

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

***Bordetella bronchiseptica* törzsek összehasonlító feno- és
genotípusos vizsgálata, különös tekintettel a baktérium
virulencia tényezőire és gazdaadaptációjára**

PhD értekezés

Khayer Bernadett

2015

Témavezető:

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

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

.....
Khayer Bernadett

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Rövidítésjegyzék.....	3
1. Összefoglalás	4
Summary.....	6
2. Bevezetés.....	8
3. Irodalmi áttekintés	10
3.1. <i>Bordetella bronchiseptica</i> általános jellemzése	10
3.1.1. A <i>Bordetella</i> nemzetség tagjai és jellemzésük.....	10
3.1.2. A <i>B. bronchiseptica</i> evolúciós kapcsolatai.....	13
3.2. A <i>Bordetella bronchiseptica</i> által okozott betegségek	15
3.2.1. Sertések torzító orrgyulladás.....	15
3.2.2. Kutyák fertőző tracheobronchitise.....	16
3.2.3. Macskák bordetellosisa	17
3.2.4. Nyulak <i>B. bronchiseptica</i> fertőzöttsége.....	18
3.2.5. Rágcsálók <i>B. bronchiseptica</i> fertőzöttsége	19
3.2.6. Humán megbetegedések, zoonosis	19
3.3. A <i>Bordetella bronchiseptica</i> virulencia tényezői.....	20
3.3.1. A BvgAS szabályozó rendszer	20
3.3.2. Adhezinek	22
3.3.3. Toxinok.....	24
3.3.4. Egyéb virulenciafaktorok	26
3.4. A <i>Bordetella bronchiseptica</i> jellemzésére használt vizsgálati módszerek.....	28
4. Anyag és módszer	31
4.1. A felhasznált <i>B. bronchiseptica</i> törzsek.....	31
4.1.1. A baktériumok izolálása, tenyésztése és azonosítása	31
4.2. A <i>B. bronchiseptica</i> törzsek fenotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok.....	31
4.2.1. Telepmorfológiai vizsgálatok.....	31
4.2.2. Hemolizáló képesség vizsgálata	31
4.2.3. Biokémiai tulajdonságok vizsgálata	32
4.2.4. Ureum-bontó képesség vizsgálata.....	32
4.2.5. Hemagglutinációs próba	33
4.2.6. A mozgásképeség vizsgálata	33
4.2.7. Antibiotikum-érzékenység meghatározása.....	34
4.3. <i>B. bronchiseptica</i> törzsek genotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok	35
4.3.1. DNS izolálás	35

4.3.2. Polimeráz láncreakció.....	35
4.3.3. Restriktációs fragmenthossz polimorfizmus	37
4.3.4. Szekvencia-meghatározás és filogenetikai elemzés	38
5. Eredmények.....	40
5.1. A <i>B. bronchiseptica</i> törzsek jellemzői	40
5.1.1. Az izolált törzsek.....	40
5.1.2. A fajazonosítás eredményei.....	40
5.2. A fenotípusos vizsgálatok eredményei.....	41
5.2.1. A törzsek hemolizáló képessége.....	41
5.2.2. A hemagglutinációs képesség vizsgálata	42
5.2.3. A motilitás vizsgálata.....	44
5.2.4. A törzsek antibiotikum-érzékenysége.....	45
5.3. Az ureáz-negatív törzsek.....	48
5.4. Virulenciagének jellemzése.....	49
5.4.1. Dermonekrotoxin	50
5.4.2. Fimbria.....	50
5.4.3. Flagellin	52
5.4.4. Adenilát cikláz-hemolizin	56
5.4.5. Peptid transzport protein	58
6. Megvitatás	60
6.1. A törzsek izolálása és biokémiai tulajdonságai.....	60
6.2. Antibiotikum-rezisztencia	61
6.3. Az ureáz-negatív törzsek sajátosságai.....	63
6.4. Adhezinekkal kapcsolatos megfigyelések.....	64
6.5. A mozgásképességgel összefüggő sajátosságok	67
6.6. Toxinokkal kapcsolatos tulajdonságok	71
6.7. Következtetés	73
7. Új tudományos eredmények.....	75
8. Irodalomjegyzék	76
9. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények	90
9.1. Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk	90
9.2. Konferencia prezentációk	90
9.3. Akadémiai beszámolók	92
10. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó publikációk	92
11. Köszönetnyilvánítás.....	93
12. Mellékletek	94

Rövidítésjegyzék

ACT	adenilát cikláz-hemolizin toxin	adenylate cyclase-hemolysin toxin
as	aminosav	amino acid
ATP	adenozin-trifoszfát	adenosine triphosphate
<i>B.</i>	<i>Bordetella</i>	<i>Bordetella</i>
Bb	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
BG	Bordet-Gengou táptalaj	Bordet-Gengou agar
BHI	szarvasmarha agy-szív kivonat	brain-heart-infusion
bp	bázispár	base pair
<i>bvg</i>	<i>Bordetella</i> virulencia gének	<i>Bordetella</i> virulence genes
BvgAS	a <i>Bordetella</i> -k szabályozó rendszere	<i>Bordetella</i> regulatory system
c-AMP	ciklikus adenozin-monofoszfát	cyclic adenosine monophosphate
<i>cyaA</i>	adenilát cikláz kódoló gén	adenylate cyclase coding gene
DMSO	dimetil-szulfoxid	dimethyl sulfoxide
DNS	dezoxiribonukleinsav	deoxyribonucleic acid
DNT	dermonekrotoxin	dermonecrotic toxin
<i>dnt</i>	dermonekrotoxin kódoló gén	dermonecrotic toxin coding gene
dNTP	dezoxinukleotid-trifoszfát	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav	ethylenediaminetetraacetic acid
ET	elektroforetikus típus	electrophoretotype
FIM	fimbria	fimbria
<i>fimA</i>	“A” típusú fimbriát kódoló gén	coding gene of A-type fimbria
FHA	filamentózus hemagglutinin	filamentous haemagglutinin
FLA	flagellin	flagellin
<i>flaA</i>	flagellint kódoló gén	flagellin coding gene
LB	Luria-Bertani táptalaj/tápleves	Luria-Bertani agar/broth
LPS	lipopoliszacharid	lipopolysaccharide
MIC	minimális gátló koncentráció	minimal inhibitory concentration
mtsai.	munkatársai	<i>et alii</i>
n	darabszám	number
PBS	foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat	phosphate buffered saline
PCR	polimeráz láncreakció	polymerase chain reaction
PRN	pertaktin	pertactin
<i>ptp</i>	peptid transzport protein operon	peptide transport protein operon
RE	restrikciós endonukleáz	restriction endonuclease
RFLP	restrikciós fragmenthossz polimorfizmus	restriction fragment length polymorphism
szm	szarvasmarha	bovine
TBE	tris-borát-EDTA puffer	tris-borate-EDTA buffer
TCT	tracheális citotoxin	tracheal cytotoxin
TO	torzító orrgyulladás	atrophic rhinitis (AR)
TTSS	hármastípusú szekréciós rendszer	type three secretion system
<i>ureC</i>	ureáz enzim kódoló gén	urease coding gene
VA	véres agar	blood agar
vt	vörösvértest / vörösvérsejt	red blood cell

1. Összefoglalás

A *Bordetella bronchiseptica* széles körben elterjedt kórokozó baktérium. Fontos szerepet játszik a sertések torzító orrgyulladásának és a kutyák kennelköhögésének kóroktanában, összefüggésbe hozzák számos házi és vadon élő állatfaj légúti megbetegedéseivel, és egyre gyakrabban számolnak be emberi fertőzésekről is.

Munkánk célja volt kilenc különböző gazdafajból izolált és eltérő földrajzi területekről származó *B. bronchiseptica* törzsek fenotípus- és genotípusjellemzőkkel történő jellemzése, különös tekintettel a *B. bronchiseptica* virulencia tényezőinek pontosabb megismerésére és gazdaadaptációra utaló jegyek keresésére.

A vizsgálatokba bevont törzsek azonosítására hagyományos biokémiai próbákat és fajspecifikus polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmaztunk. A molekuláris azonosítás során az összes törzs *B. bronchiseptica*-nak bizonyult, annak ellenére, hogy a törzsek 7%-a a nitrát-redukciós, 2%-a pedig az ureáz aktivitást jelző próbában – a fajra nem jellemző módon –, negatív eredményt adott. Az ureáz-negatív törzsek további biokémiai próbákban (Diatabs tabletták, API 20 NE lemez) sem adtak pozitív reakciót. Az ureáz enzimet kódoló génszakaszt (*ureC*) azonban minden vizsgált törzsnél kimutattuk, ami arra utal, hogy az ureáz aktivitás hiányának oka transzkripció szinten és/vagy a járulékos fehérjék megváltozásában keresendő.

A *B. bronchiseptica* antibiotikumokkal szembeni érzékenységét nyúl és sertés eredetű törzseken Kirby-Bauer korongdiffúziós módszerrel vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a törzsek rezisztensek a penicillinre, a ceftiofurra, a vankomicinre és a linkomicinre, de érzékenyek a kolisztinre, a neomicinre, valamint az alkalmazott quinolonokra. Ampicillinnel és eritromicinnel szemben mindkét gazdafajból származó törzsek esetén változatos eredményeket kaptunk. Tetraciklinre és szulfonamidokra a törzsek többsége érzékenyen reagált, de a nyúl eredetű törzsek 5%-a, a sertés eredetű törzseknek pedig egyharmada szulfonamid-rezisztens volt, és találtunk egy sertés eredetű tetraciklin-rezisztens *B. bronchiseptica* törzset is.

A *B. bronchiseptica* mozgásképességét félfolyékony táptalajon vizsgáltuk különböző moduláló szignálok (szobahőmérséklet, $MgSO_4$) jelenléte mellett, illetve azok hiányában. Megállapítottuk, hogy törzseink valamennyi kísérleti elrendezésben aktív mozgást mutattak, de legnagyobb motilitási zónákat a moduláló szignálok hiányában mértünk, amely alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a vizsgálat során törzseink avirulens állapotúak voltak. A mozgásképesség molekuláris vizsgálata során a csillók fő alkotóelemét (flagellin) kódoló *flaA* génszakaszt vizsgáltuk PCR-t követő restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) módszerrel. Három restrikciós endonukleáz (*HincII*, *BglI* és *MspI*) használatával összesen 8

különböző hasítási mintázatot írtunk le (A-H típus). Az egyes hasítási típusok hazai törzsek esetén összefüggést mutattak a gazdafajjal; kutya eredetű törzsek A, sertés eredetű törzsek B, macskák és tengerimalacok C típusú mintázatot adtak. Nyúl eredetű törzseknél A és B típust is kimutattunk, a humán törzsek (n=7) viszont változatos RFLP-típussal rendelkeztek (A, C, D, F, H). A *flaA* gén változatai és a törzsek gazdafaja közötti összefüggés a nukleinsav alapú filogenetikai fán is nyomon követhető, ugyanis a különböző RFLP-típusok (gazdafajok) különböző klaszterekben helyezkedtek el.

A törzsek adhéziós képességét különböző gazdafajokból származó vörösvértestekkel végzett hemagglutinációs próbával vizsgáltuk. A legerősebb reakciókat kutya- és sertésvér esetében láttuk, míg a leggyengébb agglutinációt csirkevérral tapasztaltuk. Munkánk során gazdaadaptációra utaló jeleket nem találtunk. Feltételezhetjük viszont, hogy a *B. bronchiseptica* többféle hemagglutinációs faktorról rendelkezik, ugyanis egyes törzsek a vizsgálatok folyamán (adott vértípusnál is) eltérő eredményeket adtak. A *B. bronchiseptica* számos adhezinje közül genetikai vizsgálatainkhoz a *fimA* gén által kódolt fimbriát választottuk ki. PCR módszer segítségével megállapítottuk, hogy az összes törzs rendelkezik *fimA* génnel, melyek az RFLP vizsgálatok során azonos mintázatot adtak, a gazdafajtól függetlenül. Szekvencia- és filogenetikai elemzést követően megállapítottuk, hogy a *fimA* génszakaszon belül csak minimális a különbség a törzsek között.

A *B. bronchiseptica* toxinjai közül az adenilát cikláz-hemolizin toxint vizsgáltuk mind hagyományos, mind pedig molekuláris módszerekkel, ugyanis ez a toxin – számos egyéb citopatogén hatás mellett –, felelős a vörösvértestek széteséséért is. A *B. bronchiseptica* hemolitikus tulajdonságait különböző összetételű és pH-jú táptalajokon néztük. A vizsgálatok során változó eredményeket kaptunk, de a hazai kutya eredetű törzsek esetében soha nem tapasztaltunk hemolízist. PCR módszerrel kimutattuk, hogy ezeknél a törzseknél a toxint kódoló *cyaA* gén hiányzik, és helyére az ún. *ptp* operon épül be, amely nukleotida sorrendjét tekintve minden vizsgált törzsnél azonos volt. Magyarországi kutya eredetű *B. bronchiseptica* törzsek esetén a *cyaA* gén hiányát gazdaadaptációs jegynek tekinthetjük. A *cyaA*-pozitív törzsek RFLP vizsgálatakor 4 különböző típust (A-D), azon belül az A típus dominanciáját (90%) írtunk le, amely gazdafajtól független tulajdonság. A *cyaA* génszekvenciák elemzésekor a humán törzsek változatosságát tapasztaltuk, egy hazai törzs esetén új alléltípust írtunk le. A filogenetikai elemzés során törzseink két fő csoportot alkottak, az 1. klaszterbe inkább állati, míg a 2. klaszterbe inkább humán eredetű törzsek kerültek.

A *B. bronchiseptica* törzsekkel végzett kutatásaink alapján elmondható, hogy a fenotípusos jellegek nagymértékben változhatnak a baktérium intra- és extracelluláris állapotától függően, viszont a genetikai vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy léteznek baktériumfajon belüli gazdaadaptációs jegyek, legalábbis szűkebb földrajzi régióon belül.

Summary

Bordetella bronchiseptica is a widespread pathogen bacterium. *B. bronchiseptica* is involved in respiratory diseases in a variety of wild, household, and laboratory mammalian species. It plays a key role in the aetiology of atrophic rhinitis in pigs and canine kennel cough. Accumulation of case reports on human infections indicates that *B. bronchiseptica* may implicate an increasing zoonotic risk as well.

Our aims were to examine *B. bronchiseptica* strains isolated from nine different host species and various geographic regions by pheno- and genotypic methods, and to characterize some virulence factors of *B. bronchiseptica* looking for signs of host adaptation.

Primary identification of the examined strains was confirmed by traditional biochemical tests and species-specific polymerase chain reaction (PCR). However, some of the strains gave unusual reaction in the nitrate-reduction test (7% negative) and in the urease test (2% negative). The *ureC* gene, which codes urease enzyme, was detected at all urease-negative isolates. Presumably, the presence of a partial region of *ureC* could not provide information about the whole urease operon. Conceivably, transcriptional failure or mutations and/or deletions in the coding region of *ureC* or associated genes might block the ability of urea-hydrolysis of *B. bronchiseptica*.

The antibiotic susceptibility of *B. bronchiseptica* strains originated from rabbits and pigs were examined by Kirby-Bauer disk-diffusion method. All strains were resistant to penicillin, ceftiofur, vancomycin and lincomycin, while susceptible to colistin, neomycin and the used quinolones. The sizes of inhibition zone of ampicillin and erythromycin were varied widely between strains from both host species. The majority of the strains were susceptible to tetracycline and sulphonamides, while 5% of the strains from pig and one third of the strains from rabbit proved to be sulphonamide-resistant and one porcine strain was tetracycline-resistant, too.

The motility of *B. bronchiseptica* was investigated on semisolid media with presence or absence of modulating signals (room temperature, MgSO₄). All strains showed active movement in every experimental layout. The largest motility zones were measured at the absence of modulating signals. Presumably, the examined strains shifted into avirulent phase by phenotypic modulation.

Flagellin (encoded by *flaA*), the main component of cilia was analysed by PCR followed restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP). Three restriction endonucleases (*HincII*, *BglI* and *MspI*) were used and 8 different fragment patterns were described (A-H types). Some RFLP-types correlated with host species; canine strains showed type A, porcine strains represented type B and type C flagellin profile was found in

strains from cats and guinea pigs. Type A and B were detected in strains from rabbits, while strains of human origin possessed various RFLP types (A, C, D, F and H). Connection between variances of *flaA* and the host species might be followed up on the phylogenetic tree as well as the different RFLP types (hosts) located on distinct clusters.

Adhesion of the strains was investigated by haemagglutination test with erythrocytes from different host species. We found the most intense reactions with canine and porcine erythrocytes, while the slightest agglutinations were observed with chicken red blood cells. Signs of host adaptation were not detected. Presumably, *B. bronchiseptica* has more haemagglutination factors since some strains showed different results during the tests. From the adhesins of *B. bronchiseptica*, the fimbria (encoding by *fimA*) was chosen for genetic examinations. All strains possessed the *fimA* gene, and every PCR products yielded the same fragment pattern by RFLP, irrespectively of the host. The sequence and phylogenetic analysis showed only minimal differences between strains within *fimA*.

Of the toxins of *B. bronchiseptica*, adenylate cyclase-haemolysin, responsible for the lysis of erythrocytes, was chosen for traditional and molecular examinations. Haemolytic properties of *B. bronchiseptica* were observed on various culture media with different compositions and pH values. The strains showed various results, however, we never saw haemolytic activity with the Hungarian canine strains. The lack of the toxin-coding *cyaA* gene was detected by PCR in these non-haemolytic strains. Additionally, the *cyaA* was replaced by *ptp* operon in all examined strains. Furthermore, the nucleotide sequence of the *ptp* was the same in every *ptp*-positive strains. The deletion of *cyaA* gene within the Hungarian canine *B. bronchiseptica* strains can be regarded as a sign of host adaptation. Four different types (A-D) of the *cyaA* gene were established by RFLP analysis, and the dominance of type A (90%) was noticed, independently from the host. The strains were sorted into two major groups at phylogenetic analysis. Cluster 1. contained strains from animals while cluster 2. involved mostly human strains.

In summary, the phenotypic properties of *B. bronchiseptica* could change considerably, depending on the actual intra- and extracellular conditions of the bacterium. However, results of genetic methods suggest the existing of host adaptation, at least in limited geographic regions.

2. Bevezetés

A *Bordetella bronchiseptica* széles gazdaspektrummal rendelkező, világszerte előforduló Gram-negatív baktérium. Az általa okozott legismertebb kórképek közé tartozik a sertések torzító orrgyulladása és a kutyák kennelköhögése. A légutak megbetegedését idézheti elő még nyúlban, macskában, tengerimalacban, emellett számtalan egyéb házi, laboratóriumi és vadon élő emlősállat légutaiból is izolálták már. A *B. bronchiseptica* fertőzés többnyire nem jár súlyos klinikai tünetekkel vagy nagyarányú elhullásokkal, de tetemes gazdasági veszteségeket okozhat a tenyésztőknek és az állattartó telepeknek. Az egyedileg vagy kis csoportban tartott házi kedvencek fertőződése az egyre gyakoribb emberi megbetegedések miatt válhat fontossá; a megnövekedett humán esetek száma a *B. bronchiseptica* zoonotikus jelentőségére hívja fel a figyelmet.

A kórokozó baktériumok virulencia tényezőik segítségével képesek a betegségek kialakítására. A *B. bronchiseptica* esetében a gazdaszervezet nyálkahártyáján való megtapadásban és annak kolonizációjában szerepet játszó adhezinek, valamint a betegség jellemző tüneteinek kialakításában résztvevő toxinok vizsgálata jelenti a fő kutatási irányvonalat napjainkban. A virulenciafaktorok és a baktériumok gazdaszervezethez való alkalmazkodásának vizsgálata nagymértékben hozzájárulnak a kórokozó baktériumok patomechanizmusainak jobb megértéséhez. A *B. bronchiseptica* alapvető tulajdonságainak feltárása, az általa okozott betegségek előidézésében betöltött szerepének tisztázása elengedhetetlen a hatékony védekezés és a megelőzés szempontjából.

A jelen kutatás célja, hogy a széles körben elterjedt és igen heterogén *B. bronchiseptica* fajon belül az általunk alkalmazott módszerekkel jellemezni és csoportosítani tudjuk törzseinket. Különös figyelmet fordítottunk arra, hogy a fertőzés egyes fázisaiban lényeges virulenciafaktorokat (motilitás, adhezinek és toxinok) fenotípusos tulajdonságaik alapján jellemezzük, és molekuláris technikák segítségével a törzsek közötti esetleges különbségekre, valamint a filogenetikai kapcsolatokra fényt derítsünk. Vizsgálataink középpontjában annak felderítése állt, hogy a *B. bronchiseptica* virulenciáját meghatározó tényezőknek létezik-e gazdafaji specifikussága (gazdaadaptáció), és hogy ezek a tényezők mennyire állandóak térben és időben.

Annak ellenére, hogy a szakirodalomban számos példát találunk a *B. bronchiseptica*-val kapcsolatos célzott kutatásokra, meglehetősen kevés a nagyszámú, elsősorban állati eredetű törzset többféle szempontból vizsgáló, összehasonlító tanulmány. Magyarországon hagyománya van a sertés eredetű *B. bronchiseptica* törzsekkel végzett kutatásoknak, de több gazdafajból származó törzsek összehasonlító vizsgálatára eddig nem került sor. Hazai és nemzetközi viszonylatban is hiánypótlónak tekinthető munkánk nemcsak az általános

alapkutatás számára szolgáltathat új ismereteket, de fontos lehet a nagy- és kisállattartók igényeit kielégítő gyorsdiagnosztikában, a célzottabb terápiás kezelésben és vakcinák fejlesztésében is. A *B. bronchiseptica*-val kapcsolatos új információk segíthetik a zoonózis veszélyének csökkentését, valamint a – *B. pertussis*-szal való nagyfokú hasonlósága miatt –, a számarköhögés elleni hatékonyabb védekezést is. Eredményeink tehát fontosak lehetnek az állatgyógyászat és a humán orvoslás területén is.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. *Bordetella bronchiseptica* általános jellemzése

3.1.1. A *Bordetella* nemzetség tagjai és jellemzésük

A *Bordetella* genus tagjai világszerte elterjedt, Gram-negatív patogén baktériumok, rendszerint a β -proteobaktériumok osztályának *Alcaligenaceae* családjába tartoznak. Jelenleg 8 faj sorolható a nemzetségbe: a *B. pertussis*, a *B. parapertussis*, a *B. bronchiseptica*, a *B. avium*, a *B. hinzii*, a *B. holmesii*, a *B. petrii*, és a *B. trematum*. A nemzetség legismertebb, és egyben névadó tagja a *B. pertussis*, melyet 1906-ban Jules Bordet és Octave Gengou izolált először. A kizárólag embereket fertőző *B. pertussis* a nagy morbiditású szamárköhögés (más néven pertussis) kórokozója. A szamárköhögés pontos eredete nem ismert, első említése is csak az 1540-es években történt, ezért viszonylag új betegségnek tekinthető (Diavatopoulos, 2006). A szamárköhögés klasszikus gyermekbetegség, leginkább az 1-10 éves korosztályt érinti. A kezdeti nátha-szerű tünetek megjelenése után a baktérium által termelt toxinok – elsősorban a pertussistoxin –, hatására kialakulnak a betegségre jellemző szimptomák. A fokozott nyálkatermelés miatt görcsös köhögőrohamok alakulnak ki, az ezt követő erőltetett belégzést pedig jellegzetes húzó hang követi, amelyről a nevét kapta a betegség. A köhögés után gyakran előfordul hányás és cianózis. A tünetek 6-8 hét alatt megszűnhetnek, súlyosabb esetekben azonban tüdőgyulladás és encephalopathia is kialakulhat, amelyek akár halálos kimenetelűek is lehetnek (Cotter és Miller, 2001). Az 1940-es években bevezetett védőoltásoknak köszönhetően a betegség jelentősen visszaszorult, ennek ellenére továbbra is mintegy 50 millió embert érint, és közel 300 000 ember hal meg évente pertussis miatt, főleg a fejlődő országokban (Crowcroft és mtsai., 2003). A *B. pertussis*-nál manapság életkor-váltás figyelhető meg, ugyanis egyre gyakrabban lehet találkozni serdülők és felnőttek megbetegedéseivel (Deville és mtsai., 1995; Epiinfo, 2013), annak ellenére, hogy a közel 30 éve bevezetett acelluláris vakcinák sokkal hosszabb védeltséget nyújtanak. A (már oltott) felnőttek fertőződése sokszor tünetmentes, vagy kevésbé súlyos lefolyású, de járványtanilag igen jelentős, ugyanis az érintettek a baktérium rezervoárját képezhetik, illetve az újabb megbetegedések a baktérium antigén készletének megváltozását (antigén drift) jelezhetik (Cotter és Miller, 2001; Budai, 2005).

A *B. parapertussis*-t 1937-ben írták le először egy humán klinikai mintából, és sokáig kizárólag emberi megbetegedésekből izolálták. A *B. parapertussis* fertőzés jellemző tünetei nagyon hasonlítanak a szamárköhögés szimptomáira (köhögőroham, hányás), de nem jár lymphocytosissal, gyorsabb lefolyású, és enyhébb tünetek kialakulása az általános. A

kevésbé súlyos tünetek valószínűsíthető oka, hogy a *B. parapertussis* nem termel pertussistoxint (Cotter és Miller, 2001; Diavatopoulos, 2006). A nyolcvanas évek második felétől kezdődően több juhállományban is kimutatták a *B. parapertussis*-t, mind tüdőgyulladásban szenvedő, mind egészséges juhok légzőszerveiből. A két eddig ismert gazdafaj légutait a baktérium eltérő törzsei kolonizálják, megkülönböztetésükre a *B. parapertussis*_{hu} és a *B. parapertussis*_{ov} jelölések használatosak (Cotter és Miller, 2001). A két eltérő vonalba tartozó törzseket fenotípus alapján nem lehet megkülönböztetni egymástól, a nagyfokú genetikai különbség miatt azonban egyes kutatók külön fajnak tekintik a különböző gazdafajból származó *B. parapertussis* izolátumokat (Mattoo és Cherry, 2005).

A *B. bronchiseptica*-t Ferry (1911) izolálta először légzőszervi tüneteket mutató kutyából, ezért *Bacillus bronchicanis*-nak nevezte el. Később különböző emlősök (tengerimalac, majom, ember) légutaiból is kimutatta, ezért a mikroba nevét *Bacterium bronchisepticus*-ra változtatta. Ezt követően számos néven illették a baktériumot, majd 1952-ben, amikor rendszertani hovatartozása tisztázódott, Moreno-López javaslatára kapta jelenlegi elnevezését (Goodnow, 1980).

A *B. bronchiseptica* burokkal rendelkező, átlagosan $0,5 \times 2,0 \mu\text{m}$ nagyságú, pleomorf, rövid pálcika alakú baktérium. Spórát nem képez, csillói segítségével aktív mozgásra képes. Szigorúan aerob, hőmérsékleti optimuma $35-37^\circ\text{C}$ (Goodnow, 1980). Tápanyagok szempontjából igénytelen baktérium, amely természetes vizekben, szűrt csapvízben, valamint PBS-ben hosszabb ideig is életképes (Porter és mtsai., 1991). Könnyen tenyészthető, szaporodásához szénforrásként aminosavak, citrát, vagy laktát is elegendő. Szelektív izolálása antibiotikumokat tartalmazó MacConkey táptalajon történik. Véres agaron 24 órás inkubációt követően apró, domború, fényes, szürkésfehér telepeket képez, a kolóniák körül β -hemolízis látható, melynek kialakulása függ a táptalaj és a vér minőségétől is (González és mtsai., 2006). Biokémiai tulajdonságait tekintve a *B. bronchiseptica* meglehetősen inaktív baktérium. Kataláz- és oxidáz-pozitív, az ureumot akár 4 órán belül bontja, a nitrátot az esetek többségében nitráttá redukálja. Indol-negatív, a különböző szénhidrátokat nem hasznosítja, lipáz- és észteráz-aktivitása nincs (Goodnow, 1980).

A *B. bronchiseptica* világszerte elterjedt, széles gazdaspektrumú kórokozó, amely különféle légzőszervi megbetegedéseket képes előidézni. Összefüggésbe hozták a sertések torzító orrgyulladásával, a kutyák kennelköhögésével, a nyulak náthájával, de számtalanszor izolálták már egyéb házi-, haszon-, vad- és laboratóriumi emlősállatok légúti betegségeiből, és egyre gyakrabban jelennek meg adatok humán esetekről is (Mattoo és Cherry, 2005). A *B. bronchiseptica* nemcsak zoonotikus jellege miatt érdekes a humán gyógyászat számára, hanem a *B. pertussis*-hoz viszonyított nagyfokú fenotípusos hasonlósága miatt annak modelljeként alkalmazható a kórokozó jobb megismerését elősegítő, és így a szamárköhögés elleni hatékonyabb védekezést szolgáló kutatásokban.

A *B. avium* házi- és vadmadarak légutaiban megtelepedő patogén baktérium. Természetes körülmények között is megtalálható csirkék, pulykák és más madarak légzőszerveiben, de elszaporodva, vagy hajlamosító tényezők hatására gyorsan terjedő, heveny betegséget idéz elő. A fertőzésre elsősorban a fiatal állatok fogékonyak, általános tünetek közé tartozik a bágyadság, nehezített légzés, a szem és az orr bő váladékozása, tüsszögés, kötőhártya gyulladás és gyakran a hang elvesztése. Idősebb állatoknál mindezekhez száraz köhögés is társulhat. Súlyos esetben kialakulhat tracheobronchitis, ami elhullást eredményezhet. A baromfi bordetellosisok közül a legismertebb kórkép a pulykacoryza, mely nagy gazdasági károkat okoz, házityúkban és fűrjben a betegég enyhébb lefolyású (Mattoo és Cherry, 2005; Varga és mtsai., 1999). Annak ellenére, hogy a *B. avium* madarakhoz társult baktériumnak tekinthető, számos *B. avium* és *B. avium*-like törzs létezik, melyeket hullókból vagy immundeficiens emberekből izoláltak (Gross és mtsai., 2010).

Az elmúlt 30 évben a *Bordetella* nemzetség 4 fajjal bővült, és számtalan, faji szinten még nem azonosított törzs vár besorolásra. Jelenleg a *B. ansorpii*, (Ko és mtsai., 2005) vár az új fajként való megerősítésre.

Az "új" *Bordetella* fajok közül a legismertebb a *B. hinzii*, amely madarak légúti baktériumflórájának kommenzalista tagjának tekinthető, de bizonyos törzsek képesek a coryzához hasonló tünetek kialakítására is. A *B. hinzii* az emberi szervezetben is megtelepedhet, immunszuppresszált betegeknél (AIDS, cysticus fibrosis, Epstein-Barr fertőzés) szepszémiaát okoz, légúti tünetek viszonylag ritkán jelentkeznek (Gerlach és mtsai., 2001; Gross és mtsai., 2010).

A *B. holmesii*-t 1983-ban izolálták humán szepszemiából, és sokáig csak néhány hasonló jellegű sporadikus esetet írtak le. Az 1990-es évek végén azonban egy észak-amerikai szamárköhögés-szerű járványból izolálták, ahol életkortól függetlenül betegített meg egészséges embereket is. A legtöbb "új" *Bordetella*-nak ismeretlen a patogenitási potenciálja, de tény, hogy a *B. holmesii*-t általában humán sérülésekből, sebekből és légutakból izolálják (Mattoo és Cherry, 2005), és 16S rDNS vizsgálatok alapján a *B. pertussis* testvércsoportjának tekinthető (Gross és mtsai., 2010).

B. trematum-ot különböző humán sebekből, fülfertőzésekből és cukorbetegék fekélyeiből izolálták (Vandamme és mtsai., 1996), légúti eredetű törzsről eddig nem számolt be a szakirodalom.

A *B. petrii* – a nemzetség többi tagjától eltérően –, fakultatív anaerob, a környezetben megtalálható baktérium (von Wintzingerode és mtsai., 2001). A legtöbbször kontaminált környezeti mintákból (pl. anaerob bioreaktor üledéke, klórbenzános talaj), tengeri szivacsokból, vagy fűfajok gyökere mellől izolálták, de humán klinikai esetekből is kitenyésztették már (Fry és mtsai., 2005).

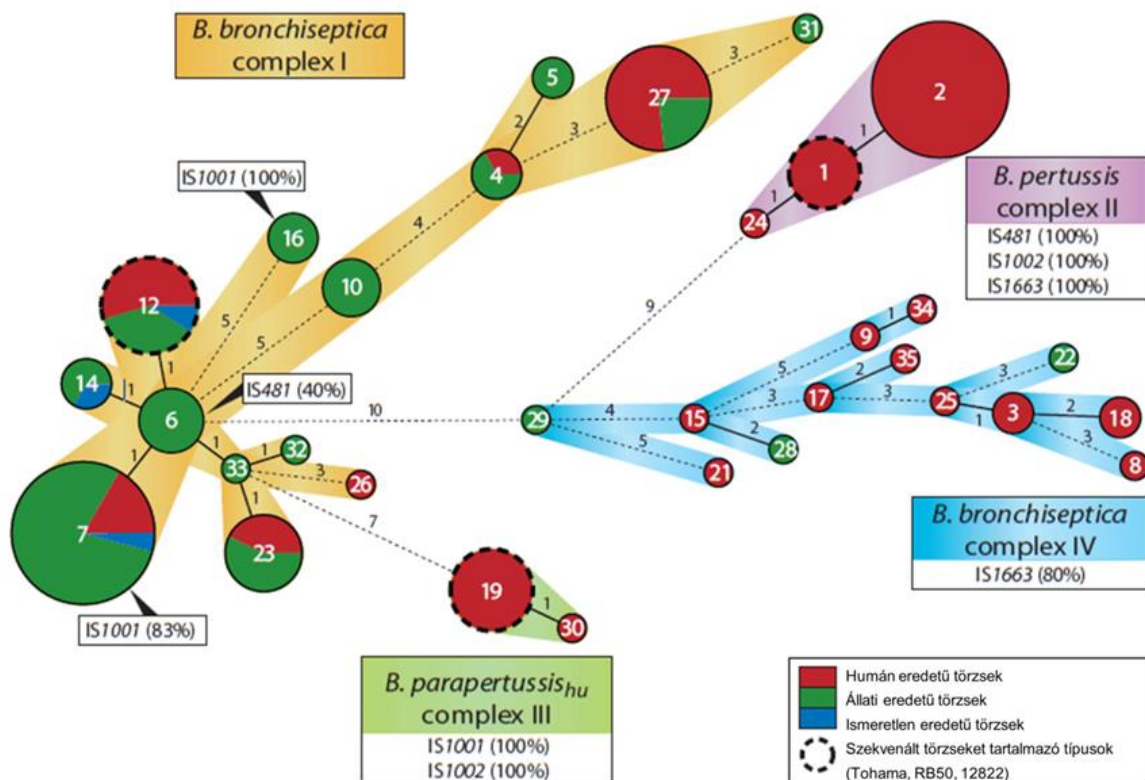
3.1.2. A *B. bronchiseptica* evolúciós kapcsolatai

A *B. pertussis*-t, a *B. parapertussis*-t és a *B. bronchiseptica*-t közösen a „klasszikus *Bordetella*-k” névvel illetik. Együttes említésük alapja nem csak az emlős fajokat érintő légúti fertőzések megjelenése, hanem a köztük levő szoros filogenetikai kapcsolat is (Aricó és mtsai., 1987). A három faj közötti rendkívül alacsony genetikai változatosság miatt Kloos és mtsai. (1981) a csoport tagjainak egy baktériumfaj különböző gazdához adaptálódott alfaj-szintű besorolását is javasolták. Tizenöt metabolikus enzim multilókuszos enzim elektroforézis (MEE vagy MLEE) módszerrel végzett vizsgálata során van der Zee és mtsai. (1997) 36 különböző elektroforetikus típust (ET) mutattak ki, és a legnagyobb változatosságot a *B. bronchiseptica* törzsek között találták. Feltételezve, hogy az ET-k közötti polimorfizmusok száma arányos a közös őstől való elágazás idejével, a törzsek egymáshoz viszonyított leszármazási vonalaira következtettek. Kimutatták, hogy a két *B. parapertussis* (humán és juh) vonal evolúciósan is különbözik egymástól, a humán *B. parapertussis* törzsek egyes *B. bronchiseptica* izolátumokkal állnak szorosabb rokonságban, míg a *B. pertussis* fajba tartozó minták teljesen különálló klasztert alkotnak. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a *B. pertussis* és a *B. parapertussis* egy feltételezett *B. bronchiseptica* ősből evolválódhatott, és a humán gazdafajhoz való adaptációjuk két, egymástól független esemény során jött létre.

Újabban a nagyfokú molekuláris és filogenetikai hasonlóság miatt a *B. pertussis*, a *B. parapertussis* és a *B. bronchiseptica* külön „klaszterbe” sorolása az elfogadott (Gerlach és mtsai., 2001). A „klaszter” tagjainak 1-1 típus-törzsének (*B. pertussis*: Tohama 1, *B. parapertussis*: 12822 és *B. bronchiseptica*: RB50) teljes genom szekvencia vizsgálatát Parkhill és mtsai. (2003) végezték el. A három törzs genomjának méretét rendre 4,1; 4,8 és 5,3 millió bázispár nagyságúnak határozták meg, és akárcsak van der Zee és mtsai. (1997), ők is az inszerció elemek nagyfokú elterjedését írták le a humán-adaptált fajokban, ráadásul a *B. pertussis* genomjában 9,4%, a *B. parapertussis* genomjában 5% pszeudogént is találtak. A teljes genomot összehasonlító vizsgálataik azt mutatták, hogy a *B. pertussis* 0,7-3,5, a *B. parapertussis* 0,27-1,4 millió éve evolválódott egy *B. bronchiseptica*-szerű ősből, és ez a folyamat – feltehetőleg az egy gazdához való alkalmazódás miatt –, széleskörű génvesztéssel járt. A delécio vagy inaktiváció főleg a metabolizmusban, a felszíni struktúrák szintézisében és a membrántranszportban szereplő géneket érintette, a patogenitásért felelős génekre nem terjedt ki.

A *B. bronchiseptica* klaszter evolúciós kapcsolatainak feltérképezésére Cummings és mtsai. (2004) microarray alapú összehasonlító genom hibridizációval (CGH) tettek kísérletet. Az általuk kapott dendrogram sok hasonlóságot mutatott a van der Zee és mtsai. (1997) által alkotott fával, ugyanis szintén a *B. bronchiseptica* törzsek nagyfokú változatosságát mutatta.

Azonban ez az újabb fa jobban támogatja azt az elképzelést, miszerint a humán és juh eredetű *B. parapertussis* szorosabb rokonságban áll egymással, mint bármely *B. bronchiseptica* törzssel, de feltűnik egy mélyen elágazó *B. bronchiseptica* csoport is, mely a *B. pertussis*-szal áll kapcsolatban. A klasszikus *Bordetella*-k evolúciójával kapcsolatos tanulmányok közül Diavatopoulos és mtsai. (2005) munkája újabb érdekességgel szolgált. Hét háztartási gént és inszerciós szekvenciákat alapul vevő multilókusz szekvencia tipizálás (MLST) módszerrel 4 komplexbe csoportosították a három faj törzseit. A *B. pertussis*, és a *B. parapertussis* egy-egy külön komplexbe került (II és III), míg a *B. bronchiseptica* két alpopulációra oszlott, amiben elkülönültek egymástól az állati (I komplex) és az emberi (IV komplex) eredetű törzsek. Közös őznek egy állati eredetű *B. bronchiseptica* tekinthető, amiből kialakult a *B. parapertussis*, majd később a humán-adaptált *B. bronchiseptica* vonalról a *B. pertussis* is kivált (1. ábra).



1. ábra: A klasszikus *Bordetella*-k evolúciós viszonya [Diavatopoulos és mtsai., 2005]

Az egyes törzsek eltérő fenotípusos tulajdonságainak oka lehet, hogy a klasszikus *Bordetella*-k genomjának mindössze fele konzervatív. Ezt Park és mtsai. (2012) állapították meg elsősorban humán eredetű *Bordetella* törzsek (6 *B. bronchiseptica*, 3 *B. pertussis*, 2 *B. parapertussis* és 1 *B. parapertussis* plazmid) genomját egy pontos nukleotid polimorfizmus (SNP) analízissel vizsgálva. Kutatásaik alapján az utolsó közös ősz egy

B. pertussis- és *B. bronchiseptica*-szerű baktérium lehetett, így még közelebbi rokonságot feltételezve e két faj között a többi fejlődési ághoz képest.

3.2. A *Bordetella bronchiseptica* által okozott betegségek

A *B. bronchiseptica*-t a világ szinte minden pontján izolálták már különböző emlősfajokból, és néha madaraktól is (Musser és mtsai., 1987). Az általa okozott betegségekre jellemző, hogy széles körben elterjedtek, nagyarányú elhullással azonban nem járnak. A fertőzés gazdafajon belül és esetenként a gazdafajok között is létrejöhet. A *B. bronchiseptica* számos gazdafaj orrüregeiben megtalálható (tünetmentes hordozás), gyakran bakteriális vagy virális társfertőzés szükséges a tünetek kialakításához. A betegség cseppfertőzéssel terjed, de a patogén átadásában szerepet játszhat a beteg/hordozó állattal való közvetlen érintkezés, a beteg/hordozó állat nyálával szennyezett takarmány, a környezetben megtalálható ragályfogó tárgyak (pl. itató, ketrec, játékok) és a gondozók is. A betegség terjedését segíti az állatok zsúfolt tartása, a stressz, a nem megfelelő szellőzés és a rossz higiéniai viszonyok (Cotter és Miller, 2001). A *B. bronchiseptica* a különböző gazdafajokban eltérő kórképek kialakítására képes, a leggyakoribb és legjelentősebb megbetegedéseket a következőkben ismertetjük.

