

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

SERTÉSEKBŐL IZOLÁLT *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*
TÖRZSEK SZEROTÍPIZÁLÁSA ÉS ANTIBIOTIKUM-
ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

TDK dolgozat

Készítette: Tóth Alexandra
V. évf.

Témavezető: Dr. Sárközi Rita
PhD hallgató
SZIE-ÁOTK



Budapest

2012

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. Tartalomjegyzék.....	2
2. Bevezetés, célok.....	3
3. Irodalmi áttekintés	5
3.1 A kórokozó.....	5
3.2 Betegség, kórbonctan, kórhatározás.....	7
3.3 Szerotipizálás	9
3.4 A szerotípusok megoszlása	10
3.5 Antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok.....	11
4. Anyag és módszer	13
4.1 A vizsgálatokba bevont vágóhidak	13
4.2 Mintavétel.....	13
4.3 Baktériumizolálás, elsődleges tesztek.....	14
4.4 Az izolált törzsek szerotipizálása.....	15
4.5 Antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok.....	17
5. Eredmények	19
5.1 Szerotipizálás	19
5.2 Antibiotikum-érzékenység	24
6. Megbeszélés.....	26
7. Összegzés	28
8. Summary	29
9. Alkalmazott rövidítések jegyzéke	30
10. Irodalomjegyzék.....	31
11. Köszönetnyilvánítás	35

2. Bevezetés, célok

Napjainkban, a nyugati világban a háztáji sertéstartást részben, vagy teljesen felváltotta a nagyüzemi tartástechnológia. Gazdasági szempontból a legfontosabb az, hogy a termelés hatékony és gyors legyen. A fertőző eredetű betegségek ellen vakcinázással, ill. antibakteriális szerekkel védekeznek. Szerke a világon, így hazánkban is jelentős gazdasági problémát okoznak a különböző bakteriális légzőszervi megbetegedések. A heveny megbetegedések nagyszámú állatelhullást okoznak, míg krónikus esetben a csökkent étvágy és súlygyarapodás miatt a hízalási időszak megnyúlik, az állományban szétnövés figyelhető meg, ezáltal jelentős gazdasági kárral számolhatunk.

A légzőszervi betegségek közül világszerte ismert az *Actinobacillus pleuropneumoniae* okozta tüdő- és mellhártya-gyulladás. A kórokozó iránt kizárólag a sertés fogékony, főként 12-16 hetes korban okoz heveny lefolyású megbetegedést. Az aerogén úton bekerült kórokozó a tüdőben savós-vérzéses, majd vérzéses-elhalásos tüdőgyulladást és fibrines mellhártyagyulladást idéz elő. Fakultatív patogén baktériumról lévén szó, a hajlamosító tényezőknek igen nagy szerepe van a jellegzetes betegség kialakulásában. Az *A. pleuropneumoniae* okozta pleuropneumonia súlyos problémát jelent világszerte a sertéstenyésztésben (Gutiérrez-Martín és mtsai, 2006).

Ezen baktériumfajnak két biotípusát, ezen belül pedig 15 szerotípusát különböztetjük meg. Egy 1992-es felmérés alapján hazánkban az 1-es biotípus fordul elő 90-95%-ban, ennek is az 1-es és a 2-es szerotípusa, de alkalmanként előfordulnak a 3-as, 7-es, 9-es és a 11-es szerotípusok is.

A törzsek négyféle toxint termelnek (Apx I-II-III-IV), melyek haemolitikus és toxikus hatású fehérjék, így jelentős szerepük van a tüdőben kialakuló vérzések és necrosisok kialakításában, ezért virulenciafaktoroknak tekinthetők. Manapság ezeket a toxinokat vakcina készítésére is használják.

A felszabaduló citotoxinok pedig tönkreteszik a tüdő alveolaris macrophagjait és lymphoidsejtjeit, amelyek súlyosbítják a kórképet (Varga és mtsai, 2007).

A heveny lefolyás miatt a betegség mihamarabbi felismerését követően egyedileg, parenterálisan adott antibiotikumokkal kezelhető. Erre leggyakrabban β -laktám, cefalosporin, fluorokinolon, pleuromutilin és tetraciklin antibiotikumokat használnak. Nagyon fontos emellett a hajlamosító tényezők kiiktatása. A vélemények megoszlanak abban a tekintetben, hogy mekkora az *A. pleuropneumoniae* jelentősége jelen évtizedben (Bornhorn, 2008).

Vizsgálataink során a következő célokat tűztük ki magunk elé:

- vágóhidakról származó, elváltozást mutató sertéstüdőkből *A. pleuropneumoniae* törzsek izolálása,
- az izolált törzsek szerotipizálása,
- a különböző állományokból származó *A. pleuropneumoniae* törzsek antibiotikum-érzékenységének meghatározása két eljárást alkalmazva.

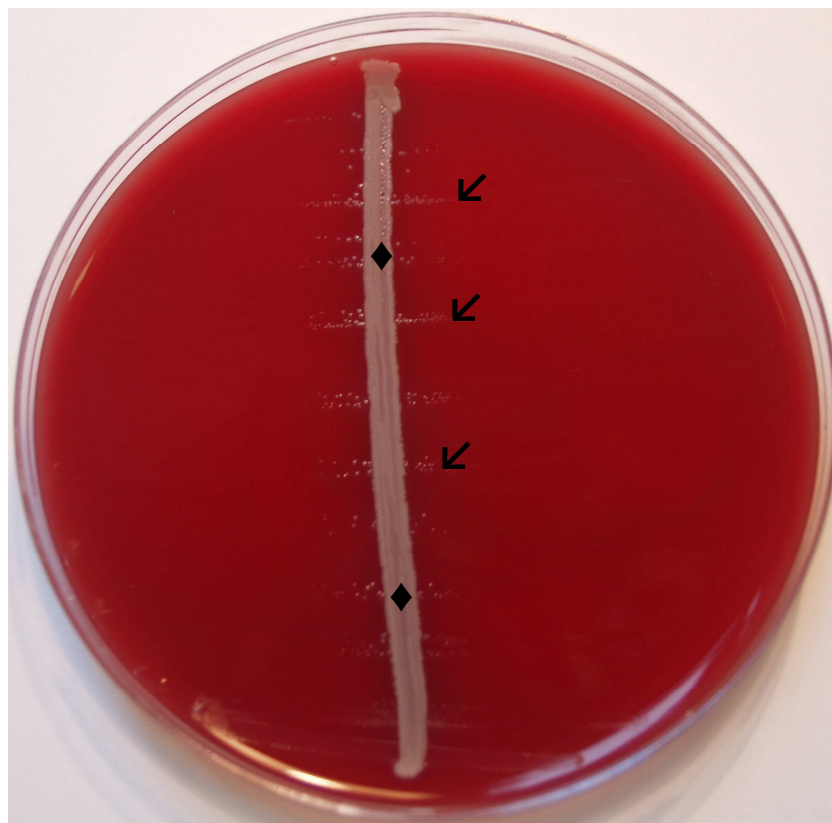
3. Irodalmi áttekintés

3.1. A kórokozó

Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* a Pasteurellaceae családba tartozó csilló nélküli, Gram-negatív kokkoid, rövid pálcika, vékony, poliszacharid burokkal rendelkező igényes, fakultatív anaerob baktérium (Marsteller és Fenwick, 1999). Fakultatív patogén kórokozó, amely iránt csak a sertés fogékony és különösen a 12-16 hetes malacokban okoz súlyos megbetegedést (Marsteller és Fenwick, 1999). A baktérium izolálható az orrüregből, a tonsillákból, a felső légutak nyálkahártyájáról és a fertőzött állat tüdejéből is (Bossé és mtsai, 2002). Újabb kutatások szerint szájból vett mintából is ki lehet mutatni az *A. pleuropneumoniae* egyes szerotípusait (Costa és mtsai, 2012). A kórokozó a heveny megbetegedést átvészoló állatokban a tonsilla cryptaiban képes túlélni, ennek köszönhetően a fertőzött sertés élete végéig hordozza és üríti a kórokozót. Fakultatív patogén kórokozóról lévén szó, a hajlamosító tényezőknek jelentős szerepe van a betegség kialakulásában.

1963-ban Shope izolálta először a baktériumot az Amerikai Egyesült Államokban, és a *Haemophilus pleuropneumoniae* nevet kapta. Az 1983-ban elvégzett DNS vizsgálatokat követően az *Actinobacillus* nemzetségbe sorolták át, és *Actinobacillus pleuropneumoniae*-nek nevezték el (Molnár, 1990).

Tenyésztése csokoládé vagy véres agaron történhet, amely utóbbin a virulens törzsek β -haemolízist okoznak (Marsteller és Fenwick, 1999). *Staphylococcus aureus* jelenlétében pozitív Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) teszt látható (Bossé és mtsai, 2002). A legtöbb *A. pleuropneumoniae* törzs ureáz pozitív, de 1993-ban már írtak le ureáz negatív törzseket is. Izolálásukhoz célszerű szelektív táptalajt vagy *Staphylococcus aureus*-sal beoltott dajkatenyészetet alkalmazni (1. ábra).



