

Szent István Egyetem Állatorvos tudományi Kar
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

HAZAI NEM BESOROLHATÓ *ACTINOBACILLUS*
***PLEUROPNEUMONIAE* TÖRZSEK ÖSSZEHASONLÍTÓ**
VIZSGÁLATA

Készítette: Birgermajer Anetta

Témavezető: Dr. Sárközi Rita
SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Budapest

2014

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	3
2.	Irodalmi áttekintés	5
2.1	A kórokozó	5
2.2	Kórtan	6
2.3	Kórbonctan.....	7
2.4	Szerotipizálás	10
3.	Anyag és módszer.....	15
3.1	Baktériumtörzsek	15
3.2	Baktériumtenyésztés	15
3.3	Hiperimmun savó előállítása	16
3.4	Szerotipizálás	16
3.4.1	Passzív hemagglutinációs próba.....	16
3.4.2	PCR vizsgálat	18
4.	Eredmények	21
4.1	Passzív hemagglutinációs próba	21
4.2	PCR vizsgálat.....	22
5.	Következtetések.....	23
6.	Összefoglaló	24
7.	Summary.....	25
8.	Irodalmi jegyzék	26
9.	Köszönetnyilvánítás	30

1. Bevezetés

A sertés az egyik legjelentősebb gazdasági haszonállatfajunk. A sertéshústermelés a világ összes hústermeléséből az első helyet foglalja el. Hogy a termelés minél hatékonyabb és gyorsabb legyen, napjainkra világszerte a nagyüzemi tartástechnológia került előtérbe. A nagy létszámú, zárt tartástechnológia előnyei mellett annak hátrányai is megmutatkoznak. A különböző fertőző betegségek könnyebben kialakulnak és terjednek, ezzel jelentős gazdasági veszteségeket okozva. A heveny elhullások mellett, az idült megbetegedések okozta termelésesökkenés, a hízalási időszak megnyúlása és a tetemes gyógyszerfelhasználás növeli a sertéshús előállításának költségeit.

Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* okozta légzőszervi megbetegedés világszerte, így hazánkban is jelentős gazdasági károkat okoz. A fertőzött állatok nem képesek genetikai adottságaik teljes kihasználására, átlagos napi súlygyarapodásuk elmarad egészséges társaikétól, ezáltal vágáskori súlyuk sem éri el a kívántat. A gyógykezelések költsége, valamint a betegség heveny formája által okozott magas elhullási arány szintén jelentős veszteségeket okoz a gazdaságok számára.

Az *A. pleuropneumoniae* baktériumfajnak két biotípusát, ezen belül pedig 15 szerotípusát különböztetjük meg. Egy 1992-es felmérés alapján hazánkban az 1-es biotípus fordul elő 90-95%-ban, ennek is az 1-es és a 2-es szerotípusa, de alkalmanként előfordulnak a 3-as, 7-es, 9-es és a 11-es szerotípusok is.

A törzsek négyféle toxint termelnek (Apx I-II-III-IV), melyek hemolítikus és toxikus hatású fehérjék, így jelentős szerepük van a tüdőben kialakuló vérzések és elhalások kialakításában, ezért virulencia faktorok.

Az aerogén úton bekerült kórokozó a tüdőben heveny, savós-vérzéses, majd vérzéses-elhalásos tüdőgyulladást és fibrines mellhártyagyulladást idéz elő. A citotoxinok tönkreteszik az alveolaris makrofágokat és a tüdő limfoid sejtjeit, amelyek súlyosbítják a kórképet (VARGA, és mtsai., 2007).

Munkánk során célul tűztük ki:

- a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék törzsgyűjteményéből származó, valamint telepekről beérkezett sertéstüdőkből frissen izolált, be nem sorolt *Actinobacillus pleuropneumoniae* törzsek vizsgálatát,
- a törzsek szerotipizálását passzív hemagglutinációs próbával és molekuláris biológiai módszerrel,
- a passzív hemagglutinációs próba és a PCR vizsgálat eredményeinek összehasonlítását,
- az eddig be nem sorolt szerotípus jellemzőinek leírását

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A kórokozó

Elsőként az Egyesült Államokban 1963-ban leírt, korábban *Haemophilus pleuropneumoniae*-nak nevezett kórokozó csak sertésekben okoz felső légúti tünetekkel járó vérzéses-elhalásos tüdő- és fibrines mellhártyagyulladást. Később a kórokozót a DNS struktúrája alapján átsorolták az Actinobacillus nemzetségbe és az *Actinobacillus pleuropneumoniae* nevet kapta (MARSTELLER és FENWICK, 1999).

A kórokozó a Pasteurellaceae családba tartozik, Gram-negatív, fakultatív anaerob baktérium. Fakultatív patogén és gazda specifikus, csak a sertést betegíti meg. Mozgásra képtelen, spórákat nem képez, gyenge ellenállású, kokkoid vagy rövid pálcika alakú. Igényes baktérium, tenyésztése csokoládé vagy véres agaron történik, utóbbin béta-hemolízist okoz. A baktérium hozzávetőlegesen 1 mm átmérőjű, szürkésfehér, éles szélű, domború, sima felszínű telepeket képez (FODOR, és mtsai., 1989a; TUBOLY, és mtsai., 1998).

Tenyésztési tulajdonságai alapján két biotípust különböztetünk meg, az 1-es biotípusba tartozó törzsek NAD-ot (nikotinamid-adenin-dinukleotid) igényelnek a növekedésükhöz. Izoláláskor NAD-ot termelő *Staphylococcus aureus*-t használunk, amellyel ún. dajkatenyészetet hozunk létre. Ezzel szemben a 2-es biotípusba tartozó törzsek nem igényelnek NAD-ot a növekedésükhöz, valamint nagyobb telepeket képeznek, levestenyészetben jobban szaporodnak, illetve erősebb béta-hemolízist és ureáz aktivitást mutatnak (NIVEN és LÉVESQUE, 1988; TUBOLY, és mtsai., 1998). Az 1-es biotípusba tartozó törzsek virulensebbek, a 2-es biotípus szórványosan fordul elő (FODOR, és mtsai., 1989b) és csak nagyon magas dózisban vagy súlyos immunszuppresszió esetén képes túlheveny, illetve heveny formában megnyilvánuló betegség kialakítására (NIELSEN, és mtsai., 1997). A két biotípus hasonló kórbonctani és kórszövettani elváltozást alakít ki (FODOR, és mtsai., 1989b).