3.2.1. Sertések torzító orrgyulladás

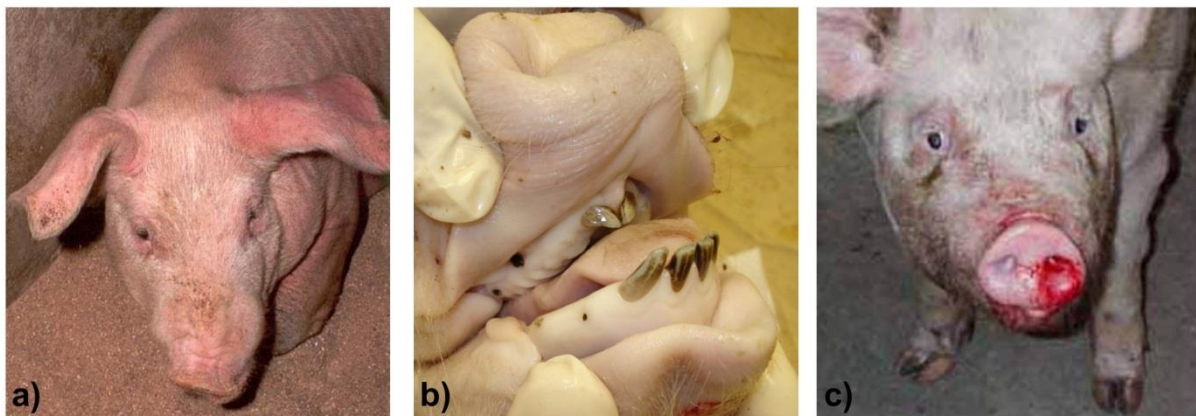
A *B. bronchiseptica*-hoz kapcsolódó betegségek közül a legnagyobb gazdasági jelentőséggel a sertések torzító orrgyulladása (TO) bír. A kórképet 1830-ban Németországban írták le először (Franque, 1830), Magyarországon az 1960-as évektől van jelen a betegség (Áldásy és Ványi, 1962). A téma gazdag szakirodalommal rendelkezik, több hazai közlemény is megjelent, melyek elsősorban Ősz Gyula (1956), Éliás Béla (Éliás és mtsai., 1983) és Magyar Tibor (1999) nevéhez fűződnek.

A TO kialakulását kezdetben genetikai rendellenességekkel és/vagy takarmányozási problémákkal (A és D vitamin hiánya, nem elegendő Ca és P) magyarázták, később azonban egyre inkább valamilyen fertőző ágens szerepe került előtérbe (Goodnow, 1980). Végül kiderült, hogy a betegség hátterében a *B. bronchiseptica* és a *Pasteurella multocida* toxikus törzsei állnak (Magyar és Lax, 2002). A *B. bronchiseptica* önmagában általában közepes súlyosságú és regenerálódásra hajlamos elváltozásokat okoz, de – elsősorban dermonekrotoxinja által –, olyan elváltozásokat képes létrehozni az orrüreg nyálkahártyáján, hogy az ép szövethez csak kis affinitással kötődő *P. multocida* azt kolonizálni tudja, és toxintermelése révén kialakulhatnak a betegségre jellemző súlyos elváltozások (Magyar, 1999).

A malacok életük első hetében a legfogékonyabbak a fertőzésre, melynek gyakori tünetei a könnyezés, tüszögés, savós-gennyes orrfolyás, esetleg orrvérzés. Súlyosabb

esetekben a csontképző sejtek károsodása miatt a csontosodás zavara figyelhető meg, aminek következtében az egyik-, vagy mindkét oldali orrkagylók elsvadnak, az orr az érintett oldal felé elcsavarodik vagy megrövidül (2. ábra). Ez utóbbi magával hozza az orrhát bőrének durva ráncosodását, és gyakran a metszőfogak találkozásának elmaradását is (brachygnathia superior). Jellemző a könnycsatorna elzáródása is, ami a belső szemzug szennyeződésektől történő elszíneződését eredményezi. Az elváltozások következtében az állatok takarmányfelvétele csökken, és fogékonyabbá válnak egyéb fertőzésekkel szemben (Magyar és Lax, 2002).

A TO ellen számos kereskedelmi forgalomban megtalálható vakcinát kifejlesztettek már, ahogy az állományok oltására is több stratégia létezik (ivarérett egyedek, vemhes koca, malacok különböző variációban történő oltása). A vakcinák hatásosak ugyan a betegség klinikai formáinak visszaszorítására, a kórokozók eliminálására azonban nem képesek. A gyakorlatban a betegség heveny formájának megjelenésekor antibiotikum-terápiát használnak (tetraciklinek, florfenikol, szulfonamidok), az esetek többségében általában kevés sikerrel. A klóramfenikolok – bár hatásos gyógyszerei a TO-nak –, húzállományokban nem használhatóak (Brockmeier és mtsai., 2012; Kadlec, 2006).



2. ábra: A torzító orrgyulladás (TO) klinikai tünetei

a: az orr elcsavarodása; b: maxilla megrövidülése; c: orrvérzés és a könnycsatorna elzáródása

3.2.2. Kutyák fertőző tracheobronchitise

A kutyák fertőző tracheobronchitise, más néven a kennelköhögés, a vakcinázások ellenére is gyakori, erősen fertőző többtényezős légzőszervi megbetegedés, melyben a *B. bronchiseptica*-nak elsődleges szerepet tulajdonítanak (Bemis és mtsai., 1977). A *B. bronchiseptica* önállóan is képes létrehozni a jellegzetes elváltozásokat, de a kennelköhögés kóroktanában szerepet játszhat a kutya adenovírus (CAV-2), a kutya parainfluenzavírus (CPIV), valamint a kutya légzőszervi coronavírus és reovírusok, bakteriális kórokozók közül pedig *Mycoplasma*-kat és *Streptococcus equi*-t izolálnak gyakran

a megbetegedésből (Vieson és mtsai., 2012). A betegség vezető tünete az elhúzódó, sokszor rohamszerűen jelentkező száraz köhögés, ami stressz, fizikai megterhelés, vagy a gége tapintására súlyosbodhat és mukózus váladék öklendezésébe torkollhat. Súlyosabb tünetek csak ritkán, általában kölyökkutyáknál és immunszuppresszált egyedeknél jelentkeznek. Ekkor előfordulhat mukopurulens orrfolyás, nehezített légzés, émelygés, étvágytalanság, elesettség, láz és tüdőgyulladás is, amely kezelés hiányában az állatok elhullásához vezethet (Datz, 2003a). A kórelőzményben általában az szerepel, hogy az állat kutyapanzióban, állatklinikán, állatmenhelyen tartózkodott, vagy találkozott hasonló tüneteket mutató kutyával. Az egyedi fertőzésekről elmondható, hogy az enyhébb tünetekből a beteg állat 2-3 hét alatt spontán gyógyul (Fenwick, 2005), ellenkező esetben doxiciklin vagy tertaciklin, esetleg fluorokinolon, vagy co-trimoxazol antibiotikumok alkalmazása javasolt (Datz, 2003b).

3.2.3. Macskák bordetellosisa

A felső légúti megbetegedések a macskák leggyakoribb klinikai problémájának tekinthetők. Háttérükben különböző vírusok (pl. macska-herpeszvírus, macska-calicivírus) és baktériumok (pl. *B. bronchiseptica*, *Chlamydophila psittaci*, *Clamydophila felis*, *Mycoplasma* spp.) állnak, gyakran társfertőzés formájában (Magyar és mtsai., 2009), de a *B. bronchiseptica*-t egyedüli kórokozóként is kimutatták már macskákból (Jacobs és mtsai., 1993). A fertőzésre elsősorban a fiatal, 4-11 hónapos egyedek fogékonyak, így a macskák többsége átesik a bordetellosison, mire eléri az egyéves kort (Binns és mtsai., 1999). Házi kedvencként tartott macskák gyakran a velük egy háztartásban élő kutyáktól fertőződnek meg (Dawson és mtsai., 2000). Macskák között gyakori a szubklinikai fertőzöttség, amely például a zsúfolt tartásból eredő stressz következtében manifesztálódhat. Ekkor enyhe láz, étvágytalanság, tüszögés és kötőhártya-gyulladás figyelhető meg, a köhögés – ellentétben a kutyákkal –, nem általános tünete a betegségnek. Kezelés hiányában fekélyes orrgyulladás, hörghurut és tüdőgyulladás alakulhat ki, amely az állatok elhullásához vezethet (Magyar és mtsai., 2009).

B. bronchiseptica fertőzés ellen meglehetősen ritkán alkalmaznak macskáknál vakcinákat, sokkal gyakoribb a tünetek gyógyszeres kezelése. Igen hatékonyak az enrofloxacin típusú szerek, de hosszabb távú alkalmazásuk retinakárosodáshoz vezet. Leggyakrabban fluorokinolonokat, gentamicint, tetraciklint és potenciált szulfonamidokat használnak a terápia során (Datz, 2003b).

3.2.4. Nyulak *B. bronchiseptica* fertőzöttsége

A *B. bronchiseptica* előfordulása mind egészséges, mind beteg nyulakban általánosnak mondható. A légutakban megjelenő baktérium betegséget általában nem okoz, viszont hajlamosít a *Pasteurella* fajokkal való fertőződésre, amelyek súlyos megbetegedést válthatnak ki. Deeb és mtsai. (1990) szerint a nyulak nagy része már fiatal korban fertőződik *B. bronchiseptica*-val, míg a *Pasteurella*-fertőzöttség valószínűsége a nyulak életkorával emelkedik, és így a felső légúti megbetegedések kockázata is nő az állatok életkorával. Rámutattak arra is, hogy a kórképet a *P. multocida* egyedül vagy a *B. bronchiseptica*-val együtt alakítja ki, amire az utóbbi egymagában nem képes. Ezzel ellentétben Glávits és Magyar (1990) arról számol be, hogy kísérletesen fertőzött laboratóriumi nyulaknál a *B. bronchiseptica* önmagában is képes volt súlyos betegséget okozni.

Kedvtelésből tartott nyulak leggyakrabban a velük egy háztartásban élő tengerimalacoktól fertőződhetnek meg, míg tenyészetekben a felnőtt nyulak tekinthetők rezervoárnak. A *B. bronchiseptica* terjedését az anyától való fertőződés indítja el, majd az elválasztott (1-4 hónapos) állatok között testvérről testvérré terjed szét a populációban (Long és mtsai., 2010).



3. ábra: Felső légúti tüneteket mutató nyúl [van Praag, 2014]

A nyulak felső légúti megbetegedéseire orr- és szemváladékozás, tüszögés és esetenként láz jellemző (3. ábra). A *B. bronchiseptica* megtelepedhet az alsó légutakban is, ekkor étvágytalanság, lehangoltság, nehézlégzés, cianózis és láz vagy éppen túl alacsony testhőmérséklet a jellemző tünet (van Praag, 2014).

Nyulak felső légúti fertőzéseinek kezelésére legsikeresebben különféle antibiotikum-kombinációk használatosak. Leggyakoribb az enrofloxacin/ciprofloxacin gentamicinnel kísérve, vagy az enrofloxacin doxiciklinnel kombinálva. Alacsony dózisban, hosszútávon

alkalmazható a trimetoprim-szulfadiazin antibiotikum kombináció, valamint az eritromicin és annak módosulatai is (van Praag, 2014).

3.2.5. Rágcsálók *B. bronchiseptica* fertőzöttsége

Az évek során számos alkalommal izoláltak *B. bronchiseptica*-t különböző rágcsálófajokból (van der Zee és mtsai., 1997), annak ellenére, hogy az egyes gazdafajok érzékenysége meglehetősen eltérő. Természetes körülmények között a patkány tünetmentesen is hordozhatja a kórokozót, az egerek és a hörcsögfélék viszont kevésbé érzékenyek a betegségre (Beregi és mtsai., 2010). Szabadon élő rágcsáló-kolóniák *B. bronchiseptica* fertőzöttségéről nincsenek adatok, de számolni kell azzal, hogy a beteg vagy hordozó rágcsáló potenciális fertőzőforrás lehet egy arra fogékony állattenyésztésben.

A *B. bronchiseptica* a hobbi és laboratóriumi tengerimalac-tenyésztésekben egyaránt az első számú légúti kórokozónak tekinthető (Krogstad és Dixon, 2003), amely nagyarányú elhullásokat is eredményezhet. A kezdeti tünetek (orrváladékozás, étvágytalanság, láz) megjelenése után a fertőzés az alsó légutakra is gyorsan kiterjed, ahol – általában fatális –, bronchopneumonia alakul ki (Nakagawa és mtsai., 1971).

3.2.6. Humán megbetegedések, zoonosis

A *B. bronchiseptica* az emberi légutakban is képes megtelepedni, gyakran társfertőzés formájában (Wernli és mtsai., 2011), de egyedüli kórokozóként is képes betegség kialakítására (Lorenzo-Pajuelo és mtsai., 2002). Az 1960-as évektől kezdve egyre nagyobb számban jelennek meg írások humán *B. bronchiseptica* fertőzésekről a világ minden tájáról (Ghosh és Tranter, 1979). Általános tünetek közé tartozik az orrmelléküreg gyulladása, a pertussis-szerű köhögés, a tracheobronchitis és a tüdőgyulladás (Woolfrey és Moody, 1991). A nem-invazív *B. pertussis*-szal és a *B. parapertussis*-szal ellentétben a *B. bronchiseptica* emberben képes előidézni agyhártyagyulladást, szívbelhártya-gyulladást és szeptikémiát is (Diavatopoulos, 2006). A legtöbb érintett valamilyen immunszuppressziót okozó alapteregségben szenvedett (pl. diabétesz, leukémia, rákos megbetegedések, AIDS), és nagy arányban találhatóak transzplantált egyének a fertőzöttek között. Viszont az idős kor (ritkábban a kisgyermekkor), a nem megfelelő higiénia és az alkoholizmus is növeli a fertőzés veszélyét (Ghosh és Tranter, 1979; Shimoni és mtsai., 2000; Woolfrey és Moody, 1991).

A humán megbetegedések nagy részében szerepet játszik a *B. bronchiseptica*-val fertőzött állattal való kontaktus, ezért a *B. bronchiseptica* zoonotikus jelentősége nem elhanyagolható. A szakirodalomban szép számmal találunk példát haszonállatoktól, kutyától,

macskától és nyúltól kapott fertőzésre is (Guierard és mtsai., 1995; Wernli és mtsai., 2011; Woolfrey és Moody, 1991).

Egy, a klasszikus *Bordetella*-k evolúcióját vizsgáló tanulmány szerint (Diavatopoulos és mtsai., 2005) a legtöbb humán eredetű *B. bronchiseptica* izolátum (komplex IV) eltér a más gazdafajokból származó *B. bronchiseptica*-któl (komplex I). Ahuja és mtsai. (2012) az I és a IV komplexbe tartozó törzsek citotoxicitását vizsgálva megállapították, hogy a IV komplexbe tartozó humán eredetű törzsek nagyobb sejtkárosító hatással rendelkeztek, mint az I komplex törzsei. Emberi tüdőkarcinóma sejteken (A-549) viszont már szignifikáns különbség volt a két komplex tagjai között: a humán eredetű *B. bronchiseptica* törzsek hatására akár 10-20-szor nagyobb mennyiségben keletkezett a sejtek pusztulása során felszabaduló laktát-dehidrogenáz enzim.

Emberi megbetegedéseknél gyakori jelenség, hogy az alkalmazott antibiotikum-terápia hatástalannak bizonyul, ugyanis a humán *B. bronchiseptica* izolátumok *in vivo* és *in vitro* antibiotikum-rezisztenciája eltérhet egymástól. Ettől függetlenül leghatásosabb gyógyszernek az eritromicint, a potenciált szulfonamidokat és az amoxicillin/klavulánsav kombinációt, valamint a tobramicint és a ciprofloxacint tekinthetjük (Shimoni és mtsai., 2000; Wernli és mtsai., 2011).

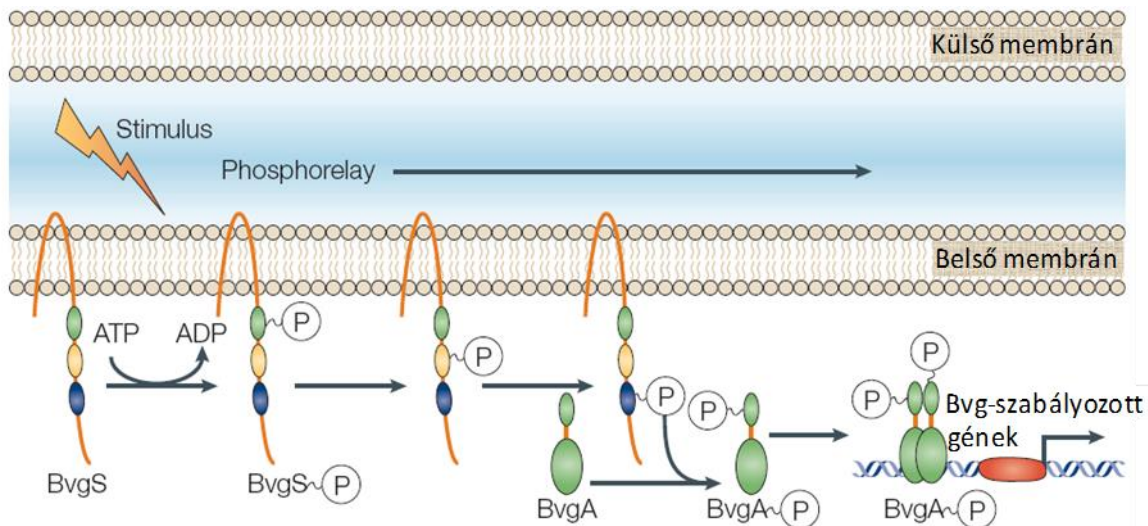
3.3. A *Bordetella bronchiseptica* virulencia tényezői

A bakteriális kórokozók virulenciafaktoraik segítségével képesek kifejteni patogén hatásukat, ezért a különböző virulenciafaktorok vizsgálata, azok szerepének elemzése fontos kutatási irányt jelentenek napjainkban. A *Bordetella* nemzetség tagjai szintén számos virulencia tényezővel rendelkeznek. Annak ellenére, hogy e faktorok között található olyan, amely csak bizonyos fajokra jellemző (pl. a pertussistoxin csak a *B. pertussis*-ra), mások csak bizonyos fajokból hiányoznak (pl. TTSS a *B. parapertussis*_{hu}-ból), a klasszikus *Bordetella*-k virulenciafaktor készlete egységesnek mondható, és kifejeződésüket mindegyik fajban azonos rendszer szabályozza.

3.3.1. A BvgAS szabályozó rendszer

A *B. bronchiseptica* képes alkalmazkodni a környezeti változásokhoz azáltal, hogy megfelelő módon expresszálja strukturális és felületi fehérjéit, metabolikus enzimeit és szekréciós proteinjait. Ez a folyamat a gének szintjén meghatározott, a szabályozásért a BvgAS (*Bordetella* virulence gene activator/sensor) kétkomponensű transzdukciós rendszer a felelős, melynek komponensei 100, illetve 96%-os egyezést mutatnak a *B. bronchiseptica* és a *B. pertussis* között (Martínez de Tejada és mtsai., 1996). A BvgS szenzor kináz egy 135 kDa-os transzmembrán protein, melynek periplazmatikus N-terminális része érzékeli a

környezeti jeleket. Stimulus hatására egy ATP molekulától foszfát-csoportot von el és egy négylépcsős foszforilációs kaskádát indít, melynek utolsó lépéseként aktiválja a citoplazmában található 23 kDa-os BvgA transzkripció aktivátort. Az aktivált BvgA C-terminális végén található DNS-kötő domén kapcsolódik a gének promóteréhez és megindítja a transzkripciót (Akerley és mtsai., 1992). Ezt az állapotot Bvg⁺, vagy virulens fázisnak nevezzük, ugyanis elsősorban a *vag* (*vir* activated genes [a BvgAS-t eredetileg *vir*-nek jelölték]) lókuszt gének aktiválódnak, mely tartalmazza az adhézióért és toxikus hatásokért felelős géneket. Mindemellett a *vag* gének aktivációjával gátlódik a *vrg* (*vir* repressed genes) lókuszon található gének transzkripciója. Cotter és Miller (1994) igazolták, hogy a Bvg⁺ fázis szükséges és elégséges feltétel a *B. bronchiseptica* számára a légzőszerv hámjának kolonizációjához (4. ábra).



4. ábra: A BvgAS rendszer működése [Preston és mtsai., 2004]

Kedvezőtlen körülmények között, mint például alacsony hőmérséklet (26°C alatt) vagy kémiai modulátorok (MgSO₄ és/vagy nikotinsav) hatására a BvgS inaktiválódik, és így a BvgA foszforiláció hiányában nem tudja befolyásolni a transzkripciót. Ekkor Bvg⁻, avirulens fázisról beszélünk, amelyben a *vag* lókuszt funkciója gátolt, a *vrg* lókuszt pedig aktivált. A *vrg* lókuszt funkciója még kevésbé ismert, itt a motilitásért és az ureáz aktivitásért felelős, valamint a sziderofórok kódoló gének találhatóak (Cotter és Miller, 2001). A Bvg⁺ és Bvg⁻ fázisok közötti, környezeti hatásra létrejövő szabályozási mechanizmus az ún. fenotípusos (antigén) moduláció már régen ismert jelenség (Lacey, 1960).

Scarlato és Rappuoli (1991) leírták a *Bordetella*-kban egy átmeneti fázist is, amit az adhezinek megjelenésével és a toxinok hiányával jellemeztek. Cotter és Miller (1997) hasonló átmeneti fázist mutató *B. bronchiseptica* törzset a *bvgS* lókuszt egy nukleotid cseréjével hozták létre, és a köztes fenotípust Bvgⁱ (intermediate) fázisnak nevezték el. A

B. bronchiseptica képes biofilm képzésre, melynek kifejezetten kedvez a Bvg^I fenotípus (Irie és mtsai., 2004). Az elsőként jellemzett Bvg^I-fázisú gén a *bipA* volt, ami egy külső membrán fehérjét kódol, és az *E. coli* intimin, valamint a *Yersinia* fajok invasin molekulájának aminosav összetételével mutat nagymértékű homológiát (Stockbauer és mtsai., 2001).

A Bvg⁻ és Bvg^I fázisok funkciója a természetes infekcióban még ismeretlen, de feltételezhető, hogy a Bvg⁻ fázisnak a gazdaszervezeten kívüli túlélésben (Ottemann és Miller, 1997), míg a Bvg^I fázisnak a transzmisszióban van fontos szerepe (Deora és mtsai., 2001). A legalább három fázis jelenléte arra utal, hogy a BvgAS rendszer nem csupán két végállapotot váltogató kapcsoló, funkcióját tekintve sokkal inkább egy reosztát, ami diszkrétan szabályozza az általa kontrollált fehérjék expresszióját a környezeti hatások függvényében (Edwards, 2006). A legújabb kutatások fényében (Melvin és mtsai., 2014) a BvgAS regulációja alatt álló gének négy csoportba sorolhatóak. Első csoportba tartoznak a toxinokat és szekréciós rendszereket kódoló gének, melyek csak és kizárólag Bvg⁺ fázisban fejeződnek ki. Második csoportot képezik azok a gének, melyek expressziója Bvg⁺ és Bvg^I fázisban is magas, vagyis a filamentózus hemagglutinint, a fimbriákat, valamint magát a BvgAS-t kódoló gének. Harmadik csoportba a kizárólag Bvg^I fázisra jellemző *bipA* található, míg negyedik csoportba a *vrg* lókuszt Bvg⁻ fázisban szintetizáló fehérjégek tartoznak.

A fenotípusos moduláció a virulenciafaktorok szintézisének transzkripció szintjén történő, környezeti hatásokra végbemenő reverzibilis gátlása. Egy másik szabályozó mechanizmus az ún. fázisváltás, melynek alapja egy környezeti hatásoktól független frameshift mutáció, amely irreverzibilis Bvg⁻ variánsokat eredményez. A Bvg⁻ törzsek fenotípusosan hasonlóak, függetlenül attól, hogy milyen módon keletkeztek (Passerini de Rossi és mtsai., 1997).

3.3.2. Adhezinek

A bakteriális fertőzés első lépése a gazda sejtjeihez való specifikus tapadás. Minden patogénnek rendelkeznie kell valamilyen adhéziós mechanizmussal, amely a megtapadástól a felületen történő elszaporodást is segíti, ráadásul megakadályozza a gazdaszervezet fizikai védekező mechanizmusai által történő kisodródást. Az ilyen adhézióért és kolonizációért felelős virulenciafaktorokat adhezineknek nevezzük. *Bordetella*-k esetén számos fehérje (pl. flagellin, BrkA [*Bordetella* resistance to killing], BipA) játszhat közvetett szerepet az adhézióban, valódi adhezinek azonban jelenleg csak a filamentózus hemagglutinint, a pertaktint és a fimbriákat tekintjük (Jacob-Dubuisson és Locht, 2007).

A *B. bronchiseptica* adhezinjei (5. ábra) közül nagy jelentőségű a 220 kDa-os filamentózus hemagglutinint (FHA), amelynek 367 kDa méretű prekursora az *fhaB* génről szintetizálódik. Az érett monomer fehérje 50 × 4 nm nagyságú, hajtúszerűen visszahajló

fonalas képlet, amely nagy mennyiségben van jelen a baktérium felszínén a növekedés logaritmusos fázisában, míg a stationer fázisban már egyáltalán nem található meg (Jacob-Dubuisson és Locht, 2007). Szerkezetileg sok β -redőt és β -hélixet tartalmaz, melyek két régióba rendeződnek, a 19 tagú ismétlődések száma akár a hetvenet is meghaladhatja (Kajava és mtsai., 2001). Az FHA többféle receptor-kötő doménnel rendelkezik, ezáltal különböző sejttípusokhoz képes kapcsolódni. A molekula közepén lévő Arg-Gly-Asp triplet (RGD) felelős a makrofágok és egyéb leukociták megkötéséért. A szénhidrát-felismerő domén (CRD) segítségével a csillós nyálkahártyahámsejtek és a makrofágok felületén található glikolipidekkel teremt összeköttetést (Relman és mtsai., 1990). Menozzi és mtsai. (1994) egy lektin-szerű aktivitással rendelkező heparin-kötőhelyet is meghatároztak, melynek a hemagglutinációban, és a nem-csillózott epitél sejtekhez történő adhéziónban van jelentősége. Az FHA protektív antigén, nagyfokú immunogenitása miatt a sejtmentes vakcinák egyik fő komponense (Cotter és Miller, 2001).

A pertaktin (PRN) egy 69 kDa méretű külső membránfehérje, amely nélkülözhetetlen a nyálkahártya kolonizációjához (Nicholson és mtsai., 2009). Egy 93 kDa-os prekursorból jön létre proteolitikus hasítások által, adhézión tulajdonságai fehérje-fehérje kölcsönhatások révén érvényesülnek. Az FHA-hoz hasonlóan tartalmaz egy RGD motívumot, és két ismétlődő, prolinban és leucinban gazdag régiót, melyek paralell β -hélixeket alakítanak ki. A PRN az autotranszporterek családjába tartozik. Ez annyit tesz, hogy a fehérje rendelkezik egy szignál peptiddel, ami segíti a biológiailag aktív domén átjutását az eukarióta sejt plazmamembránján (Jacob-Dubuisson és Locht, 2007). Ez lehet az alapja a PRN citotoxikus hatásának is, ugyanis PRN-negatív mutáns *B. bronchiseptica* törzs makrofágokon vizsgált citotoxikus hatása szignifikánsan kisebb volt, mint a vad típusú törzsé (Forde és mtsai., 1999). A PRN a *B. bronchiseptica* bakteriofágjának receptora (Doulatov és mtsai., 2004), és fontos alkotóeleme a szarvakkal szembeni sejtmentes vakcináknak.

A fimbriák (FIM) hosszú, vékony, peritrich, heparin-kötő régióval rendelkező külső membrán fehérjék. Lényegesek az adhézión folyamatában, ezen kívül az adaptív immunrendszer fő célpontjai, és feltételezhetően gyulladáskeltő hatással is rendelkeznek. A FIM-negatív mutáns *Bordetella* törzsek sokkal kevésbé képesek a nyálkahártya kolonizációjára, mint a vad típusúak (Jacob-Dubuisson és Locht, 2007). A fimbriák többféle alegységből épülnek fel. Az alegységeket egymástól független gének kódolják, így változatos módon, kombinálódva fejeződhetnek ki. A két fő nagy alegységet (Fim2, Fim3) a *fim2* és a *fim3* gének kódolják, ezek határozzák meg a baktérium szerotípusát, és mindkettő szokásos összetevője az acelluláris pertussis vakcináknak (Jacob-Dubuisson és Locht, 2007). További fimbriális (*fimA*, *fimX*, és *fimN*) nagy alegység géneket is leírtak már (Mattoo és Cherry, 2005), de ezek jelenléte és/vagy expressziója eltér az egyes fajokban. Például *B. pertussis*-ből hiányzik a *fimN*, *B. parapertussis*-nál a *fimX* frameshift mutációt szenvedett, és a *fimA*

csak a *B. bronchiseptica*-ban teljes és funkcióképes (Boswitz és mtsai., 1997). A kis alegységek közül a FimD a fimbriák tetején található, meglehetősen konzervatív struktúra, amely befolyásolja a nagy alegységek expresszióját és a termékek polimerizációját (Willems és mtsai., 1990). A FimB és FimC kis alegységek a strukturális alegységek összeszereléséért felelős chaperon fehérjék (Cotter és Miller, 2001).

3.3.3. Toxinok

A *Bordetella*-k által termelt virulencia tényezők közül a betegségre jellemző lokális és szisztémás elváltozások kialakításában a toxinok kiemelkedő szereppel bírnak. A *B. bronchiseptica* legfontosabb toxinjai közé tartozik a lipopoliszacharid (LPS), az adenilát cikláz-hemolizin (ACT), a dermonekrotoxin (DNT) és a tracheális citotoxin (TCT) (5. ábra).

A Gram-negatív baktériumok, így a *B. bronchiseptica* sejtfalának fontos összetevői az LPS komplexek. Az LPS endotoxin poliszacharid komponensei antigén hatásúak (O-antigén), míg a toxicitásért a foszfolipid komponens (lipid-A) a felelős. A lipid-A toxikus, pirogén és mitogén funkcióval bír, valamint aktiválja a makrofágok tumor nekrosis faktor termelését (Mattoo és Cherry, 2005). Feltételezhető, hogy egy adott fertőzésben az LPS szerepe változhat, ugyanis Sisti és mtsai. (2002) különböző LPS szerkezeti variánsok jelenlétét mutatták ki egy fertőzési folyamat során.

A tracheális citotoxin (TCT) a bakteriális sejtfal újraépítése során keletkező toxin, amelynek citopatogén hatása a csillós nyálkahártyahámsejtek nagymértékű elhalását okozza a mitokondriumok károsodása, a sejtek közötti „tight junction” kapcsolatok felszakadása és a sejtek kilökődése miatt. (Mattoo és Cherry, 2005). Ezeket a hatásokat nem-csillós hámsejteken azonban nem tapasztalták. A TCT glikopeptid természetű molekula, mely minden Gram-negatív baktériumban megtalálható, de csak a *Neisseria gonorrhoeae*, illetve a *Bordetella* nemzetség tagjai ürítik környezetükbe, a többi baktérium a citoplazmájába visszaforgatva újrahasznosítja. (Cotter és Miller, 2001). Mivel a TCT a sejtfal felépüléséhez szükséges, kifejeződése független a BvgAS rendszertől.

A dermonekrotoxin (DNT) egy fehérjetermészetű, 160 kDa nagyságú hőérzékeny toxin, amely a *B. bronchiseptica* klaszter tagjaiban hasonló genetikai összetétellel és biológiai funkcióval rendelkezik. A DNT-t kódoló génszakasz meglehetősen konzervált, expressziója a BvgAS rendszer szabályozása alatt áll (Walker és Weiss, 1994). Kísérleti állatok bőrébe fecskendezve a toxin lokális elhalást idéz elő, intravénásan pedig az egerek elhullását okozza (Magyar, 1999). Természetes körülmények között a DNT a baktériumok citoplazmájában található, a környezetbe a baktérium szétesése következtében jut ki (Cowell és mtsai., 1979). DNT-pozitív és DNT-negatív mutáns *B. pertussis* és *B. parapertussis* törzsek szopósegereken végzett vizsgálata során Weiss és Goodwin (1989) azt tapasztalták,

hogy a törzsek azonos virulenciával rendelkeztek. „ Ebben az esetben úgy tűnik, hogy a DNT nem szükséges a sikeres fertőzéshez. Másrészt a DNT-nek meghatározó szerepe van a sertések torzító orrgyulladásának kialakításában (Magyar és mtsai., 1988), ugyanis képes megváltoztatni a gazda sejtjeinek morfológiáját és gátolni az osteoblastok differenciálódását (Horiguchi és mtsai., 1991). A DNT 30 aminosav (as) hosszú N-terminális régiója segítségével kötődik a célsejtekhez, majd egy intramolekuláris hasítás után a katalitikus aktivitású C-terminális régió (300 as) az eukarióta sejt citoplazmájába jut. A citoplazmában kölcsönhatásba kerül a Rho-GTPáz fehérjével, ezáltal a citoskeletális rendszer, valamint a génexpresszióhoz és a sejtciklushoz kapcsolódó jelátviteli utak szabályozását befolyásolja (Hewlett és Donato, 2007).

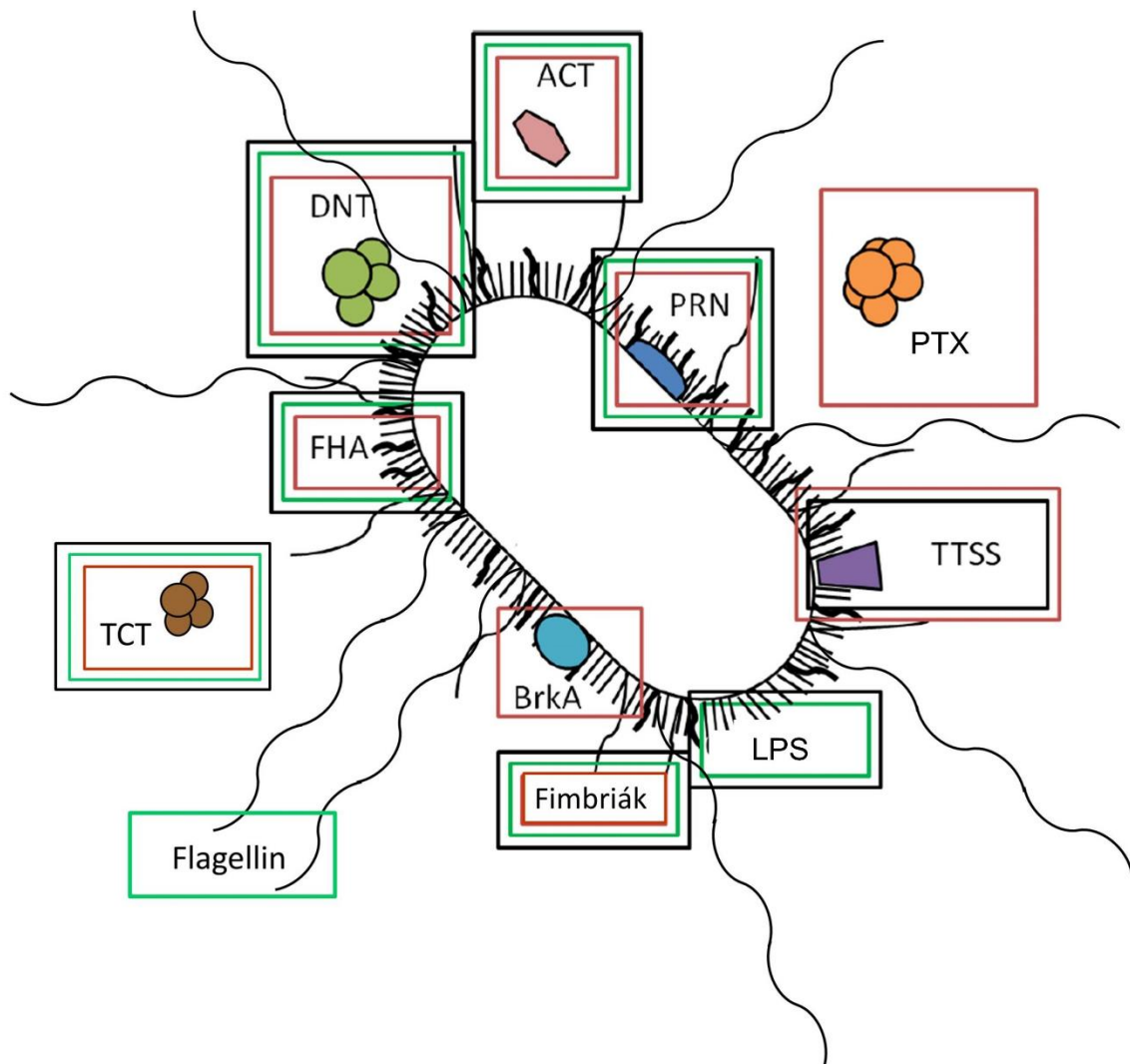
Az adenilát cikláz-hemolizin toxin (ACT) 200 kDa tömegű, nagymértékben konzervált, bifunkcionális fehérje, amely kizárólag Bvg⁺ fázisban expresszálódik. A toxint a *cyaABCDE* operon kódolja. A *cyaA* génről szintetizálódik egy 1706 as-ból álló protoxin monomer, melyet a *cyaC* gén terméke, egy poszt-transzlációs regulátor fehérje aktivál. A *cyaB*, D és E gének termékei pedig a toxin szekréciójáért felelősek. Az ACT négy funkcionális doménnel rendelkezik; az N-terminális régió (400 as) foglalja magába az adenilát cikláz domént, a C-terminális régióban (1300 as) található a hidrofób pórus-képző domén, a kalcium-kötő domén és egy szekréciós szignál domén. C-terminális szakasz aminosav sorrendjében glicinben és aszparaginsavban gazdag, tandem ismétlődő szekvenciák találhatóak, ezért az ACT az RTX (repeats in toxin) bakteriális citotoxinok családba sorolható (Vojtova és mtsai., 2006a). A többfunkciós ACT a CD11b/CD18 receptorokhoz kötődik, majd transzlokálódik az eukarióta sejt citoplazmájába, ahol kalmodulin hatására aktiválódik és szuprafiziológiás mennyiségben adenozin-trifoszfáttól (ATP) ciklikus adenozin-monofoszfátot (cAMP) állít elő (Hewlett és Donato, 2007). A megnövekedett cAMP szint és a citoplazma membrán permeabilitásának megváltozása felborítja a sejt normál működését, a monociták, makrofágok és neutrofil sejtek effektor funkcióit, és így immunstátuszuk (fagocitózis, gyulladáskeltő mediátorok képzése) csökken (Serezani és mtsai., 2008). Ezen felül az ACT gátolja a kemotaxist (Mattoo és mtsai., 2001), megváltoztatja az eritrociták morfológiáját (Vojtova és mtsai., 2006b), apoptózist indukál makrofágokban (Khelef és mtsai., 1993), és dendritikus sejtek érésének akadályozásával gátolja az antigén-prezentációt, melynek következtében a T-sejtek aktiválódása is csökken (Lebrun és mtsai., 2009). Az ACT hemolitikus, és az eddig ismert leghatékonyabb adenilát cikláz aktivitással rendelkező toxin, ami nagymértékben gátolja mind a veleszületett, mind az adaptív immunitást, ezért is tulajdonítanak neki meghatározó szerepet a *Bordetella* fajok légzőszervi patogénként elért evolúciós sikerében (Buboltz és mtsai., 2008).

