

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Különböző állatfajokból származó *Pasteurella multocida*
törzsek jellemzése tradicionális és molekuláris módszerekkel**

PhD értekezés

Sellyei Boglárka

2010

Témavezető:

.....

Dr. Magyar Tibor

Magyar Tudományos Akadémia

Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

Készült 8 példányban. Ez a sz. példány.

.....
Sellyei Boglárka

Tartalomjegyzék

1	Összefoglalás.....	8
	Summary.....	10
2	Bevezetés és célkitűzés.....	12
3	Irodalmi áttekintés.....	14
3.1	A <i>Pasteurella</i> nemzetség.....	14
3.2	A <i>Pasteurella multocida</i>	15
3.2.1	A <i>P. multocida</i> meghatározása és általános jellemzői.....	15
3.2.2	A <i>P. multocida</i> fenotípusos jellemzői.....	17
3.2.2.1	Biokémiai sajátosságok.....	17
3.2.2.1.1	Biotípusok.....	17
3.2.2.1.2	Alfajok.....	18
3.2.2.2	Szerológiai sajátosságok.....	19
3.2.2.2.1	A baktérium buroktípusán alapuló szerotípusok.....	19
3.2.2.2.2	Szomatikus antigének.....	21
3.2.3	A <i>P. multocida</i> antibiotikum érzékenysége.....	22
3.2.4	A <i>P. multocida</i> feltételezett virulenciafaktorai.....	25
3.2.5	A <i>P. multocida</i> okozta megbetegedések.....	28
3.2.6	A <i>P. multocida</i> járványtani vizsgálatára alkalmazott módszerek.....	29
4	Anyagok és módszerek.....	32
4.1	A felhasznált <i>P. multocida</i> törzsek.....	32
4.2	Anyagok.....	32
4.2.1	A törzsek fenntartásához használt félfolyékony táptalaj.....	32
4.2.2	A törzsek szaporításához használt táptalajok és tápoldat.....	32
4.2.3	Hagyományos fermentáción alapuló biokémiai tipizáláshoz használt oldatok.....	33
4.2.4	Az agargél-precipitációhoz használt oldatok.....	34
4.2.5	Antibiotikum-rezisztencia meghatározásához használt készítmények.....	34
4.2.6	Molekuláris módszerekhez használt oldatok.....	35
4.3	Módszerek.....	37
4.3.1	Hagyományos fermentáción alapuló biokémiai tipizálási módszerek.....	37
4.3.1.1	Az egységes irodalmi fajtipizáló reakciók.....	37
4.3.1.2	Az altípusok elkülönítésére használt további reakciók.....	37
4.3.1.3	A biotípusok meghatározása.....	37
4.3.2	A szomatikus szerotípusok meghatározása (agargél-precipitáció).....	38
4.3.3	Antibiotikum-rezisztencia meghatározás.....	38
4.3.4	Molekuláris tipizálási módszerek.....	39

4.3.4.1	<i>P. multocida</i> - , PMT toxin- és A burok-specifikus multiplex-PCR.....	40
4.3.4.2	Buroktípus-specifikus PCR	41
4.3.4.3	Allél-specifikus PCR (<i>ptfA</i> gén)	42
4.3.4.4	ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus)-PCR	42
4.3.4.5	PCR – RFLP	44
4.3.4.6	Szekvenálás	45
5	Eredmények	46
5.1	A sertés-eredetű törzsek jellemzése	46
5.1.1	Fenotípusos sajátságok	46
5.1.1.1	Alfajok	46
5.1.1.2	Biotípusok	46
5.1.2	A törzsek antigén sajátságain alapuló jellemzése	47
5.1.2.1	Buroktípusok	47
5.1.3	Toxintermelő törzsek	47
5.2	A nyúl-eredetű törzsek jellemzése	47
5.2.1	Fenotípusos sajátságok	47
5.2.1.1	Alfajok	47
5.2.1.2	Biotípusok	48
5.2.2	A törzsek antigén sajátságain alapuló jellemzése	48
5.2.2.1	Buroktípusok	48
5.2.3	Toxintermelő törzsek	48
5.3	A baromfi-eredetű törzsek jellemzése	48
5.3.1	Fenotípusos sajátságok	48
5.3.1.1	Alfajok	49
5.3.1.2	Biotípusok	49
5.3.2	A törzsek antigén sajátságain alapuló jellemzése	51
5.3.2.1	Buroktípusok	51
5.3.2.2	Szomatikus szerotípusok	51
5.3.3	A törzsek antibiotikum-rezisztenciája	53
5.3.4	A törzsek rokonsági viszonyai	54
5.3.5	Egyedi génvizsgálatok	57
5.3.5.1	PCR-RFLP	57
5.3.5.1.1	„A” buroktípust meghatározó génszakasz	57
5.3.5.1.2	Oma87 külső membrán fehérje génje	58
5.3.5.1.3	OmpA külsőmembrán fehérje génje	59
5.3.5.1.4	OmpH külsőmembrán fehérje génje	59
5.3.5.1.5	4-es típusú fimbria kisalegység génje	61

5.3.5.2	Szekvenálás	61
5.3.5.3	Allél-specifikus PCR.....	62
6	Megbeszélés	64
6.1	Az emlős gazdafajokban előforduló <i>P. multocida</i> törzsek	64
6.1.1	Fermentációs sajátosságok	64
6.1.2	Antigenitási sajátosságok	66
6.1.3	Toxintermelés	67
6.2	A baromfi-gazdafajokban előforduló <i>P. multocida</i> törzsek.....	67
6.2.1	Fermentációs sajátosságok	68
6.2.2	Antigenitási sajátosságok	68
6.2.3	Antibiotikum-rezisztencia	69
6.2.4	A törzsek rokonsági viszonyai.....	70
6.2.5	Génvizsgálatok	71
7	Új tudományos eredmények	73
8	Irodalom	74
9	Közlemények.....	84
10	Mellékletek	87
11	Köszönetnyilvánítás.....	121

Rövidítések jegyzéke:

<i>aadA14</i>	– spetinomcin, streptomcin kettős rezisztenciáért felelős gén
AFLP	– amplified fragment length polymorphism – felerősített fragmentumhossz polimorfizmus
<i>ahpA</i>	– hemolizin gén
APR	– apramicin (antibiotikum)
<i>aroA</i>	– aromás aminosavak bioszintézisében szerepet játszó gén
<i>atpG</i>	– ATP szintáz gén
BHI	– brain-heart-infusion – szarvasmarha agy-szív kivonat
<i>bla_{ROB1}</i>	– β -laktám rezisztenciáért felelős gén
BOX	– 154bp szekvencia elem a <i>boxA</i> alegység génjében
C	– klóramfenikol (antibiotikum)
<i>catAI-catAIII</i>	– klóramfenikol rezisztenciáért felelős gének
CT	– colistin (antibiotikum)
<i>dfr20</i>	– trimetoprim rezisztenciáért felelős gén
DO	– doxiciklin (antibiotikum)
DS	– dextrose stratch agar – burgonyakeményítő kivonatot tartalmazó tápközeg
E	– eritromicin (antibiotikum)
ENR	– enrofloxacin (antibiotikum)
ERIC	– enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence – enterális baktériumokban előforduló, a gének közötti szakaszokra jellemző, ismétlődő konzervatív szekvenciákon alapuló PCR
FC	– fowl cholera - baromfikolera
FFC	– florfenicol (antibiotikum)
<i>fha B1, B2</i>	– filamentózus hemagglutinin gének
<i>flp1</i>	– Flp pilin fimbria génje
<i>floR</i>	– florfenikol rezisztenciáért felelős gén
<i>fur</i>	– a vasfelvételt kontrolláló negatív szabályozó elem
<i>galE</i>	– az UDP-galaktóz UDP-glükóz átalakulásért felelős epimeráz génje
<i>guaA</i>	– guanin szintézisben szerepet játszó gén
<i>gyrA</i>	– DNS-giráz A alegység génje
<i>hbpA</i>	– haemin kötő fehérje génje
HS-PCR	–a vérzésem vérfertőzést okozó B buróktípusú törzsek kimutatására szolgáló PCR
<i>hgbA, B</i>	– hemoglobin kötő fehérje génje
HS	– haemorrhagic septicaemia – vérzésem vérfertőzés
IHA	– indirect haemagglutination assay – indirekt hemagglutinációs teszt
IROMPs	– iron-regulated outer membrane proteins – a vasfelvételen szerepet játszó, a bakteriális külsőmembránban elhelyezkedő fehérjék
<i>kmt1</i>	– <i>P. multocida</i> -specifikus génszakasz
MBG	– minor groove binding – a DNS kisárkában kötődő oligonukleotid címke
<i>mesA</i>	– acetil-eszteráz enzim gén
<i>mioC</i>	– kromoszóma replikációban szerepet játszó gén
<i>mreB</i>	– baktérium (pálcikaforma) alakját meghatározó 37kDa fehérje génje
N	– neomicin (antibiotikum)
<i>nanH, B</i>	– szialidáz gének
OA	– oxolinsav (antibiotikum)
OMP	– outer membrane protein – a bakteriális külsőmembránban elhelyezkedő fehérje
OmpA	– a külsőmembrán A fehérjéje
OmpH	– a külsőmembrán H fehérjéje
P	– penicillin (antibiotikum)
PAR	– progressive atrophic rhinitis - progresszív torzító orrgyulladás

PFGE	– pulse-field gel electrophoresis – váltakozó erőterű gélelektroforézis
PHA	– passive haemagglutination assay – passzív hemagglutinációs teszt
PlpB	– <i>P. multocida</i> lipoprotein B
PM-PCR	– <i>P. multocida</i> specifikus PCR
PMT	– <i>P. multocida</i> toxin
<i>parC</i>	– a 4-es típusú DNS topoizomeráz A alegységének génje
<i>pmv</i>	– <i>P. multocida</i> virulencia gén
<i>pnhA</i>	– dinukleotid-oligofoszfát-pirofoszfátáz enzim génje
<i>pnp</i>	– polinukleotid foszforiláz
<i>ptfA</i>	– 4-es típusú fimbria (pili) kisalegység génje
<i>purF</i>	– purin szintézisben szerepet játszó gén
QRDR	– quinolone resistance-determining regions – a quinolonokkal szembeni rezisztenciáért felelős génrégió
RAPD	– random amplified palindromic DNA – véletlenszerűen felerősített, mindkét irányban azonos DNS szakaszok
REA	– restriction endonuclease analysis – a restrikciós enzimek specifikus hasítási tulajdonságait kihasználó DNS jellemzési módszer
REP-PCR	– repetitive extragenic palindromeic sequence – a géneken belüli, ismétlődő, mindkét irányban azonos szekvenciaszakaszokon alapuló PCR
RFLP	– restriction fragment length polymorphism - restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus
<i>rci</i>	– DNS rekombináz gén
<i>recA</i>	– homológ rekombinációért felelős gén
<i>strA</i>	– streptomycin rezisztenciáért felelős gén
SXT	– szulfametoxazol/ trimetoprim 19:1 (antibiotikum)
S3	– szulfonamidok (antibiotikum)
<i>tadD</i>	– tight adherence secretion system protein - feltételezett adhézios fehérje gén
<i>tbpA</i> , B	– transzferrin kötő fehérje gének
TE	– tetraciklin (antibiotikum)
<i>tet</i> (H), (M), (B)	– tetraciklin rezisztenciáért felelős gének
Tn	– transzpozon – mobilis genetikai elem
<i>tonB</i> , <i>exbB</i> , C	– vas transzport rendszer
<i>toxA</i>	– <i>P. multocida</i> toxin gén
<i>txaR</i>	– a <i>toxA</i> gént reguláló trans hatású negatív szabályozó elem
UB	– flumequin (antibiotikum)
<i>wwaQ</i>	– heptóz-transzferáz gén
<i>yabK</i>	– <i>E. coli</i> homológ ABC transzporter gén
<i>yiaO</i>	– <i>H. influenzae</i> homológ gén
<i>yjgF</i>	– izoleucin szintézisben szerepet játszó gén
<i>znuABC</i>	– cink-felvételért felelős gének

1 Összefoglalás

A *P. multocida*-t, mint feltételes (fakultatív) kórokozót már több mint 100 éve ismerjük, de kórokozó mechanizmusai, gazdafaj-adaptációs tényezői a mai napig nem tekinthetők tisztázottak. Ennek egyik oka a mellőzöttség lehet, mely a feltételesen kórokozó sajátságokra és ennek megfelelően az okozott betegségek diszpozíciós jellegére vezethető vissza, másrészt pedig az a fokozott fenó-, és genotípusos heterogenitás, mely szinte minden tanulmány során elrejtje az érdemi összefüggéseket a vizsgálódó szemelől.

Vizsgálataink általánosan összefoglalható célja az volt, hogy a törzseket jellemző változatosságon belül próbáljunk törvényszerűségeket kimutatni, mivel egyedül a megfelelő rendező elv felismerése teheti lehetővé a *P. multocida* populáción belül létező törzscsoportok körülhatárolását, melyek mind patogenitásukban, mind gazdafaj-specifitásukban elkülönülhetnek egymástól. Az e törzscsoportokon belüli célzott vizsgálatok ugyanis minden bizonnyal a korábbiaknál egyértelműbb eredményeket adnak majd a *P. multocida* virulencia- és gazdafaj-adaptációs tényezőinek felismerése és azok célszerű diagnosztikai és oltóanyag-termelési hasznosítása tekintetében.

Ennek megfelelően vizsgálataink során első lépésében az emlős- és baromfi-eredetű törzsek fermentációs sajátságait elemeztük, összesen 14 tápanyagforrást figyelembe véve. Feltártunk néhány jellemző jegyet, mint pl. az egyes emlős-eredetű törzseket jellemző ornitin-dekarboxiláz termelő képesség hiányát, a csökkent indoltermelést bizonyos nyúl-eredetű törzsekben, vagy a laktóz fermentáló képesség megjelenését adott sertés-eredetű törzsek esetén.

A szintén fermentációs-bélyegek alapján meghatározott alfaji kategóriák közül a *P. multocida* subsp. *multocida* dominanciája egyértelműen megmutatkozott. Az alfajok és a gazdafajok, illetve a megbetegedések súlyossága között nem tudtunk egyértelmű összefüggést kimutatni. Eredményeink felhívták azonban a figyelmet az egyes gazdafajok hasonló tulajdonságú *P. multocida* törzsekkel szembeni eltérő érzékenységre.

A továbbiakban a törzsek antigenitási sajátságainak megoszlását vizsgáltuk. A *P. multocida* esetében a különböző buroktípusok előfordulásának nagy jelentőséget tulajdonítanak a gazdafaj-adaptációban. Munkánk során – a gazdafajtól függetlenül - az A buroktípus előtérbe kerülését tapasztaltuk. A D buroktípusú törzsek aránya ugyanakkor csökkent a sertés-, míg az F buroktípusúaké nőtt a nyúl-gazdafajokban. Összességében azonban a buroktípusok törzscsoport elkülönítő szerepének csökkenését tudtuk kimutatni.

További vizsgálatainkat csak baromfi-eredetű törzseken végeztük el, mert így lehetőségünk volt az azonos karakterű, de különböző gazdafaj-eredetű törzsek összehasonlító vizsgálatára. A törzsek antigenitási sajátságait szerológiai próbákkal is kiegészítettük, mivel a baromfi-eredetű törzsek buroktípus tekintetében nagymértékű

homogenitást mutattak (A buroktípus 93,5%). A szerológiai eredmények elsősorban a patogenitással összefüggő csoportosításra adtak lehetőséget. Dominánsan az A:1 és A:3 szerotípusú törzsek fordultak elő. Közülük a feltehetőleg fokozott virulenciával rendelkező törzseket az A:1, a mérsékelt virulenciájúakat az A:3 törzsek képviselték. Egyedi szerotípusok csak a pulyka-eredetű törzsek között fordultak elő.

A *P. multocida* a legtöbb forgalomban lévő antibiotikummal szemben érzékeny. Antibiotikum-rezisztencia a törzsekben elsősorban csak más baktériumfajoktól felvett mechanizmusok révén jön létre. Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatokkal a *P. multocida* törzsek genetikai változékonyságára való fogékonyságát kívántuk jellemezni. A törzsek 54%-a rendelkezett valamilyen antibiotikum-rezisztenciával. Leggyakrabban a nalidixsav és a szulfonamid származékokkal szembeni rezisztenciát tapasztaltuk. A multirezisztens törzsek 82%-a az A:1 szerotípusba tartozott.

A törzsek rokonsági viszonyainak feltérképezésére molekuláris módszereket alkalmaztunk. Az ERIC-PCR módszerrel generált fenogram törzscsoportok elkülönülését mutatta, mind gazdafaj- (tyúkalkatúak; récefélék; pézsmaréce), mind földrajzi-eredet tekintetében. Az egyes törzscsoportokon belül az A:1 és A:3 szerotípusú törzsek típusazonos törzsekkel való összetartozása volt megfigyelhető.

A kialakult törzscsoportok további jellemzésére egyedi génvizsgálatokat végeztünk el. Öt különböző fehérjét kódoló génszakaszt (az A burok-specifikus(*hyaDC*), három külső membrán (*oma87*, *ompA*, *ompH*) és a 4-es típusú fimbria kisaegység (*ptfA*)-*hofB*) PCR-RFLP vizsgálatnak vetettük alá. Az *ompA* és *ptfA-hofB* génszakasz a pézsmaréce-eredetű törzsek a többi baromfiból származó törzstől való elkülönülését erősítette meg. Az *ompH* génszakaszon tapasztalt különbségek a törzsek szerológiai sajátágaival mutattak összefüggést, de azok egyértelmű molekuláris megkülönböztetését nem tették lehetővé. Ellenben az A:1 és egyes egyedi szerológiájú pulyka-eredetű törzsek esetén egységes mintázatot adott.

Harminckét törzs *ptfA* génszekvencia vizsgálata a gén 3' végi régiójában számos nukleotid konzervatív cseréjét jelezte, ami két alléltípus (A és B allél) elkülönítését tette lehetővé. A két típus egyszerű megkülönböztetésére allél-specifikus PCR-t hoztunk létre. Ennek használatával kimutattuk, hogy az A:1 szerotípusú törzsek dominánsan az A alléltípust hordozzák, a B alléltípus jelenléte az egyéb szerotípusú törzsekre volt jellemző.

Vizsgálataink igazolták, hogy a *P. multocida* populáció, mind gazdafaji, mind patogenitási szempontból elhatárolódó törzscsoportokból épül fel, melyek elkülönítéséhez a feno-, és genotípusos bélyegek széles körű vizsgálata szükséges. Igazoltnak látjuk továbbá a célmeghatározás során a fentiekben kifejtett azon véleményünket, hogy a törzscsoportok meghatározása, további jellemzése elengedhetetlen a *P. multocida* törzsek jövőbeni sikeres vizsgálataikhoz és az ismeretek gyakorlati hasznosításához.

Summary

High degree of genotypic and phenotypic diversity is characteristic of *Pasteurella multocida*. Studying of sorting rules within this heterogeneity ensures delineation of unique groups of related strains. Detailed observations of these groups of strains provide the opportunity of thoroughly studying the virulence and host-adaptation factors of *P. multocida*.

Examination of phenotypic characters of *P. multocida* isolated from mammals (221 strains) and poultry (61 strains) showed the presence and co-occurrence of certain strains with well-characterized biochemical features.

P. multocida is divided to three subspecies (subsp. *multocida*, subsp. *septica*, subsp. *gallicida*). In our study, *P. multocida* subsp. *multocida* was dominant among strains isolated both from mammals and poultry. A definite correlation between subspecies, host and severity of diseases caused by *P. multocida* could not be detected.

Different capsule types of *P. multocida* may have a role in host-adaptation. Our results demonstrated that capsule type A is becoming dominant independently from the host. At the same time, the number of strains with capsule type D decreased in swine and strains with capsule type F increased in rabbits.

The serological typing showed that the majority of strains isolated from poultry belonged to serotype A:1 and A:3. Few unique serotypes (F:4,5,[7]; F:10) occurred only among strains from turkey. Serotype A:1 strains might represent a virulent type while serotype A:3 may be a moderately virulent type.

The antimicrobial resistance pattern of *P. multocida* is pointed to the sensitivity of strains to genetic changes. Fifty-four percent of strains isolated from poultry possessed resistance to at least one of the antimicrobial agents tested in our study. Most of them (82%) were multi-resistant. The resistance to nalidixic acid and sulphonamides was the most frequent.

With ERIC-PCR, we could delineate groups of strains separated according to host (Muscovy duck, galliformes, anseriformes) and geographic origin. Serotype A:1 and A:3 strains showed relation with strains with similar serotype.

The groups of strains was further characterised with PCR-RFLP on genes (*hyaDC*, *oma87*, *ompA*, *ompH*, *ptfA-hofB*) encoding surface localized proteins. The gene region of *ompA* and *ptfA-hofB* indicated separation of strain isolated from Muscovy duck from other strains from poultry. PCR-RFLP of *ompH* gene region showed considerable diversity that harmonized with the presence of certain serotypes. Serotype A:1 strains and strains with unique serotypes isolated from turkey could be separated by their uniform PCR-RFLP patterns.

The sequence analysis of *ptfA* gene of 32 strains from poultry identified consensus nucleotide changes in the 3'-end region. These differences on the sequence defined two alleles of *ptfA* gene (allele A and B). For rapid identification of these alleles we developed an allele-specific PCR assay that demonstrated the dominance of allele A in serotype A:1 strains while allele B was typical for the other serotypes.

Our experiments proved that *P. multocida* population consists of groups of strains separated either by the origin of host or their pathogenicity.

2 Bevezetés és célkitűzés

A *Pasteurella* nemzetségbe tartozó fajok a házi és a vadon élő emlősök és madarak légúti, valamint a száj és a nemi utak nyálkahártyáin megtelepedő baktériumok. Az ide tartozó fajok zöme feltételes kórokozó, melyek gyakran tünetmentes formában vannak jelen a különböző gazdafajokban. Ritkán önállóan, gyakrabban a gazda ellenálló képességét csökkentő élő vagy élettelen környezeti tényezők hatására tömeges elhullásokhoz vezető megbetegedéseket idéznek elő. Emberi fertőzések a baktériumhordozó állatokkal való közvetlen érintkezés (harapás, karmolás, a sebek nyállal való érintkezése) és cseppfertőzés útján, szórványosan jöhetnek létre. Ezen megbetegedések döntő többségéért a *P. multocida* felelős, mely a gazdafajok széles körét képes megfertőzni és bennük változatos, pasteurellosisként ismert, megbetegedéseket előidézni. A gerincesekben kifejtett patogén hatása több mint száz éve ismeretes.

A legnagyobb gazdasági veszteséget a sertések progresszív (progreáló) torzító orrgyulladásának (PAR - De Jong 1999), a szarvasmarhák és bivalyok vérszes vérfertőzésének (HS – De Alwis 1999), a baromfikolerának (FC – Christensen és Bisgaard 2000) és a nyulak pasteurellosisának (DeLong és Manning 1994) kiváltásával idézi elő. De meghatározó szerepe van a sertések (Pijoan 1999) és kérődzők (Frank 1989) más baktériumok által előidézett tüdőgyulladás során tapasztalható kiterjedt szöveti elhalások kialakításában is.

A *P. multocida* által okozott megbetegedések hatalmas gazdasági terheket rónak a nagyüzemi állattenyésztésre, így egyre nagyobb az igény a kórokozó általános tulajdonságainak leírásán (faj, buroktípus, toxintermelés meghatározása) túlmutató, diagnosztikai célokat szolgáló módszer(ek) kidolgozására. Korábban az ilyen irányú vizsgálatok háttérbe szorultak, mivel a *P. multocida* által kiváltott megbetegedéseket egyértelműen diszpozíciós okokra vezették vissza, melyek a tartástechnológia szabályok szigorításával kiküszöbölhetők. Bár e szemlélet nem sokat változott az elmúlt időben, számos megfigyelés utal arra, hogy a szigorú feltételek betartása mellett is a kórokozó ismételt behurcolásával gyors és nagyszámú elhullással járó megbetegedések időről-időre előfordulhatnak egyes állományokban. Ez megkérdőjelezi mind a hajlamosító tényezők *P. multocida* fertőzésekre gyakorolt hatásának szükségszerűségét, mind az egyes törzsek feltételesen kórokozó mivoltát. A fajon belül tapasztalható jelentős fenó-, és genotípusos heterogenitás különböző patogenitású törzsek együttes jelenlétének lehetőségét sejteti, mely nem csak a törzsek megbetegítő képességben felmerülő eltérésekre, de a gazdafajok velük szemben mutatott változó fogékonyságára is magyarázatul szolgálhat.

A megfelelő diagnosztikai módszerek és hatékonyabb oltóanyagok kidolgozásához ezért elengedhetetlen a *P. multocida* törzseket jellemző virulenciafaktorok és a gazdafaj-

adaptációs tényezők alaposabb ismerete. Habár számos feltételezett virulenciafaktor leírására az utóbbi időben már sor került (Hunt et al. 2000, Christensen és Bisgaard 2000, Ewers et al. 2006, Harper et al. 2006), továbbra is keveset tudunk az egyes törzsek patogenitását, illetve a gazda-baktérium kölcsönhatást ténylegesen meghatározó tényezőkről, a gazdaszervezetbe való bejutást és megtelepedést, valamint a betegségek kialakítását biztosító mechanizmusokról. Pedig a mindennapi diagnosztika egyre sürgetőbben várja olyan gyorsesztek kidolgozását, melyek a hagyományos módszereket kiegészítve vagy felváltva hatékonyan alkalmazhatók a klinikai esetek megerősítésére és a tünetmentes baktériumhordozó egyedek vagy a rezervoár-állományok virulens *P. multocida* törzsekkel való fertőzöttségének szűrésére. Az egészséges hordozók jelenléte, a tünetmentes fertőzés természetes velejárói az összes *P. multocida* fertőzésnek, és meghatározó szerepük van a kórokozó járványtanában.

Jelen értekezés elsődleges célja nagyszámú sertés-, nyúl- és baromfi-eredetű *P. multocida* törzs hagyományos és újabban leírt fenotipizáló módszerekkel való jellemzése volt. Ennek során olyan tulajdonságok meghatározására törekedtünk, melyek a heterogén *P. multocida* populáción belül az egyes törzscsoportok összetartozására is utalhatnak.

A következő lépésben a törzsek szűkebb (baromfiból izolált) körében, változatos gazdafaji-eredet mellett, teljes genomot érintő ERIC-PCR vizsgálatokkal kívántuk igazolni törzscsoportok létezését és/vagy a gazdafajokkal való összefüggését.

Végül célirányos génvizsgálatokkal a körülhatárolt törzscsoportok további jellemzését kívántuk elvégezni a gyorsdiagnosztika számára is felhasználható markerek azonosítása céljából, majd azok felhasználásával a mezei izolátumok vizsgálatára is alkalmazható rendszer(ek)e)t kidolgozni.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A *Pasteurella* nemzetség

A baromfikolerával és a szarvasmarhák vérvézes vérfertőzésével kapcsolatos baktériumokat első ízben az 1880-as években sikerült kitenyészteni és jellemezni.

Micrococcus gallicidus volt az ide tartozó baktériumok első tudományos neve (Burill 1883). Később átmenetileg különböző nemzetségekbe, mint a *Bacterium*, *Octopis*, *Coccobacillus*, *Eucystia*, sorolták be. A végleges *Pasteurella* nemzetség nevet 1887-ben Trevisantól kapta, aki ezzel a gesztussal kívánt tisztelni Louis Pasteur a baromfikolera kórokozójával végzett munkája előtt.

Az évek során számos baktérium változatos fajnév alatt került besorolásra az új nemzetségbe. Az elnevezések főként a baktérium jellegzetes bipoláris festődésére, valamint a gazdafajokra utaltak. Így például a szarvasmarha-eredetű törzsek a *bovisseptica*, a sertés-eredetű törzsek a *suisseptica*, a baromfi-eredetű törzsek az *avisseptica* nevet kapták. Végül 1929-ben került bevezetésre az egységes *P. septica* elnevezés, mely hamar elfogadottá is vált a világ angolszász területein.

A ma is használatos *multocida* (*multus* – sok, *caedere* vagy szóképzőként *-cidus* - öl) jelzőt Rosenbusch és Merchant javaslatára született meg (1939). A kifejezés már korábban is használatos volt *Bacterium bipolare multocidum* majd *Bacterium multocidum* formában. Bár a *gallicida* jelző a későbbiekben is elsőbbséget élvezett, a *Pasteurella multocida* elnevezés maradt fenn, mert ez bizonyult a leginkább találónak (Mutters et al. 1985).

Ezt követően hosszú ideig a *P. multocida* volt nemzetség egyetlen hivatalos faja, majd fokozatosan kibővült a: *P. haemolytica*, *P. pneumotropica* Heyl típus, Jawetz típus, Henriksen típus (→ *P. dagmatis*), *P. gallinarum*, *P. ureae*, *P. aerogenes* valamint *P. avium* fajokkal. 1985-ben megtörtént a nemzetség fajainak rokonsági vizsgálata DNS szinten (Mutters et al.). A vizsgálat 11, részben korábban leírt, részben újonnan létrehozott fajt sorolt a *Pasteurella sensu stricto* csoportba. Az eredmények alapján a *P. multocida* fajt három alfajra bontották fel (*P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica*, *P. multocida* subsp. *gallicida*). Körülhatárolásra került a: *P. anatis* (→¹ *Gallibacterium anatis*), *P. avium* (→ *Avibacterium avium*), *P. canis* (korábban *P. multocida* 6 biotípus vagy „kutya típus”), *P. dagmatis* (korábban *P. „gas”*, *P. new species 1* vagy *P. pneumotropica* Henriksen típus), *P. gallinarum* (→ *A. gallinarum*), *P. langaa* (korábban Bisgaard taxon 1 és 4 → *P. langaaensis*), *P. stomatis* és a *P. volantium* (→ *A. volantium*) fajok, valamint két új fajcsoport a *Pasteurella* A illetve B törzsek. A *P. ureae* (→ *Actinobacillus ureae*), *P. haemolytica* (→

¹ A → az egyes fajok (egyéb vagy új) genusokba való átsorolását jelzik, amit a jelenleg elfogadott rendszertani név követ.

Mannheimia haemolytica), *P. testudinis*, *P. pneumotropica* Heyl típu, Jawetz típusok közelebbi rokonságot az *Actinobacillus* csoporttal mutattak. Egyes fajok, mint a *P. aerogenes* vagy a szarvasmarha lymphangitis csoport fajai bizonytalan helyzetűek voltak. 1990-ben további új fajokat soroltak a nemzetségbe: *P. bettyae* (korábban *P. bettii*) *P. lymphangitidis* (korábbi szarvasmarha lymphangitis csoport), *P. trehalosi* (korábbi *P. haemolytica* T biotípus → *Bibersteinia trehalosi*), *P. mairii*, *P. caballi* és a *P. granulomatis* (→ *M. granulomatis*). A *P. skyensis* 2002-ben került leírásra. (A genuson belüli fajokat érintő változások nyomon követhetők a www.bacterio.cict.fr/p/pasteurella.html webcímen). Mindemellett máig is számos tudományos névvel nem rendelkező (Bisgaard taxonok, www.bisgaard.eu/templates/site/7/default.asp), vagy korábban leírt törzs („*P. leonis*”; „*P. multocida* subsp. *tigris*” Capitini et al. 2002) várakozik a végleges besorolásra.

3.2 A *Pasteurella multocida*

3.2.1 A *P. multocida* meghatározása és általános jellemzői

A *P. multocida* a nemzetség típusfaja.

A *P. multocida* feltételesen (fakultatív) anaerob, nem mozgó, Gram-negatív, 0,2-0,4 µm átmérőjű, 0,6-2,5 µm hosszú, coccoid vagy idősebb tenyészetekben rövid pálcika alakú baktérium. Általában egyesével, néha párosával fordul elő, vagy csoportokba rendeződik. A friss tenyészetből készült kenetben gyakran bipolárisan festődik. Ennek okát pontosan nem ismerjük, de a jelenség a burokanyagok termelődésével lehet kapcsolatos (Dziva et al. 2008). Tenyésztésére véresagar, a juhvérrel kiegészített burgonyakeményítő, kazein-szója agar, vagy csokoládéagar a legalkalmasabb. A baktériumtenyészetek növekedésének hőmérsékleti optimuma 37 °C az emlős-eredetű törzsek esetén, a madár-eredetű törzsek még 42 °C-on is képesek szaporodni. 18-24 órás inkubálás után 1-2 mm átmérőjű, kerek, nyálkás, cseppszerű, szürke, csillogó, kissé domború telepeket képeznek. Nem hemolizálnak, jellegzetes orrváladék vagy vadgesztenye szagot árasztanak. Az egyes törzsek buroktermelő képességük függvényében kazein-szója agaron sztereomikroszkóp alatt vagy erős megvilágításban irizáló, míg burokanyagok hiányában kékes telepeket képeznek (Heddleston et al. 1964). A nyálkás tenyészetek elsősorban emlősök elhalásos gyulladással járó területeiből, míg kevésbé nyálkás tenyészetek leginkább különféle baromfifélékből tenyészthetők ki. (Dziva et al. 2008).

A törzsek klinikai mintákból való izolálásának módját a kialakult betegség határozza meg. A felső légúti megbetegedések esetében az orr-garatról üregből vagy a mandulákról vett tampon minta a legmegfelelőbb. Vérzéses vérfertőzésben, baromfikolerában frissen elhullott

állatok szívvéréből vagy a zsigeri szervekből (máj, lép) izolálható tisztán a kórokozó. Ha friss minta nem áll rendelkezésre megfelelő a csontvelői és/vagy agyszöveti minta is.

A törzsek izolálását megnehezíti, hogy ellenálló képességük gyenge, a gazdában fellelhető egyéb organizmusok könnyen felülnövik őket.

A *P. multocida* törzsek meghatározása a közelmúltig alapvetően hagyományos fenotípusos bélyegeken alapult. Ezek azonban nem minden esetben megbízhatóak, a tenyésztési körülmények jelentős hatással lehetnek rájuk. Így idővel felmerült az igény a törzsek DNS-szintű azonosítására.

Elsőként Kasten et al. (1997) írtak le *P. multocida* fajspecifikus-PCR-t (PCR-H). A reakció a *P. multocida pls* génjéből egy 453 bp-os régiót erősít fel. A génszakasz jelentős hasonlatosságot mutat a *Haemophilus influenzae* P6 fehérjével, így az fals pozitív reakciót eredményezhet. *H. influenzae* azonban szárnyasokból nem izolálható, így a rendszer madár gazdafajokban alkalmas lehet a *P. multocida* történő kimutatására.

Később a 23S rRNS génszekvenciát felhasználva Miflin és Blackall (2001) hozott létre fajspecifikus PCR-t (1432bp). Ez a reakció egyaránt alkalmasnak bizonyult a referencia törzsek, a mezei madár- valamint sertés-eredetű törzsek azonosítására, bár a PCR-termék hossza nem volt egységes az egyes madár-eredetű törzsekben.

Liu et al. (2004) két feltételezett transzkripciót szabályozó elem (Pm0762 és Pm1231) génszekvenciáját felhasználva dolgoztak ki fajspecifikus PCR-t. A gének a *P. multocida* genomban egyedileg fordulnak elő, a reakcióban egy 567bp-os és egy 601bp-os termék keletkezik. A rendszert jó eredménnyel tesztelték számos közel rokon fajon, de más, a *Pasteurella* nemzetségbe tartozó, fajokat nem vontak be vizsgálatokba.

A *P. multocida* DNS-szintű fajmeghatározására szolgáló jelenleg legérzékenyebb és egyben legköltségesebb - így a diagnosztika számára nem kedvező - módját egy valós idejű PCR jelenti (5' Taq nuclease assay). A rendszer a 16S rRNS génre íródott PCR reakciót és a DNS kisárkában kötődő stabilizáló funkciójú kettős jelölésű oligonukleotid (MGB) próbát foglal magába (Corney et al. 2007). A reakció specifikusnak bizonyult 18 *P. multocida* referenciatörzss, 9 rokon *Pasteurella* faj és 26 egyéb baktérium faj és mezei izolátumok tesztelése során.

A jelenleg széles körben elfogadott és használt módszert (PM-PCR) Townsend et al. (1998b) dolgozták ki. A reakció a *P. multocida* szubsztraktív hibridizációja során felismert egyedi génszekvenciát (*kmt1*) használja fel. A módszer mind vágóhídi sertések, mind kísérletesen fertőzött csirkék *P. multocida* fertőzöttségének vizsgálatakor megbízható eredményeket adott.

