

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Termofil *Campylobacter*-fajok genetikai és epidemiológiai
jellemzése**

PhD értekezés

Dr. Schweitzer Nóra

2011

Témavezetők és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Varga János, DSc, az MTA tagja
SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
Témavezető

.....

Dr. Dán Ádám, PhD
MgSzH ÁDI, Molekuláris Biológiai Laboratórium
Témavezető

.....

Juhászné Dr. Kaszanyitzky Éva, PhD
MgSzH ÁDI, Higiénés bakteriológiai Laboratórium
a témabizottság tagja

.....

Dr. Makrai László, PhD
SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
a témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez a n. ... sz. példány.

.....

dr. Schweitzer Nóra

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
Rövidítések jegyzéke	5
1 Összefoglalás.....	6
2 Bevezetés, célok	8
3 Irodalmi áttekintés	11
3.1 A <i>Campylobacter</i> -fajok jellemzői	11
3.2 A <i>Campylobacter</i> -fajok előfordulása.....	12
3.2.1 Campylobacterek előfordulása a különböző élelmiszer-termelő állatfajokban	15
3.2.2 Élelmiszerek <i>Campylobacter</i> -szennyezettsége	17
3.2.3 <i>C. lanienae</i> előfordulása.....	17
3.3 Campylobacterek okozta kórképek	18
3.3.1 Campylobacterek okozta megbetegedések emberben	18
3.3.2 Campylobacterek okozta megbetegedések állatokban.....	22
3.4 <i>Campylobacter</i> -fajok kimutatása, tipizálása	22
3.4.1 Campylobacterek felfedezése	22
3.4.2 Campylobacterek tenyésztése	23
3.4.3 Campylobacterek meghatározása	26
3.4.4 <i>Campylobacter</i> tipizálási módok	30
3.5 Antibiotikum-rezisztencia	31
3.6 A védekezés szempontjai:	32
3.6.1 Állattartó telepek	33
3.6.2 Vágóhídi higiénia.....	34
3.6.3 Élelmiszer-feldolgozás, személyi higiénia.....	34
4 Anyag és módszer.....	35
4.1 Mintagyűjtés és a campylobacterek tenyésztése.....	35
4.2 DNS kivonás	36
4.3 Primer tervezés <i>C. jejuni</i> -ra.....	36
4.4 Real-time PCR paraméterek beállítása <i>C. jejuni</i> és <i>C. coli</i> azonosítására.....	38
4.5 Real-time PCR rendszer specificitásának és érzékenységének vizsgálata	40
4.6 Primerek <i>flaA</i> SVR tipizáláshoz.....	41
4.7 Nemzetség- és <i>C. lanienae</i> fajspecifikus PCR-ek	42
4.8 A PCR reakció eredményének láthatóvá tétele (vizualizáció).....	42
4.9 Szekvencia-meghatározás és filogenetikai vizsgálatok	43
4.9.1 16S rRNS gén vizsgálata	43

4.9.2	Az <i>flaA</i> SVR vizsgálata.....	44
4.10	PFGE.....	44
4.11	MLST.....	45
4.12	Antibiotikum-érzékenységi vizsgálat.....	46
4.13	Takarmányozási kísérletek.....	47
5	Eredmények.....	49
5.1	<i>Campylobacter</i> -tenyésztés és PCR.....	49
5.2	Real-time PCR bevezetése a <i>Campylobacter</i> -diagnosztikába.....	53
5.3	Szekvencia-meghatározás és filogenetikai vizsgálatok.....	55
5.3.1	<i>C. lanienae</i>	55
5.3.2	<i>C. lanienae</i> azonosítása szekvencia mintázat alapján.....	57
5.3.3	<i>FlaA</i> SVR.....	58
5.4	PFGE.....	60
5.4.1	<i>C. jejuni</i> és <i>C. coli</i>	60
5.4.2	<i>C. lanienae</i>	63
5.5	PFGE és <i>flaA</i> SVR tipizálás összehasonlítása.....	64
5.6	MLST.....	65
5.7	Antibiotikum-érzékenységi vizsgálat.....	66
5.8	Takarmányozási kísérletek.....	68
6	Megbeszélés.....	69
7	Új tudományos eredmények.....	76
8	Irodalom.....	77
9	A doktori kutatás eredményeinek közlései.....	90
9.1	Lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban elfogadott publikációk: ...	90
9.2	A témában tartott konferencia prezentációk.....	90
10	Köszönetnyilvánítás.....	92

Rövidítések jegyzéke

ATCC	American Type Culture Collection	Amerikai Típustörzs Gyűjtemény
bp	base pair	bázispár
CAT-agar	cefoperazone amphotericin teicoplanin agar	cefoperazon amfotericin teikoplanin agar
CFU	colony forming unit	telep formáló egység
DNA	deoxy-ribonucleic-acid	dezoxiribonukleinsav (DNS)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	enzimhez kötött immunadszorpció vizsgálat
EU	European Union	Európai Unió
FBP	ferrous sulphate, sodium metabisulphite and sodium pyruvate	Vasszulfát, Na-metabiszulfit és Na- piruvát tartalmú adalék
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points	Veszélyelemzés és Kritikus Szabályozási Pontok
IMS	immunomagnetic separation	immunmágneses szeparáció
IVS	intervening sequences	beékelődött szekvenciák
mCCDA	modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar	módosított szén tartalmú <i>Campylobacter</i> szelektív agar
MIC	minimal inhibition concentration	minimális gátló koncentráció
MLST	multi locus sequence typing	multi-lókusz szekvencia tipizálás
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis	pulzáltatott mezejű gélelektroforézis
RNA	ribonucleic-acid	ribonukleinsav (RNS)
RFLP	restriction fragment length polymorfism	amplikonok emésztése restrikciós enzimekkel
SVR	short variable region	rövid variábilis szakasz
ST	sequence type	szekvencia típus
TBE	tris-borate-ethylenediamine-tetraacetic acid	trisz-borát-etilén-diamin-tetraacetát
Tm	melting temperature	olvadáspont hőmérséklet
U	unit	egység
UPGMA	unweighted pairs geometric- matched analysis	nem súlyozott pár csoport analízis
VBNC	viable but not culturable	életképes, de nem szaporítható

1 Összefoglalás

Az emberekben előforduló, bakteriális eredetű hasmenések leggyakoribb okozói a termofil campylobacterek Magyarországon és szerte a világon. Ugyanakkor kevés adattal rendelkezünk e zoonotikus kórokozók előfordulásáról a hazai állatállományokban. Munkánk célja volt, hogy egy komplex, átfogó képet kapjunk a magyarországi haszonállatok *Campylobacter*-fertőzöttségéről, fajonkénti eloszlásáról, és a fertőzést okozó *Campylobacter*-fajok molekuláris biológiai jellemzőiről.

A fő élelmiszer-alapanyagként szolgáló állatfajokból (szarvasmarhából, sertésből és baromfi fajokból) vágóhidakon két év (2008-2009) alatt gyűjtött 1110 bélmintát vizsgáltunk meg. Vizsgáltuk a *Campylobacter*-fajok kimutathatóságát tenyésztéssel és PCR módszerekkel, fenotípusos sajátosságokat és genetikai jellemzőit. Megvizsgáltuk az egyes fajok további tipizálhatóságát *flaA* SVR szekvenálással, PFGE-vel, MLST-vel.

A monitoring vizsgálatok megkönnyítésére kifejlesztettünk egy real-time PCR módszert a *C. jejuni* és a *C. coli* azonosítására. A két rendszert úgy optimalizáltuk, hogy azok azonos hőmérsékleti profillal fussanak, így nem multiplex formában, de egy gépben egyszerre 45 mintát tudunk vizsgálni. A rendszer EvaGreen fluoreszcens jelölőfestékkel működik, és a két faj az olvadási görbék alapján különíthető el. Összehasonlítottuk a hagyományos fenotípusos tulajdonságok vizsgálata alapján végzett fajmeghatározásokat a PCR-rel kapott eredményekkel, és azt tapasztaltuk, hogy több esetben, amikor a biokémiai tulajdonságok alapján bizonytalan eredményt kaptunk, vagy a fajt nem sikerült azonosítani, a PCR gyors és megbízható eredményt adott.

A vizsgálatok eredményeként megállapítottuk, hogy a magyarországi haszonállatok közül a brojlercsirke- és sertésállományok *Campylobacter*-fertőzöttsége magas, 60,1% illetve 43,3%, míg a szarvasmarhák *Campylobacter*-hordozása nem jellemző (6,7%). A brojlercsirke-állományok fertőzöttségéért a *C. jejuni* és *C. coli* fele-fele arányban felelős, sertésállományokban pedig a *C. coli* dominál. Figyelemre méltó, hogy a pozitív sertésekből viszonylag magas százalékban (20,7%) izoláltunk *C. lanienae*-t, amelynek gyakorisága megelőzi a *C. jejuni* előfordulását sertésben. Ezt a fajt először egészséges emberekből tenyésztették ki, majd sertésből és szarvasmarhából is izolálták. Nekünk szarvasmarhából nem sikerült kimutatni.

Az izolált törzsek antibiotikum-rezisztenciáját leveshígítási módszerrel vizsgáltuk és a MIC értékeket mikrotiter lemezekről olvastuk le. Megállapítottuk, hogy jelentős az enrofloxacin/ciprofloxacin és nalidixsav rezisztencia, különösen a brojlercsirkéből származó *C. jejuni*-ban (73,3%) és *C. coli*-ban (77,2%). Az eritromicin ($p=0,043$) és tetraciklin ($p=1,865e-14$) rezisztencia magasabb a *C. coli*-ban (9,7% és 74,1%), mint a *C. jejuni*-ban (3,1% és 36,6%), ezáltal sertésekben gyakoribb. A magas fluorokinolon rezisztencia

veszélyezteteti az esetleges humán gyógykezelés hatékonyságát, mivel azok elsődlegesen alkalmazott szerek.

A kórokozók járványtanának, a fertőzések terjedése dinamikájának megértéséhez elengedhetetlen a mikrobák összehasonlítása, tipizálása. Összesen 73 *C. jejuni* és *C. coli* törzset tipizáltunk az *flaA* gén SVR szekvenálásával. 47 különböző típust határoztunk meg, amelyek közül 35 csak egyszer fordult elő. A leggyakoribb allél típus az A66 és A21 volt. A filogenetikai elemzések során baktériumfaj vagy állatfaj szerinti csoportosulás nem volt megfigyelhető a törzsfán.

PFGE módszerrel 122 törzset vizsgáltunk meg. Az izolátumok 66%-a egyedi mintázatot mutatott a *SmaI* enzimmel való hasítás után. 42 izolátumot, amelyek 18 *SmaI*-klasztert alkottak, tovább vizsgáltunk *KpnI* enzimmel. Ezek közül 24 izolátum 10 *KpnI*-klasztert alkotott. 7 *KpnI*-klaszterben járványügyi kapcsolatot találtunk az izolátumok között. Stabil *C. jejuni* és *C. coli* klónokat találtunk, amelyek jelentősége a humán megbetegedésekben további vizsgálatokat igényel.

Magyarországon először tipizáltunk MLST módszerrel különböző állatfajokból származó *Campylobacter* törzseket. Egy szarvasmarhából izolált *C. jejuni* és egy sertésből izolált *C. coli* törzs MLST profilját határoztuk meg.

Magyarországon elsőként izoláltunk *C. lanienae*-t. A két év alatt 43 izolátumot gyűjtöttünk, amely a faj átfogó vizsgálatát tette lehetővé. A részleges 16S rRNS gén szekvenciák vizsgálata során eddig le nem írt változatokat találtunk a Vc2 és Vc6-os variábilis régiókban. A filogenetikai vizsgálatok a *C. jejuni*-hoz hasonló genetikai változatosságról tanúskodtak. Vizsgálataink arra utalnak, hogy a sertésből és szarvasmarhából származó törzsek mind fenotípusosan, mind genotípusosan elkülönülnek egymástól.

Elsőként tipizáltunk *C. lanienae* törzseket PFGE módszerrel, és a kipróbált három különböző enzim közül a *SmaI* enzim bizonyult a leghatékonyabbnak. Habár zoonotikus jelentősége ennek a fajnak még nem ismert, munkánk rámutat országos elterjedtségére sertésállományainkban, és egy tipizálási lehetőségről számolunk be egy esetleges epidemiológiai vizsgálathoz.

A *C. lanienae* törzsek a sertésekben előforduló *C. coli* törzsekhez hasonlóan magas tetraciklin rezisztenciát mutattak (60,9%), és eritromicin–enrofloxacin rezisztens, illetve multirezisztens törzseket is találtunk.

Takarmányozási kísérletekben vizsgáltuk különböző takarmány-kiegészítők *Campylobacter* ellenes hatását, de az eredmények alapján nem csökkentették az állatok *Campylobacter*-fertőzöttségét.

2 Bevezetés, célok

A termofil *Campylobacter*-fajok - a salmonellák mellett - a humán bakteriális eredetű gastroenteritisek leggyakoribb okozói világszerte.

Ezek a fajok a normál bélflóra tagjaként, természetes körülmények között is megtalálhatók mind a különféle emlős fajok, mind pedig a madarak bélcsatornájában. Állatokban szórványosan vetélést, mastitist, újszülöttekben ritkán enteritist okozhatnak. Tyúkállományokban szintén hasmenést, illetve a bélcsatornából a vérkeringésbe, majd a májba jutva hepatitiszt idézhetnek elő. Rendszerint azonban tünetmentes baktériumhordozás alakul ki. A bélsárral ürülve szétszóródnak a környezetbe, és bejuthatnak a természetes vizekbe. Az állatok vágásakor bekerülhetnek a nyers húsba, húskészítményekbe, a tőgyből és a környezetből pedig a tejbe is (Varga, 2001).

A termofil campylobacterek közül leggyakrabban a *C. jejuni*, ritkábban a *C. coli*, *C. lari*, kivételesen más fajok az embert is megbetegíthetik, rendszerint élelmiszer eredetű fertőzések következményeként néhány napig tartó hasmenés alakul ki. Az ember számára a leggyakoribb fertőzési forrás a nyers baromfihús, jóval ritkábban a nyers tej, a természetes vizek, alkalmanként azonban a fertőzés nyers emlőshúsoktól, illetve az állatokkal való közvetlen érintkezés során is bekövetkezhet. A bejelentett humán *Campylobacter*-esetek száma 2004-2009 között az Európai Unió országaiban 40-50/100 000 fő között, nálunk pedig ugyanezen idő alatt 55-90 között változott (Epinfo, 2011).

A humán fertőzések járványtanának részletes ismerete elengedhetetlen a betegség elleni védekezéshez. A fertőzések nagyobb része sporadikusan fordul elő, ami a járványügyi nyomozást megnehezíti. Számos nukleinsav alapú tipizálási módszert dolgoztak ki, amelyek alkalmasak az állatok környezetében, az élelmiszerláncban előforduló, illetve a fertőzéseket okozó *Campylobacter*-fajok, típusok kimutatására, azonosítására, egymástól való megkülönböztetésére, és szóródásának nyomonkövetésére. Ezek a módszerek alkalmasak a különböző élelmiszer-termelő állatállományok és élelmiszerek monitoring vizsgálatára is.

Az Európai Parlament és a Tanács 2003/99/EK irányelve a zoonózisok és zoonózis-kórokozók monitoringjáról javasolja az adatok gyűjtését a zoonózisok és a zoonózis-kórokozók előfordulásáról a takarmányokban, az állatokban, az élelmiszerben, és az emberben annak érdekében, hogy meghatározza a kórokozók forrását, és adatokat kapjon a terjedés mértékére és irányára. Javasolja továbbá a rezisztens törzsek fokozott előfordulása miatt egy harmonizált, antibiotikum-rezisztenciát figyelő rendszer felállítását *Campylobacter* és egyéb zoonotikus baktériumokra vonatkozóan.

Új-Zélandon nemzeti *Campylobacter* szubtípus adatbázist hoztak létre, hogy a zoonotikus betegség epidemiológiáját jobban felderítsék, és ennek érdekében egységes és hatékony izolálási, kimutatási, azonosítási módszereket alakítottak ki (Donnison, 2003).

Hazánkban jelenleg nincs egységes nemzeti referencia módszer a campylobacterek vizsgálatára, és kevés adattal rendelkezünk a különböző állatfajokban előforduló *Campylobacter*-fajok molekuláris jellemzőiről is.

Intézetünkben, az MgSzH Állategészségügyi és Diagnosztikai Igazgatóságán (korábban Országos Állategészségügyi Intézet) 2001 óta folyik *Campylobacter* kimutatására és antibiotikum-rezisztencia vizsgálatára irányuló országos monitoring vizsgálat (Kaszanyitzky és mtsai, 2002). Az ország minden megyéjéből, különböző vágóhidakról havonta kapunk 3-3 lekötött bélkacsot a fontosabb élelmiszer-termelő állatokból, azaz szarvasmarhából, sertésből, tyúkból és néha pulykából is.

Ezen mintaküldésre alapozva munkánk céljai az alábbiak voltak:

1. A termofil campylobacterek izolálása szelektív tenyésztéssel és annak megállapítása, hogy azok milyen gyakorisággal fordulnak elő a különböző állatfajokban.
2. Mivel a fajok meghatározása a hagyományos tenyésztési és biokémiai tulajdonságok alapján nehézkes, ezért célunk volt egy gyors és hatékony real-time PCR módszer kidolgozása a leggyakrabban előforduló fajok, a *C. jejuni* és a *C. coli* azonosítására, hogy megkönnyítsük a monitoring vizsgálatokat.
3. A törzsek hagyományos módszerrel történő meghatározása azok tenyésztési és biokémiai tulajdonságai alapján, és összehasonlítása a PCR-rel kapott eredményekkel.
4. A tenyésztés és a PCR módszer érzékenységének összehasonlítása a campylobacterek kimutatására a bélminták közvetlen vizsgálata esetén.
5. Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatokkal célunk volt felderíteni a különböző antibiotikumokra rezisztens törzsek arányát, és a tendenciákat, melyek az esetlegesen szükséges humán gyógykezelés és a rezisztencia terjedés szempontjából kiemelkedően fontosak.
6. A *Campylobacter* törzsek genetikai jellemzése *flaA* SVR szekvenálás, PFGE és MLST módszerekkel a törzsek besorolása, egymástól való megkülönböztethetősége és szóródásuk nyomon követhetősége érdekében, illetve a módszerek összehasonlítása.
7. Csirkeállományok *Campylobacter* mentes felnevelése lehetőségének a vizsgálata, a közegészségügyi kockázat csökkentése érdekében.

A felmérő és járványügyi vizsgálatok, illetve a laboratóriumi kutatások elsősorban a *C. jejuni* és *C. coli* fajokra, mint a fertőzések elsődleges okozóira, és a baromfiállományokra, mint a fő fertőzési forrásra koncentrálnak. Azonban számos kevésbé gyakori *Campylobacter*-fajt is azonosítottak emberi megbetegedésekből. Ezen egyéb fajokat általában ritkábban izoláljuk nem csak a ritkább előfordulásuk miatt, hanem azért is, mert az általánosan

használt módszereket a *C. jejuni* kitenyésztésére optimalizálták. Így ezeknek a fajoknak a jelentősége valószínűleg alulbecsült.

Az általunk használt tenyésztési módszer is elsősorban a termofil campylobacterek izolálására alkalmas, mégis ahogy elkezdtek felmérni a magyarországi haszonállatok *Campylobacter*-fertőzöttségét, azok faj szerinti eloszlását, fény derült egy eddig hazánkban ki nem mutatott faj, a *C. lanienae* széles körű előfordulására a sertésállományokban.

Megvizsgáltuk ezeknek a törzseknek a genetikai sajátosságait a 16S rRNS-t kódoló gén szekvenálásával és PFGE módszerekkel, annak érdekében, hogy összehasonlíthassuk azokat az irodalomban eddig leírt törzsekkel, illetve hozzájáruljunk a faj jobb megismeréséhez.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A *Campylobacter*-fajok jellemzői

A *Campylobacter*-nemzetség tagjai hajlott pálcika alakú, 0,2-0,8 µm széles és 2-5 µm hosszú Gram-negatív baktériumok, ha a többször osztódott baktériumok egymáshoz tapadva maradnak, S-alakok, illetve hosszabb spirális láncok formájában láthatók (Tuboly és mtsai, 1998).

A fajok többsége motilis, uni- vagy bipoláris csillóval rendelkezik. A *C. gracilis* nem mozog, a *C. showae* és alkalmanként a *C. hyointestinalis* több csillóval rendelkezik (campynet, 2001). Jellemző, dugóhúzó vagy csigavonalszerű mozgást végeznek, amely fáziskontraszt vagy sötét látóteres mikroszkópban jól látható (Songer és Post, 2005).

Néha az öreg tenyészetekben, vagy környezeti stressz hatására a sejtek lekerekednek, coccoid vagy fánk formájúak lesznek, de ez nem feltétlen jelenti azt, hogy a törzs életképes, de nem szaporítható (viable but not culturable, VBNC) állapotban van (Park, 2002).

A campylobacterek 25-42 °C-on tenyészthetők, a termofil campylobacterek (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*) 30 °C alatt nem nőnek, optimális tenyésztési hőmérsékletük 42 °C. A fajok többsége a légköri levegőhöz képest csökkentett oxigén (5-10%) és magasabb CO₂ koncentrációt (3-5%) igényel (mikroaerofil környezet). Néhány faj az anaerob körülményeket jobban kedveli (*C. rectus*, *C. gracilis*), egyes fajok (pl.: *C. mucosalis*) hidrogén jelenlétét is igénylik (On, 2001).

Érzékeny baktériumok, a kiszáradást, a hőkezelést, a légköri oxigén koncentrációt rosszul tűrik, de hűtött, mélyhűtött élelmiszerekben, nedves környezetben hónapokig túlélhetnek. A savas környezetre érzékenyek, a tisztító- és fertőtlenítőszerrel könnyen elpusztíthatók (CDC, 2010).

A szubletális környezeti feltételek, tápanyagok hiánya, stb. indukálhatják a baktériumsejtek lekerekedését és az életképes, de nem tenyészthető forma (VBNC) kialakulását. Ez a túlélési stratégia fontos szerepet játszhat az ember és állatok campylobacteriosisának epidemiológiájában (Blackburn és McClure, 2002). Az ilyen törzsek ugyan nem tenyészthetők, de fertőzőképes állapotban vannak (Cappelier et al., 1999). Mások azonban úgy találták, hogy a vélelmezett VBNC állapot megkérdőjelezhető és nincs jelentősége a baktérium epidemiológiájában (Hald et al., 2001). A tenyészthető forma visszanyerése egy érzékeny gazdaállatban vagy embrionált tojásban való elszaporítással lehetséges (Cappelier et al., 1999). Azonban a VBNC baktériumok felélesztése nehezen elkülöníthető a kis számban jelen lévő tenyészthető baktériumok elszaporításától (Newell és Davison, 2003).

A campylobacterek nem fermentálnak szénhidrátokat (egyebek mellett ez is elkülöníti őket a vibrióktól), aminosavakból vagy a trikarboxilsav ciklus intermedierekből nyerik az energiát. Többnyire ureáz negatívak, ami elkülönítheti őket a helicobacterektől (Songer és Post, 2005). Tipikus biokémiai jellemzői: fumerát redukciója szukcináttá, metilvörös negatív, indol negatív, acetoin termelés negatív, oxidáz pozitív (Debruyne et al., 2008).

Ezidáig 36 fajt, illetve alfajt írtak le a *Campylobacter*-nemzetségen belül. Rendszertani besorolásuk:

Ország: Baktériumok

Törzs: Proteobacteria

Osztály: Epsilonproteobacteria

Rend: Campylobacterales

Család: Campylobacteraceae

Nemzetség: *Campylobacter* (DSMZ, 2011)

3.2 A *Campylobacter*-fajok előfordulása

A *Campylobacter*-fajok világszerte előfordulnak, megtalálhatók a különböző melegvérű állatok bélcsatornájában és a genitáliákban. Mivel a környezetben tartósan nem maradnak életben, a melegvérű állatok tekinthetők a baktérium rezervoárjának (Newell és Davison, 2003).

1. táblázat. A különböző *Campylobacter*-fajok és alfajok, illetve a korábban *Campylobacter*-nek tartott *Arcobacter*-, *Helicobacter*-fajok előfordulása és első leírása. A pirossal jelzett fajok **emberben** is előfordulnak (DSMZ, 2011).

Hivatalos név	Szinonima	Előfordulás	Leíró	Folyóirat
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	Különböző melegvérű állatok belében, madarakban gyakori, ember, emlősök campylobacteriosis - enteritis, juh, (sertés) genitális campylobacteriosis, baromfi hepatitis	(Jones et al. 1931) Veron and Chatelain 1973	Int. J. Syst. Bacteriol. 23:122-134
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>		Ember székletéből klinikai esetből izolálták	Steele and Owen 1988	Int. J. Syst. Bacteriol. 38:316-318
<i>C. coli</i>	<i>C. hyoilei</i> (heterotypic syn.)	Különböző melegvérű állatok belében, sertésben gyakori, ember és sertés campylobacteriosis – enterocolitis	(Doyle 1948) Veron and Chatelain 1973	Int. J. Syst. Bacteriol. 23:122-134
<i>C. hyoilei</i>	<i>C. coli</i>		Alderton et al. 1995	Int. J. Syst. Bacteriol. 45:61-66

			Vandamme et al. 1997	Int. J. Syst. Bacteriol. 47:1055-1060
<i>C. lari</i> subsp. <i>lari</i>	<i>C. lari</i> , <i>C. laridis</i>	Különböző melegvérű állatok belében, különösen madarakban gyakori, ember campylobacteriosis – enteritis	Benjamin et al. 1983	Curr. Microbiol. 8:231-238
			Debruyne et al. 2009	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:1126-1132
<i>C. lari</i> subsp. <i>concheus</i>		Kagyló	Debruyne et al. 2009	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:1126-1132
<i>C. upsaliensis</i>		Kutya, macska belében, ember és állat campylobacteriosis – hasmenés	Sandstedt and Ursing 1991	Syst. Appl. Microbiol. 14:39-45
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	<i>C. hyointestinalis</i>	Sertés normál bélflóra, (porcine proliferative enteropathy), ember hasmenés	Gebhardt et al. 1985 emend. On et al. 1995	J. Clin. Microbiol. 21:715-720
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>		Sertés gyomor	On et al. 1995	Int. J. Syst. Bacteriol. 45:767-774
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	<i>C. fetus</i>	Juh, szarvasmarha belében, ember, állatok campylobacteriosis – juh, (szarvasmarha) genitalis campylobacteriosis, ember extraintestinalis campylobacteriosis	(Smith and Taylor 1919) Sebald and Véron 1963	Ann. Inst. Pasteur 105:897-910.
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>		Szarvasmarha nemi utak, szarvasmarha genitalis campylobacteriosis	(Florent 1959) Veron and Chatelain 1973	Int. J. Syst. Bacteriol. 23:122-134
<i>C. sputorum</i> bv <i>sputorum</i> (kat-, ureáz-)	<i>C. sputorum</i> subsp. <i>sputorum</i>	Ember szájüreg, sertés, szarvasmarha, juh bél, nemi utak nem fajspecifikus, mint korábban gondolták, ember hasmenés	(Prévot 1940) Véron and Chatelain 1973 --> Roop et al. 1985 emend. On et al. 1998	Int. J. Syst. Bacteriol. 48:195-206
<i>C. sputorum</i> bv <i>paraureolyticus</i> (kat-, ureáz+)	<i>C. sputorum</i> subsp. <i>bubulus</i>	Szarvasmarha nemi utak	(Florent 1953) Veron and Chatelain 1973 --> Roop et al. 1985 emend. On et al. 1998	Int. J. Syst. Bacteriol. 48:195-206
<i>C. sputorum</i> bv <i>faecalis</i> (kat+, ureáz-)	<i>C. faecalis</i>	Juh bélsár	--> Roop et al. 1985 emend. On et al. 1998	Int. J. Syst. Bacteriol. 48:195-206
<i>C. concisus</i>		Ember szájüreg, periodontalis elváltozás	Tanner et al. 1981	Int. J. Syst. Bacteriol. 31:432-445

<i>C. curvus</i>	<i>Wolinella curva</i> (basonym)	Ember szájüreg, periodontalis elváltozás	(Tanner et al. 1984) Vandamme et al. 1991	Int. J. Syst. Bacteriol. 41:88-103
<i>C. rectus</i>	<i>Wolinella recta</i> (basonym)	Ember szájüreg, periodontalis elváltozás	(Tanner et al. 1981) Vandamme et al. 1991	Int. J. Syst. Bacteriol. 41:88-103
<i>C. gracilis</i>	<i>Bacteroides gracilis</i> (basonym)	Ember szájüreg, periodontalis elváltozás	(Tanner et al. 1981) Vandamme et al. 1995	Int. J. Syst. Bacteriol. 45:145-152
<i>C. showae</i>		Ember szájüreg, periodontalis elváltozás	Etoh et al. 1993	Int. J. Syst. Bacteriol. 43 631-639
<i>C. mucosalis</i>	<i>C. sputorum</i> subsp. <i>mucosalis</i>	Sertés bél, porcine intestinal adenomatosis	Lawson et al. 1981	Int. J. Syst. Bacteriol. 31:385-391
			Roop et al. 1985	Int. J. Syst. Bacteriol. 35:189-192
<i>C. helveticus</i>		Kutya, macska belében – hasmenés	Stanley et al. 1992	J. Gen. Microbiol. 138: 2293-2303.
<i>C. lanienae</i>		Sertés, szarvasmarha belében, vágóhídi dolgozók	Logan et al. 2000	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:865-872
<i>C. hominis</i>		Ember bél	Lawson et al. 2001	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:651-660
<i>C. insulaenigrae</i>		Tengeri emlősök	Foster et al. 2004	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:2369-2373
<i>C. canadensis</i>		Darvak	Inglis et al. 2007	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:2636-2644
<i>C. cuniculorum</i>		Nyúl	Zanoni et al. 2009	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:1666-1671
<i>C. avium</i>		Baromfi	Rossi et al. 2009	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:2364-2369
<i>C. peloridis</i>		Kagyló	Debruyne et al. 2009	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:1126-1132

<i>C. subantarcticus</i>		Madarak	Debruyne et al. 2010	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:815-819
<i>C. volucris</i>		Dankasirály	Debruyne et al. 2010	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:1870-75
<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>C. butzleri</i>	Szarvasmarha, juh, sertés bél, nemi utak, ember campylobacteriosis - hasmenés, állatokban hasmenés, abortusz	Kiehlbauch et al. 1991	J. Clin. Microbiol. 29:376-385
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	<i>C. cryaerophilus</i>	Különböző fajok bél, szarvasmarha, juh, sertés nemi utak, szarvasmarha mastitis, szarvasmarha, juh, sertés, ló, kutya abortusz	corrig. Neill et al. 1985	Int. J. Syst. Bacteriol. 35:342-356
<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	<i>C. nitrofigilis</i>	Növény gyökerén nitrogén kötő baktérium	McClung et al. 1983	Int. J. Syst. Bacteriol. 33:605-612
<i>Helicobacter mustelae</i>	<i>C. pylori</i> subsp. <i>mustelae</i>	Vadászgörény gyomor, gastritis	Fox et al. 1988	Int. J. Syst. Bacteriol. 38:367-370
			Fox et al. 1989	Int. J. Syst. Bacteriol. 39:301-303
<i>Helicobacter pylori</i> / <i>H. nemestrinae</i>	<i>C. pylori</i> subsp. <i>pylori</i>	Főemlősök gyomor, gastritis	Marshall et al. 1985	Int. J. Syst. Bacteriol. 35:223-225
<i>Helicobacter fennelliae</i>	<i>C. fennelliae</i>	Ember, kutya bél	Totten et al. 1985	J. Infect. Dis. 151:131-139
<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>C. cinaedi</i>	Ember, hörcsög bél	Totten et al. 1985	J. Infect. Dis. 151:131-139

A *C. jejuni* és a *C. coli* a madarak és a legtöbb emlősállat-faj bélcsatornájának természetes lakói. A *C. jejuni*-t és *C. coli*-t 10^7 CFU/g bélsár mennyiségben hordozhatják a haszonállatok. A vadmadarak bélcsatornájában elsősorban *C. jejuni* és *C. lari* telepszik meg. A bélsárral szennyeződhet a talaj, a felszíni vizek és az élelmiszerek (Quinn et al., 2002).

3.2.1 Campylobacterek előfordulása a különböző élelmiszer-termelő állatfajokban

A **baromfi fajok** 65-95%-ban *C. jejuni*-val, ritkábban *C. coli*-val és alkalmanként más fajokkal fertőzöttek (OIE, 2010). A brojlercsirke (és pulyka) nagyon fogékony a *C. jejuni* megtelepedésére, és a fertőzéstől számítva 24 órán belül elkezdti üríteni a baktériumot, amely akár a vágó kor eléréséig tarthat (Achen et al., 1998). A nagyfokú érzékenység és a magas arányú ürítés (általában 10^6 CFU/g-nál nagyobb) miatt a campylobacterek az állományon belül horizontálisan bélsárral, vízzel, vektorok révén gyorsan terjednek. Az

állományok 2 hetes korig többnyire fertőzéstől mentesek, majd a campylobacterek megjelenése után 72 órán belül akár 100%-os fertőzöttség is kialakulhat (OIE, 2010).

A baktérium vertikális terjedése nem volt igazolható. Tojásból, napos csirkékből (Pearson et al., 1993), egy hetesnél (Pokamunski, et al., 1986) és 13 naposnál fiatalabb csirkékből (Jacobs-Reitsma et al., 1995) nem tudtak kimutatni *Campylobacter*-t.

