

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi kar
MTA ATK, ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI INTÉZET

A *Coxiella burnetii* és a *Chlamydiales* rendbe tartozó fajok előfordulása és jelentősége hazai házi kérődzők vetéléses eseteiben és vadon élő kérődzőkben

Occurrence and significance of *Coxiella burnetii* and *Chlamydiales* spp. in abortions of domestic ruminants and in wild ruminants in Hungary

Készítette:

Tóbiás Enikő
5. évf., állatorvostan-hallgató

Témavezetők:

dr. Kreizinger Zsuzsa
tudományos munkatárs

dr. Gyuranecz Miklós
tudományos főmunkatárs

Budapest
2014.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. Rendszertan	6
2.1.1. <i>Coxiella burnetii</i>	6
2.1.2. <i>Chlamydiales</i> rend.....	6
2.2. Morfológia.....	6
2.2.1. <i>Coxiella burnetii</i>	6
2.2.2. <i>A Chlamydiales</i> rendbe tartozó fajok	7
2.3. Járványtan, kórfejlődés.....	8
2.3.1. <i>Coxiella burnetii</i>	8
2.3.2. <i>A Chlamydiales</i> rendbe tartozó, kérődzők vetélését előidéző fajok.....	9
2.4. Tünetek.....	9
2.4.1. <i>Coxiella burnetii</i>	9
2.3.2. <i>A Chlamydiales</i> rendbe tartozó, kérődzők vetélését előidéző fajok.....	10
2.5. Kórbonctan	11
2.5.1. <i>Coxiella burnetii</i>	11
2.5.2. <i>A Chlamydiales</i> rendbe tartozó, kérődzők vetélését előidéző fajok.....	12
2.6. Kórjelzés.....	13
2.6.1. <i>Coxiella burnetii</i>	13
2.6.2. <i>A Chlamydiales</i> rendbe tartozó fajok	13
2.7. Megelőzés, gyógykezelés, védekezés	14
2.7.1. <i>Coxiella burnetii</i>	14
2.7.2. <i>A Chlamydiales</i> rendbe tartozó fajok	14
2.8. Közegészségügyi vonatkozások.....	15
2.8.1. <i>Coxiella burnetii</i>	15
2.8.2. <i>A Chlamydiales</i> rendbe tartozó fajok	16
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	17
3.1. Mintagyűjtés és előkészületek.....	17
3.2. DNS-kivonás és real-time PCR-vizsgálat	18
3.3. Szövetteni és immunhisztokémiai vizsgálatok.....	20

4. EREDMÉNYEK	22
4.1. Coxiella burnetii	22
4.2. A Chlamydiales rendbe tartozó fajok	24
4.3. A Coxiella burnetii és a Chlamydiales rendbe tartozó fajok együttes előfordulása.....	26
5. MEGBESZÉLÉS	29
6. ÖSSZEFOGLALÁS	33
7. SUMMARY	34
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	35
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	36

1. BEVEZETÉS

A kérődző állatokban számos fertőző ágens és nem fertőző ok képes vetélést előidézni. A vetélést okozó baktériumok közül több az emberre is veszélyes, zoonotikus kórokozó. Ilyenek a leptospirák, a *Listeria monocytogenes*, a brucellák és az általunk vizsgált *Coxiella burnetii* és a *Chlamydiales* rendbe tartozó fajok is (MCVEY et al., 2013).

A *C. burnetii* és a *Chlamydiales* rendbe tartozó fajok egyaránt világszerte elterjedt, kisméretű, Gram-negatív, coccoid pálcá alakú, intracelluláris baktériumok. A házi kérődzők a legfontosabb rezervoárjai a *C. burnetii*-nek, amelyek gyakran tünetmentesen ürítik a kórokozót. Időnként azonban vetéléssel, koraelléssel, terméketlenséggel járó kórképeket okozhat a *C. burnetii* a kérődzőkben (VARGA et al., 1999). Különböző kullancsfajok vektorszerepet tölthetnek be a betegség járványtani ciklusában. A házi kérődzőállományok a legfontosabb forrásai az emberi megbetegedéseknek. A *C. burnetii* emberekben magas lázzal járó tüdő- és májgyulladást okozhat, idült esetben pedig szívbelhártya-gyulladás alakulhat ki (ANGELAKIS et al., 2010, 2014; PÁL, 2012).

A *Chlamydiales* rendbe tartozó fajok szarvasmarhában idült, perzisztáló fertőzéseket okoznak, melyek a termelés hatékonyságát nagymértékben ronthatják a tejtermelés, a termékenység és a súlygyarapodás csökkentése miatt. Egyéb fertőzésekkel és immunszuppresszív tényezőkkel együtt pedig már klinikai tünetekben manifesztálódó megbetegedéseket is előidéznek (REINHOLD et al., 2011). Juhban a *Chlamydia abortus* a juhok járványos vetélése néven ismert kórképet okozza (GYLES et al., 2010). A kérődzőkben előforduló fajok emberben ritkán okoznak tüneteket, de ha mégis, akkor az enyhe, influenzaszerű tünetektől kezdve igen súlyos kórképekig, mint az akut veseelégtelenség és a DIC (disszeminált intravaszkuláris koaguláció), sokféle megbetegedést előidézhetnek. Ezen kívül több fajról bebizonyosodott, hogy terhes nőkben vetélést válthatnak ki (BAUD et al., 2009, 2011, PÁL, 2012).

Egy korábbi hazai felmérésben valós idejű polimeráz láncreakciós vizsgálatokkal (rt-PCR) a *C. burnetii* DNS-ét mutatták ki a vizsgált tehéntejek 8,7%-ában, illetve a vizsgált juhtejek 4%-ában. A szeropozitivitás ugyanerre a kórokozóra szarvasmarhák körében komplementkötési próbával (KK) 19,3%-osnak, enzyme linked immunosorbent assay-jel (ELISA) 38%-osnak bizonyult. Ugyanebben a felmérésben a juhok esetében a szeropozitivitás KK próbákkal 0%-os, ELISA vizsgálatokkal 6%-os volt (GYURANECZ et al., 2012). Egy másik, kiskérődzők vetelését elemző, átfogó hazai vizsgálat eredményei alapján a *C. abortus* állt leggyakrabban a vetélések hátterében, a juhok fertőző eredetű vetélései közül

90%-ban, míg kecskék esetében 68%-ban azonosították, mint kiváltó okot. A *C. burnetii* előfordulása jóval ritkább volt ennél, a juhok fertőző eredetű vetéléseinek kevesebb, mint 4%-át, míg kecskében kicsit több mint 5%-át okozták (SZEREDI et al., 2006).

Az általunk végzett kutatás célja az volt, hogy átfogó képet kapjunk a *C. burnetii* és a *Chlamydiales*-fajok hazai előfordulásáról kérődző állatokban, és szerepükről a házi kérődző állatok vetélése eseteiben. Ennek érdekében juhokból, kecskékből, szarvasmarhákból, valamint őzekből, däm vadakból és gímszarvasokból származó mintákat vizsgáltunk meg rt-PCR-rel, kórszövettani és immunhisztokémiai (IH) módszerekkel.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Rendszertan

2.1.1. *Coxiella burnetii*

A *C. burnetii* a *Coxiellaceae* családba tartozó *Coxiella* nemzetség tagja. A *Coxiellaceae* családot a *Legionellaceae* családdal együtt a *Legionellales* rendbe sorolják. Ez a rend rendszertanilag a *Proteobacterium*ok törzsébe, ezen belül pedig a *Gammaproteobacterium*ok osztályába tartozik. A *Coxiellaceae* család tagjai még a *Coxiella* nemzetségen kívül az *Aquicella*, a *Diplorickettsia* és a *Rickettsiella* genus (NCBI, 2014).

2.1.2. *Chlamydiales* rend

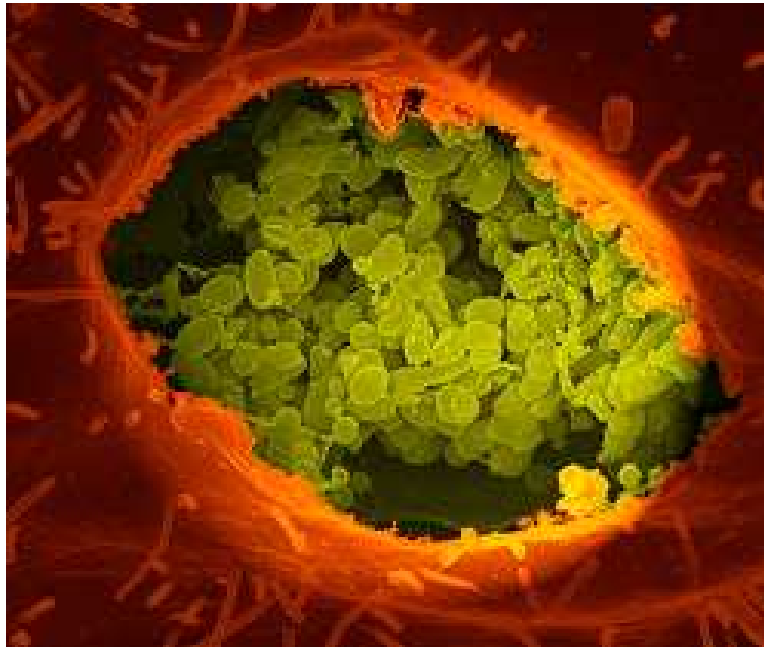
A *Chlamydiales* rend a *Chlamydiae* törzsbe, azon belül a *Chlamydiae* osztályba tartozó rendszertani csoport. A *Chlamydiales* rendbe tartozó fajokat 8 családba sorolják, ezek a *Chlamydiaceae*, a *Parachlamydiaceae*, a *Simkaniaceae*, a *Waddliaceae*, a *Criblamydiaceae*, a *Rhabdochlamydiaceae*, a *Clavichlamydiaceae* és a *Piscichlamydiaceae* családok (CROXATTO et al., 2014). A *Chlamydiaceae* család egyetlen nemzetsége a *Chlamydia* genus. Ebbe a nemzetségbe tartozik a *C. trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum*, *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. felis* és a *C. caviae* (SACHSE et al., 2014).

2.2. Morfológia

2.2.1. *Coxiella burnetii*

A *C. burnetii* egy kisméretű, Gram-negatív, coccoid pálca alakú, obligát intracelluláris baktérium (1. ábra). Lipopoliszacharid (LPS)-fázisvariációra képes, ennek megfelelően két alakban fordul elő. Az egyik a kis sejtes variáns (small cell variant, SCV), ami a rendkívül ellenálló, a környezetben sokáig életképes, fertőző forma. Ennek az LPS-e a viszonylag gyenge antigenitású I. fázisú antigént fejezi ki, ezáltal megakadályozza az immunrendszer reakcióját a felszíni fehérjékkel. A szervezetbe kerülő SCV sejtek a mononukleáris fagocita rendszer (mononuclear phagocyte system, MPS) sejtjeit fertőzik, és ahelyett, hogy megakadályoznák a fagolizoszóma kialakulását, pont annak savanyodásának hatására alakulnak ki az SCV sejtekből az osztódásra képes nagy sejtes variánsok (large cell variant, LCV). Az egy sejtben kialakuló több fagolizoszóma végül összeolvad és egy nagy

vakuólum képződik (PORTER et al., 2011). A szaporodás közben az I. fázisú antigén fázisvariáción megy át, így alakul ki a II. fázisú antigén. Az osztódás közben az LCV sejtekből ismét SCV sejtek keletkeznek, melyek a sejt lízise következtében a környezetbe kerülnek (PÁL, 2012).



