

**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Doktori Iskola**

**Nem tuberkulotikus mycobacteriumok**  
**azonosítása és tipizálása**

PhD értekezés tézisei

dr. Rónai Zsuzsanna

2016

Témavezető és témabizottsági tagok:

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

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

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

## Bevezetés, célkitűzések

Az elmúlt években a hazai állategészségügy egyik kiemelten fontos célja az ország gümőkórmentes státuszának elfogadtatása volt. Bár a hazai szarvasmarha-állományok 1981-től gyakorlatilag gümőkórmentesek voltak, az Európai Unió ezt a reaktív egyedek nagy száma miatt mégsem ismerte el. Az olyan állományokat, melyekben a gümőkór jelenlétét nem lehetett igazolni, azonban a tuberkulin bőrpróbákban nagyszámú pozitív vagy kétes reakció jelentkezett, paraallergiásnak minősítették. A szoros antigénszerkezeti rokonság miatt a nem tuberkulotikus *Mycobacterium*ok (NTM) képesek áthangolni a gazdaszervezet immunrendszerét, minek következtében a hordozó gazdák reagálhatnak a tuberkulin bőrpróbában, megnehezítve ezzel a gümőkór *in vivo* diagnosztikáját.

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

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

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

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

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

## Anyag és módszer

A vizsgálati minták és a kitenyésztési kívánt *Mycobacterium* törzsek sokszínűsége nem tette lehetővé egy szigorú mintafeldolgozási és *Mycobacterium* tenyésztési protokoll követését, így az egyes törzsek eltérő táptalajigényéhez, hőmérsékleti optimumához és növekedési idejéhez alkalmazkodva alakítottuk ki a különböző mintatípusok vizsgálati protokollját. Amennyiben egy adott *Mycobacterium* fajt nem tudtuk a korábban alkalmazott táptalajokon megfelelően tenyészteni, vagy vegyes tenyészetből szelektív izolálásra volt szükség, a különböző adalékok és alapanyagok kombinálásával magunk fejlesztettünk táptalajokat.

A beoltott szilárd táptalajokat természetes fény mellett szabad szemmel, megtekintéssel, a levestáptalajokat Ziehl–Neelsen (ZN) festéssel havonta vizsgáltuk, azzal a kitételrel, hogy a MGIT csöveket csak akkor festettük, ha a Wood-lámpás vizsgálat pozitív eredményt adott.

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

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

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

A kitenyésztett *Mycobacterium* törzseket molekuláris biológiai módszerek segítségével vizsgáltuk tovább. A sikeres molekuláris biológiai vizsgálatok előfeltétele, hogy a mintákból megfelelő mennyiségű és minőségű bakteriális DNS-t vonjunk ki. A mycobacteriumok speciális sejtfalának köszönhetően a más baktériumoknál jól működő egyszerű fagyasztás/felolvasztásos DNS feltárás nem ad megfelelő eredményt, sőt, mintatípusonként (köpet, szövet, bélsár) és baktériumfajonként is más-más módszer szükséges.

Kitenyésztett törzseink esetén szonikálást és főzést, vagy kézi DNS kivonást alkalmaztunk.

Vizsgálataink során kísérletet tettünk mycobacteriumok közvetlen szövetből és bélsármintából történő kimutatására/azonosítására is, melyeknél az alacsony baktériummennyiség és az esetleges gátló anyagok jelenléte miatt speciális DNS feltárási módszerekre volt szükség. Szerv-

és szövetminták esetén Roche High Pure PCR Template Preparation v.16.0 kittel valamint QIAamp® DNA Mini kittel dolgoztunk, míg bélsárminták esetén mindezek mellett ExtractMaster™ Fecal DNA Extraction kitet is használtunk, a gyártók utasítása szerint.

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

A *M. avium* subsp. *avium* (MAA) és *M. avium* subsp. *silvaticum* (MAS) törzsek elkülönítéséhez molekuláris biológiai identifikáló módszert fejlesztettünk, mely egy duplex real-time rendszer alfaj specifikus mismatch (MM) primerekkel és nagy felbontású olvadáspont analízissel (HRM).

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

A szekvenálási reakciókat BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit segítségével végeztük a gyártó utasítása szerint. A szekvenciafuttatást a Biomi Kft.-nél végeztettük ABI Prism 3400 DNA Sequencer készülék segítségével.