3.2.2 A *P. multocida* fenotípusos jellemzői

3.2.2.1 Biokémiai sajátosságok

A *P. multocida* biokémiai sajátosságai tekintetében: kataláz, és oxidáz és a legtöbb esetben ornitin-dekarboxiláz pozitív. Nem termel ureázt, lizin-dekarboxilázt, béta-galaktozidázt vagy arginin-dihidrolázt. A alkalikus-foszfataz termelése változó. A nitrátot nitritté redukálja. A triptofánból több-kevesebb indolt valamint egy kevés H₂S-t termel. A szénhidrátokat fermentatívan, kevés kivételtől eltekintve gázképződés nélkül bontja. Fermentálja a glükózt, mannózt, galaktózt, fruktózt és a szacharózt, legtöbbször a mannitot. Nem fermentálja a rhamnózt, cellobiózt, raffinózt, inulint, erythritot, adonint, m-inozitolt és a szalicilt, legtöbbször az arabinózt, maltózt, laktózt, dextrint. A xilóz-, trehalóz-, glicerol-, szorbit-fermentáció változó.

3.2.2.1.1 Biotípusok

A *P. multocida* törzsek szénhidrát-fermentációs képességeiben fennálló nagyfokú változatosságot már korán megfigyelték és a törzsek csoportosítására használták fel (Murti 1971, Heddeleston 1976). A csoportosítások alapját az arabinóz, xilóz, mannit/dulcit/szorbit - fermentáció adta. Így kezdetben három (A, B, C) -három (I., II., III.), majd összesen nyolc (I-VIII) különböző biokémiai csoportot állítottak fel. Később a szénhidrát-fermentációs sajátosságok a nitrát-redukció, az indol, urea, H₂S termelés, a metilvörös és Voges-Proskauer teszt, a kataláz, oxidáz és alkalikus-foszfataz aktivitás vizsgálatával kibővült ki (Murti 1971).

Bár egyik rendszert sem fogadták el széles körben, a biokémiai vizsgálatokat a későbbiekben is alkalmazták a különböző eredetű *P. multocida* törzsek jellemzésére. A *Pasteurella* genus molekuláris vizsgálatai (Mutters et al. 1985) pontosították a *P. multocida* fajba (illetve *P. multocida* alfajokba: subsp. *multocida*, subsp. *septica*, subsp. *gallicida*) tartozó törzsek körét, de ugyanakkor rámutattak a törzsek közti nagyfokú fenotípusos változatosságra is. Így újra előtérbe került a fermentációs sajátosságok alapján történő csoportok létrehozásának lehetősége, mint a diverzitás gyors, olcsó és könnyen kivitelezhető vizsgálati eszköze. Ez több ízben segítette újabb változatok, vagy új fajok felismerését is.

Az immáron szigorúan vett *P. multocida* fajon belül, pulyka-eredetű törzsek vizsgálatával, Blackall et al. (1995) négy különböző ún. biokémiai típust (A, B, C, D biotípust) határoztak meg. Az A, B és C biotípusok sajátosságai megegyeztek a Mutters-féle *P. multocida* subsp. *multocida* törzsekkel, közülük a leggyakoribbnak, a típustörzssel biokémiailag megegyező, A biotípus bizonyult. A D biotípus, maltóz reakciójától eltekintve, a *P. multocida* subsp. *septica* referencia törzssel volt azonos. 1997-ben, nagyszámú (110) baromfi-eredetű törzs vizsgálata a rendszer további 6 biotípussal való kibővítésére adott lehetőséget. A nomenklátúra megváltozott, az alfabetikus felváltotta a numerikus. Az újonnan leírt változatokkal már 5

biotípus (1, 2, 3, 4 és 9) tartozott a *P. multocida* subsp. *multocida* alfajhoz (A→3 biotípus, B→1 biotípus, C→2 biotípus); 2 biotípus (7 és D→10) a *P. multocida* subsp. *septica* alfajhoz; egy biotípus pedig a *P. multocida* subsp. *gallicida* alfajhoz (8). Két biotípust (5 és 6) nem sikerült egyik alfajba sem besorolni (Fegan et al. 1995). Ám a genotípusos vizsgálatok bizonyították, hogy ezek is közeli rokonságban állnak a *P. multocida*-val, bár ezt a fenotípusos bélyegeik nem jelzik (Blackall et al. 1998). Végül, sertésből származó törzsek (150) további vizsgálatával 3 új, szintén a *P. multocida* subsp. *multocida* egyes biokémiai változatát képviselő biotípussal (12, 13 és 14) vált teljessé a fenotipizáló rendszer (Blackall et al. 1997). A hiányzó 11-es biotípus Townsend et al. (1998a) munkájában került leírásra. Így napjainkra, hivatalosan, 14 biotípusba sorolandók a jellemzésre kerülő *P. multocida* törzsek (1. táblázat).

1.táblázat: A *P. multocida* törzsek különböző biotípusainak változása az egyes publikációk függvényében

B 1	C 2	A 3	D 10	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14
Blackall et al. 1995										Townsend et al. 1998a	Blackall et al. 1997		
Fegan et al. 1995													
multocida			maltóz: + septica	multocida	??		septica	gallicida	ODC: - multocida	??	laktóz: + multocida	ODC: - multocida	laktóz: + ODC: - multocida

A biotípus-vizsgálatokat a sertés-eredetű törzsek esetében széles körben, míg a baromfi-eredetű törzseknél ritkábban alkalmazzák (Blackall et al. 1997, Townsend et al. 1998a, Varga et al. 2007). Mindkét gazdakörben a 3-as biotípus előfordulása tűnik dominánsnak (60-70%), amit váltakozó arányban, részben a gazdafaj függvényében, követ a többi biotípus.

3.2.2.1.2 Alfajok

A *Pasteurella* nemzetség körében DNS-DNS hibridizációval végzett taxonómiai vizsgálatok eredményei alapján a *P. multocida* fajt három, a járványtani jellemzés számára is hasznos alfajra osztották (Mutters et al. 1985). Az alfajok elnevezése során a *P. multocida* fajokra korábban alkalmazott jelzőket használták fel, mint maga a „multocida”, az angolszász országokban elterjedt „septica” és a dulcít és gyakran arabinóz-fermentációt mutató madár-

eredetű törzsek elnevezéseként ismert „gallicida”. Az egyes alfajokba tartozó törzsek fenotípusos jellegek alapján is elkülöníthetők. A *P. multocida* subsp. *multocida* törzsek fermentálják a szorbitot, de a dulcitol nem, a *P. multocida* subsp. *gallicida* törzsek pozitívak dulcitra is, míg a *P. multocida* subsp. *septica* törzsek mindkét szénhidrátra nézve negatív reakciót adnak. Gazdafajtól függetlenül a *P. multocida* subsp. *multocida* törzsek izolálhatók leggyakrabban. A két másik alfaj előfordulási gyakorisága változó. A tyúkalkatúak állományaiban és az emberi megbetegedések esetében általában a *P. multocida* subsp. *septica* törzsek száma jóval felülmúlja a *P. multocida* subsp. *gallicida* törzsekét, sertéseknél ritkábban. Az evezőlábú madarakban és a sertéseknél gyakran a *gallicida* és *septica* alfaj aránya fordított. Egyébiránt, a *gallicida* alfaj megjelenése egyéb gazdafajokban (fogoly, trópusi seregély, déli óriáshojsza, szarvasmarha, nyúl és kutya-, macskaharapás, karmolás okozta emberi megbetegedés) kifejezetten ritka.

3.2.2.2 Szerológiai sajátosságok

A *P. multocida* törzsek a burokban lévő K- és a sejtfalban lévő O-antigének alapján szerotípusokba sorolhatók.

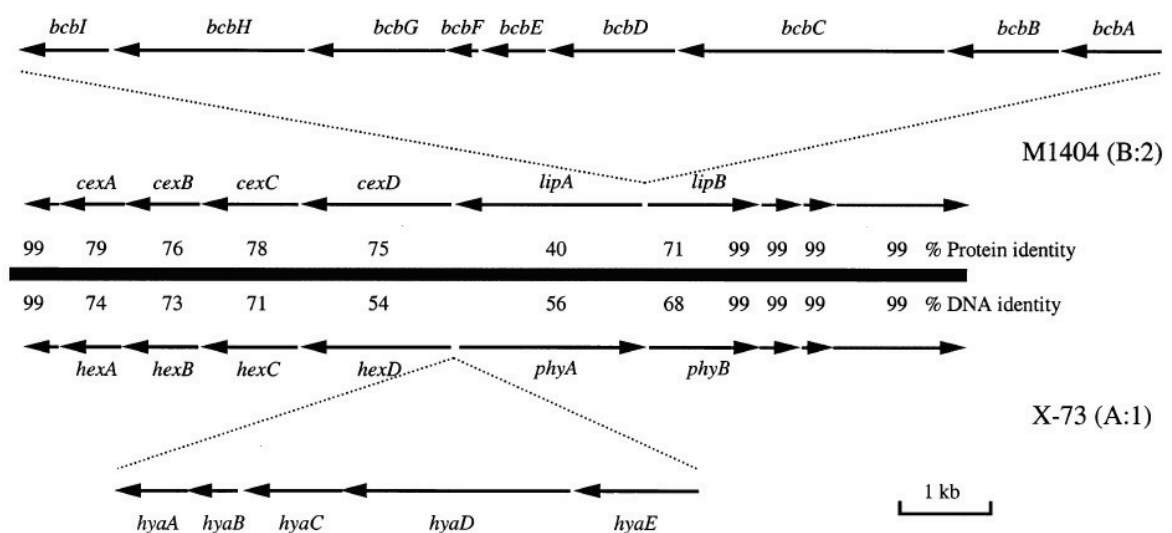
3.2.2.2.1 A baktérium buroktípusán alapuló szerotípusok

A *P. multocida* törzsek szerológiai vizsgálatai a törzsek egyes gazdafajokkal való összefüggéseinek felismerése érdekében indultak meg. A szerológiai eredmények alapján történő csoportosításra tett kísérletek az 1920-as évekig nyúlnak vissza. Az első, széles körben elfogadott rendszer, egereken elvégzett passzív védési teszttel, öt (I., II., III., IV., V.) szerotípust azonosított (Roberts 1947, Hudson 1954). Ezek az eredmények jelentették a későbbi vizsgálatok alapját. Carter előbb precipitációs, majd indirekt haemagglutinációs tesztet (1955) használva azonosított négy szerotípust (A, B, C, D). Majd felismerve, hogy az afrikai HS-t okozó törzsek nem tartoznak szorosan a már meghatározott típusokba, számukra új szerotípus (E) csoportot hozott létre. A C szerotípust a későbbiekben elhagyta az általa felállított szerológiai rendszerből. Az így létrejött tipizáló módszer, mint Carter-féle indirekt vagy passzív haemagglutinációs teszt (IHA, PHA), vált ismerté és elfogadottá. De a PHA alkalmazása a fellépő nehézségek (megfelelő titerű ellenanyagok előállítás, kellő számú humán erythrocyta biztosítása, illetve a hialuronsavnak a reakcióban kifejtett gátló hatása) miatt újabb módszerek kifejlesztését tette szükségessé. Ekkor jelentek meg azon nem-szerológiai módszerek, melyek a baktériumburok sajátos összetétele alapján különítették el az egyes típusokat. Az A buroktípus meghatározásának a burokban lévő hialuronsav *Staphylococcus aureus* hialuronidáz enzime általi depolimerizációja, a D buroktípus meghatározásának a burokanyagokkal reakcióba lépő akriflavin flokkulációja adta az alapját. A B és E buroktípusok meghatározására nem sikerült új módszert kidolgozni (De

Alwis 1999). 1987-ben Rimler és Rhoades új, pulyka törzsekre jellemző, buroktípust (F) írtak le. Az F buroktípusú törzsek felismerését zavarta, hogy gyakran pozitív eredményt adnak az akriflavin tesztben, így hamarosan a jellegzetes burok-poliszaharidok (hialuronsav, heparin, kondroitin) specifikus, enzimatis (hialuronidáz, heparináz, kondroitináz) depolimerizációján alapuló szerotipizáló rendszer született (Rimler 1994). A módszer biztosította a leggyakoribb három buroktípus (A, D, F) azonosítását megfelelő táptalajon a burokanyagok lebontásával. A B és E buroktípusú törzsek az enzimekkel nem reagáltak.

A különböző buroktípusokba tartozó törzsek molekuláris elkülönítésére elsőként 1998-ban tettek kísérletet. Ekkor egymástól függetlenül két kutatócsoport is kidolgozott egy-egy rendszert. Townsend et al. (1998b) a KMT1 génszekvencia felhasználásával, párhuzamosan a *P. multocida* specifikus PCR kifejlesztésével, hozták létre a HS-PCR-t. A reakció a HS-t okozó B buroktípusú törzsekben egy 590bp-os génszakaszt erősített fel. A Brickell et al. (1998) által létrehozott másik rendszert a HS-t okozó B törzsek 16-23S rRNS szekvenciájában fellelhető egyedi génszakaszra tervezték, a specifikusnak tekintett 334bp-os fragment több, ELISA eredményekkel alá nem támasztott, esetben is megjelent. A többi buroktípus molekuláris elkülönítését csak a *P. multocida* referenciatörzsek (X-73 [A:1], M1404 [B:2]) burok bioszintéziséért felelős lókusznak vizsgálata tette lehetővé (Chung et al. 1998; Boyce et al. 2000).

1. ábra: A buroktípust meghatározó génlókus szerveződése *P. multocida* A (X-73) és B (M1404) buroktípusú referencia törzsekben



Boyce et al. 2000 nyomán

A különböző buroktípusokba tartozó törzsekben a burok szintéziséért felelős lókuszt felépítése alapvetően azonos. A gének három funkcionális régióba szerveződnek. Az 1. régióba tartozó gének a burok-poliszacharidok sejt felszínre való kijutásáért felelősek (*cxh*-*hex* gének), a 2. régióban a prekursor mediált burok-poliszacharid felépülést szabályzó, valamint a burokanyag-bioszintézisben szerepet játszó fehérjék génjei találhatóak (*bc**b*-*hya* gének), a 3. régió génjei a burok-poliszacharidok foszfolipid szubsztitúciójában játszanak szerepet (*lip-phy* gének). A különböző buroktípusú törzsekben az egyedi poliszacharidok szintézisében szerepet játszó 2. génszakasz mutatja a legnagyobb változatosságot.

A buroktípusok DNS alapú elkülönítését egy lépésben megvalósító multiplex PCR az e régiókra tervezett specifikus primerek együttes használatával jött létre (Townsend et al. 2001). Bár ezt a módszert használják a legelterjedtebben az A buroktípusú törzsek kimutatására, közel azonos génszakaszok felhasználásával, más módszert is kidolgoztak (Gautam et al. 2004). A multiplex módszer gyengesége, hogy egyes F buroktípusú törzseket nem ismer fel, míg az utóbbi, hogy az E buroktípusú törzsekkel fals pozitív reakciót ad.

A különböző buroktípusú törzsek előfordulása többé-kevésbé összefüggésben áll a gazdafajokkal és a megbetegedésekkel (Quinn et al. 1994). Az A buroktípusú törzsek előfordulása a leggyakoribb, gazdafajtól függetlenül. Ezek a törzsek elsősorban tüdőgyulladásos kórképekért felelősek. Az A és F buroktípusú törzsek izolálhatók leginkább baromfikolerában vagy pasteurellosisban szenvedő madaraktól és a nyulak „ragadós náthájából”. A toxintermelő A és D buroktípusú törzsek felelősek a sertés esetleg kiskérődzők, nyulak (Krametter et al. 2004, DiGiacomo et al. 1993) torzító orrgyulladásáért. A D buroktípusú törzsek kisebb-nagyobb arányban madaraktól és nyulaktól is kimutathatók. A B és E buroktípusú törzsek a világ trópusi területein (Ázsia, Afrika) gyakoriak, ahol a bölények, szarvasmarhák, vagy szabadon élő kérődzők vérfertőzését idézik elő (De Alwis 1999). A B buroktípusú törzsek ezeken a területeken ritkán sertéseket, birkákat, kecskéket és madaraktól is megfertőznek (Rhoades és Rimler 1987, Cameron et al. 1996, Townsend 1998a).

3.2.2.2 Szomatikus antigének

A buroktípusok meghatározását követően továbbra is ellentmondásos maradt az egyes buroktípusok és a gazdafajok, valamint megbetegedések közti összefüggés. Így a későbbi szerológia vizsgálatok további antigenitási különbségek feltárását célozták meg.

A szomatikus, vagy sejt fal O-antigének tárgylemez agglutinációs próbával végzett vizsgálata alapján 11, egymással gyakran keresztreakciót adó szerotípus (Namioka és Murata 1961), kivonat-antigénnel végzett precipitációs próbával viszont 16 szomatikus szerotípus volt azonosítható (Heddleston et al. 1972). A két módszer eredményei nem

összeegyeztethetők, a szomatikus szerotípusok meghatározására napjainkig is a Heddleston-féle módszer használatos.

A szomatikus szerotípusok hagyományos agargél-precipitációval történő meghatározása nehéz és időigényes, de fontos feladat, mert jelenlegi tudásunk szerint a vakcina-törzsek védettséget csak a velük azonos szomatikus szerotípusba tartozó törzsek ellen nyújtanak, a keresztvédettséget biztosító faktort máig sem sikerült meghatározni.

A szomatikus antigének gyors, egyértelmű, DNS alapú meghatározására elsőként Wilson et al. (1993) restriktív enzim (*HhaI*) analízis használatával tettek kísérletet. Bár a 16 referencia törzs mindegyike egyedi mintázatot mutatott, a mezei izolátumok (baromfi, szarvasmarha, sertés stb.) szerológiai eredményei és a DNS-mintázat között csak a törzsek kis hányadánál lehetett egyezést kimutatni. Random primerekkel végzett véletlenszerű PCR reakciók során Roche et al. (2002) olyan 490 bp-os fragmentet azonosítottak a DNS-mintázatban, mely a Heddleston 1-es szomatikus szerotípusra specifikusnak tűnt. Az adott fragment nukleotidszekvenciája semmilyen ismert szekvenciával nem mutatott homológiát. A génszakaszra tervezett PCR reakció kipróbálása során a specifikusnak tekintett fragment a 14-es szomatikus szerotípusú referencia törzs esetén is megjelent.

Az immunológiai jelentőségű OmpH fehérje génszekvenciájának szomatikus szerotípus szintű vizsgálata (Luo et al. 1999) alapján új lehetőség kínálkozik a szerológiai tipizálás megoldására. A Heddleston 1 - 4-es szomatikus szerotípusok azonosítására az *ompH* génen végzett PCR-RFLP módszerrel többféle restriktív enzim (*EcoRI*, *HindIII*, *CfoI*, *HinfI*, *DraI*) felhasználásával Jabbari és Esmaelizadeh 2005 és Anthony et al. 2007 tettek kísérletet. A hasítási mintázatok többsége nem mutatott jelentős különbséget az *EcoRI*, *HindIII*, *CfoI*, *HinfI* enzim esetén a szomatikus szerotípustörzsek közt, míg a *DraI* enzim biztató eredményeket adott, bár a vizsgálatok sem a többi referencia törzsre, sem mezei izolátumokra nem terjedtek ki.

3.2.3 A *P. multocida* antibiotikum érzékenysége

Az antibiotikumok használata máig is a *P. multocida* által előidézett fertőző megbetegedések leküzdésének legfőbb eszköze. A kemoterápiás szerek indokolatlan használata azonban kedvez a rezisztens baktériumok elszaporodásának, elősegítve a plazmid vagy transzpozon hordozta rezisztenciagének elterjedését. A folyamat eredményeként csökken a kórokozók elleni védekezésben felhasználható antibiotikumok köre és hatékonysága.

A *P. multocida* törzsek általában érzékenyek a legtöbb széles körben használt antibiotikumra. Bennük antibiotikum-rezisztencia legtöbbször egyéb baktériumokból származó mobilis genetikai elemek révén, horizontális génátvitellel alakul ki. A rezisztencia

terjedése általában fokozatos, szinte mindig jelen vannak különböző rezisztenciával bíró *P. multocida* törzsek az egyes állományokban. A rezisztens törzsek száma, az általuk hordozott rezisztencia fajtája változó lehet gazdafajtól, földrajzi eredettől és az izolálás időpontjától függően.

β -laktámrezisztencia csak szórványosan, legtöbbször plazmidon kódoltan fordul elő a *P. multocida* törzsekben. A ROB1- β -laktamáz a β -laktamáz gátló szerekre fokozottan, a penicillin és első generációs cefalosporinokra mérsékelten érzékeny. A *bla*_{ROB1} gén jelenlétét szarvasmarha és sertés-eredetű törzsekben mutatták ki (Philippon et al. 1986).

A tetraciklineket² negyven éven keresztül, nemcsak terápiás készítményként, de hozamnövelő-szerként is alkalmazták. Ennek köszönhetően a tetraciklinrezisztencia mértéke jelentős szintet ért el mind a sertés- (15%), mind a baromfi-eredetű (40%) *P. multocida* törzsekben. A napjainkban érvényes korlátozásoknak köszönhetően azonban már csak kis mértékben növekszik (Shivachandra et al. 2004, Lizarazo et al. 2006).

A *P. multocida* törzsekben megtalálható tetraciklin rezisztenciáért felelős gének három hibridizációs csoportba sorolhatók (M, B, H). A Pasteurellák és a Gram-pozitív baktériumok körében egyaránt a *tet*(M) gén a legelterjedtebb tetraciklinrezisztenciagén. Az általa kódolt fehérje gátló hatását a riboszómákon fejt ki. Leginkább konjugatív plazmidon kódoltan fordul elő, bár a szarvasmarha-eredetű *P. multocida* törzsekben kromoszómán kódolt formában van jelen (Chalus-Dancla et al. 1995). A *tet*(B) gén efflux-fehérjét kódol, és a nem-konjugatív Tn10 transzpozon része, sertés-eredetű törzsekből mutatható ki (Kehrenberg 2000). A plazmid kódolt *tet*(H) génnel kapcsolatban ismertek fel először a *Pasteurella* nemzetségben eredendően megtalálható transzpozon (Tn5706) kapcsolt rezisztenciagént. A *tet*(H) gén szintén efflux-fehérjét kódol. Elsőként plazmid kódolt formában, madár-, majd kromoszómáisan, sertés- és szarvasmarha-eredetű törzsekben írták le (Hansen et al. 1996).

Az aminoglikozidok általában hatékony antibiotikumok a Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzések kezeléséhez. Bár a *P. multocida* törzsekkel szembeni aktivitásuk relatíve alacsony, a velük szemben mutatott mérsékelt rezisztencia előfordulása gyakori (Yosimura et al. 2001).

A *Pasteurella* törzsek aminoglikozidrezisztenciájának molekuláris vizsgálata a streptomycinrezisztenciára szorítkozik. A streptomycinrezisztencia plazmidhoz kötött pulyka-, szarvasmarha- és sertés-eredetű *P. multocida* törzsekben fordul elő. A rezisztenciáért az *strA* gén által kódolt aminoglikozid-3'-foszfortranszferáz felelős, mely enzimatis úton képes inaktíválni a streptomocint. A spectinomycin és streptomycin együttes rezisztenciáért kombinált funkciójú adenilil-transzferázok (*aad*) felelősek. Ezek az enzimek egyaránt képesek strukturális változást előidézni mindkét antibiotikum szerkezetében, szarvasmarhából

² Az antibiotikumok neveinek írásmódjában az Állatorvosi járványtan I. (Szerk.: Tuboly Sándor) által használt formákat vettük alapul.

származó *P. multocida* törzsben egyedi adenilil-transzferázok gént (*aadA14*) lehetett azonosítani (Kehrenber et al. 2005a).

A szulfonamidrezisztencia megjelenése 1980-as évek óta jelent folyamatos gondot a baromfiállományokban (Hirsh et al. 1985). A sertésállományokból származó *P. multocida* törzsek között, az 1990-es évek folyamán, a rezisztencia 25%-ról 50%-ra emelkedett (Coté et al. 1991). A szulfonamid/ trimetoprim kombinációja az 1990-es években még jó választásnak tűnt a *P. multocida* okozta fertőzések leküzdésére, de az ellene való rezisztencia gyorsan elterjed (Lizarazo et al. 2006).

A szulfonamidrezisztencia a leggyakrabban észlelt rezisztencia a *Pasteurella* törzsekben. Általában a *sulII* gén által kódolt dihidropteroát-szintetáz felelős a törzsek ezen tulajdonságáért. A legtöbb esetben rezisztencia plazmidon kódolt formában mutatható ki pulyka- és sertés-eredetű *P. multocida* törzsekből. Gyakran ezek a plazmidok streptomycin-, kanamicin- és/vagy tetraciklinrezisztenciagéneket is hordoznak. A trimetoprimrezisztenciát a dihidrofolát-reduktázok (*dhfr*) jelenléte szabályozza. *P. multocida* szarvasmarha törzsben 2005-ben sikerült új típusú *dhfr* gént (*dhfr20*) leírni (Kehrenber et al. 2005b).

A klóramfenikolrezisztencia ritkán fordul elő a *P. multocida* törzsekben. Bár, 1994-es európai betiltásáig, kiterjedten használták az állatgyógyászatban három évtizeden át a rezisztencia értéke nem haladta meg az 5-10%-ot. Helyét fluorinált származéka, a florfenikol, vette át. A klóramfenikolrezisztenciáért főként a klóramfenikol-acetiltranszferáz jelenléte tehető felelőssé. A rezisztenciagéneket plazmid hordozza. A *catAI* és *catAIII* gén biztosította klóramfenikolrezisztenciát kimutatták már sertés-, de szarvasmarha-eredetű *P. multocida* törzsekből is. A florfenikolrezisztencia a Gram-negatív enterális baktériumoknál gyakoribb, mint a felső légúti kórokozónál. Utóbbiak csak akkor juthatnak a plazmid kódolt *floR* génhez, ha egy környezetbe kerülnek az enterális kórokozókkal. Ilyen folyamat eredményeként azonosítottak elsőként florfenikolrezisztens *P. multocida* szarvasmarha törzset (Kehrenber és Schwarz 2005c).

A *P. multocida* törzsek quinolonrezisztenciája kevéssé ismert. Különböző szintű (2-16%) nalidixsav- (Cardenas et al. 2001) vagy flumequinrezisztenciáról (Pijpers et al. 1989) is csak néhány közlemény számol be.

A nalidixsav és fluoroquinolon-származékok ellen elég gyorsan fejlődik ki kromoszómális rezisztencia, ezért elsősorban a DNS-giráz A alegységét kódoló (*gyrA*) és a *parC* gének ún. quinolonrezisztenciát meghatározó régióiban (QRDR) bekövetkező mutációk felelősek. A mutációk eredménye változó mértékű nalidixsav- vagy fluoroquinolonrezisztencia lehet (Cardenas et al. 2001).

A makrolid antibiotikumok a 23S rRNS kötőfehérjéken fejtik ki hatásukat. Így a fehérjében bekövetkező egyszerű pontmutáció, vagy a metilációért felelős gének (*erm*) aktiválódása, illetve antibiotikum-effluxfehérjék (Met) megjelenése rezisztencia kialakulásához vezethet. A

makrolidokrezisztenciáját célzó molekuláris vizsgálatok *P. multocida* törzsekkel kapcsolatosan nem zajlanak. Az erithromicinre, mint leggyakrabban használt makrolid antibiotikumra, vonatkoztatott rezisztencia értékek (2-4%) alacsonyok (Lizarazo et al. 2006), a félszintetikus származékok hatásfoka még ennél is jobb (Nanjiani et al. 2005).

3.2.4 A *P. multocida* feltételezett virulenciafaktorai

Számos egyedi sajátosság szükséges ahhoz, hogy egy patogén baktérium képes legyen bejutni, megtelepedni, elszaporodni és kárt okozni a gazdaszervezetben. A baktériumnak egyszerre kell alkalmazkodnia a szűkös tápanyagforrásokhoz és a gazda immunrendszerének támadásaihoz. A túléléshez gyakran jelentős változások történnek a sejtműködésben, a génkifejeződés mértéke és célpontjai megváltoznak. Azon molekulák és mechanizmusok összességét, amelyek fokozzák a baktérium megbetegítő képességét és elősegítik a különféle betegségek kialakulását, serkentik a patogén szaporodását, vagy gyengítik a megtámadott szervezet ellenálló képességét, virulenciafaktoroknak nevezzük.

A virulenciát befolyásoló gének, illetve azok termékeit két csoportba oszthatjuk annak megfelelően, hogy már ismert, vagy ismeretlen szerepű fehérjékről van e szó. Az ismeretlen szerepet betöltő molekulákat kódoló gének gyakran kapják a *pmv* (*P. multocida* virulenciagén) jelzöt (*pmvA*, B, C) vagy a más baktériumokkal homológ génjeinek funkciójából eredő rövidítéseket (*E. coli yabK*, *H. influenzae yiaO*, *yleA*). Az ismert szerepű fehérjék lehetnek a különböző bioszintetikus utak résztvevői, a sejtműködést szabályozó komponensek és természetesen klasszikus virulenciagének is. A bioszintetikus utak közül kiemelt jelentősége van a DNS- (*purF*, *guaB*) vagy a fehérjeszintézisben (*aroA*, *yjgF*) szerepet játszó faktoroknak és a sejtműködéshez szükséges energetikai folyamatokat biztosító komponenseknek (*atpG*, *pnhA*). A sejtműködést szabályozó mechanizmusok közül a nukleinsavak stabilitását (*pnp*), kicserélődését biztosító (*rci*, *recA*) és a sejtosztódást (*mreB*) vagy a kromoszómák megkétszereződését szabályozó (*mioC*) elemeknek tulajdonítanak nagy jelentőséget (Fuller et al. 2000).

A klasszikus virulenciafaktorok a sejtkomponensek azon csoportját foglalják magukba, melyek közvetlenül részt vesznek a baktérium és gazdasejt közti kölcsönhatásokban.

A *P. multocida* A, D és F buroktípusú törzseinek burokanyaga nagymértékben hasonlít az emlősök glükózaminoglikánjára, főként hialuronból, heparinból és chondroitinból áll. Ez jó álcát biztosít a kórokozónak a gazdaszervezetben. Általánosságban igaz, hogy a burokkal rendelkező törzsek virulensebbek, mint a burok nélküliek, de nagy mennyiségben ez utóbbiak is képesek immunválaszt előidézni (Chung et al. 2005). A burok megléte és vastagsága meghatározója a fagocitózis és a szérum-komplement-rezisztenciának.

A burok-lipopoliszacharidok fokozott jelentőséggel bírnak a *P. multocida* által okozott megbetegedések kialakításában. Ezek a molekulák stimulálják a humorális immunrendszert. A *P. multocida* összetett lipopoliszacharid-burokstruktúrával rendelkezik, mely egy erősen konzervált központi részből (a 2-keto-3-deoksi-oktulozonsav 3 heptózon keresztül kötődik a foszfolipid A-hoz) és a hozzá kapcsolódó variábilis helyzetű, többek között foszfofokolin és foszfoetanolamin molekulákból áll. A foszfofokolin a neutrofilekhez való kötődésben és az epitél sejteken való átjutásban, a foszfoetanolamin az immunrendszer kikerülésében játszhat szerepet. A lipopoliszacharid-burokstruktúra megomlásával a virulencia nagymértékben csökkenhet, mint ezt a *wwaQ_{PM}* (heptóz-transzferáz), vagy a *galE* (a lipopoliszacharid részét képző UDP-galaktóz epimerizációjáért felelős) génben bekövetkező mutáció is mutatja (Harper et al. 2004).

A gazdaszervezet nyálkahártyáin való megtapadást és annak kolonizációját a különböző adhéziós fehérjék biztosítják a baktérium számára. A *P. multocida* törzsekben két különböző adhéziós rendszer fő fehérjéének, az F1p pilin és a 4-es típusú fimbria, jelenléte igazolható (Doughty et al. 2000). Bár magát az F1p pilin alegység fehérjét nem sikerült fizikailag kimutatni a *P. multocida* törzsekből, a fehérjét kódoló gént (*flp1*) és egy a szekrécijában szerepet játszó komponens kódoló gént (*tadD*) egyaránt sikerült azonosítani. Mindkét komponens mutációja fokozott virulenciacsökkenést idéz elő (Fuller et al. 2000). A 4-es típusú fimbria kisaegység fehérje (PtfA) egyedi jellegzetessége, hogy bár a fehérje jelentős szekvencia variabilitást hordoz, az N-terminális szignálszekvencia erősen konzervált (Siju et al. 2007). Az adhéziós fehérjék másik csoportját a filamentózus haemagglutininek (PfhaB1 és PfhaB2) képviselik. A *pfhaB2* génben bekövetkező mutáció igazolta, hogy az általa kódolt filamentózus haemagglutininek az invázióban vagy a kezdeti kolonizációban van szerepe (Tatum et al. 2005).

A mitogén hatású dermonekrotikus toxin (*P. multocida* toxin, PMT) a *P. multocida* virulenciájának fontos faktora. Számos A és D buroktípusú törzs termeli. Jelentősége a *P. multocida* okozta megbetegedések többségénél nem ismert, az azonban igazoltnak látszik, hogy a progresszív (progreddáló) torzító orrgyulladás elengedhetetlen tényezője. A toxint kódoló gén kromoszómálisan, a tRNS génbe épülten, helyezkedik el, a génszekvenciája erősen konzervált (Lax et al. 1990). A gén kifejeződését egy *trans* hatású negatív szabályozó elem (Txar) transzkripció szinten regulálja, melyet a gént megelőző DNS régió kódol (Petersen 1990). A génszekvencia alacsony G-C tartalma (35%-41%) és a határoló szekvenciákban megtalálható bakteriofág-elemek (Pullinger et al. 2004) arra utalnak, hogy fajidegen struktúra, mely nemrégiben került a *Pasteurella* genomba, feltehetőleg horizontális génátvitel során.

A vas és a cink megszerzése alapvető fontosságú a baktériumok számára a tápanyagszegény gazdakörnyezetben. Ezek a nyomelemek elengedhetetlenek sok

bakteriális fehérje szerkezeti és katalitikus funkciójához, sőt egyes fehérjék kifejeződéséhez is (IROMP vas-szabályozott külsőmembrán fehérjék). Mivel szabad formában ezek a fémionok toxikusak, így csak fehérjéhez kötötten fordulnak elő a gazdaszervezetben. A baktériumoknak számos mechanizmust kellett kidolgozniuk, hogy a gazda molekuláitól megszerezhessék ezeket a létfontosságú elemeket. A vas és a cink megszerzésért felelős fehérjék génjeit (*znuABC*) egyaránt egy negatív szabályozóelem (*fur*) regulálja (Garrido et al. 2003). A vasszerzési folyamatok közül meg kell említenünk a hemolizinek (AhpA, MesA) hatására bekövetkező sejtlyízist (Cox et al. 2000), valamint a különböző vasszállító fehérjék (TbpA, TbpB, HgbA, B, HbpA) szerepét (Ogunnariwo et al. 2001, Cox et al. 2003). A vas membrántranszportját a TonB, ExbB, ExbD rendszer biztosítja (Bosch et al. 2002).

Egyes enzimek képesek a baktériumok inváziós képességét növelni a gazdaszervezetben. Ilyen a hialuronidáz és szialidáz is, melyek a gazda glikozilált fehérje és lipid molekuláiból szabadítják fel a hialuronsavat és a szialinsavat, amit vagy felhasználnak saját sejtalkotóik felépítéséhez, vagy szénforrásként hasznosítanak. E mellett fokozzák a virulenciát a receptorokra és a gazda védelmét szolgáló mucinra kifejtett hatásukkal. A hialuronidáztermelés a HS-t okozó B:2 *P. multocida* törzsekre jellemző sajátosság (Carter és Chengappa 1980). Szialidáz enzimet ezzel ellentétben a legtöbb törzs termel. A *P. multocida* törzsekben, mind a sejthez kötött, mind az extracelluláris szialidáz termelés jelen van. Szubsztrátját tekintve két különböző szialidáz fordulhat elő (NanH, és NanB) a *P. multocida* törzsekben, a 2,6' szial-laktózt (NanB) valamint a 2,3' és 2,6' szial-laktózt (NanH) is hasznosítani képes forma (Mizan et al. 2000). A szialinsav sejtkomponensekbe való beépítését a különböző szialinsav-transzferázok biztosítják (*pm0508*, *pm0188*), de arra is van példa, hogy a két előbbi funkciót egyszerre látja el egy enzim (Yu et al. 2005).

A bakteriális sejt felszín az elsődleges határvonala a gazda-kórokozó kölcsönhatásnak. A gazdaszervezet immunválaszainak kiváltásában kiemelt jelentősége a külső membrán fehérjéknek (OMP) lehet. A külsőmembrán fehérjék száma nagy, közülük kiterjedten a 28 (OmpA), 37 (OmpH), 39 (PlpB), 87kDa immunológiai szerepét vizsgálták. A Oma87 felületi antigén sajátosságú fehérje, immunitási kísérletekben, egérben homológ védetség kialakítására képes nagy dózisu fertőzés esetén, de a magas ellenanyagszint ellenére megfelelő védetség nem alakul ki csirkében (Ruffolo és Adler 1996). A *Pasteurella* lipoprotein B (PlpB) a heterológ felülfertőzésekben keresztvédési sajátosságokat mutat (Ali et al. 2004). A porin sajátosságú fehérjék, mint az OmpH, gyakran a szerocsoport-specifikus epitópok hordozói (Luo et al. 1999), vagy, mint az OmpA, a membránintegritás fenntartói, az adhézis folyamatok elősegítői (Dabo et al. 2003).