1. ábra. Scanning elektronmikroszkópos felvétel egy megrepedt Vero-sejtről, melyben így láthatóvá vált egy osztódó *C. burnetii*-ket tartalmazó vakuólum, 7800-szoros nagyítás. (Forrás: www.niaid.nih.gov)

2.2.2. A *Chlamydiales* rendbe tartozó fajok

A chlamydiák szintén kisméretű, Gram-negatív, coccoid pálcá alakú, intracelluláris vakuólumokban szaporodó mikroorganizmusok (2. ábra). Obligát intracelluláris életmódjuk oka, hogy bár képesek saját makromolekuláik szintézisére, de sejthártyájukból hiányoznak az oxidatív enzimek - a flavoproteinek és a citokrómok -, ezáltal az ATP szintézisére képtelenek, ún. energiaparaziták. A 300 nm nagyságú chlamydiák - más néven kis chlamydiasejtek vagy elemi testek (ET) - a gazdasejt mikrovillusaihoz tapadva aktív penetrációval jutnak a sejtbe. Megakadályozzák az endoszóma savasodását és egyesülését a lizoszómával, ez biztosítja a túlélésüket. Ezt követően megnagyobbodnak és 1000 nm-es ún. hálózatos sejtekké, más szóval retikuláris testekké (RT) alakulnak. Ezek hozzájárulnak a mikroszkóppal is megfigyelhető zárványtestek kialakulásához. Többszörös osztódás után a sejtek zsugorodni kezdenek és ismét fertőzőképes elemi testekké alakulnak, melyek fajtól függően exocitózissal vagy a gazdasejt lízise révén szabadulnak ki a fertőzött sejtől, és ebben a

formában élnek túl a környezetben (PÁL, 2012). A chlamydiákra jellemző emellett a perzisztens fertőzések kialakítása. Ennek során életképes, atípusos retikuláris sejtek jönnek létre, melyek a normális RT-hez képest nagyobbak (aberrant bodies, AB) és a szervezet legkülönbözőbb sejtjeiben előfordulhatnak. Ezek kialakulását *in vitro* körülmények között, különféle negatív behatásokkal (antibiotikumok, bakteriofágok, tápanyagelvonás stb.) indukálni lehetett. Ezen kívül a *Parachlamydia acanthamoebae* fejlődési ciklusában egy ún. crescent body is ismert, mely az ő esetében a fertőző forma (GYLES et al., 2010).



2. ábra. Elektronmikroszkópos felvétel egy fagyasztva tört *C. abortus* zárványról 30 órával a fertőzés után. A képen jól látható, ahogy a chlamydiák a zárvány széli részén, a membránon gyűlnek össze, 7800-szoros nagyítás. (Forrás: www.chlamydiae.com)

2.3. Járványtan, kórfejlődés

2.3.1. *Coxiella burnetii*

A *C. burnetii* világszerte, így hazánkban is előfordul, ellenállóképessége a környezetben nagyon jó, beszáradt váladékokban akár egy évig is fertőzőképes maradhat. A baktérium a fertőzött állatok testváladékaiból képződött aeroszol belélegzésével, per os és kötőhártyán át is képes átjutni egyik állatról a másikra (VARGA et al., 1999). Egyébként a

kórokozót a kullancsok - nálunk főleg az *Ixodes ricinus*, vadon élő kistesű rágsálók, madarak, kutyák és a macskák is hordozhatják (ANGELAKIS et al., 2010, 2014), de a háziállatok közül a fertőzést elsősorban a kérődzők tartják fent (VARGA et al., 1999). A kórokozót a szél nagyobb távolságba is elsodorhatja (MARRIE et RAOULT, 1997). A fertőzést követően a *C. burnetii* átmeneti szeptikémiát okoz (VARGA et al., 1999), így jut a predilekciós helyek, így a nyirokcsomók, a vesék, a tüdő és a máj makrofágjaiba, valamint a vér monocitáiba (BACA et al., 1985), továbbá a tögybe és a vemhes méhbe is így kerül (VARGA et al., 1999). A magzat a vérkeringés útján és az amnionfolyadék száján át való felvételével fertőződik (AGERHOLM, 2013). A fertőzött állatok a kórokozót a tejjel, bélsarukkal, vizeletükkel és a nyálukkal ürítik, de fontos fertőzési forrás a hüvelyváladék, a magzatvíz és a vetélt szövetek is (GUATTEO et al., 2006). A pásztorkutyák a vetélt részek elfogyasztása útján fertőződhetnek (VARGA et al., 1999).

2.3.2. A *Chlamydiales* rendbe tartozó, kérődzők vetélését előidéző fajok

A *C. abortus*-szal történő fertőződés leggyakrabban a vetélt magzatburokból és a fertőzött hüvelyváladékból képződött aeroszol belélegzésével vagy per os felvételével történik. A beszáradt váladékokban a chlamydiák sokáig fertőzőképesek maradnak. A legújabb kutatások szerint azonban ízeltlábú vektorok, így kullancsok és bolhák is szerepet játszhatnak a terjesztésükben (CROXATTO et al., 2014). A szarvasmarha fertőződésében a legfontosabb tényezőnek a bélsárral nagy mennyiségben ürülő kórokozók száján át való felvételét tartják (REINHOLD et al., 2011). Ezen kívül elképzelhető a közvetlen érintkezés és a különböző testváladékokban jelenlévő kórokozók általi fertőzés, valamint a nemi úton történő átvitel, bár ez utóbbi valószínűleg nem játszik fontos szerepet a terjesztésben. A bejutást követően a kórokozó a mandulákban szaporodik el és a vérárammal jut el a különböző szervekbe. A gyomor-béltraktusban hosszan perzisztáló fertőzések alakulhatnak ki (GYLES et al., 2010).

2.4. Tünetek

2.4.1. *Coxiella burnetii*

A *C. burnetii* iránt sok madár- és emlősfaj fogékony, de klinikai tüneteket általában nem okoz. Szarvasmarhában, juhban és kecskében, ritkán egyéb állatfajokban a Q-láznak nevezett betegséget idézheti elő. Kérődzőkben elvétele étvágytalanságot, a tejtermelés csökkenését, vagy kötőhártyagyulladást okozhat, illetve veteléshez, koraelléshez vezethet,

valamint halva született vagy csökkent életképességű utód ellését eredményezheti (AGERHOLM et al., 2012). A vetélés a vemhesség végén következik be. Szarvasmarhában a fertőzöttség azonban gyakran tünetmentes marad, és ha ki is alakulnak klinikai tünetek, azok inkább terméketlenség, méh- és tőgygyulladás formájában mutatkoznak (TO et al., 1998). Kecskékben a fent említett tüneteken kívül tüdőgyulladás is kialakulhat, továbbá a szarvasmarhához hasonlóan krónikus fertőzés maradhat fent a méhben és a tőgyben (SÁNCHEZ et al., 2006). Juhokban a krónikus fertőzöttség kevésbé jellemző (VAIDYA et al., 2008).

2.3.2. A *Chlamydiales* rendbe tartozó, kérődzők vetélését előidéző fajok

A *C. abortus* okozza a juhok enzootiás vetélését (endemic abortion of ewes, EAE). Világszerte a leggyakoribb vetélést okozó ágens kiskérődzőkben, de a szarvasmarhát, a sertést, a lovat és az őzet is megfertőzheti. Az anyában ritkán okoz tüneteket, ha igen, az általában hüvelyi folyásban nyilvánul meg - ez kecskékben viszont gyakrabban előfordul, mint juhokban. A juhok enzootiás vetélése során a vetélés általában a vemhesség utolsó 2-3 hetében jelentkezik, esetleg halva született vagy csökkent életképességű újszülött ellése következhet be. Klinikai tünetek általában az állományba újonnan bekerülő fiatal egyedekben és első vemhes anyákban alakulnak ki. Ezekben az esetekben juhokban 30%-os, míg kecskékben 60%-os vetelési ráta is kialakulhat. Ez 2-3 évig marad fenn, amíg közel az összes nőtény fertőzötté nem válik, mivel az átvészelés élethosszig tartó védettséget okoz, tehát ritka a másodszori vetélés. A vetélések aránya ezután 5% alatt marad, amíg ki nem alakul egy újabb járvány az elsővemhes anyák között (GYLES et al., 2010). Kosokban a *C. abortus* a szeptikémia során eljuthat a herékbe, a mellékherékbe és az ondóhólyagba, aminek következménye idült gyulladás és az ondó minőségének romlása (VARGA et al., 1999).

A szarvasmarhákban előforduló, a *Chlamydia* nemzetségbe tartozó baktériumok a *C. abortus*, a *C. pecorum*, a *C. psittaci* és a *C. suis*. Ezek a kórokozók gyakran idéznek elő szarvasmarhában tünetmentes, szubklinikai fertőzöttséget, aminek következtében kártételük nehezebben nyomkövethető (REINHOLD et al., 2011). Bikákban a kosokhoz hasonlóan a *C. abortus* a vérárammal eljuthat a nemi szervekbe és járulékos mirigyekbe, ahol idült gyulladást idézhet elő (VARGA et al., 1999). Általánosságban elmondható, hogy a légzőszervek, a tőgy, a nemi szervek és a béltraktus enyhe, ámde hosszantartó chlamydiás fertőzöttsége a tejtermelést, a termékenységet és a súlygyarapodást egyaránt negatívan befolyásolja. Ezen kívül más járványtani tényezőkkel együtt már klinikai tünetekben is megnyilvánuló betegséget okozhatnak (REINHOLD et al., 2011). A szarvasmarha chlamydiás fertőzöttségét a

vehesség utolsó harmadában történő vetélés vagy az élő, de csökkent életképességű utód születése jellemzi. A vetelő anyaállatok a vetélést megelőzően klinikai tüneteket nem mutatnak (VARGA et al., 1999).

Bár korábban úgy gondolták, hogy a többi *Chlamydiales* rendbe tartozó faj szimbiontaként él amőbákban és más eukarióta gazdáiban, az újabb kutatások több idetartozó kórokozó egészségügyi jelentőségét is kimutatták. Például a *Parachlamydia* spp., többek között a *P. acanthamoebae* megfigyelésre kerültek kérődzők vetéléses eseteiben (BOREL et al., 2007; RUHL et al., 2008) és egy humán koraszülés esetében is (BAUD et al., 2009). Kimutattak *Waddlia chondrophila*-t is vetélt borjakból Európában és Amerikában is (HENNING et al., 2002; RURANGIRWA et al., 1999), valamint a kórokozó jelenlétével összefüggő humán vetéléses esetet is leírtak (BAUD et al., 2011).

2.5. Kórbonctan

2.5.1. *Coxiella burnetii*

A kórokozó a magzatburkokba jutva azokban vérzéses-elhalásos gyulladást okoz, a magzat ennek következtében elhal, és az anyaállat elvetél. Az érintett magzatburkon a méhpogácsák közötti területek sárgásak, megvastagodottak és kisebb mennyiségű gyulladással borítottak (3. ábra). A magzatban szembetűnő elváltozás nem tapasztalható. Mikroszkóppal vizsgálva a placenta akut gyulladással beszűrődése szintén a méhpogácsák közötti területeken a legsúlyosabb. A hipertrofizált chorionhámsejtekben *C. burnetii*-k figyelhetők meg. Ha kialakul kórszöveti elváltozás a magzatban, akkor a hörgők körüli, a vese velőállományában és a máj portális területein kialakuló limfoid szövetszaporulat jellemzi (MCGAVIN et al., 2001).



3. ábra. *C. burnetii* okozta vérzéses-elhalásos magzatburokgyulladás kórbonctani képe. (A képet készítette: Szeredi Levente)

2.5.2. A *Chlamydiales* rendbe tartozó, kérődzők vetélését előidéző fajok

A placenta elváltozásai gyakran enyhe fokúak, csak kórszövettani vizsgálattal állapíthatóak meg. A fertőzés előrehaladtával a chorion epithelsejtjeinek száma jelentősen lecsökken és gyulladásos sejtes beszűrődés jelenik meg. A magzatburokok gyakran visszamaradnak, gyulladtak, kifejezetten ödémásak, a méhpogácsákon fibrinnel fedett elhalások, alattuk pedig gennyes arteritisz figyelhető meg. A magzat hasüregében savó halmozódik fel, a bőr alatti kötőszövet is testszerte ödémás. Tűszúrásnyi vérzések mutatkoznak a savóshártyák alatt, az oltógyomor nyálkahártyájában és az egyébként megnagyobbodott térdhajlati és belföldri nyirokcsomókban (GYLES et al., 2010). A máj duzzadt, sárgásvörös, a multifokális elhalások következtében tarkázott, az MPS-sejtek gócos hiperpláziája következtében felülete egyenetlen. A gyulladásos és/vagy elhalásos gócok, továbbá az MPS-sejtek gócos proliferációja a többi szervben is megfigyelhetőek (VARGA et al., 1999). A méhfalban elváltozás nem jellemző, bár azokon a területeken, ahol a fertőzött chorion érintkezik az anyai szövetekkel, az endometrium hámrétegében zárványtestek figyelhetőek meg. Előrehaladott esetben azonban előfordul az endometrium hámrétegének elhalása és leválása (GYLES et al., 2010).

