

MTA Doktori Értekezés

A brucellózis és a Q-láz járványtanának vizsgálata

Dr. Gyuranecz Miklós

Agrártudományi Kutatóközpont

Állatorvos-tudományi Intézet

Budapest, 2020

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés	5
Rövid irodalmi áttekintés	6
Brucellózis.....	6
Q-láz	12
Anyag és Módszer.....	18
A brucellózis vizsgálatának anyag és módszertana.....	18
Kórszövettani, immunhisztokémiai vizsgálatok	18
Izolálás	19
Fenotípusos vizsgálatok	19
Szerológia vizsgálatok.....	20
Molekuláris biológiai vizsgálatok	20
Fehérje analízis.....	23
A Q-láz vizsgálatának anyag és módszertana	24
Kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok	24
Szerológiai vizsgálatok	24
Molekuláris biológiai vizsgálatok	25
Kutatási eredmények bemutatása.....	27
A brucellózis járványtanának vizsgálata	27
Mezei nyúl (<i>Lepus europaeus</i>) brucellózisának vizsgálata.....	27
Az <i>omp31</i> gén természetes gátlása IS711 beékelődés következtében <i>B. ovis</i> -ban	32
<i>B. canis</i> fertőzés első hazai megállapítása	37
A <i>B. canis</i> gazdafajon belüli evolúciója a járvány során	45
<i>B. microti</i> első izolálása vaddisznóból (<i>Sus scrofa</i>).....	48
Sertés, vaddisznó és mezei nyúl eredetű <i>B. suis</i> 2-es biotípusú törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata	53
Teve eredetű <i>B. melitensis</i> törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata	60
A Q-láz járványtanának vizsgálata	64
A <i>C. burnetii</i> prevalenciája Magyarországon: tejelő szarvasmarha állományok, juhászatok, kereskedelmi forgalomban kapható tejek és kullancsok felmérő vizsgálata	64
Hazai állati és emberi eredetű <i>C. burnetii</i> törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata...	68

Új <i>C. burnetii</i> genotípusok kimutatása etiópai kullancsokból	72
Egy hazai Q-láz járvány ismertetése	75
A <i>C. burnetii</i> kimutatása házi és vadon élő kérődzők egészséges és vetélt magzatburok mintáiból Magyarországon.....	79
Új tudományos eredmények	82
A doktori mű alapjául szolgáló közlemények	83
Brucellózis:.....	83
Q-láz:	84
Irodalomjegyzék	85
Köszönetnyilvánítás	101
Mellékletek	102

Rövidítések jegyzéke

bp	bázis pár
Ct	cycle threshold
DNS	dezoxiribonukleinsav
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
G+C	guanin+citozin
GT	genotípus
HE	hematoxin-eozin
HGDI	Hunter-Gaston diverzitás index
IHK	immunhisztokémiai vizsgálat
kbp	kilo bázispár
KK	komplement kötés
LCV	large-cell variant
LPS	lipopoliszaharid
Mbp	mega bázispár
2-ME-RSAT	2-merkaptóetanolos kicsapás utáni tárgylemez agglutináció
MIF	mikro-immunofluoreszcencia vizsgálat
MLVA	multi-locus variable-number tandem repeat analysis
MLST	multi-locus sequence typing
MST	multi-spacer typing
OMP	külső membrán fehérjék
PBS	foszfát pufferolt sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
RSAT	tárgylemez agglutináció
SCV	small-cell variant
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel elektroforezis
SNP	pontmutáció
ST	szekvencia típus
TSB	kazeinpepton-szójapepton tartalmú folyékony tápközeg
VNTR	variable-number tandem repeat

Bevezetés

Tudományi iránti érdeklődésem még egyetemi hallgatóként a vadegészségügy területén indult. TDK dolgozataimat vadmadarak himlővírus fertőzése és állatkerti madarak tüdőmikózisának témaköreiben készítettem. Állatorvosi diplomám kézhezvétele után a vadegészségügyi vonalon maradva a tularémiát választottam kutatási területemnek a SZIE Állatorvos-tudományi Kar Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékén. PhD értekezésemet 2011-ben védtem meg „A tularémia ökológiájának vizsgálata és *Francisella tularensis* törzsek összehasonlító elemzése” című dolgozattal. Doktori kutatásaim során érdeklődésem egyre inkább a zoonótikus, állatot és embert egyaránt megbetegíteni képes, baktériumok felé fordult. 2012-ben sikerült elnyernem a Magyar Tudományos Akadémia fiatal kutatóknak kiírt, nagy presztízsű Lendület pályázatát, aminek segítségével saját kutatócsoportot alapíthattam az MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézetében „Zoonótikus Bakteriológia és Mycoplasmatológia” névvel.

Folytattuk tularémia kutatásainkat, az állategészségügy területén a világ egyik vezető tularémia laboratóriumává, kutató műhelyévé váltunk. Ennek egyik elismerése volt, hogy 2015 és 2018 között laboratóriumunk a világ egyetlen OIE (World Organization for Animal Health) tularémia referencia laboratóriumaként is funkcionált. Vizsgálatainkat egyúttal kiterjesztettük a brucellózis, a Q-láz és a lépfene területeire is. Idővel azonban kutatásaink súlypontja egyre inkább a mycoplasmatológia irányába tolódott. A 2019-ben elnyert Élvtal pályázatomban is a *Mycoplasma* fajok vizsgálatát célozza. Jelenleg tizenöt fős csoportom kutatásainak 80%-a a mycoplasmatológia területét fedi le.

Véleményem szerint legjelentősebb tudományos eredményeim az utóbbi évek mycoplasmatológiai kutatásaiból származnak. Egy-egy vizsgálatot azonban csak egyszer illik új tudományos eredményként elszámolni, és mivel nem szeretném a PhD hallgatóim előtt „elvenni” a kutatási eredményeket, ezért korai post-doc időszakom brucellózis és Q-láz területén végzett munkáihoz nyúltam vissza az MTA doktori értekezés elkészítéséhez. Ezek jellemzően nem megtervezett kutatások voltak, hanem többségében az élet kínálta váratlan lehetőséget ragadtuk meg, és dolgoztuk fel kíváncsiságtól vezérelve tudományos szemszögből. A kezdeti csalódottságomat szerencsére kárpótolta a dolgozat megírása során érzett nosztalgia, az egykori élmények újra élése, amikor még gondtalan kutatóként időm zömét a terepen és a laborasztal mellett tölthettem, nem pedig a számítógép monitorja előtt görnyedve irányítottam egy nagy csoport mindennapi ügyeit.

Rövid irodalmi áttekintés

Brucellózis

Történet

A Vezúv Kr. u. 79-ben történt kitörése alkalmával betemetett Herculaneum régészeti feltárása során a brucellózisra jellemző csontdeformitásokat mutató emberi maradványokat találtak (Godfroid és mtsai., 2005). Az ugyanekkor előkerült, megkövült sajtok elektronmikroszkópos vizsgálata során pedig apró, kokkoid-pálcákat azonosítottak, amik akár *Brucella* fajok is lehetnek (Capasso, 2002). A kórokozót, melyet először *Micrococcus melitensis*-nek neveztek el Sir David Bruce izolálta 1887-ben Máltán egy lázas megbetegedésben elhunyt brit katonából. Innen származik a betegség máltai lázként való elnevezése (Bruce, 1887), a kórokozót pedig első leírója tiszteletére *Brucella melitensis*-re keresztelték át. Zannit, szintén Máltán 1905-ben kecsketejéből is kimutatta a *B. melitensis*-t, ezzel igazolva a baktérium zoonótikus jellegét (Zammit, 1905).

A brucellózis az egyik legrégebb óta és legintenzívebben kutatott bakteriális betegség. Ennek megfelelően Magyarországon is számos vizsgálat született a fertőzéssel kapcsolatban az elmúlt évtizedekben. A teljesség igénye nélkül párat kiemelve: A legkorábbi hazai vizsgálat Nyiredi István nevéhez fűződik, aki már az 1930-as években vizsgálta a *Brucella* törzseket (Nyiredi, 1932). A Q-lázzal is intenzíven foglalkozó Romváry József a brucellózis témakörében is végzett kutatásokat (Romváry, 1954). Prohászka László attenuált *B. suis* törzsek előállításával próbálkozott (Prohászka, 1959). Kardeván Andor és Kemenes Ferenc (1961) a mezei nyulak brucellózisáról számolt be hazánkban. Körmendy Béla és mtsai. a 70-80-as években sokat foglalkoztak a brucellózis intézeti diagnosztikai módszereinek fejlesztésével. Munkáik során többek között felismerték a kutyák szerepét a *B. suis* terjesztésében (Körmendy és Nagy, 1982). A rendszerváltás utáni évtizedekből pedig Hajtós István és Dénes Béla juhok *B. ovis* fertőzöttségének a vizsgálata terén kifejtett munkásságát mindenképpen ki kell emelni (Dénes és Glávits, 1994; Hajtós, 1988).

Kóroktan

A *Brucella* fajok kicsi, kokkoid-pálca alakú (0,5-0,7 µm széles, 0,6-1,5 µm hosszú), fakultatív intracelluláris, Gram-negatív kórokozók (OIE, 2018a). Jelenleg 10 különböző *Brucella* fajt (*B. abortus*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. inopinata*, *B. melitensis*, *B. microti*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. pennipedalis*, *B. suis*) különböztetünk meg, és néhány további faj vár hivatalos leírásra (Olsen és Tatum, 2016). Számos fajon belül további biotípusokat különböztetünk meg.

A *Brucella* fajok 2 kromoszómával rendelkeznek, amik együttesen kb. 3,2 Mbp nagyságúak. Genetikai állományuk guanin+citozin (G+C) aránya 58-59% és 3200-3400 kódoló szakaszt tartalmaznak (Olsen és Tatum, 2016). A klasszikus *Brucella* fajok (*B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis* és *B. suis*) között több mint 94%-os a genom szintű genetikai hasonlóság, ami miatt egy időben, ideiglenesen egy közös faj alfajainak is tekintették őket.

Járványtan

Brucella fajok a Föld minden részén előfordulnak, de az egyes fajok előfordulása és gazdaspektruma nagy változatosságot mutat. A fajok legfőbb járványtani tulajdonságait és zoonótikus potenciálját az 1. táblázat tartalmazza. Általában gazdafaj specifikusak, de időnként más állatokat is megbetegíthetnek, mely tulajdonság különösen a *B. melitensis*-re jellemző. A fertőződés az egyedek közötti közvetlen kontaktus révén vagy a vetélés során szennyeződött környezetből (szennyezett takarmány, ivóvíz) történik. A természetes és a mesterséges megtermékenyítés is fontos szerepet játszhat a betegség terjesztésében.

A *B. melitensis* Magyarországon soha nem fordult elő, az ország mentességét 2004-ben ismerte el az Európai Unió. Az utolsó hazai *B. abortus* esetet 1985-ben diagnosztizálták. Hazánkban a *B. canis*, *B. microti*, *B. ovis* és *B. suis* fordul elő.

1. táblázat: *Brucella* fajok fő gazdafajai és közegészségügyi jelentőségük.

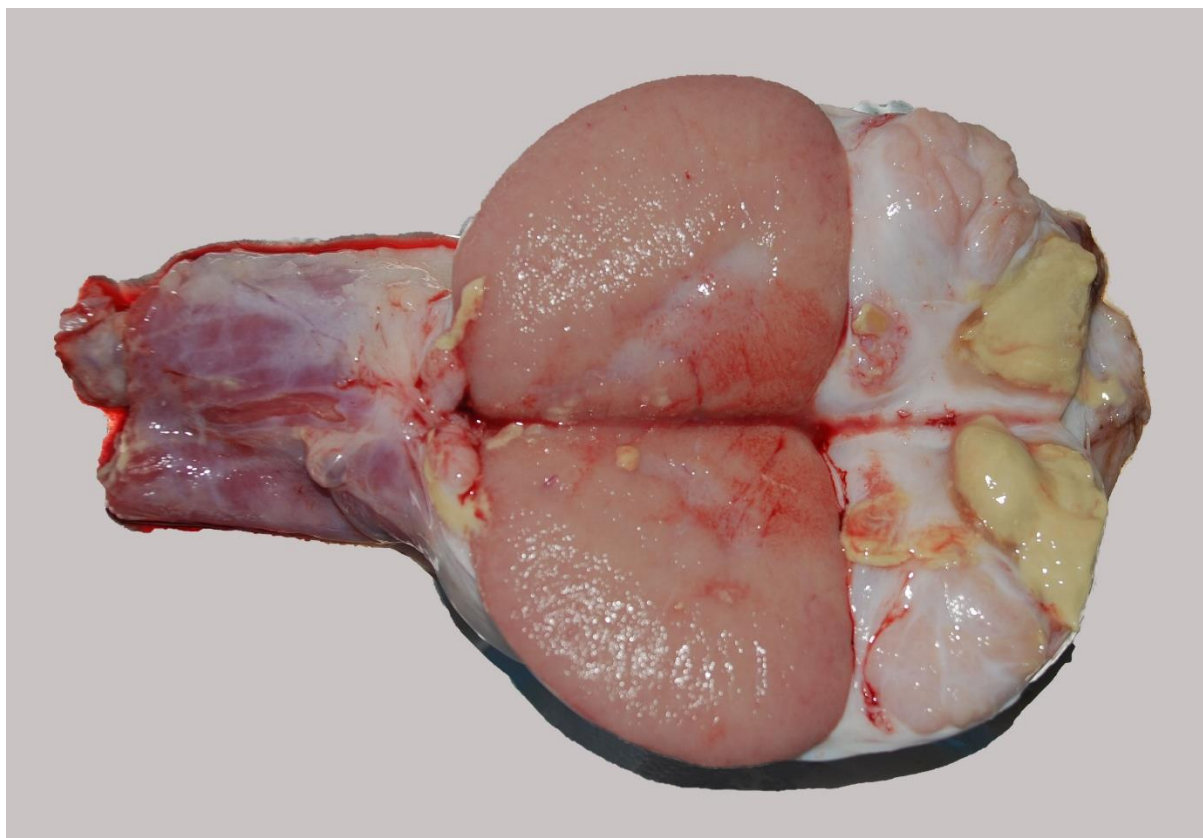
Faj	Gazdafaj	Humán egészségügyi jelentőség
<i>B. abortus</i>	szarvasmarha, bölény, bivaly, jávorszarvas, teve	gyakran okoz megbetegedést
<i>B. canis</i>	kutyafélék	apatogén/patogén, egyre több diagnosztizált eset Dél-Amerikában
<i>B. ceti</i>	delfinek, bálnák	egyre több diagnosztizált eset
<i>B. inopinata</i>	nem ismert	mell implantátumból történt az izolálása
<i>B. melitensis</i>	kecske, juh, teve	nagyon gyakran okoz megbetegedést
<i>B. microti</i>	róka, mezei pocok, vaddisznó, talaj	nem ismert
<i>B. neotomae</i>	rágcsálók	nem ismert
<i>B. ovis</i>	juh	apatogén
<i>B. pinnipedialis</i>	fókák	nem ismert
<i>B. suis</i>	1-es biotípus: sertés/vaddisznó 2-es biotípus: sertés, vaddisznó, mezei nyúl 3-as biotípus: sertés/vaddisznó 4-es biotípus: rénszarvas 5-ös biotípus: rágcsálók	1-es biotípus: patogén 2-es biotípus: feltehetően apatogén 3-as biotípus: patogén 4-es biotípus: patogén 5-ös biotípus: nem ismert

Kórfejlődés

Az állatok leggyakrabban szájon át fertőződnek, de légúton, ivarváladékkal vagy a nyálkahártya és bőr sérülésen át is bejuthat a kórokozó a szervezetbe. Természetes ellés során is bekövetkezhet az utódok fertőződése. A brucellákat a bemeneti kapuban lévő makrofágok bekebelezik, majd a regionális nyirokcsomóba szállítják. A baktériumok egy része túlél a falósejtekben, szaporodik, majd a véráramba tör és 2-3 hétig tartó, gyakran intermittáló bakterémiát alakít ki, mely során a kórokozó eljut a belső szervekbe. Mind a sejtes, mind a humorális immunválasz részt vesz a baktérium elleni védekezésben, melyek közül az előbbi szerepe a domináns. A szervezet immunválasza következtében végül eltűnnek a brucellák a vérpályából és a szervek döntő többségéből, visszahúzódnak a predilekciós szervekbe (méh, magzatburok, magzat, tejmirigy, here, mellékhere, nyirokcsomók, ízületek), ahol tovább szaporodnak és idült gyulladást; vetélést, ízületgyulladást, csontdeformitásokat idéznek elő (WHO, 2006).

Tünetek, Kórbonctan

A betegség kezdeti szakasza általában tünetmentes. Az ivarérett állatokban a kórokozó eljut az ivarszervekbe. A vemhes nőstényekben magzatburok gyulladást okoz, ami többnyire a vemhesség harmadik trimeszterében vetéléshez vezet. A péréjkek duzzadtak lehetnek, a hüvelyből szürkésvörös váladék folyhat. Gyakori a magzatburok visszamaradás. A placenta bővérű, a méhpogácsák felületén sárgás színű elhalások és fibrin kiválás látható. A vetélt magzatok ödémásak, testüregükben savós-véres folyadék található. Hím állatokban here és mellékhere gyulladás alakul ki, állományukban elhalásos-gennyos góccal (1. ábra). A sperma minősége romlik, nagyszámú gyulladással sejtet és baktériumot tartalmaz. Előfordul ízület, ínhüvely és nyáktömlő gyulladás, valamint tályogok, elhalásos góccal jelennek meg a bőrben és időnként a belső szervekben. A különböző szervekben kialakult góccal jellegzetes granulóma felépítést mutatnak (Varga és mtsai, 2018; WHO, 2006)



1. ábra: B. ovis okozta mellékhere gyulladás kosban.

Kórjelzés

A klinikai tünetek és kórbonctani elváltozások alapján felmerült betegség gyanúját laboratóriumi vizsgálatokkal kell megerősíteni (OIE, 2018a). A vetélt magzattól, magzatburoktól, hüvelyváladéktól készített kenetben Köster-féle festéssel mutathatók ki a brucellák, de mivel más baktériumok hasonló morfológiával és festődéssel rendelkezhetnek, ezért további direkt vagy indirekt módszerekkel kell megerősíteni a fertőzés gyanúját. Számos konvencionális és valós idejű polimeráz láncreakció (PCR) rendszer áll rendelkezésre a mintában található *Brucella* DNS kimutatására. Amikor lehetőség van rá, akkor meg kell próbálkozni a kórokozó izolálásával a különböző klinikai mintákból (hüvelyváladék, vetélt magzat, tej, nyirokcsomók, nemi szervek). Az egyes fajok és biotípusok elkülönítése történhet fág tipizálással, telepmorfológiai tulajdonságaik alapján, biokémiai és szerológiai próbák segítségével. Különböző molekuláris biológiai módszerek (pl. multi-locus variable-number tandem repeat analysis /MLVA/) is rendelkezésre állnak az egyes törzsek faj, biotípus vagy akár még finomabb szintű azonosításához.

A fertőzés indirekt azonosítására szerológiai és celluláris immun próbák állnak rendelkezésre. Szűrővizsgálatokra alkalmasak a különböző pufferolt *Brucella* antigént tartalmazó tesztek (Rose-Bengal, tárgylemez agglutináció), komplement kötési (KK) próba, enzime-linked immunosorbet assay (ELISA) vagy a fluoreszcencia-polarizációs próba. A pozitív eredményt további tesztek elvégzésével kell megerősíteni. Tejminták vizsgálata történhet indirekt ELISA-val vagy az úgynevezett tejgyűrű teszttel. Celluláris immun próbák közül a brucellin bőrpróba alkalmas a nem vakcinázott kérődzők vagy sertések vizsgálatára.

Az egyedi szintű diagnózis felállításakor gyakran ismételt vizsgálatokra és több direkt és indirekt módszer együttes alkalmazására van szükség.

Gyógykezelés, védekezés

A *Brucella* fajok számos antibiotikummal (tetraciklinek, aminoglikozidok, fluorokinolonok) szemben érzékenyek, de a megbetegedett állatokat nem kezeljük, egyrészt mert a mentesítésre való törekvés a cél, másrészt a fertőzött állatokból nem lehet tökéletesen eliminálni a kórokozót. Az endémiásan fertőzött területeken a klinikai tünetek időleges mérséklésére igénybe vehetnek antibiotikumokat.

A mentes területekre a fertőzés behurcolását állategészségügyi-igazgatási jogszabályokban rögzített rendelkezések segítségével védik ki és ellenőrzik, melyek karanténost, ismételt és kombinált laboratóriumi vizsgálatokat és rendszeres szűrővizsgálatokat jelentenek. A fertőzött állományok mentesítése történhet a fertőzött egyedek szelekciójával, generációváltással vagy állománycserével (Varga és mtsai., 2018; WHO, 2006).

Endémiás területeken a fertőzött állományok veszteségeinek csökkentésére vagy az első generációs mentes állományok védelmére vakcinás védekezést alkalmaznak a járványvédelmi intézkedések betartása mellett. Élő, attenuált vakcinákat alkalmaznak; a Rev.1 törzset *B. melitensis* és a S19 és RB51 törzseket *B. abortus* ellen. Az nőtények oltása az ivarérés előtt javasolt, mert vemhes nőtényekben vetélést okozhat a vakcinázás, tejjel ürülhet a törzs, illetve a kifejlett korban végzett vakcinázás fals pozitív szerológia tesztet eredményezhet. Hímekben a vakcinatörzs megtelepedhet az ivarszervekben, ezért oltásuk nem javallott. Mindent összevetve az endémiás területeken a szemcseppentéssel végzett immunizálás gyakorlatias és hatékony védekezési módszernek bizonyult a brucellózis ellen (Varga és mtsai., 2018; WHO, 2006).

Közegészségügyi jelentőség

Hazánkban sporadikusan, elsősorban importált emberi megbetegedések fordulnak elő, de a Föld endémiásan fertőzött régióiban gyakori zoonótikus fertőzés. Az emberi megbetegedések elsődleges forrása a nyers tej és abból készült tejtermékek fogyasztása. Ritkábban fertőzött vadállatoktól, laboratóriumi munka során vagy esetleg az attenuált vakcinák használata során fertőződnek az emberek. A szájon át, légúton, kötőhártyán vagy bőrön át történő fertőződést egy 10-14 napig tartó lappangási idő követi, majd a betegek lázasak, étvágytalanok lesznek. Jellemző a visszatérő láz. A kezelt betegek lesoványodnak, gyakori az ízületi, ínhüvely, csigolyagyulladás, szívberhártya gyulladás, heregyulladás, magzatkárosodás és a vetélés (Varga és mtsai., 2018; WHO, 2006).

A kórjelzés során fontos a kórelőzmény és a klinikai tünetek figyelembevétele. A vérben emelkedő titerben megjelenő ellenanyagok mutathatók ki. Az elváltozott szervből vett biopsziából vagy vérmintából a kórokozó kitenyészthető vagy PCR-rel kimutatható. A betegek hetekig tartó antibiotikum (doxiciklin, rifampicin) terápiában részesülnek (Varga és mtsai., 2018). A kezelés sikerességét szerológiai vizsgálatokkal kell nyomon követni. A megelőzés szempontjából legfontosabb a tej pasztörözése és az egyéb nyers állati eredetű termékek fogyasztásának a kerülése, valamint a foglalkozás körében veszélyeztetett emberek felvilágosítása és a megfelelő védőöltözet viselése.

Q-láz

Történet

A Q-láz első említése 1935-ből származik, amikor az ausztráliai Brisbane-ben vágóhídi munkások lázas megbetegedéséről számoltak be (Derrick, 1937). A megbetegedett emberek kórelőzményének áttanulmányozása és fizikális vizsgálata során Derrick nem jutott diagnózisa, így a betegségnek a „Q” jelzöt adta a „query” (ismeretlen eredetű) láz után. Későbbiekben az is felmerült, hogy a „Q” igazából Queensland-re, a tartományra utal, ahol a betegséget először leírták (McDade, 1990). Burnet és Freeman (1937) egy igényes, intracelluláris kórokozót izolált a Derrick által kezelt betegek vizeletével fertőzött tengerimalacokból, aminek a *Rickettsia burnetii* nevet adta. Tenyésztési és biokémiai tulajdonságai alapján Philip (1948) egy új genusba sorolta a *R. burnetii*-t, amit *Coxiella*-nak nevezett el az amerikai kutató Herald R. Cox után, aki elsőként izolálta a baktériumot az Egyesült Államokban (Angelakis és Raoult, 2010).

A Q-lázat hazánkban először vágóhídi munkások szerológiai vizsgálata során mutatták ki Farkas és mtsai. (1950). Szarvasmarha állományban először 1956-ban azonosította a fertőzést Romváry József (1957). Szerológiai felmérő vizsgálat során a magyarországi juh állományokban 14,2%, míg a szarvasmarhák között 13,45% pozitivitást mutatott ki (Romváry és mtsai., 1979). *C. burnetii* okozta kérődző vetélésekről is többször beszámoltak hazánkban az elmúlt évtizedek során (Rády és mtsai., 1985; Szeredi, 2004; Szeredi és mtsai, 2006).

Kóroktan

A *C. burnetii* egy kicsi, kokkoid-pálca alakú (0,2-0,4 µm széles, 0,4-1,0 µm hosszú), obligált intracelluláris, Gram-negatív kórokozó (Maurin és Raoult, 1999). Két fejlődési stádiuma van. A large-cell variant (LCV) egy nagyobb, metabolikusan aktív forma, mely az eukarióta sejtek citoplazmájában lévő vakuólumokban szaporodik. Sporuláció során ezekből alakulnak ki a spóra szerű, környezeti hatásoknak ellenálló, úgynevezett small-cell variant-ok (SCV), amik a gazdasejt felbomlásakor a környezetbe kerülnek (Angelakis és Raoult, 2010).

A *C. burnetii* egy kb. 5 Mbp nagyságú kromoszómával rendelkezik, genomjának G+C aránya 43%. A legtöbb izolátum emellett a négy ismert plazmidból legalább egyet még tartalmaz, ami a genetikai információjuk közel 2%-át teszi ki. A plazmidot nem tartalmazó izolátumok pedig egy kb. 16 kbp nagyságú plazmid-szerű szekvenciát tartalmaznak a kromoszómájukba épülve (Mallavia, 1991). Kódoló szekvenciáinak a száma 2134, melyek közül 719 (Eldin és mtsai., 2017; Oyston és Davies, 2011) hipotetikus. Számos transzpozont és inzerciós szekvenciával (pl.: IS1111) is rendelkezik.

Járványtan

Új-Zéland kivételével világszerte, így hazánkban is széles körben elterjedt a *C. burnetii* (Oyston és Davies, 2011). Számtalan faj gazdafajaként szolgálhat a házi állatoktól a madarakon át a különböző ízeltlábú vektorokig. Az emberi Q-lázás megbetegedések elsődleges forrásai azonban a házi kérődző állományok, mint a szarvasmarhák, juhok és kecskék (Maurin és Raoult, 1999; Angelakis és Raoult, 2010).

A haszonállatok *C. burnetii* fertőzöttségét gyakran a coxiellosis terminológiával illetjük, ami egy krónikus, de gyakran tünetmentes fertőzésre utal (Eldin és mtsai., 2017). A nőnemű egyedek méhében és tejmirigyekben bújik meg kórokozó, ami juhokban és kecskében vetélést, szarvasmarhában terméketlenséget okozhat (Palmer és mtsai., 1983; Rády és mtsai., 1985; To és mtsai., 1998). A baktérium ürítése tejjel, vizelettel és bélsárral történhet. Ellés, vetélés során

a magzatburokkal nagy mennyiségű *C. burnetii* kerülhet a környezetbe. A különböző mezőgazdasági technológiák, mint például a szántóföldek trágyázása vagy a fertőzött állatok szállítása hozzájárulhatnak a kórokozó terjedéséhez (Enserik, 2010). Figyelembe véve a baktérium relatíve jó ellenálló képességét ezek aztán jelentős járványok kialakulásához vezethetnek, mint például Hollandiában (Enserik, 2010).

Számos ízeltlábú vektorról, többek között a kullancsokról kimutatták, hogy a *C. burnetii* vektoraivá válhatnak a fertőzött állatok vérének elfogyasztása révén. Az ilyen kullancsok jelentős számban üríthetik a baktériumot az ürülékükkel. Annak ellenére, hogy már a korai kutatások során bebizonyították, hogy a kullancsok képesek az egyik tengerimalacról átvinni a kórokozót a másikra, feltételezhetően nem játszanak fontos szerepet a gazdasági állatok fertőződése során, amik elsősorban direkt kontaktus révén fertőzik egymást (Babudieri, 1959). Egyes esetekben, mint például a *C. burnetii* madarak, rágcsálók vagy vadon élő kérődzők közötti terjesztében szerepet játszhatnak a kullancsok (Stein és Raoult, 1999; Babudieri, 1959). Az emberi Q-lázás megbetegedések elsődleges forrása a fertőzött légúti részecskék belélegzése, ami származhat méhváladékból, magzatburokból, szennyezett gyapjúból, beszáradt trágyából, stb. A fertőzött állatok a tejjükkel is ürítik a kórokozót, ezért potenciálisan a nyers tej fogyasztása is fertőzési forrásként szolgálhat, de önkénteseken végzett kísérletek eredményei ellentmondásosak ezzel kapcsolatban. A kullancsok szerepét eddig nem igazolták az emberi Q-lázás megbetegedések hátterében (Kazar, 1996). A *C. burnetii* közvetlen emberi kontaktussal (klinikai beteg vizsgálat, kórbonctani vizsgálat) és szexuális úton történő terjedése ritka (Milazzo és mtsai., 2001; Oyston és Davies, 2011).

Kórfejlődés

A *C. burnetii* egyik fontos tulajdonsága az antigenitás változása, az úgynevezett fázis variancia. Az akutan fertőzött állatból vagy emberből izolált vad, virulens kórokozó sima, teljes hosszúságú LPS-t expresszál, úgynevezett I-es fázisban van. Embrionált tyúktojáson vagy sejtenyészetben történő néhány passzázs során a baktérium I-es fázisból avirulens II fázis-ba alakul át, ami durva, csavart LPS-t expresszál (Angelakis és Raoult, 2010; Oyston és Davies, 2011).

Miután a kórokozó bejut a szervezetbe rövid időn belül vérfertőzés alakul ki, majd eljut a belső szervekbe (tüdőbe, májba, tőgybe, vemhes méhbe, nyirokcsomókba), ahol elszaporodik és a különböző váladékokkal (bélsárral, vizelettel, tejjel, nyállal) ürül a környezetbe. A baktérium eljut a magzatburokba, majd a véren vagy amnion folyadékon keresztül a magzatot is megfertőzheti. A *C. burnetii* intracelluláris kórokozó, mely a monociták/makrofágok

citoplazmájában kialakuló fagoszómákban szaporodik. A gazdaszervezet elsődlegesen sejtes immunválasszal és granulóma képződéssel reagál a fertőzésre. Ellenanyagok is megjelennek a vérben, az IgM mind a fázis I-es és II-es sejtek ellen termelődik, míg az IgG elsősorban a fázis II-es antigén ellen irányul (Maurin és Raoult, 1999). Az immunválasz hatására a vérpályából és szervek többségéből eliminálódik a kórokozó, de egyes szervekben, mint állatok esetén a bélben és a tőgyben, míg emberben a szívbillentyűkben tartósan jelen maradhat és krónikus fertőzés alakul ki.

Tünetek és Kórbonctan

Kérődző állatokban gyakran tünetmentes a fertőzés, vérfertőzés idején enyhe hőemelkedés, tejtermelés csökkenés vagy étvágytalanság kialakulhat (Varga és mtsai., 2018). Elsősorban kecskében, de juh állományokban is a tömeges vetélés, esetleg koraellés, gyenge életképességű utódok születése a Q-láz legszembetűnőbb klinikai tünete. A vetélt magzatburkokban vérzések, elhalások láthatóak, felületükön fibrinkiválás fordulhat elő (2. ábra). Szarvasmarhában a *C. burnetii* vetélést kiváltó szerepe nem tisztázott. Szintén kutatásokat igényel még a *C. burnetii* szerepének a felmérése a terméketlenség, az endometritis/metritis és magzatburok retenció kérdésében (Agerholm, 2013). A szubklinikai tőgygyulladás és a coxiellosis között egyes vizsgálatok szerint feltételezhető ok-okozati összefüggés. Sporadikus vetélésekről beszámoltak más kérődző fajokban (bivaly, teve, stb.) is, míg egyéb állatfajokban (kutya, sertés, madarak, stb.) rendszerint tünetmentes marad a fertőzés, csak szerológiai áthangolódás történik.



2. ábra: Vérzéses-elhalásos magzatburok gyulladás kecske *C. burnetii* okozta vetélése során.
(dr. Szeredi Levente felvétele)

Kórjelzés

A kórbonctani kép, a jellegzetes vérzéses magzatburok gyulladás, felkelti a Q-láz gyanúját. A laboratóriumi vizsgálatok során a vetélt magzatburokból, magzati szervekből a kórokozót Stamp-festéssel, immunfluoreszcens vizsgálattal, immunhisztokémiával (IHK) vagy PCR-rel lehet kimutatni. Az utóbbi alkalmas a vetélésből származó minták mellett az tej, bélsár és vizelet minták vizsgálatára is. Napjainkban a szűrővizsgálatokra elsősorban a genomban számos kópiában (törzsenként változó) jelenlévő IS1111 régiót célzó rendkívül érzékeny ($\sim 10^0$ - 10^1 telep formáló egység/TFE/) valós idejű PCR-eket használnak (OIE, 2018b). A *C. burnetii* izolálása speciális tudást igényel és 3-as biztonsági fokozatú laboratóriumi körülmények között történhet a klinikai minta tengerimalacba oltásával, embrionált tojásban, sejttenyészetben, valamint szintetikus tápközegekben (Omsland és mtsai., 2009).

A Q-láz fertőzés indirekt kimutatása történhet indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálattal, KK próbával és ELISA segítségével (OIE, 2018b). A rutin diagnosztikai vizsgálat során elsősorban az utóbbi kettőt alkalmazzák. Az ELISA előnye az magasabb érzékenység, a könnyebb kivitelezhetőség és, hogy alkalmas a tejből történő ellenanyag kimutatásra is. A KK próba kivitelezése gyakorlatot igényel, érzékenysége is elmarad az ELISA-étól, de alkalmas a fázis I-es és II-es antigének ellen termelt ellenanyagok kimutatására, ezáltal információval szolgálhat az akut és idült fertőzés elkülönítéséhez.

