

Állatorvostudományi Egyetem
Aujeszky Aladár Elméleti Állatorvostudományok
Doktori Iskola

**Házi- és vadmadár eredetű *Bordetella avium* és
Ornithobacterium rhinotracheale törzsek összehasonlító
feno- és genotípusos vizsgálata**

PhD értekezés

dr. Szabó Réka

2017

Témavezető:

.....
Dr. Magyar Tibor
MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézet

Készült 8 példányban. Ez a(z) sz. példány.

.....
dr. Szabó Réka

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	4
1. Összefoglalás.....	5
Summary.....	7
2. Bevezetés	9
3. Irodalmi áttekintés	11
3.1. <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	11
3.1.1. Történet	11
3.1.2. A kórokozó tulajdonságai.....	11
3.1.3. Járványtan	12
3.1.4. Klinikai tünetek és kórbonctani elváltozások	14
3.1.5. Kórjelzés	15
3.1.6. A kórokozó jellemzése	16
3.1.7. Megelőzés, védekezés	17
3.2 <i>Bordetella avium</i>	19
3.2.1. Történet	19
3.2.2. A kórokozó tulajdonságai.....	19
3.2.3. Járványtan	20
3.2.4. Klinikai tünetek és kórbonctani elváltozások	21
3.2.5. Kórjelzés.....	22
3.2.6. A kórokozó jellemzése	22
3.2.7. Megelőzés, védekezés	22
4. Anyag és módszer.....	24
4.1.A felhasznált baktérium törzsek	24
4.1.1. A baktériumok izolálása, tenyésztése és azonosítása.....	24
4.2.A törzsek fenotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok	24
4.2.1. Telepmorfológiai vizsgálatok.....	24
4.2.2. Biokémiai tulajdonságok vizsgálata.....	24
4.2.3. A növekedés körülményeinek vizsgálata.....	25
4.2.4. A hemolízis vizsgálata	25
4.2.5. Hemagglutinációs próba	25
4.2.6. A szerotípus meghatározása	26
4.2.7. Antibiotikum-érzékenység meghatározása.....	27
4.2.8. A minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása.....	28
4.3.A törzsek genotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok	28
4.3.1. DNS izolálás	28
4.3.2. Plazmid izolálás	28
4.3.3. Polimeráz láncreakciók	29
4.3.4. Az ERIC-PCR és RAPD vizsgálatok eredményeinek elemzése	31

4.3.5. Szekvencia-meghatározás és filogenetikai elemzés	31
4.3.6. Multi-lókuszos szekvencia tipizálás.....	32
5. Eredmények	34
5.1. A baktériumok izolálása és azonosítása	34
5.2. A baktériumok fenotípusos vizsgálatainak eredményei.....	36
5.2.1. A baktériumok biokémiai tulajdonságai	36
5.2.2. A növekedés körülményeinek vizsgálata.....	37
5.2.3. A hemolízis vizsgálata	37
5.2.4. Hemagglutinációs próba	37
5.2.5. A szerotípus meghatározása	38
5.2.6. Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálata	39
5.2.7. MIC meghatározása.....	40
5.3. A baktériumok genotípusának meghatározása	42
5.3.1. A baktériumok genotípusos vizsgálatainak eredményei	42
5.3.1.1. Plazmid izolálás	42
5.3.1.2. ERIC-PCR	42
5.3.1.3. RAPD vizsgálat M13 primerrel	42
5.3.1.4. RAPD vizsgálat OPG11 primerrel	42
5.3.1.5. RAPD vizsgálat OPH19 primerrel.....	42
5.3.1.6. Szekvencia-meghatározás és filogenetikai elemzés.....	48
5.3.1.7. Multi-lókuszos szekvencia tipizálás	50
6. Megvitatás.....	52
6.1. A baktériumok izolálása és azonosítása	52
6.2. A baktériumok biokémiai tulajdonságai.....	53
6.3. A növekedés körülményeinek vizsgálata	54
6.4. A hemolízis vizsgálata	55
6.5. Hemagglutinációs próba	56
6.6. A szerotípus meghatározása	58
6.7. Antibiotikum rezisztencia	60
6.8. ERIC-PCR.....	63
6.9. RAPD vizsgálatok.....	64
6.10. Szekvencia-meghatározás és filogenetikai elemzés	66
6.11. A B. avium törzsek molekuláris tipizálásának eredményei	68
6.12. Következtetések	69
7. Új tudományos eredmények	70
8. Irodalomjegyzék	71
9. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények.....	83
9.1. Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk	83
9.2. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó publikációk	83

9.3. Konferencia prezentációk	84
9.4. Akadémiai beszámolók.....	85
10. Köszönetnyilvánítás.....	86
11. Mellékletek	87

Rövidítésjegyzék

AGP	agargél-precipitáció	agar gel precipitation
BHI	szarvasmarha agy-szív kivonat	brain heart infusion
bp	bázispár	base pair
CLSI		Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	dimetil-szulfoxid	dimethyl-sulphoxide
DNS	dezoxiribonukleinsav	deoxyribonucleic acid
dNTP	dezoxinukleotid-trifoszfát	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	etiléndiamin tetraecetsav	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzimkötött immunoassay vizsgálat	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERIC	enterobaktériumokból leírt repetitív intergénikus konszenzus szekvencia	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence
FHA	filamentózus hemagglutinin	filamentous hemagglutinin
MIC	minimális gátló koncentráció	minimal inhibitory concentration
MLST	multi-lókuszos szekvencia tipizálás	Multi-Locus Sequence Typing
mtsai.	munkatársai	<i>et alii</i>
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat	phosphate buffered saline
PCR	polimeráz láncreakció	polymerase chain reaction
RAPD	random amplifikált polimorf DNS	Random Amplified Polymorphic DNA
rRNS	riboszomális ribonukleinsav	ribosomal ribonucleic acid
rep-PCR	repetitív extragenikus palindrom PCR	repetitive extragenic palindromic PCR
SPF	specifikus kórokozótól mentes	specific pathogen free
ST	szekvencia típus	sequence type
TBE	trisz-bórsav-EDTA puffer	tris-borate-EDTA buffer
TSA	triptikáz szója agar	tryptic soy agar
vt	vörösvértest / vörösvérsejt	red blood cell

1. Összefoglalás

A *Bordetella avium* és *Ornithobacterium rhinotracheale* világszerte előforduló, légzőszervi megbetegedést okozó baktériumok, melyek számos madárfajt képesek megbetegíteni. A kialakuló tünetek súlyossága függ a környezeti tényezőktől és az esetleges társfertőzésektől, azonban a megbetegedések járulékos költségeik és széles körű elterjedtségük miatt komoly gazdasági károkat okozhatnak.

Munkánk célja különböző gazdafajokból izolált és eltérő földrajzi területekről származó *B. avium* és *O. rhinotracheale* törzsek fenotípusos tulajdonságaikat vizsgáló módszerekkel történő jellemzése volt, valamint olyan molekuláris módszer kiválasztása, amellyel kis munka- és eszközigénnyel is vizsgálható e két kórokozó változatossága.

A vizsgálatokba bevont törzseket fajspecifikus polimeráz láncreakció (PCR) segítségével azonosítottuk, majd fenotípusos tulajdonságaikat vizsgáltuk. Ezen tulajdonságok elemzése során a *B. avium* törzsek egységeseknek bizonyultak, az *O. rhinotracheale* izolátumok viszont nagyobb változatosságot mutattak. Vizsgáltuk a baktériumok ureum-bontó és nitrát-redukáló valamint a triptofán-bontó képességét. Az izolátumok szénhidrát hasznosító képességét arabinóz, dulcit, glükóz, laktóz, maltóz, szacharóz és szorbit tartalmú táplevesben ellenőriztük. A biokémiai próbákban a *B. avium* törzsek a fajra jellemző módon egységesen negatív eredményt adtak. Az *O. rhinotracheale* izolátumok indol és nitrát tesztben negatív, urea tesztben pozitív eredményt adtak, a szénhidrátok hasznosításában pedig változatos képet mutattak.

A baktériumtörzsek növekedési sajátosságait négy táptalajon, három különböző hőmérsékleten (31, 37 és 41 °C) vizsgáltuk. A *B. avium* és *O. rhinotracheale* törzsek mindhárom vizsgált hőmérsékleten növekedtek. Az *O. rhinotracheale* számára a vérrel kiegészített táptalajok jelentették az ideális közeget. Az *O. rhinotracheale* törzsek 61%-a 48 óra 37°C-on történő tenyésztést követően 48 órán át szobahőmérsékleten való inkubálás után β -hemolízis jeleit mutatta.

Hemagglutinációs próbákban házityúk-, kacsa-, ló-, szarvasmarha-, juh- és nyúlvérrel vizsgálva a *B. avium* törzsek jobb agglutinációs képességet mutattak, mint az *O. rhinotracheale* izolátumok. A *B. avium* törzsek a nyúl vörösvértestekkel (vvt) egyáltalán nem reagáltak. Kacsa vvt-vel csak egy, házityúk vvt-vel pedig két törzs nem adott reakciót, ló és juh vvt-vel az izolátumok 78,9%-a, míg szarvasmarha vvt-vel 52,6%-uk reagált. A ló, szarvasmarha és juh vvt-eket az *O. rhinotracheale* törzsek egyáltalán nem agglutinálták. Legnagyobb arányban a házityúk (a törzsek 9%-a), a kacsa valamint a nyúl vvt-vel (a törzsek 14-14%-a) adtak reakciót az izolátumok. Vizsgálatunk alapján nem figyelhető meg gazdafaj-specifitás az *O. rhinotracheale* hemagglutinációs képességében. Valószínűsíthető, hogy más baktérium fajokhoz hasonlóan, az *O. rhinotracheale* törzsek esetén is valamilyen adhezín

jelenlétét jelzi a hemagglutinációs képesség. Mivel a kórokozó széles gazdaspektrummal rendelkezik, ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy az *O. rhinotracheale* adhezinek esetében nem beszélhetünk a fajon belüli, egyes madárfajokhoz adaptálódott kórokozó csoportokról.

Az *O. rhinotracheale* törzsek szerotípusának meghatározása hagyományos agargél-precipitációs próbában történt. Az 59 mezei izolátum közül legnagyobb számban az A szerotípusba tartozó törzsek fordultak elő (82,8%). Két izolátumot (3,4%) B szerotípusúként, öt törzset (8,6%) pedig D szerotípusúként azonosítottunk. Három törzs (5,2%) nem volt tipizálható az A-E szerotípusok ellen termeltetett savókkal.

A korongdiffúziós módszerrel végzett antibiotikum-érzékenység vizsgálatok során az *O. rhinotracheale* törzsekkel szemben a kloramfenikol, a spektinomycin és a tilmikozin bizonyult a leghatékonyabbnak. A törzsek nagy százaléka rezisztens volt gentamicinnel, nalidixsavval, szulfametoxazol-trimetoprimmel és polimixin B-vel szemben. A *B. avium* törzsekkel szemben a doxiciklin, gentamicin, polimixin B, spektinomycin, szulfonamidok, ciprofloxacín, eritromicin, szulfametoxazol-trimetoprim és oxitetraciklin is hatékony volt.

A fenotípusos tulajdonságok elemzése során feltárt különbségek nem mutattak összefüggést a törzsek gazdafaji eredetével, azaz nem tekinthetőek a fajon belüli, egyes madárfajokhoz való gazdaadaptáció jeleinek.

A 16S rRNS génjének részleges filogenetikai elemzése során a *B. avium* törzsek teljes azonosságot mutattak, míg az *O. rhinotracheale* izolátumok két klaszterbe rendeződtek.

ERIC-PCR (Enterobaktériumokból leírt intergénikus konszenzus szekvencia) segítségével az *O. rhinotracheale* törzsek tizenhárom mintázatot adtak. Az M13 primerrel végzett RAPD (random amplifikált polimorf DNS) vizsgálattal tíz csoportot kaptunk. További két (OPG 11 és OPH19 primerrel végzett) RAPD vizsgálat két-két fő típusba sorolta a törzseket, ezért ezeket kevésbé találtuk alkalmasnak a hazai *O. rhinotracheale* izolátumok változatosságának vizsgálatára. Sem az ERIC- sem a RAPD-mintázatok nem mutattak összefüggést az izolálás helyével és idejével, azonban a házityúk eredetű törzsek változatosabbnak bizonyultak, mint a pulykából izolált törzsek.

Kilenc *B. avium* törzs multi-lókusz szekvencia tipizálás (MLST) analízise során a hét vizsgált gén közül négy szekvenciájában mutattunk ki pontmutációkat, így három új szekvencia típust azonosítottunk, míg a további négy vizsgált törzs az adatbázis eddigi egyetlen *B. avium* törzsével azonos szekvencia típusba tartozik.

Summary

Bordetella avium and *Ornithobacterium rhinotracheale* are pathogenic bacteria of worldwide distribution that cause respiratory disease in several avian species. The severity of clinical signs is affected by environmental factors and concurrent infections; nevertheless, both diseases cause considerable economic losses due to collateral expenses and the worldwide prevalence of these pathogens.

The aim of this work was to characterize *B. avium* and *O. rhinotracheale* strains of different host and geographical origin by various pheno- and genotyping methods and to select a molecular typing method that does not require expensive equipment and is not labour intensive.

The examined strains were identified by species-specific polymerase chain reactions (PCR). The *B. avium* strains proved to be uniform in their phenotypic properties, while the *O. rhinotracheale* isolates showed higher variability in these tests. The isolates were examined for production of indole, urease, nitrate reductase, and the fermentation of arabinose, dulcitol, glucose, lactose, maltose, sucrose, and sorbitol was also tested. The *B. avium* strains were uniformly negative in conventional biochemical tests. The *O. rhinotracheale* isolates were negative in the indole and nitrate tests and positive in the urea test. Their ability to use different sources of carbohydrates was variable.

The growth requirements of the strains were tested on four different solid media at three different temperatures (31, 37, and 41 °C). Both *B. avium* and *O. rhinotracheale* strains grew at all three temperatures. Agars supplemented with sheep blood proved to be the ideal growth media for the growth of *O. rhinotracheale*. 61% of the *O. rhinotracheale* strains showed signs of β -haemolysis after incubation for 48 hours at 37°C followed by 48 hours at room temperature.

The *B. avium* strains showed more intensive hemagglutinating activity with chicken, duck, horse, cattle, sheep and rabbit erythrocytes (RBCs) than the *O. rhinotracheale* isolates. None of the *B. avium* strains gave any reaction with rabbit RBCs. Only one and two *B. avium* strains did not agglutinate duck and chicken RBCs, respectively. The *O. rhinotracheale* strains did not react at all with horse, cattle and sheep RBCs. The highest numbers of reactions were observed with chicken (9%), duck and rabbit (14-14%) RBCs. No host-specificity could be observed in the hemagglutinating activity of the *O. rhinotracheale* strains. Hemagglutinating activity is most likely the indicator of the presence of an adhesin-like structure in *O. rhinotracheale*, as seen in other bacterial pathogens.

The serotypes of the *O. rhinotracheale* strains were determined in an agar-gel precipitation test. Most of the 59 field isolates belonged to serotype A (82.8%). Two strains

were serotype B (3.4%) and five were serotype D (8.6%). The serotype of three strains (5.2%) could not be determined using the five most common serotype-specific sera (A-E).

Chloramphenicol, tilmicosin and spectinomycin were the most effective antibiotics against *O. rhinotracheale* isolates in disk-diffusion tests. A high percentage of the strains were resistant to gentamicin, nalidixic acid, sulfamethoxazol-trimethoprim and polymixin B. Doxycycline, gentamicin, polymixin B, spectinomycin, sulphonamids, ciprofloxacin, erythromycin, sulfamethoxazol-trimethoprim and oxytetracycline were all effective against the *B. avium* strains.

Differences in phenotypic characteristics of the strains did not correspond to their host origin, thus cannot be regarded as a sign of host adaptation of *O. rhinotracheale* subgroups to different host bird species.

The phylogenetic analysis of the partial sequence of the 16S rRNA gene revealed a 100% similarity of the *B. avium* strains, while *O. rhinotracheale* strains formed two clusters.

Thirteen distinct patterns were identified with ERIC-PCR, and the RAPD (Random Amplified polymorphic DNA) assay with the M13 primer assigned the *O. rhinotracheale* isolates to 10 different patterns. The other two RAPD assays assigned the isolates into two groups, thus were found to be unsuitable for distinguishing the Hungarian isolates. No correlation was found between the ERIC- or RAPD patterns and either the place or year of isolation, however, the strains isolated from chickens were more heterogeneous on ERIC-PCR than the isolates recovered from turkeys.

Multi-locus sequence typing (MLST) analysis of nine *B. avium* strains revealed point mutations in four genes out of the seven examined gene sequences. Three new sequence types were identified, and four strains belong to the same sequence type as the only other strain in the *Bordetella* MLST database.

2. Bevezetés

A légzőszervi megbetegedések világszerte gyakran fordulnak elő a baromfiállományokban. A megbetegedések kóroktanában vírusok, baktériumok és gombák egyaránt szerepelhetnek, mind önállóan, mind más kórokozókkal együttesen. A betegség kialakulásához nem fertőző kórokok (pl. nem megfelelő klimatikus viszonyok, az istálló levegőjének magas ammóniatartalma, zsúfoltság) is hozzájárulhatnak. A légzőszervi megbetegedést gyakrabban okozó baktériumok az *Escherichia coli*, *Avibacterium paragallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Mycoplasma* fajok, *B. avium*, és az *O. rhinotracheale*.

A *B. avium* és *O. rhinotracheale* által kialakított betegségek többnyire nem járnak súlyos klinikai tünetekkel. Az *O. rhinotracheale* fertőzöttség brojlerekben leggyakrabban 2–8 hetes korban figyelhető meg, tojó- és tenyészállományokban pedig a tojástermelés csúcsán jellemző a megbetegedés. A könnyezéssel, orrfolyással, köhögéssel, tüszögéssel járó betegség a fertőzést követő 5–7. nap körül gyakran megszűnik. Az enyhe légzőszervi tüneteket egyes esetekben súlyos dyspnoe, levertség, sinusitis követheti. A bordetellosis többnyire szintén enyhe légzőszervi tünetekkel járó megbetegedés. A fertőzött állatokon tüszögés, köhögés, savós orrfolyás, könnyezés figyelhető meg. A légutak gyakran mucinosus váladékkal telnek meg, ami nehézlégzéshez vezet, ritkábban fulladás is kialakulhat. A klinikai gyakorlatban különféle társfertőzések és/vagy tartástechnológiai hibák súlyosíthatják mindkét betegség lefolyását. A két kórokozó jelentőségét a növekedésben való visszamaradás, a takarmányhasznosítás romlása, a tojástermelés csökkenése, a keltethetőség romlása, a megnövekedett mortalitás, a gyógyszerköltségek növekedése és a vágóhídi kobzások következtében kialakuló gazdasági kártétel adja.

Vizsgálataink célja *B. avium* és *O. rhinotracheale* törzsek hazai baromfiállományokból és vadmadaraktól való izolálása, majd az így létrehozott törzsgyűjtemény baktériumai közötti változatosság felderítése volt. Ennek során először hagyományos, fenotípusos tulajdonságok vizsgálatán alapuló módszerekkel jellemeztük törzseinket. Célunk volt, hogy felderítsük, hogy az esetlegesen feltárt különbségek összefüggnek-e az izolátumok gazdafaji eredetével, és tekinthetőek-e ezen két, széles gazdaspektrumú kórokozó esetében az egyes madárfajokhoz való adaptálódás jeleinek. A következő lépésben a törzsek szűkebb körében azok genetikai állományát összehasonlító, molekuláris módszerekkel elemeztük a két baktériumfaj magyarországi izolátumai körében tapasztalható változatosságot.

Vizsgálataink során arra törekedtünk, hogy olyan tulajdonságokat határozzunk meg, amelyek alapján a *B. avium* és *O. rhinotracheale* fajokon belül több tulajdonságukban megegyező törzscsoportokat írhatunk le. Célunk volt olyan korszerű, molekuláris módszer

kiválasztása, amellyel kis munka- és eszközigénnyel is vizsgálható e két kórokozó faj változatossága, lehetővé téve így járványtani vizsgálatok elvégzését is.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. *Ornithobacterium rhinotracheale*

3.1.1. Történet

Az *O. rhinotracheale* által okozott betegséget először Dél-Afrikában figyelték meg brojler házityúkból 1991-ben, azonban az izolált Gram-negatív, polimorf pálcákat akkor még nem sikerült azonosítani. A kórokozó első leírása Charlton és mtsai. (1993) nevéhez fűződik, ők azonban csak még ismeretlen Gram-negatív, polimorf pálcaként jellemezték izolátumaikat. További vizsgálatokat követően, Vandamme és mtsai.-tól (1994) kapta nevét az új baktériumfaj 1994-ben. Később németországi törzsgyűjtemények vizsgálata során kiderült, hogy ezt a kórokozót már korábban is izolálták: 1981-ben pulykából, 1983-ban vetési varjúból, valamint 1990 előtt Belgiumban, az USA-ban és Izraelben is (Vandamme és mtsai., 1994). Feltételezhető, hogy további, akkoriban *Pasteurella*-, *Haemophilus paragallinarum* illetve *Riemerella anatipestifer* szerű baktériumoknak tulajdonított kórképek hátterében is *O. rhinotracheale* fertőzöttség állt (van Empel és Hafez, 1999).

3.1.2. A kórokozó tulajdonságai

Az *O. rhinotracheale* Gram-negatív, polimorf, nem mozgó, nem spórás, pálcá alakú baktérium. Rendszertanilag az V-ös rRNS szupercládba tartozó Cythophaga-Flavobacterium-Bacteroides törzs tagja, a legközelebbi rokonságot a szintén baromfipatógén *Riemerella anatipestifer*-rel és *Coenonia anatiná*-val mutatja (Chin és mtsai., 2013).

5–10% CO₂ jelenlétében 5%-os juhvéres agar táptalajon tenyésztve 24 óra után telepei aprók, tűszúrásnyiak, 48 óra után 1–3 mm átmérőjű, kerek, szabályos alakú, szürkésfehér-áttetsző, harmatcseppszerű, domború telepeket képez, amelyek vajsavas illatúak és nem hemolizálnak (Chin és mtsai., 2013; Hafez, 2002). A frissen izolált vagy levestenyészetből kioltott törzsek telepei eltérő nagyságúak lehetnek, azonban átoltás után méretük egységessé válik (Hafez, 2002).

A közelmúltban beszámoltak néhány olyan törzsről is, amely a szokásos inkubációt követő 48 órában, szobahőmérsékleten véres agaron β-hemolizáló telepeket hozott létre (Tabatabai és mtsai., 2010).

Az egyes törzsek eltérő gyorsasággal nőhetnek a hagyományos biokémiai próbák során alkalmazott tápközegben (Canal és mtsai., 2005; Vandamme és mtsai., 1994). A törzsek legtöbbje a próbákban az 1. táblázatban látható eredményeket adja.

1. táblázat: Az *O. rhinotracheale* néhány jellemző biokémiai tulajdonsága más légzőszervi baktériumokkal összevetve (Hafez, 2002 alapján)
(Or: *O. rhinotracheale*, Ba: *B. avium*, Ra: *R. anatipestifer*, Pm: *P. multocida*, Ap: *A. paragallinarium*)

Biológiai, biokémiai tulajdonság	Or	Ba	Ra	Pm	Ap
hemolízis	+/-	-	-	-	-
oxidáz aktivitás	+	+	+	+	-
kataláz aktivitás	-	+	+	+	-
arginin dihidroláz aktivitás	+	+	+	-	-
β galaktozidáz aktivitás	+	+	-	-	+
eszkulin-hidrolízis	-	-	+/-	-	-
indol termelés	-	-	+/-	+	-
nitrát redukció	-	-	-	+	+
ureum bontás	+	-	+/-	-	-
Voges-Proskauer próba	+	-	+	-	-
savtermelés					
szénhidrátok bontása:					
arabinóz	-	-	-	-	-
dulcit	-	-	-	+/-	
galaktóz	+/-	-	-	+	-
glükóz	+/-	-	-	+	+
laktóz	+/-	-	-	-	-
maltóz	+/-	-	-	-	+
szacharóz	+/-	-	-	+	+
szorbit	+/-	-	-	+/-	+/-

3.1.3. Járványtan

Az *O. rhinotracheale* számos országban előfordul. Az USA-ban (Charlton és mtsai, 1993), Brazíliában (Canal és mtsai., 2005), Indiában (Murthy és mtsai., 2008b), Tajvanon (Tsai és Huang, 2006), Dél-Afrikában, illetve Európa több államában (Németország, Hollandia, Franciaország, Egyesült Királyság, Belgium) is leírták már az általa kialakított betegséget (van Empel és Hafez, 1999; van Veen és mtsai., 2001). Az ornithobacteriosis első magyarországi leírása Tanyi és mtsai. (1995) nevéhez fűződik.

Bár a legsúlyosabb tüneteket pulykában idézi elő, világszerte kimutatták már az *O. rhinotracheale* fertőzöttséget házityúkban, gyöngytyúkban, házikacsában, házilúdban, galambban, fácánban, fogolyban, fürjben, struccban, sirályban, sólyomban és vetési varjúban is (Hafez és Lierz, 2010; Tsai és Huang, 2006). Molekuláris vizsgálatok és az antibiotikum rezisztencia-mintázatok között található eltérések alapján feltételezik, hogy a kórokozó vadmadarokból került át a különféle házimadár fajokba (Amonsin és mtsai., 1997; Devriese és mtsai., 1995). Emberben eddig nem írtak le fertőzöttséget, így közegészségügyi jelentőséget nem tulajdonítanak a kórokozónak (van Empel és Hafez, 1999).

A betegség horizontálisan terjed, közvetlen és közvetett érintkezéssel (Asadpour és mtsai., 2011). Varga és mtsai. (2001) kísérletében a baktérium a tojáshéjon 37 °C-on 24 órán belül elpusztult, mások azonban kimutatták a kórokozót petefészekből és petevezetőből, tojásokból, valamint elhalt embriókból is (Hafez, 2002; van Empel és mtsai., 1996), ami a vertikális terjedést valószínűsíti.

Az irodalom meglehetősen ellentmondásos az *O. rhinotracheale* kórokozó képességét illetően. Egyes szerzők fakultatív patogénnek tartják, mivel kísérletes állatfertőzések során csak abban az esetben tudtak klinikai tünetet előidézni tyúkokban és pulykákban, ha az *O. rhinotracheale* fertőzés előtt baromfipestis, pulyka rhinotracheitis, csirke fertőző bronchitis vírussal (van Empel és mtsai., 1996), vagy avian pneumovírussal (Marien és mtsai., 2005), illetve *E. coli*-val (Thachil és mtsai., 2009) is fertőzték az állatokat. Hajlamosító tényezőként működő előzetes fertőzés hiányában csak növekedésben való visszamaradást tapasztaltak. Back és mtsai. (1998) 56 hetes pulykákat fertőztek intranazálisan, intratracheálisan vagy intravénásan. Egyik kísérleti csoportban sem figyeltek meg sem klinikai tüneteket, sem kórbonctani elváltozásokat, de több szervből visszaizolálták, és immunfluoreszcenciás vizsgálattal is kimutatták a kórokozót. A gyakorlatban a tartástechnológiai hibák is jelentős mértékben befolyásolhatják a betegség lefolyását (Chin és mtsai., 2013).

Mások szerint a betegség előzetes vírusfertőzés hiányában is előidézhető. Sprenger és mtsai. (1998) 22–24 hetes pulykákat tudtak megbetegíteni intravénás és intratracheális fertőzéssel, egy másik vizsgálatban (Ryll és mtsai., 1996) pedig 10 napos pulykák fertőzésekor orrfolyást, dyspnoét, a kórbonctani vizsgálatok során pedig bronchopneumoniát és légzságyulladást állapítottak meg. Van Veen és mtsai. (2000) úgy találták, hogy a baktérium SPF tyúkokban is képes önállóan légzőszervi tüneteket okozni. Konvencionális brojlerkakasok fertőzésekor enyhe légzőszervi tünetekkel és kórszövettani elváltozásokkal járó megbetegedést tapasztaltak (Kilic és mtsai., 2009), egy törökországi kísérletben (Eroksuz és mtsai., 2006) pedig fürjekben idézték elő sikeresen a betegséget. Az egyes madárfajok érzékenysége (van Veen és mtsai., 2000) és az *O. rhinotracheale* törzsek kórokozó képessége (Ryll és mtsai., 1996) eltérő lehet, ebből adódhatnak a különböző vizsgálatok eredményeiben mutatkozó eltérések. A legsúlyosabb tüneteket pulykákban figyelték meg, a brojlercsirkék pedig fogékonyabbnak bizonyultak, mint a Leghorn típusúak (Thachil és mtsai., 2009).

Az *O. rhinotracheale* virulencia faktorairól keveset tudunk. Kastelic és mtsai (2013) kimutatták, hogy az általuk vizsgált *O. rhinotracheale* törzsek mindegyike rendelkezett neuraminidáz aktivitással. A neuraminidázok (más néven szialidázok) számos baromfipatogén baktériumban megtalálható, a glikokonjugátumok szíalsavát hasítani képes enzimek. A nyálkahártyák felszíne erősen szializált, a szíalsavban gazdag glikoproteinek a gazdaszervezet kórokozókkal szembeni védelmi vonalát jelentik. A neuraminidázok szerepe a bakteriális adhézióban és kolonizációban a laphámsejtek potenciális baktériumkötő

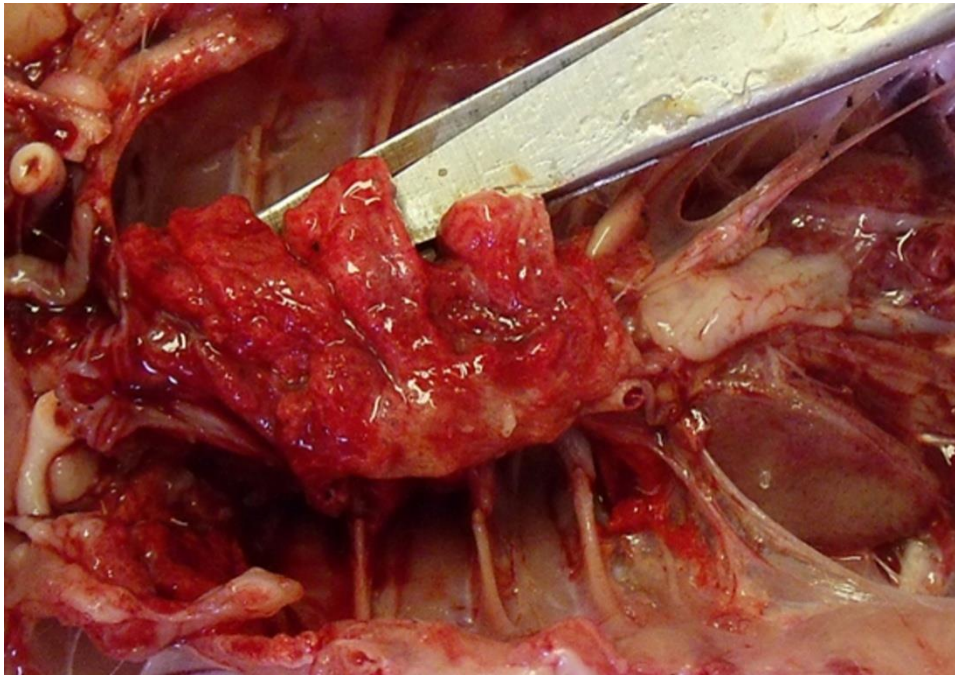
receptorainak felfedése lehet (Soong és mtsai., 2006). A ~40 kDa molakulatömegű fehérje képes volt házityúk és pulyka glikoproteineket is hasítani, kódoló génszekvenciájának vizsgálatakor pedig öt jól megkülönböztethető típust írtak le. Mivel azonban ezidáig nem azonosítottak *O. rhinotracheale* specifikus baktériumkötő receptorokat a madarak légutainak hámsejtjein, nem ismert, hogy a leírt neuraminidáz pontosan milyen szerepet játszik a légutak *O. rhinotracheale* által való kolonizációjában (Kastelic és mtsai., 2013).

3.1.4. Klinikai tünetek és kórbonctani elváltozások

A betegséget kéthetes pulykákban enyhébb lefolyásúnak találták, idősebb (14 hetes kor felett) állatokban súlyosabb tüneteket figyeltek meg (Szalay és Glávits, 2002). Brojlerekben leggyakrabban 2–8 hetes korban lép fel a betegség, tojó- és tenyészállományokban pedig a tojástermelés csúcsán, 24–52 hetes korban jellemző a fertőződés (Chin és mtsai., 2013; Hafez, 2002).

A betegség kísérletes előidézésekor a fertőzést követő 48–96 órától általában enyhe klinikai tünetek – könnyezés, orrfolyás, enyhe nehézlégzés, köhögés, tüszögés – figyelhető meg. A tünetek a fertőzést követő 5–7. nap körül gyakran megszűnnek (Kilic és mtsai., 2009; Ryll és mtsai., 1996; Sprenger és mtsai., 2000). A klinikai gyakorlatban, részben a kevert fertőzések miatt, a tünetek súlyosabbak lehetnek: a kezdeti enyhe légzőszervi tüneteket egyes esetekben súlyos dyspnoe, levertség, sinusitis követheti. Gyakori a növekedésben való visszamaradás, a takarmányhasznosítás romlása, amit gyakran a tojástermelés zavarai kísérnek (Gornatti Churria és mtsai., 2011).