3.2.5 A *P. multocida* okozta megbetegedések

Az állati és emberi fertőzések túlnyomó többségét a *P. multocida* idézi elő, az egyéb *Pasteurella* fajok jelentősége kisebb.

A *P. multocida* törzsek virulenciája tág határok között változik, így akár huzamosan megtelepedhetnek az emlősállatok és madarak felső légútjait béleelő nyálkahártyán, miközben a fertőzés tünetmentes marad.

Hajlamosító tényezők jelenlétében azonban önmagukban (elsődleges pasteurellosis) vagy egyéb kórokozókhoz társulva szövődményként (másodlagos pasteurellosis) különböző megbetegedéseket idézhetnek elő. Elsődleges pasteurellosisnak tekinthető a szarvasmarhák és bivalyok vérzésszerű vérfertőzése (HS vagy „bivalyvész”), a sertés progresszív (progreáló) torzító orrgyulladás (PAR) és a madarakban előforduló baromfikolera (FC). A másodlagos fertőzések közül ki kell emelni a kérődzők (szarvasmarha, juh, kecske), a ló és a sertések tüdőgyulladással járó megbetegedéseit, valamint a nyulak „ragadós nátháját”.

A *P. multocida* többnyire gazdafaj-specifikusan okoz megbetegedéseket, de létrejöhetnek fajok közötti keresztfertőzések is.

A „bivalyvész” elsősorban Délkelet-Ázsiában, Dél-Afrikában számos dél-európai országban a Közép-keleten, valamint Indiában előforduló betegség (DeAlwis 1999). Főként a bivalyokat és szarvasmarhákat, esetenként sertéseket (Cameron et al. 1996, Townsend 1998a), vagy kecskéket (Tao et al. 1996), juhokat (Watson és Davies 2002) és vadon élő kérődzőket sújtja (Aalbaek et al. 1999). A fertőzés általában heveny vagy túlheveny lefolyású, gyakran jár elhullással.

A PAR a *P. multocida* okozta megbetegedések sajátos formája. A világon mindenütt előfordul. Elsődlegesen sertésekben jelentkezik, de hasonló tünetekkel járó megbetegedést leírtak juhokban (Krametter et al. 2004) és nyulakban is (DiGiacomo et al. 1993). A jellegzetes elváltozásokat az orrnyálkahártyán megtelepedő *Bordetella bronchiseptica* és a toxintermelő *P. multocida* együttesen idézi elő. A *B. bronchiseptica* jelenlétében az orrnyálkahártya gyulladása jön létre. A megtelepedő *P. multocida* által termelt toxin hatására a gyulladás ráterjed az orrkagylóra és az orrsövényre, melynek következtében az orrkagyló részben vagy egészben elsovad, az orrsövény elferdül. A PAR nem jár elhullásokkal, de romlik az állatok teljesítőképessége, és hajlamosabbakká válnak másodlagos légzőszervi fertőzésekre.

A baromfikolera széles körben elterjedt, az összes házi baromfifélet és a vadmadarakat is érintő megbetegedés. Több mint 100 féle madárfajból kimutatták már, valószínűleg a legtöbb, ha nem az összes madárfaj érzékeny rá (Christensen és Bisgaard 2000). A betegség változó mértékben az egész világon előfordul. Természetes viszonyok között megbetegedés a házityúk, pulykák, házikacsák és háziludak között fordul elő, gyöngytyúkban rendkívül ritka, galambállományokban, foglyok és fécánok között

gyakorlatilag nem jelentkezik (Szécsényi 1961). Hazánkban az intenzív, nagy létszámú házityúk- és pulyka-állományokban ritka, a kis létszámú ház körüli, valamint extenzíven tartott vízibaromfi-állományokban gyakori. A megbetegedés idült és heveny formájára vonatkozó kóroktani és járványtani, valamint a megelőzést és védekezést szolgáló vizsgálatok elsősorban Szécsényi István nevéhez fűződik, aki az ide vonatkozó megfigyeléseket „A baromfi kolera felszámolhatóságáról” címmel adta közre (1983). Munkásságával ismereteink jelenlegi, alább tárgyalt, részleteihez lényegesen hozzájárult.

A baromfikolera generatív úton, tojással nem terjed (Rimlér és Glisson 1997), így a kikelt napos baromfi biztosan fertőzéstől mentes és az is marad mindaddig, míg beteg vagy tünetmentes baktériumhordozó egyeddel nem találkozik.

A járvány terjesztői elsődlegesen a baromfikolerát átvészelt egyedek, melyek orrüregükben, sinusaikban és szájpadrólhasadékukban hordozzák a virulens *P. multocida* törzseket, az ellenálló-képességüket kedvezőtlenül befolyásoló hatásra baktériumokat ürítenek. Verebek, gerlek, galambok és foglyok nem lehetnek baktériumhordozók, mert a fertőzést követően rövid időn belül elhullnak. Esetenként varjak, fácánok, emlősök közül pedig sertések és rágcsálók lehetnek a fertőzés forrásai. A fertőződés nem okoz minden egyedben elhullást, sőt ritkán megbetegedést sem. A baromfikolera járványok leggyakrabban nyár végén, ősszel, illetve télen jelentkeznek (Rimlér és Glisson 1997).

A pasteurellosis a házinyulak egyik legfontosabb bakteriális megbetegedése, mely jelentős gazdasági veszteségeket okoz mind a kereskedelmi, mind a kísérleti célból tenyésztett állományokban. A klinikailag egészséges házinyulak jelentős része (30-50%) az orrjáratok nyálkahártyájának felületén hordozza a kórokozót. Betegség azonban csak hajlamosító tényezők hatására alakul ki. A pasteurellosis leggyakrabban észlelt formája az orrhurut. A kórokozó a légutakon keresztül a tüdőbe is bejuthat, ahol tüdő- és/vagy mellhártyagyulladás okoz (Glávits és Magyar 1990). Idült fertőzéseknél a baktérium a vérpálya útján testszerte szétszóródhat. A bőr alatti kötőszövetben tályogok alakulhatnak ki. Az ellenálló képesség drasztikus csökkenése esetén általános vérfertőzés alakulhat ki, amely gyors elhulláshoz vezethet.

3.2.6 A *P. multocida* járványtani vizsgálatára alkalmazott módszerek

A járványokat előidéző törzsek azonosítását vagy a törzsek csoportosítását célzó nukleinsav alapú módszerek elengedhetetlen eszközei a kórokozó baktériumok jellemzésének. A leggyakrabban használt technikák három csoportra tagolhatók: 1, a restrikciós enzim alapú módszerek (hibridizációval kiegészítve vagy anélkül), 2, a PCR alapú technikák, 3, (leggyakrabban háztartási gének) szekvenanciaelemzésen alapuló vizsgálatok. A megfelelő módszer megválasztása a rendelkezésre álló minta jellegétől függ.

A restrikciós enzim analízis (REA) a DNS adott restrikciós enzimmel történő hasításából és a keletkező fragmentek számának, méretének szabad szemmel vagy számítógéppel történő elemzéséből áll. A módszer specificitása nukleinsav hibridizációval fokozható. A módszert széles körben alkalmazzák a különböző pasteurellosisok járványtani vizsgálataiban (Harel et al. 1990, El Tayeb et al. 2004). Alkalmazhatósága nagyban függ a felhasznált restrikciós enzim típusától. A *HpaII* és *HhaI*, ellentétben a *BglII*, *EcoRI*, *PstI*, *SmaI*, illetve *SmaI/SalI* és *SmaI/XhoI* kombinációktól, a teljes genomon mutatott egyenletes hasítási mintázata és a keletkező, jól elkülöníthető fragmentek folytán a leginkább ajánlott restrikciós enzimek (Christensen és Bisgaard 2000). A CU és M9 vakcinatörzsek elkülönítésére leginkább a *BglII* restrikciós enzimmel végzett hasítás az alkalmas.

A váltakozó erőterű gélelektroforézis (PFGE) a REA specializált formája. A ritkán hasító enzimek használatával kisszámú (5-20), nagyméretű DNS-fragment (10-800kb) keletkezik, melyek gélen való elválasztása periodikusan változó erőterben valósítható meg. Használata kevésbé elterjedt speciális műszerigénye miatt (Gunawardna et al. 2000), pedig felbontóképessége jóval nagyobb, mint a REA-nak. A *P. multocida* törzsek vizsgálatára az *Apal* enzim alkalmas.

A ribotipizálás szintén a REA egyik típusa. A DNS enzimátikus hasítását követően speciális, adott esetben a 16S és 23S rRNS-re tervezett, génpróbával végzett hibridizáció után csak a homológ szekvenciával rendelkező fragmentek válnak láthatóvá. Az alkalmazott restrikciós enzimek és génpróbák változatossága miatt a *P. multocida* törzseken végzett vizsgálatok nehezen összevethetők. Elsősorban madár-eredetű törzsek jellemzésére alkalmazzák a módszert (Muhairwa et al. 2001, Dziva et al. 2004). Érzékenysége a REA módszer alatt marad. A legelőnyösebb kombinációnak a *HpaII* restrikciós enzim és az OligoMix5 próba szett tűnik (Regnault et al. 1997).

Az AFLP (felerősített fragmenthossz polimorfizmus) a REA és a PCR technika kombinációja. A restrikciós enzimekkel hasított DNS – fragment végéhez a szelekciót biztosító oligót ligáltatnak, mely szekvenciálisan komplementer az enzimek felismerőhelyeivel és egy adaptor szekvenciát tartalmaz. Ezt követően az ismert szekvenciákra tervezett, véletlenszerűen kiegészített primerekkel elvégzik a PCR reakciót. A szelekciós PCR biztosítja, hogy csak az adott sajátságoknak megfelelő restrikciós fragmentek sokszorozódjanak fel. A módszer elsősorban referencia laboratóriumok számára elérhető, de rutin diagnosztikában is alkalmazzák madár- és sertés-eredetű *P. multocida* törzsek összehasonlítására (Moreno et al. 2003, Blehert et al. 2008). Finomabb felbontást mutat, mint a RAPD.

A PCR alapú technikák közül a polimorf DNS szekvenciákat véletlenszerűen megsokszorozó módszer (RAPD) az, melynek használatához nincs szükség a genomszekvencia előzetes ismeretére. A rövid (8-12 nukleotida hosszú) véletlenszerű

szekvenciákkal rendelkező primerek alkalmazásával általában számos DNS fragment keletkezik. Az általuk létrehozott gélelektroforézis mintázat alkalmas a törzsek összehasonlítására. A módszert, könnyű kivitelezhetősége miatt, széles körben használják a *P. multocida* törzsek vizsgálatára is (Chalus-Dancla et al. 1996, Al-Haddawi et al. 1999), bár reprodukálhatósága alacsony.

Az ismétlődő, géneken belüli palindrom szekvenciákra specifikus (REP) PCR módszerek alkalmazása igen elterjedt, mind a humán, mind az állati megbetegedéseket előidéző kórokozók esetében. Három típusa létezik, a 35-40bp-os ismétlődő, géneken belüli palindrom; a 124-127bp-os enterális baktériumokban előforduló ismétlődő, gének közötti, konzervatív (ERIC) és a 154bp-os BOX szekvencia elemekre specifikus PCR. Ezek a szekvenciák elszórtan vannak jelen a genomban. A fordított ismétlődéseket tartalmazó kifelé mutató primerekkel a szekvencia elemek közti DNS régiók felsokszorosíthatók (Versalovic et al. 1991). A rep-PCR genomiális ujjlenyomat technika lehetőséget ad a törzsek faj, alfaj és egyedi törzs szintű azonosítására is. Az egyes módszereket (REP, ERIC) önmagukban (Townsend et al. 1997, Saxena et al. 2006) vagy AFLP-vel vagy PFGE-vel kombináltan (Shivachandra et al. 2008) felhasználják a *P. multocida*-val kapcsolatos vizsgálatokban is.

A *P. multocida* törzsek összehasonlító szekvencia vizsgálatára, a háztartási gének közül, a 16S rRNS gént használják (Davies 2004). A génen belüli jelentős mértékű szekvenciális különbségek a faj nagyfokú heterogenitását jelzi.

4 Anyagok és módszerek

4.1 A felhasznált *P. multocida* törzsek

Magyarország különböző területeiről származó sertés- (145), nyúl- (76) és baromfi-eredetű (17 házilúd, 20 házikacsa, 15 pulyka, 4 házityúk, 3 fácán, 2 pézsmaréce [*Cairina moschata*]) törzseket vizsgáltunk (Mellékletek 2.-4. táblázat). Az azonos eredetű törzsek izolálási helyét a mellékelt térképek mutatják (Mellékletek 2.-6. ábra).

A buroktípus referencia törzsek: X-73 (A buroktípus)
M1404 (B buroktípus)
P3881 (D buroktípus)
P1235 (E buroktípus)
P4679 (F buroktípus)

R. B. Rimler (National Animal Disease Center, Ames, IA, USA)

4.2 Anyagok

4.2.1 A törzsek fenntartásához használt félfolyékony táptalaj

Hitchens-táptalaj:

1,0 g agar
2,0 g Na₂HPO₄
3,0 g NaCl
10 g pepton
6,0 g hús extraktum
1000 ml desztillált víz pH 7,6

4.2.2 A törzsek szaporításához használt táptalajok és tápoldat

Véres agar (VA):

45,2 g Columbia agar base (Micro Media MM0137)
1000 ml desztillált vízben
5-10% defibrinált birkavér

Antibiotikummal kiegészített véres agar:

1l véres agarhoz: 4 mg vancomicin
4 mg amfotericin
2 mg clindamicin

Burgonyakeményítő – agar (DS):

65 g Dextrose Starch Agar (Difco 266200)
1000 ml desztillált víz

Agy-szív kivonat (BHI):

36,8 g BHI broth (Micro Media MM0106)
1000 ml desztillált víz

4.2.3 Hagyományos fermentáción alapuló biokémiai tipizáláshoz használt oldatok

Brómtimolkékes peptonvíz:

10,0 g Bacto pepton (Difco)
5,0 g NaCl
0,03 g brómtimolkék por
1000 ml desztillált víz **pH 7,2 - 7,4**

1% szénhidrát: glükóz, laktóz, szacharóz, dulcit, szorbit, trehalóz

Nitrát-leves:

3,0 g marhahúskivonat
5,0 g Bacto pepton
4,0 g KNO₃
1000 ml desztillált víz **pH 7,3 - 7,4**

Nitrát-redukció értékeléséhez:

A-oldat:

0,8 g szulfonilsav
100 ml 5N ecetsav

B-oldat:

0,5 g α-naftilamin
100 ml 5N ecetsav

Indol-próba:

10 g pepton
5,0 g NaCl
1000 ml desztillált víz **pH 7,4**

Indoltermelés kimutatására

Kovács-reagens:

4,0 g p-dimetil-amino-benzaldehyd
360 ml 96%-os etanol
80 ml ccHCl

Urea-próba:

20 ml ureum-puffer
180 ml peptonvíz

Ureum-puffer:

0,1 g KH_2PO_4
0,2 g K_2HPO_4
2,0 g ureum
20 ml desztillált víz

4.2.4 Az agargél-precipitációhoz használt oldatok

Noble-agar:

0,9 % Noble-agar
8,5 % NaCl
0,01% mertiolát (az agar feloldása után)
100 ml desztillált víz

Mosóoldat:

10 ml PBS
30 μl 35%-os formaldehyd

4.2.5 Antibiotikum-rezisztencia meghatározásához használt készítmények

Mueller-Hinton agar:

5,0 g marhahúskivonat (Oxoid L30)
17,5 g savval emésztett kazein (Casein hydrolysate Oxoid L41)
2,0 g glükóz
15 g agar
1000 ml desztillált víz **pH 7,4**

Antibiotikum korongok: (Oxoid)

Apramicin	APR	15µg	CT0545B
Linkomicin	MY	2,0 µg	CT0027B
Klóramfenikol	C	30 µg	CT0013B
Colistin	CT	10 µg	CT0065B
Doxiciklin	DO	30 µg	CT0018B
Enrofloxacin	ENR	5,0 µg	CT0639B
Eritromicin	E	15 µg	CT0020B
Florfenicol	FFC	30 µg	CT1754B
Flumequin	UB	30 µg	CT0666B
Oxolinsav	OA	2,0 µg	CT0181B
Neomicin	N	30 µg	CT0033B
Penicillin	P	10 U	CT00438B
STM*	SXT	25 µg	CT0052B
Szulfonamidok	S3	300 µg	CT0059B
Tetraciklin	TE	30 µg	CT0054B
Vancomicin	VA	30 µg	CT0058B

*STM - Szulfametoxazol/ trimetoprim (19:1)

4.2.6 Molekuláris módszerekhez használt oldatok

6%-os Chelex-oldat:

6,0 g Chelex-100 (BioRad 142-1235)
100 ml PBS

Foszfát puffer (PBS):

2,14 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
0,2 g KH_2PO_4
8,0 g NaCl
0,2 g KCl
1000 ml desztillált víz **pH 7,5**

1,5%-os agaróz gél:

1,5 g agaróz (Amresco, 0710)
100ml 1 x TAE
+ 0,5 µl etidium-bromid (EtBr) (c=1mg/ml) / ml gél

10 x TBE törzsoldat:

108 g Trisz (hidroxi-metil) amino-metán (Trizma base, Sigma T6066)

55 g bórsav (Sigma B-6768)

40 ml 0,5 M EDTA pH 8

1000 ml desztillált víz

Futtató festék:

5 mg brómfenolkék (Reanal 02187)

5 mg xilécianid (Sigma 335940)

3 ml 87% glicerol

7 ml desztillált víz

4.3 Módszerek

4.3.1 Hagyományos fermentáción alapuló biokémiai tipizálási módszerek:

1. nap: A vizsgálandó törzsek kioltása Hitchens-táptalajból VA-táptalajra. 24 órára 37°C-os termosztátba helyeztük.
2. nap: Egyedi telepek átoltása VA-táptalajról DS-táptalajra. Ismét 24 órára 37°C-os termosztátba helyeztük.
3. nap: Egyedi irizáló telepeket beoltása 1,5 ml BHI-táplevesbe. A beoltott leveseket 24 órára 37°C-os termosztátba helyeztük.
4. nap: A tenyészetekből 100-100 µl hozzáadása a fermentálandó vegyületek csövenként 2 ml-ét tartalmazó biokémiai sorhoz. A beoltás után a csöveket ismét 24 órára 37°C-os termosztátba helyeztük.
5. nap: A cukoroldatok 24 órás inkubálás után a színreakciók alapján, az egyéb komponenseket tartalmazó oldatok, a megfelelő reagens(ek) hozzáadása után, való értékelése.

4.3.1.1 Az egységes irodalmi fajtipizáló reakciók:

Biokémia	pozitív reakció	negatív reakció	<i>P. multocida</i>
Indol	a felülúszó reagens piros	sárga	+
Nitrát	piros	sárga	+
Urea	piros	sárga	-
Glükóz	sárga	kék	+
Laktóz	sárga	kék	-
Szacharóz	sárga	kék	+

4.3.1.2 Az altípusok elkülönítésére használt további reakciók:

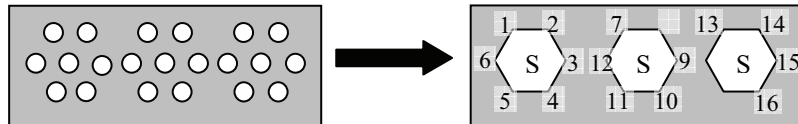
	dulcit	szorbit
<i>P m. subsp. multocida</i>	-	+
<i>P m. subsp. septica</i>	-	-
<i>P m. subsp. gallicida</i>	+	+

4.3.1.3 A biotípusok meghatározása:

(Melléklet 5. táblázat)

4.3.2 A szomatikus szerotípusok meghatározása (agargél-precipitáció):

- 1, 5,0 ml Noble-agarból mikroszkóp-tárgylemezre (25X75-mm) gélt öntünk. A megdermedt gélben háromszor hét 4 mm átmérőjű mélyedést készítünk a középső lyuktól és egymástól 6 mm-re.



- 2, A *P. multocida* DS lemezre szélesztett 24 órás tenyészetét mosóoldattal lemossuk (kb. 1,5 ml).
- 3, A sejtuszpenziót 1,5 ml-es eppendorf csövekben 1 órán át ~ 100°C-os vízfürdőn tartjuk.
- 4, Az eppendorf csöveket ülepitjük szükség szerint 5-10 percig 3000-6000 rpm-el.
- 5, A szomatikus szerotípus meghatározáshoz a felülúszót használjuk.
- 6, Az előkészített 1-1 agarlemez középső 3 mélyedésébe a vizsgált baktérium-szuszpenzió felülúszójának 40-40 µl-ét tesszük.
- 7, A vizsgált baktérium-szuszpenzió felülúszója körülötti lyukakba pedig 1-16 referencia kakassavók 1:4 arányú hígításának 40-40 µl-ét visszük fel.
- 8, A tárgylemezeket nedves környezetben 24 órán át 37 °C-on inkubáljuk.
- 9, A precipitációs sarkantyúk megjelenését erős megvilágításban ellenőrizzük.
- 10, Szükség szerint a tárgylemezeket további 24 óráig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
- 11, Az esetleges keresztreakciók kizárására a típusavókat nagyobb arányban hígítva ismételjük meg a tesztet.

4.3.3 Antibiotikum-rezisztencia meghatározás:

- 1, A vizsgálandó törzsek VA-táptalajon nőtt 24 órás tenyészetéből 2 ml fiziológiás sóoldatban 0,5 MacFarland sűrűségű szuszpenziót készítünk.
- 2, A szuszpenzióval steril vattatampon segítségével 3 db 5% defibrinált birkavért tartalmazó Mueller-Hinton agart masszív oltással beoltjuk, majd rövid ideig szárítjuk.
- 3, A csészesorozatokra antibiotikum korongokat (Oxoid) vittünk fel a gyári utasításnak megfelelően.
- 4, A csészéket 24 órára 35°C-os termosztátba helyeztük.
- 5, A gátlási zónákat milliméter pontossággal leolvastuk.
- 6, Az adott antibiotikummal szembeni érzékenység mértékének megítélésakor a CLSI/NCCLS M31A3 (2008) irányadó értékeit vettük figyelembe.

4.3.4 Molekuláris tipizálási módszerek:

- *P. multocida* - specifikus PCR
- Buroktípus - specifikus PCR
- Allél - specifikus (*ptfA* gén) PCR
- ERIC - PCR
- PCR - RFLP
- Szekvenálás

Templát készítése:

- 1) a VA-on nőtt törzsek egy kacsnyi tenyészetét 50 µl 6%-os Chelex-oldatban szuszpendáltuk
- 2) a mintákat 30 percre 65°C-os vízfürdőbe tettük
- 3) összekevertük (10 másodperc)
- 4) majd 8 percre 99°C-os vízfürdőbe tettük
- 5) majd ismét összekevertük (10 másodperc)
- 6) végül lecentrifugáltuk (11000 rpm 3 perc)
- 7) felhasználásig -20 °C-on tároltuk

A felhasznált primerek:

KMT1T7-primer: 5' – ATCCGCTATTTACCCAGTGG – 3'	(Townsend et al. 1998b)
KMT1T7-primer: 5' – GCTGTAAACGAACTCGCCAC – 3'	(Townsend et al. 1998b)
GauA fwd. primer: 5' – AATGTTTGGGATAGTCCGTTAGA – 3'	(Gautam et al. 2004)
GauA rev. primer: 5' – ATTTGGCGCCATATCACAGTC – 3'	(Gautam et al. 2004)
toxA-6 primer: 5' – TGCTCAAATCCTAAATCACCTTGT – 3'	(Register, DeJong 2006)
toxA-7 primer: 5' – ACTACAGATTCCTAACAAAGGTTCTGG – 3'	(Register, DeJong 2006)
CapA fwd. primer: 5' – TGCCAAAATCGCAGTCAG - 3'	(Townsend et al. 2001)
CapA rev. primer: 5' – TTGCCATCATTGTCAGTG - 3'	(Townsend et al. 2001)
CapB fwd. primer: 5' – CATTTATCCAAGCTCCACC - 3'	(Townsend et al. 2001)
CapB rev. primer: 5' – GCCCGAGAGTTTCAATCC - 3'	(Townsend et al. 2001)
CapD fwd. primer: 5' – TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC - 3'	(Townsend et al. 2001)
CapD rev. primer: 5' – CATCTACCCACTCAACCATATCAG - 3'	(Townsend et al. 2001)
CapE fwd. primer: 5' – TCCGCAGAAAATTATTGACTC - 3'	(Townsend et al. 2001)
CapE rev. primer: 5' – GCTTGCTGCTTGATTTTGTC - 3'	(Townsend et al. 2001)
CapF fwd. primer: 5' – AATCGGAGAACGCAGAAATCAG - 3'	(Townsend et al. 2001)
CapF rev. primer: 5' – TTCCGCCGTCAATTAATCTG - 3'	(Townsend et al. 2001)

ERIC 2 primer: 5' – AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG - 3'	(Versalovic et al. 1991)
ERIC 1R primer: 5' – ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC - 3'	(Versalovic et al. 1991)
ptfA fwd. primer: 5' - AATGCCAGTCCACTCGTTGT - 3'	(saját)
ptfA rev. primer: 5' - CGTCCTGAGGCAAGCGTGTT - 3'	(saját)
oma87 fwd. primer: 5' - AGACATTCGTGTTGACGGTG - 3'	(saját)
oma87 rev. primer: 5' - TAACTCAACCAACTCCGAGG - 3'	(saját)
ompA fwd. primer: 5' - TATCGTTGCACTAGCCGTGG - 3'	(saját)
ompA rev. primer: 5' - CGCTTCACCGTGACCTGTTG - 3'	(saját)
ompH fwd. primer: 5' - TTCACGCGTTTCWTTCAAAGC - 3'	(saját)
ompH rev. primer: 5' - CWACYCMASCKRCYYCRWC - 3'	(saját)
out fwd. primer: 5' -TATCGTGCCGAGGTAGAAC - 3'	(Sellyei et al. 2010)
'A' rev. primer: 5' - CTTGACATTGATTGAGCTGAG - 3'	(Sellyei et al. 2010)
'B' rev. primer: 5' - AAGAAACACCTTGAGCTG - 3'	(Sellyei et al. 2010)

W= A+T, Y= C+T, M= A+C, S= G+C, K= G+T, R= A+G,

4.3.4.1 *P. multocida*- , PMT toxin- és A burok-specifikus multiplex-PCR

(Townsend et al. 1998b, Register és DeJong 2006, Gautam et al. 2004, Sellyei et al. 2008)

Reakció elegy:

- 2,5 µl 10 x PCR-puffer Mg²⁺-mentes (Finnzymes F-503)
- 0,5 µl 25 mM MgCl₂ (Finnzymes F-503)
- 0,5 µl 1 mM dNTP-mix (Finnzymes F-560)
- 0,25 µl 50 µM toxA-6 primer
- 0,25 µl 50 µM toxA-7 primer
- 0,3 µl 40 µM KMT1T7-primer
- 0,3 µl 40 µM KMT1SP6-primer
- 0,4 µl 50 µM GauA fwd. primer
- 0,4 µl 50 µM GauA rev. primer
- 0,6 µl 2 U/µl DyNAzyme II (Finnzymes F-503)
- 14,3 µl bidesztillált víz
- 5,0 µl templát

Reakció körülmények:

lépés	hőmérséklet	idő	ciklus-szám
kezdeti denaturálás	95°C	10min	
denaturálás	94°C	30sec	
primer-kötődés	55°C	30sec	35
elongáció	72°C	45sec	
végző elongáció	72°C	7min	

4.3.4.2 Buroktípus-specifikus PCR

(Townsend et al. 2001)

Reakció elegy:

16 µl 2 x PCR Master mix (Finnzymes F-508)

1,0 µl 50mM MgCl₂

5 x 1,0 µl 20 µM CapA-, CapB-, CapD-, CapE-, CapE- fwd. primer

5 x 1,0 µl 20 µM CapA-, CapB-, CapD-, CapE-, CapE- rev. primer

1,0 µl 2 U/µl Dynazyme II (Finnzymes F-503)

5,0 µl templát

Reakció körülmények:

Lépés	hőmérséklet	idő	ciklus-szám
kezdeti denaturálás	95°C	5min	
denaturálás	95°C	30sec	
primer-kötődés	55°C	30sec	30
elongáció	72°C	60sec	
végző elongáció	72°C	10min	

4.3.4.3 Allél-specifikus PCR (*ptfA* gén)

Reakció elegy:

2,5 µl 10 x PCR puffer (Fermentas EP0702)
0,5 µl 1 mM dNTP-mix (Fermentas R0193)
0,3 µl 50 µM out fwd. primer
0,2 µl 50 µM 'A' rev. primer
0,3 µl 50 µM 'B' rev. primer
0,2 µl 5 U/µl Dream Taq (Fermentas EP0702)
16,0 µl bidesztillált víz
5,0 µl templát

Reakció körülmények:

Lépés	hőmérséklet	idő	ciklus-szám
kezdeti denaturálás	95°C	5min	
denaturáció	95°C	30sec	
primer-kötődés	60°C	30sec	20
elongáció	72°C	20sec	
végző elongáció	72°C	10min	

4.3.4.4 ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus)-PCR

(Versalovic et al. 1991)

Reakció elegy:

12,5 µl 2 x PCR Master mix (Finnzymes F-508)
0,5 µl 50 mM MgCl₂
2,5 µl 4 µM ERIC 1R-primer
2,5 µl 4 µM ERIC 2-primer
1,5 µl 2U/µl Dynazyme II (Finnzymes F-503)
0,5 µl bidesztillált víz
5,0 µl templát

Reakció körülmények:

Lépés	hőmérséklet	idő	ciklus-szám
kezdeti denaturálás	95°C	5min	
denaturálás	95°C	1min	
primer-kötődés	50°C	1min	30
elongáció	72°C	8min	
végző elongáció	72°C	10min	

A PCR-termékek kimutatása:

- 1,5%-os, az allél-specifikus PCR esetén 2,5%-os, agaróz gélen
- GeneRuler 100bp DNS molekulaszúly marker (Fermentas SM0241) mellett
- konstans 4V/ cm

Futtatás ideje:

- *Pasteurella multocida*-specifikus PCR – 1 óra
- Buroktípus-specifikus PCR – 1 óra 30 perc
- Allél-specifikus PCR – 1 óra 30 perc
- ERIC-PCR – 4 óra

Géldokumentálás:

Kodak Digital Science 1D Application (version: 3.0.2.25) program

PCR mintázat kiértékelés:

Fingerprinting II Informatix™ Software (Bio-Rad)

PCR termékek:

<i>Pasteurella multocida</i> -specifikus fragment:	460 bp
Gautam-féle A burok-specifikus fragment:	564 bp
Buroktípus – specifikus fragmentek:	CapA 1044 bp
	CapB 760 bp
	CapD 657 bp
	CapE 511 bp
	CapF 851 bp
'A' allél-specifikus fragment:	126 bp
'B' allél-specifikus fragment:	217 bp

4.3.4.5 PCR – RFLP

Reakció elegy:

- 2,5 µl 10 x PCR puffer Mg²⁺- mentes (Finnzymes F-503)
- 2,5 µl 25 mM MgCl₂ (Finnzymes F-503)
- 5,0 µl 1 mM dNTP-mix (Finnzymes F-560)
- 0,25 µl 50 µM fwd. primer
- 0,25 µl 50 µM rev. primer
- 0,6 µl 2 U/µl DyNAzyme II (Finnzymes F-503)
- 8,9 µl bidesztillált víz
- 5,0 µl templát

Reakció körülmények:

lépés	hőmérséklet	idő	ciklus-szám
kezdeti denaturálás	95°C	5min	
denaturálás	95°C	30sec	
primer-kötődés	változó	30sec	30
elongáció	72°C	60sec	
végző elongáció	72°C	10min	

Célszekvencia	Primer	Primer-kötődés	PCR-termék	RE
hyaD-C	CapA fwd. CapA rev.	55 °C	1044 bp	<i>DraI</i> (New England R0129)
oma87	oma87 fwd. oma87 rev.	52 °C	1069 bp	<i>DraI</i> (New England R0129)
ompH	ompH fwd. ompH rev.	54 °C	798-823 bp	<i>DraI</i> (New England R0129)
ptfA-hofB	ptfA fwd. ptfA rev.	56 °C	1085 bp	<i>BsrDI</i> (New England R0574)
ompA	ompA fwd. ompA rev.	57 °C	913 bp	<i>PvuII</i> (New England R0151)

A PCR termékek visszaizolálása: MinElute PCR Purification Kit (Qiagen 28004)

A PCR termékek restriktív enzimekkel történő hasítása:

- 1,0 µl 10 x puffer
 - 6,5 µl desztillált víz
 - 2,0 µl DNS
 - 0,5 µl restriktív enzim
- 16 óra 37°C**

4.3.4.6 Szekvenálás

Reakció elegy:

- 1,0 µl 2,5xReady Reaction Premix*
- 1,0 µl 5x BigDye Sequencing puffer*
- 1,0 µl 10µM primer
- 2,0 µl bidesztillált víz
- 5,0 µl visszaizolált PCR termék

*BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems 4337449)

Reakció körülmények:

lépés	hőmérséklet	idő	ciklus-szám
denaturáció	94°C	20sec	
primer-kötődés	50°C	5sec	35
elongáció	60°C	4min	

PCR termék tisztítása: BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits protokoll szerint

Futtatás:

ABI Prism 3100 Genetic Analyzer kapilláris szekvenáló (SZBK Szekvenáló Laboratórium, Szeged)

A molekuláris elemzésekhez felhasznált programok:

- Fingerprinting II Informatix™ Software (Bio-Rad) – ERIC-PCR mintázat kiértékelés
- NEBcutter V2.0 – PCR termék restrikciós enzimmel történő hasításának szimulálása
- OLIGO V6.71 – primer tervezés
- Chromas LITE V2.01 – szekvenálási kromatogramok értékelése
- MultAlin V5.4.1 – szekvenciák többszörös összerendezése
- BioEdit V7.0.9, GeneDoc – szekvenciák szerkesztése

5 Eredmények

5.1 A sertés-eredetű törzsek jellemzése

5.1.1 Fenotípusos sajátosságok

Az törzsek elsődleges azonosítása biokémiai tulajdonságaik alapján történt. A vizsgálatokban a törzsek kataláz és oxidáz pozitívak, ureáz negatívak voltak, triptofánból indolt termeltek és a nitrátot redukálták. A glükózt, mannitot és a szacharózt savtermeléssel, gázképzés nélkül bontották (Mellékletek 6.-11. táblázat).

A sertés-eredetű törzsek laktóz-fermentációja ingadozó volt. 30 esetben (21%) tapasztaltunk kisebb-nagyobb mértékű savtermelést a laktóz-fermentációs tesztben.

5.1.1.1 Alfajok

Az alfajok elkülönítése a dulcit- és szorbit-fermentáció alapján történt (5.3.1.2). A trehalóz bontását nem vettük figyelembe, mivel ennek nagyfokú változatossága folytán nem alkalmazható kellőképpen az ilyen irányú fenotípusos jellemzésre.

A sertés-eredetű *P. multocida* törzsek közt mind a három alfaj jelenlétét ki tudtuk mutatni. Legnagyobb arányban a *P. multocida* subsp. *multocida* alfaj (127/145 = 87,5%) volt jelen. A törzsek 9,5%-a (14/145) tartozott a *P. multocida* subsp. *septica* alfajhoz. Csupán 4 törzset (3%) tudunk a *P. multocida* subsp. *gallicida* alfajba besorolni.

5.1.1.2 Biotípusok

A biokémiai sajátosságok szélesebb körű vizsgálatával a törzseket az alfajokon belül biotípusokba sorolhattuk. A biotípusok meghatározásakor a dulcit-, szorbit-, trehalóz-fermentáción túl az arabinóz, laktóz, maltóz és xilóz bontó képességet és az ornitin-dekarboxiláz aktivitást vettük figyelembe (Mellékletek 5. táblázat).

