

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
ÁLLATHIGIÉNAI, ÁLLOMÁNY-EGÉSZSÉGTANI TANSZÉK ÉS MOBILKLINIKA

Tehéntejek mikroorganizmus profilvizsgálata,
különös tekintettel egyes tőgypatogén
mikroorganizmusokra
Examination on microorganism profile of cows bulk milk
with a focus on mastitis pathogens

Készítette: Bendő Blanka Anikó

Témavezető: Dr. Könyves László

ÁTE, Állathigiéniai, Állomány-egészségtani Tanszék és Mobilklinika

Egyetemi docens, tanszékvezető

Budapest, 2019

Tartalomjegyzék

| | |
|---|----|
| 1.Bevezetés | 2 |
| 1.1.A tej, mint táptalaj | 2 |
| 1.2.A mikrobiota befolyása a tejtermékekre | 2 |
| 2.Célkitűzés | 3 |
| 3.Szakirodalmi áttekintés | 3 |
| 3.1.Tőgygyulladás | 3 |
| 3.2.Az endogén út hipotézis | 5 |
| 3.3.Vizsgált baktériumfajok | 7 |
| 3.4.A DNS szekvenálás történeti áttekintése | 11 |
| 3.5.Új generációs szekvenálási eljárások | 12 |
| 4.Anyag és módszertan | 14 |
| 4.1.Mintavétel | 14 |
| 4.2.Alkalmazott eljárás | 15 |
| 4.3.Kiértékelés módszerei | 16 |
| 5.Eredmények | 17 |
| 6.Következtetés | 34 |
| 7.Összefoglalás | 35 |
| 8.Summary | 36 |
| 9.Irodalomjegyzék | 37 |
| 10.Köszönetnyilvánítás | 40 |

1.Bevezetés

1.1.A tej, mint táptalaj

A tej egy komplex, magas tápanyagtartalmú, faj-specifikus folyadék, melynek célja az emlős utód tápanyagigényének kielégítése, de számos egyéb szereppel is rendelkezik az ivadék fejlődése folyamán. Biológiai aktivitása a benne található immunsejtek és aktív molekulák (cukrok, nukleotidok, lipidek, antimikrobiális proteinek, cytokinek, és egyéb immunmoduláns faktorok) eredménye (Addis et al, 2016). Amellett, hogy támogatják az újszülött fejletlen immunrendszerét, az immunregulátor anyagok fontos szerepet játszanak a tőgy védekezőrendszerének elemeként, valamint védik a tőgyet a patogén és opportunistá baktériumok kártételétől (Derakhshani, Hooman, 2018).

Emberi fogyasztásra többféle állati eredetű tej kerülhet (pl. tehén-, kecske-, juh- és bivalytej). Magas tápanyagtartalma, közel neutrális pH-ja és magas vízaktivitása miatt ideális környezetet biztosít sokféle mikroorganizmus növekedéséhez (Quigley et al, 2013). Ezek a mikrobák különböző forrásokból kerülhetnek a tejbe, és különféle szerepeket tölthetnek be. Felgyorsíthatják a fermentációt (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* és bizonyos gombák), romlást okozhatnak (*Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* és egyéb spóráképző hőtűrő mikroorganizmusok), hozzájárulhatnak az egészség támogatásához (*Lactobacillus*ok és *bifidobacterium*ok) vagy betegséget okozhatnak (*Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* és mycotoxin termelő gombák) (Quigley et al, 2013).

1.2.A mikrobiota befolyása a tejtermékekre

A tej mikrobiomjának összetétele közvetlen hatással bír a készülő tejtermékekre. A fermentációt beindító mikroorganizmusok a laktáttermeléssel befolyásolhatják a késztermék ízét, állagát és organoleptikus tulajdonságait. Bizonyos mikrobák negatívan tudják befolyásolni a tej minőségét és eltarthatóságát. A psychrotoleráns baktériumok, melyek hűtőhőmérsékleten is képesek szaporodni, az általuk termelt extracelluláris lipáz és proteáz enzimek által a termék romlását idézhetik elő (Quigley et al, 2013).

Általánosan elfogadott, hogy a tejsavanyító baktériumok (egy baktériumcsoport, amelyek a laktózt laktáttá fermentálják) dominálnak a pasztörözés előtti tehén, juh és bivalytejben. A legelterjedtebb tejsavanyító baktériumok közé tartoznak a *Lactococcus*, *Lactobacillus*,

Leuconostoc, *Streptococcus* és *Enterococcus* fajok. Pszichotróp populációk (általában *Pseudomonas* és *Acinetobacter spp*), melyek főleg a hűtött tárolás folyamán szaporodnak fel (Quigley et al, 2013).

Az állatok egészségére és a tejtermékek minőségére, fogyaszthatóságára gyakorolt hatása miatt az elmúlt évtizedben jelentősen megnövekedett az érdeklődés a tej mikrobiota összetételének és eredetének megértésére (Addis et al, 2016).

2.Célkitűzés

A kutatás célja a magyar árutejben előforduló tőgypatogén mikroorganizmusok előfordulásának reprezentatív felmérése volt.

3.Szakirodalmi áttekintés

3.1.Tőgygyulladás

A tejmirigy fertőzése miatt kialakult mastitis a tejelő tehenek körében magas arányban előforduló betegség, mely világszerte nagy gazdasági veszteségeket okoz a tejiparban a megtermelt tej mennyiségének csökkenése, minőségének romlása, a betegség kezelésének költségei és az állat korai selejtezése által okozott kár miatt. A közelmúltban több kutatás készült a tőgygyulladások, különösképpen a szubklinikai tőgygyulladások hátterének felderítésére és a kiváltó tényezők megelőzésére. Kialakulásának gyakoriságát és a megtelepedni képes kórokozó milyenségét a tej mikrobiomja is befolyásolja (Addis et al, 2016, Pang et al, 2018).

Az egészséges vagy mastitises tőgyből vett tejmintákban jelenlévő mikrobiom nem reprezentálja az egész tejmirigyet, hanem csak a ciszternát és lehetségesen a tejmedencét, így a tej és a tejmirigy mikrobiomját két különböző dolognak tekintjük. A tejmintákból kimutatható mikrobiota származhat egy fertőzött mirigyből, a tőgyön kívülről vagy mindkét helyről, és elméletben tartozhatnak a tejmirigy úgynevezett természetes mikrobiotájához (Taponen et al, 2019).

A tejelő tehenben a tőgy egy nyílt rendszer, amelybe baktériumok juthatnak a bimbócsatornán keresztül a külvilágból (Taponen et al, 2019). Tőgygyulladás esetén, mint a gyulladásos folyamatoknál általában, leukocyták és szérumproteinek áramlanak a fertőzés helyére, amely lehetővé teszi a tejben lévő milliliterenkénti sejtszám, a szomatikus sejtszám indikátorként

való használatát a monitoring vizsgálatoknál. A szubklinikai és klinikai tőgygyulladás közül az előbbi becsülten akár 40-szer gyakoribb és a helyi gyulladás klinikai tüneteinek hiánya jellemzi, míg a klinikai mastitissel járó gyulladásos válaszreakció szemmel látható elváltozást okoz a tejben, időnként a tőgy duzzadásával, kivörösödésével, és a szomatikus sejtszám növekedésével jár együtt (Addis et al, 2016). Tőgygyulladások mikrobák lehetnek jelen a ductusokban és a mirigy más területein a patogén invazivitásától, a fertőzés időtartamától és egyéb tényezőktől függően. Fejés során terjedhet, különösen nem megfelelő vákuumszint használata esetén (Taponen et al, 2019).

A tőgygyulladást okozó baktériumfaj azonosítása a későbbi sikeres kezelés egyik alapvető feltétele. A baktériumtenyésztés jelenleg a leggyakrabban alkalmazott módszer, azonban a klasszikus baktériumkultúrák hátrányai (a 48 órás várakozás az eredményre, vagy hogy a tőgygyulladásos minták nagyjából 25%-ában a standard tenyésztés nem mutat ki mastitist okozó baktériumot) indokoltá tették más, molekuláris technikák alkalmazását a mastitis diagnosztizálására (Addis et al, 2016).

A tőgy és a tej mikrobiomja nagyon hasonlónak tekinthető, azzal a különbséggel, hogy a tejbe nem csak az emlőmirigyekben található, hanem a tőgy külső felületéről és a környezetből belekerülő baktériumok is megtalálhatóak. Felvetődött egy, a tőgymirigyben természetesen előforduló mikrobatarsulás (mikrobiota) lehetősége (Taponen et al, 2019).

Egyes feltételezések szerint a tőgygyulladás a tejmirigy mikrobiom diszbiózisának következménye lehet, és nem csak egyszerűen a patogén baktériumok bejutása és elszaporodása. Ez a hipotézis olyan kutatások eredményein alapul, melyekben az egészséges tőgynegyedekből származó minták mikroba összetétele különbözött a mastitises mintából származóktól.

Egy másik, valószínűbb magyarázat a gyulladásos és egészséges negyedek mikrobiomja közötti különbségre a tej összetételének változása mastitis esetén. A gyulladásos tej és savó más baktériumok növekedésének kedvez mint a normál tej. A *Lactobacillus*, *Bacillus subtilis* és *Pseudomonas fluorescens* -melyek nem tartoznak a tőgypatogén baktériumok közé növekedésének kedvezőtlen a gyulladásos tej, míg az ismert patogének közé tartozó *Staphylococcus aureus* és *Escherichia coli* a normál tejben van hátrányban (Taponen et al, 2019).

Egy 2018-ban publikált kutatás az időjárás hatásait vizsgálta a tej mikrobiomjára, és nyomonkövette annak változásait 12 hónapon keresztül. A legváltozatosabb baktériumkultúrát júniusban, a legszegényesebbet decemberben találták. *Firmicutes*, *Actinobacterium* és *Proteobacterium* voltak a legnagyobb számban megtalálható törzsek, melyek egymással egyensúlyt tartottak fenn. *Pseudomonas*, *Acinetobacter* és *Lactococcus* fordultak elő leggyakrabban a mintákban (>1%), és kis törzs mikrobiota (*Actinobacter* és *Pseudomonas*) volt megfigyelhető. A leginkább befolyásoló környezeti tényezők a batériumok többségénél mind phylum, mind genus szinten a hőmérséklet és a páratartalom voltak. A hűvösebb időjárás és a nagyobb mennyiségben előforduló *Pseudomonas*, *Flavobacterium* és *Propionibacter* között korreláció volt megfigyelhető. Továbbá a *Pseudomonas/Propionibacterium* és a *Lactobacillus/Bifidobacterium* két szinergista párt alkottak. Ezen felül a mikrobiota és a tejminőség közötti összefüggéseket is vizsgálták, melynek alapján a nagy számban fellelhető *Propionibacterium* és *Pseudoalteromonas* negatív korrelációt mutatott a teljes baktériumszámmal, mely alapján segítettek a tejminőség megőrzésében, míg számos a környezetben fellelhető mikroorganizmus hozzájárult a nyers tej romlásához (Nan Li et al, 2018).

3.2. Az endogén út hipotézis:

Felmerült a feltételezés, hogy a tejben lévő mikroflóra nem csak a tőgyet kívülről kolonizáló baktériumok eredménye. A bőr és tejmintájában lévő baktériumok genotípusa különbözött ugyanabból az egyedből vett minták és ugyanazon baktériumfajok esetén. Ezen kívül a Bifidobacteriumok szigorúan anaerob baktériumok, ezért nem származhatnak a környezetből. Több cikkben felvetették egy entero-mamillaris út lehetőségét egyes mikrobáknak arra a tulajdonságára alapozva, hogy azok képesek elhagyni a bél lumenét, bejutni a mesenterialis nyirokcsomókba és azon keresztül elérni a tőgymirigyet. Az endogén út lehetőségét egérkísérletekkel vizsgálták. Bár a mechanizmus nem teljesen tisztázott, nagy valószínűséggel immunsejtek, különösképpen dendritikus sejtek játszanak szerepet a folyamatban (Addis et al, 2016). Kérdésben azonban ez a kapcsolat a belek és a tőgy immunrendszere között nagyon gyenge, a helyi védelmet biztosító lymphocyták nagyrésze a perifériás nyirokcsomókból származik, nem pedig olyan nyálkahártya felületekről, mint a bél (Derakhshani, Hooman, 2018).

A hematogén és lymphogén terjedés lehetősége merült fel egyes patogéneknél (*Mycoplasma bovis* és *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*), melyek képesek a tőgybe jutva

tőgygyulladás kialakítására. Fontos azonban megjegyezni, hogy ezen patogének tejből, szövetekből és nyirokcsomókból történő egyidejű kimutatása nem elegendő bizonyíték a tőgygyulladást okozó kórokozó endogén transzlokációjára a tőgymirigybe, a külvilágból, a bimbócsatornán keresztül történő fertőződés helyett. Hasonlóképpen, egyes bél eredetű baktériumoknak a bélsárból, tej szomatikus sejtjeiből, és vérben lévő leukocytákból való egyidejű kimutatása egészséges tehenekben nem bizonyítja a bélből származó mikrobák endogén úton történő migrációját a tőgybe. Bélből származó baktériumok nagy mennyiségben lehetnek jelen a bélsárral szennyezett környezetben, ebből kifolyólag a környezetből történő fertőződés nagy eséllyel lehet oka annak, hogy a keringő lymphocyták ezeket a baktériumokat tartalmazzák. Mindezek ellenére a bél-tőgy endogén út lehetséges mechanizmusának felderítése további kutatást igényel, melynek eredményei új lehetőségeket nyithatnak a továbbiakban a mastitis alternatív módszerekkel (pl.: per os probiotikumokkal) történő kezelésére (Derakhshani, Hooman, 2018).

Teheneknél a tej mintavétel viszonylag egyszerű a többi állatfajhoz képest. Tőgygyulladás egyedi szintű vizsgálatára steril mintavételi mód az ajánlott, de még így sem lehetünk biztosak, hogy a minták semmilyen kontamináló mikrobát nem tartalmaznak. Metzger 2018-ban publikált kutatása szerint a különböző almon tartott tehenek tejmintájában található baktériumok összetétele különbözik, ami arra enged következtetni, hogy a környezet akkor is hatással van a tej mikrobiomjára, ha a tejminta vétele közvetlenül a ciszternákból történik (Taponen et al, 2019, Metzger et al, 2018).

