

**Állatorvostudományi Egyetem
Doktori Iskola**

**Nem tuberkulotikus mycobacteriumok
azonosítása és tipizálása**

PhD értekezés

dr. Rónai Zsuzsanna

2016

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Dr. Dán Ádám
Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal,
Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság,
Molekuláris Biológiai Laboratórium
témavezető

.....
Dr. Tuboly Sándor
Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
témabizottság tagja

.....
Dr. Gyuranecz Miklós
Magyar Tudományos Akadémia,
Agrártudományi Kutatóközpont,
Állatorvos-tudományi Kutatóintézet
témabizottság tagja

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

.....
dr. Rónai Zsuzsanna

„Per aspera ad astra”

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	4
ÁBRÁK JEGYZÉKE	5
TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	5
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. ÖSSZEFOGLALÁS	9
2. SUMMARY	10
3. BEVEZETÉS	11
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	13
4.1. A <i>MYCOBACTERIUM</i> NEMZETSÉG.....	13
4.2. A <i>MYCOBACTERIUM</i> OK JELLEMZŐI.....	14
4.3. A <i>MYCOBACTERIUM</i> OK JELENTŐSÉGE, AZ OKOZOTT KÓRKÉPEK.....	17
4.4. A <i>MYCOBACTERIUM</i> OK EVOLÚCIÓJA ÉS CSOPORTOSÍTÁSA	20
4.5. A <i>MYCOBACTERIUM</i> OK TENYÉSZTÉSE	22
4.6. A <i>MYCOBACTERIUM</i> OK AZONOSÍTÁSA, GENOTÍPIZÁLÁSA.....	23
4.7. A MAGYARORSZÁGI ÁLLAT-EGÉSZSÉGÜGYI <i>MYCOBACTERIUM</i> DIAGNOSZTIKA.....	26
4.8. CÉLKITŰZÉSEK	28
5. ANYAG ÉS MÓDSZER	29
5.1. MINTAFELDOLGOZÁS, <i>MYCOBACTERIUM</i> TENYÉSZTÉS.....	29
5.2. TÁPTALAJOK VIZSGÁLATA, ZIEHL–NEELSEN FESTÉS	30
5.3. TENYÉSZETEK MORFOLÓGIAI ÉS NÖVEKEDÉSI SAJÁTOSSÁGAINAK VIZSGÁLATA, ÁTOLTÁSOK	32
5.4. DNS KIVONÁS	33
5.5. <i>MYCOBACTERIUM</i> OK AZONOSÍTÁSA I. – PCR MÓDSZEREK ADAPTÁLÁSA	34
5.6. <i>MYCOBACTERIUM</i> OK AZONOSÍTÁSA II. – PCR MÓDSZERFEJLESZTÉS.....	37
5.7. SZEKVENÁLÁS, SZEKVENCIAELEMZÉS	38
5.8. LSP ^A 17 ÉS MIRU–VNTR ANALÍZIS	39
5.9. FELHASZNÁLT TÖRZSEK	40
6. EREDMÉNYEK	41
6.1. <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>AVIUM</i> (MAA)	42
6.2. <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>SILVATICUM</i> (MAS).....	43
6.3. <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>HOMINISSUIS</i> (MAH).....	46
6.4. <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>PARATUBERCULOSIS</i> (MAP).....	47
6.5. EGYÉB, NEM <i>M. AVIUM</i> NTM-OK KIMUTATÁSA ÉS AZONOSÍTÁSA.....	49
6.6. VEGYES FERTŐZÉSEK	55
6.7. <i>M. AVIUM</i> ALFAJOK GENOTÍPIZÁLÁSA	55
6.8. TÖRZSGYŰJTEMÉNY	61
7. MEGBESZÉLÉS	62
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	75
9. IRODALOMJEGYZÉK	77
10. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI	110
11. A DOKTORI KUTATÁS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK	115
12. MELLÉKLETEK	119
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	129

Ábrák jegyzéke

1. ÁBRA: ROBERT KOCH.....	13
2. ÁBRA: <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> TELEPEK LÖWENSTEIN–JENSEN TÁPTALAJON.....	15
3. ÁBRA: AZ AMERIKAI VÖRÖSKERESZT TUBERKULÓZIS KAMPÁNYÁNAK PLAKÁTJA	17
4. ÁBRA: GENOTYPE <i>MYCOBACTERIUM CM</i> ÉS <i>MTBC</i> KITEK EREDMÉNYEI.....	25
5. ÁBRA: A GÜMÖKÖRMENTESSÉGET HÍRDETŐ TÁBLA.....	27
6. ÁBRA: ZIEHL–NEELSEN SZERINT FESTETT BÉLNYÁLKAHÁRTYA KAPARÉK	31
7. ÁBRA: <i>MYCOBACTERIUM</i> TÖRZSEK PCR IDENTIFIKÁLÁSA.....	35
8. ÁBRA: MULTIPLEX <i>MYCOBACTERIUM</i> PCR.....	36
9. ÁBRA: MAP IDENTIFIKÁLÓ ÉS TIPIZÁLÓ PCR RENDSZEREK.....	36
10. ÁBRA: IS901-IS1245 PCR	36
11. ÁBRA: LSP ^A 17 PCR.....	39
12. ÁBRA: <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>AVIUM</i> OKOZTA ELVÁLTOZÁSOK	42
13. ÁBRA: <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>SILVATICUM</i> TÖRZS 7H11 TALAJON	43
14. ÁBRA: OLVADÁSI GÖRBÉK A DUPLEX MM-HRM VALÓS IDEJŰ PCR RENDSZERBEN	45
15. ÁBRA: NORMALIZÁLT GÖRBE.....	45
16. ÁBRA: MEGNAGYOBBODOTT PEYER-PLAKKOK KUTYA VÉKONYBELÉBEN.....	47
17. ÁBRA: JUH TÍPUSÚ (S, I-ES) <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>PARATUBERCULOSIS</i> TÖRZS J TALAJON	47
18. ÁBRA: 34 REPREZENTATÍV NEM <i>M. AVIUM</i> NTM TÖRZS FILOGENETIKAI FÁJA	54
19. ÁBRA: <i>M. AVIUM</i> GENOTÍPUSOK FILOGENETIKAI FÁJA.....	60

Táblázatok jegyzéke

1. TÁBLÁZAT: KÜLÖNBÖZŐ KÓRFORMÁKBÓL IZOLÁLT <i>MYCOBACTERIUM</i> FAJOK	20
2. TÁBLÁZAT: <i>MYCOBACTERIUM</i> FAJOK AZONOSÍTÁSÁHOZ ALKALMAZOTT GÉNEK.....	25
3. TÁBLÁZAT: 2006 ÉS 2015 KÖZÖTT AZONOSÍTOTT <i>MYCOBACTERIUM</i> TÖRZSEK	41
4. TÁBLÁZAT: 2006 ÉS 2015 KÖZÖTT AZONOSÍTOTT NTM-OK ÁLLATFAJONKÉNT.....	41
5. TÁBLÁZAT: 2006 ÉS 2015 KÖZÖTT AZONOSÍTOTT MAA TÖRZSEK ADATAI.....	43
6. TÁBLÁZAT: 2006 ÉS 2015 KÖZÖTT AZONOSÍTOTT MAS TÖRZSEK ADATAI.....	44
7. TÁBLÁZAT: 2006 ÉS 2015 KÖZÖTT AZONOSÍTOTT MAH TÖRZSEK ADATAI.....	46
8. TÁBLÁZAT: 2006 ÉS 2015 KÖZÖTT AZONOSÍTOTT MAP TÖRZSEK ADATAI.....	48
9. TÁBLÁZAT: MAP DIREKT KIMUTATÁSÁRA IRÁNYULÓ VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI.....	49
10. TÁBLÁZAT: 2006 ÉS 2015 KÖZÖTT AZONOSÍTOTT EGYÉB, NEM <i>M. AVIUM</i> NTM TÖRZSEK	50
11. TÁBLÁZAT: AZ EGYES EGYÉB, NEM <i>M. AVIUM</i> NTM TÖRZSEK AZONOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI ÉS A MEGFIGYELT KÓRBONCTANI ELVÁLTOZÁSOK GYAKORISÁGA	53
12. TÁBLÁZAT: A <i>M. AVIUM</i> ALFAJOK EGYES LÓKUSZAIN MEGFIGYELT TANDEM ISMÉTLŐDÉSEK.....	56
13. TÁBLÁZAT: AZ EGYES <i>M. AVIUM</i> GENOTÍPUSOK (GT) GAZDAFAJAI ÉS IZOLÁLÁSUK ÉVE	58-59

Rövidítések jegyzéke

A	<u>a</u> denin
ÁDI	Állat-egészségügyi <u>D</u> iagnosztikai <u>I</u> gazgatóság
AU	<u>A</u> nson <u>U</u> nit: Anson egység: 1AU azt az enzimmennyiséget jelöli, mely kazeinből pH 7 mellett percenként 1 µmol (181 µg) tirozint szabadít fel
BCG	<u>B</u> acillus <u>C</u> almette– <u>G</u> uérin: <i>Mycobacterium bovis</i> vakcinatörzs
C	nukleobázisként: <u>c</u> itozin
C	vegyjelként: szén
°C	Celsius-fok
DI	<u>i</u> ndex of <u>d</u> iscrimination: diszkriminációs index
DNS	<u>d</u> eoxiribo <u>n</u> ukleins <u>a</u> v
ELISA	<u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay: enzimhez kötött immunoszorbens próba
G	<u>g</u> uanin
GT	<u>g</u> enotype: genotípus
h	allélváltozatosság
HPC	<u>h</u> exadecyl- <u>p</u> yridinium- <u>cl</u> oride: hexadecil-piridinium-klorid
HRM	<u>h</u> igh <u>r</u> esolution <u>m</u> elting: nagyfelbontású olvadáspont elemzés
ITS	<u>i</u> nternal <u>t</u> ranscribed <u>s</u> pacer: belső átíródó elválasztó szakasz
LPSN	<u>l</u> ist of <u>p</u> rokar <u>y</u> otic names with <u>s</u> tanding in <u>n</u> omenclature: prokarióták érvényes fajneveit tartalmazó lista
LSP	<u>l</u> arge <u>s</u> equence <u>p</u> olymorphism: hosszabb szekvencia polimorfizmus
M.	<i><u>M</u>ycobacterium</i>
MA	<i><u>M</u>ycobacterium <u>a</u>viu<u>m</u></i>
MAA	<i><u>M</u>ycobacterium <u>a</u>viu<u>m</u> subspecies <u>a</u>viu<u>m</u></i>
MAC	<i><u>M</u>ycobacterium <u>a</u>viu<u>m</u> <u>c</u>omplex: <i>Mycobacterium avium</i> komplex</i>
MAH	„ <i><u>M</u>ycobacterium <u>a</u>viu<u>m</u> subspecies <u>h</u>ominissuis”</i>
MAI	<i><u>M</u>ycobacterium <u>a</u>viu<u>m</u>-<u>i</u>ntracellulare complex: <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> komplex</i>
MAIS	<i><u>M</u>ycobacterium <u>a</u>viu<u>m</u>-<u>i</u>ntracellulare-<u>s</u>crofulaceu<u>m</u> complex: <i>Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum</i> komplex</i>
MAP	<i><u>M</u>ycobacterium <u>a</u>viu<u>m</u> subspecies <u>p</u>aratuberculosis</i>
MAS	<i><u>M</u>ycobacterium <u>a</u>viu<u>m</u> subspecies <u>s</u>ilvaticu<u>m</u></i>

MATR	<u>M</u> ycobacterium <u>a</u> vium <u>t</u> andem <u>r</u> epeat: <i>Mycobacterium avium</i> ismétlődő egységek elemzése
MGIT	BBL <u>M</u> ycobacteria <u>G</u> rowth <u>I</u> ndicator <u>T</u> ube: BBL <i>Mycobacterium</i> növekedési indikátoros cső
MI	<u>M</u> ycobacterium <u>i</u> ntracellulare
MIRU	<u>M</u> ycobacterial <u>i</u> nterspersed <u>r</u> epetitive <u>u</u> nits: szétszórt mycobacteriális ismétlődő egységek elemzése
MgSzH	<u>M</u> ezőgazdasági <u>S</u> zakigazgatási <u>H</u> ivatal
MgSzHK	<u>M</u> ezőgazdasági <u>S</u> zakigazgatási <u>H</u> ivatal <u>K</u> özpont
MLST	<u>m</u> ulti- <u>l</u> ocus <u>s</u> equencing <u>t</u> yping: multi-lókus szekvencia tipizálás
MST	<u>m</u> ultispacer <u>s</u> equencing <u>t</u> yping: multispacer szekvencia tipizálás
MTC	<u>M</u> ycobacterium <u>t</u> uberculosis <u>c</u> omplex: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> komplex
NALC	<u>N</u> - <u>a</u> cetyl- <u>L</u> - <u>c</u> ysteine
NaOH	nátrium-hidroxid
NÉBIH	<u>N</u> emzeti <u>É</u> lelmiszerlánc- <u>b</u> iztonsági <u>H</u> ivatal
NJ	<u>n</u> eighbour- <u>j</u> oining: szomszédösszevonó módszer
NTM	<u>n</u> on- <u>t</u> uberculous <u>M</u> ycobacterium: nem tuberkulotikus <i>Mycobacterium</i>
nv	nem vizsgált
OÁI	<u>O</u> rszágos <u>Á</u> llategészségügyi <u>I</u> ntézet
OIE	eredetileg <u>O</u> ffice <u>I</u> nternational des <u>E</u> pizooties, 2003-tól The World Organisation for Animal Health: Állat-egészségügyi Világszervezet
PBS	<u>p</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline: foszfát puffer
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction: polimeráz láncreakció
PFGE	<u>p</u> ulsed- <u>f</u> ield <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis: pulzáló erőterű gélelektroforézis
pH	<u>p</u> ondus <u>H</u> ydrogenii: kémhatás
RFLP	<u>r</u> estriction <u>f</u> ragment <u>l</u> ength <u>p</u> olymorphism: restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus
RNS	<u>r</u> ibon <u>u</u> kleinsav
rpm	<u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute: percenkénti fordulatszám
rRNS	<u>r</u> iboszomális <u>r</u> ibon <u>u</u> kleinsav
Σ	summa, összesen
subsp.	subspecies: alfaj
SNP	<u>s</u> ingle <u>n</u> ucleotide <u>p</u> olymorphism: egy pontos nukleotid polimorfizmus
T	<u>t</u> hymine
TCH	<u>t</u> hiophen-2- <u>c</u> arboxylic-acid- <u>h</u> ydrazide: tiofén-2-karbonsav-hidrazid

TR	<u>t</u> andem <u>r</u> epeat: tandem ismétlődés
TSPB	<u>t</u> ri <u>s</u> odium- <u>p</u> hosphate- <u>b</u> enzalkonium: trinátrium-foszfát és benzalkónium-klorid
UV	<u>u</u> ltrayiolet: ultraibolya
ún.	úgynevezett
VNTR	<u>v</u> ariable <u>n</u> umber of <u>t</u> andem <u>r</u> epeats: változó számú tandem ismétlődés elemzés
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization: Egészségügyi Világszervezet
ZN	<u>Z</u> iehl- <u>N</u> eelsen

1. Összefoglalás

Az elmúlt években a hazai állategészségügy egyik kiemelten fontos célja az ország gümőkórmentes státuszának elfogadtatása volt, melynek elérését megnehezítette az ún. paraallergiás reakciók jelenléte. A szoros antigénszerkezeti rokonság miatt a nem tuberkulotikus *Mycobacterium*ok (NTM) képesek áthangolni a gazdaszervezet immunrendszerét, minek következtében a hordozó gazdák reagálhatnak a tuberkulin bőrpróbában, megnehezítve ezzel a gümőkór *in vivo* diagnosztikáját.

Vizsgálataink célja az országban előforduló NTM-ok szilárd táptalajon való tenyésztése, azonosítása és tipizálása, valamint előfordulási gyakoriságuk, gazdaspektrumuk és kórokozó képességük felmérése volt. Munkánk során házi és vadon élő emlős- és madárfajok mellett tőgygyulladásos tehének tejéből, valamint társ- és kedvtelésből tartott állatok mintáiból származó törzseket is vizsgáltuk.

Vizsgálatainkba 2006 és 2015 között izolált *Mycobacterium avium* és egyéb, nem *M. avium* NTM-okat vontunk be. A korábban szilárd táptalajon nem tenyészthető törzsek esetén a vizsgálatukhoz szükséges tenyészetek létrehozásához táptalajokat fejlesztettünk. A törzsek megbízható azonosításához és tipizálásához 20 molekuláris biológiai módszert honosítottunk meg. Két *M. avium* alfaj elkülönítésére, melyhez a nemzetközi szakirodalomban nem találtunk megbízható módszert, magunk fejlesztettünk valós idejű PCR identifikáló rendszert, mely egy alfajspecifikus és egy nagyfelbontású olvadáspont elemzésen alapuló eljárás kombinációja.

Száznegyvennégy (144) *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (MAA), 65 *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* (MAS), 94 „*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*” (MAH) és 659 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) törzs mellett 1419 egyéb, nem *M. avium* NTM-ot azonosítottunk. A *M. avium* törzsek genetikai változatosságát LSP^A17 és MIRU-VNTR módszerekkel vizsgáltuk. Ezen genotipizálások eredményeként 772 törzs között 85 különböző, alfajspecifikus genotípust mutattunk ki, melyek filogenetikai rokonságát szomszédösszevonó módszerrel vizsgáltuk. A MAH és MAA törzsek nagymértékű változatossága mellett a MAS és MAP törzsek relatív homogenitását találtuk. A nem *M. avium* NTM-ok közül 230 törzs pontos azonosítását végeztük el. Harmincegy ismert faj mellett 8 új törzstípust is kimutattunk. Vizsgálataink során sikerrel izoláltunk Magyarországon korábban nem ismert fajokat és alfajokat. Egyes fajokat és alfajokat új gazdafajokban is megtaláltuk, valamint korábban apatogénnek vélt fajok okozta fertőzéseknel kórtani elváltozásokat találtunk.

A hazánkban nagy múltra visszatekintő *Mycobacterium* diagnosztika folytatását képező vizsgálataink hiánypótló jellegűek. Eredményeink jelentősen hozzájárultak a NTM-ok magyarországi előfordulásáról, patogenitásáról, gazdaspektrumáról rendelkezésre álló ismeretanyag bővítéséhez. Az egyidejűleg létrehozott részletesen jellemzett törzsekből álló törzsgyűjtemény kiváló alapot szolgáltat esetleges jövőbeni mycobacteriológiai vizsgálatokhoz.

2. Summary

One of the most important goals of the Hungarian livestock breeding in the past few years was to achieve the official declaration of the tuberculosis-free status of our cattle farms, which was hampered by the presence of numerous so-called 'paraallergic' reactions. Due to the high degree of antigenic relatedness non-tuberculous Mycobacteria (NTM) infected animals can react in the tuberculin skin testing, thus hampering the *in vivo* diagnosis of bovine tuberculosis.

The primary aim of our study was the identification and typing of NTM in Hungary. For this purpose the cultivation of some strains on the surface of solid media had to be solved. Furthermore we intended to survey the occurrence, host species spectrum and pathogenicity of the different strains. Beside domestic and wild mammals and birds we also tested milk samples from mastitic cattle and a diverse panel of samples from companion- and pet animals.

In our study, we included *M. avium* and non-*avium* NTM strains isolated between 2006 and 2015 in Hungary. For the reliable identification of the strains numerous molecular biological assays were adapted, while we also developed a new molecular identification method.

Besides 144 *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (MAA), 65 *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* (MAS), 94 '*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*' (MAH) and 659 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) strains 1419 other, non-*avium* NTM were identified. The genetic diversity of the *M. avium* strains was tested by LSP^A17 and MIRU–VNTR analyses. Among 772 strains 85 subspecies specific genotypes were identified, whose phylogenetic relatedness was investigated by Neighbour-Joining method. We found extrem heterogeneity among MAH and MAA strains, while MAS and MAP displayed relative homogeneity. Of the non-*avium* NTM isolates, we identified 230 strains to the species level. Among them we detected 31 known species and 8 new strain types. In the course of our investigations we successfully isolated several species and subspecies earlier not known in Hungary. Some species or subspecies were isolated from new hosts. We also found gross pathologic lesions in infections caused by species, which were not considered to be pathogenic before.

Despite the long-standing *Mycobacterium* diagnostics in Hungary, our investigations are gap-filling. Our results greatly contribute to the expansion of our knowledge about the occurrence, pathogenicity, and host spectrum of NTM in Hungary. The strain collection created in this study provides excellent basis for further investigations.

3. Bevezetés

„Nobody ever figures out what life is all about, and it doesn't matter. Explore the world. Nearly everything is really interesting if you go into it deeply enough.”

Richard P. Feynman

Az Országos Állategészségügyi Intézet (OÁI), majd jogutódainak [Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal (MgSzH), Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Központ (MgSzHK), Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság (NÉBIH-ÁDI)] Gümőkór és Klinikai, a későbbiekben csupán Bakteriológiai Laboratóriumában a szarvasmarha-gümőkór kórokozóinak kimutatására végzett vizsgálatok során igen nagy számmal találkoztunk olyan *Mycobacterium* (*M.*) törzsekkel, melyek nem voltak tagjai a *Mycobacterium tuberculosis* komplexnek (MTC). E törzsek tenyésztési idejükben és morfológiájukban igen változatosaknak bizonyultak. Jelentőségüket sok esetben nehéz volt felmérni, hisz kórbonctani elváltozás csupán az esetek töredékében kapcsolódott jelenlétükhöz és az akkoriban alkalmazott klasszikus biokémiai próbák pontos azonosításukra nem voltak megbízhatóan alkalmasak.

Bár az ország szarvasmarha-állománya 1981-től gyakorlatilag gümőkórmentes volt, az Európai Unió ezt a reaktív egyedek nagy száma miatt mégsem ismerte el. Az olyan állományokat, melyekben a gümőkór jelenlétét nem lehetett igazolni, azonban a tuberkulin bőrpróbákban nagyszámú pozitív vagy kétes reakció jelentkezett, paraallergiásnak minősítették. A 2000-es évek elején számos közlemény látott napvilágot, melyek bizonyítják az egyéb, nem tuberkulotikus *Mycobacteriumok* (NTM) szerepét a fals pozitív bőrpróbák hátterében. Mindezek alapján feltételezhető, hogy hazánkban a tuberkulin próbában reagáló egyedek nyirokcsomó mintáiból kitenyésztett nagyszámú NTM törzs szerepet játszik az állományokban megfigyelhető paraallergiás reakciók oktanában.

A hazánkban az 1980-as 1990-es években folyó vizsgálatok eredményeiből ismert, hogy a paratuberkulózis jelen van Magyarországon. E betegség kórokozója kiemelt jelentőségű a paraallergiás reakciók hátterében feltételezett NTM-ok sorában, hisz jelentős gazdasági veszteségek mellett a humán Crohn-betegség kóroktanában is szerepet tulajdonítanak neki. Tekintettel arra, hogy zoonotikus képességet számos egyéb NTM faj esetén leírtak, e törzsek jelenléte közegészségügyi szempontból sem elhanyagolható.

Annak érdekében, hogy a paraallergiás reakciók hátterét minél pontosabban felderítsük, s hogy a paraallergiának tulajdonított pozitív tuberkulin bőrpróbákat okozó egyéb, NTM-okat minél több esetben ki tudjuk tenyésztetni, fejlesztéseket vezettünk be mind a *Mycobacterium* tenyésztés, mind pedig az azonosítás területén. A változtatások hatására többek között 3–5-szörösére emelkedett a kitenyésztett, a paratuberkulózis kórokozójaként ismert *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) törzsek száma, és kezdtük megismerni a még előforduló *Mycobacterium* fajokat. A molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzéséhez az Intézet, majd Igazgatóság Molekuláris Biológiai Laboratóriumában kaptunk lehetőséget.

Vizsgálatainkat szarvasmarha és egyéb háziállatok mellett vadállatokra és környezeti mintákra is kiterjesztettük. A vadon élő emlősök és madarak, vagy akár természetes (talaj) és mesterséges környezeti elemek (itató), mint a különböző *Mycobacterium* fajok rezervoárjai, meghatározó jelentőséggel bírnak a *Mycobacterium* fertőzések fenntartásában és terjesztésében.

Munkánk során újabb és újabb kihívásokkal találtuk magunkat szemben, melyekre új táptalajok fejlesztésével, molekuláris biológiai azonosító módszerek meghonosításával, vagy új identifikáló módszer fejlesztésével reagáltunk. Mindamellet, hogy megpróbáltunk felzárkózni a *Mycobacterium* diagnosztika nyugati színvonalához, adataink szűk földrajzi környezetünkben hiánypótlónak, új eredményeink pedig, nemzetközi viszonylatban is figyelemreméltónak bizonyultak.

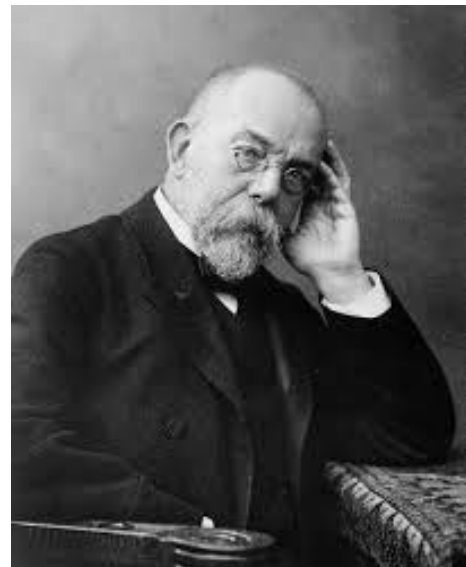
4. Irodalmi áttekintés

„Nunquam otiosus”

Robert Koch

4.1. A *Mycobacterium* nemzetség

A mycobacteriumok a valódi baktériumok országának (*Eubacteria*) *Actinobacteria* törzsében, az *Actinomycetales* rend *Corynebacterineae* alrendjén belül a *Mycobacteriaceae* családba tartoznak (Skerman és mtsai., 1980, Magee és Ward, 2012). A nemzetséget Karl Bernhard Lehmann és Rudolf Otto Neumann írta le 1896-ban, melynek mai napig legfontosabb tagja a *Mycobacterium (M.) tuberculosis*, vagy Koch bacillus, ahogy Nobel-díjas felfedezőjéről (1. ábra) ismerik világszerte (Lehmann és Neumann, 1896).



1. ábra:
Robert Koch (1843-1910)

A nemzetségnek jelenleg 174 elfogadott tagja van az érvényes fajneveket tartalmazó „List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature” (LPSN, <http://www.bacterio.net>) szerint. Az 1970-es 1980-as években a nemzetség azon fajait, melyek az akkor elérhető biokémiai és tenyésztési módszerekkel nem voltak elkülöníthetők, előszeretettel sorolták komplexekbe. A molekuláris taxonómia fejlődésének következtében azonban ezen komplexek határai az elmúlt években sokat változtak.

A *Mycobacterium tuberculosis* komplex (*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTC) tagjai a *M. africanum*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* és a BCG (Bacillus Calmette–Guérin, BCG) törzs, azonban mindezek mellett több olyan fajnév is előkerül [*M. canettii* (van Soolingen és mtsai., 1997), *M. mungii* (Alexander és mtsai., 2010), *M. orygis* (van Ingen és mtsai., 2012), *M. suricattae* (Parsons és mtsai., 2013)], melyeket nem tartalmazza az LPSN lista.

A *Mycobacterium avium* komplex (*Mycobacterium avium* complex, MAC) az elmúlt években nem csak nyert, hanem veszített is tagokat, és neve is többször megváltozott. Az 1980-as években még *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum* komplexként (*Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum* complex, MAIS) említették (Picken és mtsai., 1988), azonban a 90-es években egyértelművé vált, hogy a *M. scrofulaceum*-ot nem

helyes e csoportba sorolni (Inderlied és mtsai., 1993), így az akkori szakirodalomban már csak *Mycobacterium avium-intracellulare* komplexként (*Mycobacterium avium-intracellulare* complex, MAI (Legrand és mtsai., 1999)) találjuk. Ma már a *M. intracellulare*-t sem soroljuk ide (Bull és mtsai., 2003), így pusztán MAC-ről beszélünk (Kazda és mtsai., 2009). Ennek tagjai a *M. avium* 3 elfogadott [*M. avium* subsp. *avium* (MAA), *M. avium* subsp. *silvaticum* (MAS), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)] és egy javasolt [„*M. avium* subsp. *hominissuis*” (MAH), Mijs és mtsai., 2002] alfaja mellett a *M. chimaera* (korábban MAC-A, Tortoli és mtsai., 2004), *M. colombiense* (korábban MAC-X, Murcia és mtsai., 2006), *M. vulneris* (korábban MAC-Q, van Ingen és mtsai., 2009b), *M. marseillense*, *M. timonense* és a *M. bouchodurhonense* (Ben Salah és mtsai., 2009). Magát a *M. avium* fajt először 1901-ben Chester professzor írta le (Chester, 1901).

A MTC és MAC mellett találkozhatunk még *M. terrae* komplex (tagjai: *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. arupense*, *M. senuense*, *M. kumamotoense*, *M. hiberniae*, *M. engbaekii*, *M. heraklionense*, *M. longobardum*) (Tortoli és mtsai., 2013), *M. fortuitum* komplex (tagjai: *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*, *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum*, *M. peregrinum*, *M. septicum*, *M. porcinum*, *M. boenickei*, *M. houstonense*, *M. neworleansense*, *M. brisbanense*, *M. farcinogenes*, *M. senegalense*) (Han és mtsai., 2007), *M. parafortuitum* komplex (tagjai: *M. parafortuitum*, *M. aurum*, *M. neoaurum*, *M. austroafricanum*, *M. diernhoferi*) (Tsukamura és mtsai., 1983), *M. simiae* komplex (tagjai: *M. simiae*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. heidelbergense*, *M. lentiflavum*, stb.) (Fusco da Costa és mtsai., 2015) vagy *M. chelonae-abscessus* komplex (tagjai: *M. chelonae*, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. immunogenum*, stb.) (Simmon és mtsai., 2011) kifejezésekkel is.

4.2. A mycobacteriumok jellemzői

A mycobacteriumok nevében a „myco” előtag görög eredetű, jelentése: gomba, mely e csoport tagjainak folyékony táptalaj felszínén mutatott jellegzetes penészszerű növekedésére utal. A mycobacteriumok Gram-pozitív (esetleg szakaszosan festődő), obligát aerob, nem mozgó, sav- és alkoholálló [Ziehl-Neelsen (ZN) pozitív], egyenes, vagy enyhén hajlott pálcika alakú baktériumok, melyek nem képeznek spórákat. A baktériumsejtek hossza 1–10 µm, míg szélességük 0,2–0,6 µm közötti tartományban mozog. Tápanyagigényük, hőmérsékleti tartományuk, növekedési sebességük és telepmorfológiájuk szintén igen változatos (Medveczky és mtsai., 1998).

A különböző *Mycobacterium* fajok között találunk olyanokat, melyek szinte bármilyen táptalajon képesek növekedni, de vannak olyanok is, melyek speciális táptalaj-összetevőket (pl.: mycobactin) igényelnek (Lambrecht és Collins, 1992). A lepra kórokozójának (*M. leprae*)



2. ábra:
Mycobacterium tuberculosis
telepek Löwenstein-Jensen
táptalajon

szilárd táptalajon való kitenyésztése évtizedekig lehetetlen volt (Pattyn, 1973, Murohashi és Yoshida, 1978).

Egyes *Mycobacterium* fajok csupán meghatározott, szűk (*M. ulcerans*: <33 °C, *M. kansasii*, *M. caprae*: 35–40 °C, *M. thermoresistibile*: 37–52 °C), míg mások tág (*M. psychrotolerans*: 4–37 °C, MAH: 18–45 °C, *M. phlei*: 22–52 °C, *M. hassiacum*: 30–65 °C) hőmérsékleti tartományban képesek szaporodni (Magee és Ward, 2012). Ugyanakkor az is bizonyítást nyert, hogy kedvezőtlen környezeti viszonyok esetén a törzsek képesek ún. alvó, nyugalmi állapotba kerülni, megőrizve fertőzőképességüket hónapokon, vagy akár éveken át (Whittington és mtsai., 2004).

Az egyes törzsek növekedési sebessége (melyen a szilárd táptalaj felületén képzett szemel látható telepek megjelenéséig eltelt időt értjük) összefüggésben áll a baktériumsejtek osztódási sebességével. Egy baktériumsejt osztódása *M. smegmatis* esetén 3 órát, *M. tuberculosis* esetén 18–24 órát, míg *M. leprae* esetén akár 14 napot is igénybe vesz (Gomez és Bishai, 2000). Ennek következtében gyorsan és lassan növvő *Mycobacterium* fajokat különböztetnek meg, és a határt e két csoport között 7 napnál húzták meg (Stahl és Urbance, 1990).

A kialakult baktériumtelepek (2. ábra) általában aprók, domborúak, durva [R (rough) telep] vagy sima [S (smooth) telep] felületűek, viaszosan fénylők, azonban egyazon törzs különféle táptalajokon eltérő morfológiával is képes megjelenni. A telepek leggyakrabban szürkésfehér színűek (non-chromogen fajok), de sok *Mycobacterium* faj képes karotinoid pigmentek termelésére. A pigmenttermelés egyes fajoknál csak fény hatására indul be (photochromogen fajok), másoknál ettől függetlenül is működik (scotochromogen fajok) (Runyon, 1959).

A mycobacteriumok speciális tulajdonságaik jó részét egyedi sejtfaluknak köszönhetik. A sejtfal alapvetően egy belső és egy külső rétegből áll. A belsőben peptidoglikán, arabinogalaktán és mikolsav kapcsolódik egymáshoz kovalens kötésekkel a sejtmembrántól a sejtfal külső rétegének irányába. A peptidoglikán glikán láncában N-acetil-glükózamin és N-acetil-muraminsav molekulák kapcsolódnak egymáshoz. A peptid részt L-alanil-D-izoglutaminil-mezo-diaminopimelinsavból álló fehérjeláncok alkotják, melyek az N-acetil-muraminsavban található tejsavmaradék karboxil csoportjaihoz kapcsolódnak. A peptidoglikán molekulák összekapcsolásában ezek a rövid fehérje oldalláncok játszanak szerepet. A mycobacteriumok sejtfalának különlegessége, hogy a peptidoglikánok között

nagyjából négyszer annyi a keresztirányú oldallánc kapcsolat, mint más baktériumoknál. A mikolsav molekulák egy telített rövidebb (20–26 C) α -láncból és egy hosszabb (60–90 C) meromikolát láncból állnak. A sejtfa külső rétegében található szabad lipidek közül (trehalóz-dimikolátok, glikopeptidolipidek, phthiocerol-dimikocerosatok, szulfolipidek, fenolos glikolipidek, lipooligoszacharidok) a hosszú láncúak a mikolsav molekulák rövid, míg a rövid láncúak a mikolsav molekulák hosszú láncjaihoz illeszkednek, és kiegészítve azokat az ún. mycomembránt, egy ál-külső membránt hoznak létre (Brennan, 2003, Abdallah és mtsai., 2007, Hett és Rubin, 2008).

A mycobacteriumok sejtfaelemeinek még egy fontos csoportját olyan strukturális foszfolipidek alkotják, melyek lipid komponensükkel a sejtmembránhoz vagy a mycomembránhoz kötődnek. Ide tartoznak a foszfatidilinozitol-mannozidok, a mannóz-tartalmú glikolipidek, valamint a lipomannán és a lipoarabinomannán (Fukuda és mtsai., 2013).

E magas lipidtartalmú hidrofób sejtfa a legtöbb hidrofil antibiotikum számára komoly barriert jelent, így a mycobacteriumok ezekkel szemben természetes rezisztenciával bírnak. A lipofil antibiotikumok, mint a rifampicin, a makrolidok (pl.: erythromycin), a fluorokinolonok (pl.: ciprofloxacin), a vancomycin, vagy a β -laktámok (imipenem, penicillinek) képesek átjutni a sejtfaon (Lambert, 2002), azonban a mycobacteriumok magas mutációs rátájának köszönhetően szerzett rezisztencia hamar kialakulhat. A környezeti szaprofita mycobacteriumok az őket körülvevő erősen kompetitív közegnek köszönhetően általában sokkal rezisztensebbek, mint a patogén fajok, melyeknél viszont egyre nagyobb problémát okoz az ún. multidrog rezisztencia (Prasanthi és Murty, 2014).

Különleges sejtfa mellett a mycobacteriumok jellegzetes biokémiai tulajdonságokkal is bírnak. A niacintermelés minden *Mycobacterium* törzs sajátja, azonban egyesek, mint pl. a *M. tuberculosis* egy enzimdefektus okán nem képesek azt továbbalakítani, így akumulálják. Ezen felhalmozott niacin kimutatását szolgálja a niacin akumulációs próba. A mycobacteriumok kataláz, ureáz, aril-szulfatáz, vagy pirazin-amidáz enzim termelését, nitrát-, nitrit- vagy tellurit-redukáló képességét, amidáz-, észter-, foszfatáz-, szulfatáz- vagy β -D-galaktozidáz-aktivitását, vasfelvevő vagy polioxietilén-mono-oleát (Tween-80) hidrolizáló képességét specifikus próbák segítségével vizsgálhatjuk (Ribón, 2012).

Ugyancsak jellemző az egyes fajokra, hogy mely vegyületek segítik, vagy éppen gátolják növekedésüket. Glicerinn jelenlétében a legtöbb *Mycobacterium* faj jobban növekszik, de pl. a *M. bovis* növekedésére e vegyület nincs hatással. A toluidinkék jelenléte azonban gátolja a *M. bovis* növekedését éppúgy, mint a tiofén-2-karbonsav-hidrazid (TCH) vagy a pironyálkasav, míg a *M. tuberculosis* p-nitro-benzoosav jelenlétében nem képes növekedni. Az egyes fajok vagy fajcsoportok között további elkülönítési lehetőséget jelent a

0,5% nátrium-klorid, a 0,2% pikrinsav, vagy hidroxil-amin, nátrium-oleát, esetleg nátrium-nitrit mellett való növekedés képességének vizsgálata (Iwainsky és Káppler, 1974).

A mycobacteriumok nemcsak biokémiai tulajdonságaikat tekintve, de genetikai hátterükben is sok szempontból különlegesek. A *Mycobacterium* DNS egyetlen cirkuláris molekula, mely 4,4–6,9 Mb méretű, igen magas, 60–70%-os GC tartalommal, mely 4500–6900 gént kódol. A genom sok ismétlődő DNS elemet tartalmaz, különösen inszerciós szekvenciákat (Cole és mtsai., 1998, Prasanna és Mehra, 2013).

A nemzetség tagjainak egyre részletesebb génszintű vizsgálatai nemcsak taxonómiai, de morfológiai, biokémiai, ökológiai, patogenitási, antibiotikum érzékenységi kérdésekre egyaránt választ adhatnak. Jó példa erre a nemzetségre (pantoát-béta-alanin-ligáz inszerció, orotidin-5'-foszfát-dekarboxiláz deléció) vagy annak meghatározott csoportjaira jellemző (lassan növekvő *Mycobacterium* fajoknál a 16S rRNS 451-es és 482-es pozíciói között hosszabb helix található, mint a gyorsan növekvőben) specifikus inszerciós vagy deléciós szakaszok, esetleg fehérjék felismerése (Gao és Gupta, 2012).

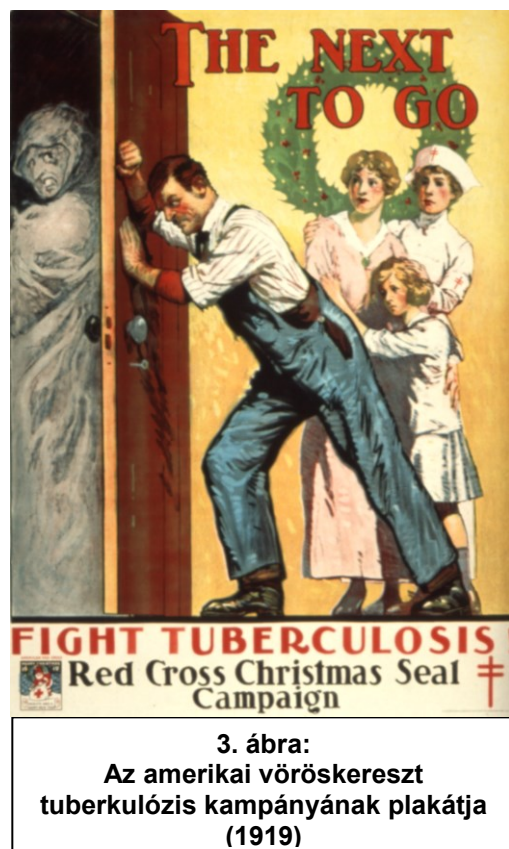
4.3. A mycobacteriumok jelentősége, az okozott kórképek

A mycobacteriumok zoonotikus kórokozók, melyek mind állatokban, mind pedig az emberben súlyos, általában krónikus lefolyású, nehezen gyógykezelhető, gyakran fatális kimenetelű kórképeket hoznak létre.

A *Mycobacterium* fertőzések jelentőségét tovább fokozza, hogy intracelluláris kórokozóként a gazda humorális immunválasztól védetten nemcsak túlélnek, de szaporodni is képesek a makrofágokban (Meena és Rajni, 2010, Gengenbacher és Kaufmann, 2012).

A nemzetség tagjai közül obligát patogén kórokozónak csupán a MTC tagjait és a *M. leprae*-t tartják. Habár az új leprás esetek száma évente alig 200.000, a betegség világszerte még mindig milliós nagyságrendben van jelen (Suzuki és mtsai., 2012, WHO – Global Leprosy Update 2013: <http://www.who.int/wer/2014/wer8936.pdf?ua=1>).

A tuberkulózis a világ vezető kórképeinek egyike (3. ábra). A föld népességének egy harmada feltételezhetően fertőzött *M. tuberculosis*-szal. Az Egészségügyi Világszervezet



3. ábra:
Az amerikai vöröskereszt
tuberkulózis kampányának plakátja
(1919)

(World Health Organization, WHO) adatai szerint 2013-ban 9 millió új esetet találtak (http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).

A tuberkulózis és a lepra mellett az emberek harmadik legjelentősebb mycobacteriumos megbetegedése a *M. ulcerans* által kialakított ún. Buruli-fekély, melynek kórfejlődésében a baktérium által termelt citotoxikus toxin, a mycolakton játszik kulcsszerepet (Doig és mtsai., 2012).

A szarvasmarha-gümőkór annak ellenére, hogy a fejlett országok zömében sikerült elérni és fenntartani a mentességet, továbbra is globális probléma, mely fenyegeti mind az emberek, mind pedig az állatok egészségét (Humblett és mtsai., 2009).

A mycobacteriumok által okozott kórképekben azonban nem csupán az obligát patogén fajok vesznek részt (Pimm és mtsai., 2004).

