

Állatorvostudományi Egyetem
Aujeszky Aladár Elméleti Állatorvostudományok
Doktori Iskola

**Házi- és vadmadár eredetű *Bordetella avium* és
Ornithobacterium rhinotracheale törzsek összehasonlító
feno- és genotípusos vizsgálata**

PhD értekezés tézisei

dr. Szabó Réka

2017

Témavezető:

.....
Dr. Magyar Tibor
MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézet

Bevezetés

A légzőszervi megbetegedések világszerte gyakran fordulnak elő a baromfiállományokban. A megbetegedések kóroktanában vírusok, baktériumok és gombák egyaránt szerepelhetnek, mind önállóan, mind más kórokozókkal együttesen. A betegség kialakulásához nem fertőző kórokok (pl. nem megfelelő klimatikus viszonyok, az istálló levegőjének magas ammóniatartalma, zsúfoltság) is hozzájárulhatnak.

A *B. avium* és *O. rhinotracheale* által kialakított betegségek többnyire nem járnak súlyos klinikai tünetekkel. Az *O. rhinotracheale* fertőzöttség brojlerekben leggyakrabban 2–8 hetes korban figyelhető meg, tojó- és tenyészállományokban pedig a tojástermelés csúcsán jellemző a megbetegedés. A könnyezéssel, orrfolyással, köhögéssel, tüszögéssel járó betegség a fertőzést követő 5–7. nap körül gyakran megszűnik. Az enyhe légzőszervi tüneteket egyes esetekben súlyos dyspnoe, levertség, sinusitis követheti. A bordetellosis többnyire szintén enyhe légzőszervi tünetekkel járó megbetegedés. A fertőzött állatokon tüszögés, köhögés, savós orrfolyás, könnyezés figyelhető meg. A légutak gyakran mucinosus váladékkal telnek meg, ami nehézlégzéshez vezet, ritkábban fulladás is kialakulhat. A klinikai gyakorlatban különféle társfertőzések és/vagy tartástechnológiai hibák súlyosbíthatják mindkét betegség lefolyását. A két kórokozó jelentőségét a növekedésben való visszamaradás, a takarmányhasznosítás romlása, a tojástermelés csökkenése, a keltethetőség romlása, a megnövekedett mortalitás, a gyógyszerköltségek emelkedése és a vágóhídi kobzások következtében kialakuló gazdasági kártétel adja.

Vizsgálataink célja *B. avium* és *O. rhinotracheale* törzsek hazai baromfiállományokból és vadmadaraktól való izolálása, majd az így létrehozott törzsgyűjtemény baktériumai közötti változatosság felderítése volt. Ennek során először hagyományos, fenotípusos tulajdonságok vizsgálatán alapuló módszerekkel jellemeztük törzseinket. Célunk volt annak felderítése, hogy az esetlegesen feltárt különbségek összefüggnek-e az izolátumok gazdafaji eredetével, és tekinthetőek-e ezen két, széles gazdaspektrumú kórokozó esetében az egyes madárfajokhoz való adaptálódás jeleinek. A következő lépésben a törzsek szűkebb körében azok genetikai állományát összehasonlító, molekuláris módszerekkel elemeztük a két baktériumfaj magyarországi izolátumai körében tapasztalható változatosságot.

Vizsgálataink során arra törekedtünk, hogy olyan tulajdonságokat határozzunk meg, amelyek alapján a *B. avium* és *O. rhinotracheale* fajkon belül több tulajdonságukban megegyező törzscsoportokat írhatnak le. Célunk volt olyan korszerű, molekuláris módszer kiválasztása, amellyel kis munka- és eszközigénnyel is vizsgálható e két kórokozó faj változatossága, lehetővé téve így járványtani vizsgálatok elvégzését is.

Anyag és módszer

A felhasznált baktérium törzsek

Munkánkhoz frissen izolált és az MTA ATK ÁOTI törzsgyűjteményében megtalálható, hazai és külföldi eredetű, különféle gazdafajokból származó 64 *O. rhinotracheale* és 19 *B. avium* törzset használtunk fel. A baktériumokat telepmorfológiai vizsgálatok és fajspecifikus PCR segítségével azonosítottuk.

A törzsek fenotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok

Biokémiai próbák

Az izolátumok elsődleges azonosításához és jellemzéséhez biokémiai próbákat végeztünk. Hagyományos levestáptalajok segítségével vizsgáltuk a baktériumokat urea, indol, nitrát, arabinóz, dulcit, glükóz, laktóz, maltóz, szacharóz és szorbit próbákban. A tápleveseket az *O. rhinotracheale* növekedésének elősegítésére 2% steril csirkesavóval egészítettük ki. A tesztek mindkét baktériumfaj vizsgálata során 4 napig inkubáltuk.