Több szerotípus is jelen lehet egyszerre egy-egy állományban, melyek különböző forrásokból származhatnak (Varga és mtsai, 1990). Az állományok fertőződése több forrásból is bekövetkezhet; átjárás más baromfi- vagy sertésállományba, statikus ventiláció az istállóban, több istálló egy telepen, az emberek, akik a csirkéket ellátják, legyek, alombogarak (Skov et al., 2004), gyászbogár (Bates et al., 2004; Strother et al., 2005), mint mechanikai vektorok. A legnagyobb kockázati tényező a szennyezett itatóvíz (Kapperud et al., 1993). A vadmadarak szintén hordozzák a baktériumot, és fertőzési forrást jelenthetnek (Craven et al., 2000). A száraz takarmány és az alom nem tekinthető fertőzési forrásnak, mivel a baktérium ellenálló képessége kicsi, a túléléséhez nedvesség szükséges (Pokamunski, et al., 1986).

A **sertések** fertőzöttsége akár 96%-ig (pl.: Nagy-Britannia) *C. coli*-ra vezethető vissza, azonban Hollandiában 79%-os *C. jejuni* pozitívitas fordult elő (Oosterom et al., 1985). A fiatal állatok nagyobb arányban fertőzöttek, mint az idősebbek. A bélsárból a kimutatás intermittáló lehet a nem folyamatos, de visszatérő ürítés, vagy az alacsony csíraszám miatt (OIE, 2010).

A baktérium ürítése stresszhatásra fokozódik, így fialáskor, választáskor, szállításkor valószínűsíthető. A malacok az életük első napjaiban fertőződnek. A baktérium a bélcsatornában tartósan megtelepedhet, de a baktérium ismételt felvétele is lehetséges (Weijtens et al., 1997; Weijtens et al., 2000).

Szarvasmarhák és **juhok** horizontálisan fertőződnek különösen fiatal, fogékonyabb korban és hordozókká válhatnak. Elsősorban *C. jejuni*-val fertőzöttek, de előfordul *C. coli*-val, *C. hyointestinalis*-szal és *C. fetus*-szal való fertőzöttség is (Grau, 1988). Egy vizsgálat adatai szerint, a 4 hetes borjak 54%-a, míg a felnőtt állatok 12,5%-a volt fertőzött (OIE, 2010; Grau, 1988). Az idősebb szarvasmarhák bélsárából az idősebb sertéseknél tapasztaltakhoz hasonlóan a kimutatás intermittáló lehet (OIE, 2010). A fertőződés veszélye nő, ha az állomány nagy (>100) (Hoar et al., 2001; Wesley et al., 2000), ha lehetséges a vadmadarakkal való kapcsolat, pl. a takarmányhoz hozzáférnek (Grau, 1988). A takarmány összetétele a baktériumok túlélését befolyásolhatja a bélben. Az állatok szennyezett víz fogyasztásával is fertőződhetnek.

A baktérium ürítése összefügg a stresszhatásokkal, tejelő állományokban az ellések idején megnő (Stanley et al., 1998). A rossz minőségű legelőn tartott juhoknál, illetve tavasszal (ellés ideje, legelőváltás, parazitás fertőzések) az ürítés fokozottabb. A megfelelő

legelőn lévő juhok *Campylobacter*-ürítése a vágóhídon mért hordozás arányának fele, egyharmada (Jones et al., 1999; Stanley et al., 1998).

3.2.2 Élelmiszerek *Campylobacter*-szennyezettsége

Az élelmiszerek közül Magyarországon is a **baromfihús** a legszennyezettebb campylobacterekkel (2. táblázat), így a legjelentősebb fertőzési forrásnak a baromfihús tekinthető (EFSA, 2010; Varga, 1997). A hús szennyezettségét a csirke fertőzöttségén túl, tovább növeli a zsúfolt szállítás és a vágás folyamata (Stern et al., 1995). A mentes állományból származó csirke húsa is szennyeződhet a vágóhídon, a fertőzött állományok egyedeinek beléből kiszabaduló baktériumok szétkenődése által. *Campylobacter*ek az aprólékban, zsigerekben, különösen a májban is előfordulhatnak (CDC, 2010; Rivoal et al., 1999).

A humán fertőzéseket jóval kisebb arányban okozzák a **sertéshús** eredetű campylobacterek (elsősorban *C. coli*). Ennek hátterében az állhat, hogy a sertéshús a feldolgozás folyamán kevésbé szennyeződik, illetve a húst szennyező baktériumok a feldolgozás folyamatában kevésbé élnek túl. Egy vizsgálatban a belsőségek eltávolítása után a hús 9%-át találták fertőzöttnek, a hűtés után pedig egyet sem (Oosterom et al., 1985). Azokban az országokban azonban, ahol nagyobb a sertéshús-fogyasztás, ott a *C. coli* fertőzések aránya is nagyobb (Newell és Davison, 2003).

A **szarvasmarhák** is magasabb arányban fertőzöttek, mint a húruk (Newell és Davison, 2003).

A **tej** elsősorban a fejés során szennyeződhet a bélsárból származó baktériumokkal, ritkábban a tőgyből *Campylobacter* okozta mastitis miatt (Kálmán és mtsai, 2000). A *Campylobacter* a tejben nem tud szaporodni, de 3 hétig is túlél a hűtött tejben. A szennyezett nyers kecske- és juhtej is tartalmazhat termofil campylobactereket.

2. táblázat. Élelmiszerek *Campylobacter*-szennyezettsége 2008-ban (EFSA, 2010).

Camp. pozitív %	EU	Magyarország
brojlercsirke bőr	75,8 (tagállamok: 4,9-100)	55,3
pulykahús	10,1	4,6
kacsahús	nincs adat	1,2
libahús	nincs adat	1,4
sertéshús	0,5	1,4 (2009)
marhahús	0,3	0,4 (2009)
tej	2,3	2,5

3.2.3 *C. lanienae* előfordulása

C. lanienae-t először Logan et al. (2000) írta le. Egy rutin higiéniai felmérés során tünetmentes vágóhídi dolgozók székletéből izolálták Svájcban. Az egyetlen közös fertőzési

forrás a vágóhídi munka volt, ahol szarvasmarha és sertés vágás történt. A baktériumot azonban nem sikerült kitenyészteni az állatokból.

Sasaki et al. (2003) egészséges szarvasmarhából, sertésből és brojlercsirkéből próbáltak campylobactereket kitenyészteni Japánban, és csak sertésekből tudtak izolálni 6 *C. lanienae* törzset.

Gorkiewicz et al. (2003) Ausztriában szintén izoláltak *C. lanienae*-t sertésből.

Inglis és Kalischuk (2004), és Inglis et al. (2003; 2004) Kanadában szarvasmarha bélsárból mutatták ki a *C. lanienae*-t tenyésztéssel és direkt módon PCR-rel. Továbbá összefüggést találtak a *C. lanienae* jelenléte és májtályogok képződése között az Angus fajtával keresztezett húsmarhákban, ami arra enged következtetni, hogy a *C. lanienae* patogén lehet szarvasmarhában.

3.3 Campylobacterek okozta kórképek

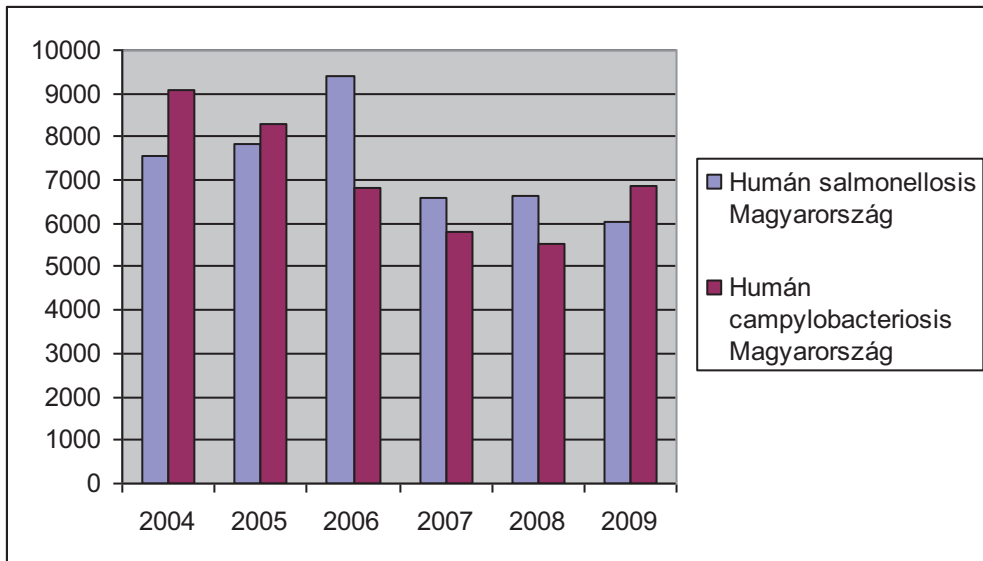
3.3.1 Campylobacterek okozta megbetegedések emberben

A campylobacteriosis zoonózis, sok fejlett országban a leggyakoribb humán enterális megbetegedést okozó bakteriális élelmiszerfertőzés (Blackburn és McClure, 2002) (3. táblázat). Magyarországon is a vezető helyen áll a gastroenteritist okozó kórokozók sorában, a humán orvoslásban 1998. óta bejelentési kötelezettség alá tartozik.

3. táblázat. Campylobacteriosis előfordulása egyes fejlett országokban.

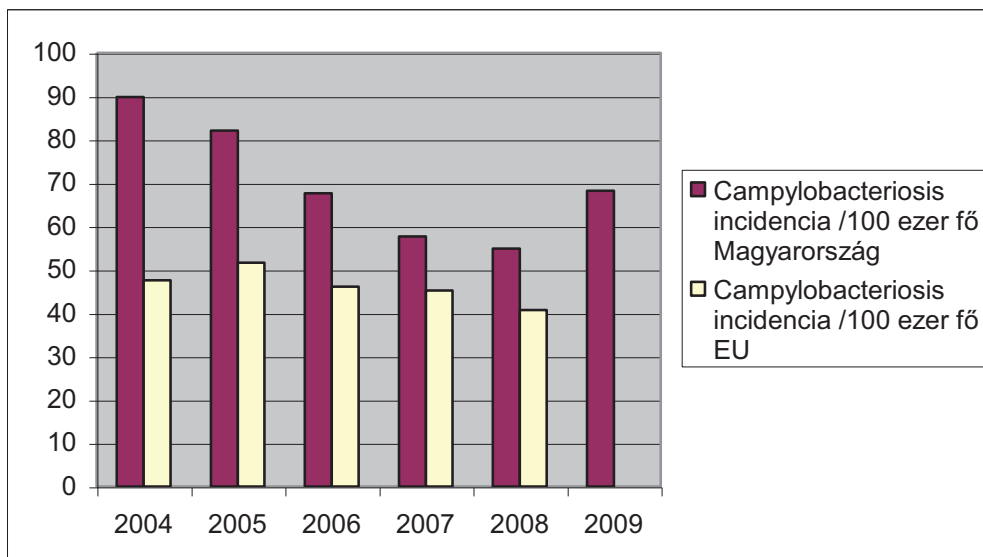
Ország	megbetegedés/100 000 fő
Új-Zéland	341,0
Ausztrália	116,5
EU	40,7
USA	15,0

Magyarországon 2004-2005-ben a campylobacteriosis, 2006-2008 között a salmonellosis fordult elő nagyobb számban, majd 2009-ben ismét a *Campylobacter*-fertőzés volt a leggyakoribb (1. és 2. ábra). 2008-ban 5563 bejelentés történt, ebből 5516 esetet laboratóriumi vizsgálatokkal is bizonyítottak. 100 000 főre vetítve 54,9 megbetegedés történt, ami az EU-s átlag (40,7) felett van (EFSA, 2010). 2010-ben több campylobacteriosist jelentettek, mint 2009-ben, a nyilvántartásba került esetek száma 15%-kal meghaladta a 2009-es értéket (Epinfo, 2011).



1. ábra: A humán salmonellosis és campylobacteriosis esetek száma Magyarországon 2004-2009.

Összességében az EU-n belül nincs szignifikáns változás, egyes országokban csökken (Belgium, Csehország, Hollandia Spanyolország), egyesekben nő (Németország, Finnország, Franciaország, Lengyelország, Szlovákia, Svédország, Egyesült Királyság) a campylobacteriosis előfordulása. Magyarországon a bejelentett campylobacteriosisos esetek száma 1998-2004-ig 8300 - 9200 között mozgott, 2004-től 2008-ig szignifikánsan csökkent, majd 2009-ben ismét növekedésnek indult (EFSA, 2010).



2. ábra: Humán campylobacteriosis esetek száma Magyarországon és az EU-ban 2004-2009.

Az északi országokban az esetek jellemzően importáltak (Svédország, Finnország, Norvégia), míg Magyarországon a fertőzés 99,8%-ban hazai eredetű.

Campylobacteriosis nyáron, kora ősszel (június-szeptember) gyakrabban fordul elő (CDC, 2010). A baktériumot gyakrabban izolálják 5 év alatti gyerekekből (105,4/100 000), illetve 15-24 éves fiatalokból (46,5/100 000), mint más korosztályból (EFSA, 2010). A campylobacter okozta humán hasmenéses esetek több mint 50%-a nálunk is öt évesnél fiatalabb gyermekekben fordult elő (Varga és Fodor, 1998).

Az infektív dózis alacsony, emberben kevesebb, mint 500 baktérium, tehát egy csepp nyers húslé is elég a fertőzéshez (CDC, 2010).

A *Campylobacter*-fertőzés következményei nagyban függenek attól, hogy a fertőzött egyén immunrendszere mennyire erős és találkozott-e már a baktériummal. A gyengébb immunrendszerrel rendelkezőkben nagyobb a valószínűsége a klinikai tünetek kialakulásának, ugyanakkor, ha már átesett *Campylobacter*-fertőzésen, a tünetek valószínűleg enyhébbek lesznek. A fertőzött emberek egy része tünetmentes marad.

Campylobacteriosis általában 2-5 nappal a fertőzés után a jejunum-ileum gyulladása miatt hasmenésben, hasi fájdalmakban és lázban nyilvánul meg. A hasmenés lehet véres, hányingerrel, hányással társulhat. A betegség általában 2-5 nap alatt lezajlik, de tovább is eltarthat (OIE, 2010). Az emberek többsége a campylobacteriosisból kezelés nélkül is meggyógyul.

Immunszuppresszált egyéneknél a *Campylobacter* alkalmanként betör a véráramba, és életveszélyes fertőzést okoz. A campylobacteriosis extraintestinalis formája sokféleképp megnyilvánulhat: bacteriaemia, endocarditis, pneumonia, meningitis, cholecystitis, hepatitis, pancreatitis, peritonitis, mesenterialis lymphadenitis, cystitis, arthritis, septicus abortus. Habár a campylobacter többnyire nem okoznak halálos fertőzést, becslések szerint évente 124 ember hal meg ebben a fertőzésben az Amerikai Egyesült Államokban (CDC, 2010). Ritkán (1/1000), néhány héttel a hasmenéses tünetek után kialakulhat a Guillain-Barré szindróma, ami az idegrendszert érinti. Ez autoimmun reakció következménye, mely több hétig tartó bénulást okoz, és intenzív ellátást tesz szükségessé (CDC, 2010).

Minden *C. jejuni* törzs termel egy cytotoxint, ami gátolja a sejtek osztódását és letálas a sejtekre. A baktérium kórokozó képességét segíti, hogy aktív mozgásra képes, továbbá az enterocitához történő adhézión, mely által a perisztaltika nem távolítja el (Songer és Post, 2005).

A virulenciában nagy szerepe van az inváziós képességének, mellyel bejut a bélhámsejtekbe. Az invázió mértéke nagyban függ az adott törzstől: a környezetből származó izolátumok sokkal kevésbé invazívak, mint a tüneteket mutató állatokból izoláltak és a gyulladás nélküli hasmenésből izoláltak kevésbé invazívak, mint a colitises esetekből származók. Kimutatták, hogy egy plazmid is szerepet játszik az invázióban (pVir) (Bacon et

al., 2002). A pVir plazmid génjeiben történt mutáció csökkenti a törzs virulenciáját, ilyen mutációk a természetben is előfordulhatnak (Bacon et al., 2000; Schmidt-Ott et al., 2005). A *C. jejuni* törzsek egy része hordoz csak pVir plazmidot. Ezen törzsek általában véres hasmenést okoznak. A pVir plazmidot hordozó törzsek egyben tetraciklinre is rezisztensek, bár a két plazmid nem együtt konjugálódik (Tracz et al., 2005).

A baktériumok mélyebb szövetekbe is bejuthatnak transzcitózis segítségével, és 3 nappal a fertőzés után megjelennek a granulocytákban, parenchyma sejtekben, mononukleáris sejtekben. Az intracelluláris túlélésüket segíti a szuperoxid-dizmutáz, kataláz aktivitásuk (Songer és Post, 2005).

Az esetek 95%-ában a campylobacteriosis előfordulása sporadikus, csak egy-egy egyénre vagy családra korlátozódik (CDC, 2010), alkalmanként azonban sok embert érintő járvány is előfordul. 2008-ban 45 bejelentett járvány volt Magyarországon. A megbetegedés jellegéből következően a valós fertőzések száma sokkal magasabb lehet, mint a bejelentett eseteké.

Campylobacteriosisért elsősorban a termofil campylobacterek a felelősek, Európában leggyakrabban *C. jejuni* okozza, kisebb százalékban *C. coli*, alkalmanként *C. lari*, vagy más faj (CDC, 2010; OIE, 2010; Blackburn és McClure 2002). Ausztráliában és Dél-Afrikában a hasmenéses gyerekekből izolált campylobacterek 20%-a *C. upsaliensis*. Humán enteritist *C. hyointestinalis* is okozhat. A campylobacteriosis extraintestinalis formáját elsősorban a *C. fetus* subsp. *fetus* okozza. Hazánkban az izolált törzsek 75-80%-a *C. jejuni*, kb. 10%-a *C. coli* és 2-5%-a *C. lari*, ez az arány az elmúlt években nem változott jelentősen (EFSA, 2010).

A humán fertőzéseknél a kórokozót legnagyobb arányban a különböző élelmiszerek viszik át. A fertőzések leggyakoribb oka a nyers vagy nem eléggé hőkezelt baromfi, vagy más ezek által keresztfertőzött élelmiszerek fogyasztása. A marhahús, sertéshús továbbá a belsőségek, különösen a máj, szintén fertőzési forrás lehet (Wong et al., 2007). *C. jejuni*-t és *C. coli*-t izoláltak (feltehetően bélsárral szennyeződött) felszíni vizekből: folyóból, tóból (Hörman et al., 2004; Vereen et al., 2007). A baktérium ugyan szaporodni nem képes a természetes vizekben, de túlél akár 160 napig is, ami arra enged következtetni, hogy a víz szintén lehet a fertőzés forrása. Mechanikai vektor szerepet tölthetnek be különböző ízeltlábúak, mint például a házilég (Adhikari et al., 2002). A nem megfelelő konyhai higiénia következtében más élelmiszerek is fertőzettek lehetnek, mint például a tonhalsaláta (Roels et al., 1998). A szennyezett vízzel érintkező különböző zöldségeken is előfordulhat *Campylobacter* (Brandl et al., 2004; Chai et al., 2007). Különböző tengeri halászati termékből, mint például rákból is izolálták a kórokozót (Reinhard et al., 1996). Fertőzés forrása lehet továbbá, az élő állatokkal való kontaktus, a fertőzött állatok, illetve ember székletével való érintkezés is (CDC, 2010). A fertőzés után az ember akár egy hónapig is ürítő maradhat (Aarestrup et al., 2008).

Járványos előfordulás hátterében a baromfihúson kívül általában szennyezett víz vagy nyers tej fogyasztása áll (CDC, 2010).

Megbetegedés esetén folyadékterápiát alkalmaznak a hasmenés okozta dehidráció elkerülésére. Súlyosabb esetekben antibiotikum-terápia szükséges, elsődlegesen alkalmazott szer az eritromicin vagy valamelyik fluorokinolon származék (CDC, 2010).

3.3.2 *Campylobacterek okozta megbetegedések állatokban*

Állategészségügyi szempontból főleg a *C. fetus* subsp *fetus*, a *C. fetus* subsp. *venerealis*, a *C. jejuni* és a *C. coli* fajoknak van jelentősége.

Szarvasmarhában, juhban, kecskében szórványosan vetélést, mastitist, újszülöttekben ritkán enteritist okozhatnak. Fiatal kutyákban, macskákban, nyulakban, sertésben hasmenéssel járó enteritist idézhetnek elő, a tojásrakás kezdetén lévő tyúkállományokban pedig a bélcsatornából beszaporodva hasmenést és hepatitist okozhatnak (Varga és mtsai, 1999).

3.4 *Campylobacter*-fajok kimutatása, tipizálása

3.4.1 *Campylobacterek felfedezése*

Hasmenéses gyermekek székletének mikroszkópos vizsgálatával a német T. Escherich észlelt először *Campylobacter*-szerű baktériumokat 1886-ban. A morfológiai hasonlóságra tekintettel a talált baktériumot a *Vibrio* genusba sorolta, az általuk okozott megbetegedést pedig vibriosisnak hívták (Czirók, 1999). Először 1906-ban izoláltak manapság *Campylobacter*-nek tekintett fajt vetélt juh méhváladékából (McFadyean és Stockman, 1913). Smith 1919-ben hasonló baktériumot izolált vetélt szarvasmarha magzatból, és *Vibrio fetus*-nak nevezték el (Smith és Taylor, 1919). Szarvasmarha- és juh-vetélesekben, akkor vibrióknak tekintett kórokozókat az elmúlt század első harmadában nálunk is kitenyésztettek (Schmiedhoffer, 1926; Marcis, 1934). A hasmenéses szarvasmarhából (Winter dysentery) és sertésből kimutatott *Vibrio*-like baktériumokat *Vibrio jejuni* (Jones et al., 1931) és *Vibrio coli*-nak (Doyle, 1948) nevezték el az 1930-40-es években. Hasonló baktériumokat találtak hasmenéses emberek vérében is (Blackburn és McClure, 2002). A *Campylobacter* genus elnevezés 1963-ban született meg Sebald és Véron javaslatára. A baktériumok tenyésztése nehézségekbe ütközött, mivel a bélsár szennyező flórája túlnötte a campylobactereket. Humán enteritis kapcsán Európában először 1972-ben Butzler és munkatársai szűrési technikával kombinált tenyésztéssel tudtak *Campylobacter*-t izolálni. Az angol Skirrow és munkatársai Butzlerrel együttműködve kidolgoztak egy egyszerűbb, szelektív talajon alapuló tenyésztési módot, ezáltal lehetőség nyílt a *Campylobacter* izolálására humán mintákból a rutin diagnosztikában. Skirrow az

előzetes eredmények alapján felhívta a figyelmet arra, hogy a humán fertőzések elsődleges forrása a csirkeállományokban keresendő (Post, 1995). A *Campylobacter*-nemzetségbe soroltak korábban *Wolinella*-nak tartott baktériumokat, mint a *C. rectus* és *C. curvus* és két *Bacteroides*-fajt, a *C. gracilis*-t és *B. ureolyticus*-t. A *Campylobacter*, *Arcobacter* és *Helicobacter* genusok *Campylobacteraceae* családba történő besorolását Vandamme javasolta 1991-ben DNS hibridizációs vizsgálatok alapján (Debruyne et al., 2008).

3.4.2 *Campylobacterek tenyésztése*

A *Campylobacter* elleni védekezés feltétele, hogy megismerjük az ökológiáját, epidemiológiáját, ehhez pedig elengedhetetlen, hogy azt megbízható módon ki tudjuk mutatni. A *Campylobacter* izolálása nehezebb, mint más élelmiszer eredetű patogéneké (Newell és Davison, 2003). Az elsődleges szerepet játszó termofil campylobacterek és azon belül is a *C. jejuni* kitenyésztéséhez számos szelektív táptalajt fejlesztettek ki.

Bár szarvasmarha- és juh-vetélés esetekből, továbbá a tyúkállományokban előforduló vibrio hepatitisz-ként leírt esetekből a kórokozó kitenyésztéséhez antibiotikumokat tartalmazó szelektív talajokat már az 1950-es évek elejétől kezdődően használtak (Bisping et al., 1964), humán célra Skirrow állította össze az első olyan antibiotikumokkal (vankomicin, trimetoprim, polimixin B) kiegészített szelektív talajt, melyen sikerrel izolálta a campylobactereket bélsárból. Ezzel és a baktérium mikroaerofil jellegének leírásával lehetővé vált a campylobacterek rutinszerű vizsgálata és bizonyossá vált a campylobacterek szerepe a humán megbetegedésekben (Post, 1995).

Ahogy a *Campylobacter*-rel kapcsolatos kutatások kiterjedtek a környezetre, vízre és a különféle élelmiszerekre, szükségessé vált érzékenyebb módszerek kidolgozása a kisebb számban jelen lévő baktériumok izolálására, méghozzá eltérő kísérőflórákból. A hamis negatív eredmények elkerülése érdekében elterjedt a különféle elődúsító (dúsító) levesek alkalmazása. Lander (1982) borjúhús levest egészített ki haemolizált lóvérrel, szénnel, antibiotikumokkal (vankomicin, polimixin B, trimetoprim, cikloheximid) és 5-fluorouracillal. Nem csak dúsítónak, hanem transzport közegnek is bevált, mikroaerob környezetet sem igényel. A *C. fetus* izolálására is alkalmas.

A bélsárból való tenyésztésnél csirkék esetében elegendő a közvetlen szelektív talajra való oltás, hiszen a tyúk nagy számban (akár 10^8 CFU/g) üríti a baktériumot. (Stern és Line, 1992). Szarvasmarha és juh bélsárból azonban elődúsítással nagyobb arányban lehet a *Campylobacter*-t kimutatni (Stanley et al., 1998). Madden et al. (2000) sertés bélsártampon minta vizsgálatánál közvetlen kioltással, az ileumból ugyanakkor elődúsítással kaptak jobb eredményt. Felhívták a figyelmet arra is, hogy az elődúsítót érdemesebb 24 órás inkubálás után továbboltani, mert hosszabb inkubálással az izolálás aránya csökkent.

Környezeti vizek vizsgálata szűrési módszerrel lehetséges. Nagy mennyiségű vizet (2-4l) kell átszűrni egy 0,2 µm-es szűrőn, majd a szűrőt elődúsítóba, vagy közvetlen szelektív talajra helyezni. Egy másik lehetséges módszer a centrifugálás, majd az üledék dúsítása (Newell és Davison, 2003).

A campylobacterek számos antibiotikumra rezisztensek, amit ki is használnak a szelektív talajok összeállításában. Rezisztensek vankomicinre (Gram-pozitív coccusokat gátol), polimixin B-re (Enterobacteriaceae tagjai és Pseudomonasok ellen hatásos), trimetoprimre (Proteust, Gram-pozitív coccusokat gátolja), és számos cefalosporinra (Enterobacter, Serratia Pseudomonas aeruginosa, Yersinia enterocolitica és néhány Proteus faj ellen hatásos). A Preston talajban rifampicinnel kiváltották a vankomicint, ám későbbi vizsgálatok során kiderült, hogy a rifampicin a stresszelt *C. jejuni* sejteket gátolja (Humphrey és Cruickshank, 1985). A cefoperazon optimalizálja a *C. coli* izolálását. Élesztők és penészek ellen cikloheximidet használtak általában, manapság az amfotericin B jó helyettesítőnek bizonyult (Martin et al., 2002).

Mivel a campylobacterek közül a *C. jejuni* a leggyakoribb kórokozó, így elsősorban ezen baktériumra szelektív talajok kerültek forgalomba. Ezek azonban egyéb *Campylobacter*-fajok számára az esetlegesen eltérő érzékenységük miatt nem biztos, hogy optimális körülményeket biztosítanak a növekedésükhöz, így az előfordulásuk és jelentőségük is alábecsült lehet (Post, 1995).

Aspinall et al. (1993) megalkották a CAT agart (cefoperazone amphotericin teicoplanin agar), ami a *C. upsaliensis* kitenyésztésére is alkalmas. A CAT agar az mCCDA (modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar) módosításával jött létre. Az amfotericin B helyett teicoplanint tartalmaz és kevesebb a cefoperazon tartalma. Végeredményként a CAT agaron a *C. coli* és *C. jejuni* izolálására ugyanúgy lehetséges, mint az mCCDA-n, de a *C. upsaliensis* is jól nő rajta (Post, 1995). Az arcobacterek izolálására is alkalmasabb, mint az mCCDA (Blackburn és McClure, 2002).

A baktériumok sérülhetnek a különböző élelmiszer-feldolgozási és tartósítási folyamatok során, ami érzékennyé teheti őket a táptalajokban használt szelektív anyagokra, amelyeket az intakt baktérium még tolerál (Post, 1995).

Humphrey és Cruickshank (1985) a fagyasztás és melegítés által sérült és nem sérült *C. jejuni* érzékenységét vizsgálták különböző szelektív anyagokra. Eredményeik szerint a rifampicin gátló hatású a sérült törzsekre, de kisebb mértékben az intakt törzsekre is. A deoxycholat néhány sérült törzsre volt toxikus. Lovett et al. (1983) azt találták, hogy a polimixin B magas koncentrációja gátol sok *C. jejuni* törzset.

Humphrey (1986) munkája megerősítette Ray és Johnson (1984) azon megfigyelését, hogy *C. jejuni* jobban regenerálódik 37 °C-on, mint 42 °C-on és a fagyasztás, hűtés során sérült baktériumok érzékennyé válnak a polimixin B-re. Ajánlása szerint a

kezdeti 37 °C-os inkubáláskor a tápleves antibiotikumokat ne tartalmazzon. Az antibiotikum keveréket (trimetoprim, cefoperazon, colistin, amfotericin B és vancomicin vagy rifampicin) 4 órás előinkubálás után kell hozzáadni a dúsítóhoz, és utána lehet az inkubálást magasabb hőmérsékleten folytatni. Az antibiotikumok késleltetett hozzáadásával a szelektív nyomás később, már a regenerálódott baktériumokra irányul.

Az érzékeny *C. jejuni*-k felderítésére Steel és McDermott (1978) szűrési módszert alkalmazott, ami alkalmas az érzékeny egyéb *Campylobacter*-fajok felderítésére is. A szűrőt nem szelektív talajra helyezi, amire 100 µl 1:10 hígítású bélsárminta kerül. 37 °C-os, 30-45 perces inkubálás alatt a baktériumok átmigrálnak a 0,45-0,65 µm-es szűrőn. A szűrő eltávolítása után az átszivárgott folyadékot steril üveggel szétkeni a talajon, majd 42 °C-on inkubálja tovább.

Bolton et al. (1984) azt találták, hogy a közönséges tápagarok a fényben és levegőn gátló hatásúvá válnak a *C. jejuni*, *C. coli* és *C. lari*-ra. A toxikus hatás kialakulásához mindkét tényezőre szükség van, és ha egyszer kialakult, a mikroaerob vagy anaerob inkubálás sem fordítja vissza. Ezért a tenyésztést frissen készített talajokon, vagy maximum 5 napos talajokon kell végezni (Corry et al., 1995). A vér (5-7% haemolizált lóvér) kiválóan megelőzi a fotokémiai indukált toxikus oxigényökök (pl hidrogén-peroxid, szuperoxid) felhalmozódását. A vér neutralizálja a trimetoprim antagonistákat is (Corry et al., 1995). A vér antitoxikus hatását egyik kiegészítő anyag sem helyettesíti teljes mértékben, de a szén hatásosan gátolja a toxikus vegyületek kialakulását. Az FBP vegyületek (piroszőlősav nátrium sója a toxikus anyagok megkötésére, nátrium-metabiszulfid és vasszulfát az aerotolerancia növelésére) szintén erősítették ezt a hatást. A Bolton levesben vagy a Karmali agarban vasszulfát helyett hemin van. A véren kívül a szukcinát és cisztein-hidroklorid kiegészítés is segíti a baktériumok védelmét (Ray és Johnson, 1984). A talajokban a vér kiváltására gazdasági és praktikussági okokból törekedtek. Megjelentek a vér nélküli, szén tartalmú agarok (Post, 1995).

Az elődúsító folyadék oxigényök kötő, illetve toxinkötő anyagokkal való kiegészítése lehetővé tette a leves tenyészetek aerob körülmények közti inkubálását (Bolton et al., 1984). Az aerob inkubált levestenyészeteknél fontos, hogy az elődúsító cső jól záródjon és a folyadék felett kevesebb, mint 1 cm maradjon (Humphrey, 1986).

A különböző szilárd talajokon általában 48 óra elteltével kialakulnak a jellegzetes telepek, de szükség lehet akár 4-5 napra is a lassan növekvő törzseknél. A talaj minősége is nagyban befolyásolja a telepmorfológiát: nedves felületű talajon a telepek szétterülnek, laposak, egyenetlenek. Szárazabb talajon kerek, domború alakúak, fémes fényük lehet (Corry et al., 1995).

Mivel a campylobacterek nem fermentálnak szénhidrátokat, a különböző tápközegek energiaforrásnak peptont, húskivonatot, piroszőlősavat tartalmaznak. A Bolton leves és

Campylobacter dúsító leves (Campylobacter Enrichment Broth) peptont, élesztőkivonatot és trikarboxilsav ciklus intermediert, afa-ketoglutársavat tartalmaznak (Post, 1995).

Általánosan elfogadott módszer a termofil campylobacterek élelmiszerből, bélsárból, környezeti mintákból történő kitenyésztésére nincsen, de ajánlásokat publikált számos elismert nemzeti és nemzetközi szervezet, mint a Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (International Organization for Standardization, ISO), a brit Közegészségügyi Laboratóriumi Szolgálat (Public Health Laboratory Service, PHLS), az amerikai Élelmiszer és Gyógyszer Engedélyezési Hivatal (Food and Drug Administration, FDA). Az Európai Bizottság és az Európai Élelmiszer-biztonsági Hivatal (European Food Safety Authority, EFSA) együttműködésében kidolgoztak egy egységes vizsgáló módszert a termofil campylobacterek kimutatására brojlercsirke-állományokból, annak érdekében, hogy a 2008-as év során, a Bizottság 2007/516/EK határozata szerint elvégzett felmérő vizsgálatok összehasonlítható adatokkal szolgáljanak.