1.ábra: *Staphylococcus aureus*sal beoltott *A. pleuropneumoniae* dajkatenyészet

↙: *Actinobacillus pleuropneumoniae* telepek

◆: *Staphylococcus aureus* beoltás

Két biotípust különböztetünk meg a baktériumtörzs NAD (nikotinamid-adenin-dinukleotid; V-faktor) igényének megfelelően: 1-es biotípusba tartoznak azok a törzsek, amelyek NAD-ot igényelnek növekedésükhöz, 2-es biotípusba pedig a (korábban *Pasteurella haemolytica*-szerű törzseknek nevezett) NAD-ot nem igénylő *A. pleuropneumoniae* törzsek (Fodor, 1989a). Eddigi ismereteink szerint 15 szerotípust különböztetünk meg, ebből 13 tartozik az 1-es biotípusba (1,2,3,4,5a,5b,6,7,8,9,10,11,12), kettő pedig a 2-es biotípusba (1,2) (Mouser, 2007).

A baktérium körülbelül 1 mm átmérőjű, szürkésfehér, éles szélű, domború és sima felszínű telepeket képez (Fodor, 1989a).

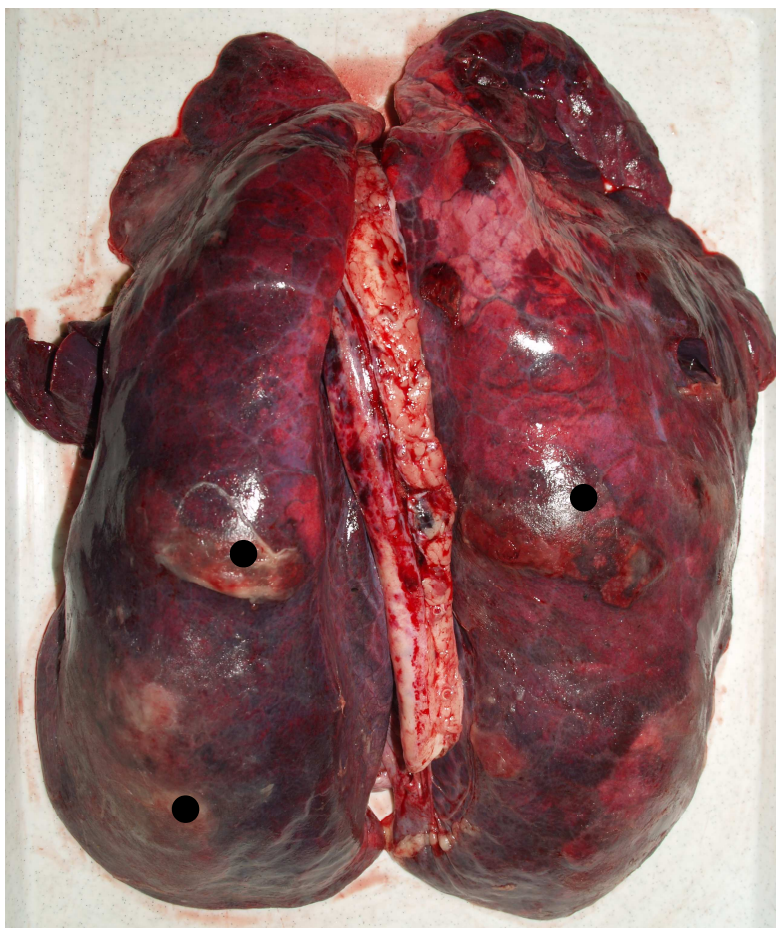
3.2. Betegség, kórbonctan, kórhatározás

A fertőződés aerogén úton történik, de a megbetegedéshez hajlamosító tényezők szükségesek, így a zárt tartástechnológia, zsúfoltság, rossz szellőzés, tartási és takarmányozási hiányosságok mind közrejátszhatnak a betegség megeredésében. A betegség lehet túlheveny, heveny, félheveny és idült. A betegség lefolyása az állat immunstátusza, a szerotípus, és a baktériumszám függvénye, bár egy vizsgálat szerint leginkább ez utóbbi számít (Sebunya és mtsai, 1983). Túlheveny esetben a leggyakoribb a 4-12 órán belüli elhullás, míg heveny lefolyás esetén magas láz, súlyos nehézlégzés, cyanosis, köhögés, ataxia, diarrhoea és anorexia jelei láthatóak. Ezek az állatok néhány nappal a klinikai tünetek megjelenését követően elpusztulnak. A betegséget átvészelt állatok baktériumhordozókká válhatnak, ezeket nagyon nehéz észrevenni, ugyanis a krónikus hordozók nem mutatnak nyilvánvaló klinikai tüneteket: csökkent étvágy, csökkent súlygyarapodás, kisebb mozgásigény figyelhető meg (Bossé és mtsai, 2002; Mouser, 2007; Yoshimura és mtsai, 2002).

Az *A. pleuropneumoniae* törzsek megbetegítő képessége virulencia faktorokra vezethető vissza. A virulencia faktorok közé tartoznak az *A. pleuropneumoniae* által termelt exotoxinok (Apx I-II-III-IV), lipopoliszacharidok (LPS), adhaesios faktorok, membránproteinek és a burokantigének (Sthitmatee és mtsai, 2003; Chiers és mtsai, 2010).

A baktérium gyorsan szaporodik az érzékeny és fertőzött állatban. Először a tonsilla cryptainak epitheliális sejtjein, majd az alsó légutakba is bejut, ahol citotoxinokat termel és LPS tartalmú membránrészecskék szabadulnak fel a baktériumsejt szétesése során, amelyek külön is sejtkárosító hatással bírnak (Chiers és mtsai, 2010). Az érkező neutrophil granulocyták gyulladásos választ alakítanak ki, miközben megpróbálják leküzdeni a baktérium antigénjeit. A megsemmisülő neutrophil granulocytákkal lizozimek kerülnek ki ezekre a területekre, amelyek további szövetkárosodást idéznek elő. Az LPS és a citotoxinok nemcsak segítenek a baktériumnak a sejtek károsításában, hanem megvédik őket a komplement rendszerrel szemben és a phagocytosistól is (Mouser, 2007).

Kórbonctani vizsgálatkor egy- vagy kétoldali csúcslebenyben és rekeszi lebenyben, a tompaszél mentén sötétvörös vagy feketevörös, tömött tapintatú gyulladásos gócok észlelhetők, amelyeket általában fibrinréteg borít **(2. ábra)**. Az elváltozások előfordulhatnak lokálisan vagy multifokálisan az egész tüdőre kiterjedve **(3. ábra)**. A tüdő a fibrinkiválás miatt a mellkas falához tapadhat, és fibrines mellhártyagyulladás alakul ki (Fodor és mtsai, 1989a). A légcsőben és a tüdőben habos, véres exsudatum látható (Fodor és mtsai, 1989a; Mouser, 2007). A nyirokcsomók megnagyobbodtak és bővérűek.



2. ábra: *A.pleuropneumoniae* okozta vérzéses-elhalásos tüdőgyulladás, tömött tapintatú gyulladós gócok, fibrinréteggel borítva (●).



3. ábra: Lokálisan helyeződő *A. pleuropneumoniae* okozta vérzéses tüdőgyulladás

Kórszövettani vizsgálat esetén erősen megszélesbedett interlobularis söveteket láthatunk, amelyek kötőszövettel átszöttek. Az interstitium véreire körül is kifejezett savós beszűrődés látható, az erekben pedig thrombus, illetve embolusképződés figyelhető meg. Az alveolusokban vérzések, oedema, gyakran gyulladásos sejtek tűnnek fel (Fodor és mtsai, 1989a; Varga és mtsai, 2007). A tüdőben vérzések, necrotikus területek, neutrophil infiltráció és macrophagok, valamint fibrines exsudatum látható (Marsteller és Fenwick, 1999).

A kóroktani diagnózis felállításához ki kell tenyészteni a kórokozót és meghatározni a szerotípusát.

3.3. Szerotipizálás

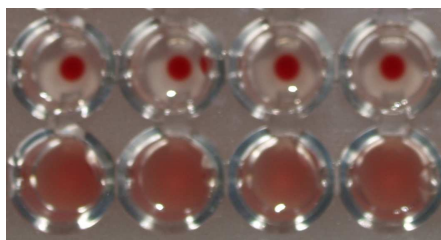
A szerotipizálási vizsgálatok a felületi burokantigének elkülönítése alapján történik. Összesen 15 szerotípust különböztetünk meg. A burokantigén virulencia-faktornak számít, de a virulencia és a klinikai tünetek *A. pleuropneumoniae* törzsenként is változhatnak (Marsteller és Fenwick, 1999). Virulencia szempontjából a következőképpen lehet csoportosítani az 1-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* szerotípusokat:

- legvirulensebb: 1
- közepesen virulens: 2, 5, 9, 10, 11
- legkevésbé virulens: 3, 6, 7, 12 szerotípusok (Marsteller és Fenwick, 1999).

A szerotipizálási próbák elbírálása nehézkessé válhat, mert az *A. pleuropneumoniae* törzsek között keresztreakciók jöhetnek létre. Ha az egyébként egyedi szerkezetű sejtfalantigének (O-antigén) túlságosan hasonlítanak egymásra két szerotípus között, akkor tapasztalhatunk immunológiai keresztreakciókat (Tuboly és mtsai, 1999). Ezeket már több szerotípus között felfedezték, így a 1-9-11, a 3-6-8 és a 4-7 szerotípusok között (Marsteller és Fenwick, 1999).