A növekedés körülményeinek vizsgálata

A *B. avium* és *O. rhinotracheale* törzsek ideális növekedési körülményeit 31, 37 és 41 °C-on, Columbia és triptikáz szója agaron, valamint ezek 5% juhvérrel kiegészített változatain vizsgáltuk. A táptalajokat minden esetben 48 órán keresztül inkubáltuk.

A hemolizáló képesség vizsgálata

Bár eredetileg mindkét kórokozót nem hemolizáló baktériumként írták le, irodalmi adatok β -hemolizáló *O. rhinotracheale* izolátumok megjelenéséről számolnak be. A *B. avium* és *O. rhinotracheale* törzsek hemolitikus tulajdonságait ezért 5% juhvérrel kiegészített Columbia táptalajon, 48 órás, 37 °C-on történt tenyésztés után 48 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubálva figyeltük meg.

Hemagglutinációs próba

Az izolátumok adhéziós képességének vizsgálatához tárgylemez-hemagglutinációs vizsgálatokat végeztünk. A vizsgálatokhoz alvadásban gátolt juh-, ló-, nyúl-, szarvasmarha-, kacs- és háztyúkvért használtunk. A vörösvértesteket illetve –sejteket (vvt) fiziológias sóoldatban mostuk, majd a vvt-eket tartalmazó üledékből foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) 10%-os szuszpenziót készítettünk. A szuszpenzió 20 μ l-ét tárgylemezre cseppentettük, amelyben egyenletesen eloszlattunk egy kacsnyi friss baktériumtenyészetet. A reakciók eredményét egy perc elteltével, ötfokozatú skálán (0-4) értékeltük.

Szerotipizálás

Az *O. rhinotracheale* törzsek szerotípusát agargél-precipitációs (AGP) tesztben határoztuk meg. Ehhez leggyakoribb (A-E) szerotípusok típus-törzsei ellen specifikus kórokozóktól mentes házityúkból termeltettünk szerotípus-specifikus ellensavot. A vizsgált *O. rhinotracheale* törzseket 48 órán keresztül 37°C-on, véresagaron tenyésztettük, majd PBS-ben 3 McFarland töménységű szuszpenziót készítettünk, majd hőstabil antigéneket állítottunk elő. Az AGP teszteket nedves környezetben, 37 °C-on inkubáltuk, és 24, 48, valamint 72 óra elteltével bíráltuk el.

Az antibiotikum-érzékenység meghatározása

A baktériumok korongdiffúziós módszerrel végzett antibiotikum-érzékenység vizsgálatához 19 *B. avium* és 50 *O. rhinotracheale* törzset választottunk ki. Egy kacsnyi friss tenyészetből származó baktériumot 5 ml fiziológiás konyhasóoldatban szuszpendáltunk. A szuszpenzió sűrűségét 0,5 McFarland-re állítottuk be, majd 5% juhvér tartalmú Müller-Hinton táptalajra szélesztettük. A vizsgálat során 18 különböző antibiotikum korongot használtunk fel. A vizsgálatokat a CLSI M31-S1 valamint M100-S21 dokumentumaiban megadott határértékek alapján bíráltuk el.

Az amoxicillint, doxiciklint és eritromicint a korongdiffúziós tesztben mutatott változó hatékonyságuk miatt választottuk ki a MIC meghatározáshoz. Ehhez a vizsgált antibiotikumokból kettes alapú hígítási sort készítettünk 96 lyukú lemezen úgy, hogy a végső koncentrációk 0,03 és 64 µg/ml között voltak. A lyukakba ezután a vizsgált baktériumok log fázisú szuszpenzióját pipettáztuk. A lemezeket *B. avium* esetében 24 órán, *O. rhinotracheale* esetén 48 órán át inkubáltuk 37 °C-on.

A törzsek genotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok

Polimeráz lánreakciók

A molekuláris fajazonosításhoz, a 16S rRNS gén vizsgált szakaszának felsokszorozásához, valamint az *O. rhinotracheale* törzsek ERIC-PCR és RAPD vizsgálatához szükséges primereket a szakirodalom alapján választottuk ki. A DNS templátot friss baktérium tenyészetből, forralásos módszerrel állítottuk elő, a reakciók ESCO Swift Mini készülékben zajlottak. A PCR termékeket 1,5%-os SeaKem agaróz gélben 1×TBE pufferben ellenőriztük 9 V/cm elektromos térerősségű gélelektroforézissel. A termékek láthatóvá tétele és dokumentálása UV fényben történt Kodak Gel Logic 212 Imaging System (Rochester, USA) segítségével.