A baktérium érzékenységét figyelembe kell venni nem csak a tenyésztés, de a minta vételénél, szállításánál és feldolgozásánál is. A tamponmintákat transzport táptalajban kell szállítani (pl.: Amies, Cary-Blair), a mintákat óvni kell a fénytől, és minél előbb, de maximum 2 napon belül fel kell dolgozni. A fagyasztás, a magas hőmérséklet (>20 °C), illetve a hőmérséklet fluktuációja csökkenti az életképességet, ezért a mintákat 4 °C-on kell tárolni, ha hosszabb idő telik el a minta vételétől a feldolgozásig. Hűtött minták esetében a feldolgozás előtt meg kell várni, amíg azok szobahőmérsékletűre felmelegsznek (OIE, 2010).

A baktériumtörzsek –80 °C-on jól tárolhatók, táplevesbe oltva (triptic soy broth, brain heart infusion broth, Brucella broth, stb.) 20-50% glicerinnel kiegészítve. Mínusz 20 °C-on hasonló módon 6 hónapig eltarthatók a törzsek.

3.4.3 *Campylobacterek meghatározása*

A **nemzetség meghatározása** a mikroaerofil növekedés, a jellegzetes telepmorfológia, a jellegzetes mozgás, sejtmorfológia és a pozitív oxidáz reakció alapján lehetséges. A termofil campylobacterek további jellemzője, hogy 25 °C-on nem, míg 42 °C-on jobban nőnek. A rutin diagnosztika megkönnyítésére kifejlesztettek különböző tesztek a termofil campylobacterek csoportjának azonosítására.

A latex agglutinációs tesztekben a latex részecskék poliklonális ellenanyaggal vannak bevonva a leggyakoribb termofil campylobacterek kimutatására. Alacsony az érzékenységük és specificitásuk, csak a kinőtt telepek azonosítására használhatók, különböző állati eredetű vagy környezeti mintákra nem. Ilyenek a Campyslide (BLL Microbiology Systems), Meritec-Campy (Meridian Diagnostics), Microscreen (Mercia Diagnostics), ID Campy (Integrated Diagnostics) (Sahin et al., 2003).

Az izolált termofil *Campylobacter* telepek azonosítására Colony Lift Immunoassay-t (CLI) is kifejlesztettek, amely során az agaron kinőtt telepeket átviszik egy membránra, és jelölt poliklonális ellenanyag segítségével - egy direkt ELISA-hoz hasonlóan – különítik el a keresett telepeket más telepektől (Rice et al., 1996).

Bélsár és élelmiszerek közvetlen (vagy egy elődúsítást követő) vizsgálatára is alkalmas a szendvics ELISA-hoz hasonló elven működő Enzyme Immunoassay. Érzékenysége és specificitása jobb, mint az agglutinációs teszteké, de rosszabb, mint a tenyésztéses módszeré. A kimutatás határa 10^3 CFU/ml felett van. Gyors és automatizálható, ilyenek pl. a VIDAS *Campylobacter* (BioMérieux), EIA-Foss *Campylobacter* (Foss Electric), ProSpecT (Alexon-Trend) (Sahin et al., 2003).

Nukleinsav alapú kimutatási mód a DNS hibridizáció, amely próba DNS-t alkalmaz (fluoreszcens vagy kromogén jelölővel) membrán vagy folyadék hibridizáció formájában. Használhatók különböző mintákból a *Campylobacter* közvetlen kimutatására és a telepek azonosítására is (Chuma et al., 1994). Számos a 16S rRNS génre tervezett próba került kereskedelmi forgalomba, pl. SNAP (Synergene), AccuProbe (Gen-Probe). Közvetlen kimutatásra alkalmazva kevésbé érzékeny, mint a hagyományos tenyésztéses módszer (On, 1996), de a tenyésztéses módszerrel kombinálva növeli annak érzékenységét. Lamoureux et al. (1997) mikrotiter lemezhez kötötték a specifikus próbát. Immunmágnes gyöngyöket is alkalmaztak a 48 órás elődúsítás után a baktériumok koncentráálására. A DNS kivonás után a mintákat a lemezre mérték. A kimutatás érzékenysége elérte a 3 *C. jejuni* CFU/10g húst (Sahin et al., 2003).

A ***Campylobacter*-fajok meghatározása** hagyományosan a fenotípusos tulajdonságok (kataláz-próba, nitrát és nitrit redukció, 25 és 42 °C -on való növekedés, glicin- és konyhasótűrés, hidrogén-szulfid termelés, hippurát és indoxil-acetát hidrolízis, nalidixsav és cefalotin iránti érzékenység) alapján történt. A különböző fajok biokémiai jellemzőit a 4. táblázat tartalmazza.

A *C. jejuni*-t a hippurát pozitivitása alapján lehet elkülöníteni a *C. coli*-tól, azonban a törzsek kb. 5%-a hippurát negatív (OIE, 2010). Az újabban leírt *C. avium* is hippurát pozitív. A *C. jejuni* és *C. coli* cefalotin rezisztens és nalidixsav érzékeny, bár egyre több a rezisztens törzs. A *C. lari* a nalidixsav rezisztens campylobacterek közé tartozik, de vannak érzékeny törzsek is (OIE, 2010). A rutin diagnosztikához összeállítottak *Campylobacter* meghatározásra alkalmas asszimilációs tesztlemezt (BioMérieux API Campy), de a konvencionális biokémiai tesztekénél nem ad jobb eredményt, és az *Arcobacter* nincs rajta.

4. táblázat. *Campylobacter*-fajok fenotípusos jellemzői (Quinn et al., 2002; Logan et al., 2000).

Faj / alfaj	Kataláz	Nitrát redukció	Nitrit redukció	H ₂ S termelés (TSI)	H ₂ S termelés acetátos	Hippurát hidrolízis	Indoxil acetát hidrolízis	Növekedés 25 °C-on	Növekedés 42 °C-on	Növekedés 1% glicin	Alkalikus foszfatáz	Érzékenység Nalidixsav	Érzékenység Cefalotin	G-C tartalom (mol %)
<i>C. coli</i>	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	v	Érzékeny	Rezisztens	30-33
<i>C. concisus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	v	Rezisztens	Rezisztens	37-41
<i>C. curvus</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	nd	Érzékeny	nd	45-46
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	-/w	+	-	Rezisztens	Érzékeny	33-35
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	+	+	-	-	-	-	-	+/w	-	-	-	Rezisztens	Érzékeny	33-34
<i>C. gracilis</i>	-	+	+	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Rezisztens	nd	44-46
<i>C. helveticus</i>	-	+	Nd	-	-	-	+	-	+	+	-	Érzékeny	Érzékeny	34
<i>C. hyoilei</i> (<i>C. coli</i>)	+	+	+	+	+	-	nd	nd	+	+	nd	Érzékeny	Rezisztens	35
<i>C. hyointestinalis</i> subsp.														
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	+	+	-	+	+	-	-	v	+	+	v	Rezisztens	Érzékeny	33-36
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	+	-	-	-	+	v	+	-	-	+	+	Érzékeny	Érzékeny	30-31
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	Érzékeny	Rezisztens	30-33
<i>C. lari</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	Rezisztens	Rezisztens	36
<i>C. mucosalis</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	Rezisztens	Rezisztens	30-32
<i>C. rectus</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	v	Rezisztens	Érzékeny	36-38
<i>C. showae</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	w	+	nd	Érzékeny	nd	45-46
<i>C. sputorum</i> bv. <i>bubulus</i>	-	+	+	+	+	-	+	-	+	v	-	Rezisztens	Érzékeny	44-46
<i>C. sputorum</i> bv. <i>fecalis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	Rezisztens	Érzékeny	29-30
<i>C. sputorum</i> bv. <i>sputorum</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	v	Rezisztens	Érzékeny	30-32
<i>C. upsaliensis</i>	w/-	+	-	-	+	-	+	-	+	v	nd	Érzékeny	Érzékeny	30-31
											v	Érzékeny	Érzékeny	32-36

w: weak - gyenge

v: variable - változó

nd: not determined - nem vizsgált

A PCR lehetővé teszi a célba vett szekvencia exponenciális megsokszorozását rövid idő alatt, ezáltal a kis számú mikroorganizmus kimutatását és azonosítását. Konzervatív szakaszokra tervezett primerek általános, genus specifikus kimutatásra alkalmasak, míg a variábilis régiókra tervezett primerekkel a fajok vagy törzsek elkülönítése is lehetséges. Számos rendszert leírtak mind élelmiszer, mind bélsár vizsgálatára. A PCR lehet simplex vagy multiplex rendszerű is a különböző fajok azonosítására egy reakción belül (Sahin et al., 2003; On és Jordan, 2003).

A PCR kombinálható további technikákkal a kimutatás hatékonyságának növelésére, mint a reverz blot hibridizáció, vagy az ELISA. Ennél a két módszernél specifikus próbát kötnék egy membránhoz vagy mikrotiter lemezhez. Erre kerül rá a jelölt primerekkel felsokszorozott PCR termék. A hibridizációt színreakció jelzi. Különböző fajspecifikus próbákat lehet egy membráncsíkhöz vagy lemezhez kötni, így a kevert fertőzések is egyszerre felderíthetők. A 23S rRNS génjére tervezett PCR amplikonok emésztése restrikciós enzimekkel is alkalmazható a fajok elkülönítésére (Sahin et al., 2003).

Real-time PCR rendszereket is kidolgoztak. Ezek egyik legnagyobb előnye, hogy mérhető a DNS mennyisége, és ezen keresztül megbecsülhető a mintában a baktériumok száma is.

A PCR előnye általában az érzékenység, a specificitás és a gyorsaság. Tiszta tenyészetekből működik a legjobban, közvetlenül a mintákra alkalmazva drámaian csökken a teljesítménye, valószínűleg a különböző gátlóanyagok jelenléte miatt (Sahin et al., 2003). A megfelelő eredmény elérése érdekében elengedhetetlen egy megbízható DNS feltérési módszer a különböző (bélsár, élelmiszer, stb.) mintákból (Sahin et al., 2003). A közvetlen kimutatás érzékenységét növeli, ha egy elődúsítás előzi meg a PCR reakciót, mivel az hígítja a gátló anyagokat és növeli a kimutatandó csíraszámot. Az Immunomagnetic separation (IMS) úgy működik, hogy mágneses golyók vannak mono- vagy poliklonális ellenanyaggal bevonva, amiket az elődúsítás után a mintához kell adni. A baktériumok kapcsolódnak a golyócskákhöz és rajtuk koncentrálódnak. Ezáltal növeli az azt követő tenyésztés vagy PCR érzékenységét (<10 CFU/g baktérium kimutatása lehetséges) (Lamoureux et al., 1997). A használata mégsem terjedt el, valószínűleg a *Campylobacter* nagy antigén diverzitása miatt. A baktériumot ürítő egyedek bélsárában azonban általában elég magas a csíraszám, így elődúsítás nem szükséges (Sahin et al., 2003).

A PCR hátránya, hogy nem képes megkülönböztetni az élő és elhalt baktériumokat, ami a pozitív eredmény jelentőségét megkérdőjelezheti. Ezt mRNS-re tervezett RT-PCR-rel próbálták kiküszöbölni (Sahin et al., 2003).

3.4.4 *Campylobacter* tipizálási módok

A *Campylobacter*-fajok tipizálására szükség lehet epidemiológiai vizsgálatokhoz, járványügyi nyomozáshoz, diagnosztikai és monitoring vizsgálatokhoz (Wassenaar és Newell, 2000).

Tradicionálisan használt **fenotípusos tipizálási módszerek** a szerotipizálás, fág-tipizálás és biotipizálás. Hőlabilis, fehérje természetű, csilló antigén (H antigén) és hőstabil, LPS összetételű sejtfal antigén (O antigén) jellemzi a *Campylobacter* törzseket. Penner és munkatársai (Penner és Hennesy, 1980) az O antigén alapján passzív hemagglutinációval, Lior et al. (1982) a H antigén alapján, tárgylemez agglutinációval szerotipizálták a törzseket. Lior sémája alapján 130 szerocsoport különíthető el a *C. jejuni* subsp *jejuni*, *C. coli*, és *C. lari* esetében. Hátránya, hogy sok a nem tipizálható és az egyszerre több szerotípusba is tartozó törzs, illetve a reagensek nehezen hozzáférhetőek.

A szerotipizálás mellett a biotipizálást (Skirrow-Benjamin biotyping rendszer, Roop rendszer) és fágtipizálást (Preston és Khakhria-Lior phage-typing rendszer) lehet alkalmazni, mint fenotípusos vizsgáló módszert (Miller et al., 2005). Ezen módszerek hátránya, hogy korlátozott mennyiségű információt adnak a vizsgált törzsről és sok törzs meghatározását nem is teszik lehetővé.

A nemzetközi irodalomban számos **genotípusos tipizálási módszert** leírtak.

Az *flaA* gént és más géneket (*groEL* gén, 16S rRNS gén) a fajok jellemzésére is lehet használni a PCR-RFLP (restriction fragment length polymorfism) módszerrel. Ekkor az adott gén amplifikálása után a kapott PCR termékeket különböző restrikciós enzimekkel hasítjuk és a fragmensek futtatása után kapott mintázatokat hasonlítjuk össze (Karenlampi et al., 2004; Nakari et al., 2005; Stern et al. 1997; Wittwer et al., 2005).

A *flaA* (flagellint kódoló) gén SVR (short variable region) szekvenálása alapján a campylobacterek szintén tipizálhatók. Más gének, mint például a *cmp* gén (outer membrane protein), 16S rRNS, 23S rRNS, *cpn60*, *rpoB* (Korczak et al., 2006) gén szekvenálását is leírták, mint lehetséges módszert (Sahin et al., 2003; Inglis et al., 2007).

A ribotipizálás módszere 3 szorosan összefüggő rRNS gént és azok melletti régiókat vizsgálja. Előnye, hogy automatizálható és nagyszámú minta vizsgálatára alkalmas. Hátránya, hogy a készülék és a hozzávalók drágák, emellett a feloldó képesség korlátozott.

Az AFLP (amplified fragment length polymorfism) módszer az egész genomból származó, kicsiny fragmentekből álló csoport vizsgálatán alapul, genetikai ujjlenyomatot ad a vizsgált törzsekről. A módszer megbízható és jól alkalmazható egyszerre nagy számú *Campylobacter*-faj, alfaj és típus elkülönítésére is (Duijn et al., 2001).

A PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) esetén az egész genomot hasítjuk restrikciós enzimek segítségével fragmensekre, és a pulzáttatott mezejű gélelektroforézis

után kialakult mintázatokat vizsgáljuk. Bár nagyon időigényes, mégis járványügyi nyomozásra a leginkább alkalmas módszer.

Az MLST (multi locus sequence typing) módszer során 7 háztartási gén szekvenciáját vizsgáljuk. Hasonló az elve a multilocus enzyme electrophoresis-hez (MLEE), de nem indirekt módon a gének termékeit, hanem magukat a géneket vizsgálja nukleinsav szinten. A gének kb. 500 bp hosszúságú szakaszait szekvenáljuk. A különböző szekvenciák 1-1 génen különböző allélt képviselnek. Ezek alapján kapott szekvencia típusok (ST) mindegyike a típusra jellemző allélokból áll. Ma már a *C. jejuni* ST adatbázisa több mint 1000 ST-t tartalmaz. A módszer alkalmas a *Campylobacter* törzsek eredetének, rokonsági kapcsolatainak és genetikai változásainak hosszú távú vizsgálatára, és a gél alapú módszerekkel ellentétben az eredmények összehasonlíthatóak a különböző laboratóriumok közt (Miller et al., 2005).

A genotípusos módszerek diszkriminatívabbak, mint a fenotípusos tipizálási módok. Hátrányuk, hogy a genetikai ujjlenyomat vizsgálatán alapuló módszerekkel kapott eredmények standardizálás hiányában nehezen összehasonlíthatók. A gélelektroforézis során kapott csíkok elhelyezkedése és száma a használt technikától függően különböző lehet azonos törzs vizsgálata esetén is. A szekvencia elemzésén alapuló tipizálási módok ezzel szemben könnyen összehasonlíthatók (Boer et al., 2000).

3.5 Antibiotikum-rezisztencia

A campylobacterek általában érzékenyek a makrolidokra, aminoglikozidokra, kloramfenikolra, klindamicinre és rezisztensek penicillinre, cefalosporinokra, szulfonamidokra (Czirók, 1999).

Ma már jelentős probléma a *C. jejuni* törzsek különböző antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája vagy multirezisztenciája (Altekruse et al., 1999; Nirdnoy et al., 2005; Tenover et al., 1985). Eritromicinnel és azitromicinnel szemben viszonylag alacsony, míg a kinolon antibiotikumokkal szemben magas, 96% körüli a rezisztenciát mutató törzsek aránya (Nirdnoy et al., 2005). A tetraciklin rezisztencia kialakulása valószínűleg az antibiotikum állatorvoslásban való széles körű alkalmazására vezethető vissza (Batchelor et al., 2004).

Korábban már leírták, hogy a *C. jejuni* tetraciklinnel, kloramfenikollal és kanamicinnel szembeni rezisztenciája plazmidfüggő (Nirdnoy et al., 2005; Tenover et al., 1985). A *C. jejuni* törzsek kb. 30%-a míg a *C. coli* törzsek kb. 40%-a hordoz egy vagy több különböző plazmidot (Boosinger et al., 1990; Tenover et al., 1985). A plazmidok mérete 2 és 162 kilobázis (kb) közé esik (Tenover et al., 1985). Amíg a *C. jejuni* és *C. coli* törzsek plazmidjainak restriktív endonukleázokkal történő hasítása során nem találtak jelentős eltéréseket, a campylobacterekben talált plazmidok nem hasonlítottak az Enterobacteriaceae családban oly gyakori tetraciklin R faktorhoz (Taylor et al., 1983; Tenover et al., 1985).

A *C. jejuni* 81-176-os törzse a legjobban karakterizált *C. jejuni* törzs, melyet 1985-ben egy nyers tej okozta, súlyosabb hasmenéssel járó járványból izoláltak (Batchelor et al., 2004). Ez a törzs két, 37 kb-nál nagyobb plazmidot tartalmaz, az egyik a TcR tetraciklin rezisztenciát kódoló plazmid (45,2 kb) vagy pTet (a kódoló génszakasz a *tetO* gén), a másik pedig a pVir (37 kb) vagy virulencia plazmid (Bacon et al., 2000 és 2002).

A *C. coli* esetén a tetraciklin rezisztenciát kódoló plazmid szintén nagyobb, kb. 44,7 kb. A két faj tetraciklin rezisztenciát kódoló plazmidja nukleotidszekvenciáját tekintve 94,3%-ban azonos, ugyanígy a plazmidon található *tetO* gének között is 94,8%-os a homológia. A tetraciklin rezisztenciát kódoló plazmidok közül a 6 és 66 kb közé eső, kisebb plazmidok konjugációra alkalmasak, átadódhatnak a campylobacterek között (Batchelor et al., 2004; Taylor et al., 1983).

Az állományok bármely makroliddal történő kezelése okozhat eritromicin rezisztenciát (Roberts et al., 1999). A makrolidok, a linkomicin és/vagy virginiamicin alkalmazásának során kialakulhat az úgynevezett makrolid-linkóزامid-sztreptogramin B (MLSB) rezisztencia, amely hatására a törzsek valamennyi makrolidra, linkóزامidokra (linkomicin, klindamicin) és sztreptograminokra (Pl.: pristinamicin, virginiamicin) is rezisztenssé válnak (Gibree és Taylor, 2006).

A fluorokinolon és makrolid rezisztencia elterjedése a *Campylobacter*-fajokban nem kívánatos, ugyanis ezek a campylobacteriosis kezelésére elsődlegesen alkalmazott szerek. A fluorokinolonokat a campylobacterek elleni kezelésre, érzékenységüknek jelentős csökkenése miatt, ma már csak a rezisztencia vizsgálatuk kedvező eredménye alapján ajánlhatjuk, a törzsek makrolidokra való érzékenységét is célszerű vizsgálni.

3.6 A védekezés szempontjai:

A 2008-as év során, a Bizottság 2007/516/EK határozata szerinti felmérő vizsgálatokat az Európai Unió országaiban azzal a céllal végezték, hogy mérlegelni lehessen a közösségi szintű szabályozó intézkedések szükségességét, megvalósíthatóságát, költségeit és előnyeit. Egyértelműen látszik, hogy nincs egyetlen univerzális módszer a campylobacteriosis elleni védekezésre, a kérdést a farmtól az asztalig szemlélettel kell megközelíteni (Blackburn és McClure, 2002). A humán fertőzések legnagyobb részéért a *C. jejuni* a felelős, a fertőzések döntő többségét kitevő sporadikus előfordulások hátterében a baromfi húst valószínűsítik (Newell és Davison, 2003). A baktérium jellemzőit figyelembe kell venni az állattartó telepek higiéniai előírásainál és az élelmiszer feldolgozási folyamata alatt is (OIE, 2010).

3.6.1 Állattartó telepek

A *Campylobacter* előfordulásának gyérítése az elsődleges termelés helyén, így elsősorban a brojlercsirke telepeken, csökkenthetné az élelmiszerlánc baktérium terheltségét (Blackburn és McClure, 2002). A brojlercsirke-állományok megóvása a *Campylobacter*-fertőzéstől a legjobb módja a baromfi termékek campylobacterekkel való kontaminációjának csökkentésére vagy megszüntetésére (Rivoal et al., 2005).

A baromfiállományoknál a zárt tartás, az egyszerre ürítés és betelepítés rendszere és a közben elvégzett alapos takarítás-fertőtlenítés következtében valószínű, hogy az egymást követő állományok nem fertőzik egymást (Evans és Sayers, 2000). Mivel a baktérium ellenálló képessége kicsi, az új csoport nem a bekészített száraz alommal és takarmánnyal fertőződik. A nem fertőtlenített itatórendszeren keresztül a vízzel erre nagyobb az esély. A legvalószínűbb fertőzési forrás az istállón kívülről származik, mint a hordozó ízeltlábúak, más házi- és vadon élő állatok, és az általuk szennyezett föld, mely a dolgozók csizmáján és a különböző eszközökön juthat be az istállóba. Az állomány fertőződése a telepeken szigorú higiénés előírásokkal megelőzhető, vagy legalább a gyakorisága jelentősen csökkenthető (Allen és Newell, 2005).

- Az állományok zárt tartása
- A korcsoportok izolált tartása
- Az egyszerre ürítés és betelepítés rendszere
- Épületek takarítása, fertőtlenítése betelepítés előtt
- Épületek karbantartása (résmentesség)
- Féreg, rovar, rágcsáló mentesség
- Egyéb háziállatok, vad madarak távoltartása,
- Az itatóvíz tisztasága, az itatóedények tisztítása, fertőtlenítése
- Baromfihullák megfelelő tárolása
- A dolgozóknak fekete-fehér öltözőrendszer
- Kézmosás az istállóba lépés előtt
- Lábbeli fertőtlenítés, csizma csere
- Felső védő öltözet csere
- Látogatók számának csökkentése
- Istállónként elkülönített eszközök

A csirkék fogékonyságának csökkentése kompetitív kizárás (probiotikumok) segítségével szintén csökkentheti az állomány fertőződésének az esélyét. Vakcina nem áll rendelkezésre.

3.6.2 Vágóhídi higiénia

A fertőzött állományokat célszerű a mentes állományok után vágni, a keresztszennyezés elkerülése érdekében szükséges az alapos tisztítás, fertőtlenítés. A HACCP rendszer alkalmazásával és a jó higiéniai gyakorlat (GHP) kritériumainak betartásával a kontamináció veszélye nagymértékben csökkenthető.

3.6.3 Élelmiszer-feldolgozás, személyi higiénia

A *Campylobacter* nem szaporodik az élelmiszerben, számuk csökkenthető fagyasztással, és elpusztítható besugárzással, hőkezeléssel. A nyers tej pasztörizálásakor, illetve a hús sütése vagy főzése közben, ha a maghőmérséklet eléri a 74 °C-ot, a baktérium elpusztul.

Az ember fertőződésének a megelőzése szempontjából fontos:

- A nyers hús, nem pasztörizált tej és kezeletlen felszíni víz fogyasztásának a tilalma.
- A hús és egyéb élelmiszer feldolgozásához külön eszközök használata.
- Az eszközök gondos tisztítása, fertőtlenítése.
- A rovarok és rágcsálók távoltartása az élelmiszerektől.
- A személyi higiénia szabályainak a betartása (kézmosás, stb.) (CDC, 2010).

4 Anyag és módszer

4.1 Mintagyűjtés és a campylobacterek tenyésztése

A nemzeti antibiotikum-rezisztencia monitoring program keretében termofil *Campylobacter*-fajokat kerestünk vágóhidakról származó lekötött bélkacsokból. Három egyedből származó 3 bélmintát vizsgáltunk egy-egy szarvasmarha-, sertés- vagy baromfiállományból. Szarvasmarha és sertés esetében vastagbelet, baromfi esetében vakbelet vizsgáltunk. A mintákat havonta küldték minden megyéből, mindhárom élelmiszer-termelő állatfajból. A beleket vagy azonnal feldolgoztuk, ahogy azok a laboratóriumba érkeztek, vagy -20 °C -on tároltuk néhány napot a feldolgozásig. A szobahőmérsékletűre melegedett mintákat steril eszközökkel felbontottuk és a béltartalomból, a bélfalat végighúzva kacsnyi mennyiséget mCCDA (Oxoid, Drogen, Belgium) lemezre kentünk és szélesztettük.

A közvetlen kioltást mCCDA lemezre és a Bolton szelektív elődúsítóval kiegészített feldolgozást (ISO 10272-1 szabvány) összehasonlítottuk, és ugyan az elődúsítóval jobb eredményt kaptunk, az elődúsítást kihagytuk a rutin munka egyszerűsítése érdekében.

Az mCCDA lemezeket 48-72 órát mikroaerob környezetben, $41,5\text{ °C}$ -on inkubáltuk. A mikroaerob környezetet GasPack EZ Campy (Becton Dickinson, Sparks, USA) tasakkal plexi edényben (Oxoid) állítottuk elő. A tipikus, önálló telepeket tovább oltottuk 3 db 7%-os véres Columbia agarra (Merck, Darmstadt, Germany), és újabb 48 órát inkubáltuk $41,5\text{ °C}$ -on és 25 °C -on mikroaerob környezetben, illetve $41,5\text{ °C}$ -on aerob környezetben. Az egy állományból származó 3 almintából, az mCCDA-ról csak egy telepet oltottunk tovább, ha egyforma telepeket láttunk. Amennyiben különböző telepmorfológiájú baktériumok fejlődtek, mindegyikből 1-1-et oltottunk tovább. A továbbiakban a 3 almintát nem külön-külön vizsgáltuk, hanem egységes mintaként kezeltük, mely az állományt jellemezte.

Campylobacter-nek tekintettük az izolátumot, amennyiben 25 °C -on és aerob körülmények között nem nőtt, $41,5\text{ °C}$ -on, mikroaerob környezetben tipikus telepekben fejlődött, oxidáz pozitív volt, és sötétlátóteres mikroszkópos vizsgálattal tipikus sejtmorfológiát és mozgást tapasztaltunk.

Az alábbi fenotípusos tulajdonságokat vizsgáltuk a campylobacterek hagyományos módon történő fajmeghatározása érdekében: kataláz (3%-os hidrogén-peroxid-oldat) és H_2S termelés (TSI agar), hippurát és indoxil acetát hidrolízis (Rosco), növekedés 1% glicin tartalmú talajon és cefalotin, nalidixsav érzékenység (30 μg korong; Oxoid).

A baktérium kultúrából egy kacsnyi mennyiséget ultra tiszta vízben (Millipore, Billerica, USA) szuszpendáltunk és -20 °C -on tároltuk a molekuláris vizsgálatokhoz.

Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálat elkészítésével egyidőben a törzseket elődúsító folyadékban glicerinnel kiegészítve -80 °C -ra fagyasztottuk.

2008-2009 folyamán összesen 1110 mintát vizsgáltunk meg, melyből 480 sertésből, 267 szarvasmarhából, 348 brojlercsirkéből, 15 pedig pulykából származott.

A szezonális okainak vizsgálatához a relatív páratartalom adatokat a <http://hungarian.wunderground.com/history/airport/LHBP/2009/12/31/CustomHistory.html> weblapról töltöttük le.

4.2 DNS kivonás

Összehasonlítottunk 5 DNS feltárási módot: QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), szonikálás (95 °C 15 perc), guanidin HCl alapú módszerrel Dán és mtsai (2003) útmutatása alapján, Total RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel), szonikálás + Total RNA Isolation Kit. A tenyészetek vizsgálatánál nem volt különbség a feltárási módok hatékonysága közt, azonban alacsonyabb csíraszám esetén, közvetlen a mintából való kivonáshoz (vagy elődúsítós minta vizsgálatához) leghatékonyabbnak a Total RNA Isolation Kit bizonyult. Az előzetes szonikálás nem növelte a hatékonyságot. Ezért, és az automatizált feltárást kihasználva, végül a DNS kivonását 100 µl baktérium szuszpenzióból X-tractor Gene nukleinsav kivonó robottal (Corbett Robotics Pty. Ltd., Queensland, Australia), Total RNA Isolation Kit, Nucleospin 96 RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany) segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint a DNase alkalmazása nélkül. A DNS-t 50 µl eluáló pufferben vettük fel. A kivont DNS-t -20 °C-on tároltuk a további vizsgálatokhoz.

4.3 Primer tervezés *C. jejuni*-ra

A PCR rendszerünk kifejlesztésekor a legfontosabb szempont az volt, hogy az képes legyen valamennyi *C. jejuni* törzs kimutatására.

A *C. jejuni* *hipO* génjére terveztük a primereket a Primer Designer Version 2.0. (Scientific & Educational Software) segítségével. Ehhez teljes, illetve részleges *C. jejuni* szekvenciákat töltöttünk le a GenBank-ból BLASTN (Altschul et al., 1990) használatával (GenBank, National Center for Biotechnology Information Bethesda, Maryland USA, www.ncbi.nih.gov). A letöltendő szekvenciák kiválasztásakor elsődleges szempont volt, hogy valamennyi fontosabb *C. jejuni* törzs az illesztés részét képezze. A szekvenciákat a szoftver segítségével egymáshoz illesztettük, és az így kapott illesztés részletes vizsgálatával konzervatív területeket kerestünk (3. ábra).