2.2 Kórtan

Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* nagyon gyakori okozója a sertések baktériumok okozta tüdőgyulladásának. Sokszor kevert fertőzésekből mutatható ki, és leggyakrabban *Pasteurella multocida*-val együtt fordul elő (FODOR, és mtsai., 1989b). Ezen kívül gyakran kombinálódik *Haemophilus parasuis*-szal és különböző Streptococcus fajokkal (FRANK, és mtsai., 1992). A kórokozó elsősorban a nagy létszámú, zárt sertéstelepeken okoz jelentős gazdasági kárt. Legsúlyosabb formában a kolosztrális védetség megszűnése után jelentkezik 12-16 hetes korban, de a kórokozó elszaporodása esetén bármilyen életkorú sertést képes megbetegíteni (MOLNÁR, 2002).

A kórokozót rendszerint tünetmentes baktériumhordozó sertések viszik be egy-egy állományba. A sertések aerogén úton, illetve állományon belül közvetlen érintkezéssel, elsősorban felköhögött hörgő- és orrváladék belélegzésével fertőződnek. A betegség kifejezetten ragályos, az állományba bekerülve gyorsan terjed (VARGA, és mtsai., 2007). Az újszülött malacok a kocától a szoptatás során fertőződnek leggyakrabban, így a malacok elkülönítése megelőzheti a fertőzést (MARSTELLER és FENWICK, 1999). A fertőzött kocák malacai ugyanakkor a kolosztrumnak köszönhetően 5-9 hétig tartó védetségre tesznek szert (VARGA, és mtsai., 2007).

A betegség kifejeződése a csíramennyiség függvényében változik. A fertőzéshez szükséges csíraszám a korral logaritmikusan növekszik a fertőzött állományokban (SEBUNYA, és mtsai., 1983). Hazánkban főleg a téli, kora tavaszi hónapokban számottevő a fertőzés megjelenése, de nagy állományokban egész évben jelen lehet (VARGA, és mtsai., 2007).

A betegség lefolyását az állatok immunállapota, valamint a kórokozó virulenciája és a fertőzés mértéke befolyásolja. Állományonként a morbiditás 30-80%, míg a mortalitás 1-50% között változhat. Gyakran előfordul tünetmentes hordozás, különösen idősebb korban. Később ezek az egyedek jelentik a fertőzés forrását, ha az állomány ellenálló képessége valamilyen okból csökken (MOLNÁR, 2002). A fertőzés klinikai megjelenését a hajlamosító tényezők, különösen a stressz, valamint az egyidejűleg megjelenő egyéb kórokozók jelentősen befolyásolják azáltal, hogy csökkentik a légzőszervek védekező képességének hatékonyságát és fokozzák az *A. pleuropneumoniae* ürítésének mértékét (BOSSÉ, és mtsai., 2002).

Az antibiotikumos kezelés a baktériumhordozást nem akadályozza meg, ezért a betegség megelőzése érdekében gondolnunk kell a hajlamosító tényezők kiiktatására és a kórokozó behurcolásának megakadályozására (MOLNÁR, 2002).

A betegség túlheveny, heveny és idült formában jelentkezhet. Túlheveny esetben klinikai tünetek megjelenése nélkül az állatok 1-2 napon belül elhullanak. Ez a forma leginkább a behurcolással fertőződött állományokban fordul elő. Heveny esetben az elhullást megelőzően rövid ideig láz, étvágytalanság, könnyezés, véres-savós orrfolyás, neheztelt légzés, cianózis és köhögés jellemző. A heveny forma idültté válhat vagy eleve idült formában jelentkezhet a megbetegedés. Az idült formában a tünetek már kevésbé kifejezettek, étvágycsökkenés, köhögés és fejlődésben való visszamaradás figyelhető meg. A jellemző tünetek és tüdőbeli elváltozások képezik az elsődleges diagnózis alapját, de a pontos diagnózis felállításához elengedhetetlen a bakteriológiai vizsgálat (MOLNÁR, 2002).

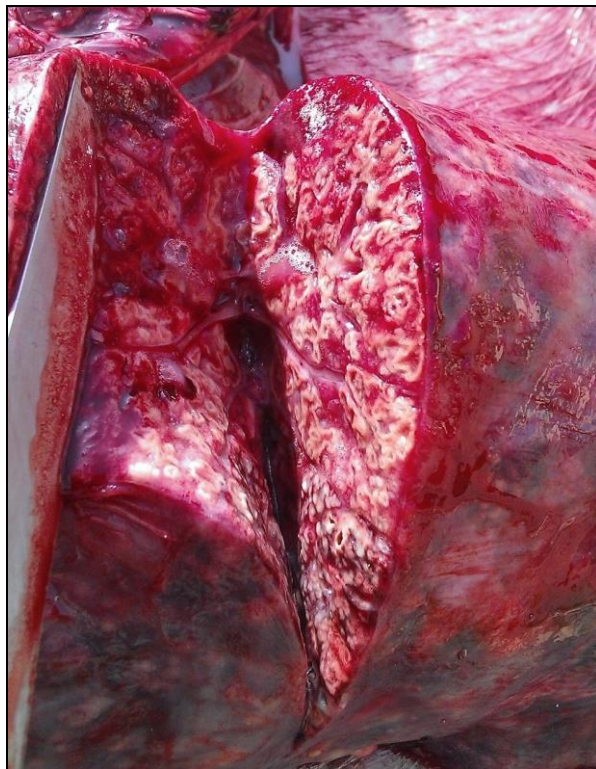
2.3 Kórbonctan

A sajátos kórtani elváltozások szinte kizárólag a tüdőre szorítkoznak. Elsősorban a rekeszi lebenyekben mutatkozik az elváltozás. A fő jellemzők: ödéma, vérzés, fibrines exsudatum kiválása, gyulladás és elhalás. A tüdő felülete fölé emelkedő különböző nagyságú, tömött tapintatú gócok környezetében vérzés, felületükön pedig minden esetben mellhártyagyulladás látható. Heveny esetben (**1. és 2. ábra**) a bővérűség dominál, míg idült formában (**3. ábra**) kötőszövetes tokkal határolt elhalásos gócok uralják a makroszkópos képet (MOLNÁR, 2002).