Gyógykezelés, védekezés

Az antibiotikus gyógykezelés állatok esetében ritkán alkalmaznak, amennyiben sor kerül rá, akkor tetraciklineket (oxitetracliklin, doxiciklin) érdemes választani. Megelőzés, védekezés szempontjából elsődleges a megfelelő telepi és ellési higiéniai szabályok betartása, a vetélt állatok elkülönítése, a magzat, magzataburok megsemmisítése, alomanyag és trágya ártalmatlanítása, a terület fertőtlenítése (Varga és mtsai., 2018). Hosszútávú védekezési lehetőségként rendelkezésre áll kereskedelmi forgalomban kapható inaktivált vakcina is a Q-láz elleni védekezésre. A vakcina kecskére és szarvasmarhára van törzskönyvezve, de kísérleti eredmények alapján juhon immunizálására is alkalmas a készítmény. Kecske esetében a vakcinázás a korábban nem fertőzött egyedekben megelőzi a vetélést és a baktérium ürítést. Szarvasmarhában az immunizálás csökkenti a vetelés kockázatát, de nem mérsékli a baktérium ürítését (Arricau-Bouvery és Rodolakis, 2005). Szerológiai vizsgálattal a vakcinázott és fertőzött állatok nem különíthetők el. Kisebb állományok mentesítésére történtek kísérletek, de nagyobb állományok esetén a fertőzés gyakori előfordulása és környezetből történő újrafertőződés miatt a mentesítési próbálkozások eddig nem jártak sikerrel.

Közegészségügyi jelentőség

A Q-láz zoonotikus betegség, az emberek leggyakrabban kérődzők beszáradt bélsarának, méhváladékának, vizeletének belélegzése útján fertőződnek. A nyers tej fogyasztás szerepe a humán megbetegedések kialakulásában nem tisztázott. Emberekben az esetek közel felében a fertőzés tünetmentes marad vagy nagyon enyhe tünetekkel jár. Az esetek másik felében a heveny megbetegedés során influenzaszerű tünetek, láz, tüdőgyulladás, májgyulladás alakul ki. A kezeltlen emberi megbetegedések 5%-ban idült kórkép jön létre, ami szívbelhártya, szívbillentyű gyulladásal jár együtt (Angelakis és Raoult, 2010; Arricau-Bouvery és Rodolakis, 2005).

A diagnózis felállítása a kórelőzmény és a klinikai tünetek figyelembevételével a vérben emelkedő titerben megjelenő ellenanyagok és/vagy a kórokozó PCR-rel történő direkt kimutatásán alapul. Gyógykezelésre általában hosszan tartó doxiciklin terápia javasolt a szerológiai titerek nyomon követése mellett. Megelőzés szempontjából a veszélyeztetett emberek felvilágosítása, a por útján történő terjedés megakadályozása, megfelelő védőöltözet viselése és a nyers tej fogyasztásának kerülése ajánlott. Egyes országokban (pl. Ausztrália) vakcinát is alkalmaztak az emberek immunizálására (Gidding és mtsai., 2009).

Anyag és Módszer

A brucellózis vizsgálatának anyag és módszertana

Kórszövettani, immunhisztokémiai vizsgálatok

A boncolás során kutatástól függően különféle szerv mintákat vettünk a szövettani vizsgálatokhoz. A mintákat 10%-os formalinban fixáltuk. A formalinban fixált, és paraffinba ágyazott szövetmintákból 4 µm vastag metszeteket készítettünk, hematoxilinnal és eozinnal (HE) megfestettük, majd fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

A különböző kísérletek során IHK vizsgálatokat végeztünk *B. abortus* specifikus (S típusú *Brucella* fajok), *B. canis* specifikus (R típusú *Brucella* fajok) hiperimmun nyúl és *B. suis* specifikus (S típusú *Brucella* fajok) hiperimmun egér savó segítségével. Az utóbbi kettőt magunk állítottuk elő.

A *B. suis* specifikus savó előállítását egérben végeztük (Naval Medical Research Institute egér, hozzávetőlegesen 20 g) szubkután fertőzéssel. Az egereket négy héten át, heti egy alkalommal az egyik mezei nyúlból izolált élő *B. suis* 2-es biotípusú törzzsel fertőztük, 2×10^9 csíraszámban. A mintákat egy éjszakán át 4°C-on az egér hiperimmun szérummal együtt (1:20 000-hez hígítás) inkubáltuk. Az antigén-ellenanyag kapcsolódását torna-peroxidázzal jelölt polimerrel mutattuk ki (EnVisionTM + Kit). Negatív kontrollként egy foszfát puffer oldatban inkubált metszetsort alkalmaztunk. Egy *B. suis* 2-es biotípusú baktérium okozta vetélésből származó, sertés magzat szerveiből gyűjtött szövetmintákat pedig pozitív kontrollként használtuk. A metszeteken megvizsgáltuk a *F. tularensis* előfordulását is, egy korábban publikált IHK módszer szerint az esetleges kettős fertőzés kizárása érdekében (Gyuranecz és mtsai., 2010). A *B. suis*-specifikus IHK tesztet, mely az általunk előállított hiperimmun egér szérumon alapul, olyan szövetmintákon is elvégeztük, amelyek *B. canis*, *F. tularensis*, és *Y. pseudotuberculosis* pozitív estekből származtak, hogy kizárjuk az esetleges keresztreakciókat ezen baktérium fajokkal.

A *B. canis* specifikus hiperimmun savó előállításához nyulat fertőztünk négy héten át, heti egy alkalommal, alkalmanként 4×10^9 TFE *B. canis* törzsszel. Ez a savó a *B. canis*-ra és *B. ovis*-ra specifikus tárgylemez agglutinációs próba során pozitív eredményt adott, de negatív lett a teszt a *B. abortus* és *B. suis* specifikus agglutinációs próba alkalmával. A nyulakat az ötödik héten elvéreztettük, és a szerológiai vizsgálatok elvégzése után kezdtük meg a *B. canis* sejtfal antigénjeinek kimutatására alkalmas IHK vizsgálatot. A deparaffinizált metszeteket a foszfát pufferolt sóoldattal (PBS) 1:20000 arányban hígított hiperimmun szérummal egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk. Az ellenanyag kötődést torna-peroxidázzal jelölt polimerrel (EnVisionTM+Kit; Dako, Glostrup, Dánia) mutattuk ki. Foszfát pufferben inkubált metszeteket használtunk negatív kontrollként.

Izolálás

A különböző klinikai mintákat (tampon, szövet, vér) az esetek többségében 5% inaktivált lószérumot tartalmazó, *Brucella* szelektív táptalajra (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) oltottuk, majd 7 napig 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett inkubáltuk. A vérmintákból 1-1 millilitert kazeinpepton-szójapepton (tryptic soy broth /TSB/) tartalmú folyékony tápközegbe is inokuláltuk (Difco, Becton Dickinson Co., Sparks, MD), amelyeket 21 napig szintén 37°C-on és 5% CO₂ tartalom mellett tenyésztettünk, és amelyekből a 7., 14. és a 21. napokon az előzőekben leírt táptalajra oltottunk és az előbbieken ismertetett körülmények között inkubáltunk. A mezei nyúl vizsgálatok során a lépben található gócokat kivágtuk, majd belőlük 1-1 grammot homogenizáltunk, véres agarra oltottunk, és 5 napig 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett inkubáltunk. A táptalajon a baktériumtelepek növekedését és morfológiai tulajdonságaikat minden esetben naponta ellenőriztük.

Fenotípusos vizsgálatok

Standard módszerekkel vizsgáltuk a kitenyésztett törzsek tenyésztési, morfológiai és biokémiai sajátosságait, úgy mint telepmorfológiáját, Gram-festődését, oxidáz-, kataláz- és ureáz aktivitását valamint CO₂- és H₂S-termelő képességét, illetve, hogy növekednek-e tionint és fukszint (20µg/ml) tartalmazó táptalajokon, 5% CO₂ jelenlétében vagy hiányában (Alton és mtsai., 1988; Barrow és Feltham, 1993). Az API 20 NE teszt (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Franciaország) segítségével is karakterizáltuk egyes esetekben az izolátumokat.

A törzseket a referencia savók (French Agency for Food, Environmental & Occupational Health Safety /ANSES/, Maisons-Alfort Cedex, Franciaország) segítségével is vizsgálatuk. Tárgylemez agglutinációt végeztünk a törzseken A, M (monospecifikus savók a sima /S-

smooth/ telep morfológiájú *Brucella* fajok A és M agglutinációs faktoraival szemben) és R (monospecifikus savó az egyenetlen /R-rough/ telep morfológiájú *Brucella* fajok agglutinációs faktorával szemben) savókkal.

Meghatároztuk a *B. ovis* törzsek autoagglutinációs képességét. Ehhez a 48 órás baktérium tenyészetekből 5% lósavót és *Brucella* szelektív kiegészítőt tartalmazó TSB levesben 600 nm (OD₆₀₀) hullámhosszon mérve 0,8-as sűrűségű szuszpenziót készítettünk, melynek változását spektrofotométer segítségével 6 órás időközönként mértük 48 órán keresztül.

Meghatároztuk a kitenyésztett törzsek szénforrás-hasznosítását a MicroLog MicroStation™ ID System rendszer (BioLog Inc., Hayward, CA) segítségével. A vizsgálathoz 96 lyukú, ún. GN2 mikrolemezeket használtunk. A 96 lyukból 95 különböző szénforrást tartalmazott, a 96. a negatív kontroll volt. A baktériumtelepekből homogén szuszpenziót készítettünk, a lemezekre mértük és 37°C-on, 6,5% CO₂ tartalom mellett inkubáltuk. A metabolikus aktivitás meglétét 4 illetve 24 óra múlva ellenőriztük. A lemezeket a BioLog MicroLog2 (5.20) szoftver segítségével dolgoztuk fel.

Szerológia vizsgálatok

A kutya savó mintákkal elvégeztük az R-teleptípusú *Brucella* fajokra (mint a *B. canis*) specifikus tárgylemez agglutinációt (RSAT) (D-Tec CB, Synbiotics Co., San Diego, CA), és a 2-merkaptóetanolos kicsapás után a tárgylemez agglutinációt (2-ME-RSAT) (D-Tec CB, Synbiotics Co.). A kutyák S-teleptípusú *Brucella* fajokkal (pl.: *B. suis*) történt esetleges fertőződésének kimutatására tárgylemez agglutinációt (Viricell S.L., Granada, Spanyolország), csőagglutinációt (Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, Egyesült Királyság), és KK próbát (Virion/Serion GmbH, Würzburg, Németország) végeztünk.

A mezei nyúl vérmintákban Rose-Bengal teszt (Biovet Inc., Ivanovice na Hané, Csehország) segítségével kerestük a *B. suis* specifikus ellenanyagokat (Sterba és Halacková, 1987).

Indirekt ELISA-t használtunk a *B. ovis* specifikus ellenanyagok kimutatására a juh savó mintákból (Diavet Kft., Budapest, Magyarország).

Molekuláris biológiai vizsgálatok

DNS kivonás

A különböző mintákból a DNS-t a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) segítségével vontuk ki a Gram-negatív baktériumokra, illetve szervmintára vonatkozó gyártói utasítások szerint.

PCR vizsgálatok

A *Brucella* fajok kimutatására a különböző klinikai mintákból két konvencionális és egy valós idejű PCR rendszert használtunk. Az egyik gél alapú PCR módszer során az alább bemutatásra kerülő „Bruce-ladder” rendszer BMEI0535-öt és a BMEII0428-at primer párait használtuk fel. A másik gél alapú rendszer során 16S-23S rDNS szakaszt vizsgáltuk Keid és mtsai. (2007) leírása alapján. A *bcs31* gént célzó TaqMan típusú valós idejű PCR rendszert alkalmaztuk (Probert és mtsai. 2004).

Különböző molekuláris eljárásokat használtunk munkáink során az izolált baktériumtörzsek azonosítására. Az első lépésben minden esetben az úgynevezett „Bruce-ladder” módszert alkalmaztuk (López-Goñi és mtsai., 2008), mely a baktérium faj szintű azonosítására alkalmas. A reakcióhoz 8 primerpárt használtunk, amelyeket fajspecifikus genetikai különbségek alapján terveztek meg.

A *B. canis* és a régebben izolált *B. suis* törzsek azonosítása során másodikként a *B. canis* és az egyes *B. suis* biotípusok elkülönítésére alkalmas pontmutációk/egyponos nukleotid polimorfizmusok („single nucleotide polymorphism”-SNP) kimutatásán alapuló multiplex rendszert alkalmaztunk (Fretin és mtsai., 2008). A tipizálás során 5 különböző gén adott pozíciójában lévő pontmutációit vizsgáltuk: *ptsP*-1677, *pyrH*-816/817, *malG*-963/984, *dnaK*-1005, *rpoB*-244. A *B. microti* és a későbbiekben izolált *B. suis* törzsek leírása során már rendelkezésre állt a „Bruce-ladder” módszer továbbfejlesztett változata, az úgynevezett „Suis-ladder” rendszer arra, hogy megállapítsuk egyes az izolált törzsek egyes *B. suis* biotípusokhoz történő hasonlóságának a mértékét (Lopez-Goñi és mtsai, 2011). A *B. ovis* törzsek vizsgálata során az *omp31* gén nagyobb darabjának az felszoroazása céljából egy új PCR rendszert terveztünk a BtransF2: 5'-CGCCGAATGTGATTAGGT-3' és BtransR2: 5'-GGACGCCAAAATTACGGACTTCAT-3' primerekkel.

Genotipizálás

Két féle MLVA rendszert használtunk a különböző *Brucella* törzsek összehasonlító genetikai vizsgálatára. Az *B. canis* törzsek elemzésére a 15 variable-number tandem repeat (VNTR) régió vizsgálatán alapuló Huynh és mtsai. (2008) által kifejlesztett módszer általunk továbbfejlesztett változatát használtuk. A vizsgálat első lépéseként újraterveztük a 2-es, 29-es és 33-as lokuszokat, hogy a PCR termékek mérete kisebb legyen, ezáltal kiküszöbölhessük az 500 bp méret feletti tartományban jelentkező mérési pontatlanságokat. Az újratervezett primerek szekvenciái: VNTR 2: F: 5'-CGCTCTCCTCGCCCGCTTCTTCTT-3', R: 5'-TGTTTTTGGTTGCGCATGGCCG-3'; VNTR 29: F: 5'-

GTTTGTCGTCGCGGGAGAGATTAGGGG-3', R: 5'-
 CGGCAGGCGCTTGAGGATGAGG-3'; VNTR 33: F: 5'-
 CGGATAGGCGCGGCGTGAGTAAGG-3', R: 5'-ACAACATGGCGCGTGAAAGGCCC-3'.

A *B. canis* törzsek vizsgálata során a VNTR PCR termékeket kapilláris elektroforézissel választottuk el egymástól (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), majd elemzéshez a GeneMapper programot (Applied Biosystems Inc.) használtuk. Ha egy izolátum egy adott VNTR vizsgálata során több leolvasási csúcsot is adott (pl: több allél előfordulása az adott lókuszon), akkor a legnagyobbat vettük számításba, de a többit is figyelembe vettük, mint alternatív allélt. A teljes MLVA profillal rendelkező törzsek közötti filogenetikai kapcsolatok megjelenítésére a PAUP 4.0 Beta 10 (Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA) programot használtuk maximum parsimony elemzéssel. A vizsgálatok során kontrollként korábban karakterizált *B. melitensis* és *B. suis* törzseket alkalmaztuk.

A többi faj vizsgálata során egy 16 VNTR régiót elemző módszert vettük igénybe (Al Dahouk és mtsai., 2007; Le Flèche és mtsai., 2006). A VNTR PCR termékeket méretüktől függően 2 vagy 3%-os agaróz gélben futtattuk, majd méreteiket a Kodak MI SE program (Kodak Inc., Rochester, NY) segítségével mértük le. Azoknál a VNTR lókusznál (Bruce04, Bruce09 and Bruce19), ahol csak néhány bázispárból állt az ismétlődő régió hossza vagy több allél jelenlétét is észleltük, ott fluoreszcens festékkel (NED, HEX, FAM) jelölt primereket alkalmaztunk és az előbb leírt MLVA15-ös rendszerhez hasonlóan kapilláris elektroforézissel határoztuk meg a fragmentek hosszát. Az egyes ismétlődő régiók számát a *Brucella* allél adatbázis (<http://mlva.u-psud.fr>) alapján határoztuk meg. Az egyes elemzésekhez ebből az adatbázisból töltöttünk le a további, más szerzők által publikált adatokat, amit szükség esetén további publikációk eredményeivel egészítettünk ki (Abril és mtsai., 2011). A teljes 16 allél (MLVA 16) vizsgálata mellett elvégeztük külön-külön ezek közül 8 (MLVA 8: csak 1-es panel lókuszeit tartalmazza) és 11 (MLVA 11: 1-es és 2A panelek lókuszeit tartalmazza) allél elemzését is (Kiliç és mtsai. 2011). A 16 allél együttes vizsgálata során foglalkoztunk a markerek súlyozásával is Al Dahouk és mtsai. (2007) útmutatásai alapján. Ez alapján az alacsony felbontó képességű lókuszek (Bruce06, Bruce08, Bruce21, Bruce11, Bruce12, Bruce16, Bruce18, Bruce19, Bruce42, Bruce43, Bruce45, Bruce55), a közepesfelbontó képességű lókuszek (Bruce07 és Bruce30) és a nagy felbontó képességű lókuszek (Bruce04 és Bruce09) 2, 1 és 0,2-es szorzóval voltak súlyozva az elemzés során. Az egyes MLVA rendszerek felbontó képességét a Simpson diverzitás indexxel határoztuk meg 95% konfidencia intervallum mellett (<http://darwin.phyloviz.net/ComparingPartitions/index.php?link=Tool>). Az egyes lókuszek,

illetve MLVA rendszerek változékonyságát a Hunter-Gaston diverzitás indexszel is jellemeztük (HGDI, <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>).

A törzsek közötti evolúciós kapcsolatokat neighbor-joining módszerrel vizsgáltuk a MEGA6 program segítségével (Tamura és mtsai., 2013) és goeBURST algoritmus felhasználásával minimum spanning törzsfát készítettünk a PhyloViz programmal (Fransico és mtsai., 2012). A vizsgálatok során a *B. suis* 2-es biotípus típustörzsét, az úgynevezett Thomsen törzset (ATCC 23445) használtuk kontrollként, a *B. suis* 5 biotípus típustörzsét (NCTC 11996) pedig viszonyítási pontként (outgroup).

Szekvenálás

A klasszikus PCR termékek detektálásához agaróz gél elektroforézist használtunk és a nukleotid sorrend meghatározáshoz Sanger szekvenálást végeztünk ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer segítségével (Applied Biosystems Inc.). A leolvasási hibákat a kromatogrammon manuálisan javítottuk, majd a BioEdit Sequence Alignment Editor vettük igénybe az annotáláshoz (Hall, 1999).

Új generációs szekvenálási módszert használtunk a *B. microti* izolátum genomjának bázis sorrend meghatározásához. A könyvtár készítéshez a NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™ kitet (New England Biolabs, Hitchin, Egyesült Királyság) alkalmaztuk a gyártó útmutatásai alapján. Az Ion PGM™ Template kit segítségével, a gyártó, 200 bp-os protokollját követve végeztük az emulziós PCR-t és az egyéb szekvenálást előkészítő folyamatokat, majd 316-os chipen a Ion PGM™ Sequencing Kit felhasználásával történt a szekvenálás. Lasergene Genomics Suite program (DNASTAR Inc., Madison, WI) segítségével végeztük a nyers szekvenciák javítása, a *B. microti* referencia genomhoz (NC_013119, NC_013118) való illesztését és a pontmutációk azonosítását.

Fehérje analízis

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel elektroforézist (SDS-PAGE) végeztünk a vizsgált *B. ovis* törzsön. A szonikált baktérium szuszpenziót azonos mennyiségű lízis pufferben (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) inkubáltuk 10 percig 25°C-on. Ezt követően a mintát 1:2 arányban Laemmli pufferben (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) kihígítottuk, majd 10 percig forraltuk. A fehérjéket Coomassie brilliant kék (Sigma-Aldrich Inc.) festéssel tettük láthatóvá és marker (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) segítségével azonosítottuk az Omp25/Omp31 fehérje családot.

A Q-láz vizsgálatának anyag és módszertana

Kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok

Kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk minden olyan magzatburok mintán, ami a *C. burnetii* (Loftis és mtsai., 2006) vagy a *Chlamydiales* (Lienard és mtsai., 2011) specifikus valós idejű PCR vizsgálatok során pozitívnak bizonyult. A mintákat formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, majd 4 µm vastag metszeteket készítettünk, HE-nel festettük, majd fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A különböző bakteriális és gombás fertőzések kizárására Giemsa festés és Gömöri-féle ezüst impregnációt alkalmaztunk. Az IHK vizsgálatot a *Brucella* fajoknál ismertetett módon végeztük. A *C. burnetii* kimutatására nyúlban termelt hiperimmun savót (W. Baumgartner felajánlása) alkalmaztunk 1:10000 hígításban. Pozitív kontrollként *C. burnetii*-vel ismerten fertőzött metszetet használtunk.

Szerológiai vizsgálatok

Az állati eredetű vérminták szerológiai vizsgálata során KK próbát és ELISA vizsgálatokat végeztünk. A KK próba során a 2-es fázisú antigéneket mutattuk ki (Virion/Serion GmbH). Az ELISA vizsgálatok (IDEXX Laboratories Inc., Bern, Svájc) alkalmával az 1-es és 2-es fázisú antigéneket is detektáltuk.

Az emberi savó mintákat mikro-immunofluoreszcencia teszttel (MIF) vizsgáltuk (Focus Diagnostics Inc., Cypress, CA). A járványtani vizsgálat során minden embert fertőzés gyanúsnak tekintettünk, aki magas lázzal vagy tüdőgyulladásra utaló röntgen lettel rendelkezett 2013 április 17-ét követően és a járvánnyal érintett területen járt április 4-ét követően. Az első vérminta MIF vizsgálati eredménye alapján minden fertőzés gyanús egyént szeronegatívnak vagy feltételezetten fertőzöttnak (bármilyen jellegű szeropozitivitást /IgM, IgG/ mutatott) tekintettünk. Amennyiben a savópár vizsgálatára is lehetőség nyílt, akkor igazolt Q-láz fertőzésnek tekintettünk minden olyan esetet ahol szerokonverzió történt és/vagy megemelkedett (nagyobb, mint 1:252) az IgG-II/IgG-I ellenanyag szintje.

Molekuláris biológiai vizsgálatok

DNS kivonás

A tej mintákat centrifugáltuk Loftis és mtsai. (2010) útmutatásai alapján, majd az üledékből történt a DNS kivonás. A magzatburok mintákat 10 ml foszfát pufferelt sóoldatban homogenizáltuk stomacher segítségével 5 percig, 10 rázás/fordulaton, majd centrifugáltuk 5000 g-n 5 percig. Az ezt követően nyert üledékből történt a nukleinsav izolálás. A többi minta (vér, kullancs, bélsár) esetében a DNS kivonó kit gyártójának az útmutatásait követtük a minta előkészítés során. A DNS kivonás az egyes mintákból különféle kereskedelmi forgalomban kapható kitékkel: QIAamp Tissue and Blood kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország), QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH), the ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System (Promega Inc., Madison, WI), MagNA Pure LC total nucleic acid isolation kit (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Svájc) és egy házi módszer segítségével történt (Dán és mtsai., 2003).

PCR vizsgálatok

A minták szűrésére a genomban több kópiában jelen lévő *IS1111* gén szakaszt célzó TaqMan típusú valós idejű PCR rendszert használtuk (Loftis és mtsai., 2006). Egy kereskedelmi forgalomban kapható pozitív kontrol (Adiavet Cox; Aes Chemunex Inc., Cranbury, NJ) segítségével történt validálás alapján a PCR érzékenysége 0,1 TFE volt.

Genotipizálás

A PCR pozitív minták genotipizálására két módszert alkalmaztunk. Az egyik a multi-spacer typing (MST), mely a *C. burnetii* genomban egyenletesen eloszló 10 kitöltő régió (Cox2, 5, 18, 20, 22, 37, 51, 56, 57 and 61) nukleotid sorrendjét elemzi (Glazunova és mtsai., 2005). Ez egy közepes felbontó képességű módszer, ami egymástól relatíve távoli rokonságban álló törzsek összehasonlítására, evolúciós kapcsolataik feltárására alkalmas. Vizsgálataink során kapott szekvenciákat javítottuk, összefűztük és az MST adatbázisban, illetve korábbi publikációkban szereplő törzsek szekvenciáihoz illesztettük a BioEdit Sequence Alignment Editor 7.1.11 program segítségével (Hall, 1999). A MEGA6 program alkalmazásával, maximum likelihood model szerint Neighbor-joining típusú filogenetikai fán jelenítettük meg az eredményeket (Tamura és mtsai., 2013).

A másik alkalmazott genotipizáló módszer az MLVA volt, ami egymással közeli rokonságban álló törzsek közötti finom genetikai kapcsolatok feltárását is lehetővé tevő rendszer, ami így kiválóan alkalmas akár járványtani nyomozás céljára is. Hat lókuszon alapuló módszert használtunk (Arricau-Bouvery és mtsai., 2006; Astrobiza és mtsai., 2012; Klaassen és mtsai.,

2009; Tilburg és mtsai., 2012b; Santos és mtsai., 2012). Az Ms27, Ms28 és Ms34 lókoszok 6 nuklotid hosszúságú ismétlődő régiókból épültek fel, míg az Ms23, Ms24 és Ms33 lókusok 7 nukleotidot tartalmazó ismétlődő régiók alkotnak. A kisméretű ismétlődő régiók miatt fluoreszcens festékekkel (NED, HEX, FAM) jelölt primereket alkalmaztunk és a PCR termékek méretének meghatározására kapilláris elektroforézist használtunk (ABI 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems Inc.), majd az eredményeket a Peak Scanner 2.0 program (Applied Biosystems Inc.) segítségével értékeltük ki. A törzsek közötti rokonsági kapcsolatokat a Brucella MLVA vizsgálatokhoz hasonlóan a MEGA6 és a Phyloviz programokkal készített törzsfákon jelenítettük meg (Fransico és mtsai., 2012; Tamura és mtsai., 2013).

Új MST és MLVA profilnak tekintettünk minden olyan általunk elsőként leírt profilt, ami nem szerepelt a nyilvánosan hozzáférhető *C. burnetii* adatbázisokban (Coxiella burnetii MLVA database: <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>; Coxiella Multi Spacers Typing Database: <http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/>) vagy korábban leközölt publikációkban. Sajnos más kórokozókkal ellentétben a *C. burnetii* esetében több kutatócsoport nem tette nyilvánossá a publikálás során a szekvencia és MLVA adatait, így ezekkel nem tudtuk a mi eredményinket összehasonlítani.

Kutatási eredmények bemutatása

A brucellózis járványtanának vizsgálata

Mezei nyúl (*Lepus europaeus*) brucellózisának vizsgálata

Bevezetés

A mezei nyúl az egyik legjelentősebb európai vadászható vad és a *B. suis* 2-es biotípusának fontos rezervoár faja is (Godfroid és mtsai., 2005; Kardeván és Kemenes, 1961). A brucellózis mellett gyakran fertőzi a mezei nyulat egy másik zoonótikus kórokozó, a *F. tularensis* is (Gyuranecz és mtsai., 2010). E két kórokozó hasonló antigéneket hordoz, ezért gyakori közöttük a keresztreakció szerológiai vizsgálatok során. Továbbá hasonló makroszkópos kórbonctani elváltozásokat is okoznak. Mindezek miatt további kiegészítő laboratóriumi vizsgálatokra van szükség a két betegség elkülönítéséhez (Gyuranecz és mtsai., 2010; Sterba, 1983).

Az évek során számos IHK módszert fejlesztettek ki a *B. abortus* antigének kimutatására, de a vizsgálatunkig még nem történt IHK módszer kidolgozása a *B. suis* fertőzés detektálására (Meador és mtsai., 1986; Pérez és mtsai., 1998; Xavier és mtsai., 2009). Vizsgálatunk célja ezért egy a *B. suis* antigének kimutatására alkalmas IHK rendszer kidolgozása és a mezei nyúlban megfigyelhető, brucellózis okozta makroszkópos és mikroszkópos kórbonctani elváltozások leírása volt.

Eredmények

Három vadászati idény (2007-2008, 2008-2009 és 2009-2010) alatt 510 mezei nyulat (*Lepus europaeus*) vizsgálatunk meg Rose-Bengal próba segítségével, a szívből vett vérből, melyek közül 5 bizonyult szeropozitívnak. A kórbonctani vizsgálat során sárgás-fehér elhalásos gócot találtunk az állatok lépében (3/A. ábra), továbbá néhány esetben a tüdőben, a vesében, a méhben (3/B. ábra) és a májban (2. táblázat). A gócok 0,1-0,5 cm nagyságúak, jól körül határoltak, kerek, gyakran a szerv felszínéből kiemelkedtek és sárgás-fehér száraz tartalommal vagy gennyes izzadmánnyal teltek voltak. Kórszövettani vizsgálat során a gócok egy nagyobb vagy több kisebb, összeolvadt granulómának bizonyultak. Számtalan kisebb góc csak a mikroszkópos vizsgálattal látszódot (3/C. ábra). A lépben a normál szöveti struktúra helyét teljesen átvették a granulómák. Az 1-es nyúlban a méh endometriumát több helyen gócok erodálták. A granulómák központját néhány heterofil granulocitát és bazofil törmelék

tartalmazó eozinofil massa töltötte ki, melyet széles zónában hámsejtek határoltak, néhány heterofil granulocitával és Langhans típusú óriássejttel kiegészülve (3/E. ábra). Az ezt körülölelő zónát hámsejtek, nagy számban heterofil granulocita, közepes mennyiségben limfocita és néhány fibrocita határolta (3/E. ábra).

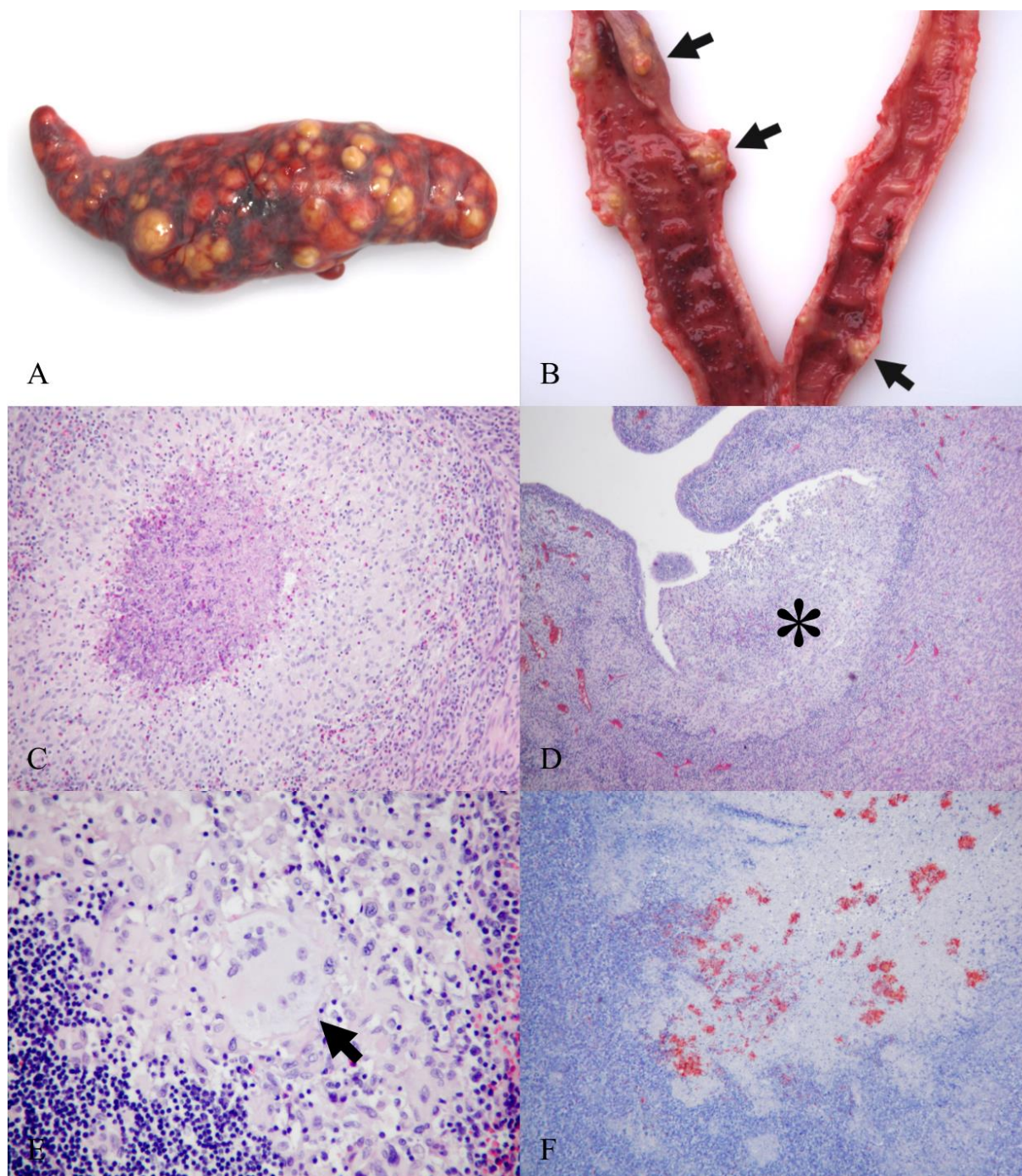
2. táblázat: Összefoglalás a *B. suis* szeropozitív mezei nyulak kondíciójáról, kórbonctani, kórszövettani, valamint IHK és bakteriológiai vizsgálatáról.