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	*	120	*	140
AY168301	:	AAATGTAATGCATGCTTTCGGGTCATGATGGACATACTACTACCTTTTATTGCTTTCGTCGCAAAAGTATTTAGCAAGTCAGAAATTTTAAATGCTACTCTAAATCTTTTAAATTTTCAACCTGCTGAAGAGGGTTTGGGTGG												
AY168302	:	AAATGTAATGCATGCTTTCGGGTCATGATGGACATACTACTACCTTTTATTGCTTTCGTCGCAAAAGTATTTAGCAAGTCAGAAATTTTAAATGCTACTCTAAATCTTTTAAATTTTCAACCTGCTGAAGAGGGTTTGGGTGG												
36940	:	AAATGTAATGCATGCTTTCGGGTCATGATGGACATACTACTACCTTTTATTGCTTTCGTCGCAAAAGTATTTAGCAAGTCAGAAATTTTAAATGCTACTCTAAATCTTTTAAATTTTCAACCTGCTGAAGAGGGCTTTCGGGTGGTCTAAGGCCAATGATAG												
AY944149	:	AAATGTAATGCATGCTTTCGGGTCATGATGGACATACTACTACCTTTTATTGCTTTCGTCGCAAAAGTATTTAGCAAGTCAGAAATTTTAAATGCTACTCTAAATCTTTTAAATTTTCAACCTGCTGAAGAGGGCTTTCGGGTGGTCTAAGGCCAATGATAG												
AY944171	:	AAATGTAATGCATGCTTTCGGGTCATGATGGACATACTACTACCTTTTATTGCTTTCGTCGCAAAAGTATTTAGCAAGTCAGAAATTTTAAATGCTACTCTAAATCTTTTAAATTTTCAACCTGCTGAAGAGGGCTTTCGGGTGGTCTAAGGCCAATGATAG												
AY944167	:	AAATGTAATGCATGCTTTCGGGTCATGATGGACATACTACTACCTTTTATTGCTTTCGTCGCAAAAGTATTTAGCAAGTCAGAAATTTTAAATGCTACTCTAAATCTTTTAAATTTTCAACCTGCTGAAGAGGGCTTTCGGGTGGTCTAAGGCCAATGATAG												
AY944161	:	AAATGTAATGCATGCTTTCGGGTCATGATGGACATACTACTACCTTTTATTGCTTTCGTCGCAAAAGTATTTAGCAAGTCAGAAATTTTAAATGCTACTCTAAATCTTTTAAATTTTCAACCTGCTGAAGAGGGCTTTCGGGTGGTCTAAGGCCAATGATAG												
AY944170	:	AAATGTAATGCATGCTTTCGGGTCATGATGGACATACTACTACCTTTTATTGCTTTCGTCGCAAAAGTATTTAGCAAGTCAGAAATTTTAAATGCTACTCTAAATCTTTTAAATTTTCAACCTGCTGAAGAGGGCTTTCGGGTGGTCTAAGGCCAATGATAG												
AY944153	:	AAATGTAATGCATGCTTTCGGGTCATGATGGACATACTACTACCTTTTATTGCTTTCGTCGCAAAAGTATTTAGCAAGTCAGAAATTTTAAATGCTACTCTAAATCTTTTAAATTTTCAACCTGCTGAAGAGGGCTTTCGGGTGGTCTAAGGCCAATGATAG												
AY944157	:	AAATGTAATGCATGCTTTCGGGTCATGATGGACATACTACTACCTTTTATTGCTTTCGTCGCAAAAGTATTTAGCAAGTCAGAAATTTTAAATGCTACTCTAAATCTTTTAAATTTTCAACCTGCTGAAGAGGGCTTTCGGGTGGTCTAAGGCCAATGATAG												
AY944175	:	AAATGTAATGCATGCTTTCGGGTCATGATGGACATACTACTACCTTTTATTGCTTTCGTCGCAAAAGTATTTAGCAAGTCAGAAATTTTAAATGCTACTCTAAATCTTTTAAATTTTCAACCTGCTGAAGAGGGCTTTCGGGTGGTCTAAGGCCAATGATAG												
AY944151	:	AAATGTAATGCATGCTTTCGGGTCATGATGGACATACTACTACCTTTTATTGCTTTCGTCGCAAAAGTATTTAGCAAGTCAGAAATTTTAAATGCTACTCTAAATCTTTTAAATTTTCAACCTGCTGAAGAGGGCTTTCGGGTGGTCTAAGGCCAATGATAG												

	*	160	*	180	*	200	*	220	*	240	*	260
AY168301	:	AAATGCGATTGTTTGAAAAAATTTGGATAGTGAAATATGCTTTTGGATGGCAATTAATATGCCCTTTTGGTAGTGATAAAGAAATTTTATCTTTAAAAAAGGTCCGATCATGGCTTCCTTCGG										
AY168302	:	AAATGCGATTGTTTGAAAAAATTTGGATAGTGAAATATGCTTTTGGATGGCAATTAATATGCCCTTTTGGTAGTGATAAAGAAATTTTATCTTTAAAAAAGGTCCGATCATGGCTTCCTTCGG										
36940	:	AAATGCGATTGTTTGAAAAAATTTGGATAGTGAAATATGCTTTTGGATGGCAATTAATATGCCCTTTTGGTAGTGATAAAGAAATTTTATCTTTAAAAAAGGTCCGATCATGGCTTCCTTCGG										
AY944149	:	AAATGCGATTGTTTGAAAAAATTTGGATAGTGAAATATGCTTTTGGATGGCAATTAATATGCCCTTTTGGTAGTGATAAAGAAATTTTATCTTTAAAAAAGGTCCGATCATGGCTTCCTTCGG										
AY944171	:	AAATGCGATTGTTTGAAAAAATTTGGATAGTGAAATATGCTTTTGGATGGCAATTAATATGCCCTTTTGGTAGTGATAAAGAAATTTTATCTTTAAAAAAGGTCCGATCATGGCTTCCTTCGG										
AY944167	:	AAATGCGATTGTTTGAAAAAATTTGGATAGTGAAATATGCTTTTGGATGGCAATTAATATGCCCTTTTGGTAGTGATAAAGAAATTTTATCTTTAAAAAAGGTCCGATCATGGCTTCCTTCGG										
AY944161	:	AAATGCGATTGTTTGAAAAAATTTGGATAGTGAAATATGCTTTTGGATGGCAATTAATATGCCCTTTTGGTAGTGATAAAGAAATTTTATCTTTAAAAAAGGTCCGATCATGGCTTCCTTCGG										
AY944170	:	AAATGCGATTGTTTGAAAAAATTTGGATAGTGAAATATGCTTTTGGATGGCAATTAATATGCCCTTTTGGTAGTGATAAAGAAATTTTATCTTTAAAAAAGGTCCGATCATGGCTTCCTTCGG										
AY944153	:	AAATGCGATTGTTTGAAAAAATTTGGATAGTGAAATATGCTTTTGGATGGCAATTAATATGCCCTTTTGGTAGTGATAAAGAAATTTTATCTTTAAAAAAGGTCCGATCATGGCTTCCTTCGG										
AY944157	:	AAATGCGATTGTTTGAAAAAATTTGGATAGTGAAATATGCTTTTGGATGGCAATTAATATGCCCTTTTGGTAGTGATAAAGAAATTTTATCTTTAAAAAAGGTCCGATCATGGCTTCCTTCGG										
AY944175	:	AAATGCGATTGTTTGAAAAAATTTGGATAGTGAAATATGCTTTTGGATGGCAATTAATATGCCCTTTTGGTAGTGATAAAGAAATTTTATCTTTAAAAAAGGTCCGATCATGGCTTCCTTCGG										
AY944151	:	AAATGCGATTGTTTGAAAAAATTTGGATAGTGAAATATGCTTTTGGATGGCAATTAATATGCCCTTTTGGTAGTGATAAAGAAATTTTATCTTTAAAAAAGGTCCGATCATGGCTTCCTTCGG										

3. ábra: Primer tervezés *C. jejuni* hipO génjére.

Egy 261 bp hosszú terméket közrefogó primerpárt találtunk a tervezési kritériumok alapján a legmegfelelőbbnek (5. táblázat). A genomikus primer: CAMNORF 5' - AAT GTA ATG CAT GCT TGC GGT CA – 3' és a reverz primer: CAMNORR 5' - CGA AGA AGC CAT CAT CGC ACC T – 3'. A termék a 36. bázisnál kezdődik és a 296-ig tart, olvadási hőmérséklete 71 °C, javasolt annealing hőmérséklet 51 °C.

5. táblázat. A *hipO* génre tervezett *C. jejuni* primerek jellemzői.

Primer	Genomikus (A)	Reverz (B)	
Hossz	23 nt	22 nt	1 bázis különbség
GC%	43%	54%	11% különbség
T _m °C	78 °C	79 °C	1 °C különbség
Run G/C 3' végen	0 nt	0 nt	
Run	2 nt	2 nt	
Hairpin képzés	nincs	nincs	
Dimer képzés	A-A	B-B	A-B
3' végnél	2 nt	2 nt	1 nt
Egyéb helyen	6 nt	3 nt	4 nt

4.4 Real-time PCR paraméterek beállítása *C. jejuni* és *C. coli* azonosítására

Az általunk tervezett primerekkel hagyományos agarózgél alapú PCR optimalizálási kísérleteket végeztünk, hogy megállapítsuk az optimális annealing hőmérsékletet és MgCl₂ koncentrációt.

Összehasonlítottunk néhány az irodalomban leírt, a *C. jejuni* és a *C. coli* azonosítására alkalmas hagyományos PCR módszert, hozzávéve a saját módszerünket. A szenzitivitási vizsgálatokhoz a nukleinsav oldatokból 10-es alapú hígításokat készítettünk, és az összehasonlításokat ezekkel végeztük. Ugyanazon mintákat vizsgáltuk Vandamme et al. (1997) multiplex rendszerével (multiplex és szimplex formában), Wang et al. (2002) multiplex rendszerével (multiplex és szimplex formában), Linton et al. (1997) primereivel (külön *C. jejuni*-ra és *C. coli*-ra) és az általunk tervezett primerekkel (*C. jejuni*-ra). Először az irodalomban leírt protokollokat követtük, majd azonos hőmérsékleti profillal (65 °C-os, illetve 59 °C-os annealing hőmérsékletekkel) próbáltuk futtatni a különböző rendszereket. Előbb hagyományos PCR-rel végeztük az összehasonlításokat, majd real-time PCR módszerrel is kipróbáltuk a kiválasztott primereket.

Az így kifejlesztett real-time PCR rendszerhez végül a *C. coli* kimutatására a Wang et al. (2002) által leírt, *glyA* génre tervezett CCF: 5' - GTA AAA CCA AAG CTT ATC GTG – 3' és CCR: 5' - TCC AGC AAT GTG TGC AAT G – 3' primereket, a *C. jejuni* kimutatására pedig a *hipO* génre, általunk tervezett primereket választottuk, melyek szimplex formában, de azonos hőmérsékleti profillal működtek.

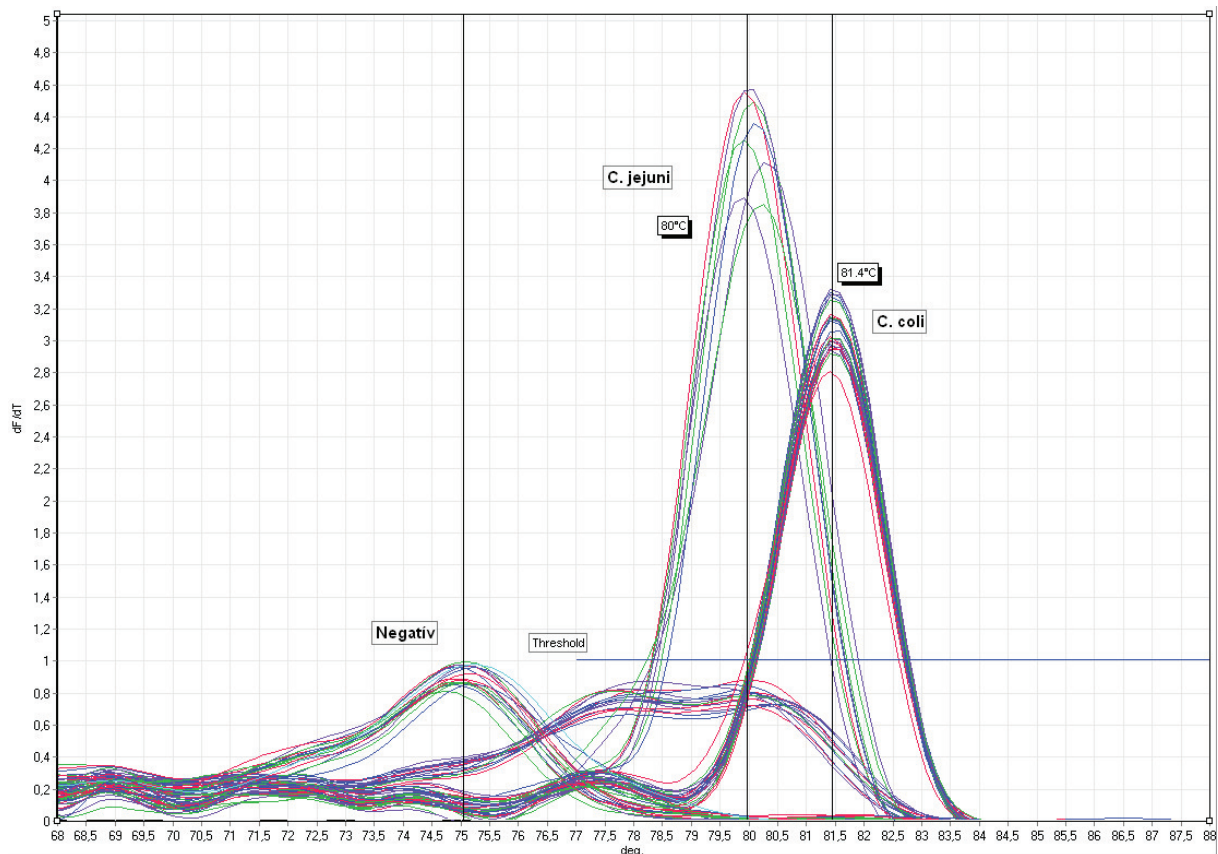
A PCR amplifikációt 25 µl-es reakciókeverékben, egy Corbett Research Rotor-Gene Real Time Amplification készülékben (RG-6000, Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) végeztük. Első lépésben 95 °C-on 5 percig denaturáció és a DNS polimeráz aktiválása történt. Ezt követően 45-ször ismételtük az alábbi lépéseket: 94 °C /30 s (denaturáció), 59 °C /30 s (primer tapadás, annealing), 72 °C /45 s (láncszintézis, extenzió). A termék olvadáspontjának meghatározásához a folyamatot egy 60-tól 99 °C-ig tartó, 0,5 °C /5 s-os hőmérséklet emelkedés zárta.

A 25 µl reakcióelegy 5 µl puffert (GoTaq Flexi Buffer Colorless {5X} Promega, M890A), 1,5 mM (*C. jejuni*) és 2,5 mM (*C. coli*) MgCl₂ (Promega, A351B), 0,24 mM dezoxinukleozid trifoszfátot (dNTP) (Fermentas, R0181), 0,4 µM primereket (IDT-DNA), 0,2 µl (1U) emzimet GoTaq DNA Polymerase (Promega, M830A), 1,25 µl EvaGreen-t (20x) és 2 µl DNS templátot tartalmazott (6. táblázat).

6. táblázat. Reakcióelegyek összetétele a *C. jejuni* és *C. coli* azonosításához.

Reagens	Mennyiség egy mintára (µl) <i>C. jejuni</i>	Mennyiség egy mintára (µl) <i>C. coli</i>	Referencia
H ₂ O	13,5	12,5	Ultraszta MQ víz (Millipore)
Puffer GoTaq Flexi Buffer Colorless (5X)	5	5	Promega, M890A
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	2,5	Promega, A351B
dNTP (10 mM)	0,6	0,6	Fermentas, R0181
F primer (10 pmol/µl)	1	1	IDT-DNA
R primer (10 pmol/µl)	1	1	IDT-DNA
GoTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2	0,2	Promega, M830A
EvaGreen 20x	1,25	1,25	Biotium Cat: 31000
DNS templát	2	2	

A rendszer EvaGreen (Biotium, California, USA) zöld fluoreszcens jelölőfestékkel működik, a két faj elkülöníthető az olvadási görbék alapján (4. ábra). A reakciók befejeztével minden alkalommal meghatároztuk a termék olvadáspontját (melting temperature, T_m), amely 80,0 +/- 0,4 °C *C. jejuni*, és 81,4 +/- 0,4 °C *C. coli* esetében.



4. ábra: Real-time PCR eredmények értékelése az olvadásgörbék alapján.

Az EvaGreen a dupla szálú DNS-hez kötődve válik fluoreszcenssé. A fluoreszcens jelet a gép az elongáció, illetve az olvadáspont vizsgálat alatt mérte. A megvilágításhoz használt fény hullámhossza 470 nm volt, míg a kibocsátott fényt 510 nm-en mértük.

Amennyiben, a pozitív PCR kontrollként és a pozitív feltérési kontrollként használt minta felerősítése során a küszöbértéket látható módon meghaladó görbét (fluoreszcens jelet) kapunk, a negatív PCR kontroll és a negatív feltérési kontroll eredménye negatív (nincs jel), a PCR vizsgálat eredményei kiértékelhetőek. Bármelyik fent említett kritérium meg nem valósulása esetén, a vizsgálatot megismételtük. A minta pozitívnak minősül, ha a küszöb értéket meghaladó fluoreszcens görbét kapunk. Ellenkező esetben, a minta negatívnak minősül.

4.5 Real-time PCR rendszer specifitásának és érzékenységének vizsgálata

Az általunk kifejlesztett real-time PCR rendszer specifitását az alábbi *Campylobacter* és nem-*Campylobacter* referens törzsekkel teszteltük az esetleges keresztreakciók kizárására: *C. jejuni* (ATCC 33291, NCTC 11351), *C. coli* (ATCC 33559), *C. fetus* subsp. *fetus* (NCTC 10842), *C. fetus* subsp. *venerealis* (NCTC 10354), *C. sputorum* subsp. *sputorum* (NCTC 11528), *Arcobacter cryaerophilus* (NCTC 11885), *Escherichia coli*

(ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Az amplikonok megfelelő méretéről agarózgél-elektroforézissel győződünk meg.

Az izolátumok vizsgálata során a *C. jejuni* és *C. coli* negatív törzseket, illetve néhány *C. jejuni* és *C. coli* pozitív törzset is azonosítottunk szekvenálás alapján annak érdekében, hogy kizárjuk az esetleges műtermékek jelenlétét és ellenőrizhessük, hogy az általunk talált szakaszok valóban a keresett baktérium genomjának részletei-e.

Az irodalomban leírt PCR módszerek és a saját PCR rendszerünk érzékenységének összehasonlításához a referens *C. jejuni* (ATCC 33291) és *C. coli* (ATCC 33559) baktériumtörzseket a korábban már ismertetett módon elszaporítottuk, és a baktérium kultúrából egy kicsiny mennyiséget ultra tiszta vízben (Millipore, Billerica, USA) szuszpendáltunk. A korábban már szintén ismertetett módon kivontuk a DNS-t. A nukleinsav oldatokból 10-es alapú hígításokat készítettünk, és az összehasonlításokat ezekkel végeztük.

Néhány párhuzamos vizsgálattal összehasonlítottuk a tenyésztés és a PCR módszer érzékenységét a minták közvetlen vizsgálata esetén.

1. Egy vágóhídon 50 csirke testüregéből vettünk tamponmintát (2 tampon/csirke) a vágás, mosás után, hűtés előtt (Fót 2008. 10. 13.). Az egyik tamponmintát közvetlen mCCDA-ra kentük fel, a másikat pedig a PCR vizsgálathoz használtuk.
2. A vágóhidakról érkező bélmintákból 35-öt feldolgoztuk párhuzamosan tenyésztéssel (közvetlen kioltás) és PCR-rel. A béltartalmat puffertolt peptonvízben 1:10 arányban hígítottuk, és a DNS feltáráshoz ebből vettünk ki mintát.
3. Egy másik alkalommal 10 bélből a tenyésztést közvetlen kioltással és Bolton dúsító alkalmazásával is elvégeztük. A PCR vizsgálathoz a bélből tamponnal vettünk ki mintát, illetve a Bolton dúsítóból is, amelyet előtte 20 órán át 41,5 °C-on inkubáltunk (13. táblázat).

Hatvankilenc tenyészet fajmeghatározását elvégeztük párhuzamosan a korábban leírt hagyományos fenotípusos tesztek alapján és PCR-rel is.

4.6 Primerek *flaA* SVR tipizáláshoz

Összesen 73 *C. jejuni* és *C. coli* törzset vizsgáltunk meg az *flaA* gén SVR szekvenálásával. Az izolátumokat úgy választottuk ki, hogy legyen köztük minden állatfajból, az ország különböző területéről és mindkét baktériumfajból. Az *flaA* gén SVR felerősítéséhez a korábban leírt FLA4F és FLA1728 primereket használtuk (Meinersmann et al., 1997, Nachamkin et al., 1993). Az *flaA* SVR szekvenálásához eltérő, az FLA242FU forward és az FLA625RU reverz primereket használtuk (Meinersmann et al., 1997).

4.7 Nemzetség- és *C. lanienae* fajspecifikus PCR-ek

A törzseket először real-time PCR-rel vizsgáltuk, hogy azonosítsuk a leggyakrabban előforduló *C. jejuni*- és *C. coli*-fajokat. A *C. jejuni* és *C. coli* negatív eredményt adó törzseket tovább vizsgáltuk a 16S rRNS génre tervezett genus specifikus primerekkel (C412F és C1228R) (Linton et al., 1996), hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az izolátum *Campylobacter*. A 45 ilyen *C. jejuni* és *C. coli* negatív, de *Campylobacter* genusba tartozó törzset ezekkel a primerekkel megszekvenáltuk az azonosításuk érdekében.

A *C. lanienae* azonosítására és filogenetikai vizsgálatokhoz Logan et al. (2000) által leírt, szintén a 16S rRNS génre tervezett, fajspecifikus primereket (CLAN76F és CLAN1021R) és PCR protokollt használtuk (7. táblázat).

7. táblázat. A *Campylobacter* azonosítására és jellemzésére használt primerek.

Kórokozó	Gén	Primerek 5'-3'	Amplikon
<i>C. jejuni</i>	<i>hipO</i>	CAMNORF AAT GTA ATG CAT GCT TGC GGT CA CAMNORR CGA AGA AGC CAT CAT CGC ACC T	261 bp
<i>C. coli</i>	<i>glyA</i>	CCF GTA AAA CCA AAG CTT ATC GTG CCR TCC AGC AAT GTG TGC AAT G	126 bp
<i>C. lanienae</i>	16S rRNS	CLAN76F GTA AGA GCT TGC TCT TAT GAG CLAN1021R TCT TAT CTC TAA GAG GTT CTT A	920 bp
<i>Campylobacter</i> spp.	16S rRNS	C412F GGA TGA CAC TTT TCG GAG C C1228R CAT TGT AGC ACG TGT GTC	816 bp
<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> <i>flaA</i> SVR	<i>flaA</i>	FLA4F GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT GGT GC FLA1728 CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG	1700 bp
<i>flaA</i> SVR szekvenálás	<i>flaA</i>	FLA242FU CTA TGG ATG AGC AAT TWA AAA T FLA625RU CAA GWC CTG TTC CWA CTG AAG	321 bp

4.8 A PCR reakció eredményének láthatóvá tétele (vizualizáció)

A hagyományos PCR reakciót követően az amplifikált PCR terméket agarózgél-elektroforézissel vizsgáltuk. 10 µl terméket 0,1 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó, TBE (tris-borát-etilén-diamin-tetraacetát) pufferben oldott, 1%-os agarózgélben (SeaKem® LE Agarose, Cambrex BioScience, Rockland, Maine, USA) elektroforetizáltunk.

Az alkalmazott feszültség 140 V volt 40 percen át. Az agarózgél ezt követően 302 nm hullámhosszú ultraibolya (UV) fény átvilágítással vizsgáltuk (Alpha Innotech Corporation, USA), majd a transzilluminátor segítségével a narancs (595 nm) szűrő használatával kapott képet a hozzá kapcsolódó FluorChem program segítségével rögzítettük és tároltuk. A termékek méretét 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litvánia) marker segítségével határoztuk meg. Pozitív kontrollnak ismert *Campylobacter* törzseket használtunk mind a feltárásnál, mind a PCR-nél, míg feltárási és PCR negatív kontrollként 100 µl 1xTE puffer, illetve DNS mentes reakcióelegy szolgált.

Amennyiben a pozitív PCR kontrollként és a pozitív feltárási kontrollként használt minta felerősítése során a gélen jól látható módon, a markerhez viszonyítva a várt hosszúságú fragmentet kapunk, a negatív PCR kontroll és a negatív feltárási kontroll eredménye negatív (nincs látható csík a megadott méretállományban), a PCR vizsgálat eredményei kiértékelhetőek. Bármelyik fent említett kritérium meg nem valósulása esetén a vizsgálatot megismételtük. A minta pozitívnak minősült, ha jól kifuttatott gélen a vártnak megfelelő méretű csíkot láttunk. Ellenkező esetben, a minta negatívnak minősült.

4.9 Szekvenca-meghatározás és filogenetikai vizsgálatok

A nemzetség-specifikus és az *flaA* SVR szekvenálásához tervezett PCR termékeit (amplikonokat) TBE pufferben oldott, 0,1 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó, 1%-os agarózgélben (SeaKem® LE Agarose, Cambrex BioScience, Rockland, Maine, USA) elektroforetizáltuk 140 V feszültség mellett 40 percen át. Az amplikon helyzetét rövid idejű 302 nm-es UV átvilágítással (Alpha Innotech Corporation, USA) vizsgáltuk, majd az amplikont tartalmazó géldarabot kivágtuk a gélből és QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével kivontuk belőle a DNS-t.

A termékek kétirányú, direkt szekvenálását fluoreszcens festékkel jelölt didezoxinukleotidos szálépítésen alapuló szekvenáló reakció módszerével, ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit V 3.1 használatával és egy ABI Prism™ 3130 genetikai analizátor (Applied Biosystems, Foster City, USA) használatával végeztük az amplifikáláshoz használt primerekkel, a gyártó leírása alapján.

A kétirányú szekvenálás eredményeként kapott szekvenciadatokat egymással összehasonlítottuk, és az esetleges eltéréseket, hibás hullámértelmezéseket javítottuk a DNASTAR (Lasergene, Madison, USA) szoftver csomagban lévő EditSeq és SeqMan használatával.

A szekvenciák hasonlóság alapján történő illesztéséhez (alignment) a MUSCLE (Edgar, 2004) programot használtuk, majd a filogenetikai törzsfa készítéséhez a Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 4.0 (Tamura et al., 2007) szoftvert alkalmaztuk.

4.9.1 16S rRNS gén vizsgálata

A nemzetség-specifikus primerekkel kapott szekvenciákat a GenBank adatbázisában elérhető, a baktérium genom azonos részletére vonatkozó szekvenciákkal összehasonlítottuk a BLAST (NCBI, Bethesda, USA) program segítségével és meghatároztuk a *Campylobacter*-fajt. Azonosítottuk mind a 43 magyar *C. lanienae* törzset, 1 *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*-t és 1 *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*-t.

A GenBank-ban megtalálható összes, a *C. lanienae* azonos részletét tartalmazó szekvenciát hozzáillesztettük a magyar törzsekhez. Az így kapott 658 nukleotid hosszúságú

illesztés részletes vizsgálatával 15 törzset kiválasztottunk a törzsfő csoportjaiból. Ezek amplifikációját a fajspecifikus primerekkel is elvégeztük filogenetikai vizsgálatok céljából. Mivel a nemzetség és a fajspecifikus primerek által közrefogott szakaszok átfedik egymást a 16S rRNS génen (a 816 és 920 bp méretű termékek együtt 1152 nukleotid hosszúságú részt fednek le), az így kapott szekvenciákat kijavítva, egybegyűjtve és egymáshoz illesztve egy 1055 nukleotid hosszúságú végső illesztést kaptunk és ezt használtuk a további vizsgálatokhoz. A kapott részleges 16S rRNS gén szekvenciákat benyújtottuk a GenBank-hoz, és az alábbi azonosító számokat kaptuk: HM462449-től HM462455-ig, HM462460 és HM462464-től HM462470-ig.

A kapott termékeket szekvencia-analízisnek vetettük alá a Gorkiewicz et al. (2003) által leírt variábilis szakaszokon. Az első, Vc1-es régiót a mi szekvenciáink nem tartalmazták, ezért az kimaradt a vizsgálatból.

A filogenetikai törzsfő készítéséhez a Neighbour-Joining módszert használtuk (Saitou és Nei, 1987), az evolúciós távolságok meghatározását a Maximum Composite Likelihood modell (Tamura et al., 2004) segítségével végeztük.

4.9.2 Az *flaA* SVR vizsgálata

Az *flaA* SVR-t FLA242FU forward és FLA625RU reverz primerekkel szekvenáltuk (Meinersmann et al., 1997). A szekvenciák javítása után az *flaA* alléltípusokat a Keith Jolley és Man-Suen Chan által (Jolley et al., 2004) kifejlesztett *C. jejuni* MLST weblap (<http://pubmlst.org/campylobacter/>, 2010-06-12.) segítségével azonosítottuk.

A filogenetikai törzsfő készítéséhez a Neighbour-Joining módszert használtuk (Saitou és Nei, 1987), az evolúciós távolságok meghatározását a Maximum Composite Likelihood modell (Tamura et al., 2004) segítségével végeztük. A bootstrap mintázást 1000 megismételt törzsfő rekonstrukció adatai alapján kaptuk meg. Ezzel a módszerrel a törzsfák mintázatának (topológia) a megbízhatóságát ellenőriztük (Felsenstein, 1985). A filogenetikai törzsfák megjelenítéséhez és szerkesztéséhez szintén a Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 4.0 programot használtuk.

4.10 PFGE

122 *C. jejuni* és *C. coli*, továbbá 9 *C. lanienae* és 1 *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* törzs PFGE vizsgálatát végeztük el a korábban leírt módon (Michaud et al., 2001; Ribot et al., 2001). A *C. jejuni* és *C. coli* törzsek esetében *Sma*I restrikciós enzimet, majd az azonos profilú törzseken *Kpn*I-et, míg az egyéb *Campylobacter* törzsek esetében három különböző enzimet, *Sma*I, *Sal*I és *Kpn*I-et (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) használtunk. A DNS restrikciós sávok elemzését Fingerprinting II (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) szoftver segítségével végeztük, a hasonlósági együttható számítása és a

dendrogram készítése Dice-együttható alkalmazásával, és a számtani átlagok nem súlyozott pár csoport módszerének (UPGMA) alkalmazásával történt. Az optimalizálási érték és a pozíció tolerancia 1% volt. A klaszterek kialakítása a genomialis DNS emésztési profiljának 95%-os (*C. jejuni* és *C. coli*) illetve 90%-os (egyéb *Campylobacter*) azonossági szintje felett történt. Kontrollnak a *C. jejuni* ATCC 33560 referens törzset használtuk.

4.11 MLST

A *Campylobacter* MLST az alábbi 7 háztartási gén vizsgálatán alapszik: *aspA* (aspartase) *glnA* (glutamine synthetase) *gltA* (citrate synthase) *glyA* (serine hydroxy methyl transferase) *pgm* (phospho glucomutase) *tkt* (transketolase) *uncA* (ATP synthase alpha alegység)

Az ezekre a génekre tervezett primerek a *C. jejuni* esetében egy kb. 1000 bp nagyságú szakaszt erősítenek fel. A szekvenáláshoz használt primerek ezeken belül egy-egy kb. 400-600 bp nagyságú szakaszt fognak közre. A *C. coli* esetében azonos primerekkel történt az amplifikáció és a szekvenálás (8. táblázat). A PCR reakciókat és a szekvenálást a korábban leírtaknak megfelelően végeztük. (Dingle et al., 2001 és 2005)

A szekvenciák javítása után a szekvencia típus (ST) és klón komplex (CC) azonosítását az Interneten hozzáférhető *C. jejuni* MLST weblap (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) segítségével végeztük.

8. táblázat. MLST-hez használt primerek.

Gén	<i>C. jejuni</i> primerek 5'-3'	<i>C. coli</i> primerek 5'-3'
<i>aspA</i>	A9 AGTACTAATGATGCTTATCC A10 ATTTTCATCAATTTGTTCTTTGC	S1 CAACTTCAAGATGCAGTACC S2 ATCTGCTAAAGTATGCATTGC
szekvenáláshoz	S3 CCAACTGCAAGATGCTGTACC S6 TTCATTTGCGGTAATACCATC	ua.
<i>glnA</i>	A1 TAGGAACTTGGCATCATATTACC A2 TTGGACGAGCTTCTACTGGC	S1 TTCATGGATGGCAACCTATTG S2 GCTTTGGCATAAAAAGTTGCAG
szekvenáláshoz	S3 CATGCAATCAATGAAGAAAC S6 TTCCATAAGCTCATATGAAC	ua.
<i>gltA</i>	A1 GGGCTTGACTTCTACAGCTACTTG A2 CCAAATAAAGTTGTCTTGGACGG	S1 GATGTAGTGCATCTTTTACTC S2 AAGCGCTCCAATACCTGCTG
szekvenáláshoz	S3 CTTATATTGATGGAGAAAATGG S6 CCAAAGCGCACCAATACCTG	ua.
<i>glyA</i>	A1 GAGTTAGAGCGTCAATGTGAAGG A2 AAACCTCTGGCAGTAAGGGC	S1 TCAAGGCGTTTATGCTGCAC S2 CCATCACTTACAAGCTTATAC
szekvenáláshoz	S3 AGCTAATCAAGGTGTTTATGCGG S4 AGGTGATTATCCGTTCCATCGC	ua.
<i>tkt</i>	A3 GCAAACCTCAGGACACCCAGG A6 AAAGCATTGTTAATGGCTGC	S1 AGGCTTGTGTTTTTCAGGCGG S2 TGACTTCCTTCAAGCTCTCC
szekvenáláshoz	S5 GCTTAGCAGATATTTTAAGTG S6 AAGCCTGCTTGTCTTTGGC	ua.

<i>pgm</i>	A7 TACTAATAATATCTTAGTAGG A8 CACAACATTTTTTCATTTCTTTTTTC	S1 TTATAAGGTAGCTCCGACTG S2 GTTCCGAATAGCGAAATAACAC
szekven áláshoz	S5 GGTTTTAGATGTGGCTCATG S2 TCCAGAATAGCGAAATAAGG	ua.
<i>uncA</i>	A7 ATGGACTTAAGAATATTATGGC A8 ATAAATTCCATCTTCAAATTCC	S1 AAGCACAGTGGCTCAAGTTG S2 CTACTIONTGCCTCATCCAATCAC
szekven áláshoz	S3 AAAGTACAGTGGCACAAGTGG S4 TGCCTCATCTAAATCACTAGC	ua.

4.12 Antibiotikum-érzékenységi vizsgálat

Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokat leveshígításos módszerrel végeztük mikrotiter lemezeken (EUCAMP plates, TREK Diagnostic Systems Ltd., Cleveland, USA) az antibiotikum-rezisztencia közösségi referencia laboratórium ajánlása szerint (DTU, Koppenhága). A minimális gátló koncentrációt (MIC) határoztuk meg, ami a vizsgált antibiotikum legkisebb koncentrációja ($\mu\text{g/ml}$), amely még gátolta a baktérium növekedését. A lemezek az alábbi antibiotikumokat tartalmazták: kloramfenikol, ciprofloxacín, eritromicin, gentamicin, nalidixsav, streptomycin és tetraciklin (9. táblázat).

9. táblázat. Az alkalmazott antibiotikum koncentrációk.

EUCAMP	$\mu\text{g/ml}$
Kloramfenikol	2-32
Ciprofloxacín	0,06-4
Eritromicin	0,5-32
Gentamicin	0,12-16
Nalidixsav	2-64
Streptomycin	1-16
Tetraciklin	0,25-16

Amikor nem állt rendelkezésünkre EUCAMP mikrotiter lemez, E-teszt csíkokat (AB Biodisk, Solna, Sweden) alkalmaztunk a rezisztencia vizsgálatokhoz az alábbi antibiotikumokkal: nalidixsav, tetraciklin, eritromicin, enrofloxacin, ampicillin és klindamicin. A tápagarokat az E-teszt csíkokkal 37 °C-on inkubáltuk 48 órán át mikroaerofil körülmények között, és a különböző antibiotikumok minimális gátló koncentrációját a csepp formájú gátló zóna csúcsánál, ahol metszette a csíkot, olvastuk le (Baker, 1992).

Az eredmények értékelésénél az EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) által meghatározott epidemiológiai határértékeket vettük alapul. Amennyiben ilyen nem volt, akkor EUCAST vagy NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System) által meghatározott klinikai határértékeket vettük figyelembe (10. táblázat).

10. táblázat. A rezisztencia vizsgálatok értékelésénél alkalmazott határértékek *C. jejuni* és *C. coli* törzsek esetében. Fekete: EUCAST epidemiológiai határértékei, kék: EUCAST fajtól független klinikai határértéke, zöld: NARMS határértékek.

