

NÉBIH-Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság, Bakteriológiai Laboratórium
Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék



n é b i h
Termőföldről az asztalig



***Corynebacterinae* alrendbe tartozó tőgygyulladás-kórokozó baktériumok diagnosztikai vizsgálatai**

Valkó Anna

állatorvostan-hallgató, 5. évfolyam

Témavezetők:

dr. Jánosi Szilárd, laboratóriumvezető

dr. Rónai Zsuzsanna, laboratóriumi állatorvos

Budapest

2013

Tartalomjegyzék

Bevezetés	1
Irodalmi áttekintés	2
Anyag és módszer	7
Eredmények	13
Megbeszélés	23
Összefoglalás	27
Summary	28
Mellékletek	29
Irodalomjegyzék	31
Köszönetnyilvánítás	39

Bevezetés

A tejelő szarvasmarhatartásban világszerte az egyik leggyakoribb és legnagyobb gazdasági veszteséggel járó megbetegedés a tehenek tőgygyulladása^{1,2}, melyet az esetek döntő többségében baktériumok okoznak³. A kórokozók a fertőzés terjedésének módja szerint csoportosíthatók. Eszerint megkülönböztetünk állatról állatra terjedő, ún. fertőző illetve környezeti kórokozókat⁴. A fertőző kórokozók visszaszorításával gyakoribbá válik a környezeti kórokozók okozta tőgygyulladás, melyet az általánosan elterjedt *Escherichia coli* és *Streptococcus uberis* mellett számos más, a környezetben előforduló és feldúsuló baktérium okozhat^{3,5}. Ilyen fakultatív patogén baktériumokat írtak le a *Corynebacterinae* alrend több nemzetségében is.

Az alrend *Mycobacterium* nemzetségébe tartozó *M. fortuitum* és *M. smegmatis* ismert tőgygyulladás-kórokozók, melyek akár a tehén elhullásával végződő betegséget is okozhatnak³. Szintén régóta ismert kórokozó a *Corynebacterium* nemzetségbe tartozó, a tőgygyulladás enyhe formáját okozó, állatról állatra terjedni képes *C. bovis*⁶, de kimutatásra kerültek tőgygyulladásban szenvedő tehenek tejéből egyéb, a környezetből származó *coryneform* baktériumok is⁷. A *Nocardia* nemzetségben számos fakultatív kórokozó található, melyek közül több mint harmincnak közegészségügyi jelentősége van⁸, emellett sok fajt kimutattak nyerstejből⁹ illetve klinikai tőgygyulladásból is¹⁰. A *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó *Rhodococcus equi* több emberi és állati megbetegedéssel hozható összefüggésbe¹¹, leírásra került szarvasmarha tőgygyulladásával kapcsolatban is¹². A korábban *R. maris* néven ismert baktérium részletes vizsgálata vezetett a *Dietzia* nemzetség létrehozásához¹³, melynek tőgygyulladás-kórokozó szerepéről a közelmúltban számolt be HAMID¹⁴. Az előzőekkel közeli rokonságban áll a *Gordonia* nemzetség, melyben több baktériumfajt azonosítottak másodlagos kórokozóként humán megbetegedésekben¹⁵, de szarvasmarha tőgygyulladásának kórokozójaként még nem került leírásra a szakirodalomban.

Vizsgálatunk alapjául Magyarország 21 tehenészeti telepéről a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságának (ÁDI) Bakteriológiai Laboratóriumába 2006 óta érkezett tejminták szolgáltak. Munkánk célja az volt, hogy kidolgozzunk egy diagnosztikai eljárást, mely segítségével a *Corynebacterinae* alrendbe tartozó tőgygyulladás-kórokozó baktériumok azonosíthatóak és elkülöníthetőek.

Irodalmi áttekintés

A szarvasmarha tejmirigyeiben zajló gyulladásos folyamatokat tőgygyulladásnak nevezzük, amely külföldi² és hazai¹⁶ felmérések alapján is a leggyakrabban előforduló és a legnagyobb gazdasági veszteséget okozó betegség a tejtermelési ágazatban. Kialakulásában egyaránt szerepet játszanak a külső környezet, a gazdaszervezet és a mikroorganizmusok, valamint a közöttük kialakuló kölcsönhatások, ezért összetett oktanú és több tényezőtől függő állománybetegségnek tekintendő⁴. A hajlamosító tényezők együttes hatására kialakuló tőgyfertőzésre a szervezet gyulladásos reakcióval válaszol, amely ALBERT és HUSZENICZA leírása alapján¹⁷ jelentkezhet klinikai vagy szubklinikai tőgygyulladás formájában. A klinikai tőgygyulladás során a tünetek korlátozódhatnak a tőgyre illetve egy tőgynegyedre, mely a termelt tej makroszkópos elváltozásaival jár, vagy jelentkezhetnek a szervezet egészét érintő általános tünetek is. A folyamat időbeli lefolyását tekintve lehet többnyire elhullással járó túlheveny, helyi és/vagy szisztémás tünetekkel is járó heveny, kevésbé kifejezett helyi tünetekkel jellemezhető félheveny és sokszor visszafordíthatatlan elváltozásokkal járó idült jellegű. Ha a gyulladás egyik tünetét sem észleljük, de a termelt tejben a gyulladásos sejtek, vagyis a szomatikus sejtek száma megnő, akkor a tőgygyulladás szubklinikai. Az egyes kórokozók jellegzetes klinikai tüneteket és/vagy kórbonctani elváltozásokat okozhatnak, azonban a kórokozó pontos meghatározása nem lehetséges laboratóriumi vizsgálatok elvégzése nélkül.

A tőgygyulladás kiváltó oka lehet fizikai hatás, például mechanikai sérülés, kémiai anyag, például sav vagy lúg okozta károsodás, de többnyire különböző mikroorganizmusok miatt alakul ki. A leggyakoribb tőgygyulladás-kórokozók a baktériumok, melyeket a gyakorlatban a fertőzés terjedésének módja szerint csoportosítunk. Ennek alapján megkülönböztetünk állatról állatra terjedni képes fertőző kórokozókat és a tehenek környezetéből vagy kultakarójáról származó környezeti kórokozókat. A két csoport között nincs éles határ, számos mikroorganizmus rendelkezik a tartós megtelepedéshez és terjedéshez szükséges képességekkel, emellett a környezetben is túlélhetnek, rezervoárt képezhetnek, ezért átmeneti jellegű kórokozóknak tekintjük őket⁴. A fertőző kórokozók közé tartozik például a *Staphylococcus aureus*, a *Streptococcus agalactiae* és bizonyos *Mycoplasma* fajok¹⁸. Az ellenük végzett sikeres védekezés esetén megfigyelhető a környezeti kórokozók okozta tőgygyulladások előfordulási arányának növekedése¹⁹, melynek hátterében leggyakrabban a *Streptococcus uberis* vagy egyes, az *Enterobacteriaceae* családba tartozó

fajok állnak. A felsoroltakon kívül azonban a számukra kedvező viszonyokat kihasználva, a környezetből származó számos egyéb baktérium, gomba és alga is megtelepedhet a tőgyben, annak gyulladását okozva.

A *Corynebacterinae* alrendben, melyet STACHEBRANDT és munkatársai az *Actinobacteria* osztály *Actinomycetales* rendjébe soroltak²⁰, több nemzetségen belül ismertek fakultatív kórokozók, melyek közül számos baktériumfajnak a tőgygyulladásban betöltött szerepét is leírták. Ezen alrendbe tartozik a közegészségügyi és állatgyógyászati szempontból is kiemelt jelentőségű *Mycobacterium* nemzetség. Az első kórokozóként felismert *Mycobacterium*-ok a *M. leprae* és a *M. tuberculosis* voltak²¹, melyek közül a humán tuberkulózist okozó *M. tuberculosis* egy, a kórházi felvételt követően pár nap után elhalálozott betegből 1882-ben izolált, azóta megőrzött törzséből a XXI. században is sikeresen azonosították a baktériumot²². A tuberkulózis jelenleg is világszerte előfordul, évente több millió embert érint²³. A betegség oktatában azonban a *M. tuberculosis* mellett számos más baktérium is szerepelhet, melyek feltehetően közös eredetűek, ezért napjainkban a *Mycobacterium tuberculosis* komplex összefoglaló néven tartják őket számon²⁴. A komplexbe tartozik az embert is megbetegítő, elsőként szarvasmarhából izolált *M. bovis*²⁵, melynek felhasználásával készült a virulens baktériumtól három génszakaszban különböző, világszerte hosszú ideig a tuberkulózis megelőzésére használt attenuált humán vakcina (BCG)²⁶. Noha a sikeres védekezésnek köszönhetően több országban is felszámolták a szarvasmarha *M. bovis* okozta tuberkulózisát²⁷, a baktérium és az általa okozott betegség előfordul különböző vadállatokban is^{28,29}, így továbbra is kockázatot jelent mind a háziállatok, mind az ember számára, ennek megfelelően szerepel az Állategészségügyi Világszervezet 2013-ban hatályos listáján is³⁰. A szarvasmarha fertőzésekora a baktérium a tőgybe, majd a tejbe is kerülhet, melynek fogyasztása során fertőződik az ember. Ennek a folyamatnak a felismerése vezetett a tej pasztörözésének bevezetéséhez, melynek segítségével sikerült megszüntetni a humán fertőzések forrását³¹, viszont a terjedés több irányban is lehetséges, így jelentőséggel bírhat az embertől eredő szarvasmarha-fertőzés is³². A tej pasztörözése azonban nem mindegyik *Mycobacterium* faj esetében végezhető el sikeresen azonos feltételek mellett³³. Ezt figyelték meg a *M. avium* és *M. intracellulare* fajok egyes szerotípusainál is, melyeket a *M. avium*-*M. intracellulare* komplexbe sorolnak³⁴. Szarvasmarha esetében jelentős a komplexbe tartozó *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, melynek szerepét feltételezik a humán Chron-betegség oktatában, ezért sok kutató foglalkozik ezen baktérium vizsgálatával, melyet kimutattak kereskedelmi forgalomban kapható, hőkezelt tejből is³⁵. A

nemzetségbe tartozó kiemelt fontosságú fajokon kívül számos egyéb *Mycobacterium* fajt kimutattak már nyerstejből³⁶. Tőgygyulladás kórokozójaként írták le többek között a *M. chelonae*-t, mely általános és helyi tünetekkel járó heveny, majd kezelésre nem reagáló idült betegséget okozott³⁷, valamint ismert a *M. fortuitum* és *M. smegmatis* ezen betegségben megnyilvánuló szerepe is³, melyet saját vizsgálataink is alátámasztanak.

A *Corynebacterinae* alrend nevét adó *Corynebacterium* nemzetségbe tartozik a *C. bovis*, mely a jelen tanulmányban vizsgált többi baktériummal szemben az állatról állatra terjedő kórokozók közé tartozik, az általa okozott általában enyhe lefolyású és jól gyógyuló tőgygyulladás szórványosan fordul elő⁶. Ugyanezen nemzetség tagja a környezeti patogén *C. ulcerans*, melyet szintén azonosítottak tőgygyulladás kórokozójaként³⁸, vizsgálati mintáinkban azonban nem jelentkezett. A betegségre utaló elnevezést kapta a *C. mastitidis*, melyet szubklinikai tőgygyulladástól szenvedő anyajuhok tejéből mutattak ki Spanyolországban³⁹, szarvasmarhában nem került leírásra.

A *Corynebacterinae* alrend *Nocardiaceae* családjába tartozó *Nocardia* nemzetség több mint ötven tagjának hozzávetőlegesen a fele kapcsolódik humán és/vagy állati megbetegedésekhez, melyek nagyon eltérő formában jelentkezhetnek⁸. Emberekben leggyakrabban a tüdőt érintik az elváltozások, melyekhez hasonlókat már tengeri emlősökben is megfigyeltek⁴⁰, szarvasmarha esetében viszont a tőgygyulladás a legtöbbször előforduló nokardiózis, noha ebben az állatfajban is kialakulhat tüdőgyulladás, bőrelváltozások vagy akár vetélés is⁴¹.

A legújabb nevezéktan alapján a *Nocardia*-val közös családba sorolják a *Rhodococcus* nemzetséget⁴², melynek tagja az emberi és állati opportunistá patogénként¹¹ és tőgygyulladás kórokozójaként¹² is ismert *R. equi*. A nemzetségbe tartozó, a környezetben széles körben előforduló *R. erythropolis*-t gazdag enzimgarnitúráját kihasználva a biotechnológiában alkalmazzák⁴³, kórokozóként még nem került leírásra.

A *Rhodococcus* nemzetséggel szoros rokonságban, tulajdonképpen a *R. maris* részletes vizsgálata alapján a baktérium *Dietzia maris*-szé történő átnevezésével különítették el a *Dietzia* nemzetséget¹³, melynek egyes tagjait már humán fertőzésekben származó mintákból is azonosítottak⁴⁴. Szarvasmarha tőgygyulladásából elsőként az elmúlt évben került kimutatásra Afrikában Szudánban, ahol két napos különbséggel vett, összesen 100 tejmintából 5 esetben azonosítottak *Dietzia* nemzetségbe tartozó baktériumot kórokozóként molekuláris biológiai vizsgálatok segítségével¹⁴.