Az ERIC-PCR és RAPD-vizsgálatok eredményeinek elemzése

Az egyes reakciók során keletkezett mintázatokban fellelhető ampliconok megléte (1) vagy hiánya (0) alapján a PyElph programmal bináris mátrixot készítettük. Az *O. rhinotracheale* törzsek genetikai hasonlóságának vizsgálatához Dice koefficienszt használtunk, a dendrogramot UPGMA módszerrel készítettük. A törzsfá topológiáját 100 ismétléses bootstrap analízissel vizsgáltuk.

Szekvencia-meghatározás és filogenetikai elemzés

A nukleinsav-sorrendek meghatározását a *B. avium* és az *O. rhinotracheale* törzsek 16S rRNS génjének egy-egy kijelölt szakaszán végeztük el. Szekvenáló primerként a 27F és 1492R univerzális primereket használtuk. A PCR termékek tisztítását és a hagyományos Sanger-féle dideoxinukleotid módszerrel történő, kapilláris elektroforézis alapú szekvenálást a Macrogen Europe Ltd. végezte. A kapott kromatogramokat a Chromas LITE 2.01 programmal értékeltük ki, a két irányból leolvasott szekvenciákat BioEdit 7.1.3.0 programmal illesztettük össze.

Az általunk vizsgált törzsek szekvenciáit a GenBank adatbázisában szereplő *B. avium* és *O. rhinotracheale* teljes genom és részleges 16S rRNS génszekvenciákkal hasonlítottuk össze BioEdit program segítségével. A nukleotid szekvencia hasonlóságokat Clustal W algoritmussal számoltuk ki. Az illesztés eredményeként filogenetikai dendrogramot készítettünk, a filogenetikai analízist a MEGA 6.06 szoftverrel, Neighbor-Joining módszer használatával hajtottuk végre. Az evolúciós távolságokat Jukes-Cantor korrekciós ráta figyelembevételével számítottuk ki, a törzsfá topológiáját 500 ismétléses bootstrap analízissel vizsgáltuk.

Multi-lókuszos szekvencia tipizálás

Az MLST-analízist kilenc kiválasztott *B. avium* törzsnél végeztük el hét háztartási gén (*adk*, *fumC*, *glyA*, *tyrB*, *icd*, *pepA*, *pgm*) részleges szekvenciájának elemzésével. Mivel az egyéb *Bordetella*-k tipizálására leírt primerek a *B. avium* esetén nem erősítettek fel szekvenálásra alkalmas amplicont, magunk terveztünk primereket a Primer3Plus program segítségével a vizsgálni kívánt gének megfelelő szakaszaira.

A PCR termékek szekvenciáját ezután a 16S rRNS szekvencia-meghatározásnál ismertetett módon határoztuk meg, és a *Bordetella* Multi-Locus Sequence Typing weboldalon szereplő szekvenciákkal összevetve elemeztük szintén a korábban ismertetett módon.

Eredmények

A baktériumok izolálása és azonosítása

Az azonosítási vizsgálatokat követően összesen 13 pulyka, három házityúk, két galamb, egy héja és egy karvaly eredetű *O. rhinotracheale* és hat pulykából származó *B. avium* törzs izolálását erősítettük meg. *O. rhinotracheale* törzsek esetében a megvizsgált minták 6%-a, *B. avium* törzsek esetén pedig mindössze 1,8%-a adott pozitív eredményt. Az azonosítási vizsgálatokat a törzsgyűjteményben megtalálható törzseken is elvégeztük. A molekuláris azonosítás során az *O. rhinotracheale* izolátumok esetében a fajspecifikus reakció egy 784 bp hosszúságú DNS szakaszt sokszorozott fel. A *B. avium* fajazonosító PCR terméke 524 bp hosszúságú volt.

A törzsek fenotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok

Biokémiai próbák

A *B. avium* törzsek a fajra jellemző módon az összes vizsgált biokémiai tesztben egységesen inaktívak voltak. Az *O. rhinotracheale* törzsek indol és nitrát tesztben negatívak, urea próbában pozitívak voltak. A felkínált szénhidrátok közül az arabinózt, dulcitol és szorbitot egyik törzs sem hasznosította. A glükózt az *O. rhinotracheale* törzsek 56,3%-a, a laktózt 65,6%, a szacharózt 15,6%, a maltózt 50%, a galaktózt pedig az izolátumok 21,9%-a volt képes felhasználni.