A szerotipizáláshoz szükséges immunológiai vizsgálatokra többféle módszer ismeretes: tárgylemez-agglutináció, gyűrűprecipitáció, immunodiffúzió, komplementkötési próba, immunoelektroforézis és indirekt haemagglutináció (Mittal és mtsai, 1983; Kucerova és mtsai, 2005; Nielsen, 1986b; Perry és mtsai, 2011). Napjainkban egyre elterjedtebbé váltak az ELISA, illetve a PCR vizsgálatok (Broes és mtsai, 2007; Sthitmatee és mtsai, 2003; Klausen és mtsai, 2002; Perry és mtsai, 2011).

Az indirekt haemagglutinációs próba (IHA) lényege, hogy az oldott antigéneket sejtfelülethez (pl. vörösvértest) adszorbeáljuk, így láthatóvá válik az agglutináció. Ilyenkor a vörösvértestekhez kötött antigének kapcsolódnak az ellenanyaghoz, ami összezsugorodást eredményez. Negatív eredmény esetén a vörösvértestek leülepednek, és éles határral jelzett területen gyűlnek össze (Nielsen, 1986a) (**4. ábra**).



4. ábra: Szerotipizálás kiértékelése, felső sor negatív, alsó sor pozitív eredménnyel

Több korábbi vizsgálatban is nyulak által termelt ellenanyaggal dolgoztak (Mittal és mtsai, 1983; Nielsen, 1986a; Nielsen, 1986b; Nielsen és mtsai, 1997; Kucerova és mtsai, 2005; Dom és mtsai, 1994; Fodor és mtsai, 1989a; Fodor és mtsai, 1989b, Yang és mtsai, 2011; Aarestrup és mtsai, 1999).

3.4. A szerotípusok megoszlása

A szakirodalmakból összegyűjtött szerológiai vizsgálatok alapján kiderült, hogy az *A. pleuropneumoniae* szerotípusok rendkívüli módon megoszlanak a világban. Belgiumban a leggyakoribb szerotípusok a 2, 3, 5b, 8 és 10 (Chiers és mtsai, 2002), amely azért érdekes, mert egy szintén belga, de 10 évvel korábbi vizsgálatban, még elég gyakorinak számított a 9-es szerotípus is (Dom és mtsai, 1994). Dániában a 2-es szerotípus tűnt a leggyakoribbnak, továbbá ezen országban készült publikáció az 5a és 5b szerotípusok megkülönböztetéséről, valamint foglalkoztak a 2-es biotípusba tartozó *A. pleuropneumoniae* törzsekkel is (Nielsen 1986b; Nielsen és mtsai, 1997). Csehországban ezzel szemben a 9-es szerotípus a leggyakoribb (46,5%), ezt követi a 2-es és a 11-es (Kucerova és mtsai, 2005). Míg Spanyolországban a 2-es, 4-es és 7-es szerotípusok okoznak megbetegedéseket (Gutiérrez-Martín és mtsai, 2006). Európában a 2-es és a 9-es szerotípusok dominálnak, tehát 1-es szerotípus ezen publikációk alapján nem is volt detektálható. Ezzel szemben az USA-ban az 1-es, az 5-ös és a 7-es szerotípusok fordulnak elő gyakrabban (Marsteller és Fenwick, 1999), míg a világ másik oldalán Tajvanon is az 1-es szerotípus fordul elő döntő többségben (Yang és mtsai, 2011).

Magyarországon az 1990-es években történt vizsgálatok azt mutatták, hogy a 2-es, a 8-as, a 10-es és a 11-es szerotípusok a gyakoribbak (Molnár, 1990). Ezen kívül hazánkban sikerült elsőként szerotipizálni a 2-es biotípusba tartozó két szerotípust (Fodor és mtsai, 1989b). Egy 1992-es kutatás szerint azonban a leggyakoribb szerotípusnak az 2-es mutatkozott hazánkban (70,2%), majd ezt követte a 1-es (12%), és előfordult még 3-as, 7-es, 9-es és 11-es szerotípusok (Varga és mtsai, 2007).

3.5. Antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok

A betegség gyógykezelésére különféle antibiotikumokat alkalmaznak. Ezeket célszerű injekciós formában adni az állatoknak, ugyanis egy súlyosan beteg, lesoványodott, lázas sertés valószínűleg nem tud elegendő gyógyszert a takarmánnyal vagy a vízzel magához venni (Mouser, 2007; Yang és mtsai, 2011). Az *A. pleuropneumoniae* a Pasteurellaceae családba tartozó többi baktériumfajhoz hasonlóan különböző mértékben rezisztens egyes antibiotikumokra. Ezt többen is vizsgálták más-más országban (Nedbalcova és mtsai, 2005; Yoshimura és mtsai, 2002; Kucerova és mtsai, 2011; Dom és mtsai, 1994).

Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokra két alapvető módszert használnak: a gyakorlati szempontból érdekes és gyors eredményt adó korongdiffúziós eljárás, illetve a pontosabb vizsgálat, az úgynevezett minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása. Több tanulmány is foglalkozik ezzel a kérdéssel, ugyanis a rezisztencia kialakulása miatt sok esetben nem hatásos a kezelés (Nedbalcova és mtsai, 2005; Yang és mtsai, 2011).

Az *A. pleuropneumoniae* okozta pleuropneumonia kezelésére többféle antibiotikumot használnak: penicillineket, cephalosporinokat, kinolonokat, tetraciklineket, makrolidokat, aminoglikozidokat, szulfonamidokat, pleuromutilineket, stb. Az izolált *A. pleuropneumoniae* törzsek a világ legnagyobb részén a tetraciklinekre mutatnak rezisztenciát (Nedbalcova és mtsai, 2005; Yoshimura és mtsai, 2002; Kucerova és mtsai, 2011; Yang és mtsai, 2011).

Az egyik, hazánkban is alkalmazott antibiotikumra, a tiamulinra, az izolált törzsek 72,7%-a mutatott rezisztenciát az alábbi tanulmányban. Érdekesség továbbá ugyanebben az értekezésben, hogy a tetraciklinekre vizsgált rezisztencia mértéke évről-évre nőtt: 2001-11%; 2002-36,4%; 2003-81,8% (Nedbalcova és mtsai, 2005).

Több kutató állítja, hogy nincs kapcsolat az antibiotikum-érzékenység és a szerotípusok között, de néhányan véltek felfedezni némi egyezést az antibiotikum-rezisztencia és néhány *A. pleuropneumoniae* szerotípus között (Yoshimura és mtsai, 2002).

Egy 2010-es tajvani tanulmányban a korongdiffúziós vizsgálat során összesen 10 antibiotikumot vizsgáltak (amoxicillin, ampicillin, ceftiofur, cephalotin, chloramphenikol, doxyciklin, gentamicin, lincospectin, nitrofurantoinm oxitetraciklin). A korongdiffúziós vizsgálat eredményeként a ceftiofurra mutatott érzékenység 100%-os, míg az oxitetraciklinre mutatott érzékenység 47,4%-os lett. Ezek után végezték el a MIC vizsgálatokat mikrotiter lemezeken. A tanulmány írója szerint komoly problémát jelent, hogy ezzel szemben az oxitetraciklint országában prevencióra használják, pedig a nagymértékű rezisztencia miatt nem szabadna (Yang és mtsai, 2011).

Egy dán értekezés szerint a korongdiffúzióval mért gátlási zónák alapján rezisztensnek bizonyultak a vizsgált *A. pleuropneumoniae* törzsek a penicillin, az enrofloxacin és a ceftiofur antibiotikumokra is. A MIC vizsgálatok eredményei korreláltak a korongdiffúzióval elvégzett tesztekkel (Aarestrup és mtsai, 1999).

Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy hazánkban is fontos hasonló vizsgálatok elvégzése, hogy a már fellépett rezisztenciát megállapítva sikerüljön a gyógykezelést hatékonyabbá tenni.

4. Anyag és módszer

4.1. A vizsgálatokba bevont vágóhidak

Vizsgálatainkhoz mintát Magyarország két legnagyobb vágóhídjáról gyűjtöttünk. A Szegeden található Pick Zrt., valamint a Kiskunfélegyházán lévő Hungary-Meat Kft. vágóhídjára az ország különböző megyéiből szállítanak vágósertést. A megvizsgált mintáink 10 megyéből származtak.

4.2. Mintavétel

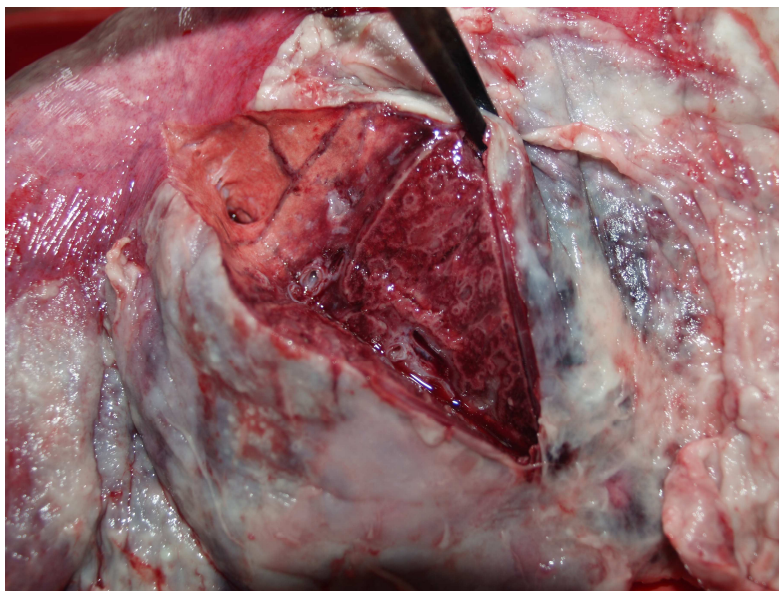
A mintavétel a vágóhidakon a tulajdonos, illetve a hatósági állatorvos engedélyével történt. A makroszkopikus elváltozást, vérzéses-elhalásos gyulladást, fibrines mellhártya-gyulladást mutató tüdőket vágóhídi sorszámmal ellátva hűtőládákba helyeztük **(5. ábra)**, és a Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékének laboratóriumába szállítottuk. Az azonnal fel nem dolgozott tüdőket $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.



