₅₀ értéke 10⁶, a csikókra vonatkoztatott minimális infektív dózisa pedig 10⁴ baktérium. A mérsékelten virulens *R. equi* törzsek 20 kDa molekulatömegű virulenciához kötődő felületi fehérjeantigénnel (vapB) rendelkeznek, amelyet egy 79-100 kbp-ig terjedő (79, 87, 88, 88,5, 89, 95, 100 kbp) méretű virulenciaplazmid kódol. Ezeket a mérsékelten virulens törzseket elsősorban sertések áll alatti nyirokcsomóiból, valamint HIV-fertőzött emberekből izolált törzsek között lehet megtalálni. Ezen törzsek egerekre vonatkoztatott LD₅₀ értéke 10⁷ baktérium. Az avirulens *R. equi* törzsek sem virulenciához kötődő antigénnel, sem pedig virulenciaplazmiddal nem rendelkeznek. Ezen törzsek egerekre vonatkoztatott LD₅₀ értéke nagyobb, mint 10⁸, csikókra vonatkoztatott minimális infektív dózisa pedig nagyobb, mint 10⁹ baktérium. Az avirulens törzsek széles körben elterjedtek környezetünkben, elsősorban a talajban (Takai és mtsai., 1995b; Takai, 1997).

A virulenciafehérjék funkciója nem ismert (Hondalus, 1997), de a makrofágokban való túlélésre és intracelluláris szaporodásra csak virulenciaplazmidot tartalmazó, virulenciafehérjével rendelkező törzsek képesek (Hondalus és Mosser, 1994; Takai és mtsai., 1995b).

A virulenciaplazmidaal rendelkező törzsek 38°C-on lassabban szaporodnak, mint a virulenciaplazmidaal nem rendelkezők, 30°C-on azonban nincs különbség a szaporodás ütemében (Takai és mtsai., 1994b). A virulenciafehérje kifejeződését a környezet pH-ja és hőmérséklete is befolyásolja. A virulenciafehérje csak 34-41°C között fejeződik ki (optimális hőmérséklet: 38°C). A virulenciafehérje kifejeződéséhez enyhén savas közeg kell (optimális pH: 6,5). Enyhén lúgos (pH: 7,5-8) környezetben a fehérje már nem fejeződik ki (Takai és mtsai., 1996a).

A *R. equi* törzsek plazmidprofiljának vizsgálata, a virulenciaplazmidok jelenléte együttesen azok RFLP-vizsgálatával járványtani markerként használható. Ezen vizsgálatok információval szolgálhatnak a *R. equi* törzsek eredetéről és a különböző állatpopulációk (ló, sertés) és az emberek közötti terjedéséről (Takai és mtsai., 1999, 2001b).

A csikókból és azok környezetéből származó, különböző országokban izolált *R. equi* törzsek virulenciaplazmidjainak *EcoRI* restrikciós endonukleázzal történő emésztést követő RFLP-vizsgálatával a virulenciaplazmidok egymással szoros rokonságban álló 10 különböző plazmidtípusba (85 kbp I-II-III-IV típusú, 87 kbp I-II típusú és 90 kbp I-II-III-IV típusú plazmid) sorolhatók. A virulenciaplazmidok elterjedtségében a különböző országok (kontinensek) között különbségek vannak (Takai és mtsai., 2001b).

A lovakból származó klinikai izolátumok többsége Argentínában, Ausztráliában, Kanadában, Franciaországban, Texas államban és Törökországban 85 kbp I-es típusú és 87 kbp I-es típusú plazmidot tartalmaz (Nicholson és Prescott, 1997; Takai és mtsai., 1999; Martens és mtsai., 2000; Ozgur és mtsai., 2000; Becu és mtsai., 2000). 85 kbp II-típusú plazmidot tartalmazó törzset csak Franciaországban, 85 kbp III-IV típusú plazmidot tartalmazó törzset pedig csak Texas államban izoláltak (Rahal és mtsai., 1999; Takai és mtsai., 1999, 2001a). Az előbbieken említett 5-féle plazmid-típust ez ideig nem lehetett megtalálni Japánban izolált *R. equi* törzsekben. A 87 kbp II-es és a 90 kb I-II-III-IV típusú plazmidot tartalmazó törzset ez ideig csak Japánban találtak (Takai és mtsai., 1993a, 1993b, 1999, 2001b, 2001c).

A mérsékelt virulens (vapB+) törzsek nem fordulnak elő sem a lovakban, sem azok környezetében a talajban.

A sertésekből izolált mérsékelt virulens (vapB+) törzsek között legalább öt különböző méretű virulenciaplazmid fordult elő. Japánban vágóhídon levágott sertések áll alatti nyirokcsomóiból kitenyésztett 56 *R. equi* törzs közül 1 volt virulens, 1 avirulens, a maradék 54 törzs (93,9%) pedig mérsékelt virulens, amelyek 79 (42,8%), 88 (5,4%), 88,5 (19,6%), 89 (23,2%) és 95 (5,4%) kbp méretű virulenciaplazmidot hordoztak (Takai és mtsai., 1996b).

Az embert megbetegítő *R. equi* törzsek diverzitása a virulencia tekintetében nagyobb, szélesebb határok között változik, mint lovak esetén. A beteg emberek különböző immundeficiens állapota lehetővé teszi, hogy kisebb virulenciájú törzsek is megbetegedéseket okozzanak (Hondalus, 1997).

Egy széleskörű felmérés vizsgálatban különböző országokban (Franciaországban, az Amerikai Egyesült Államokban, Ausztráliában, Olaszországban, Dániában, Svédországban) élő AIDS beteg emberekből izolált *R. equi* izolátumok 24%-a volt virulens (15-17 kDa, vapA+), 48%-a mérsékelt virulens (20 kDa, vapB+), 28%-a pedig avirulens. A nem HIV-fertőzött, de valamilyen más immunsuppresszált állapotban lévő beteg emberekből származó *R. equi* izolátumok túlnyomó többsége (80%) avirulens volt.

Az emberből izolált mérsékelt virulens (vapB+) törzsek négy különböző méretű (79, 87, 95, 100 kbp) virulenciaplazmidot hordoztak, amelyek közül kettő (79 kbp, 95 kbp) azonos típusú volt a sertésben is megtalálható plazmid típusokkal. Az emberi eseteknek mintegy 33%-ában lehetett a gazdasági haszonállatokkal vagy azok trágyájával közvetlen vagy közvetett kapcsolatot kideríteni (Takai és mtsai., 1995c).

Nordmann és mtsai., (1993a, 1994) szerint az embereket megbetegítő, de virulenciaplazmidot nem hordozó törzsek β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája virulenciafaktornak tekinthető. A rezisztencia pontos mechanizmusa nem ismert. A törzsek nem rendelkeznek β -laktamáz aktivitással, de a felületükön speciális, bakteriofág farok részére emlékeztető képletek vannak, amelyeket viszont nem lehetett megfigyelni a β -laktám antibiotikumokra érzékeny törzseken.

3.14. Immunitás a *R. equi*-vel szemben

A *R. equi* okozta fertőzés következménye és kimenetele alapvetően az infektív dózistól, a törzs virulenciájától és a megfelelő immunválasz kialakulásától függ. A *R. equi* fertőzést követő legfontosabb mozzanat az, hogy a virulens baktérium képes túlélni az őt bekebelező alveoláris makrofág citoplazmájában (Takai és mtsai., 1985; Zink és mtsai., 1987.).

A *R. equi* az alternatív úton aktiválódott komplementet megköti, a hármas típusú komplementreceptor (Mac-1) révén kötődik a makrofágokhoz és fagocitálódik (Hondalus és mtsai., 1993). Egy kezdeti lag fázist követően a baktériumok intracellularisan szaporodni kezdenek, a makrofágok baktériumölő képességét kikerülve megakadályozzák a fagoszóma és a lizoszóma fúzióját (Takai és mtsai., 1985; Hietala és Ardans, 1987; Zink és mtsai., 1987; Hondalus és Mosser, 1994).

Tekintettel arra, hogy intracelluláris kórokozóról van szó, a celluláris immunválaszt alapvető fontosságúnak tekintik a *R. equi* eliminálásában, bár mind a humorális, mind pedig a celluláris immunválasznak szerepe van a baktériummal szembeni védekezésben (Hines és mtsai., 1997).

3.14.1. A humorális immunválasz szerepe

R. equi-vel szembeni ellenanyagok a sejt fertőződésének kezdeti fázisát blokkolhatják, megváltoztatva a baktérium makrofágokba történő bejutásának a módját, illetve gátolják a baktérium azon képességét, hogy a fagoszóma és a lizoszóma fúzióját képesek megakadályozni (Speert, 1992). A csikók 1 és 6 hónapos kor közötti nagyfokú fogékonyságát a maternális ellenanyagok kiürülésével magyarázzák. Ezt a feltevést alátámasztja Hietala és Ardans (1987) azon megfigyelése, hogy *in vitro* a hiperimmun savó elősegíti a baktérium makrofágok általi fagocitózist és elpusztítását. Hasonlóképpen a *R. equi*-vel szemben termelt hiperimmun savó képes megelőzni a megbetegedést, vagy csökkenteni a kialakuló betegség súlyosságát (Martens és mtsai., 1989; Madigan és mtsai., 1991). A hiperimmun savó csak akkor fejti ki kedvező hatását, ha a fertőzés idején már jelen van a csikó szervezetében. A fertőzést követően 1 héttel beadott hiperimmun savó már nem képes megváltoztatni a betegség lefolyását (Chaffin és mtsai., 1991). Arra is vannak azonban adatok, hogy a hiperimmunizált kanca kolosztruma nem tudta megvédeni az azt felvevő csikót a megbetegedéstől (Martens és mtsai., 1991).

Az ellenanyagok csak a fertőzés kezdeti szakaszában lehet szerepe, mivel az intracellularisan elhelyezkedő baktériumok már elérhetetlenek az ellenanyagok számára, így a betegség későbbi fázisában már a celluláris immunválasz játsza a főszerepet (Hines és mtsai., 1997).

3.14.2. A sejt közvetítette immunválasz szerepe

A *R. equi*-vel szembeni immunválaszt leggyakrabban egér-modellben vizsgálták. Immunkompetens egereket virulens *R. equi*-vel intratrachealisan fertőzve az egérben átmeneti gyulladással válaszreakció alakul ki, amely azonban a védő hatású primer immunválasz eredményeként 21 napon belül meggyógyul (Bowles és mtsai., 1989; Yager és mtsai., 1991). Intravénás fertőzés esetén azonban az egerek elhullanak. Az elhullás mértéke függ az infektív dózistól és a törzs virulenciájától (Takai és mtsai., 1991a).

Az immundeficiens egerek *R. equi* okozta tüdőgyulladásra való érzékenysége alátámasztja a celluláris immunitás szerepét a betegséggel szembeni védekezésben.

Sem a csak T-limfocitával, sem pedig a T- és B-limfocitával nem rendelkező egerek nem képesek a *R. equi*-vel szembeni védekezésre, így fertőzést követően a tüdőben kialakulnak a betegségre jellemző elváltozások.

A komplement-deficiens egerek azonban képesek a fertőzéssel szembeni védekezésre, ami arra utal, hogy a komplement, a fagocita-funkció és az NK (természetes ölő) sejtfunkció hiánya nem gátolja a *R. equi* tüdőből való eliminálását (Yager és mtsai., 1991).

Az alacsony CD4+ sejtszámmal rendelkező HIV-fertőzöttek kifejezetten fogékonyak a *R. equi* fertőzéssel szemben, ami szintén a celluláris immunválasz szerepére hívja fel a figyelmet (Harvey és Sunstrum, 1991).

A fertőzött immunkompetens egér lépsejtjeit átvíve T- és B-limfocitával nem rendelkező egerbe az megvédte az immundeficiens egeret az intranasalis fertőzés hatásától (Balson és mtsai., 1992).

A két alapvető mechanizmus, amellyel a T-limfociták az intracelluláris baktériumokat eliminálni tudják: a fertőzött sejtre ható direkt citotoxicitás (MHC-I, CD8+ T sejtek), és a citokinek elválasztása. A CD4+ és a CD8+ sejtek is részt vesznek a *R. equi* eliminálásában, de a CD8+ sejteknek egyes szerzők nagyobb szerepet tulajdonítottak (Nordmann és mtsai., 1992). Ross és mtsai. (1996) szerint a CD4+ limfocitáknak van központi szerepe, míg a CD8+ sejteknek bár jelentős, de csak járulékos szerepük lehet, vagy egyáltalán nem vesznek benne részt.

Egérben a CD4+ limfociták citokintermelésük alapján Th1- és Th2-szubpopulációra oszthatók (Mosmann és Coffman, 1989; Mosmann és Sad, 1996). A Th1-sejtek interferon-gamma (IFN- γ) és interleukin-2 (IL-2) termelésére, míg a Th2-sejtek IL-4, IL-5 és IL-10 termelésére képesek. Egérben és emberben több fertőző ágens elsődlegesen Th1- (1-es típusú) vagy Th2- (2-es típusú) immunválaszt indukál (Bretsher és mtsai., 1992). A Th1- és a Th2-típusú immunválasz relatív aránya határozza meg a végeredményt, ide értve egy sor intracelluláris patogén baktérium szervezetből való eliminálásának képességét is (Gajewski és Fitch, 1988).

Az IFN- γ a legfőbb makrofág-aktiváló faktor, amely különböző utakon képes serkenteni a baktériumok elpusztítását, valamint stimulálja a fagoszóma és a lizoszóma fúzióját és serkenti az Fc-receptorok kifejeződését is (Nathan és mtsai., 1983). A sejt közvetítette védekező mechanizmusokat egyes citokinek (IL-2, TNF- α) serkenthetik, mások (IL-10) viszont csökkentik a makrofágok funkcióját (Trinchieri és mtsai., 1993).

Lovakban a makrofágok limfocita-közvetítette aktiválása szerepet játszik a *R. equi* eliminálásában. Hietala és Ardans (1987) kimutatták, hogy *R. equi* antigénnel stimulált vérből nyert perifériás limfociták tápfolyadék szignifikánsan növelte a lovak alveoláris makrofágjainak *R. equi*-re gyakorolt elimináló képességét.

Egérben a *R. equi* szervezetből való eliminálása Th1-típusú immunválasz révén történik, és ennek során az IFN- γ az elsődleges mediátor. Kanaly és mtsai. (1995) arra a következtetésre jutottak, hogy egérben a Th1-típusú immunválasz megvédi az egeret a *R. equi* okozta megbetegedéstől, a Th2-típusú immunválasz viszont nem ad védelmet, hanem a betegség kialakulásához járul hozzá.

Nordmann és mtsai. (1993b), valamint Kanaly és mtsai. (1996) kísérletes eredményei arra utalnak, hogy az IFN- γ szekréciója más fajokban is alapvető a *R. equi* szervezetből való eliminációja és a Th1-típusú immunválasz kialakulása szempontjából.

3.15. A *R. equi* patogenitása

A *R. equi* fakultatív patogén kórokozó, amely elsősorban a fiatal csikókat betegíti meg, de bizonyos körülmények között, az emberben, sertésben, szarvasmarhában és más állatfajokban is képes kórfolyamatokat előidézni.

3.15.1. A csikók megbetegedése

A csikók *R. equi* okozta megbetegedése egy világszerte előforduló, az 1 és 6 hónapos kor közötti csikókban az esetek többségében idültlen lezajló, gennyes, tályogképződéssel járó tüdőgyulladásban megnyilvánuló betegség, amelyhez az esetek jelentős százalékában bélgyulladás, ritkábban ízületgyulladás is társulhat.

3.15.1.1. Előfordulás

A *R. equi* a talajban gyakorlatilag mindenütt megtalálható, a kórokozó előidézte klinikai megbetegedés azonban egyes ménesekben endémiás jelleggel fordul elő, és évről évre visszatérően jelentős számú elhullást okoz, míg másokban sporadikusan jelenik meg, az állattartó telepek egy részében pedig klinikai tünetekben nem nyilvánul meg a kórkép. Ez a jelenség valószínűleg a környezeti tényezők (talaj pH-ja, időjárás, porképződés), a tartási körülmények, és a baktérium virulenciájában lévő különbségekkel áll összefüggésben (Takai és mtsai., 1991b).

3.15.1.2. Járványtan

A 6 hónap alatti csikók fogékonyak a megbetegedésre, de a kórkép leggyakrabban 2-3 hónapos korú szopóscsikókban jelentkezik. Ritkán a 2-3 hetes csikók is megbetegedhetnek (Sippel és mtsai., 1968).

A *R. equi* okozta megbetegedések leggyakrabban a nyári meleg időszakban, elsősorban május és augusztus között, főként júliusban fordulnak elő (Takai és mtsai., 1985; Zink és mtsai., 1986). Erre az időszakra a csikók többsége eléri a 2-3 hónapos életkort, ekkor vannak a csikók a legnagyobb porterhelésnek kitéve, és a maternális ellenanyagok szintje is jelentősen csökken (Hietala és mtsai., 1985; Prescott, 1991).

A *R. equi*-fertőzések csikókban való gyakori előfordulásában a csikók koprofágiájának is szerepe lehet (Knottenbelt, 1993). A csikók bélcsatornájában a 8. élethétig a baktérium képes szaporodni is (Takai és mtsai., 1986a). A lovak bélsarának acetát- és propionát-tartalma elősegíti a *R. equi* szaporodását a talajban (Hughes és Sulaiman, 1987). A bélsárral szennyezett földben a *R. equi* több, mint egy évig életben maradhat (Wilson, 1992).

A baktériumot tartalmazó por belélegzése jelenti a legfőbb fertőzési forrást a csikó számára, így a poros környezet, szeles, meleg időjárás hajlamosít a betegség kialakulására (Giguere és Prescott, 1997). Takai és mtsai. (1987) elsősorban meleg, szeles időben, de ritkábban nedves, szélcsendes időben is izolálni tudták a kórokozót az istálló levegőjéből.

Hajlamosító tényezőnek számítanak a vírusfertőzések (Rooney, 1966; Pálfi és mtsai., 1978; Belák és mtsai., 1980; Nordengrahn és mtsai., 1996), a hiányos takarmányozás (Knight, 1969), a sérülések (Knight, 1969), a nagy állatsűrűség (Ardans és mtsai., 1986), valamint az immunrendszer veleszületett vagy szerzett károsodása (Yager, 1987; Freestone és mtsai., 1989; Prescott és Hoffman, 1993).

Genetikai hajlam elképzelhető, de nem bizonyított (Woolcock és mtsai., 1987; Yager, 1987; Giguere és Lavoie, 1994). Studdert (1978) vizsgálatai szerint a *R. equi*-t gyakran olyan immunszuppresszált arab csikók tüdőtályogjaiból izolálták, amelyek egy elsődleges, súlyosfokú összetett immundeficienciában szenvedtek.

A betegség endémiásan vagy sporadikusan jelentkezik. Szubklinikai lefolyás is előfordul (Prescott, 1991; Takai és mtsai., 1991b).

Csikókban az elhullások 10%-át, a tüdőgyulladások 45%-át a *R. equi* okozza (Zink és mtsai., 1986). Egy állományon belül a betegség morbiditása az 5-17%-ot, a letalitása pedig akár a 80%-ot is elérheti (Takai és mtsai., 1985).

Nemek szerinti predispozíciót nem figyeltek meg (Zink és mtsai., 1986). Minden fajta fogékony a megbetegedésre, de Falcon és mtsai. (1985) az arab fajtájú csikók között különösen nagy számú megbetegedést figyeltek meg.

Zink és mtsai. (1986) szerint a kórkép Kanadában különösen a félvérekben fordul elő, míg Hutchins és mtsai. (1980) azt állapították meg, hogy Ausztráliában főként a telivér csikók érintettek a megbetegedésben.

3.15.1.3. Kórfejlődés

A csikók *R. equi* okozta megbetegedésének kórfejlődése nem teljesen tisztázott (Yager, 1987; Takai és mtsai., 1995b). A fertőződés főként aerogén úton jön létre, de alimentárisan, a köldökcsonton keresztül vagy intrauterin úton is bekövetkezhet (Barton és Hughes, 1980; Yager, 1987). Egyes szerzők szerint, nyílt sebek, bőrsérüléseken keresztül is megeredhet a fertőzés (Knight, 1969; Smith és Jang, 1980). A beteg állat orrváladéka szintén hozzájárulhat a betegség terjedéséhez (Burrows, 1968). Vándorló parazitalárvák (*Strongyloides*) is szerepet játszhatnak kórokozó számára a bemeneti kapu kialakításában (Etherington és Prescott, 1980; Perdrizet és Scott, 1987; Dewes, 1989). Fiatalabb csikókban a megbetegedés súlyosabb lefolyású (Hartwig, 1982).

A belélegzés útján az alsó légutakba jutó baktériumot az alveoláris makrofágok bekebelezik. A *R. equi* megakadályozza a fagoszóma és a lizoszóma fúzióját és elszaporodik a makrofágokban, amely azok irreverzibilis károsodásához, széteséséhez vezet. A neutrofil granulocitákból és a makrofágokból kiszabaduló lizoszómális enzimek és az oxigén-szabadgyökök tehetők felelőssé a kialakuló szövet-károsodásért.

A bélgyulladásos forma esetén a baktériumok a Peyer-plakkok sejtjeiben szaporodnak el és a nyálkahártyában gyulladást és fekélyeket hoznak létre (Hillidge, 1986).

A fertőzés leggyakrabban a félhevenytől a krónikusig terjedő gennyes bronchopneumoniában, vagy fekélyképződéssel járó bélgyulladásban nyilvánul meg, ami gyakran együtt jár ízületgyulladással, vagy bőr alatti tályogok képződésével (Firth és mtsai., 1980; Smith és Jang, 1980; Takai és mtsai., 1985; Zink és mtsai., 1986). Yager (1987) és Prescott (1991) a megbetegedett állatok mintegy felében elhalásos enterocolitist észleltek. A betegség lefolyását 89 olyan csikón vizsgálták, amelyek a megfigyelés ideje alatt tüdőgyulladásban és/vagy enterocolitisben hullottak el. A betegség időtartama az állatok 26%-ában 1 hétnél rövidebb volt, a csikók 25%-ában 1-3 hétig tartott, míg a maradék 49% esetén 3 hétnél is tovább húzódott el.

3.15.1.4. Klinikai tünetek

a./ Bronchopneumonia

Csikókban a *R. equi* fertőzések leggyakoribb formája az idült, gennyes, tályogképződéssel járó bronchopneumonia és az ehhez társuló gennyes lymphadenitis (Zink és mtsai., 1986).

A tüdőfolyamatok lassú terjedése megnehezíti a fertőzöttség korai felismerését. A kezdeti klinikai tünetek a légzésszám kismértékű megemelkedésében és enyhe fokú testhőmérséklet-emelkedésben nyilvánulnak meg. Ezek a kezdeti tünetek gyakran rejtve maradnak miközben a kórfolyamat tovább halad. Ebből adódóan még a betegség krónikus formájában is a légzőszervi tünetek gyakran gyorsan alakulnak ki. A klinikai tünetek ilyenkor étvágytalanságban, lázban (38,8 - 40,0°C, egészen 41,5°C-ig), a légzésszám megemelkedésében és nehezített légzésben jutnak kifejezésre. A köhögés és a kétoldali orrfolyás nem minden esetben alakul ki. A csikók ilyenkor még jó kondícióban vannak, de az olyan állatok esetén, amelyekben a folyamatok félheveny vagy krónikus formába mennek át,

testtömeg-csökkenést is meg lehet figyelni. A súlyos fokban érintett csikók gyakran néhány napon belül elhullanak a legszakosítottabb gyógykezelés ellenére is (Beech és Sweeney, 1991). A félheveny formában elhullott csikók kórboncolása során diffúz, miliáris, gennyes, granulomaképződéssel járó tüdőgyulladást lehet megfigyelni, és a tüdőelváltozások kora arra utal, hogy már a légzőszervi tünetek megjelenése előtt kiterjedt elváltozások voltak jelen a tüdőben (Martens és mtsai., 1982).

A tüdő hallgatósági vizsgálata során szörtyögő és bűgő zörejeket hallhatunk (Magnusson, 1923; Hartwig, 1982; Freestone és mtsai., 1987). A hallgatóság során hallott zörejek nem minden esetben állnak összhangban a tüdőgyulladás súlyosságával (Falcon és mtsai., 1985). A tüdő fölötti terület kopogtatásos vizsgálatával a tüdőtályogok helyeződése meghatározható.

b./ Bélgyulladás

A *R. equi* okozta tüdőgyulladásban elhullott csikók mintegy felében a kórbonctani vizsgálat során bélgyulladással is találkozni lehet, annak ellenére, hogy e csikók túlnyomó többsége nem mutatott bélgyulladásra utaló klinikai tüneteket (Zink és mtsai., 1986). A *R. equi* okozta bélgyulladással járó forma az eseteknek csak 4%-ában fordul elő önállóan, tüdőelváltozások nélkül.

A *R. equi* okozta fertőzés bélgyulladással járó multifocalis tályogképződéssel járó enterocolitis és typhlitis a bélfodri nyirokcsomók granuloma-képződéssel járó vagy gennyes gyulladással (Zink és mtsai., 1986). Alkalmanként a bélfodri nyirokcsomókból kiinduló hasüregi tályog is kialakulhat, amely a bélszakaszok összenövésével, peritonitisszel is járhat.

A bélgyulladással járó formát láz, étvágytalanság, bágyadság, testtömeg-csökkenés, kólika és hasmenés kísérheti (Zink és mtsai., 1986; Baldwin és mtsai., 1992).

c./ Nem szepikus polysynovitis

A *R. equi* okozta tüdőgyulladással járó esetek mintegy egyharmadában, főként a csánk és a térdízületben immunpatológias alapon létrejövő polysynovitis is kialakulhat. Néha minden ízület érintett. Az ízületek érintettségének a mértéke különböző lehet. A legtöbb esetben sántítást nem lehet megfigyelni, a klinikai tünetek csak kötött járásra korlátozódnak. Az ízületi nedv citológiai vizsgálatával nem szepikus mononucleáris pleocitózis állapítható meg, negatív bakteriológiai lelet mellett (Sweeney és mtsai., 1987). Kenney és mtsai. (1994) az ízületi folyadékban reumatoid faktorokat, más kutatók (Madison és Scarratt, 1988) pedig speciális festési eljárást alkalmazva az ízületi felületen immunglobulinokat mutattak ki. Az ízületek elváltozásai a tüdőgyulladás gyógyulásával egyidejűleg kezelés nélkül is elmúlnak.

A csikók 1 és 6 hónapos kora között kialakuló nem szepikus polysynovitis egyértelműen *R. equi* fertőzöttségre utal (Giguère és Prescott, 1997).

d./ Fertőző ízület- és csontvelőgyulladás

A *R. equi* primer formában, vagy a tüdőben ill. a bélcsatornában kialakult elváltozásokból szóródva fertőző ízület- és csontvelőgyulladást is okozhat. A szepikus ízületgyulladás súlyosabb fokú sántítással jár, mint az aszeptikus, lokális terápiát igényel és kórjósolata is kedvezőtlenebb.

A csontvelőgyulladás lázban, bágyadságban, kötött járásban nyilvánul meg, az érintett csontok tapintásra fájdalmasak (Mayhew, 1989). A gerincoszlopra kiterjedő formája sem tartozik a ritkaságok közé.

e./ Más kórformák csikókban

R. equi okozta fekélyes nyirokér-gyulladást, cellulitist és bőr alatti tályogokat szintén leírtak (Dewes, 1972; Smith és Jang 1980; Zink és mtsai., 1986; Perdrizet és Scott, 1987).

Ritkán a *R. equi* csikókban uveitist (Beech és Sweeney, 1991), panophthalmitist (Blogg és mtsai., 1983), vesegyulladást, vese- és májtályogot is képes előidézni (Ellenberger és Genetzky, 1986).

3.15.1.5. Kórbonctani elváltozások

A *R. equi* okozta tüdőgyulladás során a tüdőre a gennyes, tályogképződéssel járó bronchopneumonia képe jellemző: a tüdő bőnedvű, tömött tapintatú, sötét színű (Smith és Robinson, 1981), állományában a gombostüfejnítől az ökölnyi nagyságig terjedő tályogok vannak, amelyeket vékony kötőszövetes tok vesz körül. Az elváltozások először a csúcslebenyekben jelennek meg. A tályogtartalom általában sűrűn folyó, szürkésvörös színű (Magnusson, 1923).

A kórszövettani képen a tüdőalveolusok falában a makrofágok és kisebb mértékben a neutrofil granulociták jelenlétét lehet megfigyelni. A makrofágok nagy számban tartalmaznak fagocitált *coccobacillus*okat. Az intraalveoláris sövények megtartottak, később azonban a bronchiolusok sejttörmelékekkel telítődnek (Smith és Robinson, 1981; Prescott, 1991). A peribronchialis nyirokcsomók többszörösükre nagyobbodnak, ödemásak, bennük elhalások alakulhatnak ki. Végül az agy, vese, máj és az ízületek is érintetté válhatnak, vagy generalizált lymphadenitis is kialakulhat (Jubb és Kennedy, 1970). Egyes szerzők gerincoszlopra kiterjedő csontvelőgyulladást is megfigyeltek (Firth és mtsai., 1980; Olchoway, 1994; Giguère és Lavoie, 1994; Prescott, 1994; Chaffin és mtsai., 1995). Firth és mtsai. (1980) *R. equi* okozta egy, vagy több ízületre kiterjedő szepszistikus gyulladást és azt kísérő csontvelőgyulladást is megállapítottak.

A betegség heveny, bélsatornára korlátozódó formájánál, a vékony- és a vastagbél nyálkahártyája duzzadt és nyúlós nyálkával fedett (Jubb és Kennedy, 1970). A Peyer-plakkok 2-4 cm hosszúak és kidomborodnak, majd közepük élesen és körülírtan vöröses-szürkés színűvé válik, a mesenterialis nyirokcsomók megnagyobbodnak és tömötté válnak. Krónikus forma esetén ezek a nyirokcsomók bőnedvűvé válnak és szürkés, nyálkás folyadék vonható le metszéspapokról. Cimprich és Rooney (1977) szerint a heveny bélgyulladással járó formánál a kórszövettani kép jellegzetessége, hogy a jejunum és az ileum mikrobolyhai atrofizáltak. Fibrinkiválást, és a lamina propriában kifejezett mononukleáris sejtes beszűrődést lehet megfigyelni.

3.15.1.6. Kórjelzés

A *R. equi*-fertőzés korai diagnózisa, és más fertőző kórokoktól való elkülönítése nem egyszerű feladat, mert a betegség észrevétlenül, alattomosan alakul ki, ami a légzőszervi tünetek kialakulását megelőzően esetleg csak hetekig tartó testtömeg-csökkenésben nyilvánul meg (Knight, 1969). A diagnózis különösen azokon az állattartó telepeken jelenthet gondot, ahol korábban a *R. equi* fertőzés nem fordult elő. Többféle módszert is leírtak a kórjelzésre, közülük a betegség megállapítására a hörgőváladék bakteriológiai és citológiai vizsgálata a legalkalmasabb.

A klinikai laboratóriumi vizsgálatok közül a teljes vérkép vizsgálat mellett a vérplazma fibrinogén-koncentrációjának meghatározása szükséges. A fibrinogén-szint vérben való megemelkedése (akár 10 mg/ml) a legállandóbb laboratóriumi lelet a *R. equi* okozta tüdőgyulladás esetén, de a neutrofil leukocitózis is gyakori (Falcon és mtsai., 1985; Sweeney és mtsai., 1987).

A mellkasi röntgenfelvétel, vagy más képalkotó technikák alkalmazása hasznos lehet a tüdőgyulladás súlyosságának megállapításában, és a gyógykezelés eredményességének elbírálásában.

a./ Szerológiai próbák

A *R. equi* okozta fertőzések diagnosztikájában használható szerológia vizsgálo módszerek három csoportba sorolhatók: 1./ agargél-precipitáció, 2./ szinergista hemolízis gátlás, és 3./ ELISA.

A szerológiai diagnosztika alkalmazása kapcsán az eredmények értékelésénél figyelembe kell venni, hogy a csikók születésüktől kezdődően folyamatosan ki vannak téve a *R. equi*-expozíciónak, mivel a kórokozó az állatok környezetében széleskörben elterjedt, valamint azt, hogy a maternális ellenanyagok pozitív reakciókat eredményezhetnek.

1./ Agargél-precipitáció

Ezzel a próbával a *R. equi* által termelt extracelluláris koleszterol-oxidáz és foszfolipáz C-vel szemben termelődött precipitáló ellenanyagokat mutathatjuk ki.

A felnőtt lovak túlnyomó többségében nem lehet precipitáló ellenanyagokat kimutatni ebben a próbában, ebből következően a csikókban nem várhatunk hamis pozitív eredményt a maternális ellenanyagok miatt (Gaskin és mtsai., 1990). Legkorábban a 26 napos csikókban tudtak ellenanyagokat kimutatni ezzel a módszerrel. Ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre a módszer érzékenysége és specificitása tekintetében. Hietala és mtsai. (1985) 50%-os, Nakazawa és mtsai. (1987) 100%-os, míg Hoffman és mtsai. (1993) 60%-os érzékenységűnek találták a módszert. A próba specificitását Nakazawa és mtsai. (1987) 100%-osnak, Hoffman és mtsai. (1993) pedig 69%-osnak találták.

2./ Szinergista hemolízis gátlás (SHI)

Az „equi-faktorok” együttesen a *Corynebacterium pseudotuberculosis* foszfolipáz D-jével, vagy a *Staphylococcus aureus* β -toxinjával képesek az emlősök vörösvérsejtjeit károsítani, és ezáltal hemolízist előidézni. Az equi-faktorokkal szembeni ellenanyagok képesek gátolni ezt a szinergista hemolízist.

Az SHI módszer segítségével az egészséges csikó véréből el lehetett különíteni a természetes fertőzés eredményezte tüdőgyulladásos csikó véréből, de a kísérletesen előidézett fertőzés korai stádiumában nem volt képes felismerni a fertőzést. A módszer érzékenységét és specificitását nem határozták meg (Prescott és mtsai., 1984b). Skalka és Svastová (1985a, 1985b), valamint Skalka (1987) továbbfejlesztette és még érzékenyebbé tette az SHI módszert. Gaskin és mtsai. (1990) szerint az SHI túlságosan érzékeny a diagnosztikai célokra, sokkal több szubklinikai fertőzést detektál, mint az agargél-precipitáció.

3./ ELISA

Az 1980-as évek közepétől napjainkig négy ELISA-t fejlesztettek ki, amelyek révén lehetővé vált az ellenanyagok kimutatása természetes és mesterséges fertőzésnek kitett különböző életkorú lovakban (Ellenberger és mtsai., 1984; Hietala és mtsai., 1985; Takai és mtsai., 1985; Prescott és mtsai., 1996). Az irodalomban leírt ELISA-k a *R. equi* felületi, ill. a burokantigénjeit alkalmazták. Az ELISA-k segítségével kimutatott ellenanyagok természetes fertőződés során kifejtett védőhatása nem tisztázott, és további vizsgálatokat igényel (Ellenberger és Genetzky, 1986).

Az Ellenberger és mtsai. (1984), valamint Hietala és mtsai. (1985) által egymástól függetlenül kifejlesztett ELISA-k egészséges csikók maternális ellenanyagait és 6 hónaposnál idősebb lovak ellenanyagait voltak képesek kimutatni. A Takai és mtsai. (1985) által alkalmazott ELISA segítségével viszont egészséges felnőttekben és csikókban is sikerült nagyon alacsony ellenanyagszinteket kimutatni, amelyek jelentős mértékben emelkedtek természetes vagy mesterséges expozíciónak kitett csikókban (Higuchi és mtsai., 1997).

A Prescott és mtsai. (1996) által kifejlesztett ELISA a virulenciafehérje (vapA) ellen termelődött ellenanyagok kimutatására alkalmas, amely segítségével a 4-8 hét közötti

csikókban találták a legalacsonyabb ellenanyag-titereket, amelyek az antigén-expozíciónak megfelelően a 8-10. héttől kezdtek emelkedni.

b./ A bronchusváladék citológiai és bakteriológiai vizsgálata

A *R. equi* okozta fertőzés biztos diagnózisához a csikóból vett bronchusváladék bakteriológiai és citológiai vizsgálata szolgáltathatja a legmegbízhatóbb adatokat (Hartwigk, 1982; Wilson, 1992).

A bronchusváladék vétele endoszkópos vizsgálat során lehetséges. A bakteriológiai vizsgálat eredményét a citológiai, a fizikális és a többi laboratóriumi vizsgálat eredményével együtt kell értékelni.

Egy kísérlet alkalmával az utólag igazolt *R. equi* okozta tüdőgyulladásos esetek 62-64%-a lett bakteriológiailag pozitív a bronchusváladék megelőzően elvégzett tenyésztéses vizsgálata során (Hillidge, 1987).

A citológiai vizsgálat során intracellulárisan Gram-pozitív pleomorf pálcákat lehet megfigyelni. A bronchusváladékból tenyésztéssel pozitív minták 61%-ában találtak a citológiai eredményeket is pozitívnak (Sweeney és mtsai., 1987). A bronchusváladékkal szemben a bronchusmosó folyadék nem alkalmas a citológiai vizsgálatra, mivel a biztosan tüdőgyulladásban szenvedő csikók 50%-ának bronchusmosó folyadéka nem mutat eltérést az egészséges állatokhoz képest (Rossier és mtsai., 1991).

Az orr- és a végbéltamponokból kitenyésztett *R. equi* nem jelenti egyértelműen a betegség fennállását, hiszen a *R. equi* olyan telepen tartott csikók bélsarából is kitenyészthető, amelyiken a betegség egyáltalán nem fordul elő klinikai formában (Nakazawa és mtsai., 1983a; Takai és mtsai., 1986a, 1986c).

A bélsárból történő negatív bakteriológiai lelet sem jelenti a *R. equi* fertőzés hiányát, mivel egy vizsgálatban a *R. equi* okozta tüdőgyulladásban beteg csikók bélsármintáinak csak 17%-ából tudták a baktériumot kitenyészteni (Ardans és mtsai., 1986).

Leadon és mtsai. (1988) 10 tüdőgyulladásban szenvedő csikó közül 6 véreből ki tudták tenyészteni a *R. equi* baktériumokat.

A *R. equi* okozta bélgyulladás korai kórjelzéséhez Takai és mtsai. (1986b) a *R. equi* számának a bélsárban való meghatározását javasolták. Heveny megbetegedés esetén a baktériumszám 10^4 -ről 10^{7-8} -ra (*R. equi*/g bélsár) emelkedik a csikó bélsárában.

3.15.1.7. Kórjóslat

A betegség kórjósolata rendszerint a kétségstől a kedvezőtlenig terjed, és a kezelés sikere nagyban függ a betegség korai felismerésétől és a terápiától. Abban az esetben, ha a kezelést követően 7 nap után a csikó egészségi állapotában javulás áll be, akkor a kórjóslat kedvező (Wilson, 1992). Teljes gyógyulás csak megfelelően hosszú terápia esetén érhető el (Prescott, 1987). Ainsworth és mtsai. (1993) vizsgálataira utaltak, hogy a gyógyult csikókban az élet későbbi szakaszában nem lehetett maradandó károsodásokat megállapítani.

3.15.1.8. Gyógykezelés

Az antibiotikumok széles köre hatásos a *R. equi* ellen *in vitro*, de mivel ez a baktérium intracelluláris kórokozó, képes túlélni és szaporodni a makrofágokban, és elsajtosodott tartalommal telt tályogokat hoz létre a tüdőben és más szervekben, ezért ezen antibiotikumok többsége hatástalan *in vivo*.

Az eritromicin és rifampicin kombinációja az elsődlegesen választandó gyógyszer a *R. equi* fertőzésekre, amely amióta bevezették az alkalmazását, jelentősen csökkentette a csikók letalitását (Hillidge, 1987; Sweeney és mtsai., 1987). Mindkét antibiotikum bakteriosztatikus (Nordmann és Ronco, 1992), együtt alkalmazva szinergista hatásúak (Prescott és Nicholson, 1984; Nordmann és mtsai., 1992), és csökkentik a rezisztencia kialakulásának a valószínűségét (Nordmann és Ronco, 1992).

A rifampicin, és kisebb mértékben az eritromicin is lipid-oldékony, lehetővé téve az elsajtosodott anyagba történő penetrálásukat. A rifampicin kétszeresére koncentrálódik a fagocita sejtekben és hatásos több intracelluláris baktériummal szemben (Maurin és Raoult, 1993).

Az eritromicin aktív mechanizmus révén 10-20 szorosára koncentrálódik a granulocitákban és az alveoláris makrofágokban, de a magas intracelluláris koncentráció ellenére az intracelluláris aktivitása közel azonos az extracelluláris baktériumokkal szembeni aktivitásával (Maurin és Raoult, 1993; van den Broek, 1993). Az alacsony intracelluláris aktivitásnak az a magyarázata, hogy az eritromicin a lizoszómákban koncentrálódik, de a *R. equi* megakadályozza a lizoszóma és a fagoszóma fúzióját. A fagolizoszóma savas kémhatása szintén csökkentheti az eritromicin hatásosságát (Maurin és Raoult, 1993).

A rifampicin ajánlott dózisa 5 mg/ttkg 12 óránként, vagy 10 mg/ttkg 24 óránként perorálisan adagolva (Hillidge, 1987; Castro és mtsai., 1986; Burrows és mtsai., 1992). A rifampicin a vizeletet, könnyet és a nyálát vörösre, narancssárgára színezheti.

Az eritromicin ajánlott dózisa 37,5 mg/ttkg 12 óránként perorálisan alkalmazva eritromicin-sztearát vagy eritromicin-foszfát formájában (Ewing és mtsai., 1994).

A klinikai tünetek megszűnése, a plazmafibrinogén-szint normalizálódása segítséget nyújthatnak a terápia abbahagyásának megítélésében. A gyógykezelést általában 4-9 hétig célszerű folytatni (Hillidge, 1987). A plazmafibrinogén-szint normális értékre való visszatérését követően még 1-2 hétig kell folytatni a kezelést. A gyógykezelésre adott egy héten belüli kedvező klinikai válaszreakció, és a plazmafibrinogén-szint csökkenése kedvezővé teszi a kórjólátot.

Alternatív antibakteriális terápiaként trimetoprim-szulfonamid kombináció (30 mg/ttkg, 12 óránként) hatásos lehet enyhe fokú tüdőgyulladás esetén, a betegség kezdeti stádiumában, vagy más hatásos antibiotikumokkal megkezdett terápia folytatásaként (Wilson, 1992). Az enrofloxacin (5 mg/ttkg perorálisan, 24 óránként, 5 hétig) magában vagy rifampicinnel, esetleg ceftiofurral való kombináció formájában szintén alkalmazható alternatív terápiaként (Giguère és Prescott, 1997).

A lázas, étvágytalan, bágyadt csikókat nem szteroid gyulladáscsökkentőkkel kell kezelni. A megfelelő terápia mellett a nyugodt, jól szellőztetett, hűvös istállóban való elhelyezésről és a megfelelő takarmány- és bőséges ivóvízellátásról gondoskodni kell (Giguère és Prescott, 1997).

Ízületgyulladás esetén az antibiotikumos kezelés mellett sebészi beavatkozás is szükséges lehet (Desjardins és Vachon, 1990; Chaffin és mtsai., 1995).

3.15.1.9. Megelőzés

A *R. equi* okozta megbetegedések előidézte károk megelőzésének alapvetően négy területe van:

- a./ A csikó szervezetébe bejutó fertőző ágens mennyiségének csökkentése
- b./ A megbetegedés minél korábbi felismerése
- c./ Passzív immunizálás
- d./ Aktív immunizálás

- a./ A csikó szervezetébe bejutó fertőző ágens mennyiségének csökkentése

A betegség endémiás formában való megjelenésére hajlamosít:

- ha az adott telepen már hosszabb ideje tenyésztenek lovakat (a virulens törzsek talajban történő feldúsulása)
- a nagy állatsűrűség
- a nyári meleg időjárás
- homokos talaj
- erős porképződés

Alapvetően a talajban lévő *R. equi* baktériumok számában nincs különbség az állattartó telepek között, azokon a telepeken viszont, ahol a megbetegedés endémiásan fordul elő, a virulens (vapA+) törzsek aránya sokkal nagyobb más telepekhez viszonyítva (Takai és mtsai., 1991b).

Ha sok csikót tartanak homokos, poros, bélsárral-szennyezett kifutóban, akkor ez lehetőséget teremt nagy mennyiségű baktérium felvételére.

Nagyon fontos a csikókat jól szellőztetett, pormentes, tiszta és nem zsúfolt istállóban elhelyezni. A legelő rotációszerű váltásával is hozzájárulhatunk a porképződés megakadályozásához.

A homokos területeket célszerű befűvesíteni, vagy locsolással megakadályozni a porképződést. A trágyát rendszeresen el kell távolítani a kifutóból és komposztálni.

Az a tenyésztési gyakorlat, hogy az ellések ideje a téli hónapokra essen, jelentősen csökkentheti a megbetegedések számát, mivel a nyári meleg, a fertőződés szempontjából kedvező időszakra a csikók már kevésbé fogékonyak a megbetegedésre (Giguére és Prescott, 1997).

b./ A megbetegedés minél korábbi felismerése

A betegség korai felismerése és a csikó elkülönítése csökkenti a veszteségeket, megakadályozza a virulens törzsek terjedését, és csökkenti a gyógykezelés költségeit. A hetente kétszer végzett teljes fizikális vizsgálat, beleértve a testhőmérséklet mérését és a tüdő feletti hallgatószerű vizsgálatot is, sikeres a korai kórjelzés és az elhullások megelőzése szempontjából (Prescott és mtsai., 1989). Egyes szerzők a csikók vérmintáinak kéthetenkénti agargél-precipitációs próbával való ellenőrzését javasolják születésüktől 5 hónapos korukig (Gaskin és mtsai., 1990; Wilkins és mtsai., 1993). Higuchi és mtsai. (1997) a 30 és 45 napos csikók vérsavóinak ELISA-val történő vizsgálatát javasolják, és a pozitív csikók rendszeres vizsgálatával (naponkénti testhőmérséklet-mérés, rendszeres fizikális vizsgálat, és plazmafibrinogén-szint mérése, ultrahang vizsgálat) a betegség a korai fázisában felismerhető és a gyógykezelés elkezdhető. Az esetek kisebb részében a csikók szerokonverzió nélkül is megbetegedhetnek (Gaskin és mtsai., 1990; Hoffmann és mtsai., 1993).

A rendszeres, naponkénti testhőmérséklet-mérés, a szerológiai módszerek alkalmazása és a plazmafibrinogén-szint kéthetenkénti mérése jelenti a legjobb módszert a betegség korai felismerésére (Giguére és Prescott, 1997).

c./ Passzív immunizálás

Elsőként Martens és mtsai. (1989) mutatták ki a *R. equi*-vel szemben termelt hiperimmun savó védő hatását kísérletes modellben. Később megállapították, hogy csikónként egy liter *R. equi*-vel szemben termelt hiperimmun savó alkalmazása az ugyanazon a ménesben tartott kontrollokhöz viszonyítva hatásosan csökkentette a csikókban a *R. equi* okozta tüdőgyulladás fellépését és a mortalitást (Madigan és mtsai., 1991; Müller és Madigan, 1992).

A hiperimmun savó hatásmechanizmusa nem tisztázott, de egyes feltételezések szerint az opszonizáló ellenanyagok révén fejtik ki hatásukat, bár más alkotórészek, mint a fibronectin, komplement és citokinek szintén szerepet játszhatnak a védelemben.

A hiperimmun savó védő hatásának elmaradásáról is beszámolnak egyes közlemények (Hurley és Begg, 1995).

Müller és Madigan (1992) javaslata szerint az 1 l hiperimmun savót az 1-2 hetes csikóknak kell beadni abban az esetben, ha a csikó a fertőzésnek leginkább kitett időszakban született, az év elején született csikók esetén pedig a nyári meleg időjárás kezdetén célszerű a savót alkalmazni.

Giguère és Prescott (1997) szerint a két alkalommal, először az élet első hetében, majd pedig 25-30 napos korban, alkalmazott hiperimmun savó kezelés jelenti a legjobb megoldást a betegség megelőzésére.

d./ Aktív immunizálás

Az aktív immunizálás sokkal kényelmesebb módja lenne a *R. equi* okozta megbetegedések megelőzésének, mint a nagy mennyiségű hiperimmun savó alkalmazása.

Prescott és mtsai. (1979) formalinnal inaktivált alumínium-hidroxiddal adjuvált vakcinát használtak, ami mind a humorális, mind pedig a celluláris immunválaszt indukálta, de nem volt képes megvédeni a vakcinázott állatokat a ráfertőzéstől. Ebben a kísérletben azonban csak három csikót használtak, és a szerzők is fölvetik annak lehetőségét, hogy túlságosan nagy dózist alkalmaztak a ráfertőzés során.

Chirino-Trejo és mtsai. (1987) élő, avirulens vakcinatörzsszel perorálisan olyan csikókat vakcináltak, amelyeket később aeroszol formájában virulens baktériumtörzsszel fertőztek. Bár az immunizálás megvédte a csikókat a kísérletes ráfertőzéstől, a szerzők arra figyelmeztettek, hogy az élő vakcina növeli a környezet fertőződésének kockázatát.

Madigan és mtsai. (1991) a maternális ellenanyagok révén próbálták megvédeni a csikókat a megbetegedésektől. A vemhes kancákat inaktivált *R. equi* vakcinával oltották. Bár a *R. equi* elleni ellenanyagok szintje emelkedett a colostrumban, de a csikók vérsavójában mért ellenanyagszintek nem növekedtek, ami arra utal, hogy a vakcinázás által kiváltott IgG izotípus nem tud jelentős mennyiségben felszívódni a csikók bélcsatornájából.

Becu és mtsai. (1997) azt tapasztalták, hogy kancák vakcinázása exoenzim aktivitással rendelkező és vapA-t is tartalmazó vakcinával szignifikánsan csökkentette (3%-ról 1,2%-ra) a csikók között a tüdőgyulladás előfordulását. Egy másik gazdaságban pedig a kancák vakcinázása és a csikóknak hiperimmun savó adagolása révén a csikók mortalitása 6%-ról 0%-ra csökkent. A szerzők szerint a csikók parenterális vakcinázása nem hatásos.

Pálfi és mtsai. (1978), valamint Belák és mtsai. (1980) arra hívták fel a figyelmet, hogy az EHV-2 fertőzésnek, mint hajlamosító tényezőnek, jelentős szerepe lehet a *R. equi* okozta megbetegedések előfordulásában, és az EHV-2 elleni védekezés jelentősen csökkentheti a *R. equi* kártételét. A szerzők az EHV-2 elleni hiperimmun savót önmagában vagy *R. equi* elleni hiperimmun savóval keverve találták hatékonynak a betegség megelőzésére.

Nordengrahn és mtsai. (1996) egy olyan állományban, ahol *R. equi* okozta megbetegedések endémiásan fordultak elő és az EHV-2 fertőzöttség is jelen volt, 19 csikót vakcináltak egy EHV-2 ISCOM vakcinával. A kontrollként használt öt, nem vakcinázott csikóból három elhullott, egyben pedig súlyos fokú légzőszervi tünetek alakultak ki. A vakcinázott 19 állat közül 18 egészséges maradt, egyben pedig enyhe légzőszervi tünetek mutatkoztak. A kísérlet eredménye alátámasztja a korábbi feltevést, amely szerint az EHV-2 fertőzés hajlamosító tényező lehet a *R. equi* okozta tüdőgyulladásra.