A MAC tagjai közül a MAA a madarak gümőkórjának kórokozója. A MAA-ot ritkán izolálják környezeti mintákból, talajból vagy vízből, így feltételezhetően a fertőzött gazdák tartják fenn és terjesztik e kórokozót (Kazda és mtsai., 2009). Hejlicek és Trembl (1995) vizsgálatai szerint az egyes madárfajok eltérő fogékonyságot mutatnak ezen kórokozóval szemben: a házityúk, a fácán és a házi veréb a legérzékenyebb, míg például a vetési varjú a legellenállóbbak csoportjába tartozik. A különböző házi és vadon élő madárfajok mellett azonban kimutatták már MAA-ot szarvasmarhákból, lovakból, sertésekből és egyéb házi és vadon élő emlősökből is (Thoen, 1994, Thorel és mtsai., 1997). Friend és Franson (1999) a lehetséges gazdafajok érzékenységét vizsgálva megállapították, hogy míg a madarak, sertések és nyulak igen fogékonyak a kórokozóval szemben, addig a kutyák, macskák és az ember különösen ellenállóak.

A MAP a paratuberkulózis, vagy ahogy tőlünk nyugatabbra nevezik, a Johne-kór kórokozója. A kérődző állatok ezen idült bélgyulladásban megnyilvánuló, csillapíthatatlan hasmenéssel, fokozatos lesoványodással járó betegsége másodlagos tünetek sorát és jelentős gazdasági veszteségeket eredményez (Hasonova és Pavlik, 2006). A betegséget 1895-ben Heinrich Albert Johne írta le (Johne és Frothingham, 1895), a kórokozót azonban csak 1910-ben, Frederick William Twort-nak sikerült kitenyészteni (Twort és Ingram, 1912). A juh típusú törzsek eltérő tulajdonságaira az 1930-as években figyeltek fel (Dunkin és Balfour-Jones, 1935). A kórokozót a humán Crohn-betegséggel már igen korán kapcsolatba hozták (Chiodini, 1989), azonban egyértelmű bizonyítékok híján szerepe a mai napig vitatott (Tuboly és mtsai., 2005, Nagy és Buckley, 2008, Chiodini és mtsai., 2012).

A betegség elsősorban kérődző állatokban fordul elő, de kimutatták már ragadozó állatfajokból, lovakból, sőt madaraktól is (Beard és mtsai., 2001, Larsen és mtsai., 1972). A betegség ez egész világon elterjedt. Az Állat-egészségügyi Világszervezet (eredetileg Office International des Epizooties, 2003-tól The World Organisation for Animal Health, OIE)

adatai szerint (http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines) Ukrajna és Szerbia kivételével minden hazánkkal szomszédos országban jelen van.

A paratuberkulózis okozta gazdasági kártétel ellen leginkább állományszintű védekezés folytatható, melynek sarokpontjai: a kórokozó behurcolásának elkerülése, a fertőzött és ürítő állatok kiemelése által a környezeti terhelés csökkentése, és az állatok fertőződésének megakadályozása (Nielsen és Toft, 2007, Pillars és mtsai., 2011). Habár a betegségre egyre nagyobb figyelem irányul világszerte, és több országban indultak már mentesítési programok (Luyven és mtsai., 2002, Nielsen, 2009), hazánkban nem zajlanak országos felmérő vizsgálatok, és csupán állományszinten találkozunk mentesítési törekvésekkel (Fodor és mtsai., 2014). Hazai juhállományokban a paratuberkulózis előfordulásáról Hajtós és mtsai. (1999) számoltak be.

A MAS-ot szintén összefüggésbe hozták a Crohn-betegséggel (Moss és mtsai., 1992b, McFadden és mtsai., 1992). Elsőként örvös galambból izolálták, de mint ahogy neve is mutatja, vadon élő állatokban is gyakori (Saxegaard és Baess, 1988), és kimutatták már daruból (Thorel és mtsai., 1990), pingvinből (Turenne és mtsai., 2008) és császármadárból (Saxegaard és Baess, 1988) is.

A MAH elnevezést Mijs és mtsai. (2002) kifejezetten az emberből és sertésekből származó *M. avium* izolátumok számára javasolták, de kimutatták már kutyákból (Campora és mtsai., 2011), lovakból, vaddisznóból, gímszarvasból (Rindi és Garzelli, 2014), és ritkán madaraktól (Shitaye és mtsai., 2009b) is.

A komplex további tagjait leginkább immunhiányos emberek légúti kórképeiből izolálják (Bills és mtsai., 2009), a *M. vulneris* azonban bőrelváltozások kórokozójának bizonyult (van Ingen és mtsai., 2009b).

A MAC-en kívüli *Mycobacterium* fajok is különös klinikai-kórtani jelentőséggel bírnak.

A halak gümőkórját zömében *M. marinum*, *M. fortuitum* vagy *M. chelonae* okozza (Decostere és mtsai., 2004), azonban kimutattak már többek között *M. abscessus*-t, *M. goodii*-t, *M. shottsii*-t vagy *M. pseudoshottsii*-t is jellegzetes elváltozásokból (Gauthier és Rhodes, 2009).

Szarvasmarhákban a *M. farcinogenes* és *M. senegalense* olyan kórképet alakít ki, mely a bőr és a felületes nyirokerekről krónikus granulomatózus gyulladással jár (Hamid, 2014).

A szarvasmarhák mycobacteriumos tőgygyulladásában leginkább *M. smegmatis* és *M. fortuitum* játszanak kórtani szerepet (Richardson, 1970), de kimutattak már *M. goodii*-t is a betegség hátterében (Machado és mtsai., 2015), sőt gümőkór és paratuberkulózis esetén a *M. bovis/caprae* és a MAP is ürülhet a tejjel (Messelhäuser és mtsai., 2012).

A fent felsorolt kórképek mellett változatos egyéb kórformákból is izoláltak már *Mycobacterium* fajokat emberek és állatok esetén egyaránt (1. táblázat). A humán fertőzések hátterében az esetek nagy százalékában valamilyen immunhiányos kórkép áll (Kiehn és mtsai., 1985) és gyakoriak a nozokomiális infekciók is (Zlojtro és mtsai., 2015).

1. táblázat: Különböző kórformákból izolált *Mycobacterium* fajok

kórokozó	elváltozás jellege	előfordulás	hivatkozás
<i>M. algericum</i>	légúti	kecske	Sahraoui és mtsai., 2011
<i>M. alvei</i>	izületi	humán	Lee, C. H. és mtsai., 2011
<i>M. arosiense</i>	légúti	humán	Tortoli és mtsai., 2009
<i>M. arupense</i>	ínhüvelygyulladás	humán	Vasireddy és mtsai., 2016
<i>M. aurum</i>	szaruhártya-gyulladás	humán	Honarvar és mtsai., 2012
<i>M. austroafricanum</i>	izületi	humán	Croce és mtsai., 2014
<i>M. bohemicum</i>	nyaki nyirokcsomó-duzzanat	humán	Huber és mtsai., 2008
<i>M. branderi</i>	bőrelváltozás	humán	Wolfe és mtsai., 2000
<i>M. brisbanense</i>	légúti	humán	Poh és mtsai., 2014
<i>M. celatum</i>	légúti	humán	Patsche és mtsai., 2014
<i>M. conspicuum</i>	disszeminált	humán	Springer és mtsai., 1995
<i>M. doricum</i>	csont	humán	Pettit és mtsai., 2011
<i>M. florentinum</i>	nyaki nyirokcsomó-duzzanat	humán	Syed és mtsai., 2010
<i>M. haemophilum</i>	bőrelváltozás	humán	Ishii és mtsai., 2015
<i>M. heraklionense</i>	ínhüvelygyulladás	humán	Vasireddy és mtsai., 2016
<i>M. hippocampi</i>	farokúszó rothadás	csikóhal	Balcázar és mtsai., 2014
<i>M. intermedium</i>	bőrelváltozás	humán	Edson és mtsai., 2006
<i>M. kansasii</i>	disszeminált	humán	Nei és mtsai., 2012
<i>M. montefiorensis</i>	bőrelváltozás	muréna	Levi és mtsai., 2003
<i>M. mucogenicum</i>	bőrelváltozás	humán	Shehan és Sarma, 2008
<i>M. nonchromogenicum</i>	légúti	humán	Sawai és mtsai., 2006
<i>M. salmoniphilum</i>	viszcerális	atlanti lazac	Zerihun és mtsai., 2011
<i>M. setense</i>	csont	humán	Lamy és mtsai., 2008
<i>M. shimoidei</i>	légúti	humán	Tortoli és Simonetti, 1991
<i>M. terrae</i>	disszeminált	humán	Carbonara és mtsai., 2000
<i>M. wolinsky</i>	csont	humán	Lee, Y. S. és mtsai., 2015

4.4. A mycobacteriumok evolúciója és csoportosítása

Az evolúció nem más, mint az élőlények alkalmazkodása egy új vagy változó környezethez, mely dinamikus folyamat lévén változatosságot eredményez. A változatosság mutációk

következtében jön létre, mely gyakrabban eredményezi bizonyos tulajdonságok elvesztését, mint új képességek szerzését. Ahogy a baktériumok alkalmazkodnak az új környezethez, virulenciájuk fokozódik. Az obligát patogén mycobacteriumok közös apatogén környezeti őstől származnak, és az évmilliók során bekövetkezett genomiális veszteségek következtében váltak magas patogenitású gazdaparazitává. Jó példa erre a gyorsan nöövő, tág környezeti tűrőképességű, alacsony patogenitású, sokrétű antibiotikum-rezisztenciával rendelkező *M. smegmatis* közel 7 Mb méretű genomja és a lassan nöövő, obligát patogén, abszolút gazdaparazita, antibakteriális szerekre alapvetően érzékeny *M. tuberculosis* alig 4,4 Mb méretű genomja közti különbség. Ennek fényében egyes kutatások azt jósolják, hogy a környezeti szelekciós nyomás hatására több környezeti szaprofita *Mycobacterium* faj is patogénné válhat a közeljövőben (Prasanthi és Murty, 2014).

A nemzetség tagjait obligát patogén, opportunista patogén és környezeti szaprofita csoportokba sorolják. Az obligát patogén fajok (a MTC tagjai és a *M. leprae*) magas virulenciával rendelkeznek, gyenge alkalmazkodóképességük (pl. beszűkült növekedési hőmérséklet-tartomány) miatt a gazdafajon kívül nem képesek szaporodni, a betegség a fertőzött egyedekről általában cseppfertőzéssel adódik át új gazdákra (Kazda és mtsai., 2009).

Az opportunista patogén fajok alkotják a legszélesebb kört. Mindamellet, hogy igen tág hőmérsékleti tartományban és változatos környezeti körülmények mellett is képesek osztódni, gyakran okoznak megbetegedéseket hiányos immunállapotú emberekben. A fertőződés minden esetben a környezetből származik (Primm és mtsai., 2004, Lee, W. I. és mtsai., 2011).

A környezeti szaprofita fajok leginkább nitrogénkötő és szervesanyag-bontó képességük miatt jelentősek (Kazda és mtsai., 2009).

Egy másik csoportosítási szempont az egyes fajok növekedési sebességén alapul. A lassan nöövő fajok, melyek több mint 7 nap alatt képeznek látható telepeket szilárd táptalaj felszínén, klinikai, míg a gyorsan nöövő fajok, melyek telepei kevesebb, mint 7 nap alatt jelennek meg, inkább ökológiai szempontból fontosak (Stahl és Urbance, 1990).

Vizsgálataink szempontjából a legfontosabb csoportosítási mód a tuberkulotikus és nem-tuberkulotikus mycobacteriumok elkülönítése. Nem tuberkulotikus *Mycobacteriumnak* minősül minden olyan faj, mely nem tagja a MTC-nek, korábbi néven „Mycobacteria other than tuberculosis”, azaz MOTT, vagy csak egyszerűen atípusos mycobacteriumok (ebben a csoportosítási rendszerben a *M. leprae*-t sehová sem soroljuk).

Tekintve, hogy a MAA a madarak, a *M. marinum* pedig a halak gümőkórjának kórokozója, ez okozhat némi keveredést, de ebben a csoportosítási rendszerben a tuberkulotikus kifejezés szigorúan a MTC tagjai által okozott elváltozásokra utal, így a *M. avium*, és minden más opportunista patogén vagy szaprofita faj a nem tuberkulotikus mycobacteriumok

(non-tuberculous mycobacteria, NTM) csoportjának része. Ezen mycobacteriumok az egész világon elterjedtek, jelen vannak az állatok és az ember közvetlen környezetében, talajban, porban, természetes vizekben, csővezetékekben (Kazda és mtsai., 2009, Biet és Boschioli, 2014).

4.5. A mycobacteriumok tenyésztése

Az egyes betegségek kórokozóinak kitenyésztése mind a pontos diagnózis felállítása, mind pedig a megfelelő terápia megválasztása szempontjából kulcsfontosságú. Ugyanakkor a tiszta baktériumtenyészet lehetőséget ad a kórokozó részletes vizsgálatára, mely információkkal szolgálhat a kórokozó- és ellenállóképeségről, a fertőzési és ürítési utakról, ami pedig a betegség leküzdéséhez és terjedésének megakadályozásához nélkülözhetetlen. Lehmann és Neumann „Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik” című könyvének 48. táblóján burgonyaszeleten tenyésztett, valamint glicerin tartalmú és szérum tartalmú táptalajokon növesztett *M. tuberculosis* telepeket mutatnak be (Lehmann és Neumann, 1896). Az egyes *Mycobacterium* törzsek tenyésztési módjai között azonban jelentős különbségek vannak.

A baktériumtenyésztés alapja, hogy a baktériumok növekedéséhez szükséges anyagokat biztosítsuk számukra a tápközegben, legyen az szilárd vagy folyékony. Ugyanakkor a szükséges tápanyagok biztosítása mellett a kitenyésztési kívánt törzsek számára optimális kémhatást (pH), nedvességtartalmat, ozmotikus viszonyokat és hőmérsékletet kell beállítani (Medveczky és mtsai., 1998). A *Mycobacterium* tenyésztés specialitását a lassú növekedés és a minták szennyezettsége adja.

Mivel egyes fajok tenyésztéséhez akár 35–45 hetes inkubációra is szükség van, az alkalmazott táptalajoknak ez idő alatt nemcsak nedvesség- és tápanyagtartalmukat, de sterilitásukat is meg kell őrizniük, ami a bakteriológiai munka alapelveinek szigorú betartását követeli meg (de Juan és mtsai., 2006).

A minták szennyezettsége alatt a mintavételi helyek normál (légutak, bőr, bélsár) vagy egyéb baktérium és gomba flóráját (talaj, víz) értjük. Még a gyorsan növő *Mycobacterium* fajokat is felülnövik ezek a mikroorganizmusok, így a minták zöménél dekontamináció szükséges.

A dekontamináció különféle kémiai eljárásokkal történhet [oxálsav, hexadecilpiridinium-kloriddal (HPC), N-acetil-L-cisztein (NALC), nátrium-hidroxid (NaOH), Sputofluol, trinátrium-foszfát és benzalkónium-klorid (TSPB)]. Azonban szem előtt kell tartani, hogy a dekontaminálás akár a mintában lévő mycobacteriumokat is elpusztíthatja, így maga a szer és az alkalmazott behatási idő körültekintő megválasztása meghatározó (Medeiros és mtsai., 2012, Bradner és mtsai., 2013, Chatterjee és mtsai., 2013).

A mycobacteriumok tenyésztésére kifejlesztett táptalajok köre igen széles. Függetlenül attól, hogy a mintákat a táptalajra oltás előtt dekontamináltuk, sok táptalaj tartalmaz malachitzöldet vagy antibiotikumokat (polimixin B, trimetoprim, amfotericin B, azlocillin, nalidixsav) a kísérő flóra visszaszorítására. Mindamellet, hogy a táptalajok a mycobacteriumok növekedéséhez szükséges általános összetevőket tartalmazzák, bizonyos adalékanyagokkal (glicerin, piruvát, mycobactinJ, TCH, pikrinsav) szelektívvé tehetők egyes törzsek, vagy törzscsoportok tenyésztéséhez. Levestáptalajok (Middlebrook, Sula, Dubos, Sauton, Henley) mellett leggyakrabban tojás tartalmú szilárd táptalajokat alkalmaznak (Dorset, Petragnani, Löwenstein–Jensen, Herrold's, Kirchner, Stonebrink). Mivel egyes fajok jobban szeretnek levestáptalajban szaporodni, mások meg könnyebben kitenyészthetők szilárd táptalajok felületén, ezért szükséges e kétféle tápközeg párhuzamos alkalmazása (Iwainy és Káppler, 1974, Medveczky és mtsai., 1998).

A palettát tovább bővítették az automatizált *Mycobacterium* tenyésztő rendszerek, melyek a MTC tagjainak lehető leggyorsabb kimutatását célozzák. A laboratóriumok eltérő mintaszámához és igényeihez alkalmazkodva különböző rendszerek érhetők el a manuálistól a teljesen automatizáltig (Tortoli és mtsai., 1999, Hines és mtsai., 2006, Shitaye és mtsai., 2009a, Robbe-Austerman és mtsai., 2013).

Fontos megemlíteni, hogy mycobacteriumok okozta kórformáknál is előfordulhat vegyes fertőzés (Álvarez és mtsai., 2008a). A tenyésztéshez választott táptalajok és a tenyésztési körülmények (inkubációs idő, hőmérséklet) a mintában található minden lehetséges kórokozó és esetlegesen előforduló szaprofita kontamináns faj kimutatását lehetővé kell tegyék.

4.6. A mycobacteriumok azonosítása, genotipizálása

Bár mindkettő a diagnosztika része, különbséget kell tenni a mycobacteriumos fertőzések és maguknak az egyes *Mycobacterium* törzseknek az azonosítása között.

A mycobacteriumos fertőzések diagnosztizálása történhet köpet, punktátum, bioptátum, bélsár, vér, tej, vagy bármilyen más, élő vagy halott szervezetből vett minta, vagy speciális esetben magának a szervezetnek valamilyen képkeltő eljárással vagy bőrpróbával végzett vizsgálatával.

A minták vizsgálata történhet kórbonctani, kórszövettani, szerológiai, bakteriológiai és molekuláris biológiai módszerekkel.

A kórbonctani vizsgálat során az egyes szervek, szervrendszerek érintettsége és az elváltozások makroszkópos képe alapján, akárcsak a kórszövettani vizsgálatban a látott

mikroszkópos szöveti elváltozások és esetleges speciális festési eljárások segítségével kimutatott baktériumalakok alapján valószínűsíthető a kórokozó jelenléte.

A szerológiai vizsgálatok (Quantiferon – humán γ -interferon teszt, Bovigen – γ -interferon teszt kérődzőkre, ID Screen – kérődző paratuberkulózis ELISA), csakúgy, mint a bőrpróbák (tuberkulin-bőrpróba, Mantoux-teszt) a különböző *Mycobacterium* fajok közötti szoros antigénszerkezeti rokonság miatt keresztreakciókra hajlamosak (Osterstock és mtsai., 2007, Michel, 2008, Barry és mtsai., 2011).

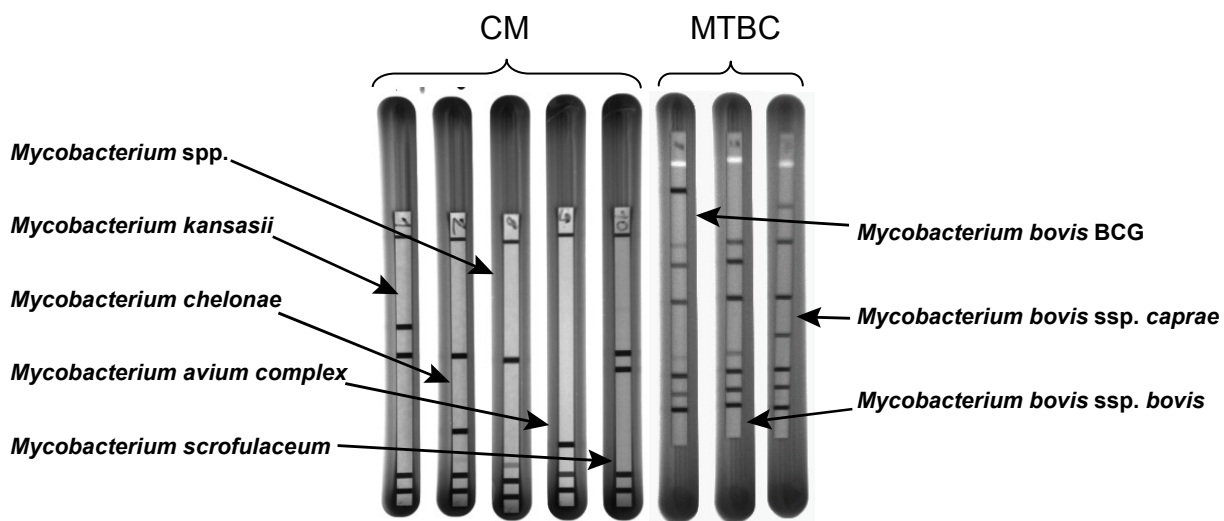
A klasszikus bakteriológiai diagnosztika során figyelembe vesszük, hogy az adott törzs milyen táptalajokon mennyi idő alatt nőtt ki, megfigyeljük telepmorfológiáját, és speciális festési eljárásokat végzünk (Gram, ZN, auramin). A kenet mikroszkópos vizsgálata során megfigyeljük a baktériumsejtek méretét, alakját és esetleges speciális elrendeződésüket [magányos, páros, fészkes, köteges (cord képződés)]. A primer tenyészet egy telepéből átváltásokat készítünk, melyeken vizsgáljuk az adott törzs pigmenttermelését (scotochromogen, photochromogen, non-chromogen), növekedési hőmérséklet-tartományát, és biokémiai tulajdonságait. E próbák során egy esetleges kontamináció vagy a vizsgált törzs életképtelensége fals pozitív vagy negatív reakciókat eredményezhet. A biokémiai próbák munkaerőigénye magas, kiértékelésük pedig nagy gyakorlatot igényel, nem beszélve a patogén vagy oportunistá patogén törzsekkel végzett munka során fennálló fertőzésveszélyről.

A *Mycobacterium* nemzetség tagjainak nagyfokú változatosságával a biokémiai próbák alapuló klasszikus bakteriológiai identifikáció nem tudott lépést tartani (Chimara és mtsai., 2008). Az 1980-as évektől vékonyréteg kromatográfiás lipidanalízist (Brennan és mtsai., 1978), gáz-folyadék kromatográfiás zsírsavanalízist (Tisdall és mtsai., 1979) és nagy teljesítményű folyadék kromatográfiás mikolsav-analízist (Butler és Guthertz, 2001) is alkalmaztak.

Az 1990-es évektől a molekuláris biológia fejlődésével a különböző gének (2. táblázat) egyedi szekvencia analízise mellett kombinált génszekvencia-elemzés (Adékambi és Drancourt, 2004, Devulder és mtsai., 2005, Gomila és mtsai., 2007), valamint reverz hibridizáción és ún. line-probe technológián alapuló (Tortoli és mtsai., 2001, Richter és mtsai., 2006), kereskedelmi forgalomban kapható tesztek (4. ábra) is rendelkezésre álltak a különböző *Mycobacterium* törzsek azonosítására, mely megnyitotta a molekuláris taxonómia kapuját (Tortoli, 2003).

2. táblázat: *Mycobacterium* fajok azonosításához alkalmazott gének

gén jelzése	gén neve és funkciója	hivatkozás
16S rRNS	a bakteriális riboszóma kis alegységének (30S) RNS lánc	Lane, 1991 Turenne és mtsai., 2001
<i>hsp65</i>	hősokk fehérje (heat-shock protein) 65 gén	Telenti és mtsai., 1993 Turenne és mtsai., 2006
<i>dnaJ</i>	chaperon (dajkafehérje) J domén, más néven <i>hsp40</i>	Takewaki és mtsai., 1993
<i>sod</i>	superoxid dismutáz gén	Zolg és Philippi-Schulz, 1994
16S-23S rRNS ITS	16S-23S rRNS belső átíródó elválasztó szakasz	Roth és mtsai., 2000
<i>recA</i>	rekombináz A gén	Blackwood és mtsai., 2000
<i>gyrB</i>	DNS-giráz β -alegysége	Kasai és mtsai., 2000
<i>rpoB</i>	riboszómális RNS-polimeráz β -alegysége	Adékambi és mtsai., 2003
<i>dnaA</i>	a DNS replikáció iniciátor génje	Mukai és mtsai., 2005
<i>secA1</i>	szekretoros fehérjét kódol	Zelazny és mtsai., 2005
<i>ssrA</i>	transzfer-messenger RNS-t kódol	Mignard és Flandrois, 2007
<i>tuf</i>	elongációs faktor Tu-t kódolja	Mignard és Flandrois, 2007



4. ábra: GenoType Mycobacterium CM és MTBC kitek eredményei

További lehetőséget jelentett az inszerciós szekvenciák felfedezése. Bizonyos szekvenciák adott törzsrre vagy törzscsoportra [IS6110: MTC (van Soolingen és mtsai., 1991), IS1311: *M. avium* (Whittington és mtsai., 1998), IS901: MAA, MAS, IS1245: MAA, MAH, MAS (Kunze

és mtsai., 1991, Guerrero és mtsai., 1995)], míg mások egyes alfajokra [IS900: MAP (Green és mtsai., 1989)] specifikusak. Az IS902-es elemet sokáig tévesen a MAS specificus inszerciós szekvenciájának tartották (Moss és mtsai., 1992a).

A *Mycobacterium* törzsek pontos azonosításával párhuzamosan felmerült az igény a fajokon belüli genetikai változatosság vizsgálatára, mely lehetőséget ad az egyes kórokozók által okozott fertőzések epidemiológiájának pontosabb megismerésére. Ennek felderítésére pulzáló erőterű gélelektroforézis (Pulsed-Field Gel Elektrophoresis, PFGE) (de Juan és mtsai., 2005), vagy bizonyos gének, szekvencia szakaszok (Guerrero és mtsai., 1995, van Soolingen és mtsai., 1998, Dvorska és mtsai., 2003), esetleg a teljes genom restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus vizsgálata (Pavlik és mtsai., 1999) mellett egyponos nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism, SNP) (Röltgen és mtsai., 2010) és hosszabb szekvencia polimorfizmus (large sequence polymorphism, LSP) analíziseket (Semret és mtsai., 2004, 2005, Mostowy és mtsai., 2002, Alland és mtsai., 2007), multispacer szekvencia tipizálást (multispacer sequence typing, MST) (Cayrou és mtsai., 2010), multi-lókuszos szekvencia tipizálást (multi-locus sequence typing, MLST) (Macheras és mtsai., 2014), vagy akár a szétszórt mycobacteriális ismétlődő egységeket (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units, MIRU) (Stragier és mtsai., 2005) és változó számú tandem ismétlődéseket (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) (Iakhiaeva és mtsai., 2016) is vizsgálhatunk. Több esetben olvashatunk a különböző módszerek párhuzamos vagy kombinált alkalmazásáról is (Thibault és mtsai., 2008). A MTC-en belüli genotipizálás fontos eszköze a spoligotyping, vagy spacer oligonukleotid tipizálás (Driscoll, 2009), mely egy, a MTC-re specifikus, rendkívül polymorf direkt ismétlődő szekvencia vizsgálatán alapul.

4.7. A magyarországi állat-egészségügyi *Mycobacterium* diagnosztika

A nagy hagyományokkal rendelkező magyar állat-egészségügyi diagnosztikában a szarvasmarha-gümőkór kórokozójának kimutatása különösen az 1960-as években megkezdett mentesítési kampány okán nyert jelentőséget (5. ábra). A 70-es évek derekán az Országos Állategészségügyi Intézetben (OÁI) *Mycobacterium* Referencia-központot hoztak létre. A különböző mycobacteriumok okozta betegségeket, a kórokozók diagnosztikájának és az ellenük való védekezés lehetőségeit Tuboly Sándor (Tuboly, 1965, 1967, 1968, 1979), Körmendy Béla (Körmendy és mtsai., 1989, 1990, Körmendy, 1994) és Nagy György (Szilágyi és mtsai., 1989, Erlér és mtsai., 2004, Prodingler és mtsai., 2005) vizsgálták behatóan. Habár a szarvasmarha-állományok gümőkórmentességét 1980-ra sikerült elérni, a mentességet hivatalosan csak 2014-ben ismerték el (2014/91/EU bizottsági végrehajtási határozat, http://publications.europa.eu/resource/ellar/ae45f39-9873-11e3-94f8-01aa75ed71a1.0012.03/DOC_1).

Az ország gümőkórmentességének elfogadtatását leginkább az ún. paraallergiás reakciók jelenléte nehezítette. Ezek hátterében leggyakrabban a NTM-ok okozta fertőzések során kialakult áthangolódás áll.



Jelenleg a mycobacteriumos betegségek/fertőzések diagnosztikáját, a baktériumok kimutatását az OÁI jogutódjaként működő Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságának budapesti telephelyén található, a Bakteriológiai Laboratórium részeként működő Szarvasmarha-gümőkór Nemzeti Referencia Laboratórium látja el. Az egyes törzsek identifikálása az ugyanitt található Molekuláris Biológiai Laboratóriumban történik. A laboratóriumok a tuberkulin-bőrpróbában pozitívan vagy kétesen reagáló szarvasmarhák nyirokcsomó mintái mellett szarvasmarha- és vadmonitoring programok keretében, vagy vágóhídon gyűjtött, de akár állatkerti és kedvtelésből tartott állatok mintáit is vizsgálják. A hazánkban állategészségügyi szempontból jelentős *Mycobacterium* fajokat az M1. melléklet, míg a még ki nem tenyésztett vagy nem azonosított fajokat a M2. melléklet tartalmazza.

4.8. Célkitűzések

Vizsgálataink elsődleges célja a Magyarországon előforduló NTM-ok pontos azonosítása volt. A mycobacteriumok ezen csoportja igen változatos. Az egyes fajok tenyésztési és növekedési tulajdonságaiban jelentős különbségek figyelhetők meg, mely kihívást jelent a diagnosztika állatorvos számára.

Ennek megvalósításához szükségessé vált az addigi klasszikus diagnosztikai eljárások mellett (és részben azokat felváltva) molekuláris diagnosztikai módszerek bevezetése, így ilyen módszerek meghonosítása és fejlesztése is célunkká vált.

A *Mycobacterium* törzsek pontos azonosítását követően fel kívántuk térképezni, hogy melyek a hazánkban leggyakrabban előforduló mycobacteriumok, és azok mely állatfajokban (gazdaspektrum) milyen elváltozásokat (patogenitás) hozhatnak létre.

A különböző fajok gazdaspektruma és patogenitása mellett vizsgálni kívántuk a *M. avium* alfajainak genetikai változatosságát MIRU–VNTR módszerrel, és fel kívántunk tárnai a különböző genotípusok előfordulása közötti epidemiológiai kapcsolatokat.

Az ily módon összegyűjtött adatokból, kiegészítve azokat a gazdaállatokról megszerezhető információkkal törzsgyűjteményt kívántunk felállítani, mely esetleges jövőbeli vizsgálatok alapját képezheti.

5. Anyag és módszer

5.1. Mintafeldolgozás, *Mycobacterium* tenyésztés

A vizsgálati minták és a kitenyészteni kívánt *Mycobacterium* törzsek sokszínűsége nem tette lehetővé egy szigorú mintafeldolgozási és *Mycobacterium* tenyésztési protokoll követését, így az egyes törzsek eltérő táptalajigényéhez, hőmérsékleti optimumához és növekedési idejéhez alkalmazkodva alakítottuk ki a különböző mintatípusok vizsgálati protokollját. Amennyiben egy adott *Mycobacterium* faj nem tudunk a korábban alkalmazott táptalajokon megfelelően tenyészteni, vagy vegyes tenyészetből szelektív izolálásra volt szükség, a különböző adalékok és alapanyagok kombinálásával magunk fejlesztettünk táptalajokat. A saját fejlesztésű táptalajoknak csak egy része váltotta be a hozzá fűzött reményeket, de olyan is volt, mely bár jól működött, bonyolult összetétele miatt hasonlóan jól működő, de egyszerűbb összetételű, szakirodalmi forrásban publikált táptalajjal került leváltásra. A használt táptalajok összetételét és tulajdonságait az M3. melléklet tartalmazza, melyben a saját fejlesztésű táptalajok közül csak a 2MA jelzésűt tüntettük fel.

Tejminták feldolgozása: a tejminták kb. 10 µl-nyi mennyiségét steril oltókacs segítségével Middlebrook agarra oltottuk, melyet 3–5 napig 25 °C-on inkubáltunk.

Szerv- és nyirokcsomó minták feldolgozása: a szerv- és nyirokcsomó mintákból makroszkópos kórbonctani vizsgálatot követően kb. diónyi mennyiséget szűrőbetétes műanyag zacskóba (BagPage, Interscience, St. Nom La Breteche, Franciaország) helyeztünk, melyre 10 ml steril fiziológiás sóoldatot öntöttünk, és stomacherben (BagMixer, Interscience, St. Nom La Breteche, Franciaország) a legnagyobb fokozaton teljesen homogén állapotúra zúztunk. A homogenizálást követően a szűrőn átfolyt folyadékból 7 ml-t ugyancsak 7 ml 10%-os oxálsavat tartalmazó centrifugacsőbe pipettáztunk, melyet vortexelést követően rázógépen 500 rpm-en 15 percig ráztunk. E dekontamináló lépés után a csöveket 3000 ×g-n 10 percig centrifugáltuk, a felülúszót elöntöttük, az üledéket pedig 5 ml steril fiziológiás sóoldattal felvortexeltük. Tíz perc szobahőn történő ülepités elteltével a felülúszóból táptalajokra csöppentettük. A szilárd táptalajokra (Löwenstein–Jensen, piruvátos Löwenstein–Jensen, Herrold's) kb. 100–200 µl-nyi, míg a levestáptalajokba (Middlebrook leves, MGIT leves) 1–1,5 ml-nyit oltottunk be. A beoltott táptalajokat 37 °C-on inkubáltuk, azonban egyes speciális esetekben (változó testhőmérsékletű állatok mintái) 25 °C-ra is

készítettünk párhuzamos leoltásokat. A maximális tenyésztési idő MGIT leves esetén 6 hét, Löwenstein–Jensen, piruvátos Löwenstein–Jensen és Middlebrook leves táptalajoknál 4 hónap, míg Herrold's talajok esetén 12 hónap volt.

Bélsárminták feldolgozása: a bélsármintákból kb. diónyi mennyiséget szűrőbetétes műanyag zacskóba (BagPage, Interscience, St. Nom La Breteche, Franciaország) helyeztünk, melyre 10 ml steril fiziológiás sóoldatot öntöttünk, és stomacherben (BagMixer, Interscience, St. Nom La Breteche, Franciaország) a legnagyobb fokozaton teljesen homogén állapotúra zúzattunk. A homogenizálást követően a szűrőn átfolyt folyadékból 5 ml-t 10 ml 0,75%-os HPC-t tartalmazó centrifugacsőbe pipettáztunk, majd vortexelést követően 24 órán át szobahőn inkubáltunk. E dekontamináló lépés után a csöveket 3000 ×g-n 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszó elöntését követően az üledéket 10 ml steril fiziológiás sóoldattal felvortexeltük. Ismételt centrifugálást (3000 ×g, 10 perc) és a felülúszó elöntését követően az üledéket 5 ml steril fiziológiás sóoldattal felvortexeltük, és 10 perc szobahőn történő ülepités után a felülúszóból táptalajokra csöppentettük. A szilárd táptalajokra (Löwenstein–Jensen, piruvátos Löwenstein–Jensen, Herrold's, 7H11, J) kb. 100–200 µl-nyi, míg a levestáptalajba (Middlebrook leves) 1–1,5 ml-nyit oltottunk be. A beoltott táptalajokat 37 °C-on inkubáltuk. A maximális tenyésztési idő 24 hónap volt.

Bélszakaszok feldolgozása: bélszakaszok esetén a makroszkópos kórbonctani vizsgálat során minden esetben vettünk nyálkahártya kaparékot, melyből tiszta, zsírtalanított tárgyilemez felületén kenetet készítettünk. A továbbiakban a minta feldolgozásával a bélsármintáknál leírt módon jártunk el.

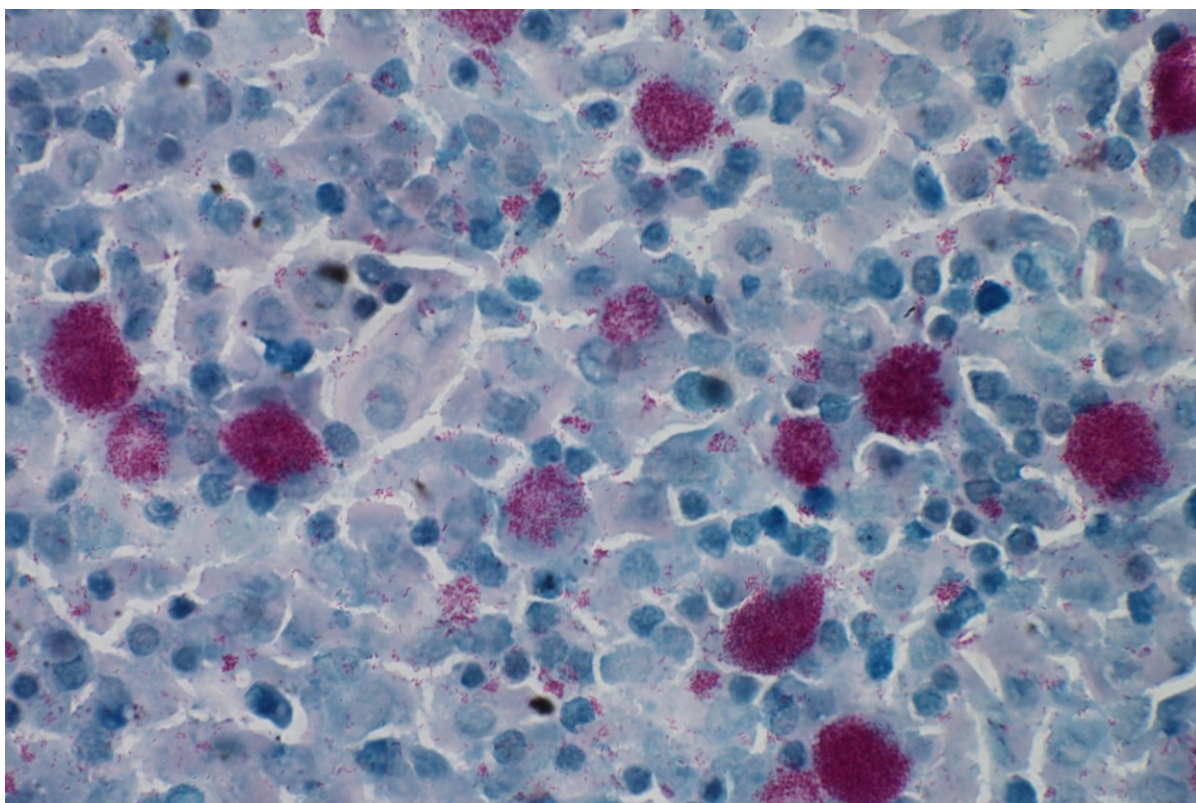
Környezeti minták feldolgozása: környezeti minták esetén kb. 2 diónyi mennyiséget szűrőbetétes műanyag zacskóba (BagPage, Interscience, St. Nom La Breteche, Franciaország) helyeztünk, melyre 10 ml steril közönséges levestáptalajt öntöttünk, stomacherben (BagMixer, Interscience, St. Nom La Breteche, Franciaország) a legnagyobb fokozaton teljesen homogén állapotúra zúzattunk, majd 4 órán át 37 °C-on inkubáltunk. Ezt követően alom esetén a bélsárminták, takarmány és egyéb környezeti minták esetén pedig a szerv- és nyirokcsomó minták feldolgozásával megegyezően jártunk el.

5.2. Táptalajok vizsgálata, Ziehl–Neelsen festés

A beoltott szilárd táptalajokat természetes fény mellett szabad szemmel, megtekintéssel vizsgáltuk; tejminták esetén naponta, egyébként hetente, majd 2 hónap elteltével havonta.

A levestáptalajokat ZN festéssel havonta vizsgáltuk, azzal a kitétellel, hogy a MGIT csöveket csak akkor festettük, ha a Wood-lámpás vizsgálat pozitív eredményt adott.

Kenetek ZN festése: A gyanús baktériumtenyészet egy telepéből egy csepp steril fiziológiás sóoldattal, vagy alapos vortexelést követően a vizsgálandó levestáptalaj egy cseppjéből, esetleg bélnyálkahártya-kaparékból (6. ábra) tiszta, zsírtalanított tárgylemez felületén kenetet készítettünk, melyet levegőn megszáritottunk, majd láng felett fixáltunk. A fixált kenetet festőállványra helyeztük, Ziehl-féle fuchsin oldattal befedtük, majd Bunsen-égővel háromszor gőzölésig melegítettük. A Ziehl-féle fuchsin oldat leöntését követően a kenetet 1–2 percig 5%-os kénsavoldattal differenciáltuk, majd 10–15 másodpercig 96%-os alkohollal (Reanal, Budapest, Magyarország) kivontuk. A kivontást követően a kenetet csapvízzel leöblítettük, majd 3%-os metilénkék oldattal 5–10 másodpercig kontrasztfestettük. A kontrasztfestést követően a kenetet ismét csapvízzel leöblítettük, majd levegőn száradni hagytuk. A kenetre 1 csepp immerziós olajat (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) cseppentettünk, majd fénymikroszkópban 1000 ×-es nagyításon vizsgáltuk.



6. ábra: Ziehl–Neelsen szerint festett bélnyálkahártya kaparék (1000 ×-es nagyítás)

Bélsárminták ZN festése: A vizsgálandó bélsármintából kb. 1 grammnyi mennyiséget 5 ml steril fiziológiás sóoldatot tartalmazó csőbe mértünk, majd 0,5 ml dietil-éterrel (Reanal, Budapest, Magyarország) óvatosan összeráztuk és 10 percig állni hagytuk. Az állás során kialakult két fázis határáról kipipettázott folyadék egy cseppjével kenetet készítettünk tiszta, zsírtalanított tárgylemez felületén, melyet a továbbiakban a kenetek ZN festése alatt leírtaknak megfelelően festettünk.

A használt festőoldatok összetételét és készítési módját az M4. melléklet tartalmazza.

A kenetek vizsgálata során nem csupán a ZN-pozitív baktériumalakok előfordulását vizsgáltuk, de megfigyeltük azok méretét, alakját, egymáshoz viszonyított elhelyezkedését (cord képződés, fészkes elrendeződés), és esetleges szennyező flóra jelenlétét is.

5.3. Tenyészetek morfológiai és növekedési sajátosságainak vizsgálata, átoltások

A ZN festéssel pozitív tenyészetek esetén feljegyeztük, hogy milyen táptalajon, mennyi inkubációt követően jelent meg a törzs, megfigyeltük telepmorfológiáját (elsődleges tulajdonságok), és tiszta tenyészet esetén egy telepből átoltást készítettünk további vizsgálatokhoz. Levestáptalaj pozitívítás vagy szennyezett tenyészet esetén dekontaminálással végeztük az átoltást, hogy a kontamináns baktériumflórát eltávolítsuk.