Eset száma	Kondíció	Makroszkópos elváltozások	Mikroszkópos elváltozások	Pozitív IHK reakció	<i>B. suis</i> izolálás
1.	gyenge	lég, tüdő, méh, vese	lég, tüdő, méh, vese, nyirokcsomók	lég, tüdő, méh, vese, nyirokcsomók	pozitív
2.	gyenge	lég, tüdő	lég, tüdő, nyirokcsomók	lég, tüdő	pozitív
3.	gyenge	lég, tüdő	lég, tüdő	lég, tüdő	pozitív
4.	gyenge	lég	lég	lég	pozitív
5.	gyenge	lég, máj	lég, máj	lég, máj	pozitív

Minden szeropozitív állatban kimutattunk immunfestődést az IHK vizsgálat során. Kevésből közepes mennyiségben észleltünk *B. suis* antigént a góccok középső részét képező törmelékben és az extracelluláris izzadmányban (3/F. ábra). Számos granulómában nem tudtunk immunfestődést kimutatni. Elszórtan *B. suis* specifikus festődést láttunk az 1-es nyúl lépében, méhizomzatában és nyirokcsomójában található egyes makrofágokban. Mind az öt vizsgált nyúl szeropozitivitást mutatott a *F. tularensis* specifikus tárgylemez agglutinációs vizsgálat során is, de a *F. tularensis* specifikus IHK vizsgálatuk negatív eredménnyel zárult. Az egérben termelt *B. suis* specifikus himerimmun savó erős extra és intracelluláris festődést adott egy *B. suis* 1-es biotípusa okozta sertés vetélmény mintán. Nagyon gyenge festődést eredményezett *B. canis*-szal fertőzött szöveten. Nem észleltünk reakciót PBS-sel kezelt negatív kontroll szöveten és *F. tularensis*-szel vagy *Y. pseudotuberculosis*-sal fertőzött mintákon. Vizsgálataink alapján az általunk kifejlesztett IHK eljárás 100%-os specificitást és szenzitivitást mutatott a baktérium izolálással összehasonlítva.

A baktérium tenyésztés során szürkésfehér, 1 mm átmérőjű telepeket észleltünk mind az 5 szeropozitív esetből 4 napos inkubálás után. A kitenyésztett izolátumok Gram-negatív

festődésűek, 1 μm -nél kisebb, nem mozgó pálcák voltak. Köster-féle festéssel pozitívan festődtek és oxidáz és kataláz aktivitást mutattak. Szénforrás hasznosítás vizsgálat alapján *B. suis*-ként azonosítottuk a törzseket, majd a pontmutációk vizsgálata alapján a 2-es biotípusba soroltuk őket. *F. tularensis*-t egyik mintából sem tudtunk izolálni.



3. ábra: *B. suis* 2-es biotípusa okozta kórszövettani és IHK elváltozások mezei nyúl szerveiben. A: számos sárgás-fehér góc a duzzadt lépben (2-es eset), B: sárgás-fehér gócok a méh falában (nyilak)(1-es eset), C: granulóma a lépben (HE) (1-es eset), D: a méh endometriumát erodáló granulóma (csillag) (HE) (1-es eset), E: Langhans típusú óriássejt (nyíl) a lépben (HE) (3-as eset), F: közepes mennyiségű *B. suis* antigén a lépben található granulóma középső részét kitöltő törmelékben (IHK) (4-es eset).

Megbeszélés

Korábbi külföldi kutatások során *B. suis*-szal fertőzött mezei nyulakban azt találták, hogy a makroszkópikus és mikroszkópikus gócok elsősorban az ivarszervekben és a májban fordulnak elő (Výtovec és mtsai., 1976; Sterba, 1982; Sterba, 1984). Ehhez hasonló elváltozásokat a saját vizsgálataink során is tapasztaltunk, de a külföldi kutatásokkal ellentétben mi a lépben észleltük a legmarkánsabb elváltozást, hasonlóan a korábbi hazai vizsgálatokhoz (Kardeván és Kemenes, 1961). A kórszövettani vizsgálat során központi elhalt tartalommal rendelkező granulómákat találtunk, melyhez hasonló elváltozásokat több kórokozó is képes előidézni a mezei nyúlban, ezért további kiegészítő laboratóriumi vizsgálatokra van szükség a brucellózis megállapításához (Sterba, 1983). Az IHK egy hasznos és érzékeny módszernek bizonyult már számtalan esetben házi és vadon élő állatok *Brucella* fertőzésének a kimutatása során (Meador és mtsai., 1986; Pérez és mtsai., 1998; Xavier és mtsai., 2009; González-Barrientos és mtsai., 2010). Az IHK vizsgálat nagy előnye, hogy a minta fertőzőképességét a formalin fixáció eliminálja és a kórokozó szöveten belüli lokalizációja is meghatározható. A vizsgálatok elvégzése idején csak egy kereskedelmi forgalomban kapható *Brucella* ellen termelt antiszérum létezett, ami alkalmas volt indirekt IHK vizsgálat elvégzésére formalinban fixált, paraffinba ágyazott szöveten (Pérez és mtsai., 1998). Vizsgálataink során mi is sikerrel alkalmaztuk ezt a reagenst *B. suis* kimutatására sertés mintákon. Azonban ezt a savót házi nyúlban termelték, így mezei nyúl mintákon nem tudtuk használni a keresztreakció és az ebből adódó erős háttér festődés miatt. Ennek a problémának az orvoslására termeltünk *B. suis* specifikus hiperimmun savót házi egérben. Ez a savó nem mutatott keresztreakciót olyan kórokozókval, mint a *F. tularensis* és a *Y. pseudotuberculosis*, amik szintén megbetegedést okoznak mezei nyúlban (Sterba, 1983; Gyuranecz és mtsai., 2010), de enyhe keresztreakciót adott *B. canis*-szal. További *Brucella* fajokkal való esetleges keresztreakció fennállását nem tudtuk tesztelni, mert a kísérletek kivitelezése idején egyéb szövet mintákkal nem rendelkezünk.

Vizsgálataink során elsőként fejlesztettünk és használtunk IHK eljárást a mezei nyulak *B. suis* fertőzésének a kimutatására. Az IHK módszer érzékenysége és specificitása megegyezett a baktérium izolálásával. Habár csak kis mintaszámon tudtuk a vizsgálatainkat elvégezni, ezek alapján úgy tűnik, hogy az IHK eljárás egy megfelelő diagnosztikai módszer a mezei nyulak *B. suis* okozta megbetegedésének a megállapítására.

Az *omp31* gén természetes gátlása IS711 beékelődés következtében *B. ovis*-ban

Bevezetés

A kosok *B. ovis* okozta mellékhere és here gyulladása jelentős gazdasági veszteségeket okoz a juh tenyésztő országokban (Buddle, 1956; Carpenter és mtsai., 1987; Reichel és mtsai., 2008). Ugyanakkor a betegség ellen sikeresen lehet védekezni a fertőzött kosokra fókuszáló szelekciós mentesítéssel (Burgess, 1982; Ridler és mtsai., 2011). A *B. ovis* egy kisméretű kokkoid-pálca alakú baktérium, ami nem rendelkezik az O-poliszaharid láncsal, ezért durva felszínű lipopoliszaharid borítja a felszínét (R-LPS). Az LPS mellett a külső membrán fehérjék (OMP) képezik a sejtfalának fő alkotórészét, amik egyúttal protektív antigénként is szolgálnak (Caro-Hernández és mtsai., 2007; Cloeckert és mtsai., 2002). Az Omp31 a legfőbb OMP, ami a *B. ovis* vakcina fejlesztés elsődleges célpontjaként is szolgál (Cassataro és mtsai., 2007; Estein és mtsai., 2009).

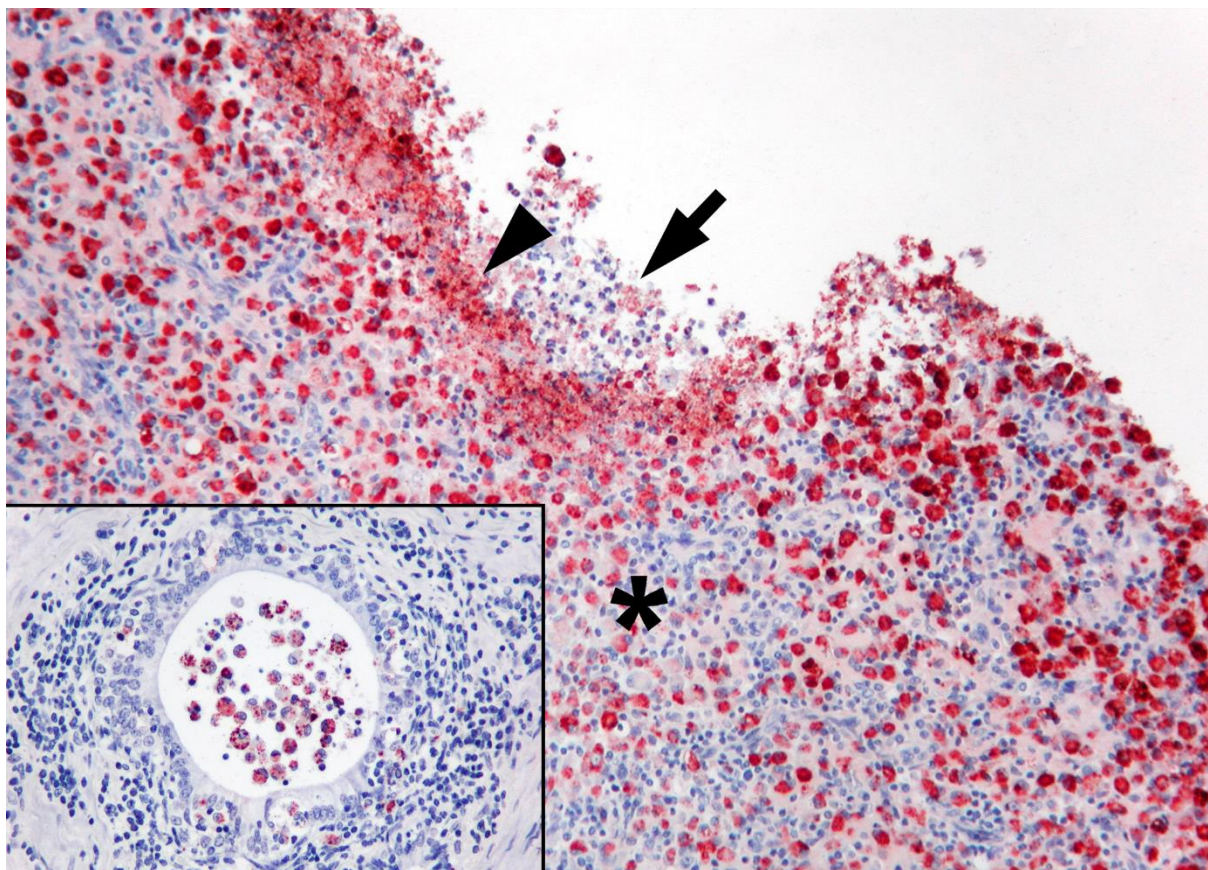
A *B. ovis* egy kb. 3,27 Mbp nagyságú genommal rendelkezik, mely két kromoszómán helyezkedik el (CP000708, CP000709). A *Brucella* fajok genomja tartalmaz egy 842 bp hosszúságú inzerációs szakaszt, az úgynevezett IS711-et, amit az egyes fajok azonosítása során is felhasználnak (Halling és mtsai., 1993; Mancilla és mtsai., 2011; Ouahrani és mtsai., 1993). A *B. ovis* genomja 38 kópiában tartalmazza az IS711-et (Tsolis és mtsai., 2009). Annak ellenére, hogy az IS711 lokalizációja stabil a genomban, mesterségesen transzpozon csapda segítségével sikeresen módosították a genomon belüli elhelyezkedését *B. pinnipedialis*-ban és *B. ovis*-ban (Ocampo-Sosa és García-Lobo, 2008). Egyesek szerint az is elképzelhető, hogy az IS711 valójában mobilis génszakasz (Vemulapalli és mtsai., 1999). Munkánk során az *omp31* gén inaktiválásáról szeretnénk beszámolni az IS711 szakasz beékelődése következtében egy *B. ovis* mentesítési program során izolált *B. ovis* törzsben.

Eredmények

Egy *B. ovis* elleni szelekciós mentesítést hajtottunk végre egy 2400 anyajuhot és 93 kost számláló merinó juhászatban 2011-ben. A kosokat elkülönítettük az anyajuhoktól és havi rendszerességgel, egyedileg szűrtük őket ELISA vizsgálattal. A mentesítés folyamata 8 hónapig tartott, mialatt 42 szeropozitív kost szűrtünk ki, különítettünk el, majd vágtunk le. A leölt kosok heréjéből és mellékheréjéből végzett tenyésztés során 27 állatból (64%) sikerült kitenyésztünk a *B. ovis*-t. A PCR vizsgálat során egy további állatból tudtuk még kimutatni a kórokozót. A maradék 14 állat PCR és tenyésztéses vizsgálata negatív eredménnyel zárult. Egy törzs kivételével (Bo10) valamennyi izolátumot egyértelműen *B. ovis*-ként azonosítottunk

klasszikus bakteriológiai és molekuláris biológiai módszerekkel. Az egyéb, kosokban mellékhere gyulladás kiváltására képes kórokozók (*Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, és *Trueperella pyogenes*) jelenlétét bakteriológiai vizsgálattal zártuk ki.

A Bo10-es izolátummal fertőzött kos a vizsgálatok alkalmával ELISA és PCR pozitívnak bizonyult. A kórbonctani vizsgálat során jól körül határolt, kerek, 1,5-2 cm nagyságú, sárgás-fehér krémes tartalommal telt tályogokat találatunk a mellékherében (1. ábra). Kórszövettani vizsgálat során krónikus, diffúz gennyes mellékheregyulladást láttunk, a herében pedig tályogok és idült limfo-hisztiocitás gyulladást észleltünk. Az *B. canis* ellen nyúlban termelt hiperimmun savó segítségével végzett IHK vizsgálat során *Brucella* antigént mutattunk ki a ductus epididimidis körül és a tályog tartalomban található makrofágok citoplazmájában. Ritkábban immunfestődést láttunk még egyéb sejtekben is, úgy mint a ductus epididimidis hámsejtjeiben, limfocitákban, plasma sejtekben és az intravascularis monocitákban (4. ábra).

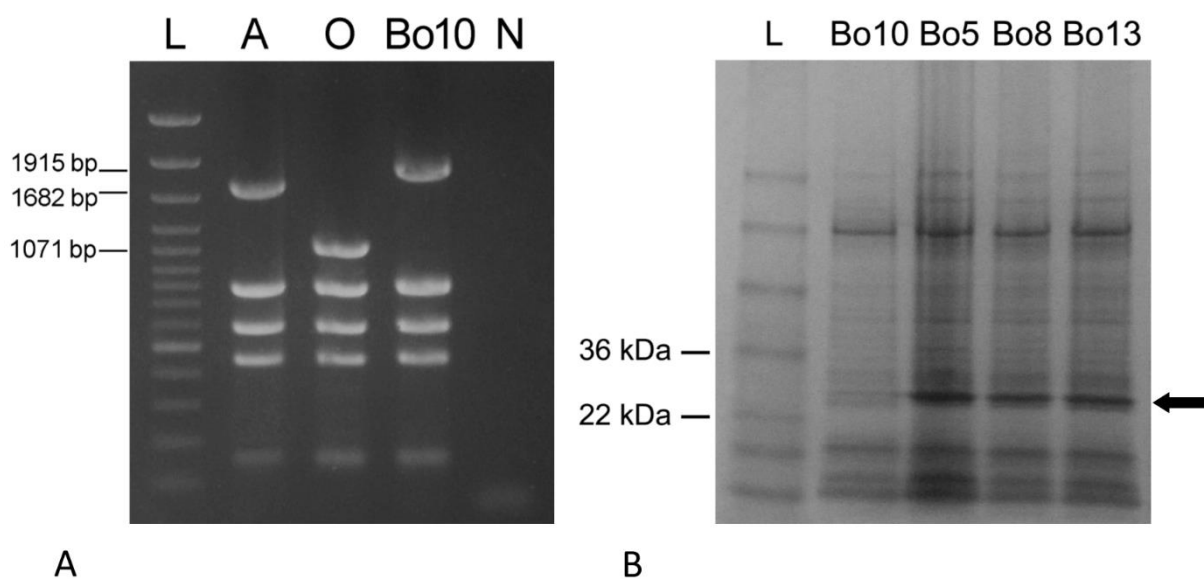


4. ábra: A 10-es kos (Bo10) gyulladt mellékheréjéből készített IHK metszet. nyíl: Gyulladásos sejtek maradványait tartalmazó tályog tartalom közepes mennyiségű intra és extracelluláris *Brucella* antigénnel. Nyílhegy: Nagy mennyiségű extracelluláris *Brucella* antigén. Csillag: Nagy számú makrofág intracellulárisan festődő *Brucella* antigénnel. Index kép: Krónikus gyulladás és gyulladásos sejtekkel kitöltött ductus epididymidis.

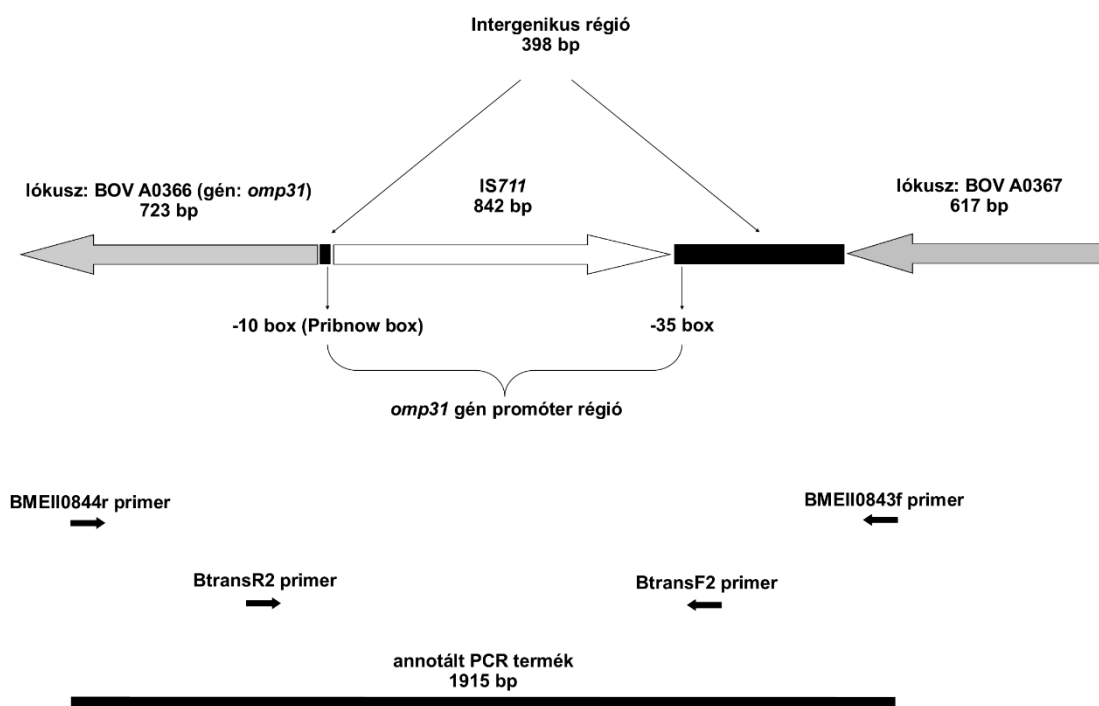
A Bo10-es törzs telepei 1 nappal később (4. napon) jelentek meg az izolálás során, mint a többi mintából kitenyésztett törzsek. Apró, tűszúrásnyi, sárgás színű, krémes állagú telepeket képzett, melyek R telepmorfológiát mutattak kristályibolya festés során. Az apró, kokkoid-pálca alakú, Gram-negatív, Köster-negatív baktériumok kataláz pozitívak voltak. Oxidáz és ureáz aktivitást nem mutatott és H_2S -t sem termelt az izolátum. A Bo10-es törzs 20 mg/ml tionin jelenlétében növekedett, de a bázikus fuxin gátolta a szaporodását. A Biolog rendszer egyik törzset sem tudta *B. ovis*-ként azonosítani a szénforrás hasznosítási profiljuk alapján. Az izolátumokat *B. melitensis*-nek határozta meg, kivéve a Bo10-es törzset, amit *B. suis*-ként azonosított. A Bo10-es izolátum nagyon gyengén agglutinált R savóval, és egyáltalán nem agglutinált A és M savókkal. Erős autoagglutinációs képességgel rendelkezett a Bo10-es izolátum. A vizsgált

szuszpenzió sűrűsége 0,149, 0,040, és 0,000 (OD600) volt 6, 12, és 48 óra inkubáció után, míg a többi izolátum oldatban maradt a teljes vizsgálati időtartam során (OD600: 0.8).

A Bo10-es törzs a „Bruce-ladder” multiplex PCR során az *omp31* gént célzó PCR-ben a *B. ovis*-ra jellemző 1071 bp nagyságú termék helyett egy közel 1900 bp nagyságú terméket adott, ami közel állt a *B. abortus*-tól várható termék mérethez (5/A ábra). A kapott terméket sikeresen amplifikáltuk és szekvenáltuk a Bruce-ladder BMEII0843f/BMEII0844r primer párjával és az általunk tervezett BtransF2/BtransR2 primerekkel. A PCR termék (JX081250) pontos mérete 1915 bp volt ami magába foglalt egy 842 bp hosszú inzerciót, az IS711-et. Ennek a szakasznak a szekvenciája megegyezett a GénBankban található IS711 szekvenciával (M94960) az 5' végen található 5. nuklotid pontmutációját (C-T) leszámítva. Az IS711 intergenikusan ékelődött be, pont az *omp31* gén promoter régiójába, közvetlenül a riboszóma kötő hely elé (-10 bokszt/Pribnow box) és 388 nuklotidnyira a BOV A0367 lókuszt után (6. ábra). Ennek következtében a beékelődött IS711 1915 bázispárra növelte az eredetileg várt 1071 bázispárnyi PCR terméket. Az SDS-PAGE során a Bo10-es törzsben hiányzott az Omp31 fehérje méretének megfelelő 31 kDa méretű termék, míg a többi *B. ovis* izolátumban jelen volt (5/B ábra).



5. ábra: A: *B. abortus* (A), *B. ovis* (O) és a Bo10-es törzs elkülönítése a „Bruce-ladder” multiplex PCR rendszer segítségével (L: DNS marker, N: negatív kontrol). B: A Bo10-es törzs és további 3 izolátum (Bo5, Bo8, Bo13) SDS-PAGE. Nyíl: A 31kDa nagyságú fehérje csík hiánya a Bo10-es izolátumban.



6. ábra: Az *IS711*, az *omp31* gén és promóter régiójának, a PCR primereknek és a PCR terméknek az elhelyezkedése a Bo10-es *B. ovis* izolátum 2-es kromoszómáján.

Megbeszélés

A szelekciós mentesítés szabályait követve sikeresen mentesítettük az állományt a *B. ovis* fertőzéstől. A kórbonctani, kórszövettani és IHK elváltozások mind a Bo10-es törzssel, mind a többi izolátummal fertőzött állatban megegyeztek a szakirodalomban leírtakkal. Az Omp31 fehérje hiánya nem befolyásolta az IHK vizsgálatot, feltehetően azért mert poliklonális nyúl savót használtunk. A Bo10 törzs és a többi izolátum telepmorfológiája, mikroszkópos képe, festődése, biokémiai profilja és az, hogy nem agglutináltak az A és M savókkal megfelelt a *B. ovis*-ról rendelkezésre álló ismereteknek (Alton és mtsai., 1988). A Bo10-es törzs kivételével az összes törzs erősen agglutinált R savóval, ami szintén a baktérium faj jellegzetessége. A „Bruce-ladder” módszer megbízhatóan azonosította faj szinten a törzseket a Bo10-es törzs kivételével. E különleges izolátum által adott nagyobb PCR termék mérete azonban megtévesztő lehet és könnyen a faj hibás, *B. abortus*-ként történő, azonosítását eredményezheti, ami ritkán, de szintén okozhat szaporodásbiológiai zavarokat juhban (Collier és Molello, 1964; Gorham és mtsai., 1986; Luchsinger és Anderson, 1979).

A vizsgálat során elsőként állapítottuk meg az IS711 egy eddig ismeretlen elhelyezkedését a *B. ovis* genomjában. Korábbi vizsgálatok alapján feltételezik, hogy az IS711 egy mozgógénszakasz, de mozgását *B. ovis*-ban eddig csak *in vitro* körülmények között sikerült bizonyítani. Genomon belüli áthelyeződését természetes körülmények között eddig csak *B. abortus*-ban sikerült megfigyelni (Mancilla és mtsai., 2011; Ocampo-Sosa és García-Lobo, 2008; Vemulapalli és mtsai., 1999). Eredményeink alapján azonban feltételezhető, hogy az IS711 *B. ovis*-ban is egy helyváltoztatásra képes aktív transpozon.

A Bo10-es törzs lassabb növekedési képessége, autoagglutinációs tulajdonsága, az IS711 genombeli elhelyezkedése és a jellemző 31 kDa nagyságú fehérje hiánya alapján megalapozottan feltételezhetjük, hogy az *omp31* gén természetes inaktivációját észleltük *B. ovis*-ban. Ezt támasztja alá, hogy hasonló tulajdonságokat észleltek egy mesterségesen előállított *omp31* gén kiütött *B. ovis* törzsnél is (Caro-Hernández és mtsai., 2007). Ehhez a mesterségesen előállított mutánshoz hasonlóan a Bo10-es törzs is egy virulens törzs, amit a fertőzött kosban talált jellegzetes kórbonctani és kórszövettani elváltozások is alátámasztanak. Összefoglalva egy természetes körülmények között kialakult, IS711 beékelődés által előidézett *omp31* gén inaktivációt volt szerencsénk felfedezni egy virulens *B. ovis* törzsben.

***B. canis* fertőzés első hazai megállapítása**

Bevezetés

A kutyák *B. canis* okozta megbetegedése jelentős gazdasági károkat okozhat a tenyészetekben. A gyakran tünetmentes fertőzésre az állományban előforduló vetélések, a mindkét nemből kialakuló terméketlenség, az ivarszervek gyulladása, duzzanata, vagy olykor sorvadása hívja fel a figyelmet. A *B. canis* megbetegítheti az embert is, zoonózis. Magyarországon a *B. canis* jelenlétét 2009-ig nem sikerült igazolni. A 2001 és 2002 között elvégzett felmérő vizsgálat során hazánk különböző területeiről származó 1153 kutya vérmintájának szerológiai vizsgálata negatív eredménnyel zárult (Dénes és mtsai., 2004).

Egy magyarországi kutyatenyészet tulajdonosa 2008 októberétől sorozatos vetéléseket észlelt állományában. 2009 júliusában két vetélt magzatot és egy magzatburkot küldött intézeti vizsgálatra, amelyekből *B. canis*-t tenyésztettünk ki. Kutatásunk célja az első hazai *B. canis* okozta járvány és az összetett diagnosztikai folyamat bemutatása.

Eredmények

A vizsgált soltszentimrei kennel 31 kutyából állt: tenyésztés céljából 22 havanese fajtájú (20 szuka, 2 kan), 8 beagle fajtájú (7 szuka, 1 kan) egyedet és egy házörzés céljából tartott német juhászkutyát tartalmazott. A mintavétel során használt kutyaazonosítókat (BC1-31) és a kutyák kórelőzményét az 1. mellékletben csatolt táblázat foglalja össze. A kutyatenyészetbe 2008-ban került egy havanese fajtájú szuka kutya ismeretlen helyről. Érkezésekor a kutya vemhes volt és októberben elvetélt. Ez volt az első vetélés a tenyészetben, majd ezt követően még öt vetélést, két koraellést és öt sikertelen párosítást tapasztalt a tulajdonos (3. táblázat), míg 2009 júniusában egy frissen vetélt szuka kutya két magzatát és a magzatburkot intézeti diagnosztikai vizsgálatra küldte.

3. táblázat: Kórelőzmény és az elvégzett klinikai vizsgálatok a fertőzött kutyatenyészetben.

Dátum	Kórtörténet és mintagyűjtés	Laborvizsgálatok
2008. október	BC18-as számú kutya bekerült az állományba és elvetélt	nem végeztünk
2009. január	BC6-os számú kutya elvetélt	nem végeztünk
2009. március	BC5-ös számú kutya 4 kölyköt vetélt, majd 10 nappal később 2 halott magzatot és egy élő kölyköt (BC21) hozott világra BC18-as számú kutyánál koraellést tapasztaltak	nem végeztünk
2009. június	BC3-as számú kutya elvetélt és egy másik kutyánál koraellés történt	a vetélt magzatok és magzatburok bakteriológiai, kórbonctani, kórszövettani, IHK vizsgálata

2009. július	torok tampon és vérminták gyűjtése mind a 31 kutyától, valamint hüvely tamponminták a 27 szuka kutyától	bakteriológia, szerológia
2009. augusztus	Mind a 31 kutyát elaltattuk, belőlük vérminták és szövetminták gyűjtése	bakteriológia, kórbonctan, továbbá szövettan, IHK, PCR (BC2, BC3, BC5, BC6, BC18, BC21)

Miután a két vetélt magzat és egy magzatburok vizsgálata során *Brucella* fajjal történt fertőzést állapítottunk meg, július végén a kutyaállomány minden tagjától további mintákat vettünk. A július végén gyűjtött vér-, hüvely- és torok tampon minták további bakteriológiai vizsgálatai során szintén sikerült *Brucella* törzseket izolálnunk 3/31 (10%) mintából: a vetélt szukanak (BC3-as számú) a hüvely és vér mintájából, amelynek előzőleg a vetélt magzatait beküldték, valamint egy tenyészkán (BC2-es számú) és egy féléves szuka (BC21-es számú) haemokultúrájából (4. táblázat). A torok- és további vérminták negatívak voltak.

Augusztus végén a vérvételt megismételtük. Az augusztusi mintavétellel egy időben mind a 31 állat elaltatására került sor. Közülük hat állatot további vizsgálatnak vetettünk alá. A hat egyed a pozitív laboreredmények, valamint a gyanús kórelőzmény alapján (elvetélt, nem vemhesült, koraellés) választottuk ki. Belőlük szív, tüdő, máj, lép, vese, bél, here, mellékhere, petefészek, méh, bélfodri, hörgők körüli és áll alatti nyirokcsomó szövetmintát vettünk. A vizsgált hat állat (a három előző és még három fertőzés gyanús: BC5, BC6, BC18-as számú) közül a BC21-es és a BC2-es számú kutyák esetében a kórokozó kimutatható volt a vizsgált szervekből és nyirokcsomókból. Az augusztus végi ismételt mintavételt követően a többi állat hüvely- és torok tampon, valamint a BC21-es kutya kivételével a vérminták tenyésztése negatív eredménnyel zárult.

4. táblázat: A szerológiai, bakteriológiai, immunhisztokémiai, szövettani és PCR reakció vizsgálatát összefoglaló táblázat.

Esetszám	Szerológiai vizsgálat				Baktériumtenyésztés				IHK	szövettan	PCR	
	RSAT		2ME- RSAT		vér	hüvely	szerv					
	júl.	aug.	júl.	aug.				júl.	aug.			aug.
beküldött minta	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	+	+	+	NV	
	(júl.)											
BC2	+	-	+	-	+	-	NV	+	-	+	-	
BC3	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	
BC5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
BC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
BC8	+	-	-	-	-	-	-	-	NV	NV	NV	
BC9	+	-	+	-	-	-	-	-	NV	NV	NV	
BC18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
BC19	-	+	-	+	-	-	-	-	NV	NV	NV	
BC21	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	

Rövidítések: NV: nem vizsgált, -: negatív, +: pozitív

A kitenyésztett baktérium Gram-negatív, Köster-pozitív kokkoid-pálca volt, amely apró, szürkés-sárga telepeket képzett, kataláz, oxidáz pozitív volt és ureáz aktivitást mutatott, továbbá H₂S-t nem termel és R-telepmorfológiával rendelkezett. A kórokozó 20 mg/ml tionin és fukszin tartalmú táptalajon is növekedett. A telepmorfológiájának megfelelően R-telepmorfológiájú *Brucella* fajok ellen termelt monovalens savóval erős agglutinációt mutatott, míg az S-típus ellen termelt poliklonális szérummal enyhén reagált. A szénforrás-hasznosítás vizsgálattal *B. canis*/*B. suis*-nak határoztuk meg a kitenyésztett kórokozót. A „Bruce-ladder” módszer szerint elvégzett PCR vizsgálat alapján a kitenyésztett *Brucella* törzs a *B. suis*-ra jellemző nagyságú termékeket adott. A további SNP tipizálás során viszont egyértelműen *B. canis* okozta fertőzést állapítottunk meg a tenyésztésben.

