

Baromfipatógén *Pasteurella multocida* és *Riemerella anatipestifer* nyomon követése molekuláris epidemiológiai módszerekkel

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette: Kardos Gábor
DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet

Témavezetők: Dr. Kiss István, DVM. Ph.D.
Prof. Dr. Gergely Lajos, MD. Ph.D. D.Sc.

Debrecen, 2007.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. Tipizáló módszerek.....	6
2.2. DNS-alapú tipizáló módszerek bemutatása.....	9
2.2.1. Plazmidprofil analízis.....	9
2.2.2. A genom egy kitüntetett részét vizsgáló módszerek.....	10
2.2.2.1. Egy kiválasztott gén (régió) RFLP analízise	10
2.2.2.2. Kiválasztott gének (régiók) polimorfizmusa	10
2.2.3. A teljes genomot vizsgáló módszerek.....	12
2.2.3.1. A genom egészét megjelenítő módszerek.....	12
2.2.3.1.1. Teljes genom RFLP	12
2.2.3.1.2. Kariotipizálás	13
2.2.3.1.3. A genom restrikciós analízise (REAG)	14
2.2.3.2. A genomot megmintázó módszerek	15
2.2.3.2.1. Ribotipizálás.....	15
2.2.3.2.2. RAPD.....	16
2.2.3.2.3. Repetitív elemeket célzó PCR.....	16
2.2.3.2.4. AFLP.....	17
2.3. A tipizáló módszerek eredményének értékelése.....	18
2.3.1. A hasonlóság mérése.....	18
2.3.1. Csoportanalízis (cluster analysis)	19
2.4. A molekuláris tipizáló módszerek jelentősége.....	20
2.5. Az értekezés témájául szolgáló baktériumok bemutatása.....	21
2.5.1. <i>Pasteurella multocida</i>	21
2.5.2. <i>Riemerella anatipestifer</i>	23
3. Célkitűzések	24
4. Anyag és módszer.....	25
4.1. Izolátumok.....	25
4.1.1. <i>Pasteurella multocida</i> izolátumok	25
4.1.1.1. Az első járványsorozat.....	25
4.1.1.2. A második járványsorozat	26
4.1.1.3. A harmadik járványsorozat.....	27
4.1.2. <i>Riemerella anatipestifer</i> izolátumok.....	28
4.2. Az antibiotikum érzékenység meghatározása	28
4.3. PCR módszerek	29
4.3.1. A DNS kivonása a sejtekből	29
4.3.2. <i>Pasteurella multocida</i> kimutató és kapszuláris tipizáló PCR.....	29
4.3.3. <i>Riemerella anatipestifer</i> kimutató PCR	30
4.3.4. rep-PCR-ek	32
4.3.4.1. ERIC-PCR	32
4.3.4.2. SERE-PCR.....	34
4.3.4.3. BOX-PCR	34
4.3.5. RAPD	34
4.3.6. Elektroforézis, dokumentálás	35
4.4. PFGE.....	35

4.5. A mintázatok kiértékelése	37
5. Eredmények és értékelésük	38
5.1. Az első baromfikolera járványsorozat	38
5.2. A második baromfikolera járványsorozat	41
5.3. A harmadik baromfikolera járványsorozat.....	43
5.4. A Riemerella anatipestifer kimutató PCR.....	45
5.5. A Riemerella anatipestifer izolátumok vizsgálata	46
6. Összefoglalás.....	51
7. Irodalomjegyzék	52
7.1. Felhasznált irodalom.....	52
7.2. A szerző az értekezéshez felhasznált közleményei	67
7.3. A szerző egyéb közleményei	67
8. Tárgyszók.....	69
9. Köszönetnyilvánítás.....	69
10. Függelék.....	70

Rövidítések jegyzéke

AFLP	amplifikált fragment hossz polimorfizmus (amplified fragment length polymorphism)
ARDRA	az amplifikált riboszómális DNS restrikciós analízise (amplified ribosomal DNA restriction analysis)
BHI	agy-szív kivonat (brain-heart infusion)
bp	bázispár
BSA	bovin szérum albumin
CHEF	(contour-clamped homogeneous electric field)
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
DGGE	denaturáló grádiens gél elektroforézis (denaturing gradient gel electrophoresis)
DMSO	dimetilszulfid
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleotid-trifoszfát
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
ERIC	enterobaktériumokból leírt repetitív intergénikus konszenzus szekvencia (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence)
FIGE	térerő-inverziós gél elektroforézis (field inversion gel electrophoresis)
IRS-PCR	ritka restrikciós helyek PCR analízise (infrequent restriction site-PCR)
IS	inszerációs szekvencia
kbp	kilobázispár
MALDI-TOF	mátrix-asszisztált lézer deszorpció ionizáció-repülési idő analízis (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight)
MLEE	multilokusz enzim elektroforézis (multilocus enzyme electrophoresis)
MLST	multilokusz szekvencia tipizálás (multilocus sequence typing)
MLVA	multilokusz variábilis számú tandem ismétlődés analízis (multilocus variance analysis)
MRSA	meticillin rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
NCCLS	National Comitee for Clinical Laboratory Standards
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PFGE	pulzáló mezejű gélelektroforézis (pulsed field gel electrophoresis)
PMSF	fenilmetilszulfonilfluorid
RAPD	random amplifikált polimorf DNS analízis (randomly amplified polymorphic DNA)
REAG	a genom restrikciós enzimes analízise (restriction enzyme analysis of the genome)
rDNS	riboszómális ribonukleinsavat kódoló DNS
rRNS	riboszómális ribonukleinsav
REP	repetitív extragénikus palindrom szekvencia (repetitive extragenic palindromic)
rep-PCR	repetitív elemeken alapuló polimeráz láncreakció
RFEL	restrikciós fragmentek végjelöléses analízise (restriction fragment end labelling)
RFLP	restrikciós fragment hossz polimorfizmus (restriction fragment length polymorphism)