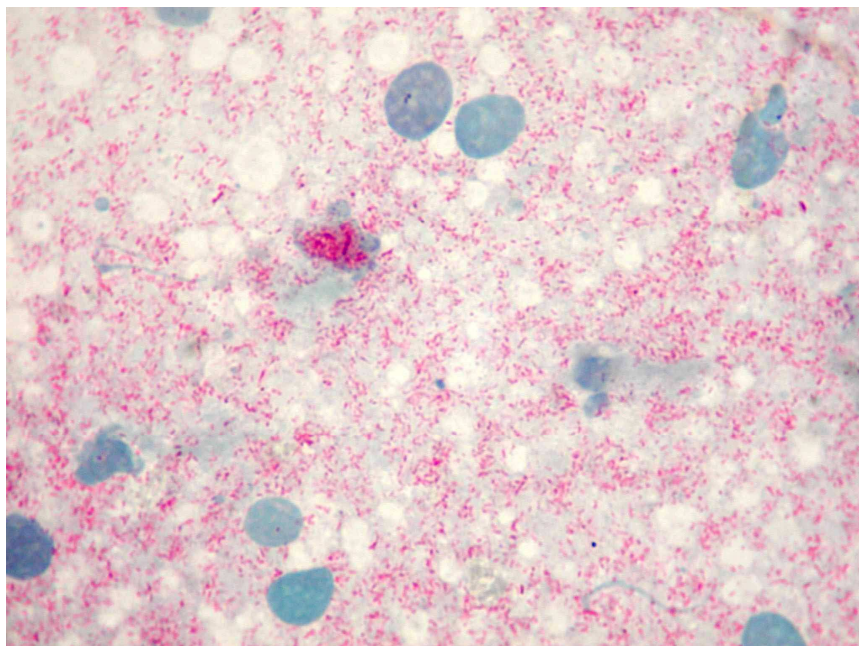
2.6. Kórjelzés

2.6.1. *Coxiella burnetii*

A sorozatos vetélések vagy halva születések laboratóriumi diagnózisa méhlepényből, hüvelyváladékból és a vetélt magzat májából, tüdejéből vagy gyomortartalmából vett minta alapján történhet. A *C. burnetii*-ürítés felméréséhez mintát vehetünk a hüvelyből, a tejből, a főcstejből és a bélsárból. Mivel a *C. burnetii* egy intracelluláris baktérium, ezért tenyésztése megfelelő sejtvonalakban, embrionált tyúktojásban vagy kísérleti állatokban történhet. A baktérium megfestést követően kórszövettani metszetben vagy hüvelykenetben vizsgálható. Bár hivatalosan Gram-negatív kórokozó, nehezen festhető Gram-féle festéssel (PORTER et al., 2011). Savállóságának köszönhetően Stamp, Gimenez és Giemsa szerint viszont festődik, valamint a Ziehl–Neelsen- és a Köster-festés módosított változatai is alkalmazhatóak rajta, de ezek nem *C. burnetii*-specifikus kimutatási módok. Ilyen célra az IH, az *in situ* hibridizáció és a PCR használható. Szerológiai módszerek közül az indirekt IF (immunfluoreszcencia), az ELISA és a KK vehető igénybe, melyek közül az ELISA a legkönnyebben használható és a legmagasabb érzékenységgű (OIE, 2010).

2.6.2. *A Chlamydiales rendbe tartozó fajok*

A *C. abortus* okozta vetélés gyanúja a vemhesség késői stádiumában bekövetkező abortusz esetén merülhet fel. Ezt megerősíti a kórbonctani vizsgálat során talált elhalásos placentitisz és a kórokozó nagyszámú előfordulása az érintett méhlepényből készült kórszövettani metszetben. A vetélt magzat még nedves gyapja vagy szőrzete és hüvelytamponminták is használhatóak a baktérium kimutatására (OIE, 2012). Festésükre a Giemsa- és a Castaneda-festés mellett a Stamp-festést és módosított változatait alkalmazzuk leggyakrabban. Mivel a chlamydiák enyhe és relatív savállóságot mutatnak, ezért ezek a Stamp-féle fukszin miatt piros, míg az egyéb baktériumok és a sejtes elemek a háttérfestésként alkalmazott malachitzöld miatt zöld színben tűnnek elő (4. ábra) (TUBOLY, 1998). A *C. abortus* izolálása csirkeembrióban vagy szövettenyészetben történhet. Antigénkimutatásra ELISA, IH és IF, DNS-kimutatásra pedig PCR használható. A KK-val mért *C. abortus* elleni ellenanyagszint emelkedése gyakori vetélés és holtellés után, de nem jelentkezik minden esetben, ráadásul keresztreakció alakul ki *C. pecorum*mal és néhány más Gram-negatív baktériummal is, továbbá a vakcinázás miatt szeropozitív állatok elkülönítésére sem alkalmas (OIE, 2012).



4. ábra. Stamp szerint festett chlamydiák metszetben, 1000-szeres nagyítás. (A képet készítette: Szeredi Levente)

2.7. Megelőzés, gyógykezelés, védekezés

2.7.1. *Coxiella burnetii*

A *C. burnetii* elleni ellenanyagválasz a kórokozó kétféle megjelenési formájának megfelelően az I. fázisú és a II. fázisú antigén ellen is kialakul. Az I. fázisú antigént kifejező alak a lépből izolálható a laboratóriumi rágsálók beoltását követően. A II. fázisú antigént hordozó forma az embrionált tojáson vagy szövettényészeteken végzett ismételt passzálások során jelenik meg. Csak azok a vakcinák nyújtanak megfelelő védelmet a Q-láz ellen, amelyek az I. fázisú antigént tartalmazó inaktivált *C. burnetii*-ből készültek vagy csak magát az antigént tartalmazzák. Az endémiás területeken ajánlott különösen a fiatal állatok évenkénti oltása a kórokozó ellen (OIE, 2010). Így az általános járványvédelmi szabályok betartásával, az állatállomány oltásával, a vetélt állatok elkülönítésével és fertőtlenítéssel csökkenthető mind az állatok, mind az emberek átfertőzöttsége (PÁL, 2012).

2.7.2. A *Chlamydiales* rendbe tartozó fajok

A nem komplikált chlamydia fertőzések ellen leggyakrabban használt antibiotikumok a tetraciklinek. A makrolidok, például az azitromicin és az eritromicin, és a fluorokinolonok szintén hatékonyak (PÁL, 2012). A *C. abortus*-fertőzés megelőzésének legfontosabb lépései az általános járványvédelmi szabályok betartása, így a fertőtlenítés, a vetélt állatok

elkülönítése, az állományok keveredésének elkerülése és a vemhes állatok együttes elletése. Vakcinázási lehetőség szarvasmarha esetén nem áll rendelkezésre, juhok számára inaktivált kórokozókat tartalmazó és egy hőérzékeny mutánst tartalmazó élő vakcina is elérhető, melyek kétszeri alkalmazásával a vetélés megelőzhető és az ürítés csökkenthető, így az újonnan érkezett állatok beoltása mindenképpen tanácsos. A vakcinázás azonban a mentesítéshez nem elegendő, a szerológiai monitorozás az elletési időszak után segíthet a fertőzött nyájak megtalálásában, ezután ajánlott folyamatosan ellenőrző felméréseket végezni (OIE, 2012).

2.8. Közegészségügyi vonatkozások

2.8.1. *Coxiella burnetii*

Az ember elsősorban közvetlenül fertőződik az ellések és vetélések során, de a beszáradt váladékokból származó por, valamint a nem pasztörizált tej és tejtermékek is közvetíthetik a kórokozót. A kullancsok általi átvitel igen ritka. Mivel az ember általában kérődzőktől fertőződik, a megbetegedés foglalkozási ártalomnak tekinthető, hiszen gyakrabban fordul elő az állattartók, állatgondozók, vágóhídi munkások stb. körében (VARGA et al., 1999). 2013-ban Dél-Magyarországon humán Q-láz járvány tört ki, melynek kiindulópontja egy fertőzött juhnyáj lehetett. Ennek során 70 ember bizonyult a vérminták mikro-immunfluoreszcens és rt-PCR vizsgálata alapján *C. burnetii* fertőzöttnek (GYURANECZ et al., 2014).

Az ember fertőzöttsége általában tünetmentes marad, esetleg enyhe nátha jelei mutatkoznak. Az esetek 5%-ában azonban súlyos tüdőgyulladás, granulomás hepatitisz vagy szisztémás fertőzés alakul ki. A kórkép hónapok után krónikus fertőzésbe megy át, mely immunhiányos vagy szívbillentyű-elégtelenségben szenvedő személyekben és terhes nőkben szívbelhártya- vagy szívizomgyulladás kialakulásával jár (ANGELAKIS et al., 2010, 2014; PÁL, 2012). Kezelés nélkül ennek a formának a mortalitása több mint 50% (PÁL, 2012).

A humán gyógyászatban a kezelés alapja a doxiciklin, de ezt súlyos vagy krónikus fertőzés esetén rifampicinnel vagy fluorokinolonokkal szükséges kiegészíteni. Krónikus fertőzés esetén a kezelés hónapokig, vagy akár évekig is eltarthat. Teljes elölt sejtes, I. fázisú és alegységvakcina is rendelkezésre áll, de csak néhány országban, például Ausztráliában alkalmazzák a fertőzésveszélynek jobban kitett személyek esetén (állatorvosok, állattartók stb.). Megoldást jelenthet a védőoltózet használata is (PÁL, 2012).

2.8.2. A *Chlamydiales* rendbe tartozó fajok

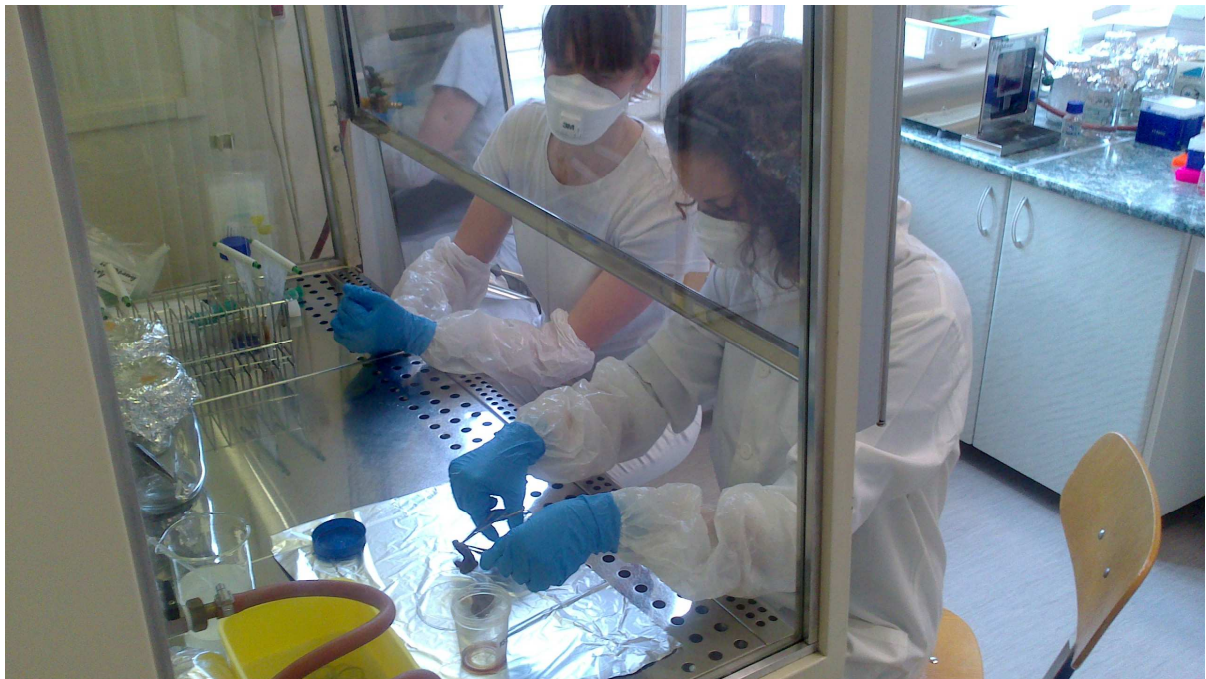
A *C. abortus* ritkán emberben is okozhat enyhe influenzaszerű tüneteket és tüdőgyulladást, de sporadikusan súlyos megbetegedést vagy abortuszt is előidézhethet. Az első tünetek a láz, a fejfájás, a hányinger és a hányás, ezt követi a vetélés és kezeletlen esetben akut veseelégtelenség, DIC és légzési elégtelenség is kialakulhat (PÁL, 2012). A *C. abortus* mellett a *W. chondrophila*-t és *Parachlamydia* fajokat is mutattak ki humán abortuszok háttérében (BAUD et al., 2009, 2011). A fertőzés kezelésére az állatgyógyászatban alkalmazottakhoz hasonló szereket vesznek igénybe (Pál, 2012).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Mintagyűjtés és előkészületek

A vizsgálatok során 2011 és 2013 között 111 házi kérődző (szarvasmarha, n=85; juh, n=21; kecske, n=5) vetélt méhlepényéből és 91 vadon élő kérődzőből (őz /*Capreolus capreolus*/, n=33; dāmivad /*Dama dama*/, n=22; gímszarvas /*Cervus elaphus*/, n=36) származó méhpogácsát dolgoztunk fel. A mintákat az ország különböző részeiről küldték be rutin diagnosztikai vizsgálatokra a NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságának budapesti, debreceni és kaposvári intézeteibe, a vad kérődzőkből származó mintákat pedig három vadászidény alatt gyűjtöttük Délnyugat-Magyarországon.