A nem specifikus kimutatási módszerek használata a tőgymirigy baktériumflórájának kimutatására jelentős mennyiségű új információ gyűjtését teszi lehetővé, de kritikus bírálatot igényelnek. Ezek a vizsgálatok különösen érzékenyek a külső kontaminációra mind a mintavételi, mintakezelési és a feldolgozási fázisokban (Taponen et al, 2019).

3.3. Vizsgált baktériumfajok

Escherichia coli

Az *Escherichia coli* egy gyakori, opportunista, környezeti tőgypatogén kórokozó a tejelő tehéntelegeken. A fertőzések legtöbbször klinikai tünetekben manifesztálódnak. Jelenleg nem írtak le olyan specifikus virulencia faktort, amely specifikusan elkülönítené a mastitist okozó törzseket a többi *E.coli* törzstől. A klinikai tünetek lefolyásának súlyossága, mely az enyhétől a súlyosig terjedhet, nagyban függ a hordozó állat tulajdonságaitól (Zadoks et al, 2011). A mastitist okozó coliform baktériumok közé tartozik az *E. coli*- és a *Klebsiella* fajok. A patogén hatásuk a sejtfalban lévő endotoxinoknak köszönhető. Perakut mastitis esetén a tehenek endotoxaemia miatt néhány napon belül elhullhatnak. A coliform mastitis általában önlimitáló, nem okoz súlyos károsodást a parenchymában, így gyógyulást követően a megtermelt tejmenyiség nem csökken jelentősen. A laktációs ciklus bármely szakaszában előfordulhat, azonban közvetlen ellés után, és az utána következő 2-3 hónapban, valamint a legnagyobb tejtermelésű egyedek fogékonyabbak a fertőződésre (Jain, 1979).

Corynebacterium bovis

Ez a baktériumfaj állatról-állatra terjed, és általában enyhe fokú tőgygyulladást idéz elő (Valkó, 2014). A *C. bovis* jelentősége a tőgygyulladásos esetekben azonban több okból nem elhanyagolható. Ezen okok egyike a kórokozó gyakori előfordulása, az érintett tőgynegyedek akár 23,5%-kal történő tejtermelés csökkenése és a megemelkedett SCC (Samea, 2017).

Prototheca zopfii

A *Prototheca zopfii* egyegysejtű alga, mely széleskörben elterjedt a nyirkos, meleg területeken. A kórokozóval való fertőződés a környezetből történik. A *P. zopfii* általában szubklinikai, krónikus tőgygyulladást okoz nagyon magas szomatikus sejtszámmal, azonban akut, tünetekkel kísért forma is előfordulhat. Akut esetekben savós-gennyes gyulladás figyelhető meg nagy mennyiségű algasejtekkel a tejben, a bélben és a macrophagokban. Mikrogranulómákat kialakító proliferatív folyamatok szintén jellemzőek. A fertőzés helyileg általában enyhe tünetekkel jár, szisztémás tünetek nem jellemzőek. A legjellemzőbb klinikai tünet a csomós, vizes állagú tej. A csökkent tejtermelés mellett általában csak a tartósan magas szomatikus sejtszám utal a tőgynegyed szubklinikai fertőzöttségére. A *P. zopfii* a környezeti kórokozók közé tartozik. A hiányos fejés előtti fertőtlenítésnek jelentős szerepe

van a fertőzés kialakulásában. A tőgybimbó sérülések prediszponálják a tehenek a *Prototheca* fertőzésekre is, így a fertőzés megelőzésében fontos szerepet tölt be a fejőgépek megfelelő állapota és beállítása. Ez a kórokozó sokáig életképes a szárazonálló tehenek tőgyében is. A további kontamináció veszélye és a kezelési nehézségek miatt a fertőzött állatok selejtezésre kerülnek (Jánosi et al, 2001).

Staphylococcus aureus

A *Staphylococcus aureus* az egyik leggyakoribb szubklinikai tőgygyulladást okozó baktérium. Bár néhány eset klinikai tőgygyulladásba fordulhat át (különösen ellés után), a fertőzés általában szubklinikai, az emelkedett SCC mellett nem okoz érzékelhető változást a tőgyben vagy a tejben (Petersson-Wolfe et al, 2010). Gangrénás tőgygyulladás leggyakrabban fiatal teheneknél, ellés után fordul elő (Jain, 1979).

A tőgy fertőződése, a kórokozó továbbvitele főleg fejőberendezésekkel történik. A tejutakban perzisztáló fertőzést okoz. A bejutás tipikusan a tőgybimbón keresztül történik, ebből adódóan kezdetben a bimbócsatorna és a tejmedence szöveteit károsítja a kórokozó, mely idővel hegszövet képződéséhez vezet. A baktérium felfelé halad a ductusokban, majd az alveolusokban telepszik meg. A neutrophil sejtekben, melyek megpróbálják eliminálni, képesek dormant állapotba kerülni, majd a sejt halálával folytatni fertőzési ciklusukat. Toxinokat termel, melyek károsítják a sejtmembránt, így közvetlen is pusztítva a tejtermelő szövetet, és gyulladást alakítanak ki (Petersson-Wolfe et al, 2010). Az α -toxin potenciálisan a legszövetkárosítóbb hatású, ugyanis vazokonstriktiót okozva a szövetek ischemiás nekrozisához és üszkösödéséhez vezet. A baktérium által termelt koaguláz enzimnek a phagocitózis elleni védekezésben van szerepe, ugyanis gátolja az immunsejtek fertőzés helyére jutását (Jain, 1979).

Fertőzéskor az alveolusok és ductusok károsodása miatt csökken a tejtermelés, elzáródások alakulhatnak ki a tejutakban, melyek további hegeképződéshez és termeléseszkökenéshez vezetnek. A kialakult abszcesszusok tapintható méretűek lehetnek a tőgy belsejében. Ezek az elzáródott területek később megnyílnak, a bennük lévő baktériumtömeeggel tovább fertőzve a tejmirigyet. A kezelés a baktériumok fehérvérsejtekben történő túlélése, az elzáródott ductusokban történő megbúvása és szaporodása miatt igen nehéz (Petersson-Wolfe et al, 2010). A baktérium phagocitózis elleni védelmében szerepet játszik: az α -toxin, ami károsítja a neutrophilokat, a protein A antiphagocita hatása, bizonyos bakteriális anyagok, amik védik a sejten belüli pusztulástól (Jain, 1979).

Koaguláz negatív Staphylococcusok (CNS)

A Staphylococcus nemzetség koaguláz pozitív staphylococcus fajokra (CPS) és koaguláz negatív Staphylococcus fajokra (CNS) lehet osztani az alapján, hogy képesek-e plazma koagulációra. A CNS-ek sok országban az egyik leggyakrabban detektált mastitist okozó patogének közé kerültek. Opportunista fajok, fém eszközökhöz tapadnak ahol biofilm réteget képeznek, amely segíti a környezetben való túlélésüket. A biofilm képző képességük segíti a fejőberendezésen és a fejő személyzet kezén történő perzisztálásukat, melyek ezen fajok fő fertőzési forrásai. Koaguláz negatív Staphylococcusok közé tartozik a *S. warneri*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. xylosus*, váltakozó negatív és pozitív az *S. hyicus* (Jakeen et al, 2013).

A koaguláz negatív Staphylococcus fajokat a mastitist okozó patogén baktériumok között tartják számon, ám csak néhány lett közülük rendszeresen kapcsolatba hozva szarvasmarhák klinikai vagy szubklinikai tőgygyulladásának okozójaként. Az egyik faj, mely rendszeresen izolálásra kerül szubklinikai mastitisben szenvedő állatok tejéből a *Staphylococcus epidermidis*. A többi mastitist okozó CNS fajjal szemben a *S. epidermidis* általában nem képezi a marha bőrén vagy nyálkahártyáján élő természetes mikroflóra részét, azonban *S. epidermidis* az emberi bőrön az egyik leggyakrabban előforduló baktérium. Jelentős szerepet játszhat a fejőszemélyzet a fertőzés továbbvitelében, akik a napi tőgygel való kontaktus során átadhatják a kórokozót. A tőgy -nem megfelelő fejési technika vagy fejőberendezés miatt-meggyengült helyi védekezőrendszere szintén hozzájárul a *S. epidermidis* fertőzés kialakulásához (Thorberg et al, 2006).

Streptococcus agalactiae

A *Streptococcus* fajok a főbb tőgygyulladást okozó kórokozók közé sorolhatók. A *Streptococcus agalactiae* általában szubakut vagy krónikus lefolyású tőgygyulladást okoz periodikus akut fellángolásokkal. A fertőzött tőgyszövet pusztulása idővel csökkent tejtermeléshez vagy a tejtermelés teljes megszűnéséhez, agalactiához vezet. Mivel a baktérium nem él túl hosszasan a környezetben, az eradikációja egyszerűbb más tőgypatogénekhez viszonyítva (Jain, 1979).

Streptococcus dysgalactiae

A *Streptococcus uberis* és *Streptococcus dysgalactiae* a tőgyön kívül, a környezetben és az állatok testfelületén is képes hosszú ideig életben maradni, így ellenük nehezebb a védekezés. Ezek a baktériumok hajlamosító tényezők hatására kolonizálják a tőgyet. Akut és krónikus tőgygyulladást is okozhatnak, de általában szubklinikai fertőzöttséggel járnak (Jain, 1979).

Streptococcus uberis

A *Streptococcus uberis* egy Gram pozitív, aerotoleráns, párokat és láncokat alkotó coccus. Pozitív aesculinpróbát eredményeznek, és 95% termel β -galaktozidáz enzimet, aminek segítségével el lehet különíteni az aesculinhidrolizáló enterococcusoktól. Módosított Rambach agaron kék színű telepeket képez, míg a *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* és az *Enterococcus faecalis* nem metabolizálják a propilén-glikolt, vörös kolóniákat képeznek, és nem termelnek β -galaktozidáz enzimet. Egy szerológiailag heterogén faj, ezért epidemiológiailag nagy heterogenitás jellemzi. A *Streptococcus uberis* képes kitapadni a tőgymirigy epithelium falára és bejutni a sejtbe egy adhezív molekula, a Streptococcus uberis adhesion molecule (SUAM) segítségével. Hyaluronidáz enzimet termel, mely segíti a baktérium szövetekben történő terjedését. A tejben található lactoferrint használja fel a baktérium a növekedéséhez szükséges vasigény kielégítésére. Kolonizálja az állatot és annak életterét is. Kimutatták már az állatok ajkáról, tonsillából, szájüregből, bőrfelületről és bélrendszerből, légzőrendszerből, ürülékből és fertőzött tőgyből. A tehenek leggyakrabban a szárazonállás folyamán fertőződnek (Kromker et al, 2014). Fertőzött telepeken a *Str. uberis* fertőzések fellángolása szezonális jelleget mutatott, és függött az állat korától és laktációs ciklusától. Télen magasabb volt a fertőzöttek aránya, főként az idősebb, laktációs ciklusuk elején járó tehenek betegedtek meg. A legritkább előfordulás nyáron, a szárazon álló tehenek között volt (Jain, 1979).

3.4.A DNS szekvenálás történeti áttekintése

A biológiai minták nukleinsav sorrendjének meghatározása számos kutatási folyamat fontos lépése. Az 1. ábra a különböző szekvenálási technikákat mutatja be. Az első két széleskörben ismertté vált szekvenálási módszer a Maxam és Gilbert által publikált kémiai hasításon alapuló módszer, és a Sanger-féle lánctermináció (Heather és Chain, 2016).

Kémiai hasítás

Ezen módszerrel a szekvenálni kívánt DNS darab kinyerhető, például plazmid restrikciós emésztésével, majd az így nyert fragmentumok elektroforézises szeparálásával és a felhasználandó szakasz izolálásával. Az így kapott DNS szakasz 3' és 5' végpontjait alkalikus foszfatáz és polinukleotid kináz (5' jelölés) vagy terminal transzferáz (3' jelölés) segítségével jelölik. Ezt követően a duplaszálú fragmentumot denaturálják, majd az így nyert szimpla szálú fragmenteket poliakrilamid gél elektroforézissel szeparálják, majd izolálják, ezzel lehetővé téve az egyes szálak szekvenálását. A kémiai hatításon alapuló módszer alkalmazása két fő hátrány miatt nem terjed el. Az egyik a veszélyes alapanyagok (a hidrazin neurotoxikus), a másik pedig hogy nagy mennyiségű DNS szükséges a kivitelezéséhez. Mindezek ellenére ez a módszer lehetőséget jelenthet rövid fragmentumok meghatározására, vagy ha a szekvenáláshoz szükséges primerek megtervezése problémákba ütközik (Miodrag Guzvic, 2013).

Sanger-féle szekvenálás

Frederick Sanger 1970-es években publikálta a lánctermináción alapuló módszerét. A kémiai hasításos módszerrel szemben, ez a módszer DNS polimeráz, egyszálú DNS templát, deoxi- és radioaktív vagy fluoreszcens jelöléssel ellátott 2,3-dideoxinukleotidok felhasználásával szekvenálja a DNS-t egy polimerizációs reakcióval. Négy csőben párhuzamosan folyik a reakció, melyekben a négyféle dNTP (deoxiribonukleotid-trifoszfát) (dATP, dCTP, dGTP, és dTTP) mellett -amik mindegyik közegben megtalálhatóak- minden csőbe más-más dideoxinukleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP, vagy ddTTP) kerül kis mennyiségben. Azokon a pontokon, ahol dNTP helyett ddNTP beépülés történik, a láncterminációja megszakad, így különböző hosszúságú láncokat nyerünk, melyek poliakrilamid gélen futtatva méret szerint szétválaszthatók. Mivel a terminációs pontok ismertek, a négyféle mintából összeolvasható a DNS szekvenciája (Miodrag Guzvic, 2013, Babay et al, 2015).