RGE	forgó gél elektroforézis (rotating gel electrophoresis)
RNS	ribonukleinsav
SERE	Salmonella Enteritidis repetitív elem
SRF	szubtrakciós restrikciós ujjlenyomatozás (subtracted restriction fingerprinting)
TAFE	keresztezett váltakozó mezejű gél elektroforézis (tranverse alternating gel electrophoresis)
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGGE	hőmérsékleti grádiens gél elektroforézis (temperature gradient gel electrophoresis)
TMP+SMX	trimethoprim+sulfamethoxazol
UPGMA	súlyozatlan pár-csoport módszer aritmetikai átlagokkal (unweighted pair group method with arithmetic averages)
VNTR	variábilis számú tandem ismétlődések (variable number of tandem repeats)

1. Bevezetés

A különböző fertőző betegségek vizsgálatában egyre fontosabb szerepe van a járványtanilag összefüggő esetek nyomon követésének, így a zoonózis ételfertőzések vagy a nozokomiális fertőzések esetében ma már nemcsak a pontos etiológiai diagnózis felállítása, hanem a járványtani elemzés is részévé vált a rutin diagnosztikának.

Erre a célra szolgáló tipizáló módszereket (szerotipizálás, fágtypizálás) már régóta alkalmaznak mind az orvosi mind az állatorvosi diagnosztikában, ezek azonban számos szituációban (például egy szerotípusba tartozó izolátumok esetén, vagy ha a kórokozó szerológiailag egységes) nem adnak kielégítő eredményt. Emiatt szükség van modern, nagy felbontású, molekuláris (DNS-) alapú tipizáló módszerekre, amelyek lehetővé teszik a járványtani kapcsolatok pontos elemzését gyakorlatilag minden kórokozó mikroba esetén.

A molekuláris tipizáló módszerek alkalmazásával lehetőség nyílik a fertőzőforrások hatékony felderítésére, járványok korai felismerésére és a fertőzések pontos nyomon követésére, tehát alkalmazásukkal javítható az orvosi, állatorvosi munka hatékonysága, javulnak a megelőzés lehetőségei, és esetenként jelentős költségek takaríthatók meg.

A hazai gyakorlatban ezek a technikák a humánpatogének diagnosztikájában meghonosodtak, bár nem váltak még számos laboratóriumban elérhető rutin módszerekké, a hazai állatorvosi diagnosztikában azonban eddig a molekuláris tipizáló módszereket alig vagy egyáltalán nem alkalmazták a baktériumok vonatkozásában. A baktériumok tipizálásának standard módszere, a PFGE csak nagyon nehezen volt elérhető az állategészségügyi és az élelmiszerégszségügyi diagnosztika számára. Jelen munka beszámol a módszerek bevezetéséről a hazai állatorvosi diagnosztikai gyakorlatba, és bemutatja alkalmazhatóságukat két fontos baromfipatógén baktérium, a *Pasteurella multocida* és a *Riemerella anatipestifer* laboratóriumi diagnosztikájában.

2. Irodalmi áttekintés

A mikrobiológiai diagnosztikai eljárások elsődleges célja a kórokozó azonosítása, így az etiológiai diagnózis felállítása. Mivel azonban egy speciesen belül is jelentős eltérések lehetnek az egyes törzsek között, azok különbözhetnek virulenciájukban és/vagy antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájukban, a kórokozó faj szerinti azonosítása mellett gyakran van szükség annak pontosabb jellemzésére is. Így meg kell határozni az antibiotikumok iránti érzékenységet, illetve egyes fajok esetén a korrekt diagnózis felállításának feltétele (lehet) egyes fontos virulenciafaktorok kimutatása is (*Corynebacterium diphtheriae*, enterohemorrágiás *E. coli*, *Pasteurella multocida*, *Yersinia enterocolitica*).

A diagnózis ilyen módon való fölállítása azonban több fontos kérdésre nem adhat választ. Nem tudjuk megállapítani, hogy az időben vagy térben halmozódó izolálások hátterében ugyanazon törzs járványszerű terjedése, vagy egymástól járványtanilag független események állnak, hiszen a kórokozók számos különböző, a hagyományos mikrobiológia számára megkülönböztethetetlen törzse okozhat klinikailag ugyanolyan megbetegedést. Emiatt az egymással járványtanilag összefüggő megbetegedések esetén gyakran a különböző izolátumok faj alatti csoportokba sorolására, tipizálására van szükség.