A növekedés körülményeinek vizsgálata

A *B. avium* törzsek mindhárom vizsgált hőmérsékleten, mind a négy felkínált táptalajon egyformán növekedtek. Az *O. rhinotracheale* izolátumok 37 °C-os hőmérsékleten mind a négy táptalajon növekedtek. 31 °C-on való tenyésztéskor egyetlen *O. rhinotracheale* törzs sem volt képes növekedni a vért nem tartalmazó két táptalajon. A vérrel kiegészített TSA-n és Columbia agaron az izolátumok 81,8%-a nőtt. A 41 °C-on való inkubációkor a vérrel kiegészített táptalajokon minden vizsgált törzs nőtt. A vér nélküli Columbia és TSA táptalajokon a törzsek közel fele (45,5%) nem növekedett.

A törzsek hemolizáló képessége

A *B. avium* izolátumok közül egyik sem hemolizált. Az *O. rhinotracheale* törzsek 39%-a nem hemolizált, 61%-uk azonban a 48 óra 37°C-on történő tenyésztést követően 48 órán át szobahőmérsékleten való inkubálás után β -hemolízis jeleit mutatta.

A hemagglutinációs képesség vizsgálata

A *B. avium* törzsek jobb agglutinációs képességet mutattak, mint az *O. rhinotracheale* izolátumok. Előbbieknél ritkább volt a reakció hiánya, és magasabb volt a 2-es szintű reakciók aránya. A *B. avium* törzsek a nyúl vvt-vel egyáltalán nem reagáltak, a többi emlős vvt-t

azonban az izolátumok nagy százalékban (ló és juh: 78,9%; szarvasmarha: 52,6%) agglutináltak. Kacsa vvt-vel csak egy, házityúk vvt-vel pedig két törzs nem adott reakciót, és ezen vvt-vel figyelhettük meg a két legerőteljesebb (3-as fokozatú) reakciót is. A ló, szarvasmarha és juh vvt-eket az *O. rhinotracheale* törzsek egyáltalán nem agglutináltak, a házityúk vvt-eket négy, a kacsa vvt-eket kilenc, a nyúl vvt-eket szintén kilenc *O. rhinotracheale* izolátum agglutinálta.

Szerotipizálás

A mezei *O. rhinotracheale* törzsek között legnagyobb számban az A szerotípusba tartozó törzsek fordultak elő (49 törzs; 83%). Két izolátumot (3,4%) B szerotípusúként, öt törzset (8,5%) pedig D szerotípusúként azonosítottunk. Három törzs (5,1%) nem volt tipizálható az A-E szerotípusok ellen termeltetett savókkal.

A törzsek antibiotikum-érzékenysége

Minden vizsgált *O. rhinotracheale* törzs érzékeny volt kloramfenikolra és spektinomycinre valamint nagy részük tilmikozinra is. A törzsek nagy százaléka rezisztens volt gentamicinnel, nalidixsavval, szulfametoxazol-trimetoprimmal és polimixin B-vel szemben. A szulfonamidok sem bizonyultak hatékonynak a törzsek jelentős hányadánál. A héjából, karvalyból és galambból származó törzsek több antibiotikumra voltak érzékenyek, mint a baromfi eredetűek. Amoxicillin és eritromicin esetében a MIC értékek 0,12 µg/ml és 32 µg/ml között, doxiciklin esetében pedig 0,06 µg/ml és 32 µg/ml között alakultak. A vadmadaraktól és háztáji körülmények között tartott madaraktól izolált törzsek esetén a MIC értékek alacsonyabbak voltak.

Az összes *B. avium* törzs rezisztens volt ceftiofurral és linkomicinnel szemben, és érzékeny volt doxiciklinre, gentamicinre, polimixin B-re, spectinomycinre és szulfonamidokra. A ciprofloxacin, kloramfenikol, eritromicin, szulfametoxazol-trimetoprim és oxitetra-ciklin is hatékonynak bizonyult, bár néhány törzs csak mérsékelt érzékenységet mutatott. A MIC értékek amoxicillin esetében ≤0,03 µg/ml és 1 µg/ml között, doxiciklin esetében ≤0,03 µg/ml és 0,12 µg/ml, eritromicin vizsgálata során pedig 8 µg/ml és 16 µg/ml között változtak. A németországi törzsekkel szemben mindhárom antibiotikum MIC értékei magasabbak voltak, mint a magyar törzsek esetén.