A méhpogácsákból 3 x 3 cm nagyságú darabokat 8%-os formalinban fixáltuk szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok céljára, illetve ugyanekkora darabokat apróra vágunk (5. ábra), hozzáadtunk 10 ml foszfáttal pufferolt sóoldatot és 5 percig 10 ütés/másodperces sebességgel homogenizáltuk (BagMixer 400 VW, InterScience, Saint Nom, Franciaország). Az így kinyert szövetzúalékokat 5000 G sebességgel 5 percig centrifugáltuk, majd az üledékből 25 mg-ot félretettünk DNS-kivonás céljára.

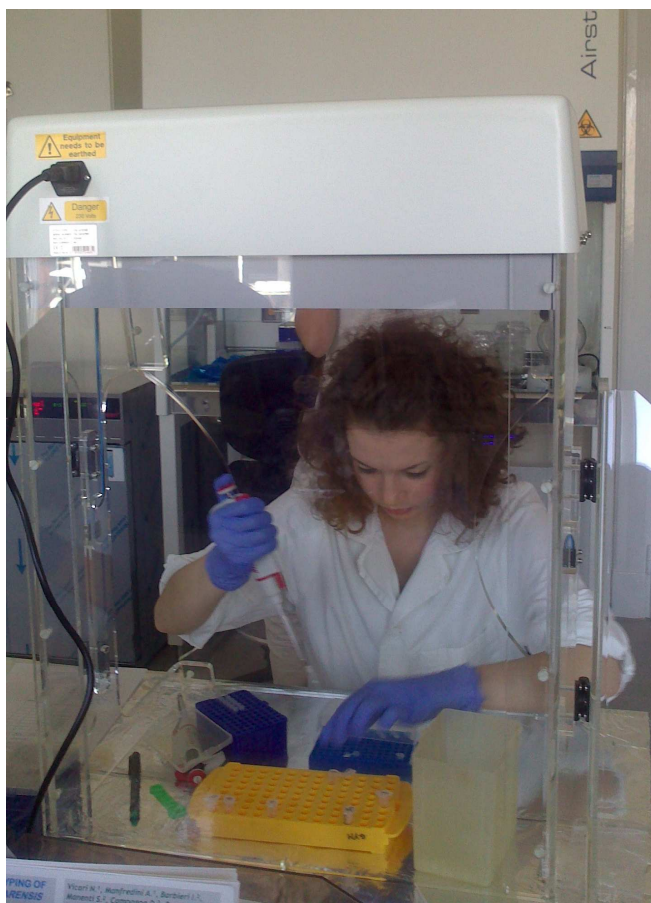


5. ábra. A placenták feldarabolása és előkészítése a homogenizálásra.

3.2. DNS-kivonás és real-time PCR-vizsgálat

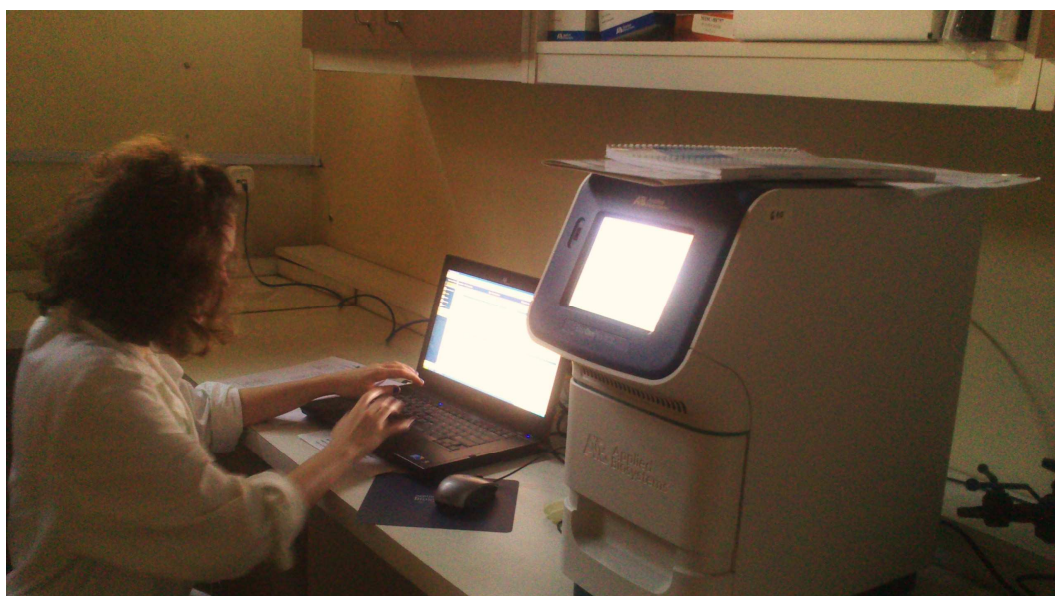
A DNS-t a homogenizátumokból egy a kereskedelmi forgalomban is kapható kit (QIAamp DNA Mini kit, Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével vontuk ki a gyártó utasításainak megfelelően.

A *C. burnetii* kimutatására egy, az *IS1111* inzerációs elemre specifikus rt-PCR vizsgálatot végeztünk (LOFTIS et al., 2006), melyhez az IS1111F (5'-CCG ATC ATT TGG GCG CT-3') és az IS1111R (5'- CGG CGG TGT TTA GGC-3') primereket és az IS1111P (5'-FAM-TTA ACA CGC CAA GAA ACG TAT CGC TGT G-MGB-3') probe-ot (jelölt primer) használtuk. Minden PCR-reakcióelegy tartalmazott 6,775 µl tisztított vizet (Milli-Q, Millipore Corp., Billerica, Massachusetts, USA), 1,25 µl AmpliTaq Gold puffert (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1,25 µl MgCl₂-ot (25 mmol) (Life Technologies), 0,5 µl dezoxiribonukleotid-trifoszfát-keveréket (dNTP, 10 mmol) (Fermentas Inc., Burlington, Kanada), 1 µl forward primert (10 pmol/µl), 0,5 µl reverse primert (10 pmol/µl), 0,125 µl probe-t (10 pmol/µl), 0,1 µl AmpliTaq Gold DNS-polimeráz enzimet (5 egység/µl) (Life Technologies) és 1 µl DNS mintát, így az elegy végtérfogata összesen 12,5 µl lett (6. ábra).



6. ábra. A DNS bemérése az elkészített PCR-reakcióelegyekbe.

Az eljárás során a készülék (StepOnePlus Real-Time PCR Systems version 2.2, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) 10 percig 95°C-os hőmérsékleten tartotta a DNS-mintát, hogy a szálak kettéváljanak (7. ábra). Ezután 45 ciklust futtatott le, melyek során először 1 percre 60°C-ra hűlt a rendszer, hogy a primerek kötődni tudjanak és a hőstabil DNS-polimeráz szintetizálni tudja a hiányzó szálát. Ezután 15 másodpercre ismét 95°C-ra melegítette az elegyet, hogy a régi és az új szálak szétváljanak és a folyamat kezdődött előlről.



7. ábra. Az adatok betáplálása a real-time PCR készülékbe a futtatás előtt.

Pozitív kontrollként egy a kereskedelemben kapható pozitív kontrollt (Adiavet Cox, AesChemunex Inc., Cranbury, NJ, USA) vettünk igénybe az összes vizsgálat esetén. A pozitív kontroll leírása szerint a PCR-rendszer érzékelési küszöbe 1 telepkepző egység (colony forming unit, CFU) körül van, ami 36,95-ös Ct-értéknek (cycle threshold, ciklusszámküszöb polimeráz láncreakcióban) felel meg. A vizsgált *IS1111* inzerció elem több példányban van jelen a *C. burnetii*-ben és a másolatainak száma törzsenként is változik (KLEE et al., 2006). Emiatt a baktériumok pontos mennyiségét nem lehet megállapítani ezzel a módszerrel, de a hozzávetőleges számukat meg lehet becsülni az eredményekből.

A *Chlamydiales* rendbe tartozó fajokat a 16S rRNS génen alapuló *Chlamydiales*-specifikus qPCR-teszttel vizsgáltuk a panCh16F2 (5'-CCG CCA ACA CTG GGA CT-3') és a panCh16R2 (5'-GGA GTT AGC CGG TGC TTC TTT AC-3') primerek és a panCh16S (5'-FAM-CTA CGG GAG GCT GCA GTC GAG AAT C-BHQ1-3') probe segítségével. Az

oligonukleotidok aláhúzott elemei rögzítettek a teszt nagyobb specificitása érdekében. A PCR-reakcióelegyek végtérfogata mintánként 25 µl volt, mely 12,8 µl tisztított vizet (Milli-Q, Millipore Corp.), 2,5 µl AmpliTaq Gold puffert (Life Technologies), 2,5 µl MgCl₂-ot (25 mmol) (Life Technologies), 1 µl dezoxiribonukleotid-trifoszfát-keveréket (dNTP, 10 mmol) (Fermentas Inc.), 1-1 µl primert és probe-ot (10 pmol/µl), 0,1 µl AmpliTaq Gold DNS-polimeráz enzimet (5 egység/µl) (Life Technologies) és 3 µl DNS-mintát tartalmazott. Pozitív kontrollként a *W. chondrophila* DNS-e szolgált. A folyamat során először 3 percig 95°C-on tartotta a mintákat a rendszer, majd 50-szer ismételte a következő ciklust: a 15 másodpercig tartó 95°C-os lépés alatt a szálak kettéváltak, ezután 15 másodpercig 67°C-on tartotta az elegyet, hogy a primerek kötődjenek a DNS-szálakhoz, majd a 15 másodperces 72°C-os stádium alatt a polimeráz elkészítette a hiányzó szálakat. A rendszer érzékenységének küszöbe öt genommásolat, ami körülbelül 36,3-as Ct-értéket ad (LIENARD et al., 2011).

Annak érdekében, hogy a detektált *Chlamydiales* fajokat azonosítani tudjuk, a PCR termékeit szekvenálásnak vetettük alá (ABI 3730xl DNA Analyzer, Applied Biosystems Inc., USA). A kromatogramok olvasási hibáit a SeqMan programmal javítottuk (Lasergene package, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA), majd az így kapott szekvenciákat az interneten elérhető BLAST keresővel kerestük meg a GenBankban.

3.3. Szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok

A szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokat azokon a mintákon végeztük el, amelyek pozitívnak bizonyultak valamelyik PCR módszerrel. A formalinban fixált méhpogácsadarabokat paraffinba ágyaztuk, haematoxin-eozinnal festettük, majd a kórszövettani elváltozásokat fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A baktériumok és gombák felismerése érdekében Giemsa-festést és Gömöri-féle ezüstimpregnációt használtunk. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a paraffinba ágyazott szövetszeleteket először deparaffináltuk. Ennek során a metszetekből xilol segítségével kioldottuk a beágyazószert, majd leszálló alkoholsoron (növekvő hígítású) vittük őket végig, hogy rehidráljuk a szövetet.