5. ábra: Vágóhídi mintavétel, egy kórtani elváltozást mutató sertéstüdő a vágósoron

4.3. Baktériumizolálás, elsődleges tesztek

Harminc kórbonctani elváltozást mutató tüdőt vizsgáltunk meg. Az elváltozást mutató területet felforrósított szikével leégettük, majd steril szikepengével felnyitottuk **(6. ábra)** és steril oltókaccsal kis mennyiségű mintát vettünk.



6. ábra: Lokálisan helyeződő *A. pleuropneumoniae* okozta gyulladásos góc metszéslapja, a mintavétel helye

A mintát tripszin-szója agar (TSA) alapú, 10% juhvért tartalmazó véres agarra oltottuk. A lehetséges NAD-függőség miatt a szélesztést követően *Staphylococcus aureus*-szal történő áthúzással dajkatenyészetet készítettünk. A leoltás után a táptalajokat aerob körülmények között 24 óráig 5% CO₂ jelenlétében 37°C-os termosztátban inkubáltuk. Az esetek nagy részében a primer tenyészet kizárólag NAD-dependens, β -hemolízist okozó különböző méretű szürkésfehér telepekből állt, amelyek közül egy-egy telepet többször egymás után 1% szűrt NAD-ot tartalmazó TSA csokoládé agarra oltottunk tovább és ezzel szintenyészetet hoztuk létre.

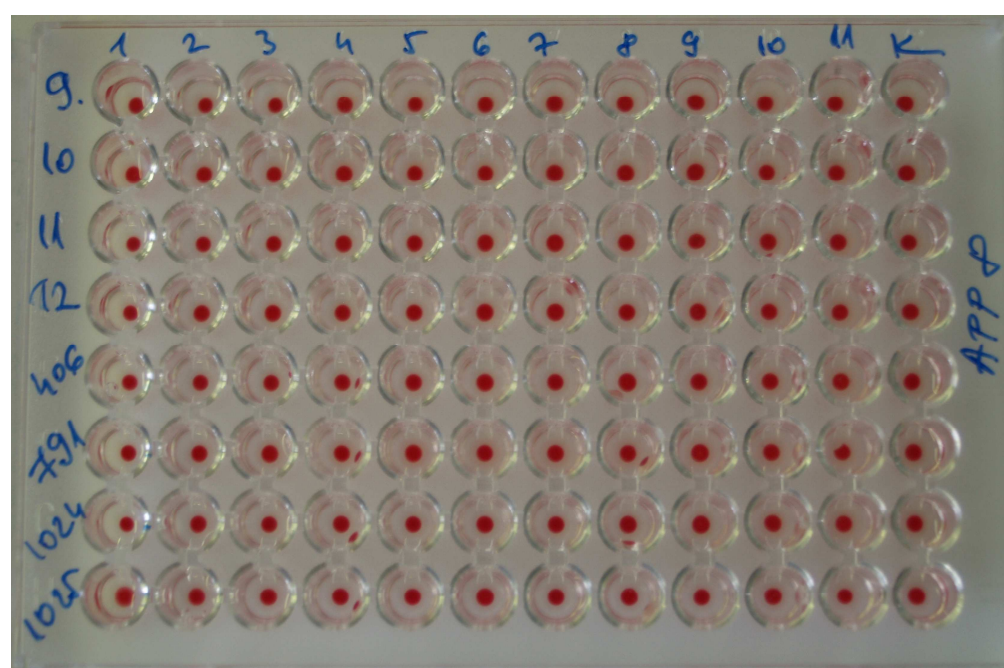
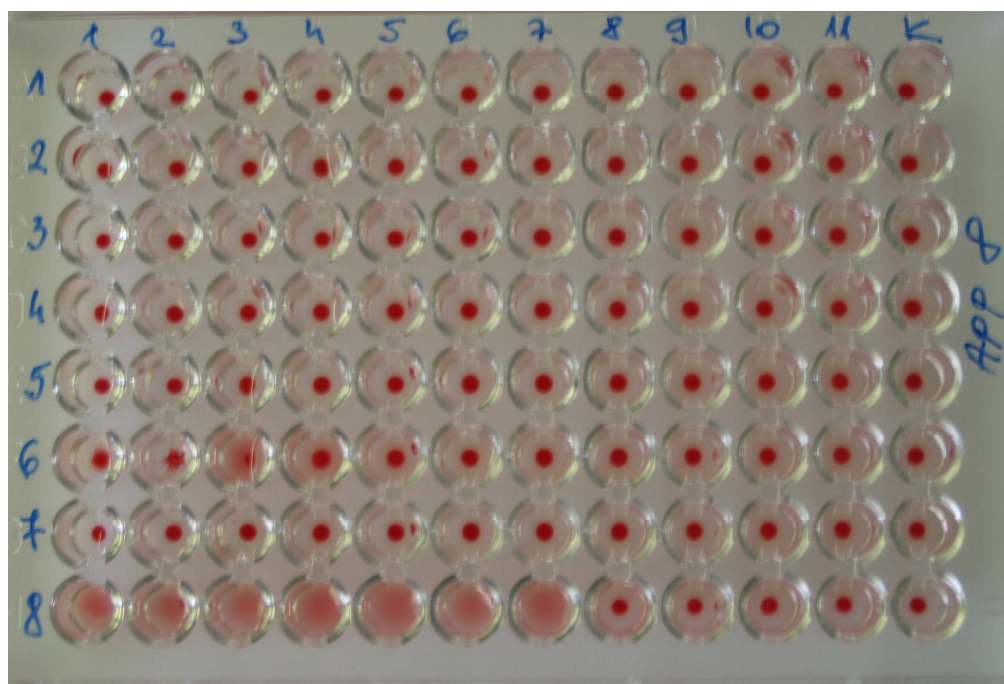
Megvizsgáltuk a NAD-dependens izolátumok elsődleges morfológiai, tenyésztési és biokémiai tulajdonságait, és ezek eredménye alapján valamennyi izolátumot *Actinobacillus pleuropneumoniae* 1-es biotípusként határoztunk meg, amelyeket további felhasználásukig 25% steril glicerint tartalmazó táplevesbe szuszpendálva mélyhűtőben (–80°C-on) tároltunk. Az elsődleges morfológiai, tenyésztési és biokémiai tulajdonságokat a standard leírásoknak megfelelően végeztük el (Barrow és Feltham, 2003).

4.4. Az izolált törzsek szerotipizálása

A vizsgálataink során a harminc sertéstüdőből izolált *A. pleuropneumoniae* törzset indirekt haemagglutinációval szerotipizáltuk. A szerotipizálási vizsgálatokhoz házinyulakban termeltetett hiperimmunsavót használtunk. A szerotipizálási vizsgálatokat 96 lyukú U-alakú mikrotitráló lemezekben végeztük. Az antigént, ez esetben az izolált baktériumot 5 ml fiziológiás sóoldatba szuszpendálva 56°C-os vízfürdőben 60 percig inkubáltuk. Ezután 50 µl mosott juh vörösvértest-szuszpenziót adtunk hozzá és 60 percre 37°C-os vízfürdőbe helyeztük. A vörösvértesteket a felhasználás előtt háromszor mostuk fiziológiás sóoldattal. A vörösvértestekre adszorbeált antigént a 60 perces vízfürdő után háromszor 15 percig centrifugáltuk és a felülúszót elöntve fiziológiás sóoldattal mostuk. Végül az érzékenyített vörösvértesteket 10 ml fiziológiás sóoldatban szuszpendáltuk.

A lemez minden mélyedésébe mértünk 50 µl fiziológiás sóoldatot, majd a típustörzsekkel szemben termelt savókból 50-50 µl-t adtunk az első oszlopokba, amelyet felező hígítással (log 2 alapú hígítási sor) hígítottunk. Ezt követően tettük bele a 96 mikrocsőbe az 50 µl antigént, azaz az izolált baktériumot. Az utolsó sort kontrollként használtuk, abba nem tettünk savót, csak antigént.

A lemezeket 2 órán át szobahőmérsékleten tároltuk, majd 24 órára hűtőbe (+4°C) tettük, és csak 24 óra elteltével bíraltuk el **(7. és 8. ábra)**.



7. és 8. ábra: A szerotipizálás 96 lyukú U-alakú mikrotitráló lemezekon történt, a képeken egy 8-as szerotípusú *A. pleuropneumoniae* szerotipizálási vizsgálatának eredménye látható

4.5. Antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok

Az *A. pleuropneumoniae* egy igényes baktérium, ezért a gátlókoncentráció vizsgálatához egy speciális, az NCCLS által javasolt tápfolyadékot készítettünk. A veterinary fastidious medium (VFM) alapja a Müller-Hinton táptalaj, amit élesztőkivonattal, CaCl_2 -dal, MgCl_2 -dal valamint szűrt NAD-dal egészítettünk ki. A baktériumtenyészetekből 4-4 ml VFM tápfolyadékban 0,5 MacFarland sűrűségű szuszpenziót készítettünk.