A törzsek genotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok

ERIC-PCR

A vizsgált *O. rhinotracheale* törzsek között tizenhárom ERIC-mintázatot azonosítottunk. A leggyakoribb típusba (1. típus) 29 törzs tartozott. Az ERIC-mintázatok nem mutattak összefüggést az izolálás helyével és idejével. Az izolátumok gazdafaji eredetével azonban megfigyelhető volt némi korreláció: az 1. típusú izolátumok nagy része (26 törzs) pulyka

eredetű volt, kettő vadmadaraktól, egy házityúktól származott. A 2. és 3. ERIC-típusba kizárólag pulykától izolált törzsek tartoztak (nyolc illetve öt törzs). A házityúk eredetű törzsek ezzel szemben nagyobb változatosságot mutattak: a kilenc izolátum nyolcféle ERIC-típusba tartozott.

RAPD vizsgálatok

Az M13 primerrel végzett RAPD vizsgálattal 10 különböző típusba soroltuk a vizsgált törzseket. Az 1. típusba az A szerotípus típus-törzs, valamint 42 mezei izolátum tartozott. A 2. és 3. típusba 2-2 törzs tartozott, a fennmaradó 7 izolátum egyedi mintázatot mutatott. Az M13-típusok sem a törzsek földrajzi vagy gazdafaji eredetével, sem azok szerotípusával nem mutattak összefüggést.

Az OPG11 vizsgálat két fő típusba csoportosította az izolátumokat. A 3. és 8. típusba két-két törzs tartozott, négy törzs mintázata pedig egyedi volt.

Az OPH19 primerrel végzett vizsgálat szintén két nagy csoportba sorolta a vizsgált *O. rhinotracheale* törzseket. A vizsgált izolátumok 57,1%-a az 1. típusba tartozott, míg a második leggyakoribb típusba (2. típus) 17,5% sorolódott. A 4. típus három házityúk eredetű törzs alkotta, a 2. típusból pedig csupán egy csíkkal eltérő mintázatú 6. típus pedig a D és E szerotípus típus-törzsek alkották. Két törzs egyedi mintázattal rendelkezett.

Szekvencia-meghatározás és filogenetikai elemzés

A *B. avium* törzsek a vizsgált szakaszon 100%-os egyezést mutattak egymással és a madár eredetű génbanki izolátumok megfelelő génszakaszaival. A 16S rRNS szekvencia elemzése a 42 vizsgált *O. rhinotracheale* törzset két klaszterbe csoportosította. A mezei izolátumok nagy része (37 izolátum) 100%-ban megegyezett az A, B és E szerotípus típus-törzsekkel és más GenBank-i szekvenciákkal. Az öt, eltérést mutató törzs közül négy házityúk, egy pedig pulyka eredetű volt.

Multi-lókuszos szekvencia tipizálás

A Bordetella MLST adatbázis primereivel elvégzett PCR-ek nem adtak szekvenálásra alkalmas PCR terméket, ezért saját primereket terveztünk. Az ezekkel végzett PCR-ek már szekvenálásra alkalmas termékeket eredményeztek. A hét háztartási gén részleges szekvenciájának elemzésekor az *icd*, *pepA* és *pgm* gének esetében törzseink szekvenciája 100% egyezést mutatott az adatbázisban szereplő egyetlen *B. avium* törzs, a 197N megfelelő génszakaszával. Az *adk* gén esetében három törzs (Ba01, Ba08, Ba18) szekvenciájában egy G→A pontmutációt azonosítottunk a 119. bázisnál. A *fumC* génszekvenciájában a Ba18 törzs szekvenciájának elemzésekor két T→C pontmutációt a 4. és 40. bázisnál, a *glyA* gén esetében a Ba18 génjének megfelelő szakaszán egy T→C cserét a 83. bázisnál, a *tyrB* gén esetében a Ba01, Ba07, Ba08 és Ba18 törzsek vizsgálata során egy C→T cserét azonosítottunk a 245.

bázisnál. A fennmaradó törzsek minden esetben 100% homológiát mutattak a 197N törzsgénszakaszaival.

A Ba13, Ba14, Ba15 és Ba16 törzsek így az adatbázisban szereplő 197N törzssel együtt az ST76-ba tartoznak. A Ba01 és Ba08, a Ba07 és a BA09 valamint a Ba18 törzsek három új szekvencia típust képeznek.