2.1. Tipizáló módszerek

A tipizálás irányulhat egy (vagy több) fontos jellemző (például virulenciafaktor) kimutatására, illetve az izolátumok különböző szempontok szerinti csoportosítására. A tipizálás kifejezést a továbbiakban ez utóbbi szűkebb értelemben használom.

A kórokozó egyes, egymástól eltérő alcsoportjainak jellemzésére már régóta alkalmaznak különböző tipizáló eljárásokat. A tipizáló módszerek célja a kórokozó izolátum jellemzése, az adatok segítségével az izolátumok különböző típusokba sorolhatóak. A típusok térbeli és időbeli eloszlása, összevetve az izolátumokkal kapcsolatos járványtani adatokkal több fontos probléma vizsgálatát lehetővé teszi (lásd alább).

Ahhoz, hogy egy tipizáló módszer megfeleljen egy adott kórokozó, illetve járványtani helyzet analízisére, különböző kritériumoknak kell megfelelnie (44, 118). Ezek közül talán a legfontosabb a felbontóképeség (diszkriminatív érték). Ez azt mutatja meg, hogy a módszer a vizsgálandó törzsek közül mennyit tud egymástól elkülöníteni. Optimális a módszer, ha

elkülöníti az összes járványtanilag független izolátumot, de egy csoportba sorolja az összefüggőeket. Ha túlságosan nagy a felbontóképesség, akkor még a rokon, illetve egy klónba tartozó izolátumok is különbözni fognak, így a módszer alkalmatlan lesz járványtani problémák elemzésére (ilyen extrém példa lehet nem konzervatív gének szekvencialízise), míg ha ez a felbontóképesség kicsi, akkor egymástól járványtanilag egyértelműen független törzsek is egy „rokonsági” csoportba kerülhetnek. A felbontóképességet egy úgynevezett diverzitási index-szel (D) jellemezhetjük (72):

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^N a_j$$

N: a mintázatok (törzsek) száma
a_j: a j-edik mintázattal megegyező mintázatok száma

Minél közelebb van a D értéke az 1-hez, annál jobb a módszer felbontóképessége.

A felbontóképesség mellett lényeges a módszer ismételhetősége és laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatósága, valamint a kapott mintázatok stabilitása (változékonyság a sorozatos passzálás során). Fontos az is, hogy a törzsek túlnyomó többsége tipizálható legyen az adott módszerrel (44, 118). Természetesen, mint minden laboratóriumi módszer esetében, az egyszerű kivitelezhetőség és a minél alacsonyabb munka-, műszer- és költségigény szintén igen fontos szempontok.

A tipizáló módszerek két csoportba sorolhatóak a tipizálás céljából vizsgált tulajdonság alapján. A klasszikus tipizáló módszerek általában a kórokozó egy jól karakterizált fenotípusban megjelenő tulajdonságának alapos vizsgálatán alapulnak, így például a biokémiai vagy szerológiai viselkedés (biotipizálás, szerotipizálás), illetve az antibiotikum-, bakteriocin- vagy fágrezisztencia (rezisztotipizálás, biocintipizálás, fágtypizálás) alapján sorolják alcsoportokba az izolátumokat (44).

Ezeknek a módszereknek számos limitációja ismeretes. Fő közös hátrányuk, hogy mivel fenotípusos jellemzőkön alapulnak, a rokonságra nézve csak indirekt következtetés vonható le, és hogy a környezet befolyásolhatja a vizsgálni kívánt tulajdonság megjelenését (a kapott típust). A fenotípus vizsgálatán alapuló módszerekkel gyakran csak a törzsek egy része tipizálható. Ennek oka lehet új variánsok (új szerotípus, új fágtypus) megjelenése, illetve a tipizálni kívánt tenyészet aktuális állapota (például a csilló elvesztése a tenyésztés során megghiúsítja a H antigén meghatározását). Nehéz újabb, kevésbé ismert kórokozókra adaptálni, és a módszerek nagy részénél a kapott adatok nem alkalmasak számítógépes elemzésre, így

például adatbázis létrehozására. Biotipizálás és rezisztotipizálás esetén a reprodukálhatóság sem optimális (44).

Bár a szero- és fágtipizálás reprodukálhatósága általában kiváló, ezen módszerek esetében gyakori probléma a kellő felbontóképesség hiánya (44, 114). Egy gazdaállatban a különböző *Pasteurella multocida* buroktípusok közül általában csak egy-két típus fordul elő (32, 159), így a járványok nyomon követésére a buroktípus vizsgálata csak korlátozottan alkalmas. Hasonló a helyzet a humán ételfertőzésekben gyakran izolálható *Salmonella* szerovariánsok esetén is. A szerotipizálás általában alkalmatlan a vad-vakcina elkülönítésre is, hiszen általában a vakcina azon szerotípus(ok)at tartalmazza, amely ellen védelmet kíván nyújtani. A fágtipizálás elégtelennek bizonyult az erősen klonális meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* törzsek megfelelő tipizálására (173).

