

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Háziállatokból izolált *Histophilus somni*
törzsek összehasonlító vizsgálata**

PhD értekezés

Készítette:

Dr. Jánosi Katalin

Témavezető: Dr. Fodor László

2009

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

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

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

Dr. Makrai László, egyetemi adjunktus, PhD,
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Készült 8 példányban. Ez az 1. számú példány.

.....

Dr. Jánosi Katalin

Tartalom

1. Összefoglalás	8
2. Summary.....	10
3. Bevezetés	12
4. Célok	13
5. Irodalmi áttekintés.....	14
5.1 A <i>H. somni</i> rendszertani besorolása	14
5.2 A <i>H. somni</i> földrajzi elterjedése	15
5.3 A <i>H. somni</i> állatfajonkénti előfordulása	15
5.4 A <i>H. somni</i> tenyésztése	16
5.5 A <i>H. somni</i> alakja és festődése.....	19
5.6 A <i>H. somni</i> ellenálló képessége.....	20
5.7 A <i>H. somni</i> biokémiai tulajdonságai.....	21
5.7.1 Enzimaktivitás	21
5.7.2 Szénhidrátbontás.....	23
5.7.3 A szénforrás-hasznosítás vizsgálata – anyagcsere-ujjlenyomat	23
5.7.4 Azonosítás fenotípusos tulajdonságok vizsgálatával.....	23
5.8 A <i>H. somni</i> genetikai állományának vizsgálata	24
5.8.1 Pulzáló mezejű gélelektroforézis – a teljes genom vizsgálata	24
5.8.2 A teljes genomszekvencia	24
5.8.3 A genom mintázatának vizsgálata – genom-ujjlenyomat	25
5.8.4 A 16S rRNS és <i>rpoB</i> gének vizsgálata – taxonómiai vizsgálatok.....	25
5.8.5 Azonosítás a 16S rRNS gén vizsgálatával	25
5.9 A <i>H. somni</i> által előidézett legfontosabb kórképek.....	26
5.9.1 A szarvasmarhák légzőszervi megbetegedése.....	27
5.9.2 A szarvasmarhák fertőző thrombotizáló meningoencephalitis	29
5.9.3 A kosok here- és mellékheregyulladására.....	31
5.10 A <i>H. somni</i> virulenciafaktorai	32
5.11 A <i>H. somni</i> jelentősebb antigénjei.....	35
5.12 A <i>H. somni</i> elleni védekezés lehetőségei.....	36
5.12.1 Antibiotikumok alkalmazása	36
5.12.2 Vakcinák alkalmazása.....	37
6. Anyagok és módszerek.....	39
6.1 Mintagyűjtés.....	39
6.1.1 A minták eredete.....	39
6.1.2 A <i>H. somni</i> előfordulásának vizsgálata kecskeállományokban.....	40
6.2 A korábban izolált <i>H. somni</i> törzsek	40
6.3 A <i>H. somni</i> törzsek izolálása, azonosítása	41
6.3.1 A tampon- és szervminták tenyésztéses bakteriológiai vizsgálata	41
6.3.2 A kórokozó azonosítása morfológiai és biokémiai tulajdonságai alapján	41
6.3.3 A törzsek azonosítása szénforrás-hasznosítás alapján	42
6.3.4 A baktérium azonosítása a 16S rDNS részletének vizsgálatával	43
6.4 A <i>H. somni</i> törzsek szénforrás-hasznosításának vizsgálata	45
6.4.1 A szénforrás-hasznosítás alapján vizsgált törzsek.....	45

6.4.2	A <i>H. somni</i> törzsek előkészítése a vizsgálathoz	45
6.4.3	A vizsgálatok eredményei és értékelésük	46
6.5	A <i>H. somni</i> törzsek vizsgálata pulzáló mezejű gélelektroforézissel.....	46
6.5.1	A PFGE-vel vizsgált törzsek	46
6.5.2	A <i>H. somni</i> törzsek emésztése <i>SmaI</i> és <i>Cfr9I (XmaI)</i> restriktív enzimekkel	46
6.5.3	Pulzáló mezejű gélelektroforézis.....	47
6.5.4	Az eredmények dokumentálása és értékelése	47
6.6	A <i>H. somni</i> klinikai és kórtani hatásainak vizsgálata borjak mesterséges fertőzése során....	48
6.6.1	Állatok.....	48
6.6.2	Baktériumtörzsek.....	48
6.6.3	Kísérleti terv	49
6.6.4	A kísérlet során végzett bakteriológiai vizsgálatok.....	50
6.6.5	Klinikai adatok és értékelésük.....	50
6.6.6	Kórbonctani vizsgálatok és értékelésük.....	51
6.6.7	Kórszöveti vizsgálatok és értékelésük.....	51
6.6.8	Statisztikai elemzés.....	51
6.7	A <i>H. somni</i> törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata.....	51
6.7.1	A vizsgálatokba vont <i>H. somni</i> törzsek.....	51
6.7.2	A vizsgálatok menete.....	52
6.7.3	Az eredmények elbírálása, dokumentálása és értékelése	55
7.	Eredmények	56
7.1	<i>H. somni</i> törzsek izolálása kérődzőkből	56
7.1.1	A <i>H. somni</i> törzsek eredete	56
7.1.2	A <i>H. somni</i> előfordulása kecskék genitális nyálkahártyáján.....	56
7.2	A <i>H. somni</i> törzsek azonosítása.....	59
7.2.1	Tenyésztési tulajdonságok.....	59
7.2.2	Morfológiai és biokémiai tulajdonságok.....	59
7.2.3	A törzsek azonosítása szénforrás-hasznosítás alapján	60
7.2.4	Azonosítás a 16S rDNS részletének vizsgálatával	61
7.2.5	A szénforrás-hasznosításon alapuló, valamint a 16S rDNS alapú azonosítás összehasonlítása	61
7.3	A <i>H. somni</i> törzsek szénforrás-hasznosítása	62
7.3.1	A szénforrás-hasznosítási vizsgálatok eredményei	62
7.3.2	A <i>H. somni</i> törzsek szénforrás-hasznosítási mintázatának összehasonlító vizsgálata....	66
7.4	A <i>H. somni</i> törzsek vizsgálata pulzáló mezejű gélelektroforézissel.....	69
7.5	A <i>H. somni</i> klinikai és kórtani hatásainak vizsgálata borjak mesterséges fertőzése során....	71
7.5.1	Állatok.....	71
7.5.2	Baktériumtörzsek.....	71
7.5.3	Klinikai tünetek	71
7.5.4	Kórbonctani vizsgálat	74
7.5.5	Bakteriológiai vizsgálatok.....	75
7.5.6	Kórszöveti vizsgálatok	75
7.6	A <i>H. somni</i> törzsek antibiotikum-érzékenysége.....	76
7.6.1	A vizsgált antibiotikumok minimális gátló koncentrációja (MIC-értéke).....	76
7.6.2	A <i>H. somni</i> törzsek antibiotikum-érzékenységének meghatározása.....	79
8.	Következtetések	80

8.1	A <i>H. somni</i> előfordulása hazai kérődző állományokban	80
8.1.1	Előfordulás hazai szarvasmarha állományokban.....	80
8.1.2	A <i>H. somni</i> előfordulása kecskeállományokban.....	81
8.2	A <i>H. somni</i> törzsek azonosítása.....	82
8.2.1	Tenyésztési tulajdonságok.....	82
8.2.2	Morfológiai és biokémiai tulajdonságok.....	82
8.2.3	A törzsek azonosítása szénforrás-hasznosítás alapján	82
8.2.4	Azonosítás a 16S rDNS részletének vizsgálatával	83
8.2.5	A szénforrás-hasznosítás és a 16S rDNS alapú azonosítás	83
8.3	A <i>H. somni</i> törzsek szénforrás-hasznosításának vizsgálata	83
8.3.1	A különböző eredetű törzsek szénforrás-hasznosítási képessége.....	83
8.3.2	A <i>H. somni</i> törzsek szénforrás-hasznosítási mintázata.....	85
8.4	A <i>H. somni</i> törzsek vizsgálata pulzáló mezejű gélelektroforézissel.....	86
8.5	A <i>H. somni</i> törzsek szénforrás-hasznosítási és PFGE eredményeinek összehasonlítása	86
8.6	A <i>H. somni</i> klinikai és kórtani hatásai borjakban.....	87
8.6.1	Klinikai tünetek	87
8.6.2	Kórbonctani vizsgálatok.....	88
8.6.3	Bakteriológiai vizsgálatok.....	88
8.6.4	Kórszövettani vizsgálatok	88
8.7	A <i>H. somni</i> törzsek antibiotikum-érzékenysége.....	89
8.7.1	A vizsgált antibiotikumok minimális gátló koncentrációja	90
8.7.2	Az antibiotikumok gátló hatásának és a törzsek izolálási időpontjának összefüggései .	92
8.7.3	A <i>H. somni</i> törzsek antibiotikum-érzékenységének meghatározása.....	92
9.	Új tudományos eredmények	93
10.	Irodalom	94
11.	A témában megjelent tudományos publikációk.....	109
12.	Függelék	110
13.	Köszönetnyilvánítás	116

Rövidítések jegyzéke

ÁDI	Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
ÁOTK	Állatorvos-tudományi Kar
ATCC	American Type Culture Collection, Amerikai Típustörzs Gyűjtemény
ÁTKI	Állatorvos-tudományi Kutatóintézet
BHI	brain heart infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRD	bovine respiratory disease; szarvasmarhák légzőszervi megbetegedése
CHEF	contour-clamped homogeneous electric field, rögzített homogén elektromos mezejű gélelektroforézis
CO ₂	szén-dioxid
CSA	csokoládéagar
DD-víz	kétszer desztillált víz
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay; enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok
ERIC	enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence enterobaktériumokból leírt repetitív intergénikus konszenzus szekvencia
GN-FAS	Gram-negative fastidious; Gram-negatív, igényes
HH-csoport	<i>Haemophilus-Histophilus</i> csoport
HMW	high molecular weight; nagy molekulatömegű
ibpA	immunoglobulin-binding protein A
Ig	immunoglobulin
IgBP	immunoglobulin-binding protein, ellenanyag-kötő fehérje
LOS	lipooligoszacharid
MgSzH	Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal
MH	Mueller-Hinton
MIC	minimal inhibitory concentration, minimális gátló koncentráció
MOMP	major OMP; külső fő-membránfehérje
MTA	Magyar Tudományos Akadémia
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information; Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NE	nemzetközi egység
OMP	outer membrane protein; külső membránfehérje
PCR	polymerase chain reaction; polimeráz láncreakció

PFGE	pulzáló mezejű gélelektroforézis (pulsed field gel electrophoresis)
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA; random amplifikált polimorf DNS analízis
rDNS	riboszomális ribonukleinsavat kódoló DNS
REP	repetitive extragenic palindromic; repetitív extragénikus palindrom szekvencia
RNS	ribonukleinsav
rpm	round per minute; percenkénti fordulatszám
rRNS	riboszomális ribonukleinsav
SZIE	Szent István Egyetem
TAE	Tris-acetát-EDTA
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEME	thromboemboliás-meningoencephalitis
Tf	transzferrin
TFE	telepformáló egység
TME	thrombotizáló meningoencephalitis
TNF α	tumor-necrosis factor alpha
UPGMA	unweighted pair group method with arithmetic averages; aritmetikai átlagokkal alkalmazott, súlyozatlan pár-csoport csoport
V-faktor	nikotinamid-adenin-dinukleotid
VFM	veterinary fastidious medium
X-faktor	hemin

1. Összefoglalás

A szerző vizsgálataiban háziállatokból izolált *Histophilus somni* törzsek összehasonlító vizsgálatát végezte el.

Magyarország öt megyéjének 18 településén, 9 szarvasmarha-, valamint 10 kecskeállományban gyűjtött 652 tamponminta vizsgálata során 56 tenyésztési, morfológiai és biokémiai tulajdonságai alapján *H. somni*-nak meghatározott baktériumtörzset izolált. Öt szarvasmarha-állomány vizsgálata alapján a *H. somni* hüvelynyálkahártyán való előfordulásának 10-40%-os gyakoriságát állapította meg. Hús állat 30 napos időközökkel elvégzett négyszeri vizsgálata során, az összesített eredmények alapján a kórokozó előfordulásának 40%-ról 90%-ra való növekedését tapasztalta. Tíz kecskeállomány felmérő vizsgálata során a *H. somni* jelenlétét elsőként igazolta kecskében.

A további vizsgálatokba összesen 100 különböző eredetű *H. somni* törzset vont be, amelyeket a Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményéből, valamint a frissen izolált baktériumtörzsek közül választott ki.

A BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM rendszerével elvégezte a törzsek szénforrás-hasznosításon alapuló azonosítását, amelynek során a rendszer a *H. somni* törzsek 83%-ának, fajszintű meghatározását tette lehetővé. Az eredményeket 15 eltérő eredetű *H. somni* törzs 16S rDNS alapján történt baktériumazonosítással vetette össze, és azt tapasztalta, hogy a rendszer tévesen negatív eredményt adhat, de tévesen pozitív eredmény nem fordult elő a *H. somni* törzsek vizsgálata során.

A BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM rendszerével végzett anyagcsere-ujjlenyomat vizsgálatok eredményeit valamennyi törzs esetében, azok eredetétől függetlenül elemezte, amelynek során azt tapasztalta, hogy az α -D-glükózt és a dextrint a törzsek 100%-a képes volt hasznosítani. A szarvasmarha hüvely eredetű *H. somni* törzsek jellemzésére alkalmasnak találta a törzsek D, L-tejsav hasznosítási képességének vizsgálatát, míg a juh eredetű törzsek esetében a D-mannóz és a turanóz hasznosítási képesség volt a csoportot jellemző tulajdonság.

A *H. somni* törzsek szénforrás-hasznosításának eredményei alapján készített összesített és csoportonként lebontott törzsfá elemzése során, a szarvasmarha hüvely- és juh genitális eredetű izolátumok vizsgálata során több esetben beszámolt azonos állományban előforduló, de fenotípusos tulajdonságait tekintve különböző *H. somni* törzsek jelenlétéről, valamint egy szarvasmarha állományban igazolta két *H. somni* törzs tartós fennmaradását.

A pulzáló mezejű gélelektroforézis vizsgálatok eredményeinek összehasonlító elemzése során szintén igazolta a juh- és szarvasmarha állományokban előforduló eltérő *H. somni* törzsek előfordulását, valamint egy szarvasmarha légzőszervi eredetű törzs tartós fennmaradását is alátámasztotta egy állományban.

A szénforrás-hasznosítási és a PFGE vizsgálatok eredményeinek összevetése során azt tapasztalta, hogy a *H. somni* törzsek anyagsere-ujjlenyomatának elemzése hatékonyan egészítette ki a PFGE vizsgálatok eredményeit. A szénforrás-hasznosításon alapuló vizsgáló módszert, azonos állatfajból származó *H. somni* törzsek járványtani jellemzésében sikeresen alkalmazta.

A kórokozó klinikai és kórtani hatásainak vizsgálata érdekében a természetes fertőzési utat nagymértékben megközelítő, borjak fertőzéséhez sikeresen alkalmazható aeroszolos modellt dolgozott ki. A fertőzött állatok, valamint a kontroll csoport kórbonctani vizsgálata során, ez utóbbi is mutatott kórtani elváltozásokat, ami alapján a kórbonctani vizsgálatot, kiegészítő kórszövettani elemzés nélkül nem javasolta az aeroszolos fertőzési modellek hatékonyságának megítélésére. A fertőzött állatok szervmintáinak 100%-ából kimutatták a kórokozót, míg a kontroll csoport bakteriológiai vizsgálatai minden esetben negatív eredménnyel zárultak. A *H. somni* fertőzés következtében a tüdőben tapasztalható kórbonctani és kórszövettani elváltozásokat Magyarországon elsőként írta le.

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok során a *H. somni* törzsek enrofloxacinnal, florfenikollal, penicillin-G-vel, tetraciklinnel és tilmikozinnal szembeni érzékenységét tapasztalta, míg a gentamicinnel szemben a törzsek közel 30%-ának a mérsékelt érzékenységét állapította meg.

2. Summary

The author carried out the comparative examination of *H. somni* strains isolated from farm animals. She collected 652 swab samples in 9 cattle- and 10 goat flocks of Hungary then isolated 56 bacterial strains identified as *H. somni* on the basis of cultural, morphological and biochemical characteristics. *H. somni* was found to be present in 10-40% on the genital mucous membranes of cattle, the isolation rate increased from 40% to 90% during a four-time, monthly sampling of 20 heifers. She reported the first isolation of *H. somni* from goats.

One hundred *H. somni* strains from fresh clinical isolates and from the culture collection of Department of Microbiology and Infectious Diseases (Szent István University, Faculty of Veterinary Science, Budapest, Hungary) were included in the examinations.

Using the BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM she identified the *H. somni* strains on the basis of the utilisation 95 single carbon sources. The system identified 83% of the examined bacterial strains as *H. somni*. Compared to the results of 15 *H. somni* identified by partial amplification of 16S rDNA, false negative but no false positive ones could be found.

Analysing the metabolic fingerprints of *H. somni* strains there were two carbon sources – dextrin and α -D-glucose – that could be utilised by all of the strains. In the case of bovine vaginal isolates the 100% utilisation ability of D, L-lactic acid was a typical characteristic of the group as well as D-mannose and turanose were in the case of *H. somni* strains isolated from sheep.

Studying the relationships of 100 *H. somni* strains on the dendrogram based on their carbon source utilisation, she found several highly similar strains as well as different ones in certain cattle and sheep flocks. She proved the presence of two persistent respiratory isolates in a cattle stock.

Analysing the cumulative results of pulsed field gel electrophoresis (PFGE) she also confirmed the presence of similar, different and persistent *H. somni* strains in certain cattle and sheep flocks.

Comparing the results of metabolic fingerprinting and PFGE, the methods completed well each other. She adopted the first time the examination of carbon source utilisation for epidemiological characterisation of *H. somni* strains.

For studying the clinical and pathological effect of *H. somni* in calves an aerosol infection method closely resembling the natural way of infection was developed. She applied the method successfully in infecting calves. Pathological examination of infected and control groups showed catarrhal bronchopneumonia in all animals, thus histopathological examination to complete pathological results and evaluate the efficacy of the trial was recommended. In the control group no *H. somni* was isolated in contrast the 100% detection rate in infected groups. She characterised the first time in Hungary the pathological and histological findings of *H. somni* infected calf lungs.

Examining the antimicrobial susceptibility of 40 *H. somni* strains, they were found to be susceptible to enrofloxacin, florfenicol, penicillin-G, tetracycline and tilmicosine in contrast the intermediate susceptibility to gentamicine.

3. Bevezetés

A *Histophilus somni* (korábbi nevén: *Haemophilus somnus*) a *Histophilus* genusba tartozó egyetlen faj, Gram-negatív, igényes, fakultatív patogén baktérium.

A *H. somni* törzsek leggyakrabban szarvasmarhák és juhok felső légúti-, valamint genitális nyálkahártyáin fordulnak elő, változatos helyi jellegű vagy általános megbetegedéseket okozhatnak (Andrews et al., 1985; Hajtós et al., 1986; Kennedy et al., 1958; Panciera et al., 1968), de mindkét faj esetében előfordul tünetmentes hordozás is (Humphrey et al., 1982; Walker és LeaMaster, 1986). A kórokozó által okozott megbetegedések világszerte elterjedtek, előfordulásukról az 1950-es évek közepétől számolnak be külföldi szerzők (Roberts, 1956).

A *H. somni* által előidézett kórképek közül a szarvasmarha légzőszervi megbetegedése és a thromboemboliás-meningoencephalitis (TEME), valamint a növendék kosok mellékhere- és heregyulladására bír a legnagyobb gazdasági jelentőséggel (Griffin, 1997; Lees et al., 1990; Saunders et al., 1980).

A *H. somni* által okozott légzőszervi megbetegedések világszerte előfordulnak, hazánkban a kórkép először 1984-ben került leírásra (Forray et al., 1984). A hazai szarvasmarha-tenyészetekben igen jelentős gazdasági kárt okoznak a légzőszervi megbetegedések, korábbi adatok alapján a veszteségeknek 5-20%-a a szarvasmarhák légzőszervi megbetegedésének-komplexére vezethető vissza (Rusvai et al., 1999), melynek kialakításában a *H. somni* is fontos szerepet tölt be.

4. Célok

Munkánk első célja az volt, hogy a *H. somni* előfordulását vizsgáljuk hazai kecskeállományokban, és elterjedtségét felmérjük a hazai szarvasmarha-állományokban gyűjtött légzőszervi- és hüvelytamponminták vizsgálatával.

A mintagyűjtés során izolált, valamint a SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében elhelyezett *H. somni* törzsek jelentős részének szénforrás-hasznosításon alapuló fajszintű azonosítását, a BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM rendszerének segítségével kívántuk elvégezni. Az anyagcsere-ujjlenyomat vizsgálatok eredményei alapján a vizsgált törzsek hasonlóságát állatfajonkénti eredet szerint, valamint összesítve szándékoztunk elemezni.

Továbbá céljaink közt szerepelt, hogy a szénforrás-hasznosítás alapján vizsgált *H. somni* törzseket a teljes genom makrorestrikciós mintázatának törzsek eredete szerinti, valamint összesített elemzésével jellemezzük.

Az anyagcsere-ujjlenyomat technika és a PFGE módszer összehasonlító elemzésének elvégzése is céljaink között szerepelt.

A *H. somni* klinikai és kórtani hatásait kísérletes borjúfertőzés során kívántuk vizsgálni. A vizsgálataink során egy új, a természetes fertőződés kialakulásához nagymértékben hasonlító fertőzési modell kidolgozását, és a fertőzés következtében kialakult klinikai, kórbonctani és kórszövettani kép részletes jellemzését is célul tűztük ki.

Végül a vizsgálataink során gyűjtött, különböző eredetű *H. somni* törzsek egy részének antibiotikum-érzékenységét standard leves-mikrohígítós eljárás alkalmazásával kívántuk vizsgálni, és a különböző eredetű *H. somni* törzsek eredményeit összehasonlítani.

5. Irodalmi áttekintés

5.1 A *H. somni* rendszertani besorolása

A *Histophilus somni* (*H. somni*) rendszertani besorolása és elnevezése igen hosszú időn át kérdéses volt, a Bergey-féle baktérium rendszertan a „*species incertae sedis*”, azaz bizonytalan helyzetű kórokozók közt említette (Kilian és Biberstein, 1984). A sokáig párhuzamosan használt elnevezések – *Haemophilus somnus*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus agni* – tovább nehezítették a pontos taxonómiai hely meghatározását. A jelenleg használt *H. somni* fajnevet néhány éve fogadták el (Angen et al., 2003), ezt alkalmazza a Bergey-féle baktériumrendszertan legújabb kiadása (Kilian, 2005).

A kórokozó elnevezése már az első esetleírások során is bizonytalan volt. Roberts 1956-ban juh tőgygyulladásból egy addig ismeretlen baktériumfajt izolált, amelyet tenyésztési tulajdonságai alapján egy új, a *Haemophilus* genushoz igen közel álló, de attól CO₂ és növekedési faktorok – X- és V-faktor – iránti igényében eltérő nemzetségbe sorolt. A kórokozót a szövetekben való előfordulása és a gazdafaj alapján *Histophilus ovis*-nak nevezte el.

Két évvel később Kennedy és mtsai. (1958) egy közel 20%-os mortalitással járó bárány septikaemia járvány során több állatból izolálható, tenyésztési és morfológiai tulajdonságai alapján a *Haemophilus* genusba sorolt új baktériumfajt írtak le, amelyet az érintett korcsoport alapján *Haemophilus agni*-nak nevezték el.

1960-ban szintén Kennedy és mtsai. szarvasmarha thromboemboliás-meningoencephalitiséből izolált az előzőekben ismertett kórokozókhoz tenyésztési sajátosságait tekintve nem teljesen, de morfológiailag és szerológiailag igen hasonló *Haemophilus*-szerű mikroorganizmust. A kórokozó *Haemophilus somnus*-nak történő elnevezését később Bailie javasolta (1969), annak ellenére, hogy korábban a szarvasmarha TEMA esetében izolálható mikroorganizmusnak az „*Actinobacillus actinoides*-szerű” elnevezésére tett javaslatot (Bailie et al. 1966).

A fenti kórokozók *Haemophilus* genusba történő besorolása nem pontos, mivel sem X- sem V-faktort nem igényelnek növekedésükhöz (Holt et al., 1984). Stephens és mtsai. (1983) a *Haemophilus* – *Histophilus* (HH-) csoportba tartozó 10 baktériumtörzs tenyésztési, morfológiai, biokémiai, szerológiai, valamint citokémiai kapcsolatainak vizsgálata során igen nagymértékű fenotípusos hasonlóságot találtak a törzsek között, amely alapján a HH-csoportba tartozó mikroorganizmusok egy új, önálló genusba sorolását javasolták. De Ley és mtsai. (1990) DNS-rRNS hibridizációs vizsgálataik alapján a *Pasteurellaceae* család *Haemophilus*, *Pasteurella* és

Actinobacillus csoportjától elkülönülő *Histophilus* genusba sorolták a HH-csoportba tartozó mikroorganizmusokat.

A 16S rRNS és *rpoB* gének szekvencia analízisével Angen és mtsai. (2003) egyértelműen bizonyították, hogy a korábban *H. somnus*-nak, *H. agni*-nak, valamint *H. ovis*-nak nevezett baktériumfajok a *Pasteurellaceae* család, *Histophilus* genusába sorolt egyetlen fajt képviselik, amelynek a *H. somni* nevet javasolták. A *H. somni* jelenlegi rendszertani besorolása a következő (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Eubacteria>):

Baktériumok országa

Proteobaktériumok törzse

Gammaproteobaktériumok osztálya

Pasteurellales rend

Pasteurellaceae család

Histophilus nemzetség

Típus faj: *Histophilus somni* – Angen et al., 2003. (Szinonimái: *Haemophilus ovis* – Mitchell, 1925; *Histophilus ovis* – Roberts, 1956; *Haemophilus agni* – Kennedy et al., 1958; *Haemophilus somnus* – Bailie, 1969; *Haemophilus somnifer* – Miles et al., 1972.).

Az értekezés során a jelenleg elfogadott fajnevet, a *Histophilus somni*-t fogom használni.

5.2 A *H. somni* földrajzi elterjedése

A kórokozó által okozott megbetegedések világszerte elterjedtek, előfordulásukról az 1950-es évek közepétől számolnak be külföldi szerzők. Az első igazoltan *H. somni* kórtani szerepére visszavezethető eset leírása Ausztráliából származik (Roberts, 1956), bár ugyanebben az évben korábban, Colorado államban (Amerikai Egyesült Államok) is beszámoltak valószínűsíthetően *H. somni* kóroktanú megbetegedésekről (Griner et al. 1956). A következő évtizedben Új-Zélandon (Kater et al., 1962) és az Egyesült Államokban számos esetet leírtak (Kennedy et al., 1958; Kennedy et al., 1960; Bailie et al., 1966; Panciera et al., 1968). Az 1970-es években Kanadában (Van Dreumel et al., 1970), Európában (Pritchard és MacLeod, 1977) és Afrikában is (Van Tonder, 1979) beszámoltak *H. somni* kóroktanú megbetegedésekről. Hazánkban a kórokozót Forray és mtsai. írták le először 1984-ben.

5.3 A *H. somni* állatfajonkénti előfordulása

A *H. somni* törzsek leggyakrabban szarvasmarhák és juhok felső légúti-, valamint genitális nyálkahártyáin fordulnak elő, változatos helyi jellegű vagy általános megbetegedéseket okozhatnak

(Andrews et al., 1985; Hajtós et al., 1986; Kennedy et al., 1958; Panciera et al., 1968), de mindkét faj esetében előfordul tünetmentes hordozás is (Humphrey et al., 1982; Walker és LeaMaster, 1986). Más háziállatfajban a kórokozó előfordulását ezidáig nem igazolták. A kórokozó előfordul amerikai bölényben (*Bison bison*) (Dyer, 2001) és kanadai vadjuhban (*Ovis canadensis nelsoni*) is (Ward et al., 2006).

5.4 A *H. somni* tenyésztése

A *H. somni* igényes, lassan szaporodó, közepes hőmérsékleti tartományt és CO₂ jelenlétét kedvelő mikroorganizmus.

A tenyésztéséhez használható optimális szilárd táptalaj meghatározása érdekében számos vizsgálatot végeztek. Brewer és mtsai. (1985) az 5% juhvért, 5% ló vérszérumot és 0,5% élesztőkivonatot tartalmazó BHI agar használatát javasolták. A gyakorlatban általánosan az 5% borjúvért (Tegtmeier et al., 1999b; Ward et al., 2006) vagy 5% juhvért (Ward et al., 1999) tartalmazó Columbia véresagart illetve BHI agart (Ward et al., 1995) használnak. A 10% defibrinált szarvasmarhavért és élesztőkivonatot tartalmazó véresagar (Hajtós et al., 1986), valamint a 7-10% szarvasmarha- vagy juhvérrel kiegészített véresagar 80°C-on 20 percig történő hőkezelése után nyert CSA (Barrow és Feltham, 1993) is igen jó eredménnyel használható *H. somni* törzsek tenyésztéséhez (Prescott és Yielding, 1990; Stephens et al., 1983).

A *H. somni* törzsek levestáptalajokban is szaporíthatók. Webb (1983a) 10% juh-vérszérummal kiegészített tripton- vagy peptonleves sikeres alkalmazását írta le. A 10% szarvasmarha-vérsavót és élesztőkivonatot tartalmazó BHI levesben több szerző is a baktérium szaporodásáról számolt be (Brewer et al., 1985; Forray et al., 1984). Merino és Biberstein (1982) a *H. somni* növekedési igényeinek vizsgálata során a kiegészítés nélküli triptózleves alkalmasnak találta a baktérium folyamatos tenyésztéséhez. Napjainkban a kórokozó levestáptalajban történő gyors szaporításához, az igényes mikroorganizmusok tenyésztéséhez kifejlesztett nemzetközi standard táptalaj (veterinary fastidious medium – VFM) alkalmazását javasolják (NCCLS, M31-A2, 2002).

A kórokozó közepes hőmérsékleti tartományt kedvel, tenyésztése normál testhőmérsékleten, 37°C-on történik. Webb (1983a) 17 *H. somni* törzs vizsgálata során sem 22°C-on, sem 45°C-on nem tapasztalt baktériumnövekedést, míg Stephens és munkacsoportja. (1983) 22°C hőmérsékleten néhány törzs esetében apró, tűszúrásnyi telepek képződését figyelte meg.

A *H. somni* törzseket 5% (McDermott et al., 2001), 8% (Panciera et al., 1968) vagy 10% (Tegtmeier et al., 2000a) CO₂ jelenlétében tenyésztik, amely többnyire kedvezően hat a baktériumok szaporodására. A mikroorganizmus aerob körülmények között tapasztalt növekedéséről azonban ellentmondásos szakirodalmi adatok találhatók. Van Dreumel és mtsai. (1970), valamint Higgins és

munkacsoportja (1981) a primer tenyészetekben nem, de az első továbboltások során aerotoleranciát figyelt meg, míg Kennedy és mtsai. (1960) által a hasonló elváltozásokból izolált törzsek normál légköri körülményekhez történő alkalmazkodása csak hosszabb idő után alakult ki. Ezzel szemben Forray és munkacsoportja (1984) a kórokozó első magyarországi izolálása során primer tenyészetek aerobiosisát figyelte meg, de beszámolt a CO₂ ugyanazon törzsek növekedésére kifejtett jótékony hatásáról is. McDowell és mtsai. (1994) gyenge növekedést tapasztaltak aerob és anaerob körülmények között is. Egyes *H. somni* törzsek növekedése azonban független volt a légkör CO₂-tartalmától (Ward et al., 2006).

A *H. somni* lassan növekedő mikroorganizmus, inkubációs ideje általában 48 óra, az agarlemezek vizsgálata a 16., 24., 40. és 48. órában (Saunders et al., 2007, Swanepoel, 1984; Tegtmeier et al., 2000a; Ward et al., 2006) javasolt. Kórbonctani mintákból származó primer tenyészetek vizsgálata során, azonban három (Szalay et al., 1994) vagy akár hét napos (Hajtós et al., 1986; Brewer et al., 1985) tenyésztési időt is alkalmaztak. Forray és mtsai. (1984), valamint Brewer és mtsai. (1985) levestáptalajokban 24-48 órás inkubáció után finom zavarosodásról számolnak be, míg McDermott és munkacsoportja (2001) VFM alkalmazása esetén a vizsgálataikba vont izolátumok optimális szaporodását tapasztalta már 24 óra elteltével.

A *H. somni* nem tenyészthető közönséges agaron (Pritchard és MacLeod, 1977; Webb, 1983a), valamint MacConkey táptalajon (Forray et al., 1984; Ward et al., 2006). Stephens és munkacsoportja (1983) az 1 µg/ml tiamin-monofoszfáttal kiegészített MacConkey-, citrát-, urea- és triple sugar iron táptalajokon sem tapasztalt baktériumnövekedést.

Levestáptalajok közül a *H. somni* tenyésztéséhez nem alkalmas a közönséges leves, a pepton- (Merino és Biberstein, 1982) illetve triptonleves még 1%-os glükóz-kiegészítéssel sem (Webb, 1983a). Számos esetben a baktériumtörzsek az 1 µg/ml tiamin-monofoszfáttal kiegészített proteóz-peptonlevesben sem szaporodtak, ha dextróz helyett más cukorforrást tartalmazott a táptalaj (Stephens et al., 1983).

A H. somni növekedéshez szükséges kiegészítő anyagok

A *H. somni* első izolálásai során azt tapasztalták, hogy a kórokozó nem képes növekedni vért, egyéb testfolyadékot vagy állati eredetű kiegészítő anyagot nem tartalmazó táptalajon (Roberts, 1956), azonban növekedéséhez nem igényel sem X-, sem V-faktort, amit már Kennedy és mtsai. (1960) is bizonyítottak. Amussen és Baugh (1981) a NAD-dal vagy heminnel kiegészített, valamint kiegészítő anyagot nem tartalmazó BHI levesekben szignifikáns különbséget nem állapított meg a baktériumnövekedésben. Későbbi vizsgálatok a kórokozó önálló porfirin-szintézisét bizonyították (Stephens et al., 1983).

Számos tanulmány vizsgálta a kórokozó egyéb növekedési faktorok iránti igényét, amelyek során abszolút növekedési faktorként az uracilt (Inzana és Corbeil, 1987) határozták meg, emellett a megvizsgálták a mesterséges körülmények közti szaporodást serkentő, további kiegészítő anyagok hatásait is. A tiamin-pirofoszfát és tiamin-monofoszfát szignifikáns serkentő hatását tapasztalták, míg a foszfátalt formái nélkül, csak tiammal kiegészített táptalajban minimális baktériumszaporodást sem láttak (Amussen és Baugh, 1983). Ugyanezen tanulmány eredményei az L-cisztin és L-cisztein növekedésre gyakorolt jótékony hatását nem támasztották alá, míg Merino és Biberstein (1982), valamint Inzana és Corbeil (1987), a két aminosavat szükségesnek találta az optimális növekedéshez, ők azonban a tiamin-pirofoszfát serkentő hatását nem tapasztalták. A táptalajok tenyésztés előtti és utáni aminosav-analízise nem állapította meg sem az L-cisztin, sem az L-cisztein csökkenését, így valószínűsíthető, hogy nem tápanyagként, hanem a környezeti tényezők kedvező alakításával serkentik a *H. somni* növekedését (Humphrey és Stephens, 1983).

Telepmorfológia és pigmenttermelés

A megfelelő tenyésztési eljárásokat alkalmazva, a *H. somni* 24 órás inkubációs idő után apró, tűszúrásnyi, kerek, csillogó, szürkés-fehéres vagy áttetsző telepeket képez (Hajtós et al., 1986; Pritchard és MacLeod, 1977; Roberts, 1956; Szalay et al., 1994; Stephens et al., 1983). További 48-72 óra elteltével nagyobb, 1-1,5 mm átmérőjű, ellapult, kissé egyenetlen szélű, kiemelkedő közepű „tükrötjás” jellegű, vajkonzisztenciájú, jellegzetesen sárga pigmentálságú telepek láthatók a *H. somni* törzsek tiszta tenyészeiben (Hajtós et al., 1986; Kennedy et al., 1960; Szalay et al., 1994; Webb, 1983a).

Egyes szerzők beszámoltak szintenyészeikben hasadt telepmorfológiájú *H. somni* törzsekről. Az eltérő méretű telepek megjelenését az adott törzs normál légköri körülményekhez történő adaptációja során valószínűsíthetően bekövetkezett mutációval (Bailie, 1969) vagy a táptalaj megváltozott összetételével magyarázták (Brewer et al., 1985). Nivard és mtsai. (1982) csirkeembrió fertőzési kísérletek során, az elhalt embriókból visszaizolált *H. somni* törzs kétszeresen vagy háromszorosan hasadt telepmorfológiáját tapasztalta, amely tulajdonságát a baktériumtörzs számos átoltás után is stabilan megtartotta. A három telepvariáns megjelenését a fertőzés során bekövetkezett virulencia-változással magyarázták.

A *H. somni* törzsek jellegzetesen sárga, a táptalaj közegébe nem diffundáló pigmentje nem minden törzs esetében azonos intenzitású. Ward és mtsai. (2006) 1-től (fehér) 5-ig (citromsárga) terjedő skálán pontozta az eltérő eredetű törzsek színét, amelynek során a juh eredetű törzsek minden esetben világosabb sárgának bizonyultak, mint a szarvasmarha eredetűek.

Hemolizáló képesség

A *H. somni* törzsek hemolizáló képességük tekintetében eltérőek lehetnek (Angen et al., 2003): α -hemolízis (Forray et al., 1984; Pritchard és MacLeod, 1977; Szalay et al., 1994; Swanepoel, 1984; Van Dreumel et al., 1970; Van Dreumel és Kierstead, 1975; Ward et al., 2006), β -hemolízis (Higgins et al., 1987; Szalay et al., 1994) és a hemolízis hiánya (McEwen és Hulland, 1985; Panciera et al., 1968; Van Tonder, 1979; Ward et al., 2006) egyaránt előfordulhat. Eltérő állatfajból származó vörösvérsejtet tartalmazó táptalajok esetében egyazon törzs hemolizáló képessége is eltéréseket mutathat, Ward és mtsai. (2006) 13 *H. somni* törzs vizsgálata során 9 esetben a juhvért tartalmazó táptalaj enyhe feltisztulását tapasztalta, míg szarvasmarhavért tartalmazó táptalajon csak egy törzs okozott gyenge hemolízist.

Szelektív táptalajok

A kórokozó igényessége és érzékenysége miatt a szelektív táptalajok kialakítása és alkalmazása igen nagy körültekintést igényel, több esetben beszámoltak a kifejlesztett táptalaj alkalmatlanságáról (Kwiecien és Little, 1989). Brewer és mtsai. (1985) egy, a *H. somni* izolálására alkalmas szelektív táptalaj kifejlesztése során a törzsek 40 antibiotikummal és 12 antibiotikum-kombinációval szembeni érzékenységét, 12 festék három hígításának, valamint 7 egyéb kiegészítő anyagnak a törzsekre kifejtett hatását vizsgálta. A vizsgálatok eredményei alapján a 100 $\mu\text{g/ml}$ ciklohexamiddal és 3 $\mu\text{g/ml}$ linkomicinnel kiegészített, 5% juhvért, 5% ló vérszérumot és 0,5% élesztőkivonatot tartalmazó agar bizonyult a legérzékenyebbnek. Slee és Stephens vizsgálatai (1985) során az 5 $\mu\text{g/ml}$ vankomicint, 5 $\mu\text{g/ml}$ neomicint, 50 $\mu\text{g/ml}$ Na-azidot, 100 NE/ml nisztatint, 100 $\mu\text{g/ml}$ ciklohexamidot és 5% lóvért tartalmazó agar használatakor több mint 10%-kal magasabb arányban izolálták vegyes mintákból a kórokozót, mint gátlóanyagokat nem tartalmazó juhvéres agar használata esetén.

5.5 *A H. somni* alakja és festődése

A *Histophilus* genusba Gram-negatív, Ziehl-Neelsen és Stamp festési eljárás szerint nem festődő, nem mozgó, apró – 1-3 $\mu\text{m} \times 0,5-0,6 \mu\text{m}$ – pálcika vagy coccus alakú baktériumok tartoznak (Angen et al., 2003; Hajtós et al., 1986).

A *H. somni* törzsek fiatal (20-24 órás) tenyészeiből vagy kórbonctani anyagból készült kenetekben szabályos, párhuzamos oldalú, lekerekedett végű pálcikák láthatók (Webb, 1983a). A 48 órás tenyészetekből készült kenetekben vaskosabb – 0,6-0,7 μm átmérőjű – coccoid pálcákat, valamint elkeskenyedő végű, kissé hajlott tengelyű, fonalszerű – akár 6 μm hosszúságú – alakokat (Roberts 1956; Ward et al., 1984) is lehet látni. A tiamin-pirofoszfáttal kiegészített BHI levesben tenyésztve kifejezett fonálképződés tapasztalható, akár 8-15 pálcából álló láncok is létrejöhetnek

(Amussen és Baugh, 1981). Bipoláris festődést Van Dreumel és mtsai. (1970) tapasztaltak szarvasmarha eredetű törzsek esetében, azonban Webb (1983a) juhból származó izolátumoknál sem bipoláris festődést, sem metakrómás szemcséket nem írt le.

Hiss-technikával festett kenetekben a baktériumok körül vékony burokhhoz hasonló zóna látható (Miller et al., 1975), a burok jelenlétét azonban sem Garcia-Delgado és mtsai. (1977) ugyanazon technikával végzett vizsgálatait, sem elektronmikroszkópos vizsgálatok nem támasztották alá *in vitro* (Stephens és Little, 1981; Ward et al., 1984). A kórokozó buroktermelését *in vivo* sem tudta igazolni Tegtemier és munkacsoportja (1999a) *H. somni*-val fertőzött szövetek transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatait során. A baktériumok csillót, pilust és spórát nem képeznek (Angen et al., 2003; Tegtemier et al., 1999a; Ward et al., 1984).