3.5. Új generációs szekvenálási eljárások

Az új generációs szekvenálási eljárások (next generation sequencing – NGS) a korábbi (Sanger-féle szekvenálás) módszerekhez viszonyítva nagyságrendekkel felgyorsították a bázissorrend meghatározás sebességét a masszív, parallel szekvenálási reakciók által, jelentősen kedvezőbb áron. Általánosságban négy fő lépést különíthetünk el: 1. a minta előkészítése, 2. génekönyvtár-generálás, 3. klonális amplifikáció, 4. nukleotidsorrend megállapítása. Az előkészítés során a DNS molekulát fizikai behatással, vagy enzimatis emésztéssel 50-500 bázispár nagyságú egységekre darabolják. A könyvtárkészítés során a különböző nukleinsavsorrendű fragmentumokra adapter szekvenciákat kapcsolnak. A DNS fragmentumok felsokszorozása a klonális amplifikáció során, melynek szerepe a fluoreszcencia jelek felerősítése, legtöbbször polimeráz láncreakcióval (PCR) történik. A sokszorosított templátok nukleotidsorrendjének meghatározására több módszer áll rendelkezésre, melyek a szintézisalapú és a ligáció alapú szekvenálás, a piroszekvenálás, a reverzibilis termináción alapuló szekvenálás és a szemikonduktor-szekvenálás (Babay et al, 2015, Balicza, 2018).

Piroszekvenálás

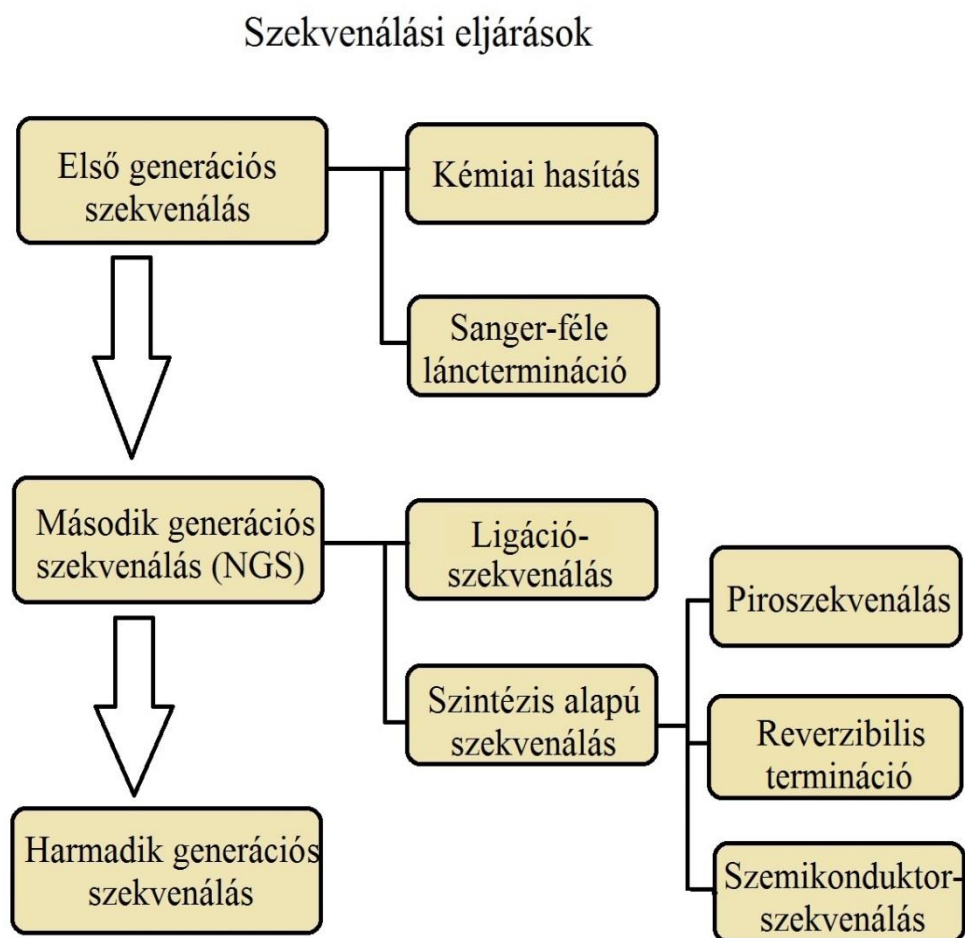
A piroszekvenálás lényege a komplementerszál bázisainak egyesével történő beépítésén és azok biolumineszcenciával történő detektálásán alapul. Az egyszálú DNS templáthoz egymás után adják hozzá a négy féle nukleotidot, a be nem épült dNTP-t pedig enzimatisan bontják a következő nukleotid hozzáadása előtt. A DNS polimeráz segítségével történő beépülés következményeképp pirofoszfát keletkezik, amelyet az ATP foszforiláz enzim ATP-vé alakít. Az így keletkezett ATP katalizálja a jelen lévő luciferin oxyluciferinné történő konverzióját a luciferáz enzim segítségével, ami látható fényjelenséget eredményez (Cummings et al, 2013). A megnövekedett fényintenzitás több nukleotid beépülését jelzi. A képződött fényt kamerával detektálható, az így érzékelt sorrend és intenzitás alapján pedig leírható a DNS szekvenciája (Babay et al, 2015).

Szemikonduktor-szekvenálás

A szemikonduktor-szekvenálás hasonló elv szerint működik, mint a piroszekvenálás, fény helyett azonban a kibocsátott protonok (hidrogén ionok) érzékelésével történik a nukleotidsorrend meghatározás (Babay et al, 2015).

Reverzibilis termináció

Illumina szekvenálás során a DNS fragmentumokat a klonális amplifikáció során bridge-PCR-rel felszorzozzák, majd reverzibilis terminációval szekvenálják. A beépülő nukleotidok 3'-OH csoportja védett, és fluoreszcens anyaggal van jelölve. A DNS polimeráz egyesével építi be a módosított nukleotidokat. A négy féle bázist különböző fluoreszcens anyagok jelölik, melyek felvillanása jelzi a nukleotid beépülését és lehetővé teszi azok elkülönítését. A beépülés után szabaddá válik a 3'-OH csoport a terminációs szignál és a fluoreszcens anyag lehasadásával, így folytatódhat tovább a reakció (Ambardar et al, 2016).



1. ábra A szekvenálási eljárások fajtái

4. Anyag és módszer

4.1. Mintavétel

A mintákat az MTKI Kutató-Élelmiszervizsgáló és Nyerstej Minősítő Laboratóriumába, Budapestre érkező minták képezték, melyek levétele a Magyar Élelmiszerkönyv (Codex Alimentarius Hungaricus) Hivatalos Élelmiszervizsgálati Módszergyűjtemény 3-2-1/2004 számú irányelve - A nyerstej árkonzekvens minősítésének mintavételi és vizsgálati módszerei 3. kiadás 2013. - irányelv a vizsgálati módszerekre, valamint a vonatkozó rendeletben hivatkozott dokumentum a mintavétel végrehajtásának szabályozására - szerint történt.

A vizsgálatba néhány kivétellel valamennyi magyarországi árutej termelő gazdaság szolgáltatott mintát.

A minták a kutatásban szereplő vizsgálatok elvégzésére Szegedre, a Seqomics Kft.-hez kerültek szekvenálásra. A megyénként vett minták számát az 1. táblázat mutatja. A minták anonimitása és a költségcsökkentés érdekében a minták poolokban lettek felhasználva, melyekben 3-6 minta került elegyítésre.

1. táblázat: A minták szám szerinti eloszlása, megyékre bontva, alfabetikus sorrendben

| Mintasámok származási hely szerinti csoportosítása | |
|--|--------------|
| Megye | Minták száma |
| Baranya | 38 |
| Bács-Kiskun | 55 |
| Békés | 43 |
| Borsod-Abaúj-Zemplén | 33 |
| Csongrád | 38 |
| Fejér | 40 |
| Győr-Moson-Sopron | 75 |
| Hajdú-Bihar | 90 |
| Heves | 8 |
| Komárom-Esztergom | 11 |
| Nógrád | 13 |
| Pest | 48 |
| Somogy | 33 |
| Szabolcs-Szatmár-Bereg | 56 |
| Jász-Nagykun-Szolnok | 46 |
| Tolna | 62 |
| Vas | 38 |
| Veszprém | 33 |
| Zala | 22 |

4.2. Alkalmazott szekvenálási eljárás

A DNS izolálás és a 16S rDNS amplikon PCR

A dúsitott mikrobiális DNS kimutatásához mintánként 10 ml tejet centrifugáltak 4000 g-vel, 4°C-on 10 percig, és a DNS-t pelletekkel izolálták a Dneasy UltraClean Mikrobial Kit (Qiagen) használatával a gyártó utasításai szerint. A 16S rDNS-alapú közösség profiláláshoz a 16 S génen található V3 és V4 változó régiókat fedő amplikonokat a 16 S Metagenom Szekvenálási Könyvtár Készítési Útmutató (Metagenomic Sequencing Library Preparation Guide) által ajánlott primer használatával készítették. A PCR reakciók a KAPA HiFi HotStart Ready Mix (KAPA Biosystems) használatával történtek az Illumina által kiadott 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Guide alapján.

16S rDNS amplikon szekvenálás és adatkezelés

A tejmintákban található baktériumtársulás alkotóinak pontos meghatározásához Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálást végeztek. „Paired-end” könyvtárakat készítettek a NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (Cat.Num.: E7645L) alapján. A „paired-end” fragmentum read-eket az Illumina MiSeq szekvenáló és a MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycle) segítségével készítették. Az elsődleges adatelemzés (base-calling) Bbcl2fastq^ software (v2.17.1.14, Illumina) használatával történt. A read-eket CLC Genomics Workbench Tool 9.5.1 segítségével minőség és hossz alapján trimmelték úgy, hogy a fennmaradó readek hosszúsága minimum 50 nukleotid legyen. A trimmelt szekvenciák analizálásra kerültek, majd a legújabb SILVA rDNS adatbázis használatával BLASTN alignment-et végeztek. A Downstream taxonómiai elemzés és a megtartott minták vizualizálása a MEGAN6 software (Huson et al. 2007) használatával történt. 16S Percent Identity Filtert használtak plusz szűrőként a 16S amplikon olvasatok specifikus taxonómiai szintre történő sorolásához. A szűrő minimális értéke 97%-ra volt állítva a nemzetség szintű besoroláshoz. Az összehasonlítások és a további elemzés előtt a read számok normalizálásra kerültek a minta méretéből eredő hatások elkerülésére.

4.3.A kiértékelés módszerei

A 836 mintából összesen 54 db minta került kizárásra, így 782 minta elemzése történt meg.

A minták az átlagos napi tejmenyiség alapján lettek csoportosítva. 86 poolt sikerült azonos átlagos napi tejtermelésű telepekkel feltölteni, a kimaradt minták közül pedig az átlagos napi termelésben egymáshoz legközelebb eső telepek mintái kerültek egy poolba. Összesen 141 pool került kialakításra.

Az elemzések elvégzésére az R version 3.6.0 – Planting of a Tree programmal került sor. Az eredményekről deskriptív statisztikai elemzés készült.

A vizsgálat során csak a patogén baktériumok jelenléte került kimutatásra, az egyes poolokban található baktériummennyiség megállapításához további vizsgálatokra nem került sor. Ezen adatok alapján a közegészségügyi vonatkozásokkal vagy a klinikai betegség prevalenciájával kapcsolatban nem lehet következtetést levonni.

A kimutatott patogén baktériumok alapján két határérték közé sorolhatjuk az érintett tejmenyiséget. A legkisebb befolyásolt/szennyezett tejmenyiség abban a lehetőségben történik, ha a kimutatott patogén a vizsgált poolt alkotó, elegyítés előtti minták közül csak az egyikben, mégpedig a legkisebb tejmenyiséget reprezentáló mintában volt jelen. Ehhez a poolban található legkisebb átlagos tejtermelésű telepről származó minta által reprezentált térfogattal kell számolni.

A patogén baktériumok által szennyezhetett legnagyobb maximum tejmenyiséget akkor kapjuk, ha feltételezzük, hogy a poolt alkotó összes mintában jelen volt a kórokozó, és a telepek átlagos tejtermelésének összegével készülnek a számítások.

A minimális és maximális érintett térfogatokat a százalékok kiszámításához a vizsgált nyerstej korábban említett össztérfogatát ($4,3133 \times 10^6$ liter), majd termelési csoportonkénti térfogatait felhasználva lettek kiszámítva kis, közepes és nagytermelésű telepek kategóriákban. Az így kapott százalékos eredmény megmutatja, hogy a magyar nyerstejben minimum és maximum hány százalékban található meg az adott tőgypatogén kórokozó.

5.Eredmények

A kutatás során vizsgált nyerstej össztérfogata $4,3133 \times 10^6$ liter volt. A legkisebb térfogatot reprezentáló pool 300 liter nyerstej mikrobiomját jellemezte, a legnagyobb térfogatot reprezentáló pool pedig $3,46 \times 10^5$ liter nyerstej mikrobiomjáról szolgáltatott adatokat. A jellemzett térfogatok mediánja 7300 liter nyerstej. A 2. táblázat a poolok által reprezentált térfogatokat mutatja, termelési csoportokra bontva.

2. táblázat: A poolok által reprezentált térfogat, három termelési csoportra bontva

| | Összes pool | Kis tejterm. pool | Közepes tejterm. pool | Nagy tejterm pool |
|-----------------|-------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| Átlag | 30, 590.780 | 11, 091.960 | 82, 565.220 | 195, 333.300 |
| Minimum | 300 | 300 | 45, 000 | 100, 000 |
| Alsó kvartilis | 1, 800 | 1, 750 | 66, 000 | 142, 250 |
| Medián | 7, 300 | 3, 900 | 78, 000 | 174, 000 |
| Felső kvartilis | 39, 200 | 17, 225 | 98, 000 | 228, 250 |
| Maximum | 346, 000 | 55, 600 | 138, 000 | 346, 000 |

Kis tejtermelésű telepek közé azon telepek lettek sorolva, melyek átlagos napi tejtermelése <10 000 liter, közepes termelésű telepek a 10 000 liter és 25 000 liter tej közötti átlagos napi termelésű telepek, nagy tejtermelésűnek pedig azok minősültek, melynek átlagos napi tejtermelése meghaladja a 25 000 litert.

A kis tejtermelésű telepek mintáiból 112 db pool került kialakításra, míg a közepes termelésű telepekből 23 db, a nagytermelésű telepekből pedig 6 db poolba lettek csoportosítva a minták.