A két irányból leolvasott szekvenciákat a SeqMan – Lasergene 12 (DNASTAR) programmal illesztettük össze. A szekvenciák páronkénti összehasonlítását BioEdit 7.2.5 programmal, míg a filogenetikai analízist MEGA 6.06 szoftverrel szomszédösszevonó módszerrel (Neighbor-Joining, NJ) végeztük. Egyedi szekvenciáinkat a GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) internetes adatbázisába töltöttük fel.

A *M. avium* alfajok genotipizálást LSP<sup>A</sup>17 szekvencia polimorfizmus és MIRU–VNTR módszerekkel végeztük.

A MIRU–VNTR vizsgálatokhoz négy MIRU, három VNTR és egy MATR lókuszt amplifikáltunk. A tandem ismétlődések (tandem repeat, TR) számát az egyes PCR termékek méretéből állapítottuk meg. Kétes esetekben a termékeket megszekvenáltuk.

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

A diszkriminációs indexet (DI) a Hunter és Gaston által leírt képlettel határoztuk meg. Azon törzseket, melyek között közvetlen epidemiológiai összefüggés állt fenn, mind az allélváltozatosság, mind pedig a diszkriminációs index meghatározásnál kizártuk vizsgálatainkból.

A különböző genotípusok (GT) rokonsági fokának vizsgálatát NJ analízissel végeztük MEGA 6.06 program segítségével.

## Eredmények

A 2006 és 2015 között a NÉBIH-ÁDI Bakteriológiai Laboratóriumában izolált közel 3000 *Mycobacterium* törzset fő csoportbeli hovatartozásuk meghatározását követően vontuk be részletesebb vizsgálatokba. A csaknem 2400 NTM-ből közel 1000 bizonyult *M. avium*-nak.

A *M. avium* törzsek között 144 MAA-t, 65 MAS-t, 94 MAH-t és 659 MAP törzset azonosítottunk.

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

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

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

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

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

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

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

A MM primer az *aspB* gén egy C/G eltérését mutatja ki. Ezzel a primerpárral a MAA, MAH, MAP, *M. bovis*, és *M. intracellulare* törzsek nem amplifikálódtak, míg MAS törzsek esetén 369 bp hosszú terméket kaptunk 94,9±0,2 °C-os olvadásponttal. A HRM primer egy feltételezett membránfehérje génjében található TT/CG eltérést fog közre. Ebben a rendszerben a MAA törzsek 91,63±0,05 °C, a MAS törzsek pedig 91,17±0,13 °C-os olvadáspontúak voltak, és normalizálást követően eltérő lefutású olvadási-görbéket mutatnak 0,7 °C-os hőmérséklet-

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

A MM és a HRM primerek által felsokszorozott szakaszokat a referens törzsekben és több saját izolátumban is megszekvenáltuk, hogy igazoljuk az eltérések valóságát. A szekvenciákat KP792232–KP792236 azonosítóval a GenBank gyűjteményében helyeztük el.

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

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

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

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

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

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

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

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

Az 542 mellékletként kitenyésztett szarvasmarha eredetű törzs közül 76 (14,02%) olyan állatokból származott, melyek nem reagáltak a tuberkulin bőrpróbában, míg a fennmaradó 466 törzs (85,98%) a bőrpróbában pozitív vagy kétes reakciót adó állatokból tenyésztett ki. Húsmarhákból (Aberdeen Angus, Aubrac, Charolais, Limousin, Magyar szürke) 158, tejelőkből (Brown Swiss, Holstein-fríz, Jersey) 416 törzset izoláltunk, melyek 184 különböző állományból származtak. A legfiatalabb gazda 2 hónapos, a legidősebb 16 éves volt. Az ismert eredetű

törzsek 7,6%-át (44/577) bikákból, több mint 92%-át tehenekből izoláltuk. Több esetben izoláltunk MAP törzseket egymással rokon állatokból, mint pl.: anyából és borjából, testvérborjából, valamint külföldről (pl.: Németország, Dánia, Szlovákia, Hollandia) importált állatokból.