Következtetések

Az *O. rhinotracheale* törzsek szénhidrát-felhasználásában tapasztalt változatosság miatt ezeket a próbákat fajazonosításra nem találtuk alkalmasnak. Az indol, nitrát és urea tesztekben azonban kellően egységesen viselkednek az *O. rhinotracheale* törzsek ahhoz, hogy ezek a próbák az azonosítási protokoll részét képezzék.

A két kórokozó különböző hőmérsékleteken való tenyésztetőségét magyarázhatja, hogy a madarak légzőszerveiben nem egységes hőmérséklet uralkodik: a felső légutakban alacsonyabb, míg a tüdőhöz közeledve egyre magasabb a hőmérséklet.

Az *O. rhinotracheale* törzsek hemolitikus tulajdonságáért egy hemolizin-szerű fehérje felelős, ennek pontos, virulenciabeli szerepe azonban nem kellően tisztázott, további vizsgálatokat igényel.

A hemagglutinációs képesség számos baktériumfaj esetén összefüggést mutat a mikroba gazdasejthez történő adhéziójával, a virulens baktériumok pedig gyakran erősebb adhéziós és hemagglutinációs képességgel rendelkeznek. A *B. avium* adhezinje, a filamentózus hemagglutinin régóta ismert virulenciafaktor. Valószínűsíthető, hogy más baktérium fajokhoz hasonlóan az *O. rhinotracheale* törzsek esetében is valamilyen adhezin jelenlétét jelzi a hemagglutinációs képesség. Feltételezhető, hogy az eltérő állatfajokból származó vvt-k agglutinálásában mutatkozó különbségek háttérében mindkét kórokozó esetén a hemagglutinációért felelős struktúrák változatossága áll, azonban a pontos összefüggés jelenleg még nem ismert.

A szakirodalmi adatokkal megegyező módon a magyarországi *O. rhinotracheale* izolátumok között is az A szerotípust találtuk a leggyakoribbnak. A szerotipizálás az *O. rhinotracheale* törzsek jellemzésének általánosan alkalmazott módszere, jelentősége ugyanakkor ellentmondásos. Az egyes szerotípusok virulenciájában nem találtak különbséget, a szerotípusok közötti részleges keresztvédelem pedig tovább csökkenti meghatározásának gyakorlati fontosságát.

Az általános elvárásoknak megfelelően a baromfitartásban is törekednek az antibiotikum-használat csökkentésére. A baktériumok okozta fertőző betegségek azonban továbbra is gyakran előfordulnak, és meglehetősen nagy gazdasági károkat képesek okozni, így az antibiotikumok alkalmazása egyelőre elkerülhetetlen. Ugyanakkor nagyon valószínű, hogy az antibiotikumok helytelen használata hozzájárul a rezisztens kórokozók kiszelektálódásához. Mindezek miatt kiemelten fontos lenne a rezisztencia vizsgálatokon alapuló antibiotikum-használat, ez pedig a folyamatos monitorozás, valamint az adott kórokozóra megállapított rezisztencia határértékek és egységes vizsgálati módszerek kialakításának szükségességére hívja fel a figyelmet.

Az *O. rhinotracheale* és *B. avium* fenotípusos tulajdonságaiban tapasztalható eltérések összefüggést mutathatnak ma még nem, vagy nem kellő mélységben ismert virulencia tényezőkkel, így alapot jelenthetnek azok későbbi vizsgálatához. Ezen kívül értékes információt adhat a kórokozók terjedésének, környezetben való fennmaradásának, egyes törzsek szélesebb körben való elterjedésének pontosabb megismeréséhez és megértéséhez. Az ezekben a tulajdonságokban tapasztalható különbségek azonban nem tekinthetők az egyes madárfajokhoz való adaptáció jeleinek.

