

**Állatorvostudományi Egyetem**

**Egzotikusállat- és Vadegészségügyi Tanszék**



**KEDVTELELSBŐL TARTOTT NYULAK FELSZŐ LÉGÚTI MIKROBIOMJÁNAK  
ELEMZÉSE, ILLETVE ANTIBIOTIKUM-ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATA**

**TDK DOLGOZAT**

**Készítette: Ambrus Dorottya**

**Témavezetők:**

**Dr. Papp Antal**

Állatorvostudományi Egyetem

Egzotikusállat- és Vadegészségügyi Tanszék

klinikus főállatorvos

**Dr. Pintér Krisztina**

HUN-REN, Állatorvostudományi kutatóintézet

Légzőszervi bakteriológia témacsoport

Tudományos segédmunkatárs, PhD hallgató

Budapest,

2024

## Tartalomjegyzék

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Rövidítések jegyzéke: .....                                                                          | 4  |
| 1. Célkitűzések .....                                                                                | 5  |
| 2. Irodalom áttekintés .....                                                                         | 6  |
| 2.1 A nyulak élettana és felső légúti anatómiája .....                                               | 6  |
| 2.2 Nyulak felső légúti megbetegedése .....                                                          | 7  |
| 2.3 Leggyakoribb felső légúti megbetegedést okozó baktériumok és antibiotikum<br>érzékenységek ..... | 9  |
| 2.3.1 <i>Pasteurella multocida</i> .....                                                             | 9  |
| 2.3.2 <i>Bordetella bronchiseptica</i> .....                                                         | 12 |
| 2.3.3 <i>Staphylococcus</i> .....                                                                    | 13 |
| 2.3.4 <i>Moraxella cuniculi</i> .....                                                                | 15 |
| 2.3.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                                                            | 16 |
| 2.4 A vizsgált antibiotikumok jellemzése .....                                                       | 17 |
| 2.4.1 Penicillin G és Amoxicillin-klavulánsav .....                                                  | 17 |
| 2.4.2 Gentamicin .....                                                                               | 18 |
| 2.4.3 Szulfametoxazol-trimetoprim (SXT) .....                                                        | 19 |
| 2.4.4 Enrofloxacin, Marbofloxacin és Pradofloxacin .....                                             | 19 |
| 2.4.5 Florfenikol és Klóramfenikol .....                                                             | 20 |
| 2.4.6 Tulatromicin .....                                                                             | 20 |
| 2.4.7 Doxiciklin .....                                                                               | 21 |
| 3. Anyag és Módszer .....                                                                            | 22 |
| 3.1 A minták eredete .....                                                                           | 22 |
| 3.2 A baktériumok izolálása .....                                                                    | 22 |
| 3.3 A baktériumok fajazonosítása .....                                                               | 22 |
| 3.3.1 <i>Moraxella cuniculi</i> fajazonosítás .....                                                  | 25 |
| 3.3.2 <i>Pasteurella multocida</i> fajazonosítás .....                                               | 25 |
| 3.3.3 <i>Bordetella bronchiseptica</i> fajazonosítás .....                                           | 25 |

|       |                                                                                                                          |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.4 | 16S rRNS szekvenciaanalízis.....                                                                                         | 25 |
| 3.3.5 | <i>Pasteurella</i> sp. MCCM 02539 fajazonosítás.....                                                                     | 25 |
| 3.4   | <i>Pasteurella multocida</i> törzsek jellemzése .....                                                                    | 26 |
| 3.4.1 | A <i>Pasteurella multocida</i> buroktípusának meghatározása .....                                                        | 26 |
| 3.4.2 | <i>Pasteurella multocida</i> LPS genotípus azonosítására szolgáló PCR.....                                               | 26 |
| 3.4.3 | <i>Pasteurella multocida</i> alfaj meghatározás .....                                                                    | 26 |
| 3.4.4 | <i>Pasteurella multocida</i> törzsek Heddlestone szerotípusának meghatározása agargél precipitációs (AGP) próbával ..... | 26 |
| 3.5   | Törzsek korongdiffúziós vizsgálata.....                                                                                  | 26 |
| 4.    | Eredmények.....                                                                                                          | 28 |
| 4.1   | Azonosított baktériumfajok gyakorisága .....                                                                             | 28 |
| 4.2   | Antibiotikum-rezisztencia vizsgálat .....                                                                                | 30 |
| 4.2.1 | A <i>Pasteurella</i> fajok és antibiotikum rezisztencia vizsgálatuk.....                                                 | 30 |
| 4.2.2 | <i>Staphylococcus</i> fajok és antibiotikum rezisztencia vizsgálatuk.....                                                | 31 |
| 4.2.3 | <i>Moraxella</i> fajok és antibiotikum rezisztencia vizsgálatuk .....                                                    | 32 |
| 4.2.4 | <i>Bordetella</i> fajok és antibiotikum rezisztencia vizsgálatuk .....                                                   | 33 |
| 4.2.5 | <i>Pseudomonas</i> fajok és antibiotikum rezisztencia vizsgálatuk .....                                                  | 33 |
| 5.    | Következtetések .....                                                                                                    | 35 |
| 5.1   | <i>Pasteurella</i> .....                                                                                                 | 35 |
| 5.2   | <i>Bordetella</i> .....                                                                                                  | 35 |
| 5.3   | <i>Staphylococcus</i> .....                                                                                              | 35 |
| 5.4   | <i>Moraxella</i> .....                                                                                                   | 36 |
| 5.5   | <i>Pseudomonas</i> .....                                                                                                 | 36 |
| 6.    | Összefoglalás.....                                                                                                       | 37 |
| 7.    | Irodalomjegyzék.....                                                                                                     | 39 |
| 8.    | Köszönetnyilvánítás .....                                                                                                | 43 |

**Rövidítések jegyzéke:**

**AGP:** agargél-precipitációs próba

**AUG:** augmentin, amoxicillin-klavulánsav

**B. bronchiseptica, BB:** *Bordetella bronchiseptica*

**C:** klóramfenikol

**CLSI:** Clinical & Laboratory Standards Institute

**DMSO:** dimetil-szulfoxid

**DOX:** doxiciklin

**EN:** enrofloxacin

**FFC:** florfenikol

**GN:** gentamicin

**LPS:** lipopoliszacharid

**MAR:** marbofloxacin

**M. catarrhalis:** *Moraxella catarrhalis*

**M. cuniculi:** *Moraxella cuniculi*

**MDR:** multi drug rezisztens

**MRSA:** meticillin rezisztens *Staphylococcus aureus*

**P. aeruginosa:** *Pseudomonas aeruginosa*

**PBP:** penicillinkötő-fehérje, Penicillin Binding Protein

**PCR:** polimeráz-láncreakció, polymerase chain reaction

**PG:** penicillin G

**P. multocida, Pm:** *Pasteurella multocida*

**PRA:** pradofloxacin

**S. aureus:** *Staphylococcus aureus*

**SXT:** szulfametoxazol-trimetoprim

**TUL:** tulatromicin

## 1. Célkitűzések

Kutatásunk elsődleges célja az, hogy azonosítsuk a magyarországi egészséges, illetve a felső légúti betegségben szenvedő nyulak légútjában található baktériumflóra tagjait. Különös figyelmet szentelve az utóbbi évtizedben újonnan leírt fajokkal jelentősen bővülő *Pasteurellaceae* család tagjaira, azon belül is főleg a *Pasteurella multocidára*.

A betegségben szenvedő, tüneteket mutató állatok mintáiból izolált baktériumtörzsek vizsgálatával szeretnénk feltérképezni, hogy mely törzsek okoznak felső légúti megbetegedést és milyen gyakorisággal. Emellett a tüneteket mutató állatok mintáiból izolált és azonosított baktériumtörzsek antibiotikum-érzékenységi profilját is szeretnénk meghatározni több antibiotikumosztály bevonásával. Az érzékenységi profil által azonosíthatóvá válnak az MDR törzsek is.

A panaszmentes állatok vizsgálatának a célja az egészséges nyulak felső légútjának mikrobiom-összetételének általános felmérése volt. A baktériumfajok könnyebb azonosítása érdekében új polimeráz-láncreakció (PCR, polymerase chain reaction) protokollokat tervezünk kidolgozni.

Összefoglalva, ezen vizsgálatoknak a célja az volt, hogy összehasonlítva a panaszmentes és tüneteket mutató egyedek mintáit megállapítsuk, hogy mely baktériumok okozzák leggyakrabban a nyulak felső légúti bakteriális megbetegedéseit. Valamint, hogy a megbetegedést okozó baktérium törzsek mely antibiotikumokra érzékenyek. Ezzel is segítve a célzott antibiotikum használatot.

## **2. Irodalom áttekintés**

### ***2.1 A nyulak élettana és felső légúti anatómiája***

A nyulak népszerűsége házi kedvencként folyamatosan nőtt az elmúlt évtizedekben, aminek köszönhetően jelentős javulás történt ellátásuk színvonalában. A kedvtelésből tartott nyulaknál az egyik leggyakrabban fellépő egészségügyi problémák közé a különböző légúti betegségek tartoznak. Ezek sikeres diagnosztikája és kezelése pontos anatómiai, valamint élettani ismereteket igényel. [1].

A nyulak egyedi élettani tulajdonságaiknál és természetes viselkedésükénél fogva speciális kezelési technikákat igényelnek. Mivel a nyulak zsákmányállatok eltérően a húsevő háziállatoktól, ennél fogva sokáig képesek nagyon hatékonyan leplezni betegségeik jeleit. Ennek eredetileg a ragadozók elleni védekezésben volt szerepe.[2].

A nyulak élettanilag az orrukon át veszik a levegőt, ennek háttérében a megnyúlt epiglottis áll, amely a légyszájpadlás caudális széle felé tér, elválasztva egymástól a szájüregét és a felső légúti traktust. Ez az anatómiai sajátosság teszi lehetővé, hogy a levegő akadálytalanul az orrlyukon és orrüregeken keresztül a rima glottisba jusson. Ennek az anatómiai helyzetnek viszont hátránya, hogy bármely elzáródás az orrüregben elkerülhetetlenül megnöveli a légzési frekvenciát és erőltetettebb légzéshez fog vezetni [1, 3].

A nyulak orrlyukai és az orr maga, nagy mennyiségű idegvégződéssel rendelkezik, emiatt kifejezetten érzékenyek az érintésre. A nyulak fejlett szaglásukat a vomeronasalis szervnek és a szagló érzékelő hámmal ellátott turbina csontoknak köszönhetik. Az orrüreget a porcos septum osztja fel jobb és bal oldalra. Az orrüreget a szájüregtől caudálisan a légyszájpadlás, cranialisan pedig a keményszájpadlás zárja el. A dorsalis és ventrális orrkagylók az orrüregbe nyúlnak az orr laterális faláról, ezeket tulajdonképpen nyálkahártyával borított porcos szövet alkotja [3]. A páros orrkagylók összetett fás szerkezetűek és ezek alkotják a dorsalis, ventrális, etmoidális, és középső meatusokat a környező orrcsontokkal. A paranasalis üregek közül az egyik a nagy, kétkamrás maxilláris recessus, amely dorsalis és ventrális részből áll és ezeket egy nagy nyílás köti össze. Továbbá a paranasalis sinusokhoz tartozik még a sphenoidális sinus és a páros dorsalis concha sinus. A dorsalis conchal sinus és a maxilláris sinus együtt alkotja a conchomaxilláris üregét, amely egy résszerű kapcsolaton keresztül az orrba nyílik. Ez a nyílás sebezhetővé teszi a sinusokat a kórokozókkal szemben. A könnycsatorna másnéven ductus nasolacrimalis egy csontos csatorna, amely a fossa orbitalisból ered és medialisan halad a maxillától és dorsomedialisan szájadzik be az orrüregbe. Az orrüreg a dobüregekkel is

közlekedik a nasopharyngealis meatuson és az Eustach-féle fülkürtön keresztül. Az ilyen anatómiai sajátosságok miatt egy orrüregi probléma okozhat fül vagy dobüreg problémát, valamint fogászati probléma is vezethet orrüregi problémához [1].

Nagyon sok tényező vezethet a felső légutak védelmének legyengüléséhez például, ha károsodik a nyálkahártya, akkor kevésbé lesz képes a szennyeződések és idegen anyagok kiürítésére az orrüregből, de mechanikai elzáródás vagy ostialis diszfunkció is nagyban hozzájárulhat a légúti betegségek és fertőzések kialakulásához [1].

## **2.2 Nyulak felső légúti megbetegedése**

A légúti megbetegedés a nyulak morbiditásának egyik legjelentősebb és leggyakoribb oka [3]. Felső légúti megbetegedések kialakulhatnak elsődlegesen és másodlagosan. Elsődleges megbetegedésről, akkor beszélhetünk, ha az elváltozás eleve a felső légutakban gyökerezik. Másodlagosnak akkor nevezzük, ha az eredeti megbetegedés máshol lokalizált és annak egyik következményeként érintetté válik a felső légút is. A bakteriális fertőzések okozhatják mindkét formát [1].

*Pasteurellosis* a bakteriális felső légúti megbetegedések elsődleges oka, de sok más patogén is szerepet játszhat a betegség kialakításában. Számításba kell venni virális és gombás megbetegedés lehetőségét is. Gombás megbetegedések lehetnek például: *zygomycosis*, *aspergillosis*, *penicillosis* és *pneumocystosis*. Virális megbetegedést okozhat például a *myxomatosis* és a *herpesvírus*. Ki kell zárni a nem fertőző eredetű elváltozásokat is, hiszen fogproblémák, neoplastikus elváltozások, idegen testek, de akár trauma is okozhat légúti tüneteket, amelyek hasonlatosak lehetnek a bakteriális fertőzés esetén tapasztaltakhoz. *Pasteurellán* kívül figyelembe kell venni sok más baktériumfajt is, melyek szintén gyakran állhatnak a fertőzések hátterében, mint például a *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas* fajok, *Staphylococcus* fajok, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma* fajok, valamint gyakran fordulnak elő kevert fertőzések is [1].

A lehetséges kórokok hosszú sora miatt elengedhetetlen a precíz diagnosztikai eljárás elvégzése a pontos diagnózis és a megfelelő kezelési terv felállításához. Azzal is számolni kell, hogy az egyes *Pasteurella* törzseknek különböző lehet a megbetegítésre való képessége. Valamint egyes baktériumtörzsek, köztük *Pasteurella* törzsek is, normál flóraalkotóként vannak jelen az orrüregében és nem okoznak klinikai tüneteket, elváltozásokat. Ennek ellenére a fakultatív patogének nagyobb stressz hatásra, immunszuppresszióra reagálva okozhatnak megbetegedést. Egyedi érzékenységet is megfigyeltek egyes nyulaknál *Pasteurella* törzsek jelenlétekor, egyes egyedek ellenállnak a fertőzésnek, míg más esetekben rhinitist, otitist, conjunctivitist, ductus nasolacrimalis fertőzést, sinusitist, tracheitist, pneumóniát, tályogokat,

akut megbetegedést és akár 24 órán belüli elhullást is okozhatnak. A fertőzés tovább is terjedhet a nasalis és paranasalis üregből a környező szövetekre, így eljuthat a fertőzés a ductus nasolacrimalisba, konjunktivához, Eustach-féle fülkürtbe, középfülbe, belső fülbe és akár az alsó légutakba is [1].

A fertőzés általában fertőzött nyúllal való kontaktussal képes terjedni, főleg légúti váladék segítségével. Terjedhet párház során, orálisan, kötőhártya váladék útján és egyes sérülések is jelenthetnek bemeneteli kaput a kórokozók számára. Amennyiben egy ember kontaktot létesít egy fertőzött nyúllal, akkor körültekintően kell eljárnia, mivel a bőrén és ruháján hordozhatja a fertőző ágenszt és segítheti annak terjedését. A rossz tartási körülmények, túl nagy egyedsűrűség, nem megfelelő higiénia, magas ammónia szint, rossz szellőzés és más konkurens fertőzések is segíthetik a légúti betegségek kialakulását, fennmaradását és rohamosan rosszabbodó prognózisát [1].