További vizsgálatokat igényel olyan protektív antigének és adjuvánsok alkalmazása, amelyek hatásos Th1-típusú immunválaszt képesek indukálni a *R. equi* okozta tüdőgyulladás megelőzése érdekében (Giguère és Prescott, 1997).

3.15.2. A betegség előfordulása felnőtt lovakban

A szakirodalomban csak kevés közlemény szól felnőtt lovak megbetegedéséről. Felnőtt állatokban a *R. equi* okozta fertőzés elsősorban immunszuppresszált egyedekben jelentkezik, vagy más szisztémás megbetegedéshez társultan fordul elő (Freestone és mtsai., 1987; Hondalus 1997).

Sporadikusan a csikókhöz hasonló elváltozásokat (tüdő, vastagbél, és nyirokcsomó-elváltozások) és sebfertőzéseket is megfigyeltek felnőtt lovakban (Roberts és mtsai., 1980; Ellenberger és Genetzky, 1986; Zink és mtsai., 1986; Vengust és mtsai., 2002).

Szórványosan meddő kancák méhéből és elvetélt magzatokból is ki tudták a *R. equi*-t tenyészteni (Fitzgerald és Yamini, 1995; Zink és mtsai., 1986).

3.15.3. A sertés *R. equi* fertőzöttsége

A *R. equi* sertésekben az esetek túlnyomó többségében gümőkórra emlékeztető elváltozásokat képes előidézni, de sertések makroszkópos elváltozást nem mutató áll alatti nyirokcsomóiból is kitenyészthető (Karlson és mtsai., 1940, Jubb és Kennedy, 1970, Katsumi és mtsai., 1991).

Egyes szerzők mycobacteriumokkal együtt (Cotchin, 1943; Clapp, 1956), mások önmagukban tudták e baktériumokat a nyirokcsomókból izolálni (Woodrooffe, 1950).

Zink és Yager (1987) malacokban kísérletesen létrehozott *R. equi* fertőzés kapcsán megállapították, hogy malacokban a csikókkal szemben, nem képződnek makrofágokban gazdag tályogok és a kísérletes fertőzést követően a malacok lassan meggyógyulnak.

Rao és mtsai. (1982) malacok között fellépő heveny *R. equi* fertőzést észleltek, amely bágyadságban, étvágytalanságban, lázban, a szájüregben képződő tályogokban, nyálzásban és hirtelen elhullásban nyilvánult meg. Egyes állatok fején és nyaktájékán ödéma alakult ki, a nyaki és az áll alatti nyirokcsomók gümőkórhoz hasonló elváltozásokat mutattak. A nyirokcsomókból és a szívvérből a *R. equi* baktériumokat izolálták.

Gotoh és mtsai. (1991) sertések ép tonsilláiból rövid szénláncú mikolsavakat tartalmazó, míg tályogos nyirokcsomókból hosszú szénláncú mikolsavakat tartalmazó *R. equi* törzseket izoláltak.

3.15.4. Az ember *R. equi* fertőzöttsége

Az utóbbi 10-15 évben a *R. equi*-nek, mint emberi kórokozónak a szerepe jelentősen megnőtt. Ez összefüggésben áll az immunszuppresszált, elsősorban a HIV-fertőzött emberek számának a növekedésével. McNeil és Brown (1994) több mint 100 AIDS-beteg esetét közli. A szerzők úgy látják, hogy az ember *R. equi* fertőzése indikátora lehet az AIDS kezdetének a HIV-pozitív emberekben. Az elmúlt években számos közlemény jelent meg az ember AIDS-hez társuló *R. equi* fertőzéséről (Scott és mtsai., 1995; Arlotti és mtsai., 1996.; Donisi és mtsai., 1996).

Más immunszuppresszív hatásnak kitett, vagy immunszuppresszív terápiában részesülő embereket szintén megbetegíthet a kórokozó. Ebbe a kategóriába tartoznak a daganatos betegek, leukemiában, lymphomában szenvedők, alkoholisták, kortikoszteroid kezelésben részesültek, valamint a vese-, szív- és májtranszplantáltak (Prescott, 1991; McNeil és Brown, 1994; Segovia és mtsai., 1994; Sabater és mtsai., 1996). Ritkán ép immunrendszerű emberek is megbetegedhetnek, ezekben az esetekben általában sebzésekhöz, sérülésekhez társul a fertőzés (Prescott, 1991; Walsh és Cunha, 1994).

A lovak megbetegedéséhez hasonlóan az emberek esetén is elsősorban a tüdőgyulladás és tályogképződés jellemzi a kórképet, ami lázzal, köhögéssel és mellkasi fájdalommal jár (McNeil és Brown, 1994). A kórokozó a vérárammal szóródhat a szervezetben, bacteriaemia alakulhat ki és más szervekben is lehetnek elváltozások. Az ilyen fertőzések általában nagyon súlyosak és halálos kimenetűek (Harvey és Sunstrum, 1991). Emberekben az AIDS-hez társuló *R. equi* fertőzöttség halálozási aránya még gyors diagnózis és megfelelő kezelés esetén is, elérheti az 55%-ot, de az AIDS alapbetegségtől mentes esetekben is megközelíti a 20%-ot (About és mtsai., 1996; Emmons és mtsai., 1991).

HIV-fertőzöttek *R. equi* okozta tüdőgyulladására esetén a hemokultúra az esetek 78%-ában pozitív, de bacteriaemia tüdőgyulladás nélkül is kialakulhat (Kovács és mtsai., 1997).

A gyógykezelés általában antibiotikum-kombinációkkal, hosszú ideig tartó terápia formájában történik (Mascellino és mtsai., 1994). A vankomicin, eritromicin, imipenem és a rifampicin az ajánlott terápia a *R. equi* fertőzésekben (Kovács és mtsai., 1997).

Capdevila és mtsai. (1997) szerint a HIV-pozitív betegek *R. equi* fertőzéseinek kezelésére leggyakrabban alkalmazott antibiotikumok az eritromicin, a rifampicin, a vankomicin, az imipenem, a ciprofloxacin magában, vagy kombinációban egymással vagy más antibiotikumokkal, mint pl. aminoglikozidokkal vagy tetraciklinnel.

Munoz és mtsai. (1998) az eritromicin és a rifampicin kombinációját tartják a legalkalmasabb terápiának az emberi megbetegedésekben, de felhívják a figyelmet arra, hogy olyan szervátültetett betegeknek, akik egyidejűleg ciklosporint is kapnak, nem ajánlott a rifampicin alkalmazása, mert a rifampicin közvetett úton a ciklosporin metabolizmusát felgyorsítja és ez nemkívánatos, fatális mellékhatásokkal járhat. A szerzők a nem-HIV fertőzött betegek esetén perorális ciprofloxacin kezelést javasolnak monoterápia formájában.

Marsh és mtsai. (2000) rifampicint és ciprofloxacint alkalmaztak sikeresen egy vesetranszplantált betegen 4 hónapig tartó terápia formájában.

3.15.5. *R. equi* fertőzések más állatfajokban

A *R. equi* fertőzést más állatfajokban (szarvasmarhában, juhban, kecskében, szarvasban, bivalyban, macskában, kutyában) is leírták, általában ezekben a fajokban nyirokcsomók eltályogosodásában és sebfertőzésekben nyilvánul meg a kórkép, de ezek ritkán fordulnak elő (Hondalus, 1997).

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Baktériumtörzsek

Az általunk izolált és összegyűjtött valamennyi *R. equi* törzs Magyarország területéről származott. A csikó-tüdőtályogokból, bélfodri- és gátorközi-nyirokcsomókból származó törzsek egy részét Magyarország különböző területein működő diagnosztikai laboratóriumokba, állategészségügyi intézetekbe küldött 1-4 hónapos korú csikóhullákból, ill. azokból származó szervmintákból izolálták az ott dolgozó kollégák, másik részét pedig tanszékünkön magunk izoláltuk. A csikó orrtamponokból és végbéltamponokból származó törzsek többségét három magyarországi ménesben (Hortobágyon, Mezőhegyesen és Somogyárdon) gyűjtött tamponmintákból, kisebb részét pedig más hazai állományokban gyűjtött tamponmintákból izoláltuk. A sertésből származó törzseket két magyarországi vágóhídon (Devecseren és Miskolcon) gyűjtött áll alatti nyirokcsomókból tenyésztettük ki. Az emberből származó törzseket az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet Általános Bakteriológiai Osztályáról, a Johan Béla Országos Epidemiológiai Központ Bakteriológiai Osztályáról és a Debreceni Orvostudományi Egyetem Mikrobiológiai Intézetéből kaptuk. Ezen törzsek a következő betegekből származtak: 21. sz. törzs (transzplantált beteg mellkasi sebe), 22. sz. (transzplantált beteg hemokultúrája), 31. sz. (ismeretlen immun-deficienciával született gyermek hemokultúrája), 32. sz. (AIDS-es beteg köpete), 33. sz. (AIDS-es beteg köpete), 131. sz. (vérsejtes non-Hodgkin lymphomás beteg bronchusmosó folyadéka) 201. sz. (idős mezőgazdasági munkás lábszárfekélye), 245. sz. (vesetranszplantált beteg köpete). Valamennyi beteg élt, amikor a baktériumizolálást belőlük elvégezték. A talajból származó törzseket két magyarországi ménesben (Hortobágyon, Somogyárdon) gyűjtött talajmintákból tenyésztettük ki.

A kórtani mintákból az izoláláshoz közönséges agartáptalajt (5 g pepton (Oxoid), 3 g húskivonat (Reanal, Magyarország), 2 g élesztőkivonat (Reanal, Magyarország), 2 g agar (Oxoid), 1 g glükóz (Reanal, Magyarország), ad 1000 ml víz)/ vagy 10% defibrinált szarvasmarhavért tartalmazó agartáptalajt használtunk. A beoltott táptalajokat 37°C-on 48-72 órán át, aerob körülmények között tenyésztettük. A tamponmintákból, a sertés nyirokcsomókból, és a talajmintákból történő szelektív izoláláshoz CAZ-NB (Graevenitz és Pünter-Streit, 1995) és/vagy az általunk kidolgozott TCP táptalajt (összetételét lásd a 4.2 fejezetben) használtuk. A tenyésztést 37°C-on 48-72 órán át aerob viszonyok között végeztük.

A kitenyésztett, morfológiai és tenyésztési tulajdonságaiban *R. equi*-re emlékeztető izolátumokat primer és szekunder biokémiai vizsgálatoknak vettettük alá, és a *R. equi*-nek bizonyult törzseket a további vizsgálatok elvégzéséig -80°C-on, 25% steril glicerint tartalmazó közönséges levesben lefagyaszta tároltuk.

A szerológiai és az összehasonlító vizsgálatokhoz használt típus-törzseket (ATCC 33701-33707) a Guelphi Egyetem (University of Guelph, Guelph, Canada), a Justus Liebig Egyetem (Justus-Liebig-Universität, Gießen, Germany) és a Kitasato Egyetem (Kitasato University, Towada, Aomori, Japan) bocsátotta rendelkezésünkre.

4.2. Szelektív táptalajok összehasonlító vizsgálata

Szelektív táptalajok

Négy különböző, korábban az irodalomban leírt szelektív táptalajt TINSDALE (Tinsdale, 1947), M3T (Rowbotham és Cross, 1977), NANAT (Woolcock és mtsai., 1979) és a CAZ-NB (Graevenitz és Pünter-Streit, 1995), és négy, általunk az előzetes kísérletek alapján összeállított (PNP, NC, TVP és TCP) táptalajt hasonlítottunk össze. Az általunk újonnan összeállított táptalajok peptont (Oxoid) (10 g/l), NaCl-ot (Reanal, Magyarország) (5 g/l), piroszőlősavat (Reanal, Magyarország) (1 g/l), élesztőkivonatot (Reanal, Magyarország) (5 g/l), agart (Oxoid) (20 g/l) és a szelektív adalékokat tartalmazták. A szelektív adalékok összetételét az **3. táblázat** mutatja.

3. táblázat: Az alkalmazott szelektív adalékanyagok összetétele.

A szelektív táptalaj neve	NC	PNP	TCP	TVP
Összetétel	norfloxacin (0,78 mg/l), cefoperazon (3,125 mg/l), nisztatin (25 mg/l), K-tellurit (50 mg/l)	penicillin (0,78 mg/l), nitrofurantoin (6,25 mg/l), polimixin E (12,5 mg/l), nisztatin (25 mg/l), K-tellurit (50 mg/l)	trimetoprim (6,25 mg/l), cefoperazon (6,25 mg/l), polimixin B (6,25 mg/l), cikloheximid (100 mg/l), K-tellurit (50 mg/l)	trimetoprim (3,125 mg/l), vankomicin (0,098 mg/l), polimixin B (6,25 mg/l), nisztatin (25 mg/l), K-tellurit (50 mg/l)

Baktériumtörzsek

Tizenkét, különböző forrásból Magyarországon izolált *R. equi* törzset (**4. táblázat**), egy típus-törzset (ATCC 33701) és tíz más fajhoz tartozó baktériumtörzset (lásd. lejjebb) használtunk a korábban ismert és az általunk összeállított szelektív táptalajok hatékonyságának a vizsgálatára. A törzseket használatukig -80°C -on tároltuk.

4. táblázat: A szelektív táptalajok vizsgálatára használt *R. equi* törzsek eredete és sorszáma.

Eredet	A törzsek sorszáma
Ló	24, 27, 37, 85, 127, 128,
Ember	21, 33,
Sertés	129,
Talaj	69, 80, 96,

Talaj- és bélsárminták

A talaj- és a bélsármintákat magyarországi ménesek területén a talaj felületéről gyűjtöttük és műanyagdobozokban szállítottuk a laboratóriumba. A mintákat felhasználásukig $+4^{\circ}\text{C}$ -on hűtőszekrényben tároltuk.

A vizsgálat menete

A szelektív táptalajok összehasonlításának első lépésében az irodalomban leírt 4, és az általunk összeállított 4 táptalaj szelektív kapacitását (telepmorfológia, visszaizolálhatóság, gátló hatás) vizsgáltuk.

1./ A szelektív táptalajok hatása a *R. equi* törzsek telepmorfológiájára

Tizenkét, különböző eredetű *R. equi* törzset oltottunk a szelektív táptalajok felületére és 72 óráig tartó, 37°C -on történő tenyésztést követően a baktériumtörzsek növekedését és a telepmorfológiát vizsgáltuk.

2./ A *R. equi* törzsek visszaizolálhatóságának vizsgálata

A visszaizolálási arány meghatározása céljából hígítási sort (10^{-1} – 10^{-5}) készítettünk négy *R. equi* törzs (33, 96, 127, 128) 48 órás levestenyészetéből, és ezen levestenyészetek 10^{-5} -szeres hígításaiból $3 \times 50 \mu\text{l}$ -t szélesztettünk ki 3-3 táptalaj felületére. Szelektív adalékanyagokat nem tartalmazó közönséges agart használtunk kontrollként. Három napig tartó, 37°C -on történő tenyésztés után meghatároztuk a táptalajok felületén nőtt telepek számát.

3./ A különböző baktériumfajok növekedésének gátlása

A táptalaj gátló hatásának vizsgálata céljából öt Gram-negatív (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*) és öt Gram-pozitív (*Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) baktériumtörzset oltottunk a különböző szelektív táptalajokra. Ezek növekedését 72 órán át 37°C -on történt tenyésztés után vizsgáltuk. Kontroll táptalajként 10% defibrinált szarvasmarhavért tartalmazó agart használtunk.

Második lépésben az irodalomban leírt táptalajok közül és az általunk összeállított táptalajok közül a legjobb szelektív kapacitásúnak talált egy-egy táptalajt hasonlítottunk össze bélsár- és talajminták alkalmazásával:

4./ A szakirodalomban leírt és az általunk összeállított táptalajok közül legjobbnak talált szelektív táptalajok összehasonlítása

A korábbi vizsgálatok során legjobbnak bizonyult két szelektív táptalaj hatékonyságát lóbélsár- és talajmintákba belekevert, ismert mennyiségű *R. equi* visszaizolálhatóságával jellemeztük. Három különböző talaj- és bélsármintát gyűjtöttünk, majd fiziológias konyhasóoldattal ezekből szuszpenziót készítettünk (10 g minta + 30 ml steril fiziológias konyhasóoldat), és ezen szuszpenzió 5 ml-éhez adtunk $9,6 \times 10^3$ TFE (telepformáló egység) *R. equi*-t. Ebből a baktériummal kiegészített szuszpenzióból szélesztettünk 50 µl-t a CAZ-NB és a TCP talaj felületére, amelyeket ezt követően 37°C-on 72 órán át tenyésztettük, majd a nőtt *R. equi* telepek számát és a háttér baktérium- és gombaflóra növekedésének mértékét vizsgáltuk.

Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzéshez a táptalajon nőtt telepek száma alapján kiszámított telepformáló egység kettes alapú logaritmusát (\log_2) használtuk. Mivel a baktériumok a kettő hatványai szerint szaporodnak, a kettes alapú logaritmus értékek a baktériumsejtek osztódásának számával arányosak. Ezek az értékek jobban jellemzik a szelektív táptalajok közötti különbséget, mint a csíraszám. Mivel a nulla logaritmus nem definiálható, abban az esetben, amikor nem nőtt egyetlen telep sem az agaron, akkor a nulla telepszámot 0,5-tel helyettesítettük a logaritmos transzformációt megelőzően. A statisztikai elemzés során az SPSS 7.5 szoftver (SPSS 7.5, 1996., SPSS Inc., Chicago, Illionis, Amerikai Egyesült Államok) GLM (General Linear Model) eljárását, kétutas variancia analízist és Dunett-tesztet alkalmaztunk.

4.3. Morfológiai, tenyésztési és biokémiai vizsgálatok, a törzsek DNS-alapú azonosítása

Primer tesztek

A baktérium-izolátumok tenyésztési, morfológiai és biokémiai tulajdonságait a standard módszereknek (Barrow és Feltham, 1993; Czirók, 1999) megfelelően, az alábbiak szerint vizsgáltuk.

A baktériumok alakját és festődését 48 órás tenyészetből készített, Gram szerint megfestett kenetekben fénymikroszkópos vizsgálat során bíráltuk el.

A mozgás vizsgálatához 10 µl fiziológias konyhasóoldatba 48 órás baktériumtenyészetből vett mákszemnyi baktérium-mennyiséget szuszpendáltunk, és ezt fedőlemezzel lefedve fáziskontraszt mikroszkópban vizsgáltuk.

Az aerob körülmények között való növekedést 37°C-os termosztátban 48 óráig tartó tenyésztést követően, az anaerob tenyésztést pedig anaerob edényekben, anaerob indikátor (Oxoid) jelenlétében vizsgáltuk.

A kataláz-próbát 3%-os H_2O_2 -oldattal, a citokróm-oxidáz jelenlétét tetrametil-para-feniléndiamin-oldattal hajtottuk végre. A glükóz bontását fenolvörös levesben (Difco), az OF-próbát pedig Hugh-Leifson táptalajban végeztük.

A vizsgálatba bevont valamennyi *R. equi* törzs (8. táblázat, 57. oldal) primer biokémiai tulajdonságait megvizsgáltuk.

Szekunder tesztek

A pigmenttermelést közönséges agaron 1 héten át szobahőn való tenyésztést követően bíráltuk el. A CAMP-próbát *S. aureus*-szal 10% szarvasmarhavért tartalmazó agaron végeztük. A vizsgálathoz szükséges baktériumtörzset tanszékünk törzsgyűjteményéből választottuk ki. A sótürelést 7% NaCl-ot tartalmazó közönséges agaron 3 napig ill. 5 napig tartó 37°C-on történő tenyésztést követően bíráltuk el. Az indoltermelést triptofán tartalmú levestenyészetben, a H_2S -termelést 3 ml cisztein tartalmú levesben, ólomacetáttal impregnált megnedvesített szűrőpapírcsík segítségével vizsgáltuk. A zselatinhidrolízist a baktérium közönséges levestenyészetébe tett aktív szén tartalmú zselatinkorong felhasználásával végeztük. Az ureáztermelését karbamidot és fenolvörös indikátort tartalmazó levestenyészetben, a nitrátredukciót pedig 0,1% KNO_3 -ot tartalmazó levestáptalajban vizsgáltuk. A különböző szénhidrátokból (laktóz, maltóz, mannit,

szacharóz, xilóz, trehalóz, szalicin) történő savtermelést, a szénhidrátot és fenolvörös indikátort tartalmazó levesben vizsgáltuk. A szekunder biokémiai próbákat 145 törzs esetén végeztük el.

A hemolízis vizsgálata nyúlvért tartalmazó agaron

A nyúlvért tartalmazó agar készítéséhez vágóhídon gyűjtött, defibrinált nyúlvérből PBS-ben mosott vörösvérsejt-szuszpenziót állítottunk elő és ebből 5%-ot használtuk a nyúl vörösvérsejteket tartalmazó agar készítéséhez. A tenyészeteket 30°C-on 96 órán át tenyésztettük és 24, 48, 72 és 96 óra elteltével bíráltuk el. A nyúlvér-hemolízis vizsgálatát 133 törzs esetén végeztük el.

A törzsek DNS alapú azonosítása

Az azonosítás a bakteriális 16S rRNS gén *R. equi* specifikus konzervatív szekvenciáira alapozott PCR vizsgálattal történt (Soedarmanto és mtsai., 1998).

Valamennyi vizsgálatba bevont törzsből DNS-t vontunk ki a következő módon: Eppendorf csőbe 200 µl steril bidesztillált vizet mértünk, majd az adott baktériumtörzs színtenyészetéből kacsnyi mennyiséget szuszpendáltunk benne. Ezt követően 100°C-os vízfürdőben a baktérium-szuszpenziót 10 percig hőkezeltük, majd centrifugáltuk (10 000 g, 2 perc) és a felülúszóból 100 µl-t átvittünk egy másik Eppendorf csőbe. A felülúszóban lévő DNS-t használtuk a polimeráz láncreakció során templátként. A mintákat felhasználásukig -80°C-on tároltuk.

A polimeráz láncreakciót Soedarmanto és mtsai. (1998) által leírt primerek felhasználásával hajtottuk végre:

Rq1 (5'-) GGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTC (-3');

Rq2 (5'-) CGCAAGCTTGGGGTTGAGCCCCAA (-3')

A polimeráz láncreakcióhoz felhasznált dNTP-t, a Taq-polimerázt és a puffert az MBI Fermentas (Litvánia) cégtől vásároltuk. A reakciót 50 µl reakcióegységben hajtottuk végre. A dNTP-t 0,2 mM-os a primereket pedig 1 µM-os végkoncentrációban alkalmaztuk. A reakcióhoz 10 µl DNS-templátot használtunk. A polimerázt az első ciklus során 93°C-on adtuk a reakcióelegyhez. A DNS kezdeti denaturálását 98°C-on 3 percig végeztük. A 35 ciklus során a denaturáció 93°C-on, 30 mp-ig, a primerek kötődése 52°C-on 30 mp-ig, a lánchosszabbodás pedig 72°C-on 1 percig történt. Molekulatömeg-markerként GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus markert használtunk (MBI Fermentas, Litvánia). A termék 15 µl-ét 2%-os agaróz gélben 100 V-on 20 percig futtattuk. A pozitív reakciót 450 bp méretű termék megjelenése jelezte.

4.4. Enzimaktivitás vizsgálata

Az enzimaktivitási vizsgálatok során API ZYM (bioMérieux, Franciaország) tesztsíkokat használtuk. A vizsgálat végrehajtása és az eredmények értékelése a gyártó útmutatásainak megfelelően történt. A vizsgálatokhoz a baktériumtörzsek közönséges agaron nőtt 48 órás tenyészetéből készített McFarland 5-ös sűrűségű szuszpenzióját használtuk.

Az enzimaktivitást 19 enzimre vonatkoztatva 31 törzssel vizsgáltuk meg (**5. táblázat**).

5. táblázat: Az enzimaktivitás, szénforrás-hasznosítás és a 16S rRNS gén vizsgálatára használt *R. equi* törzsek eredete és száma.

A törzsek eredete	A törzsek sorszáma
Típustörzsek	1-7 (ATCC 33701-33707)
Ló	23, 26, 27, 34, 64, 122, 128,
Ember	21, 22, 31, 32, 33, 131, 201,
Sertés	123, 129, 130,
Talaj	66, 72, 80, 88, 97, 106, 108,

4.5. Szénforrás-hasznosítás vizsgálata

A szénforrás-hasznosítási vizsgálatokat BIOLOG rendszer (Biolog, Inc., Hayward, Kanada) GP2 lemezeiben (GP MicroPlate™) végeztük el, amelyek a 95 szubsztrátot a polisztirol lemez vályulataiba beszárított formában tartalmazzák.

A vizsgálatba vont 31 törzset (**5. táblázat**) leoltottuk 1-1 közönséges agarra. Ezen a táptalajon a törzseket 72 óráig, 30°C-on tenyésztettük, majd mindegyik törzset ráoltottuk 10% defibrinált szarvasmarhavért tartalmazó BUG (Biolog Universal Growth) agarra, amelyen 30°C-on 24 órán át tenyésztettük. Ezt követően steril vattatamponnal az agar felületéről a baktériumokat táptalajba (4 g NaCl, 0,57 g Na-tioglikolát, 1000 ml vízben) szuszpendáltuk. A szuszpenzió sűrűségét Biolog denzitométerrel a standardnak megfelelően állítottuk be. A szuszpenzióból a 96 lyukú lemez minden vályulatába 150 µl-t oltottunk és a lemezeket 30°C-on 48 órán át inkubáltuk. A baktérium növekedését 4, 24, 48 óráig tartó tenyésztést követően számítógéphez csatlakoztatott ELISA-leolvasóval (Multiscan Plus, Labsystems Oy, Finnország) detektáltuk 590 nm-es szűrőt használva.

A mérési eredmények kiértékelésére, és a dendrogram elkészítésére a BIOLOG rendszer saját szoftverét (MicroLog 4.01) használtuk.

4.6. Antibiotikum-érzékenység vizsgálata

Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokat leveshígítós módszerrel, Mueller-Hinton levesben a standardnak tekintett módszertani előírás szerint (Czirók, 1999) végeztük.

Hús reprezentatív *R. equi* törzsnél (**6. táblázat**) határoztuk meg a minimális gátló koncentrációt (MIC), tíz antibiotikumra vonatkozóan. Valamennyi antibiotikumot a Sigma-Aldrich Co.-tól (Amerikai Egyesült Államok) szereztük be.

A felhasznált antibiotikumok:

aminoglikozidok:	amikacin-szulfát gentamicin-szulfát neomicin-szulfát
antituberculoitikumok:	rifampicin
glikopeptidok:	vankomicin-hidroklorid
makrolidok:	eritromicin
penicillinek:	amoxicillin penicillin G
tetraciklinek:	minociklin-hidroklorid oxitetraciklin-hidroklorid

6. táblázat: Az antibiotikum-érzékenység vizsgálatára használt *R. equi* törzsek eredete és száma.

A törzsek eredete	A törzsek sorszáma
Ló	23, 26, 27, 34, 64, 65, 125, 128
Ember	21, 22, 31, 32, 33, 131
Sertés	123, 129, 130,
Talaj	66, 72, 97

4.7. Szerológiai vizsgálatok

A *R. equi* törzsek szerotipizálását a Prescott-féle szerotipizálási rendszer (Prescott, 1981) szerint, agargél-precipitációs (AGP) próbával végeztük.

Hiperimmun vérsavók termelése nyulakban *R. equi*-vel szemben

A 7 típusú törzset (ATCC 33701-33707) 3-3 közönséges agaron elszaporítottuk (30°C, 48 óra), majd a tenyészeteket 0,5% formalint tartalmazó fiziológiás konyhasó-oldatban úgy

szuszpendáltuk, hogy McFarland 3-as sűrűségű szuszpenziót nyerjünk. Az így elkészített oltóanyag segítségével minden szerotípussal 6 egymást követő alkalommal, 3-4 naponként, növekvő dózissal (0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml; 3 ml; 3 ml) 2-2 nyulat fülvénaiba oltottunk. Az utolsó oltást követően 1 héttel a nyulakat ketamin - xilazin narkózisban elvégeztettük, majd a vérsavót felhasználásig -20°C -on tároltuk.

Az agargél-precipitációs próbához szükséges antigén előállítása

A *R. equi* törzseket közönséges agaron 30°C -on 48 óráig tenyésztettük, majd az agar felületéről eltávolított 0,5 g (nedves tömeg) baktériumot törzsenként 5 ml fiziológiás konyhasó-oldatban szuszpendáltuk. Egy éjszakán át tartó, 30°C -on történő inkubálást követően a baktérium-szuszpenziót 3000 g-vel 4°C -on 15 percig centrifugáltuk. Antigénként a felülúszót használtuk, amit felhasználásig -20°C -on tároltuk.

Szerotipizálás

A törzsek szerotípusát agargél-precipitációs próbával, Petri-csészébe öntött 0,8% agarózt (Noble agar) tartalmazó gélben vizsgáltuk.

A vizsgálat során törzsenként 2 rozettát használtunk, a rozetta középső mélyedésébe az antigén-szuszpenziót, a körülötte lévőbe pedig az egyes típustörzsekkel szemben termelt hígítatlan hiperimmun savók 20 μl -ét mértük. A reakciót nedves-kamrában való 24 óráig tartó inkubálást (20°C) követően bíráltuk el.

A Prescott-féle szerotipizálási rendszerbe be nem sorolható törzsek közül 30 törzssel (11, 12, 15, 18, 70, 76, 84, 96, 110, 121, 125, 139, 190, 201, 208, 244, 245, 251, 260, 272, 281, 294, 300, 305, 311, 341, 348, 355, 370, 405) szemben az előzőekben leírt módon nyulakban hiperimmun savót termeltünk. Valamennyi savót megvizsgáltuk agargél-precipitációs próbában mind a 30 törzsből készített antigénnel.

A vizsgálat alapján azonos csoportba tartozó törzsekkel szemben termelt hiperimmun savók közül egyet-egyét kiválasztva agargél-precipitációs próbában megvizsgáltuk a korábban a Prescott-féle szerotipizálási rendszerbe be nem sorolható valamennyi törzset.

4.8. A 16S riboszomális RNS gén vizsgálata

A vizsgálatba bevont baktériumtörzseket az **5. táblázat** (44. oldal) tartalmazza.

DNS-kivonás és -tisztítás *R. equi* szintenyészetből

- 400 µl lízispuffert (0,15 M NaCl, 0,01 M EDTA di-Na só, pH: 8,0) tartalmazó Eppendorf-csőbe kacsnyi mennyiségű baktériumot szuszpendáltunk,
- keverés után 10 µl lizozimet (10 mg/ml) adtunk az Eppendorf-csőhöz, újra kevertük és 37°C-os vízfürdőben 30 percig inkubáltuk,
- 5 µl proteináz-K-t (15 mg/ml) és 10 µl SDS-t (25%-os, felhasználás előtt 60°C-os vízfürdőben tartottuk) adtunk a mintához, összekevertük és 60 °C-os vízfürdőben 30 percig inkubáltuk,
- a mintát extraháltuk 400 µl Tris/EDTA-val telített fenol hozzáadásával, összekevertük, majd centrifugáltuk (4°C, 10000 g, 10 perc),
- a 400 µl felülúszót új Eppendorf-csőbe mértük, majd extraháltuk 400 µl kloroform hozzáadásával,
- keverés után centrifugáltuk (4°C, 10 000 g, 10 perc),
- a 300 µl felülúszót új Eppendorf csőbe mértük.

A további DNS-tisztítás

A további DNS-tisztítást Prep-A-Gene DNS-tisztító készlettel (BioRad) végeztük.

- a mintához 600 µl Prep-A-Gene Binding Puffert adtunk, majd forgatással összekevertük,
- a mintához 10 µl Prep-A-Gene Matrixot adtunk, forgatással összekevertük, majd szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk,
- 2 percig centrifugáltuk (10 000 g), majd leöntöttük a felülúszót,
- a mintához 500 µl Prep-A-Gene Binding Puffert adtunk, keverés után centrifugáltuk (1,5 perc, 10 000 g), majd a felülúszót leöntöttük,
- a mintához 750 µl Prep-A-Gene mosópuffert adtunk, keverés után centrifugáltuk a mintát (1,5 perc, 10 000 g), majd leöntöttük a felülúszót,
- a mintához 750 µl Prep-A-Gene mosópuffert adtunk, a mintát centrifugáltuk (2 perc, 10 000 g), majd a felülúszót pipettával leszívtuk,
- a mintához 50 µl steril vizet adtunk (ezzel kioldottuk a DNS-t a mátrixból), keverés után 15 percig 37°C-on inkubáltuk a mintákat,
- centrifugálás (2,5 perc, 10 000 g) után, 40 µl felülúszót mértünk át egy új Eppendorf csőbe, és a DNS-t 4°C-on tároltuk.

A 16S rDNS amplifikálása polimeráz láncreakció használatával

A polimeráz láncreakciót Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 készülékkel végeztük, amely során a következő primereket használtuk:

63f: (5'-) CAGGCCTAACACATGCAAGTC (-3')

1387r: (5'-) GGGCGGTGTGTACAAGGC (-3')

A polimeráz láncreakcióhoz felhasznált anyagokat az MBI Fermentas (Litvánia) cégtől szereztük be. A reakciót 50 µl reakcióegységben hajtottuk végre. A dNTP-t 0,2 mM-os, a primereket pedig 0,5 µM-os végkoncentrációban alkalmaztuk. A reakcióhoz 2 µl DNS-templátot és 2,5 U polimerázt használtunk. A polimerázt az első ciklus során 93°C-on adtuk a reakcióelegyhez. A DNS kezdeti denaturálását 98°C-on 3 percig végeztük. A 28 ciklus során a denaturáció 93°C-on, 30 mp-ig, a primerek kötődése 52°C-on 30 mp-ig, a lánchosszabbodás pedig 72°C-on 1 percig történt. A PCR-termék kimutatását 0,5 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó 1%-os agaróz gélben elektroforézis segítségével végeztük el. A PCR-terméket TBE-pufferben 100 V-on 15 percig futtattuk. A DNS jelenlétét UV-fényben vizsgáltuk. A 16S riboszomális RNS gén amplifikációját 1338 bp méretű termék megjelenése jelezte. A PCR termék tisztítását Prep-A-Gene DNS-tisztító készlettel (BioRad) végeztük (lásd. feljebb). A 8 µl PCR-termék restriktív endonukleázokkal (*Tru9I*, *Hin6I*) való emésztését R-puffer ill. Y-puffer alkalmazásával 3 órán át végeztük. Az

emésztett terméket 0,5 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó 1,5%-os agaróz gélben, 80 V-on, 70 percig futtattuk.

A kiválasztott 11 törzsből (5, 6, 26, 27, 31, 64, 66, 97, 106, 123, 131) származó 16S rRNS gén első 440 bp-ra kiterjedő szekvenálását ABI 310 Genetic Analyser készülékkel végeztük. Az általunk a 16S rRNS génen végzett vizsgálatokat szekvencia szinten az **1. ábra** szemlélteti.

1. ábra: A *R. equi* törzsek 16S rRNS génjén végzett vizsgálatok szekvencia szintű bemutatása. (A teljes 16S rRNS génen (1478 bp) az általunk használt primerek tapadási helyét narancssárgával, az amplifikált régiót félkövér nyomtatott nagybetűvel, a 11 törzs esetén megszekvenált régiót kék színnel, a *Tru9I* restrikciós endonukleáz vágási helyeit piros színnel, a *Hin6I* restrikciós endonukleáz vágási helyeit pedig zöld színnel jelöltük.)

tcctggctcaggacgaacgctggcgg**CGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTTCG**
GGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCC
TGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGTTTACTG
GTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGG
TAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGC
CTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACC
GGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGGTTGTCCGGAATTACTGGGCG
TAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCGTCCGTGAAAACCTTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGCGG
GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATCGCA
GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAA
GCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCGCTAGGTGTG
GGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGC**CCCGCCTGGGGAGTACGGCCG**
CAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAA**TTCGA**
TGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTACATATACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTT
GTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG**TCCC**
GCAACGACGCA**ACCCTTGTCTGTGTTGCCA**CGCG**GTAATGGCGGGACTCGCAGGAGACTGCCG**
GGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACA
CATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTTAA**AGCCGGT**
CTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG
CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC**gtcacgtcatgaaagtcggtaa**
caccgaagccggtggcctaacccttgtggagggagccgtcgaaggtgggatcggcgattgggacg
aagtcgtaacaaggtagccgtaccgg

4.9. Plazmidprofil-vizsgálatok

A vizsgálatba bevont törzsek

Munkánk során az összesen 204, zömében lovakból, és lovak környezetéből származó talajból izolált, valamint 167, sertések áll alatti nyirokcsomóiból és 8, emberekből származó *R. equi* törzs plazmidprofilját vizsgáltuk meg.

Referenciatörzsekként az ATCC 33701 (csikóból izolált virulens törzs, 85 kbp-os I típusú virulenciaplazmiddal rendelkezik), a 222-es törzset (csikóból izolált, virulens törzs, 87 kbp-os I típusú virulenciaplazmiddal rendelkezik) és az S5-ös törzset használtuk (sertésből izolált, mérsékelten virulens törzs, 95 kbp-os virulenciaplazmiddal rendelkezik), mivel ezen törzsek plazmidprofilja, és virulenciája is ismert volt (Takai és mtsai., 1996b; 2001a; 2001b).

A plazmid DNS izolálása és vizsgálata

A plazmid DNS-t alkalikus lízis módszerrel (Birnboim és Doly, 1979) izoláltuk, a Takai és mtsai. (1991a) által leírt módosításokkal (**1. melléklet**, 131. oldal). A plazmid DNS-t restrikciós endonukleázokkal (*EcoRI* és *EcoT22I*) emésztettük, a DNS-fragmenseket pedig 0,7%-os agaróz gélben választottuk szét (5 V/cm, 2 óra), a DNS-t etídium-bromid jelenlétében UV-fényben tettük láthatóvá.

A virulenciafehérjét kódoló gének kimutatása

A törzsekből kivont plazmid DNS-mintákban polimeráz láncreakció segítségével mutattuk ki a vapA- ill. a vapB-géneket. A polimeráz láncreakcióhoz a következő primereket használtuk (Takai és mtsai., 1995a):

A 15-17 kDa antigén (vapA) génjének kimutatásához:

primer 1 (5'-)GACTCTTCACAAGACGGT(-3')

primer 2 (5'-)TAGGCGTTGTGCCAGCTA(-3').

A 20-kDa antigén (vapB) génjének kimutatásához:

primer 3 (5'-)AACGTAGTCGCGGTGAGAA(-3')

primer 4 (5'-)ACCGAGACTTGAGCGACTA(-3').

A polimeráz láncreakciót 50 µl-es reakcióelegyben Takai és mtsai. (1995a) leírásának megfelelően végeztük. Az amplifikációhoz GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) készüléket használtunk. Az amplifikációt követően a reakcióelegy 10 µl-ét 0,7%-os agaróz gélben elektroforetizáltuk (50 V, 2 óra), a DNS-t etídium-bromid jelenlétében UV-fényben tettük láthatóvá. A pozitív reakciót 564 bp (vapA-gén) ill. 827 bp (vapB-gén) méretű reakciótermék megjelenése jelezte.

4.10. Immun-hisztokémiai vizsgálatok

Az immun-hisztokémiai vizsgálatokhoz egy 6 hónapos korban elhullott csikó („A”) és egy másik állományból származó két négyhónapos csikó („B” és „C”) mellkasi szervei álltak rendelkezésünkre. Valamennyi állat lázas állapottal járó légzőszervi tünetek között hullott el. Az „A” csikó az elhullás előtti napon parenterálisan gentamicin és cekvinom-szulfát (Cobactan 2,5% inj., Hoechst, Németország) kezelést kapott. A „B” és „C” állat gyógykezelésben nem részesült.

Makroszkópos vizsgálat

A makroszkópos vizsgálat során az „A” állatnál gennyes orrváladékot és általános, enyhe fokú sárgaságot láttunk. Valamennyi állatban („A”, „B”, „C”) a gátorközi nyirokcsomók jelentősen megnagyobbodtak. A tüdő megnagyobbodott, tömött tapintatú, szabálytalan területeken sötétvörös színű volt. Benne a „B” és a „C” állatban elszórta 1-4 cm átmérőjű, tokkal nem határolt tályogok voltak. Az „A” állatban a jobb csúcslebenyben 5 cm átmérőjű, kötőszövettel erősen átszőtt, idült tályog volt látható. Valamennyi állatban („A”, „B”, „C”) a légső nyálkahártyáját habos, sárgás, nyúlós váladék fedte. Az „A” állatnál normális béltartalom mellett a vékony- és vastagbél csoportos nyiroktüszői duzzadtak, kipirultak voltak. Ezekből kiindulva a vastagbél teljes hosszában számos, mélyre terjedő fekély volt látható. A bélfodri nyirokcsomók tetemesen megnagyobbodtak, részben eltályogosodtak. Az „A” állatban a lép és a máj kissé megnagyobbodott volt.

A tüdőből és a gátorközi nyirokcsomóból az „A” csikó esetében pedig a vastagbélfodri nyirokcsomóból is bakteriológiai vizsgálatot végeztünk. A közönséges- és véresagar táptalajokat aerob, anaerob és 10% CO₂-ot is tartalmazó légtérben 37°C-on tenyésztettük és 24, 48 óra, valamint 72 óra után bíraltuk el. A baktériumok morfológiai vizsgálatát, továbbá a primer próbákat standardban leírtak szerint (Barrow és Feltham, 1993) végeztük, a szekunder tesztek pedig az API Coryne lemez (bioMérieux, Franciaország) felhasználásával hajtottuk végre.

A „B” és „C” állat tüdejéből és gátorközi nyirokcsomójából, míg az „A” állat esetében csak az eltályogosodott vastagbélfodri nyirokcsomóból aerob viszonyok között nagy számban, színtenyészetben 48 órára 2-3 mm átmérőjű, vízceppszerű, nyálkás telepek nőttek. Az anaerob tenyésztés során baktériumnövekedést nem tapasztaltunk. A kitenyésztett baktériumtörzsek a primer és szekunder biokémiai tesztek alapján *R. equi*-nek bizonyultak.

Szövetteni vizsgálat

Valamennyi állat esetében („A”, „B”, „C”) a tüdőtályogokból és a gátorközi nyirokcsomóból valamint az „A” állat eltályogosodott vastagbélfodri nyirokcsomójából 5 µm vastag fagyasztott metszeteket készítettünk (Cryotome, Shandon Co.). Ugyanezen szervekből szövetmintát is vettünk és azokat 10%-os formalinoldatban 1-5 napig fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, majd ezekből 5 µm vastag metszeteket készítettünk, amelyeket hematoxilin-eozinnal, valamint Ziehl-Neelsen szerint festettünk meg. Valamennyi állatból lenyomati készítményt is vettünk a bifurkáció előtt a légső nyálkahártyáját fedő váladékból, a megnagyobbodott gátorközi nyirokcsomó és az eltályogosodott tüdőterületek metszslapjáról. Az „A” állat esetében az orrjáratból és az eltályogosodott vastagbélfodri nyirokcsomóból szintén lenyomatokat készítettünk. A fagyasztott metszeteket és a lenyomati készítményeket 10 percig szobahőmérsékleten tömény acetonban fixáltuk, majd -20°C-on tároltuk.

Valamennyi állatban („A”, „B”, „C”) a gátorközi nyirokcsomóban és a tüdőben gennyes granuloma-képződéssel járó gyulladást, a tüdőben ezen kívül elhalást és tályogképződést, az „A” állatban pedig kifejezett kötőszövet-szaporodást is megfigyeltünk. Az „A” állatban a vastagbélfodri nyirokcsomóban gennyes, granuloma és tályogképződéssel járó gyulladást találtunk. Ziehl-Neelsen festéssel kórokozót nem tudtunk kimutatni.

R. equi specifikus hiperimmun savó előállítása

Az immun-hisztokémiai vizsgálatokhoz használt hiperimmun savót 1-es szerotípusú *R. equi* (ATCC 33701) törzssel szemben nyulakban állítottuk elő a szerotípezáshoz használt

immunsavókkal azonos módon.

R. equi specifikus IgG preparálása és tisztítása

Egy rész vérsavóhoz állandó keverés mellett fokozatosan 1 rész telített ammónium-szulfátot (pH 7,2) adtunk, majd folyamatosan 60 percig kevertük. Ezt követően az anyagot 10 000 g-vel 20 percig centrifugáltuk. A csapadékot az eredeti vérsavó térfogatával megegyező térfogatú PBS-ben oldottuk fel, majd megismételtük az ammónium-szulfátos kisózást és centrifugálást. A csapadékot, a lehető legkisebb mennyiségben, PBS-ben oldottuk fel. Az ammónium-szulfátot 0,02 M Na-foszfát pufferral (pH 7,0) szemben, dializálással távolítottuk el az oldatból. Az így előkezelt anyagot, az affinitás-kromatográfia elvén alapuló eljárással, Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) oszlopon tisztítottuk meg az alábbiak szerint.

A Protein G Sepharose 4 Fast Flow oszlopot 0,02 M Na-foszfát pufferral (pH 7,0) hoztuk egyensúlyba, majd perisztaltikus pumpa segítségével az anyagot 60 cm/óra sebességgel vittük fel a géltre. A nem specifikusan kötődő fehérjéket UV 280 nm hullámhosszon való folyamatos ellenőrzés mellett 0,02 M Na-foszfát pufferral (pH 7,0) mostuk le az oszlopról. Az eluáláshoz 0,1 M glicin-HCl (pH 2,7) puffert használtunk, közben folyamatosan UV 280 nm hullámhosszon mértük a frakciók fehérjetartalmát. A gyűjtött frakciók savas közegét 1 M Tris-HCl (pH 9,0) pufferral közömbösítettük. Az IgG-t tartalmazó frakciókat egyesítettük, majd telített ammónium-szulfáttal (pH 7,2) bekoncentráltuk. Ezt követően PBS-sel szemben dializáltuk. A preparált IgG tisztaságát SDS-PAGE-analízissel (Laemmli, 1970), PhastSystem automata készülékkel (Amersham Pharmacia Biotech), PhastGel 8-25 típusú minigélben (Amersham Pharmacia Biotech) ellenőriztük. Az immunglobulint Coomassie Blue R-350 (Amersham Pharmacia Biotech), illetve PhastGel Protein Silver Staining Kit (Amersham Pharmacia Biotech) alkalmazásával tettük láthatóvá. Molekulatömeg standardként Low Molecular Weight Calibration Kit (LMW) (Amersham Pharmacia Biotech) markert használtunk. Az IgG-t homológ *R. equi* antigénnel szemben Ouchterlony-módszerrel, kétdimenziós kettős immundiffúzióval is azonosítottuk. Ezzel a módszerrel, ill. passzív hemagglutinációs próbával vizsgáltuk az IgG specifitását a *R. equi* 2-es, 3-as, 4-es, 5-ös, 6-os és 7-es szerotípusával, valamint a *Streptococcus equi* ssp. *equi*-vel és a *Staphylococcus aureus*-szal szemben.

Az így előállított IgG-hez 1:1 arányban glicerint adtunk és felhasználásig -20°C -on tároltuk.

Immun-hisztokémia

2%-os szilán (Sigma Aldrich Co., Amerikai Egyesült Államok) oldattal kezelt lemezeket használtunk, és a reakciót kapilláris elven működő rendszerben (Sequenza immunostaining Center, Shandon Co.) végeztük. A formalinban fixált, paraffinba ágyazott metszeteken a deparaffinálást követően antigén-feltárással és anélkül is elvégeztük az immun-hisztokémiai reakciót. Az alábbi antigén-feltárási módszereket próbáltuk ki. A metszeteket 0,1%-os protease XIV (Sigma Aldrich Co., Amerikai Egyesült Államok) -oldattal szobahőmérsékleten 5 percig, 37°C -on pedig 10, 20, ill. 30 percig inkubáltuk, valamint kuktában citrátpufferben (pH 6,0) nagy nyomáson 2, ill. 4 percig melegítettük. Az antigén-feltárással nélkül, a 10 perces proteáz oldatban 37°C -on történő inkubálással, valamint a 4 percig tartó melegítés után nem láttunk festődést. A szobahőmérsékleten történő 5 perces proteázos és a 2 perces kuktában végzett feltárással több foltban kaptunk nem túl erős festődést. A 37°C -on 20, ill. 30 percig proteáz oldattal végzett kezelést követően diffúz erős festődés mutatkozott. A 30 perces kezelés nyomán az alapszövet már károsodott, ezért vizsgálatainkban a 20 perces inkubálást választottuk. A továbbiakban a paraffinos és a fagyasztott metszeteket, valamint a keneteket azonos módon kezeltük. A metszeteket szobahőmérsékleten 3%-os H_2O_2 -oldatban 10 percig, majd foszfát-pufferral (PBS) végzett mosás után 2%-os sovány tejporral 20 percig inkubáltuk. A *R. equi*-specifikus IgG-vel az inkubációt többféle módon és hígításban kipróbáltuk. A legjobb eredményt 1:12 000 hígításban 37°C -on 3 órán át, vagy szobahőmérsékleten egy éjszakán át és 1:2000 hígításban 57°C -on fél órán át végzett inkubálással kaptuk. Kontrollként egy szériametszeten a *R. equi* specifikus IgG-t PBS-re cseréltük. *Mycobacterium bovis*-szal fertőzött szarvasmarha paraffinba ágyazott tüdejéből és *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-szal (továbbiakban *Mycobacterium paratuberculosis*) fertőzött

szarvasmarha paraffinba ágyazott csípőbeléből készített metszeteket szintén inkubáltuk a *R. equi* specifikus IgG-vel. Az „A” állat paraffinba ágyazott tüdőmetszetét, valamint a *M. bovis*-pozitív és a *M. paratuberculosis*-pozitív metszeteket egy éjszakán át antigén-feltárás nélkül nyúlban termelt anti-*Mycobacterium bovis* immunglobulinnal (Rabbit-anti-*Mycobacterium bovis* Ig fraction, DAKO Co.) 1:1000 hígításban egy éjszakán át szintén inkubáltuk. A mosást (PBS) követően egy tormaperoxidázzal jelölt sztreptavidin-biotin kitet (DAKO Universal LSAB2 Kit-HRP, DAKO Co.) alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint. Az újabb mosást (PBS) követően H₂O₂-t is tartalmazó 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma Aldrich Co., Amerikai Egyesült Államok) oldatával 10 percig kezeltük szobahőmérsékleten. A kontrasztfestést Mayer-féle hematoxilinnal 20 másodpercig végeztük. A metszeteket glicerinzselatinnal fedtük, és 100-1000× nagyításon vizsgáltuk.

4.11. Vakcinázási kísérletek

A vakcinázási kísérleteket két, egymástól elkülönülő helyen és időben végeztük (I.-II.). Az I. kísérlet során csak *R. equi*-t tartalmazó vakcinát, illetve olyan vakcinát használtunk, amelyik a *R. equi* mellett EHV-2-t is tartalmazott, és ekkor a kancákat és a csikókat is oltottuk és a kolosztrális immunitás hatását is vizsgáltuk, míg a II. kísérlet során a csak *R. equi*-t tartalmazó különböző módon adjuvált vakcinával csupán a csikókat oltottuk.