Elhullott állatokban a felső légutak, légzsákok gyulladása figyelhető meg. Enyhébb esetekben a nyálkahártyák kipirultak, bővérűek, ezerosen belövelltek, súlyosabb esetekben nyálkával, fibrinnel borítottak (Ryll és mtsai., 1996), a légzsákokban savós-fibrines légzsákgyulladás, habos exsudatum, fibrines felrakódások vannak jelen (Szalay és Glávits, 2002). A tüdőben körülírt vagy kiterjedt fibrines gyulladás, bővérűség (1. ábra), fibrines mellhártyagyulladás tapasztalható (Ryll és mtsai., 1996). Pulykában szívburok- és hashártyagyulladást (Sprenger és mtsai., 2000), brojlerekben ízületgyulladással járó kórképet (Travers és mtsai., 1996) is megfigyeltek. Fogolyban idegrendszeri tünetekkel járó fülgyulladást és a koponyacsontok csontvelőgyulladását írták le, melynek a hátterében szintén *O. rhinotracheale* fertőzöttség állt (Moreno és mtsai., 2009).



1. ábra: Bövérű tüdő pulykában *O. rhinotracheale* fertőzést követően

Kórszövettanilag a fertőzés kezdetekor a baktériumok az epithelium csillóihoz tapadva később makrofágokkal aggregálódva találhatóak meg. A bronchus-asszociált lymphoid szövet infiltrálódik és nekrotikus lehet (van Empel és Hafez, 1999). A tüdőparenchymában fibrin, a lumenekben heterophil granulocyták és macrophágok figyelhetők meg (Gornatti Churria és mtsai., 2011; Szalay és Glávits, 2002).

3.1.5. Kórjelzés

Az *O. rhinotracheale* a légutak valamennyi szakaszából, de leggyakrabban a légcsőből és az orrjáratokból izolálható (Thachil és mtsai., 2009). Kísérletes fertőzések során kimutatták már más szervekből, így agyból, lépből, petefészekből, petevezetőből is (Sprenger és mtsai., 2000). Mivel a baktériumot a vegyes baktériumflórában a gyorsabban szaporodó fajok (*E. coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, streptococcusok, staphylococcusok) túlnőhetik, a mintavételt ajánlott a megbetegedés kezdeti szakaszában végezni (Hafez, 2002).

A faj azonosítására szolgáló polimeráz láncreakció az *O. rhinotracheale* 16S rRNS génjének egy 784 bp-os fragmentumát sokszorozza meg (van Empel és Hafez, 1999).

Az *O. rhinotracheale* ellen termelt ellenanyagot tárgylemez-agglutinációs próbával, dot-immunkötési próbával, vagy ELISA próba segítségével lehet kimutatni. Utóbbinál a felhasznált antigén kivonásának módjától függ a módszer szerotípus-specifitása (Hafez, 2002). Az ellenanyag-titer a fertőzés után egy-négy héttel a legnagyobb, utána gyorsan csökken (Canal és mtsai., 2005). Van Empel és Hafez (1999) úgy találta, hogy brojler szülőállománynál

79%-os, míg brojlereknél és húshasznú pulyka-állományoknál 55%-os arányban vannak jelen antitestek.

3.1.6. A kórokozó jellemzése

Az *O. rhinotracheale* viszonylag rövid idő alatt való széles körű elterjedése miatt előtérbe kerültek az epidemiológiai kutatásokat elősegítő tipizáló vizsgálatok.

Szerotipizálás

Eddig 18 szerotípust (A–R) azonosítottak agargél-precipitációs és ELISA vizsgálatokban (Hafez, 2002; van Empel és mtsai., 1996). A napjainkig vizsgált izolátumok közel 97%-a a fő szerotípusoknak tekintett A, B, D és E típusba tartozik. A házityúk eredetű törzsek 94%-a, a pulykából származó törzseknek pedig 57%-a A típusúnak bizonyult. A D és az F szerotípusba tartozó törzsek mindegyike, míg a B és az E szerotípusú törzsek túlnyomó része (88, ill. 77%-a) pulyka eredetű, J és K szerotípusú törzseket pedig házityúkból izoláltak (van Empel és Hafez, 1999; Thachil és mtsai 2007; Numees és mtsai., 2012).

A fenotípusos tulajdonságokon alapuló tipizálás korlátai vezettek a genetikai változékonyság kutatásához.

Genotipizáló vizsgálatok

A RAPD (random amplifikált polimorf DNS) vizsgálat egyetlen rövid (tíz-tizenkét nukleotidból álló), random szekvenciájú primer használatán alapul. A primer nem specifikus semmilyen szekvenciára, random módon választják ki. Amennyiben két RAPD-primer megfelelő irányban és távolságban tapad egymástól, PCR-termék keletkezik. Mivel a primer tapadására alkalmas helyek száma és elhelyezkedése baktériumtörzsenként eltérő, így a létrejövő hosszabb-rövidebb PCR-termékek az agargél-elektroforézis során egyedi mintázatot hoznak létre, amit „genetikai ujjlenyomatnak” is neveznek (Olive és Bean, 1999).

A rep-PCR-ek a bakteriális genomban jelen lévő repetitív elemeket amplifikálják. Az ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) szekvenciák is ilyen repetitív elemek, amelyeket számos baktérium faj genotipizálása során használtak sikerrel (Olive és Bean, 1999). *O. rhinotracheale* törzsek elemzésére mindkét módszert több tanulmányban is használták. Amonsin és mtsai., (1997) az ERIC-típusok és a törzsek gazdafaji eredetével találtak összefüggést. Egy másik vizsgálatban (Thachil és mtsai., 2007) egyes szerotípusok esetén specifikus ERIC-mintázatot kaptak, néhány szerotípust viszont nem tudtak elkülöníteni ezzel a módszerrel. Waldow (2009) M13 primerrel végzett RAPD vizsgálatnál egy, a szerotípusokat elkülönítő rendszert dolgozott ki, Thachil és mtsai. (2007) hasonló vizsgálatában azonban ugyanez a rendszer csak részlegesen volt erre alkalmas. Ozbey és

mtsai. (2005) RAPD-vizsgálatuk során OPG11 primer használatával nagy genetikai változatosságot találtak az *O. rhinotracheale* törzsek között.

További módszerként alkalmazták a baktérium teljes fehérje- és külső membránfehérje-profiljának vizsgálatát (Hung és Alvarado, 2001; Lopes és mtsai., 2000; Ozbey és mtsai., 2004), a 16S rRNS gén szekvenálását (Amonsin és mtsai., 1997; Canal és mtsai., 2005; Travers és mtsai., 1996), valamint a ribotipizálást (Leroy-Sétrin és mtsai., 1998). Ezek a módszerek viszont nem rendelkeztek megfelelő megkülönböztető erővel, a törzsek nagyfokú hasonlóságot mutattak egymással.

3.1.7. Megelőzés, védekezés

Gyógykezelés

Az elmúlt években az *O. rhinotracheale* fertőzések megszorodtak, miközben az antibiotikumoknak a kórokozóval szemben mutatott hatékonysága csökkent (van Veen és mtsai., 2001). A kórokozó antibiotikum-érzékenységét számos szerző vizsgálta, a kapott eredmények azonban sok esetben ellentmondanak egymásnak. Ennek hátterében részben az eltérő antibiotikum-használat (van Veen és mtsai., 2001), részben az alkalmazott vizsgálati módszerek különbségei állhatnak. Utóbbi oka, hogy bár sokan a Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) nehezen tenyészthető Gram-negatív baktériumokra kiadott útmutatóját követik, hivatalos standard vizsgálati módszer erre a baktériumra nincs kidolgozva.

A rezisztencia genetikai hátteréről egyelőre keveset tudunk. A β -laktám antibiotikumokkal szemben rezisztens törzsekről beigazolódott, hogy β -laktamázt termelnek (Devriese és mtsai., 1995), a kinolonokkal szembeni rezisztencia hátterében pedig a *gyrA* génen található pontmutáció lehet felelős (Marien és mtsai., 2006).

Vakcinák

A gazdaságilag hatékony baromfitartásban a különböző kórokozókkal szembeni immunizálás kulcsszerepet játszik, az *O. rhinotracheale* elleni védekezés során pedig az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia gyors terjedése miatt kiemelten fontos a megelőzésnek ez a módja. A vakcinázás kedvező hatása gyakran csak közvetett módon, a nagyobb testtömegre való hízlalás során, a jobb takarmányhasznosításban jelentkezik (Erganis és mtsai., 2010).

A kórokozó ellen elölt teljes sejt (bakterin), élő és rekombináns alegység vakcinákat is fejlesztettek, változó sikerrel.

Inaktivált oltóanyag használatakor brojler szülőállományokban hosszantartó immunválasz jött létre (Cauwerts és mtsai., 2002). A vakcinázott állományokban az

ellenanyag-titerek a teljes termelési időszakban jók maradtak, és az utódokban is magasabbak voltak a maternális ellenanyag-titerek, mint a nem vakcinázott állományok utódaiban. Az elhullások aránya szignifikánsan kisebb, a produkciós index pedig szignifikánsan nagyobb volt, mint a nem vakcinázott szülőállományból származó állományban.

Murthy és mtsai. (2007) kétféle módszerrel (formalinnal, illetve tiomerzállal) inaktivált vakcinát vizsgáltak háromféle adjuváns (ásványi olaj, kálium-alumínium timsó és alumínium-hidroxid) kombinációban. Mindegyik adjuvánsal, és az adjuváns nélkül alkalmazott bakterin is indukált immunválaszt, de az az ásványi olajos adjuválás során volt a leghosszabban tartó és a legerősebb. Az inaktiválás módjában nem találtak különbséget. A szerzők ezért a tojóállományok olajjal adjuválta bakterin vakcinával történő kétszeri, 8 és 12 hetes korban végzett oltását javasolják (Murthy és mtsai., 2007).

Egy másik kísérletben, bivalens (A és B szerotípusú törzseket tartalmazó) bakterinvakcinával való oltást követő fertőzés után a vakcinázott madarak ellenanyag-titerei szintén nagyobbak voltak, mint a nem vakcinázott csoporté. A vakcina kellő védelmet nyújtott a kísérleti fertőzéssel szemben, bár az oltás helyén nemkívánatos reakciót tapasztaltak (Erganis és mtsai., 2010). Sprenger és mtsai. (2000) pulykákat immunizáltak hat- és tízhetes korban élő vagy formalinnal inaktivált oltóanyaggal. Mindkét vakcina megakadályozta a kísérletes fertőzést követően a klinikai tünetek megjelenését, az állatok szeropozitivitása pedig nyolc héten át fennmaradt. Lopes és mtsai. (2002) hőérzékeny mutáns *O. rhinotracheale* törzset használtak élő vakcina alapanyagaként. A törzssel való fertőzés során egyik csoportban sem alakult ki klinikai megbetegedés, a törzs egyik külső membránfehérjéje ellen termelt ellenanyag az immunizálás utáni 3. héten az állatok 19%-ában kimutatható volt, ezért a szerzők ígéretes vakcinajelöltnek tartják ezt a törzset.

Schuijffel és mtsai. (2005) élő B, G illetve M szerotípus típus-törzsekkel vakcináztak kéthetes házityúkokat, majd öthetes korukban A szerotípus típus-törzsszel fertőzték meg őket. Mindhárom vakcinázott csoportban alacsonyabb pontszámú (kisebb mértékű) makroszkópos elváltozásokat figyeltek meg, mint a kontroll csoportban. A legjobb keresztvédelmet a G szerotípus adta, így a továbbiakban ezt használták fel egy nyolc keresztreakáló antigént tartalmazó alegység vakcina fejlesztésére. Az így előállított vakcina mind G, mind A szerotípusú törzssel való fertőzés során jó védőhatást mutatott. Egy másik kísérletben (Schuijffel és mtsai., 2006) a korábban elemzett (Schuijffel és mtsai., 2005) nyolc fehérje egyedi védőhatását vizsgálták. A nyolc vizsgált fehérje közül egy rendelkezett szignifikáns keresztvédő hatással. Négy antigén kombinálásával pedig az összes szerotípus ellen kialakul védelem.

3.2 *Bordetella avium*

3.2.1. Történet

A *B. avium* által okozott betegséget először 1967-ben Kanadában írták le. Az 1-6 hetes pulykákban krónikus légúti fertőzésre utaló tünetek jelentkeztek, melyek megjelenése után 5-7 nappal az állatok elhullottak. A kórbonctani vizsgálatok során rhinitist, bronchitist és bronchopneumoniát állapítottak meg. Az izolált kórokozóval pulykában és házityúkban reprodukálták a betegséget, és feltételezték, hogy egy ismeretlen, a *B. bronchiseptica*-val rokon baktérium állt a megbetegedés hátterében (Filion és mtsai., 1967).

A megfigyelt tünetek etiológiai háttereként a későbbiekben több kórokozót feltételeztek. Hinz és mtsai. (1978) *B. bronchiseptica*-szerű baktériumot, az USA-ban légzőszervi adenovírust (Blalock és mtsai., 1975), más szerzők *Alcaligenes faecalis*-t (Rimler és Simmons, 1983) neveztek meg a betegség okozójaként. A betegség kísérletes állatfertőzéssel való reprodukálása azonban több esetben sem volt sikeres (Dillman és Simmons, 1977, Jackwood és Saif, 1985). Végül 1984-ben, a megbetegedést kiváltó baktérium fenotípusos, szerológiai és molekuláris módszerekkel való jellemzését követően a *B. avium* nevet kapta az addig I. típusú *A. faecalis* néven ismert kórokozó (Kerstens és mtsai., 1984), míg a korábban II. típusú *A. faecalis*-nak nevezett izolátumokat végül *B. hinzii*-ként azonosították (Spears és mtsai., 2000).

3.2.2. A kórokozó tulajdonságai

A *B. avium* a *Bordetella* nemzetségbe tartozó apró, Gram-negatív kórokozó. A nemzetség a *Proteobacteria* törzs *Betaproteobacteria* osztályába sorolt *Alcaligenaceae* család tagja, és jelenleg nyolc fajt foglal magába. Ezek a *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. hinzii* és a *B. petrii*.

A humán kórokozók közé tartoznak a számarköhögést okozó *B. pertussis*; a számarköhögéshez hasonló, de annál enyhébb lefolyású, szintén humán megbetegedéseket előidéző *B. parapertussis* (Goodnow, 1980); a gyakran emberi sebektől izolálható, valamint számarköhögésre emlékeztető légzőszervi megbetegedést okozó *B. holmesii* (Mattoo és Cherry, 2005); a szintén emberi sebektől, középfülgyulladásból azonosított *B. trematum* (Vandamme és mtsai., 1996).

A széles gazdaspektrummal rendelkező *B. bronchiseptica* többek között a sertések torzító orrgyulladásával (Magyar és Lax, 2002), a kutyák kennelköhögésével (Bemis és mtsai., 1977), a nyulak náthájával (Glávits és Magyar, 1990) hozható összefüggésbe, de humán megbetegedések is ismertek (Lorenzo-Pajuelo és mtsai., 2002). A *B. avium* elsősorban pulykák, házityúkok és más madarak légzőszervi megbetegedéseikért felelős (Jackwood és

Saif, 2013). Ezzel szemben a *B. hinzii*-t leginkább madarak nyálkahártyáján élő kommenzalista baktériumnak tartják, bár kiderült, hogy egyes esetekben a *B. avium* által előidézett megbetegedéshez hasonló tünetek hátterében *B. hinzii* fertőzés állt (Gerlach és mtsai., 2001; Gross és mtsai., 2010). Ritkán immunszuppresszált emberekben is okoz megbetegedést (Cookson és mtsai., 1994). A *B. petrii* a környezetben megtalálható, fakultatív anaerob baktérium, mely leginkább kontaminált környezeti mintákban fordul elő, és jelen ismereteink szerint nem patogén (von Wintzingerode és mtsai., 2001).

A *B. pertussis*, *B. parapertussis* és *B. bronchiseptica* között szoros filogenetikai kapcsolat van, és az általánosan elfogadott elmélet szerint a *B. pertussis* és *B. parapertussis* a *B. bronchiseptica*-tól vált külön mintegy 35 millió évvel ezelőtt (Sebahia és mtsai., 2006). Egy *B. avium* törzs (197N) teljes genomjának megszekvenálása alapján a *B. avium* a genus legtávolabbi tagja: nukleotida szinten 97%-ban, fehérje szinten 75%-ban mutat egyezést a *B. pertussis*-szal, *B. parapertussis*-szal és *B. bronchiseptica*-val (Jackwood és Saif, 2013). A *B. petrii* mellett ez a faj képviseli a legközelebbi kapcsolatot a szintén *Alcaligenaceae* családba tartozó *Achromobacter* nemzetséggel (Bemis és Fenwick, 2008).

A *B. avium* jól nő MacConkey, Bordet-Genou valamint véresagaron. BHI és triptikáz szója levesben a növekedéshez rázás szükséges. 37 °C-os, 48 órás tenyésztést követően 1-2 mm-es, szürkésfehér, transzlucens, gyöngyszerűen fénylő telepeket képez. Biokémiai tesztekben a kórokozó meglehetősen inaktív: kataláz és oxidáz pozitív, de nem bontja az ureumot, nem redukálja a nitrátot, indol-negatív, a különböző szénhidrátokat nem hasznosítja.

3.2.3. Járványtan

A *B. avium* világszerte előforduló baktérium, főként a jelentős pulykatartó országokban, az USA-ban, Kanadában, Ausztráliában és Németországban okoz komoly gazdasági károkat. Elsősorban 1-6 hetes pulykákban okoz megbetegedést, innen ered az általa kialakított betegség neve: pulykacoryza (Kerstens és mtsai., 1984). Emellett légzőszervi tüneteket idéz elő több más madárfajban, így házityúokban, kacsában, házilúdban, pézsmarécében, fogolyban, struccban, kakaduban, és több papagájfajban (Odugbo és mtsai., 2006). Kimutatták a kórokozót vadkacsából, kanadai lúdból, vadpulykából is (Raffel és mtsai., 2002). Vad- és házimadarokban való széleskörű elterjedését mutatja, hogy 61 vizsgált fajból 41-ben kimutattak *B. avium* ellen termelt ellenanyagot (Raffel és mtsai., 2002).

Az általa kialakított betegségre a legfogékonyabb, 2-6 hetes pulykákban magas (80-100%) morbiditás, de alacsony (<10%) mortalitás jellemző, míg tenyészállományokban a morbiditás csak 20% körüli (Jackwood és Saif, 2013).

3.2.4. Klinikai tünetek és kórbonctani elváltozások

A betegség lefolyása hasonlít a más *Bordetella*-k által kialakított kórképekhez (Sebahia és mtsai., 2006). 7-10 nap lappangás után a fertőzött állatokon tüszögés, köhögés, savós orrfolyás, könnyezés figyelhető meg, az orrnyílások és a szem körül a bőr jellegzetesen nedves, barnás színű exsudatummal szennyezett (Filion és mtsai., 1967). A betegség második hetében a légutak mucinosus váladékkal telnek meg, emiatt az állatok nyitott csőrrel lélegeznek, dyspnoe is gyakran megfigyelhető a nem specifikus tünetek (bágyadság, gubbasztás, takarmányfelvétel csökkenése) mellett (Odugbo és mtsai., 2006). A környezeti tényezők és a másodlagos fertőzések *B. avium* esetében is súlyosbíthatják a tüneteket. Ezek közül kiemelendő az *E. coli*-val való társfertőzés: kísérletes állatfertőzések során kimutatták, hogy *B. avium* jelenlétében az *E. coli* súlyosabb légzsákgyulladást okozott. Ezek hiányában a tünetek 2-4 hét után maguktól javulnak (Jackwood és Saif, 2013).

A megbetegedés kórbonctani képére a légutakban található savós, majd mucinosus exsudatum, hurutos orrgyulladás, légcsőgyulladás jellemző (Filion és mtsai., 1967). A légcsőporcok ellágyulása és eltorzulása, dorsoventralis ellapulása is megfigyelhető (Jackwood és Saif, 2013). Átmetszetben a légcső fala megvastagodott, ürege szűkült. A légcsőporcok eltorzulása a fertőződést követő 53. napon is kimutatható volt (Arp és Cheville, 1984). A leszűkült lument eltömítő mucosus váladék akár az állat fulladásához is vezethet. A *B. pertussis*-hoz, *B. parapertussis*-hoz és *B. bronchiseptica*-hoz hasonlóan a *B. avium* is a légzőszervek csillós hámsejtjei felé mutat tropizmust (Arp és Cheville, 1984), a tüdőből és légzsákokból ritkán izolálható (Gentry-Weeks és mtsai., 1988), bár egyes esetekben bronchopneumoniát is megfigyeltek (Filion és mtsai., 1967). A klinikai tünetek kialakulásának hátterében feltehetően a csillós hámsejtek pusztulása áll (Spears és mtsai., 2003).

A *B. pertussis*, *B. parapertussis* és *B. bronchiseptica* számos virulenciafaktorral rendelkeznek, melyek az adhezinek vagy a toxinok csoportjába sorolhatók.

Az adhezinek a kórokozó olyan virulenciafaktorai, melyek elősegítik a gazdaszervezet sejtjeihez való specifikus tapadást, megakadályozzák a kórokozó a gazdaszervezet fizikai védekező mechanizmusai által történő kisodródását. A *Bordetella*-k ilyen adhezinjai a filamentózus hemagglutinin (FHA), a pertaktin és a fimbriák, azonban ezek mellett számos egyéb fehérje játszhat közvetett szerepet az adhézióban és kolonizációban (Bemis és Fenwick, 2008).

A toxinok a betegségre jellemző elváltozások kialakításában töltenek be fontos szerepet. A *Bordetella* nemzetség tagjainak toxinjai közé sorolható a pertussis toxin, az adenilát-cikláz-hemolizin, a lipopoliszacharid, a dermonekrotoxin és a tracheális citotoxin.

A *Bordetella*-kban megtalálható virulencia faktorok közül az FHA-t, fimbriákat, lipopoliszacharidot, dermonekrotoxint és tracheális citotoxint azonosították *B. avium*-ban (Sebahia és mtsai., 2006), míg más virulencia tényezők (adenilát-cikláz-hemolizin, pertussis toxin) hiányoznak a *B. avium* törzsekből (Gentry-Weeks és mtsai., 1988). A virulencia faktorok genetikai hátterét összehasonlítva a *B. avium* és a *B. bronchiseptica* között jelentős különbségek vannak (Sebahia és mtsai., 2006).

3.2.5. Kórjelzés

A betegség kórjelzése a klinikai és kórbonctani tünetek, valamint a kórokozó direkt vagy indirekt kimutatásán alapul. A *B. avium* a felső légutakból izolálható (Jackwood és Saif, 2013). Mivel a choananyíláson vagy a trachea felső szakaszából vett tamponminták számos nem pathogén baktériumot is tartalmaznak, sikeresebben tenyésztethető ki a kórboncolás során a légcső középső szakaszán ejtett bemetszésen keresztül. MacConkey agaron 24 óra tenyésztést követően tűszúrásnyi, 48 óra után 1-2 mm nagyságú telepeket képez (Slavik és mtsai., 1981).

Szerológiai vizsgálatok közül mikroagglutinációs (Slavik és mtsai., 1981) és ELISA teszt is használható (Jackwood és Saif, 2013).

3.2.6. A kórokozó jellemzése

A *B. avium* törzsek, bár egyes fenotípusos tulajdonságaikban (toxintermelő képességük, megbetegítő képességük, és antibiotikum rezisztenciájuk) különbözőek lehetnek (Jackwood és Saif, 2013), több tipizáló vizsgálatban nagyfokú hasonlóságot mutattak. Külső membránfehérjék (Kerstens és mtsai., 1984), valamint antigén profilok agargél-precipitációs, illetve Western blot módszerrel való elemzésekor is minimális különbözőséget mutattak a vizsgált *B. avium* törzsek (Jackwood és Saif, 2013). Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus elemzésével azonban találtak eltéréseket az izolátumok között (Sacco és mtsai., 2000).

3.2.7. Megelőzés, védekezés

A *B. bronchisepticához* hasonlóan a *B. avium* is hosszú ideig életképes marad vízben. Fertőzött vízzel és alomanyaggal igen, aeroszollal nem terjed. Alomanyagban a *B. avium* 1-6 hónapig fertőzőképes marad (Sebahia és mtsai., 2006). A környezetben való túlélését az alacsony hőmérséklet és páratartalom, valamint a semleges pH meghosszabbítja (Cimiotti és mtsai., 1982), azonban a legtöbb fertőtlenítőszer hatékony a mikróbával szemben (Jackwood és Saif, 2013). Ezen tulajdonságai miatt a kórokozó elleni védekezésben kiemelten fontos a

szennyezett felületek alapos tisztítása és fertőtlenítése, valamint a megfelelő higiénias gyakorlat (cipő- és járműfertőtlenítő, fekete-fehér öltöző).

Gyógykezelés

Pulyka eredetű törzsek vizsgálata során számos antibiotikum hatástalannak bizonyult, amit a nagyüzemi állattartás túlzott antibiotikum-használatából eredő szelektív nyomással magyaráztak (Mortensen és mtsai., 1989). Beach és mtsai. (2012) harmadik generációs cefalosporinokkal, ampicillinnel és aztreonammal szemben figyeltek meg rezisztenciát. Penicillinekre és ticarcillin/klavulánsavra azonban érzékenyek voltak az általuk vizsgált törzsek. A *B. avium* törzsekből tetraciklin- és szulfonamid-rezisztenciát hordozó plazmidot izoláltak (Beach és mtsai., 2012).

Vakcinák

Kereskedelmi forgalomban inaktivált (bakterin tartalmú) és élő, hőszenzitív mutáns *B. avium* törzset tartalmazó vakcina is elérhető (Jackwood és Saif, 2013). Utóbbi egy virulens törzsből mesterségesen előállított vakcinatörzs, mely az első vizsgálatok szerint az orrnyálkahártyát kolonizálja, és a szérumban mérhető ellenanyagszintet is emeli (Burke és Jensen, 1980). Jackwood és Saif (1985) vizsgálatában azonban a vakcina használata a megbetegedéstől nem védett, de csökkentette a kialakult tünetek súlyosságát, amit Arp és McDonald (1985) a mutáns törzs lassú növekedésével és az ebből következő elégtelen kolonizációs képességgel magyaráztak.

Megfigyelések szerint 3 hetesnél fiatalabb pulykák vakcinázása nem vált ki megfelelő mértékű immunválaszt (Jackwood és Saif, 2013), ezzel szemben tenyészállományok tojóinak immunizálása részleges védelmet eredményezett a betegség ellen a napos pulykákban (Neighbor és mtsai, 1991).

4. Anyag és módszer

4.1.A felhasznált baktérium törzsek

Munkánkhoz frissen izolált és az MTA ATK ÁOTI törzsgyűjteményében megtalálható, hazai és külföldi eredetű, különféle gazdafajokból származó 64 *O. rhinotracheale* (Melléklet 1. táblázat) és 19 *B. avium* törzset használtunk fel (Melléklet 2. táblázat).

4.1.1. A baktériumok izolálása, tenyésztése és azonosítása

Az *O. rhinotracheale* és *B. avium* izolálását állattartó telepeken és háztáji állományokban élő, légzőszervi tüneteket mutató házimadarakból, valamint klinikai tünetet nem mutató vadmadarokból vett choana- és tracheatumpon-mintákból kíséreltük meg. Elhullott állatok tüdőmintáiból szintén végeztünk a két baktériumfaj izolálását célzó bakteriológiai vizsgálatot. *B. avium* izolálásához MacConkey (Becton, Dickinson and Company; New Jersey, USA) táptalajra oltottuk le a mintákat. Az *O. rhinotracheale* izolálásához 0,005 mg/ml gentamicinnel és 0,005 mg/ml polimixin B-vel kiegészített, 5% juhvért tartalmazó Columbia agar táptalajt (Lab M; Bury, UK), valamint antibiotikumot nem tartalmazó, 5% juhvérrel kiegészített Columbia agar táptalajt (Lab M) használtunk. A lemezeket 5% CO₂ jelenlétében, 37°C-on 48 órán keresztül inkubáltuk.

A vizsgált kórokozókra jellemző telepmorfológiát mutató baktériumtelepeket 5% juhvért tartalmazó Columbia agar táptalajra oltottuk, és az így kapott színtenyészetet használtuk további vizsgálataink során. A törzsek fenntartása liofilizált és -70°C-on fagyasztott formában történt. Az izolátumokat telepmorfológiájuk, biokémiai tulajdonságaik és fajspecifikus PCR segítségével azonosítottuk.

4.2.A törzsek fenotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok

4.2.1. Telepmorfológiai vizsgálatok

A baktériumok 48 órás, 37°C-on történő inkubációja után megfigyeltük a kialakuló kolóniák színét, fényességét, nagyságát, alakját, a telepek szélét, konzisztenciáját.

4.2.2. Biokémiai tulajdonságok vizsgálata

Az izolátumok elsődleges azonosításához és jellemzéséhez biokémiai próbákat végeztünk. Hagyományos levestáptalajok segítségével vizsgáltuk a baktériumok ureum-bontó és nitrát-redukáló képességét, a triptofán-bontó képességet indol próbával ellenőriztük. Az

izolátumok szénhidrát hasznosító képességét arabinóz, dulcitol, glükóz, laktóz, maltóz, szacharóz és szorbit tartalmú táplevesben vizsgáltuk (Konkoly Thege és Lányi, 1999). A tápleveseket az *O. rhinotracheale* növekedésének elősegítésére 2% steril csirkesavóval (Biosera, Sussex, UK) egészítettük ki. A teszteket mindkét baktériumfaj vizsgálata során 4 napig inkubáltuk.

4.2.3. A növekedés körülményeinek vizsgálata

A *B. avium* és *O. rhinotracheale* törzsek ideális növekedési körülményeit 31, 37 és 41 °C-on, Columbia (LabM) és triptikáz szója agaron (TSA; Scharlau Chemie, Spanyolország), valamint ezek 5% juhvérrel kiegészített változatain vizsgáltuk aerob körülmények között és 5% CO₂ jelenlétében. A táptalajokat minden esetben 48 órán keresztül inkubáltuk.

4.2.4. A hemolízis vizsgálata

A *B. avium* és *O. rhinotracheale* törzsek hemolitikus tulajdonságait 5% juhvérrel kiegészített Columbia táptalajon, 48 órás, 37 °C-on történt tenyésztés után 48 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubálva figyeltük meg.

4.2.5. Hemagglutinációs próba

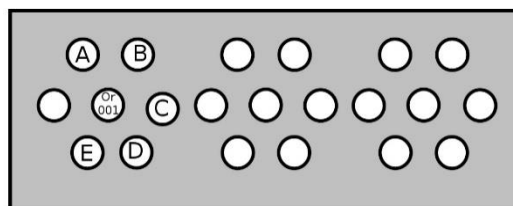
A 19 *B. avium* és 64 *O. rhinotracheale* törzs adhéziós képességének vizsgálatához tárgylemez-hemagglutinációs vizsgálatokat végeztünk. A vizsgálatokhoz alvadásban gátolt juh-, ló-, nyúl-, szarvasmarha-, kacs- és házityúkvert használtunk. A véreket 3000 g-n 5 percig centrifugáltuk. A cső aljára ülepedett vörösvértesteket illetve –sejteket (vvt) fiziológiás sóoldatban (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) szuszpendáltuk, majd ismét lecentrifugáltuk az elegyet (3000 g, 5 perc). A mosást a felülúszó kitisztulásáig ismételtük. Ekkor a vvt-eket tartalmazó üledékből foszfáttal pufferealt sóoldattal (phosphate-buffered saline; PBS [Sigma-Aldrich]) 10%-os szuszpenziót készítettünk. A szuszpenzió 20 µl-ét tárgylemezre cseppentettük, amelyben egyenletesen eloszlattunk egy kacsnyi friss baktériumtenyészetet. A reakciók eredményét egy perc elteltével, ötfokozatú skálán (0-4) értékeltük. A 0 hemagglutinációs szint a hemagglutináció hiányát jelölte, a 4 pedig a teljes hemagglutinációt. Pozitív kontrollként a Khaber (2015) által vizsgált KM22 jelű *B. bronchiseptica* törzset használtuk. A vizsgálatot szobahőmérsékleten végeztük, és legalább háromszor ismételtük meg. Az ismétlések eredményeit átlagoltuk, majd a kapott értékeket egész számokra kerekítettük.

4.2.6. A szerotípus meghatározása

A szerotípus meghatározását 59 *O. rhinotracheale* törzs esetén végeztük el. Az A-E szerotípus típus törzsek ellen specifikus kórokozótól mentes (specific pathogen free; SPF) háziútkban termeltettük szerotípus-specifikus ellensavót. A négyhetes állatokat formalinnal inaktivált, 10^8 CFU/ml töménységű baktérium szuszpenzió 1 ml-vel oltottuk *subcutan*. A booster hatás érdekében 4 héttel később az oltást *intramuscularisan* megismételtük, majd a második oltás után egy héttel az állatokat elvéreztettük.