A bivaly, a gímszarvas, a róka és a sertés eredetű törzsek Somogy megyéből származtak. A muflon törzsek Somogy megyében, karanténban mintázott Csehországból importált állatokból tenyésztettek ki. A fertőzött juhok Hajdú-Bihar és Jász-Nagykun-Szolnok, míg a kecskék Hajdú-Bihar, Pest, Somogy és Veszprém megyeiek voltak. A vaddisznó minták zöme (22/31) Somogyból származott, de Bács-Kiskun, Baranya, Győr-Moson-Sopron, Hajdú-Bihar, Heves, Komárom-Esztergom, Tolna, Vas és Veszprém megye eredetű törzsek is voltak.

A paratuberkulózis célzott kimutatására érkezett minták közül 41 bélsárminta, a 4 kecske minta valamint a 3 juh bélminta esetén többféle közvetlen DNS kivonási módszert követően is megkíséreltük a MAP kimutatását specifikus PCR rendszerek segítségével. A „gold standardnak” minősülő, kontrollként végzett tenyésztéses vizsgálattal 19 törzset sikerült kitenyésztelnünk. A tenyésztéses vizsgálatban negatív minták minden esetben negatív PCR eredményeket mutattak. A pozitív minták közül 15-öt találtunk pozitívnak a direkt PCR vizsgálatokban. A legtöbb pozitív eredményt a Roche High Pure PCR Template Preparation v.16.0 kittel vagy az ExtractMaster™ Fecal DNA Extraction kittel történt DNS kivonást követően végzett F57 specifikus PCR-ek adtak.

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

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

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

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

Míg egyes törzseket, mint a *M. abscessus*-t, a *M. palustre*-t, a *M. peregrinum*-ot vagy a *M. thermoresistibile*-t különböző gazdafajokban is azonosítottunk, *M. smegmatis*-t,



*M. neoaurum*-ot, *M. shimoidei*-t, *M. europaeum*-ot, *M. nebraskense*-t, *M. malmoense*-t és *M. phlei*-t csak szarvasmarhában, *M. arosiense*-t, *M. saskatchewanense*-t és *M. gordonae*-t csak vaddisznóban, és *M. parafortuitum*-ot csak gímszarvasban találtunk.

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

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

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

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

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

34 reprezentatív törzs és válogatott referens törzsek *tuf* génjének 548 bp hosszú szakaszát felhasználva filogenetikai fát készítettünk. Az általunk identifikált törzsek referens törzseik mellett jelentek meg. A nem azonosítható törzsek közül a #6-os és #7-es a *M. terrae* komplexbe sorolódott, melyben a *M. nonchromogenicum*hoz álltak a legközelebbi rokonságban. A #4-es törzs a *M. vanbaalenii*, *M. vaccae* és *M. gilvum* csoporthoz állt közel, míg a #3-as törzs a *M. nebraskense*-hez, az #5-ös a *M. colombiense*-hez hasonlított leginkább. A vaddisznókból izolált #1-es, #2-es és #8-as törzsek rendre a *M. thermoresistibile*-vel, *M. florentium*mal és *M. europaeum*mal álltak a legközelebbi rokonságban.

## ***M. avium* alfajok genotipizálása**

Az LSP<sup>A</sup>17 szekvencia polimorfizmus vizsgálatát mind a 962 *M. avium* törzsön elvégeztük. A vizsgált szekvencia minden MAA és MAS törzsből hiányzott, míg minden MAP törzsben jelen volt. A 94 MAH törzsből 64-ben (67,1%) tudtuk kimutatni, míg 31-ben (32,9%) nem.

MIRU–VNTR analízisbe a 3 referens törzs mellett 795 törzset vontunk be, és 772 esetben tudunk teljes profilt képezni (135 MAA, 62 MAS, 84 MAH, 491 MAP).

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

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

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

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

Bizonyos farmokon ugyanazt a genotípust egymástól időben távoli kitéréseknél is azonosítottuk. Az egyes kitéréseknél a MAA törzsek mindig azonos, míg a MAH törzsek mindig eltérő genotípusúak voltak. A szarvasmarha eredetű MAP törzsek (455 db) 150 különböző állományból származtak. Hat állományban találtunk rokonsági kapcsolatokat MAP-fertőzött állatok között. A 14 állatból 10 esetben a rokonok azonos genotípust hordoztak.