3. táblázat: A következő táblázat az egyes poolokban detektált patogén baktériumfajok számát ismerteti.

| Pool sorszáma | Detektált patogének száma | Pool sorszáma | Detektált patogének száma | Pool sorszáma | Detektált patogének száma | Pool sorszáma | Detektált patogének száma |
|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|
| Pool 1 | 5 | Pool 39 | 5 | Pool 77 | 5 | Pool 115 | 6 |
| Pool 2 | 6 | Pool 40 | 6 | Pool 78 | 6 | Pool 116 | 7 |
| Pool 3 | 5 | Pool 41 | 7 | Pool 79 | 4 | Pool 117 | 8 |
| Pool 4 | 6 | Pool 42 | 5 | Pool 80 | 4 | Pool 118 | 9 |
| Pool 5 | 5 | Pool 43 | 6 | Pool 81 | 1 | Pool 119 | 9 |
| Pool 6 | 4 | Pool 44 | 7 | Pool 82 | 2 | Pool 120 | 6 |
| Pool 7 | 5 | Pool 45 | 5 | Pool 83 | 5 | Pool 121 | 6 |
| Pool 8 | 1 | Pool 46 | 8 | Pool 84 | 2 | Pool 122 | 9 |
| Pool 9 | 4 | Pool 47 | 8 | Pool 85 | 2 | Pool 123 | 10 |
| Pool 10 | 2 | Pool 48 | 8 | Pool 86 | 5 | Pool 124 | 9 |
| Pool 11 | 4 | Pool 49 | 6 | Pool 87 | 6 | Pool 125 | 8 |
| Pool 12 | 4 | Pool 50 | 7 | Pool 88 | 7 | Pool 126 | 3 |
| Pool 13 | 7 | Pool 51 | 8 | Pool 89 | 2 | Pool 127 | 6 |
| Pool 14 | 3 | Pool 52 | 7 | Pool 90 | 8 | Pool 128 | 8 |
| Pool 15 | 6 | Pool 53 | 5 | Pool 91 | 7 | Pool 129 | 5 |
| Pool 16 | 4 | Pool 54 | 8 | Pool 92 | 8 | Pool 130 | 11 |
| Pool 17 | 3 | Pool 55 | 9 | Pool 93 | 7 | Pool 131 | 6 |
| Pool 18 | 4 | Pool 56 | 4 | Pool 94 | 7 | Pool 132 | 9 |
| Pool 19 | 3 | Pool 57 | 2 | Pool 95 | 8 | Pool 133 | 6 |
| Pool 20 | 3 | Pool 58 | 10 | Pool 96 | 9 | Pool 134 | 8 |
| Pool 21 | 4 | Pool 59 | 3 | Pool 97 | 5 | Pool 135 | 9 |
| Pool 22 | 4 | Pool 60 | 4 | Pool 98 | 8 | Pool 136 | 10 |
| Pool 23 | 7 | Pool 61 | 4 | Pool 99 | 7 | Pool 137 | 7 |
| Pool 24 | 7 | Pool 62 | 6 | Pool 100 | 8 | Pool 138 | 5 |
| Pool 25 | 9 | Pool 63 | 4 | Pool 101 | 5 | Pool 139 | 6 |
| Pool 26 | 7 | Pool 64 | 2 | Pool 102 | 6 | Pool 140 | 5 |
| Pool 27 | 8 | Pool 65 | 2 | Pool 103 | 5 | Pool 141 | 5 |
| Pool 28 | 7 | Pool 66 | 5 | Pool 104 | 7 | | |
| Pool 29 | 9 | Pool 67 | 5 | Pool 105 | 8 | | |
| Pool 30 | 7 | Pool 68 | 6 | Pool 106 | 7 | | |
| Pool 31 | 6 | Pool 69 | 4 | Pool 107 | 6 | | |
| Pool 32 | 7 | Pool 70 | 5 | Pool 108 | 6 | | |
| Pool 33 | 8 | Pool 71 | 4 | Pool 109 | 8 | | |
| Pool 34 | 9 | Pool 72 | 3 | Pool 110 | 6 | | |
| Pool 35 | 9 | Pool 73 | 5 | Pool 111 | 9 | | |
| Pool 36 | 10 | Pool 74 | 10 | Pool 112 | 8 | | |
| Pool 37 | 4 | Pool 75 | 3 | Pool 113 | 10 | | |
| Pool 38 | 6 | Pool 76 | 5 | Pool 114 | 8 | | |

A 3. táblázatban látható, hogy a 141 pool mindegyikéből legalább egyféle tőgypatogén kórokozó detektálható volt. A poolok közül kettő tartalmazott csak egy félé a vizsgált patogének közül, 8-8 pool pedig két és három féle kórokozót. 17 pool volt, amelyből négy tőgypatogén faj volt kimutatható, 23-23 poolból öt és hat, 20-20-ból pedig hét és nyolc keresett kórokozó jelenléte lett detektálva. 13 pool tartalmazott kilenc, 6 pool tíz, és 1 poolból pedig tizenegy tőgygyulladást okozó faj került kimutatásra.

4. táblázat: Adott patogénnel kontaminált poolok száma összesen

| Adott patogénnel kontaminált poolok száma | |
|---|-----|
| STREPTOCOCCUS UBERIS | 7 |
| STREPTOCOCCUS AGALACTIAE | 78 |
| STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE | 26 |
| STAPHYLOCOCCUS AUREUS | 119 |
| STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS | 79 |
| STAPHYLOCOCCUS HYICUS | 1 |
| STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES | 5 |
| STAPHYLOCOCCUS SIMULANS | 5 |
| STAPHYLOCOCCUS WARNERI | 107 |
| STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS | 15 |
| STAPHYLOCOCCUS SCIURI | 28 |
| CORYNEBACTERIUM BOVIS | 131 |
| PROTOTHECA ZOPFII | 5 |
| ESCHERICHIA COLI | 120 |
| KLEBSIELLA PNEUMONIAE | 35 |
| PSEUDOMONAS AERUGINOSA | 90 |

A 4. táblázatban megfigyelhető, hogy a négy leggyakrabban kimutatott kórokozó a *C. bovis*, az *E. coli*, a *Staphylococcus aureus* és a *Staphylococcus warneri* volt, melyeket több mint 100 poolban lehetett detektálni. A minták alapján a legszélesebb körben előforduló tőgypatogén kórokozónak a *Corynebacterium bovis* bizonyult, mely a poolok 92,9%-ából kimutatható volt. Az *Escherichia coli* a poolok 85 %-át szennyezte. A *Staphylococcus aureus* a poolok 84,4%-ában, a *Staphylococcus warneri* pedig a poolok 75,9%-ában volt megtalálható.

Az 5., 6. és 7. táblázatban a kimutatott tőgypatogének a telepek által megtermelt tej mennyiség szerint három csoportba lettek sorolva, kicsi, közepes és nagy termelésű telepek kategóriákban.

5. táblázat: Kis termelésű telepek pooljaiból kimutatott patogének

| Adott patogénnel kontaminált poolok száma | |
|---|-----|
| STREPTOCOCCUS UBERIS | 5 |
| STREPTOCOCCUS AGALACTIAE | 59 |
| STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE | 19 |
| STAPHYLOCOCCUS AUREUS | 97 |
| STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS | 65 |
| STAPHYLOCOCCUS HYICUS | 0 |
| STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES | 3 |
| STAPHYLOCOCCUS SIMULANS | 2 |
| STAPHYLOCOCCUS WARNERI | 84 |
| STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS | 14 |
| STAPHYLOCOCCUS SCIURI | 25 |
| CORYNEBACTERIUM BOVIS | 110 |
| PROTOTHECA ZOPFII | 4 |
| ESCHERICHIA COLI | 96 |
| KLEBSIELLA PNEUMONIAE | 30 |
| PSEUDOMONAS AERUGINOSA | 76 |

6. táblázat: Közepes termelésű telepek pooljaiból kimutatott patogének

| Adott patogénnel kontaminált poolok száma | |
|---|----|
| STREPTOCOCCUS UBERIS | 1 |
| STREPTOCOCCUS AGALACTIAE | 13 |
| STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE | 5 |
| STAPHYLOCOCCUS AUREUS | 16 |
| STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS | 11 |
| STAPHYLOCOCCUS HYICUS | 1 |
| STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES | 2 |
| STAPHYLOCOCCUS SIMULANS | 3 |
| STAPHYLOCOCCUS WARNERI | 19 |
| STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS | 0 |
| STAPHYLOCOCCUS SCIURI | 3 |
| CORYNEBACTERIUM BOVIS | 15 |
| PROTOTHECA ZOPFII | 1 |
| ESCHERICHIA COLI | 18 |
| KLEBSIELLA PNEUMONIAE | 4 |
| PSEUDOMONAS AERUGINOSA | 12 |

7. táblázat: Nagy termelésű telepek pooljaiból kimutatott patogének

| Adott patogénnel kontaminált poolok száma | |
|---|---|
| STREPTOCOCCUS UBERIS | 1 |
| STREPTOCOCCUS AGALACTIAE | 6 |
| STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE | 2 |
| STAPHYLOCOCCUS AUREUS | 6 |
| STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS | 3 |
| STAPHYLOCOCCUS HYICUS | 0 |
| STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES | 0 |
| STAPHYLOCOCCUS SIMULANS | 0 |
| STAPHYLOCOCCUS WARNERI | 4 |
| STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS | 1 |
| STAPHYLOCOCCUS SCIURI | 0 |
| CORYNEBACTERIUM BOVIS | 6 |
| PROTOTHECA ZOPFII | 0 |
| ESCHERICHIA COLI | 6 |
| KLEBSIELLA PNEUMONIAE | 1 |
| PSEUDOMONAS AERUGINOSA | 2 |

A 8. táblázat az egyes patogén fajok által lehetségesen szennyezett térfogtmennyiségeket ábrázolja, míg a 9., 10. és 11. táblázatok ugyan ezt mutatják meg, de termelési csoport szerinti bontásban. A tejmennyiség az alábbi táblázatoknál literben van feltüntetve.

8. táblázat: Adott patogénnel kontaminált poolok térfogata

| Patogén faj | Min. térf. (l) | Max. térf. (l) | Min. térf. (%) | Max. térf. (%) |
|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| STREPTOCOCCUS UBERIS | 53,000 | 240,500 | 1.229 | 5.576 |
| STREPTOCOCCUS AGALACTIAE | 572,000 | 3,068,100 | 13.261 | 71.131 |
| STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE | 207,250 | 1,101,200 | 4.805 | 25.530 |
| STAPHYLOCOCCUS AUREUS | 688,650 | 3,712,900 | 15.966 | 86.080 |
| STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS | 439,650 | 2,186,300 | 10.193 | 50.687 |
| STAPHYLOCOCCUS HYICUS | 11,000 | 66,000 | 0.255 | 1.530 |
| STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES | 41,200 | 167,200 | 0.955 | 3.876 |
| STAPHYLOCOCCUS SIMULANS | 48,900 | 273,800 | 1.134 | 6.348 |
| STAPHYLOCOCCUS WARNERI | 596,100 | 3,096,000 | 13.820 | 71.778 |
| STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS | 45,200 | 185,200 | 1.048 | 4.294 |
| STAPHYLOCOCCUS SCIURI | 122,350 | 570,700 | 2.837 | 13.231 |
| CORYNEBACTERIUM BOVIS | 660,600 | 3,542,300 | 15.315 | 82.125 |
| PROTOTHECA ZOPFII | 34,000 | 153,300 | 0.788 | 3.554 |
| ESCHERICHIA COLI | 690,150 | 3,719,200 | 16.001 | 86.226 |
| KLEBSIELLA PNEUMONIAE | 186,000 | 937,300 | 4.312 | 21.730 |
| PSEUDOMONAS AERUGINOSA | 415,150 | 2,224,400 | 9.625 | 51.571 |

9. táblázat: Adott patogénnel kontaminált kis tejtermelésű telepeket tartalmazó poolok térfogata

| Patogén faj | Min. térf. (l) | Max. térf. (l) | Min. térf. (%) | Max. térf. (%) |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| STREPTOCOCCUS UBERIS | 13, 000 | 78, 500 | 1.046 | 6.319 |
| STREPTOCOCCUS AGALACTIAE | 151, 000 | 765, 100 | 12.155 | 61.587 |
| STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE | 64, 250 | 329, 200 | 5.172 | 26.499 |
| STAPHYLOCOCCUS AUREUS | 231, 650 | 1, 193, 900 | 18.647 | 96.104 |
| STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS | 175, 650 | 888, 300 | 14.139 | 71.504 |
| STAPHYLOCOCCUS HYICUS | 0 | 0 | 0 | 0 |
| STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES | 8, 200 | 35, 200 | 0.660 | 2.833 |
| STAPHYLOCOCCUS SIMULANS | 6, 900 | 41, 800 | 0.555 | 3.365 |
| STAPHYLOCOCCUS WARNERI | 196, 100 | 980, 000 | 15.785 | 78.886 |
| STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS | 20, 200 | 85, 200 | 1.626 | 6.858 |
| STAPHYLOCOCCUS SCIURI | 72, 350 | 343, 700 | 5.824 | 27.666 |
| CORYNEBACTERIUM BOVIS | 239, 600 | 1, 239, 300 | 19.287 | 99.759 |
| PROTOTHECA ZOPFII | 23, 000 | 108, 300 | 1.851 | 8.718 |
| ESCHERICHIA COLI | 218, 150 | 1, 110, 200 | 17.560 | 89.366 |
| KLEBSIELLA PNEUMONIAE | 86, 000 | 413, 300 | 6.923 | 33.269 |
| PSEUDOMONAS AERUGINOSA | 158, 150 | 824, 400 | 12.730 | 66.361 |