Az izolátumok genetikai állományának vizsgálata – a fenotípusos tulajdonságokat vizsgáló módszerekkel szemben – valósabb képet ad a törzsek rokonsági viszonyairól, és nem befolyásolják a mikroorganizmus tenyésztetőségével kapcsolatos nehézségek. Ezek közül a legteljesebb összehasonlítást a teljes genom szekvenálás teszi lehetővé, azonban a választható módszerek közül jelenleg ez a legköltségesebb. Az MLST módszer során ezzel szemben csak az összehasonlítást lehetővé tevő gének nukleotida sorrendjét kell meghatározni. Ez a teljes genom szekvenáláshoz képest kevesebb információ alapján vizsgálja a törzsek változatosságát, ugyanakkor anyagi vonzata is alatta marad a teljes genom szekvenálás költségeinek. Ezen módszerek mellett azonban a rep-PCR-ek és a RAPD vizsgálatok költségei eltörpülnek. Gyorsaságuk és kis eszközigényük miatt akár egy jól felszerelt állattartó telepi laboratóriumban is elvégezhetőek. Az adott laboratóriumon belüli megfelelő reprodukálhatóság biztosítása mellett járványtani összefüggések felderítésének első, gyors eredményt adó lépéseként is használhatóak, melyeket szükség esetén további, pontosabb rokoni viszonyokat feltáró vizsgálatok követhetnek.

A 16S rRNS-t kódoló gén filogenetikai vizsgálatát széles körben használják a különféle mikroorganizmusok megkülönböztetésére. A szekvencia változatosságának mértéke a legtöbb esetben lehetővé teszi a baktériumok faji szintű, és sok esetben a fajon belüli összehasonlítását is. Az *O. rhinotracheale* esetében, bár szintén gyakran használatos módszer a baktérium törzsek genetikai változatosságának vizsgálatára, a nagyfokú hasonlóság miatt ez a módszer fajon belüli genetikai különbségek feltárására csak korlátozottan alkalmas.

Munkánk során a felhasznált tipizáló módszerek közül az ERIC-PCR bizonyult a leghatékonyabbnak az *O. rhinotracheale* törzsek fajon belüli genetikai változatosságának elemzésére, ezért jó felbontóképessége miatt is ajánlható lehet ilyen típusú analízisekhez.

Mind a 16S rRNS gén szekvenálásából, mind az MLST analízisből származó adataink a *B. avium* izolátumok közötti kis genetikai változatosságra engednek következtetni, ami megegyezik az irodalmi adatokkal. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a *Bordetella*-k MLST vizsgálatára korábban kidolgozott primerek és PCR reakciókörülmények alkalmatlanok a *B. avium* izolátumok vizsgálatára. Feltételezhető, hogy a 197N törzs MLST analízisét a teljes genom szekvencia *in silico* elemzésével végezték el.

Az általunk meghatározott szekvencia típusok nem mutattak összefüggést sem az izolálás helyével és idejével, sem a törzsek gazdafaji eredetével. Amennyiben az MLST adatbázis a jövőben tovább bővül *B. avium* törzsek adataival, pontosabb következtetéseket vonhatunk majd le az ebben a *Bordetella* fajban előforduló szekvencia típusok számáról és jelentőségéről.

Új tudományos eredmények

1. Elsőként végeztük el magyarországi eredetű, *B. avium* és *O. rhinotracheale* törzsek átfogó fenó- és genotípusos összehasonlító vizsgálatát.
2. Fenotípusos próbákban a hazai *B. avium* törzsek egységességét és a Magyarországon izolált *O. rhinotracheale* izolátumok változatosságát tártuk fel.
3. Kimutattuk, hogy az *O. rhinotracheale* törzsek fenó- és genotípusos tulajdonságokban tapasztalható változatossága nem tekinthető a gazdaadaptáció jelének.
4. Felderítettük, hogy a Magyarországon izolált *O. rhinotracheale* törzsek között az A a leggyakoribb szerotípus. Emellett B és D szerotípusú törzsek magyarországi előfordulását írtuk le. Három törzset nem találtunk tipizálhatónak az A-E szerotípus-specifikus savókkal.
5. Megállapítottuk, hogy az ERIC-PCR és az M13 primerrel végzett RAPD vizsgálat alkalmas a magyarországi *O. rhinotracheale* törzsek genetikai változatosságának vizsgálatára és járványtani nyomozásra.
6. A hazai *O. rhinotracheale* izolátumok között molekuláris módszerekkel a házityúk eredetű törzsek nagyobb változatosságát derítettük fel a pulykából izolált törzsekéhez képest.
7. A *B. avium* *Bordetella* MLST rendszerben való vizsgálatához új PCR rendszereket fejlesztettünk. A *B. avium* törzsek MLST analízise során három új szekvencia típust azonosítottunk. Az adatbázis eddigi egyetlen *B. avium* adatát kilenc törzsével egészítettük ki.

A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Szabó R., Magyar T.: **A baromfi *Ornithobacterium rhinotracheale* okozta megbetegedése. Irodalmi áttekintés**, Magyar Állatorv. Lapja, 136. 589–597, 2014.

