

**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Emlősökből izolált *Pasteurella multocida* törzsek  
összehasonlító jellemzése**

**PhD értekezés**

**Ujvári Barbara**

**2021**

Témavezető:

.....

Dr. Magyar Tibor

ATK Állatorvos-tudományi Intézet

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

.....

Ujvári Barbara

## Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék .....	3
Összefoglalás .....	4
Summary .....	6
<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Történet .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2. A kórokozó tulajdonságai .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3. Járványtan .....</b>	<b>13</b>
2.3.1. A szarvasmarhák légzőszervi megbetegedése .....	13
2.3.2. A <i>P. multocida</i> okozta vérzéses vérfertőzés .....	14
2.3.3. Torzító orrgyulladás .....	17
2.3.4. Baromfikolera .....	17
2.3.5. Házinyulak pasteurellosisa .....	18
2.3.6. A <i>P. multocida</i> zoonótikus potenciálja .....	18
<b>2.4. Kórjelzés .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5. A kórokozó jellemzése .....</b>	<b>19</b>
2.5.1. Szerotipizálás .....	19
2.5.2. Genotipizáló vizsgálatok .....	20
2.5.2.1. RAPD-PCR .....	20
2.5.2.2. ERIC-PCR .....	21
2.5.2.3. Multi-lókusz szekvencia tipizálás (MLST) .....	21
2.5.2.4. Teljes genom szekvenálás .....	22
<b>2.6. Gyógyítás, megelőzés, védekezés .....</b>	<b>23</b>
2.6.1. Gyógykezelés .....	23
2.6.2. Vakcinák .....	26
<b>3. Anyag és módszer .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. A felhasznált baktériumtörzsek .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. A törzsek tenyésztése és azonosítása .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3. A törzsek fenotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok .....</b>	<b>28</b>
3.3.1. Telepmorfológiai vizsgálatok .....	28
3.3.2. Biokémiai tulajdonságok vizsgálata .....	28
3.3.3. A szerotípus meghatározása .....	29
3.3.4. Az antibiotikum-érzékenység vizsgálata .....	30
Antibiotikum-érzékenység meghatározása korongdiffúziós módszerrel .....	30
<b>3.4. A törzsek genotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok .....</b>	<b>31</b>
3.4.1. DNS izolálás .....	31
3.4.2. Polimeráz láncreakciók .....	32
3.4.4. Multi-lókusz szekvencia tipizálás .....	39
3.4.5. Plazmid izolálás .....	41
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1. A baktériumok azonosítása .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2. A baktériumok fenotípusos vizsgálatainak eredményei .....</b>	<b>43</b>
4.2.1. A buroktípus meghatározása .....	43
4.2.2. A szerotípus meghatározása .....	43
4.2.3. A buroktípusok és LPS genotípusok kombinálása .....	43
<b>4.3. A baktériumok genotípusának meghatározása .....</b>	<b>44</b>
4.3.1. A toxingén kimutatása .....	44
4.3.2. Virulenciagén profil meghatározás .....	45
4.3.3. Szekvencia-meghatározás és filogenetikai elemzés .....	48

4.3.4.	Humán esetekből származó <i>P. multocida</i> izolátumok .....	49
4.3.5.	B:2 típusú <i>P. multocida</i> törzsek.....	51
4.3.6.	Az antibiotikum-érzékenység vizsgálata .....	52
4.3.6.1.	Korongdiffúziós tesztek eredménye.....	52
4.3.6.2.	Multirezisztens <i>P. multocida</i> törzs (Pm238) vizsgálata.....	57
<b>5.</b>	<b>Megvitatás .....</b>	<b>60</b>
5.1.	Virulenciagén profil meghatározás és <i>ompA</i> szekvencia elemzés .....	60
5.2.	Humán esetekből izolált <i>P. multocida</i> törzsek jellemzése.....	64
5.3.	B buroktípusú <i>P. multocida</i> törzsek jellemzése .....	65
5.4.	Antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok.....	68
5.4.1.	Korongdiffúziós tesztek.....	68
5.4.2.	Multirezisztens <i>P. multocida</i> törzs vizsgálata (Pm238).....	72
<b>6.</b>	<b>Új tudományos eredmények.....</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>A doktori kutatás eredményeiből született közlemények .....</b>	<b>91</b>
8.1.	Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk.....	91
8.2.	A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó publikációk .....	91
8.3.	Konferencia prezentációk .....	92
8.4.	Akadémiai beszámolók.....	93
<b>9.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>94</b>
<b>10.</b>	<b>Mellékletek.....</b>	<b>95</b>

## Rövidítésjegyzék

AGP	agargél-precipitáció	agar gel precipitation
bp	bázispár	base pair
BRDC	szarvasmarhák légzőszervi megbetegedés-komplexe	bovine respiratory disease complex
CLSI		Clinical and Laboratory Standards Institute
DNS	dezoxiribonukleinsav	deoxyribonucleic acid
dNTP	dezinukleotid-trifoszfát	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	tris-bórsav-EDTA puffer	tris-borate-EDTA buffer
ELISA	enzimkötött immunoassay vizsgálat	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERIC	enterobaktériumokban leírt repetitív intergénikus konszenzus szekvencia	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence
ICE	integratív-konjugatív elem	integrative-conjugative element
LPS	lipopoliszacharid	lipopolysaccharide
MIC	minimális gátló koncentráció	minimal inhibitory concentration
MLST	multi-lókuszos szekvencia tipizálás	Multi-Locus Sequence Typing
mtsai.	munkatársai	<i>et alii</i>
OMP	külső membrán fehérje	outer membrane protein
PCR	polimeráz láncreakció	polymerase chain reaction
RFLP	restrikciós fragmenthossz polimorfizmus	restriction fragment length polymorphism
PFGE	pulzáló mezejű gélelektroforézis	pulsed field gel electrophoresis
PMT	<i>P. multocida</i> toxin	<i>P. multocida</i> toxin
QRDR	kinolon rezisztencia determináló régió	quinolone resistance determining region
RAPD	random amplifikált polimorf DNS	Random Amplified Polymorphic DNA
REP-PCR	repetitív extragenikus palindrom PCR	repetitive extragenic palindromic PCR
RIRDC		Rural Industries Research and Development Corporation
rRNS	riboszomális ribonukleinsav	ribosomal ribonucleic acid
SNP	egy nukleotidot érintő polimorfizmus	single nucleotide polymorphism
ST	szekvencia típus	sequence type
TBE	tris-bórsav-EDTA puffer	tris-borate-EDTA buffer
VGP	virulenciagén profil	virulence gene profile
WGS	teljes genom szekvenálás	whole genome sequencing

## Összefoglalás

A *Pasteurella multocida* egy világszerte előforduló baktériumfaj, mely számos madár és emlősfajt képes megbetegíteni. A kialakuló tünetek súlyossága függ a betegséget okozó baktériumtörzsek virulenciájától és a környezeti tényezőktől, azonban a kórokozó széles körű elterjedése miatt a megbetegedések komoly gazdasági károkat okozhatnak.

Munkánk célja a különböző gazdafajokból izolált és eltérő földrajzi területekről származó *P. multocida* törzsek fenotípus- és genotípusjellemzőkkel történő jellemzése volt, valamint a kórokozó antibiotikum-rezisztencia viszonyainak vizsgálata.

A vizsgálatokba bevont törzseket fajspecifikus polimeráz láncreakció (PCR) segítségével azonosítottuk, majd fenotípusos tulajdonságaikat vizsgáltuk. PCR-ek alkalmazásával vizsgáltuk a törzsek buroktípusát, valamint lipopoliszacharid (LPS) genotípusát is, utóbbit egyes esetekben agargél precipitációs módszerrel végzett szomatikus szerotípus meghatározással is kiegészítettük. A különböző buroktípus : LPS genotípus kombinációk előfordulását a gazdafajokra lebontva is meghatároztuk. A *P. multocida* toxint kódoló *toxA* génszakaszt csak sertés és kiskérődző eredetű törzsekben tudtuk kimutatni. A *P. multocida* feltételezett virulenciafaktorainak vizsgálata során összesen 13 különböző virulenciagén profilt tudtunk azonosítani, melyek kevés kivétellel csak egy-egy gazdafajra voltak jellemzőek. Az *ompA* génszakasz szekvencia elemzése során összesen 25 egyedi, de közeli rokonságot mutató szekvencia típus volt elkülöníthető, melyek kilenc klasztert alkottak. Ezek összefüggést mutattak a virulenciagén profilokkal és a törzsek gazdafaji eredetével. Részletesen vizsgáltunk humán esetekből izolált *P. multocida* törzseket is, melyek fenotípusos tekintetben is nagyobb változatosságot mutattak.

A *P. multocida* által okozott, eddig hazánkban nem tapasztalt megbetegedés kóroktanát vizsgáltuk háztáji sertésállományokban. Három, különböző állományból származó baktériumtörzset *P. multocida* ssp. *multocida*ként határoztunk meg. A törzsek mindegyike B buroktípusúnak és 2-es szomatikus szerotípusúnak bizonyult. A Multi-host multi-lókuszos szekvencia tipizálás (MLST) vizsgálat során kapott adatok alapján egy új szekvencia típust (ST61) írtunk le. A RIRDC MLST séma alkalmazásával a vizsgált törzseket a vérzéscsökkentést okozó *P. multocida* törzsekre jellemző 122-es szekvencia típusba soroltuk be. Három évvel később szarvasmarha vérzéscsökkentés esetekből származó *P. multocida* törzseket vizsgáltunk. A megbetegedés egy telepre korlátozódott, földrajzilag ~130 km-re nyugatra a sertésekben leírt esetek azonosítási helyétől, és nem volt ismert kapcsolat a telepek között. Az állományból származó baktériumtörzseket a vérzéscsökkentés esetekre jellemző B buroktípussal és 2-es szerotípussal rendelkező *P. multocida* ssp. *multocida*ként határoztunk meg. A Multi-host MLST vizsgálat során kapott adatok alapján egy új szekvencia

típust (ST64) írtunk le, mely egy allélban tér el (*aroA*) a háztáji sertésekben azonosított ST61-től.

A *P. multocida* törzsek antibiotikum-érzékenységét korongdiffúziós módszerrel határoztuk meg. Vizsgálataink alapján a törzsek nagy többsége érzékeny volt florfenikolra (98,7%), kloramfenikolra (93,7%), ampicillinre (91,8%), penicillinre (91,1%), enrofloxacinra (88,6%) ceftiofurra (88%), tularomicinre (79,1%), tetraciklinre (86,7%), tilmikozinra (86,1%), és doxiciklinre (82,9%). A gentamicin, eritromicin, sztreptomycin és nalidixsav kevésbé bizonyultak hatékonyak (44,9%, 23,4%, 27,2% és 13,9% rezisztencia), ugyanakkor a mérsékelten érzékeny törzsek aránya magas volt eritromicinre (71,5%) és gentamicinre (32,3%) is. A törzsek nagy számban rezisztensek voltak apramicinnel (87,3%), klindamicinnel (97,5%) és szulfonamidokkal (97,5%) szemben. Az adatokat gazdafajokra lebontva is kiértékeljük. Egy borjúból izolált multirezisztens *P. multocida* törzset részletes vizsgálatba vontunk. A törzset az A buroktípusba, a 3-as Heddleston szerotípusba és a 9-es biotípusba soroltuk be. A RIRDC MLST vizsgálatban a törzs 79-es szekvencia típusúnak bizonyult. A MIC tesztek alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált törzs rezisztenciát mutatott sztreptomocinnel, tetraciklinnel, doxiciklinnel, eritromicinnel, klindamicinnel, kloramfenikollal, szulfametoxazollal, enrofloxacinnal, és nalidixsavval szemben. A vizsgált törzs nem rendelkezett plazmiddal. Másrészt, összhangban a fent ismertetett antibiotikum rezisztencia fenotípussal, PCR reakciók segítségével sikeresen ki tudtuk mutatni a kloramfenikol (*catAIII*), szulfonamid (*sulIII*), sztreptomycin (*strA*), és tetraciklin (*tetB*) rezisztencia kialakításáért felelős génszakaszokat. A kinolon rezisztencia kialakításáért felelős pontmutációt is azonosítottunk a topoizomeráz IV (*parC*) génszakasz szekvencia analízisével, mely a 84-es kodon aminosav cseréjét jelentette (Glu → Lys). A makrolid- és linkozamid rezisztencia kialakításáért felelős rezisztencia géneket nem tudtuk azonosítani a tesztelésre kiválasztott PCR reakciókkal. Az ICEPmu1 mobilis genetikai elemmel asszociált géneket célzó PCR reakciókban is negatív eredményt kaptunk.

## Summary

*Pasteurella multocida* is a widespread bacterial species that can infect several avian and mammalian species causing severe economic losses to animal husbandry. The severity of the symptoms depends on the virulence of the disease causing strains and various predisposing environmental factors.

The aim of our work was to characterize *P. multocida* strains isolated from different host species and from different geographical regions by phenotyping and genotyping methods, and to investigate the antibiotic resistance patterns of the pathogen.

The strains involved in our study were identified by species-specific polymerase chain reaction (PCR), and their phenotypic properties were also examined. The capsular type as well as the lipopolysaccharide (LPS) genotype of the strains were examined using PCRs, the latter with the addition of somatic serotyping by agar gel precipitation in some cases. The presence of different capsular type : LPS genotype combinations and its relationship to host species were also determined. The *toxA* gene encoding *P. multocida* toxin could only be detected in strains of porcine and small ruminant origin. Examining the putative virulence factors of *P. multocida*, we were able to identify 13 different virulence gene profiles, which, with a few exceptions, were characteristic to only one host species. Sequence analysis of the *ompA* gene distinguished a total of 25 unique but closely related sequence types, forming nine clusters. These were associated with virulence gene profiles and host species. We also examined *P. multocida* strains isolated from human cases in detail, which showed greater diversity in both phenotypic and genotypic aspects.

The pathology of a disease caused by *P. multocida* in backyard pigs, which has not been experienced in Hungary before, was studied in detail. Three bacterial strains from pigs in different yards were classified as *P. multocida* ssp. *multocida*. Each strain proved to be capsular type B and somatic serotype 2. Based on the data obtained by Multi-host multi-locus sequence typing (MLST), a new sequence type (ST61) was described. Using RIRDC MLST scheme, the tested strains were classified into sequence type 122, characteristic of *P. multocida* strains causing haemorrhagic septicaemia. Three years later, *P. multocida* strains from bovine haemorrhagic septicaemia cases were examined. The disease was limited to one farm, geographically 130 km west of the site of identification of the cases described in pigs, and there was no known connection between the farms. Bacterial strains from the herd were defined as *P. multocida* ssp. *multocida*. Based on the data obtained with Multi-host MLST, a new sequence type (ST64) was described that differed in one allele (*aroA*) from ST61 found in backyard pigs.

Antibiotic susceptibility of *P. multocida* strains was determined by the disk diffusion method. The vast majority of strains were sensitive to florfenicol (98,7%), chloramphenicol



(93,7%), ampicillin (91,8%), penicillin (91,1%), enrofloxacin (88,6%), ceftiofur (88%), tulathromycin (79,1%), tetracycline (86,7%) tilmicosin (86,1%) and doxycycline (82,9%). Gentamicin, erythromycin, streptomycin and nalidixic acid were less effective (44,9%, 23,4%, 27,2 and 13,9% resistance), while the proportion of moderately susceptible strains was also high for erythromycin (71,5%) and gentamicin (32,3%). A large number of strains were resistant to apramycin (87,3%), clindamycin (97,5%), and sulfonamides (97,5%). Data were also evaluated by host species. A multidrug-resistant *P. multocida* strain isolated from a calf has been studied in detail. The strain was classified into capsular type A, Heddleston serovar 3, and biovar 9. By RIRDC MLST, the strain was found to be sequence type 79. Based on MIC tests, the isolate was found to be resistant to streptomycin, tetracycline, doxycycline, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol, sulfamethoxazole, enrofloxacin, and nalidixic acid. The isolate had no plasmid. On the other hand, according to the antibiotic resistance phenotype described above, we were able to successfully detect genes responsible for the development of resistance to chloramphenicol (*catAIII*), sulfonamide (*sulIII*), streptomycin (*strA*), and tetracycline (*tetB*) by PCR reactions. A point mutation responsible for the development of quinolone resistance was also identified by sequence analysis of the topoisomerase IV (*parC*) gene region, which resulted an amino acid substitution at codon 84 (Glu → Lys). The genes responsible for the development of macrolide and lincosamide resistance could not be identified by the PCR reactions selected for testing. PCR reactions targeting genes associated with the ICE*Pmu1* mobile genetic element were also negative.

## 1. Bevezetés

A *Pasteurella multocida* egy világszerte előforduló, Gram-negatív baktériumfaj, mely számos madár- és emlősfaj megbetegítésére képes. A légutak nyálkahártyáján megtelepedő patogén változat, sokszor a gazdafajra jellemző betegségek kialakításáért felelős. Az általa okozott legismertebb kórképek közé tartozik a baromfikolera, a sertések torzító orrgyulladása, valamint a szarvasmarha és bivaly vérzéses vérfertőzése. Opportunista kórokozóként gyakran szerepel a kérődzők (szarvasmarha, juh, kecske), a ló és a sertés tüdőgyulladással járó megbetegedéseiben, valamint a nyulak pasteurellosisának kialakításában. A kórokozó a hazai állatállományokban jelentős gazdasági károkat okoz napjainkban is, ezért a betegségek megelőzésében a hajlamosító tényezők minimalizálása, továbbá az adott régióban előforduló virulens *P. multocida* törzsek részletes ismeretén alapuló vakcina választás is kiemelt jelentőségű.

A *P. multocida* törzsek nagyfokú változatosságot mutatnak fenotípusos és genotípusos jellemzőik tekintetében is. A baktériumtörzsek jellemzésének első lépését a hagyományos biokémiai módszerekkel való fajazonosítás, a cukrok- és cukoralkoholok fermentációján alapuló biotípus elkülönítés, illetve a burok és a sejtfal antigének alapján történő szerológiai besorolás képezi. Munkánk elsődleges céljaként hazai izolálású törzsek részletes jellemzését választottuk, szerológiai, biokémiai és molekuláris biológiai eljárások segítségével. A kórokozó azonosítása fajspecifikus polimeráz láncreakcióval (PCR), az egyedi (*kmt1*) génszekvenciára tervezett oligonukleotidok segítségével gyors és biztos módszert jelent. További, PCR és szekvencia alapú módszerekkel a törzsek differenciálása, a köztük lévő filogenetikai kapcsolatok feltárása és járványtani nyomozás is megvalósítható. A törzsek diverzitásának vizsgálata mellett a különböző kórképekből származó izolátumok közötti különbségeket is szeretnénk volna feltárni. További célunk volt a betegség kialakításáért felelős virulens törzstípus(ok) azonosítása. Napjainkban egyre aggasztóbb méreteket ölt az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia terjedése, ezért a *P. multocida* törzsek antibiotikum-rezisztencia vizsgálata és a mögötte álló genetikai háttér felderítése is szerepelt a terveink között. A *P. multocida* számos virulenciafaktort tartalmaz, melyek között a sertések torzító orrgyulladásaért felelős toxintermelés, valamint a gazdaszervezet kolonizációjában kiemelkedő szerepű adhezinek is szerepelnek. Az adhézióért felelős struktúrák feltárása napjainkban a *P. multocida* kutatások egyik alapvető irányvonalát jelenti, így munkánkban a fenti folyamatokkal kapcsolatba hozható virulenciagének vizsgálatára is nagy figyelmet fordítottunk.

Eredményeink hasznos információkat nyújthatnak a hazai sertés és szarvasmarha állományokban jelen lévő, főbb törzstípusok virulenciafaktorainak és gazdafaj-specifitásának tekintetében is. A kutatás eredményei a tudományos ismeretek bővítése mellett a számottevő

gazdasági veszteségeket okozó megbetegedések korszerűbb és hatékonyabb diagnosztikájának, valamint új, a törzsek részletes ismeretén alapuló védekezési eljárások kidolgozásának is alapfeltételét jelenthetik.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Történet

A *Pasteurellaceae* családot nagyszámú, Gram-negatív baktérium alkotja, melyek madár- és emlősfajok felső légúti nyálkahártyáin, főként fakultatív kórokozóként fordulnak elő. A *Pasteurella* nemzetség nevét Trevisantól kapta 1887-ben, aki ily módon fejezte ki tiszteletét a baromfikolera elleni immunizáció lehetőségeit kutató Louis Pasteur előtt. A nemzetség típusfaja a *P. multocida*, amely genetikailag nem egységes. A fajon belül három alfajt – *P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica*, és *P. multocida* subsp. *gallicida* – sikerült elkülöníteni a DNS-DNS hibridizációval végzett taxonómiai vizsgálatok segítségével (Mutters és mtsai., 1985). A genuson belüli változások a [www.bacterio.net/Pasteurella.html](http://www.bacterio.net/Pasteurella.html) webcímen követhetők nyomon. A különböző alfajokba tartozó törzsek fermentációs sajátásaikban is eltérést mutatnak. A *septica* alfaj a szorbit fermentációs képesség hiányában, míg a *gallicida* alfaj a dulcit fermentáció meglétében tér el a *multocida* alfajtól (1. táblázat).

Gazdafajtól függetlenül leggyakrabban *P. multocida* subsp. *multocida* törzsek izolálhatók, de az alfajok járványtani jelentősége jelenleg nem tisztázott. Ráadásul, a 16S rRNS génjének és az alapvető celluláris működések szempontjából kulcsszerepet játszó háztartási gének összehasonlító szekvencia elemzése mára már csak két taxonómiai egység – a *multocida* és *gallicida* alfajt magába foglaló komplex csoport, valamint a *septica* alfaj – létezését támasztja alá a fajon belül (Blackall et al., 1998, Christensen et al., 2004, Sellyei et al., 2012).

**1. táblázat:** Az alfajok elkülönítése fermentációs sajátásaik alapján. (Mutters és mtsai. 1985)

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

## 2.2. A kórokozó tulajdonságai

A *P. multocida* Gram-negatív, nem mozgó, spórát nem képző, 1,0-2,0 µm hosszú, 0,3-1,0 µm átmérőjű, gömb (coccus), vagy rövid pálcá alakú baktérium. Kenetekben a sejtek egyesével, ritkán párosával, esetleg láncokba rendeződve fordulnak elő. Festődése olykor bipoláris.

5%-os juhvéres táptalajon tenyésztve 24 óra után a buroktermelés meglététől vagy hiányától függően nyálkás, sima felszínű vagy száraz, rögös, szürkésfehér, kör alakú, 0,5-2 mm átmérőjű telepeket képez (Mutters és mtsai., 2005). Nem hemolizál, telepei az indol termelésnek köszönhetően jellegzetes vadgesztenye szagot árasztanak. A buroktermeléssel rendelkező törzsek ferdén áteső fényben irizálnak (1. ábra) (Heddleston és mtsai., 1964).



1. ábra. Irizáló *P. multocida* tenyészet áteső fényben

A hagyományos biokémiai próbákban a törzsek oxidáz és kataláz pozitívak. Fajsztíű azonosításukra a pozitív indol, nitrát, glükóz, szacharóz reakció, illetve az ureáz aktivitás hiánya szolgál. A törzsek többsége pozitív reakciót ad továbbá fruktóz, galaktóz, mannit, mannóz, ribóz, és ornitin-dekarboxiláz próbában. A laktóz, maltóz, arabinóz, fukóz, trehalóz, xilóz, dulcít és szorbit hasznosítása törzsenként eltérő lehet (Mutters és mtsai., 2005). A törzsek változatos fermentációs képességeit a jellemzéshez széles körben felhasználják. A manapság alkalmazott rendszert nagyszámú baromfi és sertés eredetű törzs vizsgálata eredményeképpen állították fel (Fegan és mtsai., 1995, Blackall és mtsai., 1997), mely a fermentációs mintázat alapján a törzsek 13 biotípusát (1-10, 12-14) különbözteti meg (2. táblázat). Korábbi biotípus vizsgálatok azt mutatják, hogy gazdafajtól függetlenül a hármas biotípus előfordulása a leggyakoribb (Varga és mtsai., 2007, Ekundayo és mtsai., 2008, Stahel és mtsai., 2009, Mühlendorfer és mtsai., 2011).

**2. táblázat:** A szénhidrát és cukoralkohol-fermentációs mintázat alapján definiált biotípusok (Fegan és mtsai., 1995, Blackall és mtsai., 1997, Townsend és mtsai., 1998a)

Biotípus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ornitin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Arabinóz	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Laktóz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Maltóz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Trehalóz	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Xilóz	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Dulcit	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Szorbit	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Alfaj	<i>multocida</i>				?		<i>septica</i>	<i>gallicida</i>	<i>multocida</i>	<i>septica</i>	?	<i>multocida</i>		

A *P. multocida* megbetegítő képességét számos lehetséges virulenciafaktorral hozzák összefüggésbe. Ezek közül kiemelt jelentőségű a sejtfal lipopoliszacharid rétege és a sejtet körülvevő mukopoliszacharid burok, melyeken a jelenleg is általánosan használt szerológiai besorolás alapszik. A *P. multocida* törzsek lipopoliszacharid antigénjei alapján 16 szomatikus szerotípus különíthető el (Heddleston és mtsai., 1972). Az 1-es és 3-as szerotípus előfordulása madarakban gyakori (Samuel és mtsai., 2008), a 2-es és 5-ös szerotípusok pedig a kérődzők vérszerű vérfertőzés eseteire jellemzőek (De Alwis, 1992). A sertések és szarvasmarhák tüdőgyulladásos kórképeit leggyakrabban 3-as szerotípusú törzsek idézik elő (Dabo és mtsai., 2007). A *P. multocida* törzsek szomatikus szerotípusának meghatározása többféle módszerrel történhet. Az agargél precipitációs próbában szerotípus specifikus immunsavók használatával mind a 16 típus elkülöníthető egymástól (Heddleston és mtsai., 1972). Újabban egy 8 LPS genotípus elkülönítésére alkalmas molekuláris módszert is leírtak (Harper és mtsai., 2015).

A *P. multocida* burkát felépítő mukopoliszacharidok ötféle buroktípus (A, B, D, E, és F) elkülönítését teszik lehetővé (Carter, 1955). A *P. multocida* buroktípusának meghatározására egy multiplex PCR reakció használatos (Townsend és mtsai., 2001). A buroktípusok és a megbetegedések, illetve a gazdafajok bizonyos esetekben összefüggésbe hozhatók egymással. A tüdőgyulladásos megbetegedésekért leggyakrabban az A buroktípusú törzsek tehetők felelőssé. A toxint termelő D, illetve az utóbbi időkben egyre gyakrabban megjelenő A buroktípussal rendelkező törzsek a sertések torzító orrgyulladásának kialakításában játszanak döntő szerepet. Az elsőként pulykákból izolált F buroktípusú törzsek más baromfifajokban és nyulakban is leírásra kerültek. A kérődzők szubtrópusi területeken endémiás megbetegedését,

a vérzéses vérfertőzést B és E buroktípusú *P. multocida* törzsek idézik elő (De Jong és Nielsen, 1990, Confer és mtsai., 1996, Wilkie és mtsai., 2012).

A *P. multocida* ezen felül számos feltételezett virulenciafaktorról is rendelkezik (Harper és mtsai., 2006) melyek hozzájárulnak a gazdaszervezethez történő adhézióhoz, majd a kolonizációban és az invázióban is segítik a kórokozót. Ezek közé tartoznak az adhezinek, a *P. multocida* toxin (PMT), a vaskötő fehérjék, extracelluláris enzimek (pl. neuraminidáz) és a külső membrán fehérjék (Harper és mtsai., 2006). A különböző virulenciában szerepet játszó gének kimutatása alkalmasnak bizonyult a *P. multocida* törzsek tipizálására, és ezek a virulenciafaktorok egyben fontos epidemiológiai markerek az izolátumok patogenitási potenciáljának felismeréséhez (Ewers és mtsai., 2006; Atashpaz és mtsai., 2009; García-Alvarez és mtsai., 2017). Ezek közül a legfontosabbak az adhezinek (fimbriák, filamentózus haemagglutinin), a *P. multocida* toxin (PMT), a szialidázok, a vaskötő fehérjék és a külső membrán fehérjék (Ruffolo és mtsai., 1997, Ewers és mtsai., 2006, Fuller és mtsai., 2000, Geme és Cutter, 1995, Tang és mtsai., 2009).

## 2.3. Járványtan

### 2.3.1. A szarvasmarhák légzőszervi megbetegedése

A szarvasmarhák légzőszervi megbetegedés-komplexe (bovine respiratory disease complex, BRDC) világszerte jelentős állat-egészségügyi problémát jelent. A *P. multocida* az egyik leggyakrabban izolált baktériumfaj a tünetegyüttes kialakításában szerepet játszó kórokozók közül. A BRDC egy összetett kóroktanú betegség, melyet a környezeti és gazdaszervezettel kapcsolatos tényezők, valamint a kórokozók közötti kölcsönhatások együttesen idéznek elő. A járványesetek megjelenése a hazai és a nemzetközi állományokban is jelentős gazdasági veszteségekkel járó állat-egészségügyi problémát jelent (Ózsvári és mtsai., 2012). A tünetegyüttes kialakulásában a fertőző ágensek (vírusok és baktériumok) mellett igen fontos szerepet játszanak nem fertőző eredetű hajlamosító tényezők is. Ez utóbbiak között az állat kora, makro- és mikroklíma anomáliák és tartástechnológiai hibák (túlzsúfoltság, higiéniai és takarmányozási elégtelenség, szállítási stressz) említendők elsősorban. Ezek a tényezők gyengítik a gazdaszervezet védekező mechanizmusait, ami növeli az állatok fertőzésekkel szembeni érzékenységét (Ózsvári és mtsai., 2015). A betegség kialakulására lépcsőzetes felépítés jellemző. Általában egy vírusfertőzés nyit utat a súlyos légzőszervi tüneteket előidéző baktériumfajok számára. A kórkép kialakításában szerepet játszó vírusok közül a legjelentősebbek a parainfluenza-3 vírus, a respiratory syncytial vírus, az 1-es típusú szarvasmarha herpeszvírus, valamint egyes adeno- és reovírusok (Ellis, 2001, Richer és mtsai., 1988). A baktériumok közül a *Mannheimia haemolytica*, a *P. multocida*, a *Histophilus somni*, a *Mycoplasma bovis*, a *Mycoplasma dispar* és a *Chlamydia psittaci* játszik kiemelt szerepet (Ellis, 2001, Nicholas és mtsai., 2008, Twomey és mtsai., 2006, Griffin és

mtsai., 2010). A BRDC és a *P. multocida* között fennálló kapcsolat a XX. század közepe óta ismert (Carter, 1954), bár a baktérium pontos szerepe a kórkép kialakításában máig nem tisztázott kellőképpen. Ennek oka, hogy hosszú ideig másodlagos kórokozóként, a felső légutak normál flórájának tagjaként tartották számon (Nikunen és mtsai., 2007).

A *P. multocida* által előidézett légzőszervi megbetegedések két jelentősebb formáját különíti el a szakirodalom. A borjak tüdőgyulladás (enzootic calf pneumonia) a 2-6 hónapos borjakat érinti (Lillie, 1974, Dabo és mtsai., 2007). A fiatal állatok anyjuktól fertőződnek, a légutakon keresztül. A felnőtt szarvasmarhákban jelentkező kórkép elnevezése szállítási betegség (shipping fever), mely az állatokat jelentősen megviselő szállítás, és az azt követő keveredés utáni napokban jelentkezik (Yates, 1982, Dabo és mtsai., 2007). A klinikai tünetek mindkét korcsoport esetében a levertséggel járó és fokozatosan súlyosbodó lázas állapot, étvágycsökkenés, valamint orrfolyás, nedves köhögés, és gyors, felületes légzés (Adams és mtsai., 1959).

A *M. haemolytica*, a *P. multocida* és a *H. somni* a felső légutak normál flórájának tagjai, jelen vannak a nyálkahártyán. A hajlamosító tényezők a gazdaszervezet védekező képességének meggyengülését eredményezik, egy ezt követő vírusfertőzés pedig a nyálkahártya károsodását idézi elő. A *M. haemolytica* citotoxikus hatása csökkenti az alveoláris macrophagok fagocitáló képességét. A nyálkahártya károsodása és az immunszuppresszió megteremtik a másodlagos fertőzések lehetőségét. A további baktérium-szaporodás hatására a gyulladással járó reakció fokozódik, tüdőgyulladás és mellhártyagyulladás alakul ki, amely az állat elhullásához is vezethet. A betegség előrehaladásával a hörgőkben és hörgőcskékben nagyszámú neutrofil granulocita és macrophag jelenik meg, a nekrotikus hámon pedig fibrines felrakódások alakulnak ki. Az alveolusokban falósejteket tartalmazó exsudátum jelenik meg. A kóros elváltozások között kruppos tüdőgyulladás, fibrines mellhártyagyulladás, fibrines szívburokgyulladás, savóshártyák alatti vérzések, a tüdőszövetbe beszivárgott fibrinogénben gazdag savó, valamint duzzadt nyirokcsomók is megfigyelhetők (Chengappa és mtsai., 1989, Dowling és mtsai., 2002, Dabo és mtsai., 2007).

### 2.3.2. A *P. multocida* okozta vérzéscsökkentő vérfertőzés

A vérzéscsökkentő vérfertőzés egy heveny, és többnyire elhullással végződő megbetegedés, amely a szarvasmarha és bivalytartás egyik legtöbb gazdasági kárt okozó bakteriális megbetegedése Ázsiában és Afrikában. A B buroktípusú törzsek elsősorban Ázsiában, míg az E buroktípusba tartozó törzsek főleg Afrikában felelősek a megbetegedésért (Dziva és mtsai., 2008). A megbetegedés iránt más állatfajok így a ló, szamár, elefánt, bölény, sertés, juh, kecske, nyúl, egér és tengerimalac is fogékonyak (Soike és Schulze, 2011; Townsend és mtsai., 1998a).



A vérfertőző Pasteurellosis előfordulása sertésekben meglehetősen ritka, ugyanakkor sporadikus esetek a világ minden táján előfordulnak. A B típusú *P. multocida* által okozott heveny sertés pasteurellosis első részletes leírása Murthy és Kaushik (1965) nevéhez fűződik, akik 1963 júliusában, a monszun követő időszakban 30 malacot érintő, 7 elhullással járó esetről számoltak be Indiában. Az izolátumokat B típusú *P. multocida*-ként azonosították. Minden esetben heveny kórlefolyás volt megfigyelhető, mely pár órától 2-3 napig terjedt. Oxitetraciklinnel végzett kezelés hatására a betegség 7-10 nap után gyógyult. Az állatok a vérvérzéses vérfertőzés jellegzetes tüneteit mutatták. Minden esetben láz (40.5-42.2°C) és nehezített légzés volt tapasztalható. A toroktájék nagymértékű duzzanata, a bőr diffúz lilás elszíneződése és különösen a füleken, a nyaki és a hasi testtájakon pontszerű vérzések jelentek meg. További jellegzetes elváltozásként vizenyős beszűrődéssel kísért heveny garatgyulladást, valamint a tüdőben, a vesékben, a hörgőkörüli és bélfodri nyirokcsomókban bővérűséget és vizenyőt figyeltek meg. A savóshártyákon, valamint a bőr alatti kötőszövetben vérzések jelentek meg. Minden esetben megállapítottak heveny vérzéses gyomor-bélgyulladást is. A máj és a lép nem mutatott elváltozást. Indiában sertés pasteurellosis esetek az első leírást követő évtizedekben is rendszeresen előfordultak. Pillai és mtsai. (1986) két előfordulásról is beszámoltak, de az izolált *P. multocida* törzsek szerotípusát nem határozták meg. Egy Verma és mtsai (2014) által közölt esetben egy indiai sertéstelepen a heveny vérfertőző Pasteurellosis 40%-os elhullást eredményezett. 53 izolátumból 47-et sikerült *P. multocida*-ként azonosítaniuk, melyeket a B:2-es szerotípusba soroltak. A sertéseket megbetegítő B típusú *P. multocida* indiai előfordulásáról 1994-ben (Sriraman és mtsai., 1994), és 2014-ben (Verma és mtsai., 2014) is jelentek meg közlemények. A betegség sporadikusan Malajziában, Sri Lankán, Ausztráliában és Vietnámban is megjelent (Chandrasekaran és Yeap, 1982; Gamage és mtsai., 1995; Mackie, 1996; Townsend és mtsai., 1998a).

Townsend és mtsai. (Townsend és mtsai., 1997) a genomban lévő ismétlődő szekvenciákat azonosító REP PCR (repetitive sequence based polymerase chain reaction) segítségével szarvasmarhából és sertésből izolált B típusú *P. multocida* törzseket vizsgáltak. A kapott fragment-mintázatok eltértek az egyéb kórképeket (pl. baromfikolerát) előidéző törzsektől, ugyanakkor egymással megegyeztek. Ez alapján a szerzők genetikai kapcsolatot feltételeztek a vérzéses vérfertőzést okozó törzsek között, függetlenül a gazdafajtól. A közleményben a törzsek biotípusát is meghatározták. A homogén REP PCR fragment mintázattal rendelkező B típusú törzsek mindegyike a 3-as biotípus fermentációs sajátosságait mutatta: ornitin-dekarboxiláz aktivitással rendelkezett, savat képzett xilózból és szorbitból, de nem volt képes az arabinóz, a maltóz, a laktóz, a trehalóz és a dulcitol hasznosítására.