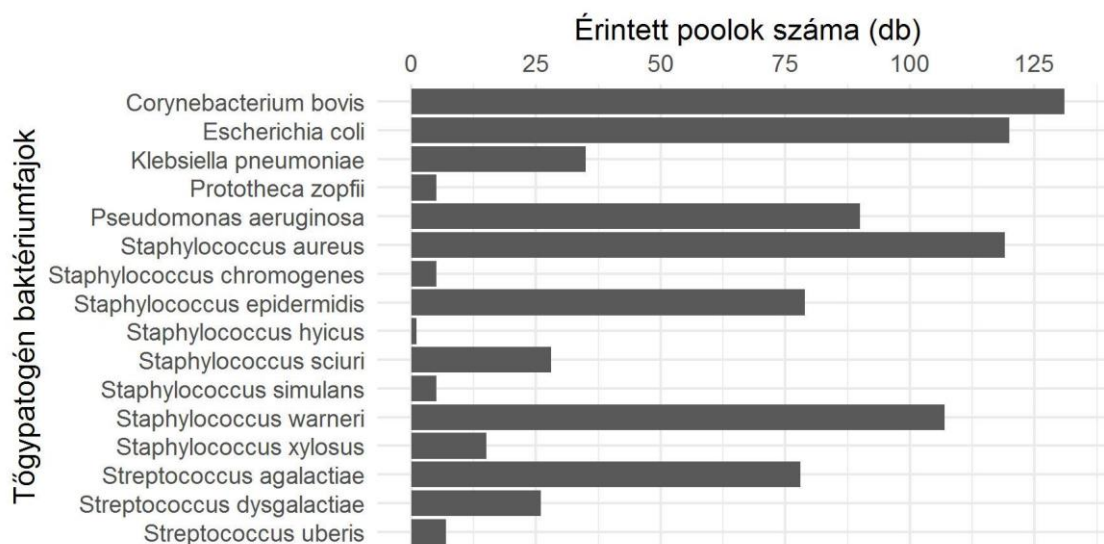
10. táblázat: Adott patogénnel kontaminált közepes tejtermelésű telepeket tartalmazó poolok térfogata

| Patogén faj | Min. térf. (l) | Max. térf. (l) | Min. térf. (%) | Max. térf. (%) |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| STREPTOCOCCUS UBERIS | 15, 000 | 62, 000 | 0.790 | 3.265 |
| STREPTOCOCCUS AGALACTIAE | 221, 000 | 1, 131, 000 | 11.638 | 59.558 |
| STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE | 79, 000 | 426, 000 | 4.160 | 22.433 |
| STAPHYLOCOCCUS AUREUS | 257, 000 | 1, 347, 000 | 13.533 | 70.932 |
| STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS | 181, 000 | 891, 000 | 9.531 | 46.919 |
| STAPHYLOCOCCUS HYICUS | 11, 000 | 66, 000 | 0.579 | 3.476 |
| STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES | 33, 000 | 132, 000 | 1.738 | 6.951 |
| STAPHYLOCOCCUS SIMULANS | 42, 000 | 232, 000 | 2.212 | 12.217 |
| STAPHYLOCOCCUS WARNERI | 289, 000 | 1, 536, 000 | 15.219 | 80.885 |
| STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS | 0 | 0 | 0 | 0 |
| STAPHYLOCOCCUS SCIURI | 50, 000 | 227, 000 | 2.633 | 11.954 |
| CORYNEBACTERIUM BOVIS | 221, 000 | 1, 131, 000 | 11.638 | 59.558 |
| PROTOTHECA ZOPFII | 11, 000 | 45, 000 | 0.579 | 2.370 |
| ESCHERICHIA COLI | 272, 000 | 1, 437, 000 | 14.323 | 75.671 |
| KLEBSIELLA PNEUMONIAE | 74, 000 | 392, 000 | 3.897 | 20.642 |
| PSEUDOMONAS AERUGINOSA | 182, 000 | 954, 000 | 9.584 | 50.237 |

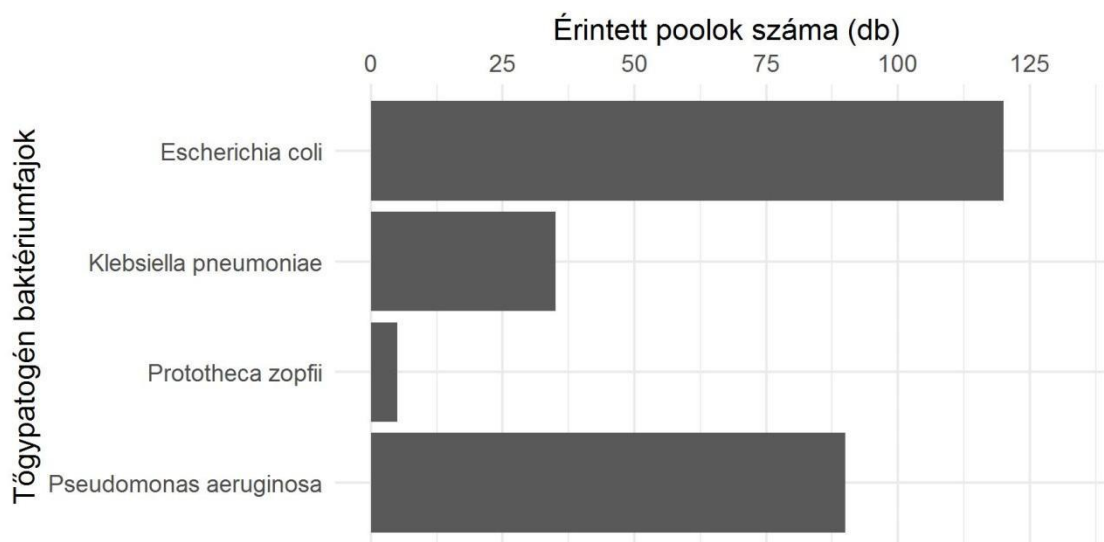
11. táblázat: Adott patogénnel kontaminált nagy tejtermelésű telepeket tartalmazó poolok térfogata

| Patogén faj | Min. térf. (l) | Max. térf. (l) | Min. térf. (%) | Max. térf. (%) |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| STREPTOCOCCUS UBERIS | 25,000 | 100,000 | 2.133 | 8.532 |
| STREPTOCOCCUS AGALACTIAE | 200,000 | 1,172,000 | 17.065 | 100 |
| STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE | 64,000 | 346,000 | 5.461 | 29.522 |
| STAPHYLOCOCCUS AUREUS | 200,000 | 1,172,000 | 17.065 | 100 |
| STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS | 83,000 | 407,000 | 7.082 | 34.727 |
| STAPHYLOCOCCUS HYICUS | 0 | 0 | 0 | 0 |
| STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES | 0 | 0 | 0 | 0 |
| STAPHYLOCOCCUS SIMULANS | 0 | 0 | 0 | 0 |
| STAPHYLOCOCCUS WARNERI | 111,000 | 580,000 | 9.471 | 49.488 |
| STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS | 25,000 | 100,000 | 2.133 | 8.532 |
| STAPHYLOCOCCUS SCIURI | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CORYNEBACTERIUM BOVIS | 200,000 | 1,172,000 | 17.065 | 100 |
| PROTOTHECA ZOPFII | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ESCHERICHIA COLI | 200,000 | 1,172,000 | 17.065 | 100 |
| KLEBSIELLA PNEUMONIAE | 26,000 | 132,000 | 2.218 | 11.263 |
| PSEUDOMONAS AERUGINOSA | 75,000 | 446,000 | 6.399 | 38.055 |

A 2. ábra a tőgypatogénnel szennyezett poolok számát mutatja meg, a 3., 4., 5., 6. és 7. ábrák pedig ugyan ezen eredmények egyes patogénjeit, patogén csoportjait mutatják be.

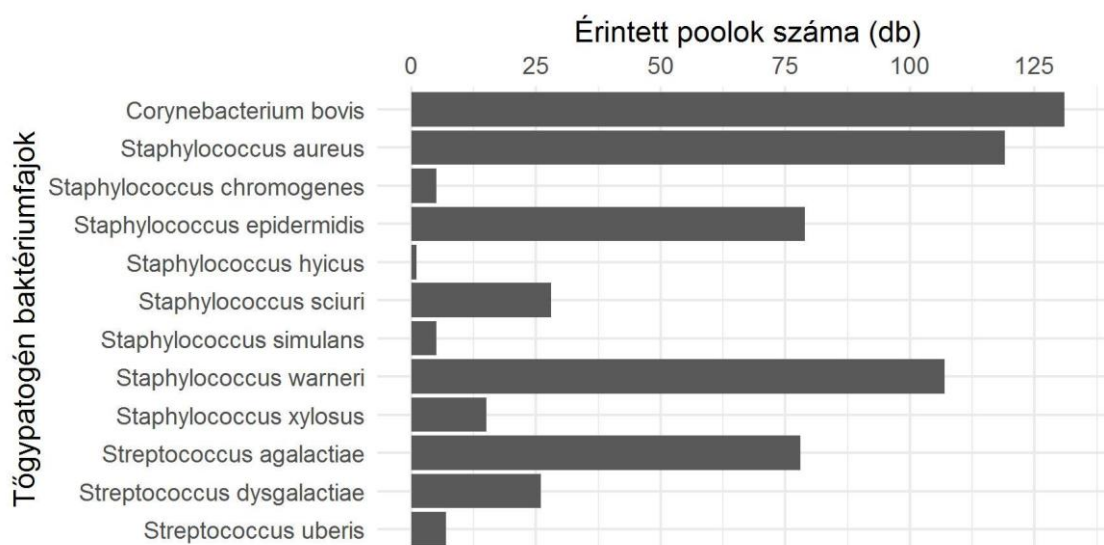


2. ábra Egyes patogénnel szennyezett poolok száma



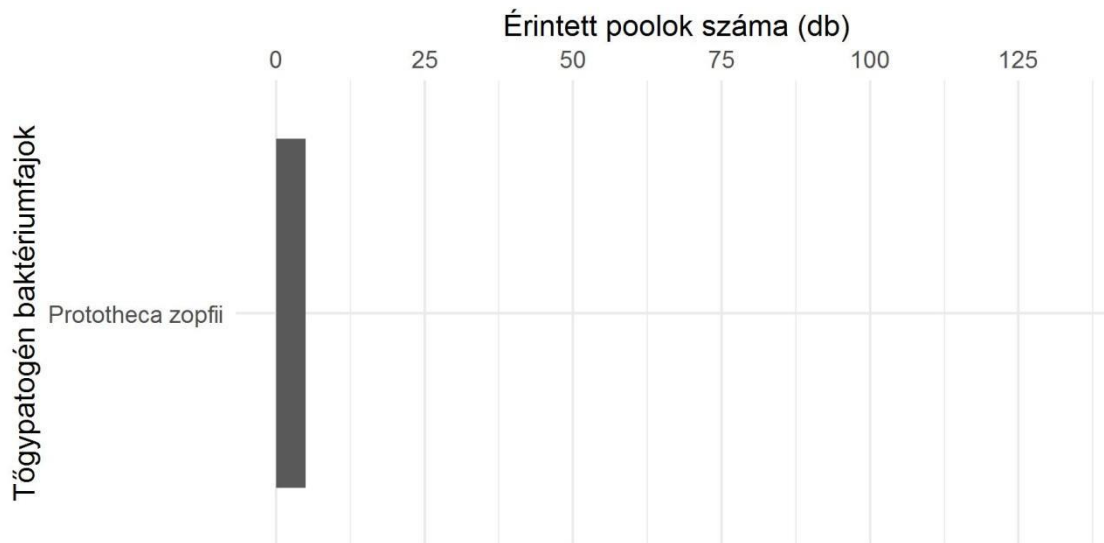
3. ábra Gram- baktériumokkal és *Protothecával* szennyezett poolok száma

Az *E. coli* szennyezettség 120 db poolból volt kimutatható. A *Klebsiella pneumoniae* 35 db, a *Prototheca zopfii* 5 db, a *Pseudomonas aeruginosa* pedig 90 db poolt kontaminált.



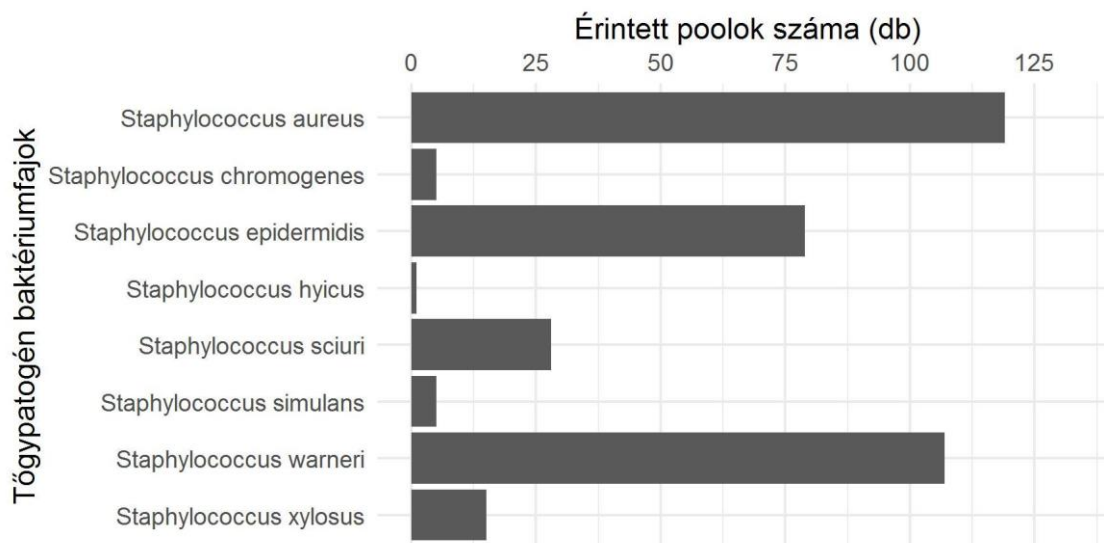
4. ábra Gram + baktériumokkal szennyezett poolok száma

Corynebacterium bovis a vizsgált poolok közül 131-ben volt detektálható. A *Staphylococcus* fajok közül *Staphylococcus aureus* 119 db, *Staphylococcus chromogenes* 5 db, *Staphylococcus epidermidis* 79 db, *Staphylococcus hyicus* 1 db, *Staphylococcus sciuri* 28 db, *Staphylococcus simulans* 5 db, *Staphylococcus warneri* 107 db, *Staphylococcus xylosus* pedig 15 db poolt kontaminált. *Streptococcus agalactiae* által 78 db, *Streptococcus dysgalactiae* által 26 db, *Streptococcus uberis* által pedig 7 db pool volt szennyezett.