A MIC vizsgálatot is 96 lyukú mikrotitráló lemezen végeztük. A mélyedésekbe 100 μl fiziológiás sóoldatot és 100 μl munkaoldatot mértünk, amelyből log 2 alapú hígítási sort készítettünk.

A MIC antibiotikum-érzékenységi vizsgálatához az antibiotikumokat úgy oldottuk fel, hogy a törzsoldatunk 12,8 mg/ml legyen. Ebből készítettük a munkaoldatokat, amelybe a törzsoldatból annyit mértünk, hogy az antibiotikumonként kiszámolt hígítási sort érjük el. Az alkalmazott antibiotikumok vizsgált log 2 alapú hígítási sorai az **1. táblázat**ban láthatók.

$\mu\text{g/ml}$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CTF	1	0,5	0,25	0,125	0,66	0,03	0,015	0,008	0,004	0,002	0,001
ERFX	1	0,5	0,25	0,125	0,66	0,03	0,015	0,008	0,004	0,002	0,001
PEN	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,66	0,03	0,015	0,008
OTC	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,66	0,03	0,015
TAM	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125

1. táblázat: A vizsgálatunk során alkalmazott antibiotikumok hígítási sora

Az általunk kiválasztott húsz *A. pleuropneumoniae* törzs antibiotikum-érzékenységét (MIC-érték) öt különböző antibiotikum esetén vizsgáltuk meg. A vizsgálatokat leves-hígításos módszerrel az NCCLS standard protokollnak (M31-A2) megfelelően végeztük.

A MIC vizsgálatokra vonatkozó határértékeket a **2. táblázat**ban foglaltuk össze az NCCLS M31-A2 alapján:

Antibiotikumok	Érzékeny	Mérsékelten érzékeny	Rezisztens
CTF	$\leq 0,002 \mu\text{g/ml}$	0,015-0,004 $\mu\text{g/ml}$	$\geq 0,03 \mu\text{g/ml}$
ERFX	$\leq 0,008 \mu\text{g/ml}$	0,06-0,015 $\mu\text{g/ml}$	$\geq 0,125 \mu\text{g/ml}$
OTC	$\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$	2-0,25 $\mu\text{g/ml}$	$\geq 4 \mu\text{g/ml}$
PEN	$\leq 0,06 \mu\text{g/ml}$	1-0,12 $\mu\text{g/ml}$	$\geq 2 \mu\text{g/ml}$
TAM	$\leq 4 \mu\text{g/ml}$	8-32 $\mu\text{g/ml}$	$\geq 64 \mu\text{g/ml}$

2. táblázat: A MIC vizsgálatokra vonatkozó határértékek (NCCLS M31-A2)

Az elkészített baktérium-szuszpenzióból 100 µl-t mértünk a mikrotitráló lemez minden vályulatába, kivéve az utolsó sorba, amelyet kontrollként használtunk. Ebbe a tisztán elkészített Müller-Hinton levesből mértünk 100-100 µl-t. Az eltérő antibiotikum-tartalmú levestáptalajokban történő baktérium-szaporodást szabad szemmel, 24 órás, 37°C-on történő inkubációt követően bíráltuk el.

Az antibiotikum-érzékenységet korongdiffúziós módszerrel is vizsgáltuk, amely során baktérium-szuszpenziót készítettünk színtenyészetből és 1% NAD tartalmú TSA alapú csokoládéagarra szélesztettük, majd erre helyeztük rá az adott koncentrációjú antibiotikummal átitatott korongokat. A Petri-csészéket 24 óráig 37°C-on inkubáltuk, majd ezután bíráltuk el. Az elbírálás a gátlási zóna mérésével történt.

A korongdiffúziós vizsgálat gátlási zónájának határértékeit a NCCLS M31-A2 részéből gyűjtöttük össze. A határértékeket a **3. táblázat**ban foglaltuk össze:

Antibiotikum	Rezisztens	Mérsékelten rezisztens	Érzékeny
CFT	≤ 33 mm	34-42 mm	≥ 43 mm
ERFX	≤ 30 mm	31-38 mm	≥ 39 mm
OTC	≤ 22 mm	23-30 mm	≥ 31 mm
PEN	≤ 28 mm	29-36 mm	≥ 37 mm
TAM	≤ 11 mm	12-19 mm	≥ 20 mm

3. táblázat: A korongdiffúziós vizsgálat gátlási zónáinak határértékei

5. Eredmények

5.1. Szerotipizálás

Vizsgálataink során gyűjtött minták a következő 10 megyéből származtak: Baranya megye, Békés megye, Fejér megye, Hajdú-Bihar megye, Jász-Nagykun-Szolnok megye, Komárom-Esztergom megye, Győr-Moson-Sopron megye, Somogy megye, Tolna megye és Veszprém megye (9. ábra).



9. ábra: Magyarország megyéi, mintáink a világos barnával színezett megyékből származtak

A kiszállítás során a vágóhidakról gyűjtött harminc kórtani elváltozásokat mutató tüdő mindegyikéből izoláltunk *A. pleuropneumoniae*t. Az izolált törzseket szerotipizáltuk. Eredményeinket a **4. táblázat**ban foglaltuk össze:

	Szám	Faj	Szerotípus	Telep/Szállító	Származás	Származási megye	Dátum
1.	8/12	App	9		Barcs	Somogy	2012. 05. 28.
2.	196/12	App	2	Fiorács Kft.	Küngös	Veszprém	2012. 05. 28.
3.	246/12	App	2	Fiorács Kft.	Gyömöre	Győr-Moson-Sopron	2012. 05. 28.
4.	249/12	App	2	Fiorács Kft.	Mocsa	Komárom-Esztergom	2012. 05. 28.
5.	262/12	App	2	Fiorács Kft.	Rábaszentandrás	Győr-Moson-Sopron	2012. 07. 02.
6.	263/12	App	2	Fiorács Kft.	Küngös	Veszprém	2012. 07. 02.
7.	270/12	App	Ø	Bóly Mg. Zrt	Komárom	Komárom-Esztergom	2012. 07. 02.
8.	272/12	App	Ø	Fiorács Kft.	Csém	Komárom-Esztergom	2012. 07. 02.
9.	276/12	App	2	Bóly Mg. Zrt	Beremend	Baranya	2012. 07. 02.
10.	286/12	App	Ø	Olmos és Tóth Kft.	Elek	Békés	2012. 07. 31.
11.	287/12	App	12	Bóly Mg. Zrt	Komárom	Komárom-Esztergom	2012. 07. 31.
12.	309/12	App	2	Numero 2	Felsőcikola	Fejér	2012. 08. 30.
13.	316/12	App	2	Numero 2	Felsőcikola	Fejér	2012. 08. 30.
14.	322/12	App	2	Alföld	Nagyhegyes	Hajdú-Bihar	2012. 08. 30.
15.	323/12	App	8	Alföld	Nagyhegyes	Hajdú-Bihar	2012. 08. 30.
16.	327/12	App	9	SM Hús	Marcaltó	Veszprém	2012. 08. 30.
17.	329/12	App	2	SM Hús	Marcaltó	Veszprém	2012. 08. 30.
18.	335/12	App	2	SM Hús	Magyarkeszi	Tolna	2012. 08. 30.
19.	346/12	App	2	Tiszántúli	Tiszatenyő	Jász-Nagykun-Szolnok	2012. 08. 30.
20.	350/12	App	8	Alföld	Nagyhegyes	Hajdú-Bihar	2012. 08. 30.
21.	317/12	App	2	Numero 2	Felsőcikola	Fejér	2012. 08. 30.
22.	324/12	App	2	Alföld	Nagyhegyes	Hajdú-Bihar	2012. 08. 30.
23.	325/12	App	2	Alföld	Nagyhegyes	Hajdú-Bihar	2012. 08. 30.
24.	328/12	App	9	SM Hús	Marcaltó	Veszprém	2012. 08. 30.
25.	330/12	App	8	Alföld	Nagyhegyes	Hajdú-Bihar	2012. 08. 30.
26.	331/12	App	2	Alföld	Nagyhegyes	Hajdú-Bihar	2012. 08. 30.
27.	332/12	App	2	Alföld	Nagyhegyes	Hajdú-Bihar	2012. 08. 30.
28.	347/12	App	2	Tiszántúli	Tiszatenyő	Jász-Nagykun-Szolnok	2012. 08. 30.
29.	348/12	App	2	Tiszántúli	Tiszatenyő	Jász-Nagykun-Szolnok	2012. 08. 30.
30.	349/12	App	2	Tiszántúli	Tiszatenyő	Jász-Nagykun-Szolnok	2012. 08. 30.