A *Corynebacterinae* alrendbe 1971-ben TSUKAMURA javaslata alapján került be a *Gordona* nemzetség⁴⁵, mely 1997-ben kapta meg az etimológiailag helyes *Gordonia* elnevezést²⁰. A 2004-ben megjelent, a nemzetségre vonatkozó tulajdonságokat részletesen leíró és összefoglaló tanulmány¹⁵ óta egyre nagyobb érdeklődés övezi az ide tartozó baktériumokat⁴⁶. Ez köszönhető egyrészt magas metabolikus aktivitásuknak, mellyel egyes törzsek képesek a szerves anyagok lebontására, átalakítására és szintetizálására, így alkalmazhatók lehetnek a biotechnológiában. Ugyanakkor egyre többször mutatnak ki bizonyos fajokat másodlagos kórokozóként immunszuppresszált humán betegek esetében, ami hátráltathatja ipari célú felhasználásukat. Ismert tehát e fajok környezeti előfordulása, valamint több törzs fakultatív patogén tulajdonsága, azonban szarvasmarha tőgygyulladásának kórokozójaként még nem került leírásra a szakirodalomban.

A tőgygyulladást okozó különböző mikrobák kimutatásához a baktériumok kitenyésztésére van szükség, melyhez a tejmintákat aszeptikusan kell levenni, hogy elkerülhető legyen a tehén környezetéből származó szennyeződés⁴. A mintavétel során először a tőgybimbó csúcsi részét tisztítják és fertőtlenítik 70%-os etil-alkohollal, majd száradás után kifejik az első tejsugarakat próbacsészébe, és csak ezután fognak fel kb. 2-5 ml tejet egy tejsugárból a ferdén tartott mintavételi csőbe. A minták ezután +4 °C-on tárolva vagy 24 óránál későbbi feldolgozás esetén fagyaszttva kerülnek szállításra a laboratóriumba. A beküldött tejminták feldolgozásához SZITA alapján⁴⁷ általában Petri-csészébe kiöntött, véres agart tartalmazó táptalajt használnak, melynek a felületére egy csepp tejet kennek fel, majd aerob légkörben 37°C-os termosztátban inkubálják. A leoltás után 16-24 óra múlva vizsgálják meg először a kinőtt baktérium-telepeket, melyek hiányában a mintákat további 48-72 órára visszateszik a termosztátba. Az elbírálás a klasszikus bakteriológiai módszer szerint a kifejlődött baktériumtelepek morfológiai sajátosságain, biokémiai tulajdonságain, a belőlük készített natív és festett kenetek mikroszkópos vizsgálatán és további leoltásokon alapszik. A tenyészetekből közvetlen módon elvégezhető fenotípusos tesztek kibővítésére alkalmas a Biolog™ rendszer (Biolog Inc., Hayward, Kalifornia, USA), melynek 95 szénforrás hasznosításán alapuló fajszintű meghatározó rendszerét már hazánkban is sikerrel alkalmazták⁴⁸. A rendszernek a NÉBIH-ÁDI Bakteriológiai Laboratóriumában elérhető újabb verziója (GEN III MicroLog™ Manual) egy-egy pozitív és negatív kontroll mellett 71 szénforrás-hasznosítás és 23 kémiai gátló tulajdonság figyelembe vételével alakít ki egy fenotípusos ujjlenyomatot. Az azonosítás a MicroStation™ System szoftver segítségével történik, mely az általunk leolvasott adatokat összeveti a Biolog™ adatbázisában (GEN III

Database 2.6.1) található adatokkal, és ennek alapján, valószínűségi sorrendben megadja a vizsgált törzshöz leginkább hasonlító négy baktériumfajt, melyek közül az első helyen állót azonosítja a mintával, kellően magas hasonlósági érték esetén. A hasonlósági érték (similarity index value – SIM) az a nulla és egy közötti szám, amely megadja a leolvasott mintázat azonosságának arányát az adatbázisban lévő baktériumfaj mintázatához viszonyítva. A hasonlósági érték 1, ha a megegyezés tökéletes, nulla, ha egyáltalán nincs egyezés a vizsgált mintázat és az ahhoz viszonyított baktérium között. A vizsgált törzset a program akkor azonosítja az adatbázisban található baktériummal, ha a hasonlósági érték 0,5 feletti értéket mutat.

A kórokozók pontos azonosítására molekuláris biológiai vizsgálatok is alkalmazhatóak, melyek közül baktériumok esetében a leggyakrabban alkalmazott eljárás azon 16S rRNS gén szekvenciájának meghatározása, amely szinte az összes baktériumban megtalálható⁴⁹. *Mycobacterium*-ok esetében a 16S rRNS génben található kisebb eltérések segítségével kidolgoztak egy polimeráz láncreakciós módszert (multiplex *Mycobacterium* PCR), melynek segítségével a *M. tuberculosis* komplexbe tartozó baktériumok megkülönböztethetőek a *M. avium* és *M. intracellulare* fajoktól, valamint kimutathatóak egyéb *Mycobacterium* fajok is⁵⁰. A rendszer alkalmazása egyszerű és gyors, mely a *Mycobacterium* nemzetségbe tartozó kiemelt fontosságú kórokozók szempontjából jelentős, emellett a tejmintákban előforduló egyéb fajok esetén is segítséget nyújt a nemzetség szintű meghatározásban. A faji szintű meghatározáshoz azonban a génszakasz további vizsgálatára, vagyis szekvenálásra van szükség, melyet szintén alapozhatunk a 16S rRNS gén felépítésére. Noha általánosságban még mindig ezt a gént vizsgálják a baktériumok meghatározására, a módszer a rendszertanilag egymáshoz közel álló fajokat tévesen azonosként határozhatja meg, tehát nem feltétlenül ad pontos eredményt⁵¹. Ezt a jelenséget figyelték meg például a gyorsan nöövő, azaz hét napon belül telepeket képző *Mycobacterium*-ok esetén, melyek közé tartozik a tőgygyulladás-kórokozó *M. fortuitum* és *M. smegmatis* is⁵². A pontos azonosítás érdekében sok más génszekvencia meghatározásával próbálkoztak, többek között az RNS polimeráz β alegységét kódoló *rpoB* gén szekvenciájával, mely eljárás ezen baktériumcsoportban alkalmasnak bizonyult az egyes fajok elkülönítésére⁵³.

Anyag és módszer

Minták

A vizsgált 309 tejmintát klinikai tüdőgyulladásból vagy magas szomatikus sejtszám alapján feltételezeten szubklinikai tüdőgyulladásból származott összesen 21 magyarországi tehenészeti telepről. A beküldő által aseptikusan gyűjtött tejminták a NÉBIH-ÁDI Bakteriológiai Laboratóriumába érkezve azonnal +4°C hőmérsékletű hűtőszekrénybe kerültek azonos munkanapon történő feldolgozás esetén, ellenkező esetben -20°C hőmérsékletű fagyaszóban tároltuk őket. A vizsgálat előkészítéséhez a mintákat szobahőmérsékletre (20-25°C) melegítettük, majd alaposan homogenizáltuk a csövek kézzel történő felrázásával. 50 µl-nyi tejmintát 5% juhvért és 1% eszkuint tartalmazó Columbia táptalajon szélesztettünk, majd 48 óráig +37°C hőmérsékletű termosztátba helyeztük, ezt követően újabb 48 óráig szobahőmérsékleten (20-25°C) inkubáltuk. Az inkubációs idő alatt a tenyészeteket naponta megvizsgáltuk, keresve a lassabban növekvő, *coryneform* baktériumokat, melyek vizsgálatunk tárgyát képezték.

Tenyészetek fenotípusos bírálata

A táptalajon kinőtt telepeken makroszkópos telepmorfológiai vizsgálatot végeztünk, figyelembe véve a telepek méretét, színét, állagát (nedves-S, száraz-R telepek) és kiemelkedését a táptalaj felületéhez képest. A vizsgálatot a telepek átoltása után minden alkalommal megismételtük.

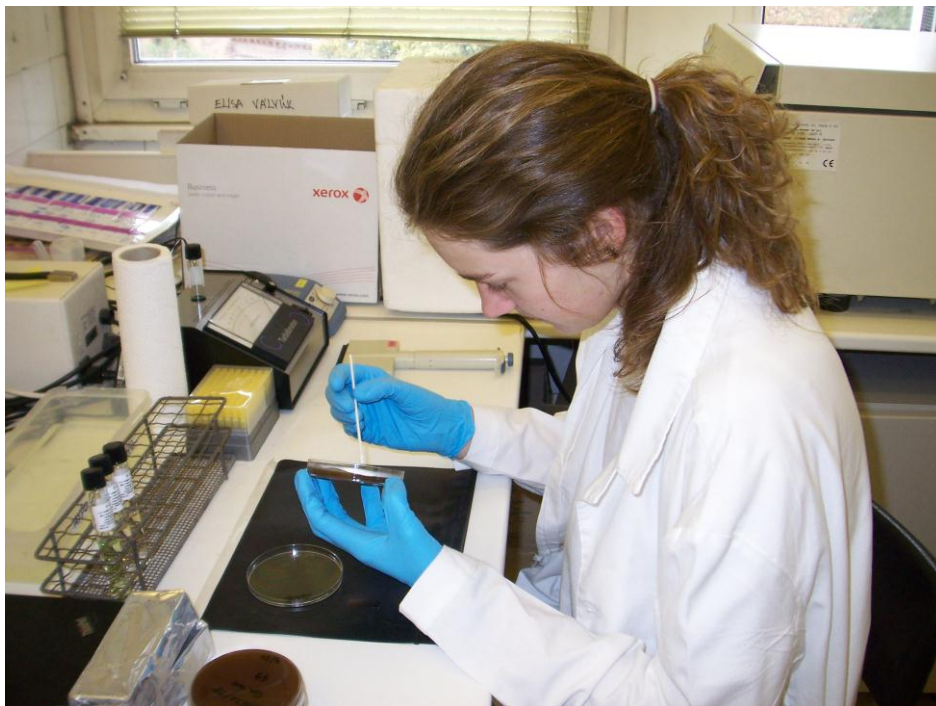
A telepekből oltókacs és steril fiziológiás sóoldat segítségével zsírtalanított tárgylemezeken keneteket készítettünk, melyeket megszáritottunk és Bunsen égő lángja felett fixáltunk, majd megfestettünk Gram és Ziehl-Neelsen szerint. A Gram festéshez a kenetet 1 percig ammónium-oxalátot tartalmazó kristályibolya-oldattal festettük, majd 1 percig Lugol-oldattal fedtük. Vizes öblítés után 10 másodpercig 96%-os alkoholos kivonást végeztünk, melynek vizes leöblítése után a kenetet 1 percig safraninnal kontrasztfestettük, végül vizes öblítés után szárítottuk. A Ziehl-Neelsen festéshez a kenetet Ziehl-féle karbolsavas fukszin oldattal festettük, Bunsen égő lángja felett háromszor gőzölésig melegítettük, lehűlés után vízzel öblítettük, 15-20 másodpercig 5%-os kénsav oldattal, majd ennek leöntése után 10-15 másodpercig 96%-os alkohollal kezeltük, melynek vizes öblítése után a kenetet 5-10 másodpercig metilénkék-oldattal kontrasztfestettük, végül vizes öblítés után szárítottuk. A

megszáradt, festett keneteket immerziós objektívvel 1000x-es nagyításon vizsgáltuk. Gram festés esetén a kékes-lila szín jelentette a pozitív (pozitív kontroll a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), a rózsaszín a negatív baktériumokat (negatív kontroll az *Escherichia coli* ATCC 25922). Ziehl-Neelsen festés esetén a pozitív baktériumokat a piros szín, a negatívakat a kék szín jelezte. A baktériumok színe mellett a morfológiájukat is vizsgáltuk.

A telepekről azonnali eredményt adó gyors tesztek, azaz kataláz, oxidáz és indol próbákat végeztünk. A kataláz próbához a tenyészet 10 µl-es oltókacsnyi mennyiségét tiszta tárgylemez felületére cseppentett 3%-os H₂O₂-oldatba merítettük, és értékeltük a buborékképződést, mely megjelenése a próba pozitivitását jelentette. Az oxidáz próbához a tenyészet kacsnyi mennyiségét Bactident oxidáz tesztcsík (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) felületére kentük, és 20-60 másodpercen belül értékeltük a kékes elszíneződést (pozitív) vagy annak hiányát (negatív). Az indol teszthez tiszta tárgylemez felületére helyezett szűrőpapírra 1 csepp indol spot reagenst (90 ml steril desztillált víz és 10 ml 37%-os sósav elegyében feloldott 1 g p-dimetil-amino-cinnam-aldehidet (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország)) cseppentettünk, melyre a tenyészet kacsnyi mennyiségét felkentük, és 1 percen belül értékeltük a kékes-zöld elszíneződést (pozitív) vagy annak hiányát (negatív).