5.6 A *H. somni* ellenálló képessége

A *H. somni* ellenálló képessége igen gyenge. A környezeti túlélőképesség vizsgálata érdekében Dewey és Little (1984) szarvasmarha eredetű testnedvekben és váladékokban szuszpendált baktériumok életképességét vizsgálta a hőmérséklet, valamint az idő függvényében és azt tapasztalta, hogy szobahőmérsékleten, orrváladékban közel 75 napig, míg hüvelyváladékban 5 napig életképes a kórokozó. A baktérium túlélése normál testhőmérsékleten orrváladékban, míg alacsony hőmérsékleten hüvelyváladékban volt a leghosszabb. Jansen (1983) vizsgálatait során nedves alomanyag-törmelékben, szobahőmérsékleten két napig élt túl a *H. somni*.

Brewer és mtsai. (1985) vizsgálataiban a *H. somni*-t tartalmazó tamponminták szállító táptalajban, illetve kiegészítő anyagot nem tartalmazó agargélben történő tárolás esetén a kórokozó túlélése 4°C-on legalább 72 órán át biztosított volt. Ugyanebben a tanulmányban a Stuart (1959) által igényes kórokozók szállítására kialakított és Amies (1967) által továbbfejlesztett szállító táptalajok használatakor a *H. somni* az első 48 órában hűtés nélkül is túlélte, ugyanakkor hűtve tárolás esetén több mint 6 napig visszaizolálható volt a kórokozó.

Laboratóriumi körülmények között –70°C-on és 37°C-on szarvasmarha teljes vérben, vérplazmában és cerebrospinalis folyadékban, valamint 23,5°C-on teljes vérben történő tárolásakor a kórokozó több mint 75 napig túlélte. Cerebrospinalis folyadékban szuszpendálva –196°C-on, folyékony nitrogénben legalább 56 napig túlélte a kórokozó, azonban ezen a hőmérsékleten eltérő arányban tojássárgáját, zselatint, glicerint vagy tej-állománynövelőt alkalmaztak krioprotektív anyagként (Dewey és Little, 1984).

5.7 A *H. somni* biokémiai tulajdonságai

A *H. somni* biokémiai tulajdonságainak vizsgálata a kórokozó igényessége és érzékenysége miatt számos esetben nehézségeket okoz. A klasszikus biokémiai vizsgálómódszerek alkalmazása során általában az anyagcsere-folyamatok során képződött termékeket – például savakat – mutatják ki (Barrow és Feltham, 1993), azonban az olyan érzékeny mikroorganizmusok esetében, mint a *H. somni*, a baktérium anyagcseréjét környezetének kismértékű változása is gátolhatja, megakadályozva ezzel az alacsony koncentrációban jelen lévő termékek kimutatását. A témában található szakirodalmi adatok is számos esetben ellentmondásosak (Webb, 1983a; Stephens et al., 1983), azt azonban, hogy az eltéréseket a vizsgálómódszerek hiányosságai vagy valóban a vizsgált törzsek közti különbségek eredményezték, kiegészítő vizsgálatok során nem elemezték. A *H. somni* biokémiai tulajdonságait vizsgáló tanulmányok összesített adatait az **1. táblázat** tartalmazza.

5.7.1 Enzimaktivitás

A szakirodalmi adatok alapján a vizsgált *H. somni* törzsek a nitrátot nitritté ($\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$) redukálják és rendelkeznek citokróm-oxidáz C enzimmel, bár Webb (1983a) 17 juh eredetű *H. somni* törzs mindegyikében az utóbbi enzim hiányát állapította meg. Annak ellenére, hogy a Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt et al., 1994) kilencedik kiadása eltérő eredményeket közölt a *H. somni* törzsek indoltermelő képességével kapcsolatban, a szakirodalomban csak Stephens és munkacsoportja (1983) írt le ehhez hasonló különbségeket, így feltételezhető, hogy a szerzők által alkalmazott kevésbé érzékeny vizsgálómódszerek következtében tapasztalták egyes törzsek esetében az indoltermelés hiányát (**1. táblázat**).

A *H. somni* törzsek nem rendelkeztek kataláz, ureáz, lizin-dekarboxiláz és arginin-dihidroláz enzimmel, az ornitin-dekarboxiláz enzim és dihidrogén-szulfid (H_2S) termelése tekintetében pedig eltérő adatokat közöltek az áttekintett közlemények.

Groom és munkatársai (1986) 95 különböző eredetű *H. somni* törzs API ZYM (bioMérieux, Franciaország) rendszerrel végzett vizsgálata során a leucin-aminopeptidáz és a α -glükuronidáz enzim jelenlétét a törzsek 100%-ában tapasztalták, a savas-foszfátáz enzim a vizsgált törzsek több mint 70%-ában, míg a foszfoamidáz enzim csupán 17%-ban volt kimutatható. Ezzel szemben, Cousins és Lloyd (1988) 30 *H. somni* törzs szintén API ZYM rendszerrel végzett vizsgálata során a foszfoamidáz enzim jelenlétét minden esetben kimutatta.

1. táblázat. *A H. somni* biokémiai tulajdonságai szakirodalmi adatok alapján

	Bergey ^a 1994	Garcia-D. 1977	Stephens ^c 1983	Webb ^d 1983a	Forray ^e 1984	Hajtós ^f 1986	Szalay ^g 1994	Ward ^h 2006	Összesítés
Kataláz	-	-	-	-	-	-	-	N	-
Oxidáz	+	+	+	-	+	+	+	N	+
Nitrát-redukció	+	+	+	+	+	+	+	N	+
H₂S-termelés	N	+	+	-	-	-	-	N	+/-
Indol-termelés	+/-	+	+/-	+	+	+	+	N	+
Ureáz	+/-	-	N	-	-	N	-	N	-
Metilvörös	N	-	N	-	-	-	N	N	-
Voges-Proskauer	N	-	N	-	-	-	N	N	-
Ornitin-dekarboxiláz	+/-	-	N	+	N	-	-	+	+/-
Lizin-dekarboxiláz	-	-	N	-	N	-	-	N	-
Arginin-dihidroláz	-	-	N	-	N	-	-	N	-
O/F teszt	N	F	F	F	F	F	F	N	F
D-glükóz	+	+	N	+	+	+	N	N	+
dulcitol	+/-	-	N	-	N	-	N	-	+/-
fruktóz	+	+/-	N	+	N	+	N	N	+
D-galaktóz	+/-	N	N	+	N	-	N	N	+/-
laktóz	-	-	N	-	-	-	N	N	-
maltóz	+	+	N	+/-	+	+	N	N	+
D-mannit	+	+	N	+	+	+	N	+	+
D-mannóz	+/-	+	N	+	+	N	N	N	+
raffinóz	-	-	N	-	-	-	N	N	-
L-ramnóz	-	-	N	+/-	-	-	N	N	-
D-szorbit	+/-	+	N	+	+	+	N	+	+
szaharóz	-	-	N	-	-	-	N	-	-
trehalóz	+/-	+	N	-	-	-	N	N	+
D-xilóz	+	+	N	+	+	+/-	N	+	+

+ = 90–100%; +/- = 11–89%; - = 0–10%; N = nem vizsgált, O/F teszt = oxidatív-fermentatív teszt; F = fermentatív,

^aHolt et al., 1994;

^cStephens et al., 1983;

^eForray et al., 1984;

^gSzalay et al., 1994;

^bGarcia-Delgado et al., 1977;

^dWebb, 1983a;

^fHajtós et al., 1986;

^hWard et al., 2006.

5.7.2 Szénhidrátbontás

Az **1. táblázat**ban összesített szakirodalmi adatok alapján a D-glükózt és a D-mannitot a vizsgált törzsek mindegyike, míg a fruktózt, maltózt, D-mannózt, D-szorbitot, trehalózt és D-xilózt a törzsek többsége bontotta savképződés közben. A dulcít, D-galaktózt, valamint L-ramnózt esetében változó eredményeket közöltek, a laktózt, raffinózt, és szacharózt egyetlen törzs sem bontotta a vizsgált közlemények adatai alapján.

5.7.3 A szénforrás-hasznosítás vizsgálata – anyagcsere-ujjlenyomat

A BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM (Biolog Inc. Hayward, Kanada) rendszere egyszerre 95-féle egyedüli szénforrás hasznosításának elemzése alapján a vizsgált baktériumtörzsről anyagcsere-ujjlenyomatot készít.

A rendszert sikeresen alkalmazták állatorvosi patogén baktériumok jellemzésére (Wong et al., 1992; Gyuranecz et al., 2009), azonban *H. somni* törzsek szénforrás-hasznosítási mintázatáról adatok nem állnak rendelkezésre.

5.7.4 Azonosítás fenotípusos tulajdonságok vizsgálatával

A *H. somni* genus-szinten történő azonosítása a gyakorlatban a tenyésztési, morfológiai és biokémiai tulajdonságai alapján lehetséges (Odugbo et al., 2008; Tegtmeyer et al., 2000a).

A fajszenen történő azonosításhoz és a rendszertanilag közel álló genusokba tartozó fajoktól – pl.: *Actinobacillus* – való elkülönítéshez az APY ZYM (bioMérieux, Franciaország) rendszer sikeresen használható (Groom et al., 1986; Cousins és Lloyd, 1988), mivel a *H. somni* törzsek által termelt enzimek mintázata a fajra jellemző, valamint az eredmények reprodukálhatók.

Salmon és mtsai. (1993) vizsgálatai alapján a *Haemophilus* és *Neisseria* nemzetségekbe tartozó, humán megbetegedéseket okozó fajok meghatározására alkalmas RapID NH rendszer (Innovative Diagnostics, Atlanta, Ga.) adatbázisának kismértékű módosítása alkalmassá tenné a rendszert a *H. somni* fajszenintű meghatározására.

A BIOLOG MICROSTATION ID™ SYSTEM (Biolog, Ca) által készített anyagcsere-ujjlenyomat alapján a vizsgált baktériumtörzs fajszenintű azonosítása lehetséges (Gyuranecz et al., 2009), a *H. somni* törzsek BIOLOG rendszerrel végzett fajszenintű meghatározásáról szakirodalmi adatok nem állnak rendelkezésre.

5.8 A *H. somni* genetikai állományának vizsgálata

5.8.1 Pulzáló mezejű gélelektroforézis – a teljes genom vizsgálata

A teljes genom makrorestrikciós mintázatának vizsgálata PFGE alkalmazását teszi szükségessé (Soll, 2000). A PFGE eukarióták esetén (Schwartz és Cantor, 1984) a kromoszómák méret-polimorfizmusa, prokarióták esetén (Kardos és Kiss, 2005) pedig a genomban megtalálható restrikciós hasítási helyek megléte vagy hiánya alapján vizsgálja az izolátumok genetikai hasonlóságát. Mint a legtöbb jelenleg alkalmazott tipizáló módszer, így a PFGE is alkalmas a mintázatok közti eltérések és hasonlóságok alapján a vizsgált izolátumok közti genetikai rokonság vizsgálatára, de filogenetikai és rendszertani következtetések nem vonhatók le (Riley, 2004). Előnye számos más DNS alapú elemző módszerhez képest, hogy kiváló laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatósággal rendelkezik (Birren és Lai, 1993).

Az elektródák száma és elhelyezkedése alapján a PFGE számos típusa ismert, a legáltalánosabban alkalmazott módszer a rögzített homogén elektromos mezejű (CHEF) gélelektroforézis, amelynek során 24 hexagonálisan elrendezett elektróda alakítja ki az elektromos erőteret és hozza létre annak változásait (Chu et al., 1986).

A *H. somni* PFGE módszerrel végzett teljes genom vizsgálatáról kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre. St. Michael és mtsai. (2005) egy szarvasmarha tüdőgyulladásból származó *H. somni* törzset (2336) és annak egyszeri borjúoltással felerősített változatát (738) vizsgálta PFGE-vel, a törzsek *SmaI* restrikciós enzimmel végzett emésztése után.

A *SmaI* endonukleázzal nem emészthető baktériumtörzseket a *Cfr9I* enzim, az *SmaI* metilációra nem érzékeny izoschizomerje emészti (Silva-Costa et al., 2006).

5.8.2 A teljes genomszekvencia

Challacombe és mtsai. (2007) egy nem virulens, szarvasmarha tasak eredetű *H. somni* (129Pt) törzs, egy nem virulens *Haemophilus influenzae* (*H. i.* Rd) törzs és egy virulens *Haemophilus ducrei* (*H. d.* 35000HP) törzs teljes genom szekvenciájának vizsgálata során számos közös gén mellett, több a *H. somni*-ban egyedülállóan előforduló a szénhidrát- és aminosav metabolizmusban, a LOS-, az ubiquinon- és a menaquinon bioszintézisében, valamint a kation- és elektron transzportban szerepet játszó gén jelenlétét bizonyították.

Ugyanebben a tanulmányban a *H. somni* 129Pt törzs szénhidrát metabolizmusában 94, míg aminosav metabolizmusában 58 gén szerepét igazolták. A vizsgált *H. somni* törzs a purin bioszintézisére képes, a pirimidin bioszintéziséhez szükséges enzimek génjeivel azonban nem rendelkezik, ami magyarázatot ad a törzsek uracil igényére (Inzana és Corbeil, 1987). Az ubiquinon és menaquinon szintéziséhez szükséges enzimeket kódoló génszakaszok megtalálhatók a *H. somni*

129Pt törzs genomjában, míg a NAD *de novo* L-aszparaginsavból történő szintézishez szükséges enzimeké nem, ami igazolja Inzana és Corbeil (1987) korábbi tapasztalatait, hogy a *H. somni* törzsek optimális növekedéséhez szükséges a táptalajba adagolt nikotinamid.

5.8.3 A genom mintázatának vizsgálata – genom-ujjlenyomat

A PCR-eljáráson alapuló módszerek nem a genetikai állomány egészét vizsgálják, hanem annak egyes specifikus részeit, amelyek alapján lehetséges az adott mikroorganizmus azonosítása.

Azonosítása a teljes genom mintázatának vizsgálatával

Myers és munkacsoportja (1993) RAPD-PCR eljárással összesen 18 – 16 szarvasmarha és 2 juh eredetű – *H. somni* törzs genetikai állományát vizsgálta. Eredményeik alapján a vizsgáló módszert a *H. somni* egyéb, hozzá hasonló és kórtani jelentőséggel bíró baktériumoktól való elkülönítéséhez ajánlják.

Appuhamy és mtsai. (1997) 23 szarvasmarha és 2 juh eredetű *H. somni* törzs PCR ribotipizálással, valamint REP- és ERIC-PCR eljárással végzett vizsgálata alapján a törzseket típusokba sorolták. A REP- és ERIC-PCR módszerek komplexebb genommintázatot és több típust eredményeztek, míg a PCR ribotipizálás során kisebb számú, de kifejezetten elkülönülő típusokat azonosítottak. Mindhárom eljárás alkalmazásával igazolható volt a *H. somni* törzsek *Pasteurellaceae* családon belüli elkülönült helyzete, ugyanakkor lehetőség nyílt a juh és szarvasmarha, valamint a légzőszervi és genitális eredetű törzsek megkülönböztetésére is.

5.8.4 A 16S rRNS és *rpoB* gének vizsgálata – taxonómiai vizsgálatok

A *H. somni* pontos rendszertani helyzetének meghatározása érdekében Angen és mtsai. (2003) 19 különböző eredetű *H. somni* törzs 16S rRNS génjét vizsgálták. A 16S rDNS egy 1257 bp hosszúságú szakaszának bázissorrendje alapján törzsfát készítettek, amely alapján a *Pasteurellaceae* családon belül a törzsek elkülönült helyzetét állapították meg. Az *rpoB* gén részletének szekvenciái alapján készült törzsfá szintén a *H. somni* törzsek elkülönült helyzetét jelezte.

Későbbi vizsgálatok során (Tanaka et al., 2005) a 16S rRNS és *rpoB* gének vizsgálata hasonló eredményekkel zárult, azonban a szarvasmarha és juh eredetű *H. somni* törzsek *rpoB* génrészleteinek szekvenciája két bázis tekintetében következetesen eltért, amely különbség egy *HincII* endonukleáz felismerési helyet eredményezett a juh eredetű törzsek 85%-ában. A szerzők a *HincII* enzimmel végzett hasítási tesztet a juh és szarvasmarha eredetű törzsek elkülönítéséhez ajánlották.

5.8.5 Azonosítás a 16S rRNS gén vizsgálatával

A 16S rRNS gén egy konzervatív genetikai állomány, amely igen jellemző az adott mikroorganizmusra, így kiválóan alkalmazható a baktériumok fajsinten történő azonosítására.

Angen és mtsai. (1998) az általuk tervezett HS-453F (5'-GAAGGCGATTAGTTTAAGAG-3') és HS-860R (5'-GAAGGCGATTAGTTTAAGAG-3') primerekkel a 16S rDNS egy 400 bp hosszúságú szakaszának amplifikálására alkalmas *H. somni* specifikus PCR eljárást dolgozott ki, amelynek segítségével tiszta tenyészetek, valamint a kórokozót átlagosan 3,3 TFE mennyiségben tartalmazó, egyéb légzőszervi kórokozókkal erősen szennyezett tenyészetek vizsgálata során is kimutatható volt a *H. somni*. A kidolgozott PCR módszert széles körben alkalmazzák a *H. somni* fajsztíntú azonosításában (Tegtmeier et al., 2000).

Saunders és munkacsoportja (2007) a HS-860R primert a 16S rRNS gén szintén egy igen konzervatív szakszára tervezett HS-756R (5'-ACTCGAGCGTCAGTATCTTC-3') primerrel helyettesítette a *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis*, és *H. somni* juh ondóból történő kimutatására szolgáló multiplex PCR eljárás kidolgozása során. A vizsgáló módszer alkalmasnak bizonyult a *H. somni* egyes mintákból történő kimutatására, keresztreakciók kialakulását nem tapasztalták.

5.9 A *H. somni* által előidézett legfontosabb kórképek

Szarvasmarhában a *H. somni* thromboemboliás-meningoencephalitist (Kennedy et al., 1960; Szalay et al., 1994), tüdőgyulladást, esetenként mellhártyagyulladást (Andrews et al., 1985; Blackall et al., 2007), méhgyulladást (Miller et al., 1983), vetélést (Van Dreumet és Kierstead, 1975; Chladek, 1975) és tőgygyulladást (Higgins et al., 1987) okozhat. A kórokozó által előidézett septikaemia következtében kialakulhat ízületgyulladás (Panciera et al., 1968), szív- (Guichon et al., 1988) és vázizomgyulladás (Janzen, 1987) egyaránt. Kórtani szerepe bizonyított szarvasmarha fibrines-gennyes agyhártyagyulladásában, valamint következményes, gennyes közép- és belsőfülgulladásában (McEwen és Hulland, 1985). A fenti kórképeken kívül gyakori a nyálkahártyákon történő tünetmentes hordozás is (Humphrey et al., 1982).

Juhban a *H. somni* septikaemiát (Kennedy et al., 1958), agyhártyagyulladást (Lees et al., 1994), tőgygyulladást (Roberts, 1956), sokizületi gyulladást és neonatális veszteségeket okozhat, valamint kimutatták bárányok májelhalásából, plexus chorioideus gyulladásából és szívizomelhalásából is (Rahaley és White, 1977). A baktérium kóroktani szerepét fiatal kosok mellékheregyulladásában (Low és Graham, 1985; Saunders et al., 2007), anyajuhok vetelésében (Hajtós, 1987), valamint hüvelygyulladásában (Ball et al., 1991) is igazolták és beszámoltak a *H. somni* nemi utakban történő tünetmentes hordozásáról is (Walker és LeaMaster, 1986).

A kórokozó előfordul amerikai bölényben (*Bison bison*) (Dyer, 2001) és kanadai vadjuhban (*Ovis canadensis nelsoni*) is (Ward et al., 2006).

A *H. somni* által előidézett kórképek közül a szarvasmarha légzőszervi megbetegedése és TEME, valamint a növendék kosok here- és mellékheregyulladására bír a legnagyobb gazdasági jelentőséggel (Griffin, 1997; Lees et al., 1990; Saunders et al., 1980).

5.9.1 A szarvasmarhák légzőszervi megbetegedése

A *H. somni* által okozott légzőszervi megbetegedések világszerte előfordulnak. A baktérium oktatni szerepét szarvasmarhák tüdőgyulladásában Európában (Pritchard és MacLeod, 1977), Észak-Amerikában (Andrews et al., 1985) és Ausztráliában (Lancaster et al., 1984) is több, mint 20 éve igazolták. Hazánkban a kórkép először 1984-ben került leírásra (Furray et al., 1984).

A hazai szarvasmarha-tenyészetekben igen jelentős gazdasági kárt okoznak a légzőszervi megbetegedések (BRD-komplex), korábbi adatok alapján a veszteségeknek 5-20%-a a BRD-komplexre vezethető vissza (Rusvai et al., 1999). A *H. somni* kóroktani szerepe országonként eltérő mértékű, míg Dániában a leggyakoribb légzőszervi patogén (Tegtmeier et al., 1999b), addig Finnországban csupán 10 esetet írtak le 1994 és 2004 között (Härtel et al., 2004). Kanada húsmarha állományában a borjúelhullások jelentős hányada (43%-a) a *H. somni* által előidézett kórképekre vezethető vissza (Van Donkersgoed et al., 1990).

A *H. somni* okozta tüdőgyulladások klinikai tüneteit a megemelkedett testhőmérséklet, savós orrfolyás, könnyezés, emelkedett légzésszám, felerősödött légzési zörejek, köhögés, nehezített légzés, az állat levertsége, étvágytalansága és kondícióromlása jellemzi (Pritchard és MacLeod, 1977; Furray et al., 1984).

Andrews és munkacsoportja (1985) 68, tisztán *H. somni* fertőzésre visszavezethető, természetes eset kórbonctani és kórszövettani vizsgálatát végezte el. Makroszkóposan minden esetben a tüdő cranioventralis területein szürke-szürkésvörös, lobularis kiterjedésű színváltozást, valamint a kis légutakban váladék-felhalmozódást tapasztaltak. Számos esetben az érintett tüdőterületek apró tályogokat tartalmaztak, valamint az esetek több mint 30%-ában a nem érintett caudodorsalis tüdőterületek húsos tapintatúnak bizonyultak, vesiculo-alveolaris, septalis vagy subpleuralis emphysemával tarkítva. Az esetek többségét a mediastinalis és tracheobronchialis nyirokcsomók enyhe oedemája kísérte. A mellhártya két esetben mutatott érintettséget, heveny fibrines pleuritis formájában. Kórszövettani vizsgálattal az esetek 54,4%-ában gennyes bronchiolitis és bronchopneumonia került megállapításra, amelyet a bronchiolaris exsudatum és bronchusfalak kifejezett elhalása jellemzett, míg 34,4%-ban minimális elhalással kísért bronchiolitist és bronchopneumoniát állapítottak meg. Bryson és mtsai. (1990) 32 természetes eset vizsgálata során, az Andrews és mtsai. (1985) által leírt kórbonctani képpel nagymértékben egyező makroszkópos elváltozásokat észlelt, kórszövettanilag az esetek 68%-ában elhalásos, míg 25%-ában gennyes bronchiolitis dominált a kórszövettani vizsgálatban.

A mesterséges fertőzések alapvető fontosságúak a *H. somni* által előidézett tüdőelváltozások kórfejlődésének, kórbonctanának és kórszövettanának tanulmányozásában. A szakirodalomban számos leírás található *H. somni*-val végzett mesterséges fertőzésekről, amelyek során intratrachealis (Groom és Little, 1988; Groom et al., 1988; Jackson et al., 1987; Pritchard et al., 1979; Silva és Little, 1990), intrabronchialis (Gogolewski et al., 1987a; Gogolewski et al., 1987b; Potgieter et al., 1988; Widders et al., 1986), intravénás (Nayar et al., 1977; Pritchard et al., 1979; Stephens et al., 1981a; Widders et al., 1986), valamint intraperitoneális (Pritchard et al., 1979) fertőzési modelleket alkalmaztak. A leírt módszerek megbízhatók és reprodukálhatók, azonban alkalmazásuk során a kórokozót a természetes fertőződési úttól jelentősen eltérő módon került a fertőzött szervezetbe. Csupán néhány tanulmány készült (Nayar et al., 1977; Tegtmeier et al., 2000b) aeroszolos fertőzési modell alkalmazásáról, amely kísérletek alacsony állatlétszámmal zajlottak, valamint a módszer hatékonyságát alátámasztó kórbonctani és kórszövetteni vizsgálatok részlegesen voltak vagy teljesen hiányoztak.

Gogolewski és munkacsoportja (1987a) *H. somni*-val intrabronchialis fertőzött borjakat, amelyek következtében mérsékelt depressziót, esetenként köhögést és enyhe mértékű testhőmérséklet-emelkedést tapasztalt, míg Groom és mtsai. (1988) által végzett intrabronchialis fertőzést követően a rektális hőmérséklet szignifikáns emelkedését nem tapasztalták, csupán légzésszám-emelkedésről számoltak be. Korábbi aeroszolos fertőzési kísérletek (Nayar et al., 1977; Tegtmeier et al., 2000b) során egymásnak ellentmondó klinikai tapasztalatokról számoltak be a szerzők.

Jackson és munkacsoportja (1987) hat előkezeletlen és hat dexamethazonnal (0,1 mg/ttkg adagban) előkezelt borjút intratrachealisán átlagosan $2-8 \times 10^{10}$ TFE *H. somni*-val fertőzött. A fertőzést követő tizenkettedik napon végzett kórbonctani vizsgálat során minden esetben a tüdő cranioventralis területein lilászörös-szürke színváltozást, gennyes bronchitist, esetenként multifokális tályogképződést, az elváltozott területek felett diffúz fibrines pleuritist, valamint a peribronchialis nyirokcsomók oedemáját tapasztalták. A kórszövetteni képet minden esetben fibrines-gennyes bronchiolitis, valamint tályogképződés jellemezte, amelyet esetenként multifokális bronchushám-fekélyesedés és a bronchiolusok fibrines elzáródása kísért. Az elváltozott területek nyirokerei fibrines-sejtes törmelékekkel voltak telve. A kísérlet tizenkét napos megfigyelési időszaka alatt a dexametazonnal előkezelt állatok közül kettő elhullott.

Gogolewski és mtsai. (1987b) kilenc, hagyományosan tartott 6-12 hetes borjút fertőzött $10^6 - 10^8$ TFE-t tartalmazó *H. somni* szuszpenzióval, a tüdő caudalis lebenyének hátsó részéig levezetett nasotrachealis tubus segítségével. A fertőzés utáni 24. órában végzett kórbonctani vizsgálatok során az elváltozások a fertőzés helyének megfelelően, a hátsó tüdőterületeken jelentkeztek, ahol a duzzadt, sötétvörös területekkel tarkázott, közepesen tömött tapintatú hátsó lebenyben az

interlobularis sövetek kifejezett oedemája volt tapasztalható. A mikroszkopikus elváltozások a természetes esetek során leírtakkal (Andrews et al., 1985) megegyeztek. Fontos kiemelni azonban, hogy a kis erek gyulladását sokkal gyakrabban tapasztalták a kísérletesen előidézett heveny elváltozások kezdeti szakaszának vizsgálatakor, mint a természetes esetek során. Annak ellenére, hogy korábban a *H. somni* által előidézett érgyulladások kialakulását immunkomplexek lerakódásával magyarázták (Stephens et al., 1981a), Gogolewski és munkatársai (1987b) többnyire neutrophil granulocytás érgyulladást tapasztaltak és a kórokozó antigénjeit immunperoxidáz technikával sem tudták az érfalakban kimutatni.

5.9.2 A szarvasmarhák fertőző thrombotizáló meningoencephalitis

A szarvasmarhák fertőző TME kórképét először 1956-ban Colorado államban (Amerikai Egyesült Államok) írták le (Griner et al., 1956), de a *H. somni* kóroktani szerepét ekkor még igazolni nem tudták. Négy évvel később Kennedy és mtsai. (1960) egy sporadikus elhullásokkal kezdődő, majd öt hónapig elhúzódó, megközelítően 400 állatot érintő és 75 állat elhullását okozó járványból egy általuk *Haemophilus* genusba sorolt, igényes Gram-negatív, apró coccobacillust izoláltak.

A kórkép számos elnevezése közül a leggyakrabban használt a TME, amely azonban nem pontos megnevezés, mert valójában nem baktérium-embolusok haladnak a vérpályában, hanem a *H. somni* és LOS-ja által aktivált trombocyták az endothelsejtek apoptózisát idézik elő, amely kulcsfontosságú szerepet játszik az érgyulladás és thrombosis kialakulásában (Kuckleburg et al., 2005), ezért inkább a thrombotizáló meningoencephalitis (TME) a kórképet helyesen leíró elnevezés.

A TME leggyakrabban ősszel és tél elején jelentkezik (Bailie et al., 1966; Saunders et al., 1980) növendék, 4-12 hónapos kórú hízómarhákban, de előfordulásáról beszámoltak tejelő állományokban is (Saunders et al., 1980). Egy 1969 és 1978 közötti időszakban, Nyugat-Kanadában készült tanulmány alapján 838 esetből 759-et TME-ként diagnosztizáltak (Saunders et al., 1980), napjainkban azonban a *H. somni* által előidézett légzőszervi megbetegedések sokkal nagyobb gazdasági kártételt okoznak, mint a TME (Welsh et al., 2004). Hazánkban a TME előfordulását először Szalay és mtsai. (1994) írták le.

A TME megjelenését az állományban általában néhány hirtelen elhullott vagy moribund állat jelzi (Kennedy et al., 1960). A betegség kezdeti szakaszában a rektális hőmérséklet emelkedését az idegrendszeri tünetek széles skálája kísérheti – depresszió, kötött mozgás, a propiocepció kiesése és következetes ataxia –, valamint étvágytalanság jellemzi az állatokat. A betegség előrehaladtával az idegrendszeri tünetek kifejezetté válnak körmozgás, fejrázás, kancsalság, szemrengés és vakság jelentkezhet, az állatok elesnek, segítség nélkül képtelenek felkelni (Bailie et al., 1966), végül

bénulás következik be, majd az állatok csillagvizsgáló fejtartásban elhullnak (Griner et al., 1956; Kennedy et al., 1960; Stephens et al., 1981a).

A megközelítően 12 órán át tartó kezdeti stádiumban a gyógykezelés még sikeres lehet, de a kifejezett idegrendszeri tünetek kialakulása után az állat menthetetlen (Stephens et al., 1981b). Az állományt ellátó állatorvost a fenti tünetek mellett a diagnózisban segítheti a nem minden esetben előforduló, de diagnosztikai értékű vérzések megjelenése a retinán (Dukes et al., 1971).

A kórbonctani vizsgálat során az agyvelő elváltozásai jellegzetesek és kórtani értékűek: a zavaros, átlátszatlan, sokszor véres cerebrospinalis folyadék mennyisége megszorodott, különböző átmérőjű (0,1 – 4 cm) szürkés vöröses-barna, vérzéses-elhalásos góccok találhatók az agyvelő felületén és állományában, valamint fibrines-gennyes agyhártyagyulladás látható. A szívburkon, a nyelőcső nyálkahártyáján, a vázizmokban látható pontszerű vagy kissé kiterjedtebb vérzések, valamint a vese vérzéses-elhalásos gócai és a nagy ízületek megnövekedett mennyiségű synovialis folyadék tartalma szintén a kórképre jellemző elváltozások (Griner et al., 1956; Kennedy et al., 1960; Stephens et al., 1981a).

Az agyvelő kórszövettani vizsgálatával minden esetben, a szürke- és fehérállományban kiterjedten a kis erek gyulladása, thrombosis és következményes infarktus tapasztalható, az elhalt érfalakban és szövetekben pedig kifejezett neutrophil granulocytás beszűrődés, valamint baktériumcsoportok láthatók (Little, 1986).

A TME kórbonctanának és kórfejlődésének tanulmányozásában elengedhetetlenül fontosak a kísérleti állatfertőzések, amelyek azonban sok esetben nehézségekbe ütköztek a kórkép gyenge reprodukálhatósága miatt (Stephens et al., 1981b).

Kennedy és mtsai. (1960) által kilenc intravénásan fertőzött borjú közül öt állat (55,6%) 24-96 órán belül a TME jellegzetes tünetei között elhullott, azonban intraperitonealis, intranasalis és ocularis fertőzési modellek alkalmazásával nem tudták reprodukálni a betegségre jellemző tüneteket.

Nayar és munkacsoportja (1977) négy borjú 9×10^7 - $1,8 \times 10^8$ TFE *H. somni*-val végzett intravénás fertőzése során két borjú (50%) hullott el 24 illetve 72 órán belül túlhevény septikaemia tünetei között. A kórbonctani vizsgálat során mindkét állatban a TME-re jellemző elváltozásokat találtak, allergiás reakció kialakulását pedig vérvizsgálati eredményekkel (alacsony eosinophil granulocytaszám) kizárták.

A Stephens és mtsai. (1981a) 23 borjún végzett kísérleti fertőzése során 16 (70%) állat hullott el, vagy extermináltak a hosszú agónia miatt. Az intravénás fertőzéshez használt 8025 *H. somni* (ATCC-43625) törzset borjún végzett egyszeri passzázzsal erősítették fel, ami valószínűsíti, hogy a korábbi kísérletek a gyengébb virulenciájú baktériumtörzsek alkalmazása miatt eredményeztek alacsonyabb reprodukálhatóságot.

5.9.3 A kosok here- és mellékheregyulladásása

A fiatal kosok *H. somni* okozta here- és mellékheregyulladását Új-Zélandon (Bruere et al., 1977), Európában (Low és Graham, 1985), Ausztráliában (Webb, 1983b), Afrikában (Jansen, 1983) és az Egyesült Államokban (Bulgin és Anderson, 1983) már több mint 20 éve leírták, valamint a kórkép jelen van Kanadában is (Lees et al., 1990). Az európai kontinensen 1986-ban Hajtós és mtsai. írták le először a megbetegedést. Korábbi, az Amerikai Egyesült Államokban (Idaho állam) végzett tanulmányok eredményei azt mutatják, hogy a *H. somni* a vizsgált 6 hónapos korú növendék kosok és jerek többségében jelen volt a genitális traktusban (Walker és LeaMaster, 1986), míg egy Kanada Ontario és Alberta tartományában végzett felmérés eredményei alapján a központi fedezettő állomásra kerülő, 50 napos kosbárányok közel 10%-ának tasakjában jelen volt a kórokozó (Lees et al., 1990).

A kosok *H. somni* okozta mellékhere- és heregyulladását az állatok étvágytalansága, bágyadsága, valamint emelkedett testhőmérséklete kíséri, a herezacskók megnagyobbodtak, kifejezetten duzzadtak, forrók, fájdalmasak (Low és Graham, 1985) és feszesen hullámzó tapintatúak (Hajtós et al., 1986), esetenként sipolyjárat képződik, amelyből véres-gennyes váladék ürül (Webb, 1983b). Az elváltozások érinthetik csak az egyik oldali mellékherét (Low és Graham, 1985; Webb, 1983b), de kétoldali here- és mellékheregyulladás is lehetséges (Hajtós et al., 1986).

A kórbonctani vizsgálat során az elváltozott területeken a herezacskó oedemáját, a tunica vaginalis falai és zsigeri lemezei, valamint a tunica dartos közötti fibrózis összenövését és jelentős megvastagodást tapasztaltak. A herék és mellékherék metszéspapjára nagy mennyiségű, világoszöldesszürke, szagtalan, törmelékes váladék ürült, az állományukban pedig számos, nagyméretű – akár tyúktojásnyi – sárgászöldes gennyet és spermatozoákból összeállt rögöket tartalmazó tályogok voltak. A herékben az elváltozások inkább a mediastinumban voltak, míg a mellékherékben az állományban elszórtan jelentkeztek, valamint elhúzódó esetben a vasa deferentia falai fibrózussá váltak és eltömődtek (Hajtós et al., 1986; Webb, 1983b).

Kórszöveti vizsgálattal a korai esetekben, a mellékhere csatornácskáiban főként polimorfonukleáris (PMN) sejteket tartalmazó gyulladással exsudatumot és levált hámsejteket, valamint az interstitium következményes mononuclearis sejtes beszűrődését írták le. Idült esetekben az interstitium súlyos fokú, elhalásos gyulladással és fibrosisát tapasztalták. A Gram-szerint festett kenetekben a mellékherék csatornácskáiban és a tályogok gennyes tartalmában számos pleomorf coccobacillus volt látható (Hajtós et al., 1986; Webb, 1983b).

Jansen (1983) nyolc juhállományban vizsgálta a genitális fertőzések előfordulásának, az alkalmazott tartástechnológiának, valamint a kosok tasakalakulásának összefüggéseit, és vizsgálatai során megállapította, hogy az intenzíven, kis helyen tartott, sokat fekvő kosok esetében sokkal

gyakrabban fordult elő heveny heregyulladás. A kosok anatómiai adottságainak vizsgálatakor a kevésbé szoros, kissé függő tasakkal rendelkező állatok esetében gyakrabban fordult elő a tasaknyílás sérülése, kifekélyesedése, ami lehetőséget adhatott a felszálló fertőzés kialakulására (Jansen, 1983), azonban Webb (1983b) *H. somni*-t tartalmazó szuszpenzióval végzett 15 perces tartó tasaköblítéssel nem tudta ascendáló fertőzés kialakulását elősegíteni. Ez utóbbi kísérletben, *H. somni*-t tartalmazó szuszpenzió herébe történő injektálása után enyhe gyulladás, majd tályog alakult ki, míg a mellékhere fertőzésével a természetes úton kialakuló mellékhergyulladásához igen hasonló klinikai és kórbonctani elváltozásokat tapasztalt a szerző.

5.10 A *H. somni* virulenciafaktorai

Az immunoglobulin-kötő felületi fehérjék, szérumrezisztencia

A *H. somni* virulenciával összefüggő tulajdonságai közül kiemelt jelentősége van a kórokozó szarvasmarhából származó friss vérérszék baktericid hatásaival szembeni ellenálló képességének (Corbeil et al., 1985). A klinikai esetekből, valamint a tünetmentes állatok hüvelyéből izolált *H. somni* törzsek közel mindegyike, míg a tünetmentes hordozó bikák tasakjából származó törzsek 75%-a bizonyult szérumrezisztensnek (Corbeil et al., 1985), amely tulajdonságuk következetesen összefüggött az Ig Fc-doménkötő aktivitásukkal (Widders et al., 1989), valamint egy HMW (~120-350 kDa molekula tömegű) p120 és egy 76 kDa molekula tömegű (p76) antigén meglétével (Cole et al., 1992), amelyek a szarvasmarha IgG2 alosztályának Fc-doménjét kötik (Yarnall et al., 1988). Tagawa és munkacsoportja (2005) vizsgálatai során kiderült, hogy a p76 és HMW IgBP-eket egyetlen, igen nagyméretű (> 12 000 bp) nyitott leolvasási keret, az *ibpA* kódolja. Az eredmények alátámasztják, hogy az IgBP-k hozzájárulnak a *H. somni* törzsek szérumrezisztenciájához, de a mechanizmus még nem teljesen tisztázott (Corbeil, 2007).

A H. somni hatása a phagocytafunkciókra

Az opsonizált *H. somni*-t szarvasmarha neutrophil granulocytái rövid idő alatt phagocytálták, azonban elpusztítani nem tudták, amire magyarázatot adhat a bekebelezés során felszabaduló reakív oxigén-metabolitok csökkent mennyisége (Czuprynski és Hamilton, 1985). Lederer és mtsai. (1987) bizonyították, hogy a kórokozót az alveolaris macrophagok és a monocyták is bekebelezik anélkül, hogy képesek lennének elpusztítani azt, sőt a baktérium a monocytákban szaporodni is képes volt, ezért a *H. somni*-t fakultatív intracellularis patogén kórokozónak tekintették. Későbbi vizsgálatok azonban igazolták, hogy a baktérium-macrophag kölcsönhatás eredményeképpen az utóbbiak elfajulása következik be (Gogolewski et al., 1987b), ami inkább a kórokozó normál macrophagokban történő szaporodási ciklusokkal megszakított, extracellularis jelenlétét támasztja alá (Corbeil, 2007). Gomis és mtsai. (1997) vizsgálataiban, a szaporodásának log-fázisában levő *H.*

somni képes volt a monocyták phagocytáló funkcióját csökkenteni *in vitro*. A monocytákban sejtmembránhoz kapcsolódott vakuólumokban túlélő és szaporodni képes kórokozó teljes eliminációját még az antimicrobiális mechanizmusok cytokinekkal (TNF α , gamma-interferon) vagy *Escherichia coli* (*E. coli*) lipopoliszachariddal történő aktiválásával sem lehetett kiváltani (Gomis et al., 1998).

A kórokozó lipooligoszacharidja – LOS

Az IgBP-k mellett a kórokozó LOS-ja is egy igen fontos virulenciafaktor (Inzana et al., 1988). A *H. somni* LOS lipid A részének kémiai összetétele szinte teljesen megegyezik az *E. coli* J5 törzs lipid A frakciójának összetételével, míg az oligoszacharid részé eltér attól (Inzana et al., 1988), amelyet általában a 3-deoxy-D-manno-2-karboxioktulóz savat, heptózt, foszfátot és foszfoetanolamint tartalmazó belső-, valamint a galaktózt, glükózt, hexóزامint és foszforilkolint tartalmazó külső magra lehet felosztani (Cox et al., 1998). A gazdaszervezet immunválaszának elkerülése érdekében a *H. somni* folyamatosan változtatja LOS összetételét, amely változások a szelektív nyomás hatására egyre véletlenszerűbbé válnak (Inzana et al., 1992).

A fázisváltás során megváltozik a LOS oligoszacharid szerkezete, amelynek kialakulásában a *lobI* génben ismétlődő 5'-CAAT-3' szekvenciák számának megváltozása mellett számos más gén is szerepet játszhat (McQuiston et al., 2000). A klinikai izolátumok igen nagy arányban (12%) és akár egy baktériumtelepen belül (Inzana et al., 1997) is képesek fázisváltásra, míg a tünetmentes hordozó állatokból származó *H. somni* törzsekben a LOS oligoszacharid szerkezete változatlan (Inzana et al., 1992).