Az angolszász irodalomban gyakran a snuffels kifejezéssel utalnak röviden a felső légúti megbetegedésekre. Ez a kifejezés magába foglalja az erre a kórképre jellemző tünetegyüttest is. A legjellemzőbb tünetek, amelyek először szembetűnnek az orrfolyás, a tüsszögés és a kötőhártyagyulladás [4]. Az orr és/vagy szem váladékozása kezdetben vizes lehet, de ahogy a betegség progrediál úgy általában a váladék is egyre purulensebbé válik és színe fehér áttetszőből sárgába vált [1]. Mivel a nyulak természetes viselkedésének része a tisztálkodás, így a váladék gyakran nem csak az orr és/vagy szem közvetlen közelében található meg, hanem a mancsait és pofatájékát is beszennyezi vele, miközben magát próbálja tisztán tartani. Ahogy fentebb említettem a nyulak kizárólag az orrukon keresztül vesznek levegőt, így a felső légúti megbetegedések súlyos légúti tüneteket okozhatnak [1, 4]. Ennek jelei lehetnek a szorongás, dyspnoe, nyitott szájon át való légzés és cyanosis, valamint, ha a fertőzés áterjed a szemre és a nasolacrimális ductusra, akkor epiphora, conjunctivitis és dacryocystitis is kialakulhat. Amennyiben még tovább terjed a probléma, akkor eléri az Eustach-féle fülkürtöt, majd a közép és belső fület, ekkor felfigyelhetünk fejrázásra, vakarásra és akár öncsonkításra is. A belső fül érintettség neurológia tünetként manifesztálódhat, jellemző lehet a fejdaltartás, disorientáltság és a körbe-körbe járás [1]. A mellkasi hallgatózást minden légúti megbetegedésre utaló jelet mutató nyúlra el kell végezni, de fontos észben tartani, hogy a felső légúti részen fiziológiásan is lehet valamennyi légzési zörejt [4]. Kóros légzési hangok, légszomj és zihálás utalhat arra, hogy a fertőzés áterjedt az alsóbb légutakra is. Továbbá gyakran észlelhetünk fogyást, étvágytalanságot, anorexiát, letargiát és fáradékonyságot is, de ezek nem specifikus tünetek [1].

### **2.3 Leggyakoribb felső légúti megbetegedést okozó baktériumok és antibiotikum érzékenységük**

Az eddigi szakirodalom alapján a felső légutakban a *P. multocida* az elsődleges kórokozó, de sok más patogén is szerepet játszhat a már fentebb említett snuffels kialakításában [3, 5]. Például sok nyúl orrüregében a *B. bronchiseptica* és a *M. catarrhalis* együtt is megtalálhatók [3]. Korábbi kutatásokban gyakran állapították meg, hogy a snuffels háttérében elsősorban polibakteriális fertőzés állt. Egy 2006-os epidemiológiai kutatásban a leggyakrabban előforduló társfertőzés a *P. multocida* és a *B. bronchiseptica* volt (28.9%). Valamint a legtöbbet izolált baktériumtörzsek közé a *P. multocida* (54,8%), a *B. bronchiseptica* (52,2%), a *Pseudomonas spp.* (27,9%) és *Staphylococcus spp.* (17,4%) tartozott [6].

#### **2.3.1 *Pasteurella multocida***

A *P. multocida* az egyik leggyakoribb baktériumfaj, amely megtelepedhet a nyulak szájgaratüregében és a felső légutaiban. A *P. multocida* egy *Pasteurellaceae* családba tartozó, pleomorf, Gram-negatív, fakultatív aerob-anaerob, asporigén, fermentatív anyagcserével rendelkező, immobilis coccobacillus [7]. A *P. multocida* nem csak nyulakban, hanem más állatokban is felelőssé tehető különböző megbetegedésekért. Megbetegíthet szarvasmarhát, sertést, nyulat, kutyát, csirkét, vadon élő emlősöket, hüllőket és laboratóriumi állatokat [8, 9].

A *P. multocida* -ra jelentős genetikai és antigén variabilitás jellemző. Carter passzív hemagglutinációs módszerével a *P. multocida*-t burokantigénjei alapján különböző típusokba sorálták, ezt figyelembe véve a későbbiekben Rimler és Rhoades öt buroktípust (A, B, D, E és F) határozott meg [10, 11]. A baktériumfaj lipopoliszacharid (LPS) antigénjeit figyelembe véve gélprecipitáció próbával 16 szerotípust (1-16. szerotípus) különböztetnek meg [10]. Valamint az eddigi kutatások alapján 3 alfajtypust különítenek el [12].

A *P. multocida* különböző szerotípusai gazdaspecifikusak és különböző betegségeket, patológiás típusokat okozhatnak az egyes állatfajokban. Nyulakban *pasteurellosis* általában az A buroktípussal rendelkező törzsek váltanak ki, ám bár előfordulhat D és F buroktípussal rendelkező törzsek okozta megbetegedés is [8]. Azt is bebizonyították, hogy egyes buroktípusok patogénebbek lehetnek, mint társaik pl: egereken tesztelve a bakterémiában szenvedő nyúlból izolált, D buroktípusú törzs patogénebbnek bizonyult, mint egy rhinitisben szenvedő nyúlból izolált, A buroktípusú törzs. Valamint a 3-as szerotípus patogénebb, mint a 12-es [5].

A nyulakban összetett légúti megbetegedéseket okoz általában, de a fertőzött egyedek akár klinikai tünetek nélkül is hordozhatják a kórokozót. Gyakrabban jelentkeznek tünetek immunszuppresszió, stressz vagy kedvezőtlen környezeti feltételek jelenlétében. Viszont a *P.*

*multocida* patogenitását számos, a kapszulában jellemzően azonosított virulenciafaktor jelenléte is képes befolyásolni. Ezek lehetnek többek között fehérjék és LPS-k. A *P. multocida* patogenitását befolyásoló virulenciagének kódolhatnak fimbriákat, adhézíós és kolonizációs faktorokat (*ptfA*, *fimA*, *pfhA* és *tadD*), vas-szabályozó faktorokat és fehérjefelvételt (*exbB*, *exbD*, *tonB*, *hgbA*, *hgbB*, *tbpA* és *fur*), szuperoxid-diszmutázt (*sodA* és *sodC*), dermonekrotikus toxinokat (*toxA*), számos külső membrán fehérjéket (OMP) védőfaktorkat (*ompA*, *ompH*, *omp87*, és *plpB*), valamint neuraminidázt (*nanB* és *nanH*). Ez a fajta variabilitás felelős azért, hogy a *pasteurellosis* több klinikai formában is megnyilvánulhat és több különböző betegségért tehető felelőssé. Főként légúti betegségek képében tűnik fel, mely során főleg gennyes orrfolyással járó rhinitis tapasztalható. De ezen felül otitist, pyometrát, tőgygyulladást, orchitist, conjunctivitist, dacryocystitist, vetélést, szubkután tályogot és akut szeptikémiát is okozhat [7].

A nátha és a sinusitis a *pasteurellosis* leggyakoribb formái. A nyulaknál jellemző „snuffels” elnevezéssel illetett tünetegyüttest foglalja magába. Jellemzően a savós orrfolyás megelőzi a tipikus fehér vagy sárgás színű, nyálkás-gennyes váladékozást. A váladék általában az arc szőrzetéhez tapad, de mivel a nyulak mellső mancsukkal ápolják a pofájukat, ebből kifolyólag a végtagokon is látható elszíneződés. Az érintett nyulak gyakran hallható, hangos hörgést hallatnak és tüszögési rohamaik vannak, hiszen próbálják a nyálkás gennyes váladékot eltávolítani az orrjáratokból. Az orr- és könnycsatorna fertőzés tovább terjedve kötőhártyagyulladást okozhat. A váladék az arcüregeket is eldugíthatja, alopeciát és pyodermát okozhat. A légcső és mellkas auszkulációjánál légzési zörejeket okozhat a váladék. A fertőzés az Eustach-féle fülkürtön keresztül a középfülre is ráterjedhet. Előfordulhat, hogy az orrjáratokban megszűnik a fertőzés, de tünetmentesen akár a középfül is fertőzött maradhat. Ha a belsőfülre is ráterjed, akkor torticollis, nystagmus és ataxia is előfordulhat. Fertőzés a dobhártya megrepedése esetén a külső fülig terjed [5].

A rhinitis jelei enyhülhetnek vagy akár el is tűnhetnek, de az orrmelléküregekben és/vagy a középfülben fennmaradhat tünetmentes fertőzés. Egyes esetekben lehetséges az akut betegségből való felépülés és a fertőzés megszűnése, de a krónikus fertőzésből való spontán felépülés nem valószínű. Az orrnyálkahártya akut fertőzését ödéma és a nyálkahártya hiperémiája jellemzi, a krónikus fertőzést viszont a nyálkahártya eróziója és a turbinák sorvadása kíséri [5].

A patogénebb törzsek valószínűleg hematogén módon terjedve generalizálódhatnak és bakterémiát eredményezhetnek, ami lázzal és hirtelen halállal jár. A hematogén terjedés miatti pleuropneumonia a betegség másik lehetséges következménye. Krónikus fertőzés esetén tüdőgyulladás, mellhártyagyulladás, szívburokgyulladás, tályogok a tüdő vagy a szív

környékén, anorexia, fogyás, depresszió, fáradékonyság és terhelés során jelentkező légszomj is előfordulhat. Fontos kiemelni, hogy a nyulak gyakran minimálisan működő tüdővel is viszonylag normálisnak tűnnek. Ilyen krónikus esetben gyakran van jelen fibrinopurulens váladék a mellkasban [5].

A *P. multocida* által okozott tályogok jól eltokolódnak, sűrű fehér váladékot tartalmaznak, amely nem ürül ki, emiatt lassan, de folyamatosan nőnek. Előfordulhatnak retrobulbaris és subcutan szövetekben, valamint belső szervekben is. A mandibuláris tályogok és a csánk ízületi fertőzések gyakoriak. A genitális traktus fertőzése a nőtényeket és bakokat is érintheti. Nőtényeknél gyakran alakulhat ki pyometra. Alkalmanként a *P. multocida* által okozott sebfertőzések inkább cellulitist okoznak, mintsem tályogot. Ennek az a jelentősége, hogy az előbbi nehezebben kezelhető [5].

Egy 2022-es kutatás során a fertőzött nyulaknál elsősorban légúti tünetek jelentkeztek, főként súlyos nehézlégzés és savós orrfolyás formájában. A kísérlet végén a halálozási arány 60%-os volt [8]. Egy ezt megelőző vizsgálatban, ahol az F buroktípusú törzsek patogenitását vizsgálták, a 12 subcutan fertőzött nyúlból 11 súlyos tüneteket mutatott, majd elpusztult. Minden beteg nyúlban akut szeptikus szindróma alakult ki légzési elégtelenséggel és sokkal [13].

Egy 2019-es kínai kutatás során 205 mintát teszteltek 12 antibiotikummal, korong diffúziós módszerrel és az antimikrobiális érzékenységüket a Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) szabvány szerint állapították meg. A 12 vizsgált antibiotikum a penicillin, kanamicin, ceftriaxon, enrofloxacin, levofloxacin, cefminox, sztreptomycin, florfenikol, ceftizoxim, ciprofloxacin, gentamicin és azitromicin volt. Az antimikrobiális érzékenységi teszt eredményei azt mutatták, hogy a 205 *P. multocida* izolátum érzékeny vagy közepesen érzékeny a legtöbb antibiotikumra, azonban a sztreptomicinnel, gentamicinnel, kanamicinnel és ceftriaxonnal szemben rezisztenciát találtak. Viszont egyik minta sem volt 3, vagy annál több antibiotikummal szemben rezisztens [14].

Egy 2018-as egyiptomi kutatás során összesen 200 mintát vizsgáltak, ezek közül 53 db orrtampont, 72 tüdő, 32 máj, 30 szív és 13 lép szövetmintát gyűjtöttek be klinikailag beteg nyulaktól. A tenyészetek közül 16 bizonyult *P. multocida*-nak. A minták antibiotikum-érzékenységét 17 antibiotikummal szemben mérték fel. A baktériumtörzsek vizsgálata során nagy arányban tapasztaltak rezisztenciát doxiciklin, tetraciklin és kolisztin ellen (100%), valamint eritromicin, cefotaxim, klóramfenikol, ciprofloxacin, trimetoprim/szulfametoxazol ellen (93,8%), illetve apramicin, neomicin, amoxicillin/klavulánsav és amoxicillin (75%) ellen. Az összes vizsgált törzs multi drug rezisztensnek (MDR) bizonyult [15].

Egy 2018-as egyiptomi kutatás során 100 orrtampon mintából 10 esetben tudtak *P. multocida*-t kimutatni, a minták felsőlégtüti betegségben szenvedő nyulakból származtak. Az összes izolátum rezisztensnek bizonyult ampicillinnel, amoxicillinnel amoxicillin/klavulánsavval, neomicinnel és tetraciklinnel (100%) szemben. Kanamicinnel és sztreptomicinnel 9 minta (90%) eritromicinnel és doxiciklinnel szemben 8 minta (80%) mutatott rezisztenciát. Érdekes módon négy izolátum (40%) rezisztens volt az összes vizsgált antibiotikumokkal szemben. Az összes törzs MDR-nek bizonyult [16].

Egy 2012-es brazil kutatás során 140 nyulat vizsgáltak, melyek közül 29 lett pozitív *P. multocida*-ra. Ezekből az egyedekből végül összesen 46 baktériumtörzset sikerült izolálni, melyek antibiotikum-érzékenységét korongdiffúzióval a CLSI szabvány alapján jellemezték. A vizsgált antimikrobiális szerek közé tartozott a ceftiofur, penicillin, amoxicillin, florfenikol, norfloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin, tetraciklin, doxiciklin, szulfametazin, trimetoprim-szulfametoxazol és az eritromicin. A vizsgálat során megállapított antimikrobiális érzékenységi adatok azt mutatták, hogy a cefalosporinok, florfenikol, tetraciklinek és fluorokinolonok a leghatékonyabb gyógyszerek [17].

Egy 2006-os francia kutatásban 121 kedvtelésből tartott, 2 hónapnál idősebb légúti betegségben szenvedő nyulat vizsgáltak meg, ebből 63 nyúl volt *Pasteurella*-val fertőzött és 106 törzset izoláltak. Nyolc antibiotikumra terjedt ki a vizsgálat: marbofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin, gentamicin, oxitetra-ciklin, doxiciklin, cefalexin és trimetoprim-szulfametoxazol. A *P. multocida* törzsek esetében az összes antibiotikum nagyon aktívnek bizonyult: a három fluorokinolonra és a cefalexinre 100%-os érzékenységet mutattak, ezt követte a gentamicin (99,1%), mindkét tetraciklin (oxitetra-ciklin és doxiciklin) (97,2%) és a trimetoprim-szulfametoxazol (93,4%). A fluorokinolonok eloszlása bimodális volt, a többi antibiotikum esetében a gátlási zóna átmérők eloszlása unimodális volt [6].

### 2.3.2 *Bordetella bronchiseptica*

A *B. bronchiseptica* egy széles gazdaspektrumú Gram-negatív coccobacillus és igen mozgékony kórokozó. Számos emlősnél összefüggésbe hozható légúti betegséggel, kimutatták már kutyából, tengerimalacból, sertésből, nyulból és patkányból is. Maga a *B. bronchiseptica* fertőzés klinikailag a laboratóriumi állatok közül inkább tengerimalacokban és nyulakban jelentős, a természetes fertőzés patkányokban és egerekben csekély jelentőségű [4, 18]. A kutyákban összefüggésbe hozták a kennel köhögéssel, macskákban a tracheobronchitis-sel, a sertések atrófiás rhinitis-ével, a lovak tüdőgyulladásával, illetve a nyulak snuffels-ével [19].