A vizsgált *O. rhinotracheale* törzsek szerotípusát agargél-precipitációs (AGP) tesztben, hőstabil antigének használatával határoztuk meg. A hőstabil antigén előállítása Heddleston és mtsai. (1972) módszere szerint történt. A szerotípus-specifikus törzseket, valamint a mezei izolátumokat 5% juhvért tartalmazó Columbia agarra oltottuk, és 48 órán át $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 5% CO_2 jelenlétében tenyésztettük. A 48 órás baktérium tenyészeteket 1,5 ml PBS-sel lemostuk, és a baktériumszuszpenzió sűrűségét denzitóméter (DEN-1 McFarland Densitometer, Biosan, Riga, Lettország) segítségével 3 McFarland-re állítottuk be. A baktériumszuszpenziókat egy órán át asztali blokk termosztátban (BioSan) $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on forraltuk, majd 12000 g-n 5 percig centrifugáltuk, és a felülúszót használtuk antigénként az AGP tesztben.

Az AGP teszt során 5 ml Noble-agarból (0,9% Noble agar [BD Difco™ Agar, Noble; Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, New Jersey], 8,5% NaCl, és 0,01% thimerosal desztillált vízben) mikroszkóp-tárgylemezre gélét öntöttünk. A megdermedt gélbe 4 mm átmérőjű mélyedéseket vágunk, olyan elrendezésben, hogy egy központi mélyedést hat szélső vett körbe hatszög alakban, egymástól és a központi mélyedéstől 6 mm távolságra. A központi mélyedésbe a vizsgált antigén 20 μl -e került, a perifériás lyukakba pedig a szerotípus-specifikus savók 20-20 μl -ét cseppentettük.



2. ábra: Az AGP teszt elrendezése mikroszkóp-tárgylemezen.

A lemezeket nedves környezetben, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk, és 24, 48, valamint 72 óra elteltével bíraltuk el. A termelt savók specificitását a szerotípus típus törzsekkel ellenőriztük. Amennyiben egynél több precipitációs vonal is megfigyelhető volt, a legerősebb reakciót tekintettük a szerotípusnak, a gyengébbeket pedig keresztreakcióknak.

4.2.7. Az antibiotikum-érzékenység vizsgálata

A baktériumok korongdiffúziós módszerrel végzett antibiotikum-érzékenység vizsgálatához 19 *B. avium* és 50 *O. rhinotracheale* törzset választottunk ki. A törzseket a CLSI nehezen tenyészthető Gram negatív baktériumokra kiadott ajánlásának megfelelően vizsgáltuk (CLSI, 2002). Egy kacsnyi friss tenyészetből származó baktériumot 5 ml fiziológiás konyhasóoldatban szuszpendáltunk. A szuszpenzió sűrűségét denzitométerrel (BioSan) 0,5 McFarland-re állítottuk be, majd steril vattapálca segítségével 5% juhvér tartalmú Müller-Hinton (LAB M) táptalajra szélesztettük, majd ráhelyeztük az antibiotikum korongokat (2. táblázat).

2. táblázat: Az antibiotikum-érzékenység vizsgálata során felhasznált antibiotikumok adatai

Antibiotikum neve	rövidítés	gyártó
Amoxicillin	AX10	Biolab
Ampicillin	AMP	Abtek
Ceftiofur	FUR30	Biolab
Ciprofloxacín	CPR5	Abtek
Doxiciklin	DOX	Abtek
Enrofloxacin	ENO	Abtek
Eritromicin	ERY15	Abtek
Gentamicin	GEN10	Abtek
Kloramfenikol	CHL30	Abtek
Linkomicin	L2	Biolab
Nalidixsav	NAL30	Abtek
Oxitetraciklin	T30	Biolab
Penicillin	PEN10	Abtek
Polimixin B	POL	Abtek
Spektinomycin	SPC100	Abtek
Szulfametoxazol+trimetoprim	SXT25	Abtek
Szulfonamidok	SMX	Oxoid
Tilmikozin	TIL15	Biolab

A táptalajokat 37 °C-on inkubáltuk *B. avium* esetében 24 óráig, *O. rhinotracheale* esetén 48 óráig. A vizsgálatokat legalább háromszor megismételtük. A vizsgálatokat a CLSI M31-S1 (CLSI, 2004) valamint M100-S21 (CLSI, 2011) dokumentumaiban megadott határértékek alapján bíráltuk el. Azon antibiotikumok esetében, amelyekhez egyik CLSI dokumentumban sem találtunk határértéket, a Murthy és mtsai. (2008a) által megadott határértékeket használtuk. Pozitív kontrollként az ATCC25922 törzset alkalmaztuk.

4.2.8. A minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása

Az amoxicillint, doxiciklint és eritromicint a korongdiffúziós tesztben mutatott változó hatékonyságuk miatt választottuk ki a MIC meghatározáshoz. Ehhez a vizsgált antibiotikumokból kettes alapú hígítási sort készítettünk 96 lyukú lemezen úgy, hogy a végső koncentrációk 0,03 és 64 µg/ml között voltak. A vizsgált baktériumok log fázisú szuszpenziójának töménységét 0,5 McFarland egységre állítottuk be, ami $1,5 \times 10^6$ CFU/ml töménységnek felelt meg. Ezt 5×10^5 CFU/ml végső töménységűre hígítottuk. A baktériumszuszenzió töménységét csíraszámolással ellenőriztük. A lemezeket *B. avium* esetében 24 órán, *O. rhinotracheale* esetén 48 órán át inkubáltuk 37 °C-on. MIC értéknek azt a legalacsonyabb antibiotikum koncentrációt tekintettük, ami gátolta a baktérium növekedését. A baktériumok a táplevesben való növekedését úgy ellenőriztük, hogy minden törzs szuszpenziójából antibiotikumot nem tartalmazó táplevesbe is oltottunk. A vizsgálatokat legalább ötször megismételtük és a kapott eredményeket átlagoltuk. MIC₅₀ értéknek azt a legkisebb MIC értéket tekintettük, ami a vizsgált törzsek legalább 50%-ának növekedését gátolta.

4.3.A törzsek genotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok

4.3.1. DNS izolálás

Minden vizsgált törzs friss színtenyészetéből egy kacsnyi baktériumot 50 µl PCR vízben (VWR) szuszpendáltuk, vortexeltük, majd 20 percig 99 °C-on asztali blokktermosztátban (BioSan) forraltuk. Ezt követően a baktériumszuszenziót 12000 g-n 3 percig centrifugáltuk, hogy a forralásos módszer során keletkezett sejttörmelék elváljon a felülúszóban található DNS-től. A felülúszót steril csövekbe pipettáztuk át. A szuszpenzió töménységét Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) segítségével ellenőriztük, majd koncentrációját 100 ng/µl-ra hígítottuk. Az így elkészített DNS templátot további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

4.3.2. Plazmid izolálás

Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatra kiválasztott törzsekből plazmid izolálását is megkíséreltük, QIAGEN Plasmid Mini Kit (Hilden, Németország) segítségével, a gyártó utasítása szerint. A plazmid izolálás feltárási kontrollja egy ismert, plazmiddal rendelkező *Riemerella anatipestifer* törzs (RA126) volt.

4.3.3. Polimeráz lánreakciók

Vizsgálataink során a következő primereket használtuk fel.

Név	5'-3' szekvencia	Hivatkozás
OR16S-F1	5'-GAGAATTAATTTACGGATTAAG-3'	van Empel és Hafez (1999)
OR16S-R1	5'-TTCGCTTGGTCTCCGAAGAT-3'	van Empel és Hafez (1999)
N-avium	5'-CGGCGTCAACACATACTCTTGAT-3'	Register és Yersin (2005)
C-avium	5'-AGGGAGGTCAGATAGCTCTAGAAT-3'	Register és Yersin (2005)
ERIC R1	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	(Versalovich és mtsai., 1991)
ERIC 2	5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'	(Versalovich és mtsai., 1991)
M13	5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'	(Vassart és mtsai., 1987)
OPG11	5'-TGCCCGTCGT-3'	(Leroy-Sétrin és mtsai., 1998)
OPH19	5'-CTGACCAGCC-3'	(Leroy-Sétrin és mtsai., 1998)
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	(Lane, 1991)
1492R	5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'	(Lane, 1991)

Az *O. rhinotracheale* fajazonosító PCR-t a van Empel és Hafez (1999) által leírtak alapján állítottuk össze, az alábbi módosításokkal:

A reakcióelegy összetétele:

19,5 µl	PCR víz
2,5 µl	10 x DreamTaq puffer (20 mM MgCl ₂ -dal)
1,0 µl	10 mM dNTP
0,4 µl	10 µM OR16S-F1 primer
0,4 µl	10 µM OR16S-R1 primer
0,2 µl	5 U/µl DreamTaq polimeráz
1,0 µl	100 ng/µl DNS templát

A *B. avium* fajazonosító PCR során a Register és Yersin (2005) által leírt primereket és hőprofilot használtuk, a reakcióelegy összetételét pedig az általunk használt rendszerhez adaptáltuk.

A reakcióelegy összetétele:

18,2 µl	PCR víz
2,5 µl	10 x DreamTaq puffer (20 mM MgCl ₂ -dal)
1,3 µl	DMSO
1,0 µl	10 mM dNTP mix (Fermentas)
0,4 µl	10 pmol N avium primer
0,4 µl	10 pmol C avium primer
0,2 µl	5U/µl Dream Taq (Fermentas)
1,0 µl	templát

A fajazonosító PCR-eket minden *B. avium* és *O. rhinotracheale* törzs esetén elvégeztük. Az általános 16S rRNS PCR reakcióelegye megegyezett a *B. avium* fajazonosító PCR-ével.

Az *O. rhinotracheale* törzsek jellemzésére használt ERIC-PCR-t és RAPD vizsgálatokat 54 kiválasztott törzsön végeztük el.

Az ERIC-PCR reakcióelegyének összetétele a következő volt:

13,6 µl	PCR víz
2,5 µl	10x DreamTaq puffer
0,5 µl	10 mM dNTP mix
1,5 µl	10 pmol ERIC R1 primer
1,5 µl	10 pmol ERIC 2 primer
0,4 µl	5U/µl DreamTaq polimeráz
5,0 µl	templát

Az *O. rhinotracheale* törzsek elemzésére használt RAPD vizsgálatok reakcióelegyének összetétele a következő volt:

11,1 µl	PCR víz
2,5 µl	10x DreamTaq puffer
1 µl	10 mM dNTP mix
5 µl	10 pmol M13 /vagy OPG11 /vagy OPH19 primer
0,4 µl	5U/µl DreamTaq polimeráz
5,0 µl	templát

Az egyes reakciók körülményeit és a felhasznált primereket a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: A vizsgált génszakaszok felszorzozásakor alkalmazott reakciókörülmények és primerek

PCR	Kezdeti denaturáció	Denaturáció	Anneláció	Extenzió	Végső extenzió	Ciklus-szám	Primerek
Fajspecifikus (Or)	94 °C 5 min	94 °C 30 s	53 °C 45 s	72 °C 1 min	72 °C 7 min	35	OR16S-F1 OR16S-R1
Fajspecifikus (Ba)	95 °C 5 min	95 °C 30 s	50 °C 30 s	72 °C 30 s	72 °C 7 min	35	N-avium C-avium
általános 16S rRNS	94 °C 3 min	94 °C 30 s	55 °C 45 s	72 °C 90 s	72 °C 7 min	30	27F 1492R
ERIC	94 °C 4 min	94 °C 1 min	52 °C 90 s	72 °C 90 s	72 °C 7 min	30	ERIC 1R ERIC 2
RAPD-M13	94 °C 2 min	94 °C 1 min	40 °C* 1 min	72 °C 90 s	72 °C 7 min	35	M13
RAPD-OPG11	94 °C 5 min	94 °C 30 s	37 °C 1 min	72 °C 90 s	72 °C 10 min	50	OPG11
RAPD-OPH19	94 °C 5 min	94 °C 40 s	35 °C 30 s	72 °C 90 s	72 °C 10 min	40	OPH19

A PCR termékeket 1,5%-os SeaKem (Lonza; Basel, Svájc) agaróz gélben 1×TBE (tris-bórsav-EDTA, Lonza) pufferben, megfelelő méretű molekulasúly-markerek (Fermentas) mellett ellenőriztük 9 V/cm elektromos térerősségű gélelektroforézissel. A gél zsebeibe mintánként 5 µl PCR terméket és 1 µl 6×DNA Loading Dye-t (Fermentas) mértünk. A termékek láthatóvá tétele és dokumentálása UV fényben történt Kodak Gel Logic 212 Imaging System (Rochester, USA) segítségével.

4.3.4. Az ERIC-PCR és RAPD vizsgálatok eredményeinek elemzése

Az egyes reakciók során keletkezett mintázatokban fellelhető amplikonok megléte (1) vagy hiánya (0) alapján a PyElph programmal (Pavel és Vasile, 2012) bináris mátrixot készítettük. Az *O. rhinotracheale* törzsek genetikai hasonlóságának vizsgálatához Dice koefficientst használtunk, a dendrogramot UPGMA módszerrel készítettük. A törzsfá topológiáját 100 ismétléses bootstrap analízissel vizsgáltuk (Pavel és Vasile, 2012).

4.3.5. Szekvenca-meghatározás és filogenetikai elemzés

A nukleinsav-sorrendek meghatározását a *B. avium* és az *O. rhinotracheale* törzsek 16S rRNS génjének egy-egy kijelölt szakaszán végeztük el, 11 *B. avium*, illetve 42

O. rhinotracheale reprezentatív törzsnél. Szekvenáló primerként a 27F és 1492R univerzális primereket használtuk. A PCR termékek tisztítását és a hagyományos Sanger-féle dideoxinukleotid módszerrel történő, kapilláris elektroforézis alapú szekvenálást a MacroGen Europe Ltd. (Amszterdam, Hollandia) végezte, a szekvenáláshoz ABI 3130XL készüléket (Applied Biosystems, Foster City, USA) használtak. A MacroGen-től kapott kromatogramokat a Chromas LITE 2.01 (Technelysium Pty Ltd; South Brisbane, Ausztrália) programmal értékeltük ki, a két irányból leolvasott szekvenciákat BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999) programmal illesztettük össze.

Az általunk vizsgált törzsek szekvenciáit a GenBank adatbázisában szereplő *B. avium* és *O. rhinotracheale* teljes genom és részleges 16S rRNS génszekvenciákkal hasonlítottuk össze BioEdit program segítségével. A nukleotid szekvencia hasonlóságokat Clustal W algoritmussal (Higgins és mtsai., 1994) számoltuk ki. Az illesztés eredményeként filogenetikai dendrogramot készítettünk, a filogenetikai analízist a MEGA 6.06 szoftverrel (Tamura és mtsai., 2013) hajtottuk végre. Eredményeink összehasonlíthatósága érdekében a szakirodalomban általánosan használt Neighbor-Joining módszert alkalmaztuk (Saitu és Nei, 1987). Az evolúciós távolságokat Jukes-Cantor korrekciós ráta figyelembevételével számítottuk ki, a törzsfá topológiáját 500 ismétléses bootstrap analízissel vizsgáltuk.

4.3.6. Multi-lókuszos szekvencia tipizálás

Mivel az ERIC-PCR és RAPD vizsgálatok a *B. avium* izolátumok differenciálására nem voltak alkalmasak, ezek genetikai változatosságát MLST analízissel vizsgáltuk. Az MLST-analízist kilenc kiválasztott *B. avium* törzsnél végeztük el hét háztartási gén (*adk*, *fumC*, *glyA*, *tyrB*, *icd*, *pepA*, *pgm*) részleges szekvenciájának elemzésével (Diavatopoulos és mtsai., 2005). Mivel a Diavatopoulos és mtsai (2005) által egyéb *Bordetella*-k tipizálására leírt primerek a *B. avium* esetén nem erősítették fel szekvenálásra alkalmas amplikont, magunk terveztünk primereket a Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) program segítségével a vizsgálni kívánt gének megfelelő szakaszaira.

A PCR reakcióelegyek összetétele megegyezett a *B. avium* fajspecifikus PCR-nél közölt premixével. A vizsgált génszakaszok felsokszorozásakor alkalmazott reakciókörülmények adatait a 4. táblázat ismerteti.

Név	5'-3' szekvencia	Termék hossza
adk-Ba-F	CCAGGCCACGTTCATCACGCAGA	571 bp
adk-Ba-R	GACGCTGCCCACGCCGAAA	
fumC-Ba-F	TGGCCGAATGAGTTTCCGCTGT	881 bp
fumC-Ba-R	TCGGCCAGCAAACGCACCGACT	
glyA-Ba-F	CCAACGTGCAGCCCAACTCGG	646 bp
glyA-Ba-R	ATACGCAGACCACGCTTGACC	
tyrB-Ba-F	ACACTTATTACGATGCCGCCACC	671 bp
tyrB-Ba-R	CACCGCGTACACACCGTGCTC	
icd-Ba-F	CCATCCAGTACGCCGTGACCAC	589 bp
icd-Ba-R	CCGAAACCCGAGCAAGAAACCTG	
pepA-Ba-F	AGCTCACCGAAGGCGTATCCAC	689 bp
pepA-Ba-R	GGGGAGGTTTTTCGCAGGCAG	
pgm-Ba-F	GACGGCAACTTCCCCAACCCAC	684 bp
pgm-Ba-R	TTCGAAGCGCAGCACGACCAC	

4. táblázat: Az MLST-analízis során vizsgált génszakaszok felszorzozásakor alkalmazott reakciókörülmények

Gén	Kezdeti denaturáció	Denaturáció	Anneláció	Extenzió	Végső extenzió	Ciklusok száma
<i>adk</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	66 °C 45 s	72 °C 45 s	72 °C 7 min	23
<i>fumC</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	63 °C 1 min	72 °C 45 s	72 °C 7 min	25
<i>glyA</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	66 °C 45 s	72 °C 45 s	72 °C 7 min	23
<i>tyrB</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	66 °C 45 s	72 °C 45 s	72 °C 7 min	23
<i>icd</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	66 °C 45 s	72 °C 45 s	72 °C 7 min	23
<i>pepA</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	66 °C 45 s	72 °C 45 s	72 °C 7 min	23
<i>pgm</i>	95 °C 5 min	95 °C 30 s	66 °C 45 s	72 °C 45 s	72 °C 7 min	30

A PCR termékek szekvenciáját ezután a 4.3.4. pontban ismertetett módon határoztuk meg, és a Bordetella Multi-Locus Sequence Typing weboldalon szereplő szekvenciákkal összevetve elemeztük szintén a 4.3.4. pontban ismertetett módon.

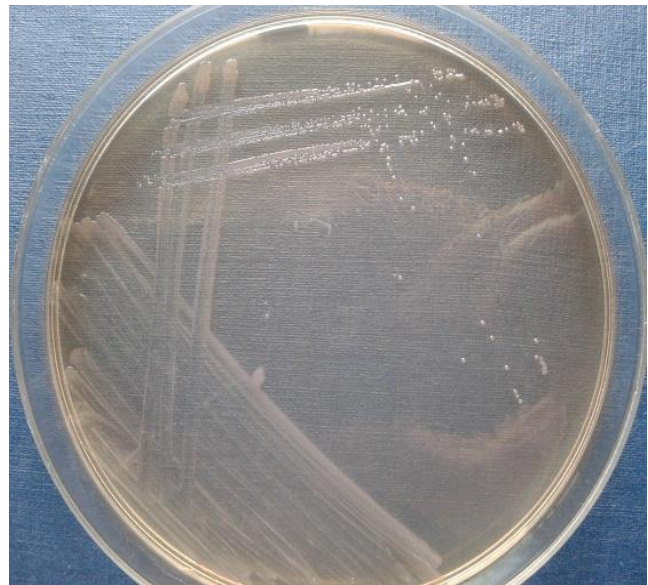
5. Eredmények

5.1. A baktériumok izolálása és azonosítása

2009 és 2016 között összesen 179 choana- és 122 tracheatampon valamint 32 tüdőmintát dolgoztunk fel. Munkánk során azokat a baktériumtelepeket tekintettük *O. rhinotracheale* gyanúsak, melyek 24 óra tenyésztési idő után tűszúrásnyi, 48 óra elteltével 1-3 mm nagyságú, szürkésfehér, domború, vajsavas illatú, nem hemolizáló, kerek telepeket képeztek véresagaron (3. ábra). A MacConkey agaron 24 óra után 0,5-1 mm, 48 óra után 1-3 mm méretű, kerek, áttetsző, gyöngyszerű telepekről telepmorfológiájuk alapján feltételeztük, hogy *B. avium*-ok lehetnek (4. ábra).

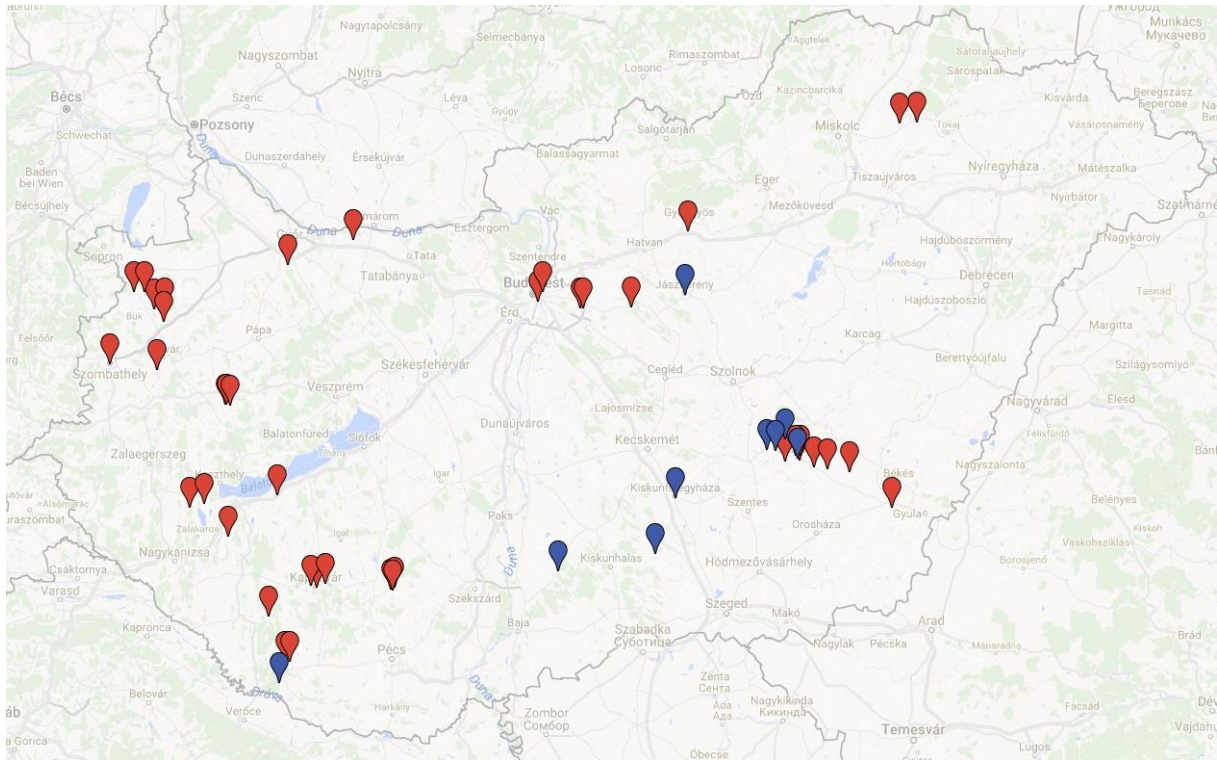


3. ábra: Az *O. rhinotracheale* telepmorfológiája 48 óra inkubációt követően



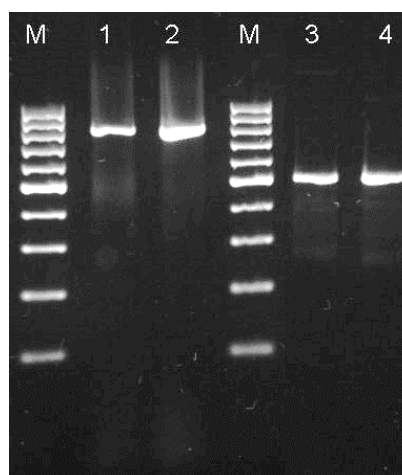
4. ábra: A *B. avium* telepmorfológiája 24 óra inkubációt követően

Az azonosítási vizsgálatokat követően összesen 13 pulyka, három házityúk, két galamb, egy héja és egy karvaly eredetű *O. rhinotracheale* és hat pulykából származó *B. avium* törzs izolálását erősítettük meg. *O. rhinotracheale* törzsek esetében a megvizsgált minták 6%-a, *B. avium* törzsek esetén pedig mindössze 1,8%-a adott pozitív eredményt. Az általunk izolált, valamint a törzsgyűjtemény további hazai izolátumainak földrajzi eredetét az 5. ábra mutatja be.



5. ábra: A hazai *B. avium* [kék szín] és *O. rhinotracheale* [piros szín] izolátumok izolálásának helyszínei

Az azonosítási vizsgálatokat a törzsgyűjteményben megtalálható törzseken is elvégeztük. A molekuláris azonosítás során – a szakirodalomban ismertetteknek megfelelően – az *O. rhinotracheale* izolátumok esetében a fajspecifikus reakció egy 784 bp hosszúságú DNS szakaszt sokszorozott fel. A *B. avium* fajazonosító PCR terméke 524 bp hosszúságú volt (6. ábra).



6. ábra: Az *O. rhinotracheale* és *B. avium* fajazonosító PCR reakcióinak termékei (M: Generuler 100 bp molekulatömeg marker, 1: *O. rhinotracheale* B3263/91 fajspecifikus [784 bp], 2: *O. rhinotracheale* Or063 fajspecifikus [784 bp], 3: *B. avium* Ba01 fajspecifikus [524 bp], 4: *B. avium* Ba13 fajspecifikus [524 bp])

5.2.A baktériumok fenotípusos vizsgálatának eredményei

5.2.1. A baktériumok biokémiai tulajdonságai

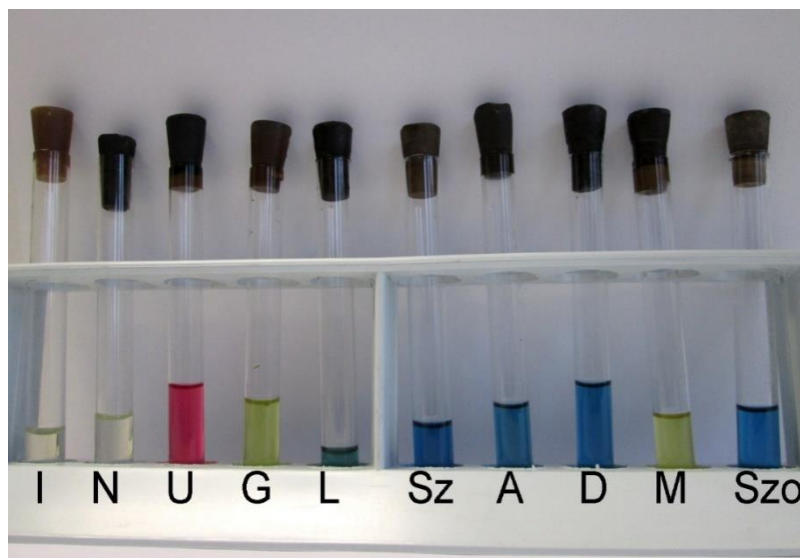
A *B. avium* törzsek a fajra jellemző módon az összes vizsgált biokémiai testben egységesen inaktívak voltak (7. ábra).



7. ábra: A *B. avium* fajra jellemző biokémiai tulajdonságai.

(I: indol, N: nitrát, U: urea, G: glükóz, L: laktóz, Sz: szacharóz, A: arabinóz, D: dulcitol, M: maltóz, Szo: szorbit)

Az *O. rhinotracheale* törzsek a triptofán bontását jelző indol testben és a nitrát redukció vizsgálatokor is negatívak voltak, az ureumot pedig mindegyik vizsgált törzs bontotta. A felkínált szénhidrátok közül az arabinózt, dulcitolot és szorbitot egyik törzs sem hasznosította. A glükózt 36 törzs (56,3%), a laktózt 42 (65,6%), a szacharózt 10 (15,6%), a maltózt 32 (50%), a galaktózt pedig 14 izolátum (21,9%) volt képes felhasználni (Melléklet 3. táblázat és 8. ábra).



8. ábra: Az *O. rhinotracheale* fajra jellemző biokémiai tulajdonságai.

(I: indol, N: nitrát, U: urea, G: glükóz, L: laktóz, Sz: szacharóz, A: arabinóz, D: dulcitol, M: maltóz, Szo: szorbit)

5.2.2. A növekedés körülményeinek vizsgálata

A *B. avium* törzsek mindhárom vizsgált hőmérsékleten, mind a négy felkínált táptalajon egyformán növekedtek.

Az *O. rhinotracheale* izolátumok változatosabb képet mutattak. 37 °C-os hőmérsékleten minden törzs képes volt növekedni. A törzsek az 5% juhvérrel kiegészített Columbia és TSA-n az egyéb esetekben is megfigyelt, 1-3 mm nagyságú telepeket képeztek. A vért nem tartalmazó táptalajokra leoltva 48 óra tenyésztési idő elteltével is apró, 0,5-1 mm-es telepeket hoztak létre.

31 °C-on való tenyésztéskor egyetlen törzs sem volt képes növekedni a vért nem tartalmazó két táptalajon. Véres Columbia agaron az izolátumok 81,8%-a nőtt, a vérrel kiegészített TSA-n ugyanennyi törzs volt képes növekedni. A 31 °C-on nem növekvő törzsek nagy része sem a véres Columbia, sem a véres TSA táptalajon nem növekedett, azonban volt olyan törzs (OR008), mely vérrel kiegészített TSA-n nem, véres Columbia agaron viszont növekedett. Az OR010 törzs ezzel éppen ellentétes növekedést mutatott.

A 41 °C-on való inkubációkor a vérrel kiegészített táptalajokon minden vizsgált törzs nőtt. A vér nélküli Columbia és TSA táptalajokon a törzsek közel fele (45,5%) nem növekedett. A 31 °C-on nem növekvő törzsek 41 °C-on csak a vért is tartalmazó táptalajokon nőttek. A növekedési körülmények vizsgálatának részletes eredményeit a Melléklet 4. táblázata mutatja be.

5.2.3. A hemolízis vizsgálata

A *B. avium* izolátumok közül egyik sem hemolizált.

Az *O. rhinotracheale* törzsek 39%-a (n=25) nem hemolizált, 61%-uk azonban a 48 óra 37°C-on történő tenyésztést követően 48 órán át szobahőmérsékleten való inkubálás után β -hemolízis jeleit mutatta. A hemolízis vizsgálatának részletes eredményeit a Melléklet 1. táblázata mutatja be.

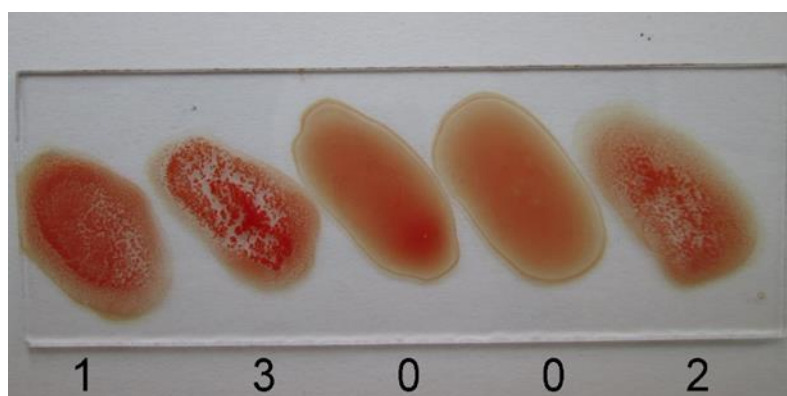
5.2.4. Hemagglutinációs próba

A hemagglutinációs vizsgálatokat 19 *B. avium* és 64 *O. rhinotracheale* törzsön végeztük el. Az egyes vizsgálati alkalmakkor többszöri ismétlés során kapott eredmények átlaga a Melléklet 5. táblázatában található, az eredmények összefoglalása pedig az 5. táblázatban tekinthető meg.

5. táblázat: A hemagglutinációs próba eredményének összefoglaló táblázata

vértípus	hemagglutináló törzsek aránya (%)	
	<i>B. avium</i>	<i>O. rhinotracheale</i>
ló	78,9	0
juh	78,9	0
szarvasmarha	52,6	0
házityúk	89,5	6,3
kacsa	94,7	14
nyúl	0	14

Minden állatfajból származó vvt esetén megfigyeltünk agglutinációt, azonban teljes (4-es fokozatú) reakció egy esetben sem jelent meg (9. ábra).