Howard és mtsai (2000) klinikai esetekből izolált *H. somni* törzsek LOS külső magjának oligoszacharid építőpjait vizsgálva, nagyfokú törzsek közötti és törzsön belüli heterogenitást tapasztalt, míg a belső mag építőpjai konzervatívnak bizonyultak. Ugyanebben a tanulmányban a *H. somni* 2336 törzs borjún egyszer passzált variánsának (*H. somni* 738) a LOS külső mag foszforilkolinhoz kapcsolódó fázisváltását tapasztalták, míg a *H. somni* 2336 törzs oligoszacharidjának belső magjából a foszforilkolin hiányzott (St. Michael et al., 2005). Az egymáshoz igen közel álló két törzs közötti jelentős különbség jelzi, hogy a *H. somni* igen hatékonyan alkalmazza a fázisváltást a gazdaszervezethez történő adaptációja során (St. Michael et al., 2005).

Az avirulens *H. somni* törzsek esetében nem, de a virulens törzsek esetében megfigyelhető volt az N-acetil-neuraminsav LOS glikolizációs módosulataihoz való kapcsolódása (szialilálása), amely fokozta a baktériumok normál és immunizált szérummal szembeni ellenálló képességét, valamint csökkentette az ellenanyagok kötődését (Inzana et al., 2002).

A *H. somni* egyéb virulenciával összefüggő tulajdonságai

A *H. somni* endothelsejtekhez történő tapadásának kezdeti lépése során a baktérium nagy molekulatömegű heparinkötő fehérjéje az endothelsejtek szulfatált glükózaminoglikán rétegéhez kapcsolódik (Behling-Kelly et al., 2006), a tapadást a virulens és avirulens *H. somni* törzsek esetében egyaránt szignifikánsan serkenti az endothelsejtek TNF- α -val történő aktiválása (Kwiecien et al., 1994), amely mediátort maguk az endothelsejtek is képesek termelni (Behling-Kelly et al., 2006). A *H. somni* endothelsejt-adhéziójában szerepet játszik még a baktérium által kifejezett IbpA fehérje, amelyben heparin- és szénhidrátkötő szakaszok meglétét bizonyították (Tagawa et al., 2005). A tapadás során a *H. somni* és hőstabil virulenciafaktora, a sejtfalában található LOS-ja (Sylte et al., 2001) a thrombocytákat aktiválja (Kuckleburg et al., 2005), aminek hatására az endothelsejtek felületükön adhéziós molekulákat fejeznek ki, valamint gyulladáshoz vezető mediátorokat termelnek (monocytá chemotaktikus protein-1, macrophag inflammatory protein-1 α , interleukin-1 β) (Kuckleburg et al., 2008), végül az endothelsejtek kromatinállományának tömörülése és sejthalál következik be (Sylte et al., 2001). Az ismertetett mechanizmusok a *H. somni* által előidézett kórképekre igen jellemző érgyulladás és thrombosis kialakulásában jelentős szerepet töltenek be (Kuckleburg et al., 2008).

A *H. somni* LOS az endothel sejtek károsítása mellett a cisztein proteázok (kaspáz-3, -8, -9) aktiválására is képes (Sylte et al., 2003), ugyanebben a tanulmányban a szerzők igazolták, hogy a kaspáz-3 aktiválás és az endothelsejt apoptózis kaspáz-8 függő folyamat.

Ruby és mtsai. (2002) igazolták a hisztamin jelenlétét a *H. somni*-ban, valamint kimutatták a baktérium hisztamin-eltávolító képességét is.

A *H. somni* szarvasmarha-, juh- vagy kecske Tf-ek jelenlétében, vashiányos közegben, két elkülönülő Tf-kötő receptort fejez ki felületén (Ekins et al., 2004), az egyik receptor a szarvasmarha Tf-ekre, míg a másik az egyéb kérődző fajokból származó Tf-ekre specifikus. A kórokozó a növekedéséhez szükséges vas felvételéhez képes a környezetében fellelhető kérődző eredetű Tf-eket felhasználni, ezért a termelt Tf-receptor specificitását minden esetben a jelenlévő Tf-ek minősége határozza meg (Ekins et al., 2004).

Sandal és mtsai. (2007) által vizsgált összes *H. somni* törzs képes volt többnyire poliszacharidokból, fehérjékből és nukleinsavakból álló extracelluláris polimer állomány (biofilm) termelésére. Az avirulens törzsek torony- vagy fonalszerű sejtcsoportok és extracelluláris mátrix összefonódásából létrejött vékony biofilm rétegével szemben, a virulens törzsek által termelt biofilm mély vízcsatornákat tartalmazó, amorf extracelluláris mátrixba ágyazott vastag, homogén dombszerű mikrotelepekből állt, ami szelekciós előnyt jelenthet a szisztémás megbetegedést okozó törzsek számára (Sandal et al., 2007).

5.11 A *H. somni* jelentősebb antigénjei

A *H. somni* külső membrán fehérjéi (OMP) közül a gazdaszervezet szempontjából a 40 kDa molekulatömegű (40p) antigén bír a legnagyobb jelentőséggel, mivel az ellene termelődött ellenanyagok passzív védelmet biztosítanak a kórokozó által okozott tüdőgyulladás szemben (Gogolewski et al., 1987a). Az immundomináns p40 antigén részletes vizsgálata során Corbeil és mtsai. (1991) egy kisebb molekulatömegű p39 antigén jelenlétét is leírták, amely a *H. somni*-ra igen jellemző, valamint az ellene termelt ellenanyagok keresztreakciót más baktériumfajjal nem adnak, ezért alkalmasnak találták immundiagnosztikai antigénnek. A p40 fehérje szintén igen konzervatívnak bizonyult virulens és avirulens *H. somni* törzsek esetében is (Silva et al., 1995), ugyanakkor az anti-p40 szérum védőhatása, valamint a *Pasteurellaceae* családba tartozó számos egyéb kórokozóval adott keresztreakciója következtében, alkalmas lehet a BRD-komplex elleni vakcinák egyik antigén-komponensének (Corbeil et al., 1991).

Virulens és avirulens *H. somni* törzsek nem immuneredetű Ig-kötő képességének vizsgálata során Widders és mtsai. (1989) csak a tünetmentes hordozó bikák tasakjából származó izolátumok esetében tapasztalta Fc-kötő aktivitás hiányát. A többi vizsgált törzs esetében az Fc-kötő képesség egy 41 kDa molekulatömegű MOMP jelenlétével függött össze, míg a kötőképesség hiánya esetén egy csonkolt 33 kDa méretű fehérjét lehetett minden esetben kimutatni (Widders et al., 1989). A *H. somni* Fc-kötő képessége összefüggésben áll a törzsek szérumrezisztenciájával (Widders et al., 1989). Gogolewski és munkacsoportja (1987a) vizsgálatai során az MOMP nem bizonyult immunreaktívnek, azonban későbbi vizsgálatok igazolták, hogy az IgE felismeri (Corbeil et al., 2006).

Tagawa és mtsai. (1993a; 1993b) további két, rekonvaleszcens szérum által felismert *H. somni* OMP jelenlétét igazolták. A 37 kDa molekulatömegű, hőre módosuló fehérje a *H. somni* törzsek közös antigénje (Tagawa et al., 1993a), míg a 17,5 kDa OMP egy sejtfelületen kifejezett epitopja a *H. somni* törzsek között igen konzervatív és azokra specifikus (Tagawa et al., 1993b). Ezen fehérjék gazdaszervezet immunválaszára gyakorolt hatása azonban még nem ismert (Corbeil, 2007).

Az immunhisztokémiai módszereket egyre szélesebb körben alkalmazzák a kórokozó jelenlétének szövetekben történő kimutatására (Haritani et al., 1990; Haines et al., 2004). Tegtmeyer és mtsai. (1995) a *H. somni* szomatikus antigénjének azonosítására peroxidáz-antiperoxidáz (PAP) technikát dolgozott ki, amelynek segítségével sikeresen lehetett a kórokozót azonosítani még azokban a szövetmintákban is, amelyekben a tenyésztéses bakteriológiai vizsgálat negatív eredménnyel zárult.

A kórokozó kimutatása szerológiai módszerekkel

Az elmúlt több mint 30 évben számos szerológiai próba alkalmasságát vizsgálták a *H. somni* ellen képződött ellenanyagok kimutatására (Canto et al., 1983; Cho et al., 2008; Garcia-Delgado et al.,

1977; Martin et al., 1998; O'Connor et al., 2001; Sanfaçon et al., 1983; Stefaniak, 1993; Stephens et al., 1981a; Tekes és Hajtós, 1990; Thomson et al., 1990; Walker et al., 1988). Kezdetben a hőkezelt *H. somni* teljes sejt antigénjét alkalmazták agglutinációs próbák végzésére (Garcia-Delgado et al., 1977; Stephens et al., 1981a), majd Canto és mtsai. (1983) a *H. somni* azonosításához ELISA vizsgálatok során a kórokozó sejtfalantigénjeinek fiziológiás sóoldatos kivonatát alkalmazta és az eljárást igen érzékenynek és specifikusnak találta. Napjainkban a *H. somni* ellenanyagokat IgA, IgG és IgE osztályokat alkalmazó ELISA módszerrel azonosítják (Stefaniak, 1993).

A *H. somni* antigénjeinek gazdaszervezeten belüli folyamatos változása (Inzana et al., 1992), valamint az egymáshoz akár igen közel álló *H. somni* törzsek (pl.: 2336 és 738) közötti jelentős különbségek miatt (St. Michael et al., 2005) a kórokozó szerológiai csoportokba sorolása igen nehéz. Canto és Biberstein (1982) eltérő földrajzi eredetű törzsek között bizonyított szerológiai különbségeket, azonban ezek az eltérések nem kapcsolódtak a törzsek kórtani vagy anatómiai eredetéhez. Canto és Biberstein (1982) vizsgálatain kívül a *H. somni* törzsek szerológiai csoportosításáról illetve egységes szerológiai rendszer kialakításáról szakirodalmi adat nem áll rendelkezésre (Siddaramppa és Inzana, 2004).

5.12 A *H. somni* elleni védekezés lehetőségei

5.12.1 Antibiotikumok alkalmazása

A *H. somni* számos, napjainkban is használt antibiotikumra érzékeny (Aarestrup et al., 2004), azonban a standard eljárások hiánya miatt (McDermott et al., 2001) a vizsgálatok eredményeit sokáig nem lehetett összehasonlítani (Prescott és Yielding, 1990; Sugimoto et al., 1983).

Az H. somni antibiotikum-érzékenységének in vitro vizsgálata

A *H. somni* antibiotikum-érzékenységének vizsgálatáról számos szakirodalmi adat áll rendelkezésre (McDermott et al., 2001; Prescott és Yielding, 1990; Reeks et al., 2005; Welsh et al., 2004), amelyekben több, egymástól eltérő összetételű táptalaj alkalmazásáról számoltak be. Korongdiffúziós vizsgálatai során Welsh és mtsai. (2004) 5% szarvasmarha vérszérummal kiegészített MH agaron tenyésztették a *H. somni*-t. Agarhígításos módszerrel végzett MIC érték meghatározási vizsgálataihoz Prescott és Yielding (1990) 5% borjúvérrel és 0,001% NAD-dal kiegészített MH-CSA-t, míg Sugimoto és munkacsoportja (1983) 0,5% élesztőkivonatot és 5% juhvér peptikus emésztésével előállított kiegészítőt tartalmazó heart-infusion agart alkalmazott. Leves mikrohígítási vizsgálatok során beszámoltak 5% ló vérszérummal és 1% tiamin-monofoszfáttal kiegészített közönséges levestáptalaj (Tanner és Hargis, 1992) alkalmazásáról.

Az állatorvosi szempontból jelentős, igényes kórokozók antibiotikum-érzékenységét vizsgáló módszerek standardizálása óta (McDermott et al., 2001) egyre szélesebb körben alkalmazzák a *H.*

somni törzsek antibiotikum-érzékenységének meghatározása során a leves-mikrohígítós módszert (Aarestrup et al., 2004; Godhino et al., 2005; Godhino, 2008)

A H. somni antibiotikum-érzékenysége

A *H. somni* számos antibiotikummal szemben érzékeny, korábbi vizsgálatok során ampicillinre, dihidroxi-sztreptomycinre, eritromicinre, novobiocinra, oxitetraciklinre, penicillin-G-re, polimixin-B-re és tetraciklinre érzékeny volt a kórokozó, míg neomicinnel, linkomicinnel, spiramicinnel és egyes szulfonamidokkal szemben nagyfokú rezisztenciát figyeltek meg (Brewer et al., 1985; Garcia-delgado et al., 1977; Kennedy et al., 1960; Sugimoto et al., 1983).

A BRD-komplexben betöltött jelentős szerepe miatt a *H. somni* elleni védekezésben az antibiotikumok széles skáláját alkalmazzák napjainkban. A szarvasmarhák légzőszervi megbetegedéseinek kezelésére leggyakrabban alkalmazott antibiotikumokkal végzett érzékenységi vizsgálatok során, a *H. somni* törzsek többsége továbbra is érzékenynek bizonyult ampicillinre, eritromicinre, penicillin-G-re és tetraciklinre, ezenkívül ceftiofurra, ciprofloxacinnra, enrofloxacinra, florfenikolra, szulfametoxazol-trimetoprim kombinációra és tilmikozinra is érzékeny volt (Aarestrup et al., 2004; Watts et al., 1994; Welsh et al., 2004). Annak ellenére, hogy az általánosan alkalmazott antibiotikumok többségére a kórokozó érzékeny, az állomány szinten, megelőzőképpen végzett antibiotikum-kezeléssel a *H. somni* által okozott megbetegedések arányát nem, csak a BRD előfordulását lehetett csökkenteni, ami rávilágít a *H. somni* elleni komplex járványtani védekezés jelentőségére (Van Donkersgoed et al., 1994).

Szakirodalmi adatok alapján a gentamicin-rezisztencia egyre elterjedtebb a Gram-negatív (Chang et al., 2003) és a Gram-pozitív (Sauer et al., 2003) baktériumok esetében is. A *H. somni* gentamicinnel szembeni rezisztenciájáról szakirodalmi adatok nem állnak rendelkezésre.

A *H. somni* antibiotikum-érzékenységének kiterjedt vizsgálatai ellenére, a kórokozó érzékenységi zónái számos antibiotikum esetében nem ismertek, ezért más kórokozókra meghatározott, vagy általános értékelési zónákat alkalmaznak (Aarestrup et al., 2004).

5.12.2 Vakcinák alkalmazása

Az aktív immunitás kialakításában szerepet játszó tényezők

A *H. somni* elleni védekezésben igen nagy jelentősége van a humorális immunválasznak, amelyet alátámaszt, hogy kísérletes *H. somni* fertőzésen átesett borjak véréruma passzív védő hatással bír (Gogolewski et al., 1987a). A rekonvaleszcens szérum részletes vizsgálata a *H. somni* 40 kDa molekulatömegű (p40) OMP-vel szemben képződött ellenanyagok védő hatását állapította meg (Gogolewski et al., 1988). Az anti-p40 IgG2 védőhatása jelentősebb, mint az IgG1 ellenanyagé (Corbeil et al., 1997), ami magyarázatot adhat a kísérleti fertőzések második hetében tapasztalható

szérum IgG2 csúcs kialakulására (Gogolewski et al., 1989). Mindezek alapján a p40 OMP fontos antigénkomponense lehet a *H. somni* ellen kialakított vakcináknak (Corbeil et al., 1991).

A *H. somni* pelletált sejtfrakciói közül a szérum IgE elsődlegesen a 41 kDa molekulatömegű MOMP-t ismeri fel (Corbeil et al., 2006). A szérum IgE szintje szoros kapcsolatban van a kialakuló betegség súlyosságával, így a szérum IgE/IgG2 arány alapján meghatározható a kóros immunológiai folyamatok és a védekező mechanizmusok aránya a fertőzött szervezetben (Gershwin et al., 2005). A *H. somni* MOMP kedvezőtlen immunológiai hatásai miatt alkalmazását nem javasolják vakcinák komponenseként (Corbeil, 2007).

A virulens *H. somni* törzsek szérumrezisztenciája (Corbeil et al., 1985), valamint a LOS antigénszerkezetének folyamatos, véletlenszerű változása (Inzana et al., 1992) miatt egy, a *H. somni* összes törzse ellen specifikus védelmet nyújtó vakcina kialakítása nehéz.

A H. somni elleni vakcinák alkalmazása

A fiatal állatok *H. somni* elleni aktív immunizálásának első lépése az anyaállatok 4 héttel az ellés előtti, egy alkalommal történő vakcinázása, majd a borjak 4 és 8 hetes korában végzett kétszeri immunizálás eredményeként közel fél éves korig megfelelő ellenanyagszinteket tapasztaltak (Van Donkersgoed et al., 1995). Az alacsony maternális ellenanyagokkal rendelkező állatok esetében a kétszeri vakcinázást 3 illetve 4 hónapos korban javasolják a fél éves korig tartó *H. somni* elleni védelem kialakítása érdekében (Donkersgoed et al., 1995).

A bőr alatti kötőszövetbe injektált, valamint az olajjal adjuvált *H. somni* vakcinák által kiváltott szérum IgE emelkedés magasabb volt, mint az izomba beadott vagy az alumínium-hidroxidos vakcinák esetében (Ruby et al., 2000).

6. Anyagok és módszerek

6.1 Mintagyűjtés

A *H. somni* törzsek gyűjtése során arra törekedtünk, hogy az izolált törzsek az általuk előidézett kórképek és gazdafajok, valamint földrajzi eredetük tekintetében minél nagyobb változatosságot mutassanak. A mintagyűjtés a SZIE-ÁOTK, Állathigiéniai, Állomány-egészségtani és Állatorvosi Etológiai Tanszékével és a Borsod-Abaúj-Zemplén megyei MgSzH, Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóságával szoros együttműködésben, valamint a SZIE-ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékével kapcsolatban álló szarvasmarha-állományok (Békés, Nemesszalók, Tarhos) ellátó állatorvosainak segítségével, 2006 szeptembere és 2008 szeptembere között zajlott.

6.1.1 A minták eredete

A mintavételezés 24 hónapja során Magyarország öt megyéjének 18 településén, 9 szarvasmarha-, valamint 10 kecskeállományban, összesen 652 tamponminta alapján vizsgáltuk a *H. somni* előfordulását.

Három szarvasmarha-állomány légzőszervi tüneteket mutató 4-10 hetes életkorú borjaiból 26 orrtampon- és 1 tüdőmintát gyűjtöttünk.

A hüvelytamponmintákat hat szarvasmarha-állomány 155 állatából vettük. A *H. somni* előfordulási gyakoriságának vizsgálata érdekében, egy állomány 20, első ellése előtt álló, mesterségesen termékenyített üsző hüvelynyálkahártyájának tenyésztéses bakteriológiai vizsgálatát végeztük el az ellés előtti 5., 4., 3. illetve 2. hónapban 30 napos időközönként (**2. táblázat**, P1, P2, P3 és P4).

A mintavételezésbe vont üszők és tehenek a laktáció eltérő szakaszaiban voltak vagy termékenyítés előtt álltak, jelentős szaporodásbiológiai probléma nem fordult elő az állományokban.

Tíz Borsod-Abaúj-Zemplén megyei kecskeállomány 191 anyaállatának, 13 bakjának és 1 hermafrodita állatának orr- és genitális nyálkahártyájáról vettünk tamponmintákat.

A mintagyűjtés időszaka alatt tanszékünkre beérkezett orrtamponmintákat, valamint elhullott állatokból származó szerveket is vizsgáltuk *H. somni* jelenlétére.

Ezenkívül egy, az MgSzH-Központ ÁDI, valamint négy, a MTA-ÁTKI által rendelkezésünkre bocsátott baktériumtörzset is bevontuk a vizsgálatokba.

A mintavételezések összesített adatait a **2. táblázat** tartalmazza.

2. táblázat. A mintagyűjtés összesített adatai

időpontja	A mintavétel helye	A minták száma	A minták eredete				
			állatfaj	tüdő	orr	hüvely	tasak
2006.09.21	Dalmand (D) ^a	47	szarvasmarha			47	
2006.09.26	Tolnanémedi (T)	11	szarvasmarha	1	10		
2006.10.04	Mezőkeresztes (M)	22	szarvasmarha			22	
2006.11.14	Mohács (IV)	20	szarvasmarha			20	
2006.11.20	Békés (B)	26	szarvasmarha			26	
2006.12.15	Dabas (VI)	20	szarvasmarha			20	
2007.02.20	Pápa (P1)	20	szarvasmarha			20	
2007.03.20	Pápa (P2)	20	szarvasmarha			20	
2007.04.17	Pápa (P3)	20	szarvasmarha			20	
2007.05.22	Pápa (P4)	20	szarvasmarha			20	
2007.09.21	Tarhos (VII)	9	szarvasmarha		9		
2007.10.09	Nemesszalók (VIII)	7	szarvasmarha		6		
2008.03.27	Sőlősardó (1)	40	kecske		20	20	
2008.03.27	Zádorfalva (2)	40	kecske		20	19	1
2008.03.27	Kurityán (3)	40	kecske		20	20	
2008.05.22	Abod (4)	50	kecske		25	24	1
2008.05.22	Szalonna (5)	32	kecske		16	15	1
2008.05.22	Szuhogy (6)	28	kecske		14	13	1
2008.09.18	Vámosújfalú (7) ^b	40	kecske		20	18	2
2008.09.18	Erdőbénye (8) ^{b,c}	60	kecske		30	26	4
2008.09.18	Baskó (9) ^{b,c}	34	kecske		17	14	2+1 ^d
2008.09.18	Baskó-Köröshegy (10) ^b	46	kecske		23	22	1
Kecske eredetű minták		410					
Szarvasmarha eredetű minták		242					
Minták összesen		652					

^aa minták jelölését zárójelben tüntettük fel; ^bivarzási szezonban mintázott kecskeállományok; ^cjuhokkal közösen tartott kecskeállományok; ^dhermafrodita állat ivari nyílásából származó +1 minta

6.1.2 A *H. somni* előfordulásának vizsgálata kecskeállományokban

A *H. somni* kecskeállományokban való jelenlétének igazolása érdekében a BAZ megyei MgSzH, Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóságával együttműködésben, 10 BAZ megyei kecskeállományban vettünk orr- és hüvely- vagy tasaktampon mintákat.

Hat kecskeállomány 111 anyaállatából és 4 bakjából az ivarzási szezonon kívül eső időszakban gyűjtöttük orr- és genitális tamponmintákat, míg négy állományt az ivarzási szezonban mintáztunk meg. Az utóbbi négy állomány 80 anyakecskéjéből, 9 bakjából és 1 hermafrodita állatából az orr- és a hüvely-, vagy a tasak nyálkahártyáról gyűjtöttünk tamponmintákat. Az ivarzási szezonban mintázott állományok közül kettőt juhokkal közösen tartottak, ezekben 40 anyajuhot, 6 bakkecskét és 1 hermafrodita állatot vizsgáltunk.

6.2 A korábban izolált *H. somni* törzsek

Tanszékünkön az elmúlt 25 évben izolált és a tanszék törzsgyűjteményében –80°C-on tárolt, Magyarország 7 megyéjének 10 szarvasmarha-állományából származó 33 borjú tüdő- és

oronyálcakártya eredetű, valamint 6 juhállományból származó 25 ondó- és 2 here eredetű, primer tulajdonságai alapján *H. somni*-nak meghatározott baktériumtörzs állt rendelkezésünkre a vizsgálatokhoz. Ezenkívül 5, az MTA-ÁTKI által felajánlott *H. somni* törzset is tároltunk a gyűjteményben. A 2006 szeptembere előtt a tanszéki törzsgyűjteményben elhelyezett *H. somni* törzsek adatait az **1. és 2. függelék** tartalmazza.

Vizsgálómódszereink minőség-ellenőrzésére az ATCC-43625 és ATCC-700025 számú szarvasmarha agyvelőből és tüdőből származó *H. somni* törzseket vontuk be vizsgálatainkba.

6.3 A *H. somni* törzsek izolálása, azonosítása

6.3.1 A tampon- és szervminták tenyésztéses bakteriológiai vizsgálata

A mintákat fiziológias sóoldattal nedvesített, steril vattatamponokkal vettük, amelyeket a mintavételt követően hűtött körülmények között, 3 órán belül laboratóriumba szállítottunk. A szervmintákat az állat elhullása után hűtve, esetleg -20°C -ra fagyasztva tárolták a beküldő állatorvosok. A laboratóriumi vizsgálatra hűtött minták esetében 24 órán belül, fagyasztás esetén pedig 1 héten belül került sor.

A *H. somni* izolálása érdekében a szarvasmarhából származó hüvelytamponmintákat, valamint a szervmintákból egy kacsnyi mennyiséget 10% juhvért tartalmazó közönséges agartáptalaj (1000 ml-ben: 5 g hús- és 5 g élesztőkivonat, 15 g pepton, 1 g glükóz, 3 g NaCl, 2,3 g Na_2HPO_4 ; Spektrum 3-D Kft., Magyarország) 20 perces 80°C -on történő hőkezelésével (Barrow és Feltham, 1993) elkészített CSA lemezekre oltottunk. Az orrtamponokat és a kecske genitális tamponmintákat 100 $\mu\text{g/ml}$ ciklohexamidot tartalmazó (Slee és Stephens, 1985) CSA lemezekre szélesztettük. Az agarlemezeket 5% CO_2 jelenlétében, 37°C -on 48 órán át inkubáltuk. A tenyésztési tulajdonságai, telep morfológiája és pigmenttermelése alapján *H. somni*-ra emlékeztető baktériumtelepekből nyert színtenyészeteket morfológiai tulajdonságaik alapján, valamint elsődleges és másodlagos biokémiai módszerekkel vizsgáltuk. Az izolált törzseket 25% steril glicerint tartalmazó közönséges levestáptalajban szuszpendálva -80°C -on több példányban tároltuk.

6.3.2 A kórokozó azonosítása morfológiai és biokémiai tulajdonságai alapján

A *H. somni*-szerű baktériumtörzsek genus-szintű meghatározása érdekében, morfológiai és biokémiai tulajdonságaikat klasszikus, standard bakteriológiai módszerek alkalmazásával vizsgáltuk (Barrow és Feltham, 1993).

Morfológiai vizsgálatok

A baktériumok alakját és festődését 48 órás baktérium-színtenyészetekből készített Gram-szerint festett kenetek 1000×-es nagyításának fénymikroszkópos vizsgálatával határoztuk meg.

Az izolátumok mozgásképeségének elbírálása során 5 µl fiziológiás sóoldatban túhegynyi mennyiségű 48 órás baktériumtelepet szuszpendáltunk, fedőlemezzel fedtük majd a nedveskamra készítményt fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk.

Biokémiai tulajdonságok vizsgálata

A kataláz próbát zsírtalanított tárgylemezen végeztük, kacsnyi mennyiségű baktériumra 3%-os hidrogén-peroxidot (H₂O₂) cseppentettünk, az elbírálást szabad szemmel végeztük a pezsgés megindulása vagy hiánya alapján.

A citokróm-oxidáz C enzim vizsgálatát szűrőpapíron, steril üveg Petri-csészében végeztük. Műanyag kaccsal 3-4 baktériumtelepet a szűrőpapír felületére kentünk, majd tetrametil-para-fenilén-diamin (Sigma) frissen készített vizes oldatát öntöttük rá, a pozitív eredményt jelző kék színváltozás megjelenését vagy hiányát 30 másodperc elteltével vizsgáltuk.

Az izolált törzsek indoltermelő képességét 10% ló vérsavót és 1% L-triptofánt (Sigma) tartalmazó levestáptalajba (100 ml: 1 g pepton, 1 g élesztőkivonat, 0,5 g glükóz, 0,4 g KHPO₄, 0,4 g K₂HPO₄, 0,5 g NaCl; pH 7,5; Spektrum 3-D Kft., Magyarország) oltott kacsnyi mennyiségű baktérium normál légköri körülmények között 37°C-on végzett 24 órás inkubálása után bíráltuk el. A levestenyészetet először pár csepp (~10 µl) éterrel kiráztuk, majd 20 µl Kovács-reagenst (10 g 4-dimetilamino-benzaldehyd 150 ml 1-pentanolban feloldva, 50 ml tömény sósavval kiegészítve) rétegeztünk az étergyűrű alá. A határfelületen létrejött piros gyűrű megléte vagy hiánya alapján bíráltuk el a tesztet.

6.3.3 A törzsek azonosítása szénforrás-hasznosítás alapján

A BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM rendszere a mikroorganizmus 95-féle tulajdonságát vizsgálja egyszerre, mely alapján a vizsgált baktérium fajszintű azonosítása lehetséges. A vizsgálmódszer részletes ismertetése az 6.4 szakaszban található.

Az azonosítás során a szoftver összeveti az általunk betáplált adatokat az adatbázisában található adatokkal és ez alapján, százalékos valószínűség szerint listába rendezve megad 10, a vizsgált baktériumtörzshöz leginkább hasonló, a rendszer által ismert baktériumfajt. Abban az esetben, ha a program fajszinten nem ismeri fel pontosan a vizsgált izolátumot, akkor jelzi, hogy csak genus-szinten vagy egyáltalán nem tudta azonosítani, de ez esetben is valószínűségi sorrendben megadja a 10 leghasonlóbb fajt.

6.3.4 A baktérium azonosítása a 16S rDNS részletének vizsgálatával

A genus szinten történt meghatározás eredményének megerősítése érdekében a tanszék törzsgyűjteményében elhelyezett, valamint a frissen izolált baktériumtörzsek egy részének DNS alapú azonosítását is elvégeztük, a vizsgált törzsek részletes adatait az **1., 2. és 5. függelék** tartalmazza.

DNS-kivonás a H. somni törzsekből

A *H. somni* színtenyészetéből a DNS kivonást kereskedelmi forgalomban kapható, DNS-kivonó QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., USA, Valencia, CA) segítségével, a gyártó ajánlásait (Protocol C) követve végeztük. Az eljáráshoz felhasznált enzimet, puffereket és centrifugacsöveket a gyártó biztosította.

Kacsnyi mennyiségű baktériumtenyészetet 180 µl ATL szöveti lízispufferben határozott keverő mozdulatokkal szuszpendáltunk, majd 20 µl Proteináz K-t adtunk hozzá és laboratóriumi vortex berendezéssel rövid ideig kevertük. A 200 µl szuszpenziót tartalmazó mikrocentrifuga csövet 3 órán át 55°C-os hőmérsékletű, mozgó vízfürdőben inkubáltuk a baktériumsejtek teljes lízise érdekében. A sejtek lízise után 200 µl DNS tisztító, guanidin bázisú AL lízispuffert adtunk a szuszpenzióhoz és keverés után 70°C-on 10 percig inkubáltuk. Ezt követően 200 µl 96%-os etil-alkoholt adtunk az elegyhez, majd a többszöri keverés után teljesen homogénné vált keveréket a szűrővel ellátott, 2 ml űrtartalmú gyűjtőcsőbe helyeztük, kisméretű centrifugacsövekbe pipettáztuk, amelyeket percenként $\geq 6\ 000\times g$ -n (~8 000 rpm) 1 percig centrifugáltunk. A centrifugacsövet új gyűjtőcsőbe helyeztük, a szűrőre pedig 500 µl etanol-alapú, alacsony guanidin tartalmú AW1 mosópuffert mértünk és ezt egy újabb $\geq 6\ 000\times g$ -n (~8 000 rpm) végzett egy perces centrifugálás követte. A centrifugacső szűrőjére 500 µl Tris-alapú, etanolt tartalmazó AW2 mosópuffert mértünk, majd 3 percig $\sim 20\ 000\times g$ -n (~14 000 rpm) centrifugáltuk. A centrifugacsövet új gyűjtőcsőbe helyeztük, majd a szűrőre 200 µl Na- azidot tartalmazó TE oldatot (AE kivonó puffer) mértünk és 1 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az ezt követő $\geq 6\ 000\times g$ -n (~8 000 rpm) végzett 1 percig tartó centrifugálás során az AE kivonó puffer a DNS-t leoldotta szűrőről. Az utolsó lépést egyszer megismételtük. A második kivonás után nyert 400 µl DNS tartalmú oldatot egyéb adalék nélkül, a további felhasználásig 100 µl-es egységekben -20°C-on tároltuk.

A H. somni törzsek 16S rRNS gén részletének amplifikálása

A 16S rRNS gén egy, a *H. somni* törzsek között igen konzervatív és azokra jellemző, megközelítőleg 400 bp hosszú szakaszának amplifikálására Angen és mtsai. (1998) által tervezett primereket (HS-453F: 5'-GAAGGCGATTAGTTTAAGAG-3' és HS-860R: 5'-GAAGGCGATTAGTTTAAGAG-3') és PCR eljárást alkalmaztunk.

A PCR reakció előkészítése során 2 µl DNS-templátot adtunk a deoxi-ribonukleotid-trifoszfátokból 100 µM-t, a HS-453F és HS-860R oligonukleotid primerekből 65-65 ng-ot, valamint 0,5 NE Taq polimerázt tartalmazó, DD-vízzel 48 µl-re kiegészített reakcióelegyhez. Az 50 µl reakcióelegy Tris/HCl-t (pH 8,3) 10 mM-os, KCl-ot 50 mM-os, MgCl₂-ot 1,5 mM-os végkoncentrációban tartalmazott. A PCR reakcióhoz felhasznált anyagokat az MBI Fermentas (Litvánia) cégtől vásároltuk.

A PCR reakciót Biometra T-personal 48 Thermal Cycler (Biocompare®, San Francisco, USA) készülékkel végeztük. A minták kezdeti denaturálását 94°C-on 3 percig végeztük, amelyet 94°C-on 1 percig tartó denaturáció, 1 perces 55°C-on történő primer kötődés és 1 percig tartó, 72°C-on végzett lánchosszabbítás követett. Az utóbbi három lépésből álló ciklus 35 alkalommal ismétlődött, a PCR reakció teljes hossza megközelítőleg 1 óra 50 perc volt.

A PCR-termékek kimutatását 0,5 µg/ml etidium-bromidot tartalmazó, 1,7%-os agarózgélben végeztük, a gélelektroforézis TAE (40 mM Tris-acetát és 1 mM EDTA; pH 8,3) pufferben 100 V-os feszültségen 40 percig tartott. Molekulatömeg-markerként GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (1 µg/ µg; MBI Fermentas, Litvánia) markert használtunk. A 16S rRNS gén részletének sikeres amplifikációja esetén nyert megközelítőleg 400 bp hosszúságú terméket UV-fénnyel tettük láthatóvá, és egy digitális kamera (KODAK) segítségével elektronikusan rögzítettük az eredményeket.

A PCR termékek tisztítása az agarózgélből

A PCR reakció termékeként kapott 16S rDNS részletet az agarózgélből QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., USA, Valencia, CA) DNS tisztító kittel a gyártó ajánlásait követve végeztük.

Az agarózgélből a lehető legkisebb, de a PCR terméket tartalmazó géldarabot, steril szikepengével kivágtuk, amelynek tömegét meghatároztuk majd – 100 mg ~ 100 µl összefüggést alkalmazva – háromszoros mennyiségű QG oldópuffert adtunk hozzá. A géldarabot az oldópufferben 50°C-on általában 10 percig inkubáltuk, a gél teljes feloldódásakor sárga színű oldatot kaptunk. Ezt követően egyszeres mennyiségű izopropil-alkoholt adtunk az elegyhez és egyenletesen elkevertük. A homogén keveréket egy 2 ml űrtartalmú gyűjtőcsőbe helyeztük, szűrővel ellátott centrifugacsőbe pipettáztuk, amelyet 1 percig $\geq 10\ 000\times g$ -n (~13 000 rpm) centrifugáltuk. Az átszűrt folyadékot előöntöttük, majd a centrifugacső szűrőjére 500 µl QG oldópuffert mértünk és újból 1 percig centrifugáltuk $\geq 10\ 000\times g$ -n (~13 000 rpm). Ezután a szűrőre 750 µl PE mosópuffert mértünk, majd 5 perces szobahőmérsékleten történő inkubálás után ismét centrifugáltuk $\geq 10\ 000\times g$ -n (~13 000 rpm) 1 percen át. Az átszűrt folyadék előntését újabb 1 perces centrifugálás követte $\geq 10\ 000\times g$ -n (~13 000 rpm). A centrifugacsövet 1,5 ml űrtartalmú mikrocentrifuga csőbe helyeztük és 50 µl EB kioldó puffert (10 mM Tris-Cl; pH 8,5) mértünk és 1 percig a legmagasabb

fordulatszám (15 000 rpm, 20 000× g-n) centrifugáltuk, amelynek során a DNS a szűrő membránjáról folyadékfázisba került. Az agarózgélből kitisztított PCR termékünket az EB pufferben –20°C-on két részletben tároltuk.

A 16S rRNS génrészlet bázissorrendjének meghatározása és vizsgálata

Az agarózgélből kitisztított PCR termékek bázissorrendjét független laborban határoztattuk meg (Biomi Kft., Magyarország). A 16S rDNS részlet szekvenciáját a BLAST algoritmuson (Altschul et al., 1997) alapuló elemző programok segítségével összevetettük a NCBI honlapján elérhető adatbázissal (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

6.4 A *H. somni* törzsek szénforrás-hasznosításának vizsgálata

A *H. somni* törzsek szénforrás-hasznosító képességét a BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM (Biolog Inc. Hayward, Kanada) rendszerével végeztük el. A rendszer 96 lyukú lemezen (GN2/GP2 MICROPLATE™), egy negatív kontroll mellett vizsgálja 95-féle szénforrás hasznosítását és az eredmények alapján anyagcsere-ujjlenyomatot készít a vizsgált baktériumtörzsről.

6.4.1 A szénforrás-hasznosítás alapján vizsgált törzsek

Az anyagcsere-ujjlenyomat vizsgálatokba a szarvasmarhából származó *H. somni* törzsek közül 40 légzőszervi és 20 hüvely eredetű izolátumot vontunk be. Az összes juh- (27) és kecske (11) eredetű *H. somni* törzs, valamint két típus-törzs (ATCC-43625 – Brown et al., 1972; ATCC-700025 – McDermott et al., 2001) szénforrás-hasznosítását is vizsgáltuk. A vizsgált törzsek adatait az **1.**, **2.**, **3.**, **4.** és **5. függelék** tartalmazza.

6.4.2 A *H. somni* törzsek előkészítése a vizsgálathoz

A *H. somni* törzseket a gyártó által a Gram-negatív, igényes baktériumok előkészítéséhez ajánlott módszert követve, az alábbiak szerint végeztük: a –80°C-on tárolt baktériumtörzseket 10% juhvért tartalmazó egységesített BIOLOG agarból (Biolog Universal Growth – BUG) vagy Tryptic Soy (TS) agarból készített CSA lemezekre oltottuk és 5% CO₂ jelenlétében, 37°C-on, 48 órán át inkubáltuk, majd ugyanezeket a tenyésztési körülményeket alkalmazva egyszer átoltottuk őket. A tenyésztési idő elteltével a baktériumokat steril vattatampon segítségével BIOLOG Gram-negatív – Gram-pozitív (GN-GP) baktériumok részére biztosított (1000 ml víz, 4 g NaCl és 0,57 g Na-tioglikolát), 3 csepp Na-tioglikoláttal kiegészített, inokulumkészítő oldatban szuszpendáltuk. A szuszpenziót BIOLOG sűrűségmérő segítségével a – 20±1% fényáteresztést biztosító – GN-FAS standarddal megegyező sűrűségűnek állítottuk be. Az így elkészített szuszpenzióból, a GN2 MICROPLATE™ 1 negatív kontrollt és 95-féle szénforrást vízmentes formában tartalmazó vájulataiba 150 µl-eket mértünk, majd a lemezeket 5% CO₂ jelenlétében, 37°C-on inkubáltuk.

6.4.3 A vizsgálatok eredményei és értékelésük

Az inkubációs idő 16. és 24. órája között a MICROPLATE™ vájolataiban kialakult színváltozás meglétét vagy hiányát szemmel bíráltuk el, majd a BIOLOG rendszerhez tartozó MicroLog3 (4.20.05) szoftver adatlapjain törzsenként rögzítettük az eredményeket.

Az vizsgált *H. somni* törzsek anyagcsere-ujjlenyomatai alapján a MicroLog3 (4.20.05) szoftver segítségével az összes törzs eredményét magában foglaló, valamint állatfajonkénti eredet szerint csoportosított eredményeket tartalmazó törzsfákat készítettünk.

A törzsfán 1 egységnyi távolság a törzsek 1 szénforrás hasznosításában való eltérését jelezi, tíznél több eltérő tulajdonság esetén a rendszer külön csoportba sorolta a vizsgált törzseket, az elemzés során pedig az alcsoportokat 3 tulajdonság különítette el egymástól.

6.5 A *H. somni* törzsek vizsgálata pulzáló mezejű gélelektroforézissel

6.5.1 A PFGE-vel vizsgált törzsek

A *SmaI* restriktív enzimmel végzett emésztéses vizsgálatokba 1 juh ondo eredetű törzs kivételével, ugyanazokat a törzseket vontuk be, mint a szénforrás-hasznosítási vizsgálatokba, azaz 40 szarvasmarha légzőszervi- és 20 hüvely eredetű, valamint 26 juh- és 11 kecske genitális eredetű *H. somni* törzset vizsgáltunk.

A *Cfr9I* restriktív enzimmel végzett vizsgálatokba a *SmaI* által nem emésztett törzsek közül 6 szarvasmarha légzőszervi eredetű törzset és az ATCC-43625 számú *H. somni* típus-törzset vontuk be. Ezenkívül 3 szarvasmarha légzőszervi- és 1 hüvely eredetű, valamint 7 juh ondo eredetű, az *SmaI* restriktív enzim által hasított *H. somni* törzset is vizsgáltunk.

A vizsgált törzsek adatait az **1., 2., 3., 4. és 5. függelék** tartalmazza.

6.5.2 A *H. somni* törzsek emésztése *SmaI* és *Cfr9I* (*XmaI*) restriktív enzimekkel

A PFGE vizsgálathoz BHI levestáptalajban, 37°C-on, 24 órán át inkubált *H. somni* tenyészeteket használtunk. A levestenyészetek csíraszámát, 600 nm-en spektrofotométerrel mértük, majd TE (100 mM Tris, 250 mM EDTA) pufferben (pH 8,0) milliliterenként 4×10^8 TFE-t tartalmazó (TFE/ml) szuszpenziókat készítettünk belőlük. A szuszpenzióból 100 µl-t óvatosan összekevertünk 100 µl 2% SeaPlaque agarózzal (Cambrex), az így kapott 200 µl keverék 1% nátrium-lauril-szarkozil-szulfátot, valamint 1 mg/ml Proteináz K-t (Sigma) is tartalmazott. Az agaróz-baktérium szuszpenziót 2 mm × 4 mm × 8 mm-es öntőformába („dugó”) pipettáztuk és 4°C-on 30-40 percig dermedni hagytuk.