Átoltás készítése: a szilárd táptalaj felületéről steril oltókacs segítségével egy különálló telepet 2 ml steril PBS-ben (pH 7,2, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) elkevertünk, majd a kívánt táptalajokat e szuszpenzió 50–50 µl-nyi mennyiségével beoltottuk.

Átoltás készítése dekontaminálással: a szennyezett, de mycobacteriumokat is tartalmazó szilárd táptalajra 2 ml steril fiziológiás sóoldatot pipettáztunk, melybe a talaj felszínéről steril oltókacs segítségével belemostuk a növekményt. Az így kapott szuszpenziót, vagy levestáptalaj esetén annak 2 ml-ét ugyancsak 2 ml 10%-os oxálsavat tartalmazó centrifugacsőbe pipettáztuk, majd vortexelést követően rázógépen 500 rpm-en 15 percig ráztuk. A dekontaminálást követően a csöveket 3000 ×g-n 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszó elöntése után az üledéket 5 ml steril fiziológiás sóoldattal felvortexeltük.

Ismételt centrifugálást (3000 ×g, 10 perc) és a felülúszó elöntését követően az üledéket 2 ml steril PBS-ben (pH 7,2, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) felvortexeltük, majd a kívánt táptalajokat e szuszpenzió 50–50 µl-nyi mennyiségével beoltottuk.

Az átoltás során beoltott táptalajok típusát (pl.: vegyes tenyészetek esetén szelektív táptalajok használata) és az inkubáció körülményeit (pl.: sötétben vagy fény jelenlétében, 25 °C, 37 °C, 42 °C és/vagy 52 °C hőmérsékleten) a tenyészet elsődleges tulajdonságai alapján választottuk meg, valamint minden esetben beoltottunk olyan táptalajt, melyen a törzset megtaláltuk. Az átoltásokat kétnaponta vizsgáltuk természetes fény mellett szabad szemmel, megtekintéssel. Baktériumnövekedés esetén ellenőrző ZN festést végeztünk, hogy meggyőződjünk a tenyészet tisztaságáról. Az átoltásban kitenyésztett törzsnek feljegyeztük növekedési sebességét (gyorsan, 7 napon belül vagy lassan, 7 napon túl növő), növekedési hőmérséklet-tartományát, pigmenttermelő képességét, telepmorfológiai tulajdonságait és táptalaj preferenciáit.

5.4. DNS kivonás

A kitenyésztett *Mycobacterium* törzseket molekuláris biológiai módszerek segítségével vizsgáltuk tovább. A sikeres molekuláris biológiai vizsgálatok előfeltétele, hogy a mintákból megfelelő mennyiségű és minőségű bakteriális DNS-t vonjunk ki. A mycobacteriumok speciális sejtfalának köszönhetően a más baktériumoknál jól működő egyszerű fagyasztás/felolvasztásos DNS feltárás nem ad megfelelő eredményt, sőt, mintatípusonként (köpet, szövet, bélsár) és baktériumfajonként is más-más módszer szükséges (Hosek és mtsai. 2006). A szakirodalomban cikkek tucatjai foglalkoznak a témával, melyek zöme a *M. tuberculosis* DNS-ének feltárására koncentrálnak (Aldous és mtsai. 2005, Kumar és mtsai. 2010, Thakur és mtsai. 2011), azonban egységes referencia módszer máig nem alakult ki. Kitenyésztett törzseink esetén szonikálást és főzést, vagy kézi DNS kivonást alkalmaztunk.

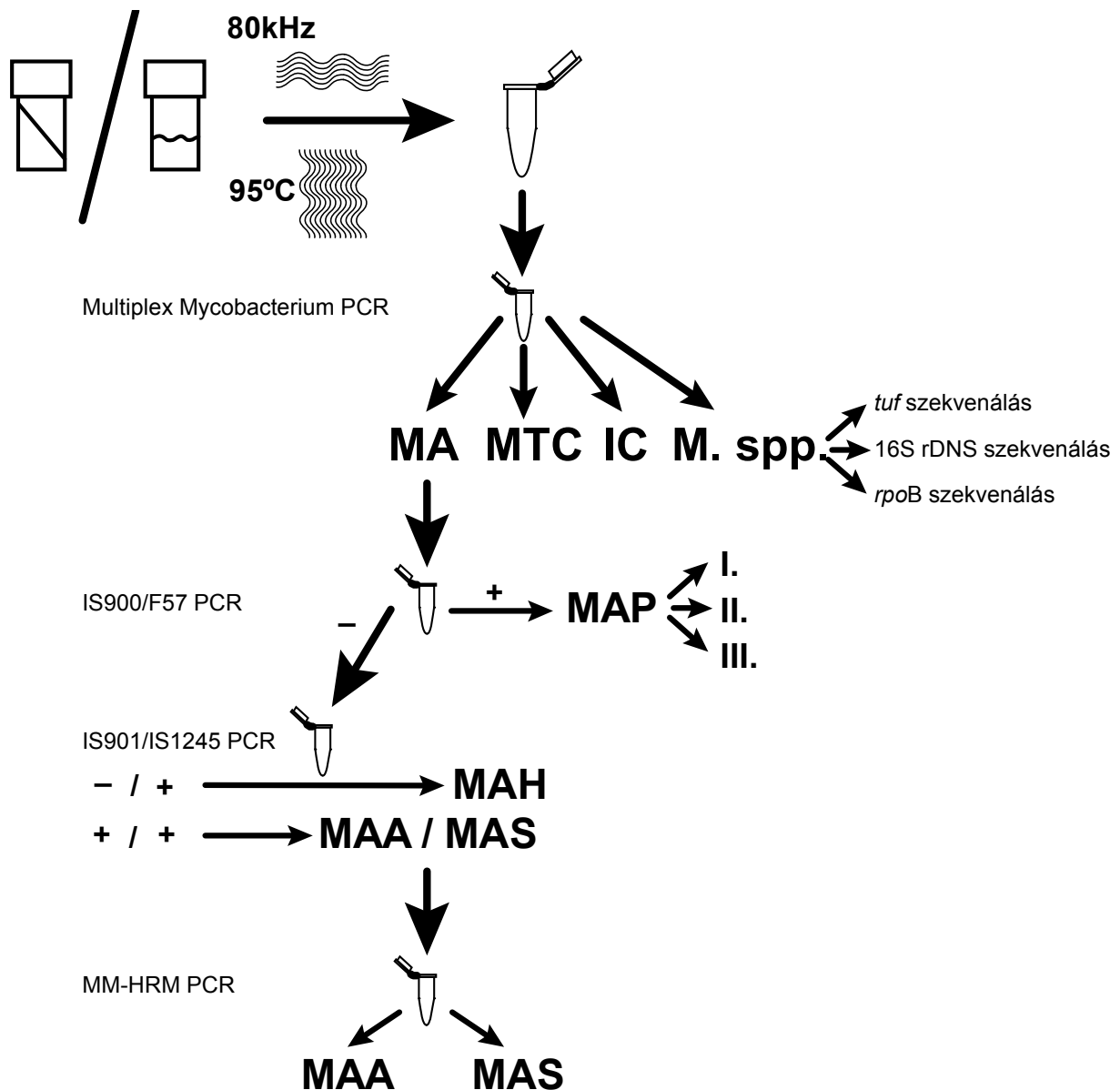
DNS kivonás szonikálással és főzéssel: A vizsgálandó baktériumtenyészet kacsnyi mennyiségét, levestenyészet esetén pedig 1 ml levestenyészet 3 perces 3000 ×g-n történő centrifugálásával nyert üledékét 200 µl PCR tisztaságú vízben (Nuclease-Free Water, Ambion, Foster City, USA) kevertünk el steril 1,5 ml-es eppendorf csőben. A csöveket lezártuk, majd 15 percig 80 °C-on, pulzáló 80 kHz frekvencián ultrahangos vízfürdőben (Elma GmbH, Singen, Németország) szonikáltuk, majd 10 percre 95 °C-os száraz termosztátba helyeztük. Ezt követően a csöveket 12000 ×g-n 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk, a felülúszót steril pipettával leszívtuk, melyet a PCR vizsgálatokig 4 °C-on, egy héten túl pedig -80 °C-on tároltunk.

Kézi DNS kivonás: A vizsgálandó baktériumtenyészet kacsnyi mennyiségét, levestenyészet esetén pedig 1 ml levestenyészet 3 perces 3000 ×g-n történő centrifugálásával nyert üledékét 200 µl PCR tisztaságú vízben kevertünk el steril 1,5 ml-es eppendorf csőben. Egy megfelelően feliratozott steril eppendorf csőbe 4 µl 600 mAU/ml-es Proteináz-K-t (Merck Millipore, Budapest, Magyarország) és 10 µl 10%-os Sarcosyl-t (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) mértünk, majd a baktériumszuszpenzió 100 µl-ével egy éjszakán át 53 °C-os vízfürdőben inkubáltuk. Az inkubációs idő leteltével 300 µl Guanidin-t (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) és 20 µl 7,5 M-os ammónium-acetátot (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) adtunk a csőhöz, melyet egy órán át többszörös összerázás mellett szobahőn inkubáltunk. Ezt követően 1 ml -20 °C-os abszolút alkohollal szobahőn tovább inkubáltuk 15 percig, majd 15 percig 4 °C-on, 12000 ×g-n centrifugáltuk. A felülúszó leöntését követően az üledéket 1 ml 70%-os -20 °C-os alkohollal felvortexeltük, majd ismét lecentrifugáltuk (15 perc, 4 °C-on, 12000 ×g). A felülúszó leöntését követően a csövet pillanatcentrifugáltuk, és a maradék alkoholt pipettával eltávolítottuk. A csövet nyitva inkubáltuk szobahőn további 15 percig, majd a pelletet 50 µl PCR tisztaságú vízzel feloldottuk. Ismételt centrifugálást követően (5 perc, 4 °C-on, 12000 ×g) a felülúszót steril pipettával leszívtuk, melyet a PCR vizsgálatokig 4 °C-on, egy héten túl pedig -80 °C-on tároltunk.

Vizsgálataink során kísérletet tettünk mycobacteriumok közvetlen szövetből és bélsármintából történő kimutatására/azonosítására is, melyeknél az alacsony baktériummennyiség és az esetleges gátló anyagok jelenléte miatt speciális DNS feltárási módszerekre volt szükség. Szerv- és szövetminták esetén Roche High Pure PCR Template Preparation v.16.0 kittel (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) valamint QIAamp® DNA Mini kittel (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) dolgoztunk, míg bélsárminták esetén mindezek mellett ExtractMaster™ Fecal DNA Extraction kitet (Epicentre Biotechnologies, Madison, Wisconsin, USA) is használtunk, a gyártók utasítása szerint.

5.5. Mycobacteriumok azonosítása I. – PCR módszerek adaptálása

A kitenyésztett *Mycobacterium* törzseket pontos azonosításuk érdekében különböző molekuláris biológiai vizsgálatoknak vetettük alá. Az egyes PCR módszerek összeállítását és reakciókörülményeit az M5. melléklet, a különböző PCR rendszerekben használt primerek nevét és szekvenciáját pedig az M6. melléklet tartalmazza. Az azonosítás menetét a 7. folyamatábra szemlélteti.

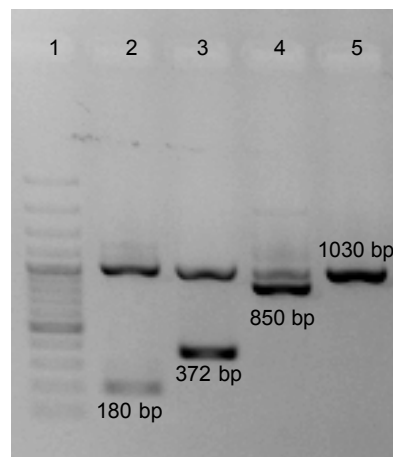


7. ábra: Mycobacterium törzsek PCR identifikálása
 (MTC: *Mycobacterium tuberculosis* komplex, IC: *M. intracellulare*, MA: *M. avium*,
 MAP: *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, MAH: „*M. avium* subsp. *hominissuis*”,
 MAA: *M. avium* subsp. *avium*, MAS: *M. avium* subsp. *silvaticum*)

A különböző PCR vizsgálatokban feltárási és PCR negatív kontrollok mellett *M. bovis* CIP102426^T, *M. avium* subsp. *avium* NCTC13034^T, *M. avium* subsp. *silvaticum* ATCC49884^T és *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ATCC19851 törzseket használtunk pozitív kontrollként.

MTC tagjainak azonosítása: A MTC tagjait Wilton és Cousins (1992) multiplex Mycobacterium PCR-e segítségével azonosítottuk (8. ábra). Faji elkülönítésüket a GenoType MTBC (Hain Lifescience, Nehren, Németország) kit segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint.

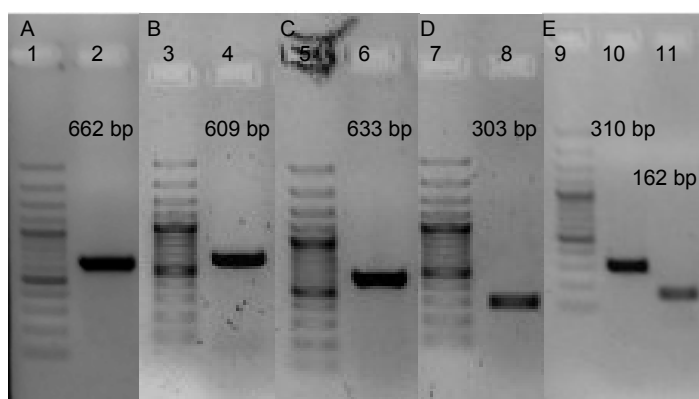
M. avium törzsek azonosítása és tipizálása: A *M. avium* törzseket Wilton és Cousins (1992) multiplex Mycobacterium PCR-e segítségével mutattuk ki. A MAP törzseket IS900 és F57 primerekkel azonosítottuk (Castellanos és mtsai. 2009a), típusaikat pedig Collins és mtsai. (2002) valamint Castellanos és mtsai. (2009b) módszereivel határoztuk meg (9. ábra).



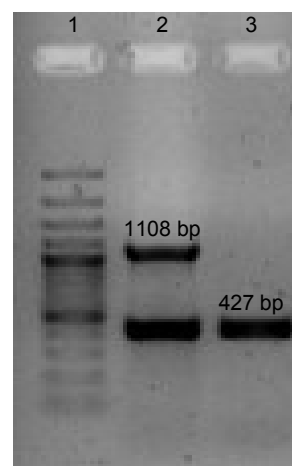
8. ábra:
Multiplex Mycobacterium PCR
(1: 100bp DNS létra, 2: *M. avium* 3: MTC, 4: MI, 5: *M. spp.*)

A MAH törzseket Álvarez és mtsai. (2008b) módszerével azonosítottuk (IS1245, IS901 – 10. ábra), míg a MAA és MAS törzseket ezen inszerciós szekvenciák kimutatása mellett saját fejlesztésű PCR rendszerrel különítettük el (Izd. 5.6. alfejezet).

M. intracellulare azonosítása: A *M. intracellulare* törzsek azonosítását Wilton és Cousins (1992) multiplex Mycobacterium PCR-e segítségével, valamint GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Nehren, Németország) kittel és szekvenálással is végeztük.



9. ábra:
MAP identifikáló és tipizáló PCR rendszerek
A – IS900, B – F57, C – MAP3584, D – MAV4125,
E – 'C' / 'S' típus elkülönítő
(1, 3, 5, 7, 9: 100bp DNS létra, 2, 4: MAP törzs, 6: MAP I., MAP II. törzs, 8: MAP I., MAP III. törzs, 10: szarvasmarha 'C' típusú MAP, 11: juh 'S' típusú MAP)



10. ábra:
IS901-IS1245 PCR
(1: 100bp DNS létra, 2: MAA, MAS törzs, 3: MAH törzs)

Nem *M. avium* NTM-ok azonosítása: a *M. avium* melletti egyéb NTM-ok azonosítását megkíséreltük kereskedelmi forgalomban kapható kitek [GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Nehren, Németország), INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (Innogenetics, Ghent, Belgium)] segítségével a gyártók utasításai szerint, valamint 16S rDNS (Lane, 1991), *tuf* (Mignard és Flandrois, 2007) és *rpoB* (Adékambi és mtsai., 2003) génekre (szükség esetén egyéb génszakaszokra) történő szekvenálással (ld. 5.7. alfejezet).

5.6. Mycobacteriumok azonosítása II. – PCR módszerfejlesztés

Az előző fejezetben jelzett módszerek egyike sem tette lehetővé a MAA és MAS törzsek elkülönítését. Habár a MAS törzsek jellegzetes telepmorfológiájuk és növekedési tulajdonságaik alapján megkülönböztethetők (Castellanos és mtsai., 2010a), mivel ezen tulajdonságok változhatnak, szükségesnek láttuk egy megbízható molekuláris biológiai identifikáló módszer kifejlesztését. Mivel a MAS és MAA törzsek genomszekvenciája nagyfokú azonosságot mutat (Paustian és mtsai., 2008), az ilyen irányú törekvések ezidáig kudarcba fulladtak.

Először az IS1613 (AJ011837.1) és IS1612-es szekvenciákra (Bull és mtsai., 2000) terveztünk primereket, melyeket MAA ill. MAS specifikusnak vélték, majd a GenBank-ban elérhető szekvenciák (36 MAS szekvencia és 3 MAA teljes genom contigokban) segítségével próbáltunk különbségeket találni a MAA és MAS törzsek genomjában.

2013 decemberében elhelyezték a MAS referens törzs teljes genomjának contigjait a GenBankban (AYOC00000000, BioProject szám: PRJNA219418). Ekkor az elérhető MAS és MAA szekvenciákat [808 MAS contig, 258 MAA ATCC25291^T contig (ACFI00000000, BioProject szám: PRJNA30909), 886 MAA 10-9275 contig (AYOB00000000, BioProject szám: PRJNA216926), 577 MAA 11-4751 contig (AYNY00000000, BioProject szám: PRJNA216924), 772 MAA Env77 contig és 1201 MAA DT78 contig (Hsu és mtsai., 2011)] a DNASTAR SeqMan pro szoftvere (Lasergene 12, DNASTAR Inc., Madison, USA) segítségével összeillesztettük, és 2800 nukleotid pozícióban talált eltérésekből 50 potenciális szekvencia változatot választottunk ki, melyek egy vagy többszörös hézagokat (gap), SNP-okat, vagy többszörös bázispár eltéréseket mutattak. Az 50 eltérésekből 12-re mismatch (MM) és nagy felbontású olvadáspont-analízis (HRM) primereket terveztünk a DNASTAR Primer design szoftvere segítségével. Mindkét módszer lehetővé teszi akár egyetlen bázispár eltérés kimutatását is. A MM primerek esetén a nukleotid eltérést a 3' végre pozicionáltuk, míg a HRM primerek olyan rövid szekvenciaszakaszokat fogtak közre, melyek tartalmazták az eltérő nukleotidokat. A tervezett primerpárokat referens törzsek segítségével teszteltük, a kapott PCR termékeket pedig szekvenálással ellenőriztük.

A megfelelően működő primerek közül kiválasztottunk egy párt (egy HRM és egy MM), melyek termékei olvadáspontjuk alapján egymással kombinálhatók voltak (HRM primerek: 5'-CGGCGATCGGAATGGAAATA-3' és 5'-CGGAACCCTGGTCAAGAT-3'; MAS specifikus MM primerek: 5'-TTCCTGGCCTGCTTCGACC-3' és 5'-GTTGACCACCACGGCATTCC-3'), és létrehoztunk egy duplex HRM/MM subspecies elkülönítő valós idejű PCR-t Rotor Gene 6000 Real-Time PCR gépre optimalizálva. A reakcióelegy 25 µl-ben 0,1 µl (5 U/µl) GoTaq G2 Flexi DNS polimeráz (Promega, Madison, USA) mellett 0,5 µl 10 mM-os dNTP-t (Fermentas, Burlington, Canada), 5 µl 10× PCR puffert, 2,2 µl 25 mM-os MgCl₂-ot, 1,25 µl 20× EvaGreen fluoreszcens nukleinsav festéket (Biotium, California, USA) és 20 ng-nyi templát DNS-t tartalmazott. PCR kondíciók: 95 °C-on 10 perc denaturációt követően 40 ciklus (95 °C 20 másodperc, 62 °C 40 másodperc, 72 °C 30 másodperc). Az olvadáspont-analízist 85–99 °C között 0,5 °C/sec rátával, a HRM analízist pedig 87–99 °C között, 0,02 °C-os hőmérséklet-emelkedéssel végeztük.

Az adatokat a RotorGene Q 2.2.3 szoftver (Qiagen, Venlo, Netherlands) segítségével értékeltük ki.

A módszer identifikáló-képességének megbízhatóságát független t-tesztel ellenőriztük.

A rendszer specificitását *M. bovis* CIP102426^T, MAA ATCC25291^T, MAS ATCC49884^T és MAP ATCC19851 referens törzsekkel valamint *M. intracellulare*, MAH és *M. saskatchewanense* izolátumokkal vizsgáltuk.

A rendszer szenzitivitását (legkisebb kimutatható kiindulási DNS mennyiség) MAA ATCC25291^T és MAS ATCC49884^T referens törzsek hígítási soraival határoztuk meg.

5.7. Szekvenálás, szekvenciaelemzés

A szekvenálásra szánt PCR termékeket agaróz gélből QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével tisztítottuk ki. A szekvenálási reakciókban egy kivétellel ugyanazokat a primereket használtuk, mint a PCR reakciókban. 16S rDNS szekvenálás esetén a 27F és 1492R amplifikáló primerek mellett egy további szekvenáló primert (536F) is beiktattunk (Smith és mtsai., 2006).

A szekvenálási reakciókat BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) segítségével végeztük a gyártó utasítása szerint. A szekvenciafuttatást a Biomi Kft.-nél (Gödöllő, Magyarország) végeztettük ABI Prism 3400 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA) készülék segítségével.

A két irányból leolvasott szekvenciákat a SeqMan – Lasergene 12 (DNASTAR) programmal illesztettük össze.

A szekvenciák páronkénti összehasonlítását BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) programmal, míg a filogenetikai analízist MEGA 6.06 szoftverrel (Tamura és mtsai., 2013), szomszédösszevonó módszerrel (Neighbor-Joining, NJ) végeztük.

Egyedi szekvenciáinkat a GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) internetes adatbázisába töltöttük fel.

5.8. LSP^A17 és MIRU-VNTR analízis

A *M. avium* alfajok genotipizálást az alábbiak szerint végeztük.

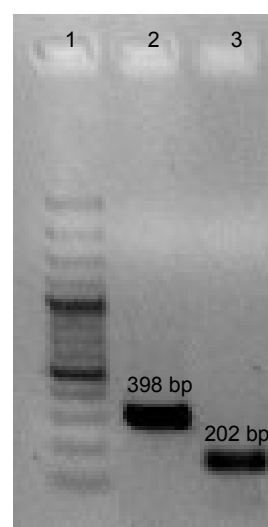
Az LSP^A17 szekvencia polimorfizmust Semret és mtsai. (2006) módszerével vizsgáltuk (11. ábra).

A MIRU-VNTR vizsgálatokhoz négy MIRU (MIRU1, MIRU2, MIRU3, MIRU4), három VNTR (VNTR25, VNTR32, VNTR259) és egy MATR (MATR9) lókuszt amplifikáltunk Bull és mtsai. (2003), Castellanos és mtsai. (2010b), Millán és mtsai. (2010), valamint Inagaki és mtsai. (2009) leírásainak megfelelően. A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen jelenítettük meg GR Safe II nukleinsav festék (Lab Supply Mall, Innovita Inc., Gaithersburg, MD, USA) segítségével UV átvilágításban. A tandem ismétlődések (tandem repeat, TR) számát az egyes PCR termékek méretéből állapítottuk meg. Kétes esetekben a termékeket megszekvenáltuk.

A különböző lókuszon az allélváltozatosságot (h) a következő képlet alapján számítottuk: $h = n(1 - \sum x_i^2)/(n-1)$, ahol n a baktériumtörzsek száma, x_i pedig az i-edik allél gyakorisága az adott lókuszon (Kim és mtsai., 2010).

A diszkriminációs index (DI) annak a valószínűségét adja meg, hogy egy véletlenszerűen mintázott mikrobiológiai populációban az alkalmazott tipizáló módszer két független törzset különböző csoportba sorol-e be. A DI-et a Hunter és Gaston (1988) által leírt képlettel határoztuk meg. Azon törzseket, melyek között közvetlen epidemiológiai összefüggés állt fenn, mind az allélváltozatosság, mind pedig a diszkriminációs index meghatározásánál kizártuk vizsgálatainkból.

A különböző genotípusok (GT) rokonsági fokának vizsgálatát NJ analízissel végeztük MEGA 6.06 program (Tamura és mtsai., 2013) segítségével.



11. ábra:
LSP^A17 PCR
(1: 100bp DNS létra, 2: LSP^A17 negatív törzs, 3: LSP^A17 pozitív törzs)

5.9. Felhasznált törzsek

A 2006 és 2015 között a NÉBIH-ÁDI Bakteriológiai Laboratóriumában izolált közel 3000 *Mycobacterium* törzset fő csoportbeli hovatartozásuk meghatározását követően vontuk be részletesebb vizsgálatokba. A nem *M. avium* NTM-ok közül 230-at igyekeztünk azonosítani, míg a *M. aviumok* közül 962-t vizsgáltunk LSP^A17 szekvencia polimorfizmus jelenlétére és 795-öt teszteltünk MIRU-VNTR-el.

6. Eredmények

A 2006 és 2015 között izolált csaknem 2400 NTM-ből (3. táblázat) közel 1000 bizonyult *M. avium*-nak.

3. táblázat: 2006 és 2015 között azonosított *Mycobacterium* törzsek

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Σ
MTC	52	88	61	12	119	25	42	70	64	8	541
<i>M. avium</i>	21	75	168	117	132	105	84	106	108	56	972
nem <i>M. avium</i> NTM-ok	53	98	120	52	100	107	124	113	91	47	905
NTM tejből	10	7	64	36	60	37	42	39	68	151	514
összesen:	136	268	413	217	411	274	292	328	331	262	2932

A *M. avium* törzsek között 144 MAA-t, 65 MAS-t, 94 MAH-t és 659 MAP törzset azonosítottunk (10 törzsnél további azonosításra a tenyészetek beszennyeződése miatt nem volt lehetőségünk). A különböző törzsek eredetét és számát a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: 2006 és 2015 között azonosított NTM-ok állatfajonként

Forrás/gazdafaj	<i>M. avium</i>				nem <i>M. avium</i> NTM-ok	Σ
	MAA	MAS	MAH	MAP		
szarvasmarha	14	5	46	595	355	1015
bivaly	0	0	0	1	3	4
juh	0	0	0	3	1	4
kecske	0	0	0	5	0	5
muflon	0	0	1	4	2	7
sertés	47	0	14	1	10	72
borz	0	1	0	0	0	1
vörös róka	8	2	0	1	4	15
vaddisznó	55	47	14	32	396	544
dámvad	0	0	0	0	9	9
gímszarvas	2	10	16	17	64	109
őz	0	0	0	0	7	7
kacsa	1	0	0	0	0	1
páva	0	0	1	0	0	1
pulyka	1	0	0	0	0	1
házi tyúk	7	0	0	0	0	7
díszbaromfi	1	0	0	0	0	1
balkáni gerle	0	0	0	0	2	2
házi galamb	1	0	0	0	0	1
barát réce	1	0	0	0	0	1
tőkés réce	1	0	0	0	0	1
fütyös réce	1	0	0	0	0	1
erdei fülesbagoly	1	0	0	0	0	1
tragopán	1	0	0	0	0	1
turákó	1	0	1	0	0	2
ember	0	0	0	0	1	1
fehér busa ivadék	0	0	0	0	1	1
fagyasztott haleleség	0	0	0	0	6	6
kutya	0	0	1	0	1	2
krokodil	0	0	0	0	1	1
teve	0	0	0	0	1	1
varánusz	1	0	0	0	0	1
kaméleon	0	0	0	0	1	1
földigiliszta	0	0	0	0	2	2
környezeti minták	0	0	0	0	38	38
szarvasmarhatej	0	0	0	0	514	514
összesen:	144	65	94	659	1419	2381

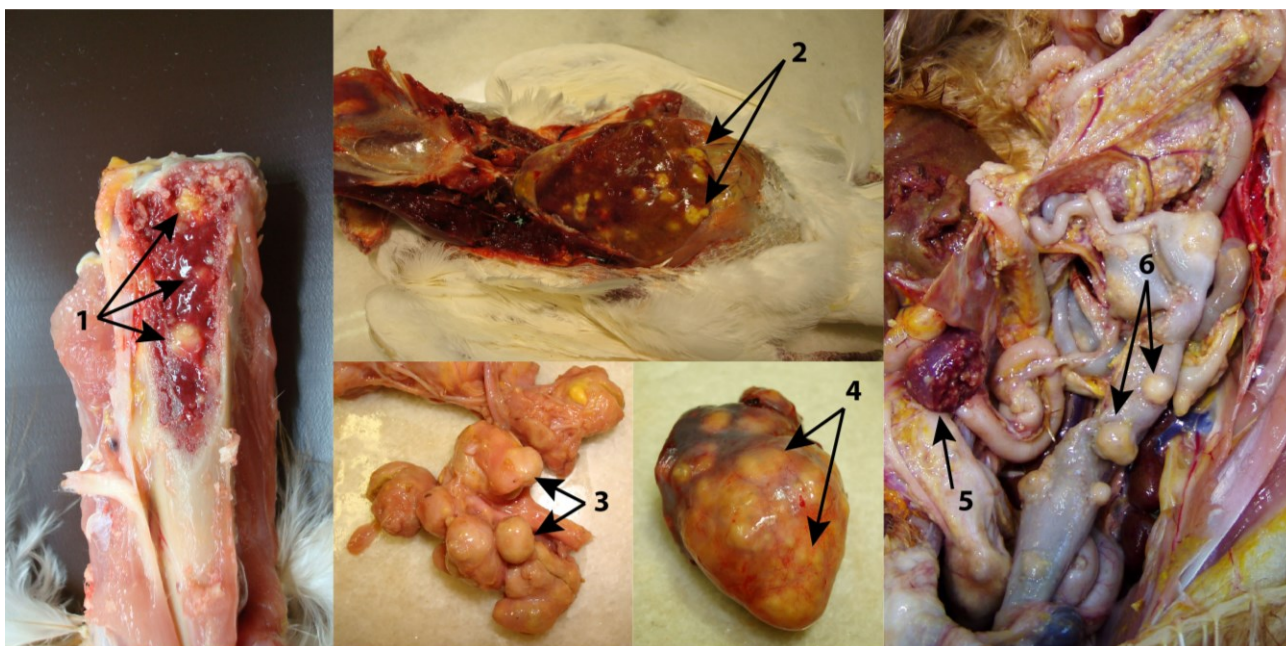
Környezeti mintákból *M. avium* törzseket nem tudtunk kimutatni. A 38 kitenyésztett nem *M. avium* NTM törzs mindössze 7 megye 12 állományából származott. E törzseket további azonosítási vizsgálatokba nem vontuk be.

6.1. *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (MAA)

MAA törzseket házi, vad- és állatkerti madarak mellett házi és vadon élő emlősfajokból is izoláltunk, Heves és Tolna megyék kivételével az ország egész területéről. Vörös rókában elsőként írtunk le MAA fertőzést.

Madarakban kivétel nélkül a madárgümőkór kórbonctani képét találtuk (12. ábra), szemben a gímszarvas és róka mintákkal, melyekben nem volt látható elváltozás. A szarvasmarha, vaddisznó és sertés minták 14,3, 54,5 és 95,7%-ában láttunk kóros folyamatot. A sertések 8 megye 27, míg a szarvasmarhák 9 megye 12 állományából származtak. A szarvasmarhák egy kivételével reagáltak a tuberkulin bőrpróbában. Fajtájukat tekintve 5 törzs tej-, míg 9 törzs húshasznú állatokból származott, melyek 11 hónap és 14 év közötti korúak, és 1 kivételével üszők voltak.

A fertőzött állatok fajtát, a minta megnevezését, az izolálás évét és az esetleges elváltozások jelenlétét és arányát a 5. táblázat tartalmazza.



12. ábra: *Mycobacterium avium* subsp. *avium* okozta elváltozások
(1: tyúk csontvelő, 2: galamb máj, 3: kacsza mediastinum, 4: pulyka szív, 5: tyúk lép, 6: tyúk bélcsatorna)

5. táblázat: 2006 és 2015 között azonosított MAA törzsek adatai

állatfaj	minta	kórbonctan	kórtani elváltozások aránya	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Σ
barátréce	szervek	pozitív	1/1, 100%				1							1
díszbaromfi	szervek	pozitív	1/1, 100%										1	1
erdei fülesbagoly	máj	pozitív	1/1, 100%	1										1
fűttyös réce	szervek	pozitív	1/1, 100%			1								1
gímszarvas	nyirokcsomó	negatív	0/2, 0%				2							2
házigalamb	szervek	pozitív	1/1, 100%				1							1
kacsa	mellkasi góc, máj, lép	pozitív	1/1, 100%						1					1
pulyka	szervek	pozitív	1/1, 100%					1						1
sertés	nyirokcsomó	negatív	45/47, 95,7%				1							1
		pozitív			14	3	4	1	1			23		
	szervek	negatív					1							1
		pozitív			6	2	11				3		22	
szarvasmarha	nyirokcsomó	negatív	2/14, 14,3%	5	1	3		1	2					12
		pozitív						1	1			2		
tőkés réce	szervek	pozitív	1/1, 100%			1							1	
tragopán	szervek	pozitív	1/1, 100%						1					1
turákó	máj	pozitív	1/1, 100%			1								1
tyúk	máj	pozitív	7/7, 100%			2		1			1			4
	szervek	pozitív						1	2					3
vaddisznó	nyirokcsomó	negatív	30/55, 54,5%			2	3	1	3	6	4	2	2	23
		pozitív			1	5		1	4	12	3	1	2	29
	szervek	negatív								2				2
		pozitív								1				1
varánusz	szervek	pozitív	1/1, 100%					1					1	
vörös róka	nyirokcsomó	negatív	0/8, 0%		1	1	3	1		1	1		8	
összesen:				6	23	21	27	8	16	23	9	6	5	144

6.2. *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* (MAS)

MAS törzseket elsőként izoláltunk vaddisznóból, vörös rókából, gímszarvasból, borzból, és szarvasmarhákból.

A lassan növény, növekedésükhöz mycobactin-t igénylő, pigmentet nem termelő telepek jellegzetes morfológiáját a 13. ábra mutatja.

A fertőzött állatok fajtát, eredetét, a minta megnevezését, az izolálás évét és az esetleges kórbonctani elváltozások jelenlétét és arányát 6. táblázat tartalmazza.



13. ábra:
Mycobacterium avium subsp. *silvaticum* törzs 7H11 agaron

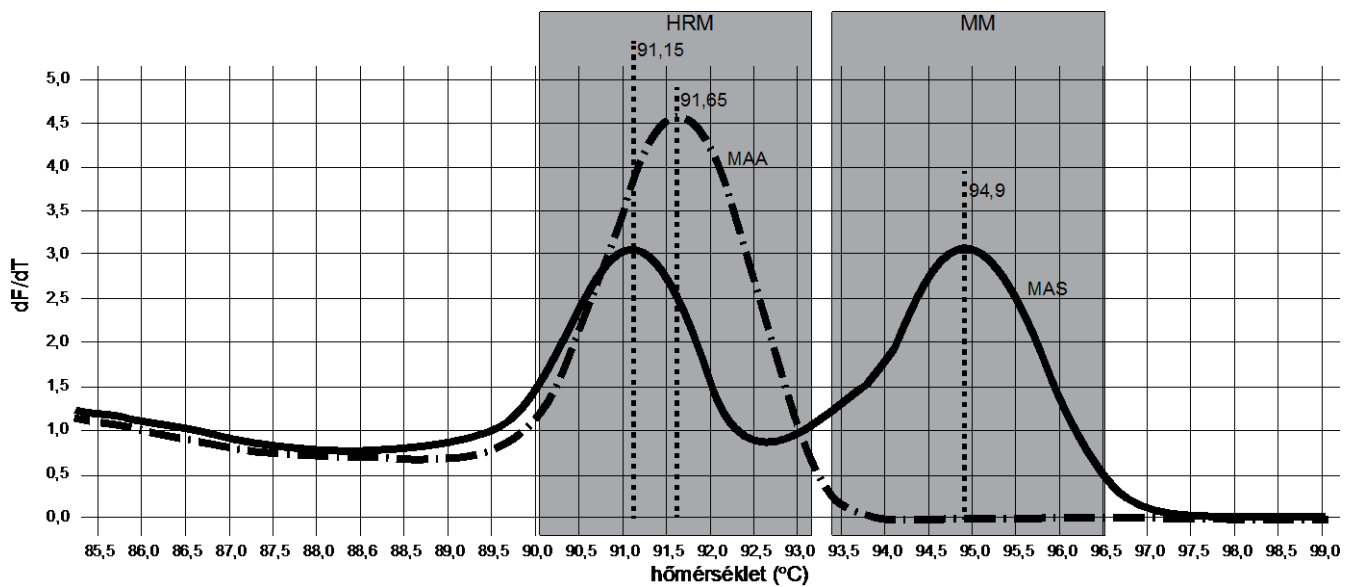
6. táblázat: 2006 és 2015 között azonosított MAS törzsek adatai

állatfaj	megye	minta	kórbonctan	kórtani elváltozások aránya	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Σ		
borz	Pest	nyirokcsomó	negatív	0/1, 0%							1		1		
gímszarvas	Bács-Kiskun	nyirokcsomó	negatív	3/10, 30%		1				1			2		
			pozitív				1					1			
	Somogy	nyirokcsomó	negatív		1	1			2		1		5		
		nyirokcsomó	pozitív				1		1				2		
szarvasmarha	Baranya	nyirokcsomó	pozitív	1/5, 20%					1				1		
	Somogy	nyirokcsomó	negatív							3	1		4		
vaddisznó	Bács-Kiskun	nyirokcsomó	negatív	19/47, 40,4%						2			2		
	Borsod-Abaúj-Zemplén	nyirokcsomó	negatív		1									1	
	Fejér	nyirokcsomó	negatív							1				1	
	Győr-Moson-Sopron	nyirokcsomó	negatív						1						1
			pozitív										1		1
	Heves	nyirokcsomó	pozitív									1		1	
	Komárom-Esztergom	nyirokcsomó	negatív									1		1	
	Pest	nyirokcsomó	pozitív								1			1	
	Somogy	nyirokcsomó	negatív		1			6	3	5					15
			pozitív				2	2	5	2	2				13
		szervek	negatív								6				6
			pozitív								2				2
	Szabolcs-Szatmár-Bereg	nyirokcsomó	negatív										1	1	
Zala	nyirokcsomó	pozitív				1						1			
vörös róka	Somogy	nyirokcsomó	negatív	0/2, 0%					2				2		
összesen:					3	2	3	10	15	23	7	2	65		

Makroszkópos elváltozásokat a minták 35%-ában (23/65) találtunk, melyek 60%-a (14/23) gümőkórra jellemző kórszövettani képet mutatott. A szarvasmarhák, melyek Limousin és magyartarka fajtájúak voltak, tuberkulin bőrpróbában pozitívan reagáltak.

A saját fejlesztésű valós idejű PCR rendszer sikeresen azonosította mind a 65 törzset, és így a változékony morfológiai és növekedési sajátosságokra alapozott bizonytalan identifikáláson túl lehetővé vált a MAA törzsektől való megbízható és pontos molekuláris biológiai alapú elkülönítés.

A MM primerek közül egy bizonyult megfelelőnek, melyet az *aspB* gén egy C/G eltérésére terveztünk. Ezzel a primerpárral a MAA, MAH, MAP, *M. bovis*, és *M. intracellulare* törzsek nem amplifikálódtak, míg MAS törzsek esetén 369 bp hosszú terméket kaptunk 94,9±0,2 °C-os olvadásponttal (14. ábra). A HRM primerek közül azt a párt választottuk, mely egy feltételezett membránfehérje génjében található TT/CG eltérést fog közre.

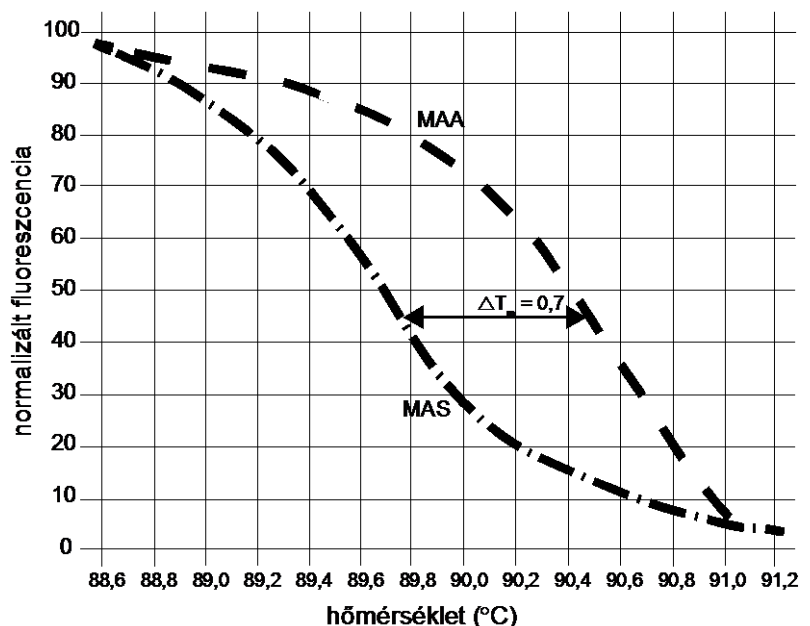


14. ábra: Olvadási görbék a duplex MM-HRM valós idejű PCR rendszerben
(MM: mismatch PCR, HRM: nagy felbontású olvadáspont analízis PCR)

Ebben a rendszerben a MAA törzsek $91,63 \pm 0,05$ °C, a MAS törzsek pedig $91,17 \pm 0,13$ °C-os olvadáspontúak voltak, és normalizálást követően eltérő lefutású olvadási-görbéket mutatnak $0,7$ °C-os hőmérséklet-eltolódással (15. ábra).

A független t-próbában a HRM analízis eredményei statisztikailag szignifikánsak voltak ($p < 0,0001$). A rendszer 100 ng és 15 pg közötti kiindulási DNS mennyiséggel működött.

A MM és a HRM primerek által felszorzott szakaszokat a referens törzsekben és több saját izolátumban is megszekvenáltuk, hogy igazoljuk az eltérések valódiságát. A szekvenciákat KP792232–KP792236 azonosítóval a GenBank gyűjteményében helyeztük el. A szekvenciaillesztéseket az M7. melléklet tartalmazza.



15. ábra: Normalizált görbe

6.3. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH)

MAH törzseket emlős vad- és haszonállatok mellett egy esetben kutyából, két esetben pedig állatkerti madaraktól izoláltunk, Fejér megye kivételével az ország egész területéről.