A 127 db *P. multocida* subsp. *multocida* alfajba tartozó törzs mindössze négy biotípusba volt besorolható. A törzsek többsége (86/127) a 3-as biotípusba tartozott. Jelentős számban (21/127) voltak még jelen a 2-es biotípust képviselő törzsek. Tíz törzs tartozott a 12-es és 7 a

12. táblázat: Sertésekből izolált *P. multocida* alfajok (subsp.) biotípus megoszlása

Alfaj	Biotípus														Össz
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	NT	
<i>Pm</i> subsp. <i>multocida</i>		22	86								10	7		2	127
<i>Pm</i> subsp. <i>septica</i>					7	2	2							3	14
<i>Pm</i> subsp. <i>gallicida</i>														4	4

NT = nem tipizálható

13-as biotípusba. Két törzset nem tudtunk biotípus szinten jellemezni. A *P. multocida* subsp. *septica* alfajú 14 törzs három biotípust képviselt. Hét volt az 5-ös, 3 a 6-os és 2 a 7-es biotípusba besorolható. Három törzset nem tudtunk biotípus szinten jellemezni. A 4 *P. multocida* subsp. *gallicida* alfajba sorolt törzs egyike sem rendelkezett az alfajra jellemző 8-as biotípus arabinóz fermentáló képességével (12. táblázat).

5.1.2 A törzsek antigén sajátosságain alapuló jellemzése

5.1.2.1 Buroktípusok

A sertés-eredetű törzsek 59%-a (85/145) D buroktípusúnak bizonyult, míg 59 törzs A buroktípussal rendelkezett (59/145). Egy törzs F buroktípusú volt.

5.1.3 Toxintermelő törzsek

Összes törzs 18%-ában (26/145) tudtuk a PMT-t kódoló *toxA* gén jelenlétét kimutatni. Ezen törzsek döntő hányada (24/26) A buroktípussal rendelkezett. Csupán két esetben tudtunk olyan toxintermelő törzset azonosítani, amely D buroktípusú volt. A toxintermelő törzsek elsősorban dunántúli állományokból származtak (Mellékletek 2. ábra).

5.2 A nyúl-eredetű törzsek jellemzése

5.2.1 Fenotípusos sajátosságok

A vizsgálatokban az összes törzs kataláz és oxidáz pozitív volt, nem rendelkezett ureáz aktivitással és a nitrátot redukálta. A glükózt, mannitot és a szacharózt savtermeléssel, gázképzés nélkül bontották (Mellékletek 13.-15. táblázat).

A nyúl-eredetű törzsek indoltermelése ingadozó volt. Nagy arányban (11 eset, 14%) fordultak elő indolt gyengén vagy nem termelő törzsek.

5.2.1.1 Alfajok

A dulcit- és szorbithasznosítás alapján törzseinket a lehetséges három alfaj közül kettőbe tudtuk besorolni. A 76 törzsből 51 (67%) *P. multocida* subsp. *multocida*, míg a maradék 25 törzs (33%) *P. multocida* subsp. *septica* alfajhoz tartozott. *P. multocida* subsp. *gallicida* alfajú törzset nem sikerült azonosítani.

5.2.1.2 Biotípusok

A vizsgálat során az 51 *P. multocida* subsp. *multocida* alfajú törzs jelentős változékonyságot mutatott: összesen hat biotípust képviselt (16. táblázat).

16. táblázat: Nyúlból izolált *P. multocida* alfajok (subsp.) biotípus megoszlása

Alfaj	Biotípus														Össz
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14		
<i>Pm</i> subsp. <i>multocida</i>	16	6	13	4					2			10			51
<i>Pm</i> subsp. <i>septica</i>						25									25

E törzsek döntő többsége az 1-es (16/51 eset; 31%) és 3-as (13/51 eset; 25%) biotípusba tartozott. Viszonylag nagy számban (10/51 eset, 20%) fordult elő a 13-as biotípus is. A törzsek maradéka (12/51 eset, 24%) a 2-es, 4-es és 9-es biotípusba volt besorolható (egyenként 12%, 8% és 4%). A *P. multocida* subsp. *multocida* alfajú törzsekkel szemben a *P. multocida* subsp. *septica* törzsek biokémiaiilag teljesen egységesek voltak. A 25 *P. multocida* subsp. *septica* alfajú törzs mindegyike (az összes minta 33%-a) 6-os biotípusúnak bizonyult.

5.2.2 A törzsek antigén sajátosságain alapuló jellemzése

5.2.2.1 Buroktípusok

A megvizsgált nyúl-eredetű törzsek 63%-a (48/76) A buroktípusúnak bizonyult. D buroktípust csak kisebb számban (9/76, 12%) tudtunk kimutatni, ugyanakkor az F buroktípusú törzseket aránya a vártnál magasabb volt (19/76, 25%).

5.2.3 Toxintermelő törzsek

A nyúl-eredetű törzsek közül 2 (egy *P. multocida* subsp. *multocida* és egy *P. multocida* subsp. *septica* alfajhoz tartozó) bizonyult toxikusnak. Mindkét törzs A buroktípussal rendelkezett.

5.3 A baromfi-eredetű törzsek jellemzése

5.3.1 Fenotípusos sajátosságok

A vizsgálatokban az összes törzs kataláz és oxidáz pozitív volt. Nem rendelkezett ureáz aktivitással, triptofánból indolt termelt és a nitrátot redukálta. A glükózt, mannitot és a szacharózt savtermeléssel, gázképzés nélkül bontották (Mellékletek 17.-19. táblázat).

5.3.1.1 Alfajok

Az alfajok előfordulására a *P. multocida* subsp. *multocida* nagy gyakorisága volt jellemző (69%). A törzsek kisebb hányadát képviselték a *P. multocida* subsp. *septica* alfajú törzsek (31%). *P. multocida* subsp. *gallicida* alfajba tartozó törzs nem fordult elő az általunk vizsgált törzsek közt (20. táblázat).

20. táblázat: Az alfajok előfordulási arányai gazdafajonként a vizsgált populációban

Alfajok	H.lúd	H.kacsa	Pulyka	P.réce	H.tyúk	Fácán	Össz
<i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	9	13	12	1	4	3	42
<i>P. multocida</i> subsp. <i>septica</i>	8	7	3	1	0	0	19
Össz	17	20	15	2	4	3	61

Az egyes gazdafajokban az alfajok megoszlása eltérő volt. A fácán és házityúk gazdafajból csak *P. multocida* subsp. *multocida* törzseket tudtunk kimutatni, bár a törzsek száma is alacsony volt. A házilúd-eredetű törzsek 57%-a tartozott csak a *P. multocida* subsp. *multocida* alfajba, a fennmaradó 43% *P. multocida* subsp. *septica* alfajú volt. Így a házilúd-eredetű törzsek közt közel egyenlő arányban volt képviselve mindkét alfaj. A két pézsmaréce-eredetű törzs egyike szintén a *P. multocida* subsp. *multocida*, míg a másik a *P. multocida* subsp. *septica* alfajhoz tartozott. A házikacsa- és pulyka-eredetű törzsek döntő többségében (65% és 80%) a *P. multocida* subsp. *multocida* alfajhoz tartoztak és csak 35-20% arányban fordult elő köztük *P. multocida* subsp. *septica* alfajú törzs.

5.3.1.2 Biotípusok

A korábban leírt 14 biotípusból hetet (1 - 7) tudtunk saját törzseink közt azonosítani. Legnagyobb arányban az 1-es, majd a 3-as és 6-os biotípus fordult elő (25%, 23% és 21%). A 2-es biotípus képviselte a maradék törzsek felét (9/19), további 7 törzs három különböző biotípusba (4-es, 5-ös és 7-es) tartozott. Három törzset nem tudtunk az irodalomban leírt biotípusok egyikébe sem besorolni.

Az 1-es, 2-es, 3-as és 4-es biotípusba tartozó törzsek a *P. multocida* subsp. *multocida* alfajt képviselik. A 6-os biotípusú törzsek a *P. multocida* subsp. *septica* alfajba tartoznak. Az 5-ös és 7-es biotípushoz tartozó törzsek alfaji meghatározását az irodalmi adatok nem pontosítják, de a szorbit-, dulcit-fermentáció figyelembe vételével ezek a törzsek a *P. multocida* subsp. *septica* alfajhoz sorolandók. Hasonló megfontolásból a biotípusok tekintetében nem jellemezhető törzseket *P. multocida* subsp. *septica* alfajú törzsként kezeltük.

A biotípusok megoszlása a gazdafajok tekintetében igen változatos volt. Jól tükrözte a madár-eredetű *P. multocida* törzsek heterogenitását (21. táblázat).

21. táblázat: A biotípusok megoszlása a különböző gazdafajokban

Biotípus	H.lúd	H.kacsa	Pulyka	P.réce	H.tyúk	Fácán	Össz	
1	1	11	1	-	2	-	15	<i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i>
2	2	-	5	-	-	2	9	
3	6	-	5	1	1	1	14	
4	-	2	1	-	1	-	4	
5	2	-	-	-	-	-	2	<i>P. multocida</i> subsp. <i>septica</i>
6	3	7	2	1	-	-	13	
7	-	-	1	-	-	-	1	
Nem tipizálható	3	-	-	-	-	-	3	
Össz	17	20	15	2	4	3	61	

A leginkább egységesek a házikacsa-eredetű törzsek voltak, a törzsek 55%-a (11/20) az 1-es biotípusba tartozott. Hét törzs (35%) 6-os biotípusú, 2 (10%) pedig 4-es biotípusú volt.

A pézsmaréce-, házityúk- és fácán-eredetű törzsek alacsony száma miatt e törzsek tekintetében messzemenő következtetések nem vonhatók le. A fácán-eredetű törzsek a 2-es, illetve a 3-as biotípusokba tartoztak (2, illetve 1). A házityúk-eredetű törzsek esetében 1-es (2), 3-as (1) és 4-es (1) biotípusúakat tudtunk azonosítani. A 2 pézsmaréce-eredetű törzs a leggyakrabban előforduló 3-as, illetve 6-os biotípushoz tartozott.

A házilúd- és pulyka-eredetű törzsek mutatták a leginkább változatos képet. Mindkét csoportban 6-6 különböző biotípust képviselő törzsek voltak jelen, közel egyenletes eloszlásban. A pulyka-eredetű törzsek 66%-ban a 2-es és a 3-as (5, 5/ 20) biotípusba tartoztak. Két törzs (13%) 6-os biotípusú volt. Az 1-es, 4-es és 7-es biotípust egy-egy törzs képviselte. A házilúd-eredetű törzsek közt szintén a 3-as biotípus volt némiképp túlsúlyban (5/17, 29%). Ezt a 6-os biotípus követte (3/17, 17,5%). A 2-es és az 5-ös biotípusok aránya egyaránt 12% volt (2/17). Mindössze 1 törzs tartozott az 1-es biotípusba. A házilúd-eredetű törzsek közt 3, a korábban leírt biotípusokba be nem sorolható törzset is azonosítottunk. Ezek a törzsek a fajazonosításon túl tekintett fermentációs sajátosságokban inaktívnak bizonyultak.

5.3.2 A törzsek antigén sajátságain alapuló jellemzése

5.3.2.1 Buroktípusok

A különböző baromfi-eredetű törzseink túlnyomó többsége (57/61) A buroktípussal rendelkezett (93,5%). A törzsek fennmaradó része (6,5%) F buroktípusú volt. Egyéb buroktípusba (B, D, E) tartozó törzset, a megvizsgált baromfi-eredetű törzsek közt, nem tudtunk azonosítani (22. táblázat).

22. táblázat: Az eltérő buroktípusok megoszlása a különböző gazdafajokban

Burok	H.lúd	H.kacsa	Pulyka	P.réce	H.tyúk	Fácán	Össz
A	17	20	12	1	4	3	57
F	0	0	3	1	0	0	4
Össz	17	20	15	2	4	3	61

Az összes házilúd, házikacsa, házityúk és fácán-eredetű törzs A buroktípussal rendelkezett. Egy pézsmaréce-eredetű törzs és a pulyka-eredetű törzsek 80%-a (12/15) volt A buroktípusú. F buroktípus csak a pézsmaréce (1) és a pulyka-eredetű (3/12) törzsek között fordult elő.

5.3.2.2 Szomatikus szerotípusok

A törzseink szomatikus szerotípusának meghatározását a hagyományos Heddleston-féle agargél-precipitációs próbával végeztük el.

A baromfi-eredetű törzsek között hat különböző szomatikus szerotípust (1; 3; 3,4; 4,5; 4,5,(7); 10) tudtunk azonosítani (22. táblázat). Legnagyobb számban (34/61) az 1-es szomatikus szerotípusba tartozó törzsek fordultak elő (56%). Az törzsek 31%-a 3-as szomatikus szerotípusú volt (19/61). Összesen hat törzs tartozott a 4,5-ös illetve 4,5,(7)-es szomatikus szerotípushoz (6,5% és 3,5%). Egy-egy törzs 3,4-es és 10-es szomatikus szerotípusúnak bizonyult (1,5% és 1,5%).

A házikacsa-eredetű törzsek egységesen az 1-es, a fácán-eredetű törzsek pedig a 3-as szomatikus szerotípusba tartoztak. A többi gazdafaj esetén változatosabb volt a szomatikus szerotípusok megoszlása (23. táblázat).

A házityúk-eredetű törzsek az 1-es (3/4) és 3-as (1/4) szomatikus szerotípusúak voltak. A házilúd-eredetű törzsek közt is az 1-es szomatikus szerotípus (9/17), majd a 3-as szomatikus szerotípus (7/17) volt a leggyakoribb, de egy 4,5-ös szomatikus szerotípusú törzset is sikerült azonosítanunk. A pulyka-eredetű törzsek mutatták a legváltozatosabb képet. Az törzsek túlnyomó többsége 3-as szomatikus szerotípussal rendelkezett (11/15). Egy pulyka-eredetű törzs volt 1-es szomatikus szerotípusú. A 4,5,(7)-es és 10-es szomatikus szerotípust csak a

pulyka-eredetű törzsek közt tudunk azonosítani (2/15; 1/15). A két pézsmaréce-eredetű törzs 1-es és 3,4-es szomatikus szerotípusú volt.

23. táblázat: A szomatikus szerotípusok előfordulási aránya a baromfi-eredetű törzsek közt

Gazdafajok	Szomatikus szerotípusok					
	1	3	3,4	4,5	4,5,(7)	10
H.kacsa (20)	20	-	-	-	-	-
H.lúd (17)	9	7	-	1	-	-
Pulyka (15)	1	11	-	-	2	1
H.tyúk (4)	3	1	-	-	-	-
Fácán (3)	-	-	-	3	-	-
P.réce (2)	1	-	1	-	-	-
	56%	31%	1,5%	6,5%	3,5%	1,5%

A burok és szomatikus szerotípusok kombinációja együttesen határozza meg a *P. multocida* törzsek szerológiai sajátosságát. Ennek figyelembevételével, hét szerotípust tudunk elkülöníteni a baromfi-eredetű törzseken belül (24. táblázat).

A 3-as, 3,4-es és 4,5-ös szomatikus szerotípussal rendelkező törzsek mind A buroktípusúak voltak. Az 1-es szomatikus szerotípusú törzsek, az egy pézsmaréce-eredetű törzs kivételével (F:1), szintén A buroktípussal rendelkeztek. A pulyka-eredetű, egyedi, 4,5,(7)-es és 10-es szomatikus szerotípust mutató törzsek (2, 1) F típusú burokkal bírtak.

24. táblázat: A különböző buroktípus és a szomatikus szerotípus kombinációk gyakorisága a vizsgált madár-eredetű törzsek közt

Gazdafajok	Szerotípusok						
	A:1	A:3	A:3,4	A:4,5	F:1	F:4,5,(7)	F:10
H.kacsa (20)	20	-	-	-	-	-	-
H.lúd (17)	9	7	-	1	-	-	-
Pulyka (15)	1	11	-	-	-	2	1
H.tyúk (4)	3	1	-	-	-	-	-
Fácán (3)	-	-	-	3	-	-	-
P.réce (2)	-	-	1	-	1	-	-
	54%	31%	1,75%	6,5%	1,75%	3,25%	1,75%

5.3.3 A törzsek antibiotikum-rezisztenciája

A baromfi-eredetű törzseink összesen 13%-a (8/61) bizonyult minden megvizsgált antibiotikumra érzékenynek (Melléklet 25. táblázat). További 20 törzs (33%) csak mérsékelt rezisztenciát mutatott egyes antibiotikumokra (apramicin, eritromicin, neomicin, tetraciklin). A törzsek több mint fele (34/61= 58%) eritromicinre, egyharmada (21/61 = 34%) apramicinre volt mérsékeltlen rezisztens. Alacsonyabb számban fordultak elő SXT (5/61) és enrofloxacinra (5/61), illetve szulfonamidokra (4/61) és doxiciklinre (4/61) mérsékelt rezisztenciát mutató törzsek (8% illetve 6,5%). Szórványosan akadtak tetraciklinre (3/61= 5%), flumequinre (2/61= 3%) és neomicinre (1/61= 2%) mérsékelt rezisztens törzsek.

A különböző antibiotikum-rezisztenciát mutató törzsek aránya 54% (33/61) volt. Öt törzs (3 szulfonamid, 1 apramicin, 1 flumequin) hordozott egyszeres antibiotikum-rezisztenciát (5/33 = 15%). A többi törzssel (28/33) szemben 2-8 antibiotikum bizonyult hatástalannak. Oxolinsavra a multirezisztens törzsek mindegyike (28/28), flumequinre 93%-uk (26/28) volt rezisztens. E mellett szintén gyakran fordult elő a szulfonamid- (17/28), SXT- (13/28) és az apramicinrezisztencia (13/28). Kisebb arányban voltak jelen tetraciklin (9/28) és neomicin (8/28) rezisztens törzsek. Doxiciklin (2/28), penicillin (2/28), vagy enrofloxacin (1/28), florfenikolrezisztenciát (1/28) csak elvétve tudtunk kimutatni. Általában az oxolinsav és flumequinrezisztencia, valamint az SXT- és szulfonamidrezisztencia együtt járt, míg a többi rezisztencia típus szabadon kombinálódott.

A rezisztens törzsek jellegzetes eloszlást mutattak a törzsek izolálási idejének függvényében (Mellékletek 26.-27. táblázat). A 2004 előtt izolált törzsek, eltekintve 4 törzstől, nem hordoztak rezisztenciát egyetlen vizsgált antibiotikummal szemben sem. A későbbiekben a rezisztenciák fokozott mértékű felszaporodása volt tapasztalható.

A antibiotikum-rezisztenciák eltérő mértékben voltak jelen a különböző gazdaeredetű törzsekben (Melléklet 28.-29. táblázat). A fácán- (3/3) és pézsmaréce-eredetű (2/2) törzsek gyakorlatilag érzékenyek voltak minden megvizsgált antibiotikummal szemben.

A fácán-eredetű törzsek nem (3/1), vagy csak egy antibiotikumra mutattak mérsékelt rezisztenciát (2/3). A két pézsmaréce-eredetű törzs egyike egy, a másik két antibiotikumra volt mérsékeltlen rezisztens. A pulyka-eredetű törzsek 80% (12/15), míg a házilúd-eredetű törzsek 59%-a (10/17) nem hordozott rezisztenciát. A pulyka-eredetű törzsek 33% mérsékelt rezisztenciával sem bír. A fennmaradó 47%-uk (7/15) döntően két antibiotikummal szemben bizonyult mérsékeltlen rezisztensnek (4/7). Két pulyka-eredetű törzs egy, egy pedig három antibiotikumra volt mérsékeltlen rezisztens. A rezisztens törzseket a pulyka-eredetű törzsek 13%-a (3/15), a házilúd-eredetű törzsek 41%-a (7/17), a házityúk-eredetű törzsek 75%-a (3/4), valamint a házikacsa-eredetű törzsek képviselték (30. táblázat). A házityúk-eredetű törzsek egy (1), illetve hat antibiotikumra (2) voltak rezisztensek. A házilúd-eredetű törzsek csak 1-2, míg a pulyka-eredetű törzsek viszont döntően 1-4 antibiotikummal szemben

mutattak rezisztenciát. Ezzel szemben a házikacsa-eredetű törzsek nagyobbik hányada (14/20 = 70%) 4 vagy több antibiotikumra volt rezisztens.

30. táblázat: A különböző mértékű antibiotikum-rezisztenciák előfordulása baromfi-eredetű törzsekben a gazdafajok tekintetében

	H.kacsa (20)	H.lúd (17)	Pulyka (15)	H.tyúk (4)	Fácán (3)	P.réce (2)
É	-	2	5	-	1	-
	-	2 (12%)	5 (33%)	-	1	-
MR 1	-	6	2	1	2	1
MR 2	-	2	4	-	-	1
MR 3	-	-	1	-	-	-
	-	8 (47%)	7 (47%)	1	2	2
R 1	1	2	1	1	-	-
R 2	5	1	2	-	-	-
R 3	-	1	-	-	-	-
R 4	4	2	-	-	-	-
R 5	6	-	-	-	-	-
R 6	2	-	-	2	-	-
R 7	1	-	-	-	-	-
R 8	1	1	-	-	-	-
Össz	20	7 (41%)	3 (20%)	3	-	-

MR – mérsékelt rezisztencia ; R – rezisztencia; a számok a sajátsággal kapcsolatos antibiotikumok számát jelzik

5.3.4 A törzsek rokonsági viszonyai

A baromfi-eredetű törzsek rokonsági viszonyainak vizsgálatára ERIC-PCR-t használtuk. A gének közötti, konzervatív szakaszokat felszorzó rendszer a fajokra, sőt az egyes törzsekre jellemző egyedi, PCR mintázatot eredményez, mely lehetővé teszi a törzsek között fennálló DNS-szintű hasonlóság vizsgálatát a teljes genomon.

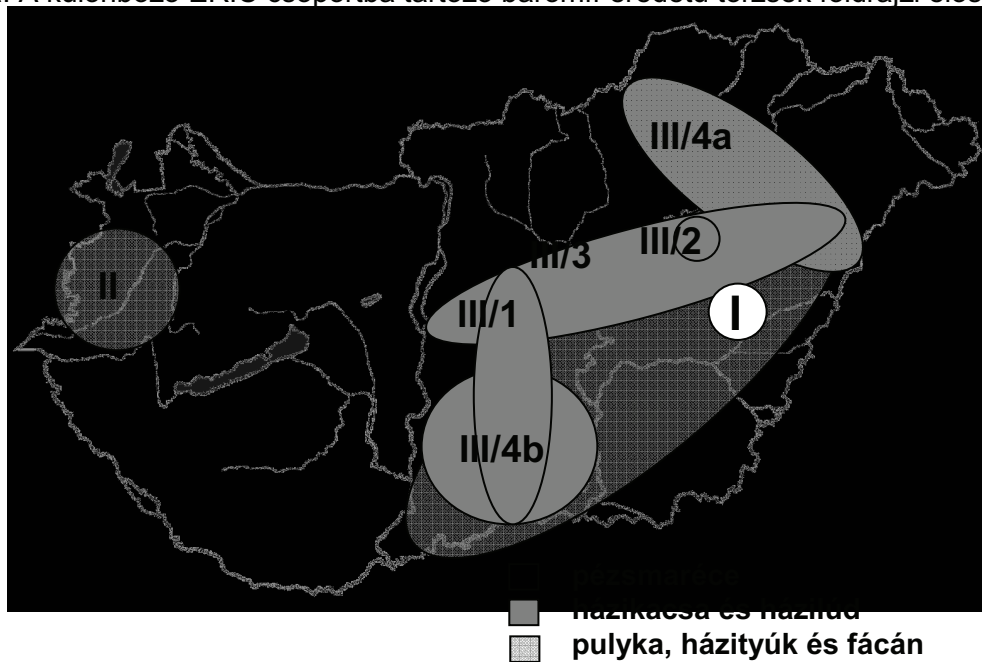
Az ERIC-PCR által létrehozott ujjenyomat-mintázatok, 100-1000 bázispáros tartományban, 8-20 összehasonlítható felszorzított fragmentet tartalmaztak. Ezeket a mintázatokot, csoportátlagot felhasználó, távolság-optimalizáló módszerrel értékeltük (UPGMA). Az eredményekből a megfelelő számítógépes program hasonlósági indexen alapuló fenogramot generált (Mellékletek 7. ábra).

A 61 baromfi-eredetű *P. multocida* törzset 90%-os hasonlósági szint mellett 24 különböző ERIC-PCR mintázattal lehetett jellemezni. 75%-os hasonlósági szinten pedig négy nagyobb klaszterbe (I-IV) tudtuk besorolni a törzseinket.

A legnagyobb eltérés az I és a másik három klaszter között mutatkozott (hasonlósági index: 66%). Ezt a csoportot a két pézsmaréce-eredetű törzs alkotta. A fenotípusos sajátságok korábbi vizsgálata nem utalt ilyen jelentős különbségekre.

A III klaszter a vízibarmfi-eredetű (házikacsa, házilúd) törzseket foglalta magában, míg a maradék két klaszter (II, IV) a tyúkidomúakból (házityúk, pulyka, fácán) származó törzseket tartalmazta. A II és IV klaszterbe fogalt törzsek eredete azonban eltért. A IV klasztert elsősorban a Duna-Tisza közéről és a Tiszántúlról származó törzsek alkották, míg a II klaszterbe a Dunántúlról eredeztethető törzsek kerültek (8. ábra).

8. ábra: A különböző ERIC csoportba tartozó baromfi-eredetű törzsek földrajzi eloszlása



A III klaszter 80%-os hasonlósági szint felett négy kisebb mini-klaszterre volt bontható. A III/4 klaszter további két szubklaszterre tartozott (a, b). A III/1 és III/4b klaszter főként kacsából származó, míg a III/2, III/3 és a III/4a klaszterek házilúd-eredetű törzseket foglaltak magukba. A III/2, III/3 és a III/4a klaszter földrajzilag a Felső- és Közép-Tiszavidéken három elkülönülő területet fedett le. A III/2 klaszter a vándormadarak egyik legfontosabb magyarországi pihenőhelyén, a Hortobágyon izolált törzseket foglalta magában.

A III/1 és III/4b klaszterbe tartozó törzsek földrajzi eloszlása nagyban átfedést mutatott, ami két független klón egy régióban való együttes jelenlétére utalhat. Ugyanakkor a III/2, III/3 és a III/4a klaszter esetén viszonylag egyértelmű a területi elkülönülés. A II és IV klaszter esetén a Dunától nyugatra, illetve keletre eső területekről származó törzsek elkülönülése egyértelmű volt. De a klasztereken belül további alcsoportokat nem karakterizáltunk, mivel nem tudtunk csoportalkotó tendenciát kimutatni.

31. táblázat: A szomatikus antigének előfordulása az ERIC-PCR mintázat alapján létrehozott klaszterekben

ERIC klaszter	Gazdafaj	Szerotípus						
		A:1	A:3	A:3,4	A:4,5	F:1	F:4,5,(7)	F:10
I (2)	2 B	-	-	1	-	1	-	-
	3 F	-	-	-	3	-	-	-
II (7)	3 P	-	3	-	-	-	-	-
	1 T	1	-	-	-	-	-	-
III/1 (12)	9 K	9	-	-	-	-	-	-
	3 L	2	1	-	-	-	-	-
III/2 (4)	4 L	-	3	-	1	-	-	-
III/3 (4)	4 L	1	3	-	-	-	-	-
III/4 (17)	11 K	11	-	-	-	-	-	-
	6 L	6	-	-	-	-	-	-
IV (15)	12 P	1	8	-	-	-	2	1
	3 T	2	1	-	-	-	-	-

B: pézsmaréce; F: fácán; K: házikacsa; L: házilúd; P: pulyka; T: házityúk

32. táblázat: A biotípusok megoszlása az ERIC-PCR mintázat alapján létrehozott klaszterekben

ERIC klaszter	Gazdafaj	Biotípus							
		1	2	3	4	5	6	7	UT
I (2)	2 B	-	-	1	-	-	1	-	-
	3 F	-	2	1	-	-	-	-	-
II (7)	3 P	-	2	-	-	-	-	1	-
	1 T	-	-	-	1	-	-	-	-
III/1 (12)	9 K	5	-	-	1	-	3	-	-
	3 L	-	-	1	-	-	2	-	-
III/2 (4)	4 L	-	-	2	-	2	-	-	
III/3 (4)	4 L	-	2	2	-	-	-	-	
III/4 (17)	11 K	6	-	-	1	-	4	-	-
	6 L	1	-	1	-	-	1	-	3
IV (15)	12 P	1	3	5	1	-	2	-	-
	3 T	2	-	1	-	-	-	-	-

B: pézsmaréce; F: fácán; K: házikacsa; L: házilúd; P: pulyka; T: házityúk

Az ERIC-PCR vizsgálat eredményei a gazdafaji megoszlással párhuzamosan a szerotípusok előfordulásával sajátos összefüggést mutatott. A III/1 és III/4 klaszterben, mely dominánsan házilúd és házikacsa-eredetű törzseket tartalmazott, egyértelműen az A:1 antigén sajátságokkal bíró törzsek kerültek (28/29). Míg a házilúd-eredetű törzsek alkotta III/2 és III/3 klaszterek elsősorban az A:3 szerotípusú törzseket foglalták magukba (6/8). Az egyéb madárfajokból származó törzseket felölelő I, II és IV klaszterben a törzsek fele (12/24) szintén az A:3 szerotípus volt, A:1 szerotípusú törzsek csak kis számban (5/24) fordultak elő. Ellenben, csak ezen klaszterekben tudunk egyéb antigén sajátságokkal bíró (A:3,4; A:4,5; F:1; F:4,5,(7); F:10) törzseket is azonosítani (31. táblázat).

A különböző biotípusok megoszlása az ERIC klaszterekben némiképp hasonlított a szerotípusok előfordulásához. A III/1 és III/4 klaszter, e tekintetben is, feltűnően homogén volt. Dominánsan az 1-es és a 6-os biotípus fordult elő (12+10/29). Mindkét klaszterben csak 1-1 esetben találtunk 3-as, illetve 4-es biotípusú törzset. A többi klaszterben az 1-es és a 6-os biotípus aránya mindössze 5% volt (3+3/32). Legnagyobb számban a 3-as (12/32), majd a 2-es biotípus fordult elő (9/32). Öt törzs egyéb biotípusba tartozott (4-es, 5-ös, 7-es). A *P. multocida* alfajok megoszlása az egyes klaszterekben részarányos volt (32. táblázat).

5.3.5 Egyedi génvizsgálatok

5.3.5.1 PCR-RFLP

Az ERIC-PCR-el kialakított csoportok lehetséges fajadaptációs sajátságainak további vizsgálatára PCR-RFLP-t alkalmaztunk. A vizsgálatba bevont gének körének megválasztásakor a kódolt fehérjék virulenciával való összefüggését, a gének madár-eredetű törzsekben való előfordulási arányát és - amennyiben rendelkezésre állt irodalmi adat - az adott gének szekvencia variabilitását, valamint a fehérje termékeknek sejt felszíni lokalizációját és immunválasz stimuláló hatását vettük figyelembe.

E sajátságok szem előtt tartásával öt fehérjét, illetve a megfelelő génszakaszokat vizsgáltunk: (1.) az „A” buroktípus meghatározásában szerepet játszó, (2.) az Oma87 külső membrán fehérje, (3.) az OmpA külső membrán fehérje, (4.) az OmpH külső membrán fehérje, és a (5.) 4-es típusú fimbria kislegegység génjeit kódoló régiókat.

A vizsgálatokat, első lépésben, 20 reprezentatív (különböző gazdafaj-eredetű) madár-eredetű törzsön végeztük el (Melléklet 33. táblázat).

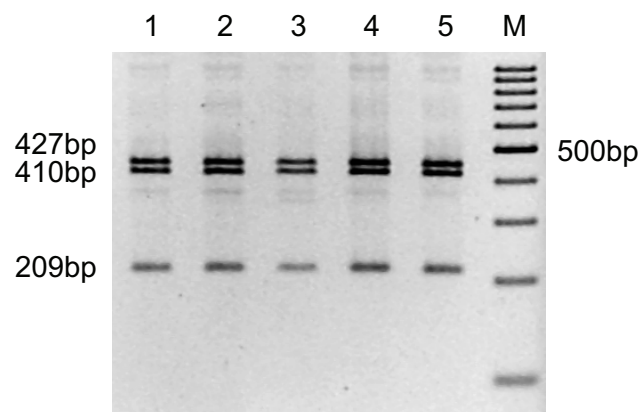
5.3.5.1.1 „A” buroktípust meghatározó génszakasz

Az adott génszakasz PCR-RFLP vizsgálatára az „A” buroktípus meghatározásában szerepet játszó egyedi génekre kidolgozott PCR reakciót (Townsend et al. 2001) használtuk

fel. A keletkező 1046 bp-os PCR termékeket, tisztítás után, *DraI* restriktions enzimmel hasítottuk. A génbanki szekvenciák (AF067175; AY225345) szimulált hasítási vizsgálatával (NEBcutter V2.0) a várt fragmentumok hossza: 209bp, 410bp és 427bp volt.

A *DraI* restriktions enzimmel az „A” buroktípust meghatározó génszakaszon végzett PCR-RFLP vizsgálatokban a kiválasztott törzsek egységesnek bizonyultak; a kapott fragmentek hossza megegyezett az előzetesen, a génbanki adatok alapján jósolt értékekkel (9. ábra).

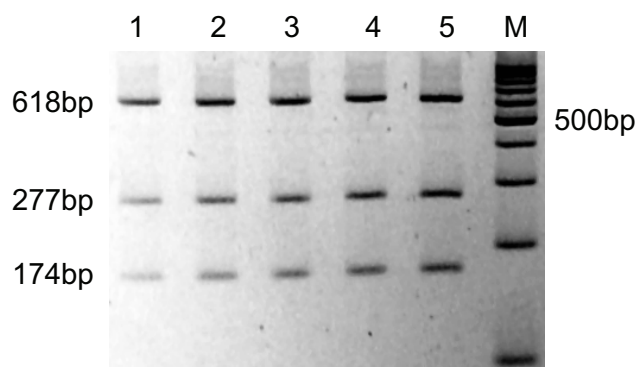
9. ábra: Különböző madárfajból származó reprezentatív *P. multocida* törzsek PCR-RFLP mintázata az *hyaDC* génszakaszon. (1- P415 P; 2- P414 B; 3- P369 F; 4- P325 L; 5- 131 T; M- 100bp molekula marker)



5.3.5.1.2 Oma87 külső membrán fehérje génje

Az Oma87 fehérjét kódoló génszakasz PCR-RFLP vizsgálata céljából a génbanki szekvenciák (U60439, AJ426473) felhasználásával egyedi primereket terveztünk (OLIGO V6.71). A keletkező 1069 bp-os PCR termékeket, tisztítás után, *DraI* restriktions enzimmel hasítottuk. A génbanki szekvenciák szimulált hasítási vizsgálatával (NEBcutter V2.0) a várt fragmentumok hossza: 174bp, 277bp és 618bp volt.

10. ábra: Különböző madárfajból származó reprezentatív *P. multocida* törzsek PCR-RFLP mintázata az *oma87* génen. (1- P415 P; 2- P414 B; 3- P369 F; 4- P325 L; 5- 131 T; M- 100bp molekula marker)

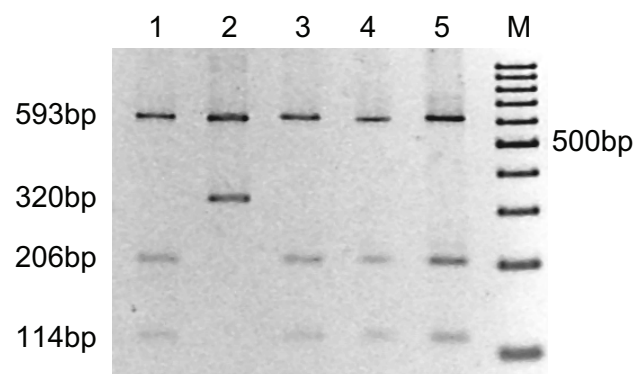


A reprezentatív törzsek Oma87 fehérjét kódoló génjére tervezett PCR reakcióban keletkező termékén *DraI* restrikciós enzimmel végzett PCR-RFLP vizsgálatokban a törzsek egységesnek mintázatot mutattak; a fragmentek hossza megegyezett az előzetesen, a génbanki adatok alapján jósolt értékekkel (10. ábra).

5.3.5.1.3 OmpA külsőmembrán fehérje génje

Az OmpA fehérjét kódoló génszakasz PCR-RFLP vizsgálatára a génbanki szekvenciák (AY035341, AY903603, AY643798) felhasználásával egyedi primereket terveztünk (OLIGO V6.71). A keletkező 913 bp-os PCR termékeket, tisztítás után, *PvuII* restrikciós enzimmel hasítottuk. A génbanki szekvenciák szimulált hasítási vizsgálatával (NEBcutter V2.0) a várt fragmentumok hossza: 114bp, 206bp és 593bp volt.