Dermedés után 1 ml lízispufferben (100 mM EDTA, 1% nátrium-lauril-szarkozil-szulfát, 0,2% nátrium-dezoxikolat, 1 mg/ml Proteináz K, pH 8,0), 50°C-on legalább 18 órán át emésztettük a dugókat. Az emésztés után szobahőmérsékleten, 15 percig steril DD-vízzel mostuk a dugókat, majd ezt további 4, egyenként 1 órással, 37°C-on végzett TE pufferes mosás követte. Az első TE pufferes mosás alkalmával a mosópufferhez 0,35 mg/ml fenil-metil-szulfonilfluoridot (PMSF) adtunk, a Proteináz K inaktiválása érdekében.

A négyszer ismételt mosást követően a dugókat azonnal emésztettük, vagy a feldolgozásig – de maximum 6 hónapig – friss mosópufferben 4°C-on tároltuk őket. Az emésztési kívánt dugó felét 1 órán keresztül, 37°C-on TE pufferben ismételten mostuk, majd a gyártó által az alkalmazni kívánt enzimhez ajánlott restriktív pufferben 37°C-on, 1 órán át inkubáltuk. Ezt követően a dugókat 150 µl restriktív puffert és 20 NE restriktív enzimet tartalmazó 2 ml-es mikrocentrifuga csövekbe helyeztük, majd az enzimnek megfelelő hőmérsékleten legalább 15 órán át inkubáltuk. A *H. somni* törzsek emésztéséhez *SmaI* restriktív enzimet (Fermentas) alkalmaztunk. A *SmaI* által nem emésztett baktériumtörzsek egy részét *Cfr9I* (Fermentas) restriktív enzimmel, a *SmaI* metilációra nem érzékeny izoskizomerjével emésztettük.

Az emésztés után a dugókat TE mosópufferben szobahőmérsékleten, 30 percig újra mostuk, amelynek során a pufferben lévő EDTA megszüntette a restriktív enzim aktivitását.

6.5.3 Pulzáló mezejű gélelektroforézis

Az emésztést követően a futtatást azonnal megkezdjük. A futtatáshoz Pulse-Field Certified (BioRad) vagy SeaKem Gold (Cambrex) 1-1,2%-os töménységű agarózt használtunk. A futtatás CHEF DRIII PFGE (BioRad) készülékben, 14°C-on, 0,5× TBE pufferben zajlott. A paraméterek mindkét restriktív enzimmel végzett emésztést követően azonosak voltak: a futtatás 6 V/cm feszültség mellett, 120°-os reorientációs szöggel, 24 órán át zajlott. A pulzusidő az elektroforézis ideje alatt 2 másodpercről 15 másodpercre emelkedett.

6.5.4 Az eredmények dokumentálása és értékelése

A futtatást követően az agarózgélt 30 percig etídium-bromiddal festettük, majd legalább 2 órán keresztül desztillált vízzel mostuk. A futtatás során nyert mintázatot UV fényben hívtuk elő, és egy digitális kamera (KODAK) segítségével számítógépes adatbázisban rögzítettük az eredményeket.

A kapott PFGE mintázatokat a Fingerprinting II szoftver (BioRad) segítségével elemeztük. A hasonlóságok leírására a Dice koefficiens, a csoportanalízisre UPGMA-módszert alkalmaztuk. Az optimalizáció és a pozíció-tűrés értéke 1,5% volt.

Az értékelés során a *SmaI* és *Cfr9I* enzimekkel kapott mintázatokat is összehasonlítottuk, ezért a két enzimmel kapott eredményeket egy adatbázisban rögzítettük és az elemzés során azonos paramétereket alkalmaztunk.

Az eredmények elemzőprogrammal történő statisztikai értékelését független szakértő végezte.

A törzsfá részletes elemzése során a törzsek közötti 20%-os hasonlóság alapján alcsoportokra osztottuk a különböző eredetű *H. somni* törzseket és ezeknek a törzsfán való elhelyezkedését vizsgáltuk.

6.6 A *H. somni* klinikai és kórtani hatásainak vizsgálata borjak mesterséges fertőzése során

6.6.1 Állatok

Tizenhét hagyományosan tartott, 3 hónapos Holstein-fríz borjút véletlenszerűen kétszer hat és egyszer öt állatból álló – A, B és C – csoportba osztottunk, az állatok csoportonként szabadon, de elkülönítve kerültek elhelyezésre.

Korábban végzett vizsgálatok alapján a származási állomány szeropozitívnak bizonyult fertőző rhinotracheitis- (BoHV-1), valamint parainfluenza-3 (PI-3) vírussal szemben, de mentes volt *H. somni*-tól. Az anyaállatokat nem vakcinázták *H. somni* ellen. A kísérletet megelőző fél évben heveny légzőszervi megbetegedés nem fordult elő az állatok között.

A borjak két nappal születésük után egyedileg kerültek elhelyezésre, egy hétig kolosztrummal, majd tejpótló tápszerrel etették őket. A választás 60-70 napos kor között történt, majd az állatokat szilázssal, szénával, gabonával és kereskedelmi forgalomban kapható borjútáppal etették.

A *H. somni* és *Mycoplasma bovis* mentesség ellenőrzése céljából a kísérlet megkezdése előtt orrtamponmintákat vettünk az állatokból (6.6.3 szakasz). A kísérlet helyszínére a fertőzés előtt 8 nappal szállították a borjakat.

6.6.2 Baktériumtörzsek

A kísérleti állatok fertőzéséhez két, borjútüdőből izolált, az MTA-ÁTKI által rendelkezésünkre bocsátott *H. somni* – 343/07 és 344/07 jelölésű – törzset alkalmaztunk.

A baktériumtörzseket több példányban -80°C -on tároltuk. A törzsek újraélesztése során CSA lemezekre szélesztve, 5% CO_2 jelenlétében, 37°C -on 48 órán át inkubáltuk, majd a fertőző anyag előállításához ugyanilyen körülmények között tenyésztettük tovább őket.

A fertőzés megkezdése előtt három órával, a 48 órás baktériumtenyészeteket steril vattatampon segítségével BHI (Difco) levesben szuszpendáltuk. Minden fertőzéshez friss szuszpenziót készítettünk, amelyeket felhasználás előtt 37°C -on lassú rázatással 30 perc alatt homogenizáltunk.

A homogén baktériumszuszpenziók milliliterenkénti csíratartalmát csőhígítási módszer alkalmazásával a fertőző anyag elkészültekor (0. h), valamint 3 órával később (3. h) vizsgáltuk.

A fertőző anyag egy részét (5 ml) a laboratóriumban a szállítási körülményekhez hasonlóan, hűtve tároltuk, hogy a baktérium-szuszpenzió valós csíraszámát leginkább megközelítő értéket kapjunk a fertőzés megkezdésekor végzett csíraszámolásakor (3. h).

A csíraszámoláshoz szükséges hígítások elkészítéséhez 7 Wassermann-csőbe 4,5 ml, valamint 1 csőbe 9,9 ml fiziológiás sóoldatot mértünk. A vizsgált fertőző anyagból 100 µl-t pipettáztunk a 9,9 ml fiziológiás sóoldatot tartalmazó csőbe, amelyet laboratóriumi vortex segítségével egyenletesen elkevertünk. Majd ebből az oldatból kivett 500 µl szuszpenzióval log₁₀ hígítási sort készítettünk a 4,5 ml fiziológiás sóoldatot tartalmazó csövekben.

A szuszpenziók hígításaiból 50 µl-t kivettünk és egy egész CSA lemez felületén egyenletesen eloszlattunk, majd a kísérlet során általánosan használt tenyésztési eljárást alkalmaztuk.

Az inkubációs idő végén azokban a Petri-csészékban, ahol az agarlemez felületén látható baktériumtelepek száma 30 és 300 közé esett, a *H. somni*-szerű baktériumtelepek számát meghatároztuk és a fertőző anyag csíraszámát az alábbi képlet segítségével számoltuk ki:

$$x = n \times 20 \times 10^y$$

ahol x = a kiindulási baktérium-szuszpenzió csíraszám (TFE/ml), n = az agarlemez felületén számolt baktériumtelepek száma és y = a vizsgált log₁₀ hígítás kitevőjének (-1)-szerese.

A 0. és 3. órában meghatározott csíraszámokból napi átlagcsíraszámot (TFE_n/ml) számoltunk, a három napon kapott csíraszámokból pedig fertőzési átlagcsíraszámot (TFE_f/ml) határoztunk meg.

6.6.3 Kísérleti terv

A 17 állatot véletlenszerűen elhelyeztük a 3 csoport – A, B és C – valamelyikébe. A *H. somni* és *M. bovis* mentesség ellenőrzése érdekében a kísérlet megkezdése előtti 20. és 5. napon orrtamponmintákat vettünk, amelyeket tenyésztéses és specifikus PCR eljárással vizsgáltunk a kórokozók jelenlétére. A kísérletbe a kétszeri vizsgálat alapján *H. somni*-tól és *M. bovis*-tól továbbra is mentesnek bizonyult borjakat vettük be.

Az A csoport állatait a 343/07 számú, míg a B csoportba tartozókat a 344/07 számú *H. somni* törzssel, három egymást követő napon, aerogén úton, párologtató maszk segítségével fertőztük, amelynek során minden állat 100 másodpercen keresztül, 101,3 kPa (1 atm) nyomáson aeroszollá alakított, 10 ml fertőző anyagot lélegzett be. A kontroll (C) csoport ugyanezzel az eljárással 10 ml foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldatot (phosphate buffered saline – PBS; 1000 ml: 1M K₂HPO₄, 5M NaCl) inhalált.

A fertőzött csoportokat egy istállóban, de elkülönített légtérben, a kontroll csoportot pedig másik istállóban helyeztük el. A 14 napig tartó megfigyelési periódus alatt a klinikai adatokat naponta, egyedi klinikai vizsgálati lapokon rögzítettük. A kísérlet befejezése előtt egy nappal ismételt orrtamponmintákat vettünk, majd az állatokat a 15. napon elvéreztettük. Az egyedi kórbonctani vizsgálat során tüdő- és nyirokcsomómintákat vettünk bakteriológiai és kórszövettani vizsgálatra.

Munkánk során a kísérleti és egyéb tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó 86/609/EGK irányelv, az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII sz. Törvény és a 243/1998 (XII. 31.) Korm. rendelet előírásait követtük.

6.6.4 A kísérlet során végzett bakteriológiai vizsgálatok

A fiziológiás sóoldattal nedvesített orrtamponmintákat, valamint a tüdő- és nyirokcsomómintákat hűtve, 3 órán belül a laboratóriumba szállítottuk.

A bakteriológiai vizsgálatok során a 6.3.1 alfejezetben ismertetett tenyésztési módszereket alkalmaztuk.

Az orrtampon- és szervmintákat *H. somni*-specifikus PCR eljárással is vizsgáltuk. Munkánk során, a Saunders és Reddacliff (2007) által kidolgozott *Brucfella ovis*, *Actinobacillus seminis* és *H. somni*, vegyes mintákból történő kimutatására kidolgozott multiplex PCR eljárást alkalmaztuk, vizsgálataink során azonban csak a *H. somni*-specifikus primereket (HS-453F: 5'-GAAGGC-GATTAGTTTAAGAG-3'; HS-756R: 5'-ACTCGAGCGTCAGTATCTTC-3') használtuk. A PCR eljárás kondícióit minden tekintetben az irodalmi forrás által meghatározott paramétereket követve állítottuk be.

A visszaizolált *H. somni*-szerű baktériumtörzseket a 6.3.2 pontban ismertetett, klasszikus bakteriológiai módszerek alkalmazásával azonosítottuk (Barrow és Feltham, 1993).

6.6.5 Klinikai adatok és értékelésük

A kísérlet kezdetekor és végén az állatok testtömegét lemértük és egyedenként feljegyeztük. Az állatok végbélben mérhető testhőmérsékletét a kísérlet kezdete előtt egy nappal, majd a megfigyelési időszakban naponta mértük és rögzítettük. A 14 napos megfigyelési időszak során a borjak naponta egyedi klinikai vizsgálaton estek át, amelynek eredményeit állatonként külön klinikai vizsgálati lapokon rögzítettünk. A fizikai vizsgálat során a légzőszervi tünetek hiányát vagy meglétét vizsgáltuk és a légzőszervi tünetek súlyossága szerint az alábbi pontrendszert alkalmaztuk (légzőszervi pontszám, respiratory score – RS): 0 = nincs légzőszervi tünet; 1 = enyhe légzőszervi bántalom, savós orrfolyás vagy könnyezés; 2 = közepes légzőszervi bántalom, emelkedett légzésszám, nyálkás vagy gennyos orrfolyás; 3 = súlyos légzőszervi bántalom, kifejezett légzésszám emelkedés, légszomj (tátott szájjal vagy nyújtott nyakkal légzés).

6.6.6 Kórbonctani vizsgálatok és értékelésük

Az állatokat a kísérlet 15. napján elvégeztettük. Az egyedi kórbonctani vizsgálatot független szakértő végezte. A kórbonctani leleteket egyedi kórbonctani vizsgálati lapokon rögzítettük, heveny, félheveny és idült elváltozásokat különböztettünk meg, az elváltozások kiterjedtségét a tüdő teljes területéhez viszonyítva százalékosan fejeztük ki.

A kórbonctani vizsgálat befejezése után az elváltozott és ép tüdőterületek határáról, valamint a mediastinalis és peribronchalis nyirokcsomókból mintákat vettünk kórszövettani és bakteriológiai vizsgálatokra.

6.6.7 Kórszövettani vizsgálatok és értékelésük

Minden állatból az elváltozott tüdőterületekről, valamint a peribronchalis és mediastinalis nyirokcsomókból kórszövettani vizsgálatra mintákat vettünk, amelyhez a szöveteket 10%-os puffertolt formaldehid oldatban fixáltuk, majd paraffinba ágyaztuk. Az elkészült blokkokról 4 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket hematoxilin-eozinnal (H.-E.) festettünk és fénymikroszkóppal vizsgáltunk.

A metszetek elbírálása során a heveny elváltozásokat kórszövettani pontszámmal (kórszövettani pontszám, histopathological score, HS) láttuk el, az alábbiak szerint: 0 = nincs elváltozás; 1 = enyhe; 2 = közepes mértékű; 3 = súlyos bronchopneumonia vagy nyirokcsomógyulladás tapasztalható.

6.6.8 Statisztikai elemzés

A rektálisan mért testhőmérsékletek, a testtömegek és a testtömeg-gyarapodások átlagát csoportonként meghatároztuk, az adatokat pedig Student-féle t-teszt alkalmazásával hasonlítottuk össze. A légzőszervi és kórszövettani pontszámokat χ^2 -négyzet próbával vizsgáltuk.

6.7 A *H. somni* törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata

6.7.1 A vizsgálatokba vont *H. somni* törzsek

Különböző állatfajokból és elváltozásokból vagy anatómiai helyről gyűjtött, összesen 39 *H. somni* törzs egyes antibiotikumokkal szembeni érzékenységét vizsgáltuk. A vizsgálatokba 14 szarvasmarha légzőszervi és 10 hüvely eredetű, valamint 10 juh és 5 kecske genitális eredetű *H. somni* törzset vontunk be. Ezenkívül egy, *H. somni* típus törzset (ATCC-700025) is bevontunk vizsgálatainkba. A vizsgált törzsek adatait az **1., 2., 3., 4. és 5. függelék** tartalmazza.

6.7.2 A vizsgálatok menete

A *H. somni* törzsek antibiotikum-érzékenységét az NCCLS (ma CLSI) 2002-ben kiadott „Eljárási szabványok állatokból izolált baktériumok antibiotikumokkal szembeni érzékenységének korongdiffúziós és hígítási vizsgálatához” című M31-A2 jelzésű dokumentumában megadott, a standard leves-mikrohígítási eljárásra vonatkozó ajánlásokat követve vizsgáltuk.

Az alkalmazott levestáptalajok elkészítése (MH és VFM)

Az M31-A2 dokumentum által ajánlott MH levestáptalajt, valamint állatorvosi szempontból jelentős, igényes kórokozók tenyésztéséhez szükséges levestáptalajt (VFM) az alábbiak szerint készítettük el.

A MH levestáptalaj 1000 ml-ének elkészítéséhez 3,0 g szarvasmarha húskivonatból, 17,5 g savasan hidrolizált kazeinből és 1,5 g keményítőből álló, 22 g össztömegű MH (Oxoid) portáptalajt és 20 g élesztőkivonatot (yeast extract – YE; Oxoid) 955 ml desztillált vízben feloldottunk és pH értékét 7,2-7,4 közé állítottuk. Az oldatot 121°C-on, 111,5±10,1 kPa (1,1±0,1 bar) nyomáson 15 percig hőkezeltük, majd 8°C-ra lehűtöttük. Ezt a MH levestáptalajt használtuk a *H. somni* törzsek primer szuszpenziójának elkészítéséhez.

A VFM levestáptalaj kation-kiegészítéséhez szükséges 10 mg/ml végkoncentrációjú Ca⁺⁺- és Mg⁺⁺-törzsoldatokhoz 3,68 g kalcium-kloridot (CaCl₂×2H₂O; Spektrum-3D Kft., Magyarország) illetve 8,36 g magnézium-kloridot (MgCl₂×6H₂O; Spektrum-3D Kft., Magyarország) 100 ml desztillált vízben feloldottunk. A 10 mg/ml kation-koncentrációjú törzsoldatokat membránszűréssel baktériummentessé tettük és felhasználásig 4°C-on tároltuk.

A lehűtött MH levestáptalajt 1000 ml-ét 1,9 ml Ca⁺⁺ és 0,81 ml Mg⁺⁺ törzsoldattal egészítettük ki, így 22,465 ml Ca⁺⁺-ion és 11,25 mg Mg⁺⁺-ion koncentrációjú, kation-kiegészített MH (cation-adjusted MH– CAMH) levestáptalajt kaptunk.

A VFM levestáptalaj kiegészítéséhez szükséges steril teljes lóvért 1,5 ml-es adagokban mikrocentrifuga csövekben tároltuk. A vörösvérsejtek lízise érdekében egymást követő 3 alkalommal –80°C-ra hűtöttük majd felolvasztottuk a véreket, ezután felhasználásig –20°C-on tároltuk őket. A lizált lóvéreket ≥ 6 000× g-n (~8000 rpm) 20 percig centrifugáltuk, így mikrocentrifuga csövenként megközelítőleg 1,3 ml sejttörmeléktől biztosan mentes felülúszót nyertünk, amelyből a 2%-os végkoncentrációra egészítettük ki a CAMH levestáptalajt.

Végül a kereskedelmi forgalomban por formában kapható Supplement CTM (BDMS) megnevezésű élesztőkoncentrátumot steril DD-vízzel, a gyártó ajánlását követve 5 ml-re töltöttük fel, majd 2%-os végkoncentrációban a 2% lizált lóvérrel kiegészített CAMH levestáptalajhoz adtuk. Az így kapott VFM levestáptalajt használtuk a *H. somni* törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata során.

A vizsgált antibiotikumok és az alkalmazott antibiotikum-hígítások

A *H. somni* törzsek antibiotikum-érzékenységét napjainkban széles körben használt hat antibiotikummal: enrofloxaccinnal, florfenikollal, gentamicinnel, penicillin-G-vel, tetraciklinnel és tilmikozinnal szemben vizsgáltuk.

A felhasználni kívánt antibiotikumok tisztaságának adatait, valamint oldhatósági tulajdonságait a katalógusszám és a tételszám alapján, a gyártó honlapjáról letölthető analitikai műbizonylat tartalmazta. Az általunk felhasznált antibiotikum porok kereskedelmi adatai a **3. táblázat**ban találhatók.

3. táblázat. A vizsgált antibiotikumok kereskedelmi adatai

Antibiotikum	Katalógusszám	Gyártó	Tételszám
Enrofloxacin	17849	Fluka	136903
Florfenikol	F1427	Fluka	081K1680
Gentamicin	G1264	Sigma	050K0342
Penicillin-G	Penna	Sigma	086K1286
Tetraciklin	87130	Fluka	1330148
Tilmikozin	33864	Fluka	7045x

Az ATCC-700025 *H. somni* minőségellenőrzésre (QC) alkalmazható törzs standard rendszerekben történő vizsgálata során meghatározott, antibiotikum-érzékenységi adatait az NCCLS M31-A2 számú (2002) dokumentuma tartalmazza. A QC törzs adatait figyelembe véve meghatároztuk az antibiotikumok log₂ alapú, általunk vizsgálni kívánt hígítási intervallumát (**4. táblázat**).

4. táblázat. Az alkalmazott antibiotikumok vizsgált log₂ alapú hígítási sora (µg/ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Enrofloxacin	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008	0,004	0,002	0,001
Florfenikol	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008
Gentamicin	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Penicillin-G	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008	0,004	0,002	0,001
Tetraciklin	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008
Tilmikozin	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06

A **félkövér** betűvel szedett értékek az ATCC-700025 QC törzs standard rendszerben meghatározott MIC-intervallumát jelzik.

A hígítások elkészítéséhez szükséges antibiotikum tömegét az alábbi képlet alapján számoltuk ki:

$$W = \frac{V \times C}{Pot}$$

ahol W = az antibiotikum por tömege (mg), V = a felhasználni kívánt oldószer mennyisége (ml), C = a készítendő antibiotikum-oldat koncentrációja (µg/ml) és Pot = az antibiotikum por potenciálja (µg/mg).

Az antibiotikumok hígítása során, $10\times$ töménységű ($10\times T$) törzsoldatokat készítettünk, amelyeknek koncentrációja minden esetben 12,8 mg/ml volt. Az oldatokat elkészítésük és felhasználásuk során fénytől védve tároltuk. A törzsoldatokat 200 μ l-es egységekben -80°C -on tároltuk felhasználásig, de maximum 6 hónapig. Az egyszer már felolvasztott oldatokat aznap felhasználtuk, a maradékot pedig elöntöttük.

A leves-mikrohígításos antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok során minden esetben vízszintes fenéklemezű vájulatokkal kialakított mikrotitráló lemezeket használtunk. Egy lemezen nyolc *H. somni* törzs egy antibiotikummal szembeni érzékenységét vizsgáltuk.

A mikrotitráló lemezek vájulateit a 12. oszloptól a 2. oszlop felé haladva \log_2 szerint növekvő koncentrációjú antibiotikum oldatok 25 μ l-ével töltöttük fel. A vizsgálni kívánt antibiotikum koncentrációknál négyszer töményebb oldatokat használtunk, mivel a baktérium-szuszpenzió (75 μ l) hígító hatását is figyelembe kellett vennünk. Az első oszlop vájulateit pozitív kontrollnak használtuk, amelyeket 25 μ l PBS-sel töltöttünk fel antibiotikum-oldat helyett.

Az antibiotikumot tartalmazó lemezeket előkészítésük során óvtuk az erős fényhatásoktól.

A baktériumtörzsek

A vizsgálatokhoz a *H. somni* törzseket tenyésztése során a 6.3.1 szakaszban leírt módszert alkalmaztuk, az inkubációs időt azonban 24 órára csökkentettük.

Az antibiotikum-hígításokat és negatív kontrollt tartalmazó lemezek beoltásához szükséges baktérium-szuszpenziót 24 órás *H. somni* tenyészetekből készítettük.

Első lépésként a CSA lemez felületéről felvett 5-7 baktériumtelepet 4 ml MH levestáptalajban szuszpendáltunk (primer szuszpenzió). Az így elkészített, 0,5 MacFarland standardnak megfelelő zavarosságú szuszpenzió megközelítőleg $1-2\times 10^8$ TFE/ml csírákat tartalmazott. A csíraszámot az előkísérletek során a 6.6.2 szakaszban leírt eljárás szerint minden alkalommal, a kísérletek során pedig hetente egy alkalommal meghatároztuk.

A mikrotitráló lemezek beoltásához 5×10^5 TFE/ml csíratartalmú szuszpenziót állítottunk elő a primer szuszpenzió megfelelő mennyiségének steril VFM levestáptalajban történő hígításával. Negatív kontrolként steril VFM levest alkalmaztuk.

A frissen előkészített, vagy -80°C -ról felolvasztott antibiotikum-hígításokat és negatív kontrollt tartalmazó mikrotitráló lemez nyolc sorába, soronként különböző *H. somni* törzset 5×10^5 TFE/ml koncentrációban tartalmazó 75 μ l VFM levestáptalajt mértünk, majd a lemezeket 5% CO_2 jelenlétében 37°C -on 72 órán át inkubáltuk.

6.7.3 Az eredmények elbírálása, dokumentálása és értékelése

A lemezeket a 24. a 48. és a 72. órában szemmel bíráltuk el, a vájulatokban lévő leves zavarosságának megléte vagy hiánya alapján. Az eredményeket lemezenként külön adatalapon és elektronikus formában is rögzítettük.

Azt a *H. somni* törzset, amelynek pozitív kontrolljában nem tapasztaltunk baktériumnövekedést vagy a negatív kontrolljában látható baktériumszaporodás volt, kizártuk az értékelésből.

Az eredményeket összesítve, valamint állatfajonként és anatómiai eredet szerint lebontva elemeztük, ezenkívül vizsgáltuk az antibiotikum-érzékenység és a törzsek izolálásának időpontja közti összefüggéseket.

Az antibiotikumok minimális gátló koncentrációjának (MIC-értékének) meghatározása

A *H. somni* törzsek antibiotikum-érzékenységének leves-mikrohígításos vizsgálata során az antibiotikumok legkisebb gátló koncentrációját, MIC-értékét határoztuk meg, ami a vizsgált antibiotikum azon legkisebb $\mu\text{g/ml}$ -ben kifejezett koncentrációját jelzi, amely standard körülmények között a szemmel látható baktériumnövekedést megakadályozza. Eredményeink alapján meghatároztuk a 24. órában a vizsgált *H. somni* törzsek 50%-ának (MIC_{50}), 90%-ának (MIC_{90}) és 100%-ának (MIC_{100}) növekedését gátolni képes antibiotikum-koncentrációkat, valamint az összes törzs eredménye alapján megadható minimális gátló intervallumokat. Ezenkívül állatfajonkénti csoportok szerint és az összes törzsre vonatkozóan meghatároztuk a leggyakrabban előforduló MIC értéket, az eredmények móduszát.

A H. somni törzsek antibiotikum-érzékenységének meghatározása

Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok eredményeinek elemzése során az NCCLS M31-A2 (2002) dokumentumában meghatározott értékelési zónákat alkalmaztuk. Az érzékenységi zónák adatait a **5. táblázat** tartalmazza.

Az értékelés során megkülönböztettük az adott antibiotikumra érzékeny (É), mérsékelten érzékeny (MÉ) valamint az antibiotikumnak ellenálló (rezisztens, R) törzseket.

5. táblázat. A vizsgált antibiotikumok értékelési határai (NCCLS, M31-A2, Table. 2.; 2002)

Antibiotikum	Értékelési zónák ($\mu\text{g/ml}$)		
	É ^a	MÉ ^b	R ^c
Enrofloxacin	$\leq 0,25$	0,5-1	$2 \leq$
Florfenikol	≤ 2	4	$8 \leq$
Gentamicin	≤ 4	8	$16 \leq$
Penicillin-G	≤ 2	–	$4 \leq$
Tetraciklin	≤ 4	8	$16 \leq$
Tilmikozin	≤ 8	16	$32 \leq$

^aérzékeny; ^bmérsékelten érzékeny; ^crezisztens

7. Eredmények

7.1 *H. somni* törzsek izolálása kérődzőkből

7.1.1 A *H. somni* törzsek eredete

A mintagyűjtés során, Magyarország 5 megyéjének, 9 szarvasmarha és 10 kecskeállományában gyűjtött 652 tamponminta vizsgálata során összesen 56 (8,6%) tenyésztési, morfológiai és biokémiai szempontból *H. somni*-nak meghatározott baktériumtörzset izoláltunk (**3., 4. és 5. függelék**).

Hat szarvasmarha-állomány 155 állatából származó 215 hüvelytamponmintából 5 állomány 38 (17,7%) mintája lett pozitív, míg egy állomány mentesnek bizonyult *H. somni*-tól.

Tíz kecskeállomány 205 genitális eredetű tamponmintáinak vizsgálata során 11 (5,4%) *H. somni* törzset azonosítottunk. A pozitív minták két állományból származtak, míg nyolc állomány mentes volt tenyésztési bakteriológiai vizsgálatok alapján a kórokozótól. A kecskeállományokban gyűjtött orrtamponminták vizsgálata minden esetben negatív eredménnyel zárult.

A tanszékünkre érkezett, három szarvasmarha-állományból származó 26 orrtampon- és 1 tüdőminta vizsgálata során 7 (25,9%), klasszikus bakteriológiai módszerekkel *H. somni*-nak meghatározott törzset izoláltunk. Mindegyik állományban igazoltuk a *H. somni* jelenlétét. Az orrtamponminták primer tenyészeteiben a *H. somni* gyakran fordult elő *Pasteurella multocida*-val együtt.

A munkánk során gyűjtött baktériumtörzsek részletes adatait a **6. táblázat** tartalmazza. Az **1. ábra** mutatja az általunk izolált és a tanszéki törzsgyűjteményben korábban elhelyezett *H. somni* törzsek földrajzi eloszlását.

7.1.2 A *H. somni* előfordulása kecskék genitális nyálkahártyáján

Két kecskeállomány genitális nyálkahártyáiról származó tamponmintákból tenyésztési, morfológiai és biokémiai tulajdonságai alapján összesen 11 *H. somni*-nak meghatározott baktériumtörzset izoláltunk. Mindkét pozitív állományt juhokkal együtt tartották és a mintákat a párzási időszakban vettük.

A 9. számú (Baskó) állomány anyaállataiból származó 14 hüvelytamponmintából 8 (57,1%), valamint az ugyanitt tartott két bak tasak- és egy hermafrodita állat ivari nyílásából származó tamponmintákból 1-1 *H. somni* törzset izoláltunk. Az összes mintát tekintve, a *H. somni* izolálási arány 58,5% volt. A másik állományból (8. számú – Erdőbénye) származó 26 hüvelytamponmintából 1 (3,8%) *H. somni* törzset izoláltunk.

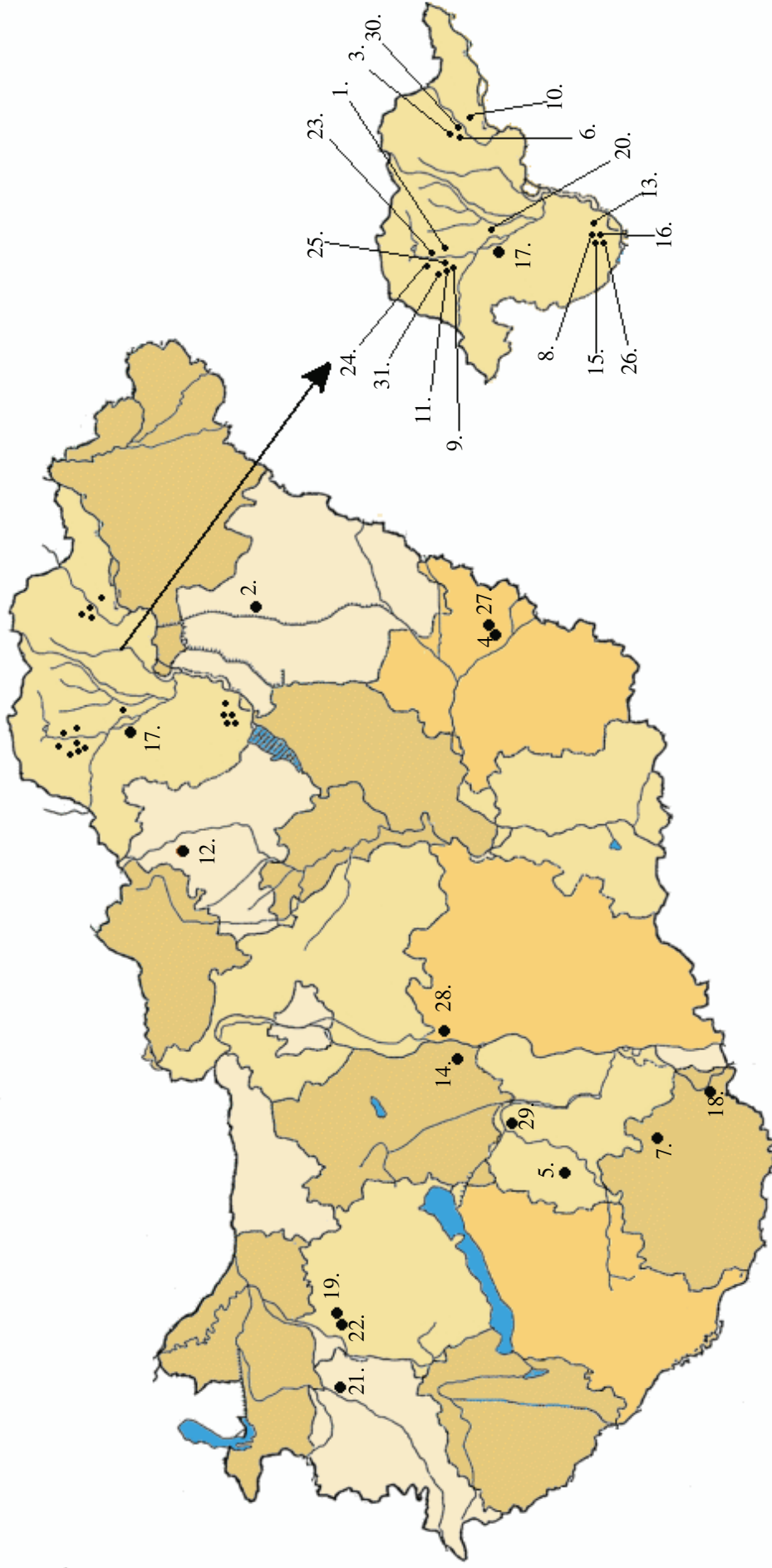
A 10 kecskeállományból származó orrtamponminták egyikéből sem lehetett *H. somni*-t izolálni. A tenyésztéses bakteriológiai vizsgálatok során 8 állomány 158 állata *H. somni*-tól mentesnek bizonyult

6. táblázat. A mintagyűjtés során izolált *H. somni* törzsek adatai

időpontja	A mintavétel helye	A minták száma	A minták eredete				
			állatfaj	tüdő	orr	hüvely	tasak
2006.09.21	Dalmand (D) ^a	47	szarvasmarha			9/47 (19,1%)	
2006.09.26	Tolnanémedi (T)	11	szarvasmarha	1/1 (100%)	0/10		
2006.10.04	Mezőkeresztes (M)	22	szarvasmarha			3/22 (13,6%)	
2006.11.14	Mohács (IV)	20	szarvasmarha			5/20 (25%)	
2006.11.20	Békés (B)	26	szarvasmarha			3/26 (11,5%)	
2006.12.15	Dabas (VI)	20	szarvasmarha			0/20	
2007.02.20	Pápa (P1)	20	szarvasmarha			8/20 (40%)	
2007.03.20	Pápa (P2)	20	szarvasmarha			12/20 (60%)	
2007.04.17	Pápa (P3)	20	szarvasmarha			8/20 (40%)	
2007.05.22	Pápa (P4)	20	szarvasmarha			8/20 (40%)	
2007.09.21	Tarhos (VII)	9	szarvasmarha		5/9 (55,6%)		
2007.10.09	Nemesszalók (VIII)	7	szarvasmarha		1/7 (14,3%)		
2008.03.27	Szőlősardó (1)	40	kecske		0/20	0/20	
2008.03.27	Zádorfalva (2)	40	kecske		0/20	0/19	0/1
2008.03.27	Kurityán (3)	40	kecske		0/20	0/20	
2008.05.22	Abod (4)	50	kecske		0/25	0/24	0/1
2008.05.22	Szalonna (5)	32	kecske		0/16	0/15	0/1
2008.05.22	Szuhogy (6)	28	kecske		0/14	0/13	0/1
2008.09.18	Vámosújfalva (7)	40	kecske		0/20	0/18	0/2
2008.09.18	Erdőbénye (8)	60	kecske		0/30	1/26 (3,8%)	0/4
2008.09.18	Baskó (9)	34	kecske		0/17	8/14 (57,1%)	1+1/2+1^d (66,7%)
2008.09.18	Baskó-Köröshegy (10)	46	kecske		0/23	0/22	0/1
Kecske légzőszervi minták:		0/205	Kecske genitális minták:		11/205 (5,4%)		
Szarvasmarha légzőszervi minták:		7/27 (25,9%)	Szarvasmarha hüvely minták:		38/215 (17,7%)		
Minták összesen: 56/652 (8,6%)							

^aa minták jelölését zárójelben tüntettük fel;

^dhermafrodita állat ivari nyílásából származó +1 minta

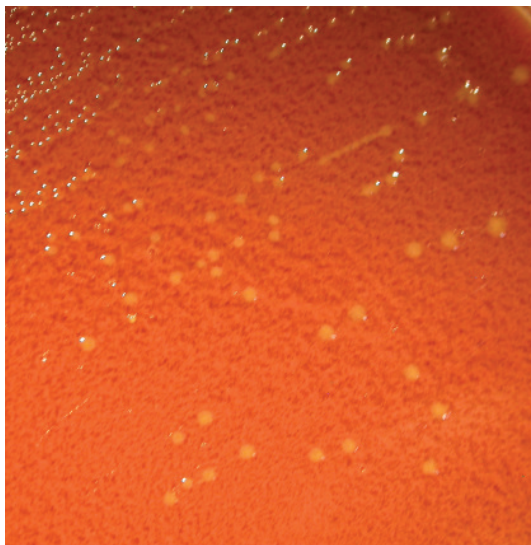


1. ábra. A 2006-2008 közötti időszakban gyűjtött *H.* somni törzsek földrajzi eredete

- | | | | | |
|------------------|------------------|---------------------|-----------------|------------------|
| 1. Abod | 8. Gelej | 15. Mezőkeresztes | 22. Pápa | 29. Tolnanémedi |
| 2. Balmazújváros | 9. Izsófalva | 16. Mezőnagymihály | 23. Szalonna | 30. Vámosújfalva |
| 3. Baskó | 10. Kenézlő | 17. Miskolc | 24. Szőlőszárd | 31. Zádorfalva |
| 4. Békés | 11. Kuriyán | 18. Mohács | 25. Szuhogy | |
| 5. Dalmand | 12. Mátradereske | 19. Nemesszalók | 26. Szentistván | |
| 6. Erdőbénye | 13. Mezősát | 20. Onga | 27. Tarhos | |
| 7. Erdősmezse | 14. Mezőfalva | 21. Ostffyasszonyfa | 28. Tass | |

7.2 A *H. somni* törzsek azonosítása

7.2.1 Tenyésztési tulajdonságok



2. ábra. A *H. somni* telepei CSA-n (37°C-on, 5%CO₂ jelenlétében 48 órás inkubáció után)

A megfelelő tenyésztési módszerek alkalmazásakor, a 48 órás inkubációs idő végén a *H. somni*-ra jellemző kerek, lapos, csillogó, 1,5 mm átmérőjű, jellegzetesen sárga pigmentáltságú telepeket kerestünk (**2. ábra**), 48 óránál hosszabb inkubációs idő esetén a telepek ellapultak, közepükön kiemelkedés keletkezett, tükrötjás-szerűvé váltak, ez a telepmorfológiai változás különösen a juh eredetű törzsekre volt jellemző.

Egy szarvasmarha hüvely eredetű törzs esetében aerotoleranciát figyeltünk meg.

A baktériumtelepek az izolátumok többségében vajkonzisztenciájúak voltak, a táptalaj felületéről kacsával könnyen le tudtuk emelni őket. A friss kórtani elváltozásokból izolált szarvasmarha légzőszervi eredetű törzsek azonban inkább lágyabb állagúak, valamint a táptalajról nehezen leemelhetők voltak.

Az oxigéntűrő szarvasmarha hüvely eredetű *H. somni* törzs tenyésztése során, valamint néhány esetben a –80°C-ról történő kioltás után a törzsek hasadt telepmorfológiáját figyeltünk meg.

A *H. somni* szintenyészetet tartalmazó Petri-csésze kinyitásakor, rövid ideig jellegzetes, igen csípős szagot lehetett érezni.

Munkánk során alkalmazott tenyésztési módszerekkel a *H. somni* törzsek hemolizáló képességét nem tudtuk vizsgálni.

A táptalajhoz adagolt 100 µg/ml ciklohexamid nem befolyásolta a *H. somni* törzsek növekedését és telepmorfológiájuk alakulását sem.

7.2.2 Morfológiai és biokémiai tulajdonságok

Az izolált *H. somni* törzsek 48 órás tenyészeiből készült Gram-szerint festett kenetekben minden esetben Gram-negatív, apró (1-2 µm × 0,4-0,5 µm), pleomorf pálcákat láttunk. Fonalakat ritkán, leginkább a friss klinikai izolátumok esetében figyeltünk meg, de többszöri átoltást követően többnyire tömzsi coccoid-pálcákat láttunk.

A baktériumsejtek egyenletesen, de néha igen halványan festődtek. A kenetekben erősebben festődő szemcsék jelenlétét nem tapasztaltuk.

A 48 órás tenyészetek szuszpenziójának fáziskontraszt mikroszkóppal végzett vizsgálata során mozgó alakokat egyetlen törzs esetében sem láttunk.

Az izolált *H. somni* törzsek morfológiai és biokémiai tulajdonságait az **7. táblázat** tartalmazza.

7. táblázat. A *H. somni* genus szintű azonosítása során vizsgált tulajdonságai (121 *H. somni* törzs)

CO ₂ -igény	+ (120) ^a
Festődés Gram-szerint	– (0)
Alak, méret	1-3 µm × 0,5-0,6 µm coccobacillus
Mozgás	– (0)
Kataláz enzim termelés	– (1)
Citokróm-oxidáz C enzim termelés	+ (121)
Indoltermelés	+ (118)

^apozitív törzsek számát zárójelben tüntettük fel

7.2.3 A törzsek azonosítása szénforrás-hasznosítás alapján

A BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM a vizsgált törzsek 83%-át fajszinten azonosította, 56%-ban a *H. somni*-t jelölte meg legvalószínűbb fajként, a törzsek további 21%-át második legvalószínűbb fajként azonosította, míg 6%-ban a harmadik helyen vagy ennél hátrébb helyezte el a rendszer a baktériumot.