A fertőzés prevalenciája a nyulkolóniákban magas (körülbelül 75%) és az életkorral növekszik [4]. A nyulak gyakran a *B. bronchiseptica* szubklinikai hordozói, csak stresszes vagy

immunszuppressziós időszakokban lesznek betegek és mutatnak klinikai tüneteket. A *B. bronchiseptica* gyakran a *P. multocida*-val együtt, mint társfertőzés jelenik meg, valamint ez a két baktérium a leggyakoribb oka a felső légúti megbetegedéseknek nyulakban [20]. Általában a fiatal 4-12. hetes korban lévő nyulaknál tekinthető potenciális kórokozónak, érdekes módon a *P. multocida* inkább a felnőtt egyedekben gyakoribb [4, 6]. Amennyiben a fertőzés felülkerekedik a szervezeten, akkor gennyes rhinitist, bronchopneumoniát és középfül- és középfülgyulladást okozhat, de ezek általában enyhébbek, mint a *P. multocida* fertőzés esetén kialakulók [21]. A klinikai tünetek között lehet a letargia, depresszió, étvágytalanság, tüszögés, orrfolyás, köhögés, nehézlégzés, nyitott szájjal való légzés, az arc dörzsölése és emiatt váladékkal borított mellső mancsok, illetve pofa, ferde fejtartás, fejremegés, torticollis, nystagmus és ataxia. A fertőzés leggyakrabban a légcsőt, a hörgőket, a tüdőt, az orrnyálkahártyát és az orrmelléküregeket érinti, viszont a középfülből ritkábban kimutatható [3, 22].

Egy 2006-os francia kutatásban 121 kedvtelésből tartott, légúti betegségben szenvedő, 2 hónaposnál idősebb nyulat vizsgáltak meg, ebből 60 nyúl volt *B. bronchiseptica*-val fertőzött és 99 törzset izoláltak. A *B. bronchiseptica* a legmagasabb érzékenységi szintet a gentamicinre (96,0%) mutatta, majd ezt követte a marbofloxacin és a doxiciklin (88,9%), az oxitettraciklin (86,9%) és a trimetoprim-szulfametoxazol (81,8%). Alacsonyabb szintű érzékenységet figyeltek meg az enrofloxacin (71,7%) és a danofloxacin (43,4%) esetében. A cefalexinnak nem volt valódi hatása (2,0%) ezekkel a törzsekkel szemben. A gátlási zóna eloszlása unimodális volt a gentamicinnél és bimodális a többi antibakteriális szer esetében [6].

Egy 2020-as kínai kutatásban 833 légúti betegségben szenvedő nyulat vizsgáltak meg postmortem, a mintákat 9 farmról gyűjtötték be és 4 nyúlfajtát vizsgáltak. Az antimikrobiális érzékenységi teszt eredményei azt mutatták, hogy az azonosított 219 *B. bronchiseptica* izolátum többsége érzékeny vagy közepesen érzékeny sztreptomycinre (100%), ciprofloxacinra (99,09%), gentamicinre (98,63%), ofloxacinra (96,80%), kanamicinre (96,34%) és norfloxacinra (21%). Viszont a cefiximmal (33,33%), ceftizoximmal (31,05%), ceftriaxonnal (11,87%) és ampicillinnel (3,20%) szemben rezisztenciát figyeltek meg [19].

### 2.3.3 *Staphylococcus*

A *Staphylococcus aureus* egy széleskörben előforduló, opportunist, Gram-pozitív coccus, amely embereket és állatokat érintő betegségekért is felelős. Különböző klinikai elváltozásokat okozhat, akut vagy szubakut lefolyással is járhat. A kifejezetten nagy alkalmazkodóképessége és sokoldalúsága miatt, valamint az állatokról emberre vagy fordítva történő terjedése végett kiemelten fontos lehet az állategészségügyben. Az elmúlt években

jelentősen megnőtt a multirezisztens *S. aureus* által okozott megbetegedések száma, ami komoly veszélyt jelent az állatok és emberek egészségére, valamint az élelmiszer-biztonságra, hiszen ez jelentősen korlátozza a rendelkezésre álló terápiás lehetőségeket [23].

A *S. aureus*-t és a *S. albus*-t gyakran izolálják egészséges és beteg nyulak orrából is. A *Staphylococcus* fajok fertőzése gyakran fokozza a már eleve sérült nyálkahártya gyulladását, vagyis gyakori másodlagos betolakodó a trauma vagy más hajlamosító ok által károsodott szövetekben. Általában gennyes gyulladást okoz. A patogenitás a gazdaszervezet érzékenységétől és a bakteriális virulenciától függ. A *S. aureus* képes olyan toxinokat termelni, amelyek elpusztítják a nyulak neutrofil granulocytáit. Továbbá képes olyan protein A-t is termelni, amely megköti az IgG Fc részét, így blokkolva a gazda baktericid mechanizmusait. A disszeminált *staphylococcosis* okozhat középfülgyulladást, fibrines tüdőgyulladást, illetve tályogok kialakulását tüdőben vagy szívben. A tályogok nagy hasonlóságot mutatnak a *P. multocida* által okozott tályogokkal [3]. A már fentebb említett eseteken kívül *S. aureus* izolálható fekélyes pododermatitisből, náthából, kötőhártyagyulladásból, dacryocystitisből, és bőrfertőzésekben is [24].

A nyúlállomány szintjén a *S. aureus* fertőzésnek két típusa különböztethető meg. Az egyik típust az alacsony virulenciájú törzsek okozzák, ilyenkor a betegség kevés egyedre korlátozódik, ennek a típusnak csak csekély gazdasági jelentősége van. A fertőzés másik típusát a nagy virulenciájú törzsek okozzák, ekkor járványos terjedés jellemzi a betegséget és krónikus problémákat okoz. A fertőzés rossz termelési eredményekhez, meddőséghez és halálhoz vezethet. A szopós fiatalok elpusztulhatnak az anya agalactiája következtében, hiszen gyakran mastitist is okozhat [25].

Az antibiotikum-rezisztencia gyakrabban fordul elő *S. aureus* esetén, mint *P. multocida* esetében. Különös figyelem fordul a meticillin rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) fertőzésekre, hiszen ezek komoly közegészségügyi aggályokat jelentenek. Általában tenyésztési és érzékenységi vizsgálatot végeznek a fertőzés megállapításához és a megfelelő antibiotikum terápia kiválasztásához. Előfordulhat, hogy a tályog elérhetetlen helyen van, ilyen helyzetekben a hemokultúra hasznos lehet, mint alternatív megoldás. Ha a tenyésztés nem lehetséges, akkor általában a választott antibiotikumok közé tartoznak a fluorokinolonok, klóramfenikol vagy trimetoprim-szulfametoxazol [3].

Egy 2004-es belgiumi kutatás során 56 *S. aureus*-t izoláltak 31 nyúlfarmról, ezek között volt krónikus *staphylococcosis* problémával küzdő és attól mentes farm is. Majd enrofloxacin, eritromicin, gentamicin, linkomicin, neomicin, penicillin- és dilucillintesttel szembeni rezisztenciára szűrtek. A penicillin esetében korongdiffúziós tesztet

is végeztek. A vizsgált törzsek 54%-a volt érzékeny mind a hét vizsgált antimikrobiális szerre. Az agarhígítási tesztben a legnagyobb rezisztencia a tetraciklinekkel (11 törzs), illetve a penicillinekkel (5 törzs) szemben jelentkezett. A penicillin korongdiffúziós tesztje során azonban az 56 törzs közül 12-nél találtak  $\beta$ -laktamázt. Minden törzs érzékeny volt a neomicinre és az enrofloxacinra. Négy törzs rezisztens volt eritromicinnel, valamint linkomicinnel szemben, további egy törzs pedig penicillinnel és gentamicinnel szemben is. A többi törzs vagy érzékeny volt az összes vizsgált antibiotikumra, vagy csak egy antimikrobiális szerrel szemben mutatott rezisztenciát. A vizsgált 19 nagy virulenciájú törzsből 9 volt rezisztens egy antimikrobiális szerrel szemben, viszont az alacsony virulenciájú 37 törzsből 9 volt rezisztens. A törzsek, amelyek egynél több antibiotikummal szemben mutattak rezisztenciát mind alacsony virulenciájúak voltak [26].

A már fentebb említett 2006-os francia kutatásban 121 kedvtelésből tartott, 2 hónapnál idősebb, légúti betegségben szenvedő nyulat vizsgáltak. Ezek közül 20 nyúl volt *Staphylococcus spp.*-vel fertőzött, 27 törzset izoláltak. A *S. aureus* törzsek esetében az összes vizsgált antibiotikum aktív volt: 96,3% a marbofloxacin esetében, ezt követte a trimetoprim-szulfametoxazol (92,6%), cefalexin (88,9%), gentamicin (85,2%), enrofloxacin (81,2%), danofloxacin (77,8%) és mindkettő tetraciklin (oxitetra-ciklin és doxiciklin) (74,1%). Unimodális eloszlást figyeltek meg a fluorokinolonoknál, gentamicinnél és a cefalexinnél, míg minden más antibiotikum esetében bimodális volt az eloszlás [6].

Egy 2018-as kínai kutatás keretében kilenc nyúlfarm elhullott nyulaiból 466 tüdőmintát, 93 tüdőgyulladás-mintát és 132 pododermatitisz mintát gyűjtöttek. A 691 elhullott nyúl mintájából összesen 281 *S. aureus* izolátumot azonosítottak. A tüdőmintából 93 törzset, tüdőgyulladásos mintából 78 törzset, pododermatitisz mintából 110 törzset izoláltak. Az antimikrobiális érzékenységi vizsgálat során penicillin, streptomycin, gentamycin, enrofloxacin, kanamycin, ciprofloxacin, cefminox, azithromycin, florfenicol, levofloxacin, ceftizoxim és ceftriaxon szereket alkalmazták. Az eredmény azt mutatta, hogy az összes izolátum érzékeny volt florfenikolra, ceftizoximra és ceftriaxonra. A penicillinnel, streptomiticinnel, kanamicinnel és azitromicinnel szembeni rezisztencia aránya magasabb volt, mint 10%. Tizenhat törzs volt rezisztens 3 antibiotikumokkal szemben, a legnagyobb rezisztencia arányt pedig a streptomycin, a kanamycin és az azithromycin alkalmazása során állapították meg. Az izolátumok bizonyítottan MRSA törzsek voltak [27].

#### 2.3.4 *Moraxella cuniculi*

A *Moraxella* nemzetség tagjai közé Gram-negatív baktériumok tartoznak, amelyek opportunistá fertőzést okozhatnak emberekben és állatokban. Morfológiailag a *Moraxella* fajok

rövid pálcikák vagy coccoidok, de előfordulhatnak diplococcusok is, mint például a *M. catarrhalis* esetében. A *M. catarrhalis* a nyulak orrflórájának gyakori alkotója. A *B. bronchiseptica*-hoz hasonlóan néha rhinitisben vagy kötőhártya-gyulladásban szenvedő nyulakból mutatják ki. Ha tiszta tenyészetben izolálják, akkor szerepet játszhat a betegségben, mint opportunist baktérium, amely a már sérült nyálkahártyát fertőzi meg. Amennyiben nincs jelen klinikai betegség, akkor antibiotikum-terápia nem indokolt a *M. catarrhalis* kiirtására [28]. A *M. cuniculi* régebbi felmérések eredményeiből ítélve egyértelműen a felső légutak fiziológiás bakteriális flórájának a része és gyakran megtalálható nyulak orrüregében is [29].

#### 2.3.5 *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa* egy aerob, Gram-negatív, mozgékony, opportunist patogén baktérium, ami számos gerinces faj szájgaratüregében, orrgaratüregében, bőrén és az alsó emésztőszervrendszerében megtalálható, akár egészséges nyulakban is előfordulhat. Gyakran megtalálható nedves, meleg helyeken, izolálható talajból és vízből. A fertőzés terjedhet takarmánnyal, szennyezett vízzel, alommal, valamint fertőzött rágcsálókkal és emberekkel való érintkezés útján [30]. Mivel képes biofilmet képezni, így gyakran perzisztál kórházakban, komoly problémát jelenthet emberben és állatban egyaránt. Gyakran hozzák összefüggésbe kutyákban pyodermával, húgyúti gyulladással, valamint külső- és középfül-gyulladással. Okozhat még vérzéses tüdőgyulladást nyérceknél, sporadikusan szarvasmarhában tüdőgyulladást, csirkékben vérzéses tüdőgyulladást. A fertőzés számos különféle szervrendszerben megjelenhet nyulakban, okozhat húgyúti, légzőszervi, gyomor-bél traktus, bőr és szemfertőzést is, de leggyakrabban bőrbetegségeknél jelenik meg [31].

Köztudott, hogy a *P. aeruginosa* számos antibiotikummal szemben természetes rezisztenciával rendelkezik. Rezisztenciát tapasztaltak már például a benzilpenicillinekkal, aminobenzilpenicillinekkal, karboxipenicillinekkal, klóramfenikollal, tetraciklinek, első és második generációs cefalosporinokkal szemben is. Ennek háttérében a számos gyógyszer efflux rendszer és a porinok állnak. A fertőzés szisztémás kezelésére gyakran használnak harmadik és negyedik generációs *Pseudomonas* ellen is hatásos penicillineket, karbapenemeket, cefalosporinokat, fluorokinolonokat és aminoglikozidokat. Viszont a klinikai gyakorlatban sokszor ezek ellen is tapasztalható rezisztencia. A széleskörű és igen változatos rezisztenciaprofil miatt az empirikus antibiotikum használat igen csak kerülendő, így az antimikrobiális érzékenységi vizsgálat a legmegfelelőbb módszer a terápiás szer kiválasztására [32].

A már fentebb említett 2006-os francia kutatásban 121 kedvtelésből tartott, 2 hónaposnál idősebb, légúti betegségben szenvedő nyulat vizsgáltak. *P. aeruginosa*-val 32 nyúl volt

fertőzött, melyből összesen 41 törzset izoláltak. A legnagyobb érzékenységet a vizsgált 8 antibiotikum közül a marbofloxacinra mutatta 87,8%-kal. A gentamicinre 75,6%, a danofloxacinra 65,9%, az oxitetraciklinre 63,4%, az enrofloxacinra 58,5%, a doxiciklinre 56,1%, a szulfametoxazol-trimethoprimre 24,4% és a cefalexinre 2,4% volt az érzékenység. A gátlási zóna átmérők eloszlása bimodális volt [6].

Egy 2010-es szlovák kutatás során 16 különböző farmról származó 546 nyúltól vettek bélsár mintákat és 46 mintából sikerült *Pseudomonas*-t kimutatni. Ezeknek a mintáknak az antibiotikum-érzékenységét vizsgálták klindamicinnel, eritromicinnel, karbenicillinnel, azlocillin piperacillinnel, tikarcillin-klavulánsaval és tetraciklinnel. Minden törzs 100%-os rezisztenciát mutatott klóramfenikollal, klindamicinnel, eritromicinnel, azlocilinnal, és karbenicillinnel szemben. Bár nem 100%-os, de igen magas rezisztenciát figyeltek meg a tikarcillin-klavulánsaval szemben 95%-al, ezt követte a tetraciklin 89%-al és a piperacillin 84%-al [31].

## **2.4 A vizsgált antibiotikumok jellemzése**

### **2.4.1 Penicillin G és Amoxicillin-klavulánsav**

Mind a két antibiotikum a  $\beta$ -laktám antibiotikumhoz, azon belül pedig a penicillinek közé tartozik. A hatásmechanizmusuk a baktériumok sejtfal szintézisének gátlásán alapul, mivel képesek meggátolni az N-acetil-muraminsavból és az N-acetil-glükózaminból álló peptidoglikánváz képzését. Az N-acetil-muraminsav és N-acetil-glükózamin láncokat oligopeptid keresztkötések tartják össze, amiket a transzpeptidáz és a karboxipeptidáz enzimek szintetizálnak. Ezeknek az enzimeknek a kompetitív gátlása a baktériumok líziséhez vezet. A transzpeptidázok és a karboxipeptidázok a penicillinek kötőhelyeként is szolgálnak, ezért nevezték el őket penicillinkötő-fehérjének (Penicillin Binding Protein, PBP). Az ide tartozó antibiotikumok időfüggő baktericidek, csak az éppen szaporodó baktériumokat képesek elpusztítani, hiszen az osztódásuk során zajlik a sejtfalszintézis. A Gram-pozitív baktériumok esetében a sejtfal nagy részét alkotó peptidoglikánvázon keresztül viszonylag könnyen át tud jutni az antibiotikum és a PBP-hez kötődik, ezzel gátolva a sejtfalszintézist. A Gram-negatív baktériumoknál viszont egy LPS réteg veszi körül a sejtfalat, amiben porin-fehérjékből álló hidrofíl csatornák találhatóak, melyeken keresztül képes a baktériumba bejutni és a PBP-hez kapcsolódni. A porin csatornák mennyisége egyes baktériumoknál eltérő lehet, így érzékenységük is változó. A penicillinek a *Staphylococcusok* ellen posztantibiotikus hatással is rendelkeznek. A penicillinekkel szemben számos módon és igen gyakran jöhet létre rezisztencia. A baktériumok nagy része már *ab ovo* rezisztens, mint például az intracelluláris, vagy a sejtfallal nem rendelkező baktériumok, valamint olyan baktériumok, melyek LPS rétege

porin-fehérjékben szegény. A szerzett rezisztencia egyik oka lehet a PBP-ket képző gének mutációja, amely miatt az antibiotikum nem tud kötődni. Viszont a leggyakoribb ok az egyes baktériumok  $\beta$ -laktamáz termelése, mely képes elhasítani az antibakteriális hatásért felelős  $\beta$ -laktámvázat [33–35].