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

A genotípusok evolúciós rokonságát ábrázoló filogenetikai fán a MAH, MAA, MAS és MAP törzsek különálló csoportokba rendeződtek. A MAH törzsek 3 nagy alcsoportot alkottak, míg a

MAA törzsek egy nagy és két kisebb alcsoport mellett önálló genotípusokat is tartalmaztak, mint pl. a 12-es, mely a típusörzset is magába foglalta. A MAS törzsek egy kivételével egy nagyobb alcsoportba rendeződtek. A MAP törzsek között az I-es típusúak külön alcsoportot alkottak, míg a II-es típusúak között 4 közepes alcsoportot és 3 független genotípust találtunk.

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

## **Törzsgyűjtemény**

A 2006 és 2015 között izolált törzsekből HUN\_MYCO\_COLLECTION\_2006-2015 néven törzsgyűjteményt hoztunk létre. A gyűjtemény egyik részét (A) a szarvasmarha tejmintákból eredetű pontosan azonosított 38 törzs alkotja, míg másik részében (B) a nem tej eredetű törzseket (2417 db: 541 MTC tag, 972 MA, 904 állati vagy környezeti eredetű NTM), a referens törzseket (3 db), a körvizsgálati mintákból származó törzseket (13 db), és az emberi eredetű törzseket (10 db) tüntettük fel. A származási állomány és a gazdaállatok adatai (kor, születési év, fajta, nem, hasznosítási irány) mellett a minta típusát (nyirokcsomó, bél, bélsár, stb.), laboratóriumba érkezésének dátumát, a vizsgálat célját (pozitív vagy kétes tuberkulin bőrpróba vagy jellegzetes elváltozások jelenléte esetén: diagnosztikai, elváltozások és tuberkulin bőrpróba pozitivitás hiányában felmérő mintáknál: monitoring), valamint a kórbonctani és szövettani vizsgálatok eredményeit is feltüntettük. A törzsek őrzésének helye és az azonosításukhoz elvégzett próbák eredményei mellett az egyes törzsek esetén a jelen munka keretében elvégzett tipizálások eredményeit is rögzítettük.

## Megbeszélés

A szarvasmarhákban szinte világszerte nagy számmal előforduló tuberkulin bőrpróba pozitivitás jelzi, hogy a vizsgált NTM-ok képesek áthangolni a gazdaszervezetet, ezáltal megnehezítve a gümőkór *in vivo* diagnosztikáját. Bár a hazai szarvasmarha-állományok gümőkórmentességét 2014 februárjában elismerte az Európai Unió, a vadállatok az endémiás területeken továbbra is fenntartják és terjesztik a *M. caprae*-t, mely szerepük a NTM-ok esetén is kihangsúlyozandó. Mivel a NTM-ok zöme bizonyítottan rendelkezik zoonotikus potenciállal, így a fertőzött állatok veszélyt jelenthetnek a gondozókra, az állatorvosokra, a vadászokra, valamint a vágóhídi és húsüzemi dolgozókra.

**Vizsgálataink egyik fő célja a nem *M. avium* NTM-ok molekuláris módszerekkel történő azonosítása és elterjedtségüknek, változatosságuknak felmérése volt.** Eredményeink azt mutatják, hogy a hazai házi és vadon élő állatok körében a nem *M. avium* NTM-ok nagy számban fordulnak elő, melyek klinikai jelentőségének megítélése csak pontos azonosításukat követően lehetséges. Az állategészségügyi mintákból származó nem *M. avium* NTM-ok esetén jó felbontóképességet tapasztaltunk a *tuf* és az *rpoB* gének esetén.

A kereskedelmi forgalomban kapható kitek általában csupán a törzsek egy szűk körét képesek azonosítani. Ezen törzsek leginkább humán egészségügyi jelentőséggel bírnak, mely természetesen nem vág egybe az állategészségügy területén fontosnak ítélt fajokkal. Az egyedinek vélt jelzett DNS szakaszok használata ellenére e rendszerek specificitása sem kielégítő. Az általunk vizsgált állategészségügyi mintakollekción igen alacsony (INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: 10%, GenoType Mycobacterium CM/AS: 22%) azonosítási arányt tapasztaltunk.