Az antigének kinyerése céljából a valamelyik *Chlamydiaceae* fajra pozitív mintákat 0,1%-os proteáz XIV-oldattal (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO) 37°C-on 10 percig inkubáltuk, míg a *C. burnetii*-re pozitív mintákat pH 6 kémhatású citrát pufferrel mikrohullámú sütőben, 750 W-on 20 percig melegítettük. A mintákat 10 percig 3%-os H₂O₂-oldatban inkubáltuk, majd a proteázt sovány tejpor 2%-os oldatával blokkoltuk. A metszeteket a *Chlamydiaceae* család egyik lipopoliszacharidjára specifikus egér eredetű monoklonális ellenanyaggal (Clone AC-1, Progen GmbH, Heidelberg, Németország) egy éjszakán keresztül

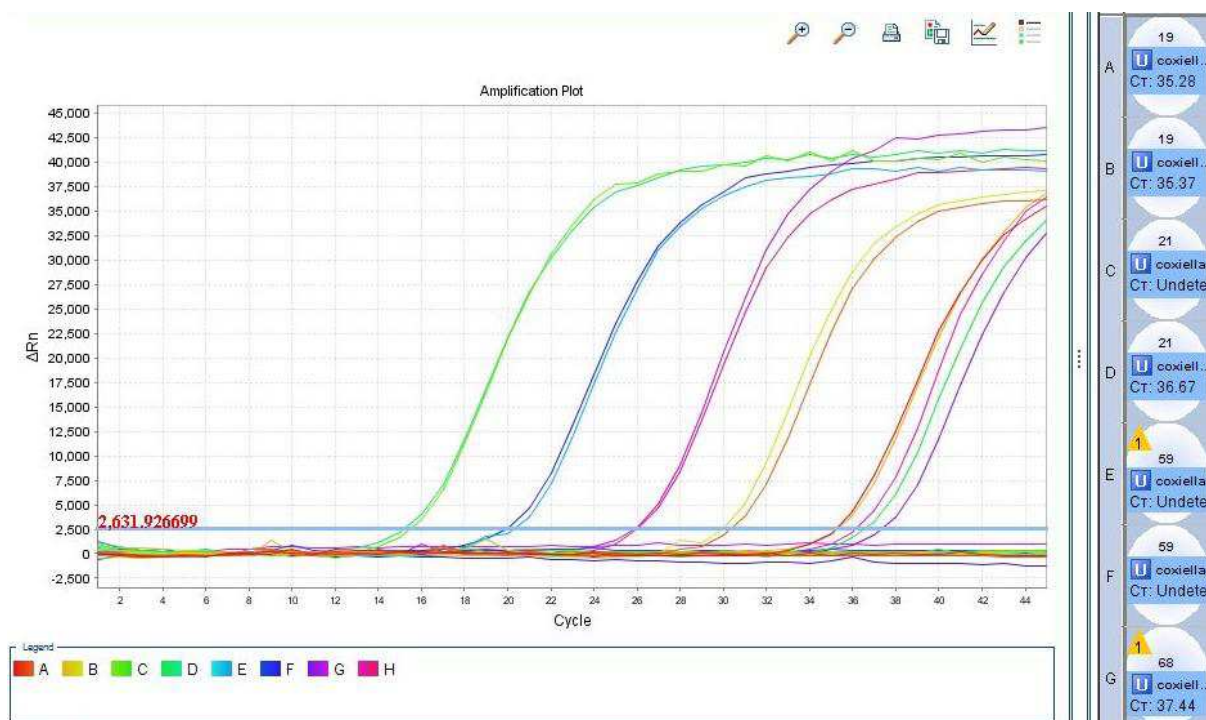
1:400 hígításban inkubáltuk szobahőmérsékleten. A *C. burnetii* vizsgálata ehhez hasonlóan történt, azzal a különbséggel, hogy ott egy nyúlból származó monoklonális ellenanyagot alkalmaztunk, 1:10000 hígításban.

A primer antitestek kötődését torna-peroxidázzal jelölt polimer kittel detektáltuk (EnVision+ HRP Anti-Mouse vagy Anti-Rabbit, Dako Co., Glostrup, Dánia), a gyártó utasításai szerint. A metszeteket 10 percig kezeltük szobahőmérsékleten 3-amino-9-etilkarbazol kittel (AEC+ High sensitivity substrate chromogen, Dako Co.), majd Mayer-féle hematoxilinnal 20 percig festettük és glikol-zselatinnal fedtük. Pozitív kontrollként a megfelelő baktériummal fertőzött szövetszeleteket használtunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. *Coxiella burnetii*

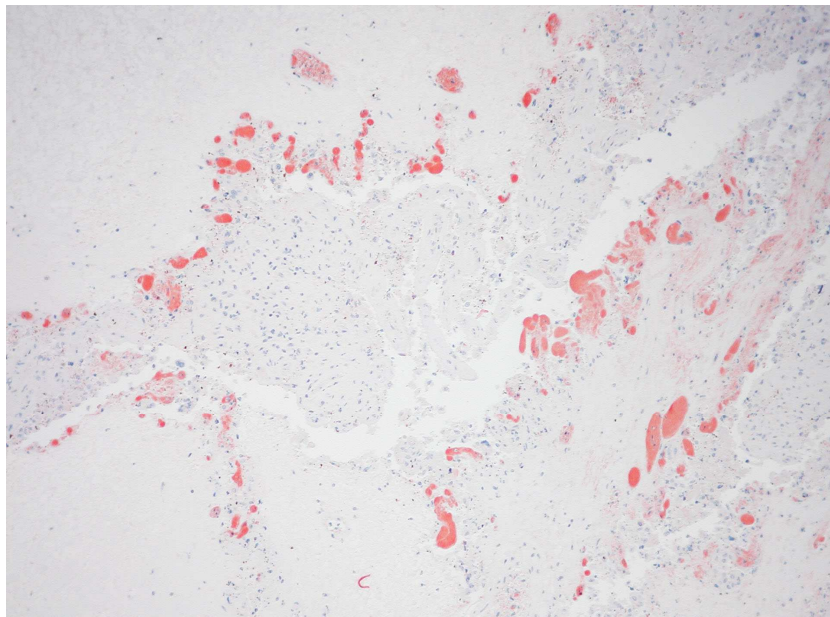
Önállóan a *C. burnetii* DNS-ét szarvasmarhából 19 esetben mutattuk ki PCR vizsgálat segítségével, de ezek közül egyiket sem erősítette meg az IH (8. ábra). Nyolc esetben placentitisz volt megfigyelhető, a kórszövettani vizsgálat során baktériumok okozta elhalásos-gennyes gyulladást kettő, elhalásos gyulladást négy esetben diagnosztizáltunk. Ezekben az esetekben az intracellulárisan helyeződő coccusok is megfigyelhetőek voltak. Egy-egy esetben fordult elő gomba okozta és ismeretlen oktanú elhalásos gyulladás és vaszkulitisz. Magas *C. burnetii* DNS-tartalom (Ct 14,12-17,06) három mintából volt kimutatható, de ezek közül placentitist egyikben sem találtunk. Autolítikus elváltozások miatt egy minta nem volt vizsgálható kórszövettanilag.



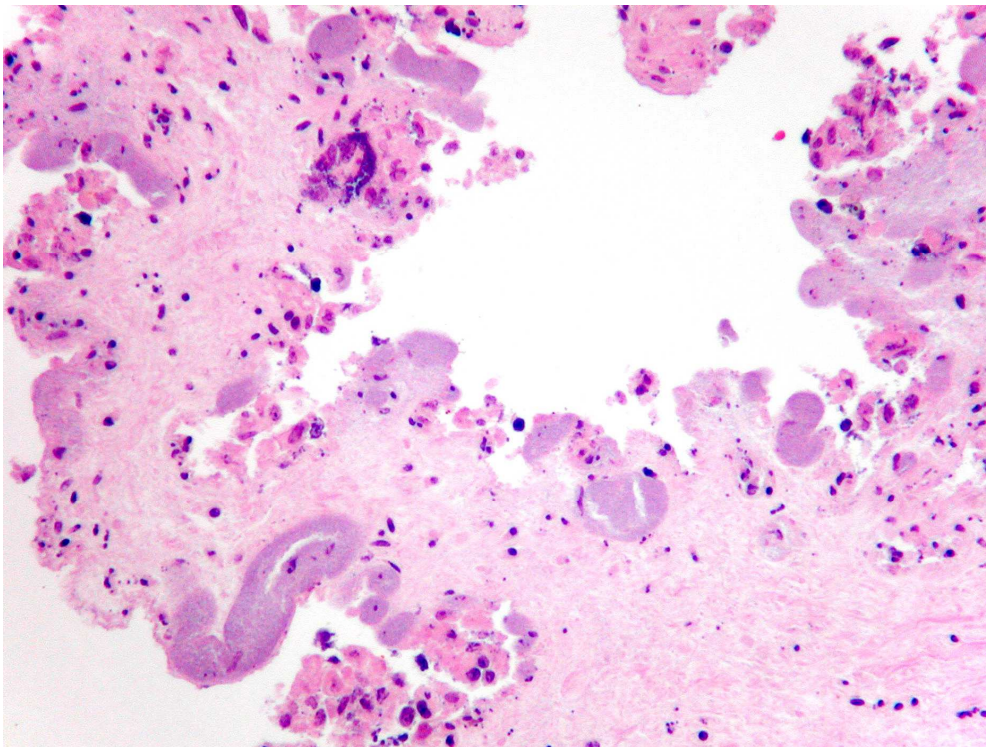
8. ábra. Egy *Coxiella burnetii*-specifikus rt-PCR-rel vizsgált csoport és a pozitív kontroll hígítási sorának eredményei.

A juhból származó minták közül a *C. burnetii* DNS-ét önállóan két esetben mutatta ki a rt-PCR vizsgálat és a DNS-tartalom mindkét esetben magasnak bizonyult (Ct 8,51-10,08). Mindkét esetet megerősítette az IH és a kórszövettani vizsgálat során placentitisz is

megfigyelhető volt mindkét mintában (9. és 10. ábrák). A kecske eredetű minták közül egyikben sem volt kimutatható a *C. burnetii* önálló jelenléte.



9. ábra. *C. burnetii*-specifikus IH-val jelölt szövet. A kórokozók piros halmozók formájában láthatók, 100-szoros nagyítás. (A képet készítette: Szeredi Levente)

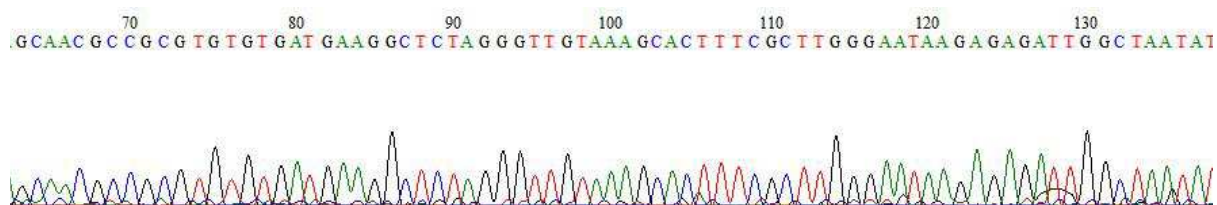


10. ábra. *C. burnetii*-vel (lila baktériumfelhők) fertőzött juh placéntája. Hematoxin-eozin festés, 200-szoros nagyítás. (A képet készítette: Szeredi Levente)

A gímszarvas eredetű minták közül kétfőben diagnosztizáltuk a *C. burnetii* DNS-ét a rt-PCR vizsgálat segítségével, de ennek a mennyisége mindkét esetben alacsonynak bizonyult (Ct 34,73 és 35,98). Ezek közül egy esetben találtunk multiplex gócos elhalásos placentitist baktériumok vagy gombák jelenléte nélkül, immunhisztokémiával viszont egy esetben sem volt megerősíthető a *C. burnetii* kóroktani szerepe.

4.2. A *Chlamydiales* rendbe tartozó fajok

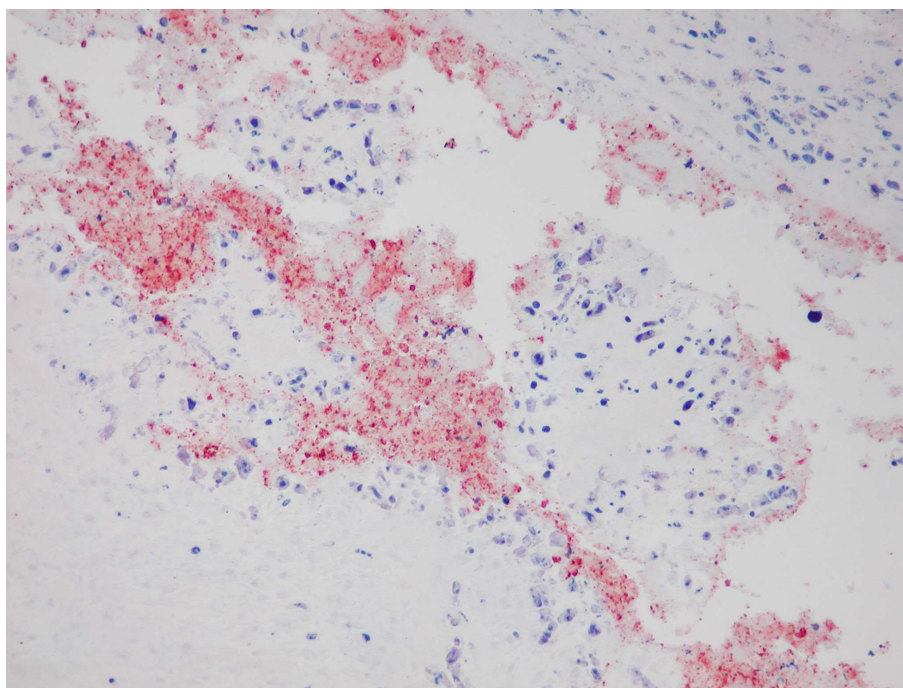
A rt-PCR segítségével a szarvasmarhából származó minták közül 11-ben diagnosztizáltuk önállóan a *Chlamydiales* rendbe tartozó kórokozók jelenlétét, de a detektált baktériummennyiség minden esetben 5 genommásolat alatt maradt (Ct 42,37-47,71) és az IH sem erősítette meg az eredményeket. A rt-PCR termékeit DNS-szekvenálásnak is alávetettük a fajok azonosítása érdekében (11. ábra), ami alapján a *C. abortus* kétfő, a *W. chondrophila* három, *Parachlamydia* spp. egy, ismeretlen *Chlamydiales*-fajok pedig öt esetben kerültek kimutatásra.