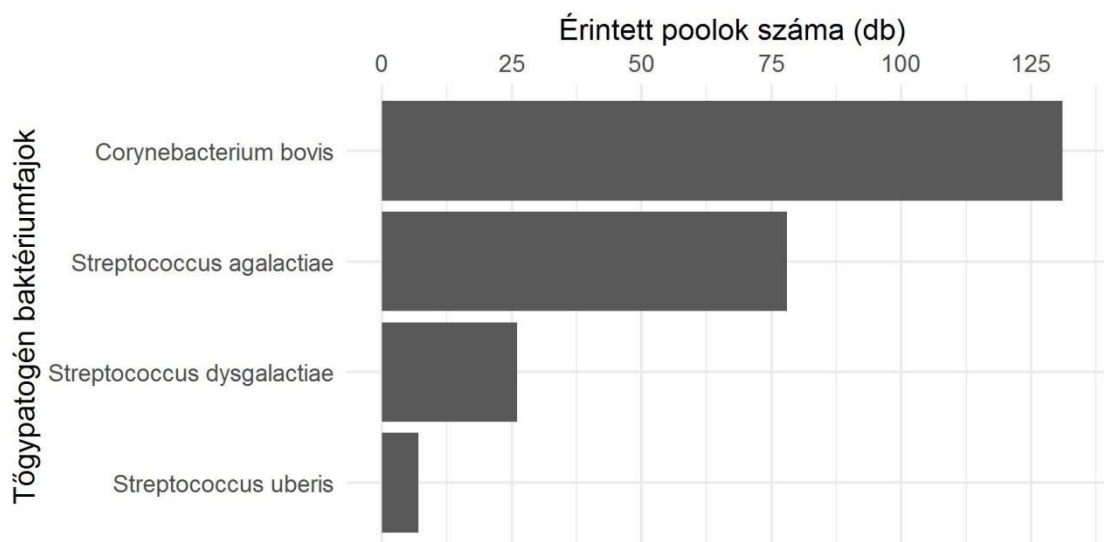
5. ábra *Protothecával* szennyezett poolok száma

Prototheca zopfii 5 db poolból volt kimutatható.



6. ábra *Staphylococcus* fajokkal szennyezett poolok száma

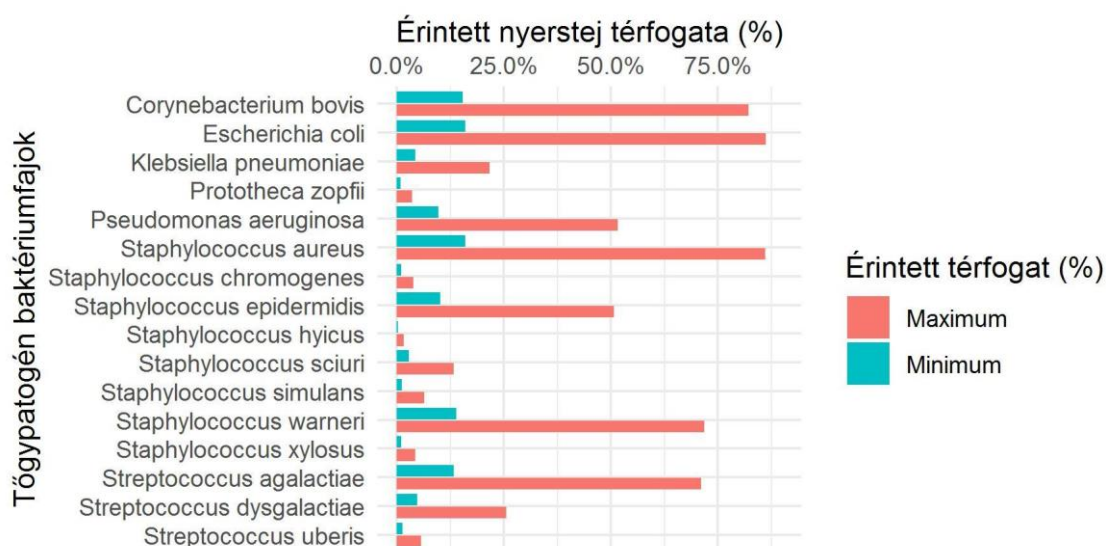
A *Staphylococcus* fajok közül *Staphylococcus aureus* 119 db, *Staphylococcus chromogenes* 5 db, *Staphylococcus epidermidis* 79 db, *Staphylococcus hyicus* 1 db, *Staphylococcus sciuri* 28 db, *Staphylococcus simulans* 5 db, *Staphylococcus warneri* 107 db, *Staphylococcus xylosus* pedig 15 db poolt kontaminált.



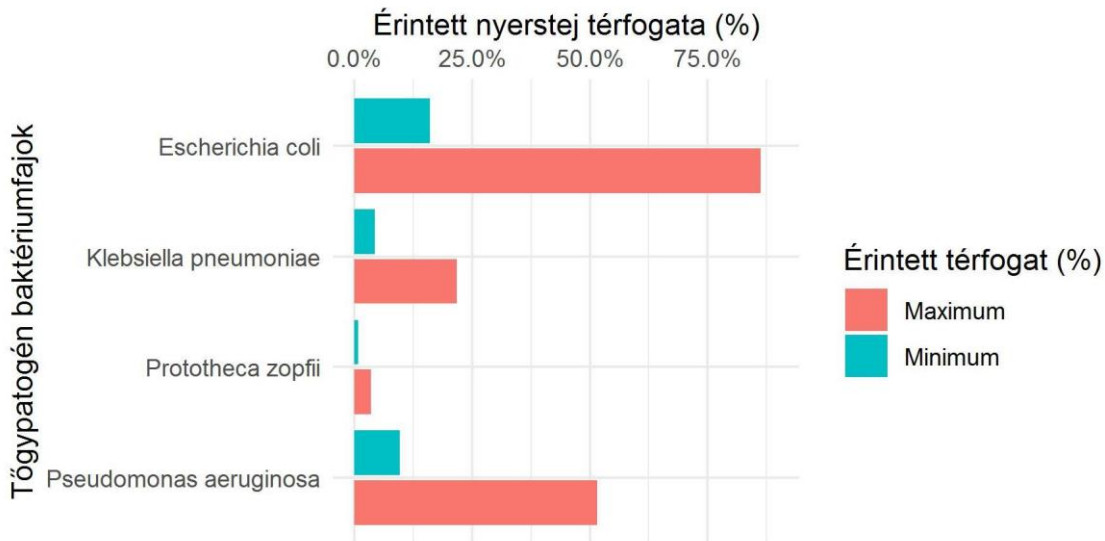
7. ábra *Corynebacterium* és *Streptococcus* fajok által kontaminált poolok száma

Corynebacterium bovis a vizsgált poolok közül 131-ben volt detektálható. *Streptococcus agalactiae* által 78 db, *Streptococcus dysgalactiae* által 26 db, *Streptococcus uberis* által pedig 7 db pool volt szennyezett.

A következő ábrákon (8.-13. ábra) a kimutatott baktériumok által szennyezett térfogat ábrázolása látható, a teljes vizsgált tejmennyiség százalékban megadva, abc sorrendben. Piros színnel az adott patogén által legnagyobb szennyezhető tejmennyiség, kék színnel pedig a legkevesebb szennyezett mennyiség került ábrázolásra.

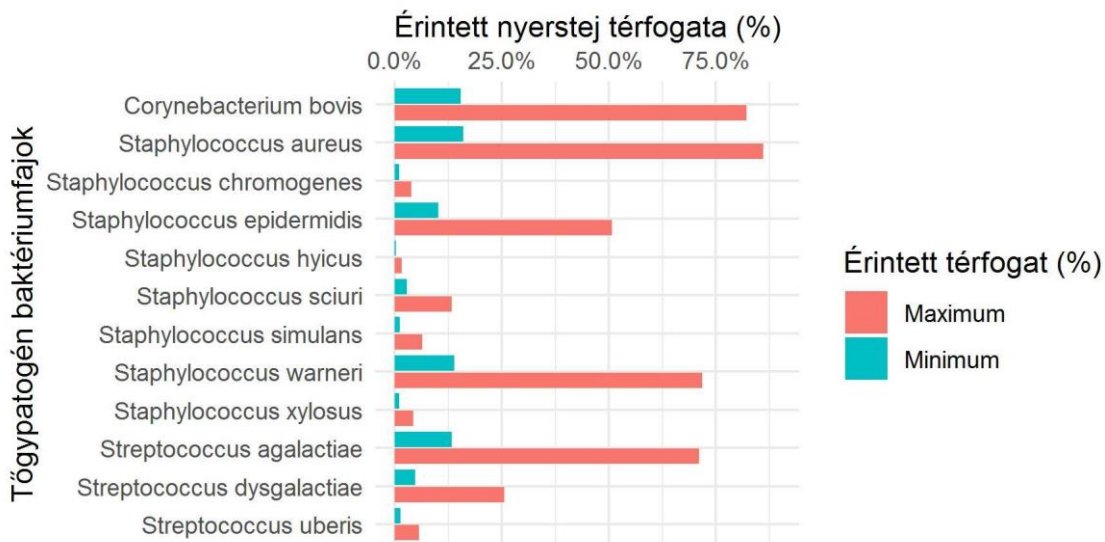


8. ábra Egyes patogén baktériumok által kontaminált minimális és maximális térfogat (%)

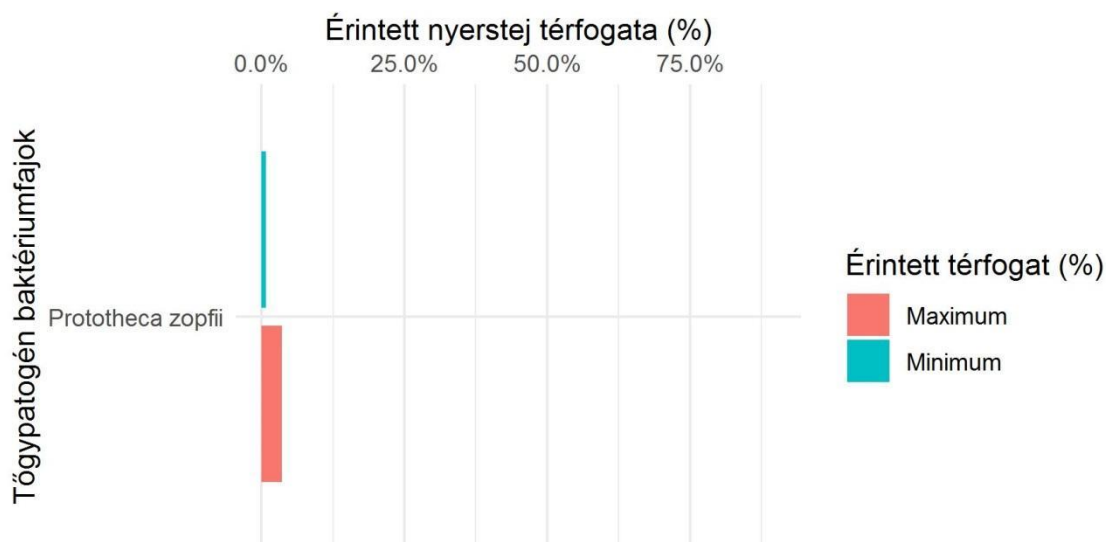


9. ábra Gram- baktériumok és *Prototheca* által kontaminált minimális és maximális térfogat (%)

Az *Escherichia coli* által szennyezett tej a teljes vizsgált térfogatra vonatkoztatva minimum 16.001 %-ot, maximum pedig 86.226 %-ot tett ki. *Klebsiella pneumoniae* a poolok által reprezentált tejmennyiség minimum 4.312 %-ában, maximum 21.730%-ában volt jelen. *Pseudomonas aeruginosa* a teljes tejmennyiségre vetítve minimum 9.625 %-ban , maximum pedig 51.571%-ban volt jelen. *Prototheca zopfii* a teljes tejmennyiségre vonatkoztatva minimum 0.788 százalékból, maximum pedig 3.554 százalékból mutatható ki.

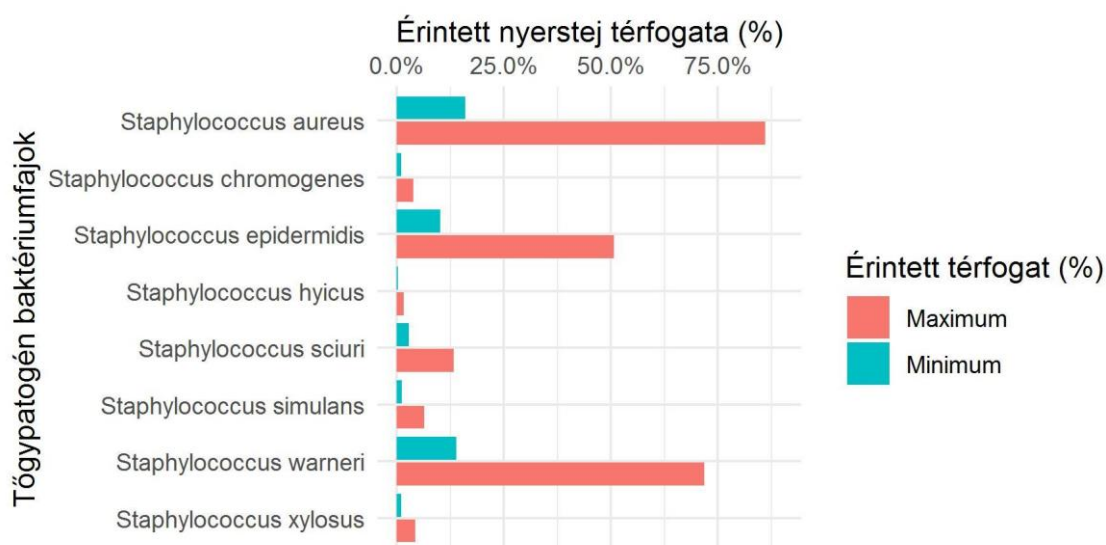


10. ábra Gram + baktériumok által kontaminált minimális és maximális térfogata (%)



11. ábra *Prototheca* által kontaminált minimális és maximális térfogat (%)

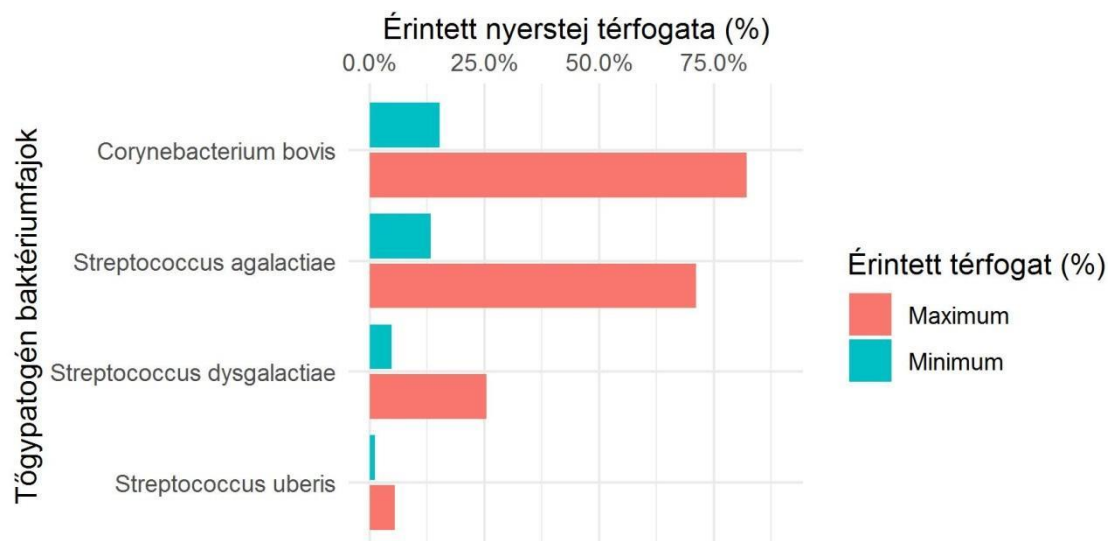
Prototheca zopfii a teljes tejmennyiségre vonatkoztatva minimum 0.788 százalékból, maximum pedig 3.554 százalékból mutatható ki.