A szero- és fágtipizálás további hátránya, hogy minden kórokozóra külön egyedi rendszert kell kifejleszteni és működtetni, amelyeknek a megfelelő minőségi kontrollja is nehézkes és drága (44, 114).

A fenti módszereken kívül a fenotípus vizsgálatára alkalmas még a MLEE (18, 61, 133), de ez kórokozók vizsgálatára kevésbé használatos, inkább filogenetikai célú vizsgálatok eszköze (7). Újabban szofisztikált kémiai műszeres analitikai módszereket (elsősorban a MALDI-TOF tömegspektrometriai technikát) is alkalmaznak (50, 54, 87). Utóbbi a fenotípusos módszerek számos hátrányát (gyenge reprodukálhatóság, alacsony felbontóképesség, bonyolult kontroll rendszerek) kiküszöböli, de a rokonság tekintetében ezek a módszerek is csak indirekt következtetések levonását teszik lehetővé.

A DNS-alapú tipizáló eljárások segítségével a fent felsorolt hátrányok legtöbbje kiküszöbölhető. Ezek a módszerek, mivel magát az örökítő anyag vizsgálatát használják fel a tipizáláshoz, lehetővé teszik direkt következtetések levonását a rokonságra nézve, erre a környezeti feltételek heterogenitása semmiféle befolyással nincs. A módszer(ek) körültekintő megválasztásával általában a klasszikus módszerek nyújtotta felbontóképességnél jobb érhető el, bár ritkán kivételek is előfordulnak (pulzáló mezejű gélelektroforézis vs. fágtipizálás a *Salmonella* Enteritidis esetében; P. Tassios, személyes közlés). Már jól működő rendszerek könnyebben adaptálhatóak más kórokozók vizsgálatára. Nem szükséges fenntartani és folyamatosan validálni fágtenyészeteket és savókat, a minőségi kontrollhoz csak néhány kontroll törzs rendszeres vizsgálatára van szükség. Mindezek miatt a molekuláris módszerek számos területen jól alkalmazható alternatíváivá váltak a klasszikus szero- és fágtipizálásnak (44).

2.2. DNS-alapú tipizáló módszerek bemutatása

Az alább felsorolt módszerek közös vonása, hogy a DNS vizsgálatán alapulnak. A vizsgált DNS leggyakrabban a genomi DNS, de természetesen vizsgálhatók extrakromoszomális elemek, illetve mobilis genetikai elemek is. A módszerek több irányból közelíthetik meg a genom változatosságának vizsgálatát. Elemezhető a genomban elhelyezkedő restrikciós hasító helyek mintázata (RFLP, REAG, AFLP), repetitív (rep-PCR, MLVA, IS-tipizálás) és véletlenszerűen kiválasztott (RAPD) szekvenciák genomi elhelyezkedése, a telomerek polimorfizmusa, és bizonyos kiválasztott gének szekvenciájában jelentkező különbségek (MLST). (A mikrobiális ökológiában olyan tipizáló módszerek is ismeretesek, amelyek egy teljes mikrobaközösség diverzitásának felmérésére szolgálnak, például DGGE, TGGE, ARDRA (106), de ezeket a molekuláris epidemiológiában nem alkalmazzák).

A módszerek három nagyobb csoportba sorolhatók aszerint, hogy milyen módon mintázzák a tipizálni kívánt mikroba DNS-ét. A tipizálás alapjául szolgálhat nem genomiális DNS (plazmidprofil analízis), egyes módszerek a genom egy kiválasztott részét vizsgálják (egy kiválasztott gén vagy régió RFLP analízise, MLVA, MLST), mások a teljes genomot mintázzák meg restrikciós hasítási hely polimorfizmusok (teljes genom RFLP, REAG, AFLP) vagy repetitív (rep-PCR) illetve random szekvenciák (RAPD) elhelyezkedésében mutatkozó polimorfizmusok segítségével.

A továbbiak a teljesség igénye nélkül áttekintést nyújtanak a legfontosabb tipizáló módszerekről és azok felhasználási területeiről, különös tekintettel a munka során alkalmazott módszerekre.

2.2.1. Plazmidprofil analízis

A **plazmidprofil analízis** kórokozó által hordozott plazmidok vizsgálatán alapszik, a tipizálás alapjául szolgáló információt a hordozott plazmidok méretének változatossága adja (76, 97, 151, 173). Fő hátránya, hogy mivel a plazmidok mobilis elemek, hiányukból vagy jelenlétükből a rokonságra nézve egyértelmű következtetés nem vonható le, emellett plazmidokat nem hordozó kórokozók (*M. tuberculosis*, bizonyos eukarióták) tipizálására nem alkalmas.

2.2.2. A genom egy kitüntetett részét vizsgáló módszerek

A módszerek közös hátránya, hogy a rokonság megítélése csak a genom egy viszonylag kicsi részének vizsgálatával történik. Ha a kiválasztott régió a genom egészénél jelentősen konzervatívabb vagy változékonnyabb, az torzítja a kapott rokonsági adatokat. Emellett a vizsgált régió(ka)t igen körültekintően kell megválasztani, különben a módszerünk felbontóképessége túl gyenge vagy túlságosan nagy lesz.