I./ Kísérleti állatok, vakcinázás és mintavétel

A bivalens vakcinát két ménesben használtuk, amelyek közül az egyikben („A”) 25 vemhes arab telivér, míg a másikban („B”) 25 nóniusz-magyar félvér kanca volt. Az „A” ménesben minden kancát és megszülető csikót is vakcináztunk, míg a „B” ménesben 15 kancát vakcináztunk és a fennmaradó 10 kanca és csikói szolgáltak vakcinázatlan kontrollként. A csak *R. equi* baktériumokat tartalmazó vakcinát egy harmadik ménesben alkalmaztuk, ahol 27 vemhes kancát (angol telivér) vontunk be a kísérletbe, amelyekből 15 vemhes kancát és csikóját vakcináztuk, és 12 kanca és csikója szolgált kontrollként. A korábbi években mindhárom ménesben a *R. equi* okozta megbetegedések és elhullások rendszeresen előfordultak. Az „A” és a „B” ménesben az EHV-2 fertőzés szintén jelen volt, amelyet a kancák vérsavóinak VN-próbával való vizsgálata támasztott alá.

Minden vakcinázott állat 3 ml vakcinát kapott intramuscularisan. A kancákat ellés előtt 6 és 4 héttel vakcináztuk. Az „A” ménesben a csikókat három alkalommal 3, 5 és 7 hetes korban oltottuk. A „B” és a „C” ménesben a csikókat kétszer vakcináztuk 3 és 5 („B”) ill. 5 és 7 hetes („C”) korban. A kísérletbe bevont valamennyi kancát és csikót rendszeresen vakcinázták rhinopneumonitis és lóinfluenza ellen (Resequin F, Hoechst, Germany).

A kancáktól vért vettünk a vakcinázások időpontjában és két héttel az utolsó vakcinázás után. A kolosztrum-mintákat az ellést követő 24 órán belül gyűjtöttük. A kontroll kancákból ugyanabban az időpontokban vettük a mintákat, mint a vakcinázott társaiktól. A csikóktól a vérmintákat 2-4 nappal a születésüket követően, illetve 3, 5, 7 és 9 hetes korban vettük.

Vakcinák

A vakcinakészítéshez egy olyan (23/93) 1-es szerotípusú *R. equi* törzset használtunk, amelyet egy tüdőgyulladásban elhullott csikó tüdejéből izoláltunk. A törzset közönséges agarokra oltottuk és 48 órán át 37°C-on tenyésztettük. A telepeket PBS-sel (pH: 7,2) mostuk le az agar felületéről, és ezt követően centrifugáltuk. Az üledéket háromszor mostuk PBS-ben, fiziológiás konyhasóoldatban reszuszpendáltuk és a sűrűségét 10⁹ TFE/ml koncentrációra állítottuk be. Formalint (0,3% végkoncentráció) adtunk a szuszpenzióhoz és 24 órán keresztül 37°C-on tartottuk. Ezt követően az inaktivált baktériumsuszpenziót frissen készített alumínium-foszfát (végkoncentráció 3 mg/ml) gélhez adszorbeáltattuk, és felhasználásig 4°C-on tároltuk.

A vakcinakészítéshez használt EHV-2 törzs egy légzőszervi tüneteket mutató csikóból származott (Pálfi és mtsai., 1978). A vírustörzset nyúlvese sejtvonalon (RK13) szaporítottuk el. A sejteket koncentráltuk a vírustitert meghatároztuk, majd formalinnal történő inaktiválást követően az előzőekben leírt módon alumínium-foszfát gélhez adszorbeáltattuk. Az egyik kísérleti vakcina

(bivalens) azonos mennyiségben tartalmazott inaktivált és adjuvált *R. equi* baktériumokat (10^9 TFE/ml) és EHV-2 törzset ($1,5 \times 10^7$ PFE/ml), míg a másik vakcinában csak *R. equi* baktériumok (10^9 TFE/ml) voltak.

Klinikai, szerológiai és bakteriológiai vizsgálatok

A klinikai vizsgálatokat valamennyi ménesben a helyi állatorvos végezte. A vér- és a kolosztrum-minták ellenanyag-tartalmát passzív hemagglutinációs próbával vizsgáltuk, Biberstein (1978) leírása alapján. Az EHV-2-vel szemben termelődött ellenanyagokat VN-próbával mértük. A beteg csikók orrtamponmintáiból és az elhullott csikók tüdőmintáiból bakteriológiai vizsgálatot végeztünk.

Statisztikai vizsgálat

A vérsavóban mért titerek kiértékelésére a Student-féle t-próbát használtuk.

II./ Kísérleti állatok, vakcinázás és mintavétel

Kísérleteinket két magyarországi ménesben hajtottuk végre. A „D”-jelű állományban 24, 2000. február és május között született magyar félvér csikót, míg az „E” ménesben 30, 2000. április és június között született nóniusz – magyar félvér keresztezett csikót vontunk be a kísérletbe. A csikókat születési idejüknek megfelelően véletlenszerűen osztottuk be a vakcinázott és a kontroll csoportokba. A „D” ménesben 12 csikót vakcináztunk kétszer, 4 és 6 hetes korban, formalinnal inaktivált, alumínium-foszfát gélhez adszorbeált virulens *R. equi* törzsből készített vakcinával. Ugyanebben az állományban 12, nem vakcinázott csikó szolgált kontrollként. Az „E” ménesben 20 csikót vakcináztunk 5 és 7 hetes korban, ahol is 10 csikó ugyanazt az alumínium-foszfát gélhez adszorbeált vakcinát kapta, mint a „D” csoportban lévő állatok, és másik 10 csikót ugyanazzal az inaktivált *R. equi* törzsszel, de inkomplett Freund adjuvánst tartalmazó vakcinával oltottunk. Kontrollként 10 csikót használtunk.

Minden csikót fizikális vizsgálatnak vetettünk alá a vakcinázás időpontjában és hetente legalább egyszer a kísérlet tartama alatt. Csak olyan csikókat vontuk be a kísérletbe amelyek az első vakcinázás időpontjában légzőszervi tüneteket nem mutattak. Minden csikóból orr- és végbéltampon mintákat, valamint vért vettünk a vakcinázások időpontjában és ezt követően 2, 4 és 6 héttel.

Vakcinák

Az alkalmazott vakcinát egy olyan egyes szerotípusú, virulens *R. equi* törzsből (195/92) készítettük, amelyet egy tüdőgyulladásban elhullott csikó tüdejéből izoláltunk. A törzset közönséges agaron szaporítottuk el, PBS-ben (pH 7,2) szuszpendáltuk, hőkezeltük (56°C , 1 óra), centrifugáltuk, az üledéket háromszor mostuk PBS-ben, majd steril fiziológiás konyhasóoldatban szuszpendálva a csíraszámát 2×10^9 TFE/ml-re állítottuk be. A szuszpenziót formalinnal (0,3%) inaktiváltuk és frissen készített alumínium-foszfát (3 mg/ml) gélhez adszorbeáltattuk, vagy azonos mennyiségű inkomplett Freund (Difco) adjuvánssal kevertük. A vakcinákat 3 ml-es dózisban intramuscularisan alkalmaztuk.

Bakteriológiai és szerológiai vizsgálatok

A tamponmintákat véres agarra és a CAZ-NB szelektív táptalajra (Graevenitz és Pünter-Streit, 1995) oltottuk le, a *R. equi* baktériumok jelenléte és relatív számának meghatározása céljából.

A vérmintákat agargél-precipitációval és ELISA-val vizsgáltuk. Az ELISA-hoz antigénként a *R. equi* fiziológiás konyhasóoldatos kivonatát használtuk, amelyet ugyanolyan módon állítottunk elő, mint az agargél-precipitációhoz használt antigént (lásd 46. oldal).

Az antigén fehérjetartalmát 280 nm hullámhosszon spektrofotométerrel (Camspec Ltd., Egyesült Királyság), míg munkahígítását 0,05 M karbonát-pufferben (pH 9,6), 0,1 M NaOH-oldatban (pH 13), ill. PBS-ben (0,01 M foszfát/0,15 M NaCl, pH 7,2) való titrálással állapítottuk meg. Az antigént karbonát pufferrel (pH 9,6) hígítottuk, majd 0,97 µg/ml koncentrációban 100 µl

mennyiségben mértük az ELISA-lemezek (Analyzer Kft., Magyarország) vályulataiba. Egy éjszakán át 4°C-on történő inkubálást követően, 0,05% Tween 20-at (Sigma Aldrich Co., Amerikai Egyesült Államok) tartalmazó PBS-mosó-hígító pufferrel háromszor mostuk a lemezeket. A vérsavókból PBS-Tween 20-pufferrel 1:10-től - 1:1280-ig hígítási sort készítettünk, majd párhuzamosan 100-100 µl-nyi mennyiségeket mértünk a vájatokba. A lemezeket 60 percig inkubáltuk 37 °C-on. Ezt követően ötször mostuk PBS-Tween 20-pufferrel, majd 200 µl PBS-Tween 20-pufferben 1:6000-re hígított, nyúlban termelt, tormaperoxidázzal jelölt anti-ló IgG (whole molecule) konjugátumot (Sigma Aldrich Co., Amerikai Egyesült Államok) mértünk a vályulatokba. A 60 perces 37 °C-on végzett inkubáció után, a lemezeket az előzőekhez hasonlóan ismét mostuk, majd az enzimaktivitást 100 µl TMB (tetra-metilén-benzidin) (Diavet Bt., Magyarország) bemérésével tettük láthatóvá. Tíz perces szobahőmérsékleten végzett inkubálás után a reakciót 50 µl 4N H₂SO₄ oldattal állítottuk le. Az értékelést 450 nm-es optikai szűrővel ellátott és számítógéphez csatlakoztatott Multiscan Ms (Labsystems Oy, Finnország) leolvasóval végeztük.

Valamennyi lemezen negatív és pozitív kontrollt helyeztünk el. Negatív kontrollként az ELISA elővizsgálatok során a minimális (OD: 0,143±0,014), míg pozitívként a maximális OD-értéket (1,727±0,202) mutató vérsavót használtuk. Az eredmények értékelése során az $(OD_{\text{minta}} - OD_{\text{negatív kontroll}}) / (OD_{\text{pozitív kontroll}} - OD_{\text{negatív kontroll}}) \times 100$ képletet használtuk és a 15% feletti értékeket tekintettük pozitívnak. ELISA-titer alatt a vizsgált savónak azt a legnagyobb hígítását értettük, amely az alkalmazott rendszerben még pozitív eredményt adott.

A vizsgálati eredmények szemléltetése során az egyes vizsgálati csoportok egyedi mintáiban mért ELISA-titerek 10-es alapú logaritmusainak egyszerű számtani átlagát ábrázoltuk.

Valamennyi csikó és ló vérmintáját agargél-precipitációs próbával is megvizsgáltuk. A reakciót 0,8%-os agargél közegben, hígítatlan vérsavóval hajtottuk végre. Antigénként az ELISA-hoz használt, *R. equi* fiziológias konyhasóoldatos kivonatát alkalmaztuk.

5. EREDMÉNYEK

5.1. *R. equi* törzsek izolálása

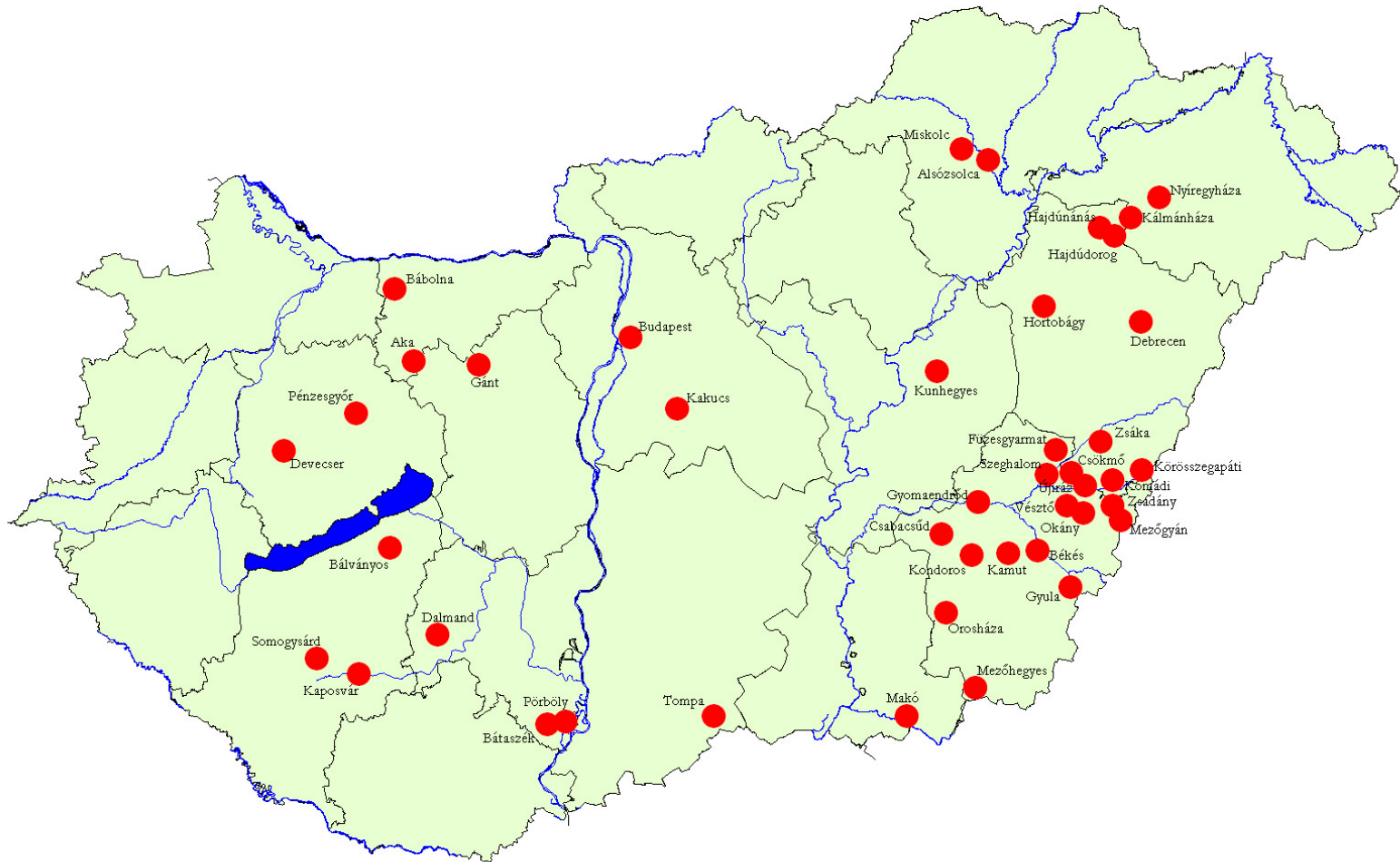
Magyarország különböző településein gyűjtött, összesen 236, lóból vett orrtampon-, ugyanennyi végbéltampon-mintát, 70 talajmintát és 1124 sertésből származó áll alatti nyirokcsomót vontunk bakteriológiai vizsgálat alá. Vizsgálataink során összesen 379 *R. equi* törzset gyűjtöttünk össze Magyarország mintegy 43 településéről (**2. ábra**), amelyek túlnyomó többsége saját izolátum, egy részét pedig diagnosztikai intézeteink munkatársai bocsátották rendelkezésünkre.

A SZIE-ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékére gyakorló állatorvosok által beküldött tályogos csikótüdők mindegyikéből, az orrtamponminták közül 34-ből (14,41%), a végbéltampon-minták közül 67-ből (28,39%), a talajminták közül 48-ból (68,57%), a sertés áll alatti nyirokcsomók közül pedig 167 mintából (14,86%) tudtuk a *R. equi* baktériumokat kitenyészteni.

A vágóhídon gyűjtött sertés áll alatti nyirokcsomók bakteriológiai vizsgálatának eredményét a **7. táblázat**, míg az általunk összegyűjtött valamennyi törzs eredet és az izolálás helye szerinti csoportosítását a **8. táblázat** tartalmazza.

7. táblázat: A vágóhídon gyűjtött sertés áll alatti nyirokcsomók bakteriológiai vizsgálatának eredménye.

A sertés eredete	A megvizsgált áll alatti nyirokcsomók száma	<i>R. equi</i> pozitív nyirokcsomók száma	A csoporton belüli pozitív minták aránya
Alsózsolca, Bátaszék, Pörböly, Tompa	136	21	15,44%
Békés, Csabacsúd, Kondoros	54	11	20,37%
Csökmő, Füzesgyarmat, Szeghalom, Ujiráz, Zsáka	147	20	13,61%
Devecser	51	3	5,88%
Gyomaendrőd, Gyula	82	7	8,54%
Hajdúdorog, Hajdúnánás, Kálmánháza, Nyíregyháza	66	4	6,06%
Hajdunánás	108	18	16,67%
Kamut, Körösszegapáti, Mezőgyán, Okány, Zsadány, Vésztő	308	57	18,51%
Komádi, Okány	69	9	13,04%
Kunhegyes	98	16	16,33%
Miskolc	5	1	20%
ÖSSZESEN	1124	167	14,86%



2. ábra: Az általunk összegyűjtött *R. equi* törzsek származási helyei.

8. táblázat: Az összegyűjtött *R. equi* törzsek eredet és izolálás helye szerinti csoportosítása.

Eredet	A törzs izolálásának a helye és a törzs sorszáma	Összesen
Csikó tüdőtályog	Bábolna: 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 48, 61, 62, 63, 120, Bálványos: 164, 165, 182, Dalmand: 34, 35, Gánt: 128, Hortobágy: 57, 58, Kakucs: 23, 122, Kaposvár: 50, 51, 52, 53, 55, 59, 60, Pénzesgyőr: 49, Makó: 27, 36, Mezőhegyes: 26, 28, 29, 30, Orosháza: 46, Somogyásárd: 54, 64, 119, 121, 124, 126, 133, 211,	46
Csikó bélfodri nyirokcsomó	Kakucs: 24, Somogyásárd: 65, 125, 127, 132,	5
Csikó gátorközi nyirokcsomó	Bálványos: 166, 167, Orosháza: 45, Somogyásárd: 212,	4
Csikó orrtampon	Aka: 200, Bálványos: 162, 163, Budapest: 56, Hortobágy: 16, 18, 20, 91, Mezőhegyes: 183, 185, 187, 202, 205, 206, 208, 218, 219, 222, Nyíregyháza: 9, 13, 14, Somogyásárd: 37, 136, 138, 139, 140, 154, 157, 159, 169, 172, 174, 176, 196,	34
Csikó végbéltampon	Bálványos: 168, Hortobágy: 17, 19, 92, 93, 94, 95, Kakucs: 25, Mezőhegyes: 184, 186, 188, 189, 191, 203, 204, 207, 209, 210, 213, 214, 215, 216, 217, 220, 221, Nyíregyháza: 10, 11, 12, 15, Somogyásárd: 134, 135, 137, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 155, 156, 158, 160, 161, 170, 171, 173, 175, 177, 178, 179, 180, 181, 190, 192, 193, 194, 195, 197, 198, 199,	67
Ember	Budapest: 32, 33, 131, 245; Debrecen: 21, 22; Miskolc: 31, 201,	8
Sertés	Alsószolca, Bátaszék, Pörböly, Tompa: 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 346, 347, 348, 349, 350, 351, Békés, Csabacsúd, Kondoros: 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 270, 271, Csökmő, Füzesgyarmat, Szeghalom, Ujiráz, Zsáka: 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, Devecser: 123, 129, 130, Gyomaendrőd, Gyula: 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, Hajdúdorog, Hajdúnánás, Kálmánháza, Nyíregyháza: 275, 303, 304, 305, Hajdúnánás: 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 370, Kamut, Körösszegapáti, Mezőgyán, Okány, Zsadány, Vésztő: 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, Komádi, Okány: 272, 273, 274, 276, 277, 278, 279, 280, 281, Kunhegyes: 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, Miskolc: 244,	167
Talaj	Hortobágy: 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, Somogyásárd: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90,	48
ÖSSZESEN	43 település	379

5.2. Szelektív táptalajok összehasonlító vizsgálata

A korábban a szakirodalomban leírt táptalajok közül a TINSDALE táptalajon lehetett a legjellegzetesebb morfológiájú telepeket megfigyelni. Ezen a táptalajon a törzsek 72 óráig történő tenyésztést követően, nagy (2-3 mm átmérőjű), fényes, vízcseppszerű telepeket képeztek. A CAZ-NB és a NANAT táptalajon a legtöbb törzs jól nőtt, de a telepek kisebbek voltak (1-2 mm átmérőjűek), az M3T talajon azonban 72 óra tenyésztés után sem lehetett telepeket megfigyelni.

Az általunk kifejlesztett táptalajok közül a legnagyobb méretű telepeket a TVP és a TCP táptalajon láttuk. Mindkét táptalajon nagyméretű, fénylő, vízcseppszerű telepeket figyeltünk meg. Az NC táptalajon két törzs, a PNP talajon pedig hat törzs a megvizsgált 12-ből gyenge növekedést mutatott, a telepek átmérője 1 mm alatt maradt.

Az általunk megvizsgált szelektív táptalajok potenciális szennyező baktériumfajokra kifejtett gátló hatását a **9. táblázat** mutatja. Egyes táptalajok nem voltak képesek a *Proteus mirabilis* növekedését gátolni, másokon pedig a *Staphylococcus aureus* volt képes nagy számban növekedni. A háttér baktériumflórára gyakorolt gátló hatás tekintetében a legjobb eredményt a NANAT, a CAZ-NB és a TCP táptalaj mutatott.

A korábban leírt és az általunk kifejlesztett 4-4 szelektív táptalaj *R. equi* telepszámra kifejtett hatását négy kiválasztott *R. equi* törzs esetén vizsgáltuk meg, oly módon, hogy a szelektív talajokon nőtt telepszámokat szelektív komponenst nem tartalmazó közönséges agaron növekvő telepek számához hasonlítottuk. A különböző talajok esetén kapott értékeket a **10. táblázat** és a **11. táblázat** tartalmazza. A telepszám jelentős különbségeket mutatott annak megfelelően, hogy milyen táptalajt használtunk.

A telepszámok kettes alapú logaritmusának alapján a három korábban leírt táptalaj (**10. táblázat**) szelektív kapacitása között, valamint a törzsek között is szignifikáns különbséget találtunk ($p < 0,001$). A táptalaj \times törzs interakció szintén szignifikáns volt ($p = 0,001$), arra utalva, hogy a táptalajok közötti különbség szignifikánsan változik a törzseknek megfelelően. A NANAT, TINSDALE és a CAZ-NB táptalajokat Dunett teszt segítségével a kontrollhoz (közönséges agar) hasonlítva, kiderült, hogy a NANAT táptalajon szignifikánsan kevesebb volt a telepszám ($p < 0,001$), míg a másik három táptalaj esetén nem volt szignifikáns a különbség (TINSDALE: $p = 0,318$, CAZ-NB: $p = 1,000$).

Amikor a négy általunk kifejlesztett táptalajt hasonlítottuk össze (**11. táblázat**) ugyanazt a négy *R. equi* törzset használva, a táptalajok szelektív kapacitásának különbségei szignifikánsak voltak ($p = 0,009$), de nem volt szignifikáns a különbség a törzsek között ($p = 0,677$), és a táptalaj \times törzs interakció szintén nem volt szignifikáns ($p = 0,210$). Dunett teszt segítségével valamennyi táptalajt a kontrollhoz hasonlítva csak a PNP talajon volt szignifikánsan alacsonyabb a telepszám ($p < 0,001$), míg a másik három táptalaj esetén nem volt szignifikáns különbség (NC: $p = 0,947$, TVP: $p = 0,969$, TCP: $p = 0,308$) a telepszámokban.

Az eddigi vizsgálataink során a két legjobbnak ítélt szelektív táptalajt összehasonlítva a CAZ-NB talajon a bélsármintákból a hozzáadott *R. equi* baktériumok minimum 72%-át míg a TCP talajon 91%-át sikerült visszaizolálni. Talajminták esetén ez az érték 79% és 62% (**12. táblázat**). A szennyező baktérium- és gombaflórákat a két táptalaj megfelelő mértékben gátolta, de azonos mennyiségű (50 μ l) talajmintát mindkét táptalajra leoltva, a TCP talajon csak típusos fekete csillogó *R. equi* telepek fejlődtek ki (**3. ábra**), míg a CAZ-NB-talajon a *R. equi*-n kívül néhány más baktériumtelep is kifejlődött (**4. ábra**).

9. táblázat: A különböző szelektív táptalajok szennyező baktériumflórára kifejtett gátló hatása.

Baktérium törzsek	Táptalajok								
	NANAT	TINSDALE	M3T	CAZ-NB	NC	TVP	PNP	TCP	Véres agar (kontroll)
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	–	+	–	–	–	–	–	–	+
<i>Bacillus cereus</i>	–	+	–	±	+	–	–	–	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	–	+	–	–	+	+	+	±	+
<i>Escherichia coli</i>	–	±	±	–	–	–	±	–	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	–	+	–	–	–	–	–	–	+
<i>Pasteurella multocida</i>	–	±	–	–	–	–	–	–	+
<i>Proteus mirabilis</i>	–	+	–	–	–	+*	+	–	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	–	+	–	±	+	–	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+	–	–	–	+	–	–	+

* nincs rajzás

+ jó növekedés és a fajra jellemző telepmorfológia

± gyenge növekedés

– nincs növekedés

10. táblázat: A szakirodalomban korábban leírt szelektív táptalajok, négy kiválasztott *R. equi* törzsre kifejtett hatása.

Táptalaj	TFE*/ml	A TFE kettes alapú logaritmusa	
		Tartomány	Átlag ± SE
NANAT	$2,00 \times 10^6 - 7,20 \times 10^7$	19,93 – 26,10	23,18 ± 0,59
TINSDALE	$3,00 \times 10^7 - 1,42 \times 10^8$	24,84 – 27,08	26,09 ± 0,19
CAZ-NB	$2,40 \times 10^7 - 1,90 \times 10^8$	24,52 – 27,50	26,48 ± 0,22
közönséges agar (kontroll)	$3,60 \times 10^7 - 1,88 \times 10^8$	25,10 – 27,49	26,47 ± 0,22

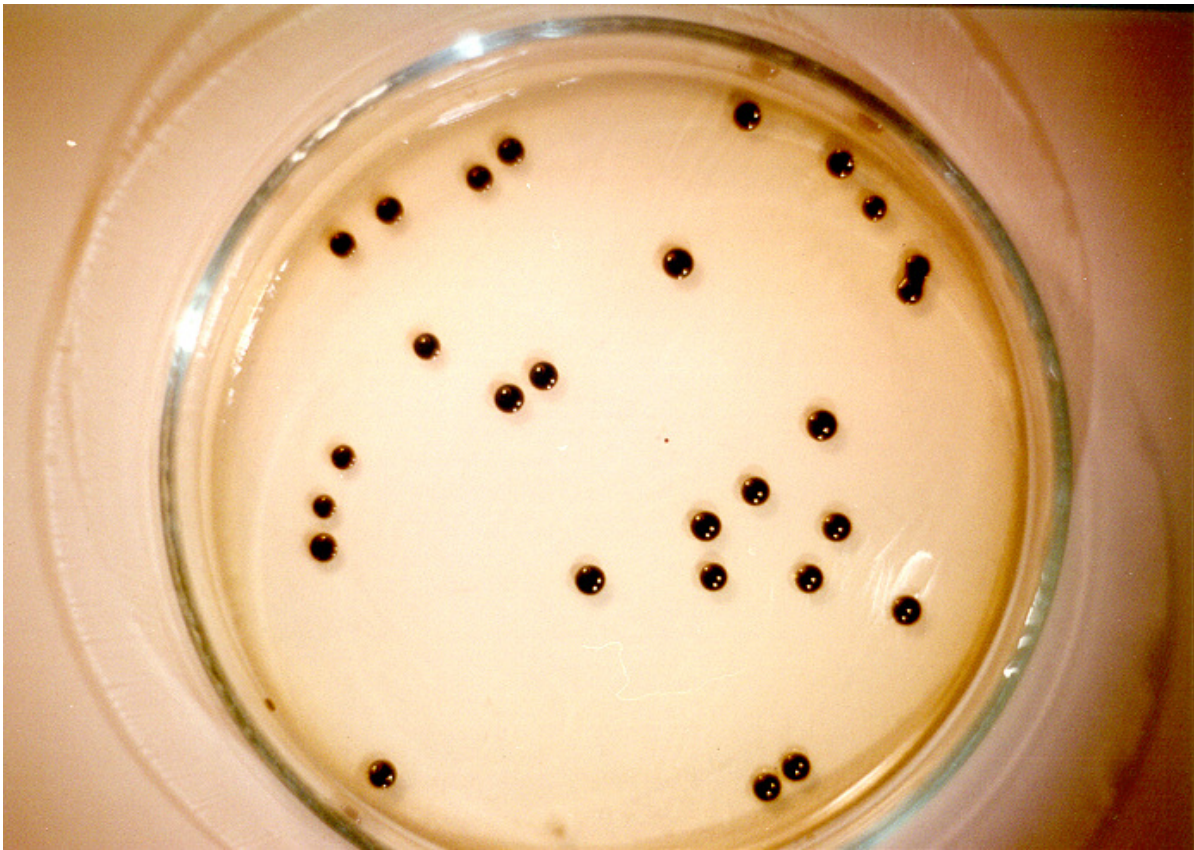
*TFE: telepformáló egység

11. táblázat: Az általunk kifejlesztett táptalajok, négy kiválasztott *R. equi* törzsre kifejtett hatása.

Táptalaj	TFE/ml	A TFE kettes alapú logaritmusa	
		Tartomány	Átlag ± SE
PNP	$7,20 \times 10^7 - 1,86 \times 10^8$	26,10 – 27,47	26,97 ± 0,13
NC	$1,28 \times 10^8 - 2,18 \times 10^8$	26,93 – 27,70	27,33 ± 0,07
TVP	$1,22 \times 10^8 - 2,96 \times 10^8$	26,86 – 28,14	27,48 ± 0,10
TCP	$8,60 \times 10^7 - 2,08 \times 10^8$	26,36 – 27,63	27,17 ± 0,10
közönséges agar (kontroll)	$9,60 \times 10^7 - 2,38 \times 10^8$	26,52 – 27,83	27,41 ± 0,11

12. táblázat: *R. equi* telepszámok a két legjobbnak bizonyult szelektív táptalaj esetén. A talajok beoltására három különböző talaj- és bélsármintát használtunk.

	Bélsár		Talaj	
	Kontroll hozzáadott <i>R. equi</i> nélkül (TFE/ml)	1940 TFE <i>R. equi</i> /ml baktériummal kiegészítve	Kontroll hozzáadott <i>R. equi</i> nélkül (TFE/ml)	1940 TFE <i>R. equi</i> /ml baktériummal kiegészítve
CAZ-NB	0 – 200	1400 – 2160 (72% – 111%)	0 – 20	1540 – 2060 (79% – 106%)
TCP	20 – 60	1760 – 2340 (91% – 121%)	0	1200 – 1840 (62% – 95%)



3. ábra: *R. equi* telepek TCP táptalajon 72 óráig tartó tenyésztést követően (50 µl talaj-szuszpenziót oltottunk a táptalajra).



4. ábra: *R. equi* telepek és néhány szennyező baktériumtelep a CAZ-NB táptalaj felületén 72 óráig tartó tenyésztést követően (50 µl talaj-szuszpenziót oltottunk a táptalajra ugyanabból a mintából, mint amit az előző kép esetén használtunk).

5.3. Morfológiai, tenyésztési és biokémiai sajátosságok, a törzsek DNS-alapú azonosítása

A genusba történő besoroláshoz szükséges elsődleges morfológiai, tenyésztési és biokémiai tulajdonságok tekintetében valamennyi általunk megvizsgált törzs egységesen viselkedett. A megvizsgált törzsek között három esetben talákoztunk pleomorfnál alakokkal, az összes többi esetben a szilárd táptalajon történő 48 óráig tartó tenyésztést követően valamennyi törzs Gram szerint festett kenetében coccus alakokat figyeltünk meg. A törzsek genusba történő besorolásához szükséges tulajdonságait a **13. táblázatban** foglaltuk össze.

13. táblázat: A megvizsgált *R. equi* törzsek elsődleges morfológiai, tenyésztési és biokémiai tulajdonságai.

Tulajdonságok	Eredmény
Alak	coccus
Gram-festés	+
Mozgás	-
Növekedés levegőn	+
Növekedés anaerob körülmények között	-
Kataláztermelés	+
Oxidáztermelés	+
Glükózbontás	-
Oxidatív/Fermentatív teszt	-

A vizsgált törzsek kis hányada (7 törzs, 1,85%) az oxidáz-próbában gyenge színreakciót adott. Csak akkor lehetett enyhe kékes elszíneződést látni, amikor kacsnyi mennyiségű baktériumhalmazt tettünk a szűrőpapírra, ha azonban szétdörzsöltük a baktérium mennyiséget a szűrőpapíron, akkor pozitív eredményre utaló színreakció nem volt látható.

A faji besoroláshoz szükséges, valamint az egyéb tenyésztési és biokémiai vizsgálatok során a vizsgálatba bevont törzseknek 18 sajátosságát vizsgáltuk meg. Az eredményeket a **14.** és a **15. táblázatban** foglaltuk össze.

A vizsgálatba bevont összes törzs termelt narancssárgás-rózsaszín pigmentet, pozitív volt a CAMP-próbában a *S. aureus*-szal, a törzsek túlnyomó többsége ureáz enzimet termelt és a nitrátot nitritté redukálta.

A típustörzsek 25%-a, a saját izolátumoknak pedig 12,41%-a volt képes 7% NaCl-tartalmú táptalajon növekedni (5 nap, 37°C), és az előbbieket 62,5%-a, az utóbbiaknak pedig 27,74%-a kénhidrogént termelt Westphal-leves táptalajban.

A megvizsgált törzsek egyike sem termelt indolt és zselatinázt, valamint savat a táptalajban lévő hétféle szénhidrátból és nem volt képes növekedni 7% NaCl-t tartalmazó táptalajon 3 napig tartó tenyésztést követően (37°C).

A nyúl vörösvérsejteket tartalmazó agaron kialakuló hemolízist (**5. ábra**) 48 óráig tartó tenyésztés után elbírálva a típustörzseknek 87,5%-a, a magyarországi vizsgálatba bevont izolátumoknak pedig 82,11%-a okozott hemolízist.

A törzsek biokémiai és tenyésztési tulajdonságait eredet szerint megvizsgálva a nyúlvéres agaron történő hemolízisben, a sótürésben és a H₂S-termelésben találtunk jelentősebb eltéréseket.

Amíg a sertésből izolált törzseknek csak a fele, addig a más forrásból származóknak több mint 83%-a okozott hemolízist a nyúlvéres agaron.

A lovakból és a talajból származó törzsek kevesebb, mint 12,5%-a volt képes a 7% NaCl jelenlétében való növekedésre, a sertésből és az emberekből származó törzseknek azonban legalább a fele képes volt erre.

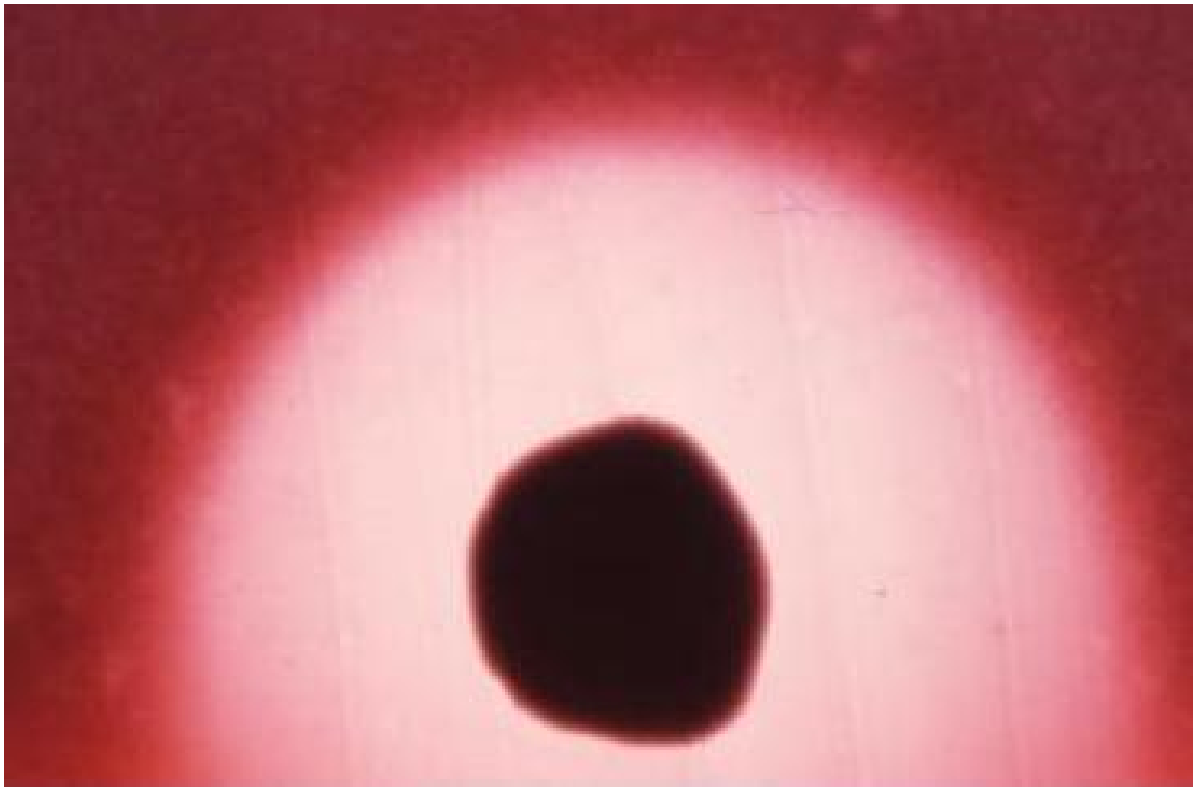
A sertésből és az emberekből származó törzsek kb. fele termelt H₂S-t, a lovakból származó törzseknek viszont közel 35%-a, a talajból izolált törzseknek pedig csak kb. 10%-a volt képes erre.

14. táblázat: A magyarországi izolátumok és a típus törzsek másodlagos tenyésztési és biokémiai tulajdonságainak összevetése.

A vizsgált tulajdonságok	Pozitív törzsek	
	Típus törzsek (8)	Saját izolátumok (137)
Pigmenttermelés	8 (100%)	137 (100%)
Hemolízis nyúl vörösvérsejteket tartalmazó (5%) agaron (48 óra)	7 (87,5%)	101/123 (82,11%)
CAMP-próba <i>S. aureus</i>-szal	8 (100%)	137 (100%)
Sótűrés (7% NaCl) 3 nap	0 (0%)	0 (0%)
Sótűrés (7% NaCl) 5 nap	2 (25%)	17 (12,41%)
Indoltermelés	0 (0%)	0 (0%)
H₂S-termelés	5 (62,5%)	38 (27,74%)
Zselatináztermelés	0 (0%)	0 (0%)
Ureáztermelés	8 (100%)	125 (91,24%)
Nitrátredukció	8 (100%)	129 (94,16%)
Savtermelés szénhidrátokból		
Laktóz	0 (0%)	0 (0%)
Maltóz	0 (0%)	0 (0%)
Mannit	0 (0%)	0 (0%)
Szacharóz	0 (0%)	0 (0%)
Xilóz	0 (0%)	0 (0%)
Trehalóz	0 (0%)	0 (0%)
Szalicin	0 (0%)	0 (0%)

15. táblázat: A másodlagos tenyésztési és biokémiai sajátosságok a törzsek eredete szerint (a pozitív törzsek száma és az azonos eredetű törzsek közötti aránya).

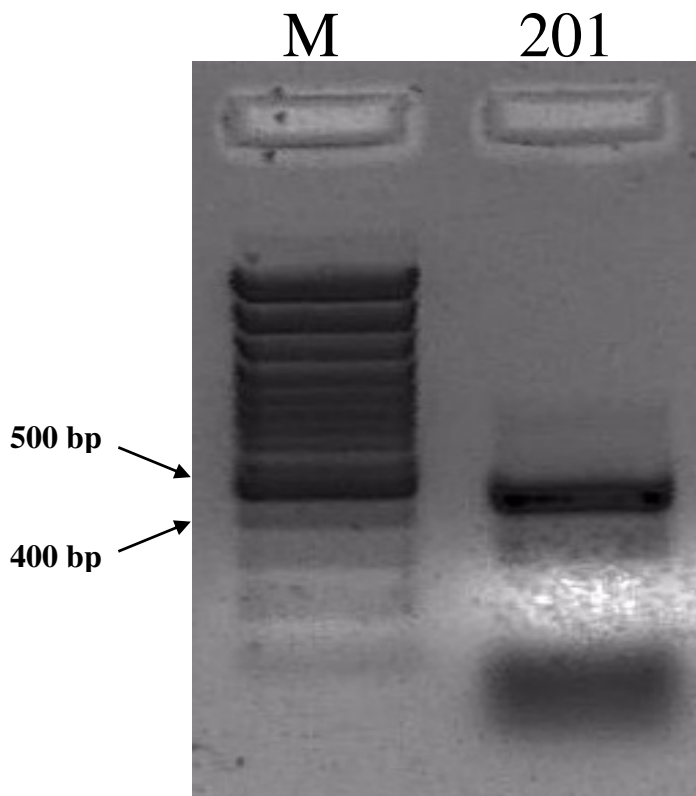
A vizsgált tulajdonságok	A törzsek eredete				
	Ló (69)	Talaj (48)	Sertés (21)	Ember (6)	Kutya (1)
Pigmenttermelés	69 (100%)	48 (100%)	21 (100%)	6 (100%)	1
Hemolízis nyúl vörösvérsejteket tartalmazó (5%) agaron (48)	59 (85,51%)	40 (83,33%)	3/6 (50%)	5 (83,33%)	1
CAMP-próba <i>S. aureus</i>-szal	69 (100%)	48 (100%)	21 (100%)	6 (100%)	1
Sótűrés (7% NaCl) 3 nap	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
Sótűrés (7% NaCl) 5 nap	6 (8,7%)	6 (12,5%)	4/6 (66,67%)	3 (50%)	0
Indoltermelés	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
H₂S-termelés	24 (34,78%)	5 (10,42%)	11 (52,38%)	3 (50%)	0
Zselatináztermelés	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
Ureáztermelés	68 (98,55%)	41 (85,42%)	18 (85,71%)	5 (83,33%)	1
Nitrátredukció	64 (92,75%)	47 (97,92%)	19 (90,48%)	6 (100%)	1
Savtermelés szénhidrátokból					
Laktóz	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
Maltóz	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
Mannit	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
Szacharóz	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
Xilóz	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
Trehalóz	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
Szalicin	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0



5. ábra: *R. equi* okozta hemolízis 5% nyúlvért tartalmazó agaron (131. törzs, 48 óra, 37°C).

A törzsek DNS-alapú azonosítása

Az általunk összegyűjtött, biokémiai és tenyésztési tulajdonságai alapján *R. equi*-nek meghatározott összes baktériumtörzs DNS-alapú azonosítását elvégeztük. Valamennyi törzsből kivont DNS-minta esetén ki tudtuk mutatni a reakcióelegyből a polimeráz láncreakciót követően a *R. equi* specifikus, 450 bp méretű reakcióterméket (**6. ábra**).



6. ábra: A 201-es sorszámú törzs *R. equi* specifikus 450 bp méretű reakcióterméke.

5.4. Enzimaktivitás

Az enzimaktivitási vizsgálatok során a vizsgálatba bevont 31 *R. equi* törzs meglehetősen homogén módon viselkedett (16. és 17. táblázat). Mind a típusörzsek, mind pedig a hazai izolálású törzsek mindegyike rendelkezett alkalikus foszfatáz, leucin-, valin- és cisztin-arilamidáz, savanyú foszfatáz, naftol-AS-BI-foszfohidroláz, valamint α - és β -glükózidáz aktivitással.

A típusörzsek és a saját izolálású törzsek között csak az eszteráz (C4) és az eszteráz lipáz (C8) aktivitásban tudunk különbséget kimutatni. A hazai izolálású törzsek között mind az előbbi, mind pedig az utóbbi enzim esetén nagyobb arányban (42%, 96%) találtunk pozitív törzseket, mint a típusörzseknél (14%, 57%).

A megvizsgált törzsek egyike sem rendelkezett lipáz (C14), tripszin, α -kimotripszin, α - és β -galaktozidáz, β -glükuronidáz, N-acetil- β -glükózaminidáz, α -mannozidáz és α -fukozidáz aktivitással.

A törzsek enzimaktivitását azok eredetével összevetve megállapítható, hogy az emberből származó törzsek eszteráz (C4) aktivitással nem rendelkeztek, míg a más forrásból (ló, talaj, sertés) származó törzsek mintegy fele (43-56%-a) rendelkezett ezzel a tulajdonsággal. A különböző eredetű törzsek 67-100%-a rendelkezett eszteráz lipáz (C8) aktivitással.

16. táblázat: A hazai izolálású *R. equi* törzsek és a típusörzsek enzimaktivitása.

Vizsgált enzimek	Típusörzsek (7)	Saját izolálású törzsek (24)
Alkalikus foszfatáz	7 (100%)	24 (100%)
Eszteráz (C4)	1 (14%)	10 (42%)
Eszteráz lipáz (C8)	4 (57%)	23 (96%)
Lipáz (C14)	0	0
Leucin-arilamidáz	7 (100%)	24 (100%)
Valin-arilamidáz	7 (100%)	24 (100%)
Cisztin-arilamidáz	7 (100%)	24 (100%)
Tripszin	0	0
α -kimotripszin	0	0
Savanyú foszfatáz	7 (100%)	24 (100%)
Naftol-AS-BI-foszfohidroláz	7 (100%)	24 (100%)
α -galaktozidáz	0	0
β -galaktozidáz	0	0
β -glükuronidáz	0	0
α -glükózidáz	7 (100%)	24 (100%)
β -glükózidáz	7 (100%)	24 (100%)
N-acetil- β -glükózaminidáz	0	0
α -mannozidáz	0	0
α -fukozidáz	0	0

17. táblázat: A *R. equi* enzimaktivitása a törzsek eredete szerint.

Vizsgált enzimek	A törzsek eredete				
	Ló (9)	Talaj (7)	Sertés (6)	Ember (8)	Kutya (1)
Alkalikus foszfatáz	9 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	1
Eszteráz (C4)	5 (56%)	3 (43%)	3 (50%)	0 (0%)	0
Eszteráz lipáz (C8)	8 (89%)	7 (100%)	4 (67%)	7 (88%)	1
Lipáz (C14)	0	0	0	0	0
Leucin-arilamidáz	9 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	1
Valin-arilamidáz	9 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	1
Cisztin-arilamidáz	9 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	1
Tripszin	0	0	0	0	0
α -kimotripszin	0	0	0	0	0
Savanyú foszfatáz	9 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	1
Naftol-AS-BI-foszfohidroláz	9 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	1
α -galaktozidáz	0	0	0	0	0
β -galaktozidáz	0	0	0	0	0
β -glükuronidáz	0	0	0	0	0
α -glükozidáz	9 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	1
β -glükozidáz	9 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	8 (100%)	1
N-acetil- β -glükózaminidáz	0	0	0	0	0
α -mannozidáz	0	0	0	0	0
α -fukozidáz	0	0	0	0	0

5.5. Szénforrás-hasznosítás

Az általunk megvizsgált 31 *R. equi* törzs közül változó számú törzs összesen 44 szénforrás hasznosítására volt képes (18. táblázat), míg 51 szénforrást nem tudtak anyagszeréjükhöz felhasználni. Míg a típus-törzsek összesen 20 szénforrás hasznosítására voltak képesek, addig a hazai izolátumok összesen 44 szénforrást tudtak hasznosítani.

Egyes szénforrásokat (Tween 40, Tween 80, α -D-glükóz, α -hidroxivajsav, L-tejsav, metil-piruvát) az általunk megvizsgált összes törzs hasznosította, míg mások (α -, β -ciklodextrin, glikogén, inulin, mannan, N-acetil-D-glükózamid, N-acetil-D-mannózamid, amigdalín, L-arabínóz, D-arabitol, cellobióz, L-fukóz, D-galakturonsav, α -D-laktóz, laktulóz, D-mannit, D-melibióz, α -, és β -metil-D-galaktozid, α -, és β -metil-D-glükozid, α -metil-D-mannozid, D-raffinóz, sedoheptulosan, D-szorbit, stachióz, szacharóz, D-tagatóz, xilit, D-, és L-almasav, N-acetil-L-glutaminsav, alaninamid, D-alanin, L-alanin, L-alanin-glicin, L-asparagin, glicil-L-glutaminsav, L-piroglutaminsav, putreszcin, 2-deoxi-adenozin, inozin, timidin, uridin, adenzin-5-monofoszfát, timidin-5-monofoszfát, uridin-5-monofoszfát, fruktóz-6-foszfát, glükóz-1-foszfát, glükóz-6 foszfát, D-L- α -glicerol-foszfát) hasznosítására egyik törzs sem volt képes.

A dextringet az emberi törzseknek csak a negyede, a sertésből, a talajból és a lóól származó törzseknek pedig 60-100%-a hasznosította. A sertésből izolált törzsek nem voltak képesek a gentiobióz hasznosítására, a más eredetű törzseknek viszont 25-57%-a hasznosította ezt a szénforrást. A D-mannózt a lovakból és azok környezetéből származó talajból gyűjtött törzsek mindegyike képes volt hasznosítani, a sertésből és emberből származó törzseknek azonban csak 60-63%-a. A borostyánkő-amidosavat az emberből származó törzsek nem

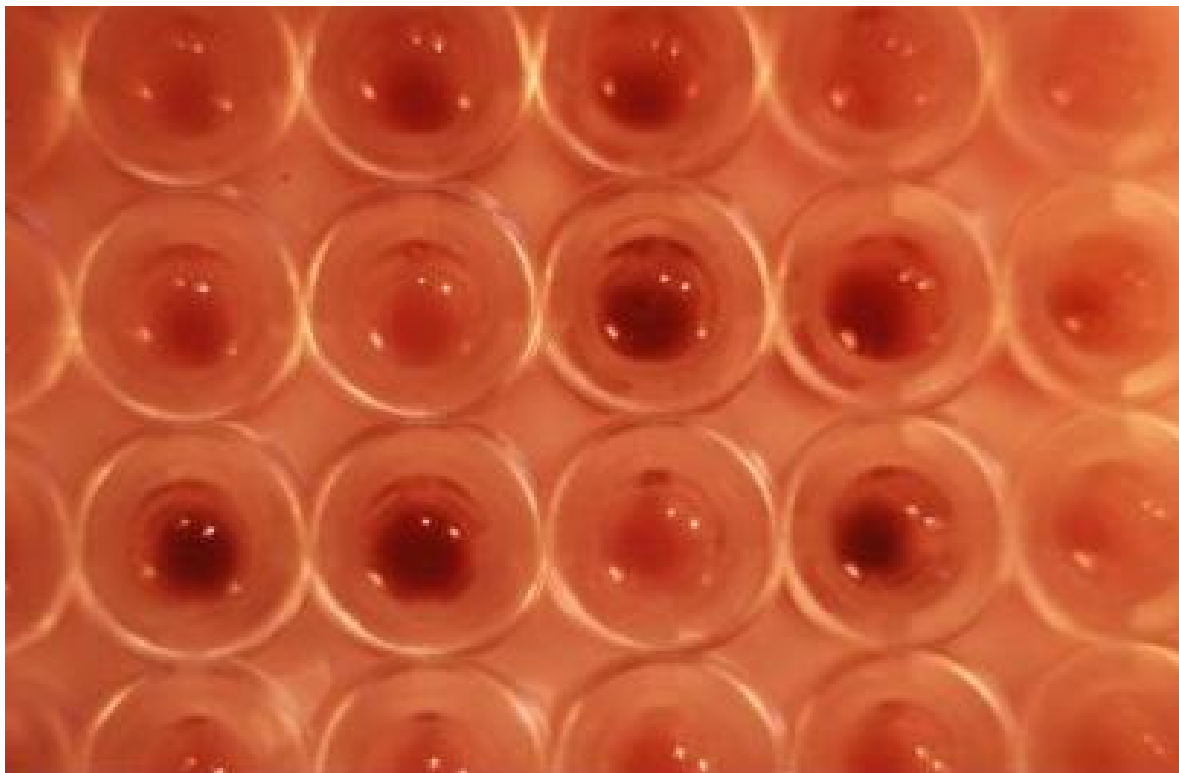
tudták hasznosítani, a más forrásból származó törzsek azonban 29-40%-os arányban képesek voltak erre.