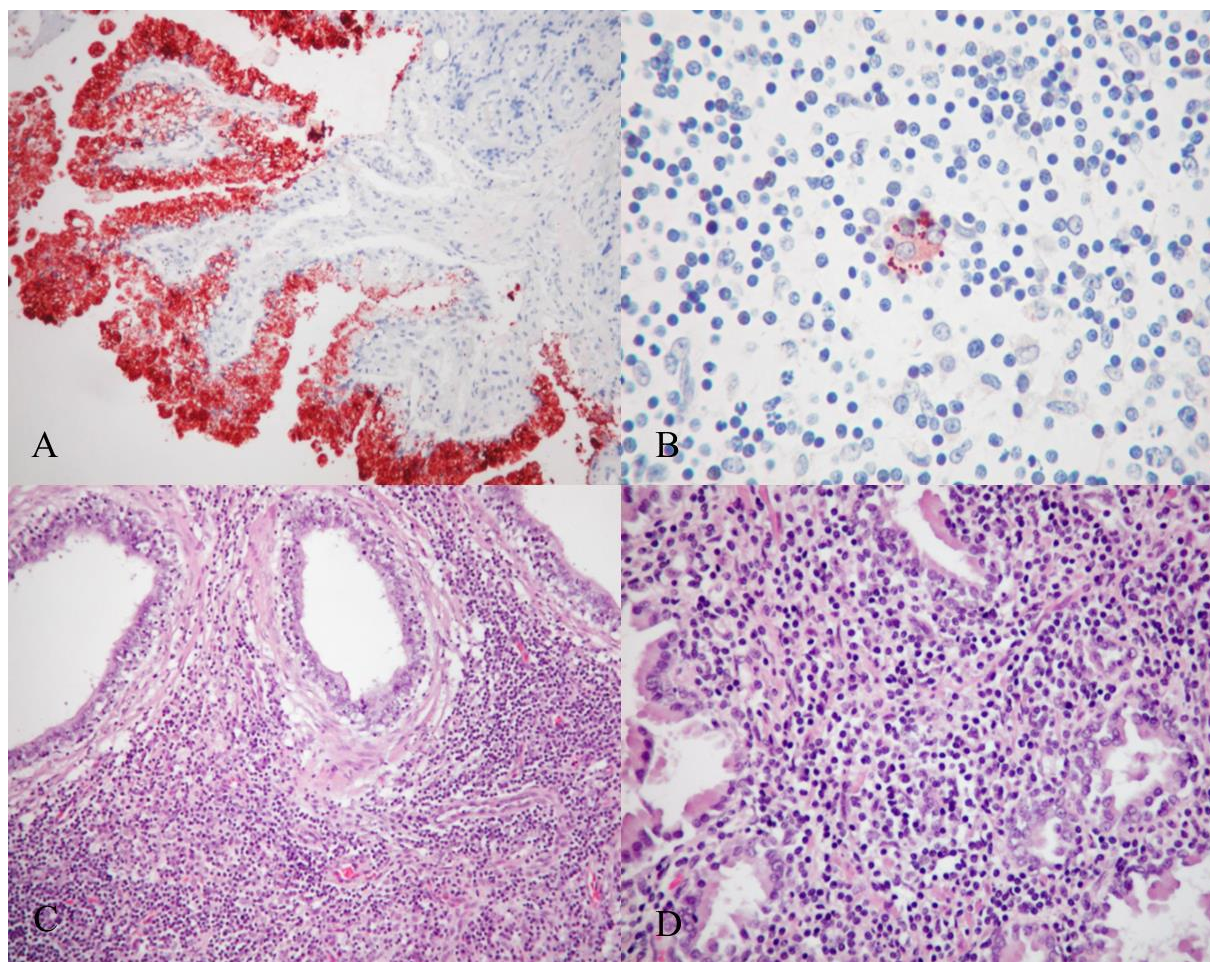
Júliusban a *B. canis* specifikus tárgylemez agglutináció a BC2-es kan, illetve a BC3-as, BC8-as, BC9-es és a BC21-es szuka kutya esetében pozitívnak bizonyult. 2-merkaptóetanolos kicsapás után pedig csak a BC2-es, BC3-as, BC9-es és BC21-es volt pozitív. Augusztus végén a BC3-as, BC19-es és BC21-es kutyák voltak pozitívak az agglutinációs teszttel. 2-

merkaptotetanolos kicsapás után szintén ez a három kutya volt pozitív. Számos megkérdőjelezhető reakciót tapasztaltunk a *B. suis* specifikus Rose-Bengal teszt és a komplementkötési reakció esetében is. A csőagglutináció minden esetben negatív volt.

A beküldött magzatok, a placenta és az elaltatott állatok kórbonctani vizsgálata során makroszkópos elváltozásokat nem tapasztaltunk. Kórszövettani vizsgálat során az egyik magzatban diffúz limfo-hisztiocitás intersticiális májgyulladást találtunk. A magzatburkokban multifokális koagulációs szövetelhalás volt megfigyelhető, mérsékelt makrofág és sok neutrofil granulocita infiltrációjával kísért. A metszeteket anti-*B. canis* nyúlszérummal kezelve erős immunfestődést észleltünk a trofoblaszt sejtekben mindkét placentában (7/A. ábra). Az elhalt területeken ez alig vagy egyáltalán nem volt látható. Az immunfestődést nem tapasztaltunk a magzati szervekből, és a BC2, BC5, BC6, BC18, BC21-es számú kutyák szerveiből készült metszeteken, valamint a negatív kontroll metszeteken.

Mindegyik fertőzött kutyában limfoid hiperpláziát észleltünk a mandulákban és a nyirokcsomókban, azonban csak az BC3-as számú kutya esetében mutattak ezek a képletek sok makrofág és óriássejt által kísért immunfestődést (7/B. ábra). Az BC3-as és BC5-ös számú kutyákban ezen kívül enyhe multifokális limfo-hisztiocitás meningitist is találtunk. A BC2-es és BC5-ös számú kutyákban intersticiális tüdőgyulladás, a BC18-as számúban pedig intersticiális emlőgyulladás alakult ki. Endometritist észleltünk az BC3-as, BC6-os és BC18-as számú szukákban. A kan kutyánál kétoldali diffúz limfo-hisztiocitás mellékhere-gyulladást valamint prosztatagyulladást tapasztaltunk (7/C&D. ábra).

A hat állat szövethomogenizátumainak PCR-es vizsgálata során csak a BC21-es számú kutya szöveteiből tudtuk kimutatni a kórokozót.



7. ábra: A: Vetélt kutya placenta. A képen a *B. canis* jelenlétére utaló erős immunfestődést látunk (IHK). B: Pontszerű festődés látható egy óriássejt citoplazmájában a BC21-es kutya nyirokcsomójában (IHK). C: Súlyos limfo-hisztiocitás gyulladás a BC2-es kutya mellékheréjében (HE). D: Súlyos limfo-hisztiocitás gyulladás a BC2-es kutya prosztatájában (HE).

A *Brucella* fajokon kívül egyéb fontos, vetélést okozó kórokozók jelenlétét kizártuk a magzatok és a magzatburkok vizsgálatakor. Ezek közül immunhisztokémiai vizsgálattal kizártuk a *Chlamydiaceae* család tagjait, a *Neospora caninum*-ot, a *Toxoplasma gondii*-t, a *Leptospira* fajokat, és a *Coxiella burnetti*-t, továbbá PCR vizsgálattal a kutya herpeszvírust.

Megbeszélés

A kutyatenyészetbe a fertőzés feltehetőleg a BC18-as számú vemhes szuka kutyával került be. Ennek a kutyának a vetélése volt az első a kennelben. A tulajdonos az első laboratóriumi vizsgálatok megkezdése előtt 8 hónapon keresztül szórványos szaporodásbiológiai zavarokat tapasztalt a tenyészetben. Hasonlóan hosszú ideig fennálló szaporodásbiológiai tüneteket írtak

le egy korábban publikált kanadai kennelben lezajlott kutya brucellózis során is (Brennan és mtsai., 2008).

Kutatásunk során a vizsgált kutyák közül legnagyobb arányban a RSAT mutatott pozitív eredményt. Az esetek 4/7 (57%)-ában szubklinikai fertőzést állapítottunk meg, amely eredmény hasonló a szakirodalomban leírtakkal (Hollett, 2006; Wanke, 2004). Mivel a detektálható ellenanyagok a fertőződés után 4-8 héttel jelennek meg és hiányozhatnak a fertőzés krónikus szakaszában, a minták jelentős része negatív volt az RSAT során (Keid és mtsai., 2007). Még a BC2-es kan kutya is szeronegatív lett a vizsgálatok során a pozitív baktériumtenyésztés ellenére. Eredményeink alátámasztják a korábbi vizsgálatokat, amelyek szerint a 2-merkaptóetanolos kicsapás növeli ugyan a szerológiai vizsgálatok specificitását, de az érzékenységet csökkenti (Keid és mtsai., 2007). Esetünkben a szeropozitív egyedek aránya alacsonyabb (23%) volt, mint egy hasonlóan *B. canis*-szal fertőződött állományban, ahol az állatok 61%-a volt pozitív (Brennan és mtsai., 2008). Brennan és munkatársai vizsgálataik során indirekt fluoreszcenciát használtak, amely feltehetően érzékenyebb mint az általunk használt RSAT.

A szerológiai státusz két esetet kivéve mindegyik vizsgált kutyánál változott az idő folyamán. Az egyik a BC3-as számú nemrégiben vetélt szuka kutya volt, a másik a BC21-es koraeltett alomból életben maradt egyetlen kölyök. Egyedül ennek a kölyöknek a vizsgálatakor állt fenn bakterémia. Ez az 5 hónapos kölyök valószínűleg az ellés körüli időben fertőződött meg a baktériummal, amikor a kórokozó nagy mennyiségben ürül a nemi váladékokkal (Hollett, 2006). Ez az eset rávilágít arra a tényre, hogy milyen kockázatos fertőzött állatot tartani és tenyészteni egy tenyészetben, ugyanis ezek potenciális fertőződési forrásai lehetnek nemcsak a többi kutyának, de az embernek is.

A szerológiai pozitív állatoknak kevesebb, mint a fele volt pozitív a baktérium tenyésztés során. A negatív bakteriológia oka az intermittáló bakterémia, ugyanis ekkor a baktériumok nem biztos, hogy jelen vannak a vérben, így nem tudjuk azokat kitenyészteni a mintából.

Korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan (Brennan és mtsai., 2008) mi is úgy találtuk, hogy a biokémiai vizsgálatok és a szénforrás hasznosítás vizsgálat önmagában nem alkalmasak a *B. canis* és *B. suis* elkülönítésére. A növekedési tulajdonságok alapján egyedül a telep morfológia volt önmagában is alkalmas a két faj differenciálására. Még a kifinomultabb molekuláris módszerek, mit például a „Bruce-ladder” módszer is elbukott a faj meghatározásában, amelynek a közeli rokonság a magyarázata. Az egyértelmű azonosításhoz végül az 5 pontmutáció kimutatásán alapuló molekuláris biológiai módszer bizonyult megfelelőnek. Az esetek többségében a baktérium direkt kimutatása PCR reakcióval sikertelen volt. Ezen

eredmények figyelembevételével egy új PCR eljárás kidolgozása, vagy más szervminták vizsgálata megfontolandó.

A dolgozat felhívja a figyelmet arra, hogy a különböző szerológiai és a baktérium kimutatására irányuló módszerek önmagukban nem mindig elegendőek a diagnózis felállításához.

A kutyákban és a magzatburkokon talált szövettani elváltozások, valamint az IHK eredmények a korábbi cikkekben leírtakhoz nagyon hasonlóak voltak (Brennan és mtsai., 2008; Gleiser és mtsai., 1971; Gordon és Rutgers, 1985; Hollett, 2006). Mind a hat vizsgált állatban a *B. canis*-ra jellemző szövettani elváltozásokat találtunk, sőt az BC6-os és BC18-as számú kutyák esetében csak szövettani elváltozások voltak, minden más laboratóriumi teszt negatív eredményt adott. Mivel anti-*B. canis* ellenanyag kereskedelmi forgalomban nem kapható, az IHK vizsgálathoz magunk állítottuk elő két nyúl immunizálásával. Azoknak az eseteknek a hátterében, ahol az IHK negatív eredményt adott, a kimutatható mennyiség alatti baktérium jelenlétére következtettünk.

A járványtani körülmények és a modern diagnosztikai vizsgálatok alkalmazásával hazánkban először állapítottuk meg *B. canis* okozta vetélést egy kutyatenyészetben. A kennelben a kutya brucellózisra jellemző klinikai tünetek enyhék voltak és főként szórványos szaporodási rendellenességekben nyilvánult meg. Fontosnak tartjuk felhívni a tenyésztők figyelmét arra, hogy figyeljék az állományban esetlegesen felbukkanó, a kutya brucellózisra jellemző tüneteket. Továbbá a fertőzés tenyészeteken belüli és tenyészetek közötti terjedésének megakadályozása részben az ő felelősségük lenne. A koraellés után életben maradt kölykök fontos forrásai lehetnek a fertőzésnek, mivel tartós baktériumhordozókká és -ürítőkké válhatnak. Minden kutya vetelésből származó mintát be kellene küldeni *Brucella* kimutatásra irányuló bakteriológiai és molekuláris biológiai vizsgálatra. Továbbá a vetélt placenta IHK-iai vizsgálata is javasolt, ugyanis ez egy gyors és érzékeny módszer a baktérium kimutatására. Számos módszer (szerológia, vérminták és nemi váladékok bakteriológiai vizsgálata) egyidejű és ismétlődő alkalmazása szükséges az élő egyedek fertőzöttségének a megállapításához.

A *B. canis* gazdafajon belüli evolúciója a járvány során

Bevezetés

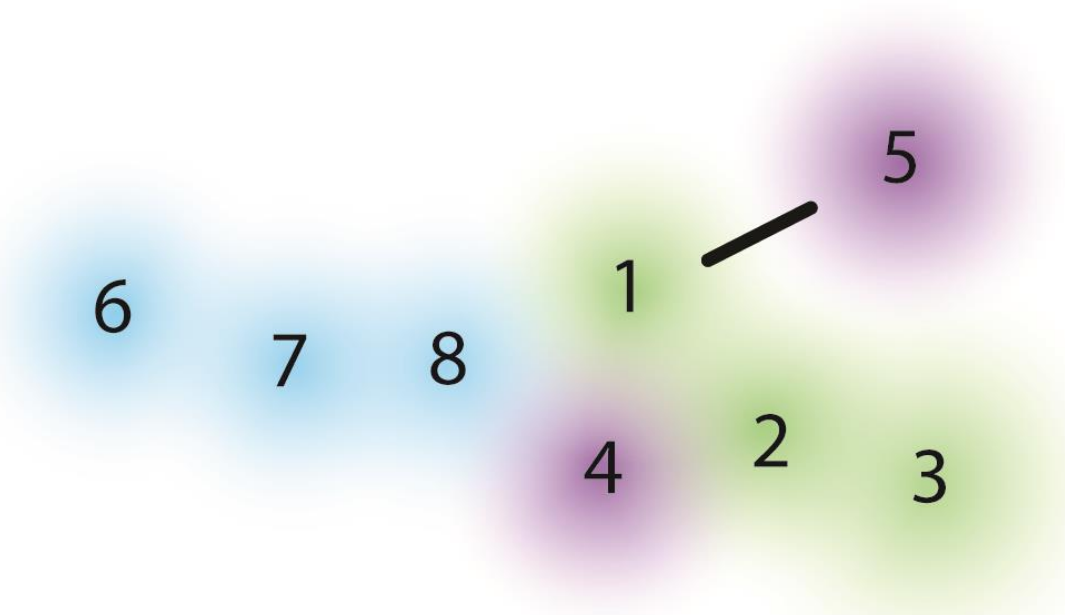
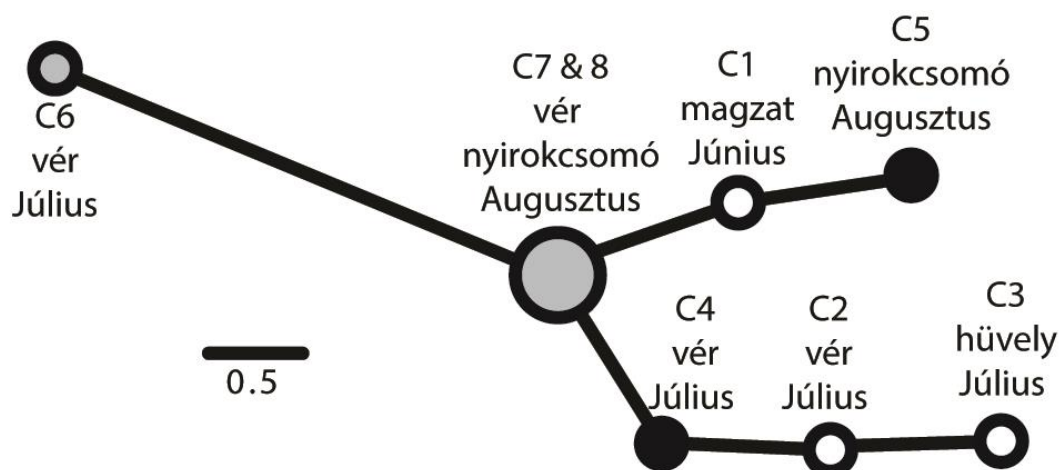
Az MLVA módszer egy finom felbontó képességű genotipizáló eljárás, ami kiválóan alkalmas járványok molekuláris epidemiológiai vizsgálatára. Kutatásunk célja az előző fejezetben bemutatott, első hazai *B. canis* járvány során kitenyésztett izolátumok összehasonlító genetikai vizsgálata, a járványt okozó eredeti, ősi törzs gyors evolúciós változásainak feltérképezése a gazda egyedek között, valamint egyedeken belül térben és időben.

Eredmények

A *B. canis* járvány során 8 törzset izoláltunk a kutya tenyészet különböző kutyáiból. A 15 vizsgált VNTR lókuszt közül 10 nem mutatott különbséget a vizsgált törzsek között (2. melléklet). A VNTR3 7 izolátum esetében megegyezett, míg egy izolátum esetében nem volt jelen (0 allélt adott), így ezt azt allélt monomorfának tekintettük a vizsgálatunk során. A VNTR1 és a VNTR30 egy ismétlődő egységnyi inzerciót tartalmazott a C6-os izolátum esetében. A VNTR2 és VNTR33-as markerek nagy változatosságot mutattak a nyolc izolátumban. Alternatív allélok jelenlétét is kimutattuk a VNTR1, 2 és 33 esetében. Tíz eset közül nyolcban olyan alternatív allélt észleltünk, ami egy másik izolátumban elsődleges allélként szerepelt. A nyolc izolátum a filogenetikai vizsgálat során három ágra tagolódott (8/A ábra). A nyolc izolátum közül hat egyedi genotípussal rendelkezett. Ugyanabból a kutyából, de különböző időpontban vagy szervből izolált törzsek egymástól elkülönülve helyezkedtek el a törzsfán. Például a C1-es izolátum a genetikai vizsgálat alapján közelebbi rokonságot mutatott a C4, 5, 6, 7 és 8 izolátumokkal, mint a C2 és 3 törzsekkel, holott a C1, 2 és 3 izolátumok származtak ugyanabból a szuka kutyából. A C4 és 5 izolátumok ugyanabból a kan kutyából lettek izolálva egy hónap különbséggel, de közelebbi genetikai rokonságban álltak más törzsekkel, mint egymással. A C6 törzs egy kölyök kutyából származott (nem az előbb említett szuka kölyke volt) és genetikailag jól elkülönült a többi vizsgált izolátumtól, a VNTR1 és 30-as lókuszon más allélokkal rendelkezett. Érdekes eredmény, hogy a C6 törzs izolálása csak egy hónappal korábban történt, mint az ugyanezen kutyából izolált C7 és 8 törzsek.

Az alternatív allélok szerepének a megjelenítésére a körökből és vonalakból álló törzsfák helyett alkalmasabbnak találtuk felhő-szerű ábrázolást (8/B ábra). A VNTR1 esetében a C6 törzsben kimutatott elsődleges allél előfordult a C2 és 8 izolátumokban is. A C1, 4, 7 és 8 izolátumokban előforduló elsődleges VNTR2 allélt kimutattuk a C2 és 6 törzsekben.

A C2 és 4 a VNTR33 lókuszon azonos allélt is tartalmazott mint a C1, míg a C3 törzs ezen a lókuszon található elsődleges allélját észleltük a C6, 7, és 8 izolátumokban. Így ha az elsődleges és másodlagos allélokat egyaránt bevontuk az elemzésbe, akkor jelentős genetikai hasonlóságot/átfedéseket mutattunk ki az egyes törzsek között.



8. ábra: A: A járvány során izolált *B. canis* törzsek MLVA15 alapú törzsfája. Egyazon gazdából származó törzseket ugyanolyan színek jelölik. B: A filogenetikai kapcsolatok felhő-szerű ábrázolása, ami megjeleníti az elsődleges és másodlagos allélok átfedését. A C5 izolátum kivételével valamennyi törzs között van allél átfedés. Az azonos színek ugyanabból a gazdából származó törzseket jelölik.

Megbeszélés

Az MLVA segítségével genetikai különbségeket tudtunk kimutatni más módszerekkel egyébként megkülönböztethetetlen izolátumok között, melyek különböző egyedekből, vagy ugyanazon állat különböző szerveiből származtak. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a különböző egyedekből izolált *B. canis* törzsek közös őstől származnak, ami nem sokkal korábban kerülhetett be az állományba, majd gyors *in vivo* genetikai változásokon ment keresztül. A C1 törzs a vizsgált szuka kutya magzatából lett izolálva júniusban. Ez a törzs közeli rokonságban áll a C2 és 3 törzsekkel, melyek a nőstény kutya véréből és hüvelyéből izoláltunk júliusban. Ehhez hasonlóan *in vivo* evolúció mutatható ki a kan kutyából júliusban és augusztusban izolált C4 és C5 törzsek között. Ugyancsak *in vivo* mutációt észleltünk a kölyök kutyából kitenyésztett C6, 7 és 8 izolátumok között. Ezek az eredmények hasonlóan mások munkáihoz, mint például gazdán belüli evolúció kimutatása egy emberi *Burkholderia pseudomallei* fertőzés esetén, vagy bolhából és prérikutyaiból izolált *Yersinia pestis* rokonságának feltárása, igazolják, hogy a VNTR markerek akár néhány hetes időtávon belül is képesek változni (Girard és mtsai., 2004; Price és mtsai., 2010). Az alkalmazott MLVA rendszer néhány VNTR eleme nagy mutációs rátájú. A módszer kifejlesztése során Huyhn és mtsai. (2008) *B. suis* törzsek (amik legközelebbi rokonai a *B. canis*-nak) vizsgálata során úgy találták, hogy az MLVA rendszer átlagos allél változékonysága közepes (0,49). Néhány lókuszt, mint a VNTR1, 2, 3, 30 és 33 esetében azonban igen magas (0,77-0,88) allél változékonyságot tapasztaltak, akár 6-13 között változó allélszámmal az egyes lókusztokat illetően. Ez pedig arra utal, hogy ezeken a lókusztokon akár nagy változatosságot is megfigyelhetünk viszonylag rövid időintervallum alatt is. Meg kell említeni, hogy ezeken a lókusztokon az izolálási folyamat során elviekben *in vitro* is bekövetkezhetnek változások. Ugyan minden bizonnyal az egyes vizsgált törzsek jóval több generációváltáson mentek át a gazdában, mint később a viszonylag rövid ideig tartó izolálási folyamat során, de a jövőben az ilyen jellegű vizsgálatokat célszerűbb lenne közvetlenül a klinikai mintákból elvégezni. Meg kell jegyezni azt is, hogy az általunk vizsgált VNTR lókusztok közömbös genetikai markerek, amelyek nem állnak semmilyen szelekciós nyomás alatt. Érdekes lenne megnézni, hogy ha esetleg szelekciós nyomás alatt lévő markereket (pl. patogenitásért felelős gének) vizsgálunk, akkor milyen eredményeket kapunk.

Különösen fontos része volt a munkánknak az alternatív allélok vizsgálata, melyek aztán elsődleges alléllá lépnek elő más törzsekben és ezzel mutatják a genetikai változás folyamatát az MLVA vizsgálat során. Az alternatív allélok elemzését általában kihagyják az adatok feldolgozása során. Úgy tekintenek rájuk, mint zavaró tényezőre, holott inkább úgy kellene rájuk tekinteni, mint fontos mutációkra, amik feltárhatják az egyes törzsek közötti rokonságot.

Mindazonáltal, nem tudtuk a munkánk során egyértelműen ábrázolni a vizsgált izolátumok közötti rokonságot. Ennek hátterében az állhat, hogy néhány lókuszt annyira variábilis volt, hogy megnehezítette a valós rokonsági kapcsolatok feltárását, ami abban is megnyilvánult, hogy ugyanabból az állatból származó izolátumok nem minden esetben egymás mellett helyezkedtek el a törzsfán. A legvariábilisabb lókuszok magas mutációs rátája és az ennek eredményeként esetleg kialakuló homoplázia korlátja lehet az MLVA használhatóságának bizonyos esetekben. Más kutatók is szembesültek ezzel a jelenséggel pl. a *B. melitensis*-en végzett MLVA16 elemzés során (Al Dahouk és mtsai., 2007; Jiang és mtsai., 2011; Kattar és mtsai., 2008), aminek kiküszöbölésére bevezették az egyes markerek súlyozását, többek között a hipervariábilis markerek hatásának csökkentését az anyag és módszer fejezetben bemutatottak szerint. Ezzel azonban óvatosan kell bánni, mert a legvariábilisabb lókuszok kiküszöbölésével, hatásának mérséklésével pont a nagyon hasonló izolátumok elkülönítésének lehetőségét veszíthetjük el. Nagyon vékony az a mezsgye, amin belül kell maradni, hogy elég nagy variabilitást mutató lókuszt vegyünk bele az elemzésbe, hogy lássuk a törzsek közötti különbséget, de ne túl sokat, hogy elkerüljük a fals eredményeket.

Ez az első olyan vizsgálat, mely finom felbontó képességű genetikai vizsgáló módszerrel feltárta egy *B. canis* járványból származó törzsek rokoni kapcsolatait. Kimutattuk, hogy több VNTR lókuszt gyorsan mutálódik a *B. canis*-ban és alternatív allélok jelenhetnek meg. Ugyanakkor az is kiderült, hogy az MLVA módszer nem volt a legmegfelelőbb az izolátumok közötti feltehetően valós járványtani kapcsolatok feltárására. Mindemellett azonban igazoltuk, hogy a *B. canis* akár igen rövid időintervallumon belül is képes genetikailag változni a gazdaszervezetben.

***B. microti* első izolálása vaddisznóból (*Sus scrofa*)**

Bevezetés

Hubalek és mtsai. (2007) mezei pockok (*Microtus arvalis*) brucellózisáról számoltak be Csehországban, az izolált kórokozót pedig *B. microti*-nak nevezték el (Scholz és mtsai., 2008a). Ezt követően a kórokozót kimutatták még talaj és róka (*Vulpes vulpes*) eredetű mintákból is Csehországban és Ausztriában (Scholz és mtsai., 2008b; Scholz és mtsai., 2009). A típus törzs (CCM 4915^T) teljes genomját 2009-ben határozták meg, majd egér modellben vizsgálták a kórokozó patogenitását és további vizsgálatok során pedig a fajon belüli

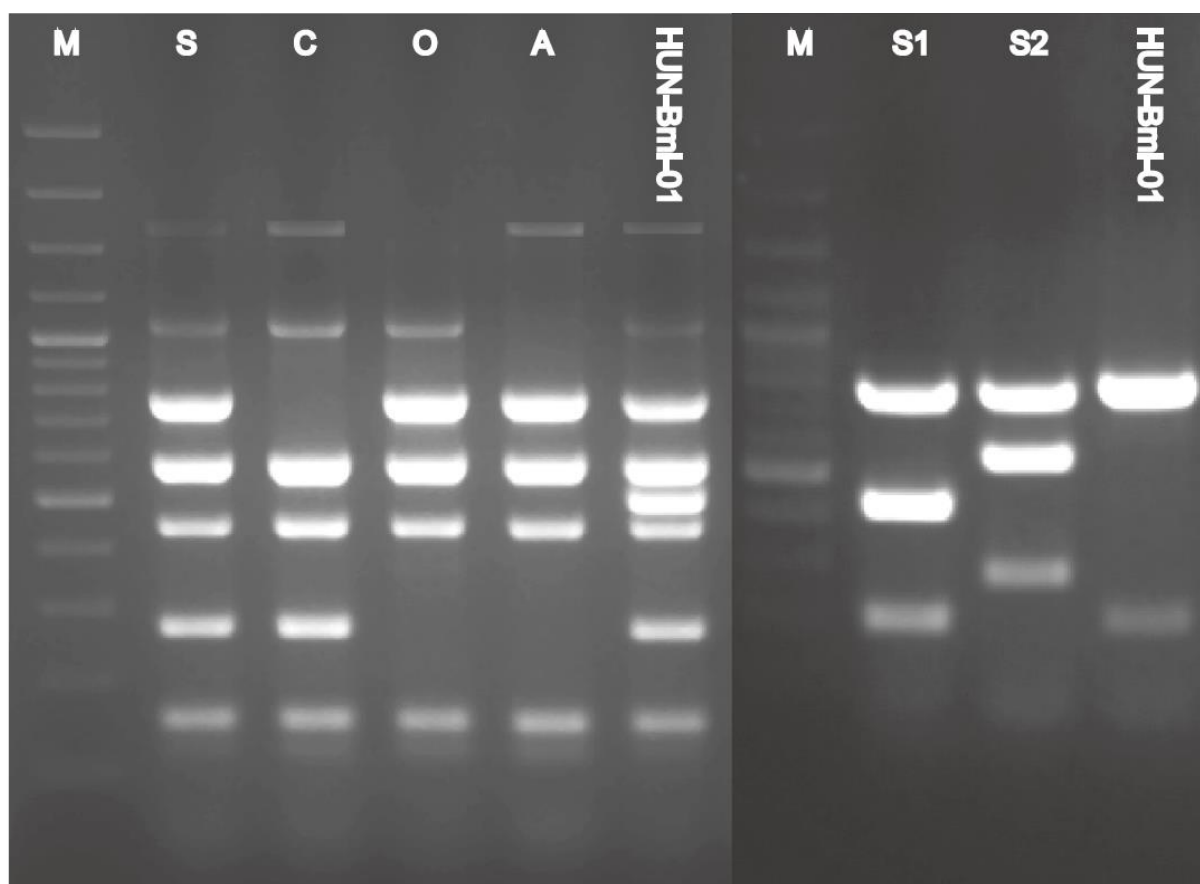
biodiverzitását (Audic és mtsai., 2009; Jiménez de Bagüés és mtsai., 2010; Al Dahouk és mtsai., 2012). Ez az egyetlen *Brucella* faj, mely előfordul a talajban, ezért a faj környezeti előfordulása, ökológiája, zoonótikus potenciálja, genetikája különösen érdekes tudományos szempontból (Al Dahouk és mtsai., 2012). Vizsgálatunk célja, hogy beszámoljunk az első vaddisznó eredetű *B. microti* törzs izolálásáról, ami egyben a kórokozó első hazai kimutatása is, illetve jellemezzük a kitenyésztett baktériumot.

Eredmények

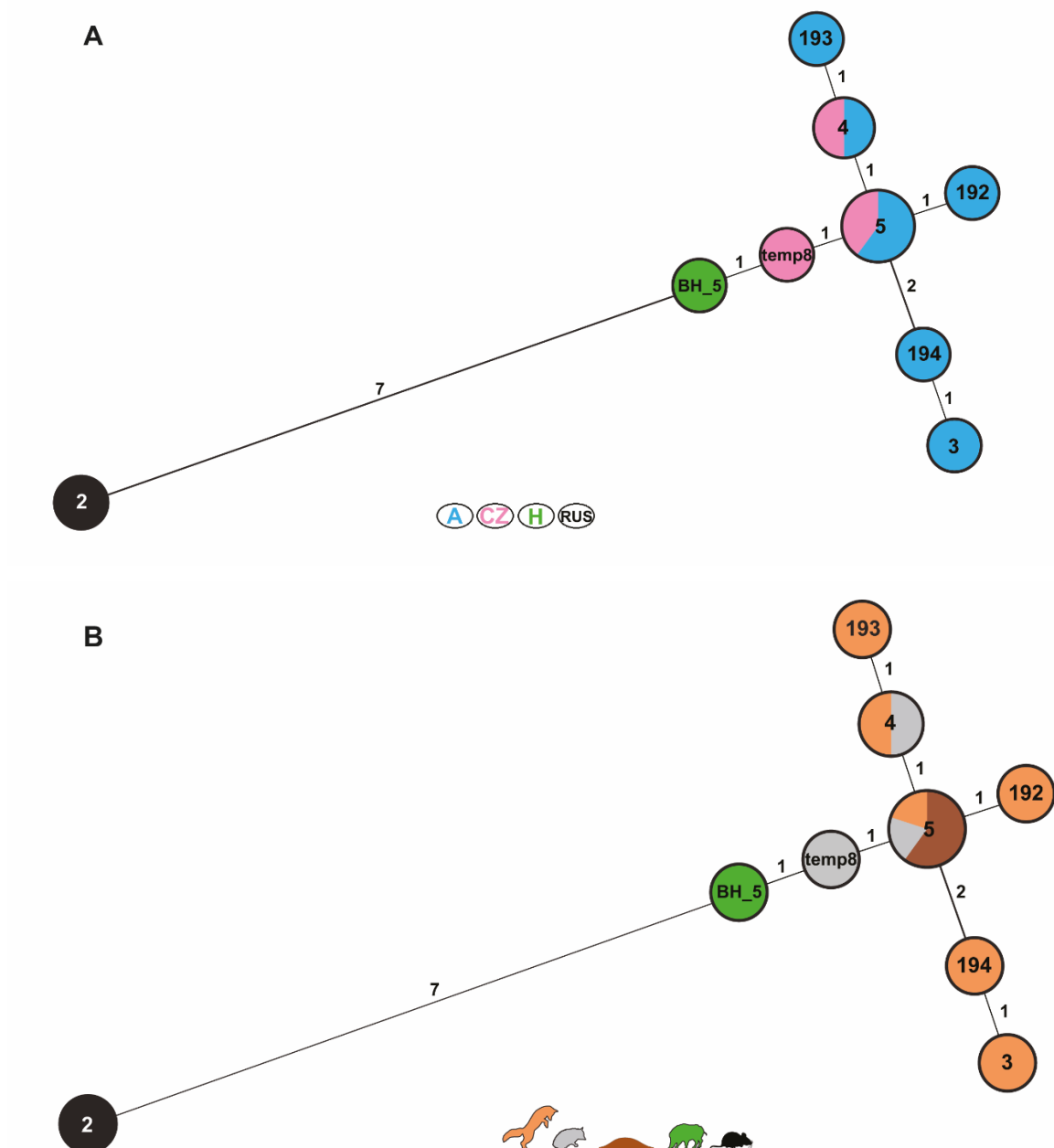
Egy Rajka melletti vadászat során elejtett vaddisznó áll alatti nyirokcsomójából *B. microti* törzset izoláltunk 2014. szeptemberében. A nyirokcsomó kórbonctani, kórszövettani és *B. abortus*, *B. suis* és *B. canis* specifikus hiperimmun savókkal végzett IHK vizsgálata során nem tudtunk kórtani elváltozást kimutatni. A nyirokcsomóból közvetlenül *Brucella* szelektív agarra történt kioltás negatív eredménnyel zárult, de a *Brucella* szelektív táplevesben történt elődúsítás, majd *Brucella* szelektív táptalajra oltás során, két nap inkubációt követően telepek jelentek meg szintenyészet formájában. A kezdetben átlátszó, tűszúrásnyi, krémes állagú telepek barna színeződést mutattak 3 napos inkubálás után. A kitenyésztett baktérium Gram-negatív, Köster-pozitív, kokkoid-pálca volt, kataláz, oxidáz és ureáz aktivitást mutatott, de H₂S-t nem termelt. Növekedett 20 µg/ml tionin és bázikus fuxin jelenlétében és CO₂-t nem igényelt a szaporodásához. Erősen agglutinált A és M savókkal, de R savóval nem reagált. Az API 20 NE teszt *Ochrobactrum anthropi*-ként azonosította 99,9%-os valószínűséggel. Az alábbi reakciók mutattak pozitivitást: nitrát redukció, ureáz aktivitás, D-glükóz, L-arabinóz, D-mannóz, N-acetilglükózamin, D-maltóz, adipinsav és almasav asszimilációs próba. Negatív eredményt kaptunk a többi vizsgálat során: indol próba, D-glükóz bontás, arginin hidrolízis, eszculin és zselatin bontás, β-galaktozidáz aktivitás, valamint D-mannitol, K-glükonát, kaprinsav, trinátrium foszfát és fenilsav asszimilációs próba.