2.2.2.1. Egy kiválasztott gén (régió) RFLP analízise

A legrégebben alkalmazott molekuláris tipizáló módszerek egyike. A lényege, hogy a genom egy releváns részét (egy fontos gént vagy génszakaszt) restrikciós endonukleázzal hasítjuk, majd az RFLP mintázat változatosságát használjuk tipizálásra (49). Ilyen megközelítést alkalmaz *Campylobacter spp.* és *Helicobacter pylori* tipizálása során alkalmazott **fla (flagellin)-tipizálás** (66, 107), a különböző toxin gének (20, 66, 115, 134) és más virulenciafaktor gének (43, 66, 81, 173) RFLP analízisén alapuló tipizáló módszerek.

2.2.2.2. Kiválasztott gének (régiók) polimorfizmusa

Ebbe a csoportba tartozik a széles körben elterjedt **PCR-ribotipizálás**, amely a genomban több kópiában elszórtan meglévő rDNS régiók nem kódoló régióinak méret-polimorfizmusát használja fel a tipizáláshoz. Nagy előnye, hogy egyszerű, egyetlen PCR elvégzésével eredményt kapunk. Hátránya, hogy nem alkalmazható olyan organizmusok jellemzésére, amelyek a rRNS géneket csak kevés kópiában tartalmazzák (*Mycobacteriumok*, *Helicobacter*), mivel ebben az esetben nem kapunk a megfelelő felbontóképességhez szükséges elegendően komplex mintázatot. Fontos alkalmazási területe a számos más módszer számára (azok nem kielégítő felbontóképessége miatt) megközelíthetetlen *Salmonella* Enteritidis tipizálása (83, 85), de számos más példa is ismeretes (56, 64, 152, 159, 173).

Hasonlóan egyszerű (egyetlen PCR-t igényel) a **telomer-polimorfizmus vizsgálata**, amely természeténél fogva eukarióták ujjlenyomatozására alkalmas. Különböző telomer-

specifikus primerek segítségével azok változatossága megjeleníthető, a módszert gombák és protozoonok tipizálására alkalmazzák (14, 161).

Az **MLVA** egy hasonló elven működő, de sokkal munkaigényesebb módszer. Alapja az, hogy a genom egyes régióiban változó számú, nemkódoló tandem ismétlődés található (VNTR vagy mikroszatelliták; a VNTR elnevezés inkább baktériumok, a mikroszatellita pedig eukarióták esetén elterjedt), amelyek felderítéséhez a teljes genom szekvenciák meghatározására volt szükség (91). Ezek amplifikációjával a tandem szakaszok méretétől és számától függően különböző méretű PCR termékeket kapunk. Ha ezt több kiválasztott régióban elvégezzük (MLVA), akkor egy jellemző, ujjlenyomatozásra alkalmas mintázatot kapunk (91, 164). A módszer a PCR-ribotipizálásnál sokkal munkaigényesebb, mivel itt egy izolátum típusának meghatározásához több egymást követő PCR-t kell elvégezni, emellett minden organizmusra külön rendszert kell kidolgozni (91). Előnye viszont, hogy a lókuszok megfelelő megválasztásával organizmus-specifikussá tehető, így alkalmas közvetlenül a mintából történő tipizálásra, nem szükséges a tipizálandó organizmus tiszta tenyészetének előállítása. Emiatt gyakran alkalmazzák nem vagy nehezen tenyészthető organizmusok, például *Anaplasma phagocytophylum* (24) vagy *Mycobacterium leprae* (174) tipizálására. Több hasonló elven működő tipizáló módszert alkalmaznak a *Mycobacterium tuberculosis* komplex vizsgálatára is (118), de egyre jobban terjed nozokomiális patogének (90, 111, 155) és ételfertőzést okozó baktériumok (91, 110, 177) vizsgálatára is. Eukarióta kórokozók tipizálására is használatos (13).

A mikroszatellita (VNTR) tipizálásnak további előnye, hogy magasabbrendű eukarióták, így például emberek rokonsági viszonyainak felderítésére is alkalmas (63, 89, 113). A rokonsági viszonyok megállapítása mellett alkalmazzák filogenetikai vizsgálatokra (129), és különböző betegségek, például diabéteszes nefropátia (100), magas vérnyomás betegség (179) vagy neurodegeneratív betegségek (128) genetikai hátterének vizsgálatára is.

Szintén a *M. tuberculosis* komplex vizsgálatában van szerepe a **spoligotipizálás**nak (spacer oligotyping), amely egy a genomban gyakran előforduló rövid szekvencia elválasztó (spacer) szekvenciáinak polimorfizmusát használja tipizálásra. A változatosság megjelenítésére a target szekvenciát nagy kópiaszámban és változatossággal tartalmazó referencia izolátumból készített, membránon rögzített próbasorozat szolgál, eredményhez a tipizálni kívánt törzsekből amplifikált szekvenciák a próbákat tartalmazó membránra való hibridizációja útján jutunk (9, 77, 118).