A szűk spektrumú penicillinek közé soroljuk a benzilpenicillint, más néven penicillin G sóit és észtereit. Az ide tartozó antibiotikumok kifejezetten hatásosak a Gram-pozitív baktériumok ellen, kivételt képeznek a penicillináz termelő *Staphylococcusok*. A Gram-negatívok ellen csak gyengén-mérsékelt hatékonyak, viszont egész jól alkalmazhatóak a tápigényes Gram-negatív baktériumok esetében, mint például a *Pasteurella*. *Ab ovo* rezisztensek a *P. aeruginosa*, *Mycoplasma*k, *Enterobacteriaceae* család tagjai, *Mycobakteriumok*, *Rickettsiák*, *Chlamydoophilák* és minden baktérium, ami  $\beta$ -laktámáz tud termelni [33–35].

Az amoxicillin a szélesített spektrumú penicillin származékok egyik félszintetikus tagja. A  $\beta$ -laktám gyűrűhöz kapcsolódik egy tiazolidin gyűrű és egy amino-hidroxi-fenil csoport. Az antibakteriális spektrumát ez az oldallánc határozza meg. Hatásos a Gram-pozitív és a Gram-negatív baktériumok ellen is, viszont nem rendelkezik se penicillináz stabilitással sem pedig egyéb laktamáz stabilitással. A Gram-pozitív korokozók ellen hatékonyságuk gyengébb, mint a szűk spektrumú penicillineknek. A szélesített spektrumú penicillinek hasonlóan hatékonyak a Gram-pozitív baktériumok ellen, mint a benzilpenicillinek, de hatásosabbak a Gram-negatívok ellen. A  $\beta$ -laktamáz termelés okozta rezisztencia problémájának a megoldásában nagy előre lépés volt a klavulánsav felfedezése, amelynek hála az amoxicillin-klavulánsav használata képes volt kivédeni a  $\beta$ -laktamáz-érzékenységet. Viszont ez nem oldotta meg a PBP-t képző gének mutációjának problémáját. Az amoxicillinre és annak klavulánsavval való kombinációjára is rezisztens a *P. aeruginosa*, *Chlamydoophilák*, *Rickettsiák*, *Mycoplasma*k, *Mycobakteriumok* és az MRSA [33–35].

#### 2.4.2 Gentamicin

A koncentráció függő baktericid hatású aminoglikozidok közül az egyik leggyakrabban alkalmazott a gentamicin. Bázikus hidrofil, poláros vegyület, amely számos aminocsoporttal rendelkezik. A hatásmechanizmusa a fehérjeszintézis gátlásán alapul a baktériumok 30S riboszómális alegységén. Bár a translációt nem gátolja, de misztranszlációt okoz, ezért hibás aminosavak épülnek be a bakteriális fehérjékbe, így a sejtmembránba is, ezzel növelve annak permeabilitását. A hidrofilitás miatt a baktérium aktív transzporttal csatornán keresztül veszi fel az antibiotikumot. Továbbá irreverzibilisen kapcsolódnak a bakteriális RNS-hez, ezzel strukturálisan károsítva azt. Kizárólag aerob környezetben hatékony, hiszen a sejtbe való

bejutáshoz és a baktericid hatásának kifejtéséhez oxigénre van szüksége. Ennél fogva csak az aerob baktériumok lehetnek érzékenyek rájuk, míg az anaerob baktériumok *ab ovo* rezisztensek az aminoglikozidokkal szemben. Elsősorban Gram-negatív aerob baktériumok és *Staphylococcus* ellen használják. Fontos megemlíteni a plazmid közvetítette rezisztenciát, aminek köszönhetően egyes enzimek képesek úgy módosítani az amino- és hidroxil-csoportokat az aminoglikozidokon, hogy nem lesznek képesek csatlakozni a 30S riboszóma alegységhez. Előfordulhat még a sejtfal permeabilitásának a csökkenése is [33–35].

#### 2.4.3 Szulfametoxazol-trimetoprim (SXT)

A szulfonamidok és a diamino-pirimidinek kombinációját potencírozott szulfonamidoknak nevezzük. A kombináció előnye, hogy nagyban megnő az antimikrobiális hatás, hiszen együtt alkalmazva őket az eredeti bakteriosztatikus hatás már baktericidé és protozoociddé alakul, így sokkal szélesebbé válik az antimikrobiális spektrum. Továbbá nő a hatékonysága a *Pasteurellával* szemben. Hatékonyak a Gram-pozitív és Gram-negatív aerobok ellen, az anaerobok ellen pedig in vitro hatékonyak, de in vivo nem mindig azok, mert a necrotikus szövetekben nagy mennyiségű timidin és para-amino-benzoészav található. Továbbá *ab ovo* rezisztensek a *Mycoplasma*k és a *P. aeruginosa*. Ennek a csoportnak a tagja az SXT, ami képes a folsav szintézisét gátolni és ezzel a DNS szintézisében zavart kelteni. A szulfametoxazol gátolja a dihidropteorát-szintetázt, a timetoprim pedig a dihidrofolát-reduktázt, így kettős gátlás jön létre. A rezisztencia igen gyakori mindkét antibiotikumra, amennyiben önmagukban vannak alkalmazva, kombinációban viszont viszonylag ritkán figyelhető meg [33–35].

#### 2.4.4 Enrofloxacin, Marbofloxacin és Pradofloxacin

A fluorokinolonok koncentráció függő baktericid hatásúak. A hatásmechanizmus a DNS-topoizomeráz II és IV gátlásán alapul, amellyel meggátolja a DNS szintézisét, melynek következtében a baktériumok elpusztulnak. Az enrofloxacin és a marbofloxacin is a 2.2 generációs fluorokinolonok közé tartoznak. Kifejezetten érzékenyek rájuk a Gram-negatív aerob baktériumok, mint például a *B. bronchiseptica*, *Mycoplasma*k, *P. aureginosa* illetve a tápigényes légúti baktériumok, így a *Pasteurellaceae* család is. A Gram-pozitív fajok közül is néhány mérsékelten érzékeny rájuk, például a *Staphylococcus*ok. Az intracelluláris baktériumok ellen jó hatékonysággal bírnak [33–35].

A pradofloxacin a fluorokinolonok 4. generációjába tartozik. A 2. generációhoz képest a Gram-pozitívak ellen kifejezetten hatékonyabbak és a *Streptococcus*ok nagy része is érzékeny velük szembe. A Gram-negatívok ellen hasonlóan hatékonyak, mint a 2. generáció tagjai, de

akár kissé mérsékeltebb is lehet a hatásuk. Valamint a 4. generáció az anaerob baktériumok és az intracelluláris kórokozók ellen is kifejezetten hatékony [33–35].

A fluorokinolonokkal szemben rezisztenciát elsősorban a *gyrA* és a *parC* gének mutációja okozza, ennél fogva megváltozik a bakteriális topoizomeráz kötőhelye, így az antibiotikum nem lesz képes bekötni. Ritkábban, de okozhat még rezisztenciát az efflux pumpák aktivitásának növekedése és a membránfehérje módosulás miatti kisebb penetráció, valamint a plazmid által is közvetített rezisztencia is előfordulhat. A 4. generációs hatóanyagoknál a rezisztencia kialakulásának esélye jóval kisebb, mint a korábbi generációknál [33–35].

#### 2.4.5 Florfenikol és Klóramfenikol

A florfenikol és a klóramfenikol a fenikolok csoportjába tartozó bakteriosztatikus antibiotikumok. Bár a klóramfenikol nagy koncentráció esetén lehet baktericid hatású egyes kórokozókkal szemben. Az ebbe a csoportba tartozó antibiotikumok képesek az 50S riboszómális alegységhez kapcsolódni és gátolni az elongációt. A peptidil-transzferáz aktivitását is csökkentik, valamint az aminoacil-tRNS-t nem engedik kapcsolódni a peptidil-transzferáz enzimen lévő aktív kötőhelyéhez. Bár a fehérjeszintézis gátlása egy hatékony módszer, fontos megjegyezni, hogy mivel az emlős sejtek mitokondriumaiban azonos hatást fejtenek ki, így csak részben szelektívek. A Gram-negatív és a Gram-pozitív, aerob és anaerob baktériumok is érzékenyek rájuk. Viszont *ab ovo* rezisztens a *P. aeruginosa* és a *Brachyspira hyodysenteria*. A *Mycoplasmák* ellen *in vitro* hatékonyak, de *in vivo* nem mindig hatásosak, így ők mérsékelten érzékenyek. Általánosságban a florfenikol kissé hatékonyabbnak bizonyult, mint a klóramfenikol. Az enzimatis bontás okozta rezisztenciát plazmidok terjesztik, előfordulhat még a permeabilitás csökkenése, ami lehet plazmidon vagy kromoszómán kódolt is [33–35].

#### 2.4.6 Tulatromicin

A tulatromicin a makrolidok közé tartozó félszintetikus triamilid, mely a baktériumok 50S riboszómális alegységéhez reverzibilisen kötve fejt ki fehérjeszintézis gátló bakteriosztatikus hatását. A hatóanyagot kizárólag állatorvosi célra fejlesztették ki főleg sertés és kérődzők légzőszervi megbetegedése ellen használják. Az antibakteriális spektruma kismértékben eltér a többi makrolidétól, mivel a Gram-pozitívokkal szembeni hatása csökkent a társaihoz képest, viszont a Gram-negatív tápigényes baktériumok, *B. bronchiseptica* és *Mycoplasmák* elleni hatékonysága kifejezett. A légúti megbetegedések kezelésében nagy jelentőségű, gyakran alkalmazzák *Pasteurellosis* kezelésére is. A makrolidokkal szemben ritkán jelentkezik rezisztencia, de előfordulhat plazmidokon kódolt vagy kromoszómális mutáció

során létrejött rezisztencia is. A baktériumokban a hatóanyag koncentrációját csökkenthetik a baktériumok által termelt gyógyszert hidrolizáló enzimek vagy a fokozódó efflux mechanizmus, valamint a riboszómális kötőhely megváltozása is [33–35].

#### 2.4.7 Doxiciklin

A doxiciklin a hosszú hatástartamú bakteriosztatikus tetraciklinekhez tartozik. A bakteriális riboszóma 30S alegységhez kötődve fejezi ki fehérjeszintézisgátló hatását. Szelektív toxicitással rendelkezik, hiszen az eukarióták riboszómáihoz jelentősen kisebb affinitással kötődik, így a kezelés alatt álló egyedekben nem gátolja a fehérjeszintézist. Jellegzetesen halványsárga színű és négy darab benzolgyűrűből áll. Széles antibakteriális spektrummal rendelkezik, hatásos a Gram-pozitív anaerob és aerob, valamint Gram-negatív tápigényes, aerob és anaerob baktériumok ellen is. Továbbá kifejezetten érzékenyek rá a *Mycoplasmák* és a *Chlamyophilák*, valamint egyes protozoák ellen is hatékony. Klinikailag hatékonyabb, mint a tetraciklin vagy az oxitetra-ciklin, és a rezisztencia is kevésbé elterjedt vele szemben. Ezt a lipofilitásának köszönheti, aminek segítségével jobban penetrál a baktériumokba. Ennél fogva a *Staphylococcus* ellen is jóval hatékonyabb, mint társai. Viszont ettől függetlenül még kialakulhat rezisztencia például a riboszómális kötőhely megváltozása révén, de a leggyakoribb ok a baktérium megnövekedett aktivitású multidrog efflux-pumpái. A baktériumok egymásnak a rezisztenciát plazmidokkal vagy transzpozonokkal adják át [33–35].

### **3. Anyag és Módszer**

#### **3.1 A minták eredete**

A kutatás során 73 db nyúlból történt mintavétel, melyből 88 darab baktériumtörzset izoláltunk 2023 februárjától 2024 júliusáig. A minták egy része az Állatorvostudományi Egyetem Egzotikusállat- és Vadegészségügyi Tanszékéről származtak, de érkeztek be minták a Talpas kisállatrendelőből is. A kutatás részét képezte továbbá a saját házi nyulaimnak a vizsgálata is, mely lehetővé tette az egy populációból származó nagyobb számú minta vizsgálatát is.

Tekintettel arra, hogy a *Pasteurellaceae* család tagjai nagyon gyenge ellenállóképességgel rendelkeznek a mintákat transport medium-os tamponnal (Sarstedt AG&Co KG, Germany) vettük le a nyulak orrából, hogy megakadályozzuk a minták kiszáradását. A tampon minták legfeljebb egy héten belül feldolgozásra kerültek.

#### **3.2 A baktériumok izolálása**

A beérkezett új tamponok kaptak egy azonosító számot, ezután kioltottuk sima véres agar táptalajra (Columbia agar, VWR), valamint antibiotikumokkal kiegészített (Cephalexin, Linkomicin (2-2 mg/l), Amphotericin B, Vancomycin (4-4 mg/l)) MacConkey táptalajra (Oxoid) is. A csészéket szintén az azonosító számmal és dátummal jelöltük. Ezután a tenyészeteket 37°C-os termosztátba helyeztük 24-48 órára. Amíg az inkubációs idő tartott, addig a kísérő adatokat dokumentáltuk a későbbi analízishoz. A baktériumtenyészeteket 24 és 48 óra elteltével is megvizsgáltuk, különös figyelmet fordítva a telepmorfológiára. Vizsgáltuk a telepméretet, a teleptípust, a telepek színét, szagát, a burokra és/vagy hemolízisre utaló jeleket. Ezek alapján megállapítottuk, hogy körülbelül hányféle baktériumtörzs van egy adott tenyészetben, valamint, hogy melyik közülük a domináns. A domináló törzsekből szintenyészetet hoztunk létre.

#### **3.3 A baktériumok fajazonosítása**

A tenyésztés után a fajazonosításhoz PCR vizsgálatot végeztünk. Az ismeretlen baktériumtenyészetből először templátot készítettünk. A vizsgált törzs szintenyészetéből egy kicsinyi baktériumot 50 µl PCR vízben (VWR) szuszpendáltunk és vortexeltünk. Ezután 20 percig 99 °C-on PCR gépben (Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler, Hercules, CA, USA) forraltuk a mintát. A forralás során keletkezett sejttörmelék és a DNS elkülönítése céljából a baktériumszuspenziót 12500 rpm-en 5 percig centrifugáltuk. A PCR reakciók során az így nyert felülúszó szolgálta templát DNS-ként.

Ezután összekészítettük a Master mixet, melyhez molekuláris tisztaságú vizet, PCR puffert, MgCl<sub>2</sub>-t, dNTP-t, forward és reverz primereket, DreamTaq- polimeráz enzimet, egyes esetekben dimetil-szulfoxidot (DMSO) adtunk. Az egyes vizsgálatok reakcióelegyének összetételét, valamint az alkalmazott primerek nevét és szekvenciáját az **1.**, illetve az **3. táblázat** szemlélteti. Ezután hozzáadtuk a Master mixhez a Templát DNS-t és vortexeltük. A minta PCR gépbe került, itt kiválasztottuk az adott PCR-nek megfelelő hőprofil (2. táblázat).