A vizsgálatokba vont ATCC-43625 és ATCC-700025 számú *H. somni* típus-törzseket a rendszer 100%-os valószínűséggel, fajszinten azonosította.

A fennmaradó 17 baktériumtörzset (17%) 8 esetben (8%) genus-szinten azonosította a rendszer, míg további 8 törzset (8%) nem ismert fel, de a *H. somni*-t adta meg a legvalószínűbb törzsek listáján az első (5%) vagy második (3%) helyen.

A törzsek 1%-ának szénforrás-hasznosítási mintázata alapján a rendszer nem jelölte meg a *H. somni*-t a lehetséges törzsek listáján.

A rendszerrel végzett azonosítás részletes adatait a **8. táblázat** tartalmazza.

8. táblázat. 100 *H. somni* törzs BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM segítségével végzett azonosításának részletes adatai

Eredet	Szarvasmarha légzőszervi			Szarvasmarha hüvely		
	Sp ID ^a	Gen ID ^b	No ID ^c	Sp ID	Gen ID	No ID
Azonosítás						
1. helyen	62,5%	2,5%	7,5%	45,0%	10,0%	10,0%
2. helyen	12,5%	5,0%	2,5%	15,0%	—	5,0%
2 < helyen	5,0%	—	2,5%	15,0%	—	—
Eredet	Juh genitális			Kecske genitális		
	Sp ID	Gen ID	No ID	Sp ID	Gen ID	No ID
Azonosítás						
1. helyen	66,7%	3,7%	—	18,2%	—	—
2. helyen	18,5%	7,4%	3,7%	72,7%	—	—
2 < helyen	—	—	—	9,1%	—	—
Eredet	ATCC			Összes törzs		
	Sp ID	Gen ID	No ID	Sp ID	Gen ID	No ID
Azonosítás						
1. helyen	100,0%	—	—	56,0%	4,0%	5,0%
2. helyen	—	—	—	21,0%	4,0%	3,0%
2 < helyen	—	—	—	6,0%	—	1,0%

^afajszintű azonosítás; ^bgenus-szintű azonosítás; ^cnem lehetett azonosítani a törzset

7.2.4 Azonosítás a 16S rDNS részletének vizsgálatával

A genus szinten végzett baktériumazonosítás igazolása érdekében 15 *H. somni* törzs 16S rRNS génrészletének vizsgálatát végeztük el.

A vizsgálatokba vont 3 kecske eredetű *H. somni* törzs 16S rDNS részletének (382 bp) bázissorrendje 100%-ban megegyezett egymással. A 8/17 *H. somni* törzs amplikonjának bázissorrendjét a **3. ábra** mutatja be, valamint az EU708473 azonosító számmal a Génbankból online letölthető (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

```

1   caacgcgaag aaccttacct actcttgaca tcctaagaag ccgccagaga tgggtggtgtg
61  ccttcgggag ctagagaca ggtgctgcat ggctgtcgtc agctcgtggt gtgaaatggt
121 gggттаagtc ccgcaacgag cgcaaccctt atcctttggt gccagcatgt tagggtgggga
181 actcaaagga gactgccggt gataaactgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcatcat
241 ggcccttacg agtagggcta cacacgtgct acaatggcgt atacagaggg aggcgagcct
301 gcgagggtaa gcgaagctca gaaagtacgt ctaagtccgg attggagtct ggaactcgac
361 tccatgaagt cggaatcgct ag

```

3. ábra. A 8/17 *H. somni* törzs 16S rDNS 382 bp hosszúságú szakaszának bázissorrendje

7.2.5 A szénforrás-hasznosításon alapuló, valamint a 16S rDNS alapú azonosítás összehasonlítása

9. táblázat. A 16S rDNS alapján azonosított *H. somni* törzsek és szénforrás-hasznosításon alapuló azonosíthatóságuk

TÖRZS SZÁMA	SZÁRMAZÁS		IZOLÁLÁS	BIOLOG
	ÁLLATFAJ	SZERV	HELYE	
24/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1. ^a <i>H. somni</i> , 90% ^b
25/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	Genus ID ^c , 2. <i>H. somni</i>
26/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	2. <i>H. somni</i> , 1%
27/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	2. <i>H. somni</i> , 11%
28/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	2. <i>H. somni</i> , 17%
34/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	Genus ID, 2. <i>H. somni</i>
41/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1. <i>H. somni</i> , 99%
15/00	borjú	tüdő	MTA-ÁTKI	1. <i>H. somni</i> , 98%
16/00	borjú	tüdő	MTA-ÁTKI	No ID, 1. <i>H. somni</i>
6/01	borjú	tüdő	Balmazújváros	1. <i>H. somni</i> , 97%
21/01	borjú	tüdő	Ostffyasszonyfa	Genus ID, 1. <i>H. somni</i>
57/03	borjú	tüdő	MTA-ÁTKI	1. <i>H. somni</i> , 67%
9/13	kecske	hüvely	Baskó	3. <i>H. somni</i> , 1%
9/15	kecske	tasak	Baskó	2. <i>H. somni</i> , 36%
8/17	kecske	hüvely	Erdőbénye	1. <i>H. somni</i> , 99%

^aa legvalószínűbb törzsek listáján elfoglalt pozíció; ^baz azonosítás pontosságának mértéke; ^cgenus-szinten történt azonosítás

A **9. táblázat** adatai alapján látható, hogy a BIOLOG rendszer által fajszerintem azonosított baktériumtörzsek mindegyike, a 16S rDNS részletének vizsgálata alapján *H. somni*-nak bizonyult, azaz a rendszer téves negatív eredményeket adhat. A **9. táblázat** adatai szerint, a szénforrás-

hasznosítás alapján *H. somni*-nak meghatározott baktériumtörzsek azonosságát a genetikai vizsgálatok minden esetben alátámasztották, a rendszer nem adott tévesen pozitív eredményeket.

7.3 A *H. somni* törzsek szénforrás-hasznosítása

7.3.1 A szénforrás-hasznosítási vizsgálatok eredményei

A szénforrás-hasznosítási vizsgálatok eredményeit állatfajonkénti csoportosításban, valamint összesítve a **10. táblázat** tartalmazza.

A rendszerhez tartozó adatbázis alapján a *H. somni* törzsek 100%-a képes hasznosítani a dextrint, az N-acetil-D-glükózamint, a D-fruktózt, az α -D-glükózt, a D-mannitot, a turanózt, a piroszőlősav-metilésztert, valamint az α -keto-vajsavat, míg a törzsek több mint 90%-a tudja hasznosítani a D-cellobiózt, a D-mannózt, a D-szorbitot, a D-trehalózt és az uridint (**11. táblázat**).

Az anyagcsere-ujjlenyomat vizsgálatok során, a 100 *H. somni* törzs összesen 40-féle szénforrás hasznosítására volt képes, amelyek közül 16-ot a törzsek több mint 50%-a tudott metabolizálni, míg 55 szénforrást a törzsek egyike sem volt képes hasznosítani. A törzsek 100%-a tudta hasznosítani a dextrint és az α -D-glükózt, míg az N-acetil-glükózamint, a D-fruktózt, a D-mannitot, a D-szorbitot és a turanózt a törzsek legalább 90%-a volt képes metabolizálni.

A szarvasmarha légzőszervi eredetű 40 *H. somni* törzs 28 különböző szénforrást tudott hasznosítani. A dextrint és az α -D-glükózt ebben a csoportban is törzsek 100% bontotta, a többi szénforrást hasznosítani képes törzsek aránya azonban nem haladta meg a 90%-ot. A nem hasznosítható szénforrások száma ebben a csoportban 67 volt.

A szarvasmarha hüvely eredetű *H. somni* törzsek 35-féle szénforrást metabolizáltak, amelyek közül a dextrint, a D-fruktózt, az α -D-glükózt, a D-mannitot, a D-szorbitot és a D, L-tejsavat, azaz összesen 6 szénforrást a törzsek 100%-a hasznosított.

A juh genitális eredetű törzsek 100%-a négy (dextrin, α -D-glükóz, mannóz, turanóz), míg a törzsek 90%-a az előbbieken kívül további négy (N-acetil-glükózamin, D-mannit, D-szorbit, α -keto-vajsav) szénforrást metabolizált. A csoportba tartozó törzsek által hasznosított 32 különböző szénforrás közül kilencet a törzsek legfeljebb 10%-a hasznosította.

A 11 kecske eredetű *H. somni* törzs 22 különböző szénforrás hasznosítására volt képes, ebből a dextrint, az N-acetil-D-glükózamint, a D-cellobiózt, a D-fruktózt, az α -D-glükózt, a D-mannitot, a D-mannózt, a D-szorbitot, a turanózt, az α -keto-vajsavat, a D, L-tejsavat és a D-glükóz-6-foszfátot a törzsek 100%-a, míg a D-trehalózt 90%-uk metabolizálta.

10. táblázat. A BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM rendszerével vizsgált *H. somni* törzsek szénforrás-hasznosítási képessége

Szénforrás	Szarvasmarha		Juh genitális	Kecske genitális	aÖsszes törzs
	légzőszervi	hüvely			
negatív kontroll	^b —	—	—	—	—
dextrin	^c 100	100	100	100	100
tween 80	21	36	5	—	18
N-acetil-D-glükózamin	87	81	93	100	90
D-cellobióz	65	86	72	100	75
i-erythritol	—	19	16	—	10
D-fruktóz	89	100	84	100	91
gentiobióz	28	38	43	64	38
α-D-glükóz	100	100	100	100	100
mezo-inozit	—	—	5	—	≤ 2
α-D-laktóz	—	7	—	—	≤ 2
maltóz	18	21	28	50	25
D-mannit	84	100	90	100	91
D-mannóz	84	81	100	100	88
D-melibióz	—	17	9	—	6
β-metil-D-glükozid	—	19	14	—	9
D-pszikóz	7	14	9	23	11
D-szorbit	87	100	90	100	91
szacharóz	7	—	—	—	≤ 2
D-trehalóz	72	79	86	91	79
turanóz	83	86	100	100	90
xilitol	—	—	5	—	≤ 2
piroszőlősav-metilészter	63	62	22	59	52
ecetsav	—	10	—	—	≤ 2
D-glükonsav	41	50	43	27	42
α-hidroxi-vajsav	60	79	43	73	60
α-keto-vajsav	83	79	90	100	86
α-keto-glutársav	7	14	9	—	9
D,L-tejsav	83	100	72	100	85
propionsav	—	10	—	—	≤ 2
borostyánkősav	11	14	—	9	9
glükuronamid	—	7	—	—	≤ 2
L-aszparaginsav	11	21	17	59	20
L-glutaminsav	—	—	5	—	≤ 2
D-szerin	—	10	—	—	≤ 2
urokánsav	11	45	19	—	19
inozin	23	14	10	—	15
uridin	70	57	48	50	58
timidin	10	12	—	—	7
α-D-glükóz-1-foszfát	—	—	7	—	≤ 2
D-glükóz-6-foszfát	40	60	66	100	57
Hasznosított szénforrások:	28	35	32	22	40
^d 100%	2	6	4	12	2
^e 90% ≤	2	6	8	13	7
^f 50% ≤	15	17	13	19	16
^g ≤ 10%	4	5	9	1	6

^aAz összesített adatok tartalmazzák az ATCC-43625 és ATCC-700025 számú típus-törzs adatait is.

^b— = egyetlen törzs sem volt képes hasznosítani az adott szénforrást;

^ca szénforrás hasznosítási aránya százalékban kifejezve;

^da törzsek 100%-a által hasznosított szénforrások száma;

^ea törzsek legalább 90%-a által hasznosított szénforrások száma;

^fa törzsek legalább 50%-a által hasznosított szénforrások száma.

^ga törzsek legfeljebb 10%-a által hasznosított szénforrások száma.

A vizsgált két típus törzs által hasznosított szénforrásokat a **11. táblázat** tartalmazza. A BIOLOG adatbázisa által 100%-osan hasznosíthatónak jelölt 8 szénforrás közül az ATCC-700025 *H. somni* törzs 7-et tudott hasznosítani, míg az ATCC-43625 *H. somni* törzs 5-öt, további két szénforrás hasznosításának elbírálásakor kétes eredményt állapítottunk meg. Mindkét törzs metabolizálta a dextrint, az N-acetil-D-glükózamint, az α -D-glükózt, a D-mannitot és a turanózt. Az α -keto-vajsavat és a piroszőlősav-metilésztert az ATCC-700025 törzs hasznosította, az utóbbi szénforrás és a D-fruktóz tekintetében az ATCC-43625 törzs metabolizáló képessége kétes volt. Az ATCC-43625 *H. somni* típus törzs az α -keto-vajsavat, az ATCC-700025 *H. somni* típus törzs pedig a D-fruktózt nem tudta hasznosítani, annak ellenére, hogy a BIOLOG rendszer adatbázisa szerint a törzsek 100%-a képes ezeket a szénforrásokat hasznosítani.

11. táblázat. Két *H. somni* típus törzs szénforrás-hasznosítási mintázata és a BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM *H. somni*-ra vonatkozó adatai

Szénforrás	Biolog adatbázis	ATCC 43625	ATCC 700025
negatív kontroll	—	—	—
dextrin	100^a	+	+
N-acetil-D-glükózamin	100	+	+
D-cellobióz	91	±	+
D-fruktóz	100	±	—
gentiobióz	82	±	±
α -D-glükóz	100	+	+
maltóz	27	—	±
D-mannit	100	+	+
D-mannóz	95	±	+
D-szorbit	93	+	+
D-trehalóz	95	+	+
turanóz	100	+	+
piroszőlősav-metilészter	100	±	+
D-glükonsav	18	—	±
α -keto-vajsav	100	—	+
D,L-tejsav	80	—	+
uridin	95	±	+
D-glükóz-6-foszfát	11	±	±
Hasznosított szénforrások:	41	14	17

^aa szénforrás hasznosítási aránya százalékban kifejezve

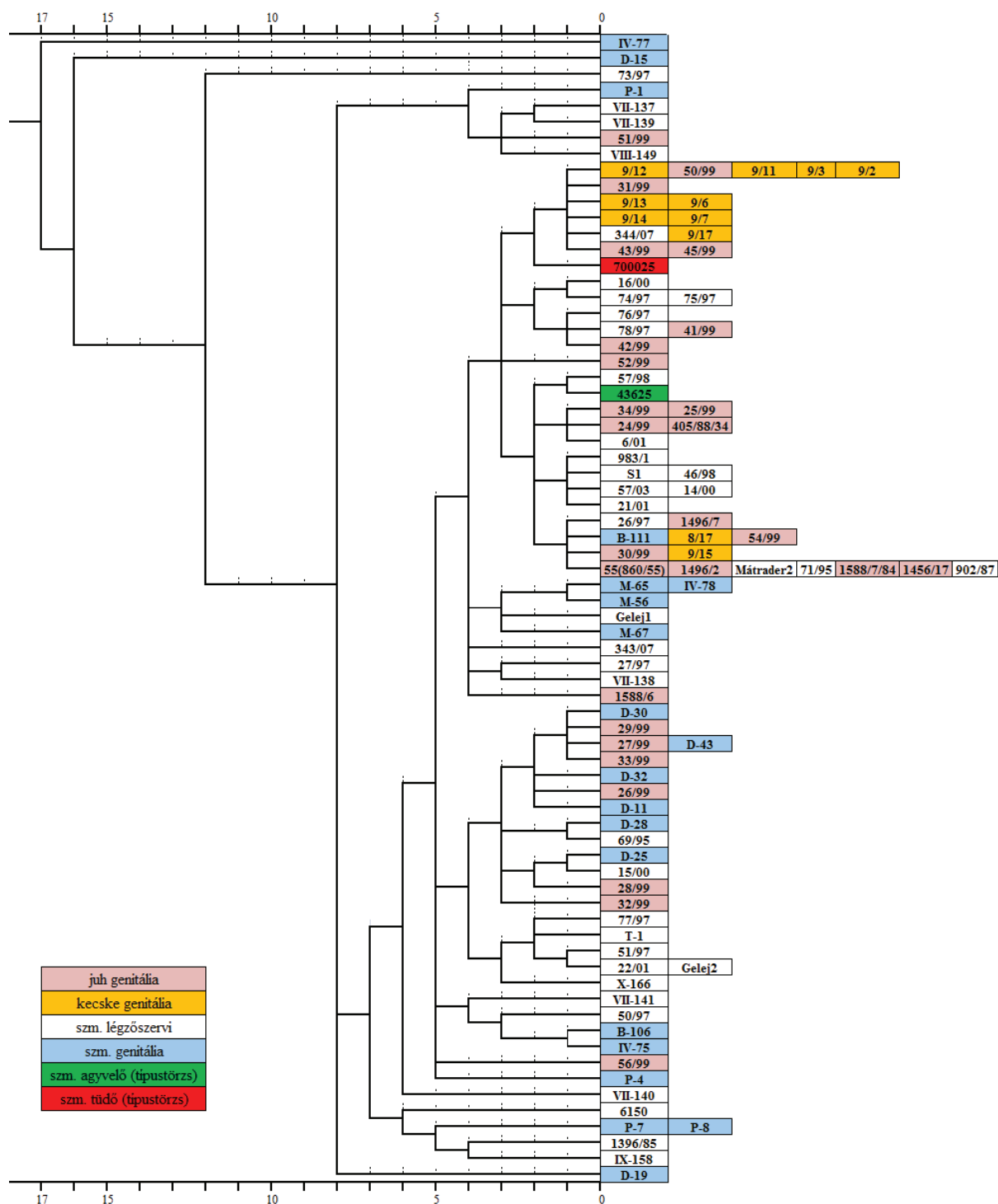
12. táblázat. A BIOLOG adatbázisban szereplő adatok összehasonlítása saját eredményeinkkel

Szénforrás	Biolog adatbázis	Összes törzs	Szénforrás	Biolog adatbázis	Összes törzs
gentiobióz	82 ^a	38	tween 80	5	18
meso-inozit	48	≤ 2	D-pszikóz	2	11
β-metil-D-glükozid	52	9	D-glükonsav	18	42
piroszőlősav-metilészter	100	52	α-hidroxivajsav	32	60
α-keto-vajsav	100	86	D-glükóz-6-foszfát	11	57
inozin	73	15			
uridin	95	58			

^aa szénforrás hasznosítási aránya százalékban kifejezve

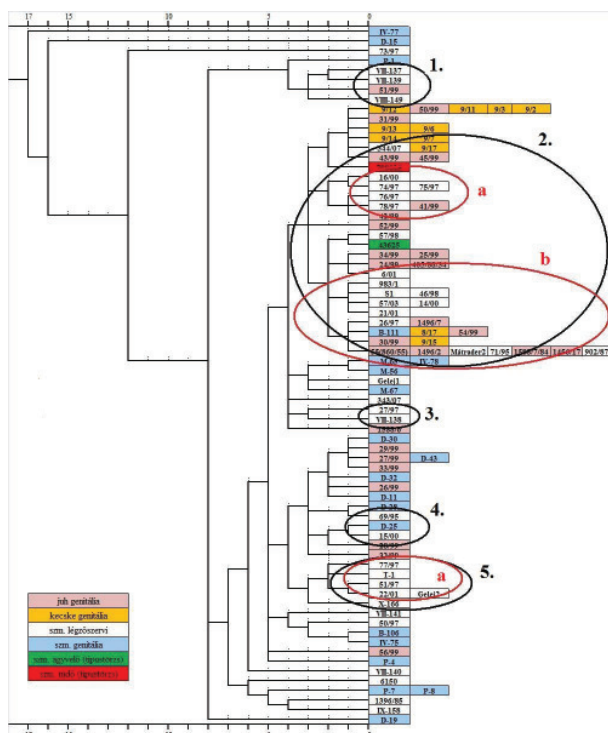
A vizsgált klinikai izolátumok összesített anyagcsere-ujjlenyomata a dextrin és az α-D-glükóz 100%-os hasznosítási arányában egyezett a BIOLOG rendszer adatbázisában megadott adatokkal. Az adatbázisban számos szénforrás esetében, magasabb hasznosítási arány szerepelt, mint az általunk vizsgált törzsek összesített eredménye. A BIOLOG adatbázis és az általunk vizsgált törzsek összehasonlítását a **12. táblázat** tartalmazza.

7.3.2 A *H. somni* törzsek szénforrás-hasznosítási mintázatának összehasonlító vizsgálata



4. ábra. 100 *H. somni* törzs anyagcsere-ujjlenyomata alapján készült törzsfá

A vizsgálatokba vont 100 *H. somni* törzs anyagcsere-ujjlenyomata alapján a BIOLOG MicroLog3 (4.20.05) szoftver által készített törzsfá az 4. ábrán a látható. A vizsgált törzseket szénforrás-hasznosításuk alapján 4 csoportba tudtuk osztani, amelyek közül a legnagyobb csoportba 97 *H. somni* törzs tartozott, a további három baktériumtörzs pedig egyenként külön csoportot alkotott. A dendrogram egymástól legtávolabbi két pontján két szarvasmarha hüvely eredetű törzs található.

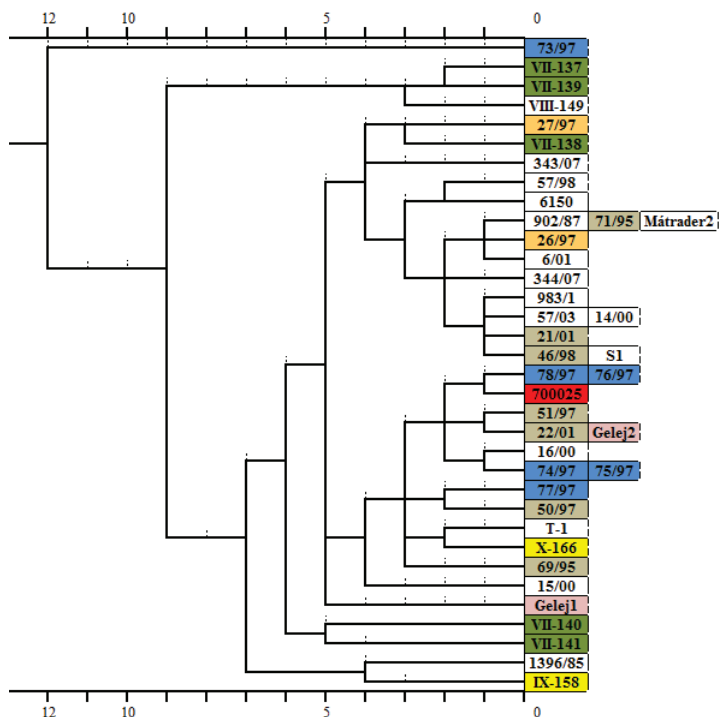


5. ábra. A szarvasmarha légzőszervi eredetű *H. somni* törzsek elhelyezkedése az összesített törzsfán

A kecske eredetű *H. somni* törzsek a törzsfá egyetlen alcsoportjában helyezkedtek el, azaz legfeljebb 3 szénforrás hasznosításában tértek el egymástól.

Az összesített törzsfá alapján számos esetben az eltérő állatfajból származó *H. somni* törzsek egyetlen tulajdonságban sem tértek el egymástól

A 100 *H. somni* törzs anyagcsere-ujjlenyomata alapján készült törzsfá elemzése során a dendrogram fő ágán található szarvasmarha légzőszervi eredetű törzseket további 5 alcsoportra osztottuk, melyek eloszlása a 5. ábrán látható. Ezek közül két alcsoport számos törzset magába foglalt, amelyek közül a nagyobbikba (2.) 18 törzs, a kisebbikbe (5.) pedig 6 *H. somni* törzs tartozott.



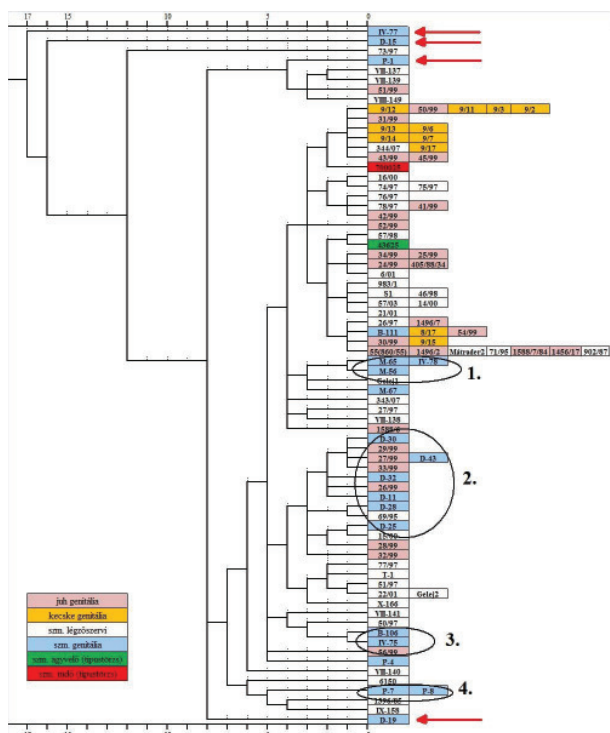
6. ábra. A szarvasmarha légzőszervi eredetű *H. somni* törzsek anyagcsere-ujjlenyomata alapján készült törzsfá

A két alcsoportot további kisebb alcsoportokra osztottuk, az ezekbe tartozó törzsek egy, legfeljebb két tulajdonságban tértek el egymástól.

A szarvasmarha légzőszervi eredetű *H. somni* törzsek szénforrás-hasznosítási képessége alapján készített dendrogramot a 6. ábra mutatja, amelyen az eltérő színek különböző állományokat jelölnek, míg a jelöletlen törzsek különbözőállományokból származó egyedüli izolátumok.

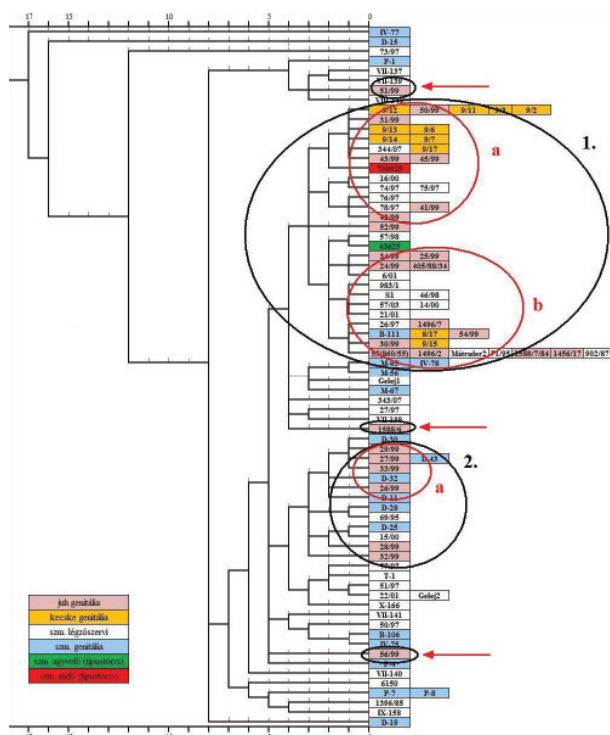
A szarvasmarha légzőszervi eredetű törzseket anyagcsere-ujjlenyomatuk alapján a rendszer két csoportra osztotta. A törzsfá egyik ágán 40 törzs szerepelt, a másik csoportot pedig 1 törzs alkotta, amely 12 szénforrás hasznosításában tér el a többi törzstől.

A **6. ábrán** látható, hogy minden állomány esetében a vizsgált izolátumok legalább két, egymástól elkülönülő alcsoportba tartoznak, továbbá egy állomány esetében (szürke színű négyszögek), a különböző időpontban izolált törzsek következetesen ugyanabba a két alcsoportba tartoznak.



7. ábra. A szarvasmarha hüvely eredetű *H. somni* törzsek elhelyezkedése az összesített törzsfán

A szarvasmarha hüvely eredetű *H. somni* törzsek esetében 3 kisebb és 1 nagyobb alcsoportot tudtunk a törzsfá fő ágán elkülöníteni (**7. ábra**). A 2. és 4. alcsoportba azonos állományból (Dalmand, Pápa) származó törzsek tartoztak, ugyanakkor egy állomány izolátumai minden esetben legalább két, esetenként több alcsoport között oszlottak el. A törzsfá négy, egymástól legtávolabb elhelyezkedő pontján szarvasmarha hüvely eredetű törzseket találtunk (ezeket piros nyíllal jelöltük), amelyek közül két törzs azonos állományból (Dalmand) származott.

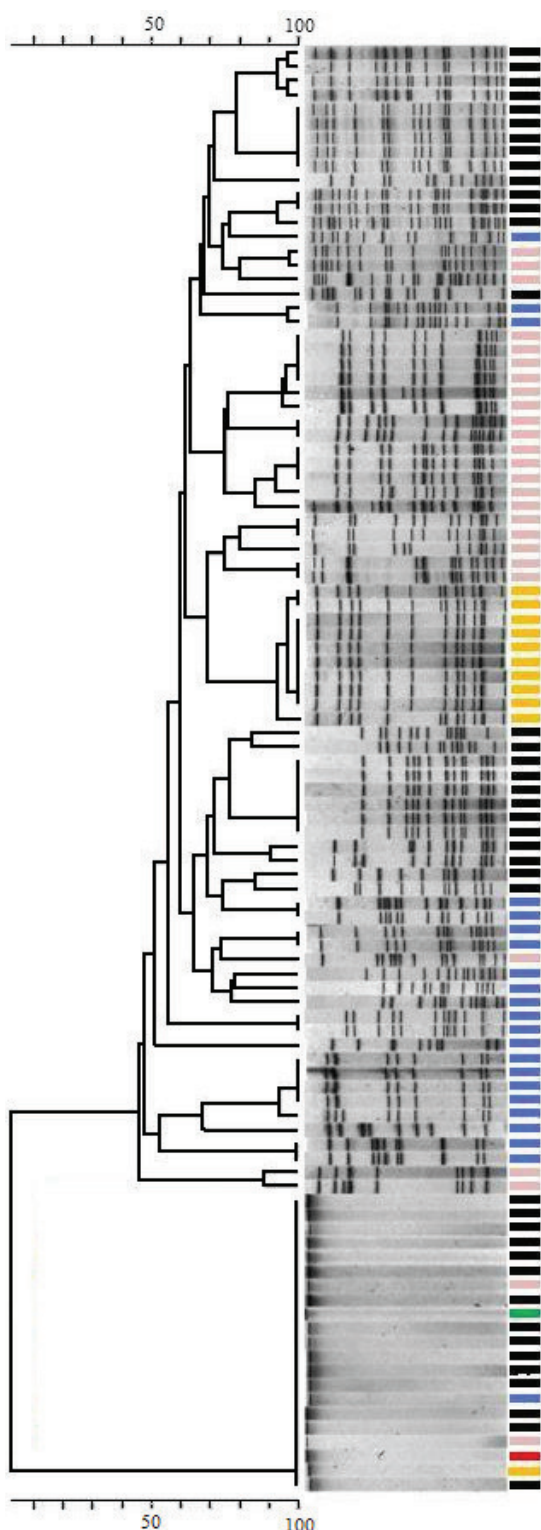


8. ábra. A juh genitális eredetű *H. somni* törzsek elhelyezkedése az összesített törzsfán

A **8. ábrán** látható, hogy juh genitális eredetű törzseket két nagy alcsoportra lehetett osztani, valamint a törzsfán három *H. somni* törzs, önállóan, elkülönülten helyezkedett el (ezeket piros nyíllal jelöltük).

A szarvasmarha hüvely-, a juh- és kecske genitális eredetű törzsek csoportonként készített törzsfái nem szolgálnak kiegészítő eredményekkel a 100 *H. somni* törzs kapcsolatait ábrázoló törzsfához képest, ezért a dolgozatban nem szerepelnek.

7.4 A *H. somni* törzsek vizsgálata pulzáló mezejű gélelektroforézissel



9. ábra. A PFGE-vel vizsgált 99 *H. somni* törzs teljes genom mintázata alapján megállapítható összefüggések

alapján a törzsek 70%-a 100%-ban azonosnak bizonyult, az összes törzs hasonlósága pedig 90%-on belüli volt

A 99 különböző eredetű *H. somni* törzs *Sma*I enzimmel végzett emésztéses vizsgálata során, 78 esetben kaptunk a baktériumtörzs jellemzésére alkalmas képet. Az enzim által nem emésztett törzsek között volt az ATCC-700025 és ATCC-43625 számú *H. somni* típus törzs is. A PFGE-vel vizsgált törzsek kapcsolatai a **9. ábrán** láthatók.

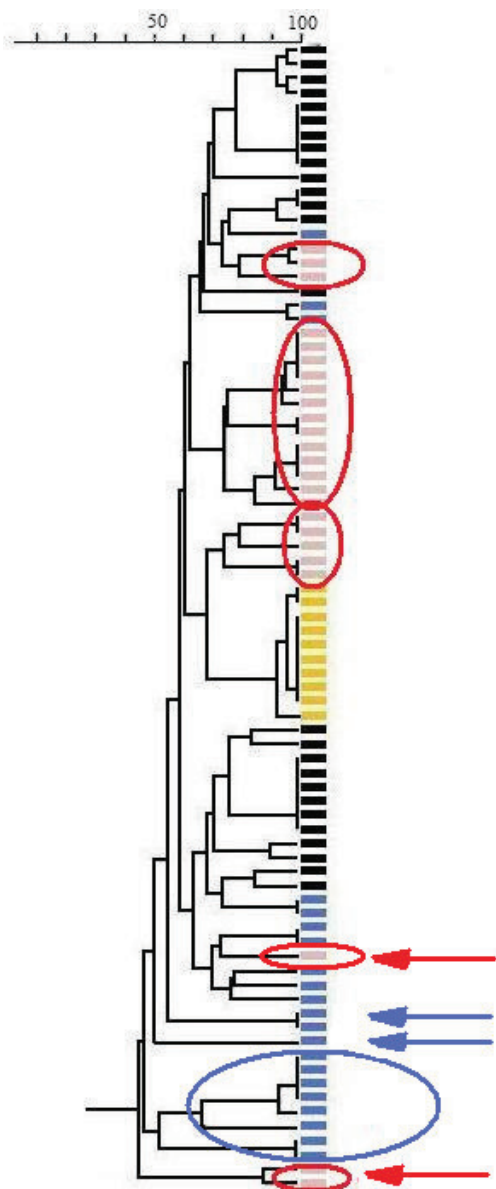
A törzsek elhelyezkedése a dendrogramon állatfajonkénti eloszlást mutatott, de mind a szarvasmarhából – légzőszervi- és hüvely eredetűek egyaránt –, mind pedig a juh genitális mintákból származó törzsek több elkülönült csoportra oszlottak.

Az elemzőprogram összesen 8 csoportot, 10 rokon párt, valamint 18 genetikailag független törzset határozott meg.

A **9. ábrán** feketével a szarvasmarha légzőszervi eredetű, késsel a szarvasmarha hüvely eredetű törzseket jelöltük. A sárga szín a kecskéből származó törzseket jelzi, míg a rózsaszín a juhokból származókat. Az ATCC-43625 számú típus törzset zöld színnel, míg az ATCC-700025 számú *H. somni* törzset pirossal jelöltük. A **9. ábra** csupán szemléltető jellegű, a pontos, elektronikus formában rendelkezésre álló törzsfá, annak nagy mérete miatt a dolgozatban nem szerepel.

A **9. ábrán** látható dendrogramon egyetlen esetben sem figyeltük meg két eltérő eredetű *H. somni* törzs 100%-os hasonlóságát.

A kecske genitális eredetű törzsek PFGE eredményei alapján a törzsek 70%-a 100%-ban azonosnak bizonyult, az összes törzs hasonlósága pedig 90%-on belüli volt



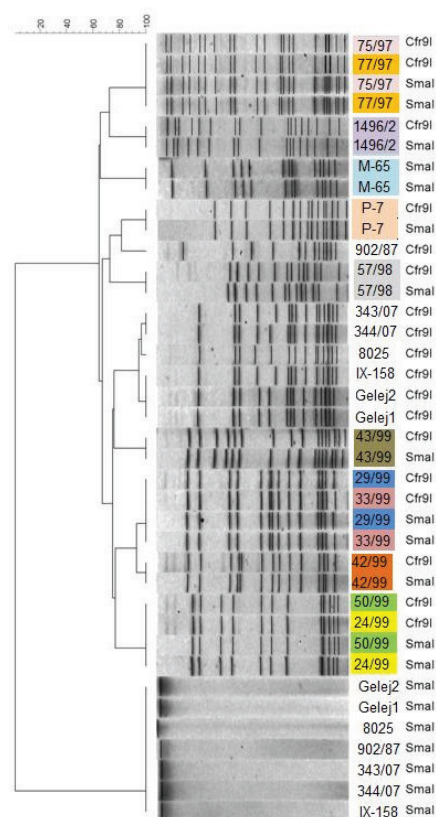
10. ábra. A juh genitális és szarvasmarha hüvely eredetű *H. somni* törzsek kapcsolatainak elemzése a PFGE eredmények alapján készült összesített törzsfán

A *SmaI* és *Cfr9I* enzimmel végzett emésztések eredményeit 18 *H. somni* törzs esetében összevetettük és azt találtuk, hogy a 11, mindkét enzimmel emészthető *H. somni* törzs mintázata a két vizsgálat során 100%-ban megegyezett (**11. ábra**). Az ábrán az azonos törzseket megegyező színnel jelöltük.

A szarvasmarha légzőszervi eredetű törzseket 20%-os hasonlóságuk alapján két nagyobb és három kisebb alcsoportra lehetett osztani. Egy állomány esetében több, 100%-ban hasonló restriktós mintázatú törzset két, egymástól eltérő időben végzett mintagyűjtés során izoláltuk.

A juh genitális eredetű törzseket egy nagyobb és két kisebb alcsoportra tudtuk osztani (ezeket a **10. ábrán**, pirossal elmeltük ki) az összesített PFGE törzsfá alapján, továbbá 3 baktériumtörzs a törzsfán elkülönülten helyezkedett el (ezeket piros nyíllal jelöltük).

A szarvasmarhahüvely-eredetű *H. somni* törzsek esetén megfigyelhető volt 100%-ban hasonló, valamint igen eltérő makrorestriktós mintázattal rendelkező törzsek egy állományból történő izolálása is, amit a **10. ábrán** késsel karikázott és kék nyíllal jelölt törzsek segítségével szemléltetünk.



11. ábra. A *H. somni* törzsek *SmaI* és *Cfr9I* enzimmel végzett PFGE- vizsgálatainak eredményei

7.5 A *H. somni* klinikai és kórtani hatásainak vizsgálata borjak mesterséges fertőzése során

7.5.1 Állatok

A orrtamponminták kétszeri tenyésztéses bakteriológiai és specifikus PCR (Saunders et al., 2007) vizsgálatai alapján, a kísérlet kezdetekor minden állat továbbra is mentes volt *H. somni*-tól és *M. bovis*-tól, valamint fizikális vizsgálattal minden borjú klinikailag egészségesnek bizonyult.

7.5.2 Baktériumtörzsek

A 0. és 3. órában tapasztalt átlagos csíraszámokat (TFE/ml), napi átlagcsíraszámokat (TFE_n/ml), valamint a fertőzési átlagcsíraszámot (TFE_f/ml) **13. táblázat** tartalmazza.

13. táblázat. A fertőzéshez használt *H. somni*-szuszpenziók csíraszámának alakulása

Csoport	<i>H. s.</i> törzs	Csíraszám	1. nap		2. nap		3. nap	
			0. h	3. h	0. h	3. h	0. h	3. h
A	343/07	TFE/ml ^a	4×10 ⁸	1×10 ⁸	1×10 ⁸	1×10 ⁸	2×10 ⁸	2×10 ⁸
		TFE _n /ml ^b	2,5×10 ⁸		1×10 ⁸		2×10 ⁸	
		TFE _f /ml ^c	1,8×10 ⁸					
B	344/07	TFE/ml	8×10 ⁷	7×10 ⁷	6×10 ⁷	6×10 ⁷	5×10 ⁷	3×10 ⁷
		TFE _n /ml	7,5×10 ⁷		6×10 ⁷		4×10 ⁷	
		TFE _f /ml	5,8 ×10 ⁷					

^aa baktérium-szuszpenzió átlagos csíraszám; ^ba baktérium-szuszpenziók napi átlagcsíraszám; ^ca baktérium-szuszpenziók fertőzési átlagcsíraszám

A három egymást követő aeroszolos fertőzés során az A csoportba tartozó borjak ~ 2×10⁸ TFE/ml, míg a B csoport állatai ~ 6×10⁷ TFE/ml csíratartalmú szuszpenziót lélegeztek be.

A fertőző anyag 3 órán át tartó hűtése alatt jelentős csíraszám-csökkenést nem tapasztaltunk.

A csíraszám-lálások során *H. somni*-tól eltérő telepmorfológiájú baktériumokat nem figyeltünk meg a CSA lemezek felületén.

7.5.3 Klinikai tünetek

A fertőzött csoportokban az első klinikai tünetek a fertőzést követő 7. napon (D7) jelentek meg, ekkor a rektális hőmérséklet emelkedését, valamint közepesen súlyos légzőszervi tüneteket tapasztaltunk. A megfigyelési időszak további hét napján a borjakat savós orrfolyás, könnyezés, emelkedett légzésszám és magasabb testhőmérséklet jellemezte.

A 7. napon a fertőzött csoportokban a légzőszervi pontszám és az átlagos testhőmérséklet szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll csoportban, a fertőzött csoportok között jelentős különbség nem mutatkozott. A kísérlet teljes megfigyelési időszaka alatt az A és B csoportban

megállapított légzőszervi összpontszám és átlagos testhőmérséklet szignifikánsan meghaladta a C csoportban tapasztalt értékeket. A fertőzött csoportokban rögzített értékek között szignifikáns eltérés nem mutatkozott.

A kísérlet kezdetén mért testtömegek csoportonkénti átlagában különbséget nem tapasztaltunk, azonban a megfigyelési időszak végén ugyanez az érték a kontroll csoportban magasabbnak bizonyult, mint a fertőzött csoportokban, de az eltérés nem volt szignifikáns.