A fertőzött állatok faját, a minta megnevezését, az izolálás évét és az esetleges elváltozások jelenlétét és arányát az 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat: 2006 és 2015 között azonosított MAH törzsek adatai

állatfaj	minta	kórbonctan	kórtani elváltozások aránya	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Σ	
gímszarvas	nyirokcsomó	negatív	2/16, 12,5%	2	3	2	1			1	1	1	11	16	
		pozitív		1									1		
	szervek	negatív		3											3
		pozitív		1											1
kutya	lép, nyirokcsomó	pozitív	1/1, 100%					1					1	1	
muflon	szervek	pozitív	1/1, 100%							1			1	1	
páva	szervek	pozitív	1/1, 100%			1							1	1	
sertés	nyirokcsomó	pozitív	14/14, 100%	3	7		1			1			12	14	
	szervek	pozitív					1						1		
	szervek	pozitív							1				1		
szarvasmarha	nyirokcsomó	negatív	2/46, 4,3%	1	6	10	3	7	2	1	2	7	5	44	46
		pozitív					1					1		2	
turákó	máj	pozitív	1/1, 100%			1							1	1	
vaddisznó	nyirokcsomó	negatív	4/14, 28,6%	1			1			2	2	3	1	10	14
		pozitív			2				1				3		
	szervek	pozitív									1			1	
összesen:				1	17	24	5	12	3	3	10	12	7	94	

A fertőzött sertések 7 megye 8 különböző állományából származtak, és kivétel nélkül jellegzetes elváltozásokat mutattak, melyek leginkább a bélfodri nyirokcsomókra korlátozódtak.

A szarvasmarha eredetű törzsek 16 megye 38 állományából származtak. A fertőzött gazdaállatok 76%-a (35/46) reagált tuberkulin bőrpróbában. A törzsek 2/3-át tej- (Holstein-fríz, Jersey), 1/3-át húshasznú (Aberdeen Angus, Charolais, Magyar szürke) állatokból tenyésztettünk ki, melyek 3 hónap és 13 év közötti korúak voltak. Hét törzs származott bikákból, 39 tehenekből.

A gímszarvas minták 12,5, míg a vaddisznó minták 28,6%-ában láttunk makroszkópos elváltozásokat. A pávában és a turákóban a madárgümőkórral megegyező kórbonctani képet láttunk. A kutya eredetű törzs egy városi, lakásban tartott 2 éves törpe schnauzer kanból származott, melyben testszerte jelentkező nyirokcsomó megnagyobbodás háttérben szisztémás *Mycobacterium* fertőzést diagnosztizáltunk (16. ábra).



16. ábra: Megnagyobbodott Peyer-plakkok kutya vékonybelében

6.4. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)

MAP törzseket az ország egész területéről nagy számban mutattunk ki. Házi és vadon élő kerdőzök mellett vaddisznóból, rókából és sertésből is izoláltuk a kórokozót. Magyarországon elsőként tipizáltunk MAP törzseket és mutattuk ki az I-es/S (juh) típus előfordulását juhokban, kecskében és szarvasmarhában (17. ábra). Ugyancsak elsőként tenyésztettük ki II-es/C (szarvasmarha) típusú MAP törzset sertésből.

A fertőzött állatok számát, a minta típusát, az izolálás évét és a törzsek típusát a 8. táblázat tartalmazza.

A törzsek csupán 9,7%-a (64/659: 3 juh, 4 kecske, 4 muflon, 53 szarvasmarha minta) származott a paratuberkulózis célzott kimutatására irányuló vizsgálatokból, a többi a gümőkór igazolására/cáfolására végzett bakteriológiai vizsgálatokban, mint melléklet került kimutatásra.



17. ábra:
Juh típusú (S, I-es) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* törzs J talajon

8. táblázat: 2006 és 2015 között azonosított MAP törzsek adatai

(rövidítések: nv: nem vizsgált, II: II-es típusú MAP törzs, C: cattle – szarvasmarha típusú MAP törzs, I-es típusú MAP törzs, S: sheep – juh típusú MAP törzs)

állatfaj	minta	típus	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Σ	
bivaly	nyirokcsomó	II/C							1				1	
gímszarvas	nyirokcsomó	II/C				2	4	9					15	
	szervek					1							1	
	bél										1		1	
juh	bél	I/S				2		1					3	
kecske	bél	I/S							1			1	2	
		II/C									1		1	
	szervek	I/S								1			1	
		II/C									1		1	
muflon	szervek	II/C							4				4	
sertés	szervek	II/C						1					1	
szarvasmarha	bél	II/C	2	1	3	2	2				1		11	
		nv		1										1
	bélsár	II/C	3	2	1	7	12	3	2	4		2		36
		nv					1							1
	nyirokcsomó	I/S					1							1
		II/C	7	21	107	67	87	51	31	48	75	38		532
		nv	1	3	6									10
szervek	II/C			1					2				3	
vaddisznó	nyirokcsomó	II/C				1	2	10	7	5	4	1	30	
	szervek	II/C						1	1				2	
vörös róka	nyirokcsomó	II/C				1							1	
összesen:			13	28	118	83	109	76	43	64	83	42	659	

Az 542 mellékletként kitenyésztett szarvasmarha eredetű törzs közül 76 (14,02%) olyan állatokból származott, melyek nem reagáltak a tuberkulin bőrpróbában, míg a fennmaradó 466 törzs (85,98%) a bőrpróbában pozitív vagy kétes reakciót adó állatokból tenyésztett ki. Húsmarhákból (Aberdeen Angus, Aubrac, Charolais, Limousin, Magyar szürke) 158, tejelőkből (Brown Swiss, Holstein-fríz, Jersey) 416 törzset izoláltunk, melyek 184 különböző állományból származtak. A legfiatalabb gazda 2 hónapos, a legidősebb 16 éves volt. Az ismert eredetű törzsek 7,6%-át (44/577) bikákból, több mint 92%-át tehenekből izoláltuk. Több esetben izoláltunk MAP törzseket egymással rokon állatokból, mint pl.: anyából és borjából, testvérborjából, valamint külföldről (pl.: Németország, Dánia, Szlovákia, Hollandia) importált állatokból.

A bivaly, a gímszarvas, a róka és a sertés eredetű törzsek Somogy megyéből származtak. A muflon törzsek Somogy megyében, karanténban mintázott Csehországból importált állatokból tenyésztették ki. A fertőzött juhok Hajdú-Bihar és Jász-Nagykun-Szolnok, míg a

kecskék Hajdú-Bihar, Pest, Somogy és Veszprém megyeiek voltak. A vaddisznó minták zöme (22/31) Somogyból származott, de Bács-Kiskun, Baranya, Győr-Moson-Sopron, Hajdú-Bihar, Heves, Komárom-Esztergom, Tolna, Vas és Veszprém megye eredetű törzsek is voltak.

A paratuberkulózis célzott kimutatására érkezett minták közül 41 bélsárminta, a 4 kecske minta valamint a 3 juh bélminta esetén többféle közvetlen DNS kivonási módszert követően is megkíséreltük a MAP kimutatását specifikus PCR rendszerek segítségével (9. táblázat).

A „gold standardnak” minősülő, kontrollként végzett tenyésztéses vizsgálattal 19 törzset sikerült kitenyésztenünk. A tenyésztéses vizsgálatban negatív minták minden esetben negatív PCR eredményeket mutattak. A pozitív minták közül 15-öt találtunk pozitívnak a direkt PCR vizsgálatokban.

A legtöbb pozitív eredményt a Roche High Pure PCR Template Preparation v.16.0 kittel vagy az ExtractMaster™ Fecal DNA Extraction kittel történt DNS kivonást követően végzett F57 specifikus PCR-ek adták.

9. táblázat: MAP direkt kimutatására irányuló vizsgálatok eredményei

	vizsgált mintaszám	kontroll tenyésztés (+/ Σ)	pozitív minták PCR eredményei (+/ Σ)									
			S		K		Q		E		R	
			Is900	F57	Is900	F57	Is900	F57	Is900	F57	Is900	F57
szarvasmarha bélsár	41	12/41	0/12	0/12	2/12	3/12	2/12	4/12	0/12	6/12	5/12	8/12
juh bél	3	3/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3
kecske bél/szervek	4	4/4	1/4	2/4	1/4	2/4	2/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4
összesen:	48	19/48	2/19	3/19	4/19	6/19	6/19	9/19	7/19	13/19	12/19	15/19

(rövidítések: +: pozitív, Σ : összes, S: szonikálást követő, K: kézi DNS kivonást követő, Q: QIAamp® DNA Mini kittel végzett DNS kivonást követő, E: ExtractMaster™ Fecal DNA Extraction kittel végzett DNS kivonást követő, R: Roche High Pure PCR Template Preparation v.16.0 kittel végzett DNS kivonást követő)

6.5. Egyéb, nem *M. avium* NTM-ok kimutatása és azonosítása

A közel 1000 *M. avium* törzs mellett 1419 egyéb, nem *M. avium* NTM-ot azonosítottunk 2006 és 2015 között. Ezen törzsek több mint egy harmadát tejmintákból tenyésztettük ki. További vizsgálatokba 230 törzset vontunk be, melyek közül 38 volt tejeredetű.

10. táblázat: 2006 és 2015 között azonosított egyéb, nem *M. avium* NTM törzsek

állatfaj	baktérium	típus	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2015	Σ		
bivaly	<i>M. thermoresistibile</i>	nyirokcsomó			1							1	1	
dámvad	" <i>M. sinense</i> JDM601"	szervek		2								2	4	
	<i>M. nonchromogenicum</i>	nyirokcsomó				2						2		
fehér busa	<i>M. chelonae</i>	máj					1					1	1	
gímszarvas	<i>M. arupense</i>	nyirokcsomó		1								1	16	
	<i>M. fortuitum</i>	nyirokcsomó			1							1		
	<i>M. intermedium</i>	nyirokcsomó			1							1		
	<i>M. nonchromogenicum</i>	nyirokcsomó			1	2						3		
	<i>M. palustre</i>	nyirokcsomó			1							1		
	<i>M. parafortuitum</i>	nyirokcsomó						1				1		
	<i>M. spp. #3, #4, #5, #7</i>	nyirokcsomó		1	2	1		1				5		
	<i>M. vaccae</i>	nyirokcsomó, szervek		3								3		
haltáp	<i>M. arupense</i>	homár ikra					2					2	5	
	<i>M. llatzerense</i>	artémia (sórák)							1			1		
	<i>M. nonchromogenicum</i>	homár ikra					1					1		
	<i>M. peregrinum</i>	zooplankton					1					1		
humán	<i>M. abscessus</i>	törzs							1			1	1	
juh	<i>M. triviale</i>	lép									1	1	1	
kaméleon	<i>M. abscessus</i>	térdizületi punktátum	1									1	1	
krokodil	<i>M. ulcerans</i> ecovar Liflandii	máj									1	1	1	
kutya	<i>M. fortuitum</i>	hasúri punktátum								1		1	1	
őz	<i>M. fortuitum</i>	nyirokcsomó				1						1	2	
	<i>M. kansasii</i>	nyirokcsomó			1							1		
sertés	" <i>M. sinense</i> JDM601"	nyirokcsomó		2								2	2	
	" <i>M. sinense</i> JDM601"	nyirokcsomó		1	4	1						6		
	<i>M. abscessus</i>	tej									2	2		
	<i>M. arupense</i>	nyirokcsomó		2	3	1	1					7		
	<i>M. bourgelatii</i>	nyirokcsomó			1	1						2		
	<i>M. europaeum</i>	nyirokcsomó	1	1								2		
	<i>M. fortuitum</i>	nyirokcsomó	2	1								3		
		tej			1									1
	<i>M. intermedium</i>	nyirokcsomó	1	3	4		5					13		
	<i>M. intracellulare</i>	nyirokcsomó					1			2		3		
	<i>M. kansasii</i>	nyirokcsomó	2	3	4	1						10		
	<i>M. malmoense</i>	nyirokcsomó				1						1		
	<i>M. nebraskense</i>	nyirokcsomó						1				1		
	<i>M. neoaurum</i>	nyirokcsomó		1								1		
	<i>M. nonchromogenicum</i>	nyirokcsomó	5	8	10	4	3					30		
	<i>M. palustre</i>	nyirokcsomó				1						1		
	<i>M. peregrinum</i>	nyirokcsomó					2					2		
	<i>M. phlei</i>	nyirokcsomó	1	1								2		
	<i>M. scrofulaceum</i>	nyirokcsomó					1					1		
	<i>M. shimoidi</i>	nyirokcsomó		2	1							3		
<i>M. smegmatis</i>	nyirokcsomó	1		1		1					3			
	tej		3	5	2	10	4	8	2	1		35		
<i>M. sp. #4</i>	nyirokcsomó	1				1	1				3			
<i>M. sp. F106258</i>	nyirokcsomó		2								2			
<i>M. thermoresistibile</i>	nyirokcsomó, bél+lép		4	1	1	1						7		
teve	<i>M. chitae</i>	nyirokcsomó				1						1	1	
	" <i>M. sinense</i> JDM601"	nyirokcsomó			1							1		
	<i>M. arosiense</i>	nyirokcsomó				1						1		
	<i>M. bourgelatii</i>	nyirokcsomó			3							3		
	<i>M. fortuitum</i>	nyirokcsomó, szervek	1	2	5		1					9		
	<i>M. gordonae</i>	nyirokcsomó		1								1		
	<i>M. intermedium</i>	nyirokcsomó			1							1		
	<i>M. intracellulare</i>	nyirokcsomó							3			3		
	<i>M. nonchromogenicum</i>	nyirokcsomó		4	11	2	5					22		
	<i>M. saskatchewanense</i>	szervek								2		2		
	<i>M. scrofulaceum</i>	nyirokcsomó			1							1		
<i>M. spp. #1, #2, #3, #6, #7, #8</i>	nyirokcsomó		1	4		1					6			
<i>M. vaccae</i>	nyirokcsomó						1				1			
vörös róka	<i>M. thermoresistibile</i>	nyirokcsomó			1							1	1	
összesen:			20	46	70	23	37	9	13	7	5	230		

A különböző állatfajokból (mintákból) faji szinten meghatározott törzsek nevét, a minta típusát, és az izolálás évét a 10. táblázat tartalmazza.

A gímszarvas eredetű törzseket kettő (Tolna) kivételével Somogy megyéből izoláltuk. Vaddisznókból az alföldi megyék (Bács-Kiskun, Békés, Csongrád, Jász-Nagykun-Szolnok) kivételével az egész ország területéről származtak a törzsek. A sertés eredetű törzsek egy Baranya megyei állományból származtak. A 103 nem tej eredetű szarvasmarha törzset Győr-Moson-Sopron és Jász-Nagykun-Szolnok megyék kivételével az ország 65 különböző állományából tenyésztettük ki, vegyesen bikákból (12%) és tehenekből (88%), hús- (33%) és tejtípusú (67%) állatokból. A szarvasmarha gazdák 92,3%-a reagált a tuberkulin bőrpróbában, kórbonctani elváltozást azonban csak 7,7%-ukban láttunk. A tejeredetű törzsek 8 megye 17 állományából származtak.

A vizsgált törzsek között *M. nonchromogenicum* volt a leggyakoribb (25,2%), melyet 16,5%-os gyakorisággal *M. smegmatis* követett. Bizonyos törzseket, mint a *M. fortuitum*, *M. intermedium* és *M. kansasii* ismételten izoláltunk, míg pl. *M. chitae*-t, *M. chelonae*-t, *M. parafortuitum*-ot és *M. nebraskense*-t csak egyedi esetekben találtunk.

Míg egyes törzseket, mint a *M. abscessus*-t, a *M. palustre*-t, a *M. peregrinum*-ot vagy a *M. thermoresistibile*-t különböző gazdafajokban is azonosítottunk, *M. smegmatis*-t, *M. neoaurum*-ot, *M. shimoidei*-t, *M. europaeum*-ot, *M. nebraskense*-t, *M. malmoense*-t és *M. phlei*-t csak szarvasmarhában, *M. arosiense*-t, *M. saskatchewanense*-t és *M. gordonae*-t csak vaddisznóban, és *M. parafortuitum*-ot csak gímszarvasban találtunk.

A nem tej eredetű szarvasmarha törzsek 97%-át (100/103) tudtuk azonosítani, a fennmaradó 3 törzs (*M. sp. #4*) *tuf*, *rpoB* és 16S rDNS szekvenciák alapján sem volt azonosítható. Szekvenciájuk nem csak egymással, de 2 gímszarvas eredetű törzssel is megegyezett.

A vaddisznó izolátumok között 45 ismert törzset találtunk (88,2%), a maradék 6 új törzstípusokat képviselt (*M. sp. #1, #2, #3, #6, #7, #8*). A 16 gímszarvas izolátumot 5 kivételével (31,25%) azonosítottuk, a nem azonosíthatók 4 különböző törzstípust képviseltek (*M. sp. #3,#4, #5, #7*). Az ismert szekvenciák alapján nem azonosítható új törzstípusok *tuf*, *rpoB* és 16S rDNS gén szekvenciáit KP840553–KP840591 azonosító számokkal elhelyeztük a GenBank gyűjteményében. Sertésből, őzből, dámvadból, vörös rókából, juhból, kutyából, tevéből, kaméleonból, krokodilból és emberből csak korlátozott számú törzssel rendelkezünk, melyeket kivétel nélkül azonosítani tudtunk.

A kereskedelmi forgalomban kapható kitek közül az INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 egy 50 törzsön végzett tájékoztató vizsgálatban az izolátumok mindössze 10%-át tudta azonosítani, így ezt a módszert további vizsgálatainkból kizártuk. A GenoType Mycobacteria CM/AS kit tévesen *M. gordonae*-ként azonosította a *M. boogelatii* törzseket és a *M. intermedium* törzsek egy részét, a *M. nonchromogenicum* törzsek zömét mint *M. celatum*-ot, két *M. peregrinum*-ot mint *M. fortuitum*₁, 12 *M. smegmatis*-t mint *M. fortuitum*₂, és három új törzstípust, mint *M. szulgai*, *M. scrofulaceum* és *M. intracellulare*. Ezzel a kittel a pontos identifikálás aránya 22,07%-nak bizonyult (34/154).

A vizsgált törzsek zöme jól azonosítható volt *rpoB* vagy *tuf* szekvenciájuk alapján, míg a 16S rDNS szakaszok sok esetben nem bizonyultak megfelelő felbontóképességűnek.

A *M. ulcerans* ecovar Liflandii törzs a *M. ulcerans*-hoz és *M. marinum*-hoz való nagyfokú szekvencia-hasonlóság miatt 16S rDNS, valamint részleges *tuf* és *rpoB* szekvenciák alapján nem volt azonosítható, így irodalmi adatokra támaszkodva vizsgáltuk az IS2404-es szakasz, az *esxA* és *esxB* gének jelenlétét és a *hsp65* gén részleges szekvenciáját is.

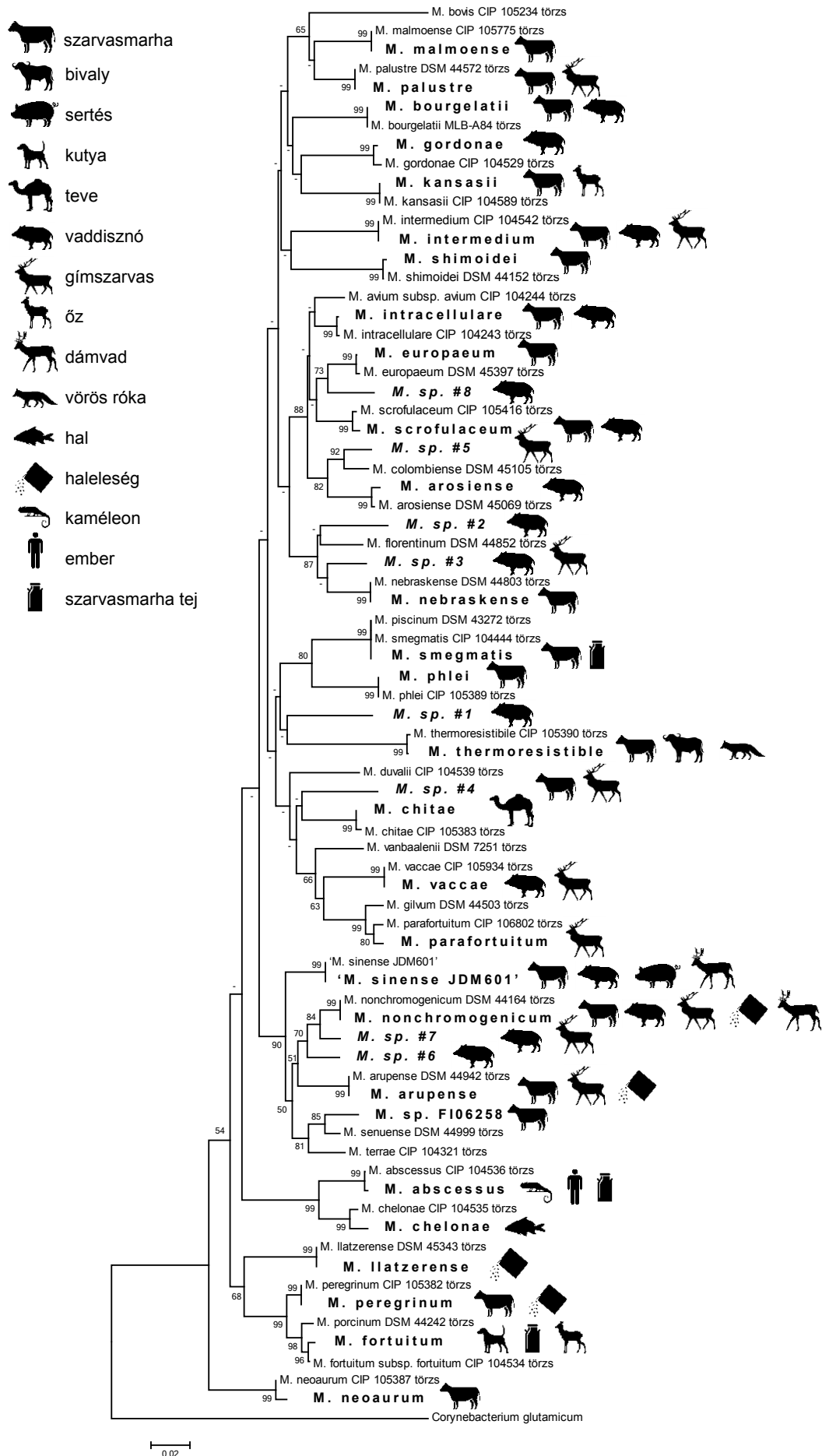
Az egyes baktériumfajok azonosítási lehetőségeit és a megfigyelt kórbonctani elváltozásokat a 11. táblázat tartalmazza. Pozitív kórbonctani leletnek nem csupán a nyirokcsomókban megfigyelt gócos elváltozásokat tekintettük, hanem a köpet és punktátum pozitívást, vagy akár a krónikus tüdőgyulladást.

34 reprezentatív törzs és válogatott referens törzsek *tuf* génjének 548 bp hosszú szakaszát felhasználva filogenetikai fát készítettünk (18. ábra). Az általunk azonosított törzsek referens törzseik mellett jelentek meg. A nem azonosítható törzsek közül a #6-os és #7-es a *M. terrae* komplexbe sorolódott, melyben a *M. nonchromogenicum*-hoz álltak a legközelebbi rokonságban. A #4-es törzs a *M. vanbaalenii*, *M. vaccae* és *M. gilvum* csoportba állt közel, míg a #3-as törzs a *M. nebraskense*-hez, az #5-ös a *M. colombiense*-hez hasonlított leginkább. A vaddisznókból izolált #1-es, #2-es és #8-as törzsek rendre a *M. thermoresistibile*-vel, *M. florentium*-mal és *M. europaeum*-mal álltak a legközelebbi rokonságban. Az elágazások valószínűségét az 1000-es ismétlésben elvégzett „bootstrap” értékek mutatják, melyek közül csak az 50 felettieket tüntettük fel.

11. táblázat: Az egyes egyéb, nem *M. avium* NTM törzsek azonosítási lehetőségei és a megfigyelt kórbonctani elváltozások gyakorisága

(rövidítések: nv: nem vizsgált, +: helyes azonosítás, (+): komplex szintű azonosítás, -: nem lehetséges az azonosítás, !!!: téves azonosítás, n: törzsek száma, *: további vizsgálatok szükségesek az azonosításhoz)

baktérium	kórbonctani elváltozás előfordulása (+/Σ, %)	azonosítási lehetőségek					Σ
		InnoLipa	Genotype CM/AS	16S	<i>rpoB</i>	<i>tuf</i>	
<i>M. abscessus</i>	4/4 (100%)	nv	+	+	+	+	4
<i>M. arosiense</i>	1/1 (100%)	nv	-	+	+	+	1
<i>M. arupense</i>	0/10 (0%)	nv	-	nv	nv	+	10
<i>M. bourgelatii</i>	3/5 (60%)	nv	!!!	+	-	+	5
<i>M. chelonae</i>	1/1 (100%)	nv	+	nv	nv	+	1
<i>M. chitae</i>	1/1 (100%)	nv	-	nv	nv	+	1
<i>M. europaeum</i>	0/2 (0%)	nv	-	nv	nv	+	2
<i>M. fortuitum</i>	7/16 (43,7%)	(+)	+	+	+	+	16
<i>M. gordonae</i>	1/1 (100%)	!!!	+	+	nv	+	1
<i>M. intermedium</i>	2/15 (13,3%)	-	!!!	nv	nv	+	15
<i>M. intracellulare</i>	0/6 (0%)	nv	+	nv	nv	+	6
<i>M. kansasii</i>	1/11 (9,1%)	+	+	-	+	+	11
<i>M. llutzerense</i>	---	nv	nv	nv	nv	+	1
<i>M. malmoense</i>	0/1 (0%)	nv	+	+	nv	+	1
<i>M. nebraskense</i>	0/1 (0%)	nv	nv	+	nv	+	1
<i>M. neoaurum</i>	0/1 (0%)	nv	-	nv	nv	+	1
<i>M. nonchromogenicum</i>	9/58 (15,5%)	-	!!!	+	+	+	58
<i>M. palustre</i>	0/2 (0%)	-	(+)	+	+	+	2
<i>M. parafortuitum</i>	0/1 (0%)	nv	nv	+	nv	+	1
<i>M. peregrinum</i>	0/3 (0%)	nv	!!!	+	nv	+	3
<i>M. phlei</i>	0/2 (0%)	nv	+	+	nv	+	2
<i>M. saskatchewanense</i>	1/2 (50%)	nv	nv	+	nv	+	2
<i>M. scrofulaceum</i>	1/2 (50%)	+	+	nv	+	+	2
<i>M. shimoidei</i>	0/3 (0%)	-	+	nv	+	+	3
" <i>M. sinense</i> JDM601"	2/11 (18,1%)	-	-	+	-	+	11
<i>M. smegmatis</i>	36/38 (94,7%)	nv	!!!	+	+	+	38
<i>M. thermoresistibile</i>	3/9 (33,3%)	nv	-	+	+	+	9
<i>M. triviale</i>	1/1 (100%)	nv	nv	nv	+	nv	1
<i>M. ulcerans</i> ecovar Liflandii	1/1 (100%)	nv	nv	-*	-*	-*	1
<i>M. vaccae</i>	2/4 (50%)	nv	-	+	nv	+	4
<i>M. sp. #1</i>	0/1 (0%)	-	!!!	KP840559	-	KP840560	1
<i>M. sp. #2</i>	1/1 (100%)	-	-	KP840561	KP840562	KP840563	1
<i>M. sp. #3</i>	0/2 (0%)	-	-	KP840564 KP840567	KP840565	KP840566 KP840568	2
<i>M. sp. #4</i>	1/5 (20%)	-	-	KP840569 KP840572 KP840574 KP840577	KP840570 KP840575	KP840571 KP840573 KP840576 KP840578	5
<i>M. sp. #5</i>	0/1 (0%)	-	!!!	KP840579	KP840580	KP840581	1
<i>M. sp. #6</i>	0/1 (0%)	-	-	KP840582	KP840583	KP840584	1
<i>M. sp. #7</i>	1/2 (50%)	-	-	KP840585	KP840586 KP840588	KP840587 KP840589	2
<i>M. sp. #8</i>	0/1 (0%)	-	!!!	KP840590	KP840591	KP840553	1
<i>M. sp. FI06258</i>	0/2 (0%)	-	-	KP840554 KP840556	+	KP840555 KP840558	2
összesen:							230



18. ábra: 34 reprezentatív nem *M. avium* NTM törzs filogenetikai fája

6.6. Vegyes fertőzések

A törzsek mélyebb vizsgálatához (szekvánálás, genotipizálás) szilárd táptalaj felületén növesztett szintenyészetek létrehozására volt szükség. Vizsgálataink megkezdése előtt nem tudtuk szilárd táptalajon tenyészteni a juh típusú MAP és a MAS törzseket. A MAS törzseket először saját fejlesztésű (2MA), majd 7H11 táptalajon sikerült kitenyészteni, míg a juh típusú MAP törzseknél a 7H11 mellett a J agart találtuk megfelelőnek. Vegyes fertőzések esetén további speciális táptalajok és szelektív tenyésztési körülmények szükségesek a különféle törzsek szétválasztásához.

Sikerrel izoláltunk MAP-t *M. bovis* subsp. *caprae* mellől toluidinkékes Herrold's agar segítségével, valamint MAH, MAS és egyéb nem *M. avium* NTM-ok, mint *M. fortuitum* mellől. Különböző *M. avium* alfajok és más NTM-ok vegyes fertőzése esetén (pl. *M. intracellulare*-MAH) az eltérő telepmorfológiai sajátosságokat használtuk ki. *M. bovis* subsp. *caprae* és MAS, vagy MAA vegyes fertőzésnél a magasabb (45 °C), míg egyéb nem *M. avium* NTM-okkal vegyes fertőzés esetén az alacsonyabb (25 °C) tenyésztési hőmérséklet szelektív hatását alkalmaztuk.

6.7. *M. avium* alfajok genotipizálása

Az LSP^A17 szekvencia polimorfizmus vizsgálatát mind a 962 *M. avium* törzsön elvégeztük. A vizsgált szekvencia minden MAA és MAS törzsből hiányzott, míg minden MAP törzsben jelen volt. A 94 MAH törzsből 64-ben (67,1%) tudtuk kimutatni, míg 31-ben (32,9%) nem.

MIRU–VNTR analízisbe a 3 referens törzs mellett 795 törzset vontunk be, 135 MAA-ot, 62 MAS-ot, 84 MAH-t és 514 MAP-t.

Huszonhárom MAP törzs esetén egyes lókuszokon egyszerre több TR párhuzamos jelenlétét tapasztaltuk, melyeket kizártuk a további vizsgálatokból, így 772 esetben tudunk teljes profilt képezni (135 MAA, 62 MAS, 84 MAH, 491 MAP). Az egyes lókuszokon megfigyelt TR-ek számát és az allélváltozatosságot a 12. táblázat tartalmazza.

MAA és MAH törzseknél a MIRU3, MAP törzseknél a MIRU2, míg MAS törzseknél a MIRU4 allél bizonyult a legváltozékonyabbnak. MAP törzseknél a MIRU4, MAA törzseknél a MIRU1 és VNTR25, míg MAS törzseknél a MIRU1, MIRU2, VNTR25, VNTR32 és MATR9 lókuszoknál csak egyféle TR fordult elő.

12. táblázat: A *M. avium* alfajok egyes lókuszaiban megfigyelt tandem ismétlődések

lókuszt	Tandem ismétlődések a vizsgált törzsek számával											allél- változatosság (h)	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11
MIRU1	MAA	92											0,000
	MAS	27											0,000
	MAH	42		22		11							0,587
	MAP	20		175									0,185
	Σ	181		197		11							
MIRU2	MAA					90		2					0,043
	MAS					27							0,000
	MAH	13		1		50		10		1			0,514
	MAP					7		92		95		1	0,542
	Σ	13		1		174		104		96		1	
MIRU3	MAA	2		6		3		31		22		28	0,739
	MAS	1								25		1	0,041
	MAH	18		1		9		16		12		19	0,803
	MAP			1		191		3					0,145
	Σ	21		8		203		50		59		48	
MIRU4	MAA			16		73		3					0,343
	MAS			1		25		1					0,145
	MAH			16		57				2			0,381
	MAP	195											0,000
	Σ	195		33		155		4		2			
VNTR25	MAA	92											0,000
	MAS	27											0,000
	MAH		43	23	9								0,570
	MAP			188		7							0,070
	Σ	119	43	211	9	7							
VNTR32	MAA							91		1			0,022
	MAS							27					0,000
	MAH						2		69	4			0,152
	MAP						2		193				0,020
	Σ						4		118	263	4		
VNTR259	MAA	6	85	1									0,144
	MAS		1	26									0,074
	MAH	41	29	5									0,555
	MAP	4	191										0,040
	Σ	51	306	32									
MATR9	MAA	6	86										0,123
	MAS	27											0,000
	MAH	8	57			10							0,399
	MAP	18	177										0,168
	Σ	59	320			10							

A 772 törzs között 85 különböző genotípust mutattunk ki. A különböző genotípusok nem voltak gazdafaj specifikusak, előfordulásuk független volt a gazdaállatok korától és nemétől, és az egyes években való előfordulásuk sem különbözött. A 68-as és 70-es genotípusok kivételével, melyeket a Duna–Tisza közének északi részén illetve az ország észak-keleti csücskében találtunk meg, a különböző genotípusok előfordulása nem mutatott területi különbségeket.

Ugyanakkor az egyes genotípusok alfajspecifikusak voltak. MAA törzsek között 17, MAH törzsek között 43, MAS törzsek között 6, MAP törzsek között pedig 19 különböző genotípust azonosítottunk.

Az egyes genotípusokat a 13. táblázat tartalmazza, a köztük lévő genetikai rokonságot pedig a 19. ábra mutatja.

MAA alfajnál a genotípusok tyúokban voltak a legváltozatosabbak, míg MAH-nál vaddisznóban. A MAP alfajon belül két domináns genotípust találtunk, a 77-est és a 84-est. Néhány halmozódástól eltekintve az egyes genotípusok házi és vadon élő állatokban közel azonos arányban fordultak elő.

Bizonyos farmokon ugyanazt a genotípust egymástól időben távoli kitéréseknél is azonosítottuk. Az egyes kitéréseknél a MAA törzsek mindig azonos, míg a MAH törzsek mindig eltérő genotípusúak voltak. A szarvasmarha eredetű MAP törzsek (455 db) 150 különböző állományból származtak, melyek közül 75-ből több törzssel is rendelkezünk. Ezek közül 40-ben többféle genotípus párhuzamos jelenlétét találtuk, gyakran egy állatban való vegyes fertőzést is megfigyeltünk. Hat állományban találtunk rokonsági kapcsolatokat MAP-fertőzött állatok között. A 14 állatból 10 esetben a rokonok azonos genotípust hordoztak.

Vadállatokban és szarvasmarhákban a 2 fő MAP genotípus előfordulási aránya megegyezett általános előfordulási arányukkal, azonban a különböző hasznosítási irányú szarvasmarhákat elkülönítve vizsgálva a húshasznú állatokban a 84-est, míg tejhasznúaknál inkább a 77-est találtuk dominánsnak. Az ősi magyar fajtáknál (magyar szürke, magyartarka) egyértelműen a 84-es genotípus javára billent a mérleg. A főleg Dániából, és Németországból importált tejhasznú Jersey, Brown Swiss és kanadai és USA importból származó Holstein-fríz állatok szinte kizárólag a 77-es, míg a Szlovákiából és Franciaországból importált húshasznú (Aubrac, Limousine, Charolais) állatok egytől-egyig a 84-es genotípust hordozták.

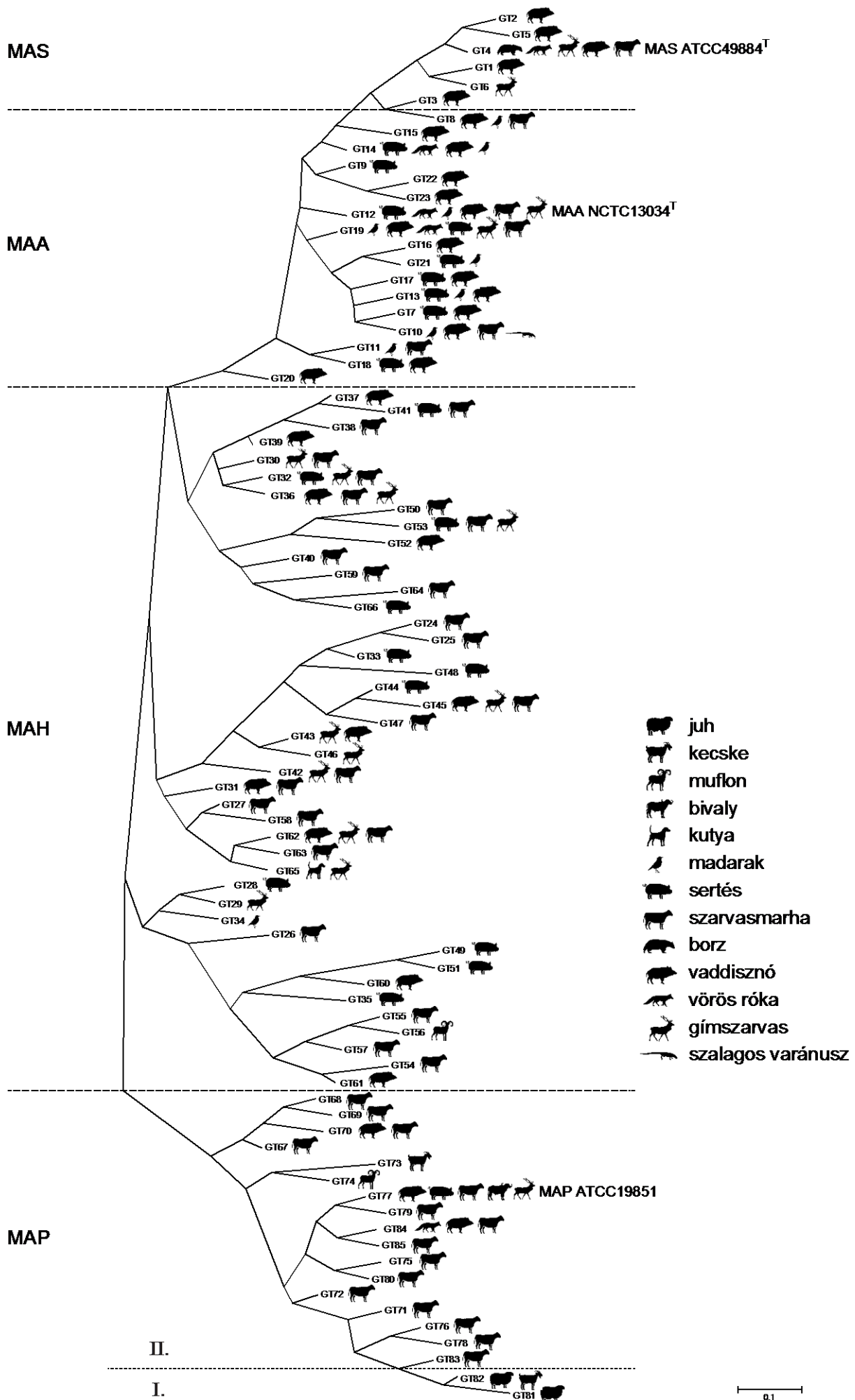
A genotípusok evolúciós rokonságát ábrázoló filogenetikai fán a MAH, MAA, MAS és MAP törzsek különálló csoportokba rendeződtek. A MAH törzsek 3 nagy alcsoportot alkottak, míg a MAA törzsek egy nagy és két kisebb alcsoport mellett önálló genotípusokat is tartalmaztak, mint pl. a 12-es, mely a típus törzset is magába foglalta. A MAS törzsek egy kivétellel egy nagyobb alcsoportba rendeződtek. A MAP törzsek között az I-es típusúak külön alcsoportot alkottak, míg a II-es típusúak között 4 közepes alcsoportot és 3 független genotípust találtunk.

A DI, mely a vizsgálómódszer diszkriminációs erejét mutatja, a négy alfajt együttesen tekintve 0,9175, míg az egyes alfajokat külön-külön vizsgálva MAA-nál 0,8679-nek, MAH-nál 0,9762-nek, MAS-nál 0,3419-nek, MAP-nál pedig 0,7159-nek bizonyult. A DI madarak között 0,967, háziállatoknál 0,8583, míg vadállatok esetén 0,9601 volt.