A kitenyésztett törzset *B. microti*-ként (HUN-Bmi-01) azonosítottuk a továbbfejlesztett „Bruce- és Suis-ladder” módszerekkel. A „Bruce-ladder” v2.0 vizsgálat során 1682, 1071, 774, 587, 450, 272, 152, és a *B. microti* specifikus 510 bp nagyságú fragmenteket kaptuk, míg a „Suis-ladder” multiplex PCR 774 és 197 bp nagyságú termékeket adott (9. ábra). Meghatároztuk a törzs inkomplett teljes genom szekvenciáját, melyet SRP053188 azonosítószámon elhelyeztünk a GénBankban. Az illesztéshez használt leolvasások száma 2 705 699 volt (1 725 428 az 1-es kromoszómához és 980 271 a 2-es kromoszómához tartozott), míg további 122 318 leolvasást nem vontunk be az elemzésbe. A medián lefedettség 142× volt az 1-es kromoszómán és 140× a 2-es kromoszómán. Összehasonlítottuk a kapott genom szekvenciát a GénBankban található

B. microti referencia genom szekvenciával és 19 nuklotid eltérést azonosítottunk az 1-es és 11-et a 2-es kromoszómán a két törzs között. A 30 pontmutáció közül 6 integenikus szakszon helyezkedett el, míg a 24 kódoló szakaszon elhelyezkedő pontmutáció közül 14 szinoním és 9 miszcens mutáció volt. Az MLVA16 vizsgálat során egy új, eddig nem ismert *B. microti* profilt azonosítottunk (BH_5: 4-5-12-13-5-2-5-6-7-7-9-10-13-12-4-6, az alábbi lókuszokon: Bruce06-08-11-12-42-43-45-55-18-19-21-04-07-09-16-30). A *B. microti* törzsek közötti genetikai rokonságot az MLVA11-es alrendszer segítségével vizsgáltuk (10. ábra). A vizsgált törzsek VNTR profiljait az MLVA adatbázis (<http://mlva.u-psud.fr>) tartalmazza.



9. ábra: A „Bruce (bal oldal) és a Suis-ladder” (jobb oldal) multiplex PCR rendszerek eredménye a HUN-Bmi-01 hazai *B. microti* törzzsel. S: *B. suis*, C: *B. canis*, O: *B. ovis*, S1: *B. suis* 1-es biotípus, S2: *B. suis* 2-es biotípus.



10. ábra: A HUN-Bmi-01 hazai *B. microti* törzs és az MLVA adatbázisban (<http://mlva.u-psud.fr>) elérhető többi izolátum MLVA11 elemzése alapján készített minimum spanning törzsfák földrajzi eredet (A) és gazdafaj/minta eredet (B) szerint színekódolva. A: kék: Ausztria, lila: Csehország, zöld: Magyarország. B: narancssárga: róka, szürke: mezei pocok, barna: talaj, zöld: vaddisznó. Fekete mindkét ábrán: *B. suis* 5-ös biotípus, rágcsáló, Oroszország (outgroup)

Megbeszélés

A vadászterület, ahol a vaddisznót elejtették közel helyezkedik el az osztrák határhoz, ahol a korábbi években több *B. microti* törzset is izoláltak. Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a *B. microti* endemikus Közép-Európában. Feltételezésünk szerint a vaddisznó egy rágsáló vagy állati tetem (pl. pocok, róka) elfogyasztása során, vagy egyszerűen csak a földet túrva fertőződhetett a törzzsel. A vadászok beszámolója szerint a lelőtt állatban semmilyen makroszkópos elváltozást nem láttak, feltételezhetően nem betegedett meg a kórokozótól. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy a vaddisznó egyfajta rezervoár szerepet is betölthet, ami képes a környezetben fenntartani és terjeszteni a *B. microti*-t.

Az S és R típusú *Brucella* fajok ellen termelt hiperimmun savókkal végzett IHK vizsgálatok során kapott negatív eredmények arra engednek következtetni, hogy a *B. microti* mennyisége kisebb volt mint az IHK vizsgálatok érzékenysége. Ezt támasztja alá az is, hogy közvetlenül kioltva nem, csak elődúsítás után sikerült a kórokozót izolálni. Mindezek megerősítik azt a feltételezést, hogy a vaddisznó csak egy tünetmentes hordozója volt a *B. microti*-nak.

A telepmorfológiai, növekedési és biokémiai tulajdonságai a kitenyészett törzsnek, beleértve az izolálás 3. napján megjelenő barnás színű pigmentációt megegyeztek a Scholz és mtsai (2008a) által az első *B. microti* törzsről leírt tulajdonságokkal. Az agglutinációs profilja azonban különleges volt. Az elsőként izolált *B. microti* törzs csak M savóval agglutinált, de Al Dahouk és mtsai. (2012) a későbbiekben több különféle agglutinációs mintázatról is beszámoltak. Vizsgálataik során ugyan a legtöbb törzs reagált az M savóval, egy róka eredetű izolátum csak az A, míg a talaj mintákból származó törzsek mindhárom savó típussal agglutináltak.

A cseh mezei pocok eredetű és a hazai vaddisznóból származó *B. microti* törzsek inkomplett teljes genom szekvenciájának az összehasonlítása során felfedezett csupán 30 pontmutáció meglepően kevés, ami arra enged következtetni, hogy igen nagy lehet a *B. microti* törzsek között a genetikai hasonlóság Közép-Európában. A pontmutációk kereséséből ugyan kihagytuk a több kópiában jelenlévő génszakaszok, inzerciós szekvenciák és ismétlődő régiók vizsgálatát. Emiatt a pontmutációk számának meghatározására tett próbálkozásunk csak egy mérsékelt becslésnek tekinthető, de nagyobb valószínűséggel tártuk fel azokat a mutációkat, amik valódi biológiai különbségeket is jelentenek. Mindamellet a feltárt pontmutációk megbízható alapot adnak filogenetikai vizsgálatokhoz, mert elhelyezkedésük alapján lefedik a teljes genomot, relatíve konzervatívok, könnyen összehasonlíthatóak és intergenikus régiókból is származnak. Így a pontmutációk elemzésének elsődleges célja az volt, hogy tágabb evolúciós szinten feltárja a cseh és magyar *B. microti* törzs közötti genetikai rokonság mértékét.

A nagy mutációs rátával rendelkező VNTR lokuszokat nem tudtuk meghatározni a teljes genom szekvenálás során a használt módszer jellegéből adódóan. Annak érdekében, hogy a Csehországból és Ausztriából származó többi *B. microti* törzzsel is össze tudjuk hasonlítani az általunk izolált törzset, elvégeztük a MLVA vizsgálatot. Eredményeink alapján a vaddisznóból kitenyészett törzs jól elkülönült a környező országokból származó mezei pocok, róka és talaj eredetű izolátumoktól. A vaddisznó fertőződésének forrása (pocok, róka, talaj vagy valami más) megfejtéséhez nem kerültünk közelebb, további vizsgálatokra van szükség, hogy többet megtudjunk a *B. microti* ökológiájáról.

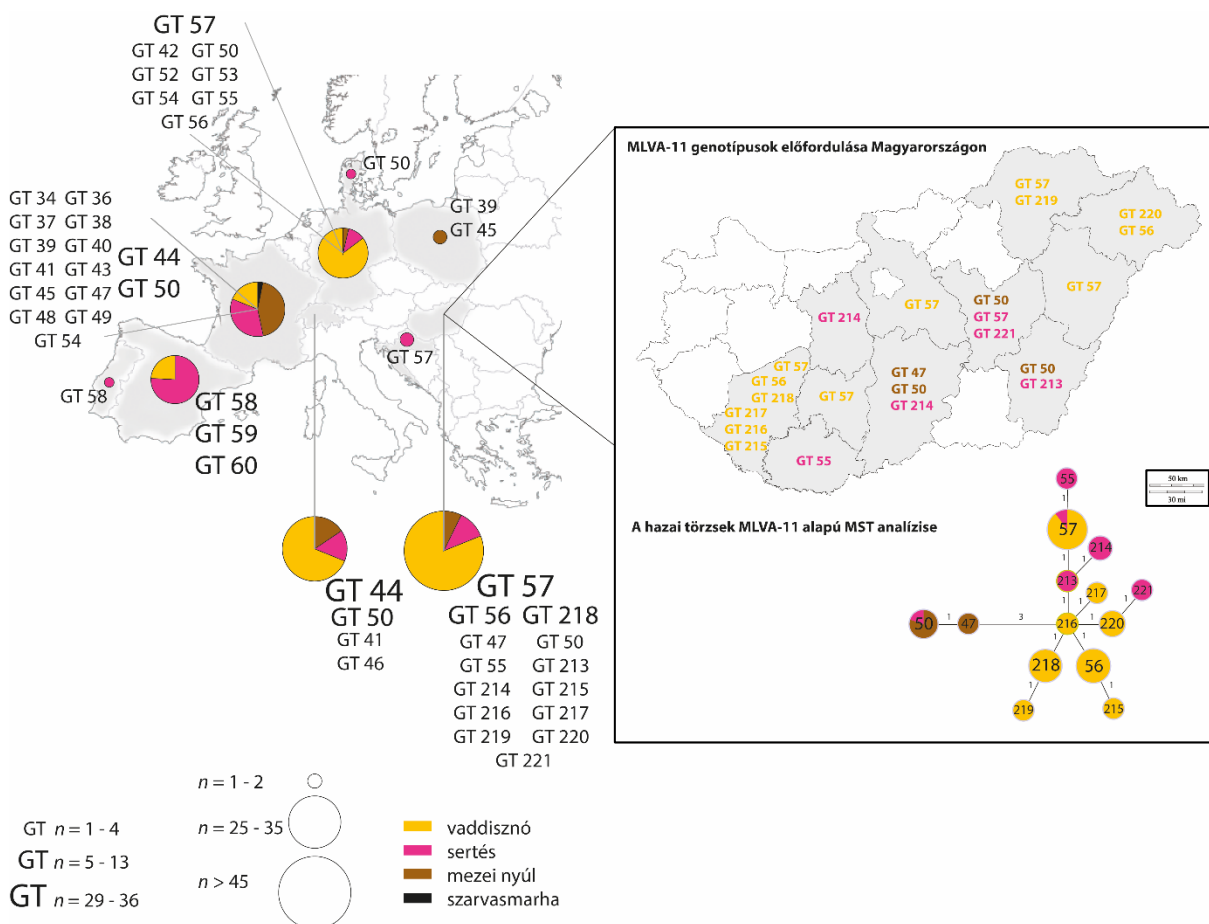
Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy elsőként mutattuk ki a *B. microti*-t vaddisznóból és elsőként izoláltuk Magyarország területéről.

Sertés, vaddisznó és mezei nyúl eredetű *B. suis* 2-es biotípusú törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata

Bevezetés

A sertésállományokat fenyegető sertés brucellózis kórokozója a *B. suis*. A fajon belül öt biotípust különböztetnek meg, melyek közül az 1-es, 2-es és 3-as biotípusok okoznak megbetegedést házi sertésben. Az egyes biotípusok földrajzi elterjedés, gazdfajlagosság és fertőzőképesség szempontjából különböznek egymástól (OIE, 2018a). Európában elsősorban a *B. suis* 2-es biotípusa fordul elő, de az 1-es és a 3-as biotípus okozta megbetegedésről is beszámoltak már (Cvetnić és mtsai., 2005, 2009; Gennero és mtsai., 2004; Godfroid és mtsai., 2005). Az említett három biotípus között az egyik legjelentősebb különbség, hogy a 2-es biotípus gyakorlatilag apatogén az emberekre nézve (Garin-Bastuji és mtsai., 2006; Lagier és mtsai., 2005; Paton és mtsai., 2001; Teyssou és mtsai., 1989), addig az 1-es és 3-as biotípusok jelentős zoonotikus kórokozók. A természetben a vaddisznó és a mezei nyúl a *B. suis* 2-es biotípusának a rezervoár fajtái (Godfroid és mtsai., 2005; Gyuranecz és mtsai., 2011). A vaddisznó és mezei nyúl az extenzíven tartott házi sertés állományok potenciális fertőzési forrásai lehetnek (Godfroid, 2012; Godfroid és Kasbohrer, 2002; Grégoire és mtsai., 2012; Köppel és mtsai., 2007; Leiser és mtsai., 2013; Muñoz és mtsai., 2010; Wu és mtsai., 2011, 2012). A vadállomány hozzájárulhat a betegség nagy távolságokra, akár határokon is átívelő terjedéséhez az állatok természetes mozgása vagy mesterséges áttelepítése révén (Godfroid, 2012; Godfroid és mtsai., 2005; Godfroid és Kasbohrer, 2002; Grégoire és mtsai., 2012).

A vizsgálat célja a magyarországi *B. suis* törzsek MLVA tipizálása és a nemzetközi adatbázisban (<http://mlva.u-psud.fr>) található egyéb európai törzsekkel történő összehasonlító genetikai vizsgálata volt (11. ábra). Reményeink szerint eredményeink hozzásegítenek ahhoz, hogy jobban megértsük a hazai és más európai izolátumok rokonsági kapcsolatait és feltárjuk a betegség járványtanát és az egyes törzsek gazdafaj specifikitását.

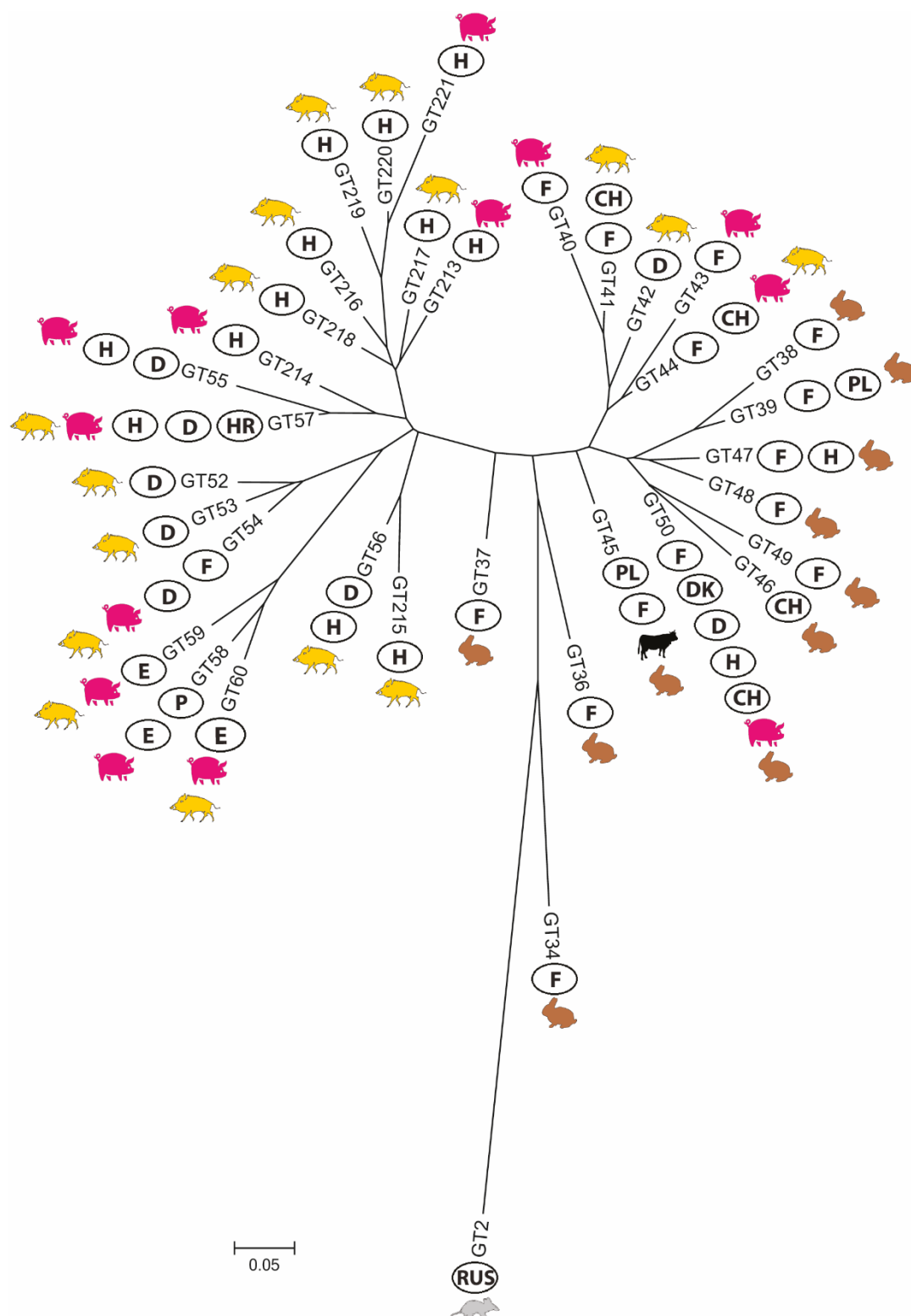


11. ábra: A vizsgálatba bevont *B. suis* 2-es biotípusú törzsek földrajzi eredete. A genotípus (GT) számok mérete reprezentálja az adott MLVA11 genotípusú törzsek számát. A tortadiagrammok mérete az adott országból a vizsgálatba bevont izolátumok számát mutatja. A színek a törzsek gazdafajaira utalnak: narancssárga: vaddisznó, rózsaszín: sertés, barna: mezei nyúl, fekete: szarvasmarha. Az indexképben a magyarországi törzsekre vonatkozó információk és a törzsek MLVA11 elemzése alapján készített minimum spanning törzsfá látható.

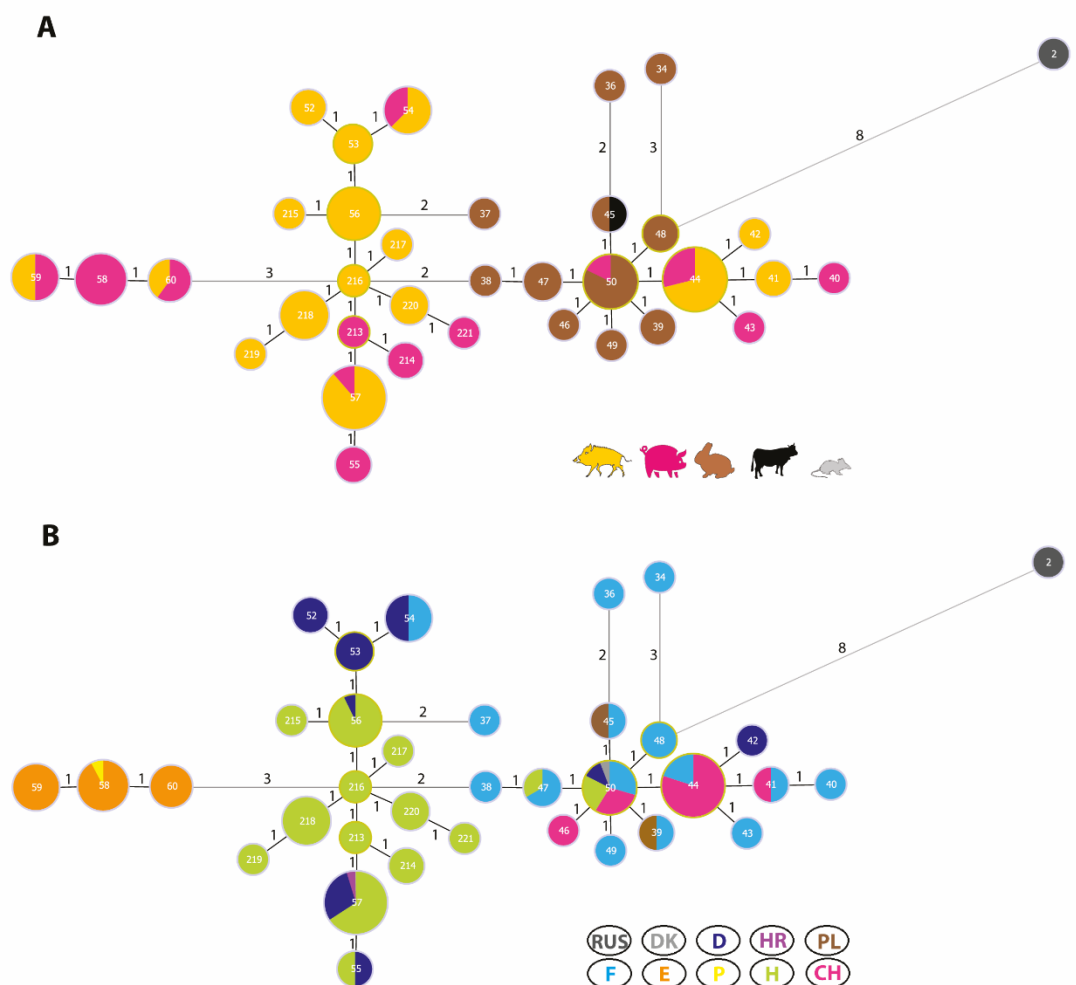
Eredmények

A 68 magyarországi törzs MLVA16 vizsgálata során 55 genotípust különítettünk el, melyek közül 45-öt csak 1-1 izolátum képviselt, míg a maradék 23 törzs 10 db 2-3 fős csoportba sorolódott. A 16 vizsgált lókuszt HGDI értéke alapján a Bruce04 marker mutatta a legnagyobb felbontóképességet 0,929-es értékkel. A 203 vizsgált európai *B. suis* 2-es biotípusú törzs között 167 genotípust különböztettünk meg. Ezzel ellentétben, mikor csak a hazai törzseket hasonlítottuk össze, akkor a Bruce04 (0,928) és Bruce09 (0,911) markerek mutatták a legnagyobb felbontóképességet, míg valamennyi európai törzset vizsgálva a Bruce07 (0,870) és a Bruce30 (0,843) régiók mutatták a legnagyobb változatosságot. A magyar törzsek esetében a Bruce09 marker rendelkezett a legkisebb (0,653) HGDI indexszel, melyet a Bruce07 (0,835) és a Bruce30 (0,805) régiók követtek. Mind a 203 *B. suis* 2-es biotípusú törzset vizsgálva az MLVA11 rendszer és a 2B panel hasonló felbontó képességet mutatott; 0,886-os és 0,883-as HGDI indexet. Az MLVA16 0,995-ös, míg az MLVA8 0,804-es értékeket adott. A vizsgált törzsek VNTR profiljait az MLVA adatbázis (<http://mlva.u-psud.fr>) tartalmazza.

A vizsgált *B. suis* 2-es biotípusú törzsek közötti rokonsági viszonyok megjelenítésére használt neighbor-joining és minimum spanning tree módszerek hasonló topológiájú törzsfákat eredményeztek (12. és 13. ábra). Az egyes markerek súlyozása nem befolyásolta a törzsfák megjelenését.



12. ábra: *B. suis* 2-es biotípusú törzsek MLVA11 elemzése alapján készített neighbor-joining törzsfá. GT: genotípus, Állat piktogrammok: narancssárga: vaddisznó, rózsaszín: sertés, barna: mezei nyúl, fekete: szarvasmarha, szürke: rágcsáló, *B. suis* 5-ös biotípus (outgroup), Dánia (DK), Franciaország (F), Horvátország (HR), Lengyelország (PL), Magyarország (H), Németország (D), Oroszország (RUS), Portugália (P), Spanyolország (E), Svájc (CH)



13. ábra: *B. suis* 2-es biotípusú törzsek MLVA11 elemzése alapján készített minimum spanning törzsfá gazdafaj (A) és földrajzi eredet (B) szerint színekódolva. A: narancssárga: vaddisznó, rózsaszín: sertés, barna: mezei nyúl, fekete: szarvasmarha, szürke: rágcsáló, B. suis 5-ös biotípus (outgroup). B: Dánia (DK), Franciaország (F), Horvátország (HR), Lengyelország (PL), Magyarország (H), Németország (D), Oroszország (RUS), Portugália (P), Spanyolország (E), Svájc (CH)

Az MLVA vizsgálat eredményei alapján a hazai *B. suis* 2-es biotípus populáció rendkívül heterogén. Összesen kilenc MLVA8 és tizennégy MLVA11 genotípust azonosítottunk, melyek közül öt MLVA8 (108, 109, 118, 119 és 120) és kilenc MLVA11 (213-221) új genotípusnak bizonyult (13. ábra). Az 57-es MLVA-11 genotípus országsszerte előfordult és a vizsgált törzsek 43% ebbe a típusba tartozott. Valamennyi vaddisznóból vagy sertésből származott. A mezei nyúl és vaddisznó eredetű törzsek két, genetikailag élesen elkülönült csoportot alkottak. A hazai vaddisznó eredetű törzsek esetében nem találtunk összefüggést a genotípus és a törzs földrajzi

eredete között. Ugyanabba a genotípusba tartozó törzset kimutattunk az ország nyugati és keleti részéből egyaránt, de azonos földrajzi eredetű törzsek között több, különböző genotípust is megfigyeltünk. A hazai mezei nyúl eredetű izolátumok (5 db) a 47-es és 50-es MLVA11 genotípusba sorolódtak, melyek közül az 50-es genotípust három különböző megyéből is kimutattuk. Az egyes törzsek izolálásának ideje és genotípusa között nem találtunk összefüggést.

A különböző európai mezei nyúl eredetű törzsek (Franciaország, Lengyelország, Magyarország, Németország, Svájc) egymáshoz közel helyezkedtek el az MLVA11 törzsfán, de ezen a nagyobb csoporton belül nem találtunk további csoportosulást a törzsek között a földrajzi eredetük alapján. Ezzel szemben az európai szinten a vaddisznó eredetű törzsek genotípusa többnyire földrajzi lokalizációt mutatott. Az Ibériai-félszigetről származó valamennyi vaddisznó és házi sertés eredetű törzs egy csoportba sorolódott. A német vaddisznókból és sertésekből kitenyészett izolátumok változatos genotípusokkal rendelkeztek és többnyire a magyar vaddisznó és sertés eredetű törzsekkel mutattak rokonságot. Az 57-es MLVA11 genotípus jelenlétét Horvátországból, Magyarországról és Németországból is kimutattuk. Az 57-es MLVA11 genotípust tovább bontva az MLVA16-os rendszerrel azt találtunk, hogy egy horvát sertés és egy magyar vaddisznó eredetű törzs továbbra is megegyezik egymással.

Megbeszélés

A multi-locus sequence typing (MLST) és az MLVA módszereknek egyaránt van erősségük és gyengeségük, melyek megjelennek a *Brucella* törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata, filogenetikai analízise során. Az MLST a megfelelő módszer a stabil, nagyobb léptékű evolúciós folyamatok leírására, míg az MLVA az alkalmas eljárás a kisebb léptékű, újabb evolúciós változások nyomon követésére és járványtani nyomozásra (Kiliç, és mtsai., 2011; Scholz és Vergnaud, 2013). Korábbi MLST vizsgálatok során nagyfokú genetikai homogenitást tapasztaltak a *B. suis* 2-es biotípusú törzsek között, huszonkilenc törzs megvizsgálása során mindössze két szekvencia típust azonosítottak (ST15 és ST16) Európában (Whatmore és mtsai., 2007). Emiatt vizsgálatunk során az MLVA módszert alkalmaztuk a hazai és európai *B. suis* 2-es biotípusú törzsek összehasonlító genetikai és járványtani vizsgálatára.

Általában a törzsek genetikai rokonságának feltárására a minimum spanning tree módszer elsősorban járványtani nyomozások során lehet a megfelelő választás, amikor a rövid időintervallumon belül bekövetkező apró genetikai változások kimutatására van szükség. Ez a módszer azonban a filogenetikai vizsgálatok elvégzésére legtöbbször kevésbé megbízható

(Salipante és Hall, 2011). MLVA11 vizsgálatunk során azonban a *B. suis* 2-es biotípusú törzsek mind a minimum spanning tree, mind pedig a neighbor-joining módszerrel hasonló topológiájú törzsfákat adtak, amik arra utalnak, hogy mindkét módszer megfelelő a törzsek összehasonlító genetikai vizsgálatára egy ilyen genetikailag homogén/konzervatív kórokozó esetében.

A megvizsgált 68 hazai *B. suis* 2-es biotípusú izolátum között viszonylag nagy változékonyságot tapasztaltunk, hiszen az MLVA11 módszerrel 14, míg az MLVA16 rendszerrel 55 genotípust különböztettünk meg. Az MLVA11 genotípusok közül kilencet elsőként írtunk le. Az 57-es genotípus volt a legelterjedtebb az országban, a vizsgált izolátumok 43%-a ennek bizonyult. Sem időbeli, sem földrajzi összefüggéseket nem találtunk a magyar vaddisznó és sertés eredetű törzsek genetikai vizsgálata során. A nagy létszámú hazai vaddisznó populáció (Vadgazdálkodási Adattár, 2013), az állatok természetes vándorlása, kevésbé szabályozott mesterséges áttelepítése mind hozzájárulhatnak a betegség terjedéséhez, a különböző genotípusok keveredéséhez, ami összességében egy változatos hazai *B. suis* 2-es biotípus populációt eredményez. Emellett azonban a hazai vaddisznó és mezei nyúl eredetű törzsek között éles genetikai elkülönülést figyeltünk meg. Hasonló jelenséget észleltek Spanyolországban is az ottani izolátumok PCR-restrikciós fragment hossz polimorfizmus vizsgálata során (Muñoz és mtsai., 2010).

Az európai és hazai izolátumok MLVA16 vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy egy horvát sertés és egy magyar vaddisznó eredetű izolátum genotípusa megegyezik. Ez az eredmény egyrészt megerősíti a fertőzés terjedését a vaddisznó és házi sertés állományok között, másrészt utal a kórokozó határokon átívelő terjedésére az állatok vándorlása vagy áttelepítése révén. Mivel Horvátországban a zoonótikus, 3-as biotípusú *B. suis* is előfordul (Cvetnic és mtsai., 2005, 2009), ezért fokozottan oda kell figyelni a betegség terjedésének a megelőzésére.

A huszonkilenc, különböző európai országból származó mezei nyúl eredetű törzs ugyan több genotípusba sorolódott, de ezek mind egymáshoz közel helyezkednek el a törzsfán. Az izolátumok földrajzi eredete és genotípusa között nem találtunk összefüggést, ami akár szintén lehet az Európán belüli intenzív élő mezei nyúl kereskedelem következménye (Gyuranecz és mtsai., 2012; Somogyi, 2006). Az eredmények alapján arra is következtethetünk, hogy egyes *B. suis* törzsek sokkal inkább a mezei nyulakhoz, mind a vaddisznókhoz adaptálódtak (Gyuranecz és mtsai., 2011; Szulowski és mtsai., 1999). Ennél megalapozottabb következtetések levonásához azonban további mezei nyúl eredetű törzsek vizsgálatára lenne szükség.

Az európai vaddisznó eredetű törzsek elsősorban földrajzi eredetük alapján csoportosultak a törzsfán. A sertés eredetűek nem alkottak különálló csoportot, hanem egyes izolátumok a

vaddisznó, míg mások a mezei nyúl eredetű törzsekkel mutattak rokonságot. Ezek az eredmények alátámasztják azokat a korábbi feltételezéseket, hogy mind a vaddisznó, mind a mezei nyúl populációk a szabadon tartott sertés állományok fertőzési forrásai lehetnek (Godfroid, 2012; Godfroid és Kasbohrer, 2002; Grégoire és mtsai., 2012; Köppel és mtsai., 2007; Leiser és mtsai., 2013; Munoz és mtsai., 2010; Wu és mtsai., 2011, 2012). Mivel a vaddisznó és a mezei nyúl eredetű törzsek genetikailag viszonylag jól elkülönülnek egymásról, ezért a sertések fertőződési forrása az izolált törzsek genotípusa alapján jól megbecsülhető.

Teve eredetű *B. melitensis* törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata

Bevezetés

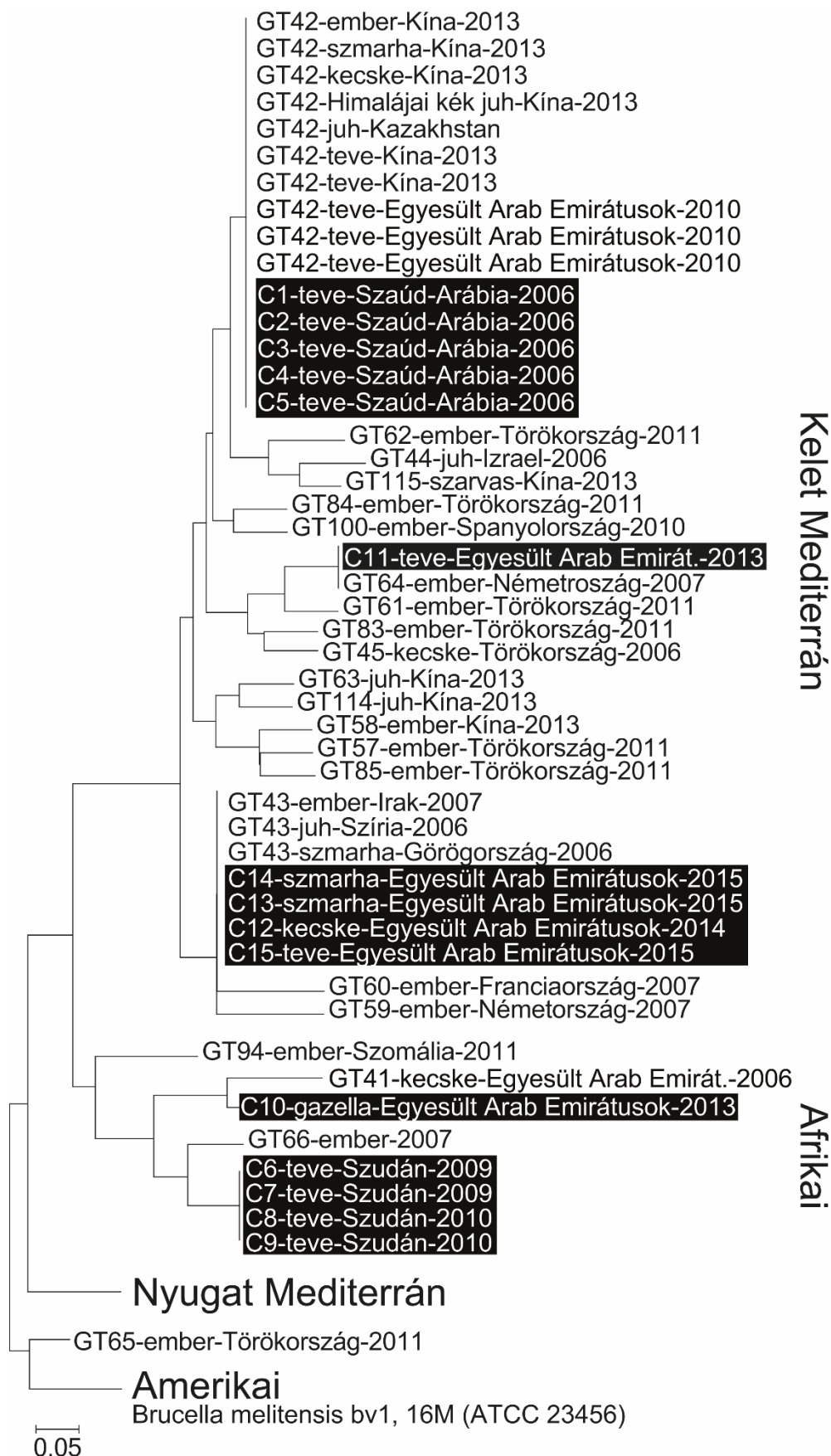
A brucellózis az egyik leggyakoribb zoonotikus betegség a Földön, évente 500 000 új, emberi megbetegedést regisztrálnak (Pappas és mtsai., 2006). Habár a világ számos pontján felszámolták a betegséget, egyes helyeken, mint amilyen az Arab-félsziget, továbbra is endémiás és jelentős közegészségügyi problémát jelent (Kiliç és mtsai., 2011). A *B. melitensis* és *B. abortus* által okozott teve brucellózis előfordulásáról Ausztrália kivételével valamennyi teve tenyésztő országban beszámoltak már (Wernery, 2014). A *B. melitensis* a kiskérődzők brucellózisának a kórokozója, de más állatfajokat, mint pl. a tevét is megbetegíti, illetve ez a baktérium felelős elsődlegesen az emberi *Brucella* fertőzésekért is.