11. ábra: Különböző madárfajból származó reprezentatív *P. multocida* törzsek PCR-RFLP mintázata az *ompA* génen. (1- P415 P; 2- P414 B; 3- P369 F; 4- P325 L; 5- 131 T; M- 100bp molekula marker)



A reprezentatív törzsek OmpA fehérjét kódoló génjére tervezett PCR reakcióban keletkező termékén *PvuII* restrikciós enzimmel végzett PCR-RFLP vizsgálatokban a törzsek, a pézsmaréce-eredetű törzstől (P414) eltekintve, egységesnek mintázatot mutattak ; a kapott fragmentek hossza megegyezett az előzetesen, a génbanki adatok alapján jósolt értékekkel. A pézsmaréce esetében egy restrikciós hely kiesése folytán a 114bp és 206bp restrikciós fragment helyett egy 320bp fragment jelent meg (11. ábra).

5.3.5.1.4 OmpH külsőmembrán fehérje génje

Az OmpH fehérjét kódoló génszakasz PCR-RFLP vizsgálatára a génbanki szekvenciák (AY603962, U52200-13, AJ459785, AY057869, AY057870, AF416986) felhasználásával egyedi primereket terveztünk (OLIGO V6.71). A keletkező 786-828bp-os PCR termékeket, tisztítás után, *DraI* restrikciós enzimmel hasítottuk. A génbanki szekvenciák szimulált hasítási

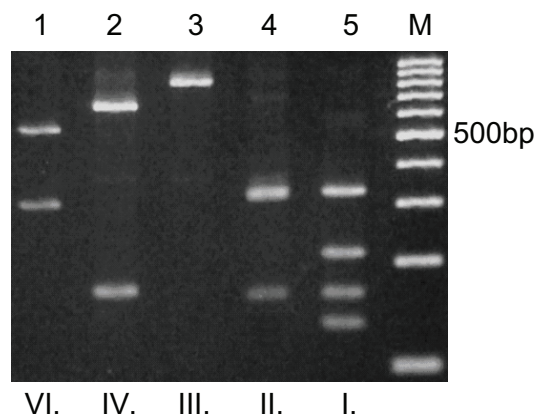
vizsgálatával (NEBcutter V2.0) a várt fragmentumok hossza a különböző szerotípusokból származó szekvenciáknak megfelelően eltért (34. táblázat).

34. táblázat: Az *ompH* gén szimulált PCR-RFLP vizsgálatával várható fragmentek mérete a különböző szomatikus szerotípusú *P. multocida* törzsekben

Szomatikus szerotípusok	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
PCR (bp)	828	798	798	792	798	798	814	801	813	786	813	814	828	786
RE-fragmentek (bp)	323 216 158 131	325 314 159	- -	- -	640 158	640 158	641 158	- 15	514 299	323 305 158	514 299	641 158	323 216 158 131	-
Mintázat	I.	II.	III.	III.	IV.	IV.	IVb.	III.	VI.	V.	VI.	IVb.	I.	III.

Az OmpH fehérje génjére tervezett PCR-RFLP reakciót mind a 61 madár-eredetű törzs bevonásával elvégeztük. A keletkező 786-828bp-os terméket *DraI* restrikciós enzimmel emésztve, a jósolt hasítási mintázatok közül, összesen ötöt (I., II., III., IV., VI.) tudtunk kimutatni a saját törzseink közt (12. ábra).

12. ábra: A madár-eredetű törzsek *ompH* génjén végzett PCR-RFLP vizsgálatban előforduló hasítási mintázatok



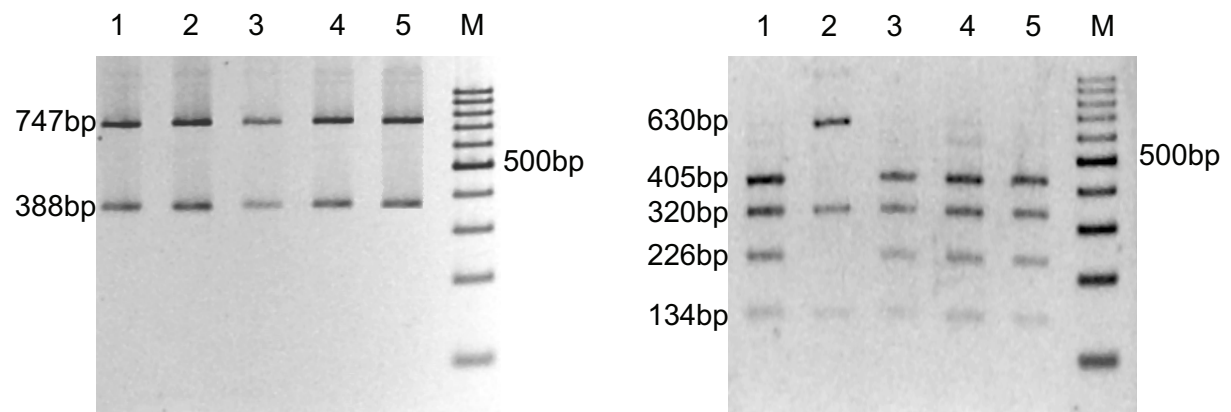
Legnagyobb arányban az I. (61/31) és II. (61/21), majd a IV. (61/5), végül a III. (61/2) és VI. (61/2) hasítási mintázat fordult elő (Melléklet 13. ábra). A IV. és VI. mintázat csak pulyka-eredetű törzsekre volt jellemző, míg a többi hasítási mintázat egyaránt jelen volt a különböző eredetű törzsekben. Az I. és a VI. hasítási mintázat esetén az A:1 és F:4,5,(7) antigenitási sajátosságokkal való összefüggést volt kimutatható, ellentétben a többi mintázati típusal.

5.3.5.1.5 4-es típusú fimbria kisalegység génje

Az PtfA fehérjét kódoló, illetve a vele feltehetően együtt átíródó *hofB* (*E. coli piB* homológ), génszakasz PCR-RFLP vizsgálatára a génbanki szekvenciák (AF154834, AY644678, AE006044, DQ788723, DQ788724) felhasználásával egyedi primereket terveztünk (OLIGO V6.71). A keletkező 1085 bp-os PCR termékeket, tisztítás után, *DraI* és *BsrDI* restrikciós enzimmel hasítottuk. A génbanki szekvenciák szimulált hasítási vizsgálatával (NEBcutter V2.0) a várt fragmentumok hossza: (1) 134bp, 226bp, 320bp és 405bp; (2) 338bp és 747bp volt.

A reprezentatív törzsek PtfA fehérjéjét is kódoló génjére tervezett PCR reakcióban keletkező terméken *DraI* restrikciós enzimmel végzett PCR-RFLP vizsgálatokban az összes törzs egységes mintázatot mutatott. A *BsrDI* restrikciós enzimmel végzett hasítás során, a pézsmaréce-eredetű törzs (P414) kivételével, a törzsek egységesek voltak; a kapott fragmentek hossza mindkét esetben megegyezett az előzetesen, a génbanki adatok alapján jóslott értékekkel. A pézsmaréce-eredetű törzs esetén egy restrikciós hasításihely kiesése folytán a 226bp és 405bp restrikciós fragmentek helyett egy 630bp fragment jelent meg (14. ábra).

14. ábra: Különböző madárfajból származó reprezentatív *P. multocida* törzsek PCR-RFLP mintázata az *ptfA* génen. (1- P415 P; 2- P414 B; 3- P369 F; 4- P325 L; 5- 131 T; M- 100bp molekula marker)



5.3.5.2 Szekvenálás

Szekvenálási reakciót a *ptfA* géne tervezett PCR reakcióban keletkező 1085 bp-os terméken végeztünk. Negyven törzset vizsgáltunk meg. A törzsek elsősorban A:1 szerológiai sajátosságokkal rendelkeztek (30/40) de minden egyéb, a vizsgálatunkba előforduló, szerocsoportot is képviselve volt (Melléklet 35. táblázat).

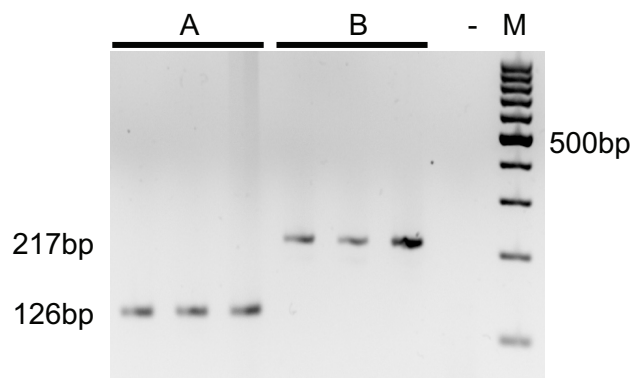
A szekvencia elemzésbe átlagosan 380bp hosszú szakaszt tudtuk bevonni. Ez tartalmazta a *ptfA* gén 88%-át. A szekvenciák többszörös összerendezése során (Multalin version 5.4.1) referenciaként, génbanki adatokat (A:1- AF15834, A:3 – AE006044) is felhasználtunk. A szekvencia 5' végi régiója (1-200nukleotid) nagymértékben homológnak bizonyult, míg a 3' végi szekvencia 180 nukleotidos régiójában 60 nukleotid cserét azonosítottunk (Melléklet 15. ábra).

A 3' végi szekvenciában megmutatkozó következetes eltérések alapján a *ptfA* gén két variánsát tudtuk megkülönböztetni. A szekvencia variánsokat A és B allélnak neveztük el. A különböző allél variánsok előfordulása alapján a madár-eredetű *P. multocida* törzseinket két csoportba sorolhattuk. Az A:1 szerológiai sajátosságokkal rendelkező törzsek, egy kivételével (P60), az A allél variánst, míg a többi törzs a B allél variánst hordozta.

5.3.5.3 Allél-specifikus PCR

A *ptfA* gén két allél variánsa által képviselt szekvenciák közti jelentős különbséget kihasználva, a két típus elkülönítésére allél-specifikus PCR reakciót dolgoztunk ki. A rendszer egy közös forward és allél-specifikus reverz primerekkel működik. A multiplex jellegű reakcióban a különböző allél variánsok jelenléte egy lépésben vizsgálható. Az adott törzs által hordozott allél variánsnak megfelelően különböző méretű fragmentek keletkeznek. Az A allél variáns esetén a keletkező fragment 126bp, a B allél variáns esetén pedig 217bp (16. ábra).

16. ábra: Az allél-specifikus PCR reakcióban keletkező fragmentek különböző *ptfA* allél variánst hordozó *P. multocida* törzsek esetén. A allél: P131; P418; P237, B allél: P531; P358; P329 (M - 100bp molekula marker)



Az allél-specifikus PCR reakciót 32 madár-eredetű *P. multocida* törzsön teszteltük. Tizenegy törzsről a *ptfA* gén allél típusát illetően nem voltak korábbi adataink, 21 törzs esetén pedig rendelkezünk szekvencia adatokkal (Mellékletek 13. ábra). A tesztelt törzsek

mindegyike tipizálható volt az általunk kidolgozott rendszerben. A 21 törzs a szekvencia adatok, a további 11 törzs pedig a szerológia sajátosságok alapján elvárt eredményeket mutatták. Az eredmények a különböző *ptfA* allél variánsok és a szerológiai adatok közti korábban megfigyelt összefüggést megerősítették.

6 Megbeszélés

A *P. multocida* az emlősök és a madarak széles körében elterjedt feltételesen kórokozó baktérium. Az egyes törzsek gazdafaj-specifitása, a kiváltott megbetegedések típusa és súlyossága jelentős mértékben függ mind a gazdaszervezetet, mind a baktériumtörzset jellemző tulajdonságoktól. Egy adott baktériumtörzs patogenitását különböző virulenciafaktorok határozzák meg. Ezek megléte, hiánya vagy a bennük lezajló funkcionális változások hatással vannak a gazdaszervezet - kórokozó közti kölcsönhatásokra és ezen keresztül a baktérium virulenciájára. Az utóbbi időben számos feltételezett virulenciafaktort írtak le (Hunt et al. 2000, Christensen és Bisgaard 2000, Harper et al. 2006), ám ezek megoszlása nagyszámú, különböző gazdafaj-eredetű, független törzs vizsgálata során egyértelmű összefüggéseket a virulenciafaktor – gazda - betegség kapcsolatában nem mutatott, kivétel a már korábban is felismert PMT– sertés - PAR és a B, E buroktípus – kérődzők – HS relációjában (Ewers et al. 2006, Tang et al. 2009). Az összefüggések hiányának kézenfekvő oka a vizsgálati célcsoport megválasztásának elégtelensége lehet. Hiszen a *P. multocida* feno-, és genotípusos vizsgálatai egyaránt a faj jelentős heterogenitását mutatják (Fegan et al. 1995, Davies 2004). Ez a diverzitás pedig arra utal, hogy a fajon belül számos, különböző sajátsággal rendelkező törzscsoportnak kell jelen lennie, melyek adott esetben mind patogenitásuk, mind gazdafaj-adaptációjuk és ennek megfelelően virulenciafaktoraik terén különböznek. Mindaddig, míg e törzscsoportokat nem tudjuk egymástól elkülöníteni, feno-, és genotípusos bélyegekkel jellemezni, a *P. multocida* valós virulenciafaktorai és azok szerepe rejtve marad. Épp ezért munkánkat e törzscsoportok klasszikus és modern eszközökkel való feltérképezésének szenteltük. Ennek során, mint általános jellemzőket, a törzsek fermentációs és antigenitási sajátságait vizsgáltuk. A mélyebb összefüggések tisztázására pedig, szűkebb mintaszám mellett, nagyfelbontású molekuláris eszközöket használtunk.

6.1 Az emlős gazdafajokban előforduló *P. multocida* törzsek

6.1.1 Fermentációs sajátságok

A *P. multocida* fajon belül DNS-DNS hibridizációs módszerrel (Mutters et al. 1985), valamint a dulcit-, szorbit-, (trehalóz)-fermentáció alapján (Olsen et al. 2005) 3 alfaj különíthető el. A szénhidrát-fermentációs képességek alfajok meghatározására történő alkalmazhatóságáról széles körben folyik vita (Kuhnert et al. 2000, Gerardo et al. 2001, Davies 2004). Ez és egyes molekuláris adatok (Blackall et al. 1998, Petersen et al. 2001, Davies 2004) ugyan az alfaji kategóriák, mint elkülönülő genetikai csoportok létjogosultságát

megkérdőjelezi, a kialakult megbetegedések súlyosságával való feltételezett összefüggések azonban a fent említett taxonómia kategóriák fenntartását tovább erősítik (Chen et al. 2002). E szerint a súlyosabb megbetegedések kialakításáért a *septica* alfajú törzsek felelősek. Ezzel szemben a *P. multocida*-val foglalkozó tanulmányok mindegyikét, így a saját vizsgálatainkat is 80% *P. multocida* subsp. *multocida* (dulcit -, szorbit +) és 20% *P. multocida* subsp. *septica* (dulcit -, szorbit -) arány jellemzi, jóllehet a törzsek súlyosan beteg vagy elhullott állatból származnak. Bár saját törzseink járványtani háttere nem minden esetben tisztázott, semmi nem utal arra, hogy az alfajok és a megbetegedés súlyossága közötti összefüggések valóban fennállnak. Így tehát, az alfaji kategóriák megkülönböztetése nem visz közelebb az esetleges patogenitásukban eltérő törzscsoportok körülhatárolásához; viszont jól szemlélteti, hogy elsősorban a *P. multocida* subsp. *multocida* alfajba tartozó törzsek rendelkezhetnek az alkalmazkodóképességet meghatározó tényezők széles spektrumával. A másik két alfajba tartozó törzsek gyakorisága és/vagy elterjedtsége sokkal kisebb. Jó példa erre a *P. multocida* subsp. *gallicida* alfaj, mely elsődlegesen evezőlábú madarakban, illetve az utóbbi időben egyre gyakrabban, sertésekben mutatható ki (Cameron et al. 1996). Ez utóbbi tény saját vizsgálataink is igazolták (Varga et al. 2007).

A *P. multocida* törzsek fermentációs sajátosságainak széles körű vizsgálatával jellegzetes biotípusok meghatározására van mód. Jelenleg 14, hivatalosan publikált (Fegan et al. 1995, Blackall et al. 1997, Townsend et al. 1998a) biotípus létezik (Mellékletek 5. táblázat). Az egyes cukor komponensek fermentációjában felismert eltérések azonban a még nem jellemzett biotípusok körét fokozatosan növelik (Townsend et al. 1998a). A vizsgálatainkban előforduló, nem tipizált törzsek szintén ilyen csoportok képviselői lehetnek.

A fentiek alátámasztják, hogy a *P. multocida* törzsek fenotípusos jellegeik tekintetében nagyfokú változatossággal rendelkeznek, feltehetőleg ez biztosítja számukra a széles gazdakörben való elterjedtséget. Ezt bizonyítja az is, hogy bár a sertés, nyúl és madár (ld. következő fejezet) gazdafajokban egyaránt az 1-es, 2-es és 3-as biotípust képviselő *P. multocida* subsp. *multocida* törzsek mutatkoztak a legelterjedtebbnek, bizonyos biotípusok előfordulása, illetve egyes fermentációs sajátosságok megjelenése leginkább adott gazdafajra volt jellemző. Így a csökkent indoltermelés a nyúl-eredetű (Brogden 1980), a laktóz fermentáló képesség (12-es biotípus) a sertés-eredetű (Bowles et al. 2000), az ornitindekarboxiláz termelő képesség hiánya (9-es és 13-as biotípus) viszont mindkét emlősfajból származó törzsekre egyaránt jellemző volt.

A nyúl-eredetű törzsek közt magas arányban előforduló, egységes biokémiai sajátosságokat mutató (6-os biotípus) *P. multocida* subsp. *septica* törzsek jelenléte is megerősíti a gazdafaj-specifikus törzscsoportok létezésének lehetőségét a *P. multocida* törzsek által alkotott komplexen belül.

Bár a *P. multocida* törzsek biokémiai sajátosságai, biotípusai, kisebb-nagyobb mértékben mutatják a törzsek közötti kohézió és/vagy gazdafajhoz való adaptáció jeleit, melyek az egyes gazdakörön belül folytatott vizsgálatok esetén megfontolandók, koránt sem szolgáltatottak megfelelő szintű felbontást a célkitűzéseinkben megfogalmazott tényezők vizsgálatára.

6.1.2 Antigenitási sajátosságok

A *P. multocida* patogenitásában, akárcsak más Gram-negatív baktérium esetében, nagy jelentőséget tulajdonítanak a bakteriális burok jelenlétének és típusának. A baktériumburok elvékonyodása vagy hiánya egyértelműen csökkenti a baktérium gazdaszervezetben belüli túlélését, ám a túlzott burokanyag termelés sem feltétlen előnyös sajátosság a *P. multocida* számára (Gatto et al. 2002).

A *P. multocida* törzsek 5 (A, B, D, E, F) különböző buroktípussal rendelkeznek (Carter 1952; Rimler és Rhoades 1987). Ezek közül egyértelműen a B buroktípus, valamint endemikus afrikai változata (E buroktípus) az, amihez leginkább egységes gazdakör (kérődzők) és megbetegedés (vérzéses vérfertőzés) köthető (De Alwis 1999). Az A, D és F buroktípussal rendelkező törzsek széles gazdakörben elterjedtek, és leggyakrabban felső légúti megbetegedést és tüdőgyulladást idéznek elő.

Korábban a különböző buroktípussal rendelkező törzsek előfordulását egyes gazdafajokhoz kötötték, így például az D buroktípusú törzsek a sertésekre, az F buroktípusú törzsek a pulykákra tűntek specifikusnak. Ugyanakkor vizsgálatainkban a sertésből izolált törzsek között egy F buroktípusú törzs is felbukkant. Ez arra utal, hogy ilyen jellegű éles gazdafaji határok eltűnőben vannak. Jaglic et al. (2004) megfigyelése szerint a nyulak a különböző buroktípusú törzsek (A, D, F) keveredésének elsőrendű színterévé váltak. Megerősíti ezt a feltételezést saját tapasztalatunk is: nyúl-eredetű törzseinkben mindhárom buroktípus jelentős számban volt jelen (A 63%, D 12%, F 25%). Különösen figyelemre méltó az F buroktípusú törzsek magas előfordulási aránya.

Újabb az is megfigyelhető, hogy a *P. multocida* populációban, gazdafajtól függetlenül, megindult az A buroktípusú törzsek térhódítása. Ez egyértelműen nyomon követhető volt saját vizsgálatainkban is (előfordulás: 41% sertés-eredetű, 63% nyúl-eredetű törzsek esetén). Ezért feltehetőleg az A buroktípusú törzsek, az egyéb burokkal rendelkező törzsekét akár tízszeres mértékkel is meghaladó tapadási képessége felelős, ami nagyban elősegíti a gazdaszervezet nyálkahártyáinak fokozott kolonizációját (Glorioso et al. 1982).

Az A buroktípusú törzsek gyakoriságának növekedésével csökken a buroktípus, mint a gazdafaj-adaptációra utaló bélyeg jelentősége. Pedig a különböző buroktípusok feltehetőleg, de nem bizonyítottan, a gazdafaj nyálkahártya felületeit jellemző egyedi sajátosságokhoz

mérten alakultak ki. Az A buroktípusú törzsek, úgy tűnik, a többi buroktípushoz képest jobb alkalmazkodóképességgel rendelkeznek e faji különbségek áthidalására.

6.1.3 Toxintermelés

A PMT termelése, mint virulenciatényező, nem minden *P. multocida* törzs sajátja. Ezt a korai vizsgálatok a progresszív (progrediáló) torzító orrgyulladásban szenvedő sertésekből izolált és D buroktípussal rendelkező *P. multocida* törzsek egyedi tulajdonságaként tartották számon (Pijoan et al. 1984, Pedersen és Elling 1984). Azonban az utóbbi időben a toxintermelésre képes A buroktípusú törzsek előfordulása jelentősen megnövekedett. A toxintermelő A buroktípusú törzsek mellett a D buroktípusú törzsek aránya csak 8% volt a saját sertés-eredetű törzsek között (Varga et al. 2007). Emellett a toxikus, elsősorban A buroktípussal rendelkező törzsek a nem specifikus, vagy éppen a torzító orrgyuladáshoz hasonló tünetekkel járó megbetegedésekben szenvedő nyulakban és kiskérődzőkben is megjelentek (DiGiacomo et al. 1993, Krametter et al. 2004). Bár az ilyen jellegű megbetegedések ritkább észlelése és esetünkben a toxikus törzsek kis száma (2/76) arra utal, hogy nyulakban e törzsek toxintermelő képessége nem jelent egyértelmű előnyt a kórokozó számára, de talán éppen ezért megjelenése ebben a gazdában is további vizsgálatokra érdemes tény (Sellyei et al. 2008).

E típusváltás valószínűsíthető oka az A buroktípussal rendelkező és ezáltal gazdaszervezet kolonizálásában előnyös helyzetben lévő törzsek térhódítása, melyek patogenitását tovább fokozta a D buroktípusú törzsektől horizontális géntranszporttal felvett idegen eredetű, feltehetőleg más *Enterobacteriaceae*-be tartozó baktériumoktól származó (Lax et al. 1990), a toxintermelést meghatározó gén.

A toxintermelő képesség A buroktípusú törzsekbe való felvételével, e sajátosság számára, megteremtődött a gazdafaji határok átlépésének lehetősége. A toxintermelés, mint a sertés-eredetű *P. multocida* törzsek egyedi jellemzője, csak abban az esetben maradhat továbbra is használható bélyeg az egyes törzscsoportok elkülönítésében, ha a PMT az egyéb gazdafajokban nem jut hatékony szerephez valamely betegség kialakításában.

6.2 A baromfi-gazdafajokban előforduló *P. multocida* törzsek

A *P. multocida* törzsek diverzitásának, körülhatárolt gazdakörön belüli, párhuzamos vizsgálatára a különböző baromfifajokból származó törzsek tanulmányozása teremtette meg számunkra a lehetőséget. A hat különböző baromfi-gazdafajból származó, azonos időszakon belül gyűjtött törzsek aránya megfeleltethető az adott gazdafaj-populációk érintettségének.

6.2.1 Fermentációs sajátosságok

A *P. multocida* alfajok megoszlása a különböző baromfi-gazdafajokban, akár az emlősökből származó törzsek esetében, egyezett az irodalmi adatokkal. Kivételt csak a házilúd-eredetű törzsek jelentettek, ahol a *P. multocida* subsp. *multocida* és *P. multocida* subsp. *septica* előfordulási aránya közel azonosnak mutatkozott. Ez az adat viszont összhangba hozható azzal a megfigyelésünkkel, hogy a háziludakban a súlyos baromfikolerás és az enyhébb lefolyású pasteurellosisos megbetegedések aránya egyensúlyban van. Továbbá, hogy a pulykákban, ahol a *P. multocida* subsp. *multocida* dominál, csaknem mindig pasteurellosisos megbetegedések fordulnak elő. E tények az irodalomban megfogalmazott alfaj és megbetegedés közötti összefüggés-elmélettel is összeegyeztethetők. Ezzel szemben a házikacsákban (65%-os *P. multocida* subsp. *multocida* arány mellett is) gyakorlatilag szinte mindig baromfikolerás megbetegedések tapasztalhatók. Ez a látszólagos ellentmondás felhívja a figyelmet arra, hogy az adott *P. multocida* törzs patogenitásának megítélésénél lényeges, hogy azt mely gazdafajra vonatkoztatjuk. Figyelemre méltó tény, hogy a *P. multocida* subsp. *septica* törzsek elsősorban szabad tartású baromfiban (házilúd, házikacsa) fordultak elő.

A baromfi-gazdafajokból származó *P. multocida* törzsek fenotípusos heterogenitásuk tekintetében sem maradtak el az emlős-eredetű törzsektől. Kivételt a házikacsa-eredetű törzsek jelentettek, amelyek nagymértékben egységesnek bizonyultak. Ezek többsége, az irodalmi adatokkal ellentétben (Fegan et al. 1995), az 1-es biotípusba volt sorolható.

Bár, mind az emlős, mind a madár-eredetű *P. multocida* törzsek változatos fermentációs képességekkel rendelkeznek, az egyes gazdafajokból származó törzsek vagy dominánsan a 3-as (és kisebb mértékben 2-es) biotípusba (ld. házilúd, pulyka), vagy az 1-es és 6-os biotípusba (ld. házikacsa, nyúl) tartoztak. Úgy tűnik, hogy az egyes gazdafajok nyálkahártya környezete bizonyos biotípusok elszaporodásának jobban kedvez. Érdekes, hogy a vizsgálatainkba bevont 6-os biotípusú törzsek, függetlenül attól, hogy madárból vagy nyúlból származtak, egyaránt egy nem klasszikus *P. multocida* subsp. *septica* alfajt képviseltek (xilóz negatív), ami a típus endemikus akkumulálódására utal.

E tények megerősítik, hogy a feltételezett törzscsoportok kisebb-nagyobb mértékű gazdafaj-adaptációval rendelkezhetnek.

6.2.2 Antigenitási sajátosságok

A baromfi-eredetű *P. multocida* törzsek buroktípus megoszlása, ellentétben az egyéb fenotípusos tényezőket jellemző változatossággal, egységes képet mutatott. A törzsekre, az emlős-eredetű törzseket meghaladó mértékben, az A buroktípus túlsúlya (93,5%) volt jellemző, jelezve a baromfi-eredetű törzsek, e sajátóságra nézve mutatott, homogenitását. Így

a törzsek közt fennálló antigenitási különbségeket csak a szomatikus antigének megoszlásával lehetett jellemezni.

A fennmaradó törzsek F buroktípusúak és az irodalmi adatoknak megfelelően, elsősorban pulyka-eredetűek voltak, de a pézsmaréce-eredetű törzsek egyike is ezzel a buroktípussal rendelkezett. Az F buroktípus más gazdafajokban (nyúl, sertés, pézsmaréce) való megjelenése figyelemre méltó tény, hisz e buroktípus A buroktípussal való nagyfokú hasonlatossága újabb, esetleg erősen invazív típus elszaporodásának lehet előjele. Ennek lehetősége nagymértékben megnövelheti az F buroktípusú törzsek jelentőségét a *P. multocida* patogenezisében.

A *P. multocida* fajon belül 16 (1-16) különböző, a sejtfal O antigénjei által meghatározott szomatikus szerotípus különíthető el (Heddleston 1972). A szomatikus szerotípusok egymással és az 5 féle buroktípussal szabadon kombinálódhatnak. A két tulajdonság együttesen határozza meg a törzsek szerotípusát.

A baromfi-eredetű törzseknél előforduló hétféle szerotípus (A:1; A:3; A:3,5; A:4,5; F:1; F:4,5,[7]; F:10) közül az A:1 és az A:3 bizonyult a leggyakoribbnak (Shivachandra et al. 2006). A két domináns szerotípus megoszlása a három nagyobb mintaszámú csoportban (házikacsa, házilúd, pulyka) összeegyeztethető volt a fent említett megbetegedési arányokkal. Így a házikacsa-eredetű törzsek mind A:1 szerotípussal, a házilúd-eredetű törzsek közel egyenlő arányban A:1 és A:3 szerotípussal, míg a pulyka-eredetű törzsek döntően A:3 szerotípussal rendelkeztek. Az egyéb szerotípussal szinte kizárólag pulykákban fordultak elő (Rimler és Rhoades 1987).

E megfigyelések rávilágítanak arra, hogy a szerológia sajátságok, az A:1 és az A:3 szerotípusú törzsek tekintetében összefüggést mutatnak a különböző baromfi-gazdafajokban a megbetegedések súlyosságával. Ahol az A:1 szerotípusú törzsek egyértelműen elhatárolható fokozottan virulens és nem feltételesen kórokozó sajátságú törzscsoport(ok)at alkotnak.

A többi típus, feltételezésünk szerint, a kevésbé vagy nem patogén típusok változatos, de a fertőzött állatokban háttérbe szorult bázisát képviseli.

6.2.3 Antibiotikum-rezisztencia

A *P. multocida* törzsek fennmaradását, sokszor a kontrollált állományokon belül is, saját virulencia készletükön túl jelentős mértékben befolyásolja a különböző antibiotikum-rezisztenciáért felelős mechanizmusok jelenléte. Mivel a *P. multocida* törzsek eredendően a legtöbb kereskedelmi forgalomban lévő antibiotikummal szemben érzékenyek, ezekért a mechanizmusokért minden esetben idegen eredetű tényezők tehetők felelőssé, amelyekre a közös gazda bakteriális környezetéből tesznek szert (Kehrenber és Schwarz 2005c). A

törzsek antibiotikum-rezisztenciáért felelős mechanizmusok felvételére való hajlandósága utalhat az egyes törzscsoportok genetikai változásokra való fogékonyságában fennálló különbségekre is.

Ennek mértékét szemlélteti, hogy a megvizsgált baromfi-eredetű törzsek 54%-a rendelkezett valamilyen antibiotikum-rezisztenciával. Sőt e törzsek többsége (93%) 2-8 antibiotikummal szemben volt rezisztens. Elsősorban, összhangban az irodalmi adatokkal (Jonas et al. 2001; Shivachandra et al. 2004), a klasszikus nalidixsav (93 - 100%) és szulfonamid származékokkal (46 - 61%) szembeni rezisztencia volt leggyakrabban kimutatható, mivel ezek a legelterjedtebben és legrégebben használt szerek. De figyelemre méltó a neomicin vagy a tetraciklinrezisztencia is (29 - 32%). Alacsony számban lehetett kimutatni doxiciklin, penicillin (7%) valamint enrofloxacin- és florfenikolrezisztenciát (3,5%) is. A különböző antibiotikum-rezisztenciák az időben előrehaladva, a vártnak megfelelően, a halmozódás jeleit mutatták. Megoszlásuk, a három nagyobb gazdafaji csoportban, a fertőzési gyakoriságokkal volt összevethető. Míg a pulyka-eredetű törzsek csak 13%-a, a házilúdból izolált törzsek 41%-a volt rezisztens, addig a házikacsából származó törzsek egyöntetűen rezisztensek voltak. A 33 rezisztens törzs 82%-a az A:1 szerotípusba tartozott, csupán 6 törzs esett más antigenitású csoportba. Ez utóbbi törzsekben a rezisztenciák száma is alacsonyabb volt (1-4).

6.2.4 A törzsek rokonsági viszonyai

A változatos fenotípusos sajátságokat mutató baromfi-eredetű törzsek egymással, illetve a gazdafajokkal kapcsolatos összefüggéseinek mélyebb feltárása érdekében különböző DNS szintű vizsgálatokat végeztünk el.

A teljes genomok vizsgálata ERIC-PCR módszerrel az egyes törzsek egymás közötti rokonsági viszonyainak feltérképezésére volt hivatott (Versalovic et al. 1991). Az ERIC-PCR által létrehozott ujjenyomat-mintázatok csoportátlagot felhasználó, távolság-optimalizáló módszer (UPGMA) és a megfelelő számítógépes program használatával hasonlósági indexen alapuló fenogramot generál.

A fenogram, 75%-os hasonlósági index mellett, a különböző gazdafaj-eredetű törzscsoportok elkülönülését jelezte (Mellékletek 6. és 13. ábra), ellentétben mások korábbi megfigyeléseivel (Shivachandra et al. 2008). Négy nagy klasztert lehetett körülhatárolni (I, II, III, IV). Melynek értelmében a pézsmaréce-eredetű törzsek (I) egyértelműen elváltak (66%-os hasonlósági index) az egyéb récefélékből (házikacsa, házilúd – III klaszter), sőt a tyúkalkatúakból (házityúk, fácán, pulyka – II és IV klaszter) származó törzsektől is. Az egyes csoportokon belül még kisebb-nagyobb mértékben földrajzi megosztottság is azonosítható volt (8. ábra). A tyúkalkatú madaraktól származó törzseket magukba foglaló két klasztert (II,

IV) a Dunától keletre és nyugatra eső országrész, egymástól független területeit fedte le. Míg a házikacsa- és házilúd-eredetű törzseket magában foglaló klasztert alkotó subklaszterek (III/1, 2, 3, 4a, 4b) a Tisza felső- és középső folyása, valamint a Duna-Tisza köze mentén oszlottak meg, nagyrészt elhatárolódó területeken. A III klaszter alcsoportjai részben gazdafaji (III/1, 4b – házikacsa; III/2, 3, 4a - házilúd), részben földrajzi megosztottságot mutattak. Ez alól csak a két, dominánsan házikacsa-eredetű törzseket tartalmazó, alcsoport (III/1, 4b) volt kivétel, mely területileg (Duna-Tisza köze) átfedett. Ez az adott területen jelen lévő több, gazdafaji egyezést mutató törzscsoport létezésének lehetőségét veti fel.

A vizsgálat eredményei igazolták, hogy egyes törzsek, illetve törzscsoportok adott gazdafajokat részesítenek előnyben a fertőzés során, bár ez nem kizárólagos.

A fenogrammon körülhatárolt klaszterek, elsősorban a récefélékből származó törzsek esetén, a már korábban is megfigyelt A:1 és A:3 szerotípusú törzsek, néha gazdafaj független kohézióját mutatta.

6.2.5 Génvizsgálatok

Az ERIC-PCR-el kialakított csoportok lehetséges gazdafaj-adaptációs sajátosságainak további vizsgálatára a bakteriális sejt felszínén elhelyezkedő, és így a gazdaszervezettel közvetlenül érintkező és a környezeti hatásoknak kitett fehérje komponenseket választottunk. Az öt különböző fehérjét kódoló gént, az A burok-specifikus, három külső membrán (Oma87, OmpA, OmpH) és a 4-es típusú fimbria kisaegység, PCR-RFLP vizsgálatnak vetettük alá. Az adott megközelítésben az A burok-specifikus és az Oma87 fehérjét kódoló génszakasz alapján a törzsek egységesnek mutatkoztak, az OmpA és a 4-es típusú fimbria kisaegység fehérjéjét és a *hofB* génterméket kódoló génszakasz esetében is csak a pézsmaréce-eredetű törzs különült el a többitől. Jelezve, a már az ERIC-PCR vizsgálat eredményéből kitűnő tény, hogy ezek a törzsek jelentősen különböznek az egyéb baromfifajokból izolált törzsektől, bár ezt a korábban megvizsgált fenotípusos jelegek nem mutatták.

Domináns különbségek az *ompH* génszakasz vizsgálatakor mutatkoztak meg. Öt különböző hasítási típust (I., II., III., IV., VI.) sikerült azonosítanunk, melyek a törzsek antigenitási sajátosságaival, elsősorban a különböző szomatikus szerotípusokkal mutattak összefüggést. Ezek az eredmények megerősítették Luo et al. (1999) megfigyelését, mely szerint az egyes szomatikus szerotípusok az *ompH* génjében, főként a fehérje sejt felszíni 2 és 5 hurkot kódoló régiójában, jellegzetes különbségek vannak. A kapott hasítási mintázatok azonban nem voltak a törzseinket jellemző szerotípusokkal minden esetben egyértelműen azonosíthatók, mint azt Jabbari et al. (2005) vagy Antony et al. (2007) saját munkáik során találták. Az azonban egyértelműen kitűnt az eredményeinkből, hogy az A:1 szerotípusú

törzsek egy meghatározott hasítási mintázattal rendelkeznek. Megerősítve az ebbe a típusba tartozó törzsek összetartozását és homogenitását.