1. táblázat: A táblázat a PCR vizsgálatok során alkalmazott primerek neveit, illetve szekvenciáit tünteti fel a megfelelőhivatkozással ellátva.

| Primer neve           | Szekvencia 5'-3'             | Hivatkozás     |
|-----------------------|------------------------------|----------------|
| toxA-6                | GCTCAAATCCTAAATCACCTTGT      | [36]           |
| toxA-7                | ACTACAGATTCTAACAAGGTTCTGG    | [35]           |
| KMT1T7                | ATCCGCTATTIACCCAGTGG         | [37]           |
| KMT1SP6               | GCTGTAAACGAACGCGCCAC         | [36]           |
| GauA fwd              | AATGTTTGCGATAGTCCGTTAGA      | [38]           |
| GauA rev              | ATTTGGCGCCATATCACAGTC        | [38]           |
| GatD fwd              | TTGGTGGTATGTGCACCGTT         | [39]           |
| GatD rev              | TTAGCACGTGGACCAGCAAT         | [39]           |
| S152 fwd              | GCGTAATCTCTGAGGAGTAAAGGG     | [39]           |
| S991 rev              | CATCTCTGCAAGCTTCTCTGG        | [39]           |
| CapA fwd              | TGCCAAAATCGCAGTCAG           | [40]           |
| CapA rev              | TTGCCATCATGTTCAGTG           | [40]           |
| CapB fwd              | CATTTATCCAAGCTCCACC          | [40]           |
| CapB rev              | GCCCGAGAGTTTCAATCC           | [40]           |
| CapD fwd              | TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC     | [40]           |
| CapD rev              | CATCTACCCACTCAACCATATCAG     | [40]           |
| CapE fwd              | TCCGCAGAAAATTATTGACTC        | [40]           |
| CapE rev              | GCTTGCTGCTTGATTTTGTC         | [40]           |
| CapF fwd              | AATCGGAGAACGCAGAAATCAG'      | [40]           |
| CapF rev              | TTCCGCCGTCAATTACTCTG         | [40]           |
| L1 fwd                | ACATTCCAGATAATACACCCG        | [41]           |
| L1 rev                | ATTGGAGCACCTAGTAACCC         | [41]           |
| L3 fwd                | TGCAGGCGAGAGTTGATAAACCATC    | [41]           |
| L3 rev                | CAAAGATTGGTTCCAAATCTGAATGGA  | [41]           |
| L6 fwd                | TCTTTATAATTATACTCTCCCAAGG    | [41]           |
| L6 rev                | AATGAAGGTTTAAAAGAGATAGCTGGAG | [41]           |
| 27(8) F               | AGAGTTTGATCITGGCTCAG         | [42]           |
| 1512 R                | ACGGITACCTTGTTACGACTT        | [42]           |
| Mcuniculi<br>SodA fwd | ACGCTCGCCATCATCAAGC          | Jelen dolgozat |
| Mcuniculi<br>SodA rev | GTCCCAGTTTACCACCGACC         | Jelen dolgozat |
| Pastsp F1             | TGAGTAATGCTTGGGAATCTGT       | Jelen dolgozat |
| Pastsp F2             | TGAGTAATGCTTGGGAATCCGT       | Jelen dolgozat |
| Pastsp R              | GGCTAACGTCAATTCGCTGT         | Jelen dolgozat |
| BB fwd                | AGGCTCCCAAGAGAGAAAGGCTT      | [43]           |
| BB rev                | TGGCGCCTGCCCTATC             | [43]           |

2. táblázat: A PCR próbák során alkalmazott reakció körülmények

| PCR                                         | Kezdeti denatúráció | Denatúráció    | Anneláció      | Extenzió       | Végző extenzió | Ciklus-szám |
|---------------------------------------------|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------|
| <i>Pasteurella</i> fajspecifikus            | 95°C<br>5 min       | 95°C<br>1 min  | 55°C<br>1 min  | 72°C<br>1 min  | 72°C<br>10 min | 35          |
| Buroktípus                                  | 95°C<br>5 min       | 95°C<br>30 sec | 55°C<br>30 sec | 72°C<br>1 min  | 72°C<br>10 min | 30          |
| LPS                                         | 95°C<br>5 min       | 95°C<br>30 sec | 53°C<br>45 sec | 72°C<br>1 min  | 72°C<br>10 min | 30          |
| Alfaj                                       | 95°C<br>10 min      | 95°C<br>30 sec | 58°C<br>30 sec | 72°C<br>1 min  | 72°C<br>7 min  | 25          |
| 16S rRNS                                    | 94°C<br>10 min      | 94°C<br>30 sec | 55°C<br>45 sec | 72°C<br>90 sec | 72°C<br>7 min  | 30          |
| <i>M. cuniculi</i> fajazonosító             | 94°C<br>4 min       | 94°C<br>30 sec | 62°C<br>30 sec | 72°C<br>40 sec | 72°C<br>4 min  | 30          |
| <i>Pasteurella sp. MCCM 02539</i> azonosító | 94°C<br>5 min       | 94°C<br>10 sec | 59°C<br>20 sec | 72°C<br>30 sec | 72°C<br>1 min  | 30          |
| <i>B. bronchiseptica</i> fajazonosító       | 94°C<br>3 min       | 94°C<br>30 sec | 53°C<br>30 sec | 72°C<br>30 sec | 72°C<br>5 min  | 30          |

3. táblázat: PCR próbák reakcióelegyének (Master-mix) összetétele. Az értékek µl mértékegységben értendők.

|              | <i>M. cuniculi</i> fajazonosítás | <i>B. bronchiseptica</i> fajazonosítás | 16S rRNS szekvencia-analízis | <i>Pasteurella sp. MCCM 02539</i> fajazonosítás | <i>P. multocida</i> burok PCR | <i>P. multocida</i> LPS PCR | <i>P. multocida</i> alfaj | <i>P. multocida</i> fajazonosítás |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Víz          | 9,70                             | 16,50                                  | 17,20                        | 18,00                                           | 7,20                          | 18,40                       | 18,10                     | 14,40                             |
| Puffer       | 2,50                             | 2,50                                   | 2,50                         | 2,50                                            | 2,50                          | 2,50                        | 2,50                      | 2,40                              |
| DMSO         | -                                | 2,00                                   | 1,30                         | -                                               | -                             | -                           | -                         | -                                 |
| Mg           |                                  | 1,20                                   | 1,20                         | 0,50                                            | 0,50                          | 0,50                        | 0,50                      | 0,50                              |
| dNTP         | 0,30                             | 4,00                                   | 1,00                         | 0,50                                            | 0,50                          | 0,50                        | 0,50                      | 0,50                              |
| primer (F/R) | 0,40                             | 0,30                                   | 0,40                         | 0,40                                            | 1,00                          | 0,40                        | 0,4 / 0,25                | 0,4/0,25                          |
| Taq          | 0,20                             | 0,20                                   | 0,25                         | 0,30                                            | 0,30                          | 0,30                        | 0,30                      | 0,30                              |
| Templát      | 1,50                             | 1,00                                   | 1,00                         | 2,00                                            | 5,00                          | 2,00                        | 1,00                      | 5,00                              |

A PCR eredményét végül agaróz gélelektroforézissel tettük láthatóvá. Ehhez agarózzgél készítettünk por állagú agaróz (Seakem LE agarose, Lonza) és egyszeres hígítású Tris-Bórsav-EDTA puffer (Lonza AccuGENE) segítségével. Ehhez adtunk DNS-festéket (GelRed Nucleic acid stain, Biotium). Az agarózzgél első két „zsebébe” került a létra, utána a vak negatív minta következett, ami nem tartalmazott DNS-t. Ezután a pozitív kontrol következett, majd az

ismeretlen törzseket raktuk növekvő sorrendben. Az elektroforézis eredményét UV-megvilágítás alatt detektáltuk.

#### 3.3.1 *Moraxella cuniculi* fajazonosítás

A gyanús tenyészetek azonosítására egy PCR reakciót fejlesztettünk, a *Mcuniculi* SodA forward, illetve reverz primer segítségével, amely a baktériumfaj *SodA* génjének speciális szakaszát amplifikálja. A reakcióelegy összetétele a **3. táblázatban** látható.

#### 3.3.2 *Pasteurella multocida* fajazonosítás

A gyanús tenyészetek azonosítására multiplex PCR reakciót alkalmaztunk, melynek segítségével a fajspecifikus régiót (*kmt1*), a toxingént, valamint az A buroktípusra jellemző génszakaszt tudtuk kimutatni [36–38]. A **3. táblázatban** látható a reakcióelegy összetétele, a primereknél a feltüntetett első érték a *GauA*, a másik érték a *KMT1*, illetve a *tox* primerpárra vonatkozik.

#### 3.3.3 *Bordetella bronchiseptica* fajazonosítás

A gyanús tenyészetek azonosítására multiplex PCR reakciót alkalmaztunk. Hozbor és munkatársainak munkássága alapján, a BB forward, illetve reverz primerek alkalmazásával. Pozitív kontrollként a KM22 típusú törzset használtuk.

#### 3.3.4 16S rRNS szekvenciaanalízis

Abban az esetben, ha olyan telep morfológiával talákoztunk a tenyésztés során, amely számunkra ismeretlen volt, vagy a laboratóriumban korábban elvégzett vizsgálatok eredménye negatív lett, akkor 16S rRNS szekvenciaanalízist végeztünk. Ehhez először a már fentebb kifejtett módon templátot állítottunk elő az ismeretlen baktériumtenyészetből, majd elvégeztük a 16S riboszómális RNS génjére specifikus PCR reakciót a 27F és 1512 R primerek segítségével. A PCR eredményét ugyancsak gélelektroforézissel állapítottuk meg. Amennyiben a PCR-termék megfelelő tisztaságú lett, akkor a mintákat a Macrogen Europe céghez küldtük szekvenálásra. A kapott szekvenciákat az NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) szerver segítségével azonosítottuk baktériumfaj szintjén.

#### 3.3.5 *Pasteurella sp. MCCM 02539* fajazonosítás

A 16S rRNS szekvenciaanalízist követően többször is a *Pasteurella sp. MCCM 02539*-t azonosítottunk. A gyorsabb azonosítás végett egy PCR reakciót fejlesztettünk, amely a parciális 16S rRNS génszekvencia egyik, a fajra specifikus régióját amplifikálja. A felhasznált primerek a következők voltak: Pastsp F1, Pastsp F2, Pastsp R.

### 3.4 *Pasteurella multocida* törzsek jellemzése

Az izolált *P. multocida* törzseket további vizsgálatnak vetettük alá. Ezen vizsgálatok közé tartozott többek között a törzsek buroktípusának, LPS genotípusának, és a Heddleston szerotípusának, valamint alfajának meghatározása.

#### 3.4.1 *A Pasteurella multocida buroktípusának meghatározása*

A törzsek buroktípusának meghatározásához kombinált burok PCR reakciót alkalmaztunk a táblázatban feltüntetett primerekkel [40]. Pozitív kontrollként az X-73 (A típus), M1404 (B típus), P3881 (D típus), P1235 (E típus) és P4679 (F típus) referenciatörzseket használtuk.

#### 3.4.2 *Pasteurella multocida* LPS genotípus azonosítására szolgáló PCR

A törzsek LPS genotípusát az LPS PCR segítségével határoztuk meg [41].

#### 3.4.3 *Pasteurella multocida* alfaj meghatározás

A törzsek alfajának meghatározásához kombinált PCR próbát használtunk. Pozitív kontrollként a X-73 (*subspec. gallicida*) és a P2192 (*subspec. septica*) referenciatörzsek szolgáltak. A **3. táblázatban** szereplő primer mennyiségnél az első érték a GatD, illetve a 16S, a második a KMT primerpárokra vonatkozik.

#### 3.4.4 *Pasteurella multocida* törzsek Heddleston szerotípusának meghatározása agargél precipitációs (AGP) próbával

A vizsgálatban részt vevő *P. multocida* törzsek Heddleston szerotípusát AGP próbával állapítottuk meg. A tesztben használt hőstabil antigéneket egy korábbi publikáció alapján készítettük el [10].

### 3.5 Törzsek korongdiffúziós vizsgálata

A tünetet mutató és klinikailag relevánsnak ígérkező minták antibiotikum-érzékenységét is meghatároztuk korongdiffúziós módszerrel a CLSI szabványnak megfelelően. A vizsgálatba igyekeztünk olyan antibiotikumokat beválogatni, melyek a legtöbb antibiotikumosztályt lefedik. Ennek megfelelően 7 antibiotikum osztály 11 db antibiotikumára esett a választás: penicillin, enrofloxacin, marbofloxacin, pradofloxacin, klóramfenikol, florfenikol, SXT, doxiciklin, amoxicillin-klavulánsav, gentamicin, tulatromicin. A korongdiffúzió vizsgálatához a vizsgált törzsekből egy 0.5 MacFarland sűrűségű szuszpenziót készítettünk. A szuszpenzióból Müller-Hinton alapú véres agarra (MastGroup) pázsittenyészetet hoztunk létre, melyekre az antibiotikum korongokat (**4. táblázat**) egymástól megfelelő távolságra ráhelyeztük. A korongok felhelyezése után a tenyészeteket 24 órára 37°C-os termosztátba helyeztük. Másnap lemértük a gátlási zóna átmérőjét mm-es pontossággal, vonalzó segítségével (**1.ábra**). Az értékeket rezisztens, mérsékelten érzékeny és érzékeny kategóriákba soroltuk a CLSI

kiadványaiban (CLSI-M31-S1, CLSI-M31-A2, CLSI-M45, VET01S, CLSI-M100) feltüntetett értékek alapján [44–48]. Pozitív kontrollként az *Escherichia coli* ATTC 25922 és a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 referencia törzseket alkalmaztuk.

4. táblázat: A vizsgálatban felhasznált antibiotikum korongok koncentrációja, illetve gyártócégek neve

| Antibiotikum osztály               | Antibiotikum neve       | Koncentráció (µg) | Gyártó cég |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------|------------|
| <b>Penicillinek</b>                | Penicillin G            | 10                | Biolab     |
|                                    | Amoxicillin-klavulánsav | 20/10             | Biolab     |
| <b>Fenikolok</b>                   | Klóramfenikol           | 30                | Biolab     |
|                                    | Florfenikol             | 30                | Biolab     |
| <b>Fluorokinolonok</b>             | Enrofloxacin            | 5                 | Biolab     |
|                                    | Pradofloxacin           | 5                 | MastDisc   |
|                                    | Marbofloxacin           | 5                 | Biolab     |
| <b>Aminoglikozidok</b>             | Gentamicin              | 10                | Biolab     |
| <b>Tetraciklinek</b>               | Doxiciklin              | 30                | Biolab     |
| <b>Potencírozott szulfonamidok</b> | SXT                     | 25                | Oxoid      |
| <b>Makrolidok</b>                  | Tulatromicin            | 30                | Biolab     |

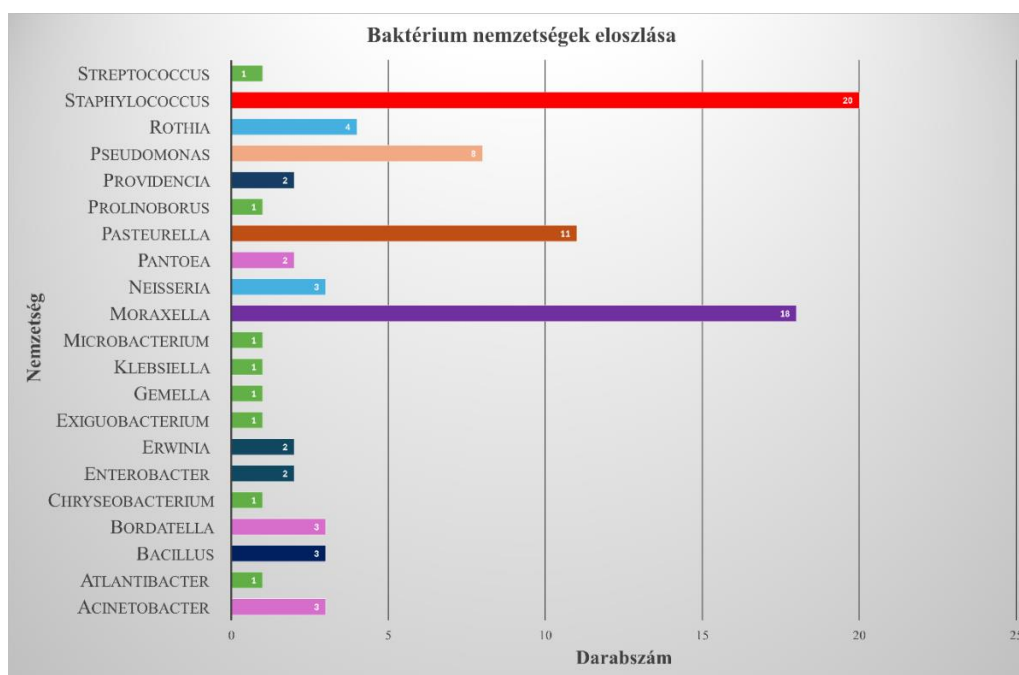


1. ábra: *Moraxella cuniculi* korongdiffúziós vizsgálata

## 4. Eredmények

### 4.1 Azonosított baktériumfajok gyakorisága

A kutatás során összesen 73 nyúltól vettünk mintát, melyekből 88 baktériumtörzset sikerült azonosítani. A vizsgálatom tárgyát képező baktériumok közül a *Pasteurella* genusba összesen 11 azonosított törzs, valamint 3 izolátum a *Bordetella* genusba, 8 a *Pseudomonas* genusba tartozott, a *Staphylococcus* genusba 20, a *Moraxella* genusba pedig 18 törzs tartozott. Ezeken kívül számos más baktériumfajt sikerült izolálni. Az azonosított törzsek nemzetségi eloszlását az **2. ábra** szemlélteti:



2. ábra: Az azonosított baktériumtörzsek nemzetségi eloszlása

Amint azt az **2. ábra** is szemlélteti, az előtérbe helyezett baktériumokon kívül még számos másik nemzetség tagjait is sikerül izolálni. Kimutattunk 3 panaszmentes nyúlból és 1 tályoggal rendelkezőből *Rothia nasimurium*-t is. Valamint 2 panaszmentes és egy tályoggal és légúti tünetekkel küzdő nyúlból *Neisseria sp.*-t. Továbbá 3 panaszmentes nyúlból *Acinetobacter*-t, valamint 1 panaszmentes, 1 légúti tünetekkel rendelkező és 1 fülgyulladásban szenvedő nyúlból *Bacillus*-t. Ezeken a törzseken kívül egy-két esetben kevésbé fontos baktériumokfajok is megjelentek, melyeket a többi baktériumfajjal együtt az **5. táblázatban** összegeztem.