A teve brucellózis előfordulása egyes területeken a 40%-ot is elérheti, ezáltal súlyos problémát jelent az érintett országoknak (Wernery, 2014). Ismereteink hiányosak a teve brucellózis járványtanára; a fertőzési forrásokra, állatról-állatra terjedésre és az állományon belüli perzisztálásra vonatkozóan (Schulze zur Wiesch és mtsai., 2010; Gwida és mtsai., 2012; Sprague és mtsai., 2012; Wernery, 2014). A teve brucellózis járványtanának jobb megértése elengedhetetlen a megfelelő védekezési eljárások kidolgozásához.

A vizsgálat célja az volt, hogy elsőként végezzük el egy púpú teve (*Camelus dromedarius*) eredetű *B. melitensis* törzsek összehasonlító genetikai vizsgálatát, melyhez alapvetően egy dubai teve telepről tíz éven át izolált törzsek gyűjteményét használtuk. Reményeink szerint eredményeink hozzásegítenek a teve brucellózis járványtanának jobb megismeréséhez és közvetve védekezési stratégiák kidolgozásához.

Eredmények

Az MLVA8 vizsgálat alapján az Egyesült Arab Emírátsokból származó 15 vizsgált *B. melitensis* törzs 5 különböző genotípusba sorolódott, melyek közül kettő új típusnak bizonyult. Az MLVA11 és 16 vizsgálat során további alcsoportokat határoztunk meg, az előbbivel hét, az utóbbival tíz genotípust különítettünk el. A Simpson diverzitás index az MLVA8 esetében 0,790 (0,705-0,876), az MLVA11 esetében 0,838 (0,724-0,952), míg az MLVA16 esetében 0,943 (0,891-0,994) volt. A vizsgált törzsek VNTR profiljait az MLVA adatbázis (<http://mlva.u-psud.fr>) tartalmazza. A minimum spanning tree és neighbor joining (14. ábra) módszerekkel készített törzsfák hasonló topológiát mutattak. Az Egyesült Arab Emírátsokból származó törzsek két fő genetikai kládba, a kelet-mediterrán és az afrikai kládba sorolódtak. Az emírátsi teve eredetű törzsek a helyi vad és házi kérődzőkből származó izolátumokkal vagy akár a világ más részeiről származó törzsekkel mutattak genetikai rokonságot. Ugyan limitált számú (11) tevéből származó izolátumot vizsgáltunk, azok a tevék földrajzi eredete vagy a mintavétel dátuma szerint kisebb genetikai csoportokat alkottak.



14. ábra: *B. melitensis* törzsek MLVA8 elemzése alapján készített neighbor-joining törzsfá. A Feketével kiemelve láthatóak az általunk vizsgált törzsek.

Megbeszélés

A vizsgált törzsek első csoportja (C1-C5, GT42) olyan állatokból származott, melyek Szaúd-Arábiából érkeztek 2006 folyamán. Ugyanebből a csoportból származó állatokból korábban már izoláltak és laboratóriumban történt emberi megbetegedéssel hoztak összefüggésbe egy *B. melitensis* törzset (Schulze zur Wiesch és mtsai., 2010). A genetikai vizsgálat eredményei alapján az látszik, hogy a vizsgált teve állományt sikeresen mentesítették ezektől a törzsektől szelekciós mentesítéssel 2006-ban.

Az izolátumok második csoportja (C6-C9, új genotípus) 2008 és 2010 között Szudánból érkezett tevékből származott. A farmon ezt követően újabb sikeres szelekciós mentesítést hajtottak végre. A C10, szintén egy új genotípusú törzs, egy homoki gazellából (*Gazella marica*) izolálták 2013-ban Abu Dhabiban. Bár a két új genotípus közeli rokonságban áll egymással, közvetlen járványtani kapcsolat nem ismert a 2008-2010 közötti dubai teve és a 2013-as abu dhabii gazella brucellózis esetek között. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy az afrikai/szudáni élő állat import hozzájárulhatott az afrikai kládba tartozó *B. melitensis* törzsek megjelenéséhez az Egyesült Arab Emírátságokban. Ez a feltételezést támasztja alá egy korábbi vizsgálat, mely során egy közeli rokon genotípusú törzset (GT41) mutattak ki kecskéből az országban (Le Flèche és mtsai., 2006), továbbá a kelet-afrikai teve import után a brucellózis esetek ugrásszerű megemelkedéséről számoltak be (Wernery, 2014).

A C11 izolátumot (GT64) egy másik emírátsági farmról vásárolt tevéből izolálták egy évvel a telepre érkezése után. A C15 törzset egy Szudánból érkezett nőstény tevéből tenyésztették ki hét évvel a megvásárlását követően. Mindkét állat a telepre érkezésük előtt karanténban volt, ahol többszörös brucellózis specifikus szerológiai vizsgálaton esett át, ezért feltételezéseink szerint ezek az állatok már a telepen betegedhettek meg. A fertőzés forrása ismeretlen, mivel a telep körbekerített és szigorú járványvédelmi intézkedésekkel rendelkezik. Időnként azonban vadállatokat (pl.: gazellákat) lehet látni a telep közelében, a kerítésen kívül, amik esetleg a brucellózis fertőzési forrásai lehetnek. Ugyanazt a *B. melitensis* genotípust sikerült kimutatni Dubai távolabbi részeiből származó kecske (C12) és tejelő szarvasmarha (C13 és C14) mintákból is. Közvetlen járványtani kapcsolatot nem sikerült kimutatni az esetek között, de a genetikai eredmények alapján feltételezhető egy olyan közös fertőzési forrás (pl. vadállatok, kiskérődzők), ami gyakori Dubai különböző területein.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy négy különböző forrásból érkezett *B. melitensis* törzs a vizsgált telepre és ezek közül kettő új MLVA8 genotípusnak bizonyult. Az első két esetben a Szaúd-Arábiából és Szudánból importált tevékkel került be a fertőzés az állományba. Mindkét esetben sikeresen mentesítették az állományt. Az utóbbi két fertőződés forrása nem teljesen

tisztázott, de feltételezhető, hogy az Egyesült Arab Emírátságokban széles körben elterjedt élőlény (kiskérődző, vadállat) lehet a kórokozó rezervoárja. Mindenesetre az MLVA segítségével sikeresen feltártuk az egyes teve eredetű *B. melitensis* törzsek közötti genetikai rokonságot és eredményeink hozzájárulhatnak a kórokozó elleni sikeres védekezéshez az Egyesült Arab Emírátságokban.

A Q-láz járványtanának vizsgálata

A *C. burnetii* prevalenciája Magyarországon: tejelő szarvasmarha állományok, juhászatok, kereskedelmi forgalomban kapható tejek és kullancsok felmérő vizsgálata

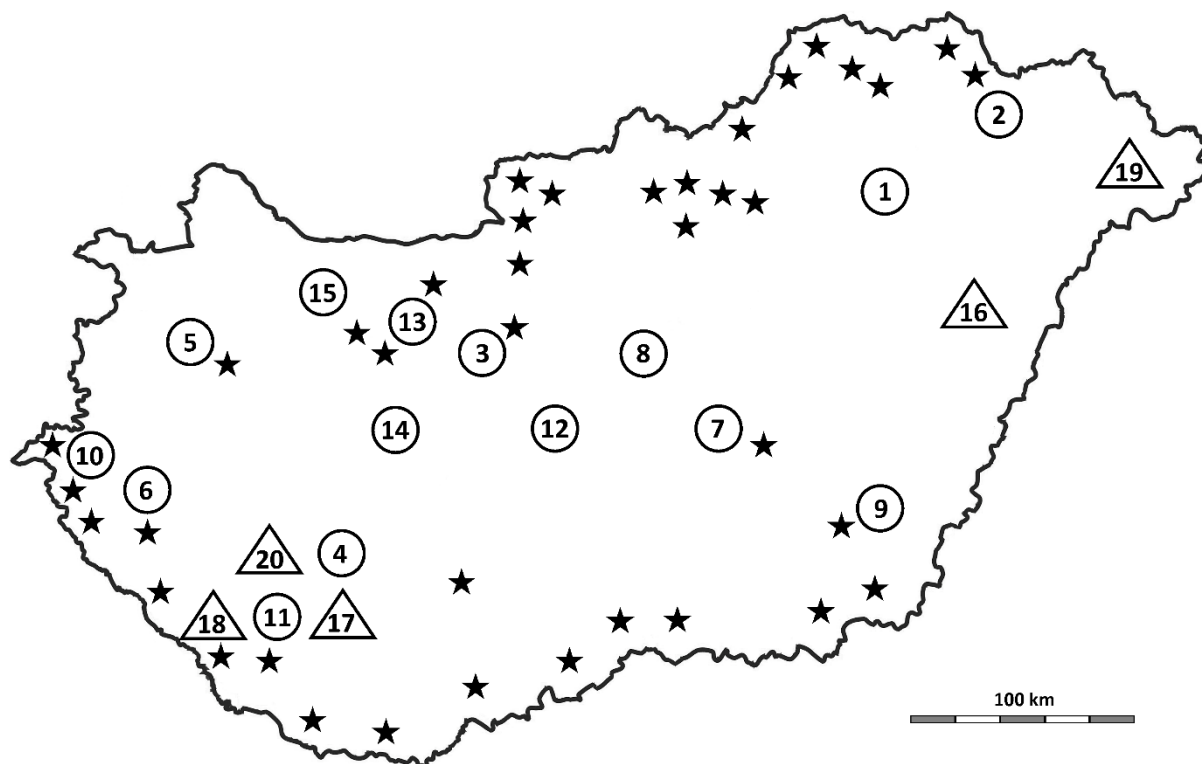
Bevezetés:

Világszerte kevés alapos és megbízható felmérő vizsgálat született a Q-láz előfordulására vonatkozóan (Guatteo és mtsai., 2011). Hazánkban az 1970-es években végezték az egyetlen Q-láz felmérő vizsgálatot (Romváry és mtsai., 1979). Vizsgálatunk célja így a *C. burnetii* prevalenciájának meghatározása volt Magyarországon.

Eredmények:

Az egyes állományok/minták földrajzi eredetét a 15. ábra, míg vizsgálati eredményeit az 5. táblázat tartalmazza. A tejelő szarvasmarha állományokban átlagosan 19,33%-os egyed szintű szeropozitivitást észleltünk a KK vizsgálatok során. Az esetek többségében (15,7%) alacsony (1:10-1:40), míg kisebb hányadában (3,7%) magasabb ($\leq 1/80$) titer értékeket tapasztaltunk. A vizsgált juh állományokban KK vizsgálattal nem tudtunk szeropozitivitást kimutatni. Az ELISA vizsgálatok során a szarvasmarha és juh állományokban 38,0%-os és 6,0%-os egyedi szeropozitivitást és 100,0%-os és 60,0%-os állomány szintű pozitivitást detektáltunk.

A tej minták valós idejű PCR vizsgálata során 8,7% (Ct 24,2-36,8) *C. burnetii* ürítést mutattunk ki szarvasmarhában és 4,0%-ot (Ct 34,5-35,1) juhban. A tanktej minták vizsgálata során a tejelő szarvasmarha állományok 66,7%-a (Ct 32,6-36,8) bizonyult Q-láz pozitívnak. A *C. burnetii* DNS-ét a vizsgált 9 kereskedelmi forgalomban kapható pasztörizált tej közül 8-ból sikerült kimutatnunk (Ct 27,7-34,8). Az 5402 kullancs (*Ixodes ricinus* /3222/, *Dermacentor marginatus* /369/, *D. reticulatus* /361/, *Haemaphysalis inremis* /315/, *H. concinna* /735/, *H. punctata* /22/) *C. burnetii* specifikus valós idejű PCR vizsgálata negatív eredménnyel zárult.



15. ábra: A vizsgálatba bevont tejelő szarvasmarha állományok (kör), juhászatok (háromszög) földrajzi lokalizációja és kullancs gyűjtések helyszínei (csillag). A körökben és háromszögekben található számok az 5-ös táblázatban található telep azonosítókkal egyeznek meg.

5. táblázat: A tejelő szarvasmarha és juh állományok KK, ELISA és valós idejű PCR vizsgálati eredményei.

faj	telep ID	KK (titer: 1/10-1/40), látens fertőzés*	KK (titer: 1/80 ≤), akut fertőzés*	ELISA**	egyedi tej minták valós idejű PCR **†	tanktej minták valós idejű PCR
szarvasmarha	1	6	1	7	1 (1)	+
	2	6	1	5	0	+
	3	3	2	5	3 (1)	+
	4	6	1	4	1 (1)	+
	5	5	1	6	1 (1)	+
	6	2	0	2	1	-
	7	1	0	3	0	+
	8	2	0	4	1 (1)	+
	9	2	0	2	0	-
	10	4	1	7	3 (2)	+
	11	1	0	1	0	-
	12	0	2	1	1 (1)	-
	13	1	0	1	0	-
	14	3	2	4	1 (1)	+
	15	5	0	5	0	+
	átlag %	47/300 (15.7 %)	11/300 (3.7 %)	57/150 (38.0 %)	13/150 (8.7 %)	10/15 (66.7 %)
juh	16	0	0	0	0	NV
	17	0	0	1	2	NV
	18	0	0	0	0	NV
	19	0	0	1	0	NV
	20	0	0	1	0	NV
	átlag %	0/100 (0 %)	0/100 (0 %)	3/50 (6.0 %)	2/50 (4.0 %)	NV

* 20 vizsgált egyed/állomány, ** 10 vizsgált egyed/állomány (előbbi 20 fele), † ELISA pozitív is, NV: Nem vizsgált

Megbeszélés

A KK próba napjainkban is laboratóriumok széles köre használja a *C. burnetii* okozta szerológiai áthangolódás kimutatására, mivel kiválóan alkalmazható az állomány szintű diagnózis felállítására. Eredményeink ugyanakkor alátámasztják a korábbi megfigyeléseket (WHO, 2010), miszerint a KK próba érzékenysége elmarad az ELISA vizsgálatétól. A KK próba előnye azonban, hogy a titer értékek alapján könnyen elkülöníthető egymástól a heveny és a krónikus fertőzés (OIE, 2010b). A nemzetközi ajánlásoknak megfelelően az ELISA eredményeket vettük alapul a valós prevalencia értékek meghatározása során (OIE, 2010b; Guatteo és mtsai., 2011). A tejelő szarvasmarha állományokban tapasztal egyedi és állomány szintű szeroprevalencia értékek meghaladták a nemzetközi átlagot (20,0% és 37,7%; Guatteo és mtsai., 2011). Ennek

egyik magyarázata az lehet, hogy a korábbi felmérő vizsgálatokat még akkor végezték, amikor csak kevésbé érzékeny diagnosztikai módszerek (Pl: KK próba) álltak rendelkezésre. Ezt a feltételezést támasztja alá a tanktej minták PCR vizsgálati eredménye, mely során hasonló állományszintű prevalencia értéket kaptunk, mint más kutatók (Guatteo és mtsai., 2011). A *C. burnetii* hazai juh állományokban tapasztalt állomány szintű előfordulása szintén meghaladta a nemzetközi átlagot (25,0%), míg az egyedi szintű prevalencia elmaradt a különböző országokból jelentett értékektől (15,0%; Guatteo és mtsai., 2011). Korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan mi is azt tapasztaltuk, hogy a fertőzött állatok egy része már azelőtt üríti a *C. burnetii*-t, és ezáltal fertőzési forrásként szolgál, hogy az ellenanyag válasz kimutatható lenne. Természetesen ez akár azt is jelentheti, hogy a fertőzött állatok egy része szerológiaiilag nem hangolódik át.

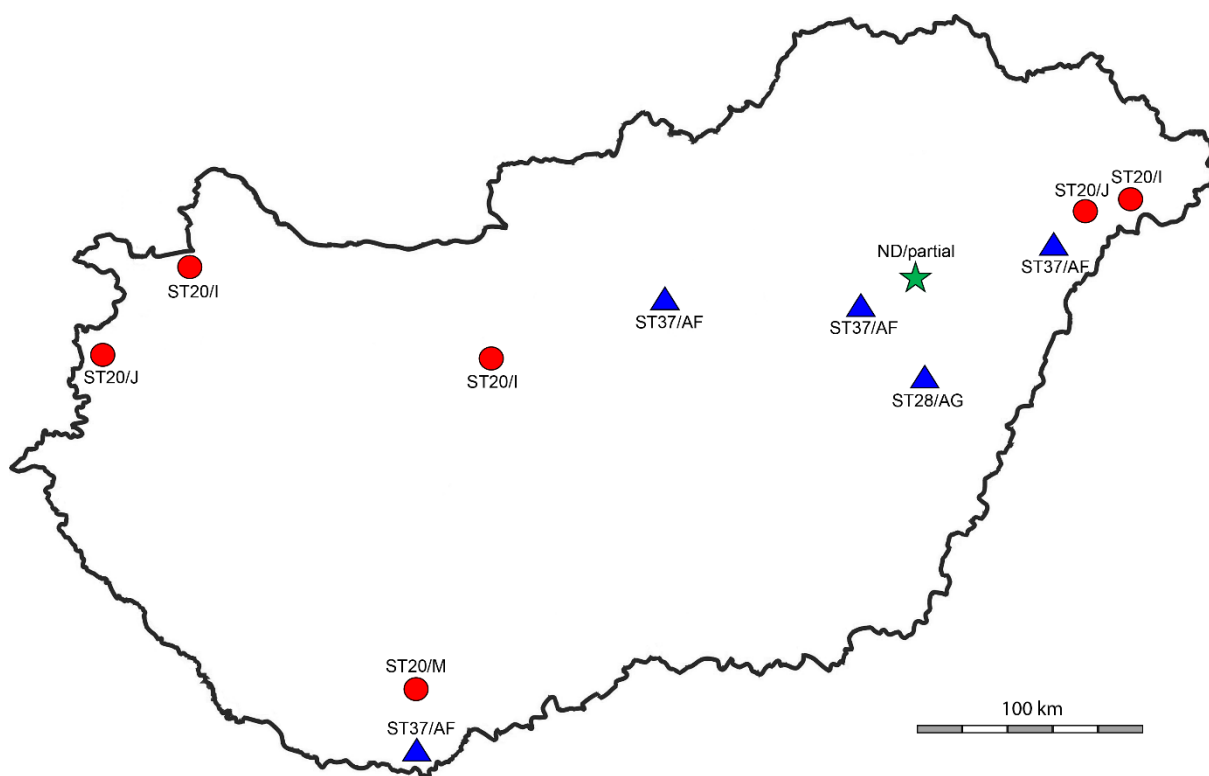
Ellentétben egy korábbi vizsgálattal mely során a Szlovákiában és Észak-Magyarországon gyűjtött kullancsok 2,6%-a (6/235) bizonyult *C. burnetii* pozitívnak (Spitalska és Kocianová, 2003), a jelen vizsgálat során nem tudtuk kullancsokban kimutatni a vizsgált baktériumot. Eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a kullancsok Hollandiához hasonlóan nem játszanak fontos szerepet a Q-láz hazai járványtanában (Sprong és mtsai., 2012). Valószínűsíthetően a házi kérődző állományok (pl.: tejelő szarvasmarhák) a *C. burnetii* fő rezervoárjai Magyarországon. A tejelő szarvasmarhákat zárt telepeken tartják, ahol elsősorban különböző váladékaik révén fertőzik egymást. Legelőre nem járnak, így a kullancs vektorok fertőzési forrásaiként sem szolgálhatnak.

Guatteo és munkatársai (2011) vizsgálataik során azt figyelték meg, hogy kevés jól megtervezett felmérő vizsgálat született, ahol kellően érzékeny diagnosztikai módszereket használtak volna a *C. burnetii* fertőzöttség felmérésére. Az adekvát prevalencia adatok ugyanakkor elengedhetetlenek a megfelelő járványvédelmi intézkedések meghozatalához. Vizsgálatunk során Magyarországra vonatkozóan igyekeztünk alapvető prevalencia adatokat szolgáltatni, bár a kecske és vad kérődző állományok, valamint a hüvelyváladékkal, vizelettel és bélsárral történő *C. burnetii* ürítés mértékének a felderítése további vizsgálatokat igényel.

Hazai állati és emberi eredetű *C. burnetii* törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata

Bevezetés

A *C. burnetii* törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata elengedhetetlen eleme a felmérő vizsgálatoknak és a járványtani nyomozásoknak. Semmilyen információval nem rendelkezünk a hazai *C. burnetii* populáció genetikai összetételéről. Ezért Magyarország különböző területeiről öt juh és öt szarvasmarha vetélt magzatburokból származó méhpogácsa mintát és egy szarvasmarha tej mintát gyűjtöttünk (16. ábra) a bennük található *C. burnetii* törzsek genotipizálása céljából. Egy heveny Q-láz fertőzésben (1:128 IgGII titer) szenvedő 72 éves férfi vérmintáját is bevontuk a vizsgálatba. A mintákat sporadikus fertőzések során gyűjtöttük, rutin diagnosztikai vizsgálatok alkalmával.



16. ábra: A vizsgálatba bevont szarvasmarhából (piros kör), juhból (kék háromszög) és emberből (zöld csillag) kimutatott *C. burnetii* törzsek földrajzi eredete, MST és MLVA genotípusa.

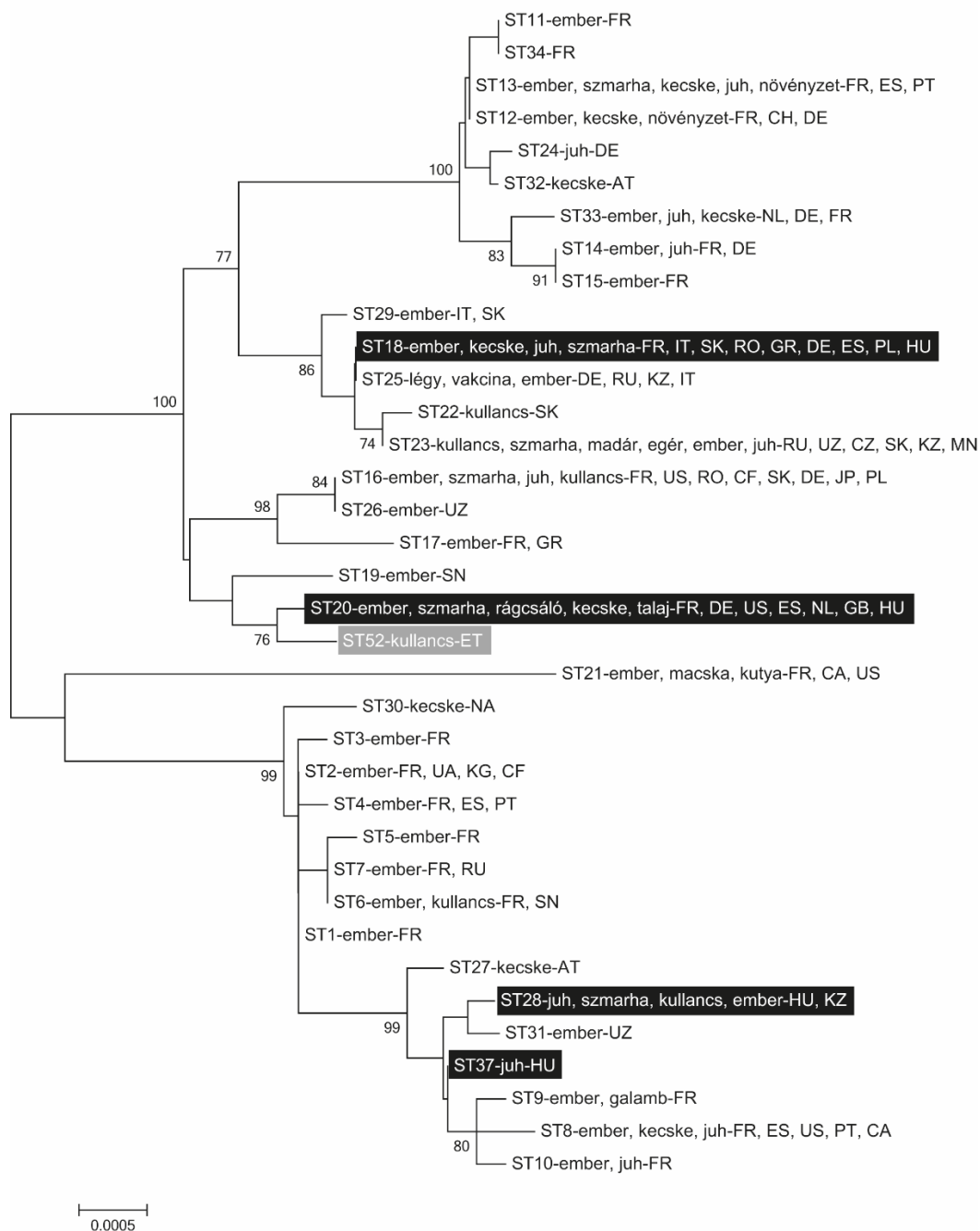
Eredmények

Mind a 12 vizsgált minta 33-as cycle threshold (Ct) érték alatti pozitivitást mutatott a *C. burnetii* specifikus valós idejű PCR vizsgálat során és egy kivételével elegendő DNS-t tartalmazott a teljes MST és MLVA genotípus meghatározáshoz. Az MST és MLVA adatokat a Dryadon (doi:10.5061/dryad.rc8q4) és az MLVA adatbázisban (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>) érhető el.

A hat szarvasmarha és az öt juh minta MST vizsgálata során egy új (ST37) és két korábban leírt (ST20, ST28) szekvencia típus (ST) előfordulását mutattuk ki (17. ábra). Az újonnan leírt ST37-es genotípus értékei a Cox2-Cox5-Cox18-Cox20-Cox22-Cox37-Cox51-Cox56-Cox57-Cox61 allélokra vonatkozóan az alábbiak szerint alakultak: 5-4-9-5-8-5-2-3-4-6.

A tizenegy juh és szarvasmarha minta MLVA vizsgálata során öt genotípust különítettünk el, melyek közül kettő új típusnak bizonyult. A szarvasmarha minták három MLVA típusba (I, J, M) sorolódtak, míg a juh minták adták a két új genotípust (AF és AG). Az emberi mintának a relatív magas DNS koncentráció (Ct 28,31) ellenére is csak részlegesen sikerült elvégezni a genotipizálását. A részleges VNTR profil az MLVA adatbázisban található egyik profillal sem mutatott egyezést, így feltételezhetően egy szintén új genotípusba tartozik. Legnagyobb hasonlóságot a juhokból kimutatott AG genotípussal mutatott, a meghatározott öt VNTR közül négy megegyezett.

MLVA típusuktól függetlenül valamennyi szarvasmarha eredetű minta 20-as szekvencia típusú *C. burnetii* törzset tartalmazott. A juh eredetű törzsek két MST típusba sorolódtak. A 28-as szekvencia típust adták az AG MLVA profilú törzsek, míg az újonnan javasolt 37-es szekvencia típusba az AF MLVA profilú törzsek sorolódtak. Tehát összefüggést találtunk a törzsek gazdafaji eredete és genotípusa között.



17. ábra: MST vizsgálataink során meghatározott hazai (fekete) és etiópai (szürke) *C. burnetii* törzsek és a világ más területein leírt törzsek rokonsági kapcsolatait megjelenítő Neighbor-joining filogenetikai fa. Rövidítések: Amerikai Egyesült Államok (US), Ausztria (AT), Csehország (CZ), Egyesült Királyság (GB), Etiópia (ET), Francia Guinea (GF), Franciaország (FR), Görögország (GR), Hollandia (NL), Japán (JP), Kanada (CA), Kazahsztán (KZ), Kirgizisztán (KG), Közép-Afrikai Köztársaság (CF), Lengyelország (PL), Magyarország (HU), Mongólia (MN), Namíbia (NA), Németország (DE), Olaszország (IT), Oroszország (RU), Portugália (PT), Románia (RO), Slovákia (SK), Spanyolország (ES), Svájc (CH), Szenegál (SN), Ukrajna (UA) és Üzbegisztán (UZ).

Megbeszélés

A *C. burnetii* izolátumok molekuláris jellemzése egy megfelelő módszer egy adott földrajzi régióban előforduló törzsek közötti genetikai kapcsolatok feltárására. Mind az MST és az MLVA módszer erőssége, hogy nagy felbontóképességgel rendelkezik és nem igényli a kórokozó előzetes izolálását.

Az MST és az MLVA módszerek segítségével feltártuk a magyarországi kérődző és humán eredetű *C. burnetii* törzsek genetikai sokféleségét. Vizsgálataink során három *C. burnetii* ST (ST20, ST28 és S37) előfordulását állapítottuk meg a hazai kérődző állományokban.

Az ST20-as genotípus széleskörű elterjedtségét tapasztaltuk világszerte. Kimutatták Franciaországban, Hollandiában, Németországban, Spanyolországban és az USA-ban szarvasmarha tejből, kecske méhlepényből, humán diagnosztikai mintából és talaj mintákból (Astobiza és mtsai., 2012; Glazunova és mtsai., 2005; Hornstra és mtsai., 2011; Pearson és mtsai., 2014; Tilburg és mtsai., 2012b). Az ST20-as genetikai mikrovariánsait is kimutatták a Föld különböző részeiről. Az I, J és M MLVA genotípusokat azonosítottak szarvasmarha tejben és tejtermékekben Európa (Franciaország, Hollandia, Portugália, Spanyolország, Svájc) és a világ (Katar, Szaúd-Arábia, stb.) különböző országaiban (Tilburg és mtsai., 2012a). Kecskék között kitört Q-láz járvány során szintén az ST20-as genotípust azonosították az Egyesült Királyságban (Reichel és mtsai., 2012). Következtetésként elmondhatjuk, hogy ugyan a 20-as szekvencia típusú *C. burnetii* törzset elsősorban szarvasmarha eredetű mintákból mutatták ki, időnként más gazdafajban is azonosították.

A 28-as szekvencia típusú törzseket korábban szarvasmarha, juh, *Hyalomma* sp. kullancsból és emberi vérmintákból mutatták ki Kazahsztánban (Glazunova és mtsai., 2005). Az ST37 az ST8, ST9, ST10, ST27, ST28 és ST31 genotípusokkal mutat közeli rokonságot, melyek jelenlétét emberekben mutatták ki Ausztriában, Franciaországban, Kazahsztánban Portugáliában és Üzbegisztánban, valamint juhban és kecskében Franciaországban, Kanadában, Spanyolországban és az USA-ban (17. ábra) (Astobiza és mtsai., 2012; Glazunova és mtsai., 2005; Hornstra és mtsai., 2011; Pearson és mtsai., 2014; Tilburg és mtsai., 2012b). A vizsgálataink során újonnan leírt AG és AF genotípusok közeli rokonságot mutatnak (2-3 lókuszt eltérés) a szintén Európában juh, kecske és emberi mintákból leírt AA és T variánsokkal. Ezeket a genotípusok szintén elsősorban juhban és kecskében fordulnak elő, ami egy újabb bizonyítéka a gazdafaj adaptációnak (Pearson és mtsai., 2014). Feltételezéseink szerint még akár valamiféle kapcsolat is lehetett a jelen kutatás során vizsgált emberi és juh (AG MLVA genotípus) esetek között, mivel a két törzs genetikailag közel áll egymáshoz.

Sem az MST, sem az MLVA vizsgálat során nem tudtunk genetikai rokonságot kimutatni a hazai *C. burnetii* törzsek és a 2007-es hollandiai járványt okozó izolátumok (ST33) között (Tilburg és mtsai., 2012a,b). A hazai törzsek ugyancsak különböztek a korábbi években Közép-Európai más országaiban azonosított baktériumoktól (Glazunova és mtsai., 2005; <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>; http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/MST_Coxiella/mst/).

Eredményeink alap adatokat szolgáltatnak a magyarországi *C. burnetii* populáció genetikai sokszínűségéről. A megvizsgált 12 hazai szarvasmarha, juh és emberi eredetű törzs 3 MST (közülük 1 új) és 5 MLVA (közülük 2 új) genotípusba sorolódott. Összefüggést találtunk a törzsek gazdafaji eredete és genotípusa között, ami megerősíti Pearson és mtsai. (2014) gazdafaj adaptációs evolúciós hipotézisét. Eredményeink hozzájárulnak az európai *C. burnetii* monitoringhoz is.