AB csoport	Antibiotikum	<i>C. jejuni</i> µg/ml	<i>C. coli</i> µg/ml
Kinolonok	Nalidixsav	>16	>32
	Enrofloxacin/Ciprofloxacin	>1	>1
Tetraciklinek	Tetraciklin	>2	>2
Makrolid	Eritromicin	>4	>16
	Azitromicin	>4	>4
Penicillinek	Ampicillin	>8	>8
Amfenikolok	Kloramfenikol	>16	>16
	Florfenikol	>4	>4
Aminoglikozidok	Gentamicin	>1	>2
	Streptomycin	>2	>4
Ketolid	Telitromicin	>8	>8
Linkózamid	Klindamicin	>4	>4

Pearson-féle Chi-négyzet statisztikai próbát alkalmaztuk a különböző antibiotikumokra rezisztens törzsek arányának összehasonlításához.

4.13 Takarmányozási kísérletek

Takarmányozási vizsgálatokban az Immunofort illetve a Sangrovit természetes alapú takarmány-kiegészítők *Campylobacter* ellenes hatását teszteltük kísérleti és telepi körülmények közt.

1. Egy vizsgálatban 120 napos brojlercsirkét 4 csoportba osztottunk (A-D), amelyekből az A csoport takarmányában anorganikus Zn és Cu sók voltak, a B csoport takarmányában az előző táp 100 mg/kg Sangrovittal volt kiegészítve. A C csoport takarmányában 40 mg/kg Zn-glicinát és 5 mg/kg Cu-glicinát volt keverve az anorganikus mikroelemek helyett, a D csoportban pedig a szerves Zn és Cu tartalmú takarmány volt kiegészítve 100 mg/kg Sangrovittal. A Sangrovit növényi alkaloidokat tartalmazó, immunstimuláns hatású takarmány-kiegészítő.

A 120 csirke *Campylobacter*-fertőzöttségét először 1 napos korban vizsgáltuk kloákából vett tamponmintából tenyésztéssel. Tíz napon, 20 napon, és 30 napon csoportonként 10-10 csirke vakbelének tenyésztéses vizsgálatát végeztük el.

2. A következő kísérletben pecsenye kacsákat vizsgáltunk, telepi körülmények közt. A kacsák egy része Immunoforttal (Vitafort Zrt) kiegészített takarmányt kapott 3-18 napos koráig. Az Immunofort zsírsavakat, aminosavakat, foszforsavat valamint cink- és réz-só komplexeket tartalmaz.

A kacsák fertőzöttségét napos korban, 18 napon és 40 napon kloaka tamponminta tenyésztéses vizsgálatával ellenőriztük. Negyven napon 30-30 kacsavakbelének tenyésztéses vizsgálatát is elvégeztük.

3. Egy másik kísérletben 60 db pekingi kacsából 3 csoportot alakítottunk ki, melyek 20-20 kacsából (10 tojó és 10 gácsér) álltak. Az I. csoport volt a kontroll. A II. csoportban az állatok Immunofort-ot (Vitafort Zrt) kaptak 1 l/m³ mennyiségben az itatóvízhez keverve. A III. csoportban a kacsák az Immunoforthoz hasonló összetételű, de szilárd adalékot kaptak 2 g/kg mennyiségben a takarmányba keverve 35 napon át.

A *Campylobacter*-negatív kacsákat hat napon tyúkból származó *C. jejuni* törzsszel (2010/2074) fertőztük per os. Huszonegy napon 3x20 db kloaka tamponminta és csoportonként 6 állat vakbelének tenyésztéses vizsgálatát végeztük. Huszonnyolc napon 3x14 db kloaka tamponminta és 3x6 db vakbélminta, végül 40 napon 3x8 db kloaka tamponminta és ugyanezen állatokból származó vakbélminta tenyésztése történt.

5 Eredmények

5.1 *Campylobacter*-tenyésztés és PCR

Összehasonlítottuk a *Campylobacter*-tenyésztést az ISO 10272-1 szabvány szerint Bolton szelektív elődúsítóval és az elődúsítás kihagyásával, közvetlen mCCDA-ra való kioltással. Tíz bélmintát dolgoztunk fel párhuzamosan, a 8 pozitív mintából a közvetlen kioltással 5, az elődúsító használatával 7 minta lett pozitív. Egy *C. jejuni* pozitív minta csak a közvetlen kioltással lett pozitív, 2 *C. jejuni* és 1 *C. coli* pozitív minta pedig az elődúsító használatával lett csak pozitív (13. táblázat).

A 2008 és 2009-es év során 1110 baromfiból, sertésből és szarvasmarhából származó, vágóhidakon gyűjtött bélmintát vizsgáltunk meg, amelyek az ország egész területéről (mind a 19 megyéből) származtak. Ebből 441 (39,7%) volt *Campylobacter* spp. pozitív tenyésztéssel, amit az izolátumok PCR vizsgálata meg is erősített.

Az általunk kifejlesztett real-time PCR rendszerrel a 441 pozitív minta közül 266 volt *C. coli* (60,3%) és 143 volt *C. jejuni* (32,4%) pozitív. A *C. jejuni* és *C. coli* negatív törzseket (45 izolátum) a nemzetség-specifikus primerekkel vizsgáltuk tovább. Mind a 45 izolátum pozitívnak bizonyult és a termék szekvenálásával meghatároztuk az izolált egyéb *Campylobacter*-fajokat. Az előfordulás gyakoriságát állatfajonként a 11. táblázat tartalmazza.

11. táblázat. *Campylobacter*ek előfordulására vizsgált minták száma állatfajonként. A pozitív minták száma és az izolátumok száma és százalékos aránya.

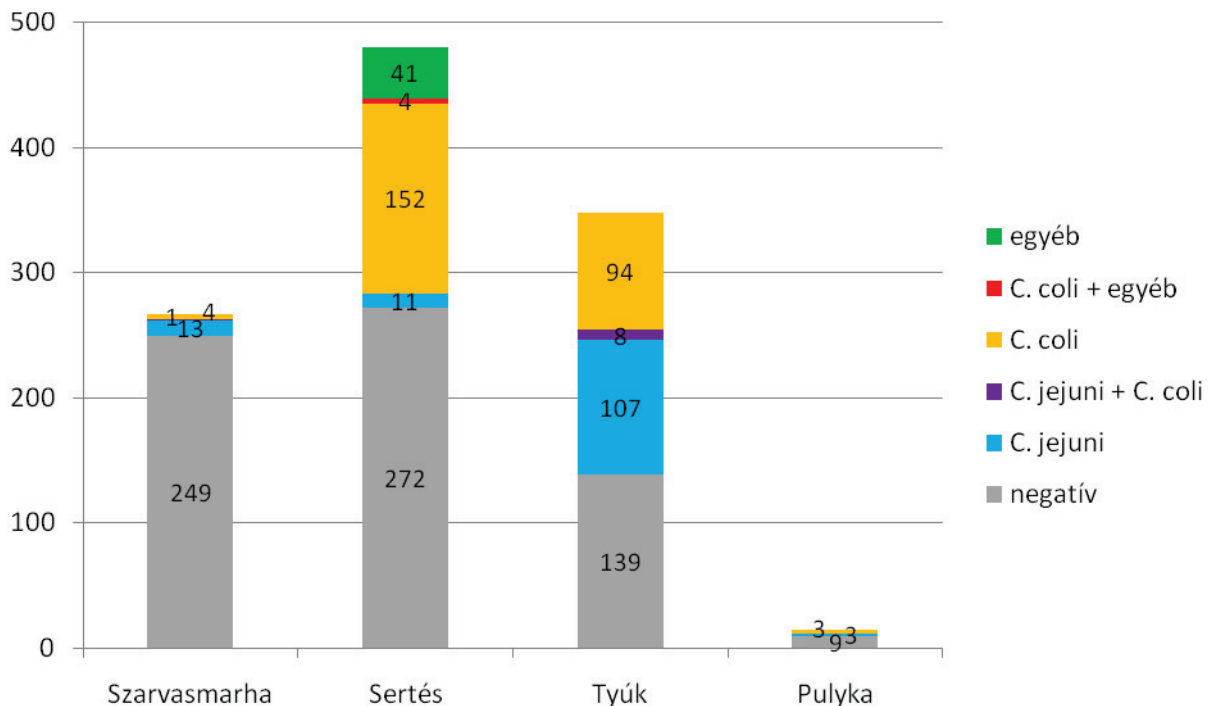
2008-2009	Mintaszám	Pozitív minták száma (%)	Izolátumok száma				
			<i>C. jejuni</i> (%)	<i>C. coli</i> (%)	<i>C. lanienae</i> (%)	<i>C. hyoint. subsp. hyoint.</i> (%)	<i>C. hyoint subsp. lawsonii</i> (%)
Szarvasmarha	267	18 (6,7)	14 (77,8)	5(27,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Sertés	480	208 (43,3)	11 (5,3)	156 (75,0)	43 (20,7)	1 (0,5)	1 (0,5)
Brojlercsirke	348	209 (60,1)	115 (55,0)	102 (48,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Pulyka	15	6 (40,0)	3 (50,0)	3 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Összesen	1110	441 (39,7)	143 (32,4)	266 (60,3)	43 (9,8)	1 (0,2)	1 (0,2)

A 480 sertés mintából 208 (43,3%) volt *Campylobacter*-pozitív. Csak sertésből izoláltunk *C. jejuni*-tól vagy *C. coli*-tól eltérő *Campylobacter*-fajt. A pozitív minták közül 156 (75,0%) volt *C. coli* pozitív, négy esetben kevert fertőzéssel (3 *C. coli* + *C. lanienae* és 1 *C. coli* + *C. hyointestinalis subsp. lawsonii*), 43 (20,7%) volt *C. lanienae*, 11 (5,3%) *C. jejuni*, 1 *C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis* és 1 *C. hyointestinalis subsp. lawsonii* pozitív.

A 267 szarvasmarhából származó mintából 18 (6,7%) volt pozitív, amelyekből 19 izolátumot azonosítottunk: 14 *C. jejuni*-t (77,8%) és 5 *C. coli*-t (27,8%). Egy mintában tehát vegyes fertőzés volt.

A 348 brojlercsirke mintából 209 (60,1%) volt *Campylobacter*-pozitív. A pozitív minták közül 115 (54,5%) *C. jejuni*-ra, 102 (45,5%) *C. coli*-ra volt pozitív, tehát 8 mintában vegyes fertőzést találtunk.

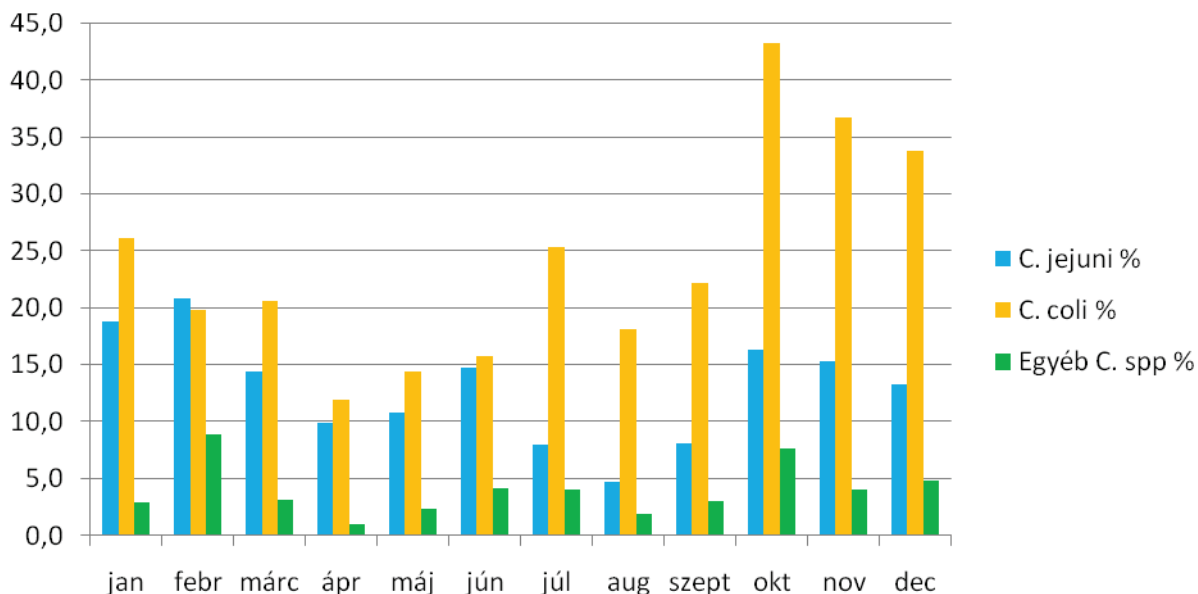
A 15 pulyka mintából 6 (40,0%) volt pozitív: 3 *C. jejuni*-t és 3 *C. coli*-t izoláltunk.



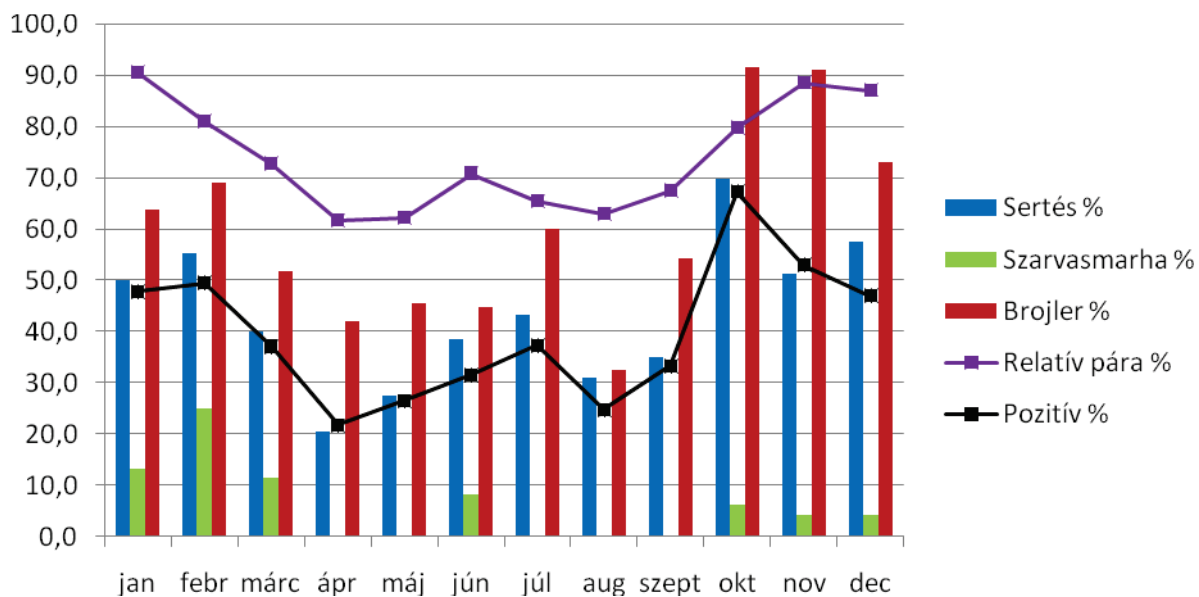
5. ábra: Campylobacterok előfordulása állatfajonként 2008-2009.

A földrajzi eloszlást vizsgálva azt találtuk, hogy 2 szomszédos megyében (Nógrád és Pest) magasabb arányban fordultak elő fertőzött brojlercsirke-állományok Nalimov teszttel vizsgálva $\alpha=0,05$ -el (Kaiser és Gottschalk, 1972). A sertésállományokat tekintve nagyobb arányú fertőzöttséget figyeltünk meg Tolna és Csongrád megyékben. Szarvasmarha minta több megyéből is kevesebb, mint 10 érkezett a két év alatt, ezért nem alkalmas hasonló megállapításokra.

A *Campylobacter*-fertőzöttségre jellemző a szezonális (6. ábra). A *Campylobacter*-pozitív minták időbeli előfordulását vizsgálva azt találtuk, hogy a pozitív minták száma mindhárom állatfaj és mindkét *Campylobacter*-faj esetében növekszik áprilistól októberig. (6. és 7. ábra). Pearson-féle korreláció analízissel szignifikáns kapcsolatot találtunk a relatív páratartalom és a *Campylobacter*-pozitív minták előfordulása között ($p=0,00161$).



6. ábra: Campylobacterok előfordulásának szezonálisága baktériumfajok szerint.



7. ábra: Campylobacterok előfordulásának szezonálisága állatfajok szerint. Relatív páratartalom és a pozitív minták alakulása 2008-2009. folyamán.

Érdekeség, hogy a nemzetség-specifikus primerek *Arcobacter*-fajokkal – melyeket mások izoláltak szarvasmarhából szűrési módszerrel – is pozitív reakciót adtak, azonban az általunk használt tenyésztéssel ilyen fajokat nem tudtunk izolálni.

Az általunk használt módszert a termofil *Campylobacter* csoportra, azon belül is elsősorban *C. jejuni*, *C. coli* és *C. lari* tenyésztésére fejlesztették ki, mégis sikerrel izoláltunk a sertés vastagbéléből *C. lanienae* törzseket. A bélből direkt mCCDA-ra való kioltással 48-72

órás, 41,5 °C-os, mikroaerob inkubálás után jól látható baktériumtelepek fejlődtek. A *C. lanienae* telepei kisebbek és áttetszőbbek az mCCDA és Columbia agaron, mint a *C. jejuni* vagy *C. coli* telepek. Az oxidáz reakcióban a *C. lanienae* törzsek kevésbé intenzív színváltozást okoznak, mint a *C. jejuni* vagy a *C. coli*. Az összes izolált *C. lanienae* kataláz pozitív, H₂S negatív, hippurát és indoxil acetát hidrolízis negatív volt. Továbbá minden törzs cefalotin rezisztens és 1%-os glicerines talajon nem nőtt. A *C. hyointestinalis* subsp *hyointestinalis* törzs (17528) a fajra jellemző módon termelt H₂S-t, cefalotin érzékeny volt és nőtt 1% glicint tartalmazó agaron.

C. lanienae törzsek földrajzi eloszlását tekintve 16 megyéből származtak, 2 törzs Szlovákiából származott (8. ábra). Egy-három törzset izoláltunk általában 1-1 hónapban az év folyamán. A *C. lanienae* tehát viszonylag magas százalékban előfordul országsszerte a sertésállományokban. A tengeren túl szarvasmarhából is kimutatták, a mi szarvasmarha mintáink eddig negatívak voltak.



8. ábra: *C. lanienae* izolátumok származása megyék szerint 2008-2009.

Mind a 43 *C. lanienae* izolátum a 16S rRNS génre tervezett fajspecifikus PCR-rel pozitív reakciót adott. A PCR termékek a várt nagyságban (920 bp) jelentek meg. Egy törzs (6555) esetében egy kb. 200 bp-rel nagyobb termék keletkezett, 3 esetben (5172, 24639, 17459) pedig mindkét nagyságú ampikon megjelent.

A *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* törzs (17530b) a *C. lanienae* fajspecifikus primerekkel pozitív reakciót adott, és egy 920 bp nagyságú amplicon keletkezett.

5.2 Real-time PCR bevezetése a *Campylobacter*-diagnosztikába

Az általunk tervezett primerekkel végzett hagyományos agarózgél alapú PCR optimalizálási kísérletek eredményeként azt tapasztaltuk, hogy a rendszer 56-65 °C-on is jól működik. A MgCl₂ koncentrációra érzékenyebb, 1,5 mM mennyiségben optimális.

Az irodalomban leírt, *C. jejuni* és *C. coli* kimutatására alkalmas hagyományos, agarózgél alapú PCR módszerek összehasonlítása során az találtuk, hogy Vandamme et al. (1997) multiplex rendszere duplex formában jobban működött, mint szimplex, de a *C. coli*-t nem erősítette fel. Wang et al. (2002) multiplex rendszere ugyanúgy működött multiplex és szimplex formában, de a *C. jejuni*-t kis mértékben erősítette fel a Go Taq enzimünkkel. Linton et al. (1997) primereivel jó eredményeket kaptunk.

A szenzitivitási vizsgálatok során azt találtuk, hogy Wang *C. coli* primere erősebben működött, mint Linton *C. coli* primere. Vandamme, Linton és a mi *C. jejuni* primerünk hasonló érzékenységgű volt (12. táblázat).

12. táblázat. PCR optimalizálási kísérletek.

	Hagyományos PCR (saját hőmérsékleti profil)	Szenzitivitás vizsgálat hígításokkal	Azonos hőmérsékleti profil (65 °C annealing)		Azonos hőmérsékleti profil (59 °C annealing)	
			Hagyományos PCR	Real-time PCR	Hagyományos PCR	Real-time PCR
Vandamme <i>C. jejuni</i>	Jó	5 hígítás	Nem működött	Nem működött	Nem működött	Nem működött
Vandamme <i>C. coli</i>	Nem működött	-	-	-	-	-
Wang <i>C. jejuni</i>	Nem működött	-	-	-	-	-
Wang <i>C. coli</i>	Jó	5 hígítás	6 hígítás	6 hígítás	6 hígítás szebb	6 hígítás szebb
Linton <i>C. jejuni</i>	Jó	5 hígítás	5 hígítás	4 hígítás nem szép	3 hígítás	3 hígítás nem szép
Linton <i>C. coli</i>	Jó	4 hígítás	Nem működött	Nem működött	-	-
Saját <i>C. jejuni</i>	Jó	5 hígítás	3 hígítás	4 hígítás	5 hígítás szebb	5 hígítás szebb

Az 5 rendszert azonos hőmérsékleti profillal futtatva 65 °C-os annealing hőmérséklet esetében Linton *C. coli* rendszere és Vandamme *C. jejuni* primere nem működött. Real-time PCR-rel futtatva Linton *C. jejuni* primerével kettős csúcsú görbéket kaptunk, de a mi *C. jejuni* primerünk 4 hígítást, Wang *C. coli* primerei 6 hígítást erősített fel. 59 °C-os annealing hőmérséklettel vizsgálva Linton *C. jejuni* rendszere csak 3 hígításig futott, a mi *C. jejuni* rendszerünk 5, Wang *C. coli* rendszere 6 hígításig, és szebben futott. Vandamme *C. jejuni* primerei nem működtek, Linton *C. coli* primereit nem is néztük (12. táblázat).

Tehát végül a *C. coli* kimutatására a Wang et al. (2002) által leírt, *glyA* génre tervezett primereket, a *C. jejuni* kimutatására pedig a *hipO* génre, általunk tervezett primereket választottuk, mert ezt a két rendszert tudtuk real-time PCR-rel azonos hőmérsékleti profillal, jó érzékenységgel futtatni.

Az így kifejlesztett real-time PCR azonosította a *C. jejuni* és *C. coli* törzseket, de nem adott pozitív eredményt más *Campylobacter*, vagy egyéb nem *Campylobacter*-fajokkal, melyekkel teszteltük. A *C. jejuni* és *C. coli* törzsek a várt olvadási hőmérsékleten adtak hullámot.

Az esetleges téves negatív eredmények kiszűrése érdekében a negatív eredményt adó törzseket szekvenáltuk, amelyek mind egyéb *Campylobacter*-fajnak bizonyultak. Az esetleges téves pozitivitást pedig néhány (kicsit eltolódott olvadásgörbét adó) pozitív törzs szekvenálásával ellenőriztük, amelyek mind *C. jejuni*-nak vagy *C. coli*-nak bizonyultak.

Néhány minta párhuzamos vizsgálatával összehasonlítottuk a tenyésztés és a közvetlen PCR vizsgálat érzékenységét, de a PCR messze elmaradt a tenyésztéses módszer mögött.

1. Mind az 50 csirke testüregéből vett tamponminta pozitív lett tenyésztéssel, 1-1 telepet azonosítottunk, és 33 *C. jejuni*-t és 17 *C. coli*-t izoláltunk. A feltárás után a real-time PCR vizsgálattal csak 3 lett pozitív, 2 *C. coli* és 1 *C. jejuni*.
2. A 35 bélmintából tenyésztéssel 5 minta *C. jejuni* és 10 minta *C. coli* pozitív lett. Real-time PCR-rel csak 2 minta lett *C. coli* pozitív, ebből az egyik tenyésztéssel negatív volt.
3. A 10 bélmintából 4 *C. coli* és 1 *C. jejuni* pozitív lett tenyésztéssel, közvetlen kioltással. A bélből vett tamponminták PCR vizsgálatával csak 1 *C. coli* pozitív mintát találtunk. A Bolton dúsító PCR vizsgálatával már 3 *C. coli* pozitív mintát találtunk, amelyből 1 a közvetlen tenyésztéssel negatív lett (13. táblázat).

13. táblázat. Különböző *Campylobacter* izolálási módok, illetve a tenyésztés és a PCR vizsgálat összehasonlítása.

Iktatószám	Faj		Közvetlen mCCDA	Bolton dúsító majd mCCDA	Bolton + PCR	Tamponból PCR
M2009-10006707	Sertés	<i>C. coli</i>	+	+	<i>C. coli</i>	-
M2009-10006711	Tyúk	-	-	-	-	-
M2009-10006714	Tyúk	<i>C. jejuni</i>	Nem jell	+ !	-	-
M2009-10006718	Tyúk	<i>C. coli</i>	+	+	-	-
M2009-10006719	Sertés	<i>C. coli</i>	+	+	-	<i>C. coli</i>
M2009-10006720	Tyúk	<i>C. jejuni</i>	+ !	Nem jell	-	-
M2009-10006723	Tyúk	<i>C. jejuni</i>	Nem jell	+ !	-	-
M2009-10006769	Sertés	<i>C. coli</i>	+	+	<i>C. coli</i>	-
M2009-10006773	Sertés	<i>C. coli</i>	Nem jell	+ !	<i>C. coli</i>	-
M2009-10006776	Sertés	-	-	-	-	-

Elvégeztük 69 izolátum fajmeghatározását a hagyományos biokémiai módszerekkel és PCR-rel is. A hagyományos módszerrel 23 törzs nem volt meghatározható, ezeket a PCR-rel sikerült azonosítani. A 23-ból 9 *C. lanienae*, 6 *C. jejuni*, 5 *C. coli* lett, 3 pedig nem is volt *Campylobacter*. A maradék 32 *C. jejuni*, 14 *C. coli* és 9 egyéb *Campylobacter* törzs azonos eredményt adott a két módszerrel.

5.3 Szekvencia-meghatározás és filogenetikai vizsgálatok

5.3.1 *C. lanienae*

A *C. jejuni* és *C. coli* negatív törzseket (45 izolátum) a nemzetség-specifikus primerekkel megszekvenáltuk az azonosításuk érdekében. A 45 törzsből 43 *C. lanienae*, 1 *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* és 1 *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* lett.

A 43 *C. lanienae* törzssel a nemzetség-specifikus primerek által felerősített részleges 16S rRNS gén alapján előzetes filogenetikai vizsgálatot végeztünk. A saját szekvenciákhoz hozzátettük a GenBank-ban fellelhető összes *C. lanienae*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* és *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* genomjának azonos szakaszára vonatkozó szekvenciákat és egyéb *Campylobacter*-fajok egy-egy képviselőjének szekvenciáit is. A végső 658 nukleotid hosszúságú illesztést használtuk végül a törzsfa létrehozására Neighbour-Joining módszerrel. Ezen előzetes vizsgálatban a *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* törzseket magában foglaló csoport a *C. lanienae* törzsek alkotta csoport alcsoportjaként ábrázolódott.

Kiválasztottunk 15 *C. lanienae* törzset különböző alcsoportokból, és a fajspecifikus primerekkel tovább szekvenáltuk őket. Ezáltal hosszabb 16S rRNS gén szekvenciát kaptunk, amely már tartalmazott a Gorkiewicz et al. (2003) által jellemzett 4 variábilis szakaszból 3-at (Vc2, Vc5 és Vc6). A saját szekvenciáinkhoz hozzáillesztettük a GenBank-ban fellelhető összes *C. lanienae*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* hasonló szakaszára vonatkozó szekvenciákat és egy-egy *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. fetus*, *C. jejuni* és *C. coli* szekvenciát is. Egy 1055 nukleotid hosszúságú illesztést használtuk végül a filogenetikai fa létrehozására Neighbour-Joining módszerrel. A *C. lanienae* törzsek elkülönültek a *C. hyointestinalis* szekvenciáktól. Legközelebbi rokonságot a *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* törzsekkel mutattak, mely az SVS3038 törzset is tartalmazta. A fa topológiáját 1000 ismétléssel erősítettük meg, de a bootstrap értékek változó nagyságúak voltak (10-99%).

A 15 *C. lanienae* törzs részleges 16S rRNS gén szekvenciáját benyújtottuk a GenBank-ba.



9. ábra: Részleges 16S rRNS gén alapján készült, a 15 magyar *C. Ianieniae* törzset (félkövér) is tartalmazó filogenetikai fa. A PFGE-vel is vizsgált törzseket aláhúzással jelöltük. A GenBank-i akcessziós számot, a törzs elnevezését, a földrajzi és állatfaji származást, a variábilis régiók mintázatát tüntettük fel.

5.3.2 *C. lanienae* azonosítása szekvencia mintázat alapján

A 15 *C. lanienae* törzs részleges 16S rRNS gén szekvenciái – a Gorkiewicz et al. (2003) által leírt, és mint lehetséges *Campylobacter*-fajok azonosítására alkalmas markerekként jellemzett 4 variábilis szakaszból (Vc1, Vc2, Vc5 és Vc6) – 3 variábilis szakaszt tartalmaznak (Vc2, Vc5 és Vc6). Gorkiewicz et al. (2003) az egyes variábilis szakaszok típusait szekvencia mintázatuk alapján külön betűkkel jelölték (1A-H, 2A-L, 5A-G, 6A-E), és meghatározták, hogy az egyes *Campylobacter*-fajokra mely kombinációk a jellemzők.

A Vc1 szakasz a *C. lanienae*-kben konzervatív, a GenBank-ban elérhető összes erre a szakaszra vonatkozó *C. lanienae* szekvencia 1B mintázatot mutatott egy kivétellel, a szarvasmarhából leírt L52-es (AY288304) számú törzs 1 nukleotiddal eltért (G-t tartalmaz A helyett a 72. nukleotidnál). Ezért azt valószínűsítettük, hogy a Vc1-es szakasz hiánya a magyar szekvenciákból nem befolyásolja az eredményeinket.

A Vc2-es variábilis szakaszon a magyar törzsek többsége a 2C szekvencia mintázatot mutatta, azonban 4 törzs a szarvasmarhából leírt törzsekhez, illetve az FK176 és AF371867 jelű törzsekhez hasonlóan 2A mintázattal rendelkezett (CA-t tartalmaznak TG helyett a 139-140-es pozícióban). A 2A mintázat Gorkiewicz et al. (2003) leírása szerint a *C. hyointestinalis*-ra vagy a *C. fetus*-ra jellemző. A 195 és 205-ös pozíciókban polimorfizmus fordulhat elő, amit mi is észleltünk minden lehetséges variációban a törzseink közt: C és T, T és T, C és C, és T és C.

A Vc5-ös variábilis szakaszon 11 törzs 5C, 4 törzs 5B szekvencia mintázatot mutatott, mindkét változat jellemző a *C. lanienae*-re. A 836-os pozícióban polimorfizmust írtak le, amit mi is észleltünk mindkét lehetséges formában: A (5 törzs) vagy G (6 törzs) fordult elő ezen a helyen.

A Vc6-os variábilis szakasz fedti a Logan et al. (2000) által leírt és általunk használt fajspecifikus primerek közül a reverz primer tapadási helyét. Inglis et al. (2003) 3 polimorf nukleotidot írt le ezen a szakaszon az L52-es jelzésű, szarvasmarhából származó *C. lanienae* izolátum kapcsán. Mi is megtaláltuk ezeket a polimorfizmust mutató nukleotidokat 10 törzsben, melyeket 6Db-vel jelöltünk, eltérően az 5 izolátumtól, melyek a Gorkiewicz et al. (2003) által leírt szekvencia mintázatot mutatták és 6Da-nak neveztünk el. A 6Da jelzésű törzsek CT-t tartalmaztak az 1008-1009-es helyen és A-t az 1018-as pozícióban, míg a 6Db jelzésű törzsek TG-t tartalmaztak az 1008-1009-es és C-t az 1018-as pozícióban. Az FK171-es jelzésű törzs egy további nukleotiddal eltért a többi törzstől (TC-t tartalmazott TG helyett az 1008-1009-es helyen).

5.3.3 FlaA SVR

Összesen 73 *flaA* SVR szekvenálást végeztünk, amelyből 37 *C. jejuni* és 36 *C. coli* izolátum volt mind brojlercsirkéből, pulykából, sertésből és szarvasmarhából.

14. táblázat. FlaA SVR tipizálással vizsgált *Campylobacter* törzsek.