5. táblázat: Sikeresen azonosított baktériumnemzetségek fajai, és azok előfordulási aránya

| Nemzetség               | Baktériumfaj                        | darabszám (db) | százalék (%) |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------|--------------|
| <b>Acinetobacter</b>    | <i>Acinetobacter oryzae</i>         | 1              | 1,14         |
|                         | <i>Acinetobacter sp.</i>            | 1              | 1,14         |
|                         | <i>Acinetobacter ursingii</i>       | 1              | 1,14         |
| <b>Atlantibacter</b>    | <i>Atlantibacter sp.</i>            | 1              | 1,14         |
| <b>Bacillus</b>         | <i>Bacillus cereus</i>              | 1              | 1,14         |
|                         | <i>Bacillus sp.</i>                 | 2              | 2,27         |
| <b>Bordetella</b>       | <i>Bordetella bronchiseptica</i>    | 2              | 2,27         |
|                         | <i>Bordetella sp. CLR2013-1</i>     | 1              | 1,14         |
| <b>Chryseobacterium</b> | <i>Chryseobacterium</i>             | 1              | 1,14         |
| <b>Enterobacter</b>     | <i>Enterobacter hormaechei</i>      | 1              | 1,14         |
|                         | <i>Enterobacter ludwigii</i>        | 1              | 1,14         |
| <b>Erwinia</b>          | <i>Erwinia persicina</i>            | 2              | 2,27         |
| <b>Exiguobacterium</b>  | <i>Exiguobacterium profundum</i>    | 1              | 1,14         |
| <b>Gemella</b>          | <i>Gemella cuniculi</i>             | 1              | 1,14         |
| <b>Klebsiella</b>       | <i>Klebsiella oxytoca</i>           | 1              | 1,14         |
| <b>Microbacterium</b>   | <i>Microbacterium sp</i>            | 1              | 1,14         |
| <b>Moraxella</b>        | <i>Moraxella cuniculi</i>           | 18             | 20,45        |
| <b>Neisseria</b>        | <i>Neisseria sp.</i>                | 3              | 3,41         |
| <b>Pantoea</b>          | <i>Pantoea agglomerans</i>          | 2              | 2,27         |
| <b>Pasteurella</b>      | <i>Pasteurella canis</i>            | 1              | 1,14         |
|                         | <i>Pasteurella multocida</i>        | 5              | 5,68         |
|                         | <i>Pasteurella sp.</i>              | 1              | 1,14         |
|                         | <i>Pasteurella sp. MCCM 02539</i>   | 4              | 4,55         |
| <b>Prolinoborus</b>     | <i>Prolinoborus fasciculus</i>      | 1              | 1,14         |
| <b>Providencia</b>      | <i>Providencia rettgeri</i>         | 1              | 1,14         |
| <b>Pseudomonas</b>      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       | 5              | 5,68         |
|                         | <i>Pseudomonas moraviensis</i>      | 1              | 1,14         |
|                         | <i>Pseudomonas reidholzensis</i>    | 1              | 1,14         |
|                         | <i>Pseudomonas sp</i>               | 1              | 1,14         |
| <b>Rothia</b>           | <i>Rothia nasimurium</i>            | 4              | 4,55         |
| <b>Staphylococcus</b>   | <i>Staphylococcus arlettae</i>      | 1              | 1,14         |
|                         | <i>Staphylococcus caeli</i>         | 2              | 2,27         |
|                         | <i>Staphylococcus epidermidis</i>   | 1              | 1,14         |
|                         | <i>Staphylococcus equorum</i>       | 2              | 2,27         |
|                         | <i>Staphylococcus lugdunensis</i>   | 1              | 1,14         |
|                         | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 4              | 4,55         |
|                         | <i>Staphylococcus sp</i>            | 2              | 2,27         |
|                         | <i>Staphylococcus succinus</i>      | 4              | 4,55         |
|                         | <i>Staphylococcus xylosus</i>       | 3              | 3,41         |
| <b>Streptococcus</b>    | <i>Streptococcus salivarius</i>     | 1              | 1,14         |
|                         | <b>Összesen</b>                     | <b>88</b>      | <b>100</b>   |

## 4.2 Antibiotikum-rezisztencia vizsgálat

Az egyes törzseket 11 antibiotikumra teszteltük. Ezek közül kettő a penicillinek közé tartozik: a Penicillin G (PG) és az Amoxicillin-klavulánsav, másnéven Augmentin (AUG). A fluorokinolonok közül hármat vizsgáltunk: az Enrofloxacin (EN), Marbofloxacin (MAR) és a Pradofloxacin (PRA). A fenikolok közül szintén kettőt vizsgáltunk: a Florfenikolt (FFC) és a Klóramfenikolt (C). Vizsgáltuk a Doxiciklint (DOX), amely a tetraciklinek közé tartozik, valamint az aminoglikozidok közül a Gentamicint (GN). A potencírozott-szulfonamidok közül az SXT-t és a makrolidok közül pedig a Tulatromicint (TUL) vizsgáltuk.

### 4.2.1 A *Pasteurella* fajok és antibiotikum rezisztencia vizsgálatuk

Munkánk során külön figyelmet fordítottunk a *Pasteurella multocida*-ra, hiszen több korábbi kutatás szerint ez a baktériumfaj a leggyakoribb okozója a nyulak felső légúti bakteriális betegségének. Összesen 11 *Pasteurella* nemzetségbe tartozó törzset izoláltunk, ami így a harmadik leggyakoribbnak bizonyult. Ezek közül 7 esetben klinikai tünetekkel rendelkezett az állat, míg további 4 esetben a minták panaszmentes egyedekből származtak. A klinikai tünetek közül két esetben tályog és légúti tünet is jelen volt, egy esetben csak tályoggal rendelkezett az állat, a többi esetben pedig csak légúti tünet volt tapasztalható. A két minta esetében, amely légúti tünetekkel és tályoggal is küzdő nyúlból származott, az egyikből *Pasteurella canis*-t izoláltunk, a másiktól pedig *Pasteurella sp.* mutatunk ki. A további 5 esetben pedig *P. multocida*-t találtunk. Kutatásunk során sikerült 4 olyan *Pasteurella* törzset kimutatni, amelyet eddig még csak egyszer mutattak ki [12]. A gyanús tenyészetek azonosításán túl megállapítottuk a buroktípusukat, LPS genotípusukat és a Heddlestone szerotípusukat, valamint alfajukat is. Ennek eredményét a **6. táblázat** szemlélteti.

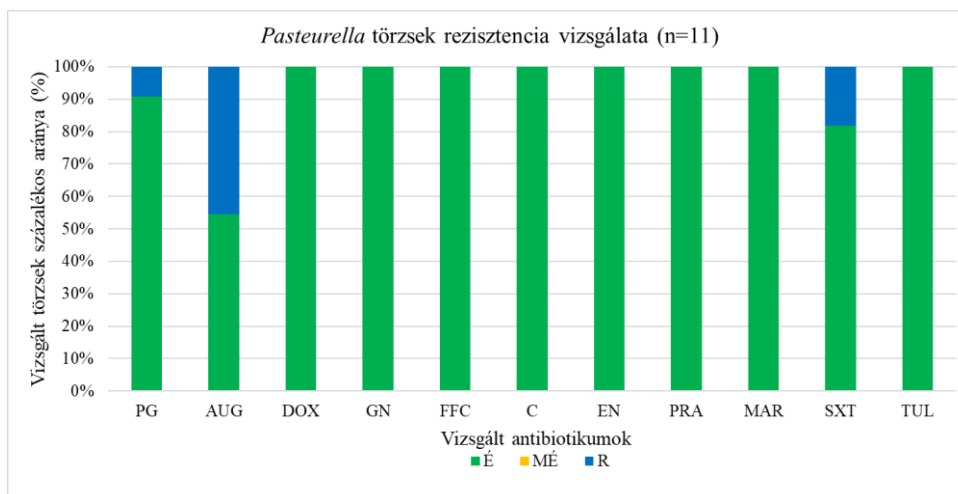
6. Táblázat: Vizsgált *Pasteurella multocida* (Pm) törzsek PCR próbáinak eredménye

| Törzsszám | Multiplex PCR | Burok | LPS | Heddlestone | Alfaj                                                |
|-----------|---------------|-------|-----|-------------|------------------------------------------------------|
| 15/23     | atoxikus Pm   | A     | L3  | 3           | <i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i> |
| 22/23     | atoxikus Pm   | A     | L3  | 3           | <i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i> |
| 2/23      | atoxikus Pm   | A     | L3  | 3           | <i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i> |
| 50/23     | atoxikus Pm   | A     | L3  | 3           | <i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i> |
| 82/24     | atoxikus Pm   | A     | L1  | 1           | <i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>septica</i>   |

Négy törzsre igaz volt, hogy L3-as LPS genotípusúak, 3-as szerotípusúak és a *P. multocida subspecies multocida* alfajba tartoztak. Egy törzs volt a kivétel, ahol L1-es LPS

genotípust, 1-es szerotípust állapítottunk meg és *P. multocida subspecies septica* alfajba tartozott. Az 5 törzs közül csak 1 származott tünetmentes nyúlból, a 22/23-as, érdekes módon típusában nem ennél tapasztaltunk eltérést a többségtől, hanem a többséghez hasonlóan légúti tünetekkel rendelkező nyúlból származó mintánál.

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálat során a 11 vizsgált törzsnél nem találtunk rezisztenciát doxiciklinnel, gentamicinnel enrofloxacinnal, florfenikollal, marbofloxacinnal, pradofloxacinnal, klóramfenikollal és tulatromicinnel szemben. Viszont a Penicillin G-vel szemben 9,1%, a szintén penicillinek közé tartozó augmentinnel (amoxicillin-klavulánsav) szemben 45,5% volt rezisztens. A szulfametoxazol-trimetoprimmel szemben pedig a törzsek 18,2%-a volt ellenálló. Mérsékelt érzékenységet nem tapasztaltunk, továbbá egy törzs sem bizonyul MDR-nek. A törzsek érzékenységét a **3. ábra** szemlélteti.



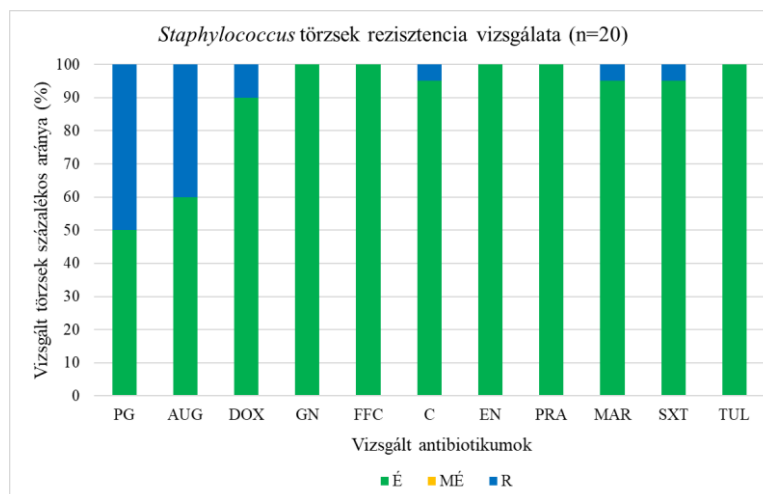
3. ábra: Vizsgált *Pasteurella* törzsek antibiotikum érzékenysége. Felhasznált rövidítések: PG: penicillin G, AUG: amoxicillin-klavulánsav, DOX: doxiciklin, GN: gentamicin, FFC: florfenikol, C: klóramfenikol, EN: enrofloxacin, PRA: pradofloxacin, MAR: marbofloxacin, SXT: szulfametoxazol-trimetoprim, TUL: tulatromicin

#### 4.2.2 *Staphylococcus* fajok és antibiotikum rezisztencia vizsgálatuk

A leggyakrabban kimutatott baktériumfajok a *Staphylococcus* nemzetségbe tartoztak. A 12 nyúlból származó 20 azonosított törzs közül 17 panaszmentes állatból származott. A panaszmentes nyulak mintájából 1 *S. arlettae*-t, 1 *S. epidermidis*-t, 2 *S. equorum*-ot, 1 *S. caeli*-t, 3 *S. saprophyticus*-t, 3 *S. xylosus*-t és 2 további *Staphylococcus sp.*-t izoláltunk. Klinikai tünetekkel rendelkező nyulakból 1 *S. caeli*-t, 1 *S. lugdunensis*-t, és 1 *S. saprophyticus*-t mutattunk ki. Szeretném megjegyezni, hogy a vizsgált nyulak közül 15 a sajátom, közülük egy a mintavétel előtt nem sokkal érkezett hozzám fülgyulladásal, ezért ő elkülönítve volt tartva és csak ennek a nyúlnak voltak klinikai tünetei. A fülgyulladásban szenvedő nyúl orrtampon mintájából *P. aeruginosa*-t mutattunk ki. A 14 együtt tartott tünetmentes nyúl orrtampon mintáiból 7-nél izoláltunk különböző *Staphylococcus* fajt, egynél pedig *P. multocidát* is

találtunk. A többi esetben 1-1 kevésbé jelentős faj jelent meg. Főleg arra voltunk kíváncsiak amikor ezeket az izolátumokat vizsgáltuk, hogy mennyire fognak hasonlítani egymásra az együtt tartott nyulak mintái.