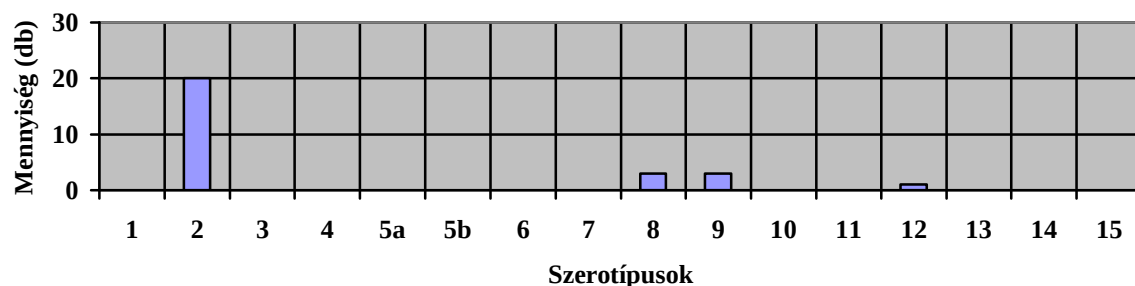
**4. táblázat: Az izolált
A. pleuropneumoniae
törzsek, szerotipizálás
eredménye
(Jelmagyarázat:
„Ø”= nem lehetett
szerotipizálni, a fehér
háttérrel jelzett
törzsek antibiotikum-
érzékenységi
vizsgálatát végeztük
el)**

Szerotípusok	Izolált mennyiség
1	-
2	20
3	-
4	-
5a	-
5b	-
6	-
7	-
8	3
9	3
10	-
11	-
12	1
13	-
14	-
15	-
Ø	3
Összesen	30

5. táblázat: Az általunk izolált *A. pleuropneumoniae* törzsek szerotipizálásának összefoglaló táblázata (Jelmagyarázat: „Ø”=nem tipizálható törzsek; „-”=nem fordult elő)

A 5. táblázatban látható, hogy a leggyakoribb szerotípusok a 2-es, a 8-as, a 9-es voltak, és egy esetben talákoztunk 12-es szerotípussal. Vizsgálataink során 3 törzset nem lehetett szerotipizálni. 2-es szerotípust 20 esetben detektáltunk, 8-as szerotípust 3 esetben, 9-es szerotípust szintén 3 esetben, míg 12-es szerotípust 1 esetben mutattunk ki. Az alábbi diagramon (10. ábra) szemléletesebben láthatóak eredményeink.

Kórtani mintákból izolált APP törzsek szerotipizálása



10. ábra: Kórtani mintákból izolált APP (*A. pleuropneumoniae*) törzsek szerotípusainak eloszlásából készített diagram

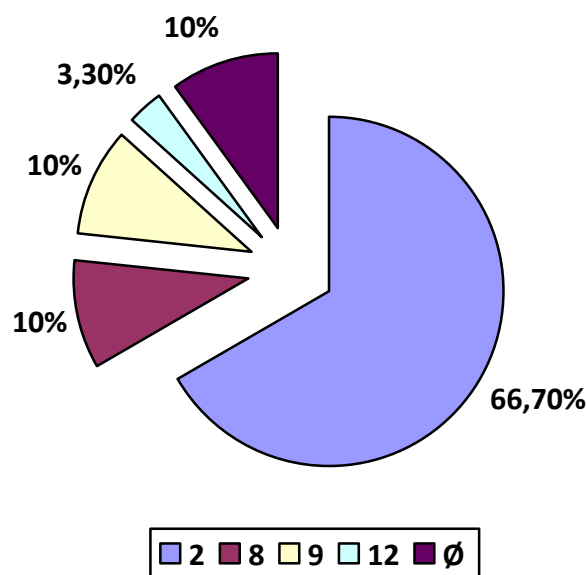
Meghatároztuk az előfordult szerotípusok százalékos arányát, és a következő eredményeket kaptuk: 2- es szerotípus 66,7%-ban, 8-as szerotípus 10%-ban, 9-es szerotípus szintén 10%-ban és 12-es szerotípus 3,3%-ban volt kimutatható, míg az izolált eseteink 10%-át nem lehetett szerotipizálni (**6. táblázat**). Ehhez további vizsgálatok szükségesek.

SZEROTÍPUS	Törzsek száma
2	20 (66,70%)
8	3 (10%)
9	3 (10%)
12	1 (3,30%)
Ø	3 (10%)
ÖSSZESEN	30 (100%)

6. táblázat: A vizsgálatunkban előfordult szerotípusok százalékos eloszlása (Jelmagyarázat: „Ø”=nem tipizálható törzsek)

Az imént említett eredményeinket kördiagramon (**11. ábra**) is szemléltetjük.

Az izolált szerotípusok százalékos előfordulása



11. ábra: Kördiagram a szerotípusok százalékos arányáról

Keresztreakciókkal több esetben is találkoztunk. A 327/12-es törzs a 9-es és a 11-es típustörzsekkel, míg a 330/12-es törzs a 6-os és a 8-as szerotípussal szemben termeltetett hiperimmunsavóra is adott reakciót.

Elvégeztük a szerotípusok állományonkénti megoszlásának elemzését is, melyet a 7. táblázatban tüntettünk fel. A táblázatban látható a származási hely, megye, valamint az ott előforduló szerotípusok és azok előfordulási esetszámaik az adott helyről.

Szerotípusok megoszlása állományonként		
Származás	Származási megye	Szerotípusok (előfordulási számuk)
Marcaltó	Veszprém	2 (1); 9 (2)
Küngös	Veszprém	2 (2)
Gyömöre	Győr-Moson-Sopron	2 (1)
Rábaszentandrás	Győr-Moson-Sopron	2 (1)
Mocsa	Komárom-Esztergom	2 (1)
Komárom	Komárom-Esztergom	Ø (1); 12 (1)
Csém	Komárom-Esztergom	Ø (1)
Beremend	Baranya	2 (1)
Elek	Békés	Ø (1)
Felsőcikola	Fejér	2 (3)
Nagyhegyes	Hajdú-Bihar	2 (5); 8 (3)
Barcs	Somogy	9 (1)
Magyarkeszi	Tolna	2 (1)
Tiszatenyő	Jász-Nagykun-Szolnok	2 (4)

7. táblázat: Az általunk izolált *A. pleuropneumoniae* törzsek állományonkénti megoszlása szerotípusok szerint (Jelmagyarázat: „Ø”=nem tipizálható törzsek)

5.2. Antibiotikum-érzékenység

Korongdiffúziós antibiotikum-érzékenységgel vizsgált *A. pleuropneumoniae* törzsek érzékenységének megoszlását a **8. táblázatban** foglaltuk össze. A táblázatban megjelenítettük, hogy hány törzs tartozott az adott csoportokba, és ez hány százaléka a vizsgált törzseknek.

Antibiotikum	Rezisztens	Mérsékelten rezisztens	Érzékeny
CFT	5 (25%)	15 (75%)	-
ERFX	9 (45%)	9 (45%)	2 (10%)
OTC	14 (70%)	6 (30%)	-
PEN	2 (10%)	18 (90%)	-
TAM	-	2 (10%)	18 90%)

8. táblázat: Korongdiffúziós eljárással végzett antibiotikum-érzékenységi vizsgálat húsz általunk izolált *A. pleuropneumoniae* törzs esetén

Ez alapján a ceftiofurra 75%-os mérsékelt rezisztenciát mértünk, a többi törzs ezen antibiotikumra rezisztenciát mutatott (25%). Enrofloxacinra az izolált törzsek 45%-a mérsékelten rezisztensnek bizonyult, szintén 45%-a rezisztensnek, 10%-a pedig érzékenynek. Az oxitetraciklin vizsgálata során a törzsek 70%-a rezisztenciát mutatott, 30%-a mérsékelt rezisztenciát. A penicillin-G vizsgálatokor 10%-os rezisztenciát és 90%-os mérsékelt rezisztenciát tapasztaltunk. Tiamulinra pedig a vizsgált törzsek 90%-ban érzékenyek voltak és 10%-ban bizonyultak mérsékelten rezisztensnek.

MIC antibiotikum-érzékenységi vizsgálataink eredményét a **9. táblázatban** foglaltuk össze.

Antibiotikumok	Érzékeny	Mérsékelten érzékeny	Rezisztens
CTF	$\leq 0,004 \mu\text{g/ml}$	0,008-0,125 $\mu\text{g/ml}$	$\geq 0,25 \mu\text{g/ml}$
ERFX	$\leq 0,015 \mu\text{g/ml}$	0,03-0,5 $\mu\text{g/ml}$	$\geq 1 \mu\text{g/ml}$
OTC	$\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$	1- $\geq 32 \mu\text{g/ml}$	$\geq 64 \mu\text{g/ml}$
PEN	$\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$	0,25- $\geq 16 \mu\text{g/ml}$	$\geq 32 \mu\text{g/ml}$
TAM	$\leq 8 \mu\text{g/ml}$	16-32 $\mu\text{g/ml}$	$\geq 64 \mu\text{g/ml}$

9. táblázat: MIC vizsgálataink eredménye

A minimális gátló koncentrációra vonatkozó vizsgálataink eredményeként a következő mérsékelt érzékenységi zónákat állapítottuk meg: ceftiofur 0,008-0,125 $\mu\text{g/ml}$, enrofloxacin 0,03-0,5 $\mu\text{g/ml}$, oxitetraciklin 1- $\geq 32 \mu\text{g/ml}$, penicillin-G 0,25- $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ és tiamulin 16-32 $\mu\text{g/ml}$. Ezek alapján könnyen meghatározhatóak az érzékenység és rezisztencia határértékei.

MIC vizsgálataink során megfigyeltük, hogy néhány antibiotikum esetén több törzs is rezisztensnek bizonyult. Ezeket az eredményeket a **10. táblázat**ban foglaltuk össze.