FlaA SVR	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Összesen
Szarvasmarha	6	0	6
Sertés	5	17	22
Brojlercsirke	24	16	40
Pulyka	2	3	5
Összesen	37	36	73

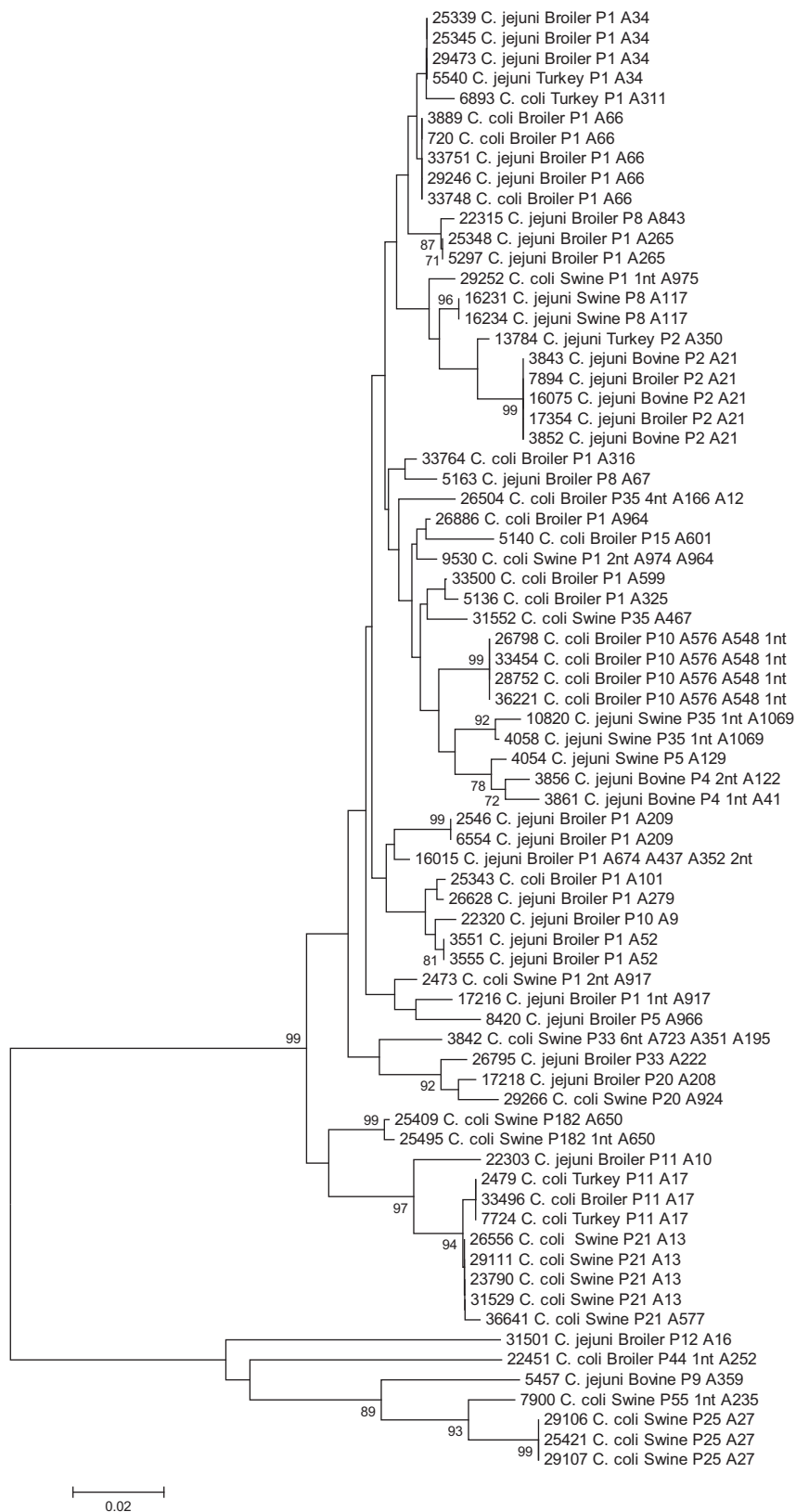
A vizsgált törzsek nagy változatosságot mutattak. Összesen 47 különböző *flaA* SVR nukleotid allél típust azonosítottunk, melyek 18 különböző fehérje allélt képviseltek. A 73 izolátumból 27 (15 *C. jejuni* és 12 *C. coli*) a P1-es peptid alléllal rendelkezett. Nukleinsav szinten a leggyakoribb *flaA* típus az A66 és A21-es volt (5 izolátum szarvasmarhából, illetve 5 izolátum baromfiból). A 47-ből 35 *flaA* típus csak egyszer fordult elő.

A részleges *flaA* gén szekvenciákat hasonlóság alapján illesztettük és egy végső 321 nukleotid hosszúságú illesztést használtunk a törzsfák elkészítéséhez Neighbour-Joining módszerrel. A fa topológiáját 1000 bootstrap ismétléssel ellenőriztük (10. ábra).

Az azonos nukleotid allél típusú törzsek egy-egy csoportot képeztek, de nem minden fehérje típus volt azonos ágán a filogenetikai fának. A P1, P5, P8 és P35 peptid allél típusú törzsek nem azonos ágon helyezkedtek el. A *C. jejuni* és *C. coli* törzsek nem különültek el a törzsfán, és az állatfajok szerint sem képeztek egységes csoportokat a törzsek.

Az azonos *flaA* típusú törzsek 12 különálló csoportot képeztek a törzsfán, melyekbe különböző állatfajból származó törzsek is tartoztak.

1. P1 A34 csoport 3 brojlercsirke és egy pulyka *C. jejuni* törzset tartalmaz (Kpnl 8. klaszter). Járványügyi kapcsolatot nem találtunk.
2. P1 A66 csoport: brojlercsirkéből származó 3 *C. coli* és két *C. jejuni* törzs. Két *C. coli* közt találtunk járványügyi kapcsolatot, azonos telepről (Békés) származtak (Kpnl 3. és 7. klaszter).
3. P1 A265 csoport: 2 brojlercsirkéből származó *C. jejuni* törzs. Egy közel eső harmadik *C. jejuni* törzssel 22315 (P8 A843) együtt azonos telepről (Mezőkövesd) származtak (Kpnl 5. klaszter).



10. ábra: *FlaA* SVR alapján készült, 73 *Campylobacter* törzset tartalmazó filogenetikai fa. A törzs számát, az állatfaji származást és a peptid, illetve alléltípust tüntettük fel.

4. P8 A117 csoport: két sertésből származó *C. jejuni* törzs. Járványügyi kapcsolat nincsen.
5. P2 A21 csoport: 2 brojlercsirke és 3 szarvasmarha *C. jejuni* törzs. 2 szarvasmarha törzs között találtunk összefüggést, különböző helyről azonos teherjárművel szállították ugyanarra a vágóhidra (*Kpnl* 2. és 4. klaszter).
6. P10 A576 A548 1nt csoport: 4 *C. coli* brojlercsirkéből. 2 törzs azonos telepről (Császárszék) származott (*Kpnl* 9. klaszter).
7. P35 A1069 1nt csoport: 2 sertésből származó *C. jejuni*. Járványügyi kapcsolat nincsen.
8. P1 A209 csoport: 2 *C. jejuni* brojlercsirkéből. Azonos telepről (Lippó) származtak (*Kpnl* 1. klaszter).
9. P1 A52 csoport: 2 *C. jejuni* brojlercsirkéből. Azonos telepről (Nagyesztergár) származtak (*Kpnl* 6. klaszter).
10. P11 A17 csoport: 2 brojlercsirkéből és 1 pulykából származó *C. coli*. Járványügyi kapcsolat nincsen.
11. P21 A13 csoport: 4 *C. coli* törzs sertésből. Járványügyi kapcsolat nincsen.
12. P25 A27 csoport: 3 *C. coli* törzs sertésből. A sertések különböző telepeken nevelkedtek, de a malacok azonos helyről származtak 2 törzs esetében (*Kpnl* 10. klaszter).

A 12-ből összesen 7 esetben találtunk járványügyi összefüggést a törzsek közt.

5.4 PFGE

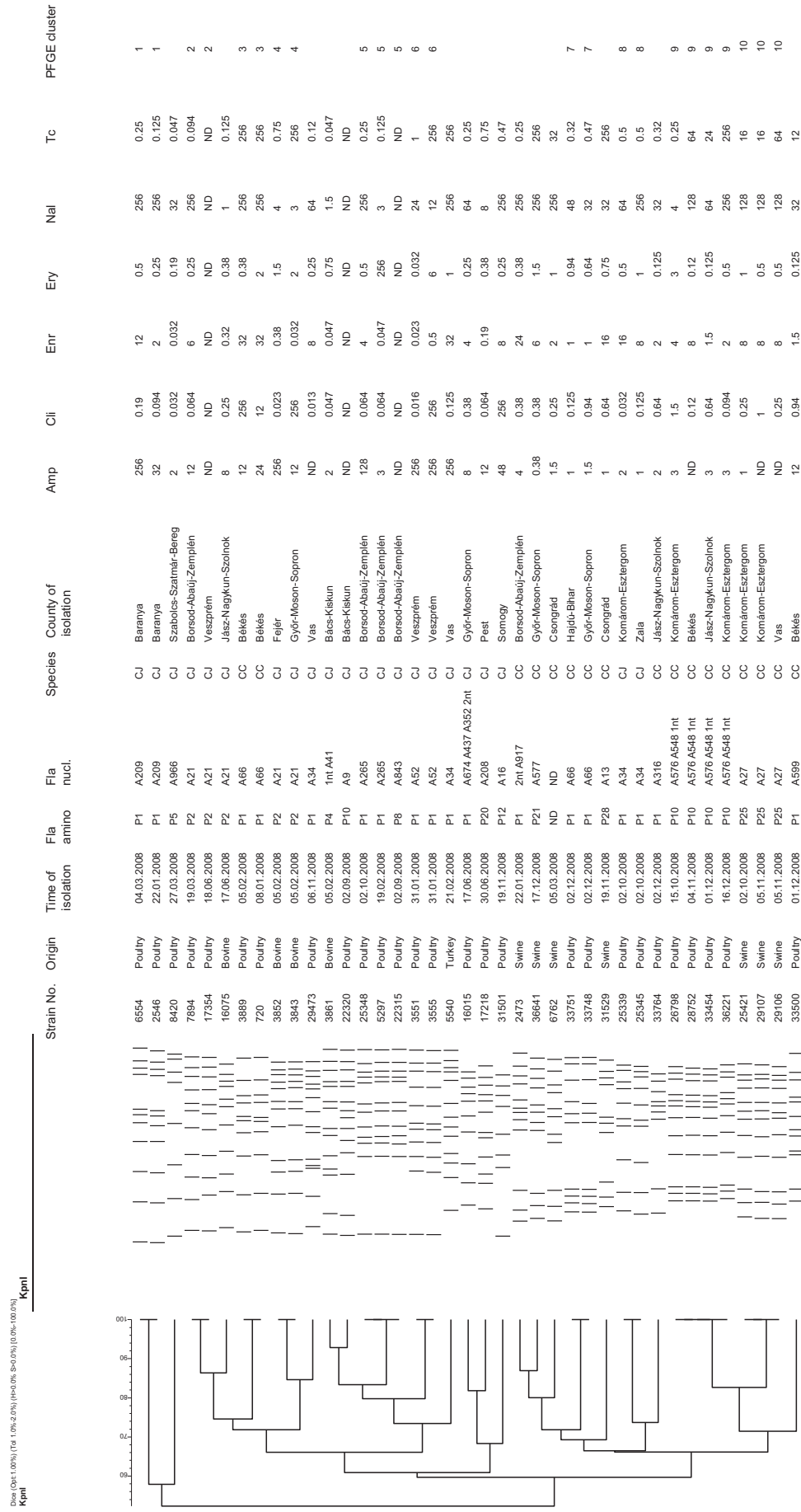
5.4.1 *C. jejuni* és *C. coli*

Szarvasmarhából, sertésből, brojlercsirkéből és pulykából származó, összesen 122 izolátumon (60 *C. jejuni* és 62 *C. coli*) végeztünk makrorestrikciós mintázat meghatározást *Sma*I hasító enzim (restrikciós endonukleáz) segítségével. A kapott mintázat (a makrorestrikciós fragmentumok száma és mérete) alapján a törzsek meghatározott PFGE típusba, illetve altípusba voltak sorolhatók.

Általánosan elmondható, hogy mindkét *Campylobacter*-fajra a nagy genetikai változatosság volt jellemző. 40 *C. jejuni* és 40 *C. coli* törzs egyedi PFGE mintázatot mutatott a *Sma*I enzimmel hasítva. A fennmaradó 42 izolátum 2-3 törzset tartalmazó, azonos makrorestrikciós profilú klasztereket (18 db) alkotott. Előfordultak azonos PFGE mintázatú törzsek, amelyek különböző állatfajból származtak. Ezt a 42 izolátumot *Kpn*I restrikciós enzimmel is megvizsgáltuk. A hasítás eredményeként 24 törzs 10 különböző 2-4 azonos profillal rendelkező törzset tartalmazó klaszterbe csoportosult (11. ábra). A *Kpn*I enzimmel

történt emésztés után már nem találtunk azonos PFGE mintázatú törzseket különböző állatfajból.

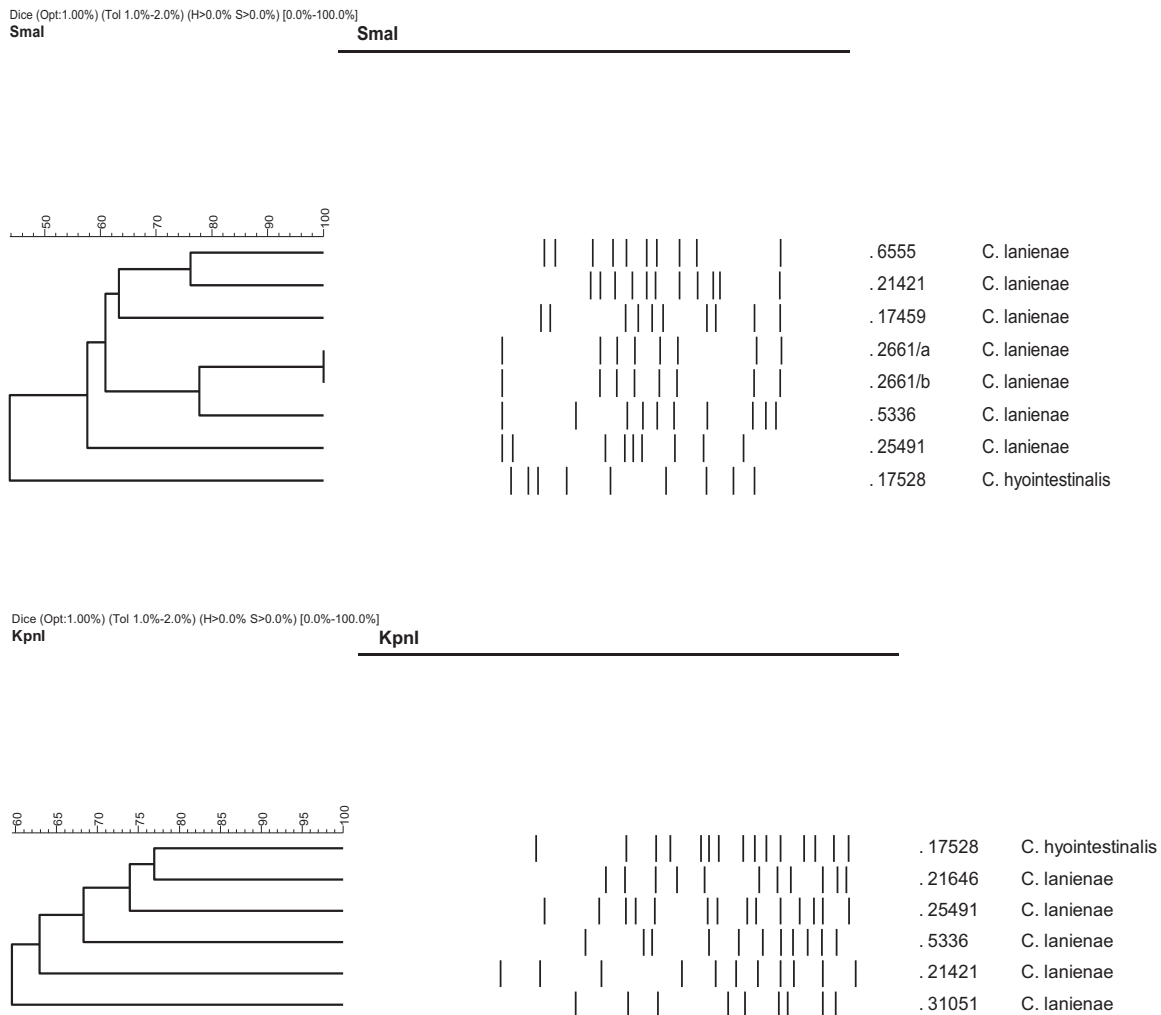
1. Klaszter: a 6554 és 2546-as számú, brojlercsirkéből származó *C. jejuni* törzseket azonos állattartó telepről (Lippó) származó baromfiból izoláltuk 40 nap különbséggel, de azok különböző, egymást követő állományokból származtak.
2. Klaszter: 7894 és 17354-es számú, brojlercsirkéből származó *C. jejuni* törzsek hordozói két különböző keltetőből és egymástól távoli állattartó telepről származtak, és a vágás is különböző időben és helyen történt, így járványügyi kapcsolatra utaló információt nem találtunk.
3. Klaszter: két brojlercsirkéből származó *C. coli* (3889 és 720 jelű) törzs, amelyek azonos állattartó telepről (Békés), két egymást követő állományból származtak 30 nap eltéréssel.
4. Klaszter: 3852 és 3843-as jelű, szarvasmarhából származó *C. jejuni* törzsek alkotják. Az állatok különböző telepről származtak, de azonos teherjárművel szállították őket ugyanarra a vágóhídra.
5. Klaszter: 3 (25348, 5297 és 22315 jelű) *C. jejuni*-t tartalmaz, amelyeket azonos állattartó telepről (Mezőkövesd) származó baromfiból izoláltunk 8 hónapos eltéréssel.
6. Klaszter: azonos brojlercsirke-állományból (Nagyesztergár) származó *C. jejuni* törzsek (3551 és 3555 jelzéssel).
7. Klaszter: brojlercsirkéből származó (33751, 33748 számú) *C. coli* törzsek, melyek hordozói két különböző keltetőből és egymástól távoli állattartó telepekről származtak, és a vágás is különböző helyen történt.
8. Klaszter: brojlercsirkéből származó *C. jejuni* törzsek (25339, 25345 jelzéssel), melyek hordozói két különböző keltetőből és egymástól távoli állattartó telepekről származtak, és a vágás is különböző helyen történt.
9. Klaszter: a 26798 és 36221 jelű törzsek a négy *C. coli* közül azonos helyről származtak, egymást követő brojlercsirke-állományokból (Császár). A másik 2 (28752, 33454 jelű) törzsszel nem találtunk járványügyi kapcsolatot.
10. Klaszter: Sertésből származó *C. coli* törzsek (25421, 29107 jelzéssel). A sertések azonos helyről származtak (Szákszend), de különböző telepeken nevelkedtek, majd azonos vágóhídon vágták le őket 1 hónap különbséggel. A harmadik (29106 jelű) törzsszel nem találtunk járványügyi kapcsolatot.



11. ábra: PFGE eredménye a Kpnl enzimmel történt hasítás után.

5.4.2 *C. lanienae*

Egy *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* és 9 *C. lanienae* törzset választottunk a származásuk (8 különböző megye) és a részleges 16S rRNS gén filogenetikai törzsfáján való elhelyezkedésük alapján PFGE tipizálásra. 3 különböző restrikciós enzimmel próbáltuk a genom hasítását három ismétlésben. A *Sma*I restrikciós enzimmel 6, a *Kpn*I enzimmel 5 *C. lanienae* izolátumot sikerült tipizálni. A *Sal*I enzimmel végzett hasítási kísérletek nem jártak sikerrel. Minden izolátum egyedi mintázatot adott, azonos mintázatokat nem kaptunk. Tehát a *C. lanienae* más *Campylobacter*-fajokhoz hasonlóan nagy genetikai változatosságot mutatott. A két azonos izolátum – a és b – azonos mintából származik. A *Sma*I vagy a *Kpn*I enzimmel való hasítás a tipizálható izolátumoknál legalább 8 jól megkülönböztethető restrikciós fragmentumot eredményezett.



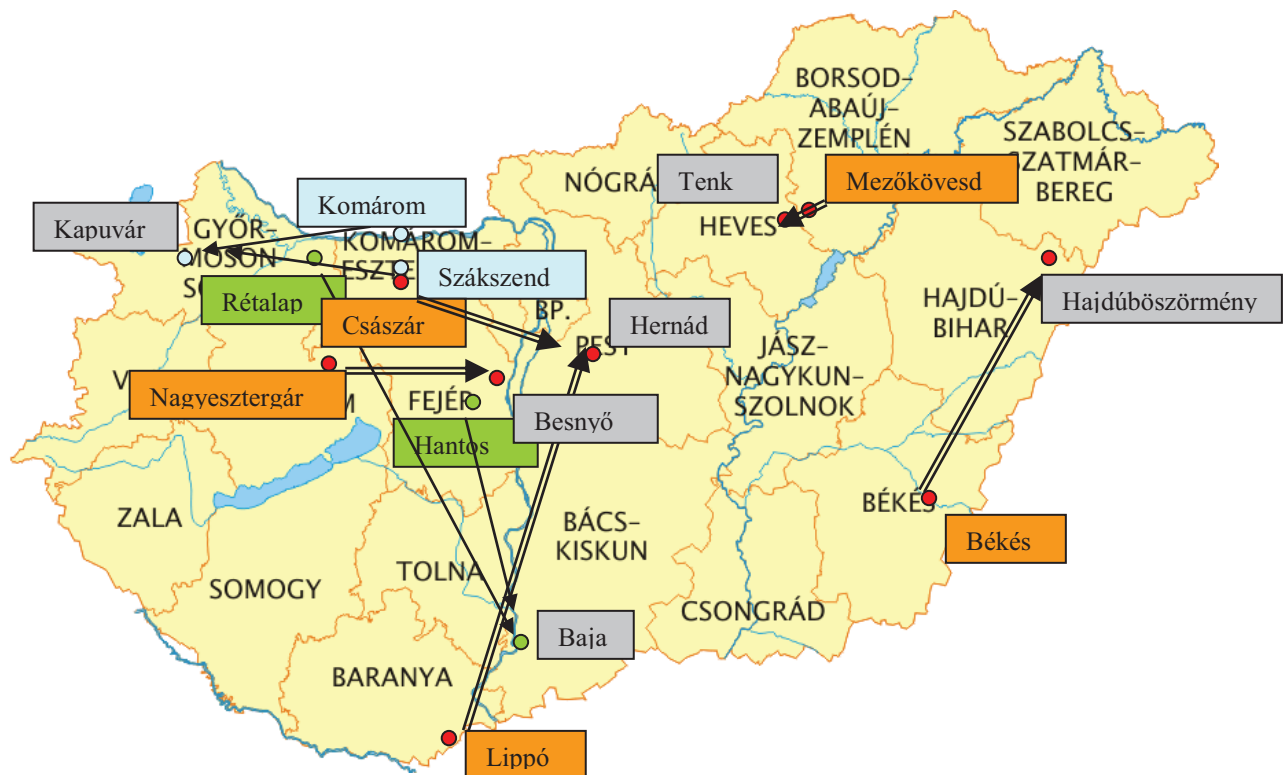
12. ábra: A 9 *C. lanienae* és 1 *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* PFGE eredménye a *Sma*I és *Kpn*I enzimes hasítás után.

5.5 PFGE és *flaA* SVR tipizálás összehasonlítása

Azonosítottunk törzseket, melyek azonos *flaA* típussal rendelkeztek, de különböző *SmaI* PFGE mintázatot mutattak és fordítva, olyan törzseket, amelyek azonos *SmaI* PFGE mintázatot mutattak, de különböző *flaA* típussal rendelkeztek.

Az azonos *SmaI* PFGE mintázattú törzseket tartalmazó 18 klaszterből 10 klaszterben azonos volt a törzsek *KpnI* mintázata és *flaA* típusa is. Ebből a 10 klaszterből 7-ben járványügyi kapcsolatot is találtunk (13. ábra). 5 esetben (*KpnI* klaszter 1, 3, 5, 6, és 9) a brojlercsirke különböző állományból származott, de azonos állattartó telepről. A 10-es *KpnI* klaszter esetében a sertések azonos helyről származtak, de különböző telepen nevelkedtek. A 4-es *KpnI* klaszter törzseit szarvasmarhából izoláltuk, amelyek földrajzilag távoli telepekről származtak, de ugyanarra a vágóhídra azonos szállítójármű vitte.

Az azonos *flaA* típusú törzsek 12 különálló csoportot képeztek a törzsfán. 3 csoporton belül a PFGE tipizálás (*KpnI* enzimmel) tovább differenciált, és szubklaszttereket hozott létre. Négy csoportban a törzsek PFGE profilja (*SmaI* enzimmel) eltért annak ellenére, hogy az *flaA* típusuk azonos volt. Azokban az esetekben, ahol a PFGE mintázat vagy az *flaA* típus eltért, nem találtunk járványügyi kapcsolatot.



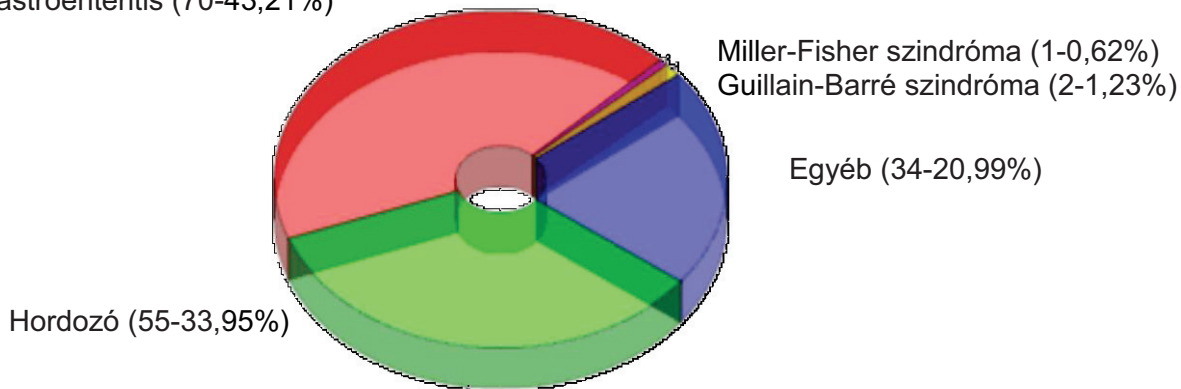
13. ábra: Járványügyi kapcsolatok a tipizálással azonos törzsek között. Zöld: szarvasmarha telep (4. klaszter), kék: sertés telep (10. klaszter), narancs: baromfi telep (1., 3., 5., 6., 9. klaszter), szürke: vágóhidák, ahol levágták az állatokat.

5.6 MLST

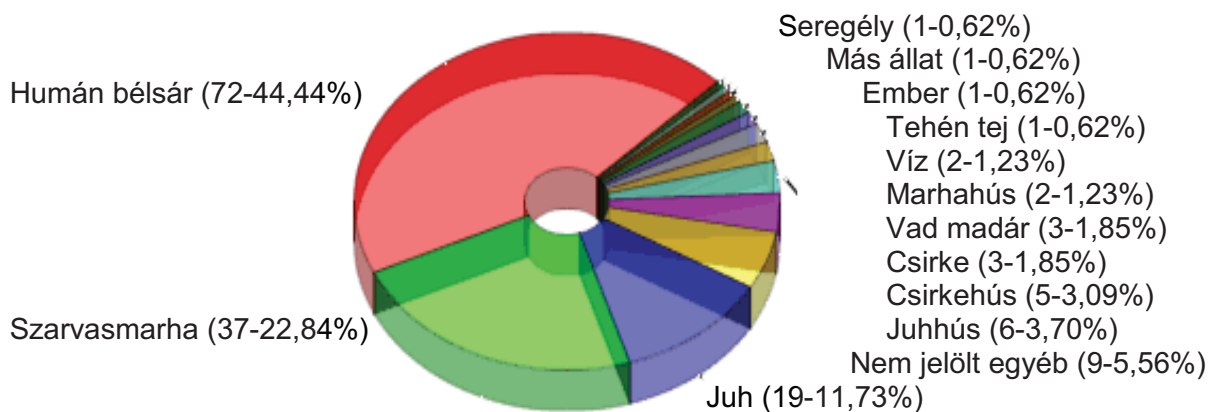
A vizsgálat magas költségei miatt csak egy-egy *C. jejuni* és *C. coli* MLST profilt határoztunk meg. A *C. jejuni* törzset (M2007-10005681) szarvasmarhából izoláltuk (Komárom-Esztergom megye - Csém), és az MLST szekvencia eredményeink alapján a 42-es klón komplexbe tartozik (ST 42). A *C. coli* törzset (M2007-10003120) sertésből izoláltuk (Győr-Moson-Sopron megye - Fertő), és a 828-as klón komplexbe tartozik (ST 899).

Az MLST honlapján bőséges és részletes információkat találunk a különböző szekvencia típusokról. Többek között megtaláljuk pl. azt, hogy a 42-es klónt hány esetben izolálták beteg emberből, illetve állatból, milyen fajokból és milyen jellegű mintákból (14. ábra).

Gastroenteritis (70-43,21%)



Humán bélsár (72-44,44%)



14. ábra: 42-es klón az MLST honlap alapján.

5.7 Antibiotikum-érzékenységi vizsgálat

A **nalidixsav** rezisztencia ($p=0,0465$) és az **enrofloxacin/ciprofloxacín** rezisztencia ($p=0,0114$) növekedett 2008-2009 folyamán. A nalidixsav rezisztens ($p=4,626e-05$) és a fluorokinolon-rezisztens ($p=3,403e-07$) *Campylobacter* törzsek aránya magasabb volt brojlércsirkében, mint sertésben 2009-ben. A fluorokinolonokra a legnagyobb arányban a brojlércsirke-állományokból származó *C. coli* törzsek rezisztensek, mintegy 89,0%-uk 2009-ben (15. ábra és 15. táblázat).

15. táblázat. *C. jejuni* és *C. coli* rezisztencia százalékban, a legfontosabb antibiotikumokra összesen, illetve sertésben és brojlércsirkében évenként. ^aKevés izolátum (<10).

Összes % rezisztens	2008 <i>C. jejuni</i>	2008 <i>C. coli</i>	2009 <i>C. jejuni</i>	2009 <i>C. coli</i>
Enrofloxacin/ciprofloxacín	53,2	63,5	74,3	70,1
Tetraciklin	40,3	71,4	32,4	76,8
Eritromicin	4,8	11,1	1,4	8,2
Klindamicin	10,5	10,0	8,0	10,6
Nalidixsav	61,3	57,1	71,6	68,6
Ampicillin	30,2	20,0	0,0	12,0

Sertés % rezisztens	2008 <i>C. jejuni</i> ^a	2008 <i>C. coli</i>	2009 <i>C. jejuni</i> ^a	2009 <i>C. coli</i>
Enrofloxacin/ciprofloxacín	16,7	52,9	40,0	58,5
Tetraciklin	33,3	85,3	40,0	90,7
Eritromicin	0,0	14,7	0,0	11,9
Klindamicin	0,0	6,1	0,0	16,1
Nalidixsav	16,7	52,9	60,0	58,5
Ampicillin	0,0	4,0	0,0	5,9

Brojlércsirke % rezisztens	2008 <i>C. jejuni</i>	2008 <i>C. coli</i>	2009 <i>C. jejuni</i>	2009 <i>C. coli</i>
Enrofloxacin/ciprofloxacín	60,9	73,1	82,5	89,0
Tetraciklin	41,3	53,8	33,3	54,8
Eritromicin	6,5	7,7	1,6	2,7
Klindamicin	12,2	16,7	10,5	0,0
Nalidixsav	71,7	61,5	77,8	84,9
Ampicillin	32,4	33,3	0,0	14,3

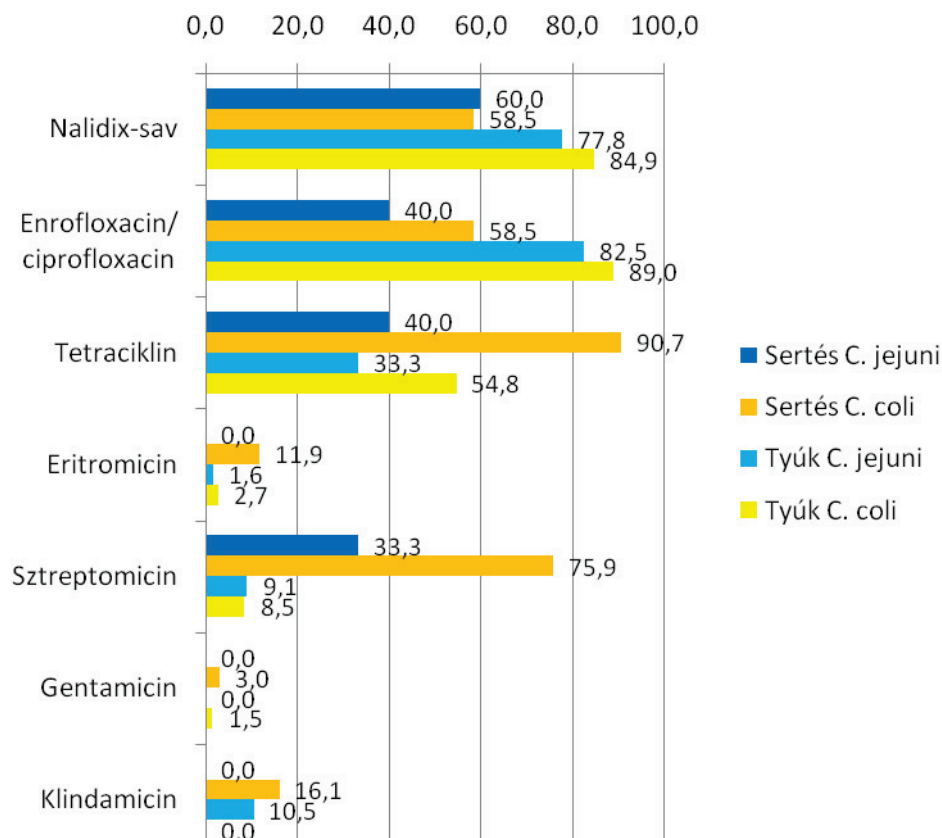
Az **eritromicin** rezisztencia előfordulása csökkenő tendenciát mutat. Alacsonyabb eritromicin ($p=0,02509$) rezisztenciát találtunk *C. jejuni*-ban, mint *C. coli*-ban, sertésben gyakoribb.