A vérzéses vérfertőző Pasteurellosis szórványos megjelenését évről-évre számos európai országból jelentik be. Magyarország esetében utoljára 1970-ben történt bejelentés a betegség előfordulásáról ([https://web.oie.int/hs2/sit\\_mald\\_freq\\_pl.asp?c\\_cont=4&c\\_mald=39](https://web.oie.int/hs2/sit_mald_freq_pl.asp?c_cont=4&c_mald=39)). A B

típusú *P. multocida* törzsek okozta sertés-megbetegedés első európai felbukkanását 2009-ben Spanyolországban igazolták (Borge és mtsai., 2011). A betegség hét extenzíven tartott sertésállományt érintett az ország déli részén, heveny kórlefyással és magas mortalitással. A vérzéses vérfertőzés tüneteit mutató állatok 1-2 napos betegség után hullottak el. A kórbonctani vizsgálattal vérzéseket, tüdőbővérűséget, és az állalatti terület bőralatti kötőszövetében vizenyőt találtak, amelyben kórszövettani vizsgálattal a neutrofil granulocytás beszűrődés és fibrinthrombusok mellett elhalásos gócok voltak megfigyelhetők. A bakteriológiai vizsgálat során B típusú *P. multocida* törzseket izoláltak, melyek mindegyike a szorbitot és xilózt bontani képes 13-as biotípus jellemzőit mutatta. A betegség 2010-ben bukkant fel újra Európában (Soike és Schulze, 2011), az északkelet-németországi Brandenburg és Szász-Anhalt tartományokban. A megbetegedések halmazottan jelentkeztek dāmivad, szarvasmarha és sertésállományokban. A fertőzés súlyosságát jelezte, hogy az egyik érintett szarvasmarha állományban néhány napon belül 82 állat, az állomány 22%-a, míg egy hízósertés állományban 2 hét alatt 340 állat, az állomány 14%-a hullott el. A kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok vérzéses vérfertőzésre jellemző elváltozásokat mutattak. Az izolált kórokozót B típusú *P. multocida*ként határozták meg, majd multi-lókusz szekvencia tipizálás [RIRDC (Rural Industries Research and Development Corporation) MLST] alkalmazásával a törzsek genotipizálását is elvégezték (Subaaharan és mtsai., 2010). A szekvencia analízis az izolátumokat a 122-es szekvencia típusba sorolta, mely gazdafajtól függetlenül a vérzéses vérfertőzést okozó törzsekre jellemző, és világszerte elterjedt típus (Petersen és mtsai., 2014). A sertéseket érintő vérfertőzéses pasteurellosis 2011-ben ismét megjelent dél-Spanyolországban, egy külterjes viszonyok között tartott állományban (Cardoso-Toset és mtsai., 2013). A betegség mintegy 800 választott malacot érintett, 70%-os morbiditással és 95%-os letalitással. Minden esetben köhögés, nehézlégzés, valamint a toroktájékon a bőr lilás elszíneződése és elhalásos gyulladása volt megfigyelhető. A kórbonctani vizsgálat során tüdőbővérűséget és vizenyőt, emellett vérzéseket is megfigyeltek. A kórszövettani vizsgálattal súlyos, diffúz vizenyőt, valamint macrophag, lymphocyta, és neutrofil granulocytás beszűrődést találtak, amelyek a nyaki tájék zsírszövetében és a vázizomzatában is előfordultak. A tüdőben bővérűség valamint peribronchioláris és alveoláris ödéma volt megfigyelhető, továbbá monocytákból és neutrofil granulocytákból álló beszűrődést, valamint fibrinthrombusokat és baktérium-embólusokat találtak. A garatmandulában és a nyirokcsomókban vérzések, és ugyancsak fibrinthrombusok voltak megfigyelhetők (Shivachandra és mtsai., 2011). A bakteriológiai vizsgálatok során B típusú *P. multocida* törzseket azonosítottak, melyek fermentálták a szorbitot, a laktózt, és a xilózt, de a dulcít, a maltózt, az arabinózt, és a trehalózt bontására nem voltak képesek, valamint ornitindekarboxiláz aktivitással sem rendelkeztek. A törzsek további vizsgálatára ők is az MLST módszerét használták (Davies és mtsai., 2004), mellyel egy új szekvencia típust (ST47) írtak

le. A rákövetkező 2012-es évben Dél-Spanyolországban újra megállapították a megbetegedést egy vadaskertben, ahol rövid időn belül 23 vaddisznó pusztult el (Risco és mtsai., 2013).

### 2.3.3. Torzító orrgyulladás

A torzító orrgyulladás a sertések egyik jelentős megbetegedése, mely jelentős gazdasági veszteségeket okoz a tenyésztők számára. A malacok fertőződése korán, 1-2 hetes korban történik, és felső légúti tünetek (orrfolyás, tüsszögés, orrvérzés) megjelenését eredményezi. Az orr csontjainak fejlődése zavart szenved, a betegség súlyos formája az egyik vagy mindkét oldali orrkagyló teljes elsovadásához vezet. Ennek következtében az orr megrövidül, vagy elcsavarodik a beteg oldal felé. A torzulás az állatok takarmányfelvételének, ezáltal súlygyarapodásának csökkenését eredményezi. Az orr szűrőfunkciójának hiányában a másodlagos fertőzések veszélye is megemelkedik. A betegség progrediáló formájának kialakulásában két baktériumfaj, a toxikus *P. multocida* és a *Bordetella bronchiseptica* szinergista kölcsönhatása játszik szerepet. Az orrjáratban elsőként a *B. bronchiseptica* toxikus törzsei telepednek meg, ahol gyulladást idéznek elő, ami létrehozza a toxikus *P. multocida* számára megfelelő kolonizációs feltételeket. A kórokozók elszaporodását követően toxinjaik idézik elő az orrkagylók teljes elsovadását. A nem-progrediáló forma esetében csak *B. bronchiseptica* törzsek vannak jelen, és általában enyhébb elváltozásokat idéznek elő (Pedersen és mtsai., 1988; De Jong és Nielsen, 1990; Magyar és Lax, 2002).

### 2.3.4. Baromfikolera

A baromfikolera egy széles körben elterjedt megbetegedés, melyre az összes madárfaj fogékony, és a pulykák különösen érzékenyek rá. Főként A buroktípusú *P. multocida* törzsek tehetők felelőssé a megbetegedés kialakításáért, de pulykák esetében F buroktípusú törzsekről is beszámoltak (Wilkie és mtsai., 2012). A baromfikolera terjesztői elsősorban a betegséget átvészelő egyedek, és az állományokon belüli terjedésében közrejátszhatnak az itatóvályúk vagy tavak is (Pabs-Garnon és Soltys, 1971). A fertőződés főként a felső légutak nyálkahártyán keresztül történik, a virulens baktériumtörzsek kolonizációját követően a kórokozó a légzsákok és a tüdő felé terjed. A betegség későbbi stádiumaiban szisztémás fertőzés alakulhat ki. A kórlefolyás néhány óra és néhány nap közötti időtartamú lehet, perakut esetben a betegség első jele a hirtelen elhullás. A klinikai tünetek között szerepel az étvágytalanság, bágyadság, láz és az orrfolyás, továbbá köhögés és nehézlégzés. A morbiditás és mortalitás igen magas lehet a betegséget előidéző *P. multocida* törzs virulenciájától függően. A betegségből kigyógyult madarakban exudatív artritisz alakulhat ki a láb vagy a szárny ízületeiben (Wilkie és mtsai., 2012).

### 2.3.5. Házinyulak pasteurellosisa

Az egészséges házinyulak jelentős része a felső légúti nyálkahártyák felületén hordozza a kórokozót, azonban hajlamosító tényezők jelenlétében megbetegedés is kialakulhat. A házinyulak pasteurellosisa akut és krónikus formában egyaránt előfordulhat, mely súlyos tüdő- és/vagy mellhártya gyulladáshoz is vezethet (Glávits és Magyar, 1990). A betegsége jellemző, hogy a felső légutak nyálkahártyáját A vagy D buroktípusú *P. multocida* törzsek kolonizálják leggyakrabban. A nyulak társaiktól közvetlenül fertőződhetnek, ugyanakkor a *B. bronchiseptica* is szerepet játszhat a kórkép kialakításában. Az első klinikai tünet az orrfolyás, a betegség előrehaladásával párhuzamosan azonban a köhögés, a láz, és a neheztelt légzés is megjelenhet (Wilkie és mtsai., 2012).

### 2.3.6. A *P. multocida* zoonótikus potenciálja

A *P. multocida*, amely többek között a kutyák és macskák felső légúti mikroflóráját alkotó baktériumfajok közé tartozik (Griego és mtsai., 1995), zoonótikus potenciállal is rendelkezik (Magyar és Lax, 2014). *P. multocida* okozta humán megbetegedésekről a szakirodalomban is beszámoltak az utóbbi évtizedekben (Weber és mtsai., 1984; Kimura és mtsai., 2004; Wilson és mtsai., 2013). Az emberek leggyakrabban a kedvtelésből tartott háziállatoktól szerzett sérülések (harapás vagy karmolás) útján fertőződnek, (Weber és mtsai., 1984; Kimura és mtsai., 2004). A sérülés helyén kialakuló sebfertőzés a leggyakoribb klinikai kép, melyet a *P. multocida* emberben előidéző, de ezen kívül kialakulhat ízületgyulladás, tályogképződés, kötőszöveti gyulladások, nyirokér-gyulladás, agyhártyagyulladás, szívburokgyulladás, tüdőgyulladás vagy szepszis is (Liu és mtsai., 2003; Abrahamian és Goldstein, 2011). A szisztémás fertőzések elsősorban a legyengült immunrendszerű embereket érinthetik (Wilkie és mtsai., 2012). Az állati harapások okozta sebfertőzéseket a *Pasteurella canis* és a *Pasteurella dagmatis* is okozhatja, de a *Pasteurella* genus tagjai közül a *P. multocida* izolálható a leggyakrabban a humán megbetegedésekből (Holst és mtsai., 1992). Korábbi közleményekben a pulzáló mezejű gélelektroforézis módszerével (PFGE) meg tudták erősíteni a *P. multocida* állatok és emberek közötti zoonótikus terjedésének lehetőségét (Liu és mtsai., 2003; Satomura és mtsai., 2010).

## 2.4. Kórjelzés

Bár a tünetek és a kórbonctani elváltozások gyanút kelthetnek, a biztos diagnózishoz a kórokozó kimutatása szükséges. A *P. multocida* a légutak valamennyi szakaszából, de leggyakrabban a gyulladással járó területből izolálható. A baktériumot a gyorsabban szaporodó fajok túlnőhetnek egy kevert mintában, ezért az izolálást szelektív táptalajon ajánlatos elvégezni (Moore és mtsai., 1994; Avril és mtsai., 1990). A faj meghatározása hagyományos

módszerekkel (telepalakulás, biokémiai próbák) is lehetséges, de újabban a molekuláris technikákat részesítik előnyben. A *P. multocida* azonosítására szolgáló PCR reakció a baktérium genomjának 460 bp-os szakaszát erősíti fel (Townsend és mtsai., 1998b). A *P. multocida* ellen termelt ellenanyagot immunoblot eljárás vagy ELISA teszt segítségével ki lehet mutatni (Confer és mtsai., 1996), de a szerológiai próbák diagnosztikai értéke erősen kétséges.

## 2.5. A kórokozó jellemzése

A *P. multocida* által előidézett megbetegedések leküzdéséhez, illetve megelőzéséhez szükséges a kórokozó minél alaposabb megismerése. Ezzel magyarázható, hogy az izolátumok genetikai változékonyságának kutatása egyre szélesebb körben folyik. Nagyobb számú minta esetén a nagy felbontó képességű, ismétlődő genetikai elemek azonosításán alapuló PCR módszereket alkalmazzák leggyakrabban.

### 2.5.1. Szerotipizálás

A *P. multocida* sejtfalának lipopoliszacharid antigénjei a baktérium fontos virulenciafaktorai, és egyben a törzsek jellemzésére is felhasználhatók. Jelenleg két tipizáló módszer létezik a szomatikus szerotípusok azonosítására. A szomatikus, vagy sejtfal O-antigének vizsgálatán alapuló csőagglutinációs rendszer 11 szerotípus megkülönböztetésére képes (Namioka, 1978), míg a Heddleston által felállított agargél precipitációs rendszer 16 szerotípust képes azonosítani (Heddleston és mtsai., 1972). Napjainkra a Heddleston-féle módszer terjedt el széles körben.

A Heddleston által kidolgozott agargél precipitációs módszer azonban időigényes folyamat, és a specifikus ellensavók termelése is igen nehézkes. Ugyanakkor az adott területeken jelen lévő *P. multocida* törzsek szerotípusának ismerete kiemelt jelentőségű a vakcinázás megtervezésének szempontjából, hiszen a *P. multocida* elleni védettség általában szerotípus-specifikus (Boyce és mtsai., 2010).

A szomatikus szerotípusok nukleinsav alapú meghatározására elsőként DNS ujjlenyomat technikák alkalmazhatóságát vizsgálták. Wilson és mtsai. (1992, 1993) a *HhaI* restrikciós enzim használatával sikeresen el tudták különíteni a 16 szomatikus szerotípus referenciatörzset egymástól, ugyanakkor a mezei izolátumok esetében a módszer nem adott minden esetben az adott szerotípusra jellemző hasítási mintázatot.

A *P. multocida* külső membrán fehérjéi (OMP) szintén kiemelt jelentőséggel bírnak a virulencia szempontjából, és többen is megpróbálták összefüggést találni az OMP-k és a Heddleston szerotípusok között. A *P. multocida ompH* génjének restrikciós hasítási módszerrel történő vizsgálatáról több közleményben is beszámoltak. Jabbari és Esmaelizadeh (2005) az *EcoRI*, *HindIII* és *CfoI*, Antony és mtsai. (2007) pedig a *DraI* és *Hinfl* restrikciós

endonukleázokat alkalmazva összefüggést tudtak kimutatni a törzsek szomatikus szerotípusa és a kapott hasítási mintázatok között, de egyik szerző sem vizsgálata mind a 16 szomatikus szerotípus referenciatörzset. Sellyei és mtsai. (2013) a szomatikus szerotípus referenciatörzsek és különböző madárfajokból izolált *P. multocida* törzsek jellemzését végezték el az *ompH* külső membrán protein *DraI*, *HindIII* és *PvuII* enzimekkel végzett restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (PCR-RFLP) vizsgálatával. Munkájuk során összefüggésről számoltak be a törzsekre jellemző hasítási mintázatok és egyes szomatikus szerotípus referenciatörzsek között, ugyanakkor mezei izolátumok esetében az azonos szerotípusba tartozó törzsek esetében több restrikciós hasítási mintázatot is azonosítani tudtak.

Harper és mtsai. (2015) a *P. multocida* lipopoliszacharid struktúráinak összeállításáért felelős génszakaszok vizsgálata során nyolc LPS genotípust különítettek el, melyek azonosítására egy multiplex PCR reakciót is terveztek (3. táblázat).

**3. táblázat:** Az LPS genotípusok és a Heddleston szerotípusok megfeleltetése

LPS genotípus	Heddleston szerotípus	PCR-termék mérete
L1	1, 14	1307 bp
L2	2, 5	810 bp
L3	3,4	474 bp
L4	6,7	550 bp
L5	9	1175 bp
L6	10, 11, 12, 15	668 bp
L7	8, 13	931 bp
L8	16	255 bp

2.5.2. Genotipizáló vizsgálatok

2.5.2.1. RAPD-PCR

A RAPD (random amplifikált polimorf DNS) PCR érzékeny, költséghatékony és gyors módszer, mely rövid, random szekvenciájú primerek alkalmazásán alapul. A RAPD-primerek tapadására alkalmas helyek száma törzsenként eltérő, melynek köszönhetően változatos méretű és számú termékek jönnek létre a PCR során. A PCR-termékek agaróz gélelektroforézissel történő elválasztása mintázatok kialakulását eredményezi, melyek a törzsek közötti genetikai variabilitás és járványtani kapcsolatok feltárására is alkalmasak (Dabo és mtsai., 2000). Számos közlemény beszámolt a RAPD-PCR alkalmazásáról *P. multocida* izolátumok esetében is. Al-Haddawi és mtsai. (1999) egészséges és beteg nyulakból izolált *P. multocida* törzsek vizsgálatát végezte el RAPD-PCR technikával.

Eredményeik alapján megállapították, hogy az általuk vizsgált törzsek nagyfokú heterogenitást mutatnak, így a RAPD-PCR a szerotipizálás hasznos kiegészítéseként szolgál az epidemiológiai kutatások számára. Taylor és mtsai. (2010) szarvasmarhából származó *P. multocida* törzsek esetében vizsgálták a RAPD-PCR alkalmazhatóságát. A kísérletbe vont 41 törzs RAPD profilja alapján a módszert reprodukálhatónak találták, mely megbízhatóan alkalmazható a törzsek jellemzésére. Lee és mtsai. (2011) Kínában izolált sertés eredetű *P. multocida* törzsek vizsgálatával megállapították, hogy az A és D buroktípusú törzsek eltérő fragment mintázatot mutattak, ezáltal különböző klaszterekbe tudták őket besorolni. Emellett megállapították, hogy az egy telepről származó izolátumok genetikailag egységesek voltak, mely alapján arra következtettek, hogy egy gazdaságon belül egy adott törzs okozhatta a megbetegedéseket. A törzsek buroktípusa és a RAPD-PCR fragment mintázat közti összefüggésről indiai kutatók is beszámoltak sertés eredetű izolátumok esetében (Varte és mtsai., 2014).

#### 2.5.2.2. ERIC-PCR

Az ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) PCR ismeretlen funkciójú, ismétlődő szekvenciák azonosítására alkalmas, melyek a bakteriális genom nem kódoló, gének közötti régiókban helyezkednek el (Versalovic és mtsai., 1994). Az ERIC-PCR módszerét vérzésemes vérfertőzéses esetekből izolált törzsek vizsgálatára is sikeresen alkalmazták indiai kutatók (Biswas és mtsai., 2004). Az eredmények alapján megállapították, hogy a módszer alkalmas fenotípusos tulajdonságaikban megegyező izolátumok közti különbségek feltárására, és a referenciatörzstől való elkülönítésükre is. Hotchkiss és mtsai. (2011b) skót és francia szarvasmarhatartó telepekről izolált *P. multocida* törzsek vizsgálatát végezték el ezzel a módszerrel. A kapott mintázatok diverzitása a francia telepek esetében nagyobb mértékű volt, és az egy telepen belül azonosított többféle mintázat minden esetben állatvásárláshoz volt köthető.

#### 2.5.2.3. Multi-lókuszos szekvencia tipizálás (MLST)

A *P. multocida* multi-lókuszos szekvencia tipizálásának alapja 7 háztartási gén szekvencia elemzése. Ennek köszönhetően az MLST specifikus, érzékeny és reprodukálható módszer, mely adatbázisa révén a nemzetközi eredményekkel való összevetést is lehetővé teszi. A *P. multocida* MLST vizsgálatára napjainkban két rendszer használatos, mindkettő széles körben elterjedt. A Multi-host adatbázis (Davies és mtsai., 2004) változatos gazdafajokból izolált törzseket tartalmaz. A RIRDC MLST sémát (Subaaharan és mtsai., 2010) eredetileg madár eredetű törzsek tipizálására fejlesztették ki, de mára emlősökből származó izolátumokkal is nagymértékben bővült adatbázisa. Hotchkiss és mtsai. (2011a) szarvasmarha eredetű *P. multocida* törzsek MLST vizsgálatát végezték el. A 128 vizsgált törzs közül 105 a

13-as klonális komplexbe tartozott, a vérzésem vérfertőzést okozó törzsek pedig egyértelműen elkülönültek a légzőszervi tüneteket előidéző izolátumoktól. A vizsgált törzsek gazdafajok szerinti egyedi szekvencia típusokkal rendelkeztek, a sertés és a szarvasmarha eredetű törzsek esetében ugyanakkor fajok közötti keresztfertőzésre utaló jelek is azonosíthatók voltak. A szarvasmarhából izolált törzsek diverzitása alacsonyabb volt a madár, sertés vagy juh eredetű izolátumokhoz képest. Egy további vizsgálatban (Hotchkiss és mtsai., 2011b) az MLST módszer megkülönböztető erejét alacsonyabbnak találták az ERIC-PCR módszerrel szemben. A közleményben azonosított 34 ERIC-PCR típus 13 MLST szekvencia típusba (ST) volt besorolható, melyek többsége a BRDC eredetű törzsekre jellemző 13-as klonális komplexbe tartozott. Petersen és mtsai. (2014) vérzésem vérfertőzések esetekből származó törzsek MLST vizsgálatát végezték el, és megállapították, hogy a törzsek nagy többsége (91%) a 122-es szekvencia típusba (RIRDC MLST rendszer) volt sorolható, valamint a vérzésem vérfertőzést okozó törzsekre jellemző szekvencia típusokat magába foglaló klonális komplexet is meghatározták. Ezt később pakisztáni és thaiföldi izolátumok esetében is megerősítették (Moustafa és mtsai., 2013). Spanyol kutatók (Cardoso-Toset és mtsai., 2013) szabad tartású sertések septikaemiás pasteurellosis eseteiből izolált *P. multocida* törzseket vizsgálva a törzseket a 47-es szekvencia típusba sorolták be (Multi-host MLST rendszer), ami az adatbázisban lévő egyéb vérzésem vérfertőzés esetekből származó törzsekkel egy jól elkülönülő klasztert alkotott a baktériumfajon belül. Szintén spanyol kutatók (García-Alvarez és mtsai., 2017) juh és sertés eredetű *P. multocida* törzsek MLST vizsgálatát végezték el. Munkájuk során megállapították, hogy a juh eredetű izolátumokra jellemző szekvencia típusok csak erre a gazdafajra jellemzőek. Ezzel ellentétben, a sertés eredetű törzseket olyan szekvencia típusokba tudták besorolni, melyek széles körben elterjedtek, és számos gazdafajból izolálásra kerültek. Kínában a sertések tüdőgyulladásos megbetegedéséből izolált *P. multocida* törzsekre jellemző szekvencia típust azonosítottak (ST 11), mely széles körben elterjedt az országban (Peng és mtsai., 2018a).

#### 2.5.2.4. Teljes genom szekvenálás

A teljes genom szekvenálás (WGS – whole genome sequencing) széles körű elterjedésével a *P. multocida* kutatásokban is egyre nagyobb szerephez jutott az utóbbi években. Mivel a WGS ára egyre inkább lecsökken, mára a korábban használt molekuláris biológiai módszerekkel is felveszi a versenyt. A WGS az egy nukleotidot érintő polimorfizmusok (SNP – single nucleotide polymorphism) detektálásával pontosabban képes az izolátumok filogenetikai kapcsolatait is azonosítani.

A *P. multocida* kutatásokban virulens típusú törzsek (X73 és P1059) és egy avirulens törzs (Pm70) genomjában kerestek a virulencia mértékét befolyásoló géneket, melyeket vakcina célpontként lehetne felhasználni (Johnson és mtsai., 2013).



Peng és mtsai. (2018b) a különböző gazdafajokból izolált *P. multocida* törzsek összehasonlító genomikai elemzését végezték el. Munkájuk során nem tudtak azonosítani a *P. multocida* genomjában olyan géneket, melyek specifikusak lennének valamely gazdafajra, annak ellenére, hogy a jelenség a baktériumfaj esetében általánosan ismert. A filogenetikai vizsgálatok során azt is megállapították, hogy az azonos LPS genotípussal és MLST szekvencia típussal rendelkező izolátumok egy klaszterbe kerültek, ami arra utal, hogy az LPS és az MLST kombinációja jobb magyarázattal szolgál a filogenetikai fák topológiájára, mint a gazdafaji eredet.

Egy friss publikációban WGS adatok elemzésével baromfikolera esetekből izolált *P. multocida* törzsek leszármazási viszonyait határozták meg, és a REP-PCR módszerrel is összevetették. Az eredmények alapján megállapították, hogy a REP-PCR nem volt képes elkülöníteni az L1 és L3 LPS genotípusba tartozó törzseket, ugyanakkor a WGS és az SNP analízis alkalmas módszerek a PCR-alapú technikák helyettesítésére, és a teljes genom analízis egyértelmű betekintést tesz lehetővé a *P. multocida* állományon belüli és állományok közötti terjedésével kapcsolatban is (Omaleki és mtsai., 2020).

## **2.6. Gyógyítás, megelőzés, védekezés**

### **2.6.1. Gyógykezelés**

A bakteriális kórokozók antibiotikum-érzékenységének ismerete kiemelt jelentőségű a hatékony gyógykezelés kiválasztása szempontjából. A *P. multocida* törzsek antibiotikum-rezisztenciájával és annak genetikai hátterével kapcsolatban egyre több ismerettel rendelkezünk.

Chang és Carter (1976) korongdiffúziós teszt segítségével 262, szarvasmarha és sertés eredetű *P. multocida* törzs antibiotikum-érzékenységét vizsgálták, és az izolátumok 80,5%-ánál tapasztaltak rezisztenciát. A legtöbb törzs sztreptomocinnal, penicillinnel és tetraciklinnel szemben mutatott rezisztenciát, ugyanakkor minden törzs érzékeny volt kloramfenikolra.

Post és mtsai. (1991) szarvasmarha légzőszervi megbetegedésből izolált *P. multocida* törzsek antibiotikum-érzékenységét vizsgálták minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározással. Minden izolátum érzékenynek bizonyult ceftiofurra és szulfaklorpiridazinra, azonban szulfadimethoxinnal, tetraciklinnel és tilozinnal szemben rezisztenciát tapasztaltak.

Észak-Amerikában egy évtized (2000-2009) antibiotikum érzékenységi adatait elemezték légzőszervi megbetegedés tüneteit mutató szarvasmarhákból izolált *P. multocida* törzsek esetében, MIC meghatározással. Összesen 3291 *P. multocida* törzs vizsgálatát végezték el. Minden izolátum érzékeny volt ceftiofurra, de a penicillin, a danofloxacin, a florfenikol, a tilmikozin és a tultatromicin is jó hatékonyságúnak bizonyult. A vizsgálatok kezdetekor minden törzs érzékeny volt enrofloxacinra, azonban a következő három évben

rezisztens törzsek is megjelentek. Tetraciklinre a törzsek kevesebb, mint 50%-a volt érzékeny, és számuk folyamatosan csökkent a vizsgálati periódus alatt (Portis és mtsai., 2012).

Németországban szarvasmarha eredetű *P. multocida* törzsek antibiotikum-érzékenységét vizsgálták mikrohígítási módszerrel (Schwarz és mtsai., 2004). A törzsek mindegyike érzékeny volt cefkinomra, ceftiofurra, florfenikolra, gentamicinre, és a többségük amoxicillinre is. A törzsek rezisztenciát mutattak spektinomocinnel és szulfametoxazzal szemben, a trimetoprim-szulfametoxazol kombináció azonban jó hatékonyságúnak bizonyult.

Welsh és mtsai. (2004) 1994 és 2002 között vizsgálták szarvasmarhák tüdőgyulladásos megbetegedéséből izolált *P. multocida* törzsek antibiotikum érzékenységét, korongdiffúziós teszt segítségével. A ceftiofur, a cefalotin és az enrofloxacin jó hatékonyságúnak bizonyult a teljes vizsgált időszak alatt. Az eritromicin, florfenikol, spektinomicin, szulfaklorpiridazin, tetraciklin és trimetoprim-szulfametoxazol érzékenység viszont szignifikáns csökkenést mutatott.

Katsuda és mtsai. (2013) borjából izolált *P. multocida* törzsek antibiotikum rezisztenciáját vizsgálták MIC módszer segítségével. A törzsek 27%-a rezisztens volt legalább egy antibiotikummal szemben. A legtöbb törzsre oxitetraciklin rezisztencia volt jellemző, melyeknél a *tet(H)* génszakasz is azonosítható volt. A törzsek kisebb hányada rezisztensnek bizonyult tiamfenikollal, ampicillinnel, kanamicinnel és florfenikollal szemben is. A ceftiofur, a cefkinom, a cefazolin és az enrofloxacin azonban jó hatékonyságúnak bizonyult.

A *P. multocida* antibiotikum rezisztenciájának genetikai háttere széles körben kutatott. A baktérium  $\beta$ -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájáért a leggyakrabban a kisméretű plazmidokon kódolt (~4.1 kilobázis) *bla* gének tehetők felelőssé (Livrelli és mtsai., 1988, Rosenau és mtsai., 1991). Kehrenberg és mtsai. (2001) a tetraciklin rezisztencia genetikai hátterét tanulmányozva megállapították, hogy a *P. multocida* esetében legalább három különböző gén, a *tet(H)*, *tet(B)*, illetve *tet(G)* szabályozza a rezisztencia kialakulását. A tetraciklin rezisztencia kialakításáért felelős génszakasz és a MIC értékek között nem találtak összefüggést.

A *P. multocida* aminoglikozid rezisztenciájának kutatása kezdetben a sztreptomycinre irányult. A sztreptomycin rezisztenciáért felelős *strA* gén egy aminoglikozid-3'-foszfotransferáz kódolásáért felelős, melynek funkciója a sztreptomycin enzimatis inaktivációja (Schwarz és mtsai., 1989). Később egy további spektinomicin/sztreptomycin rezisztenciáért felelős gént is azonosítottak egy szarvasmarha eredetű *P. multocida* törzsben (Kehrenberg és mtsai., 2005b).

A szulfonamid rezisztencia kialakításáért a *sullI* génszakaszt tették felelőssé, mely szarvasmarha, sertés és baromfi eredetű *P. multocida* törzsek esetében is plazmidokon kódolt volt, melyek egy része a sztreptomycin, kanamicin, és kloramfenikol rezisztenciáért felelős génszakaszokat is hordozta (Yamamoto és mtsai., 1990). Egy borjúból izolált, florfenikollal és

kloramfenikollal szemben rezisztens *P. multocida* törzs vizsgálata során pedig sikeresen azonosították a rezisztenciáért felelős *floR* génszakaszt, melyről megállapították, hogy kódolásáért egy kisméretű plazmid (10874 bp) felelős (Kehrenberg és mtsai., 2005a).

Kadlec és mtsai. (2011) a *P. multocida* törzsek esetében megfigyelt makrolid rezisztencia genetikai hátterét tanulmányozva három új rezisztenciagént (rRNS metiláz - *erm(42)*, makrolid transzporter - *msr(E)*, makrolid foszfotransferáz - *mph(E)*) azonosítottak. Az *erm(42)* szekvenciát nem hordozó *P. multocida* törzsekbe klónozva 128-szoros MIC növekedés volt tapasztalható eritromicinnel, tilmikozinnal és klindamicinnel szemben, és 4-8-szoros növekedés tularomicinnel szemben. Az *msr(E)-mph(E)* rezisztenciagéneket hordozó klónok esetében 128-szoros MIC növekedés volt megfigyelhető eritromicinnel, tilmikozinnal és tularomicinnel szemben, ugyanakkor a klindamicin MIC értékek nem változtak. Ez arra enged következtetni, hogy az *msr(E)-mph(E)* rezisztenciagének spektruma csak a makrolidokra terjed ki, és a linkozamidokra nem.

Egy szarvasmarha légzőszervi tünetegyütteséből izolált *P. multocida* törzs genomjában egy integratív és konjugatív elem (ICE – integrative and conjugative element) is azonosításra került. Ez a 82 kilobázis méretű egység összesen 12 rezisztenciagént hordozott, melyek a sztreptomycin, spektinomycin, gentamicin, kanamicin, neomicin, tetraciklin, kloramfenikol, florfenikol, szulfonamidok, tilmikozin, klindamicin, és tularomicin rezisztenciáért tehető felelőssé (Michael és mtsai., 2012).

## 2.6.2. Vakcinák

A *P. multocida* elleni vakcinák fejlesztése szarvasmarhák esetében elsősorban a vérzéscsillapító vérfertőzést okozó törzsek ellen irányul (Confer, 1993), a légzőszervi tüneteket okozó törzsek elleni immunitás kevésbé tanulmányozott.

A kórokozó elleni első immunizálási kísérletek élő vakcinákkal történtek. Newman és mtsai. (1982) virulens *P. multocida* törzsekkel, aeroszol formájában vagy bőr alá oltva immunizáltak borjakat. Az aeroszollal immunizált borjak ellenállóbbnak bizonyultak a kísérleti fertőzéssel szemben, mint a szubkután oltott csoport egyedei. Élő, sztreptomycin-függő *P. multocida* törzsekkel is történtek vakcinázási kísérletek. A vakcinázott borjak ellenanyag títtere és testtömeg-gyarapodása meghaladta a kontroll csoportét, esetükben a klinikai tünetek enyhébbek voltak, és az elhullások aránya is kisebb volt (Catt és mtsai., 1985, Kadel et al, 1985, Chengappa és mtsai., 1989).

Adler és mtsai. (1999) a potenciális vakcina antigének között említi az Oma87 külső membrán fehérjét, a 4-es típusú fimbria kisalegység proteinjét (*ptfA*), illetve egy vas szabályozott külső membrán fehérjét (*tbpA*), azonban ezek egyike sem képezte vakcina fejlesztési kutatások tárgyát a szarvasmarhák légzőszervi tünetegyüttesével kapcsolatosan. Dabo és mtsai. (2007) egy korábbi fertőzések kísérlet (Confer és mtsai., 1996) eredményei alapján az A buroktípusú *P. multocida* törzsek külső membrán fehérjeit javasolták potenciális vakcina célpontnak. Confer és mtsai. (1996) A:3 szerotípusú *P. multocida* vakcinával oltott borjak esetében vizsgálták a baktérium külső membrán proteinjeire specifikus ellenanyag titeret. A élő baktériummal aeroszol úton vakcinázott borjak ellenanyag szintjei szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll csoporthoz képest, melyet előlt vakcinával immunizáltak.

Prado és mtsai. (2005) egy szarvasmarha eredetű, A:3 szerotípusú *P. multocida* törzs külső membrán proteinjeit vizsgálták vakcina célpontként. A külső membrán frakciókkal és inkomplett Freund-adjuvánssal történt immunizáció ellenanyag választ produkált a szarvasmarhákban, és az elváltozások szignifikáns csökkenését idézte elő a kizárólag adjuvánssal oltott kontroll csoporthoz képest. A vizsgálatok során egy 96 kDa molekulatömegű immundomináns fehérjét is azonosítottak, mely a *hasR*, sejtfelszínen lokalizált, vasfelvételben szerepet játszó fehérje homológja.

Gatto és mtsai. (2002) a *P. multocida* OmpA külső membrán proteinjét vizsgálva megállapították, hogy az egy konzervált, immunogén tulajdonsággal rendelkező fehérje, mely adhezin funkcióval is rendelkezik. Egy későbbi kísérletben Dabo és mtsai. (2008) A:3 szerotípusú *P. multocida* OmpA proteinjével immunizált egerekben sikeresen indukáltak ellenanyag választ, ugyanakkor protektív immunitás nem alakult ki a kísérleti fertőzéssel szemben.

Egy közelmúltban megjelent közleményben (Wei és mtsai., 2017) a *P. multocida* lipoprotein B (PlpB) vizsgálata során megállapították, hogy a különböző eredetű törzsek PlpB szekvenciája 80,8-99,4%-os homológiát mutat. A PlpB proteinnel immunizált egerekben védetség alakult ki a kórokozóval szemben, mely alapján potenciális alegység vakcina jelöltként szolgálhat.

### **3. Anyag és módszer**

#### **3.1. A felhasznált baktériumtörzsek**

Összesen 185 db *P. multocida* törzset vontunk be a vizsgálatba, melyek szarvasmarha, juh, kecske, sertés, macska gazdafajból és humán esetekből kerültek izolálásra Magyarországon, 1988 és 2018 között. A humán esetekből izolált törzseket a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ bocsátotta rendelkezésünkre. A törzsek részletes adatait a Melléklet 1. táblázata mutatja be.

#### **3.2. A törzsek tenyésztése és azonosítása**

A törzseket 20% zsírszegény tejpor oldatban (Skim milk powder, BD Difco), -70°C-on tároltuk. A vizsgálatokhoz a fagyasztott baktérium kultúrából kioltott, 5% birkavérrel kiegészített táptalajon (Columbia agar, LAB M) 37°C-on 24 órán át inkubált tenyészeteket használtuk. A telepeket a biokémiai vizsgálatokhoz marha agy-szív kivonatot (Brain-heart infusion, Merck) tartalmazó táplevesbe oltva szaporítottuk, a szerológiai vizsgálatokhoz pedig burgonya-keményítő táptalajon (Dextrose Strach agar, BD Difco) készítettünk pázsittenyészetet. A lemezeket 37°C-on, 24 órán keresztül inkubáltuk.

#### **3.3. A törzsek fenotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok**

##### **3.3.1. Telepmorfológiai vizsgálatok**

A baktériumok 24 órás, 37°C-on történt inkubációja után megfigyeltük a kialakult baktériumtenyészet színét, fényességét, alakját, nagyságát, konzisztenciáját és a telepek szélének morfológiai jellemzőit.

##### **3.3.2. Biokémiai tulajdonságok vizsgálata**

Az izolátumok fenotípusos jellemzéséhez biokémiai próbákat végeztünk. Hagyományos levestáptalajok alkalmazásával vizsgáltuk a baktériumok ornitin-dekarboxiláz aktivitását (Millipore, Ornithine Decarboxylase Broth), és szénhidrát hasznosító képességét laktóz, arabinóz, maltóz, xilóz, trehalóz, dulcit és szorbit tartalmú táplevesekben. A marha agy-szív kivonatot tartalmazó táplevesben 37°C-on 24 órán át szaporított baktériumtenyészet 100 µl-nyi mennyiségeit oltottuk be a táplevesbe. A teszteket 24 és 48 órás inkubációt követően olvastuk le. Az egységes irodalmi fajtipizáló reakciók értékelését (3. táblázat) követően, a törzseket Fegan és mtsai. (1995), valamint Blackall és mtsai. (1997) által leírt biotípusokba soroltuk be (2. táblázat).

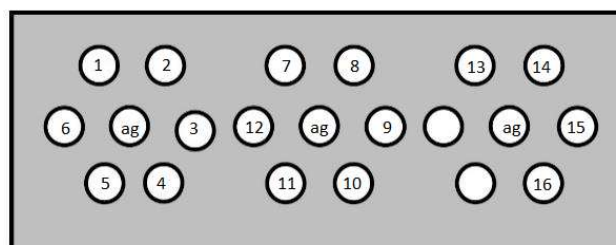
Az ornitin-dekarboxiláz tesztet a gyártó utasításainak megfelelően végeztük el. A szénhidrát bontó képesség vizsgálatához felhasznált tesztek a következő recept alapján állítottuk össze:

*Brómtimolkékes peptonvíz* (pH = 7,2 - 7,4):  
10,0 g Bacto pepton (LAB M)  
5,0 g NaCl  
0,03 g brómtimolkék por  
1000 ml desztillált víz  
1% szénhidrát: laktóz, arabinóz, maltóz, trehalóz, xilóz, dulcitol, szorbit

### 3.3.3. A szerotípus meghatározása

A vizsgált *P. multocida* törzsek szerotípusát agargél-precipitációs (AGP) próbában határoztuk meg. A tesztben használt hőstabil antigéneket Heddleston és mtsai. (1972) módszere alapján állítottuk elő. A szerotípus típus-törzseket, valamint a mezei izolátumokat burgonya-keményítő táptalajra (Dextrose Strach agar, BD Difco) oltottuk, és 24 órán át 37°C-on inkubáltuk. A 24 órás baktérium tenyészeteket 1,5 ml mosóoldattal (40 ml fiziológiás konyhasóoldat, 200 µl 35%-os formaldehid) lemostuk, és a baktérium szuszpenzió sűrűségét denzitométer (DEN-1 McFarland Densitometer, BioSan, Riga, Lettország) segítségével 3 McFarland-re állítottuk be. A baktérium szuszpenziókat egy órán át asztali blokk termosztátban (BioSan) 100°C-on forraltuk, majd 9000 g-n 5 percig centrifugáltuk, és a felülúszót használtuk antigénként az AGP tesztben.