Antibiotikum	Rezisztens törzsek száma	Százalék	Szerotípusok
CFT	1	5%	2
ERFX	0	0%	-
OTC	6	30%	Ø, 2, 9
PEN	2	10%	Ø
TAM	0	0%	-
<i>PEN+OTC</i>	2	10%	Ø

10. táblázat: MIC vizsgálataink során rezisztensnek bizonyult törzsek (Jelmagyarázat: „Ø”=olyan *A. pleuropneumoniae* törzs, amelyik nem szerotipizálható)

Azt tapasztaltuk, hogy 1 törzs volt rezisztens a ceftiofurra, ami a vizsgált törzsek 5%-át jelenti, ez a 2-es szerotípusba tartozott. Oxitetraciklinre 6 törzs mutatott rezisztenciát, ami az általunk izolált és vizsgált *A. pleuropneumoniae* törzsek 30%-a. Ezek között megtalálható volt a 2-es, a 9-es szerotípusú és olyan törzsek is, amelyeket nem lehetett szerotipizálni. Az oxitetraciklin rezisztenciát mutató törzsek 50%-a a 2-es szerotípusba, 33,3%-a a nem szerotipizálható törzsekbe és 16,7%-a a 9-es szerotípusba tartozott (**11. táblázat**). Rezisztencia mutatkozott a penicillinre is 10%-ban, ezek a törzsek azokhoz a törzsekhez tartoztak, amelyeket nem lehetett szerotipizálni. Ez utóbbi két törzs azonban megegyezik azzal a kettővel, amely az oxitetraciklinre is rezisztensnek bizonyult. Az enrofloxacinra és a tiamulinra semmilyen rezisztenciát nem találtunk.

OTC rezisztencia	Szerotípus
50 %	2
33,30 %	Ø
16,70 %	9

11. táblázat: Oxitetraciklinre rezisztenciát mutató törzsek százalékos megoszlása

6. Megbeszélés

Az *A. pleuropneumoniae* hazánkban is előfordul és a szakirodalomban leírt elváltozások alapján izolálni lehet a kórokozót a kórtani elváltozás helyéről. Szerotipizálási vizsgálatainkkal igazoljuk, hogy a leggyakoribb Magyarországon a 2-es szerotípus, de előfordul a 8-as, 9-es és a 12-es is. A megyénkénti eloszlás vizsgálatához ez az esetszám nem elegendő. A harminc szerotipizált *A. pleuropneumoniae* törzsből 20 izolátum 2-es, 3 törzs 8-as, 3 törzs 9-es és 1 izolátum 12-es szerotípusként lett meghatározva. Keresztreakciók az egyes szerotípusok között vizsgálatunk során is előfordultak a 9-es és 11-es szerotípusok, és a 6-os és 8-as szerotípusok között, ahogyan ezzel a szakirodalomban is találkoztunk (Marsteller és Fenwick, 1999). Ezen eredményeink változást mutatnak az eddig leírt szakirodalomhoz képest, a 10 éve végzett szerotipizálási vizsgálatok ugyanis még nagy számban jeleztek 1-es szerotípust is Magyarországon (Varga és mtsai, 2007).

A szerotipizálást követően kiválasztottunk húsz izolált törzset, úgy, hogy a minták minél több megyéből származzanak és lehetőség szerint külön állományból. Az öt vizsgálandó antibiotikumot a szakirodalomban *A. pleuropneumoniae* okozta tüdőgyulladás gyógykezelésére ajánlottak közül választottuk: a β -laktám antibiotikumok közül a penicillin-G-t, a cefalosporinok közül a ceftiofurt, a tetraciklinek közül az oxitetraclint, a fluorokinolonok közül az enrofloxacin, valamint a pleuromutilinek közül a tiamulint.

Az antibiotikum-vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a korongdiffúziós eljárással az általunk vizsgált antibiotikumokra a legtöbb esetben érzékenyek, illetve mérsékelten rezisztensek a törzsek. Vizsgálatainkban a tiamulinra nem mutatkozott rezisztencia, amely a szakirodalomban fellelhető volt. (Nedbalcova és mtsai, 2005, Kucerova és mtsai, 2011). Ez talán visszavezethető a különböző országokban való eltérő gyógyszerhasználatra.

Az oxitetraclinre nagymértékű rezisztenciát tapasztaltunk, ami megegyezik a szakirodalomban leírtakkal (Dom és mtsai, 1994; Yoshimura és mtsai, 2002; Yang és mtsai, 2010). A penicillinre is mutatkozott vizsgálatunkban rezisztencia, ami korrelál a szakirodalommal (Yoshimura és mtsai, 2002).

A penicillin MIC vizsgálata során mért érték nagymértékben hasonlít Gutiérrez-Martín és mtsai által írt 2006-os értekezéséhez (Gutiérrez-Martín és mtsai, 2006). Az enrofloxacin és az oxitetraclin mérsékelt érzékenységi határértékei megegyeznek a szakirodalomban megismertekkel (Dom és mtsai, 1994).

A ceftiofur vizsgálatakor meglepően nagymértékű mérsékelt rezisztenciát és 25%-ban rezisztenciát állapítottunk meg. A szakirodalomban jellemzően nagy érzékenységről számolnak be (Yoshimura és mtsai, 2002; Yang és mtsai, 2011; Aarestrup és mtsai, 1999).

Összességében elmondható, hogy vizsgálataink alapján a betegség kezelésére a tiamulin a legalkalmasabb antibiotikum, hiszen rezisztencia még nem detektálható. A rezisztencia elkerülésére azonban szükséges a kórokozó kitenyésztése és célzott terápia kialakítása, valamint a gyógyszer megfelelő ideig tartó és megfelelő mennyiségben történő felhasználása.

7. Összegzés

Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* egy Gram-negatív, fakultatív anaerob, igényes baktérium, amely kizárólag a sertést betegíti meg. A baktérium világszerte, így hazánkban is előfordul, vérzékes-elhalásos tüdőgyulladással és fibrines mellhártyagyulladással járó megbetegedést okoz, elsősorban a 12-16 hetes sertésekben. Fakultatív patogén kórokozóról lévén szó, a hajlamosító tényezőknek nagy szerepe van a betegség kialakulásában. A baktérium a tonsilla cryptáiban képes túlélni, és az állat élete végéig hordozza és üríti a kórokozót.

A baktérium tenyésztése során bizonyos törzsei élesztőkivonatot igényelnek, ezek az ún. NAD-dependens, 1-es biotípusba tartozó törzsek, míg a NAD-independens törzseket a 2-es biotípusba sorolják. A korábbi szerotipizálási rendszereket egyesítve 15 szerotípust különböztetünk meg.

A vizsgálataink célja, hogy adatokhoz jussunk az izolált törzsek szerotipizálásának és antibiotikum-érzékenységének vizsgálata révén az itthon előforduló törzsek szerotípusának gyakoriságáról, sajátosságairól, és egyes, a betegség gyógykezelése szempontjából fontos antibakteriális szerekkel szembeni érzékenységéről, esetlegesen kialakult rezisztenciáról.

Munkánk során harminc *A. pleuropneumoniae* törzset vizsgáltunk meg, amelyeket harminc, vágóhídról származó, kórtani elváltozásokat mutató sertéstüdőből izoláltunk klasszikus bakteriológiai módszerekkel. A minták tíz különböző megyéből származtak. Az izolált törzsek tenyésztési és biokémiai tulajdonságai alapján a törzseket a NAD-dependens, 1-es biotípusba soroltuk. Az izolátumok szerotípusát indirekt hemagglutinációval, a felületi antigénjeik alapján határoztuk meg. Ennek eredményeként 20 törzs a 2-es szerotípusba, 3 törzs a 8-as, 3 törzs a 9-es, valamint 1 törzs a 12-es szerotípusba tartozott. Három törzset nem sikerült egyik szerotípusba sem besorolni.

Az izolált törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálatát korongdiffúziós és leveshígítós módszerrel (MIC) végeztük el öt olyan antibiotikummal szemben, amelyeket az állatorvosi gyakorlatban alkalmaznak *A. pleuropneumoniae* okozta tüdőgyulladás kezelésére. Az elvégzett antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok során a következő eredményeket kaptuk: a baktérium érzékeny a penicillin-G-re, ceftiofurra, enrofloxacinra és tiamulinra, viszont rezisztensnek bizonyult az oxitetraciklinnel szemben.

8. Summary

EXAMINATION OF SEROTYPES AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE STRAINS ISOLATED FROM SWINE

Actinobacillus pleuropneumoniae is a Gram-negative, facultative anaerobic, fastidious bacterium which causes respiratory disease in swine throughout the world. Haemorrhagic-necrotic pneumonia and fibrinous pleuritis can be seen in growing pigs. The bacterium is facultative pathogenic, it is present on the mucous membrane of the respiratory tract of swine and can cause disease in case of different predisposing factors.

On the basis of NAD requirement for growth *A. pleuropneumoniae* biotype 1 (NAD-dependent) and biotype 2 (NAD-independent) can be distinguished. After combining the previous typing systems 15 serotypes can be differentiated.

The aim of the study was to collect data on the frequency of the different serotypes and their antibiotic susceptibility

Thirty pneumonic samples were collected in two slaughterhouses representing ten counties. Primary and secondary cultural, morphological and biochemical features of the bacterial isolates were tested. According to the cultural and biochemical characteristics thirty biotype 1 (NAD-dependent) *A. pleuropneumoniae* strains were identified.

The isolated strains were serotyped on the basis of surface antigens with indirect haemagglutination test. As a result of serotyping 20 strains proved to be of serotype 2, 3-3 strains were serotypes 8 and 9, 1 strain was serotype 12 and 3 strains could not be serotyped by hyperimmun sera.