Alacsonyabb **tetraciklin** ($p=1,865e-14$) rezisztenciát találtunk *C. jejuni*-ban, mint *C. coli*-ban. A tetraciklin rezisztens *C. coli* törzsek aránya sokkal magasabb volt sertésben, mint brojlércsirkében 2009-ben ($p=1,046e-08$). A tetraciklin rezisztencia a sertésállományokból származó *C. coli* törzsek közt 90,7% volt.

Jelentős mértékű **streptomycin** rezisztenciát találtunk a sertésből származó *C. coli* törzsek közt, amely 75,9% 2009-ben, míg brojlercsirkében ez az érték csak 8,5%.

A **klindamicin** rezisztencia szintén növekedett a sertésekből származó *C. coli* törzsek közt.

A vizsgált törzsek mindkét fajból többnyire **kloramfenikol** és **gentamicin** érzékeny volt.



15. ábra: Rezisztens törzsek százalékos aránya állatfajonként és baktériumfajonként szétbontva 2009-ben.

A fluorokinolon, makrolid és tetraciklin rezisztenciát együtt tekintve a *C. coli* törzsek 55,2%-a, a *C. jejuni* törzsek 21,6%-a volt rezisztens több mint egy csoportra. A leggyakoribb kombináció az enrofloxacin/ciprofloxacin és tetraciklin volt. Ez a kombináció *C. jejuni*-ban csak a tyúkból származó törzsek közt fordult elő. A fluorokinolon és makrolid rezisztencia, vagy a makrolid és tetraciklin rezisztencia csak a sertésből származó *C. coli*-ban fordult elő, *C. jejuni*-ban nem. Mindhárom antibiotikum csoportra rezisztens törzs ritkán fordult elő: 2009-ben a *C. jejuni* törzseknek az 1,4%-ában, a *C. coli* törzseknek pedig a 4,1%-ában.

Az antimikrobiális érzékenységre megvizsgált 23 *C. lariena*e törzs hasonló tendenciát mutatott, mint az előbbi fajok. Öt (21,7%) törzs volt eritromicin rezisztens (MIC > 4

µg/ml), 5 (21,7%) enrofloxacin/ciprofloxacin (MIC > 1 µg/ml) rezisztens. 78,3% (18/23) nalidixsav rezisztens (MIC > 16 µg/ml) és 60,9% (14/23) tetraciklin rezisztens (MIC > 2 µg/ml). Az izolátumok fele volt streptomycin rezisztens (MIC > 2 µg/ml). Valamennyi vizsgált izolátum ampicillin (MIC ≤ 8 µg/ml), gentamicin (MIC ≤ 1 µg/ml) és kloramfenikol (MIC ≤ 16 µg/ml) érzékeny volt.

Az 5 eritromicin rezisztens törzsből 4 volt tetraciklin rezisztens is, és mindegyik enrofloxacin/ciprofloxacin rezisztens törzs tetraciklin rezisztens is volt. Egy törzs (3894 jelzéssel) rezisztens volt eritromicinre, enrofloxacinra, nalidixsavra, tetraciklinre és klindamicinre is.

5.8 Takarmányozási kísérletek

Több kísérletben vizsgáltuk különböző takarmány-kiegészítők *Campylobacter* (és *Salmonella*) ellenes hatását a fertőzöttség csökkentése érdekében.

1. A 120 csirke 1 naponan tízesével poolozva, kloákából vett tamponmintából tenyésztéssel vizsgálva mind *Campylobacter*-negatív volt. Tíz naponan, 20 naponan, és 30 naponan csoportonként 10-10 csirke vakbelének tenyésztéses vizsgálata szintén negatív eredményt adott.
2. A telepi körülmények közt tartott kacsák napos korban *Campylobacter*-negatívak voltak. Tizennyolc naponan 36-36 állat kloaka tamponját tenyésztéssel vizsgálva (6-os poolokban) az találtuk, hogy a kezelt csoportnál a 6 mintából 4 volt pozitív (3 *C. lari* és 1 *C. jejuni*), míg a kezeletlen csoport 6 mintájából 2 lett pozitív (*C. lari*). Negyven naponan 60-60 kacsá kloaka tampon vizsgálata (5-ösével poolozva) tenyésztéssel negatív volt. Ugyanakkor 30-30 kacsá vakbelének tenyésztéses vizsgálata (3-asával poolozva) a kezelt csoportban a 10-ből 7, a kontroll csoportban 10-ből 6 minta lett *C. jejuni* pozitív.
3. A 60 db pekingi kacsá 1 naponan kloakatamponnal vizsgálva *Campylobacter*-negatívnak bizonyult. Hat naponan tyúkból származó *C. jejuni* törzsszel (2010/2074) fertőztük őket per os. A 21 naponan vett összes kloaka tamponminta (3x20 db) és csoportonként 6 állat vakbelének tenyésztéses vizsgálata pozitív eredményt adott. Az összes 28 naponan vett kloaka tamponminta (3x14 db) és 3x6 db vakbélminta is *Campylobacter*-pozitív volt. Végül a 40 naponan vett összes (3x8 db) kloaka tamponminta és ugyanezen állatokból származó vakbélminta tenyésztése is pozitív volt.

6 Megbeszélés

A campylobacterek izolálása időigényes, és speciális körülményeket, eszközöket igényel, mivel ezek érzékeny, mikroaerofil baktériumok. A különböző kísérőflóra (belső, környezeti mintában, élelmiszerben jelen lévő egyéb baktériumok) tovább nehezíti az izolálást. Számos dúsító tápközeget fejlesztettek ki a campylobacteriosisokért elsősorban felelős *C. jejuni* izolálására a különböző eredetű mintákból (Buechat, 1986; Doyle és Roman, 1982; Humphrey, 1986). Ezek az elsődlegesen használt izolálási módszerek a ritkábban előforduló fajokra gátló hatásúak lehetnek, mivel az egyéb *Campylobacter*-fajok eltérő antibiotikum-érzékenységek lehetnek. A termofil campylobacterek izolálásának optimális hőmérséklete 42 °C, mely magas hőmérséklet szintén szelektív hatású, és csökkenti az ily módon izolálható *Campylobacter*-fajok számát. Nem meglepő tehát, hogy nem termofil *Campylobacter*-t, mint például *C. fetus*-t nem tudtunk izolálni. A lassan növekvő campylobacterek, melyek akár 5 napos inkubációs időt is igényelhetnek, a rutin munkában alkalmazott rövid inkubációs idő (2-3 nap) miatt alul izoláltak. Vegyes fertőzöttség esetén a gyorsabban fejlődő campylobacterek túlnőhetik a lassabban növekvőket, elfedve azok jelenlétét. Azzal, hogy egy állományból származó mintákból a telepek uniform megjelenése miatt általában csak egyetlen izolátumot azonosítottunk, a legdominánsabb klónt szelektáltuk. Ezek lehetnek az okai annak, hogy csak alacsony százalékban találtunk vegyes fertőzöttséget a mintákban. Ez a néhány eset azonban igazolta a vegyes fertőzöttség lehetőségét mindhárom élelmiszer-alapanyagként szolgáló állatfajban.

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a magyarországi brojlercsirke- (60,1%) és sertésállományok (43,3%) nagyarányú *Campylobacter* fertőzöttséget mutatnak a vágás idején. Ezzel ellentétben a szarvasmarha-állományok (6,7% pozitív) nem gyakori hordozói a kórokozónak. Ezek az arányok valószínűleg valamivel magasabbak lennének, ha használtunk volna dúsító folyadékot is a tenyésztés során. A brojlercsirkék magas csíraszámában hordozzák a baktériumot, ezért valószínűleg a módszer érzékenysége kevésbé befolyásolta az eredményt, de sertés és szarvasmarha esetében a különbség nagyobb lehet.

A brojlercsirke-állományok fertőzöttsége szezonális mutatót mutatott néhány országban, nyáron, kora ősszel (június-szeptember) nagyobb a campylobacterek előfordulása (FAO/WHO, 2009). Érdekes, hogy Magyarországon magasabb fertőzöttséget a hideg őszi-téli hónapokban állapítottunk meg október-novemberi csúccsal. A szezonális okait vizsgálva szoros korrelációt találtunk a relatív páratartalom és a *Campylobacter*-fertőzöttség között.

Az általunk használt izolálási módszer elsősorban *C. jejuni*, *C. coli* és *C. lari* tenyésztésére szolgál, mégis sikerrel izoláltunk *C. lanienae* törzseket is. A *C. lanienae*

normál bélflóra alkotónak tűnik sertésben, mivel a sertés bélmintákból egész évben az ország majd teljes területéről rendszeresen izoláltuk ezt a fajt. Különösen figyelemre méltó, hogy a *C. lanienae* a sertésekből izolált 2. leggyakoribb faj (20,7%) volt ebben a munkában. *C. jejuni*-val a pozitív sertés bélmintáknak csak 5,3%-a volt fertőzött.

Hasonlóan, mint Sasaki et al. (2003), mi is csak sertésekből tudtuk izolálni a *C. lanienae*-t. Ennek egyik lehetséges oka az, hogy a magyarországi szarvasmarhákban nincs is jelen a baktérium, vagy magyarázható azzal, hogy a szarvasmarhákat fertőző *C. lanienae* más tenyésztési körülményeket kíván. Inglis et al. (2003) Kanadában kitenyésztettek *C. lanienae*-t szarvasmarhából Karmali táptalajon, 40 °C-on. A CCDA nem volt megfelelő ugyanabban a vizsgálatban. Guévremont et al. (2008) beszámoltak *C. lanienae* kimutatásáról – szintén Kanadában – bélsárból mind sertésből mind szarvasmarhából, de csak direkt PCR-rel, az izolálás nem volt eredményes. Érdeemes megjegyezni, hogy Európában még nem számoltak be *C. lanienae* izolálásáról, vagy kimutatásáról szarvasmarhából. Tehát lehetséges, hogy a magyarországi szarvasmarha mintákból azért nem sikerült izolálni, mert a szarvasmarhákat fertőző *C. lanienae* földrajzilag máshol fordul csak elő. Az elsődleges rezervoárja a baktériumnak még mindig nem ismert, további vizsgálatokat igényel.

A biokémiai és egyéb fenotípusos tulajdonságok alapján történő hagyományos fajmeghatározás hátránya, hogy sok esetben bizonytalan eredményt ad. Ezért szükségesnek tartottunk a monitoring vizsgálataink megkönnyítésére kifejleszteni egy real-time PCR módszert, amelynek megbízhatósága és pontossága jobb. Az általunk kifejlesztett PCR módszer alkalmas a *C. jejuni* és *C. coli* azonosítására egyidőben, mivel a két rendszer azonos hőmérsékleti profillal működik, de a primerek kompetíciójának elkerülése érdekében nem multiplex PCR-ként. A folyamatok automatizálása révén 45 tenyészetet tudtunk megvizsgálni 4 órán belül mind a két fajra.

A real-time PCR módszerünkben alkalmazott EvaGreen fluoreszcens jelölőfesték előnye a SYBR Green-nel szemben, hogy nem mutagén és nem toxikus, mert a sejtmembránon nem jut át. Mivel az EvaGreen-nek kevésbé van PCR gátló hatása, ezért nagyobb koncentrációban alkalmazható, ami erősebb jelet ad, és ezáltal robosztusabb eredményeket kaphatunk vele.

A minták közvetlen PCR vizsgálatának érzékenysége jelentősen elmaradt a tenyésztéses módszertől, de az antibiotikum-rezisztencia vizsgálat érdekében a baktérium kitenyésztése amúgy is nélkülözhetetlen. Ugyanakkor a PCR a tenyésztés utáni biokémiai vizsgálatokat helyettesíti, pontosabbá és gyorsabbá teszi a fajmeghatározást.

A PCR, szekvencia-meghatározás és filogenetikai analízis a legszélesebb körben alkalmazott molekuláris biológiai módszerek, amelyeket a *Campylobacter*-fajok kimutatására, elkülönítésére és további genetikai jellemzésre használnak. A genetikai vizsgálatok alapján

kiderült, hogy a *Campylobacter* spp genomja nagy változatosságot mutat, ami a fertőzési ciklus során gyors adaptációt tükrözhet. Az új variációk kialakulásában több mechanizmus szerepet játszhat, így a transzformáció, intra- és intergenomikus rekombináció, genom átrendeződés és kromoszóma pontmutációk.

Azt tapasztaltuk, hogy hasonlóan más fajokhoz, bizonyos *C. lanienae* izolátumok is rendelkezhetnek megnagyobbodott génnel. Négy *C. lanienae* törzs esetében a fajspecifikus primerekkel egy kb. 200 nukleotiddal hosszabb terméket kaptunk, mint a várt 920 bp. A jelenség a 16S rRNS génen különböző hosszúságú beékelődött szekvenciák (intervening sequences, IVS) előfordulására vezethető vissza a 213. nukleotidnál (*C. jejuni*, ATCC 43431 szerinti számozás). A 6555 számú törzs csak a megnagyobbodott gént hordozta, míg az 5172, 24639 és 17459 jelzésű törzsek mindkét féle géntípussal rendelkeztek, ami miatt kettős csíkot adtak a gélelektroforézis vizsgálat során. Az összes többi törzs csak az IVS nélküli gént tartalmazta. A megnagyobbodott gén jelenségét már korábban leírták különböző *Campylobacter*-fajok esetében, mint például *C. sputorum*, *C. helveticus*, *C. rectus*, *C. curvus* (Etoh et al., 1998; Gorkiewicz et al., 2003) és *C. hyointestinalis* (Harrington és On, 1999). Sasaki et al. (2003) 4 *C. lanienae* törzset talált (FK172, FK173, FK174, FK175), amelyek IVS-t tartalmaztak, mint a mi 6555 számú törzsünk. A *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* CHY4 jelű törzs is tartalmaz IVS-t. A 16s rRNS IVS előfordulásának a szerepe nem tisztázott. Chan et al. (2007) szerint az IVS hiánya a pulykából izolált *C. coli* 23S rRNS génjéből azokra a törzsekre volt jellemző, amik nem voltak eritromicin rezisztensek.

Az, hogy a *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* (17530b jelű) törzs pozitív volt a Logan et al. (2000) által leírt *C. lanienae*-re tervezett primerekkel, azzal magyarázható, hogy a primerek annealing régiója azonos a két fajban.

A részleges 16S rRNS gén szekvencia meghatározása alapján azonosítottuk a 45 nem *C. jejuni* és nem *C. coli* izolátumokat. A *C. lanienae* fajba tartozó 43 törzs szekvencia analízise 98,2%-os hasonlóságot mutatott.

A részleges 16S rRNS gén szekvenciák illesztésén alapuló filogenetikai fán a magyar *C. lanienae* törzsek az illesztéshez hozzátett egyéb, a GenBank-ban közölt *C. lanienae* törzsekkel együtt egy különálló csoportot képeztek a *C. lanienae* fajt képviselve. A *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* a *C. lanienae*-vel közös ágon helyezkedik el, és jól elkülönül a *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*-tól. Harrington és On (1999) írta le az AF097691 (SVS 3038) jelű törzset, és *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*-nak határozták meg. Később Gorkiewicz et al. (2003) foglalkoztak ezzel a törzssel és átsorolták a *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* csoportjába. Ez a törzs a mi vizsgálataink szerint is elkülönül, de közelebb esik a *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* csoporthoz.

A *C. lanienae* faj csoportján belül sok alcsoport különül el megerősítve a faj nagyfokú genetikai diverzitását. Az emberből származó törzsek nem alkotnak külön csoportot, hanem

különböző sertésből származó törzsekkel együtt képeznek csoportokat. Ugyanakkor a szarvasmarhából és juhból származó törzsek egy egységes, külön csoportba tartoznak. Ez megerősíti a Guévremont et al. (2008) által tapasztaltakat, miszerint egy 360 bp hosszú 16S rRNS gén részlet alapján készült törzsfán a *C. lanienae* törzsek az állatfaj szerinti eredet (szarvasmarha és sertés) alapján két genetikai csoportra különültek. Sajnos a Guévremont et al. (2008) által vizsgált szarvasmarha törzseket mi nem tudtuk hozzáilleszteni a saját szekvenciáinkhoz, mert túl rövidek voltak (360 bp), és kis szakaszon fedtek át a mi szekvenciáinkkal.

Jelentős genetikai változatosságot figyeltünk meg a sertésből származó törzsek között, míg az összes kérődzőből származó törzs egyforma 16S rRNS gén mintázatot mutatott a három vizsgált variábilis régió: 2A/5C/6Db. Ez a mintázat három sertés eredetű *C. lanienae* törzsre is jellemző volt (25491, 31051 és FK176), ugyanakkor a sertés törzsek nagyobb változatosságot mutattak a három vizsgált variábilis régió. Ezek alapján felmerül annak a lehetősége, hogy a szarvasmarhában megtelepedő *C. lanienae* törzsek a sertés törzsekből származnak. A 2A mintázatot eredendően a *C. hyointestinalis* és a *C. fetus* törzsek jellemzőjének vélték (Gorkiewicz et al., 2003). Mi megtaláltuk *C. lanienae*-ben is, ami arra enged következtetni, hogy további változatok fordulnak elő a *C. lanienae* izolátumok közt ezen a régió. A Vc6 régió két jól elkülönülő, 3 nukleotidban különböző mintázatot találtunk, ezért a 6D mintázaton belül a törzsek elkülönítésére bevezettük a 6Da és 6Db jelölést. Ez a különbség az oka annak, hogy a fajspecifikus reverz primer (Logan et al., 2000) – mely a Vc6-os variábilis régió belül tapad – a 6Db szekvenciamintázatú törzsek esetében a 3 nukleotid eltérés miatt rosszabban működik, és a PCR-ben a termék mennyisége kevesebb.

A *C. jejuni* és *C. coli* törzsek filogenetikai vizsgálatához az *flaA* gén SVR szekvenciáját használtuk. Az SVR rövid (321 bp), a szekvenálása gyors, pontos, robosztus és összehasonlítható a laboratóriumok között. Az *flaA* SVR szekvenálását alkalmazták a *Campylobacter*-populáció vizsgálatára a baromfi iparban, hogy vizsgálják a törzsek elterjedtségét, és különbséget tegyenek környezeti és állatból származó törzsek közt (Meinersmann et al., 2005).

A magyarországi brojlercsirkéből, sertésből és szarvasmarhából származó *C. jejuni* és *C. coli* törzsek vizsgálata során azt állapítottuk meg, hogy a törzsek a filogenetikai fán nem a baktériumfaj, az állatfaji származás, vagy földrajzi eredet, hanem az *flaA* SVR tipizálás alapján meghatározott alléltípusok szerint képeztek külön csoportokat. Továbbá nem találtunk összefüggést az *flaA* típus és a baktériumfaj (például P1 A66 típusú *C. jejuni* és *C. coli* is előfordult), illetve *flaA* típus és állatfaji származás (P11 A17 típus előfordult pulykában és brojlercsirkében is, vagy P2 A21 típus előfordult szarvasmarhában és brojlercsirkében is) között.

A *C. jejuni* rutinszerű tipizálására a PFGE terjedt el, amely az egyes törzsek között meglévő igen kis különbségeket is képes kimutatni. Az általunk vizsgált *C. jejuni* és *C. coli* törzsek *SmaI* enzimmal történő hasításával létrejött 18, több törzset is magába foglaló csoportból 10 még tartalmazott olyan izolátumokat, amelyek különböző állatfajból származtak és/vagy különböző *flaA* SVR típusúak. Ezzel ellentétben a *KpnI* enzimmal való hasítás után az izolátumok, melyek azonos hasítási képet mutattak, azonos *flaA* SVR típusba tartoztak, és azonos állatfajból származtak, tehát valódi genetikai klónokat képviseltek.

Az *flaA* és PFGE tipizálásokkal végzett vizsgálatok eredményeképpen különböző járványügyi kapcsolatokat fedeztünk fel. A nagyfokú genom plaszticitás miatt a különböző törzsek és vonalak közti kapcsolat megállapítása nehéz, különösen a hosszú távú epidemiológiai vizsgálatokban (Dingle et al., 2002). A baromfi izolátumok esetében találtunk 2-3 különböző állományból, azonos telepről származó azonos törzset, ami stabil *C. jejuni* és *C. coli* klón jelenlétét igazolja akár 8 hónapon keresztül. Valószínűleg az állomány cserék közötti nem megfelelő takarítás, fertőtlenítés tette lehetővé az azonos törzssel való fertőződést. Azonos helyről származó, de különböző telepen nevelkedett sertésekből izolált genetikai klónok jelenléte utalhat arra, hogy a sertések még szopós korban fertőződtek ugyanazzal a törzssel. A földrajzilag távoli telepekről ugyanarra a vágóhidra szállított szarvasmarhákban talált törzsek lehettek az országban előforduló stabil klónok, vagy az állatok az azonos szállítójárművön fertőződtek. Továbbá találtunk a baromfiállományokban olyan klónokat is, amelyek között járványügyi kapcsolat nem volt, ami azt mutatja, hogy az országban előfordulnak nagyon stabil *C. jejuni* és *C. coli* törzsek is. Mások is leírtak különböző fajokban és területeken jelen lévő bizonyos stabil genomú *C. jejuni* törzset (Manning et al., 2001; Petersen és Wedderkopp 2001). További vizsgálatok szükségesek brojlercsirke és humán törzsekkel annak érdekében, hogy ezen stabil klónok szerepe a humán fertőzésben kiderüljön.

Elsőként tettünk kísérletet a *C. lanienae* tipizálására PFGE módszerrel. Három különböző enzimmal (*SmaI*, *KpnI* és *SaII*) végeztünk hasítási próbákat a kiválasztott törzsek makrorestrikciós profil vizsgálatához. Az izolátumok többségét (66,7%) a *SmaI* enzim hasította, a törzsek több mint felét (55,6%) hasította a *KpnI* enzim és egyet sem a *SaII*. A *SmaI* enzim alkalmasnak látszik a *C. lanienae* izolátumok tipizálására, ha epidemiológiai vizsgálatokra kerül sor. Ezen előzetes PFGE eredmények is arra utalnak, hogy - hasonlóan más *Campylobacter*-fajokhoz - a *C. lanienae* fajon belül nagy a genetikai változatosság és genom plaszticitás.

Az eddigiekben tárgyalt módszerek közül a legérzékenyebb a PFGE, ugyanakkor problémát is okozhat, mert olyan törzsek között is jelentős különbséget mutathat ki, amelyek valójában rokonok és azonos klónba tartoznak. További hátránya, hogy nehezen

standardizálható, ami akadályozhatja a különböző helyszíneken végzett vizsgálatok összehasonlítását. Ezen tulajdonságai miatt a gyakorlatban elsősorban halmozott kórházi fertőzések járványügyi kivizsgálására használják, amikor a vizsgálatok egyetlen laboratóriumban azonos körülmények között történnek és az izolált kórokozók közötti teljes azonosság megállapítására irányulnak. Ezzel szemben az MLST módszer előnye, hogy a különböző laboratóriumokban végzett vizsgálatok összehasonlíthatók: a megfelelő technikával végzett szekvenálási vizsgálatok minden laboratóriumban megbízható, egymással összevethető eredményt adnak a nukleotid sorrendre vonatkozóan. Ezért az MLST a legalkalmasabb eljárás országos, vagy nemzetközi összehasonlító tipizálási vizsgálatok végzésére, mind rövid, mind hosszú távú vizsgálatok esetében. Hátránya ugyanakkor, hogy drága, így az MLST vizsgálatot csak korlátozott számú, lehetőleg az epidemiológiai szempontból legfontosabb törzseknél szokták elvégezni.

A kinolon és makrolid rezisztens *Campylobacter* törzsek által okozott humán fertőzések száma jelentősen megnőtt az utóbbi években. A fertőzések kezelésében sokáig a fluorokinolonok játszottak meghatározó szerepet, azonban a fluorokinolon rezisztencia növekedése miatt ez a terápiás lehetőség komoly veszélybe került. A fluorokinolon rezisztenciáért leggyakrabban a giráz enzim A alegységét kódoló *gyrA* génben létrejövő, a 86-os pozícióban lévő treonint (magas fokú rezisztencia), illetve a 90-aszparagint és 70-alanint érintő (alacsonyabb fokú rezisztencia) pontmutáció felelős. A génen belüli régiót, melyben a rezisztenciáért felelős mutációk találhatóak, Quinolone Resistance Determinant Region-nek (QRDR) nevezzük.

Az élelmiszer-alapanyagként szolgáló állatokban a kinolon rezisztencia nagyon magas arányú (74,3% *C. jejuni* és 70,1% *C. coli* esetében 2009-ben) és növekvő tendenciát mutat mind *C. jejuni*-ban és *C. coli*-ban, mindhárom állatfajból. A kinolon-rezisztens *C. jejuni* ($p=0,00159$) és *C. coli* ($p=4,475e-06$) törzsek aránya magasabb brojlercsirkében, mint sertésben, összhangban azokkal az eredményekkel, melyeket Olaszországban, Máltán, Romániában, Lengyelországban és Hollandiában kaptak.

Az eritromicin rezisztencia általában magasabb a *C. coli* törzsekben, különösen a sertésből származó *C. coli*-ban, mint *C. jejuni*-ban (Aarestrup et al., 1997). Magyarországon az utóbbi években mindkét *Campylobacter*-fajban, mind brojlercsirke- mind sertésállományokban nő a makrolidokkal szembeni érzékenység. Az eritromicin rezisztencia ritka a *C. jejuni* izolátumokban, de gyakoribb *C. coli*-ban ($p=0,043$). Ennek magyarázata lehet, hogy a makrolid antibiotikumokat nem lehet hozamfokozóként használni az EU-ban 1999. július óta, ezért virginiamicint egyáltalán nem, és tilozint is kisebb mennyiségben etetnek az állatokkal.

A tetraciklinnel szembeni rezisztencia is jelentős volt a *C. jejuni* és *C. coli* törzsek között brojlercsirkében (33,3% és 54,8% 2009-ben) és sertésben is (40,0% és 90,7% 2009-ben). Több mint 2 antibiotikummal szembeni rezisztencia azonban relatív ritka volt.

A rezisztencia százalékok összehasonlításánál vigyázni kell, hogy milyen határértékekkel kerültek azok elbírálásra, mert az epidemiológiai határértékek általában alacsonyabbak, mint a klinikai határértékek. Tetraciklin esetében az EUCAST epidemiológiai határérték 2 µg/ml, míg a CLSI szerinti klinikai határérték 8 µg/ml.

Az antibiotikumok helyett a különböző természetes alapú takarmány-kiegészítők, probiotikumok kerülnek előtérbe a *Campylobacter* elleni védekezésben. Az első takarmányozási kísérletünkben a Sangrovit *Campylobacter*-ellenes hatását vizsgáltuk, azonban a 120 brojlercsirke egyike sem fertőződött *Campylobacter*-rel a kísérlet 30 napja alatt – valószínűleg a telepi viszonyokat kevésbé tükröző izolált tartás miatt -, így nem lehetett különbséget tenni a különböző takarmányok esetleges *Campylobacter*-ellenes hatása között. A következő kísérletben Immunoforttal (Vitafort Zrt) kiegészített takarmányt etettünk pecsenye kacsákkal telepi körülmények közt. Az Immunofort savanyítás, a bélflóra stabilizálása és az immunkompetencia javítása révén fokozza a termelésbiztonságot. Az Immunofort a *Campylobacter*-t nem gyérítette, hisz a kontroll csoportban kisebb arányú volt a fertőzöttség, mint a kísérleti csoportban, de a takarmányhasznosítást jelentősen javította. A fertőzöttség vizsgálata hatékonyabb volt a vakbél mintázásával, mint a kloakatumponnal. A *C. jejuni*-val fertőzött 60 db pekingi kacsá vizsgálati eredménye alapján az Immunofort vagy a szilárd adalék nem gyérítette a *Campylobacter*-fertőzöttséget, ami a 40. napig 100%-os maradt.

A *C. lanienae* izolátumok antibiotikum-érzékenysége arra utal, hogy a szarvasmarha és sertés eredetű törzsek nem csak genotípusosan, hanem fenotípusosan is különböznek. Az Inglis et al. (2003) által izolált szarvasmarha eredetű összes *C. lanienae* törzs cefalotin érzékeny volt, nem úgy, mint az emberből származó referencia törzs, vagy a magyar sertésből származó törzsek, amelyek cefalotin rezisztensek voltak.

A *C. lanienae* törzsek közt szintén jelentős tetraciklin, eritromicin és enrofloxacin rezisztenciát, valamint multirezisztens törzseket is találtunk, ami felveti a kérdést, hogy a *C. lanienae*-nek van-e szerepe az antibiotikum-rezisztencia terjesztésében.

Habár a *C. lanienae*-t nem patogén baktériumnak tekintik, a relatív magas előfordulási aránya sertésekben, és a tény, hogy emberekből is izolálták, a zoonózis lehetőségére utal.

7 Új tudományos eredmények

1. Kidolgoztunk egy real-time PCR módszert, mellyel gyorsan azonosíthatók a leggyakrabban előforduló termofil *Campylobacter*-fajok (*C. jejuni* és *C. coli*) kevert tenyészetek esetében is. Az eljárás EvaGreen fluoreszcens jelölőfestékekkel működik, és a fajok az olvadásgörbék alapján különíthetők el. A *C. jejuni* azonosítására magunk terveztünk új primereket. Ezzel az általunk kidolgozott real-time PCR vizsgálati módszerrel 4 óra alatt 45 tenyészet azonosítását, illetve elkülönítését tudjuk elvégezni. Ez annak is köszönhető, hogy mind a feltárási, mind a PCR reakciók pipettázási folyamatait robotok segítségével automatizáltuk.
2. Felmértük a háziállatokban előforduló *Campylobacter*-fajok gyakoriságát, területi, időbeli eloszlását. Megállapítottuk, hogy a magyarországi brojlercsirke- (60,1%) és sertésállományok (43,3%) nagy arányban fertőzöttek *Campylobacter*-rel a vágás idején. Ezzel ellentétben a szarvasmarha-állományok (6,7% pozitív) nem gyakori hordozói a kórokozónak. A fertőzöttség szezonálisát vizsgálva szoros korrelációt találtunk a pozitív minták aránya és a relatív páratartalom között.
3. Elsőként izoláltunk és azonosítottunk Magyarországon *C. lanienae*-t. Beszámoltunk a baktérium országos előfordulásáról sertésekben. Megállapítottuk, hogy a *C. lanienae* a sertésekből izolált 2. leggyakoribb faj (20,7%), míg *C. jejuni*-val a pozitív sertés bélmintáknak csak 5,3%-a volt fertőzött.
4. A részleges 16S rRNS génen alapuló szekvencia analízis során a Vc2 régió leírtuk a 2A mintázat előfordulását *C. lanienae*-ben is. A Vc6 régió két jól elkülönülő, 3 nukleotidban különböző mintázatot találtunk, ezért a 6D mintázaton belül a törzsek elkülönítésére bevezettük a 6Da és 6Db jelölést.
5. Elsőként végeztünk PFGE vizsgálatokat *C. lanienae* törzseken, és megállapítottuk, hogy az *Sma*I enzimmel való hasítás a legalkalmasabb egy esetleges epidemiológiai vizsgálat esetén.
6. PFGE és *flaA* SVR szekvenciák alapján meghatároztuk a hazánkban, háziállatokban előforduló *C. jejuni* és *C. coli* genotípusokat. Stabil *C. jejuni* és *C. coli* klónokat találtunk.
7. Magyarországon elsőként megvizsgáltunk háziállatokból származó 1-1 *C. jejuni* és *C. coli* törzset MLST módszerrel.
8. Megállapítottuk, hogy jelentős az enrofloxacin/ciprofloxacin és nalidixsav rezisztencia az izolált törzsek közt, különösen a brojlercsirkéből származó *C. jejuni*-ban (73,3%) és *C. coli*-ban (77,2%). Az eritromicin ($p=0,043$) és tetraciklin ($p=1,865e-14$) rezisztencia magasabb a *C. coli*-ban (9,7% és 74,1%), mint a *C. jejuni*-ban (3,1% és 36,6%), ezáltal sertésekben gyakoribb.

8 Irodalom

Aarestrup, F. M., McDermott, P. F., Wegener, H. C.: **Transmission of antimicrobial resistance from food animals to humans.** In: Nachamkin, I., Szymanski, C., Blaser, M. J. (szerk.): *Campylobacter* 3rd ed. ASM Press. Washington, DC, USA. 645–665, 2008.

Aarestrup, F. M., Nielsen, E. M., Madsen, M., Engberg, J.: **Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41. 2244-50, 1997.

Achen, M., Morishita, T. Y., Ley, E. C.: **Shedding and colonization of *Campylobacter jejuni* in broilers from day-of-hatch to slaughter age.** *Avian Dis.*, 42. 732–737, 1998.

Adhikari, B., Madie, P., Conolly, J., Davies, P., Layland, M., Rogers, L.: **Wild Birds, Flies and Rodents as Reservoirs of *Campylobacter* spp. on Dairy Farm.** MAF Technical Paper. Ministry of Agriculture and Forestry, New Zealand, 2002.

Allen, V. M., Newell, D. G.: **Evidence for the effectiveness of biosecurity to exclude *Campylobacter* from poultry flocks.** Food Standards Agency Report. UK, 2005.

Altekruse, S. F., Stern, N. J., Fields, P. I., Swerdlow, D. L.: ***Campylobacter jejuni* - an emerging foodborne pathogen.** *Emerg. Infect. Dis.*, 5. 28-35, 1999.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J.: **Basic local alignment search tool.** *J. Mol. Biol.*, 215. 403–410, 1990.

Aspinall, S. T., Wareing, D. R. A., Hayward, P. G., Hutchinson, D. N.: **Selective medium for thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*.** *J. Clin. Pathol.*, 46. 829-831, 1993.

Bacon, D. J., Alm, R. A., Burr, D. H., Hu, L., Kopecko, D. J., Ewing, C. P., Trust, T. J., Guerry, P.: **Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176.** *Infect. Immun.*, 68. 4384–4390, 2000.