13. táblázat: Az egyes *M. avium* genotípusok (GT) gazdafajai és izolálásuk éve

baktérium	GT	MIRU-VNTR profil	állatfaj	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Σ	
MAS	1	1-5-0-5-1-8-3-1	vaddisznó							1			1	
	2	1-5-9-3-1-8-3-1	vaddisznó								1		1	
	3	1-5-9-5-1-8-2-1	vaddisznó									1	1	
	4	1-5-9-5-1-8-3-1	borz										1	1
			gímszarvas			1	1	1	1	3	1	1	9	56
			szarvasmarha							1	3	1	5	
vaddisznó					2		2	9	8	16	2	39		
vörös róka								2		2	2			
5	1-5-9-7-1-8-3-1	vaddisznó								2		2		
6	1-5-11-5-1-8-3-1	gímszarvas				1						1		
MAS összesen:												62		
MAA	7	1-5-0-3-1-8-2-2	sertés		1								1	
			vaddisznó					1					1	
	8	1-5-3-5-1-8-2-1	barát réce				1							1
			fűttyős réce			1								1
			szarvasmarha			2								2
			tőkés réce			1								1
			tragopán						1					1
			vaddisznó			1					1			2
	9	1-5-5-5-1-8-2-2	sertés		2		4						6	
	10	1-5-7-3-1-8-2-2	pulyka						1					1
			szalagos varánusz						1					1
			szarvasmarha						1					1
			vaddisznó						1			1		2
	11	1-5-7-5-1-8-1-2	házigalamb				1							1
			szarvasmarha					1						1
			turákó			1								1
	12	1-5-7-5-1-8-2-2	erdei fülesbagoly	1										1
			gímszarvas				1							1
			sertés		9	4	8	1				1	23	
			szarvasmarha	5		1			2	1			9	
			vaddisznó			1			2	6			9	
			vörös róka					1						1
	13	1-5-9-3-1-8-2-2	sertés				1							1
tyúk								2					2	
vaddisznó							1		2				3	
14	1-5-9-5-1-8-2-2	kacsa							1				1	
		vörös róka		1		2					1		4	
		sertés		4								1	5	
		tyúk			1								1	
		vaddisznó				1	1	2	6	1	1	12		
15	1-5-9-5-1-8-3-2	vaddisznó			1							1		
16	1-5-9-7-1-8-2-2	vaddisznó							1			1		
17	1-5-11-3-1-8-2-2	sertés		1	1							1	3	
		vaddisznó				1			2				3	
18	1-5-11-5-1-8-1-2	sertés				1							1	
		vaddisznó			1						1		2	
19	1-5-11-5-1-8-2-2	gímszarvas				1							1	
		sertés		2				1					3	
		szarvasmarha		1									1	
		tyúk					2				1		3	
		vaddisznó		1	3			1	2	4			11	
		vörös róka			1	1			1				3	
20	1-5-11-5-1-9-2-2	vaddisznó							1			1		
21	1-5-11-7-1-8-2-2	sertés		1									1	
		tyúk			1								1	
22	1-7-5-5-1-8-2-2	vaddisznó				1						1		
23	1-7-9-5-1-8-2-2	vaddisznó									1	1		
MAA összesen:												135		
MAH	24	1-1-7-5-3-9-1-5	szarvasmarha			1							1	
	25	1-1-7-5-3-9-3-5	szarvasmarha					1					1	
	26	1-5-0-3-4-9-2-2	szarvasmarha			2							2	
	27	1-5-0-5-2-9-2-2	szarvasmarha		1								1	
	28	1-5-5-3-2-9-1-2	sertés			1							1	
	29	1-5-5-3-2-9-2-2	gímszarvas				1						1	
	30	1-5-5-5-2-9-1-2	gímszarvas					1						1
			szarvasmarha		1							1	2	
	31	1-5-5-5-2-9-2-2	szarvasmarha					1			1			2
			vaddisznó							1	1			2
32	1-5-7-5-2-9-1-2	gímszarvas		2									2	
		sertés		1									1	
		szarvasmarha	1										1	

33	1-5-7-5-3-9-1-5	sertés										1								1	1	1																					
34	1-5-9-3-2-9-2-2	páva				1																1	1																				
		turákó				1																	1	2																			
35	1-5-9-3-4-9-1-1	sertés							1														1	1																			
36	1-5-9-5-2-9-1-2	gímszarvas			2																		2	2																			
		szarvasmarha				1			1					1									3	6																			
		vaddisznó												1									1	1																			
37	1-5-11-5-2-10-1-2	vaddisznó												1									1	1																			
38	1-5-11-5-2-6-1-2	szarvasmarha			1				1														2	2																			
39	1-5-11-5-2-9-1-2	vaddisznó			1																		1	1																			
40	1-5-11-5-3-9-1-2	szarvasmarha				1																	1	1																			
41	1-5-11-9-2-10-1-2	sertés												1									1	2																			
		szarvasmarha							1														1	1																			
42	1-7-0-5-2-9-2-2	gímszarvas				1																	1	2																			
		szarvasmarha							1														1	1																			
43	1-7-7-5-2-9-2-2	gímszarvas			2																		2	3																			
		vaddisznó				1																	1	1																			
44	1-7-7-5-2-9-2-5	sertés				1																	1	1																			
45	1-7-7-5-2-9-3-5	gímszarvas																					1	1																			
		szarvasmarha																					1	3																			
		vaddisznó											1										1	1																			
46	1-7-7-5-3-9-2-2	gímszarvas			1																		1	1																			
47	1-7-7-5-3-9-2-5	szarvasmarha				1				1													2	2																			
48	1-9-9-5-3-9-3-5	sertés				1																	1	1																			
49	3-1-0-3-4-9-2-1	sertés				1																	1	1																			
50	3-1-3-5-3-9-2-2	szarvasmarha								1													1	1																			
51	3-1-9-3-4-9-2-1	sertés				2																	2	2																			
52	3-1-9-5-2-9-1-2	vaddisznó				1																	1	1																			
53	3-1-11-5-3-9-1-2	gímszarvas																					1	1																			
		sertés				1	1		1														3	7																			
		szarvasmarha				1			1														1	3																			
54	3-3-11-3-4-9-1-2	szarvasmarha											1										1	1																			
55	3-5-0-3-3-9-1-1	szarvasmarha							1	2													3	3																			
56	3-5-0-3-4-9-1-1	muflon																					1	1																			
57	3-5-0-3-4-9-1-2	szarvasmarha			1	1																	2	2																			
58	3-5-0-5-2-9-2-2	szarvasmarha				1																	1	1																			
59	3-5-0-5-3-9-1-2	szarvasmarha																					1	1																			
60	3-5-9-3-3-9-2-1	vaddisznó																					1	1																			
61	3-5-11-3-4-9-1-2	vaddisznó								1													1	1																			
62	5-5-0-5-2-9-2-2	gímszarvas							1	1													2	2																			
		szarvasmarha				1	1																2	5																			
		vaddisznó																					1	1																			
63	5-5-7-5-2-9-2-2	szarvasmarha			1					1													2	2																			
64	5-5-9-5-3-10-1-2	szarvasmarha																					3	3																			
65	5-5-11-5-2-9-2-2	gímszarvas				1																	1	2																			
		kutya																					1	1																			
66	5-5-11-5-3-9-1-2	sertés				1																	1	1																			
MAH összesen:																																										84	
MAP																																											
67	1-5-5-1-3-9-2-2	szarvasmarha							1														1	1																			
68	1-7-5-1-3-9-2-2	szarvasmarha							1	2	2	2											7	7																			
69	1-7-5-1-5-9-2-2	szarvasmarha																					3	3																			
70	1-9-5-1-3-9-2-2	szarvasmarha				4	4		7	6				1	3								25	26																			
		vaddisznó												1									1	1																			
71	3-5-5-1-3-9-2-1	szarvasmarha							2														2	2																			
72	3-5-5-1-3-9-2-2	szarvasmarha								1				1									2	2																			
73	3-5-5-1-5-6-2-2	kecske																				1	1	1																			
74	3-5-7-1-5-9-2-2	muflon																				4	4	4																			
75	3-7-3-1-3-9-2-2	szarvasmarha											1										1	1																			
76	3-7-5-1-3-9-2-1	szarvasmarha				2	4		3	2	8	1	1										21	21																			
77	3-7-5-1-3-9-2-2	bivaly																					1	1																			
		gímszarvas								3	4	9											16	16																			
		sertés										1											1	242																			
		szarvasmarha				7	6	46	31	38	26	14	32	6									206	206																			
		vaddisznó							1	2	9	1	3	2									18	18																			
78	3-7-5-1-5-9-2-1	szarvasmarha																					1	1																			
79	3-7-5-1-5-9-2-2	szarvasmarha				1	4			1				1									7	7																			
80	3-7-7-1-3-9-2-2	szarvasmarha							2					2									4	4																			
81	3-9-5-1-3-6-1-1	juh							1														1	1																			
82	3-9-5-1-3-9-1-1	juh							1														1	1																			
		kecske												1	1								2	3																			
83	3-9-5-1-3-9-2-1	szarvasmarha				2	3		1				2	1									9	9																			
84	3-9-5-1-3-9-2-2	szarvasmarha				5	9	30	16	35	12	13	11	11									142	142																			
		vaddisznó										2	6	2	2								12	155																			
		vörös róka							1														1	1																			
85	3-11-5-1-3-9-2-2	szarvasmarha							1														1	1																			
MAP összesen:																																										491	
összesen:																																											772



19. ábra: *M. avium* genotípusok filogenetikai fája

6.8. Törzsgyűjtemény

A 2006 és 2015 között izolált törzsekből HUN_MYCO_COLLECTION_2006-2015 néven törzsgyűjteményt hoztunk létre (M8. melléklet). A gyűjtemény egyik részét (A) a szarvasmarha tejminta eredetű pontosan azonosított 38 törzs alkotja. Az egyes törzsek iktatószáma, mintasorszáma és a törzs őrzésének helye mellett feltűntettük a származási állományt, a származási helyet és megyét, a gazdaállatok jelzését (általában a krotáliaszám néhány számjegye a beteg tőgynegyed jelzésével pl.: BE – bal első, JH – jobb hátsó), valamint az azonosításhoz elvégzett vizsgálatokat és azok eredményeit. A gyűjtemény másik részében (B) a nem tej eredetű törzseket (2417 db: 541 MTC tag, 972 MA, 904 állati vagy környezeti eredetű NTM), a referens törzseket (3 db), a körvizsgálati mintákból származó törzseket (13 db), és az emberi eredetű törzseket (10 db) tűntettük fel. A származási állomány és a gazdaállatok adatai (kor, születési év, fajta, nem, hasznosítási irány) mellett a minta típusát (nyirokcsomó, bél, bélsár, stb.), laboratóriumba érkezésének dátumát, a vizsgálat célját (pozitív vagy kétes tuberkulin bőrpróba vagy jellegzetes elváltozások jelenléte esetén: diagnosztikai, elváltozások és tuberkulin bőrpróba pozitivitás hiányában felmérő mintáknál: monitoring), valamint a kórbonctani és szövettani vizsgálatok eredményeit is feltűntettük. A törzsek őrzésének helye és az azonosításukhoz elvégzett próbák eredményei mellett az egyes törzsek esetén a jelen munka keretében elvégzett tipizálások eredményeit is rögzítettük.

7. Megbeszélés

„Csak az az igazi tudomány, amely világra szól; s ezért ha igazi tudósok és – amint kell – jó magyarok akarunk lenni, úgy a tudomány zászlaját olyan magasra kell emelnünk, hogy azt határainkon túl is meglássák, és megadhassák neki az illő tiszteletet.”

Eötvös Lóránd

A szarvasmarhákban szinte világszerte nagy számmal előforduló tuberkulin bőrpóba pozitivitás jelzi, hogy a vizsgált NTM-ok képesek áthangolni a gazdaszervezetet, ezáltal megnehezítve a gümőkór *in vivo* diagnosztikáját. Bár a hazai szarvasmarha-állományok gümőkórmentességét 2014 februárjában elismerte az Európai Unió, a vadállatok az endémiás területeken továbbra is fenntartják és terjesztik a *M. caprae*-t (Machackova és mtsai., 2003). A vadállomány fertőzésfenntartó szerepe a NTM-ok esetén is kihangsúlyozandó (Stevenson és mtsai., 2009). Mivel a NTM-ok zöme bizonyítottan rendelkezik zoonotikus potenciállal, így a fertőzött állatok veszélyt jelenthetnek a gondozókra, az állatorvosokra, a vadászokra, valamint a vágóhídi és húszüzemi dolgozókra (Biet és mtsai., 2005). A kutyában talált generalizált fertőzés jelentőségét fokozza, hogy ezen állatok társállatként az ember közvetlen közelségében élnek, mely gyerekek, időskorúak, valamint immunhiányos kórképekben szenvedők esetén különös kockázatot jelent (Henkle és Winthrop, 2015).

Vizsgálataink egyik fő célja a nem *M. avium* NTM-ok molekuláris módszerekkel történő azonosítása és elterjedtségüknek, változatosságuknak felmérése volt. Az eredmények ismertetésének sorrendjétől eltérve, a diszkussziót ezen, eddig kevesebb figyelmet kapott, de növekvő közegészségügyi jelentőségűnek látszó csoporttal láttam célszerűnek kezdeni. Eredményeink azt mutatják, hogy a hazai házi és vadon élő állatok körében a nem *M. avium* NTM-ok nagy számban fordulnak elő, melyek klinikai jelentőségének megítélése csak pontos azonosításukat követően lehetséges. Az összes *Mycobacterium* fajt önállóan a 4.6. alfejezetben felsorolt génekre tervezett PCR rendszerek egyike sem képes azonosítani, így egyes szerzők több génen alapuló kombinált szekvencia analízist javasolnak (Adékambi és Drancourt, 2004, Devulder és mtsai., 2005, Gomila és mtsai., 2007). Az állategészségügyi mintákból származó nem *M. avium* NTM-ok sokfélesége ellenére, korábbi leírásokhoz hasonló jó felbontóképességet tapasztaltunk a *tuf* (Mignard és Flandrois, 2007) és az *rpoB* gének esetén (Higgins és mtsai., 2011), így e törzsek azonosítására mindkét gén részleges szekvenciái külön-külön is megfelelőek lehetnek, amennyiben a referencia szekvenciák elérhetőek.

A kereskedelmi forgalomban kapható kitek általában csupán a törzsek egy szűk körét képesek azonosítani. Ezen törzsek leginkább humán egészségügyi jelentőséggel bírnak, mely természetesen nem vág egybe az állategészségügy területén fontosnak ítélt fajokkal. Az egyedinek vélt jelzett DNS szakaszok használata ellenére e rendszerek specificitása nem kielégítő, amit jól mutat a GenoType Mycobacteria CM/AS kit használata során talált téves azonosítások nagy száma, hasonlóan mások korábbi eredményeihez (Padilla és mtsai., 2004, Tortoli és mtsai., 2003, 2010, van Ingen és mtsai., 2009a, 2010). A kitek identifikáló képessége az általunk vizsgált állategészségügyi mintakollekción jóval gyengébbnek bizonyult (INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: 10%, GenoType Mycobacterium CM/AS: 22%), mint azt korábban van Ingen és mtsai. (2010) emberi eredetű törzseknél leírták (INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: 36%, GenoType Mycobacterium CM/AS: 53%). Vizsgálataink során 31 korábban leírt nem *M. avium* NTM-ot azonosítottunk, melyek környezeti előfordulásáról, patogenitásáról és zoonotikus képességéről már rendelkezünk bizonyos információkkal (Kazda és mtsai., 2009).

A *M. abscessus*-t 1953-ban írták le (Moore és Frerichs, 1953) egy tályogképződéssel járó térdelváltozással kapcsolatban emberben. Jelenlétét igazolták vízben (Thomson és mtsai., 2013), és számos halfajban is megtalálták (Gomez és mtsai., 1993). Vizsgálataink során egy humán minta mellett kaméleon térdizületi punktátumából és tejmintákból izoláltuk. Ismereteink szerint *M. abscessus*-t tőgygyulladásos tehének tejéből eddig nem mutattak ki, azonban többször leírták humán emlőgyulladások kórokozójaként (Pasticci és mtsai., 2009), ami e törzs zoonotikus képességét hangsúlyozza.

A *M. arosiense*-t, melyet 2008-ban egy immunhiányos gyermek osteomyelitises elváltozásából írták le (Bang és mtsai., 2008), mi vaddisznóban találtuk meg. A nemzetközi szakirodalomban nem találtunk adatot állati eredetű törzs izolálásáról.

A *M. arupense*-t szintén a 2000-es években írták csak le (Cloud és mtsai., 2006). Mindamellet, hogy humán megbetegedések kóroktanában gyakran találkozhatunk vele, kimutatták már apró szárazföldi emlősökben és környezeti mintákban egyaránt (Slany és mtsai., 2010). Jelen vizsgálatokban fagyasztott haleleség mellett gímszarvasban és 7 esetben szarvasmarhákban (6 Holstein-fríz, 1 Limousine) találtuk meg, melyek 1 kivételével reagáltak a tuberkulin bőrpróbában. Mivel a reaktív szarvasmarhákban sem gümőkórra gyanút keltő kórbonctani elváltozást, sem pedig a szarvasmarha-gümőkór kórokozóit nem sikerült kimutatni, feltételezhető, hogy az immunológiai áthangolódásért a kitenyésztett *M. arupense* törzsek voltak felelősek. A fagyasztott haleleségben való jelenléte megegyezik Zhang D.F. és mtsai. (2015) eredményeivel. A mycobacteriumokkal fertőzött élő

(Nenoff és Uhlemann, 2006) vagy fagyasztott (Eszterbauer és mtsai., 2012) haleleség etetése által jelentett kockázat jól ismert.

Az eddig említett törzsekkel ellentétben a *M. bourgelatii*-t 2013-as leírása óta (Guérin-Faubleé és mtsai., 2013) emberi megbetegedésekkel ezidáig nem hozták összefüggésbe. Amellett, hogy szarvasmarha nyirokcsomókban megtaláltuk, vaddisznókból is kitenyésztettük. Fontos megemlíteni, hogy a gazdaállatoknál 5-ből 3 esetben (60%) gümőkórra gyanút keltő kórbonctani elváltozásokat láttunk, így feltételezhető, hogy e törzs emlősökben nagyfokú patogenitással rendelkezik.

A *M. chelonae* fehér busa májából való izolálása megegyezik korábbi ismereteinkkel, hiszen e faj a *M. fortuitum* és *M. marinum* mellett a halak és más változó testhőmérsékletű fajok 1900-as évek eleje óta ismert kórokozója (Bercovier és Vincent, 2001). Mindemellett azonban humán megbetegedésekből (Al-Mussawi, 2014) és különböző melegvérű állatokból is izolálták már (Cvetnić és mtsai., 2007).

A *M. chitae*-t talajból izolálták, és Tsukamura (1967) mint nem patogén, gyorsan növő, nem pigmenttermelő fajt írta le. Munkánk során a vizsgált teve áll alatti nyirokcsomóiban gümőkórra gyanút keltő elváltozásokat láttunk, mely, az irodalmi adatokkal ellentétben, az izolált törzs kórokozó voltára utal.

Az első *M. europaeum* törzseket 1995 és 2009 között Európa különböző országaiban humán elváltozásokból tenyésztették ki (Tortoli és mtsai., 2011). Vizsgálataink során tuberkulin bőrpróbában reagáló húshasznú szarvasmarhák kórtani elváltozást nem mutató nyirokcsomóiból izoláltuk.

A *M. fortuitum* egyike a legrégebb óta ismert *Mycobacterium* fajoknak, melyet emberi megbetegedésekből, állati és környezeti minták széles köréből izoláltak már (Bercovier és Vincent, 2001). Saját vizsgálatainkban vadállatok között *M. fortuitum* volt a második leggyakrabban izolált faj, míg szarvasmarhákban csupán négy törzset találtunk. A megfigyelt magas előfordulási arány megerősíti széles körű elterjedtségét. Saját eredményünkhöz hasonlóan korábban Higgins és mtsai. (2011) számoltak be kutyában való előfordulásáról. Ugyanakkor e faj régóta ismert tüdőgyulladás kórokozó (Richardson, 1970), melyet saját eredményeink szintén megerősítenek.

A *M. gordonae*-t leginkább környezeti, apatogén baktériumnak tartják, habár találkozunk humán, főleg légúti kórképekben való jelenlétével is (Mazumder és mtsai., 2010). Vaddisznóban való előfordulása megegyezik Machackova és mtsai. (2003) eredményeivel.

A *M. intermedium*-ot humán köpetből 1993-ban írták le (Meier és mtsai., 1993). Beszámoltak előfordulásáról vaddisznóban (http://ec.europa.eu/food/animals/docs/req-com_ahw_20140506_pres_2013_eradication_programme_for_bovine_tuberculosis_croatia.pdf) és szarvasmarhában is (Gcebe és mtsai., 2013, Thacker és mtsai., 2013). Az általunk izolált szarvasmarha eredetű törzsek közül 7 hús- (Aberdeen Angus, Limousine) és 6 tejhasznú

(Holstein-fríz) állatokból származott. Mind a 13 állat pozitívan reagált a tuberkulin bőrpróbában, egy 2008-as születésű 2 éves korában levágott Aberdeen Angus üsző esetén pedig mind kórbonctani, mind kórszövettani vizsgálattal gümőkórra gyanút keltő elváltozásokat találtunk. Mivel egyik állatból sem izoláltuk a szarvasmarha-gümőkór kórokozót, feltételezésünk szerint mind a kórtani elváltozásért, mind pedig a pozitív tuberkulin reakcióért a *M. intermedium* törzsek voltak felelősek.

A *M. intracellulare*-t szinte minden környezeti élettérből izolálták már (Kazda és mtsai., 2009). Amellett, hogy humán megbetegedések okozója lehet (Koh és mtsai., 2012), vaddisznóban is kimutatták (Machackova és mtsai., 2003), ami egybevág saját eredményeinkkel. A nemzetközi szakirodalomban szarvasmarhában való előfordulásával eddig nem találkoztunk. Szarvasmarha eredetű törzseinket tejhasznú állatokból izoláltuk, melyek közül kettő reagált a tuberkulin bőrpróbában.

A *M. kansasii*-t az 1950-es években humán légúti fertőzésből izolálták (Kazda és mtsai., 2009), azonban állatpatogenitása is jól ismert (Rastogi és mtsai., 2001). Higgins és mtsai. (2011) eredményeihez hasonlóan mi is azonosítottunk *M. kansasii*-t őzből, bár *M. kansasii* törzseink 91%-a (10/11) szarvasmarhából származott. E törzsek 80%-a tuberkulin pozitív állatokból tenyésztett ki, ami nem meglepő, hisz korábbi vizsgálatokban több szerző igazolta már, hogy a *M. kansasii* és a *M. bovis* fehérjéi keresztreakálnak a szerológiai alapú tesztekben (Waters és mtsai., 2006, Vordermeier és mtsai., 2007).

A *M. llatzerense*-t vízmintákban azonosították (Gomila és mtsai., 2008), és azóta csak humán esetekből izolálták (Teixeira és mtsai., 2013, Cárdenas és mtsai., 2014). Elsőként számoltunk be haleleségben való előfordulásáról.

1977-es leírása óta a *M. malmoense* egyike a legjelentősebb humán légúti patogén *Mycobacterium*oknak (Hoefsloot és mtsai., 2009). A törzs szarvasmarha nyirokcsomóból való izolálása megegyezik Hughes és mtsai. (2005) eredményeivel.

A *M. nebraskense*-t 2004-ben szintén humán esetekből írták le (Mohamed és mtsai., 2004). A környezetben való előfordulásán kívül (Slany és mtsai., 2010) állati mintákból ezidáig csak szarvasfélékből izolálták (Thacker és mtsai., 2013). Az általunk izolált törzs egy tuberkulin próbában reagáló Holstein-fríz üszőből származott.

A *M. neoaurum*-ot saját eredményünkhöz hasonlóan szintén kimutatták már szarvasmarhákból (Thacker és mtsai., 2013, Katale és mtsai., 2014, Padya és mtsai., 2015), habár humán egészségügyi kórtani szerepének nagyobb jelentőséget tulajdonítanak (Davison és mtsai., 1988).

Vizsgálataink során *M. nonchromogenicum*-ot izoláltunk leggyakrabban, 36,48%-os előfordulással vadállatok és 29,12%-os előfordulással szarvasmarhák között. Ezen eredmények ellentétben állnak Gcebe és mtsai. (2013) megfigyelésével, akik mindössze 2,2%-os előfordulást találtak szarvasmarhák és kafferbivalyok között 10–16,7%-os

környezeti prevalencia mellett Dél-Afrikában. Ugyanakkor Biet és Boschioli (2014) szintén a *M. nonchromogenicum* 26,13%-os előfordulásáról számol be franciaországi szarvasmarhák körében. Vadállatokból származó mintákat egyik esetben sem teszteltek. A haleleségben való előfordulása megegyezik Zanoni és mtsai. (2008) eredményeivel.

A *M. palustre*-t a 2000-es évek elején humán, állati és környezeti mintákból egyaránt kimutatták (Torkko és mtsai., 2002). Hasonlóan saját eredményeinke szarvasmarhából többször is izolálták (Hughes és mtsai., 2005, Thacker és mtsai., 2013), azonban gímszarvasban való előfordulásáról elsőként számoltunk be.

A *M. parafortuitum*-ot az 1960-as években talajmintákból izolálták (Tsukamura és mtsai., 1966), és azóta sem hozták összefüggésbe humán vagy állati megbetegedésekkel. Gímszarvasból való kitenyésztéséről elsőként számoltunk be.

A *M. peregrinum*-ot 1962-es leírása óta humán légyszöveti kórokozóként tartják számon (Nagao és mtsai., 2009). Haleleségben való jelenléte megegyezik Zanoni és mtsai. (2008), míg szarvasmarhából való kimutatása Thacker és mtsai. (2013) eredményeivel.

A *M. phlei* egyike a legrégebb óta ismert *Mycobacterium* fajoknak (Kazda és mtsai., 2009). Környezeti minták mellett szarvasmarhából is kimutatták (Thacker és mtsai., 2013), saját eredményeinkkel megegyezően.

A *M. saskatchewanense*-t bár humán megbetegedés kórokozójaként írták le 2004-ben (Turenne és mtsai., 2004), azóta, csakúgy mint mi, vadállatokban is igazolták jelenlétét (Albertti és mtsai., 2015). Ezen törzs azonosításánál nehézséget jelent, hogy ahogy arról Turenne és mtsai. is beszámolnak, fals pozitív reakciót ad a MAC kimutatását célzó vizsgálatokban.

A *M. scrofulaceum* az 1950-es évek óta ismert humán kórokozó (Prissick és Masson, 1956). Kimutatása vaddisznóban és szarvasmarhában megegyezik Machackova és mtsai. (2003), Gortazar és mtsai. (2011), valamint Thacker és mtsai. (2013) eredményeivel.

Bár a *M. shimoidei*-t Tsukamura (1982) az 1980-as években szintén humán légúti kórokozóként írta le, azóta állati eredetű mintákból is kimutatták már (Thacker és mtsai., 2013), hasonlóan saját vizsgálateink eredményeihez.

A '*M. sinense* JDM601'-es törzset egy ember gümőkórhoz hasonló megbetegedéséből izolálták (Zhang Z-Y. és mtsai., 2011, 2013), ám ezidáig házi vagy vadon élő állatokban nem mutatták ki. Elsőként számoltunk be ezen törzs vaddisznóban, dámvadban, sertésben és szarvasmarhában való előfordulásáról.

A *M. smegmatis* a *M. fortuitum*-hoz hasonlóan régóta ismert tőgygyulladás kórokozó (Richardson, 1970). Tejmintáinkban a *M. smegmatis* dominanciája meglepő, tekintve hogy Franco és mtsai. (2013) csupán egy *M. smegmatis* törzset azonosítottak 24 brazilai pozitív tejminta között. A *M. fortuitum*-mal szemben a szélesebb növekedési hőmérséklet-tartomány és a jobb környezeti túlélőképesség a hazai klimatikus viszonyok között előnyt jelenthetnek a

M. smegmatis számára (Magee és Ward, 2012). Bár 3 szarvasmarha nyirokcsomó mintában is megtaláltuk, vadállatokból nem tudtuk kitenyészteni, ellentétben Thacker és mtsai. (2013) eredményeivel, akik az Amerikai Egyesült Államokban szarvasfélékből izolálták.

A *M. thermoresistibile*-t Tsukamura 1966-ban írta le (Tsukamura, 1966). Eredetileg talajból izolálták. Thacker és mtsai. (2013) valamint Katale és mtsai. (2014) kimutatták már szarvasmarhában, azonban bivalyban és rókában való előfordulásáról elsőként számoltunk be.

A *M. triviale*-t 1970-ben Kubica és mtsai. (1970) mint a *M. terrae* komplex egy tagját írták le, azonban 2013-ban Tortoli és mtsai. (2013) munkája nyomán kizárták a komplexből. Bár emberekből izolálták, kórtani szerepéről nem voltak meggyőződve. Az általunk izolált törzs juhban kórboctani elváltozásokat okozott.

A krokodilból származó törzsünk *M. ulcerans* ecovar Liflandii-nak bizonyult, melyet fogságban tenyésztett béka állományokban fedeztek fel 2004-ben (Trott és mtsai., 2004). Tekintve, hogy a *M. ulcerans*, mint a Buruli-fekély kórokozója évente több ezer igen súlyos és nehezen kezelhető megbetegedésért felelős, e variánsának állatkerti állatokban való megjelenését nem csak a gondozók, de a látogatók szempontjából is kiemelt veszélyforrásnak kell tekinteni.

A *M. vaccae*-t az 1960-as években írták le (Bonicke és Juhász, 1964). Magyarországon mindezidáig csak szarvasmarhában találták meg (Tuboly és Szabó, 1967), eredményeink azonban azt mutatják, hogy jelen lehet vaddisznóban és gímszarvasban egyaránt.

A *M. sp.* FI-06258-as törzs a *M. terrae* komplex tagja, melyet eredetileg egy humán mintából izoláltak (Tortoli és mtsai., 2013). Elsőként számoltunk be ezen törzs szarvasmarhában való jelenlétéről.

Nem azonosítható törzseket 14 esetben találtunk. A környezeti, nem *M. avium* NTM-ok valós változatossága jóval nagyobb, mint amilyenek azt az 1990-es évek elején ismerték (Wayne és Sramek, 1992). Míg szarvasmarha eredetű törzsek között csupán egyetlen új törzstípust találtunk, a vadállatokból származó mintákban mind a 8 féle jelen volt. A NTM fajok leginkább a környezetből kerülnek felvételre. Mivel a vadállatoknak szorosabb a kapcsolata természetes környezetükkel (talaj, természetes vizek, üledék, növények), ez magyarázatul szolgálhat az új törzstípusok köztük tapasztalt sokféleségére.

Az új törzstípusokból általában csak egy-két törzset találtunk, azonban az *M. sp.* #4 törzset 5 esetben tenyésztettük ki. Három tuberkulin bőrpróbában pozitívan reagáló, legelőn tartott húshasznú szarvasmarha mellett 2 gímszarvasból is izoláltuk 2006 és 2011 között, ami egyrészt a törzs állandó jelenlétét feltételezi a környezetben, másrészt bizonyítja, hogy az fertőzést és immunológiai áthangolódást egyaránt képes okozni.

A környezetben jelen lévő különböző *Mycobacterium* fajokat a vadállatok összegyűjthetik, hordozhatják és továbbadhatják. Megfigyelésünk, mely szerint az új törzstípusok általában nem okoztak kórtani elváltozásokat, szintén a gazdák rezervoár szerepére hívja fel a figyelmet.

Vadállatokban és szarvasmarhában közel azonos számban találtunk különféle nem *M. avium* NTM törzseket, azonban eltérő volt az izolált törzsek köre, mely különbségeket feltételez az egyes törzsek gazdafaji preferenciája és patogénitása terén, ahogy erről Bercovier és Vincent (2001) is beszámoltak.

Vizsgálataink másik fő célja a *M. avium*-ok molekuláris módszerekkel történő, alfaji szintű azonosítása és genetikai változatosságuk megismerése volt.

A MAA a madarak gümőkórjának obligát patogén kórokozója, amit jól mutat, hogy madaraktól szinte kizárólag ezt az alfajt izoláltuk, és minden esetben jelen voltak a jellegzetes kórbonctani elváltozások (Dhama és mtsai., 2011). Madarak mellett más állatfajokban is kimutattuk a kórokozót, hasonlóan korábbi eredményekhez (Kazda és mtsai., 2009). Ugyanakkor az alfaj rókában való előfordulása nem találtunk irodalmi adatot, így ezt elsőként közöltük. Az egyes állatfajoknak a kórokozóval szembeni érzékenységét jelzi a fertőzésekben előforduló kórbonctani elváltozások aránya. A sertéseknél megfigyelt nagyarányú, míg a szarvasmarháknál kis számban előforduló kórbonctani elváltozások megfelelnek Friend és Franson (1999), a különböző állatfajok MAA-val szembeni érzékenységét leíró eredményeinek. Az alfaj sertésekben való dominanciája azonban ellentétben áll korábbi tapasztalatokkal, hisz általában a MAH-t izolálják gyakrabban sertésekből (Agdestein és mtsai., 2012).

A MAH törzs széleskörű elterjedtsége és tág gazdaspektruma szintén megegyezik korábbi eredményekkel (Kazda és mtsai., 2009). Szemben a MAA-mal, MAH-t ritkán izolálnak madaraktól (Shitaye és mtsai., 2009b). Esetünkben a két törzs állatkerti, fogságban tartott állatokból származott, ahol a fertőzés forrása feltehetően egy itató lehetett, ahol a MAH alfaj könnyen képez biofilmet (McNabe és mtsai., 2011). A kutyában talált MAH okozta kórkép különös érdekessége, hogy a húsevők általában rezisztensek a *M. avium* fertőzésekkel szemben (Friend és Franson, 1999), azonban egyes szerzők genetikai hajlamot feltételeznek bizonyos fajtáknál, mint amilyen az esetünkben vizsgálat törpe schnauzer is (Horn és mtsai., 2000). A MAA és MAH törzsek előfordulása szarvasmarháknál sem hasznosítási irány szerinti, sem pedig korcsoporti, vagy nemi preferenciát nem mutatott.

MAP törzseket a gazdák széles köréből izolálták már (Marco és mtsai., 2002, Sivakumar és mtsai., 2006, Corn és mtsai., 2005). Vadállatok, mint a róka vagy a vaddisznó ismert rezervoár fajai a kórokozónak (Beard és mtsai., 2001, Stevenson és mtsai., 2009).

Az általunk izolált törzsek 3 juh, 3 kecske és 1 szarvasmarha törzs kivételével II-es típusúak voltak. Habár szarvasmarhákban a II-es típus a leggyakoribb, kimutattuk, hogy az I-es típus is előfordulhat. Ugyanakkor a II-es típus széles gazdaspektruma is megerősítést nyert, hisz 8 különböző állatfajból izoláltuk. Mindezen eredmények megegyeznek korábbi adatokkal (Behr és Collins, 2010). A sertés törzs Turenne és mtsai. (2008) és Biet és mtsai. (2012) korábbi eredményeivel ellentétben szintén II-es típusúnak bizonyult. Mindemellett kecskéből is izoláltunk II-es típusú törzset, mely megegyezik Castellanos és mtsai. (2010b) eredményeivel. Tudomásunk szerint Magyarországon elsőként izoláltunk MAP-t sertésből, vaddisznóból, vörös rókából, gímszarvasból, muflonból és bivalyból. Bár Beregi és mtsai. (2012) nemrég ismertettek egy muflon esetet, azonban a mintákból MAP kimutatására irányuló baktériumtenyésztés nem történt. A kitenyésztett törzsek származása hazánk állattenyésztési viszonyainak és vadállományunk eloszlásának felelt meg. A juhból izolált törzsek a jelentős kiskérődző-tartási hagyományokkal és állatlétszámmal rendelkező észak-alföldi területről származtak, míg a vaddisznó, gímszarvas és róka eredetű törzsek zömében a gazdag vadállományáról ismert Dunántúli-középhegység és Dunántúli-dombság területeiről kerültek izolálásra. A szarvasmarhákból mellékleletként izolált törzsek esetén a gazdák több mint 85%-a reagált a tuberkulin bőrpróbában, mely alátámasztja, hogy a MAP képes immunológiai áthangolódást okozni a fertőzött állatokban, ahogy erről Álvarez és mtsai. (2009) is beszámoltak. A paratuberkulózis célzott kimutatására érkezett minták direkt PCR vizsgálatának eredményei jól mutatják, hogy bélsárminták esetén szükséges a mintában található PCR gátló anyagok eltávolítása a DNS feltárás során (Plain és mtsai., 2014).

MAS törzseket madarak mellett korábban őzből izoláltak (Saxegaard és Baess, 1988), szarvasmarhák esetén pedig csak mesterséges fertőzésről van irodalmi adat (Matthews és McDiarmid, 1979). Habár Turenne 2007-es összefoglaló cikkében még megkérdőjelezte az alfaj valódiságát (Turenne és mtsai., 2007), az elmúlt években izolált törzsek száma bizonyítja jelentőségét. Elsőként tenyésztettük ki vaddisznóból, vörös rókából, gímszarvasból, borzból és szarvasmarhából. Mivel ez az alfaj speciális tenyésztési körülményeket igényel, izolálásához különös figyelemre és tapasztalatra van szükség (Kazda és mtsai., 2009). Amikor 1990-ben a *M. avium* alfajának minősítették (Thorel és mtsai., 1990) azonosítására csak fenotípusos tulajdonságai alapján volt lehetőség. Az elmúlt évtizedekben többen próbálkoztak molekuláris módszerrel történő azonosításával (Orrú és mtsai., 2007, Higgins és mtsai., 2011, Chiers és mtsai., 2012), azonban a MAA törzsekkel való nagyfokú szekvencia-hasonlóság miatt ezidáig ez nem sikerült (Tran és Han, 2014). A HRM módszer lehetővé teszi akár egyetlen bázis eltérés azonosítását is (Zeinzinger és mtsai., 2012), lehetőséget kínálva fajok, alfajok, genotípusok vagy akár szerovariánsok

molekuláris biológiai azonosítására. Az általunk fejlesztett duplex HRM és MAS specifikus valós idejű PCR rendszer lehetővé teszi a MAS és MAA törzsek megbízható elkülönítését, és mivel nem igényel jelölt primereket, „probe”-ot vagy PCR-t követő kimutatási eljárásokat, gyors és költségkímélő. Az egy csőben végzett HRM és MM vizsgálatok ugyanakkor fokozzák a rendszer megbízhatóságát. A MAA és MAS specifikus görbék közötti stabil hőmérséklet-eltolódás és a termékek olvadáspontjának alacsony szórása szilárdságot ad a rendszernek, míg a széles templát DNS mennyiség rugalmassá és könnyen alkalmazhatóvá teszi azt.

A törzsek genetikai változatosságának megismerése elengedhetetlen az egyes fertőzések eredetének, a különböző törzsek közötti járványtani különbségek megismeréséhez.

A LSP-ok a genetikai változatosság molekuláris markerei a MTC-ben (Mostowy és mtsai., 2002) és *M. avium* fajok között (Semret és mtsai., 2004) egyaránt. Az LSP^A17 szekvencia polimorfizmus MAA és MAS törzsekben való hiánya és MAP törzsekben való jelenléte egybevág Semret és mtsai. (2006) tapasztalataival. A MAH törzsek közötti előfordulása független volt a gazda fajától, éppúgy, mint Turenne és mtsai. (2008) vizsgálataiban.

A *M. avium* törzsek tipizálására és genetikai változatosságuk vizsgálatára a MIRU-VNTR módszert Thibault és mtsai. (2007) használták először. Vizsgálataikban 8 lókuszt teszteltek (32, 292, 7, 10, 25, 47, X3, 3) 183 MAP és 82 humán *M. avium* törzsön. A MAP törzsek között a 32-es, míg a *M. avium* törzsek között az X3 lókusznak volt a legnagyobb az allélváltozatossága (0,59 és 0,72). A MAP törzsek között 21, míg a *M. avium* törzsek között 30 genotípust mutattak ki, 0,751 és 0,889-es DI értékekkel. Azóta több új lókuszt azonosítottak, és változatos lókuszos összeállításokat vizsgáltak különböző *M. avium* törzseken. Inagaki és mtsai. (2009) a Thibault által vizsgált lókusztokat 15 MATR lókusssal hasonlította össze 70 humán izolátumon, melyeknél a DI-et rendre 0,949 és 0,990-nek találta. 2010-ben Millán és mtsai. (2010) négy MIRU lókuszt használtak Bull és mtsai-tól (2003), és kettő VNTR lókuszt Thibault-tól 14 vadmadarakból származó MAA törzs genetikai elkülönítésére. Vizsgálataikban csupán a MIRU3 és MIRU4 lókusztok mutattak allélváltozatosságot. Castellanos és mtsai. (2010b) 2 MIRU és 3 VNTR lókuszt alkalmazásával 70 MAP törzset vizsgáltak, és 0,84-es DI-et értek el. Pate és mtsai. (2011) a Thibault-féle lókusztokat 121 emberi és állati eredetű MAA és MAH törzsön vizsgálták. A 23 genotípus 0,716 és 0,866-os DI-et mutatott. Radomski és mtsai. (2010) vontak be vizsgálataikba először MAS törzseket. A 81 MAH, 32 MAA és 4 MAS törzsön elvégzett genotipizálás 32 eltérő mintázatot eredményezett, a DI pedig 0,885-nek adódott. A MAS törzsek azonos genotípusúak voltak.

Annak érdekében, hogy magasabb DI-et érjünk el, a MIRU-VNTR vizsgálathoz egy egyedi lókuszkombinációt választottunk 4 MIRU, 3 VNTR és egy MATR lókuszt bevonásával. Az

egyed lókuszokon megfigyelt allélvariációk nagyjából megegyeztek a korábbi vizsgálatok eredményeivel, azonban néhány eltérést is tapasztaltunk. Madaraktól származó MAA törzsek között MIRU1, MIRU2, VNTR25 és VNTR32 lókuszokon ugyanazokat a TR-et találtuk, mint Millán és mtsai. (2010), ugyanakkor nem madár eredetű MAA törzseknél és MAH törzsek között más TR-ek is előfordultak. MAP törzsek között a MIRU1-es lókuszon II-es típusú törzseknél is találtunk 1 TR-t, ellentétben korábbi eredményekkel (Bull és mtsai., 2003, Möbius és mtsai., 2009, Fernández-Silva és mtsai., 2012). Míg VNTR32 lókuszon 6 TR-t eddig csak II-es típusú MAP törzseknél találtak (Castellanos és mtsai., 2010b), mi kimutattuk juh típusú törzseknél is. A MIRU4 lókuszt Castellanos és mtsai. (2010b) munkájához hasonlóan mi is egységesnek és egyedinek találtuk MAP törzsek között, mely így képes ezen alfaj specifikus azonosítására. Hasonlóképpen a VNTR259-es lókusz a C és S típusú MAP törzsek megkülönböztetésére alkalmas (Castellanos és mtsai., 2010b). A MATR lókusz allélváltozatossága kissé alacsonyabbnak bizonyult, mint Inagaki és mtsai. (2009) leírásában, azonban 2 és 3 TR mellett saját vizsgálatainkban 5 TR-et is megfigyeltünk. Összességében a MIRU3-as lókusz bizonyult a legváltozékonyabbnak, bár MAP törzsek között a MIRU2, míg MAS törzsek között a MIRU4 volt a legvariábilisabb. Mivel a különböző alfajoknál jelentős különbségek tapasztalhatók a lókuszok allélváltozatosságában, egy jövőbeni vizsgálat tervezésénél ajánlott az alkalmazott lókuszokat a vizsgálandó törzsek típusához igazítani. Megfigyelésünk, miszerint egyes lókuszokon egyszerre több TR is előfordulhat, megegyezik korábbi eredményekkel (Castellanos és mtsai., 2010b, van Hulzen és mtsai., 2011). Ilyen esetek vegyes MAP fertőzéseknél fordultak elő, amikor egy állatban egyszerre több, az állományban párhuzamosan jelenlévő, eltérő genotípusú törzs okozott fertőzést. Bár telep morfológiai különbséget nem láttunk, több esetben sikerrel választottuk szét egy adott állat mintájában a különféle genotípusú törzseket.

Millán és mtsai. (2010) megfigyelései alapján az egyes lókuszokon a TR-ek száma összefüggésben lehet az adott törzs patogenitásával. Habár saját vizsgálataink ez irányba nem terjedtek ki, eredményeink jó alapot szolgáltatnak későbbi vizsgálatokhoz annak megismerésére, vajon az egyes genotípusok súlyosabb megbetegedéseket alakítanak-e ki, vagy eltérő képességekkel rendelkeznek-e a környezeti túlélés és terjedés tekintetében.

A különböző genotípusok alfajspecifitása megegyezik Radomski és mtsai. (2010) eredményeivel. Hasonlóan Pate és mtsai. (2011) tapasztalataihoz, MAH törzsek között nagyfokú változatosságot figyeltünk meg. Habár MAS törzsek között alacsony változatosságot tapasztaltunk, Radomski és mtsai. (2010) eredményével ellentétben mi nem csak egyféle genotípust mutattunk ki.

Az egyes genotípusok széles körű elterjedtsége, évek távlatából való izolálhatósága folyamatos jelenlétüket és extrém környezeti tűrőképességüket bizonyítja. A genotípusok

adott területen (pl.: MAP 77-es genotípus Somogyban szarvasmarhában, bivalyban, sertésben, gímszarvasban és vaddisznóban), vagy azonos térben (pl.: MAH 34-es genotípus állatkerti pávában és turákóban 2008-ban) különböző állatfajokban való jelenléte alátámasztja a fajok közötti átadás, vagy azonos fertőzési forrásból származó fertőződés lehetőségét.