Az AGP teszt során mikroszkóp tárgylemezre 5 ml Noble-agarból (0,9% Noble agar [BD Difco™ Agar, Noble; Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, New Jersey], 8,5% NaCl, és 0,01% thimerosal desztillált vízben) gélét öntöttünk. A megdermedt gélbe 4 mm átmérőjű mélyedéseket vágunk, olyan elrendezésben, hogy a központi mélyedést hatszög alakban hat szélső mélyedés vette körbe, 6 mm távolságra a középső mélyedéstől. A középső mélyedésbe a vizsgált antigén 30 µl-e került, a szélső mélyedésekbe pedig a szerotípus-specifikus savók (1-16) 30-30 µl-ét vittük fel pipetta segítségével (2. ábra).



**2. ábra:** Az AGP teszt elrendezése

A tárgylemezeket nedves környezetben, 37 °C-on inkubáltuk, majd 24 és 48 óra elteltével bíraltuk el. A precipitációs ívek megjelenését erős ferdefényű megvilágításban ellenőriztük. Amennyiben egynél több precipitációs ív is megfigyelhető volt, a legerősebb reakciót tekintettük a szerotípusnak, a gyengébbeket pedig keresztreakciónak.

### 3.3.4. Az antibiotikum-érzékenység vizsgálata

Antibiotikum-érzékenység meghatározása korongdiffúziós módszerrel

Az antibiotikum-érzékenységet az összes vizsgált *P. multocida* törzs esetében meghatároztuk korongdiffúziós módszerrel. A törzseket a CLSI által kiadott ajánlásnak megfelelően vizsgáltuk (CLSI, 2018a). Friss baktériumtenyészetekből 5 ml fiziológias konyhasóoldatban 0.5 McFarland sűrűségű szuszpenziót készítettünk, melyet denzitométer segítségével (BioSan) állítottunk be. A szuszpenziót steril vattapálca segítségével 5% juhvért tartalmazó Müller-Hinton (LAB M) táptalajra oltottuk, majd ráhelyeztük az antibiotikum korongokat (4. táblázat).

**4. táblázat:** Az antibiotikum-érzékenység meghatározás során felhasznált antibiotikumok (Mast Diagnostica)

<b>Antibiotikum neve</b>	<b>Rövidítés</b>
Penicillin	PEN 10
Ampicillin	AP 10
Ceftiofur	CFU 30
Sztreptomycin	S 10
Gentamicin	GM 10
Apramicin	APR 15
Tetraciklin	T 30
Doxiciklin	DXT 30
Eritromicin	E 15
Tilmikozin	TIL15
Tulatromicin	TUL 30
Klindamicin	CD 2
Szulfonamidok	SMX 300
Enrofloxacin	ENF 5
Nalidixsav	NA 30
Kloramfenikol	C 30
Florfenikol	FFC 30

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



A táptalajokat 24 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. Az eredményeket a CLSI Vet01S (CLSI, 2018b) és az M100 (CLSI, 2018a) dokumentumaiban megadott határértékek alapján bíráltuk el. Pozitív kontrollként az ATCC25922 *P. multocida* törzset használtuk.

#### Minimális gátló koncentráció meghatározás

A részletes vizsgálatba vont Pm238 azonosítóval ellátott törzs esetében az antibiotikum rezisztencia viszonyokat minimális gátló koncentráció (MIC – minimal inhibitory concentration) meghatározással is felmértük, melyhez MIC tesztcsíkokat alkalmaztunk (Liofilchem, Roseto, Italy). Összesen 18 antibiotikummal szemben vizsgáltuk a törzs érzékenységét, melyek a következők voltak: penicillin, ampicillin, cefalotin, ciprofloxacin, sztreptomycin, spektinomycin, gentamicin, tetraciklin, doxiciklin, eritromicin, klindamicin, kloramfenikol, florfenikol, szulfametoxazol, trimetoprim-szulfametoxazol, kolisztin, enrofloxacin és nalidixsav. Az *Escherichia coli* ATCC25922 törzset használtuk kontroll törzsként a tesztekben. A törzseket 5% juhvérrel kiegészített Müeller-Hinton táptalajon tenyésztettük 37°C-on 24 órán keresztül. A baktériumokat fiziológiás sóoldatban szuszpendáltuk, és 0.5 McFarland denzitásra állítottuk be. Ezt követően egy steril tamponnal a táptalaj felületére oltottuk a baktériumokat, majd a MIC tesztcsíkot a táptalaj közepére helyeztük. Az egyes antibiotikumokhoz tartozó határértékeket a CLSI ajánlásainak megfelelően alkalmaztuk (CLSI, 2018a; CLSI 2018b).

### **3.4. A törzsek genotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok**

#### 3.4.1. DNS izolálás

A friss színtenyészetekből egy kacsnyi baktériumot 50 µl PCR vízben (VWR) szuszpendáltunk, majd 20 percen keresztül 99°C-on forraltunk asztali blokktermosztátban (BioSan). Az így kapott szuszpenziót 5 percig 9000 g-n centrifugáltuk, majd a DNS-t tartalmazó felülúszót steril csövekbe pipettáztuk át. Az így kapott templát DNS töménységét Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) segítségével ellenőriztük, majd a koncentrációt 100 ng/µl-re állítottuk be. A DNS templátot további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

### 3.4.2. Polimeráz láncreakciók

Vizsgálataink során az 5. táblázatban ismertetett primereket használtuk fel.

**5. táblázat:** A vizsgálatok során felhasznált primerek

Név	Primer	Hivatkozás
toxA-6	5' -TGCTCAAATCCTAAATCACCTTGT -3	Register és DeJong, 2006
toxA-7	5'- ACTACAGATTCTAACAAGGTTCTGG -3'	Register és DeJong, 2006
KMT1T7	5'- ATCCGCTATTIACCCAGTGG -3'	Townsend és mtsai., 1998b
KMT1SP6	5'- GCTGTAAACGAACTCGCCAC -3'	Townsend és mtsai., 1998b
GauA fwd	5'- AATGTTTGCGATAGTCCGTTAGA -3'	Gautam és mtsai., 2004
GauA rev	5'- ATTTGGCGCCATATCACAGTC -3'	Gautam és mtsai., 2004
CapA fwd	5' – TGCCAAAATCGCAGTCAG – 3'	Townsend és mtsai., 2001
CapA rev	5' – TTGCCATCATTGTCAGTG - 3'	Townsend és mtsai., 2001
CapB fwd	5' – CATTATCCAAGCTCCACC - 3'	Townsend és mtsai., 2001
CapB rev	5' – GCCCGAGAGTTTCAATCC - 3'	Townsend és mtsai., 2001
CapD fwd	5' – TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC - 3'	Townsend és mtsai., 2001
CapD rev	5' – CATCTACCCACTCAACCATATCAG - 3'	Townsend és mtsai., 2001
CapE fwd	5' – TCCGCAGAAAATTATTGACTC - 3'	Townsend és mtsai., 2001
CapE rev	5' – GCTTGCTGCTTGATTTTGTC - 3'	Townsend és mtsai., 2001
CapF fwd	5' – AATCGGAGAACGCAGAAATCAG - 3'	Townsend és mtsai., 2001
CapF rev	5' – TTCCGCCGTCAATTACTCTG - 3'	Townsend és mtsai., 2001
27F	5'- AGAGTTTGATCATGGCTCAG -3'	Sellyei és mtsai., 2012
1242R	5'- CCATTGTAGGACGTGTGAAGCCC -3'	Sellyei és mtsai., 2012
L1 fwd	5'- ACATTCCAGATAATACACCCG -3'	Harper és mtsai., 2015
L1 rev	5'- ATTGGAGCACCTAGTAACCC -3'	Harper és mtsai., 2015
L2 fwd	5'- CTAAAGTAACACTCGCTATTGC -3'	Harper és mtsai., 2015
L2 rev	5'- TTTGATTTCCCTTGGGATAGC -3'	Harper és mtsai., 2015
L3 fwd	5'- TGCAGGCGAGAGTTGATAAACCATC -3'	Harper és mtsai., 2015
L3 rev	5'- CAAAGATTGGTTCCAAATCTGAATGGA -3'	Harper és mtsai., 2015
L4 fwd	5'- TTTCCATAGATTAGCAATGCCG -3'	Harper és mtsai., 2015
L4 rev	5'- CTTTATTTGGTCTTTATATATACC -3'	Harper és mtsai., 2015
L5 fwd	5'- AGATTGCATGGCGAAATGGC -3'	Harper és mtsai., 2015
L5 rev	5'- CAATCCTCGTAAGACCCCC -3'	Harper és mtsai., 2015
L6 fwd	5'- TCTTTATAATTATACTCTCCCAAGG -3'	Harper és mtsai., 2015
L6 rev	5'- AATGAAGGTTTAAAAGAGATAGCTGGAG -3'	Harper és mtsai., 2015
L7 fwd	5'- CCTATATTTATATCTCCTCCCC -3'	Harper és mtsai., 2015
L7 rev	5'- CTAATATATAAACCATCCAACGC -3'	Harper és mtsai., 2015
L8 fwd	5'- GAGAGTTACAAAATGATCGGC -3'	Harper és mtsai., 2015
L8 rev	5'- TCCTGGTTCATATATAGGTAGG -3'	Harper és mtsai., 2015
out fwd	5'- TATCGTGCCGAGGTAGAAC -3'	Sellyei és mtsai., 2010
A rev	5'- CTTGACATTGATTGAGCTGA -3'	Sellyei és mtsai., 2010
B rev	5'- AAGAAACACCTTGAGCT -3'	Sellyei és mtsai., 2010
fimA F	5'- CCATCGGATCTAAACGACCTA -3'	Ewers és mtsai., 2006
fimA R	5'- AGTATTAGTTCCTGCGGGTG -3'	Ewers és mtsai., 2006
hsf-1 F	5'- TTGAGTCGGCTGTAGAGTTCG-3'	Ewers és mtsai., 2006

**5. táblázat (folytatás):** A vizsgálatok során felhasznált primerek

Név	Primer	Hivatkozás
hsf-1 R	5'- ACTCTTTAGCAGTGGGGACAACCTC -3'	Ewers és mtsai., 2006
hsf-2 F	5'- ACCGCAACCATGCTCTTAC -3'	Ewers és mtsai., 2006
hsf-2 R	5'- TGACTGACATCGGCGTAC -3'	Ewers és mtsai., 2006
pfhA F	5'- TTCAGAGGGATCAATCTTCG -3'	Ewers és mtsai., 2006
pfhA R	5'- AACTCCAGTATGGTTTGTCG -3'	Ewers és mtsai., 2006
tadD F	5'- TCTACCCATTCTCAGCAAGGC -3'	Ewers és mtsai., 2006
tadD R	5'- ATCATTTTCGGGCATTACC -3'	Ewers és mtsai., 2006
hgbA F	5'- TGGCGGATAGTCATCAAG -3'	Ewers és mtsai., 2006
hgbA R	5'- CCAAAGAACCACTACCCA -3'	Ewers és mtsai., 2006
hgbB F	5'- TCATTGAGTACGGCTTGAC -3'	Ewers és mtsai., 2006
hgbB R	5'- CTTACGTCAGTAACACTCG -3'	Ewers és mtsai., 2006
tbpA F	5'- TTGGTTGGAAACGGTAAAGC -3'	Ewers és mtsai., 2006
tbpA R	5'- TAACGTGTACGGAAAAGCCC -3'	Ewers és mtsai., 2006
nanH F	5'- GAATATTTGGGCGGCAACA -3'	Ewers és mtsai., 2006
nanH R	5'- TTCTCGCCCTGTCATCACT-3'	Ewers és mtsai., 2006
PmompA fwd	5'- ATGAAAAAACAGCAATTGC-3'	Katoch és mtsai., 2014
PmompA rev	5' – TTATTTGTTACCTTTAACAGC-3'	Katoch és mtsai., 2014
catAIII F	5'-ACCATGTGGTTTTAGCTTAACA-3'	Kehrenberg és Schwarz, 2001
catAIII R	5'-GCAATAACAGTCTATCCCCTTC-3'	Kehrenberg és Schwarz, 2001
sullI F	5'-ACAGTTTCTCCGATGGAGGCC-3'	Kehrenberg és Schwarz, 2001
sullI R	5'-CTCGTGTGTGCGGATGAAGTC-3'	Kehrenberg és Schwarz, 2001
strA F	5'-TGACTGGTTGCCTGTCTCAGAGG-3'	Kehrenberg és Schwarz, 2001
strA R	5'-CCAGTTGTCTTCGGCGTTAGCA-3'	Kehrenberg és Schwarz, 2001
parC F	5'-GATGGCTTGAAACCGGTGCA-3'	Katsuda és mtsai., 2009
parC R	5'-GCCATTCCCACCGCAATCC-3'	Katsuda és mtsai., 2009
tetB F	5'-TACGTGAATTTATTGCTTCGG-3'	Aminov és mtsai., 2002
tetB R	5'-ATACAGCATCCAAAGCGCAC-3'	Aminov és mtsai., 2002
erm(42) F	5'-TGCACCATCTTACAAGGAGT-3'	Rose és mtsai., 2012
erm(42) R	5'-CATGCCTGTCTTCAAGGTTT-3'	Rose és mtsai., 2012
msr(E) F	5'-ATGCCCAGCATATAAATCGC-3'	Rose és mtsai., 2012
msr(E) R	5'-ATATGGACAAAGATAGCCCG-3'	Rose és mtsai., 2012
mph(E) F	5'-TATAGCGACTTTAGCGCAA-3'	Rose és mtsai., 2012
mph(E) R	5'-GCCGTAGAATATGAGCTGAT-3'	Rose és mtsai., 2012
Pmu_02680F	5'- TTATGAACCCGGTGCAGTG-3'	Klima és mtsai., 2014
Pmu_02680R	5'- TGTGAGAGCAAAGACTCTGGT-3'	Klima és mtsai., 2014
Pmu_02700F	5'- ACGGAATCATAGACCTGCCAC-3'	Klima és mtsai., 2014
Pmu_02700R	5'- TCTGTTGCAGTTGTATGTCGGA-3'	Klima és mtsai., 2014
Pmu_03360F	5'- CAAGGCAGTGCTGGGACATA-3'	Klima és mtsai., 2014
Pmu_03360R	5'- GTTCCTTGCCTTTCACCCAC-3'	Klima és mtsai., 2014
Pmu_03510F	5'- TGCCGCTTTTCGTCTTTGTG-3'	Klima és mtsai., 2014
Pmu_03510R	5'- TACACGCCGAAGTTTCCGAA-3'	Klima és mtsai., 2014
Pmu_03540F	5'- GACTTCTCGACGTTCTCCGG-3'	Klima és mtsai., 2014
Pmu_03540R	5'- ATCGTTGCAATTCCTGTCC-3'	Klima és mtsai., 2014

### *Fajazonosítás*

A törzsek faji besorolásának megerősítésére multiplex PCR reakciót alkalmaztunk. A módszer segítségével a fajspecifikus régió (*kmt1*), a toxingén, valamint az A buroktípusra jellemző génszakasz egyidejű kimutatását tudtuk elvégezni. (Townsend és mtsai., 1998b; Gautam és mtsai., 2004; Register és DeJong, 2006).

A reakcióelegy összetétele:

- 14.4 µl PCR víz
- 2.5 µl 10 x DreamTaq puffer (20 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 0.5 µl 10 mM dNTP
- 0.5 µl MgCl<sub>2</sub>
- 0.4 µl 50 µM GauA fwd primer
- 0.4 µl 50 µM GauA rev primer
- 0.25 µl 50 µM KMT1SP6 primer
- 0.25 µl 50 µM KMT1T7 primer
- 0.25 µl 50 µM toxA-6 primer
- 0.25 µl 50 µM toxA-7 primer
- 0.3 µl 5 U/µl DreamTaq polimeráz
- 5 µl templát DNS

### *A burok antigének molekuláris meghatározása*

Az A buroktípus meghatározásához a fent leírt kombinált multiplex PCR reakciót alkalmaztuk. Az egyéb buroktípusok (B, D, E, F) detektálására buroktipizáló PCR-t használtunk (Townsend és mtsai., 2001). Pozitív kontrollként az X-73 (A típus), M1404 (B típus), P3881 (D típus), P1235 (E típus) és P4679 (F típus) buroktípus referencia törzsek szolgáltak.

A reakcióelegy összetétele:

- 7.2 µl PCR víz
- 2.5 µl 10 x DreamTaq puffer (20 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 0.5 µl 10 mM dNTP
- 0.5 µl MgCl<sub>2</sub>
- 1.0 µl 20 µM CapA fwd primer
- 1.0 µl 20 µM CapA rev primer
- 1.0 µl 20 µM CapB fwd primer
- 1.0 µl 20 µM CapB rev primer
- 1.0 µl 20 µM CapD fwd primer
- 1.0 µl 20 µM CapD rev primer
- 1.0 µl 20 µM CapE fwd primer
- 1.0 µl 20 µM CapE rev primer
- 1.0 µl 20 µM CapF fwd primer
- 1.0 µl 20 µM CapF rev primer
- 0.3 µl 5 U/µl DreamTaq polimeráz
- 5 µl templát DNS

## LPS PCR

A törzsek LPS genotípusát az LPS PCR segítségével határoztuk meg (Harper és mtsai., 2015).

A reakcióelegy összetétele:

- 18.4 µl PCR víz
- 2.5 µl 10xPCR puffer
- 0.5 µl 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.5 µl 10mM dNTP-mix
- 0.4 µl 10µM fwd primer
- 0.4 µl 10µM rev primer
- 0.3 µl 5U/ µl DreamTaq
- 2 µl templát DNS
- 16S rDNS PCR-RFLP

A *P. multocida* fajon belül a két fő leszármazási vonalat a 16S riboszómális RNS génjének PCR-RFLP (polimeráz láncreakciót követő restrikciós hasításon alapuló fragmenthossz polimorfizmus) módszerrel különítettük el egymástól (Sellyei és mtsai., 2012).

A reakcióelegy összetétele:

- 16.3 µl PCR víz
- 2.5 µl 10 x DreamTaq puffer (20 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 0.5 µl 10 mM dNTP
- 0.5 µl 10 µM 27F primer
- 0.5 µl 10 µM 1242R primer
- 0.2 µl 5 U/µl DreamTaq polimeráz
- 5 µl templát DNS

A PCR termékeket a FastDigest™ *Hind*III restrikciós endonukleázzal hasítottuk a gyártó utasításainak megfelelően (Thermo Scientific). A fragmentek hosszát agaróz gélelektroforézissel és a Kodak Molecular Imaging Software (v. 5.0) programmal állapítottuk meg.

## Virulencia asszociált gének komplex kimutatása

I és IV típusú fimbria alegység gének (*fimA*, *ptfA*), autotranszporter adhezinek (*hsf1*, *hsf2*), az FliP fimbria összeállításáért felelős szekréciós apparátus alkotóeleme (*tadD*), és a filamentózus haemagglutinin (*pfhA*) génjének azonosítására az irodalomban leírt PCR reakciókat használtuk (Sellyei és mtsai., 2010; Tang és mtsai., 2009). A vaskötő fehérjéket kódoló gének (*hgbA*, *hgbB*, *tbpA*) és a *nanH* neuraminidáz génjének kimutatását Ewers és mtsai. (2006) és Atashpaz és mtsai. (2009) által leírtak szerint végeztük el. A vizsgálatokat Bio-Rad C1000 PCR (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA, USA) készülékben végeztük.

A reakcióelegyek összetétele:

*pfhA – hsf1- hsf2* PCR

16.8 µl PCR víz  
2.5 µl 10 x DreamTaq puffer (20 mM MgCl<sub>2</sub>)  
0.5 µl 10 mM dNTP  
0.5 µl MgCl<sub>2</sub>  
0.4 µl 10 µM *pfhA* fwd primer  
0.4 µl 10 µM *pfhA* rev primer  
0.4 µl 10 µM *hsf-1* fwd primer  
0.4 µl 10 µM *hsf-1* rev primer  
0.4 µl 10 µM *hsf-2* fwd primer  
0.4 µl 10 µM *hsf-2* rev primer  
0.3 µl 5 U/µl DreamTaq polimeráz  
2 µl templát DNS

*tadD – fimA* PCR

17.6 µl PCR víz  
2.5 µl 10 x DreamTaq puffer (20 mM MgCl<sub>2</sub>)  
0.5 µl 10 mM dNTP  
0.5 µl MgCl<sub>2</sub>  
0.4 µl 10 µM *tadD* fwd primer  
0.4 µl 10 µM *tadD* rev primer  
0.4 µl 10 µM *fimA* fwd primer  
0.4 µl 10 µM *fimA* rev primer  
0.3 µl 5 U/µl DreamTaq polimeráz  
2 µl templát DNS

A *hgbB – tbpA* PCR és a *hgbA – nanH* PCR esetében a reakcióelegy összetétele megegyezett a *tadD – pfhA* PCR premixével.

A IV. típusú fimbria kisalegysége alapvetően két allélváltozatban (A és B) fordul elő a *P. multocida* populációban, ezek kimutatására és elkülönítésére a *ptfA* differenciál PCR (Sellyei és mtsai., 2010) technikát alkalmaztuk.

A reakcióelegy összetétele:

18.5 µl PCR víz  
2.5 µl 10 x DreamTaq puffer (20 mM MgCl<sub>2</sub>)  
0.5 µl 10 mM dNTP  
0.5 µl MgCl<sub>2</sub>  
0.3 µl 50 µM out fwd primer  
0.3 µl 50 µM B rev primer  
0.2 µl 50 µM A rev primer  
0.2 µl 5 U/µl DreamTaq polimeráz  
2 µl templát DNS

### *Antibiotikum rezisztencia gének kimutatása*

A kloramfenikol (*catAIII*), szulfonamid (*sullI*), és sztreptomycin (*strA*) rezisztencia géneket Kehrenberg és mtsai. (2001), a tetraciklin (*tetB*) rezisztencia kialakításáért felelős génszakaszt Aminov és mtsai. (2002) munkája alapján mutattuk ki. A *parC* génszakaszt célzó PCR reakciót Katsuda és mtsai. (2009) közleménye alapján végeztük el. A makrolid- és linkozamid rezisztencia kialakításáért felelős génszakaszok kimutatását a Rose és mtsai., (2012) által leírt PCR reakciókkal vizsgáltuk. A Klima és mtsai. (2014) által kidolgozott ICEP*mu1* mobilis genetikai elemmel asszociált géneket célzó PCR reakciókat is elvégeztük.

A reakcióelegyek összetétele minden esetben megegyezett:

- 15.4 µl PCR víz
- 2.5 µl 10 x DreamTaq puffer (20 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 0.5 µl 10 mM dNTP
- 0.5 µl MgCl<sub>2</sub>
- 0.4 µl 10 µM fwd primer
- 0.4 µl 10 µM rev primer
- 0.3 µl 5 U/µl DreamTaq polimeráz
- 5 µl templát DNS

Az egyes reakciók körülményeit a 6. táblázat tartalmazza.

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

**6. táblázat:** A PCR reakciók során alkalmazott reakciókörmények és primerek

PCR	Kezdeti denaturáció	Denaturáció	Anelláció	Extenzió	Végső extenzió	Ciklus-szám
Fajspecifikus	95°C 5 min	95°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 10 min	35
Buroktípus	95°C 5 min	95°C 30 sec	55°C 30 sec	72°C 1 min	72°C 10 min	30
LPS	95°C 5 min	95°C 30 sec	53°C 45 sec	72°C 1 min	72°C 10 min	30
16S	95°C 5 min	95°C 45 sec	55°C 1 min	72°C 45 sec	72°C 10 min	35
<i>ptfA</i>	95°C 5 min	95°C 30 sec	50°C 1 min	72°C 30 sec	72°C 10 min	30
<i>pfhA-hsf1-hsf2</i>	95°C 5 min	95°C 30 sec	59°C 1 min	72°C 1 min	72°C 10 min	25
<i>tadD-fimA</i>	95°C 5 min	95°C 30 sec	59°C 1 min	72°C 1 min	72°C 10 min	25
<i>hgbB-tbpA</i>	95°C 5 min	95°C 30 sec	54°C 50 sec	72°C 1 min	72°C 10 min	25
<i>hgbA-nanH</i>	95°C 5 min	95°C 30 sec	56°C 30 sec	72°C 30 sec	72°C 10 min	25
<i>ompA</i>	95°C 5 min	95°C 30 sec	50°C 30 sec	72°C 1 min	72°C 10 min	35
<i>catAIII, tetB</i>	95°C 5 min	95°C 1 min	64°C 1.5 min	72°C 1 min	72°C 10 min	35
<i>strA, sullI, parC, erm(42), msr(E), mph(E)</i>	95°C 5 min	95°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 10 min	35
ICEP <sub>mu1</sub>	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C	35
asszociált gének	5 min	1 min	1 min	1 min	10 min	



### 3.4.3. Szekvencia meghatározás és filogenetikai analízis

Az *ompA* külső membrán fehérje génjének filogenetikai elemzését 94 db *P. multocida* törzs esetében végeztük el, melyeket földrajzi elterjedésük, szerotípusuk és virulenciagén profiljuk alapján választottunk ki. Az *ompA* génszakasz amplifikálását Katoch és mtsai. (2014) munkája alapján végeztük el.

A reakcióelegy összetétele:

- 16.0 µl PCR víz
- 2.5 µl 10xPCR puffer
- 0.5 µl 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.5 µl 10mM dNTP-mix
- 0.4 µl 10µM forward primer
- 0.4 µl 10µM reverse primer
- 0.3 µl 5U/ µl DreamTaq
- 2 µl templát DNS

A PCR termékek szekvenálását a Macrogen Europe cég végezte (Amszterdam, Hollandia). A részleges *ompA* gén szekvenciák illesztését a BioEdit programmal (7.2.3. verzió) végeztük el (Hall, 2011). A nukleotid szekvencia adatokat a MEGA7 szoftverrel elemeztük tovább (Kumar és mtsai, 2016). A távolságokat a Neighbour-Joining algoritmus segítségével állapítottuk meg (Saitu és Nei, 1987). Az evolúciós távolságokat a p-distance korrekciós ráta figyelembevételével számítottuk ki, és a törzsfa topológiáját 1000 ismétléses bootstrap analízissel vizsgáltuk. Az *ompA* szekvenciákat a GenBank adatbázisba is benyújtottuk, azonosító számuk MK805100-MK805124.

### 3.4.4. Multi-lókuszos szekvencia tipizálás

A vérzéses vérfertőzés esetekből izolált törzseket a Multi-host MLST séma alkalmazásával jellemeztük (Davies és mtsai., 2004). A macska eredetű és a humán esetekből izolált törzsek MLST vizsgálatát Subaaharan és mtsai. (2010) munkájában leírt RIRDC MLST séma szerint végeztük el (7. táblázat).

## 7. táblázat: A felhasznált MLST primerek

MLST rendszer	Név	5'-3' szekvencia	Termék hossza
Multi-host	adk fwd	5'- AAGGBACWCAAGCVCAAT -3'	531 bp
Multi-host	adk rev	5'- CACTTTTTKYGTMCCGTC -3'	
Multi-host	aroA fwd	5'- TTTACCDGGYTCYAAAAG -3'	558 bp
Multi-host	aroA rev	5'- CTTYACVCGCCAGTTAT -3'	
Multi-host	deoD fwd	5'- GTGCATTTGCGYATGTTG -3'	576 bp
Multi-host	deoD rev	5'- TGSYGTKGTTTGTTCGTG -3'	
Multi-host	gdhA fwd	5'- YTAGTTGARCCTGAACG -3'	651 bp
Multi-host	gdhA rev	5'- CTTGACCTTCAATYGTGC -3'	
Multi-host	g6pd fwd	5'- CHGGYGAYYTMACTYATCG -3'	513 bp
Multi-host	g6pd rev	5'- TTTBGGGATBARTTTRTCRGC -3'	
Multi-host	mdh fwd	5'- AAGTTGCWGTWYTAGGTG -3'	552 bp
Multi-host	mdh rev	5'- CCTAATTCAATATCYGCACG -3'	
Multi-host	pgi fwd	5'- GCCWGTGYTKGTTGATGG -3'	609 bp
Multi-host	pgi rev	5'- TTGKGCTGGCGCRATRAA -3'	
RIRDC	adk fwd	5'- TTTTTCGTCCCGTCTAAGC -3'	570 bp
RIRDC	adk rev	5'- GGGGAAAGGGACACAAGC -3'	
RIRDC	est fwd	5'- TCTGGCAAAGATGTTGTCG -3'	641 bp
RIRDC	est rev	5'- CCAATTCTTGGTTGGTTGG -3'	
RIRDC	pmi fwd	5'- TGCCTTGAGACAGGGTAAGC -3'	739 bp
RIRDC	pmi rev	5'- GCCTTAACAAGTCCCATTTCG -3'	
RIRDC	zwf1 fwd	5'- AATCGGTCGTTTGACTGAGC -3'	808 bp
RIRDC	zwf1 rev	5'- TGCTTCACCTTCAACTGTGC -3'	
RIRDC	mdh fwd	5'- ATTTCCGGATCAGGGTTAGC -3'	620 bp
RIRDC	mdh rev	5'- GGAAAACCGGTAATGGAAGG -3'	
RIRDC	gdh fwd	5'- ATCGACTTCTTCCGCAGACC -3'	702 bp
RIRDC	gdh rev	5'- GCGGGTGATATTGGTGTAGG -3'	
RIRDC	pgi rev	5'- ACCACGCTATTTTTGGTTGC -3'	784 bp
RIRDC	pgi rev	5'- ATGGCACAACCTCTTTCACC -3'	

A PCR termékek szekvenálását a MacroGen Europe cég végezte (Amszterdam, Hollandia). A DNS szekvenciák illesztését a BioEdit programmal (7.2.3. verzió) végeztük el (Hall, 2011). A nukleotid szekvencia adatokat a MEGA7 szoftverrel elemeztük tovább (Kumar és mtsai, 2016). A távolságokat a Neighbour-Joining algoritmus segítségével állapítottuk meg (Saitu és Nei, 1987). Az evolúciós távolságokat a p-distance korrekciós ráta figyelembevételével számítottuk ki, és a törzsfa topológiáját 1000 ismétléses bootstrap analízissel vizsgáltuk. Az MLST adatokat benyújtottuk az online adatbázisba

(<https://pubmlst.org/pmultocida/>). A PCR reakcióelegyek összetétele megegyezett az *ompA* PCR-nél ismertetett premixével. A vizsgált génszakaszokat és a reakciókörülményeket a 8. táblázat szemlélteti.

**8. táblázat:** Az MLST vizsgálat során alkalmazott PCR reakciók körülményei

MLST rendszer	Génszakasz	Kezdeti denaturáció	Denaturáció	Anelláció	Extenzió	Végső extenzió	Ciklusok száma
Multi-host	<i>adh, gdhA, mdh</i>	95°C 5 min	95°C 45 sec	57°C 45 sec	72°C 2 min	72°C 10 min	30
Multi-host	<i>aroA, g6pd</i>	95°C 5 min	95°C 45 sec	56°C 45 sec	72°C 2 min	72°C 10 min	30
Multi-host	<i>deoD, pgi</i>	95°C 5 min	95°C 45 sec	60°C 45 sec	72°C 2 min	72°C 10 min	30
RIRDC	összes géne	95°C 5 min	95°C 45 sec	50°C 45 sec	72°C 2 min	72°C 10 min	30

A PCR termékek szekvenciáját a 4.4.3. pontban ismertetett módon határoztuk meg, és a *P. multocida* MLST weboldalon szereplő szekvenciákkal összevetve elemeztük szintén a 4.4.3. pontnak megfelelően.

#### 3.4.5. Plazmid izolálás

A plazmid izolálást Quiagen Plazmid Mini kit (Hilden, Németország) használatával végeztük el. Az izolált DNS-t 0.7%-os SeaKem (Lonza; Basel, Svájc) agaróz gélben 1×TBE (trisz-bórsav-EDTA, Lonza) pufferben, megfelelő méretű molekulasúly-markerek (Fermentas) mellett ellenőriztük 9 V/cm elektromos térerősségű gélelektroforézissel.

## 4. Eredmények

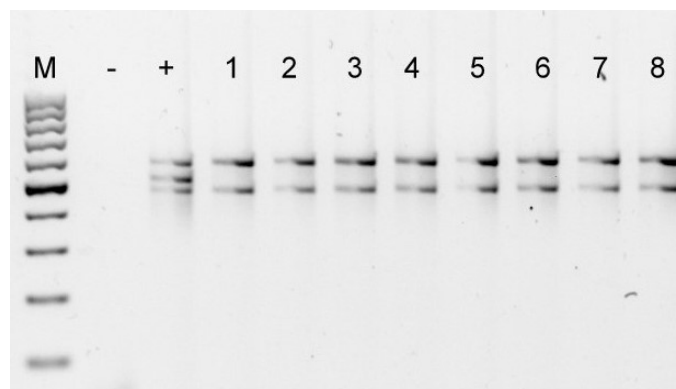
### 4.1. A baktériumok azonosítása

Munkánk során azokat a baktériumtelepeket tekintettük *P. multocida* gyanúsak, melyek 24 órás tenyésztési időt követően a buroktermelés meglététől vagy hiányától függően nyálkás, sima felszínű vagy száraz, rögös, szürkésfehér, kör alakú, 0,5-2 mm átmérőjű, jellegzetes illatú, nem hemolizáló telepeket képeztek (3. ábra).



3. ábra: A *P. multocida* telepmorfológiája

A molekuláris fajazonosításhoz a szakirodalomban ismertett fajspecifikus régió 460 bp hosszúságú szakaszát minden mintánál kimutattuk (4. ábra). A multiplex PCR egy reakcióban alkalmas volt az A buroktípus (564 bp) és a toxingén (498 bp) azonosítására.



4. ábra: A *P. multocida* fajazonosító multiplex PCR

(M: Generuler 100 bp molekulatömeg marker, - negatív kontroll, + pozitív kontroll, 1-8 A buroktípusú, nem toxikus *P. multocida* törzsek.)

## 4.2. A baktériumok fenotípusos vizsgálatainak eredményei

### 4.2.1. A buroktípus meghatározása

A szarvasmarha, juh, kecske és sertés eredetű törzsek esetében az A és D buroktípust azonosítottuk. A humán megbetegedésekből származó törzseket az A és F buroktípusba soroltuk, míg a macska eredetű izolátumok mindegyike az A típust képviselte. Az A buroktípus volt a leggyakoribb a szarvasmarha, juh, sertés, humán és macska eredetű izolátumok esetében, míg a kecskéből származó törzsekben a D buroktípus volt a leggyakoribb.

### 4.2.2. A szerotípus meghatározása

A vizsgált *P. multocida* törzsek szerotípusát az LPS PCR-rel és egyes esetekben hagyományos agargél precipitációs módszerrel is meghatároztuk.

Az LPS tipizálás során két LPS genotípust azonosítottunk a szarvasmarha és a juh eredetű izolátumokban (L3: 87,7% és 73,3% és L6: 12,3% és 26,7%). A kecske és sertés eredetű törzsek esetében csak az L3 LPS genotípus fordult elő. A humán esetekből izolált *P. multocida* törzsek esetében öt különböző LPS genotípus is azonosítható volt (L1, L3, L4, L5 és L7). Ezek közül az L1 volt a leggyakrabban előforduló típus (53,6%), melyet az L3 követett (32,1%), míg az L4 (7,1%), az L5 (3,6%) és az L7 (3,6%) kisebb arányban fordult elő. A macska eredetű *P. multocida* izolátumokra az L1 (72,7%), az L3 (9,1%) és az L7 (18,2%) LPS genotípus volt jellemző.

### 4.2.3. A buroktípusok és LPS genotípusok kombinálása

A buroktípusokat az LPS genotípusokkal kombinálva a szarvasmarha, juh és sertés eredetű izolátumok esetében az A:L3 volt a leggyakoribb (77,8% és 72,5%). A kecske eredetű törzsek esetében a D:L3 kombináció volt a leggyakoribb (80,0%), míg a humán és macska gazdafajból származó izolátumokra az A:L1 volt a legnagyobb számban jellemző (46,5% és 72,7%) (9. táblázat).

**9. táblázat:** A buroktípus : LPS genotípus kombinációk százalékos megoszlása gazdafaj szerint  
Az izolátumok számát zárójelben tüntettük fel.