A 4-es típusú fimbria kisalegységét kódoló *ptfA* génszakaszt érintő szekvenálási vizsgálatok két, a gén 3' végi régiójában egyértelműen elkülönülő allélváltozat létezését jelezték (15. ábra). Az irodalomban leírt és a génbankban megtalálható, a *ptfA* génre vonatkozó csekély adat tanulmányozása (Doughty et al. 2000, Siju et al. 2007) során azt a következtetést vontuk le, hogy a gén két változatát kimutatták ugyan, a két variáns egy *P. multocida* populációban végzett párhuzamos vizsgálatára, és ezáltal a köztük lévő különbségek jelentőségére utaló adat nem áll rendelkezésre. A két változat szekvenciális eltérései megengedték számunkra, hogy az egyes típusok (A és B allél) elkülönítésére allél-specifikus PCR reakciót dolgozzunk ki (Sellyei et al. 2010). A módszer minden megvizsgált törzs esetében működött. A vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy - a korábban már több egyéb tényező vizsgálata során is kirívóan egységes - A:1 szerotípusú törzsek rendelkeznek a gén A allél típusával, míg az egyéb törzsek a gén B allél változatát hordozzák.

Ez a megfigyelés, úgy véljük, végképp alátámasztja az A:1 törzsek egységes és elkülönülő genetikai vonalba való tartozását.

Ezen egyedi 4-es típusú fimbria kisalegység jelenléte az A:1 típusú törzsekben felveti annak lehetőségét, hogy talán éppen PtfA fehérjében bekövetkező változás tehető felelőssé a baktérium és a gazdaszervezet közti megváltozott sejtadhéziós folyamatokért, melyek biztosítják az e típusúhoz tartozó törzsek fokozódó térhódítását.

7 Új tudományos eredmények

Munkánk új tudományos eredményeiként:

- a, - összefüggéseket tudtunk kimutatni a *P. multocida* törzsek egyes fenotípusos sajátságai, mint az indoltermelés, vagy az ornitin-dekarboxiláz enzim hiánya és a laktóz-fermentáció képessége, és gazdafaji eredetük között
- b, - ERIC-PCR módszerével *P. multocida* törzsek közt, mind gazdafaj-adaptációs, mind földrajzi eredet tekintetében, elkülönülő törzscsoportot sikerült azonosítanunk
- c, - az *ompH* gén PCR-RFLP vizsgálataival a hagyományos szerológiai vizsgálatok eredményeit kiegészítő, a törzsek jellemzésére alkalmas rendszert hoztunk létre
- d, - mind az ERIC-PCR, mind az *omaA* és *hofB* (*ptfA* génszakasz) gének PCR-RFLP vizsgálataival kimutattuk a pézsmaréce-eredetű törzsek elkülönülését az egyéb baromfi-eredetű törzsektől
- e, - szekvenciálisan jellemeztük a *ptfA* gén (4-es típusú fimbria kisalegység) két allélvariánsát a magyarországi baromfi-eredetű *P. multocida* populáción belül
- f, - a *ptfA* gén 3' végi régiójában mutatkozó szekvenciális különbségek felhasználásával, az allélvariánsok (A és B allél) gyors és egyszerű felismerésére alkalmas allél-specifikus PCR reakciót dolgoztunk ki
- g, - a fent említett módszerek segítségével elkülönítettük és jellemeztük a *P. multocida* törzseken belül az A:1 törzseket magában foglaló, feltehetőleg fokozottan virulens törzscsoportot

8 Irodalom

- Aalbaek, B., Eriksen, L., Rimler, R.B., Leifsson, P.S., Basse, A., Christiansen, T., Eriksen, E.: Typing of *Pasteurella multocida* from haemorrhagic septicaemia in Danish fallow deer (*Dama dama*), *APMIS*. 107. 913-920, 1999.
- Al-Haddawi, M.H., Jasni, S., Son, R., Mutalib, A.R., Bahaman, A.R., Zamri-Saad, M., Sheikh-Omar, A.R.: Molecular characterization of *Pasteurella multocida* isolates from rabbits, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 45(6). 269-275, 1999.
- Ali, H.A., Sawada, T., Noda, K.: Protectivity of an immunoaffinity-purified 39kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* in mice, *J.Vet. Med. Sci.*, 66. 1603-1604, 2004.
- Antony, P .X., Nair, G. K., Jayaprakasan, V., Mini, M., Aravindakshan, T.V.: Nucleic acid based differentiation of *Pasteurella multocida* serotypes, *Internet J. Vet. Med.*, 2(2). 2007.
- Blackall, P.J., Fegan, N., Chew, G.T.I., Hampson, D.J.: Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia, *Microbiology*, 144. 279-289, 1998.
- Blackall, P.J., Pahoff, J.L., Bowles, R.: Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs, *Vet. Microbiol.*, 57(4). 355-360, 1997.
- Blackall, P.J., Pahoff, J.L., Marks D., Fegan N., Morrow C.J.: Characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from fowl cholera outbreaks on turkey farms, *Aust. Vet. J.*, 72(4). 135-138, 1995.
- Blehert, D.S., Jefferson, K.L., Heisey, D.M., Samuel, M.D., Berlowski, B.M., Shadduck, D.J.: Using amplified fragment length polymorphism analysis to differentiate isolates of *Pasteurella multocida* serotype 1, *J. Wildl. Dis.*, 44(2). 209-225, 2008.
- Bosch, M., Garrido, M.E., Campoy, S., Llagostera, M., Pérez de Rozas, A.M., Badiola, I., Barbé, J.: Characterization of the *Pasteurella multocida hgbA* gene encoding a hemoglobin-binding protein, *Infect. Immun.*, 70(11). 5955-5964, 2002.
- Boyce, J. D., Chung, J.Y. , Adler, B.: Genetic organisation of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* B:2, *Vet. Microbiol.*, 72. 121-134, 2000.
- Bowles, R.E., Pahoff, J.L., Smith, B.N., Blackall, P.J.: Ribotype diversity of porcine *Pasteurella multocida* from Australia, *Aust. Vet. J.*, 78(9). 630-635, 2000.
- Brogden, K.A.: Physiological and serological characteristics of 48 *Pasteurella multocida* cultures from rabbits, *J. Clin. Microbiol.*, 11(6). 646-649, 1980.
- Brickell, S.K., Thomas, L.M., Long, K.A., Panaccio, M., Widders, P.R.: Development of a PCR test based on a gene region associated with the pathogenicity of *Pasteurella*

- multocida* serotype B:2 the causal agent of haemorrhagic septicaemia in Asia, *Vet. Microbiol.*, 59. 295-307, 1998.
- Burill, T.J.: New species of *Micrococcus* (bacteria), *Am. Nat.*, 17. 319-320, 1883.
- Cameron, R.D., O'Boyle, D., Frost, A.J., Gordon, A.N., Fegan, N.: An outbreak of haemorrhagic septicaemia associated with *Pasteurella multocida* subsp. *gallicida* in large pig herd, *Aust. Vet. J.*, 73(1). 27-29, 1996.
- Capitini, C.M., Herrero, I.A., Patel, R., Ishitani, M.B.: Wound infection with *Neisseria waeveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite, *Clin. Infect. Dis.*, 34. 74-76, 2002.
- Cardenas, M., Barbé, J., Llagostera, M., Miró, E., Navarro, F., Mirelis, B., Prats, G., Badiola, I.: Quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Pasteurella multocida* strains with different levels of nalidixic acid resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45. 990-991, 2001.
- Carter, G.R., Chengappa, M.M.: Hyaluronidase production by type B *Pasteurella multocida* from cases of hemorrhagic septicemia, *J. Clin. Microbiol.*, 11(1). 94-96, 1980.
- Carter, G.R.: A haemagglutination test for identification of serological types, *Am. J. Vet. Res.*, 16. 481-484, 1955.
- Carter, G.R.: Type specific capsular antigens of *Pasteurella multocida*, *Can. J. Med. Sci.*, 30. 48-53, 1952.
- Chalus-Dancla, E., Lesage-Decausés, M.C., Leroy-Sétrin, S., Martel, J.L., Coudert, P., Lafont, J.P.: Validation of random amplified polymorphic DNA assays by ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella* from animals, *Vet. Microbiol.*, 52(1-2). 91-102, 1996.
- Chalus-Dancla, E., Lesage-Descauses, M.C., Leroy-Sétrin, S., Martel, J.L., Lafont, J.P.: Tetracycline resistance determinant, TetB and TetM, detected in *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* from bovine herds, *Antimicrob. Chemother.*, 36. 815-819, 1995.
- Chen, H.I., Hulten, K., Clarridge, J.E.: Taxonomic subgroups of *Pasteurella multocida* correlate with clinical presentation, *J. Clin. Microbiol.*, 40(9). 3438-3441, 2002.
- Christensen, H., Bisgaard, M.: Fowl cholera, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 19. 626-637, 2000.
- Chung, J. Y., Wilkie, I., Boyce, J.D., Adler, B.: Vaccination against fowl cholera with acapsular *Pasteurella multocida* A:1, *Vaccine*, 23. 2751-2755, 2005.
- Chung, J. Y., Zhang, Y.M., Adler, B.: The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A-1, *FEMS Microbiol. Lett.*, 166. 289-296, 1998.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, M31-A3 , 2008.
- Corney, B.G., Diallo, I.S., Wright, L.L., Hewitson, G. R., DeJong, A.J., Burrell, P.C., Duffy, P.F., Stephens, C.P., Rodwell, B.J., O'Boyle, D.B., Blackall, P.J.: *Pasteurella multocida* detection by 5'Taq nuclease assay: A new tool for use in diagnosing fowl cholera, J. Microbiol. Methods, 69. 376-80, 2007.
- Coté, S., Harel, J., Higgins, R., Jacques, M.: Resistance to antimicrobial agents and prevalence of R-plasmids in *Pasteurella multocida* from swine, Am. J. Vet. Res., 52. 1653-1657, 1991.
- Cox, A.J., Hunt, M.L., Boyce, J.D., Adler, B.: Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*, Microb. Pathog., 34. 287-296, 2003.
- Cox, A.J., Hunt, M.L., Ruffolo, C.G., Adler, B.: Cloning and characterisation of the *Pasteurella multocida* *ahpA* gene responsible for a haemolytic phenotype in *Escherichia coli*, Vet. Microbiol., 72. 135-152, 2000.
- Dabo, S.M., Confer, R.A., Quijano-Blas, R.A.: Molecular and immunological characterization of Pm serotype A:3 OmpA:evidence of its in *Pasteurella multocida* interaction with extracellular matrix molecules, Microbial. Pathog., 35. 147-157, 2003.
- Davies, R.L.: Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene, Microbiology., 150(12). 4199-4210, 2004.
- De Alwis, M.C.L.: Haemorrhagic septicaemia, Canberra, A.C.T. : Australian Centre for International Agricultural Research, 1999.
- De Alwis, M.C.L.: Haemorrhagic septicaemia. A general review, Nr. Vet. J., 148. 99-112, 1992.
- De Jong, M.F.: Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. In: *Diseases of swine*. Szerk.: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1999. p. 355-384.
- De Long, D., Manning, P.J.: Bacterial diseases. In: *The biology of laboratory rabbit*. Szerk.: Manning, P.J., Ringler, D.H., Newcomer, C.E. San Diego: Academic Press, 1994. p. 129-170.
- DiGiacomo, R.F., Deeb, B.J., Brodie, S.J., Zimmerman, T.E., Veltkamp, E.R., Chrisp, C.E.: Toxin production by *Pasteurella multocida* isolated from rabbits with atrophic rhinitis, Am. J. Vet. Res., 54.1280-1286, 1993.
- DiGiacomo, R. F., Jones, C. D., Wathes CM. : Transmission of *Pasteurella multocida* in rabbits, Lab. Anim. Sci., 37. 621-623. 1987.

- Doughty, S.W., Ruffolo, C.G., Adler, B.: The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*, Vet. Microbiol., 72. 79-90, 2000.
- Dziva, F., Muhairwa, A.P., Bisgaard, M., Christensen, H.: Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*, Vet. Microbiol., 128. 1-22, 2008.
- Dziva, F., Christensen, H., van Leengoed, L.A., Mohan, K., Olsen, J.E.: Differentiation of *Pasteurella multocida* isolates from cases of atrophic rhinitis in pigs from Zimbabwe by RAPD and ribotyping, Vet Microbiol.; 102(1-2). 117-122, 2004.
- El Tayeb, A.B., Morishita, T.Y., Angrick, E.J.: Evaluation of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits by capsular typing, somatic serotyping, and restriction endonuclease analysis, J. Vet. Diagn. Invest., 16(2). 121-125, 2004.
- Ewers, C., Lubke-Becker, A., Bethe, A., Kiabing, S., Filter, M., Wieler, L.H.: Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status, Vet. Microbiol., 114(3-4). 304-317, 2006.
- Frank, G.H.: Pasteurellosis of cattle. In: *Pasteurella and Pasteurellosis*. Szerk.: Adlam, C., Rutter, J.M. London: Academic Press, 1989. p. 197-222.
- Fegan, N., Blackall, P.J., Pahoff, J.L.: Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry, Vet. Microbiol., 47(3-4). 281-286, 1995.
- Fuller, T.E., Kennedy, M.J., Lowery, D.E.: Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis, Microb. Pathog., 29. 25-38, 2000.
- Garrido, M.E., Bosch, M., Medina, R., Llagostera, M., Pérez de Rozas, A.M., Badiola, I., Barbé, J.: The high-affinity zinc-uptake system *znuABC* is under control of the iron-uptake regulator (*fur*) gene in the animal pathogen *Pasteurella multocida*, FEMS Microbiol. Lett., 221. 31-37, 2003.
- Gatto, N.T., Dabo, S.M., Hancock, R.E., Confer, A.W.: Characterization of, and immune responses of mice to, the purified OmpA-equivalent outer membrane protein of Pm serotype A:3 (Omp28), Vet. Microbiol., 87. 221-235, 2002.
- Gautam, R., Kumar, A.A., Singh, V.P., Dutta, T.K., Shivachandra, S.B.: Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup-A isolates by PCR assay, Res. Vet. Sci., 76. 179-185, 2004.
- Gerardo, S.H., Citron, D.M., Claros, M.C., Fernandez, H.T., Goldstein, E.J.C.: *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *P. multocida* subsp. *septica* differentiation by PCR fingerprinting and α -glucosidase activity, J. Clin. Microbiol., 39. 2558-2564, 2001.
- Glávits R., Magyar T.: The pathology of experimental respiratory infection with *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in rabbits, Acta Vet. Hung., 38. 211-215. 1990.

- Glorioso, J.C., Jones, G.W., Rush, H.G., Pentler, L.J., Darif, C.A., Coward, J.E.: Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract insertions, *Infect. Immun.*, 35. 1103-1109, 1982.
- Gunawardana, G.A., Townsend, K.M., Frost, A.J.: Molecular characterisation of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE, *Vet. Microbiol.*, 72. 97-109, 2000.
- Hansen, L.M., Blanchard, P.C., Hirsh, D.C.: Distribution of *tet(H)* among *Pasteurella* isolates from the United States and Canada, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40(6). 1558-1560, 1996.
- Harel, J., Coté, S., Jacques, M.: Restriction endonuclease analysis of porcine *Pasteurella multocida* isolates from Quebec, *Can. J. Vet. Res.*, 54(4). 422-426, 1990.
- Harper, M., Adler, B.: *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur, *FEMS Microbiol. Lett.*, 265. 1-10, 2006.
- Harper, M., Cox, A.D., St Michael, F., Wilkie, I.W., Boyce, J.D., Adler, B.: A heptosyltransferase mutant of *Pasteurella multocida* produced a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence, *Infect. Immun.*, 72. 3436-3443, 2004.
- Heddleston, K.L.: Physiologic characteristics of 1268 cultures of *Pasteurella multocida*, *Am. J. Vet. Res.*, 37. 745-747, 1976.
- Heddleston, K.L., Gallagher, J.E., Rebers, P.A.: Fowl cholera: Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species, *Avian Dis.*, 16. 925-936, 1972.
- Heddleston, K.L., Watko, L.P., Rebers, P.A.: Dissociation of a fowl cholera strains of *Pasteurella multocida*, *Avian Dis.*, 8. 649-657, 1964.
- Hirsh, D.C., Martin, D.L., Rhoades, K.R.: Resistance plasmids of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys, *Am. J. Vet. Res.*, 46. 1490-1493, 1985.
- Hudson, J. R.: Typing of strains of *Pasteurella septica* and a note on a living attenuated vaccine, *Bull. Internat. Epiz.*, 42. 267-277, 1954.
- Hunt, M.L., Cox, A.J., Ruffolo, C.G., Rajakumar, K., Adler, B.: Characterisation of a *Pasteurella multocida* esterase gene which confers a hemolytic phenotype in *Escherichia coli* under anaerobic condition, *FEMS Microbiol. Lett.*, 192. 249-256, 2000.
- Jabbari, A.R., Esmaelizadeh, M.: Molecular typing of avian *Pasteurella multocida* isolates by PCR-RFLP of *ompH* gene, *Iranian J. Biotech.*, 3(2). 99-103, 2005.
- Jaglic, Z., Kucerova Z., Nedbalcova K., Hlozek P., Bartos M.: Identification of *Pasteurella multocida* serogroup F isolates in rabbits, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.*, 51. 467-469, 2004.

- Jonas, M., Morishita, T.Y., Angrick, E.J., Jahia, J.: Characterization of nine *Pasteurella multocida* isolates from avian cholera outbreaks in Indonesia, *Avian Dis.*, 45(1). 34-42, 2001.
- Kuhnert, P., Boerlin, P., Emler, S., Krawinkler, M., Frey, J.: Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subsp. *septica* by 16S rRNA gene sequencing, *Int. J. Med. Microbiol.*, 290(7). 599-604, 2000.
- Kasten, R.W., Carpenter, T.E., Snipes, K.P., Hirsh, D.C.: Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in turkey flocks by use of the polymerase chain reaction, *Avian Dis.*, 41. 676-682, 1997.
- Kehrenberg, C., Catry, B., Haesebrouck, F., de Kruif, A., Schwarz, S.: Novel spectinomycin/streptomycin resistance gene, *aadA14*, from *Pasteurella multocida*, *Antimicrob. Agents And Chemother.*, 49. 3046-3049, 2005a.
- Kehrenberg, C., Schwarz, S.: *dfrA20*, a novel trimetroprim resistance gene from *Pasteurella multocida*, *Antimicrob. Agents And Chemother.*, 49. 414-417, 2005b.
- Kehrenberg, C., Schwarz, S.: Plasmid-borne florfenicol resistance in *Pasteurella multocida*, *J. Antimicrob. Chemother.*, 55. 773-775, 2005c.
- Kehrenberg, C.: Molecular basis of tetracycline resistance among isolates of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*: identification of novel plasmids and transposons, Ph.D.Thesis, Hannover School of Veterinary Medicine, 2000, p.1-265.
- Krametter, R., Hassan, J., Mayrhofer, E., Baumgartner, W.: Atrophic rhinitis in sheep in Austria, *Vet Rec.*, 154.147-148, 2004.
- Lax, A.J., Chanter, N., Pullinger, G.D., Higgins, T., Staddon, J.M., Rozengurt, E.: Sequence analysis of the potent mitogenic toxin of *Pasteurella multocida*, *FEBS* 277. 59-64, 1990.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Austin, F.W.: Specific PCR identification of *Pasteurella multocida* based on putative transcriptional regulator genes, *J. Microbiol. Methods*, 58. 263-267, 2004.
- Lizarazo, Y.A., Ferri, E.F., de la Fuente, A.J., Martin, C.B.: Evaluation of changes in antimicrobial susceptibility patterns of *Pasteurella multocida* subsp *multocida* isolates from pigs in Spain in 1987-1988 and 2003-2004, *Am. J. Vet. Res.*, 67(4). 663-668, 2006.
- Luo, Y., Zeng, Q., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Cheng, I-H. N., Wang, C.: Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge, *Vaccine*, 17. 821-831, 1999.

- Miflin, J.K., Blackall, P.J.: Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*, Lett. Appl. Microbiol., 33. 216-21, 2001.
- Mizan, S., Henk, A., Stalling, A., Maier, M., Lee, M.D.: Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*, J. Bacteriol., 182. 6874-6883, 2000.
- Moreno, A.M., Baccaro, M.R., Ferreira, A.J., Pestana De Castro, A.F.: Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolates from pigs, J. Clin. Microbiol., 41(4). 1743-1746, 2003.
- Muhairwa, A.P., Christensen, J.P., Bisgaard, M.: Relationships among *Pasteurellaceae* isolated from free ranging chickens and their animal contacts as determined by quantitative phenotyping, ribotyping and REA-typing, Vet. Microbiol., 78(2). 119-137, 2001.
- Murti, P.S.R.C.: Studies on fowl cholera. I. Biochemical investigations of *Pasteurella multocida*, Acta Vet. Acad. Sci. Hung., 21. 313-317, 1971.
- Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W., Mannheim, W.: Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*, Int. J. Syst. Bacteriol., 35. 309-322, 1985.
- Namioka, S., Murata M.: Serological studies on *Pasteurella multocida*. I: A simplified method for capsular typing of the organisms, II: Characteristics of the somatic 'O' antigen of the organism. III: 'O' antigen analysis of cultures isolated from various animals, Cornell Vet., 51. 498-528, 1961.
- Nanjiani, I.A., McKelvie, J., Benchaoui, H.A., Godinho, K.S., Sherington, J., Sunderland, S.J., Weatherley, A.J., Rowan, T.G.: Evaluation of the therapeutic activity of tulathromycin against swine respiratory disease on farms in Europe, Vet Ther., 6(2). 203-213, 2005.
- Ogunnariwo, J.A., Schryvers, A.B.: Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*, J. Bacteriol., 183(3). 890-896, 2001.
- Olsen I., Dewhirst F.E., Paster B.J., Busse H.J.: Family *Pasteurellaceae*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Szerk.: Garrity G.M., New York: Springer, 2005. p.851-866.
- Pedersen, K.B., Elling, F.: The pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs induced by toxigenic *Pasteurella multocida*, J. Comp. Pathol., 94. 203-214, 1984.
- Petersen, K.D., Christensen, H., Bisgaard, M., Olsen, J.E.: Genetic diversity of *Pasteurella multocida* fowl cholera isolates as demonstrated by ribotyping and 16S rRNA and partial *atpD* sequence comparisons, Microbiology, 147(10). 2739-48, 2001.

- Petersen, S.K.: The complete nucleotide sequence of the *Pasteurella multocida* gene and evidence for a transcriptional repressor, TxaR, Mol. Microbiol., 4. 821-830, 1990.
- Philippon, A., Joly, B., Reynauld, D., Paul, G., Martel, J.L., Sirot, D., Cluzel, R., Nevot, P.: Characterization of a beta-lactamase from *Pasteurella multocida*, Ann. Inst. Pasteur Microbiol. A., 137. 153-158, 1986.
- Pijoan, C.: Pneumonic pasteurellosis. In: *Diseases of swine*. Szerk.: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1999. p. 511-520.
- Pijoan, C., Lastra, A., Ramirez, C., Leman, A.D.: Isolation of toxigenic strains of *Pasteurella multocida* from lung of pneumonic swine, J. Am. Vet. Med. Assoc., 185. 522-523, 1984.
- Pijpers, A., Van Kligeren, B., Schoevers, E.J., Verheijden, J.H., Van Miert, A.S.: In vitro activity of five tetracyclines and some other antimicrobial agents against four porcine respiratory tract pathogens, J. Vet. Pharmacol. Ther., 12. 267-276, 1989.
- Pullinger, G.D., Bevir, T., Lax, A.J.: The *Pasteurella multocida* toxin encoded within a lysogenic bacteriophage, Mol. Microbiol., 51(1). 255-269, 2004.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R.: *Pasteurella* species. In: *Clinical Veterinar Microbiology*. London: Wolfe Publishing, Mosby-Year Book Europe Limited, 1994. p. 254-258.
- Register, K.B., DeJong, K.D.: Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine, Vet. Microbiol., 117. 201-210, 2006.
- Regnault, B., Grimont, F., Grimont, P.A.: Universal ribotyping method using a chemically labelled oligonucleotide probe mixture, Res. Microbiol., 148(8). 649-659, 1997.
- Rimler, R. B., Glisson, J.R.: Fowl cholera. In: *Diseases of poultry*. Szerk.: Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., McDougald, L. R., Saif, Y. M. 10th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1997. p. 143-159.
- Rimler, R.B.: Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F by capsule depolymerisation with mucopolysaccharidases, Vet. Rec., 134. 191-192, 1994.
- Rimler, R.B., Rhoades, I.R.: Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*, J. Clin. Microbiol., 25, 615-618, 1987.
- Roberts, R.S.: An immunological study of *Pasteurellaseptica*, J. Comp. Pathol., 57. 261-278, 1947.

- Rocke, T.R., Smith, S.R., Miyamoto, A., Shadduck, D.J.: A serotype-specific polymerase chain reaction for identification of *Pasteurella multocida* serotype 1, *Avian Dis.*, 46. 370-377, 2002.
- Rosenbusch, C.T., Merchant, I.A.: A study of the hemorrhagic septicemia pasteurella, *J. Bacteriol.*, 37. 69-89, 1939.
- Ruffolo C.G., Adler, B.: Cloning, sequencing, expression and protective capacity of the *oma87* gene encoding the *Pasteurella multocida* 87-kilodalton outer membrane antigen, *Infect. Immun.*, 64. 3161-3167, 1996.
- Saxena, M.K., Singh, V.P., Kumar, A.A., Chaudhuri, P., Singh, V.P., Shivachandra, S.B., Biswas, A., Sharma, B.: REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from wild and domestic animals in India, *Vet. Res. Commun.*, 30(8). 851-861, 2006.
- Shivachandra, S.B., Kumar, A.A., Chaudhuri, P.: Molecular characterization of avian strains of *Pasteurella multocida* serogroup-A:1 based on amplification of repetitive regions by PCR, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 31(1). 47-62, 2008.
- Shivachandra, S.B., Kumar, A.A., Biswas, A., Ramakrishnan, M.A., Singh, V.P., Srivastava, S.K.: Antibiotic sensitivity patterns among Indian strains of avian *Pasteurella multocida*, *Trop. Anim. Health. Prod.*, 36(8). 743-750, 2004.
- Siju, J., Kumar, A.A., Shivachandra, S.B., Chaudhuri, P., Srivastava, S.K., Singh, V.P.: Cloning and characterization of type 4 fimbrial gene (*ptfA*) of *Pasteurella multocida*; serogroup B:2 (strain P52), *Vet. Res. Commun.*, 31. 397-404, 2007.
- Szécsényi I.: A baromfikolera oktana és a védekezés irányelvei, *Baromfiipar*, 209. 10-11, 1961.
- Szécsényi I.: A baromfikolera felszámolhatóságáról (Cikkgyűjtemény). Budapest: Dabas Nyomda, 1983.
- Tatum, F.M., Yersin, A.G., Briggs, R.E.: Construction and virulence of a *Pasteurella multocida* *fhb2* mutant in turkey, *Microb. Pathog.*, 39. 9-17, 2005.
- Tao, L.V., Nhien, N.N.: Isolation and identification of *Pasteurella* in goats from North Vietnam, *Jap. Vet. Sci. Tech.*, 3. 45-49, 1996.
- Tang, X., Zhao, Z., Hu, J., Wu, B., Cai, X., He, Q., Chen, H.: Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *J. Clin. Microbiol.*, 47 (4). 951-958, 2009.
- Townsend, K. M., O'Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A.J., Adler, B.: Genetic organization of *Pasteurella multocida* *cap* loci and development of a multiplex capsular PCR typing system, *J. Clin. Microbiol.*, 39. 924-929, 2001.
- Townsend, K.M., Boyle, D.O., Phan, T.T., Hanh, T.X., Wijewardana, T.G., Wilkie, I., Trung, N.T., Frost, A.J.: Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs, *Vet. Microbiol.*, 63. 205-215, 1998a.

- Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M., Dawkins, H.J.: Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates, J. Clin. Microbiol., 36. 1096-1100, 1998b.
- Townsend, K.M., Dawkins, H.J., Papadimitriou, J.M.: REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates that cause haemorrhagic septicaemia, Res. Vet. Sci., 63(2). 151-155, 1997.
- Trevisan, V.: Sul micrococco della rabbia e sulla possibilità di riconoscere durante il periodo d'incubazione, dall'esame del sangue della persona morsicata, se ha contratta l'infezione rabbica, Rend. R. Ist. Lomb. Sci. Let. Ser. II., 20. 88-105, 1887.
- Varga Zs., Sellyei B., Magyar T.: Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Hungary, Acta Vet. Hung., 55(4). 425-434, 2007.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R.: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes, Nucleic Acids Res., 19(24). 6823-6831, 1991.
- Watson, P.J., Davies, R.L.: Outbreak of *Pasteurella multocida* septicaemia in neonatal lambs, Vet.Rec., 151. 420-422, 2002.
- Wilson, M. A., Morgan, M.J., Barger, G.E.: Comparison of DNA fingerprinting and serotyping for identification of avian *Pasteurella multocida* isolates, J. Clin. Microbiol., 31. 255-259, 1993.
- Yosimura, H., Ishimaru, M., Endoh, Y.S., Kojima, A.: Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs, Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health., 48(7). 555-560, 2001.
- Yu, H., Chokhawala, H., Karpel, R., Wu, B., Zhang, J., Zhang, Y., Jia, Q., Chen, X.: A multifunctional *Pasteurella multocida* sialyltransferase: a powerful tool for the synthesis of sialoside libraries, J. Am. Chem. Soc., 127. 17618-17619, 2005.

9 Közlemények

Cikkek:

1. Boglárka Sellyei, K. Bányai, T. Magyar: Characterization of the *ptfA* gene of avian *Pasteurella multocida* strains by allele specific polymerase chain reaction. J. Vet. Diagn. Invest. (közlésre benyújtva)
IF: 1,403
2. Boglárka Sellyei; Enikő Wehmann, L. Makrai, T. Magyar: Characterisation of *Pasteurella dagmatis*-like isolates recovered from the feline oral cavity. Vet. Microbiol. (közlésre benyújtva)
IF:2,370
3. Zs. Varga, B. Sellyei, É. Ivanics, T. Magyar: Distinguishing between *Pasteurella multocida* strains responsible for fowl cholera and pasteurellosis cases in geese
IF:
4. Boglárka Sellyei, Zsuzsanna Varga, Katalin Szentesi-Samu, Éva Kaszanyitzky and Tibor Magyar: Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry. Acta Vet., 57 (3). 357-367, 2009.
IF:0,624
5. Boglárka Sellyei, Zsuzsanna Varga, Éva Ivanics, T. Magyar: Characterisation and comparison of avian *Pasteurella multocida* strains by conventional and ERIC-PCR assays. Acta Vet., 56 (4). 429-440, 2008.
IF:0,624
6. Sellyei Boglárka, Varga Zsuzsanna, Samu Péterné, Magyar Tibor: Nyúlból izolált *Pasteurella multocida* törzsek jellemzése (**Characterisation of *Pasteurella multocida* strains isolated from rabbits**). MÁL., 130. 396-403, 2008.
IF:0,088
7. Zsuzsanna Varga, Boglárka Sellyei és T. Magyar: Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Hungary. Acta Vet., 55 (4). 425-434, 2007.
IF:0,474

Előadások és absztraktok:

2nd Central European Forum for Microbiology , 2009 okt. 7-9., Keszthely

Zs. Varga, B. Sellyei, É. Ivanics, T. Magyar: Comparison of avian *Pasteurella multocida* isolates by conventional characterisation methods and by their outer membrane protein pattern. Acta Microbiol. Imm. Hung., Volume 56, 2009, Supplement. Pp.257

Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2008 okt.14-17., Keszthely

B. Sellyei, Zs. Varga, É. Ivanics, T. Magyar: Characterisation of avian *Pasteurella multocida* isolates with some molecular methods. Acta Microbiol. Imm. Hung., Volume 56, 2009, Supplement. Pp.88

Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2006 okt.18-20., Keszthely

B. Sellyei, Zs. Varga, É. Ivanics, T. Magyar: Traditional and molecular characterisation of *Pasteurella multocida* strains isolated from various animal species in Hungary. Acta Microbiol. Imm. Hung., Volume 53 (3), 2006, Supplement. Pp.337

1st Central European Forum for Microbiology , 2005 okt. 26-28., Keszthely

B. Sellyei, Zs. Varga, T. Magyar: Comparative study on *Pasteurella multocida* isolates using traditional and molecular diagnostic method. Acta Microbiol. Imm. Hung., Volume 52, 2005, Supplement. Pp.140

Akadémiai beszámolók:

2010. Sellyei Boglárka, Enikő Wehmann, Makrai László, Magyar Tibor: Egyedi, macska szájflóra eredetű *Pasteurella dagmatis*-szerű izolátumok fenotípusos és genotípusos jellemzése
- Varga Zsuzsanna, Sellyei Boglárka, Ivanics Éva, Magyar Tibor: Libákból izolált eltérő patogenitású *Pasteurella multocida* törzsek összehasonlító vizsgálata
2009. Sellyei Boglárka, Varga Zsuzsanna, az ÁO Tud. Kandidátusa, Ivanics Éva és Magyar Tibor, az ÁO Tud. Kandidátusa: Baromfi eredetű *Pasteurella multocida* izolátumok molekuláris jellemzése
- Varga Zsuzsanna, az ÁO Tud. Kandidátusa, Sellyei Boglárka, Ivanics Éva és Magyar Tibor, az ÁO Tud. Kandidátusa. Madaraktól izolált *Pasteurella multocida* törzsek külső membránfehérjéinek összehasonlító vizsgálata

Makrai László, Sellyei Boglárka, Varga Zsuzsanna, az áó tud kandidátusa, Lisanne Willimzing, Jánosi Katalin, Gyuranecz Miklós és Magyar Tibor, az áó tud kandidátusa: Különböző eredetű *Pasteurella multocida* törzsek anyagcsere ujjlenyomatának vizsgálata

2008. Sellyei Boglárka, Varga Zsuzsanna, az áó tud kandidátusa, Ivanics Éva és Magyar Tibor, az áó tud kandidátusa: Magyarországi baromfi eredetű *Pasteurella multocida* izolátumok összehasonlító vizsgálata

Varga Zsuzsanna, az áó tud kandidátusa, Sellyei Boglárka, Juhászné Kaszanitzky Éva, PhD, és Magyar Tibor, az áó tud kandidátusa: Magyarországi sertés- és nyúlállományokból származó *Pasteurella multocida* izolátumok összehasonlító vizsgálata

2006. Sellyei Boglárka, Varga Zsuzsanna, az áó tud kandidátusa és Magyar Tibor, az áó tud kandidátusa: Magyarországi *Pasteurella multocida* izolátumok összehasonlító vizsgálata hagyományos és újszerű diagnosztikai módszerek felhasználásával

Poszterek:

MED-VET-NET 5th Annual Scientific Meeting, 2009 jún. 3-6., San Lorenzo de El Escorial, Madrid, Spain

B. Sellyei, L. Makrai, T. Magyar: Characterisation of *Pasteurella dagmatis* strains. 5th Annual Scientific Meeting Abstract Book Pp. 48-49., Med-Vet-Net 3-6 June 2009, Madrid, Spain.