3.3.4. Egyéb virulenciafaktorok

A mozgásképeség számos kórokozó számára fontos tulajdonság, mert így képes eljutni a mikroorganizmus a célsejthez. A *B. bronchiseptica* – ellentétben a klaszter többi tagjával (Parkhill és mtsai., 2003) –, aktív mozgásra képes, peritrich csillós baktérium. A csilló (flagellum) részei az alapi test, a kampó és az ostor, ez utóbbi 18-22 nm átmérőjű struktúra, hossza akár a baktériumsejt két-háromszorosa is lehet (Richter és Kress, 1967). Fő építőeleme a flagellin, amely összehúzóásra képes, helikális szerkezetű fehérje. A *B. bronchiseptica*-ban két motilitásért felelős génszakaszt azonosítottak. Az egyik a *flaA*, ami a flagellin strukturális génjét kódolja, valamint az *fliAB* (flagellar regulatory locus) operont, amely szabályozó funkciót lát el, termékei a csillók komponenseinek szintézisét és összeszerelését segítik (Akerley és Miller, 1993). Az *fliAB* transzkripcióját közvetlenül a BvgAS rendszer gátolja, ezért a motilitásért felelős gének csak Bvg⁻ fázisban fejeződnek ki. Avirulens fázisban a flagellum valószínűleg a környezetben való túlélésében és az új gazda megtalálásában fontos a baktérium számára (Cotter és Miller, 2001). Savelkoul és mtsai. (1996) kimutatták, hogy a csillókkal rendelkező *B. bronchiseptica* törzsek, illetve a tisztított flagellumok is képesek HeLa sejtekhez kötődni, vagyis a csillók szerepet játszhatnak a nyálkahártyákon történő megtapadásban. A csillók adhezin-szerű tulajdonságáért a flagellin molekulák középső, hipervariábilis régiója tehető felelőssé (Ramos és mtsai., 2004). Emellett a flagellin jó antigén, és erős gyulladáskeltő tulajdonsággal is rendelkezik. Hatására a gazdaszervezetben különböző gyulladáshoz vezető mediátorok (pl. TNF α és IL-6) és toll-like receptorok nagyfokú termelése indul meg. Az erős immunválaszt indukáló hatása miatt a flagellin fontos szerepet játszhat a *B. bronchiseptica* elleni vakcinák fejlesztésében (Lopez-Boado és mtsai., 2005).

A III típusú, vagy kontakt-dependens szekréciós rendszer (type three secretion system; TTSS) általánosan használt a Gram-negatív baktériumok körében, hogy effektor proteinjeiket direkt módon az eukarióta sejt citoplazmájába juttassák, aminek következtében a fertőzött sejt funkciói megváltoznak (Kurushima és mtsai., 2012). Az effektor molekulákat átjuttatni a belső és a külső bakteriális membránon az injektiszóma elnevezésű apparátus feladata, amely egy bazális testből és egy extracitoplazmatikus túból áll, amelyen keresztül távoznak a molekulák. A TTSS-t a *bsc* lókuszt kódolja mindegyik klasszikus *Bordetella* fajban, a lókuszt közel 30 nyílt leolvasási keretet (ORF) tartalmaz és kódolja a TTSS apparátust, a BscN ATPáz, a szekretálandó fehérjéket, regulátor molekulákat és a feltételezett chaperonokat. A különböző ORF-ek expressziókor képződő kombinálódása többféle fenotípust eredményez (Kozak és mtsai., 2007). A lókuszt főleg *B. bronchiseptica*-ban tanulmányozták, mert a Bsc-asszociált fenotípus könnyebben detektálható ebben a fajban, mint a *B. pertussis*-ban. A Bsc leglátványosabb *in vitro* hatása a különböző sejtvonalakon előidézett sejthalál. Míg a legtöbb

TTSS-rel rendelkező Gram-negatív kórokozó (*Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*) a fagocitákon fejt ki citotoxikus hatását, addig a *B. bronchiseptica* TTSS apparátusa a makrofágok mellett különböző fajokból származó epitél sejteket is károsít (Stockbauer és mtsai., 2003). Yuk és mtsai. (1998) *in vivo* patkány-kísérletben kimutatták, hogy a TTSS-negatív mutáns törzsek a vad típusúhoz képest csak kis mértékben tudták kolonizálni a légutakat, és fertőzésre utaló tüneteket sem mutattak az állatok. A TTSS immunmoduláló hatása, és feltehetőleg szerepet játszik az alsó légutak sikeres kolonizációjában, és perzisztáló fertőzések kialakulásában (Kozak és mtsai., 2007; Skinner és mtsai., 2004).



5. ábra: A klasszikus *Bordetella* fajok virulencia faktorai [Hester, 2012]

A *B. pertussis* (piros), a *B. parapertussis* (fekete) és a *B. bronchiseptica* (zöld) jellemző virulencia tényezői az adenilát cikláz-hemolizin (ACT), a dermonekrotoxin (DNT), a filamentózus hemagglutinin (FHA), a fimbriák, a flagellin, a lipopoliszacharid komplex (LPS), a pertaktin (PRN), a pertussistoxin (PTX), a tracheális citotoxin (TCT) és a hármas típusú szekréciós rendszer (TTSS)

A baktériumok számára a vas elengedhetetlen a növekedéshez, az oxidációs-redukciós biológiai folyamathoz, a kolonizációhoz és a patogenezishez. Emlős gazdában a szabadon elérhető vas mennyisége nagyon alacsony (10^{-9} M), mert hemhez, laktoferrinhez, transferrinhez, vagy más vas-kezelő faktorokhoz kötötten van jelen, ami a természetes immunitás részének tekinthető (Diavatopoulos, 2006). A szükséges vas felszabadítására számos patogén úgy evolválódott, hogy képes szintetizálni és szekretálni kis molekulású vegyületeket, melyek a vasat nagy affinitással kötik meg. Ezeket a molekulákat siderofóroknak nevezzük. A *Bordetella* nemzetség specifikus siderofórja az alcaligin, ami – még nem tisztázott mechanizmus által –, képes a laktoferrintől és transferrintől elvonni a vasat (Giardina és mtsai., 1995). Az alcaligint az *alc* operon génjei kódolják, de kifejeződésük a környezetben található vas mennyisége által szabályozott. Vas-éhezéskor sok alcaligin képződik, elegendő vas mellett viszont alcaligin felszabadulás nem mutatható ki (Foster és Dyer, 1993).

3.4. A *Bordetella bronchiseptica* jellemzésére használt vizsgálati módszerek

A mikroorganizmusok azonosítására manapság is elterjedt módszer a tenyésztést követő biokémiai profil vizsgálata. A *B. bronchiseptica* esetén légzési enzimek jelenlétét, az ureum bontását, a nitrát-redukciót és különböző szénhidrátok hasznosítását tesztelik elsődlegesen. A hagyományos biokémiai próbákat egyre inkább háttérbe szorítják az automatizált rendszerek, mint például az API 20 NE, vagy a BIOLOG, melyek rövidebb idő alatt szélesebb körű vizsgálatra adnak lehetőséget. Kétségtelen azonban, hogy egy jól megválasztott szelektív vagy differenciáló táptalaj (pl. véres agar, kromogén talajok) mellett a baktérium számos tulajdonsága leolvasható.

Az adhézió mechanizmusának egyik legegyszerűbb *in vitro* vizsgálati módszere a vörösvértest (vvt) szuszpenziókkal végzett hemagglutinációs próba, ugyanis a baktériumok hasonló módon képesek a vvt-khez tapadni, mint a hámsejtekhez (Ofek és Beachey, 1980). Ennek következtében párhuzam vonható a baktérium adhéziós képessége és a vvt-k általa történő összecsapódásának mértéke között. A *Bordetella* nemzetség hemagglutinációs aktivitásáról először Keogh és munkatársai (1947) számoltak be. Megfigyelték, hogy az általuk vizsgált *B. bronchiseptica* törzsek agglutinálták az emberből, egérből, baromfiból és más állatfajokból származó véreket.

A szerológiai vizsgálatok szintén szerves részét képezik a *Bordetella* fajokkal kapcsolatos kutatásoknak. Az 1960-as évektől különböző agglutinációs próbákat (cső-agglutináció, tárgylemez-agglutináció, mikro-agglutináció) alkalmaztak az adott állat(állomány) *B. bronchiseptica* ellen termelt ellenanyag szintjének meghatározásához, sok esetben pedig a nem manifesztálódott fertőzésekre lehetett fényt deríteni a módszer

segítségével. Az antigén–ellenanyag kölcsönhatásán alapuló kutatásokban (pl. vakcina-fejlesztés) áttörés jelentett az ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszer megjelenése, mert segítségével gyorsabb, pontosabb és szignifikánsan érzékenyebb lett az ellenanyag szint meghatározása (Venier és mtsai., 1984).

A kórokozó baktériumok ellen széles körben alkalmaznak antibiotikumokat, de a célzott terápia érdekében elengedhetetlen az adott izolátum antibiotikum-rezisztencia vizsgálata. A *B. bronchiseptica* törzsek antibiotikum-érzékenységét hagyományos korongdiffúziós, E-tesztes, vagy minimális gátló koncentráció (MIC) módszerrel határozzák meg leginkább a gyakorlatban. Ezzel szemben az alap kutatásban előtérbe került az antibiotikum-rezisztencia genetikai hátterének vizsgálata is (Kadlec, 2006).

A fehérje alapú vizsgálatok közül kiemelendő a multilókusz enzim elektroforézis (MLEE). Musser és mtsai. (1987) 300-nál több, eltérő gazdafajból származó *B. bronchiseptica* törzs MLEE vizsgálatával nagyfokú fajon belüli változatosságot tártak fel. Megállapították, hogy legnagyobb különbségek a kutya eredetű törzseknél találhatóak, ugyanis a 20 típusból tizenkettőt képviseltek, ráadásul az evolúciós törzsfa különböző ágain helyezkedtek el ezek a törzsek. A sertés eredetű törzseket is öt típusba sorolták, de ezek közül négy típust csak 1-1 törzs képviselt.

A genotipizáló módszerek a környezeti körülményektől függetlenül adnak információt a fajok közötti és a fajkon belüli különbségekről és hasonlóságokról. A polimeráz láncreakció (PCR) segítségével az izolátumok gyors és egyszerű azonosítása vált lehetővé. Dragsted és mtsai. (2004) által kifejlesztett *B. pertussis* és *B. parapertussis* azonosítására szolgáló PCR módszer szenzitivitása (97%) messze meghaladta a hagyományos tenyésztéssel végzett vizsgálatok érzékenységét (58%). Hozbor és mtsai. (1999) létrehoztak egy, a rutin diagnosztikában is használható *B. bronchiseptica* fajspecifikus PCR-t. A flagellin strukturális génjének upstream régióját választották ki célszekvenciának, így segítségével azonosíthatók és egymástól elválaszthatók a különböző *Bordetella* fajok. Fajon belüli molekuláris tipizálás egyik legegyszerűbb, PCR alapú módja a RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), ahol rövid primerek a genom homológ szakaszait erősítik fel, és a kapott mintázat alapján csoportosíthatók a törzsek (Keil és Fenwick, 1999; Shin és mtsai., 2007). Napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek a gyorsdiagnosztikában is alkalmazható módszerek fejlesztésére. Ezen technikák közül a real-time PCR rendkívül nagy segítséget nyújt a rutin diagnosztikai vizsgálatokban (Tizolova és mtsai., 2014).

A restrikciós endonukleázok (RE-k) felfedezésével új genetikai vizsgálati módszerek jöttek létre, melyeket a *Bordetella* kutatásokban is szép számmal alkalmaznak. A kromoszómális DNS RE-k általi hasításával (Restriction Endonuclease Analysis; REA) a képződő fragmentek alapján fajok közötti (Khattak és Matthews, 1993) és fajon belüli (Sacco és mtsai., 2000) megkülönböztetésre nyílik lehetőség. Register és Magyar (1999) a

ribotipizálást használta *B. bronchiseptica* törzsek jellemzésére. A *PvuII* RE emésztéssel nyert fragmenteket egy *E. coli* génjéből előállított próbával hibridizálták, és a már meglevő 13 ribotípus mellé a magyarországi izolátumok vizsgálata során további két új ribotípust írtak le. Manapság a PCR- és az RE-technikák együttes alkalmazása a gyakori, mint például az AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Gzyl és mtsai., 2005), vagy a 16S rDNS-re specifikus ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis). Friedman és munkatársai (2006) különböző gazdafajokból származó *B. bronchiseptica* izolátumok jellemzésére kifejlesztettek egy PCR-t követő RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) rendszert, ahol a flagellin gén szakaszát *EaeI*, a *HinII*, a *BglI* és a *HaeIII* RE-kkel való hasítását követően különböző mintázatokat tudtak megkülönböztetni. A PCR-termékek és/vagy restrikciós fragmentek elkülönítése nem mindig megoldható hagyományos gélelektroforézissel, különösen nagyméretű termékek esetében. Ilyenkor különböző futtatási technikákat érdemes használni, mint például a DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temporal Temperature Gradient Electrophoresis) (Shina és mtsai., 2002), vagy a PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) (Gueirard és mtsai., 1995).

A microarray-ek megjelenésével egyszerre több tulajdonság is vizsgálható (Cummings és mtsai., 2004), többek között ezáltal sikerült elkülöníteni a Bvg^+ és Bvg^- fázisban kifejeződő *B. bronchiseptica* géneket (Nicholson, 2007). Egy, vagy több gén (pl. MLST), de akár a teljes genom szekvenálásával nukleotid szintű különbségek, és sokkal pontosabb filogenetikai kapcsolatok olvashatók le (Park és mtsai., 2013; Diavatopoulos, 2006).

Az állatkísérletek mind a mai napig elengedhetetlen részét képezik a *Bordetella*-kkal kapcsolatos kutatásoknak. Kezdetben mesterséges fertőzésekkel igazolták a *B. bronchiseptica* kórokozó képességét (Bemis és mtsai., 1977), vagy éppen a különböző virulenciával rendelkező vad típusú törzsek jelenlétét (Rutter és mtsai., 1981). Kísérleti állatokat használnak az egyes toxinok hatásának (Magyar és mtsai., 2000), valamint vad típusú és egy adott gén deléciójával kialakított mutáns törzsek kórokozó képessége közti *in vivo* vizsgálatára (Harvill és mtsai., 1999). A különböző képalkotó eljárásoknak (röntgen, komputer tomográfia, mágneses rezonancia) köszönhetően *in situ* is megfigyelhetőek és időben nyomon követhetőek bizonyos elváltozások (Magyar és mtsai., 2003; Pósa és mtsai., 2011). Egyre gyakoribbak azonban az állatkísérleteket kiváltó, *in vitro* szövettenyészeteken történő vizsgálati módszerek, melyekkel szintén jól modellezhető egy fertőzés, vagy egyes virulenciafaktorok működése (Ahuja és mtsai., 2012).

4. Anyag és módszer

4.1. A felhasznált *B. bronchiseptica* törzsek

Munkánkhoz frissen izolált és az MTA ATK ÁOTI törzsgyűjteményében megtalálható, hazai és külföldi eredetű, különféle gazdafajokból (sertés [n=48], kutya [n=47], nyúl [n=43], macska [n=4], tengerimalac [n=6], ló [n=5], koala [n=2], pulyka [n=2] és ember [n=7]) származó *B. bronchiseptica* törzseket használtunk fel (Melléklet 1. táblázat).

4.1.1. A baktériumok izolálása, tenyésztése és azonosítása

A *B. bronchiseptica* izolálását laboratóriumunkba érkezett szervekből (légcső, tüdő) vagy orrtampon-mintákból kíséreltük meg antibiotikum tartalmú MacConkey (Becton, Dickinson and Company; New Jersey, USA) táptalajon. A lemezeket aerob körülmények között, 37°C-on 48 órán keresztül inkubáltuk. A *B. bronchiseptica*-ra jellemző telepmorfológiát mutató (Sanden és Weyant, 2005) baktériumtelepeket 5% juhvért tartalmazó Columbia agar táptalajra (Lab M; Bury, UK) oltottuk, és a 37°C-on 24 óra alatt kinövő tenyészetet használtuk további vizsgálataink során. A törzsek fenntartása liofilizált és -70°C-on fagyasztott formában történt.

A friss izolátumok identifikálásához és a törzsgyűjteményi törzsek ellenőrzéséhez telepmorfológiai, biokémiai és molekuláris vizsgálatokat végeztünk. Az szükséges vizsgálatok részletes leírását a 4.2.1, a 4.2.3, a 4.3.1 és a 4.3.2. fejezetek tartalmazzák.

4.2. A *B. bronchiseptica* törzsek fenotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok

4.2.1. Telepmorfológiai vizsgálatok

A baktériumok 24 órás, 37°C-on történő inkubációja után megfigyeltük a kialakuló kolóniák színét, fényességét, nagyságát, alakját, a telepek szélét, konzisztenciáját és hemolizáló képességét.

4.2.2. Hemolizáló képesség vizsgálata

Az azonosítás és a tenyésztés során a törzsek nem mindig mutatták a *B. bronchiseptica*-ra jellemző β -hemolízist. Mivel ezt a sajátságot befolyásolhatják a tenyésztési körülmények is, a törzsek hemolitikus tulajdonságainak vizsgálatára a következő táptalajokat használtuk fel:

5% juhvért tartalmazó Columbia agar, pH 7,2 (véres agar) (Lab M)

5% juhvért tartalmazó Columbia agar, pH 6,8 (Lab M)

5% juhvért tartalmazó Columbia agar, pH 7,2 (Bio-Rad; Hercules, USA)

5% lóvért tartalmazó Columbia agar, pH 7,2 (Bio-Rad)

15% lóvért tartalmazó Bordet Gengou (BG) agar, pH 6,8 (Becton, Dickinson and Company)

15% juhvért tartalmazó BG agar, pH 6,8 (Becton, Dickinson and Company)

Luria-Bertani (LB) (Lab M) táplevesből való kioltás véres agarra

A vizsgálatokat legalább kétszeri ismétléssel hajtottuk végre, valamennyi elrendezésben aerob körülmények között, 37°C-on és 24 óráig tartott az inkubáció.

4.2.3. Biokémiai tulajdonságok vizsgálata

A *B. bronchiseptica* izolátumok faji szinten történő azonosításához a szükséges és elégséges biokémiai próbákat végeztük el (Sanden és Weyant, 2005). Hagyományos levestáptalajok segítségével teszteltük a mikrobák ureum-bontó és nitrát-redukáló képességét, a triptofán-bontó képességet indol próbával ellenőriztük. Az izolátumok szénhidrát hasznosító képességét glükóz, laktóz és szacharóz tartalmú táplevesben vizsgáltuk (Konkoly Thege és Lányi, 1999).

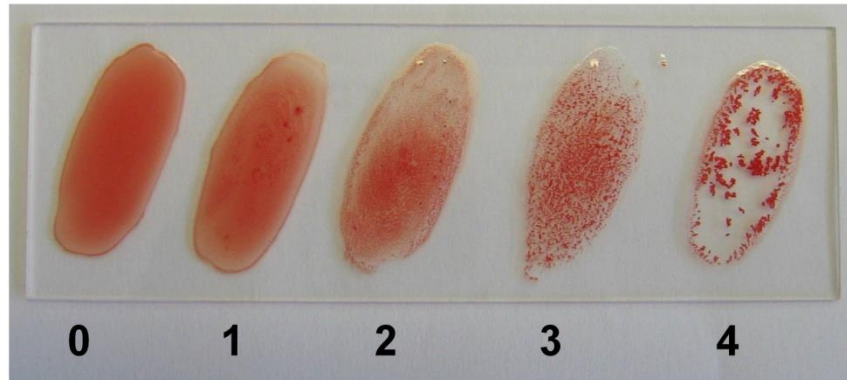
4.2.4. Ureum-bontó képesség vizsgálata

A biokémiai fajazonosítás során felfigyeltünk 4 darab, egy Bács-Kiskun megyei sertéstelepről származó törzsre, melyek az átlagtól eltérő módon nem rendelkeztek ureáz aktivitással. Az atipikus (ureáz-negatív) törzsek mellett a KM22 jelű, jól jellemzett (Magyar és mtsai., 2008) sertés eredetű törzset használtuk kontrollként.

Az ureum-bontásért felelős gének aktivitása alacsony hőmérsékleten, valamint nikotinsav és/vagy $MgSO_4$ mellett megemelkedik (Cotter és Miller, 2001), ezért 24°C-os inkubáció mellett is elvégeztük a hagyományos biokémiai tesztet. A $MgSO_4$ mennyiségétől való függés vizsgálatához különböző, 0, 40, 100 és 150 mM $MgSO_4$ tartalmú LB táplevesbe oltottunk egy kacsnyi friss baktériumot, majd az inkubáció után (37°C, 24 h) 30 μ l szuszpenziót pipettáztunk a hagyományos ureum levesbe (Heininger és mtsai., 2002). A tesztet 37°C-os, 24 órás inkubáció után értékeltük ki. Az ureum-bontó képességet Diatabs diagnosztikai tabletták (Rosco Diagnostica; Taastrup, Dánia), valamint API 20 NE lemez (bioMérieux; Marcy l'Etoile, Franciaország) segítségével is teszteltük a gyártók utasításai szerint. A mikrobák sótűrő képességét 3,5%-os, valamint 5%-os NaCl tartalmú nutrient agaron (Lab M) tanulmányoztuk.

4.2.5. Hemagglutinációs próba

A *B. bronchiseptica* törzsek adhéziós képességének vizsgálatához tárgylemez-hemagglutinációs vizsgálatokat végeztünk, amelyhez összesen 79 (32 hazai és 47 külföldi), 9 különböző gazdafajból származó *B. bronchiseptica* törzset választottunk ki. A vizsgálatokhoz alvadásban gátolt szarvasmarha-, sertés-, ló-, juh-, kutya- és csirkevért, illetve humán „A”, „B” és „0” vércsoportú véreket használtunk. A véreket 3000 g-n 5 percig centrifugáltuk. A cső aljára ülepedett vvt-eket PBS (foszfáttal pufferelt sóoldat) (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) oldatban szuszpendáltuk, majd ismét lecentrifugáltuk az elegyet (3000 g, 5 perc). A mosási folyamatot a felülúszó kitisztulásáig ismételtük. Ekkor a leülepedett vvt-eket tartalmazó pelletből PBS-sel 10%-os szuszpenziót készítettünk. A szuszpenzió 20 µl-ét tárgylemezre cseppentettük, amelyben egyenletesen eloszlattunk egy kacsnyi friss baktériumot. A reakciók eredményét egy perc elteltével olvastuk le, és ötfokozatú skálán (0-4) értékeltük. A 0 hemagglutinációs szint a hemagglutináció hiányát jelölte, a 4 pedig a teljes hemagglutinációt (6. ábra). A vizsgálatot szobahőmérsékleten végeztük és a vérek mennyiségétől függően (akár több alkalommal is), alkalmanként legalább háromszor ismételtük meg. A végső értékeléskor az ismétlések eredményeit átlagoltuk, majd a kapott értékeket egész számokra kerekítettük.



6. ábra: Hemagglutinációs szintek

0: negatív reakció, 1: gyenge reakció, 2: közepesen erős reakció, 3: erős reakció, 4: teljes hemagglutináció

4.2.6. A mozgásképesség vizsgálata

A különböző környezeti tényezők *B. bronchiseptica* törzsek mozgásképességére gyakorolt hatását Passerini de Rossi és mtsai. (1997) módszere alapján végeztük el. Vizsgálatainkat 40 darab (34 hazai és 6 külföldi) nyúl eredetű törzsszel hajtottuk végre. Kétféle, 0,4% agart tartalmazó félfolyékony táptalajt használtunk: Luria-Bertani (LB) és 40 mM MgSO₄-tal dúsított Luria-Bertani (LB+MgSO₄) táptalajt. Két sorozatot oltottunk a talajokra pontoltással, és egy-egy sorozatot 24°C-on, illetve 37°C-on 24 óráig inkubáltuk. A

különböző környezeti feltételek mellett (LB-37; LB-24; LB+MgSO₄-37; LB+MgSO₄-24) keletkezett motilitási zónákat milliméter pontossággal olvastuk le. A vizsgálatot háromszori ismétléssel végeztük el. Az adatok megjelenítéséhez az intézetben fejlesztett Phyton script programot használtuk.

4.2.7. Antibiotikum-érzékenység meghatározása

A *B. bronchiseptica* antibiotikum-rezisztencia vizsgálatához 40 nyúl (34 hazai és 6 külföldi) és 15 (hazai) sertés eredetű törzset választottunk ki, és Kirby-Bauer korongdiffúziós módszert alkalmaztunk (Ortez, 2005). Egy kacsnyi friss tenyészetből származó baktériumot 5 ml fiziológiás sóoldatban szuszpendáltunk, az elegy sűrűségét denzitométerrel (BioSan; Riga, Lettország) 0,5 McFarland-re állítottuk be, a szuszpenziót steril vattapálca segítségével Müller-Hinton (LAB M) táptalajra szélesztettük. A vizsgálat során használt 14 különböző antibiotikumot az 1. táblázat ismerteti.

1. táblázat: Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok során felhasznált antibiotikumok adatai

Antibiotikum csoportok	Antibiotikum neve	Rövidítés*	Gyártó
Sejtfalszintézist gátlók			
Penicillinek	Penicillin	PEN 10	Abtek
	Ampicillin	AMP 10	Abtek
Cefalosporinok	Ceftiofur	FUR 30	Biolab
Glikopeptidok	Vankomicin	VAN 30	Abtek
Citoplazmamembránt károsítók			
Polymixinek	Kolisztin	COL 10	Abtek
Fehérjészintézist gátlók			
Aminoglikozidok	Neomicin	NEO 30	Abtek
Tetraciklinek	Tetraciklin	TET 30	Abtek
Makrolidok	Eritromicin	ERY 15	Abtek
Linkozamidok	Linkomicin	L 2	Biolab
Nukleinsavsintézist gátlók			
Quinolonok	Flumequin	FLM 30	Biolab
	Enrofloxacin	ENO 5	Abtek
	Nalidixsav	NAL 30	Abtek
Szulfonamidok	Szulfonamid	SMX 300	Abtek
	Co-trimoxazol	COT 25	Abtek

*:A rövidítés melletti szám a korongok µg-ban megadott antibiotikum tartalmát jelöli

Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok kiértékelésekor a Clinical and Laboratory Standards Institute (2013) ajánlott határértékei alapján, a NÉBIH Állat-egészségügyi

Diagnosztikai Igazgatóság által kidolgozott határértékeket (Melléklet 2. és 3. táblázat) vettük figyelembe.

4.3. *B. bronchiseptica* törzsek genotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok

4.3.1. DNS izolálás

A friss baktériumtenyészetek egy-egy telepét 50 µl desztillált vízben szuszpendáltuk, és vortexelést követően 20 percig 99°C-on asztali rázó-termosztátban (BioSan) főztük. A felfőzött szuszpenziót centrifugáltuk (16 000 g, 1 perc), hogy a forralásos módszer közben keletkezett sejttörmelék és a felülúszóban levő DNS elváljon egymástól. A felülúszót (DNS templát) steril csövekbe pipettáztuk át és a további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

4.3.2. Polimeráz láncreakció

PCR

A reakciókhoz szükséges primereket vagy a szakirodalom alapján választottuk ki, vagy magunk terveztük OLIGO 5 Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc; Colorado Springs, USA) segítségével. A molekuláris azonosítás során a *B. bronchiseptica* flagellin génjének upstream régiójára tervezett primereket használtunk, a reakció körülményeinek megválasztásánál Hozbor és mtsai. (1999) ajánlását követtük. A premix oldatot Friedman és mtsai. (2006) leírása alapján állítottuk össze.

Reakcióelegy összetétele:

- 16,5 µl PCR víz
- 2,5 µl 10×DreamTaq puffer
- 2,0 µl DMSO
- 1,2 µl 25 mM MgCl₂
- 1,0 µl 10 mM dNTP
- 0,3 µl 50 µM Bbr fwd primer
- 0,3 µl 50 µM Bbr rev primer
- 0,2 µl 5U/µl DreamTaq polimeráz
- 1,0 µl DNS templát

A 4 atipikus ureáz-negatív és a kontroll KM22 törzs *ureC* génszakaszának felsokszorosításához követtük a Reed (2001) által leírt hőprofil, a premix összeállításakor viszont az általunk alkalmazott rendszerhez optimalizáltuk a cikkben szereplő mennyiségeket.

Reakcióelegy összetétele:

17,25 µl	PCR víz
2,5 µl	10×DreamTaq puffer
2,0 µl	DMSO
1,0 µl	25 mM MgCl ₂
0,5 µl	10 mM dNTP
0,5 µl	50 µM ureC fwd primer
0,5 µl	50 µM ureC rev primer
0,25 µl	5U/µl DreamTaq polimeráz
0,5 µl	DNS templát

A vizsgálatokba vont 152 törzs kiválasztott génszakaszainak (*fimA*, *flaA*, *dnt*, *cyaA* és *ptp*) felsokszorozásához a reakcióelegy összetétele – a primerek kivételével – megegyezett a fajspecifikus PCR-nél leírt receptúrával (Friedman és mtsai., 2006). Vizsgálataink során a következő primereket használtuk fel:

Bbr fwd	5'-AGGCTCCCAAGAGAGAAAGG-3'	Hozbor és mtsai., 1999
Bbr rev	5'-TGGCGCCTGCCCTATC-3'	Hozbor és mtsai., 1999
ureC fwd:	5'-TGGGCCTGAAGATCCACGAGGACTGGG-3'	Reed, 2001
ureC rev	5'-GGTGATGGCACACCATGACCATGTC-3'	Reed, 2001
fimA fwd	5'-CTGACCGCCTGTGCATTGA-3'	Boschwitz és mtsai., 1997
fimA rev	5'-CACCTGGCTGCGGAGATT-3'	Boschwitz és mtsai., 1997
flaA fwd	5'-TGGCTGCAGTCATCAATACC-3'	Winstanley és mtsai., 2001
flaA rev	5'-AGCGACAGGACGTTTTGC-3'	Friedman és mtsai., 2006
dnt fwd	5'-GCGGTACTIONTGGGATAATAGA-3'	Stępniewska & Markowska-Daniel, 2010
dnt rev	5'-ATAAAGATGAATCGGCATTG-3'	Stępniewska & Markowska-Daniel, 2010
cyaA fwd	5'-GATGAYGTCGTGCTTGCCAATGCTT-3'	jelen dolgozat
cyaA rev	5'-ATGCGGATCTCCAGGTCGTT-3'	jelen dolgozat
ptp fwd:	5'-ATCCTGGTGCAACTGAGGTTCTG-3'	Buboltz és mtsai., 2008
ptp rev:	5'-AGGTTGTGGGTGATGAACAGCAG-3'	Buboltz és mtsai., 2008

Az egyes génszakaszokhoz tartozó reakciók hőprofilja, valamint a termékek várt hossza a 2. táblázatban található. A reakciókat Swift Mini Instrument (Esco; Hatboro, USA) PCR készülék segítségével hajtottunk végre, a PCR termékeket további felhasználásig - 20°C-on tároltuk.

2. táblázat: A vizsgált génszakaszok felsokszorozásakor alkalmazott reakciókörülmények és a PCR termékek várt hossza

PCR	Kezdeti denaturáció	Denaturáció	Anneláció	Extenzió	Végső extenzió	Ciklusok száma	Termék hossza
Fajspecifikus	94°C 180 s	94°C 30 s	53°C 30 s	72°C 30 s	72°C 300 s	30	237 bp
<i>ureC</i>	94°C 540 s	94°C 30 s	50°C 30 s	72°C 30 s	72°C 600 s	35	323 bp
<i>fimA</i>	94°C 180 s	94°C 30 s	60°C 30 s	72°C 45 s	72°C 300 s	30	549 bp
<i>flaA</i>	94°C 180 s	94°C 60 s	50°C 60 s	72°C 90 s	72°C 600 s	30	1165 bp
<i>dnt</i>	95°C 600 s	94°C 30 s	56°C 30 s	72°C 20 s	72°C 420 s	35	224 bp
<i>cyaA</i>	94°C 120 s	94°C 15 s	68°C 150 s	72°C 120 s	72°C 120 s	35	2151 bp
<i>ptp</i>	95°C 300 s	95°C 30 s	56°C 30 s	72°C 60 s	72°C 480 s	30	958 bp

A PCR termékek detektálása

A PCR termékeket 1,5%-os SeaKem (Lonza; Basel, Svájc) agaróz gélben 1×TBE (trisz-bórsav-EDTA) (Lonza) pufferben, megfelelő méretű molekulasúly markerek mellett ellenőriztük 9 V/cm elektromos térerősségű gélelektroforézissel. A gél zsebeibe mintánként 5 µl PCR terméket és 1 µl 6×DNA Loading Dye-t mértünk. Az elektroforézis után a gél 2 µg/ml töménységű etídium-bromid oldatban festettük meg. A termékek detektálása és dokumentálása UV fényben történt Kodak Gel Logic 212 Imaging System (Rochester, USA) segítségével.

4.3.3. Restriktációs fragmenthossz polimorfizmus

A minták előkészítése

Az RFLP analízishez a négy gén vizsgálat (*fimA*, *flaA*, *cyaA* és *ptp*) PCR termékeit használtuk fel. Ha gélfotó alapján úgy ítéltük meg, a PCR termékeket PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) segítségével a gyártó utasításai szerint megtisztítottuk.

A PCR termékeket (20 µl) 500 µl, -20°C-on tárolt tömény etanolba mértük, majd vortexelést követően az elegyet legalább egy éjszakán keresztül -20°C-on tartottuk. Ezt követően a mintákat 18 000 g-n, 4°C-on 20 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót leöntöttük. A maradék alkoholt vákuumcentrifuga segítségével távolítottuk el. A kiszáritott

pelletet (DNS) 10 µl ultra tisztaságú PCR vízben oldottuk fel, és ez a betöményített DNS minta szolgált alapul az RFLP vizsgálatoknál.

RFLP

Az egyes géneknél alkalmazott restrikciós endonukleázokat a BioEdit 7.3.1.0. (Hall 1999) és a GeneQuest – Lasergene 7.1.0. (DNASTAR; Madison, USA) programok segítségével választottuk ki. A *fimA* gén vizsgálatához *HincII* és *SaI* enzimeket, a *flaA* génszakasz hasításához *HincII*, *BglI* és *MspI* endonukleázokat alkalmaztunk. A *cyaA* génszakaszt *NarI* és *SaI*, a *ptp* operont *NarI* és *BglI* enzimek használatával vizsgáltuk. A reakcióelegyek összemérésénél és az egyéb reakciókörülmények megválasztásánál a gyártók, a Thermo Scientific [*BglI*, *HincII*, *MspI*, *SaI*] és a Promega (Fitchburg, USA) [*NarI*] ajánlása alapján jártunk el.

A hasítási mintázat detektálása

Az enzimek hatására létrejött fragmenteket 2,5%-os MetaPhor (Lonza) agaróz gélben 1×TBE pufferben gélelektroforézissel (7 V/cm) ellenőriztük. A gél zsebeibe megfelelő méretű molekulasúly markereket, valamint a 7 µl 6×DNA Loading Dye festékkel összekevert teljes térfogatú RFLP mintákat pipettáztuk. A gélt elektroforézis után 2 µg/ml töménységű etídium-bromid oldatban festettük meg. A termékek detektálása és dokumentálása UV fényben történt Kodak Gel Logic 212 Imaging System segítségével, a fragmentek hosszának megállapításához a Kodak Molecular Imaging Software-t használtuk.

4.3.4. Szekvencia-meghatározás és filogenetikai elemzés

A nukleinsav sorrendek meghatározását négy gén kijelölt szakaszán végeztük el (*fimA*, *flaA*, *cyaA* és *ptp*) összesen 40 reprezentatív törzsnél. A szekvenáló primerek minden esetben megegyeztek a PCR során alkalmazott primerekkel, azonban a *cyaA* 2151 bp hosszú szakaszának vizsgálatához egy további, saját tervezésű belső primerre is szükség volt (*cyaA*-in rev: 5'-TGGTTTCGGGTTTCGTCCATCA-3'). A PCR termékek tisztítását és a szekvenáló reakció összemérését a Macrogen Europe Ltd. (Amszterdam, Hollandia) hajtotta végre. A hagyományos Sanger-féle dideoxinukleotid módszerrel történő, kapilláris elektroforézis alapú szekvenáláshoz ABI 3130XL készüléket használtak. A Macrogen-től kapott kromatogramokat Chromas LITE 2.01 (Technelysium Pty Ltd; South Brisbane, Ausztrália) programmal értékeltük ki, a két irányból leolvasott szekvenciákat a SeqMan – Lasergene 7.1.0. (DNASTAR) programmal illesztettük össze. A kész szekvenciákat a GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) internetes adatbázisába töltöttük fel.

Az általunk vizsgált törzsek szekvenciáit a GenBank adatbázisában szereplő *B. bronchiseptica* teljes genom, *fimA*, *flaA*, *cyaA* valamint *ptp* génszekvenciákkal (Melléklet 6. táblázat) hasonlítottuk össze BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999) és MegAlign – Lasergene 7.1.0. (DNASTAR) programok segítségével. A nukleotid és az ebből származtatott aminosav 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. Az evolúciós távolságokat Jukes-Cantor korrekciós ráta figyelembevételével számítottuk ki, a törzsfa topológiáját 1000 ismétléses bootstrap analízissel vizsgáltuk.

5. Eredmények

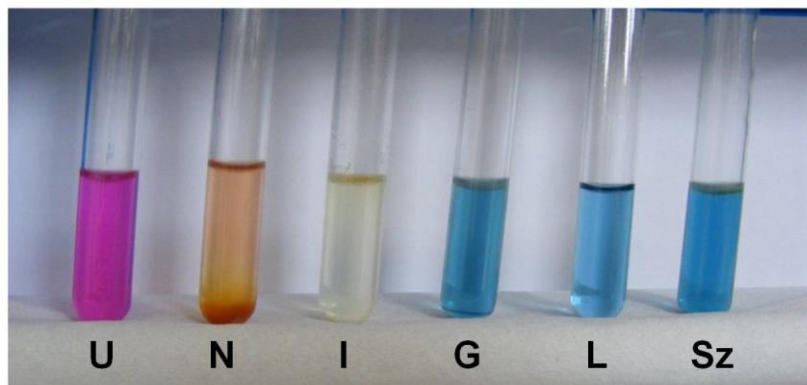
5.1. A *B. bronchiseptica* törzsek jellemzői

5.1.1. Az izolált törzsek

Magyarországról a vizsgálati időszakban (2009-2013) 91 kutya, 45 nyúl, 30 sertés, 16 ló, 10 macska, 2 tengerimalac, 2 vaddisznó és 2 ékszerteknős szerv vagy orrtampon minta érkezett laborunkba, valamint további 1-1 mintát dolgoztunk fel egér, patkány, vakond, cickány, nyest, menyét, gőte és szécinege gazdafajokból. Telepmorfológia alapján azokat a baktériumokat tekintettük *B. bronchiseptica* gyanúsnak, amelyek izoláláskor MacConkey táptalajon 48 óra inkubálás után legfeljebb 1-2 mm átmérőjű, rózsaszínes, domború, ép szélű telepeket képeztek, és véres agaron jellegzetes szagú, szürkés-fehér, fényes, legfeljebb 1-2 mm átmérőjű, domború, ép szélű, kaccsal könnyen felvehető és szétkenhető telepeket formáltak. A 206 mintából az azonosítási vizsgálatokat követően 23 sertés, 30 nyúl és 24 kutya eredetű törzset izoláltunk, a többi mintából *B. bronchiseptica* nem tenyésztett ki.

5.1.2. A fajazonosítás eredményei

A törzsgyűjteményünkben és saját izolátumaink közül összesen 164 törzset választottunk ki, melyeket először azonosítási vizsgálatoknak vetettünk alá. A biokémiai próbák során a reprezentatív törzsek többsége (90%) fajra jellemző, egységes eredményt adott (7. ábra).



7. ábra: A biokémiai próbák eredményei

U: ureumbontás, N: nitrát-redukció, I: indol termelés, G: glükóz hasznosítás, L: laktóz hasznosítás, Sz: szacharóz hasznosítás

A *B. bronchiseptica* biokémiai inaktivására jellemzően egyetlen törzs sem hasznosította a felkínált szénhidrátokat (glükóz, laktóz és szacharóz), és a triptofán bontását jelző indol tesztben is negatív eredményt kaptunk. A nitrát-redukció tesztelésekor a törzsek

csupán 92%-a lett pozitív, és találtunk 4 darab ureáz-negatív izolátumot is (Mellélet 1. táblázat).

A molekuláris azonosítás során a fajspecifikus PCR-rel felszorzosított 237 bp hosszúságú DNS szakaszt – a biokémiai próbák eredményétől függetlenül –, minden mintánál kimutattuk (16. ábra).

5.2. A fenotípusos vizsgálatok eredményei

5.2.1. A törzsek hemolizáló képessége

A törzsek hemolizáló képességének vizsgálatokor változatos eredményeket kaptunk. Leggyengébb hemolitikus aktivitást a Bio-Rad típusú juhvéres Columbia talajon tapasztaltunk, ahol néhány viszonylag friss sertés és nyúl eredetű izolátumon kívül nem volt feltisztulás a telepek körül. Ezzel ellentétben a lóvérrel kiegészített Bio-Rad-os táptalajon az esetek többségében gyenge β -hemolízist figyeltünk meg. Kivételt képeztek ez alól a hazai kutya eredetű törzsek, valamint külföldi törzsek közül az MBORD 843 és a Bb 335 jelű törzs, ugyanis ezeknél a törzseknél hemolízist egyetlen esetben sem figyeltünk meg. Az MBORD jelzésű külföldi törzsek közel felénél nagyon gyenge, csak a baktérium telepek alatt kialakuló feltisztulást láttunk.