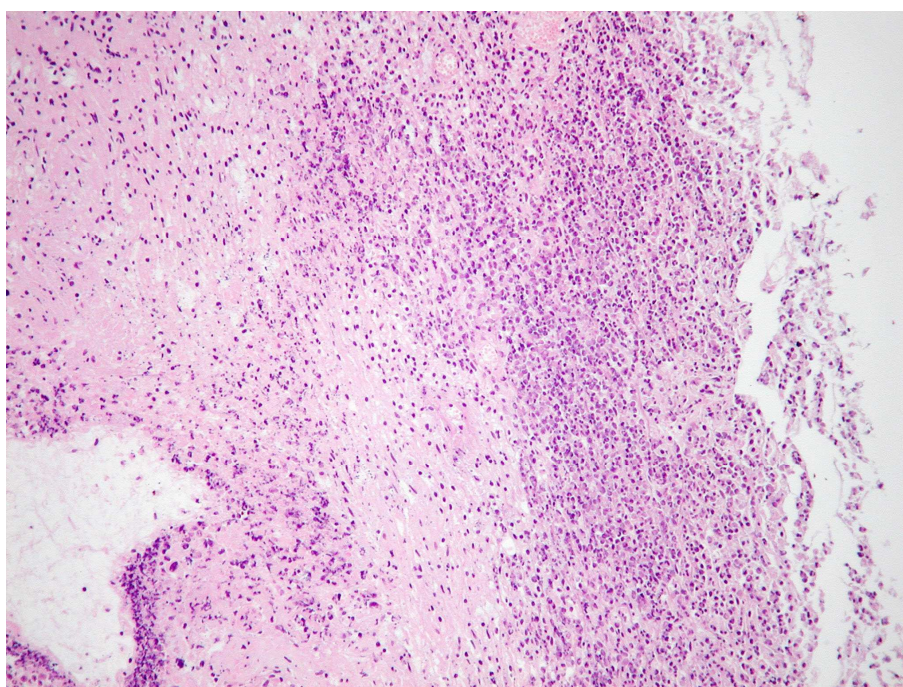
11. ábra. Kromatogram.

Autolízis miatt egy-egy *C. abortus*, *W. chondrophila* és ismeretlen *Chlamydiales*-pozitív minta és a *Parachlamydia*-fajt tartalmazó eset sem volt elbírálható kórszövettanilag. Baktérium okozta súlyos elhalásos gyulladást, illetve elhalásos-gennyes gyulladást vaszkulitisszel és intracellulárisan helyeződő cocciakkal egy-egy ismeretlen *Chlamydiales* rendbe tartozó fajjal fertőzött mintában mutattunk ki. Egy *Waddlia*- és egy *C. abortus*-pozitív mintában találtunk gomba okozta elhalásos-gennyes gyulladást vaszkulitisszel.

A *C. abortus*-t a rt-PCR vizsgálatot követő szekvenálás során nyolc juh eredetű mintában diagnosztizáltuk önállóan. A Ct-érték 26,61 és 36,83 között alakult. Mind a nyolc esetet megerősítette az IH is (12. ábra), továbbá 6 esetben placentitisz is megfigyelhető volt (13. ábra). A maradék két eset autolízis miatt nem volt elbírálható. Más *Chlamydiales* rendbe tartozó fajt juhból nem mutattunk ki. *C. abortus* a kecskékből származó minták közül egyben fordult elő önmagában, ez immunhisztokémiailag is pozitív lett, a kórszövettani vizsgálat során pedig placentitisz is megfigyelhető volt.



12. ábra. *Chlamydiaceae*-specifikus IH-val jelölt placentaminta. A *Chlamydiaceae* család tagjai piros színben tűnnek elő, 200-szoros nagyítás. (A képet készítette: Szeredi Levente)



13. ábra. Placentitisz juhban, hematoxin-eozin festés, 100-szoros nagyítás. (A képet készítette: Szeredi Levente)

Az őzekből származó minták közül két esetben mutattunk ki rt-PCR-rel *Chlamydiales* rendbe tartozó kórokozó jelenlétét, melyek a szekvenálás során ismeretlen *Chlamydiales* fajoknak bizonyultak. Autolízis miatt egyik minta sem volt kórszövettanilag vizsgálható. Dámvadból és gímszarvasból egy-egy esetben mutattuk ki rt-PCR-rel és szekvenálással szintén ismeretlen *Chlamydiales* faj jelenlétét. Mind a négy esetben kevesebb, mint öt genommásolat volt detektálható (Ct 45,88-49,25).

4.3. A *Coxiella burnetii* és a *Chlamydiales* rendbe tartozó fajok együttes előfordulása

A szarvasmarha eredetű minták közül a *C. burnetii* ismeretlen *Chlamydiales* rendbe tartozó fajokkal kettő, míg *W. chondrophila*-val egy esetben került együttesen megfigyelésre. Az IH egyik esetben sem erősítette meg egyik kórokozó jelenlétét sem, továbbá vagy nem voltak megfigyelhetőek kórszövettani elváltozások vagy az autolízis miatt nem voltak vizsgálhatóak a metszetek.

A juhokból származó nyolc darab *C. burnetii*-re és *Chlamydiales* rendbe tartozó kórokozóra is PCR-pozitív minta közül IH vizsgálat egyet erősített meg *C. burnetii*-re is, míg a *Chlamydiaceae*-specifikus antigént az összes esetben kimutatta az IH. A szekvenálás alapján mind a nyolc *Chlamydiales*-faj *C. abortus*-nak bizonyult. Savós vagy elhalásos placentitis az összes esetben megfigyelhető volt a kórszövettani vizsgálat során.

Egy kecskemagzataból származó mintában diagnosztizáltunk rt-PCR segítségével kettős fertőzést. Specifikus antigéneket az IH során nem tudtunk kimutatni, viszont Stamp-festéssel *Chlamydia*-pozitívnak bizonyult a minta. A szekvenálás eredménye szerint a *Chlamydiales* rendbe tartozó kórokozó a *C. abortus* volt.

A PCR-pozitív minták állatfajonkénti és földrajzi eloszlása a 14. ábrán, az eredmények összefoglalása pedig az 1. táblázatban található.



14. ábra: A rt-PCR-pozitív minták állatfajonkénti és földrajzi megoszlása. A rt-PCR-rel *C. burnetii*-re pozitív mintákat sötétszürkével, a *Chlamydiales* rendbe tartozó kórokozóra pozitívakat pedig világosszürkével jelöltük.

1. táblázat: A házi kérődzők vetéléses eseteiből származó minták és a vadon élő kérődzőkből származó méhlepények rt-PCR, kórszövettani és IH vizsgálata során kapott eredményei.

	<i>C. burnetii</i>			<i>C. abortus</i>			Egyéb <i>Chlamydiales</i> - fajok		Közös fertőzés		
	PCR	IH	plac.	PCR	IH	plac.	PCR	plac.	PCR	IH*	plac.
szarvasmarha	19	0	8	2	0	0	9	4	3	0	0
juh	2	2	2	8	8	6	0	0	8	1**	8
kecske	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0***
őz	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
gímszarvas	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
dámszarvas	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Magyarázat:

***C. burnetii*, *C. abortus*:** Az adott kórokozóval fertőzött minták száma.

Egyéb *Chlamydiales*-fajok: A *C. abortus*-on kívüli, a *Chlamydiales* rendbe tartozó fajokkal fertőzött minták száma.

Közös fertőzés: Azoknak a mintáknak a száma, melyekben a *C. burnetii* valamelyik *Chlamydiales* rendbe tartozó fajjal együtt fordult elő.

PCR: Az adott kórokozóra rt-PCR-rel pozitívnak bizonyult minták száma.

IH: Az adott kórokozóra IH-val is pozitív minták száma.

plac.: Azoknak a mintáknak a száma, melyek rt-PCR-rel pozitívnak bizonyultak az adott kórokozóra és bennük megfigyelhető volt bármilyen jellegű placentitisz.

* Csak azoknak a mintáknak a száma, amelyek mindkét kórokozóra pozitívak lettek IH-val.

** Juhokban *C. burnetii* és *Chlamydiales* fajokra egyaránt rt-PCR-pozitív minták közül ezen kívül a *C. abortus* még hat esetben kimutatható volt IH-val.

*** A minta magzatból származott.

5. MEGBESZÉLÉS

A *C. burnetii* 26%-os ($n=22/85$) előfordulása az általunk vizsgált szarvasmarhákból származó vetéléses mintákban összhangban áll a 2012-es magyarországi vizsgálat során felmért 38%-os szeroprevalenciával (GYURANECZ et al., 2012). Az általunk kapott Ct-értékek azonban mind magasak voltak és az IH sem erősítette meg egyetlen esetben sem a kórokozó jelenlétét. Mindez arra enged következtetni, hogy ebben a fajban a *C. burnetii* szubklinikai fertőzést okoz, és nem számít jelentős abortív ágensnek hazánkban.

A külföldi felmérések eredményei is hasonlóak az általunk kapott adatokhoz a *C. burnetii* szarvasmarhában való előfordulását illetően. Fiziológias ellések során is kimutatták a baktériumot a placenta trofoblaszt sejtjeiben, továbbá úgy találták, hogy a *C. burnetii* nem számít gyakori vetélést okozó ágensnek még endémiás területeken sem (AGERHOLM, 2013). Valószínű, hogy ennek a kórokozónak inkább tögygyulladások és terméketlenség kiváltásában lehet szerepe ebben a fajban (PORTER et al., 2011).

Gyuranecz és munkatársai 6%-os *C. burnetii* szeroprevalenciát írtak le juhok körében (GYURANECZ et al., 2012), míg az általunk végzett kutatás során a juh eredetű vetéléses mintáknak majdnem 48%-a ($n=10/21$) lett pozitív rt-PCR-rel vizsgálva. Ezek közül három esetben volt alacsony a Ct-érték és pozitív az IH teszt, ami azt bizonyítja, hogy a *C. burnetii* lehetett az abortuszt kiváltó tényező. Az általunk IH-val *C. burnetii*-pozitívnak talált juh eredetű minták aránya 14% ($n=3/21$) volt, míg a 2006-ban publikált felmérésben ez a szám még csak 2% körül alakult, jóllehet az általunk vizsgált minták száma kisebb volt ($n=21$), mint akkoriban ($n=246$) (SZEREDI et al., 2006). Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a kórokozó elterjedtsége folyamatosan nő hazánkban. A kórokozó feltételezett növekvő előfordulási aránya a hazai juhállományban, és a tény, hogy a 2013-as humán Q-láz járvány kiindulópontja is egy juhnyáj volt (GYURANECZ et al., 2014), felhívja a figyelmet arra, hogy az ezeket megelőző járványvédelmi módszerekre nagyobb hangsúlyt kellene fektetni.

A kecskéből származó minták száma is alacsonyabb volt a 2006-os felmérésben résztvevőkénél, mi mindössze öt kecske eredetű esetet vizsgáltunk, míg Szeredi és munkatársai 75 kecskemagzataból vettek mintát. Ebben az esetben nem találtunk lényeges különbséget a két végeredmény között, az általunk vizsgált minták közül az ötből egy lett pozitív rt-PCR-rel vizsgálva, míg 2006-ban 5%-os pozitivitást állapítottak meg az IH vizsgálatok alapján (SZEREDI et al., 2006).

A *C. burnetii* általunk mért előfordulása kiskérődzőkben olyan szempontból ellentétben áll a többi országban mért adatokkal, hogy ott a kecskék vetéléses kórképeiben gyakoribb előfordulást állapítottak meg, mint juhokban (AGERHOLM, 2013). Ennek az lehet a magyarázata, hogy a tartástechnológia és a telepítési sűrűség is befolyásolja a betegség megjelenését. Ennek oka például, hogy az intenzív állattenyésztetekben az év minden szakában van elletés, továbbá a nagyobb telepítési sűrűség miatt a kórokozó terjedése gyorsabb (HELLENBRAND et al., 2001). Azokkal az országokkal szemben, ahol az intenzív kecsketenyésztés jellemző, amilyen például Hollandia is (VELLEMA et al., 2014), Magyarországon a kis létszámú kecskenyájak jellemzőek, ami magyarázhatja a *C. burnetii* kisebb arányú előfordulását.