MAA járványok esetén adott farmokon mindig azonos genotípus jelenlétét figyeltük meg, ami a kórokozó fajon belüli átadását támasztja alá. A MAH okozta járványkitöréseknél ezzel szemben eltérő genotípusokat találtunk, ami felveti, hogy különbség lehet a MAA és MAH alfajokra jellemző fertőzési módokban. Johansen és mtsai. (2014) vizsgálatainak megfelelően MAH törzsek esetén a fertőzés inkább környezeti eredetűnek tűnik, és a megbetegedések halmozódása háttérben az állomány egyéb okból csökkent immunvédekezése állhat. Mivel a MAA törzsek környezeti életképessége alacsonyabb (Kazda és mtsai., 2009) ezen alfaj esetén a fertőzés egyik állatról a másikra való átadása tűnik jellemzőnek.

MAP törzsek esetén azon állományok magas aránya, melyekben több genotípus egyszerre fordult elő, az állatok gyakori cseréjével állt összefüggésben. Az újonnan az állományba érkezett fertőzött egyedek nem csak a MAP környezeti terhelést növelik, de közvetlenül is képesek átadni a kórokozót társaiknak és utódaiknak, melyet a rokon állatok között megfigyelt nagyarányú genotípus egyezés is alátámaszt. Knupfer (2010) és Benedictus és mtsai. (2008) vizsgálataikban azt tapasztalták, hogy MAP-fertőzött anyák borjai nagyobb eséllyel lesznek MAP-fertőzöttek, mint a nem fertőzött anyák utódai.

Bár a külföldről származó MAP-fertőzött állatok száma nem volt túl nagy, mégis érdekes megfigyelést tettünk. Úgy tűnik, hogy az importált hús- és tejhasznosítású állatok következetesen eltérő genotípust hordoztak függetlenül fajtájuktól és származási országuktól. Ugyanakkor mivel az ősi magyar fajták is jellemzően egyféle genotípusúak voltak, azt feltételezzük, hogy az adott állat hasznosítási típusa összefüggésben áll a hordozott genotípussal hazánkban. Az 1970-es évek óta fokozatosan lecserélték a klasszikus hús- és kettős hasznosítású magyar fajtákat tejelő Holstein-frízekre. Habár visszatekintő vizsgálatok elvégzésére nem volt módunk, úgy véljük, hogy Magyarországon a 84-es genotípus lehetett általános, míg a 77-es genotípus az állománycserékhez importált tejelő (túlnyomóan kanadai és USA eredetű Holstein-Friz) állatokkal kerülhetett az országba, mely azóta széles körben elterjedt, visszaszorítva az eredetileg jellemző genotípust. Ezen elméletünk csak feltételezés, és visszatekintő elemzések hiányában talán nem is bizonyítható, de mindenképp felveti annak lehetőségét, hogy az egyes genotípusok elterjedtsége, az általuk okozott fertőzés lehetősége valamilyen formában összefüggésben lehet környezeti tényezőkkel vagy a gazdaállatok genetikai tulajdonságaival.

Szarvasmarhákban MAS fertőzést eddig csak mesterségesen hoztak létre (Matthews és McDiarmid, 1979). A vizsgálatainkban fertőzöttnek talált állatokban ugyanaz a genotípus volt jelen, mely az adott területen vadállatok között a leggyakoribb volt. A fertőzött állatok legelőn tartott húsmarhák voltak, így vagy a környezetből vették fel a kórokozót, mely feltételezi annak állandó és nagyarányú jelenlétét, vagy a kórokozót hordozó vadállatok révén fertőződtek. Megfigyelésünk, miszerint a házi és vadon élő állatokban egyaránt kimutatott genotípusok esetén a vadállatokban való előfordulási arány tükrözi az egyes genotípusok háziállatokban való jelenlétét, szintén a vadállatok fertőzésfenntartó és -közvetítő, rezervoár szerepére hívja fel a figyelmet. A különböző *Mycobacterium* fajok szilvatikus jelenléte nemcsak a különböző törzsek állományok közötti átadásához járulhat hozzá (Beard és mtsai., 2001), de akadályozhatja a mentesítési és gyérítési programok sikerességét (Aranaz és mtsai., 2006). Mindezen megfigyelések kiemelik annak a szükségességét, hogy javított epidemiológiai ellenőrző intézkedésekkel próbáljuk megakadályozni a fertőzés farmok, egyedek, és rezervoár fajok közötti terjedését.

Turenne és mtsai. (2008) genetikai vizsgálatai szerint a MAH törzsek egy változatos csoportot alkotnak, melyből a MAA/MAS és MAP klónok egymástól függetlenül fejlődtek ki. Jelen vizsgálataink eredményeit filogenetikai fán ábrázoltuk, melyen az egyes genotípusok elhelyezkedése megfelel az alfajok közötti, Turenne és mtsai. (2008) által vázolt genetikai rokonságnak.

Az általunk használt lókuszos-összeállítás a korábbi kombinációknál (Thibault és mtsai., 2007; Millán és mtsai., 2010; Radomski és mtsai., 2010) megfigyeltnél magasabb DI értékeket eredményezett, így ajánlható további vizsgálatokhoz. A négy alfajt együttesen tekintve megközelítette az Inagaki és mtsai. (2009) által 15 lókuszos kombinációjával elért értéket. Az alfajokat külön-külön vizsgálva a MAS törzseknél tapasztalt alacsony DI érték hátterében a törzsek nagyfokú homogenitása áll. A különböző állatfajok esetén a háziállatok csoportja valamivel alacsonyabb DI értéket mutatott, melynek oka a nagyszámú, alacsony változatosságú szarvasmarha MAP törzs jelenléte.

Összességében megállapítható, hogy a Magyarországon nagy múltra visszatekintő állatorvosi mycobacteriológiai diagnosztika folytatása- és újraélesztéseként elvégzett vizsgálataink hiánypótló jellegűek. Az új táptalajok fejlesztésével hazánkban lehetővé vált korábban nem, vagy csak nehezen tenyésztethető *Mycobacterium* fajok izolálása, míg a bevezetett molekuláris biológiai identifikáló módszerek lehetővé tették a törzsek gyors és pontos azonosítását, és utat nyitottak az egyes NTM fajok elterjedtségének, gazdaspektrumának és patogenitásának vizsgálatára.

A kitenyészett törzsekből összeállított törzsgyűjtemény lehetőséget ad a NTM-ok által kiváltott immunológiai keresztreakciók finomabb antigénszerkezeti okainak, valamint az egyes fajok, alfajok és genotípusok mélyebb megismerésére, elterjedtségük, kórokozó képességük, gazdaspektrumuk és az okozott kórképek súlyosságának háttérében feltételezett genetikai különbségek részletes vizsgálatára, melyek, természetesen, e munka keretein már messze túlmutatnak.

8. Új tudományos eredmények

„Lieber ein Ende mit Schrecken als ein Schrecken ohne Ende.”

Összességében: megújítottuk és molekuláris biológiai alapokra helyeztük a hazai állatorvosi *Mycobacterium* diagnosztikát. Ezen munka eredményei közül az alábbiakat emelem ki.

A *M. avium* fajra és alfajaira vonatkozóan:

1. Magyarországon először azonosítottuk a *M. avium* faj alfajait molekuláris biológiai módszerekkel, és adatokat szolgáltatunk magyarországi előfordulásukról, gazdaspektrumukról, az okozott kórtani elváltozásokról.

2. Új táptalajok fejlesztésével lehetővé tettük a MAS törzsek szilárd táptalaj felületén történő tenyésztését, specifikus identifikálásukhoz pedig HRM és MM duplex valós idejű PCR módszert fejlesztettünk.

3. Elsőként izoláltunk *M. avium* subsp. *silvaticum* törzseket vaddisznóból, vörös rókából, gímszarvasból, borzból, és szarvasmarhából, II. típusú *M. avium* subsp. *paratuberculosis* törzset sertésből, és *M. avium* subsp. *avium* alfajt vörös rókából.

4. Magyarországon először azonosítottuk a *M. avium* subsp. *paratuberculosis* törzsek típusait, és mutattuk ki az I-es típusú MAP jelenlétét szarvasmarhában, kecskében és juhban. Új táptalajok bevezetésével lehetővé tettük ezen törzsek szilárd táptalaj felületén történő tenyésztését és tanulmányozását.

5. Magyarországon elsőként vizsgáltuk a *M. avium* alfajokat LSP^A17 jelenlétére, és MIRU–VNTR analízissel.

A nem *M. avium* NTM-okra vonatkozóan:

6. Magyarországon elsőként alkalmaztunk molekuláris biológiai módszereket nem *M. avium* NTM-ok azonosítására.

7. Házi, vadon élő és kedvtelésből tartott állatok mintáiban 31 ismert NTM fajt és 8 új törzstípust mutattunk ki, és információval szolgáltunk ezen törzsek előfordulásáról, esetleges kórokozó képességéről: egyes fajokat és alfajokat új gazdafajokból is izoláltunk, illetve korábban apatogénnek vélt fajok okozta fertőzéseknél kórtani elváltozásokat találtunk.

8. Az izolált és tipizált törzsekből egy jól dokumentált, korszerű, 2481 törzset tartalmazó *Mycobacterium* törzsgyűjteményt hoztunk létre.

9. Irodalomjegyzék

Abdallah, A. M., Gey van Pittius, N. C., DiGiuseppe Champion, P. A., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Applemelk, B. J., Bitter, W.: **Type VII secretion – mycobacteria show the way.** Nat. Rev. Microbiol., 5(11). 883–891., 2007.

Adékambi, T., Colson, P., Drancourt, M.: **RpoB-Based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing *Mycobacteria*.** J. Clin. Microbiol., 41. 5699–5708., 2003.

Adékambi, T., Drancourt, M.: **Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54. 2095–2105., 2004.

Agdestein, A., Johansen, T. B., Kolbjørnsen, Ø., Jørgensen, A., Djønne, B., Olsen, I.: **A comparative study of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in experimentally infected pigs.** BMC Vet. Res., 8. 11., 2012.

Albertti, L. A. G., Souza-Filho, A. F., Fonseca-Júnior, A. A., Freitas, M. E., de Oliveira-Pellegrin, A., Zimmermann, N. P., Tomás, W. M., Péres, I. A. H. F. S., Fontana, I., Osório, A. L. A. R.: ***Mycobacteria* species in wild mammals of the Pantanal of central South America.** Europ. J. Wildlife Res., 61(1). 163–166., 2015.

Aldous, W. K., Pounder, J. I., Cloud, J. L., Woods, G. L.: **Comparison of Six Methods of Extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Processed Sputum for Testing by Quantitative Real-Time PCR.** J. Clin. Microbiol., 43(5). 2471–2473., 2005.

Alexander, K. A., Laver, P. N., Michel, A. L., Williams, M., van Helden, P. D., Warren, R. M., Gey van Pittius, N. C.: **Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*.** Emerg. Infect. Dis., 16. 1296–1299., 2010.

Alland, D., Lacher, D. W., Hazbón, M. H., Motiwala, A. S., Qi, W., Fleischmann, R. D., Whittam, T. S.: **Role of large sequence polymorphisms (LSPs) in generating genomic diversity among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and the utility of LSPs in phylogenetic analysis.** J. Clin. Microbiol., 45(1). 39–46., 2007.

Al-Mussawi, A. A.: **Isolation and Identification of *Mycobacterium chelonae* from Human Sputum among Suspected Pulmonary Tuberculosis Infections in Basra-Iraq.** Am. J. Infect. Dis. Microbiol., 2(6). 145–148., 2014.

Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Sáez, J. L., Marqués, S., Dominguez, C., Mínguez, O., Fernández-Mardomingo, B., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A.: **Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay.** Vet. Microbiol., 135(3–4). 389–393., 2009.

Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Sáez, J. L., Reviriego Gordejo, F. J., Briones, V., Moreno, M. A., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A.: **Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection.** Vet. Microbiol., 128(1–2). 72–80., 2008a.

Álvarez, J., García, I. G., Aranaz, A., Bezos, J., Romero, B., de Juan, L., Mateos, A., Gómez-Mampaso, E., Dominguez, L.: **Genetic diversity of *Mycobacterium avium* isolates recovered from clinical samples and from the environment: molecular characterization of diagnostic purposes.** J. Clin. Microbiol., 46. 1246–1251., 2008b.

Aranaz, A., de Juan, L., Bezos, J., Alvarez, J., Romero, B., Lozano, F., Paramio, J. L., López-Sánchez, J., Mateos, A., Dominguez, L.: **Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.** Vet. Res., 37(4). 593–606., 2006.

Balcázar, J. L., Planas, M., Pintado, J.: ***Mycobacterium hippocampi* sp. nov., a rapidly growing scotochromogenic species isolated from a seahorse with tail rot.** Curr. Microbiol., 69(3). 329–333., 2014.

Bang, D., Herlin, T., Stegger, M., Andersen, A. B., Torkko, P., Tortoli, E., Thomsen, V. O.: ***Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58(10). 2398–2402., 2008.

Barry, C., Corbett, D., Bakker, D., Andersen, P., McNair, J., Strain, S.: **The effect of *Mycobacterium avium* complex infections on routine *Mycobacterium bovis* diagnostic tests.** Vet. Med. Int., Article ID 145092, 7 pages., 2011.

Beard, P. M., Daniels, M. J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M. R., McKendrick, I., Stevenson, K., Sharp, J. M.: **Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland.** J. Clin. Microbiol., 39. 1517–1521., 2001.

Behr, M. A., Collins, D. M. (Szerk.): **Paratuberculosis: Organism, Disease, Control.** Oxfordshire: CAB International, p. 10–21, 126–137, 294–305., 2010.

Ben Salah, I., Cayrou, C., Raoult, D., Drancourt, M.: ***Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 59. 2803–2808., 2009.

Benedictus, A., Mitchell, R. M., Linde-Widmann, M., Sweeney, R., Fyock, T., Schukken, Y. H., Whitlock, R. H.: **Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program.** Prev. Vet. Med., 83. 215–227., 2008.

Bercovier, H., Vincent, V.: ***Mycobacterial* infections in domestic and wild animals due to *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. porcinum*, *M. farcinogenes*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. simiae* and *M. genavense*.** Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 20. 265–290., 2001.

Beregi, A., Erdélyi, K., Fodor, K., Csányi, S.: **Muflon (*Ovis musimon*) paratuberculosis.** MÁL, 10. 594–596., 2012.

Biet, F., Boschioli, M. L.: **Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance.** Res. Vet. Sci., 97. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.08.007., 2014.

Biet, F., Boschioli, M. L., Thorel, M. F., Guilloteau, L. A.: **Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC).** Vet. Res., 36. 411–436., 2005.

Biet, F., Sevilla, I. A., Cochard, T., Lefrancois, L. H., Garrido, J. M., Heron, I., Juste, R. A., McLuckie, J., Thibault, V. C., Supply, P., Collins, D. M., Behr, M. A., Stevenson, K.: **Inter- and intra-subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains.** BMC Microbiol., 12. 264., 2012.

Bills, N. D., Hinrichs, S. H., Aden, T. A., Wickert, R. S., Iwen, P. C.: **Molecular identification of *Mycobacterium chimaera* as a cause of infection in a patient with chronic obstructive pulmonary disease.** *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 63(3). 292–295., 2009.

Blackwood, K. S., He, C., Gunton, J., Turenne, C. Y., Wolfe, J., Kabani, A. M.: **Evaluation of *recA* Sequences for Identification of *Mycobacterium* Species.** *J. Clin. Microbiol.*, 38. 2846–2852., 2000.

Bonicke, R., Juhász, S. E.: **Beschreibung der neuen Species *Mycobacterium vaccae* n. sp.** *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung I*, 192. 133–135., 1964.

Bradner, L., Robbe-Austerman, S., Beitz, D. C., Stabel, J. R.: **Optimization of hexadecylpyridinium chloride decontamination for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk.** *J. Clin. Microbiol.*, 51(5). 1575–1577., 2013.

Brennan, P. J.: **Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Tuberculosis (Edinb.)*, 83(1–3). 91–97., 2003.

Brennan, P. J., Souhrada, M., Ullom, B., McClatchy, J. K., Goren, M. B.: **Identification of Atypical *Mycobacteria* by Thin-Layer Chromatography of Their Surface Antigens.** *J. Clin. Microbiol.*, 8. 374–379., 1978.

Bull, T. J., Sheridan, J. M., Martin, H., Sumar, N., Tizard, M., Hermon-Taylor, J.: **Further studies on the GS element. A novel mycobacterial insertion sequence (IS1612), inserted into an acetylase gene (*mpa*) in *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* but not in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.** *Vet. Microbiol.*, 77(3–4). 453–463., 2000.

Bull, T.J., Sidi-Boumedinea, K., McMinna, E.J., Stevenson, K., Pickup, R., Hermon-Taylor, J.: **Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex.** *Mol. Cell. Probes*, 17. 157–164., 2003.

Butler, W. R., Guthertz, L. S.: **Mycolic Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography for Identification of *Mycobacterium* Species.** *Clin. Microbiol. Rev.*, 14. 704–726., 2001.

Campora, L., Corazza, M., Zullino, C., Ebani, V. V., Abramo, F.: ***Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* disseminated infection in a Basset Hound dog.** J. Vet. Diagn. Invest., 23(5). 1083–1087., 2011.

Carbonara, S., Tortoli, E., Costa, D., Monno, L., Fiorentino, G., Grimdi, A., Boscia, D., Rollo, M. A., Pastore, G., Angarano, G.: **Disseminated *Mycobacterium terrae* infection in a patient with advanced human immunodeficiency virus disease.** Clin. Infect. Dis., 30(5). 831–835., 2000.

Cárdenas, A. M., Gomila, M., Lalucat, J., Edelstein, P. H.: **Abdominal abscess caused by *Mycobacterium llutzerense*.** J. Clin. Microbiol., 52(4). 1287–1289., 2014.

Castellanos, E., Aranaz, A., De Buck, J.: **PCR amplification and high-resolution melting curve analysis as a rapid diagnostic method for genotyping members of the *Mycobacterium avium-intracellulare* complex.** Clin. Microbiol. Infect., 16. 1658–1662., 2010a.

Castellanos, E., Aranaz, A., de Juan, L., Álvarez, J., Rodriguez, S., Romero, B., Bezos, J., Stevenson, K., Mateos, A., Dominguez, L.: **Single nucleotide polymorphisms in the IS900 sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are strain type specific.** J. Clin. Microbiol., 47. 2260–2264., 2009a.

Castellanos, E., Aranaz, A., Gould, K. A., Linedale, R., Stevenson, K., Álvarez, J., Dominguez, L., de Juan, L., Hinds, J., Bull, T. J.: **Discovery of stable and variable differences in the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III genomes by pan-genome microarray analysis.** Appl. Environ. Microbiol., 75. 676–686., 2009b.

Castellanos, E., Romero, B., Rodriguez, S., de Juan, L., Bezos, J., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A.: **Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* types II and III isolates by a combination of MIRU–VNTR loci.** Vet. Microbiol., 144. 118–126., 2010b.

Cayrou, C., Turenne, C., Behr, M. A., Drancourt, M.: **Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing.** Microbiology, 156. 687–694., 2010.

Chatterjee, M., Bhattacharya, S., Karak, K., Dastidar, S. G.: **Effects of different methods of decontamination for successful cultivation of *Mycobacterium tuberculosis***. Indian J. Med. Res., 138(4). 541–548., 2013.

Chester, F. D.: **A manual of determinative bacteriology**. Macmillan & Co. Ltd.: London, 1901. p. 356–357.

Chiers, K., Deschaght, P., De Baere, T., Dabrowski, S., Kotlowski, R., De Clercq, D., Ducatelle, R., Vaneechoutte, M.: **Isolation and identification of *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum* from a horse**. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 35. 303–307., 2012.

Chimara, E., Ferrazoli, L., Ueky, S. Y. M., Martins, M. C., Durham, A. M., Arbeit, R. D., Leão, S. C.: **Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns**. BMC Microbiol. 8. 48., 2008.

Chiodini, R. J.: **Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities**. Clin. Microbiol. Rev. 2(1). 90–117., 1989.

Chiodini, R. J., Chamberlin, W. M., Sarosiek, J., McCallum, R. W.: **Crohn's disease and the mycobacterioses: a quarter century later. Causation or simple association?** Crit. Rev. Microbiol. 38(1). 52–93., 2012.

Cloud, J. L., Meyer, J. J., Pounder, J. I., Jost, K. C. Jr., Sweeney, A., Carroll, K. C., Woods, G. L.: ***Mycobacterium arupense* sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens**. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56. 1413–1418., 2006.

Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E. 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrel, B. G.: **Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence**. Nature, 393(6685). 537–544., 1998.

Collins, D. M., de Zoete, M., Cavaignac, S. M.: ***Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference.** J. Clin. Microbiol., 40. 4760–4762., 2002.

Corn, J. L., Manning, E. J. B., Sreevatsan, S., Fischer, J. R.: **Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises.** Appl. Environ. Microbiol., 71. 6963–6967., 2005.

Croce, O., Robert, C., Raoult, D., Drancourt, M.: **Draft Genome Sequence of *Mycobacterium austroafricanum* DSM 44191.** Genome Announc., 2(2). pii: e00317-14., 2014.

Cvetnić, Z., Spicić, S., Benic, M., Katalinić-Janković, V., Pate, M., Krt, B., Ocepek, M.: **Mycobacterial infection of pigs in Croatia.** Acta Vet. Hung., 55(1). 1–9., 2007.

Davison, M. B., McCormack, J. G., Blacklock, Z. M., Dawson, D. J., Tilse, M. H., Crimmins, F. B.: **Bacteremia caused by *Mycobacterium neoaurum*.** J. Clin. Microbiol., 26. 762–764., 1988.

Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F.: **Piscine mycobacteriosis: a literature review covering the agent and the disease it causes in fish and humans.** Vet. Microbiol., 99(3-4). 159–166., 2004.

de Juan, L., Álvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A., Dominguez, L.: **Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats.** Appl. Environ. Microbiol., 72(9). 5927–5932., 2006.

de Juan, L., Mateos, A., Dominguez, L., Sharp, J. M., Stevenson, K.: **Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis.** Vet. Microbiol., 106(3-4). 249–257., 2005.

Devulder, G., Pérouse de Montclos, M., Flandrois, J. P.: **A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55. 293–302., 2005.

Dhama, K., Mahendran, M., Tiwari, R., Singh, S. D., Kumar, D., Singh, S., Sawant, P. M.: **Tuberculosis in birds: insights into the *Mycobacterium avium* infections.** Vet. Med. Int., <http://dx.doi.org/10.4061/2011/712369>, 2011.

Doig, K. D., Holt, K. E., Fyfe, J. A., Lavender, C. J., Eddyani, M., Portaels, F., Yeboah-Manu, D., Pluschke, G., Seemann, T., Stinear, T. P.: **On the origin of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer.** BMC Genomics, 13:258. doi: 10.1186/1471-2164-13-258., 2012.

Driscoll, J. R.: **Spoligotyping for molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex.** Methods Mol. Biol., 551. 117–128., 2009.

Dunkin, G. W., Balfour-Jones, S. E. B.: **Preliminary investigation of a disease of sheep possessing certain characteristics simulating Johne's disease.** J. Comp. Pathol., 48. 236–240., 1935.

Dvorska, L., Bull, T. J., Bartos, M., Matlova, L., Svastova, P., Weston, R. T., Kintr, J., Parmova, I., van Soolingen, D., Pavlik, I.: **A standardised restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS901 with virulence for birds.** J. Microbiol. Methods, 55. 11–27., 2003.

Edson, R. S., Terrell, C. L., Brutinel, W. M., Wengenack, N. L.: ***Mycobacterium intermedium* granulomatous dermatitis from hot tub exposure.** Emerg. Infect. Dis., 12(5). 821–823., 2006.

Erler, W., Martin, G., Sachse, K., Naumann, L., Kahlau, D., Beer, J., Bartos, M., Nagy, G., Cvetnić, Z., Zolnir-Dovc, M., Pavlik, I.: **Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from central Europe.** J. Clin. Microbiol., 42(5). 2234–2238., 2004.

Eszterbauer, E., Rónai, Zs., Marton, Sz., Ursu, K., Baska, F., Láng, M.: ***Mycobacterium* fajok terjedése kereskedelmi forgalomban kapható fagyasztott haleleségek útján.** Fisheries & Aquaculture Development, 34. ISBN 978-963-7120-32-9, 2012.

Fernández-Silva, J. A., Abdulmawjood, A., Akineden, Ö., Dräger, K., Klawonn, W., Bülte, M.: **Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at a regional scale in Germany.** Res. Vet. Sci., 93. 776–782., 2012.

Fodor, I., Matyovszky, B., Biczó, A., Ózsvári, L.: **A paratuberkulózis kártétele és az ellene való védekezés egy hazai nagyüzemi holstein-fríz tehenészetben.** MÁL, 136. 213–222., 2014.

Franco, M. M. J., Paes, A. C., Ribeiro, M. G., Pantoja, J. C. F., Santos, A. C. B., Miyata, M., Leite, C. Q. F., Motta, R. G., Listoni, F. J. P.: **Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of Sao Paulo, Brazil.** BMC Vet. Res., 9. 85., 2013.

Friend, M., Franson, J.C.: **Field manual of wildlife diseases general field procedures and diseases of birds.** Chapter 8, 93–98 http://www.nwhc.usgs.gov/publications/field_manual/field_manual_of_wildlife_diseases.pdf, 1999.

Fukuda, T., Matsumura, T., Ato, M., Hamasaki, M., Nishiuchi, Y., Murakami, Y., Maeda, Y., Yoshimori, T., Matsumoto, S., Kobayashi, K., Kinoshita, T., Morita, Y. S.: **Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis.** MBio., 4(1): e00472-12. doi: 10.1128/mBio.00472-12., 2013.

Fusco da Costa, A. R., Fedrizzi, T., Lopes, M. L., Pecorari, M., Oliveira da Costa, W. L., Giacobazzi, E., da Costa Bahia, J. R., De Sanctis, V., Batista Lima, K. V., Bertorelli, R., Grottola, A., Fabio, A., Mariottini, A., Ferretti, P., Di Leva, F., Fregni Serpini, G., Tagliazucchi, S., Rumpianesi, F., Jousson, O., Segata, N., Tortoli, E.: **Characterization of 17 strains belonging to the *Mycobacterium simiae* complex and description of *Mycobacterium paraense* sp. nov.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65. 656–662., 2015.

Gao, B., Gupta, R. S.: **Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 76(1). 66–112., 2012.

Gauthier, D. T., Rhodes, M. W.: **Mycobacteriosis in fishes: A review.** Vet. J., 180(1). 33-47., 2009.

Gcebe, N., Rutten, V., Gey van Pittius, N. C., Michel, A.: **Prevalence and Distribution of Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM) in Cattle, African Buffaloes (*Syncerus caffer*) and their Environments in South Africa.** Transbound. Emerg. Dis., 60. 74–84., 2013.

Gengenbacher, M., Kaufmann, S. H. E.: ***Mycobacterium tuberculosis*: Success through dormancy.** FEMS Microbiol. Rev., 36(3). 514–532., 2012.

Gomez, S. A., Barnabe, A., Gomez, M. A., Navarro, J. A., Sanchez, J.: **Fish mycobacteriosis, morphological and immunological aspects.** Fish Dis., 16. 137–141., 1993.

Gomez, J. E., Bishai, W., R.: **whmD is an essential mycobacterial gene required for proper septation and cell division.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97(15). 8554–8559., 2000.

Gomila, M., Ramirez, A., Gascó, J., Lalucat, J.: ***Mycobacterium llatzerense* sp. nov., a facultatively autotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from haemodialysis water.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58(12). 2769–2773., 2008.

Gomila, M., Ramirez, A., Lalucat, J.: **Diversity of Environmental *Mycobacterium* Isolates from Hemodialysis Water as Shown by a Multigene Sequencing Approach.** App. Env. Microbiol., 73. 3787–3797., 2007.

Gortazar, C., Torres, M. J., Acevedo, P., Aznar, J., Negro, J. J., de la Fuente, J., Vicente, J.: **Fine-tuning the space, time, and host distribution of mycobacteria in wildlife.** BMC Microbiol., 11. 27., 2011.

Green, E. P., Tizard, M., L., Moss, M. T., Thompson, J., Winterbourne, D. J., McFadden, J. J., Hermon-Taylor, J.: **Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*.** Nucleic Acids Res., 17(22). 9063–9073., 1989.

Guérin-Faubleé, V., Flandrois, J. P., Pichat, C., Boschioli, M. L., Lamy, B.: ***Mycobacterium bourgelatii* sp. nov., a rapidly growing, non-chromogenic species isolated from the lymph nodes of cattle.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 63(12). 4669–4674., 2013.

Guerrero, C., Bernasconi, C., Burki, D., Bodmer, T., Telenti, A.: **A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness.** J. Clin. Microbiol., 33(2). 304–307., 1995.

Hajtós, I., Glávits, R., Galal, M.: **Paratuberculosis észak-magyarországi juhállományokban.** MÁL, 7. 383–390., 1999.

Hall, T.A.: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucleic Acids Symp. Ser., 41. 95–98., 1999.

Hamid, M. E.: **Current Perspectives on Mycobacterium farcinogenes and Mycobacterium senegalense, the Causal Agents of Bovine Farcy.** Vet. Med. Int. Article ID 247906, 13 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/247906>, 2014.

Han, X. Y., Dé, I., Jacobson, K. L.: **Rapidly growing mycobacteria: clinical and microbiologic studies of 115 cases.** Am. J. Clin. Pathol., 128(4). 612–621., 2007.

Hasonova, L., Pavlik, I.: **Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review.** Vet. Med. Czech., 51. 193–211., 2006.

Hejlíček, K., Tremel, F.: **Comparison of the pathogenesis and epizootiological importance of avian mycobacteriosis in various types of domestic and free-living syntropic birds.** Vet. Med. Czech., 40. 187–194., 1995.

Henkle, E., Winthrop, K. L.: **Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts.** Clin. Chest Med., 36(1). 91–99., 2015.

Hett, E. C., Rubin, E. J.: **Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective.** Microbiol. Mol. Biol. Rev., 72(1). 126–156., 2008.

Higgins, J., Camp, P., Farrell, D., Bravo, D., Pate, M., Robbe-Austerman, S.: **Identification of Mycobacterium spp. of veterinary importance using rpoB gene sequencing.** BMC Vet. Res., 7. 77., 2011.

Hines, N., Payeur, J. B., Hoffman, L. J.: **Comparison of the recovery of Mycobacterium bovis isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media.** J. Vet. Diagn. Invest., 18(3). 243–250., 2006.

Hoefsloot, W., van Ingen, J., de Lange, W. C., Dekhuijzen, P. N., Boeree, M. J., van Soolingen, D.: **Clinical relevance of Mycobacterium malmoeense isolation in The Netherlands.** Eur. Respir. J., 34(4). 926–931., 2009.

Honarvar, B., Movahedan, H., Mahmoodi, M., Sheikholeslami, F. M., Farina, P.: **Mycobacterium aurum keratitis: an unusual etiology of a sight-threatening infection.** Braz. J. Infect. Dis., 16(2). 204–208., 2012.

Horn, B., Forshaw, D., Cousins, D., Irwin, P. J.: **Disseminated *Mycobacterium avium* infection in a dog with chronic diarrhoea.** Aust. Vet. J., 78. 320–325., 2000.

Hosek, J., Svastova, P., Moravkova, M., Pavlik, I., Bartos, M.: **Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review.** Veterinarni Med., 51(5). 180-192., 2006.

Hsu, C.Y., Wu, C.W., Talaat, A.M.: **Genome-wide sequence variation among *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates: a better understanding of Johne's disease transmission dynamics.** Front. Microbiol., 2. 236., 2011.

Huber, J., Richter, E., Binder, L., Maass, M., Eberl, R., Zenz, W.: ***Mycobacterium bohemicum* and cervical lymphadenitis in children.** Emerg. Infect. Dis., 14(7). 1158-1159., 2008.

Hughes, M. S., Ball, N. W., McCarroll, J., Erskine, M., Taylor, M. J., Pollock, J. M., Skuce, R. A., Neill, S. D.: **Molecular analyses of mycobacteria other than the *M. tuberculosis* complex isolated from Northern Ireland cattle.** Vet. Microbiol., 108(1-2). 101–112., 2005.

Humblet, M-F., Boschioli, M. L., Saegerman, C.: **Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach.** Vet. Res., 40(5). 50., 2009.

Hunter, P.R., Gaston, M.A.: **Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity.** J. Clin. Microbiol., 26. 2465-2466., 1988.

Iakhiaeva, E., Howard, S. T., Brown Elliott, B. A., McNulty, S., Newman, K. L., Falkinham, J. O. 3rd., Williams, M., Kwait, R., Lande, L., Vasireddy, R., Turenne, C., Wallace, R. J. Jr.: **Variable-Number Tandem-Repeat Analysis of Respiratory and Household Water Biofilm Isolates of "*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*" with Establishment of a PCR Database.** J. Clin. Microbiol., 54(4). 891–901., 2016.

Inagaki, T., Nishimori, K., Yagi, T., Ichikawa, K., Moriyama, M., Nakagawa, T., Shibayama, T., Uchiya, K., Nikai, T., Ogawa, K.: **Comparison of a variable-number tandemrepeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with *mycobacterial* interspersed repetitive-unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing.** J. Clin. Microbiol., 47. 2156–2164., 2009.

Inderlied, C. B., Kemper, C. A., Bermudez, L. E. M.: **The Mycobacterium avium Complex.** Clin. Microbiol. Rev., 6. 266–310., 1993.

Ishii, K., Ishii, N., Nakanaga, K., Nakano, K., Saito, I., Asahina, A.: **Mycobacterium haemophilum infection with prominent facial manifestation mimicking leprosy.** J. Dermatol., 42(10). 992–995., 2015.

Iwainsky, H., K ppler, W.: **Mykobakterien Biochemie und biochemische Differenzierung. Bibliothek für das Gesamtgebiet der Lungenkrankheiten.** Band 103, Leipzig: Johann Ambrosius Barth, 1974.

Johansen, T. B., Agdestein, A., Lium, B., J rgensen, A., Dj nne, B.: **Mycobacterium avium subsp. hominissuis infection in swine associated with peat used for bedding.** Biomed. Res. Int., <http://dx.doi.org/10.1155/2014/189649> (8 pages), 2014.

Johne, H. J., Frothingham, J.: **Ein eigent mlicher Fall von Tuberculose beim Rind.** Deutsche Zeitschrift f r Tiermedizin und Vergleichende Pathologie, 21. 438–454., 1895.

Kasai, H., Ezaki, T., Harayama, S.: **Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria by Their gyrB Sequences.** J. Clin. Microbiol., 38. 301–308., 2000.

Katale, B. Z., Mbugi, E. V., Botha, L., Keyyu, J. D., Kendall, S., Dockrell, H. M., Michel, A. L., Kazwala, R. R., Rweyemamu, M. M., van Helden, P., Matee, M. I.: **Species diversity of non-tuberculous mycobacteria isolated from humans, livestock and wildlife in the Serengeti ecosystem, Tanzania.** BMC Inf. Dis., 14. 616., 2014.

Kazda, J., Pavlik, I., Falkinham III, J. O., Hruska, K. (Szerk.): **The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health.** New York: Springer, 2009.

Kiehn, T. E., Edwards, F. F., Brannon, P., Tsang, A. Y., Maio, M., Gold, J. W., Whimbey, E., Wong, B., McClatchy, J. K., Armstrong, D.: **Infections caused by Mycobacterium avium complex in immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility tests, and morphological and seroagglutination characteristics.** J. Clin. Microbiol., 21. 168–173., 1985.

Kim, S. H., Chun, B. W., Jung, J., Kemp, B. M., Kwak, K. D., Cho, N. S., Kim, J. J., Han, M. S., Kim, W.: **A preliminary study on the origin of Koreans based on YSTR variation.** *Genes Genomics*, 32. 371–377., 2010.

Knupfer, E.: **Within-farm strain dynamics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Evidence for limited vertical transmission.** Doctoral thesis, <http://igiturarchive.library.uu.nl/>, 2010.

Koh, W. J., Jeong, B. H., Jeon, K., Lee, N. Y., Lee, K. S., Woo, S. Y., Shin, S. J., Kwon, O. J.: **Clinical significance of the differentiation between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* in *M avium* complex lung disease.** *Chest*, 142(6). 1482-1488., 2012.

Körmendy, B.: **The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds.** *Vet. Microbiol.*, 41. 117–125., 1994.

Körmendy, B., Kopál, T., Bálint, T., Szilágyi, M., Béki, L.: **Economic losses caused by paratuberculosis in a dairy herd: case report.** *Acta Vet. Hung.*, 37. 45–53., 1989.

Körmendy, B., Szilágyi, M., Tuboly, S., Nagy, Gy.: **Some diagnostic features of the pathogenesis of bovine paratuberculosis (Johne's Disease) and serum biochemical changes after oral reinfection.** *Zbl. Vet. Med. B.*, 37. 229–235., 1990.

Kubica, G. P., Silcox, V. A., Kilburn, J. O., Smithwick, R. W., Beam, R. E., Jones, W. D. Jr., Stottmeier, K. D.: **Differential identification of mycobacteria VI. *Mycobacterium triviale* Kubica sp. nov.** *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20. 161–174., 1970.

Kumar, M., Sharma, S., Ram, A. B., Khan, I. A.: **Efficient mycobacterial DNA extraction from clinical samples for early diagnosis of tuberculosis.** *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 14(7). 847–851., 2010.

Kunze, Z. M., Wall, S., Appelberg, R., Silva, M. T., Portaels, F., McFadden, J. J.: **IS901, a new member of a wide-spread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*.** *Mol. Microbiol.*, 9. 2265–2272., 1991.

Lambert, P. A.: **Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria.** *J. Appl. Microbiol.*, 92. Suppl:46S–54S., 2002.

Lambrecht, R. S., Collins, M. T.: ***Mycobacterium paratuberculosis*. Factors that influence mycobactin dependence.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 15(3). 239–246., 1992.

Lamy, B., Marchandin, H., Hamitouche, K., Laurent, F.: ***Mycobacterium setense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum*-group organism isolated from a patient with soft tissue infection and osteitis.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58. 486–490., 2008.

Lane, D. J.: **16S/23S rDNA sequencing.** In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Szerk.: Stackebrand, E. és Goodfellow, M.: Chichester, United Kingdom: Wiley, 1991. p.115–175.

Larsen, A. B., Moon, H. W., Merkal, R. S.: **Susceptibility of horses to *Mycobacterium paratuberculosis*.** Am. J. Vet. Res., 33(11). 2185–2189., 1972.

Lee, C. H., You, H. L., Wang, J. W., Tang, Y. F., Liu, J. W.: **Prosthetic joint infection caused by *Mycobacterium alvei* in an elderly patient.** J. Clin. Microbiol., 49(8). 3096-3098., 2011.

Lee, Y. S., Nam, S. W., Park, Y. S., Lee, B. K.: ***Mycobacterium wolinskyi* infection after total knee arthroplasty in a healthy woman.** J. Orthop. Sci., 20(1). 229–231., 2015.

Lee, W. I., Huand, J. L., Yeh, K. W., Jaing, T. H., Lin, T. Y., Huang, Y. C., Chiu, C. H.: **Immune defects in active mycobacterial diseases in patients with primary immunodeficiency diseases (PIDs).** J. Formos Med. Assoc., 110(12). 750–758., 2011.

Legrand, E., Sola, C., Rastogi, N.: **Le complexe *Mycobacterium avium/intracellulare*: marqueurs phénotypiques et génotypiques et les bases moléculaires de la transmission inter-espèces.** Manuscript 2155/RIP 7. 3e Colloque du Réseau International des Instituts Pasteur et Instituts Associés, 14 to 15 October 1999. Institut Pasteur de Paris, Paris, France. <http://www.pathexo.fr/documents/articles-bull/T93-3-2155-RIP7.pdf>., 1999.

Lehmann, K. B. et Neumann, R.: **Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik,** München: J. F. Lehmann, 1896. Tab. 48.

Levi, M. H., Bartell, J., Gandolfo, L., Smole, S. C., Costa, S. F., Weiss, L. M., Johnson, L. K., Osterhout, G., Herbst, L. H.: **Characterization of *Mycobacterium montefiorensis* sp. nov.,**

a novel pathogenic *Mycobacterium* from moray eels that is related to *Mycobacterium triplex*. J. Clin. Microbiol., 41(5). 2147–2152., 2003.

Luyven, G., vom Schloss, A., Sasserath, M.: **Paratuberculosis eradication programs in Northrhine-Westfalia.** Dtsch. Tierarztl. Wochenschr., 109(12). 524–527., 2002.

Machackova, M., Matlova, L., Lamka, J., Smolik, J., Melicharek, I., Hanzlikova, M., Docekal, J., Cvetnić, Z., Nagy, G., Lipiec, M., Ocepek, M., Pavlik, I.: **Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 to 2001.** Vet. Med. Czech, 48. 51–65., 2003.

Machado, G., Trevisan Gressler, L., Maboni Siqueira, F., Balzan, C., Brum, J. S., Castagna de Vargas, A.: **Bovine pyogranulomatous mastitis caused by *Mycobacterium goodii*.** JMM Case Reports, DOI 10.1099/jmmcr.0.004150-0., 2015.

Macheras, E., Konjek, J., Roux, A. L., Thiberge, J. M., Bastian, S., Leão, S. C., Palaci, M., Sivadon-Tardy, V., Gutierrez, C., Richter, E., Rüscher-Gerdes, S., Pfyffer, G. E., Bodmer, T., Jarlier, V., Cambau, E., Brisse, S., Caro, V., Rastogi, N., Gaillard, J. L., Heym, B.: **Multilocus sequence typing scheme for the *Mycobacterium abscessus* complex.** Res. Microbiol., 165(2). 82–90., 2014.

Magee, J. G., Ward, A., C.: **Genus I. *Mycobacterium* Lehmann and Neumann 1896.** In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Szerk.: Whitman, W. G.; New York: Springer, 2012. p.312–375.

Marco, I., Ruiz, M., Juste, R., Garrido, J. M., Lavin, S.: **Paratuberculosis in free-ranging fallow deer in Spain.** J. Wildl. Dis., 38. 629–632., 2002.

Matthews, P. R. J., McDiarmid, A.: **The production in bovine calves of a disease resembling paratuberculosis with a *Mycobacterium* sp. Isolated from a woodpigeon (*Columba palumbus* L.).** Vet. Rec., 104. 286., 1979.

Mazumder, S. A., Hicks, A., Norwood, J.: ***Mycobacterium gordonae* pulmonary infection in an immunocompetent adult.** N. Am. J. Med. Sci., 2(4). 205–207., 2010.

McFadden, J., Collins, J., Beaman, B., Arthur, M., Gitnick, G.: **Mycobacteria in Crohn's disease: DNA probes identify the wood pigeon strain of *Mycobacterium avium* and**

***Mycobacterium paratuberculosis* from human tissue.** J. Clin. Microbiol., 30. 3070–3073., 1992.

McNabe, M., Tennant, R., Danelishvili, L., Young, L., Bermudez, L. E.: ***Mycobacterium avium* subsp *hominissuis* biofilm is composed of distinct phenotypes and influenced by the presence of antimicrobials.** Clin. Microbiol. Infect., 17(5). 697-703., 2011.