Vizsgálataink során legtöbbször LAB M típusú juhvéres Columbia agart használtunk. A többszörös leoltás során a törzsek eltérő hemolitikus aktivitást mutattak. VA-on soha nem tapasztaltunk hemolízist a magyarországi kutya eredetű törzsek körében, de nem volt hazai törzs, amely az összes leoltás során kifejezett β -hemolízist mutatott volna. Egyes törzsek, mint például az 5230 (sertés), a leoltások 95%-ban nem hemolizált, míg többek között a KM22 95%-ban feloldotta a táptalajban levő vvt-eket. A sertés és nyúl eredetű friss izolátumok esetében az izolálást követő 1-2 leoltásnál még széles hemolitikus zónát láttunk a telepek körül, majd idővel ezeknél a törzseknél is leoltásonként változó hemolitikus aktivitást tapasztaltunk. Külföldi törzsek körében szintén eltérő volt a hemolitikus aktivitás az egyes leoltásokkor, viszont az MBORD jelzésű törzsek közül csak a két koala eredetűnél (681 és 698) láttuk a talaj kisebb-nagyobb feltisztulását. Szintén nem tapasztaltuk egyetlen esetben sem VA-on hemolízist a 4607 és a 4609 (sertés), valamint a Bb 335 (kutya) külföldi törzseknél (8. és 9. ábra).

A VA-on való hemolízist folyadék kultúrában (LB) való tenyésztéssel próbáltuk erősíteni, de a táplevesből történő kioltás után is változó eredményeket kaptunk. A VA-on eddig nem hemolizáló (kutya eredetű) törzsek továbbra sem mutattak hemolitikus aktivitást, a többi törzsnél általában nem tapasztaltunk változást, de egyesek gyengébb, mások erősebb hemolízist mutattak, mint azt megelőzően. Az alacsonyabb (7,2 helyett 6,8) pH-jú VA-on kifejezettebb hemolitikus aktivitást tapasztaltunk, de az eddig inaktív törzsek továbbra

is negatívak maradtak. A tápanyagokban dúsabb BG agaron 15% juhvér mellett törzseink a sima VA-hoz hasonlóan viselkedtek. A lóvért tartalmazó BG talajon viszont a hemolizáló törzsek egyértelmű, akár 1 cm nagyságú hemolitikus zónát is kialakítottak a telepek körül, de a kutyákból származó törzsek esetén (38 hazai és 2 külföldi) nem láttunk feltisztulást. Az MBORD-os törzsek közül továbbra is csak a két koalából származó törzs produkált hemolízist, a többi törzs esetében – függetlenül a gazdafajtól –, nem láttunk feltisztulást.



8. ábra: Juhvéres agaron nem hemolizáló kutya eredetű (5462) *B. bronchiseptica* törzs

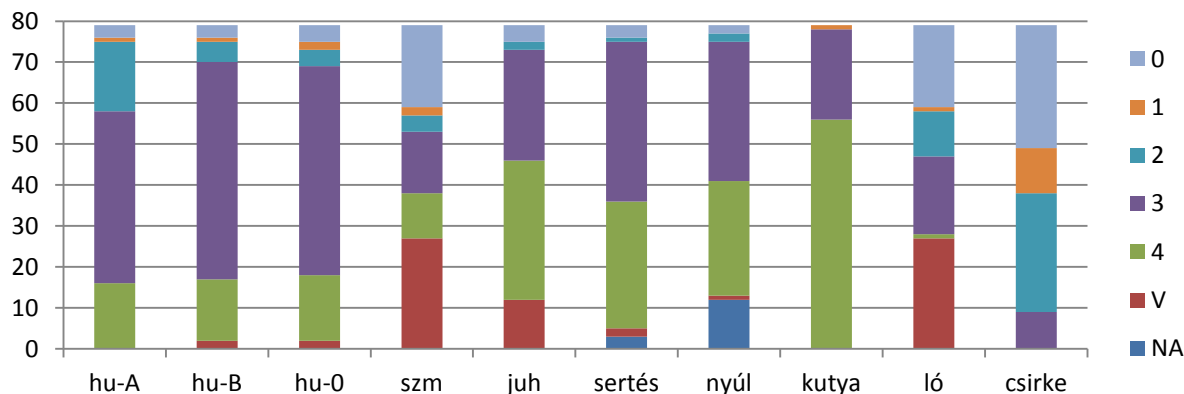


9. ábra: Juhvéres agaron β -hemolízist mutató nyúl eredetű (5653) *B. bronchiseptica* törzs

5.2.2. A hemagglutinációs képesség vizsgálata

A hemagglutinációs vizsgálatokat 9 gazdafajból származó, összesen 79 (32 hazai és 47 külföldi) *B. bronchiseptica* törzsszel végeztük el. A munkához felhasznált azonos típusú vérek az esetek többségében nem azonos donortól származtak. Az egyes vizsgálati alkalmakkor többszöri ismétlés során kapott eredmények átlaga a Melléklet 4. táblázatában található. Általánosságban elmondható, hogy a vizsgált törzsek a különböző típusú vvt-eket agglutinálták, és a legtöbb vérnél valamennyi hemagglutinációs szint megjelent. Gyenge és közepes erősségű reakciót emlős eredetű vvt-k mellett csak elvétve találtunk. Csirkevérrel viszont – az emlős vérekkel ellentétben –, jóval gyengébb reakciókat kaptunk. A három eltérő típusú (A, B és 0) humán vérrel kapott reakciók között számottevő különbséget nem találtunk, különösen a B és 0 típusú vvt-ekkel kapott eredmények egyeztek meg az összesítésben. A legerősebb (3 és 4 fokozatú) reakciókat kutya eredetű vérrel adták a baktériumtörzsek, a hemagglutináció hiányát szarvasmarha, ló és csirke vvt-k mellett tapasztaltuk nagy számban. Több esetben (9,5%) is előfordult, hogy a különböző alkalmakkor, vagy más donortól kapott vvt-ekkel történő vizsgálat során az előzőekhez képest más eredményt kaptunk. Humán 0, szarvasmarha, juh és ló vvt-k mellett egyszer erős vagy

teljes hemagglutinációt láttunk, míg ugyanaz a törzs másik donor vérrel semmilyen reakciót sem adott. Humán B, sertés és nyúl eredetű vérek esetén az 1/3 vagy a 2/4 hemagglutinációs szintek közötti változatosságot tapasztaltunk (10. ábra).



10. ábra: A hemagglutinációs próbák átlagolt eredménye különböző típusú vörösvértest szuszpenziók mellett

hu: humán; szm: szarvasmarha; 0: negatív reakció; 1: gyenge hemagglutináció; közepesen erős reakció; 3: erős reakció; 4: teljes hemagglutináció; NA: nincs adat; V: változó hemagglutináció (a különböző alkalmakkor/donorral végzett vizsgálatok eredménye legalább két hemagglutinációs szinttel eltért egymástól)

Magyarországi és külföldi eredetű törzsek között a vizsgálatok során eltérést nem tapasztaltunk, mindkét csoportban megjelent valamennyi hemagglutinációs szint, és változó hemagglutinációt mutató törzseket is találtunk. Egyedüli kivételt az MBORD jelzésű külföldi törzsek képeztek, amelyek a vizsgálatok negyedében negatív reakciót adtak. Közülük kerültek ki a humán, sertés és nyúl véreket nem agglutináló törzsek (2 pulyka és 1 humán eredetű). Ló vvt-kkel kapott negatív reakciók 75%-ánál szintén MBORD jelzésű törzssel történt a vizsgálat.

Ha adott gazdafajból származó törzsek hemagglutinációs próbában adott eredményeit nézzük a különböző típusú vérekkel, az összesítéshez képest kisebb-nagyobb eltéréseket tapasztalunk. Sertés eredetű (n=30) *B. bronchiseptica* törzsek körében csak erős és teljes hemagglutinációt kaptunk humán 0, sertés, nyúl és kutya vvt-kkel, az A és B típusú humán, valamint juhvérrel szemben szintén ezt a két hemagglutinációs szintet figyeltük meg az esetek legalább 83%-ban. Negatív és gyenge reakciót szarvasmarha, ló és csirke vvt-k esetén kaptunk, bár 2, 3 és 4-es hemagglutinációs szinteket is feljegyeztünk.

A 14 kutyából izolált törzsnél a sertés eredetű törzsekhez képest arányaiban kevesebb teljes hemagglutinációt találtunk. Ezt a csökkenést az összes vértípusnál megfigyeltük, viszont a 2-es szintű és annál gyengébb reakciók aránya nem változott. Az összes vizsgált törzs (n=79) közül egyetlen kutya eredetű (NCTC 452) adott gyenge hemagglutinációt humán vvt-kkel. Az összes vizsgálati elrendezésből 19 esetben változó hemagglutinációs

értéket kaptunk, és szarvasmarha vvt-t használva a kutya eredetű törzsek felénél nem tudtunk konkrét szintet megállapítani.

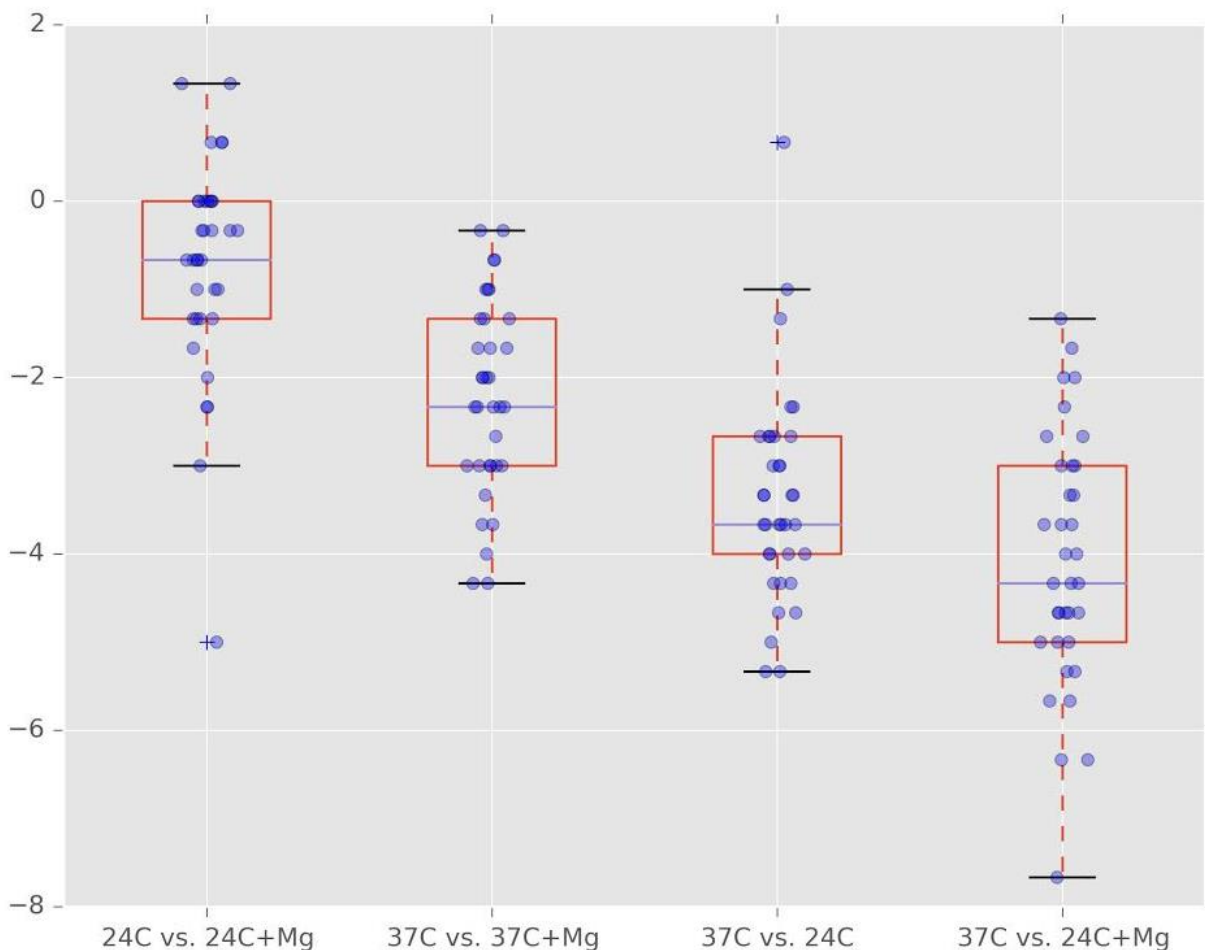
Nyúl eredetű törzseknél alig kaptunk teljes hemagglutinációt, ez alól csak a kutya vvt-kkel adott reakció volt kivétel. Az esetek többségében 3-as szintű erős reakciót tapasztaltunk, de humán A, ló és csirke vvt-kkel közepesen erős (2-es szintű) reakciót kaptunk. A törzsek 58%-a nem agglutinálta a szarvasmarha vvt-eket, más gazdafajból származó törzseknél nem tapasztaltuk a negatív reakciók ilyen magas arányát. A legtöbb változó értéket juh vvt-kkel kaptuk.

A humán megbetegedésből származó *B. bronchiseptica* törzsek esetében a sertés vvt-vel szemben kaptuk a legtöbb (57%) teljes reakciót, a többi vértípusnál legfeljebb egy vagy két törzs viselkedett hasonlóképpen. Kutya eredetű vvt mellett tapasztaltuk a legtöbb (71%) erős (3-as) reakciót. Szarvasmarha és ló vérekkel a törzsek 43-43%-a adott változó reakciót.

A tengerimalac (n=5) és különösen a ló (n=5) eredetű törzseknél sok teljes hemagglutinációt láttunk, mindkét esetben a kutya vvt-k mellett volt a legtöbb 4-es szintű reakció. Mindkét gazdafajnál a ló és a csibe eredetű vérekkel kaptuk a leggyengébb, legfeljebb 2-es szintű hemagglutinációt. Elsősorban ló és szarvasmarha vvt-kkel váltakozott a hemagglutinációs próba erőssége. Viszont amíg tengerimalac eredetű törzseknél többféle hemagglutinációs szint is megjelent a vizsgálatok során, addig a lovakból származó mintáknál – ló és csirke vvt-k kivételével –, mindenhol erős vagy teljes reakciót észleltünk.

5.2.3. A motilitás vizsgálata

A *B. bronchiseptica* mozgásképességét 40 darab nyúl eredetű törzsön vizsgáltuk a környezeti paraméterek változásának függvényében 4 különböző kísérleti elrendezésben. A háromszori ismétlés során kapott eredményeket a Melléklet 5. táblázata tartalmazza. Általánosan elmondható, hogy nagy kiterjedésű motilitási zónákat nem tapasztaltunk, azok legfeljebb másfél cm átmérőjűek voltak. A legnagyobb motilitási zónákat LB táptalajon, 37°C-os inkubáció mellett mértük. Alacsonyabb hőmérséklet vagy $MgSO_4$ hatására kisebb aktivitást láttunk, a legkisebb mozgást pedig mindkét moduláló szignál jelenléte mellett jegyeztük fel. Ettől függetlenül törzseink nem viselkedtek egységesen, néhány törzsre az alacsonyabb hőmérséklet, másokra a $MgSO_4$ volt nagyobb hatással. Öt törzsnél (ebből 3 azonos eredetű) motilitást egyik elrendezésben sem tapasztaltunk, az 5636 jelű törzs pedig csak minimális mozgást mutatott (1-3 mm átmérő), azt is csak 37°C-on.



11. ábra: *B. bronchiseptica* törzsek különböző környezeti paraméterek mellett mért motilitási zónájának különbségei

A pontok az egyes mérési eredményeket jelölik. Az ábrán a nem mozgó törzseket nem tüntettük fel.

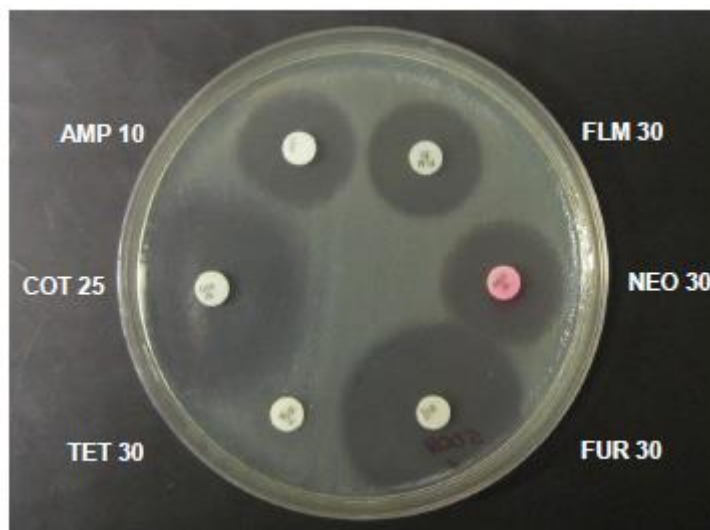
Az egyes elrendezések közötti különbségek alapján leolvasható (11. ábra), hogy az alapállapothoz képest (LB-37) összességében az alacsony hőmérséklet jobban gátolta a mozgást, mint a $MgSO_4$. A 24°C-on tenyésztett törzseknél nagy különbséget nem találtunk a $MgSO_4$ -tal dúsított és a sima LB agaron megfigyelt mozgásképesség között, $MgSO_4$ hatására pozitív és negatív irányban is változott a törzsek motilitása. Viszont kiugró értékeket több összehasonlításban is találunk; az 5008 törzsnél nagyobb motilitási zóna alakult ki 24°C-on, mint 37°C-on, az 5023 számú törzs mozgására pedig kifejezetten gátló hatással volt a $MgSO_4$.

5.2.4. A törzsek antibiotikum-érzékenysége

Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokat 40 nyúl eredetű (34 hazai és 6 külföldi) és 15 magyarországi sertésállományból izolált *B. bronchiseptica* törzssel végeztük el. Az

antibiotikumok körül mért gátlási zónák nagyságát és az adott gazdafajhoz tartozó határértékeket a Melléklet 2. és 3. táblázata tartalmazza.

A vizsgálatba vont törzsek közül az összes érzékeny volt a kolisztinre, viszont teljes rezisztenciát találtunk mind az 55 törzsnél penicillinnel, ceftiofurral, vankomicinnel és linkomicinnel szemben. A többi vizsgált antibiotikum (AMP 10, NEO 30, TET 30, ERY 15, FLM 30, ENO 5, NAL 30, SMX 300 és COT 25) esetében mind a nyúl, mind a sertés eredetű törzseknél változatosságot tapasztaltunk (12. ábra).



12. ábra: Az 5008 számú, nyúl eredetű *B. bronchiseptica* törzs antibiotikum rezisztencia vizsgálatának eredménye ampicillin, co-trimoxazol, tetraciklin, flumequin, neomicin és ceftiofur antibiotikumok mellett

Nyúl eredetű törzseknél nagyfokú, 100%-os érzékenységet tapasztaltunk neomicin és tetraciklin antibiotikumokkal szemben, míg a legváltozatosabb eredményeket az ampicillin esetében kaptuk. A törzsek 22,5%-a érzékeny, 20%-a mérsékelten érzékeny volt, viszont a rezisztens törzsek 30%-ánál egyáltalán nem tapasztaltunk gátlási zónát. A 6 külföldi törzs ampicillin-rezisztens volt. Eritromicinnel, flumequinrel, enrofloxaccinnal és nalidixsavval szemben egyetlen törzs sem mutatott rezisztenciát, de amíg az eritromicin esetében a mérsékelten érzékeny törzsek voltak túlsúlyban (72,5%), addig a quinolonoknál legalább 92% volt az érzékeny törzsek aránya (3. táblázat). A quinolonokra mérsékelt érzékenységet mutató törzsek között hely- vagy időbeli összefüggést nem találtunk, ráadásul az általuk képzett gátlási zónák átmérőjének nagysága a felső határértékkal egyezett meg. A vizsgált szulfonamidokra a törzsek 95%-a érzékeny volt, a korongok körül akár 54 mm (SMX 300) átmérőjű zónát is mértünk. Bár a két szulfonamid-rezisztens törzs (5652 és 5653) azonos időből, azonos nyúltelepről származott, a harmadik törzs ugyanarról a telepről már érzékeny volt mindkét általunk alkalmazott szulfonamidra.

3. táblázat: A vizsgált nyúl és sertés eredetű *B. bronchiseptica* törzsek antibiotikum rezisztenciájának megoszlása a NÉBIH ÁDI osztályozási rendszere alapján

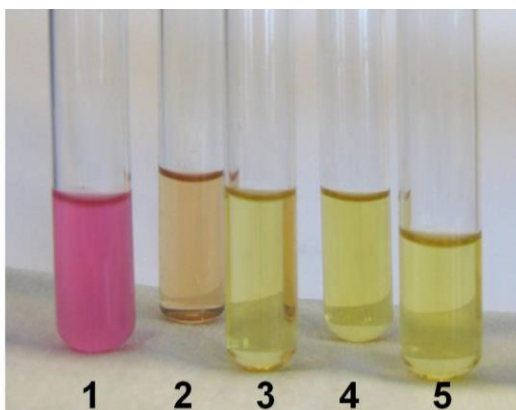
Antibiotikum	Nyúl eredetű törzsek			Sertés eredetű törzsek		
	Érzékeny	Mérsékelten érzékeny	Rezisztens	Érzékeny	Mérsékelten érzékeny	Rezisztens
PEN 10	0	0	40	0	0	15
AMP 10	9	8	23	1	1	13
FUR 30	0	0	40	0	0	15
VAN 30	0	0	40	0	0	15
COL 10	40	0	0	15	0	0
NEO 30	40	0	0	5	10	0
TET 30	40	0	0	14	0	1
ERY 15	11	29	0	0	13	2
L 2	0	0	40	0	0	15
FLM 30	37	3	0	4	10	1
ENO 5	38	2	0	14	1	0
NAL 30	39	1	0	14	0	1
SMX 300	38	0	2	10	0	5
COT 25	38	0	2	10	0	5

Ampicillinnel szemben a sertés eredetű törzsek 86,7%-a mutatott rezisztenciát, ezek közül nyolcnál nem alakult ki gátlási zóna, de találtunk gátlási zónával rendelkező rezisztens, mérsékelten érzékeny (5484), valamint érzékeny (5487) törzset is. A többi sejtfalszintézisre ható antibiotikummal szemben minden törzs egységesen viselkedett. A fehérjeszintézist gátló antibiotikumok esetében a törzsek kisebb-nagyobb mértékben eltértek egymástól. Eritromicinnel szemben a törzsek rezisztenciát (13%) és mérsékelt rezisztenciát (87%), neomicin esetében mérsékelt rezisztenciát (6,7%) és szenzitivitást (93,3%) mutattak. Tetraciklinnél a felső határértéket jóval meghaladó nagyságú gátlási zónákat mértünk, viszont egyetlen törzs (5234) teljes rezisztenciát mutatott. A nukleinsavak szintézisére ható antibiotikumok esetében, a kis mintaszám ellenére is, nagyfokú változatosságot tapasztaltunk. Flumequinre rezisztens, mérsékelten érzékeny és érzékeny törzseket egyaránt találtunk. Enrofloxacinra és nalidixsavra azonban csak az 5250 számú komáromi törzs nem volt érzékeny. Szulfonamidoknál (COT 25 és SMX 300) a sertés eredetű törzseknél is nagy gátlási zónákat mértünk, viszont 5 törzs esetében semmilyen gátlás nem volt tapasztalható (3. táblázat).

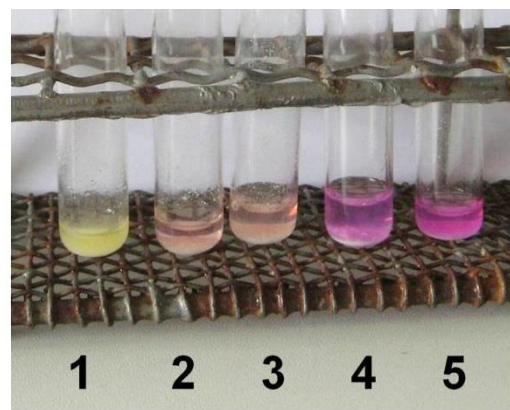
5.3. Az ureáz-negatív törzsek

Egy dél-magyarországi sertéstelepről származó orrtampon-mintákból négy esetben izoláltunk *B. bronchiseptica*-t. Ez a 4 izolátum a hagyományos biokémiai tesztben – többszöri ismétlésben is –, ureáz-negativitást mutatott mind 37°C-os, mind pedig 24°C-os inkubáció mellett. A tenyésztés során hozzáadott MgSO₄ egyik koncentrációban (0 mM -150 mM MgSO₄) sem változtatott a baktériumok ureum-bontó képességén (13. ábra).

A Rosco által gyártott ureáz diagnosztikai tablettával végzett vizsgálatban izolátumaink 48 óra inkubációt követően is kétes eredményt adtak, a tesztek során a pozitív kontrollként használt KM22 jelű törzs viszont mindig ureáz-pozitív volt (14. ábra).



13. ábra: *B. bronchiseptica* törzsek ureum bontása 100 mM MgSO₄ mellett
1: KM22; 2: 5594; 3: 5595; 4: 5596; 5: 5597

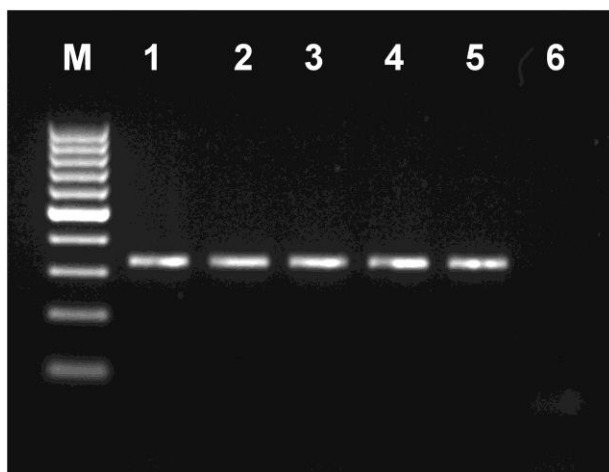


14. ábra: *B. bronchiseptica* törzsek ureum bontása DIATABS tablettákkal
1: *Pasteurella multocida*; 2: 5594;
3: 5595; 4: KM22; 5: *Proteus vulgaris*

Az API 20 NE rendszerben szintén kétes eredményt kaptunk az ureáz próbában: 81,4%-os biztonsággal *B. bronchiseptica*-nak és 17,5%-os valószínűséggel *Achromobacter denitrificans*-nak határozta meg az izolátumokat. Az *A. denitrificans* halofil tulajdonsága miatt az API-System ajánlása alapján (4% NaCl) megnéztük a baktériumok sótűrő képességét. Izolátumaink csak a 3,5% NaCl tartalmú lemezen képeztek telepeket, az 5%-os sótartalmú táptalajon növekedést nem tapasztaltunk.

A fenotípusos vizsgálatokkal párhuzamosan genetikai próbákban is teszteltük a tenyészeteket. A fajspecifikus-, a *dnt*-, a *fimA*-, a *flaA*- és a *cyaA*-PCR-ben az összes izolátum a *B. bronchiseptica*-ra jellemző terméket adta. A *fimA*, a *flaA* és a *cyaA* génszakaszok PCR-RFLP elemzésekor mind a 4 ureáz-negatív izolátum fragmentmintázata megegyezett a KM22 sertés eredetű törzs hasítási mintázatával (lásd 5.4. fejezet).

Az ureáz operon fő tagjára, az *ureC*-re tervezett molekuláris vizsgálat (PCR) során az ureáz-negatív törzsekből és az ureát hasznosító KM22-ből egyaránt kimutattuk a 323 bp hosszú génszakaszt (15. ábra).

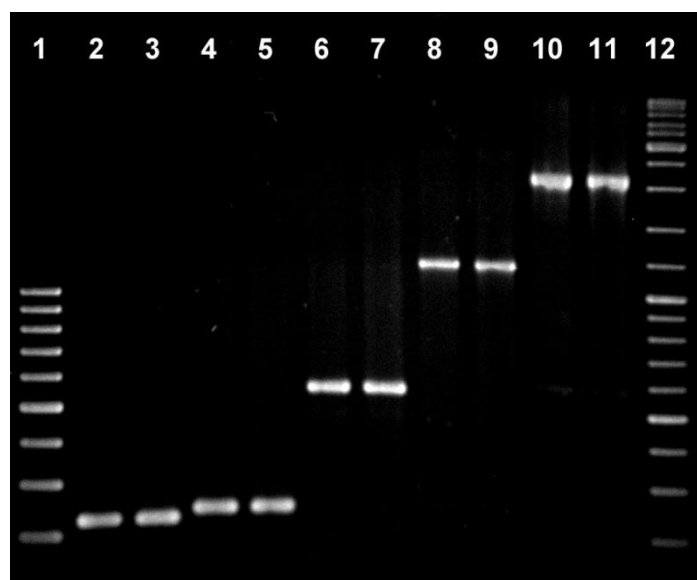


15. ábra: A vizsgált *B. bronchiseptica* törzsek *ureC* génjének PCR terméke

1: KM22; 2: 5594; 3: 5595; 4: 5596; 5: 5597; 6: vak minta;
M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder

5.4. Virulenciagének jellemzése

Az egyes *B. bronchiseptica* törzseken elvégzett molekuláris vizsgálatok eredményét a 4. táblázat, valamint a Melléklet 1. összefoglaló táblázata tartalmazza. A virulenciafaktorokat kódoló gének vizsgálatánál azonos, 152 különböző eredetű törzset magába foglaló mintával dolgoztunk. A vizsgált virulenciagének PCR során felszorzozott génszakaszai a 16. ábrán láthatóak.



16. ábra: A *B. bronchiseptica* vizsgált génjeinek PCR termékei

1: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); 2: KM22-*dnt* [224 bp];
3: 5652-*dnt* [224 bp]; 4: KM22-fajspecifikus PCR [237 bp];
5: 5652-fajspecifikus PCR [237 bp]; 6: KM22-*fimA* [549 bp]; 7: 5652-*fimA*
[549 bp]; 8: KM22-*flaA* [1165 bp]; 9: 5652-*flaA* [1165 bp]; 10: KM22-*cyaA*
[2151 bp]; 11: 5652-*cyaA* [2151 bp]; 12: GeneRuler DNA Ladder Mix (100-
10 000 bp) (Thermo Scientific)

4. táblázat: *Bordetella bronchiseptica* törzsek virulenciagénjeivel kapcsolatos vizsgálataink eredménye

Gazdafaj (n)	Eredet (n)	PCR-RFLP típusok (n)			PCR (n)	
		<i>fimA</i>	<i>flaA</i>	<i>cyaA</i>	<i>ptp</i>	<i>dnt</i>
sertés (36)	H(23)	A (23)	B (22); G (1)	A (22); B (1)	– (23)	+ (23); – (1)
	K (13)	A (13)	B (13)	A (13)	– (13)	+ (13)
kutya (47)	H (38)	A (38)	A (38)	– (38)	+ (38)	+ (38)
	K (9)	A (9)	A (5); B (2); D (2)	A (5); B (1); C (1); – (2)	+ (2); – (7)	+ (7)
nyúl (43)	H (37)	A (37)	A (13); B (24)	A (37)	– (37)	+ (37)
	K (6)	A (6)	A (4); B (2)	A (6)	– (6)	+ (6)
tm (6)	H (3)	A (3)	C (3)	A (3)	– (3)	+ (3)
	K (3)	A (3)	C (3)	A (2); D (1)	– (3)	+ (3)
macska (4)	H (2)	A (2)	C (2)	A (2)	– (2)	+ (2)
	K (2)	A (2)	A (1); C (1)	A (2)	– (2)	+ (2)
ló (5)	H (0)	◻	◻	◻	◻	◻
	K (5)	A (5)	A (5)	A (5)	– (5)	+ (5)
koala (2)	H (0)	◻	◻	◻	◻	◻
	K (2)	A (2)	C (2)	A (2)	– (2)	+ (2)
pulyka (2)	H (0)	◻	◻	◻	◻	◻
	K (2)	A (2)	E (1); G (1)	B (1); C (1)	– (2)	+ (1); – (1)
ember (7)	H (1)	A (1)	F (1)	B (1)	– (1)	– (1)
	K (6)	A (6)	A (1); C (1); D (3); H (1)	A (2); B (3); D (1)	– (6)	+ (4); – (2)

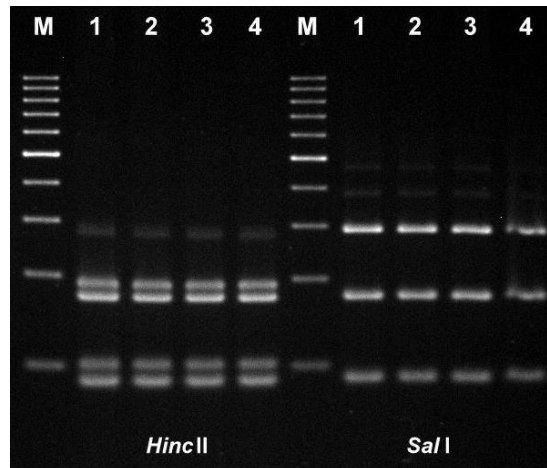
tm: tengerimalac; n= a törzsek darabszáma; H = Magyarország, K = Külföld; +: pozitív reakció; –: negatív reakció; A-H: az egyes géneknél talált hasítási típusok; ◻: nincs adat

5.4.1. Dermonekrotoxin

A DNT-t kódoló *dnt* gén jelenlétét különböző eredetű *B. bronchiseptica* törzseknél tanulmányoztuk. A 152 vizsgált baktérium 97%-ánál kimutattuk a keresett 224 nukleotid hosszúságú génszakaszt (16. ábra). Az 5 darab *dnt*-negatív törzs közül 3 humán (5390, Bb VAL és MBORD 675), 1 sertés (PV6), 1 pedig pulyka (MBORD 901) gazdafajból származott.

5.4.2. Fimbria

A *fimA* gén 549 bp hosszú szakaszát az összes vizsgált törzsnél kimutattuk, majd mindegyik mintánál elvégeztük az RFLP analízist *HincII* és *SalI* endonukleázok felhasználásával. Az összes törzs – eredetüktől függetlenül –, azonos hasítási mintázatot adott. *HincII* enzimmel 88, 100, 173 és 188 nukleotid hosszú szakaszokat láttunk a gélben, míg *SalI* enzimmel 90, 171 és 288 bázispár nagyságú csíkokat találtunk (17. ábra).



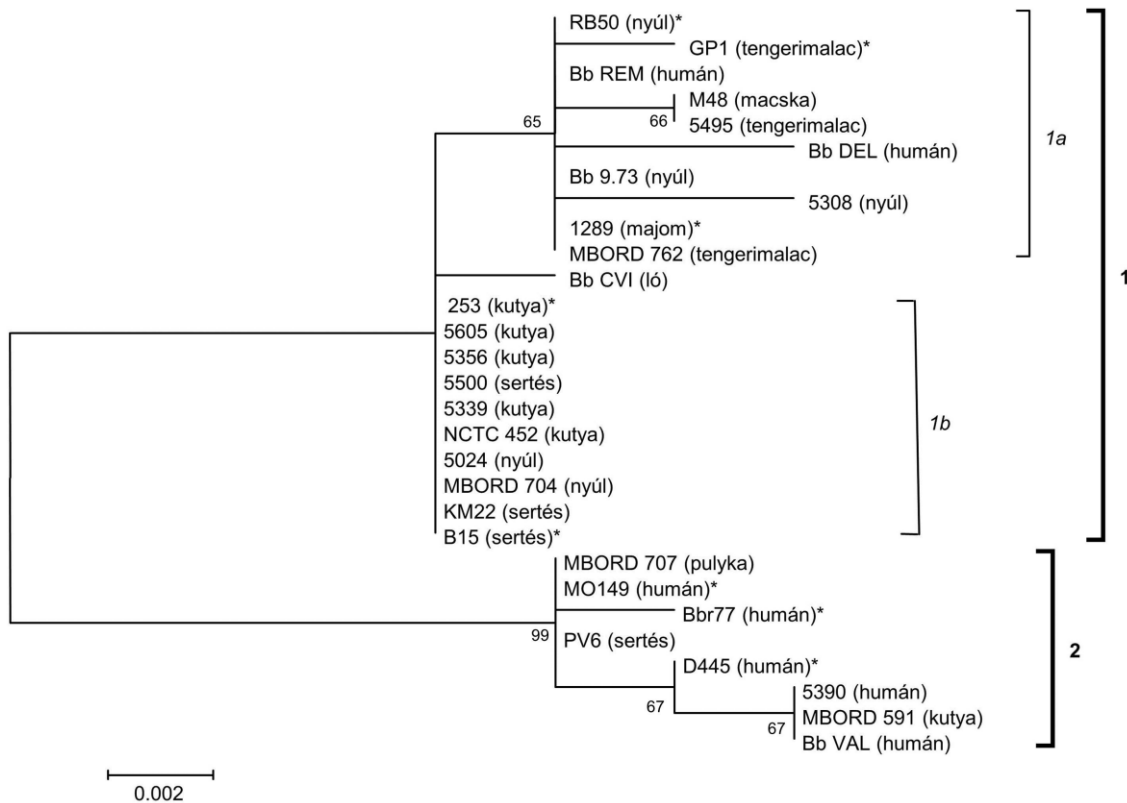
17. ábra: Különböző gazdafajból származó *B. bronchiseptica* törzsek *fimA* génjének PCR-RFLP mintázata

1: KM22-sertés; 2: 5462-kutya; 3: 5652-nyúl; 4: 5390-humán; M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific)

A szekvencia-elemzéshez 21 reprezentatív törzset választottunk ki. Az *in silico* elemzést követően törzseink 456 bp hosszú *fimA* szakaszát a GenBank adatbázisba KF211375-KF211395 kódszámmal helyeztük el, és a későbbi vizsgálatokhoz az adatbázisban szereplő további 8 *B. bronchiseptica fimA* szekvenciát használtunk fel (Melléklet 6. és 7. táblázat).

A 29 *fimA* szekvencia egymáshoz illesztésekor elszórtan a 456 bp hosszú szakaszon 14 pozícióban találtunk 1-1 nukleotid eltérést. Ezek közül 8 pozíciónál ugyanazok a törzsek (PV6, MBORD 591, MBORD 707, 5390, Bb VAL, MO149, Bbr77 és D445) tértek el a többitől. Az aminosavra lefordított szekvenciáknál összesen 7 ponton volt 1-1 aminosavnyi eltérés a törzsek között, melyekből 2 alkalommal az említett nyolc deviáns törzsnél egyszerre jelent meg a változás. A páronkénti genetikai távolság nukleotid és aminosav szinten is 0,0% és 3,0% között mozgott, a legnagyobb értéket két humán eredetű törzs (Bb DEL és 5390) között találtuk.

A filogenetikai fán (18. ábra) a törzsek két fő csoportban helyezkedtek el, az 1. klaszteren belül 2 alcsoportot tudtunk elkülöníteni (1a és 1b). Az 1a alcsoportot főleg (80%) külföldi törzsek alkották, és nem volt köztük egy sertés vagy kutya eredetű sem, az 1b alcsoport 10 (kutya, sertés és nyúl eredetű) törzse teljesen egyforma nukleotid szekvenciával rendelkezett a vizsgált szakaszon. A filogenetikai fa 2. főcsoportja humán és atipikus állati eredetű törzseket (PV6, MBORD 591 és MBORD 707) tartalmazott, melyek eltértek a többi állati eredetű törzstől.



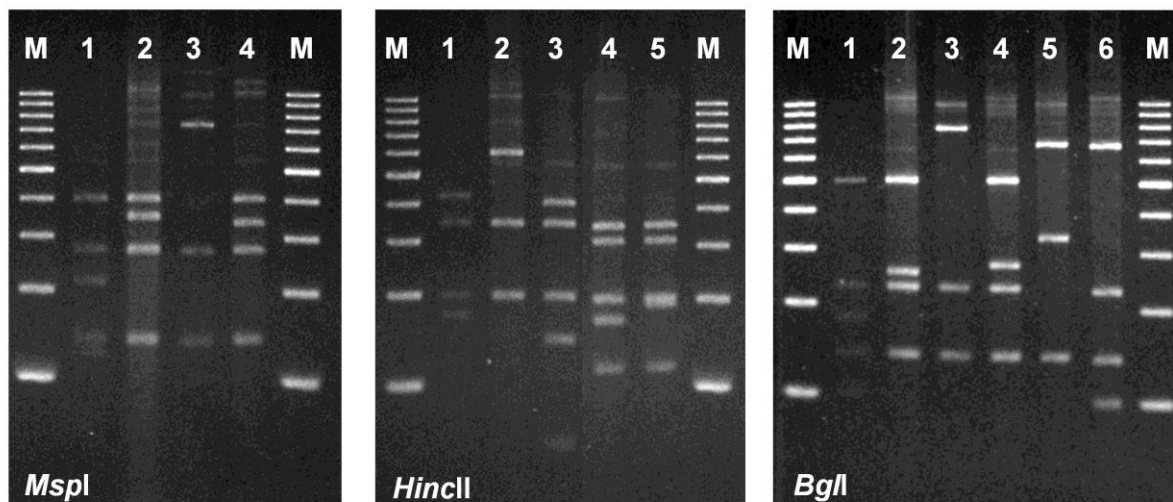
18. ábra: *B. bronchiseptica* törzsek 456 bp hosszú *fimA* génszakaszára Neighbor-Joining módszerrel, MEGA 6.06 programmal szerkesztett filogenetikai fa

A filogenetikai fa csomópontjaiban a 60%-nál magasabb bootstrap értékeket tüntettük fel.