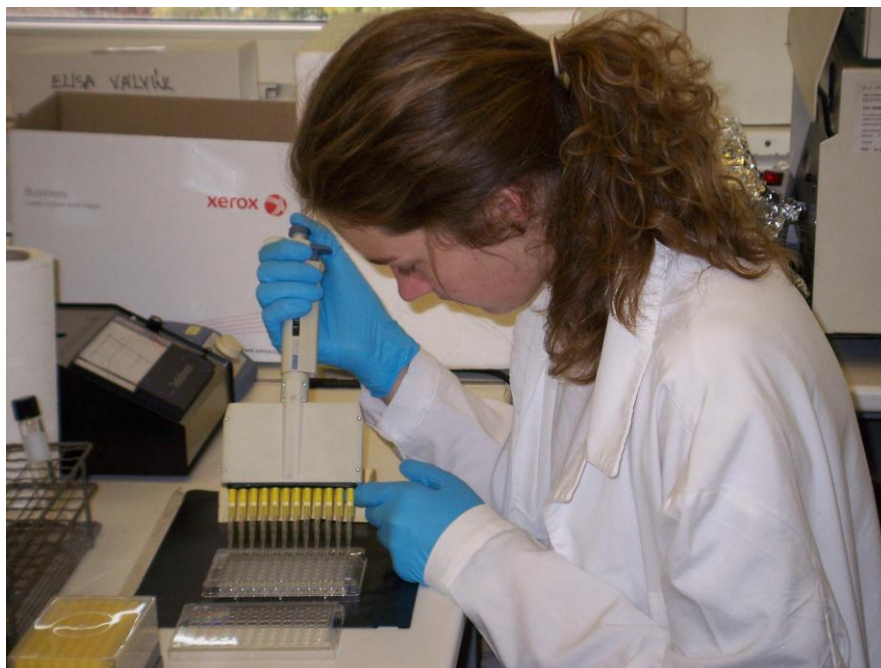
A klasszikus biokémiai tesztek közül az ureáz és nitrát próbákat végeztük el. Ehhez a tenyészetből egy telepet átoltottunk Columbia táptalajra vagy *Mycobacterium*-ok tenyésztéséhez használt Middlebrook táptalajra (Becton Dickinson Hungary Kft., Budapest, Magyarország), majd a próbákat a kétszer 48 órás inkubáció (37°C-on és szobahőmérsékleten) után a szintenyészetekből végeztük el. Az ureáz teszthez a tenyészetből legalább 4 McFarland sűrűségű szuszpenziót készítettünk steril fiziológiás sóoldatban, melynek 250 µl-nyi mennyiségét steril üvegcsőbe mértük. A baktérium szuszpenzióhoz 1 db ureáz tablettát (Rosco Diatabs, BioConnections, Nagy-Britannia) adtunk, a csövet papírdugóval zártuk, majd alapos keverést követően 24, illetve 48 óráig 37°C-on inkubáltuk, majd értékeltük a ciklámen színváltozást (ureáz bontás pozitív) vagy annak hiányát (sárga alapszín, negatív). A nitrát próbához a tenyészet kacsnyi mennyiségét nitrát levesbe oltottuk (10 g Bakto-pepton (Oxoid Ltd., Hampshire, Nagy-Britannia) és 1,5 g kálium-nitrát 1000 ml desztillált vízben feloldva, pH 7,4-7,5-re beállítva, szűrve, autoklávban sterilizálva, gumidugóval lezárva), majd 24, illetve 48 órán át 37°C-on inkubáltuk. Az inkubációt követően 1 csepp NIT1 és NIT2 reagenst (BioMérieux Hungaria Kft., Budapest, Magyarország) cseppentettünk a leveshez és alaposan összeráztuk, majd értékeltük a mélybordó színváltozást (nitrát redukció pozitív) vagy annak hiányát (negatív).

A színtenyészetekről a Biolog™ rendszer (GEN III MicroLog Manual System™; Biolog Inc., Hayward, Kalifornia, USA) segítségével 52 törzsről fenotípusos ujjlenyomatot készítettünk. A tenyészetekből egy telepet átoltottunk 10% juhvért tartalmazó egységesített BUG+B (Biolog™ Universal Growth + Blood) agarra és 48, illetve 72 órán át 33°C-on inkubáltuk. Az inkubációs időt követően a baktériumokat steril vattatampon (Inoculatorz™, Biolog Inc.) segítségével a gyártó által *Mycobacterium*-ok részére javasolt inokulátumkészítő folyadékban (IF-B) szuszpendáltuk (**1. ábra**).



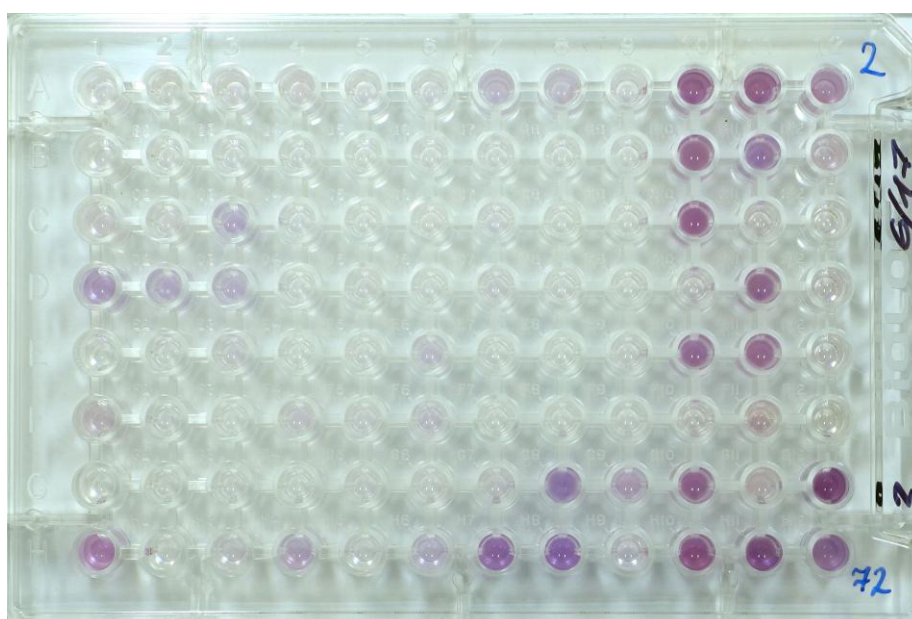
1. ábra: A mintákat steril vattatampon (Inoculatorz™) segítségével vettük le a BUG+B táptalaj felületéről.

A szuszpenziót a Biolog™ sűrűségmérő (Turbidimeter No. 3532) segítségével a B protokollnak megfelelő 90-98%-os sűrűsége állítottuk be. Az így elkészített szuszpenzióból a 96 lyukú GEN III Microplate™ 1 negatív és 1 pozitív kontrollt, valamint 71 szénforrást és 23 kémiai vegyületet vízmentes formában tartalmazó vájolataiba 100-100 µl-nyi mennyiségeket mértünk, majd a lemezeket 72 óráig 33°C-on inkubáltuk (**2. ábra**).



2. ábra: A GEN III Microplate™ vájolataiba a 100-100 µl-nyi baktériumszuszpenziót 12 csatornás pipetta segítségével mértük ki.

Az inkubációs idő 48. és 72. órájában a lemezek vájolataiban a lila színreakció meglétét vagy hiányát szemmel bíráltuk, a gyártó utasítása szerint a pozitív kontrollal megegyező vagy annál erősebb színváltozást pozitívnak, a negatív kontrollal megegyező szintelen lyukakat negatívnak, a halvány színváltozást pedig kétesnek értékeltük (3. ábra).



3. ábra: A GEN III Microplate™ vájolataiban megjelenő színváltozást szemmel bíráltuk.

Az eredményt a Biolog rendszerhez tartozó MicroStation™ System/Microlog™ szoftver segítségével rögzítettük. Az adatok összesítését a Biolog RetroSpect™ Trending and Tracking Software segítségével végeztük el.

Molekuláris biológiai vizsgálatok

A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz a baktériumtörzsekből készített szintenyészeteket használtuk. A baktériumsejtek elölését és a DNS feltárását ultrahangos hőkezeléssel (szonikálás) végeztük az Elma Ultrasonic Cleaner (Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co KG, Singen, Németország) berendezés segítségével. A mintákat 12000 rpm-n 15 percig centrifugáltuk, templátként a felülúszóból vett 5-5 µl-nyi mennyiségeket használtuk.

Az előző vizsgálatok alapján feltételezhetően a *Mycobacterium* nemzetségbe tartozó baktériumtörzsek közül összesen 168 mintából multiplex *Mycobacterium* polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatot végeztünk WILTON és COUSINS módszere alapján⁵⁰. A PCR reakciókat az Applied Biosystems Thermal Cycler 2720 gép (Life Technologies Magyarország Kft., Budapest) segítségével végeztük. A PCR-termékek láthatóvá tételéhez agarózgél-elektroforézist használtunk. A 1,5%-os agaróz gélre Gelsafe DNS festék (Bio-Rad Magyarország Kft., Budapest) hozzáadásával öntöttük ki. A génlétrát (GeneRuler 100bp DNA Ladder; Biocenter Kft., Szeged, Magyarország), a mintákat és a kontrollokat a gélbe készített zsebekbe mértük, majd 190V-on 40 percig futtattuk. Ezt követően a gélre UV fény alá helyezve tettük láthatóvá a génszakaszokat.

A multiplex *Mycobacterium* PCR segítségével *Mycobacterium* sp.-ként azonosított törzsek közül 35 törzs esetében az rpoB gén alapján történő szekvenálást végeztünk az ADEKAMBI és munkatársai által kidolgozott módszer szerint⁵³.

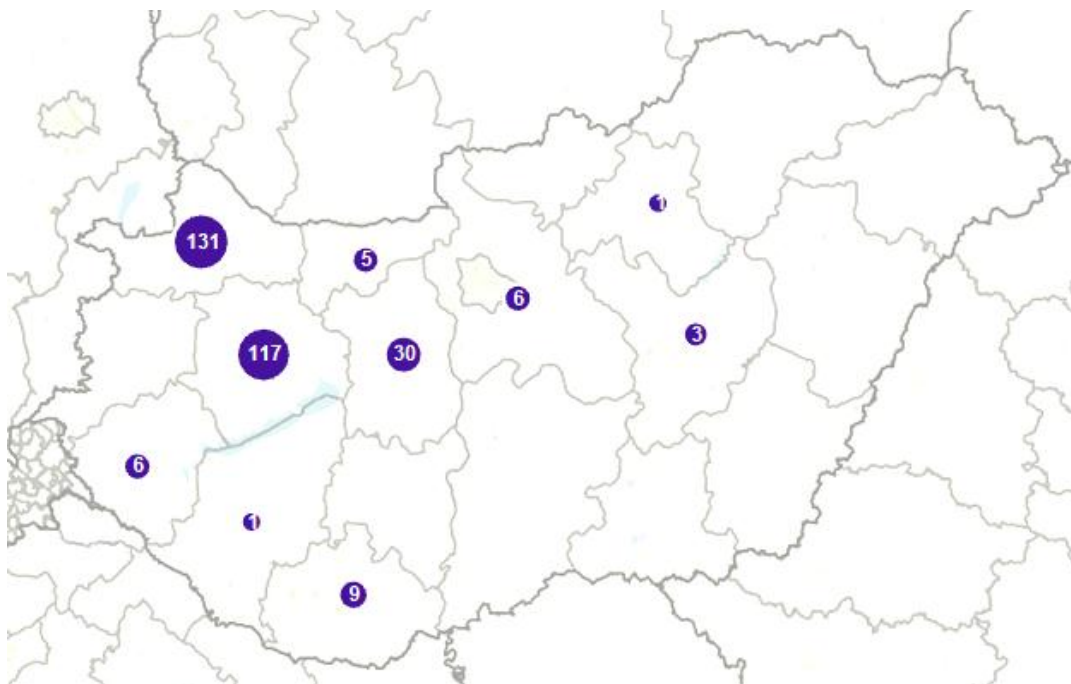
Az előzetes vizsgálatok alapján feltételezhetően nem a *Mycobacterium* nemzetségbe tartozó 27 törzs esetében a szekvenálást a 16S rRNS-t kódoló gén felhasználásával JANDA és ABBOTT leírása szerint végeztük⁴⁹.

A szekvenálásokhoz a PCR termékeket tartalmazó agarózgélből a DNS kivonását a QIAquick Gel Extraction Kit 250 (Qiagen N. V., Hilden, Németország) segítségével, a gyártó utasításai alapján végeztük. A tisztított DNS termékeket az alkalmazott primerekkel együtt elküldtük a Biomi Kft. (Gödöllő, Magyarország) részére, mely napokon belül elektronikus üzenetben küldte el a minták szekvenálásával kapott eredményeket. A kapott szekvenciák szerkesztéséhez és javításához a SeqMan NGen szoftvert (DNASTAR Inc., Madison,

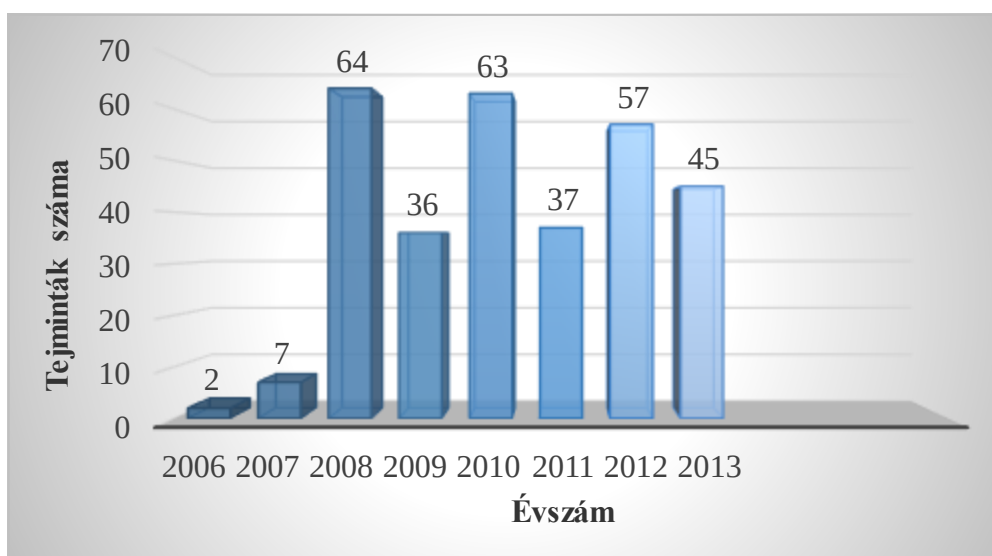
Wisconsin, USA) használtuk. A véglegesnek minősített konszenzus szekvenciákat a Nucleotide BLAST program segítségével a National Center for Biotechnology Information (NCBI) génbankjában⁵⁴ tárolt szekvenciákkal összeegyeztetve, a mintákat a 99-100%-os egyezést mutató törzsekkel azonosítottuk. A meghatározott szekvenciákból mind a két vizsgált génre vonatkozóan törzsfákat készítettünk a MegAlign szoftver (DNASTAR Inc.) segítségével.