A testtömeg-gyarapodások csoportonkénti átlaga azonban a C csoportban szignifikánsan magasabb volt, mint az A és B csoportokban, ugyanakkor a fertőzött csoportok ezen értékei közt is szignifikáns ($p < 0,05$) volt a különbség. A klinikai tünetek és a statisztikai elemzés összesített adatait az **14. táblázat** mutatja.

14. táblázat. A kísérleti és kontroll csoportok összesített klinikai adatai

Csoport	\bar{T}_{D-1}^a	\bar{T}_{D7}^b	$\bar{T}_{D1 \rightarrow D14}^c$	$\sum RS_{D7}^d$	$\sum RS_{D1 \rightarrow D14}^e$	\bar{W}_{D-1}^f	\bar{W}_{D14}^g	$\Delta \bar{W}_{D14-D1}^h$
A	39,0±0,3 ^x	40,1±0,5 ^x	39,7±0,5 ^x	10 ^x	92 ^x	105,17±19,47 ^x	112,00±20,67 ^x	6,83±1,2 ^{x,v}
B	38,9±0,4 ^x	40,0±0,7 ^x	39,8±0,4 ^x	9 ^x	78 ^x	109,83±12,35 ^x	120,50±10,67 ^x	10,67±3,2 ^{x,z}
C	38,9±0,3 ^x	39,1±0,2 ^y	39,1±0,2 ^y	0 ^y	4 ^y	107,60±17,77 ^x	128,20±19,12 ^x	20,60±5,27 ^y

^aA kísérlet kezdete előtt egy nappal mért rektális hőmérsékletek átlaga (°C);

^bA kísérlet 7. napján mért rektális hőmérsékletek átlaga (°C);

^cA megfigyelési időszakban mért rektális hőmérsékletek átlaga (°C);

^dA kísérlet 7. napján regisztrált légzőszervi pontszámok összege;

^eA megfigyelési időszakban regisztrált légzőszervi pontszámok összege;

^fA kísérlet előtt mért testtömegek átlaga (kg);

^gA kísérlet végén mért testtömegek átlaga (kg);

^hÁtlagos testtömeg-gyarapodás a megfigyelési időszak alatt (kg);

15. táblázat. Összesített bakteriológiai és kórszövettani eredmények

Csoport	Állatlétszám	Tenyésztés ^a		PCR ^b		Hurutos bronchopneumonia		Kórszövettani pontszám				
		Orr ^c	T ^d	Nyacs ^e	Orr	T	Nyacs	heveny	félhveny	idült	HS ^f	HS ^g
A	6	6 ^h	6	0	6 ^h	4	2	5	0	1	12 ^x	11 ^x
B	6	4	6	0	6	5	1	5	1	0	10 ^x	11 ^x
C	5	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1 ^y	3 ^y

^a*H. somni* jelenlétére irányuló tenyésztéses bakteriológiai vizsgálat;

^b*H. somni* jelenlétére irányuló specifikus PCR vizsgálat;

^cOrrtamponminták;

^dTüdőminták;

^eNyirokcsomóminták;

^fA heveny bronchopneumonia mértéke;

^gA heveny nyirokcsomógyulladás mértéke;

^hA pozitív állatok száma;

A 14. táblázat és 15. táblázat oszlopaiban látható eltérő indexek (x, y, v, z) az értékek közti szignifikáns különbségeket jelzik (x, y → p < 0,001; v, z → p < 0,05).

7.5.4 Kórbonctani vizsgálat

A kórbonctani vizsgálat során mindhárom csoport minden állatában hurutos bronchopneumoniát tapasztaltunk, melyek kiterjedtsége nem, de jellege jelentősen eltért a fertőzött és a kontroll csoportok esetében. A fertőzött csoportokban 5-5 heveny, 1 félheveny – B csoport – valamint 1 idült eset – A csoport – került megállapításra. A kontroll csoportban 3 félheveny és 2 idült elváltozást tapasztaltunk (**15. táblázat**).

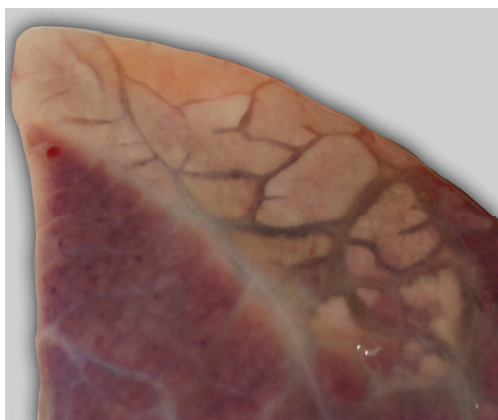


12. ábra. Heveny bronchopneumonia a tüdő cranialis részeiben (lobus cranialis és medius); B csoport, 10. állat

A fertőzött állatok tüdejének elváltozásai a teljes tüdő 19,8 - 61,0%-ára (A csoport), valamint 20,3 - 50,4%-ára (B csoport) terjedtek ki és főként az elülső lebenyeket érintették. A jobb csúcslebeny érintettsége az A csoportban minden esetben 95% vagy a feletti volt, míg a B csoportban ugyanezen lebenyben öt esetben 100%-os volt az elváltozott területek aránya.

Az elváltozott területeken a tüdő normális alakú, kissé megnagyobbodott, sötétvörös – néhány esetben szürkés-vörös – színű volt (**12. ábra**), számos

esetben interlobularis oedema volt megfigyelhető (**13. ábra**). A tüdő tapintata enyhén tömöttebb, kissé mirigyes jelleget mutatott, bemetszéskor nem sercegett. A metszéslapra a hörgőcskékből a tüdő összenyomásakor nyálkás, néha gennyszerű váladék volt kinyomható (**14. ábra**). A félheveny és idült esetekben a kis hörgők fala enyhén megvastagodott. A mellhártya egyetlen esetben sem volt érintett.



13. ábra. Interlobularis oedema a bal cranialis lebenyben; A csoport, 4. állat



14. ábra. Hurutos váladék a hörgőcskékből és egyes hörgőkben; A csoport 1. állat

A kontroll csoport állataiban a tüdőelváltozások szintén a tüdő cranialis részeire terjedtek ki, ahol tömöttebb tapintatú, kissé sötétebb tüdőterületeket láttunk, nem tapasztaltunk sem interlobularis oedemát, sem váladék-felhalmozódást a kisebb légutakban.

7.5.5 Bakteriológiai vizsgálatok

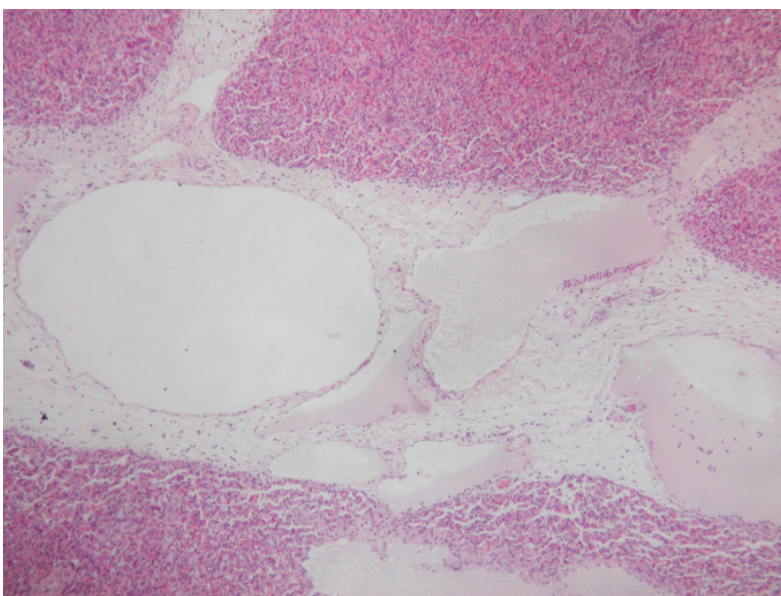
A kísérlet végén az A csoport orrtampon- és tüdőmintáinak mindegyikéből izolálható volt a *H. somni*, míg tenyésztéses vizsgálattal egyetlen nyirokcsomómintában sem lehetett igazolni a kórokozó jelenlétét. *H. somni* specifikus PCR vizsgálattal az összes orrtampon-, 4 tüdő- és 2 nyirokcsomóminta bizonyult pozitívnak ugyanebben a csoportban.

A B csoport mintáinak tenyésztéses bakteriológiai vizsgálata során 4 orrtampon-, valamint az összes tüdőmintából izolálható volt a *H. somni*, míg a nyirokcsomóminták vizsgálata ebben a csoportban is minden esetben negatív eredménnyel zárult. A *H. somni* specifikus PCR vizsgálat során valamennyi orrtampon-, 5 tüdő- és 1 nyirokcsomóminta volt pozitív ebben a csoportban.

A kontroll csoport a bakteriológiai vizsgálatok során mindvégig negatívnak bizonyult, sem tenyésztéses bakteriológiai, sem specifikus PCR vizsgálattal a *H. somni* jelenlétét nem lehetett igazolni. A bakteriológiai vizsgálatok összesített eredményeit a **15. táblázat** mutatja.

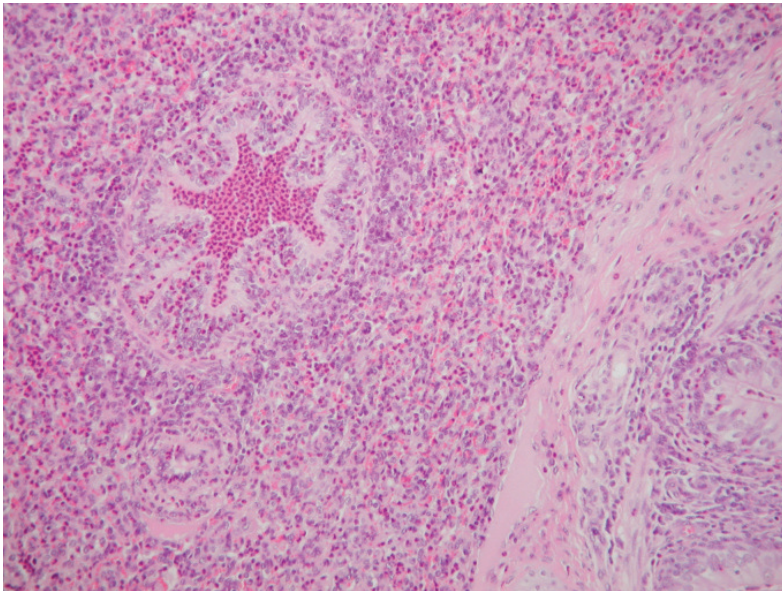
7.5.6 Kórszövettani vizsgálatok

A fertőzött csoportokba tartozó állatok makroszkóposan elváltozott tüdőterületeiben a bronchusok, a bronchiolusok és az alveolusok üregét túlnyomórészt neutrophil granulocyták kisebb arányban histiocyták (alveolaris macrophagok), szétesett sejtek maradványai és savós-fibrines exsudatum töltötték ki. Az inter-lobularis kötőszöveti sővények, valamint az ott található vérerek és nyirokerek erősen kitágultak, nagy mennyiségű savós-fibrines exsudatum, valamint ugyancsak neutrophil

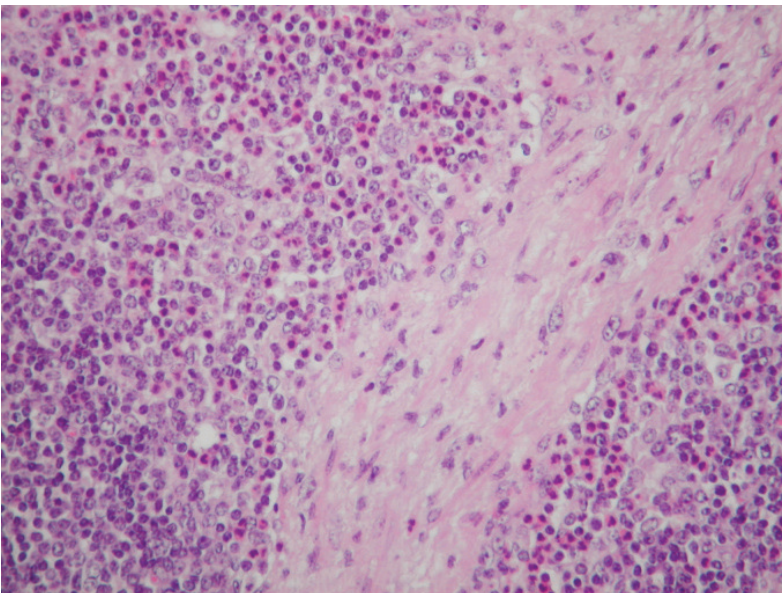


15. ábra. Interlobularis oedema, nyirokértágulat és -thrombus, heveny bronchopneumonia

granulocyták, macrophagok és lymphocyták halmozódtak fel bennük (**15. ábra**). Az elváltozott tüdőlebenyekben elhalást nem lehetett felismerni. A peribronchalis nyirokcsomókban hyperaemia, valamint a subcapsularis és a medullaris sinusoidok neutrophil granulocytás és savós beszűrődése látszott (**16. és 17. ábra**).



16. ábra. A tüdő interlobularis kötőszövetének kitéágulása, bronchiolitis és savós-gyulladásos sejtes beszűrődés



17. ábra. Heveny nyirokcsomógyulladás. Neutrophil granulocytás és savós beivódás a medullaris sinusoidokban

Mindkét fertőzött csoportban 1-1 esetben a tüdőelváltozások enyhébb mértékűek voltak, és azokhoz interstitialis fibrosis is társult.

A kontroll csoport állatainak tüdőmintáiban a félheveny és idült elváltozásokat enyhe fibrosis kísérte.

A heveny elváltozások – bronchopneumonia és nyirokcsomógyulladás – kórszövettani pontszámainak csoportonkénti összege szignifikánsan magasabb volt az A és B csoportban, mint a kontroll csoportban. Az összesített kórszövettani eredmények és statisztikai értékelésük a **15. táblázat**ban látható.

7.6 A *H. somni* törzsek antibiotikum-érzékenysége

A vizsgálatok során az ATCC-700025 számú *H. somni* típus-törzs MIC értéke minden antibiotikum esetében az NCCLS M31-A2 (2002) dokumentumában meghatározott MIC-intervallumba esett.

7.6.1 A vizsgált antibiotikumok minimális gátló koncentrációja (MIC-értéke)

A vizsgált antibiotikumok *H. somni* törzsekre vonatkoztatott MIC-értékeit az **6., 7., 8. és 9. függelék** tartalmazza.

Enrofloxacin

Az enrofloxacin MIC értéke a 38 vizsgált *H. somni* törzs eredménye alapján 0,015-0,06 µg/ml közé esett. A törzsek 100%-át gátolni képes koncentráció (MIC₁₀₀) 0,06 µg/ml volt, míg a MIC₉₀ és MIC₅₀ érték egyaránt 0,03 µg/ml volt. A legtöbb törzset gátolni képes antibiotikum-koncentráció a 0,03 µg/ml volt. Az enrofloxacin különböző eredetű *H. somni* törzsek esetében tapasztalt legkisebb gátló koncentrációjának alakulását a **16. táblázat** tartalmazza.

16. táblázat. Az enrofloxacin MIC-értékeinek (µg/ml) alakulása a különféle eredetű *H. somni* törzsek esetében

	Szarvasmarha		Juh	Kecske	Összes törzs
	légzőszervi	hüvely	genitális	genitális	
MIC intervallum	0,015-0,06 ^a	0,03-0,06	0,03	0,015-0,03	0,015-0,06
MIC ₁₀₀	0,06	0,06	0,03	0,03	0,06
MIC ₉₀	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
MIC ₅₀	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
módusz	0,03 (93%) ^b	0,03 (78%)	0,03 (100%)	0,03 (100%)	0,03 (92%)

^aµg/ml; ^bzárójelben az adott antibiotikum-koncentráció által gátolt törzsek százalékos arányát jelöltük

Florfenikol

A florfenikol legkisebb gátló koncentrációjának értéke 0,125-0,5 µg/ml közé esett a vizsgálatunkba vont 37 eltérő eredetű *H. somni* törzs antibiotikum-érzékenységi adatai alapján. A törzsek 100%-ának növekedését a 0,5 µg/ml florfenikolt tartalmazó levestáptalaj gátolta, azonban a legtöbb törzs (97%) növekedését már 0,25 µg/ml antibiotikum-koncentráció gátolta.

A florfenikol különböző eredetű *H. somni* törzsek esetében tapasztalt legkisebb gátló koncentrációjának alakulását a **17. táblázat** tartalmazza.

17. táblázat. A florfenikol MIC-értékeinek (µg/ml) alakulása a különféle eredetű *H. somni* törzsek esetében

	Szarvasmarha		Juh	Kecske	Összes törzs
	légzőszervi	hüvely	genitális	genitális	
MIC intervallum	0,25 ^a	0,125-0,5	0,125-0,25	0,125-0,25	0,125-0,5
MIC ₁₀₀	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5
MIC ₉₀	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25
MIC ₅₀	0,25	0,25	0,25	0,125	0,25
módusz	0,25 (100%) ^b	0,25 (89%)	0,25 (100%)	0,125 (60%)	0,25 (97%)

^aµg/ml; ^bzárójelben az adott antibiotikum-koncentráció által gátolt törzsek százalékos arányát jelöltük

Gentamicin

Összesen 38 *H. somni* törzs vizsgálata során a gentamicin minimális gátló koncentrációja 1-8 µg/ml közötti érték volt. A leggyakrabban kapott koncentráció érték a gentamicin esetében azonban csak a törzsek 71%-át volt képes gátolni.

A gentamicin különböző eredetű *H. somni* törzsek esetében tapasztalt MIC-értékének alakulását a **18. táblázat** tartalmazza.

18. táblázat. A gentamicin MIC-értékeinek (µg/ml) alakulása a különféle eredetű *H. somni* törzsek esetében

MIC intervallum	Szarvasmarha		Juh	Kecske	Összes törzs
	légzőszervi	hüvely	genitális	genitális	
MIC intervallum	1-8 ^a	1-4	4-8	4	1-8
MIC ₁₀₀	8	4	8	4	8
MIC ₉₀	8	4	8	4	8
MIC ₅₀	4	4	8	4	4
módusz	4 (64%) ^b	4 (100%)	8 (100%)	4 (100%)	4 (71%)

^a µg/ml; ^b zárójelben az adott antibiotikum-koncentráció által gátolt törzsek százalékos arányát jelöltük

Penicillin-G

A penicillin-G legkisebb gátló koncentrációja, 38 különböző eredetű *H. somni* törzs vizsgálatai alapján 0,002-0,125 µg/ml közé esett. A vizsgált törzsek 100%-át a penicillin-G-t 0,125 µg/ml koncentrációban tartalmazó levestáptalaj gátolta, de a törzsek 90%-ában már 0,06 µg/ml-es antibiotikum koncentráció mellett sem tapasztalunk növekedést.

A penicillin-G különböző eredetű *H. somni* törzsek esetében tapasztalt legkisebb gátló koncentrációjának alakulását a **19. táblázat** tartalmazza.

19. táblázat. A penicillin-G MIC-értékeinek (µg/ml) alakulása a különféle eredetű *H. somni* törzsek esetében

MIC intervallum	Szarvasmarha		Juh	Kecske	Összes törzs
	légzőszervi	hüvely	genitális	genitális	
MIC intervallum	0,004-0,125 ^a	0,002-0,06	0,002-0,015	0,004-0,015	0,002-0,125
MIC ₁₀₀	0,125	0,06	0,015	0,015	0,125
MIC ₉₀	0,03	0,06	0,015	0,015	0,06
MIC ₅₀	0,008	0,008	0,008	0,004	0,008
módusz	0,008 (64%) ^b	0,008 (78%)	0,008 (80%)	0,004 (80%)	0,008 (73%)

^a µg/ml; ^b zárójelben az adott antibiotikum-koncentráció által gátolt törzsek százalékos arányát jelöltük

Tetraciklin

A tetraciklin vizsgálata során, 38 *H. somni* törzs adatai alapján, az antibiotikum legkisebb gátló koncentrációjának 0,25-0,5 µg/ml közötti érték felelt meg. A vizsgált *H. somni* törzsek 71%-át gátolta a MIC-intervallum alsó határát képző 0,25 µg/ml-es antibiotikum koncentráció.

A tetraciklin különböző eredetű *H. somni* törzsek esetében tapasztalt legkisebb gátló koncentrációjának alakulását a **20. táblázat** tartalmazza.

20. táblázat. A tetraciklin MIC-értékeinek (µg/ml) alakulása a különféle eredetű *H. somni* törzsek esetében

MIC intervallum	Szarvasmarha		Juh genitális	Kecske genitális	Összes törzs
	légzőszervi	hüvely			
MIC intervallum	0,25-0,5 ^a	0,25-0,5	0,25-0,5	0,25	0,25-0,5
MIC ₁₀₀	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5
MIC ₉₀	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5
MIC ₅₀	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
módusz	0,5 (100%) ^b	0,25 (78%)	0,25 (90%)	0,25 (100%)	0,25 (71%)

^a µg/ml; ^b zárójelben az adott antibiotikum-koncentráció által gátolt törzsek százalékos arányát jelöltük

Tilmikozin

A tilmikozint 16 µg/ml-es koncentrációban tartalmazó levestáptalaj az általunk vizsgált összes *H. somni* törzs (37) növekedését gátolta, azonban a törzsek 73%-ának gátlásához elegendő volt a 2 µg/ml-es antibiotikum koncentráció.

A tilmikozin különböző eredetű *H. somni* törzsek esetében tapasztalt legkisebb gátló koncentrációjának alakulását a **21. táblázat** tartalmazza.

21. táblázat. A tilmikozin MIC-értékeinek (µg/ml) alakulása a különféle eredetű *H. somni* törzsek esetében

MIC intervallum	Szarvasmarha		Juh genitális	Kecske genitális	Összes törzs
	légzőszervi	hüvely			
MIC intervallum	1-16 ^a	0,5-2	2-4	2-4	0,5-16
MIC ₁₀₀	16	2	4	4	16
MIC ₉₀	16	2	4	4	4
MIC ₅₀	2	2	2	4	2
módusz	2 (73%) ^b	2 (100%)	2 (62%)	4 (100%)	2 (73%)

^a µg/ml; ^b zárójelben az adott antibiotikum-koncentráció által gátolt törzsek százalékos arányát jelöltük

7.6.2 A *H. somni* törzsek antibiotikum-érzékenységének meghatározása

Az értékelési zónák alapján a vizsgált *H. somni* törzsek mindegyike érzékenynek bizonyult enrofloxacinra, florfenikolra, penicillin-G-re, tetraciklinre és tilmikozinra. A gentamicinre a törzsek közel 30%-a csak mérsékelten volt érzékeny.

8. Következtetések

8.1 A *H. somni* előfordulása hazai kérődző állományokban

8.1.1 Előfordulás hazai szarvasmarha állományokban

A mintagyűjtés során vizsgált szarvasmarha-állományok 88,9%-a, a vizsgált mintáknak pedig 18,6%-a bizonyult pozitívnak a *H. somni* jelenlétére. Eredményeink alapján hazánk szarvasmarha-állományaiban a kórokozó gyakrabban fordul elő, mint Finnországban (Härtel et al., 2004), azonban nem olyan gyakori, mint Dánia szarvasmarha-állományaiban (Tegtmeier et al., 1999b).

A szarvasmarhák hüvelynyálkahártyáján a pozitív minták alapján 11-40%-ban fordul elő a kórokozó. A hús előhasi üsző négyszeri vizsgálata alapján a baktérium minden mintavétel alkalmával legalább az állatok 40%-ában jelen volt, a mintavételek számának növekedésével a *H. somni* izolálhatósága nem csökkent, a második mintavételkor az állatok 60%-ából kimutatható volt a kórokozó. A négy mintavétel során az állatok 90%-ából legalább egyszer izoláltuk a kórokozót. A vizsgálatainkba vont 20 állatot a mintagyűjtési időszakban együtt tartották, ami felveti, hogy a kezdeti 40%-os fertőzöttségi arány a kórokozó állatról-állatra kenődése következtében emelkedett 90%-ra, ugyanakkor nem zárható ki a baktérium iatrogén úton való terjedése sem.

A légzőszervi minták alapján a vizsgált állományok 100%-a pozitívnak bizonyult a *H. somni* jelenlétére, míg a tamponminták és az egy tüdőminta vizsgálata során 26%-ban izoláltuk a kórokozót. Az izolálás során a kórokozó igen gyakran fordult elő *Pasteurella multocida*-val együtt, ami az utóbbi gyors növekedése miatt sokszor nehezítette a primer tenyészetek pontos elbírálását.

A kórokozó orrtamponokból történő izolálása annak kismértékű ürítése miatt, valamint az orrüreg más baktériumokkal esetleg gombákkal való szennyeződése következtében igen nehéz, amit igazol az is, hogy a tanszéki törzsgyűjteményben korábban elhelyezett szarvasmarha légzőszervi eredetű *H. somni* törzsek között csak egy orrtampon eredetű volt. Vizsgálataink során egy szarvasmarha-állományban (Tarhos) 2-3 hetes, légzőszervi megbetegedés tüneteit mutató borjak orrtamponmintáinak vizsgálata során, azok 55,6%-os pozitívitasát tapasztaltuk, míg a másik két állományból, 3-4 hónapos állatokból származó orrtamponmintákban a *H. somni* izolálhatósága 5,8%-os volt. A minták vizsgálata során 100 µg/ml ciklohexamiddal kiegészített CSA lemezeket használtunk, ami szelektíven gátolta az esetleg jelen lévő gyorsan növekvő gombákat. A vizsgált orrtamponminták nagymértékű pozitívitasára magyarázható a vizsgált állatok fiatal korával, mivel ebben a korban a maternális ellenanyagok szintje lecsökken, ami lehetővé teszi a kórokozó nagyobb mértékű elszaporodását és orrváladékkal való ürítését. A kórokozó izolálását jelentősen

megkönnyítette a más mikroorganizmusokat gátló kiegészítő anyagot tartalmazó CSA használata is (Slee és Stephens, 1985).

Eredményeink azt mutatják, hogy a hazai szarvasmarha-állományokban a *H. somni* előfordulási aránya igen magas, ezért minden esetben javasoljuk a szarvasmarha légzőszervi- és genitális tamponminták *H. somni* izolálását is lehetővé tevő, valamint szelektív tenyésztési módszerekkel történő vizsgálatát is.

A szarvasmarhák genitális nyálkahártyákon történő baktériumhordozásának vizsgálatát minden esetben kétszer 30 napos időközzel vett hüvelytamponminták alapján javasoljuk. A légúti nyálkahártyákon történő *H. somni* hordozás arányának orrtamponminták alapján történő meghatározására pedig a 2-3 hetes korú borjak vizsgálatát ajánljuk.

8.1.2 A *H. somni* előfordulása kecskeállományokban

Tenyésztéses bakteriológiai módszerek alkalmazásával elsőként igazoltuk a *H. somni* jelenlétét kecskében (Jánosi et al., 2009).

A *H. somni* előfordulása kecskék genitális nyálkahártyáin igen kismértékű, a vizsgált állományok 20%-a, míg a tamponminták 5,4%-a volt pozitív. Vizsgálataink alapján a kórokozó nem fordul elő kecskék orrnyálkahártyáján.

A *H. somni* jelenlétére pozitív mintákat ivarzási szezonban gyűjtöttük, juhokkal közösen tartott kecskeállományokban. A juhokat és kecskéket szabadon, együtt tartották, ami lehetőséget adott a kosoknak és kecskebakoknak különböző fajú nőstény egyedekkel szembeni szexuális viselkedésre. A két pozitív állományban a *H. somni* előfordulási aránya jelentősen eltért. A kecskék és juhok közel azonos aránya esetén, a kórokozó előfordulási aránya 58,8%-os volt, míg ahol a kecskék közt egyetlen kos tartottak, ott 3,8% volt a fertőzöttségi arány. A fertőzött állományokban a *H. somni*-t a hüvelytamponminták 30%-ából, míg a tasaktamponminták 50%-ából izoláltuk. Ez az előfordulási arány jelentősen eltér a Walker és LeaMaster (1986) által a felnőtt anyajuhok (16%) és kosok (7,1%) genitális traktusában tapasztalt *H. somni* hordozástól.

A *H. somni* kecskék genitális nyálkahártyáin való előfordulása igen szoros összefüggésben van juhok jelenlétével, mivel már egy kos jelenléte esetén is izolálható volt a kórokozó az állományban. A juhok jelenléte és száma mellett fontos a kecskék *H. somni* fertőzöttsége szempontjából a kosok ivarzási szezonban tanúsított fajok közötti szexuális aktivitása is.

A kecskék *H. somni* hordozásának, a hordozás időtartamának, valamint a baktérium esetleges kóroktani szerepének vizsgálata terveink közt szerepel. Ezenkívül tisztázni szeretnénk azt, hogy a tasaktamponminták nagyobb arányú pozitivitásának milyen jelentősége van a kecskeállományok *H. somni* hordozásában.

8.2 A *H. somni* törzsek azonosítása

8.2.1 Tenyésztési tulajdonságok

Az általunk izolált *H. somni* törzsek tenyésztési tulajdonságaik és telepmorfológiájuk tekintetében igen hasonlóak voltak.

Vizsgálataink során egy aerotoleráns törzset találtunk, melynek normál légköri körülmények között való tenyésztése a telepmorfológia megváltozását eredményezte, míg CO₂ jelenlétében a jelenséget nem tapasztaltuk. Egyes törzsek –80°C-ról történő kioltása során, 5% CO₂-dal dúsított légtérben való tenyésztésük ellenére is a telepmorfológia hasadását tapasztaltuk.

Az általunk izolált egyes *H. somni* törzsek telepmorfológiájának megváltozását valószínűleg a baktérium számára nem megfelelő tenyésztési vagy tárolási körülmények idézték elő (pl.: CO₂-hiány, ultrahűtés).

8.2.2 Morfológiai és biokémiai tulajdonságok

Az általunk izolált és vizsgált *H. somni* törzsek morfológiai és biokémiai tulajdonságaikat tekintve többnyire egységesek voltak. A klasszikus bakteriológiai módszerek sikeresen alkalmazhatók a kórokozó primer tulajdonságainak vizsgálatában, a tenyésztési tulajdonságok vizsgálatával együtt megfelelően jellemzik a *H. somni*-t, így a baktériumazonosítás alapját képezik.

Az indoltermelés vizsgálata során, a reakció elbírálása előtt az indol éterrel történő kivonása a táptalajból jelentősen megnövelte a vizsgáló módszer érzékenységét, ezért a *H. somni* törzsek indoltermelési képességének vizsgálatakor javasoljuk az éteres kivonás alkalmazását.

8.2.3 A törzsek azonosítása szénforrás-hasznosítás alapján

A BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM a vizsgált ATCC-43625 és ATCC-700025 számú típus-törzseket 100%-os pontossággal *H. somni*-ként azonosította, valamint a vizsgált törzsek 56%-ának esetében a *H. somni*-t jelölte meg a legvalószínűbb fajként.

A szarvasmarha hüvelyből származó *H. somni* törzsek vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az egy állomány egyedeiből származó, tenyésztési, morfológiai és klasszikus biokémiai tulajdonságaik tekintetében megegyező baktériumtörzseket eltérő hatékonysággal azonosította a rendszer. A rendszer a hüvelytampon eredetű *H. somni* törzsek közül állományonként legalább egy törzset 89%-os vagy annál nagyobb valószínűséggel *H. somni*-nak azonosított, míg szintén minden állomány esetében legalább egy törzs esetében nem a *H. somni*-t adta meg, mint legvalószínűbb fajt. A jelenséget magyarázhatja, hogy néhány szarvasmarhahüvely-eredetű *H. somni* törzs szénforrás-hasznosítási mintázatának vizsgálata csak a törzs többszöri leoltása után volt értékelhető, mivel a rendszer érzékenysége ellenére nem adtak a MICROPLATE™ lemezekon látható színreakciókat az

első vizsgálat során. Az ilyen inaktív törzsek tulajdonságainak változnia kellett ahhoz, hogy a vizsgált szénforrásokot hasznosítani tudják, ami magyarázatul szolgálhat a rendszer által adott eredmények közötti eltérésekre.

A kecske eredetű törzseket igen kis hatékonysággal (18,2%) azonosította a rendszer, ami felveti, hogy a nem megszokott gazdafajban való megtelepedés a kórokozó fenotípusos tulajdonságainak megváltozásához vezethet.

8.2.4 Azonosítás a 16S rDNS részletének vizsgálatával

A 16S rRNS gén részletének vizsgálata alapján a *H. somni* törzseket sikeresen azonosítottuk fajsztinten.

A kecske eredetű *H. somni* törzsek PCR vizsgálata során amplifikált 16S rDNS részlet bázissorrendje mindhárom törzs esetében 100%-ban azonos volt, ami közös fertőződési forrásra utal. Ugyanakkor ez a szekvencia 100%-os hasonlóságot mutatott egy juh septikaemia eredetű (Culture Collection University of Göteborg, CCUG-46772) *H. somni* törzs azonos génrészletének bázissorrendjével, ami alátámaszthatja a kecskék juhoktól történő fertőződését.

8.2.5 A szénforrás-hasznosítás és a 16S rDNS alapú azonosítás

A 16S rDNS vizsgálata igazolta, hogy a BIOLOG rendszer megbízhatóan azonosította a *H. somni* törzseket, bár egyes, a 16S rDNS vizsgálata alapján fajsztinten azonosított *H. somni* törzseket nem ismert fel. A BIOLOG rendszer adatbázisát célszerű bővíteni azon törzsek szénforrás-hasznosítási adataival, amelyeket más módszerek alkalmazásával fajsztinten azonosítottak, ezáltal a *H. somni* törzsek anyagcsere-ujjlenyomat alapján történő azonosíthatósága megbízhatóbb lesz.

Tévesen negatív eredmény esetén az azonos állományból származó, tenyésztési, morfológiai és elsődleges biokémiai tulajdonságaik tekintetében azonos baktériumtörzsek párhuzamos vizsgálata pontosíthatja az azonosítást, azonban új állatfajból vagy elváltozásból történő izolálás esetén elengedhetetlenül szükséges a *H. somni* genetikai alapon történő azonosítása.

8.3 A *H. somni* törzsek szénforrás-hasznosításának vizsgálata

8.3.1 A különböző eredetű törzsek szénforrás-hasznosítási képessége

A BIOLOG MISCROSTATION™ ID SYSTEM rendszerével vizsgált *H. somni* törzsek mono- és diszacharidokat, cukoralkoholokat, észtereket, savakat, aminocukrokat és foszfátalt cukorszármazékokat, valamint aminosavakat és nukleozidokat tudtak hasznosítani. A rendszer – más baktériumfajok vizsgálata során tapasztaltakhoz hasonlóan (Gyuranecz et al., 2009) – alkalmas a *H. somni* szénforrás-hasznosításának vizsgálatára.

Az eltérő eredetű *H. somni* törzsek szénforrás-hasznosítási képességében számos hasonlóságot és különbséget találtunk.

A vizsgált négy csoport közül a kecske genitália eredetű törzsek hasznosították a legkevesebb (22) szénforrást, melyek közül 12-t a törzsek 100%-a, valamint további egy szénforrást a törzsek több mint 90%-a képes volt hasznosítani. A szarvasmarha és juh eredetű törzsekhez viszonyítva a kecske eredetűek nagyobb arányban hasznosították a gentiobiózt, a mannózt és az L-aszparaginsavat. Mivel a 11 kecske eredetű *H. somni* törzs közül 10 egy állományból származott, valamint a szénforrás-hasznosításuk alapján megközelítőleg 100%-os, míg a genetikai vizsgálatuk alapján ténylegesen 100%-os azonosságot állapítottunk meg a törzsek között, ezért a csoportra vonatkozó további általános következtetésektől és a többi csoporttal történő összehasonlításától tartózkodunk, a vizsgált alacsony mintaszámból adódó hibák elkerülése érdekében.

A hasznosítható szénforrások tekintetében a szarvasmarha légzőszervi eredetű törzsek csoportja bizonyult a legkevésbé egyneműnek. Az eredmények elemzése során, nem találtunk olyan szénforrást, amelynek kiugróan magas hasznosíthatósága a csoportot egyértelműen jellemezné. Az uridin hasznosítása ebben a csoportban kissé magasabb volt, mint a szarvasmarha- és juh genitális törzseket magába foglaló csoportokban. Számos szénforrás esetében – pl.: a D-cellobióz és D-glükóz-6-foszfát –, a szarvasmarha légzőszervi eredetű törzsek hasznosítási képessége elmaradt a másik két csoportban tapasztalhatótól. A csoportba tartozó törzsek anyagcsere-ujjlenyomatainak különbségeit a törzsek eltérő eredete magyarázza, de nem kizárható, hogy a kórokozó által előidézett megbetegedés során a gazdaállatban bekövetkező folyamatos antigén szerkezeti változás következtében (Inzana et al., 1992) a törzsek egyéb tulajdonságai is megváltozhatnak.

A szarvasmarha hüvely eredetű törzsek hasznosították a szénforrások legnagyobb hányadát, amelyek 17,1%-át az összes törzs képes volt hasznosítani. A szarvasmarha genitális eredetű törzsek széleskörű szénforrás-hasznosítását Challacombe és mtsai. (2007) is igazolták a 129Pt számú *H. somni* törzs teljes genom vizsgálata során, a szénhidrát-metabolizmusban résztvevő 94 gén azonosításával. A szarvasmarha hüvely eredetű *H. somni* törzsek csoportjának jellemzésére alkalmas lehet a D-fruktóz, a D-mannit, a D-szorbit és a D, L-tejsav hasznosításának vizsgálata, mivel mind a négy szénforrást ebben a csoportban a törzsek 100%-a képes volt hasznosítani, míg a másik két csoportban csupán a törzsek 72-90%-a tudta metabolizálni azokat. További két szénforrás, az α -hidroxivajsav és az urokánsav esetében a csoportba tartozó *H. somni* törzsek hasznosítási képessége nagyobb arányú volt a másik két csoportban tapasztalhatótnál. A felsorolt 4 szénforrás közül, a törzsek D, L-tejsav-hasznosítási képessége tért el legjobban a másik két csoportban tapasztalható értéktől, így alkalmas a szarvasmarha hüvely eredetű csoportba tartozó *H. somni* törzsek más csoportoktól való elkülönítésére.

A két szarvasmarha eredetű csoportba tartozó törzsek a piroszölősav-metilészter (~60%) és timidin (~10%) hasznosítási képességében lényegesen eltértek a juh eredetű törzsektől (~20% és 0% vonatkozóan).

A juh ondó- és here eredetű 27 *H. somni* törzs közül 4 szénforrást tudott a törzsek 100%-a hasznosítani, melyek közül a D-mannóz és a turanóz hasznosítási képessége a csoportot jellemző tulajdonság volt, és mintegy 20%-kal meghaladta a másik két csoportban tapasztalható hasznosítási arányt. Az N-acetil-D-glükózamin és az α -keto-vajsav hasznosítási aránya is magasabb volt a juh eredetű törzsek esetében. A juh genitális eredetű *H. somni* törzseket magába foglaló csoport jellemzésére, valamint többi csoporttól való elkülönítésére a D-mannóz és a turanóz hasznosításának vizsgálata alkalmas.

8.3.2 A *H. somni* törzsek szénforrás-hasznosítási mintázata

Az összesített törzsfán számos esetben egyes eltérő állatfajból származó *H. somni* törzsek nagymértékű, esetenként 100%-os hasonlóságát állapítottuk meg.

A kecske eredetű *H. somni* törzsek a törzsfá egyetlen alcsoportjában való elhelyezkedése továbbra is alátámasztotta azt, hogy ezek a törzsek nagyon szoros rokonságban állnak egymással.

A szarvasmarha légzőszervi eredetű *H. somni* izolátumok csoportjába tartozó baktériumtörzsek szénforrás-hasznosítási mintázatuk alapján igen eltérőek voltak. Számos állományban több, egymástól eltérő fenotípusos tulajdonságokkal rendelkező *H. somni* törzs jelenlétét figyeltük meg. Egy állomány esetében (Ostffyasszonyfa) két, egymástól időben elkülönülő mintavétel során izolált 2 törzs következetesen ugyanazokban az alcsoportokban helyezkedett el, azaz a törzsek tartós fennmaradását figyeltük meg az állományban.

A szarvasmarhahüvely-eredetű *H. somni* izolátumok esetében is igazoltuk a szénforrás-hasznosítási vizsgálatok eredményei alapján, hogy egyes állományokban (Dalmand, Pápa) akár több, egymástól jelentősen eltérő *H. somni* törzs lehet jelen, ugyanakkor számos, egymáshoz igen hasonló baktériumtörzs előfordulását is igazoltuk.

A szénforrás-hasznosítás alapján vizsgált 27 juh ondó- és here eredetű *H. somni* törzs közül 20 törzs ugyanabból az állományból (Mezőnagymihály) származott, amely alapján a vizsgált törzsek nagymértékű hasonlóságát várnánk. Az azonos származási állomány ellenére a törzseket két nagy alcsoportra lehetett osztani, valamint a törzsfán elkülönülten található három *H. somni* törzs közül két törzs Mezőnagymihályból származott. Ennek alapján valószínű, hogy a széleskörű mintagyűjtés során az állományban egyszerre jelen lévő, számos hasonló és egymástól igen eltérő fenotípusos tulajdonságokkal rendelkező *H. somni* törzset izoláltunk.

Az azonos állományban előforduló, egymástól igen eltérő fenotípusos tulajdonságokkal rendelkező *H. somni* törzsek esetében felmerül a kérdés, hogy mennyiben befolyásolhatják a gazdaszervezet védekező mechanizmusai a kórokozó megjelenő tulajdonságait (Inzana et al., 1992).

8.4 A *H. somni* törzsek vizsgálata pulzáló mezejű gélelektroforézissel

Eltérő eredetű *H. somni* törzsek között a PFGE vizsgálatok eredményei alapján egyetlen esetben sem állapítottunk meg 100%-os hasonlóságot.

A kecske eredetű törzsek makrorestrikciós mintázatának 90%-on belüli hasonlósága a törzsek nagyfokú genetikai hasonlóságát jelezte, ami alátámasztja a törzsek azonos eredetét.