9. ábra: Hemagglutinációs szintek *B. avium* vizsgálata során.
(0: negatív reakció, 1: gyenge reakció, 2: közepesen erős reakció, 3: erős reakció)

A *B. avium* törzsek jobb agglutinációs képességet mutattak, mint az *O. rhinotracheale* izolátumok. Előbbieknél ritkább volt a reakció hiánya, és magasabb volt a 2-es szintű reakciók aránya. A *B. avium* törzsek a nyúl vvt-kel egyáltalán nem reagáltak, a többi emlős vvt-t azonban az izolátumok nagy százalékban (ló és juh: 78,9%; szarvasmarha: 52,6%) agglutinálták. Kacsa vvt-vel csak egy, házityúk vvt-vel pedig két törzs nem adott reakciót, és ezen vvt-kel figyelhettük meg a két legerőteljesebb (3-as fokozatú) reakciót is.

A ló, szarvasmarha és juh vvt-eket az *O. rhinotracheale* törzsek egyáltalán nem agglutinálták, a házityúk vvt-eket négy, a kacsa vvt-eket kilenc, a nyúl vvt-eket szintén kilenc *O. rhinotracheale* izolátum agglutinálta.

5.2.5. A szerotípus meghatározása

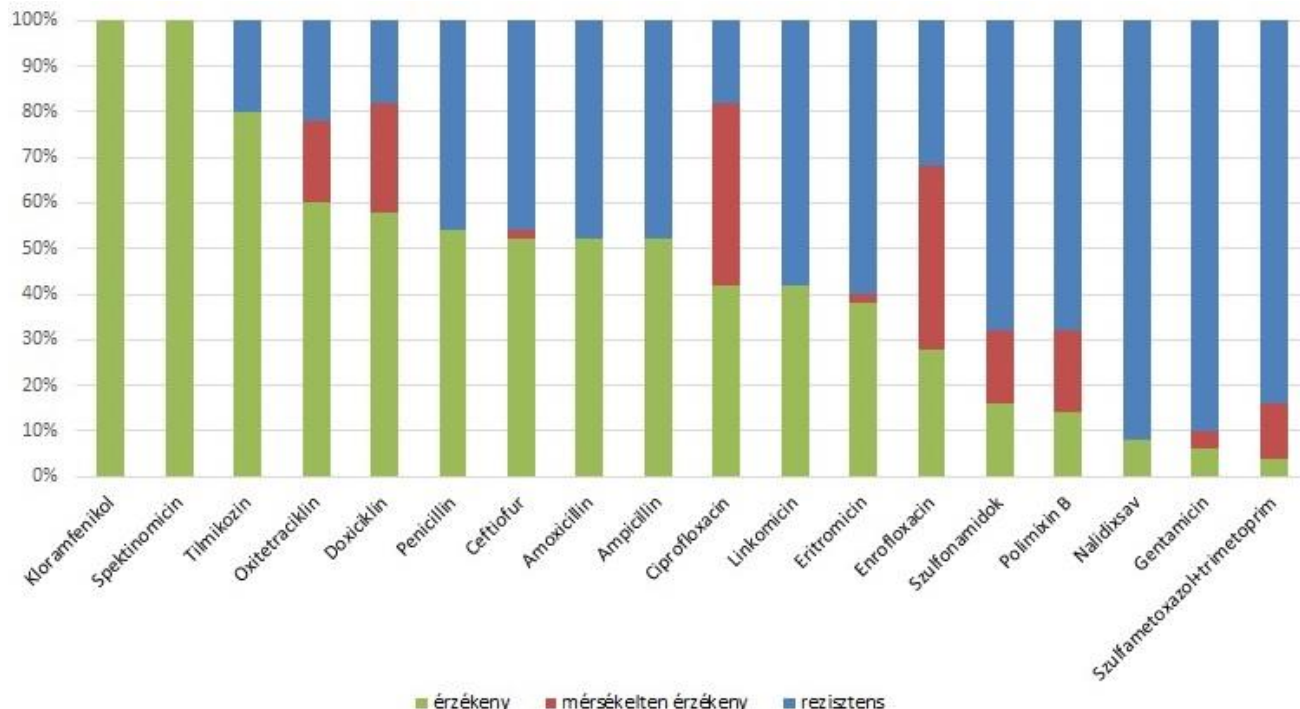
A mezei *O. rhinotracheale* törzsek között három szerotípust (A, B, D) tudtunk azonosítani a hagyományos Heddlestone-féle agargél-precipitációs próbával (Melléklet 1. táblázat).

Legnagyobb számban az A szerotípusba tartozó törzsek fordultak elő (49 törzs; 83%). Két izolátumot (3,4%) B szerotípusúként, öt törzset (8,5%) pedig D szerotípusúként azonosítottunk. Három törzs (5,1%) nem volt tipizálható az A-E szerotípusok ellen termeltetett savókkal. Ötvenegy mezei törzs (86,4%) monospecifikus reakciót mutatott. Öt izolátum (8,5%: OR010, OR011, OR012, OR060, OR062) az A szerotípusba tartozott, de keresztreakciót mutattak a B típusavóval, két D szerotípusú törzs (OR007, OR063) a C típusavóval, egy A szerotípusú törzs (OR057) pedig a D típusavóval keresztreakált. A keresztreakciók 24 óra után a fő reakciónál halványabb, elmosódottabb precipitációs csíkként jelentkeztek, 48 illetve 72 óra elteltével erősebbé váltak.

5.2.6. Az antibiotikum-érzékenység vizsgálata

Az *O. rhinotracheale* és *B. avium* izolátumok korongdiffúziós antibiotikum-érzékenység vizsgálatának eredményei a Melléklet 6. és 7. táblázatában tekinthetők meg.

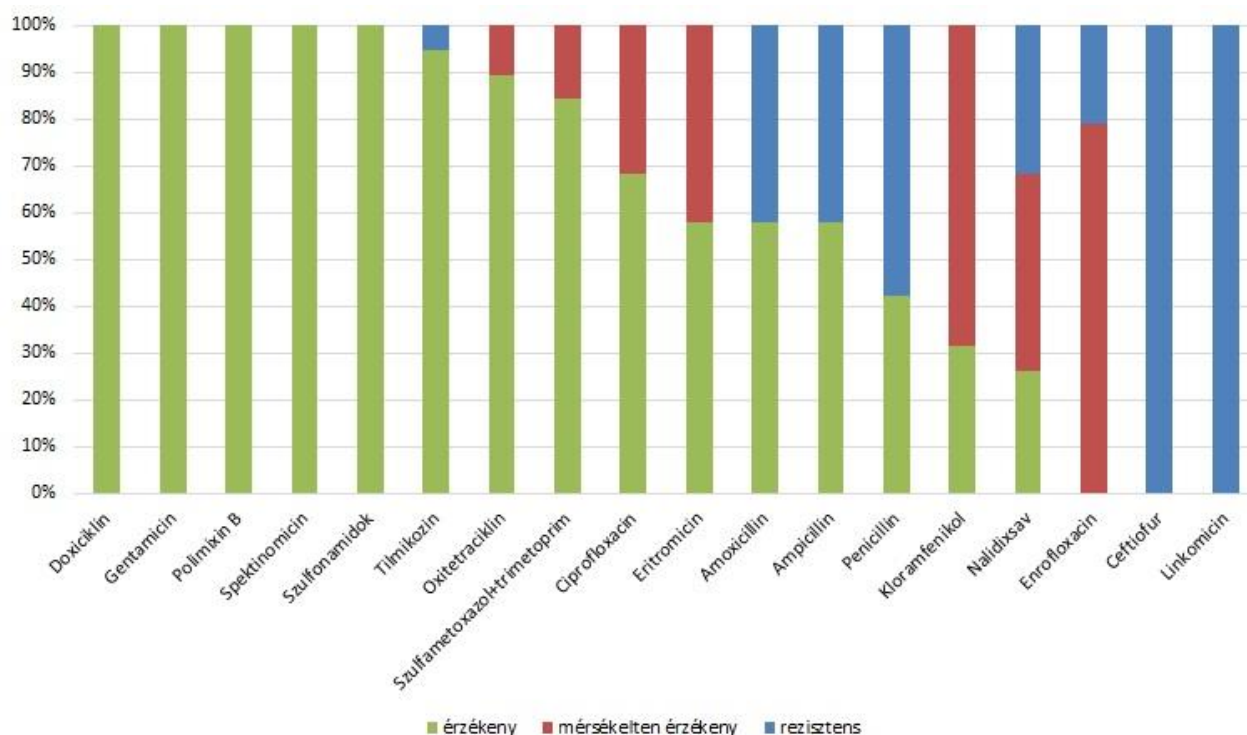
Minden vizsgált *O. rhinotracheale* törzs érzékeny volt kloramfenikolra és spektinomocinra valamint nagy részük tilmikozinra is. A törzsek nagy százaléka rezisztens volt gentamicinnel, nalidixsavval, szulfametoxazol-trimetoprimmal és polimixin B-vel szemben. A szulfonamidok sem bizonyultak hatékonyak a törzsek jelentős hányadánál (10. ábra).



10. ábra: Az *O. rhinotracheale* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának eredménye

A héjából, karvalyból és galambból származó törzsek több antibiotikumra voltak érzékenyek, mint a baromfi eredetűek. A héjából izolált törzs csak a szulfonamidokkal szemben volt rezisztens, a karvalyból származó izolátummal szemben pedig csak a szulfonamidok és a nalidixsav nem voltak hatékonyak.

Az összes *B. avium* törzs rezisztens volt ceftiofurral és linkomicinnel szemben, és érzékeny volt doxiciklinre, gentamicinre, polimixin B-re, spectinomycinre és szulfonamidokra. A ciprofloxacín, kloramfenikol, eritromicin, szulfametoxazol-trimetoprim és oxitetraciklin is hatékonynak bizonyult, bár néhány törzs csak mérsékelt érzékenységet mutatott. Az amoxicillin, ampicillin és tilmikozin nagyrészt hatékony volt, azonban néhány izolátum rezisztens volt ezekre az antibiotikumokra. A 13 magyar törzsből kilenc érzékeny volt penicillinre. Az 1980-as években, Németországban izolált törzsek mindegyike rezisztens volt penicillinre és öt törzs nalidixsavra is (a hatodik csökkent érzékenységet mutatott), ampicillinre pedig mindegyik érzékeny volt (11. ábra).



11. ábra: A *B. avium* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának eredménye

5.2.7. MIC meghatározása

A MIC értékek az öt ismétlés során egy kétszeres hígításon belül reprodukálhatóak voltak. Az *O. rhinotracheale* törzsek vizsgálata során a MIC értékek mindhárom antibiotikum esetében széles határok között mozogtak (6. táblázat).

6. táblázat: Amoxicillin, doxiciklin és eritromicin minimális gátló koncentrációja *O. rhinotracheale* törzsekkel szemben

Hatóanyag	MIC (µg/ml)											MIC ₅₀ (µg/ml)	
	≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32		≥64
Amoxicillin (nagyüzemi)				1	1	2	8	7	3	6	2		4
Amoxicillin (háztáji és vadmadarak)			2		3	1							0,5
Doxiciklin (nagyüzemi)					3	1	7	5	8	4	2		4
Doxiciklin (háztáji és vadmadarak)		1	2		3								0,12
Eritromicin (nagyüzemi)					1	4	3	6	3	8	5		8
Eritromicin (háztáji és vadmadarak)			2		4								0,5

Amoxicillin és eritromicin esetében 0,12 µg/ml és 32 µg/ml közötti, doxiciklin esetében pedig 0,06 µg/ml és 32 µg/ml közötti értékeket olvastunk le. A vadmadaraból izolált törzsek esetén a MIC értékek alacsonyabbak voltak (0,12 µg/ml mindhárom antibiotikumra). Hasonló volt a helyzet a háztáji állományokban tartott házityúkból származó törzseknél (0,5 µg/ml és 1 µg/ml amoxicillin, 0,06 µg/ml és 0,5 µg/ml doxiciklin, 0,5 µg/ml eritromicin esetén). Az amoxicillin és doxiciklin MIC₅₀ értéke 4 µg/ml, az eritromiciné pedig 8 µg/ml volt a nagyüzemi baromfikból izolált törzseknél és rendre 0,25 µg/ml, 0,12 µg/ml és 0,5 µg/ml a vad- és háztáji madaraból származó izolátumokkal szemben.

A *B. avium* törzsek vizsgálatakor kapott MIC értékek megoszlása a 7. táblázatban látható. Az értékek amoxicillin esetében ≤0,03 µg/ml és 1 µg/ml között, doxiciklin esetében ≤0,03 µg/ml és 0,12 µg/ml, eritromicin vizsgálata során pedig 8 µg/ml és 16 µg/ml között változtak. A németországi törzsekkel szemben mindhárom antibiotikum MIC értékei magasabbak voltak, mint a magyar törzsek esetén (amoxicillin: 0,5 és 1 µg/ml, doxiciklin: 0,06 és 0,12 µg/ml, eritromicin: 16 µg/ml). A MIC₅₀ érték 0,12 µg/ml volt amoxicillin, 0,06 µg/ml doxiciklin és 8 µg/ml eritromicin vizsgálatakor a magyar törzsekkel szemben. A németországi izolátumokkal szemben ugyanezek az értékek rendre 0,5 µg/ml, 0,12 µg/ml és 16 µg/ml voltak.

7. táblázat: Amoxicillin, doxiciklin és eritromicin minimális gátló koncentrációja *B. avium* törzsekkel szemben

Hatóanyag	MIC (µg/ml)											MIC ₅₀ (µg/ml)	
	≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32		≥64
Amoxicillin (magyar törzsek)	1	4	5		3								0,12
Amoxicillin (német törzsek)					4	2							0,5
Doxiciklin (magyar törzsek)	4	8	1										0,06
Doxiciklin (német törzsek)		4	2										0,06
Eritromicin (magyar törzsek)									7	6			8
Eritromicin (német törzsek)										6			16

5.3. A baktériumok genotípusának meghatározása

5.3.1. A baktériumok genotípusos vizsgálatának eredményei

5.3.1.1. Plazmid izolálás

A plazmid izolálás minden törzs esetén negatív eredményt adott.

5.3.1.2. ERIC-PCR

A vizsgált *O. rhinotracheale* törzsek között tizenhárom ERIC-mintázatot azonosítottunk (12. ábra). A leggyakoribb típusba (1. típus) 29 törzs tartozott (53,7%). Az 1. típusú izolátumok nagy része (26 törzs; 89,6%) pulyka eredetű volt, kettő vadmadarakból, egy házityúkból származott. A B szerotípus típus-törzse, amely szintén pulyka eredetű, ugyancsak az 1. típusba sorolódott. A 2. és 3. ERIC-típusba kizárólag pulykából izolált törzsek tartoztak (nyolc illetve öt törzs). 12 izolátum, köztük az A, C, D és E szerotípus típus-törzsek, 10 különböző mintázatot adtak (4-13. típus). Ezek közül nyolc törzs származott házityúkból, kettő pulykából, kettő pedig galambból.

5.3.1.3. RAPD vizsgálat M13 primerrel

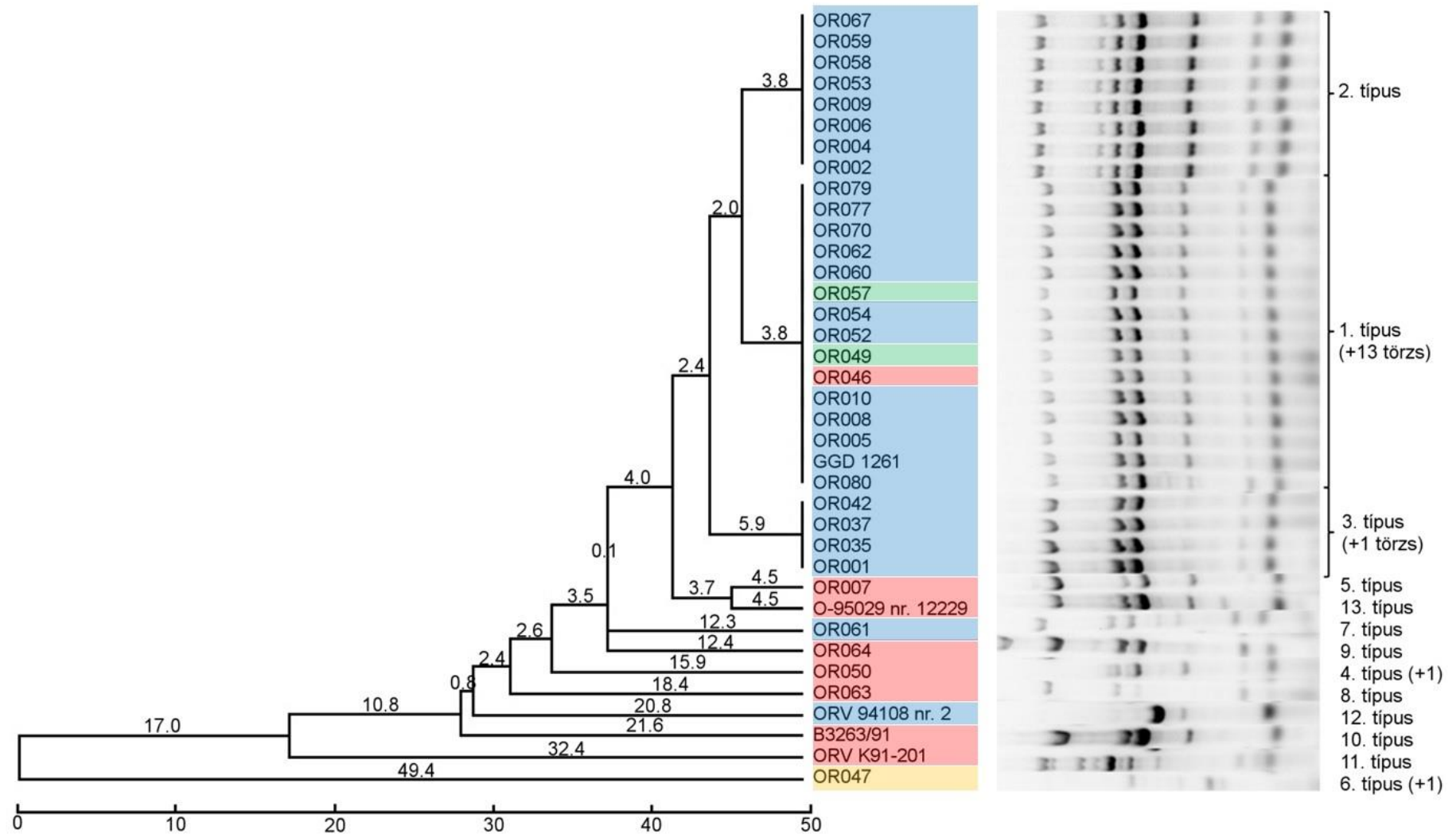
Az M13 primerrel végzett RAPD vizsgálat 10 különböző típusba soroltuk a vizsgált törzseket (13. ábra). Az 1. típusba az A szerotípus típus-törzs, valamint 42 mezei izolátum tartozott. A 2. és 3. típusba 2-2 törzs tartozott, a fennmaradó 7 izolátum, köztük a B-E szerotípus típus-törzsek is, egyedi mintázatot mutattak.

5.3.1.4. RAPD vizsgálat OPG11 primerrel

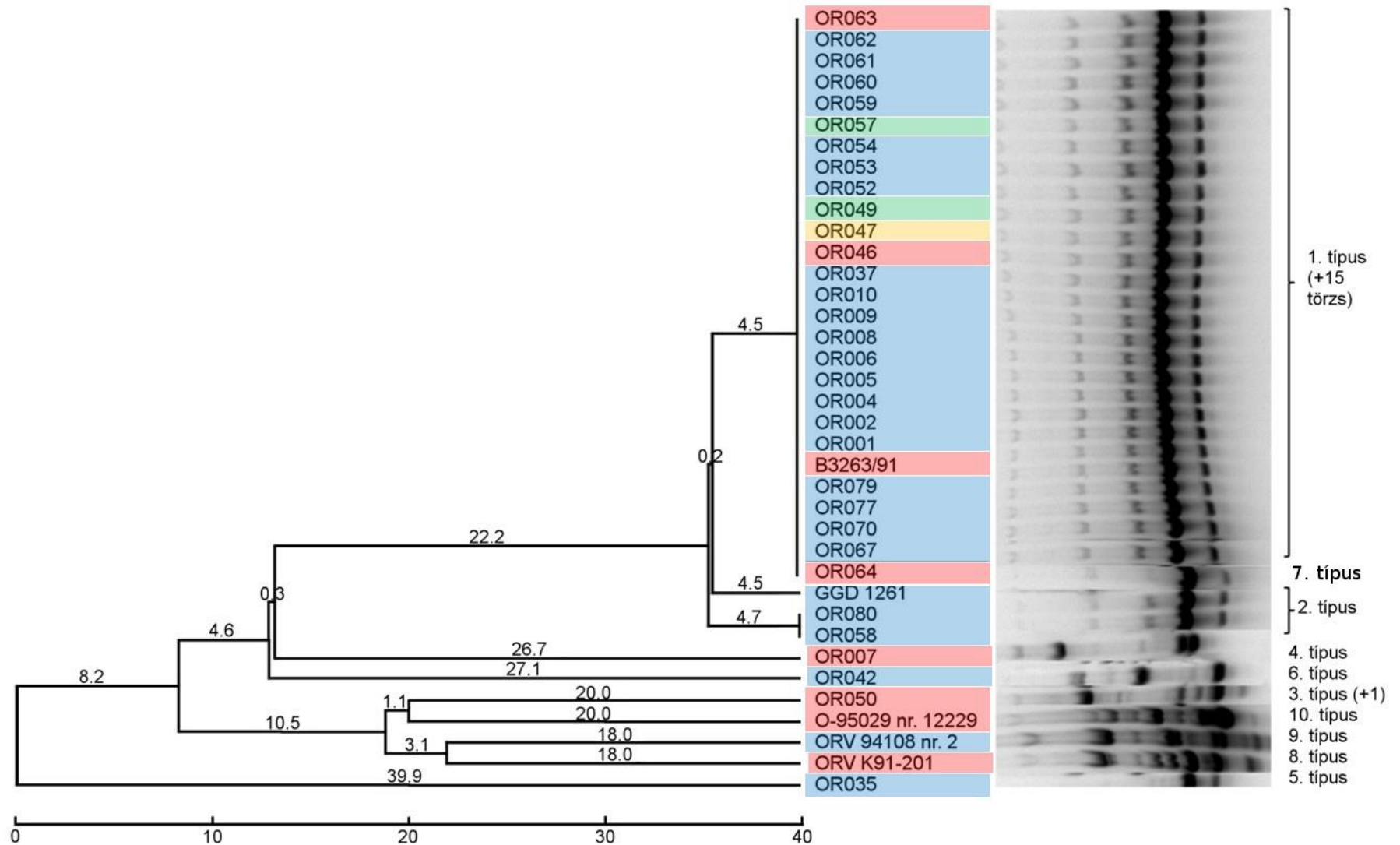
Az OPG11 vizsgálat két fő típusba csoportosította az izolátumokat (14. ábra). Az A, B és C szerotípus típus-törzsek és az OR042 törzs mintázata egyedi volt. A 3. típusba két mezei törzs tartozott, a 8. típust pedig a D és E szerotípus típus-törzsek alkották.

5.3.1.5. RAPD vizsgálat OPH19 primerrel

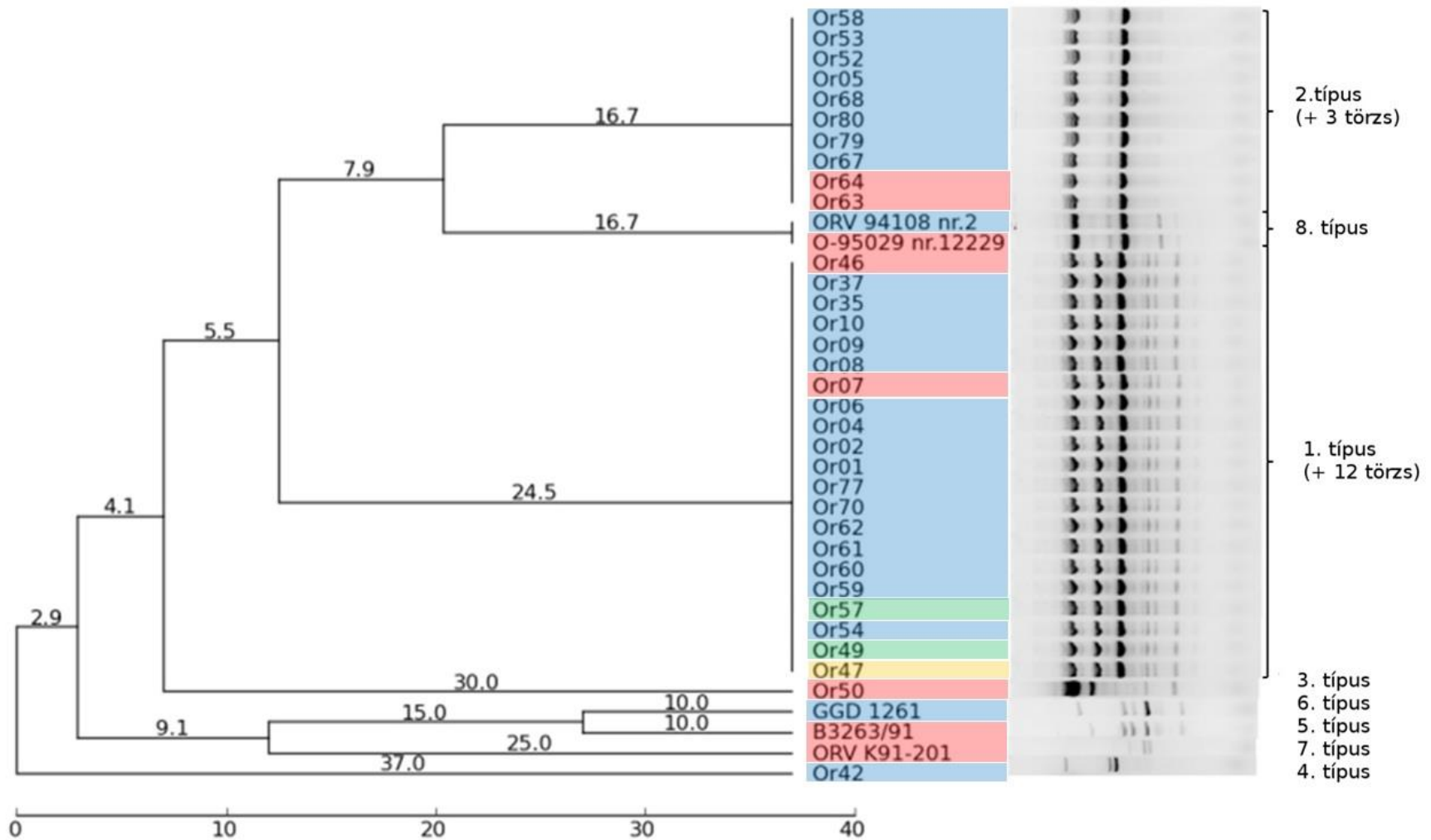
Az OPH19 primerrel végzett vizsgálat szintén két nagy csoportba sorolta a vizsgált *O. rhinotracheale* törzseket (15. ábra). A vizsgált izolátumokból 36 (66,7%) az 1. típusba tartozott, míg a második leggyakoribb típusba (2. típus) 11 törzs (20,4%) sorolódott. A 4. típust három házityú eredetű törzs alkotta, a 2. típustól pedig csupán egy csíkkal eltérő mintázatú 6. típust pedig a D és E szerotípus típus-törzsek alkották. A C szerotípus törzs és az OR063 egyedi mintázattal rendelkeztek.



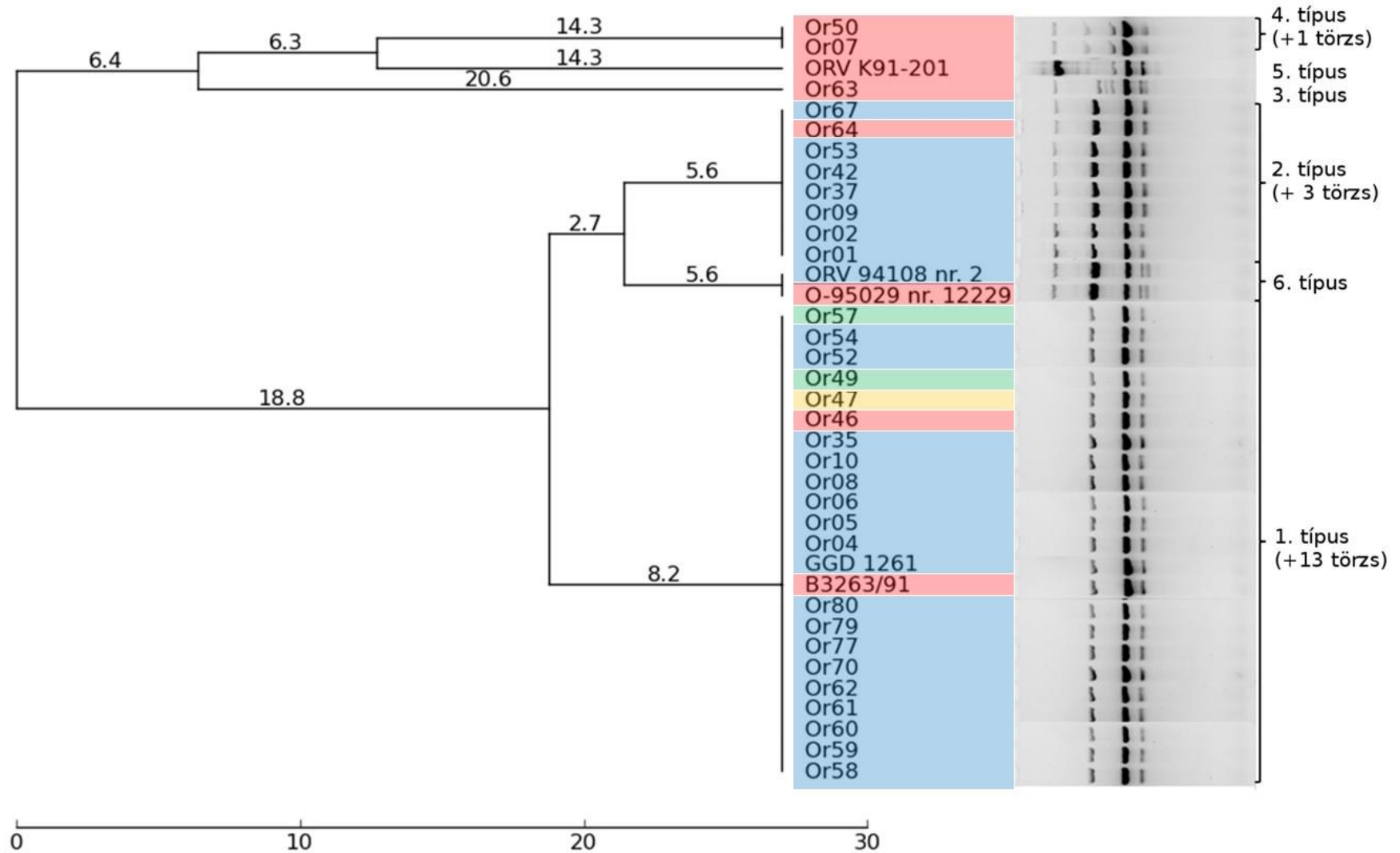
12. ábra: Az *O. rhinotracheale* törzsek ERIC-PCR eredményei alapján UPGMA metódussal készített dendrogram. (kék szín: pulykából izolált törzsek; piros: házityúk; zöld: vadmadár; sárga: galamb eredetű törzsek)



13. ábra: Az *O. rhinotracheale* törzsek M13 primerrel végzett RAPD vizsgálat eredményei alapján UPGMA módszerrel készített dendrogram (kék szín: pulykából izolált törzsek; piros: házityúk; zöld: vadmadár; sárga: galamb eredetű törzsek)



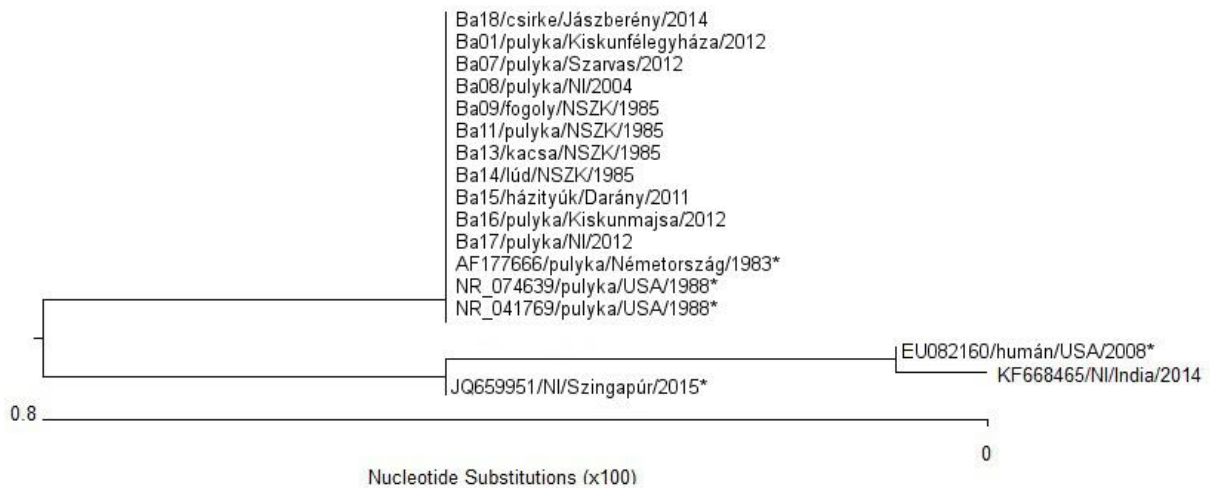
14. ábra: Az *O. rhinotracheale* törzsek OPG11 primerrel végzett RAPD vizsgálat eredményei alapján UPGMA metódussal készített dendrogram (kék szín: pulykából izolált törzsek; piros: házi tyúk; zöld: vadmadár; sárga: galamb eredetű törzsek)



15. ábra: Az *O. rhinotracheale* törzsek OPH19 primerrel végzett RAPD vizsgálat eredményei alapján UPGMA metódussal készített dendrogram (kék szín: pulykából izolált törzsek; piros: házityúk; zöld: vadmadár; sárga: galamb eredetű törzsek)

5.3.1.6. Szekvencia-meghatározás és filogenetikai elemzés

A *B. avium* törzsek a vizsgált szakaszon 100%-os egyezést mutattak egymással és a két *B. avium* típusörzs (ATCC 35086 [AF177666]; 197N [NR_074639]) megfelelő génszakaszaival (16. ábra).