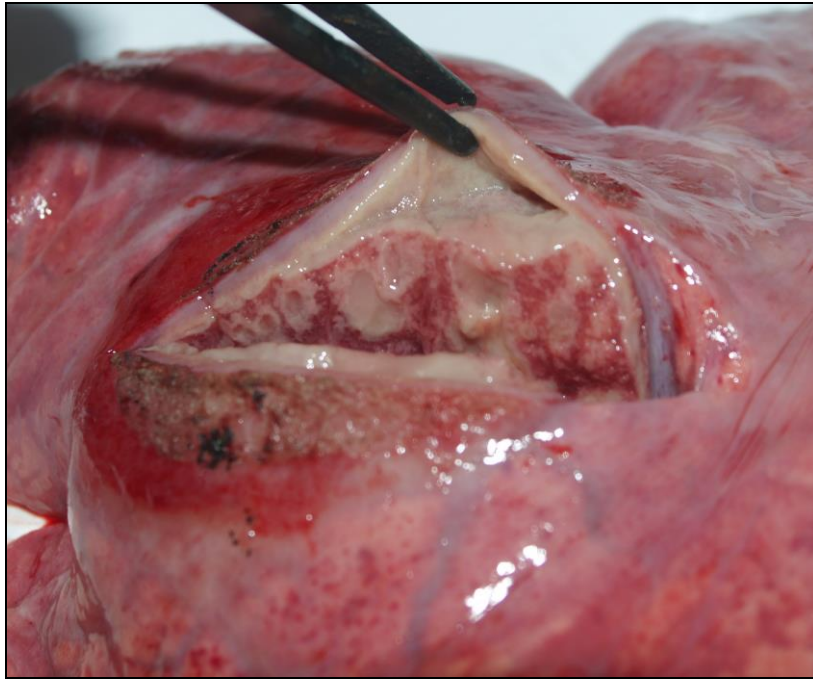
Általában a tracheobronchiális és mediastinális nyirokcsomók is érintettek. A baktérium a nyirokerek útján éri el a mellhártyát, a bakteriémia ritka (BOSSÉ, és mtsai., 2002). A tüdőbeli elváltozások néhány hét alatt kialakulnak, de gyakran az idültté váló betegség következtében a vágóhídon már csak összenövéseket láthatunk a mellhártyán, ami utal a korábbi fertőzésre (MARSTELLER és FENWICK, 1999).



1. ábra: *Actinobacillus pleuropneumoniae* okozta heveny tüdőelváltozás, sertésstelepi felvétel



2. ábra: *Actinobacillus pleuropneumoniae* okozta heveny tüdőelváltozás



3. ábra: *Actinobacillus pleuropneumoniae* okozta idült tüdőelváltozás

2.4 Szerotipizálás

A szerotipizálás hozzájárul ahhoz, hogy megismerhessük egyes fertőző betegségek járványtanát, segíti a vakcinák előállítását, ezáltal a betegségek megelőzését, valamint lehetővé teszi a fertőzött állományok szerológiai szempontból történő monitorizálását (MITTAL, és mtsai., 1993).

Az *A. pleuropneumoniae* két biotípusán belül a burok poliszacharidok (capsule polysaccharide, CPS) és lipopoliszacharidok (LPS) alapján jelenleg 15 szerotípust különítünk el (FODOR, és mtsai., 1989b; NIELSEN, és mtsai., 1997; BLACKALL, és mtsai., 2002).

A felületi antigének hasonlósága miatt gyakoriak a keresztreakciók. Kifejezett keresztreakció figyelhető meg az 1-9-12, a 4-7, valamint a 3-6-8-as szerotípusok között (FREY és NICOLET, 1990).

Az egyes országokban különböző szerotípusok fordulhatnak elő, de egy-egy állományban párhuzamosan több szerotípus is jelen lehet. Ilyenkor jellemzően a betegség lefolyása súlyosabb, a mortalitás pedig magasabb lesz (MOLNÁR, 2002). Európában leggyakrabban az 1-es biotípus 2-es és 9-es szerotípusa fordul elő (MARSTELLER és FENWICK, 1999). Hazánkban 1988-ig kizárólag 1-es és 2-es szerotípusba tartozó törzseket izoláltak, és továbbra is a 2-es szerotípus fordul elő leggyakrabban (MOLNÁR, 2002). A dominánsan előforduló szerotípusok eloszlása azonban országonként különbözik, ezért a sertések behozatalakor mindig számolnunk kell a kockázattal, hogy esetlegesen új szerotípus üti fel a fejét a hazai állományokban (KUCEROVA, és mtsai., 2005).

Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* okozta fertőzések diagnosztizálásában "gold standard"-nak a klinikai tünetek és a tüdő elváltozások megfigyelésével együtt a baktérium izolálása tekinthető (MARSTELLER és FENWICK, 1999). Heveny esetekben a kórokozó viszonylag könnyen izolálható, ezzel szemben az idült formánál a másodlagosan megtelepedő baktériumok a tenyésztést megnehezítik (MOLNÁR, 2002).

A kórokozót a fertőzött állatok orrüregéből, manduláiból, középfüléből és tüdejéből izolálhatjuk, habár a baktérium elsődlegesen az alsóbb légutak (alveolusok és hörgőcskék) hámsejtjeihez kötődik (DOM, és mtsai., 1994).

A baktérium felületi poliszacharid burkában (CPS) lévő szerotípus specifikus antigének jelenlétét az 5-ös szerotípus burkának vizsgálata során írták le, amelyben legnagyobb mennyiségben egy hexozamin, a glukozamin fordult elő (INZANA és MATHISON, 1987). Később a hexozamin tartalomra alapozva vizsgálták az 1, 2, 5 és 7 szerotípusok burkát. A CPS mennyiségét a hexozamin tartalom alapján határozták meg, ugyanakkor mérték a fehérjék, valamint a KDO (alfa-ketodeoksioktonát) tartalom alapján a lipopoliszacharidok (LPS) mennyiségét. A burokból nyert kivonat minél kevesebb fehérjét és KDO-t, de minél több CPS-t (hexozamin) tartalmazott, annál kifejezettebb szerotípus specifikusságot mutatott. Ugyanis a jelen lévő fehérjék fenollal történő kivonásával a keresztreakciók előfordulása csökkent. Ez enged következtetni a szerotipizálás szempontjából a CPS fontosságára (BOSSÉ, és mtsai., 1990).

Klasszikus és molekuláris biológiai módszerek állnak rendelkezésünkre, melyek különböző érzékenységek a baktérium szerotipizálása szempontjából. A burok antigének alapján történő szerotípus-meghatározásra leggyakrabban a koagglutinációs, a tárgylemez-agglutinációs, a csőagglutinációs, a gyűrűprecipitációs, az immundiffúziós, a passzív hemagglutinációs próbát és az ellenáramú immunoelektroforézist alkalmazzák (MITTAL, és mtsai., 1993).

A szerzők többsége a passzív hemagglutinációs próbát találta a legalkalmasabb eljárásnak specificitás és érzékenység szempontjából (MOLNÁR, 1990). A próba lényege, hogy oldott antigéneket adszorbeálnak vörösvértestek felületéhez, és pozitív próba esetén az ellenanyagok sejtfelületi antigénekhez történő kapcsolódása agglutinációt eredményez. Ellenkező esetben a vörösvértestek éles határral jelzetten leülnek a cső aljára (NIELSEN, 1986).

Figyelembe kell venni, hogy különböző tesztek egymás mellett végezve sosem kapunk teljesen egységes eredményt. A koagglutinációs próba (Co-A), a direkt immunfluoroszenciás módszer (IF) és az agargél-precipitációs próba (AGP) összehasonlításakor a Co-A teszt bizonyult a leginkább érzékeny eljárásnak (MOLNÁR, 1990).