<b>Buroktípus: LPS genotípus</b>	<b>Szarvasmarha (n=81)</b>	<b>Juh (n=15)</b>	<b>Kecske (n=5)</b>	<b>Sertés (n=40)</b>	<b>Humán (n=28)</b>	<b>Macska (n=11)</b>
A: L1	0	0	0	0	46,5 (13)	72,7 (8)
A: L3	77,8 (63)	40,0 (6)	20,0 (1)	72,5 (29)	32,1 (9)	9,1 (1)
A: L4	0	0	0	0	7,1 (2)	0
A: L5	0	0	0	0	3,6 (1)	0
A: L6	12,3 (10)	26,7 (4)	0	0	0	0
A: L7	0	0	0	0	3,6 (1)	18,2 (2)
D: L3	9,9 (8)	33,3 (5)	80,0 (4)	27,5 (11)	0	0
F: L1	0	0	0	0	7,1 (2)	0

### 4.3. A baktériumok genotípusának meghatározása

#### 4.3.1. A toxingén kimutatása

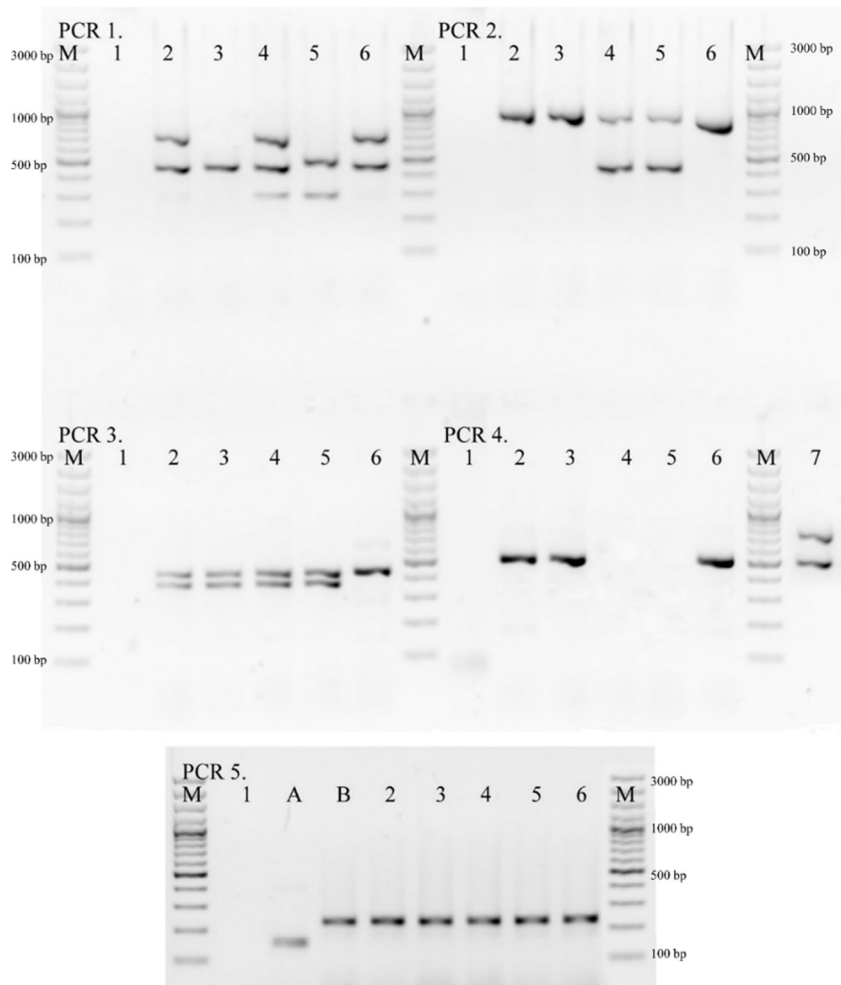
A *P. multocida* toxint kódoló *toxA* génszakasz minden juh eredetű törzsben azonosítható volt, és jelentős arányban fordult elő a kecske (40,0%) és sertés (55,0%) eredetű izolátumokban is. Humán, macska és szarvasmarha eredetű törzsekben nem volt kimutatható a *P. multocida* toxint kódoló génszakasz. A kecske eredetű *P. multocida* törzsekben a *toxA* génszakasz csak tüdőgyulladásos esetekből izolált, D buroktípusú törzsekben volt detektálható. Tüdőgyulladásos esetekből származó sertés eredetű izolátumok esetében a *toxA* génszakasz alacsonyabb százalékban volt jelen (38,8%), mint az orrtampon mintákból izolált törzsekben (68,2%). A buroktípussal összevetve megállapítottuk, hogy a *toxA* génszakasz nagyobb gyakorisággal fordult elő A buroktípusú törzsekben, mint a D buroktípusú izolátumokban, a tüdő (40,0%) és orrtampon (71,4%) eredetű mintákban egyaránt (10. táblázat).

**10. táblázat:** A *P. multocida* toxin (PMT) kódoló génszakaszt hordozó törzsek megoszlása a gazdafaj, a minta típusa és a buroktípus szerint

Gazdafaj	Minta típusa	Buroktípus	Törzsek száma	PMT % (n)
kecske	tüdő	A	0	0
		D	3	66,7 (2)
	orrtampon	A	1	0
		D	1	0
juh	tüdő	A	8	100 (8)
		D	4	100 (4)
	orrtampon	A	2	100 (2)
		D	1	100 (1)
sertés	tüdő	A	15	40,0 (6)
		D	3	33,3 (1)
	orrtampon	A	14	71,4 (10)
		D	8	62,5 (5)

#### 4.3.2. Virulenciagén profil meghatározás

Az I. típusú fimbria alegységét kódoló *fimA* génszakasz minden *P. multocida* törzsben megtalálható volt, ezért a további adatelemzésből kihagytuk (5. ábra).



**5. ábra:** A virulencia asszociált gének azonosítására szolgáló PCR reakciók gélfotója

PCR 1. A *hsf1* (654 bp), *hsf2* (433 bp) és *pfhA* (286 bp) génszakaszok azonosítása multiplex reakcióban.

PCR 2. A *fimA* (866 bp) és *tadD* (416 bp) génszakaszok azonosítása.

PCR 3. A *hgbA* (402 bp) és *nanH* (340 bp) génszakaszok azonosítása.

PCR 4. A *hgbB* (499 bp) és *tbpA* (728 bp) génszakaszok azonosítása.

PCR 5. *ptfA* allél specifikus PCR. 1 negatív kontroll, 2 Pm242, 3 Pm243, 4 Pm244, 5 Pm247, 6 Pm249, 7 pozitív kontroll a *hgbB* és *tbpA* génszakaszokra, a pozitív kontroll a *ptfA* A allélváltozatra (126 bp), B pozitív kontroll a *ptfA* B allélváltozatra (217 bp).

A további kilenc virulenciagén megléte vagy hiánya alapján 13 különböző virulenciagén profilt (VGP) állítottunk fel (11. táblázat).



**11. táblázat:** A *P. multocida* törzsek által hordozott virulenciagének alapján meghatározott virulenciagén profilok (VGP)

Virulenciagén profil	Gazdafaj	<i>hgbA</i>	<i>nanH</i>	<i>hgbB</i>	<i>tbpA</i>	<i>pfhA</i>	<i>hsf1</i>	<i>hsf2</i>	<i>tadD</i>	<i>ptfA</i> *
VGP 1	szarvasmarha	+	+	-	+	+	-	+	+	B
VGP 2	szarvasmarha	+	+	-	+	-	-	+	+	B
VGP 3	szarvasmarha	+	+	-	+	-	-	+	-	B
VGP 4	juh	+	+	-	+	-	-	+	-	A
VGP 5	juh, kecske	+	-	-	+	-	-	-	-	A
VGP 6	sertés, humán	+	+	-	-	+	-	+	+	B
VGP 7	sertés	+	+	-	-	-	-	+	+	B
VGP 8	sertés	+	+	+	-	-	-	+	+	B
VGP 9	sertés, humán	+	+	+	-	-	+	+	-	B
VGP 10	humán	+	+	-	-	+	+	+	-	B
VGP 11	humán	+	-	+	-	-	+	+	-	B
VGP 12	humán, macska	+	+	+	-	-	-	+	-	B
VGP 13	humán, macska	-	+	+	-	-	-	+	-	B

\**ptfA* allél variáns

Kevés kivétel mellett megállapítottuk, hogy minden VGP csak egy gazdafajra volt jellemző. A szarvasmarha eredetű *P. multocida* törzsek a VGP 1, 2, vagy 3 csoportba tartoztak, melyek közül a VGP 1 volt a legnépesebb (61,7%). A juh eredetű izolátumokra a VGP 4 és 5 volt jellemző, melyek közül a VGP 5 volt a gyakoribb (67%), a kecske eredetű törzsek mindegyike a VGP 5 virulenciagén profiljával rendelkezett. A sertés eredetű izolátumok összesen négy virulenciagén profilba voltak besorolhatók (VGP 6-9). Ezek közül a törzsek legnagyobb része a VGP 9 profilba tartozott (70%). A macska eredetű izolátumok a VGP 12 (82%) és a VGP 13 (18%) profilokba kerültek. A humán esetekből származó törzsek viszont nagyobb változatosságot mutattak, összesen hatféle virulenciagén profil volt rájuk jellemző (VGP 6, 9-13), melyek közül a VGP 12 (60,7%) volt a leggyakoribb (12. táblázat) A hatból négy esetben más gazdafajok (sertés, macska) társaságában helyezkedtek el.

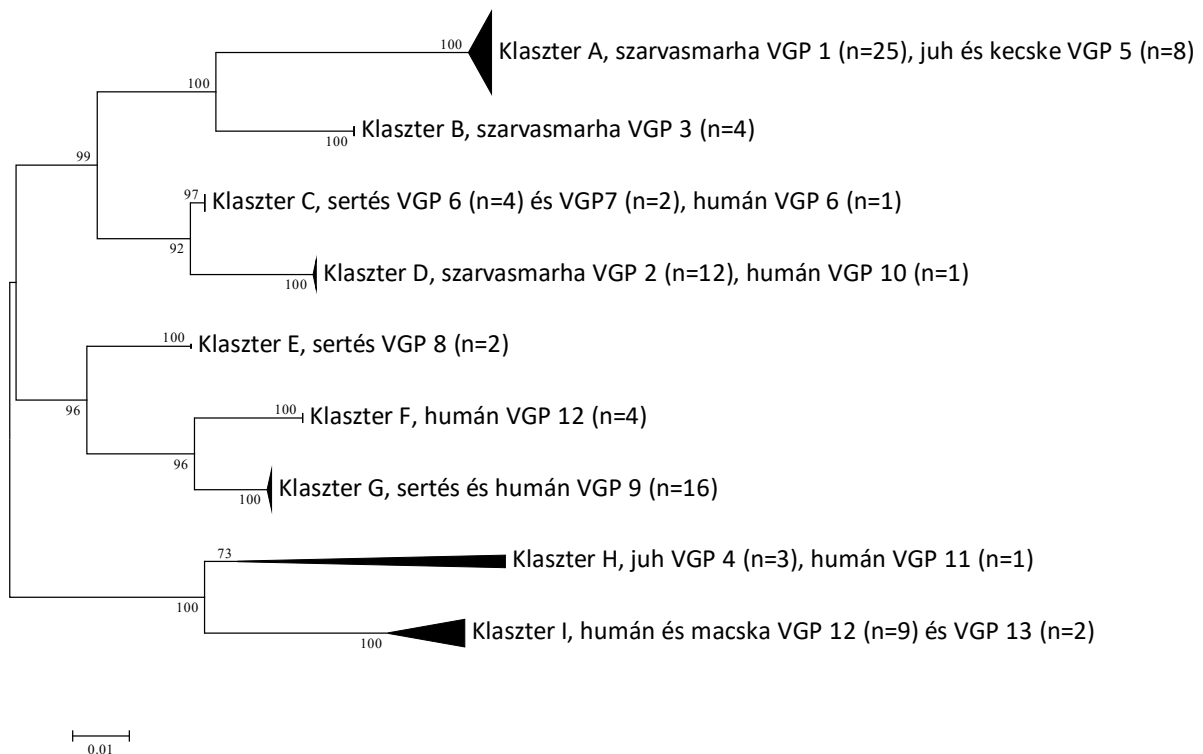
**12. táblázat:** A virulenciagén profilok százalékos megoszlása a különböző gazdafajokból származó *P. multocida* törzsek esetében

Virulenciagén profil	szarvasmarha (n=81)	juh (n=15)	kecske (n=5)	sertés (n=40)	humán (n=28)	macska (n=11)
VGP 1	61,7 (50)	0	0	0	0	0
VGP 2	28,4 (23)	0	0	0	0	0
VGP 3	9,9 (8)	0	0	0	0	0
VGP 4	0	33,3 (5)	0	0	0	0
VGP 5	0	66,7 (10)	100 (5)	0	0	0
VGP 6	0	0	0	17,5 (7)	3,6 (1)	0
VGP 7	0	0	0	5,0 (2)	0	0
VGP 8	0	0	0	7,5 (3)	0	0
VGP 9	0	0	0	70,0 (28)	17,8 (5)	0
VGP 10	0	0	0	0	3,6 (1)	0
VGP 11	0	0	0	0	3,6 (1)	0
VGP 12	0	0	0	0	60,7 (17)	81,8 (9)
VGP 13	0	0	0	0	10,7 (3)	18,2 (2)

#### 4.3.3. Szekvencia-meghatározás és filogenetikai elemzés

Az *ompA* génszakasz szekvencia analízise során a 94 törzsben összesen 25 egyedi, de közeli rokonságot mutató szekvencia típus volt elkülöníthető (6. ábra), melyek kilenc klasztert alkottak (*ompA* klaszter A-I). Az A klaszter volt a leggyakoribb *ompA* típus (35,1%), melyet a G (17,0%), a D (13,8%) és az I klaszter (11,7%) követett. A további *ompA* klaszterek ritkábban fordultak elő (6. ábra, Melléklet 1. táblázat). Az *ompA* klaszterek és a virulenciagén profilok között korrelációt lehetett felfedezni. Az A klaszter a VGP 1 és VGP 5 profilokkal mutatott összefüggést, melyek szarvasmarha és kiskérődző eredetű izolátumokra voltak jellemzőek. Az *ompA* klaszter B-be kizárólag a szarvasmarha eredetű VGP 3-ba tartozó törzsek kerültek. Az *ompA* klaszter C a VGP 6 és 7 izolátumokat tartalmazta, sertés eredetű törzsekkel és egy humán izolátummal együtt. A D klaszterbe a VGP 2 virulenciagén profittal rendelkező szarvasmarha eredetű törzsek, és egy VGP 10-be sorolt humán izolátum tartozott. Az *ompA* E klasztert a sertés eredetű VGP 8 törzsek, az F klasztert pedig humán VGP 12-be sorolt izolátumok alkották. Az *ompA* klaszter G sertés és humán eredetű VGP 9 törzseket tartalmazott. Az *ompA* klaszter H juh eredetű törzseket (VGP 4) és egy humán izolátumot (VGP 11) foglalt magába. Az *ompA* klaszter I pedig a VGP 12 és 13 virulenciagén készletével rendelkező macska és humán eredetű törzseket tartalmazott (6. ábra). Az *ompA* gén

szekvenciák által kódolt *ompA* proteinek alapján képzett filogenetikai fán a DNS szekvenciák alapján elkülönített klaszterekkel megegyező elkülönülés volt megfigyelhető (M1. ábra).

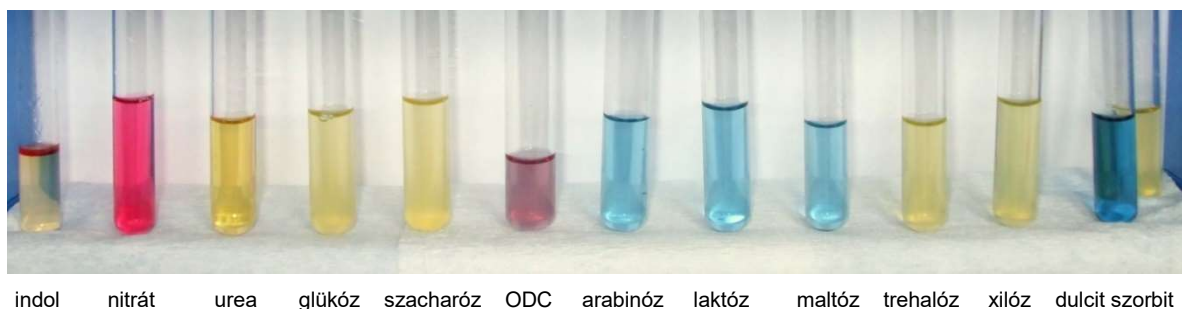


6. ábra. Az *ompA* gén szekvenciák alapján képzett összevont filogenetikai fa

#### 4.3.4. Humán esetekből származó *P. multocida* izolátumok

A további vizsgálatokba 15 db humán esetekből származó izolátumot vontunk be. A *P. multocida* toxint kódoló génszakaszt egyik esetben sem tudtuk kimutatni. Az izolátumok többsége A buroktípussal rendelkezett (14/15), míg egy esetben az F buroktípus bioszintézis génjét (*fcbD*) azonosítottuk. A humán megbetegedésekből izolált törzseket általában a Heddleston 1-es (53%) és 3-as (40%) szerotípusba soroltuk be, de egy esetben a 6-os szerotípust is azonosítottuk. Az agargél precipitációs teszt eredményét minden esetben az LPS multiplex PCR-rel is megerősítettük.

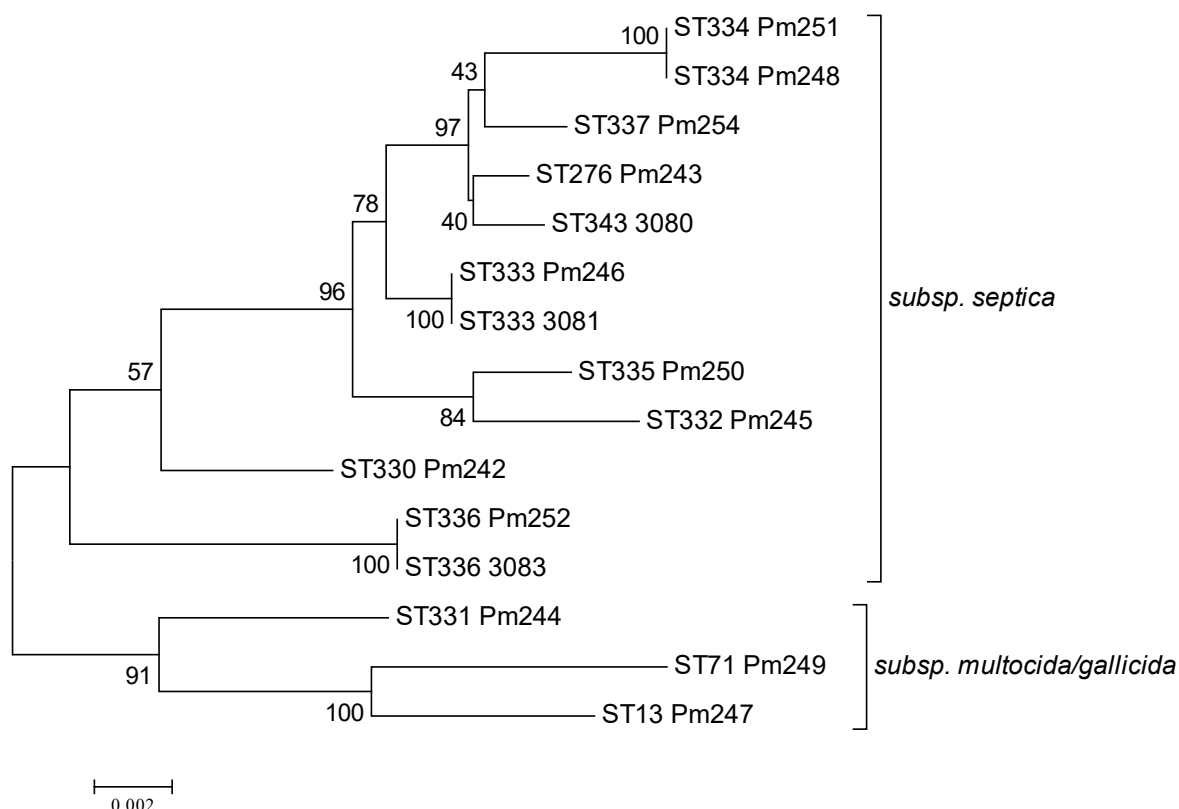
A törzsek nagy többsége a *septica* alfajba tartozott (12/15 törzs, 80%), a *multocidalgallicida* leszármazási vonalat csupán három törzs képviselte. A szénhidrát fermentációs sajátosságok és az ornitin-dekarboxiláz aktivitás megléte alapján hat különböző biotípusba tudtunk besorolni a vizsgált humán *P. multocida* izolátumokat. A 2-es, 3-as és 7-es biotípust azonosítottuk a leggyakrabban, de egyedi esetekben a 6-os, 9-es és 10-es biotípust is detektálni tudtuk (7. ábra).



**7. ábra:** A 2-es biotípusra jellemző biokémiai profil

Minden vizsgált *P. multocida* törzs hordozta az I. és IV. típusú fimbria alegység génjeit (*fimA*, *ptfA* B allél) és a *hsf2* autotranszporter adhezint, illetve nagy többségük a *hgbA* (95%) és *hgbB* (90%) hemoglobin kötő fehérjét és a *nanH* neuraminidázt kódoló génszakaszokat is. A transferrin kötő fehérjét kódoló génszakasz (*tbpA*) nem volt azonosítható a vizsgált törzsekben. Ráadásul néhány adhezint kódoló génszakasz csak kevés esetben fordult elő, ezek a *hsf-1* (20%), a *pfhA* (10%) és a *tadD* (5%) voltak.

A RIRDC MLST adatok alapján összesen 9 új szekvencia típust határoztunk meg, közülük három ST-t (ST 333, 334 és 336) több törzs esetében is azonosítani tudtuk. Megállapítottuk, hogy a *P. multocida* subsp. *septica* és subsp. *multocida* törzsek a fajon belül két jól elkülönülő leszármazási vonalat képviseltek (8. ábra).



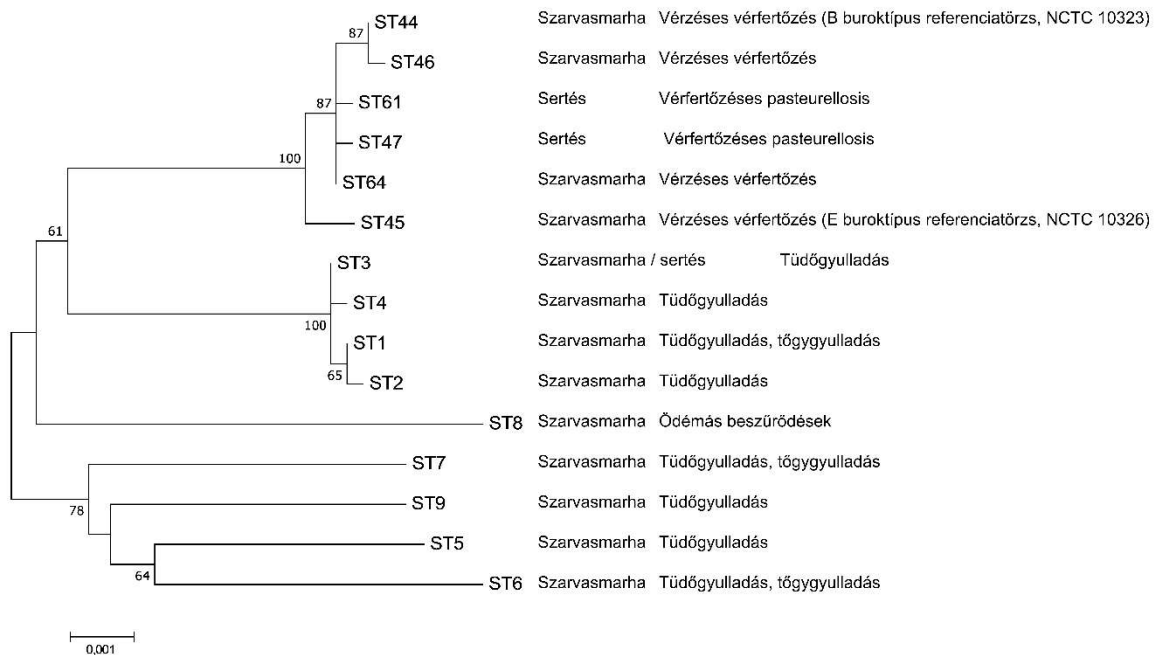
**8. ábra:** A humán esetekből izolált *P. multocida* törzsek RIRDC MLST módszerrel végzett vizsgálatának eredménye

#### 4.3.5. B:2 típusú *P. multocida* törzsek

2013 augusztusában egy eddig hazánkban nem tapasztalt megbetegedést észleltünk egy kb. 12 km átmérőjű körön belül elhelyezkedő 6 háztáji sertésállományban. Az esetek egy közel 2 hétig tartó időszakban jelentkeztek, és házi sertésen kívül más állatfajok nem voltak érintve. Három, különböző sertésállományból származó baktériumtörzset *P. multocida* ssp. *multocida*ként azonosítottunk és részletesen megvizsgáltunk. A törzsek mindegyike képes volt hasznosítani a xilózt és a szorbitot, valamint ornitin-dekarboxiláz aktivitással rendelkezett. Negatív reakciót kaptunk az arabinózt, laktózt, maltózt, trehalózt, és dulcitol bontást vizsgáló tesztekben. Ezek alapján a törzseket a 3-as biotípusba soroltuk. A törzsek mindegyike B buroktípusúnak és 2-es szomatikus szerotípusúnak bizonyult. A Multi-host MLST vizsgálat során kapott adatok alapján egy új szekvencia típust (ST61) írtunk le. A RIRDC MLST séma alkalmazásával a vizsgált törzseket a vérzésemes vérfertőzést okozó törzsekre jellemző 122-es szekvencia típusba soroltuk be.

2016 júliusában borjakat érintő haemorrhagias septikaemia esetekből származó *P. multocida* törzseket mutattunk ki. Az esetek egy telepre korlátozódtak, földrajzilag ~130 km-re nyugatra a sertésekben leírt esetek azonosítási helyétől, és nem volt ismert kapcsolat a telepek között. Két, az állományból származó baktériumtörzset *P. multocida* ssp. *multocida*ként határoztunk meg, és részletesen megvizsgáltunk. A törzsek ornitin-dekarboxiláz aktivitással rendelkeztek, és képesek voltak a xilóz és szorbit hasznosítására, ugyanakkor nem tudták bontani az arabinózt, maltózt, laktózt, trehalózt és dulcitol. A fermentációs tulajdonságaik alapján a 3-as biotípusba soroltuk be a törzseket, melyek a haemorrhagias septikaemia esetekre jellemző B buroktípussal és 2-es szerotípussal rendelkeztek. A Multi-host MLST vizsgálat során kapott adatok alapján egy új szekvencia típust (ST64) írtunk le, mely egy alléban tér el (*aroA*) a háztáji sertésekben azonosított ST61-től.

A filogenetikai vizsgálatok során a Multi-host MLST adatbázisban fellelhető törzsek szekvencia adataival vetettük össze saját adatainkat. Az elemzés során a B:2 szerotípusú vérzésemes vérfertőzést okozó törzsek egy jól elkülönülő klasztert alkottak (9. ábra). Vizsgálataink és az irodalomban fellelhető adatok alapján megállapítottuk, hogy a kétféle *P. multocida* MLST séma közül a Multi-host MLST nagyobb felbontóképességgel rendelkezik a B típusú *P. multocida* törzsek esetében. A Multi-host sémával különböző szekvenciatípusokba sorolt izolátumok a RIRDC sémával gazdafajtól, és az izolálás helyétől függetlenül az ST 122-be tartoznak (Petersen és mtsai., 2014).

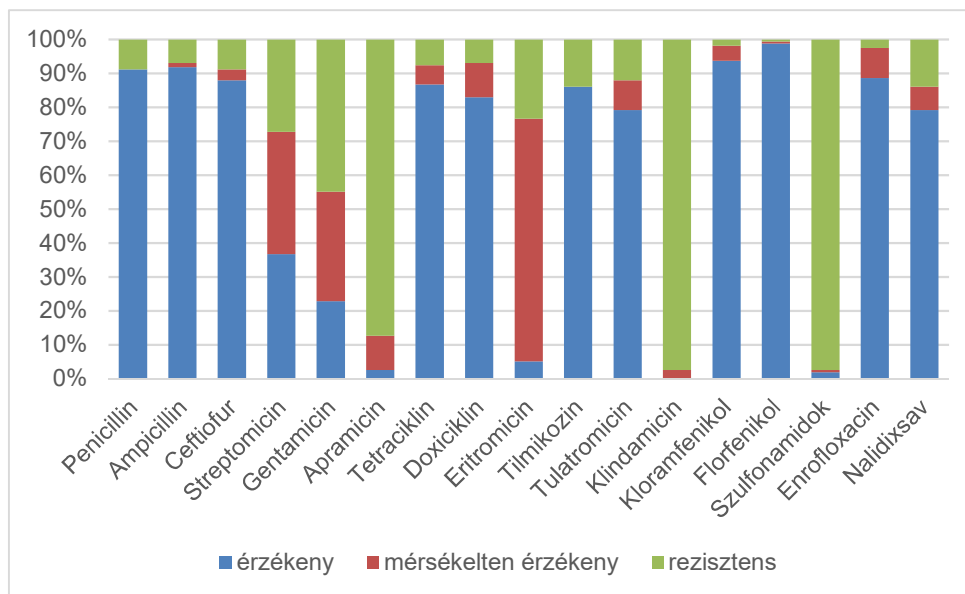


**9. ábra:** A különböző gazdafajokból és megbetegedésekből izolált *P. multocida* törzsek filogenetikai kapcsolatai, a Multi-host MLST rendszerben  
A leszármazási viszonyok tisztázásához a neighbor-joining algoritmust használtuk.

#### 4.3.6. Az antibiotikum-érzékenység vizsgálata

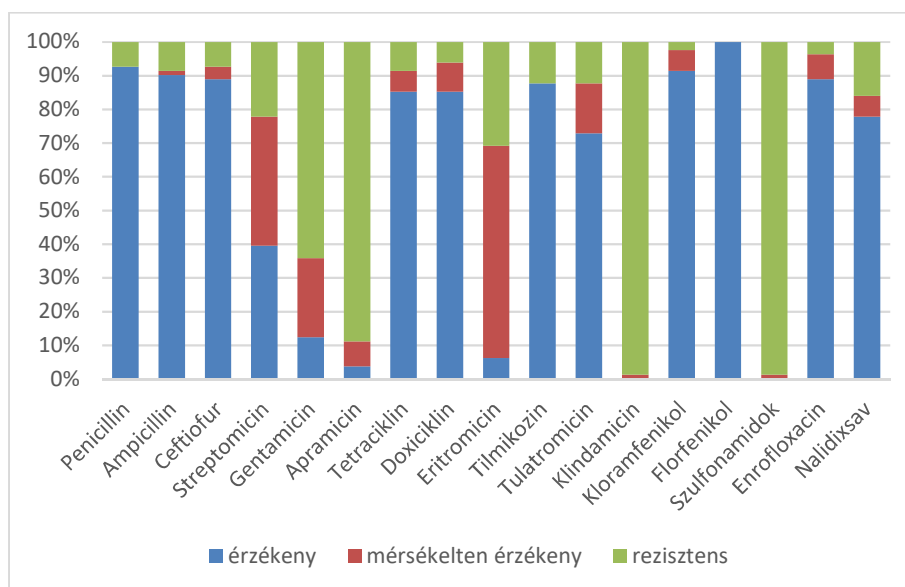
##### 4.3.6.1. Korongdiffúziós tesztek eredménye

A *P. multocida* törzsek antibiotikum-érzékenységét Kirby-Bauer korongdiffúziós módszerrel határoztuk meg, melyek részletes eredményei a Melléklet 2. és 3. táblázatában tekinthetők meg. Vizsgálataink alapján a törzsek nagy többsége érzékeny volt florfenikolra (98,7%), kloramfenikolra (93,7%), ampicillinre (91,8%), penicillinre (91,1%), enrofloxacinra (88,6%) ceftiofurra (88%), tularomicinre (79,1%), tetraciklinre (86,7%), tilmikozinra (86,1%), és doxiciklinre (82,9%). A gentamicin, eritromicin, sztreptomycin, és nalidixsav kevésbé bizonyultak hatékonyak (44,9%, 23,4%, 27,2% és 13,9% rezisztencia), ugyanakkor a mérsékelten érzékeny törzsek aránya magas volt eritromicinre (71,5%) és gentamicinre (32,3%) is. A törzsek nagy számban rezisztensek voltak apramicinnel (87,3%), klindamicinnel (97,5%) és szulfonamidokkal (97,5%) szemben (10. ábra).



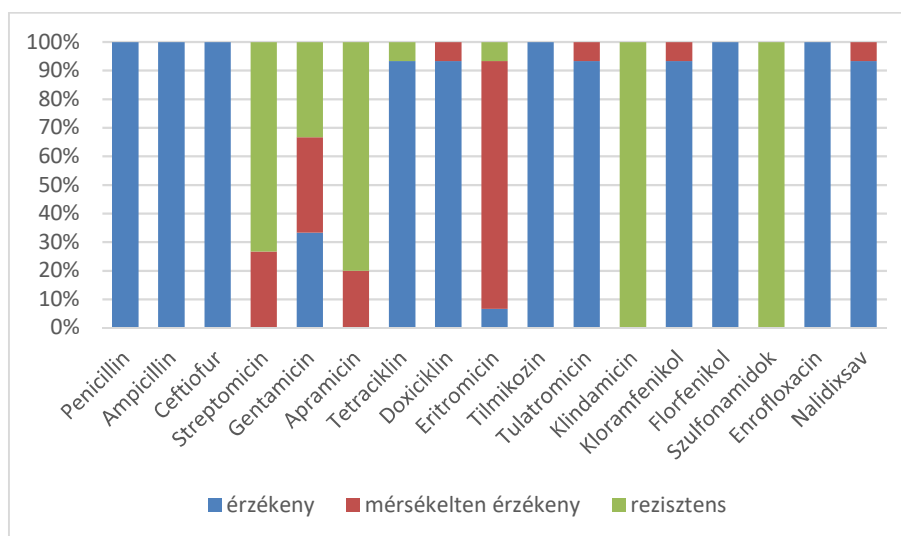
10. ábra: A *P. multocida* törzsek összesített antibiotikum-érzékenységi adatai

A szarvasmarha eredetű *P. multocida* törzsek antibiotikum-érzékenységi adatai alapján megállapítottuk, hogy a törzsek mindegyike csak florfenikolra (100%) volt érzékeny. A törzsek többsége érzékeny volt kloramfenikolra (91,4%), penicillinre (92,6%), ampicillinre (90,1%), enrofloxacinra (88,9%) ceftiofurra (88,9%), tetraciklinre (85,2%), doxiciklinre (85,2%) tilmikozinra (87,7%), tulatromicinre (72,8%) és nalidixsavra (77,8%). A gentamicin, az eritromicin és a streptomycin kevésbé bizonyultak hatékonyak (64,2%, 30,9% és 22,2% rezisztencia), ugyanakkor a mérsékelten érzékeny törzsek aránya magas volt eritromicinre (63%) és gentamicinre (23,5%) is. A törzsek nagy számban rezisztensek voltak szulfonamidokkal (98,8%), klindamicinnel (98,8%) és apramicinnel (88,9%) szemben (11. ábra).



11. ábra: A szarvasmarha eredetű *P. multocida* törzsek antibiotikum-érzékenység adatai

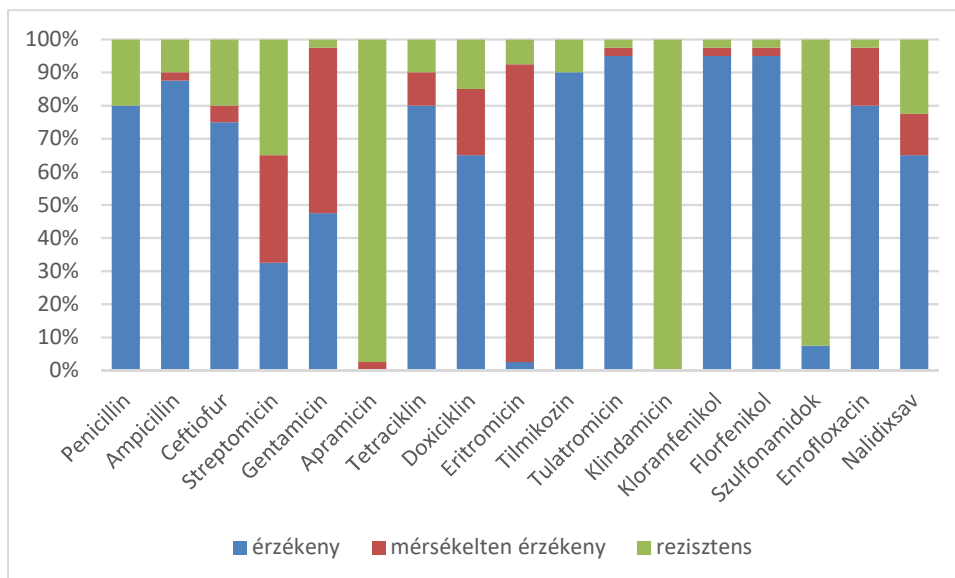
A juhokból származó *P. multocida* törzsek mindegyike érzékeny volt penicillinre, ampicillinre, ceftiofurra, tilmikozinra, florfenikolra és enrofloxacinra. A törzsek nagy többsége érzékeny volt tetraciklinre (93,3%), doxiciklinre (93,3%), kloramfenikolra (93,3%), tulatromicinre (93,3%) és nalidixsavra (93,3%). Kevésbé bizonyult hatékonyak a gentamicin (33,3% rezisztencia), eritromicinre pedig a törzsek nagy többsége mérsékelten volt érzékeny (86,7%). A törzsek mindegyike rezisztenciát mutatott klindamicinnel és szulfonamidokkal szemben, valamint nagy többségük mutatott rezisztenciát sztreptomicinnel (73,3%) és apramicinnel (80%) szemben is (12. ábra).