Új *C. burnetii* genotípusok kimutatása etiópai kullancsokból

Bevezetés

A házi kérődző állományok gyakran tünetmentes hordozói a *C. burnetii*-nek, de időnként vetélést is okozhat a kórokozó (Maurin és Raoult, 1999). Közel 40 kullancs fajban mutatták már ki a *C. burnetii* jelenlétét, melyek természetes rezervoárjaiként és vektorjaiként is szolgálhatnak a kórokozónak (Porter és mtsai., 2011).

Etiópiában Philip és mtsai. (1966) mutatták ki először a *C. burnetii* jelenlétét szarvasmarháról gyűjtött kullancsokban. KK próbával vizsgált addis abebai vágóhídi munkások között 6,5% szeroprevalenciát állapítottak meg (Abebe, 1990). ELISA vizsgálatok alapján Etiópiában a Q-láz prevalenciája 31,6% szarvasmarhában, 90,0% tevében és 54,2% kecskében. Ezek Afrika más részein mért értékekhez képest magasabbak (Gumi és mtsai., 2013).

Vizsgálatunk célja szarvasmarháról gyűjtött kullancsokban kimutatott *C. burnetii* törzsek genetikai karakterizálása és összehasonlítása a világ más tájain kimutatott *C. burnetii* izolátumokkal.

Eredmények

Összesen 296 kullancsot (*Amblyomma variegatum*, n=118; *A. cohaerens*, n=100; *A. lepidum*, n=2; *Rhipicephalus decoloratus*, n=50; *R. evertsi*, n=17; *R. praetextatus*, n=8 and *Hyalomma rufipes*, n=1) gyűjtöttünk össze 18 különböző zebu csordába tartozó 109 szarvasmarháról a délnyugat etiópai Didessa völgyben 2012-ben. A *C. burnetii* specifikus valós idejű PCR

vizsgálat során 32 pozitív kullancsot azonosítottunk, melyek közül 8 (*Amblyomma cohaerens*, n=6; *A. variegatum*, n=2) tartalmazott elegendő DNS-t ($C_t < 35$) a további genetikai vizsgálatokhoz.

Az MST analízis során egy új szekvencia típust (ST52) azonosítottunk a vizsgált kullancs mintákban (17. ábra). Az 52-es szekvencia típus allél értékei 3-9-6-1-5-4-4-10-6-5 voltak a Cox2-Cox5-Cox18-Cox20-Cox22-Cox37-Cox51-Cox56-Cox57-Cox61 lókuszokra vonatkozóan. Ez nem csak már ismert allélok új kombinációját jelentette, hanem egy eddig ismeretlen Cox5-ös allél felfedezését is, aminek a Cox5.9 (GénBank azonosító: KJ473948, KJ473949) elnevezést javasoltuk.

Az MLVA módszer segítségével két új genotípust írtunk le. A 24-es genotípust a *Coxiella* MLVA adatbázis nomenklatúrája alapján vagy a korábbi publikációk nevezéktana alapján AH genotípust mindkét vizsgálat *Amblyomma* kullancs fajban, a 26-os vagy AI genotípust az *A. cohaerens*-ben. A genotípusok Ms23-Ms24-Ms27-Ms28-Ms33-Ms34 markerekre vonatkozó allél értékei 6-12-2-7-10-10 volt a 24/AH genotípus és 2-12-2-7-8-10 a 26/AI variáns esetében (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>).

Három *A. cohaerens* mintából csak részleges *C. burnetii* MLVA genotípust sikerült kinyernünk, feltételezhetően az alacsony DNS tartalom (magas C_t érték) miatt. A HSE-167-es és HSE-170-es mintákból meghatározott részleges profil alapján feltételezhetően a 26/AI genotípust azonosítottuk, míg a HSE-210-es minta részleges profilja alapján akár mindkét MLVA típusba (26/AI vagy 24/AH) tartozhat.

Megbeszélés

Mindkét módszer segítségével új *C. burnetii* genotípusokat azonosítottunk a vizsgált kullancs mintákban (Astobiza és mtsai., 2012; Glazunova és mtsai., 2005; Klaassen és mtsai., 2009; Loftis és mtsai., 2006; Tilburg és mtsai., 2012a,b; http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/MST_Coxiella/mst/; <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>). Sajnos az elmúlt évek során több publikáció is megjelent, amelyben az akkor újonnan leírt MST típusok (ST 35-51) allél kódjait/szekvenciáit nem tették hozzáférhetővé, ezért nem lehet teljes bizonyossággal kijelenteni, hogy az általunk felfedezett ST52 mindent kétséget kizáróan újonnan leírt genotípusnak tekinthető (Angelakis és mtsai., 2014; Mediannikov és mtsai., 2010). Az MST és különböző MLVA rendszerek közötti adat egyeztetési/harmonizációs hiányosságok további nehézséget jelentenek az eredmények kiértékelése során.

Kevés ismerettel rendelkezünk az afrikai *C. burnetii* törzsek genetikai sokféleségéről. Az ST2-es és 16-os genotípust Közép-Afrikában, az ST30-ast Namíbiában, míg az ST6-os, 9-es és az

ST35 és 36-os variáns részleges szekvenciáit mutatták ki eddig Afrikában kullancs és emberi eredetű mintákból (Angelakis és mtsai., 2014; Glazunova és mtsai., 2005). Az általunk újonnan azonosított ST52-es genotípus közeli rokonságot mutat a világszerte elterjedt 20-as szekvencia típussal. Az ST20-as genotípus jelenlétét kimutatták már az Egyesült Államokban, az Egyesült Királyságban, Franciaországban, Hollandiában, Magyarországon, Németországban és Spanyolországban. Ez a genotípus leggyakrabban szarvasmarhákban fordul elő, de leírták már más állatfajokból is (Astobiza és mtsai., 2012; Glazunova és mtsai., Hornstra és mtsai., 2011). Az ST52 ugyancsak rokonságot mutatott az ST19-cel, melyet korábban egy emberi mintából mutattak ki Szenegálban (Glazunova és mtsai., 2005).

Az MLVA vizsgálat során az 52-es szekvencia típust további két variánsra (24/AH és 26/AI) bontottuk. Ezt a két újonnan leírt MLVA genotípus szintén szarvasmarhából leírt *C. burnetii* típusokkal mutattak rokonságot. Például a 24/AH variáns a 25/L típustól, melyet egy szlovák tej mintából mutattak ki, csupán az Ms24-es lókuszon különbözött egy ismétlődő régiónyi egységben (12 helyett 13 kópia) (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>).

Mindkét genotipizáló vizsgálat során azt találtuk, hogy az általunk leírt genotípusok, más, a világ különböző részeiről kimutatott szarvasmarha eredetű genotípusokkal mutatnak közeli rokonságot. Ez egybevág azzal, hogy az általunk vizsgált kullancsokat zebu szarvasmarhákról gyűjtöttük. Eredményeink megerősítik a korábbi eredményeket, hogy az egyes *C. burnetii* genotípusok erős gazdafaj adaptációval rendelkeznek (Tilburg és mtsai., 2012a; http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/MST_Coxiella/mst/).

Vizsgálataink során genetikai információval szolgáltunk a kevésbé vizsgált afrikai *C. burnetii* populációról. Az etióp szarvasmarhákról gyűjtött 8 kullancs mintában található *C. burnetii* törzseket egy újonnan leírt MST (ST52) és két, új MLVA (24/AH és 26/AI) genotípusba soroltuk. Valamint újabb bizonyítékkal szolgáltunk az egyes *C. burnetii* variánsok erőteljes gazdafaj adaptációjáról.

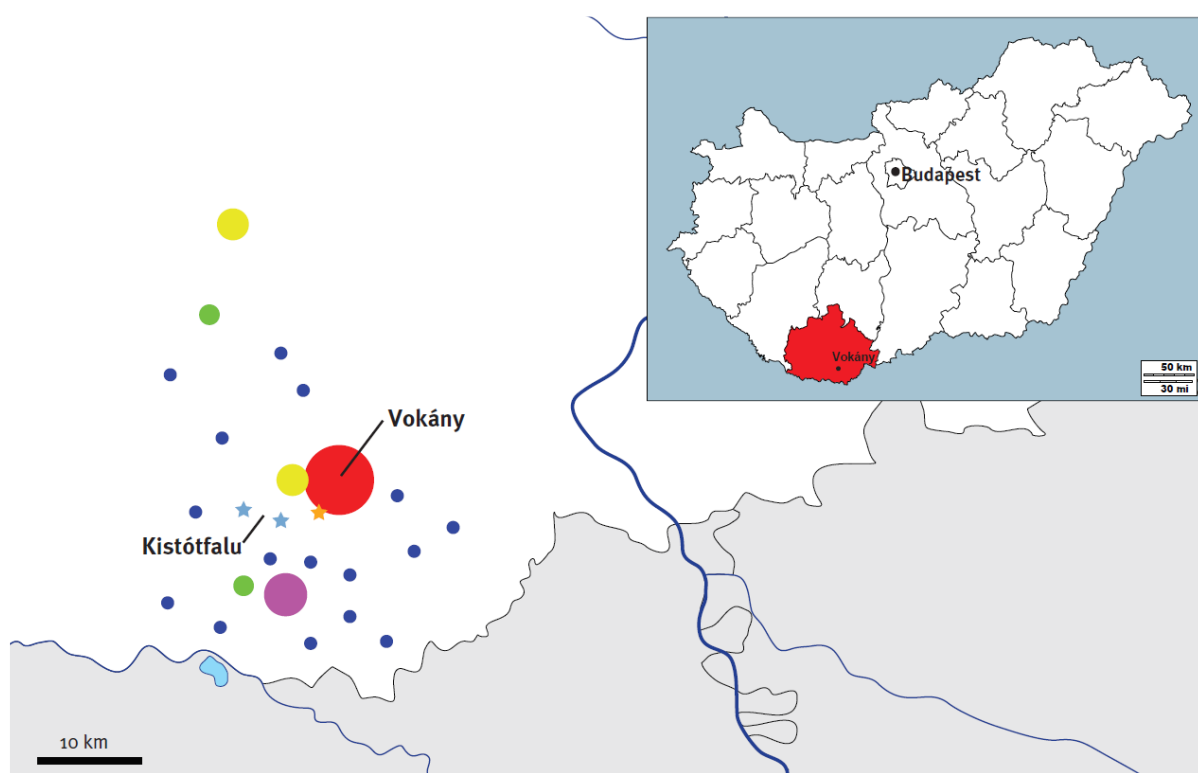
Egy hazai Q-láz járvány ismertetése

Bevezetés

A kutatás célja a 2013 tavaszán és nyarán Baranya megyében lezajlott Q-láz járvány járványtani, intézeti diagnosztikai és molekuláris epidemiológia vizsgálatainak bemutatása.

Eredmények

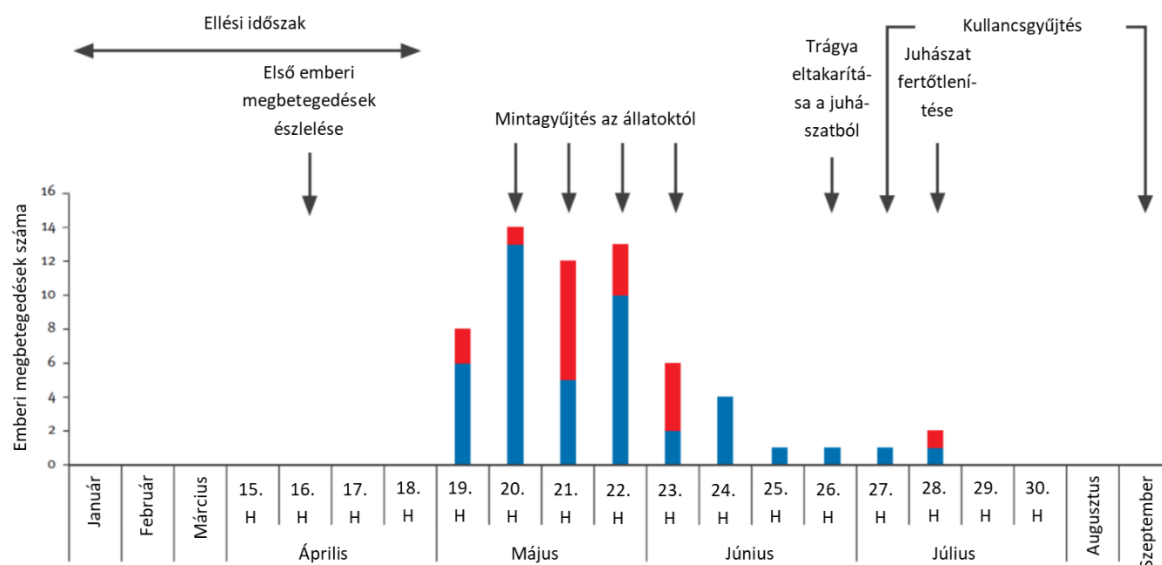
A járvány gócpontja egy körülbelül 10 km²-es dombos, erdőkkel, mezőkkel és mezőgazdasági területekkel tarkított terület volt a Baranya megyei Vókány (851 fő) és Kistótfalu (321 fő) települések területén (45.90 °N, 18.33 °E) (18. ábra). A terület kontinentális klímájú, de 2013-ban egy szokatlanul hideg és havas márciust egy meleg, száraz és időnként szeles április követett. Egy Vókány melletti merinó juh állomány (450 anyajuh), egy kis létszámú tehenészet (40 állat), egy kis létszámú, vegyes juh és kecske állomány (20 állat) és néhány háztáji kérődző képezte a terület állatállományát. A vizsgált évben a juhok ellési időszaka januártól ápriliséig tartott a területen.



18. ábra: A Q-láz járvánnyal érintett terület Baranya megyében. piros kör: 29 humán eset, lila kör: 11 humán eset, sárga körök: 6-6 humán eset, zöld körök: 2-3 humán eset, kék körök: egyedi humán esetek, narancssárga csillag: merinó juhászat (450 állat), világoskék csillagok: szarvasmarha állomány (40 állat) és vegyes juh-kecske telep (20 állat).

A közegészségügyi szolgálat a május 8-án rutin légzőszervi kórokozó vizsgálatra érkezett, április 17. óta lázas tüneteket mutató nyolc beteg vérmintájából hatban *C. burnetii* specifikus 2-es fázisú IgM-et mutatott ki más légzőszervi kórokozók kizárása mellett. Ezt követően minden fertőzés gyanús emberi esetet (magas láz és tüdőgyulladásra utaló röntgen leletet mutató beteg, aki április 4. után az érintett földrajzi területen megfordult) Q-láz specifikus szerológiai vizsgálatnak vetettek alá, valamint a Baranya megyei közegészségügyi szolgálat járványtani nyomozásba kezdett. A vérminta vétel a helyi körzeti orvosi rendelőkben és kórházakban, míg a minták feldolgozása egy központi laboratóriumban történt.

Április 17. és július 31. között 176 fertőzés gyanús, magas lázzal, légzőszervi tünetekkel, fejfájással és mellkasi fájdalommal járó emberi megbetegedést regisztráltak. Az esetek közül 103 férfi, 73 pedig nő volt. A betegek 14 és 84 év közöttiek voltak. A megbetegedett emberek többsége vókanyi vagy kistótfalui lakos volt, de néhány beteg csak átmenetileg érintkezett a járvány gócpontjával. Huszonhat beteg kórházi ellátásra szorult, de halálos kimenetelű megbetegedés nem történt (19. ábra).



19. ábra: A járvány lefolyása és a diagnosztikai vizsgálatok időbeli sorrendje. Az oszlopok (kék: férfi, piros: nő) az igazolt emberi fertőzések számát jelzik az első vérvétel időpontja szerint.

A MIF vizsgálati eredmények alapján a 176 fertőzés gyanús emberi megbetegedés közül 100 ember *C. burnetii* szeronegativnak bizonyult, míg 76 egyén feltételezett fertőzöttként lett diagnosztizálva. Száztizenhét emberből sikerült savópár mintákat venni és 70 esetben (60%) állapítottunk meg igazolt Q-láz fertőzést (szerológiai áthangolódás történt és/vagy emelkedett

/nagyobb, mint 1:252/ IgGII/IgGI szintet detektáltunk a savópár vizsgálat során). Az igazolt esetek között többsége férfi volt (45 férfi, 25 nő). A 26 kórházi ellátásra szorult beteg közül 15-nél igazoltuk a *C. burnetii* fertőzést. A valós idejű PCR vizsgálat során a 26 alvadásban gátolt vérminta közül háromból, míg az 51 savó minta közül 17-ből tudtuk a kórokozót kimutatni (Ct 29,4-36,1) 1-3 héttel a klinikai tünetek megjelenését követően. Az idő előrehaladtával a kimutathatóság csökkent; a fertőzés első hetében vett minták 48%, második hetében vett minták 23%, míg a harmadik héten vett minták közül viszont egy sem mutatott PCR pozitivitást. Az összesen 20 PCR pozitív ember közül 19-ben tudtunk szerológiai áthangelódást kimutatni. A differenciál diagnosztikai szempontból jelentős egyéb kórokozókat (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Ch. psittaci*, *Legionella* spp.) laboratóriumi vizsgálattal zártuk ki. Három hetes doxiciklin (200mg/nap) terápiában részesítettünk valamennyi igazoltan Q-láz fertőzött beteget és a járvánnyal érintett területről származó gyanús esetek döntő többségét (pontos szám ismeretlen) is. Valamennyi beteg számára a fertőzés szerológiai nyomon követését, IgGI titerének ellenőrzését javasoltuk, mert a tartósan magas (≥ 800) titer értékek krónikus Q-láz fertőzés kialakulására utalhatnak. Sajnos 2014. júniusáig harmadik savó minta a 70 igazolt Q-láz fertőzött ember közül csak 21-től érkezett vizsgálatra, és mindnél magas (≥ 512) IgGII/IgGI titer értékeket detektáltunk.

A vókányi merinó juh állományból 56 savó és 20 tejminta, míg a többi állatállomány valamennyi egyedétől érkezett minta laboratóriumi vizsgálatra. Valamennyi telep ellető istállójából trágya mintákat is gyűjtöttünk. A juhászatból gyűjtött savó minták 23,2%-a (13/56) és 44,6%-a (25/56) bizonyult pozitívnak a KK és ELISA vizsgálatok során. A valós idejű PCR vizsgálat alkalmával a 20 egyedi tej minta közül 4-ből tudtuk kimutatni a kórokozót (Ct 30,1-33,5), míg a trágya minták kétharmada (41/65, Ct 28,9-36,82) bizonyult pozitívnak. A 4 PCR pozitív juh közül 2 ELISA pozitív is volt. A járvánnyal érintett területen található tehenészetből és juh-kecske vegyes állományból gyűjtött vérminták esetén 11 a 40-ből, és 2 a 20-ból bizonyult pozitívnak az ELISA vizsgálat során, illetve egy tehéntej mintából sikerült kimutatnunk a *C. burnetii* DNS-ét (Ct 33,7). Ebből a két kisebb állat állományból gyűjtött trágya minták, valamint a háztáji állatoktól gyűjtött vér, tej és trágya minták *C. burnetii* specifikus laboratóriumi vizsgálatai negatív eredménnyel zárultak.

Július és szeptember között csak 7 kullancsot (5 *I. ricinus* és 2 *H. concinna*) kullancsot sikerült a merinó juh állomány legelőjéről begyűjtenünk. Ezért a vizsgálatokba bevontunk 115 gyűjteményben tárolt kullancsot, amit 2011-2012 folyamán gyűjtöttünk a merinó juhászattal akkor együtt tartott két kutyáról (4 *D. marginatus*) és 23 kecskéről (91 *I. ricinus* és 20 *H.*

concinna). A kecskékről gyűjtött 2011-es archivált minták közül 5 kullancsból (3 lárv, 1 nimfa, 1 nőtény) tudtuk kimutatni a *C. burnetii* DNS-ét (Ct 35,0-36,58).

Az MST vizsgálat során egy humán mintából és a merinó juhászatból gyűjtött két trágya mintából egyaránt ST18-as *C. burnetii* genotípust sikerült kimutatnunk (17. ábra). A minták MLVA mintázata szintén majdnem megegyezett; 4/5-9-3-3-0-5 (Ms23-Ms24-Ms27-Ms28-Ms33-Ms34). A kullancs és szarvasmarha mintából kimutatott *C. burnetii* genotipizálása nem volt sikeres a minták alacsony DNS tartalma miatt.

Megbeszélés

Hetven igazolt emberi megbetegedést diagnosztizáltunk a 2013-as Baranya megyei Q-láz járvány során. A szerológiai és valós idejű PCR vizsgálatok segítségével sikerült néhány nap alatt pontos diagnózist adnunk az első betegekkel kapcsolatban, ami lehetővé tette a további fertőzés gyanús emberek célzott vizsgálatát és terápiáját. A két módszer kombinált alkalmazása szintén megfelelőnek bizonyult a helyes diagnózis felállításához a fertőzés korai, első két hetes stádiumában. A járvány forrásaként a vókányi merinó juhászatot azonosítottuk. Érdekes módon a juhász nem tapasztalt a szokásosnál nagyobb számú szaporodás biológiai problémát a januártól áprilisig tartó ellési időszak alatt. A vizsgálat során megállapított 44,6%-os szeropozitivitás viszont sokkal magasabb volt, mint a korábbi magyarországi felmérő vizsgálat során a juhászatokban tapasztalt 6,0%-os prevalencia, ami egyértelműen járványra utalt (Gyuranecz és mtsai., 2012).

A járvány kórokozója egy 18-as szekvencia típusú *C. burnetii* törzs volt. Ez alapján egyértelmű, hogy a Baranya megyei járvány nem állt oktani kapcsolatban a 2007-2009-es holland járvánnyal, amit elsősorban az ST33 okozott (Huijsmans és mtsai., 2011; Tilburg és mtsai., 2012a). Korábban az ST18 jelenlétét Franciaországban, Németországban, Olaszországban, Romániában és Szlovákiában mutatták ki (Glazunova és mtsai., 2005). Közelmúltban Belgiumban egy emberi vérmintából szintén kimutatták a 18-as szekvencia típusú, vagy ahhoz nagyon közel álló *C. burnetii* törzset (Huijsmans és mtsai., 2011). A genetikai vizsgálataink során szintén igazolást nyert, hogy az Baranya megyei emberi Q-láz megbetegedések forrása a vókányi juhászat volt. Az Ms23-as lókuszon tapasztalt egy ismétlődő régiónyi különbség a juh és emberi törzs között minden valószínűség szerint a lókusz magas mutációs rátájával magyarázható (Tilburg és mtsai., 2012b). Feltételezésünk szerint a *C. burnetii*-t tartalmazó méhváladékkal szennyezett és beszáradt trágyát a szél fújhatta el a telepről a települések irányába. Ezt a feltételezést támasztja alá annak a beteg esete is, akinek a mintájából a genotipizálást végeztük. Ennek az embernek semmilyen közvetlen kapcsolata nem volt a

juhászattal. Egy másik közeli faluban lakott, de valószínűleg egy Vókány közeli domboldalban fertőződhetett miközben ott mezőgazdasági munkát végzett. A járványtani adatok, a laboratóriumi vizsgálati eredmények és az emberi megbetegedések nagy száma miatt nagy valószínűséggel kizárható a kullancs vagy nyers tej fogyasztása közvetítette fertőzés. Az ST18-as genotípusú törzs eredete ismeretlen, Magyarország területén elsősorban az ST20-as (szarvasmarha) és az ST28-as és ST37-es (juh) genotípusok fordulnak elő (Sulyok és mtsai., 2014).

A merinó juhászatban járványvédelmi intézkedéseket vezettek be. A trágyát eltávolították a telepről 2013 júniusában, majd a helyszínt fertőtlenítették (VIROCID, Cid Lines Inc, Belgium és Disinflex, Hexachem Kft, Magyarország) júliusban. Ezt követően újabb akut emberi Q-lázás megbetegedést nem regisztráltak a régióban. Egy évvel később, 2014 májusában trágya és tej mintákat gyűjtöttünk a vókányi juhászatból és annak 30 km-es körzetében található valamennyi állattartó telepről, melyek *C. burnetii* specifikus valós idejű PCR vizsgálata negatív eredménnyel zárult. Elővigyázatosságból 2014. júniusában a juhászatot újra fertőtlenítették.

A *C. burnetii* kimutatása házi és vadon élő kérődzők egészséges és vetélt magzatburok mintáiból Magyarországon

A vizsgálat célja az volt, hogy felmérjük, hogy a *C. burnetii* milyen szerepet játszik a házi és vadon élő kérődzők vetéléses kórképeiben. A kutatáshoz méhpogácsa mintákat gyűjtöttünk 111 házi kérődző (85 szarvasmarha, 21 juh, 5 kecske) vetélt magzatburkából és 91, vadászatok során elejtett vad kérődző (33 őz *Capreolus capreolus*/, 22 dāmivad *Dama dama*/, 36 gímszarvas *Cervus elaphus*/) egészséges magzatburkából.

Eredmények

A szarvasmarha magzatburok minták 26%-ból (22/85) tudtunk valós idejű PCR-rel *C. burnetii* DNS-t kimutatni, ami nagyságrendileg megegyezik a korábban hazánkban végzett felmérő vizsgálat során talált egyedi szeropozitivitási adatokkal (38%, 57/150) (Gyuranecz és mtsai., 2012). A vizsgálat esetek 3,5%-ban (3/85) tudtunk magas DNS tartalmat detektálni (Ct 14,12-17,06), de magzatburok gyulladást nem tapasztaltunk, és a fertőzést IHK-val sem tudtuk megerősíteni (6. táblázat). Egyéb baktérium okozta magzatburok gyulladást 6 esetben, míg gomba okozta fertőzést egy esetben diagnosztizáltunk a kórszöveti vizsgálat során. További egy esetben vaszkulitisszel társult magzatburok gyulladást észleltünk, bakteriális vagy gombás

fertőzés kizárása mellett és a *C. burnetii* PCR pozitivitás is határérték alatti volt (Ct 39,68). Egy esetben *C. burnetii* és *Waddlia chondrophila*, két esetben pedig *C. burnetii* és ismeretlen *Chlamydiales* faj kevert hordozását mutattuk ki PCR-rel.

6. táblázat: Házi és vadon élő kérődzők magzatburok mintáinak *C. burnetii* specifikus valós idejű PCR, kórszövettani és IHK vizsgálatainak eredményei *

Gazdafaj	Mintaszám	PCR	magzatburok gyulladás		IHK
			Specifikus	Nem specifikus	
szarvasmarha	85	22 (3)	0	8	-
juh	21	10 (8)	3	7	3
kecske	5	1 (1)	-	-	-
gímszarvas	36	2	0	1	-
őz	33	-	NV		NV
dámvad	22	-	NV		NV

*Minden mintán elvégeztük a PCR vizsgálatot, de csak a PCR pozitív mintákat vizsgáltuk tovább kórszövettani és IHK módszerekkel. A PCR vizsgálati eredmények esetén zárójelben azt soroltuk fel, hogy a *C. burnetii* pozitív minták közül hány bizonyult *Chlamydiales* pozitívnak is. -: negatív; NV: nem vizsgált

A *C. burnetii* DNS-ét a juh vetélés minták 47,6%-ból (10/21) sikerült kimutatnunk, ami sokkal magasabb értéket jelent mint a korábbi szerológiai felmérő vizsgálat során tapasztalt 6% (3/50) (Gyuranecz és mtsai., 2012). Az összes PCR pozitív mintában méhgyulladást is diagnosztizáltunk a kórszövettani vizsgálat során (6. táblázat). Három PCR pozitív esetben (Ct 8,51-13,07) kórszövettani és IHK vizsgálattal is megerősítettük a fertőzést, így feltételezésünk szerint a *C. burnetii* oktani szerepet játszott a vetélés kialakulásában. Csak öt kecske magzatburok mintát volt lehetőségünk megvizsgálni, és közülük csak az egyikből tudtuk kimutatni a *C. burnetii* jelenlétét (Ct 35,3). A vad kérődző minták közül két gímszarvasból származó méhpogácsa mintából sikerült a *C. burnetii*-t kimutatni a PCR vizsgálat során (5,55%, 2/36, Ct 34,73 és 35,98).

Megbeszélés

Korábbi kísérletes fertőzések során nem tudták igazolni a *C. burnetii* szerepét szarvasmarhák vetéléseinek kiváltásában. Feltételezhetően még endemikusan fertőzött területeken is csak ritkán okoz vetélést szarvasmarhában (Angerholm, 2013). Vizsgálatunk során tapasztalt magas Ct értékek (22,3%, 19/85) és az antigén kimutatás hiánya arra enged következtetni, hogy a *C.*

burnetii csak szubklinikai megbetegedést okoz szarvasmarhában és Magyarországon sem tekinthető jelentős vetélést okozó kórokozónak. Vizsgáltunk során IHK-val megállapított *C. burnetii* okozta juh vetélések száma (14,3%, 3/21), illetve egy korábbi hazai vizsgálat eredményei (2%, 5/246) meghaladják Európa más részein tapasztalt prevalenciát (kb. 1% vagy az alatt) (Angerholm, 2013). Tíz *C. burnetii* pozitív magzatburok mintából 8 *Chlamydia abortus* pozitív is volt a PCR és IHK vizsgálat során. A *C. abortus* fertőzésre jellemző savós vagy elhalásos magzatburok gyulladás 7 *C. burnetii* pozitív (Ct 30,59-37,23) mintában szintén megfigyelhető volt. A juh vetélések során gyakran fennálló szubklinikai *C. burnetii* fertőzés és a Baranya megyei Q-láz járvány felhívja a figyelmet a hazai juhászatok higiéniai helyzete javításának a szükségességére (Gyuranecz és mtsai., 2014). Az elmúlt évek vizsgálatai azt mutatták, hogy a Q-láz okozta vetélés sokkal gyakoribb kecskében, mint juhban vagy szarvasmarhában (Angerholm, 2013). Szemben az intenzív kecske tenyésztő országokkal (pl.: Hollandia: 1 160 000 egyed), Magyarországon viszonylag kevés kecskét tartanak (55 000 egyed) és azokat is inkább kisebb, 1-50 állatot számláló telepeken (Magyar Juh és Kecsketenyésztő Szövetség: <http://mjksz.hu/>), ami magyarázatul szolgálhat a hazai *C. burnetii* okozta kecske vetélések alacsony számára. A vad kérődzőkre vonatkozóan egy korábbi spanyol vizsgálat áll rendelkezésre, ahol a mi vizsgálatunkhoz hasonlóan a gímszarvas minták 5,1%-ból (4/78) mutatták ki a *C. burnetii* DNS-ét, míg a szerológiai vizsgálat során 15,4% (6/39) és 29,3% (34/116) szeropozitivitást találtak őzben és gímszarvasban (Astobiza és mtsai., 2011, Ruiz-Fons és mtsai., 2008).

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a *C. burnetii* igen elterjed a hazai házi kérődző állományokban. Elsősorban kiskérődzőkben, időnként a vetélés közvetlen kiváltó oka is lehet a fertőzés. Szarvasmarhában inkább csak szubklinikai megbetegedést okoz és Magyarországon sem tekinthető jelentős vetélést okozó kórokozónak. A vadon élő kérődzőkben pedig csak elvétve fordul elő a *C. burnetii* hordozása.

Új tudományos eredmények

1. Immunhisztokémiai módszert fejlesztettünk ki a mezei nyúl (*Lepus europaeus*) brucellózisának kimutatására.
2. Az *omp31* gén természetes gátlását mutattuk ki az IS711 beékelődése következtében *B. ovis*-ban. Bizonyítottuk, hogy az IS711 természetes körülmények között is mobilis genetikai elem lehet a *B. ovis* genomjában.
3. Elsőként mutattuk ki a *B. canis* jelenlétét Magyarországon, és leírtuk, hogy jelentős szaporodásbiológiai zavarokkal járó megbetegedéseket tud okozni hazánkban is.
4. Elsőként mutattuk ki, hogy a *B. canis* képes a gazdaszervezeten belül, az időbeli és térbeli változások függvényében mutálódni.
5. Elsőként izoláltuk a *B. microti*-t vaddisznóból (*Sus scrofa*), és először mutattuk ki a kórokozó jelenlétét Magyarországon, valamint jellemeztük a kitenyészett baktériumot.
6. Kimutattuk, hogy egyes *B. suis* 2-es biotípusú törzsek sokkal inkább a mezei nyulakhoz, mind a vaddisznókhoz adaptálódtak. Az európai vaddisznó eredetű törzsek elsősorban földrajzi eredetük alapján mutatnak rokonságot. A sertés eredetűek nem alkottak különálló genetikai csoportot, hanem a vaddisznó és a mezei nyúl eredetű törzsekkel is rokonságban állnak, bizonyítva, hogy mind a vaddisznó, mind a mezei nyúl populációk a szabadon tartott sertés állományok fertőzési forrásai lehetnek.
7. Elsőként végezzük el egypúpú teve (*Camelus dromedarius*) eredetű *B. melitensis* törzsek összehasonlító genetikai vizsgálatát, megállapítva, hogy mind az afrikai, mind a kelet-mediterrán kládba tartozó *B. melitensis* törzsek előfordulnak tevében.
8. Meghatároztuk a *C. burnetii* prevalenciáját Magyarországon. Megállapítottuk a tejelő szarvasmarha és juh állományok, kereskedelmi forgalomban kapható tejek, valamint kullancsok *C. burnetii* fertőzöttségét.
9. Feltártuk a magyarországi kérődző és emberi eredetű *C. burnetii* törzsek genetikai sokféleségét. Egy új MST (ST37) és két új MLVA (AF és AG) genotípust írtunk le.
10. Egy új MST (ST52) és két új MLVA (24/AH és 26/AI) mutattunk ki etiópai kullancsokból.
11. Az ST18-as genotípusú *C. burnetii* törzset azonosítottuk egy nagyszámú emberi megbetegedést kiváltó Q-láz járvány okozójaként.
12. Megállapítottuk, hogy a hazai juhokban időnként a vetélés közvetlen kiváltó oka is lehet a *C. burnetii* fertőzés, míg szarvasmarhában nem tekinthető jelentős vetélést okozó kórokozónak. Vadon élő kérődzőkben csak elvétve fordul elő a *C. burnetii* hordozása.

A doktori mű alapjául szolgáló közlemények

Brucellózis:

Gyuranecz M., Szeredi L, Rónai Z, Dénes B, Dencső L, Dán Á, Pálmai N, Hauser Z, Lami E, Makrai L, Erdélyi K, Jánosi S. Detection of *Brucella canis*-induced reproductive diseases in a kennel. J Vet Diagn Invest. 2011; 23:143-147.