A keresztreakciók előfordulásán kívül a laboratóriumi körülmények megléte, az időigényesség és a specifikus antitestek jelenlétének szüksége miatt egyre inkább előtérbe kerülnek a molekuláris biológiai módszerek (RAYAMAJHI, és mtsai., 2005).

Egy külső membrán lipoproteint kódoló génre (omlA) alapozott faj-specifikus PCR próbák képesek elkülöníteni az *A. pleuropneumoniae*-t a többi Pasteurellaceae családba tartozó baktérium fajtól és az egyéb légúti kórokozóktól, de a módszer szerotipizálásra alkalmatlan. Ezzel szemben a multiplex, toxingénekre épülő PCR próbák előnye, hogy egy lépésben képesek faj- és szerotípus meghatározást is végezni.

A kórokozó 4 fehérje természetű exotoxin termelésére képes (ApxI, ApxII, ApxIII és ApxIV), melyek citotoxikus és/vagy hemolítikus tulajdonságuk révén az alveoláris makrofágokat károsítva okoznak vérzést és elhalást (MOLNÁR, 2002). Az ApxI erősen hemolítikus és citotoxikus, az ApxII enyhén hemolítikus és mérsékelt citotoxikus, míg az ApxIII nem hemolítikus, de erősen citotoxikus tulajdonságú. Az egyes szerotípusok különböző kombinációban termelik ezeket a toxinokat (**1. táblázat**). Az ApxIV toxint minden *A. pleuropneumoniae* szerotípus termeli *in vivo* (SCHALLER, és mtsai., 1999), és az előző három toxintól eltérően ezt a toxint csak az *A. pleuropneumoniae* képes termelni, míg a többi toxint egyéb Actinobacillus fajok is képesek előállítani (CHO és CHAE, 2001; RAYAMAJHI, és mtsai., 2005).

1. táblázat: A toxintermelés szerotípusonkénti eloszlása (RAYAMAJHI, és mtsai., 2005)

Toxinok	Szerotípusok
ApxI	1, 5a, 5b, 9, 10, 11, 14
ApxII	10 és 14 kivételével az összes szerotípus
ApxIII	2, 4, 6, 8, 15
ApxIV	összes szerotípus

Ezen toxinok felelősek a klinikai tünetek és a jellemző kórbonctani elváltozások kialakulásáért. Azok az állatok ugyanis, amelyeket kísérletileg Apx toxinokat nem termelő *A. pleuropneumoniae* törzssel fertőztek, nem vagy csak enyhe klinikai tüneteket mutattak, valamint a boncolási eredmény is negatív volt vagy csak enyhe hurutos bronchopneumonia volt látható (KAMP, és mtsai., 1997).

Az ApxI és ApxIII toxinoknak van elsődleges szerepe a súlyos klinikai tünetek és tüdő elváltozások kialakításában. Az ApxII toxin csak enyhébb tüneteket kialakítására képes (KAMP, és mtsai., 1997).

Minden szerotípus hasonló elváltozást képes kialakítani, attól függetlenül, hogy némely szerotípus virulensebb a másikonál. A legvirulensebb változatok ApxI és ApxII exotoxint is képesek termelni, de a felületen kifejeződő poliszacharid antigének mennyisége is befolyásolja az egyes szerotípusok, valamint a szerotípusokon belül az egyes törzsek virulenciáját (BOSSÉ, és mtsai., 2002).

Ugyanakkor az egyes szerotípusok virulenciáját a termelt hemolizinek is befolyásolják. A kórokozó két fehérje természetű hemolizin termelésére képes (HlyI és HlyII), amelyek hőre érzékenyek és proteázok hatására inaktiválódnak. Azon szerotípusok, amelyek HlyI-et, illetve HlyI-et és HlyII-t is termelnek virulensebbek, mivel a HlyI sokkal erősebb hemolízist képes okozni, mint a HlyII. Az egyes szerotípusok különböző kombinációban termelik ezen hemolizineket (**2. táblázat**).

2. táblázat: Hemolizinek szerotípusonkénti termelése

Hemolizinek	Szerotípusok
HlyI	1
HlyII	2, 4, 6, 7, 8
HlyI és HlyII	5a, 5b, 9, 10, 11

A 3 és 12-es szerotípusok a vizsgálatok során nagyon gyenge hemolitikus aktivitást mutattak (FREY és NICOLET, 1990).

Az RTX toxincsaládba tartozó négy féle toxint (ApxI, ApxII, ApxIII és ApxIV) minden szerotípus különböző kombinációban termeli, ezt szemlélteti a **3. táblázat** (BOSSÉ, és mtsai., 2002; RAYAMAJHI, és mtsai., 2005).

3.táblázat: A termelt toxinok szerotípusonkénti eloszlása (BOSSÉ, és mtsai., 2002):

	<i>Operon</i>			<i>Activitás</i>		MW (kDa)	Szerotípus
	<i>Activátor</i>	<i>Structurális</i>	<i>Export</i>	<i>Hemolízis</i>	<i>Citotoxicitás</i>		
ApxI	apxIC	apxIA	apxIBD	erős	erős	105-110	1,5a,5b,9,10,11
ApxII	apxIIC	apxIIA	None	gyenge	mérsékelt	103-105	mind, kivéve 10
ApxIII	apxIIIC	apxIIIA	apxIIIBD	nincs	erős	120	2,3,4,6,8
ApxIV	ORF1	apxIVA	Nincs	gyenge	nem meghatározott	200	Mind

Korrelációt figyeltek meg a szerotípusok és a toxintermelés között. Az apxIV gén kifejezetten az *A. pleuropneumoniae* fajra specifikus. Másik előnyös jellemzője még, hogy négy különböző méretben termelődik. Az ApxI, ApxII és ApxIII toxint egyéb Actinobacillus fajok is képesek előállítani, így az *A. rossii*, az *A. suis* és a nem patogén *A. porcinosillarum*. Az Apx toxin génekre alapozott módszert alkalmazva a 2-8-15; az 5a-5b; a 9-11, valamint a 12-13 szerotípusok között keresztreakció volt megfigyelhető, így a toxinprofilok alapján csupán a szerotípusok négy csoportja különíthető el (RAYAMAJHI és mtsai., 2005).

3. Anyag és módszer

3.1 Baktériumtörzsek

A vizsgálatainkba öt *A. pleuropneumoniae* törzset vontunk be. Közülük egyet-egyet Baranya (270/12) és Komárom-Esztergom megyéből (272/12) származó sertésekből vágóhídon izoláltunk, két törzset két Hajdú-Bihar megyei telepről (51/14, 107/14), míg egy törzset egy Jász-Nagykun-Szolnok megyében (85/14) lévő sertéstelepről származó állatból frissen tenyésztettük ki. Mind az öt törzs 1-es biotípusú volt, és a 15 szerotípus típustörzsével szemben korábban megtermelt hiperimmun savót használva a passzív hemagglutinációs próbával egyik ismert szerotípusba sem tudtuk besorolni.