16. ábra: A *B. avium* törzsek részleges 16S rRNS nukleotid szekvenciái alapján készített filogenetikai fa.

A gén 57-1398 bp szakasza a 197N törzshöz (NR_074639 génbanki szám) viszonyítva.

A 16S rRNS szekvencia elemzése a 42 vizsgált *O. rhinotracheale* törzset két klaszterbe csoportosította (17. ábra). A mezei izolátumok nagy része (37 izolátum) 100%-ban megegyezett az A, B és E szerotípus típusörzsekkel és más GenBank-i szekvenciákkal.

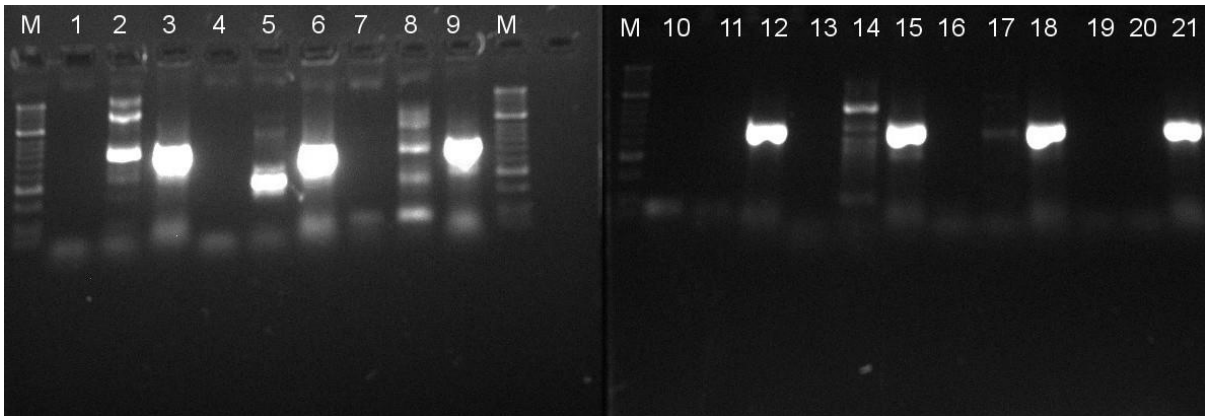


17. ábra: Az *O. rhinotracheale* törzsek részleges 16S rRNS nukleotid szekvenciái alapján készített filogenetikai fa.

A gén 64-1398 bp szakasza az LMG 9086T törzshöz (U87101 génbanki szám) viszonyítva. Mivel a 42 mezei izolátum közül 34 100% azonosságot mutatott ezen a szakaszon, az ábrán csak 25 törzset tüntettünk fel.

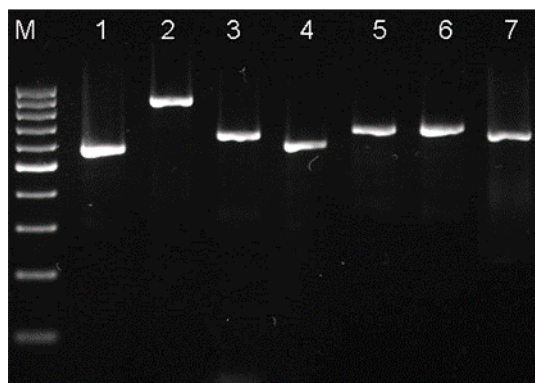
5.3.1.7. Multi-lókusz szekvencia tipizálás

Az MLST analízishez kilenc *B. avium* törzset választottunk ki. A Diavatopoulos és mtsai (2005) által leírt primerekkel elvégzett PCR-ek nem adtak szekvenálásra alkalmas PCR terméket. A *B. avium* templátokat használva több, különböző méretű PCR termék keletkezett, a kontrollként használt *B. bronchiseptica* (KM22) esetén ezzel szemben a várt méretű PCR termékeket kaptuk (18. ábra). A saját tervezésű primerekkel végzett PCR-ek szekvenálásra alkalmas termékei a 19. ábrán láthatóak.



18. ábra: A Diavatopoulos és mtsai (2005) által kidolgozott primerekkel és hőprofilal kivitelezett PCR-ek termékei

(M: Hyperladder 50 bp molekulatömeg marker, 1: *icd* [negatív kontroll], 2: *icd* [Ba01], 3: *icd* [KM22], 4: *pepA* [negatív kontroll], 5: *pepA* [Ba01], 6: *pepA* [KM22], 7: *pgm* [negatív kontroll], 8: *pgm* [Ba01], 9: *pgm* [KM22], 10: *adk* [negatív kontroll], 11: *adk* [Ba01], 12: *adk* [KM22], 13: *fumC* [negatív kontroll], 14: *fumC* [Ba01], 15: *fumC* [KM22], 16: *glyA* [negatív kontroll], 17: *glyA* [Ba01], 18: *glyA* [KM22], 19: *tyrB* [negatív kontroll], 20: *tyrB* [Ba01], 21: *tyrB* [KM22])



19. ábra: az MLST analízishez felhasznált háztartási gének PCR termékei
(M:Generuler 100 bp molekulatömeg marker, 1: *adk*, 2: *fumC*, 3: *tyrB*, 4: *icd*, 5: *pepA*, 6: *pgm*, 7: *glyA*)

Az *in silico* elemzést követően a génszekvenciákat a Bordetella MLST adatbázisban megtalálható génszakaszokkal hasonlítottuk össze.

A hét háztartási gén részleges szekvenciájának elemzésekor az *icd*, *pepA* és *pgm* gének esetében törzseink szekvenciája 100% egyezést mutatott az adatbázisban szereplő egyetlen *B. avium* törzs, a 197N megfelelő génszakaszával. Az *adk* gén esetében három törzs (Ba01, Ba08, Ba18) szekvenciájában egy G→A pontmutációt azonosítottunk a 119. bázisnál. A *fumC* génszekvenciájában a Ba18 törzs szekvenciájának elemzésekor két T→C pontmutációt a 4. és 40. bázisnál, a *glyA* gén esetében a Ba18 génjének megfelelő szakaszán egy T→C cserét a 83. bázisnál, a *tyrB* gén esetében a Ba01, Ba07, Ba08 és Ba18 törzsek vizsgálata során egy C→T cserét azonosítottunk a 245. bázisnál. A fennmaradó törzsek minden esetben 100% homológiát mutattak a 197N törzs génszakaszaival.

A Ba13, Ba14, Ba15 és Ba16 törzsek így az adatbázisban szereplő 197N törzsszel együtt az ST76-ba tartoznak. A Ba01 és Ba08, a Ba07 és a BA09 valamint a Ba18 törzsek három új szekvencia típust képeznek (7. táblázat).

7. táblázat: *B. avium* törzsek MLST analízisével kapcsolatos vizsgálataink végeredménye

Azonosító	Izolálás				alléltípus						
	Állatfaj	Szerv	ideje	helye	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>glyA</i>	<i>tyrB</i>	<i>icd</i>	<i>pepA</i>	<i>pgm</i>
Ba01	pulyka	légcső	2012.	Kiskunfélegyháza	új	8	16	új	15	12	15
Ba07	pulyka	légcső	2012.	Szarvas	9	8	16	új	15	12	15
Ba08	pulyka	légcső	2004.	NA	új	8	16	új	15	12	15
Ba09	fogoly	NA	1985.	Németország	9	8	16	új	15	12	15
Ba13	kacsa	NA	1985.	Németország	9	8	16	8	15	12	15
Ba14	liba	NA	1985.	Németország	9	8	16	8	15	12	15
Ba15	házityúk	tüdő	2011.	Darány	9	8	16	8	15	12	15
Ba16	pulyka	légcső	2012.	Kiskunmajsa	9	8	16	8	15	12	15
Ba18	házityúk	ormelléküreg	2014.	Jászberény	új	új	új	új	15	12	15

NA: nincs ismert adat

6. Megvitatás

6.1. A baktériumok izolálása és azonosítása

A munkánk során tapasztalt alacsony izolálási arány megegyezik a szakirodalomban eddig leírt megfigyelésekkel. Hassanzadeh és mtsai. (2010) 150, brojlercsirke-állományból gyűjtött tracheatampon-mintából csupán egy esetben tudtak *O. rhinotracheale* baktériumot kitenyésztetni, és tüdőminták esetében is csak 2% volt az izolálási arány. Charlton és mtsai (1993) házityúk eredetű minták esetében 3%, pulykából származó minták esetében pedig 5% pozitivitásról számoltak be. Asadpour és mtsai. (2011) 290 brojler trachea tampon vizsgálatakor a minták 1%-ból mutattak ki *O. rhinotracheale*-t, iráni pulyka-, házityúk- és galambállományok fertőzöttségének felmérésekor (Mirzaie és mtsai., 2011) pedig 2,5% volt az *O. rhinotracheale* izolálási aránya. Canal és mtsai (2005) szeropozitív pulykaállományokat vizsgáltak Braziliában, és ők sem tudtak 16%-nál magasabb *O. rhinotracheale* izolálási arányt elérni. Murthy és mtsai. (2008b) ezzel szemben a vizsgált minták 34,6%-ából tenyésztették ki a kórokozót. Raffel és mtsai (2002) 128 trachea tampon mintából kilenc *B. avium* izolátumot tenyésztettek ki. Jordániában száz légzőszervi tüneteket mutató baromfiállományból gyűjtött 170 minta 8,8%-ából *O. rhinotracheale*, 3%-ából *B. avium* tenyésztett ki (El-Sukhon és mtsai., 2002). Malik és mtsai. (2005) 1998-2002 között végzett felmérésében a trachea és sinus tamponmintákból valamint tüdőszövetekből a *B. avium* izolálási aránya 1,8% volt.

Mindkét, általunk vizsgált baktérium faj izolálását nehezíti a lassú növekedésük, mivel a mintában jelen lévő, gyorsabban növekvő baktériumok a tenyésztés során elfedhetik az *O. rhinotracheale* és *B. avium* telepeket, amin még az izolálásra használt táptalaj antibiotikummal való kiegészítése is csak részben képes segíteni. Klinikai tüneteket mutató állatokból ezért a betegség kezdeti szakaszában érdemes mintát venni. Amennyiben a kórokozó izolálása nem cél, a *B. avium* és az *O. rhinotracheale* által okozott fertőzöttség felderítésére jól használhatóak a szerológiai vizsgálatok is, melyek az állatok vérében jelen lévő, a baktérium ellen termelt ellenanyagot mutatják ki, így a baktériumtenyésztés nehézsége miatti fals negatív diagnózis, legalábbis részben, kiküszöbölhető (Hafez, 2002, Raffel és mtsai., 2002).

Az általunk izolált *O. rhinotracheale* és *B. avium* törzsek túlnyomó többsége légzőszervi tüneteket mutató állatokból származott. Kivételt jelentett a megmintázott karvaly és héja, melyek nem mutattak betegségre utaló jeleket. Tsai és Huang (2006) beteg és tüneteket nem mutató házityúkállományok szűrésekor a 31 megmintázott állomány 41,9%-ából izolált *O. rhinotracheale* törzseket. Csupán öt állományban voltak megfigyelhetőek légzőszervi tünetek, viszont meglepő módon *O. rhinotracheale* baktériumokat csak tüneteket nem mutató

állományokból tenyésztettek ki (Tsai és Huang, 2006). Galambok esetén 9% volt az izolálási arány. Legnagyobb mennyiségben vadon élő galambokból sikerült a kórokozót kimutatniuk (28,6%) (Tsai és Huang, 2006). *B. avium* esetén a vadmadarak fertőzöttségének vizsgálata hasonló eredményt hozott: negyvenegy faj száz egyedében találtak *B. avium* ellen termelt ellenanyagot (Raffel és mtsai., 2002). Ezek az eredmények, az általunk kitenyésztett két, ragadozó madár eredetű izolátummal együtt a vadon élő madarak rezervoár szerepére világítanak rá.

6.2. A baktériumok biokémiai tulajdonságai

A biokémiai próbákban a frissen izolált és a törzsgyűjteményből kiválasztott *B. avium* törzsek mindegyike egységesen és a szakirodalomban (Kerstens és mtsai., 1984) leírt módon viselkedett.

Általánosan elfogadott, hogy az *O. rhinotracheale* törzsek nitrát redukciós, triptofán és ureum bontóképessége egységes: az első két tesztben rendre negatív, az ureum-bontás vizsgálatok pedig pozitív reakciót adnak a vizsgált törzsek (Hassanzadeh és mtsai., 2010; Mohd-Zain és mtsai., 2008; Seifi, 2012; Travers és mtsai., 1996).

A szénhidrátok hasznosításának vizsgálatok, a szakirodalomban ismertetett adatokkal megegyező módon, nagyobb változatosságot tapasztaltunk. Ezt részben magyarázhatja, hogy a baktérium nehezen tenyészthető, táplevesekben lassan nő. Ezt kiküszöbölendő vizsgálataink során tápleveseinket 2% steril házityúksavóval egészítettük ki, és a teszteket 4 napig inkubáltuk. Glükóz próbában több vizsgálat során találtak mind pozitív, mind negatív törzseket (Canal és mtsai., 2005; Vandamme és mtsai., 1994). Mohd-Zain és mtsai. (2008) vizsgálatában a törzsek 55,6%-a volt pozitív ebben a tesztben, azonban Iránban, brojler házityúkból izolált törzsek mindegyike negatív eredményt adott (Siddique és mtsai., 2008). Laktózfelhasználás szempontjából hasonló változatosság volt megfigyelhető az izolátumok között (Canal és mtsai., 2005; Hassanzadeh és mtsai., 2010), míg mások (Mohd-Zain és mtsai., 2008; Seifi, 2012) egységesen laktóz-pozitívnak találták a vizsgált törzseket. Szacharóz tesztben pozitív (Siddique és mtsai., 2008; Vandamme és mtsai., 1994) és negatív törzseket is leírtak már (Canal és mtsai., 2005; Hassanzadeh és mtsai., 2010; Travers és mtsai., 1996). Több szerző (Siddique és mtsai., 2008; Travers és mtsai., 1996) megfigyelése alapján az *O. rhinotracheale* törzsek képesek a maltózt hasznosítani, mások (Canal és mtsai., 2005; Hassanzadeh és mtsai., 2010) ezzel ellenkező megállapítást tettek. Az arabinózt (Charlton és mtsai., 1993) és dulcitol (Charlton és mtsai., 1993; Travers és mtsai., 1996) a szakirodalomban leírtak szerint nem hasznosítják az *O. rhinotracheale* törzsek, ami megegyezik az általunk tapasztaltakkal.

A szénhidrátfelhasználásban tapasztalt változatosság miatt ezek a próbák fajazonosításra nem alkalmasak. Az indol, nitrát és urea tesztekben azonban kellően egységesen viselkednek az *O. rhinotracheale* törzsek ahhoz, hogy ezek a próbák az azonosítási protokoll részét képezzék. A biokémiai próbák során mutatott változékonyság oka nem ismert, a fent említett technológiai nehézségek mellett esetlegesen genetikai eltérések is állhatnak a jelenség mögött.

6.3. A növekedés körülményeinek vizsgálata

A vizsgált *B. avium* törzsek a szakirodalomban leírtaknak megfelelően (Arp, 1986, Jackwood és Saif, 2013) mind a négy felkínált táptalajon egyformán növekedtek. Az inkubáció hőmérsékletének *B. avium* törzsekre gyakorolt hatását Arp és McDonald (1985) vizsgálta. Optimálisnak a 35°C-os tenyésztési hőmérsékletet találták, de 30 és 40°C-on is jól tenyészthetőnek bizonyultak a törzsek, míg 45°C-os hőmérsékleten 24 órán belül elpusztultak. Megfigyeléseik megegyeznek az általunk tapasztaltakkal: a mi izolátumaink 31, 37 és 41°C-on is jól tenyészthetőek voltak.

Vizsgálataink eredményei alapján a szakirodalomban leírtaknak megfelelően (Chin és mtsai., 2013) az *O. rhinotracheale* számára az optimális inkubációs hőmérséklet 37°C, de 31 és 41°C-on is képes növekedni. A jelenséget az magyarázhatja, hogy madarak légzőszerveiben nem egységes hőmérséklet uralkodik: a felső légutakban alacsonyabb, míg a tüdőhöz közeledve egyre magasabb a hőmérséklet (Markham és mtsai., 1998).

Az általunk vizsgált *O. rhinotracheale* törzsek 37°C-on TSA-n is növekedtek, összhangban a szakirodalomban ismertettekkel (Chin és mtsai., 2013), azonban a létrejövő telepek mérete alapján a vérrel kiegészített táptalajok jelentették a törzsek számára az ideális közeget.

Külön kategóriát képeznek a hőérzékeny mutáns *O. rhinotracheale* törzsek, melyek 42°C-on nem képesek növekedni, és potenciális vakcina törzsek lehetnek (Lopes és mtsai. 2002). A hőérzékeny vakcina törzsek csak a felső légutakat képesek kolonizálni, és lokális immunválasz kiváltása által alakítanak ki védettséget a 42°C-on is növekedni tudó vad törzsek ellen. A Lopes és mtsai (2002) által mesterségesen előállított hőérzékeny mutáns törzsön kívül a természetben előforduló, 42°C-on növekedni nem képes törzset eddig még nem találtak. Az általunk vizsgált törzsek között sem fordult elő olyan, aminek a növekedését a magasabb hőmérséklet gátolta volna.

6.4. A hemolízis vizsgálata

A *B. avium* törzsek hemolitikus képességeinek vizsgálata során a szakirodalomban (Kerstens és mtsai., 1984) leírtakat tapasztaltuk, azaz a baktériumtörzsek egy esetben sem mutattak hemolízist.

Az *O. rhinotracheale*-t az első leírásokban (Charlton és mtsai., 1993; Vandamme és mtsai., 1994) egyértelműen nem hemolizáló baktériumként jellemezték. Tabatabai és mtsai (2010) számoltak be először gyenge β -hemolízist mutató izolátumokról. A jelenséget akkor figyelték meg, amikor 48 órás 37°C-on történő inkubációt követően további 24-48 órán át szobahőmérsékleten tartották a tenyészeteket. Tapasztalataik szerint az Észak-Amerikában, pulykából izolált törzsek többsége hemolizált. A tulajdonság hátterében egy hemolizin-szerű fehérjét azonosítottak (Tabatabai és mtsai., 2010), a jelenséget pedig más szerzők brojler állományokból származó izolátumok esetében is megerősítették (Gornatti Churria és mtsai, 2011).

Vizsgálataink során nem találtunk összefüggést a törzsek hemolizáló képessége és az izolálás ideje vagy a törzsek állatfaji eredete között. Nem függött össze ez a tulajdonság azzal sem, hogy az állat mely szervéből tenyésztették ki az adott törzset: mind hemolizáló, mind nem hemolizáló törzsek származtak tüdőből, ami súlyosabb kórlefolyást feltételez.

A hemolizinek számos baktériumfajban szerepet játszanak a kórokozó megbetegítő képességében. A hemolitikus tulajdonság virulencia tényező szerepét *O. rhinotracheale* esetében Walters és mtsai. (2014) állatkísérletben vizsgálták. Nem várt módon a nem hemolizáló törzset találták virulensebbnek. A nem hemolizáló törzzsel fertőzött állatok kórszövetteni elváltozásait a fertőzés után 7, 14, és 21 nappal is szignifikánsan súlyosabbnak találták, mint a hemolizáló törzzsel inokulált csoportban tapasztalhatóakat. A nem hemolizáló törzzsel fertőzött csoport egyedeinek testtömege is nagyobb mértékben csökkent, mint a hemolizáló törzzsel fertőzött állatoké, valamint az előbbi csoportban magasabb ellenanyag-titerek mértek. A jelenség tisztázása további vizsgálatokat kíván, hiszen nem zárható ki az sem, hogy a két törzs nem csak a hemolitikus képességében, de egyéb, a virulenciát befolyásoló tulajdonságban is különbözött egymástól.

A hemolizin-szerű fehérje genetikai hátterének pontosabb megismerése segíthetne annak megértésében, hogyan működik és milyen evolúciós előnnyel jár ez a tulajdonság, amennyiben valóban nem játszik szerepet a kórokozó megbetegítő képességében, azonban az ezzel kapcsolatos kísérletek eddig nem voltak sikeresek (Tabatabai és mtsai., 2010). Előrelépést e tulajdonság vizsgálatában a több hozzáférhető *O. rhinotracheale* teljes genomszekvencia jelentené, melyek további molekuláris vizsgálatok alapját is képezhetnék.

6.5. Hemagglutinációs próba

Összesen 19 *B. avium* és 64 *O. rhinotracheale* törzset vizsgáltunk hemagglutinációs próbában, hat gazdafajból származó vvt-k felhasználásával, a baktériumok adhéziós képességeinek megismerésére.

Fitzgerald és mtsai. (1998) vizsgálták először az *O. rhinotracheale* hemagglutinációs képességét. Vizsgálatukban 25 izolátumból 15 agglutinálta a házityúk vvt-eket. Soriano és mtsai. (2002) későbbi vizsgálatában az összes törzs rendelkezett ezzel a képességgel. Saját törzseink szintén rendelkeznek hemagglutinációs aktivitással. Összefüggést azonban nem tudtunk kimutatni törzseink gazdafaji eredete és hemagglutinációs képessége között. A szakirodalomban a két adat korrelációjára mind megerősítő, mind cáfoló adatokat találhatunk. Egy tajvani kísérlet során a házityúk eredetű törzsek jobb hemagglutinációs képességet mutattak, melyek túlnyomó többsége (n=22/28) mind a házityúk, mind a galamb vvt-eket agglutinálta, míg a galamb eredetű izolátumok nem mutattak ilyen aktivitást (Tsai és Huang, 2006). Mirzaie és mtsai. (2011) vizsgálatában a galambból származó izolátumok hemagglutinációs aktivitása nagyobb volt, mint a pulyka és fürj eredetű törzseké. A galambból izolált törzsek 39%-a reagált a házityúk és galamb vvt-ekkel, a fürjből származó törzsek közül egy, a pulyka eredetű törzsek közül egy sem mutatott hemagglutinációs aktivitást. Vizsgálatainkban a galamb és vadmadár eredetű törzsek egyik faj vvt-it sem voltak képesek agglutinálni. A házityúk eredetű izolátumok közel fele (n=4/9), míg a pulyka eredetű törzsek 19%-a reagált valamelyik állatfaj vvt-jével.

Várakozásunkkal ellentétben a házityúkból izolált törzsek egyike sem agglutinálta a házityúk vvt-eket – a négy pozitív reakciót pulyka eredetű törzsek adták. Vega és mtsai. (2008) az A-I szerotípus típusú törzsek agglutinációs képességeit tesztelték számos emlős és madár vvt-tel. Tapasztalatainkhoz hasonlóan a házityúk eredetű A és E típusú törzsek nem agglutinálták sem a brojler, sem a külön kategóriaként kezelt kakas vvt-eket, a szintén házityúkból izolált G szerotípusú törzs azonban igen. A pulykából izolált típusú törzsek nagy része agglutinálta a pulyka vvt-eket, ám az egyik házityúk eredetű típusú törzs is pozitív reakciót adott (Vega és mtsai., 2008).

Szintén némi meglepetésre adott okot a nyúl vvt-k esetében tapasztalt kilenc reakció, mely a madár vvt-ekkel adott reakciók számával összevetve magasnak számít. Vega és mtsai. (2008) megfigyelései szerint a nyúl vvt-ekkel mindegyik törzs reagált, ami egyetlen más madár vagy emlős vvt-re sem volt elmondható. A juh vvt-eket, a mi megfigyelésünkhöz hasonlóan, a típusú törzsek túlnyomó többsége nem agglutinálta. Galamb és kutya vvt-tel a törzsek körülbelül fele reagált. Vega és mtsai., (2008) úgy találták, hogy az A, B, D és G típusú törzsek agglutinálták a legtöbb állatfajból származó vvt-t. A kis elemszám (n=9) miatt messzemenő következtetések

levonására nem alkalmas a vizsgálatuk, ezért nem megállapítható, hogy ez a tulajdonságuk összefügg-e a szerotípusukkal, vagy másik jellemzőjükből következik. Az általunk elemzett mezei törzsek esetében hét A és két D szerotípusú törzs reagált valamelyik állatfaj vvt-jével, azaz az izolátumok szerotípusával nem tudunk összefüggést kimutatni.

Tsai és Huang (2006) a telepmorfológia és a hemagglutinációs aktivitás között figyeltek meg korrelációt. Beszámolójuk szerint a nagyobb telepeket képző törzsek nagyobb százaléka volt képes a házityúk vvt-eket agglutinálni, mint a kis telepmorfológiájú izolátumok. Mirzaie és mtsai. (2011) hasonló jelenséget figyeltek meg. Saját eredményeink nem erősítik meg ezt a megfigyelést: a hemagglutinációt mutató törzsek között kisebb (OR009, OR012, OR063, OR067) és nagyobb (OR077, OR078, OR079) telepeket képezők is megtalálhatóak voltak. Tapasztalataink szerint, a szakirodalomban ismertetett módon (Hafez, 2002), a frissen izolált törzsek eltérő nagyságú telepeket képezhetnek, azonban néhány átoltást követően méretük egységessé válik. Megfigyelésünk szerint továbbá a tenyésztő közeg tápanyagtartalma is befolyásolja a telepméretet.

A baktériumsejtek felületén megjelenő adhezinek tulajdonságai nagymértékben befolyásolhatják a virulenciát, hiszen a bakteriális fertőzés első lépése a gazda sejtjeihez való specifikus tapadás. A baktérium vvt-megkötő képessége számos baktériumfaj esetén jól korrelál a mikroba gazdasejtéhez történő adhéziójával, a virulens baktériumok pedig gyakran erősebb adhéziós és hemagglutinációs képességgel rendelkeznek (Ishikawa és Isayama, 1988). Az *O. rhinotracheale* virulencia faktorairól egyelőre kevés információ áll rendelkezésre. A házityúk vvt-eket hemagglutináló törzsek adhéziós vizsgálatokban képesek voltak házityúk trachea hámsejtjeihez tapadni (Soriano és mtsai., 2002), így valószínűsíthető, hogy más baktérium fajokhoz hasonlóan valamilyen adhezin jelenlétét jelzi a hemagglutinációs képesség. Vizsgálatunk és a szakirodalomban olvasható adatok (Vega és mtsai., 2008) alapján nem figyelhető meg gazdafaj-specifitás az *O. rhinotracheale* hemagglutinációs képességében. Mivel a kórokozó széles gazdaspektrummal rendelkezik, ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy az *O. rhinotracheale* adhezinek esetében nem beszélhetünk a fajon belüli, egyes madárfajokhoz adaptálódott kórokozó csoportokról.

A hemagglutináció a *B. avium* jól ismert tulajdonsága (Bemis és Fenwick, 2008). A hemagglutinációs képesség hiánya általában a törzs attenuálódására utal. A képesség jelenlétét vagy hiányát elsősorban tengerimalac vvt-k segítségével határozzák meg (Temple és mtsai., 1998), más állatfajok vvt-ivel csak elvétve végeztek vizsgálatokat. Register és mtsai. (2003) megfigyelései szerint számos *B. avium* törzs gyengén vagy egyáltalán nem hemagglutinálta a juh- és pulyka vvt-eket. Beszámolójuk szerint a választott módszer is befolyásolhatja az eredményt: a mikrotiter lemezen végzett próba nagyobb arányban ad pozitív eredményt, mint a tárgylemez-agglutinációs teszt. Gentry-Weeks és mtsai. (1988)

eredményeinkhez hasonlóan különbséget találtak az eltérő állatfajokból származó vvt-k agglutinálásában: vizsgálatukban a *B. avium* törzsek a lúd vvt-eket nem agglutinálták, a tengerimalac vvt-eket azonban igen. Saját vizsgálataink során ezekkel az eredményekkel ellentétben a juh és madár eredetű vvt-eket a törzsek többsége agglutinálta.

Gentry-Weeks és mtsai. (1988) a lúd vvt agglutinációját az FHA meglétének indikátoraként használták, és arra a következtetésre jutottak, hogy ez a struktúra hiányzik a *B. avium* törzsekből. Később igazolódott, hogy az FHA működéséért felelős két gén, az *fhaB* és *fhaC* ortológjai megtalálhatóak a *B. avium*-ban is. A két gén szekvenciájában történő inzerciós mutációk azonban nem befolyásolták a törzsek vvt-megkötő képességét, miközben pulyka modellben vizsgálva a módosított törzsek avirulensnek bizonyultak (Spears és mtsai, 2003). Ezek mellett négy másik, FHA-szerű fehérjét kódoló gén is ismert, melyekből kettő (*hagA* és *hagB*) mutációja a hemagglutinációs aktivitás megszűnésével jár (Temple és mtsai., 1998). A *hagA* génről kifejeződő fehérje hasonlóságokat mutat a más *Bordetella* fajokban is megtalálható *fhaC* gén termékével, ezért azt feltételezik, hogy a *B. avium*-ban a HagB az FhaB-nek, a HagA pedig az FhaC-nek megfelelő funkcióval bír (Temple és mtsai., 2010). Valószínűsíthető, hogy az eltérő állatfajokból származó vvt-k agglutinálásában mutatkozó különbségek hátterében a hemagglutinációért felelős struktúrák változatossága áll, azonban a pontos összefüggés jelenleg még nem ismert.

6.6. A szerotípus meghatározása

A szerotipizálás az *O. rhinotracheale* törzsek jellemzésének általánosan alkalmazott módszere (van Empel és Hafez, 1999). Az irodalmi adatokkal megegyező módon (Numee és mtsai., 2012; van Empel és mtsai., 1997), a Magyarországon 1997-2016 között izolált törzsek nagy része az A szerotípusba tartozott. A pulyka eredetű törzsek túlnyomó többsége, valamint a vadmadarokból izolált törzsek is A szerotípusúak voltak. A házityúk eredetű törzsek viszont nagyobb változatosságot mutattak: két törzs A szerotípusúnak, két törzs D szerotípusúnak bizonyult, két törzs pedig nem volt tipizálható az A-E szerotípus-specifikus savókkal. Thachil és mtsai. (2007) vizsgálatában az ötven vizsgált pulyka izolátum közül 32 A szerotípusúnak bizonyult, 11 törzs a C, 7 pedig az I szerotípusba tartozott. Ezzel ellentétben, az eddigi legszélesebb körű vizsgálat során (van Empel és Hafez, 1999) a pulyka eredetű törzsek mutattak nagyobb változatosságot: 58%-uk tartozott az A szerotípusba, 27% B, 7% E, 5% pedig D szerotípusú volt. A házityúkból izolált törzsek 95%-a A szerotípusú volt.

A világszerte vizsgált házityúk eredetű törzsek 98%-a, míg a pulykából izolált törzsek 99%-a tartozik az öt leggyakoribb (A-E) szerotípusba. A fennmaradó 13 szerotípus megjelenése szórványos (van Empel és Hafez, 1999). A három, a vizsgálatunkban nem

tipizálható törzs feltehetően az F-R szerotípusok valamelyikébe, vagy egy eddig még le nem írt szerotípusba tartozik. Hafez és Sting (1999) arról számolt be, hogy a hat leggyakoribb szerotípusra (A-E valamint G) specifikus savó használatkor az összes elemzett törzs szerotípusa megállapítható volt. Nyolc típusavó (A, C, D, E, F, I, J, K) felhasználásával Thachil és mtsai (2007) is minden vizsgált törzset tipizálni tudtak. Egy nagyobb elemszámú vizsgálatban (n=372) a vizsgált izolátumok csupán 3%-a nem volt tipizálható A-L szerotípus-specifikus savókkal (Numee és mtsai., 2012).