Eredmények

A kutatásunk alapjául szolgáló tejminták Magyarország különböző területeiről érkeztek a NÉBIH-ÁDI Bakteriológiai Laboratóriumába, a vizsgált 309 minta 10 megyéből és 21 tejhasznú szarvasmarha-tartó gazdaságból származott (**4. ábra**), melyeket 2006 és 2013 első feléve között gyűjtöttünk össze (**5. ábra**). A 309 tejmintából 48 azonos krotáliaszámmal rendelkező tehenekből került beküldésre.



4. ábra: A vizsgált minták eloszlása és száma megyénként.



5. ábra: A vizsgált minták számának alakulása 2006 és 2013 között.

A táptalajon a telepek az első 48 órás inkubációt követően gyakran nem vagy alig nőttek ki, jellemzően a 3. és 4. napon váltak jól láthatóvá. A telepmorfológia leírását a későbbi pontos azonosítások alapján adtuk meg. A *Mycobacterium*-ok esetében kis, közepes méretű, piszkossárga-krémsárga színű, nedves vagy nyálkás, domború telepeket figyelhattunk meg. A *Corynebacterium* telepei kis, közepes nagyságúak, szürkésfehér-piszkossárga színűek, szárazak és laposak voltak. A *Nocardia*-telepek aprók, narancs-rózsaszínűek, szárazak és laposak voltak. A *Rhodococcus* telepei kis, közepes méretűek, szürkésfehér színűek, igen nyálkásak és domborúak voltak. A *Dietzia*-ra a kicsi, narancs-rózsaszín, nedves és domború telepek voltak jellemzőek. A *Gordonia* törzsek megjelenése nagyon változatos volt, méret szerint kisebb vagy nagyobb, szétterő, szín alapján sötét narancssárga vagy narancs-rózsaszínű, állaguk szerint száraz vagy nedves, a táptalajhoz viszonyított kiemelkedésüket tekintve lapos vagy enyhén domború telepeket is megfigyeltünk (6. ábra).



6. ábra: *Gordonia paraffinivorans* két törzse Columbia táptalajon

A Gram szerint festett keneteken a negatívnak tűnő *Mycobacterium*-ok kivételével mindegyik baktérium pozitív volt, bár a *Nocardia* és *Rhodococcus* törzsek esetében szemcsézettséget és labilis festődést is megfigyeltünk. A Ziehl-Neelsen festéssel készült kenetek esetében a *Mycobacterium*-ok mellett a *Gordonia* egy-egy törzsénél, az első leoltásból készült keneteken is előfordultak pozitív baktériumok, ezek átoltás után készült keneteken már a többi törzshöz hasonlóan negatívként tűntek fel. A *Mycobacterium*-ok öregedő tenyészeteinél gyakran előfordult az eltérő festődés, mintha Ziehl-Neelsen negatívak lennének. A baktériumok morfológiáját tekintve a *Mycobacterium*-ok közepes vagy hosszú pálcákként, gyakran kötegekbe rendeződve, a *Corynebacterium* és a *Nocardia* pleomorf alakokban, a *Rhodococcus* kokkuszok és közepes pálcák formájában, a *Dietzia* kettős

kokkuszkok és kokkusz-halmazok képében, a *Gordonia* pedig kokkuszosként és rövid pálcákként tűntek fel.

A gyors tesztek közül a kataláz próba mindegyik törzsnél pozitív volt, s bár kisebb eltéréseket megfigyeltünk a buborékképződés sebességében és a buborékok méretében, ezek nem mutattak szignifikáns különbséget. Az oxidáz próba a *Mycobacterium*, a *Rhodococcus*, a *Dietzia* és a *Gordonia* törzsek esetében negatív volt, a *Corynebacterium*-nál pozitív, a *Nocardia* törzsek közül az egyik pozitív, a másik negatív reakciót mutatott. Az indol teszt mindegyik vizsgált törzs esetében negatív volt.

A klasszikus biokémiai tesztek közül az ureáz próbában a *Mycobacterium* és a *Rhodococcus* törzsek pozitívnak, a *Corynebacterium*, a *Dietzia* és a *Gordonia* törzsek negatívnak bizonyultak, a *Nocardia* törzsek közül az egyik pozitív, a másik negatív reakciót mutatott. A nitrát redukciós próba a *Mycobacterium* és a *Dietzia* esetében pozitív volt, a többi vizsgált törzs esetében negatív, kivéve egy *Gordonia* törzset, mely lassan, halvány színváltozást mutatva pozitívnak bizonyult.

A vizsgált nemzetségekre vonatkozó festődési és biokémiai tulajdonságok összesítését az **1. táblázat** szemlélteti.

Nemzetségek	Gram festés	Ziehl-Neelsen festés	Kataláz	Oxidáz	Indol	Ureáz	Nitrát
<i>Mycobacterium</i>	-/(+)	+	+	-	-	+	+
<i>Corynebacterium</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>Nocardia</i>	+	-	+	+/-	-	+/-	-
<i>Rhodococcus</i>	+	-	+	-	-	+	-
<i>Dietzia</i>	+	-	+	-	-	-	+
<i>Gordonia</i>	+	+/-	+	-	-	-	-(+)

1. táblázat: A vizsgált nemzetségek festődésének, gyors tesztjeinek és klasszikus biokémiai vizsgálatainak összehasonlítása.

A Biolog GEN III Microplate™ lemezekon a 48 órás inkubációt követően a legtöbb vizsgált törzs esetében csak halvány, nehezen elbírálható színváltozást tapasztaltunk. Ezen törzseket a rendszerhez tartozó Microlog™ szoftver nem volt képes meghatározni. Egy törzs esetében a jellegtelen mintázat miatt felmerült, hogy a vizsgálatot a program javaslata alapján az általános A protokollon is megismételjük, ezt az IF-A inokuláló folyadék felhasználásával a B protokollhoz hasonló módon hajtottuk végre. A 48 órás inkubációt követően egy B protokoll szerint vizsgált törzs és az A protokoll alapján vizsgált törzs esetében kaptunk

pontos eredményt, a meghatározott fajok 0,575 hasonlósági érték alapján a *Rhodococcus erythropolis*, és 0,615 hasonlósági értékkel a *Corynebacterium bovis* voltak.

A lemezek leolvasásakor a vizsgált törzs fenotípusos ujjlenyomatát a Microlog™ szoftver automatikusan összeveti a Biolog™ adatbázisában található, a vizsgált törzshöz leginkább hasonlító négy baktérium mintázatával, jelölve a vizsgált és az adatbázisban lévő tulajdonságok közötti eltéréseket. Emellett a program lehetőséget nyújt a vizsgált törzs részletes összehasonlítására az adatbázisban található bármely baktériummal. Ezt az összehasonlítást úgy végezhetjük el, hogy az általunk leolvasott mintázat mellett külön ablakban megnyitjuk a Biolog™ adatbázisát, melyben a felsorolt baktériumok közül egyet kiválasztva megjelenik a hozzá tartozó fenotípusos ujjlenyomat grafikus és számszerű ábrázolása, melyet a saját vizsgálatunk eredményei mellé téve megnézhetjük, hol találhatók különbségek. A számszerű ábrázolásban a számok százalékos arányban kifejezett átlagos maximum értékeket jelentenek, melyeket az adott baktériumfaj számos törzsével végzett vizsgálatok alapján állapítottak meg. A grafikus ábrázolás ez alapján készül, lila kör mutatja azt a tulajdonságot, amelyre a törzsek több mint 80%-a pozitív, színtelen, üres kör jelzi azt a tulajdonságot, amelyre a törzsek negatívak illetve 20%-nál kisebb mértékben pozitívak. A program azokat a tulajdonságokat, amelyeknél a törzsek 20%-nál több, de 80%-nál kevesebb esetben pozitívak, egy átlósan metszett, félig világoskék körrel ábrázolja. A leolvasás során ugyanezeket a szimbólumokat használhatjuk a pozitív, a negatív és a kétesként értékelt vájulatokra. A leolvasáskor azonban a kétes megjelölést a gyártó utasítása alapján akkor alkalmazzuk, amikor a reakciót csak halvány színváltozás jelzi, ez viszont nem egyezik az adatbázisban található jelöléssel, amely azt jelenti, hogy az adott tulajdonságra egy baktériumfaj pozitív vagy negatív reakciót is adhat. Ebből következően az általunk leolvasott, grafikusan ábrázolt mintázatot minden esetben összehasonlítottuk az adatbázisban tárolt százalékos értékekkel (7. ábra).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	A	0	2	0	45	0	0	28	0	0	100	97	66
B	○	○	○	○	○	⊕	○	○	⊕	○	○	○	B	0	0	0	0	0	74	0	0	80	96	68	28
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	C	2	0	76	0	0	0	0	0	100	9	97	
D	⊕	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	D	82	78	75	79	24	0	0	0	0	7	42	13
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	E	0	0	0	81	0	11	60	0	0	10	84	8
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	F	38	0	0	83	0	0	0	58	0	8	21	37
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	G	0	0	0	80	82	0	18	83	23	100	91	100
H	○	⊕	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	H	62	61	74	80	66	18	82	79	0	100	55	92

7. ábra: Bal oldalon a *R. erythropolis* általunk leolvasott fenotípusos ujjlenyomata grafikus ábrázolásban, a Microlog™ által jelzett, a Biolog™ adatbázisában tárolt mintázathoz viszonyított eltérésekkel; **Jobb oldalon** a *R. erythropolis* mintázata számszerű ábrázolásban (%).

A lemezek 72 órás inkubációját követően a Microlog™ szoftver az 50 vizsgált törzsből 14-et azonosított faji szinten, amely azonban a molekuláris vizsgálatok alapján tévesnek bizonyult, a Biolog™ adatbázisa a szekvenálással meghatározott *Mycobacterium* és *Gordonia* fajokat nem tartalmazta. A *Mycobacterium*-ok közül egy törzset *M. neoaurum*-ként, egy törzset *Nocardia asteroides*-ként azonosított. *Gordonia* törzsek esetében a leggyakoribb egyezés a *Gordonia effusa*-val történt, de előfordult egy-egy azonosítás *Nocardia* és *Williamsia* nemzetségekbe tartozó baktériumokkal is. A többi vizsgált törzs esetében a hasonlósági érték nem érte el a meghatározáshoz szükséges mértéket, bár a program ebben az esetben is megjelenítette a vizsgált törzshöz legközelebb álló négy találatot.

A molekuláris biológiai módszerekkel meghatározott 16 *Gordonia paraffinivorans* törzs fenotípusos ujjlenyomata alapján a Biolog™ adatbázisába illeszthető, az értékeket százalékos formában megjelenítő táblázatot készítettünk (**2. táblázat**).

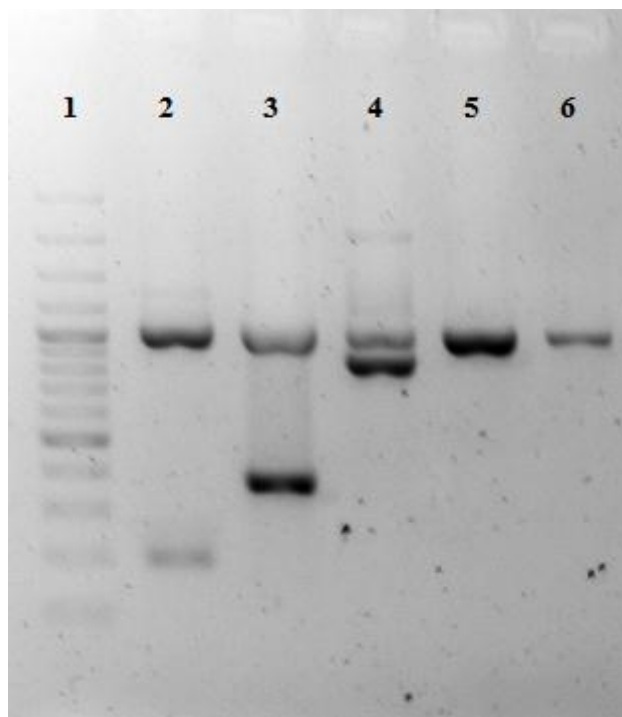
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	19	63	88	0	0	100	88	0	100	100	94
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	94	75
C	75	13	88	0	0	0	13	0	0	100	0	0
D	63	63	63	0	25	0	94	0	0	6	56	0
E	0	0	69	0	0	81	6	0	0	63	100	0
F	100	0	0	94	0	100	0	0	0	25	100	0
G	0	13	0	0	0	6	25	81	75	100	88	94
H	100	0	44	100	44	100	100	100	50	100	100	100

2. táblázat: *Gordonia paraffinivorans* fenotípusos ujjlenyomata 16 törzs vizsgálata alapján (%).

A törzsek között a vizsgált 94 tulajdonság közül 34 esetben tapasztaltunk eltérést. A törzsek 94%-a volt pozitív D-fruktóz-6-foszfát, D-glükonsav, pH5, 4%-os NaCl és kálium-tellurit vizsgálatakor, 88% D-trehalóz, D-turanóz, D-fruktóz és lítium-klorid esetén, 81% L-glutaminsav és L-almasav szempontjából, 75%-os pozitivitás volt α -D-glükóz, 2-brómborostyánkősav és 8%-os NaCl esetén, 69% L-alaninra, 63% D-maltóz, D-szorbitol, D-mannitol, D-arabitol és linkomicin esetén, 56% rifamicin SV-re, 50% hangyasavnál, 44% α -hidroxi-vajsav és α -keto vajsav esetén, 25% glicerol, D-almasav és vankomicin vizsgálatában, 19% dextrinre, 13% D-mannóz, D-fukóz és metil-piruvát esetén és mindössze 6%, azaz egy-egy törzs volt pozitív L-hisztidin, α -keto-glutársav és troleandomicin vizsgálata során. 60 tulajdonságra vonatkozóan a törzsek megegyeztek. A 96 lyukú Biolog GEN III Microplate™ lemezek felépítése megtekinthető a Biolog™ internetes honlapján (www.biolog.com)⁵⁵.