*: génbanki szekvenciák

5.4.3. Flagellin

A flagellint kódoló *flaA* gén 1165 bp hosszú szakaszát mind a 152 vizsgált *B. bronchiseptica* törzsnél megtaláltuk. Az összes PCR terméket restriktáz enzimekkel (*MspI*, *HincII* és *BglI*) hasítottuk, a hasítást követően eltérő mintázatok jelentek meg a gélben. *MspI* enzimmel 4, *HincII*-vel 5, míg *BglI* mellett 6 különböző fragmentmintázatot figyeltünk meg (19. ábra), az egyes mintázatokhoz tartozó fragmentek nagysága az 5. táblázatban látható.



19. ábra: Különböző gazdafajból származó *B. bronchiseptica* törzsek *flaA* génjének PCR-RFLP mintázata

M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); A számok az egyes endonukleázok által kialakított fragmentmintázatokat jelölik, a mintázatok alapján összesen 8 RFLP típust találtunk (A: 1-1-1, B: 2-2-2, C: 3-3-3, D: 1-4-4, E: 3-3-5, F: 1-5-4, G: 4-5-4, H: 3-3-6).

5. táblázat: *B. bronchiseptica* törzsek *flaA* génjének PCR-RFLP során kapott hasítási mintázatok bázispárban megadott, 5 bázispárra kerekített nagysága *MspI*, *HincII* és *BglI* endonukleázok mellett

<i>MspI</i>	<i>HincII</i>	<i>BglI</i>
1 20; 125; 135; 215; 275; 400	1 20; 170; 200; 350; 425	1 105; 140; 185; 230; 505
2 135; 275; 350; 400	2 200; 350; 615	2 25; 140; 230; 260; 505
3 135; 275; 750	3 60; 145; 200; 350; 410	3 140; 230; 790
4 20; 135; 275; 335; 400	4 20; 115; 170; 200; 310; 350	4 15; 140; 230; 270; 505
	5 115; 190; 200; 310; 350	5 140; 335; 690
		6 105; 140; 230; 690

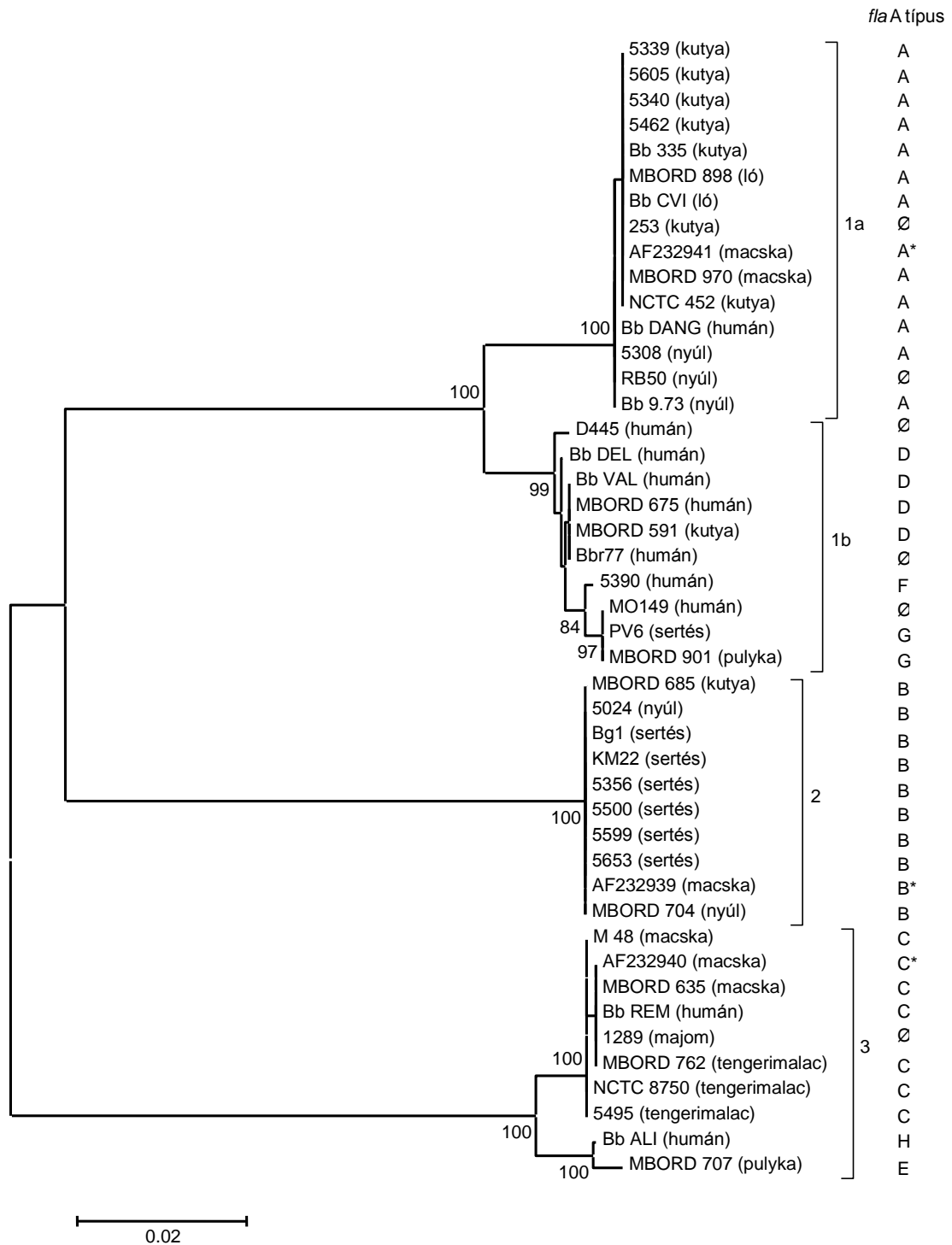
A *flaA* gén restrikciós endonukleázokkal kapott hasítási mintázatai alapján a vizsgált *B. bronchiseptica* törzseket 8 RFLP típusba tudtuk besorolni, a típusokat A-tól H-ig jelöltük (A: 1-1-1, B: 2-2-2, C: 3-3-3, D: 1-4-4, E: 3-3-5, F: 1-5-4, G: 4-5-4, H: 3-3-6). Az A, a D és az F típusú törzsek *MspI* enzimmel azonos fragmenteket adtak, *BglI* endonukleázzal történt hasítás során a D, az F és a G típusú törzsek mintázata egyezett meg. A C, az E és a H típusba tartozó törzsek mind az *MspI*, mind a *HincII* enzimmel egyforma mintázatot adtak. A leggyakoribb hasítási típus az A típus volt (44%), majd a B (41%) és a C (8%), ezeket hazai és külföldi törzseknél is kimutattuk, viszont a D, az E és a H típus kizárólag külföldi törzseknél fordult elő. Az E, az F és a H típust csupán 1-1 törzs reprezentálta, a G típushoz egy külföldi pulyka (MBORD 707) és egy hazai sertés (PV6) eredetű törzs tartozott.

A különböző RFLP típusok az egyes gazdafajok között eltérő módon jelentek meg (Melléklet 1. táblázat). A 47 kutya eredetű törzsnél az összes hazai törzs (n=38) az A RFLP típusba tartozott, és a külföldi törzsek 55%-a (n=5) szintén ezt a hasítási mintázatot mutatta. A fennmaradó négy törzsből 2 a B, 2 pedig a D *flaA* típusba tartozott. Nyúlból izolált *B. bronchiseptica* törzseknél A és B hasítási típust mutattunk ki, de amíg a hazai törzseknél a B típus volt jellemző (24 törzs; 66,7%), addig a külföldi törzsek (6 törzs) kétharmada A típusú mintázatot adott. Sertés eredetű törzsek (23 hazai és 13 külföldi) közül csupán a hazai izolálású PV6 tartozott a G *flaA* típusához, az összes többi törzs B típusú hasítási mintázatot adott. A vizsgálatba vont 3 magyarországi és 3 külföldi tengerimalac eredetű, valamint a 2 koalából származó törzs mindegyike C típusú fragmentmintázattal rendelkezett. Szintén a C típus volt jellemző a macska eredetű törzsekre, de a 4 mintából 1 (MBORD 970) az A hasítási típust mutatta. Ló eredetű *B. bronchiseptica* törzsek mindegyike külföldi izolálású, és mindegyik A típust adott az RFLP analízis során. A két külföldi pulyka eredetű törzs vizsgálatakor egy E és egy G hasítási típust figyeltünk meg. Humán megbetegedésekből származó *B. bronchiseptica* mintáknál nagyfokú változatosságot tapasztaltunk, a törzsek 57%-a egyedi hasítási mintázattal rendelkezett (A, C, F és H típus), a maradék 3 törzs pedig a D típusba tartozott.

Szekvencia-elemzéshez RFLP típusonként, gazdafajonként és földrajzi területenként lehetőség szerint legalább egy reprezentatív törzset választottunk ki. Az összesen 36 darab *flaA* szekvenciát JX673952-JX673981 és KF211396-KF211401 kódszámokon helyeztünk el a GenBank-ba, és vizsgálatainkhoz további 9 *B. bronchiseptica* referencia szekvenciát választottunk az adatbázisból (Melléklet 6. és 7. táblázat).

A többszörös szekvencia illesztés eredményeként azt figyeltük meg, hogy a vizsgált *flaA* génszakasz N-terminális része (közel 300 bp) és a C-terminális utolsó 100 bp-nyi része teljes mértékben megegyező, konzervatív régió. Ezzel ellentétben a közbülső, hipervariábilis régióban akár több nukleotidra kiterjedő szubsztitúciókat, inszerciókat és deléciókat találtunk, amelyek aminosav szinten több nem-szinoním változást is létrehoztak.

A filogenetikai fán (20. ábra) négy különálló csoportot figyelhettünk meg. Az 1a klaszterben különböző eredetű törzseket találtunk, de mindegyik A típusú mintázatot adott az RFLP vizsgálatok során. Az 1b csoportot D, F és G típusú törzsek alkották, melyek jó része (70%) humán megbetegedésből származott. A filogenetikai fa következő ágán (2. csoport) kizárólag B típusú törzsek helyezkedtek el, és egy génbanki, macska eredetű törzs kivételével sertésből vagy nyúlból származtak. A 3. klasztert C típusú törzsek alkották, a klaszter alcsoportjában pedig két egyedi hasítási mintázattal rendelkező törzs (Bb ALI és MBORD 707) jelent meg.



20. ábra: *B. bronchiseptica* törzsek 1042 bp hosszú *flaA* génszakaszára Neighbor-Joining módszerrel, MEGA 6.06 programmal szerkesztett filogenetikai fa

A filogenetikai fa csomópontjaiban a 80%-nál magasabb bootstrap értékek láthatók. A fa mellett a törzsek RFLP típusát is feltüntettük. *: ismert RFLP típusú macska eredetű génbanki szekvenciák (Winstanley és mtsai., 2001); ∅: génbanki szekvenciák

A nukleotid szinten kapott legnagyobb genetikai távolságot (14,6%) az MBORD 707 (pulyka) és az 1b alcsoportba tartozó PV6 (sertés), illetve az MBORD 901 (pulyka) és M149

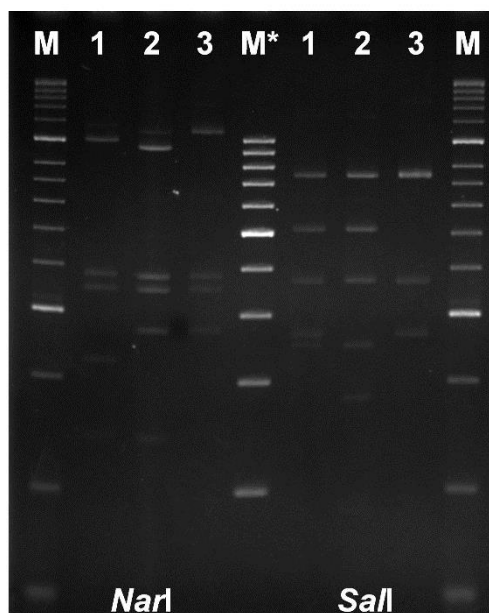
(humán) törzsek alkotta két törzscsoport között kaptuk. Az aminosavra lefordított szekvenciák esetében a páronként mért legnagyobb távolság 20,4% volt, és ezt az értéket az MBORD 707 és az 1a alcsoport tagjai közt találtuk.

5.4.4. Adenilát cikláz-hemolizin

Az adenilát cikláz-hemolizin toxint kódoló *cyaA* gén vizsgálatakor a törzsek 73,5%-ánál (n=112) megtaláltuk a keresett 2151 bp hosszú PCR terméket (23. ábra), de a fennmaradó 40 törzs (26,5%) esetében nem kaptunk specifikus terméket. A *cyaA*-negatív törzsek kivétel nélkül kutya eredetű mintákból származtak, és a 38 hazai törzsnél minden esetben a *cyaA* gén hiányát figyeltük meg. A *cyaA*-pozitív törzsek esetében *NarI* és *SalI* enzimekkel végeztük el a restrikciós hasítást. Mindkét endonukleázzal 3-3 különböző fragmentmintázatot kaptunk (21. ábra és 6. táblázat), és összesen 4 *cyaA* RFLP típusba (A, B, C és D) tudtuk besorolni törzseinket (A: 1-1, B: 2-2, C: 3-2, D: 1-3). *NarI* enzimmal az A és a D típusú törzsek adtak egyező eredményt, *SalI* endonukleázzal a B és a C típusú törzsek mutattak azonos fragmentmintázatot.

6. táblázat: *B. bronchiseptica* törzsek *cyaA* génjének PCR-RFLP során kapott hasítási mintázatok bázispárban megadott, 5 bázispárra kerekített nagysága *NarI* és *SalI* endonukleázok használata mellett

<i>NarI</i>	
1	50; 140; 230; 350; 380;1000
2	55; 140; 275; 350; 380; 950
3	55; 275; 350; 380; 1090
<i>SalI</i>	
1	250; 260; 370; 515; 755
2	85; 180; 250; 370; 515; 755
3	260; 370; 755; 765

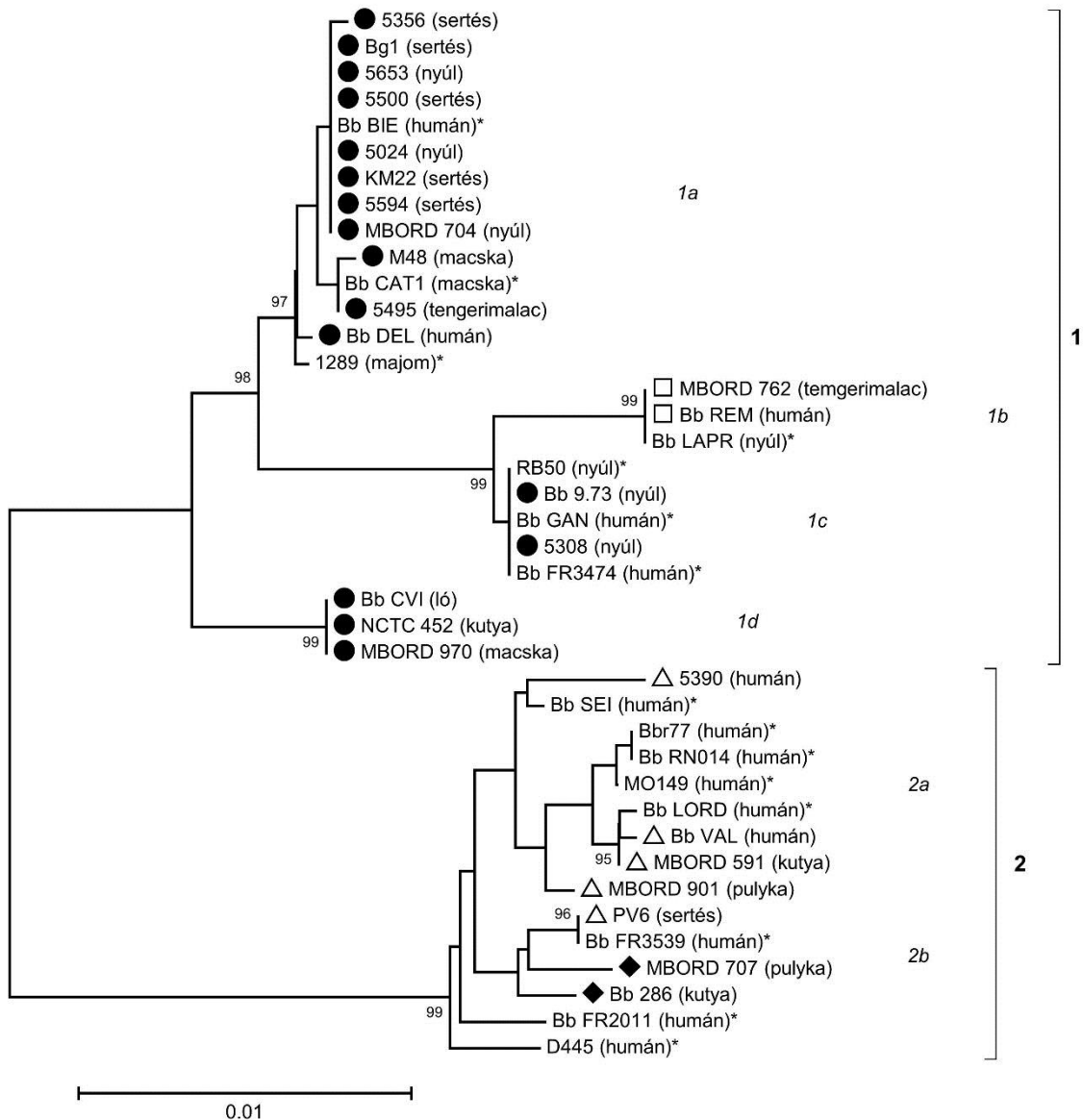


21. ábra: Különböző gazdafajból származó *B. bronchiseptica* törzsek *cyaA* génjének PCR-RFLP mintázata

M: GeneRuler DNA Ladder Mix (100-10 000 bp) (Thermo Scientific); M*: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); A számok az egyes endonukleázok által kialakított fragment mintázatot jelölik, a mintázatok alapján összesen 4 RFLP típust találtunk (A: 1-1, B: 2-2, C: 3-2, D: 1-3)

A 112 *cyaA*-pozitív *B. bronchiseptica* törzsből 100 (90%) A típusú hasítási mintázatot mutatott. Nyúl, ló, macska és koala eredetű törzseknél csak ezt a típust tudtuk kimutatni, sertésből és tengerimalacból származó minták esetén is csak 1-1 törzs rendelkezett más

mintázattal. A második leggyakoribb (6%), B típus a humán törzsekre volt jellemző (57%), a többi gazdafajnál (sertés, kutya és pulyka) csak elszórtan jelent meg ez a hasítási típus. A C és a D típust csak 2-2 külföldi törzs képviselte (Melléklet 1. táblázat). A *cyaA* génszakaszt nézve az RFLP analízis alapján az egyes gazdafajokból származó törzsek – egy-egy, a nagy átlagtól eltérő törzstől eltekintve -, meglehetősen homogének voltak, kivételt a külföldi izolálású kutya, pulyka és humán eredetű törzsek képeztek.



22. ábra: *B. bronchiseptica* törzsek 2007 bp hosszú *cyaA* génszakaszára Neighbor-Joining módszerrel MEGA 6.06 programmal szerkesztett filogenetikai fa

A filogenetikai fa csomópontjaiban a 80%-nál magasabb bootstrap értékek láthatók.

*: génbanki szekvenciák; ●: A hasítási típus; △: B hasítási típus; ◆: C hasítási típus; □: D hasítási típus

A szekvencia-meghatározást 25 törzsön végeztük el, ennek eredménye (2007 bp) a GenBank adatbázisban KF220450-KF220474 kódszámok alatt érhető el (Melléklet 7.

táblázat). A *cyaA* génszakasz elemzéséhez további 15 génbanki *B. bronchiseptica* szekvenciát használtunk fel. A nukleotid szekvenciák páronkénti illesztésekor 0,0% és 3,8% közötti különbségeket találtunk. Az egyedi különbségek a teljes szakaszon elszórtan jelentek meg, és legfeljebb 3 nukleotid hosszúságra terjedtek ki. A nukleotid sorrendből származtatott aminosav szekvenciák összehasonlításakor szintén 0,0-3,8% közötti távolság-értékeket kaptunk. A legtöbb humán eredetű törzs egyedi szekvenciával rendelkezett, a hazai törzs (5390) esetében egy új alléltípust írtunk le.

A *cyaA* génszakasz filogenetikai elemzése során két különálló klasztert kaptunk (22. ábra), de mindkét főcsoport további alcsoportokra bomlott. Az 1. főcsoport az A és a D hasítási típusú, különböző gazdafajú törzseket foglalta magába. Az 1a alcsoportba eltérő eredetű A RFLP típusú törzsek tartoztak, az 1b alcsoportba viszont a D hasítási mintázatú törzsek kerültek. Az 1c alcsoport nyúl és humán eredetű törzseket tartalmazott, míg az 1d alcsoportban csak külföldi mintákból származó A típusú törzsek voltak jelen. A 2. főcsoportba leginkább egyedi nukleotid szekvenciával rendelkező törzsek kerültek, melyeket további 2 alcsoportba (2a és 2b) lehetett beosztani. A 2a alcsoport foglalta magába - egy kivételével (PV6) -, a B típusú törzseket, míg a 2b alcsoportba a C hasítási típusú törzsek és a PV6 jelű sertés eredetű törzs került. Humán eredetű törzseket az 1d-n kívül valamennyi alcsoportban találtunk.

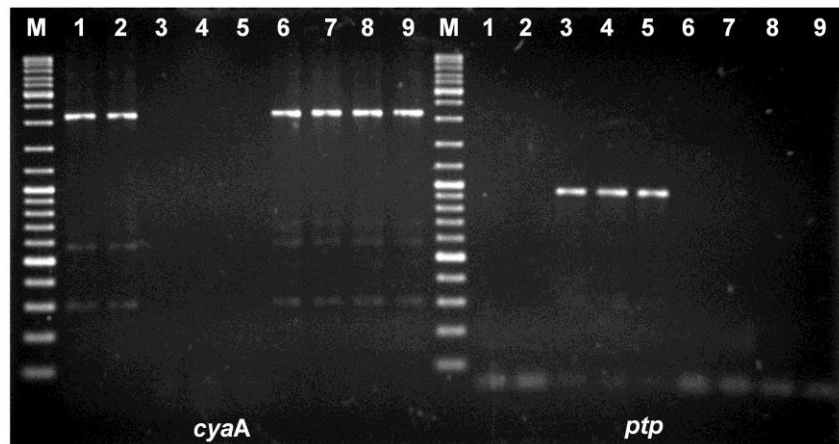
5.4.5. Peptid transzport protein

A *ptp* operon vizsgálatakor csupán 40 törzsnél tudtuk kimutatni a keresett 958 bp nagyságú terméket. A *ptp*-pozitív törzsek mindegyike kutya eredetű mintákból származott, és ezek azonosak voltak a *cyaA*-negatív törzsekkel (23. ábra). A fennmaradó 112 törzsnél semmiféle PCR terméket nem detektáltunk.

A *ptp* PCR termékeket *NarI* és *BglI* endonukleázokkal hasítottuk, és az összes törzsnél azonos hasítási mintázatot kaptunk. *BglI* enzimmel 117, 166, 294 és 381 nukleotid hosszúságú fragmenteket kaptunk, *NarI*-gyel történő hasításkor 50, 217 és 691 bp nagyságú csíkok jelentek meg a gélben.

Mivel a hasítási mintázatok megegyeztek, és a *ptp*-pozitív törzsek 95%-ban hazai kutyákból származtak, szekvencia-analízisre 3 magyarországi (5340, 5462 és 5625), és a 2 külföldi (Bb 335 és MBORD 843) törzset választottunk ki. Az *in silico* összeillesztés után az öt darab 909 bp hosszú szekvenciát a GenBank adatbázisába KF220475–KF220479 kódszámmal helyeztük el, és az adatbázisban egyedülként elérhető, 253 (HE965806) számú, kutya eredetű törzs *ptp* szekvenciájával hasonlítottuk össze (Melléklet 6. és 7. táblázat). Az általunk vizsgált 5 törzs 909 bp hosszú *ptp* szekvenciája teljes mértékben

megegyezett egymással és a génbanki szekvenciával is, eltérést egyetlen nukleotidban sem találtunk.



23. ábra: Különböző gazdafajból származó *B. bronchiseptica* törzsek *cyaA* és *ptp* génjének PCR termékei

1: KM22 (sertés); 2: PV6 (sertés); 3: 5340 (kutya); 4: 5625 (kutya); 5: MBORD 843 (kutya); 6: MBORD 707 (pulyka); 7: MBORD 762 (tengerimalac); 8: 5024 (nyúl); 9: 5390 (ember) M: GeneRuler DNA Ladder Mix (100-10 000 bp) (Thermo Scientific)

6. Megvitatás

A *B. bronchiseptica* világszerte elterjedt, széles gazdaspektrummal rendelkező patogén baktérium. Az általa okozott kórképek kialakulása és súlyossága függ a gazdaszervezet és a baktériumtörzs aktuális tulajdonságaitól, melyeket a környezeti tényezők nagymértékben befolyásolhatnak. Munkánk során a gazda – patogén kölcsönhatásokat a kórokozó oldaláról vizsgáltuk, elsősorban a baktérium virulenciafaktorainak tanulmányozása által. Kutatásainkhoz igyekeztünk olyan bakteriális tulajdonságokat kiválasztani, amelyekről feltételeztük, hogy szerepet játszanak egy adott gazdafajhoz való adaptációban, vagy legalább a vizsgált tulajdonságok alapján csoportosítani tudjuk az egyébként igen heterogén *B. bronchiseptica* fajba tartozó törzseket. A vizsgálataink által kapott (új) információk hozzájárultak ahhoz, hogy a magyarországi *B. bronchiseptica* törzseket össze tudjuk hasonlítani a világ más tájairól származó izolátumokkal, és így pontosabb képet kapjunk a hazai *B. bronchiseptica* fertőzésekről.

6.1. A törzsek izolálása és biokémiai tulajdonságai

A *B. bronchiseptica* magyarországi elterjedéséről nagyon kevés adat áll rendelkezésünkre. Az öt éves vizsgálati időszakban (2009-2013) összesen 206, 16 különböző gazdafajból származó mintát dolgoztunk fel laboratóriumunkban, melyekből 77 esetben tenyésztettünk ki *B. bronchiseptica*-t. Sertésből származó minták 77%-ából mutattuk ki a kórokozót. Ez az arány nagyon magasnak tűnhet az Éliás által 1997-ben leírt (Éliás, 1997) 10-14% körüli értékhez képest. Meg kell azonban jegyezni, hogy az említett tanulmány a teljes hazai sertésállományban nézte a TO előfordulását, míg mi légúti tüneteket mutató állatok mintáiból mutattuk ki a *B. bronchiseptica* jelenlétét. Munkánk során nyúlból (n=30) és kutyából (n=24) is izoláltunk törzseket, ám a *B. bronchiseptica* ezen gazdafajokban való előfordulásáról magyarországi adatok nem ismertek. Az általunk talált 67%-os izolálási arány összhangban van Deeb és mtsai. (1990) azon megállapításával, hogy a nyulak 75%-a már elválasztáskor hordozza a *B. bronchiseptica*-t. Chalker és mtsai. (2003) szerint közepesen súlyos légzőszervi tüneteket mutató kutyáknál 68%, a tünetmentes állatoknál pedig 39% lehet a *B. bronchiseptica* izolálási aránya. A mi esetünkben beteg kutyák vizsgálatakor is csak 26%-uknál tenyésztett ki *B. bronchiseptica*. Az alacsonyabb százalék azzal magyarázható, hogy a vizsgált kutyák között sok volt a családoknál élő házi kedvenc, valamint az egyik mintavételi telepen vakcináztak a kórokozó ellen. A többi gazdafaj (vad, házi és hobbi állatok) egyedeiből nem tudtunk *B. bronchiseptica*-t izolálni, de irodalmi adatokból (Goodnow, 1980; Musser és mtsai., 1987) ismert, hogy a *B. bronchiseptica* a legtöbb emlősfajban képes megtelepedni.

A biokémiai próbákban a frissen izolált és a törzsgyűjteményből kiválasztott reprezentatív törzsek nagy része egységesen és a szakirodalomban (Goodnow, 1980) leírt módon viselkedett. A hat vizsgált tulajdonság esetében eltérést a nitrát-redukció és az ureum-bontás vizsgálatokor tapasztaltunk, ami azért meglepő, mert ezek a tulajdonságok szolgálnak a *B. bronchiseptica* többi *Bordetella* fajtól, vagy éppen az *Alcaligenaceae* család néhány egyéb tagjától történő megkülönböztetésére (Sanden és Weyant, 2005). A Bergey's Manual (Sanden és Weyant, 2005) szerint a *B. bronchiseptica* nitrát-redukáló képessége hagyományos biokémiai tesztekben variábilis lehet, azonban API 20 NE rendszerrel történő azonosítás során minden törzs nitrát-pozitivitást mutat. Ezzel ellentétben Friedman és mtsai. (2006) API használata mellett is találtak nitrát-negatív törzseket, míg hagyományos tesztelés során minden törzsük redukálta a nitrátot. A nitrát-negatív törzsek előfordulása főleg kutya eredetű törzseknél gyakori (Bemis és mtsai., 1977; Friedman és mtsai., 2006). Vizsgálataink során a legtöbb (n=5) nitrátot nem redukáló *B. bronchiseptica* a sertés eredetű hazai törzsek köréből került ki, magyarországi kutyákból viszont csak nitrát-pozitív *B. bronchiseptica*-t mutattunk ki.

6.2. Antibiotikum-rezisztencia

A Kirby-Bauer korongdiffúziós módszert elsősorban a diagnosztikában használják a mikrobák antibiotikum-érzékenységének megállapítására. Annak ellenére, hogy a rezisztencia pontos mértéke nem határozható meg ezzel a módszerrel, megfelelő alapot teremt a további rezisztencia vizsgálatokhoz (MIC, plazmidon kódolt rezisztencia), ezen felül a különböző vegyületcsoportokra adott válaszuk alapján csoportosíthatóak a baktériumok. A *B. bronchiseptica* antibiotikum-érzékenységének vizsgálatával kapcsolatosan nemzetközi szinten is kevés irodalmi megállapítás jelent meg, magyarországi adatokkal pedig egyáltalán nem rendelkezünk. Az izolátumok antibiotikum-érzékenységének ismerete elengedhetetlen lenne a hatékony terápia érdekében, valamint az esetleges rezisztenciák terjedésének kimutatásához.

Az általunk kiválasztott nyúl és sertés eredetű törzsek az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokban meglehetősen egységesen viselkedtek. A különböző gazdafajból származó törzsek között számottevő különbséget csak neomicin és flumequin antibiotikumokkal szembeni viselkedésükben találtunk. Nyúl eredetű törzseknél az érzékenység aránya rendre 100% és 92,5% volt, viszont a sertésekből izolált törzseknél mindkét antibiotikumra nézve a mérsékelten érzékeny törzsek aránya volt a legmagasabb (67%). Eritromicin antibiotikummal szemben szintén a mérsékelten érzékeny baktériumok voltak a legnagyobb számban jelen, de a fennmaradó törzsek nyulak esetében érzékenyek, míg sertések esetében rezisztensek voltak. Ampicillinnél mindkét gazdafaji eredetű *B. bronchiseptica* csoportnál a rezisztens

baktériumok voltak legtöbbször (60% és 86%), a másik két kategóriát azonos arányban képviselték a törzsek mindkét gazdafajban. A nyúl és sertés eredetű törzsek közötti ampicillin és eritromicin antibiotikumoknál tapasztalt aránybeli eltérések oka lehet, hogy mindkét gazdafaj esetén a sertés eredetű baktériumokra vonatkozó határértékeket vettük figyelembe, mert nem rendelkezünk nyúlból származó törzsekre jellemző adatokkal. Érdekességként elmondható, hogy az ampicillinre érzékeny törzseknél tapasztaltuk a legnagyobb gátlási zónákat eritromicinnel szemben is mindkét gazdafajból származó *B. bronchiseptica* törzseknél. A két antibiotikum hasonló mértékű hatékonyságát humán légúti terápiában már leírták (Macfarlane és mtsai., 1983).

Vizsgálatainkba bevont magyarországi és külföldi nyúl eredetű *B. bronchiseptica* törzsek között nem találtunk különbséget az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok során. Eredményeink jól korrelálnak a külföldi szakirodalomban megtalálható adatokkal. Okewole és Olubunmi (2008) szintén korongdiffúziós módszerrel vizsgálták nyúl eredetű *B. bronchiseptica* izolátumokat. Az afrikai baktériumtörzsek antibiogramja a hat azonos antibiotikumot (ampicillin, eritromicin, linkomicin, penicillin, tetraciklin és enrofloxacin) tekintve megegyezett az általunk vizsgált törzsekével. Egyedül eritromicin mellett tapasztaltunk más értékeket, ugyanis Okewole és Olubunmi (2008) a törzsek 100%-os érzékenységét írták le az általunk tapasztalt 27%-kal szemben. Megemlítendő azonban, hogy tanulmányukban csupán 3-6 *B. bronchiseptica* törzset vizsgáltak antibiotikumként. Rougier és mtsai. (2006) 99 nyúl eredetű *B. bronchiseptica*-t vizsgálva egyik vegyületcsoportnál sem tapasztaltak teljes rezisztenciát vagy teljes érzékenységet. Munkájuk során enrofloxacinra (13%) és tetraciklinekre (9-11%) rezisztens törzseket is leírtak. Nyúl eredetű *B. bronchiseptica* törzseik 17%-ánál mutattak ki szulfonamid-rezisztenciát, az általunk vizsgált törzsek közül csupán kettő (5%) rendelkezett hasonló tulajdonságokkal. Az Egyesült Királyságban macska eredetű *B. bronchiseptica* törzseknél 80% (Speakman és mtsai., 1997), kutyákból származó törzseknél pedig 27% (Speakman és mtsai., 2000) a szulfonamidokra rezisztens minták aránya. Házi és hobbiállatok kórokozó baktériumai között a szulfonamid rezisztencia terjedését segítheti elő, hogy manapság – főleg növendék korban –, gyakran alkalmaznak szulfonamid származékokat a kokcidiózis megelőzése érdekében.

A magyarországi sertés eredetű *B. bronchiseptica*-k egyharmadánál szintén szulfonamid-rezisztenciát írtunk le. Dénes (2010) romániai *B. bronchiseptica* izolátumok tesztelésekor már a baktériumok 53%-nál tapasztalt rezisztenciát szulfonamidokra, míg Kadlec és mtsai. (2005) MIC alapú antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok során a törzsek csupán 2%-ánál mutattak ki nagyfokú rezisztenciát szulfonamidokra. Megállapították, hogy a szulfonamid-rezisztencia elsősorban plazmidon kódolt, és hogy a rezisztencia terjedését egy rezisztens klón fokozatos térhódítása okozza, nem pedig a horizontális géntranszfer. Kínai sertésekből izolált törzsek antibiotikumrezisztencia vizsgálatánál Zhao és mtsai. (2011) a mi

eredményeinkhez hasonló adatokat kaptak a neomicin esetében, viszont 90%-os ampicillin, 64%-os tetraciklin, 41%-os eritromicin és 33%-os enrofloxacin rezisztenciát tapasztaltak. Tanulmányukban egy négy éves időintervallumon belül vizsgálták az antibiotikum-rezisztencia terjedését, és szignifikánsan több *B. bronchiseptica* törzs volt rezisztens többek között az ampicillinre, a tetraciklinre és az eritromicinre. Kadlec és mtsai. (2004) szintén az antibiotikum-rezisztencia terjedésére hívják fel a figyelmet. Bár az általuk kimutatott változások nem olyan drasztikus mértékűek, de a rezisztencia terjedését írták le ampicillin, nalidixsav és néhány cefalosporin antibiotikummal szemben. Épp ezért a megfelelő mennyiségű és minőségű terápiás szerek alkalmazása mellett az évről évre történő ellenőrzés fontosságát javasolják. Vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy a sertés eredetű *B. bronchiseptica* törzsek több antibiotikumra és nagyobb arányban rezisztensek, mint a nyúl eredetű törzsek. A szulfonamid- és a tetraciklin-rezisztencia megjelenése hazánkban is az antimikrobiális szerek alkalmazásának átgondolását teszi szükségessé. Az egyes törzsek közötti különbségek hátterében a plazmidon kódolt rezisztencia állhat (Kadlec, 2006), valamint az, hogy az egyes területeken, állattartó telepeken más-más tulajdonságokkal rendelkező törzsek terjedhettek el, feltehetőleg az eltérő antibiotikum-terápia miatt.

6.3. Az ureáz-negatív törzsek sajátosságai

A legtöbb élő organizmus (növények, gombák, gerinctelenek és baktériumok) képes az ureáz enzim szintézisére (Mobley és mtsai., 1995). A bakteriális ureáz egy nikkeltartalmú, több alegységes enzim, amely katalizálja az urea lebontását ammóniára és ammóniumkarbamátra, mely vegyületeket nitrogénforrásként tud értékesíteni a mikroba. Az ureáz enzim egyesek szerint virulenciafaktornak tekinthető, mert hatására a baktérium képes megváltoztatni a környezete pH-ját, valamint a megnövekedő ammónia-koncentráció toxikus lehet más élőlényekre nézve (McMillan és mtsai., 1998). A *B. bronchiseptica*-ban az ureáz enzim fertőzésbeli szerepe egyelőre ismeretlen. Monack és Falkow (1993) kimutatták, hogy az ureáz-deficiens mutáns *B. bronchiseptica* törzsek is képesek kolonizálni a tengerimalacok légutait, ezért feltételezhetően az ureáz aktivitás nem nélkülözhetetlen a nyálkahártyán való megtelepedéshez. Ezt a hipotézist támasztják alá saját tapasztalataink is, ugyanis az általunk izolált ureáz-negatív törzsek azonos klinikai tüneteket idéztek elő sertésben, mint az ureáz-pozitív törzsek. Másrésztől ureáz-negatív mezei *B. bronchiseptica* izolátumot eddig nem írtak le a szakirodalomban, csak és kizárólag genetikailag módosított, élő attenuált vakcina törzseknél talákoztunk ilyen tulajdonságokkal (Monack és Falkow, 1993; McMillan és mtsai., 1999). A vizsgálataink tárgyát képező atipikus törzsek TO ellen vakcinázott

sertésekből származtak. Az állattartó telepen alkalmazott vakcina inaktivált törzseket tartalmazott, ezért az általunk izolált törzsek nem származhattak az oltóanyagból.

A *B. bronchiseptica*-nak elegendő 2 perc, hogy pozitív reakciót adjon egy gyorsesztesztben és a hagyományos biokémiai ureum tesztesztben is 4-6 óra alatt leolvasható eredményt ad (Goodnow, 1980). Az ureáz aktivitást az ureáz (*ure*) génklaszter kódolja és szabályozza, a génklaszteren belül strukturális, járulékos és szabályozó gének foglalnak helyet, de funkcionálisan az *ureC* gén a legfontosabb. Az ureáz enzim expressziója a *bvg* lokusz által negatívan szabályozott, az *ure* gének Bvg^- fázisban aktívak (Mattoo és Cherry, 2005).

A telepformológia és a hagyományos biokémiai tesztesztben kapott eredmények alapján az 5594-5597 számú izolátumok ureáz aktivitással nem rendelkező *B. bronchiseptica* fajba tartozó baktériumok. Míg a kontrollként használt KM22 törzs gyors és egyértelmű pozitív reakciót mutatott az ureum-bontás kimutatására alkalmas fenotípusos tesztesztben, az atipikus törzsek negatív vagy kétes eredményt adtak. Ezzel szemben a 4 atipikus és a kontroll törzs az összes genetikai vizsgálatban egységes, a sertés eredetű *B. bronchiseptica*-kra jellemző képet mutatta. Az atipikus törzseink annak ellenére sem bontották az ureumot, hogy náluk is kimutattuk az *ureC* génszakaszt. Valószínűleg önmagában az *ureC* 323 bp hosszú génszakaszának jelenléte nem ad megfelelő információt a teljes ureáz génklaszterről. Elképzelhető, hogy a génklaszter más génjein, vagy akár az *ureC* gén egyéb szakaszain mutáció(k) és/vagy deléció(k) gátolják a fő strukturális gén kifejeződését, ezáltal a törzsek ureum-bontó képességét.

A *B. bronchiseptica* törzsek esetében az ureáz-negativitás egyedi és szokatlan fenotípusos tulajdonság, melynek felbukkanása további érdekes kérdéseket vet fel.