A kutyából származó törzs 17, az emberből származó törzsek 24, a lóból származó törzsek 25, a talajtörzsek 31 a sertésből származó törzsek pedig 33 szénforrás hasznosítására voltak képesek.

A BIOLOG baktériumazonosító rendszer (**7. ábra**) 4 és 48 óráig tartó inkubációt követően az összes általunk megvizsgált törzset *Rhodococcus equi*-nek határozta meg. A 24 óráig tartó inkubációt követő leolvasás eredményei alapján a 31 megvizsgált törzsből a rendszer saját szoftvere 18 törzset *Corynebacterium hoagii* baktériumfajnak, 13 törzset pedig *R. equi*-nek identifikált.

A hazai izolálású és a típustörzsek szénforrás-hasznosításának eredményeit a **18. táblázat**, a törzsek eredet szerinti szénforrás-hasznosítását pedig a **19. táblázat** tartalmazza.

A 48 óráig tartó inkubációt követő eredmények alapján törzsfát állítottunk fel (**8. ábra**), amelyen a vizsgált törzsek eredet szerint ugyan nem különülnek el teljes mértékben, mégis a különböző eredetű törzsek többsége eredet szerint jól körülírható csoportokban foglal helyet.



7. ábra: A BIOLOG lemez (27. törzs, 24 óráig tartó tenyésztést követően, a sötétvörös színreakció a szénforrás-hasznosítást jelzi).

18. táblázat: A típus törzsek és a hazai *R. equi* izolátumok szénforrás-hasznosítása (BIOLOG, GP2, 48 óra, 30°C).

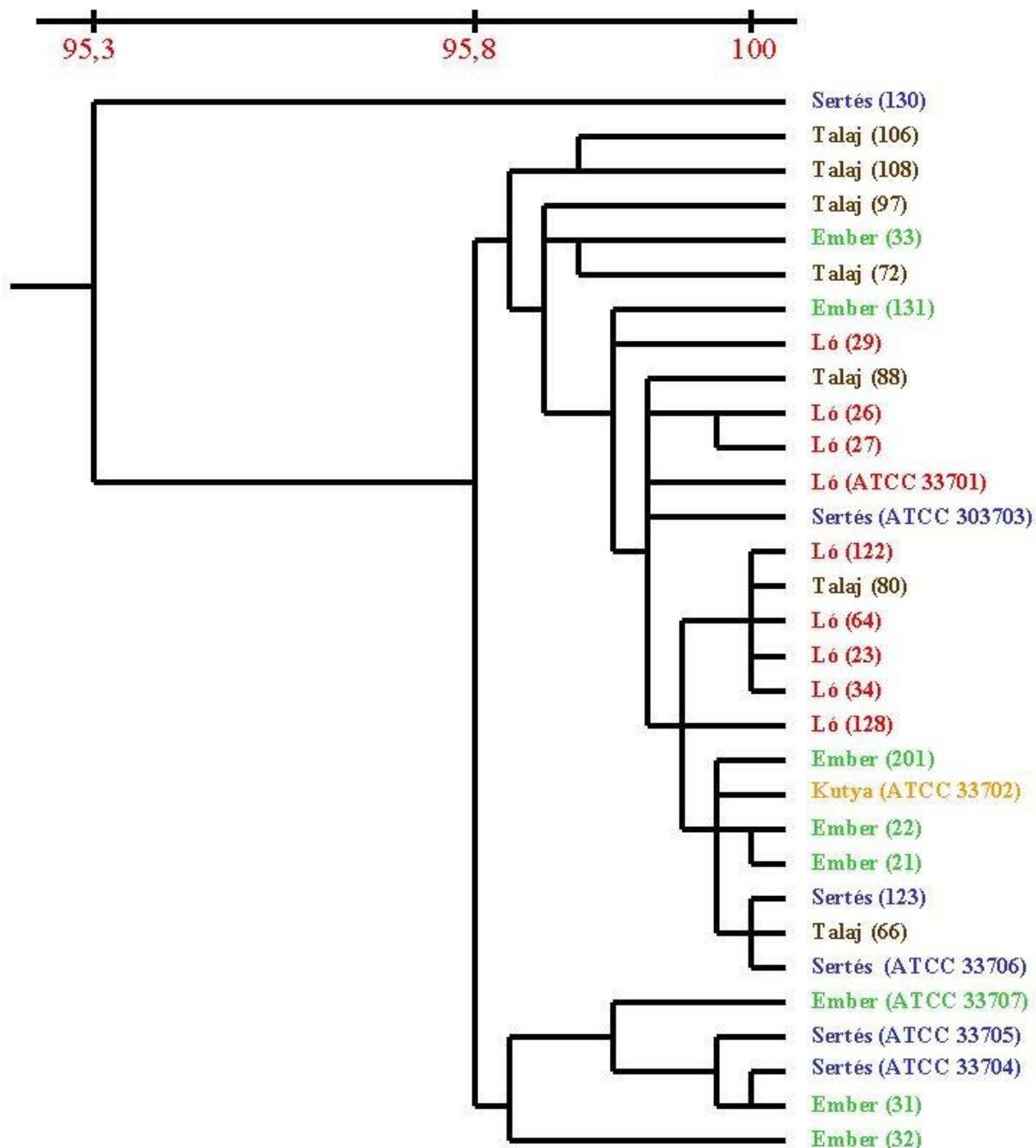
Szénforrások	Típustörzsek (7)	Hazai izolátumok (24)	BIOLOG adatbázis*
Dextrin	4 (57%)	17 (71%)	14%
Tween 40	7 (100%)	24 (100%)	100%
Tween 80	7 (100%)	24 (100%)	97%
Arbutin	0	1 (4%)	0%
D-fruktóz	0	2 (8%)	1%
D-galaktóz	0	1 (4%)	1%
Gentiobióz	0	11 (46%)	3%
D-glukonsav	0	1 (4%)	1%
α -D-glükóz	7 (100%)	24 (100%)	99%
m-inozitol	0	1 (4%)	0%
Maltóz	1 (14%)	2 (8%)	0%
Maltotrióz	0	1 (4%)	1%
D-mannóz	4 (57%)	22 (92%)	32%
D-melezitóz	0	1 (4%)	1%
3-metil-glükóz	0	1 (4%)	3%
Palatinóz	0	5 (21%)	3%
D-pszikóz	0	1 (4%)	4%
L-ramnóz	0	1 (4%)	3%
D-ribóz	3 (43%)	20 (83%)	58%
Szalicin	1 (14%)	18 (75%)	3%
D-trehalóz	0	5 (21%)	1%
Turanóz	0	4 (17%)	47%
D-xilóz	0	4 (17%)	8%
Ecetsav	4 (57%)	22 (92%)	28%
α -hidroxivajsav	7 (100%)	24 (100%)	100%
β -hidroxivajsav	0	2 (8%)	3%
γ -hidroxivajsav	0	6 (25%)	27%
p-hidroxifenil-ecetsav	0	1 (4%)	1%
α -keto-glutársav	0	1 (4%)	3%
α -keto-valeriánsav	5 (71%)	16 (67%)	99%
Laktamid	5 (71%)	21 (88%)	97%
D-tejsav-metil-észter	5 (71%)	23 (96%)	37%
L-tejsav	7 (100%)	24 (100%)	100%
Metil-piruvát	7 (100%)	24 (100%)	76%
Mono-metil-szukcinát	0	1 (4%)	4%
Propionsav	4 (57%)	23 (96%)	86%
Piroszólósav	6 (86%)	22 (92%)	96%
Borostyánkő-amidosav	2 (29%)	5 (21%)	4%
Borostyánkősav	0	1 (4%)	3%
L-glutaminsav	0	1 (4%)	3%
L-szerin	0	1 (4%)	3%
2,3-butándiol	0	1 (4%)	3%
Glicerol	7 (100%)	24 (100%)	99%
Adenozin	1 (14%)	2 (8%)	41%
Összesen	20	44	82

*A BIOLOG adatbázis oszlopban feltüntetett értékek azt jelzik, hogy átlagosan a törzsek hány %-a képes az adott szénforrást hasznosítani.

19. táblázat: *R. equi* törzsek szénforrás-hasznosítása eredet szerint (BIOLOG, 48 óra, 30°C).

Szénforrások	Ló (10)	Talaj (7)	Ember (8)	Sertés (5)	Kutya (1)
Dextrin	10 (100%)	5 (71%)	2 (25%)	3 (60%)	1
Tween 40	10 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	5 (100%)	1
Tween 80	10 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	5 (100%)	1
Arbutin	0	1 (14%)	0	0	0
D-fruktóz	0	1 (14%)	0	1 (20%)	0
D-galaktóz	0	1 (14%)	0	0	0
Gentiobióz	5 (50%)	4 (57%)	2 (25%)	0	0
D-glukonsav	1 (10%)	0	0	0	0
α -D-glükóz	10 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	5 (100%)	1
m-inozitol	1 (10%)	0	0	0	0
Maltóz	1 (10%)	1 (14%)	0	1 (20%)	0
Maltotrióz	0	0	0	1 (20%)	0
D-mannóz	10 (100%)	7 (100%)	5 (63%)	3 (60%)	1
D-melezitóz	0	0	0	1 (20%)	0
3-metil-glükóz	0	0	0	1 (20%)	0
Palatinóz	0	2 (29%)	2 (25%)	1 (20%)	0
D-pszikóz	0	0	0	1 (20%)	0
L-ramnóz	0	0	1 (13%)	0	0
D-ribóz	9 (90%)	7 (100%)	5 (63%)	2 (40%)	0
Szalicin	8 (80%)	5 (71%)	5 (63%)	1 (20%)	0
D-trehalóz	0	1 (14%)	3 (38%)	1 (20%)	0
Turanóz	1 (10%)	1 (14%)	1 (13%)	1 (20%)	0
D-xilóz	1 (10%)	2 (29%)	1 (13%)	0	0
Ecetsav	9 (90%)	7 (100%)	6 (75%)	3 (60%)	1
α -hidroxivajsav	10 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	5 (100%)	1
β -hidroxivajsav	0	1 (14%)	0	1 (20%)	0
γ -hidroxivajsav	1 (10%)	3 (43%)	2 (25%)	0	0
p-hidroxifenil-ecetsav	0	0	0	1 (20%)	0
α -keto-glutársav	0	0	0	1 (20%)	0
α -keto-valeriánsav	8 (80%)	4 (57%)	5 (63%)	3 (60%)	1
Laktamid	10 (100%)	6 (86%)	6 (75%)	3 (60%)	1
D-tejsav-metilészter	10 (100%)	7 (100%)	7 (88%)	3 (60%)	1
L-tejsav	10 (100%)	7 (100%)	7 (88%)	3 (60%)	1
Metil-piruvát	10 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	5 (100%)	1
Mono-metil-szukcinát	0	1 (14%)	0	0	0
Propionsav	10 (100%)	7 (100%)	7 (88%)	2 (40%)	1
Piroszölősav	9 (90%)	7 (100%)	7 (88%)	4 (80%)	1
Borostyánkő-amidosav	3 (30%)	2 (29%)	0	2 (40%)	0
Borostyánkősav	0	0	0	1 (20%)	0
L-glutaminsav	0	0	0	0	1
L-szerin	0	0	0	1 (20%)	0
2,3-butándiol	0	0	0	1 (20%)	0
Glicerol	10 (100%)	7 (100%)	8 (100%)	5 (100%)	1
Adenozin	0	2 (29%)	0	0	1
Összesen	25	31	24	33	17

Átlagos hasonlósági értékek:



8. ábra: Különböző eredetű *R. equi* törzsek szénforrás-hasznosítása alapján felállított törzsfája (BIOLOG, 48 óra, 30°C, a törzsek eredete mellett azok sorszámja szerepel).

5.6. Antibiotikum-érzékenység

A megvizsgált 20 *R. equi* törzs legnagyobb érzékenységet a rifampicinnel (MIC: 0,0156-0,25 µg/ml) és az eritromicinnel (MIC: 0,125-0,5 µg/ml) szemben mutatott. A törzsek az amikacin (MIC: 2-64 µg/ml), az oxitetraciklin (MIC: 16-64 µg/ml) és az amoxicillin (MIC: 2-64 µg/ml) iránt voltak a legkevésbé érzékenyek.

A törzsek eredete és antibiotikumokkal szembeni érzékenysége között nem tudunk összefüggést kimutatni. A 20 *R. equi* törzs antibiotikum-érzékenységére jellemző minimális gátló koncentrációkat a törzsek eredete szerint csoportosítva a **20. táblázat** mutatja.

20. táblázat: Egyes antibiotikumok különböző eredetű *R. equi* törzsekre kifejtett minimális gátló koncentrációi (MIC, µg/ml).

		Antituberculo- tikumok	Makrolidok	Glikopeptidek	Aminoglikozidok			Tetraciklinek		Penicillinek	
A törzsek		rifampicin	eritromicin	Vankomicin	gentamicin	neomicin	amikacin	oxitetra- ciklin	minociklin	penicillin G	amoxicillin
eredete	száma										
Ló	8	0,125 – 0,25	0,125 – 0,5	1 – 2	2 – 8	1 – 16	2 – 64	32 – 64	0,25 – 0,5	2 – 64	8 – 32
Talaj	3	0,125 – 0,25	0,25 – 0,5	1	4	2 – 16	4	64	0,5	4	16 – 32
Sertés	3	0,0156 – 0,125	0,125 – 0,5	1 – 2	4	2 – 16	4 – 16	64	0,5	2 – 4	16
Ember	6	0,0625 – 0,125	0,125 – 0,5	0,5 – 2	1 – 4	2 – 4	4 – 16	16 – 64	0,125 – 2	1 – 4	2 – 64

5.7. Szerológiai vizsgálatok

A hét *R. equi* típus törzssel szemben nyulakban termelt hiperimmun savók vizsgálata során – a típus törzseket antigénként alkalmazva – agargél-precipitációs próba (9. ábra, 77. oldal) segítségével megállapítottuk, hogy minden vérsavó specifikusnak tekinthető, azaz kizárólag a neki megfelelő szerotípusú, homológ törzs antigénjével reagált (21. táblázat).

21. táblázat: *R. equi*-vel szemben nyúlban termelt hiperimmun savók vizsgálata agargél-precipitációs próbában.

Szerotípus	Típustörzs	Homológ savó	A savók vizsgálata során használt antigének (AGP)						
			1	2	3	4	5	6	7
1	ATCC 33701	1074	+	-	-	-	-	-	-
2	ATCC 33702	1476	-	+	-	-	-	-	-
		1477	-	+	-	-	-	-	-
3	ATCC 33703	1480	-	-	+	-	-	-	-
		1481	-	-	+	-	-	-	-
		1484	-	-	+	-	-	-	-
4	ATCC 33704	1035	-	-	-	+	-	-	
5	ATCC 33705	1032	-	-	-	-	+	-	-
		1033	-	-	-	-	+	-	-
6	ATCC 33706	1038	-	-	-	-	-	+	-
		1039	-	-	-	-	-	+	-
7	ATCC 33707	1482	-	-	-	-	-	-	+
		1483	-	-	-	-	-	-	+
		1485	-	-	-	-	-	-	+

Az általunk megvizsgált 379, különböző eredetű *R. equi* törzs Prescott-féle rendszerben történő szerotipizálása során 173 törzs (45,65%) az 1-es, 107 törzs (28,23%) a 2-es, nyolc törzs (2,11%) a 3-as, egy törzs (0,26%) pedig a 4-es szerotípusba volt besorolható. Kilencven törzset (23,75%) ebbe a rendszerbe nem tudtunk besorolni. A Prescott-féle 5-ös, 6-os és 7-es szerotípusokhoz tartozó törzseket a magyarországi vizsgálati anyagokban nem találtunk.

A 90 be nem sorolható törzs közül eredet és izolálási hely alapján a legnagyobb diverzitásra törekedve 30 törzset kiválasztottunk, és ezekkel szemben nyulakat immunizáltunk. A termelt összes hiperimmun savót a 30 antigénnel AGP próbában reagáltattuk, amely alapján az antigének között négy jól elkülönülő csoport jelenlétét állapítottuk meg. Minden csoportból kiválasztottunk egy törzset, és az ezekkel szemben termelt hiperimmun savót AGP reakcióban vizsgáltuk a 90, be nem sorolható törzsből fennmaradt 60 törzssel.

A négy kiválasztott savó valamelyikével, egy törzs kivételével, mindegyik a Prescott-féle szerotipizálási rendszerbe korábban be nem sorolható törzsből készült antigén reagált. A kiválasztott négy hiperimmun savóval a Prescott-féle típus törzsekből (ATCC 33701-33707) készített egyik antigén sem eredményezett precipitációs reakciót.

Vizsgálataink azt mutatják, hogy a *R. equi* törzseknek legalább négy új (az általunk javasolt „8”-as, „9”-es, „10”-es és „11”-es) szerotípusa létezik.

A lovakból származó törzsek túlnyomó többsége, 74,36%-a (116 törzs) az 1-es, 9,62%-a (15 törzs) a 2-es, 2,56%-a (4 törzs) a 3-as szerotípusba tartozott. A törzsek 13,46%-át (21 törzs) nem tudtuk a korábbi hét szerotípus egyikébe sem besorolni. A 21 törzs közül 14-et az általunk javasolt „8”-as, hármát-hármát a „9”-es és a „10”-es, egyet pedig a „11”-es szerotípusba tartozónak találtunk.

A lovak közvetlen környezetéből gyűjtött talajból származó törzsek 64,58%-a (31 törzs) az 1-es, 2,08%-a (1 törzs) a 2-es, 4,17%-a (2 törzs) a 3-as, 2,08%-a (1 törzs) a 4-es szerotípusba tartozott, a törzsek 27,08%-a (13 törzs) pedig nem volt besorolható a Prescott-féle szerotipizálási rendszerbe. A tizenhárom, a korábbi hét szerotípusba be nem sorolható törzs közül egyet-egyet a „8”-as, a „9”-es és a „10”-es, kilencet pedig a „11”-es szerotípusba tartozónak találtunk, egy törzset pedig még a kibővített rendszerbe sem tudtuk besorolni.

A nyolc, emberekből izolált törzs közül hat törzs a 2-es szerotípusba tartozott, két törzs pedig nem volt a rendszerbe besorolható. Az általunk kiterjesztett rendszerben a két be nem sorolható törzs egyike a „10”-es a másik pedig a „11”-es szerotípusba tartozott.

A 167, sertések áll alatti nyirokcsomóiból vágóhídon gyűjtött törzs közül 26 törzs (15,57%) az 1-es, 85 törzs (50,9%) a 2-es, két törzs (1,2%) pedig a 3-as szerotípusba tartozott. A sertés eredetű törzsek közül 54-et (32,34%) nem tudtuk a rendszerbe besorolni. Az 54 törzsből egyet-egyet a „8”-as és a „10”-es, 17-et a „9”-es 35-öt pedig a „11”-es szerotípusba tartozónak találtunk.

A izolálás helye szerinti és a szerotípus alapján történő csoportosítás rámutat arra, hogy a települések többségében (15 településből 10-ben) lóból származó törzsek esetén az általunk megvizsgált törzsek között csak 1-es szerotípusú törzsek fordultak elő. Három település esetén kettő, egy esetén négy, egy település esetén pedig öt különböző szerotípusú törzs is előfordult az izolátumok között. Valamennyi állományban dominálnak (átlagosan: 74,36%) az 1-es szerotípusú törzsek a klinikai izolátumokban, de egy állomány esetén ahonnan nagyobb számban vizsgáltunk orr- és bélsártampon-mintákat is az 1-es szerotípust - követően a 2-es (21,87%) és a „8”-as (20,31%) szerotípusú törzsek is jelentős számban fordultak elő.

A sertés eredetű törzsek diverzitása nagyobb volt, mint a lóból származó törzseké. Egy vágóhídi csoportban egy szerotípus, kettőben kettő, háromban három, négyben négy, egyben pedig öt különböző szerotípusú törzs fordult elő. Legnagyobb gyakorisággal a 2-es (50,9%), a „11”-es (20,96%), az 1-es (15,57%) és a „9”-es (10,18%) szerotípusok voltak megtalálhatók.

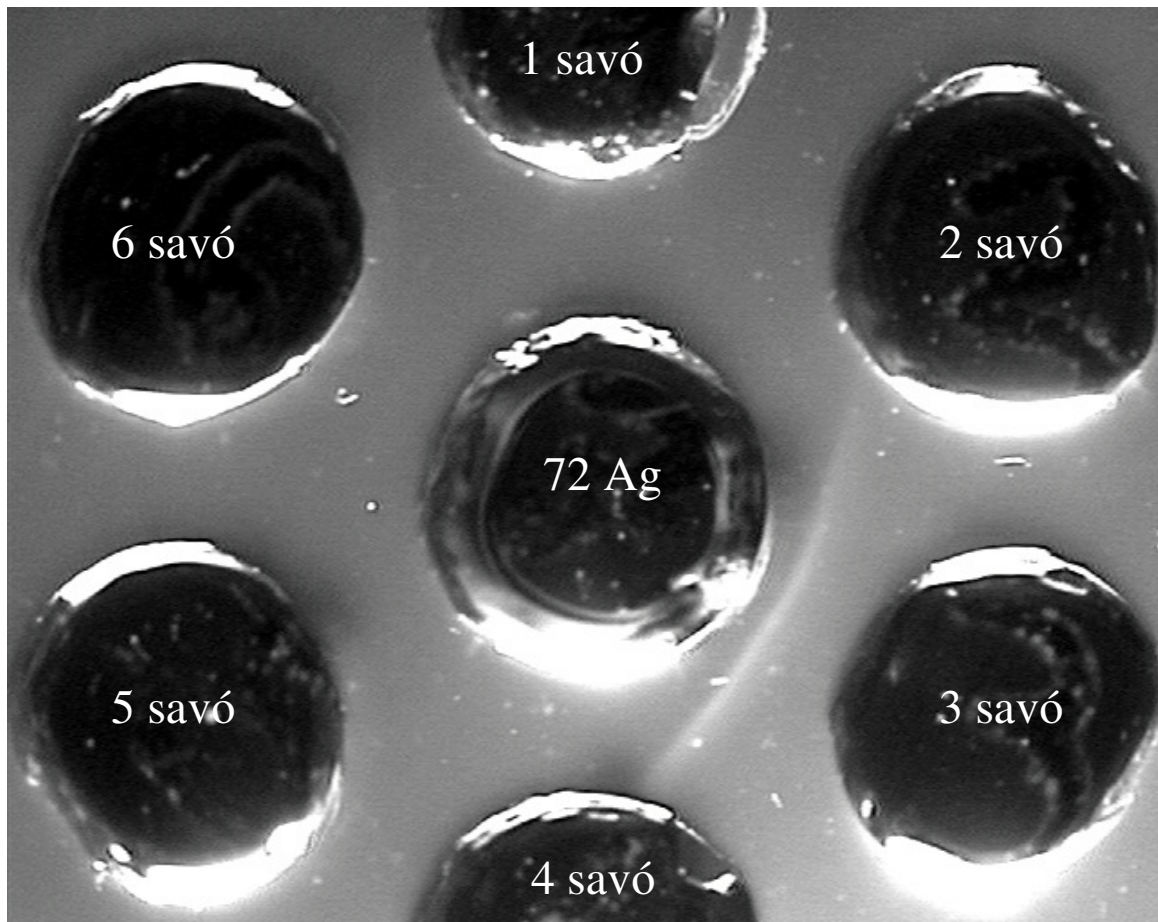
A törzsek eredet és szerotípus szerinti megoszlását a **22. és 23. táblázat**, míg az izolálás helye szerinti megoszlást a lóból származó törzsek esetén a **24. táblázat**, a sertésből izolált törzsek esetén pedig a **25. táblázat** tartalmazza.

22. táblázat: A lovakból és azok környezetéből származó talajmintákból kitenyésztett *R. equi* törzsek szerotípusok szerinti megoszlása.

Eredet	Szerotípus							Nem besorolható	Összesen
	1	2	3	4	5	6	7		
Csikó tüdőtályog	Bábolna: 13, Bálványos: 3, Dalmand: 2, Gánt: 1, Hortobágy: 2, Kakucs: 2, Kaposvár: 7, Pénzesgyőr: 1, Makó: 2, Mezőhegyes: 4, Orosháza: 1, Somogysárd: 2,	Somogysárd: 2,	Somogysárd: 1,	–	–	–	–	Somogysárd: 3,	46 (22,55%)
Csikó bélfodri nyirokcsomó	Somogysárd: 2,	–	Kakucs: 1,	–	–	–	–	Somogysárd: 2,	5 (2,45%)
Csikó gátorközi nyirokcsomó	Bálványos: 2, Orosháza: 1,	–	–	–	–	–	–	Somogysárd: 1,	4 (1,96%)
Csikó orrtampon	Aka: 1, Bálványos: 2, Budapest: 1, Hortobágy: 3, Mezőhegyes: 9, Nyíregyháza: 2, Somogysárd: 7,	Nyíregyháza: 1, Somogysárd: 3,	Somogysárd: 1,	–	–	–	–	Hortobágy: 1, Mezőhegyes: 1, Somogysárd: 2,	34 (16,67%)
Csikó végbéltampon	Bálványos: 1, Hortobágy: 6, Kakucs: 1, Mezőhegyes: 17, Nyíregyháza: 1, Somogysárd: 20,	Somogysárd: 9,	Somogysárd: 1,	–	–	–	–	Nyíregyháza: 3, Somogysárd: 8,	67 (32,84%)
Talaj	Hortobágy: 20, Somogysárd: 11,	Somogysárd: 1,	Somogysárd: 2,	Somogysárd: 1,	–	–	–	Hortobágy: 3, Somogysárd: 10,	48 (23,53%)
Összesen	147 (72,06%)	16 (7,84%)	6 (2,94%)	1 (0,49%)	–	–	–	34 (16,67%)	204 (100%)

23. táblázat: Emberekből és sertésekből származó *R. equi* törzsek szerotípusok szerinti megoszlása.

Eredet	Szerotípus							Nem besorolható	Összesen
	1	2	3	4	5	6	7		
Ember		Budapest: 3, Debrecen: 2, Miskolc: 1,						Miskolc: 1 Budapest: 1	8 (4,57%)
Sertés	Alsózsolca, Bátaszék, Pörböly, Tompa: 8, Békés, Csabacsúd, Kondoros: 4, Hajdunánás: 2, Kamut, Körösszegapáti, Mezőgyán, Okány, Zsadány, Vésztő: 9, Kunhegyes: 3,	Alsózsolca, Bátaszék, Pörböly, Tompa: 8, Békés, Csabacsúd, Kondoros: 3, Csökmő, Füzesgyarmat, Szeghalom, Ujiráz, Zsáka: 16, Devecser: 2, Gyomaendrőd, Gyula: 3, Hajdúdorog, Hajdúnánás, Kálmánháza, Nyíregyháza: 3, Hajdunánás: 8, Kamut, Körösszegapáti, Mezőgyán, Okány, Zsadány, Vésztő: 33, Komádi, Okány: 2, Kunhegyes: 7,	Csökmő, Füzesgyarmat, Szeghalom, Ujiráz, Zsáka: 1, Devecser: 1,					Alsózsolca, Bátaszék, Pörböly, Tompa: 5, Békés, Csabacsúd, Kondoros: 4, Csökmő, Füzesgyarmat, Szeghalom, Ujiráz, Zsáka: 3, Gyomaendrőd, Gyula: 4, Hajdúdorog, Hajdúnánás, Kálmánháza, Nyíregyháza: 1, Hajdunánás: 8, Komádi, Okány: 7, Körösszegapáti, Kamut, Mezőgyán, Okány, Zsadány, Vésztő: 15, Kunhegyes: 6, Miskolc: 1	167 (95,43%)
Összesen	26 (14,86%)	91 (52%)	2 (1,14%)	-	-	-	-	56 (32%)	175 (100%)



9. ábra: A pozitív agargél-precipitációs reakció képe (72. sz. törzsből kivont antigén és 3-as szerotípus típus törzsével szemben termelt hiperimmun savó precipitációs ívet hozott létre).

24. táblázat: A lovak származási helye és a belőlük izolált *R. equi* törzsek szerotípusok szerinti megoszlása.

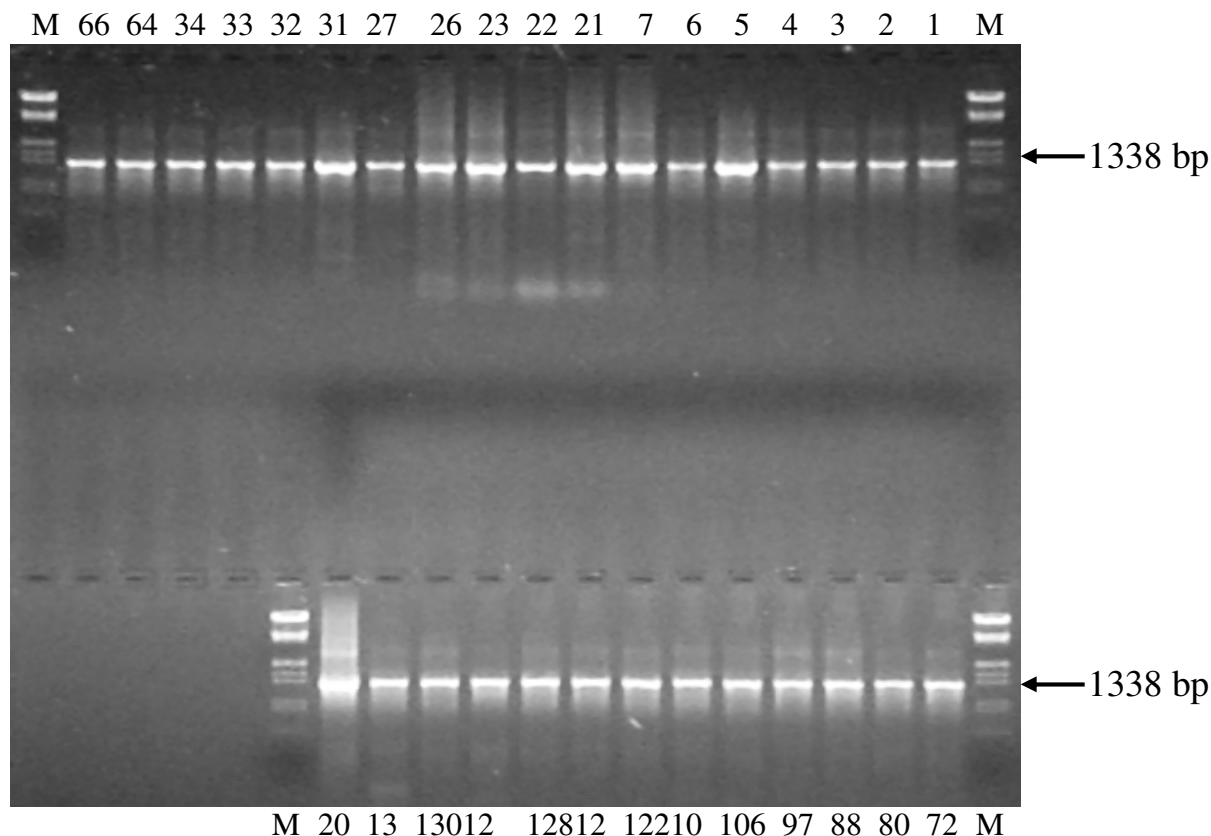
A lovak származási helye	Szerotípus											Összesen
	1	2	3	4	5	6	7	„8”	„9”	„10”	„11”	
Aka	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Bábolna	13	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	13
Bálványos	8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	8
Budapest	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Dalmand	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2
Gánt	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Hortobágy	11	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	12
Kakucs	3	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	4
Kaposvár	7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7
Makó	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2
Mezőhegyes	30	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	31
Nyíregyháza	3	1	–	–	–	–	–	–	–	2	1	7
Orosháza	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2
Pénzesgyőr	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Somogyárd	31 (48,44%)	14 (21,87%)	3 (4,69%)	–	–	–	–	13 (20,31%)	3 (4,69%)	–	–	64
Összesen	116 (74,36%)	15 (9,62%)	4 (2,56%)	–	–	–	–	14 (8,97%)	3 (1,92%)	3 (1,92%)	1 (0,64%)	156 (100%)

25. táblázat: A sertések származási helye és a belőlük izolált *R. equi* törzsek szerotípusok szerinti megoszlása.

A sertések származási helye	Szerotípus											Összesen
	1	2	3	4	5	6	7	„8”	„9”	„10”	„11”	
Alsózsolca, Bátaszék, Pörböly, Tompa	8	8	–	–	–	–	–	–	4	–	1	21
Békés, Csabacsúd, Kondoros	4	3	–	–	–	–	–	–	1	–	3	11
Csökő, Füzesgyarmat, Szeghalom, Ujiráz, Zsáka	–	16	1	–	–	–	–	–	–	–	3	20
Devecser	–	2	1	–	–	–	–	–	–	–	–	3
Gyomaendrőd, Gyula	–	3	–	–	–	–	–	–	1	–	3	7
Hajdúdorog, Hajdúnánás, Kálmánháza, Nyíregyháza	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	1	4
Hajdúnánás	2	8	–	–	–	–	–	–	–	1	7	18
Komádi, Okány	–	2	–	–	–	–	–	–	3	–	4	9
Körösszegapáti, Kamut, Mezőgyán, Okány, Zsadány, Vésztő	9	33	–	–	–	–	–	1	5	–	9	57
Kunhegyes	3	7	–	–	–	–	–	–	3	–	3	16
Miskolc	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1
Összesen	26 (15,57%)	85 (50,9%)	2 (1,2%)	–	–	–	–	1 (0,6%)	17 (10,18%)	1 (0,6%)	35 (20,96%)	167 (100%)

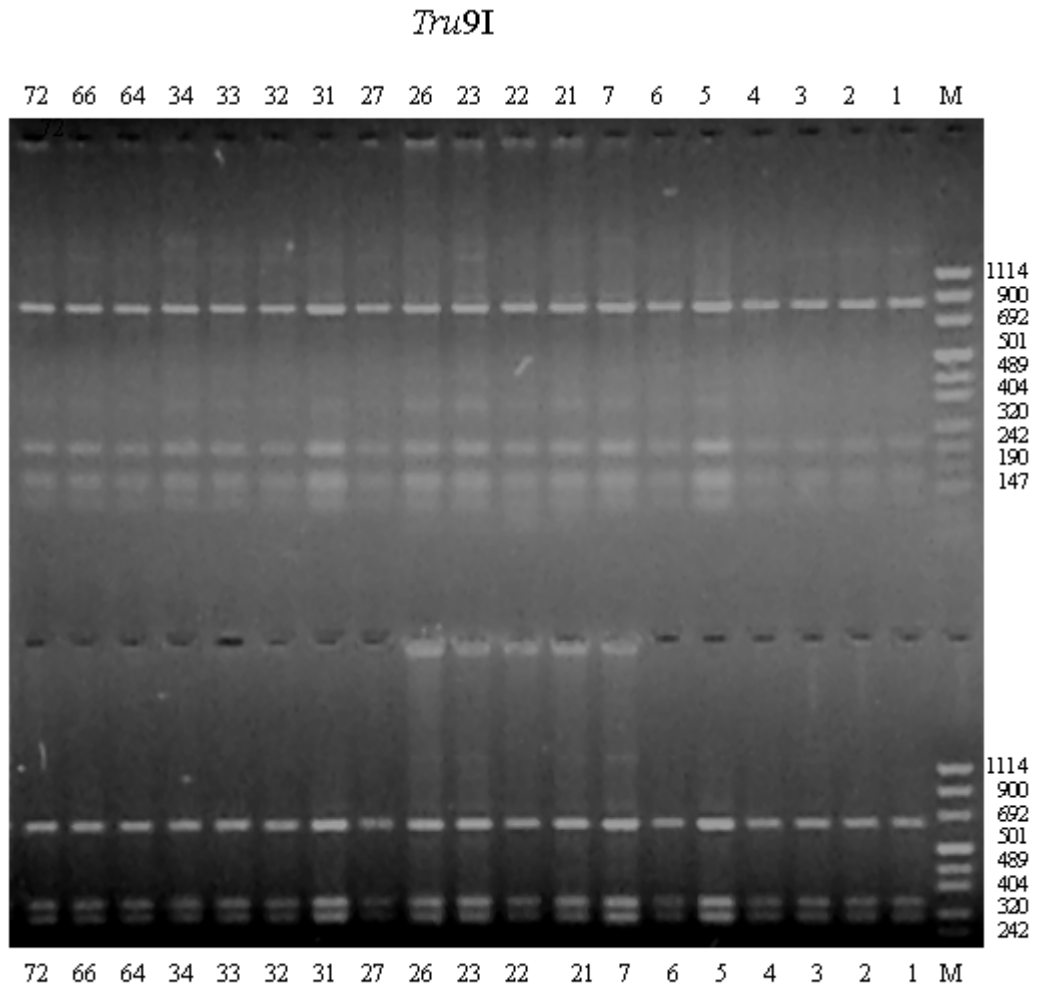
5.8. A 16S riboszomális RNS gén vizsgálata

A 16S riboszomális RNS gén vizsgálata során valamennyi a vizsgálatba bevont *R. equi* törzsből DNS-t vontunk ki. Ezt követően a kivont és megtisztított DNS-t templátként használva polimeráz láncreakcióval univerzális bakteriális primereket alkalmazva megsokszoroztuk egy 1338 bp hosszúságú DNS szakaszt a vizsgálatba bevont különböző eredetű *R. equi* törzsek genomjából (**10. ábra**).



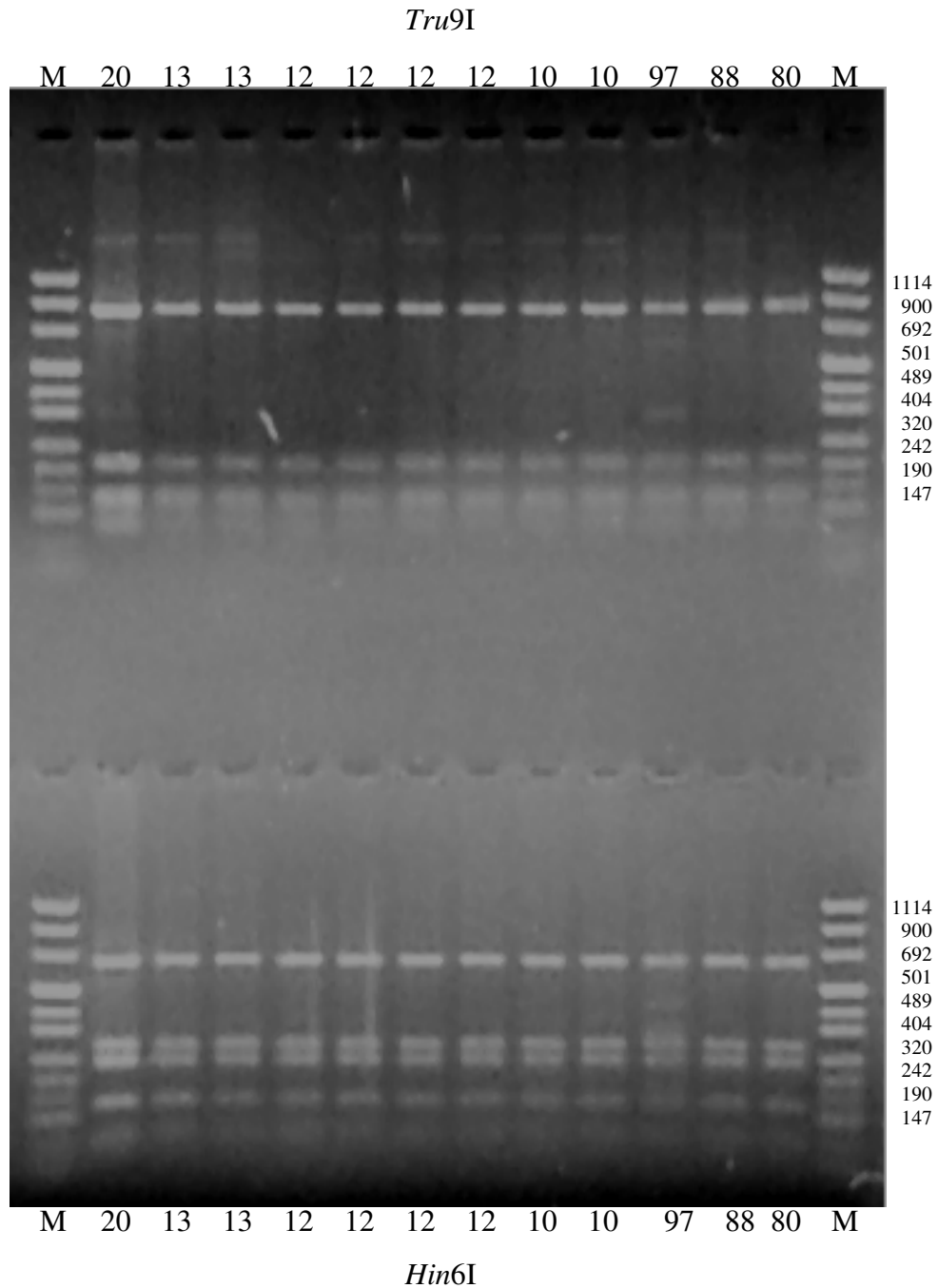
10. ábra: A 16S rRNS gén amplifikálásának az eredménye az elektroforézist követően (1%-os agaróz gél, etídium-bromiddal jelezve).

Az amplifikált DNS szakaszt RFLP-vizsgálatnak vetettük alá *Tru9I* és *Hin6I* restrikciós endonukleázokat használva (**1. ábra**, 48. oldal). Az RFLP-vizsgálat során a PCR-termékek emésztését követő elektroforézis után nem láttunk különbséget az izolátumok között (**11. és 12. ábra**). A vizsgált DNS szakaszt minden törzs esetén a várákozásnak megfelelően a *Tru9I* restrikciós endonukleáz öt részre (805 bp, 86 bp, 132 bp, 196 bp, 119 bp), a *Hin6I* enzim pedig 6 részre (631 bp, 125 bp, 53 bp, 230 bp, 25 bp, 274 bp) vágta (**1. ábra**).



Hin6I

11. ábra: Különböző eredetű *R. equi* törzsek 16S rRNS gén régiójának RFLP képe *Tru9I* és *Hin6I* restrikciós endonukleázokkal történő emésztés után (2%-os agaróz gél, etídium-bromiddal jelezve).



12. ábra: Különböző eredetű *R. equi* törzsek 16S rRNS gén régiójának RFLP képe *Tru9I* és *Hin6I* restrikciós endonukleázokkal történő emésztés után (2%-os agaróz gélben, etídium-bromiddal jelezve).

A 11 törzs 16S rRNS gén régiójának első 440 bp-jára kiterjedő szekvencia-analízis eredménye alapján megállapítottuk, hogy ezen régió szekvenciája a vizsgált törzsek esetén gyakorlatilag azonos (**2. melléklet**, 132. oldal).

5.9. Plazmidprofil

A virulenciaplazmidra irányuló vizsgálatok első lépéseként a baktérium-mintákból kivont DNS-t templátként használva polimeráz láncreakció segítségével a virulenciához kötődő vapA- és vapB-gének jelenlétét vizsgáltuk (**26. táblázat, 13. ábra**).

Az összesen megvizsgált 369 törzs közül 156 törzsben (41,5%) mutattuk ki a vapA-gén jelenlétét (564 bp reakciótermék), 51 törzsben (13,6%) a vapB-gént (827 bp reakciótermék), a fennmaradó 162 törzsben nem tudtuk a virulenciagének jelenlétét kimutatni.

A virulenciagének előfordulása a törzsek eredetétől függően sajátos eltéréseket mutatott. A lovakból származó törzsek túlnyomó többségében (88,4%) a vapA-gén jelen volt. A vapB-gén a lovakból származó törzsekben nem fordult elő. A lovak környezetéből gyűjtött talajmintákból származó törzsek több mint a felében (54,2%) szintén a vapA-gént mutattuk ki. VapB-gént hordozó törzset a talajból izolált törzsek között sem találtunk.

A 167, sertések áll alatti nyirokcsomóiból izolált törzs többsége (71,9%) avirulensnek bizonyult, mivel bennük sem vapA-, sem pedig vapB-gént nem tudtunk kimutatni. A törzsek 27,5%-ában viszont vapB-gén volt jelen. Mindössze egy törzsben (0,6%) tudtuk a vapA-gént kimutatni.

Az emberi izolátumok többsége (71,4%) mérsékelten virulens törzsnek bizonyult, mivel vapB-gént hordozott. A törzsek másik része (28,6%) avirulens volt, mivel bennük nem tudtunk virulenciagéneket detektálni.

A polimeráz láncreakcióval vapA+ (156 törzs) és a vapB+ (51 törzs) törzsekben a virulenciaplazmid jelenlétét vizsgáltuk (**14. ábra**) és az izolált virulenciaplazmidokat kétféle (*EcoRI*, *EcoT22I*) restrikciós endonukleázzal emésztettük és a fragmenseket gélelektroforézissel választottuk szét (**15. ábra**).

A csikókból származó 129 virulens törzsből, 123 törzs egy 85 kbp méretű, I-es típusú plazmidot, 6 törzs pedig egy 87 kbp méretű I-es típusú plazmidot tartalmazott (**27. táblázat**).

A talajból származó 26 virulens törzs 85 kbp méretű, I-es típusú plazmidot tartalmazott (**27. táblázat**).

A sertésekből származó 1 virulens (vapA+) törzs 85 kbp méretű I-es típusú virulenciaplazmidot tartalmazott. A 46 mérsékelten virulens (vapB+) törzs közül 1 törzs 1-es típusú (79 kbp), 1 törzs 4-es típusú (88,5 kbp), 38 törzs 5-ös típusú (95 kbp), 1 törzs 6-os típusú (89 kbp), 2 törzs 7-es típusú (96 kbp), 2 törzs 16-os típusú, 1 törzs pedig idáig nem ismert új (18-as) típusú virulenciaplazmidot tartalmazott (**16. ábra, 28. táblázat**).

Az immundeficiens emberekből izolált 5 mérsékelten virulens (vapB+) törzs mindegyike egy 95 kbp méretű 5-ös típusú virulenciaplazmidot tartalmazott (**28. táblázat**).

A lovakból és a lovak környezetéből, valamint a sertésekből és az emberekből származó avirulens (vapA-, vapB-) törzsek egy részében, összesen 41 törzs esetén ismeretlen funkciójú plazmidok jelenlétét is vizsgáltuk. A csikó végbéltamponokból kitenyésztett törzsek közül 5-ben, a talajból származó törzsek esetén pedig 8 törzsben találtunk ismeretlen funkciójú (kriptikus) plazmidot. Ezen kriptikus plazmidokat az agarózgélben való helyződésük alapján két csoportra osztottuk (kis és nagy plazmid).

26. táblázat: A *vapA*- és a *vapB*-gének jelenléte (PCR-rel vizsgálva) a Magyarországon izolált *R. equi* törzsekben.

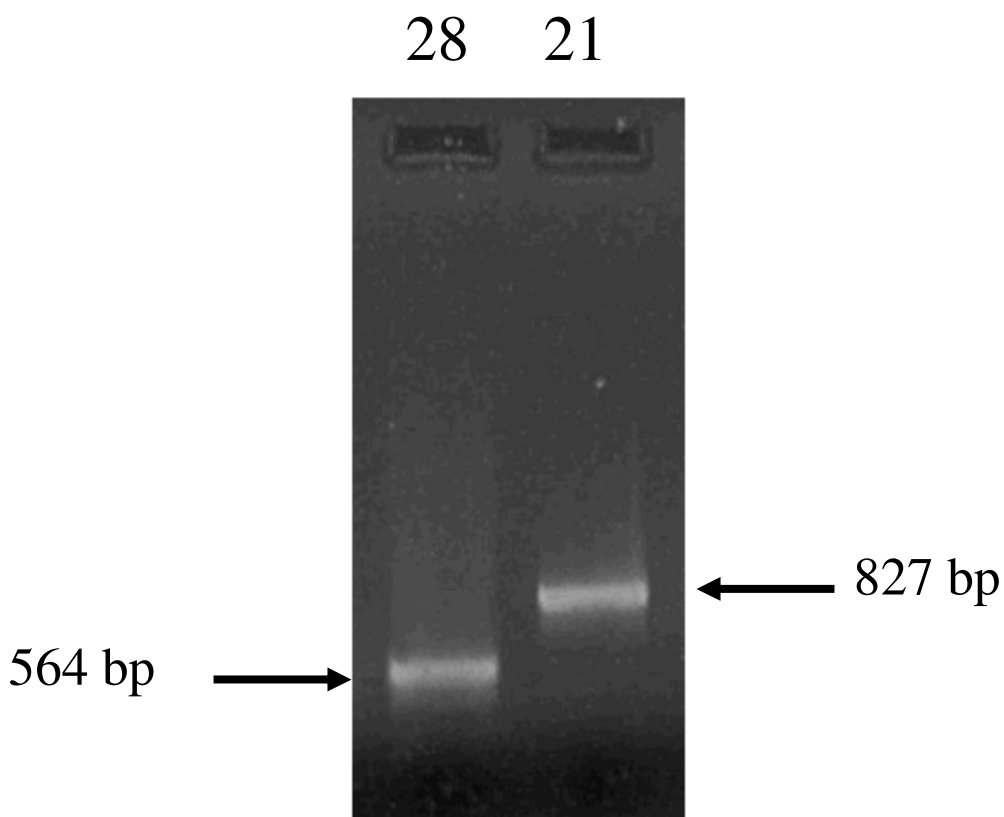
A törzsek eredete	Törzsek száma	<i>vapA</i>+ törzsek	<i>vapB</i>+ törzsek	Virulencia-gént nem hordozó törzsek
Csikó				
Tüdőtályog	46	42 (91,3%)	–	4 (8,7%)
Bélfodri nyirokcsomó	5	5 (100%)	–	–
Gátorközi nyirokcsomó	4	4 (100%)	–	–
Orrtampon	31	27 (87,1%)	–	4 (12,9%)
Végbéltampon	60	51 (85,0%)	–	9 (15,0%)
Részösszeg	146	129 (88,4%)	–	17 (11,6%)
Talaj	48	26 (54,2%)	–	22 (45,8%)
Sertés				
Áll alatti nyirokcsomók	167	1 (0,6%)	46 (27,5%)	120 (71,9%)
Ember				
AIDS-es betegek köpete	2	–	1 (50%)	1 (50%)
Szervátültetettek	3	–	2 (66,7%)	1 (33,3%)
Immundeficiens gyerek	1	–	1 (100%)	–
Non-Hodgkin lymphomás beteg	1	–	1 (100%)	–
Lábszárfekélyes beteg	1	–	–	1 (100%)
Részösszeg	8	–	5 (71,4%)	3 (28,6%)
Összesen	369	156 (41,5%)	51 (13,6%)	162 (43,1%)

27. táblázat: Magyarországon csikókból és talajmintákból izolált *R. equi* törzsek virulenciaplazmidjainak megoszlása.