Szintén munkaigényes a különböző háztartási (housekeeping) gének szekvencia-analízisén alapuló **MLST**. Fontos a megfelelő gének kiválasztása, ezeknek elegendően

konzervatívaknak kell lenniük ahhoz, hogy egy klónon belül a szekvenciájuk ne változzon, ugyanakkor kellő változatosságot kell mutatniuk a megfelelő felbontóképesség érdekében (94, 169). Munkaigényessége mellett hátránya még, hogy a módszert minden organizmusra külön ki kell dolgozni, és hogy a rokonsági fokot csak a bevont gének számának megfelelő kvantumokban tudja becsülni. Emellett nem rendelkezik elegendő felbontóképességgel erősen klonális kórokozók, így *Escherichia coli* O157 tipizálásához (53).

Rendkívül jól reprodukálható (49), és a legtöbb más tipizáló módszerrel ellentétben alkalmas filogenetikai következtetések levonására (1, 94). Alkalmas nem tenyésztethető kórokozók direkt a mintából történő tipizálására is (11), és eukarióta kórokozók is tipizálhatóak (10, 61). Ezek miatt az előnyös tulajdonságok miatt széles körben alkalmazzák (170), így például *Campylobacter spp.* (123), *Enterococcus* (2), *Aspergillus* (10), *Cryptosporidium* (60) tipizálására. Az MLST adatok egy Internetes adatbázisban mindenki számára hozzáférhetőek (1).

2.2.3. A teljes genomot vizsgáló módszerek

Mivel a tipizálás alapjául szolgáló adatok a teljes genom változatosságát reprezentálják, ezek a módszerek kevésbé érzékenyek a különböző genomi régiók evolúciójának sebességkülönbségére.

2.2.3.1. A genom egészét megjelenítő módszerek

2.2.3.1.1. Teljes genom RFLP

A legkönnyebben kivitelezhető, a genom egészét megjeleníteni képes módszer a **teljes genom RFLP**, amikor a tipizálandó mikroorganizmus totál genomi DNS-ét emésztjük restrikciós endonukleázokkal (61, 142, 173). Ez egy nagyon komplex, a maga teljességében legtöbbször elemezhetetlen mintázatot eredményez, bár rendkívül egyszerű, jelenleg már igen ritkán alkalmazott módszer.

Egy relatíve új technológia, a **RFEL** képes ezek közül a kisebb méretűeket kiválasztani és megjeleníteni, oly módon, hogy a restrikciós fragmentek ragadós végeihez

radioaktívan jelölt nukleotidokat kapcsolva, azok nagyfelbontású gélben a radioaktivitás alapján megjeleníthetők (169). Hasonló, de a radioaktív jelölés helyett biotin-streptavidin rendszert alkalmaz a **SRF** (153).

Ha a kapott mintázatra specifikus jelölt próbákat hibridizáltatnak (Southern-blot), akkor egy elemezhető és általában jól reprodukálható mintázatot lehet előállítani, viszont így a továbbfejlesztett módszerek már nem jelenítik meg az egész genomot (61). A próbaként használt szekvencia általában az rDNS operonból származik (ribotipizálás, lásd alább).

2.2.3.1.2. Kariotipizálás

A **kariotipizálás** (kromoszóma hossz polimorfizmus) a kromoszómaméret polimorfizmusát használja fel a tipizálásra (61). Természetesen ez csak több kromoszómával rendelkező eukarióta szervezetek vizsgálatára alkalmas. Mivel a kromoszómák mérete (25 kbp fölött) nem teszi lehetővé a hagyományos agaróz vagy poliakrilamid gélelektroforézissel történő szeparálást, speciális módszerre (PFGE) van szükség az elválasztásukhoz (16, 118, 142). A kariotipizálást gyakran **PFGE** néven hivatkozzák.

Az erre a célra kifejlesztett módszerek közös tulajdonsága, hogy az elválasztandó DNS molekulákra az elektroforézis során ható erőter irányja nem állandó, hanem előre meghatározott periódusidővel változik (pulzál). A módszereket ezért pulzáló mezejű gélelektroforézisnek nevezzük. A pulzáló erőterben, a hagyományos elektroforézissel ellentétben, a DNS molekulák nem folyamatosan vándorolnak az erőterben, hanem annak irányváltoztatásai miatt minden ilyen irányváltoztatás után konformációváltozást szenvednek. Ennek a konformációváltozásnak az időigénye arányos a molekula méretével, tehát a méret szerinti elválasztás elsősorban a periódusidőtől (pulzusidőtől) függ, minél nagyobb a DNS darab, annál több idő szükséges a továbbhaladáshoz szükséges konformáció felvételéhez, tehát a következő irányváltásig eltelő időből annál kevesebb marad az előrehaladásra. Minél nagyobb tehát a molekula, annál lassabban vándorol azonos pulzusidő mellett. A pulzusidő mellett az elválasztást befolyásolja még a pulzáló erőterek irányai által bezárt szög és az elválasztáshoz alkalmazott feszültség, de a futtatási idő csak a már elvált sávok távolságát növeli meg, magára az elválasztásra nincs hatással (16).