3.2 Baktériumtenyésztés

A friss izolátumokat és a -80°C-on tárolt tanszéki törzseket tripton-szója agar (TSA) alapú, 10% juhvért tartalmazó véres agarra oltottuk. A szélesztést követően a NAD-dependens törzsek kitenyésztése érdekében *Staphylococcus aureus*szal dajkatenyészetet hoztunk létre. A táptalajokat aerob körülmények között 24 óráig 5% CO₂ jelenlétében 37°C-os termosztátban inkubáltuk. A törzseket morfológiai, tenyésztési és biokémiai tulajdonságaik szerint határoztuk meg a standard leírások alapján (BARROW és FELTHAM, 2003). *A. pleuropneumoniae*-nak ítéltük meg a kórokozót, amennyiben a tenyésztés során a baktérium a táptalaj felületén 1-2 mm átmérőjű, szürkésfehér, sima felszínű, béta-hemolízist mutató NAD-függő telepeket képezett, valamint mikroszkóp alatt vizsgálva Gram- negatív, kokkoid pálca formát mutatott. Az izolátumok egy-egy telepét többször egymás után 1% NAD-ot tartalmazó TSA csokoládé agarra oltottuk tovább és szintenyészetet hoztunk létre.

3.3 Hiperimmun savó előállítása

Az öt, általunk be nem sorolhatónak ítélt törzssel szemben 2014. tavaszán termeltettünk hiperimmun savót nyulakban.

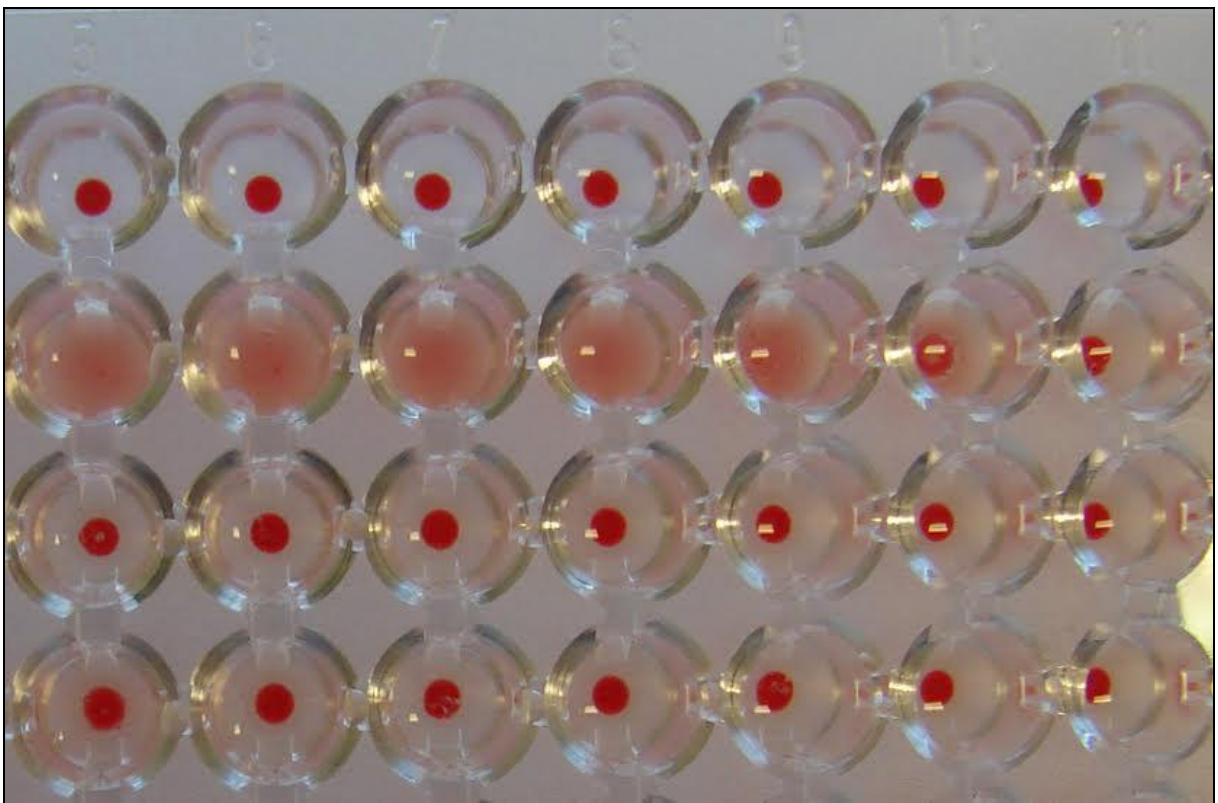
Az eljárás során az öt *A. pleuropneumoniae* törzset 1% NAD-ot tartalmazó csokoládé agaron elszaporítottuk, majd fiziológiás sóoldattal MacFarland 2-es sűrűségű baktérium szuszpenziót állítottunk elő. Minden, az általunk be nem sorolhatónak ítélt törzs antigénjével két-két nyulat oltottunk. Az első oltás alkalmával 0,5 ml-t injektáltunk bőr alá, majd 3-4 napos időközökkel 1,0; 2,0; 3,0; 3,0; 3,0 ml következett intravénásan beadva. Az utolsó oltást követően egy hét elteltével került sor a nyulak elvéreztetésére és a savók kinyerésére. Az oltások során az egyik nyúl elpusztult.

3.4 Szerotipizálás

3.4.1 Passzív hemagglutinációs próba

A szerotipizáláshoz a típustörzsekkel és az öt izolátummal szemben nyulakban termelt hiperimmun savót használtuk. A próbát 96 lyukú U-alakú mikrotitráló lemezekon végeztük. A tenyésztett baktériumot 5 ml fiziológiás sóoldatba szuszpendáltuk (MacFarland 2-es sűrűség), majd egy órára 56°C-os vízfürdőbe helyeztük. Ezután 50 µl, előzőleg háromszor fiziológiás sóoldattal mosott friss juh vörösvértest-szuszpenziót adtunk hozzá, és 37°C-os vízfürdőben egy óráig inkubáltuk. Ezután háromszor 10 percen keresztül fiziológiás sóoldattal mostuk. Majd az érzékenyített vörösvértesteket 10 ml fiziológiás sóoldatba szuszpendáltuk. A mikrotitráló lemez minden mikrocsővébe 50 µl fiziológiás sóoldatot mértünk, majd a termelt hiperimmun savókból 50-50µl-t adtunk az első oszlop mikrocsőveibe. Ebből log-2 alapú hígítási sort készítettünk. Ezt követően a lemez minden mikrocsővébe 50µl-t mértünk a baktérium szuszpenzióból, mint antigént. A lemez utolsó sora szolgált negatív kontrollként, ezekbe a mikrocsővekbe savót nem, csak baktérium szuszpenziót mértünk.