Eredet	Virulens törzsek			Avirulens törzsek			Összesen
	85 kbp plazmid (I-es típus)		87 kbp plazmid (I-es típus)	Ismeretlen (Kriptikus) plazmid		Nincs plazmid	
		+ 1 plazmid		Kis plazmid (<30 kbp)	Nagy plazmid (>30 kbp)		
Csikó tüdőtályog	Bábolna: 9, Bálványos: 3, Dalmand: 2, Gánt: 1, Hortobágy: 2, Kakucs: 2, Kaposvár: 7, Pénzesgyőr: 1, Makó: 2, Mezőhegyes: 3, Orosháza: 1, Somogysárd: 7,	Kaposvár: 1	Mezőhegyes: 1			Bábolna: 4,	46
Csikó bélfodri nycs.	Somogysárd: 4,		Kakucs: 1,				5
Csikó gátorközi nyirokcsomó	Bálványos: 2, Orosháza: 1, Somogysárd: 1,						4
Csikó orrtampon	Aka: 1, Bálványos: 1, Budapest: 1, Hortobágy: 3, Mezőhegyes: 3, Nyíregyháza: 2, Somogysárd: 13,	Bálványos: 1 Mezőhegyes: 1	Mezőhegyes: 1,			Hortobágy: 1, Mezőhegyes: 2 Nyíregyháza: 1,	31
Csikó végbéltampon	Bálványos: 1, Hortobágy: 5, Kakucs: 1, Mezőhegyes: 7, Nyíregyháza: 1, Somogysárd: 32,	Mezőhegyes: 1	Mezőhegyes: 3,	Nyíregyháza: 1 Somogysárd: 1	Hortobágy: 1, Somogysárd: 2,	Nyíregyháza: 2, Somogysárd: 2,	60
Talaj	Hortobágy: 19, Somogysárd: 7,			Somogysárd: 3,	Somogysárd: 5,	Hortobágy: 4, Somogysárd: 10,	48
Összesen	145	4	6	5	8	26	194

28. táblázat: Magyarországon emberekből és sertésekből izolált *R. equi* törzsek virulenciaplazmidjainak jellemzése.

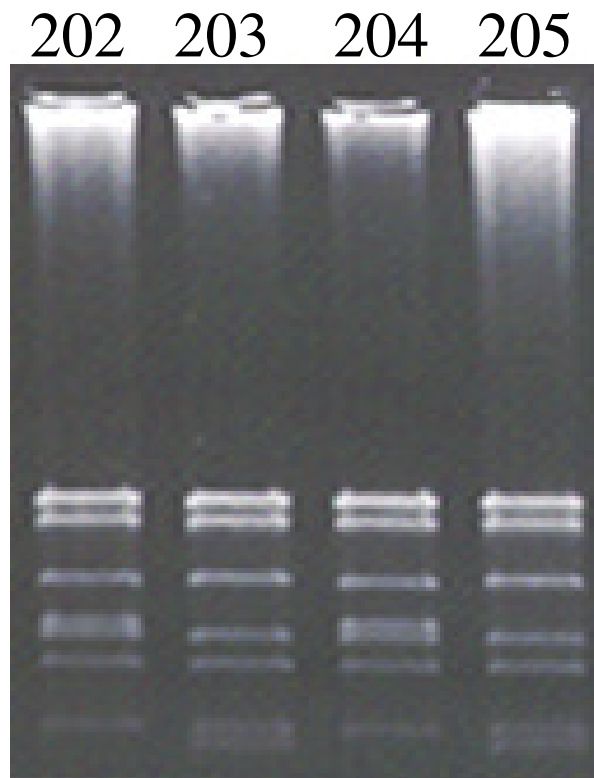
Eredet	Virulens törzsek (vapA+)	Mérsékelt virulens törzsek (vapB+)							Avirulens törzsek (vapA-; vapB-)	Összesen
		Plazmid típus (méret)								
		1 (79 kbp)	4 (88,5 kbp)	5 (95 kbp)	6 (89 kbp)	7 (96 kbp)	16	Új (18)		
Ember				Budapest: 3, Debrecen: 2, Miskolc: 1,					Budapest: 1, Miskolc: 1,	8
Sertés	Devecser: 1	Csökmő, Füzesgyarmat, Szeghalom, Ujiráz, Zsáka: 1,	Hajdunánás: 1,	Alsózsolca, Bátaszék, Pörböly, Tompa: 2, Békés, Csabacsúd, Kondoros: 3, Csökmő, Füzesgyarmat, Szeghalom, Ujiráz, Zsáka: 14, Devecser: 2, Gyomaendrőd, Gyula: 3, Hajdunánás: 6, Komádi, Okány: 2, Körösszegapáti, Kamut, Mezőgyán, Okány, Zsadány, Vésztő: 1, Kunhegyes: 4, Miskolc: 1,	Békés, Csabacsúd, Kondoros: 1,	Békés, Csabacsúd, Kondoros: 1, Körösszent-apáti, Kamut, Mezőgyán, Okány, Zsadány, Vésztő: 1,	Békés, Csabacsúd, Kondoros: 1, Komádi, Okány: 1,	Alsózsáka, Bátaszék, Pörböly, Tompa: 1,	Alsózsolca, Bátaszék, Pörböly, Tompa: 18, Békés, Csabacsúd, Kondoros: 5, Csökmő, Füzesgyarmat, Szeghalom, Ujiráz, Zsáka: 5, Gyomaendrőd, Gyula: 4, Hajdúdorog, Hajdunánás, Kálmán-háza, Nyíregyháza: 4, Hajdunánás: 11, Komádi, Okány: 6, Körösszegapáti, Kamut, Mezőgyán, Okány, Zsadány, Vésztő: 52, Kunhegyes: 15,	167
Összesen	1	1	1	44	1	2	2	1	122	175



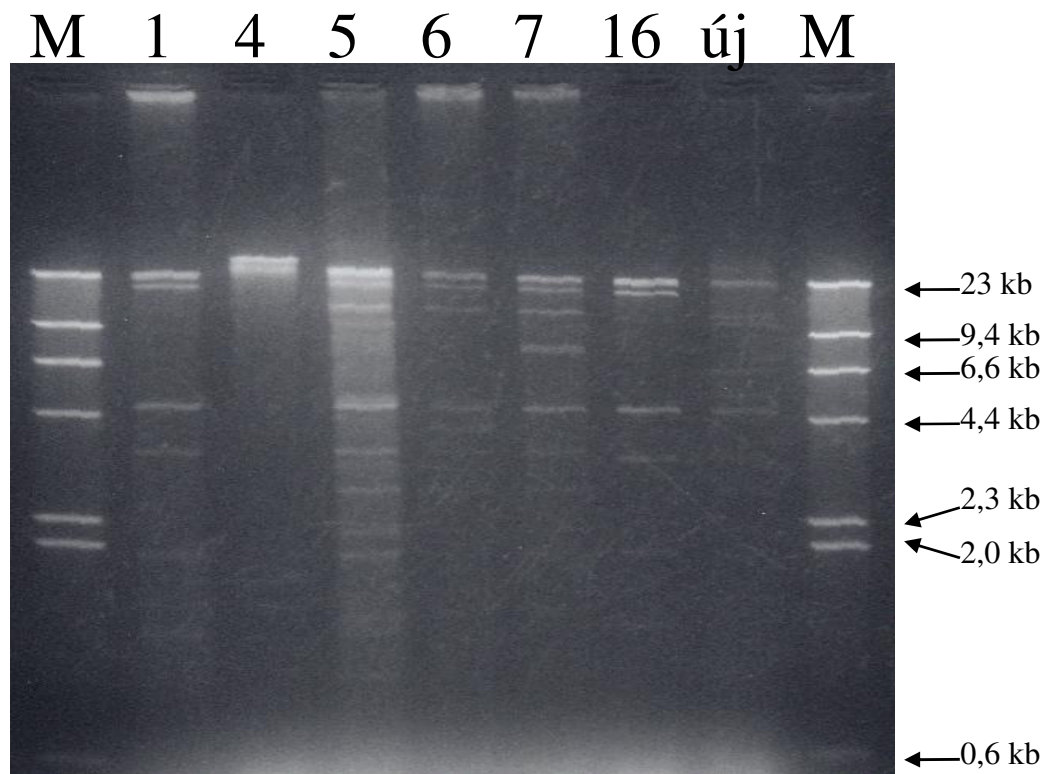
13. ábra: A vapA- és a vapB-génre specifikus PCR termék (564 bp; 827 bp) a 21-es és a 28-as sz. törzs esetén.



14. ábra: Néhány törzs plazmidképe (29., 30. 34-38. sz. törzs: 85 kbp méretű plazmid, 31-32. törzs: 5-ös típusú 95 kbp méretű plazmid, 33. törzs: nincs plazmid, az alsó csík a megváltozott elektroforetikus mobilitású kromoszomális DNS-t jelzi).



15. ábra: A hazai virulens törzsekben talált virulenciaplazmidok RFLP képe (202., 204. sz. törzs: 87 kbp, I-es típusú plazmid, 203., 205. sz. törzs: 85 kbp, I-es típusú plazmid).



16. ábra: A hazai mérsékelten virulens törzsekben talált különböző típusú virulenciaplazmidok (1, 4, 5, 6, 7, 16, új) *EcoRI* vágási képe. (Molekulatömeg marker: *HindIII*-mal emésztett lambda-fág DNS).

5.10. Immun-hisztokémiai vizsgálatok

Agargél precipitáció és passzív hemagglutináció

A tisztított IgG az agargélprecipitációs, ill. passzív hemagglutinációs próbával a *R. equi* 1-es szerotípusából készített antigénnel reagált. A többi szerotípussal, valamint a *Streptococcus equi* ssp. *equi*-vel és a *Staphylococcus aureus*-szal nem adott keresztreakciót.

Immun-hisztokémia

A kontroll (PBS) metszetekben és kenetekben nem láttunk pozitív reakciót. A *R. equi*-specifikus IgG csak a *R. equi*-hez kötődött, a *M. bovis*-hoz és a *M. paratuberculosis*-hoz nem (**29. táblázat**). A *M. bovis*-specifikus immunglobulin enyhe háttérfestődés mellett mindhárom baktériumhoz kötődött (**29. táblázat**). Ez az immunglobulin gyengébben festette meg a *R. equi*-t, mint a *R. equi*-specifikus IgG. Az utóbbi specifikusan, háttérfestődés nélkül mutatta ki a kórokozót (**17. ábra**), különösen annak sejtfalát, ill. burkát (**18. ábra**). A baktériumok döntően a makrofágok, ritkábban a neutrofil granulociták citoplazmájában voltak láthatók, extracellulárisan csak elvétve fordultak elő. A „B” és „C” állat eltályogosodott tüdejében és az „A” állat eltályogosodott vastagbélfordri nyirokcsomójában nagy számban, míg a gátorközi nyirokcsomókban („A”, „B”, „C”) és az „A” állat tüdejében csak elvétve láttunk baktériumokat. Mindhárom állat esetében a lenyomatokban hasonló pozitív reakciót láttunk, mint a paraffinos és a fagyasztott metszetekben (**30. táblázat**). A légsövet fedő nyálkából készített lenyomatban minden esetben nagy számú *R. equi*-t láttunk a makrofágok és a nagy számú neutrofil granulocita citoplazmájában (**19. ábra**). Az „A” állatban az orrból készített lenyomatban, két gócban extracellulárisan, egymással összetapadva láttunk *R. equi*-hez hasonló pozitív reakciót mutató baktériumokat. Ritkán, szabálytalan területeken a kenetekben és különösen a metszetekben, a makrofágokban a baktériumok csak nagyon halványan festődtek. Néhány esetben az egyes makrofágsejtekben lévő baktériumok közül egyesek erősen, míg mások csak alig festődtek.

29. táblázat: A nyúlban termelt *R. equi* specifikus IgG vizsgálata.

	anti- <i>R. equi</i> IgG	anti- <i>M. bovis</i> Ig
<i>R. equi</i>-vel fertőzött „A” csikó tüdeje	+	+
<i>M. bovis</i>-szal fertőzött szarvasmarha tüdeje	–	+
<i>M. paratuberculosis</i>-szal fertőzött szarvasmarha csípőbele	–	+

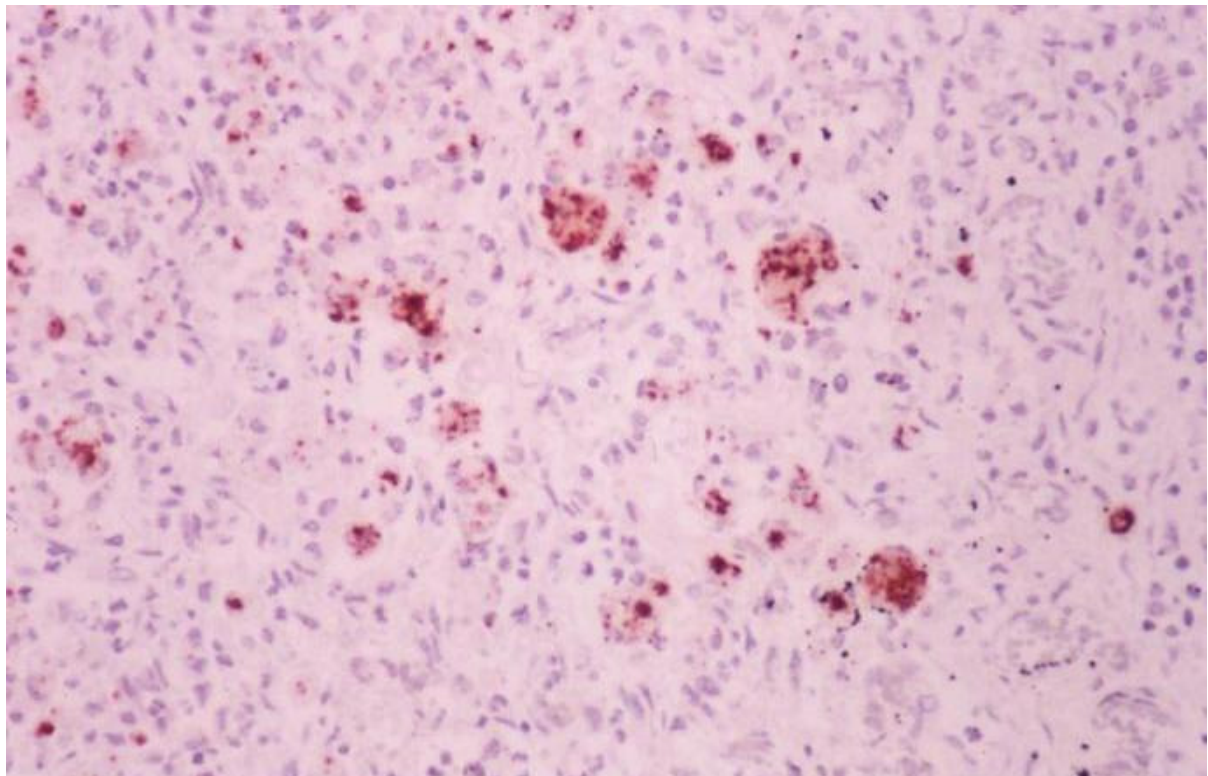
+: kötődik a baktériumhoz

–: nem kötődik a baktériumhoz

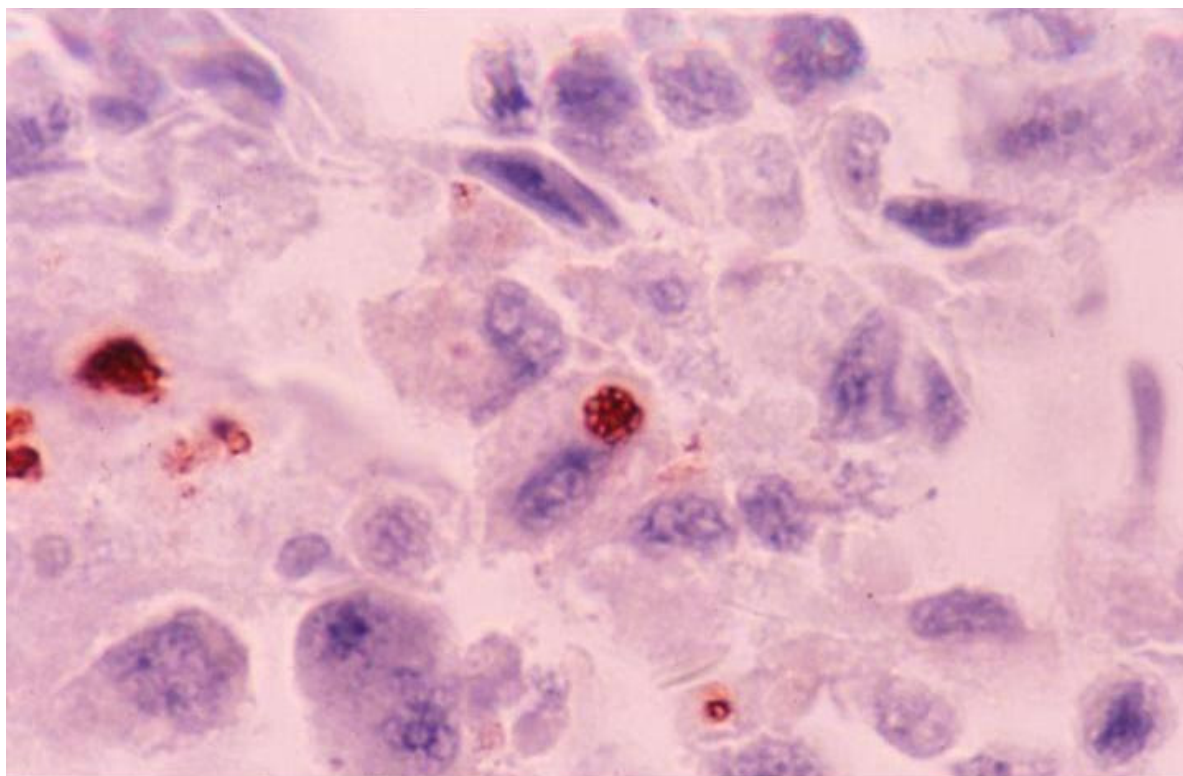
30. táblázat: A bakteriológiai és az immun-hisztokémiai vizsgálatok eredménye.

Állatok	Szervek (Minta)	Bakteriológiai vizsgálat	Paraffinos metszet	Fagyasztott metszet	Lenyomati készítmény
„A”	Tüdő	–	+/-	+/-	+/-
	Gátorközi nyirokcsomó	–	+/-	+/-	+/-
	Vastagbélbélfodri nyirokcsomó	+	+	+	+
	Légcső	n.v.	n.v.	n.v.	+
	Orrvialadék	n.v.	n.v.	n.v.	+/-
„B”	Tüdő	+	+	+	+
	Gátorközi nyirokcsomó	+	+/-	+/-	+/-
	Légcső	n.v.	n.v.	n.v.	+
„C”	Tüdő	+	+	+	+
	Gátorközi nyirokcsomó	+	+/-	+/-	+/-
	Légcső	n.v.	n.v.	n.v.	+

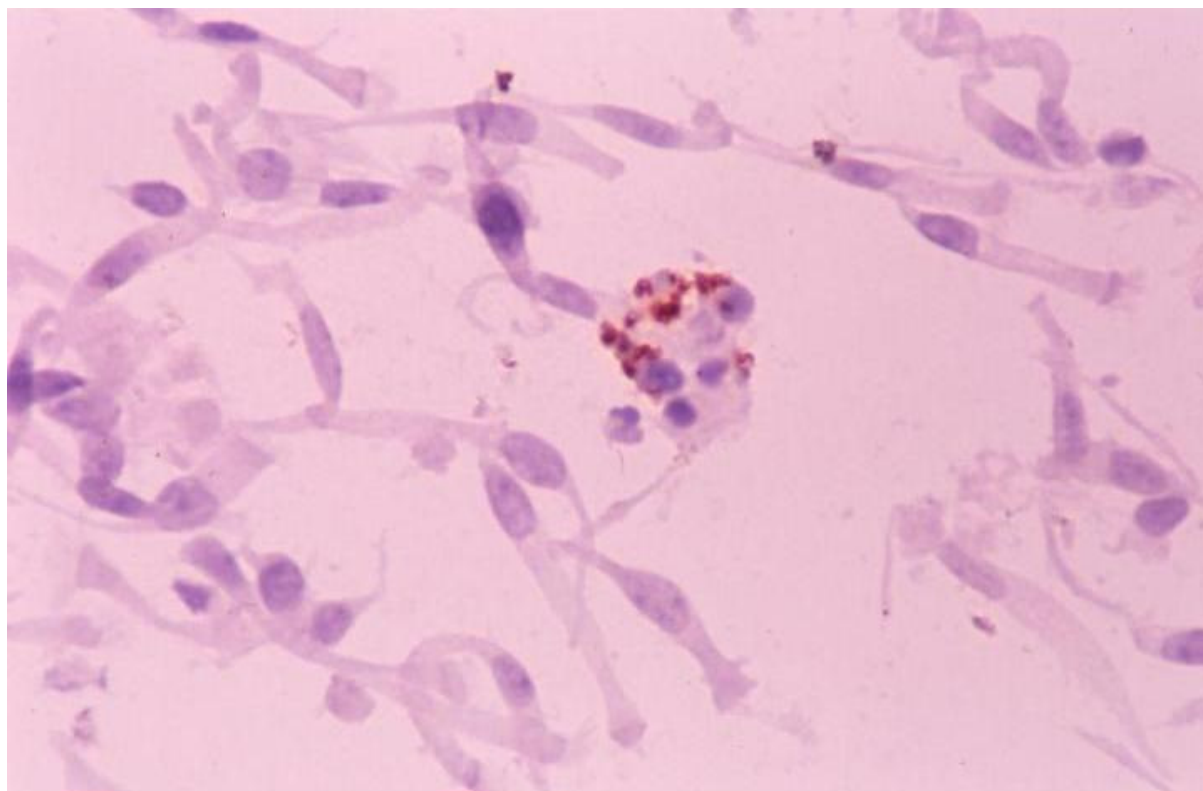
–: nincs *R. equi* baktérium
 +/-: elvértve *R. equi* baktérium
 +: sok *R. equi* baktérium
 n.v.: nem vizsgált



17. ábra: A „C” állat tüdejéből készült paraffinos metszet. Nagyszámú baktérium a makrofágok és a neutrofil granulociták citoplazmájában (Immun-hisztokémia, nyúl anti-*R. equi* IgG, Mayer-féle hematoxilinnal kontrasztfestve).



18. ábra: A „B” állat tüdejéből készült fagyasztott metszet. A makrofágsejtek citoplazmájában elhelyezkedő baktériumoknak különösen a falában látható erős festődés (Immun-hisztokémia, nyúl anti-*R. equi* IgG, Mayer-féle hematoxilinnal kontrasztfestve).



19. ábra: A „B” állat légcső-nyálkahártyájáról készített kenetben nagyszámú baktérium a makrofágsejtek és a neutrofil granulociták citoplazmájában (Immun-hisztokémia, nyúl anti-*R. equi* IgG, Mayer-féle hematoxilinnal kontrasztfestve).

5.11. Vakcinázási kísérletek

I./ A nyakizomba intramuscularisan alkalmazott vakcinák nem váltottak ki látható vagy tapintható helyi reakciókat, sem a vemhes kancákban, sem pedig vakcinázott csikókban. Az állatok végbélben mért testhőmérséklete, étvágya és viselkedése sem változott a vakcina hatására.

Az „A” ménesben 24 egészséges csikó született, de a kísérlet ideje alatt *R. equi* okozta megbetegedésből származó klinikai tünetek és elhullás nem fordult elő.

A „B” ménesben a 15 vakcinázott kancának 14 élő csikója született. A 14 csikó közül egy hullott el *Streptococcus equi* ssp. *zoepidemicus* fertőzés következtében és további két csikót kellett gyógykezeltetni hasonló okok miatt, de a csikók között nem fordult elő klinikai tünetekben vagy elhullásban megnyilvánuló *R. equi* fertőzöttség.

A kontroll csoportban 10 egészséges csikó született, amelyek közül kettő elhullott *R. equi* okozta megbetegedés következtében, és további négy csikót kellett kezelni a betegség klinikai tünetei (láz, köhögés, nehézlégzés) miatt. Mindkét elhullott csikó tüdejéből 1-es szerotípusú *R. equi* baktériumokat tenyésztettünk ki. A klinikai tüneteket mutató beteg csikók orrváladékából azonban nem tudtuk a kórokozót kitenyészteni. A *R. equi* okozta tüdőgyulladásban megbetegedett két csikónál az első klinikai tüneteket 39, illetve 41 napos korban figyeltük meg. Ezek a csikók a penicillin-, sztreptomycin- és enrofloxacin-kezelés ellenére 7 ill. 8 nap betegség után elhullottak. A kórboncolás során súlyosfokú, nagyszámú tályogképződéssel járó gennyes tüdőgyulladást figyeltünk meg mindkét állatban. A négy, légzőszervi tüneteket mutató csikó esetén az első klinikai tünetek 25, 47, 48 és 60 napos korban jelentek meg, de az antibakteriális terápia hatására a csikók gyógyultak.

A „C” ménesben a vakcinázott kancáknak 15 csikója született, amelyek között a *R. equi* okozta megbetegedéssel vagy elhullással nem találkoztunk. A 12 kontroll kancának összesen 11 csikója született, amelyek közül egy hullott el *R. equi* okozta tüdőgyulladásban és egy további pedig a betegségre jellemző klinikai tüneteket mutatott. Az elhullott csikó 43 napos korában betegedett meg és 17 nappal később a gyógykezelés ellenére elhullott. A kórbonctani vizsgálat során tályogképződéssel járó gennyes tüdőgyulladást állapítottunk meg és a *R. equi*-t a tüdőből kitenyésztettük. Más, légzőszervi tüneteket mutató csikók orrtamponmintáiból nem tudtunk *R. equi* baktériumokat kitenyészteni.

A kétszeri vagy háromszori vakcinázásra adott immunválasz meglehetősen gyenge volt, mind a *R. equi*-vel, mind pedig az EHV-2-vel szemben. A vemhes kancákban alacsony ellenanyagszinteket (mértani átlag és szórás: $1,6 \pm 1,2$ -től $3,2 \pm 0,92$ -ig) mértünk már az első vakcinázást megelőzően a *R. equi*-vel és az EHV-2-vel szemben. Két héttel a második vakcinázást követően a titerek valamennyi vakcinázott kancában növekedtek. A *R. equi*-vel szembeni átlagos titerek 1-3,5-szer magasabbak voltak, a vakcinázott kancákban, mint a nem vakcinázott kontrollban („B” és „C” ménes).

A kolosztrumban *R. equi*-vel és EHV-2-vel szemben mért ellenanyag-titerek hasonlóak voltak a második vakcinázás után két héttel a vérsavóban mért titerekhez. Az „A” és a „B” ménesben a 2-4 napos korú csikók vérsavóiban nagyon alacsony ellenanyagszinteket találtunk, mind a *R. equi*, mind pedig az EHV-2-vel szemben. A titerek alacsonyak maradtak egészen 5 hetes korig, majd fokozatosan emelkedni kezdtek. A „B” ménesben a 7 hetes korú vakcinázott csikókban a *R. equi*-vel szembeni titerek valamivel magasabbak voltak (mértani közép: 3,2), mint a kontrollokban (mértani közép: 1,8). A „C” ménesben a *R. equi*-vel szembeni titerek viszonylag magasak voltak mindkét kísérleti csoportban, a kimutatható ellenanyagok gyakorlatilag eltűntek 3 hetes korra és ezt követően fokozatosan emelkedésnek indultak és kétszer magasabb geometriai középértéket értek el a vakcinázott (5,5), mint a kontroll (2,7) csoportban (**31. táblázat**).

31. táblázat: A *R. equi*-vel (IHA – passzív hemagglutináció) és az EHV-2-vel (VN – vírusneutralizációs próba) szembeni ellenanyag-titerek (\log_2) (átlag \pm szórás) a vakcinázott és a kontroll kancák és a csikók vérsavóiban, valamint a kolosztrum-mintákban.

A kísérleti csoport	Kancák				Csikók					
	Az első vakcinázás után eltelt idő			Kolosztrum	Életkor					
	0 nap	14 nap	28 nap		2-4 nap	3 hét	5 hét	7 hét	9 hét	
„A” ménes Vakcinázott kancák és csikók										
<i>R. equi</i>	3,2 \pm 0,9	NV	4,7 \pm 2,0	3,8 \pm 1,6	0,7 \pm 1,5	0,22 \pm 1,5	NV	2,1 \pm 1,5	2,9 \pm 1,6*	
EHV-2	2,5 \pm 0,9	NV	5,8 \pm 1,8*	5,6 \pm 1,2*	1,4 \pm 0,8	3,2 \pm 1,2**	NV	5,2 \pm 1,4*	5,2 \pm 1,5*	
„B” ménes Vakcinázott kancák és csikók										
<i>R. equi</i>	2,7 \pm 1,2	3,6 \pm 0,8**	3,6 \pm 0,8**	4,1 \pm 1,5**	0,6 \pm 0,9	1,1 \pm 1,0	1,7 \pm 1,0**	3,2 \pm 1,5*	NV	
EHV-2	2,1 \pm 0,9	5,5 \pm 0,5**	6,2 \pm 1,8**	6,1 \pm 1,4**	1,8 \pm 0,6	1,6 \pm 0,7	2,5 \pm 0,7	3,4 \pm 1,2**	NV	
Kontroll kancák és csikók										
<i>R. equi</i>	1,6 \pm 1,2	1,9 \pm 1,1	2,6 \pm 0,7**	2,1 \pm 2,0	0,6 \pm 1,1	1,6 \pm 1,0	1,6 \pm 1,0**	1,8 \pm 1,0**	NV	
EHV-2	2,2 \pm 0,5	2,1 \pm 0,5	2,5 \pm 0,4	2,5 \pm 1,2	0,6 \pm 1,0	0,8 \pm 0,4	2,2 \pm 1,1	2,2 \pm 1,2	NV	
„C” ménes Vakcinázott kancák és csikók										
<i>R. equi</i>	2,3 \pm 0,8	NV	6,7 \pm 1,8**	NV	4,3 \pm 1,6	0,7 \pm 1,0	3,1 \pm 1,2	NV	5,5 \pm 1,8	
Kontroll kancák és csikók										
<i>R. equi</i>	2,7 \pm 0,9	NV	3,2 \pm 1,1	NV	2,3 \pm 1,1	0,5 \pm 0,7	2,4 \pm 1,1	NV	2,7 \pm 1,8	

*: $P \leq 0,05$

** : $P \leq 0,01$ a vakcinázás előtti titerhez (kancák), illetve a születés utáni titerhez (csikók) hasonlítva.

NV: nem vizsgált

II./ A „D” ménesben annak ellenére, hogy a csikók a kísérlet kezdetén klinikailag egészségesnek tűntek, mind a vakcinázott, mind pedig a kontroll csoportban valamennyi csikó esetén a végbéltamponból és néhány esetben az orrtamponból is ki lehetett a *R. equi* baktériumokat tenyésztani. A vakcinázott csoportban *R. equi* okozta tüdőgyulladás három csikó esetén fejlődött ki, amelyekből kettő el is hullott. Az egyik 7 hetes korban hullott el, és ez az állat a második vakcinát már nem is kapta meg, a közben kifejlődő tüdőgyulladás miatt. A kísérlet végére (hat héttel a második vakcinázást követően) valamennyi csikó, amelyikben klinikai tünetek alakultak ki, ürítette a *R. equi* baktériumokat az orrváladékával.

Az „E” ménesben a *R. equi* okozta tüdőgyulladás klinikai tüneteivel sem a két vakcinázott, sem pedig a kontroll csoportban nem találkoztunk, de a *R. equi* baktériumokat néhány állat esetén, mind a végbéltamponokból, mind pedig a orrtamponokból mindhárom csoport esetén ki tudtuk tenyésztani, ami arra utal, hogy a fertőzöttség jelen volt az állományban. Az inkomplett Freund adjuvánszt tartalmazó vakcina, enyhefokú ödémát okozott a befecskendezés helyén és enyhe, 2-3 napig tartó testhőmérséklet emelkedést váltott ki.

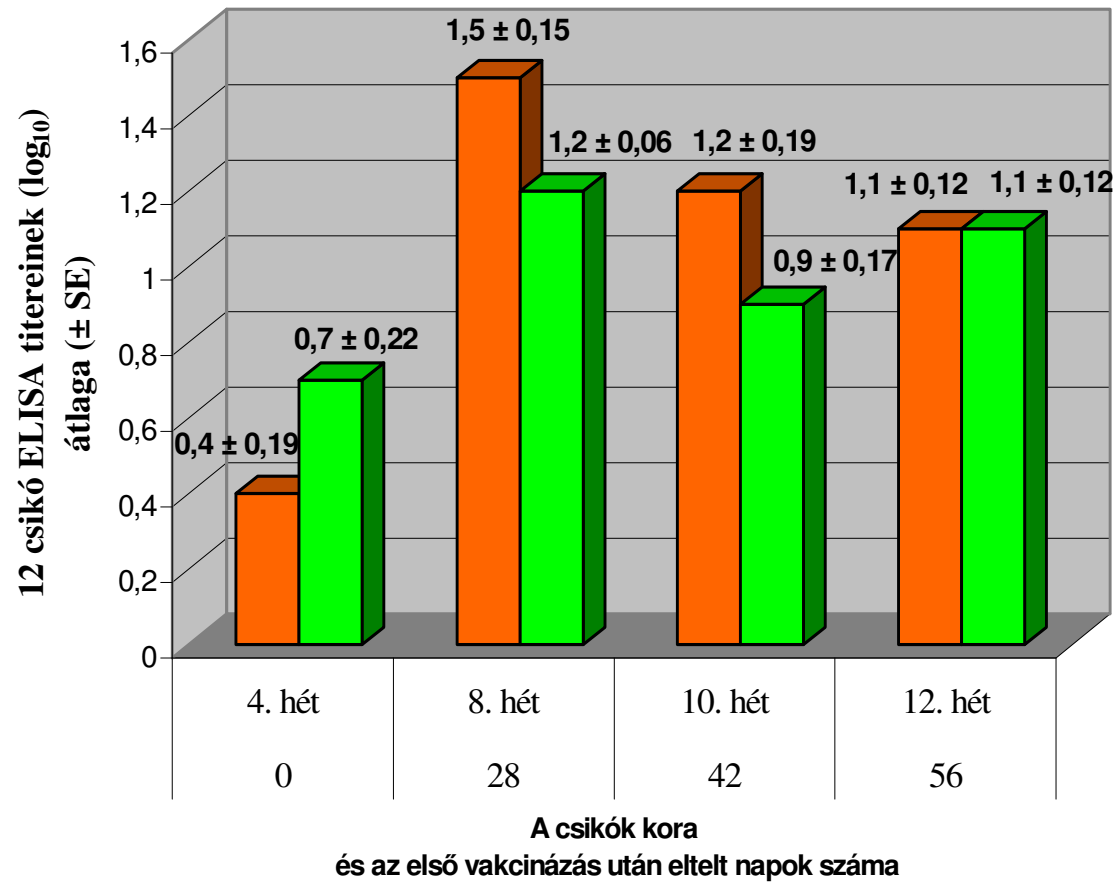
Agargél-precipitációs próbával csak egy olyan „D” ménesbeli csikó vérsavójában tudtunk precipitáló ellenanyagokat kimutatni, amelyik két alkalommal alumínium-foszfát gélhez adszorbeált vakcinát kapott. Ennek a vérsavónak az ELISA titere 640 volt.

A csikókból származó vérsavók ELISA-val történő vizsgálatával megállapítottuk, hogy a valószínűleg kolosztrális eredetű ellenanyagok alacsony titerekben még a vakcinázás előtt jelen voltak a csikókban mindkét ménesben (**20. ábra, 21. ábra**). A kétszeri vakcinázást követően az átlagos ellenanyag-titer 0,4 (\log_{10}) értékről 1,5-re emelkedett a „D” ménesben lévő csikókban, de a titerek lassan csökkenni kezdtek és a kísérlet végére nem találtunk különbséget a vakcinázott és a kontroll csoport egyedei között (**20. ábra**). Az „E” ménesben a kezdeti ellenanyag-titerek nem emelkedtek sem az alumínium-foszfát gélhez adszorbeált, sem pedig az olajos vakcina alkalmazását követően (**21. ábra**). A „D” ménesben élő csikókban az ellenanyag-titerek nagyobb mértékben emelkedtek a második vakcinázást követő második hét végére, mint az „E” ménesben, ahol a kezdeti ellenanyag-titerek sokkal magasabbak voltak.

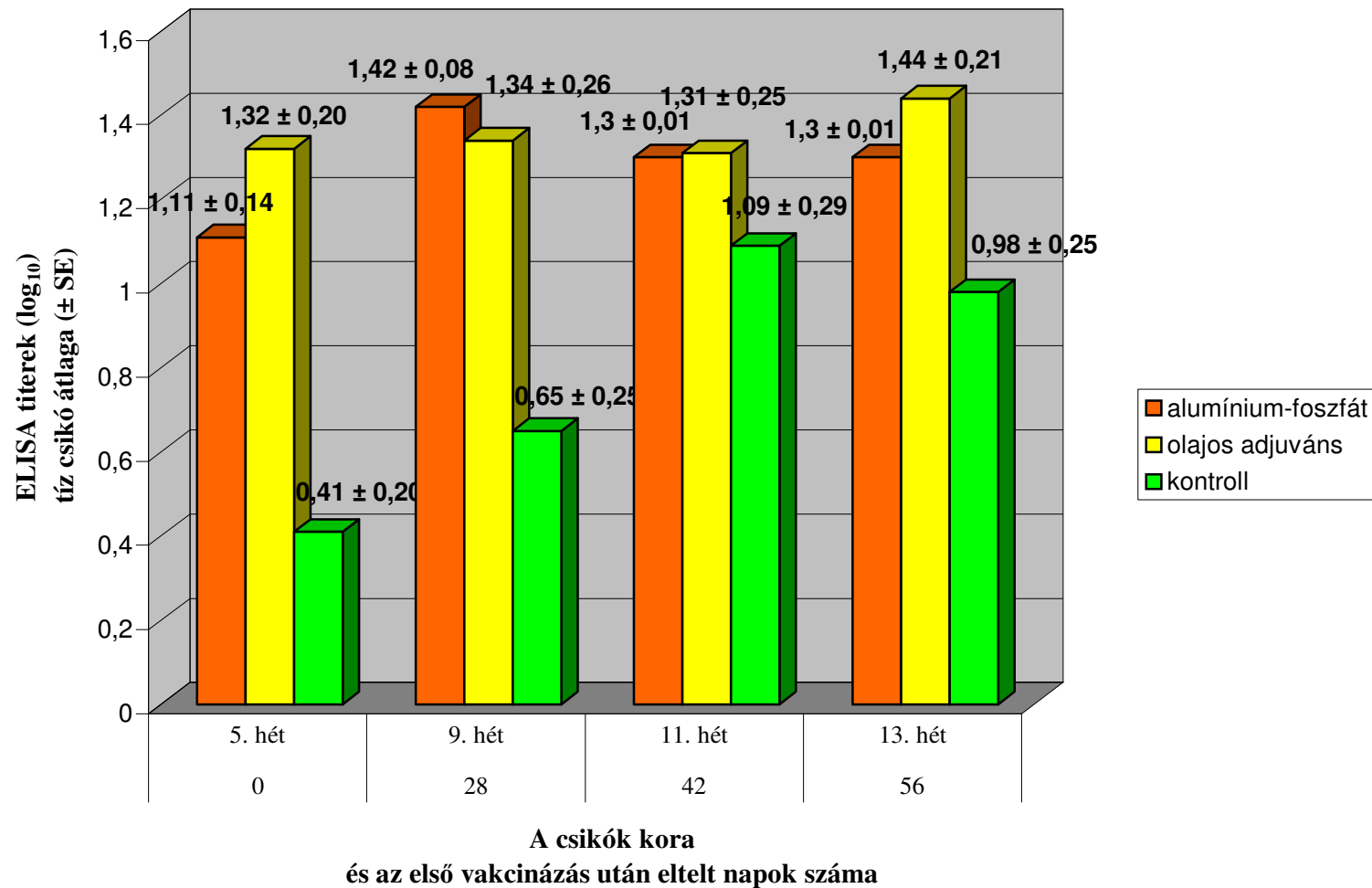
A kancák vérsavóinak ellenanyag-titerei 10 és 320 közötti értékeket mutattak (**32. táblázat**). A „D” ménesben a kancák 42,3%-ában, míg az „E” ménesben a 71,9%-ában 80-as ELISA ellenanyag-titert mutattunk ki.

32. táblázat: Felnőtt lovak ELISA-titerei a két vizsgált állományban.

ELISA-titer	„D” ménes (26 ló)	„E” ménes (32 ló)
10	1 (3,85 %)	– (0 %)
20	1 (3,85 %)	3 (9,37 %)
40	7 (26,92 %)	1 (3,12 %)
80	11 (42,31 %)	23 (71,9 %)
160	4 (15,38 %)	3 (9,37 %)
320	2 (7,69 %)	2 (6,24 %)



20. ábra: A csikók vérsavóiban mért ELISA titerek alumínium-foszfát gélhez adszorbeált *R. equi*-vakcina adását követően ("D" ménes)



21. ábra: Alumínium-foszfáttal és olajos adjuvánsal adjuvált *R. equi*-vakcinával oltott csikók vérsavóinak ELISA-titerei ("E" ménes).

6. ÉRTÉKELÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. A törzsek eredete

Munkánk során összesen 379 *R. equi* törzset gyűjtöttünk össze különböző kórtani és környezeti mintákból (csikó tüdőtüdőgyökökből, gátorközi nyirokcsomókból, bélfodri nyirokcsomókból, orrtamponokból, végbéltamponokból, sertés áll alatti nyirokcsomókból, talajmintákból és emberekből származó mintákból) Magyarország 43 településéről. A kórtani esetekből származó minták megoszlása egyenletes volt az ország különböző régióiban, a talajmintákat két nagy ménes kifutóiban gyűjtöttük, a sertés áll alatti nyirokcsomók túlnyomó többsége pedig Békés megyében hízlalt sertésekből származott.

A *R. equi* izolálására irányuló vizsgálataink alátámasztották azt a szakirodalomban is széleskörűen fellelhető vélekedést, amely szerint a *R. equi* környezetünkben széles körben előfordul (Takai és Tsubaki, 1985).

A *R. equi* okozta tüdőgyulladásra utaló járványtani és kórbonctani kép esetén szinte minden esetben ki tudtuk a kórokozót tenyésztetni a tüdőtüdőgyökökből, valamint a bélfodri- és a gátorközi nyirokcsomókból. Ezekben az esetekben szelektív táptalaj alkalmazására sem volt szükség, mivel a kórokozó közönséges agaron is képes növekedni és semmilyen különös igényt nem támaszt a táptalajjal szemben (Barton és Hughes, 1980).

A tamponmintákból és a talajmintákból történő tenyésztés során dúsítási eljárást nem végeztünk, hanem csak egy szelektív táptalajra történő leoltást követően bíraltuk el a tenyészeteket. Vizsgálataink során azonban nem a mintában történő baktériumkimutatás volt az elsődleges célunk, hanem a törzsgyűjtés. A minták levestenyészetben való dúsítást követő szilárd táptalajra történő kioltásos vizsgálatával a fertőzöttség arány bizonyára még magasabb lett volna, de a szelektív táptalajokra való közvetlen kioltás is bizonyította a *R. equi* törzsek széleskörű előfordulását.

Az orrtamponmintákban a *R. equi* 14,41%-os arányban fordult elő. A minták többsége felső légúti klinikai tünetet nem mutató állatokból származott, egy részük azonban orrfolyásos csikókból származó minta volt. Ez utóbbi esetekben természetesen a minták nagyobb részéből lehetett a kórokozót kimutatni, több esetben *Streptococcus equi*-vel együtt. Az is tény azonban, hogy a *R. equi* okozta tüdőgyulladásban beteg csikók esetén a szakaszos ürítés miatt nem lehet minden esetben az orrtamponból a kórokozót kitenyésztetni.

A végbéltampon-minták 28,39%-ából tenyésztettük ki a baktériumot, ami magas aránynak tekinthető. Takai és Tsubaki (1985) csikók bélsármintáinak 24,7%-ából tudták a kórokozót kitenyésztetni. A csikók bélsatarnájából a *R. equi* kimutathatósága az állat korától is függ, mivel a kórokozó az 1-2 hetes korú csikók bélsatarnájában telepszik meg és onnan hosszú ideig kimutatható. Az általunk megvizsgált végbéltamponok 1-3 hónapos csikókból származtak, amely életszakaszban az irodalmi adatok (Takai és mtsai., 1986a) szerint a 6-7 hetes életkorig nő az izolálhatóság, azt követően pedig csökken.

Katsumi és mtsai. (1991) vágóhídon gyűjtött sertés áll alatti nyirokcsomókból a sajtos nyirokcsomó-gyulladásos esetek 45,6%-ából, a makroszkópos elváltozást nem mutató eseteknek pedig a 9,4%-ából tudták a *R. equi* baktériumokat izolálni. Madarame és mtsai. (1998) 1615 sertésből gyűjtött áll alatti nyirokcsomót megvizsgálva pedig az állatok 5,5%-ából tudták a *R. equi*-t kitenyésztetni.

Vizsgálataink során csak néhány (10-15) makroszkópos elváltozást mutató nyirokcsomóval találkoztunk, de ezek egyikéből sem tudtuk a *R. equi*-t izolálni. Az egyes vágóhídi csoportok között jelentős eltérést (5,88%-20,37%) találtunk a *R. equi* kitenyészthetőségét illetően. A vágóhídi csoportok azonban az esetek többségében több, mind földrajzilag, mind pedig tartástechnológiailag különböző állományokból származó sertéseket foglaltak magukban. Feltételezhetően ezen állományok között lévő nagyobb különbségek az állatok keveredése miatt valamelyest elmosódtak, de az irodalomban található adatokhoz viszonyítva így is a sertések jelentős hányadából ki tudtuk a baktériumokat tenyésztetni. Ez a magas arány a tartási körülményekkel állhat összefüggésben (természetközeli tartás, talajjal való közvetlen érintkezés).

6.2. Szelektív táptalajok összehasonlító vizsgálata

Ha *R. equi* baktériumokat más mikroorganizmusokkal (baktériumokkal, gombákkal) nagymértékben szennyeződött mintából szeretnénk izolálni, akkor erre a célra szelektív táptalajokat célszerű igénybe venni.

Az általunk megvizsgált nyolc szelektív táptalaj közül a TINSDALE, a CAZ-NB, a TVP, az NC és a TCP táptalajok nem gátolták jelentősen a *R. equi* törzsek szaporodását. Ezekben a táptalajokon a legtöbb törzs megfelelően szaporodott. A NANAT, az M3T és a PNP táptalajokon azonban csak gyengébb növekedést figyeltünk meg.

A visszaizolálhatósági vizsgálatok során a korábban leírt táptalajok között a legjobb eredményeket a CAZ-NB táptalaj esetén kaptuk. Nem volt szignifikáns különbség a CAZ-NB táptalaj és a kontroll táptalajon nőtt telepszám \log_2 – értékei között.

Az általunk kifejlesztett táptalajok között csak a PNP táptalaj esetén tapasztaltunk szignifikánsan alacsonyabb \log_2 értékeket, a többi táptalaj esetén viszont nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll táptalajokhoz viszonyítva.

A korábban leírt táptalajok között a NANAT és a CAZ-NB táptalaj rendelkezett a legnagyobb szelektív kapacitással. Az általunk kifejlesztett talajok között pedig a TCP táptalaj volt képes a legjelentősebb mértékben gátolni a szennyező háttér baktériumflóra növekedését. A TINSDALE, a TVP és a PNP táptalajok nem rendelkeztek kielégítő gátló hatással a megvizsgált öt Gram-negatív és öt Gram-pozitív baktériumtörzs növekedésére.

A NANAT táptalaj nagyon jó szelektív kapacitással rendelkezett a háttér baktériumflórára; de ez a táptalaj jobban gátolja a *R. equi* törzsek növekedését, mint a TINSDALE, illetve a CAZ-NB táptalaj. Ezen a táptalajon a *R. equi* baktériumok visszaizolálhatósága alacsonyabb volt, mint a többi korábban leírt táptalajon, és a mintában jelenlévő gombákra kifejtett gátló hatás sem volt kielégítő, mivel ezek a gombák (*Mucor*, *Rhizopus*) képesek voltak a 2-3 napos tenyésztési idő alatt a baktériumtelepeket túlnőni.

A TINSDALE táptalajon a *R. equi* nagyon jól növekedett, de a háttérflórával szembeni szelektív kapacitása meglehetősen gyenge volt. Az M3T táptalaj képes volt a háttér szennyező baktériumflóra növekedését gátolni, de a rhodococcusok növekedéséhez több, mint 72 óra inkubációs időre volt szükség, és a rhodococcusok akkor is csak kisméretű (≈ 1 mm) telepeket képeztek. A PNP táptalaj nem volt képes megfelelő mértékben gátolni a háttér baktériumflóra tagjait, és a visszaizolálás során a *R. equi* telepszáma és a telepek átmérője is kisebb volt, mint a kontroll táptalaj esetén.

A TVP táptalajon a különböző eredetű *R. equi* törzsek is nagyon jól nőttek, jól gátolta a gombák növekedését is, de a háttér baktériumflórára kifejtett gátló hatása nem volt kielégítő, ezért nem javasoljuk e táptalaj használatát erősen szennyezett minták esetén.

Az NC táptalaj nem csökkentette a *R. equi* telepszámot szignifikánsan, de a háttérflórára kifejtett gátlása nem volt olyan hatásos, mint a TCP táptalaj esetén.

A nyolc szelektív táptalajra kiterjedő vizsgálataink alapján a CAZ-NB és a TCP táptalajt találtuk a legalkalmasabbnak a *R. equi* szelektív izolálására. Mindkét táptalaj lehetővé tette a bélsármintákba belekevert *R. equi* baktériumok legalább 72 – 91%-ának a visszaizolálását, és a háttér baktérium- és gombaflóra növekedését jelentős mértékben gátolta.