**12. ábra:** A juh eredetű izolátumok antibiotikum-érzékenységi adatai

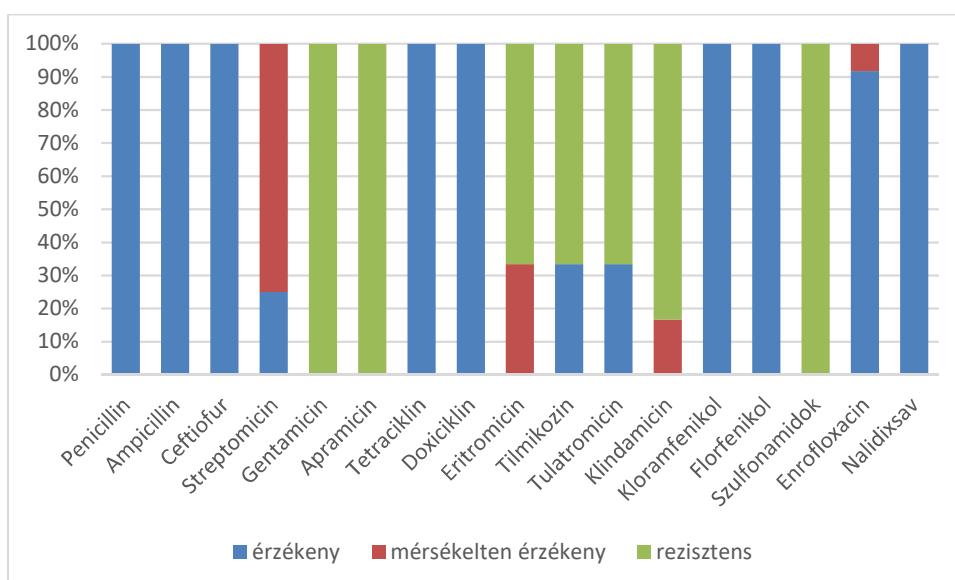
A sertés eredetű *P. multocida* törzsek nagy többsége érzékeny volt kloramfenikolra (95%), florfenikolra (95%), tulatromicinre (95%), tilmikozinra (90%), ampicillinre (87,5%), penicillinre (80%), tetraciklinre (80%), enrofloxacinra (80%), és ceftiofurra (75%). A nalidixsav, doxiciklin, eritromicin és gentamicin kevésbé bizonyultak hatékonyak (22,5%, 15%, 7,5% és 2,5% rezisztencia), ugyanakkor a mérsékelten érzékeny törzsek aránya magas volt eritromicinre (90%) és gentamicinre (50%) is. A törzsek nagy számban rezisztensek voltak klindamicinnel (100%), szulfonamidokkal (92,5%), apramicinnel (97,5%), és sztreptomicinnel (35%) szemben (13. ábra).





13. ábra. A sertés eredetű törzsek antibiotikum-érzékenységi adatai

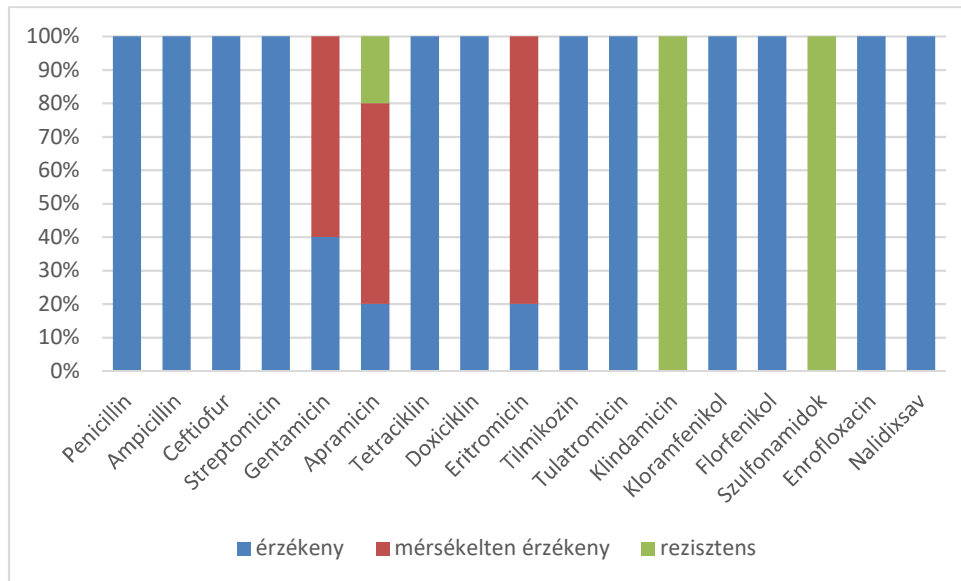
A humán esetekből származó *P. multocida* törzsek mindegyike érzékeny volt penicillinre, ampicillinre, ceftiofurra, tetraciklinre, doxiciklinre, kloramfenikolra, florfenikolra és nalidixsavra (14. ábra). A törzsek nagy többsége érzékeny volt továbbá enrofloxacinra (91,7%). A sztreptomycin kevésbé bizonyult hatékonynak, esetében a mérsékelten érzékeny törzsek aránya 75% volt. A törzsek mindegyike rezisztenciát mutatott gentamicinnel, apramicinnel és szulfonamidokkal szemben, és nagy számban rezisztensek voltak klindamicinnel (83,3%), tulatromicinnel (66,7%), eritromicinnel (66,7%) és tilmikozinnal (66,7%) szemben is (14. ábra).



14. ábra: A humán esetekből izolált *P. multocida* törzsek antibiotikum-érzékenység adatai

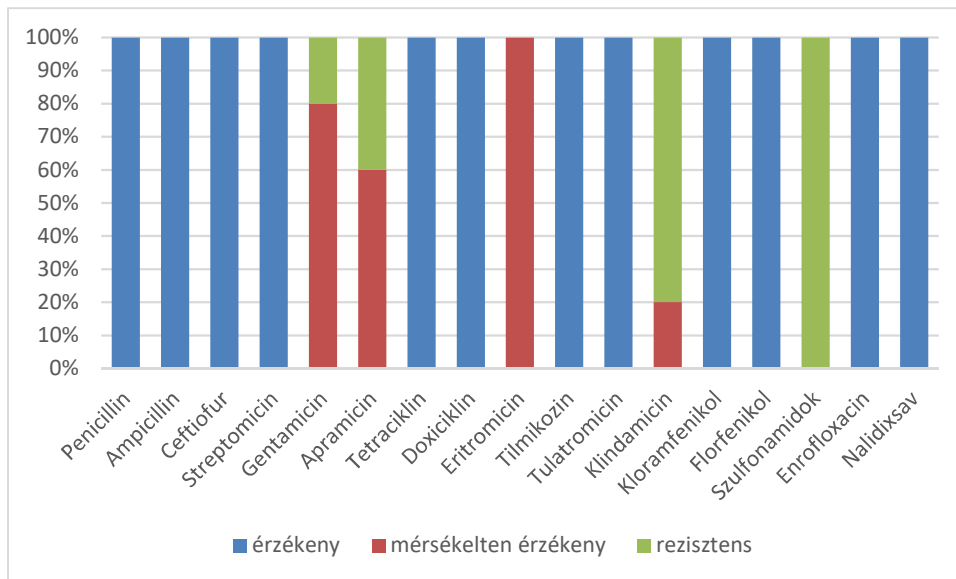
Vizsgálataink során vizsgáltunk kecske és macska gazdafajokból izolált törzseket is, azonban csak kis mintaszámban.

A kecske eredetű törzsek mindegyike érzékenynek bizonyult penicillinre, ampicillinre, ceftiofurra, sztreptomycinre, tetraciklinre, doxiciklinre, tilmikozinra, tultatromicinre, kloramfenikolra, florfenikolra, enrofloxacinra és nalidixsavra (15. ábra). A törzsek mindegyike rezisztens volt klindamicinnel és szulfonamidokkal szemben. Eritromicinre, gentamicinre, és apramicinre a törzsek nagy többsége mérsékelten volt érzékeny (80%, 60% és 60%).



**15. ábra:** A kecske eredetű törzsek antibiotikum-érzékenységi adatai

A macska eredetű törzsek mindegyike érzékenynek bizonyult penicillinre, ampicillinre, ceftiofurra, sztreptomycinre, tetraciklinre, doxiciklinre, tilmikozinra, tultatromicinre, kloramfenikolra, florfenikolra, enrofloxacinra és nalidixsavra (16. ábra). A törzsek nagy többsége rezisztens volt klindamicinnel (80%) és szulfonamidokkal (100%) szemben. Eritromicinre, gentamicinre, és apramicinre a törzsek nagy többsége mérsékelten volt érzékeny (100%, 80% és 60%).



**16. ábra:** A macska eredetű törzsek antibiotikum-érzékenység adatai

#### 4.3.6.2. Multirezisztens *P. multocida* törzs (Pm238) vizsgálata

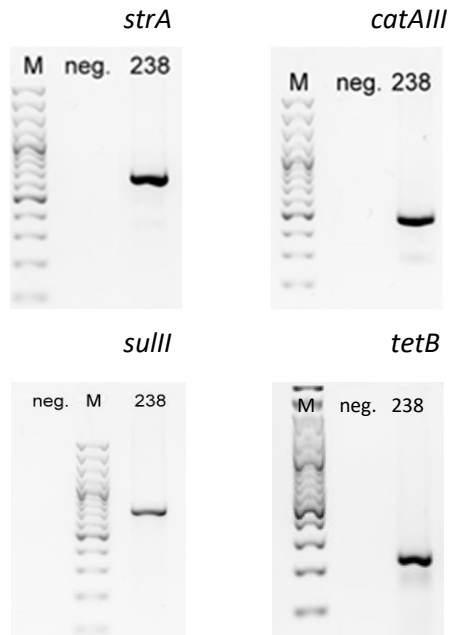
A részletes vizsgálatba vont Pm238 azonosítóval ellátott *P. multocida* törzset az A buroktípusba és a 3-as Heddleston szerotípusba soroltuk be. A törzs képes volt a trehalóz, xilóz és szorbit bontására, emellett negatív eredményt adott az arabinóz, maltóz, laktóz, dulcít és ornitin-dekarboxiláz tesztekben. A biokémiai tesztekben kapott eredmények alapján a törzset a 9-es biotípusba soroltuk be. A RIRDC MLST vizsgálatban a törzs 79-es szekvencia típusúnak bizonyult.

A MIC tesztek alapján megállapítottuk, hogy a Pm238 rezisztenciát mutatott sztreptomocinnal, tetraciklinnel, doxiciklinnel, eritromocinnal, klindamicinnal, kloramfenikollal, szulfametoxazollal, enrofloxacinnal, és nalidixsavval szemben (13. táblázat). A vizsgált törzs érzékeny volt penicillinre, ampicillinre, cefalotinra, gentamicinre, spektinomycinre, florfenikolra, trimetoprim-szulfametoxazolra, ciprofloxacinra és kolisztinre.

**13. táblázat:** A Pm238 minimális gátló koncentráció (MIC) vizsgálatának eredménye

<b>Antibiotikum</b>	<b>MIC (<math>\mu\text{g} / \text{ml}</math>)</b>	<b>Határérték É – M – R</b>
Ampicillin	0,032	$\geq 0,5 - 1 - 2 \leq$
Cefalotin	0,094	$\geq 2 - 4 - 8 \leq$
Ciprofloxacín	0,019	$\geq 1 - 2 - 4 \leq$
Kolisztin	2	$\geq 2 - 4 - 8 \leq$
Florfenikol	0,125	$\geq 2 - 4 - 8 \leq$
Gentamicin	0,094	$\geq 4 - 8 - 16 \leq$
Penicillin	0,016	$\geq 0,5 - 1 - 2 \leq$
Spektinomycin	2	$\geq 32 - 64 - 128 \leq$
Trimetoprim-szulfametoxazol	0,125/2	$\geq 2/38 - 4/76 \leq$
Kloramfenikol	96	$\geq 8 - 16 - 32 \leq$
Klindamicin	>256	$\geq 0,5 - 1-2 - 4 \leq$
Doxiciklin	24	$\geq 0,5 - 1 - 2 \leq$
Enrofloxacin	3	$\geq 0,25 - 0,5 - 1 \leq$
Eritromicin	>256	$\geq 0,5 - 1-4 - 8 \leq$
Nalidixsav	>256	$\geq 16 - 32 \leq$
Sztreptomycin	48	$\geq 4 - 8 - 16 \leq$
Szulfametoxazol	>1024	$\geq 256 - 512 \leq$
Tetraciklin	16	$\geq 0,5 - 1 - 2 \leq$

A Pm238 nem rendelkezett plazmiddal. Másrészt, összhangban a fent ismertetett antibiotikum rezisztencia fenotípussal, PCR reakciók segítségével sikeresen ki tudtuk mutatni a kloramfenikol (*catAIII*), szulfonamid (*sulII*), sztreptomycin (*strA*), és tetraciklin (*tetB*) rezisztencia kialakításáért felelős génszakaszokat (17. ábra).



**17. ábra:** A rezisztencia gének kimutatására szolgáló PCR reakciók gélfotója

A makrolid- és linkozamid rezisztencia kialakításáért felelős génszakaszokat nem tudtuk azonosítani a tesztelésre kiválasztott PCR reakciókkal (Rose és mtsai., 2012). A Klima és mtsai. (2014) által kidolgozott ICEPmu1 mobilis genetikai elemmel asszociált géneket célzó PCR reakciókban is negatív eredményt kaptunk. A kinolon rezisztencia kialakításáért felelős pontmutációkat is azonosítottunk a topoizomeráz IV (*parC*) génszakasz szekvencia analízisével, mely a 84-es kodon aminosav cseréjét jelentette (Glu → Lys).

## 5. Megvitatás

### 5.1. Virulenciagén profil meghatározás és *ompA* szekvencia elemzés

A *P. multocida* egy széles körben elterjedt kórokozó baktérium, mely számos madár- és emlősfajt képes megbetegíteni, és zoonotikus potenciállal is bír (Wilson és Ho, 2013). Munkánk során 180 db *P. multocida* törzset vizsgáltunk meg, melyek változatos gazdafajokból kerültek izolálásra, és részletesen jellemeztük őket a buroktípusuk és LPS genotípusuk meghatározásával. Ezen kívül egy kilenc virulenciagén vizsgálatán alapuló virulenciagén profil (VGP) meghatározására alkalmas módszert is leírtunk. Ezen felül az *ompA* külső membrán protein szekvencia analízisével összefüggést mutattunk ki a gazdafaj, a VGP és az *ompA* szekvencia típusok között. Összesen nyolc buroktípus-LPS genotípus kombinációt tudtunk azonosítani, melyek közül az A:L3 volt a leggyakoribb, és a kecske eredetű törzsek kivételével minden gazdafajban megtalálható volt. Ez a megállapítás megerősíti a korábbi vizsgálatok eredményeit, melyek szintén az A buroktípust írták le a legnagyobb arányban szarvasmarha és sertés eredetű izolátumokban is (Davies és mtsai., 2003; García és mtsai., 2011; Katsuda és mtsai., 2013; Jamali és mtsai., 2014; Peng és mtsai., 2018a). Mások – az itt bemutatott eredményekkel összehangban - az L3 LPS genotípus gyakoriságát hasonlóan magasnak találták szarvasmarha és sertés eredetű izolátumokban is (Taylor és mtsai., 2010; Peng és mtsai., 2018a; Lariviere és mtsai., 1992; Jamaludin és mtsai., 2005). Ugyanakkor újabban az L6 LPS genotípus gyakoriságának emelkedéséről is beszámoltak sertésből izolált *P. multocida* törzsek esetében (Peng és mtsai., 2018b; Turni és mtsai., 2018). A juh és kecske eredetű törzsek esetében a D:L3 és A:L3 bizonyult a leggyakoribb buroktípus-LPS genotípus kombinációnak. Korábbi publikációk szintén az A és D buroktípusokat mutatták ki az említett gazdafajok esetében (Ewers és mtsai., 2006; Vougidou és mtsai., 2015). Ugyanakkor, ezek a szerzők nem számoltak be olyan nagy arányban a D buroktípus előfordulásáról, mint a jelen munka. Eredményeink abban is megerősítik a korábbi adatokat, hogy az A:L1 buroktípus-LPS genotípus kombináció a leggyakoribb a humán és macska eredetű törzsekben (Ewers és mtsai., 2006).

A sertések torzító orrgyulladásának kialakításáért a *P. multocida* toxin (PMT) felelős (Magyar és Lax, 2002). Ezért, a PMT magas előfordulási aránya sertés eredetű izolátumokban (55%) nem meglepő. Az is logikusnak tűnik, hogy toxintermelő törzsek nagyobb arányban voltak izolálhatóak orrtampon mintákból (68,2%), ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy *toxA*-pozitív törzseket viszonylag nagy arányban tudtunk kimutatni tüdőgyulladásos esetekből is (38,8%). Érdekes az is, hogy a korábbi vizsgálatokhoz (és az általánosan uralkodó felfogáshoz) képest nagyobb arányban találtunk A buroktípusú toxintermelő törzseket, mint a D buroktípus esetében (Lariviere és mtsai., 1992; Davies és mtsai., 2003; Bethe és mtsai., 2009), jelezve, hogy az A típusú törzsek toxintermelési képessége terjedőben van, legalábbis

Magyarországon. Ezen kívül a *toxA* génszakaszt jelentős mértékben tudtuk kimutatni juh és kecske eredetű törzsekben is (100% és 40%). Ez a megállapítás megegyezik a PMT juhból és kecskéből származó *P. multocida* izolátumokban történő egyre gyakoribb előfordulásáról beszámoló vizsgálatok eredményeivel (Ewers és mtsai., 2006; Shayegh és mtsai., 2009; García-Alvarez és mtsai., 2017). Újdonság ugyanakkor, hogy 100%-os prevalenciáról korábban nem számoltak be. A sertésekkel ellentétben, a PMT kiskérődző gazdafajokban játszott kórtani szerepének tisztázása továbbra is várat magára. Eredményeink arra utalnak, hogy a kiskérődző eredetű *P. multocida* izolátumok a baktériumfajon belül egy elkülönülő csoportot alkotnak a többi emlősfajból származó törzshöz képest. Ezt a megállapítást támasztja alá a toxingén hordozás, a *ptfA* A allél megléte, és az egyedi VGP csoportokba tartozásuk is. Az érintett juh- és kecskeállományok változatos geográfiai megoszlást mutatnak, kimutatható epidemiológiai kapcsolat nélkül. Jelenleg nem egyértelmű, hogy mi vezethetett ezen figyelemre méltó különbségek kialakulásához a szabadtartású körülmények között tartott juhokból és kecskékből izolált *P. multocida* törzsek esetében az állományok közötti állatmozgások nélkül.

A *P. multocida* kórokozó képességének megértése szempontjából a virulenciagének tanulmányozása kiemelten fontos, és ígéretes eszköznek tűnik az izolátumok jellemzésére. A virulenciagének vizsgálata során virulenciagén profilokat (VGP) állítottunk fel a vizsgált *P. multocida* törzsek esetében. Ugyanakkor a korábban publikált adatokkal való összehasonlítást megnehezítette, hogy ezek a munkák különböző virulenciagén összeállítást vizsgáltak. Vizsgálataink és a korábbi publikációk eredményei alapján általánosan elmondható, hogy a *P. multocida* izolátumok változatos virulenciagéneket hordoznak, melyek jellemzőek lehetnek a gazdafajra.

A kérődzőkből izolált törzsek mindegyikét egy *tbpA* pozitív virulenciagén profilba tudtuk besorolni (VGP 1-5). Ewers és mtsai. (2006) kissé alacsonyabb prevalenciát találtak az említett vaskötő fehérjére nézve szarvasmarha és juh eredetű törzsekben (70,2% és 80%) a mi eredményeinkhez képest, ami a törzsek diverzitásának országok közti eltéréseivel magyarázható. További publikációk szintén a *tbpA* gén magas prevalenciájáról számoltak be (Shayegh és mtsai., 2009; Katsuda és mtsai., 2013; Verma és mtsai., 2013), valamint eredményeinkkel megegyezően a *tbpA* gént nem sikerült azonosítani nem-kérődző gazdafajokból származó izolátumokban (Ewers és mtsai., 2006; García és mtsai., 2011; Ferreira és mtsai., 2015; E-kobon és mtsai., 2017).

A *pfhA* és *tadD* gének a szarvasmarha eredetű izolátumok nagy többségében, míg a sertésből izolált törzseknek csak kis hányadában voltak kimutathatók. Korábbi publikációkban (Ewers és mtsai., 2006; Tang és mtsai., 2009; García és mtsai., 2011; Verma és mtsai., 2013; E-kobon és mtsai., 2017) a *pfhA* és *tadD* géneket szintén ezekből a gazdafajokból származó

izolátumokban találták meg, utalva arra, hogy ezen gének szerepet játszhatnak a szarvasmarha és sertés légúti epitelsejtekhez való adhézióban.

Munkánkban, összhangban a korábbi megfigyelésekkel (Tang és mtsai., 2009; Ferreira és mtsai., 2015; E-kobon és mtsai., 2017), a *hsf2* autotranszporter adhezin gazdafajtól függetlenül a *P. multocida* izolátumok nagy többségében azonosítható volt, míg a *hsf1* nagy százalékban csak a sertés (70%) és humán (7,2%) eredetű törzsekben fordult elő.

Az I és IV típusú fimbria alegység gének (*fimA* és *ptfA*) a *P. multocida* főbb sejt felszíni komponenseit kódoló gének között szerepelnek (Ruffolo és mtsai., 1997; Harper és mtsai., 2006), és vizsgálataink során a törzsek mindegyikében azonosítottuk őket. A *ptfA* esetében az A és B alléleket is sikerült detektálnunk. Érdekes módon az A allél kizárólag a kiskérődző eredetű törzsekben fordult elő, minden más gazdafajból származó izolátumra a B allél hordozása volt jellemző. Sellyei és mtsai. (2010) heveny baromfikolera esetekből származó *P. multocida* törzsekben mutatták ki a *ptfA* A allélját, míg a krónikus megbetegedésekben a *ptfA* B allélját hordozó törzseket azonosítottak. Jelenleg még nem világos, vajon milyen epidemiológiai jelentőséggel bír a *ptfA* A alléltípus előfordulása a kiskérődző eredetű *P. multocida* törzsekben.

Az általunk vizsgált *P. multocida* törzsek nagy többsége hordozta a *nanH* neuraminidáz kódoló génszakaszt, kivéve néhány kiskérődző és humán esetekből származó izolátumot, és ez az arány megegyezett a korábbi közleményekben leírtakkal (Ewers és mtsai., 2006; Tang és mtsai., 2009; Verma és mtsai., 2013, E-kobon és mtsai., 2017).

Gazdafajtól függetlenül, a *P. multocida* törzsek nagy része rendelkezett a *hgbA* vaskötő fehérje génjével, kivéve néhány humán és macska eredetű izolátumot. A *hgbA* széles körű elterjedtségét szintén megállapították a korábbi publikációkban is (Bosch és mtsai., 2002; Ewers és mtsai., 2006; Aski és Tabatabaei, 2016; E-kobon és mtsai., 2017). Másrészt a *hgbB* génszakasz meglétében a gazdafajtól függően eltérő hordozási arány mutatkozott. A szarvasmarha és kiskérődző eredetű izolátumokban a *hgbB* génszakasz nem volt kimutatható, míg a sertés, humán és macska eredetű törzsekben magas arányban fordult elő. A korábbi munkákban szintén a *hgbB* alacsony előfordulási gyakoriságáról számoltak be szarvasmarha eredetű törzsekben, ugyanakkor kiskérődző izolátumokban közel 100%-os előfordulásról számoltak be (Ewers és mtsai., 2006; Aski és Tabatabaei, 2016).

A *P. multocida* izolátumok virulenciagén profiljának összehasonlítása megerősítette a baktériumfaj diverzitásáról alkotott elképzeléseket, felfedve legalább 13 virulenciagén profil létezését, ráadásul ezek a csoportok figyelemre méltó összefüggéseket mutattak a gazdafaji eredettel. Másrészt a humán esetekből származó izolátumok kivételt jelentettek e tekintetben, mivel hat különböző virulenciagén profilba voltak besorolhatóak. Ezek közül két VGP csak humán eredetű izolátumokra volt jellemző, míg további kettő sertés eredetű törzseket is magába foglalt, és további két VGP macska eredetű izolátumokra is jellemző volt. Ennek



legvalószínűbb magyarázata az lehet, hogy az ember nem a természetes gazdaszervezet a *P. multocida* számára, ezért az emberek feltételezhetően házi kedvenc állatok vagy a nagyüzemi állattartás révén fertőződnek meg a kórokozóval. Ennek megfelelően mások által közölt adatok (Turni és mtsai., 2018) és saját eredményeink egyaránt felhívják a figyelmet a közös genotípusok létezésére a humán és különféle állatfajokból izolált *P. multocida* törzsek esetében. Ugyanakkor két VGP kizárólag humán eredetű izolátumokra volt jellemző, de ezek egyedi esetek voltak, és lehetséges, hogy további törzsek vizsgálatba vonásával ezen virulenciagén profilok is megtalálhatók lennének különböző állatfajokból származó *P. multocida* törzsekben is. Az utóbbi években leginkább egyedi esetek kerültek leírásra, és csak limitált számú munkacsoport végzett összehasonlító vizsgálatokat humán eredetű *P. multocida* törzseken. Marois és mtsai. (2009) sertés és humán eredetű *P. multocida* törzseket vizsgáltak pulzáló mezejű gélelektroforézissel, és megállapították, hogy a humán esetekből származó törzsek genetikailag sokkal diverzebbek voltak, mint a sertés eredetű izolátumok.

Számos korábbi publikáció említést tett már arról, hogy az *ompA* külső membrán fehérje génjének szekvencia variabilitása hatással van a *P. multocida* virulenciájára (Harper és mtsai., 2006; Katoch és mtsai., 2014; E-kobon és mtsai., 2017). Munkánk során az *ompA* szekvencia típusokra jellemző eltéréseket azonosítottunk a különböző gazdafaji eredetű és eltérő virulenciagén profillal rendelkező *P. multocida* törzsek között, ami a törzsek gazdafaj preferenciájára és az izolátumok klonalitására utal. Az *ompA* a *P. multocida* egyik fő külső membrán fehérjéje (Harper és mtsai., 2006). A protein ki van téve a folyamatos környezeti változásoknak, ami miatt erős szelekciós nyomás nehezedik rá, és ez strukturális változások kialakulásához vezet. Az *ompA* klaszterekhez képest többféle virulenciagén profilba tudtuk besorolni a vizsgált törzseket, és az *ompA* klaszterek a gazdafaj adaptációnak sem voltak olyan pontos indikátorai. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a virulenciagén profilok több virulenciagén meglétének kombinációját jelentik, míg az *ompA* klaszterek csak egy génszakasz vizsgálata alapján különültek el egymástól. Eredményeink alapján elmondható, hogy a virulenciagén profilok meghatározása az *ompA* szekvenálással együtt értékes eszközként szolgálhat a *P. multocida* diverzitásának és gazdafaj adaptációjának vizsgálatához.

Davies és mtsai. (2004) a külső membrán protein (OMP) tipizálást nagyobb megkülönböztető erejűnek találta az MLST-hez képest, és véleményük szerint a különböző OMP-típusok különböző genetikai háttér meglétére utalnak. Ezáltal az OMP-típusok a klonalitás kiváló markereinek tekinthetők, és az eredményeket kombinálva a kolonizációs vagy vaskötő faktorok meglétével, egy sokkal pontosabb képet adnak a *P. multocida* gazdafaj adaptációjáról, mint az MLST.

Összegezve, a baktériumok virulenciáját különböző genetikai markerek határozzák meg (Harper és mtsai., 2006), amelyek között szerepelnek kolonizációs faktorok, külső membrán fehérjék vagy vaskötő fehérjék. Az általunk kidolgozott tipizáló séma hasznos eszköze lehet az epidemiológiai vizsgálatoknak. Érdekes módon eredményeink a virulenciagén hordozás nagymértékű diverzitását tárták fel a különböző gazdafaji eredetű *P. multocida* törzsekre vonatkozóan, amely fontos szereppel bírhat a bakteriális génexpresszió különbségeinek feltárására irányuló kutatások számára a patológiás folyamatokat illetően.

## 5.2. Humán esetekből izolált *P. multocida* törzsek jellemzése

A humán eredetű *P. multocida* törzsekre irányuló összehasonlító vizsgálatok során a burok- és szerotipizálást, az alfaj meghatározást, a feltételezett virulenciafaktorok vizsgálatát és az MLST meghatározást is elvégeztük. A kapott MLST adatokat a RIRDC MLST adatbázisban található számos, különböző gazdafaji eredetű izolátummal összevetve megállapítottuk, hogy a *P. multocida* törzsek az alfajnak megfelelően két nagy csoportot alkotnak a fajon belül, gazdafaji eredettől függetlenül.

Az irodalmi adatokkal összhangban (Boyce és mtsai., 2010; Ewers és mtsai., 2006), az A típus bizonyult leggyakoribb buroktípusnak, ugyanakkor, humán eredetű *P. multocida* esetében első alkalommal az F buroktípust is sikerült azonosítanunk az általunk vizsgált törzsek között. A leggyakrabban előforduló buroktípus - LPS genotípus kombináció az A:1 és A:3 voltak, melyek gazdafajtól függetlenül a legelterjedtebb típusok (Boyce és mtsai., 2010). Két esetben a ritkán előforduló 6-os és 8-as Heddleston szerotípust is azonosítottuk. A *P. multocida* törzsek alfaját fontos epidemiológiai markernek tekintik, és leggyakrabban a multocida alfaj előfordulásáról számolnak be a publikációk (Fegan és mtsai., 1995; Blackall és mtsai., 1997; Ekundayo és mtsai., 2008). Ez alól kivételt jelentenek a macska és kutya eredetű izolátumok, melyek általában a *septica* alfajba tartoznak (Kuhnert és mtsai., 2000). A humán izolátumokra vonatkozó vizsgálataink során mi is a *septica* alfajt azonosítottuk a leggyakrabban. Ezzel szemben egy korábbi munkában Holst és mtsai. (1992) a *P. multocida* subsp. *multocida* alfaj előfordulásáról számoltak be nagy többségben humán megbetegedésekből. Ugyanakkor, vizsgálatuk során a hagyományos biokémiai próbák (szorbit és dulcit) eredménye alapján végezték el az alfaj besorolást. Munkánk során mi a biokémiai tesztek mellett a fajon belüli két fő leszármazási vonalat a 16S riboszómális RNS génjének PCR-RFLP (polimeráz láncreakciót követő restrikciós hasításon alapuló fragmenthossz polimorfizmus) módszerrel különítettük el egymástól (Sellyei és mtsai., 2012). A biokémiai próbák eredménye nem minden esetben teljesen pontos (Boerlin és mtsai., 2000), és mi is találtunk a szorbit próbában pozitív eredményt adó, de a 16S PCR-RFLP vizsgálatban a *septica* alfajba sorolt törzseket. Kizárólag a fermentációs sajátosságokra alapozva ezeket a

törzseket tévesen a subsp. *multocida* alfajba soroltuk volna be. Egy korábbi közleményben Chen és mtsai. (2002) humán légzőszervi megbetegedésekből izolált *P. multocida* törzsek nagy többségét a *multocida* alfajba sorolta be, míg a sebekből származó izolátumok nagyrészt a *septica* alfajba tartoztak. Ugyanakkor Donnio és mtsai. (2004) szintén humán megbetegedésekből izolált *P. multocida* törzsek vizsgálata során a *multocida* alfajt mutatták ki nagy többségben (87.5%), függetlenül attól, hogy légzőszervi megbetegedésekből vagy sebfertőzésekből származtak a törzsek. Másrészt, a vizsgálatban azonosított *septica* alfajú törzsek közel mindegyike sebfertőzés eredetű volt. A munkánk során vizsgált humán eredetű *P. multocida* izolátumok többsége a *septica* alfajba tartozott, és szintén sebfertőzésekből származott. Az általunk azonosított *multocida* alfajú törzs pedig légúti mintából került izolálásra.

Két kivétellel (Pm242, Pm252) az összes *septica* alfajba sorolt törzs azonos virulenciagén profillal rendelkezett (VGP 12). Ezzel szemben, a *multocida/gallicida* leszármazási vonalba sorolt törzsek esetében nagyobb változatosságot tudunk kimutatni. Egy korábbi publikációban (Ewers és mtsai., 2006) az általunk vizsgált subsp. *septica* törzsekéhez hasonló virulenciagén mintázatról számoltak be humán *P. multocida* izolátumok esetében, azonban a munkában nem végeztek alfaj meghatározást.

Az általunk elvégzett multi-lókuszos szekvencia tipizálás eredményei megerősítik azt a korábbi megállapítást (Blackall és mtsai., 1998), miszerint a *P. multocida* subsp. *septica* és subsp. *multocida/gallicida* törzsek két, egymástól jól elkülönülő leszármazási vonalat képviselnek a fajon belül.

### **5.3. B buroktípusú *P. multocida* törzsek jellemzése**

2013 augusztusában egy eddig hazánkban nem tapasztalt, B buroktípusú *P. multocida* által okozott megbetegedést észleltünk háztáji sertésállományokban. Ezt követően, 2016 júliusában szarvasmarha vérzéses vérfertőzés esetekből származó, ugyancsak B buroktípusú *P. multocida* törzseket azonosítottunk, földrajzilag ~130 km-re nyugatra a sertésekben leírt esetek azonosítási helyétől, és nem volt ismert kapcsolat a telepek között (14. táblázat).

**14. táblázat:** A magyarországi vérzések vérfertőzés esetekből származó és az irodalomban leírt európai esetekben talált *P. multocida* izolátumok jellemzői

Ország	Gazdafaj	Izolálás éve	Buroktípus	Szomatikus szerotípus	Biotípus	Multi-host ST	Referencia
Dánia	dámvad	1992-1993	B	3,4	-	-	Aalbaek és mtsai., 1999
Spanyolország	sertés	2009	B	-	-	-	Borge és mtsai., 2011
Németország	dámvad, sertés, szarvasmarha	2010	B	-	-	-	Soike és Schulze, 2011
Spanyolország	sertés	2011	B	-	13	47	Cardoso-Toset és mtsai., 2013
Spanyolország	vaddisznó	2012	B	-	-	-	Risco és mtsai., 2013
Magyarország	sertés	2013	B	2	3	61	saját munka
Magyarország	szarvasmarha	2016	B	2	3	64	saját munka

B típusú *P. multocida* által okozott megbetegedés hazai előfordulásáról sertésben eddig még nem számoltak be. A fertőzés forrását és a betegséget közvetlenül kiváltó tényezőket nem sikerült feltárni. Ismert, hogy a betegségen átesett, vagy tünetmentesen fertőződött állatok garatmandulájukban hónapokon keresztül hordozhatják a kórokozót. A garatmandula fertőződését mi is kimutattuk egy idült betegségben szenvedő hízósertésnél. Európában tartós hordozóként eddig csak az őzet és a dámvadat sikerült azonosítani (Soike és Schulze, 2011). A fertőzés a hordozó állatoktól nem csak közvetlen érintkezés útján, hanem indirekt módon, így rovarok, rágcsálók, vagy akár takarmány közvetítésével is tovább terjedhet (Soike és Schulze, 2011). Az általunk vizsgált sertésállományokban az állatokat félig, vagy teljesen extenzív körülmények között tartották, így a vadon élő állatoktól történő fertőződés lehetősége valamennyi esetben fennállt.

A kedvező időjárási viszonyok elősegítik a *P. multocida* külvilágban történő túlélését, mivel a baktérium meleg, esős-párás időben akár 2-3 hétig is életképes maradhat a környezetben (Soike és Schulze, 2011). Az Országos Meteorológiai Intézet tájékoztatása szerint 2013 nyara a 10. legmelegebb és a 6. legszárazabb nyár volt hazánkban 1901 óta. Ez az augusztus hónapra különösen igaz volt, mivel ekkor az átlagos 1 helyett 5 forró nap (35°C feletti hőmérséklet) is volt. További érdekesség, hogy az augusztus 9-én jelentkező első esetet közvetlenül megelőzően a 25°C-ot meghaladó átlagos napi középhőmérséklet miatt augusztus 2.-tól 4 napig tartó 2. fokú, ezt követően pedig a 27°C-ot meghaladó átlagos napi középhőmérséklet miatt augusztus 9.-ig 3. fokú hőségriadót rendeltek el. [https://www.met.hu/eghajlat/magyarorszag\\_eghajlata/eghajlati\\_visszatekinto/elmult\\_honapok](https://www.met.hu/eghajlat/magyarorszag_eghajlata/eghajlati_visszatekinto/elmult_honapok)

\_idojarasa/). Feltételezhető, hogy ez a forró nyári időjárás szerepet játszott a fertőzés terjedésében, és az állatok szervezetét megterhelve a klinikai tünetek megjelenésében is. A németországi járvány esetében is tartós nyári hőség előzte meg a megbetegedéseket, és az elhullások száma a forróság fokozódásával párhuzamosan emelkedett (Soike és Schulze, 2011). A saját esetünkhöz hasonlóan a forróság ott is tartós szárazsággal, és ezzel együtt a vad-itatóhelyek számának csökkenésével járt. A német szerzők véleménye szerint a kisebb számú itatóhelyen megnövekedett állatsűrűség, együtt a dāmvadakra jellemző üdvözlő viselkedéssel (a pofák kölcsönös nyalogatása) is hozzájárulhatott a fertőzés gyors terjedéséhez (Soike és Schulze, 2011).

Az általunk észlelt klinikai tünetek valamint a kórbonctani és kórszövettani elváltozások lényegében megegyeztek a korábbi, B típusú *P. multocida* által okozott sertés-megbetegedést leíró közlemények eredményeivel (Murthy és mtsai., 1965; Pillai és mtsai., 1986; Gamage és mtsai., 1995; Mackie, 1996; Subaaharan és mtsai., 2010; Borge és mtsai., 2011; Soike és Schulze, 2011; Cardoso-Toset és mtsai., 2013; Risco és mtsai., 2013; Verma és mtsai., 2014). A betegség, hasonlóan a saját megfigyeléseinkhez, egyszerre több különböző korcsoportban is előfordulhat, továbbá az elhullott sertések egy részében nem alakulnak ki a jellegzetes bőrelváltozások (Cameron és mtsai., 1996; Townsend és mtsai., 1998a; Soike és Schulze, 2011). A bivalynál és a szarvasmarhánál megfigyelt többnyire túlheveny kórlefolyás helyett három esetben heveny, egy esetben pedig idült kórlefolyást tapasztaltunk. Két esetben a bőr mellett a parenchymás szervekből is, míg két esetben, feltehetőleg az antibiotikus gyógykezelésnek is köszönhetően, csak az elváltozott bőrből sikerült a B típusú *P. multocida* kitenyésztése. Immun-hisztokémiai vizsgálattal ugyanakkor minden esetben nagy mennyiségben mutattuk ki a *Pasteurella* antigéneket a vizsgált szervek többségében. Figyelembe véve a kialakult kórszövettani elváltozásokat is, két esetben generalizált, míg másik két esetben vérérkárosodás és thrombusok megjelenésével járó vérfertőző pasteurellosist állapítottunk meg.