A passzív hemagglutinációs próbával a vizsgálatba vont mind az öt *A. pleuropneumoniae* törzset megvizsgáltuk mind a 9 frissen termelt hiperimmun savóval, majd e savókat reagáltattuk az *A. pleuropneumoniae* 15 típusörzséből készült antigénnel is. A lemezeket két órán keresztül szobahőmérsékleten tartottuk, majd hűtőbe (+4°C) helyeztük és 24 óra múlva a reakciókat elbíraltuk. Amennyiben az ellenanyag kötődött a vörösvértest felületére adszorbeált antigénhez, vagyis a próba pozitívnak bizonyult, a mikrocsőben agglutináció vált láthatóvá, ellenkező esetben, amikor nem alakult ki reakció, a vörösvértestek a cső aljára ülepedtek (4. ábra).



4. ábra: Pozitív és negatív eredményű passzív hemagglutinációs próba

3.4.2 PCR vizsgálat

Az izolált törzsek szerotipizálását polimeráz láncreakcióval is elvégeztük. A módszer alkalmasságát a típustörzsek szerotipizálásával ellenőriztük.

1. lépés: A DNS kivonása (QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit)

A -80°C -on tárolt baktériumtörzseket NAD-ot tartalmazó csokoládé agarra oltottuk, majd 24 óras inkubációt követően végeztük el a DNS kivonását. A táptalajokról egy-egy oltókacsnyi telepet szuszpendáltunk 180 μl Buffer ATL-ben. 20 μl Proteináz K hozzáadása után alaposan összeráztuk, és 12 órán át 56°C -on inkubáltuk a baktérium teljes feloldódásáig. A csőben lévő cseppeket gyors centrifugálással eltávolítottuk, majd 200 μl Buffer AL hozzáadását követően 15 másodpercig vortex segítségével homogenizáltuk a mintát. Ezt egy 10 perces tartó inkubáció követte 70°C -on és egy ismételt rövid centrifugálás, melynek a végén 200 μl etanolt (96%) adtunk az oldathoz, majd ismét összeráztuk és lecentrifugáltuk, végül pedig egy 2 ml-es gyűjtőcsőbe helyeztük a mintát (QIAamp Spin Column). 1 perc alatt 6000 g/perccel lecentrifugáltuk és egy steril 2 ml-es gyűjtőcsőbe pipettáztuk bele a leszűrt oldatot. 500 μl Buffer AW1 hozzáadása után megismételtük az előbbi 1 perces centrifugálást és a szűrlet ismét egy steril gyűjtőcsőbe került. Ezután 500 μl Buffer AW2-t adtunk hozzá és ekkor már teljes sebességen centrifugáltuk az oldatot 3 percen keresztül. Végül 200 μl Buffer AE hozzáadását követően 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk az így kinyert DNS mintát, majd a felhasználásig eltelt időre mélyhűtőbe (-20°C) tettük.

2. lépés: A PCR termék összeállítása

A PCR vizsgálat során 5 primer párt használtunk a 4 Apx gén amplifikására (**5. ábra**).

Name	Sequence (5'-3')	GeneBank accession no.	Position
APXIAF	ATC GAA GTA CAT CGC TCG GA	X52899	275–295
APXIAR	CGC TAA TGC TAC GAC CGA AC	X52899	968–998
APXIBF	TTA TCG CAC TAC CGG CAC TT	X68595	4102–4121
APXIBR	TGC AGT CAC CGA TTC CAC TA	X68595	4893–4913
APXIIF	GAA GTA TGG CGA GAA GAA CG	AY736188	973–993
APXIIR	CGT AAC ACC AGC AAC GAT TA	AY736188	1918–1938
APXIIIF	GCA ATC AGT CCA TTG GCG TT	X80055	9558–9578
APXIIIR	GAC GAG CAT CAT AGC CAT TC	X80055	9934–9954
APX4DWN-L*	GCG AAA CAA TTC GAA GGG	AF021919	6459–6442
APXIV-IR*	GGC CAT CGA CTC AAC CAT	AF021919	4111–4128

5. ábra: A felhasznált primerek és azok oligonukleotid szekvenciája

(RAYAMAJHI, és mtsai., 2005)

Különböző PCR programot és terméket alkalmaztunk a kis- és nagy bázispárú primereknél (**4. és 5. táblázat**)

4. táblázat: A nagy bázispárú primereknél alkalmazott PCR program és termék összeállítása

Nagy bázispárú primer: ApxIVA		
PCR termék összetevői (µl)		PCR program
Víz	36,35	1. kezdeti denaturálás 94 °C, 5 perc
Taq buffer (Mg ²⁺ -mentes) (Fermentas)	5	
25 mM MgCl ₂ (Fermentas)	3	2. denaturálás (35 kör) 94 °C, 35 másodperc
10mM dNTP (Fermnetas)	1,25	3. primer tapadás (35 kör) 52 °C, 40 másodperc
25µM forward primer	1	4. szálszintézis (35 kör) 72 °C, 3 perc
25µM reverse primer	1	
5U/µl Taq polimeráz (Termo Scientific)	0,4	5. végső szálszintézis 72 °C, 10 perc
templát DNS	2	6. lehűtés 4 °C

5. táblázat: A kis bázispárú primereknél alkalmazott PCR program és termék összeállítása

Kis bázispárú primerek: ApxIA, ApxIB, ApxII, ApxIII		
PCR termék összetevői (μl)		PCR program
Víz	39,8	1. kezdeti denaturálás 95 °C, 10 perc
10x dream Taq buffer (green) (Fermentas)	5	
2mM dNTP (Fermentas)	1	2. denaturálás (35 kör) 95 °C, 30 másodperc
25μM forward primer	1	3. primer tapadás (35 kör) 55 °C, 45 másodperc
25μM reverse primer	1	4. szálszintézis (35 kör) 72 °C, 1 perc
5U/μl Taq polimeráz (Thermo Scientific)	0,2	
templát DNS	2	5. végső szálszintézis 72 °C, 10 perc
		6. lehűtés 4 °C

3. lépés: Agargél elektroforézis

Az eljárás során Trisz-acetát-EDTA futtató puffert alkalmaztunk. A nagy bázispárú primerek futtatása esetén 1%-os agarózgél (SERVA agaróz), a kis bázispárú primerek futtatásánál pedig 2%-os agarózgél használtunk. Mivel az agaróz olvadáspontja 90°C, ezért a gél felolvasztása után hűtés közben adtuk hozzá a GR Safe DNS festéket (Fermentas, Biocenter). A nagy bázispárú mintákat a betöltés előtt 1:6 arányban loading pufferrel kevertük össze. A kis bázispárú mintáknál erre nem volt szükség, mert már a PCR termék összeállításakor töltő puffert tartalmazó anyagot használtunk (10xdream Taq buffer, green, Fermentas). Az első zsebbe a molekulasúly jelzésére szolgáló futtató létrát (GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus, Thermo Scientific) pipettáztunk. Végezetül elektromos térbe helyezve az agarózgél 30 percig futtattuk 100 V-on. Az eredmény elbírálása érdekében a gél UV-fénnyel átvilágítottuk, és a láthatóvá tett DNS fragmentumok méretét a molekulasúly jelzőhöz viszonyítva olvastuk le.