A Biolog RetroSpect™ Tracking and Trending Software segítségével a Microlog™ szoftverből importált adatok dolgozhatók fel. A program "Tracking" funkciója grafikusan ábrázolja a lemezekhez tartozó adatokat, lehetővé téve az azokban létrejövő változások nyomonkövetését. A "Trending" funkció az adatokat egy megadott időintervallumban összesíti. Mivel vizsgálataink során nem csak a Biolog™ rendszert használtuk, valamint az adatok importálását egy időpontban végeztük, ezen funkciókat nem alkalmaztuk. A program lehetőséget nyújt a vizsgált törzsek fenotípusos ujjlenyomata alapján törzsfa készítésére, azonban az egyes törzsek közti különbségtétel részleteit nem ismerteti. Az általunk vizsgált törzsek többségét a rendszer nem tudta azonosítani, így a készített törzsfa sem volt reprezentatív. Ehelyett a molekuláris biológiai vizsgálatok során meghatározott szekvenciák alapján készítettünk törzsfákat.

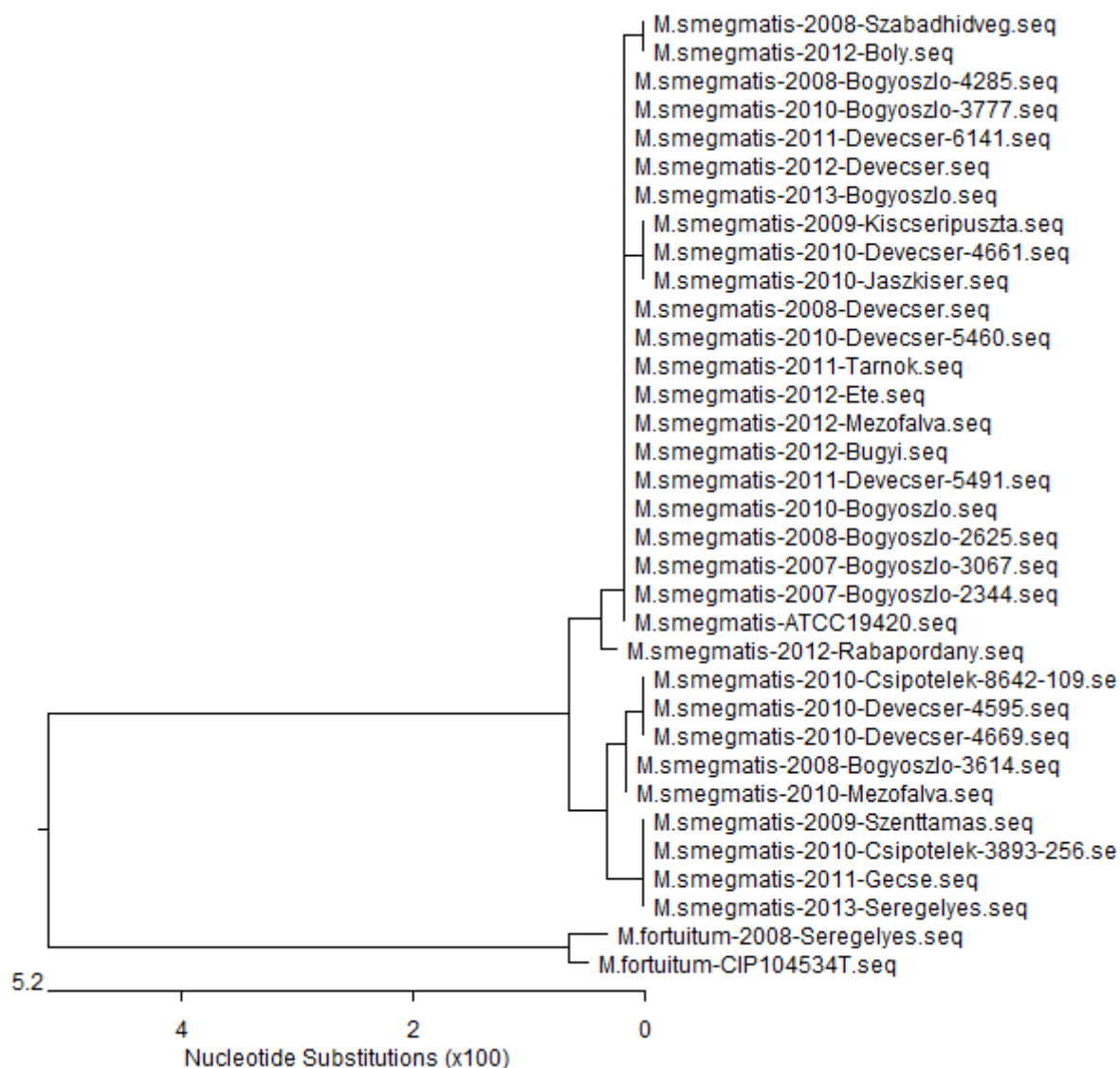
A multiplex *Mycobacterium* PCR segítségével a vizsgált 168 törzset *Mycobacterium* sp.-ként azonosítottuk (5. ábra).



8. ábra: A multiplex *Mycobacterium* PCR pozitív kontrolljai mellett két *Mycobacterium* sp.-ként azonosított minta látható (5, 6).

Az UV fény segítségével láthatóvá tett génszakaszok a génlétra (8. ábra: 1) mellett fekete csíkként tűntek fel, a *M. avium* komplex pozitív kontrollja 1030 és 180 bázispároknál (8. ábra: 2), a *M. tuberculosis* komplex pozitív kontrollja 1030 és 372 bázispároknál (8. ábra: 3), a *M. intracellulare* pozitív kontrollja a 1030 és 850 bázispároknál (8. ábra: 4). A vizsgált minták esetében csak 1030 bázispárnál látszott a PCR termék (8. ábra: 5, 6), mely alapján a mintákat egyértelműen elkülönítettük a pozitív kontrollként használt baktériumtörzsektől, valamint a *Mycobacterium*-okra specifikus génszakasz alapján a *Mycobacterium* nemzetségbe soroltuk őket.

A multiplex *Mycobacterium* PCR segítségével *Mycobacterium* sp.-ként meghatározott törzsek közül 35 törzs esetében az *rpoB* gén alapján történő szekvenálást végeztünk, melynek eredményeként 34 törzset *Mycobacterium smegmatis*-ként, egy törzset *Mycobacterium fortuitum*-ként azonosítottunk. A törzsek közötti rokonsági viszonyok ábrázolására egy törzsfát hoztunk létre, mely egy *M. smegmatis* törzs kivételével az összes általunk meghatározott törzs szekvenciája alapján, valamint a *M. smegmatis* ACC19420 és a *M. fortuitum* CIP104534T referenciatörzsek felhasználásával készült. A törzsfán az azonosított törzsek neve mellett az izolálás évszámát, helyét és sok esetben a tehén krotáliaszámát is feltüntettük, amelyből a tejminta származott (9. ábra).

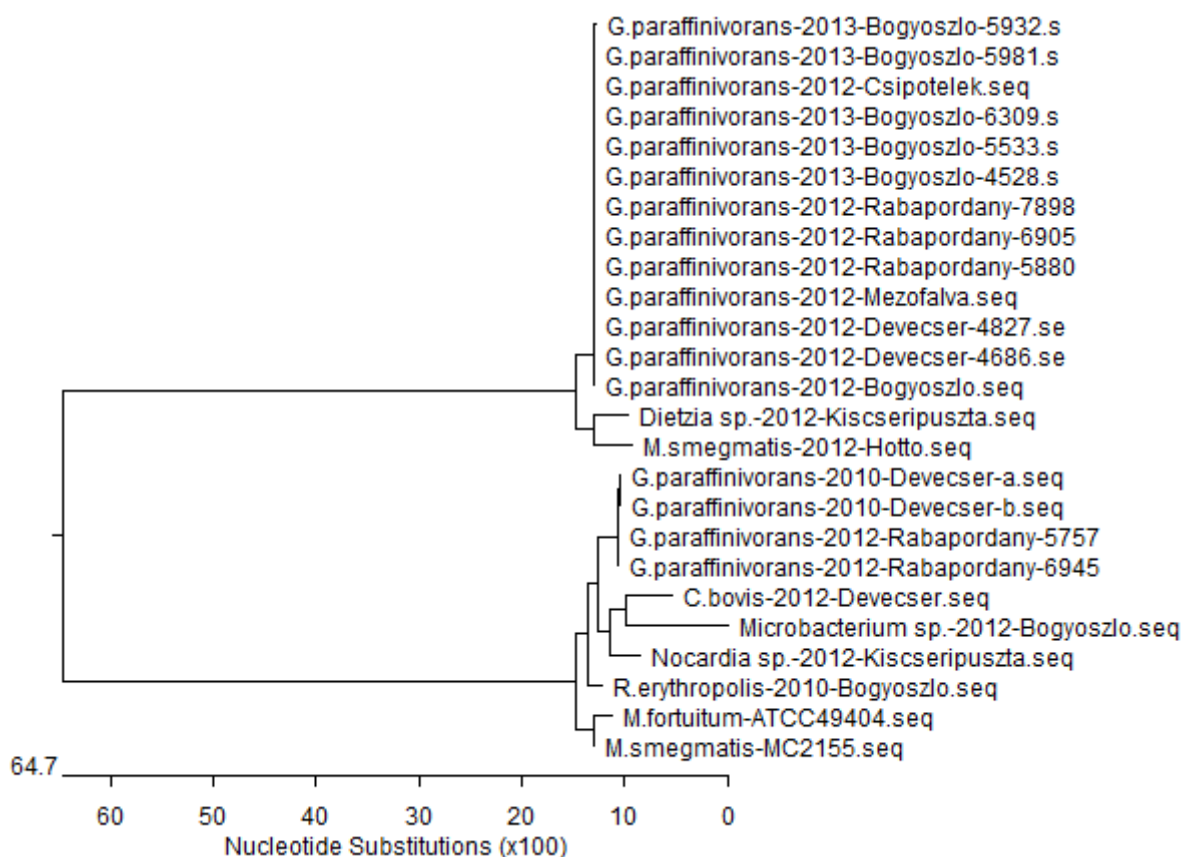


9. ábra: Az rpoB gén szekvenciájára alapozott, a *Mycobacterium* törzsek rokonsági viszonyait ábrázoló törzsfá.

A *M. fortuitum* törzs a törzsfán is jól láthatóan elkülönül a többi baktériumtól, közelebb áll a *M. fortuitum* referenciatörzséhez, bár nem egyezik vele teljes mértékben. A *M. smegmatis* törzsek a törzsfá alapján két nagyobb csoportra oszlanak, az egyik csoportba a *M. smegmatis* referenciatörzséhez nagy mértékben hasonló vagy azzal megegyező, a másik csoportba az attól nagyobb mértékben eltérő baktériumok találhatóak. A referenciatörzshöz viszonyított eltérés, valamint az azonos szekvenciával rendelkező baktériumok sem köthetők évszámhoz vagy származási helyhez.

Azoknál a törzseknél, amelyekről az előzetesen elvégzett vizsgálatok alapján feltételeztük, hogy nem tartoznak a *Mycobacterium* nemzetségbe, a szekvenálást a 16S rRNS-

t kódoló gén alapján végeztük, melynek eredményeként 22 törzset *Gordonia paraffinivorans*-ként, 2 törzset *Nocardia* sp.-ként, egy-egy törzset pedig *Corynebacterium bovis*-ként, *Rhodococcus erythropolis*-ként és *Dietzia* sp.-ként azonosítottunk. A rokonsági viszonyok ábrázolására szintén létrehoztunk egy törzsfát (10. ábra), melynek az összeállításához a meghatározott törzsek közül 17 *G. paraffinivorans*, valamint egy-egy *Nocardia* sp., *C. bovis*, *R. erythropolis* és *Dietzia* sp. szekvenciáit használtuk fel. Ezen kívül a törzsfán jelöltük a jelen tanulmányban részletesen nem szereplő, de a NÉBIH-ÁDI Bakteriológiai Laboratóriumában korábban elvégzett, még nem publikált kutatásból származó, tejmintákból izolált *Mycobacterium smegmatis*-ként, valamint *Microbacterium* sp.-ként meghatározott törzseket. Az azonosított törzsek neve mellett az adott törzs izolálására vonatkozó adatok szerepelnek. Referenciatörzsekként a *M. smegmatis* MC2155 és a *M. fortuitum* ATCC49404 törzseket tüntettük fel.



10. ábra: A 16S rRNS-t kódoló gén szekvenciájára alapozott, a *Corynebacterinae* alrendbe tartozó törzsek rokonsági viszonyait ábrázoló törzsfá.

A *G. paraffinivorans* törzsek nagy részénél azonos szekvenciákat kaptunk, melyek a törzsfá egyik nagy ágát alkotják, négy törzs esetében azonban a szekvenciák bizonyos

helyeken következetesen eltértek a többségtől, a törzsfán is jól láthatóan elkülönülnek. A *G. paraffinivorans* törzsek nagyobbik részéhez igen közel áll a *Dietzia* sp.-ként meghatározott törzs és a korábbi vizsgálatokból származó, a referenciatörzshöz képest eltérő *M. smegmatis* törzs. A vizsgálatunk során azonosított *Corynebacterium*, *Nocardia* és *Rhodococcus* törzsek, valamint a korábbi kutatásból származó, a *Corynebacterium*-mal szoros rokonságban álló *Microbacterium* törzs a szekvenciáik alapján megkülönböztethetőek, a törzsfán a rokonságukat mutatta egy ágról erednek, de egymástól jól elkülöníthető, kisebb ágakra válnak szét, a referenciaként használt *Mycobacterium* törzsektől pedig egyértelműen elválaszthatóak.