Medeiros, L., Marassi, C. D., Duarte, R. S., da Silva, M. G., Lilenbaum, W.: **Comparison of decontamination methods for primary isolation of *Mycobacterium bovis* in paucibacillary bovine tissues.** Lett. Appl. Microbiol., 54(3). 182–186., 2012.

Medveczky, I., Rusvai, M., Tuboly S., Varga, J.: ***Mycobacterium*.** In: Állatorvosi járványtan I. (Általános mikrobiológia). Szerk.: Tuboly, S.; Budapest: Mezőgazda Kiadó, 1998. p. 58–64., 136-142.

Meena, L. S., Rajni: **Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.** FEBS J., 277(11). 2416–2427., 2010.

Meier, A., Kirschner, P., Schröder, K. H., Wolters, J., Kroppenstedt, R. M., Böttger, E. C.: ***Mycobacterium intermedium* sp. nov.** Int. J. Syst. Bacteriol., 43(2). 204–209., 1993.

Messelhäuser, U., Kämpf, P., Hörmansdorfer, S., Wagner, B., Schalch, B., Busch, U., Höller, C., Wallner, P., Barth, G., Rampp, A.: **Culture and molecular method for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and dairy products.** Appl. Environ. Microbiol., 78(1). 295–297., 2012.

Michel, A. L.: ***Mycobacterium fortuitum* infection interference with *Mycobacterium bovis* diagnostics: natural infection cases and a pilot experimental infection.** J. Vet. Diagn. Invest., 20(4). 501–503., 2008.

Mignard, S., Flandrois, J-P.: **Identification of *Mycobacterium* using the EF-Tu encoding (*tuf*) gene and the tmRNA encoding (*ssrA*) gene.** J. Med. Microbiol., 56. 1033–1041., 2007.

Mijs, W., de Haas, P., Rossau, R., van der Laan, T., Rogouts, L., Portaels, F., van Soolingen, D.: **Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation**

***Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52. 1505–1518., 2002.

Millán, J., Negre, N., Castellanos, E., de Juan, L., Mateos, A., Parpal, L., Aranaz, A.: **Avian mycobacteriosis in free-living raptors in Majorca island, Spain.** Avian Pathol., 39. 1–6., 2010.

Möbius, P., Fritsch, I., Luyven, G., Hotzel, H., Köhler, H.: **Unique genotypes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains of Type III.** Vet. Microbiol., 139(3-4). 398–404., 2009.

Mohamed, A. M., Iwen, P. C., Tarantolo, S., Hinrichs, S. H.: ***Mycobacterium nebraskense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic species.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54(6). 2057–2060., 2004.

Moore, M., Frerichs, J. B.: **An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus*, n. sp.** J. Invest. Dermatol., 20. 133–169., 1953.

Moss, M. T., Malik, Z. P., Tizard, M. L. V., Green, E. P., Sanderson, J. D., Hermon-Taylor, J.: **IS902, an insertion element of the chronic-enteritis-causing *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*.** J. Gen. Microbiol., 138. 139–145., 1992a.

Moss, M. T., Sanderson, J. D., Tizard, M. L. V., Hermon-Taylor, J., el-Zaatari, F. A., Markesich, D. C., Graham, D. Y.: **Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tissues.** Gut, 33. 1209–1213., 1992b.

Mostowy, S., Cousins, D., Brinkman, J., Aranaz, A., Behr, M. A.: **Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex.** J. Infect. Dis., 186. 74–80., 2002.

Mukai, T., Miyamoto, Y., Yamazaki, T., Makino, M.: **Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA* gene.** FEMS Microbiol. Lett., 254. 232–239., 2005.

Murcia, M. I., Tortoli, E., Menendez, M. C., Palenque, E., Garcia, M. J.: ***Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56. 2049–2054., 2006.

Murohashi, T., Yoshida, K.: **Isolation of *M. leprae* using semi-synthetic solid agar medium.** Acta Leprol. 70. 3–21., 1978.

Nacy, C., Buckley, M.: ***Mycobacterium avium paratuberculosis*: Infrequent human pathogen or public health threat?** American Academy of Microbiology, Colloquium Report, 2008.

Nagao, M., Sonobe, M., Bando, T., Saito, T., Shirano, M., Matsushima, A., Fujihara, N., Takakura, S., Inuma, Y., Ichiyama, S.: **Surgical site infection due to *Mycobacterium peregrinum*: a case report and literature review.** Int. J. Infect. Dis., 13(2). 209–211., 2009.

Nei, T., Okabe, M., Mikami, I., Koizumi, Y., Mase, H., Matsuda, K., Yamamoto, T., Takeda, S., Tanaka, K., Dan, K.: **A non-HIV case with disseminated *Mycobacterium kansasii* disease associated with strong neutralizing autoantibody to interferon- γ .** Respir. Med. Case Rep., 31(8). 10–13., 2012.

Nenoff, P., Uhlemann, R.: ***Mycobacteriosis* in mangrove killifish (*Rivulus magdalенаe*) caused by living fish food (*Tubifex tubifex*) infected with *Mycobacterium marinum*.** DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr., 113. 230–232., 2006.

Nielsen, S. S.: **Programmes on paratuberculosis in Europe.** Proceedings of 10th International Colloquium on Paratuberculosis. 101–108., 2009.

Nielsen, S. S., Toft, N.: **Assessment of management-related risk factors for paratuberculosis in danish dairy herds using bayesian mixture models.** Prev. Vet. Med., 81. 306–317., 2007.

Orrú, G., Meloni, M., Spissu, F., Isola, D., Palmieri, G., Melis, E., Besharati, E., Liciardi, M.: **Rilevamento di *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* in campioni clinici di ovino mediante PCR real time.** Large Anim. Rev., 13. 13–17., 2007.

Osterstock, J. B., Fosgate, G. T., Norby, B., Manning, E. J., Collins, M. T., Roussel, A. J.: **Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis.** J. Am. Vet. Med. Assoc., 230(6). 896–901., 2007.

Padilla, E., González, V., Manterola, J. M., Pérez, A., Quesada, M. D., Gordillo, S., Vilaplana, C., Pallarés, M. A., Molinos, S., Sánchez, M. D., Ausina, V.: **Comparative Evaluation of the New Version of the INNO-LiPA Mycobacteria and GenoType Mycobacterium Assays for Identification of *Mycobacterium* Species from MB/BacT Liquid Cultures Artificially Inoculated with Mycobacterial Strains.** J. Clin. Microbiol., 42.3083–3088., 2004.

Padya, L., Chin'ombe, N., Magwenzi, M., Mbanga, J., Ruhanya, V., Nziramasanga, P.: **Molecular Identification of *Mycobacterium* Species of Public Health Importance in Cattle in Zimbabwe by 16S rRNA Gene Sequencing.** Open Microbiol. J., 9. 38–42., 2015.

Parsons, S. D., Drewe, J. A., Gey van Pittius, N. C., Warren, R. M., van Helden, P. D.: **Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa.** Emerg. Infect. Dis., 19. 2004–2007., 2013.

Pasticci, M. B., Lapalorcia, L. M., Antonini, G., Mencacci, A., Mazzolla, R., Baldelli, F.: **Community-acquired mastitis due to *Mycobacterium abscessus*: a case report.** J. Med. Case Reports, 3. 130., 2009.

Pate, M., Kušar, D., Zolnir-Dovč, M., Ocepek, M.: **MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium avium* in animals and humans: heterogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* versus homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* strains.** Res. Vet. Sci., 91, 376-381., 2011.

Patsche, C. B., Svensson, E., Wejse, C.: **Disseminated *Mycobacterium celatum* disease with prolonged pulmonary involvement.** Int. J. Infect. Dis., 26. 88–90., 2014.

Pattyn, S. R.: **The problem of cultivation of *Mycobacterium leprae*. A review with criteria for evaluating recent experimental work.** Bull. World Health Organ. 49(4). 403-410., 1973.

Paustian, M. L., Zhu, X., Sreevatsan, S., Robbe-Austerman, S., Kapur, V., Bannantine, J. P.: **Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species.** BMC Genomics 9, 135., 2008.

Pavlik, I., Horvathova, A., Dvorska, L., Bartl, J., Svastova, P., du Maine, R., Rychlik, I.: **Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis***. J. Microbiol. Methods, 38(1-2). 155-167., 1999.

Pettit, A. C., Jahangir, A. A., Wright, P. W.: ***Mycobacterium doricum* osteomyelitis and soft tissue infection**. Emerg. Infect. Dis., 17(11). 2075-2077., 2011.

Picken, R. N., Tsang, A. Y., Yang, H. L.: **Speciation of organisms within the *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* (MAIS) complex based on restriction fragment length polymorphisms**. Mol. Cell. Probes, 2. 289-304., 1988.

Pillars, R. B., Grooms, D. L., Gardiner, J. C., Kaneene, J. B.: **Association between risk-assessment scores and individual-cow Johne's disease-test status over time on seven Michigan, USA dairy herds**. Prev. Vet. Med., 98. 10-18., 2011.

Plain, K. M., Marsh, I. B., Waldron, A. M., Galea, F., Whittington, A-M., Saunders, V. F., Begg, D. J., de Silva, K., Purdie, A. C., Whittington, R. J.: **High-Throughput Direct Fecal PCR Assay for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Sheep and Cattle**. J. Clin. Microbiol., 53(3). 745-757., 2014.

Poh, M. E., Liam, C. K., Ng, K. P., Tan, R.: ***Mycobacterium brisbanense* species nova isolated from a patient with chronic cavitary lung infection**. Chest, 145(4). 858-860., 2014.

Prasanna, A. N., Mehra, S.: **Comparative Phylogenomics of Pathogenic and Non-Pathogenic *Mycobacterium***. PLoS ONE 8(8): e71248. doi:10.1371/journal.pone.0071248, 2013.

Prasanthi, K., Murty, D.S.: **A Brief review on Ecology and Evolution of *Mycobacteria***. *Mycobact. Dis.* 4, 6., 2014.

Primm, T. P., Lucero, C. A., Falkinham, J. O. 3rd.: **Health impacts of environmental mycobacteria**. Clin. Microbiol. Rev., 17(1). 98-106., 2004.

Prissick, F. H., Masson, A. M.: **Cervical lymphadenitis in children caused by chromogenic mycobacteria.** Canadian Medical Association Journal, 75. 798–803., 1956.

Proding, W. M., Brandstätter, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica, T., Boschioli, M. L., Aranaz, A., Nagy, G., Cvetnić, Z., Ocepek, M., Skrypnyk, A., Eler, W., Niemann, S., Pavlik, I., Moser, I.: **Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping.** J. Clin. Microbiol., 43(10). 4984-4992., 2005.

Radomski, N., Thibault, V. C., Karoui, C., de Cruz, K., Cochard, T., Gutiérrez, C., Supply, P., Biet, F., Boschioli, M. L.: **Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins by mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat and IS1311 restriction fragment length polymorphism typing methods.** J. Clin. Microbiol., 48. 1026–1034., 2010.

Rastogi, N., Legrand, E., Sola, C.: **The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis.** Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 20. 21–54., 2001.

Ribón, W.: **Biochemical Isolation and Identification of Mycobacteria, Biochemical Testing.** Szerk.: Jimenez-Lopez, J. C.: ISBN: 978-953-51-0249-6, InTech, 2012. <http://www.intechopen.com/books/biochemical-testing/biochemical-isolation-and-identification-of-mycobacteria>

Richardson, A.: **Bovine mastitis associated with *Mycobacterium smegmatis* and an untypable *Mycobacterium*.** Vet. Rec., 86. 497–498., 1970.

Richter, E., Rüscher-Gerdes, S., Hillemann, D.: **Evaluation of the GenoType *Mycobacterium* Assay for Identification of *Mycobacterial* Species from Cultures.** J. Clin. Microbiol., 44. 1769–1775., 2006.

Rindi, L., Garzelli, C.: **Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*.** Infect. Genet. Evol., 21. 375–383., 2014.

Robbe-Austerman, S., Bravo, D. M., Harris, B.: **Comparison of the MGIT 960, BACTEC 460 TB and solid media for isolation of *Mycobacterium bovis* in United States veterinary specimens.** BMC Vet. Res., 9. 74., 2013.

Röltgen, K., Qi, W., Ruf, M. T., Mensah-Quainoo, E., Pidot, S. J., Seemann, T., Stinear, T. P., Käser, M., Yeboah-Manu, D., Pluschke, G.: **Single nucleotide polymorphism typing of *Mycobacterium ulcerans* reveals focal transmission of buruli ulcer in a highly endemic region of Ghana.** PLoS Negl. Trop. Dis., 4(7). e751. doi: 10.1371/journal.pntd.0000751., 2010.

Roth, A., Reischl, U., Streubel, A., Naumann, L., Kroppenstedt, R. M., Habicht, M., Fischer, M., Mauch, H.: **Novel Diagnostic Algorithm for Identification of *Mycobacteria* Using Genus-Specific Amplification of the 16S-23S rRNA Gene Spacer and Restriction Endonucleases.** J. Clin. Microbiol., 38. 1094–1104., 2000.

Runyon, E. H.: **Anonymous mycobacteria in pulmonary disease.** Med. Clin. North Am. 43(1). 273–290., 1959.

Sahraoui, N., Ballif, M., Zelleg, S., Yousfi, N., Ritter, C., Friedel, U., Amstutz, B., Yala, D., Boulahbal, F., Guetarni, D., Zinsstag, J., Keller, P. M.: ***Mycobacterium algericum* sp. nov., a novel rapidly growing species related to the *Mycobacterium terrae* complex and associated with goat lung lesions.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 61(8). 1870–1874., 2011.

Saxegaard, F., Baess, I.: **Relationship between *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* and “wood pigeon mycobacteria” determinations by DNA-DNA hybridization.** APMIS, 96. 37–42., 1988.

Sawai, T., Inoue, Y., Doi, S., Izumikawa, K., Ohno, H., Yanagihara, K., Higashiyama, Y., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Tashiro, T., Kohno, S.: **A case of *Mycobacterium nonchromogenicum* pulmonary infection showing multiple nodular shadows in an immunocompetent patient.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 54(4). 311–314., 2006.

Semret, M., Alexander, D. C., Turenne, C. Y., de Haas, P., Overduin, P., van Soolingen, D., Cousins, D., Behr, M. A.: **Genomic polymorphisms for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* diagnostics.** J. Clin. Microbiol., 43(8). 3704–3712., 2005.

Semret, M., Turenne, C. Y., de Haas, P., Collins, D. M., Behr, M. A.: 2006. **Differentiation host-associated variants of *Mycobacterium avium* by PCR for detection of large sequence polymorphisms.** J. Clin. Microbiol., 44. 881–887., 2006.

Semret, M., Zhai, G., Mostowy, S., Cleto, C., Alexander, D., Cangelosi, G., Cousins, D., Collins, D. M., van Soolingen, D., Behr, M. A.: **Extensive genomic polymorphism within *Mycobacterium avium***. J. Bacteriol., 186. 6332-6334., 2004.

Shehan, J. M., Sarma, D. P.: ***Mycobacterium mucogenicum*: report of a skin infection associated with etanercept**. Dermatol. Online J., 14(1). 5., 2008.

Shitaye, E. J., Beran, V., Svobodová, J., Morávková, M., Babák, V., Pavlik, I.: **Comparison of the conventional culture, the manual fluorescent MGIT system and the automated fluorescent MGIT 960 culture system for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *avium* in tissues of naturally infected hens**. Folia Microbiol. (Praha), 54(2). 137–141., 2009a.

Shitaye, E. J., Grymova, V., Grym, M., Halouzka, R., Horvathova, A., Moravkova, M., Beran, V., Svobodova, J., Dvorska-Bartosova, L., Pavlik, I.: ***Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in a pet parrot**. Emerg. Infect. Dis., 15(4). 617–619., 2009b.

Simmon, K. E., Brown-Elliott, B. A., Ridge, P. G., Durtschi, J. D., Bridge Mann, L., Slechta, E. S., Steigerwalt, A. G., Moser, B. D., Whitney, A. M., Brown, J. M., Voelkerding, K. V., McGowan, K. L., Reilly, A. F., Kirn, T. J., Butler, W. R., Edelstein, P. H., Wallace Jr., R. J., Petti, C. A.: ***Mycobacterium chelonae-abscessus* complex associated with sinopulmonary disease, Northeastern USA**. Emerg. Infect. Dis., 17(9). 1692–1700., 2011.

Sivakumar, P., Tripathi, B. N., Singh, N., Sharma, A. K.: **Pathology of naturally occurring paratuberculosis in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*)**. Vet. Pathol., 43. 455–462., 2006.

Skerman, V. B. D., McGowan, V., Sneath, P. H. A.: **Approved Lists of Bacterial Names**. Int. J. Syst. Bacteriol., 30. 225–420., 1980.

Slany, M., Svobodova, J., Ettlova, A., Slana, I., Mrlik, V., Pavlik, I.: ***Mycobacterium arupense* among the isolates of non-tuberculous mycobacteria from human, animal and environmental samples**. Veterinarni Med., 55(8). 369–376., 2010.

Smith, J. J., Tow, L. A., Stafford, W., Cary, C., Cowan, D. A.: **Bacterial Diversity in Three Different Antarctic Cold Desert Mineral Soils**. Microbial. Ecology, 51. 413–421., 2006.

Springer, B., Tortoli, E., Richter, I., Grünewald, R., Rüscher-Gerdes, S., Uschmann, K., Suter, F., Collins, M. D., Kroppenstedt, R. M., Böttger, E. C.: ***Mycobacterium conspicuum* sp. nov., a new species isolated from patients with disseminated infections.** J. Clin. Microbiol. 33(11). 2805–2811., 1995.

Stahl, D. A., Urbance, J. W.: **The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria.** J. Bacteriol., 172(1). 116–124., 1990.

Stevenson, K., Alvarez, J., Bakker, D., Biet, F., de Juan, L., Denham, S., Dimareli, Z., Dohmann, K., Gerlach, G. F., Heron, I., Kopečna, M., May, L., Pavlik, I., Sharp, J. M., Thibault, V. C., Willemsen, P., Zadoks, R. N., Greig, A.: **Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants.** BMC Microbiol., 9. 212–224., 2009.

Stragier, P., Ablordey, A., Meyers, W. M., Portaels, F.: **Genotyping *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* by using mycobacterial interspersed repetitive units.** J. Bacteriol., 187(5). 1639–1647., 2005.

Suzuki, K., Akama, T., Kawashima, A., Yoshihara, A., Yotsu, R. R., Ishii, N.: **Current status of leprosy: epidemiology, basic science and clinical perspectives.** J. Dermatol., 39(2). 121–129., 2012.

Syed, S. S., Aderinboye, O., Hanson, K. E., Spitzer, E. D.: **Acute cervical lymphadenitis caused by *Mycobacterium florentinum*.** Emerg. Infect. Dis., 16(9). 1486-1487., 2010.

Szilágyi, M., Körmendy, B., Suri, A., Tuboly, S., Nagy, G.: **Experimental paratuberculosis (Johne's disease)--studies on biochemical parameters in cattle.** Arch. Exp. Veterinarmed., 43(3). 463–470., 1989.

Takewaki, S-I., Okozumi, K., Ishiko, H., Nakahara, K-I., Ohkubo, A., Nagai, R.: **Genus-Specific Polymerase Chain Reaction for the Mycobacterial *dnaJ* Gene and Species-Specific Oligonucleotide Probes.** J. Clin. Microbiol., 31. 446–450., 1993.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S.: **MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0**. *Mol. Biol. Evol.*, 30. 2725–2729., 2013.

Teixeira, L., Avery, R. K., Iseman, M., Arrossi, A. V., Harrington, S., Stephens, K., Winans, C. G.: ***Mycobacterium Hlatzerense* lung infection in a liver transplant recipient: case report and review of the literature**. *Am. J. Transplant.*, 13(8). 2198–2200., 2013.

Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E. C., Bodmer, T.: **Rapid Identification of *Mycobacteria* to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis**. *J. Clin. Microbiol.*, 31. 175–178., 1993.

Thacker, T. C., Robbe-Austerman, S., Harris, B., van Palmer, M., Waters, W. R.: **Isolation of mycobacteria from clinical samples collected in the United States from 2004 to 2011**. *BMC Vet. Res.*, 9. 100., 2013.

Thakur, R., Sarma, S., Goyal, R.: **Comparison of DNA Extraction Protocols for *Mycobacterium Tuberculosis* in Diagnosis of Tuberculous Meningitis by Real-time Polymerase Chain Reaction**. *J. Glob. Infect. Dis.*, 3(4). 353–356., 2011.

Thibault, V. C., Grayon, M., Boschioli, M. L., Hubbans, C., Overduin, P., Stevenson, K., Gutierrez, M. C., Supply, P., Biet, F.: **New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing**. *J. Clin. Microbiol.*, 45. 2404–2410., 2007.

Thibault, V. C., Grayon, M., Boschioli, M. L., Willery, E., Allix-Be'guec, C., Stevenson, K., Biet, F., Supply, P.: **Combined multilocus short-sequence-repeat and mycobacterial interspersed repetitive unit–variablenumber tandem-repeat typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates**. *J. Clin. Microbiol.*, 46. 4091–4094., 2008.

Tohen, C. O.: ***Mycobacterium avium* infections in animals**. *Res. Microbiol.*, 145(3). 173–177., 1994.

Thomson, R., Tolson, C., Sidjabat, H., Huygens, F., Hargreaves, M.: ***Mycobacterium abscessus* isolated from municipal water - a potential source of human infection**. *BMC Infect. Dis.*, 13. 241., 2013.

Thorel, M. F., Huchzermeyer, H., Weiss, R., Fontaine, J. J.: ***Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review.** Vet. Res., 28(5). 439-447., 1997.

Thorel, M. F., Krichevsky, M., Lévy-Frébault, V. V.: **Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov.** Int. J. Syst. Bacteriol., 40. 254–260., 1990.

Tisdall, P. A., Roberts, G. D., Anhalt, J. P.: **Identification of Clinical Isolates of *Mycobacteria* with Gas-Liquid Chromatography Alone.** J. Clin. Microbiol., 10. 506–514., 1979.

Torkko, P., Suomalainen, S., Iivanainen, E., Tortoli, E., Suutari, M., Seppänen, J., Paulin, L., Katila, M. L.: ***Mycobacterium palustre* sp. nov., a potentially pathogenic, slowly growing mycobacterium isolated from clinical and veterinary specimens and from Finnish stream waters.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52(5). 1519–1525., 2002.

Tortoli, E.: **Impact of genotypic studies on Mycobacterial taxonomy: the new Mycobacteria of the 1990s.** Clin. Microbiol. Rev., 16(2). 319–354., 2003.

Tortoli, E., Adriani, B., Baruzzo, S., Degl'Innocenti, R., Galanti, I., Lauria, S., Mariottini, A., Pascarella, M.: **Pulmonary disease due to *Mycobacterium arosiense*, an easily misidentified pathogenic novel mycobacterium.** J. Clin. Microbiol., 47(6). 1947–1949., 2009.

Tortoli, E., Böttger, E. C., Fabio, A., Falsen, E., Gitti, Z., Grottola, A., Klenk, H. P., Mannino, R., Mariottini, A., Messinò, M., Pecorari, M., Rumpianesi, F.: ***Mycobacterium europaeum* sp. nov., a scotochromogenic species related to the *Mycobacterium simiae* complex.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 61(7). 1606–1611., 2011.

Tortoli, E., Cichero, P., Piersimoni, C., Simonetti, M. T., Gesu, G., Nista, D.: **Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study.** J. Clin. Microbiol., 37(11). 3578–3582., 1999.

Tortoli, E., Gitti, Z., Klenk, H. P., Lauria, S., Mannino, R., Mantegani, P., Mariottini, A., Neonakis, I.: **Survey of 150 strains belonging to the *Mycobacterium terrae* complex and**

description of *Mycobacterium engbaekii* sp. nov., *Mycobacterium heraklionense* sp. nov. and *Mycobacterium longobardum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 63. 401–411., 2013.

Tortoli, E., Mariottini, A., Mazzarelli, G.: **Evaluation of INNO-LIPA MYCOBACTERIA v2: Improved Reverse Hybridization Multiple DNA Probe Assay for Mycobacterial Identification.** J. Clin. Microbiol., 41. 4418–4420., 2003.

Tortoli, E., Nanetti, A., Piersimoni, C., Cichero, P., Farina, C., Mucignat, G., Scarparo, C., Bartolini, L., Valentini, R., Nista, D., Gesu, G., Passerini Tosi, C., Crovatto, M., Brusarosco, G.: **Performance Assessment of New Multiplex Probe Assay for Identification of *Mycobacteria*.** J. Clin. Microbiol., 39. 1079–1084., 2001.

Tortoli, E., Pecorari, M., Fabio, G., Messino, M., Fabio, A.: **Commercial DNA Probes for Mycobacteria Incorrectly Identify a Number of Less Frequently Encountered Species.** J. Clin. Microbiol., 48. 307–310., 2010.

Tortoli, E., Rindi, L., Garcia, M. J., Chiaradonna, P., Dei, R., Garzelli, C., Kroppenstedt, R. M., Lari, N., Mattei, R., Mariottini, A., Mazzarelli, G., Murcia, M. I., Nanetti, A., Piccoli, P., Scarparo, C.: **Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54. 1277–1285., 2004.

Tortoli, E., Simonetti, M. T.: **Isolation of *Mycobacterium shimoidei* from a patient with cavitory pulmonary disease.** J. Clin. Microbiol., 29(8). 1754–1756., 1991.

Tran, Q.T., Han, X.Y.: **Subspecies identification and significance of 257 clinical strains of *Mycobacterium avium*.** J. Clin. Microbiol., 52. 1201–1206., 2014.

Trott, K. A., Stacy, B. A., Lifland, B. D., Diggs, H. E., Harland, R. M., Khokha, M. K., Grammer, T. C., Parker, J. M.: **Characterization of a *Mycobacterium ulcerans*-like infection in a colony of African tropical clawed frogs (*Xenopus tropicalis*).** Comp. Med., 54(3), 309–317., 2004.

Tsukamura, M.: **Adansonian classification of mycobacteria.** J. Gen. Microbiol., 45(2). 253–273., 1966.

Tsukamura, M.: ***Mycobacterium chitae*: a new species**. Japan J. Microbiol., 11. 43–47., 1967.

Tsukamura, M.: ***Mycobacterium shimoidei* sp. Nov., nom. rev., a Lung Pathogen**. Int. J. Syst. Bacteriol., 32(1). 67–69., 1982

Tsukamura, M., Toyama, H., Mizunu, S.: ***Mycobacterium parafortuitum* (a new species)**. Igaku To Seibutsugaku, 70(4). 232–235., 1966.

Tsukamura, M., van der Meulen, H. J., Grabow, W. O. K.: **Numerical taxonomy of rapidly growing, scotochromogenic *Mycobacteria* of the *Mycobacterium parafortuitum* complex: *Mycobacterium austroafricanum* sp. nov. and *Mycobacterium diernhoferi* sp. nov., nom. rev.** Int. J. Syst. Bacteriol., 33(3). 460–469., 1983.

Tuboly, S.: **Studies on the antigenic structure of mycobacteria. I. Comparison of the antigenic structure of pathogenic and saprophytic mycobacteria**. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 12(3). 233–240., 1965.

Tuboly, S.: **Studies on the antigenic structure of mycobacteria. II. Antigenic structure and lipid fractions of *Mycobacterium avium* and avium-like strains**. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 14(4). 317–322., 1967.

Tuboly, S.: **The lipid composition of pathogenic and saprophytic mycobacteria**. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 15(3). 207–212., 1968.

Tuboly, S.: **Avian immune response to *Mycobacterium avium* strains of different virulence**. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 27(3). 245–252., 1979.

Tuboly, S., Kovács, Á., Lami, E., Nagy, Gy.: **Az ember Crohn- és a szarvasmarha Johnnebetegsége (paratuberculosis) közötti összefüggések**. MÁL, 2. 106–112., 2005.

Tuboly, S., Szabó, I.: **Züchtung von *Mycobacterium vaccae* aus dem Rind**. Acta Vet. Acad. Scient. Hung. Tomus, 17. 149–151., 1967.

Turenne, C. Y., Collins, D. M., Alexander, D. C., Behr, M. A.: ***Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic**

clones of a much broader group of *M. avium* organisms. J. Bacteriol. 190. 2479–2487., 2008.

Turenne, C. Y., Semret, M., Cousins, D., Collins, D. M., Behr, M. A.: **Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex.** J. Clin. Microbiol., 44. 433–440., 2006.

Turenne, C. Y., Thibert, L., Williams, K., Burdz, T. V., Cook, V. J., Wolfe, J. N., Cockcroft, D. W., Kabani, A.: ***Mycobacterium saskatchewanense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic species from human clinical isolates related to *Mycobacterium interjectum* and Accuprobe-positive for *Mycobacterium avium* complex.** Int. J. Syst., Evol., Microbiol., 54(3). 659–667., 2004.

Turenne, C. Y., Tschetter, L., Wolfe, J., Kabani, A.: **Necessity of Quality-Controlled 16S rRNA Gene Sequence Databases: Identifying Nontuberculous *Mycobacterium* Species.** J. Clin. Microbiol., 39. 3637–3648., 2001.

Turenne, C. Y., Wallace, R. Jr., Behr, M. A.: ***Mycobacterium avium* in the postgenomic era.** Clin. Microbiol. Rev., 20. 205–229., 2007.

Twort, F. W., Ingram, G. L. Y.: **A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritis chronicae pseudotuberculosis bovis* Johne and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis of bovines.** Vet. J., 68. 353–365., 1912.

van Hulzen, K. J. E., Heuven, H. C. M., Nielen, M., Hoeboer, J., Santema, W. J., Koets, A. P.: **Different *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* MIRU-VNTR patterns coexist within cattle herds.** Vet. Microbiol., 148. 419–424., 2011.

van Ingen, J., Al-Hajoj, S. A., Boeree, M., Al-Rabiah, F., Enaimi, M., de Zwaan, R., Tortoli, E., Dekhuijzen, R., van Soolingen, D.: ***Mycobacterium riyadhense* sp. nov., a non-tuberculous species identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex by a commercial line-probe assay.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 59(5). 1049–1053., 2009a.

van Ingen, J., Boeree, M. J., Kösters, K., Wieland, A., Tortoli, E., Dekhuijzen, P. N. R., van Soolingen, D.: **Proposal to elevate *Mycobacterium avium* complex ITS sequevar MAC-Q to *Mycobacterium vulneris* sp. nov.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 59. 2277–2282., 2009b.

van Ingen, J., de Zwaan, R., Enaimi, M., Dekhuijzen, P. N., Boeree, M. J., van Soolingen, D.: **Re-analysis of 178 previously unidentifiable *Mycobacterium* isolates in the Netherlands in 1999-2007.** Clin. Microbiol. And Inf., 16. 1470–1474., 2010.

van Ingen J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M. J., Simeone, R., Brosch, R., van Soolingen, D.: **Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies.** Emerg. Infect. Dis., 18. 653–655., 2012.

van Soolingen, D., Bauer, J., Ritacco, V., Leão, S. C., Pavlik, I., Vincent, V., Rastogi, N., Gori, A., Bodmer, T., Garzelli, C., Garcia, M. J.: **IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization.** J. Clin. Microbiol., 36. 3051–3054., 1998.

van Soolingen, D., Hermans, P. W., de Haas, P. E., Soll, D. R., van Embden, J. D.: **Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis.** J. Clin. Microbiol., 29(11). 2578–2586., 1991.

van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P. E., Hermans, P. W., Koedam, M. A., Teppema, K. S., Brennan, P. J., Besra, G. S., Portaels, F., Top J., Schouls, L. M., van Embden, J. D.: **A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa.** Int. J. Syst. Bacteriol., 47. 1236–1245., 1997.

Vasireddy, R., Vasireddy, S., Brown-Elliott, B. A., Wengenack, N. L., Eke, U. A., Benwill, J. L., Turenne, C., Wallace, R. J. Jr.: ***Mycobacterium arupense*, *Mycobacterium heraklionense*, and a Newly Proposed Species, "*Mycobacterium virginense*" sp. nov, but not *Mycobacterium nonchromogenicum*, as Species of the *Mycobacterium terrae* Complex Causing Tenosynovitis/Osteomyelitis.** J. Clin. Microbiol., 54(5). 1340–1351., 2016.

Vordermeier, H. M., Brown, J., Cockle, P. J., Franken, W. P. J., Arend, S. M., Ottenhoff, T. H. M., Jahans, K., Glyn Hewinson, R.: **Assessment of Cross-Reactivity between *Mycobacterium bovis* and *M. kansasii* ESAT-6 and CFP-10 at the T-Cell Epitope Level.** Clin. Vaccine Immunology, 14. 1203–1209., 2007.

Waters, W. R., Palmer, M. V., Thacker, T. C., Payeur, J. B., Harris, N. B., Minion, F. C., Greenwald, R., Esfandiari, J., Andersen, P., McNair, J., Pollock, J. M., Lyashchenko, K. P.: **Immune Responses to Defined Antigens of *Mycobacterium bovis* in Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium kansasii***. Clin. Vaccine Immunology, 13. 611–619., 2006.

Wayne, L. G., Sramek, H. A.: **Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases**. Clin. Microbiol. Rev., 5. 1–25., 1992.

Whittington, R. J., Marsh, I., Choy, E., Cousins, D.: **Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species**. Mol. Cell. Probes, 12. 349–358., 1998.

Whittington, R. J., Marshall, D. J., Nicholls, P. J., Marsh, I. B., Reddacliff, L. A.: **Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment**. Appl. Environ. Microbiol., 70. 2989–3004., 2004.

Wilton, S., Cousins, D.: **Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA** Whittington, R. J., Marshall, D. J., Nicholls, P. J., Marsh, I. B., Reddacliff, L. A.: **Survival and amplification in a single tube**. Genome Res., 1. 269–273., 1992.

Wolfe, J., Turenne, C., Alfa, M., Harding, G., Thibert, L., Kabani, A.: ***Mycobacterium branderi* from both a hand infection and a case of pulmonary disease**. J. Clin. Microbiol., 38(10). 3896–3899., 2000.

Zanoni, R.G., Florio, D., Fioravanti, M.L., Rossi, M., Prearo, M.: **Occurrence of *Mycobacterium spp.* In ornamental fish in Italy**. J. of Fish Dis., 31. 433–441., 2008.

Zeinzinger, J., Pietzka, A. T., Stöger, A., Kornschöber, C., Kunert, R., Allerberger, F., Mach, R., Ruppitsch, W.: **One-step triplex high-resolution melting analysis for rapid identification and simultaneous subtyping of frequently isolated *Salmonella* serovars**. Appl. Environ. Microbiol., 78. 3352–3360., 2012.

Zelazny, A. M., Calhoun, L. B., Li, L., Yvonne, R. S., Fischer, S. H.: **Identification of *Mycobacterium* Species by *secA1* Sequences.** J. Clin. Microbiol., 43. 1051–1058., 2005.

Zerihun, M. A., Nilsen, H., Hodneland, S., Colquhoun, D. J.: ***Mycobacterium salmoniphilum* infection in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L.** J. Fish Dis., 34(10). 769–781., 2011.

Zhang, D.F., Ji, C., Zhang, X.J., Li, T.T., Li, A.H., Gong, X.N.: **Mixed mycobacterial infections in farmed sturgeons.** Aquaculture Res., 46(8). 1914–1923., 2015.

Zhang, Z-Y., Sun, Z-Q., Wang, Z-L., Wen, Z-L., Sun, Q-W., Zhu, Z-Q., Song, Y-Z., Zhao, J-W., Wang, H-H., Zhang, S-L., Gui, X-K.: **Complete genome of a novel clinical isolated non-tuberculous *Mycobacterium* strain JDM601.** J. Bacteriol., 193(16). 4300–4301., 2011.

Zhang, Z-Y., Sun, Z-Q., Wang, Z-L., Hu, H-R., Wen, Z-L., Song, Y-Z., Zhao, J-W., Wang, H-H., Guo, X-K., Zhang, S-L.: **Identification and pathogenicity analysis of a novel non-tuberculous mycobacterium clinical isolate with nine-antibiotic resistance.** Clin. Microbiol. Infect., 19. 91–96., 2013.

Zlojtro, M., Jankovic, M., Samarzija, M., Zmak, L., Jankovic, V. K., Obrovac, M., Zlojtro, I., Jakopovic, M.: **Nosocomial pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae* associated with a hospital's water supply contamination: a case series of 135 patients.** J. Water Health., 13(1). 125–130., 2015.

Zolg, J. W., Philippi-Schulz, S.: **The Superoxide Dismutase Gene, a Target for Detection and Identification of *Mycobacteria* by PCR.** J. Clin. Microbiol., 32. 2801–2812., 1994.

10. A doktori kutatás eredményeinek közlései

A doktori kutatás témájához kapcsolódó, lektorált, impakt faktoral bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk:

Jánosi, Sz., Rónai, Zs., Dán, Á., Glávits, R., Barta, E.: „Egzotikus” kórokozók okozta tőgygyulladások Magyarországon: *Prototheca*, gombák, *Corynebacteriumok* és *Mycobacteriumok*, MÁL, 134: 15–20, 2012. IF(2012): 0,146

Bende, B., Jakab, Cs., Balka, Gy., Rónai, Zs., Jánosi, Sz., Vajdovich, P., Biksi, I.: Szisztémás *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* fertőzés törpe schnauzerben, MÁL, 135: 138–148, 2013. IF(2013): 0,185

Ács, K., Rónai, Zs., Nagy, G., Cshivincsik, Á., Sugár, L., Jánosi, Sz.: *Mycobacterium caprae* és *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes* társfertőzés okozta tályogképződés dámszarvas (*Dama dama*) májában és májkapui nyirokcsomóiban – Esetismertetés, MÁL, 136: 618–621, 2014. IF(2014): 0,185

Cshivincsik, Á., Rónai, Zs., Nagy, G., Varga, Gy., Jánosi, Sz.: Új szemléletmód a szarvasmarha-gümőkór mint széles gazdaspektrumú fertőző betegség járványtanában, MÁL, 136: 631–639, 2014. IF(2014): 0,185

Rónai, Z., Cshivincsik, Á., Gyuranecz, M., Kreizinger, Z., Dán, Á., Jánosi, S.: Molecular analysis and MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from various sources, J. Appl. Microbiol., 118(2): 275–283, 2015. IF(2014*): 2,479

Rónai, Zs., Cshivincsik, Á., Szőgyényi, Zs., Bacsadi, Á., Dán, Á., Jánosi, Sz.: Adatok a paratuberkulózis hazai előfordulásáról – diagnosztikai fejlesztések és vizsgálati eredmények, 2006–2012, MÁL, 137: 211–218, 2015. IF(2015): 0,212

Rónai, Z., Cshivincsik, Á., Dán, Á.: Molecular identification of *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* by duplex high-resolution melt analysis and subspecies-specific real-time PCR, J. Clin. Microbiol., 53(5): 1582–1587, 2015. IF(2014*): 3,993

Rónai, Zs., Csivincsik, Á., Gyuris, É., Rigó, D., Dán, Á.: ***Mycobacterium avium* subspecies *avium*, „*hominissuis*” és *silvaticum* alfajok jelentősége és magyarországi előfordulása**, MÁL, 137: 549–556, 2015. IF(2015): 0,212

Rónai, Z., Csivincsik, Á., Dán, Á., Gyuranecz, M.: **Molecular analysis and MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, '*hominissuis*' and *silvaticum* strains of veterinary origin**, Infect. Genet. Evol., 7(40): 192–199, 2016. IF(2014*): 3,015

Rónai, Z., Eszterbauer, E., Csivincsik, Á., Guti, Cs., Dencső, L., Jánosi, Sz., Dán, Á.: **Detection of wide genetic diversity and several novel strains among non-*avium* non-tuberculous *Mycobacteria* isolated from farmed and wild animals in Hungary**, J. Appl. Microbiol., 121(1): 41–54, 2016. IF(2014*): 2,479

Csivincsik, Á., Rónai, Zs., Nagy, G., Nagy, E., Sugár, L.: **A vadállományban előforduló szarvasmarha-gümőkór jelentette járványtani kockázat kezelése igazgatási eszközökkel**, MÁL, 138: 209–217, 2016. IF(2015*): 0,212

Csivincsik, Á., Rónai, Z., Nagy, G., Svéda, G., Halász, T.: **Surveillance of *Mycobacterium caprae* infection in a wild boar (*Sus scrofa*) population in south western Hungary**, Vet. Arhiv, 86: 767–775, 2016. IF(2015*): 0,321

Lektorált, impakt faktorral nem bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk:

Csivincsik, Á., Rónai, Zs., Szabó, J., Lövey, L., Jánosi, Sz.: **Environmental epidemiology of bovine tuberculosis in pastured cattle and deer herds**, <https://www.landwirtschaft.sachsen.de/landwirtschaft>

Eszterbauer, E., Rónai, Zs., Marton, Sz., Ursu, K., Baska, F., Láng, M.: ***Mycobacterium* fajok terjedése kereskedelmi forgalomban kapható fagyasztott haleleségek útján**, Halászatfejlesztés, 34: 71–77, 2012.

Csivincsik, Á., Rónai, Z., Nagy, G.: **Post mortem examination of submandibular lymph node in wild boars (*Sus scrofa*) as a beneficial part of bovine tuberculosis surveillance systems**, Acta Agraria Kaposváriensis, 19: 8–12, 2015.

A doktori kutatás témájához kapcsolódó konferencia prezentációk, szakfolyóiratokban megjelent konferencia összefoglalók:

Jánosi, Sz., Dencső, L., Dán, Á., Rónai, Zs.: ***Mycobacterium caprae* hazai előfordulása 2006-ban és 2007-ben**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2008.

Jánosi, Sz., Rónai, Zs., Dán, Á., Dencső, L.: **Atípusos mycobacteriumok előfordulása szarvasmarha szervmintákban és telepi környezetben**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2008.

Csivincsik, Á., Rónai, Zs., Jánosi, Sz., Szabó, J.: **A vaddisznó fertőzésfenntartó szerepe a szarvasmarha-gümőkór járványtanában a Zselicben**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2009.

Rónai, Zs., Csivincsik, Á., Dán, Á., Dencső, L., Jánosi, Sz.: **Újabb adatok a „paraallergiás” reakciókról, különös tekintettel a hazai szarvasmarha-állományok paratuberculosisára, valamint atípusos *Mycobacterium* fertőzéseire**, Magyar Buiatrikusok Társaságának XIX. Nemzetközi Kongresszusa – előadás, 2009.

Jánosi, Sz., Csivincsik, Á., Rónai, Zs., Aranaz, A., Rodriguez, S., de Juan, L., Pálfalvi, A.: **Tuberculosis szarvasmarhában és más állatfajokban Magyarországon: aktualitások és humán-egészségügyi kockázatok**, Szent-Iványi – Binder napok, Rudnai-Kemenes Tudományos ülés – előadás, 2009.

Rónai, Zs., Dán, Á., Dencső, L., Jánosi, Sz.: **A hazai szarvasmarha-állományok atípusos *Mycobacterium* fertőzései, a diagnosztika nehézségei**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2010.