Vizsgálataink során 31 korábban leírt nem *M. avium* NTM-ot azonosítottunk, melyek környezeti előfordulásáról, patogenitásáról és zoonotikus képességéről már rendelkezünk bizonyos információkkal. Nem azonosítható törzseket 14 esetben találtunk. A környezeti, nem *M. avium* NTM-ok valós változatossága jóval nagyobb, mint amilyenek azt az 1990-es évek elején ismerték. Míg szarvasmarha eredetű törzsek között csupán egyetlen új törzstípust találtunk, a vadállatokból származó mintákban mind a 8 féle jelen volt. A NTM fajok leginkább a környezetből kerülnek felvételre. Mivel a vadállatoknak szorosabb a kapcsolata természetes környezetükkel (talaj, természetes vizek, üledék, növények), ez magyarázatul szolgálhat az új törzstípusok köztük tapasztalt sokféleségére.

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

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

Vadállatokban és szarvasmarhában közel azonos számban találtunk különféle nem *M. avium* NTM törzseket, azonban eltérő volt az izolált törzsek köre, mely különbségeket feltételez az egyes törzsek gazdafaji preferenciája és patogenitása terén.

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

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

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

MAP törzseket a gazdák széles köréből izolálták már. Vadállatok, mint a róka vagy a vaddisznó ismert rezervoár fajai a kórokozónak.

Az általunk izolált törzsek 3 juh, 3 kecske és 1 szarvasmarha törzs kivételével II-es típusúak voltak. Habár szarvasmarháknál a II-es típus a leggyakoribb, kimutattuk, hogy az I-es típus is előfordulhat. Ugyanakkor a II-es típus széles gazdaspektruma is megerősítést nyert, hisz 8 különböző állatfajból izoláltuk. Mindezen eredmények megegyeznek korábbi adatokkal, azonban a sertés törzs korábbi eredményekkel ellentétben szintén II-es típusúnak bizonyult. Mindemellett kecskéből is izoláltunk II-es típusú törzset. Tudomásunk szerint Magyarországon elsőként izoláltunk MAP-t sertésből, vaddisznóból, vörös rókából, gímszarvasból, muflonból és bivalyból.

A kitenyésztett törzsek származása hazánk állattenyésztési viszonyainak és vadállományunk eloszlásának felelt meg. A juhból izolált törzsek a jelentős kiskérődző-tartási hagyományokkal és állatlétszámmal rendelkező észak-alföldi területről származtak, míg a vaddisznó, gímszarvas és róka eredetű törzsek zömében a gazdag vadállományáról ismert Dunántúli-középhegység és Dunántúli-dombság területeiről kerültek izolálásra. A szarvasmarhákból mellékletként izolált törzsek esetén a gazdák több mint 85%-a reagált a tuberkulin bőrpróbában, mely alátámasztja, hogy a MAP képes immunológiai áthangolódást okozni a fertőzött állatokban. A paratuberkulózis célzott kimutatására érkezett minták direkt PCR vizsgálatának eredményei jól mutatják, hogy bélsárminták esetén szükséges a mintában található PCR gátló anyagok eltávolítása a DNS feltárás során.

MAS törzseket madarak mellett korábban őzből izoláltak, szarvasmarhák esetén pedig csak mesterséges fertőzésről van irodalmi adat. Habár Turenne 2007-es összefoglaló cikkében még megkérdőjelezte az alfaj valódiságát, az elmúlt években izolált törzsek száma bizonyítja jelentőségét. Elsőként tenyésztettük ki vaddisznóból, vörös rókából, gímszarvasból, borzból és szarvasmarhákból. Mivel ez az alfaj speciális tenyésztési körülményeket igényel, izolálásához különös figyelemre és tapasztalatra van szükség. Amikor 1990-ben a *M. avium* alfajának minősítették azonosítására csak fenotípusos tulajdonságai alapján volt lehetőség. Az elmúlt évtizedekben többen próbálkoztak molekuláris módszerrel történő azonosításával, azonban a MAA törzsekkel való nagyfokú szekvencia-hasonlóság miatt ezidáig ez nem sikerült. Az általunk fejlesztett duplex HRM és MAS specifikus valós idejű PCR rendszer lehetővé teszi a MAS és MAA törzsek megbízható elkülönítését, és mivel nem igényel jelölt primereket, „probe”-ot vagy PCR-t követő kimutatási eljárásokat, gyors és költségkímélő. Az egy csőben végzett HRM és MM vizsgálatok ugyanakkor fokozzák a rendszer megbízhatóságát. A MAA és MAS specifikus görbék közötti stabil hőmérséklet-eltolódás és a termékek olvadáspontjának alacsony szórása szilárdságot ad a rendszernek, míg a széles templát DNS mennyiség rugalmassá és könnyen alkalmazhatóvá teszi azt.