A vizsgált törzsek 13,8%-ánál tapasztaltunk keresztreakciót. A leggyakoribb ezek közül az A-B szerotípusok közötti volt, de a D és C, valamint az A és D szerotípusok közötti keresztreakció is megfigyelhető volt esetünkben, ami egyezést mutat az irodalmi adatokkal (Numee és mtsai., 2012). Hafez és Sting (1999) megfigyelése alapján agargél-precipitáció során mind hőstabil antigének, mind a proteináz K segítségével kivont antigének használatával kisebb a keresztreakciók aránya, mint a nátrium-lauril-szulfáttal kivont antigének alkalmazása során. A keresztreakciók fő reakciótól való megkülönböztetését segíti, hogy ezek főként 48-72 óra inkubációt követő leolvasásnál jelennek meg, valamint halványabb, elmosódottabb precipitációs csíkot adnak, mint a fő reakció. Ennek ellenére jelenlétük szubjektívabbá teszi a módszer elbírálását.

A szerotípus meghatározásának fontossága az *O. rhinotracheale* esetén ellentmondásos. Az egyes szerotípusok virulenciájában eddig nem találtak különbséget. Állatkísérletekben vírussal való előzetes fertőzést követően a különböző szerotípusú törzsek mindegyike képes volt klinikai tüneteket kialakítani mind házityúkban, mind pulykában (van Empel és Hafez, 1999). Egy másik vizsgálat során mind az A, mind a B szerotípus típus-törzs növekedésben való visszamaradást, légzsákgyulladást idézett elő pulykában és házityúkban is (van Empel és mtsai., 1996).

Schuijffel és mtsai. (2006) a szerotípusok között keresztvédelmet adó vakcinák fejlesztéséről számoltak be. Nyolc, a G szerotípus típus-törzsből kivont antigén egyedi védőhatását vizsgálták. A nyolc fehérje közül egy rendelkezett szignifikáns keresztvédő hatással. A homológ, G szerotípusú törzssel való fertőzés mellett az A és a B szerotípusú törzsekkel való fertőzés esetén is enyhébb tüneteket tapasztaltak, az M szerotípus ellen azonban nem nyújtott védelmet. Vizsgálataik során megállapították, hogy bár a fehérjét kódoló gén minden szerotípus esetén jelen van, és erősen konzervatív, az F, a K és az M szerotípusba tartozó törzsek nem expresszálják az antigént. Ebbe a három szerotípusba azonban az összes izolált törzsnek csak kevesebb, mint 3%-a tartozik, négy antigén kombinálásával pedig az összes szerotípus ellen sikeresen alakítottak ki védelmet (Schuijffel és mtsai., 2006).

A szerotípusok között keresztvédelmet adó vakcinák megjelenése, és az a tény, hogy jelenlegi ismereteink szerint a szerotípus nem mutat összefüggést a törzsek virulenciájában tapasztalható különbségekkel, csökkenti a szerotípus meghatározásának gyakorlati fontosságát. Az *O. rhinotracheale* fajon belüli változatosságát vizsgáló módszerként való használata ellen pedig a módszer jelentősnek mondható specifikus savó igénye és ezek nehézkes hozzáférhetősége, valamint a gyakori keresztreakciók szólnak. Mivel az egész világon izolált háziyúk eredetű *O. rhinotracheale* törzsek 94%-a, a pulykából származó törzseknek pedig 57%-a A szerotípusú, és az összes vizsgált izolátum közel 97%-a az A, B, D és E típusba tartozik (van Empel és Hafez, 1999), a módszer felbontóképessége várhatóan elmarad a genotipizáló módszerek megkülönböztető erejétől. Ezt saját eredményeink is megerősítik: a mezei *O. rhinotracheale* törzsek három szerotípusba tartoztak, ugyanakkor kilenc különböző mintázatot adtak ERIC-PCR használatakor.

6.7. Antibiotikum rezisztencia

Az *O. rhinotracheale* és *B. avium* antibiotikumok iránti érzékenységét számos korábbi vizsgálat elemezte. A törzsek rezisztenciája az izolálás helyétől függően nagy változékonyságot mutat. Az egyes vizsgálatok eredményeinek összehasonlítását nehezíti, hogy ezekre a mikroorganizmusokra nincs általánosan elfogadott vizsgálati módszer és elbírálási határértékek. A legtöbb munkában a CLSI nehezen tenyészthető Gram-negatív baktériumokra kiadott ajánlását követik, ennek ellenére a vizsgálati módszerek és a rezisztencia határértékek irodalmi hivatkozásokként nagyon eltérőek lehetnek.

A vizsgálandó antibiotikumokat úgy igyekeztünk kiválasztani, hogy vizsgálatunk a lehető legszélesebb összehasonlítást tegye lehetővé a szakirodalomban ismertett adatokkal. Az amoxicillint, doxiciklint és erithromicint a korongdiffúziós tesztben mutatott változó hatékonyságuk miatt választottuk ki a MIC meghatározáshoz.

A vizsgált *O. rhinotracheale* izolátumok 52%-a volt érzékeny amoxicillinre, 48% -kal szemben pedig nem volt hatékony ez az antibiotikum. A világ különböző pontjain végzett rezisztencia tesztekben az *O. rhinotracheale* izolátumokat ampicillin érzékenynek találták (Varga és mtsai., 2001; Malik és mtsai., 2003a; Tsai és Huang, 2006; Murthy és mtsai., 2008a). Az amoxicillin (Tsai és Huang, 2006; Murthy és mtsai., 2008a) és a kloramfenikol (Mohd-Zain és mtsai., 2008; Murthy és mtsai., 2008a) szintén hatékonynak bizonyult. Mohd-Zain és mtsai. (2008) érdekes jelenségről számoltak be *O. rhinotracheale* törzsek korongdiffúziós vizsgálatokor: az izolátumok 16,7%-a érzékeny volt amoxicillinre, azonban ampicillinre minden vizsgált törzs rezisztens volt. Sajnálatos módon a szerzők közleményükben nem részletezik sem a teszt pontos kivitelezését, és az érzékenység illetve rezisztencia

megállapításához használt határértékeket sem nevesítik, csupán annyit jegyeznek meg, hogy a CLSI javaslatait követték.

A legtöbb *O. rhinotracheale* törzset általában rezisztensnek találták gentamicinnel szemben (Ak és Turan, 2001; Malik és mtsai., 2003a; Soriano és mtsai., 2003; Murthy és mtsai., 2008a). Az *O. rhinotracheale* izolálásakor gyakran egészítik ki a táptalajt gentamicinnel, kihasználva, hogy a törzsek nagy része rezisztens erre az antibiotikumra. Az izolátumok mintegy 10%-a azonban érzékeny gentamicinre (Hafez, 2002), így kerülhet az a rezisztencia vizsgálati sorba.

A szulfamethoxazol-trimetoprim a legtöbb esetben szintén nem hatékony az *O. rhinotracheale* izolátumokkal szemben (Malik és mtsai., 2003a; Tsai és Huang., 2006; Mohd-Zain és mtsai., 2008; Murthy és mtsai., 2008a). A spektinomicin elemzéseink során hatékonynak bizonyult, Varga és mtsai. (2001) korábbi vizsgálatában azonban nem volt képes megakadályozni a törzsek növekedését. Malik és mtsai. (2003a) mind rezisztens, mind érzékeny törzseket megfigyeltek, az érzékenység pedig az izolálás idejével mutatott összefüggést. Az 1996-ban és 1999-ben izolált törzsekkel szemben hatékony volt az antibiotikum, az 1998-ban kitenyésztett *O. rhinotracheale* izolátumok 80%-a azonban rezisztens volt spektinomicinnel szemben, a 2000-2002 között izolált törzsek érzékenységét pedig nem vizsgálták. A linkomicin belga *O. rhinotracheale* törzsek növekedését nem gátolta (Devriese és mtsai., 2001), magyar törzsekkel szemben azonban hatékony volt (Varga és mtsai., 2001).

A Belgiumban izolált törzsek doxiciklin érzékenysége hasonló határértékek között mozgott, mint amit mi is tapasztaltunk (Devriese és mtsai., 2001). Varga és mtsai. (2001) alacsony MIC értékeket írtak le eritromicin esetén, Hollandiában azonban ez csak magas koncentrációban, vagy egyáltalán nem volt hatékony az *O. rhinotracheale* törzsekkel szemben (van Veen és mtsai., 2001). Hasonló módon, egy mexikói vizsgálatban az amoxicillin MIC értékei 16 és 128 µg/ml közé estek, érzékenyek (2 µg/ml) egyetlen törzset találtak (Soriano és mtsai., 2003). Holland izolátumokkal szemben szintén nem találták hatékonynak (64 µg/ml) (van Veen és mtsai., 2001), más vizsgálatokban azonban szélesebb értékek között változott a MIC ($\leq 0,06$ - ≥ 64 µg/ml) (Varga és mtsai., 2001).

A korongdiffúziós tesztben érzékenyek talált törzsek esetén az amoxicillin MIC-e széles határértékek között mozgott (0,12-2 µg/ml). A vadmadaraktól és háztáji állományokból izolált törzsekhez alacsonyabb MIC értékek tartoztak. A korongdiffúziós módszer alapján rezisztens törzsekkel szemben az antibiotikum MIC értékei alacsonyak voltak (8-32 µg/ml). A doxiciklin és eritromicin MIC értékei hasonlóan alakultak.

A *B. avium* törzsek egy részének kloramfenikollal, ciprofloxacinnal, eritromicinnal és oxitetra ciklinnel szemben mutatott csökkent érzékenysége a kérdéses antibiotikumok hatékonyságának csökkenő tendenciájára utal. A Minnesotában, 1998-1999 között izolált

B. avium törzsek érzékenyek voltak ampicillinre, enrofloxacinra és gentamicinre, eritromicinnel szemben azonban minden vizsgált törzs rezisztens volt (Malik és mtsai., 2005). Eritromicin és szulfametoxazol-trimetoprim esetében a rezisztencia növekedését, ampicillin kapcsán a rezisztencia visszaszorulását figyelték meg (Malik és mtsai., 2003b). Az enrofloxacinnal és gentamicinnel szembeni rezisztencia minden vizsgált évben magas volt vizsgálatukban (Malik és mtsai., 2003b). Mortensen és mtsai. (1989) megfigyelése szerint a penicillin és cefuroxim az izolálás évétől függetlenül nem volt hatékony a *B. avium* izolátumokkal szemben, a gentamicin és cefoperazon azonban igen. Beach és mtsai. (2012) harmadik generációs cefalosporinokkal és ampicillinnel szemben figyeltek meg rezisztenciát, ezzel szemben penicillinre egy törzs kivételével minden izolátum érzékeny volt. A cikk szerzői feltételezték, hogy a jelenség magyarázatául szolgálhat, hogy a GenBank-ban közzétett egyetlen *B. avium* (197N azonosítójú törzs) teljes genom szekvenciájában hiányzik a penicillinkötő fehérjét kódoló egyik gén. Arról nem áll rendelkezésre információ, hogy ez a jelenség mennyire gyakori a többi *B. avium* izolátumban. Az általunk feltárt penicillinnel szembeni csökkent érzékenységet is magyarázhatja ez a feltevés, ám az is okozhatja a fenti jelenséget, hogy nincsenek speciálisan a *B. avium*-ra kiadott határértékek, így a tesztek elbírálása torzulhat.

A *B. avium* törzsekkel szemben mért MIC értékek szűkebb határértékek között mozogtak vizsgálatunk során, mint az *O. rhinotracheale* izolátumokkal szemben mértek, valamint maguk a MIC értékek is alacsonyabbak voltak. A német törzsekkel szembeni MIC-ek mindhárom antibiotikum esetén a tartomány magasabb értékéhez estek közel. Az eritromicin MIC értéke *B. avium* izolátumokkal szemben hasonló volt a Mortensen és mtsai. (1989) által leírt $\leq 4 - \geq 8$ $\mu\text{g/ml}$ értékhez.

A vizsgált *O. rhinotracheale* és *B. avium* törzsek egyikéből sem sikerült plazmidot izolálnunk. A rezisztencia minden valószínűség szerint a kromozómán rögzített ezeknél az izolátumoknál. *B. avium*-ból több, 16-51,5 kb méretű plazmidot mutattak ki, melyek streptomycin, szulfonamidok és tetraciklin rezisztenciagéneket hordoztak (Cutter és Luginbuhl, 1991, Luginbuhl és mtsai., 1986).

O. rhinotracheale esetében egyetlen plazmidot írtak le két ritka, K szerotípusú törzsben (Jansen és mtsai, 2004). Az, hogy más izolátumokból nem sikerült ilyen struktúrát kimutatni, azt feltételezi, hogy az izolált plazmid a vizsgálatot megelőzően nem sokkal, elszigetelt esetként kerülhetett a törzsekbe, és ezidáig nem terjedt el közöttük.

A vadmadaraktól izolált *O. rhinotracheale* törzsek antibiotikum érzékenységgel kapcsolatos tapasztalataink összhangban vannak a Devriese és mtsai. (2001) által megfigyelttel. Tesztjeikben a vetési varjúból izolált törzsekkel szemben a vizsgált antibiotikumok MIC értéke alacsonyabb volt, mint a házityúk és pulyka eredetű törzseké. Ez az eredmény arra utalhat, hogy a nagyüzemi állományokból izolált *O. rhinotracheale* törzsekben tapasztalt széleskörű rezisztencia szerzett rezisztencia.

Az általunk mért MIC értékek *O. rhinotracheale* törzsek esetén még az érzékeny izolátumoknál is az érzékenység felső határának közelében voltak. Ez az eredmény összhangban van Veen és mtsai. (2001) megfigyelésével, mely szerint a betegség elleni antibiotikus kezelés az elmúlt években csökkent, míg az *O. rhinotracheale* fertőzések száma nőtt.

Mortensen és mtsai. (1989) feltételezték, hogy a nagyüzemi állományokban gyakran használt antibiotikumok által okozott szelektív nyomás hozzájárul a pulyka eredetű *B. avium* törzsekben megfigyelt antibiotikum rezisztencia terjedéséhez. Mind *O. rhinotracheale*, mind *B. avium* törzsek esetén megfigyeltük, hogy az azonos helyen és időben izolált törzsek rezisztencia mintázata azonos volt, ami arra utal, hogy a lokális antibiotikum-használat hatással van az adott telepen jelenlévő kórokozók antibiotikumokkal szembeni érzékenységére.

Annak ellenére, hogy a baromfiiparban törekednek az antibiotikum-használat csökkentésére, és egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek a preventív kezelésekre valamint a megfelelő menedzsmentre, a baktériumok okozta fertőző betegségek továbbra is gyakran előfordulnak, és meglehetősen nagy gazdasági károkat képesek okozni (Beach és mtsai., 2012; Thieme és mtsai., 2016a). Ugyanakkor a multirezisztens törzsek megjelenése és elterjedése az állat- és humán orvoslás egyik legjelentősebb kihívását jelenti. Nagyon valószínű, hogy az antibiotikumok helytelen használata hozzájárul a rezisztens kórokozók kiszelektálásához. Mindezek miatt kiemelten fontos lenne a rezisztencia vizsgálatokon alapuló antibiotikum-használat, ez pedig a folyamatos monitorozás, valamint az adott kórokozóra megállapított rezisztencia határértékek és egységes vizsgálati módszerek kialakításának szükségességére hívja fel a figyelmet.

6.8. ERIC-PCR

Az *O. rhinotracheale* ERIC-mintázatok nem mutattak összefüggést az izolálás helyével és idejével. Az izolátumok gazdafaji eredetével azonban megfigyelhető volt némi korreláció: a 2. és 3. ERIC-típusba kizárólag pulyka eredetű törzsek tartoztak, és az 1. típust is főleg ebből a fajból izolált törzsek alkották. A házityúk eredetű törzsek ezzel szemben nagyobb változatosságot mutattak: a kilenc izolátum nyolcféle ERIC-típusba tartozott. Az állatfaji eredet és az ERIC-mintázat közötti összefüggés megegyezik az irodalmi adatokkal: Amonsin és mtsai., (1997) ötvennégy, Amerikában, Európában, Afrikában és Ázsiában 1983-1995 között izolált, több madárfajból származó *O. rhinotracheale* törzset vizsgáltak ERIC-PCR segítségével. Hét ujjenyomat-típust különítettek el, melyek a földrajzi eredettel nem függtek össze. A pulyka és házityúk eredetű törzseket nem különítette el ez a módszer, ezek a két leggyakoribb (A és B) mintázatot adták. A legváltozatosabbnak a vetési varjából izolált

törzsek bizonyultak: a három vadmadárból származó törzs három eltérő típusba tartozott, és ezek mintázata markánsan különbözött az egymáshoz nagyon hasonló A és B mintázattól. Egy másik vizsgálatban 25, Peruban háziutyúkból izolált *O. rhinotracheale* törzset jellemeztek ERIC-PCR-rel (Koga és Zavaleta, 2005). Az összes törzs azonos mintázatot adott, függetlenül attól, milyen földrajzi régióból származtak a törzsek.

Thachil és mtsai. (2007) 2003-2006 között, Minnesotában izolált törzs vizsgálatok a törzsek szerotípusa és a molekuláris tipizáló módszerek eredménye között kerestek összefüggést. Az ötvennyolc izolátum elemzésekor hatféle ERIC-mintázatot különböztettek meg. Egyes szerotípusok (C, D, E, K) esetén specifikus mintázatot kaptak, néhány szerotípust (A, F, I és J) viszont nem tudtak elkülöníteni ezzel a módszerrel. Saját vizsgálataink során nem találtunk a szerotípus és az ERIC-mintázatok között összefüggést. Az A szerotípusú törzsek hat különböző ERIC-típusba sorolódtak, a hat D szerotípusú törzs pedig ötféle ERIC-mintázatot adott. A három leggyakoribb ERIC-típusba túlnyomórészt A és B szerotípusú törzsek tartoztak, azonban az egyedi ERIC-mintázatot adó OR061 és OR064 is A szerotípusú volt.

6.9. RAPD vizsgálatok

Az M13 primerrel kapott RAPD mintázat nem mutatott összefüggést sem az izolálás helyével és idejével, sem az állatfaji eredettel vagy a törzsek szerotípusával. Waldow (2009) hasonló vizsgálatában a szerotípusoknak megfeleltethető RAPD-típusokat kapott. Egyes szerotípusokhoz több RAPD-mintázat tartozott ugyan, azonban ezek jól elkülöníthetőek voltak egymástól, és lehetővé tették az izolátumok szerotípusának RAPD-vizsgálattal történő meghatározását. A mi eredményeink nem erősítették meg ezt a megfigyelést. Az A szerotípusú törzsek túlnyomó része az 1-es M13 RAPD típusba tartozott, de két törzs az ettől csupán egy csíkban eltérő 2-es mintázatot adta. Szintén az 1-es M13 RAPD típusba sorolódott viszont a D szerotípussal rendelkező törzsek nagy része és két B szerotípusú törzs is. Ugyanakkor négy A szerotípusú izolátum (OR035, OR042, OR058, and OR080) is más típusba tartozott, csakúgy, mint egy B (GGD1261) és két D (ORV94108 nr.2, OR007) szerotípussal rendelkező törzs.

M13 primer használatával ötvennyolc törzs vizsgálatok Thachil és mtsai. (2007) kilenc mintázatot különítettek el. A C, D, E, I, J, és K szerotípusok típus-törzsei jól elkülönültek, azonban az A és F szerotípusok azonos mintázatot adtak. A mezei izolátumok közül az A szerotípusúak három különböző M13 típusba sorolódtak, míg a tizenegy C szerotípusú törzs közül egy mintázata a C típus-törzsével volt azonos, a többi izolátumé az A szerotípusúakéval

egyezett meg. Nem találták tehát tökéletesen alkalmasnak a módszert a szerotípus meghatározására.

Leroy-Sétrin és mtsai. (1998) nyolc RAPD primer felbontóképességét vizsgálták 23, 1994-1995 között izolált francia *O. rhinotracheale* törzsen. A legjobb diszkriminatív erővel az OPG11 primerek rendelkezett. A RAPD-vizsgálat eredményét a ribotipizálással kombinálva három klaszterbe csoportosították az izolátumokat. Ezek a csoportok azonban nem mutattak összefüggést az izolálás helyével és idejével. Ozbey és mtsai. (2005) RAPD-vizsgálatuk során OPG11 primer használatával nagy genetikai változatosságot találtak az *O. rhinotracheale* törzsek között. Az A-E szerotípus törzsek mellett hat mezei izolátumot vizsgáltak, melyek közül öt A egy pedig B szerotípusú volt, azonban mind egyedi mintázatot adtak. Az alacsony elemszámból adódóan azonban nem lehet általános érvényű következtetést levonni a vizsgálatukból. Az OPG11 primerrel végzett RAPD a tajvani izolátumokat két csoportba osztotta: az elsőbe főként a házityúk és fűj eredetű törzsek, a másodikba nagyrészt a galambból és kontyos héjából származó izolátumok kerültek.

A fenti irodalmi adatokkal ellentétben, vizsgálatainkban az OPG11 és OPH19 primerekkel végzett RAPD-vizsgálat megkülönböztető ereje kisebb volt, mint akár az M13 primerrel végzett RAPD-é, akár az ERIC-PCR-é. A vizsgálatok összevethetőségét ugyanakkor nehezíti a gyakran alacsony elemszám és az elemzett törzsek szűk földrajzi illetve gazdafaji eredete.

Az ERIC-típusok nem estek egybe a RAPD-típusokkal: az azonos ERIC-típusba tartozó törzsek sok esetben eltérő RAPD-típusba estek és fordítva. Azonban az elmondható, hogy a gyakoribb ERIC-típusba tartozó izolátumok a RAPD-vizsgálatokban is a gyakoribb mintázatot mutatták. Az egyedi ERIC mintázattal rendelkező törzsek több RAPD-vizsgálatban is egyedi mintázatot adtak, vagy ritkább típusba tartoztak (OR007, OR050, OR063, valamint a C, D és E típusú törzsek). Ennek az ellenkezőjére is volt példa, az OR047 és OR061 törzsek egyedi ERIC-mintázattal rendelkeztek, de a három RAPD-vizsgálat mindegyikében a leggyakoribb 1-es típusba tartoztak. A házityúk eredetű törzsek az ERIC-PCR és az OPG11 és OPH19 primerekkel végzett RAPD-vizsgálat alapján nagyobb genetikai változatosságot mutattak, mint a pulykából származó izolátumok, az M13 primerrel végzett RAPD esetén már nem volt ilyen egyértelmű a helyzet: a nyolc házityúk eredetű izolátumból négy egyedi mintázatot adott, négy azonban az 1-es típusba tartozott.

Az ERIC-PCR-rel és RAPD vizsgálattal szemben gyakori kritika a módszerek rossz reprodukálhatósága, ami a körülmények legkisebb változására való érzékenységből fakad (Olive és Bean, 1999; Meacham és mtsai., 2003). Ezt elkerülendő, a PCR rendszerek beállítását akkor tekintettük véglegesnek, ha legalább három ismétlés során azonos mintázatot kaptunk a beállítás során kontrollként használt szerotípus típusú törzsek esetén.

Ezen kívül vizsgálatainkat a mezei törzsek elemzése során is legalább háromszor ismételtük. Ez – bár a más vizsgálatok által bemutatott mintázatokkal való összehasonlítást nem tette lehetővé – az általunk vizsgált törzsek összevetéséhez biztosította a kellő ismételhetőséget.

6.10. Szekvencia-meghatározás és filogenetikai elemzés

A 16S rRNS génjének szekvencia analízise alapján arra következtethetünk, hogy az általunk vizsgált *O. rhinotracheale* törzsek a GenBank-ban található szekvenciákkal szoros rokonságot mutatnak. Más szerzők (Amonsin és mtsai., 1997; Numee és mtsai., 2012) hasonló eredményeket kaptak ennek a génszakasznak az elemzésekor, és a szakirodalomban az az általános vélemény, hogy a világ különböző pontjain izolált *O. rhinotracheale* törzsek nagy genetikai hasonlóságot mutatnak. A 16S rRNS génjének egy rövidebb, a fajazonosító PCR által felerősített szakaszát vizsgálva a tajvani házityúk és galamb eredetű izolátumok két jól elkülöníthető klasztert alkottak (Tsai és Huang, 2006). Saját vizsgálatainkban a 16S rRNS filogenetikai analízise nem különítette el gazdafaji eredet szerint a baktériumtörzseket. Chou és mtsai. (2009) vizsgálatában három klasztert alkotott az ötven, különböző madárfajokból izolált törzs, ám ezek szintén nem függtek össze a törzsek gazdafaji eredetével.

Az általunk elemzett mezei izolátumok több mint 90%-a teljesen azonos szekvenciájú volt a vizsgált szakaszon, mint a GenBankban található, az izolálás helye, ideje, és gazdafaji eredet szempontjából változatosnak mondható szekvenciák. A 16S rRNS-t kódoló gén filogenetikai vizsgálatát széles körben használják a különféle mikroorganizmusok megkülönböztetésére (Kattar és mtsai., 2001; Sacchi és mtsai., 2002a; Sacchi és mtsai., 2002b; Davies, 2004). A szekvencia változatosságának mértéke a legtöbb esetben lehetővé teszi a baktériumok faji szintű, és sok esetben a fajon belüli összehasonlítását is (Clarridge, 2004). Az *O. rhinotracheale* esetében, bár szintén gyakran használatos módszer a baktérium törzsek genetikai változatosságának vizsgálatára (Amonsin és mtsai., 1997; Chou és mtsai., 2009; Hassanzadeh és mtsai., 2010; Numee és mtsai., 2012; Tsai és Huang, 2006), a nagyfokú hasonlóság miatt ez a módszer fajon belüli genetikai különbségek feltárására csak korlátozottan alkalmas.

Bár a 16S rRNS szekvenciájának elemzése eltérő módon csoportosította a mezei törzseket, mint a RAPD-vizsgálatok, az ERIC-PCR vagy a szerotipizálás, azok a törzsek, amelyek a 16S rRNS analízis alapján különböztek a többi izolátumtól (OR007, OR050, OR063), több más tipizáló vizsgálat során is eltértek azoktól: ritkább szerotípusúak voltak, és ritkább ERIC vagy RAPD típusokba tartoztak, vagy egyedi mintázatot adtak ezekkel a módszerekkel. Ezek alapján elmondható, hogy bizonyos mértékben a felsorolt módszerek mindegyike alkalmas a fajon belüli különbségek kimutatására.

Vizsgálataink alapján a házityúkból és galambból származó izolátumok a tipizáló módszerek mindegyikében nagyobb változatosságot mutattak, mint a pulyka eredetű törzsek. Ezt a heterogenitást magyarázhatja, hogy a házityúkból származó mezei törzsek fele, valamint a két galamb eredetű törzs is háztáji körülmények között tartott madaraktól került izolálásra, míg a pulyka törzsek mindegyike nagyüzemi körülmények között tartott állatoktól származik. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a nagy pulykatelepeken csak néhány törzstípus cirkulál, míg a kisebb, elzártabb körülményeket biztosító háztáji gazdaságokban más típusok vannak jelen. Érdekes módon a két ragadozó madárból izolált törzs RAPD- és ERIC-profilja a pulyka eredetű törzsekéhez volt hasonló. Egy esetben leírtak *O. rhinotracheale* fertőzöttséget sólyomfiókákban, ahol a tenyésztelő zártasága miatt a fertőzés forrása igazolható módon az előzetesen leölt és takarmányként használt kakasok voltak (Hafez and Lierz, 2010). Arra vonatkozóan nincs adatunk, hogy a jelen munkában vizsgált héja és karvaly kapcsolatba kerülhetett-e nagyüzemi pulyka állományokkal, de az *O. rhinotracheale* törzsek molekuláris vizsgálata erősen valószínűsíti ezt. Mindenesetre, ez az eredmény felhívja a figyelmet az állattartó telepeken a megfelelő hulladékkezelési gyakorlatfontosságára.

Thieme és mtsai. (2016b) vadmadarak és baromfifajok *O. rhinotracheale* törzseinek MLST módszerrel való vizsgálatakor azt tapasztalták, hogy a vadmadaraktól származó törzsek külön klasztert alkottak ugyan, ám ez két, főként baromfibtól izolált törzset magában foglaló klaszter közé esett. A legpontosabb képet a vadmadár- és baromfi eredetű izolátumok genetikai hasonlóságáról a teljes genom szekvenálás adhatná, azonban a GenBank adatbázisában jelenleg mindössze két teljes *O. rhinotracheale* genom van publikálva, így széleskörű összehasonlításra egyelőre nincs lehetőség.

Több vizsgálat (Amonsin és mtsai., 1997; Thieme és mtsai., 2016a) is felvetette, hogy az *O. rhinotracheale* törzsek körében a szerzők által tapasztalt kismértékű genetikai heterogenitást az magyarázhatja, hogy az egymástól időben és térben távol izolált baktériumtörzsek egymással szoros rokonsági viszonyt mutató klónok. Bár a mi vizsgálatunkban a kis elemszám és a földrajzi származási helyek szűk köre nem teszi lehetővé messzemenő következtetések levonását, eredményeink alátámasztják ezt az elméletet.

Sem a fenotípusos, sem a molekuláris módszerekkel elvégzett elemzések eredményeiben mutatkozó különbségek nem függtek össze törzseink gazdafaji eredetével. Ez arra enged következtetni, hogy más széles gazdaspektrumú kórokozókkal ellentétben az *O. rhinotracheale* törzsek között nincsenek egyes gazdafajokhoz adaptálódott törzscsoportok. Az antibiotikum rezisztencia mintázatokban mutatkozó különbségek pedig leginkább az állattartó telepen meglévő antibiotikum használati gyakorlatot látszanak tükrözni.

6.11. A *B. avium* törzsek molekuláris tipizálásának eredményei

A *Bordetella* MLST adatbázisban szereplő számos izolátum között ezidáig egyetlen *B. avium* törzs volt megtalálható. Ez a 197N azonosítójú törzs egyben az egyetlen, melynek teljes genom szekvenciája megtalálható a GenBank adatbázisában. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a Diavatopoulos és mtsai. (2005) által kidolgozott MLST primerek és PCR reakciókörülmények alkalmatlanok a *B. avium* izolátumok vizsgálatára. Feltételezhetően a 197N törzs MLST analízisét a teljes genom szekvencia *in silico* elemzésével végezték el.

Az általunk meghatározott szekvencia típusok nem mutattak összefüggést sem az izolálás helyével illetve idejével, sem a törzsek gazdafaji eredetével. Amennyiben az MLST adatbázis a jövőben tovább bővül *B. avium* törzsek adataival, pontosabb következtetéseket vonhatunk majd le az ebben a *Bordetella* fajban előforduló szekvencia típusok számáról és ezek jelentőségéről.

Mind a 16S rRNS gén szekvenálásából, mind az MLST analízisből származó adataink a *B. avium* izolátumok közötti kis genetikai változatosságra engednek következtetni, ami megegyezik az irodalmi adatokkal. Különböző forrásból származó *B. avium* izolátumok között nagyfokú hasonlóságot találtak a külső membrán fehérjék (Kerstens és mtsai., 1984), valamint antigén profilok agargélprecipitációs, illetve Western blot módszerrel való vizsgálatok (Jackwood és Saif, 2013). Ribotipizálással és a restrikciós fragmenthossz polimorfizmus elemzésével azonban találtak eltéréseket is a vizsgált izolátumok között (Sacco és mtsai., 2000). Az *O. rhinotracheale*-hoz hasonlóan a legteljesebb képet a *B. avium* esetében is a teljes genom szekvenciák összehasonlítása tenné lehetővé.

6.12. Következtetések

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy mind a fenotípusos vizsgálatokkal, mind a molekuláris módszerekkel való jellemzés során feltártunk különbségeket az elemzett *O. rhinotracheale* és *B. avium* törzsek között, azonban a különböző módszerek által elkülönített csoportok nem függték össze egymással.

A *B. avium* és *O. rhinotracheale* fajon belüli változatosságának feltárása fontos a két baktériumfaj jobb megismerése miatt. A fenotípusos tulajdonságokban tapasztalható eltérések összefüggést mutathatnak ma még nem, vagy nem kellő mélységben ismert virulencia tényezőkkel, így alapot jelenthetnek azok későbbi vizsgálatához. Ezen kívül értékes információt adhat a kórokozók terjedésének, környezetben való fennmaradásának, egyes törzsek szélesebb körben való elterjedésének pontosabb megismeréséhez és megértéséhez. Az ezekben a tulajdonságokban tapasztalható különbségek azonban nem tekinthetők az egyes madárfajokhoz való adaptáció jeleinek.