Gyuranecz M., Erdélyi K, Makrai L, Fodor L, Szépe B, Mészáros AR, Dán A, Dencső L, Fassang E, Szeredi L. Brucellosis of the European brown hare (*Lepus europaeus*). J Comp Pathol. 2011; 145:1-5.

Gyuranecz M., Kreizinger Z, Horváth G, Rónai Z, Dán A, Nagy B, Szeredi L, Makrai L, Jánosi S, Hajtós I, Magyar T, Bhide M, Erdélyi K, Dénes B. Natural IS711 insertion causing *omp31* gene inactivation in *Brucella ovis*. J Vet Diagn Invest. 2013; 25:234-238.

Gyuranecz M., Rannals BD, Allen CA, Jánosi S, Keim PS, Foster JT. Within-host evolution of *Brucella canis* during a canine brucellosis outbreak in a kennel. BMC Vet Res. 2013; 9:76.

Kreizinger Z, Foster JT, Rónai Z, Sulyok KM, Wehmann E, Jánosi S, **Gyuranecz M.** Genetic relatedness of *Brucella suis* biovar 2 isolates from hares, wild boars and domestic pigs. Vet Microbiol. 2014; 172:492-498.

Rónai Z, Kreizinger Z, Dán Á, Drees K, Foster JT, Bányai K, Marton S, Szeredi L, Jánosi S, **Gyuranecz M.** First isolation and characterization of *Brucella microti* from wild boar. BMC Vet Res. 2015; 11:147.

Gyuranecz M., Wernery U, Kreizinger Z, Juhász J, Felde O, Nagy P. Genotyping of *Brucella melitensis* strains from dromedary camels (*Camelus dromedarius*) from the United Arab Emirates with multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. Vet Microbiol. 2016; 186:8-12.

Q-láz:

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. Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hungary: screening of dairy cows, sheep, commercial milk samples, and ticks. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012; 12:650-653.

Sulyok KM, Kreizinger Z, Hornstra HM, Pearson T, Szigeti A, Dán Á, Balla E, Keim PS, **Gyuranecz M.** Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants and human in Hungary: indication of various genotypes. BMC Vet Res. 2014; 10:107.

Sulyok KM, Hornok S, Abichu G, Erdélyi K, **Gyuranecz M.** Identification of novel *Coxiella burnetii* genotypes from Ethiopian ticks. PLoS One. 2014; 9:e113213.

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. Q fever epidemic in Hungary, April to July 2013. Euro Surveill. 2014; 19. pii: 20863.

Kreizinger Z, Szeredi L, Bacsadi Á, Nemes C, Sugár L, Varga T, Sulyok KM, Szigeti A, Ács K, Tóbiás E, Borel N, **Gyuranecz M.** Occurrence of *Coxiella burnetii* and *Chlamydiales* species in abortions of domestic ruminants and in wild ruminants in Hungary, Central Europe. J Vet Diagn Invest. 2015; 27:206-210.

Irodalomjegyzék

1. Abebe A. Prevalence of Q fever infection in the Addis Ababa abattoir. *Ethiop Med J.* 1990; 28:119-122.
2. Agerholm JS. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals-a critical review. *Acta Vet Scand.* 2013; 55:13.
3. Al Dahouk S, Hofer E, Tomaso H, és mtsai. Intraspecies biodiversity of the genetically homologous species *Brucella microti*. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78:1534-1543.
4. Al Dahouk, S., Le Flèche, P., Nöckler, K., Jacques, I., Grayon, M. , Scholz, H.C., Tomaso, H., Vergnaud, G., Neubauer, H., 2007. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J Microbiol Meth.* 69, 137-145.
5. Alton GG, Jones Lois M, Angus RD, és mtsai. *Techniques for the Brucellosis laboratory*, INRA, Paris, France, 1988.
6. Angelakis E, Johani S, Ahsan A, és mtsai. Q fever endocarditis and new *Coxiella burnetii* genotype, Saudi Arabia. *Emerg Infect Diseases.* 2014; 20:726.
7. Angelakis E, Raoult D. Q Fever. *Vet Microbiol.* 2010; 140:297-309.
8. Abril C, Thomann A, Brodard I, és mtsai. A novel isolation method of *Brucella* species and molecular tracking of *Brucella suis* biovar 2 in domestic and wild animals. *Vet Microbiol.* 2011; 150:405-410.
9. Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, és mtsai. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.* 2006; 6:38.
10. Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res.* 2005; 36:327-49.

11. Astobiza I, Barral M, Ruiz-Fons F, és mtsai. Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. Vet Microbiol. 2011; 147:190-194.
12. Astobiza I, Tilburg JJ, Pinero A, és mtsai. Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in northern Spain. BMC Vet Res. 2012; 8:241.
13. Audic S, Lescot M, Claverie JM, és mtsai. *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. BMC Genomics. 2009; 10:352.
14. Babudieri B. Q fever: a zoonosis. Adv Vet Sci. 1959; 5:81-154.
15. Barrow GI, Feltham RKA. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 3rd ed. Cambridge University Press, New York, NY. 1993.
16. Brennan SJ, Ngeleka M, Philibert HM, és mtsai. Canine brucellosis in a Saskatchewan kennel. Can Vet J. 2008; 49:703-708.
17. Burgess GW. Ovine contagious epididymitis: a review. Vet Microbiol. 1982; 7:551-575.
18. Bruce D. Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever, Practitioner 1887; 39:161.
19. *Brucella* MLVA database: <http://mlva.u-psud.fr>
20. Buddle B. Studies on *Brucella ovis* (N.SP.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. J Hyg (London). 1956; 54:351-364.
21. Burnet FM, Freeman M. Experimental studies on the virus of "Q" fever. Med J Aust. 1937; 2:299-305.

22. Capasso L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations, *J. Infect.* 2002; 45:122-127.
23. Caro-Hernández P, Fernández-Lago L, de Miguel MJ, és mtsai. Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect Immun.* 2007; 75:4050-4061.
24. Carpenter TE, Berry SL, Glenn JS. Economics of *Brucella ovis* control in sheep: computerized decision-tree analysis. *J Am Vet Med Assoc.* 1987; 190:983-987.
25. Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM és mtsai. A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine.* 2007; 25:5958-5967.
26. Cloeckaert A, Vizcaíno N, Paquet JY, és mtsai. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol.* 2002; 90:229-247.
27. *Coxiella burnetii* MLVA database: <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>
28. *Coxiella* Multi Spacers Typing Database: <http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/>
29. Cvetnić Z, Spicic S, Curic S, és mtsai. Isolation of *Brucella suis* biovar 3 from horses in Croatia. *Vet Rec.* 2005; 156:584-585.
30. Cvetnić Z, Spicic S, Tonic J, és mtsai. *Brucella suis* infection in domestic pigs and wild boar in Croatia. *OIE Rev Sci Tech.* 2009; 28:1057-1067.
31. Dán Á, Molnár T, Biksi I, és mtsai. Characterisation of Hungarian porcine circovirus 2 genomes associated with PMWS and PDNS cases. *Acta Vet Hung.* 2003; 51:551-562.
32. Derrick EH. Q fever, a new fever entity clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Med J Aust.* 1937; 2:281-299.

33. Dénes B, Glávits R. Bacteriologically confirmed cases of ovine epididymo-orchitis caused by *Brucella ovis* in Sub-Carpathia. Acta Vet Hung. 1994; 42:25-33.
34. Dénes B, Makrai L, Hegedűs T, és mtsai. Serological survey against *Brucella canis* antibodies in Hungary. Acta Microbiol Immunol Hung. 2004; 55:153-154.
35. Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, és mtsai. From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. Clin Microbiol Rev. 2017; 30:115-190.
36. Enserink M. Questions abound in Q-fever explosion in the Netherlands. Science. 2010; 327:266-267.
37. Estein SM, Fiorentino MA, Paolicchi FA, és mtsai. The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against *Brucella ovis* infection in rams. Vaccine. 2009; 27:6704-6711.
38. Farkas E, Gerő S, Takátsy G. A Q-láz elő fordulása Magyarországon. Orv Hetil. 1950; 23:717-719.
39. Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, és mtsai. PHYLOViZ: Phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. BMC Bioinformatics. 2012; 13:87.
40. Fretin D, Whatmore AM, Al Dahouk S, és mtsai. *Brucella suis* identification and biovar typing by real-time PCR. Vet Microbiol. 2008; 131:376-385.
41. Garin-Bastuji B, Vaillant V, Albert D, és mtsai. Is brucellosis due the biovar 2 of *Brucella suis* an emerging zoonosis in France? Two case reports in wild boar and hare hunters. In: Proceedings of the International Society of Chemotherapy Disease Management Meeting, 1st International Meeting on Treatment of Human Brucellosis, 7–10 November 2006, Ioannina, Greece.
42. Gennero MS, Grattarola C, Zoppi S, és mtsai. Brucellosis in wild boar in Piemont region. Rev Epid San Anim. 2004; 45:77-79.

43. Gidding HF, Wallace C, Lawrence GL, és mtsai. Australia's national Q fever vaccination program. *Vaccine*. 2009; 27:2037-2041.
44. Girard JM, Wagner DM, Vogler AJ, és mtsai. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:8408.
45. Glazunova O, Roux V, Freylikman O, és mtsai. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11:1211-1217.
46. Gleiser CA, Sheldon WG, VanHoosier GL, és mtsai. Pathological changes in dogs infected with a *Brucella* organism. *Lab Anim Sci*. 1971; 21:540-545.
47. Godfroid J. Brucellosis. In: Gavier-Widén, D., Duff, J.P., Meredith, A. (Eds.), *Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe*, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2012. pp. 318-328.
48. Godfroid J, Cloeckert A, Liautard JP, és mtsai. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res*. 2005; 36:313-326.
49. Godfroid J, Käsbohrer A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet Microbiol*. 2002; 90:135-145.
50. Gonzalez-Barrientos R, Morales JA, Hernandez-Mora G, és mtsai. Pathology of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) infected with *Brucella ceti*. *J Comp Pathol*. 2010; 142:347-352.
51. Gordon JC, Rutgers HC. Canine brucellosis in a household. *J Am Vet Med Assoc*. 1985; 186:695-698.
52. Gorham SL, Enright FM, Snider TG 3rd, és mtsai. Morphologic lesions in *Brucella abortus* infected ovine fetuses. *Vet Pathol*. 1986; 23:331-332.

53. Grégoire F, Mousset B, Hanrez D, és mtsai. A serological and bacteriological survey of brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. BMC Vet Res. 2012; 8:80.
54. Guatteo R, Seegers H, Taurel AF, és mtsai. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review. Vet Microbiol. 2011; 149:1-16.
55. Gumi B, Firdessa R, Yamuah L, és mtsai. Seroprevalence of Brucellosis and Q-Fever in southeast Ethiopian pastoral livestock. J Vet Sci Med Diagn. 2013; 2:1.
56. Gwida, M., El-Gohary, A., Melzer, F., Khan, I., Rösler, U., Neubauer, H., 2012, Brucellosis in camels. Res. Vet. Sci. 92, 351-355.
57. Gyuranecz M, Birdsell DN, Splettstoesser W, és mtsai. Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Europe. Emerg Infect Dis. 2012; 18:290-293.
58. Gyuranecz M, Dénes B, Hornok S, és mtsai. Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hungary: screening of dairy cows, sheep, commercial milk samples, and ticks. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012; 12:650-653.
59. Gyuranecz M, Erdélyi K, Makrai L, és mtsai. Brucellosis of the European brown hare (*Lepus europaeus*). J Comp Path. 2011; 145:1-5.
60. Gyuranecz M, Sulyok KM, Balla E, és mtsai. Q fever epidemic in Hungary. Euro Surveill. 2014; 19:3.
61. Gyuranecz M, Szeredi L, Makrai L, és mtsai. Tularemia of European brown hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological and immunohistochemical study. Vet Pathol. 2010; 47:958-963
62. Hajtós I. A kosok *Brucella ovis* okozta szubklinikai genitális fertőzöttsége. Magy Állatorv Lapja. 1988; 43: 655-662.

63. Hall TA. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acid Symp Ser., 1999; 41:95-98.
64. Halling SM, Tatum FM, Bricker BJ. Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. Gene. 1993; 133:123-127.
65. Hollett RB. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. Theriogenology, 2006; 66:575–587.
66. Hornstra HM, Priestley RA, Georgia SM, és mtsai. Rapid Typing of *Coxiella burnetii*. PLoS ONE. 2011; 6:e26201.
67. hpa-bioinformatics: <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>
68. Hubálek, Z, Scholz HC, Sedláček I, és mtsai. Brucellosis of the Common Vole (*Microtus arvalis*). Vector-Borne and Zoonotic Dis. 2007; 7:679-688.
69. Huijsmans CJ, Schellekens JJ, Wever PC, és mtsai. Single-nucleotide-polymorphism genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q fever outbreak in The Netherlands. Appl Environ Microbiol. 2011; 77:2051-2057.
70. Huynh LY, Van Ert MN, Hadfield T, és mtsai. Multiple locus variable number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) of *Brucella* spp. identifies species-specific markers and provides insights into phylogenetic relationships In: Totowa G (Ed.), National Institute of Allergy and Infectious Disease, NIH: Frontiers in Research, Humana Press; New Jersey, 2008; pp. 47-54.
71. Jiang H, Fan M, Chen J, és mtsai. MLVA genotyping of Chinese human *Brucella melitensis* biovar 1, 2 and 3 isolates. BMC Microbiology. 2011; 11:256.
72. Jiménez de Bagüés MP, Ouahrani-Bettache S, Quintana JF, és mtsai. The new species *Brucella microti* replicates in macrophages and causes death in murine models of infection. J Infect Dis. 2010; 202:3-10.

73. Kardeván A, Kemenes F. A mezei nyulak brucellosisa hazánkban. Magyar állatorvosok lapja, 1961; 16:59-61.
74. Kattar MM, Jaafar RF, Araj GF, és mtsai. Evaluation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis scheme for typing human *Brucella isolates* in a region of brucellosis endemicity. J Clin Microbiol. 2008; 45:3935-3940.
75. Kazár J. Q fever. In: Kazár J, Toman R. (Eds.), Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Slovak Academy of Sciences, Bratislava, 1996; pp. 353-362.
76. Keid LB, Soares RM, Vieira NR, és mtsai. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological test and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. Vet Res Commun. 2007; 31:951-965.
77. Kiliç S, Ivanov IN, Durmaz R, és mtsai. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis genotyping of human *Brucella* isolates from Turkey. J Clin Microbiol. 2011; 49:3276-3283.
78. Klaassen CH, Nabuurs-Franssen MH, Tilburg JJ, és munkatársai. Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. Emerg Infect Dis. 2009; 15:613-614.
79. Köppel C, Knopf L, Ryser MP, és mtsai. Serosurveillance for selected infectious disease agents in wild boars (*Sus scrofa*) and outdoor pigs in Switzerland. Eur J Wildl Res 2007; 53:212-220.
80. Körmendy B, Nagy G. The supposed involvement of dogs carrying *Brucella suis* in the spread of swine brucellosis. Acta Vet Sci Hung. 1982; 30: 3-7.
81. Lagier A, Brown S, Soualah A, és mtsai. Brucellose aiguë à *Brucella suis* biovar 2 chez un chasseur de sanglier. Med Mal Inf. 2005; 35:185.
82. Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, és mtsai. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. BMC Microbiol. 2006; 6:9.

83. Leiser OP, Corn JL, Schmit BS, és mtsai. Feral swine brucellosis in the United States and prospective genomic techniques for disease epidemiology. *Vet Microbiol.* 2013.; 166:1-10.
84. Lienard J, Croxatto A, Aeby S, és mtsai. Development of a new *Chlamydiales*-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2011; 49:2637-2642.
85. Loftis AD, Priestley RA, Massung RT. Detection of *Coxiella burnetii* in commercially available raw milk from the United States. *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7:1453-1456.
86. Loftis AD, Reeves WK, Szumlas DE, és mtsai. Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals. *Exp Appl Acarol.* 2006; 40:67-81.
87. López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, és mtsai. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol.* 2008; 46:3484-3487.
88. López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, és mtsai. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet Microbiol.* 2011; 154:152-155.
89. Luchsinger DW, Anderson RK. Longitudinal studies of naturally acquired *Brucella abortus* infection in sheep. *Am J Vet Res.* 1979; 40:1307-1312.
90. Magyar Juh és Kecsketenyésztő Szövetség: <http://mjkszh.hu/>
91. Mallavia LP. Genetics of *Rickettsiae*. *Eur J Epidemiol.* 1991; 7:213-221.
92. Mancilla M, Ulloa M, López-Goñi I, és mtsai. Identification of new IS711 insertion sites in *Brucella abortus* field isolates. *BMC Microbiol.* 2011; 11:176.
93. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12:518-553.

94. McDade JE. Historical aspects of Q fever. In: Marrie TJ. (Ed.), Q fever. Volume I. The Disease. CRC Press, Boston, 1990; pp. 5-21.
95. Meador VP, Tabatabai LB, Hagemoser WA, és mtsai. Identification of *Brucella abortus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cows, goats, and mice with an avidinebiotinperoxidase complex immunoenzymatic staining technique. Am J Vet Res. 1986; 47:2147-2150.
96. Mediannikov O, Fenollar F, Socolovschi C, és mtsai. *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4:e654.
97. Milazzo A, Hall R, Storm PA, és mtsai. Sexually transmitted Q fever. Clin Infect Dis. 2001; 33:399-402.
98. Muñoz PM, Boadella M, Arnal M, és mtsai. Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. BMC Infect Dis. 2010; 10:46.
99. Nyiredy I. Elkülöníthetők-e egymástól a Huddleson-féle eljárással a különböző eredetű *Brucella*-törzsek? Közlemények az összehasonlító élet- és kórtan köréből, 1932; 25:112-120.
100. Ocampo-Sosa AA, García-Lobo JM, Demonstration of IS711 transposition in *Brucella ovis* and *Brucella pinnipedialis*. BMC Microbiol. 2008; 8:17.
101. OIE (World Organisation for Animal Health). Bovine brucellosis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2018a: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCCELL.pdf
102. OIE (World Organisation for Animal Health). Q fever. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2018b: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.16_Q_FEVER.pdf

103. Olsen SC, Tatum FM. Swine brucellosis: current perspectives. *Vet Med (Auckl)*. 2016; 8:1-12.
104. Omsland A, Cockrell DC, Howe D, és mtsai. Host cellfree growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:4430-4434.
105. Ouahrani S, Michaux S, Sri Widada J, és mtsai. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J Gen Microbiol*. 1993; 139:3265-3273.
106. Oyston PC, Davies C. Q fever: the neglected biothreat agent. *J Med Microbiol*. 2011; 60:9-21.
107. Palmer NC, Kierstead M, Key DW, és mtsai. Placentitis and abortion in goats and sheep in Ontario caused by *Coxiella burnetii*. *Can Vet J*. 1983; 24:60-61.
108. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, és mtsai. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:91-99.
109. Paton NI, Tee NWS, Vu CKF, és mtsai. Visceral abscesses due to *Brucella suis* infection in a retired pig farmer. *Clin Inf Dis* 2001; 32:129-130.
110. Pearson T, Hornstra HM, Hilsabeck R, és mtsai. High prevalence and two dominant host-specific genotypes of *Coxiella burnetii* in U.S. milk. *BMC Microbiol*. 2014; 14:41.
111. Perez J, Quezada M, Lopez J, és mtsai. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. *J Vet Diagn Invest*. 1998; 10:17-21.
112. Philip CB. Comments on the name of the Q fever organism. *Public Health Rep*. 1948; 63:58-59.

113. Price EP, Hornstra HM, Limmathurotsakul D, és mtsai. Within-host evolution of *Burkholderia pseudomallei* in four cases of acute melioidosis. PLoS Pathog. 2010; 6:e1000725.
114. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, és mtsai. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. J Clin Microbiol. 2004; 42:1290-1293.
115. Prohászka L. Kísérletek csökkent virulenciájú *Brucella suis*-törzsek előállítására. Magy Állatorv Lapja. 1959; 14:15-16.
116. Rády M, Glavits R, Nagy G. A *Coxiella burneti* izolálása és a Q-láz vetéléssel járó kórformájának hazai megállapítása szarvasmarhában és juhban. Magy Állatorv Lapja. 1985; 40:343-349.
117. Reichel MP, Ross GP, West DM. Reports from industry surveillance and disease control programmes - *Brucella ovis* flock accreditation scheme. Surveillance. 2008; 35:29.
118. Reichel R, Mearns R, Brunton L, és mtsai. Description of a *Coxiella burnetii* abortion outbreak in a dairy goat herd, and associated serology, PCR and genotyping results. Res Vet Sci. 2012; 93:1217-1224.
119. Ridler AL, West DM. Control of *Brucella ovis* infection in sheep. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2011; 27:61-66.
120. Romváry J. A *Brucella* típusainak és a Br. 19-s törzseknek elkülönítése mesterséges tenyésztőtalajokon. Magy Állatorv Lapja. 1954; 9:327-330.
121. Romváry J. A Q-láz előfordulása szarvasmarhaállományban. Magy Állatorv Lapja. 1957; 12:25-27.
122. Romváry J, Mészáros J, Rózsa J. A *Coxiella burnetii*-fertőzöttség felmérése szarvasmarha- és juhállományainkban. Magy Állatorv Lapja. 1979; 34:441-445.

123. Ruiz-Fons F, Rodríguez Ó, Torina A, és mtsai. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. Vet Microbiol. 2008; 126:282-286.
124. Salipante SJ, Hall BG, Inadequacies of minimum spanning trees in molecular epidemiology. J Clin Microbiol. 2011; 49:3568-3575.
125. Santos AS, Tilburg JJ, Botelho A, és mtsai. Genotypic diversity of clinical *Coxiella burnetii* isolates from Portugal based on MST and MLVA typing. Int J Med Microbiol. 2012; 302:253-256.
126. Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, és mtsai. Isolation of *Brucella microti* from Soil. Emerg Infect Dis. 2008b; 14:1316-1317.
127. Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, és mtsai. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008a; 58:375-82.
128. Scholz HC, Hofer E, Vergnaud G, és mtsai. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. Vector Borne Zoonotic Dis. 2009; 9:153-156.
129. Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterisation of *Brucella* species. OIE Rev Sci Tech 2013; 32:149-162.
130. Schulze zur Wiesch J, Wichmann D, Sobottka I, és mtsai. Genomic tandem repeat analysis proves laboratory-acquired brucellosis in veterinary (camel) diagnostic laboratory in the United Arab Emirates. Zoonoses Public Health. 2010; 57:315-317.
131. Somogyi F. A mezei nyúl hasznosítás kereskedelmi lehetőségei. In: Nagy E. (Ed.): Mezei nyúl, Dénes Natúr Műhely Kiadó, Százhalombatta, Magyarország, 2006. pp. 62-72.

132. Spitalská, E, Kocianová, E. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected in Slovakia and Hungary. Eur J Epidemiol. 2003; 18:263-266.
133. Sprague LD, Al-Dahouk S, Neubauer H. A review on camel brucellosis: a zoonosis sustained by ignorance and indifference. Pathog Glob Health. 2012; 106:144-149.
134. Sprong H, Tjisse-Klasen E, Langelaar M, és mtsai. Prevalence of *Coxiella burnetii* in ticks after a large outbreak of Q fever. Zoonoses Public Health 2012; 59:69-75.
135. Stein A, Raoult D. Pigeon pneumonia in Provence: a birdborne Q fever outbreak. Clin Infect Dis. 1999; 29:617-620.
136. Sterba F. Pathomorphological changes in brucellosis in hares. Vet Med (Praha). 1982; 27:437-448.
137. Sterba F. Differential pathomorphologic diagnosis of brucellosis in hares. Vet Med (Praha). 1983; 28:293-308.
138. Sterba F. Brucellosis in rabbits induced by an experimental infection with *Brucella suis* germs. Vet Med (Praha). 1984; 29:231-244.
139. Sterba F, Halacková M. Use of the Rose-Bengal test in the diagnosis of brucellosis in hares. Vet Med (Praha). 1987; 32:441-447.
140. Sulyok KM, Kreizinger Z, Hornstra HM, és mtsai. Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants and human in Hungary: indication of various genotypes. BMC Vet Res. 2014; 10:107.
141. Szeredi L. Juhok *Coxiella burnetii* okozta vetélése. Magy Állatorv Lapja. 2004; 126:482-486.

142. Szeredi L, Jánosi S, Tenk M, és mtsai. Epidemiological and pathological study on the causes of abortion in sheep and goats in Hungary (1998-2005). *Acta Vet Hung.* 2006; 54:503-515.
143. Szulowski K, Iwaniak W, Pilaszek J, és mtsai. The ELISA for the examination of hare sera for anti-*Brucella* antibodies. *Comp Immunol Microb.* 1999; 22:33-40.
144. Tamura K, Stecher G, Peterson D, és mtsai. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30:2725-2729.
145. Teyssou R, Morvan J, Leleu JP, és mtsai. A propos d'un cas de brucellose humaine a *Brucella suis* biovar 2. *Med Mal Inf* 1989; 19:160-161.
146. Tilburg JJ, Roest HJ, Buffet S, és mtsai. Epidemic genotype of *Coxiella burnetii* among goats, sheep, and humans in the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2012a; 18:887-889.
147. Tilburg JJ, Rossen JWA, van Hannen EJ, és mtsai. Genotypic diversity of *Coxiella burnetii* in the 2007–2010 Q fever outbreak episodes in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 2012b; 50:1076-1078.
148. To H, Htwe KK, Kako, N, és mtsai. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *J Vet Med Sci.* 1998; 60:859-861.
149. Tsolis RM, Seshadri R, Santos RL és mtsai. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS One.* 2009; 4:e5519.
150. Vadgazdálkodási Adattár 2013: <http://www.vmi.szie.hu/adattar/pdf/VA-2012-13.pdf>
151. Varga J, Rusvai M, Fodor L. A háziállatok fertőző betegségei. MÁOK Kft., Budapest, Magyarország, 2018.

152. Vemulapalli R, McQuiston JR, Schurig GG, és mtsai. Identification of an IS711 element interrupting the wboA gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. Clin Diagn Lab Immunol. 1999; 6:760-764.
153. Výtovec J, Vladýk P, Zahor Z, és mtsai. Morphological study of 70 cases of brucellosis in rabbits caused by *Brucella suis*. Vet Med (Praha). 1976; 21:359-368.
154. Wanke MM. Canine brucellosis. Anim Reprod Sci. 2004; 82-83:195–207.
155. Wernery U, Camelid brucellosis: a review. Rev Sci Tech. 2014; 33:839-857.
156. Whatmore AM, Perrett LL, MacMillan AP. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. BMC Microbiol. 2007; 7:34.
157. WHO (World Organisation for Health) Brucellosis in humans and animals. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2006; p. 102.
158. Wu N, Abril C, Hinić V, és mtsai. Free-ranging wild boar: a disease threat to domestic pigs in Switzerland? J Wildl Dis. 2011; 47:868-879.
159. Wu N, Abril C, Thomann A, és mtsai. Risk factors for contacts between wild boar and outdoor pigs in Switzerland and investigations on potential *Brucella suis* spill-over. BMC Vet Res 2012; 8:116.
160. Xavier MN, Paixao TA, Poester FP, és mtsai. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. J Comp Pathol. 2009; 140:149-157.
161. Zammit T. A preliminary note on the examination of the blood of goats suffering from Mediterranean fever, reports of the Commission on Mediterranean Fever, Part III, Harrison and Sons, London, 1905.

Köszönetnyilvánítás

Időrendi sorrendben legelőször dr. Erdélyi Károlynak szeretnék köszönetet mondani, akihez még egyetemi hallgatóként fordultam, és aki örömmel fogadta érdeklődésemet a vadegészségügy iránt, bevezetett az intézeti diagnosztika rejtelmeibe és megtanított arra, hogy mi is az a tudományos kutatás, TDK témavezetőm volt, majd PhD hallgató koromban is folyamatosan segítette munkámat.

Hálás köszönettel tartozom prof. dr. Fodor Lászlónak, egykori PhD témavezetőmnek, hogy mindig támogatta kutatói pályafutásomat. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Magyar Tibornak, aki PhD fokozatom megszerzése után állást ajánlott számomra az MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézetében, s támogatta, hogy minél előbb saját lábra álljak és megalapíthassam kutatócsoportomat.

Szeretném megköszönni dr. Dán Ádámnak, dr. Dénes Bélának, dr. Hornok Sándornak, dr. Makrai Lászlónak, dr. Szeredi Leventének és dr. Tuboly Tamásnak a munkáim során kapott számtalan szakmai tanácsot, valamint a különböző vizsgálatokban nyújtott segítséget és kutatási együttműködést.

Köszönettel tartozom PhD hallgatóimnak és kutató csoportom minden tagjának a számtalan kutatási projektben való részvételért, munkáért, türelemért és vidámságért. Külön szeretném megköszönni dr. Kreizinger Zsuzsának és dr. Görföl-Sulyok Kinga Máriának a dolgozat témaköreiben végzett kutatásokban való közreműködését.

Köszönöm továbbá mindenkinek, aki társ szerzőm volt vagy a cikkek köszönetnyilvánításaiban szerepelt, továbbá akikkel együtt dolgoztam, illetve dolgozom kutatási feladataim megvalósítása során.

Hálásan köszönöm a kutatásaimhoz nyújtott állandó családi háttérrel és türelmet feleségemnek, Tasnádi Katalinnak és kislányaimnak, Annának, Dorottyának és Bertának. Köszönöm továbbá szüleimnek és testvéremnek is, hogy bíztattak és támogattak a kutatói pályára lépésben.

Kutatásaimat a Magyar Tudományos Akadémia Lendület pályázata (LP2012-22), a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal K_16 (119594) és KKP19-Élvonal (129751) pályázata, Az EU FP7 ASKLEPIOS pályázata, továbbá az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja és az Innovációs és Technológiai Minisztérium Új Nemzeti Kiválóság Programjának Bolyai+ Felsőoktatási Fiatal Oktatói, Kutatói Ösztöndíjai támogatták.

Mellékletek

1. melléklet: Mintavételi jegyzőkönyv: soltszentimrei kutyatenyészet

Minta azonosító	Kutya azonosító	Ivar	Születési dátum	Minták	Egyéb
BC1	Marci	kan	2005	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v	
BC2	Bogáncs	kan	2005	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v	
BC3	Zsanett	szuka	2005	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	Elvetélt: június 7-én hat magzatot két héttel az ellés előtt.
BC4	Morci	szuka	1999	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	
BC5	Szamóca	szuka	2006	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	Elvetélt: március 16-án, 4 magzatot, majd 26-án 2 magzatot és egy élő kölyköt= Füge
BC6	Heidi	szuka	2006	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	Elvetélt: január 5-én, 4-5 magzat.
BC7	Gesztenye	szuka	2006	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	Első két pároztatáskor üres maradt, majd harmadjára vemhes lett.
BC8	Csenge	szuka	2001	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	

BC9	Sindy	szuka	2007	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	Első pároztatáskor üres maradt.
BC10	Pepita	szuka	2004	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	
BC11	Szaffi	szuka	2000	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	
BC12	Törpi	szuka	2006	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	
BC13	Dominó	szuka	2007	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	
BC14	Lizi	szuka	2004	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Garat tampon	
BC15	Trixi	szuka	2006	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	Június 6-án három kölyköt ellett, abból kettő elpusztult.
BC16	Száva	szuka	2004	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Garat tampon	
BC17	Franciska	szuka	1999	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Garat tampon	

BC18	Póni	szuka	2006	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v (ebből csak keveset sikerült begyűjteni) Hüvely tampon Garat tampon	Elvetélt: 2008. október 26-án. Ez volt az első vetelés. Vemhesen került a tenyészetbe. Március 27-én koraszülés, 4 kölyök, 1 nap múlva elpusztultak.
BC19	Tulipán	szuka	2001	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon	Hét kölyköt ellett július 4-én.
BC20	Rózsabimbó	szuka	2002	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon	2 kölyköt ellett június 29-én.
BC21	Füge	szuka	2009. 03.26.	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon	Szamóca életben maradta kölyke.
BC22	Alma	szuka	2006	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	Kétszer üres maradt, 2008. márciusában kellett volna ellenie.
BC23	Kántor (házőrző, németjuhász keverék)	kan	2002	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v	
BC24	Sátán (beagle)	kan	2003	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v	

BC25	Liza (beagle)	szuka	2003	Alvadásban gátolt vér Hüvely tampon	
BC26	Morzsza (beagle)	szuka	2006	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	
BC27	Zoé	szuka	2005	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon Garat tampon	Elvetélt: március 22-én kellett volna ellenie, de kb. 2 hétrel előtte eltűnt a hasa nyomtalanul.
BC28	Jenny	szuka	2007	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon	
BC29	Csita (beagle)	szuka	2008	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon	
BC30	Sára (beagle)	szuka	2005	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon	2 éve ellett császárral, azóta nem volt vemhes
BC31	Jenna (beagle)	szuka	2007	Alvadásban gátolt vér Alvadásban nem g. v Hüvely tampon	

2. Melléklet: A vizsgált *B. canis* izolátumok gazda egyede, izolálási ideje, helye, valamint elsődleges és másodlagos VNTR alléljai

ID	Gazda	Izolálás ideje	Izolálás helye	polimorf VNTR						monomorf VNTR											
				1	1 alt	2	2 alt	30	33	33 alt	3	7	14	16	20	21	25	27	28	29	31
C1	BC3 szuka kutya	Június	magzat	234		214		568	295	303	417	306	121	233	439	100	490	413	198	260	507
C2		Július	vér	234	242	206	214	568	303		-	306	121	233	439	100	490	413	198	260	507
C3		Július	hüvely	234		206		568	263		417	306	121	233	439	100	490	413	198	260	507
C4	BC2 kan kutya	Július	vér	234		214		568	303	311	417	306	122	233	439	100	490	413	198	260	507
C5		Augusztus	nyirokcsomó	234		231		568	295		417	306	121	233	439	100	490	413	198	260	507
C6	BC21 kölyök kutya	Július	vér	242	250	150	214	574	255	263	417	306	121	233	439	100	490	413	198	260	507
C7		Augusztus	vér	234		214		568	255	263	417	306	121	233	439	100	490	413	198	260	507
C8		Augusztus	nyirokcsomó	234	242	214		568	255	263	417	306	121	233	439	100	490	413	198	260	507