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

A LSP-ok a genetikai változatosság molekuláris markerei a MTC-ben és *M. avium* fajok között egyaránt. Az LSP<sup>A</sup>17 szekvencia polimorfizmus vizsgálataink eredményei egybevágóak korábbi adatokkal.

A *M. avium* törzsek tipizálására és genetikai változatosságuk vizsgálatára a MIRU-VNTR módszert 2007-ben használták először. Azóta több új lókuszt azonosítottak, és változatos lókuszcsoportokat vizsgáltak különböző *M. avium* törzseken. Annak érdekében, hogy magasabb DI-et érjünk el mint a korábbi szerzők, a MIRU-VNTR vizsgálathoz egy egyedi lókuszkombinációt választottunk 4 MIRU, 3 VNTR és egy MATR lókuszből. Összességében a MIRU3-as lókuszbizonyult a legváltozékonyabbnak, bár MAP törzsek között a MIRU2, míg MAS törzsek

között a MIRU4 volt a legvariábilisabb. Mivel a különböző alfajoknál jelentős különbségek tapasztalhatók a lókuszok allélváltozatosságában, egy jövőbeni vizsgálat tervezésénél ajánlott az alkalmazott lókuszokat a vizsgálandó törzsek típusához igazítani.

A különböző genotípusok alfajspecifitása megegyezik korábbi eredményekkel. MAH törzsek között nagyfokú változatosságot figyeltünk meg, míg MAS törzsek között alacsony változatosságot tapasztaltunk.

Az egyes genotípusok széles körű elterjedtsége, évek távlatából való izolálhatósága folyamatos jelenlétüket és extrém környezeti tűrőképességüket bizonyítja. A genotípusok adott területen, vagy azonos térben különböző állatfajokban való jelenléte alátámasztja a fajok közötti átadás, vagy azonos fertőzési forrásból származó fertőződés lehetőségét.

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

MAP törzsek esetén sok olyan állományt találtunk, melyekben több genotípus egyszerre fordult elő. Ez az állatok gyakori cseréjével állt összefüggésben. Az újonnan az állományba érkezett fertőzött egyedek nem csak a MAP környezeti terhelést növelik, de közvetlenül is képesek átadni a kórokozót társaiknak és utódaiknak, melyet a rokon állatok között megfigyelt nagyarányú genotípus egyezés is alátámaszt.

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

Szarvasmarhákban MAS fertőzést eddig csak mesterségesen hoztak létre. A vizsgálatainkban fertőzöttnek talált állatokban ugyanaz a genotípus volt jelen, mely az adott

területen vadállatok között a leggyakoribb volt. A fertőzött állatok legelőn tartott húsmarhák voltak, így vagy a környezetből vették fel a kórokozót, mely feltételezi annak állandó és nagyarányú jelenlétét, vagy a kórokozót hordozó vadállatok révén fertőződtek. Megfigyelésünk, miszerint a házi és vadon élő állatokban egyaránt kimutatott genotípusok esetén a vadállatokban való előfordulási arány tükrözi az egyes genotípusok háziállatokban való jelenlétét, szintén a vadállatok fertőzésfenntartó és -közvetítő, rezervoár szerepére hívja fel a figyelmet. A különböző *Mycobacterium* fajok szilvatikus jelenléte nemcsak a különböző törzsek állományok közötti átadásához járulhat hozzá, de akadályozhatja a mentesítési és gyérítési programok sikerességét. Mindezen megfigyelések kiemelik annak a szükségességét, hogy javított epidemiológiai ellenőrző intézkedésekkel próbáljuk megakadályozni a fertőzés farmok, egyedek, és rezervoár fajok közötti terjedését.

Jelen vizsgálataink eredményeit filogenetikai fán ábráztuk, melyen az egyes genotípusok elhelyezkedése megfelel az alfajok közötti genetikai rokonságnak.

Az általunk használt lókus-összeállítás a korábbi kombinációknál megfigyeltnél magasabb DI értékeket eredményezett, így ajánlható további vizsgálatokhoz.