12. ábra *Staphylococcus* fajok által kontaminált minimális és maximális térfogat (%)

Staphylococcus aureus a poolok által reprezentált tejmennyiség minimum 15.966%-ában, maximum 86.080%-ában, *Staphylococcus epidermidis* minimum 10.193%-ában, maximum 50.687%-ában, *Staphylococcus hyicus* pedig minimum 0.255%-ában, maximum 1.530%-ában volt jelen. *Staphylococcus chromogenes* a teljes tejmennyiségre vetítve minimum 0.955%-ban, maximum pedig 3.876%-ban volt jelen. *Staphylococcus simulans* a teljes tejmennyiségre vonatkoztatva minimum 1.134%-ból, maximum pedig 6.348%-ból mutatható ki. A poolok által reprezentált tejmennyiségnek a *Staphylococcus warneri* 13.820-71.778, a *Staphylococcus*

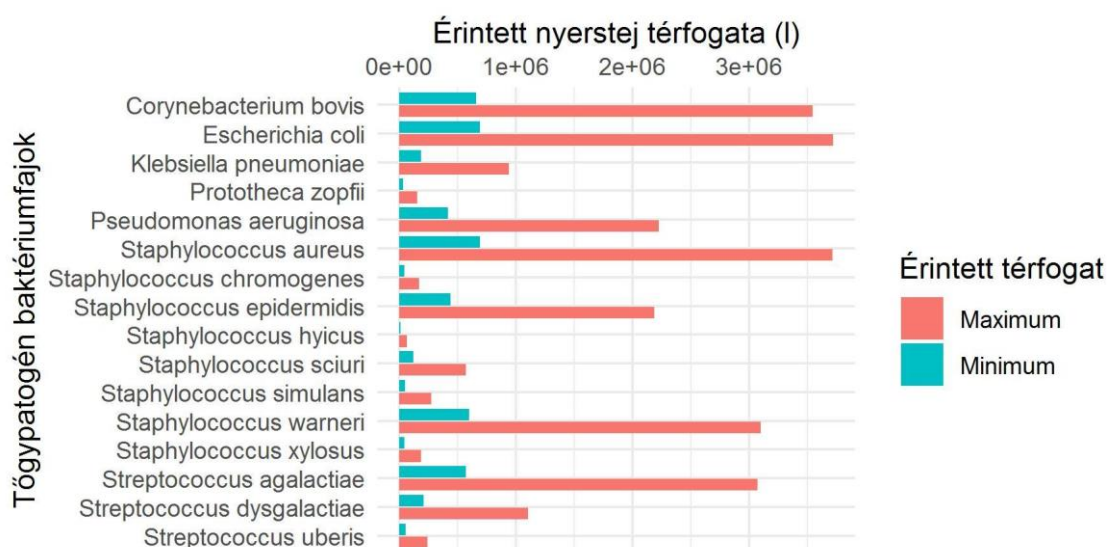
xylosus 1.048-4.294, a *Staphylococcus sciuri* pedig 2.837-13.231 térfogatszázalékában fordulhatott elő.



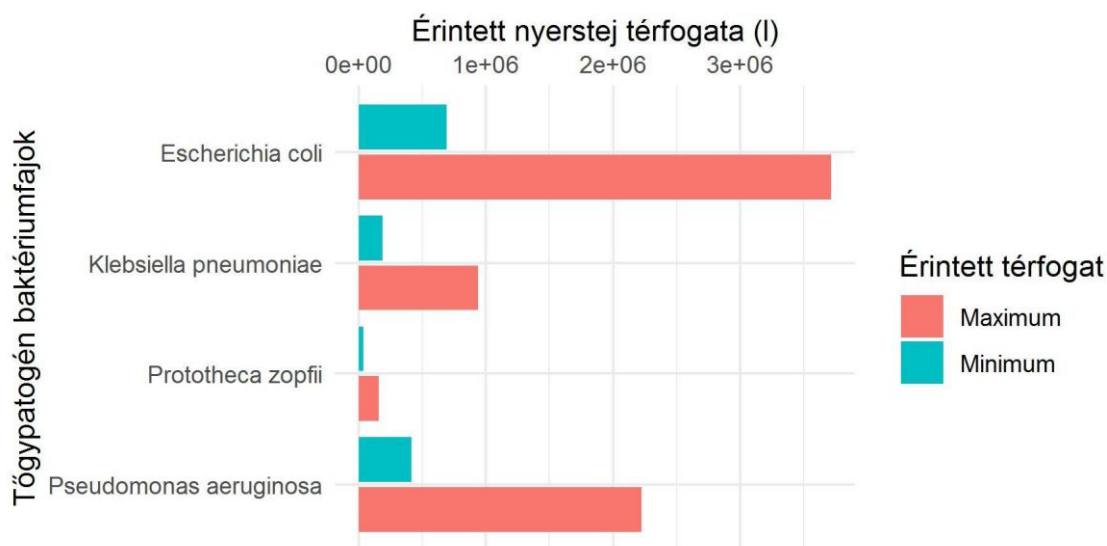
13. ábra *Corynebacterium* és *Streptococcus* fajok által kontaminált minimális és maximális térfogat (%)

Streptococcus uberis a poolok által reprezentált tejmennyiség minimum 1.229%-ában, maximum 5.576%-ában volt jelen. *Streptococcus agalactiae* a teljes tejmennyiségre vetítve minimum 13.261%-ban, maximum pedig 71.131%-ban volt jelen. *Streptococcus dysgalactiae* a teljes tejmennyiségre vonatkoztatva minimum 4.805%-ból, maximum pedig 25.530%-ból mutatható ki. *Corynebacterium bovis* a poolok által reprezentált tejmennyiség 15.315-82.125 térfogatszázalékában fordulhatott elő.

A következő ábrákon (14.-19. ábra) a kimutatott baktériumok által szennyezett térfogat ábrázolása látható, literben megadva, abc sorrendben. Piros színnel az adott patogén által legnagyobb szennyezhető tejmenyiség, kék színnel pedig a legkevesebb szennyezett mennyiség került ábrázolásra.



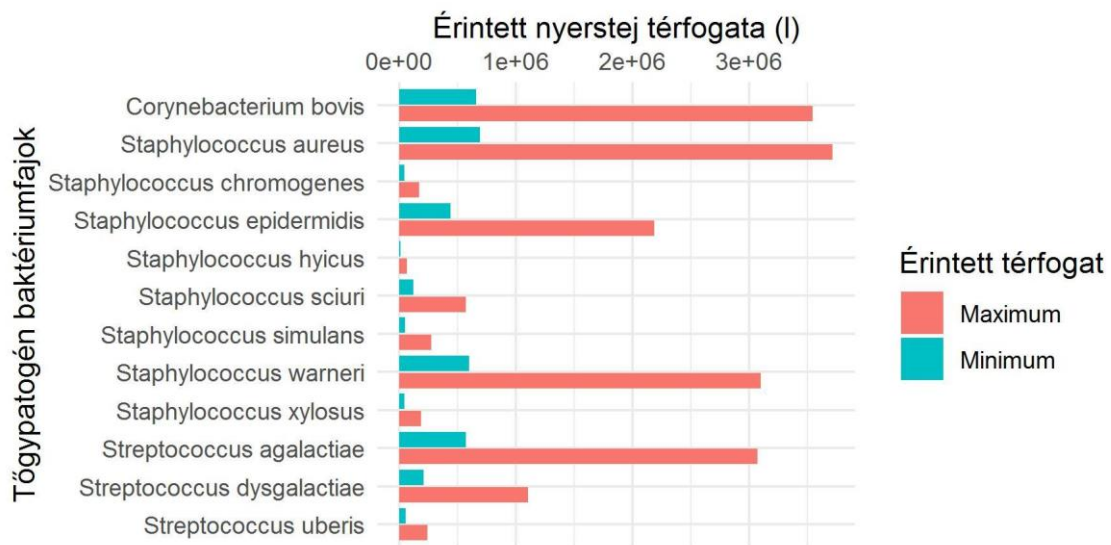
14. ábra A patogén kórokozók által kontaminált minimális és maximális térfogat (l)



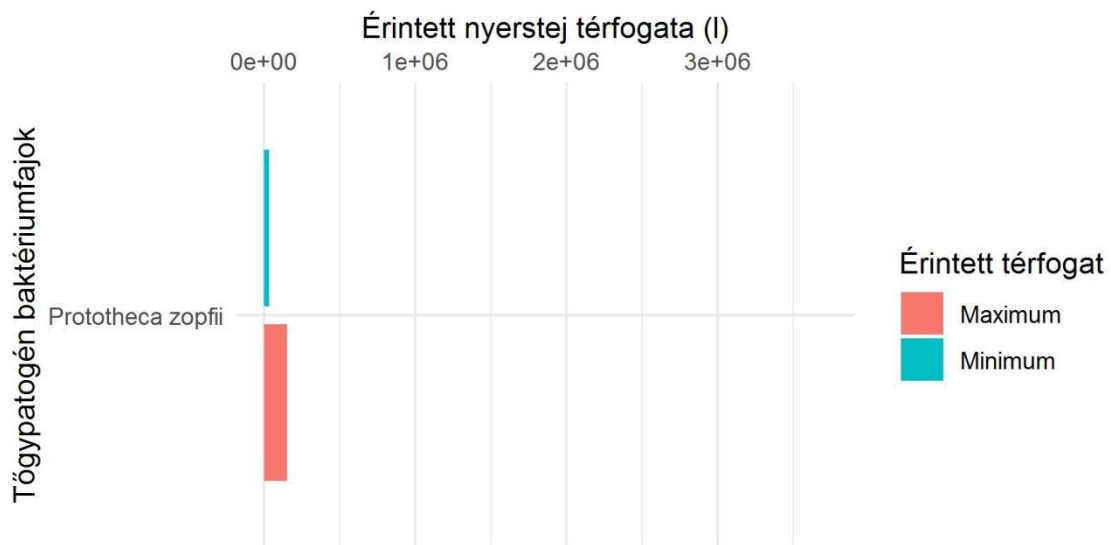
15. ábra Gram- baktériumok és *Prototheca* által kontaminált minimális és maximális térfogat (l)

Escherichia coli a számítások alapján 690,150 liter és 3,719,200 liter közötti tejmenyiséget szennyezett. A *Klebsiella pneumoniae* minimum 186,000 liter, maximum pedig 937,300 liter

közötti tejmennyiséget szennyezett. A *Pseudomonas aeruginosa* által kontaminált tejmennyiség minimum 415,150 liter, maximum pedig 2,224,400 liter.