A szekvenálással meghatározott, illetve a törzsfákon szereplő egyéb törzsekre vonatkozó adatokat összefoglalóan az **1. melléklet** szemlélteti, melyben az azonos állatból származó törzseket megegyező színekkel jelöltük.

A törzsfán szereplő 17 *G. paraffinivorans* törzs szekvenciájának egy szakaszán, a törzsek többségétől ("Majority") eltérő négy törzsnél megfigyelhető különbségeket a **2. melléklet** szemlélteti, melyen az eltéréseket keretbe foglalva emeltük ki.

Megbeszélés

Kutatásunk célja az volt, hogy klasszikus bakteriológiai és molekuláris biológiai módszerek felhasználásával kidolgozzunk egy diagnosztikai eljárást, melynek segítségével a tőgygyulladásból származó tejmintákból azonosíthatóak a *Corynebacterinae* alrendbe tartozó kórokozó baktériumok.

2006-ban a NÉBIH-ÁDI Bakteriológiai Laboratóriumában (korábban Országos Állategészségügyi Intézet (OÁI)), megváltoztatták a tőgygyulladásban megbetegedett tehenekből származó tejmintákból a kórokozó mikroorganizmusok kimutatására vonatkozó protokollt. A táptalajokat a 48 órás 37°C-on történő inkubációt követően, negatív eredmény esetén nem a 37°C-os termosztátban, hanem szobahőmérsékleten (20-25°C) inkubálták tovább. A tapasztalatok alapján a hosszabb inkubációs idő az alacsonyabb hőmérsékleten kedvezett a környezetből származó, lassabban növő mikroorganizmusoknak. Ettől az évtől kezdődően egyre több baktériumot mutattak ki ezzel a módszerrel, melyeket fenotípusos tulajdonságaik alapján alapvetően a gyorsan növő, azaz 7 napon belül, de legtöbbször már 3-4 napon belül telepeket képző *Mycobacterium*-ok közé soroltak⁵². Többek között ezek a törzsek szerepeltek a vizsgálatunk alapját képező 309 mintában, melyek közül 48 azonos krotáliaszámmal rendelkező tehénből került beküldésre, vagyis ugyanabban az állatban hosszabb ideig zajló vagy ismételten megjelenő tőgygyulladásból izoláltuk a kórokozót. Ez bizonyítja az azonosított baktérium szerepét a betegség kóroktanában, kizárva azt, hogy a mikroorganizmus a környezetből származó szennyeződésként került a mintába. Egy törzs, a *Rhodococcus erythropolis* esetében nem zárható ki teljes bizonyossággal a környezeti kontamináció, mert ezt a törzset csak egyszer, egyetlen tejmintából azonosítottuk, melynek a többi vizsgált törzshöz hasonlóan a mintavételi körülményeit, és az arra vonatkozó aszeptikusság szabályainak betartását nem ismerjük. Ugyanez érvényes a *Dietzia* sp.-ként kimutatott törzsre is, ezt azonban tőgygyulladás kórokozójaként már leírták Afrikában¹⁴, így feltételezhetjük, hogy hazánkban is előfordulhat hasonló megbetegedés esetén.

A táptalajon kinőtt telepek morfológiai vizsgálata során több törzsnél is megfigyeltünk narancssárga és rózsaszín pigmentáltságot, mely a gyorsan növő *Mycobacterium*-okra nem jellemző, kivéve a *M. smegmatis* csoportot, melyeknél azonban csak 7-10 napos inkubáció után látható sárga-narancssárga pigmentáció⁵⁶. A *Mycobacterium*-okkal közös alrendbe tartozó nemzetségekben azonban több pigmentképző baktérium is található. A telepek pigmentáltságát a *Nocardia*-fajok azonosításának szempontjaként írták le⁵⁷, a *Dietzia* és

Gordonia nemzetségekben pedig egy-egy baktériumból kivont pigmentanyagot használnak, illetve használhatónak tartanak táplálékkiegészítőként baromfi-, illetve hal-takarmányozásban^{15,58}. Az általunk vizsgált *Gordonia* törzsek színváltozatain kívül a nemzetségbe tartozó egyéb baktériumoknál megfigyeltek már fehér, halvány sárga, sárgásbarna és barna telepeket is⁵⁹, ahogyan a telepmorfológia egyéb tulajdonságaiban tapasztalt változékonyságot is leírták⁶⁰.

A *Corynebacterinae* alrend tagjai a Gram pozitív baktériumok közé tartoznak²⁰, vizsgálataink során a *Mycobacterium* törzsek mégis Gram negatívként tűntek fel. A jelenség a *Mycobacterium*-ok Gram festéssel szembeni rezisztenciája mellett régóta ismert, alkalmasnak tartották a kórokozók jelenlétének korai igazolására is⁶¹, azonban a pontosabb azonosítást a baktériumok sav- és alkoholálló képességén alapuló, a XIX. század végén Ziehl és Neelsen által kifejlesztett festési eljárás alapozta meg²¹. A Ziehl-Neelsen szerint festett keneteinken a *Mycobacterium*-ok mellett a *Gordonia* törzsek között is előfordultak pozitívak, mely a nemzetségre jellemző enyhe saválló képességnek köszönhető¹⁵. A vizsgált egyéb nemzetségbe tartozó törzsek Ziehl-Neelsen negatívak voltak, noha az *Actinomycetales* rendbe tartozó baktériumokra jellemző a részleges savtűrő képesség, melynek következtében pozitív reakciót is adhatnak, nehezítve elkülönítésüket⁶².

A munkánk során alkalmazott klasszikus bakteriológiai módszerek, azaz a telemorfológia megfigyelése, a festési eljárások és a biokémiai próbák segítségével a vizsgált törzseket nem tudtuk egyértelműen azonosítani, ezért próbáltuk meg a 94 fenotípusos tulajdonságot egyszerre tesztelő BiologTM rendszer szerinti meghatározást. Az eljárással vizsgált 52 törzsből a MicrologTM program 16-ot azonosított faji szinten, ebből azonban a később elvégzett molekuláris biológiai vizsgálatok alapján csak kettő bizonyult pontosnak. A két pontosan azonosított törzs a *Rhodococcus erythropolis* és a *Corynebacterium bovis* voltak, bár ezeknél is alacsony, az azonosításhoz szükséges, 0,5-ös értéket csak kis mértékben meghaladó hasonlósági értékek szerepeltek. A törzsek fenotípusos ujjlenyomatának általunk leolvasott grafikus ábrázolását az adatbázisban található fajokra vonatkozó számszerű ábrázolással összehasonlítva már egyértelműbbé vált a vizsgált és az azonosítás alapjául vett fajok közötti hasonlóság. Ekkor állapítottuk meg azt is, hogy a leolvasás során a gyártó utasítása alapján használt szimbólumok, melyeket az adatbázis megnyitásakor a grafikus ábrázolás is tartalmaz, nem ugyanazt jelentik. Ezen szempontok alapján a program alkalmazásakor minden esetben javasoljuk a leolvasott mintázat összevetését az adatbázisban tárolt, a fenotípusos ujjlenyomatot százalékos értékekben kifejező számszerű ábrázolással.

A Microlog™ általi téves, valamint negatív eredményt adó azonosítás oka az volt, hogy a Biolog™ adatbázisában az általunk vizsgált baktériumfajok nem szerepeltek. A molekuláris biológiai módszerekkel meghatározott 16 *Gordonia paraffinivorans* törzs fenotípusos ujjlenyomata alapján elkészítettünk egy, a Biolog™ adatbázisába illeszthető, az adott tulajdonságra vonatkozóan a pozitív törzsek arányát százalékos értékekben megjelenítő táblázatot (2. táblázat). A törzsek a vizsgált 94 tulajdonságból 34 esetben különböztek, mely mutatja fenotípusos változékonyságukat, amelyet a klasszikus bakteriológiai vizsgálatok során is tapasztaltunk. Az alacsony mintaszámból adódóan a mintázat nem tekinthető teljesen pontosnak, azonban a későbbiekben támpontot adhat a baktérium meghatározásához. A vizsgálatot nagyobb mintaszámmal elvégezve, kiegészítve a *Mycobacterium*-okra vonatkozó további vizsgálatok eredményeivel, a Microlog™ program alkalmassá válhat ezeknek a baktériumoknak az azonosítására.

A multiplex *Mycobacterium* PCR segítségével mindegyik vizsgált *Mycobacterium* törzset sikeresen azonosítottunk *Mycobacterium* sp.-ként. A módszer alkalmazása megfelelő felszereltségű laboratóriumokban jó eszközként szolgálhat a tejmintákban leggyakrabban előforduló *M. smegmatis* és *M. fortuitum* nemzetség-szintű meghatározásához, bár jelentőségét főként az adja, hogy a különböző mintákból a tuberkulózist okozó *Mycobacterium* fajok csoport szintű azonosításának eredményét direkt módon, 2-3 napon belül elérhetővé teszi⁵⁰.

A *Mycobacterium* törzsek rpoB gén alapján történő szekvenálása gyors és pontos azonosítást tesz lehetővé³⁷, bár újabb vizsgálatok szerint a biztos azonosításhoz javasolt a párhuzamosan elvégzett 16S rRNS gén alapú szekvencia-analízis is⁶³. Az általunk vizsgált törzsek közül 34 esetben *M. smegmatis*-t, egy esetben pedig *M. fortuitum*-ot mutattunk ki a mintákból. Mindkét faj ismert tőgygyulladás-kórokozó³, bár az általuk okozott betegség súlyosságáról a tapasztalatok megoszlanak^{64,65}. Az azonosított szekvenciák alapján létrehozott törzsfán a *M. smegmatis* törzsek jól láthatóan eltérnek egymástól, térhez és időhöz nem köthetően két nagyobb csoportra oszlanak, ami alapján feltételezzük, hogy alapvetően két különböző törzstől erednek.

A molekuláris biológiai módszerekkel meghatározott *Mycobacterium* törzsek több mint 40 esetben ugyanabból az állatból származtak, ami alapján feltételezzük, hogy ezek a tehenek idült, nehezen gyógyuló vagy visszatérő tőgygyulladástól szenvedtek. Az azonos fajba tartozó *Mycobacterium* által okozott tőgygyulladás halmozott előfordulása egyes állományokban arra enged következtetni, hogy a baktériumok képesek állatról állatra terjedni

vagy a környezetben feldúsulhatnak, amely további állatok fertőződését és ezzel párhuzamosan a gazdasági károk fokozódását vonhatja maga után.

A 16S rRNS gén alapján végzett szekvenálással a *Gordonia*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus* és *Dietzia* nemzetségből származó törzseket egyértelműen el tudtuk különíteni egymástól és a referenciaként használt *Mycobacterium* törzsektől is. Ezért megállapíthatjuk, hogy a *Corynebacterinae* alrendbe tartozó baktériumok elkülönítésére a legbiztosabb laboratóriumi diagnosztikai eszköz a molekuláris biológiai módszerek alkalmazása, melyet a szekvenciákban mutatkozó eltérések további elemzésével kiegészítve még pontosabb, a törzsek eredetének megállapítására irányuló eredmények érhetők el.

Külön figyelmet érdemel a kutatásunk során a tejmintákból kimutatott 22 *Gordonia paraffinivorans* törzs, melyek közül 5 törzset ismételt izoláltunk ugyanazokból az állatokból, tehát bizonyíthatóan szerepet játszottak a tehenek tőgygyulladásában. A baktériumfajt a daqingi olajmezők mikroflórájának vizsgálata során, a talaj mélyéről vett vízmintából mutatták ki Daqingban, Kínában, és sorolták be új fajként a *Gordonia* nemzetségbe, elnevezésével a paraffinbontó képességére utalva⁵⁹. A *Gordonia* fajok között sok, hasonlóan magas metabolikus aktivitású baktérium található, de a nemzetségen belül fakultatív kórokozók is ismertek, melyeket az esetek többségében immunszuppresszált betegek másodlagos bakteriális fertőzése során azonosítottak⁴⁶. A *Gordonia paraffinivorans*-t azonban, jelen tanulmány elkészítéséig fakultatív kórokozóként sem humán páciensek, sem szarvasmarha tőgygyulladásával kapcsolatban nem írták le.

Összegezve, a *Corynebacterinae* alrendbe tartozó, tőgygyulladás-kórokozó baktériumok laboratóriumi diagnosztikájában a legpontosabb eredményt molekuláris biológiai vizsgálatokkal érhetjük el. Fontos, hogy a tejminták táptalajra oltása után, a 48 órás 37°C-on történő inkubációt követően negatív eredmény esetén a táptalajokat szobahőmérsékleten inkubáljuk tovább, keressük a lassabban növekvő környezeti kórokozókat is. A klasszikus bakteriológiai módszerek sem hagyhatók el, támpontot nyújthatnak a meghatározás orientálásában. A táptalajon narancssárga vagy rózsaszínű telepek kialakulását észlelve pedig Magyarországon gondolnunk kell rá, hogy az ilyen telepeket alkotó baktériumok a *Gordonia paraffinivorans* fajhoz is tartozhatnak.

Összefoglalás

Tejelő tehenészetek esetében a legmagasabb prevalenciájú és a legnagyobb gazdasági jelentőségű megbetegedés a tőgygyulladás, melyet leggyakrabban baktériumok okoznak. Az ismert kórokozók visszaszorításával egyre inkább előtérbe kerülnek a kevésbé vizsgált környezeti patogének, melyek közé sorolhatóak a *Corynebacterinae* alrendbe tartozó *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia* és *Dietzia* nemzetség képviselői, valamint saját vizsgálataink alapján a *Gordonia* nemzetségbe tartozó *Gordonia paraffinivorans* is, melynek tőgygyulladásban megnyilvánuló szerepének leírására a szakirodalom alapján még nem került sor.