Rigó, D., Rónai, Zs., Erdélyi, K.: **Egzotikus madarak kórbonctani labordiagnosztikája**, Magyar Vad- és Állatkerti Állatorvosok Társaságának és a Fővárosi Állat- és Növénykert közös konferenciája – előadás, 2010.

Rónai, Zs., Csivincsik, Á., Dán, Á., Jánosi, Sz.: **Non-tuberculous *Mycobacteria* in animals in Hungary**, 31th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology – poszter, 2010.

Csivincsik, Á., Nemes, Cs., Rónai, Zs., Szabó, J., Jánosi, Sz.: **Gümőkórra gyanút keltő elváltozások előfordulási aránya vaddisznókban a 2008-2010. közötti időszakban, a Zselicben**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2011.

Rónai, Zs., Lami, E., Csivincsik, Á., Stollár, K., Dénes, B., Dán, Á., Jánosi, Sz.: **A paratuberculosis fertőzöttség kimutatására végzett vizsgálatok tapasztalatai**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2011.

Jánosi, Sz., Rónai, Zs., Dán, Á., Glávits, R., Barta, E.: **Egzotikus kórokozók okozta tüdőgyulladások Magyarországon: *Prototheca*, gombák, *Corynebacteriumok* és *Mycobacteriumok***, Magyar Buiatrikus Társaság 21. Nemzetközi Kongresszusa – előadás, 2011.

Rónai, Zs., Csivincsik, Á., Dán, Á., Jánosi, Sz.: **Molecular identification of Hungarian *Mycobacterium Avium* Complex isolates of animal origin**, 32th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology – poszter, 2011.

Eszterbauer, E., Rónai, Zs., Marton, Sz., Ursu, K., Baska, F., Láng, M.: **Dissemination of *Mycobacterium spp.* via commercial fish food: *Mycobacterium chelonae* infects Silver carp**, European Association of Fish Pathologists 15th Conference – poszter, 2011.

Rónai, Zs., Dán, Á., Dencső, L., Csivincsik, Á., Jánosi, Sz.: **Molecular Methods for the Identification of *Mycobacterium* Isolates with Animal Origin**, Magyar Mikrobiológiai Társaság 16. Nemzetközi Kongresszusa – poszter, 2011.

Eszterbauer, E., Rónai, Zs., Marton, Sz., Ursu, K., Baska, F., Láng, M.: ***Mycobacterium* fajok terjedése kereskedelmi forgalomban kapható fagyasztott haleleségek útján**, Halászati Tudományos Tanácskozás, Haki napok – poszter, 2011.

Csivincsik, Á., Nagy, G., Svéda, G., Rónai, Zs., Jánosi, Sz.: **Gümőkórra gyanút keltő kórbonctani elváltozások vaddisznó-populáción belüli előfordulási arányával összefüggő kockázati tényezők elemzése**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2012.

Jánosi, Sz., Rónai, Zs., Barta, E., Dénes, B., Lami, E., Dán, Á., Szeredi, L., Erdélyi, K., Gyuranecz, M., Makrai, L., Csivincsik, Á.: **A sertés brucellózis és gümőkór aktuális kérdései**, Köves napok – előadás, 2012.

Jánosi, Sz., Csivincsik, Á., Rónai, Zs., Rodriguez, S., de Juan, L., Aranaz, A.: **Tuberculosis and other mycobacterial infections of wildlife in Hungary**, 9th Biennial Conference of the European Wildlife Disease Association – poszter, 2012.

Csivincsik, Á., Nagy, G., Balog, T., Varga, Gy., Rónai, Zs., Jánosi, Sz.: **A populációbiológiai változások és a gümőkór kórbonctani prevalenciájának összefüggései vaddisznóban**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2014.

Rónai, Zs., Dán, Á., Csivincsik, Á., Gyuranecz, M.: **Comparative MIRU-VNTR analysis of *Mycobacterium avium* subspecies isolates of veterinary origin**, Magyar Mikrobiológiai Társaság 17. Nemzetközi Kongresszusa – poszter, 2015.

Rónai, Zs., Csivincsik, Á., Gyuranecz, M., Kreizinger, Zs., Szőgyényi, Zs., Dán, Á., Jánosi, Sz.: ***Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* törzsek hazai elterjedtsége és MIRU-VNTR elemzése**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2015.

Csivincsik, Á., Rónai, Zs., Nagy, G.: **"A szarvas az más" - állathigiéniai kihívások és lehetséges megoldásuk az alternatív gazdasági állatfajok tartása során**, Magyar Buiatrikus Társaság 26. Nemzetközi Kongresszusa: In Memoriam Kovács Ferenc Nemzetközi Állatorvos és Állattenyésztő Kongresszus. 375 p – 239–242., 2016.

Csivincsik, Á., Rónai, Zs., Nagy, G.: **One Health approach in free-ranging systems – bovine tuberculosis as a model**, 24th Int. Symp. "Animal Science Days". Ptuj, Szlovénia, Acta Agriculturae Slovenica Supplement 5: 28–30., 2016.

Csivincsik, Á., Rónai, Zs., Nagy, G.: **Potential target species for surveillance on a bovine tuberculosis endemic area**, VII International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2016". Jahorina, Bosznia-Hercegovina, Book of abstracts. 1226 p – 972., 2016.

11. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények

Rudas, P., Rónai, Z., Bartha, T.: **Thyroid hormone metabolism in the brain of domestic animals**, *Domest. Anim. Endocrin.*, 29(1): 88–96, 2005. IF(2005): 1,559

Zsarnovszky, A., Földvári, E.G., Rónai, Z., Bartha, T., Frenyó, L.V.: **Oestrogens in the mammalian brain: From conception to adulthood - A review**, *Acta Vet. Hung.* 55(3): 333-347, 2007. IF(2007): 0,474

Győrffy, A., Rónai, Zs., Áprily, Sz., Zsarnovszky, A., Frenyó, V.L., Bogenfürst, F., Rudas, P., Bartha, T.: **A hízottmáj-termelés metabolikus és hormonális hátterének vizsgálata máj- és húshasznosítású lúdhibridekben**, *MÁL* 130: 156–164, 2008. IF(2008): 0,088

Gyuranecz, M., Szeredi, L., Rónai, Z., Dénes, B., Dencső, L., Dán, Á., Pálmai, N., Hauser, Z., Lami, E., Makrai, L., Erdélyi, K., Jánosi, S.: **Detection of *Brucella canis*-induced reproductive diseases in a kennel**, *J. Vet. Diagn. Invest.* 23(1): 143–147, 2011. IF(2011): 1,214

Gyuranecz, M., Hauser, Zs., Dénes, B., Szeredi, L., Rónai, Zs., Bozi, R., Makrai, L., Magyar, T., Jánosi, Sz.: **A kutyák *Brucella canis* okozta megbetegedése Magyarországon**, *MÁL* 133: 471–479, 2011. IF(2011): 0,201

Khayer, B., Wehmann, E., Demeter, Z., Rónai, Zs., Jánosi, Sz., Rusvai, M., Magyar, T.: **Kutya eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek molekuláris vizsgálata**, *MÁL* 133: 594-600, 2011. IF(2011): 0,201

Szeredi, L., Jánosi, Sz., Magyar, T., Sellyei, B., Rónai, Z., Barta, E.: ***Pasteurella aerogenes* okozta vetélés két esete sertésben: patológiai, immunhisztokémiai, bakteriológiai és molekuláris biológiai vizsgálatok**, *MÁL* 133: 214–219, 2011. IF(2011): 0,201

Gyuranecz, M., Kreizinger, Zs., Horváth, G., Rónai, Zs., Dán, Á., Nagy, B., Szeredi, L., Makrai, L., Jánosi, Sz., Hajtós, I., Magyar, T., Bhide, M., Erdélyi, K., Dénes, B.: **Natural IS711 insertion caused Omp31 gene suppression in *Brucella ovis***. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25(2): 234–238, 2013. IF(2013): 1,232

Kreizinger, Z., Foster, J. T., Rónai, Z., Sulyok, K.M., Wehmann, E., Jánosi, S., Gyuranecz, M.: **Genetic relatedness of *Brucella suis* biovar 2 isolates from hares, wild boars and domestic pigs**, Vet. Microbiol. 172: 492–498, 2014. IF(2014): 2,511

Khayer, B., Rónai, Zs., Wehmann, E., Magyar, T.: **Detection of urease-negative *Bordetella bronchiseptica* from the field**, Acta Vet. Hung. 59(3): 289–293, 2011. IF(2011): 0,673

Rónai, Z., Kreizinger, Z., Dán, Á., Drees, K., Foster, J.T., Bányai, K., Marton, S., Szeredi, L., Jánosi, S., Gyuranecz, M.: **First isolation and characterization of *Brucella microti* from wild boar**, BMC Vet. Res. 11: 147–152, 2015. IF(2014*): 1,777

Szeredi, L., Rónai, Zs., Bende, B., Vrabély, T., Sík, N., Bálint, Á.: ***Rhodococcus equi* okozta tályogképződés és vérfertőzés macskában**, MÁL 137: 655–662, 2015. IF(2015): 0,212

Sellyei, B., Rónai, Zs., Jánosi, Sz., Makrai, L.: **Comparative analysis of *Pasteurella multocida* strains from bovine respiratory infections**, Acta Microbiol. Immunol. Hung. 62(4): 453–461, 2015. IF(2014*): 0,778

Kreizinger, Zs., Sulyok, K.M., Makrai, L., Rónai, Zs., Fodor, L., Jánosi, Sz., Gyuranecz, M.: **Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis* strains from Hungary**, Acta Vet. Hung. 64(2): 141–147, 2016. IF(2014*): 0,646

Grózner, D., Kreizinger, Z., Sulyok, K. M., Rónai, Z., Hrivnák, V., Turcsányi, I., Jánosi, S., Gyuranecz, M.: **Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma* sp. 1220 strains isolated from geese in Hungary**, BMC Vet. Res. 12: 176–185, 2016. IF(2014*): 1,777

Szeredi, L., Lipovszky, A. D., Rónai, Zs., Jánosi, Sz.: ***Citrobacter freundii* okozta vérfertőzés újszülött borjában. Esetismertetés**, MÁL 138: 587–592, 2016. IF(2015*): 0,212

Gyuranecz, M., Sulyok, K., Kreizinger, Zs., Wehmann, E., Lysnyansky, I., Bányai, K., Marton, Sz., Jerzsele, Á., Rónai, Zs., Turcsányi, I., Makrai, L., Jánosi, Sz., Nagy, S.: **Mutations Associated with Decreased Susceptibility to Seven Antimicrobial Families in Field and Laboratory-Derived *Mycoplasma bovis* Strains**, Antimicrob. Agents Ch., In press, 2016. IF (2015*): 4,415

A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó konferencia prezentációk, szakfolyóiratokban megjelent konferencia összefoglalók:

Horváth, K., Győrffy, A., Rónai, Zs., Áprily, Sz., Zsarnovszky, A., Somogyi, V., Kiss, D., Frenyó, V.L., Bogenfürst, F., Rudas, P., Bartha, T.: **A hízott libamáj előállítás hormonális hátterének vizsgálata**, In: Tósaki Árpád (szerk.): A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése – poszter, 2008.

Horváth, K., Győrffy, A., Rónai, Zs., Áprily, Sz., Zsarnovszky, A., Somogyi, V., Kiss, D., Frenyó, V.L., Bogenfürst, F., Rudas, P., Bartha, T.: **Hormonal aspects of fatty liver production**, Acta Physiol. Hung. 96(1): 84–85, 2009.

Győrffy, A., Rónai, Zs., Rudas, P.: **New Physiology Laboratory Course: Computer Aided Learning Serves Animal Welfare**, 1st Central and Eastern European Laboratory Animal Conference – előadás, 2009.

Gyuranecz, M., Rónai, Zs., Dénes, B., Dán, Á., Szeredi, L., Pálmai, N., Dencső, L., Hauser, Zs., Lami, E., Makrai, L., Jánosi, Sz.: **Egy kutya brucellózis járvány diagnosztikai vizsgálatának tapasztalatai**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2010.

Khayer, B., Rónai, Zs., Wehmann, E., Magyar, T.: **Ureáz-negatív *Bordetella bronchiseptica* izolátumok jellemzése**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2011.

Gyuranecz, M., Horváth, G., Kreizinger, Zs., Rónai, Zs., Szeredi, L., Jánosi, Sz., Makrai, L., Sárközi, R., Magyar, T., Dán, Á., Hajtós, I., Dénes, B.: **Egy tenyészjuh-állomány *Brucella ovis*-fertőzöttségtől való mentesítési kísérletének tapasztalatai**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2012.

Jánosi, Sz., Samu, P., Barta, E., Rónai, Zs.: **A szarvasmarha tőgygyulladásának költséghatékony gyógykezelése a laboratóriumi mikrobiológiai vizsgálatok eredményeinek felhasználásával**, Magyar Buiatrikus Társaság 22. Nemzetközi Kongresszusa – előadás, 2012.

Valkó, A., Rónai, Zs., Jánosi, Sz.: **Corynebacterinae alrendbe tartozó tőgygyulladást okozó baktériumok diagnosztikai vizsgálatai**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2014.

Kreizinger, Zs., Foster, J.T., Rónai, Zs., Sulyok, K.M., Wehmann, E., Jánosi, Sz., Gyuranecz, M.: **Hazai *Brucella suis* biovar2 törzsek MLVA (Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis) módszeren alapuló filogenetikai és epidemiológiai vizsgálata**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2014.

Pásztor, A., Kreizinger, Zs., Dán, Á., Makrai, L., Rónai, Zs., Birdsell, D., Pearson, T., Sulyok, K.M., Jánosi, Sz., Fodor, L., Keim, P., Gyuranecz, M.: **Hazai *Bacillus anthracis* törzsek genetikai jellemzése**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2015.

Rónai, Zs., Kreizinger, Zs., Dán, Á., Bányai, K., Szeredi, L., Jánosi, Sz., Gyuranecz, M.: ***Brucella microti* első magyarországi izolálása**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2015.

Sulyok, K.M., Rónai, Zs., Nagy, S., Makrai, L., Kecskeméti, T.I., Kovács, P., Jánosi, Sz., Gyuranecz, M.: ***Mycoplasma bovis* törzsek Fluoroquinolon érzékenységeik meghatározása molekuláris biológiai módszerekkel**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2015.

Szeredi, L., Rónai, Zs., Jánosi, Sz., Bálint, Á.: ***Rhodococcus equi* okozta tüdőgyulladás macskában; esetismertetés**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2015.

Kreizinger, Zs., Sulyok, K.M., Makrai, L., Rónai, Zs., Fodor, L., Jánosi, Sz., Gyuranecz, M.: **Hazai *Bacillus anthracis* törzsek antibiotikum érzékenységi profiljának meghatározása**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2016.

Gróznér, D., Kreizinger, Zs., Hrivnák, V., Rónai, Zs., Sulyok, K.M., Kecskeméti, T.I., Jánosi, Sz., Horváth-Papp, I., Thuma, Á., Gyuris, É., Gyuranecz, M.: **Magyarországi *Mycoplasma sp.* 1220 és *M. synoviae* törzsek antibiotikum érzékenységének vizsgálata**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2016.

Sulyok, K.M., Rónai, Zs., Kreizinger, Zs., Nagy, S.Á., Wehmann, E., Marton, Sz., Bányai, K., Makrai, L., Kecskeméti, T.I., Jánosi, Sz., Gyuranecz, M.: **Antibiotikum rezisztencia markerek azonosítása, és kimutatásukra alkalmas molekuláris biológiai rendszerek fejlesztése *Mycoplasma bovis* törzseknél**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2016.

12. Mellékletek

M1. Állategészségügyi szempontból jelentős *Mycobacterium* fajok Magyarországon

faj neve (leírás éve)	állatfaj	első hazai kimutatás éve	kórkép	megjegyzés
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex				
<i>M. bovis</i> (1970)	szarvasmarha	2007	szarvasmarha gümőkór	az 1980-as évek óta csak import esetek fordultak elő
<i>M. caprae</i> (1999)	bivaly dámvad gímszarvas indiai elefánt őz róka sertés szarvasmarha vaddisznó	1997 2007 2006 2006 2010 2010 2006 2006 2006	gümőkór	
<i>M. tuberculosis</i> (1883)	-	-	gümőkór	állatkerti és kedvtelésből tartott állatokban fordulhat elő
<i>Mycobacterium avium</i> complex				
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> (1990)	madarak gímszarvas róka sertés varánusz szarvasmarha vaddisznó	2006 2009 2007 2007 2011 2006 2007	madárgümőkór lokalizált vagy generalizált gócos elváltozások	
<i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i>	madarak gímszarvas kutya muflon sertés szarvasmarha vaddisznó	2008 2007 2011 2013 2007 2006 2007	lokalizált vagy generalizált gócos elváltozások	hivatalosan még nem fogadták el, csak javasolt alfajnév 2002 óta
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (1990)	bivaly gímszarvas juh kecske muflon róka sertés szarvasmarha vaddisznó	2012 2009 2009 2013 2013 2009 2011 2006 2009	paratuberkulózis vagy tünetmentes hordozás	
<i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i> (1990)	borz gímszarvas róka szarvasmarha vaddisznó	2014 2008 2012 2012 2008	lokalizált gócos elváltozások vagy tünetmentes hordozás	
egyéb <i>Mycobacterium</i> fajok				
<i>M. abscessus</i> (1953)	kaméleon tej	2006 2015	izületgyulladás, mastitis	gyorsan növvő
<i>M. arosiense</i> (2008)	vaddisznó	2009	lokalizált gócos elváltozások	lassan növvő
<i>M. arupense</i> (2006)	gímszarvas haleleség szarvasmarha	2007 2010 2007	tünetmentes hordozás	gyorsan növvő
<i>M. bourgelatii</i> (2013)	szarvasmarha vaddisznó	2008 2008	lokalizált gócos elváltozások vagy tünetmentes hordozás	gyorsan növvő
<i>M. chelonae</i> (1923)	hal	2010	halgümőkór	gyorsan növvő
<i>M. chitae</i> (1967)	teve	2009	lokalizált gócos elváltozások	gyorsan növvő
<i>M. europaeum</i> (2011)	szarvasmarha	2006	tünetmentes hordozás	lassan növvő
<i>M. fortuitum</i> (1938)	gímszarvas kutya őz szarvasmarha vaddisznó tej	2008 2013 2009 2006 2006 2008	lokalizált vagy generalizált gócos elváltozások, tünetmentes hordozás, mastitis	gyorsan növvő

<i>M. gordonae</i> (1962)	vaddisznó	2007	lokalizált gócos elváltozások	lassan növény
<i>M. intermedium</i> (1993)	gímszarvas szarvasmarha vaddisznó	2008 2006 2008	lokalizált gócos elváltozások vagy tünetmentes hordozás	lassan növény
<i>M. intracellulare</i> (1965)	szarvasmarha vaddisznó	2010 2012	tünetmentes hordozás	lassan növény
<i>M. kansasii</i> (1955)	őz szarvasmarha	2008 2006	lokalizált gócos elváltozások vagy tünetmentes hordozás	lassan növény
<i>M. llatzerense</i> (2008)	haleleség	2012	-	gyorsan növény
<i>M. malmoense</i> (1977)	szarvasmarha	2008	tünetmentes hordozás	lassan növény
<i>M. nebraskense</i> (2004)	szarvasmarha	2007	tünetmentes hordozás	lassan növény
<i>M. neoaurum</i> (1972)	szarvasmarha	2007	tünetmentes hordozás	gyorsan növény
<i>M. nonchromogenicum</i> (1965)	dámvad gímszarvas haleleség szarvasmarha vaddisznó	2009 2008 2010 2006 2007	lokalizált gócos elváltozások vagy tünetmentes hordozás	lassan növény
<i>M. palustre</i> (2002)	gímszarvas szarvasmarha	2008 2009	tünetmentes hordozás	lassan növény
<i>M. parafortuitum</i> (1965)	gímszarvas	2011	tünetmentes hordozás	gyorsan növény
<i>M. peregrinum</i> (1962)	haleleség szarvasmarha	2010 2010	tünetmentes hordozás	gyorsan növény
<i>M. phlei</i> (1899)	szarvasmarha	2006	tünetmentes hordozás	gyorsan növény
<i>M. saskatchewanense</i> (2004)	vaddisznó	2013	lokalizált gócos elváltozások vagy tünetmentes hordozás	lassan növény
<i>M. scrofulaceum</i> (1956)	szarvasmarha vaddisznó	2010 2008	lokalizált gócos elváltozások vagy tünetmentes hordozás	lassan növény
<i>M. shimoidei</i> (1975)	szarvasmarha	2007	tünetmentes hordozás	lassan növény
"<i>M. sinense</i> JDM601"	dámvad sertés szarvasmarha vaddisznó	2007 2007 2007 2008	lokalizált gócos elváltozások vagy tünetmentes hordozás	lassan növény, javasolt név
<i>M. smegmatis</i> (1889)	szarvasmarha tej	2006 2007	lokalizált gócos elváltozások, tünetmentes hordozás, mastitis	gyorsan növény
<i>M. thermoresistibile</i> (1966)	bivaly róka szarvasmarha	2008 2008 2006	lokalizált gócos elváltozások vagy tünetmentes hordozás	gyorsan növény
<i>M. triviale</i> (1970)	juh	2015	lokalizált gócos elváltozások	lassan növény
<i>M. ulcerans</i> ecovar Liflandii	krokodil	2015	generalizált gócos elváltozások	lassan növény, javasolt név
<i>M. vaccae</i> (1964)	gímszarvas vaddisznó	2007 2011	lokalizált gócos elváltozások vagy tünetmentes hordozás	gyorsan növény

M2. Magyarországon még nem izolált vagy azonosított elfogadott *Mycobacterium* fajok

***Mycobacterium tuberculosis* complex**

M. africanum (1969)
M. microti (1957)
M. pinnipedii (2003)

***Mycobacterium avium* complex**

M. chimaera (2004)
M. colombiense (2006)
M. vulneris (2009)
M. marseillense (2009)
M. timonense (2009)
M. bouchedurhonense (2009)

egyéb *Mycobacterium* fajok

Mycobacterium agri (1981)
Mycobacterium aichiense (1981)
Mycobacterium algericum (2011)
Mycobacterium alsense (2016)
Mycobacterium alvei (1992)
Mycobacterium anyangense (2015)
Mycobacterium arabiense (2013)
Mycobacterium aromaticivorans (2009)
Mycobacterium asiaticum (1971)
Mycobacterium aubagnense (2006)
Mycobacterium aurum (1966)
Mycobacterium austroafricanum (1983)
Mycobacterium bacteremicum (2012)
Mycobacterium boenickei (2004)
Mycobacterium bohemicum (1998)
Mycobacterium botniense (2000)
Mycobacterium branderi (1995)
Mycobacterium brisbanense (2004)
Mycobacterium brumae (1993)
Mycobacterium canariensis (2004)
Mycobacterium celatum (1993)
Mycobacterium celeriflavum (2015)
Mycobacterium chlorophenolicum (1994)
Mycobacterium chubuense (1981)
Mycobacterium conceptionense (2006)
Mycobacterium confluentis (1992)
Mycobacterium conspicuum (1996)
Mycobacterium cookii (1990)
Mycobacterium cosmeticum (2004)
Mycobacterium crocinum (2009)
Mycobacterium diernhoferi (1983)
Mycobacterium doricum (2001)
Mycobacterium duvalii (1971)
Mycobacterium elephantis (2000)
Mycobacterium engbaekii (2013)
Mycobacterium fallax (1983)
Mycobacterium farcinogenes (1973)
Mycobacterium flavescens (1962)
Mycobacterium florentinum (2005)
Mycobacterium fluoranthenvivorans (2006)
Mycobacterium fragae (2013)
Mycobacterium franklinii (2015)
Mycobacterium frederiksbergense (2001)
Mycobacterium gadium (1974)
Mycobacterium gastris (1966)
Mycobacterium genavense (1993)
Mycobacterium gilvum (1971)
Mycobacterium goodii (1999)
Mycobacterium haemophilum (1978)
Mycobacterium hassiacum (1997)
Mycobacterium heckeshornense (2001)
Mycobacterium heidelbergense (1998)
Mycobacterium heraklionense (2013)
Mycobacterium hiberniae (1993)
Mycobacterium hippocampi (2014)
Mycobacterium hodleri (1996)
Mycobacterium holsaticum (2002)
Mycobacterium houstonense (2004)
Mycobacterium immunogenum (2001)
Mycobacterium insubricum (2009)
Mycobacterium interjectum (1995)
Mycobacterium iranicum (2013)
Mycobacterium komossense (1979)
Mycobacterium koreense (2012)
Mycobacterium kubicae (2000)

Mycobacterium kumamotoense (2007)
Mycobacterium kyorinense (2009)
Mycobacterium lacus (2002)
Mycobacterium lentiflavum (1996)
Mycobacterium leprae (1896)
Mycobacterium lepraemurium (1912)
Mycobacterium litorale (2012)
Mycobacterium longobardum (2013)
Mycobacterium madagascariense (1992)
Mycobacterium mageritense (1997)
Mycobacterium mantonii (2009)
Mycobacterium marinum (1926)
Mycobacterium minnesotense (2013)
Mycobacterium monacense (2006)
Mycobacterium montefiorensis (2003)
Mycobacterium morioakaense (1986)
Mycobacterium mucogenicum (1995)
Mycobacterium murale (1999)
Mycobacterium neworleansense (2004)
Mycobacterium noviomagense (2009)
Mycobacterium novocastrense (1997)
Mycobacterium obuense (1981)
Mycobacterium pallens (2009)
Mycobacterium paraense (2015)
Mycobacterium paraffinicum (2010)
Mycobacterium paragordoniae (2014)
Mycobacterium parakoreense (2013)
Mycobacterium parascrofulaceum (2004)
Mycobacterium paraseoulense (2010)
Mycobacterium parmense (2004)
Mycobacterium phocaicum (2006)
Mycobacterium porcinum (1983)
Mycobacterium poriferae (1987)
Mycobacterium pseudoshottsii (2005)
Mycobacterium psychrotolerans (2004)
Mycobacterium pulveris (1983)
Mycobacterium pyrenivorans (2004)
Mycobacterium rhodesiae (1981)
Mycobacterium riyadhense (2009)
Mycobacterium rufum (2009)
Mycobacterium rutilum (2009)
Mycobacterium salmoniphilum (2007)
Mycobacterium sediminis (2013)
Mycobacterium senegalense (1979)
Mycobacterium senuense (2008)
Mycobacterium seoulense (2007)
Mycobacterium septicum (2000)
Mycobacterium setense (2008)
Mycobacterium sherrisii (2011)
Mycobacterium shinjukuense (2011)
Mycobacterium shottsii (2003)
Mycobacterium simiae (1965)
Mycobacterium sphagni (1980)
Mycobacterium stomatepiae (2008)
Mycobacterium szulgai (1972)
Mycobacterium terrae (1966)
Mycobacterium tokaiense (1981)
Mycobacterium triplex (1997)
Mycobacterium tusciae (1999)
Mycobacterium ulcerans (1950)
Mycobacterium vanbaalenii (2002)
Mycobacterium wolinskyi (1999)
Mycobacterium xenopi (1959)
Mycobacterium yongonense (2013)

M3. Használt táptalajok

Összetevők:	LJ	pLJ	H	MA	7H11	J	2MA	TKH	ML	MGIT
	szilárd táptalajok								levestáptalajok	
Bidesztillált víz	600ml	600ml	800ml	900ml	900ml	675ml	900ml	800ml	900ml	BD
Löwenstein Medium Base (Difco – 244420 – 500g BD)	37,2g	37,2g	-	-	-	-	-	-	-	-
Middlebrook 7H9 Broth (Difco – 271310 – 500g BD)	-	-	-	-	-	-	4,7g	-	4,7g	-
Mycobacteria 7H10 agar (Difco – 262710 – 500g BD)	-	-	19g	19g	-	-	-	19g	-	-
Mycobacteria 7H11 agar (Difco – 283810 – 500g BD)	-	-	-	-	21g	21g	-	-	-	-
Noble agar (Difco – 214220 – 500g BD)	-	-	-	-	-	-	15g	-	-	-
BBL Middlebrook OADC Enrichment (BD 212240)	-	-	-	100ml	100ml	100ml	-	-	-	0,5ml
BBL Middlebrook ADC Enrichment (BD 211887)	-	-	-	-	-	-	100ml	-	100ml	-
Mycobactine J (Synbiotics Mycobactine J – 2mg vial) oldat	-	-	2ml	-	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	-
glicerin	-	-	5ml	5ml	5ml	25ml	-	5ml	-	-
Tween-80	-	-	-	-	-	-	0,5ml	-	0,5ml	-
asparagin	-	-	-	-	-	0,3g	-	-	-	-
nátrium-piruvát	-	8g	5g	-	-	-	-	5g	5g	-
Teljes tojás oldat	1000ml	1000ml	-	-	-	-	-	-	-	-
Hígított steril tojássárga emulzió (Biolab EYE81100)	-	-	200ml	-	-	-	-	200ml	-	-
2%-os malachitzöld oldat	-	-	5,1ml	-	-	-	-	5,1ml	-	-
3%-os toluidinkék oldat	-	-	-	-	-	-	-	9,375ml	-	-
Newborn calf serum (Sigma-Aldrich)	-	-	-	-	-	200ml	-	-	-	-
BBL MGIT PANTA Antibiotic Mixture (BD)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1ml
Amfotericin B	-	-	-	-	-	0,01g	-	-	-	-
Trimetoprim	-	-	-	-	-	0,01g	-	-	-	-
Polymixin B	-	-	-	-	-	0,03g	-	-	-	-
végtérfogat	1600ml	1600ml	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml	4,6ml
	növekedési tulajdonságok									
MAP	-	(+)	+++*	-	++	+++**	++	++	++	(+)
MAH	+	++	++	+	+++	++	++	+++	++	+++
MAA	+	+++	++	+	+++	++	++	+++	+++	++
MAS	-	-	-	-	+++	++	+++	+	++	-
egyéb Mycobacteriumok	+++	+	+	++	+++	+	++	++	++	+
M. bovis	+	+++	++	nv	++	nv	+	-	+	+++
M. caprae	+	+++	++	nv	-	nv	+	-	+	+++

Rövidítések: LJ: Löwenstein–Jensen agar, pLJ: piruvátos Löwenstein–Jensen agar, H: Herrold's agar, MA: Middlebrook agar, 7H11: 7H11 agar, J: J agar, 2MA: saját fejlesztésű agar, TKH: toluidinkékes Herrold's agar, ML: Middlebrook leves, MGIT: „BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube” – BBL Mycobacterium növekedési indikátoros cső, *: II-es típusú, **: I és II-es típusú, nv: nem vizsgált

M4. ZN festékoldatok összetétele és készítése

Tömény Ziehl-féle karbolsavas fukszin oldat:

bázikus fukszin (Reanal 10851-0-99-21)	1 g
96%-os alkohol (Reanal 09474-2-22-65)	10 ml
fenol (Reanal 10160-0-08-38)	5 g
steril desztillált víz	100 ml

A bázikus fukszint az etanolban, a fenolt a desztillált vízben feloldjuk, majd a két oldatot összeöntjük. Néhány napig állni hagyjuk, majd szűrőpapíron átszűrjük és csiszolt dugós üvegben tároljuk.

5%-os kénsav oldat

tömény kénsav (Reanal 17769-0-0165)	5 ml
steril desztillált víz	95 ml

Készítéskor a kénsavat adjuk a desztillált vízhez.

3%-os metilénkék oldat

Metilénkék (Sigma-Aldrich 32722-1kg)	3,0 g
steril desztillált víz	100,0 ml

Az oldat hosszú ideig eltartható.

M5. Alkalmazott PCR rendszerek

Összetevők:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	mintánként (µl)																	
Templát DNS	5	2,5	1	5	2,5	5	1	5	5	5	2,5	2,5	1,5	2,5	1,5	2,5	2,5	2,5
Master Mix	20	22,5	24	20	22,5	20	24	45	45	45	22,5	22,5	23,5	22,5	23,5	22,5	22,5	22,5
GoTaq Flexi DNS polimeráz (5 U/µl)	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1	0,1			0,2		0,1		0,1	0,1		0,1	0,1
GoTaq Flexi 5× puffer	5	5	5	5		5	5			10		5		5	5		5	5
MgCl ₂ (25 mM)	2,5	2,5	1,5	1,5		2	1,5			2,5		2		2	2		2	2,5
dNTP (10 mM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
PCR tisztaságú víz	8,1	13,4	13,9	9,9	11,35	10,9	13,9	36,8	36,8	27,3	12,35	12,9	10,35	12,9	14,4	12,35	12,9	12,4
Dream Taq DNS polimeráz (5 U/µl)								0,2	0,2									
Dream Taq 10× puffer								5	5									
Hot Star Taq DNS polimeráz					0,15						0,15		0,15			0,15		
Hot Star Taq 10× puffer					2,5						2,5		2,5			2,5		
Solution Q					5						5		5			5		
Primerék (10 pmol/µl)	3,8	1	3	3	3	1,5	6	2	2	4	2	2	5	2	1,5	2	2	2
PCR kondíciók																		
Első denaturáció (°C)	95	94	94	95	95	95	94	95	95	94	95	95	95	95	95	95	95	95
Első denaturáció (t)	10 m	5 m	5 m	10 m	15 m	3 m	5 m	10 m	10 m	4 m	15 m	3 m	15 m	3 m	3 m	15 m	3 m	5 m
Ciklusszám	30	30	35	32	35	40	35	40	40	35	40	30	35	35	30	40	30	35
Denaturáció (°C)	95	94	94	95	95	95	94	95	95	94	95	95	95	95	95	95	95	98
Denaturáció (t)	30 s	30 s	30 s	30 s	45 s	30 s	30 s	30 s	1 m	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s
Annealing (°C)	65	58	59	65	55	60	59	55	55	58	53	60	58	53	62	53	60	68
Annealing (t)	3 m	45 s	30 s	40 s	45 s	30 s	30 s	2 m	2 m	30 s	1 m	1 m	1 m	1 m	1 m	1 m	1 m	45 s
Extenzió (°C)	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72
Extenzió (t)	3 m	2 m	90 s	3 m	1 m	30 s	90 s	2 m	2 m	1 m	2 m	2 m	2 m	2 m	2 m	2 m	2 m	1 m
Végső extenzió (°C)	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72
Végső extenzió (t)	10 m	10 m	5 m	10 m	10 m	7 m	5 m	10 m	10 m	5 m	10 m	10 m	10 m	10 m	10 m	10 m	10 m	7 m

1: Multiplex Mycobacterium PCR, 2: IS900 PCR, 3: F57 PCR, 4: IS901/IS1245 PCR, 5: LSP^A17 PCR, 6: DMC PCR, 7: MAP/MAV PCR, 8: 16S rDNS PCR, 9: *tuf* gén PCR, 10: *rpoB* gén PCR, 11: MIRU1 PCR, 12: MIRU2 PCR, 13: MIRU3 PCR, 14: MIRU4 PCR, 15: VNTR25 PCR, 16: VNTR32 PCR, 17: VNTR259 PCR, 18: MATR9 PCR, m: min (perc), s: sec (másodperc)

M6. Használt primerek

név	Szekvencia 5'-3'	Primer hossza (bp)	PCR termék hossza (bp)	PCR rendszer	Mennyiség (µl/reakció)
Mycgen-F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	20	1030	1	0,4
Mycgen-R	TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA	20		1	0,4
MycAV-R	ACC AGA AGA CAT GCG TCT TG	20	180	1	1
MycINT-F	CCT TTA GGC GCA TGT CTT TA	20	850	1	1
TB1-F	GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA	20	372	1	0,5
TB1-R	AGC ACG CTG TCA ATC ATG TA	20		1	0,5
IS900F	CCT TTC TTG AAG GGT GTT CG	20	662	2	0,5
IS900R	CCA CCA GAT CGG AAC GTC	18		2	0,5
F57-F	CCC GAT AGC TTT CCT CTC CT	20	609	3	1,5
F57-R	GAT CTC AGA CAG TGG CAG GTG	21		3	1,5
IS901F	GCA ACG GTT GTT GCT TGA AA	20	1108	4	1
IS901R	TGA TAC GGC CGG AAT CGC GT	20		4	1
IS1245F	GCC GCC GAA ACG ATC TAC	18	427	4	0,5
IS1245R	AGG TGG CGT CGA GGA AGA	18		4	0,5
LSPA17-F	CTG GAG TAC TTC CAC GAC CA	20		5	1
LSPA17-int	GTC CAG GAA GAA CCG GAA C	19	202	5	1
LSPA17-R	GCA CTC GAA TTC ACG AAA TG	20	398	5	1
DMC529-F1	TTG ACA ACG TCA TTG AGA ATC C	22	162	6	0,5
DMC531-F2	TCT TAT CGG ACT TCT TCT GGC	21	310	6	0,5
DMC533-R	CGG ATT GAC CTG CGT TTC AC	20		6	0,5
MAP3584-F	GCG TTG GAT CCT TTC GTG	18	633	7	1,5
MAP3584-R	GTC CAG GCC GTC GAG ATA G	19		7	1,5
MAV4125-F	TCA CCT GTC CAG ATC AAC GA	20	303	7	1,5
MAV4125-R	CGG GAT CAG CTT GAG ATA CC	20		7	1,5
27-F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	20		8	1
536-F	GCC AGC AGC CGC GGT AAT AC	20		8	-
1492-R	ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT	21		8	1
T1	CAC GCC GAC TAC ATC AAG AA	20	652	9	1
T2	GAA CTG CGG ACG GTA GTT GT	20		9	1
Myco-F	GGC AAG GTC ACC CCG AAG GG	20	764	10	2
Myco-R	AGC GGC TGC TGG GTG ATC ATC	21		10	2
MIRU1-F	CGC GGA CTT GAT GGT CTC	18	változó	11	1
MIRU1-R	CCG TTG TCC AGG TGG AGT	18		11	1
MIRU2-F	GAA CGA AGA TCC TGG GAC TG	20	változó	12	1
MIRU2-R	CGA CGA CGA ACA CCT CAA C	19		12	1
MIRU3-F	ACA TTC ACC CTG TCC ATT CC	20	változó	13	2,5
MIRU3-R	CCT CCT TAC GGA GCA GGA A	19		13	2,5
MIRU4-F	CGT TCA GCC TGT GCA TGG	18	változó	14	1
MIRU4-R	CAA GTC GTC ACG GGC AAC	18		14	1
VNTR25-F	GTC AAG GGA TCG GCG AGG	18	változó	15	0,75
VNTR25-R	TGG ACT TGA GCA CGG TCA T	19		15	0,75
VNTR32-F	CCA CAG GGT TTT TGG TGA AG	20	változó	16	1
VNTR32-R	GGA AAT CCA ACA GCA AGG AC	20		16	1
VNTR259-F	GGG TGT GGA GCT ACG ACT TC	20	változó	17	1
VNTR259-R	GAG CTG CTT GAC CAG GTG AT	20		17	1
MATR9-F	CTG TTG GAG CGC AGC CGT TT	20	változó	18	1
MATR9-R	ACC CAG TCG TCG ACG GTG TT	20		18	1

1: Multiplex Mycobacterium PCR, 2: IS900 PCR, 3: F57 PCR, 4: IS901/IS1245 PCR, 5: LSP^A17 PCR, 6: DMC PCR, 7: MAP/MAV PCR, 8: 16S rDNS PCR, 9: tuf gén PCR, 10: rpoB gén PCR, 11: MIRU1 PCR, 12: MIRU2 PCR, 13: MIRU3 PCR, 14: MIRU4 PCR, 15: VNTR25 PCR, 16: VNTR32 PCR, 17: VNTR259 PCR, 18: MATR9 PCR

M7. Saját fejlesztésű valós idejű duplex PCR rendszer részleges MM és teljes HRM termékei a MAA és MAS szekvenciaszakaszokban talált eltérések feltüntetésével

'MAA 11-4751-AYOB01000349_1'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAA 10-9275-AYNY01000602_1'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAA ATCC25291-ACFI01000027_1'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAS ATCC49884-AYOC01000540_1'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAS ATCC49884-aspB-MM.seq'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAS isolate-2104-2-apsB-MM.seq'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAS isolate-2850-29-aspB-MM.seq'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAS isolate-33931-8-aspB-MM.seq'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAS isolate-3905-3-aspB-MM.seq'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAS isolate-8727-aspB-MM.seq'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAS isolate-2801-40-aspB-MM.seq'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAS isolate-2656-14-aspB-MM.seq'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAS isolate-2449-4B-aspB-MM.seq'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAS isolate-2446-2-aspB-MM.seq'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC
'MAS isolate-27903-2B-aspB-MM.seq'	TTCTGGCCCTGCTTCGAC

aspB_mismatch
 forward primer

M8. Mycobacterium törzsgyűjtemény (HUN_MYCO_COLLECTION_2006-2015 A és B1-2)

13. Köszönetnyilvánítás

Bár távolinak tűnik, mégis elsőként Prof. Dr. Rudas Péternek és Prof. Dr. Huszenicza Gyulának mondok köszönetet, akik elindítottak ezen az úton.

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek, Dr. Dán Ádámnak türelmét, támogatását és segítségét.

Köszönet illeti ugyanakkor a Doktori Iskola mindenkori vezetőit és dolgozóit, valamint munkahelyem korábbi (Dr. Tekes Lajos) és jelenlegi igazgatóját (Dr. Abonyi Tamás).

Köszönöm a Bakteriológiai és Molekuláris Biológiai Laboratóriumok volt és jelenlegi dolgozóinak segítségét, külön kiemelve Szombatiné Boda Ildikót, Nagy Sándornét, Ottinger Ernőné, Juhász Ágnes és Dr. Ursu Krisztinát.

Köszönöm Köles Erzsébetnek és Egyetemünk könyvtári dolgozóinak a szakirodalmak megszerzésében nyújtott segítségét.

Köszönet Turák Julcsinak, Mocsári Andrisnak, Horváth Dórinak, Tarjániné Szabó Kingának, Surján Annamáriának, Veress Jánosnének és Miskó Tímeának a megrendelések, kézirat engedélyezések és mindennemű ügyintézkésekben nyújtott segítségükért és támogatásukért.

Köszönetet szeretnék mondani a mintákért munkahelyem más osztályain dolgozó kollégáimnak: Thuma Ákosnak, Gyuris Évának, Rigó Dóranak, Erdélyi Károlynak, Tóth Gergőnek, Bacsady Árpádnak és Bajmócy Endrének.

Köszönöm Gyuranecz Miklósnak, Kreiczinger Zsuzsának és Eszterbauer Editnek hasznos észrevételeiket és a kéziratok publikálása során nyújtott értékes segítségüket.

Köszönet illeti barátaimat, akik vállalták, hogy kritikus szemmel nézik át készülő dolgozatomat: Schweitzer Nóra, Khayer Bernadett, Lőrincz Márta, Szmolka Ama.

Külön köszönet illeti Cshivincsik Ágit a mintákért, az információkért, a támogatásért, a biztatásért.

Köszönöm volt és jelenlegi kollégáimnak, PhD-s évfolyamtársaimnak, barátaimnak és családtagjaimnak türelmüket és támogatásukat, és Édesanyámnak, hogy mindig hitt bennem.