IF: 0,185

Szabó R., Wehmann E., Magyar T.: **Antimicrobial susceptibility of *Bordetella avium* and *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from wild and domesticated birds in Hungary**, Acta Vet. Hung. 63. 413–424, 2015.

IF: 0,646

Szabó R., Wehmann E., Makrai L., Nemes Cs., Gyuris É., Thuma Á., Magyar T.: **Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* field isolates from Hungary**, Avian Pathol. DOI: 10.1080/03079457.2017.1321104.

IF: 1,336

A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó publikációk

Gyuranecz M., Dénes B., Hornok S., Kovács P., Horváth G., Jurkovich V., Varga T., Hajtós I., Szabó R., Magyar T., Vass N., Hofmann-Lehmann R., Erdélyi K., Bhide M., Dán Á.: **Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hungary: screening of dairy cows, sheep, commercial milk samples, and ticks**, Vector Borne Zoonotic Dis., 12. 650–653, 2012.

IF: 2,277

Konferencia prezentációk

Gyuris É., Szabó R., Wehmann E., Magyar T.: Antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* and *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from wild and domesticated birds in Hungary (poszter) [Konferencia absztraktfüzet p. 45.] International Pasteurellaceae Conference 2014. Prato, 2014.05.13–16.

Szabó R., Gyuris É., Wehmann E., Magyar T.: Antimicrobial susceptibility of *Bordetella avium*, *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Riemerella anatipestifer* strains from wild and domesticated birds in Hungary (poszter) [Konferencia absztraktfüzet p. 27.] Med-Vet-Net Association International Scientific Conference. Lyngby, 2013.06.24–25.

Szabó R., Gyuris É., Wehmann E., Magyar T.: Hazai baromfifajokból és vadmadaraktól izolált *Bordetella avium*, *Ornithobacterium rhinotracheale* és *Riemerella anatipestifer* törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata (poszter) [Szerk.: Janda T., ISBN:978-963-8351-41-8, p. 251–253.] II. ATK Tudományos Nap, Velünk élő tudomány. Martonvásár, 2013.11.08.

Szabó R., Wehmann E., Magyar T.: Isolation and characterisation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from wild and domesticated birds in Hungary (előadás) [Acta Microbiol. Imm. Hung. Supplement 58:219] 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, 2011.07.20–22.

Akadémiai beszámolók

Szabó R., Wehmann E., Magyar T.: *Ornithobacterium rhinotracheale* törzsek jellemzése. Budapest, 2016. 01. 24.

Szabó R., Wehmann E., Magyar T.: *Ornithobacterium rhinotracheale* törzsek jellemzése genotipizáló PCR módszerekkel. Budapest, 2016. 01. 26.

Szabó R., Magyar T.: Hazai baromfifajokból és vadmadaraktól izolált *Bordetella avium* és *Ornithobacterium rhinotracheale* törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata. Budapest, 2015. 01. 27.

Szabó R., Wehmann E., Magyar T.: *Ornithobacterium rhinotracheale* törzsek izolálása és jellemzése. Budapest, 2011. 01. 25.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Magyar Tibornak, az MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézete igazgatójának, aki lehetővé tette, hogy az általa vezetett Légzőszervi bakteriológia témacsoportban végezhessem a disszertációmmal kapcsolatos kutatómunkát, és biztosította ennek feltételeit. Köszönöm, hogy nagy tapasztalattal és szakértelemmel irányította a kutatás menetét, és segítette a publikációk megjelenését.

Köszönöm Dr. Wehmann Enikőnek a rengeteg, a különböző módszerek elméletével, kivitelezésével és értékelésével kapcsolatos önzetlen segítséget és tanácsot, Hegedűs Évának pedig azt, hogy széleskörű gyakorlati tapasztalatait és tudását megosztotta velem. Köszönet illeti Schihlgruberné Oryszcsák Katalint és Ujvári Barbarát, hogy elméleti és gyakorlati kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Ez úton szeretném megköszönni Gyuris Évának, Thuma Ákosnak, Nemes Csabának, Makrai Lászlónak és Német Zoltánnak, hogy a munkám során felhasznált baktériumtörzseket és véreket rendelkezésemre bocsátották.

Köszönet illeti a témacsoportunkban szakdolgozatukat elkészítő állatorvostan-hallgatókat, Horváth Annát, Wilfing Juditot és Zagyai Ildikót, hogy munkájukkal hozzájárultak eredményeinkhez.