Bacon, D. J., Alm, R. A., Hu, L., Hickey, T. E., Ewing, C. P., Batchelor, R. A., Trust, T. J., Guerry, P.: **DNA sequence and mutational analyses of the pVir plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176.** *Infect. Immun.*, 70. 6242–6250, 2002.

Baker, C. N.: **The E-test and *C. jejuni*.** *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 15. 469-472, 1992.

Batchelor, R. A., Pearson, B. M., Friis, L. M., Guerry, P., Wells, J. M.: **Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species.** *Microbiology*, 150. 3507-3517, 2004.

- Bates, C., Hiatt, K. L., Stern, N. J.: **Relationship of Campylobacter isolated from poultry and from darkling beetles in New Zealand.** Avian Dis., 48. 138–147, 2004.
- Bisping, W., Langenegger, J., Winkenwerder, W.: **Nachweis und Vorkommen der Vibrio-fetus-Infektion beim Bullen in Nordwestdeutschland und Vorschläge zu deren Bekämpfung.** Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., 71. 285-291, 1964.
- Blackburn, C. W., McClure, P. J. (szerk.): **Foodborne Pathogens – Hazards, Risk Analysis and Control. 13. Campylobacter and Arcobacter.** Woodhead Publishing. Cambridge, 2002.
- Boer, de P., Duim, B., Rigter, A., Plas, van der J., Jacobs-Reitsma, W. F., Wagenaar, J. A.: **Computer-assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for Campylobacter jejuni and Campylobacter coli.** J. Clin. Microbiol., 38. 1940–1946, 2000.
- Bolton, F. J., Coates, D., Hutchinson, D. N.: **The ability of campylobacter supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide.** J. Appl. Bacteriol., 56. 151-157, 1984.
- Boosinger, T. R., Blevins, W. T., Heron, J. V., Sunter, J. L.: **Plasmid profiles of six species of Campylobacter from human beings, swine, and sheep.** Am. J. Vet. Res., 51. 718-22, 1990.
- Brandl, M. T., Haxo, A. F., Bates, A. H., Mandrell, R. E.: **Comparison of survival of Campylobacter jejuni in the phyllosphere with that in the rhizosphere of spinach and radish plants.** Appl. Environ. Microbiol., 70. 1182–1189, 2004.
- Buechat, L. R.: **Methods for detecting and enumerating Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in poultry.** Poult Sci, 65. 2192–2198, 1986.
- Cappelier, J. M., Minet, J., Magras, C., Colwell, R. R., Federighi, M.: **Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable Campylobacter jejuni cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation.** Appl. Environ. Microbiol., 65. 5154-5157, 1999.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) **Campylobacter** <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter> 2010-08-10.
- Chai, L. C., Robin, T., Ragavan, U. M., Gunsalam, J. W., Bakar, F. A., Ghazali, F. M., Radu, S., Kumar, M. P.: **Thermophilic Campylobacter spp. in salad vegetables in Malaysia.** Int. J. Food Microbiol., 117. 106–111, 2007.
- Chan, K., Miller, W. G., Mandrell, R. E., Kathariou, S.: **The absence of intervening sequences in 23S rRNA genes of Campylobacter coli isolates from turkeys is a unique**

attribute of a cluster of related strains which also lack resistance to erythromycin. Appl. Environ. Microbiol., 73. 1208-1214, 2007.

Chuma, T., Yamada, T., Yano, K., Okamoto, K., Yugi, H.: **A survey of Campylobacter jejuni in broilers from assignment to slaughter using DNA-DNA hybridization.** J. Vet. Med. Sci., 56. 697–700, 1994.

Corry, J. E. L., Post, D. E., Colin, P., Laisney, M. J.: **Culture media for the isolation of campylobacters.** Int. J. Food Microbiol., 26. 43-76, 1995.

Craven, S. E., Stern, N. J., Line, E., Bailey, J. S., Cox, N. A., Fedorka-Cray, P.: **Determination of the incidence of Salmonella spp., Campylobacter jejuni, and Clostridium perfringens in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings.** Avian Dis., 44. 715–720, 2000.

Czirók É. (szerk.): **Klinikai és járványügyi bakteriológia kézikönyv** Melania Kft., Budapest, 1999.

Dán A., Molnár T., Biksi I., Glávits R., Shaheim, M., Harrach B.: **Characterisation of Hungarian porcine circovirus 2 genomes associated with PMWS and PDNS cases.** Acta. Vet. Hung., 51. 551-562, 2003.

Debruyne, L., Gevers, D., Vandamme, P.: **Taxonomy of the Family Campylobacteriaceae.** In: Nachamkin, I., Szymanski, C., Blaser, M. J. (szerk.): *Campylobacter* 3rd ed. ASM Press. Washington, DC, USA. 3–27. 2008.

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?species=avium&bnu_no=788099#788099 2011-03-01

Dingle, K. E., Colles, F. M., Wareing, D. R. A., Ure, R., Fox, A. J., Bolton, F. E., Bootsma, H. J., Willems, R. J. L., Urwin, R., Maiden, M. C. J.: **Multilocus Sequence Typing System for Campylobacter jejuni.** J. Clin. Microbiol., 39. 14–23, 2001.

Dingle, K. E., Colles, F. M., Falush, D., Maiden, M. C. J.: **Sequence Typing and Comparison of Population Biology of Campylobacter coli and Campylobacter jejuni.** J. Clin. Microbiol., 43. 340–347, 2005.

Dingle, K. E., Colles, F. M., Ure, R., Wagenaar, J. A., Duim, B., Bolton, F. J., Fox, A. J., Wareing, D. R. A., Maiden, M. C. J.: **Molecular Characterization of Campylobacter jejuni Clones: A Basis for Epidemiologic Investigation.** Emerg. Infect. Dis., 8. 2002.

Donnison, A.: **Isolation of Thermotolerant Campylobacter – Review and Methods for New Zealand Laboratories**, Report prepared for Ministry of Health, 2003. <http://www.moh.govt.nz/moh.nsf/pagesmh/2588?Open> 2010-08-13.

Doyle, L. P.: **The etiology of swine dysentery**. Am. J. Vet. Res., 9. 50-51, 1948.

Doyle, M. P., Roman, D. J.: **Recovery of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from inoculated foods by selective enrichment**. Appl. Environ. Microbiol., 43. 1343-1353, 1982.

DTU Food - EU Community Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance **Protocol for susceptibility testing of Salmonella and Campylobacter**. 2009. <http://www.crl-ar.eu/208-egas.htm> 2010-08-13.

Duim, B., Vandamme, P. A., Rigter, A., Laevens, S., Dijkstra, J. R., Wagenaar, J. A.: **Differentiation of Campylobacter species by AFLP fingerprinting**. Microbiology, 147. 2729-37, 2001.

Edgar, R. C.: **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput**. Nucleic Acids Res., 32. 1792–1797, 2004.

Epinfo - Epidemiológiai Információs Hetilap (Országos Epidemiológiai Központ): **A hazai járványügyi helyzet általános jellemzése**. Epinfo, 17. (52) 650, 2011.

Etoh, Y., Yamamoto, A., Goto, N.: **Intervening sequences in 16S rRNA genes of Campylobacter sp.: diversity of nucleotide sequences and uniformity of location**. Microbiol. Immunol., 42. 241–243, 1998.

European Food Safety Authority (EFSA) Working Group on Developing Harmonised Schemes for Monitoring Antimicrobial Resistance in Zoonotic Agents: **Harmonized monitoring of antimicrobial resistance in Salmonella and Campylobacter among food animals in the European Union**. Clin. Microbiol. Infect., 14. 522-533, 2008.

European Food Safety Authority (EFSA): **Report of Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of Campylobacter in broiler batches and of Salmonella on broiler carcasses in the European Union 2008. Part A: Campylobacter and Salmonella prevalence estimates**. EFSA J., 8. 1503, 2010.

European Food Safety Authority (EFSA): **The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008**. EFSA J., 8. 1496, 2010.

Evans, S. J., Sayers, R. J.: **A longitudinal study of Campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain**. Prev. Vet. Med., 46. 209–223, 2000.

Felsenstein, J.: **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.** Evolution, 39. 783-791, 1985.

Food and Agriculture Organization (FAO) / World Health Organization (WHO): **Risk assessment of Campylobacter spp. in broiler chickens. Technical report.** Microbiol. Risk Assess. Series, 12. 161, 2009.

Gibreel, A., Taylor, D. E.: **Macrolide resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli.** J. Antimicrob. Chemother., 58. 243–255, 2006.

Gorkiewicz, G., Feierl, G., Schober, C., Dieber, F., Köfer, J., Zechner, R., Zechner, E. L.: **Species-specific identification of Campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing.** J. Clin. Microbiol., 41. 2537–2546, 2003.

Grau, F. H.: **Campylobacter jejuni and Campylobacter hyointestinalis in the intestinal tract and on the carcasses of calves and cattle.** J. Food Prot., 51. 857–861, 1988.

Guévremont, E., Normand, V., Lamoureux, L., Côté, C.: **Genetic detection of Campylobacter lanienae in fecal matter and stored manure from swine and dairy cattle.** Foodborne Pathog. Dis., 5. 361-364, 2008.

Hald, B., Rattenborg, E., Madsen, M.: **Role of batch depletion of broiler houses on the occurrence of Campylobacter spp. in chicken flocks.** Lett. Appl. Microbiol., 32. 253–256, 2001.

Harrington, C. S., On, S. L. W.: **Extensive 16S rRNA gene sequence diversity in Campylobacter hyointestinalis strains: taxonomic and applied implications.** Int. J. Syst. Bacteriol., 49. 1171-1175, 1999.

Hoar, B. R., Atwill, E. R., Elmi, C., Farver, T. B.: **An examination of risk factors associated with beef cattle shedding pathogens of potential zoonotic concern.** Epidemiol. Infect., 127. 147–155, 2001.

Hörman, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., von Bonsdorff, C. H., Torvela, N., Heikinheimo, A., Hänninen, M. L.: **Campylobacter spp., Giardia spp., Cryptosporidium spp., noroviruses and indicator organisms in surface water in Southwestern Finland, 2000–2001.** Appl. Environ. Microbiol., 70. 87–95, 2004.

Humphrey, T. J.: **Techniques for the optimum recovery of cold injured Campylobacter jejuni from milk or water.** J. Appl. Bacteriol., 61. 125-132, 1986.

Humphrey, T. J., Cruikshank, J. G.: **Antibiotic and deoxycholate resistance in Campylobacter jejuni following freezing or heating.** J. Appl. Bacteriol., 59. 65-71, 1985.

- Inglis, G. D., Hoar, B. M., Whiteside, D. P., Morck, D. W.: **Campylobacter canadensis sp. nov., from captive whooping cranes in Canada.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57. 2636–2644, 2007.
- Inglis, G. D., Kalischuk, L. D.: **Direct quantification of Campylobacter jejuni and Campylobacter lanienae in feces of cattle by real-time quantitative PCR.** Appl. Environ. Microbiol., 70. 2296–2306, 2004.
- Inglis, G. D., Kalischuk, L. D.: **Use of PCR for direct detection of Campylobacter species in bovine feces.** Appl. Environ. Microbiol., 69. 3435–3447, 2003.
- Inglis, G. D., Kalischuk, L. D., Busz, H. W.: **Chronic shedding of Campylobacter species in beef cattle.** J. Appl. Microbiol., 97. 410-420, 2004.
- Jacobs-Reitsma, W. F., van de Giessen, A. W., Bolder, N. M., Mulder, R. W.: **Epidemiology of Campylobacter spp. at two Dutch broiler farms.** Epidemiol. Infect., 114. 413–421, 1995.
- Jolley, K. A., Chan, M. S., Maiden, M. C.: **mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases.** BMC Bioinformatics, 5. 86, 2004.
- Jones, F. S., Orcutt, M., Little, R. B.: **Vibriosis (Vibrio jejuni, n.sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves.** J. Exp. Med., 53. 853-64, 1931.
- Jones, K., Howard, S., Wallace, J. S.: **Intermittent shedding of thermophilic campylobacters by sheep at pasture.** J. Appl. Microbiol., 86. 531–536, 1999.
- Kaiser, R., Gottschalk, G.: **Elementare Tests zur Beurteilung von Messdaten.** Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zuerich. 1972.
- Kálmán M., Szöllősi E., Czermann B., Zimányi M., Szekeres S.: **Milkborne Campylobacter infection in Hungary.** J. Food Prot., 63. 1426–1429, 2000.
- Kapperud, G., Skjerve, E., Vik, L., Hauge, K., Lysaker, A., Aalmen, I., Ostroff, S. M., Potter, M.: **Epidemiological investigation of risk factors for Campylobacter colonization in Norwegian broiler flocks.** Epidemiol. Infect., 111. 245–255, 1993.
- Karenlampi, R. I., Tolvanen, T. P., Hanninen, M. L.: **Phylogenetic analysis and PCR-restriction fragment length polymorphism identification of Campylobacter species based on partial groEL gene sequences.** J. Clin. Microbiol., 42. 5731-8, 2004.
- Kaszanyitzky É. J-né, Tarpai A., Jánosi Sz., Papp M., Skáre J., Semjén G.: **Az antibiotikumrezisztenciát figyelő rendszer kiépítése Magyarországon.** Magy. Állatorv. Lapja, 124. 431-436, 2002.

- Korczak, B. M., Stieber, R., Emler, S., Burnens, A. P., Frey, J., Kuhnert, P.: **Genetic relatedness within the genus *Campylobacter* inferred from *rpoB* sequences.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56. 937-945, 2006.
- Lamoureux, M., MacKay, A., Messier, S., Fliss, I., Blais, B. W., Holley, R. A., Simard, R. E.: **Detection of *Campylobacter jejuni* in food and poultry viscera using immunomagnetic separation and microtitre hybridization.** *J. Appl. Microbiol.*, 83. 641–651, 1997.
- Lander, K. P.: **A selective, enrichment and transport medium for campylobacters.** In: Newell, D. G. (szerk.): *Campylobacter: Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry*, MTP Press Ltd., Lancaster. 77-78, 1982.
- Linton, D., Owen, R. J., Stanley, J.: **Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals.** *Res. Microbiol.*, 147. 707-718, 1996.
- Linton, D., Lawson, A. J., Owen, R. J., Stanley, J.: **PCR Detection, Identification to Species Level, and Fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Direct from Diarrheic Samples.** *J. Clin. Microbiol.*, 35. 2568–2572, 1997.
- Lior, H., Woodward, D. L., Edgar, J. A., Laroche, L. J., Gill, P.: **Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors.** *J. Clin. Microbiol.*, 15. 761–768, 1982.
- Logan, J. M. J., Burnens, A., Linton, D., Lawson, A. J., Stanley, J.: ***Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50. 865–872, 2000.
- Lovett, J., Francis, D. W., Hunt, J. M.: **Isolation of *Campylobacter jejuni* from raw milk.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 46. 459-462, 1983.
- Madden, R. H., Moran, L., Scates, P.: **Optimising recovery of *Campylobacter* spp. from the lower porcine gastrointestinal tract.** *J. Microbiol. Methods*, 42. 115–119, 2000.
- Manning, G., Duim, B., Wassenaar, T., Wagenaar, J. A., Ridley, A., Newell D. G.: **Evidence for genetically stable strain of *Campylobacter jejuni*.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 67. 1185-1189, 2001.
- Marcis Á.: **Újabb adatok a juhok fertőző elvetéléséhez.** *Állatorvosi Lapok*, 57. (22) 313-315, 1934.
- Martin, K. W., Mattick, K. L., Harrison, M., Humphrey, T. J.: **Evaluation of selective media for *Campylobacter* isolation when cycloheximide is replaced with amphotericin B.** *Lett. Appl. Microbiol.*, 34. 124-129, 2002.

- McFadyean, J., Stockman, S.: **Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Part III. Abortion in sheep.** London: HMSO, 1913.
- Meinersmann, R. J., Hesel, L. O., Fields, P. I., Hiatt, K. L.: **Discrimination of Campylobacter jejuni isolates by fla gene sequencing.** J. Clin. Microbiol., 35. 2810–2814, 1997.
- Meinersmann, R. J., Phillips, R. W., Hiatt, K. L., Fedorka-Cray, P.: **Differentiation of Campylobacter populations as demonstrated by flagellin short variable region sequences.** Appl. Environ. Microbiol., 71. 6368–6374, 2005.
- Michaud, S., Menard, S., Gaudreau, C., Arbeit, R. D.: **Comparison of Smal-defined genotypes of Campylobacter jejuni examined by KpnI: a population-based study.** J. Med. Microbiol., 50. 1075-1081, 2001.
- Miller, G. W., On, S. L. W., Wang, G., Fontanoz, S., Lastovica, A. J., Mandrell, R. E.: **Extended multilocus sequence typing system for Campylobacter coli, C. lari, C. upsaliensis, and C. helveticus.** J. Clin. Microbiol., 43. 2315–2329, 2005.
- MSZ EN ISO 10272-1:2006: **Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a Campylobacter spp. kimutatására és számlálására. 1. rész: Kimutatási módszer (ISO 10272-1:2006).**, 2006.
- Nachamkin, I., Bohachick, K., Patton, C. M.: **Flagellin gene typing of Campylobacter jejuni by restriction fragment length polymorphism analysis.** J. Clin. Microbiol., 31. 1531-1536, 1993.
- Nakari, U. M., Laaksonen, K., Korkeila, M., Siitonen, A.: **Comparative typing of Campylobacter jejuni by heat-stable serotyping and PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis.** J. Clin. Microbiol., 43. 1166–1170, 2005.
- Newell, D. G., Davison, H. C.: **Campylobacter: Control and prevention.** In: Torrence, M. E., Isaacson, R. E. (szerk.): *Microbial Food Safety in Animal Agriculture: Current Topics.* Iowa State Press. Iowa, 211–220, 2003.
- Nirdnoy, W., Mason, C. J., Guerry, P.: **Mosaic structure of a multiple-drug-resistant, conjugative plasmid from Campylobacter jejuni.** Antimicrob. Agents Chemother., 49. 2454–2459, 2005.
- Office International des Epizooties (OIE) **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.9.3. Campylobacter jejuni and Campylobacter coli.** Paris, 2010.

On, S. L.: **CAMPYNET** <http://campynet.vetinst.dk/CONTENTS.HTM> 2001.

On, S. L.: **Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms.** Clin. Microbiol. Rev., 9. 405-422, 1996.

On, S. L. W., Jordan, P. J.: **Evaluation of 11 PCR Assays for Species-Level Identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli.** J. Clin. Microbiol., 41. 330–336, 2003.

Oosterom, J., Dekker, R., de Wilde, G. J., van Kempen-de Troye, F., Engels, G. B.: **Prevalence of Campylobacter jejuni and Salmonella during pig slaughtering.** Vet. Quart., 7. 31–34, 1985.

Park, P.: **The physiology of Campylobacter species and its relevance to their role as foodborne pathogens.** Int. J. Food Microbiol., 74. 177-188, 2002.

Pearson, A. D., Greenwood, M., Healing, T. D., Rollins, D., Shahamat, M., Donaldson, J., Colwell, R. R.: **Colonization of broiler chickens by waterborne Campylobacter jejuni.** Appl. Environ. Microbiol., 59. 987–996, 1993.

Penner, J. L., Hennesy, J. N.: **Passive hemagglutination technique for serotyping Campylobacter fetus subsp. jejuni on the basis of soluble heatstable antigens.** J. Clin. Microbiol., 12. 732-737, 1980.

Petersen, L., Wedderkopp, A.: **Evidence that certain clones of Campylobacter jejuni persist during successive broiler flock rotations.** Appl. Environ. Microbiol., 67. 2739-2745, 2001.

Pokamunski, S., Kass, N., Borochoovich, E., Marantz, B., Rogol, M.: **Incidence of Campylobacter spp. in broiler flocks from hatching to slaughter.** Avian Pathol., 15. 83–92, 1986.

Post, D. E.: **Food-borne pathogens. Monograph Number 3: Campylobacter.** Oxoid Technical Support Department. Unipath Ltd, Basingstoke, UK, 1995.

Quinn, P. J., Markey, B. K., Donnelly, W. J., Leonard, F. C.: **Veterinary Microbiology and Microbial Disease** Blackwell Sci. Publ., Oxford, 2002.

Ray, B., Johnson, C.: **Survival and growth of freeze-stressed Campylobacter jejuni cells in selective media.** J. Food Safety, 6. 183–195, 1984.

Reinhard, R., McAdam, T. J., Flick, G. J., Croonenberghs, R. E., Wittman, R., Diallo, A. A., Fernandes, C.: **Analysis of Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, Salmonella, Klebsiella pneumoniae, and Escherichia coli O157:H7 in fresh hand-picked Blue Crab (Callinectes sapidus) Meat.** J. Food Prot., 59. 803–807, 1996.

- Ribot, E. M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B., Barr, T. J.: **Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni***. *J. Clin. Microbiol.*, 39. 1889-1894, 2001.
- Rice, B. E., Lamichhane, C., Joseph, S. W., Rollins, D. M.: **Development of a Rapid and Specific Colony Lift Immunoassay for the Detection and Enumeration of *Campylobacter jejuni/coli/lari***. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 3. 669-677, 1996.
- Rivoal, K., Denis, M., Salvat, G., Colin, P., Ermel, G.: **Molecular characterization of the diversity of *Campylobacter* spp. isolates collected from a poultry slaughterhouse: analysis of crosscontamination**. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29. 370–374, 1999.
- Rivoal, K., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P., Ermel, G.: **Genomic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolates recovered from free-range broiler farms and comparison with isolates of various origins**. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71. 6216-27, 2005.
- Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J., Seppala, H.: **Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamid-streptogramin B resistance determinants**. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43. 2823–2830, 1999.
- Roels, T. H., Wickus, B., Bostrom, H. H., Kazmierczak, J. J., Nicholson, M. A., Kurzynski, T. A., Davis, J. P.: **A foodborne outbreak of *Campylobacter jejuni* (O:33) infection associated with tuna salad: a rare strain in an unusual vehicle**. *Epidemiol. Infect.*, 121. 281-7, 1998.
- Sahin, O., Zhang, Q., Morishita, T. Y.: ***Campylobacter*: Detection of *Campylobacter***. In: Torrence, M. E., Isaacson, R. E. (eds.): *Microbial Food Safety in Animal Agriculture: Current Topics*. Iowa State Press. Iowa, 211–220, 2003.
- Saitou, N., Nei, M.: **The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees**. *Mol. Biol. Evol.*, 4. 406-425, 1987.
- Sasaki, Y., Fujisawa, T., Ogikubo, K., Ohzono, T., Ishihara, K., Takahashi, T.: **Characterization of *Campylobacter lanienae* from pig feces**. *J. Vet. Med. Sci.*, 65. 129-131, 2003.
- Schmidt-Ott, R., Pohl, S., Burghard, S., Weig, M., Gross, U.: **Identification and characterization of a major subgroup of conjugative *Campylobacter jejuni* plasmids**. *J. Infect.*, 50. 12-21, 2005.
- Schmiedhoffer Gy. **Adatok a *Vibrio fetus* morfológiai és biológiai tulajdonságaihoz, hazai estek kapcsán**. *Állategészségügy*, 49. 1-48, 1926.

- Skov, M. N., Spencer, A. G., Hald, B., Petersen, L., Nauerby, B., Carstensen, B., Madsen, M.: **The role of litter beetles as potential reservoir for Salmonella enterica and thermophilic Campylobacter spp. between broiler flocks.** Avian Dis., 48. 9–18, 2004.
- Smith, T., Taylor, M. S.: **Some morphological and biological characters of the spirilla (Vibrio fetus, n.sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle.** J. Exp. Med., 30. 299-312, 1919.
- Songer, J. G., Post, K. W.: **Veterinary Microbiology Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease.** s.l.: Elsevier Saunders, 2005.
- Stanley, K. N., Wallace, J. S., Currie, J. E., Diggle, P. J., Jones, K.: **Seasonal variation of thermophilic Campylobacters in lambs at slaughter.** J. Appl. Microbiol., 84. 1111-1116, 1998.
- Stanley, K., Cunningham, R., Jones, K.: **Isolation of Campylobacter jejuni from groundwater.** J. Appl. Microbiol., 85. 187–191, 1998.
- Steel, T. W., McDermott, S.: **Campylobacter enteritis in South Australia.** Med. J. Aust., 2. 404-406, 1978.
- Stern, N. J., Clavero, M. R. S., Bailey, J. S., Cox, N. A., Robach, M. C.: **Campylobacter spp. in broilers on the farm and after transport.** Poult. Sci., 74. 937–941, 1995.
- Stern, N. J., Myszewski, M. A., Barnhart, H. M., Dreesen, D. W.: **Flagellin A gene restriction fragment length polymorphism patterns of Campylobacter spp. isolates from broiler production sources.** Avian Dis., 41. 899-905, 1997.
- Stern, N. J., Line, J. E.: **Comparison of three methods for recovery of Campylobacter spp. from broiler carcasses.** J. Food Prot., 55. 663-666, 1992.
- Strother, K. O., Steelman, C. D., Gbur, E. E.: **Reservoir competence of lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) for Campylobacter jejuni (Campylobacterales: Campylobacteraceae).** J. Med. Entomol., 42. 42–47, 2005.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S.: **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** Mol. Biol. Evol., 24. 1596-1599, 2007.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S.: **Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method.** Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 101. 11030-11035, 2004.
- Taylor, D. E., Garner, R. S., Allan, B. J.: **Characterization of tetracycline resistance plasmids from Campylobacter jejuni and Campylobacter coli.** Antimicrob. Agents Chemother., 24. 930–935, 1983.

- Tenover, F. C., Williams, S., Gordon, K. P., Nolan, C., Plorde, J. J.: **Survey of plasmids and resistance factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli***. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27. 37–41, 1985.
- Tracz, D. M., Keelan, M., Ahmed-Bentley, J., Gibreel, A., Kowalewska-Grochowska, K., Taylor, D. E.: **pVir and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis**. *Emerg. Infect. Dis.*, 11. 838-43, 2005.
- Tuboly S. (szerk.): **Állatorvosi Járványtan I. (Állatorvosi mikrobiológia)**. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 1998.
- Varga J. (szerk.): **Háziállatok fertőző betegségei (Állatorvosi járványtan II.)**. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 218-223, 1999.
- Vandamme, P., van Doorn, L.-J., Al Rashid, S. T., Quint, W. G. V., van der Plas, J., Chan, V. L., On S. L. W.: ***Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Véron and Chatelain 1973 Are Subjective Synonyms**. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47. 1055-1060, 1997.
- Varga J.: **A baromfi *Campylobacter*-fertőzései**. *Magy. Állatorv. Lapja*, 119. 715–717, 1997.
- Varga J.: ***Campylobacter*-fajok okozta fertőzések háziállatokban és emberben**. *Magy. Állatorv. Lapja*, 123. 687-694, 2001.
- Varga J., Fodor L.: **Biochemical characteristics, serogroup distribution, antibiotic susceptibility and age-related significance of *Campylobacter* strains causing diarrhoea in humans in Hungary**. *Zentbl. Bakteriol.*, 288. 67–73, 1998.
- Varga J., Mézes B., Fodor L.: **Serogroups of *Campylobacter jejuni* from man and animals**. *J. Vet. Med.*, 37. 407–411, 1990.
- Vereen, Jr. E., Lowrance, R. R., Cole, D. J., Lipp, E. K.: **Distribution and ecology of *Campylobacters* in coastal plain streams (Georgia, United States of America)**. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73. 1395–1403, 2007.
- Wang, G., Clark, C. G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D. L., Rodgers, F. G.: **Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus***. *J. Clin. Microbiol.*, 40. 4744–4747, 2002.
- Wassenaar, T. M., Newell, D. G.: **Genotyping of *Campylobacter* spp.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 66. 1-9, 2000.
- Weijtens, M. J., Urlings, H. A. P., van der Plas, J.: **Establishing a *Campylobacter*-free pig population through a top-down approach**. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30. 479–484, 2000.

Weijtens, M. J., van der Plas, J., Bijker, P., Urlings, H., Koster, D., van Logtestijn, J., Huis in't Veld, J. H.: **The transmission of Campylobacter in piggeries; an epidemiological study.** J. Appl. Microbiol., 83. 693–698, 1997.

Wesley, I. V., Wells, S. J., Harmon, K. M., Green, A., Schroedertucker, L., Glover, M., Siddique, I.: **Fecal shedding of Campylobacter and Arcobacter spp. in dairy cattle.** Appl. Environ. Microbiol., 66. 1994–2000, 2000.

Wittwer, M., Keller, J., Wassenaar, T. M., Stephan, R., Howald, D., Regula, G., Bissig-Choisat, B.: **Genetic diversity and antibiotic resistance patterns in a Campylobacter population isolated from poultry farms in Switzerland.** Appl. Environ. Microbiol., 71. 2840–2847, 2005.

Wong, T. L., Hollis, L., Cornelius, A., Nicol, C., Cook, R., Hudson, J. A.: **Prevalence, numbers and subtypes of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in uncooked retail meat samples.** J. Food Prot., 70. 566–573, 2007.

9 A doktori kutatás eredményeinek közlései

9.1 Lektorált, impakt faktoralal bíró tudományos folyóiratban elfogadott publikációk:

Schweitzer N., Damjanova I., Kaszanyitzky É., Ursu K., Samu P., Tóth Á. Gy., Varga J., Dán Á.: **Molecular characterization of *Campylobacter lanienae* strains isolated from food-producing animals.** Foodborne Pathog. Dis., 2011. In press.

Schweitzer N., Dán Á., Kaszanyitzky É., Samu P., Tóth Á. Gy., Varga J., Damjanova I.: **Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates of poultry, swine and cattle origin collected from slaughterhouses in Hungary.** J. Food Prot., 2011. In press.

Schweitzer N., Kaszanyitzky É., Samu P., Varga J.: **A termofil *Campylobacter*-fajok jelentősége és helyzete hazánkban, a védekezés lehetőségei.** Irodalmi összefoglaló. Magy. Állatorv. Lapja, 2011. 133 (3). 165-173.

9.2 A témában tartott konferencia prezentációk

Beszámoló: Kaszanyitzky Éva, Samu Péterné, Schweitzer Nóra: **Vágóhídi mintákból kitenyészett *Campylobacter* izolátumok antibiotikum-érzékenysége.** A Magyar Zoonózis Társaság, a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Központ Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatósága és az Országos Epidemiológiai Központ által rendezett konferencia 2008. október 7-9., Ráckeve.

Összefoglaló és beszámoló: Schweitzer Nóra, Dán Ádám, Ursu Krisztina, Kaszanyitzky Éva, Varga János: ***Campylobacter jejuni* és *C. coli* azonosítása és elkülönítése real-time PCR-rel intézetünkben.** Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottsága éves konferenciája 2009. január 27., Budapest.

Összefoglaló: Dán Ádám, Schweitzer Nóra, Ursu Krisztina, Kaszanyitzky Éva: ***Campylobacter jejuni* és *C. coli* azonosítása és jellemzése molekuláris biológiai módszerekkel.** Hungalimenteria 2009. április 22., Budapest.

Összefoglaló és előadás tartása: Schweitzer Nóra, Kaszanyitzky Éva, Ursu Krisztina, Dán Ádám: **Termofil *Campylobacter* törzsek elkülönítése EvaGreen alapú real-time PCR-rel.** Zoonózis Konferencia 2009. október 16., Tiszafüred.

Összefoglaló és előadás tartása: Schweitzer Nóra, Dán Ádám, Kaszanyitzky Éva, Samu Péterné, Varga János: **Élelmiszer-termelő állatokban előforduló termofil**

***Campylobacter*-fajok kimutatása, prevalenciája és antibiotikum-érzékenysége
Magyarországon. Szent-Iványi – Binder napok 2010. augusztus 19., Budapest.**

10 Köszönetnyilvánítás

Tudományos munkám anyagi és infrastruktúrális feltételeinek biztosításáért köszönettel tartozom munkahelyemnek, a MgSzH-ÁDI-nak és mindenkori vezetésének.

Szeretném kifejezni köszönetemet munkám anyagi támogatásáért, a publikációim kéziratainak lektorálásáért, illetve azért, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy eredményeimet hazai tudományos konferenciákon előadhassam, témavezetőmnek, Dr. Varga Jánosnak.

Köszönettel tartozom Dr. Dán Ádámnak, társtémavezetőmnek, aki kivételes elhivatottságával, munkabíráásával nagymértékben segítette az általam használt molekuláris biológiai és diagnosztikai módszerek elsajátításában, a kutatás menetének irányításában, a kapott eredmények értékelésében, a publikációim kéziratainak lektorálásában.

Köszönöm dr. Damjanova Ivelinának, az Országos Epidemiológiai Központ, Fágtipizálási és molekuláris epidemiológiai osztály munkatársának, hogy lehetőséget adott a PFGE vizsgálatok elvégzésére és köszönöm az eredmények kiértékelésében, és a publikációim kéziratainak lektorálásában nyújtott segítségét.

Köszönöm kollégáimnak, Juhászné Dr. Kaszanyitzky Évának és Samu Péterné dr-nak, hogy az általuk munkám kezdetéig, a témában elvégzett kutatásaik eredményeit önzetlenül átadták, és az osztályon izolált mintákat a rendelkezésemre bocsátották.

Dr. Tóth Ádám Györgynek köszönöm a kéziratok lektorálásában való részvételt.

Köszönöm a Higiénés bakteriológiai és Molekuláris biológiai laboratóriumok összes dolgozójának a segítségét.

Köszönöm Dr. Szigeti Gábornak, hogy részt vehettem a takarmányozási kísérletekben.

Dr. Reiczigel Jenőnek a statisztikában nyújtott segítségét köszönöm.

Dr. Bányai Krisztiánnak köszönöm a szekvenálásokban nyújtott segítségét.

Köszönöm családomnak, szeretteimnek és barátaimnak, hogy támogatásukkal és gondoskodásukkal lehetővé tették számomra, hogy minél több időt és energiát fordíthassak kutatásaimra.