6.4. Adhezinekkel kapcsolatos megfigyelések

A *B. bronchiseptica* törzsek adhéziós képességeit hemagglutinációs próbában teszteltük, összesen 10 különböző vértípussal. A baktériumsejtek felületén megjelenő agglutininek tulajdonságai nagymértékben befolyásolják a virulenciát. Mivel a baktérium vvt-megkötő képessége jól korrelál a mikroba gazdasejthez történő adhéziójával, valamint a virulens baktériumok erősebb adhéziós és hemagglutinációs képességgel rendelkeznek, a hemagglutinációs aktivitást sokáig használták a patogén izolátumok azonosítására (Ishikawa és Isayama, 1987). A *B. bronchiseptica* hemagglutinációs faktorai fő protektívási antigénnek tekinthetőek, és egy 1991-ben íródott japán tanulmány (Ohgitani és mtsai., 1991) szerint a sertés eredetű és virulens fázisú törzsek között e tekintetben nincs heterogenitás. Különböző gazdafajú baktériumok és/vagy vvt-k együttes vizsgálatakor – akárcsak a jelen tanulmányban –, a kép már korántsem ilyen egyértelmű. Ezt támasztja alá Bemis és Plotkin

(1982) beszámolója is, ahol kutya és sertés eredetű *B. bronchiseptica* törzsek hemagglutinációját vizsgálták mikro-hemagglutinációs módszerrel különböző eredetű (kutya, sertés, ló, tengerimalac, csirke) vvt-kkel. A különböző gazdafajból származó izolátumok között nem tapasztaltak számottevő különbséget egyik vér esetében sem, a csirke vvt szuszpenzió kivételével (10%) valamennyi vvt-nél 81-91%-ban tapasztaltak pozitív hemagglutinációt. A legnagyobb titert lovak vérevel kapták, de magas értékeket tapasztaltak kutya eredetű vvt-kkel is, a juhvérrel kapott hemagglutinációs titer pedig alacsonyabb volt, mint a tengerimalac vörösvértesteké.

Saját vizsgálataink során a humán törzsek kivételével valamennyi törzscsoportnál a kutya vvt-k esetében írtuk le a legerősebb hemagglutinációt, és mexikói kutatók is hasonló tapasztalatokról számoltak be. González és mtsai. (2006) kutyákból származó *B. bronchiseptica* törzsekkel végzett munkájában juh, szarvasmarha (szm), ló és kutya eredetű vvt szuszpenziókkal nézték a hemagglutinációs titereket. Az összes törzsük agglutinálta a kutya vvt-eket, és a legnagyobb értékeket is ennél a csoportnál találták. Ez a megfigyelésük alátámasztani látszott Kang és mtsai. (1970) feltételezését, miszerint a hemagglutinációs aktivitás összefüggésbe hozható az izolátumok gazdafajával. A másik három vér esetében alacsony titereket és a hemagglutináció hiányát is leírták. Juh vvt-kkel az esetek 20%-ban, szm vvt-k mellett 50%-ban, ló vvt-nél 60%-ban tapasztaltak negatív reakciót. Bár más arányokkal, de mi is a hemagglutináció hiányát figyeltük meg juh-, szm- és lóvér esetében, de a baktériumtörzs gazdafajától függetlenül. Általánosságban elmondható, hogy lóvérrel törzseink alacsony hemagglutinációs szinteket mutattak, de amíg a mexikói kutya eredetű törzsek alacsony titereket adtak juh és szm vérekkkel, addig mi – pozitív esetben –, 3-as és 4-es erősségű reakciókat tapasztaltunk.

Magyar és mtsai. (1987) sertésből frissen izolált, illetve sorozatos átoltásokon átesett *B. bronchiseptica* törzsek hemagglutinációs képességét vizsgálták 8 különböző emlős, köztük humán A vércsoportú vvt szuszpenziókkal. Valamennyi törzs teljes hemagglutinációt mutatott kutya vvt-kkel, és erős reakciót tapasztaltak juh, malac, nyúl, tengerimalac és humán A vvt-k esetén is. A frissen izolált törzsek 4-es erősséggel agglutinálták a ló és szm vvt szuszpenziókat, míg a sorozatos passzáláson átesett (27-61 átoltás) törzsek elvesztették a szm és ló vvt-eket agglutináló képességüket, viszont a többi vvt szuszpenzióval továbbra is erős reakciót mutattak. Egérfertőzési kísérletekben a ló és szm vvt-eket nem agglutináló törzsek csökkent fertőző- és kórokozó-képességgel rendelkeztek.

Különböző fázisú sertés eredetű törzsek hemagglutinációs aktivitását mikro-hemagglutinációs módszerrel nézte Ishikawa és Isayama (1988) 10 különböző vvt szuszpenzióval. A törzsek izolálása során kisselektáltak BEA (bovine erythrocyte-agglutinin)-negatív spontán mutánsokat, és a teszteket ezekkel a törzsekkel is elvégezték. A virulens törzsek leginkább a szm vvt-eket agglutinálták, csirke, juh, ló és humán-0 vérekkkel alacsony

titereket adtak, kecske vvt-k esetében pedig minimális reakciót mutattak. A különböző avirulens fázisokban a vizsgálatok többségében csökkenő titert tapasztaltak a kutatók, de a nyúl vvt-eket minden fázisban azonos mértékben agglutinálták a törzsek, az emberi vérnél viszont extrém hemagglutinációt tapasztaltak a virulens fázisú törzsekhez képest. A BEA⁻ törzsek azonos titereket mutattak a virulens törzsekkel minden vértípusnál, kivéve a szm vvt szuszpenzióval, ahol nem mutattak hemagglutinációs aktivitás. Ennek ellenére a BEA⁻ törzsek rendelkeztek K-antigénnel (a virulens törzsekkel azonos mennyiségben), de a sertés ornyálkahártya sejtekhez való kötődési képességüket elvesztették.

Munkánk során legerősebb reakciókat kutya vvt-ekkel, míg leggyengébb reakciókat – más tanulmányokhoz hasonlóan –, csirke vvt esetében tapasztaltuk. Ennek magyarázata feltehetően az, hogy a csirkevér alakos véralkotóinak felépítése eltér az emlősökétől, így az emlős eredetű baktériumok nem képesek megfelelően kötődni a csirke vörösvérsejtekhez. Az általunk végzett hemagglutinációs próbákban mindhárom humán vércsoport (A, B és 0) esetén általában 3-as szintű, és igen egységes értékeket kaptunk, amely arra utalhat, hogy a vércsoportok közötti különbségek nem befolyásolják az adhéziós képességet. A vizsgálatok közel negyedénél viszont 2-es, vagy annál gyengébb reakciót tapasztaltunk, ami a törzsek csökkent virulenciájára utal, aminek hátterében a (környezeti hatásokra kialakuló) fázisváltás is állhat. Az általunk vizsgált törzsek többszöri átoltáson és tartósítási eljárásokon (liofilizálás, fagyasztás) estek át, ennek ellenére a legtöbb esetben tapasztaltunk hemagglutinációs aktivitást törzseinknél. A hemagglutináció hiányát viszont régi és friss izolálású törzseknél is kimutattuk. Különösen a ló és szm vvt-k esetében változó hemagglutinációs aktivitást tapasztaltunk. A 79 vizsgált törzsből 23 olyat találtunk, amelyek legalább egyszer 0 szintű reakciót mutattak ló és szm vvt-ekkel, ezek közül 7 juhvér esetén is negatív reakciót adott.

Az általunk és Magyar és mtsai. (1987), valamint Ishikawa és Isayama (1988) által is megfigyelt hemagglutinációs viselkedés arra utal, hogy a *B. bronchiseptica* több különböző hemagglutininnal rendelkezik. Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a *B. bronchiseptica* képes hozzátapadni sertések, kutyák, nyulak, juhok, lovak, szarvasmarhák és az ember nyálkahártyahámsejtjeihez, de a kolonizációt és a betegség kialakulását nagy valószínűséggel befolyásolják a környezeti paraméterek és a gazda aktuális immunológiai-fiziológiai állapota is.

A *Bordetella*-k adhezinjeinek fenotípus- és genotípusvizsgálata nagy múltú, mégis máig aktuális kutatási téma. A *B. pertussis* kapcsán folyamatosan jelennek meg a pertaktinnal, a filamentózus hemagglutininnal vagy a Fim2 és Fim3 fimbriákkal kapcsolatos közlemények (Jacob-Dubuisson és Loch, 2007), de arányaiban nagyon kevés a *B. bronchiseptica* adhezinjeit nukleinsav szinten vizsgáló tanulmány. Vizsgálatainkhoz igyekeztünk olyan génszakaszt kiválasztani, amely kifejezetten a *B. bronchiseptica*-ra jellemző, ezért döntöttünk a *fimA* mellett (Boschwitz és mtsai., 1997),

melynek esetleges változatosságát eddig még nem vizsgálták. A 606 bp nagyságú *fimA* gén 549 bp hosszú szakaszát vizsgáltuk PCR-RFLP módszerrel, melynek során az összes ($n=152$) törzs azonos hasítási mintázatot adott mind a *HincII*, mind a *SaI* restrikciós endonukleázt alkalmazva. A szekvencia- és filogenetikai elemzést követően már találtunk eltéréseket a törzsek között, de ezek a különbségek függetlenek voltak a *B. bronchiseptica* törzsek gazdafajától, valamint a baktérium izolálási helyétől és idejétől. Burns és mtsai. (1993) hasonló megállapításra jutottak eltérő gazdafajokból izolált *B. bronchiseptica* törzsek fimbriákhoz kötődő monoklonális ellenanyagokkal történő vizsgálata során. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a vizsgált baktériumtörzsek gazdaspecifikusságát egynél több (fimbriális) tényező határozza meg.

6.5. A mozgásképességgel összefüggő sajátságok

A *B. bronchiseptica* aktív mozgásra képes, ez különbözteti meg a többi klasszikus *Bordetella* fajtól. Csillói segítségével könnyebben jut el egy számára kedvezőbb környezeti feltételekkel rendelkező niche-be, vagy akár egy új gazdához. Munkánk során fenotipizáló módszerekkel igyekeztünk jellemezni a *B. bronchiseptica* mozgásképességét. A fenotipizáló vizsgálatok során csak nyúl eredetű törzseket néztünk, a nukleinsav alapú vizsgálatoknál különböző gazdafaji eredetű törzsekkel dolgoztunk.

A *B. bronchiseptica* mozgásképességének vizsgálatára a külföldi szakirodalomban található példát. Plotkin és Bemis (1998) különböző gazdafajokból származó klinikai izolátumok motilitását vizsgálták függőcsepp preparátumban, és a sejtek csillózatosságát elektronmikroszkóp segítségével nézték a bakteriális növekedés késői és korai log-fázisában, valamint mid-stacioner fázisban. A baktériumtelepek között voltak sima, átmeneti és durva felületű kolóniák, ezek rendre megfeleltethetők a Bvg^+ , a Bvg^i és a Bvg^- fázisoknak. Megállapították, hogy a *B. bronchiseptica* mozgásképessége független az alkalmazott szénforrástól, de nem független a teleptípustól és a sejtek korától. Bvg^+ fázisú izolátumok a korai log-fázisban nem mozogtak és csillókat sem képeztek, míg a másik két növekedési fázisban kevés csilló megjelenését és aktív mozgást tapasztaltak. A Bvg^i és a Bvg^- fázisú izolátumoknál mindig tapasztaltak mozgást, de amíg a flagelláltsági szintet Bvg^i izolátumoknál 34%-ban határozták meg, addig az összes többi növekedési fázisban – Bvg^- baktériumoknál is –, 100% volt. A motilitást azonban a baktériumsejten belüli folyamatok is befolyásolhatják. Erre kiváló példa Sisti és mtsai. (2013) munkája, akik egy másodlagos jelátvivő molekula, a c-di-GMP kialakulásában fontos diguanilát cikláz (DGC) enzim befolyását vizsgálták *B. bronchiseptica*-ban, ugyanis ezek a molekulák más baktériumoknál bizonyítottan csökkentik a motilitást (Sisti és mtsai., 2013), és így a virulenciát is. Vad típusú és mutáns *B. bronchiseptica* törzseket növesztettek $MgSO_4$ jelenlétében (mozgó, Bvg^- fázisú

törzsek), és figyelték a mozgás változását normál és megnövekedett intracelluláris DGC szint mellett, és DGC hatására szignifikánsan csökkent motilitást írtak le.

Saját vizsgálatainkhoz hasonló pontoltásos módszerrel különböző gazdafajokból (tengerimalac, nyúl, ember) izolált (Passerini de Rossi és mtsai., 1997) és főleg laboratóriumi mutáns (Akerley és mtsai., 1992) törzseket tenyésztve azt tapasztalták, hogy a vad fenotípusú (Bvg⁺) törzsek 37°C-on egyáltalán nem mozogtak. Azonban ezek a Bvg⁺ törzsek alacsonyabb hőmérsékleten (22°C) és/vagy szulfátion jelenlétében már akár 5-25 mm nagyságú motilitási zónát képeztek 24 óra alatt. Ezzel ellentétben a Bvg⁻ állapotú törzsek a moduláló szignál jelenlététől függetlenül, minden esetben mozogtak.

A vizsgálatainkba bevont nyúl eredetű törzsek (öt kivételével) valamennyi környezeti feltételnél aktív mozgást mutattak, és a MgSO₄-tal kiegészített táptalajon kevésbé reagáltak a hőmérsékleti különbségekre, mint a sima LB táptalajon tenyésztettek. Összességében megállapíthatjuk, hogy a MgSO₄ kevésbé volt hatással a törzsek motilitására (kivéve az 5023 jelű törzset), mint a hőmérséklet csökkenése. A törzsek egyedi vizsgálata során viszont tapasztaltunk kisebb-nagyobb eltéréseket a motilitási zónák átmérője között, melynek hátterében a baktériumok aktuális fiziológiai jellemzői állhatnak. A törzsek izolálási helye és ideje nem befolyásolta a mozgási aktivitást. Ettől függetlenül a mozgásképesség tanulmányozása során kapott eredményeink szintén arra utalnak, hogy törzseink a vizsgálatkor Bvg⁻ állapotúak voltak. Munkánk során azonban olyan törzsekkel is találkoztunk, melyek egyik kísérleti elrendezésben sem mutattak aktív mozgást. Hasonló *B. bronchiseptica* törzsekről Akerley és mtsai. (1992) tanulmányában is olvashatunk. Ezeket az apró, hemolizáló, de moduláló szignál jelenlétére érzéketlen törzseket Bvg^c (c~konstitutív mutáns) fenotípusúnak nevezték el. A Bvg^c fenotípust a *bvgAS* operonban keletkező missense mutációval (Arg⁵⁷⁰→His), vagy megfelelő UV besugárzással lehet irányítottan létrehozni, de a természetes fény hatására is kialakulhatnak Bvg^c spontán mutánsok.

A mozgásképesség genetikai analízise során a flagellint kódoló *flaA* gén 1165 bp hosszú szakaszát vizsgáltuk. A bakteriális flagellin génjét biomarkerként használják patogén baktériumok genetikai változatosságának tanulmányozására, és bizonyos esetekben akár ki is válthatja a teljes genom analízisen alapuló molekuláris módszereket (Winstanley és mtsai., 2001). *Bordetella* fajok egymástól való megkülönböztetésére, valamint a *B. bronchiseptica* faji azonosítására szintén a flagellint kódoló génszakasz jelenlétének vizsgálata a legáltalánosabb manapság (Hozbor és mtsai., 1999). Épp ezért volt meglepő, amikor lengyel kutatók (Stępniewska és mtsai., 2014) 209, sertés eredetű friss *B. bronchiseptica* izolátum vizsgálatakor a minták csupán 94,7%-ánál mutatták ki a keresett *flaA* génszakaszt. A sertés eredetű törzsekre – különösen azonos régióból származó baktériumok esetén –, minimális változatosság jellemző (Musser és mtsai., 1987). Ennek ellenére Stępniewska és mtsai. (2014) tanulmányában a baktériumok csupán 99%-a mutatott pozitív oxidáz reakciót és

tipikus telepmorfológiát MacConkey agaron, valamint a vizsgált baktériumok alig 73%-ánál mutatták ki a *dnt* gént. A *flaA* gén természetes hiányát eddig soha, semmilyen más irodalomban nem közölték le, és a cikkben szereplő egyéb eredmények alapján is úgy gondoljuk, hogy a *flaA*-negatív törzsek izolálása csak műtermék lehetett.

Winstanley és mtsai. (2001) macska és kutya eredetű törzsek, Friedman és mtsai. (2006) különböző állatfajokból és emberből származó *B. bronchiseptica* izolátumok *flaA* génszakaszának PCR-RFLP vizsgálatát végezték el az általunk is alkalmazott restriktív enzimek segítségével, és mindkét kutatócsoport 3 különböző hasítási típust különített el a mintázatok alapján. Az általuk leírt A, B és C RFLP-típusok rendre megfeleltethetőek az általunk talált A, B és C típusokkal, viszont mi további öt hasítási típust is kimutattunk. Az újonnan kimutatott típusokat kutya (D típus), pulyka (E és G típus), ember (F és H típus), valamint sertés (G típus) eredetű *B. bronchiseptica* törzsek képviselték.

Magyarországi törzsek esetén a leggyakoribb típusok közé az A (49%), a B (44%), és a C (5%) tartozott, és az RFLP-típusok eloszlása összefüggést mutatott a gazdafajjal. Kutya eredetű izolátumaink egységesen az A típusba tartoztak, míg a külföldről származó törzseknél A, B és D típust is kimutattunk. Shina és munkatársai (2002) TTGE módszerrel vizsgálták a különböző gazdafaj eredetű *B. bronchiseptica* törzsek *flaA* génszakaszát. Eredményeinkhez hasonlóan azt tapasztalták, hogy a kutya eredetű izolátumok igen nagy százaléka került egy fő domináns típusba.

Sertés eredetű törzseknél egyértelműen a B *flaA*-típus volt a domináns. Egyedüli kivételt a PV6 jelű, G típusú törzs jelentett. Eredményeink eltérnek Friedman és mtsai. (2006) eredményeitől, akik három RFLP típust (A, B és C) írtak le kutya eredetű törzseknél, és sertésből származó mintáiknál két típust (B és C) különítettek el.

Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a C *flaA* típus az uralkodó a tengerimalac, a macska és a koala eredetű *B. bronchiseptica* izolátumok körében, bár a kevés számú vizsgált törzs miatt messzemenő következtetéseket ebben az esetben nem vonhatunk le.

Friedman és mtsai. (2006) nyúl eredetű törzseknél 3 különböző mintázatot írtak le. Munkánk során a nyútból származó *B. bronchiseptica* törzseknél A és B hasítási típust találtunk, viszont a külföldi és a hazai törzseket nézve a két RFLP-típus aránya ellentétes volt. Érdemes figyelembe venni azt a tényt is, hogy a 2000 előtt izolált magyarországi törzsek inkább a B hasítási típusba tartoztak, míg a későbbi izolálású törzseknél már fele-fele arányban fordul elő a két típus. Általánosságban továbbra is igaznak tekinthetjük, hogy egy adott tenyészetben (populációban) a baktérium egy adott típusa található meg (pl. az isaszegi vagy a szentmártonkátai törzsek), de találtunk erre ellenpéldákat is (pl. a gödöllői és az ócsai törzsek). Ez a tény még inkább felhívja a figyelmet arra, hogy az állományfrissítések, szállítás vagy kiállítás alkalmával új baktériumtörzs jelenhet meg a közösségben, ami a fogékony egyedek fertőződését és megbetegedését idézheti elő.

A humán törzsek között nagy változatosságot tapasztaltunk, a 7 darab törzset 5 hasítási típusba (A, C, D, F és H) soroltuk be. A humán *B. bronchiseptica* törzsek között talált nagy változatosság arra enged következtetni, hogy az érintett emberek különböző állatfajoktól kapták a fertőzést. Mivel a humán törzsek nem rendelkeznek „saját” RFLP-típussal, feltételezhető, hogy az emberek az állatok széles köre által fertőződhetnek meg *B. bronchiseptica*-val.

A *B. bronchiseptica* törzsek *flaA* génjének szekvencia-analízis vizsgálata azt mutatja, hogy az N- és C-terminális régió, melyek a szekrécióért és a polimerizációért felelősek, erősen konzerváltak, míg a középső régió nagymértékben variábilis. Más baktériumoknál is (pl. *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Helicobacter pylori*) megfigyelhető a flagellin gén centrális régiójának változatossága (Winstanley és Morgan, 1997). A *flaA* génszakaszát alapul vevő filogenetikai fán 4 különálló klasztert találtunk. Az 1a és 1b klaszterek között közelebbi a rokonság, mint a 2 vagy a 3 klaszterek között.

Winstanley és mtsai. (2001) az általuk talált 3 csoport között 11% és 13% genetikai különbséget írt le, ezzel szemben a mi 4 csoportunk között páronkénti illesztés során 2,5-14,6% távolságot találtunk nukleinsav szinten, aminosav szinten pedig 2,3-20,4% volt az eltérés. A filogenetikai fa struktúrája korrelációt mutat a klaszterek és az RFLP típusok, valamint a gazdafajok között. A sertés eredetű törzsek külön ágon helyezkednek el (2 klaszter), mellettük más gazdából csupán egy humán törzs található. A *flaA* középső régiójában található pontmutációk akkumulálódása és/vagy rekombinációs események révén változások következtek be az aminosavak szekvenciájában. Ez igényelné további molekuláris evolúciós analíziseket, annak érdekében, hogy kiderüljön, a *flaA* centrális régiójának heterogenitása milyen (pozitív) szelekciós nyomást gyakorol a *B. bronchiseptica* törzsekre.

Összességében elmondható, hogy a mozgásképességgel kapcsolatos vizsgálatokban a törzsek nem adtak egységes eredményt, a motilitási zóna nagysága és a *flaA* gén RFLP mintázata között összefüggést nem tudtunk kimutatni. A *flaA* PCR-RFLP és szekvencia-analízis alapján a *B. bronchiseptica* törzsek *flaA* génszakasza meglehetősen változatos, különösen a középső régió. A kimutatott RFLP-típusok korrelációt mutatnak a gazdafajjal, különösen egy behatárolt földrajzi régió belül (Magyarország/Kárpát-medence), ezért kimondható, hogy a PCR-RFLP módszer alkalmas a törzsek egyedi jellemzésére, segítségével kimutatható a különböző gazdafajokból származó törzsek között genetikai különbség. A humán törzsek nagyfokú változatossága arra enged következtetni, hogy az ember több állatfajtól is megfertőződhet, és nincs saját RFLP-típusa. A *flaA* RFLP technika használható lehet a *B. bronchiseptica*-val kapcsolatos epidemiológiai vizsgálatokban.

6.6. Toxinokkal kapcsolatos tulajdonságok

A *B. bronchiseptica* β -hemolízist mutat véres agaron (Goodnow, 1980). Munkánk során azonban ezt a megállapítást nem tudtuk teljes mértékben igazolni, ugyanis törzseink között találtunk nem-hemolizáló és változó hemolitikus aktivitással rendelkező törzseket is. A hemolitikus aktivitást genetikai paraméterek és környezeti tényezők (inkubációs körülmények, a táptalaj összetevői) egyaránt befolyásolhatják (Akerley és mtsai., 1992). Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a táptalajba kevert vér minősége is befolyásolja a hemolízist, az esetek többségében a ló vvt-eket tartalmazó táptalajokon nagyobb hemolitikus aktivitást tapasztaltunk, mint juh vvt-k esetén. González és mtsai. (2006) a vörösvértetek minőségének befolyásoló hatását nézték kutya eredetű *B. bronchiseptica* törzseken, a baktériumok hemolizáló képességét különböző állati eredetű vvt-tel (szarvasmarha, ló, juh és kutya) kiegészített véres agaron vizsgálták. β -hemolízist lóvéres agaron egy izolátumnál, míg kutyavéres agaron négy izolátumnál figyeltek meg, a szarvasmarha vérét azonban egy izolátum sem hemolizálta, és a többi esetben is csupán néhány törzsnél mutattak ki – elsősorban inkomplett –, hemolízist.

Bodade és mtsai. (2009) a pH, a hőmérséklet és a sejtek életkorának hemolízisre gyakorolt hatását vizsgálták *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* és *B. parapertussis* esetében. Megállapították, hogy a maximális hemolitikus aktivitás akkor érhető el, ha a hőmérséklet 37°C, a pH 7,5-8 közé esik és a baktériumsejtek friss izolátumokból származnak. Ennek ellenére azt tapasztaltuk, hogy az alacsonyabb pH (pH=6,8) pozitív hatással volt a hemolízisre. Vizsgálataink során mi is azt tapasztaltuk, hogy a frissen izolált baktériumok (kivéve a kutya eredetű izolátumok) hemolizáló képessége idővel csökkent. A különböző hemolitikus aktivitások és a telepmorfológia vizsgálata során tapasztalt eltérő telepméreték (tűszúrásnyitól a 1,5 mm nagyságúig) között párhuzamot lehet felállítani, amely a törzsek fázisváltására vezethető vissza.

A legtöbb hasonló jellegű eltérés hátterében a Bvg-mediált fenotípusos moduláció áll. Bvg⁺ fázisú törzsek aprók, hemolizálnak, és virulenciájuk magasabb, mint a kedvezőtlenebb körülmények között növő, esetleg idősebb, Bvg⁻ avirulens törzseké, melyekre nagyobb telepméret és a hemolízis hiánya jellemző (Cotter és Miller, 2001). Hester és mtsai. (2012) azonban leírtak egy, a BvgAS rendszertől független szabályozási rendszert (CO₂ responsive regulon) is. Vizsgálatukban a BvgS-hiányos, nem hemolizáló törzsek 5% CO₂-t tartalmazó környezetben ismét β -hemolízist mutattak. Kutatásaik szerint a CO₂ jelenléte pozitívan befolyásolja bizonyos virulenciagének – köztük a hemolitikus aktivitásért felelős *cyaA* gén –, expresszióját is.

A *cyaA* gén (5222 bp) 2151 bp hosszú, RTX domént is kódoló, a baktérium hemolitikus tulajdonságáért felelős régióját vizsgáltuk. Bellalou és munkatársai (1990) kísérletesen

igazolták, hogy a *cyaA* génszakasz 3' régiójában történő delécióval létrehozott mutáns *B. pertussis* törzs hemolizáló képessége rendkívüli módon lecsökkent. Ez is alátámasztja, hogy munkánkban a hemolitikus aktivitás megfigyelése során tapasztalt reakciók szoros összefüggésben állnak a *cyaA* génszakasz vizsgálatakor kapott eredményekkel. A legtöbb (38 hazai és 2 külföldi) kutya eredetű törzsnél a hemolízis hiányát figyeltük meg az összes vizsgálati elrendezésben. Nem-hemolizáló, vagy csökkent hemolitikus aktivitással rendelkező kutya eredetű izolátumokról a világ számos más pontján is beszámoltak már (González és mtsai. 2006).

A nem-hemolizáló 40 törzsnél a vizsgált génszakasz hiányát mutattuk ki. A hiány oka feltehetőleg a teljes *cyaA* gén deléciója, ami elsősorban humán és kutya eredetű törzseknél fordulhat elő (Buboltz és mtsai., 2008). Fertőzési modellt alkalmazva kimutatták, hogy a *cyaA* nem feltétlenül szükséges a fertőzés kialakításához, viszont a *cyaA* gén hiánya csökkent virulenciájú törzseket eredményez. A *cyaA*-negatív törzsekben a *cyaA* helyére egy feltételezett ABC transzporter permeáz (*ptpB*) és oligopeptid/dipeptid transzporter proteint (*ptpL*) géneket kódoló operon (*ptp*) kerül (Buboltz és mtsai., 2008), amely 100%-ban megegyezik a 253 jelű kutya, és néhány (E013, E012, 99-R-0433, 00-P-2796 és 00-P-2730) humán eredetű, a GenBankban megtalálható törzs *ptp* operonjának *ptpB* és *ptpL* szakaszával. Ezt a *ptp* génszakaszt az összes *cyaA*-negatív törzsünkönél megtaláltuk, PCR-RFLP és nukleotid szekvencia analízise során pedig a minták teljes egyezését mutattuk ki.

Kutatásaink alapján a *cyaA* csak a kutya eredetű törzseknél hiányozhat, más gazdafajból származó hazai és külföldi törzseknél mindig kimutattuk a vizsgált génszakaszt. Chenal-Francisque és mtsai. (2009) azonban leírtak olyan ACT-negatív izolátumokat, melyek főleg humán, esetenként kutya vagy nyúl eredetű mintákból származtak, a hiány oka pedig a *cyaA* gén deléciója, frameshift vagy non-sense mutációja. A *cyaA*-negatív (mutáns) törzsekkel végzett kísérletek azt mutatják, hogy az ACT szükséges a gazda természetes immunitásának legyőzéséhez, feltehetőleg a fagocita és neutrofil sejtekkel való interakciója miatt (Harvill és mtsai., 1999). Mintáink beteg, felső légúti tüneteket mutató kutyákból származtak. Ez arra enged következtetni, hogy törzseink nem veszítették el megbetegítő képességüket, de a hajlamosító tényezők és az esetleges társfertőzés lehetőségét sem szabad figyelmen kívül hagyni. Munkánk alapján is feltételezhető, hogy a *cyaA* nem szükséges a fertőzés kialakításához, de ahhoz további vizsgálatokra lenne szükség, hogy kiderítsük, a kutyából izolált mezei *cyaA*-negatív törzsek virulenciája mekkora a *cyaA*-pozitív törzsekéhez képest. Mindenesetre a hazai kutya eredetű törzseknél a *cyaA* génszakasz hiánya a gazdafajoz való adaptálódás egyik lehetséges markere lehet.

A PCR-RFLP vizsgálatok alapján a *B. bronchiseptica* törzsek legtöbbször (90%) az A hasítási típusba tartozott, függetlenül a gazdafajtól. Ennek ellenére a *cyaA* génszakasz nukleotid szekvenciája alapján készült filogenetikai fa tükröz bizonyos mértékű

gazdaadaptációt. A 2. csoport leginkább humán törzseket tartalmaz, és sertés eredetű törzsek egy kivételével mind az 1a alcsoportban foglalnak helyet. A filogenetikai csoportok között található különbség aminosav szinten is megjelenik, legnagyobb különbséget a 1184. és 1256. aminosavak közötti régióban (RTX domén) találtunk. Ez a régió megfeleltethető a *B. pertussis* 1166-1281 aminosav közötti területével, amely nélkülözhetetlen a gazdasejt CD11b/CD18 receptorjaihoz való kötődésben (El-Azami-El-Idrissi és mtsai., 2003). A *cyaA* C-terminális régiójának genetikai vizsgálatakor az erősen gazda-adaptált *B. pertussis* és *B. parapertussis* esetén nem mutattak ki polimorfizmust (Chenal-Francisque és mtsai., 2009). Az (azonos szakaszra) általunk leírt genetikai variációk hátterében minden bizonnyal az áll, hogy a *B. bronchiseptica* szélesebb gazdaspektrummal bír.

A humán *B. bronchiseptica* törzsek *cyaA* alapú PCR-RFLP vizsgálatakor nagyfokú variabilitását tapasztaltunk, a 7 törzs 3 különböző mintázatot (A, B és D) mutatott. Leggyakoribb a B típus volt, amely a többi gazdafajból származó törzseknél csak elvétve fordult elő. A legtöbb humán eredetű törzs külön ágon foglalt helyet a filogenetikai fán (2. csoport), bár 1. csoportba tartozó humán törzset is találtunk. A *B. bronchiseptica* törzsek *cyaA* génszakaszának heterogenitását Chenal-Francisque és mtsai. (2009) is vizsgálták, és 14 különböző alléltípust írtak le. Az általuk vizsgált 30 *cyaA*-pozitív humán eredetű izolátumot pedig 12 eltérő alléltípusba sorolták be. Vizsgálataikhoz képest az 5390-es jelű törzs alapján egy újabb alléltípust írtunk le, amely a hozzá legközelebb eső izolátumtól (Bb SEI) is 8 nukleotidban különbözik. A humán törzsek közti változatosság megerősíti a *B. bronchiseptica* klonális struktúráját.

6.7. Következtetés

A *B. bronchiseptica* virulenciafaktorainak tanulmányozásához különböző fenotípus- és genotípusvizsgáló módszereket alkalmaztunk, és a legtöbb vizsgálatban a törzsek heterogenitását mutattuk ki. A fenotípusos vizsgálatokban (hemolizáló képesség, hemagglutináció és mozgásképesség) kapott eredmények arra utalnak, hogy törzseink többnyire avirulens (Bvg^-) fázisban voltak. Mivel a tenyésztés során nem használtunk a $BvgAS$ rendszerre ható moduláló szignálokat, ezért feltételezhető, hogy más extra- és/vagy intracelluláris körülmények indukálták a fázisváltást. Ide sorolhatók többek között olyan tényezők, mint az átoltások száma, a sejtek életkora, a sejtsűrűség, a tartósítási eljárás vagy éppen a táptalaj és a levegő aktuális nedvességtartalma. De természetesen számtalan, eddig még nem ismert befolyásoló tényező is szerepet játszhatott abban, hogy standard – legalábbis általunk standardnak vélt –, körülmények között is eltérő eredményeket kaptunk az ismétlések során.

A genotípusvizsgáló módszerek (PCR, RFLP, szekvencia- és filogenetikai analízis) eredményeit már nem befolyásolhatták sem a külső, sem a belső tényezők, ennek ellenére

itt is változatosságot tapasztaltunk a törzsek között, mely alapján viszont egyértelmű csoportokat tudunk megalkotni. A talált genetikai heterogenitást sokszor gazdafajspecifikus jegynek lehetett tekinteni, mint például a *cyaA* gén hiányát a kutya eredetű törzseknél. Szintén a gazdaadaptációra utal a *flaA*-típusok eloszlása is, melyben az A típus a kutya, a B típus pedig a sertés eredetű törzsekre volt jellemző, amiből szintén a *B. bronchiseptica* klonális struktúrájára lehet következtetni, akárcsak Musser és mtsai. (1987) munkája alapján. Hazai és külföldi *B. bronchiseptica* törzsek ribotipizálását Register és Magyar (1999) végezték el, és 18 ribotípust azonosítottak. A legtöbb sertés eredetű törzs a 3-as ribotípusba tartozott, a más gazdából származó törzsek különböző ribotípusokat reprezentáltak. A ribotipizálás a riboszomális gének analízisének alapszik, míg a PCR-RFLP a felsokszorozott DNS szakasz restrikciós enzimek általi hasításán. Az, hogy a két eltérő módszer szerint is egységesek a sertés eredetű törzsek, arra enged következtetni, hogy van összefüggés a törzsek gazdafaji eredete és a genotípusuk között, legalábbis adott földrajzi régióban.

Genotipizáló vizsgálataink során azonban feltűnt egy sertés eredetű törzs, amely eltért a többitől (*dnt*-negatív és G *flaA*-típus). Ez a törzs a PV6, amely egy SPF (specific pathogen free, adott kórokozótól mentes) állomány egyedéből származik, így a fertőzés eredete ismeretlen. Ezt megelőző vizsgálatokban Brockmeier és Register (2007) megállapította, hogy a PV6 ribotipizálás során a többi törzstől merőben eltérő mintázatot adott, ezen felül olyan egyedi PRN és FHA típussal rendelkezik, amely nem jellemző a sertés eredetű törzsekre. A PV6 és az MBORD 901 (pulyka) *flaA* PCR-RFLP és szekvenciabeli hasonlóság arra utal, hogy a PV6 szokatlan és atipikus a sertés eredetű *B. bronchiseptica* törzsek között, ezért a fertőzés forrása minden bizonnyal egy másik gazdafaj lehetett. Azon génszakaszoknál, ahol különbséget találtunk a törzsek között, a PV6 azokkal a törzsekkel mutatta a legnagyobb hasonlóságot, melyek a *B. bronchiseptica* humán-adaptált vonalát képviselték (Diavatopoulos és mtsai., 2005), ezért az sem tartható kizártnak, hogy a fogékony állatok fertőzési forrása maga az ember legyen.

7. Új tudományos eredmények

1. Elsőként végeztük el nagyszámú magyarországi (n=107) és külföldi (n=45) eredetű, eltérő gazdafajokból származó *B. bronchiseptica* törzsek átfogó fenotípusos összehasonlító vizsgálatát.
2. A világon elsőként izoláltunk és jellemeztünk ureáz-negatív mezei *B. bronchiseptica* törzseket.
3. Elsőként végeztük el hazai nyúl és sertés eredetű *B. bronchiseptica* törzsek átfogó antibiotikum-érzékenységi vizsgálatát, melynek során néhány esetben tetraciklin és/vagy szulfonamid-rezisztenciát mutató törzseket is találtunk.
4. A világon első ízben végeztük el *B. bronchiseptica* törzsek *fimA* génszakaszának PCR-RFLP analízisét, a módszer segítségével a törzsek egységességét mutattuk ki.
5. A *B. bronchiseptica flaA* génszakaszát elemző PCR-RFLP vizsgálat során az eddig ismert 3 RFLP-típuson túl 5 darab új RFLP-típust írtunk le. A *flaA* génszakaszon alapuló genotipizáló módszerek segítségével a *B. bronchiseptica* törzsek gazdafaj adaptációjára utaló jeleket mutattunk ki, különösen a magyarországi törzsek esetében.
6. PCR módszerrel kimutattuk, hogy a magyarországi kutya eredetű *B. bronchiseptica* törzsekből a *cyaA* génszakasz hiányzik, a helyére beépülő *ptp* operon jelenlétét mindegyik törzsnél igazoltuk. A *cyaA* jelenlétét más gazdafajokból származó, hazai izolálású törzseknél minden esetben kimutattuk, ezért a *cyaA* gén hiányát kutya eredetű hazai törzseknél gazda-specifikus tulajdonságként írtuk le.
7. Szekvencia-elemzést követően a szakirodalomban is megtalálható, 14 *cyaA* alléltípuson túl egy újabb, 15. alléltípust írtunk le egy magyarországi humán eredetű törzsből.

8. Irodalomjegyzék

- A hazai járványügyi helyzet általános jellemzése**, Epiinfo, 20(18). 200-203, 2013.
- Ahuja, U., Liu, M., Tomida, S., Park, J., Souda, P., Whitelegge, J., Li, H., Harvill, E. T., Parkhill, J., Miller, J. F.: **Phenotypic and genomic analysis of hypervirulent human-associated *Bordetella bronchiseptica***, BMC Microbiol., 12. e167, 2012.
- Akerley, B. J., Miller, J. F.: **Flagellin gene transcription in *Bordetella bronchiseptica* is regulated by the BvgAS virulence control system**, J. Bacteriol., 175. 3468-3479, 1993.
- Akerley, B. J., Monack, D. M., Falkow, S., Miller, J. F.: **The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica***, J. Bacteriol., 174. 980-990, 1992.
- Áldásy P., Ványi A.: **Torzító orrgyulladás előfordulása importsertések utódaiban**, Magyar Állatorv. Lapja, 17. 291-295, 1962.
- Aricó, B., Gross, R., Smida, J., Rappuoli, R.: **Evolutionary relationship in the genus *Bordetella***, Mol. Microbiol., 1. 301-308, 1987.
- Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C., Ullmann, A.: **Deletion affecting haemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenilate cyclase**, Infect. Immun., 58. 3242-3247, 1990.
- 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., Plotkin, B. J.: **Haemagglutination by *Bordetella bronchiseptica***, J. Clin. Microbiol., 15. 1120-1127, 1982.
- Beregi A., Paulina A., Krőninger K.: **Kedvtelésből tartott kisemlősök által terjesztett fontosabb zoonosisok**, Magyar Állatorv. Lapja, 132. 651-658, 2010.
- Binns, S. H., Dawson, S., Speakman, A. J., Cuevas, L. E., Gaskell, C. J., Hart, C. A., Morgan, K. L., Gaskell, R. M.: **Prevalence and risk factors for feline *Bordetella bronchiseptica* infection**, Vet. Rec., 144. 575-580, 1999.
- Bodade, R. G., Khobragade, C. N., Ahemad, N.: **Comparative study of hemolytic activity of *Bordetella* species**, Iranian Journal of Microbiology, 1. 26-31, 2009.
- Boschwitz J. S., van der Heide H. G., Mooi F. R., Relman D. A.: ***Bordetella bronchiseptica* expresses the fimbrial structural subunit gene *fimA***, J. Bacteriol., 179. 7882-7885, 1997.
- Brockmeier, S., Register, K. B.: **Expression of the dermonecrotic toxin by *Bordetella bronchiseptica* is not necessary for predisposing to infection with toxigenic *Pasteurella multocida***, Vet. Microbiol., 125. 284-289, 2007.