4. Eredmények

4.1 Passzív hemagglutinációs próba

Az oltások során az egyik nyúl elpusztult, így kilenc új hiperimmun savót vizsgáltunk. A vizsgált öt *A. pleuropneumoniae* törzs nem reagált a típusörzsekkel szemben korábban termeltetett savókkal, viszont mindegyik törzs esetében hemagglutináció mutatkozott a vele szemben termelt hiperimmun savóval. Mind az öt törzs pozitív reakciót adott a vizsgált négy másik *A. pleuropneumoniae* törzssel szemben termelt hiperimmun savóval is (**6. táblázat**). Az *A. pleuropneumoniae* 15 típusörzséből előállított antigén viszont nem agglutinálódott a jelen munka során termelt 9 hiperimmun savó egyikével sem (**7. táblázat**).

6. táblázat: Az öt törzs reakciója a velük szemben termelt savókkal

Vad törzsek		270/12	272/12	51/14	85/14	107/14
Vad törzsek savói						
270/12	1404	+++	+++	+++	+++	++
	1405	+++	+++	++	++	++
272/12	1406	++	++	++	++	++
	1407	+	++	+	+	+
51/14	1410	+++	+++	+++	+++	++
	1411	+	++	+	++	++
85/14	1413	+	++	+	++	++
107/14	1416	+	++	++	++	++
	1417	++	++	++	++	++

titer értékek: +:640; ++:1280; +++:>2560

7. táblázat: A típustörzsek reakciói az öt törzzsel szemben termelt savókkal

Típustörzsek		1	2	3	4	5a	5b	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Vad törzsek savói																	
270/12	1404	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
272/12	1406	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1407	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51/14	1410	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1411	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85/14	1413	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107/14	1416	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1417	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.2 PCR vizsgálat

A polimeráz láncreakcióval kapott eredményeket Rayamajhi és mtsai. (2005) alapján bíráltuk el. A típustörzsekkel végzett vizsgálataink megegyeztek az általuk leírtakkal.

A passzív hemagglutinációs vizsgálat során be nem sorolható szerotípusnak ítélt törzsek mindegyike a PCR próba során az 5a/5b szerotípus eredményét adta, ezen szerotípusok elkülönítését ez a PCR módszer nem teszi lehetővé.

5. Következtetések

Vizsgálataink eredménye alapján az öt, különböző sertés állományból izolált *A. pleuropneumoniae* törzs passzív hemagglutinációban egyformán viselkedett, kizárólag a homológ és a másik négy törzssel szemben termelt savóval adott pozitív reakciót, így e törzsek egy szerotípust képviselnek. Semmilyen keresztreakció nem mutatkozott e törzsek és az *A. pleuropneumoniae* 15 típustörzse között.

A toxingéneken alapuló PCR vizsgálat alapján mindegyik törzs az 5a vagy 5b szerotípusba sorolható.

Eredményeink igazolják, hogy a különböző hazai sertésállományokból izolált öt *A. pleuropneumoniae* törzs azonos szerotípusba tartozik, és ez a szerotípus eltér az *A. pleuropneumoniae* mind a 15 szerotípusától, így új szerotípusnak minősül. Ez az új szerotípus a szerotopizálásra alkalmazott toxingéneken alapuló PCR vizsgálattal nem különíthető el az *A. pleuropneumoniae* 5a és 5b szerotípusától.

6. Összefoglaló

Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* egy világszerte, így hazánkban is előforduló, sertések vérzéses-elhalásos tüdő- és fibrines mellhártya gyulladását okozó baktérium. Elsősorban a 12-16 hetes sertéseket érinti a bántalom, de súlyos megbetegedést alakíthat ki a hízlalás végén is, ezáltal nagy gazdasági kárt okozhat. A betegség megjelenését különféle hajlamosító tényezők, elsősorban a nagyüzemi, zárt tartástechnológiából adódó stressz és zsúfoltság, valamint a társfertőzések segítik elő. A betegség túlheveny, heveny és idült formában jelentkezhet, diagnosztizálását jelentősen megkönnyíti a jellemző klinikai és kórbonctani kép kialakulása.

A kórokozó a Pasteurellaceae családba tartozó igényes, Gram-negatív baktérium. Két biotípusát és 15 szerotípusát különböztetjük meg, melyek között gyakoriak a keresztreakciók. Az 1-es biotípusba tartozó törzsek növekedésükhöz NAD-ot igényelnek, míg a 2-es biotípusba tartozók NAD nélkül is tenyészthetők.

Munkánk során a tanszék törzsgyűjteményéből származó, korábban be nem sorolt és heveny elváltozásokat mutató sertés tüdőkből frissen izolált *A. pleuropneumoniae* törzseket szerotipizáltunk klasszikus- és molekuláris biológiai módszerrel. A törzsek mindegyikét a tenyésztési és biokémiai tulajdonságaik alapján a NAD-dependens, 1-es biotípusba soroltuk. A szerotipizálást passzív hemagglutinációval, majd PCR próbával is elvégeztük, hogy a kapott eredményeket összehasonlíthassuk.

A típustörzsekkel szemben termeltetett savókkal végzett passzív hemagglutinációs próba során egyik törzset sem sikerült szerotipizálnunk. Ezek az általunk nem besorolhatónak vélt törzsek csupán az ellenük frissen termeltetett savókkal adtak pozitív reakciót. A toxingénekre alapozott PCR próba alapján a törzsek 5a/5b szerotípusba tartoznak. Ez a két szerotípus a toxinprofil alapján nem választható szét, ugyanis ezzel a módszerrel a keresztreakciók előfordulása miatt a szerotípusoknak csak négy csoportját tudjuk elkülöníteni.

Vizsgálataink eredménye alapján egy új, nem besorolható szerotípust sikerült izolálnunk.

7. Summary

COMPARATIVE EXAMINATION OF NON TYPABLE *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED IN HUNGARY

Actinobacillus pleuropneumoniae is the causative agent of hemorrhagic-necrotic pneumonia and fibrinous pleuritis of swine throughout the world. The bacterium is a Gram negative, facultative anaerobic, fastidious and facultative pathogenic one, it is present on the mucous membrane of the respiratory tract of swine and can cause disease in case of different predisposing factors in growing pigs. The disease can be peracute, acute and chronic and the typical clinical signs and pathological lesions help the diagnosis.