Az ismertetett esetekben a megbetegedett állatok száma viszonylag alacsony volt, aminek hátterében az állhatott, hogy az érintett háztáji gazdaságokban kisszámú és javarészt idősebb, és ennek köszönhetően nagyobb természetes ellenálló képességgel rendelkező állatot tartottak. Ezek a körülmények akadályozhatták a kórokozó környezetben való felszaporodását, és így az állatokat ért fertőzősi nyomás viszonylag alacsony maradhatott. További magyarázatként az is felvetődik, hogy a megbetegedésekért felelős baktériumtörzs kórokozó-képessége nem volt kiemelkedő.

Az általunk izolált *P. multocida* törzsek között a klasszikus és a molekuláris módszerek sem mutattak ki különbséget, ami arra utal, hogy a különböző portákon felbukkant kórokozók egy közös forrásból származhattak. Az MLST szekvencia analízis eredménye alapján továbbá elmondható, hogy a vizsgált törzsek genetikailag egységesek, és közeli rokonságban állnak a

korábban már elemzett különböző gazdafajokból izolált vérzésem vérfertőzést okozó törzsekkel. Az Európában izolált törzsekkel összevetve megállapíthatjuk, hogy a spanyolországi megbetegedéseket okozó törzs (Cardoso-Toset és mtsai., 2013) nem azonos az itt ismertetett esetekből származó izolátumokkal. A Soike és mtsai. (2011) által publikált németországi járvány során talált vérzésem vérfertőzést okozó baktériumot a világszerte előforduló RIRDC 122-es szekvencia típusként írták le (Petersen és mtsai., 2014), amelybe a most bemutatott esetből izolált törzsek is tartoznak. A jelek szerint az utóbbi MLST séma kisebb megkülönböztető potenciállal bír a másik rendszerhez képest. Ebből következően a német és magyar esetek közti járványtani kapcsolat jelen eredmények alapján egyértelműen nem igazolható, de nem is zárható ki.

A betegség megelőzésére kereskedelmi forgalomban kapható vakcina nem áll rendelkezésre. A megelőzésnél a tartás és takarmányozásnál alkalmazott minél kisebb stresszt kiváltó eljárásokat javasolt alkalmazni. Várható hőhullámoknál a megfelelő szellőzésről, esetleg az állatok hűtéséről gondoskodni kell. A sertések mozgatásával járó beavatkozásokat (átcsoportosítás, szállítás) pedig ebben az időszakban kerülni kell. A megbetegedett állatok injekciós antibiotikummal történő kezelését mihamarabb el kell kezdeni. Ezzel szemben a szájon át történő állományszintű antibiotikus kezelés egyes irodalmi adatok szerint nem jár kielégítő eredménnyel (Cameron és mtsai., 1996).

## **5.4. Antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok**

### **5.4.1. Korongdiffúziós tesztek**

Az antibiotikum-rezisztencia terjedése miatt a patogén baktériumok vizsgálata kiemelt jelentőségű, így a *P. multocida* antibiotikumok iránti érzékenységét is számos korábbi vizsgálat elemezte. A szakirodalmi adatok az izolálás földrajzi helyétől függően változatosságot mutatnak.

Az általunk vizsgált *P. multocida* törzsek többsége érzékenynek bizonyult penicillinre (91,1%) és ampicillinre (91,8%). Korábbi közleményekben, hazánkban, illetve Ausztráliában és Koreában hasonló eredményekről számoltak be sertés eredetű izolátumok esetében (Sellyei és mtsai., 2009, Dayao és mtsai., 2014; Oh és mtsai., 2018). Egy évvel később spanyol szerzők sertés és juh eredetű törzseket vizsgálva már csökkent érzékenységről számoltak be. Petrocchi-Rilo és mtsai. (2019) a törzsek 40,6%-ában mutattak ki ampicillinnel szemben rezisztenciát, míg Cid és mtsai. (2019) sertés eredetű izolátumokban 33,3%-ban, és a juhokból izolált törzsek mindegyikében rezisztenciát mutattak ki. Ugyanebben a vizsgálatban (Cid és mtsai., 2019) penicillinnel szemben a sertés eredetű izolátumok 33,3%-a, és a juhokból izolált törzsek 1,2%-a mutatott rezisztenciát. Szarvasmarha eredetű izolátumok esetében további vizsgálatokban kis arányban mutattak ki rezisztenciát (Schwarz és mtsai., 2004; Katsuda és

mtsai., 2013; Jamali és mtsai, 2014), ugyanakkor Jamali és mtsai. (2014) ampicillinnel szemben alacsony mértékű (9,2%), és emelkedett mértékű rezisztenciáról számoltak be penicillinnel (30,5%) szemben.

A vizsgált törzsek a legtöbb esetben érzékenyek voltak florfenikolra (98,7%) és kloramfenikolra (93,7%). A világ különböző pontjain végzett vizsgálatokban a *P. multocida* izolátumok többségét érzékenynek találták ezekre az antibiotikumokra. Tang és mtsai. (2009) sertés eredetű izolátumokat vizsgálva hasonló eredményekről számolt be, a törzsek mindössze 2,6%-a mutatott rezisztenciát kloramfenikollal szemben, és minden izolátum érzékeny volt florfenikolra. Szintén sertés eredetű izolátumokat vizsgálva ausztrál kutatók 2%-os florfenikol rezisztenciáról (Dayao és mtsai., 2014), egy koreai publikáció (Oh és mtsai., 2019) szerzői viszont ennél magasabb, 18,5%-os florfenikollal szembeni rezisztenciáról számoltak be. Spanyolországban a sertés eredetű *P. multocida* törzsek 93,8%-a volt érzékeny kloramfenikolra, míg 6,2%-uk mérsékelt rezisztenciát mutatott a szerrel szemben (Cid és mtsai., 2019). Egy hazai publikációban (Sellyei és mtsai., 2009) a sertés eredetű *P. multocida* törzsek 3%-a mutatott rezisztenciát florfenikollal és kloramfenikollal szemben is. A szarvasmarha és kiskérődző eredetű *P. multocida* törzsekkel szemben a florfenikol és a kloramfenikol az izolálás földrajzi helyétől függetlenül hatékonynak bizonyult a korábbi közleményekben (Schwarz és mtsai., 2004; Katsuda és mtsai., 2013; Sarangi és mtsai., 2015; Jamali és mtsai., 2014). Bourély és mtsai. (2019) különböző gazdafajokból származó izolátumokat vizsgálva szintén a törzsek nagyfokú érzékenységről számolt be a florfenikol vizsgálata során, a rezisztens törzsek aránya macska, szarvasmarha, sertés és juh eredetű törzsek esetében is 1% alatt maradt.

A magyarországi törzsek nagy része érzékeny volt enrofloxacinra (88,6%). Korábbi közleményekben hasonló eredményekről számoltak be a törzsek gazdafaji eredetétől függetlenül. Magyar- és spanyolországi vizsgálatokban (Sellyei és mtsai., 2009; Petrocchi-Rilo és mtsai., 2019) sertés eredetű izolátumok esetében a törzsek mindegyike érzékenynek bizonyult enrofloxacinra, koreai kutatók 2,6%-ban azonosítottak rezisztenciát (Oh és mtsai., 2019), egy brazil közleményben pedig 22,5%-os rezisztenciáról számoltak be (Furian és mtsai., 2016). Spanyol kutatók (Cid és mtsai., 2019) munkájában sertés eredetű *P. multocida* törzseket vizsgálva 4,3%-os rezisztenciát azonosítottak, míg a juhokból izolált törzsek mindegyike érzékeny volt erre az antibiotikumra. Szarvasmarha és kiskérődző eredetű törzsek vizsgálata során a törzsek mindegyikét enrofloxacinra érzékenynek találta több közlemény is (Katsuda és mtsai., 2013; Sarangi és mtsai., 2015; Jamali és mtsai., 2014). Bourély és mtsai. (2019) különböző gazdafajokból származó izolátumokat vizsgálva szintén a törzsek nagyfokú érzékenységről számolt be a florfenikol vizsgálata során, a rezisztens törzsek aránya macska (2,6%), szarvasmarha (4,5%), sertés (0,5%) és juh (1,4%) eredetű törzsek esetében is meglehetősen alacsony volt.

Ceftiofurra az általunk vizsgált törzsek 88%-a volt érzékeny. Sertés eredetű *P. multocida* izolátumokat vizsgálva hasonló eredményekről számoltak be korábbi közleményekben is (Tang és mtsai., 2009; Dayao és mtsai., 2014; Furian és mtsai., 2016; Oh és mtsai., 2019; Cid és mtsai., 2019). A ceftiofur szarvasmarha és juh eredetű törzseket vizsgálva német, japán és iráni munkákban is hatékonynak bizonyult az izolátumok 100%-ában (Schwarz és mtsai., 2004; Katsuda és mtsai., 2013; Jamali és mtsai., 2014; Cid és mtsai., 2019).

Tulatromicinre és tilmikozinra az általunk vizsgált törzsek többsége érzékenynek bizonyult (79,1% és 86,1%). A szakirodalmi adatok hasonló eredményeket mutattak: egy kínai közleményben sertés eredetű törzseket vizsgálva Tang és mtsai. (2009) 28,3%-os rezisztenciát tapasztaltak tilmikozinnal szemben, ausztrál és koreai publikációkban viszont a törzsek mindegyikét érzékenynek találták erre az antibiotikumra (Dayao és mtsai., 2014; Oh és mtsai., 2019). Cid és mtsai. (2019) a sertés eredetű izolátumok 18,8%-ában, és a juh eredetű törzsek 29,9%-ában mutattak ki tilmikozinnal szemben rezisztens törzseket. Ugyanebben a közleményben a tulatromicin hatékonyabb szernek bizonyult, ugyanis a sertés eredetű törzsek 11,6%-a, és a juh eredetű izolátumok 1,2%-a mutatott rezisztenciát. Bourély és mtsai. (2019) különböző gazdafajokból származó izolátumokat vizsgálva szintén a törzsek érzékenységről számolt be a tilmikozin vizsgálata során, a rezisztens törzsek aránya macska (7,4%), szarvasmarha (17,2%), sertés (2,1%) és juh (7,3%) eredetű törzsek esetében is alacsony volt. Hazai, ausztrál és koreai, sertés eredetű *P. multocida* törzseket vizsgálva a tulatromicinre érzékenynek találták az izolátumok mindegyikét (Sellyei és mtsai., 2009; Dayao és mtsai., 2014; Oh és mtsai., 2019).

Vizsgálatainkban a törzsek nagy része érzékeny volt tetraciklinre (86,7%) és doxiciklinre (82,9%) is. Korábbi közleményekben ennél magasabb arányú rezisztenciáról is beszámoltak sertés eredetű izolátumok esetében: Tang és mtsai. (2009) 58,3%-ban, Furian és mtsai. (2016) 40%-ban, Dayao és mtsai. (2014) 28%-ban, míg Petrocchi-Rilo és mtsai. (2019) 18,8%-ban mutattak ki tetraciklinnel szemben rezisztens törzseket. Egy hazai közleményben (Sellyei és mtsai., 2009) sertés eredetű *P. multocida* törzseket vizsgálva a tetraciklinnel szemben rezisztens törzsek aránya 6%, a doxiciklinnel szemben rezisztens törzsek aránya pedig 3% volt. Bourély és mtsai. (2019) munkájában a tetraciklinre rezisztens törzsek aránya gazdafajtól függően változott: macska (4,1%), szarvasmarha (23,4%), sertés (6,7%) és juh (4,5%).

A gentamicin kevésbé bizonyult hatékonynak az általunk vizsgált *P. multocida* törzsekkel szemben, az izolátumok 44,9%-a rezisztensnek bizonyult, további 32,3% pedig mérsékelt rezisztenciát mutatott. A korábbi közleményekben ezzel szemben alacsonyabb mértékű rezisztenciáról számoltak be. Tang és mtsai. (2009) munkájában a sertés eredetű törzsek 13,7%-a mutatott rezisztenciát gentamicinnel szemben, Cid és mtsai. (2019) a sertés eredetű izolátumok 7,2%-ánál, míg Furian és mtsai. (2016) pedig 2,5%-ban azonosított rezisztens törzseket. Sarangi és mtsai. (2014) kiskérődző eredetű izolátumok vizsgálata során juhokból



származó törzsek 3%-ánál azonosított gentamicin rezisztenciát, kecske eredetű törzsek esetében pedig minden törzset érzékenynek találtak erre az antibiotikumra. Egy frissebb közleményben (Cid és mtsai., 2019) juhokból izolált *P. multocida* törzsek mindegyikét érzékenynek találta gentamicinre. Schwarz és mtsai. (2004) szintén gentamicinre érzékenynek találták az általuk vizsgált szarvasmarha eredetű *P. multocida* törzseket. Bourély és mtsai. (2019) különböző gazdafajokból származó izolátumokat vizsgálva szintén a törzsek nagyfokú érzékenységről számolt be a gentamicin vizsgálata során, a rezisztens törzsek aránya macska (9,3%), szarvasmarha (4,6%), sertés (3,5%) és juh (6,7%) eredetű törzsek esetében is alacsony volt.

Eritromicinnel szemben az általunk vizsgált törzsek 23,4%-a rezisztenciát mutatott, további 71,5%-nál pedig mérsékelt érzékenységet azonosítottunk. A szakirodalomban ennél alacsonyabb rezisztencia értékekről számoltak be a korábbi közleményekben, Tang és mtsai. (2009) 6%-ban, Dayao és mtsai. (2014) 14%-ban, Petrocchi-Rilo és mtsai. (2019) pedig 12,5%-ban azonosítottak rezisztens törzseket. Egy hazai közleményben (Sellyei és mtsai., 2009) sertés eredetű *P. multocida* törzsek 3%-a mutatott rezisztenciát eritromicinnel szemben, és az izolátumok 44%-a mérsékelt érzékenységet mutatott. Sarangi és mtsai. (2015) kiskérődző eredetű izolátumokat vizsgálva 19,4% (juh izolátumok) és 4,8%-os (kecske izolátumok) rezisztenciáról számoltak be eritromicinnel szemben.

A *P. multocida* nalidixsav érzékenységről kevés korábbi publikáció tesz említést. Vizsgálataink során a törzsek 13,9%-a volt rezisztens nalidixsavval szemben. Bourély és mtsai. (2019) macska eredetű izolátumok esetében vizsgálta a nalidixsav érzékenységet, és 3,6%-ban azonosított rezisztens törzseket.

A *P. multocida* apramicin érzékenységről szintén kevés korábbi publikáció tesz említést. Vizsgálataink során a törzsek 87,3%-a volt rezisztens apramicinnel szemben. Sellyei és mtsai. (2009) sertés eredetű izolátumok esetében 30,5%-ban azonosított rezisztens törzseket, ugyanakkor PMT pozitív törzsek esetében az apramicin rezisztencia 45%-ban fordult elő, míg a PMT negatív izolátumok csak 12,5%-ban mutattak rezisztenciát.

Sztreptomicinnel szemben a törzsek 27,2%-ában azonosítottunk rezisztenciát. Jamali és mtsai. (2014) szarvasmarha eredetű izolátumokat vizsgálva 22%-os rezisztenciáról számolt be. A korábbi közlemények több esetben is a spektinomicint vonták be az antibiotikum érzékenység vizsgálatokba, és a rezisztens törzsek alacsony előfordulási arányáról számoltak be (Schwarz és mtsai., 2004; Tang és mtsai., 2009; Oh és mtsai., 2018; Cid és mtsai., 2019).

A *P. multocida* linkozamidokkal szembeni rezisztenciájáról a korábbi publikációk is beszámoltak, és vizsgálataink során a törzsek 97,5%-a rezisztenciát mutatott klindamicinnel szemben. Tang és mtsai. (2009) sertés eredetű törzseket vizsgálva linkormicinnel szemben 96,6%-os, klindamicinnel szemben pedig 80,3%-os rezisztenciáról számoltak be. Egy évtizeddel később, Petrocchi-Rilo és mtsai. (2019) szintén sertés eredetű *P. multocida*

törzseket vizsgálva 96,9%-ban azonosítottak rezisztenciát. Egy spanyol közleményben (Cid és mtsai., 2019) a sertés eredetű törzsek 81,2%-át, és a juh eredetű izolátumok mindegyikét rezisztensnek találták.

Szulfonamidokkal szemben a törzsek 97,5%-ában azonosítottunk rezisztenciát, mely a szakirodalmi előzményekkel összhangban van. Sertés eredetű izolátumokat vizsgálva Tang és mtsai. (2009) 85,4%-ban, Furian és mtsai. (2016) 85%-ban, Oh és mtsai. (2019) pedig 76%-ban azonosítottak szulfonamidokkal szemben rezisztens törzseket. Ezzel szemben egy hazai publikációban (Sellyei és mtsai., 2009) szintén sertés eredetű *P. multocida* izolátumokat vizsgálva a törzsek 80%-át érzékenynek találták, mérsékelten érzékeny törzseket 3%-ban, míg szulfonamidokkal szemben rezisztenciát mutató izolátumokat 17%-ban azonosítottak. Schwarz és mtsai. (2004) szarvasmarha eredetű törzsek 66,2%-ában mutatott ki rezisztens törzseket, Cid és mtsai. (2019) juhokból származó törzsek 73,6%-ában, és sertés eredetű izolátumok 89,9%-ában azonosított szulfonamidokkal szembeni rezisztenciát.

#### 5.4.2. Multirezisztens *P. multocida* törzs vizsgálata (Pm238)

A Pm238 nem rendelkezett plazmiddal, és összhangban az antibiotikum rezisztencia fenotípussal, PCR reakciók segítségével sikeresen ki tudtuk mutatni a kloramfenikol (*catAIII*), szulfonamid (*sulIII*), sztreptomycin (*strA*), és tetraciklin (*tetB*) rezisztencia kialakításáért felelős génszakaszokat.

Az irodalomban leírt adatok alapján, a kinolon típusú antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulását a DNS giráz (*gyrA*) és a topoizomeráz IV (*parC*) génszakaszok kinolon rezisztencia determináló régióiban (QRDR) létrejövő mutációk szerepelnek (Cárdenas és mtsai., 2001). A vizsgált Pm238-as törzs esetében mi is azonosítani tudtunk egy aminosav cserét okozó pontmutációt a *parC* génszakaszban (Glu → Lys). A fluorokinolon rezisztenciáról *P. multocida* esetében csak ritkán számolnak be a szakirodalomban, és általában a ciprofloxacinnal szemben jelentkező rezisztenciát az enrofloxaccinnal asszociálnak tekintik. A Pm238 érzékeny volt ciprofloxacinnal, ugyanakkor rezisztenciát mutatott enrofloxaccinnal és nalidixsavval szemben. Napjainkig kevés közlemény foglalkozott a *P. multocida* említett három antibiotikummal szembeni rezisztenciájával, vagy a QRDR régiókban azonosítható mutációkkal. Kong és mtsai. (2014) nem találtak összefüggést a QRDR szekvenciákban fellelhető pontmutációk és a ciprofloxacinnal és enrofloxaccinnal MIC értékek között. Egy másik közleményben Cárdenas és mtsai. (2001) *P. multocida* törzsek MIC értékeit határozták meg ciprofloxacinnal és nalidixsavval szemben, de az enrofloxacin érzékenységet nem tesztelték. A *gyrA* génszakaszon aminosav cseréket előidéző pontmutációkat azonosítottak a QRDR régióban (Ser 83 → Ile, Asp 87 → Gly), mellyel összefüggésben a törzsek nalidixsav MIC értékei magasabbak voltak, ugyanakkor a fluorokinolonokkal szembeni érzékenység csökkenését tapasztalták. Vanni és mtsai. (2014) olyan *E. coli* törzseket találtak, melyek a

Pm238 törzshöz hasonlóan rezisztenciát mutattak enrofloxacinnal szemben, ugyanakkor érzékenyek voltak ciprofloxacinra, és ezzel összefüggésben mutációkat is azonosítottak a *parC* és *gyrA* génszakaszok QRDR régióiban. Eredményeink arra utalnak, hogy eddig ismeretlen fluorokinolon rezisztencia fenotípusok is jellemzőek lehetnek a *P. multocida* fajra, és a DNS giráz és a topoizomeráz IV génszakaszokban jelentkező mutációk tehetők felelőssé a rezisztencia kialakulásáért.

A *P. multocida* fenikol típusú antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának kialakításában több rezisztenciagén is szerepet játszik, ezért kloramfenikollal szemben rezisztens, ugyanakkor florfenikolra érzékeny törzsek is előfordulnak. A kloramfenikol rezisztencia az antibiotikum kloramfenikol acetiltranszferáz enzimmel történő inaktivációjával jön létre, és a *P. multocida* esetében a kialakulásáért a *catAIII* rezisztenciagén tehető felelőssé (Kehrenberg és Schwarz, 2001). A *catAIII* génszakaszt a Pm238-es törzs esetében is azonosítani tudtuk. A florfenikol rezisztencia kialakításáért a plazmidon kódolt *floR* génszakaszt tesz felelőssé (Kehrenberg és Schwarz, 2005a), ami egy membrán-asszociált, exportért felelős fehérjét kódol. Napjainkig ezt a rezisztenciagént csak plazmidon mutatták ki számos baktériumfaj esetében: *E. coli* (Clockaert és mtsai., 2000), *Mannheimia haemolytica* (Katsuda és mtsai., 2009), and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Bossé és mtsai., 2015). Emiatt a *catAIII* génszakasz jelenléte és a plazmid hiánya együttesen alakíthatja ki a Pm238-as törzshöz hasonló fenikol rezisztencia fenotípust.

A multirezisztencia általában mutációk vagy rezisztencia gének felhalmozódásával alakul ki (Michael és mtsai., 2012). Emellett, San Millan és mtsai. (2009) a *P. multocida* multirezisztenciájának hátterében több, kisebb méretű plazmid jelenlétét igazolták, melyek rezisztenciagéneket kódoltak. Más esetben multirezisztens, de plazmidot nem hordozó *P. multocida* törzsek vizsgálatával megállapították, hogy a törzsek rezisztencia géneket hordoztak, melyek integratív-konjugatív elemekkel (*ICEPmu1*, *ICEPmu2*) kapcsolatosan fordultak elő a bakteriális genomban (Michael és mtsai., 2012; Moustafa és mtsai., 2015). Ezek a mobilis genetikai elemek rezisztenciagén kazettákat tartalmaznak, transzpozáz- vagy inszerciós szekvenciák által határolva, arra utalva, hogy a rezisztenciagének egy integrációs vagy rekombinációs folyamat eredményeképpen kerültek a genomba. A Pm238 törzs vizsgálata során a Klima és mtsai. (2014) által leírt PCR reakciók segítségével nem tudtuk kimutatni az *ICEPmu1* integratív-konjugatív elemmel társult mobilis genetikai elemeket. Eredményünk arra utalhat, hogy a Pm238-es törzs több, egymást követő gén-transzfer lépésben tehetett szert az azonosított rezisztencia génekre, de ennek tisztázásához a törzs teljes genom szekvenálása szükséges.

A *P. multocida* multirezisztenciájának terjedése miatt az izolátumok antibiotikum érzékenységeinek folyamatos monitorozására kiemelt figyelmet kell fordítani. A Pm238-es törzshöz hasonló multirezisztens izolátumok megjelenése azt bizonyítja, hogy egyetlen klón

akár többszörösen is szert tehet rezisztenciagénekre. Eredményeinkből az is következik, hogy a *P. multocida* többféle úton is multirezisztenssé válhat, ami egyre inkább veszélyeztetheti az antibiotikumok terápiás hatékonyságát, és támogathatja a kórokozó terjedését. A *P. multocida* multirezisztenciáját kialakító mechanizmusok jobb megismerése és a rezisztencia patogén baktériumfajok közötti terjedésének megakadályozása napjaink legfontosabb kihívásai között szerepel a humán- és állatgyógyászatban egyaránt.

## 6. Új tudományos eredmények

1. Elsőként állapítottuk meg hazai kiskérődző állományokban a *P. multocida* toxint termelő törzseinek igen magas előfordulási arányát.
2. A virulenciát meghatározó gének előfordulását vizsgálva 13 különböző virulenciagén profilt írtunk le, melyek kevés kivétellel csak egy-egy gazdafajra voltak jellemzőek.
3. Az *ompA* génszakasz szekvencia elemzése során összesen 25 egyedi szekvencia típust különítettünk el, melyek kilenc klasztert alkottak. Ezek összefüggést mutattak a virulenciagén profilokkal és a törzsek gazdafaji eredetével.
4. Elsőként végeztük el magyarországi eredetű humán esetekből izolált *P. multocida* törzsek részletes összehasonlító vizsgálatát, melynek során kimutattuk a macska eredetű izolátumokkal való nagyfokú hasonlatosságot, utalva ezzel a zoonótikus eredetre.
5. Sertésben első alkalommal, szarvasmarhában pedig hosszabb szünet után újból igazoltuk a B:2 típusú *P. multocida* törzsek hazai előfordulását. Elvégeztük az izolátumok részletes vizsgálatát, összevetve az adatokat az Európában az utóbbi időben felbukkant B:2 típusú *P. multocida* törzsek tulajdonságaival.
6. Nagyszámú, különböző emlősfajokból származó *P. multocida* törzs antibiotikum-érzékenységét határoztuk meg. Az antibiotikum-rezisztencia genetikai hátterét vizsgálva egy multirezisztens *P. multocida* törzs esetében megállapítottuk, hogy a törzs valószínűleg több egymást követő géntranszfer lépésben halmozta fel a rezisztencia géneket, nem pedig plazmid vagy multirezisztens transzferálható elem konjugációs átvitelével.

## 7. Irodalomjegyzék

- Aalbæk, B., Eriksen, L., Rimler, R.B., Leifsson, P.S., Basse, A., Christiansen, T. Eriksen, E.: **Typing of *Pasteurella multocida* from haemorrhagic septicaemia in Danish fallow deer (*Dama dama*).** *Apmis.* 107. 913-920, 1999.
- Abrahamian, F.M., Goldstein, E.J.: **Microbiology of animal bite wound infections,** *Clin. Microbiol. Rev.* 24. 231–246, 2011.
- Adams, O.R., Brown, W.W., Chow, T.L., Collier, J.R., Davis, R.W., Griner, L.A., Jensen, R., Pierson, R.E., Wayt, L.: **Comparison of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever, and calf diphtheria of cattle.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 134. 85–89, 1959.
- Adler, B., Bulach, D., Chung, J., Doughty, S., Hunt, M., Rajakumar, K., Serrano, M., van Zanden, A., Zhang, Y., Ruffolo, C.: **Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*.** *J. Biotechnol.* 73. 83–90, 1999.
- Al-Haddawi, M.H., Jasni, S., Son, R., Mutalib, A.R., Bahaman, A.R., Zamri-Saad, M., Sheikh-Omar, A.R.: **Molecular characterization of *Pasteurella multocida* isolates from rabbits.** *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45. 269–275, 1999.
- Aminov, R.I., Chee-Sanford, J.C., Garrigues, N., Teferedegne, B., Krapac, I.J., White, B.A., Mackie, R.I.: **Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria.** *Appl. Environ. Microbiol.* 68. 1786–1793, 2002.
- Antony, P., Nair, G., Jayaprakasan, V., Mini, M., Aravindakshan, T.: **Nucleic acid based differentiation of *Pasteurella multocida* serotypes.** *J. Dairy Sci.* 2. 178–182, 2007.
- Aski, H.S., Tabatabaei, M.: **Occurrence of virulence-associated genes in *Pasteurella multocida* isolates obtained from different hosts.** *Microb. Pathog.* 96. 52–57, 2016.
- Atashpaz, S., Shayegh, J., Hejazi, M.S.: **Rapid virulence typing of *Pasteurella multocida* by multiplex PCR.** *Res. Vet. Sci.* 87. 355–357, 2009.
- Avril, J.L., Donnio, P.Y., Pouedras, P.: **Selective medium for *Pasteurella multocida* and its use to detect oropharyngeal carriage in pig breeders.** *J. Clin. Microbiol.* 28. 1438–1440, 1990.
- Bethe, A., Wieler, L.H., Selbitz, H.J., Ewers, C.: **Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine.** *Vet. Microbiol.* 139. 97–105, 2009.
- Biswas, A., Shivachandra, S.B., Saxena, M.K., Kumar, A.A., Singh, V.P., Srivastava, S.K.: **Molecular variability among strains of *Pasteurella multocida* isolated from an outbreak of haemorrhagic septicaemia in India.** *Vet. Res. Commun.* 28. 287–298, 2004.

- Blackall, P.J., Fegan, N., Chew, G.T., Hampson, D.J.: **Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia.** Microbiol. 144. 279–289, 1998.
- Blackall, P.J., Pahoff, J.L., Bowles, R.: **Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs.** Vet. Microbiol. 57. 355–360, 1997.
- Boerlin, P., Siegrist, H.H., Burnens, A.P., Kuhnert, P., Mendez, P., Prétat, G., Lienhard, R., Nicolet, J.: **Molecular identification and epidemiological tracing of *Pasteurella multocida* meningitis in a baby.** J. Clin. Microbiol. 38. 1235–1237, 2000.
- Borge, C., Barranco, I., Márquez del Cid, J.M., Rodríguez-Guerra, M.A., Carbonero, A., Carrasco, L., Perea, A.: **Outbreak of acute septicaemia by *Pasteurella multocida* type B in pigs reared in extensive system in Spain.** In: Proceedings of the European Symposium of Porcine Health and Management, Helsinki, Espoo. p. 127, 2011.
- Bosch, M., Garrido, M.E., Llagostera, M., de Rozas, A.M.P., Badiola, I., Barbé, J.: **Characterization of the *Pasteurella multocida hgbA* gene encoding a hemoglobinbinding protein.** Infect. Immun. 70. 5955–5964, 2002.
- Bossé, J.T., Li, Y., Atherton, T.G., Walker, S., Williamson, S.M., Rogers, J., Chaudhuri, R.R., Weinert, L.A., Holden, M.T.G., Maskell, D.J., Tucker, A.W., Wren, B.W., Rycroft, A.N., Langford, P.R.: **Characterisation of a mobilisable plasmid conferring florfenicol and chloramphenicol resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Vet. Microbiol. 178. 279–282, 2015.
- Bourély, C., Cazeau, G., Jouy, E., Haenni, M., Madec, J. Y., Jarrige, N., Jarrige, N., Leblond, A., Gay, E.: **Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from diseased food-producing animals and pets.** Vet. Microbiol. 235. 280–284, 2019.
- Boyce, J.D., Harper, M., Wilkie, I., Adler, B.: ***Pasteurella*.** In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. Szerk.: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O., New Jersey, John Wiley & Sons. 2010. p. 325–346.
- Cameron, R.D.A., O'Boyle, D., Frost, A.J., Gordon, A.N., Fegan, N.: **An outbreak of haemorrhagic septicaemia associated with *Pasteurella multocida* subsp *gallicida* in a large pig herd.** Aust. Vet. J. 73. 27–29, 1996.
- Cárdenas, M., Barbé, J., Llagostera, M., Miró, E., Navarro, F., Mirelis, B., Prats, G., Badiola, I.: **Quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Pasteurella multocida* strains with different levels of nalidixic acid resistance.** Antimicrob. Agents Chemother. 45. 990–991, 2001.
- Cardoso-Toset, F., Gómez-Laguna, J., Callejo, M., Vela, A.I., Carrasco, L., Fernández-Garayzábal, J.F., Maldonado, A., Luque, I.: **Septicaemic pasteurellosis in free-range pigs associated with an unusual biovar 13 of *Pasteurella multocida*.** Vet. Microbiol. 167. 690–694, 2013.

- Carter, G. R.: **Observations on the pathology and bacteriology of shipping fever in Canada.** Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 18. 359–364, 1954.
- Carter, G. R.: **Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types.** Am. J. Vet. Res. 16. 481–484, 1955.
- Catt, D.M., Chengappa, M.M., Kadel, W.L., Herren, C.E.: **Preliminary studies with a live streptomycin-dependent *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* vaccine for the prevention of bovine pneumonic pasteurellosis.** Can. J. Comp. Med. 49. 366–371, 1985.
- Chandrasekaran, S., Yeap, P.C.: ***Pasteurella multocida* in pigs: the serotypes and the assessment of their virulence in mice.** Br. Vet. J. 138. 332–336, 1982.
- Chang, W.H., Carter, G.R.: **Multiple drug resistance in *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* from cattle and swine.** J. Am. Vet. Med. Assoc. 169. 710–712, 1976.
- Chen, H.I., Hulten, K., Clarridge, J.E.: **Taxonomic subgroups of *Pasteurella multocida* correlate with clinical presentation.** J. Clin. Microbiol. 40. 3438–3441, 2002.
- Chengappa, M.M., McLaughlin, B.G., Kadel, W.L., Maddux, R.L., Greer, S.C.: **Efficacy of a live *Pasteurella multocida* vaccine for the prevention of experimentally induced bovine pneumonic pasteurellosis.** Vet. Microbiol. 21. 147–154, 1989.
- Christensen, H., Angen, Ø., Olsen, J.E., Bisgaard, M.: **Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium*.** Microbiol. 150. 1757–1767, 2004.
- Cid, D., Fernández-Garayzábal, J.F., Pinto, C., Domínguez, L., Vela, A.I.: **Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from sheep and pigs in Spain—Short communication.** Acta Vet. Hung. 67. 489–498, 2019.
- Cloekaert, A., Baucheron, S., Flaujac, G., Schwarz, S., Kehrenberg, C., Martel, J.L. Chaslus-Dancla, E.: **Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in *Escherichia coli* isolated from cattle.** Antimicrob. Agents Chemother. 44. 2858–2860, 2000.
- Clinical and Laboratory Standards Institute: **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**, 3rd ed., CLSI supplement VET01S, Wayne, PA, USA, 2018b.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**, 28th ed., CLSI supplement M100, Wayne, PA, USA, 2018a.
- Confer, A. W.: **Immunogens of *Pasteurella*.** Vet. Microbiol. 37. 353–368, 1993.



- Confer, A.W., Nutt, S.H., Dabo, S.M., Panciera, R.J., Murphy, G.L.: **Antibody responses of cattle to outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A: 3.** Am. J. Vet. Res. 57. 1453–1457, 1996.
- Dabo, S.M., Confer, A.W., Lu, Y.S.: **Single primer polymerase chain reaction fingerprinting for *Pasteurella multocida* isolates from laboratory rabbits.** Am. J. Vet. Res. 61. 305–309, 2000.
- Dabo, S.M., Confer, A., Montelongo, M., York, P., Wyckoff III, J.H.: **Vaccination with *Pasteurella multocida* recombinant OmpA induces strong but non-protective and deleterious Th2-type immune response in mice.** Vaccine. 26. 4345–4351, 2008.
- Dabo, S.M., Taylor, J.D., Confer, A.W.: ***Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease.** Anim. Health Res. Rev. 8. 129–150, 2007.
- Davies, R.L., MacCorquodale, R., Baillie, S., Caffrey, B.: **Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis.** J. Med. Microbiol. 52. 59–67, 2003.
- Davies, R.L., MacCorquodale, R., Reilly, S.: **Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin.** Vet. Microbiol. 99. 145–158, 2004.
- Dayao, D.A.E., Gibson, J.S., Blackall, P.J., Turni, C.: **Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia.** Vet. Microbiol. 171. 232–235, 2014.
- De Alwis, M.C.: **Haemorrhagic septicaemia – a general review.** Br. Vet. J. 148. 99–112. 1992.
- De Jong, M.F., Nielsen, J.P.: **Definition of progressive atrophic rhinitis.** Vet. Rec. 126. 93, 1990.
- Donnio, P.Y., Lerestif-Gautier, A.L., Avril, J.L.: **Characterization of *Pasteurella* spp. strains isolated from human infections.** J. Comp. Pathol. 130. 137–142, 2004.
- Dowling, A., Hodgson, J.C., Schock, A., Donachie, W., Eckersall, P.D., McKendrick, I.J.: **Experimental induction of pneumonic pasteurellosis in calves by intratracheal infection with *Pasteurella multocida* biotype A:3.** Res. Vet. Sci. 73. 37–44, 2002.
- Dziva, F., Muhairwa, A.P., Bisgaard, M., Christensen, H.: **Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*.** Vet. Microbiol. 128. 1–22, 2008.
- E-kobon, T., Leeanan, R., Pannoi, S., Anuntasomboon, P., Thongkamkoon, P., Thamchaipenet, A.: **OmpA protein sequence-based typing and virulence-associated gene profiles of *Pasteurella multocida* isolates associated with bovine haemorrhagic septicaemia and porcine pneumonic pasteurellosis in Thailand.** BMC Vet. Res. 13. 243, 2017.

- Ekundayo, S.O., Odugbo, M.O., Olabode, A.O., Okewole, P.A.: **Phenotypic variability among strains of *Pasteurella multocida* isolated from avian, bovine, caprine, leporine and ovine origin.** Afr. J. Biotechnol. 7. 1347–1350, 2008.
- Ellis, J. A.: **The immunology of the bovine respiratory disease complex.** Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract. 17. 535–550, 2001.
- Ewers, C., Lübke-Becker, A., Bethe, A., Kießling, S., Filter, M., Wieler, L. H.: **Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status.** Vet. Microbiol. 114. 304–317, 2006.
- Fegan, N., Blackall, P.J., Pahoff, J.L.: **Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry.** Vet. Microbiol. 47. 281–286, 1995.
- Ferreira, J., Treger, K., Busey, K.: **Pneumonia and disseminated bacteremia with *Pasteurella multocida* in the immune competent host: a case report and a review of the literature.** Respir. Med. Case Rep. 15. 54–56, 2015.
- Fuller, T.E., Kennedy, M.J., Lowery, D.E.: **Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature–tagged mutagenesis.** Microb. Pathog. 29. 25–38, 2000.
- Furian, T.Q., Borges, K.A., Laviniki, V., Rocha, S.L.D.S., Almeida, C.N.D., Nascimento, V.P. D., Salle, C.T.P., Moraes, H.L.D.S.: **Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine.** Braz. J. Microbiol. 47. 210–216, 2016.
- Gamage, L.N.A., Wijewardana, T.G., Bastiansz, H.L.G., Vipulasiri, A.A.: **An outbreak of acute pasteurellosis in swine caused by serotype B:2 in Sri Lanka.** Sri Lanka Vet. J. 42. 15–19, 1995.
- García, N., Fernández-Garayzábal, J.F., Goyache, J., Domínguez, L., Vela, A.I.: **Associations between biovar and virulence factor genes in *Pasteurella multocida* isolates from pigs in Spain.** Vet. Rec. 169. 362–362, 2011.
- García-Alvarez, A., Vela, A.I., San Martín, E., Chaves, F., Fernández-Garayzábal, J.F., Lucas, D., Cid, D.: **Characterization of *Pasteurella multocida* associated with ovine pneumonia using multi–locus sequence typing (MLST) and virulence–associated gene profile analysis and comparison with porcine isolates.** Vet. Microbiol. 204. 180–187, 2017.
- Gatto, N.T., Dabo, S.M., Hancock, R.E., Confer, A.W.: **Characterization of, and immune responses of mice to, the purified OmpA–equivalent outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype A: 3 (Omp28).** Vet. Microbiol. 87. 221–235, 2002.
- Gautam, R., Kumar, A.A., Singh, V.P., Singh, V.P., Dutta, T.K., Shivachandra, S.B.: **Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup–A isolates by PCR assay.** Res. Vet. Sci. 76. 179–185, 2004.