- Brockmeier, S. L., Register, K. B., Nicholson, T. L., Loving, C. L.: **Bordetellosis**. In: *Diseases of swine. 10th ed*, Szerk.: Zimmermann, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., Stevenson, G. W., West Sussex: John Wiley & Sons, 2012. p. 2445-2482.
- Buboltz, A. M., Nicholson, T. L., Parette, M. R., Hester, S. E., Parkhill, J., Harvill, E. T.: **Replacement of adenylate cyclase toxin in a lineage of *Bordetella bronchiseptica***, J Bacteriol., 190. 5502-5511, 2008.
- Budai J.: **Kedvezőtlen változások a pertussis járványtanában**, LAM, 15. 760-763, 2005.
- Burns, E. H. Jr, Norman, J. M., Hatcher, M. D., Bemis, D. A.: **Fimbriae and determination of host species specificity of *Bordetella bronchiseptica***, J. Clin. Microbiol., 31. 1838-1844, 1993.
- Chalker, V. J., Toomey, C., Opperman, S., Brooks, H. W., Ibuoye, M. A., Brownlie, J., Rycroft, A. N.: **Respiratory disease in kennelled dogs: Serological responses to *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide do not correlate with bacterial isolation or clinical respiratory symptoms**, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 10. 352-356, 2003.
- Chenal-Francisques, V., Caro, V., Boursaux-Eude, C., Guiso, N.: **Genomic analysis of the adenylate cyclase hemolysin C-terminal region of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica***, Res. Microbiol., 160. 330-336, 2009.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**. Second informational supplement., 4th ed. CLSI document VET01-S2. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
- Cotter, P. A., Miller, J. F.: **BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model**, Infect. Immun., 62. 3381-3390, 1994.
- Cotter, P. A., Miller, J. F.: **A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens**, Mol. Microbiol., 24. 671-685, 1997.
- Cotter, P. A., Miller, J. F.: **Bordetella**. In: *Principles of Bacterial Pathogenesis*. Szerk: Groisman, E. A., San Diego: Academic Press, 2001. p. 619-674.
- Cowell, J. L., Hewlett, E. L., Manclark, C. R.: **Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis***, Infect. Immun., 25. 896-901, 1979.
- Crowcroft, N. S., Stein, C., Duclos, P., Birmingham, M.: **How best to estimate the global burden of pertussis?**, Lancet Infect. Dis., 3. 413-418, 2003.

- Cummings, C. A., Brinig, M. M., Lepp, P. W., van de Pas, S., Relman, D. A.: ***Bordetella* species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation**, J. Bacteriol., 186. 1484-1492, 2004.
- Datz, C.: ***Bordetella* infections in dogs and cats: pathogenesis, clinical signs, and diagnosis**, Compendium, 25. 896-900, 2003a.
- Datz, C.: ***Bordetella* infections in dogs and cats: treatment and prevention**, Compendium, 25. 902-914, 2003b.
- Dawson, S., Jones, D., McCracken, C. M., Gaskell, R. M., Hart, C. A., Gaskell, C. J.: ***Bordetella bronchiseptica* infection in cats following contact with infected dogs**, Vet. Rec., 146. 46-48, 2000.
- Deeb, B. J., DiGiacomo, R. F., Bernard, B. L., Silbernagel, S. M.: ***Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits**, J. Clin. Microbiol., 28. 70-75, 1990.
- Dénes A. L.: **Study regarding bacterial species from genus *Bordetella* isolated from animals and their importance in the veterinary pathology**, PhD tézis, Cluj- Napoca, 2010.
- Deora, R., Bootsma, H. J., Miller, J. F., Cotter, P. A.: **Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene**, Mol. Microbiol., 40. 669-683, 2001.
- Deville, J. G., Cherry, J. D., Christenson, P. D., Pineda, E., Leach, C. T., Kuhls, T. L., Viker, S.: **Frequency of unrecognized *Bordetella pertussis* infections in adults**, Clin. Infect. Dis., 21. 639-642, 1995.
- 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 Pathog., e45; 1. 373-383, 2005.
- Diavatopoulos, D. A.: **Evolution and host-adaptation of the mammalian bordetellae**, PhD tézis, Utrecht, 2006.
- Doulatov, S., Hodes, A., Dai, L., Mandhana, N., Liu, M., Deora, R., Simons, R. W., Zimmerly, S., Miller, J. F.: **Tropism switching in *Bordetella* bacteriophage defines a family of diversity-generating retroelements**, Nature, 431. 476-481, 2004.
- Dragsted, D. M., Dohn, B., Madsen, J., Jensen, J. S.: **Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions**, J. Med. Microbiol., 53. 749-754, 2004.
- Edwards, J. A.: **Initial interactions between *Bordetella bronchiseptica* and tracheal epithelial cell cilia**, PhD tézis, Tucson (Arizona), 2006.

- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P, Ladant, D., Leclerc, C.: **Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain**, J. Biol. Chem., 278. 38514-38521, 2003
- Éliás B.: **A torzító orrgyulladás és az immunvédelem**, Magyar Állatorv. Lapja, 119. 15-17, 1997.
- Éliás B., Krüger M., Rátz F.: **Adatok a sertések torzító orrgyulladásának járványtanához - II. Sertésből izolált *Bordetella bronchiseptica*-törzsek biológiai tulajdonságai**, Magyar Állatorv. Lapja, 38. 215-217, 1983.
- Fenwick, B.: **An update in canine kennel cough**, Proceedings of The North American Veterinary Conference, Orlando, USA; p. 1112-1114, 2005
- Ferry, N. S.: **Etiology of canine distemper**, J. Infect. Dis., 8. 399-420, 1911.
- Forde, C. B., Shi, X., Li, J., Roberts, M.: ***Bordetella bronchiseptica*-mediated cytotoxicity to macrophages is dependent on *bvg*-regulated factors, including pertactin**, Infect. Immun., 67. 5972-5978, 1999.
- Foster, L. A., Dyer, D. W.: **A siderophore production mutant of *Bordetella bronchiseptica* does not grow with lactoferrin as an iron source**, Infect. Immun., 61. 2698-2702, 1993.
- Franque L. W.: **Was ist die Schnüffelkrankheit der Schweine?** Dtsch. Z. Gesamte Tierheilkd., 1. 75-77, 1830.
- Friedman, L. E., Messina, M. T., Santoferrara, L., Santillán, M. A., Mangano, A., Franco, M. A.: **Characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains using phenotypic and genotypic markers**, Vet. Microbiol., 117. 313-320, 2006.
- Fry, N. K., Duncan, J., Malnick, H., Warner, M., Smith, A. J., Jackson, M. S., Ayoub, A.: ***Bordetella petrii* clinical isolate**. Emerg. Infect. Dis., 11. 1131-1133, 2005.
- Gerlach, G., von Wintzingerode, F., Middendorf, B., Gross, R.: **Evolutionary trends in the genus *Bordetella***, Microbes Infec., 3. 61-72, 2001.
- Ghosh, H. K., Tranter, J.: ***Bordetella bronchicanis (bronchiseptica)* infection in man: review and a case report**, J. Clin. Pathol., 32. 546-548, 1979.
- Giardina, P. C., Foster, L. A., Musser, J. M., Akerley, B. J., Miller, J. F., Dyer, D. W.: ***bvg* Repression of alcaligin synthesis in *Bordetella bronchiseptica* is associated with phylogenetic lineage**, J. Bacteriol., 177. 6058-6063, 1995.
- 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.

- González, G. M., Rosales, M. E., Morales, G. B., Crespo, J. A. M.: **Isolation and characterisation of *Bordetella bronchiseptica* strains from canine origin**, Vet. Mex., 37. 313-325, 2006.
- Goodnow, R. A.: **Biology of *Bordetella bronchiseptica***, Microbiol. Rev., 44. 722-738, 1980.
- Gross, R., Keidel, K., Schmitt, K.: **Resemblance and divergence: the „new” members of the genus *Bordetella***, Med. Microbiol. Immunol., 199. 155-163, 2010.
- Gueirard, P., Weber, C., le Coustumier, A., Guiso, N.: **Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host**, J. Clin. Microbiol., 33. 2002-2006, 1995.
- Gzyl, A., Augustynowicz, E., Mosiej, E., Zawadka, M., Gniadek, G., Nowaczek, A., Slusarczyk, J.: **Amplified fragment length polymorphism (AFLP) versus randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) as new tools for inter- and intra-species differentiation within *Bordetella***, J. Med. Microbiol., 54. 333-346, 2005.
- 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.
- Harvill, E. T., Cotter, P. A., Yuk, M. H., Miller, J. F.: **Probing the function of *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase toxin by manipulating host immunity**, Infect. Immun., 67. 1493–1500, 1999.
- Heininger, U., Cotter, P. A., Fescemyer, H. W., Martinez de Tejada, G., Yuk, M. H., Miller, J. F. and Harvill, E. T.: **Comparative phenotypic analysis of the *Bordetella parapertussis* isolate chosen for genomic sequencing**, Infect. Immun., 70. 3777-3784, 2002.
- Hester, S. E.: ***Bordetella* species: sensing and evading host immunity**, PhD tézis, Penn State University, 2012.
- Hester, S. E., Lui, M. H., Nicholson, T., Nowacki, D., Harvill, E. T.: **Identification of a CO₂ responsive regulon in *Bordetella***, PloS ONE, 7. 10, e4735, 2012.
- Hewlett, E. L., Donato, G. M.: ***Bordetella* toxins**. In: *Bordetella molecular microbiology*. Szerk.: Loch, C., Wymondham: Scientific Press, 2007. p. 97-118.
- 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.
- Horiguchi, Y., Nakai, T., Kume, K.: **Effects of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin on the structure and function of osteoblastic clone MC3T3-E1 cells**, Infect. Immun., 59. 1112-1116, 1991.
- Hozbor, D., Fouque, F., Guiso, N.: **Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction**, Res. Microbiol., 150. 333-341, 1999.

- Irie, Y., Mattoo, S., Yuk, M. H.: **The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica***, J. Bacteriol., 186. 5692-5698, 2004.
- Ishikawa, H., Isayama, Y.: **Effect of antigenic modulation and phase variation on adherence of *Bordetella bronchiseptica* to porcine nasal epithelial cells**, Am. J. Vet. Res., 48. 1689-1691, 1987.
- 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.
- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C.: **The *Bordetella* adhesins**. In: *Bordetella molecular microbiology*. Szerk.: Locht, C., Wyndham: Scientific Press, 2007. p. 69-96.
- Jacobs, A. A., Chalmers, W. S., Pasman, J., van Vugt, F., Cuenen, I. H.: **Feline bordetellosis: challenge and vaccine studies**, Vet. Rec., 133. 260-263, 1993.
- Kadlec, K., Kehrenberg, C., Wallmann, J., Schwarz, S.: **Antimicrobial susceptibility of *Boretella bronchiseptica* isolates from porcine respiratory tract infections**, Antimicrob. Agents Ch., 48. 4903-4906, 2004.
- Kadlec, K., Kehrenberg, C., Schwarz, S.: **Molecular basis of resistance to trimethoprim, chloramphenicol and sulphonamides in *Bordetella bronchiseptica***, J. Antimicrob. Chemoth., 56. 485-490, 2005.
- Kadlec, K.: **Detection and organisation of antimicrobial resistance genes in *Bordetella bronchiseptica* isolates from pigs**, PhD tézis, Hannover, 2006.
- Kajava, A. V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M. N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., Steven, A. C.: **Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins**, Mol. Microbiol., 42. 279-292, 2001.
- Kang, B. K., Koshimizu, K., Ogata, M.: **Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. II. Agglutination test on *Bordetella bronchiseptica* infection**, Jpn. J. Vet. Sci., 32. 295-306, 1970.
- Keil, D. J., Fenwick, B.: **Evaluation of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates using randomly amplified polymorphic DNA fingerprint and ribotyping**, Vet. Microb., 66. 41-51, 1999.
- Keogh, E. V., North, E. A., Warburton, M. F.: **Haemagglutinins of the *Haemophilus* group**, Nature, 160. 63, 1947.
- Khattak, M. N., Matthews, R. C.: **Genetic relatedness of *Bordetella* species as determined by macrorestriction digest resolved by pulse-field gel electrophoresis**, Int. J. Syst. Bacteriol., 43. 659-664, 1993.

- Khelef, N., Zychlinsky, A., Guiso, N.: ***Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin**, *Infect. Immun.*, 61. 4064-4071, 1993.
- Kloos, W. E., Mohapatra, N., Obrogosz, W. J., Ezzel, J. W., Manclark, C. R.: **Deoxyribonucleotide sequence relationships among *Bordetella* species**, *J. Int. Syst. Bacteriol.*, 31. 173-176, 1981.
- Ko, K. S., Peck, K. R., Oh, W. S., Lee, N. Y., Lee, J. H., Song, J-H.: **New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst**, *J. Clin. Microbiol.*, 43. 2516-2519, 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.
- Kozak, N. A., Panina, E. M., Miller, J. F.: **Type III secretion system**. In: *Bordetella molecular microbiology*. Szerk.: Loch, C., Wyndham: Scientific Press, 2007. p. 119-139.
- Krogstad, A. P., Dixon, L. W.: **Gross pathology os small mammals**, *Semin. Avian Exot. Pet*, 12. 106-122, 2003.
- Kurushima, J., Kuwae, A., Abe, A.: **The type III secreted protein BspR regulates the virulence genes in *Bordetella bronchiseptica***, *PLoS ONE*, 7.6, e38925, 2012.
- Lacey, B. W.: **Antigenic modulation of *Bordetella pertussis***, *J. Hyg.*, 58. 57-93, 1960.
- Lebrun, I., Marques-Porto, R., Pereira, A. S., Pereira, A., Perpetuo, E. A.: **Bacterial toxins: an overview on bacterial proteases and their action as virulence factors**, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 9.820-828, 2009.
- Long, G. H., Sinha, D., Read, A. F., Pritt, S., Kline, B., Harvill, E. T., Hudson, P. J., Bjørnstad, O. N.: **Identifying the age cohort responsible for transmission in a natural outbreak of *Bordetella bronchiseptica***, *PLoS Pathog.*, 6. 12, e1001224, 2010.
- Lopez-Boado, Y. S., Cobb L. M., Deora, R.: ***Bordetella bronchiseptica* flagellin is a proinflammatory determinant for airway epithelial cells**, *Infect. Immun.*, 73. 7525-7534, 2005.
- 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.
- Macfarlane, J. T., Finch, R. G., Ward, M. J., Rose, D. H.: **Erythromycin compared with a combination of ampicillin and amoxicillin as initial therapy for adults with pneumonia including legionnaires-disease**, *J. Infection*, 7. 111-117, 1983.

- Magyar T.: **A *Bordetella bronchiseptica* biológiájának néhány érdekes kérdése**, Magyar Állatorv. Lapja, 121. 267-274, 1999.
- Magyar T., Chanter, N., Lax, A. J., Rutter, J. M., Hall, G. A.: **The pathogenesis of turbinate atrophy in pigs caused by *Bordetella bronchiseptica***, Vet. Microbiol., 18. 135-146, 1988.
- Magyar T., Donkó T., Kovács F.: **Atrophic rhinitis vaccine composition triggers different serological profiles that do not correlate with protection**, Acta Vet. Hung., 56. 27-40, 2008.
- Magyar T., Glávits R., Pullinger, G. D., Lax, A. J.: **The pathological effect of the *Bordetella dermonecrotic* toxin in mice**, Acta Vet. Hung., 48. 397-406, 2000.
- Magyar T., Kovács F., Donkó T., Bíró H., Romvári R., Kovács M., Repa I.: **Turbinate atrophy evaluation in pigs by computed tomography**, Acta Vet. Hung., 51. 485-491, 2003.
- Magyar T., Lax, A. J.: **Atrophic rhinitis**. In: *Polymicrobial diseases*. Szerk: Brogden, K. A., Guthmiller, J. M.; Washington: ASM International, 2002. p. 169-197.
- Magyar T., Semjén G., Osváth Zs., Lendvai N., Réthy L.: **A *Bordetella bronchiseptica* virulenciáját meghatározó tényezők vizsgálata**, Magyar Állatorv. Lapja, 42. 603-607, 1987.
- Magyar T., Vörös B., Wehmann E.: **Macskák *Bordetella bronchiseptica* okozta felső légúti megbetegedése**, Magyar Állatorv. Lapja, 131. 464-469, 2009.
- Martínez de Tejada, G., Miller, J. F., Cotter, P. A.: **Comparative analysis of the virulence control systems of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica***, Mol. Microbiol., 22. 895-908, 1996.
- 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.
- Mattoo, S., Foreman-Wykert, A. K., Cotter, P. A., Miller, J. F.: **Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis**, Front. Biosci., 6. e168-186, 2001.
- McMillan, D. J., Mau, M., Walker, M. J.: **Characterisation of the urease gene cluster in *Bordetella bronchiseptica***, Gene, 208. 243-251, 1998.
- McMillan, D. J., Medina, E., Guzman, C. A., Walker, M. J.: **Expression of urease does not affect the ability of *Bordetella bronchiseptica* to colonise and persist in the murine respiratory tract**, FEMS Microbiol. Lett., 178. 7-11, 1999.
- Melvin, J. A., Scheller, E. V., Miller, J. F., Cotter, P. A.: ***Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges**, Nat. Rev. Microbiol., 12. 274-288, 2014.

- Menozzi, F. D., Boucher, P. E., Riveau, G., Gantiez, C., Locht, C.: **Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis***, *Infect. Immun.*, 62. 4261-4269, 1994.
- Mobley, H. L. T., Island, M. D., Hausinger, R. P.: **Molecular biology of microbial ureases**, *Microbiol. Rev.*, 59. 451-480, 1995.
- Monack, D. M., Falkow, S.: **Cloning of *Bordetella bronchiseptica* urease genes and analysis of colonisation by a urease-negative mutant strain in a guinea-pig model**, *Mol. Microbiol.*, 10. 545-553, 1993.
- Musser, J. M., Bemis, D. A., Ishikawa, H., Selander, R. K.: **Clonal diversity and host distribution in *Bordetella bronchiseptica***, *J. Bacteriol.*, 169. 2793-2803, 1987.
- Nakagawa, M., Muto, T., Yoda, H., Nakano, T., Imaizumi, K.: **Experimental *Bordetella bronchiseptica* infection is guinea pigs**, *Jpn. J. Vet. Sci.*, 33. 59-60, 1971.
- Nicholson, T. L., Brockmeier, S. L., Loving, C. L.: **Contribution of *Bordetella bronchiseptica* filamentous hemagglutinin and pertactin to respiratory disease in swine**, *Inf. Immun.*, 77. 2136-2146, 2009.
- Nicholson, T. L.: **Construction and validation of a first-generation *Bordetella bronchiseptica* long-oligonucleotide microarray by transcriptional profiling the Bvg regulon**, *BMC Genomics*, 8. e200, 2007.
- Ofek, I., Beachey, E. H.: **General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man**. In: *Bacterial Adherence; Receptors and Recognition, Series B, Vol. 6*, Szerk.: Beachey, E. H.; London: Chapman and Hall, 1980. p. 3-29.
- Okewole, E. A., Olubunmi, P. A.: **Antibiograms of pathogenic bacteria isolated from laboratory rabbits in Ibadan, Nigeria**, *Lab. Anim.*, 42. 511-514, 2008.
- Ohgitali, T., Okabe, T., Sasaki, N.: **Characterisation of haemagglutinin from *Bordetella bronchiseptica***, *Vaccine*, 9. 653-658, 1991.
- Ortez, J. H.: **Disk diffusion testing**. In: *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. Szerk: Coyle, M.B.; s.l.: American Society for Microbiology, 2005. p. 39-52.
- Ósz Gy.: **A sertések torzító orrgyulladásáa**, *Magyar Állatorv. Lapja*, 11. 244- 251, 1956.
- Ottemann, K. M., Miller, J. F.: **Roles for motility in bacterial-host interactions**, *Mol. Microbiol.*, 24. 1109-1117, 1997.
- Park, J., Zhang, Y., Buboltz, A. M., Zhang, X., Schuster, S. C., Ahuja, U., Liu, M., Miller, J. F., Sebahia, M., Bentley, S. D., Parkhill, J., Harvill, E. T.: **Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens**, *BMC Genomics*, 13. e545, 2012.
- Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A., Murphy, L. D., Thomson, N., Harris, D. E., Holden, M. T., Churcher, C. M., Bentley, S. D., Mungall, K. L., Cerdeno-Tarraga, A. M., Temple, L.,

- James, K., Harris, B., Quail, M. A., Achtman, M., Atkin, R., Baker, S., Basham, D., Bason, N., Cherevach, I., Chillingworth, T., Collins, M., Cronin, A., Davis, P., Doggett, J., Feltwell, T., Goble, A., Hamlin, N., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Norberczak, H., O'Neil, S., Ormond, D., Price, C., Rabinowitsch, E., Rutter, S., Sanders, M., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Unwin, L., Whitehead, S., Barrell, B. G., Maskell, D. J.: **Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica***, Nat. Genet., 3. 32-40, 2003.
- Passerini de Rossi, B. N., Friedman, L. E., Darnaud, S., de Torres, R. A., Franco, M. A.: **Flagellin, a major protein present in SDS-PAGE profiles of Sarkosyl-OMP-enriched fraction from *Bordetella bronchiseptica* Bvg⁻ or modulated Bvg⁺ strains**, Vet. Microbiol., 56. 65-77, 1997.
- Plotkin, B. J., Bemis, D. A.: **Carbon source utilisation by *Bordetella bronchiseptica***, J. Med. Microbiol., 47. 761-765, 1998.
- Porter, J. F., Parton, R., Wardlaw, A. C.: **Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without added nutrients**, Appl. Environ. Microbiol., 57. 1202-1206, 1991.
- Pósa R., Donkó T., Bogner P., Kovács M., Repa I., Magyar T.: **Interaction of *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, and fumonisin B1 in the porcine respiratory tract as studied by computer tomography**, Can. J. Vet. Res., 75. 176-182, 2011.
- Preston, A., Parkhill, J., Maskell, D. J.: **The *Bordetellae*: lessons from genomics**, Nat. Rev. Microbiol., 2. 379-390, 2004.
- Ramos, H. C., Rumbo, M., Sirard, J. C.: **Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa**, Trends Microbiol., 12. 509-517, 2004.
- Reed, K. E.: **Restriction enzyme mapping of bacterial urease genes: using degenerate primers to expand experimental outcomes**, Biochem. Mol. Biol. Edu., 29. 239-244, 2001.
- Register, K. B., Magyar T.: **Optimized ribotyping protocol applied to Hungarian *Bordetella bronchiseptica* isolates; identification of two novel ribotypes**, Vet Microbiol., 69. 277-285, 1999.
- Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D. T., Saukkonen, K., Wright, S. D.: **Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis***, Cell, 61. 1375-1382, 1990.

- Richter, G. W., Kress, Y.: **Electron microscopy of a strain of *Bordetella bronchiseptica***, J. Bacteriol., 94. 1216-1224, 1967.
- Rougier, S., Galland, D., Boucher, S., Boussarie, D., Vallé, M.: **Epidemiology and susceptibility of pathogenic bacteria responsible for upper respiratory tract infections in pet rabbits**, Vet. Microbiol., 115.192-198, 2006.
- Rutter, J. M., Francis, L. M. A., Sansom, B. F.: **Virulence of *Bordetella bronchiseptica* from pigs with or without atrophic rhinitis**, Med. Microbiol., 15. 105-116, 1982.
- Sacco, R. E., Register, K. B., Nordholm, G. E.: **Restriction endonuclease analysis discriminates *Bordetella bronchiseptica* isolates**, J. Clin. Microbiol., 38. 4387-4393, 2000.
- Sanden, G. N., Weyant, R. S.: **Genus III. *Bordetella*. Moreno-López 1952**. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Szerk.: Garrity, G. M.; New York:Springer, 2005. p. 662-671.
- Savelkoul, P. H., de Kerf, D. P., Willems, R. J., Mooi, F. R., van der Zeijst, B. A., Gaastra, W.: **Characterization of the *fim2* and *fim3* fimbrial subunit genes of *Bordetella bronchiseptica*: roles of Fim2 and Fim3 fimbriae and flagella in adhesion**, Infect. Immun., 64. 5098-5105, 1996.
- Scarlato, V., Rappuoli, R.: **Differential response of the *bvg* virulence regulon of *Bordetella pertussis* to $MgSO_4$ modulation**, J. Bacteriol., 173, 7401-7404, 1991.
- Serezani, C. H., Ballinger, M. N., Aronoff, D. M., Peters-Golden, M., **Cyclic AMP: Master regulator of innate immune cell function**, Am. J. Resp. Cell. Mol., 39. 127-132, 2008.
- Shimoni, Z., Niven, M., Mosenkis, M., Greif, J.: **Fatal pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica***, IMAJ, 2. 402-403, 2000.
- Shin, E-K., Seo, Y-S., Han, J. H., Hahn, T-W.: **Diversity os swine *Bordetella bronchiseptica* irolates evaluated by RAPD analysis and PFGE**, J. Vet. Sci., 8. 65-73, 2007.
- Shina, A., Hart, C. A., Stenton, M. D., Dawson, S., McCracken, C. M., Binns, S. H., Gaskell, R. M., Winstanley, C.: **Distribution of *fim3* and *flaA* TTGE sequence types amongst isolates of *Bordetella bronchiseptica* from different host animals**, J. Med. Microbiol., 51. 557-587, 2002.
- Sisti, F., Fernández, J., Rodríguez, M. E., Lagares, A., Guiso, N., Hozbor, D. F.: **In vitro and in vivo characterization of a *Bordetella bronchiseptica* mutant strain with a deep rough lipopolysaccharide structure**, Infect. Immun., 70. 1791-1798, 2002.
- Sisti, F., Ha, D. G., O'Toole, G. A., Hozbor, D., Fernandez, J.: **Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica***, Microbiology-SGM, 159. 869-879, 2013.

- Skinner, J. A., Reissinger, A., Shen, H., Yuk, M. H.: ***Bordetella* type III secretion and adenylate cyclase toxin synergize to drive dendritic cells into a semimature state**, J. Immunol., 173. 1934-1940, 2004.
- Speakman, A. J., Binns, S. H., Osborn, A. M., Corkill, J. E., Kariuki, S., Saunders, J. R., Dawson, S., Gaskell, R. M., Hart, C. A.: **Characterization of antibiotic resistance plasmids from *Bordetella bronchiseptica***, J. Antimicrob. Chemoth., 40. 811-816, 1997.
- Speakman, A. J., Dawson, S., Corkill, J. E., Binns, S. H., Hart, C. A., Gaskell, R. M.: **Antibiotic susceptibility of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates**, Vet. Microb., 71. 193-200, 2000.
- Stępniewska, K., Markowska-Daniel, I.: **Evaluation of PCR test for detection of dermonecrotxin of *Bordetella bronchiseptica***, B. Vet. I. Pulawy, 54. 495-499, 2010.
- Stępniewska, K., Urbaniak, K., Markowska-Daniel, I.: **Phenotypic and genotypic characterisation of *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from pigs in Poland**, Pol. J. Vet. Sci., 17. 71-77, 2014.
- Stockbauer, K. E., Fuchslocher, B., Miller, J. F., Cotter, P. A.: **Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein**, Mol. Microbiol., 39. 65-78, 2001.
- Stockbauer, K. E., Foreman-Wykert, A. K., Miller, J. F.: ***Bordetella* type III secretion induces caspase 1-independent necrosis**, Cell. Microbiol., 5. 123-132, 2003.
- 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.
- Tivozola, A., Brun, D., Guiso, N., Guillot, S.: **Development of real-time PCR assay for differential detection of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis***, Diagn. Micr. Infec. Dis., 78. 347-351, 2014.
- van der Zee, A., Mooi, F., Van Embden, J., Musser, J.: **Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp. phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences**, J. Bacteriol., 179. 6609-6617, 1997.
- van Praag, E.: **A nyulak légzőszervi megbetegedései** (fordította: Újvidéki Mónika) http://www.medirabbit.com/HU/Respiratory/Bacterial/URI_hu.pdf. Letöltés dátuma: 2014.10.07.
- 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* Rüger and Tan 1983**, Int. J. Syst. Bacteriol., 46. 849-858, 1996.

- Varga J., Tuboly S., Mészáros J.: **Bordetella-fertőzések.** In: *A háziállatok fertőző betegségei – Állatorvosi járványtan II.* Szerk.: Varga J.; Budapest: Mezőgazda Kiadó, 1999. p. 208-212.
- Venier, L., Rothschild, M. F., Warner, C. M.: **Measurement of serum antibody in swine vaccinated with *Bordetella bronchiseptica*: comparison of agglutination and enzyme-linked immunosorbent assay methods,** Am. J. Vet. Res., 45. 2634-2636, 1984.
- Vieson, M. D., Pinyro, P., LeRoith, T.: **A review of the pathology and treatment of canine respiratory infections,** Vet. Med., 3. 25-39, 2012.
- Vojtova, J., Kamanova, J., Sebo, P.: ***Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense,** Curr. Opin. Microbiol., 9. 69-75, 2006a.
- Vojtova, J., Kofronova, O., Sebo, P., Beneda, O.: ***Bordetella* adenylate cyclase toxin induces a cascade of morphological changes of sheep erythrocytes and localizes into clusters in erythrocyte membranes,** Microsc. Res. Techniq., 69. 119-129, 2006b.
- 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 emebded description of the genus *Bordetella*,** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51. 1257-1265, 2001.
- Walker, K. E., Weiss, A. A.: **Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella*,** Infect. Immun., 62. 3817-3828, 1994.
- Weiss, A. A., Goodwin, M. S.: **Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model,** Infect. Immun., 57. 3757-3764, 1989.
- Wernli, D., Emonet, S., Schrenzel, J., Harbarth, S.: **Evaluation of eight cases of confirmed *Bordetella bronchiseptica* infection and colonization over a 15-year period,** Clin. Microbiol. Infec., 17. 201-203, 2011.
- Willems, R., Paul, A., van der Heide, H. G. J., ter Avest, A. R., Moo, i F. R.: **Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation,** EMBO J., 9. 2803-2809, 1990.
- Winstanley, C., Morgan, J. A. W.: **The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis,** Microbiology, 143. 3071–3084, 1997.
- Winstanley, C., Shina, A., Dawson, S., Gaskell, R.M., Hart, C.A.: **Variation in *Bordetella bronchiseptica flaA* does not correlate with typing by macro-restriction analysis by pulsed-field gel electrophoresis,** J. Med. Microbiol., 50. 255-260, 2001.
- Woolfrey, B. F., Moody, J. A.: **Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*,** Clin. Microbiol. Rev., 4. 243-255, 1991.

- Yuk, M. H., Harvill, E. T., Miller, J. F.: **The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica***, Mol. Microbiol., 28. 945-959, 1998.
- Zhao, Z., Xue, Y., Wang, C., Ding, K., Wu, B., He, Q., Cheng, X., Chen, H.: **Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from pigs with respiratory diseases on farms in China**, J. Vet. Med. Sci., 73.103-106, 2011.

9. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

9.1. Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Wehmann E., Khayer B., Magyar T.: **Heterogeneity of *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase (*cyaA*) RTX domain**, Arch. Microbiol., 197. 105-112, 2015.

IF₂₀₁₃: 1,861

Khayer B., Magyar T., Wehmann E.: **Flagellin typing of *Bordetella bronchiseptica* strains originating from different host species**, Vet. Microbiol., 173. 270-279, 2014.

IF₂₀₁₃: 2,726

Khayer B., Wehmann E., Demeter Z., Rónai Zs., Jánosi Sz., Rusvai M., Magyar T.: **Kutya eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek molekuláris vizsgálata**, Magyar Állatorv. Lapja, 133. 594-600, 2011.

IF: 0,201

Khayer B., Rónai Zs., Wehmann E., Magyar T.: **Detection of urease-negative *Bordetella bronchiseptica* from the field**, Acta Vet. Hung., 59. 289-293, 2011.

IF: 0,673

9.2. Konferencia prezentációk

Khayer B., Domokos J., Magyar T., Wehmann E.: Magyarországi sertés eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálata (poszter) [Antibiotic susceptibility of Hungarian *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from pigs; *Konferencia absztraktfüzet* p. 30.] Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése. Keszthely, 2014.10.15-17.

Domokos J., Khayer B.: Sertés eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálata (előadás) [*Konferencia absztraktfüzet* p. 74.] 15. Kolozsvári Biológus Napok. Kolozsvár, 2014.04.04-06.

Khayer B., Magyar T., Wehmann E.: Comparison of human and animal *Bordetella bronchiseptica* strains by PCR-RFLP and phylogenetic analysis (poszter) [No.: P1] 10th International Symposium on *Bordetella*. Dublin, 2013.09.08-11.

Khayer B., Sulyok K. M., Wehmann E., Magyar T.: Antibiotic susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from rabbits (poszter) [*Konferencia absztraktfüzet* p. 184.] EMBO/EMBL Symposium: New approaches and concepts in microbiology. Heidelberg, 2013.10.14-16.

- Khayer B, Sulyok K. M., Wehmann E., Magyar T.: Nyúl eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek antibiotikum érzékenysége (poszter) [Szerk.: Janda T., ISBN:978-963-8351-41-8, pp. 225-228.] II. ATK Tudományos Nap, Velünk élő tudomány. Martonvásár, 2013.11.08.
- Khayer B., Magyar T., Wehmann E.: Humán és állati eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek összehasonlító vizsgálata PCR-RFLP-vel és filogenetikai analízissel (előadás) [Szerk.: Janda T., ISBN:978-963-8351-41-8, pp. 50-53.] II. ATK Tudományos Nap, Velünk élő tudomány. Martonvásár, 2013.11.08.
- Magyar T., Khayer B., Wehmann E.: PCR-RFLP analysis of *Bordetella bronchiseptica* isolates from different animal species to detect the possible signs of host-adaptation (poszter) [Konferencia absztraktfüzet p. 22.] 2nd Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals. Prato, 2012.10.09-12.
- Khayer B., Magyar T., Wehmann E.: Phylogenetic analysis of *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from different host species (poszter) [Acta Microbiol. Imm. Hung. Supplement 60:32] Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése. Keszthely, 2012.10.24-26.
- Wehmann E, Magyar T, Khayer B: *Bordetella bronchiseptica* virulencia tényezői és gazdafaj adaptációja (poszter) [Szerk.: Janda T., ISBN: 978-963-8351-40-1, p. 69.] I. ATK Tudományos Nap, Felfedező kutatások az Agrártudományi Kutatóközpontban. Martonvásár 2012.11.14.
- Khayer B., Lukács L., Wehmann E., Magyar T.: Characterisation of *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from pet animals (poszter) [Acta Microbiol. Imm. Hung. Supplement 58:167] 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, 2011.07.20-22.
- Khayer B., Wehmann E., Magyar T.: PCR-RFLP analysis of *Bordetella bronchiseptica* strains originated from different hosts on *flaA* gene. (poszter) [Konferencia absztraktfüzet p. 57.] The Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals. Prato, 2010.10.06-09.
- Khayer B., Wehmann E., Magyar T.: *Bordetella bronchiseptica* gazdaadaptációjának vizsgálata PCR-RFLP módszerrel (előadás) [Identification of host adaptation markers of *Bordetella bronchiseptica* with PCR-RFLP analysis; Acta Microbiol. Imm. Hung. Supplement 58:51] Magyar Mikrobiológiai Társaság 2010. évi Nagygyűlése. Keszthely, 2010.10.12-15.

9.3. Akadémiai beszámolók

- Khayer B., Sulyok K. M., Domokos J., Magyar T., Wehmann E.: Nyúl és sertés eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálata. Budapest, 2015.01.27.
- Khayer B., Magyar T., Wehmann E.: Különböző gazdafajokból származó *Bordetella bronchiseptica* törzsek virulencia faktorainak vizsgálata. Budapest, 2013.01.29.
- Khayer B., Wehmann E., Magyar T.: Különböző gazdafajokból származó *Bordetella bronchiseptica* törzsek flagellinjének vizsgálata hagyományos és molekuláris genetikai módszerekkel. Budapest, 2012.01.17.
- Khayer B., Rónai Zs., Wehmann E., Magyar T.: Ureáz-negatív *Bordetella bronchiseptica* izolátumok jellemzése. Budapest, 2011.01.25.
- Khayer B., Wehmann E., Magyar T.: *Bordetella bronchiseptica* adenilát cikláz-hemolizin toxinjának vizsgálata. Budapest, 2011.01.25
- Khayer B., Wehmann E., Magyar T.: *Bordetella bronchiseptica* izolátumok flagellin génjének vizsgálata PCR-RFLP módszerrel. Budapest, 2010.01.26.

10. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó publikációk

- Szabó G., Khayer B., Rusznyák A., Tátrai I., Dévai Gy., Márialigeti K., Borsodi A.:
Seasonal and spatial variability of sediment bacterial communities inhabiting the large shallow Lake Balaton, Hydrobiologia, 663. 217-232, 2011.
 IF: 1,784
- Khayer B., Szabó G., Borsodi A.K., Márialigeti K.: Cultivation based bacterial diversity of the sediment of Lake Balaton. (poszter) [*Acta Microbiol. Imm. Hung. Supplement* 54:60]
 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, 2007.07.18-20.
- Khayer B., Szabó G., Márialigeti K., Borsodi A. K.: Bakteriális eredetű polifoszfát felhalmozódás és foszfatáz aktivitás három magyarországi sekélyvizű tóban. (poszter) [Studies on bacterial polyphosphate accumulation and phosphatase activity in three Hungarian shallow lakes; *Acta Microbiol. Imm. Hung. Supplement* 53:292]
 Magyar Mikrobiológiai Társaság 2006. évi Nagygyűlése. Keszthely, 2006.10.18-20.

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Magyar Tibornak, az MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézetének igazgatójának, aki lehetővé tette és biztosította, hogy az általa vezetett Légzőszervi bakteriológia témacsoportban foglalkozhassam disszertációm témájával. Köszönöm, hogy tudásával, tapasztalatával, türelmével és bizalmával segítette munkámat, köszönöm továbbá a munkámmal kapcsolatos publikációk értékének növelése érdekében tett észrevételeit.

Rendkívüli hálával tartozom Dr. Wehmann Enikőnek, aki kezdettől fogva támogatott, és akitől rengeteg hasznos tanácsot kaptam. Köszönöm bizalmát és megértését, valamint a különböző módszerek elsajátításában, a kutatás menetének irányításában, az eredmények kiértékelésében és a publikációk lektorálásában nyújtott sok segítségét.

Szeretném megköszönni Hegedűs Évának és Dr. Sellyei Boglárkának, valamint a témacsoport többi tagjának, hogy gyakorlati és elméleti kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Köszönet illeti Bartha Dánielt, az MTA ATK ÁOTI bioinformatikusát a mozgásképesseggel kapcsolatos vizsgálatokban nyújtott segítségért, továbbá az Intézet valamennyi munkatársát, akik munkájukkal és biztatásukkal támogattak.

A NÉBIH ÁDI Bakteriológiai laboratóriumának munkatársai közül köszönettel tartozom Dr. Rónai Zsuzsannának az ureáz-negatív *B. bronchiseptica* törzsek vizsgálata során nyújtott segítségért, és a számtalan gondolatébresztő beszélgetésért. Az antibiotikum-rezisztencia adatok átadásáért Dr. Szentesi Katalinnak tartozom köszönettel.

Ez úton szeretném megköszönni elsősorban PhD évfolyamtársaimnak, és minden kollégámnak, gyakorló- és laboratóriumi állatorvosnak, hogy a munkám során felhasznált baktériumtörzseket, mintákat és véreket a rendelkezésemre bocsátották.

Köszönet illeti szakdolgozóimat (Hunyadi Krisztinát, Lukács Lillát, Sulyok Kinga Máriát és Domokos Juditot), hogy munkájukkal bővítették eredményinket, és a tanítva tanulás során én is új ismeretekkel gazdagodtam. Köszönöm Dr. Borsodi Andreának, Dr. Márialigeti Károlynak, Bognár Csabának, és valamennyi tanáromnak, hogy eljuthattam ideig.

Végül szeretném megköszönni családomnak, páromnak és barátaimnak, hogy mindvégig támogattak és bíztak bennem.

A vizsgálatok elvégzéséhez az OTKA K83332 számú pályázata és a SzIE ÁTK Doktori Iskolájának ösztöndíjkerete biztosította az anyagi feltételeket.