A TCP táptalaj előnye a CAZ-NB talajjal szemben, hogy azon a *R. equi* telepmorfológiája sokkal jellegzetesebb (fénylő, nyálkás, fekete, 3-5 mm átmérőjű vízcseppszerű telepek), és hatásosabban képes a háttér gomba- és baktériumflóra növekedését gátolni a környezeti mintákban. Az erősen szennyezett minták baktérium- és gombaflórájában azonban jelentős különbségek lehetnek, amiből adódóan egy adott minta esetén az egyik vagy a másik táptalaj segítségével sikeresebben izolálhatjuk a mintában jelenlévő baktériumokat. Éppen ezért erősen szennyezett minták esetén mindkét táptalaj (CAZ-NB, TCP) együttes használata az izolálás esélyét növelheti, önálló alkalmazás esetén viszont a TCP talaj hatékonyabbnak bizonyult.

6.3. Morfológiai, tenyésztési és biokémiai sajátosságok, a törzsek DNS-alapú azonosítása

Az általunk megvizsgált összes *R. equi* törzs, 48 óráig 37°C-on, élesztőkivonatot is tartalmazó közönséges agaron történő tenyésztést követően a szakirodalomban is leírt (Prescott, 1991) jellegzetes vízcseppszerű, összefolyásra hajlamos, nyálkás telepeket képezett és néhány napig szobahőmérsékleten való tartás után lazacszínű pigmentet termelt. Az irodalomban leírt más jellegű telepekkel csak eltérő összetételű, rosszabb minőségű táptalajon történő tenyésztés után, vagy hosszabb tenyésztési időt követően találkoztunk. Az élesztőkivonat nélküli, magas NaCl tartalmú, vagy egyes szelektív táptalajok esetén kisebb, pigmentet nem termelő és nem nyálkás, hanem inkább matt-fényű, összefolyásra nem hajlamos telepeket figyeltünk meg. A véresagaron hosszabb ideig történő tenyésztést követően a kezdetben (24-48 óra) nyálkás, nyúlós telepek valószínűleg a burok víztartalmának csökkenése miatt a 3-5 napig történő tenyésztést követően matt-fényű, vaj konzisztenciájú lapos telepekké váltak. Valószínűleg Jones és mtsai. (1989) is ezen jelenség miatt találkozhattak 4 napig véres agaron történő tenyésztést követően ún. „R-típusú” *R. equi* telepekkel. A megszokottól (lazacszínű) eltérő pigmentet termelő törzssel nem találkoztunk.

Valamennyi megvizsgált tenyészet nagyon jellegzetes, kifejezett „dohos pinceszag”-ra emlékeztető szaggal rendelkezett. A *R. equi* tenyészetek ezen tulajdonságát Prescott (1991) „földszag”-ként jellemezte.

A baktérium morfológiájának vizsgálata során a szakirodalomban található adatoknak megfelelően (McNeil és Brown, 1994) az esetek túlnyomó többségében coccus alakú baktériumokat figyeltünk meg, ami a szilárd táptalajon történő 48 óráig tartó tenyésztést követően elvégzett vizsgálatra vezethető vissza.

Az általunk megvizsgált összes törzs csak oxigén jelenlétében volt képes szaporodni, anaerob viszonyok között egyetlen törzs sem indult fejlődésnek, így azt a korábbi véleményt (Prescott és Hoffman, 1993), amely szerint egyes törzsek csak anaerob viszonyok között nőnek nem tudtuk megerősíteni.

A sótűrés vizsgálata során a különböző irodalmi források egymásnak ellentmondó adatokról számoltak be. McGowan és Mangano (1991), valamint Soedarmanto és mtsai. (1997, 1998) 6,5% NaCl-tartalmú levesben nem figyeltek meg növekedést, míg Emmons és mtsai. (1991) ennek éppen az ellenkezőjét tapasztalták. A vizsgálataink során 7% NaCl-ot tartalmazó szilárd táptalajt használtunk és 5 nap tenyésztési idő után a típus törzsek 25%-a, a saját izolátumoknak pedig 12,41% képezett szemmel látható telepeket. Eredményeink alapján ez a 6,5-7%-os NaCl koncentráció az, amelyik a sótűrés határát jelenti a *R. equi* esetén.

Az emberekből és a sertésekből származó törzsek a NaCl-dal szembeni magasabb toleranciájára nem tudunk magyarázatot adni, lehet, hogy csak az alacsony törzsszám (ember: 6 törzsből 3 pozitív; sertés: 6 törzsből 4 pozitív) miatt alakult ki ez az eredmény, ennek kiderítése további vizsgálatokat igényel.

A törzsek hemolitikus aktivitásának vizsgálata alapján a Smola és mtsai. (1994) által közölt eredményeket tudtuk megerősíteni. Az általunk megvizsgált törzsek sem hemolizáltak teljes, defibrinált szarvasmarha vért tartalmazó agaron, de mosott nyúl vörösvérsejteket tartalmazó agaron a törzsek túlnyomó többsége (82%-a) erős β -hemolízist mutatott. A törzsek eredete szerint nem találtunk lényeges eltérést a nem hemolizáló törzsek aránya között. A hemolízist 48 óráig tartó tenyésztést követően bíraltuk el, mivel 72 ill. 96 óráig tartó tenyésztést követően a táptalajok egy részében spontán hemolízis alakult ki, ami a későbbi bírálatot zavarta volna.

Az equi-faktorok jelenlétét a CAMP-próba segítségével mutattuk ki. Prescott és mtsai. (1982), valamint Bern és Lämmler (1994) által leírtakhoz hasonlóan az általunk megvizsgált összes törzs termelt equi-faktorokat, amelyek a *Staphylococcus aureus* β -toxinjával kifejezett, teljes β -hemolízist idéztek elő. Eredményeink alátámasztják Prescott és mtsai. (1982) azon véleményét, mely szerint az equi-faktorok termelése a *R. equi* állandó és megbízható tulajdonsága és használható a törzsek identifikálásában. Az identifikálás során azonban minden esetben a *S. aureus*-t használatát javasoljuk. A *Listeria monocytogenes*-nek a *R. equi*-vel a CAMP-próbában való használata során kapott eredmények az irodalmi adatok (Nakazawa és Nemoto, 1980; Quinn és mtsai., 1994), és saját tapasztalataink (nem közölt adatok) alapján is ellentmondásosak. A *L. monocytogenes*-t ebben a

reakcióban használva nem csak a baktériumtörzstől, hanem a véresagar (vér) minőségétől is függhet az eredmény.

A biokémiai tulajdonságok közül a törzsek az indol- és a zselatináztermelés, valamint a szénhidrátokból való savtermelés hiánya vonatkozásában egységesen, az irodalmi adatok többségével (McKenzie és Donald, 1979; Prescott, 1991) megegyező módon viselkedtek.

Az általunk megvizsgált valamennyi törzs termelt kataláz enzimet, ami a legtöbb irodalmi adattal összhangban áll (Goodfellow és mtsai., 1982; Prescott, 1991; Bern és Lämmler, 1994).

Az oxidáz enzim termelése tekintetében az irodalom nem egységes, egymásnak ellentmondó adatokkal találkozhatunk. Az irodalmi adatok többsége szerint a *R. equi* oxidáz-negatív (Prescott, 1991), és csak kivételesen találkozhatunk oxidáz pozitív törzsekkel (Prescott és mtsai., 1982). Saját tapasztalataink ennek éppen az ellenkezőjét támasztják alá. Az általunk megvizsgált törzsek mindegyike termelt oxidáz enzimet. Egyes törzsek esetén az oxidáz-próba során kialakuló színreakció gyenge volt, és csak akkor látszott, ha baktériumokat kis halom formájában tettük a megnedvesített szűrőpapírra, de a törzsek többsége kifejezetten erős színreakciót adott. Adataink így Davis és Newton (1969) eredményeit erősítik meg és ellentmondanak a Marsh és Graevenitz (1973), Barton és Hughes (1980), Takai és mtsai. (1985), valamint Drancourt és mtsai. (1992) eredményeinek. Az egymástól ilyen mértékben eltérő eredmények az oxidázreagens minőségbeli eltéréseiből, vagy valamilyen más tenyésztéssel összefüggő (pl. buroktermelés mértéke) tulajdonságból adódhatnak.

Ureázaktivitással a megvizsgált hazai törzsek 91,24%-a, míg a típustörzsek 100%-a rendelkezett. Ez az eltérés valószínűleg csak a mintaszámbeli különbségekből adódott. Ezek az eredmények az irodalmi adatok többségével összhangban állnak (Prescott és mtsai., 1982; Fuhrmann és Lämmler, 1997; Soedarmanto és mtsai., 1997, 1998; Bizet és mtsai., 1997). Bern és Lämmler (1994) viszont az általuk megvizsgált állati eredetű törzseknek csak 6%-át, míg az emberekből izolált törzsek 31%-át találták ureáz pozitívnak. Ezeket az eltéréseket feltételezésünk szerint az API Coryne lemez használata eredményezte. Bern és Lämmler (1994) az általuk meghatározott 30 törzs közül összesen 5 törzset (16,67%) találtak ureáz-pozitívnak. Ez az érték összhangban áll az API Coryne adatbázisában található *R. equi*-re vonatkozó 15%-os értékkel. Ezek alapján feltételezzük, hogy az API Coryne tesztsíkban alkalmazott ureáz-próba érzékenysége kisebb, mint a hagyományos ureáz-tesztéké.

A törzsek többsége (típustörzsek 100%-a, a hazai izolátumok 94,16%-a) képes volt a nitrátot nitritté redukálni, amely arány megfelel az irodalomban fellelhető adatoknak (Prescott, 1991; Bern és Lämmler, 1994; Fuhrmann és Lämmler, 1997; Bizet és mtsai., 1997). Az API Coryne adatbázisában a *R. equi* törzsek 85%-át tartják nitrátredukcióban pozitívnak. Az ureáz-negativitással összesen 12 törzs esetén találoztunk, az ureázaktivitás és a nitrátredukció együttes hiányával azonban csak egy törzs esetén. Ezen eredmények alapján nem tudjuk megerősíteni, hogy ezen két tulajdonság hiánya gyakran együttesen fordul elő (van Etta és mtsai., 1983; Müller és mtsai., 1988; Novak és mtsai., 1988; Nordmann és mtsai., 1992).

A *R. equi* törzsek H₂S-termelésében különbségek vannak (Barton és Hughes, 1980; Prescott, 1991). Az általunk megvizsgált típustörzsek 62%-a, a hazai izolátumoknak pedig 27,74%-a termelt H₂S-t. Az emberből és a sertésből származó törzsek azonos arányban, kb. 50%-ban termeltek H₂S-t, míg a lovakból izolált törzsek kb. 35%-ban, a talajból izolált törzsek pedig csak kb. 10%-ban voltak erre képesek. Kaura és Mutimer (1987) által megvizsgált törzsek 62,5%-a rendelkezett ezzel a tulajdonsággal.

Bár az egyes biokémiai reakciók pozitivitásának arányában voltak különbségek a különböző eredetű *R. equi* törzsek között, de egyetlen olyan tulajdonságot sem tudtunk kimutatni, amelyik csak bizonyos eredetű törzsekre lenne jellemző.

Az általunk összegyűjtött összes, tenyésztési, morfológiai és biokémiai tulajdonságai alapján *R. equi*-nek meghatározott törzsből kivont DNS-ből polimeráz láncreakció segítségével ki tudtuk mutatni a *R. equi*-re jellemző 450 bp méretű DNS szakaszt.

Eredményeink megerősítik, hogy nem csak a kórtani esetekből, hanem a környezeti mintákból származó izolátumok esetén is a klasszikus tenyésztési, morfológiai és biokémiai vizsgáló módszerek együttesen alkalmasak a *R. equi* fajszintű meghatározására. Az azonosítás

azonban elvégezhető a 16S rRNS gén 450 bp hosszúságú specifikus DNS szakaszának polimeráz láncreakció segítségével való kimutatásával is.

6.4. Enzimaktivitás

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az általunk megvizsgált összes törzs rendelkezett alkalikus- és savanyú foszfatáz, leucin-, valin- és cisztin-arilamidáz, α - és β -glükózidáz, valamint naftol-AS-BI-foszfohidroláz aktivitással. A törzsek között különbséget csak két enzim (eszteráz (C4), eszteráz lipáz (C8)) esetén találtunk. A törzsek eredete és enzimaktivitása között lényeges különbséget csak az eszteráz (C4) aktivitása esetén figyeltünk meg, ugyanis az emberekből izolált törzsek ilyen enzimaktivitással nem rendelkeztek, míg a más eredetű törzseknek kb. a fele rendelkezett ezzel az enzimmal.

Az általunk kapott eredmények részben megegyeznek a szakirodalomban fellelhető adatokkal (Barton és Hughes, 1980; Mutimer és Woolcock, 1980; Prescott, 1991; De La Pena-Moctezuma, 1996), egyes esetekben azonban eltéréseket találtunk. A Kaura és Mutimer (1987) által megvizsgált törzseknek 84%-a rendelkezett alkalikus foszfatázzal, míg a Goodfellow és mtsai. (1990) által megvizsgált törzsek nem rendelkeztek alkalikus foszfatázzal és a törzseknek csak 90%-a mutatott savanyú foszfatáz aktivitást. De La Pena-Moctezuma és mtsai. (1996) által API ZYM tesztsíkkal megvizsgált 5 törzs mindegyike rendelkezett eszteráz lipáz (C8) aktivitással, de egyik törzsben sem lehetett eszteráz (C4) aktivitást kimutatni. Hat enzim aktivitásáról pedig, bár ugyanazt a rendszert használták, mint mi, nem tesznek említést. Bern és Lämmler (1994) API Coryne tesztsíkot használva 30 törzset vizsgált meg, amelyek közül 26 (86,7%) rendelkezett α -glükózidáz aktivitással, de egyetlen törzsben sem tudtak β -glükózidáz aktivitást kimutatni.

Az általunk használt API ZYM rendszer a konstitutív enzimek vizsgálatára szolgál, de valószínűleg a vizsgálandó baktérium elszaporítására használt táptalaj is befolyásolhatja az eredményeket. Mi a vizsgálataink során két alkalommal közönséges agaron passzáltuk a törzseket, mielőtt ráoltottuk volna a lemezre, így az általunk vizsgált különböző eredetű törzsek eredményei egymással összehasonlíthatók. Az egyes irodalmi adatokban tapasztalható eltérések feltételezésünk szerint a különböző táptalajok használatában, illetve az eredmények szubjektív kiértékelésében keresendők.

6.5. Szénforrás-hasznosítás

A szakirodalomban fellelhető adatok szerint a szénforrás-hasznosítás vizsgálatán alapuló BIOLOG (Biolog, Inc., Hayward, Kanada) identifikáló rendszert eddig a *R. erythropolis* (Wang és Krawiec, 1994) és a *R. fascians* (Harris-Baldwin és Gudmestad, 1996) meghatározására használták.

Egyetlen irodalmi forrásban olvashatunk csak (De La Pena-Moctezuma és mtsai., 1996) ezen rendszernek - a *R. equi* szénforrás-hasznosításának vizsgálatára való - a használatáról, a szerzők azonban mind a Gram-negatív, mind pedig a Gram-pozitív baktériumok meghatározására szolgáló lemezre leoltották az általuk vizsgált kis számú (5) törzset, az eredményeket azonban más baktérium-meghatározó rendszerek eredményeivel közösen, ellentmondásoktól sem mentesen közölték. A szerzők a kapott szénforrás-hasznosítási profil számítógépes kiértékeléséről nem tettek említést.

Bizet és mtsai. (1997) a szénforrás-hasznosítás vizsgálatára alkalmas Biotype-100 (bioMérieux, Franciaország) lemezt használták több más rokon faj mellett 12, lovakból és emberekből származó *R. equi* törzs jellemzésére. A két rendszer azonban csak 35%-os átfedést mutat az alkalmazott szénforrásokat illetően.

A Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Goodfellow, 1994) által közölt szénforrás-hasznosítási adatok túlnyomó többsége olyan szénforrásokat (11) nevez meg, amelyeket a BIOLOG rendszer nem tartalmaz. A maltózt olyan szénforrásnak minősíti, amelyet a *R. equi* nem képes hasznosítani, bár az általunk megvizsgált típus-törzsek közül egy, a hazai izolálású törzsek közül pedig kettő képes volt azt felhasználni. A mannózzal kapcsolatos információt viszont, amely szerint a törzsek többsége hasznosítani tudja, vizsgálataink alátámasztották.

A De La Pena-Moctezuma és mtsai. (1996) által végzett szénforrás-hasznosítási vizsgálatok eredményeinek csak egy részét tudjuk megerősíteni (Tween 40, Tween 80, α -D-glükóz, L-tejsav és

a Glicerol hasznosítását), mert a hiányos és ellentmondásos adatközlésük nem teszi lehetővé az eredmények korrekt egybevetését.

A Bizet és mtsai. (1997) által használt Biotype-100 rendszer hat olyan szénforrást tartalmazott, amelyek a BIOLOG rendszerben is megtalálhatók, és mindkét rendszerben a vizsgált törzsek képesek voltak hasznosítani ezeket. Ezen szénforrások esetén egy kivétellel (borostyánkősav) a két rendszerben vizsgált törzsek hasonló módon viselkedtek. A borostyánkősavat a Bizet és mtsai. (1997) által vizsgált törzsek mindegyike képes volt hasznosítani, a magyarországi törzsek közül viszont csak egy.

A típus-törzsek hazai izolálású törzsekhez viszonyított lényegesen kisebb aktivitását azzal magyarázzuk, hogy a típus-törzseket kb. 20-25 évvel ezelőtt izolálták, és az elmúlt években „labortörzsek”-ként sokkal kisebb környezeti terhelésnek voltak kitéve, mint a „vad” törzsek. Hat szénforrás (gentiobióz, D-mannóz, D-ribóz, szalicin, ecetsav, propionsav) esetén találtunk jelentős (legalább 30%-os) különbséget a típus-törzsek és a hazai izolátumok között. Ezekben az esetekben a hazai izolálású törzsek jelentősebb arányban tudták hasznosítani az adott szénforrásokat. A BIOLOG adatbázis és a hazai törzsek szénforrás-hasznosítása között kilenc szénforrás (dextrin, gentiobióz, D-mannóz, szalicin, turanóz, ecetsav, α -keto-valeriánsav, D-tejsav metilészter, adenzin) esetén találtunk 30%-nál nagyobb eltérést.

A különböző eredetű törzsek szénforrás-hasznosítás során mutatott eltéréseit törzsfá segítségével szemléltettük (**8. ábra**, 71. oldal). Nagyon érdekes, hogy a különböző eredetű törzsek a törzsfán jól elkülönülő csoportosulást alkotnak, és a sertés eredetű törzsek az esetek többségében az emberi eredetű törzsek társaságában foglalnak helyet.

Az eredet szerinti összehasonlító vizsgálatok, valamint az eredmények alapján készített törzsfá elemzése világít rá arra, hogy ezen anyagcsere-profil vizsgálatok alkalmasak lehetnek járványtani vizsgálatok végzésére, de különböző baktériumtörzsek azonos eredetének meghatározására is.

A BIOLOG baktériumazonosító rendszer szoftvere a 4 és a 48 óráig tartó inkubációt követő leolvasás után, valamint a 24 óráig tartó leolvasást követően 13 törzs esetén a törzseket *R. equi*-nek, míg a 24 óráig tartó leolvasást követően 18 törzset *Corynebacterium hoagii*-nek határozott meg. A *C. hoagii* fajt 1995-ben a *R. equi* fajba sorolták át (Ruimy és mtsai., 1995). Mindezek figyelembevételével a BIOLOG rendszert alkalmasnak találtuk a *R. equi* nagy pontossággal való meghatározására.

Vizsgálataink eredményei tehát hiánypótlóak abban a vonatkozásban, hogy viszonylag nagy számú (31), különböző eredetű *R. equi* törzs szénforrás-hasznosításához, valamint a BIOLOG rendszer diagnosztikai munkában való felhasználhatóságához szolgáltatunk adatokat. Vizsgálataink ugyanakkor rámutattak a BIOLOG szoftver adatbázis rendszeres felfrissítésének fontosságára is.

6.6. Antibiotikum-érzékenység

A szakirodalomban viszonylag sok olyan közleménnyel találkozhatunk, amelyek a *R. equi* törzsek antibiotikum-érzékenységére vonatkozóan korongdiffúziós módszerrel kapott adatokat közölnek. Ez a módszer kivitelezését tekintve egyszerűbb, de az eredmények felhasználhatósága vonatkozásában korlátozottabb információt ad.

Az adott antibiotikum adott baktériumtörzsre vonatkozó minimális gátló koncentrációjának (MIC) ismeretében azonban, ha az antibiotikum adott fajra jellemző farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságait is ismerjük, akkor könnyebben megítélhető az antibiotikum várható hatásosságának a kérdése. Vizsgálataink során három fajból (emberből, lóbol, sertésből) és talajból izolált, összesen 20 *R. equi* törzs esetén határoztuk meg 10 antibiotikum minimális gátló koncentrációját.

Prescott és Nicholson (1984), valamint Nordmann és Ronco (1992) eredményeivel összevetve az általunk megvizsgált törzsek megközelítőleg azonos érzékenységet mutattak rifampicin, eritromicin, minociklin és penicillin G vonatkozásában, magasabb MIC értékeket kaptunk azonban vankomicin, gentamicin, amikacin, oxitetraciklin és amoxicillin esetén. A magasabb MIC értékek, az irodalomban említett vizsgálatok óta eltelt 10-20 év, illetve a

megvizsgált törzsek alacsony számával (5 törzs) magyarázható. A törzsek eredete és MIC értéke között nem tudunk összefüggést kimutatni.

A *R. equi* okozta kórképek gyógykezelésében legszélesebb körben elterjedt és máig is javasolt terápia az eritromicin-rifampicin kombináció (Hillidge, 1987; Sweeney és mtsai., 1987). Takai és mtsai. (1997) a beteg állatokból kitenyésztett *R. equi* törzseket abban az esetben tekintették érzékenynek rifampicinre, ha MIC értékük 12,5 µg/ml alatti volt. A bélcsatornából kitenyésztett törzsek esetén a 12,5 µg/ml MIC értékű törzseket is érzékenynek tekintették. Giguére és Prescott (1997) viszont a 0,06 µg/ml vagy az ennél kisebb MIC-értéket mutató törzseket tekintették érzékenynek. Ez utóbbi szempont alapján csak 3 törzs (2 sertésből, 1 pedig emberből izolált) tekinthető érzékenynek a megvizsgált 20 törzs közül, a Takai és mtsai. (1997) által javasolt határértékek alapján viszont mind a 20 törzs érzékenynek tekinthető rifampicinnel szemben. Giguére és Prescott (1997) szerint a 0,25 µg/ml, vagy az ennél kisebb MIC értékű törzseket lehet érzékenynek tekinteni az eritromicinre. Ez alapján az általunk megvizsgált törzsek közül 7 törzs (ember: 2, ló: 3, sertés: 1, talaj: 1) tekinthető rezisztensnek, 13 pedig érzékenynek az eritromicinre. Ezen adatok értékelésénél azonban a *R. equi* kutatásban előjáró két kutatócsoport a rifampicin érzékenységre vonatkozó határértékeinek ilyen mértékű (200×) eltérése óvatosságra int.

6.7. Szerológiai vizsgálatok

A *R. equi* szerotipizálására két rendszer létezik. Prescott rendszere (1981) agargél-precipitáció segítségével 7 szerotípust különböztet meg. Nakazawa (1983b) tárgylemez-agglutinációt használva 27 szerotípust különített el. A két szerotipizálási rendszer nem feleltethető meg teljes mértékben egymásnak, az agargél-precipitációban és a tárgylemez-agglutinációban részben más antigének is működnek. Lämmler és mtsai. (1997) 98, különböző eredetű *R. equi* törzset mindkét rendszerben szerotipizáltak, amely során míg a Prescott rendszerben 5 szerotípusba tudta a törzseket besorolni, és 12 törzs nem volt besorolható, addig a Nakazawa-féle rendszerben 11 szerotípusba tagolódtak be a törzsek, 3 törzs viszont egyik szerotípusba sem volt besorolható. Zimmermann (1996) a típus-törzseken végzett vizsgálatai alapján megállapította, hogy a Prescott-féle 2-es antigén a Nakazawa-féle 3-as és 16-os, a Prescott-féle 6-os antigén a Nakazawa-féle 1-es és 17-es, a Prescott-féle 7-es antigén pedig a Nakazawa-féle 9-es és 18-as szerotípussal szemben termelt savóval reagál. Egyik rendszer sem tekinthető teljesnek, mivel mindkét szerotipizálási rendszer esetén találtak be nem sorolható törzsekkel (Mutimer és mtsai., 1982; Zimmerman, 1996; Lämmler és mtsai., 1997). A Nakazawa rendszer esetén kevesebb be nem sorolható törzset találtak, mint a Prescott rendszere esetén, ennek ellenére ez utóbbi rendszer elterjedtebb, szélesebb körben használt.

Szerológiai vizsgálataink során az általunk összegyűjtött összesen 379 *R. equi* törzs Prescott-féle rendszerben való szerotipizálását végeztük el. Az ebbe a rendszerbe be nem sorolható 90 törzs közül 89-et pedig 4 jól elkülönülő, egymással és a Prescott-féle típus-törzsekkel keresztreakciót nem adó csoportba tudtuk besorolni. Vizsgálataink arra utalnak, hogy a *R. equi*-nek agargél-precipitációs próbával vizsgálva legalább négy új (általunk javasolt: „8”-as, „9”-es, „10”-es, „11”-es) szerotípusa létezik.

A típus-törzsekkel szembeni hiperimmun savó termelése során az eredeti leírástól (Prescott, 1981) eltérően a törzseket 37°C helyett 30°C-on tenyésztjük. Egyrészt ez a *R. equi* szaporodásának optimális hőmérséklete, másrészt pedig ezen a hőmérsékleten a virulenciafehérjék (vap) nem fejeződnek ki, így nem kellett tartanunk a különböző szerkezetű poliszacharid burokkal rendelkező, de azonos virulenciafehérjét kifejező törzsek között fellépő keresztreakciók kialakulásától.

A csikók tüdejéből, belfodri- és gátorközi nyirokcsomóiból (bizonyítottan kórtani esetek) kitenyésztett törzsek túlnyomó többsége (81,8%-a) az 1-es szerotípusba tartozott. Az irodalmi adatokban az 1-es szerotípusú törzsek, ha nem is ilyen nagy mértékben, de szintén dominálnak (Prescott, 1981; Mutimer és mtsai., 1982; Lämmler és mtsai., 1997). Lovakban az 1-es szerotípust követően a leggyakrabban az általunk javasolt „8”-as (10,9%) szerotípusú, ezt követően pedig a 2-es (3,6%) és 3-as (3,6%) szerotípusú törzsek fordultak elő.

A csikó orrtampon- és végbéltampon-mintákból kitenyésztett törzsek sajátos csoportját képezik a kórtani és a környezeti mintáknak. Ezen törzsek többsége (70,3%) szintén az 1-es

szerotípusba tartozott, kisebb részük pedig a 2-es (12,9%) és az általunk javasolt „8”-as (7,9%) szerotípusba, de előfordultak közöttük „9”-es (3%), „10”-es (3%), 3-as (2%) és „11”-es (1%) szerotípusba tartozó törzsek is. A részben környezeti minta jelleg a törzsek diverzitásában is megnyilvánult.

A lovak környezetéből gyűjtött talajból kitenyészített törzsek 64,6%-a tartozott az 1-es szerotípusba, 18,8%-a az általunk javasolt „11”-es szerotípusba, 4,2%-uk a 3-as szerotípusba, és 2,2%-uk a 2-es, a 4-es és az általunk javasolt „8”-as, „9”-es és „10”-es szerotípusokba.

Vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy lovakban az 1-es szerotípusú törzsek tudnak leginkább megtelepedni, bennük kórtani elváltozásokat előidézni, és környezetükben feldúsulni, de lényegesen kisebb számban más szerotípusok – elősorban az általunk javasolt „8”-as – is megbetegíthetik a lovakat.

A lovakkal szemben a sertések áll alatti nyirokcsomóiban a 2-es szerotípusú törzsek domináltak (50,9%), míg az 1-es szerotípusú törzsek csak 15,57%-ban fordultak elő, és összesen csak kettő (1,14%) 3-as szerotípusú törzset találtunk. A sertésekből származó törzsek között kétszer akkora (30,86%) volt a be nem sorolható törzsek aránya, mint a lovakból és azok környezetéből származó törzsek között (16,67%). A be nem sorolható törzsek között két általunk javasolt új szerotípus a „11”-es (64,8%) és a „9”-es (31,5%) dominált. Tehát sertések között a leggyakrabban előforduló 2-es szerotípust (50,9%) követően az általunk új szerotípusnak javasolt „11”-es (20,96%), az 1-es (14,57%), majd pedig a „9”-es (10,17%) szerotípus fordult elő.

Vizsgálataink eredményei a 2-es szerotípus dominanciáját illetően nagyon jól korrelálnak a szakirodalomban található adatokkal. Az általunk elért öt publikáció alapján az eddig megvizsgált összesen 281 sertés eredetű *R. equi* törzs 50,18%-a tartozott a 2-es szerotípusba (Prescott, 1981; Mutimer és mtsai., 1982; Katsumi és mtsai., 1991; Zimmermann, 1996; Lämmler és mtsai., 1997), és a törzsek 27,76%-át nem lehetett a Prescott-féle szerotipizálási rendszerbe besorolni. A fentebb említett irodalmi hivatkozások közül egyedül Prescott közölt adatokat az 1-es szerotípus dominanciájáról (46%) a 2-es szerotípussal szemben (29%), de ehhez hasonló adatokat a későbbiek során egy szerző sem publikált, sőt kisebb számú törzs vizsgálata esetén a 2-es szerotípus még nagyobb dominanciáját (60%, 90%) erősítették meg (Zimmermann, 1996; Lämmler és mtsai., 1997).

Az emberi eredetű törzsek között a sertésekhez hasonlóan szintén a 2-es szerotípus dominált (75%). A Prescott-féle rendszerbe be nem sorolható két törzs közül az egyik az általunk újonnan javasolt „10”-es, a másik pedig a „11”-es szerotípusba tartozott. A Fuhrmann és Lämmler (1997) által megvizsgált 22 emberi törzs közül 8-at (36,36%) az 1-es szerotípusba, 9-et (40,9%) a 2-esbe, két törzset (9,1%) a 6-osba, 1-1-et (4,55%) pedig a 3-as és az 5-ös szerotípusba tudtak besorolni. A 22 törzs közül csak egy (4,55%) törzset nem lehetett besorolni egyik szerotípusba sem. Prescott (1981) közleményében a megvizsgált hét emberi törzs közül négy az 1-es, kettő a 2-es, egy pedig a 7-es szerotípusba tartozott. A hazai emberi izolátumokban a 2-es szerotípus erős dominanciája, vagy az alacsony törzsszám miatt a véletlen műve, vagy pedig az ember sertésekhez és a lovakhoz hasonlóan rendelkezik egyfajta szerotípus preferenciával, amely révén a kettes szerotípusú törzsek az embert nagyobb valószínűséggel képesek megbetegíteni, mint más szerotípusok.

Az emberekben és a sertésekben domináló 2-es szerotípusú *R. equi* törzsek felvetik az esetleges járványtani kapcsolatot e két faj között.

A törzsek izolálásának földrajzi helyét és a szerotípusait elemezve megállapítható, hogy azokon a településeken, ahol nemcsak tüdőtüdőgyökből, hanem orr-, és végbéltamponból kitenyészített törzseket is vizsgáltunk és a megvizsgált törzsek száma is nagyobb volt, ott nagyobb a törzsek diverzitása, többféle szerotípusba voltak a törzsek besorolhatók. Vizsgálataink és az irodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy különböző földrajzi területeken az egyes szerotípusok egymáshoz viszonyított előfordulási aránya különböző lehet. A 4-es szerotípusú törzset pl. Prescott első leírását követően, aki az általa megvizsgált törzsek 4%-át sorolta ebbe a szerotípusba, csak mi találtunk (1 törzs), az irodalomban más közlemény nem szól ezen szerotípus előfordulásáról (2. táblázat, 24. oldal, 22. táblázat, 75. oldal).

6.8. A 16S riboszómális RNS gén vizsgálata

A 16S riboszómális RNS gének megtalálhatók minden baktérium genomjában, és ezekben az idő előrehaladtával lassú ütemben mutációk halmozódnak fel, amely révén „molekuláris óráként” használhatók (Woese, 1987). A 16S rRNS gének variábilis régióinak szekvenciái egyedülálló információt szolgáltatnak valamennyi baktériumfajról és értékes információt nyerhetünk az ezek közötti rokonsági kapcsolatokról is. Másrészt viszont, a 16S rRNS gén, éppen a 16S rRNS szerkezeti állandóságának kényszere miatt, olyan konzervatív régiókkal rendelkezik, amelyek minden baktériumban megtalálhatók.

A rhodococcusok, de más baktériumok esetén is a leghatékonyabb taxonómiai eszköz a 16S riboszómális RNS gén szekvencia-analízise. Két adott baktérium esetén ezen gén szekvenciájának változatossága felhasználható a köztük fennálló rokonsági fok megállapítására (Bell és mtsai., 1998). Azok a baktériumok tartozhatnak egy azonos fajba, amelyeknél a 16S rRNS gén szekvenciájának hasonlósága 97% vagy a feletti (Stackebrandt és Goebel, 1994). A *Rhodococcus* genuson belül a 16S rRNS gén szekvencia-analízise alapján a filogenetikai fán öt jól elkülönülő csoportot állítottak fel (Rainey és mtsai., 1995b; Bell és mtsai., 1998; Goodfellow és mtsai., 1998): I./ *R. erythropolis*, *R. globerulus*, *R. marinonascens*, *R. opacus*, *R. percolatus*, II./ *R. coprophilus*, *R. zopfii*, *R. rhodochrous*, *R. ruber*, III./ *R. rhodnii*, IV./ *R. fascians*, V./ *R. equi*.

Az interneten elérhető adatbázisokból beszerzett, 12 különböző *R. equi* törzs, 16S rRNS gén szekvencia-analízisére kiterjedő előzetes vizsgálatok szerint ezen régióban kisebbfokú bázis-sorrendbeli különbségek figyelhetők meg. Az általunk megszekvenált 440 bp-nak megfelelő régió 360 bp-ja esetén 7 törzs szekvenciáit (AJ272467-73) figyelembe véve 33 bázishelyen volt báziseltérés a többséghez viszonyítva (**2. és 3. melléklet**, 132. ill. 136. oldal). Vizsgálataink során 7 típusú törzs és különböző eredetű, Magyarországon izolált 24 *R. equi* törzs 16S rDNS régiójának részleges vizsgálatát végeztük el abból a célból, hogy az esetlegesen meglévő különbségeket feltárjuk, és a különbségek alapján filogenetikai elemzést végezzünk.

Környezeti és kórtani mintákból izolált, a *R. equi* fajnak meghatározott 24 baktériumtörzs és 7 típusú törzs 16S rRNS gén régiójának RFLP vizsgálatával nem tudtunk különbségeket kimutatni. Tizenegy törzs esetén az első 440 bp-ra kiterjedő szekvencia-analízissel a törzsek között két törzs esetén egy-egy bázisra kiterjedő különbséget találtunk. Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a különböző eredetű *R. equi* törzsek 16S rRNS génje a génbank adatbázisa alapján várt értéknél nagyobb homologitást mutatott (**2. melléklet**).

A génbankból származó szekvenciákban meglévő különbségek vagy szekvenálási hibákból adódhattak, vagy pedig nagyobb számú, egymástól földrajzi értelemben nagyobb távolságról származó *R. equi* törzs vizsgálata esetén lehetne csak ebben a genomrégióban nagyobb mértékű diverzitást kimutatni.

6.9. Plazmidprofil

Magyarország különböző területeiről (43 településről származó), összesen 369 *R. equi* törzs virulenciaplazmid-hordozását is megvizsgáltuk. Munkánk első részében a törzsekből kivont DNS-mintákban polimeráz láncreakció segítségével a virulenciafehérjék (*vapA*, *vapB*) génjét próbáltuk kimutatni.

Négy törzs kivételével, 12 magyarországi gazdaságból származó csikók kórtani elváltozásaiból (tüdőtülyogból, bélfodri- és gátorközi nyirokcsomóból) kitenyészett valamennyi törzs virulens volt, tehát rendelkezett a *vapA*-génnel. A négy törzs, amelyik ezzel a génnel, ill. az ezt kódoló plazmiddal nem rendelkezett, valószínűleg a többszöri átoltás, illetve a hosszú időn keresztül cukormentes lágyagarban történő tárolás során veszítette el virulenciaplazmidjét. Tekintettel arra, hogy az általunk megvizsgált kórtani esetekből izolált baktériumtörzsek az ország különböző területeiről származtak, vizsgálataink alapján megállapítható, hogy Magyarországon a virulens *R. equi* törzsek széleskörűen elterjedtek.

A 8 gazdaságból származó csikókból gyűjtött orr- és végbéltampon-mintákból kitenyészett törzsekben, ezen minták kettős jellege (környezeti-kórtani) ellenére is nagyon magas (85-87%) volt a virulens törzsek aránya az irodalomban fellelhető adatok tükrében (Hashikura és mtsai., 2000). A két nagy ménes területén gyűjtött talajmintákból kitenyészett törzsek jelentős része (28% ill. 82,6%)

virulens volt, ami arra utal, hogy ezen méneselek talajában a hosszú idő alatt a virulens törzsek nagymértékben feldúsultak. A lovakból és lovak környezetéből izolált törzsek között mérsékelt virulens (vapB-gént hordozó) törzset nem találtunk.

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a sertések áll alatti nyirokcsomóiból származó *R. equi* törzsek majdnem mindegyike mérsékelt virulens volt és a vapB felületi fehérjét fejezte ki (Takai és mtsai., 1996b; Madarame és mtsai., 1998). Ezzel szemben az általunk megvizsgált, Magyarország 29 településéről származó, sertések áll alatti nyirokcsomóiból izolált 167 *R. equi* törzs többsége (71,9%) avirulensnek bizonyult, amelyek nem hordoztak virulenciaplazmidot. A törzsek egy része (27,5%) azonban hordozta a vapB-gént, tehát mérsékelt virulensnek tekinthető. A sertésből származó törzsek között csak egy virulens (vapA-gént hordozó) törzset találtunk. Eredményeink arra utalnak, hogy a virulens *R. equi* törzsek csak nagyon ritkán fordulnak elő a hazai sertésekből izolált törzsek között. A hazai sertésekben az avirulens törzsek magas arányú előfordulásának a természetes tartás (túrás) miatti nagyobb baktérium-expozíció, ill. az esetlegesen fennálló takarmányozással összefüggő szájnyálkahártya sérülések lehetnek az okai.

Az emberi izolátumok túlnyomó többsége (71,4%) mérsékelt virulens, kisebb részük (28,6%) pedig avirulens volt.

A virulenciaplazmidok típusát RFLP képük alapján állapítottuk meg. Vizsgálataink kimutatták, hogy a virulens, csikókból és talajból izolált *R. equi* törzsek többsége, valamint az egy sertésből származó törzs 85 kbp méretű I-es típusú plazmidot, kisebb részük pedig 87 kbp méretű I-es típusú plazmidot tartalmazott. Ugyanilyen típusú plazmidokat Franciaországban, Olaszországban, Törökországban, Észak- és Dél-Amerikában, valamint Ausztráliában élő csikókból izolált törzsekben találtak (Takai és mtsai., 1999; Becu és mtsai., 2000; Ozgur és mtsai., 2000). A lovakból és lovak környezetéből származó avirulens törzsek nem hordoztak virulenciaplazmidot, de közülük néhány (13 törzs) ismeretlen funkciójú plazmiddal rendelkezett. A különböző méretű, ismeretlen funkciójú plazmidok nagyobb arányban fordultak elő a hazai izolátumokban, mint azt korábban Japánban gyűjtött környezeti mintákból izolált törzsekben találták (Takai és mtsai., 1995a).

A sertésekből származó mérsékelt virulens törzsek többsége 95 kbp méretű 5-ös típusú virulenciaplazmidot hordozott, de néhány (7 törzs) más típusú plazmidot is találtunk. Néhány törzs a korábban is ismert 1-es, 4-es, 6-os, 7-es és 16-es típusú plazmidot hordozott, egy törzs pedig egy eddig ismeretlen új típusú virulenciaplazmiddal rendelkezett (**16. ábra**, 88. oldal).

Az emberi mérsékelt virulens törzsek mindegyike 95 kbp méretű 5-ös típusú plazmidot tartalmazott, pontosan olyat, mint amelyeket a hazai sertés eredetű mérsékelt virulens törzsek hordoztak. Takai és mtsai. (1995b) 5 országból (Ausztráliából, Franciaországból, Olaszországból, Dániából és az Amerikai Egyesült Államokból) származó AIDS-betegekből izolált *R. equi* törzsek vizsgálata során kimutatták, hogy a megvizsgált 29 törzs közül csak 8 (28%) volt avirulens, 7 törzs (24%) virulens, a törzsek többsége (14 törzs, 48%) pedig mérsékelt virulens volt. Ezzel szemben a hazai törzsek között virulens törzset nem találtunk, a 8 emberi eredetű törzs közül 6 (75%) mérsékelt virulens volt.

Vizsgálataink azt mutatják, hogy a magyarországi immundeficiens beteg emberekben ugyanolyan *R. equi* törzsek fordulnak elő, mint a sertésekben. Bár eddig nem vizsgáltuk, nagy valószínűséggel a mérsékelt virulens törzsek a sertések környezetében is jelen vannak.

6.10. Immun-hisztokémiai vizsgálatok

Az észlelt makroszkópos és mikroszkópos elváltozások jellemzőek a lovak *R. equi* fertőzése során kialakuló folyamatokra (Dungworth, 1993). Az általunk előállított *R. equi*-specifikus IgG a leírt immun-hisztokémiai reakcióban erős színreakcióval, háttérfestődés nélkül mutatta ki a kórokozót. Az ellenanyag a *R. equi*-vel rokonságban álló *M. bovis*-szal és *M. paratuberculosis*-szal ugyanakkor nem reagált. A pozitív immun-hisztokémiai reakciót, hasonlóan másokhoz (Ishino és mtsai., 1992; Madarame és mtsai., 1996) mi is főleg a makrofág sejtek, ritkábban a neutrofil granulociták citoplazmájában láttuk, extracellulárisan csak elvétve voltak jelen. Néhány makrofágsejtben lévő baktériumtestet, mivel csak gyengén festődtek, ezzel a módszerrel sem lehetett biztosan jelezni. Ennek okát nem tudtuk kideríteni. Az immun-hisztokémiai reakciót

kapilláris elven működő rendszerben végeztük, melyben a reagensek egyenletesen fedték be a tárgylemezt. Foltokban jelentkező reakció kialakulása így itt nem valószínű. Az esetleges technikai hiba ellen szól az is, hogy néha az egy sejtben helyet foglaló baktériumok sem azonos intenzitással festődtek. Lehet, hogy a citoplazmában lévő baktériumok e reakcióban résztvevő epitópjai ezekben az esetekben már károsodtak, vagy valamilyen módon rejtve voltak a *R. equi* specifikus IgG elől. A korábbi leírásoknak megfelelően (Matsui és mtsai., 1989; Ishino és mtsai., 1992) a *M. bovis*-specifikus immunglobulin gyengébb festődést eredményezve és enyhe háttérfestődés mellett, a vizsgált eseteinkben is kötődött a *R. equi*-hez.

A csikók *R. equi* okozta fertőzése esetén, a klinikai tünetek sokszor már csak a betegség előrehaladott stádiumában jelentkeznek (Dungworth, 1993). Ennek ellenére az időben elkezdett, megfelelő gyógyszeres kezelés 70%-os gyógyulási arányt eredményezhet (Powell és Jackson, 1992). A baktérium izolálása és azonosítása akár 2-5 napot is igénybe vehet. A bakteriológiai vizsgálatot megelőzően antibakteriális kezelésben részesült állatból az izolálás még ennél is tovább tarthat (Prescott és Hoffman, 1993). Az általunk leírt immun-hisztokémiai eljárás eredményét az antibiotikum adása nem befolyásolta. A fagyasztott metszetben és a lenyomatban ugyanolyan jól ki tudtuk mutatni a kórokozót, mint a paraffinos metszetben. Elhullott csikóból e módszerrel, különösen a gennyesen beolvadt területekből a *R. equi* gyorsan és megbízhatóan kimutatható. A fagyasztott metszet előnye, hogy a szövettani morfológia is viszonylag jól látható, míg a lenyomat előnye, hogy nincs szükség kriosztátberendezésre.

A *R. equi* fertőzés élő állaton történő kórjelzésére a légszóspirátum citológiával kombinált bakteriológiai vizsgálata számít a legmegbízhatóbb módszernek (Giguere és Prescott, 1997). Virulens *R. equi*-vel kísérletesen fertőzött öt csikó légszóspirátumának vizsgálata során (Anzai és mtsai., 1997) a baktériumot, a fertőzést követő 8. napon tudták legkorábban izolálni, míg immun-fluoreszcens és PCR módszerrel azt csak a 10. naptól lehetett kimutatni. A klinikai tünetek csak a fertőzést követő 11. naptól kezdtek kialakulni. E szerzők a fertőzés legkorábbi kimutatására a baktérium izolálását javasolták. A fertőzés későbbi szakában azonban az immun-fluoreszcens és PCR módszert tartják megfelelőnek, mivel ezek feltehetően a már elpusztult vagy károsodott, egyébként már ki nem tenyésztendő baktériumokat is kimutatják. Mi immun-hisztokémiai módszerrel mindhárom, *R. equi*-fertőzés következtében elhullott állat légszövadékból nagy mennyiségű, főleg intracellularisan elhelyezkedő kórokozót tudunk kimutatni sok neutrofil granulocita kíséretében. Ismert, hogy az endémiásan fertőzött lóállományokban a klinikailag egészséges egyedekből is ki lehet tenyészteni a *R. equi*-t (Ardans és mtsai., 1986). Ezért a légszóspirátum tenyésztéses vizsgálatával párhuzamosan a gyulladással járó sejtek kimutatását célzó citológiai vizsgálat elvégzése is fontos. Az általunk leírt módszer előnye, hogy az izoláláshoz viszonyítva gyors (akár 2 órán belül elbírálható), és az immun-fluoreszcens vizsgálattal szemben egyúttal a citológiai vizsgálat elvégzésére is alkalmas.

Emberben és állatban a nem virulens, vapA antigénnel nem rendelkező törzsek is megbetegedést idézhetnek elő (Hondalus 1997, Davis és mtsai., 1999). Az immun-hisztokémiai diagnosztikában ezért elsősorban olyan ellenanyagok alkalmazása célszerű, amely a virulens és nem virulens *R. equi* törzseket is képes kimutatni. Egyes szerzők szerint a *R. equi*-vel szemben termelt poliklonális ellenanyag a virulens és az avirulens törzsekhez egyaránt képes kötődni (Madaramé és mtsai., 1996; Davis és mtsai., 1999). Az általunk előállított poliklonális *R. equi*-specifikus IgG az 1-es szerotípussal reagált. A lovakból izolált *R. equi* törzsek túlnyomó többsége az 1-es szerotípusba tartozik (Lämmle és mtsai., 1997), ezért ez az IgG megbízhatóan alkalmazható lovakban a *R. equi* okozta megbetegedések diagnosztikájában a leírt immun-hisztokémiai reakcióban.

Az orrvadékból készített kenetben ugyancsak láttunk a *R. equi* morfológiájának megfelelő baktériumokat. Az előállított *R. equi* specifikus IgG a lovak légutaiban egyébként gyakran előforduló *Streptococcus equi* ssp. *equi*-vel és a *Staphylococcus aureus*-szal nem reagált. A ló orrnyálkahártyáján, e fajokon túl igen sok más baktériumfaj is előfordulhat. Ezért e módszer alkalmazhatósága a *R. equi* kimutatására orrvadékból készített kenetből további vizsgálatokat igényel.

Ez az immun-hisztokémiai módszer gyorsan, és a bakteriológiai vizsgálattal megegyező, esetenként azt meghaladó érzékenységgel mutatja ki a *R. equi*-t elhullott csikók elváltozott

szerveiből, különösen a tályogokból. Vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy ezzel a módszerrel a *R. equi*-t élő állat légszóaspirátumából is ki lehet mutatni úgy, hogy egyúttal az alsóbb légutak esetleges gyulladási elváltozásai is kimutathatók.

6. 11. Vakcinázási kísérletek

Nagy szükség lenne hatékony *R. equi* vakcinára, mivel a csikók e baktérium okozta tüdőgyulladása világszerte előfordul, főként a fertőzés kezdetén nehezen felismerhető, és gyakran a hosszan tartó antibakteriális kezelés sem vezet eredményre. Több próbálkozás történt már a csikók immunizálására kolosztrális úton, hiperimmun savó alkalmazásával vagy aktív immunizálással, de az eredmények meglehetősen ellentmondásosak (Prescott és mtsai., 1979; Machang'u és Prescott, 1991b; Becu és mtsai., 1997). Ellenanyagok ugyan megjelennek a természetes módon fertőződött és a vakcinázott csikók vérsavóiban is, de ezek titere meglehetősen alacsony (Ellenberger és mtsai., 1984). A hiperimmun vérsavó adását egyesek eredményesnek tekintik, mások szerint viszont hatástalan vagy csak mérsékelt eredményeket ad (Madigan és mtsai., 1991; Martens és mtsai., 1991; Hurley és Begg 1995). A csikók vérsavójában ELISA-val maternális ellenanyagok közel 1 hónapos korig mutathatók ki (Hietala és mtsai., 1985). A *R. equi* okozta tüdőgyulladás klinikai tünetei gyakran már 4 hetes korban elkezdődnek és az ilyen korai természetes fertőzés a lassan kialakuló humorális és celluláris immunválasz miatt magas letalitással jár.

I./

Kísérleteink során két különböző vakcinát alkalmaztunk, amelyek közül az egyik egy EHV-2 vírustörzset is tartalmazott, mivel ez a vírus magyarországi lóállományokban széles körben elterjedt és hasonló korú csikókat tud megbetegíteni, mint a *R. equi*, így hajlamosító tényező lehet a *R. equi* okozta tüdőgyulladás kialakulásában (Pálfi és mtsai., 1978). A csikók EHV-2 elleni vakcinázása, illetve maternális eredetű ellenanyagok jelenléte hozzájárul az EHV-2 légutakban való elszaporodásának megelőzéséhez, ami hozzájárulhat a *R. equi* okozta tüdőgyulladás egyik hajlamosító tényezőjének a kiküszöböléséhez. A vakcinatörzs gennyes tályogképződéssel járó tüdőgyulladásban elhullott csikó tüdejéből származott.