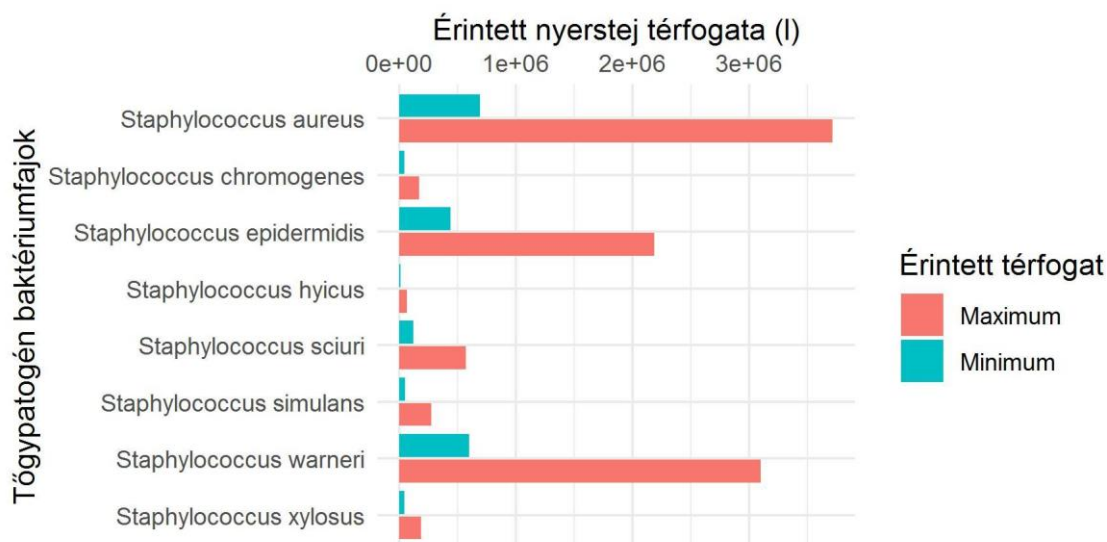


16. ábra Gram + baktériumok által kontaminált minimális és maximális térfogat (l)



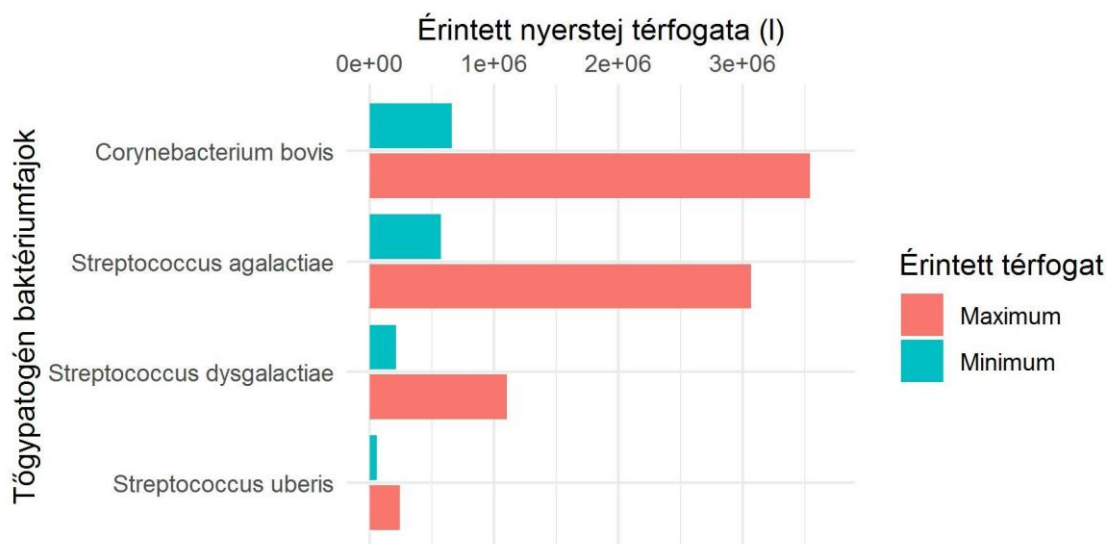
17. ábra *Prototheca zopfii* által kontaminált minimális és maximális térfogat (l)

A *Prototheca zopfii* által szennyezett tejmennyiség 34,000 liter és 153,300 liter közötti mennyiségre tehető.



18. ábra *Staphylococcus* fajok által kontaminált minimális és maximális térfogat (l)

A *Staphylococcus* fajok közül a *Staphylococcus aureus* szennyezettség 688,650 liter és 3,712,900 liter közötti mennyiségre tehető. *Staphylococcus chromogenes* a kapott adatok alapján 41,200 liter és 167,200 liter közötti tejmennyiséget kontaminált. *Staphylococcus epidermidis* minimum 439,650 liter, maximum 2,186,300 liter tejben lehet jelen. *Staphylococcus hyicus* 11,000 liter és 66,000 liter, *Staphylococcus sciuri* 122,350 liter és 570,700 liter, *Staphylococcus simulans* pedig 48,900 liter és 273,800 liter közötti tejmennyiséget szennyezhet a kapott eredmények alapján. A *Staphylococcus warneri* minimum 596,100 liter, maximum 3,096,000 liter, míg a *Staphylococcus xylosum* minimum 45,200, maximum 185,200 liter tejet szennyez.



19. ábra *Corynebacterium* és *Streptococcus* fajok által kontaminált minimális és maximális térfogat (l)

Corynebacterium bovis 660,600 liter és 3,542,300 liter közé tehető tejmennyiséget kontaminált. A *S. agalactiae* minimum 572,000 liter, maximum pedig 3,068,100 liter tejet szennyezett. A *S. dysgalactiae* szennyezettség 207,250 liter és 1,101,200 liter közötti tejmennyiséget érint. A *S. uberis* által szennyezett térfogat 53,000 liter és 240,500 liter közötti mennyiségre tehető.

6. Következtetések

A vizsgálatok eredményei hiánypótlóak a magyarországi árutej termelő állományokból származó tanktejekben előforduló tőgypatogén mikroorganizmusok jelenlétére vonatkozóan. Adatokat kapunk az előforduló kórokozók faji összetételéről és a kontaminált tételek nagyságáról, megoszlásáról. A vizsgált poolok mindegyike tartalmazott legalább egyet a releváns és vizsgálatra kiválasztott keresett kórokozók közül. A vizsgálat során a tőgypatogén baktériumok jelenléte került kimutatásra, az egyes mintákban található mennyiség megállapításához további vizsgálatokra nem került sor. Ezen adatok alapján a közegészségügyi vonatkozásokkal vagy a klinikai betegség prevalenciájával kapcsolatban nem lehet következtetést levonni, viszont az egyes baktériumok előfordulásának gyakorisága kimutatható.

Az adatok az országos, vagy regionális tőgyegészségügyi védekezési programok tervezésében hasznos támpontot szolgáltatnak az állatorvosoknak és az állattenyésztő szakembereknek.

7.Összefoglaló

A tőgygyulladás világszerte jelentős veszteségeket okoz a tejiparban, nem csak a tejmennyiség csökkenése, hanem a megtermelt tej minőségének romlása miatt is. A tejben található egyes baktériumok meggyorsítják a tej romlását, befolyásolják a készülő tejtermék ízét, állagát, egyéb organoleptikus tulajdonságait és eltarthatóságát.

A kutatás célja a magyar árutejben előforduló tőgypatogén kórokozók kimutatása volt. A mintavétel kevert mintából, tanktejből történt az ország több pontján található tehéntelegekről. A vizsgálat során a poolozásnak köszönhetően a magyarországi telepek jelentős részét, szinte minden tejtermelő telepet sikerült lefedni. A vizsgált kórokozók listáját a *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis*, *Staph. hyicus*, *Staph. chromogenes*, *Staph. simulans*, *Staph. warneri*, *Staph. xylosus*, *Staph. sciuri*, *Corynebacterium bovis*, *Prototheca zopfii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* alkotja. A vizsgált poolok mindegyiket tartalmazott legalább egy féle keresett kórokozót.

A minták anonimitása és a költségcsökkentés érdekében a minták poolokban lettek felhasználva, melyekben 5-6 minta került elegyítésre. A minták az átlagos napi tejmennyiség alapján lettek csoportosítva. 86 poolt sikerült azonos átlagos napi tejtermelésű telepekkel feltölteni, a kimaradt minták közül pedig az átlagos napi termelésben egymáshoz legközelebb eső telepek mintái kerültek egy poolba. Összesen 141 pool került kialakításra.

A rendelkezésre álló adatokat a számításokhoz alapul véve meghatározásra került az adott patogénnel szennyezett lehetséges minimum és maximum tejmennyiség. A vizsgálat során csak a kórokozók szekvenálással történő azonosítása, kimutatása történt meg, nem tért ki a mintákban található baktériumok mennyiségi meghatározására, így a klinikai kórképről és az élelmiszerbiztonsági jelentőségről következtetés nem vonható le.

8. Summary

Mastitis causes huge losses to the dairy industry worldwide, not just because of the decrease in production in volume, but also because of the inferior quality of the affected milk. The bacteria found in milk can not only facilitate spoilage, but also affect the taste, consistency and other organoleptic properties and the shelf life of the milk products.

The purpose of this study was to identify the udder pathogens located in the Hungarian commercial milk. The samples were from mixed milk, tank milk from several farms located all over the country. Because of the pooling method, most of the Hungarian farms could be included. The list of the investigated pathogens involves *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis*, *Staph. hyicus*, *Staph. chromogenes*, *Staph. simulans*, *Staph. warneri*, *Staph. xylosum*, *Staph. sciuri*, *Corynebacterium bovis*, *Prototheca zopfii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. All of the checked pools contained at least one of the searched pathogens. The analysis only consisted of sequencing and identifying the pathogens, it did not involve the quantity of detected pathogens in the samples, so it cannot provide information regarding the clinical picture and consequence to food safety.

To retain anonymity and be cost effective, the samples were examined in pools, where 3-6 samples were mixed in each pool. The samples were sorted according to the average daily milk production. 86 pools were successfully made by grouping samples with the same average daily milk production, and the remaining samples were grouped by putting together the samples with the most similar daily milk production. Including all, 141 pools were made.

Using the available data for the calculations, the minimum and maximum milk volume contaminated by each pathogen was determined. In this research only the identification by sequencing and determination of presence was done, no attempt was made for quantitative determination, so it can't be used to determine clinical or food safety indications.

9.Irodalomjegyzék

Addis et al, The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies Mol. BioSyst., 2016,12, 2359-2372

Ambardar S, Gupta R, Trakroo D, Lal R, Vakhlu J. High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. Indian J Microbiol. 2016;56(4):394–404. doi:10.1007/s12088-016-0606-4

Babay et al, Új generációs szekvenálás és használata az aneuploidiák nem invazív prae-natalis vizsgálatában, ORVOSI HETILAP 156. évfolyam, 26. szám 1041–1048. DOI: 10.1556/650.2015.30200

Balicza, Új generációs szekvenálási eljárások klinikai alkalmazása ritka neurológiai betegségek diagnosztikájában Doktori értekezés 2018 <http://dx.doi.org/10.14753/SE.2018.2145>

Cummings PJ, Ahmed R, Durocher JA, Jessen A, Vardi T, Obom KM. Pyrosequencing for microbial identification and characterization. J Vis Exp. 2013;(78):e50405. Published 2013 Aug 22. doi:10.3791/50405

Derakhshani, Hooman, Investigating the role of biotic and abiotic factors in modulating bovine mammary gland microbiota: potential implications for udder health and mastitis susceptibility, 2018-07-25, URI: <http://hdl.handle.net/1993/33186>

Guzvic, Miodrag. (2012). The history of DNA sequencing. Journal of Medical Biochemistry. 32. 301-312. 10.2478/jomb-2014-0004.

Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Genomics. 2016;107(1):1–8. doi:10.1016/j.ygeno.2015.11.003

N. C, JAIN, Common Mammary Pathogens and Factors in Infection and Mastitis, Journal of Dairy Science Vol. 62:128-134, No. 1, 1979

Jakeen et al, Emerging of coagulase negative staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard, International Journal of Veterinary Science and Medicine Volume 1, Issue 2, December 2013, Pages 74-78 <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.05.006>

Kromker V, Reinecke F, Paduch JH, Grabowski N (2014) Bovine *Streptococcus uberis* Intramammary Infections and Mastitis. *Clin Microbiol* 3: 157. doi:10.4172/2327-5073.1000157

Metzger, S.A. et al. Influence of sampling technique and bedding type on the milk microbiota: Results of a pilot study *Journal of Dairy Science*, 2018, Volume 101, Issue 7, 6346 – 6356

Li N, Wang Y, You C, et al. Variation in Raw Milk Microbiota Throughout 12 Months and the Impact of Weather Conditions. *Sci Rep.* 2018;8(1):2371. Published 2018 Feb 5. doi:10.1038/s41598-018-20862-8

Pang M, Xie X, Bao H, et al. Insights Into the Bovine Milk Microbiota in Dairy Farms With Different Incidence Rates of Subclinical Mastitis. *Front Microbiol.* 2018;9:2379. Published 2018 Oct 16. doi:10.3389/fmicb.2018.02379

C. S. Petersson-Wolfe et al, *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection, and Control *VCE Publications* / 404 / 404-229, June 11, 2010

Quigley et al. The complex microbiota of raw milk *FEMS Microbiol Rev.* 2013 Sep;37(5):664-98. doi: 10.1111/1574-6976.12030. Epub 2013 Jul 24.

Sâmea F J, Felipe M D, Rodrigo C d S, Helio L. The Importance of *Corynebacterium Bovis* Causing Mastitis. *Dairy and Vet Sci J.* 2017; 1(3): 555561. DOI: 10.19080/JDVS.2017.01.555561

S. Jánosi, F. Ratz, G. Szigeti, M. Kulcsar, J. Kerényi, T. Laukó, F. Katona & G. Huszenicza (2001) Pathophysiology: Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*, *Veterinary Quarterly*, 23:2, 58-61, DOI: 10.1080/01652176.2001.9695082

Taponen, S., McGuinness, D., Hiitiö, H. et al. Bovine milk microbiome: a more complex issue than expected. *Vet Res* 50, 44 (2019) doi:10.1186/s13567-019-0662-y

Thorberg et al. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin *Veterinary Microbiology* Volume 115, Issues 1–3, 15 June 2006, Pages 163-172 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.013>

Valkó, *Corynebacterinae* alrendbe tartozó tőgygyulladás-kórokozó baktériumok diagnosztikai vizsgálatai, Szakdolgozat, 2014 <http://hdl.handle.net/10832/1350>

Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011, 16 (4):357–372. doi:10.1007/s10911-011-9236-y

10.Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Könyves Lászlónak, az Állathigiénia, Állomány egészségügyi tanszék vezetőjének és a tanszék munkatársainak, akik mindig segítőkészek voltak, támogattak diplomamunkám megírásában. Szeretném megköszönni dr. Seregi Bernadett munkáját és segítségét, aki az eredmények kiértékelését végezte. Továbbá szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak az éveken át tartó támogatást.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósult meg (a támogatási szerződés száma: EFOP 3.6.1.-16-2016-00024, a projekt címe: Inteligens szakosodást szolgáló fejlesztések az Állatorvostudományi Egyetem és a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdasági és Élelmiszertudományi Karának együttműködésében).

Mellékletek

4. melléklet Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. Könyves László..... igazolom, hogy
Bendő Blanka Anikó..... (a hallgató neve)
Tehentejék mikroorganizmus profilvizsgálata, különös tekintettel egyes
tőgypatogén mikroorganizmusokra
című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. 11. 22......

Dr. Könyves László 

a témavezető neve és aláírása

Állatorvostudományi Egyetem
Állathigiéniai, Állomány-egészségtani
Tanszék és Mobilklinika
1078 Budapest, István u. 2.
1400 Budapest, Pf. 2.

tanszék

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Bendő Blanka Anitő
Elérhetőség (e-mail cím): bendoblanka94@gmail.com
A feltöltendő mű címe: Tehéntej és mikroorganizmus profilvizsgálata, különös tekintettel egyes tejsavbaktériumok mikroorganizmusokra
A mű megjelenési adatai: 2019
Az átadott fájlok száma: 1db

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyag rész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörtő módon visszaélne.

Budapest, 2019. év¹².....hó ..⁰⁶.....nap

Bendő Blanka

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*