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

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



## Új tudományos eredmények

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

A *M. avium* fajra és alfajaira vonatkozóan:

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

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

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

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

5. Magyarországon elsőként vizsgáltuk a *M. avium* alfajokat LSP<sup>A</sup>17 jelenlétére, és MIRU–VNTR analízissel.

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

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

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

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

## A témában megjelent tudományos publikációk

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **A témában tartott konferencia prezentációk, szakfolyóiratokban megjelent konferencia összefoglalók**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Rónai, Zs., Cshivincsik, Á., Dán, Á., Jánosi, Sz.: Molecular identification of Hungarian *Mycobacterium Avium* Complex isolates of animal origin, 32<sup>th</sup> Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology – poszter, 2011.
- Eszterbauer, E., Rónai, Zs., Marton, Sz., Ursu, K., Baska, F., Láng, M.: Dissemination of *Mycobacterium spp.* via commercial fish food: *Mycobacterium chelonae* infects Silver carp, European Association of Fish Pathologists 15<sup>th</sup> Conference – poszter, 2011.
- Rónai, Zs., Dán, Á., Dencső, L., Cshivincsik, Á., Jánosi, Sz.: Molecular Methods for the Identification of Mycobacterium Isolates with Animal Origin, Magyar Mikrobiológiai Társaság 16. Nemzetközi Kongresszusa – poszter, 2011.
- Eszterbauer, E., Rónai, Zs., Marton, Sz., Ursu, K., Baska, F., Láng, M.: *Mycobacterium* fajok terjedése kereskedelmi forgalomban kapható fagyasztott haleleségek útján, Halászati Tudományos Tanácskozás, Haki napok – poszter, 2011.
- Cshivincsik, Á., Nagy, G., Svéda, G., Rónai, Zs., Jánosi, Sz.: Gümőkórra gyanút keltő kórbonctani elváltozások vaddisznó-populáción belüli előfordulási arányával összefüggő kockázati tényezők elemzése, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2012.
- Jánosi, Sz., Rónai, Zs., Barta, E., Dénes, B., Lami, E., Dán, Á., Szeredi, L., Erdélyi, K., Gyuranecz, M., Makrai, L., Cshivincsik, Á.: A sertés brucellózis és gümőkór aktuális kérdései, Köves napok – előadás, 2012.
- Jánosi, Sz., Cshivincsik, Á., Rónai, Zs., Rodriguez, S., de Juan, L., Aranaz, A.: Tuberculosis and other mycobacterial infections of wildlife in Hungary, 9<sup>th</sup> Biennial Conference of the European Wildlife Disease Association – poszter, 2012.
- Cshivincsik, Á., Nagy, G., Balog, T., Varga, Gy., Rónai, Zs., Jánosi, Sz.: A populáció-biológiai változások és a gümőkór kórbonctani prevalenciájának összefüggései vaddisznóban, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2014.
- Rónai, Zs., Dán, Á., Cshivincsik, Á., Gyuranecz, M.: Comparative MIRU-VNTR analysis of *Mycobacterium avium* subspecies isolates of veterinary origin, Magyar Mikrobiológiai Társaság 17. Nemzetközi Kongresszusa – poszter, 2015.
- Rónai, Zs., Cshivincsik, Á., Gyuranecz, M., Kreizinger, Zs., Szőgyényi, Zs., Dán, Á., Jánosi, Sz.: *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* törzsek hazai elterjedtsége és MIRU-VNTR elemzése, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2015.
- Cshivincsik, Á., Rónai, Zs., Nagy, G.: "A szarvas az más" - állathigiéniai kihívások és lehetséges megoldásuk az alternatív gazdasági állatfajok tartása során, Magyar Buiatrikus Társaság 26. Nemzetközi Kongresszusa: In Memoriam Kovács Ferenc Nemzetközi Állatorvos és Állattenyésztő Kongresszus. 375 p – 239–242., 2016.
- Cshivincsik, Á., Rónai, Zs., Nagy, G.: One Health approach in free-ranging systems – bovine tuberculosis as a model, 24<sup>th</sup> Int. Symp. "Animal Science Days". Ptuj, Szlovénia, Acta Agriculturae Slovenica Supplement 5: 28–30., 2016.
- Cshivincsik, Á., Rónai, Zs., Nagy, G.: Potential target species for surveillance on a bovine tuberculosis endemic area, VII International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2016". Jahorina, Bosznia-Hercegovina, Book of abstracts. 1226 p – 972., 2016.

## Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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