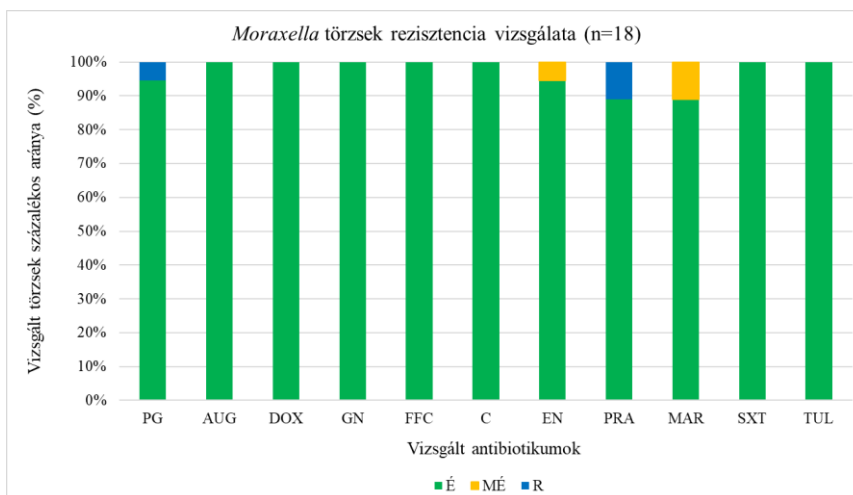
Az antibiotikum rezisztencia vizsgálat során a 20 vizsgált törzsből Penicillin G-vel szemben 50%, a szintén penicillinek közé tartozó augmentinnel szemben 40% volt rezisztens. A doxiciklinnel szemben viszont csak 10%-uk volt ellenálló. A klóramfenikollal, a marbofloxacinnal és a szulfametoxazol-trimetoprimmel szemben 5%-uk mutatott rezisztenciát. A vizsgálat során egy mérsékelt érzékeny törzset se azonosítottunk. A gentamicinre, tularomicinre, florfenikolra, enrofloxacinra és a pradofloxacinra 100%-ban érzékenyek voltak. Az összes törzs közül csak egy mutatott multi drog rezisztenciát, amely érzékeny volt penicillin G-vel, augmentinnel, doxiciklinnel és marbofloxacinnal szemben is (4. ábra).



4. ábra: Vizsgált *Staphylococcus* törzsek antibiotikum érzékenysége. Felhasznált rövidítések: PG: penicillin G, AUG: amoxicillin-klavulánsav, DOX: doxiciklin, GN: gentamicin, FFC: florfenikol, C: klóramfenikol, EN: enrofloxacin, PRA: pradofloxacin, MAR: marbofloxacin, SXT: szulfametoxazol-trimetoprim, TUL: tularomicin

#### 4.2.3 *Moraxella* fajok és antibiotikum rezisztencia vizsgálatuk

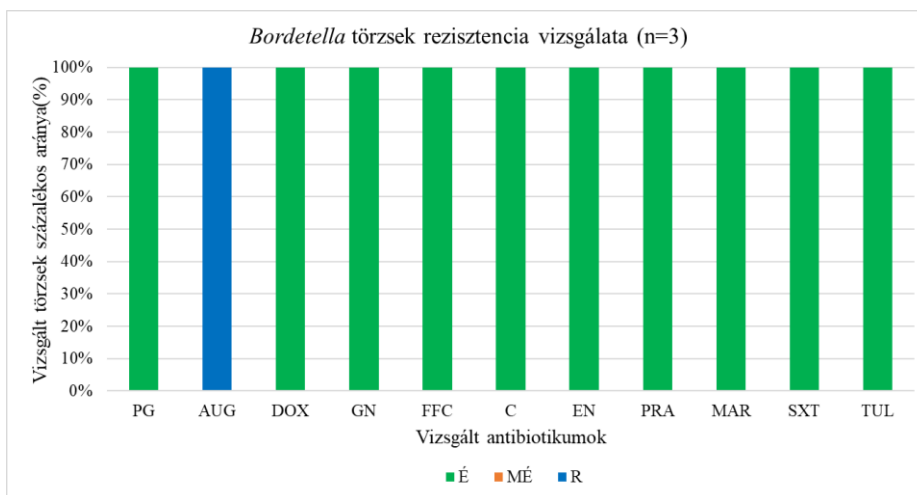
A második leggyakoribb a *Moraxella* nemzetség volt, a 18 különböző nyúlból izolált 18 törzs mindegyike *M. cuniculi* volt és 2 kivétellel mindegyik panaszmentes nyúltól származott. A maradék két esetben, egyszer légúti tüneteket mutató nyúlból, a másik esetben pedig egy tályogból izoláltuk. A rezisztencia vizsgálat során a 18 törzsből egy sem volt rezisztens a florfenikollal, doxiciklinnel, augmentinnel, gentamicinnel, szulfametoxazol-trimetoprimmel, klóramfenikollal és a tularomicinnel szemben. Mérsékelt rezisztenciát mutattunk ki az esetek 5,6%-ban az enrofloxacinnal szemben, valamint az esetek 11,1%-ban a marbofloxacinnal szemben. Továbbá 5,6%-uk volt rezisztens a penicillin G-vel szemben, a pradofloxacinnal szemben pedig ez az arány 11,1% volt. Egy törzs sem bizonyul multi drog rezisztensnek (5. ábra).



5. ábra: Vizsgált *Moraxella* törzsek antibiotikum érzékenysége. Felhasznált rövidítések: PG: penicillin G, AUG: amoxicillin-klavulánsav, DOX: doxiciklin, GN: gentamicin, FFC: florfenikol, C: klóramfenikol, EN: enrofloxacin, PRA: pradofloxacin, MAR: marbofloxacin, SXT: szulfametoxazol-trimetoprim, TUL: tulatromicin

#### 4.2.4 *Bordetella* fajok és antibiotikum rezisztencia vizsgálatuk

A vizsgálatom fókuszában lévő 4 baktérium genus közül a legritkábban előforduló a *Bordetella* volt. Összesen 2 mintából sikerült kimutatni *B. bronchiseptica*-t és 1 esetben *Bordetella* sp. CLR2013-1-t izoláltunk. Mind a 3 törzs tünetmentes nyúlból került kimutatásra. A 3 törzsnél csak az augmentinnel szemben mutattunk ki 100%-os rezisztenciát, vagyis mind a 3 törzs rezisztens volt. Az összes többi antibiotikumra 100%-ban érzékenyek voltak (6. ábra). Ennél fogva egy törzs sem bizonyul MDR-nek.

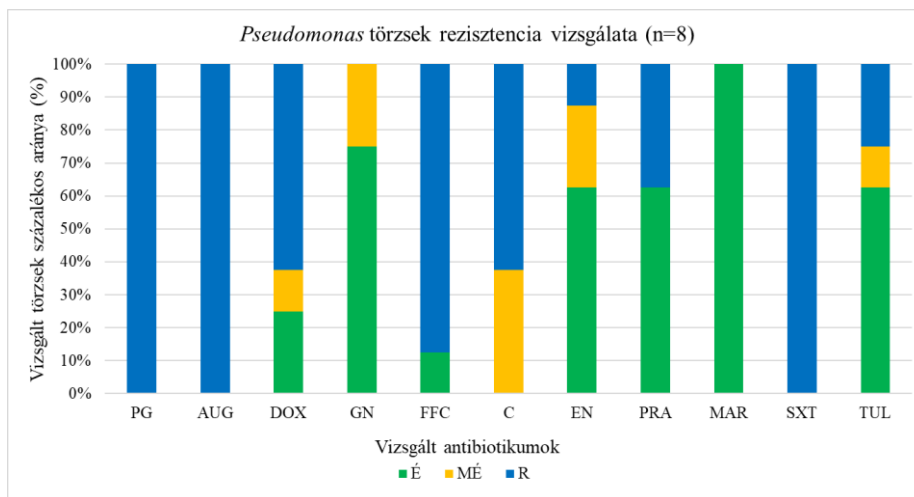


6. ábra: Vizsgált *Moraxella* törzsek antibiotikum érzékenysége. Felhasznált rövidítések: PG: penicillin G, AUG: amoxicillin-klavulánsav, DOX: doxiciklin, GN: gentamicin, FFC: florfenikol, C: klóramfenikol, EN: enrofloxacin, PRA: pradofloxacin, MAR: marbofloxacin, SXT: szulfametoxazol-trimetoprim, TUL: tulatromicin

#### 4.2.5 *Pseudomonas* fajok és antibiotikum rezisztencia vizsgálatuk

A kutatás során összesen 5 db *P. aeruginosa*-t izoláltunk, ezek közül 1 származott panaszmentes nyúltól, 2 törzs légúti tünetekkel, 1 infraorbitális tályoggal, 1 fülgyulladással küzdő nyúlból származott. Továbbá 1db *Pseudomonas moraviensis*, 1db *Pseudomonas*

*reidholzensis* és 1 db *Pseudomonas sp* törzset sikerült izolálni 3 tünetmentes nyúlból. Az antibiotikum rezisztencia vizsgálat során 100%-os volt a rezisztencia a két penicillinnel, valamint a szulfametoxazol-trimetoprimmel szemben, viszont 100%-os volt az érzékenység a marbofloxacinra. A pradofloxacinra és az enrofloxacinra 62,5%-os volt az érzékenység, valamint az enrofloxacinra további 25%-k volt mérsékelten érzékeny. Hasonlóan 62,5%-k volt érzékeny tultatromicinre, valamint 12,5%-k mérsékelten érzékeny volt. 75%-os érzékenységet mutattak a törzsek gentamicinnel szemben és a maradék 25% pedig mérsékelten érzékeny volt. A klóramfenikollal szemben 62,5%-os volt a rezisztencia gyakoriság, a fennmaradó törzsek 37,5%-a pedig mérsékelten érzékenyek voltak rá. A florfenikollal szemben 87,5% volt rezisztencia és a törzsek 12,5%-nál tapasztaltunk érzékenységet. A doxiciklinnel szemben 62,5%-os volt rezisztencia gyakorisága, míg a törzsek 12%-a mérsékelten érzékeny, 25%-a érzékeny volt (**7. ábra**). Kivétel nélkül minden törzs MDR-nek bizonyult.



7. ábra: Vizsgált *Pseudomonas* törzsek antibiotikum érzékenysége. Felhasznált rövidítések: PG: penicillin G, AUG: amoxicillin-klavulánsav, DOX: doxiciklin, GN: gentamicin, FFC: florfenikol, C: klóramfenikol, EN: enrofloxacin, PRA: pradofloxacin, MAR: marbofloxacin, SXT: szulfametoxazol-trimetoprim, TUL: tultatromicin

## **5. Következtetések**

### **5.1 *Pasteurella***

Az általunk vizsgált esetek 63,6%-ában tünetek is jelen voltak, ami nem meglepő, hiszen több fentebb már említett kutatás is az egyik leggyakoribb légúti megbetegedést okozó baktériumfajként hivatkozik rá [1, 7]. A kutatás során megállapított buroktípusok eredménye is összhangban van az ezekben a kutatásokban megfogalmazott állítással miszerint a nyulakban *pasteurellosis* általában az A burok típusú törzsek váltanak ki, hiszen mind az 5 törzs ebbe a burok típusba tartozott [8]. Az általunk végzett rezisztencia vizsgálatok értelmében a legnagyobb rezisztenciát a penicillinekkal és a potencírozott-szulfonamidokkal szemben mutatták a törzsek. Az összes többi antibiotikumra nagyfokú érzékenység volt tapasztalható és nem volt multi drug rezisztencia. Ez hasonló eredményt ad ahhoz, amit a 2019-es kínai [14] és 2006-os francia [6] kutatásban megállapítottak, hiszen ezeknél is nagyfokú érzékenységet tapasztaltak a legtöbb antibiotikummal szemben, valamint egybecseng a 2012-es brazil kutatással is [17]. Viszont szöges ellentétben áll a két 2018-as egyiptomi kutatás eredményével, amelyek során nagyfokú rezisztenciát tapasztaltak az összes vizsgált antibiotikummal szemben. Bár az egyiknél hozzánk hasonlóan egy törzs sem volt MDR, de a másiknál viszont mindegyik törzs annak bizonyult [15, 16].

### **5.2 *Bordetella***

Annak ellenére, hogy gyakran flóraalkotóként és megbetegedést okozó baktériumtörzsként is hivatkoznak rá csak csekély számban (3db) sikerült ebbe a genusba tartozó törzset kimutatni a jelenlegi kutatás során. Valamint csak az augmentinnel szemben voltak rezisztensek a törzsek, ez az eredmény viszont nem tér el nagyban a fentebb már említett 2006-os francia [6] és 2020-as kínai kutatástól [19], amelyek során a legtöbb antibiotikumra nagyfokú érzékenységet találtak egy-két kivétellel, bár ezek során inkább a cephalosporinokkal szemben volt nagyobb mértékű rezisztencia, amelyeket ebben a kutatásban nem vizsgáltunk.

### **5.3 *Staphylococcus***

A törzsek 85%-a panaszmentes állatból származott, ami érthető, hiszen egy széleskörben előforduló opportunist baktérium. A saját, együtt tartott 14 nyúlammal a felénél *Staphylococcus* fajok domináltak, 3-nál nem sikerült azonosítani baktériumfajt, a 4 másik nyúlnál 1-1 kevésbé jelentős baktériumfajt izoláltunk, ennél fogva kijelenthető, hogy volt hasonlóság az együtt tartott nyulak orrüregei baktériumflórájában. Valamint az a két minta is innen származott, amiből *Staphylococcus equorum*-t mutattunk ki. Ez a faj lovakban található meg, viszont a nyúlketrecek a lovakhoz nálunk nagyon közel vannak elhelyezve és ugyanaz az

ember gondolja őket, aki a lovakat is. Nagy eséllyel ez lehet az oka, hogy a nyulakból is sikerült izolálni. Az ebben a kutatásban végzett antibiotikum rezisztencia vizsgálat eredménye igen hasonlatos a 2006-os francia kutatáshoz, hiszen ott is azt tapasztalták, hogy az összes vizsgált antibiotikum igen aktív volt, eltekintve a penicillinektől, mert azokat nem vizsgálták a korábbi kutatásban [6]. A 2004-es belgiumi kutatásban szintén nagyobb arányban tapasztaltak rezisztenciát a penicillinekkal és tetraciklinekkel szemben, viszont a jelen kutatás nem mutatott ki olyan nagymértékű és széleskörű rezisztenciát [26]. Továbbá a 2018-as kínai kutatásban is nagyobb penicillinnel szembeni rezisztenciát állapítottak meg, viszont az ott tapasztalt makrolidokkal szembeni magas rezisztencia a jelen kutatásban nem igazolódott [27].

#### **5.4 *Moraxella***

A kutatás eredménye egybeesik a már korábban is megállapított ténnyel, miszerint a *Moraxella cuniculi* főleg normál, ártalmatlan flóraalkotóként van jelen, hiszen az általunk vizsgált törzseket 88,9%-ban panaszmentes állatokból sikerült kitenyészteni [29]. A tervezett PCR nagyban meggyorsította a kimutatást. Csak 3 törzs mutatott rezisztenciát és/vagy mérsékelt érzékenységet. Egy légúti tünetekkel rendelkező és egy panaszmentes nyúlból származó törzs volt rezisztens a pradofloxacinnal szemben. A másik tünetmentes állatból izolált törzs, viszont a penicillin G -vel szemben volt rezisztens. Ennek ellenére is megállapítható, hogy minden vizsgált antibiotikumra nagyfokú érzékenységet mutattak a törzsek.

#### **5.5 *Pseudomonas***

Kétségtelen, hogy a legnagyobb antibiotikum rezisztencia arányt a *Pseudomonas* fajok produkálták, az összes törzs MDR volt, ami szintén messze a legnagyobb arány a vizsgált baktériumfajok között. Az összes törzs közül három törzs volt 5 db és szintén három törzs volt 6 db, valamint kettő volt 7 db antibiotikummal szemben egy időben rezisztens. A legeredményesebbnek a fluorokinolonok bizonyultak, hiszen a marbofloxacinra 100%-os érzékenységet mutattak a törzsek és igen eredményesnek bizonyult a többi antibiotikumhoz képest az enrofloxacin és pradofloxacin is. Az aminoglikozidok közé tartozó gentamicin volt a második leghatékonyabb, továbbá a makrolidokhoz sorolt tulatromicin is jó aktivitást mutatott. A jelenlegi kutatás eredménye nem tér el nagyban a 2006-os francia kutatás eredményeitől hiszen ott is a marbofloxacint és a gentamicint találták a leghatékonyabbnak és mindkét kutatásban a vizsgált többi antibiotikumokhoz hasonló rezisztencia eredmények születtek [6]. A 2010-es szlovák kutatás ehhez a kutatáshoz hasonlóan magas rezisztenciát talált számos antibiotikummal szemben minden törzsnél [31].

## 6. Összefoglalás

A nyulak felső légúti megbetegedései egyre gyakrabban fordulnak elő az állatorvosi rendelőkben, hiszen folyamatosan nő a házikedvencként tartott nyulak száma és az igény a gyors és hatékony kezelésükre. Ez ellen gyakran a legnagyobb akadályt az antimikrobiális rezisztencia terjedése jelenti. A kutatás céljából tűztük ki, hogy házikedvencként tartott nyulak vizsgálatával megállapítsuk a nyulak felső légutáiban leggyakrabban elforduló és legjelentősebb baktériumfajokat, továbbá felmérjük ezek rezisztencia profilját. Ennek ismeretében csökkenthető lehet a felesleges antibiotikum felhasználás, amely nagyban hozzájárul az antibiotikum rezisztencia terjedéséhez, valamint elősegíti a nyulak eredményes gyógykezelését.