- Geme, J.W.S., Cutter, D.: **Evidence that surface fibrils expressed by *Haemophilus influenzae* type b promote attachment to human epithelial cells.** Mol. Microbiol. 15. 77–85, 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.
- Griego, R.D., Rosen, T., Orenge, I.F., Wolf, J.E.: **Dog, cat, and human bites: a review.** J. Am. Acad. Dermatol. 33. 1019–1029, 1995.
- Griffin, D., Chengappa, M.M., Kuszak, J., McVey, D.S.: **Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex.** Vet. Clin.: Food Anim. Pract. 26. 381–394, 2010.
- Hall, T.: **BioEdit: an important software for molecular biology.** GEF Bull Biosci. 2. 60–61, 2011.
- Harper, M., Boyce, J.D., Adler, B.: ***Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur.** FEMS Microbiol. Lett. 265. 1–10, 2006.
- Harper, M., John, M., Turni, C., Edmunds, M., Michael, F.S., Adler, B., Blackall, P.J., Cox, A.D., Boyce, J.D.: **Development of a rapid multiplex PCR assay to genotype *Pasteurella multocida* strains by use of the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus.** J. Clin. Microbiol. 53. 477–485, 2015.
- Heddleston, K.L., Gallagher, J.E., Rebers, P.A.: **Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species.** Avian Dis. 16. 925–936, 1972.
- Heddleston, K.L., Watko, L.P., Rebers, P.A.: **Dissociation of a fowl cholera strain of *Pasteurella multocida*.** Avian Dis. 8. 649–657, 1964.
- Holst, E., Rollof, J., Larsson, L., Nielsen, J.P.: **Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans.** J. Clin. Microbiol. 30. 2984–2987, 1992.
- Hotchkiss, E.J., Hodgson, J.C., Lainson, F.A., Zadoks, R.N.: **Multilocus sequence typing of a global collection of *Pasteurella multocida* isolates from cattle and other host species demonstrates niche association.** BMC Microbiol. 11. 115, 2011b.
- Hotchkiss, E.J., Hodgson, J.C., Schmitt-Van De Leemput, E., Dagleish, M.P., Zadoks, R.N.: **Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* in dairy and beef calves.** Vet. Microbiol. 151. 329–335, 2011a.
- Jabbari, A.R., Esmaelizadeh, M.: **Molecular typing of avian *Pasteurella multocida* isolates by PCR–RFLP of *ompH* gene.** Iranian J. Biotechnol. 3. 99–103, 2005.
- Jamali, H., Rezagholipour, M., Fallah, S., Dadrasnia, A., Chelliah, S., Velappan, R. D., Wei, K.S.C., Ismail, S.: **Prevalence, characterization and antibiotic resistance of**

- Pasteurella multocida* isolated from bovine respiratory infection.** Vet. J. 202. 381–383, 2014.
- Jamaludin, R., Blackall, P.J., Hansen, M.F., Humphrey, S., Styles, M.: **Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from pigs at slaughter in New Zealand.** New Zeal. Vet. J. 53. 203–207, 2005.
- Johnson, T.J., Abrahante, J.E., Hunter, S.S., Hauglund, M., Tatum, F.M., Maheswaran, S.K., Briggs, R.E.: **Comparative genome analysis of an avirulent and two virulent strains of avian *Pasteurella multocida* reveals candidate genes involved in fitness and pathogenicity.** BMC Microbiol. 13. 106, 2013.
- Kadel, W.L., Chengappa, M.M., Herren, C.E.: **Field-trial evaluation of a *Pasteurella* vaccine in preconditioned and nonpreconditioned lightweight calves.** Am. J. Vet. Res. 46. 1944–1948, 1985.
- Kadlec, K., Michael, G.B., Sweeney, M.T., Brzuszkiewicz, E., Liesegang, H., Daniel, R., Watts, J.L., Schwarz, S.: **Molecular basis of macrolide, triamylide, and lincosamide resistance in *Pasteurella multocida* from bovine respiratory disease.** Antimicrob. Agents Chemother. 55. 2475–2477, 2011.
- Katoch, S., Sharma, M., Patil, R.D., Kumar, S., Verma, S.: **In vitro and in vivo pathogenicity studies of *Pasteurella multocida* strains harbouring different *ompA*.** Vet. Res. Comm. 38. 183–191, 2014.
- Katsuda, K., Hoshino, K., Ueno, Y., Kohmoto, M., Mikami, O.: **Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Pasteurella multocida* isolates from calves.** Vet. Microbiol. 167. 737–741, 2013.
- Katsuda, K., Kohmoto, M., Mikami, O. and Uchida, I.: **Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle with bovine pneumonia.** Vet. Microbiol. 139. 74–79, 2009.
- Kehrenberg, C., Schwarz, S.: **Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*.** FEMS Microbiol. Lett. 205. 283–290, 2001.
- Kehrenberg, C., Schwarz, S.: **Plasmid-borne florfenicol resistance in *Pasteurella multocida*.** J. Antimicrob. Chemother. 55. 773–775, 2005a.
- Kehrenberg, C., Catry, B., Haesebrouck, F., de Kruif, A., Schwarz, S.: **Novel spectinomycin/streptomycin resistance gene, *aadA14*, from *Pasteurella multocida*.** Antimicrob. Agents Chemother. 49. 3046–3049, 2005b.
- Kehrenberg, C., Salmon, S. A., Watts, J. L., Schwarz, S.: **Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease:**

- intergeneric spread of the *tet* (H) plasmid pMHT1. J. Antimicrob. Chemother. 48. 631–640, 2001.
- Kimura, R., Hayashi, Y., Takeuchi, T., Shimizu, M., Iwata, M., Tanahashi, J., Ito, M.: ***Pasteurella multocida* septicemia caused by close contact with a domestic cat: case report and literature review.** J. Infect. Chemother. 10. 250–252, 2004.
- Klima, C.L., Zaheer, R., Cook, S.R., Booker, C.W., Hendrick, S., Alexander, T.W., McAllister, T.A.: **Pathogens of bovine respiratory disease in North American feedlots conferring multidrug resistance via integrative conjugative elements.** J. Clin. Microbiol. 52. 438–448, 2014.
- Kong, L.C., Gao, D., Gao, Y.H., Liu, S.M.: **Fluoroquinolone resistance mechanism of clinical isolates and selected mutants of *Pasteurella multocida* from bovine respiratory disease in China.** J. Vet. Med. Sci. 76. 1655–1657, 2014.
- Kuhnert, P., Boerlin, P., Emler, S., Krawinkler, M., Frey, J.: **Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subsp. *septica* by 16S rRNA gene sequencing.** Int. J. Med. Microbiol. 290. 599–604, 2000.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K.: **MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets.** Mol. Biol. Evol. 33. 1870–1874, 2016.
- Lariviere, S., Leblanc, L., Mittal, K.R., Martineau, G.P.: **Characterization of *Pasteurella multocida* from nasal cavities of piglets from farms with or without atrophic rhinitis.** J. Clin. Microbiol. 30. 1398–1401, 1992.
- Lee, K.E., Jeoung, H.Y., Lee, J.Y., Lee, M.H., Choi, H.W., Chang, K.S., Oh, Y.H., An, D. J.: **Phenotypic characterization and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* isolated from Korean pigs.** J. Vet. Med. Sci. 74. 567–573, 2011.
- Lillie, L.E.: **The bovine respiratory disease complex.** Can. Vet. J. 15. 233–242, 1974.
- Liu, W., Chemaly, R.F., Tuohy, M.J., LaSalvia, M.M., Procop, G.W.: ***Pasteurella multocida* urinary tract infection with molecular evidence of zoonotic transmission.** Clin. Inf. Dis. 36. 58–60, 2003.
- Livrelli, V.O., Darfeuille-Richaud, A., Rich, C.D., Joly, B.H., Martel, J.L.: **Genetic determinant of the ROB-1 beta-lactamase in bovine and porcine *Pasteurella* strains.** Antimicrob. Agents Chemother. 32. 1282–1284, 1988.
- Mackie, J.T.: **Haemorrhagic septicaemia in pigs.** Austr. Vet. J. 74. 399–400, 1996.
- Magyar, T., Lax, A.: ***Pasteurella multocida*.** In: Encyclopedia of food safety. Szerk.: Motarjemi, Y., Moy, G., Todd, E., Amsterdam, Boston, London, Elsevier. 2014. p. 476–479.

- Magyar, T., Lax, A.J.: **Atrophic rhinitis**. In: Polymicrobial diseases. Szerk.: Brogden, K.A., Guthmiller, J.M., Washington: ASM International, 2002. p. 169–197.
- Marois, C., Fablet, C., Gaillot, O., Morvan, H., Madec, F., Kobisch, M.: **Molecular diversity of porcine and human isolates of *Pasteurella multocida***. J. Appl. Microbiol. 107, 1830–1836, 2009.
- Michael, G.B., Kadlec, K., Sweeney, M.T., Brzuszkiewicz, E., Liesegang, H., Daniel, R., Murray, R.W., Watts, J.L., Schwarz, S.: **ICEPmu1, an integrative conjugative element (ICE) of *Pasteurella multocida*: structure and transfer**. J. Antimicrob. Chemother. 67. 91–100, 2012.
- Moore, M.K., Cicznjak-Chubbs, L., Gates, R. J.: **A new selective enrichment procedure for isolating *Pasteurella multocida* from avian and environmental samples**. Avian Dis. 38. 317–324, 1994.
- Moustafa, A.M., Bennett, M.D., Edwards, J., Azim, K., Mesaik, M.A., Choudhary, M.I., Pathanasophon, P., Worarach, A., Ali, Q., Abubakar, M., Anjum, R.: **Molecular typing of haemorrhagic septicaemia-associated *Pasteurella multocida* isolates from Pakistan and Thailand using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis**. Res. Vet. Sci. 95. 986–990, 2013.
- Moustafa, A.M., Seemann, T., Gladman, S., Adler, B., Harper, M., Boyce, J.D., Bennett, M.D.: **Comparative genomic analysis of Asian haemorrhagic septicaemia-associated strains of *Pasteurella multocida* identifies more than 90 haemorrhagic septicaemia-specific genes**. PLoS One. 10. e0130296, 2015.
- Mühldorfer, K., Schwarz, S., Fickel, J., Wibbelt, G., Speck, S.: **Genetic diversity of *Pasteurella* species isolated from European vespertilionid bats**. Vet. Microbiol. 149. 163–171, 2011.
- Murty, D.K., Kaushik, R.K.: **Studies on an outbreak of acute swine pasteurellosis due to *Pasteurella multocida* type B (Carter, 1955)**. Vet. Rec. 77. 411–416, 1965.
- Mutters, R., Christensen, H., Bisgaard, M.: **Genus I. *Pasteurella***. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Szerk.: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2005. p. 857–866.
- Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W., Mannheim, W.: **Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa***. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 35. 309–322, 1985.
- Namioka, S.: Chapter X. ***Pasteurella multocida* – Biochemical Characteristics and Serotypes**. In: Methods in microbiology (Vol. 10). Szerk.: Bergan, T., Norris, J.R., Orlando, Academic Press. 1978. p. 271–292.

- Newman, P.R., Corstvet, R.E., Panciera, R.J.: **Distribution of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* in the bovine lung following vaccination and challenge exposure as an indicator of lung resistance.** Am. J. Vet. Res. 43. 417–422, 1982.
- Nicholas, R., Ayling, R., McAuliffe, L.: **Bovine respiratory disease.** In: *Mycoplasma diseases of ruminants*. Szerk.: Nicholas, R., Ayling, R., McAuliffe, L., Surrey, Veterinary Laboratories Agency. 2008. p. 132–154.
- Nikunen, S., Härtel, H., Orro, T., Neuvonen, E., Tanskanen, R., Kivelä, S.L., Sankari, S., Aho, P., Pyörälä, S., Soveri, T.: **Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves.** Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis. 30. 143–151, 2007.
- Oh, Y.H., Moon, D.C., Lee, Y.J., Hyun, B.H., Lim, S.K.: **Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs between 2010 and 2016.** Vet. Rec. Open. 5. e000293, 2018.
- Omaleki, L., Blackall, P.J., Cuddihy, T., Beatson, S.A., Forde, B.M., Turni, C.: **Using genomics to understand inter- and intra-outbreak diversity of *Pasteurella multocida* isolates associated with fowl cholera in meat chickens.** Microb. Genom. 6. e000346, 2020.
- Ózsvári L., Búza L.: **A szarvasmarhák légzőszervi tünetegyüttesének (BRDC) és hajlamosító tényezőinek előfordulása nagy létszámú magyarországi állományokban.** Magy. Állatorv. Lapja, 137. 139–149, 2015.
- Ózsvári, L., Muntyán, J., Berkes, Á.: **A légzőszervi betegségek (BRD) által okozott veszteségek a szarvasmarhatartásban.** Magy. Állatorv. Lapja. 134. 259–264, 2012.
- Pabs-Garnon, L.F., Soltys, M.A.: **Methods of transmission of fowl cholera in turkeys.** Am. J. Vet. Res. 32. 1119–1120, 1971.
- Pedersen, K.B., Nielsen, J.P., Foged, N.T., Elling, F., Nielsen, N.C., Willeberg, P.: **Atrophic rhinitis in pigs: proposal for a revised definition.** Vet. Rec. 122. 190–191, 1988.
- Peng, Z., Wang, H., Liang, W., Chen, Y., Tang, X., Chen, H., Wu, B.: **A capsule/lipopolysaccharide/MLST genotype D/L6/ST11 of *Pasteurella multocida* is likely to be strongly associated with swine respiratory disease in China.** Arch. Microbiol. 200. 107–118, 2018a.
- Peng, Z., Liang, W., Wang, F., Xu, Z., Xie, Z., Lian, Z., Hua, L., Zhou, R., Chen, H., Wu, B.: **Genetic and phylogenetic characteristics of *Pasteurella multocida* isolates from different host species.** Front. Microbiol. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01408>. 2018b.
- Petersen, A., Bisgaard, M., Townsend, K., Christensen, H.: **MLST typing of *Pasteurella multocida* associated with haemorrhagic septicaemia and development of a real-time PCR specific for haemorrhagic septicaemia associated isolates.** Vet. Microbiol. 170. 335–341, 2014.

- Petrocchi-Rilo, M., Gutiérrez-Martín, C.B., Méndez-Hernández, J.I., Rodríguez-Ferri, E.F., Martínez-Martínez, S.: **Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolates recovered from swine pneumonia in Spain throughout 2017 and 2018.** Vet. Anim. Sci. 7. 100044, 2019.
- Pillai, A.G.R., Katiyar, A.K., Awadhiya, R.P., Vegad, J.L.: **An outbreak of pasteurellosis in swine.** Indian Vet. J. 7. 527–529, 1986.
- Portis, E., Lindeman, C., Johansen, L., Stoltman, G.: **A ten-year (2000–2009) study of antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex—*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni*—in the United States and Canada.** J. Vet. Diagn. Invest. 24. 932–944, 2012.
- Post, K.W., Cole, N.A., Raleigh, R.H.: **In vitro antimicrobial susceptibility of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* recovered from cattle with bovine respiratory disease complex.** J. Vet. Diagn. Invest. 3. 124–126, 1991.
- Prado, M.E., Dabo, S.M., Confer, A.W.: **Immunogenicity of iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A: 3 in cattle: molecular characterization of the immunodominant heme acquisition system receptor (HasR) protein.** Vet. Microbiol. 105. 269–280, 2005.
- Register, K.B., DeJong, K.D. **Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine.** Vet. Microbiol. 117. 201–210, 2006.
- Richer, L., Marois, P., Lamontagne, L.: **Association of bovine viral diarrhoea virus with multiple viral infections in bovine respiratory disease outbreaks.** Can. Vet. J. 29. 713–717, 1988.
- Risco, D., Fernández-Llario, P., Cuesta, J.M., García-Jiménez, W.L., Gil, M., Gonçalves, P., Martínez, R., Gómez, L., García, A., Rey, J., Hermoso de Mendoza, M., Hermoso de Mendoza, J.: **Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (*Sus scrofa*) population from southwest Spain.** J. Vet. Diagn. Invest. 25. 791–794, 2013.
- Rose, S., Desmolaize, B., Jaju, P., Wilhelm, C., Warrass, R. and Douthwaite, S.: **Multiplex PCR to identify macrolide resistance determinants in *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*.** Antimicrob. Agents Chemother. 56. 3664–3669, 2012.
- Rosenau, A., Labigne, A., Escande, F., Courcoux, P., Philippon, A.: **Plasmid-mediated ROB-1 beta-lactamase in *Pasteurella multocida* from a human specimen.** Antimicrob. Agents Chemother. 35. 2419–2422, 1991.
- Ruffolo, C.G., Tennent, J.M., Michalski, W.P., Adler, B.: **Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*.** Infect. Immun. 65. 339–343, 1997.



- Saitou, N., Nei, M.: **The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** Mol. Biol. Evol. 4. 406–425, 1987.
- Samuel, M.D., Botzler, R.G., Wobeser, G.A.: **Avian Cholera.** In: Infectious Diseases of wild birds. Szerk.: Thomas, N.J., Hunter, D.B., Atkinson, C.T., Ames, Blackwell Publishing Professional. 2008. 239–270.
- San Millan, A., Escudero, J.A., Gutierrez, B., Hidalgo, L., Garcia, N., Llagostera, M., Dominguez, L., Gonzalez-Zorn, B.: **Multiresistance in *Pasteurella multocida* is mediated by coexistence of small plasmids.** Antimicrob. Agents Chemother. 53. 3399–3404, 2009.
- Sarangi, L.N., Thomas, P., Gupta, S.K., Priyadarshini, A., Kumar, S., Nagaleekar, V.K., Kumar, A., Singh, V.P.: **Virulence gene profiling and antibiotic resistance pattern of Indian isolates of *Pasteurella multocida* of small ruminant origin.** Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 38. 33–39, 2015.
- Satomura, A., Yanai, M., Fujita, T., Arashima, Y., Kumasaka, K., Nakane, C., Ito, K., Fuke, Y., Maruyama, T., Maruyama, N., Okada, K.: **Peritonitis associated with *Pasteurella multocida*: molecular evidence of zoonotic etiology.** Ther. Apher. Dial. 14. 373–376, 2010.
- Schwarz, S., Spies, U., Schäfer, F., Blobel, H.: **Isolation and interspecies-transfer of a plasmid from *Pasteurella multocida* encoding for streptomycin resistance.** Med. Microbiol. Immunol. 178. 121–125, 1989.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Salmon, S.A., Watts, J.L.: **In vitro activities of spectinomycin and comparator agents against *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* from respiratory tract infections of cattle.** J. Antimicrob. Chemother. 53. 379–382, 2004.
- Sellyei, B., Bányai, K., Magyar, T.: **Characterization of the *ptfA* gene of avian *Pasteurella multocida* strains by allele-specific polymerase chain reaction.** J. Vet. Diagn. Invest. 22. 607–610, 2010.
- Sellyei, B., Ivanics, É., Magyar, T.: **Characterisation of avian *Pasteurella multocida* strains with PCR-RFLP analysis of the *ompH* gene.** Acta Vet. Hung. 61. 1–8, 2013.
- Sellyei, B., Varga, Z., Szentesi-Samu, K., Kaszanyitzky, É., Magyar, T.: **Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry.** Acta Vet. Hung. 57. 357–367, 2009.
- Sellyei, B., Wehmann, E., Magyar, T.: **Sequencing-independent method for the differentiation of the main phylogenetic lineages of *Pasteurella multocida*.** J. Vet. Diagn. Invest. 24. 735–738, 2012.
- Shayegh, J., Sharaf, J., Mikaili, P., Namvar, H.: **Pheno-and genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from goat in Iran.** Afr. J. Biotechnol. 8. 3707–3710, 2009.

- Shivachandra, S.B., Viswas, K.N., Kumar, A.A.: **A review of hemorrhagic septicemia in cattle and buffalo.** Anim. Health Res. Rev. 12. 67–82, 2011.
- Soike, D., Schulze, C.: **Acute pasteurellosis in fallow deer, cattle and pigs in a region of Eastern Germany.** Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 125. 122–128, 2011.
- Sriraman, P.K., Reddy, K.K., Choudhuri, P.C., Sreenivasul, D.: **An outbreak of pasteurellosis in swine.** Indian J. Anim. Sci. 2. 130–131, 1994.
- Stahel, A.B., Hoop, R.K., Kuhnert, P., Korczak, B.M.: **Phenotypic and genetic characterization of *Pasteurella multocida* and related isolates from rabbits in Switzerland.** J. Vet. Diagn. Invest. 21. 793–802, 2009.
- Subaaharan, S., Blackall, L.L., Blackall, P.J.: **Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida*.** Vet. Microbiol. 141. 354–361, 2010.
- Tang, X., Zhao, Z., Hu, J., Wu, B., Cai, X., He, Q., Chen, H.: **Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China.** J. Clin. Microbiol. 47. 951–958, 2009.
- Taylor, J.D., Fulton, R.W., Dabo, S.M., Lehenbauer, T.W., Confer, A.W.: **Comparison of genotypic and phenotypic characterization methods for *Pasteurella multocida* isolates from fatal cases of bovine respiratory disease.** J. Vet. Diagn. Invest. 22. 366–375, 2010.
- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A.J., Adler, B.: **Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system.** J. Clin. Microbiol. 39. 924–929, 2001.
- Townsend, K.M., Dawkins, H.J.S., Papadimitriou, J.M.: **REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates that cause haemorrhagic septicaemia.** Res. Vet. Sci. 63. 151–155, 1997.
- Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M., Dawkins, H.J.: **Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates.** J. Clin. Microbiol. 36. 1096–1100, 1998b.
- Townsend, K.M., O'Boyle, D., Phan, T.T., Hanh, T.X., Wijewardana, T.G., Wilkie, I., Trung, N.T., Frost, A.J.: **Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs.** Vet. Microbiol. 63. 205–215, 1998a.
- Turni, C., Singh, R., Blackall, P.J.: **Genotypic diversity of *Pasteurella multocida* isolates from pigs and poultry in Australia.** Aust. Vet. J. 96. 390–394, 2018.
- Twomey, D.F., Griffiths, P.C., Horgan, M.W., Hignett, B.C., Martin, T.P.: **An investigation into the role of *Chlamydophila* spp. in bovine upper respiratory tract disease.** Vet. J. 171. 574–576, 2006.

- Vanni, M., Meucci, V., Tognetti, R., Cagnardi, P., Montesissa, C., Piccirillo, A., Rossi, A.M., Di Bello, D., Intorre, L.: **Fluoroquinolone resistance and molecular characterization of *gyrA* and *parC* quinolone resistance–determining regions in *Escherichia coli* isolated from poultry.** Poultry Sci. 93. 856–863, 2014.
- Varga, Z., Sellyei, B., Magyar, T.: **Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Hungary.** Acta Vet. Hung. 55. 425–434, 2007.
- Varte, Z., Dutta, T.K., Roychoudhury, P., Begum, J., Chandra, R.: **Isolation, identification, characterization and antibiogram of *Pasteurella multocida* isolated from pigs in Mizoram with special reference to progressive atrophic rhinitis.** Vet. World. 7. 95–99, 2014.
- Verma, S., Sharma, M., Katoch, S., Verma, L., Kumar, S., Dogra, V., Chahota, R., Dhar, P., Singh, G.: **Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle.** Vet. Res. Commun. 37. 83–89, 2013.
- Verma, H., Rawat, M., Samal, A., Upmanyu, V.: **Conventional and molecular characterization of *Pasteurella multocida* isolated from a case of swine septicaemic pasteurellosis.** Indian J. Anim. Res. 48. 605–608, 2014.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., Lupski, J.R.: **Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence–based polymerase chain reaction.** Methods Mol. Cell. Biol. 5. 25–40, 1994.
- Vougidou, C., Sandalakis, V., Psaroulaki, A., Siarkou, V., Petridou, E., Ekateriniadou, L.: **Distribution of the *ompA*-types among ruminant and swine pneumonic strains of *Pasteurella multocida* exhibiting various *cap*-locus and *toxA* patterns.** Microbiol. Res. (Pavia). 174. 1–8, 2015.
- Weber, D.J., Wolfson, J.S., Swartz, M.N., Hooper, D.C.: ***Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature.** Medicine. 63. 133–154, 1984.
- Wei, X., Wang, Y., Luo, R., Qian, W., Sizhu, S., Zhou, H.: **Identification and characterization of a protective antigen, PlpB of bovine *Pasteurella multocida* strain LZ–PM.** Dev. Comp. Immunol. 71. 1–7, 2017.
- Welsh, R.D., Dye, L.B., Payton, M.E., Confer, A.W.: **Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994–2002.** J. Vet. Diagn. Invest. 16. 426–431, 2004.
- Wilkie, I.W., Harper, M., Boyce, J.D., Adler, B.: ***Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis.** In: *Pasteurella multocida*. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 361. Szerk.: Aktories K., Orth J., Adler B., Berlin, Heidelberg, Springer. 2012. p. 1–22.

- Wilson, B.A., Ho, M.: ***Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology.** Clin. Microbiol. Rev. 26. 631–655, 2013.
- Wilson, M.A., Morgan, M.J., Barger, G.E.: **Comparison of DNA fingerprinting and serotyping for identification of avian *Pasteurella multocida* isolates.** J. Clin. Microbiol. 31. 255–259, 1993.
- Wilson, M.A., Rimler, R.B., Hoffman, L.J. **Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida* isolates.** J. Clin. Microbiol. 30. 1518–1524, 1992.
- Yamamoto, J., Sakano, T., Shimizu, M.: **Drug resistance and R plasmids in *Pasteurella multocida* isolates from swine.** Microbiol. Immunol. 34. 715–721, 1990.
- Yates, W.D.: **A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral–bacterial synergism in respiratory disease of cattle.** Can. J. Comp. Med. 46. 225–263, 1982.

## 8. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

### 8.1. Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Ujvári, B., Szeredi, L., Pertl, L., Tóth, G., Erdélyi, K., Jánosi, S., Molnár, T., Magyar, T., 2015.  
First detection of *Pasteurella multocida* type B: 2 in Hungary associated with systemic pasteurellosis in backyard pigs. Acta Veterinaria Hungarica, 63, 141-156.

IF: 0,871

Ujvári, B., Szeredi, L., Pertl, L., Erdélyi, K., Tóth, G., Jánosi, S., Molnár, T., Magyar, T., 2016.  
B: 2 típusú *Pasteurella multocida* törzsek okozta megbetegedés előfordulása sertésekben. Irodalmi összefoglaló és esetismertetés. Magyar Állatorvosok Lapja, 138, 333-346.

IF: 0,189

Magyar, T., Ujvári, B., Szeredi, L., Virsinger, N., Albert, E., Német, Z., Csuka, E., Biksi, I., 2017.  
Re-emergence of bovine haemorrhagic septicaemia in Hungary. Acta Veterinaria Hungarica, 65, 41-49.

IF: 1,042

Ujvári, B., Makrai, L., Magyar, T. 2018. Characterisation of a multiresistant *Pasteurella multocida* strain isolated from cattle. Acta Veterinaria Hungarica, 66, 12-19.

IF: 1,059

Ujvári, B., Weiczner, R., Deim, Z., Terhes, G., Urbán, E., Tóth, A. R., Magyar, T. 2019.  
Characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from human infections. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 63, 37-43.

IF: 1,573

Ujvári B., Makrai L., Magyar T. 2019. Virulence gene profiling and *ompA* sequence analysis of *Pasteurella multocida* and their correlation with host species. Veterinary Microbiology. 233, 190-195.

IF: 3,03

Ujvári B., Magyar T. 2020. A szarvasmarhák *Pasteurella multocida* okozta légzőszervi megbetegedése. Irodalmi összefoglaló. Magyar Állatorvosok Lapja, 142, 3-14.

IF: 0,107

### 8.2. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó publikációk

Magyar, T., Gyuris, É., Ujvári, B., Metzner, M., Wehmann, E. 2019. Genotyping of *Riemerella anatipestifer* by ERIC-PCR and correlation with serotypes. Avian Pathology, 48, 12-16.

IF: 2,338

Nemes, Cs., Schauta, M., Simonyai, E., Turbók, J., Ujvári, B., Magyar T. 2020. *Riemerella anatipestifer* okozta agyburokgyulladás előnevelt pulyka állományban (esetismertetés). Magyar Állatorvosok Lapja, 142, 87-93.

IF: 0,107

Ujvári, B., Szeredi, L., Magyar, T. 2020. Detection of *Frederiksenia* sp. isolated from a cat with nephritis. Acta Veterinaria Hungarica, 68, 140–146.

IF: 0,991

Ujvári, B., Orbán, B., Incze, Zs., Psáder, R., Magyar, T. 2020. Occurrence of *Pasteurellaceae* and *Neisseriaceae* bacteria in the pharyngeal and respiratory tract of dogs and cats. Acta Veterinaria Hungarica, In Press.

IF: 0,991

### **8.3. Konferencia prezentációk**

Ujvári B., Sellyei B., Magyar T.: Phenotypic and genotypic characterisation and comparison of bovine *Pasteurella multocida* strains. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése. Keszthely, 2012. 10. 24-26.

Sellyei B., Ujvári B., Bányai K., Magyar T.: Distribution of adhesion factors and their impact on the pathogenicity of bovine *Pasteurella multocida* strains in bovine respiratory disease. 4th Central European Forum for Microbiology. Keszthely, 2013. 10. 16-18.

Ujvári B., Sellyei B., Magyar T.: Characterisation of *Pasteurella multocida* associated with bovine respiratory disease in Hungary. International *Pasteurellaceae* Conference. Prato, Olaszország, 2014. 05. 13-16.

Sellyei B., Ujvári B., Magyar T., Bányai K.: Molecular analysis of adhesive substances in *Pasteurella multocida*. 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, 2015. 07. 8-10.

Ujvári B., Khayer B., Wehmann E., Magyar T.: Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* strains from swine. 4th Med-Vet-Net Association Scientific Conference. Párizs, Franciaország, 2015. 10. 7-9.

Ujvári B., Magyar T.: Virulence gene profiling of *Pasteurella multocida* isolates from pigs and wild boars. 24th International Pig Veterinary Society Congress. Dublin, Írország, 2016. 06. 7-10.

Albert E., Magyar T., Ujvári B., Szeredi L., Német Z., Csuka E., Biksi I.: *Pasteurella multocida* okozta vérzékes vérfertőzés ismételt hazai előfordulása szarvasmarhában. A Magyar Buiatrikus Társaság XXVI. Nemzetközi Kongresszusa: In Memoriam Kovács Ferenc Nemzetközi Állatorvos és Állattenyésztő Kongresszus. Budapest, Magyarország, Állatorvostudományi Egyetem, 2016.

#### 8.4. Akadémiai beszámolók

Ujvári B., Szeredi L., Pertl L., Tóth G., Erdélyi K., Jánosi Sz., Molnár T., Magyar T.: B:2 típusú *Pasteurella multocida* törzsek első magyarországi izolálása. Budapest, 2015.01.27.

Ujvári B., Magyar T.: Emlősökből izolált *Pasteurella multocida* törzsek feltételezett virulencia génjeinek összehasonlító vizsgálata. Budapest, 2016. 01. 26.

Ujvári B., Makrai L., Magyar T.: Multirezisztencia vizsgálata *Pasteurella multocida* esetében. Budapest, 2017. 01. 24.

Ujvári B., Magyar T., Szeredi L., Virsinger N., Albert E., Német Z., Csuka E., Biksi I.: A vérzéses vérfertőzés ismételt előfordulása hazánkban. Budapest, 2017. 01. 24.

Ujvári B., Weiczner R., Deim Z., Terhes G., Urbán E., Tóth A.R., Magyar T.: *Pasteurella multocida* humán klinikai izolátumok vizsgálata. Budapest, 2018. 01. 23.

Ujvári B., Szeredi L., Magyar T.: Macska nephritis esetből izolált *Frederiksenia* sp. jellemzése. 2020. 01. 21.

## **9. Köszönetnyilvánítás**

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

Köszönöm Dr. Wehmann Enikőnek, Hegedűs Évának és Schihlgruberné Oryszcsák Katalinnak, hogy tapasztalataikat és tudásukat megosztották velem, és elméleti és gyakorlati kérdéseimmel bármikor fordulgattam hozzájuk.

Ez úton szeretném megköszönni a gyakorló kollégáknak, hogy a munkánk során felhasznált törzseket rendelkezésünkre bocsátották.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak és barátaimnak a türelmüket és a támogatásukat.