Az erőter irányváltoztatásának előállítás szerint különböző alcsoportokat különböztetünk meg (CHEF, RGE, FIGE, TAFE stb.) (16), ezek közül a legelterjedtebb a

CHEF módszer (16, 38), amely hatszög alakban elhelyezett 24 darab elektróda segítségével állítja elő az erőtereket és azok pulzálását.

Az elválasztandó DNS darabok nagy mérete nemcsak az elválasztó módszerrel szemben támaszt követelményeket. A megfelelő eredményhez az is szükséges, hogy ne következzenek be spontán DNS törések, amit ekkora darabok esetén vizes fázisban nem lehet elkerülni. Emiatt a kariotipizálás (és a REAG, lásd alább) különleges DNS kivonási eljárást igényel. A módszer különlegessége az, hogy a DNS tisztítása agaróz mátrixban történik, ami megakadályozza a DNS spontán törését. Ez rendkívül idő- és munkaigényes folyamat, ami egyben a módszer legfőbb hátránya is.

A kariotipizálás mint tipizáló eljárás viszonylag kevés, változatos méretű kromoszómával rendelkező organizmusok, így protozoonok (19, 143) és gombák tipizálására alkalmazható, a humán patogén gombák tipizálásának egyik legfontosabb módszere (16, 142). Felhasználják emellett a különböző malignus folyamatokban jelentkező kromoszóma-polimorfizmusok vizsgálatára is (108).

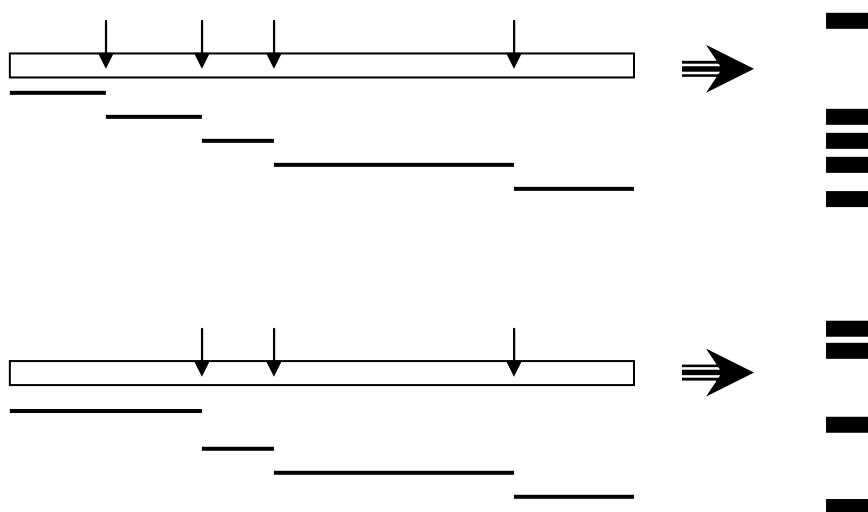
2.2.3.1.3. A genom restrikciós analízise (REAG)

A **REAG** a tipizálandó organizmus genomját viszonylag ritkán hasító restrikciós endonukleáz felismerő helyeinek polimorfizmusát vizsgálja, a kariotipizáláshoz hasonlóan a vizsgálat során csaknem a teljes genom vizualizálhatóvá válik. Ezzel az egy kromoszómával rendelkező baktériumok is vizsgálhatóvá válnak (16). A keletkező nagyméretű DNS darabok miatt a kariotipizáláshoz hasonlóan agaróz mátrixban történő preparálást igényel, így a restrikciós emésztést is az agarba ágyazott mintán kell végezni. Ez tovább növeli a módszer idő- és munkaigényét. A futtató technikáról a REAG módszert is gyakran PFGE néven emlegetik. Bár ez az elnevezés a kariotipizálás és a REAG között nem tesz különbséget, a gyakorlatban ez ritkán okoz zavart, mivel a kariotipizálást kizárólag eukarióták jellemzésére szolgál, a REAG pedig igen ritkán használatos eukarióták vizsgálatára, így baktériumok esetén a PFGE mindig REAG-ot jelent, eukarióták esetén pedig nagy valószínűséggel kariotipizálást.

A módszer óriási előnye, hogy rendkívül jól reprodukálható, nemcsak egy laboratóriumon belül, hanem különböző laboratóriumok között is (49). Emiatt jelenleg a legtöbb kórokozó tipizálásában a REAG a standard módszer, amely nemzetközi járványtani figyelőhálózatok (PulseNet, www.cdc.gov/Pulsenet; PulseNet Europe, www.pulsenet-

europe.org) működését teszi lehetővé (147, 148). További előnyei, hogy a kontaminációra kevésbé érzékeny, a preparálás protokollja a rokon fajok körében gyakorlatilag változtatás nélkül alkalmazható, és hogy az emésztést több különböző restrikciós enzimmal végezve több ujjlenyomat nyerhető egy preparálásból. Hátránya, hogy bizonyos kórokozók esetében a törzsek egy része nem tipizálható (27). Emellett a kapott fragmentek méretazonossága nem okvetlenül jelent valódi szekvenciaegyezést, illetve hogy egy esemény (mutáció) a mintázat jelentős megváltozását okozhatja (három sáv különbség a két mintázat között; 1. ábra).