Antibiotic susceptibility of the isolated *A. pleuropneumoniae* strains were tested using the disc diffusion method and broth dilution method (MIC). The most widely used antibiotics were chosen for the examination with the following results:

The strains were susceptible to penicillin-G, ceftiofur, enrofloxacin and tiamulin, but resistant for oxytetracycline.

9. Alkalmazott rövidítések jegyzéke

APP; *A. pleuropneumoniae*: *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Apx: *Actinobacillus pleuropneumoniae* által termelt toxin

CFU: colony-forming units, telepformáló egység

CTF: ceftiofur

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ERFX: enrofloxacin

IHA: indirekt hemagglutináció

LPS: lipopolyszacharid

MIC: minimum inhibitory concentration, minimális gátló koncentráció

NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid

OTC: oxitetraciklin

PCR: polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció

PEN: penicillin-G

TAM: tiamulin

TSA: tripszin-szója agar

10. Irodalomjegyzék

- AARESTRUP, F. M., JENSEN, N. E.: Susceptibility testing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Denmark. Evaluation of three different media of MIC-determinations and tablet diffusion tests. In: *Veterinary Microbiology*. 1999. 64. vol. p. 299-305.
- BARROW, G. I., FELTHAM, R. K. A.: Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. In: *Cambridge University Press*. 2003.
- BORNHORN, R.: Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) fertőzöttség stratégiai antibiotikum-terápiája a Baytril® készítménnyel egy észak-németországi kombinált szaporító-hizlaló típusú sertéstelepen üzemi körülmények között. In: *Praktischer Tierarzt*. 2008. 89. vol. 1. no. p. 46-57.
- BOSSÉ, J. T., JANSON, H., SHEEHAN, B. J., BEDDEK, A. J., RYCROFT, A. N., KROLL, J. S. AND LANGFORD, P. R.: *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. In: *Microbes and Infection*. 2002. 4. vol. p. 225-235.
- BROES, A., MARTINEAU, G. - P., GOTTSCHALK, M.: Dealing with unexpected *Actinobacillus pleuropneumoniae* serological results. In: *Journal of Swine Health and Production*. 2007. 15. vol. 5. no. p. 264-269.
- CHIER, K., DONNÉ, E., OVERBEKE, I. V., DUCATELLE, R., HAESBROUCK, F.: *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. In: *Veterinary Microbiology*, 2002. 85. vol. p. 343-352.
- CHIER, K., WAELE, T. D., PASMANS, F., DUCATELLE, R., HAESBROUCK, F.: Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. In: *Veterinary Research*, 2010. 41. vol. 5. no. p. 65.
- COSTA, G., OLIVEIRA, S., TORRISON, J.: Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in oral-fluid samples obtained from experimentally infected pigs. In: *Journal of Swine Health and Production*. 2012. 20. vol. 2. no. p. 78-81.
- DOM, P., HOMMEZ, J., CASTRYCK, F., DEVRIESE, L. A. AND HAESBROUCK, F.: Serotyping and quantitative determination of in vitro antibiotic susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated in Belgium (July 1991 - August 1992). In: *Veterinary Quarterly*. 1994. 16. vol. p. 10-13.

- FODOR, L., HAJTÓS, I., GLÁVITS, R., VARGA, J.: *Actinobacillus pleuropneumoniae* 2-es biotípusú törzsei okozta tüdőgyulladás sertésállományokban. In: *Magyar Állatorvosok Lapja*, 1989a. 44. évf. 11. sz. o. 669-674.
- FODOR, L., VARGA, J., MOLNÁR, É., HAJTÓS, I.: Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine. In: *Veterinary Microbiology*. 1989b. 20. vol. p. 173-180.
- GUTIÉRREZ-MARTIN, C. B., DEL BLANCO, N. G., BLANCO, M., NAVAS, J., RODRIGUEZ-FERRI, E. F.: Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. In: *Veterinary Microbiology*. 2006. 115. vol. p. 218–222.
- KLAUSEN, J., ANDERSEN, L. O., BARFOD, K., SØRENSEN, V.: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological deoxyribonucleic acid relatedness .In: *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1983. 33. vol. 3. no. p. 510-514.
- KUCEROCA, Z., HRADECKA, H., NECHVATALOVA, K., NEDBALCOVA, Z.: Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from clinical outbreaks of porcine respiratory diseases. In: *Veterinary Microbiology*. 2011. 150. vol. p. 203-206.
- KUCEROVA, Z., JAGLIC, Z., ONDRIASOVA, R., NEDBALCOVA, K.: Serotype distribution of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from porcine pleuropneumonia in the Czech Republic during period 2003-2004. In: *Veterinary Medicina - Czech*. 2005. 50. vol. 8. no. p. 355-360.
- MARSTELLER, T. A., FENWICK, B.: *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. In: *Swine health and production*, 1999. 7. vol. 4. no. p. 161-165.
- MITTAL, K.R., HIGGINS, R., LARIVIERE, S.: Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. In: *Journal of Clinical Microbiology*. 1983. 18. vol. 6. no. p. 1351-1354.
- MOLNÁR, É.: Survey of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection in swine by different methods. In: *Acta Veterinaria Hungarica*. 1990. 38. évf. 4. sz. p. 231-238.
- MOUSER, P. (ed.): *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine. University West Lafayette. 2007. URL: <https://www.addl.purdue.edu/newsletters/2007/Summer/SwineAPP.html> Letöltés ideje: 2012. 05.27.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard - Second Edition. Document NCCLS M31-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne Pennsylvania. 2009.

NEDBALCOVA, K., SATRAN, P., JAGLIC, Z., ONDRIASOVA, R., KUCEROVA, Z.: Monitoring of antibiotic resistance in isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the Czech Republic between 2001 and 2003. In: *Veterinary Medicina - Czech*. 2005. 50. vol. p. 181-185.

NIELSEN, R., ANDRESEN, L. O., PLAMBERK, T., NIELSEN, J. P., KRARUP, L. T., JORSAL, S. E.: Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds. In: *Veterinary Microbiology*. 1997. 54. vol. p. 35-46.

NIELSEN, R.: Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. In: *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1986a. 27. vol. p. 453-455.

NIELSEN, R.: Serology of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtypes A and B. In: *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1986b. 27. vol. p. 49-58.

PERRY, M. B., ANGEN, Ø., MACLEAN, L. L., LACOUTURE, S., KOKOTOVIC, B., GOTTSCHALK, M.: An atypical biotype I *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13 is present in North America. In: *Veterinary Microbiology*. 2011. 24. vol. p. 1-8.

SEBUNYA, T. N. K., SAUNDERS, J. R., OSBORNE, A. D.: Dose response relationship of *Haemophilus pleuropneumoniae* aerosols in pigs. In: *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 1983. 47 vol. p. 54-56.

STHITMATEE, N., SIRINARUMITR, T., MAKONKEWKEYOON, L., SAKPUARAM, T. AND TESAPRATEEP, T.: Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based-*apx* genes. In: *Molecular and Cellular Probes*, 2003. 17. vol. p. 301-305.

TUBOLY, S. (szerk), MEDVECZKY, I., RUSVAI, M., VARGA, J.: Állatorvosi járványtan I. Állatorvosi mikrobiológia. Bakteriológia, virológia, immunológia. Budapest. Mezőgazda Kiadó. 1998. p. 444.

VARGA, J. (szerk.), TUBOLY, S., MÉSZÁROS, J.: A háziállatok fertőző betegségei. Állatorvosi járványtan II. Budapest. Mezőgazda Kiadó, 2. kiadás. 2007. p. 183-186.

YANG, C.-Y., LIN, C.-N., LIN, C.-F., CHANG, T.-C., CHIOU, M.-T.: Serotypes, antimicrobial susceptibility, and minimal inhibitory concentrations of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from slaughter pigs in Taiwan (2002-2007). In: *Journal of Veterinary Microbiology*. 2011. 73. vol. 2. no. p. 205-208.

YOSHIMURA, H., TAKAGI, M., ISHIMURA, M. AND ENDOH, Y. S.: Comparative in vitro activity of 16 antimicrobials agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: *Veterinary Research Communications*. 2002. 26. vol. p. 11-19.

11. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Sárközi Ritának, türelméért, a lelkiismeretes és figyelmes munkájáért, támogatásáért.

Hálásan köszönöm Prof. Dr. Fodor Lászlónak, tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetőséget biztosított a SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszéken végzett munkám kivitelezéséhez.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Fodor Lászlónak és Dr. Makrai Lászlónak, akik kiváló meglátásaikkal segítettek ezen dolgozat elkészülését.

Köszönetemet fejezem ki a SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék dolgozóinak, külön köszönöm a segítségüket a bakteriológiai laboratóriumban dolgozó asszisztenseknek, Halasi Teréznek és Kolozsvári Évának.

A szakirodalmi adatok összegyűjtésében nyújtott önzetlen segítségéért karunk kiváló könyvtára valamennyi dolgozójának, főként Oláh Editnek szeretnék köszönetet mondani.

Ezen kívül külön köszönet illeti a CEVA-Phylaxiától Dr. Tenk Miklós által nyújtott segítséget, illetve a vágóhidak együttműködését.

Köszönöm családom és barátaim segítségét, támogatását és kitartását.

A vizsgálatainkhoz nyújtott anyagi támogatásért a TÁMOP-4.2.2.B.10/1-2010-0011 pályázatot és a 2012-es évi Normatív kutatásfinanszírozási pályázatot (NKB 15716) illeti köszönet.