MED-VET-NET 4th Annual Scientific Meeting, 2008 jún. 11-14., San Malo, France

T. Magyar, B. Sellyei, Zs. Varga: Epidemiological study on avian strains of *Pasteurella multocida* in Hungary. 4th Annual Scientific Meeting Abstract Book Pp.19, Med-Vet-Net11-14 June 2008, St Malo, France

15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 2007 júl. 18-20., Budapest

B. Sellyei, Zs. Varga, É. Ivanics, T. Magyar: Diversity of avian *Pasteurella multocida* isolates in Hungary. Acta Microbiol. Imm. Hung., Volume (54), 2007, Supplement. Pp.114

10 Mellékletek

2. táblázat: A vizsgálatokban felhasznált nyúl-eredetű törzsek törzskönyvi adatai

Azonosító	Gazdafaj	Szerv	Eredet	Dátum
P1	nyúl	orr	Ráckeve	1987
P4	nyúl	orr	Ráckeve	1987
P6	nyúl	orr		1987
P10	nyúl	orr	Ráckeve	1988
P18	nyúl	csontvelő	Ráckeve	1988
P21	nyúl	orr	Dunavarsány	1988
P38	nyúl	orr	Dunavarsány	1988
P58	nyúl	csontvelő	Dunavarsány	1988
P68	nyúl	orr		1988
P74	nyúl	orr	Jászapáti	1988
P77	nyúl	orr	Jászapáti	1988
P94	nyúl	tályog	Tornyó puszta	1988
P98	nyúl	orr	Tornyó puszta	1988
P105	nyúl	tüdő	Tornyó puszta	1988
P115	nyúl	orr	Ócsa	1989
P121	nyúl	szívvér	Ócsa	1989
P126	nyúl	mellüreg	Ócsa	1989
P146	nyúl	orr	Ócsa	1990
P167	nyúl	orr	Ócsa	1990
P171	nyúl	orr	Ócsa	1990
P179	nyúl	orr	Ócsa	1990
P230	nyúl		Gödöllő	
P231	nyúl	orr	Gödöllő	1992
P252	nyúl	orr	Gödöllő	1992
P255	nyúl	orr	Gödöllő	1992
P257	nyúl	orr	Gödöllő	1992
P258	nyúl	uterus	Gödöllő	1992
P411	nyúl	lép	Vép	2004
P412	nyúl	máj	Vép	2004
P413	nyúl	tüdő	Vép	2004
P442	nyúl	orr	Ócsa	2005
P443	nyúl	orr	Ócsa	2005
P444	nyúl	orr	Ócsa	2005
P445	nyúl	orr	Ócsa	2005
P446	nyúl	orr	Ócsa	2005
P447	nyúl	orr	Ócsa	2005
P448	nyúl	orr	Ócsa	2005
P449	nyúl	orr	Ócsa	2005
P450	nyúl	orr	Ócsa	2005
P451	nyúl	orr	Ócsa	2005
P452	nyúl	orr	Ócsa	2005
P453	nyúl	orr	Ócsa	2005
P454	nyúl	orr	Ócsa	2005
P455	nyúl	orr	Ócsa	2005
P456	nyúl	orr	Ócsa	2005
P457	nyúl	orr	Ócsa	2005
P458	nyúl	orr	Ócsa	2005
P459	nyúl	orr	Ócsa	2005
P466	nyúl			
P467	nyúl			1996
P468	nyúl			1996
P469	nyúl			1996
P470	nyúl		Tápé	1996
P578/T	nyúl	tüdő	Abony	2006
P691	nyúl	kötőhártya	Budapest	2006
P701/1	nyúl	tüdő	Alsótold	2006
P701/2	nyúl	tüdő	Alsótold	2006
P717	nyúl	tüdő	Litke	2006
P718	nyúl	tüdő	Abony	2006
P722/I.	nyúl	tüdő	Mindszent	2006
P722/II.	nyúl	tüdő	Mindszent	2006
P730/1	nyúl	tüdő	Zagyvarékas	2007
P730/2	nyúl	tüdő	Zagyvarékas	2007
P739	nyúl	tüdő	Budapest	2007
P745	nyúl	tüdő	Dabas	2007
P755/L	nyúl	lép	Karcag	2007
P755/T	nyúl	tüdő	Karcag	2007
P774	nyúl	tályog	Budapest	2007
P787	nyúl	tüdő	Mindszent	2007

P789/I	nyúl	tüdő	Karcag	2007
P789/III	nyúl	tüdő	Karcag	2007
P803	nyúl	tüdő	Györköny	2007
P807	nyúl	tüdő	Mindszent	2007
P808	nyúl	tüdő	Dabas	2007
P816/1	nyúl	tüdő	Fülöpháza	2007
P816/2	nyúl	tüdő	Fülöpháza	2007

3. táblázat: A vizsgálatokban felhasznált sertés-eredetű törzsek törzskönyvi adatai

Azonosító	Gazdafaj	Szerv	Eredet	Dátum
P70	sertés	orr	Jászapáti	1988
P72	sertés	tüdő	Szentés	1988
P111	sertés	orr	Bábolna	1989
P139	sertés	orr	Mezőhegyes	1990
P140	sertés	orr	Mezőhegyes	1990
P205	sertés			1991
P217	sertés	orr	Mesterszállás	1991
P219	sertés	orr	Mesterszállás	1991
P220	sertés	orr	Mezőhegyes	1991
P223	sertés		Lajosmizse	1992
P259	sertés	orr	Solt	1993
P264	sertés	orr	Mezőhegyes	1993
P307	sertés	orr	Mezőhegyes	1995
P308	sertés	orr	Mezőhegyes	1995
P309	sertés	orr	Vid	1995
P338	sertés		Ozora	1999
P340	sertés	orr	Mohács	2001
P342	sertés	orr	Seregélyes	2004
P344	sertés	orr	Seregélyes	2004
P345	sertés	orr	Seregélyes	2004
P346	sertés	orr	Seregélyes	2004
P347	sertés	orr	Seregélyes	2004
P348	sertés	orr	Seregélyes	2004
P349	sertés	orr	Seregélyes	2004
P350	sertés	orr	Seregélyes	2004
P351	sertés	orr	Seregélyes	2004
P352	sertés	orr	Seregélyes	2004
P364	sertés	orr	Seregélyes	2004
P366	sertés	orr	Seregélyes	2004
P377	sertés	tüdő	Ormándlak	2004
P501	sertés	orr	Komárom	2005
P502	sertés	orr	Komárom	2005
P503	sertés	orr	Komárom	2005
P504	sertés	orr	Komárom	2005
P505	sertés	orr	Komárom	2005
P535/Ám	sertés	tüdő	Kéleshalom	2005
P535/Hv	sertés	tüdő	Kéleshalom	2005
P579/L	sertés	lép		2006
P579/T	sertés	tüdő		2006
P580	sertés	lép		2006
P581/L	sertés	lép		2006
P581/M	sertés	máj		2006
P581/T	sertés	tüdő		2006
P586	sertés	orr	Mezőhegyes	2006
P587	sertés	orr	Mezőhegyes	2006
P588	sertés	orr	Mezőhegyes	2006
P589	sertés	orr	Mezőhegyes	2006
P590	sertés	orr	Biharnagybajom	2006
P591	sertés	orr	Biharnagybajom	2006
P592	sertés	orr	Püspökladány	2006
P593	sertés	orr	Püspökladány	2006
P594	sertés	orr	Karcag	2006
P596	sertés	orr	Mezőhegyes	2006
P600	sertés	orr	Komárom	1999
P601	sertés	orr	Komárom	1999
P602	sertés	orr	Komárom	1999
P603	sertés	orr	Komárom	1999
P604	sertés	orr	Komárom	2001
P605	sertés	orr	Komárom	2001
P606	sertés	orr	Komárom	2001
P607	sertés	orr	Komárom	2001
P608	sertés	orr	Komárom	2001
P609	sertés	orr	Komárom	2001
P610	sertés	orr	Komárom	2001
P611	sertés	orr	Komárom	2001
P612	sertés	orr	Komárom	2001
P613	sertés	orr	Komárom	2001
P614	sertés	orr	Kéthely	1994
P615	sertés	orr	Kéthely	1994
P616	sertés	orr	Kéthely	1994

Azonosító	Gazdafaj	Szerv	Eredet	Dátum
P617	sertés	orr	Kéthely	1996
P618	sertés	orr	Kéthely	1996
P619	sertés	orr	Kéthely	1996
P620	sertés	orr	Kéthely	1996
P621	sertés	orr	Kéthely	1996
P622	sertés	orr	Kéthely	1996
P623	sertés	orr	Kéthely	1996
P624	sertés	orr	Kéthely	1996
P625	sertés	orr	Kéthely	1996
P626	sertés	orr	Kéthely	1996
P627/1	sertés	orr	Ács	1997
P627/2	sertés	orr	Ács	1997
P628	sertés	orr	Ács	1997
P629	sertés	orr	Ács	1997
P630	sertés	orr	Ács	1997
P631	sertés	orr	Ács	1997
P632	sertés	orr	Lajoskomárom	1997
P633	sertés	orr	Lajoskomárom	1997
P634	sertés	orr	Lajoskomárom	1997
P635	sertés	orr	Lajoskomárom	1997
P636	sertés	orr	Bakonyszombathely	1997
P637	sertés	orr	Bakonyszombathely	1997
P638	sertés	orr	Bakonyszombathely	1997
P639	sertés	orr	Komárom	1993
P640	sertés	orr	Komárom	1993
P641	sertés	orr	Véménd	1994
P642	sertés	orr	Véménd	1994
P644	sertés	orr	Mohács	2001
P645	sertés	orr	Móricgát	1999
P647	sertés		Szeleste	1994
P648	sertés	orr	Somogyárd	
P649	sertés	orr	Somogyárd	
P650	sertés	orr	Mezőhegyes	1989
P651	sertés	orr	Dunaszekcső	2006
P652	sertés	orr	Dunaszekcső	2006
P653	sertés	orr	Dunaszekcső	2006
P654	sertés	orr	Dunaszekcső	2006
P655	sertés	orr	Dunaszekcső	2006
P656	sertés	orr	Dunaszekcső	2006
P657	sertés	orr	Dunaszekcső	2006
P658	sertés	orr	Ács	2006
P659	sertés	orr	Ács	2006
P662	sertés	orr	Szöny	2006
P663	sertés	orr	Szöny	2006
P664	sertés	orr	Szöny	2006
P665	sertés	orr	Szöny	2006
P666	sertés	orr	Szöny	2006
P667	sertés	orr	Szöny	2006
P668	sertés	orr	Szöny	2006
P677	sertés	tüdő	Cegléd	2006
P681	sertés	tüdő	Cegléd	2006
P683	sertés	orr	Dombegyháza	2006
P684	sertés	orr	Dombegyháza	2006
P685	sertés	tüdő	Parád	2006
P686/Am	sertés	tüdő	Sárbogárd	2006
P686/Hv	sertés	tüdő	Sárbogárd	2006
P688	sertés	tüdő	Bácsalmás	2006
P692	sertés	tüdő	Várpalota	2006
P693	sertés	tüdő	Várpalota	2006
P694	sertés	tüdő	Várpalota	2006
P698	sertés	tüdő	Várpalota	2006
P699	sertés	méh	Várpalota	2006
P702	sertés	tüdő	Mócsa	2006
P703	sertés	tüdő	Nagykarácsony	2006
P704	sertés	lép	Karancsság	2006
P705/Am	sertés	tüdő	Ócsa	2006
P705/Hv	sertés	tüdő	Ócsa	2006
P706	sertés	tüdő	Szajk	2006
P707	sertés	tüdő	Küngös	2006
P710/Am	sertés	tüdő	Budapest	2006
P710/Hv	sertés	tüdő	Budapest	2006
P711/Am	sertés	tüdő	Budapest	2006
P711/Hv	sertés	tüdő	Budapest	2006
P712/Am	sertés	tüdő	Budapest	2006
P712/Hv	sertés	tüdő	Budapest	2006

4. táblázat: A vizsgálatokban felhasznált baromfi-eredetű törzsek törzskönyvi adatai

Azonosító	Gazdafaj	Szerv	Eredet	Dátum
P60	háziú		Kunszentmiklós	1988
P61/1	háziú		Fülöpszállás	1988
P131	háziú	szívér	Gyöngyös	1989
P236	háziú		Újléta	1990
P237	pulyka		Debrecen	1990
P239	háziú		Debrecen	1990
P244/1	háziú		Baktalórántháza	1991
P325	háziú		Hortobágy	1996
P327	háziú	szívér	Mikófalva	1995
P329	háziú	szívér	Hortobágy	1996
P331	háziú	izület	Hortobágy	1996
P339	pulyka		Bátya	1999
P358	pulyka	tüdő	Hortobágy	1998
P359	pulyka	tüdő	Hortobágy	2001
P360	pulyka	tüdő	Hortobágy	2000
P362	háziú	tüdő	Hortobágy	1998
P369	fácán	máj	Szombathely	2004
P370	fácán	máj	Szombathely	2004
P371	fácán	máj	Szombathely	2004
P372	háziú	szívér	Csolyospálos	2004
P373	háziú	szívér	Csolyospálos	2004
P378	háziú		Döge	1990
P388	háziú	szívér	Kiskunmajsza	2004
P391	háziú		Balmazújváros	1998
P392	háziú		Nyírmártonfalva	1998
P403/2	háziú	máj		1996
P414	pézsmaé	máj	Füzesgyarmat	1995
P415	pulyka		Beled	1994
P418	háziú	szívér	Sükösd	2005
P428	pézsmaé		Füzesgyarmat	1992
P432	háziú	szívér	Tázlár	2005
P440	háziú	szívér	Balotaszállás	2005
P471/1	pulyka	máj	Szombathely	2005
P471/3	pulyka	máj	Szombathely	2005
P473	háziú	szívér	Kiskunmajsza	2005
P485/9	háziú	máj	Szank	2005
P486/1	háziú	szívér	Petőfiszállás	2005
P487/1	háziú	máj	Petőfiszállás	2005
P487/2	háziú	máj	Petőfiszállás	2005
P488	háziú	szívér	Fülöpjakab	2005
P489	háziú	szívér	Kiskunmajsza	2005
P492/4	háziú	máj	Kiskunmajsza	2005
P493/1	háziú	szívér	Kecel	2005
P493/2	háziú	szívér	Kecel	2005
P495	háziú	szívér	Bócsa	2005
P519/1	háziú	máj	Bócsa	2005
P520/4	háziú	szívér	Kelebia	2005
P522/1	háziú	szívér	Tázlár	2005
P531	pulyka	tüdő	Dunatétlen	2005
P538/1	háziú	máj	Pusztavacs	2005
P547/1	háziú	szívér	Budapest	2005
P553/1	háziú	szívér	Ásotthalom	2005
P553/2	háziú	szívér	Ásotthalom	2005
P555/2	háziú	máj	Bócsa	2005
P558/1	pulyka	szívér	Csolyospálos	2005
P558/2	pulyka	szívér	Csolyospálos	2005
P558/3	pulyka	szívér	Csolyospálos	2005
P559	háziú	szívér	Gyula	2005
P568/1	pulyka	szívér	Rém	2006
P568/2	pulyka	szívér	Rém	2006
P577	pulyka	tüdő	Érsekcsanád	2006

5. táblázat: A biotípusok meghatározása egyéb fermentációs sajátosságok figyelembevételével
(Fegan et al. 1995, Blackall et al. 1997, Townsend et al. 1998a)

Biotípus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ornitin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Arabinóz	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Laktóz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Maltóz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Trehalóz	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Xilóz	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Szorbit	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Alfaj	multocida					??	septica	gallicida	ODC negatív multocida	maltóz pozitív septica	??	laktóz pozitív multocida	ODC negatív multocida	laktóz poz., ODC negatív multocida

A táblázatokban használt rövidítések:

B – pézsmaréce
F - fácán
K - házikacsa
L - házilúd
P - pulyka
T - házityúk
Ind – indol
Nit – nitrát
U – urea
Glü – glükóz
Man - mannit
Sza – szacharóz
ODC – ornitin-dekarboxiláz
Ara - arabinóz
Lak – laktóz
Mal – maltóz
Tre – trehalóz
Xyl – xylóz
Dul – dulcitol
Szo – szorbit
Biot. – biotípus
subsp. – alfaj
mult. – multocida
sept. – septica
gall. – gallicida
- nem besorolható
Ir - irrizáció
I – irrizáló
B - nem irrizáló
T - toxintermelő

6. táblázat: A sertés-eredetű *P. multocida* törzsek fermentációs jellemzői

Azonosító	Gazdafaj	Szerv	Eredet	Pm PCR	Toxin PCR	Burok típus	Biokémia														Biot.	subsp.
							Ind	Nit	U	Glü	Man	Sza	ODC	Ara	Lak	Mal	Tre	Xy	Dul	Szo		
P70	sertés	orr	Jászapáti	+	-	A	+	+	+	+	+	-	-	(-)	(-)	-	+	-	+	13	mult.	
P72	sertés	tüdő	Szentes	+	-	A	+	+	+	+	+	+	-	(-)	-	-	+	-	+	3	mult.	
P111	sertés	orr	Bábolna	+	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.	
P139	sertés	orr	Mezőhegyes	+	-	D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.	
P140	sertés	orr	Mezőhegyes	+	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.	
P205	sertés			+	-	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	(-)	5	sept.	
P217	sertés	orr	Mesterszállás	+	-	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.	
P219	sertés	orr	Mesterszállás	+	-	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	2	mult.	
P220	sertés	orr	Mezőhegyes	+	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.	
P223	sertés		Lajosmizse	+	-	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	6	sept.	
P259	sertés	orr	Solt	+	-	D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.	
P264	sertés	orr	Mezőhegyes	+	-	D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.	
P307	sertés	orr	Mezőhegyes	+	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.	
P308	sertés	orr	Mezőhegyes	+	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	(-)	-	+	3	mult.	
P309	sertés	orr	Víd	+	+	A	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	(+)	13	mult.	
P338	sertés		Ozora	+	+	A	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	13	mult.	
P340	sertés	orr	Mohács	+	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	sept.	
P342	sertés	orr	Seregélyes	+	-	D	+	+	+	+	+	+	-	(-)	-	-	+	-	+	3	mult.	
P344	sertés	orr	Seregélyes	+	-	D	+	+	+	+	+	+	-	(-)	-	-	+	-	+	3	mult.	
P345	sertés	orr	Seregélyes	+	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.	
P346	sertés	orr	Seregélyes	+	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.	
P347	sertés	orr	Seregélyes	+	-	D	+	+	+	+	+	+	-	(-)	-	-	+	-	+	3	mult.	
P348	sertés	orr	Seregélyes	+	+	A	+	+	+	+	+	+	-	(-)	-	-	+	-	+	2	mult.	
P349	sertés	orr	Seregélyes	+	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.	
P350	sertés	orr	Seregélyes	+	-	A	+	+	+	+	+	+	-	(-)	-	-	+	-	+	2	mult.	
P351	sertés	orr	Seregélyes	+	-	D	+	+	+	+	+	+	-	(-)	-	-	+	-	+	3	mult.	

7. táblázat: A sertés-eredetű *P. multocida* törzsek fermentációs jellemzői

Azonosít	Gazdafaj	Szerv	Eredet	Pm PCR	Tox PCR	Buro típus	Biotékia													Biot.	subsp.				
							Ind	Nit	U	Glü	Man	Sza	ODC	Ara	Lak	Mal	Tre	Xy	Dul			Szo			
P352	sertés	orr	Seregélyes	+	-	A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	2	mult.	
P364	sertés	orr	Seregélyes	+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	3	mult.	
P366	sertés	orr	Seregélyes	+	+	A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	2	mult.	
P377	sertés	tüdő	Ormándlak	+	+	A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	3	mult.		
P501	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	gall.	
P502	sertés	orr	Komárom	+	-	A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P503	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P504	sertés	orr	Komárom	+	-	A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P505	sertés	orr	Komárom	+	-	A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P535/Ám	sertés	tüdő	Kéleshalom	+	-	A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	2	mult.
P535/Hv	sertés	tüdő	Kéleshalom	+	-	A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	2	mult.
P579/L	sertés	lég		+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P579/T	sertés	tüdő		+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P580	sertés	lég		+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P581/L	sertés	lég		+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P581/M	sertés	máj		+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	12	mult.
P581/T	sertés	tüdő		+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P586	sertés	orr	Mezőhegyes	+	-	A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	2	mult.
P587	sertés	orr	Mezőhegyes	+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P588	sertés	orr	Mezőhegyes	+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P589	sertés	orr	Mezőhegyes	+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P590	sertés	orr	Biharnagybajom	+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P591	sertés	orr	Biharnagybajom	+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P592	sertés	orr	Püspökládány	+	-	A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P593	sertés	orr	Püspökládány	+	-	A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.
P594	sertés	orr	Karcag	+	-	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	3	mult.

8. táblázat: A sertés-eredetű *P. multocida* törzsek fermentációs jellemzői

Azonosító szám	Gazdafaj	Szerv	Eredet	Pm PCR	Toxin PCR	Burok típus	Biotékia														Biot. subsp.			
							Ind	Nit	U	Glü	Man	Sza	ODC	Ara	Lak	Mal	Tre	Xy	Dul	Szo				
																						Sza	Sza	Sza
P596	sertés	orr	Mezőhegyes	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	mult.
P600	sertés	orr	Komárom	+	+	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P601	sertés	orr	Komárom	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	2	mult.
P602	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P603	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P604	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	12	mult.
P605	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	2	mult.
P606	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P607	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	5	sept.
P608	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	5	sept.
P609	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P610	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P611	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P612	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P613	sertés	orr	Komárom	+	+	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P614	sertés	orr	Kéthely	+	+	D	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	mult.
P615	sertés	orr	Kéthely	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P616	sertés	orr	Kéthely	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	5	sept.
P617	sertés	orr	Kéthely	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	sept.
P618	sertés	orr	Kéthely	+	+	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P619	sertés	orr	Kéthely	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	mult.
P620	sertés	orr	Kéthely	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P621	sertés	orr	Kéthely	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P622	sertés	orr	Kéthely	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	2	mult.
P623	sertés	orr	Kéthely	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	3	mult.
P624	sertés	orr	Kéthely	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	2	mult.

9. táblázat: A sertés-eredetű *P. multocida* törzsek fermentációs jellemzői

Azonosít	Gazdafaj	Szerv	Eredet	Pm PCR	Toxin PCR	Burok típus	Biokémia														Biot.	subsp.
							Ind	Nit	U	Glü	Man	Sza	ODC	Ara	Lak	Mal	Tre	Xy	Dul	Szo		
P625	sertés	orr	Kéthely	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	3	mult.	
P626	sertés	orr	Kéthely	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	7	sept.	
P627/1	sertés	orr	Ács	+	+	A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	7	sept.	
P627/2	sertés	orr	Ács	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	3	mult.	
P628	sertés	orr	Ács	+	+	A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	3	mult.	
P629	sertés	orr	Ács	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	gall.	
P630	sertés	orr	Ács	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	5	sept.	
P631	sertés	orr	Ács	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	3	mult.	
P632	sertés	orr	Lajoskomárom	+	-	A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	2	mult.	
P633	sertés	orr	Lajoskomárom	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	12	mult.	
P634	sertés	orr	Lajoskomárom	+	-	A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	2	mult.	
P635	sertés	orr	Lajoskomárom	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	3	mult.	
P636	sertés	orr	Bakonyszombathely	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	3	mult.	
P637	sertés	orr	Bakonyszombathely	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	12	mult.	
P638	sertés	orr	Bakonyszombathely	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	2	mult.	
P639	sertés	orr	Komárom	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	3	mult.	
P640	sertés	orr	Komárom	+	+	A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	sept.	
P641	sertés	orr	Véménd	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	2	mult.	
P642	sertés	orr	Véménd	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	3	mult.	
P644	sertés	orr	Mohács	+	-	F	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	6	sept.	
P645	sertés	orr	Móricgát	+	-	A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	mult.	
P647	sertés		Szeleste	+	-	A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	3	mult.	
P648	sertés	orr	Somogyárd	+	+	A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	5	sept.	
P649	sertés	orr	Somogyárd	+	+	A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	5	sept.	
P650	sertés	orr	Mezőhegyes	+	-	A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	mult.	
P651	sertés	orr	Dunaszekcső	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	3	mult.	

10. táblázat: A sertés-eredetű *P. multocida* törzsek fermentációs jellemzői

Azonosító	Gazdafaj	Szerv	Eredet	Pm PCR	Toxin PCR	Burok típus	Biotékia													Biot.	subsp.
							Ind	Nit	U	Glü	Man	Sza	ODC	Ara	Lak	Mal	Tre	Xy	Dul		
P652	sertés	orr	Dunaszekcső	+	-	D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P653	sertés	orr	Dunaszekcső	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P654	sertés	orr	Dunaszekcső	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P655	sertés	orr	Dunaszekcső	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P656	sertés	orr	Dunaszekcső	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P657	sertés	orr	Dunaszekcső	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P658	sertés	orr	Ács	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P659	sertés	orr	Ács	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P662	sertés	orr	Szőny	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P663	sertés	orr	Szőny	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P664	sertés	orr	Szőny	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P665	sertés	orr	Szőny	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P666	sertés	orr	Szőny	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P667	sertés	orr	Szőny	+	-	A	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	2	mult.
P668	sertés	orr	Szőny	+	-	A	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	2	mult.
P677	sertés	tüdő	Cegléd	+	-	A	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	2	mult.
P681	sertés	tüdő	Cegléd	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P683	sertés	orr	Dombegyháza	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P684	sertés	orr	Dombegyháza	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P685	sertés	tüdő	Parád	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	13	mult.
P686/Am	sertés	tüdő	Sárbogárd	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P686/Hv	sertés	tüdő	Sárbogárd	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3	mult.
P688	sertés	tüdő	Bácsalmás	+	+	A	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	13	mult.
P692	sertés	tüdő	Várpalota	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	gall.
P693	sertés	tüdő	Várpalota	+	-	D	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	gall.

11. táblázat: A sertés-eredetű *P. multocida* törzsek fermentációs jellemzői

Azonosító szám	Gazdafaj	Szerv	Eredet	Pm PCR	Toxin PCR	Burok típus	Biokémia										Biot.	subsp.				
							Ind	Nit	U	Glü	Man	Sza	ODC	Ara	Lak	Mal			Tre	Xy	Dul	Szo
P694	sertés	tüdő	Várpalota	+	-	A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	2	mult.	
P698	sertés	tüdő	Várpalota	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	2	mult.
P699	sertés	méh	Várpalota	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	2	mult.
P702	sertés	tüdő	Mócsa	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	3	mult.
P703	sertés	tüdő	Nagykarácsony	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	3	mult.
P704	sertés	lég	Karancsság	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	3	mult.
P705/Am	sertés	tüdő	Ócsa	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	(+)	-	-	-	+	+	12	mult.
P705/Hv	sertés	tüdő	Ócsa	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	(+)	-	-	-	+	+	12	mult.
P706	sertés	tüdő	Szajk	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	3	mult.
P707	sertés	tüdő	Küngös	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	3	mult.
P710/Am	sertés	tüdő	Budapest	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	3	mult.
P710/Hv	sertés	tüdő	Budapest	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	3	mult.
P711/Am	sertés	tüdő	Budapest	+	+	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	13	mult.
P711/Hv	sertés	tüdő	Budapest	+	+	A	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	13	mult.
P712/Am	sertés	tüdő	Budapest	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	3	mult.
P712/Hv	sertés	tüdő	Budapest	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	3	mult.

13. táblázat: A nyúl-eredetű *P. multocida* törzsek fermentációs jellemzői

Azonosító	Gazdafaj	Szerv	Eredet	Ir	Pm PCR	Burok típus	Biokémia											Biot.	subsp				
							Ind	Nit	U	Glü	Man	Sza	ODC	Ara	Lak	Mal	Tre			Xy	Dul	Szo	
																							+
P1	nyúl	orr	Ráckeve	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	mult.	
P4	nyúl	orr	Ráckeve	I	+	A	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	mult.
P6	nyúl	orr	Állatház	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P10	nyúl	orr	Ráckeve	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	mult.
P18	nyúl	csontvelő	Ráckeve	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	mult.
P21	nyúl	orr	Dunavarsány	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	mult.
P38	nyúl	orr	Dunavarsány	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	mult.
P58	nyúl	csontvelő	Dunavarsány	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P68	nyúl	orr	Jászapáti	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	mult.
P74	nyúl	orr	Jászapáti	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	mult.
P77	nyúl	orr	Jászapáti	I	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P94	nyúl	tályog	Tornópuszta	I	+	A	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	mult.
P98	nyúl	orr	Tornópuszta	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	mult.
P105	nyúl	tüdő	Tornópuszta	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	mult.
P115	nyúl	orr	Ócsa	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	mult.
P121	nyúl	szív vér	Ócsa	B	+	A	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	mult.
P126	nyúl	mell üreg	Ócsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P146	nyúl	orr	Ócsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	mult.
P167	nyúl	orr	Ócsa	I	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P171	nyúl	orr	Ócsa	B	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	mult.
P179	nyúl	orr	Ócsa	B	+	A	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	mult.
P230	nyúl		Gödöllő	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	mult.
P231	nyúl	orr	Gödöllő	I	+	A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P252	nyúl	orr	Gödöllő	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	mult.
P255	nyúl	orr	Gödöllő	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P257	nyúl	orr	Gödöllő	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4	mult.

14. táblázat: A nyúl-eredetű *P. multocida* törzsek fermentációs jellemzői

Azonosít	Gazdatafaj	Szerv	Eredet	Ir	P m PCR	Burok típus	Biokémia										Biot.	subsp	
							Ind	Nit	U	Glü	Man	Sza	ODC	Ara	Lak	Mal			Tre
P258	nyúl	uterus	Gödöllő	I	+	A	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	13	mult.
P411	nyúl	lép	Vép	B	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	2	mult.
P412	nyúl	máj	Vép	B	+	F	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	2	mult.
P413	nyúl	tüdő	Vép	B	+	F	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	3	mult.
P442	nyúl	orr	Ócsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	sept.
P443	nyúl	orr	Ócsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	sept.
P444	nyúl	orr	Ócsa	I	+	F	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	1	mult.
P445	nyúl	orr	Ócsa	B	+	F	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	1	mult.
P446	nyúl	orr	Ócsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	sept.
P447	nyúl	orr	Ócsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	sept.
P448	nyúl	orr	Ócsa	I	+	F	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	1	mult.
P449	nyúl	orr	Ócsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	sept.
P450	nyúl	orr	Ócsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	sept.
P451	nyúl	orr	Ócsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	sept.
P452	nyúl	orr	Ócsa	I	+	F	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	1	mult.
P453	nyúl	orr	Ócsa	B	+	F	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	1	mult.
P454	nyúl	orr	Ócsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	sept.
P455	nyúl	orr	Ócsa	B	+	F	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	4	mult.
P456	nyúl	orr	Ócsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	1	mult.
P457	nyúl	orr	Ócsa	I	+	F	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	1	mult.
P458	nyúl	orr	Ócsa	I	+	F	(+)	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	4	mult.
P459	nyúl	orr	Ócsa	B	+	F	(+)	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	4	mult.
P466	nyúl			B	+,T	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	sept.
P467	nyúl			B	+	D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	3	mult.
P468	nyúl			I	+	F	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	sept.
P469	nyúl			I	+	D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	3	mult.

15. táblázat: A nyúl-eredetű *P. multocida* törzsek fermentációs jellemzői

Azonosító	Gazdafaj	Szerv	Eredet	Ir	Pm PCR	Burok típus	Biokémia										Biot.	subsp					
							Ind	Nit	U	Glü	Man	Sza	ODC	Ara	Lak	Mal			Tre	XY	Dul	Szo	
P470	nyúl		Tápé	I	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	mult.	
P578/II	nyúl	tüdő	Abony	I	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P691	nyúl	kötőhártya	Budapest	I	+	A	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P701/I	nyúl	tüdő	Alsótold	I	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	mult.
P701/2	nyúl	tüdő	Alsótold	I	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	mult.
P717	nyúl	tüdő	Litke	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	mult.
P718	nyúl	tüdő	Abony	I	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	mult.
P722/I.	nyúl	tüdő	Mindszent	I	+	A	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	mult.
P722/II.	nyúl	tüdő	Mindszent	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	mult.
P730/1	nyúl	tüdő	Zagyvarékas	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P730/2	nyúl	tályog	Zagyvarékas	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P739	nyúl	tüdő	Budapest	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P745	nyúl	tüdő	Dabas	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	mult.
P755/I.	nyúl	tüdő	Karcag	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	mult.
P755/II	nyúl	lég	Karcag	I	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	mult.
P774	nyúl	tályog	Budapest	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P787	nyúl	tüdő	Mindszent	I	+	A	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	mult.
P789/I	nyúl	tüdő	Karcag	I	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	mult.
P789/III	nyúl	tüdő	Karcag	I	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	mult.
P803	nyúl	tüdő	Györköny	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	mult.
P807	nyúl	tüdő	Mindszent	I	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.
P808	nyúl	tüdő	Dabas	I	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	mult.
P816/1	nyúl	tüdő	Fülfőháza	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	mult.
P816/2	nyúl	tüdő	Fülfőháza	I	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	sept.

18. táblázat: A házikacsa-eredetű *P. multocida* törzsek fermentációs jellemzői

Azonosító	Gazdafaj	Szerv	Eredet	Ir	Pm PCR	Burok típus	Biokémia														Biot.	subsp.		
							Ind							Szo									Dul	Szo
							Nit	U	Glü	Man	Sza	ODC	Ara	Lak	Mal	Tre	Xy							
P372	házikacsa	szívburok	Csolyospálos	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	(-)	6	sept.		
P373	házikacsa	szívburok	Csolyospálos	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	6	sept.		
P388	házikacsa	szív	Kiskunmajsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1	mult.		
P418	házikacsa	szív	Sukösd	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1	mult.		
P485/9	házikacsa	máj	Kiskunmajsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	4	mult.		
P486/1	házikacsa	szív	Petőfiszállás	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	1	mult.		
P487/1	házikacsa	máj	Petőfiszállás	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	1	mult.		
P487/2	házikacsa	máj	Petőfiszállás	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	1	mult.		
P488	házikacsa	szív	Fülöpjakab	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	4	mult.		
P492/4	házikacsa	máj	Kiskunmajsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	1	mult.		
P493/1	házikacsa	szív	Kecel	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	1	mult.		
P493/2	házikacsa	szív	Kecel	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	1	mult.		
P495	házikacsa	szív	Bócsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	6	sept.		
P519/1	házikacsa	máj	Bócsa	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	1	mult.		
P520/4	házikacsa	szív	Kelebia	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	1	mult.		
P522/1	házikacsa	szív	Tázlár	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	6	sept.		
P538/1	házikacsa	máj	Pusztavacs	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	1	mult.		
P547/1	házikacsa	szív	Budapest	I	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	(-)	6	sept.		
P555/2	házikacsa	máj	Bócsa	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	6	sept.		
P559	házikacsa	szív	Gyula	B	+	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	(-)	6	sept.		