Vizsgálataink során a klinikai eredmények nagyon kedvezően alakultak, mivel sem *R. equi* okozta klinikai megbetegedést, sem pedig elhullást nem figyeltünk meg a vakcinázott csoportokban, a kontroll csoportban azonban 3 csikó elhullott, és 5 állat a *R. equi* fertőzésre jellemző légzőszervi klinikai tüneteket mutatott. Az „A” gazdaságban bár kontrollok nem voltak, de a vakcinázott csikók között nem alakult ki *R. equi* okozta tüdőgyulladás annak ellenére, hogy a kísérletet megelőző évben megszületett 21 csikóból 11 hullott el *R. equi* okozta tüdőgyulladásban. Az „A” és a „B” gazdaságban lévő csikók a bivalens vakcinát kapták, mivel ezekben az állományokban korábban mind az EHV-2, mind pedig a *R. equi* fertőzést megállapították. A „C” ménesben viszont csak a *R. equi* fertőzöttséget állapították meg. Az „A” ménesben a csikókat 3 alkalommal immunizáltuk, mivel ebben az állományban a 2 hónapos kor feletti csikók megbetegedését is megfigyelték.

Mivel a kolosztrumban és a 2-4 napos csikók vérsavóiban csak nagyon alacsony ellenanyag-szinteket tudtunk mérni, feltételezhetően a csikók *R. equi* okozta tüdőgyulladással szembeni védelme inkább a fiatal csikók ismételt vakcinázásának, mint a kancák oltásának volt az eredménye. Ezek a feltételezéseink összhangban állnak Madigan és mtsai. (1991), valamint Martens és mtsai. (1991) azon megfigyeléseivel, melyek szerint a kancák vakcinázásával nem lehetett megvédeni a csikókat a *R. equi* okozta tüdőgyulladással szemben. A „B” és a „C” ménesben a *R. equi*-vel és az EHV-2-vel szembeni ellenanyag-szintek az 5. héttől kezdtek emelkedni és a 9. hétre relatív magas titereket értek el, amely a legkifejezettebb a „C” ménesben volt ($5,5 \pm 1,8$ a vakcinázott csikókban és $2,7 \pm 1,2$ a kontrollokban). Eredményeink alátámasztják Hietala és mtsai. (1985) megfigyeléseit, akik kimutatták, hogy a csikók kolosztrális ellenanyagai kb. 30 napos korra ürülnek ki, amelyet a természetes fertőzés eredményeként az ellenanyag-szint 45-60 napos kor utáni emelkedése követ.

Az EHV-2-vel szembeni neutralizáló ellenanyag titerek 9 hetes korra („A” ménes, átlag: $5,2 \pm 1,4$) olyan értéket értek el (2 és 6 közötti, \log_2), mint amelyeket mások az átvészelt csikók savó-párjaiban mértek (Pálfi és mtsai., 1978). Egyes szerzők szerint a *R. equi* okozta megbetegedés

EHV-2-vel szembeni hiperimmun savó alkalmazásával önmagában is megelőzhető (Belák és mtsai., 1980).

II./

Tekintettel arra, hogy a *R. equi* virulens törzsei specifikus hajlamosító tényezők (vírusfertőzések) nélkül is képesek a csikók megbetegítésére, ezért további vizsgálatok váltak szükségessé abban a vonatkozásban, hogy egy egykomponensű, virulens, *R. equi* törzsből előállított inaktivált vakcina különböző módon adjuválva milyen ellenanyagválaszt képes indukálni a csikókban.

Kísérleteink eredményeként megállapítható, hogy inaktivált, alumínium-foszfáttal vagy olajjal adjuvált *R. equi* vakcina 4 és 6 hetes korban történő intramuscularis alkalmazásával a csikók vérsavójának ellenanyagszintje a kontroll állatokhoz képest, – amelyek csak a természetes *R. equi* expozíciónak vannak kitéve, – nagyobb mértékben emelhető abban az átmeneti időszakban, amikor a csikók leginkább fogékonyak a fertőzésre. A 4 és 6 hetes korban alkalmazott vakcinázás eredményeként az ellenanyagszint emelkedik, majd néhány hét múlva csökken, kb. 12 hetes korra csökken olyan mértékben, hogy erre az időszakra a vakcinázott és a kontroll állatok ELISA-titerei kiegyenlítődnek.

Annak ellenére, hogy a „D” ménesben a vakcinázott állatok alapvér-titerei tízes alapú logaritmusának átlaga csak 57%-a volt a kontroll állatok azonos módon számított értékének, a két vakcinázást követő 2 hét elteltével ez az arány megfordult (125%). A vakcinázás eredményezte kontrollhoz viszonyított titer-emelkedés függ az oltott állatoknak az oltás időpontjában fennálló ellenanyag-szintjétől és a környezeti expozíció mértékétől is. Az általunk vizsgált két csikóállomány környezeti feltételei között az alapvető különbség az volt, hogy az „E” ménes esetén a környezeti porexpozícióra lényegesen nagyobb lehetőség adódott (homokos talaj, extrém módon poros környezet). Ez a különbség a 4 hetes csikókból vett vérminták kiindulási titerében is megnyilvánult. Az „E”-állományból vett vérminták alapvéreinek titerei (átlag: 20) magasabbak voltak, mint a D-állomány esetén mért titerek (átlag: 10).

Az „E” gazdaságban a különböző vizsgálati csoportok alapvéreiben az ELISA-titerek átlagai lényeges különbséget mutattak annak ellenére, hogy a csoportokat a születés időpontjának megfelelően random módon alakítottuk ki. Tekintettel arra, hogy a két vakcinázott csoport alaptiterei eleve magasabbak voltak, a vakcinázással nem tudtunk további lényeges ellenanyagszint-emelkedést kiváltani, de a vakcinázott csoportok ellenanyag-titerei a kísérlet teljes ideje alatt a kontroll állatok értékei felett maradtak. Ez az ellenanyagszint azonban a védettséghez kevés volt.

A „D”-állományban a vizsgálat évében a csikók között két elhullás volt, mindkettő a vakcinázott csoportban. Az egyik állat esetén a második vakcinát az állat már nem kapta meg a klinikai tünetek megjelenése miatt. A gyorsan progrediáló, ízületekre is kiterjedő generalizált megbetegedés a kezelés ellenére két hét leforgása alatt az állat elhullásához vezetett. A másik állat esetén nagy valószínűséggel a nem megfelelő gyógykezelés vezetett a hosszan fennálló lázas állapotot követő elhulláshoz.

Az „E” gazdaságban a korábbi évek gyakorlatától eltérően, amikor is évente 4-5 állat hullott el *R. equi* okozta megbetegedésekben, sem a kontroll, sem pedig a vakcinázott állományban nem voltak klinikai tünetekben megnyilvánuló légzőszervi megbetegedések. A vakcinázást követően az állatok túlnyomó többségében 3-4 napig tartó lázas állapotot figyeltünk meg, de klinikai tünetekben megnyilvánuló megbetegedéssel nem talákoztunk.

Az AGP próbában kapott eredmények teljes mértékben összhangban állnak az irodalmi adatokkal (Nakazawa és mtsai., 1987; Takai és mtsai., 1990), mely szerint az AGP teszt, – sejtfelülűszo antigénkivonat alkalmazásával – nem eléggé érzékeny a *R. equi*-vel szemben termelődött ellenanyagok kimutatására csikók vérsavómintáiban. Az ELISA alkalmas módszer az *R. equi*-vel szembeni ellenanyagok kimutatására (Hietala és mtsai., 1985; Takai és mtsai., 1994c), de a titerek még két alkalommal, inaktivált *R. equi*-t tartalmazó vakcinával történő oltás után is csak alacsony szinteket értek el. Annak ellenére, hogy a legtöbb kísérletbe bevont csikó hosszabb-rövidebb ideig ürítette a baktériumot a bélsarával és/vagy az orrváladékával, nem tudtunk magasabb

ellenanyag-titerek kimutatni a vérsavóikban, ami a természetes humorális immunválasz kialakulásának elégtelen voltára, illetve hiányára utalt.

Kísérleteink alapján megállapítható, hogy a *R. equi*-vel szembeni maternális ellenanyagszint eltűnését követően 4-6 hetes korban kétszer, intramuscularisan alkalmazott, alumínium-foszfáttal vagy olajjal adjuvált, inaktivált oltóanyag képes a vérsavó *R. equi*-vel szembeni ellenanyagszintjének a kontrollhoz viszonyított emelésére abban az átmeneti időszakban, amikor a környezetből történő fertőződés eredményeként még nem tudott kialakulni megfelelő mértékű természetes ellenanyagválasz a csikókban. Ez a titer-emelkedés azonban nem volt képes minden esetben a megbetegedés megelőzésére.

Bár jelenleg csak egerekben és emberekben bizonyított a CD4+ limfociták Th1- és Th2-szubpopulációinak létezése, egyes szerzők feltételezése szerint a *R. equi* elsődlegesen lovakban is Th2 (2-es típusú) immunválaszt indukál. Egérben a Th1-típusú immunválasz megvédi az egeret a *R. equi* okozta megbetegedéstől, a Th2-típusú immunválasz viszont nem ad védelmet, hanem a betegség kialakulásához járul hozzá (Kanaly és mtsai., 1995). Prescott és mtsai. (1997) egérkísérletekre alapozott feltételezése szerint az adjuválószer (alumínium-hidroxid, immunstimuláló komplexek) hozzásegítik a szervezetet a Th2-típusú immunválasz kialakulásához, és így a vakcinák adta antigén-inger az elváltozások súlyosbodását eredményezheti.

További vizsgálatok szükségesek a csikók *R. equi* okozta megbetegedése kórfejlődésének és a virulenciafehérje (vapA) indukálta immunválasz jobb megértéséhez, és ennek tükrében hatékony aktív immunizálási módszer kidolgozásához.

7. IRODALOM

- 1) About I., B. Castan, J. Capdeville and J. Vanche (1996): *Rhodococcus equi* pulmonary abscess in HIV infection, Rev. Med. Interne., **17.**, 410-414.
- 2) Ainsworth D. M., A. D. Weldon, K. A. Beck and P. H. Rowland (1993): Recognition of *Pneumocystis carinii* in foals with respiratory distress, Equine Vet. J., **25.**, 103-108.
- 3) Ardans A. A., S. K. Hietala, M. S. Spensley and A. Sansome (1986): Studies of naturally occurring and experimental *Rhodococcus equi* (*Corynebacterium equi*) pneumonia in foals, Proc. Am. Ass. Equine Pract., **32.**, 129-144.
- 4) Arlotti M., G. Zoboli, G. L. Moscatelli, G. Magnani, R. Maserati, V. Borghi, M. Andreoni, M. Libanore, L. Bonazzi, A. Piscina and R. Ciammarughi (1996): *Rhodococcus equi* infection in HIV-positive subjects: a retrospective analysis of 24 cases, Scand. J. Infect. Dis., **28.**, 463-467.
- 5) Baldwin J. L., J. J. Bertone, M. M. Sommer, R. Bayha, W. Vaala, W. L. Cooper, D. K. Vanderwall and D. H. Schaller (1992): *Rhodococcus equi* enteritis, colonic lymphadenitis, and peritonitis in three foals with nonresponsive *Rhodococcus equi* bronchopneumonia, Equine Pract., **14.**, 15-18.
- 6) Balson G. A., J. A. Yager and B. A. Croy (1992): SCID/beige mice in the study of immunity to *Rhodococcus equi*. In: Plowright W., P. D. Rosedale and N. J. F. Wade (eds.): Equine Infectious Diseases, Vol. VI, R&W Publications, Newmarket, pp. 49-53.
- 7) Barrow, G. I. and R. K. A. Feltham (1993): Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria, Cambridge University Press
- 8) Barton M. D. and K. L. Hughes (1980): *Corynebacterium equi*: a review, Vet. Bull., **50.**, 65-80.
- 9) Barton M. D. and K. L. Hughes (1981): Comparison of three techniques for isolation of *Rhodococcus* (*Corynebacterium*) *equi* from contaminated sources, J. Clin. Microbiol., **13.**, 219-221.
- 10) Barton M. D. and K. L. Hughes (1982): Is *Rhodococcus equi* a soil organism? J. Reprod. Fertil. Suppl., **32.**, 481-489.
- 11) Barton M. D. and K. L. Hughes (1984): Ecology of *Rhodococcus equi*, Vet. Microbiol., **9.**, 65-76.
- 12) Bauwens L., E. Van Dyck, W. De Meurichy and P. Piot (1987): *Corynebacterium equi* pneumonia in three Baikal seals (*Pusa sibirica*), Aquat. Mammals, **13.**, 17-22.
- 13) Becu T., G. Polledo, J. M. Gaskin (1997): Immunoprophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals, Vet. Microbiol., **56.**, 193-204.
- 14) Becu T., T. Kakuda, S. Tsubaki, S. Takai (2000): Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil collected from 5 horse-breeding farms in Argentina, J. Equine Sci., **11.**, 23-27.
- 15) Beech J. and C. R. Sweeney (1991): Infections caused by bacteria, mycoplasma, parasites, and fungi, In: Beech J. (ed.): Equine Respiratory Disorders, Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 181-207.
- 16) Belák S., V. Pálfi, S. Tuboly and L. Bartha (1980): Passive immunization of foals to prevent respiratory diseases caused by equine herpesvirus type 2, Zbl. Vet. Med. B., **27.**, 826-830.

- 17) Bell K. S., J. C. Philp, N. Christofi and D. W. Aw (1996): Identification of *Rhodococcus equi* using the polymerase chain reaction, *Lett. Appl. Microbiol.*, **23.**, 72-74.
- 18) Bell, K. S., J. C. Philp, D. W. Aw and N. Christofi (1998): The genus *Rhodococcus*, *J. Appl. Microbiol.*, **85.**, 195-210.
- 19) Bern D. and C. Lämmler (1994): Biochemical and serological characteristics of *Rhodococcus equi* isolates from animals and humans, *Zbl. Vet. Med. B.*, **41.**, 161-165.
- 20) Bernheimer A. W., R. Linder and L. S. Avigad (1980): Stepwise degradation of membrane sphingomyelin by corynebacterial phospholipases, *Infect. Immun.*, **29.**, 123-131.
- 21) Birnboim H. C. and J. Doly (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acid Res.*, **7.**, 1513-1523.
- 22) Bizet C., C. Barreau, C. Harmant, M. Nowakowski and A. Pietfroid (1997): Identification of *Rhodococcus*, *Gordona* and *Dietzia* species using carbon source utilization tests ("Biotype-100" strips), *Res. Microbiol.*, **148.**, 799-809.
- 23) Blackall L. L. (1994): Molecular identification of activated-sludge foaming bacteria, *Water Science and Technology*, **29.**, 35-42.
- 24) Blogg J. R., M. D. Barton, R. Graydon and R. E. Cust (1983): Blindness caused by *Rhodococcus equi* infection in a foal, *Equine Vet. J. Suppl.*, **2.**, 25-26.
- 25) Bousfield I. J. (1972): A taxonomic study of some coryneform bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, **71.**, 441-455.
- 26) Bousfield I. J. and M. Goodfellow (1976): The „rhodochrous” complex and its relationship with allied taxa, In: Goodfellow M., G. H. Brownell and J. A. Serrano (eds.): *The biology of the nocardiae*, Academic Press, London, pp. 39-65.
- 27) Bowles P. M., J. B. Woolcock and M. D. Mutimer (1987): Experimental infection of mice with *Rhodococcus equi*: differences in virulence between strains, *Vet. Microbiol.*, **14.**, 259-268.
- 28) Bowles P. M., J. B. Woolcock and M. D. Mutimer (1989): Early events associated with experimental infection of the murine lung with *Rhodococcus equi*, *J. Comp. Path.*, **101.**, 411-420.
- 29) Bretsher P. A., G. Wei, J. N. Menon and H. Bielefeldt-Ohmann (1992): Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes 'susceptible' mice resistant to *Leishmania major*, *Science*, **257.**, 539-542.
- 30) Bruner D. W., W. W. Dimock and P. R. Edwards (1939): The serological classification of *Corynebacterium equi*, *J. Infect. Dis.*, **65.**, 92-96.
- 31) Bruner D. W. and P. R. Edwards (1941): Classification of *Corynebacterium equi*, *Kentucky Agric. Exp. Stn. Bull.*, **414.**, 92-107.
- 32) Bull L. B. (1924): Corynebacterial pyemia of foals, *J. Comp. Path.*, **37.**, 294-298.
- 33) Burrows G. E. (1968): *Corynebacterium equi* infection in two foals, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **152.**, 1119-1124.

-
- 34) Burrows G. E., C. G. MacAllister, P. Ewing, E. Stair and P. W. Tripp (1992): Rifampin disposition in the horse: effect of age and method of oral administration, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **15.**, 124-132.
- 35) Butler W. R., J. O. Kilburn, G. P. Kubica (1987): High-performance liquid chromatography analysis of mycolic acids as an aid in laboratory identification of *Rhodococcus* and *Nocardia* species, *J. Clin. Microbiol.*, **25.**, 2126-2131.
- 36) Capdevila J. A., S. Bujan, J. Gavalda, A. Ferrer and A. Pahissa (1997): *Rhodococcus equi* pneumonia in patients infected with the human immunodeficiency virus. Report of 2 cases and review of the literature, *Scand. J. Infect. Dis.*, **29.**, 535-541.
- 37) Carman M. G. and R. T. Hoghes (1987): Distribution of *Rhodococcus equi* in animals, birds and from the environment, *N. Z. Vet. J.*, **35.**, 114-115.
- 38) Carter G. R. and G. A. Hylton (1974): An indirect hemagglutination test for antibodies to *Corynebacterium equi*, *Am. J. Vet. Res.*, **35.**, 1393-1395.
- 39) Castro L. A., M. P. Brown, R. Gronwall, A. E. Houston and N. Miles (1986): Pharmacokinetics of rifampin given as a single oral dose in foals, *Am. J. Vet. Res.*, **47.**, 2584-2586.
- 40) Chaffin M. K., R. J. Martens, J. G. Martens and R. A. Fiske (1991): Therapeutic effects of immune plasma in foals with *Rhodococcus equi* pneumonia., *Equine Vet. J.*, Suppl. **21.**, 23-29.
- 41) Chaffin M. K., C. M. Honnas, M. R. Crabill, H. L. Schneiter, G. W. Brumbaugh and R. P. Briner (1995): Cauda equina syndrome, diskospondylitis, and a paravertebral abscess caused by *Rhodococcus equi* in a foal, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **206.**, 215-220.
- 42) Chirino-Trejo J. M., J. F. Prescott and J. A. Yager (1987): Protection of foals against experimental *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization, *Can. J. Vet. Res.*, **51.**, 444-447.
- 43) Cimprich R. E. and J. R. Rooney (1977): *Corynebacterium equi* enteritis in foals, *Vet. Pathol.*, **14.**, 95-102.
- 44) Clapp K. H. (1956): Tuberculosis-like lesions in swine in South Australia, *Aust. Vet. J.*, **32.**, 110-113.
- 45) Cobb R. W. (1963): Cultural characteristics of some corynebacteriae of animal origin, with special reference to *C. bovis* and *C. pyogenes*, *J. Med. Lab. Technol.*, **20.**, 199-204.
- 46) Collins M. D., J. Smida, M. Dorsch and E. Stackebrandt (1988): *Tsukamurella* gen. nov. harboring *Corynebacterium parometabolum* and *Rhodococcus auranticus*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38.**, 385-391.
- 47) Cotchin, E. (1943): *Corynebacterium equi* in the submaxillary lymph nodes of swine, *J. Comp. Path.*, **53.**, 298-309.
- 48) Craig J. F. and G. O. Davies (1940): *Corynebacterium equi* in bovine pyometra, *Vet. J.*, **96.**, 417-419.
- 49) Czirók É. (szerk.) (1999): *Klinikai és Járványügyi Bakteriológia*, Melania Kft., Budapest
- 50) Davis G. H. G. and K. G. Newton (1969): Numerical taxonomy of some named coryneform bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, **56.**, 195-214.
-

- 51) Davis W. P., B. A. Steficek, G. L. Watson, Y. Yamini, H. Madarame, S. Takai and J. A. Render (1999): Disseminated *Rhodococcus equi* infection in two goats, *Vet. Pathol.*, **36.**, 336-339.
- 52) De Briel D., F. Couderc, P. Riegel, F. Jehl and R. Minck (1992): High-performance liquid chromatography of corynomycolic acids as a tool in identification of *Corynebacterium* species and related organisms, *J. Clin. Microbiol.*, **30.**, 1407-1417.
- 53) De La Pena-Moctezuma A., J. F. Prescott and M. Goodfellow (1996): Attempts to find phenotypic markers of the virulence plasmid of *Rhodococcus equi*, *Can. J. Vet. Res.*, **60.**, 29-33.
- 54) Debey M. C. and W. E. Bailie (1987): *Rhodococcus equi* in fecal and environmental samples from Kansas horse farms, *Vet. Microbiol.*, **14.**, 251-257.
- 55) Desjardins M. R. and A. M. Vachon (1990): Surgical management of *Rhodococcus equi* metapneumonitis in a foal, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **197.**, 608-612.
- 56) Dewes H. F. (1972): *Strongyloides westeri* and *Corynebacterium equi* in foals, *N. Z. Vet. J.*, **20.**, 82.
- 57) Dewes H. F. (1989): The association between weather, frenzied behaviour, percutaneous invasion by *Strongyloides westeri* larvae and *Rhodococcus equi* disease in foals, *N. Z. Vet. J.*, **37.**, 69-73.
- 58) Dimock W. W. and P. R. Edwards (1931): *Corynebacterium equi* pneumonia in foals, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **79.**, 809-812.
- 59) Donisi A., M. G. Suardi, S. Casari, M. Longo, G. P. Cadeo and G. Carosi (1996): *Rhodococcus equi* infection in HIV-infected patients, *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, **10.**, 359-362.
- 60) Drancourt M., E. Bonnet, H. Gallais, Y. Peloux and D. Raoult (1992): *Rhodococcus equi* infection in patients with AIDS, *J. Infect.*, **24.**, 123-131.
- 61) Dungworth D. L. (1993): *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* infection, *In: Pathology of Domestic Animals*, (eds.) Jubb K. V. F., P. C. Kennedy, N. Palmer, 4th ed., pp. 652-655., Academic Press, San Diego, CA.
- 62) Dürrling H. (1991): Abszeßartige Lymphknotenveränderungen beim Rind, ein Beitrag zur Differentialdiagnose der Rindertuberkulose, *Mh. Vet. Med.*, **46.**, 54-56.
- 63) Ellenberger M. A., M. L. Kaeberle and J. A. Roth (1984): Equine humoral immune response to *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*, *Am. J. Vet. Res.*, **45.**, 2428-2430.
- 64) Ellenberger M. A. and R. M. Genetzky (1986): *Rhodococcus equi* infections: literature review, *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, **8.**, 414-423.
- 65) Emmons W., B. Reichwein and D. L. Winslow (1991): *Rhodococcus equi* infection in the patient with AIDS: literature review and report of an unusual case, *Rev. Infect. Dis.* **13.**, 91-96.
- 66) Etherington W. G. and J. F. Prescott (1980): *Corynebacterium equi* cellulitis associated with *Strongyloides* penetration in a foal, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **177.**, 1025-1027.
- 67) Ewing P. J., G. Burrows, C. MacAllister and C. Clarke (1994): Comparison of oral erythromycin formulations in the horse using pharmacokinetic profiles, *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **17.**, 17-23.

- 68) Falcon J., B. P. Smith, T. R. O'Brien, G. P. Carlson and E. Biberstein (1985): Clinical and radiographic findings in *Corynebacterium equi* pneumonia of foals, J. Am. Vet. Med. Assoc., **186.**, 593-599.
- 69) Finnerty W. R. (1992): The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*, Ann. Rev. Microbiol., **46.**, 193-218.
- 70) Firth E. C., K. J. Dik, S. A. Goedegebuure, F. M. Hagens, L. M. Verberne, H. W. Merkens and A. W. Kersjes (1980): Polyarthrititis and bone infection in foals, Zbl. Vet. Med. B., **27.**, 102-124.
- 71) Fitzgerald S. D. and B. Yamini (1995): Rhodococcal abortion and pneumonia in an equine fetus, J. Vet. Diagn. Invest., **7.**, 157-158.
- 72) Flepp M., R. Luthy, J. Wust, W. Steinke and P. Greminger (1989): *Rhodococcus equi* infection in HIV disease, Schweiz. Med. Wochenschr., **119.**, 566-574.
- 73) Fodor L., Á. Csivincsik and J. Varga (1996): Characterization of *Rhodococcus equi* strains isolated from foals, Acta Microbiol. Immunol. Hung., **43.**, 168-169.
- 74) Fraser G. (1964): The effect on animal erythrocytes of combinations of diffusible substances produced by bacteria, J. Pathol. Bacteriol., **88.**, 43-53.
- 75) Freestone J. F., S. Hietala, J. Moulton and S. Vivrette (1987): Acquired immunodeficiency in a seven-year-old horse, J. Am. Vet. Med. Assoc., **190.**, 689-691.
- 76) Fuhrmann C. and C. Lämmli (1997): Characterization of *Rhodococcus equi* isolates from horse and man, Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., **110.**, 54-59.
- 77) Gajewski T. F. and F. W. Fitch (1988): Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation, I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones., J. Immunol., **140.**, 4245-4252.
- 78) Gaskin J. M., P. R. King, T. J. Lane, I. J. Mayhew and B. D. Brewer (1990): Serological detection of *Rhodococcus equi* infections in foals, Proc. Am. Col. Vet. Int. Med. Forum, **8.**, 581-584.
- 79) Giguere S. and J. P. Lavoie (1994): *Rhodococcus equi* vertebral osteomyelitis in 3 quarter horse colts, Equine Vet. J., **26.**, 74-77.
- 80) Giguere S. and J. F. Prescott (1997): Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals, Vet. Microbiol., **56.**, 313-334.
- 81) Golub B. G., G. Falk and W. W. Spink (1967): Lung abscess due to *Corynebacterium equi*. Report of first human infection, Ann. Intern. Med., **66.**, 1174-1177.
- 82) Goodfellow M. and G. Alderson (1977): The Actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the „rhodochrous” complex, J. Gen. Microbiol., **100.**, 99-122.
- 83) Goodfellow M., A. R. Beckham and M. D. Barton (1982): Numerical classification of *Rhodococcus equi* and related actinomycetes, J. Appl. Bacteriol., **53.**, 199-207.
- 84) Goodfellow M. (1989): Genus *Rhodococcus*. In: Williams S. T., M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4., Baltimore, Williams and Wilkins, pp. 2362-2371.

- 85) Goodfellow M., E. G. Thomas, A. C. Ward and A. L. James (1990): Classification and identification of *Rhodococci*, Zbl. Bakt., **274.**, 299-315.
- 86) Goodfellow M. (1994): Genus *Rhodococcus*, In: Holt J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams (eds.): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Baltimore, Williams and Wilkins
- 87) Goodfellow M., G. Alderson and J. Chun (1998): Rhodococcal systematics: problems and developments, Antonie van Leeuwenhoek, **74.**, 3-20.
- 88) Gordon R. E. (1966): Some strains in search of a genus: *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* or what?, J. Gen. Microbiol., **43.**, 329-343.
- 89) Gotoh K., M. Mitsuyama, S. Imaizumi, I. Kawamura and I. Yano (1991): Mycolic acid-containing glycolipid as a possible virulence factor of *Rhodococcus equi* for mice, Microbiol. Immunol., **35.**, 175-185.
- 90) Graevenitz A. and V. Pünter-Streit (1995): Development of a new selective plating medium for *Rhodococcus equi*, Microbiol. Immunol., **39.**, 283-284.
- 91) Harris-Baldwin A. and N. C. Gudmestad (1996): Identification of phytopathogenic coryneform bacteria using the Biolog automated identification system, Plant Disease, **80.**, 874-878.
- 92) Hartwig H. (1982): *Corynebacterium equi*, In: Wintzer H. J. (Hrsg.): Krankheiten des Pferdes, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg, p. 473.
- 93) Harvey R. L., J. C. Sunstrum (1991): *Rhodococcus equi* infection in patients with and without human immunodeficiency virus infection, Rev. Infect. Dis., **13.**, 139-145.
- 94) Hashikura S., T. Higuchi, S. Taharaguchi, Y. Orita, Y. Nanao and S. Takai (2000): Evaluation of nasotracheal aspiration as a diagnostic tool for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals, Equine Vet. J., **32.**, 560-564.
- 95) Hietala S. K., A. A. Ardans and A. Sansome (1985): Detection of *Corynebacterium equi* specific antibody in horses by enzyme-linked immunosorbent assay, Am. J. Vet. Res., **46.**, 13-15.
- 96) Hietala S. K., A. A. Ardans (1987): Interaction of *Rhodococcus equi* with phagocytic cells from *R. equi*-exposed and non-exposed foals, Vet. Microbiol., **14.**, 307-320.
- 97) Higuchi T., S. Hashikura, S. Hagiwara, C. Gojo, T. Inui, S. Satoh, M. Yoshida, M. Fujii, D. Hidaka, S. Tsubaki and S. Takai (1997): Isolation of virulent *Rhodococcus equi* from transtracheal aspirates of foals serodiagnosed by enzyme-linked immunosorbent assay, J. Vet. Med. Sci., **59.**, 1097-1101.
- 98) Hillidge C. J. (1986): Review of *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* lung abscesses in foals: pathogenesis, diagnosis and treatment, Vet. Rec., **119.**, 261-264.
- 99) Hillidge C. J. (1987): Use of erythromycin-rifampin combination in treatment of *Rhodococcus equi* pneumonia, Vet. Microbiol., **14.**, 337-342.
- 100) Hines S. A., S. T. Kanaly, B. A. Byrne and G. H. Palmer (1997): Immunity to *Rhodococcus equi*, Vet. Microbiol., **56.**, 177-185.

- 101) Hoffman A. M., L. Viel, J. F. Prescott, S. Rosendal and J. Thorsen (1993): Association of microbiologic flora with clinical, endoscopic, and pulmonary cytologic findings in foals with distal respiratory tract infection, *Am. J. Vet. Res.*, **54.**, 1615-1622.
- 102) Holt H. and H. Amundsen (1936): Forsatte undersøkelser overbaciltypene ved tuberkulose hos svinet på Ostland, *Nor. Vet. Tidsskr.*, **48.**, 2-17.
- 103) Holtman D. F. (1945): *Corynebacterium equi* in chronic pneumonia of the calf, *J. Bacteriol.*, **49.**, 159-162.
- 104) Hondalus M. K., M. S. Diamond, L. A. Rosenthal, T. A. Springer and D. M. Mosser (1993): The intracellular bacterium *Rhodococcus equi* requires Mac-1 to bind to mammalian cells, *Infect. Immun.*, **61.**, 2919-2929.
- 105) Hondalus M. K., D. M. Mosser (1994): Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages, *Infect. Immun.*, **62.**, 4167-4175.
- 106) Hondalus M. K. (1997): Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*, *Vet. Microbiol.*, **56.**, 257-268.
- 107) Hughes K. L. and I. Sulaiman (1987): The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth, *Vet. Microbiol.*, **14.**, 241-250.
- 108) Hurley J. R. and A. P. Begg (1995): Failure of hyperimmune plasma to prevent pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals, *Aust. Vet. J.*, **72.**, 418-420.
- 109) Hutchins D. R., M. A. Brownlow and K. G. Johnston (1980): *Corynebacterium equi* infections in foals – concepts and observations, *Aust. Vet. Pract.*, **10.**, 248-252.
- 110) Ishino S., K. Kumaga, S. Kuniyoshi, M. Nakazawa, I. Matsuda and M. Oka (1992): Immunohistochemical observations on pneumonic lesions caused by *Rhodococcus equi* in foals, *J. Vet. Med. Sci.* **54.**, 509-515.
- 111) Jensen H. L. (1934): Studies on saprophytic mycobacteria and corynebacteria, *Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, **59.**, 19-61.
- 112) Jones D. (1975): A numerical taxonomic study of coryneform and related bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, **87.**, 52-96.
- 113) Jones M. R., T. J. Neale, P. J. Say and J. G. Horne (1989): *Rhodococcus equi*: an emerging opportunistic pathogen?, *Aust. N. Z. J. Med.*, **19.**, 103-107.
- 114) Jubb K. V. F. and P. C. Kennedy (1970) In: Jovanovich H. B. (ed.): Pathology of domestic animals, Second edition (Vol. 1.), Academic Press, New York
- 115) Kanaly S. T., S. A. Hines and G. H. Palmer (1995): Cytokine modulation alters pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* and development of granulomatous pneumonia, *Infect. Immun.*, **63.**, 3037-3041.
- 116) Kanaly S. T., S. A. Hines and G. H. Palmer (1996): Transfer of a CD4+ Th1 cell line to nude mice effects clearance of *Rhodococcus equi* from the lung, *Infect. Immun.*, **64.**, 1126-1132.
- 117) Karlson A. G., H. E. Moses and W. H. Feldman (1940): *Corynebacterium equi* (Magnusson, 1923) in the submaxillary lymph nodes of swine, *J. Infect. Dis.*, **67.**, 243-251.

- 118) Katsumi M., N. Kodama, Y. Miki, T. Hiramune, N. Kikuchi, R. Yanagawa and M. Nakazawa (1991): Typing of *Rhodococcus equi* isolated from submaxillary lymph nodes of pigs in Japan, J. Vet. Med. B., **38.**, 299-302.
- 119) Kaura Y. K. and M. D. Mutimer (1987): Biochemical and serological characteristics of Indian strains of *Rhodococcus equi* (*Corynebacterium equi*), Indian J. Microbiol., **27.**, 39-42.
- 120) Kenney D. G., S. C. Robbins, J. F. Prescott, A. Kaushik and J. D. Baird (1994): Development of reactive arthritis and resistance to erythromycin and rifampin in a foal during treatment for *Rhodococcus equi* pneumonia, Equine Vet. J., **26.**, 246-248.
- 121) Klatte S., R. M. Kroppenstedt, F. A. Rainey and E. Stackebrandt (1994): *Rhodococcus opacus* sp. nov., an unusually nutritionally versatile *Rhodococcus* species, Syst. Appl. Microbiol., **17.**, 355-360.
- 122) Knight H. D. (1969): Corynebacterial infections in the horse: problems of prevention, J. Am. Vet. Med. Assoc., **155.**, 446-452.
- 123) Knottenbelt D. C. (1993): *Rhodococcus equi* infections in foals: a report of an outbreak on a thoroughbred stud in Zimbabwe, Vet. Rec., **132.**, 79-85.
- 124) Kovács Á., H. L. Leaf and M. S. Simberkoff (1997): Bacterial infections, Medical Clinics of North America, **81.**, 319-343.
- 125) Kreit J., G. Lefebvre and P. Garmain (1994): Membrane-bound cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp. cells. Production and extraction, J. Biotechnol., **33.**, 271-282.
- 126) Kunke P. J. (1987): Serious infection in an AIDS patient due to *Rhodococcus equi*, Clin. Microbiol. Newsletter, **9.**, 163-164.
- 127) Lämmler C. (1995): A rapid slide agglutination test for the serological identification of *Rhodococcus equi*, Med. Sci. Res., **23.**, 637-638.
- 128) Lämmler C., B. Zimmermann and C. Fuhrmann (1997): Serological properties of *Rhodococcus equi* isolates of various origins determined with two typing systems, Med. Sci. Res., **25.**, 187-189.
- 129) Leadon D., B. Farrelly, U. Fogarty, T. Buckley (1988): Platelet counting in diagnosis of *Rhodococcus equi*, Vet. Rec., **123.**, 279.
- 130) Le Bar W. D. and M. I. Pensler (1986): Pleural effusion due to *Rhodococcus equi*, J. Infect. Dis., **154.**, 919-920.
- 131) Lechevalier M. P. and H. A. Lechevalier (1970): Chemical composition as criterion in the classification of aerobic actinomycetes, Int. J. Syst. Bacteriol., **20.**, 435-443.
- 132) Leitch R. A. and J. C. Richards (1990): Structural analysis of the specific capsular polysaccharide of *Rhodococcus equi* serotype 1, Biochem. Cell. Biol., **68.**, 778-789.
- 133) Linder R. and A. W. Bernheimer (1982): Enzymatic oxidation of membrane cholesterol in relation to lysis of sheep erythrocytes by corynebacterial enzymes, Arch. Biochem. Biophys., **213.**, 395-404.
- 134) Machang'u R. S. and J. F. Prescott (1991a): Purification and properties of cholesterol oxidase and choline phosphohydrolase from *Rhodococcus equi*, Can. J. Vet. Res., **55.**, 332-340.

- 135) Machang'u R. S. and J. F. Prescott (1991b): Role of antibody to extracellular proteins of *Rhodococcus equi* in protection against *R. equi* pneumonia in foals, *Vet. Microbiol.*, **26.**, 323-333.
- 136) Madarame H., S. Takai, N. Morisawa, M. Fujii, D. Hidaka, S. Tsubaki and Y. Hasegawa (1996): Immunohistochemical detection of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* in pulmonary lesions of foals, *Vet. Pathol.*, **33.**, 341-343.
- 137) Madarame H., R. Yaegashi, N. Fugunaga, M. Matsukuma, K. Mutoh, N. Morisawa, Y. Sasaki, S. Tsubaki, Y. Hasegawa and S. Takai (1998): Pathogenicity of *Rhodococcus equi* strains possessing virulence-associated 15- to 17-kDa and 20-kDa antigens: Experimental and natural cases in pigs, *J. Comp. Path.*, **119.**, 397-405.
- 138) Madigan J. E., S. Hietala and N. Müller (1991): Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi* pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma, *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **44.**, 571-578.
- 139) Madison J. B. and K. W. Scarratt (1988): Immune-mediated polysynovitis in four foals, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **192.**, 1581-1584.
- 140) Magnani G., G. F. Elia, M. M. McNeil, J. M. Brown, C. Chezzi, M. Gabrielli and F. Fanti (1992): *Rhodococcus equi* cavitory pneumonia in HIV-infected patients: an unsuspected opportunistic pathogen, *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, **5.**, 1059-1064.
- 141) Magnusson H. (1923): Spezifische infektiöse Pneumonie beim Fohlen. Ein neuer Eitererreger beim Pferde, *Arch. Wiss. Prakt. Tierheilkunde*, **50.**, 22-38.
- 142) Magnusson H. (1938): Pyaemia in foals caused by *Corynebacterium equi*, *Vet. Rec.*, **50.**, 1359-1468.
- 143) Marsh J. C. and A. Graevenitz (1973): Recurrent *Corynebacterium equi* infection with lymphoma, *Cancer*, **32.**, 147-149.
- 144) Marsh H. P., I. C. Bowler and C. J. Watson (2000): Successful treatment of *Rhodococcus equi* pulmonary infection in a renal transplant recipient, *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, **82.**, 107-108.
- 145) Martens R. J., R. A. Fiske and H. W. Renshaw (1982): Experimental subacute foal pneumonia induced by aerosol administration of *Corynebacterium equi*, *Equine Vet. J.*, **14.**, 111-116.
- 146) Martens R. J., J. G. Martens, R. A. Fiske and S. K. Hietala (1989): *Rhodococcus equi* foal pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals, *Equine Vet. J.* **21.**, 249-255.
- 147) Martens R. J., J. G. Martens and R. A. Fiske (1991): Failure of passive immunisation by colostrum, from immunized mares to protect foals against *Rhodococcus equi* pneumonia, *Equine Vet. J. Suppl.*, **21.**, 19-22.
- 148) Martens R. J., S. Takai, N. D. Cohen, M. K. Chaffin, H. Liu, K. Sakurai, H. Sugimoto and S. Lingsweiler (2000): *Rhodococcus equi*: prevalence and virulence in foals with spontaneous pneumonia and soil of horse breeding farms in Texas, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **217.**, 220-225.
- 149) Mascellino M. T., E. Iona, R. Ponzo, C. M. Mastroianni and S. Delia (1994): Infections due to *Rhodococcus equi* in three HIV-infected patients: microbiological findings and antibiotic susceptibility, *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.*, **14.**, 157-163.

- 150) Masoud H. and J. C. Richards (1994): Structural elucidation of the specific capsular polysaccharide of *Rhodococcus equi* serotype 7, Carbohydr. Res., **252.**, 223-233.
- 151) Matsui N., H. Agawa, N. Hashimoto, H. Nakajima, M. Sano, K. Yokoyama, K. Doi, I. Inoue, M. Nakazawa, K. Kadota and S. Ishino (1989): Immunohistochemical study with BCG antiserum on acid-fast bacterial infections of domestic animals, J. Japan Vet. Med. Ass., **42.**, 703-708.
- 152) Maurin M. and D. Raoult (1993): Antibiotic penetration within phagocytic cells, In: Raoult D. (ed.): Antimicrobial agent and intracellular pathogens, CRC Press, Boca Raton, pp. 23-37.
- 153) Mayhew I. G. (1989): Large Animal Neurology, Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 277-279.
- 154) McKenzie R. A. and B. A. Donald (1979): Lymphadenitis in cattle associated with *Corynebacterium equi*: a problem in bovine tuberculosis diagnosis, J. Comp. Pathol., **89.**, 31-38.
- 155) McGowan K. L. and M. F. Mangano (1991): Infections with *Rhodococcus equi* in children, Diagn. Microbiol. Infect. Dis., **14.**, 347-352.
- 156) McNeil M. M. and J. M. Brown (1992): Distribution and antimicrobial susceptibility of *Rhodococcus equi* from clinical specimens, Eur. J. Epidemiol., **8.**, 437-443.
- 157) McNeil M. M. and J. M. Brown (1994): The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology, Clin. Microbiol. Rev., **7.**, 357-417.
- 158) Miessner H. und R. Wetzel (1923): *Corynebacterium pyogenes (equi)* als Erreger einer infektiösen, abszedierenden Pneumonie der Fohlen, Dtsch. Tierärztl. Wschr., **31.**, 449-454.
- 159) Mordarski M., M. Goodfellow, A. Tkacz, G. Pulverer, K. P. Schaal (1980): Ribosomal ribonucleic acid similarities in the classification of *Rhodococcus* and related taxa, J. Gen. Microbiol., **118.**, 313-319.
- 160) Mosmann T. R. and R. L. Coffman (1989): Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, Ann. Rev. Immunol., **7.**, 145-173.
- 161) Mosmann T. R. and S. Sad (1996): The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more, Immunology Today, **17.**, 138-146.
- 162) Müller N. S. and J. E. Madigan (1992): Methods of implementation of an immunoprophylaxis program for the prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia: Results of 5-year field study, Proc. Am. Ass. Equine Pract., **38.**, 193-201.
- 163) Munoz P., A. Burillo, J. Palomo, M. Rodriguez-Creixems and E. Bouza (1998): *Rhodococcus equi* infection in transplant recipients: case report and review of the literature, Transplantation, **65.**, 449-453.
- 164) Mutimer M. D., J. B. Woolcock and B. R. Sturgess (1979): *Corynebacterium equi* in human faeces, J. Clin. Microbiol., **26.**, 616-618.
- 165) Mutimer M. D. and J. B. Woolcock (1980): *Corynebacterium equi* in cattle and pigs., Vet. Quarterly, **2.**, 25-27.
- 166) Mutimer M. D. and J. B. Woolcock (1981): Some problems associated with the identification of *Corynebacterium equi*, Vet. Microbiol., **6.**, 331-338.,

- 167) Mutimer M. D., J. F. Prescott and J. B. Woolcock (1982): Capsular serotypes of *Rhodococcus equi*, Aust. Vet. J., **58.**, 67-69.
- 168) Mutimer M. D. and J. B. Woolcock (1983): A note on hydrolytic enzymes of *Corynebacterium equi*, J. Appl. Bacteriol., **55.**, 367-369.
- 169) Müller F., K. P. Schaal, A. Graevenitz, L. von Moos, J. B. Woolcock, J. Wust and A. F. Yassin (1988): Characterization of *Rhodococcus equi*-like bacterium isolated from a wound infection in a noncompromised host, J. Clin. Microbiol., **26.**, 618-620.
- 170) Nakazawa M. and H. Nemoto (1980): Synergistic hemolysis phenomenon of *Listeria monocytogenes* and *Corynebacterium equi*, Jpn. J. Vet. Sci., **42.**, 603-607.
- 171) Nakazawa M., C. Sugimoto and Y. Isayama (1983a): Quantitative culture of *Rhodococcus equi* from the feces of horse, Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo), **23.**, 67-68.
- 172) Nakazawa M., M. Kubo, C. Sugimoto and Y. Isayama (1983b): Serogrouping of *Rhodococcus equi*, Microbiol. Immunol., **27.**, 837-846.
- 173) Nakazawa M., Y. Isayama, M. Kashiwazaki and T. Yasui (1987): Diagnosis of *Rhodococcus equi* infection in foals by agar gel diffusion test with protein antigen, Vet. Microbiol., **15.**, 105-113.
- 174) Nathan C. F., H. W. Murray, M. E. Wiebe and B. Y. Rubin (1983): Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity, J. Exp. Med., **158.**, 670-689.
- 175) Nicholson V. M. and J. F. Prescott (1997): Restriction enzyme analysis of the virulence plasmids of vapA-positive *Rhodococcus equi* strains isolated from humans and horses, J. Clin. Microbiol., **35.**, 738-740.
- 176) Nordengrahn A., M. Rusvai, M. Merza, J. Ekstrom, B. Morein and S. Belák (1996): Equine herpesvirus type 2 (EHV-2) as a predisposing factor for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: prevention of the bifactorial disease with EHV-2 immunostimulating complexes, Vet. Microbiol., **51.**, 55-68.
- 177) Nordmann P. and E. Ronco (1992): In-vitro antimicrobial susceptibility of *Rhodococcus equi*, J. Antimicrob. Chemother., **29.**, 383-393.
- 178) Nordmann P., E. Ronco and C. Nauciel (1992): Role of T-lymphocyte subsets in *Rhodococcus equi* infection, Infect. Immun., **60.**, 2748-2752.
- 179) Nordmann P., M. H. Nicolas and L. Gutmann (1993a): Penicillin-binding proteins of *Rhodococcus equi*: potential role in resistance to imipenem, Antimicrob. Agents Chemother., **37.**, 1406-1409.
- 180) Nordmann P., E. Ronco and M. Guenounou (1993b): Involvement of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in host defense against *Rhodococcus equi*, J. Infect. Dis., **167.**, 1456-1459.
- 181) Nordmann P., M. Keller, F. Espinasse and E. Ronco (1994): Correlation between antibiotic resistance, phage-like particle presence, and virulence in *Rhodococcus equi* human isolates, J. Clin. Microbiol., **32.**, 377-383.
- 182) Novak R. M., E. L. Polisky, W. M. Janda and C. R. Libertin (1988): Osteomyelitis caused by *Rhodococcus equi* in a renal transplant recipient, Infection., **16.**, 186-188.

- 183) Olchowy T. W. (1994): Vertebral body osteomyelitis due to *Rhodococcus equi* in two Arabian foals, *Equine Vet. J.*, **26.**, 79-82.
- 184) Oxenford C. J., R. C. Ratcliffe and G. C. Ramsay (1987): *Rhodococcus equi* infection in a cat, *Aust. Vet. J.*, **64.**, 121.
- 185) Ozgur Y., S. Ikiz, B. Carioglu, A. Ilgaz and S. Takai (2000): Two cases of dead foals associated *Rhodococcus equi* pneumonia in Turkey. Analysis of plasmid profiles from isolated strains, *J. Equine Science*, **11.**, 1-5.
- 186) Pálfi V., S. Belák and T. Molnár (1978): Isolation of equine herpesvirus type 2 from foals showing respiratory symptoms, *Zbl. Vet. Med. B.*, **25.**, 165-167.
- 187) Perdrietz J. A. and D. W. Scott (1987): Cellulitis and subcutaneous abscesses caused by *Rhodococcus equi* infection in a foal, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **190.**, 1559-1561.
- 188) Powell D. G. and S. G. Jackson (1992): The health of horses, Langman, Harlow, Essex, p. 238.
- 189) Pradip I. S., A. D. Larson and C. S. McClesky (1966): Nutritional factors effecting growth and pigmentation of *Corynebacterium equi*, *Bacteriol. Proc.*, **1.**, 20.
- 190) Prescott J. F., R. J. F. Markham and J. A. Johnson (1979): Cellular and humoral immune response of foals to vaccination with *Corynebacterium equi*, *Can. J. Comp. Med.*, **43.**, 356-364.
- 191) Prescott J. F. (1981): Capsular serotypes of *Corynebacterium equi*, *Can. J. Comp. Med.*, **45.**, 130-134.
- 192) Prescott J. F., M. Lastra and L. Barksdale (1982): Equi factors in the identification of *Corynebacterium equi*, *J. Clin. Microbiol.*, **16.**, 988-990.
- 193) Prescott J. F. and V. M. Nicholson (1984): The effects of combinations of selected antibiotics on the growth of *Corynebacterium equi*, *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **7.**, 61-64.
- 194) Prescott J. F., R. Coshan-Gauthier and L. Barksdale (1984a): Antibody to equi factor(s) in the diagnosis of *Corynebacterium equi* pneumonia of foals, *Can. J. Comp. Med.*, **48.**, 370-373.
- 195) Prescott J. F., M. Travers and J. A. Yager-Johnson (1984b): Epidemiological survey of *Corynebacterium equi* infections on five Ontario horse farms, *Can. J. Comp. Med.*, **48.**, 10-13.
- 196) Prescott J. F. (1987): Epidemiology of *Rhodococcus equi* infection in horses, *Vet. Microbiol.*, **14.**, 211-214.
- 197) Prescott J. F., R. Machang'u, J. Kwiecien and K. Delaney (1989): Prevention of foal mortality due to *Rhodococcus equi* pneumonia on an endemically affected farm, *Can. Vet. J.*, **30.**, 871-875.
- 198) Prescott J. F. (1991): *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen, *Clin. Microbiol. Rev.*, **4.**, 20-34.
- 199) Prescott J. F. and A. M. Hoffman (1993): *Rhodococcus equi*, *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, **9.**, 375-384.
- 200) Prescott J. F. (1994): *Rhodococcus equi* vertebral osteomyelitis in foals, *Equine Vet. J.*, **26.**, 1-2.