Tanulmányunk célja az volt, hogy egy olyan diagnosztikai eljárást dolgozzunk ki, amely segítségével ezek a különleges kórokozók is azonosíthatóvá válnak egy rutin laboratórium számára.

A 2006 óta gyűjtött tejmintákat Columbia táptalajon szélesztettük, 37°C-on illetve szobahőmérsékleten kétszer 48 óráig inkubáltuk, majd a kinőtt telepeken morfológiai vizsgálatot, Gram és Ziehl-Neelsen szerinti festést, kataláz, oxidáz és indol próbákat végeztünk el. Egy telep Columbia vagy Middlebrook táptalajra oltásával szintenyészetet készítettünk, amelyből ureáz és nitrát próbákat teszteltünk. 52 törzset vizsgáltunk meg a Biolog™ Microlog M rendszerrel, 62 törzset pedig multiplex polimeráz láncreakció és szekvenálás segítségével határoztunk meg.

A hosszabb inkubációs idő alatt kialakult telepek a gyorsesztek és a klasszikus biokémiai vizsgálatok alapján nem voltak elkülöníthetőek, ezért próbáltuk meg a 94 tulajdonságot vizsgáló Microlog™ rendszer szerinti meghatározást, amely az 52 vizsgált törzsből 16-ot azonosított faji szinten, ebből azonban csak kettő bizonyult pontosnak. A szekvenálással meghatározott törzsek 34 *Mycobacterium smegmatis*, 1 *Mycobacterium fortuitum*, 22 *Gordonia paraffinivorans*, 2 *Nocardia* sp., valamint egy-egy *Corynebacterium bovis*, *Rhodococcus erythropolis* és *Dietzia* sp. voltak.

A Microlog™ adatbázisából hiányoznak a szekvenálás során meghatározott *Mycobacterium* és *Gordonia* fajok, de a rendszer lehetőséget nyújt egy saját panel létrehozására, amelyet nagyobb mintaszámmal elvégzett további vizsgálatok alapján megalkotva a program alkalmassá válhat a gyakorlat számára ezen lassan növvő tőgygyulladás-kórokozó baktériumok azonosítására. A molekuláris biológiai vizsgálatok eredményeként kapott szekvenciák azonos faj esetében sem mutatnak teljes egyezést, az egyes helyeken konzekvensen eltérő szakaszok elemzése későbbi kutatás tárgyát képezheti.

Summary

Identification of mastitis causing bacteria in the *Corynebacterinae* suborder

The disease with greatest prevalence and economic importance in dairy cows is mastitis, which is caused mostly by bacteria. By reducing the most common pathogens efficiently, the less known environmental pathogens have started to spread, like the representatives of *Corynebacterinae* suborder in genera *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia* and *Dietzia*, as well as *Gordonia paraffinovorans* in genus *Gordonia*, whose role in mastitis has not been published in the literature, yet.

The aim of this study was to develop a diagnostic method, which can help identify these special pathogens for routine laboratories.

The bovine milk samples collected from 2006 were isolated on Columbia agar, incubated for 48 hours on 37°C temperature and another 48 hours on room temperature, then morphology of the colonies were examined, Gram and Ziehl-Neelsen staining, catalase, oxidase and indole tests were executed. One colony from each sample was inoculated to Columbia or Middlebrook agar to make a pure culture, then urease and nitrate tests were performed. 52 strains were analysed by Biolog™ Microlog M system, and 62 strains were defined by multiplex polymerase chain reaction and sequencing.

The colonies evolved during the longer incubation period were not suitable to differentiation with quick tests and classical biochemical examinations, so the Microlog™ system capable to analyse 94 phenotypic tests was used. From the 52 analyzed strains 16 were identified at species level, however only two were proved to be accurate. The strains defined by sequencing were 34 *Mycobacterium smegmatis*, 1 *Mycobacterium fortuitum*, 22 *Gordonia paraffinivorans*, 2 *Nocardia* sp., and 1 strain of *Corynebacterium bovis*, *Rhodococcus erythropolis* and *Dietzia* sp.

The database of Microlog™ does not contain the *Mycobacterium* and *Gordonia* species identified by sequencing, but the system allows to create a custom ID, which can be made in a further study by using a larger number of samples, so this program can worked up suitable to identify these slowly growing mastitis pathogens. The sequences obtained as results of the molecular biological investigations were not completely identical for the same species, the analysis of the sections differing consistently at certain locations may be subject of a further research.

Mellékletek

1. melléklet: A szekvenálással azonosított baktériumtörzsek származási adatai.

Baktériumtörzsek	Évszám	Származási hely	Megye	Krotáliaszám
<i>M. smegmatis</i>	2007	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	2344
<i>M. smegmatis</i>	2007	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	3809
<i>M. smegmatis</i>	2007	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	3067
<i>M. smegmatis</i>	2008	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	4285
<i>M. fortuitum</i>	2008	Seregélyes	Fejér	2973
<i>M. smegmatis</i>	2008	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	2625
<i>M. smegmatis</i>	2008	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	3614
<i>M. smegmatis</i>	2008	Szabadhidvég	Fejér	4448
<i>M. smegmatis</i>	2008	Devecser	Veszprém	4954
<i>M. smegmatis</i>	2009	Szenttamás	Jász-Nagykun-Szolnok	513
<i>M. smegmatis</i>	2009	Kiscséripuszta	Fejér	11109
<i>M. smegmatis</i>	2010	Devecser	Veszprém	4595
<i>M. smegmatis</i>	2010	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	3777
<i>M. smegmatis</i>	2010	Jászkisér	Jász-Nagykun-Szolnok	-
<i>M. smegmatis</i>	2010	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	-
<i>M. smegmatis</i>	2010	Devecser	Veszprém	5460
<i>M. smegmatis</i>	2010	Csípótelek	Baranya	8642-109
<i>M. smegmatis</i>	2010	Csípótelek	Baranya	3893-256
<i>M. smegmatis</i>	2010	Devecser	Veszprém	4661
<i>M. smegmatis</i>	2010	Devecser	Veszprém	4669
<i>M. smegmatis</i>	2010	Mezőfalva	Fejér	2024
<i>M. smegmatis</i>	2011	Gecse	Veszprém	1783
<i>M. smegmatis</i>	2011	Tárnok	Pest	6623
<i>M. smegmatis</i>	2011	Devecser	Veszprém	5491
<i>M. smegmatis</i>	2011	Devecser	Veszprém	6141
<i>M. smegmatis</i>	2012	Hottó	Zala	690
<i>M. smegmatis</i>	2012	Bugyi	Pest	-
<i>M. smegmatis</i>	2012	Devecser	Veszprém	-
<i>M. smegmatis</i>	2012	Rábapordány	Győr-Moson-Sopron	7945
<i>M. smegmatis</i>	2012	Mezőfalva	Fejér	3182
<i>M. smegmatis</i>	2012	Devecser	Veszprém	5906
<i>M. smegmatis</i>	2012	Ete	Komárom-Esztergom	-
<i>M. smegmatis</i>	2012	Bóly	Baranya	685
<i>M. smegmatis</i>	2013	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	5789
<i>M. smegmatis</i>	2013	Seregélyes	Fejér	8442
<i>Corynebacterium bovis</i>	2012	Devecser	Veszprém	3590
<i>Nocardia sp.</i>	2012	Mezőfalva	Fejér	6291
<i>Nocardia sp.</i>	2012	Kiscséripuszta	Fejér	3622
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	2010	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	6362
<i>Dietzia sp.</i>	2012	Kiscséripuszta	Fejér	1386
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2010	Devecser	Veszprém	-
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2010	Devecser	Veszprém	-
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2012	Devecser	Veszprém	4827
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2012	Devecser	Veszprém	4827
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2012	Devecser	Veszprém	4686
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2012	Rábapordány	Győr-Moson-Sopron	6905
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2012	Rábapordány	Győr-Moson-Sopron	6905
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2012	Mezőfalva	Fejér	5292
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2012	Rábapordány	Győr-Moson-Sopron	5757
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2012	Rábapordány	Győr-Moson-Sopron	5880
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2012	Rábapordány	Győr-Moson-Sopron	6945
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2012	Rábapordány	Győr-Moson-Sopron	7898
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2012	Csípótelek	Baranya	1870
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2012	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	5425
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2013	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	6309
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2013	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	5981
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2013	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	4528
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2013	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	5932
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2013	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	6309
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2013	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	5981
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2013	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	5981
<i>Gordonia paraffinivorans</i>	2013	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	5533
<i>Microbacterium sp.</i>	2012	Bogyoszló	Győr-Moson-Sopron	5163

2. melléklet: 17 *Gordonia paraffinivorans* törzs 16S rRNS génjének szekvenciája 1201 és 1280 bázispárok között.

Majority	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA
	1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
G.paraffinivorans-2013-Bogyoszló-6309.s	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA
G.paraffinivorans-2010-Devecser-a.seq	ATCATGCCCTTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACA-ATGGCTGGTACAGAGGGGTGGATACCGTGAGGTGGAGCGA
G.paraffinivorans-2010-Devecser-b.seq	ATCATGCCCTTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACA-ATGGCTGGTACAGAGGGGTGGATACCGTGAGGTGGAGCGA
G.paraffinivorans-2012-Bogyoszló.seq	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA
G.paraffinivorans-2012-Csipotelek.seq	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA
G.paraffinivorans-2012-Devecser-4686.se	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA
G.paraffinivorans-2012-Devecser-4827.se	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA
G.paraffinivorans-2012-Mezofalva.seq	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA
G.paraffinivorans-2012-Rabapordány-5757	ATCATGCCCTTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACA-ATGGCTGGTACAGAGGGGTGGATACCGTGAGGTGGAGCGA
G.paraffinivorans-2012-Rabapordány-5880	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA
G.paraffinivorans-2012-Rabapordány-6905	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA
G.paraffinivorans-2012-Rabapordány-6945	ATCATGCCCTTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACA-ATGGCTGGTACAGAGGGGTGGATACCGTGAGGTGGAGCGA
G.paraffinivorans-2012-Rabapordány-7898	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA
G.paraffinivorans-2013-Bogyoszló-4528.s	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA
G.paraffinivorans-2013-Bogyoszló-5533.s	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA
G.paraffinivorans-2013-Bogyoszló-5932.s	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA
G.paraffinivorans-2013-Bogyoszló-5981.s	CCAGTGTGGCCGATCACCC---TCTCAGGTCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAA-CAAGCTGA

Irodalomjegyzék

- ¹ KOSSAIBATI, M. A., ESSLEMONT, R. J. 1977: The costs of production diseases in dairy herds in England. *The Veterinary Journal*, 154. vol. 1. no. p. 41-51.
- ² SEEGER, H., FOURICHON, C., BEADEAU, F. 2003: Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research*, 34. vol. 5. no. p. 475-491.
- ³ QUINN, P. J., CATRER, M. E., MARKEY, B., CATRER, G. R.: Clinical Veterinary Microbiology. Spain: Wolfe Publishing. p. 648.
- ⁴ JÁNOSI SZ. 2003: A tejtermelő tehenek tőgygyulladására elleni állományszintű védekezésének alapelvei. In: RAFAI P., BRYDL E., NAGY GY.: A sertés-, a szarvasmarha- és a háziújtartás higiénája és állomány-egészségtana. Bp.: Agroiinform K. p. 274-288.
- ⁵ BRADLEY, A. 2002: Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal*, 164. vol. 2. no. p. 116.
- ⁶ HUSZENICZA GY., ALBERT M. 2000: A különböző mikrobák okozta tőgygyulladások. In: SIMON G., SZITA G., MERÉNYI I.: Tőgyegészség és tehéntejminőség. Bp.: Mezőgazda K. p. 187-215.
- ⁷ HOMMEZ, J., DEVRIESE, L. A., VANEECHOUTTE, M., RIEGEL, P., BUTAYE, P., HAESBROUCK, F. 1999: Identification of nonlipophilic *Corynebacteria* isolated from dairy cows with mastitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37. vol. 4. no. p. 954-957.
- ⁸ BROWN-ELLIOT, B. A., BROWN, J. M., CONVILLE, P. S., WALLACE, R. J. 2006: Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 19. vol. 2. no. p. 259-282.
- ⁹ WAHBA, N. M., ELNISR, N. A. G., SAAD, N. M., NASR, S. M., ALI, W. M. 2011: Incidence of *Nocardia* species in raw milk collected from different localities of Assiut City of Egypt. *Veterinary World*, 4. vol. 5. no. p. 201-204.
- ¹⁰ DITCHFIELD, J., BUTAS, C. A., JULIAN, R. J. 1959: Mastitis due to *Nocardia braziliensis*. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 23. vol. 3. no. p. 93.