## 10. Mellékletek

**M1. táblázat:** A vizsgálatba vont *P. multocida* törzsek jellemzői.

Azonosító	Gazdafaj	Minta	Izolálás helye	Izolálás éve	Buroktípus	Toxin	LPS genotípus	Virulenciagén profil (VGP)	<i>ompA</i> klaszter
P55	sertés	bőr	Kisbér	2013	B	-	L2	nv	nv
P56	sertés	lép	Kisbér	2013	B	-	L2	nv	nv
P57	sertés	bőr	Kisbér	2013	B	-	L2	nv	nv
Pm240	szarvasmarha	lép	°	2016	B	-	L2	nv	nv
Pm241	szarvasmarha	lép	°	2016	B	-	L2	nv	nv
3458	szarvasmarha	tüdő	Budapest	2006	A	-	L3	1	nv
3493	szarvasmarha	tüdő	Sóshartyán	2006	A	-	L3	1	A
3522	szarvasmarha	tüdő	Kömlő	2007	A	-	L3	1	nv
3533	szarvasmarha	tüdő	Ballószög	2007	A	-	L3	1	nv
3561	szarvasmarha	tüdő	Rum	2007	A	-	L3	1	nv
3596	szarvasmarha	tüdő	Kőröstetetlen	2007	A	-	L3	1	nv
3603	szarvasmarha	tüdő	Komárom	2007	A	-	L3	1	nv
3661	szarvasmarha	tüdő	Lajoskomárom	2008	A	-	L3	1	A
3689	szarvasmarha	tüdő	Pincehely	2006	A	-	L3	1	A
3844	szarvasmarha	tüdő	Püspökhatvan	2009	A	-	L3	1	nv
3889	szarvasmarha	tüdő	Lajosmizse	2010	A	-	L3	1	A
3942	szarvasmarha	tüdő	Cegléd	2011	A	-	L3	1	A
4127	szarvasmarha	tüdő	Sárbogárd	2014	A	-	L3	1	nv
4128	szarvasmarha	orrtampon	Nagybaracska	2014	A	-	L3	1	A
4129	szarvasmarha	tüdő	Sükösd	2014	A	-	L3	1	A
4132	szarvasmarha	tüdő	Abony	2014	A	-	L3	1	nv
4138	szarvasmarha	tüdő	Gecse	2013	A	-	L3	1	A
4140	szarvasmarha	tej	Mátyásdomb	2013	A	-	L3	1	nv
4145	szarvasmarha	orrtampon	Bóly	2013	A	-	L3	1	A

**M1. táblázat** (folytatás): A vizsgálatba vont *P. multocida* törzsek jellemzői

Azonosító	Gazdafaj	Minta	Izolálás helye	Izolálás éve	Buroktípus	Toxin	LPS genotípus	Virulenciagén profil (VGP)	ompA klaszter
4153	szarvasmarha	tüdő	Levél	2014	A	-	L3	1	A
4155	szarvasmarha	tüdő	Eger	2014	A	-	L3	1	A
4156	szarvasmarha	tüdő	Szabadhídvég	2014	A	-	L3	1	nv
4158	szarvasmarha	tüdő	Szombathely	2014	A	-	L3	1	A
4161	szarvasmarha	tüdő	Súlysáp	2015	A	-	L3	1	nv
4164	szarvasmarha	tüdő	Bugyi	2012	A	-	L3	1	nv
4166	szarvasmarha	orrtampon	Csét	2012	A	-	L3	1	A
4168	szarvasmarha	tüdő	Nagybaracska	2012	A	-	L3	1	A
4169	szarvasmarha	orrtampon	Nagybaracska	2012	A	-	L3	1	nv
4173	szarvasmarha	tej	Mezőfalva	2012	A	-	L3	1	A
4174	szarvasmarha	tej	Bóly	2012	A	-	L3	1	nv
4176	szarvasmarha	tüdő	Mezőtárkány	2012	A	-	L3	1	nv
4177	szarvasmarha	tej	Bogyoszló	2012	A	-	L3	1	A
4178	szarvasmarha	tüdő	Harkakötöny	2012	A	-	L3	1	A
4179	szarvasmarha	tej	Ete	2012	A	-	L3	1	A
4182	szarvasmarha	tüdő	Szerencs	2012	A	-	L3	1	nv
4183	szarvasmarha	tej	Polgárdi	2012	A	-	L3	1	nv
4190	szarvasmarha	tüdő	Kapuvár	2015	A	-	L3	1	A
4193	szarvasmarha	magzat-gyomor	Mátramindszent	2015	A	-	L3	1	A
4199	szarvasmarha	orrtampon	Jászkisér	2015	A	-	L3	1	A
4207	szarvasmarha	tüdő	Bicske	2015	A	-	L3	1	nv
4212	szarvasmarha	tályog	Baja	2015	A	-	L3	1	A
4213	szarvasmarha	orrtampon	Besenyőtelek	2015	A	-	L3	1	nv
4216	szarvasmarha	orrtampon	Békés	2014	A	-	L3	1	A
4217	szarvasmarha	orrtampon	Tarhos	2014	A	-	L3	1	nv

**M1. táblázat** (folytatás): A vizsgálatba vont *P. multocida* törzsek jellemzői

Azonosító	Gazdafaj	Minta	Izolálás helye	Izolálás éve	Buroktípus	Toxin	LPS genotípus	Virulenciagén profil (VGP)	ompA klaszter
4222	szarvasmarha	tüdő	Nagyecséd	2014	A	-	L3	1	nv
4231	szarvasmarha	tüdő	Takácsi	2015	A	-	L3	1	A
4251	szarvasmarha	tüdő	°	2016	A	-	L3	1	A
3509	szarvasmarha	tüdő	Hajdúnánás	2007	A	-	L3	1	nv
3763	szarvasmarha	tüdő	Kunszentmárton	2009	A	-	L3	1	nv
3925	szarvasmarha	tüdő	Tiszasüly	2010	A	-	L3	1	nv
3378	szarvasmarha	tej	Jászkisér	2005	A	-	L3	2	D
3551	szarvasmarha	tüdő	Dénesfa	2007	A	-	L3	2	D
3599	szarvasmarha	tüdő	Dömsöd	2007	A	-	L3	2	nv
3618	szarvasmarha	tüdő	Besenyőtelek	2008	A	-	L3	2	nv
3654	szarvasmarha	tüdő	Kisigmánd	2008	A	-	L3	2	nv
3688	szarvasmarha	orrtampon	Tiszanána	2008	A	-	L3	2	nv
3690	szarvasmarha	tüdő	Hidashát	2005	A	-	L3	2	D
3848	szarvasmarha	magzat-gyomor	Lakitelek	2009	A	-	L3	2	D
3892	szarvasmarha	tej	Bogyoszló	2010	A	-	L3	2	nv
3944	szarvasmarha	hüvely tampon	Pápa	2011	A	-	L3	2	D
4163	szarvasmarha	tej	Borjád	2015	A	-	L3	2	nv
3687	szarvasmarha	orrtampon	Tarhos	2008	A	-	L3	2	D
3950	szarvasmarha	tüdő	Rácalmás	2011	A	-	L3	2	nv
4125	szarvasmarha	tej	Gecse	2013	A	-	L6	2	D
4126	szarvasmarha	orrtampon	Kocsér	2013	A	-	L6	2	nv
4137	szarvasmarha	tüdő	Kocs	2013	A	-	L6	2	D
4143	szarvasmarha	tej	Enying	2013	A	-	L6	2	nv
4160	szarvasmarha	orrtampon	Hottó	2014	A	-	L6	2	D
4167	szarvasmarha	tej	Csécse	2012	A	-	L6	2	D

**M1. táblázat** (folytatás): A vizsgálatba vont *P. multocida* törzsek jellemzői

Azonosító	Gazdafaj	Minta	Izolálás helye	Izolálás éve	Buroktípus	Toxin	LPS genotípus	Virulenciagén profil (VGP)	ompA klaszter
4171	szarvasmarha	tej	Hottó	2012	A	-	L6	2	nv
4172	szarvasmarha	nyirokcsomó	Keszthely	2012	A	-	L6	2	D
4175	szarvasmarha	tüdő	Kocsér	2012	A	-	L6	2	nv
4194	szarvasmarha	tüdő	Vác	2015	A	-	L6	2	D
3686	szarvasmarha	tüdő	Törökszentmiklós	2008	D	-	L3	3	nv
4135	szarvasmarha	tüdő	Nemesszalók	2014	D	-	L3	3	nv
4146	szarvasmarha	orrtampon	Bóly	2013	D	-	L3	3	nv
4165	szarvasmarha	tüdő	Bugyi	2012	D	-	L3	3	B
4170	szarvasmarha	tüdő	Levél	2012	D	-	L3	3	nv
4180	szarvasmarha	tüdő	Vértesacsa	2012	D	-	L3	3	B
4186	szarvasmarha	tüdő	Pély	2015	D	-	L3	3	B
4223	szarvasmarha	tüdő	Csengersima	2014	D	-	L3	3	B
4325	juh	tüdő	Szokolya	2016	A	+	L6	4	H
4326	juh	orrtampon	Kiskunfélegyháza	2016	A	+	L6	4	nv
4134	juh	tüdő	Nyárlőrinc	2014	A	+	L6	4	H
4327	juh	tüdő	Szokolya	2016	A	+	L6	4	nv
4244	juh	tüdő	Kiskunfélegyháza	2016	A	+	L3	4	H
3564	juh	tüdő	Nyárlőrinc	2007	D	+	L3	5	nv
4133	juh	tüdő	Szokolya	2014	D	+	L3	5	A
4152	juh	tüdő	Kiskunfélegyháza	2014	D	+	L3	5	A
4162	juh	tüdő	Érd	2015	A	+	L3	5	A
4328	kecske	tüdő	Pomáz	2015	D	+	L3	5	nv
4329	juh	orrtampon	Kiskunfélegyháza	2016	D	+	L3	5	nv
4330	kecske	tüdő	Izsák	2016	D	+	L3	5	nv
3768	juh	tüdő	Kiskunmajsa	2009	D	+	L3	5	nv
3692	juh	orrtampon	Gelej	2008	A	+	L3	5	nv

**M1. táblázat** (folytatás): A vizsgálatba vont *P. multocida* törzsek jellemzői

Azonosító	Gazdafaj	Minta	Izolálás helye	Izolálás éve	Buroktípus	Toxin	LPS genotípus	Virulenciagén profil (VGP)	ompA klaszter
3707	juh	tüdő	Bekölce	2008	A	+	L3	5	A
3546	juh	tüdő	Káloz	2007	A	+	L3	5	A
3693	juh	tüdő	Szentistván	2008	A	+	L3	5	A
4331	kecske	orrtampon	Izsák	2015	A	-	L3	5	A
3699	kecske	orrtampon	Izsák	2006	D	-	L3	5	A
4332	kecske	tüdő	Győr	2016	D	-	L3	5	nv
4101	sertés	tüdő	°	2011	A	-	L3	6	C
4117	sertés	orrtampon	Nádudvar	2014	A	-	L3	6	nv
4159	sertés	tüdő	Pakod	2014	A	-	L3	6	C
4188	sertés	tüdő	Somogyszob	2015	A	-	L3	6	nv
4210	sertés	tüdő	Zámoly	2015	A	-	L3	6	C
3045	sertés	tüdő	Felcsút	2017	A	-	L3	6	nv
3397	sertés	orrtampon	Püspökladány	2006	D	-	L3	6	C
3042	sertés	tüdő	Jászberény	2017	A	-	L3	7	C
3075	sertés	orrtampon	Ilk	2017	A	-	L3	7	C
3048	sertés	tüdő	Somogytarnóca	2017	A	-	L3	8	E
3049	sertés	tüdő	Old	2017	A	-	L3	8	nv
3307	sertés	orrtampon	Bábolna	2005	A	-	L3	8	E
3322	sertés	orrtampon	Komárom	2005	A	-	L3	9	G
4154	sertés	orrtampon	Sajóecseg	2014	D	-	L3	9	nv
4187	sertés	tüdő	Somogyszob	2015	D	-	L3	9	G
4195	sertés	tüdő	Jászladány	2015	D	-	L3	9	nv
4202	sertés	tüdő	Küngös	2015	A	-	L3	9	G
4243	sertés	orrtampon	Jármi	2016	D	-	L3	9	nv
3047	sertés	tüdő	Nagymágocs	2017	A	+	L3	9	G
3062	sertés	tüdő	Szentes	1988	D	+	L3	9	nv

**M1. táblázat** (folytatás): A vizsgálatba vont *P. multocida* törzsek jellemzői

Azonosító	Gazdafaj	Minta	Izolálás helye	Izolálás éve	Buroktípus	Toxin	LPS genotípus	Virulenciagén profil (VGP)	ompA klaszter
3079	sertés	orrtampon	Baracska	2017	A	+	L3	9	nv
3105	sertés	orrtampon	Mezőhegyes	1990	D	+	L3	9	G
3183	sertés	orrtampon	Vid	1995	A	+	L3	9	G
3211	sertés	orrtampon	Komárom	1994	D	+	L3	9	nv
3212	sertés	orrtampon	Ozora	1999	A	+	L3	9	nv
3503	sertés	orrtampon	Solt	2007	A	+	L3	9	G
3523	sertés	tüdő	Rábakecöl	2007	A	+	L3	9	nv
3569	sertés	tüdő	Seregélyes	2007	A	+	L3	9	G
3610	sertés	tüdő	Mocsa	2007	A	+	L3	9	nv
3715	sertés	orrtampon	Döbrököz	2008	A	+	L3	9	G
3723	sertés	orrtampon	Göcsej	2009	A	+	L3	9	nv
3727	sertés	tüdő	Baracska	2009	A	+	L3	9	G
4043	sertés	orrtampon	°	1988	D	+	L3	9	G
4046	sertés	orrtampon	°	1988	D	+	L3	9	G
4056	sertés	orrtampon	Hajdúszovát	2010	A	+	L3	9	nv
4058	sertés	orrtampon	Nagykőrös	2010	D	+	L3	9	G
4087	sertés	orrtampon	Dombegyház	2011	A	+	L3	9	G
4150	sertés	orrtampon	Mezőfalva	2014	A	+	L3	9	nv
4185	sertés	tüdő	Mezőszemere	2015	A	+	L3	9	nv
4246	sertés	orrtampon	Keve	2016	A	+	L3	9	nv
3080	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L4	12	I
3081	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L1	12	F
3083	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L3	12	nv
3144	humán	felületi seb	Szeged	2017	F	-	L1	12	nv
3100	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L4	13	nv
3127	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L1	13	nv

**M1. táblázat** (folytatás): A vizsgálatba vont *P. multocida* törzsek jellemzői

Azonosító	Gazdafaj	Minta	Izolálás helye	Izolálás éve	Buroktípus	Toxin	LPS genotípus	Virulenciagén profil (VGP)	ompA klaszter
3130	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L1	12	nv
3131	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L1	12	nv
3132	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L3	9	nv
3124	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L1	12	nv
3139	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L7	12	nv
3140	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L1	12	nv
3125	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L1	12	nv
3133	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L3	9	nv
3137	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L5	13	nv
3084	humán	felületi seb	Szeged	2017	A	-	L3	9	nv
Pm242	humán	tályog	Szeged	2016	A	-	L1	9	G
Pm243	humán	felületi seb	Szeged	2016	A	-	L3	12	I
Pm244	humán	trachea	Szeged	2016	A	-	L3	10	D
Pm245	humán	tályog	Szeged	2016	A	-	L1	12	F
Pm246	humán	tályog	Szeged	2016	A	-	L1	12	F
Pm247	humán	műtési szem minta	Szeged	2016	A	-	L3	6	C
Pm248	humán	tályog	Szeged	2016	A	-	L1	12	I
Pm249	humán	felületi seb	Szeged	2016	A	-	L3	11	H
Pm250	humán	felületi seb	Szeged	2016	F	-	L1	12	I
Pm251	humán	felületi seb	Szeged	2016	A	-	L1	12	I
Pm252	humán	felületi seb	Szeged	2016	A	-	L3	9	G
Pm254	humán	műtési minta	Szeged	2016	A	-	L1	12	F
3694	macska	szájüreg	Szilvásvárad	2008	A	-	L1	12	nv
3695	macska	szájüreg	Puszavacs	2008	A	-	L1	12	nv
3697	macska	szájüreg	Dunakeszi	2008	A	-	L1	12	I



**M1. táblázat** (folytatás): A vizsgálatba vont *P. multocida* törzsek jellemzői

Azonosító	Gazdafaj	Minta	Izolálás helye	Izolálás éve	Buroktípus	Toxin	LPS genotípus	Virulenciagén profil (VGP)	ompA klaszter
3087	macska	garat	Budapest	2018	A	-	L1	12	nv
3094	macska	szájüreg	Budapest	2018	A	-	L1	12	I
3095	macska	garat	Budapest	2018	A	-	L1	12	I
3729	macska	szájüreg	Budapest	2009	A	-	L1	12	nv
4230	macska	melkasi traktus	Érd	2015	A	-	L1	12	nv
3696	macska	szájüreg	Ecser	2008	A	-	L3	12	I
3698	macska	szájüreg	Budapest	2008	A	-	L7	13	I
3521	macska	tüdő	Sóskút	2007	A	-	L7	13	I

nv – nem vizsgáltuk. ° - nincs adat.

**M2. táblázat:** A *P. multocida* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának miliméter pontosságban megadott eredményei.

Azonosító	Gazdafaj	PEN	AP	CFU	S	GM	APR	T	DXT	E	TIL	TUL	CD	C	FFC	SMX	ENF	NA
É		≥15	≥17	≥21	≥14	≥16	≥15	≥19	≥19	≥23	≥11	≥18	≥21	≥18	≥19	≥17	≥21	≥19
M			14-16	16-20	11-13	13-15	12-14	15-18	15-18	14-22		15-17	15-20	13-17	15-18	13-16	17-20	14-18
R		≥14	≥17	≥17	≥10	≥12	≥11	≥14	≥14	≥13	≥10	≥14	≥14	≥12	≥14	≥12	≥16	≥13
3042	sertés	28	30	30	8	15	6	20	20	20	14	22	0	28	29	0	29	15
3045	sertés	0	25	20	0	20	12	25	15	7	15	22	7	18	22	0	19	17
3047	sertés	0	20	26	15	16	6	25	20	15	10	25	0	24	24	6	50	10
3048	sertés	28	30	30	10	15	6	20	15	14	17	24	0	20	30	0	48	27
3049	sertés	12	20	0	0	14	6	15	14	16	16	28	0	30	31	6	36	0
3062	sertés	20	15	0	0	8	7	18	12	20	15	15	0	28	32	0	31	22
3075	sertés	33	30	32	15	20	7	23	19	10	15	19	0	24	25	0	25	0
3079	sertés	30	30	33	12	18	6	20	0	17	10	25	0	30	32	0	32	15
3105	sertés	0	30	30	12	15	0	21	20	18	17	26	8	30	18	6	20	20
3183	sertés	24	20	9	9	18	7	20	20	15	8	26	7	30	30	6	21	20
3211	sertés	36	36	30	16	20	10	30	29	26	28	30	0	36	40	0	34	31
3212	sertés	25	20	20	8	14	7	20	24	18	18	0	0	30	30	0	30	24
3307	sertés	25	21	27	10	15	9	26	15	14	13	20	0	22	25	0	25	0
3322	sertés	25	27	28	11	18	7	20	18	12	12	19	0	30	28	0	30	21
3378	szarvasmarha	25	24	30	13	16	10	9	14	0	0	0	0	14	30	0	13	0
3397	sertés	0	0	0	10	15	8	23	20	20	15	18	0	26	24	0	20	20
3458	szarvasmarha	31	23	32	12	10	9	8	12	0	0	0	0	15	29	0	18	0
3493	szarvasmarha	27	28	30	0	12	0	13	18	19	19	24	0	0	28	0	21	0
3503	sertés	32	30	30	12	15	7	24	20	17	15	21	0	26	24	0	26	22
3509	szarvasmarha	23	26	13	0	22	11	0	10	0	12	0	0	9	30	0	14	0
3522	szarvasmarha	26	29	17	12	13	8	25	20	16	11	16	0	21	29	0	18	26
3523	sertés	32	32	40	17	20	9	27	20	20	18	22	11	27	30	0	33	9
3533	szarvasmarha	18	20	24	16	12	9	22	19	14	16	14	0	27	24	0	24	21
3546	juh	25	28	25	24	16	12	23	25	17	18	28	0	33	27	0	29	23

**M2. táblázat (folytatás): A *P. multocida* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának miliméter pontosságban megadott eredményei**

Azonosító	Gazdafaj	PEN	AP	CFU	S	GM	APR	T	DXT	E	TIL	TUL	CD	C	FFC	SMX	ENF	NA
É		≥15	≥17	≥21	≥14	≥16	≥15	≥19	≥19	≥23	≥11	≥18	≥21	≥18	≥19	≥17	≥21	≥19
M			14-16	16-20	11-13	13-15	12-14	15-18	15-18	14-22		15-17	15-20	13-17	15-18	13-16	17-20	14-18
R		≥14	≥17	≥17	≥10	≥12	≥11	≥14	≥14	≥13	≥10	≥14	≥14	≥12	≥14	≥12	≥16	≥13
3551	szarvasmarha	23	21	32	16	12	10	24	20	18	21	24	0	35	31	0	32	11
3561	szarvasmarha	24	22	31	17	13	10	21	23	17	17	24	9	30	25	10	31	23
3564	juh	26	25	30	22	15	10	24	24	20	16	26	10	34	31	10	27	26
3569	sertés	25	0	24	12	15	9	23	22	15	17	20	0	28	26	0	35	25
3596	szarvasmarha	21	17	25	13	12	8	22	19	13	13	15	0	22	24	0	24	19
3599	szarvasmarha	20	15	26	13	13	9	22	21	11	14	21	0	26	25	0	23	17
3603	szarvasmarha	26	19	23	15	17	10	29	25	23	18	23	11	28	32	9	28	27
3610	sertés	28	32	28	13	18	8	22	20	16	15	18	0	25	25	0	25	22
3618	szarvasmarha	22	18	23	0	12	0	9	17	0	11	14	0	17	30	0	23	20
3654	szarvasmarha	17	19	20	12	11	0	17	18	14	13	19	0	22	24	0	27	21
3661	szarvasmarha	24	21	27	19	12	9	28	26	18	17	29	0	32	32	0	32	20
3686	szarvasmarha	23	23	24	13	13	0	23	21	15	13	19	0	26	30	0	24	21
3687	szarvasmarha	25	28	32	16	12	9	26	22	18	14	23	0	28	32	0	34	28
3688	szarvasmarha	24	22	31	13	13	8	23	19	17	13	20	0	22	27	0	26	24
3689	szarvasmarha	21	18	24	12	11	10	24	22	16	14	16	0	27	30	0	24	22
3690	szarvasmarha	0	0	23	16	14	10	19	20	13	12	24	0	27	28	0	25	20
3692	juh	23	25	30	16	17	10	24	21	17	16	24	10	30	31	0	26	28
3693	juh	25	27	31	18	13	10	23	26	18	15	23	10	31	30	0	27	27
3694	macska	20	20	28	14	14	11	24	22	18	18	20	0	28	30	0	30	24
3695	macska	22	20	30	14	15	10	26	23	17	17	22	12	27	29	0	31	24
3696	macska	21	19	25	15	14	11	22	21	16	14	18	0	24	25	0	21	21
3697	macska	22	20	29	14	14	10	25	24	17	17	21	0	27	30	0	26	21
3698	macska	19	19	26	14	12	12	21	22	16	14	22	0	26	28	0	24	24
3699	kecske	24	28	33	19	16	12	29	25	17	15	25	12	30	31	0	32	29
3707	juh	18	26	33	18	12	10	24	24	17	14	26	9	33	29	0	32	30
3715	sertés	0	0	14	14	14	8	22	18	16	15	20	0	25	26	0	22	0

**M2. táblázat (folytatás):** A *P. multocida* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának miliméter pontosságban megadott eredményei

Azonosító	Gazdafaj	PEN	AP	CFU	S	GM	APR	T	DXT	E	TIL	TUL	CD	C	FFC	SMX	ENF	NA
É		≥15	≥17	≥21	≥14	≥16	≥15	≥19	≥19	≥23	≥11	≥18	≥21	≥18	≥19	≥17	≥21	≥19
M			14-16	16-20	11-13	13-15	12-14	15-18	15-18	14-22		15-17	15-20	13-17	15-18	13-16	17-20	14-18
R		≥14	≥17	≥17	≥10	≥12	≥11	≥14	≥14	≥13	≥10	≥14	≥14	≥12	≥14	≥12	≥16	≥13
3723	sertés	33	34	40	14	15	7	22	18	18	16	20	0	28	30	0	28	11
3727	sertés	27	30	33	14	18	8	24	23	20	16	23	0	28	28	0	24	23
3763	szarvasmarha	22	24	31	15	13	10	27	21	15	16	20	0	24	28	0	36	28
3768	juh	28	28	32	19	16	11	29	27	17	13	29	0	33	26	0	32	28
3844	szarvasmarha	0	0	20	13	11	0	18	18	11	11	17	0	21	21	0	21	13
3848	szarvasmarha	22	20	25	14	13	9	20	19	0	0	18	0	24	28	0	28	20
3889	szarvasmarha	21	20	28	13	12	9	23	23	17	15	17	0	25	27	0	27	23
3892	szarvasmarha	26	23	32	15	12	0	28	21	18	17	25	0	30	32	0	32	23
3925	szarvasmarha	0	0	15	21	16	13	20	22	13	12	23	0	24	24	0	18	14
3942	szarvasmarha	23	21	23	17	11	9	23	22	18	14	25	0	24	25	0	30	26
3944	szarvasmarha	18	17	29	13	11	0	26	23	13	20	23	0	32	30	0	18	0
3950	szarvasmarha	22	25	21	14	12	9	23	19	20	17	18	0	31	31	0	26	21
4043	sertés	48	52	50	16	24	8	30	21	20	20	30	0	40	44	33	46	36
4046	sertés	36	36	42	10	18	8	30	22	14	10	20	0	30	30	21	34	28
4056	sertés	30	30	32	14	18	8	25	21	15	14	22	0	25	28	0	31	26
4058	sertés	30	33	36	10	18	7	28	26	19	15	22	0	31	34	0	38	28
4087	sertés	27	26	30	12	14	7	18	18	18	18	22	0	25	30	0	30	26
4101	sertés	26	27	26	11	14	8	13	14	18	14	18	0	25	24	0	20	16
4117	sertés	0	0	0	12	15	7	20	23	17	16	18	0	22	0	0	15	16
4125	szarvasmarha	13	0	0	18	8	0	26	23	15	13	27	13	29	22	0	25	19
4126	szarvasmarha	25	18	30	17	0	0	19	19	13	11	25	11	24	23	0	32	19
4127	szarvasmarha	30	28	27	15	11	9	28	20	18	12	26	0	30	30	0	29	26
4128	szarvasmarha	20	21	33	10	12	9	18	18	0	0	11	0	17	32	9	31	17
4129	szarvasmarha	31	25	32	13	16	18	17	18	15	18	16	0	29	30	0	30	27
4132	szarvasmarha	33	24	34	20	14	11	32	19	16	10	18	16	26	24	9	34	35
4133	juh	22	23	25	13	13	10	23	20	12	14	17	0	23	30	0	28	24

**M2. táblázat (folytatás): A *P. multocida* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának miliméter pontosságban megadott eredményei**

Azonosító	Gazdafaj	PEN	AP	CFU	S	GM	APR	T	DXT	E	TIL	TUL	CD	C	FFC	SMX	ENF	NA
É		≥15	≥17	≥21	≥14	≥16	≥15	≥19	≥19	≥23	≥11	≥18	≥21	≥18	≥19	≥17	≥21	≥19
M			14-16	16-20	11-13	13-15	12-14	15-18	15-18	14-22		15-17	15-20	13-17	15-18	13-16	17-20	14-18
R		≥14	≥17	≥17	≥10	≥12	≥11	≥14	≥14	≥13	≥10	≥14	≥14	≥12	≥14	≥12	≥16	≥13
4134	juh	20	23	25	13	9	0	20	20	16	14	23	0	28	30	0	24	19
4135	szarvasmarha	31	30	36	14	16	18	34	23	18	15	26	0	31	39	0	37	32
4137	szarvasmarha	23	18	23	10	9	0	21	19	10	0	21	0	25	20	0	22	22
4138	szarvasmarha	26	23	30	15	0	0	16	18	14	11	24	0	32	32	0	15	9
4140	szarvasmarha	25	24	32	12	8	0	28	21	15	12	24	0	29	26	0	25	26
4143	szarvasmarha	0	0	0	14	10	0	33	22	11	0	22	9	31	31	0	23	21
4145	szarvasmarha	30	22	25	17	9	9	25	21	13	12	22	10	31	30	0	33	25
4146	szarvasmarha	24	21	27	12	9	0	24	23	12	10	20	0	26	25	0	27	23
4150	sertés	23	25	26	11	15	7	20	23	15	15	21	0	23	25	0	30	25
4152	juh	19	20	26	17	12	9	25	22	18	15	28	0	30	29	12	28	24
4153	szarvasmarha	30	26	26	10	0	0	30	19	16	11	19	0	34	32	0	25	20
4154	sertés	30	24	33	0	15	8	14	15	16	15	21	0	35	35	0	35	27
4155	szarvasmarha	31	25	30	18	11	10	28	19	14	12	18	9	31	26	0	17	9
4156	szarvasmarha	28	24	36	14	14	13	30	23	17	15	20	0	28	32	0	31	32
4158	szarvasmarha	29	25	28	12	13	0	25	23	16	15	22	9	28	31	11	25	28
4159	sertés	30	25	35	14	15	7	18	20	18	18	23	0	28	30	0	24	23
4160	szarvasmarha	32	26	30	12	9	12	26	22	20	16	21	0	25	26	9	27	24
4161	szarvasmarha	24	22	22	10	0	0	25	19	13	11	22	0	29	27	0	26	25
4162	juh	24	25	27	12	12	10	9	16	24	19	24	10	15	28	0	30	16
4163	szarvasmarha	23	26	30	15	15	13	26	19	20	18	24	0	24	28	0	25	24
4164	szarvasmarha	22	20	23	12	0	0	22	21	15	12	23	0	28	28	0	28	20
4165	szarvasmarha	24	21	24	11	0	0	26	22	13	11	19	0	27	29	0	29	24
4166	szarvasmarha	23	31	25	14	18	17	30	19	15	12	14	0	24	30	0	30	28
4167	szarvasmarha	32	26	30	15	15	11	26	20	20	20	17	0	24	32	0	24	24
4168	szarvasmarha	20	21	25	0	0	0	25	20	0	0	0	0	13	22	0	25	24
4169	szarvasmarha	24	20	22	9	0	0	22	21	11	11	17	0	22	26	0	28	20

**M2. táblázat (folytatás):** A *P. multocida* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának miliméter pontosságban megadott eredményei

Azonosító	Gazdafaj	PEN	AP	CFU	S	GM	APR	T	DXT	E	TIL	TUL	CD	C	FFC	SMX	ENF	NA
É		≥15	≥17	≥21	≥14	≥16	≥15	≥19	≥19	≥23	≥11	≥18	≥21	≥18	≥19	≥17	≥21	≥19
M			14-16	16-20	11-13	13-15	12-14	15-18	15-18	14-22		15-17	15-20	13-17	15-18	13-16	17-20	14-18
R		≥14	≥17	≥17	≥10	≥12	≥11	≥14	≥14	≥13	≥10	≥14	≥14	≥12	≥14	≥12	≥16	≥13
4170	szarvasmarha	28	22	28	12	13	8	24	21	15	15	15	9	21	29	0	28	20
4171	szarvasmarha	25	24	30	15	12	10	25	23	23	16	23	0	30	32	0	29	22
4172	szarvasmarha	25	22	25	9	10	0	23	21	15	13	24	0	28	28	0	30	25
4173	szarvasmarha	26	24	28	10	11	0	24	24	16	13	26	0	30	27	0	31	26
4174	szarvasmarha	21	20	26	15	11	0	22	21	14	14	16	0	25	26	0	24	18
4175	szarvasmarha	24	22	28	12	12	8	20	21	18	14	23	9	26	27	0	28	20
4176	szarvasmarha	19	20	25	9	12	8	20	24	16	13	19	0	31	26	0	25	20
4177	szarvasmarha	25	23	30	15	13	0	23	20	17	16	21	0	34	25	0	18	0
4178	szarvasmarha	28	22	28	9	12	8	20	23	23	18	17	0	33	25	0	30	21
4179	szarvasmarha	18	19	23	13	14	9	22	23	16	11	20	0	30	25	0	26	20
4180	szarvasmarha	26	20	23	12	12	9	24	21	18	14	18	0	27	25	0	22	0
4182	szarvasmarha	26	23	24	13	12	0	22	23	20	12	22	0	31	28	0	27	24
4183	szarvasmarha	23	20	28	9	12	0	24	20	16	17	25	0	30	30	0	26	25
4185	sertés	30	31	30	13	16	0	25	25	20	20	25	0	34	30	0	35	26
4186	szarvasmarha	20	18	24	10	11	0	22	19	12	11	18	0	23	24	0	25	15
4187	sertés	27	20	30	10	15	0	25	24	17	15	21	0	30	32	0	30	27
4188	sertés	22	30	0	14	15	7	26	25	20	18	24	0	30	32	0	25	0
4190	szarvasmarha	20	18	25	11	13	10	25	24	21	17	20	0	26	26	0	27	13
4193	szarvasmarha	24	21	27	12	12	0	26	20	21	19	21	0	25	28	0	25	21
4194	szarvasmarha	22	0	25	11	11	8	23	19	18	13	20	0	23	26	0	29	19
4195	sertés	30	31	35	10	15	0	24	24	18	14	22	0	30	31	0	32	26
4199	szarvasmarha	24	25	28	10	10	0	24	19	16	15	18	0	25	28	0	28	28
4202	sertés	30	30	30	13	17	0	9	14	17	15	24	0	30	31	0	28	25
4207	szarvasmarha	23	23	27	12	12	0	21	19	13	12	17	9	28	26	0	23	13
4210	sertés	0	23	0	13	17	8	24	22	19	20	23	0	30	32	0	22	0
4212	szarvasmarha	28	18	30	14	14	0	26	21	20	17	24	0	27	28	0	27	21

**M2. táblázat (folytatás):** A *P. multocida* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának miliméter pontosságban megadott eredményei

Azonosító	Gazdafaj	PEN	AP	CFU	S	GM	APR	T	DXT	E	TIL	TUL	CD	C	FFC	SMX	ENF	NA
É		≥15	≥17	≥21	≥14	≥16	≥15	≥19	≥19	≥23	≥11	≥18	≥21	≥18	≥19	≥17	≥21	≥19
M			14-16	16-20	11-13	13-15	12-14	15-18	15-18	14-22		15-17	15-20	13-17	15-18	13-16	17-20	14-18
R		≥14	≥17	≥17	≥10	≥12	≥11	≥14	≥14	≥13	≥10	≥14	≥14	≥12	≥14	≥12	≥16	≥13
4213	szarvasmarha	23	28	26	13	17	11	28	19	21	21	21	9	28	28	9	32	28
4216	szarvasmarha	29	26	31	20	17	12	25	22	28	20	30	12	32	27	0	33	25
4217	szarvasmarha	28	27	0	18	18	12	27	28	24	22	29	11	31	26	14	32	30
4222	szarvasmarha	24	22	28	10	11	0	23	21	15	14	20	0	26	25	0	29	22
4223	szarvasmarha	28	23	28	11	13	9	25	20	15	13	18	0	29	27	0	31	26
4231	szarvasmarha	0	0	20	0	0	0	10	12	0	9	12	0	22	24	0	29	21
4243	sertés	30	29	34	15	19	8	8	10	18	14	24	0	33	32	0	32	22
4244	juh	21	21	25	12	11	9	26	22	16	16	18	0	30	26	0	32	25
4246	sertés	30	30	40	15	18	8	27	25	20	20	24	0	35	34	30	30	28
4251	szarvasmarha	23	20	29	11	11	0	12	14	13	13	14	0	23	27	0	23	19
4325	juh	27	28	32	14	17	12	27	22	21	19	20	0	22	33	10	32	30
4326	juh	25	23	29	16	14	10	26	23	17	17	23	0	28	29	0	31	23
4327	juh	26	27	31	18	19	13	33	21	20	16	26	0	32	32	0	30	29
4328	kecske	26	24	30	21	13	15	29	24	19	22	28	10	31	32	0	33	27
4329	juh	26	22	29	14	15	10	22	20	18	16	21	0	30	29	0	32	22
4330	kecske	29	30	31	17	18	12	26	23	23	17	20	0	30	32	0	31	27
4331	kecske	27	27	24	18	14	12	22	23	15	15	24	0	30	30	0	32	30
4332	kecske	26	24	29	16	15	9	28	22	18	16	18	9	30	30	0	30	23
Pm242	humán	18	18	21	12	10	9	20	19	10	9	11	0	18	22	0	21	19
Pm243	humán	20	19	21	11	9	9	20	19	11	9	10	0	21	20	0	19	19
Pm244	humán	25	23	23	16	12	9	28	29	14	12	18	10	29	30	0	25	27
Pm245	humán	19	18	21	12	10	8	21	20	12	10	14	0	25	23	0	25	22
Pm246	humán	21	20	22	11	10	9	22	22	10	10	14	0	22	22	0	24	21
Pm247	humán	21	19	22	14	10	10	24	25	14	12	13	0	22	26	0	24	21
Pm248	humán	22	17	21	12	10	10	24	20	12	10	14	0	23	23	0	26	20
Pm249	humán	15	17	21	11	10	10	20	19	10	10	11	0	23	23	0	25	23

**M2. táblázat (folytatás): A *P. multocida* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának miliméter pontosságban megadott eredményei**

Azonosító	Gazdafaj	PEN	AP	CFU	S	GM	APR	T	DXT	E	TIL	TUL	CD	C	FFC	SMX	ENF	NA
É		≥15	≥17	≥21	≥14	≥16	≥15	≥19	≥19	≥23	≥11	≥18	≥21	≥18	≥19	≥17	≥21	≥19
M			14-16	16-20	11-13	13-15	12-14	15-18	15-18	14-22		15-17	15-20	13-17	15-18	13-16	17-20	14-18
R		≥14	≥17	≥17	≥10	≥12	≥11	≥14	≥14	≥13	≥10	≥14	≥14	≥12	≥14	≥12	≥16	≥13
Pm250	humán	22	18	21	12	10	11	23	23	14	13	16	0	28	27	0	23	23
Pm251	humán	24	19	25	14	10	11	24	25	14	12	16	0	26	27	0	25	21
Pm252	humán	23	19	23	12	10	11	21	19	11	9	11	0	22	26	0	26	23
Pm254	humán	20	17	25	12	10	9	22	23	12	10	13	13	22	23	0	26	20

sárga háttér – csökkent érzékenység, zöld háttér – rezisztens.



**M3. táblázat:** A *P. multocida* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának gazdafajokra lebontott százalékos eredményei

		szm (n=81)	juh (n=15)	sertés (n=40)	humán (n=12)	kecske (n=5)	macska (n=5)
<b>Penicillin</b>	érzékeny	92,6	100	80	100	100	100
	mérsékelten érzékeny	0	0	0	0	0	0
	rezisztens	7,4	0	20	0	0	0
<b>Ampicillin</b>	érzékeny	90,1	100	87,5	100	100	100
	mérsékelten érzékeny	1,2	0	2,5	0	0	0
	rezisztens	8,6	0	10	0	0	0
<b>Ceftiofur</b>	érzékeny	88,9	100	75,0	100	100	100
	mérsékelten érzékeny	3,7	0	5,0	0	0	0
	rezisztens	7,4	0	20	0	0	0
<b>Sztreptomycin</b>	érzékeny	39,5	0	32,5	25,0	100	100
	mérsékelten érzékeny	38,3	26,7	32,5	75,0	0	0
	rezisztens	22,2	73,3	35,0	0	0	0
<b>Gentamicin</b>	érzékeny	12,3	33,3	47,5	0	40	0
	mérsékelten érzékeny	23,5	33,3	50	0	60	80
	rezisztens	64,2	33,3	2,5	100	0	20
<b>Apramicin</b>	érzékeny	3,7	0	0	0	20	0
	mérsékelten érzékeny	7,4	20	2,5	0	60	60
	rezisztens	88,9	80	97,5	100	20	40
<b>Tetraciklin</b>	érzékeny	85,2	93,3	80	100	100	100
	mérsékelten érzékeny	6,2	0	10	0	0	0
	rezisztens	8,6	6,7	10	0	0	0
<b>Doxiciklin</b>	érzékeny	85,2	93,3	65,0	100	100	100
	mérsékelten érzékeny	8,6	6,7	20	0	0	0
	rezisztens	6,2	0	15,0	0	0	0
<b>Eritromicin</b>	érzékeny	6,2	6,7	2,5	0	20	0
	mérsékelten érzékeny	63,0	86,7	90	33,3	80	100
	rezisztens	30,9	6,7	7,5	66,7	0	0
<b>Tilmikozin</b>	érzékeny	87,7	100	90	33,3	100	100
	mérsékelten érzékeny	0	0	0	0	0	0
	rezisztens	12,3	0	10	66,7	0	0

**M3. táblázat** (folytatás): A *P. multocida* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatának gazdafajokra lebontott százalékos eredményei

		<b>szm (n=81)</b>	<b>juh (n=15)</b>	<b>sertés (n=40)</b>	<b>humán (n=12)</b>	<b>kecske (n=5)</b>	<b>macska (n=5)</b>
<b>Tulatromicin</b>	érzékeny	72,8	93,3	95,0	33,3	100	100
	mérsékelten érzékeny	14,8	6,7	2,5	0	0	0
	rezisztens	12,3	0	2,5	66,7	0	0
<b>Klindamicin</b>	érzékeny	0	0	0	0	0	0
	mérsékelten érzékeny	1,2	0	0	16,7	0	20
	rezisztens	98,8	100	100	83,3	100	80
<b>Kloramfenikol</b>	érzékeny	91,4	93,3	95,0	100	100	100
	mérsékelten érzékeny	6,2	6,7	2,5	0	0	0
	rezisztens	2,5	0	2,5	0	0	0
<b>Florfenikol</b>	érzékeny	100	100	95,0	100	100	100
	mérsékelten érzékeny	0	0	2,5	0	0	0
	rezisztens	0	0	2,5	0	0	0
<b>Szulfonamidok</b>	érzékeny	0	0	7,5	0	0	0
	mérsékelten érzékeny	1,2	0	0	0	0	0
	rezisztens	98,8	100	92,5	100	100	100
<b>Enrofloxacin</b>	érzékeny	88,9	100	80	91,7	100	100
	mérsékelten érzékeny	7,4	0	17,5	8,3	0	0
	rezisztens	3,7	0	2,5	0	0	0
<b>Nalidixsav</b>	érzékeny	77,8	93,3	65,0	100	100	100
	mérsékelten érzékeny	6,2	6,7	12,5	0	0	0
	rezisztens	16,0	0	22,5	0	0	0

**M1. ábra:** Az *ompA* gén szekvenciák (a) és az általuk kódolt *ompA* proteinek (b) alapján készített filogenetikai fák.