A *C. burnetii* DNS-ét 78 őz eredetű minta 5%-ában mutatták ki Spanyolországban (ASTOBIZA et al., 2011), míg Hollandiában a 79 eset 23%-a bizonyult pozitívnak (RIJKS et al., 2011). Spanyolországban szerológiai módszerekkel őzben 5%-os, gímszarvasban pedig 29%-os szeropozitivitást találtak, 39, illetve 116 mintát vizsgálva (RUIZ-FONS et al., 2008). Az általunk vizsgált 36 esetből mindössze két gímszarvasból származó mintában került kimutatásra a kórokozó, ami 5,5%-os előfordulást jelent, az őz eredetű minták közül pedig egyik sem lett pozitív.

A más európai országokban végzett kutatásoknak megfelelően a *Chlamydiales* rendbe tartozó fajok jelentősége Magyarországon ugyancsak mérsékelt a szarvasmarhák vetéléseinek hátterében. Egy svájci felmérés szerint a *C. abortus* a szarvasmarha eredetű vetéléses mintákban még azokon a területeken is alacsony prevalenciával fordult elő, ahol a juhok és a kecskék körében endémiásnak számít. Ez arra utalhat, hogy a szarvasmarhák a kiskérődzőknél kevésbé fogékonyak erre a kórokozóra (BOREL et al., 2006). A *Parachlamydia* spp., a *W. chondrophila* és az ismeretlen *Chlamydiales* rendbe tartozó kórokozók prevalenciája a korábbi Svájcban végzett vizsgálatok eredményéhez hasonlóan alakult hazánkban is. Az általunk vizsgált esetek 14%-ában ($n=12/85$) találtunk a *C. abortus*-on kívüli *Chlamydiales* rendbe tartozó kórokozót, míg a svájci vizsgálatok 14%-osnak, illetve 18%-osnak találták az előfordulásukat (BOREL et al., 2007; BLUMER et al., 2011). Mivel azonban az összes *Chlamydiales* rendbe tartozó faj magas Ct-értékkel (Ct 42,37-47,71) került kimutatásra a hazai szarvasmarhákban, ezek a fajok valószínűleg nem jelentenek komoly fenyegetést a szarvasmarha-állományokra Magyarországon. Ezzel ellentétben egy 2009-ben publikált, Svájcban végzett kutatás rt-PCR és IH vizsgálat segítségével a szarvasmarhák vetéléses eseteinek hátterében a *Parachlamydia* fajok 15%-os előfordulását találta (RUHL et al., 2009),

továbbá Németországban a *W. chondrophila*-t kimutatták egy halva született borjában (HENNING et al., 2002).

A 2006-os vizsgálat a kiskérődzők fertőző eredetű vetéléseinek legfontosabb okozójának a *C. abortus*-t találta, juhban 90%-ukért, kecskében 68%-ukért volt felelős (SZEREDI et al., 2006). Előfordulása azonban az általunk végzett felmérés során juhban és kecskében is alacsonyabb volt, juhban kicsit több mint 76%-osnak ($n=16/21$), kecskében pedig 40%-osnak mértük ($n=2/5$), bár mi kisebb esetszámot vizsgáltunk (SZEREDI et al., 2006).

Más európai eredményekkel összehasonlítva a *C. abortus* Magyarországon mért előfordulása kiskérődzők körében magasabb, mint Svájcban, ahol a vizsgált 86 juh eredetű mintának 39%-a, a 144 kecske eredetű mintának pedig 23%-a bizonyult pozitívnak IH módszerrel (CHANTON-GREUTMANN et al., 2002). Az ír megfigyelésekkel viszont összhangban vannak az általunk mért adatok, mert ott a 46 juh eredetű elvetélt placenta 70%-ában diagnosztizálták *C. abortus* jelenlétét rt-PCR segítségével (GUTIERREZ et al., 2012). Sokkal alacsonyabb fertőzöttségi szinteket mértek Szardínián, ahol *C. abortus*-specifikus PCR-rel vizsgálva 5-6,5% volt a kórokozó előfordulása a juhok és 9-12,5% a kecskék vetéléses mintái körében (MASALA et al., 2005, 2007). Bár korábban Svájcban a *P. acanthamoebae* jelenlétét leírták kiskérődzőkben is (RUHL et al., 2008), az általunk végzett vizsgálat során a *C. abortus*-on kívül más *Chlamydiales* rendbe tartozó kórokozót nem lehetett kimutatni rt-PCR módszerrel a juhból és kecskéből származó mintákból.

Svájcban összesen 146 gímszarvas és őz eredetű, míg Spanyolországban összesen 240 gímszarvas, dämavad és őz eredetű minta alapján a *C. abortus* 3%-os, illetve 20%-os szeroprevalenciáját állapították meg (REGENSCHEIT et al., 2012; SALINAS et al., 2009). Svájcban az összesen 163 darab őzből és gímszarvasból származó mintából a *Parachlamydia* fajok közel 32%-ban voltak kimutathatóak rt-PCR-rel, ezek közül kettőt, melyek gímszarvasokból származtak és tüdő eredetűek voltak, az IH is megerősített (REGENSCHEIT et al., 2012). Az általunk végzett vizsgálat során az összesen 91 darab őzből, dämavadból és gímszarvasból származó mintában a *C. abortus* DNS-e egyik esetben sem volt kimutatható és a *Chlamydiales* rendbe tartozó egyéb fajokat is csak az esetek mindössze 4,4%-ában ($n=4/91$) detektáltuk, és ezek is csak magas Ct-értékek mellett fordultak elő.

Összességében tehát elmondható, hogy a Q-láz kórokozója, a *C. burnetii* Magyarországon széles körben elterjedt a házi kérődzők között és néhány esetben a vetélést kiváltó esődleges tényező lehet. Nagy arányban voltak fertőzöttek a vizsgált juhok mind *C. burnetii*-vel, mind *C. abortus*-szal, ami a gazdasági veszteségek mellett a közegészségügyi

veszélyre is felhívja a figyelmet. A *W. chondrophila*, a *Parachlamydia* spp. és az ismeretlen *Chlamydiales* rendbe tartozó fajok DNS-e csak alacsony mennyiségben (magas Ct-értékekkel) volt kimutatható a szarvasmarha eredetű vetéléses mintákban, ezért szerepük Magyarországon a szarvasmarhák vetéléseinek kiváltásában feltételezhetően elhanyagolható. Az általunk vizsgált összes kórokozó csak elvétve fordult elő a vadon élő kérődzőkből származó mintákban.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Coxiella burnetii* és a *Chlamydiales* rendbe tartozó baktériumok Gram-negatív, intracelluláris kórokozók. Kérődző állatokban többek között vetéléses kórképeket idéznek elő, de zoonotikus kórokozók lévén, az emberben is klinikai tünetekkel járó betegségeket okoznak.

Vizsgálatunk célja az volt, hogy felmérjük a *C. burnetii* és a *Chlamydiales* rendbe tartozó baktériumok előfordulását és jelentőségét a hazai házi kérődzők vetéléses eseteinek hátterében és vadon élő kérődzőkben. A kutatás során az ország különböző területeiről származó háziállatokból (szarvasmarhákból, juhokból és kecskékből), valamint három vadászidény alatt Délnyugat-Magyarországon lőtt dámvadakból, gímszarvasokból és őzekből vett magzatburokmintákat vizsgáltunk. A méhpogácsákból 3 x 3 cm nagyságú darabokat 8%-os formaldehid oldatban fixáltunk szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok (IH) céljára. Emellett azonos méretű szövetdarabokat homogenizáltunk, melyekből DNS-t vontunk ki „valós idejű” polimeráz láncreakciós vizsgálatokhoz (real-time PCR). A mintákat *C. burnetii*, illetve *Chlamydiales* rend-specifikus real-time PCR módszerrel vizsgáltuk, majd az ily módon pozitívnak bizonyult eseteket kórszövettani és *C. burnetii*- és *Chlamydiaceae* család-specifikus IH vizsgálatoknak vetettük alá. A 111 házi kérődzőből származó magzatburokokból 21 mintában *C. burnetii* jelenlétét (szarvasmarha, $n=19$; juh, $n=2$), 20 mintában valamely a *Chlamydiales* rendbe tartozó baktériumot (szarvasmarha, $n=11$; juh, $n=8$; kecske, $n=1$) és 12 esetben mindkét kórokozót kimutattuk (szarvasmarha, $n=3$; juh, $n=8$; kecske, $n=1$) real-time PCR segítségével. Ezek közül 20 esetben IH során is bizonyítottuk a kórokozók jelenlétét (*C. burnetii*, $n=2$, juh; *Chlamydiaceae*, $n=17$, juh $/n=15/$; kecske $/n=2/$; mindkét kórokozót egy juhban). A vadon élő kérődzőkből származó 91 mintából két esetben mutatott ki *C. burnetii*-t a real-time PCR vizsgálat, de egyiket sem erősítette meg IH. Négy placentamintában diagnosztizáltunk *Chlamydiales* rendbe tartozó, de a DNS-szekvenálás eredménye alapján a *Chlamydiaceae* családon kívüli baktériumokat.

Összességében elmondható, hogy a Q-láz kórokozója, a *C. burnetii* a világ többi részéhez hasonlóan hazánkban is elterjedt és számos esetben a vetélés elsődleges okaként jelölhető meg. Bár kevés juhból származó mintát vizsgáltunk, azokban erős *C. burnetii*-vel és *Chlamydia abortus*-szal való fertőzöttséget mutattunk ki, aminek közegészségügyi jelentősége is lehet. A *Chlamydiales* rendbe tartozó baktériumok megjelenése viszont sporadikusnak mondható mind házi, mind vadon élő kérődzőfajaink körében.

7. SUMMARY

Coxiella burnetii and members of the *Chlamydiales* order are Gram negative, intracellular bacteria. They are potential abortive agents in ruminants but they are also important due to their zoonotic character. Namely, they can develop clinical symptoms in humans as well.

The aim of this study was to estimate the occurrence and the importance of these infectious agents in the abortion cases of domestic ruminants and in wild ruminants in Hungary. During the research we examined samples from throughout the country originating from cattle, sheep, and goats and we collected placentas of red deer, fallow deer and roe deer during three hunting seasons from the south-western part of Hungary. From the cotyledons 3x3 cm large pieces were cut out and fixed in 8% formalin for histology and immunohistochemistry method (IHC). Pieces of the same size from the cotyledons were sliced up then homogenized and issued for manual DNA extraction for the real-time polymerase chain reaction assays (PCR). The samples were examined with *C. burnetii*- and *Chlamydiales* order specific real-time PCR and with *C. burnetii*- and *Chlamydiaceae* family specific IHC. According to the real-time PCR results, out of the 111 abortion samples from domestic ruminants 21 animals were infected with *C. burnetii* (cattle, $n=19$; sheep, $n=2$), members of the *Chlamydiales* order were detected in 20 cases (cattle, $n=11$; sheep, $n=8$; goat, $n=1$) and both bacteria occurred in 12 samples (cattle, $n=3$; sheep, $n=8$; goat, $n=1$). However, only 20 of the positive cases were confirmed by IHC (*C. burnetii*, $n=2$, in sheep; *Chlamydiaceae*, $n=17$, in sheep / $n=15$ / and goat / $n=2$ /; and both pathogens in one sheep). Out of the 91 abortion samples from wild ruminants two animals were positive for *C. burnetii* with real-time PCR, but none of them was confirmed by IHC. Members of the *Chlamydiales* order were detected in four placenta samples, but according to the DNA-sequencing none of them belonged to the *Chlamydiaceae* family.