Az izolátumok genetikai állományának vizsgálata – a fenotípusos tulajdonságokat vizsgáló módszerekkel szemben – valósabb képet ad a törzsek rokonsági viszonyairól, és nem befolyásolják a mikroorganizmus tenyésztetőségével kapcsolatos nehézségek. Ezek közül a legteljesebb összehasonlítást a teljes genom szekvenálás teszi lehetővé, azonban a választható módszerek közül jelenleg ez a legköltségesebb. Az MLST módszer során ezzel szemben csak az összehasonlítást lehetővé tevő gének nukleotida sorrendjét kell meghatározni. Ez a teljes genom szekvenáláshoz képest kevesebb információ alapján vizsgálja a törzsek változatosságát, ugyanakkor anyagi vonzata is alatta marad a teljes genom szekvenálás költségeinek. *Bordetellák* összehasonlítására 2005 óta (Diavatopoulos és mtsai., 2005), *O. rhinotracheale* vizsgálatára pedig 2016 elejétől (Thieme és mtsai., 2016a) áll rendelkezésre kidolgozott MLST rendszer. Ezen módszerek mellett azonban a rep-PCR-ek és a RAPD vizsgálatok költségei eltörpülnek. Gyorsaságuk és kis eszközigényük miatt akár egy jól felszerelt állattartó telepi laboratóriumban is elvégezhetőek. Az adott laboratóriumon belüli megfelelő reprodukálhatóság biztosítása mellett járványtani összefüggések felderítésének első, gyors eredményt adó lépéseként is használhatóak, melyeket szükség esetén további, pontosabb rokoni viszonyokat feltáró vizsgálatok követhetnek.

Munkánk során a felhasznált tipizáló módszerek közül az ERIC-PCR bizonyult a leghatékonyabbnak az *O. rhinotracheale* törzsek fajon belüli genetikai változatosságának elemzésére, ezért jó felbontóképessége miatt is ajánlható lehet ilyen típusú analízisekhez.

7. Új tudományos eredmények

1. Elsőként végeztük el magyarországi eredetű, *B. avium* és *O. rhinotracheale* törzsek átfogó fenó- és genotípusos összehasonlító vizsgálatát.
2. Fenotípusos próbákban a hazai *B. avium* törzsek egységességét és a Magyarországon izolált *O. rhinotracheale* izolátumok változatosságát tártuk fel.
3. Kimutattuk, hogy az *O. rhinotracheale* törzsek fenó- és genotípusos tulajdonságokban tapasztalható változatossága nem tekinthető a gazdaadaptáció jelének.
4. Felderítettük, hogy a Magyarországon izolált *O. rhinotracheale* törzsek között az A a leggyakoribb szerotípus. Emellett B és D szerotípusú törzsek magyarországi előfordulását írtuk le. Három törzset nem találtunk tipizálhatónak az A-E szerotípus-specifikus savókkal.
5. Megállapítottuk, hogy az ERIC-PCR és az M13 primerrel végzett RAPD vizsgálat alkalmas a magyarországi *O. rhinotracheale* törzsek genetikai változatosságának vizsgálatára és járványtani nyomozásra.
6. A hazai *O. rhinotracheale* izolátumok között molekuláris módszerekkel a házityúk eredetű törzsek nagyobb változatosságát derítettük fel a pulykából izolált törzsekéhez képest.
7. A *B. avium* *Bordetella* MLST rendszerben való vizsgálatához új PCR rendszereket fejlesztettünk. A *B. avium* törzsek MLST analízise során három új szekvencia típust azonosítottunk. Az adatbázis eddigi egyetlen *B. avium* adatát kilenc törzsével egészítettük ki.

8. Irodalomjegyzék

- Ak, S., Turan, N.: **Antimicrobial susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from broiler chickens in Turkey**, Veterinarski Arhiv, 71. 121–127, 2001.
- Amonsin, A., Wellehan, J.F.X., Li, L.L., Vandamme, P., Lindeman, C., Edman, M., Robinson, R., Kapur, V.: **Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale***, J. Clinical Microbiol., 35. 2894–2898, 1997.
- Arp, L.H., Cheville, N.F.: **Tracheal lesions in young turkeys infected with *Bordetella avium***, Am J Vet Res., 45. 2196–2200, 1984.
- Arp, L.H., McDonald, S.M.: **Influence of temperature on the growth of *Bordetella avium* in turkeys and in vitro**, Avian Dis., 29. 1066–1077, 1985.
- Arp, L.H.: **Adherence of *Bordetella avium* to turkey tracheal mucosa: effects of culture conditions**, Am J Vet Res. 47, 2618–2620, 1986.
- Asadpour, Y., Banani, M., Pourbakhsh, S.A.: **Isolation, identification and antibiotic sensitivity determination of *Ornithobacterium rhinotracheale* in slaughtering broiler chicken flocks of Guilan province**, Iranian J. Vet. Res., Shiraz Uni., 12. 345–349, 2011.
- Back, A., Rajashekara, G., Jeremiah, R.B., Halvorson, D.A., Nagaraja, K.V.: **Tissue distribution of *Ornithobacterium rhinotracheale* in experimentally infected turkeys**, Vet. Rec., 143. 52–53, 1998.
- Beach, N.M., Thompson, S., Mutnick, R., Brown, L., Kettig, G., Puffenbarger, R., Stockwell, S. B., Miyamoto, D., Temple, L.: ***Bordetella avium* antibiotic resistance, novel enrichment culture, and antigenic characterization**, Vet. Microbiol., 160. 189–196, 2012.
- Bemis, D. A., Carmichael, L. E., Appel, M. J.: **Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica***, Cornell Vet., 67. 282–293, 1977.
- Bemis, D.A., Fenwick, B.: ***Bordetella***. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. Szerk.: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Sanger, J.G., Thoen, C.O., Ames: Wiley-Blackwell, 2008. p. 259–272.
- Blalock, H.G., Simmons, D.G., Muse, K.E., Gray, J.G., Derieux, W.T.: **Adenovirus respiratory infection in turkey poults**, Avian Dis., 19. 707–716, 1975.
- Burke, D.S., Jensen. M.M.: **Immunization against turkey coryza by colonization with mutants of *Alcaligenes faecalis***, Avian Dis., 24. 726–733, 1980.
- Canal, C.W., Leao, J.A., Rocha, S.L.S., Macagnan, M., Lima-Rosa, C.A.V., Oliveira, S.D., Back, A.: **Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens in Brazil**, Res. Vet. Sci., 78.225–230, 2005.

- Cauwerts, K., De Herdt, P., Haesebrouck, F., Vervloesem, J. and Ducatelle, R.: **The effect of *Ornithobacterium rhinotracheale* vaccination of broiler breeder chickens on the performance of their progeny**, Avian Pathol., 31. 619–624, 2002.
- Charlton, B. R., Channing-Santiago, S. E., Bickford, A. A., Cardona, C. J., Chin, R. P., Cooper, G. L., Droual, R., Jeffrey, J. S., Meteyer, C. U., Shivaprasad, H. L., Walker, R. L.: **Preliminary characterization of a pleomorphic gram-negative rod associated with avian respiratory disease**, J. Vet. Diagn. Invest., 5. 47–51, 1993.
- Chin, R.P., Van Empel, P.C.M., Hafez, H.M.: ***Ornithobacterium rhinotracheale* infection**. In: *Diseases of Poultry*. Szerk.: Swayne, D.E.; Ames: Wiley-Blackwell, 2013. p. 828–834
- Chou, C.H., Lin, S.Y., Chen, C.L., Tsai, H.J.: **Random amplified polymorphic DNA analysis and single-enzyme amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains**, Avian Dis., 53. 108–114, 2009.
- Cimiotti, W., Glunder, G., Hinz, K.H.: **Survival of the bacterial turkey coryza agent**, Vet Rec., 110. 304–306, 1982.
- Clarridge, J.E.: **Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases**, Clin. Microbiol. Rev., 17.840–862, 2004.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (previously: National Committee for Clinical Laboratory Standards): **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**, approved standard—second edition. NCCLS document M31-A2. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002:
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**, informational supplement. CLSI document M31-S1. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004:
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**, twenty-first informational supplement; informational supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
- Cookson, B. T., Vandamme, P. Carlson, L. C. Larson, A. M. Sheffield, J. V. Kersters, K. Spach, D. H.: **Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, “*B. hinzii*.”**, J. Clin. Microbiol., 32. 2569–2571, 1994.
- Cutter, D.L., Luginbuhl, G.H.: **Characterization of sulfonamide resistance determinants and relatedness of *Bordetella avium* R plasmids**, Plasmid, 26. 136–140, 1991.

- 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. 4199–4210, 2004.
- Devriese, L.A., Hommez, J., Vandamme, P., Haesebrouck, F.: ***In vitro* antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds**, *Vet. Rec.*, 137.435–438, 1995.
- Devriese, L.A., De Herdt, P., Haesebrouck, F.: **Antibiotic sensitivity and resistance in *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from Belgian broiler chickens**, *Avian Pathol.* 30. 197–200, 2001.
- Diavatopoulos, D.A., Cummings, C.A., Schouls, L.M., Brinig, M.M., Relman, D.A., Mooi, F.R.: ***Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica***, *PLoS Pathogens*, 1. 0373–0383, 2005.
- Dillman, R.C., Simmons, D.G.: ***Histopathology of a rhinotracheitis of turkey poultts associated with adenoviruses***. *Avian Dis.*, 21. 481–491, 1977.
- El-Sukhon, S.N., Musa, A., Al-Attar, M.: **Studies on the bacterial etiology of airsacculitis of broilers in Northern and Middle Jordan with special reference to *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, and *Bordetella avium***, *Avian Dis.*, 46. 605–612, 2002.
- Erganis, O., Hadimli, H.H. Kav, K., Sayin, Z., Aras, Z.: **Production and development of vaccines for *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys**, *Eurasian J. Vet. Sci.*, 26.101–107, 2010.
- Eroksuz, H., Ozbey, G., Cevik, A., Gencer Tarakci, B., Balik, D.T.: **Immuno-histochemical, pathological, enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction analysis of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in quails (*Coturnix coturnix japonica*)**, *Rev. Méd. Vét.*, 157. 197–202, 2006.
- Filion, R., Cloutier, S., Vrancken, E. R., Bernier, G.: **Respiratory infection in the turkey caused by a bacterium related to *Bordetella bronchiseptica***, *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 31.129–134, 1967.
- Fitzgerald, S.L., Greyling, J.M., Bragg, R.R.: **Correlation between ability of *Ornithobacterium rhinotracheale* to agglutinate red blood cells and susceptibility to fosfomycin**, *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 65.317–320, 1998.
- Gentry-Weeks C.R., Cookson B.T., Goldman W.E., Rimler R.B., Porter S.B., Curtiss, R.: **Dermonecrotic toxin and tracheal cytotoxin, putative virulence factors of *Bordetella avium***, *Infect. Immun.*, 56.1698–1707, 1988.
- Gerlach, G., von Wintzingerode, F., Middendorf, B., Gross, R.: **Evolutionary trends in the genus *Bordetella***, *Microbes Infec.*, 3. 61–72, 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.
- Goodnow, R. A.: **Biology of *Bordetella bronchiseptica***, Microbiol. Rev., 44.722–738, 1980.
- Gornatti Churria, C.D., Sansalone, P.L. Vigo, G.B., Sguazza, G.H., Machuca, M.A., Origlia, J.A., Píscopo, M.V., Herrero Loyola, M.A., Petrucelli, M.A.: **Pneumonia in broiler chicken flocks associated with β -hemolytic *Ornithobacterium rhinotracheale* infection**, Braz. J. Vet. Pathol., 4. 243–246, 2011.
- Gross, R., Keidel, K., Schmitt, K.: **Resemblance and divergence: the „new” members of the genus *Bordetella***, Med. Microbiol. Immunol., 199. 155–163, 2010.
- Hafez, H.M.: **Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale***, Int. J. Poult. Sci., 1.114–118. 2002.
- Hafez, H.M., Sting, R.: **Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* “ORT” isolates**, Avian Dis., 43. 1–7, 1999.
- Hafez, H.M., Lierz, M.: ***Ornithobacterium rhinotracheale* in Nestling Falcons**, Avian Dis., 54. 161–163, 2010.
- Hall, T. A.: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**, Nucl. Acid S., 41.95–98, 1999.
- Hassanzadeh, M., Karrim, V., Fallah, N., Ashrafi, I.: **Molecular characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from broiler chicken flocks in Iran**, Turk. J. Vet. Anim. Sci., 34. 1–6, 2010.
- 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.
- Higgins D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice**, Nucleic Acids Res., 22. 4673–4680, 1994.
- Hinz, K.H., Glunder, G., Luders, H.: **Acute respiratory disease in turkey poults caused by *Bordetella bronchiseptica*-like bacteria**, Vet Rec., 103. 262–263, 1978
- Hung, A.L., Alvarado, A.: **Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Peru**, Avian Dis., 45. 999–1005, 2001.
- Ishikawa, H., Isayama, Y.: **Bovine erythrocyte-agglutinin as a possible adhesion of *Bordetella bronchiseptica* responsible for binding to porcine nasal epithelium**, J. Med. Microbiol., 25. 205–209, 1988.
- Jackwood, M.W., Saif, Y.M.: **Efficacy of a commercial turkey coryza vaccine (Art-Vax) in turkey poults**, Avian Dis., 29. 1130–1139, 1985.

- Jackwood, M.W., Saif, Y.M.: **Bordetellosis (Turkey Coryza)**. In: *Diseases of Poultry*. Szerk.: Swayne, D.E.; Ames: Wiley-Blackwell, 2013. p. 834–844.
- Jansen, R., Chansiripornchai, N., Gaastra, W. van Putten, J.P.M.: **Characterization of Plasmid pOR1 from *Ornithobacterium rhinotracheale* and Construction of a Shuttle Plasmid**, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70. 5853–5858, 2004.
- Kastelic, S1. Berčić, R.L., Cizelj, I., Benčina, M., Makrai, L., Zorman-Rojs, O., Narat, M., Bisgaard, M., Christensen, H., Benčina, D.: ***Ornithobacterium rhinotracheale* has neuraminidase activity causing desialylation of chicken and turkey serum and tracheal mucus glycoproteins**. *Vet. Microbiol.* 162. 707–712, 2013.
- Kattar, M.M., Chavez, J.F., Limaye, A.P., Rassoulian-Barrett, S.L. Yarfitz, S.L., Carlson, L.C., Houze, Y., Swanzy, S., Wood, B.L. Cookson, B.T.: **Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia**, *J. Clin. Microbiol.*, 38. 789–794, 2001.
- Kerstens, K., Hinz, K.-H., Hertle, A., Segers, P., Lievens, A., Siegmann, O., De Ley, J.: ***Bordetella avium* sp. nov., Isolated from the Respiratory Tracts of Turkeys and Other Birds**, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34. 56–70, 1984.
- Khayer, B.: ***Bordetella bronchiseptica* törzsek összehasonlító fenotípusos vizsgálata, különös tekintettel a baktérium virulencia tényezőire és gazdaadaptációjára**, PhD értekezés. Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Doktori Iskola, 2015.
- Kilic, A., Timurkaan, N., Ertas, H.B., Yilmaz F.: **Pathological examination and bacterial reisolation by culture and PCR of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in broiler chickens**, *Rev. Méd. Vét.*, 160. 140–144, 2009.
- Koga, Y., Zavaleta, A.I.: **Intraspecies genetic variability of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial birds in Peru**, *Avian Dis.*, 49. 108–111, 2005.
- Konkoly-Thege M., Lányi B.: **Az aerob és anaerob baktériumok azonosítására használatos leggyakoribb vizsgálatok**. In: *Klinikai és járványügyi bakteriológia*. Szerk.: Czirák É.; Budapest: Melania Kft., 1999. p. 150–187.
- Lane, D.J.: **16S/23S rRNA sequencing**, In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* Szerk.: Stackebrandt, E., Goodfellow, M., New York: Wiley, 1991. p. 115–175.
- Leroy-Sétrin, S., Flaujac, G., Thénaïsy, K., Chaslus-Dancla, E.: **Genetic diversity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from poultry in France**, *Lett. Appl. Microbiol.*, 26. 189–193, 1998.
- Lopes, V., Back, A., Shin, H.J., Halvorson, D.A., Nagaraja, K.V.: **Development, characterization, and preliminary evaluation of a temperature-sensitive mutant of *Ornithobacterium rhinotracheale* for potential use as a live vaccine in turkeys**, *Avian Dis.*, 46. 162–168, 2002.

- Lopes, V., Rajashekara, G., Back, A., Shaw, D.P., Halvorson, D.A., Nagaraja, K.V.: **Outer membrane proteins for serologic detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys**, Avian Dis., 44. 957–962, 2000.
- Lorenzo-Pajuelo, B., Villanueva, J. L., Rodriguez-Cuesta, J., Vergara-Irigaray, N., Bernabeu-Wittel, M., Garcia-Curiel, A., Martinez de Tehada, G.: **Cavitary pneumonia in an AIDS patient caused by an unusual *Bordetella bronchiseptica* variant producing reduced amounts of pertactin and other major antigens**, J. Clin. Microbiol., 40. 3146–3154, 2002.
- Luginbuhl, G.H., Cutter, D.L., Campodonico, G., Peace, J., Simmons, D.F.: **Plasmid DNA of virulent *Alcaligenes faecalis***, Am J Vet Res., 47. 619–621, 1986.
- Magyar T., Lax, A. J.: **Atrophic rhinitis**. In: Polymicrobial diseases. Szerk: Brogden, K. A., Guthmiller, J. M.; Washington: ASM International, 2002. p. 169–197.
- Malik, Y.S., Olsen, K., Kumar, K., Goyal, S.M.: ***In vitro* antibiotic resistance profiles of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from Minnesota turkeys during 1996–2002**, Avian Dis., 47. 588–593, 2003a.
- Malik, Y.S., Olsen, K., Chander, Y. and Goyal, S.M.: **Antimicrobial resistance in bacterial pathogens isolated from turkeys in Minnesota from 1998 to 2002**, Int. J. Appl. Res. Vet. Med. 1.506–511, 2003b.
- Malik, Y.S., Chander, Y., Gupta, S.C. and Goyal, S.M.: **A retrospective study on antimicrobial resistance in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Escherichia coli*, *Salmonella* species, and *Bordetella avium* from chickens in Minnesota**, J. Appl. Poult. Res. 14, 506–511, 2005.
- Marien, M., Decostere, A., Martel, A., Chiers, K., Froyman, R., Nauwynck, H.: **Synergy between avian pneumovirus and *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys**, Avian Pathol., 34. 204–211, 2005.
- Marien, M., Decostere, A., Nauwynck, H., Froyman, R., Devriese, L., Haesebrouck, F.: ***In vivo* selection of reduced enrofloxacin susceptibility in *Ornithobacterium rhinotracheale* and its resistance-related mutations in *gyrA***, Microbial Drug Resist., 12. 140–144, 2006.
- Markham, J. E, Scott, P.C. , Whithear, K. G.: **Field evaluation of the safety and efficacy of a temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine**, Avian Dis., 42. 682–689, 1998.
- Mattoo, S., Cherry, J. D.: **Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies**, Clin. Microbiol. Rev., 18.326–382, 2005.

- Meacham, K.J., Zhang, L., Foxman, B., Bauer, R.J., Marrs, C.F.: **Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR**, J Clin Microbiol., 41. 5224–5226, 2003.
- Mirzaie, S., Hassanzdeh, M., BozorgmehriFard, M.H., Banani, M.: **Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* in the commercial turkey, quail flocks and domestic pigeons by bacteriological and molecular methods**, Arch. Razi Inst., 66. 121–127, 2011.
- Mohd-Zain, Z., Lin Jee, T., Jusoff, K.: **Phenotypic characteristics, antibiotic susceptibility and pathogenicity of *Ornithobacterium rhinotracheale***, WSEAS Transact. Biol. and Biomed., 7. 133–142, 2008.
- Moreno, B., Chacón, G. Villa, A., Fernández, A., Vela, A.I., Fernández-Garayzábal, J.F., Ferré, S., Gracia, E.: **Nervous signs associated with otitis and cranial osteomyelitis and with *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in red legged partridges (*Alectoris rufa*)**, Avian Pathol., 38. 341–347, 2009.
- Mortensen, J.E., Brumbach, A., Shryock, T.R.: **Antimicrobial susceptibility of *Bordetella avium* and *Bordetella bronchiseptica* isolates**, Antimicrob. Agents Chemother. 33. 771-772, 1989.
- Murthy, T.R.K.G., Dorairajan, N., Balasubramaniam, G.A., Dinakaran, A.M., Kalaimathi, R.: **The effect of vaccination of pullets against *Ornithobacterium rhinotracheale* infection**, Avian Pathol., 36. 481–485, 2007.
- Murthy, T.R.K.G., Dorairajan, N., Balasubramaniam, G.A., Dinakaran, A.M., Saravanabava K.: ***In vitro* antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from laying hens in India**, Vet. Arh., 78. 49–56, 2008a.
- Murthy, T.R.K.G., Dorairajan, N., Balasubramaniam, G.A., Dinakaran, A.M., Saravanabava, K.: **Pathogenic bacteria related to respiratory diseases in poultry with reference to *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated in India**, Veterinarski Archiv, 78. 131–140, 2008b.
- Neighbor, N.K., Skeeles, J.K., Beasley, J.N. Kreider, D.L.: **Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure antibody levels in turkey breeder hens, eggs, and progeny following natural infection or immunization with a commercial *Bordetella avium* bacterin**, Avian Dis., 35. 315–320, 1991.
- Numee, S., Hauck, R., Hafez, H.M.: **Detection and typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* from German poultry flocks**, Avian Dis., 56. 654–658, 2012.
- Odugbo, M. O., Musa, U., Ekundayo, S.O., Okewole, P.A., Esilonu, J.: ***Bordetella avium* infection in chickens and quail in Nigeria: Preliminary investigations**, Vet. Res. Commun., 30. 1–5, 2006.

- Olive, B.M., Bean, P.: **Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms**, J. Clin. Microbiol., 37. 1661–1669, 1999.
- Ozbey, G., Ertas, H.B., Muz, A.: **Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from chickens in Turkey**, Vet. Med. – Czech, 50.526–530, 2005.
- Ozbey, G., Ongor, H., Balik, D.T., Celik, V., Kilic, A., Muz, A.: **Investigations on *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in Elazig province located in the East of Turkey**, Vet. Med. – Czech, 49.305–311, 2004.
- Pavel, A.B., Vasile, C.I.: **PyElph – a software tool for gel images analysis and phylogenetics**, BMC Bioinformatics, 13. 1, 2012.
- Raffel, T.R., Register, K.B., Marks, S.A., Temple, L.: **Prevalence of *Bordetella avium* infection in selected wild and domesticated birds in the eastern USA**, J. Wildl. Dis., 38.40–46, 2002.
- Register, K.B., Sacco, R.E., Nordholm, G.E.: **Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis for inter and intraspecies discrimination of *Bordetella avium* and *Bordetella hinzii***, J. Clin. Microbiol., 41. 1512–1519, 2003.
- Register, K.B., Yersin, G.: **Analytical Verification of a PCR Assay for Identification of *Bordetella avium***, J. Clin. Microbiol., 43. 5567–5573, 2005.
- Rimler, R.B., Simmons, D.G.: **Differentiation among bacteria isolated from turkeys with coryza (rhinotracheitis)**, Avian Dis., 27. 491–500, 1983.
- Ryll, M., Hinz, K-H., Salisch, H., Kruse, W.: **Pathogenicity of *Ornithobacterium rhinotracheale* for turkey poults under experimental conditions**, Vet. Rec., 139.19, 1996.
- Sacchi, C.T., Whitney, A.M., Mayer, L.W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R.S., Popovic, T.: **Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis***, Emerg. Infect. Dis., 8.1117–1123, 2002a.
- Sacchi, C. T., Whitney, A.M., Reeves, M.W., Mayer, L.W., Popovic, T.: **Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool**, J. Clin. Microbiol., 40. 4520–4527, 2002b
- Sacco, R.E., Register, K.B. Nordholm, G.E.: **Restriction enzyme analysis and ribotyping distinguish *Bordetella avium* and *Bordetella hinzii* isolates**, Epidemiol Infect., 124. 83–90, 2000.
- Saitou, N., Nei, M.: **The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**, Mol. Biol. Evol., 4. 406-425, 1987.
- Schuijffel, D.F., van Empel, P.C.M., Pennings, A.M.M.A., van Putten, J.P.M., Nuijten, P.J.M.: **Successful selection of cross-protective vaccine candidates for *Ornithobacterium rhinotracheale* infection**, Infect. Immun., 73.6812–6821, 2005.

- Schuijffel, D.F., Van Empel, P.C.M., Segers, R.P.A.M., Van Putten, J.P.M, Nuijten, P.J.M.: **Vaccine potential of recombinant *Ornithobacterium rhinotracheale* antigens**, *Vaccine*, 24. 1858–1867, 2006.
- Sebahia, M., Preston, A., Maskell, D.J., Kuzmiak, H., Connell, T.D., King, N. D., Orndorff, P.E., Miyamoto, D.M., Thomson, N.R., Harris, D., Goble, A., Lord, A., Murphy, L., Quail, M.A., Rutter, S., Squares, R., Squares, S., Woodward, J., Parkhill, J., Temple, L.M.: **Comparison of the genome sequence of the poultry pathogen *Bordetella avium* with those of *B. bronchiseptica*, *B. pertussis*, and *B. parapertussis* reveals extensive diversity in surface structures associated with host interaction**. *J. Bacteriol.*, 188. 6002–6015, 2006.
- Seifi, S.: **Seroprevalence and isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in Mazandaran province, North of Iran**, *Bulg. J. Vet. Med.*, 15.184–190, 2012.
- Siddique, M., Zia, T., Rehman, S.U.: **Outbreak of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) infection in chickens in Pakistan**, *Arch. Geflügelk.*, 72. 202–206, 2008.
- Slavik, M.F., Skeeles, J.K., Meinecke, C.F., Holloway, L.: **The involvement of *Alcaligenes faecalis* in turkeys submitted for diagnosis as detected by bacterial isolation and microagglutination test**, *Avian Dis.*, 25. 761–763, 1981.
- Soriano, V.E., Longinos, M.G., Navarrete, P.G., Fernandez, R.P.: **Identification and Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* Isolates from Mexico**, *Avian Dis.*, 46. 686–690, 2002.
- Soriano, V.E., Vera, N.A., Salado, C.R., Fernández, R.P., Blackall, P.J.: ***In vitro* susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs**, *Avian Dis.*, 47. 476–480, 2003.
- Soong, G., Muir, A., Gomez, M.I., Waks, J., Reddy, B., Planet, P., Singh, P.K., Kaneko, Y., Wolfgang, M.C., Hsiao, Y.S., Tong, L., Prince, A.: **Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production**, *J. Clin. Invest.*, 116. 2297–2305, 2006.
- Spears, P.A., Temple, L.M., Orndorff, P.E.: **A role for lipopolysaccharide in turkey tracheal colonization by *Bordetella avium* as demonstrated in vivo and in vitro**, *Mol Microbiol.* 36. 1425–1435, 2000.
- Spears, P.A., Temple, L.M., Miyamoto, D.M., Maskell, D.J., Orndorff P.E.: **Unexpected similarities between *Bordetella avium* and other pathogenic *Bordetellae***, *Infect. Immun.* 71.2091–2097, 2003.
- Sprenger S.J., Back, A., Shaw, D.P., Nagaraja, K.V., Roepke, D.C., Halvorson, D.A.: ***Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys: experimental reproduction of the disease**, *Avian Dis.*, 42. 154–161, 1998.

- Sprenger, S.J., Halvorson, D.A., Shaw, D.P., Nagaraja, K.V.: ***Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys: immunoprophylaxis studies**, Avian Dis., 44. 549–555, 2000.
- Szalay F., Glávits R.: **Clinical signs and mortality caused by *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkey flocks**, Acta Vet. Hung. 50.297–305, 2002.
- Tabatabai, L.B., Zimmerli, M.M., Zehr, E.S., Briggs, R.E., Tatum, F.M.: ***Ornithobacterium rhinotracheale* North American field isolates express a hemolysin-like protein**, Avian Dis. 54. 994–1001, 2010.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S.: **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.**, Mol. Biol. Evol., 30. 2725–2729, 2013.
- Tanyi J., Bistyák A., Kaszanyitzky É., Vetési F., Dobos-Kovács M.: ***Ornithobacterium rhinotracheale* izolálása légzőszervi megbetegedést mutató tyúkokból és pulykákból**, Előzetes közlemény. Magy. Állatorv. Lapja, 50. 328–330, 1995.
- Temple, L.M., Weiss, A.A., Walker, K.E., Barnes, H.J., Christensen, V.L., Miyamoto, D.M., Shelton, C.B., Orndorff, P.E.: ***Bordetella avium* virulence measured in vivo and in vitro**, Infect. Immun., 66. 5244–5251, 1998.
- Temple, L.M., Miyamoto, D.M., Mehta, M., Capitini, C.M., Von Stetina, S., Barnes, H.J., Christensen, V.L., Horton, J.R., Spears, P.A., Orndorff, P.E.: **Identification and characterization of two *Bordetella avium* gene products required for hemagglutination**, Infect. Immun., 78. 2370–2376, 2010.
- Thachil, A.J., Velayudhan, B.T., Lopes-Berkas, V.C., Halvorson, D.A., Nagaraja, K.V.: **Application of polymerase chain reaction fingerprinting to differentiate *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates**, J. Vet. Diagn. Invest., 19. 417–420, 2007.
- Thachil, A.J., Velayudhan, B.T., Shaw, D.P., Halvorson, D.A., Nagaraja, K.V.: **Pathogenesis of *Ornithobacterium rhinotracheale* in egg-laying hens with coexisting infectious bronchitis virus and *Escherichia coli* infections**, J. Appl. Poult. Res., 18. 780–788, 2009.
- Thieme, S., Mühldorfer, K., Lüscho, D., Hafez, H.M.: **Molecular characterization of the recently emerged poultry pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by Multilocus Sequence Typing**, PLoS ONE, 11. e0148158, 2016a.
- Thieme, S., Hafez, H.M., Gutzer, S., Warkentin, N., Lüscho, D., Mühldorfer, K.: **Multilocus sequence typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from pigeons and birds of prey revealed new insights into its population structure**, Vet. Anim. Sci., 1-2. 15-20, 2016b.
- Travers, A.F., Coetzee, L., Gummow, B.: **Pathogenicity differences between South African isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale***, Onderstepoort J. Vet. Res., 63. 197–207, 1996.

- Tsai, H.J., Huang, C.W.: **Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens and pigeons in Taiwan**, Avian Dis., 50. 502–507, 2006.
- Vandamme, P., Segers, P., Vancanneyt, M., Van Hove, K., Mutters, R., Hommez, J., Dewhirst, F., Paster, B., Kersters, K., Falsen, E., Devriese, L. A., Bisgaard, M., Hinz, K.-H., Mannheim, W.: ***Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov. isolated from the avian respiratory tract**, Int. J. Syst. Bacteriol., 44. 24–37, 1994.
- Vandamme, P., Heyndrickx, M., Vancanneyt, M., Hoste, B., de Vos, P., Falsen, E., Kersters, K., Hinz, K. H.: ***Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* R uger and Tan 1983**, Int. J. Syst. Bacteriol., 46. 849–858, 1996.
- van Empel, P.C.M., Van Den Bosch, H., Goovaerts, D., Storm, P.: **Experimental infection in turkeys and chickens with *Ornithobacterium rhinotracheale***, Avian Dis., 40. 858–864, 1996.
- van Empel, P.C.M., van der Bosch, H., Loeffen, P., Storm, P.: **Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale***, J. Clin. Microbiol. 35. 418–421, 1997.
- van Empel, P.C.M., Hafez, H.M.: ***Ornithobacterium rhinotracheale*: a review**, Avian Pathol., 28. 217–227, 1999.
- van Veen, L., van Empel, P.C.M., Fabri, T.: ***Ornithobacterium rhinotracheale*, a primary pathogen in Broilers**, Avian Dis., 44. 896–900, 2000.
- van Veen, L., Hartman, E., Fabri, T.: ***In vitro* antibiotic sensitivity of strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated in the Netherlands between 1996 and 1999**, Vet. Rec., 149.611–613, 2001.
- Varga, J., Fodor, L., Makrai, L.: **Biochemical characteristics, antibiotic susceptibility of some *Ornithobacterium rhinotracheale* strains and their transmission via eggs**, Acta Vet. Hung., 49.125–130, 2001.
- Vassart, G., Georges, M., Monsieur, R., Brocas, H., Lequarre, A.S., Christophe, D.: **A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA**. Science, 235.683–684, 1987.
- Vega, V., Zepeda, A., Ramirez, S., Morales, V., Fernandez, P., Montes de Oca, R., Guerra-Infante, F. M., de Jesus de Haro-Cruz, M., Blackall, P.J., Soriano, E.V.: **Hemagglutinating activity of serovar reference strains of *Ornithobacterium rhinotracheale***, J. Vet. Diagn. Invest., 20. 353–355, 2008.
- 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. 6823–6831, 1991.

- von Wintzingerode, F., Schattke, A., Siddiqui, R. A., Rösick, U., Göbel, U. B., Gross, R.:
Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and embedded description of the genus *Bordetella, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51. 1257–1265, 2001.
- Waldow, K.: **Untersuchungen zur embryoletalität, genotypisierung und resistenzlage aktueller *Ornithobacterium rhinotracheale*-isolate**, Phd thesis. Freie Universität Berlin, Németország. 2009.
- Walters, J., Evans, R., LeRoith, T., Sriranganathan, N., McElroy, A., Pierson, F.W.:
Experimental comparison of hemolytic and nonhemolytic *Ornithobacterium rhinotracheale* field isolates in vivo, Avian Dis., 58. 78–82, 2014.

9. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

9.1. Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Szabó R., Magyar T.: **A baromfi *Ornithobacterium rhinotracheale* okozta megbetegedése.**

Irodalmi áttekintés, Magyar Állatorv. Lapja, 136. 589–597, 2014.

IF: 0,185

Szabó R., Wehmann E., Magyar T.: **Antimicrobial susceptibility of *Bordetella avium* and *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from wild and domesticated birds in Hungary**, Acta Vet. Hung. 63. 413–424, 2015.

IF: 0,646

Szabó R., Wehmann E., Makrai L., Nemes Cs., Gyuris É., Thuma Á., Magyar T.: **Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* field isolates from Hungary**, Avian Pathol. DOI: 10.1080/03079457.2017.1321104.

IF: 1,336

9.2. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó publikációk

Gyuranecz M., Dénes B., Hornok S., Kovács P., Horváth G., Jurkovich V., Varga T., Hajtós I., Szabó R., Magyar T., Vass N., Hofmann-Lehmann R., Erdélyi K., Bhide M., Dán Á.: **Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hungary: screening of dairy cows, sheep, commercial milk samples, and ticks**, Vector Borne Zoonotic Dis., 12. 650–653, 2012.

IF: 2,277

9.3. Konferencia prezentációk

Gyuris É., Szabó R., Wehmann E., Magyar T.: Antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* and *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from wild and domesticated birds in Hungary (poszter) [Konferencia absztraktfüzet p. 45.] International Pasteurellaceae Conference 2014. Prato, 2014.05.13–16.

Szabó R., Gyuris É., Wehmann E., Magyar T.: Antimicrobial susceptibility of *Bordetella avium*, *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Riemerella anatipestifer* strains from wild and domesticated birds in Hungary (poszter) [Konferencia absztraktfüzet p. 27.] Med-Vet-Net Association International Scientific Conference. Lyngby, 2013.06.24–25.

Szabó R., Gyuris É., Wehmann E., Magyar T.: Hazai baromfifajokból és vadmadarakból izolált *Bordetella avium*, *Ornithobacterium rhinotracheale* és *Riemerella anatipestifer* törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata (poszter) [Szerk.: Janda T., ISBN:978-963-8351-41-8, p. 251–253.] II. ATK Tudományos Nap, Velünk élő tudomány. Martonvásár, 2013.11.08.

Szabó R., Wehmann E., Magyar T.: Isolation and characterisation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from wild and domesticated birds in Hungary (előadás) [Acta Microbiol. Imm. Hung. Supplement 58:219, p. 219–220.] 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, 2011.07.20–22.

9.4. Akadémiai beszámolók

Szabó R., Wehmann E., Magyar T.: *Ornithobacterium rhinotracheale* törzsek jellemzése. Budapest, 2016. 01. 24.

Szabó R., Wehmann E., Magyar T.: *Ornithobacterium rhinotracheale* törzsek jellemzése genotipizáló PCR módszerekkel. Budapest, 2016. 01. 26.

Szabó R., Magyar T.: Hazai baromfifajokból és vadmadaraktól izolált *Bordetella avium* és *Ornithobacterium rhinotracheale* törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata. Budapest, 2015. 01. 27.

Szabó R., Wehmann E., Magyar T.: *Ornithobacterium rhinotracheale* törzsek izolálása és jellemzése. Budapest, 2011. 01. 25.

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Magyar Tibornak, az MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézete igazgatójának, aki lehetővé tette, hogy az általa vezetett Légzőszervi bakteriológia témacsoportban végezhessem a disszertációmmal kapcsolatos kutatómunkát, és biztosította ennek feltételeit. Köszönöm, hogy nagy tapasztalattal és szakértelemmel irányította a kutatás menetét, és segítette a publikációk megjelenését.

Köszönöm Dr. Wehmann Enikőnek a rengeteg, a különböző módszerek elméletével, kivitelezésével és értékelésével kapcsolatos önzetlen segítséget és tanácsot, Hegedűs Évának pedig azt, hogy széleskörű gyakorlati tapasztalatait és tudását megosztotta velem. Köszönet illeti Schihlgruberné Oryszcsák Katalint és Ujvári Barbarát, hogy elméleti és gyakorlati kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Ez úton szeretném megköszönni Gyuris Évának, Thuma Ákosnak, Nemes Csabának, Makrai Lászlónak és Német Zoltánnak, hogy a munkám során felhasznált baktériumtörzseket és véreket rendelkezésemre bocsátották.

Köszönet illeti a témacsoportunkban szakdolgozatukat elkészítő állatorvostan-hallgatókat, Horváth Annát, Wilfing Juditot és Zagyai Ildikót, hogy munkájukkal hozzájárultak eredményeinkhez.

11. Mellékletek

M1.táblázat: Az *O. rhinotracheale* törzsek és a velük végzett vizsgálatok jellemzői

Azonosító	Izolálás					biokém.	fajaz. PCR	hemagglutináció	növm. körülm.	hemo-lízis	antib. rez.	MIC	plazmid lz.	ERIC	M13	OPG11	OPH19	16S rRNS szekv	szerotípus
	Állatfaj	Szerv	ideje	helye	tartásmód														
B3263/91	háziyúk	°	1991.	Dél-Afrika	°	✓	+	✓	✓	-	✓	x	✓	10	1	5	1	✓	A*
GGD 1261	pulyka	°	1991.	Németország	°	✓	+	✓	✓	+	✓	x	✓	1	7	6	1	✓	B*
K91-201	háziyúk	°	1991.	USA	°	✓	+	✓	✓	-	✓	x	✓	11	8	7	5	✓	C*
ORV 94108 nr.2	pulyka	°	1994.	Franciaország	°	✓	+	✓	✓	+	✓	x	✓	12	9	8	6	✓	D*
O-95029 nr.12229	háziyúk	°	1995.	Franciaország	°	✓	+	✓	✓	+	✓	x	✓	13	10	8	6	✓	E*
OR001	pulyka	ízület	2001.	Békéscsaba	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	+	x	x	✓	3	1	1	2	✓	A
OR002	pulyka	tüdő	2001.	°	°	✓	+	✓	✓	+	x	x	✓	2	1	1	2	✓	A
OR004	pulyka	tüdő	2009.	Iván	háztáji	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	2	1	1	1	✓	A
OR005	pulyka	légcső	2009.	Lövő	háztáji	✓	+	✓	✓	-	✓	✓	✓	1	1	2	1	✓	A
OR006	pulyka	légcső	2009.	Lövő	háztáji	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	2	1	1	1	✓	A
OR007	háziyúk	coana	2009.	Szerencs	háztáji	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	5	4	1	4	✓	D (C)
OR008	pulyka	tüdő	2010.	Ikervár	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	✓	✓	✓	1	1	1	1	✓	A
OR009	pulyka	légcső	2010.	Szarvas	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	2	1	1	2	✓	D
OR010	pulyka	légcső	2010.	Szarvas	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	1	1	1	1	✓	A (B)
OR011	pulyka	légcső	2010.	Szarvas	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	✓	✓	✓	1	1	1	1	x	A (B)
OR012	pulyka	légcső	2010.	Szarvas	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	✓	✓	✓	1	1	1	1	x	A (B)
OR034	pulyka	°	1995.	°	°	✓	+	✓	x	-	x	x	x	x	x	x	x	x	A
OR035	pulyka	tüdő	1997.	Békéscsaba	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	x	x	✓	3	5	1	1	✓	A
OR036	pulyka	tüdő	1997.	Békéscsaba	nagyüzemi	✓	+	✓	x	-	x	x	x	x	x	x	x	x	A
OR037	pulyka	koponya	2001.	Kaposvár	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	3	1	1	2	✓	A
OR038	pulyka	koponya	2001.	Kaposvár	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	+	x	x	x	3	1	1	2	x	A

M1.táblázat: Az *O. rhinotracheale* törzsek és a velük végzett vizsgálatok jellemzői (folytatás)

Azonosító	Állatfaj	Szerv	Izolálás ideje	Izolálás helye	Izolálás tartásmód	biokém.	fajaz. PCR	hemagg-lutináció	növ. körülm.	hemo-lízis	antib. rez.	MIC	plazmid lz.	ERIC	M13	OPG11	OPH19	16S rRNS szekv.	szerotípus
OR039	pulyka	koponya	2001.	Kaposvár	nagyüzemi	✓	+	✓	x	+	✓	x	x	x	x	x	x	x	A
OR040	pulyka	°	2001.	Szombathely	nagyüzemi	✓	+	✓	x	+	x	x	x	x	x	x	x	x	A
OR041	pulyka	°	2001.	Szombathely	nagyüzemi	✓	+	✓	x	+	x	x	x	x	x	x	x	x	A
OR042	pulyka	°	2001.	Szombathely	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	✓	✓	✓	3	6	4	2	✓	A
OR043	pulyka	°	2001.	Szombathely	nagyüzemi	✓	+	✓	x	+	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	A
OR044	pulyka	°	2001.	Szombathely	nagyüzemi	✓	+	✓	x	+	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	A
OR045	pulyka	°	2001.	Szombathely	nagyüzemi	✓	+	✓	x	+	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	A
OR046	háziyúk	kötőhártya	2010.	°		✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	1	1	1	1	✓	A
OR047	galamb	légcső	2010.	Legyesbénye	háztáji	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	6	1	1	1	✓	D
OR048	galamb	légcső	2010.	Legyesbénye	háztáji	✓	+	✓	x	+	✓	✓	✓	6	1	1	1	x	D
OR049	héja	légcső	2011.	Budapest	vadon élő	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	1	1	1	1	✓	A
OR050	háziyúk	légcső	2011.	Pest megye	háztáji	✓	+	✓	x	+	✓	✓	✓	4	3	3	4	✓	NT
OR051	háziyúk	légcső	2011.	Pest megye	háztáji	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	4	3	3	4	x	NT
OR052	pulyka	tüdő	2011.	Szarvas	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	✓	✓	✓	1	1	2	1	✓	A
OR053	pulyka	légcső	2011.	Csabacsüd	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	✓	✓	✓	2	1	2	2	✓	A
OR054	pulyka	légcső	2011.	Csabacsüd	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	✓	✓	✓	1	1	1	1	✓	A
OR055	pulyka	légcső	2011.	Csabacsüd	nagyüzemi	✓	+	✓	x	-	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	A
OR056	pulyka	légcső	2011.	Csabacsüd	nagyüzemi	✓	+	✓	x	-	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	A
OR057	karvaly	légcső	2011.	Budapest	vadon élő	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	1	1	1	1	✓	A (D)
OR058	pulyka	légcső	2011.	Ács	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	2	2	2	1	✓	A
OR059	pulyka	légcső	2012.	Rum	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	2	1	1	1	✓	A
OR060	pulyka	légcső	2012.	Szarvas	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	1	1	1	1	✓	A (B)
OR061	pulyka	légcső	2012.	Iván	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	7	1	1	1	✓	A
OR062	pulyka	légcső	2012.	Hunya	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	1	1	1	1	✓	A (B)
OR063	háziyúk	légcső	2013.	Tápiószecső	háztáji	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	8	1	2	3	✓	D (C)
OR064	háziyúk	légcső	2013.	Gyöngyóshalász	háztáji	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	9	1	2	2	✓	A
OR065	pulyka	tüdő	2014.	Nagygereszsd	nagyüzemi	✓	+	✓	x	-	✓	✓	✓	1	1	1	1	✓	A
OR066	pulyka	tüdő	2015.	Feketebézsény	nagyüzemi	✓	+	✓	x	+	✓	✓	✓	1	1	2	1	✓	A
OR067	pulyka	tüdő	2015.	Somogyzsitfa	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	+	✓	✓	✓	2	1	2	2	✓	A
OR068	pulyka	tüdő	2015.	Mágocs	nagyüzemi	✓	+	✓	x	+	✓	x	✓	1	1	2	2	✓	A
OR069	pulyka	tüdő	2015.	Kálmánca	nagyüzemi	✓	+	✓	x	+	✓	x	x	1	1	1	2	✓	A
OR070	pulyka	tüdő	2015.	Mike	nagyüzemi	✓	+	✓	x	+/-	✓	x	✓	1	1	1	1	✓	A

M1. táblázat: Az *O. rhinotracheale* törzsek és a velük végzett vizsgálatok jellemzői (folytatás)

Azonosító	Iszolálás		ideje	helye	tartásmód	biokém.	fajaz. PCR	hemagg-lutináció	növé. körülm.	hemo-lízis	antib. rez.	MIC	plazmid lz.	ERIC	M13	OPG11	OPH19	16S rRNS szekv.	szerotípus
	Állatfaj	Szerv																	
OR071	pulyka	tüdő	2015.	Kálmánca	nagyüzemi	✓	+	✓	x	+	✓	x	✓	1	1	1	1	x	A
OR077	pulyka	koponya	2015.	Sármellék	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	+	✓	x	✓	1	1	2	1	✓	A
OR078	pulyka	°	2015.	Kaposvár	nagyüzemi	✓	+	✓	x	-	x	x	✓	1	1	2	1	x	A
OR079	pulyka	légzsák	2015.	Mágocs	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	✓	x	✓	1	1	2	1	✓	A
OR080	pulyka	tüdő	2015.	Egeracsa	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	✓	x	✓	1	2	2	1	✓	A
OR081	pulyka	tüdő	2015.	Mágocs	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	x	x	x	1	1	1	1	x	A
OR082	pulyka	orr nyh	2015.	Szentimrefalva	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	✓	x	✓	1	1	1	1	✓	B
OR083	pulyka	sinus	2015.	Szentimrefalva	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	x	x	x	1	1	1	1	x	B
OR084	pulyka	sinus	2015.	Szentimrefalva	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	x	x	x	1	1	1	1	x	NT
OR085	pulyka	tüdő	2015.	Kaposvár	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	x	x	x	1	1	1	1	x	A
OR086	pulyka	sinus	2015.	Kaposvár	nagyüzemi	✓	+	✓	✓	-	x	x	x	1	1	1	1	x	A

°:nincs ismert adat; +: pozitív eredmény; -: negatív eredmény; ✓: a vizsgálatot elvégeztük az adott törzssel; x: a vizsgálatot nem végeztük el az adott törzssel; *: az adott szerotípus típusa; NT: nem tipizálható

M2. táblázat: A *B. avium* törzsek és a velük vézett vizsgálatok jellemzői

Azonosító	Izolálás		ideje	helye	biokémia	fajazonosító PCR	növekedés körülmények	hemagg- lutináció	antibiotikum rezisztencia	MIC	plazmid izolálás	16S rRNS szekvenálás	MLST
	Állatfaj	Szerv											
Ba01	pulyka	légcső	2012.	Kiskunfélegyháza	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ba02	pulyka	légcső	2012.	Szarvas	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	x	x
Ba03	pulyka	légcső	2012.	Szarvas	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	x	x
Ba04	pulyka	légcső	2012.	Szarvas	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	x	x
Ba05	pulyka	légcső	2012.	Szarvas	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	x	x
Ba06	pulyka	légcső	2012.	Szarvas	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	x	x
Ba07	pulyka	légcső	2012.	Szarvas	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ba08	pulyka	légcső	2004.	°	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ba09	fogoly	°	1985.	NSZK	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ba10	°	°	1985.	NSZK	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	x	x
Ba11	pulyka	°	1985.	NSZK	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x
Ba12	pulyka	°	1985.	NSZK	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	x	x
Ba13	kacsa	°	1985.	NSZK	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ba14	liba	°	1985.	NSZK	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ba15	csirke	tüdő	2011.	Darány	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ba16	pulyka	légcső	2012.	Kiskunmajsa	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ba17	pulyka	tüdő	2012.	°	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x
Ba18	csirke	ormelléküreg	2014.	Jászberény	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ba19	pulyka	ormelléküreg	2013.	Császártöltés	✓	+	✓	✓	✓	✓	✓	x	x

°:nincs ismert adat; +: pozitív eredmény, -: negatív eredmény; ✓: a vizsgálatot elvégeztük az adott törzssel; x: a vizsgálatot nem végeztük el az adott törzssel

M3. táblázat: Az *O. rhinotracheale* törzsek biokémiai tulajdonságai

Azonosító	Biokémiai teszt										
	Indol	Nitrát	Urea	Glükóz	Laktóz	Szacharóz	Arabinóz	Dulcit	Maltóz	Szorbit	Galaktóz
OR001	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
OR002	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
OR004	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
OR005	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
OR006	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
OR007	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
OR008	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
OR009	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
OR010	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
OR011	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
OR012	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
OR034	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
OR035	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
OR036	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
OR037	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
OR038	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
OR039	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
OR040	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
OR041	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
OR042	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
OR043	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
OR044	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
OR045	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
OR046	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
OR047	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
OR048	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
OR049	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
OR050	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
OR051	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
OR052	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
OR053	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
OR054	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

M3. táblázat: Az *O. rhinotracheale* törzsek biokémiai tulajdonságai (folytatás)

Azonosító	Biokémiai teszt										
	Indol	Nitrát	Urea	Glükóz	Laktóz	Szacharóz	Arabinóz	Dulcít	Maltóz	Szorbit	Galaktóz
OR055	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
OR056	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
OR057	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
OR058	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
OR059	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
OR060	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
OR061	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
OR062	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
OR063	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
OR064	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
OR065	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
OR066	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
OR067	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
OR068	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
OR069	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
OR070	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
OR071	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
OR077	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
OR078	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
OR079	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
OR080	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
OR081	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
OR082	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
OR083	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
OR084	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
OR085	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
OR086	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B3263/91	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
GGD 1261	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
K91-201	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

M3. táblázat: Az *O. rhinotracheale* törzsek biokémiai tulajdonságai (folytatás)

Azonosító	Biokémiai teszt										
	Indol	Nitrát	Urea	Glükóz	Laktóz	Szacharóz	Arabinóz	Dulcit	Maltóz	Szorbit	Galaktóz
ORV 94108 nr.2	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
O-95029 nr.12229	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

M4. táblázat: Az *O. rhinotracheale* és *B. avium* törzsek növekedését vizsgáló tesztek eredményei

Azonosító	31 °C				41 °C				37 °C			
	Col + V	Col	TSA + V	TSA	Col + V	Col	TSA + V	TSA	Col + V	Col	TSA + V	TSA
Ba001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba004	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba005	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba006	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba007	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba011	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba012	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba013	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba015	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba016	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba017	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba018	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ba019	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OR001	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR002	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR004	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR005	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
OR006	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
OR007	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR008	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR009	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR010	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR011	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR012	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR035	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+

M4. táblázat: Az *O. rhinotracheale* és *B. avium* törzsek növekedését vizsgáló tesztek eredményei (folytatás)

Azonosító	31 °C				41 °C				37 °C			
	Col + V	Col	TSA + V	TSA	Col + V	Col	TSA + V	TSA	Col + V	Col	TSA + V	TSA
OR037	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR038	+	-	-	-	+	-	+		+	+	+	+
OR042	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR046	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR047	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR049	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR051	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR052	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
OR053	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
OR054	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR057	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR058	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
OR059	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
OR060	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
OR061	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
OR062	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR063	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR064	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
OR067	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR077	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
OR079	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR080	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR081	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR082	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR083	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR084	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR085	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OR086	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
B3263/91	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
GGD 1261	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+

M4. táblázat: Az *O. rhinotracheale* és *B. avium* törzsek növekedését vizsgáló tesztek eredményei (folytatás)

Azonosító	31 °C				41 °C				37 °C			
	Col + V	Col	TSA + V	TSA	Col + V	Col	TSA + V	TSA	Col + V	Col	TSA + V	TSA
K91-201	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
ORV 94108 nr.2	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
O-95029 nr.12229	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+

M5. táblázat: Az *O. rhinotracheale* és *B. avium* törzsek hemagglutinációs képességét vizsgáló tesztek eredményei

Azonosító	A hemagglutinációs vizsgálatokhoz felhasznált vértípusok					
	ló	juh	szm	házityúk	kacsa	nyúl
Ba01	2	1	0	3	1	0
Ba02	1	1	1	1	1	0
Ba03	1	1	1	1	1	0
Ba04	2	1	0	2	1	0
Ba05	1	0	1	1	1	0
Ba06	1	1	1	1	1	0
Ba07	1	1	0	2	1	0
Ba08	1	1	0	2	1	0
Ba09	2	1	1	2	2	0
Ba10	0	1	0	1	1	0
Ba11	1	1	1	0	0	0
Ba12	0	1	0	1	1	0
Ba13	1	1	0	1	3	0
Ba14	0	0	1	1	1	0
Ba15	2	0	1	1	2	0
Ba16	1	1	1	0	1	0
Ba17	0	0	0	1	1	0
Ba18	1	1	1	2	1	0
Ba19	1	1	0	2	1	0
OR001	0	0	0	0	0	0
OR002	0	0	0	0	0	0
OR004	0	0	0	0	0	0
OR005	0	0	0	0	0	0
OR006	0	0	0	0	0	0
OR007	0	0	0	0	0	0
OR008	0	0	0	0	0	0
OR009	0	0	0	0	1	1
OR010	0	0	0	0	0	0
OR011	0	0	0	0	0	0
OR012	0	0	0	0	0	1
OR034	0	0	0	0	0	0
OR035	0	0	0	0	0	0
OR036	0	0	0	0	0	0
OR037	0	0	0	0	0	0
OR038	0	0	0	1	1	0
OR039	0	0	0	1	1	0
OR040	0	0	0	0	0	0
OR041	0	0	0	0	0	0
OR042	0	0	0	0	0	0
OR043	0	0	0	0	0	0
OR044	0	0	0	0	0	0
OR045	0	0	0	0	0	0
OR046	0	0	0	0	0	0
OR047	0	0	0	0	0	0
OR048	0	0	0	0	0	0
OR049	0	0	0	0	0	0
OR050	0	0	0	0	0	0
OR051	0	0	0	0	0	0
OR052	0	0	0	0	0	0
OR053	0	0	0	0	0	0

M5. táblázat: Az *O. rhinotracheale* és *B. avium* törzsek hemagglutinációs képességét vizsgáló tesztek eredményei (folytatás)

Azonosító	A hemagglutinációs vizsgálatokhoz felhasznált vértípusok					
	ló	juh	szm	házityúk	kacsa	nyúl
OR054	0	0	0	0	0	0
OR055	0	0	0	0	0	0
OR056	0	0	0	0	0	0
OR057	0	0	0	0	0	0
OR058	0	0	0	0	0	0
OR059	0	0	0	0	0	0
OR060	0	0	0	0	0	0
OR061	0	0	0	0	0	1
OR062	0	0	0	0	0	0
OR063	0	0	0	0	1	0
OR064	0	0	0	0	0	0
OR065	0	0	0	0	0	0
OR066	0	0	0	0	0	0
OR067	0	0	0	1	1	1
OR068	0	0	0	0	0	0
OR069	0	0	0	0	0	0
OR070	0	0	0	0	0	0
OR071	0	0	0	0	0	0
OR077	0	0	0	0	1	0
OR078	0	0	0	0	1	0
OR079	0	0	0	0	1	0
OR080	0	0	0	0	0	0
OR081	0	0	0	0	0	0
OR082	0	0	0	0	0	0
OR083	0	0	0	0	0	0
OR084	0	0	0	0	0	0
OR085	0	0	0	0	0	0
OR086	0	0	0	0	0	0
B3263/91	0	0	0	0	0	1
GGD 1261	0	0	0	0	0	1
K91-201	0	0	0	0	0	1
ORV 94108 nr.2	0	0	0	2	2	1
O-95029 nr.12229	0	0	0	0	1	

M6. táblázat: Az *O. rhinotracheale* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának milliméter pontosságban megadott eredményei

jelölés	AX10	AMP	FUR30	CHL30	CPR5	DOX	ENO	ERY15	GEN10	L2	NAL30	T30	PEN10	POL	SPC100	SMX	TIL15	SXT25
É	≥ 24	≥ 24	≥ 21	≥ 18	≥ 21	≥ 16	≥ 23	≥ 23	≥ 15	≥ 14	≥ 19	≥ 19	≥ 24	≥ 12	≥ 17	≥ 17	≥ 14	≥ 16
M			18-20	13-17	16-20	13-15	17-22	14-22	13-14	11-13	14-18	15-18		9-11	16	13-16	11-13	11-15
R	≤ 23	≤ 23	≤ 17	≤ 12	≤ 15	≤ 12	≤ 16	≤ 13	≤ 12	≤ 10	≤ 13	≤ 14	≤ 23	≤ 8	≤ 15	≤ 12	≤ 10	≤ 10
OR004	16	16	10	28	25	14	23	10	0	10	10	17	18	10	30	14	25	0
OR005	30	32	31	31	28	17	24	8	0	0	8	20	24	0	30	8	33	0
OR006	30	33	29	28	23	15	22	20	0	15	8	25	24	10	27	18	28	0
OR007	30	30	30	30	30	30	30	30	0	30	30	30	30	10	30	9	30	10
OR008	19	21	8	32	17	12	21	0	0	0	0	19	20	0	28	0	26	0
OR009	16	15	8	35	21	10	24	0	0	0	0	14	10	0	25	20	25	0
OR010	17	16	9	35	20	12	22	0	0	0	0	18	11	0	30	18	25	12
OR011	28	30	8	35	18	18	22	0	8	0	0	16	10	0	27	23	33	14
OR012	16	13	8	29	20	15	23	0	0	0	0	16	15	0	34	23	32	0
Or037	30	30	30	30	22	12	22	32	0	33	0	20	30	18	26	15	30	16
Or039	30	30	33	30	21	19	20	32	14	30	0	25	30	18	26	15	30	16
Or042	30	30	31	30	30	20	20	32	0	30	0	25	30	14	23	14	31	0
Or043	30	30	30	30	25	20	20	32	0	30	0	23	30	15	28	14	36	9
Or044	30	30	33	30	30	18	26	35	0	35	9	26	30	12	27	12	35	0
Or045	30	30	30	30	30	18	16	32	0	30	0	24	30	12	27	15	32	0
Or046	29	30	32	33	25	28	10	30	0	31	0	24	32	8	28	12	33	8
Or047	25	28	28	30	33	14	0	28	0	30	0	16	17	9	26	8	35	0
Or048	27	30	28	28	22	13	9	30	0	29	0	28	19	10	24	10	30	0
Or049	30	28	33	28	25	28	29	31	0	30	25	30	30	0	27	8	32	9
Or050	17	15	30	30	20	20	16	30	0	30	0	26	30	0	20	22	30	12
Or051	17	15	30	30	20	20	20	30	0	30	0	20	29	0	22	20	30	14
Or052	0	0	9	30	18	30	22	0	0	0	0	30	10	0	20	0	0	0
Or053	0	0	8	30	18	31	23	0	0	0	0	32	22	0	23	0	20	0
Or054	0	0	9	30	17	32	24	0	0	0	0	30	23	0	24	0	20	0
Or055	0	0	10	30	20	33	17	0	0	0	0	30	21	0	22	0	20	0
Or056	0	0	9	35	18	32	20	0	0	0	0	30	21	0	22	0	20	0
OR057	30	33	29	27	25	31	30	29	0	31	26	31	30	0	28	8	30	9
Or058	0	0	8	35	19	26	20	0	0	0	0	20	20	0	21	0	19	0
Or059	0	0	10	35	20	12	19	0	0	0	0	9	22	0	33	14	0	0

M6. táblázat: Az *O. rhinotracheale* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának milliméter pontosságban megadott eredményei (folytatás)

jelölés	AX10	AMP	FUR30	CHL30	CPR5	DOX	ENO	ERY15	GEN10	L2	NAL30	T30	PEN10	POL	SPC100	SMX	TIL15	SXT25
É	≥ 24	≥ 24	≥ 21	≥ 18	≥ 21	≥ 16	≥ 23	≥ 23	≥ 15	≥ 14	≥ 19	≥ 19	≥ 24	≥ 12	≥ 17	≥ 17	≥ 14	≥ 16
M			18-20	13-17	16-20	13-15	17-22	14-22	13-14	11-13	14-18	15-18		9-11	16	13-16	11-13	11-15
R	≤ 23	≤ 23	≤ 17	≤ 12	≤ 15	≤ 12	≤ 16	≤ 13	≤ 12	≤ 10	≤ 13	≤ 14	≤ 23	≤ 8	≤ 15	≤ 12	≤ 10	≤ 10
Or060	0	0	0	35	18	15	20	0	0	0	10	14	25	0	25	0	15	0
Or061	0	0	0	35	21	12	20	0	0	0	0	12	20	0	22	0	14	0
Or062	0	0	8	35	20	11	18	0	0	0	0	12	17	0	28	0	14	0
OR063	15	13	30	30	14	17	16	0	0	0	0	0	26	0	35	10	9	0
OR064	30	30	30	30	10	19	15	35	0	30	0	21	40	9	34	10	40	0
OR065	22	22	24	30	8	18	13	0	0	0	10	26	0	8	40	8	18	0
OR066	30	30	30	30	18	18	20	30	0	35	0	26	27	8	30	9	30	0
OR067	30	30	30	30	13	15	22	30	0	40	0	14	30	8	32	9	30	0
OR068	30	30	30	30	20	20	20	15	0	0	8	18	30	10	30	8	30	0
OR069	15	13	10	30	15	14	13	0	0	0	0	0	24	9	32	8	0	0
OR070	25	29	0	30	11	30	0	0	15	0	0	15	25	0	34	10	0	0
OR071	30	30	30	30	16	18	0	32	0	25	0	25	30	0	27	18	32	0
OR077	13	13	23	36	0	14	0	40	0	29	0	20	11	0	34	0	40	0
OR079	40	40	30	30	20	15	25	0	0	0	0	12	13	0	30	0	16	0
OR080	16	13	15	26	0	13	0	0	0	0	0	13	13	0	24	0	0	0
OR082	16	14	18	30	0	13	0	0	0	0	0	15	0	0	24	0	10	0
B3263/91	19	22	0	30	30	18	28	0	25	0	22	20	24	0	35	15	16	0
GGD 1261	27	25	0	30	30	10	35	0	10	0	0	10	26	0	30	0	0	0
K91-201	30	30	30	30	30	12	40	0	0	30	12	18	40	0	30	0	0	0
ORV 94108 nr.2	25	30	0	30	21	27	16	0	10	0	0	35	26	0	35	0	0	0
O-95029 nr.12229	26	26	0	30	20	28	15	0	10	0	0	30	22	0	31	0	30	0

kék háttér: rezisztens; piros háttér: csökkent érzékenység

M7. táblázat: A *B. avium* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának milliméter pontosságban megadott eredményei

jelölés	AX10	AMP	FUR30	CHL30	CPR5	DOX	ENO	ERY15	GEN10	L2	NAL30	T30	PEN10	POL	SPC100	SMX	TIL15	SXT25
É	24	24	≥ 21	≥ 18	≥ 21	>16	≥ 23	≥ 23	≥ 15	>14	>19	>19	>24	>12	≥ 17	>17	≥ 14	≥ 16
M			18-20	13-17	16-20	13-15	17-22	14-22	13-14	11-13	14-18	15-18		9-11	16	13-16	11-13	11-15
R	23	23	≤ 17	≤ 12	≤ 15	<12	≤ 16	≤ 13	≤ 12	<10	<13	<14	<23	<8	≤ 15	<12	≤ 10	≤ 10
Ba01	25	25	16	21	21	21	16	24	15	0	17	21	16	16	26	24	20	21
Ba02	27	26	13	18	22	21	20	25	21	0	16	19	25	16	30	25	17	21
Ba03	26	28	12	17	22	20	20	25	20	0	20	19	25	16	27	22	18	18
Ba04	30	29	12	17	22	22	21	23	20	0	19	19	25	16	26	23	17	20
Ba05	28	25	12	17	21	21	20	23	21	0	20	20	26	17	24	25	16	20
Ba06	25	25	12	19	22	18	20	24	20	0	20	19	24	16	25	25	18	20
Ba07	26	25	15	20	25	22	21	24	20	0	16	21	24	17	23	25	20	21
Ba08	25	25	15	17	22	22	19	20	20	0	17	21	24	15	20	24	0	18
Ba09	0	0	13	15	18	20	17	15	16	0	12	17	10	16	16	23	17	18
Ba10	0	0	14	15	22	20	15	20	18	0	12	19	11	24	18	26	14	17
Ba11	0	0	11	14	20	17	15	18	17	0	12	20	12	14	19	28	17	20
Ba12	0	0	13	15	21	21	19	16	17	0	12	20	10	15	20	26	15	20
Ba13	0	0	13	16	19	22	17	16	15	0	15	20	10	16	20	22	15	12
Ba14	0	0	14	15	18	21	17	20	16	0	14	18	12	14	21	20	14	12
Ba15	24	29	12	15	21	21	17	20	16	0	13	21	10	15	20	24	15	12
Ba16	25	27	13	16	17	24	19	23	15	0	16	19	11	16	18	21	14	18
Ba17	24	25	13	17	22	20	16	26	21	0	14	17	24	15	20	25	15	23
Ba18	23	23	12	20	16	28	16	23	18	0	13	20	11	17	26	25	16	20
Ba19	23	22	15	19	22	22	22	26	22	0	19	20	11	13	23	28	15	18

kék háttér: rezisztens; piros háttér: csökkent érzékenység