25. táblázat: A madár-eredetű *P multocida* törzsek antibiotikum-rezisztencia mintázata

	Törzsek száma	Rezisztencia	Mérsékelt rezisztencia
Érzékeny törzsek	8	-	-
	2	-	APR
	1	-	TE
	9	-	E
	7	-	APR, E
	1	-	APR, N, E
	Rezisztens törzsek	2	S3
1		APR	TE, E
1		OA	UB, S3
1		S3	TE, E
2		UB, OA	APR
1		UB, OA	APR, E
2		UB, OA	APR, E, ENR
3		UB, OA	ENR, SXT, S3
1		APR, UB, OA	ENR
2		APR, UB, OA, S3	SXT
1		APR, TE, OA, S3	UB
1		APR, ENR, UB, OA	E
1		UB, OA, SXT, S3	APR
1		UB, OA, SXT, S3	APR, E
2		APR, UB, OA, SXT, S3	-
1		APR, UB, OA, SXT, S3	E
1		APR, DO, TE, UB, OA	E, ENR, SXT, S3
1		APR, UB, OA, S3, P	E, ENR
1		N, UB, OA, SXT, S3	APR, E
2		N, TE, UB, OA, SXT, S3	DO
2		N, TE, UB, OA, SXT, S3	APR, E
1		APR, N, TE, UB, OA, SXT, S3	DO
1		APR, N, DO, TE, UB, OA, SXT, S3	E
1		APR, N, FFC, TE, OA, SXT, S3, P	DO

26. táblázat: A *P. multocida* törzsek antibiotikum-rezisztencia mintázata az izolálási idő függvényében

Azonosító	Dátum	Aminoglikozidok APR	N	Klóramfenikolok FFC	C	DO	TE	Makrolid E	ENR	UB	OA	SXT	S3	β laktam P	Polipeptid CT
P60 L	1988	M	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P61 L	1988	M	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P239 L	1989	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	R	É	É	É
P131 T	1989	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	R	É	É	É
P236 L	1990	É	É	É	É	É	M	M	É	É	É	R	É	É	É
P244/1 L	1990	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P378 L	1990	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P237 P	1990	M	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P428 B	1992	M	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P415 P	1994	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P414 B	1995	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P325 L	1996	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P327 L	1996	M	É	É	É	É	É	M	R	R	É	É	É	É	É
P403/2 L	1996	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P331 L	1996	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P391 L	1998	M	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P392 L	1998	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P358 P	1998	M	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P362 T	1998	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P339 P	1999	M	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P360 P	2000	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P359 P	2001	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P369 F	2004	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P370 F	2004	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P371 F	2004	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P329 L	2004	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É	É
P372 K	2004	R	É	É	É	É	É	É	É	R	R	M	R	É	É
P373 K	2004	R	É	É	É	É	É	É	É	R	R	M	R	É	É

27. táblázat: A *P. multocida* törzsek antibiotikum-rezisztencia mintázata a az izolálási idő függvényében

Azonosító	Dátum	Aminoglikozidok APR	N	Klóramfenikolok FFC	C	Tetraciklinek DO	TE	E	Makrolid	ENR	Nalidixsav és Fluoroquinolonok UB	OA	Szulfonamid-tremetoprim SXT	S3	β laktam P	Polipeptid CT
P388 K	2004	M	É	É	É	É	É	M	É	É	R	R	R	R	É	É
P432 L	2005	R	É	É	É	R	R	É	É	É	M	R	É	R	É	É
P440 L	2005	R	É	É	É	É	É	É	É	M	R	R	É	R	É	É
P473 L	2005	R	R	R	É	M	R	É	É	É	É	R	R	R	R	É
P489 L	2005	R	É	É	É	É	É	M	É	R	R	R	É	É	É	É
P418 K	2005	R	É	É	É	R	R	M	M	M	R	R	M	É	É	É
P485 K	2005	R	É	É	É	É	É	M	M	M	R	R	É	R	É	É
P486/1 K	2005	É	É	É	É	É	É	É	É	M	R	M	M	É	É	É
P487/1 K	2005	É	É	É	É	É	É	É	É	M	R	M	M	É	É	É
P487/2 K	2005	É	É	É	É	É	É	É	É	M	R	M	M	É	É	É
P488 K	2005	É	É	É	É	É	É	É	É	É	M	É	M	É	É	É
P492 K	2005	M	É	É	É	É	É	É	É	É	R	R	R	É	É	É
P493/1 K	2005	R	É	É	É	É	É	É	É	É	R	R	R	É	É	É
P493/2 K	2005	R	É	É	É	É	É	É	É	É	R	R	R	É	É	É
P495 K	2005	É	R	É	É	M	R	É	É	É	R	R	R	É	É	É
P519 K	2005	R	R	É	É	R	R	M	É	É	R	R	R	É	É	É
P520 K	2005	R	É	É	É	É	É	É	É	É	R	R	R	É	É	É
P522 K	2005	É	R	É	É	M	R	É	É	É	R	R	R	É	É	É
P538 K	2005	R	R	É	É	M	R	É	É	É	R	R	R	É	É	É
P547/1 K	2005	M	É	É	É	É	É	É	É	É	R	É	É	É	É	É
P555 K	2005	M	É	É	É	É	É	É	É	É	R	É	É	É	É	É
P559 K	2005	M	R	É	É	É	É	M	É	É	R	R	R	É	É	É
P531 P	2005	R	É	É	É	É	M	M	É	É	É	É	É	É	É	É
P558/1 P	2005	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P558/2 P	2005	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P558/3 P	2005	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P471/1 P	2005	M	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É	É
P471/3 P	2005	M	M	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É	É
P568/1 P	2005	M	É	É	É	É	É	M	É	M	R	R	É	É	É	É
P568/2 P	2005	É	É	É	É	É	É	É	É	É	R	R	É	É	É	É
P577 P	2005	M	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É	É
P553/1 T	2005	M	R	É	É	É	R	M	É	É	R	R	R	R	É	É
P553/2 T	2005	M	R	É	É	É	R	M	É	É	R	R	R	R	É	É

28. táblázat: A *P. multocida* törzsek antibiotikum-rezisztencia mintázata a gazdafajok függvényében

Azonosító	Dátum	Aminoglikozidok		Klóramfenikolok		Tetraciklinek		Makrolid	Nalidixsav és Fluoroquinolonok			Szulfonamid-trimetoprim	β laktam	Polipeptid	
		APR	N	FFC	C	DO	TE	E	ENR	UB	OA	SXT	S3	P	CT
P60 L	1988		É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P61 L	1988	M		É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P236 L	1990		É	É	É	É	M	M	É	É	É	R	R	É	É
P239 L	1989		É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P244/1 L	1990		É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P325 L	1996		É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P327 L	1996	M		É	É	É	É	M	É	R	R	É	É	É	É
P329 L	2004		É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É	É
P331 L	1996		É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P378 L	1990		É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P391 L	1998		É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P392 L	1998		É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P403/2 L	1996		É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P432 L	2005	R		É	É	É	R	É	É	M	R	R	É	É	É
P440 L	2005	R		É	É	É	É	É	M	R	R	É	É	É	É
P473 L	2005	R	R	R		É	R	É	É	É	R	R	R	R	É
P489 L	2005	R		É	É	É	É	M	É	R	R	É	É	É	É
P372 K	2004	R		É	É	É	É	É	É	R	R	É	É	É	É
P373 K	2004	R		É	É	É	É	É	É	R	R	R	R	É	É
P388 K	2004		É	É	É	É	É	M	É	R	R	R	R	É	É
P418 K	2005	M		É	É	É	R	M	M	R	R	M	M	É	É
P485 K	2005	R		É	É	É	É	M	M	R	R	É	R	R	É
P486 K	2005	R		É	É	É	É	M	M	R	R	R	M	É	É
P487/1 K	2005	É		É	É	É	É	É	M	R	R	M	M	É	É
P487/2 K	2005	É		É	É	É	É	É	M	R	R	M	M	É	É
P488 K	2005	É		É	É	É	É	É	É	R	R	M	M	É	É
P492 K	2005	É		É	É	É	É	É	É	M	R	É	É	É	É
P493/1 K	2005	M		É	É	É	É	É	É	R	R	R	R	É	É
P493/2 K	2005	R		É	É	É	É	É	É	R	R	R	R	É	É
P495 K	2005	R	R	É	É	É	É	É	É	R	R	R	R	É	É
P519 K	2005	É		É	É	É	R	M	É	R	R	R	R	É	É
P520 K	2005	R		É	É	É	É	M	É	R	R	R	R	É	É
P522 K	2005	R		É	É	É	É	É	É	R	R	R	R	É	É
P538 K	2005	É		É	É	É	R	É	É	R	R	R	R	É	É
P547/1 K	2005	R	R	É	É	É	É	É	É	R	R	R	R	É	É
P555 K	2005	M		É	É	É	É	É	É	R	R	É	É	É	É
P559 K	2005	M		É	É	É	É	É	É	R	R	R	R	É	É
P559 K	2005	M	R	É	É	É	É	M	É	R	R	R	R	É	É

29. táblázat: A *P. multocida* törzsek antibiotikum-rezisztencia mintázata a gazdafajok függvényében

Azonosító	Dátum	Aminoglikozidok APR	N	Klóramfenikolok FFC	C	Tetraciklinek DO	TE	Makrolid E	ENR	UB	OA	Szulfonamid-trimetoprim S3	SXT	B laktam P	Polipeptid CT
P339 P	1999	M	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P358 P	1998	M	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P359 P	2001	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P360 P	2000	É	É	É	É	É	É	É	É	R	É	É	É	É	É
P531 P	2005	R	É	É	É	É	M	M	É	É	É	É	É	É	É
P558/1 P	2005	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P558/2 P	2005	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P558/3 P	2005	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P415 P	1994	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P237 P	1990	M	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P471/1 P	2005	M	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P471/3 P	2005	M	M	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P568/1 P	2005	M	É	É	É	É	É	M	M	R	R	É	É	É	É
P568/2 P	2005	É	É	É	É	É	É	É	É	R	R	É	É	É	É
P577 P	2005	M	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P131 T	1989	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P553/1 T	2005	M	R	É	É	É	R	M	É	R	R	R	R	É	É
P553/2 T	2005	M	R	É	É	É	R	M	É	R	R	R	R	É	É
P362 T	1998	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P369 F	2004	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
P370 F	2004	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P371 F	2004	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P428 B	1992	M	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É
P414 B	1995	É	É	É	É	É	É	M	É	É	É	É	É	É	É

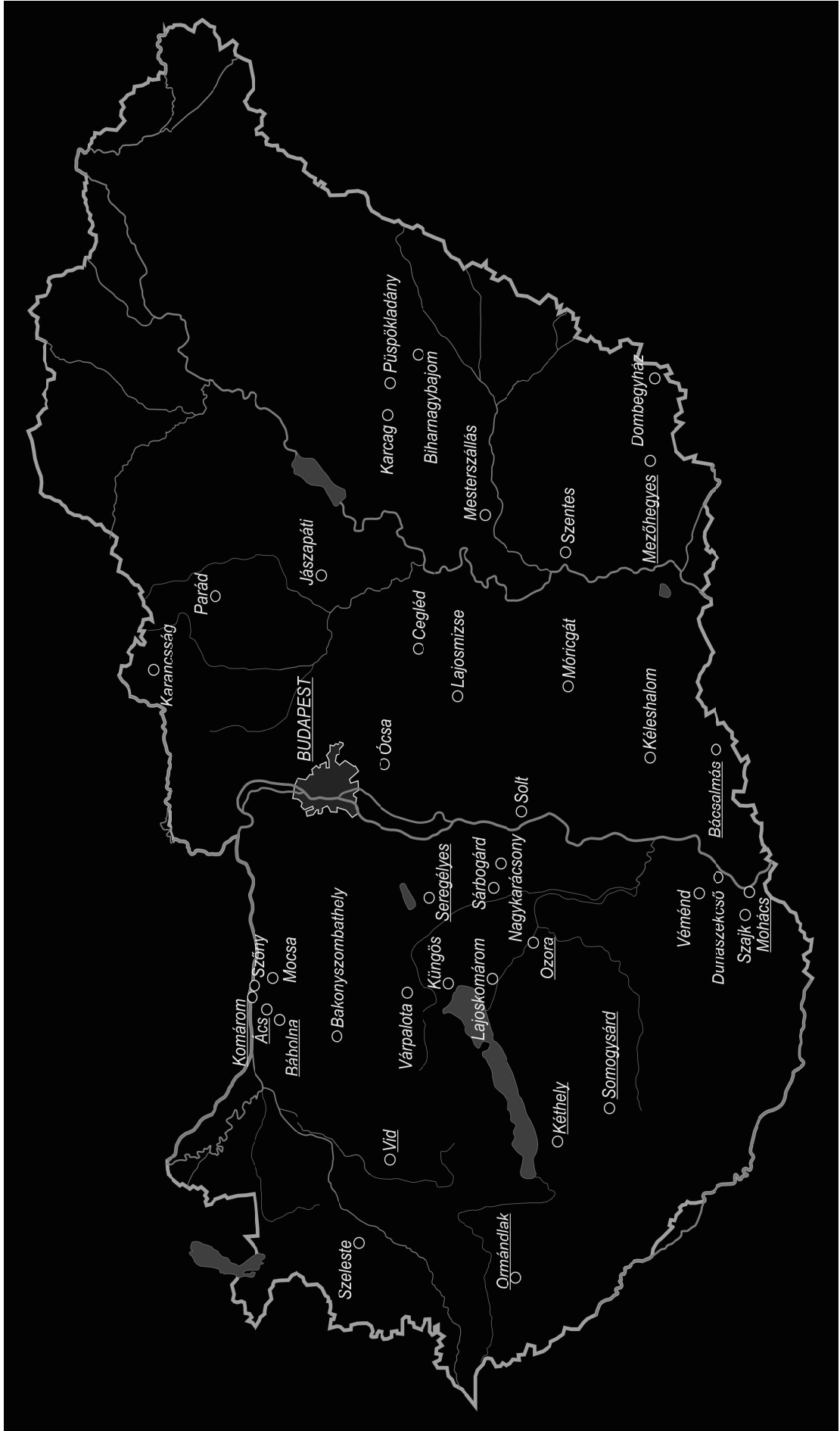
33. táblázat: A PCR-RFLP vizsgálatba bevont reprezentatív madár-eredetű törzsek eredményei

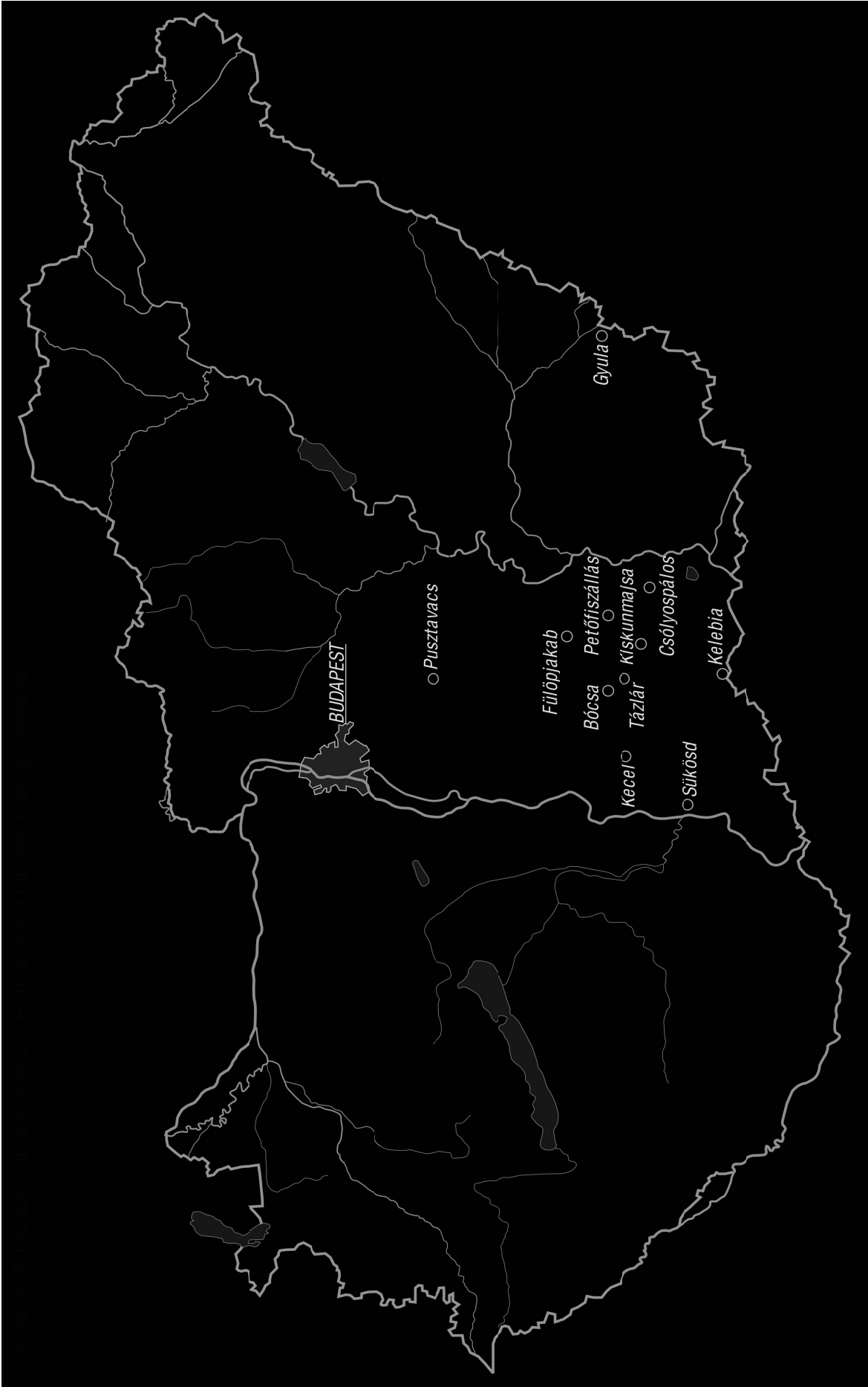
Azonosító	CapA		OmpA		PtfA		Oma87		OmpH	
	PCR	Dral	PCR	PvuII	PCR	Dral	PCR	Dral	PCR	Dral
P131 T	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.
P362 T	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	II.
P553/1 T	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.
P553/2 T	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.
P60 L	+	I.	+		-		+	I.	+	III.
P325 L	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	II.
P327 L	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.
P392 L	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	II.
P388 K	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	III.
P418 K	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.
P488 K	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.
P495 K	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.
P369 F	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	II.
P370 F	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	II.
P371 F	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	II.
P237 P	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.
P358 P	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	II.
P415 P	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	II.
A tip P	+	I.	+	I.	+	I.	+	I.	+	II.
P414 B	+	I.	+	II.	+	I.	+	I.	+	II.

35. táblázat: A *ptfA* gén szekvenálás során vizsgált 40 madár-eredetű törzs adatai

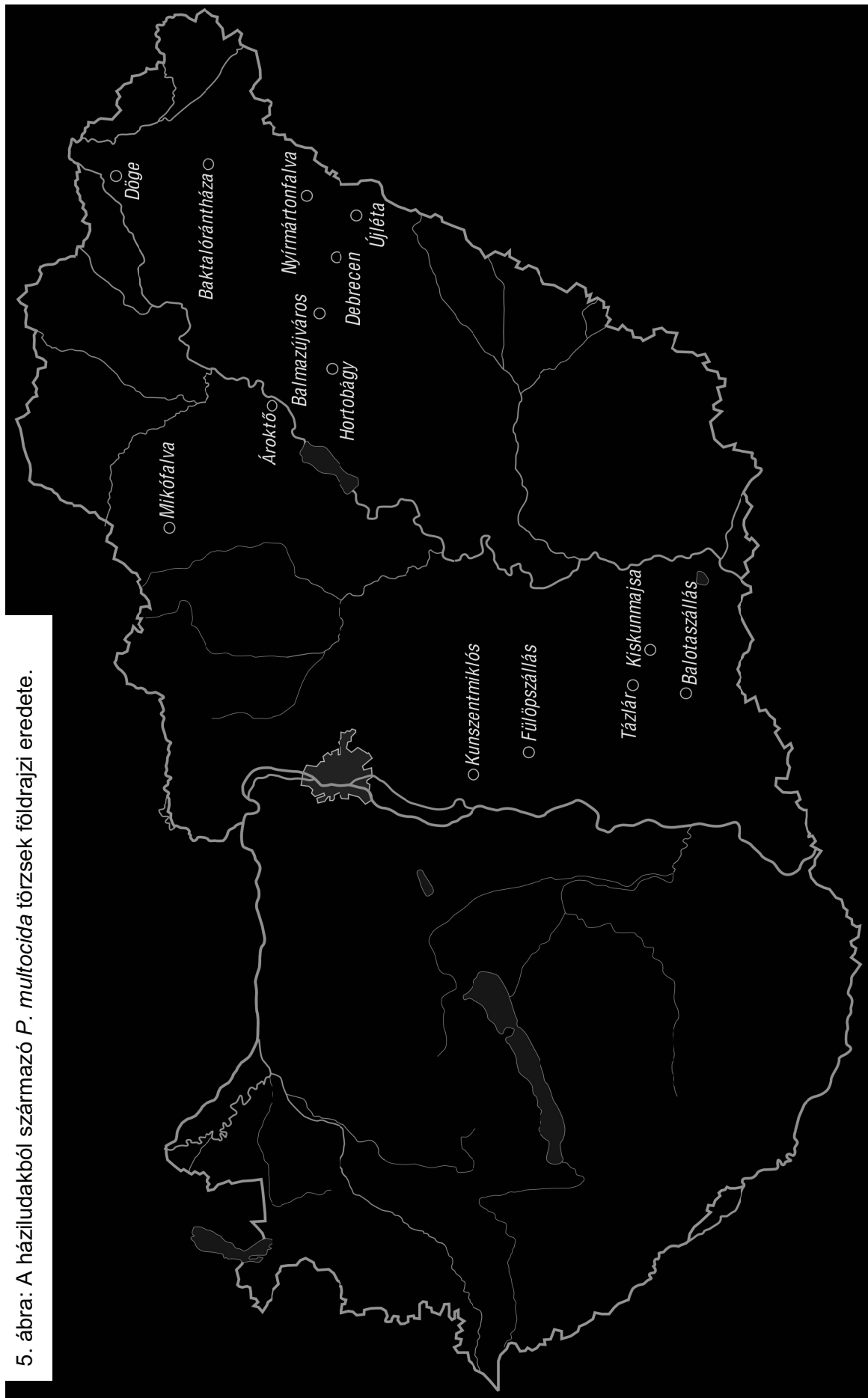
Azonosító	Burok típus	Szomatikus szerotípus	ERIC-PCR	PCR-RFLP
P60	A	1	III/3	III.
P61/1	A	1	III/4b	I.
P131	A	1	II	I.
P236	A	1	III/4a	I.
P237	A	1	IV	I.
P239	A	1	III/4a	I.
P244/1	A	1	III/4a	I.
P327	A	1	III/4a	I.
P329	A	4,5	III/2	II.
P339	F	4,5,(7)	IV	VI.
P358	A	3	IV	II.
P360	F	4,5,(7)	IV	VI.
P371	A	4,5	II	II.
P372	A	1	III/4b	I.
P373	A	1	III/4b	I.
P378	A	1	III/1	I.
P388	A	1	III/1	III.
P414	A	3,4	II	II.
P418	A	1	III/4b	I.
P428	F	1	I	II.
P473	A	1	III/1	I.
P485/9	A	1	III/1	I.
P486/1	A	1	III/4b	I.
P487/2	A	1	III/4b	I.
P488	A	1	III/4b	I.
P489	A	1	III/4b	I.
P492/4	A	1	III/4b	I.
P493/2	A	1	III/4b	I.
P495	A	1	III/4b	I.
P519/1	A	1	III/1	I.
P531	A	3	III/1	IV.
P538/1	A	1	III/1	I.
P547/1	A	1	III/1	I.
P553/2	A	1	IV	I.
P555/2	A	1	III/4a	I.
P558/3	A	3	IV	IV.
P559	A	1	III/4b	I.
P577	F	1	IV	IV.

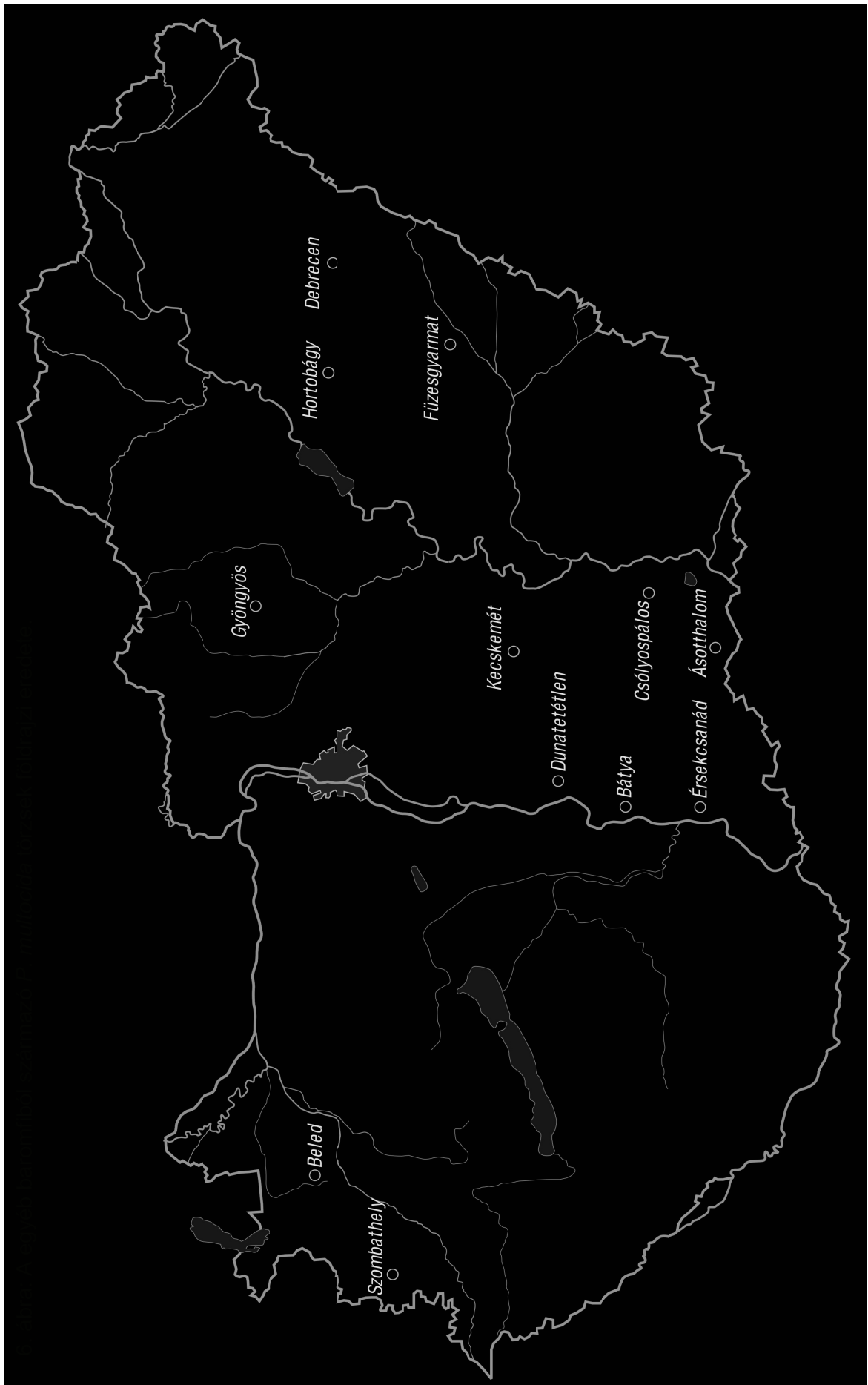
2. ábra: A sertésekől származó *P. multocida* törzsek földrajzi eredete. Az aláhúzás a toxintermelő törzsek izolálási helyeit jelzi.





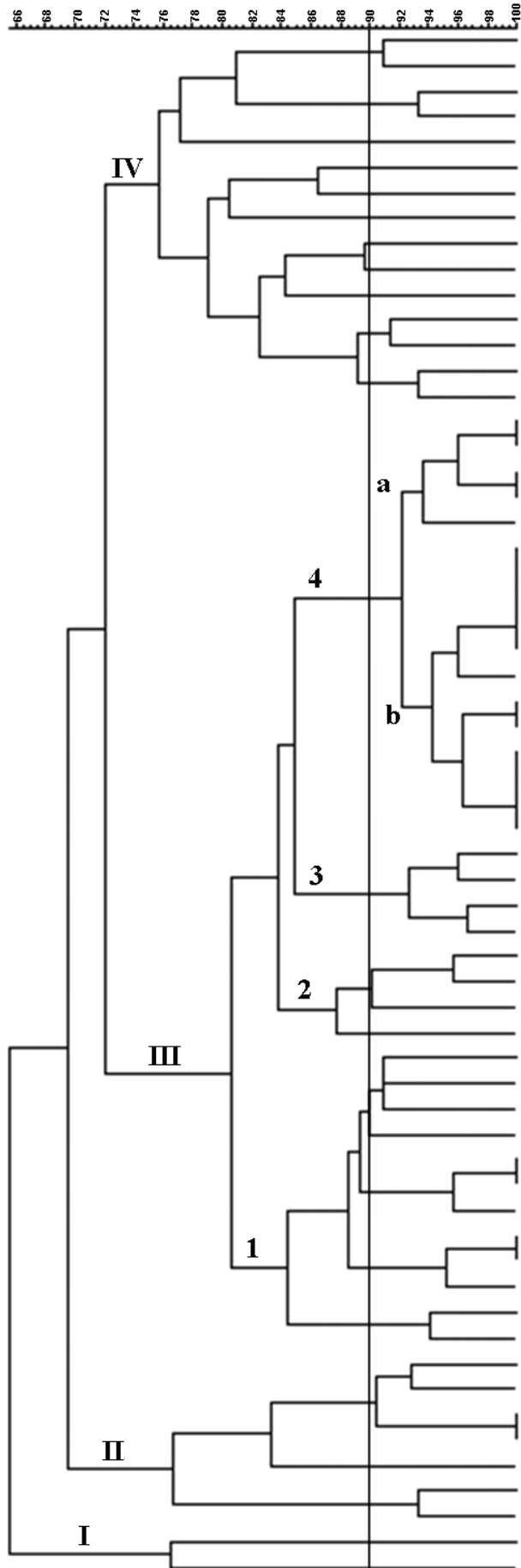
5. ábra: A háziludakból származó *P. multocida* törzsek földrajzi eredete.





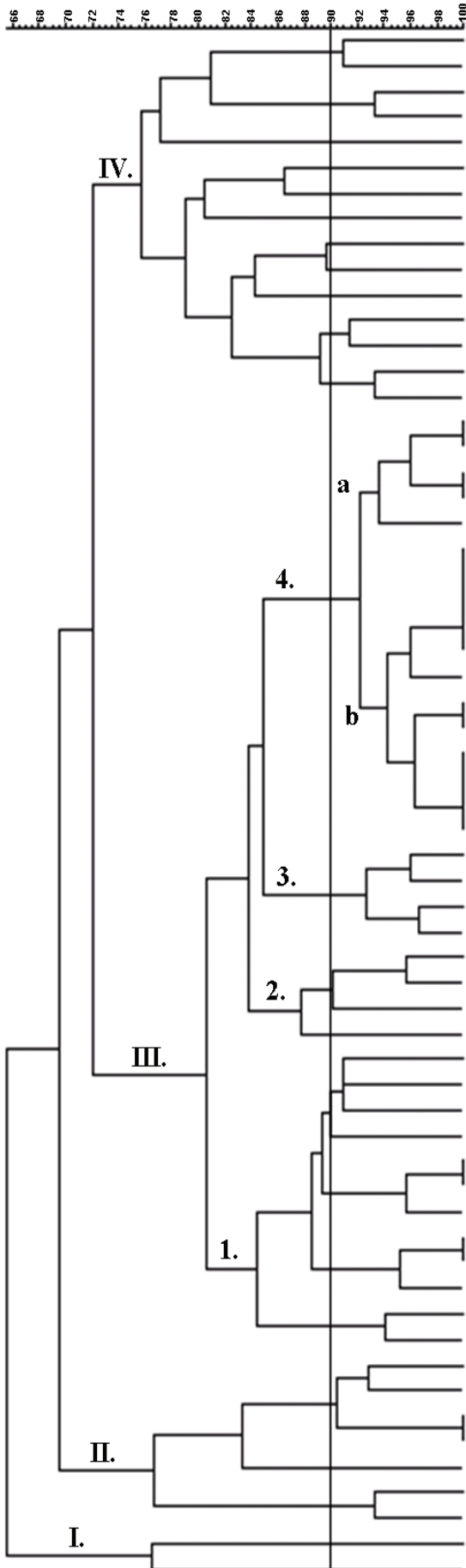
7. ábra: A 61 baromifi-eredetű *P. multocida* ERIC-PCR módszerével generált ujjlenyomat-mintázatának számítógépes összehasonlításával szerkesztett UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) dendrogram. A skála a százalékos hasonlóságot jelzi. Rövidítések: B:pézsmaréce; F:fácán; K:kacsa; L:liba; P:pulyka; T:tyúk
13. ábra: A 61 baromifi-eredetű *P. multocida ompH* génen PCR-RFLP vizsgálatban nyert hasítási-mintázatainak összefüggése a törzsek szerológiai sajátásaival és az ERIC-PCR által kialakított klaszterekkel. A skála a százalékos hasonlóságot jelzi. Rövidítések: B:pézsmaréce; F:fácán; K:kacsa; L:liba; P:pulyka; T:tyúk

7. ábra



Azonosító	Burok	Biotípus	Alfaj
P362 T	A	3	m
P577 P	F	6	s
P237 P	A	1	m
P339 P	F	4	m
P568/2 P	A	3	m
P553/2 T	A	4	m
P558/1 P	A	3	m
P558/2 P	A	3	m
P360 P	F	6	s
P553/1 T	A	1	m
P558/3 P	A	2	m
P359 P	A	3	m
P568/1 P	A	2	m
P358 P	A	3	m
P471/1 P	A	2	m
P239 L	A	-	s
P244/1 L	A	-	s
P236 L	A	-	s
P327 L	A	1	m
P555/2 K	A	6	s
P372 K	A	6	s
P373 K	A	6	s
486/1 K	A	1	m
P488 K	A	4	m
P493/1 K	A	1	m
P559 K	A	6	s
P61/1 L	A	6	s
P489 L	A	3	m
P492/4 K	A	1	m
P418 K	A	1	m
P487/1 K	A	1	m
P493/2 K	A	1	m
P391 L	A	1	m
P392 L	A	2	m
P60 L	A	3	m
P403/2 L	A	2	m
P329 L	A	3	m
P325 L	A	3	m
P432 L	A	5	s
P331 L	A	5	s
P485/9 K	A	4	m
P547/1 K	A	6	s
P495 K	A	6	s
P538/1 K	A	1	m
P519/1 K	A	1	m
P520/4 K	A	1	m
P522/1 K	A	6	s
P378 L	A	6	s
P473 L	A	6	s
P440 L	A	3	m
P388 K	A	1	m
P487/2 K	A	1	m
P531 P	A	2	m
P369 F	A	2	m
P370 F	A	2	m
P371 F	A	3	m
P471/3 P	A	2	m
P415 P	A	7	s
P131 T	A	4	m
P414 B	A	6	s
P428 B	F	3	m

13.ábra



Azonosító	Burok	Szerotípus	PCR-RFLP	<i>ptfA</i> allél
P362 Ch	A	3	II.	-
P577 T	F	10	IV.	b-B
P237 T	A	1	I.	a-A
P339 T	F	4,5,(7)	VI.	b-B
P568/2 T	A	3	II.	B
P553/2 Ch	A	1	I.	a
P558/1 T	A	3	IV.	-
P558/2 T	A	3	IV.	-
P360 T	F	4,5,(7)	VI.	b-B
P553/1 Ch	A	1	I.	A
P558/3 T	A	3	IV.	b
P359 T	A	3	II.	-
P568/1 T	A	3	II.	-
P358 T	A	3	II.	b-B
P471/1 T	A	3	II.	-
P239 G	A	1	I.	a-A
P244/1 G	A	1	I.	a
P236 G	A	1	I.	a-A
P327 G	A	1	I.	a-A
P555/2 D	A	1	I.	a
P372 D	A	1	I.	a
P373 D	A	1	I.	a-A
P486/1 D	A	1	I.	a
P488 D	A	1	I.	a
P493/1 D	A	1	I.	A
P559 D	A	1	I.	a
P61/1 G	A	1	I.	a
P489 G	A	1	I.	a-A
P492/4 D	A	1	I.	a
P418 D	A	1	I.	a-A
P487/1 D	A	1	I.	A
P493/2 D	A	1	I.	a
P391 G	A	3	II.	B
P392 G	A	3	II.	-
P60 G	A	1	III.	b-B
P403/2 G	A	3	II.	B
P329 G	A	4,5	II.	b-B
P325 G	A	3	II.	B
P432 G	A	3	II.	-
P331 G	A	3	II.	-
P485/9 D	A	1	I.	a-A
P547/1 D	A	1	I.	a
P495 D	A	1	I.	a
P538/1 D	A	1	I.	a-A
P519/1 D	A	1	I.	a
P520/4 D	A	1	I.	a
P522/1 D	A	1	I.	a
P378 G	A	1	I.	a-A
P473 G	A	1	I.	a-A
P440 G	A	3	II.	B
P388 D	A	1	III.	a-A
P487/2 D	A	1	I.	a
P531 T	A	3	IV.	b-B
P369 Ph	A	4,5	II.	-
P370 Ph	A	4,5	II.	B
P371 Ph	A	4,5	II.	b
P471/3 T	A	3	II.	B
P415 T	A	3	II.	-
P131 Ch	A	1	I.	a-A
P414 B	A	3,4	II.	b-B
P428 B	F	1	II.	b-B

11 Köszönetnyilvánítás

E helyen szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Magyar Tibornak**, az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete igazgatójának, aki az általa vezetett Légzőszervi bakteriológia témacsoportban helyet biztosított számomra, és ezzel lehetővé tette a disszertáció elkészítését. Köszönettel tartozom a témaválasztásban és kidolgozásban nyújtott segítségéért, szakmai tanácsaiért, valamint mind a dolgozat, mind a munkám során elkészült egyéb publikációk értékének növelése érdekében tett észrevételeiért és kritikáiért.

Hálás köszönettel tartozom **Dr. Varga Zsuzsanna** kolleganőmnek, aki szakmai szemléletemet formáló tanácsai mellett a laboratóriumi munka során is mindig segítségemre volt, mindvégig hitt bennem és a munkánk sikerében.

Köszönet illeti **Dr. Wehmann Enikő** kolleganőmet, aki a munkám során felmerülő, molekuláris módszereket érintő problémák megoldásában és az ezzel kapcsolatos számítógépes alkalmazások elsajátításában nyújtott segítő kezet.

Továbbá, köszönöm témacsoportunk többi tagjának, **Hegedűs Évának**, **Schihlgruberné Oryszcsák Katalinnak**, **Khayer Bernadettnek** és **Dr. Szabó Rékának**, hogy szükség szerint gyakorlati és elméleti kérdésekben segítségemre voltak.

Köszönettel tartozom **Dr. Ivanics Évának**, **Juhászné Dr. Kaszanyitzky Évának** és **Samu Péterné Dr. Szentesi Katalinnak**, az MgSzH Központ Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság munkatársainak az osztályukon izolált *P. multocida* törzsek rendelkezésünkre bocsátásáért, és az az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok elvégzése során nyújtott segítségükért. Végül, de nem utolsó sorban, köszönöm **Dr. Nógrády Noéminek**, az ERIC-PCR ujjlenyomat-mintázatok szoftveres kiértékelésében és **Dr. Bányai Krisztiánnak** a szekvenálásban és az allél-specifikus PCR kidolgozásában nyújtott szakmai segítségét.

És hálás köszönet, név nélkül, mindazoknak, családom tagjainak, barátoknak, akik talán a lehető legtöbbet tették értem e nehéz feladat során, soha nem szűntek meg bízni bennem és mindig határtalan türelemmel voltak irántam.