In conclusion, the causative agent of Q fever, *C. burnetii* is widespread in Hungary and it can be designated as the primary cause of abortions in several cases. Although we examined relatively few samples originating from sheep, we observed high infection rates with *C. burnetii* and *Chlamydia abortus* in the animals, which may lead to public health issues. The occurrence of members of the *Chlamydiales* order other than the *Chlamydiaceae* family is sporadic in both domestic and wild ruminants in Hungary.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legelőször a témavezetőimnek, dr. Kreizinger Zsuzsának és dr. Gyuranecz Miklósnak szeretnék köszönetet mondani, amiért ilyen sokat segítettek, türelmesen javígtatták a dolgozatomat és azonnal válaszoltak minden kérdésemre. Csivincsik Ágnes, Bacsadi Árpád, Nemes Csaba, Sugár László, Varga Tamás és Ács Kornél a mintagyűjtésben segítettek, amiért szintén nagyon hálás vagyok. Nagyon szépen köszönöm Szeredi Leventének a képeket a kórbonctani és a kórszövettani vizsgálatokról és az IH-ról. Sulyok Kingának, Szigeti Alexandrának és Hrivnák Veronikának a labormunkában nyújtott segítségükért tartozom köszönettel. Nicole Borelnek a pozitív kontrollként használt *Waddlia chondrophila* törzset és a szakmai segítséget szeretném megköszönni. Végül, de nem utolsó sorban a SZIE, Állatorvos-tudományi Könyvtár munkatársainak szeretnék köszönetet mondani a szakirodalom keresésében nyújtott segítségükért.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. AGERHOLM, JS: 2013, *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals - a critical review. Acta Vet Scand 55:13. doi: 10.1186/1751-0147-55-13
2. ANGELAKIS, E, JOHANI, S, AHSAN, A, MEMISH, Z, RAOULT, D: 2014, Q fever endocarditis and new *Coxiella burnetii* genotype, Saudi Arabia. Emerg Infect Dis 20 (4):726-8.
3. ANGELAKIS, E, RAOULT, D: 2010, Q fever. Vet Microbiol 140 (3-4):297-309.
4. ASTOBIZA, I, BARRAL, M, RUIZ-FONS, F, BARANDIKA, JF, GERRIKAGOITIA, X, HURTADO, A, GARCÍA-PÉREZ, A: 2011, Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. Vet Microbiol 147 (1-2):190-194.
5. BAUD, D, GOY, G, GERBER, S, VIAL, J, HOHLFELD, P, GREUB, G: 2009, Evidence of maternal-fetal transmission of *Parachlamydia acanthamoebae*. Emerg Infect Dis 15 (1):120.
6. BAUD, D, GOY, G, OSTERHELD, MC, BOREL, N, VIAL, Y, POSPISCHIL, A, GREUB, G: 2011, *Waddlia chondrophila*: from bovine abortion to human miscarriage. Clin Infect Dis 52 (12):1469-71.
7. BACA, OG, SCOTT, TO, AKPORIAYE, ET, DEBLASSIE, R, CRISSMAN, HA: 1985, Cell cycle distribution patterns and generation times of L929 fibroblast cells persistently infected with *Coxiella burnetii*. Infect Immun 47 (2):366-369.
8. BLUMER, S, GREUB, G, WALDVOGEL, A, HÄSSIG, M, THOMA, R, TSCHUOR, A, POSPISCHIL, A, BOREL, N: 2011, *Waddlia*, *Parachlamydia* and *Chlamydiaceae* in bovine abortion. Vet Microbiol 152 (3-4):385-393.
9. BOREL, N, RUHL, S, CASSON, N, KAISER, C, POSPISCHIL, A, GREUB, G: 2007, *Parachlamydia* spp. and related *Chlamydia*-like organisms and bovine abortion. Emerg Infect Dis 13(12):1904-7.
10. BOREL, N, THOMA, R, SPAENI, P, WEILENMANN, R, TEANKUM, K, BRUGNERA, R, ZIMMERMANN, DR, VAUGHAN, L, POSPISCHIL, A: 2006, *Chlamydia*-related abortions in cattle from Graubünden, Switzerland. Vet Pathol 43 (5):702-708.
11. CHANTON-GREUTMANN, H, THOMA, R, CORBOZ, L, BOREL, N, POSPISCHIL, A: 2002, Abortion in small ruminants in Switzerland: investigations during two lambing seasons (1996-1998) with special regard to chlamydial abortions. Schweiz Arch Tierheilkd 144 (9):483-492.

12. chlamydiae.com/twiki/bin/view/Cell_Biology/BiologyOfRB 2014.10.11 19:46
13. CROXATTO, A, RIEILLE, N, KERNIF, T, BITAM, I, AEBY, S, PÉTER O, GREUB, G: 2014, Presence of *Chlamydiales* DNA in ticks and fleas suggests that ticks are carriers of Chlamydiae. Ticks Tick Borne Dis 5 (4): 359-65.
14. GUATTEO, R, BEAUDEAU, F, BERRI, M, RODOLAKIS, A, JOLYC, A, SEEGER, H: 2006, Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. Vet Res 37 (6):827–833.
15. GUTIERREZ, J, O'DONOVAN, J, PROCTOR, A, BRADY, C, MARQUES, PX, WORRALL, S, NALLY, JE, McELROY, M, BASSETT, H, FAGAN, J, MALEY, S, BUXTON, D, SAMMIN, D, MARKEY, BK: 2012, Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of toxoplasmosis and enzootic abortion of ewes. J Vet Diagn Invest 24 (5):846.
16. GYLES, LC, PRESCOTT, JF, SONGER, JG, THOEN, CO: Pathogenesis of bacterial infections in animals, 4th ed. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell, 2010. p. 575-582.
17. GYURANECZ M, DÉNES B, HORNOK S, KOVÁCS P, HORVÁTH G, JURKOVICH V, VARGA T, HAJTÓS I, SZABÓ R, MAGYAR T, VASS N, HOFMANN-LEHMANN, R, ERDÉLYI K, BHIDE, M, DÁN Á: 2012, Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hungary: Screening of dairy cows, sheep, commercial milk samples, and ticks. Vector Borne Zoonot Dis 12 (8):650-653.
18. GYURANECZ M, SULYOK K, BALLA E, MAG T, BALAZS A, SIMOR Z, DENES B, HORNOK S, BAJNOCZI P, HORNSTRA, H, PEARSON, T, KEIM, P, DAN, A: 2014, Q fever epidemic in Hungary, April to July 2013. Euro Surveill 19 (30).
19. HELLENBRAND, W, BREUER, T, PETERSEN, L: 2001, Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. Emerg Infect Dis 7 (5):789-796.
20. HENNING, K, SCHARS, G, GRANZOW, H, POLSTER, U, HARTMANN, M, HOTZEL, H, SACHSE, K, PETERS, M, RAUSER, M: 2002, Neospora caninum and Waddlia chondrophila strain 2032/99 in a septic stillborn calf. Vet Microbiol 85(3):285-92.
21. KLEE, SR, TYCZKA, J, ELLERBROK, H, FRANZ, T, LINKE, S, BALJER, G, APPEL, B: 2006, Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. BMC Microbiol 6:2. doi: 10.1186/1471-2180-6-2
22. LIENARD, J, CROXATTO, A, AEBY, S, JATON, K, POSFAY-BARBE, K, GERVAIX, A, GREUB, G: 2011, Development of a new *Chlamydiales*-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples. J Clin Microbiol 49 (7):2637-2642.

23. LOFTIS, AD, REEVES, WK, SZUMLAS, DE, ABBASSY, MM, HELMY, IM, MORIARITY, JR, DASCH, GA: 2006, Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals. *Exp Appl Acarol* 40 (1):67-81.
24. Marrie, TJ, Raoult, D: 1997, Q fever—a review and issues for the next century. *Int J Antimicrob Ag* 8 (3):145–161.
25. MASALA, G, PORCU, R, SANNA, G, TANDA, A, TOLA, S: 2005, Role of *Chlamydophila abortus* in ovine and caprine abortion in Sardinia, Italy. *Vet Res Commun* 29 (Suppl 1):117-123.
26. MASALA, G, PORCU, R, DAGA, C, DENTI, S, CANU, G, PATTA, C, TOLA, S: 2007, Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J Vet Diagn Invest* 19 (1):96-98.
27. MCGAVIN, D, CARLTON, WW, ZACHARY, JF: Thomson's Special Veterinary Pathology, 3rd ed. St. Louis, Missouri, USA: Mosby, Inc. An affiliate of Elsevier, 2001. p. 617.
28. MCVEY, DS, KENNEDY, M, CHENGAPPA, MM: Veterinary Microbiology, 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2013.
29. National Center for Biotechnology Information (NCBI): ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi, 2014.09.29. 19:57
30. niaid.nih.gov/labsandresources/resources/translational/microscopy/Pages/sem.aspx 2014.10.11. 19:50
31. PÁL T: Az orvosi mikrobiológia tankönyve. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt., 2012. p. 393-399.
32. PORTER, SR, CZAPLICKI, G, MAINIL, J, GUATTÉO, R, SAEGERMAN, C: 2011, Q Fever: current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *Int J Microbiol* 2011:248418. doi: 10.1155/2011/248418. Epub 2011 Dec 13.
33. REGENSCHUIT, N, HOLZWARTH, N, GREUB, G, AEBY, S, POSPISCHIL, A, BOREL, N: 2012, Deer as a potential wildlife reservoir for *Parachlamydia* species. *Vet J* 193 (2):589-592
34. REINHOLD, P, SACHSE, K, KALTENBOECK, B: 2011, Chlamydiaceae in cattle: commensals, trigger organisms, or pathogens? *Vet J* 189 (3):257-67.
35. RIJKS, JM, ROEST, HI, VAN TULDEN, PW, KIK, MJ, IJZER, J, GRÖNE, A: 2011, *Coxiella burnetii* infection in roe deer during Q fever epidemic, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 17(12):2369-71
36. RUHL, S, GOY, G, CASSON, N, THOMA, R, POSPISCHIL, A, GREUB, G, BOREL, N: 2008, *Parachlamydia acanthamoebae* infection and abortion in small ruminants. *Emerg Infect Dis* 14 (12):1966-1968.

37. RUIZ-FONS, F, RODRÍGUEZ, O, TORINA, A, NARANJO, V, GORTÁZAR, C, DE LA FUENTE, V: 2008, Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. Vet Microbiol 126 (1-3):282-286.
38. RURANGIRWA, FR, DILBECK, PM, CRAWFORD, TB, MCGUIRE, TC, MCELWAIN, TF: 1999, Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam. nov., Waddlia chondrophila gen. nov., sp. nov. Int. J Syst Bacteriol 49 Pt 2:577-81.
39. SACHSE, K, LAROUCAU, K, RIEGE, K, WEHNER, S, DILCHER, M, CREASY, HH, WEIDMANN, M, MYERS, G, VORIMORE, F, VICARI, N, MAGNINO, S, LIEBLER-TENORIO, E, RUETTGER, A, BAVOIL, PM, HUFERT, FT, ROSSELLÓ-MÓRA, R, MARZ, M: 2014, Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of Chlamydia avium sp. nov. and Chlamydia gallinacea sp. nov. Syst Appl Microbiol 37 (2):79-88.
40. SALINAS, J, CARO, MR, VICENTE, J, CUELLO, F, REYES-GARCIA, AR, BUENDÍA, AJ, RODOLAKIS, A, GORTÁZAR, C: 2009, High prevalence of antibodies against Chlamydiaceae and Chlamydophila abortus in wild ungulates using two “in house” blocking-ELISA tests. Vet Microbiol 135 (1-2):46-53.
41. SÁNCHEZ, J, SOURIAU, A, BUENDÍA, AJ, ARRICAU-BOUVERY, N, MARTÍNEZ, CM, SALINAS, J, RODOLAKIS, A, NAVARRO, JA: 2006, Experimental Coxiella burnetii infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. J Comp Pathol 135 (2-3):108–115.
42. SZEREDI L, JÁNOSI S, TENK M, TEKES L, BOZSÓ M, DEIM Z, MOLNÁR T: 2006, Epidemiological and pathological study on the causes of abortion in sheep and goats in Hungary (1998-2005). Acta Vet Hung 54 (4):503-515.
43. TO, H, HTWE, KK, KAKO, N, KIM, HJ, YAMAGUCHI, T, FUKUSHI, H, HIRAI, K: 1998, Prevalence of Coxiella burnetii Infection in Dairy Cattle with Reproductive Disorders. J Vet Med Sci 60 (7):859–861
44. TUBOLY S: Állatorvosi járványtan I. köt. (Állatorvosi mikrobiológia). Budapest: Mezőgazda Kiadó, 1998. p. 198-202.
45. VAIDYA, VM, MALIK, SVS, KAUR, S, KUMAR, S, BARBUDDHE, SB: 2008, Comparison of PCR, immunofluorescence assay, and pathogen isolation for diagnosis of Q fever in humans with spontaneous abortions. J Clin Microbiol 46 (6):2038–2044.

46. VARGA J, TUBOLY S, MÉSZÁROS J: A háziállatok fertőző betegségei (Állatorvosi járványtan II. köt.). Budapest: Mezőgazda Kiadó, 1999. p. 258-268.
47. VELLEMA, P, VAN DEN BROM, R: 2014, The rise and control of the 2007-2012 human Q fever outbreaks in the Netherlands. Small Ruminant Res 118 (1-3):69-78.
48. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE):
www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.07_ENZ_ABOR.pdf
2014.10.16. 10:30
49. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE):
www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.12_Q-FEVER.pdf
2014.10.21. 12:43