- 201) Prescott J. F., A. S. Fernandez, V. M. Nicholson, M. C. Patterson, J. A. Yager, L. Viel and G. Perkins (1996): Use of a virulence-associated protein based enzyme-linked immunosorbent assay for *Rhodococcus equi* serology in horses, *Equine Vet. J.*, **28.**, 344-349.
- 202) Prescott J. F., M. C. Patterson, V. M. Nicholson, B. Morein and J. A. Yager (1997): Assessment of the immunogenic potential of *Rhodococcus equi* virulence associated protein (vapA) in mice, *Vet. Microbiol.*, **56.**, 213-225.
- 203) Quinn P. J., M. E. Carter, B. K. Markey and G. R. Carter (1994): *Clinical veterinary microbiology*, Wolfe Publishing, London, United Kingdom, p. 173.
- 204) Rahal K., A. Kodjo, D. Gretzel and Y. Richard (1999): Isolation of a new type of virulence plasmid DNA in *Rhodococcus equi* strains from horse and equine environment in France, *Rev. Med. Vet.*, **150.**, 349-352.
- 205) Rainey F. A., S. Klatte, R. M. Kroppenstedt and E. Stackebrandt (1995a): *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45.**, 32-36.
- 206) Rainey F. A., J. Burghardt, R. M. Kroppenstedt, S. Klatte and E. Stackebrandt (1995b): Polyphasic evidence for the transfer of *Rhodococcus roseus* to *Rhodococcus rhodochrous*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45.**, 101-103.
- 207) Rajagopalan V. R. (1936): Pneumonia in foals due to *Corynebacterium equi*, *Indian Vet. J. Sci. Anim. Husb.*, **7.**, 38-53.
- 208) Rao M. S., S. Zaki, B. S. Keshavamurthy and K. Chandrapal Singh (1982): An outbreak of an acute *Corynebacterium equi* infection in piglets, *Indian Vet. J.*, **59.**, 487-488.
- 209) Roberts M. C., D. R. Hodgson and W. R. Kelly (1980): *Corynebacterium equi* infection in an adult horse, *Aust. Vet. J.*, **56.**, 96-97.
- 210) Rooney R. J. (1966): Corynebacterial infections in foals, *Mod. Vet. Prac.*, **47.**, 43-45.
- 211) Ross T. L., G. A. Balson, J. S. Miners, G. D. Smith, P. E. Shewen, J. F. Prescott and J. A. Yager (1996): Role of CD4+, CD8+ and double negative T-cells in the protection of SCID/beige mice against respiratory challenge with *Rhodococcus equi*, *Can. J. Vet. Res.*, **60.**, 186-192.
- 212) Rossier Y., C. R. Sweeney and C. E. Benson (1991): Bronchoalveolar lavage fluid cytologic findings in horses with pneumonia or pleuropneumonia, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **198.**, 1001-1004.
- 213) Rowbotham T. J. and T. Cross (1977): Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated *Actinomyces* in fresh water and agricultural habitats, *J. Gen. Microbiol.*, **100.**, 231-240.
- 214) Ruimy R., P. Riegel, P. Boiron, H. Monteil and R. Christen (1995): Phylogeny of the genus *Corynebacterium* deduced from analyses of small-subunit ribosomal DNA sequences, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45.**, 740-746.
- 215) Sabater L., H. Andreu, J. C. Garcia-Valdecasas, A. Moreno, J. Vila, A. Rimola, L. Grande, M. Navasa, J. Visa and J. Rodes (1996): *Rhodococcus equi* infection after liver transplantation, *Transplantation*, **61.**, 980-982.
- 216) Schmiedhoffer Gy. (1922): Szopós csikók fertőző gennyés tüdőgyulladásáról, *Állatorvosi Lapok*, **45.**, 17-19.

- 217) Schuppler M., F. Mertens, G. Schon and U. B. Göbel (1995): Molecular characterization of nocardiform actinomycetes in activated sludge by 16S rRNA analysis, *Microbiology*, **141.**, 513-521.
- 218) Scott M. A., B. S. Graham, R. Verrall, R. Dixon, W. Schaffner and K. T. Tham (1995): *Rhodococcus equi* - an increasingly recognized opportunistic pathogen. Report of 12 cases and review of 65 cases in the literature, *Am. J. Clin. Pathol.*, **103.**, 649-655.
- 219) Segovia J., L. A. Pulpon, M. G. Crespo, R. Daza, J. C. Rodriguez, A. Rubio, S. Serrano, M. C. Carreno, A. Varela and R. Aranguena (1994): *Rhodococcus equi*: first case in a heart transplant recipient, *J. Heart Lung Transplant.*, **13.**, 332-335.
- 220) Severn W. B. and J. C. Richards (1990): Structural analysis of the specific capsular polysaccharide of *Rhodococcus equi* serotype 2, *Carbohydr. Res.*, **206.**, 311-332.
- 221) Sippel W. L., E. E. Keahey and T. L. Bullard (1968): *Corynebacterium* infection in foals – etiology, pathogenesis, and laboratory diagnosis, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **153.**, 1610-1613.
- 222) Skalka B. and A. Svastová (1985a): Two techniques for detection of antibodies against *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* in horse sera, *Vet. Microbiol.*, **10.**, 293-300.
- 223) Skalka B. and A. Svastová (1985b): Serodiagnostics of *Corynebacterium (Rhodococcus) equi*, *Zbl. Vet. Med. B.*, **32.**, 137-142.
- 224) Skalka B. (1987): Dynamics of equi-factor antibodies in sera of foals kept on farms with differing histories of *Rhodococcus equi* pneumonia, *Vet. Microbiol.*, **14.**, 269-276.
- 225) Smith B. P. and S. S. Jang (1980): Isolation of *Corynebacterium equi* from a foal with an ulcerated leg wound and a pectoral abscess, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **177.**, 623-624.
- 226) Smith B. P. and R. C. Robinson (1981): Studies of an outbreak of *Corynebacterium equi* pneumonia in foals, *Equine Vet. J.*, **13.**, 223-228.
- 227) Smola J., V. Katerov and C. Schalen (1994): Haemolytic and phospholipase C (PLC) activities of *Rhodococcus equi*, *J. Appl. Bacteriol.*, **77.**, 325-333.
- 228) Soedarmanto I., R. Oliveira, C. Lämmle and H. Düring (1997): Identification and epidemiological relationship of *Rhodococcus equi* isolated from cases of lymphadenitis in cattle, *Zbl. Bakt.*, **286.**, 457-467.
- 229) Soedarmanto I., W. Zhicai, A. Setyamahanani, C. Lämmle (1998): Pheno- and genotyping of *Rhodococcus equi* isolated from faeces of healthy horses and cattle, *Res. Vet. Sci.*, **64.**, 181-185.
- 230) Soto A., J. Zapardiel and F. Soriano (1994): Evaluation of API Coryne System for identifying coryneform bacteria, *J. Clin. Pathol.*, **47.**, 756-759.
- 231) Speert D. P. (1992): Macrophages in bacterial infection, In: C. E. Lewis and J. O. McGee (eds.): *The Macrophage*, Oxford University Press, Oxford, pp. 215-263.
- 232) Stackebrandt E., J. Smida and M. D. Collins (1988): Evidence of phylogenetic heterogeneity within the genus *Rhodococcus*: renewal of the genus *Gordona (Tsukamura)*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **34.**, 341-348.

- 233) Stackebrandt E. and B. M. Goebel (1994): Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology, *Int. J. Syst. Bact.*, **44.**, 846-849.
- 234) Stange R. R. Jr., D. Jeffares, C. Young, D. B. Scott, J. R. Eason and P. E. Jameson (1996): PCR amplification of the *fas-1* gene for the detection of virulent strains of *Rhodococcus fascians*, *Plant Path.*, **45.**, 407-417.
- 235) Steingrube V. A., R. W. Wilson and B. A. Brown (1997): Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis, *J. Clin. Microbiol.*, **35.**, 817-822.
- 236) Studdert M. J. (1978): Primary, severe combined immunodeficiency disease of Arabian foals, *Aust. Vet. J.*, **54.**, 411-417.
- 237) Suzuki K., K. Kaneko and K. Komagata (1981): Deoxyribonucleic acid homologies among coryneform bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **31.**, 131-138.
- 238) Sweeney C. R., R. W. Sweeney and T. J. Divers (1987): *Rhodococcus equi* pneumonia in 48 foals: response to antimicrobial therapy, *Vet. Microbiol.*, **14.**, 329-336.
- 239) Szeredi L., Albert M., Perge E. és Vetési F. (1996): *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* okozta csikómegebetegedések egy magyarországi lóállományban, *Magy. Állatorv. Lapja*, **51.**, 488-494.
- 240) Takai S., T. Michizoe, K. Matsumura, M. Nagai, H. Sato and S. Tsubaki (1985): Correlation of *in vitro* properties of *Rhodococcus equi (Corynebacterium equi)* with virulence for mice, *Microbiol. Immunol.*, **29.**, 1175-1184.
- 241) Takai S. and S. Tsubaki (1985): The incidence of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in domestic animals and soil, *Jpn. J. Vet. Sci.*, **47.**, 493-496.
- 242) Takai S., H. Ohkura, Y. Watanabe and S. Tsubaki (1986a): Quantitative aspects of fecal *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in foals, *J. Clin. Microbiol.*, **23.**, 794-796.
- 243) Takai S., S. Iimoti and S. Tsubaki (1986b): Quantitative fecal culture for early diagnosis of *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* enteritis in foals, *Can. J. Vet. Res.*, **50.**, 479-484.
- 244) Takai S., K. Narita, K. Ando and S. Tsubaki (1986c): Ecology of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in soil on a horse-breeding farm, *Vet. Microbiol.*, **12.**, 169-177.
- 245) Takai S., T. Fujimori, K. Katsuzaki and S. Tsubaki (1987): Ecology of *Rhodococcus equi* in horses and their environment on horse-breeding farms, *Vet. Microbiol.*, **14.**, 233-239.
- 246) Takai S., N. Kazama and S. Tsubaki (1990): Radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibody to *Rhodococcus equi* in horse sera, *Nippon Juigaku Zasshi*, **52.**, 653-655.
- 247) Takai S., K. Koike, S. Ohbushi, C. Izumi and S. Tsubaki (1991a): Identification of 15- to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*, *J. Clin. Microbiol.*, **29.**, 439-443.
- 248) Takai S., S. Ohbushi, K. Koike, S. Tsubaki, H. Oishi and M. Kamada (1991b): Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections, *J. Clin. Microbiol.*, **29.**, 2887-2889.

- 249) Takai S., M. Iie, C. Kobayashi, T. Morishita, T. Nishio, T. Ishida, T. Fujimura, Y. Sasaki and S. Tsubaki (1993a): Monoclonal antibody specific to virulence-associated 15- to 17-kilodalton antigens of *Rhodococcus equi*, J. Clin. Microbiol., **31.**, 2780-2782.
- 250) Takai S., Y. Watanabe, T. Ikeda, T. Ozawa, S. Matsukura, Y. Tamada, S. Tsubaki and T. Sekizaki (1993b): Virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi*, J. Clin. Microbiol., **31.**, 1726-1729.
- 251) Takai S., T. Morishita, Y. Nishio, Y. Sasaki, S. Tsubaki, T. Higuchi, S. Hagiwara, H. Senba, M. Kato, N. Seno (1994a): Evaluation of a monoclonal antibody-based colony blot test for rapid identification of virulent *Rhodococcus equi*, J. Vet. Med. Sci., **56.**, 681-684.
- 252) Takai S., T. Sugawara, Y. Watanabe, Y. Sasaki, S. Tsubaki and T. Sekizaki (1994b): Effect of growth temperature on maintenance of virulent *Rhodococcus equi*, Vet. Microbiol., **39.**, 187-192.
- 253) Takai S., H. Kitajima, Y. Tamada, S. Matsukura, Y. Ohwa, T. Inui, M. Kato, N. Seno, S. Tsubaki, T. Anzai, T. Kanemaru and M. Kamada (1994c): Humoral antibody response to the antigens of virulent *Rhodococcus equi* in foals, J. Equine Sci., **4.**, 121-126.
- 254) Takai S., T. Ikeda, Y. Sasaki, Y. Watanabe, T. Ozawa, S. Tsubaki and T. Sekizaki (1995a): Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15- to 17-kilodalton antigens, J. Clin. Microbiol., **33.**, 1624-1627.
- 255) Takai S., H. Madarame, C. Matsumoto, M. Inoue, Y. Sasaki, Y. Hasegawa, S. Tsubaki and A. Nakane (1995b): Pathogenesis of *Rhodococcus equi* infection in mice: roles of virulence plasmids and granulomagenic activity of bacteria, FEMS Immunol. Med. Microbiol., **11.**, 181-90.
- 256) Takai S., Y. Imai, N. Fukunaga, Y. Uchida, K. Kamisawa, Y. Sasaki, S. Tsubaki and T. Sekizaki (1995c): Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS, J. Inf. Dis., **172.**, 1306-1311.
- 257) Takai S., N. Fukunaga, K. Kamisawa, Y. Imai, Y. Sasaki and S. Tsubaki (1996a): Expression of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* is regulated by temperature and pH, Microbiol. Immunol., **40.**, 591-594.
- 258) Takai S., N. Fukunaga, S. Ochiai, Y. Imai, Y. Sasaki, S. Tsubaki and T. Sekizaki (1996b): Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs, J. Clin. Microbiol., **34.**, 1034-1037.
- 259) Takai S., N. Fukunaga, S. Ochiai, T. Sakai, Y. Sasaki and S. Tsubaki (1996c): Isolation of virulent and intermediately virulent *Rhodococcus equi* from soil and sand on parks and yards in Japan, J. Vet. Med. Sci., **58.**, 669-672.
- 260) Takai S., K. Takeda, Y. Nakano, T. Karasawa, J. Furugoori, Y. Sasaki, S. Tsubaki, T. Higuchi, T. Anzai, R. Wada and M. Kamada (1997): Emergence of rifampin-resistant *Rhodococcus equi* in an infected foal, J. Clin. Microbiol., **35.**, 1904-1908.
- 261) Takai S. (1997): Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review, Vet. Microbiol., **56.**, 167-176.
- 262) Takai S., M. Shoda, Y. Sasaki, S. Tsubaki; G. Fortier, S. Pronost, T. Becu, A. Begg, G. Browning, V. M. Nicholson and J. F. Prescott (1999): Genetic analysis of virulent *Rhodococcus equi* based on restriction fragment length polymorphism of virulence plasmids: a molecular approach for epidemiology of virulent *R. equi* in the world, J. Clin. Microbiol., **37.**, 3417-3420.

- 263) Takai S., M. K. Chaffin, N. D. Cohen, M. Hara, M. Nakamura, T. Kakuda, Y. Sasaki, S. Tsubaki and R. J. Martens (2001a): Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in soil, from 5 *R. equi*-endemic horse-breeding farms and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in isolates from soil and infected foals in Texas, *J. Vet. Diag. Invest.*, **13.**, 489-494.
- 264) Takai S., N. Murata, R. Kudo, N. Narematu, T. Kakuda, Y. Sasaki and S. Tsubaki (2001b): Two new variants of the *Rhodococcus equi* virulence plasmid, 90 kb type III and type IV, recovered from a foal in Japan, *Vet. Microbiol.*, **82.**, 373-381.
- 265) Takai S., K. Ogawa, N. Fukunaga, Y. Sasaki, T. Kakuda, S. Tsubaki and T. Anzai (2001c): Isolation of virulent *Rhodococcus equi* from native Japanese horses, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **24.**, 123-133.
- 266) Takeuchi S., R. Azuma, K. Ogimoto, T. Suto, M. Mochizuki and T. Nakamura (1967): Biological and serological studies on *Corynebacterium equi* isolated from swine submaxillary lymph nodes, *Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth.*, **55.**, 40-44.
- 267) Tammemagi L. (1953): Tuberculosis-like lesions in the submaxillary lymph nodes of pigs in Queensland, *Queensl. J. Agric. Sci.*, **10.**, 81-101.
- 268) Tinsdale G. F. (1947): A new medium for the isolation and identification of *C. diphtheriae* based on the production of hydrogen sulphide, *J. Pathol. Bacteriol.*, **59.**, 461-464.
- 269) Tkachuk-Saad O. and J. F. Prescott (1991): *Rhodococcus equi* plasmids: isolation and partial characterization, *J. Clin. Microbiol.*, **29.**, 2696-2700.
- 270) Trinchieri G., M. Kubin, G. Bellone and M. A. Cassatella (1993): Cytokine cross-talk between phagocytic cells and lymphocytes: relevance for differentiation/activation of phagocytic cells and regulation of adaptive immunity, *J. Cell. Biochem.*, **53.**, 301-308.
- 271) van den Broek P. J. (1993): Antibiotics and phagocytic cells, In: Raoult D. (ed.): *Antimicrobial Agents and Intracellular Pathogens*, CRC Press, Boca Raton, pp. 1-22.
- 272) van Etta L. L., G. A. Filice, R. M. Ferguson and D. N. Gerding (1983): *Corynebacterium equi*: a review of 12 cases of human infection, *Rev. Infect. Dis.*, **5.**, 1012-1018.
- 273) Vaneechoutte M., P. Riegel, D. de Briel, H. Monteil, G. Verschraegen, A. De Rouck and G. Claeys (1995): Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*, *Res. Microbiol.*, **146.**, 633-641.
- 274) Varga J., Tuboly S., Mészáros J. (1999): *A háziállatok fertőző betegségei*, Mezőgazda kiadó, Budapest
- 275) Vengust M., H. Staempfli and J. F. Prescott (2002): *Rhodococcus equi* pleuropneumonia in an adult horse, *Can. Vet. J.*, **43.**, 706-708.
- 276) Verge J. and F. Senthille (1942): Caracteres defferentiels de *Corynebacterium equi* agent de l'adanites pseudotuberculeuse du porc, *C. R. Seance Soc. Biol. (Paris)*, **136.**, 295-296.
- 277) Walsh R. D. and B. A. Cunha (1994): *Rhodococcus equi*: fatal pneumonia in a patient without AIDS, *Heart Lung*, **23.**, 519-520.
- 278) Wang P. and S. Krawiec (1994): Desulfurization of dibenzothiophene of 2-hydroxybiphenyl by some newly isolated bacterial strains, *Archives of Microbiology*, **161.**, 266-271.

- 279) Weingarten J. S., D. Y. Huang and J. D. Jr. Jackman (1988): *Rhodococcus equi* pneumonia. An unusual early manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), *Chest.*, **94.**, 195-196.
- 280) Wilkins P. A., F. R. Lesser and J. M. Gaskin (1993): *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: comparison of ELISA and AGID serology on a commercial thoroughbred breeding farm, *Proc. Am. Ass. Equine Pract.*, **39.**, 289.
- 281) Wilson M. M. (1955): A study of *Corynebacterium equi* infection in a stud of Thoroughbred horses in Victoria, *Aust. Vet. J.*, **31.**, 175-181.
- 282) Wilson W. D. (1992): *Rhodococcus equi*, In: Robinson N. E. (ed.): Current medicine in equine medicine, Vol. 3., Saunders Company, Philadelphia, pp. 466-470.
- 283) Woese C. R. (1987): Bacterial evolution, *Microbiol. Rev.*, **51.**, 221-271.
- 284) Woodroffe G. M. (1950): Studies on strains of *Corynebacterium equi* isolated from pigs, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **28.**, 399-409.
- 285) Woolcock J. B., A-M. T. Farmer and M. D. Mutimer (1979): Selective medium for *Corynebacterium equi* isolation, *J. Clin. Microbiol.*, **9.**, 640-642.
- 286) Woolcock J. B., M. D. Mutimer and A-M. T. Farmer (1980): Epidemiology of *Corynebacterium equi* in horses, *Res. Vet. Sci.*, **28.**, 87-90.
- 287) Woolcock J. B. and M. D. Mutimer (1981): *Corynebacterium equi* in the gastrointestinal tract of ruminants, *Vet. Res. Commun.*, **4.**, 291-294.
- 288) Woolcock J. B., M. D. Mutimer and P. M. Bowles (1987): The immunological response of foals to *Rhodococcus equi*: a review, *Vet. Microbiol.*, **14.**, 215-224.
- 289) Yager J. A. (1987): The pathogenesis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals, *Vet. Microbiol.*, **14.**, 225-232.
- 290) Yager J. A., C. A. Prescott, D. P. Kramar, H. Hannah, G. A. Balson and B. A. Croy (1991): The effect of experimental infection with *Rhodococcus equi* on immunodeficient mice, *Vet. Microbiol.*, **28.**, 363-376.
- 291) Yamada K. and K. Komogata (1970): Taxonomic studies on coryneform bacteria. III. DNA base composition of coryneform bacteria, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **16.**, 215-224.
- 292) Zimmermann B. (1996): Isolierung und Charakterisierung von *Rhodococcus equi* aus Untersuchungsproben verschiedener Tierarten, Inaugural-Dissertation, Justus Liebig Universität, Gießen.
- 293) Zink M. C., J. A. Yager and N. L. Smart (1986): *Corynebacterium equi* infections in horses, 1958-1984: a review of 131 cases, *Can. Vet. J.*, **27.**, 213-217.
- 294) Zink M. C. and J. A. Yager (1987): Experimental infection of piglets by aerosols of *Rhodococcus equi*, *Can. J. Vet. Res.*, **51.**, 290-296.
- 295) Zink M. C., J. A. Yager, J. F. Prescott and M. A. Fernando (1987): Electron microscopic investigation of intracellular events after ingestion of *Rhodococcus equi* by foal alveolar macrophages, *Vet. Microbiol.*, **14.**, 295-305.

8. A TÉMÁBAN MEGJELENT SAJÁT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

- 1.) Varga J., L. Fodor, M. Rusvai, I. Soós and **L. Makrai** (1997): Prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals using two different inactivated vaccines, *Veterinary Microbiology*, **56.**, 205-212.
- 2.) **Makrai L.**; L. Fodor, Á. Csivincsik, J. Varga, Zs. Senoner and B. Szabó (2000): Characterisation of *Rhodococcus equi* strains isolated from foals and from immunocompromised human patients, *Acta Veterinaria Hungarica*, **48.**, 253-259.
- 3.) Szeredi L., **L. Makrai** and B. Dénes (2001): Rapid immunohistochemical detection of *Rhodococcus equi* in impression smears from affected foals on postmortem examination, *Journal of Veterinary Medicine B.*, **48.**, 751-758.
- 4.) **Makrai L.**, S. Takai, M. Tamura, A. Tsukamoto, R. Sekimoto, Y. Sasaki, T. Kakuda, S. Tsubaki, J. Varga, L. Fodor, N. Solymosi and A. Major (2002): Characterization of virulence plasmid types in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary, *Veterinary Microbiology*, **88.**, 377-384.
- 5.) **Makrai L.**: A *Rhodococcus equi* morfológiai, tenyésztési és kórtani sajátosságai, *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2003., közlésre elfogadva.

ELŐADÁSOK

- 1.) **Makrai L.**, Fodor L., Varga J., Senoner Zs. és Szabó B.: Lovakból és emberekből izolált *Rhodococcus equi* törzsek jellemzése, Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Miskolc, 1998. augusztus 24-26.
- 2.) **Makrai L.**, Varga J., Fodor L., Vendég I., Szigeti G. és Reiczigel J.: *Rhodococcus equi* izolálására használatos szelektív táptalajok összehasonlító vizsgálata, Akadémiai beszámoló, 2001. január 23.
- 3.) **Makrai L.**, Varga J., Fodor L., Vendég I.: *Rhodococcus equi* szelektív izolálása, Poszter, Bakteriológus Munkaértekezlet, 2000 május 8-9.
- 4.) **Makrai L.**, L. Fodor, J. Varga, Zs. Senoner and B. Szabó: Characterisation of *Rhodococcus equi* strains isolated from humans and horses, First Congress of European Society for Emerging Infections, Budapest, 1998. September 13-16.
- 5.) Szeredi L., **Makrai L.**, Dénes B.: *Rhodococcus equi* kimutatása elhullott csikók szerveiből készített lenyomatban, paraffinba ágyazott és kriosztát metszetben immun-hisztokémiai módszerrel, Akadémiai Beszámoló, 2000 január 23.
- 6.) **Makrai L.**, Dénes B., Varga J., Tekes L., Szalay Sz., Szollár I., Sümeghy L., Soós P., Fodor L.: *Rhodococcus equi*-vel szembeni vakcinázási kísérletek tapasztalatai két magyarországi lóállományban, Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Jubileumi Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001. október 10-12.
- 7.) **Makrai L.**, Dénes B., Varga J., Tekes L., Major A., Fodor L.: Magyarországon gyűjtött különböző eredetű *Rhodococcus equi* törzsek szerotipizálása, Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Jubileumi Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001. október 10-12.
- 8.) **Makrai L.**, Takai S., Varga J., Major A., Fodor L.: Különböző eredetű *Rhodococcus equi* törzsek virulenciaplazmidjainak vizsgálata, (poszter) Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Jubileumi Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001. október 10-12.
- 9.) **Makrai L.**, Márialigeti K., Kovács G., Varga J., Fodor L., Senoner Zs., Bognár Cs., Major A.: Különböző eredetű *Rhodococcus equi* törzsek 16S rDNS-ének vizsgálata, (poszter) Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Jubileumi Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001. október 10-12.
- 10.) **Makrai L.**, Takai S., Varga J., Major A., Fodor L., Solymosi N.: *Rhodococcus equi* törzsek plazmid-profil vizsgálata, Akadémiai Beszámoló, 2002. január 22.
- 11.) **Makrai L.**, Dénes B., Varga J., Tekes L., Major A., Fodor L., Solymosi N.: *Rhodococcus equi* törzsek szerotipizálása, Akadémiai Beszámoló, 2002. január 22.
- 12.) **Makrai L.**, Varga J., Major A., Senoner Zs., Bognár Cs., Fodor L.: Emberekből, állatokból és talajból származó *Rhodococcus equi* törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata, (poszter), Bakteriológus Munkaértekezlet, Hévíz, 2002. április 18-20.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt köszönet illeti **Dr. Tuboly Sándor** professzor urat, aki már egyetemi éveim alatt kiváló előadásaival ráirányította figyelmemet az állatorvosi mikrobiológia és járványtan szépségeire és jelentőségére, megszerettette velem ezt a tárgyat, és bizalmával megtisztelt, amikor meghívott a tanszék munkatársának.

Hálásan köszönöm **Dr. Varga János** és **Dr. Fodor László** egyetemi tanárok sokrétű segítségét, akik egyrészt rávilágítottak a csikók *R. equi* okozta megbetegedéseinek jelentőségére, és végigkövetve munkámat folyamatos tanácsaikkal ellátva lehetővé tették számomra a munkában való előrehaladást.

Köszönöm **Dr. Vetési Ferenc** egyetemi tanárnak, hogy témabizottsági tagként segítette munkámat.

Köszönet illeti **Dr. Takai Shinji**-t, a Kitasato Egyetem (Japán) professzorát és munkatársait a virulenciaplazmidokra vonatkozó vizsgálatokban nyújtott segítségükért és együttműködésükért.

Köszönet illeti **Dr. Dénes Bélát** (Országos Állat-egészségügyi Intézet, Immunológiai Osztály), aki a szerológiai vizsgálatokban; **Dr. Szeredi Leventét** (Országos Állat-egészségügyi Intézet, Emlős-kórbonctani Osztály), aki az immun-hisztokémiai vizsgálatokban; **Dr. Márialigeti Károlyt** (ELTE, Mikrobiológiai Tanszék), aki a szénforrás-hasznosítási vizsgálatokban és **Dr. Kovács Gábort** (ELTE, Mikrobiológiai Tanszék), aki a 16S rRNS gén vizsgálatokban nyújtott segítséget és ezen szakmai együttműködések révén hozzájárultak ahhoz, hogy e szakterületen a lehetőségekhez képest a legszélesebb körű vizsgálatokat tudjam elvégezni.

Köszönettel tartozom **Dr. J. F. Prescott**-nak a Guelph-i Egyetem (Kanada) professzorának, valamint **Dr. Ch. Lämmler**-nek a Justus Liebig Egyetem (Németország) professzorának a *R. equi* típus törzsek megküldéséért és a szakmai konzultációkért.

Elengedhetetlenül fontos volt mindazon kollégák segítése (**Dr. Antal Tibor, Dr. Bakonyi Győző, Dr. Bakonyi Tamás, Dr. Bognár Csaba, Dr. Dán János, Dr. Drótos Attila, Dr. Gippert Róbert, Dr. Hajtós István, Dr. Kovács György, Dr. Kútvolgyi Gabriella, Dr. Lajos Zoltán, Dr. Laukó Tibor, Dr. Nemes Csaba, Dr. Polner Antónia, Dr. Rusvai Miklós, Dr. Senoner Zsuzsanna, Dr. Soós István, Dr. Sümeghy László, Dr. Szabó Béla, Dr. Szalay Szabolcs, Dr. Szeredi Levente, Dr. Szollár István, Dr. Tenk Miklós**), akik baktériumtörzseket vagy vizsgálati anyagokat bocsátottak rendelkezésünkre, amely révén ilyen nagy számú baktériumtörzs vizsgálatára sor kerülhetett.

A munka valamilyen fázisában nyújtott segítségért a következő kollégáknak vagyok hálás: **Dr. Major Andrea, Dr. Majoros Gábor, Dr. Nagy Miklós, Dr. Reiczigel Jenő, Dr. Solymosi Norbert, Dr. Soós Pál, Dr. Szigeti Gábor** és **Dr. Tuboly Tamás**.

A precíz, pontos asszisztensi munkáért **Gáspárné Stoll Annamáriát, Halasi Terézt, Juhász Ágneszt, Karner Editet, Kottász Tamásné, Lakosi Szilviát, Dr. Mezősi Lászlónét** és **Nógrádi Ritát** illeti köszönet.

Köszönettel tartozom azon egyetemi hallgatóknak és gyakornokoknak (**Dr. Ganter Mariann, Dr. Hegedűs Tamás, Dr. Vendég Ildikó**), akik a munka valamelyik részébe bekapcsolódva járultak hozzá annak elvégzéséhez.

Végül köszönöm karunk kiváló könyvtára valamennyi dolgozójának, itt is elsősorban **Oláh Edit**-nek az áldozatos és gyors munkáját, amely révén a szakirodalom beszerzésében volt segítségemre.

10. MELLÉKLETEK

1. melléklet: Plazmid DNS izolálásának technikája *R. equi* baktériumokból

Reagensok

I-es oldat: 20% szacharóz, 10 mM EDTA, 25 mM TrisAEHCl (pH: 8,0)

1M TrisAEHCl (pH8,0)	0,5 ml
0,5M EDTA (pH8,0)	0,2 ml
5M NaCl	0,1 ml
Szacharóz	2 g
Lizozim	0,05 g
Vízzel 10 ml-re kiegészíteni	

I-es oldat

10% SDS	2 ml
10 N NaOH	0,3 ml
Vízzel 10 ml-re kiegészíteni	

III-as oldat

5 M K-acetát vagy 3 M Na-acetát

Fenol-Kloroform keverék

TE puffer:	1 M Tris HCl (pH: 8,0)	1 ml
	0,5 M EDTA	0,2 ml
	Vízzel 100 ml-re kiegészíteni	

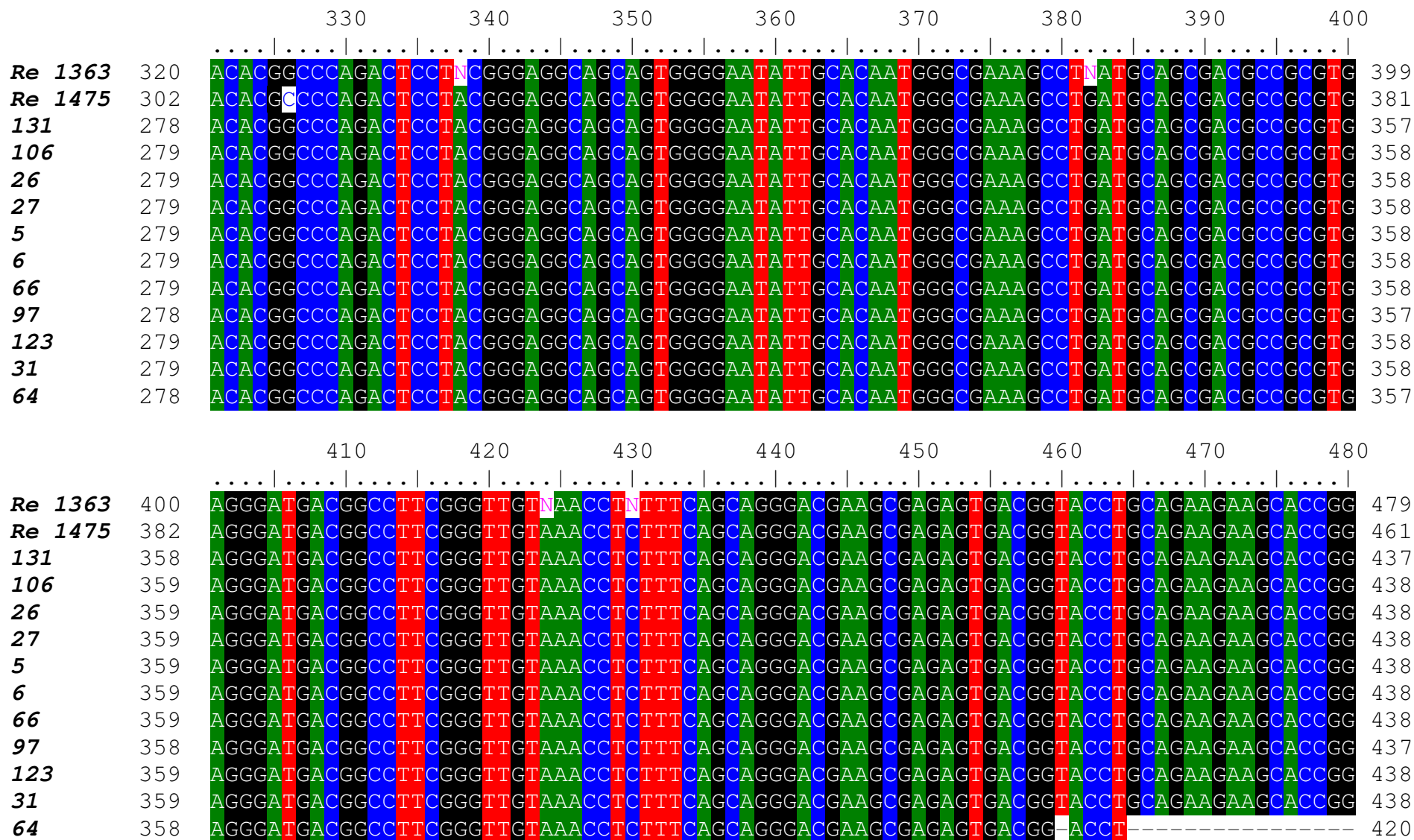
A plazmidizolálás menete:

1. A *R. equi* törzset leoltottuk 5 ml BHI levesbe.
2. 36 órán át 30°C-on tenyésztettük.
3. Centrifugálással 1,5 ml-es Eppendorf csőbe gyűjtöttük össze a baktériumsejteket.
4. Centrifugáltuk a sejteket (3 perc, 12 000 rpm) és a felülúszót leszívtuk.
5. Reszuszpendáltuk a sejteket 1 ml TE pufferben és háromszor mostuk a sejteket.
6. Centrifugáltuk a sejteket (3 perc, 12 000 rpm) és a felülúszót leszívtuk.
7. Hozzáadtunk 0,2 ml-t az I-es oldatból és vortex-szel összekevertük.
8. A csöveket 37°C-on 2 órán át inkubáltuk.
9. Hozzáadtunk 0,4 ml-t a II-es oldatból, majd átforgatással összekevertük.
10. Hozzáadtunk 0,3 ml-t a III-as oldatból és vortex-szel összerázattuk. A csöveket 30 percig vagy egy éjszakán át jégkásában inkubáltuk.
11. Centrifugáltuk a csöveket (10 perc, 15 000 rpm) és a felülúszót (0,7-0,8 ml) átöntöttük új csőbe.
12. Hozzáadtunk 0,5 ml fenol-kloroform keveréket, és 100-szor átforgattuk a csöveket.
13. Centrifugáltuk a csöveket (10 perc, 15 000 rpm).
14. A felülúszóból 0,5 ml-t pipettával átvittünk új csőbe.
15. Hozzáadtunk 0,5 ml izopropanolt, és fagyaszóba tettük 30 percre.
16. Centrifugáltuk a csöveket (10 perc, 15 000 rpm).
17. Elöntöttük az izopropanolt és a pelletet megmostuk 70%-os etanolban.
18. A pelletet levegőn megszárítottuk (5 perc).
19. A DNS-t reszuszpendáltuk 30 µl TE pufferben.
20. A plazmid DNS-t elektroforetizáltuk.

2. melléklet: Tizenegy *R. equi* törzs 16S rRNS gén régiójának első 440 bp-ja, a génbankból letöltött két (Re 1363, Re 1475) *R. equi* 16S rRNS gén szekvenciájára illesztve.

		10	20	30	40	50	60	70	80	
									
Re 1363	1	TCAACGGAGAGTTT	GATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGC	CGT	GTGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGTAAG	G	CCCTT			79
Re 1475	1	-----	CCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGC	CGT	GTGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGTAAG	G	CCCTT			62
131	1	-----	-----	-----	CAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTT					38
106	1	-----	-----	-----	CAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTT					38
26	1	-----	-----	-----	CAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTT					38
27	1	-----	-----	-----	CAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTT					38
5	1	-----	-----	-----	CAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTT					38
6	1	-----	-----	-----	CAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTT					38
66	1	-----	-----	-----	CAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTT					38
97	1	-----	-----	-----	AGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTT					37
123	1	-----	-----	-----	CAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTT					38
31	1	-----	-----	-----	CAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTT					38
64	1	-----	-----	-----	AGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTT					37
									
		90	100	110	120	130	140	150	160	
Re 1363	80	CGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG								159
Re 1475	63	CGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG								141
131	39	CGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG								118
106	39	CGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG								118
26	39	CGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG								118
27	39	CGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG								118
5	39	CGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG								118
6	39	CGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG								118
66	39	CGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG								118
97	38	CGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG								117
123	39	CGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG								118
31	39	CGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG								118
64	38	CGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG								117

		170	180	190	200	210	220	230	240	
		
Re 1363	160	TCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATATCA								239
Re 1475	142	TCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATATCA								221
131	119	TCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATATCA								197
106	119	TCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATATCA								198
26	119	TCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATATCA								198
27	119	TCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATATCA								198
5	119	TCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATATCA								198
6	119	TCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATATCA								198
66	119	TCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATATCA								198
97	118	TCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATATCA								197
123	119	TCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATATCA								198
31	119	TCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATATCA								198
64	118	TCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATATCA								197
		250	260	270	280	290	300	310	320	
		
Re 1363	240	GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG								319
Re 1475	222	GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG								301
131	198	GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG								277
106	199	GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG								278
26	199	GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG								278
27	199	GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG								278
5	199	GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG								278
6	199	GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG								278
66	199	GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG								278
97	198	GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG								277
123	199	GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG								278
31	199	GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG								278
64	198	GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG								277



		490	500	510	520	530	540	550	560	
									
Re 1363	480	CCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTNATNCGTNGGGTGCNAGCGTTGTCCGGAATTNCTGGGCGTNAAGAGCTCGTAGGC								559
Re 1475	462	CCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGC								541
131	438	CCA-----								440
106	439	CCA-----								441
26	439	CCA-----								441
27	439	CC-----								440
5	439	CC-----								440
6	439	CC-----								440
66	439	CC-----								440
97	438	CCA-----								440
123	439	CCA-----								441
31	439	CCAA-----								442
64	420	-----								420

3. melléklet: Tíz *Rhodococcus equi* törzs génbankban elérhető 16S rRNS gén szekvenciáiban fellelhető különbségek (az aláhúzott és kézzel szedett bázisoktól a előre felé terjedő régiónak megfelelő szakaszt szekvenáltuk meg a saját 11 törzs esetén).

```

AF273620 -----
AF273619 -----
AF273613 -----
AJ272468 ACACGAGTGGCAGACGGGTGAGTACAGTTATGGGTGATCTGCCCTGCACGCTGGGATAAGC
AJ272473 ACACGAGTGGCAGACGGGTGAGTACAGTTATGGGTGATCTGCCCTGCACGCTGGGATAAGC
AJ272469 ACACGAGTGGCAGACGGGTGAGTACAGTTATGGGTGATCTGCCCTGCACGCTGGGATAAGC
AJ272472 ACACGAGTGGCAGACGGGTGAGTACAGTTATGGGTGATCTGCCCTGCACGCTGGGATAAGC
AJ272471 ACACGAGTGGCAGACGGGTGAGTACAGTTATGGGTGATCTGCCCTGCACGCTGGGATAAGC
AJ272470 ACACGAGTGGCAGACGGGTGAGTACAGTTATGGGTGATCTGCCCTGCACGCTGGGATAAGC
AJ272467 ACACGAGTGGCAGACGGGTGAGTACAGTTATGGGTGATCTGCCCTGCACGCTGGGATAAGC
    
```

```

AF273620 -----
AF273619 -----
AF273613 -----
AJ272468 CTTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGG
AJ272473 CTTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGG
AJ272469 CTTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGG
AJ272472 CTTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGG
AJ272471 CTTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGG
AJ272470 CTTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGG
AJ272467 CTTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGG
    
```

```

AF273620 -----
AF273619 -----
AF273613 -----
AJ272468 TTTACTGTTTCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCTACCA
AJ272473 TTTACTGTTTCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCTACCA
AJ272469 TTTACTGTTTCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCTACCA
AJ272472 TTTACTGTTTCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCTACCA
AJ272471 TTTACTGTTTCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCTACCA
AJ272470 TTTACTGTTTCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCTACCA
AJ272467 TTTACTGTTTCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCTACCA
    
```

```

AF273620 -----
AF273619 -----
AF273613 -----
AJ272468 AGGCGACACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGAGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
AJ272473 AGGCGACACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGAGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
AJ272469 AGGCGACACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGAGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
AJ272472 AGGCGACACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGAGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
AJ272471 AGGCGACACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGAGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
AJ272470 AGGCGACACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGAGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
AJ272467 AGGCGACACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGAGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
    
```

```

AF273620 -----GAGTCAGCAGTGGGTAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
AF273619 -----AGTCAGCAGTGGGTAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
AF273613 -----AGTCAGCAGTGGGTAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
AJ272468 CCAATTCCTACGGGAGTCAGCAGTGGGTAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
AJ272473 CCAATTCCTACGGGAGTCAGCAGTGGGTAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
AJ272469 CCAATTCCTACGGGAGTCAGCAGTGGGTAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
AJ272472 CCAATTCCTACGGGAGTCAGCAGTGGGTAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
AJ272471 CCAATTCCTACGGGAGTCAGCAGTGGGTAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
AJ272470 CCAATTCCTACGGGAGTCAGCAGTGGGTAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
    
```


AJ272467 CCAATTCCTACGGGAGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
 AF273620 GCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGACGAGG
 AF273619 GCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGACGAGG
 AF273613 GCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGACGAGG
 AJ272468 GCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGACGAGG
 AJ272473 GCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGACGAGG
 AJ272477 GCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGACGAGG
 AJ272471 GCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGACGAGG
 AJ272470 GCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGACGAGG
 AJ272467 GCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGACGAGG



AF273620 CTAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AF273619 CTAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AF273613 CTAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AJ272468 CTAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AJ272473 CTAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AJ272469 CTAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AJ272472 CTAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AJ272471 CTAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AJ272470 CTAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AJ272467 CTAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT

AF273620 AATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCTAGGCGGTTTT
 AF273619 AATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCTAGGCGGTTTT
 AF273613 AATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCTAGGCGGTTTT
 AJ272468 AATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCTAGGCGGTTTT
 AJ272473 AATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCTAGGCGGTTTT
 AJ272469 AATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCTAGGCGGTTTT
 AJ272472 AATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCTAGGCGGTTTT
 AJ272471 AATACGTATGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCTAGGCGGTTTT
 AJ272470 AATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCTAGGCGGTTTT
 AJ272467 AATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCTAGGCGGTTTT

AF273620 GTCGCGTCTCCGTGAAAACCTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGC GGCGATACGGGCAGA
 AF273619 GTCGCGTCTCCGTGAAAACCTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGC GGCGATACGGGCAGA
 AF273613 GTCGCGTCTCCGTGAAAACCTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGC GGCGATACGGGCAGA
 AJ272468 GTCGCGTCTCCGTGAAAACCTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGC GGCGATACGGGCAGA
 AJ272473 GTCGCGTCTCCGTGAAAACCTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGC GGCGATACGGGCAGA
 AJ272469 GTCGCGTCTCCGTGAAAACCTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGC GGCGATACGGGCAGA
 AJ272472 GTCGCGTCTCCGTGAAAACCTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGC GGCGATACGGGCAGA
 AJ272471 GTCGCGTCTCCGTGAAAACCTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGC GGCGATACGGGCAGA
 AJ272470 GTCGCGTCTCCGTGAAAACCTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGC GGCGATACGGGCAGA
 AJ272467 GTCGCGTCTCCGTGAAAACCTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGC GGCGATACGGGCAGA

AF273620 CTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAG
 AF273619 CTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAG
 AF273613 CTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAG
 AJ272468 CTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAG
 AJ272473 CTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAG
 AJ272469 CTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAG
 AJ272472 CTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAG
 AJ272471 CTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAG
 AJ272470 CTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAG
 AJ272467 CTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAG

AF273620 GAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTGTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
 AF273619 GAGGAACACCGGTGGCGAGGGCGGGTCTGTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
 AF273613 GAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTGTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
 AJ272468 GAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTGTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
 AJ272473 GAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTGTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
 AJ272469 GAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTGTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
 AJ272472 GAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTGTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
 AJ272471 GAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTGTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
 AJ272470 GAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTGTGGGCAGTAACTGACGCTGANGAGCGAAAGC
 AJ272467 GAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTGTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC

AF273620 GTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCGCTA
 AF273619 GTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCGCTA
 AF273613 GTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCGCTA
 AJ272468 GTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCGCTA
 AJ272473 GTGGGTAGCGAACAGGATTATATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCGCTA
 AJ272469 GTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCGCTA
 AJ272472 GTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCGCTA
 AJ272471 GTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCGCTA
 AJ272470 GTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCGCTA
 AJ272467 GTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCGCTA

AF273620 GGTGTGGGTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTG
 AF273619 GGTGTGGGTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTG
 AF273613 GGTGTGGGTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTG
 AJ272468 GGTGTGGGTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTG
 AJ272473 GGTGTGGGTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTG
 AJ272469 GGTGTGGGTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTG
 AJ272472 GGTGTGGGTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTG
 AJ272471 GGTGTGGGTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTG
 AJ272470 GGTGTGGGTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTG
 AJ272467 GGTGTGGGTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTG

AF273620 GGGAGTACGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGG
 AF273619 GGGAGTACGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGG
 AF273613 GGGAGTACGCCGCAAGGCTAAAACTCAARGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGG
 AJ272468 GGGAGTACGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGG
 AJ272473 GGGAGTACGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGG
 AJ272469 GGGAGTACGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGG
 AJ272472 GGGAGTACGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGG
 AJ272471 GGGAGTACGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGG
 AJ272470 GGGAGTACGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGG
 AJ272467 GGGAGTACGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGG

AF273620 GAGCATGT-----
 AF273619 -----
 AF273613 GAGCATGTGGATTAATTCGATGCACCGCAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCG
 AJ272468 GAGCATGTGGATTAATTCGATGCACCGCAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCG
 AJ272473 GAGCATGTGGATTAATTCGATGCACCGCAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCG
 AJ272469 GAGCATGTGGATTAATTCGATGCACCGCAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCG
 AJ272472 GAGCATGTGGATTAATTCGATGCACCGCAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCG
 AJ272471 GAGCATGTGGATTAATTCGATGCACCGCAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCG
 AJ272470 GAGCATGTGGATTAATTCGATGCACCGCAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCG
 AJ272467 GAGCATGTGGATTAATTCGATGCACCGCAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCG

AF273620 -----
 AF273619 -----
 AF273613 -----
 AJ272468 GAAAGCCCTAGAGATACGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
 AJ272473 GAAAGCCCTAGAGATACGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
 AJ272469 GAAAGCCCTAGAGATACGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
 AJ272472 GAAAGCCCTAGAGATACGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
 AJ272471 GAAAGCCCTAGAGATACGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
 AJ272470 GAAAGCCCTAGAGATACGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
 AJ272467 GAAAGCCCTAGAGATACGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT

AF273620 -----
 AF273619 -----
 AF273613 -----
 AJ272468 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGT
 AJ272473 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGT
 AJ272469 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGT
 AJ272472 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGT
 AJ272471 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGT
 AJ272470 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGT
 AJ272467 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGT

AF273620 -----
 AF273619 -----
 AF273613 -----
 AJ272468 TGCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG
 AJ272473 TGCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG
 AJ272469 TGCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG
 AJ272472 TGCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG
 AJ272471 TGCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG
 AJ272470 TGCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG
 AJ272467 TGCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG

AF273620 -----
 AF273619 -----
 AF273613 -----
 AJ272468 GGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCC
 AJ272473 GGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCC
 AJ272469 GGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCC
 AJ272472 GGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCC
 AJ272471 GGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCC
 AJ272470 GGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCC
 AJ272467 GGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCC

AF273620 -----
 AF273619 -----
 AF273613 -----
 AJ272468 GGTTCAGAGGGCTGCGATCCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCCG
 AJ272473 GGTTCAGAGGGCTGCGATCCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCCG
 AJ272469 GGTTCAGAGGGCTGCGATCCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCCG
 AJ272472 GGTTCAGAGGGCTGCGATCCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCCG
 AJ272471 GGTTCAGAGGGCTGCGATCCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCCG
 AJ272470 GGTTCAGAGGGCTGCGATCCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCCG
 AJ272467 GGTTCAGAGGGCTGCGATCCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCCG

AF273620	-----
AF273619	-----
AF273613	-----
AJ272468	GATCGGGG TCT GCAAC
AJ272473	GATCGGGG TCT GCAAC
AJ272469	GATCGGGG TCT GCAAC
AJ272472	GATCGGGG TCT GCAAC
AJ272471	GATCGGGG TCT GCAAC
AJ272470	GATCGGGG TCT GCAAC
AJ272467	GATCGGGG TCT GCAAC

- 1) **AF273620, 581 bp** (28-AUG-2000) *Rhodococcus equi* isolate DY9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, Hardee, R. N. and Yoch, D. C.: A phenotypic and phylogenetic analysis of dimethyl sulfide-producing bacteria from freshwater river sediments
- 2) **AF273619 571 bp** (28-AUG-2000) *Rhodococcus equi* isolate DY8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, , Hardee, R. N. and Yoch, D. C.: A phenotypic and phylogenetic analysis of dimethyl sulfide-producing bacteria from freshwater river sediments
- 3) **AF273613 604 bp** (28-AUG-2000) *Rhodococcus equi* isolate DY1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Hardee, R. N. and Yoch, D. C. A phenotypic and phylogenetic analysis of dimethyl sulfide-producing bacteria from freshwater river sediments
- 4) **AJ272473 1208 bp** (02-MAR-2000) *Rhodococcus equi* partial 16S rRNA gene, strain CUB 1242. McMinn, E. J.: Genomic and phenomic differentiation of *Rhodococcus equi* strains,
- 5) **AJ272472, 1207 bp** (02-MAR-2000) *Rhodococcus equi* partial 16S rRNA gene, strain CUB 1239. McMinn, E. J.: Genomic and phenomic differentiation of *Rhodococcus equi* strains
- 6) **AJ272471 1207 bp** (02-MAR-2000) *Rhodococcus equi* partial 16S rRNA gene, strain CUB 1232, McMinn, E. J.: Genomic and phenomic differentiation of *Rhodococcus equi* strains
- 7) **AJ272470 1206 bp** (02-MAR-2000) *Rhodococcus equi* partial 16S rRNA gene, strain CUB1152, McMinn, E. J.: Genomic and phenomic differentiation of *Rhodococcus equi* strains
- 8) **AJ272469 1208 bp** (02-MAR-2000) *Rhodococcus equi* partial 16S rRNA gene, strain CUB1156, McMinn, E. J.: Genomic and phenomic differentiation of *Rhodococcus equi* strains.
- 9) **AJ272468 1208 bp** (02-MAR-2000) *Rhodococcus equi* partial 16S rRNA gene, strain CUB 1116, McMinn, E. J.: Genomic and phenomic differentiation of *Rhodococcus equi* strains
- 10) **AJ272467 1202 bp** (02-MAR-2000) *Rhodococcus equi* partial 16S rRNA gene, strain CUB 1063, McMinn, E. J.: Genomic and phenomic differentiation of *Rhodococcus equi* strains