On the basis of NAD requirement for growth *A. pleuropneumoniae* biotype 1 (NAD-dependent) and biotype 2 (NAD-independent) can be distinguished. After combining the previous typing systems 15 serotypes can be differentiated.

The aim of the study was serotyping recently isolated *A. pleuropneumoniae* strains and the previously non typable strains from the culture collection of the Department of Microbiology and Infectious Diseases. According to the biochemical and cultural properties all strains were classified as NAD-dependent biotype 1 ones. In order to compare the results, serotyping was carried out by indirect haemagglutination test and molecular biological (PCR) methods.

None of our strains showed positive reaction with antisera produced against type strains, they were regarded non typable, but they showed positive reactions with the antisera raised against them. According to the PCR test based on detection of toxin genes, the strains belong to the 5a/5b serotypes. These two serotypes cannot be differentiated on the basis of the toxin profile, since only four groups of serotypes can be differentiated in this method, due to cross-reactions.

According to the results of isolates seem to represent a new serotype.

8. Irodalmi jegyzék

BARROW, G. I., FELTHAM, R. K. A.: Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. *Cambridge University Press*. 2003.

BLACKALL, P. J., KLAASEN, H. L. B. M., BOSCH, H. V. D., KUHNERT, P., FREY, J.: Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Veterinary Microbiology*, 2002. 84. vol. p. 47-52.

BOSSÉ, J. T., JOHNSON, R. P., ROSENDAL, S.: Capsular polysaccharide antigens for detection of serotype-specific antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1990. 54. vol. p. 320-325.

BOSSÉ, J. T., JANSON, H., SHEEHAN, B. J., BEDDEK, A. J., RYCROFT, A. N., KROLL, J. S., LANGFORD, P. R.: *Actinobacillus pleuropneumoniae*: patobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection*, 2002. 4. vol. p. 225-235.

CHO, W. S., CHAE, C.: Genotypic prevalence of *apxIV* in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2001. 13. vol. p. 175-177.

DOM, P., HAESEBROUCK, F., DUCATELLE, R., CHARLIER, G.: In vivo association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. *Infection and Immunity*, 1994. p. 1262-1267.

FODOR L., HAJTÓS I., GLÁVITS R., VARGA J.: *Actinobacillus pleuropneumoniae* 2-es biotípusú törzsei okozta tüdőgyulladás sertésállományokban. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 1989a. 44. évf. 11. sz. o. 669-674.

FODOR L., VARGA J., MOLNÁR É., HAJÓS I.: Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine. *Veterinary Microbiology*, 1989b. 20. vol. p. 173-180.

FRANK, R., K., CHENGAPPA, M. M., OBERST, R. D., HENNESSY, K. J., HENRY, S. C., FENWICK, B.: Pleuropneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 in growing and finishing pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1992. 4. vol. p. 270-278.

FREY, J., NICOLET, J.: Haemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990. p. 232-236.

INZANA, T. J., MATHISON, B.: Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infection and Immunity*, 1987. p. 1580-1587.

KAMP, E. M., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N., LEENGOED, L. A. M. G. V., SMITS, M. A.: Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infection and Immunity*, 1997. p. 4350-4354.

KUCEROVA, Z., JAGLIC, Z., ONDRIASOVA, R., NEDBALCOVA, K.: Serotype distribution of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from porcine pleuropneumonia in the Czech Republic during period 2003-2004. *Veterinary Medicina - Czech*, 2005. 50. vol. 8. no. p. 355-360.

MARSTELLER, T. A., FENWICK, B.: *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. *Swine Health and Production*, 1999. 7. vol. 4. no. p. 161-165.

MITTAL, K. R., BOURDON, S., BERROUARD, M.: Evaluation of counterimmunoelectrophoresis for serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates and detection of type-specific antigens in lungs of infected pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993. p. 2339-2342.

MOLNÁR É.: Survey of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection in swine by different methods. *Acta Veterinaria Hungarica*, 1990. 38. vol. 4. no. p. 231-238.

- MOLNÁR T.: Sertések légzőszervi betegségei II. rész, *Actinobacillus pleuropneumoniae* okozta tüdő- és mellhártyagyulladás. *Az állatorvos, Járványtan*, 2002. 2. évf. 1. sz. p. 21-23.
- NIELSEN, R.: Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1986. 27. vol. p. 453-455.
- NIELSEN, R., ANDERSEN, L. O., PLAMBECK, T., NIELSEN, J. P., KRARUP, L. T., JORSAL, S. E.: Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds. *Veterinary Microbiology*, 1997. 54. vol. p. 35-46.
- NIVEN, D. F., LÉVESQUE, M.: V-Factor-Dependent Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Biotype 2 (Bertschinger 2008/76). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1988. p. 319-320.
- RAYAMAJHI, N., SHIN, S. J., KANG, S. G., LEE, D. Y., AHN, J. M., YOO, H. S.: Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2005. 17. vol. p. 359-362.
- SCHALLER, A., KUHN, R., KUHNERT, P., NICOLET, J., ANDERSON, T. J., MACINNES, J. I., SEGERS, R. P. A. M., FREY, J.: Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, 1999. 145. vol. p. 2105-2116.
- SEBUNYA, T. N. K., SAUNDERS, J. R., OSBORNE, A.D.: Dose response relationship of *Haemophilus pleuropneumoniae* aerosols in pigs. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 1983. 47. vol. p. 54-56.
- TUBOLY S. (szerk), MEDVECZKY I., RUSVAI M., VARGA J.: Állatorvosi járványtan I. Állatorvosi mikrobiológia. Bakteriológia, virológia, immunológia. Budapest. Mezőgazda Kiadó. 1998. p. 444.

VARGA J. (szerk.), TUBOLY S., MÉSZÁROS J.: A háziállatok fertőző betegségei.
Állatorvosi járványtan II. Budapest. Mezőgazda Kiadó, 2. kiadás. 2007. p. 183-186.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Sárközi Ritának lelkiismeretes munkájáért és türelméért. Köszönöm Neki, az ösztönző szavakat, hogy segítségemre volt a dolgozatom megírásában és mindenben támogatott.

Külön köszönöm Dr. Fodor Lászlónak, a tanszék vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított a SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszéken végzett munkám kivitelezéséhez.

Köszönettel tartozom a SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék dolgozóinak, elsősorban a bakteriológiai laboratórium asszisztenseinek, Halasi Teréznek és Kolozsvári Évának az önzetlen segítségnyújtásukért.

A szakirodalmi adatok összegyűjtéséhez nyújtott segítségért köszönet illeti karunk könyvtárának dolgozóit, elsősorban Oláh Editet.

Valamint köszönöm a családomnak és a barátaimnak a támogatásukat és kitartásukat.