Egyes szarvasmarha légzőszervi eredetű törzsek, amelyek azonos állományból (Ostffyasszonyfa), de időben elkülönülő mintavételekből származtak, a PFGE vizsgálatok alapján 100%-ban hasonlóak voltak, azaz az adott törzs az állományban tartósan fennmaradt.

A szarvasmarhahüvely-eredetű törzsek esetében két állományban (Dalmand, Pápa) igazoltuk egymáshoz igen hasonló, valamint különböző törzsek jelenlétét.

A vizsgált 25 juhból származó izolátum közül 17 egy állományból származott (Mezőnagymihály), ami alapján a PFGE vizsgálatok esetében is a törzsek nagyfokú hasonlóságát várnánk, azonban a 3 elkülönülten helyezkedő *H. somni* törzs mindegyikét a Mezőnagymihályban gyűjtött mintákból izoláltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy az igen hasonló törzsek mellett több, igen eltérő restrikciós mintázattal rendelkező, a többitől különböző *H. somni* törzset izoláltunk egy adott állományból.

Az *SmaI* restrikciós enzim által nem emésztett törzsek esetében – más baktériumfajok vizsgálatához hasonlóan (Silva-Costa et al., 2006) – ajánljuk a *Cfr9I* enzim használatát, mivel vizsgálataink alapján az *SmaI* enzimmel hasítható *H. somni* törzsek restrikciós mintázata minden esetben 100%-ban hasonló volt a *Cfr9I* enzim általi emésztés eredményeként kapott restrikciós mintázattal.

8.5 A *H. somni* törzsek szénforrás-hasznosítási és PFGE eredményeinek összehasonlítása

A *H. somni* törzsek anyagcsere-ujjlenyomatának és a teljes genom makrorestrikciós mintázatának elemzése során tett megállapítások több esetben igen hasonlóak, ezért elvégeztük a két vizsgáló módszer eredményeinek összehasonlító elemzését.

A szarvasmarha légzőszervi eredetű törzsek esetében mindkét módszer alkalmazásával bizonyítható volt az Ostffyasszonyfai állományban két *H. somni* törzs tartós fennmaradása. Az állományból 3

különböző időpontban (1995, 1997, 2001) vett mintákból izolált *H. somni* törzsek közül a szénforrás-hasznosítási mintázatuk alapján két *H. somni* törzs 1995-ben és 2001-ben történő megjelenését igazoltuk (21/01 és 71/95, valamint 22/01 és 69/95), míg a PFGE vizsgálatok alapján az 1997-ben és 2001-ben izolált (21/01, 22/01, 50/97, 51/97) törzsek 100%-os hasonlóságát igazoltuk, tehát a vizsgálataink összesített eredményei alapján két *H. somni* törzs egy szarvasmarha-állományon belüli tartós jelenlétét igazoltuk, egymást két illetve négy éves időközzel követő három mintavételezés során.

A szarvasmarha hüvely eredetű törzsek mindkét módszerrel történő vizsgálata a Dalmandi állományból izolált *H. somni* törzsek esetében több, egymáshoz igen hasonló *H. somni* törzs jelenlétét (pl.: D30, D32, D43), valamint az előbbiektől lényegesen elkülönülő (pl.: D19) baktériumtörzs jelenlétét igazolta.

A Mezőnagymihály-beli állományból származó *H. somni* törzsek csoportja esetében a szénforrás-hasznosítási-, és makrorestrikciós mintázatok elemzése is megerősítette, hogy az állományban számos, egymástól eltérő *H. somni* törzset izoláltunk.

Az különböző állatfajokból származó *H. somni* törzsek szénforrás-hasznosításon alapuló hasonlóságát vagy azonosságát a PFGE során kapott eredmények egyetlen esetben sem támasztották alá.

Ennek alapján a *H. somni* törzsek anyagcsere-ujjlenyomatának elemzése hatékonyan egészítette ki a PFGE vizsgálatok eredményeit, azaz a szénforrás-hasznosításon alapuló vizsgáló módszert azonos állatfajból származó *H. somni* törzsek járványtani jellemzésében sikeresen alkalmaztuk.

A két vizsgáló módszer eredménye a két módszerrel vizsgált összesen 99 *H. somni* törzs közül egy szarvasmarha hüvely eredetű és két juh genitális eredetű törzs esetében eltért egymástól. A két vizsgáló módszer jelentős mértékű eltérését egyéb esetekben nem tapasztaltuk, ezért három *H. somni* törzs pontos járványtani helyzetének tisztázása érdekében a vizsgálatok ismétlését javasoljuk.

8.6 A *H. somni* klinikai és kórtani hatásai borjakban

8.6.1 Klinikai tünetek

A *H. somni*-val végzett aerogén fertőzés következtében kialakult klinikai tünetek (rektális hőmérsékletemelkedés, csökkent testtömeg-gyarapodás, emelkedett légzésszám, orrfolyás) nagyon hasonlóak voltak a természetes és mesterséges fertőzések következtében kialakult tünetekhez (Lancaster et al., 1984; Gogolewski et al., 1987a; Groom et al., 1988), ami jelzi, hogy az alkalmazott eljárás alkalmas a *H. somni* által okozott légzőszervi megbetegedés előidézéséhez.

Aeroszolos fertőzési kísérlete során Nayar és munkacsoportja (1977) depressziót, ataxiát, fejrázást, felfúvódást, renyhe bélműködést, orrfolyást és légzésszám-emelkedést tapasztalt $1,8 \times 10^{10}$ TFE *H.*

somni-val történő fertőzés után. A Nayar és mtsai. (1977) által tapasztalt idegrendszeri és bélrendszeri tünetek a *H. somni* okozta légzőszervi megbetegedések természetes eseteire nem jellemzők, megjelenésük valószínűleg az alkalmazott magas fertőzési összcsíraszámra vezethetők vissza. Ezek alapján a *H. somni* által előidézett légzőszervi megbetegedések kísérletes tanulmányozásához a vizsgálataink során kidolgozott fertőzési modellt ajánljuk, mivel a 10^8 - 10^9 TFE összcsíraszámmal végzett aeroszolos fertőzés, a fertőzési út és a kialakult klinikai tünetek tekintetében is nagymértékben hasonlított a természetes esetekhez.

8.6.2 Kórbonctani vizsgálatok

Az irodalmi adatok igazolják, hogy a mesterséges *H. somni* fertőzések során kialakult tüdőelváltozások jellege nagyobb mértékben függ a fertőzési modelltől, mint az alkalmazott fertőző anyag csíraszámától (Gogolewski et al., 1987b; Groom et al., 1988; Jackson et al., 1987). Ugyanakkor a természetes úttól nagymértékben eltérő fertőzési módok alkalmazása súlyosabb elváltozásokat okozott, mint amelyeket a természetes fertőződést leginkább megközelítő aeroszolos modell alkalmazása során tapasztaltunk. Ezek alapján elmondható, hogy az általunk kifejlesztett aeroszolos fertőzési modell alkalmazása a *H. somni* által okozott kórtani elváltozások kísérletes tanulmányozásában igen jelentős segítséget nyújthat a további vizsgálatok során.

A kontroll csoportban tapasztalt félheveny és idült elváltozások arra vezethetők vissza, hogy a kísérletbe vont állatok hagyományosan tartott borjak voltak, amelyek származási állományában számos légzőszervi vírus volt jelen. Mivel a hazai szarvasmarha-állományok gyakran fertőzöttek különféle vírusokkal (herpes-, adeno-, parainfluenza vírus stb.), amelyek a maternális ellenanyagok szintjének csökkenésekor, 2-3 hónapos korban tüdőelváltozásokat okozhatnak, ezért ajánlott a *H. somni* kórtani hatásának vizsgálatait fiatalabb (2-3 hetes) borjakon elvégezni, hogy a valószínűsíthetően korábbi vírusfertőzések következtében kialakult idült tüdőelváltozások jelenlétét elkerüljük.

A kísérlet során a kontroll csoport állataiban tapasztalt félheveny és idült elváltozások miatt, a kórbonctani elváltozások nem voltak alkalmasak a kísérlet hatékonyságának meghatározására.

8.6.3 Bakteriológiai vizsgálatok

A kísérlet végén a *H. somni* fertőzött csoportokból történő 100%-os arányban történő kimutatása szemben a kontroll csoportok negatív eredményeivel, alátámasztja a fertőzési modell sikerességét.

8.6.4 Kórszöveti vizsgálatok

A természetes esetek vizsgálata során a kórszöveti elváltozásokat az elhalásos jelleg megléte vagy hiánya alapján két csoportba lehetett osztani (Andrews et al., 1985; Bryson et al., 1990),

ugyanakkor saját vizsgálataink során egyetlen esetben sem tapasztaltuk coagulatio necrosis kialakulását.

A természetes esetek során tapasztalt kórszövettani elváltozások közti különbségek valószínűleg a természetben előforduló, eltérő légzőszervi virulenciájú *H. somni* törzsekkel való fertőződés következtében alakultak ki, így valószínűsíthető, hogy a saját vizsgálataink során tapasztalt enyhébb elváltozások a fertőzéshez használt *H. somni* törzsek alacsonyabb virulenciájából következtek.

A természetes esetekben tapasztalt elhalásos jellegű elváltozások aeroszolos fertőzési modellel történő előidézéséhez a jelen kísérletben alkalmazott *H. somni* törzseknél bizonyítottan erősebb légzőszervi fertőzőképességgel rendelkező törzseket lenne szükséges alkalmazni, ugyanakkor magasabb csíraszámú fertőző anyag alkalmazását a klinikai tünetekre gyakorolt hatása miatt nem javasoljuk.

Vizsgálataink során, a *H. somni* kórtani hatását csak a kórszövettanilag megállapítható heveny bronchopneumonia és nyirokcsomógyulladás jelezte, ezért a későbbiekben az aeroszolos fertőzési modellek hatékonyságának értékelése során minden esetben javasoljuk a részletes kórszövettani vizsgálat elvégzését.

Eredményeink alapján, a kórbonctani elváltozásokat a fertőzési és kontroll csoportokban egyaránt tapasztalt hurutos bronchopneumonia miatt nem ajánljuk a kísérlet hatékonyságának, azaz a két vizsgált *H. somni* törzs kórtani hatásának megítélésére, annak ellenére, hogy a kórbonctani kép nagymértékben egyezett a szakirodalomban leírt *H. somni*-hátterű elváltozások képével. A kórbonctani vizsgálattal ellentétben, a kórszövettani vizsgálat során a fertőzött és kontroll csoportok állataiban tapasztalt, szakirodalmi adatok alapján a *H. somni* kórtani hatásaira igen jellemző kórszövettani elváltozások között szignifikáns különbséget tapasztaltunk, továbbá a *H. somni* kórtani jelentőségére utal a bakteriológiai vizsgálatok során a fertőzött csoportok 100%-os pozitivitása is. Ezáltal összességében az általunk leírt elváltozásokat a *H. somni* kórtani hatásainak tulajdonítottuk.

8.7 A *H. somni* törzsek antibiotikum-érzékenysége

A *H. somni* törzsek antibiotikum-érzékenységét a legelterjedtebben alkalmazott hat antibiotikum csoport: aminoglikozidok, fenikolok, fluorokinolonok, makrolidok, penicillinek és tetraciklinek képviselőivel szemben vizsgáltuk.

8.7.1 A vizsgált antibiotikumok minimális gátló koncentrációja

Enrofloxacin

Az enrofloxacin a fluorokinolonok csoportjába tartozó, baktericid hatású, széles spektrumú antibiotikum, amelynek hatásmechanizmusa a DNS-giráz-enzim gátlásán alapul.

A különböző eredetű *H. somni* törzsek vizsgálata során az enrofloxacin gátló hatása igen egységesnek bizonyult, az összes vizsgált törzs 92,1%-át 0,03 µg/ml antibiotikum-koncentráció gátolta.

A szarvasmarha hüvely eredetű *H. somni* törzsek esetében a törzsek 22,2%-ának gátlása a MIC-intervallum felső határértékénél (0,06 µg/ml) következett be, a légzőszervi eredetűek 7,1%-ának gátlásához volt szükséges, míg a juh genitális eredetű csoportba tartozó törzsek 100%-át már alacsonyabb antibiotikum-koncentráció is gátolta, ami kismértékű különbséget jelez a szarvasmarha és juh eredetű törzsek között az enrofloxacin gátló hatásának tekintetében.

Florfenikol

A florfenikol a klóramfenikol-csoportba tartozó, bakteriosztatikus, széles spektrumú antibiotikum, hatásmechanizmusa az 50S riboszómális alegység fehérjeszintézisének gátlásán alapul. A *H. somni* okozta TME gyógykezelésében széles körben, sikerrel alkalmazzák (de Craene et al., 1997).

A leggyakrabban előforduló minimális gátló érték, a 0,25 µg/ml-es antibiotikum-koncentráció, a szarvasmarha eredetű törzsek 95,7%-ának gátlásához volt elég. A juh eredetű törzsek 66,7%-ának gátlásához elegendő volt a MIC-értékek módusza, a fennmaradó törzseket ennél alacsonyabb antibiotikum-koncentráció is képes volt gátolni. Ez alapján látható, hogy a juhokból származó klinikai izolátumok érzékenysége nagyobb a florfenikol növekedést gátló hatásával szemben, mint a szarvasmarha eredetű *H. somni* törzseké.

A kecske genitális eredetű törzsek 60%-át már 0,125 µg/ml-es florfenikol koncentráció gátolta, amire magyarázatot adhat az, hogy a nem megfelelő gazdafajban való – akárcsak átmeneti – megtelepedés, a kórokozó tulajdonságait megváltoztathatja (8.2.3 fejezet).

Gentamicin

A gentamicin az aminoglikozidok csoportjába tartozó, baktericid hatású antibiotikum, hatásspektruma a Gram-negatív baktériumokra terjed, hatásmechanizmusa pedig a 30S riboszómális alegység fehérjeszintézisének gátlásán alapul.

A juh eredetű *H. somni* törzsek 60%-ának növekedésének gátlását csak a MIC-intervallum felső határához tartozó (8µg/ml) antibiotikum-koncentráció volt képes gátolni, míg a szarvasmarha eredetű törzsek esetében ez az érték 21,7% volt. Ezek alapján látható, hogy a juh genitális eredetű

H. somni törzsek kevésbé érzékenyek a gentamicin gátló hatásával szemben, mint a szarvasmarha eredetűek.

Az összes vizsgált törzs 57,9%-ának szemmel látható növekedésének gátlásához volt szükséges a MIC értékek móduszához tartozó koncentráció-érték (4 µg/ml), ami alapján a törzsek gentamicin-érzékenysége nem tekinthető egységesnek.

Penicillin-G

A penicillin-G a penicillinek csoportjába tartozó, baktericid hatású, Gram-pozitív hatásspektrumú antibiotikum, hatásmechanizmusa baktériumok sejtfalszintézisének gátlásán alapul.

A penicillin-G MIC-intervalluma a vizsgált *H. somni* törzsek szarvasmarha és juh eredetű csoportjának esetében 4-6 log₂ antibiotikum hígítást foglalt magában. Az összes törzs eredménye alapján meghatározható MIC-értékek módusza a törzsek mindössze 39,5%-ának gátlásához volt szükséges. Ezek alapján a vizsgált *H. somni* törzsek penicillin-G-vel szembeni érzékenysége nem egységes, amit magyarázhat, hogy a vizsgált antibiotikumot széles körben és régóta használják szarvasmarhák és juhok kezelésére.

A kecske eredetű törzsek 80%-át az összesített MIC-értékek móduszánál egy log₂ hígítással kisebb antibiotikum koncentráció (0,004 µg/ml) gátolta, ami alapján a többi *H. somni* törzsnél érzékenyebbnek bizonyultak a penicillin hatására.

Tetraciklin

A tetraciklin a tetraciklinek csoportjába tartozó, széles spektrumú, bakteriosztatikus hatású antibiotikum, amelynek hatásmechanizmusa a 30S riboszómális alegység fehérjeszintézisének gátlásán alapszik.

A szarvasmarha légzőszervi eredetű törzsek 60%-ának növekedés-gátlásához 0,5 µg/ml tetraciklin koncentráció volt szükséges. Az összes törzs esetében leggyakrabban előforduló MIC-érték (0,25 µg/ml) a vizsgált *H. somni* izolátumok 71,1%-ának gátlásához volt szükséges. Mindezek alapján a vizsgált *H. somni* törzsek tetraciklinnel szembeni érzékenysége többnyire egységesnek mondható.

Tilmikozin

A tilmikozin a makrolid antibiotikumok csoportjába tartozik, bakteriosztatikus hatású és széles spektrumú antibiotikum, hatásmechanizmusa az 50S riboszómális alegység fehérjeszintézisének gátlásán alapul.

A tilmikozin MIC-értékeinek az összes törzsre vonatkoztatott módusz értéke (2 µg/ml) a szarvasmarha hüvely eredetű törzsek 100%-ának növekedését gátolta, szemben a légzőszervi eredetű *H. somni* törzsek csoportjában tapasztalható 60%-os, valamint a juh eredetű törzsek 62,5%-

os gátlási arányával, ami a szarvasmarha hüvely eredetű törzsek tilmikozinnal szembeni lényegesen nagyobb érzékenységét jelezte.

A többi antibiotikumtól eltérően, a kecske eredetű *H. somni* törzsek érzékenysége volt a legkisebb mértékű a tilmikozin gátló hatásával szemben.

8.7.2 Az antibiotikumok gátló hatásának és a törzsek izolálási időpontjának összefüggései

Az egyes antibiotikumokkal szembeni rezisztencia az évek során növekszik. Az enrofloxacinra, a florfenikolra, valamint a penicillin-G-re kevésbé érzékeny *H. somni* törzsek aránya idővel nőtt, a három antibiotikum gátló hatására legkevesbé érzékeny baktériumtörzsek 100%-át 2006 szeptembere után izoláltuk. Hasonló jelenség mutatkozott a tetracilin esetében, a tetraciklinre kevésbé érzékeny *H. somni* törzsek aránya, a 2006 szeptembere után izolált törzsek esetében 30% volt, szemben a 2006 előtti izolátumok esetében tapasztalt 21%-kal.

A jelenség az antibiotikumok helyes alkalmazásának szükségességére hívja fel a figyelmet, mivel a helytelen antibiotikum kezelés az egyes antibiotikumokkal szembeni érzékenység csökkenéséhez vezet.

8.7.3 A *H. somni* törzsek antibiotikum-érzékenységének meghatározása

Az NCCLS M31-A2 (2002) dokumentumában meghatározott értékelési zónák alapján a szarvasmarha eredetű *H. somni* törzsek 35,7%-a, a juh eredetű törzseknek pedig 60%-a (az összes vizsgált törzs 28,9%-a) mérsékelten érzékeny volt gentamicinre. A *H. somni* gentamicinnal szembeni rezisztenciájáról szakirodalmi adatok nem állnak rendelkezésre, a jelenség vizsgálata további terveink között szerepel.

Az NCCLS M31-A2 (2002) dokumentumában csak az enrofloxacin, florfenikol és tilmikozin esetében található *H. somni*-ra illetve szarvasmarha légzőszervi patogénekre vonatkozó adatok. A standard értékelési zónák (7.6.2 fejezet) és vizsgálataink során tapasztalt MIC-értékek több antibiotikum esetében (enrofloxacin, florfenikol, penicillin, tetraciklin) nagymértékben eltértek egymástól.

Ezek alapján az általunk vizsgált törzsek igen érzékenyek tekinthetők enrofloxaccinnal és florfenikollal szemben. A penicillin és tetraciklin értékelési zónáinak *H. somni*-ra történő standardizálása azonban elengedhetetlenül fontos lenne a kórokozó pontos érzékenységének megállapítása érdekében.

9. Új tudományos eredmények

1. Munkánk során elsőként igazoltuk a *H. somni* jelenlétét kecskeállományokban. Az izolált törzsek fenotípusos és genotípusos vizsgálatai alapján megállapítottuk, hogy a kecskéből izolált *H. somni* törzsek igen hasonlóak egymáshoz, ezáltal igazoltuk, hogy azonos fertőzési forrásból származnak a törzsek. A 16S rDNS részletének vizsgálata alapján a törzsek 100%-ban hasonlóak voltak egy juh septikaemia eredetű *H. somni* törzshöz (CCUG – 46772), ami valószínűsíti, hogy a kecskék közös fertőzési forrásai az állományokkal együtt tartott juhok voltak.
2. A Magyarországon végzett mintagyűjtés során felmértük egyes szarvasmarha-állományok hüvelynyálkahártyán való *H. somni*-hordozásának arányát, ami 11-40% közé esett a vizsgált állományokban.
3. Igazoltuk, hogy a BIOLOG MICROSTATION™ ID SYSTEM rendszer alkalmas a *H. somni* meghatározására és szénforrás-hasznosításának vizsgálatára. Adataink felhasználásával bővíthető a BIOLOG rendszer adatbázisa és növelhető a pontossága.
4. Az anyagcsere-ujjlenyomat módszerrel különböző állatfajokból és kórformákból származó *H. somni* törzseket összehasonlításával bizonyítottuk, hogy a módszer járványtani nyomon követésre alkalmas.
5. Igazoltuk, hogy a PFGE módszer alkalmas a *H. somni* törzsek csoportosításra és járványtani nyomozásra, a módszer párhuzamba állítható a szénforrás-hasznosítás vizsgálatával.
6. Az anyagcsere-ujjlenyomatok és a teljes genom makrorestrikciós mintázatainak összehasonlítása alapján bizonyítottuk, hogy a szénforrás-hasznosításon alapuló vizsgáló módszer azonos állatfajból származó *H. somni* törzsek járványtani jellemzésében alkalmazható.
7. A *H. somni* klinikai és kórtani hatásainak vizsgálata érdekében egy új, a szakirodalomban fellelhető aeroszolos fertőzési modelleknél sikeresebb módszert dolgoztunk ki, és sikerrel alkalmaztuk borjak kísérletes *H. somni* fertőzésének kialakításához.
8. A kísérleti fertőzés következtében kialakult tüdőelváltozások kórbonctani és kórszövetteni képét részletesen elemeztük.
9. Különböző eredetű *H. somni* törzsek antibiotikum-érzékenységét standard eljárások alkalmazásával vizsgáltuk, amelynek segítségével meghatároztuk a napjainkban alkalmazott antibiotikumok *H. somni* törzsekkel szembeni hatékonyságát. Vizsgálataink során leírtuk a *H. somni* törzsek gentamicinnel szembeni mérsékelt érzékenységét.

10. Irodalom

1. Aarestrup, F. M., Seyfarth, A. M. and Angen, Ø.: Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Vet. Microbiol.* 2004. *101*. 143-146.
2. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 1997. *25*. 3389-3402.
3. Amies, C. R.: A modified formula for the preparation of Stuart's Transport Medium. *Can. J. Public Health.* 1967. *58*. 296-300.
4. Andrews, J. J., Anderson, T. D., Slife, L. N. and Stevenson, G. W.: Microscopic lesions associated with the isolation of *Haemophilus somnus* from pneumonic bovine lungs. *Vet. Pathol.* 1985. *22*. 131-136.
5. Angen, Ø., Ahrens, P. and Tegtmeier, C.: Development of a PCR test for identification of *Haemophilus somnus* in pure and mixed cultures. *Vet. Microbiol.* 1998. *63*. 39-48.
6. Angen Ø., Ahrens, P., Kuhnert, P., Christensen, H. and Mutters, R.: Proposal of *Histophilus somni* gen. nov., sp. nov. for the three species *incertae sedis* '*Haemophilus somnus*', '*Haemophilus agni*' and '*Histophilus ovis*'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. *53*. 1449-1456.
7. Appuhamy, S., Parton, R., Coote, J. G., and Gibbs, H. A.: Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* by a combination of PCR methods. *J. Clin. Microbiol.* 1997. *35*. 288-291.
8. Asmussen, M. D. and Baugh, C. L.: Thiamine pyrophosphate (cocarboxylase) as a growth factor for *Haemophilus somnus*. *J. Clin. Microbiol.* 1981. *14*. 178-183.
9. Bailie, W. E., Anthony, H. D. and Weide, K. D.: Infectious thromboembolic meningoencephalomyelitis (sleeper syndrome) in feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1966. *148*. 162-166.
10. Bailie, W. E.: Characterization of *Haemophilus somnus* (new species), a microorganism isolated from infectious thromboembolic meningoencephalitis of cattle. 1969. *Dissert. Abstr.* *30B*, 2482.
11. Ball, H. J., Kennedy, S. and Ellis, W. A.: Experimental reproduction of ovine vulvitis with bacteria of the *haemophilus/histophilus* group. *Res. Vet. Sci.* 1991. *50*. 81-85.
12. Barrow, G. I. and Feltham, R. K. A.: *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* 3rd ed. 1993. Cambridge University Press, New York, USA.

13. Behling-Kelly, E., Vonderheid, H., Kim, K. S., Corbeil, L. B. and Czuprynski, C. J.: Roles of cellular activation and sulfated glycans in *Haemophilus somnus* adherence to bovine brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* 2006. *74*. 5311-5318.
14. Birren, B. and Lai, E.: Pulsed field gel electrophoresis. A practical guide. 1993. Academic Press, San Diego, USA
15. Blackall, P. J., O'Dell, R. and Stephens, C. P.: Minimal inhibitory concentration of tilmicosin against isolates of *Histophilus somni* from Australian cattle. *Aust. Vet. J.* 2007. *85*. 503-504.
16. Brown, L. N., Eness, P. G. and Self, H. L.: Application of the complement fixation test to the study of *Haemophilus somnus* infections of cattle. *Proc. Ann. Meet. U. S. Anim. Health. Assoc.* 1972. *76*. 502-508.
17. Brewer, R. A., Corbel, M. J. and Stuart, F. A.: Development of improved methods for the transport and isolation of *Haemophilus somnus*. *Res. Vet. Sci.* 1985. *39*. 299-306.
18. Bruere, A. N., West, D. M., Maclachlan, N. J., Edwards, J. D. and Chapman, H. M.: Genital infection of ram hoggets associated with a gram-negative pleomorphic organism. *N. Z. Vet. J.* 1977. *25*. 191-193.
19. Bryson, D. G., Ball, H. J., McAliskey, M., McConnell, W. and McCullough, S. J.: Pathological, immunocytochemical and microbiological findings in calf pneumonias associated with *Haemophilus somnus* infection. *J. Comp. Pathol.* 1990. *103*. 433-445.
20. Bulgin, M. S., Anderson, B. C.: Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1983. *182*. 372-374.
21. Canto, G. J. and Biberstein, E. L.: Serological diversity in *Haemophilus somnus*. *J. Clin. Microbiol.* 1982. *15*. 1009-1015.
22. Canto, J., Biberstein, E. L., Schulte, T. A. and Behymer, D.: Cross-reactivity of *Haemophilus somnus* antibody in agglutination and complement fixation tests and in the enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 1983. *17*. 500-506.
23. Challacombe, J. F., Duncan, A. J., Brettin, T. S., Bruce, D., Chertkov, O., Detter, J. C., Han, C. S., Misra, M., Richardson, P., Tapia, R., Thayer, N., Xie, G. and Inzana, T. J.: Complete genome sequence of *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) strain 129Pt and comparison to *Haemophilus ducreyi* 35000HP and *Haemophilus influenzae* Rd. *J. Bacteriol.* 2007. *189*. 1890-1898.
24. Chang, C. F., Lin, W. H., Yeh, T. M., Chiang, T. S. and Chang, Y. F.: Antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks and the efficacy of ceftiofur treatment. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2003. *15*. 26-29.

25. Chladek, D. W.: Bovine abortion associated with *Haemophilus somnus*. Am. J. Vet. Res. 1975. 36. 1041.
26. Cho, Y. S., Lee, H. S., Lim, S. K., Joo, Y. S., Kim, J. M. and Kim, J. H.: Safety and efficacy testing of novel multivalent bovine bacterial respiratory vaccine composed of five bacterins and two immunogens. J. Vet. Med. Sci. 2008. 70. 959-964.
27. Chu, G., Vollrath, D. and Davis. R. W.: Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science. 1986. 234. 1582-1585.
28. Cole, S. P., Guiney, D. G. and Corbeil, L. B.: Two linked genes for outer membrane proteins are absent in four non-disease strains of *Haemophilus somnus*. Mol. Microbiol. 1992. 6. 1895-1902.
29. Corbeil, L. B., Blau, K., Prieur, D. J. and Ward, A. C.: Serum susceptibility of *Haemophilus somnus* from bovine clinical cases and carriers. J. Clin. Microbiol. 1985. 22. 192-198.
30. Corbeil, L. B., Kania, S. A. and Gogolewski, R. P.: Characterization of immunodominant surface antigens of *Haemophilus somnus*. Infect. Immun. 1991. 59. 4295-4301.
31. Corbeil, L. B., Gogolewski, R. P., Kacskovics, I., Nielsen, K. H., Corbeil, R. R., Morrill, J. L., Greenwood, R. and Butler, J. E.: Bovine IgG2a antibodies to *Haemophilus somnus* and allotype expression. Can. J. Vet. Res. 1997. 61. 207-213.
32. Corbeil, L. B., Arnold, K. F., Kimball, R., Berghaus, L. and Gershwin, L. J.: Specificity of IgG and IgE antibody responses to *Haemophilus somnus* infection of calves. Vet. Immunol. Immunopathol. 2006. 113. 191-199.
33. Corbeil, L. B.: *Histophilus somni* host-parasite relationships. Anim. Health. Res. Rev. 2007. 8. 151-160.
34. Cousins, D. V. and Lloyd, J. M.: Rapid identification of *Haemophilus somnus*, *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* using the API ZYM system. Vet. Microbiol. 1988. 17. 75-81.
35. Cox, A. D., Howard, M. D., Brisson, J. R., Zwan, M., van der Thibault, P., Perry, M. B. and Inzana, T. J.: Structural analysis of the phase-variable lipooligosaccharide from *Haemophilus somnus* strain 738. Eur. J. Biochem. 1998. 253. 507-516.
36. Czuprynski, C. J. and Hamilton, H. L.: Bovine neutrophils ingest but do not kill *Haemophilus somnus in vitro*. Infect. Immun. 1985. 50. 431-436.
37. de Craene, B. A., Deprez, P., D'Haese, E., Nelis, H. J., Van den Bossche, W. and De Leenheer, P.: Pharmacokinetics of florfenicol in cerebrospinal fluid and plasma of calves. Antimicrob. Agents Chemother. 1997. 41. 1991-1995.

38. De Ley, J., Mannheim, W., Mutters, R., Piechulla, K., Tytgat, R., Segers, P., Bisgaard, M., Frederiksen, W., Hinz, K. H. and Vanhoucke, M.: Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990. *40*. 126-137.
39. Dewey, K. J. and Little, P. B.: Environmental survival of *Haemophilus somnus* and influence of secretions and excretions. *Can. J. Comp. Med.* 1984. *48*. 23-26.
40. Dukes, T. W.: The ocular lesions in thromboembolic meningoencephalitis (ITEME) of cattle. *Can. Vet. J.* 1971. *12*. 180-182.
41. Dyer, N. W.: *Haemophilus somnus* bronchopneumonia in American bison (*Bison bison*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001. *13*. 419-421.
42. Ekins, A., Bahrami, F., Sijercic, A., Maret, D. and Niven, D. F.: *Haemophilus somnus* possesses two systems for acquisition of transferrin-bound iron. *J. Bacteriol.* 2004. *186*. 4407-4411.
43. Forray A., Varga J., Amtsberg G., Fodor L. és Százados I.: *Haemophilus somnus*-törzsek izolálása borjakból. *Magy. Áo. Lapja*, 1984. *39*. 209-212.
44. Garcia-Delgado, G. A., Little, P. B. and Barnum, D. A.: A comparison of various *Haemophilus somnus* strains. *Can. J. Comp. Med.* 1977. *41*. 380-388.
45. Gershwin, L. J., Berghaus, L. J., Arnold, K., Anderson, M. L. and Corbeil, L. B.: Immune mechanisms of pathogenetic synergy in concurrent bovine pulmonary infection with *Haemophilus somnus* and bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Immun. Immunopathol.* 2005. *107*. 119-130.
46. Godinho, K. S., Keane, S. G., Nanjiani, I. A., Benchaoui, H. A., Sunderland, S. J., Jones, M. A., Weatherley, A. J., Gootz, T. D. and Rowan, T. G.: Minimum inhibitory concentrations of tulathromycin against respiratory bacterial pathogens isolated from clinical cases in European cattle and swine and variability arising from changes in *in vitro* methodology. *Vet. Therapeut.* 2005. *6*. 113-121.
47. Godinho, K. S.: Susceptibility testing of tulathromycin: interpretative breakpoints and susceptibility of field isolates. *Vet. Microbiol.* 2008. *129*. 426-432.
48. Gogolewski, R. P., Kania, S. A., Inzana, T. J., Widders, P. R., Liggitt, H. D. and Corbeil, L. B.: Protective ability and specificity of convalescent serum from calves with *Haemophilus somnus* pneumonia. *Infect. Immun.* 1987a. *55*. 1403-1411.
49. Gogolewski, R. P., Leathers, C. W., Liggitt, H. D. and Corbeil, L. B.: Experimental *Haemophilus somnus* pneumonia in calves and immunoperoxidase localization of bacteria. *Vet. Pathol.* 1987b. *24*. 250-256.

50. Gogolewski, R. P., Kania, S. A., Liggitt, H. D. and Corbeil, L. B.: Protective ability of antibodies against 78- and 40-kilodalton outer membrane antigens of *Haemophilus somnus*. *Infect. Immun.* 1988. *56*. 2307-2316.
51. Gogolewski, R. P., Schaefer, D. C., Wasson, S. K., Corbeil, R. R. and Corbeil, L. B.: Pulmonary persistence of *Haemophilus somnus* in the presence of specific antibody. *J. Clin. Microbiol.* 1989. *27*. 1767-1774.
52. Gomis, S. M., Godson, D. L., Beskorwayne, T., Wobeser, G. A. and Potter, A. A.: Modulation of phagocytic function of bovine mononuclear phagocytes by *Haemophilus somnus*. *Microb. Pathog.* 1997. *22*. 13-21.
53. Gomis, S. M., Godson, D. L., Wobeser, G. A. and Potter, A. A.: Intracellular survival of *Haemophilus somnus* in bovine blood monocytes and alveolar macrophages. *Microb. Pathog.* 1998. *25*. 227-235.
54. Griffin, D.: Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 1997. *13*. 367–377.
55. Griner, L. A., Brown, W. W. and Jensen, R.: Infectious embolic meningo-encephalitis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1956. *129*. 417-421.
56. Groom, S. C., Hazlett, M. J. and Little, P. B.: An evaluation of the API ZYM system as a means of identifying *Haemophilus somnus* and related taxa. *Can. J. Vet. Res.* 1986. *50*. 238-244.
57. Groom, S. C. and Little, P. B.: Effects of vaccination of calves against induced *Haemophilus somnus* pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 1988. *49*. 793-800.
58. Groom, S. C., Little, P. B. and Rosendal, S.: Virulence differences among three strains of *Haemophilus somnus* following intratracheal inoculation of calves. *Can. J. Vet. Res.* 1988. *52*. 349-354.
59. Guichon, P. T., Pritchard, J. and Jim, G. K.: *Haemophilus somnus* myocarditis in a feedlot steer. *Can. Vet. J.* 1988. *29*. 1012-1013.
60. Gyuranecz, M, Erdélyi, K., Fodor, L., Jánosi, K., Szépe, B., Füleki, M., Szőke, I., Dénes, B. and Makrai, L.: Characterisation of *Francisella tularensis* strains, comparing their carbon source utilization. 2009. In press: *Zoonosis and Public Health*.
61. Haines, D. M., Moline, K. M., Sargent, R. A., Campbell, J. R., Myers, D. J. and Doig, P. A.: Immunohistochemical study of *Hemophilus somnus*, *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia hemolytica*, and bovine viral diarrhoea virus in death losses due to myocarditis in feedlot cattle. *Can. Vet. J.* 2004. *45*. 231-234.
62. Hajtós, I., Fodor, L., Varga, J. and Malik, G.: Ovine suppurative epididymo-orchitis caused by *Histophilus ovis*. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 1986. *33*. 528-536.

63. Hajtós, I.: Isolation of *Actinobacillus seminis* and *Histophilus ovis* strains from aborted ovine fetuses in Hungary. *Acta Vet. Hung.* 1987. 35. 415-425.
64. Haritani, M., Nakazawa, M., Hashimoto, K., Narita, M., Tagawa, Y. and Nakagawa, M.: Immunoperoxidase evaluation of the relationship between necrotic lesions and causative bacteria in lungs of calves with naturally acquired pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 1990. 51. 1975-1979.
65. Härtel, H., Nikunen, S., Neuvonen, E., Tanskanen, R., Kivelä, S. L., Aho, R., Soveri, T. and Saloniemi, H.: Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. *Acta. Vet. Scand.* 2004. 45. 193-200.
66. Higgins, R., Godbout-DeLasalle, F., Messier, S., Couture, Y. and Lamothe, P.: Isolation of *Histophilus ovis* from vaginal discharge in ewes in Canada. *Can. Vet. J.* 1981. 22. 395-396.
67. Higgins, R., Martin, J. R., Larouche, Y. and Goyette, G.: Mastitis Caused by *Haemophilus somnus* in a Dairy Cow. *Can. Vet. J.* 1987. 28. 117-119.
68. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A, Staley, J. T. and Williams S. T. (Eds): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1984.
69. Howard, M. D., Cox, A. D., Weiser, J. N., Schurig, G. G. and Inzana, T. J.: Antigenic diversity of *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide: phase-variable accessibility of the phosphorylcholine epitope. *J. Clin. Microbiol.* 2000. 38. 4412-4419.
70. Humphrey, J. D., Little, P. B., Barnum, D. A., Doig, P. A., Stephens, L. R. and Thorsen, J.: Occurrence of "*Haemophilus somnus*" in bovine semen and in the prepuce of bulls and steers. *Can. J. Comp. Med.* 1982. 46. 215-217.
71. Humphrey, J. D. and Stephens L. R.: „*Haemophilus somnus*”: A review. *Vet. Bulletin.* 1983. 53. 987-1004.
72. Inzana, T. J. and Corbeil, L. B.: Development of a defined medium for *Haemophilus somnus* isolated from cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1987. 48. 366-369.
73. Inzana, T. J., Iritani, B., Gogolewski, R. P., Kania, S. A. and Corbeil, L. B.: Purification and characterization of lipooligosaccharides from four strains of "*Haemophilus somnus*". *Infect. Immun.* 1988. 56. 2830-2837.
74. Inzana, T. J., Gogolewski, R. P., Corbeil, L. B.: Phenotypic phase variation in *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide during bovine pneumonia and after *in vitro* passage. *Infect. Immun.* 1992. 60. 2943-2951.
75. Inzana, T. J., Hensley, J., McQuiston, J., Lesse, A. J., Campagnari, A. A., Boyle, S. M. and Apicella, M. A.: Phase variation and conservation of lipooligosaccharide epitopes in *Haemophilus somnus*. *Infect. Immun.* 1997. 65. 4675-4681. Err. in: *Infect. Immun.* 1998. 66. 4010.

76. Inzana, T. J., Glindemann, G., Cox, A. D., Wakarchuk, W. and Howard, M. D.: Incorporation of N-acetylneuraminic acid into *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide (LOS): enhancement of resistance to serum and reduction of LOS antibody binding. *Infect. Immun.* 2002. *70*. 4870-4879. Err. in: *Infect. Immun.* 2002. *70*. 6512.
77. Jackson, J. A., Andrews, J. J. and Hargis, J. W.: Experimental *Haemophilus somnus* pneumonia in calves. *Vet. Pathol.* 1987. *24*. 129-134.
78. Jánosi, K., Hajtós, I., Makrai, L., Gyurnecz, M., Varga, J. és Fodor, L.: First isolation of *Histophilus somni* from goats. *Vet. Microbiol.*, 2009. *133*. 383-386.
79. Jansen, B. C.: The epidemiology of bacterial infection of the genitalia in rams. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1983. *50*. 275-282.
80. Janzen, E. D.: Myocardial lesions caused by *H. somnus* in cattle. *Can. Vet. J.* 1987. *28*. 208.
81. Kardos, G. and Kiss, I.: Molecular epidemiology investigation of outbreaks of fowl cholera in geographically related poultry flocks. *J. Clin. Microbiol.* 2005. *43*. 2959-2961.
82. Kater, J. C., Marshall, S. C. and Hartley, W. J.: A specific suppurative synovitis and pyaemia of lambs. *N. Z. Vet. J.* 1962. *10*. 143-144.
83. Kennedy, P. C., Frazier, L. M., Theilen, G. H. and Biberstein, E. L.: A septicemic disease of lambs caused by *Hemophilus agni* (new species). *Am. J. Vet. Res.* 1958. *19*. 645-654.
84. Kennedy, P. C., Biberstein, E. L., Howarth, J. A. and Dungworth, D. L.: Infectious meningo-encephalitis in cattle, caused by a *Haemophilus*-like organism. *Am. J. Vet. Res.* 1960. *21*. 403-409.
85. Kilian, M. and Biberstein, E. L.: *Haemophilus*. In: Krieg, N. R., Holl, J. G. (Eds.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, 1984. 558-569.
86. Kilian, M.: Genus *Haemophilus*. In: Garity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R. and Staley, J. T. (Eds.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2.: The Proteobacteria. Originally published by Williams & Wilkins, Baltimore, 1984. 2nd Ed. New York Springer, 2005.
87. Kuckleburg, C. J., Sylte, M. J., Inzana, T. J., Corbeil, L. B., Darien, B. J. and Czuprynski, C. J.: Bovine platelets activated by *Haemophilus somnus* and its LOS induce apoptosis in bovine endothelial cells. *Microb. Pathog.* 2005. *38*. 23-32.
88. Kuckleburg, C. J., McClenahan, D. J. and Czuprynski, C. J.: Platelet activation by *Histophilus somni* and its lipooligosaccharide induces endothelial cell proinflammatory responses and platelet internalization. *Shock*. 2008. *29*. 189-196.
89. Kwiecien, J. M., Little, P. B.: Failure of a selective medium to isolate *Haemophilus somnus* strains. 1989. *Aust. Vet J.* *66*. 159-160.