12. Mellékletek

M1. táblázat: A *B. bronchiseptica* törzsek és a velük végzett vizsgálatok jellemzői

Törzs	A <i>B. bronchiseptica</i> törzsek eredete				Biokémia	Fajspecifikus PCR	PCR–RFLP típusok			PCR		Fenotípusos vizsgálatok		
	Gazdafaj	Szerv	Helyszín	Év			<i>fimA</i>	<i>flaA</i>	<i>cyaA</i>	<i>ptp</i>	<i>dnt</i>	HA	Motilitás	Antib. rez.
CE	sertés	orr	Bábolna	1985	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
FG 5	sertés	orr	Bábolna	1986	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
PV 6	sertés	orr	Bábolna	1986	+	+	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>B</u>	–	–	●	○	○
5036	sertés	orr	Szentes	1988	+	+	A	B	A	–	+	●	○	●
5046	sertés	orr	Bábolna	1989	+	+	○	○	○	○	○	○	○	●
5087	sertés	orr	Pereg	1989	+	+	○	○	○	○	○	○	○	●
B 58	sertés	orr	Bábolna	1991	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
5141	sertés	orr	Mesterszállás	1991	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
KM22	sertés	orr	Komárom	1993	+	+	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	–	+	●	○	●
5230	sertés	orr	Szigetvár	1996	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
5234	sertés	orr	Kéthely	1996	+	+	○	○	○	○	○	○	○	●
5240	sertés	orr	Tápé	1996	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
5250	sertés	orr	Komárom	1999	+	+	○	○	○	○	○	○	○	●
5262	sertés	orr	Kapospula	2000	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
5269	sertés	orr	Herceghalom	2003	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
5279	sertés	orr	Somogyárd	2004	+	+	○	○	○	○	○	○	○	●
5323	sertés	orr	Bábolna	2005	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
5356	sertés	orr	Biharnagybajom	2006	+	+	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	–	+	●	○	○
5444	sertés	orr	Rábakecöl	2007	+	+	○	○	○	○	+	○	○	●
5463	sertés	orr	Hódmezővásárhely	2007	nitrát –	+	A	B	A	–	+	●	○	○
5470	sertés	orr	Parasznya	2007	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
5484	sertés	orr	Borota	2008	nitrát –	+	○	○	○	○	+	○	○	●
5485	sertés	orr	Tiszavasvári	2008	+	+	○	○	○	○	+	○	○	●
5487	sertés	orr	Hódmezővásárhely	2008	nitrát –	+	○	○	○	○	+	○	○	●

M1. táblázat: A *B. bronchiseptica* törzsek és a velük végzett vizsgálatok jellemzői (folytatás)

Törzs	A <i>B. bronchiseptica</i> törzsek eredete				Biokémia	Fajspecifikus PCR	PCR–RFLP típusok			PCR		Fenotípusos vizsgálatok		
	Gazdafaj	Szerv	Helyszín	Év			<i>fimA</i>	<i>flaA</i>	<i>cyaA</i>	<i>ptp</i>	<i>dnt</i>	HA	Motilitás	Antib. rez.
5493	sertés	orr	Rábakecöl	2008	nitrát –	+	A	B	A	–	+	●	○	○
5496	sertés	tüdő	Dalmand	2008	+	+	○	○	○	○	○	○	○	●
5500	sertés	orr	Döbrököz	2008	nitrát –	+	A	B	A	–	+	●	○	●
5505	sertés	orr	Dombiratos	2008	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
5594	sertés	orr	Borota	2009	ureáz –	+	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	–	+	○	○	○
5595	sertés	orr	Borota	2009	ureáz –	+	A	B	A	–	+	○	○	○
5596	sertés	orr	Borota	2009	ureáz –	+	A	B	A	–	+	○	○	○
5597	sertés	orr	Borota	2009	ureáz –	+	A	B	A	–	+	○	○	○
5609	sertés	orr	Hajdúszovát	2010	+	+	○	○	○	○	○	○	○	●
5647	sertés	orr	Baracska	2010	+	+	A	B	A	–	+	○	○	●
5609	sertés	orr	Hajdúszovát	2010	+	+	○	○	○	○	○	○	○	○
4607*	sertés	□	USA	1960'	nitrát –	+	A	B	A	–	+	●	○	○
4609*	sertés	□	USA	1960'	nitrát –	+	A	B	A	–	+	●	○	○
DAN*	sertés	□	Dánia	□	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
Boxtel*	sertés	□	Hollandia	□	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
5599*	sertés	□	Dánia	2010	+	+	A	<u>B</u>	A	–	+	○	○	○
Bb 46093*	sertés	□	□	□	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
Bb MH 7*	sertés	□	Egyesült Királyság	□	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
Bb IM 5*	sertés	□	Egyesült Királyság	□	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
Bb GF 8*	sertés	□	□	□	+	+	A	<u>B</u>	<u>A</u>	–	+	●	○	○
Bb Bgl*	sertés	□	□	□	nitrát –	+	A	<u>B</u>	A	–	+	●	○	○
Bb 5*	sertés	□	□	□	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○
Bb 12*	sertés	□	□	□	+	+	A	<u>B</u>	<u>A</u>	–	+	●	○	○
MBORD 676*	sertés	□	Ausztrália	□	+	+	A	B	A	–	+	●	○	○

M1. táblázat: A *B. bronchiseptica* törzsek és a velük végzett vizsgálatok jellemzői (folytatás)

Törzs	A <i>B. bronchiseptica</i> törzsek eredete				Biokémia	Fajspecifikus PCR	PCR–RFLP típusok			PCR		Fenotípusos vizsgálatok		
	Gazdafaj	Szerv	Helyszín	Év			<i>fimA</i>	<i>flaA</i>	<i>cyaA</i>	<i>ptp</i>	<i>dnt</i>	HA	Motilitás	Antib. rez.
Bö/3o	kutya	orr	Budaörs	2004	+	+	A	A	–	+	+	●	○	○
Bö/9t	kutya	torok	Budaörs	2004	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
Bö/9o	kutya	orr	Budaörs	2004	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
Bö/11t	kutya	torok	Budaörs	2004	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5339	kutya	orr	Budapest	2005	+	+	<u>A</u>	<u>A</u>	–	+	+	●	○	○
5340	kutya	orr	Magyarország	2005	+	+	A	<u>A</u>	–	±	+	●	○	○
5341	kutya	orr	Budapest	2005	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5344	kutya	orr	Budapest	2005	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5345	kutya	tüdő	Budapest	2005	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5346	kutya	orr	Budapest	2006	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5347	kutya	orr	Magyarország	2006	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5348	kutya	tüdő	Magyarország	2006	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5349	kutya	tüdő	Budapest	2006	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5351	kutya	orr	Budapest	2006	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5362	kutya	orr	Budapest	2006	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5374	kutya	orr	Budapest	2006	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5377	kutya	orr	Magyarország	2006	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5380	kutya	orr	Budapest	2006	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5381	kutya	orr	Magyarország	2006	+	+	A	A	–	+	+	●	○	○
5460	kutya	tüdő	Budapest	2007	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5461	kutya	légcső	Budapest	2007	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5462	kutya	tüdő	Budapest	2007	+	+	A	<u>A</u>	–	±	+	●	○	○
5533	kutya	légcső	Magyarország	2009	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5534	kutya	orr	Vác	2009	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○

M1. táblázat: A *B. bronchiseptica* törzsek és a velük végzett vizsgálatok jellemzői (folytatás)

Törzs	A <i>B. bronchiseptica</i> törzsek eredete				Biokémia	Fajspecifikus PCR	PCR–RFLP típusok			PCR		Fenotípusos vizsgálatok		
	Gazdafaj	Szerv	Helyszín	Év			<i>fimA</i>	<i>flaA</i>	<i>cyaA</i>	<i>ptp</i>	<i>dnt</i>	HA	Motilitás	Antib. rez.
5535	kutya	orr	Vác	2009	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5536	kutya	orr	Vác	2009	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5537	kutya	orr	Vác	2009	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5538	kutya	orr	Vác	2009	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5587	kutya	orr	Budapest	2009	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5589	kutya	orr	Budapest	2009	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5590	kutya	orr	Budapest	2009	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5593	kutya	tüdő	Magyarország	2009	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5625	kutya	tüdő	Esztergom	2010	+	+	A	A	–	±	+	○	○	○
5626	kutya	garat	Kistarcsa	2010	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5628	kutya	orr	Budapest	2009	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5629	kutya	tüdő	Göd	2008	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5639	kutya	orr	Budapest	2005	+	+	A	A	–	+	+	○	○	○
5605	kutya	orr	Budapest	2010	+	+	<u>A</u>	<u>A</u>	–	+	+	○	○	○
NCTC 452*	kutya	tüdő	USA	1910'	nitrat –	+	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	–	+	●	○	○
Bb 11*	kutya	□	□	□	nitrat –	+	A	B	A	–	+	●	○	○
Bb 286*	kutya	□	□	□	+	+	A	D	<u>C</u>	–	+	●	○	○
Bb 335*	kutya	□	□	□	+	+	A	<u>A</u>	–	±	+	●	○	○
MBORD 591*	kutya	□	USA	□	+	+	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>B</u>	–	+	●	○	○
MBORD 685*	kutya	□	USA	□	+	+	A	<u>B</u>	A	–	+	●	○	○
MBORD 787*	kutya	□	Hollandia	□	+	+	A	A	A	–	+	●	○	○
MBORD 750*	kutya	□	Dánia	□	+	+	A	A	A	–	+	●	○	○
MBORD 843*	kutya	□	Svájc	□	+	+	A	A	–	±	+	●	○	○
RB 4032	nyúl	orr	Magyarország	1984	+	+	A	B	A	–	+	●	●	●

M1. táblázat: A *B. bronchiseptica* törzsek és a velük végzett vizsgálatok jellemzői (folytatás)

Törzs	A <i>B. bronchiseptica</i> törzsek eredete				Biokémia	Fajspecifikus PCR	PCR-RFLP típusok			PCR		Fenotípusos vizsgálatok		
	Gazdafaj	Szerv	Helyszín	Év			<i>fimA</i>	<i>flaA</i>	<i>cyaA</i>	<i>ptp</i>	<i>dnt</i>	HA	Motilitás	Antib. rez.
RBK-1	nyúl	orr	Ráckeve	1987	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5002	nyúl	orr	Budapest	1988	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5008	nyúl	orr	Ráckeve	1988	+	+	A	A	A	-	+	○	●	●
5020	nyúl	orr	Dunavarsány	1988	+	+	A	B	A	-	+	●	●	●
5023	nyúl	orr	Jászapáti	1988	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5024	nyúl	orr	Jászapáti	1988	+	+	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	-	+	●	●	●
5045	nyúl	orr	Környe	1988	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5092	nyúl	orr	Ócsa	1990	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5100	nyúl	orr	Ócsa	1990	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5107	nyúl	orr	Ócsa	1990	+	+	A	B	A	-	+	●	○	○
5117	nyúl	orr	Ócsa	1990	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5122	nyúl	orr	Ócsa	1990	+	+	A	B	A	-	+	●	○	○
5126	nyúl	orr	Ócsa	1990	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5137	nyúl	orr	Ócsa	1990	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5308	nyúl	orr	Ócsa	2005	+	+	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	-	+	●	●	●
5309	nyúl	orr	Ócsa	2005	+	+	A	A	A	-	+	○	●	●
5601	nyúl	orr	Gödöllő	2010	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5602	nyúl	orr	Gödöllő	2010	+	+	A	A	A	-	+	○	●	●
5603	nyúl	orr	Gödöllő	2010	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5604	nyúl	orr	Gödöllő	2010	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5612	nyúl	orr	Isaszeg	2010	+	+	A	A	A	-	+	○	●	●
5613	nyúl	orr	Isaszeg	2010	+	+	A	A	A	-	+	○	●	●
5614	nyúl	orr	Isaszeg	2010	+	+	A	A	A	-	+	○	○	○
5615	nyúl	orr	Isaszeg	2010	+	+	A	A	A	-	+	○	●	●

M1. táblázat: A *B. bronchiseptica* törzsek és a velük végzett vizsgálatok jellemzői (folytatás)

Törzs	A <i>B. bronchiseptica</i> törzsek eredete				Biokémia	Fajspecifikus PCR	PCR–RFLP típusok			PCR		Fenotípusos vizsgálatok		
	Gazdafaj	Szerv	Helyszín	Év			<i>fimA</i>	<i>flaA</i>	<i>cyaA</i>	<i>ptp</i>	<i>dnt</i>	HA	Motilitás	Antib. rez.
5617	nyúl	orr	Isaszeg	2010	+	+	A	A	A	-	+	○	●	●
5622	nyúl	orr	Isaszeg	2010	+	+	A	A	A	-	+	○	●	●
5630	nyúl	orr	Zagyvarékas	2007	+	+	A	A	A	-	+	○	●	●
5631	nyúl	tüdő	Litke	2006	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5633	nyúl	orr	Kerekegyháza	2006	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5634	nyúl	tüdő	Zsámbok	2006	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5636	nyúl	orr	Litke	2006	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5637	nyúl	tüdő	Etyek	2006	+	+	A	A	A	-	+	○	●	●
5648	nyúl	orr	Gyál	2011	+	+	A	A	A	-	+	○	●	●
5652	nyúl	orr	Szentmártonkáta	2011	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
5653	nyúl	orr	Szentmártonkáta	2011	+	+	A	<u>B</u>	<u>A</u>	-	+	○	●	●
5654	nyúl	orr	Szentmártonkáta	2011	+	+	A	B	A	-	+	○	●	●
Bb 9.73*	nyúl	□	Franciaország	1970'	+	+	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	-	+	●	●	●
Bb LC 2*	nyúl	□	□	□	+	+	A	A	A	-	+	●	●	●
Bb LC 3*	nyúl	□	□	□	+	+	A	A	A	-	+	●	●	●
CIP 52125*	nyúl	□	Franciaország	1950'	+	+	A	B	A	-	+	●	●	●
MBORD 704*	nyúl	□	USA	□	nitrát -	+	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	-	+	●	●	●
MBORD 730*	nyúl	□	Dánia	□	+	+	A	A	A	-	+	●	●	●
5491	tengerimalac	orr	Budapest	2008	+	+	A	C	A	-	+	●	○	○
5495	tengerimalac	orr	Budapest	2008	+	+	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	-	+	●	○	○
5497	tengerimalac	orr	Budapest	2008	+	+	A	C	A	-	+	○	○	○
NCTC 8750*	tengerimalac	tüdő	USA	1950'	nitrát -	+	A	<u>C</u>	A	-	+	●	○	○
MBORD 669*	tengerimalac	□	USA	□	+	+	A	C	A	-	+	●	○	○
MBORD 762*	tengerimalac	□	Írország	□	+	+	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	-	+	●	○	○

M1. táblázat: A *B. bronchiseptica* törzsek és a velük végzett vizsgálatok jellemzői (folytatás)

Törzs	A <i>B. bronchiseptica</i> törzsek eredete				Biokémia	Fajspecifikus PCR	PCR-RFLP típusok			PCR		Fenotípusos vizsgálatok		
	Gazdafaj	Szerv	Helyszín	Év			<i>fimA</i>	<i>flaA</i>	<i>cyaA</i>	<i>ptp</i>	<i>dnt</i>	HA	Motilitás	Antib. rez.
M 9	macska	□	Magyarország	1994	+	+	A	<u>C</u>	<u>A</u>	-	+	○	○	○
M 48	macska	□	Magyarország	1994	+	+	A	C	A	-	+	○	○	○
MBORD 635*	macska	□	USA	□	+	+	A	<u>C</u>	A	-	+	●	○	○
MBORD 970*	macska	□	Hollandia	□	+	+	A	<u>A</u>	<u>A</u>	-	+	●	○	○
Bb CVE*	ló	□	□	□	+	+	A	A	A	-	+	●	○	○
Bb CVI*	ló	□	□	□	+	+	A	<u>A</u>	<u>A</u>	-	+	●	○	○
Bb CV2*	ló	□	□	□	+	+	A	A	A	-	+	●	○	○
MBORD 628*	ló	□	USA	□	+	+	A	A	A	-	+	●	○	○
MBORD 898*	ló	□	Németország	□	+	+	A	<u>A</u>	A	-	+	●	○	○
MBORD 681*	koala	□	Ausztrália	□	+	+	A	C	A	-	+	●	○	○
MBORD 698*	koala	□	Ausztrália	□	+	+	A	C	A	-	+	●	○	○
MBORD 707*	pulyka	□	USA	□	+	+	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>C</u>	-	+	●	○	○
MBORD 901*	pulyka	□	Németország	□	+	+	A	<u>G</u>	<u>B</u>	-	-	●	○	○
5390	ember	orr	Szeged	2007	+	+	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>B</u>	-	-	●	○	○
Bb ALI*	ember	□	□	□	+	+	A	<u>H</u>	B	-	+	●	○	○
Bb DANG*	ember	□	□	□	+	+	A	<u>A</u>	A	-	+	●	○	○
Bb DEL*	ember	□	□	□	+	+	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	-	+	●	○	○
Bb REM*	ember	□	□	□	+	+	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	-	+	●	○	○
Bb VAL*	ember	□	□	□	+	+	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>B</u>	-	-	●	○	○
MBORD 675*	ember	□	Németország	□	+	+	A	<u>D</u>	B	-	-	●	○	○

□: nincs ismert adat; +: pozitív eredmény; -: negatív eredmény; ●: a vizsgálatot elvégeztük az adott törzssel; ○: a vizsgálatot nem végeztük el az adott törzssel; *: külföldi törzsek; antib. rez.: antibiotikum-rezisztencia

M2. táblázat: Nyúl eredetű *B. bronchiseptica* törzsek antibiotikum-érzékenységi vizsgálatának milliméter pontosságban megadott eredményei

Törzs	A vizsgálat során felhasznált antibiotikum korongok és a <i>B. bronchiseptica</i> -ra vonatkozó határértékek (mm)													
	PEN 10	AMP 10	FUR 30	VAN 30	COL 10	NEO 30	TET 30	ERY 15	L 2	FLM 30	ENO 5	NAL 30	SMX 300	COT 25
	14 ≤ ≤ 15	13 ≤ ≤ 17	17 ≤ ≤ 21	9 ≤ ≤ 12	8 ≤ ≤ 11	12 ≤ ≤ 17	14 ≤ ≤ 19	13 ≤ ≤ 23	9 ≤ ≤ 15	16 ≤ ≤ 20	16 ≤ ≤ 21	13 ≤ ≤ 19	12 ≤ ≤ 17	10 ≤ ≤ 16
RBK-1	0	13	0	0	18	22	33	16	0	20	27	22	45	31
RB 4032	0	18	0	0	19	22	35	18	0	21	30	22	50	32
5002	0	11	0	0	26	22	35	15	0	24	29	25	51	32
5008	0	20	0	0	18	22	33	18	0	21	26	23	49	31
5020	0	0	0	0	19	24	34	18	0	20	27	24	48	35
5023	0	13	0	0	21	22	31	20	0	23	29	27	48	39
5024	0	0	0	0	21	21	36	20	0	25	32	30	52	36
5045	0	11	0	0	17	24	33	18	0	23	22	22	41	35
5092	0	10	0	0	20	24	37	11	0	25	28	19	54	39
5100	0	12	0	0	19	24	36	17	0	24	27	24	47	32
5117	0	18	0	0	18	25	38	25	0	23	29	27	47	38
5126	0	12	0	0	19	22	34	24	0	23	30	29	50	33
5137	0	10	0	0	20	22	30	22	0	26	33	30	47	34
5308	0	12	0	0	19	22	33	17	0	21	27	24	48	35
5309	0	15	0	0	19	21	32	17	0	21	27	23	50	34
5601	0	19	0	0	20	23	35	25	0	26	30	28	52	37
5602	0	0	0	0	20	21	38	21	0	26	30	27	50	36
5603	0	17	0	0	20	23	38	30	0	30	34	32	51	35
5604	0	18	0	0	19	24	36	28	0	28	33	31	50	35
5612	0	9	0	0	19	25	34	17	0	22	28	23	42	32
5613	0	8	0	0	18	23	31	17	0	20	26	24	40	30
5615	0	11	0	0	20	22	34	17	0	22	21	24	48	33
5617	0	8	0	0	18	21	33	16	0	23	28	24	46	31
5622	0	13	0	0	19	21	32	15	0	23	28	22	49	35
5630	0	11	0	0	19	23	35	19	0	25	28	22	46	33
5631	0	15	0	0	19	23	34	25	0	23	29	25	46	36
5633	0	18	0	0	19	22	35	30	0	28	32	31	48	36

M2. táblázat: Nyúl eredetű *B. bronchiseptica* törzsek antibiotikum-érzékenységi vizsgálatának milliméter pontosságban megadott eredményei (folytatás)

Törzs	A vizsgálat során felhasznált antibiotikum korongok és a <i>B. bronchiseptica</i> -ra vonatkozó határértékek (mm)													
	PEN 10	AMP 10	FUR 30	VAN 30	COL 10	NEO 30	TET 30	ERY 15	L 2	FLM 30	ENO 5	NAL 30	SMX 300	COT 25
	14 ≤ ≤ 15	13 ≤ ≤ 17	17 ≤ ≤ 21	9 ≤ ≤ 12	8 ≤ ≤ 11	12 ≤ ≤ 17	14 ≤ ≤ 19	13 ≤ ≤ 23	9 ≤ ≤ 15	16 ≤ ≤ 20	16 ≤ ≤ 21	13 ≤ ≤ 19	12 ≤ ≤ 17	10 ≤ ≤ 16
5634	0	16	0	0	20	21	39	24	0	26	34	29	54	39
5636	0	20	0	0	19	24	37	29	0	26	32	27	50	32
5637	0	0	0	0	19	21	33	20	0	24	29	26	43	32
5648	0	10	0	0	19	21	34	18	0	25	30	25	45	34
5652	0	25	0	0	19	22	29	31	0	26	29	28	0	0
5653	0	22	0	0	19	21	29	30	0	23	31	29	0	0
5654	0	13	0	0	18	22	36	15	0	23	20	23	45	35
Bb 9.73*	0	7	0	0	20	23	31	20	0	24	28	25	46	33
Bb LC2*	0	0	0	0	20	23	32	18	0	25	31	25	40	29
Bb LC3*	0	7	0	0	20	24	33	20	0	24	30	25	41	30
CIP 52.125*	0	7	0	0	19	24	35	18	0	23	28	25	45	34
MBORD 704*	0	0	0	0	19	25	31	17	0	30	34	31	43	32
MBORD 730*	0	0	0	0	18	22	33	17	0	21	27	24	46	31

fehér: érzékeny; világosszürke: mérsékelten érzékeny; sötétszürke: rezisztens; *: külföldi törzsek

M3. táblázat: Sertés eredetű *B. bronchiseptica* törzsek antibiotikum-érzékenységi vizsgálatának milliméter pontosságban megadott eredményei

Törzs	A vizsgálat során felhasznált antibiotikum korongok és a <i>B. bronchiseptica</i> -ra vonatkozó határértékek (mm)													
	PEN 10	AMP 10	FUR 30	VAN 30	COL 10	NEO 30	TET 30	ERY 15	L 2	FLM 30	ENO 5	NAL 30	SMX 300	COT 25
	14 ≤ ≤ 15	13 ≤ ≤ 17	17 ≤ ≤ 21	9 ≤ ≤ 12	8 ≤ ≤ 11	12 ≤ ≤ 17	14 ≤ ≤ 19	13 ≤ ≤ 23	9 ≤ ≤ 15	19 ≤ ≤ 24	16 ≤ ≤ 23	13 ≤ ≤ 19	12 ≤ ≤ 17	10 ≤ ≤ 16
5036	0	9	0	0	17	16	34	16	0	20	26	26	49	40
5046	0	0	0	0	16	16	32	16	0	24	26	26	54	34
5087	0	0	0	0	17	16	36	18	0	22	28	26	51	34
5190	0	10	0	0	15	24	38	16	0	26	30	26	54	40
5234	0	0	0	0	18	16	0	16	0	24	30	26	0	0
5250	0	0	0	0	16	20	30	9	0	13	22	9	52	42
5279	0	0	0	0	16	14	34	16	0	24	28	26	47	34
5444	0	9	0	0	17	20	34	18	0	21	26	26	54	40
5484	0	17	0	0	19	16	36	22	0	26	26	30	0	0
5485	0	0	0	0	16	22	34	15	0	24	28	24	52	38
5487	0	20	0	0	16	16	36	22	0	26	26	28	0	0
5496	0	0	0	0	14	16	36	16	0	24	28	26	54	38
5500	0	0	0	0	16	14	34	14	0	20	28	24	0	0
5609	0	10	0	0	16	16	34	16	0	26	34	26	54	32
5647	0	9	0	0	21	18	36	9	0	22	26	24	0	0

fehér: érzékeny; világosszürke: mérsékelten érzékeny; sötétszürke: rezisztens

M4. táblázat: A *B. bronchiseptica* törzsekkel végzett hemagglutinációs vizsgálatok eredményei

Törzs	Gazdafaj	A hemagglutinációs vizsgálatokhoz felhasznált vértípusok									
		humán A	humán B	humán 0	szm	juh	sertés	nyúl	kutya	ló	csirke
CE	sertés	3	3	4	3	4	4	3	4	3/3/3	2
FG 5	sertés	3	4/4	4	3	2/4	4/4	4	4/4	3/3/3/3	2
PV 6	sertés	4	4/4	4	3/0	2/0	4/4	4	4/4	4/3/1/3	0
B 58	sertés	4	4/4	4	3/3	4/4	4/4	4	4/4	4/3/0/4	0
KM 22	sertés	3	3/3	3	0/0/1	4/4	4/4	□	4/4	3/3/3/3	1
5036	sertés	2	3	4	0/0/0	4	□	3	4	3/3	1
5141	sertés	3	3	3	4/4/4/0/4	3	3	3	4	3/3/3	2
5230	sertés	4	3	3	4/4/4/4/4	4	4	4	4	0/0/0	0
5240	sertés	3	3	4	4/4/4/4/4	4	3	3	3	3/3/3	2
5262	sertés	3	3/3	4	0/2/0/0/0	3/3	4/4	□	4/4	3/3/0/3	1
5269	sertés	3	3	3	0	4	3	4	4	3/0/3	2
5323	sertés	3	3	3	0/0	3	3	3	4	3/0/2	2
5356	sertés	3	3	3	0/0	3	3	3	4	3/3/3	3
5463	sertés	2	3	3	0/0	3	4	3	3	3/3/3	0
5470	sertés	3	3	3	0/0	3	3	3	3	3/3/3	3
5493	sertés	2	3	3	0/0	4	3	3	4	3/3/3	2
5500	sertés	2	2	3	0/0	3	3	3	4	1/3/2	0
5505	sertés	3	3	3	0/0	4	3	3	3	2/1/3	2
4607*	sertés	4	4	4	3/3	4	3	4	4	0/0/0	0
4609*	sertés	3	3/3	3	3/3	4/4	4/4	4	4/4	3/3/0/3	0
DAN*	sertés	3	3/3	3	4/4	2/4	4/4	4	3/3	2/3/4/3	2
Boxtel*	sertés	3	3	4	4/4	4	4	4	4	1/3/3	0
Bb 46093*	sertés	4	4	3	0/3	3	3	4	4	3/3	3
Bb MH 7*	sertés	3	3	3	0/4	4	3	4	4	2/2	2

M4. táblázat: A *B. bronchiseptica* törzsekkel végzett hemagglutinációs vizsgálatok eredményei (folytatás)

Törzs	Gazdafaj	A hemagglutinációs vizsgálatokhoz felhasznált vértípusok									
		humán A	humán B	humán 0	szm	juh	sertés	nyúl	kutya	ló	csirke
Bb IM 5*	sertés	3	3	3	1	4	3	3	4	3 / 3	3
Bb GF 8*	sertés	2	3	3	1	3	3	3	4	2 / 2	2
Bb Bgl*	sertés	4	3	3	2 / 2	4	3	3	3	0 / 0	0
Bb 5*	sertés	3	3	3	3	4	3	3	4	2 / 2	2
Bb 12*	sertés	3	3	3	2 / 2	3	4	4	4	1 / 1	2
MBORD 676*	sertés	3	3	3	4 / 0 / 3	4	4	4	4	0 / 0 / 0	0
Bö/3o	kutya	2	4 / 2	3	4 / 4 / 4 / 4	4 / 4	3 / 3	3	4 / 4	4 / 0 / 0 / 2	1
5340	kutya	3	3 / 3	3	0 / 3	3 / 3	3 / 3	□	3 / 3	2 / 2 / 0 / 3	0
5339	kutya	3	3 / 3	3	0 / 0	3 / 3	4 / 2	3	3 / 3	2 / 2 / 0 / 2	0
5381	kutya	4	3 / 3	3	0 / 0	4 / 4	4 / 2	3	4 / 4	3 / 2 / 0 / 2	2
5462	kutya	3	3 / 3	2	0 / 4	4 / 4	3 / 3	□	4 / 4	3 / 3 / 3 / 3	2
NCTC 452*	kutya	1	1 / 1	1	1 / 2 / 0 / 0 / 1	0 / 1	3 / 3	3	3 / 3	0 / 0 / 0	0
Bb 11*	kutya	3	3 / 3	3	2 / 4	3 / 3	3 / 3	3	4 / 4	3 / 3 / 3	3
Bb 286*	kutya	3	3 / 3	3	2	1 / 3	4 / 4	3	3 / 3	3 / 3 / 3	2
Bb 335*	kutya	3	3 / 3	3	4 / 4 / 4 / 0 / 3	3 / 3	3 / 3	□	4 / 4	3 / 3 / 3	2
MBORD 843*	kutya	2	3 / 3	3	3 / 3	3 / 3	4 / 4	4	4 / 4	0 / 0 / 0	0
MBORD 750*	kutya	2	3 / 3	3	4	4 / 4	4 / 4	4	4 / 4	0 / 0 / 0	0
MBORD 685*	kutya	3	3 / 3	3	4 / 2 / 3	4 / 4	4 / 4	4	4 / 4	0 / 0 / 0	0
MBORD 787*	kutya	4	4 / 4	4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4	4 / 4	2 / 3 / 0 / 3	0
MBORD 591*	kutya	4	4 / 4	4	4 / 0 / 4	1 / 0	4 / 4	4	4 / 4	4 / 4 / 0 / 4	0
RB 4032	nyúl	3	4	3 / 3	3 / 3	2 / 2	3	3 / 3	4	2 / 2 / 2	2
5020	nyúl	2	3	3 / 3	4 / 2 / 3	3 / 3	□	3 / 3	4	2 / 2	2
5024	nyúl	3	3	3 / 3	0 / 0 / 0	3 / 3	□	3 / 3	4	3 / 3	3
5107	nyúl	2	3 / 3	3	0 / 0 / 0	3 / 3	3 / 3	□	4 / 4	3 / 3 / 0 / 3	1

M4. táblázat: A *B. bronchiseptica* törzsekkel végzett hemagglutinációs vizsgálatok eredményei (folytatás)

Törzs	Gazdafaj	A hemagglutinációs vizsgálatokhoz felhasznált vértípusok									
		humán A	humán B	humán 0	szm	juh	sertés	nyúl	kutya	ló	csirke
5122	nyúl	3	3/3	3	0/0/0	4/4	4/4	▫	4/4	3/3/1/2	1
5308	nyúl	2	2	0/3	0	0/3	3	1/3	1	3/3/3	3
Bb 9.73*	nyúl	3	3	3/3	0/0	3/3	3	3/3	4	1/3	2
Bb LC 2*	nyúl	3	3	3/3	0/0	3/3	3	3/3	4	2/2	2
Bb LC 3*	nyúl	2	3	3/3	0/0/0/0	2/4	3	3/3	4	2/2	3
CIP 52125*	nyúl	2	3	0/3	3	0/4	3	3/3	3	3/3	2
MBORD 730*	nyúl	2	1/3	3/3	3/3/3/0/0	4/4/4	3/3	3/3	3/3	0/0/0	0
MBORD 704*	nyúl	3	3	2/2	3/3/3/3	1/4	4	2/2	3	0/0/0	0
5491	tengerimalac	3	3	3	0/0	3	2	3	3	1/3/3	3
5495	tengerimalac	2	2/2	3	2/0	1/3	3/3	▫	3/3	2/1/0/3	1
NCTC 8750*	tengerimalac	4	3/3	3	3/3	4/4	4/4	▫	4/4	0/0/0	0
MBORD 669*	tengerimalac	3	4	3	4/2/3	3	3	4	4	0/0/0	0
MBORD 762*	tengerimalac	3	3	4	3/4/4/0/2	4	4	4	4	0/0/0	0
MBORD 635*	macska	4	4	4	3/3/3/3/3	0	3	4	4	0/0/0	0
MBORD 970*	macska	3	4	4	4/2	4	4	4	4	0/0/0	0
Bb CVE*	ló	3	3/3	3	4/4/4/0/2	3/3	4/4	▫	4/4	2/2/2	1
Bb CVI*	ló	4	4	3	0/2/0/0/0	3	3	4	4	2/2	2
Bb CV2*	ló	4	4	4	3	4	4	3	4	2/4	2
MBORD 628*	ló	3	3	3	4	4	3	4	4	0/0/0	0
MBORD 898*	ló	4	4	4	3/3/3/0/2	4	4	4	3	0/0/0	0
MBORD 681*	koala	3	3	3	4	4	3	4	4	1/4/3	1
MBORD 698*	koala	3	3/3	3	3/3/3/3	4/4	3/3	4	4/4	2/2/4/3	2
MBORD 707*	pulyka	0	0	0	4/4	0	0	2	4	0/0/0	1
MBORD 901*	pulyka	0	0	0	4/0/3	0	0	0	3	0/0/0	0

M4. táblázat: A *B. bronchiseptica* törzsekkel végzett hemagglutinációs vizsgálatok eredményei (folytatás)

Törzs	Gazdafaj	A hemagglutinációs vizsgálatokhoz felhasznált vértípusok									
		humán A	humán B	humán 0	szm	juh	sertés	nyúl	kutya	ló	csirke
5390	ember	4	3 / 3	3	0 / 3	3 / 0	4 / 4	▫	3 / 3	4 / 3 / 0 / 2	0
Bb ALI*	ember	3	3	2	2 / 0 / 0 / 2	2	4	3	3	2 / 2	2
Bb DANG*	ember	2	2 / 2	2	3 / 4 / 3 / 0 / 3	3 / 3	3 / 3	▫	4 / 4	1 / 0 / 1	1
Bb DEL*	ember	2	2	2	3	3	4	3	3	1 / 3	2
Bb REM*	ember	3	3	3	0 / 0 / 0 / 0	4	3	4	3	2 / 2	2
Bb VAL*	ember	4	4	3	2 / 2	3	4	3	4	4 / 4	2
MBORD 675*	ember	0	0	0	4 / 4	0	0	0	3	0 / 0 / 0	0

0: negatív reakció, 1: gyenge reakció, 2: közepesen erős reakció, 3: erős reakció, 4: teljes hemagglutináció

*: külföldi törzsek; ▫: nincs adat

M5. táblázat: A *B. bronchiseptica* törzsekkel végzett mozgásképeség vizsgálat eredményei

Törzs	A tenyésztés körülményei (táptalaj és hőmérséklet °C-ban)											
	LB+MgSO ₄ -24			LB-24			LB+MgSO ₄ -37			LB-37		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
RBK-1	3	3	0	6	5	4	5	6	3	9	9	5
RB 4032	3	3	2	1	5	2	2	6	3	10	8	4
5002	4	2	3	3	4	3	5	4	4	8	6	5
5008	4	3	2	7	6	3	4	5	3	5	4	5
5020	2	3	2	6	3	2	5	6	2	10	6	6
5023	2	0	2	8	6	5	5	6	3	14	7	6
5024	3	1	2	3	4	1	5	5	2	8	5	8
5045	4	5	2	4	5	2	6	6	2	7	7	7
5092	2	4	2	6	6	3	5	8	3	8	5	9
5100	4	5	1	1	5	0	3	7	3	8	5	6
5117	2	0	2	3	0	2	4	4	3	7	4	5
5126	3	3	2	4	0	2	2	5	2	6	5	3
5137	0	3	2	3	0	2	4	6	4	7	9	5
5308	2	3	2	2	4	2	5	5	3	8	7	5
5309	0	2	0	2	0	3	3	5	2	5	5	3
5601	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5602	1	2	2	1	3	3	4	5	2	4	9	4
5603	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5604	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5612	3	2	2	2	3	2	5	7	0	6	6	4
5613	2	4	1	2	4	1	3	4	2	4	10	4
5615	1	1	2	1	2	3	5	4	3	5	5	5
5617	3	3	1	1	4	3	6	7	2	8	9	5
5622	4	3	2	2	6	3	7	7	3	8	11	3

M5. táblázat: A *B. bronchiseptica* törzsekkel végzett mozgásképeség vizsgálat eredményei (folytatás)

Törzs	A tenyésztés körülményei (táptalaj és hőmérséklet °C-ban)											
	LB+MgSO ₄ -24			LB-24			LB+MgSO ₄ -37			LB-37		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
5630	2	2	2	2	3	3	3	2	2	8	6	5
5631	2	2	1	2	4	2	4	4	2	3	5	3
5633	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5634	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5636	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	3
5637	1	3	2	3	5	3	4	8	4	12	6	5
5648	3	4	2	2	4	4	4	7	3	7	9	7
5652	3	2	2	2	2	1	4	5	4	6	7	3
5653	3	3	1	1	3	3	2	6	2	4	7	3
5654	1	4	2	2	5	3	4	7	4	12	6	8
Bb 9.73*	3	3	2	3	5	4	5	6	3	10	7	7
Bb LC2*	2	5	2	3	7	5	5	6	4	9	8	6
Bb LC3*	3	2	2	2	6	3	5	5	3	10	9	7
CIP 52.125*	2	3	1	3	4	3	2	5	4	10	4	6
MBORD 704*	5	4	2	3	3	3	5	5	5	5	7	7
MBORD 730*	5	3	2	1	2	3	6	6	4	6	6	6

Az eredményeket milliméter pontossággal olvastuk le

LB: Luria-Bertani táptalaj; I-II-III: az egyes ismétlések; *: külföldi törzsek

M6. táblázat: A genetikai vizsgálatokhoz felhasznált génbanki szekvenciák

Törzs	Génbanki kód	Gazdafaj	Gén	Hossz (bp)	Referencia
B15	AF022304	sertés	<i>fimA</i>	960	Boschwitz és mtsai., 1997
GP1	AF111796	tengerimalac	<i>fimA</i>	12 256	Boschwitz és mtsai., 1997
SB22	AF232939	macska	<i>flaA</i>	1045	Winstanley és mtsai., 2001
SB521	AF232940	macska	<i>flaA</i>	1045	Winstanley és mtsai., 2001
SB283	AF232941	macska	<i>flaA</i>	1051	Winstanley és mtsai., 2001
Bb BIE	AJ303058	ember	<i>cyaA</i>	2554	Chenal-Francisque és mtsai., 2009
Bb CAT 1	AJ303059	macska	<i>cyaA</i>	2554	Chenal-Francisque és mtsai., 2009
Bb GAN	AJ303062	ember	<i>cyaA</i>	2554	Chenal-Francisque és mtsai., 2009
Bb LAPR	AJ303063	nyúl	<i>cyaA</i>	2554	Chenal-Francisque és mtsai., 2009
Bb LORD	AJ303064	ember	<i>cyaA</i>	2554	Chenal-Francisque és mtsai., 2009
Bb SEI	AJ303065	ember	<i>cyaA</i>	2554	Chenal-Francisque és mtsai., 2009
FR3539	FM165654	ember	<i>cyaA</i>	2554	Chenal-Francisque és mtsai., 2009
FR2011	FM165655	ember	<i>cyaA</i>	2554	Chenal-Francisque és mtsai., 2009
RN014	FM165656	ember	<i>cyaA</i>	2554	Chenal-Francisque és mtsai., 2009
FR3474	FM165657	ember	<i>cyaA</i>	2554	Chenal-Francisque és mtsai., 2009
RB50	NC_002927	nyúl	teljes genom	5 339 179	Parkhill és mtsai., 2003
253	HE965806	kutya	teljes genom	5 264 383	Park és mtsai., 2012
MO149	HE965807	ember	teljes genom	5 091 817	Park és mtsai., 2012
1289	HE983626	majom	teljes genom	5 208 522	Park és mtsai., 2012
D445	HE983627	ember	teljes genom	5 243 194	Park és mtsai., 2012
Bbr77	HE983628	ember	teljes genom	5 115 717	Park és mtsai., 2012

M7. táblázat: A GenBank adatbázisba általunk feltöltött *B. bronchiseptica* szekvenciák

Törzs	Gazdafaj	Génbanki szekvenciakódok			
		<i>fimA</i>	<i>flaA</i>	<i>cyaA</i>	<i>ptp</i>
KM22	sertés	KF211383	JX673973	KF220457	-
PV6	sertés	KF211394	JX673965	KF220470	-
5500	sertés	KF211389	JX673970	KF220455	-
5356	sertés	KF211390	JX673971	KF220450	-
5594	sertés	•	•	KF220452	-
5599	sertés	•	JX673969	•	-
Bb Bgl	sertés	•	JX673972	KF220453	-
5339	kutya	KF211388	JX673956	-	•
5340	kutya	•	JX673953	-	KF220476
5462	kutya	•	JX673954	-	KF220477
5605	kutya	KF211384	JX673955	-	•
5625	kutya	•	•	-	KF220479
Bb 286	kutya	•	•	KF220468	-
Bb 335	kutya	•	JX673957	-	KF220478
NCTC 452	kutya	KF211382	KF211397	KF220467	-
MBORD 591	kutya	KF211391	JX673961	KF220473	-
MBORD 685	kutya	•	KF211399	•	-
MBORD 843	kutya	•	•	-	KF220475
5024	nyúl	KF211387	JX673974	KF220456	-
5308	nyúl	KF211378	KF211396	KF220463	-
5653	nyúl	•	JX673968	KF220451	-
MBORD 704	nyúl	KF211386	KF211400	KF220454	-
Bb 9.73	nyúl	KF211375	JX673952	KF220464	-
5495	tengerimalac	KF211379	JX673978	KF220459	-
NCTC 8750	tengerimalac	•	JX673977	•	-
MBORD 762	tengerimalac	KF211381	KF211401	KF220461	-
M48	macska	KF211380	JX673981	KF220458	-
MBORD 635	macska	•	JX673980	•	-
MBORD 970	macska	•	KF211398	KF220465	-
Bb CVI	ló	KF211385	JX673959	KF220466	-
MBORD 898	ló	•	JX673958	•	-
MBORD 707	pulyka	KF211395	JX673975	KF220469	-
MBORD 901	pulyka	•	JX673966	KF220472	-
5390	ember	KF211393	JX673964	KF220471	-
Bb DEL	ember	KF211376	JX673967	KF220460	-
Bb REM	ember	KF211377	JX673979	KF220462	-
Bb VAL	ember	KF211392	JX673963	KF220474	-
Bb ALI	ember	•	JX673976	•	-
Bb DANG	ember	•	JX673960	•	-
MBORD 675	ember	•	JX673962	•	-

•: a törzs adott génjét nem szekvenáltuk meg; -: a törzs nem rendelkezik az adott génnel;
fimA, *flaA*, *cyaA* és *ptp* a vizsgált génszakaszok