-
- ¹¹ PRESCOTT, J. F. 1991: *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 4. vol. 1. no. p. 20-34.
- ¹² WANI, S. A., BHAT, M. A., QURESHI, S., BACHH, A. S. 2003: Isolation of *Rhodococcus equi* from clinical bovine mastitis – a case report. *Indian Journal of Animal Research*, 37. vol. 1. no. p. 75-76.
- ¹³ RAINEY, F. A., KLATTE, S., KROPPESTEDT, R. M., STACKEBRANDT, E. 1995: *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45. vol. 1. no. p. 32-36.
- ¹⁴ HAMID, M. E. 2013: *Dietzia* species as a cause of mastitis: Isolation and identification of five cases from dairy cattle. *African Journal of Microbiology Research*, 7. vol. 29. no. p. 3853-3857.
- ¹⁵ ARENSKÖTTER, M., BRÖKER, D., STEINBÜCHEL, A. 2004: Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70. vol. 6. no. p. 3195-3204.
- ¹⁶ ÓZSVÁRI, L. 2004: A tögygyulladások által okozott gazdasági veszteségek számszerűsítése és becslése. In: ÓZSVÁRI L.: Állat-egészségügyi döntéselemzés a tejtermelő gazdaságokban. Doktori értekezés. Szent István Egyetem, Gazdaság- és Társadalomtudományi Kar, Gödöllő. p. 67-82. URL: <http://www.hungarovet.com/wp-content/uploads/2008/10/ozsvaril-phd-dolgozat.pdf>. Letöltés időpontja: 2013. 09. 16.
- ¹⁷ ALBERT M., HUSZENICZA GY. 2000: A tögygyulladások kórtani és klinikai jellemzői. In: SIMON G., SZITA G., MERÉNYI I.: Tőgyegészség és tehéntejminőség. Bp.: Mezőgazda K. p. 172-186.
- ¹⁸ FOX, L. K., GAY, J. M. 1993: Contagious mastitis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 9. vol 3. no. p. 475.
- ¹⁹ HOGEVEEN, H., PYORALA, S., HOGAN, J. S., LAM, T. J. G. M., OLIVER, S. P., SCHUKKEN, Y. H., BARKEMA, H. W., HILLERTON, J. E. 2011: Current status and future challenges in mastitis research. NMC 50th Annual Meeting, Arlington, Virginia, January 23-26, 2011. URL: <http://www.nmconline.org/articles/MastitisStatus.pdf>. Letöltés időpontja: 2013. 09. 16.

-
- ²⁰ STACHEBRANDT, E., RAINEY, F. A., WARD-RAINEY, N. L. 1997: Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systemic Bacteriology*, 47. vol. 2. no. p. 479-491.
- ²¹ KAZDA, J., PAVLIK, I., FALKANHIM III, J. O., HRUSKA, K. 2009: The ecology of *mycobacteria*: impact on animal's and human's health. New York: Springer. p. 540.
- ²² TAYLOR, G. M., STEWART, G. R., COOKE, M., CHAPLIN, S., LADVA, S., KIRKUP, J., PALMER, S., YOUNG, DB. 2003: Koch's bacillus – a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology*, 149. vol. 11. no. p. 3213-3220.
- ²³ WORLD HEALTH ORGANIZATION 2013: Global tuberculosis report 2013. Geneva: WHO. p. 289.
- URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf Megtekintés időpontja: 2013. 10. 19.
- ²⁴ WIRTH, T., HILDEBRAND, F., ALLIX-BÉGUEC, C., WÖLBELING, F., KUBICA, T., KREMER, K., SOOLINGEN, D., RÜSCH-GERDES, S., LOCHT, C., BRISSE, S., MEYER, A., SUPPLY, P., NIEMANN, S. 2008: Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PloS Pathogens*, 4. vol. 9. no. p. 1-10. URL: <http://www.plospathogens.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000160&representation=PDF> Letöltés időpontja: 2013. 09. 19.
- ²⁵ KARLSON, A., LESSEL, E. F. 1970: *Mycobacterium bovis* nom. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 20. vol. 3. no. p. 273-282.
- ²⁶ MAHAIRAS, G. G., SABO, P. J., HICKEY, M. J., SINGH, D. C., STOVER, C. K. 1996: Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of Bacteriology*, 178. vol. 5. no. p. 1274-1282.
- ²⁷ WEDLOCK, D. N., SKINNER, M. A., DE LISLE, G. W., BUDDLE, B. M. 2002: Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes and Infection*, vol. 4. no. 4. p. 471.
- ²⁸ WARD, A. I., SMITH, G. C. 2012: Predicting the status of wild deer as hosts of *Mycobacterium bovis* infection in Britain. *European Journal of Wildlife Research*, 58. vol. 1. no. p. 127-135.

-
- ²⁹ GARCÍA-JIMÉNEZ, W. L., BENÍTEZ-MEDINA, J. M., FERNÁNDEZ-LLARIO, P., ABECIA, J. A., GARCÍA-SÁNCHEZ, A., MARTÍNEZ, R., RISCO, D., ORTIZ-PELÁEZ, A., SALQUERO, F., J., SMITH, N. H., GÓMEZ, L., HERMOSO DE MENDOZA, J. 2013: Comparative pathology of the natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in wild boar (*Sus scrofa*). *Transboundary and Emerging Diseases*, 60. vol. 2. no. p. 102-109.
- ³⁰ OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2013: URL: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2013/> Megtekintés időpontja: 2013. 10. 20.
- ³¹ O'REILLY, L. M., DABORN, C. J. 1995: The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. *Tubercle and Lung Disease*, 76. vol. 1. no. p. 1-46.
- ³² HARDIE, R. M., WATSON, J. M. 1992: *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. *Epidemiology and Infection*, 109. vol. 1. no. p. 23-33.
- ³³ GRANT, I. R., BALL, H. J., ROWE, M. T. 1996: Thermal inactivation of several *Mycobacterium* spp. in milk by pasteurization. *Letters in Applied Microbiology*, 22. vol. 3. no. p. 253-256.
- ³⁴ INDERLIED, C. B., KEMPER, C. A., BERMUDEZ, L. E. 1993: The *Mycobacterium avium* complex. *Clinical Microbiology Reviews*, 6. vol. 3. no. p. 266-310.
- ³⁵ AYELE, W. Y., SVASTOVA, P., ROUBAL, P., BARTOS, M., PAVLIK, I. 2005: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*, 71. vol. 3. no. p. 1210-1214.
- ³⁶ PARDO, R. B., LANGONI, H., MENDON, L. J. P., CHI, K. D. 2001: Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38. vol. 6. no. p. 284-287.
- ³⁷ MENARD, L., VANASSE, C., DIAZ, C., RIVARD, G. 1983: *Mycobacterium chelonae* mastitis in a Quebec Dairy Herd. *The Canadian Veterinary Journal*, 24. vol. 10. no. p. 305-307.

-
- ³⁸ SUVAJDZIC, L., POTKONJAK, A., MILANOV, D., LAKO, B., KOCIC, B., MILIC, N., CABARKAPA, I. 2012: A proposal of a diagnostic protocol for isolation of *Corynebacterium ulcerans* from cow's milk. *Acta Scientiae Veterinariae*, 40. vol. 2. no. p. 1039-1046.
- ³⁹ FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F., COLLINS, M. D., HUTSON, R. A., FERNANDEZ, E., MONASTERIO, R., MARCO, J., DOMINGUEZ, L. 1997: *Corynebacterium mastitidis* sp. nov., isolated from milk of sheep with subclinical mastitis. *International Journal of Systemic Bacteriology*, 47. vol. 4. no. p. 1082-1085.
- ⁴⁰ LEGER, J. A. ST., BEGEMAN, L., FLEETWOOD, M., FRASCA, S., GARNER, M. M., LAIR, S., TREMBLEY, S., LINN, M. J., TERIO, K. A. 2009: Comparative pathology of nocardiosis in marine mammals. *Veterinary Pathology*, 46. vol. 2. no. p. 299-308.
- ⁴¹ BAWA, B., BAI, J., WHITEHAIR, M., PURVIS, T., DEBEY, B. M. 2010: Bovine abortion associated with *Nocardia farcinina*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22. vol. 1. no. p. 108-111.
- ⁴² ZHI, X-J., LI, W-J., STACKEBRANDT, E. 2009: An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 59. vol. 3. no. p. 589-608.
- ⁴³ DE CARVALHO, C. C. C. R., DA FONSECA, M. M. R. 2005: The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67. vol. 6. no. p. 715-726.
- ⁴⁴ PILARES, L., AGÜERO, J., VÁZQUEZ-BOLAND, J. A., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., NAVAS, J. 2010: Identification of atypical *Rhodococcus*-like clinical isolates as *Dietzia* spp. by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 48. vol. 5. no. p. 1904-1907.
- ⁴⁵ TSUKAMURA, M. 1971: Proposal of a new genus, *Gordona*, for slightly acid-fast organisms occurring in sputa of patients with pulmonary disease and in soil. *Journal of General Microbiology*, 68. vol. 1. no. p. 15-26.

⁴⁶ DRZYZGA, O. 2012: The strengths and weaknesses of *Gordonia*: A review of an emerging genus with increasing biotechnological potential. *Critical Reviews in Microbiology*, 38. vol. 4. no. p. 300-316.

⁴⁷ SZITA G. 2000: A tügygyulladást okozó mikroorganizmusok. In: SIMON G., SZITA G., MERÉNYI I.: Tügyegészség és tehéntejminőség. Bp.: Mezőgazda K. p. 153-171.

⁴⁸ GYURANECZ M., ERDÉLYI K., FODOR L., JÁNOSI K., SZÉPE B., FÜLEKI M., SZŐKE I., DÉNES B., MAKRAI L. 2009: Characterisation of *Francisella tularensis* strains, comparing their carbon source utilization. *Zoonoses and Public Health*, 57. vol., 6. no. p. 417-422.

⁴⁹ JANDA, J. M., ABBOTT, S. L. 2007: 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45. vol. 9. no. p. 2761-2764.

⁵⁰ WILTON, S., COUSINS, D. 1992: Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *Genome Research*, 1. vol. 4. no. p. 296-273.

⁵¹ FOX, G. E., WISOTZKEY, J. D., JURTSCHUK, P. 1992: How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systemic Bacteriology*, 42. vol. 1. no. p. 166-170.

⁵² BROWN-ELLIOTT, B. A., WALLACE, R. J. 2002: Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing *mycobacteria*. *Clinical Microbiology Reviews*, 15. vol. 4. no. p. 716-746.

⁵³ ADÈKAMBI, T., COLSON, P., DRANCOURT, M. 2003: rpoB-based identification of non-pigmented and late-pigmenting rapidly growing *mycobacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41. vol. 12. no. p. 5699-5708.

⁵⁴ NCBI GENBANK: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> Megtekintés időpontja: 2013. 09. 30.

⁵⁵ BIOLOG GEN III MICROPLATE™ INSTRUCTIONS FOR USE: <http://biolog.com/pdf/milit/00P%20185rA%20GEN%20III%20MicroPlate%20IFU%20Mar2008.pdf> Megtekintés időpontja: 2013. 09. 13.

⁵⁶ BROWN, B. A., SPRINGER, B., STEINGRUBE, V. A., WILSON, R. W., PFYFFER, G. E., GARCIA, M. J., MENENDEZ, M. C., RODRIGUEZ-SALGADO, B., JOST, K. C.,

CHIU, S. H., ONYI, G. O., BÖTTGER, E. C., WALLACE, R. J. JR. 1999: *Mycobacterium wolinskyi* sp. nov. and *Mycobacterium goodii* sp. nov., two new rapidly growing species related to *Mycobacterium smegmatis* and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49. vol. 4. no. p. 1493-1511.

⁵⁷ KISKA, D. L., HICKS, K., PETTIT, D. J. 2002: Identification of medically relevant *Nocardia* species with an abbreviated battery of tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 40. vol. 4. no. p. 1346-1351.

⁵⁸ ESFAHANI-MASHHOUR, M., MORAVEJ, H., MEHRABANI-YEGANEH, H., RAZAVI, S. H. 2009: Evaluation of coloring potential of *Dietzia natrolimnaea* biomass as source of canthaxanthin for egg yolk pigmentation. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 22. vol. 2. no. p. 254-259.

⁵⁹ XUE, Y., SUN, X., ZHOU, P., LIU, R., LIANG, F., MA, Y. 2003: *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading actinomycete isolated from an oil-producing well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53. vol. 5. no. p. 1643-1646.

⁶⁰ LINOS, A., BEREKAA, M. M., STEINBÜCHEL, A., KIM, K. K., SPRÖER, C., KROPPESTEDT, R. M. 2002: *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52. vol. 4. no. p. 1133-1139.

⁶¹ TRIFIRO, S., BOURGAULT, A-M., LEBEL, F., RENÈ, P. 1990: Ghost Mycobacteria on Gram stain. *Journal of Clinical Microbiology*, 28. vol. 1. no. p. 146-147.

⁶² MCNEIL, M. M., BROWN, J. M. 1994: The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 7. vol. 3. no. p. 357-417.

⁶³ KAZUMI, Y., MITARAI, S. 2012: The evaluation of an identification algorithm for *Mycobacterium* species using the 16S rRNA coding gene and rpoB. *International Journal of Mycobacteriology*, 1. vol. 1. no. p. 21-28.

⁶⁴ RICHARDSON, A. 1970: Bovine mastitis associated with *Mycobacterium smegmatis* and an untypable *Mycobacterium*. *Veterinary Record*, 86. vol. 17. no. 497-498.

⁶⁵ WHITNEY, H., PRIDDLE, F. 1992: Mastitis caused by a *Mycobacterium* sp. in a dairy herd. *The Canadian Veterinary Journal*, 33. vol. 5. no. p. 344.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik közreműködésükkel hozzájárultak a dolgozatom elkészítéséhez. Elsőként témavezetőimnek, dr. Jánosi Szilárdnak és dr. Rónai Zsuzsannának türelmükért, szakmai iránymutatásukért, útmutató tanácsaikért és azért, hogy az esetlegesen felmerülő kérdéseimre mindig készségesen válaszoltak. Továbbá köszönet illeti dr. Abonyi Tamást, a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állategészségügyi Diagnosztikai Intézet igazgatóját, amiért lehetővé tette, hogy az intézetben munkámat elkészíthessem. Köszönöm az intézet Bakteriológiai Laboratóriumában dolgozó munkatársainak a vizsgálataim elvégzésében nyújtott segítségüket. Köszönettel tartozom Prof. dr. Fodor László tanszékvezető egyetemi tanárnak, amiért engedte, hogy munkámat a SZIE-ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék nevében nyújtsam be elbírálásra.