Kutatásunk során különös figyelmet szenteltünk a *Pasteurellaceae* család tagjaira főleg a *Pasteurella multocidára*, valamint vizsgáltunk *Bordetella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* és *Moraxella* törzseket is. Összesen 73 nyúlból vettünk orrtampon mintát, amelyekből különböző baktériumtörzseket izoláltunk, majd PCR vizsgálatokkal, illetve 16S rRNS szekvenciaanalízis segítségével elvégeztük a fajazonosítást. Ennek során egy új *Moraxella* PCR reakciót is kifejlesztettünk. A *Pasteurella* törzsek esetében megállapítottuk az alfajt, LPS genotípust, Heddleston szerotípust és a buroktípust is. A klinikailag releváns baktériumtörzsek rezisztencia viszonyait korongdiffúziós vizsgálat segítségével mértük fel 11 antibiotikummal szemben. A leggyakrabban kimutatott baktériumfajok a *Staphylococcus* nemzetségbe tartoztak (n=20). Magasabb rezisztenciát penicillin G-vel (50%) és augmentinnel (40%) szemben mutattak. Alacsony volt a rezisztencia mértéke doxiciklinnel (10%), klóramfenikollal, marbofloxacinnal és szulfametoxazol-trimetoprimmel (5%) szemben. A *Moraxella* törzsek voltak a második leggyakoribbak (n=18). Rezisztenciát 2 antibiotikummal szemben tapasztaltunk: pradofloxacin (11,1%) és penicillin G (5,6%). A *Pasteurella* nemzetségbe tartozó törzsek a harmadik leggyakoribbnak bizonyultak (n=11) és 3 antibiotikummal szemben találtunk rezisztenciát: augmentin (45,5%), szulfametoxazol-trimetoprim (18,2%) és penicillin G (9,1%). A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzsek voltak a negyedik leggyakoribbak (n=8), minden törzs MDR-nek bizonyult. Leghatékonyabbnak a marbofloxacin bizonyult 100%-os érzékenységgel, de viszonylag magas volt az érzékenység a gentamicinre (75%), tulatromicinre (62,5%), pradofloxacinra (62,5%) és enrofloxacinra (62,5%). Legritkábbnak a *Bordetella* fajok bizonyultak (n=3) és csak az augmentinnel szemben mutattunk ki rezisztenciát (100%). A kapott érzékenységi profilok a szakirodalomban fellelhető megfigyelésekkel, valamint a baktériumfajokat jellemző *ab ovo* rezisztencia tényével is többségében megegyeznek.

## Summary

Upper respiratory tract infections of rabbits occur more and more frequently in veterinary clinics, as the number of rabbits kept as pets is constantly increasing along with the demand for their quick and effective treatment. One of the greatest obstacles to this is often the spread of antimicrobial resistance. For this reason, the aim of this research was to identify the most common and most significant bacterial species in the upper respiratory tract of rabbits and to determine their resistance profiles by examining rabbits kept as pets. This knowledge will help to reduce the unnecessary use of antibiotics, which greatly contributes to the spread of antibiotic resistance, and helps to promote the effective medical treatment of rabbits.

During the research, particular attention was paid to members of the *Pasteurellaceae* family, especially *Pasteurella multocida*, and also *Bordetella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, and *Moraxella* strains were examined. A total of 73 rabbits were sampled by nasal swabs, from which various bacterial strains were isolated, and species identification was performed by PCR assays and 16S rRNA sequencing analysis. During this process, a new *Moraxella* PCR reaction was developed. Furthermore, the subspecies, LPS genotype, Heddlestone serotype, and capsule type of the *Pasteurella* strains were also determined. The resistance profile of clinically relevant bacterial strains were assessed using disk diffusion tests against 11 antibiotics. The most frequently detected bacterial species belonged to the *Staphylococcus* genus (n=20). They showed higher resistance to penicillin G (50%) and augmentin (40%). The level of resistance was low against doxycycline (10%), chloramphenicol, marbofloxacin, and sulfamethoxazole-trimethoprim (5%). *Moraxella* strains were the second most common (n=18). Resistance were observed to two antibiotics: pradofloxacin (11.1%) and penicillin G (5.6%). Strains belonging to the *Pasteurella* genus proved to be the third most common (n=11), and resistance were found to three antibiotics: augmentin (45.5%), sulfamethoxazole-trimethoprim (18.2%), and penicillin G (9.1%). Strains of the *Pseudomonas* genus were the fourth most common (n=8), and every strain proved to be multidrug-resistant (MDR). Marbofloxacin was the most effective with 100% susceptibility, but susceptibility was also relatively high for gentamicin (75%), tulathromycin (62.5%), pradofloxacin (62.5%), and enrofloxacin (62.5%). *Bordetella* species proved to be the rarest (n=3) and we detected resistance only to augmentin (100%). The obtained susceptibility profiles largely correspond with observations found in the literature, as well as with the ab ovo resistance characteristics of the bacterial species.

## 7. Irodalomjegyzék

1. Mancinelli E (2019) Respiratory disease in rabbits. In Practice 41:121–129. <https://doi.org/10.1136/inp.11425>
2. Paul-Murphy J (2007) Critical Care of the Rabbit. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice 10:437–461. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2007.03.002>
3. Johnson-Delaney CA, Orosz SE (2011) Rabbit Respiratory System: Clinical Anatomy, Physiology and Disease. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice 14:257–266. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2011.03.002>
4. Langan GP, Lohmiller JJ, Swing SP, Wardrip CL (2000) Respiratory Diseases of Rodents and Rabbits. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 30:1309–1335. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(00\)06009-5](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(00)06009-5)
5. Deeb BJ, DiGiacomo RE (2000) Respiratory Diseases of Rabbits. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice 3:465–480. [https://doi.org/10.1016/S1094-9194\(17\)30082-8](https://doi.org/10.1016/S1094-9194(17)30082-8)
6. Rougier S, Galland D, Boucher S, Boussarie D, Vallé M (2006) Epidemiology and susceptibility of pathogenic bacteria responsible for upper respiratory tract infections in pet rabbits. Veterinary Microbiology 115:192–198. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.02.003>
7. D'Amico F, Casalino G, Bozzo G, Camarda A, Lombardi R, Dimuccio MM, Circella E (2022) Spreading of *Pasteurella multocida* Infection in a Pet Rabbit Breeding and Possible Implications on Healed Bunnies. Veterinary Sciences 9:301. <https://doi.org/10.3390/vetsci9060301>
8. Yang W, Li M, Zhang C, Zhang X, Guo M, Wu Y (2022) Pathogenicity, colonization, and innate immune response to *Pasteurella multocida* in rabbits. BMC Vet Res 18:416. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03517-9>
9. Wilson BA, Ho M (2013) *Pasteurella multocida*: from Zoonosis to Cellular Microbiology. Clin Microbiol Rev 26:631–655. <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-13>
10. Heddleston KL, Gallagher JE, Rebers PA (1972) Fowl Cholera: Gel Diffusion Precipitin Test for Serotyping *Pasteurella multocida* from Avian Species. Avian Diseases 16:925–936. <https://doi.org/10.2307/1588773>
11. Rimler RB, Rhoades KR (1987) Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. J Clin Microbiol 25:615–618
12. Stahel ABJ, Hoop RK, Kuhnert P, Korczak BM (2009) Phenotypic and Genetic Characterization of *Pasteurella Multocida* and Related Isolates from Rabbits in Switzerland. J VET Diagn Invest 21:793–802. <https://doi.org/10.1177/104063870902100605>
13. Jaglic Z, Jeklova E, Leva L, Kummer V, Kucerova Z, Faldyna M, Maskova J, Nedbalcova K, Alexa P (2008) Experimental study of pathogenicity of *Pasteurella multocida* serogroup F in rabbits. Veterinary Microbiology 126:168–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.008>
14. Wang J, Sang L, Sun S, Chen Y, Chen D, Xie X (2019) Characterization of *Pasteurella multocida* isolated from dead rabbits with respiratory disease in Fujian, China. BMC Vet Res 15:438. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2191-3>
15. El Sayed M, El-Mowalid G, Ali A, Arnaout M, Abd El Hamid M (2018) Isolation, Identification and Antimicrobial susceptibility patterns of *Pasteurella multocida* Isolated from Diseased Rabbits. Suez Canal Veterinary Medicine Journal SCVMJ 23:13–26. <https://doi.org/10.21608/scvmj.2018.60744>
16. Awad N, Abd El-Hamid M (2019) Coexistence of Virulence and Antibiotic Resistance Genes in *Pasteurella multocida* Isolated from Diseased Rabbits. Zagazig Veterinary Journal 47:91–102. <https://doi.org/10.21608/zvjz.2019.6484.1017>

17. Ferreira TSP, Felizardo MR, Sena de Gobbi DD, Gomes CR, Nogueira Filsner PH de L, Moreno M, Paixão R, Pereira J de J, Micke Moreno A (2012) Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Profiles of *Pasteurella multocida* Strains Isolated from Rabbits in Brazil. *The Scientific World Journal* 2012:685028. <https://doi.org/10.1100/2012/685028>
18. Kameyama H, Fujimoto Y, Tomioka Y, Yamamoto S, SUYAMA H, Inoue H, Takahashi E, Ono E (2022) Pathogenicity of *Bordetella bronchiseptica* isolated from apparently healthy rabbits in guinea pig, rat, and mouse. *J Vet Med Sci* 84:574–581. <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0494>
19. Wang J, Sun S, Chen Y, Chen D, Sang L, Xie X (2020) Characterisation of *Bordetella bronchiseptica* isolated from rabbits in Fujian, China. *Epidemiol Infect* 148:e237. <https://doi.org/10.1017/s0950268820001879>
20. Lennox AM, Kelleher S (2009) Bacterial and Parasitic Diseases of Rabbits. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 12:519–530. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2009.06.004>
21. Cooper TK, Meyerholz DK, Beck AP, Delaney MA, Piersigilli A, Southard TL, Brayton CF (2021) Research-Relevant Conditions and Pathology of Laboratory Mice, Rats, Gerbils, Guinea Pigs, Hamsters, Naked Mole Rats, and Rabbits. *ILAR J* 62:77–132. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilab022>
22. Chow EP, Bennett RA, Dustin L (2009) Ventral Bulla Osteotomy for Treatment of Otitis Media in a Rabbit. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18:299–305. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2009.09.008>
23. Russo TP, Borrelli L, Minichino A, Fioretti A, Dipineto L (2024) Occurrence and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolated from Healthy Pet Rabbits. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 24:135–140. <https://doi.org/10.1089/vbz.2023.0066>
24. Harcourt-Brown F (2002) Chapter 16 - Infectious diseases of domestic rabbits. In: Harcourt-Brown F (ed) *Textbook of Rabbit Medicine*. Butterworth-Heinemann, Burlington, pp 361–385
25. Hermans K, Devriese LA, Haesebrouck F (2003) Rabbit staphylococcosis: difficult solutions for serious problems. *Veterinary Microbiology* 91:57–64. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00260-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00260-2)
26. Vancraeynest D, Hermans K, Martel A, Vaneechoutte M, Devriese LA, Haesebrouck F (2004) Antimicrobial resistance and resistance genes in *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Veterinary Microbiology* 101:245–251. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.03.021>
27. Wang J, Sang L, Sun S, Chen Y, Chen D, Xie X (2019) Characterisation of *Staphylococcus aureus* isolated from rabbits in Fujian, China. *Epidemiol Infect* 147:e256. <https://doi.org/10.1017/s0950268819001468>
28. Deeb BJ (2004) Chapter 17 - Respiratory Disease and Pasteurellosis. In: Quesenberry KE, Carpenter JW (eds) *Ferrets, Rabbits, and Rodents (Second Edition)*. W.B. Saunders, Saint Louis, pp 172–182
29. Elad D, Shlomovitz S, Bernstein M, Bassan J (1990) *Neisseria cuniculi* in ruminants: epidemiological aspects. *Epidemiol Infect* 105:559–563
30. Baker DG (1998) Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research. *Clinical Microbiology Reviews* 11:231–266. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.2.231>
31. Pogány Simonová M, Lauková A, Haviarová M (2010) *Pseudomonads* from rabbits and their sensitivity to antibiotics and natural antimicrobials. *Research in Veterinary Science* 88:203–207. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.07.010>

32. Rubin J, Walker RD, Blickenstaff K, Bodeis-Jones S, Zhao S (2008) Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Veterinary Microbiology* 131:164–172. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.02.018>
33. Gálfi, Péter, Csikó, György, Jerzsele, Ákos (2015) *Állatorvosi gyógyszerteran III.*, 2nd ed. Robbie-Vet Kft., Budapest
34. Giguère S (2013) Antimicrobial Drug Action and Interaction. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 1–10
35. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D (2013) *Clinical Veterinary Microbiology E-Book*. Elsevier Health Sciences
36. Register KB, DeJong KD (2006) Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Vet Microbiol* 117:201–210. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.05.003>
37. Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJ (1998) Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 36:1096–1100. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.4.1096-1100.1998>
38. Gautam R, Kumar AA, Singh VP, Singh VP, Dutta TK, Shivachandra SB (2004) Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup-A isolates by PCR assay. *Res Vet Sci* 76:179–185. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2003.10.005>
39. Ujvári B, Gantelet H, Magyar T (2022) Development of a multiplex PCR assay for the detection of key genes associated with *Pasteurella multocida* subspecies. *J VET Diagn Invest* 34:319–322. <https://doi.org/10.1177/10406387211063438>
40. Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B (2001) Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol* 39:924–929. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.924-929.2001>
41. Harper M, John M, Turni C, Edmunds M, St. Michael F, Adler B, Blackall PJ, Cox AD, Boyce JD (2015) 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.02824-14>
42. Kondo R, Imai I, Fukami K, Minami A, Hiroishi S (1999) Phylogenetic Analysis of Algicidal Bacteria (Family Flavobacteriaceae) and Selective Detection by PCR Using a Specific Primer Set. *Fish Sci* 65:. <https://doi.org/10.2331/fishsci.65.432>
43. Hozbor D, Fouque F, Guiso N (1999) Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 150:333–341. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(99\)80059-x](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(99)80059-x)
44. Hindler JA, Richter SS (2016) *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: M45*, 3rd edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
45. (2015) *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests for bacteria isolated from animals: CLSI supplement VET01S*; replaces VET01-S2, 3rd edition. Previous editions May 2004, July 2013. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Penn.
46. Shryock TR (2002) *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standard*, 2. ed. NCCLS, Wayne, Pa
47. Shryock TR (2006) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, Informational Suppl. CLSI, Wayne, PA

48. Weinstein MP (2021) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Thirty-first edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Place of publication not identified

## **8. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik lehetővé tették ennek a dolgozatnak az elkészülését. Hálával és köszönettel tartozom a témavezetőmnek, Dr. Papp Antalnak, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy részt vehessek ebben a kutatásban, melynek folyamán bármikor bizalommal fordultam hozzá, valamint nagy segítséget nyújtott a kutatás klinikai aspektusainak megvalósításában.

Szeretnék köszönetet mondani, Dr. Magyar Tibornak, a HUN-REN, Állatorvostudományi kutatóintézet igazgatójának, aki lehetővé tette, hogy az általa vezetett légzőszervi bakteriológia témacsoport segítségével elvégezhessem a kutatást.

Külön köszönet és hála illeti a témavezetőmet, Dr. Pintér Krisztinát, a Légzőszervi bakteriológia témacsoport tudományos segédmunkatársát és PhD hallgatóját, aki szakmai tudásával és fáradhatatlan munkájával hatalmas segítséget nyújtott a baktériumokkal kapcsolatos laboratóriumi eljárások elvégzésében, valamint a dolgozat megalkotása során is.

Szeretném kifejezni hálámat az Egzotikusállat- és Vadegészségügyi Tanszék és a Talpas kisállatorvosi rendelő munkatársainak, akik hozzájárultak ahhoz, hogy minél több mintával dolgozhassak.