90. Kwiecien, J. M., Little, P. B. and Hayes, M. A.: Adherence of *Haemophilus somnus* to tumor necrosis factor-alpha-stimulated bovine endothelial cells in culture. *Can. J. Vet. Res.* 1994. 58. 211-219.
91. Lancaster, M. J., McGillivery, D. J., Patterson, R. M. and Irwin, S.: Pneumonia associated with *Haemophilus somnus* in a calf. *Aust. Vet. J.* 1984. 61. 269.
92. Lederer, J. A., Brown, J. F. and Czuprynski, C. J.: "*Haemophilus somnus*," a facultative intracellular pathogen of bovine mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* 1987. 55. 381-387.
93. Lees, V. W., Meek, A. H. and Rosendal, S.: Epidemiology of *Haemophilus somnus* in young rams. *Can. J. Vet. Res.* 1990. 54. 331-336.
94. Lees, V. W., Yates, W. D. and Corbeil, L. B.: Ovine *Haemophilus somnus*: experimental intracisternal infection and antigenic comparison with bovine *Haemophilus somnus*. *Can. J. Vet. Res.* 1994. 58. 202-210.
95. Little, P. B.: *Haemophilus somnus* Complex: Pathogenesis of the Septicemic Thrombotic Meningoencephalitis. *Can. Vet. J.* 1986. 27. 94-96.
96. Low, J. C. and Graham, M. M.: *Histophilus ovis* epididymitis in a ram in the UK. *Vet. Rec.* 1985. 117. 64-65.
97. Martin, S. W., Harland, R. J., Bateman, K. G. and Nagy, É.: The association of titers to *Haemophilus somnus*, and other putative pathogens, with the occurrence of bovine respiratory disease and weight gain in feedlot calves. *Can. J. Vet. Res.* 1998. 62. 262-267.
98. McDermott, P. F., Barry, A. L., Jones, R. N., Stein, G. E., Thornsberry, C., Wu, C. C. and Walker, R. D.: Standardization of broth microdilution and disk diffusion susceptibility tests for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus somnus*: quality control standards for ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol, gentamicin, penicillin, tetracycline, tilmicosin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. *J. Clin. Microbiol.* 2001. 39. 4283-4287.
99. McDowell, S. W., Cassidy, J. P. and McConnell, W.: A case of ovine abortion associated with *Histophilus ovis* infection. *Vet. Rec.* 1994. 134. 504.
100. McEwen, S. A. and Hullah, T. J.: *Haemophilus somnus*-induced Otitis and Meningitis in a Heifer. *Can. Vet. J.* 1985. 26. 7-8.
101. McQuiston, J. H., McQuiston, J. R., Cox, A. D., Wu, Y., Boyle, S. M. and Inzana, T. J.: Characterization of a DNA region containing 5'-(CAAT)_n-3' DNA sequences involved in lipooligosaccharide biosynthesis in *Haemophilus somnus*. *Microb. Pathog.* 2000. 28. 301-312.
102. Merino, M. and Biberstein, E. L.: Growth requirements of *Haemophilus somnus*. *J. Clin. Microbiol.* 1982. 16. 798-802.

103. Miles, D. G., Anthony, H. D. and Dennis, S. M.: *Haemophilus somnifer* (n. sp.) infection in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 1972. 33. 431-435.
104. Miller, R. B., Lein, D. H., McEntee, K. E., Hall, C. E. and Shin, S.: *Haemophilus somnus* infection of the reproductive tract of cattle: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1983. 182. 1390-1392.
105. Miller, R. J., Renshaw, H. W. and Evans, J. A.: *Haemophilus somnus* complex: antigenicity and specificity of fractions of *Haemophilus somnus*. *Am. J. Vet. Res.* 1975. 36. 1123-1128.
106. Mitchell, C. A.: *Hemophilus ovis* (Nov. Spec.) as the cause of a specific disease in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1925. 68. 8-18.
107. Myers, L. E., Silva, S. V., Procnier, J. D. and Little, P. B.: Genomic fingerprinting of "*Haemophilus somnus*" isolates by using a random-amplified polymorphic DNA assay *J. Clin. Microbiol.* 1993. 31. 512-517.
108. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 1999. Approved standard – 2nd Ed. M31-A2. NCCLS. Wayne, Pennsylvania, USA.
109. Nayar, P. S., Ward, G. E., Saunders, J. R. and MacWilliams, P.: Diagnostic procedures in experimental *Hemophilus somnus* infection in cattle. *Can. Vet. J.* 1977. 18. 159-163.
110. Nivard, J. L., Ward, G. E., Stevens, J. B. and Maheswaran, S. K.: Model infection of the chicken embryo with *Haemophilus somnus*. *Am. J. Vet. Res.* 1982. 43. 1790-1792.
111. O'Connor, A., Martin, S. W., Harland, R., Shewen, P. and Menzies, P.: The relationship between the occurrence of undifferentiated bovine respiratory disease and titer changes to *Haemophilus somnus* and *Mannheimia haemolytica* at 3 Ontario feedlots. *Can. J. Vet. Res.* 2001. 65. 143-150. Err. in: *Can. J. Vet. Res.* 2001. 65. 272.
112. Odugbo, M. O., Ogunjumo, S. O., Chukwukere, S. C., Kumbish, P. R., Musa, A., Ekundayo, S. O., Okewole, P. A., Nwankpa, N. D., Itodo, A. E. and Haruna, G.: The first report of *Histophilus somni* pneumonia in Nigerian dairy cattle. in press *Vet. J.* 2008.
113. Panciera, R. J., Dahlgren, R. R. and Rinker, H. B.: Observations on septicemia of cattle caused by a *haemophilus*-like organism. *Pathol. Vet.* 1968. 5. 212-216.
114. Potgieter, L. N., Helman, R. G., Greene, W., Breider, M. A., Thurber, E. T. and Peetz, R. H.: Experimental bovine respiratory tract disease with *Haemophilus somnus*. *Vet. Pathol.* 1988. 25. 124-130.
115. Prescott, J. F. and Yielding, K. M.: *In vitro* susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. *Can. J. Vet. Res.* 1990. 54. 195-197.

116. Pritchard, D. G. and Macleod, N. S.: The isolation of *Haemophilus somnus* following sudden deaths in suckler calves in Scotland. *Vet. Rec.* 1977. *100*. 126-127.
117. Pritchard, D. G., Shreeve, J. and Bradley, R.: The experimental infection of calves with a British strain of *Haemophilus somnus*. *Res. Vet. Sci.* 1979. *26*. 7-11.
118. Rahaley, R. S. and White, W. E.: *Histophilus ovis* infection in sheep in Western Victoria. *Aust. Vet. J.* 1977. *53*. 124-127.
119. Reeks, B.Y., Champlin, F. R., Paulsen, D. B., Scruggs, D. W. and Lawrence, M. L.: Effects of sub-minimum inhibitory concentration antibiotic levels and temperature on growth kinetics and outer membrane protein expression in *Mannheimia haemolytica* and *Haemophilus somnus*. *Can. J. Vet Res.* 2005. *69*. 1-10.
120. Riley, L.: Molecular epidemiology of infectious diseases. Principles and practices. Am. Soc. Microbiol. Press. 2004. Washington D. C., USA.
121. Roberts, D.S.: A new pathogen from a ewe with mastitis. *Aust. Vet. J.*, 1956. *32*. 330-332.
122. Ruby, K. W., Griffith, R. W., Gershwin, L. J. and Kaeberle, M. L.: *Haemophilus somnus*-induced IgE in calves vaccinated with commercial monovalent *H. somnus* bacterins. *Vet. Microbiol.* 2000. *76*. 373-383.
123. Ruby, K. W., Griffith, R. W., Kaeberle, M. L.: Histamine production by *Haemophilus somnus*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2002. *25*. 13-20.
124. Rusvai M., Izadpanah R., és Fodor L.: Endémiás légzőszervi megbetegedések oktani vizsgálata egyes hazai szarvasmarha- és juhállományokban. *Magy. Áo. Lapja.* 1999. *121*. 255-259.
125. Salmon, S. A., Watts, J. L. and Yancey, R. J. Jr.: Evaluation of the RapID NH system for identification of *Haemophilus somnus*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from cattle and pigs with respiratory disease. *J. Clin. Microbiol.* 1993. *31*. 1362-1363.
126. Sandal, I., Hong, W., Swords, W. E. and Inzana, T. J.: Characterization and comparison of biofilm development by pathogenic and commensal isolates of *Histophilus somni*. *Eur. J Bacteriol.* 2007. *189*. 8179-8185.
127. Sanfaçon, D., Higgins, R., Mittal, K. R. and L'Archeveque, G.: *Haemophilus somnus*: a comparison among three serological tests and a serological survey in beef and dairy cattle. *Can. J. Comp. Med.* 1983. *47*. 304-308.
128. Sauer, P., Andrew, S. E., Lassaline, M., Gelatt, K. N. and Denis, H. M.: Changes in antibiotic resistance in equine bacterial ulcerative keratitis (1991-2000): 65 horses. *Vet. Ophthalmol.* 2003. *6*. 309-313.

129. Saunders, J. R., Thiessen, W. A. and Janzen, E. D.: *Haemophilus somnus* infections I. A ten year (1969-1978) retrospective study of losses in cattle herds in Western Canada. *Can. Vet. J.* 1980. *21*. 119-123.
130. Saunders, V. F., Reddacliff, L. A., Berg, T. and Hornitzky, M.: Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Aust. Vet. J.* 2007. *85*. 72-77.
131. Schwartz, D. C., and Cantor., C. R.: Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 1984. *37*. 67-75.
132. Siddaramppa, S. and Inzana, T. J.: *Haemophilus somnus* virulence factors and resistance to host immunity. *Anim. Health Res. Rev.* 2004. *5*. 79-93.
133. Silva, S. V., Little, P. B. and Kaushik, A.: An immunodominant epitope on 40 kilodalton outer membrane protein is conserved among different strains of *Haemophilus (Histophilus) somnus*. *Zentralbl. Bakteriol.* 1995. *282*. 449-456.
134. Silva, S. V. and Little, P. B.: The protective effect of vaccination against experimental pneumonia in cattle with *Haemophilus somnus* outer membrane antigens and interference by lipopolysaccharide. *Can. J. Vet. Res.* 1990. *54*. 326-330.
135. Silva-Costa, C., Ramirez, M. and Melo-Cristino, J.: Identification of macrolide-resistant clones of *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006. *12*. 513-518.
136. Slee, K. J., Stephens, L. R.: Selective medium for isolation of *Haemophilus somnus* from cattle and sheep. *Vet. Rec.* 1985. *116*. 215-217.
137. Soll, D. R.: The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000. *13*. 332-370.
138. St. Michael, F., Li, J., Howard, M. D., Duncan, A. J., Inzana, T. J. and Cox, A. D.: Structural analysis of the oligosaccharide of *Histophilus somni (Haemophilus somnus)* strain 2336 and identification of several lipooligosaccharide biosynthesis gene homologues. *Carbohydr. Res.* 2005. *340*. 665-672.
139. Stefaniak, T.: Detection of the *Haemophilus somnus* antibodies in the bulls' reproductive tract fluids using the ELISA. II. Occurrence of specific antibodies in bulls from three Bull Rearing Centers. *Arch. Vet. Pol.* 1993. *33*. 89-105.
140. Stephens, L. R. and Little, P. B.: Ultrastructure of *Haemophilus somnus*, causative agent of bovine infectious thromboembolic meningoencephalitis. *Am. J. Vet. Res.* 1981. *42*. 1638-1640.
141. Stephens, L. R., Little, P. B., Wilkie, B. N. and Barnum, D. A.: Humoral immunity in experimental thromboembolic meningoencephalitis in cattle caused by *Haemophilus somnus*. *Am. J. Vet. Res.* 1981a. *42*. 468-473.

142. Stephens, L. R., Little, P. B., Wilkie, B. N. and Barnum, D. A.: Infectious thromboembolic meningoencephalitis in cattle: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1981*b*. 178. 378-384.
143. Stephens, L. R., Humphrey, J. D., Little, P. B. and Barnum, D. A.: Morphological, biochemical, antigenic, and cytochemical relationships among *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Histophilus ovis*, and *Actinobacillus seminis*. *J. Clin. Microbiol.* 1983. 17. 728-737.
144. Stuart, R. D.: Transport medium for specimens in public health bacteriology. *Public Health Rep.* 1959. 74. 431-438.
145. Sugimoto, C., Mitani, K., Nakazawa, M., Sekizaki, T., Terakado, N. and Isayama, Y.: *In vitro* susceptibility of *Haemophilus somnus* to 33 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983. 23. 163-165.
146. Swanepoel, M. L.: A study for the differentiation of *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetem-comitans*, *Histophilus ovis* and *Pasteurella haemolytica*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1984. 51. 41-46.
147. Sylte, M. J., Corbeil, L. B., Inzana, T. J. and Czuprynski, C. J.: *Haemophilus somnus* induces apoptosis in bovine endothelial cells *in vitro*. *Infect. Immun.* 2001. 69. 1650-1660.
148. Sylte, M. J., Leite, F. P., Kuckleburg, C. J., Inzana, T. J. and Czuprynski, C. J.: Caspase activation during *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide-mediated apoptosis of bovine endothelial cells. *Microb. Pathog.* 2003. 35. 285-291.
149. Szalay D., Hajtós I., Glávits R. és Takács J.: A szarvasmarha *Haemophilus somnus* okozta thromboemboliás meningoencephalitisének (TEME-nek), valamint vetélésének hazai megállapítása. *Magy. Áo. Lapja.* 1994. 49. 149-154.
150. Tagawa, Y., Haritani, M., Ishikawa, H. and Yuasa, N.: Characterization of a heat-modifiable outer membrane protein of *Haemophilus somnus*. *Infect. Immun.* 1993*a*. 61. 1750-1755.
151. Tagawa, Y., Haritani, M. and Yuasa, N.: Characterization of an immunoreactive 17.5-kilodalton outer membrane protein of *Haemophilus somnus* by using a monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 1993*b*. 61. 4153-4157.
152. Tagawa, Y., Sanders, J. D., Uchida, I., Bastida-Corcuera, F. D., Kawashima, K. and Corbeil, L. B.: Genetic and functional analysis of *Haemophilus somnus* high molecular weight-immunoglobulin binding proteins. *Microb. Pathog.* 2005. 39. 159-170.
153. Tanaka, A., Hoshino, K., Hoshino, T. and Tagawa, Y.: Differentiation between bovine and ovine strains of *Histophilus somni* based on the sequences of 16S rDNA and rpoB gene. *J. Vet. Med. Sci.* 2005. 67. 255-262.

154. Tanner, A. C., and Hargis, J. W.: Use of a commercial broth microdilution technique for testing the susceptibility of *Haemophilus somnus* to antimicrobials. p. 205-208. in Proc. XVII World Buiatr. Congr. St. Paul, Minn. Frontier Printers, Inc., Stillwater, Okla.
155. Tegtmeier, C., Jensen, N. E. and Jensen, H. E.: Development of a peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique for the identification of *Haemophilus somnus* in pneumonic calf lungs in Denmark. A. P. M. I. S. 1995. *103*. 540-547.
156. Tegtmeier, C., Bloch, B., Jensen, N. E. and Jensen, H. E.: Initial lung lesions in two calves experimentally infected with *Haemophilus somnus*. J. Vet. Med. Series B. 1999a. *46*. 517-523.
157. Tegtmeier, C., Uttenthal, A., Friis, N. F., Jensen, N. E. and Jensen, H. E.: Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. Zentralbl. Veterinarmed. B. 1999b. *46*. 693-700.
158. Tegtmeier, C., Angen, Ø. and Ahrens, P.: Comparison of bacterial cultivation, PCR, in situ hybridization and immunohistochemistry as tools for diagnosis of *Haemophilus somnus* pneumonia in cattle. Vet. Microbiol. 2000a. *76*. 385-394.
159. Tegtmeier, C., Angen, Ø., Grell, S. N., Riber, U. and Friis, N. F.: Aerosol challenge of calves with *Haemophilus somnus* and *Mycoplasma dispar*. Vet. Microbiol. 2000b. *72*. 229-239.
160. Tekes, L. and Hajtós, I.: Trials with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of subclinical genital infections in rams caused by *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis*. J. Vet. Med. B. 1990. *37*. 549-555.
161. Thomson, M. S., Laureman, L. H. and Wilt, G. R.: Monoclonal antibody in the identification of *Haemophilus somnus*. J. Vet. Diagn. Invest. 1990. *2*. 116-119.
162. Van Donkersgoed, J., Janzen, E. D. and Harland, R. J.: Epidemiological features of calf mortality due to hemophilosis in a large feedlot. Can. Vet. J., 1990. *31*. 821-825.
163. Van Donkersgoed, J., Janzen, E. D., Potter, A. A. and Harland, R. J.: The occurrence of *Haemophilus somnus* in feedlot calves and its control by postarrival prophylactic mass medication. Can. Vet. J. 1994. *35*. 573-580.
164. Van Donkersgoed, J. Guenther, C., Evans, B. N., Potter, A. A. and Harland, R. J.: Effects of various vaccination protocols on passive and active immunity to *Pasteurella haemolytica* and *Haemophilus somnus* in beef calves. Can. Vet. J. 1995. *36*. 424-429.
165. Van Dreumel, A. A., Curtis, R. A. and Ruhnke, H. L.: Infectious thromboembolic meningoencephalitis in Ontario feedlot cattle. Can. Vet. J. 1970. *11*. 125-130.
166. Van Dreumel, A. A. and Kierstead M.: Abortion associated with *Hemophilus somnus* infection in a bovine fetus. Can. Vet. J. 1975. *16*. 367-370.

167. Van Tonder, E. M.: *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa. III. Growth and cultural characteristics of *A. seminis*. Onderstepoort J. Vet. Res. 1979. 46. 141-148.
168. Walker, R. L. and LeaMaster, B. R.: Prevalence of *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* in the genital tract of sheep. Am. J. Vet. Res. 1986. 47. 1928-1930.
169. Walker, R. L., LeaMaster, B. R., Biberstein, E. L. and Stellflug, J. N: Serodiagnosis of *Histophilus ovis*-associated epididymitis in rams. Am. J. Vet. Res. 1988. 49. 208-212.
170. Ward, A. C. S., Jaworski, M. D., Eddow, J. M. and Corbeil, L. B.: A comparative study of bovine and ovine *Haemophilus somnus* isolates. Can. J. Vet. Res. 1995. 59. 173-178.
171. Ward, A. C. S., Dyer, N. W. and Corbeil, L. B.: Characterization of putative *Haemophilus somnus* isolates from tonsils of American bison (*Bison bison*). Can. J. Vet. Res. 1999. 63. 166-169.
172. Ward, A. C. S., Weiser, G. C., Anderson, B. C., Cummings, P. J., Arnold, K. F. and Corbeil, L. B.: *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) in bighorn sheep. Can. J. Vet. Res. 2006. 70. 34-42.
173. Ward, G. E., Nivard, J. R. and Maheswaran, S. K.: Morphologic features, structure, and adherence to bovine turbinate cells of three *Haemophilus somnus* variants. Am. J. Vet. Res. 1984. 45. 336-338.
174. Watts, J. L. and Yancey, R. J. Jr.: Identification of veterinary pathogens by use of commercial identification systems and new trends in antimicrobial susceptibility testing of veterinary pathogens. Clin. Microbiol. Rev. 1994. 7. 346-356.
175. Webb, R. F.: Bacteriological characteristics of *Histophilus ovis* and its relationship to similar bacteria. Res. Vet. Sci. 1983a. 35. 25-29.
176. Webb, R. F.: Clinical findings and pathological changes in *Histophilus ovis* infections of sheep. Res. Vet. Sci. 1983b. 35. 30-34.
177. Welsh, R. D., Dye, L. B., Payton, M. E. and Confer, A. W.: Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994-2002. J. Vet. Diagn. Invest. 2004. 16. 426-431.
178. Widders, P. R., Paisley, L. G., Gogolewski, R. P., Evermann, J. F., Smith, J. W. and Corbeil, L. B.: Experimental abortion and the systemic immune response to "*Haemophilus somnus*" in cattle. Infect. Immun. 1986. 54. 555-560.
179. Widders, P. R., Dorrance, L. A., Yarnall, M. and Corbeil, L. B.: Immunoglobulin-binding activity among pathogenic and carrier isolates of *Haemophilus somnus*. Infect. Immun. 1989. 57. 639-642.

180. Wong, J. D., Janda, J. M. and Duffey, P. S.: Preliminary studies on the use of carbon substrate utilization patterns for identification of *Brucella* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1992. 15. 109-113.
181. Yarnall, M., Widders, P. R. and Corbeil, L. B.: Isolation and characterization of Fc receptors from *Haemophilus somnus*. *Scand. J. Immunol.* 1988. 28. 129-37.

11. A témában megjelent tudományos publikációk

K. Jánosi, I. Hajtós, L. Makrai, M. Gyuranecz, J. Varga, L. Fodor: First isolation of *Histophilus somni* from goats. *Veterinary Microbiology* (2009), 133: (4) 383-386.

Jánosi Katalin, Stipkovits László, Schreck Ottó, Glávits Róbert, Molnár Tamás, Makrai László, Gyuranecz Miklós, Varga János, Szathmáry Zsuzsanna, Fodor László: A tüdő kórbonctani és kórszövettani elváltozásai mesterséges *Histophilus somni* fertőzést követően borjakban. *Magyar Állatorvosok Lapja*, közlésre elfogadva.

K. Jánosi, L. Stipkovits, O. Schreck, R. Glávits, T. Molnár, L. Makrai, M. Gyuranecz, J. Varga, Zs. Szathmáry, L. Fodor: Aerosol infection of calves with *Histophilus somni*. *Acta Veterinaria Hungarica*, közlésre elfogadva.

Poszterek, előadások konferenciákon:

K. Jánosi, L. Makrai, I. Hajtós, J. Varga, A. E. Tirián, L. Fodor (poszter):

Comparative study of the metabolic fingerprint of *Histophilus somni* strains isolated from farm animals. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 18-20 July 2007. Budapest, Hungary. In: Proceedings of the 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2007. 54. Suppl.: 52-53.

K. Jánosi, I. Hajtós, L. Makrai, M Gyuranecz, J. Varga, L. Fodor (előadás):

First isolation of *Histophilus somni* from goat flocks in Hungary. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése és a XI. Fermentációs Kollokvium, 2008. október 14-17. Keszthely, Magyarország. Absztraktfüzet. 2008. 31-32.

K. Jánosi, L. Makrai, I. Hajtós, M Gyuranecz, J. Varga, A. E. Tirián, L. Fodor (előadás):

Comparative study of carbon source utilization of 100 *Histophilus somni* strains isolated from farm animals. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése és a XI. Fermentációs Kollokvium, 2008. október 14-17. Keszthely, Magyarország. Absztraktfüzet. 2008. 31.

12. Függelék

1. függelék A 2006 szeptembere előtt izolált, juh eredetű *H. somni* törzsek részletes adatai

TÖRZS JELZÉSE	SZÁRMAZÁS		IZOLÁLÁS		VIZSGÁLATOK			
	ÁLLATFAJ	SZERV	HELYE	IDŐPONTJA	BIOLOG	16S rDNS	<i>SmaI</i>	ATB.
1588/7/84	juh	here	Miskolc	1984.11.15	•		•	•
1588/6	juh	here	Miskolc	1984.11.15	•		•	•
55(860/55)	juh	ondó	Szentistván	1985.06.07	•		•	•
1456/17	juh	ondó	Kenézlő	1985.11.27	•		•	•
1496/7	juh	ondó	Gelej	1985.11.27	•		•	
1496/2	juh	ondó	Gelej	1985.11.27	•		•+ <i>Cfr9I</i>	•
405/88/34	juh	ondó	Mezőkeresztes	1988.04.06	•		•	•
26/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.18	•	•	•	
27/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.18	•	•	•	
28/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.18	•	•		
29/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.18	•		•+ <i>Cfr9I</i>	
30/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.18	•		•	
31/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.18	•		•	
32/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.18	•		•	•
33/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.18	•		•	
24/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.23	•	•	•+ <i>Cfr9I</i>	
25/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.23	•	•	•+ <i>Cfr9I</i>	•
34/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.23	•	•	•	
41/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.23	•	•	•	•
42/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.23	•		•+ <i>Cfr9I</i>	
43/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.23	•		•+ <i>Cfr9I</i>	
45/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.23	•		•	
50/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.23	•		•+ <i>Cfr9I</i>	•
51/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.23	•		•	
52/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.23	•		•	
54/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.23	•		•	
56/99	juh	ondó	Mezőnagymihály	1999.08.23	•		•	
Juh ondó eredetű törzsek:	25		Vizsgált törzsek száma:	27	7	26+7	10	
Juh here eredetű törzsek:	2							
Összesen:	27							

2. függelék A 2006 szeptembere előtt izolált szarvasmarha légzőszervi eredetű *H. somni* törzsek, valamint egy típusörzs részletes adatai

TÖRZS JELZÉSE	SZÁRMAZÁS		IZOLÁLÁS		VIZSGÁLATOK			
	ÁLLATFAJ	SZERV	HELYE	IDŐPONTJA	BIOLOG	16S rDNS	<i>SmaI</i>	ATB.
8025	szarvasmarha	agy	ATCC-43625	1985.04.26	•		•+ <i>Cfr9I</i>	
Mátrader2	borjú	tüdő	Mátraderecske	1985.05.25	•		•	•
1396/85	borjú	tüdő	Onga	1985.12.13	•		•	•
983/1	borjú	tüdő	Mezőcsát	1986.07.11	•		•	•
902/87	borjú	tüdő	Izsófalva	1987.06.29	•		•+ <i>Cfr9I</i>	•
S1	borjú	tüdő	MTA-ÁTKI	1994.11.03	•		•	
Gelej1	borjú	tüdő	Gelej	1995.05.10	•		•+ <i>Cfr9I</i>	
Gelej2	borjú	tüdő	Gelej	1995.05.10	•		•+ <i>Cfr9I</i>	
69/95	borjú	tüdő	Ostffyasszonyfa	1995.10.20	•		•	•
70/95	borjú	tüdő	Ostffyasszonyfa	1995.10.20				
71/95	borjú	tüdő	Ostffyasszonyfa	1995.11.08	•		•	
26/97	borjú	tüdő	Mezőfalva	1997.05.13	•		•	•
27/97	borjú	tüdő	Mezőfalva	1997.05.13	•		•	
50/97	borjú	tüdő	Ostffyasszonyfa	1997.07.17	•		•	
51/97	borjú	tüdő	Ostffyasszonyfa	1997.07.17	•		•	
73/97	borjú	tüdő	Erdősmecske	1997.12.11	•		•	
74/97	borjú	tüdő	Erdősmecske	1997.12.11	•		•	
75/97	borjú	tüdő	Erdősmecske	1997.12.11	•		•+ <i>Cfr9I</i>	
76/97	borjú	tüdő	Erdősmecske	1997.12.11	•		•	•
77/97	borjú	tüdő	Erdősmecske	1997.12.11	•		•+ <i>Cfr9I</i>	
78/97	borjú	tüdő	Erdősmecske	1997.12.11	•		•	
79/97	borjú	tüdő	Erdősmecske	1997.12.11				
80/97	borjú	tüdő	Erdősmecske	1997.12.11				
81/97	borjú	tüdő	Erdősmecske	1997.12.11				
11/98	borjú	tüdő	Ostffyasszonyfa	1998.02.27				
57/98	borjú	orr	Tass	1998.06.09	•		•+ <i>Cfr9I</i>	
46/98	borjú	tüdő	Ostffyasszonyfa	1998.10.20	•		•	
14/00	borjú	tüdő	MTA-ÁTKI	2000.02.10	•		•	
15/00	borjú	tüdő	MTA-ÁTKI	2000.02.10	•	•	•	
16/00	borjú	tüdő	MTA-ÁTKI	2000.02.10	•	•	•	
6/01	borjú	tüdő	Balmazújváros	2001.01.08	•	•	•	•
21/01	borjú	tüdő	Ostffyasszonyfa	2001.03.13	•	•	•	•
22/01	borjú	tüdő	Ostffyasszonyfa	2001.03.13	•		•	
57/03	borjú	tüdő	MTA-ÁTKI	2003.09.06	•	•	•	
Borjú tüdő eredetű törzsek:		32	Vizsgált törzsek száma:		29	5	29+7	9
Borjú orr eredetű törzsek:		1						
Típusörzs:		1						
Összesen:		34						

3. függelék A 2006 szeptembere után izolált, szarvasmarha hüvely eredetű *H. somni* törzsek részletes adatai

TÖRZS JELZÉSE	SZÁRMAZÁS		IZOLÁLÁS		VIZSGÁLATOK			
	ÁLLATFAJ	SZERV	HELYE	IDŐPONTJA	BIOLOG	16S rDNS	<i>SmaI</i>	ATB.
D-2	szarvasmarha	hüvely	Dalmand	2006.09.21				
D-11	szarvasmarha	hüvely	Dalmand	2006.09.21	•		•	
D-15	szarvasmarha	hüvely	Dalmand	2006.09.21	•		•	
D-19	szarvasmarha	hüvely	Dalmand	2006.09.21	•		•	
D-25	szarvasmarha	hüvely	Dalmand	2006.09.21	•		•	•
D-28	szarvasmarha	hüvely	Dalmand	2006.09.21	•		•	
D-30	szarvasmarha	hüvely	Dalmand	2006.09.21	•		•	
D-32	szarvasmarha	hüvely	Dalmand	2006.09.21	•		•	
D-43	szarvasmarha	hüvely	Dalmand	2006.09.21	•		•	•
M-56	szarvasmarha	hüvely	Mezőkeresztes	2006.10.04	•		•	•
M-65	szarvasmarha	hüvely	Mezőkeresztes	2006.10.04	•		•	•
M-67	szarvasmarha	hüvely	Mezőkeresztes	2006.10.04	•		•	
IV-75	szarvasmarha	hüvely	Mohács	2006.11.14	•		•	•
IV-77	szarvasmarha	hüvely	Mohács	2006.11.14	•		•	•
IV-78	szarvasmarha	hüvely	Mohács	2006.11.14	•		•	
IV-82	szarvasmarha	hüvely	Mohács	2006.11.14				
IV-84	szarvasmarha	hüvely	Mohács	2006.11.14				
B-106	szarvasmarha	hüvely	Békés	2006.11.20	•		•	•
B-111	szarvasmarha	hüvely	Békés	2006.11.20	•		•	•
B-114	szarvasmarha	hüvely	Békés	2006.11.20				
P1	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.02.20	•		•	•
P2	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.02.20				
P3	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.02.20				
P4	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.02.20	•		•	
P5	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.02.20				
P6	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.02.20				
P7	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.02.20	•		•+Cfr9I	•
P8	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.02.20	•		•	
P9	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.03.20				
P10	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.03.20				
P11	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.03.20				
P12	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.03.20				
P13	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.03.20				
P14	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.03.20				
P15	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.03.20				
P17	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.03.20				
P19	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.03.20				
P20	szarvasmarha	hüvely	Pápa	2007.03.20				
Szarvasmarha hüvely eredetű törzsek:			38	Vizsgált törzsek:	20		20+1	10

4. függelék A 2006 szeptembere után izolált szarvasmarha légzőszervi eredetű *H. somni* törzsek, valamint egy típus törzs részletes adatai

TÖRZS JELZÉSE	SZÁRMAZÁS		IZOLÁLÁS		VIZSGÁLATOK			
	ÁLLATFAJ	SZERV	HELYE	IDŐPONTJA	BIOLOG	16S rDNS	<i>SmaI</i>	ATB.
700025	szarvasmarha	tüdő	ATCC	2007.02.27	•		•	•
T-1	borjú	tüdő	Tolnanémedi	2006.09.28	•		•	•
6150	borjú	tüdő	MgSzH-ÁDI	2007.03.12	•		•	•
VII-137	borjú	orr	Tarhos	2007.09.21	•		•	
VII-138	borjú	orr	Tarhos	2007.09.21	•		•	
VII-139	borjú	orr	Tarhos	2007.09.21	•		•	•
VII-140	borjú	orr	Tarhos	2007.09.21	•		•	
VII-141	borjú	orr	Tarhos	2007.09.21	•		•	
VIII-149	borjú	orr	Nemesszalók	2007.10.09	•		•	•
343/07	borjú	tüdő	MTA-ÁTKI	2007.11.05	•		•+Cfr9I	
344/07	borjú	tüdő	MTA-ÁTKI	2007.11.05	•		•+Cfr9I	•
IX-158	borjú	orr	ÁTKI/4806	2007.11.27	•		•+Cfr9I	
X-166	borjú	tüdő	ÁTKI/4816	2007.11.28	•		•	
Szarvasmarha légzőszervi eredetű törzsek:			12	Vizsgált törzsek:	13		13+3	6
Típus törzs:			1					

5. függelék A 2006 szeptembere után izolált, kecske eredetű *H. somni* törzsek részletes adatai

TÖRZS JELZÉSE	SZÁRMAZÁS		IZOLÁLÁS		VIZSGÁLATOK			
	ÁLLATFAJ	SZERV	HELYE	IDŐPONTJA	BIOLOG	16S rDNS	<i>SmaI</i>	ATB
8/17	kecske	hüvely	Erdőbénye	2007.09.18	•	•	•	•
9/2	kecske	hüvely	Baskó	2007.09.18	•		•	•
9/3	kecske	hüvely	Baskó	2007.09.18	•		•	
9/6	kecske	hüvely	Baskó	2007.09.18	•		•	
9/7	kecske	hüvely	Baskó	2007.09.18	•		•	
9/11	kecske	hüvely	Baskó	2007.09.18	•		•	
9/12	kecske	hüvely	Baskó	2007.09.18	•		•	
9/13	kecske	hüvely	Baskó	2007.09.18	•	•	•	
9/14	kecske	hüvely	Baskó	2007.09.18	•		•	•
9/15	kecske	tasak	Baskó	2007.09.18	•	•	•	•
9/17	kecske	hermafrodita	Baskó	2007.09.18	•		•	•
Kecske hüvely eredetű törzsek		9		Vizsgált törzsek:	11	3	11	5
Kecske tasak eredetű törzsek		1						
Kecske hermafrodita er. törzsek		1						
Összesen:		11						

6. függelék A szarvasmarha légzőszervi eredetű *H. somni* törzsek és az ATCC-700025 *H. somni* típusörzs MIC-értékeinek alakulása

TÖRZS JELÖLÉSE	SZÁRMAZÁS		IZOLÁLÁS IDŐPONTJA	ENO ^a	FLORF ^b	GENTA ^c	PEN ^d	TC ^e	TILM ^f
	ÁLLATFAJ	SZERV							
ATCC-700025	QC típusörzs ^g		2007.02.27	0,03	0,25	8	0,03	0,5	4
6/01	borjú	tüdő	2001.01.08	0,015/0,016	0,25	2	0,004	0,5	2
21/01	borjú	tüdő	2001.03.13	0,03	0,25	4	0,015/0,016	0,25	2
69/95	borjú	tüdő	1995.10.20	0,03	0,25	2	0,008	0,25	1
26/97	borjú	tüdő	1997.05.13	0,03	0,25	4	0,004	0,25	16
76/97	borjú	tüdő	1997.12.11	0,03	0,25	8	0,008	0,5	2
983/1	borjú	tüdő	1986.07.11	0,03	0,25	4	0,008	0,25	2
902/87	borjú	tüdő	1987.06.29	0,03	0,25	4	0,015/0,016	0,5	2
1396/85	borjú	tüdő	1985.12.13	0,03	0,25	4	0,008	0,25	2
Mátrader2	borjú	tüdő	1985.05.25	0,03	0,25	8	0,004	0,25	2
T-1	borjú	tüdő	2006.09.28	0,03	0,25	8	0,125	0,5	2
6150	borjú	tüdő	2006.11.25	0,03	0,25	1	0,015/0,016	0,5	2
VII-139	borjú	orr	2007.09.21	0,03	0,25	4	0,008	0,5	1
VIII-149	borjú	orr	2007.10.09	—	0,25	—	—	—	4
344/07	borjú	tüdő	2007.11.05	0,06	—	8	0,008	0,5	4

^aEnrofloxacin; ^bFlorfenikol; ^cGentamicin; ^dPenicillin; ^eTetraciklin; ^fTilmikozin; ^gA rendszer minőségellenőrzésére (quality control – QC) szolgáló típusörzs

7. függelék A kecske genitália eredetű *H. somni* törzsek MIC-értékeinek alakulása

TÖRZS JELÖLÉSE	SZÁRMAZÁS		IZOLÁLÁS IDŐPONTJA	ENO ^a	FLORF ^b	GENTA ^c	PEN ^d	TC ^e	TILM ^f
	ÁLLATFAJ	SZERV							
8/17	kecske	hüvely	2007.09.18	0,03	0,125	4	0,004	0,25	2
9/2	kecske	hüvely	2007.09.18	0,03	0,125	4	0,004	0,25	4
9/14	kecske	hüvely	2007.09.18	0,03	0,25	4	0,004	0,25	4
9/15	kecske	tasak	2007.09.18	0,015/0,016	0,125	4	0,015/0,016	0,25	2
9/17	kecske	hr.fr.	2007.09.18	0,03	0,25	4	0,004	0,25	4

^aEnrofloxacin; ^bFlorfenikol; ^cGentamicin; ^dPenicillin; ^eTetraciklin; ^fTilmikozin

8. függelék A szarvasmarha hüvely eredetű *H. somni* törzsek MIC-értékeinek alakulása

TÖRZS JELÖLÉSE	SZÁRMAZÁS		IZOLÁLÁS IDŐPONTJA	ENO ^a	FLORF ^b	GENTA ^c	PEN ^d	TC ^e	TILM ^f
	ÁLLATFAJ	SZERV							
D-25	bo	hüvely	2006.09.21	0,06	0,25	4	0,06	0,25	2
D-43	bo	hüvely	2006.09.21	0,06	0,25	4	0,004	0,25	2
M-56	bo	hüvely	2006.10.04	0,03	0,5	4	0,008	0,25	2
M-65	bo	hüvely	2006.10.04	0,03	—	4	0,06	0,25	—
IV-75	bo	hüvely	2006.11.14	0,03	0,125	4	0,008	0,5	0,5
IV-77	bo	hüvely	2006.11.14	0,03	0,25	1	0,008	0,5	2
B-106	bo	hüvely	2006.11.20	—	0,25	—	—	—	1
B-111	bo	hüvely	2006.11.20	0,03	0,25	4	0,008	0,25	2
P-1	bo	hüvely	2007.02.20	0,03	0,25	4	0,002	0,25	1
P-7	bo	hüvely	2007.02.20	0,03	0,25	2	0,008	0,25	2

^aEnrofloxacin; ^bFlorfenikol; ^cGentamicin; ^dPenicillin; ^eTetraciklin; ^fTilmikozin

9. függelék A juh genitália eredetű *H. somni* törzsek MIC-értékeinek alakulása

TÖRZS JELÖLÉSE	SZÁRMAZÁS		IZOLÁLÁS IDŐPONTJA	ENO ^a	FLORF ^b	GENTA ^c	PEN ^d	TC ^e	TILM ^f
	ÁLLATFAJ	SZERV							
32/99	juh	ondó	1999.08.18	0,03	0,125	8	0,004	0,25	2
55(860/55)	juh	ondó	1985.06.07	0,03	0,125	4	0,008	0,25	2
1588/7/84	juh	here	1984.11.15	0,03	0,25	8	0,008	0,25	2
1456/17	juh	ondó	1985.11.27	0,03	0,25	8	0,015/0,016	0,5	4
405/88/34	juh	ondó	1988.04.06	0,03	0,125	8	0,004	0,25	2
1588/6	juh	here	1984.11.15	0,03	0,25	4	0,008	0,25	4
1496/2	juh	ondó	1985.11.27	0,03	0,25	4	0,002	0,25	4
25/99	juh	ondó	1999.08.23	0,03	0,25	4	0,015/0,016	0,25	—
41/99	juh	ondó	1999.08.23	0,03	0,25	8	0,004	0,25	2
50/99	juh	ondó	1999.08.23	0,03	—	8	0,008	0,25	—

^aEnrofloxacin; ^bFlorfenikol; ^cGentamicin; ^dPenicillin; ^eTetraciklin; ^fTilmikozin

13. Köszönetnyilvánítás

Legelőször **dr. Fodor Lászlónak**, témavezetőmnek szeretnék hálás köszönetet mondani bizalmáért és folyamatos támogatásáért, biztatásáért. **Dr. Hajtós István** segítségével és szervezése lehetővé tette számunkra, hogy Borsod-Abaúj-Zemplén megye szinte összes kecskeállományába eljutottunk. Munkám során nyújtott támogatásáért szeretnék hálás köszönetet mondani neki is.

Köszönet illeti **dr. Makrai László** kollégámat, aki gyakorlati tanácsaival és észrevételeivel minden esetben előrébb mozdította munkámat.

Hálás köszönettel tartozom **dr. Kardos Gábornak**, aki a PFGE vizsgálatok során pótolhatatlan segítséget nyújtott.

A mintagyűjtés során, **dr. Tirián Attila** révén számos magyarországi szarvasmarha-állományba eljutottunk, ezért szeretném neki is kifejezni köszönetemet.

Szeretném megköszönni **dr. Varga János** professzor úrnak, hogy számtalan teendője mellett mindig tudott időt szakítani munkáim áttekintésére, ellenőrzésére.

Nagyon köszönöm **dr. Stipkovits László** bizalmát és segítségét is közös munkánk során.

Ezenkívül **dr. Tuboly Tamásnak**, **dr. Cságola Attilának**, **dr. Glávits Róbertnek**, **dr. Molnár Tamásnak**, **dr. Gyuranecz Miklósnak** és **Schreck Ottónak** is szeretném megköszönni, hogy munkám során felmerült kérdéseimmel bizalommal fordulhattam hozzájuk.

Halasi Terike és **Kolozsvári Éva** segítő kezei nélkül munkámban nem tartanék itt, ezért szeretném hálás köszönetemet kifejezni nekik, valamint **Rendesné Éva**, **Herbák Józsefné** és **Blazsek Emese** segítségével is pótolhatatlan volt.

Baráti és szakmai támogatásukért hálás köszönetet szeretnék mondani **dr. Benyeda Zsófiának**, **Nagy Krisztinának** és **dr. Gazsi Nórának**, akik végigkísérték munkámat.

Végül, de természetesen nem utolsó sorban hálásan köszönöm **családomnak** és **szüleimnek** a támogatásukat és türelmüket, ami lehetővé tette, hogy munkámat nyugodt körülmények között végezzem.