1. ábra: Egy hasító hely mutáció miatti eltűnésének hatása a REAG mintázatra. A függőleges nyilak a hasító helyeket jelölik, a várható mintázat a jobb oldalon látható.



2.2.3.2. A genomot megmintázó módszerek

2.2.3.2.1. Ribotipizálás

A **ribotipizálás** a PCR-ribotipizáláshoz hasonlóan a riboszomális gének elhelyezkedésének változatosságát használja ki, de azok a teljes genom RFLP mintázatához hibridizált (Southern blot) rDNS próbával jeleníti meg (15). Használata különösen a PFGE megjelenése előtt volt elterjedt, de jelenleg is gyakran alkalmazzák, így például egyes *Salmonella* szerovariánsok esetében (83, 85).

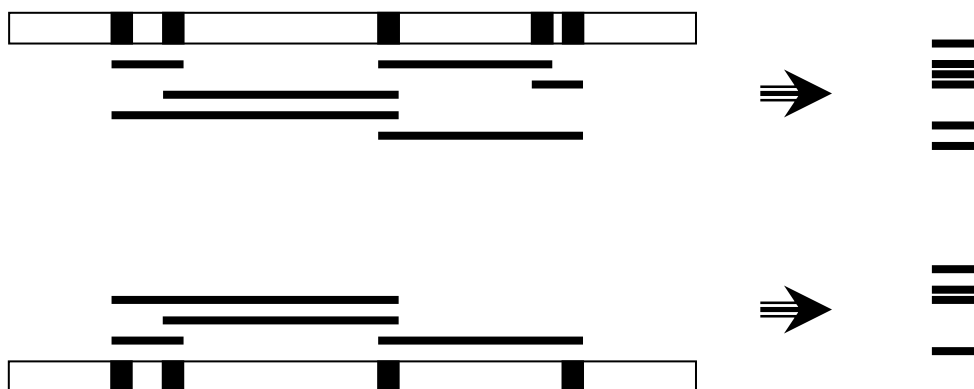
2.2.3.2.2. RAPD

A **RAPD** módszer alapja az egyetlen rövid (tíz-tizenkét tagú) primerrel, megengedő körülmények (alacsony anellációs hőmérséklet, magas Mg tartalom, magas polimeráz koncentráció) mellett végzett PCR. A primer nem specifikus semmilyen ismert szekvenciára, random módon, próbálgatással választják ki. A reakció során a random primerrel amplifikálható sávok mintázata adja az ujjlenyomatot (49). Bármilyen mikroorganizmus esetén alkalmazható (27, 28, 34, 138, 142, 173), bár a megfelelő mintázatot biztosító primer(ek) kiválasztása hosszú időt vehet igénybe. A módszer rendkívül érzékeny a körülmények apró változásaira is, akár két azonos típusú PCR készülékben futott párhuzamosok is különbséget mutathatnak. Emiatt fő hátránya a rendkívül rossz reprodukálhatóság, amely alkalmatlanná teszi laboratóriumok közötti, vagy nagy időközzel végzett összehasonlító elemzések végzésére (49, 118, 142).

2.2.3.2.3. Repetítív elemeket célzó PCR

A **rep-PCR** módszerek a különböző organizmusok genomjában számos kópiában elszórva megtalálható rövid repetítív szakaszok (93, 171) elhelyezkedését vizsgálják. A PCR reakció primere(i) a repetítív elemre specifikusak, de azok rövidsége miatt valójában két ilyen elem között elhelyezkedő DNS szakaszokat amplifikálnak.

2. ábra: A rep-PCR elvének sematikus ábrája. A fekete téglalapok a repetítív elem kópiáit jelölik, jobb oldalon pedig a várható mintázatok láthatók.



Az elemek ismétlődése miatt egyetlen primer is elég lehet. Mivel ezek az elemek elszórva helyezkednek el, az amplifikált szakaszok változatosak, és mivel egy-egy ilyen szakasz eltűnéséhez vagy megjelenéséhez a genom jelentős változása (inszerció, delécio) szükséges, a kapott mintázat jól tükrözi a rokonsági viszonyokat. A primerek specifitása miatt nem okvetlenül szükséges megengedő PCR körülményeket használni, így a rep-PCR reprodukálhatósága sokkal jobb, mint a RAPD-é, de még így sem mindig elegendő a laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálatokhoz (49).

Mivel többféle ilyen repetitív elem létezik, így többféle rep-PCR ujjlenyomat vehető fel. A legelterjedtebb a REP és az *Enterobacteriaceae*-re jellemző ERIC szekvenciák használata (8, 27, 49, 51, 69, 88, 102, 103, 119, 120, 124, 127, 137, 149), emellett ismert a *Streptococcus pneumoniae*-ben talált BOX (47, 80, 95, 148, 162, 163); kevésbé ismert a *Salmonella* Enteritidis genomjában megtalált SERE elem (4, 5, 78, 116) és a *Mycoplasma pneumoniae*-ből leírt repetitív elem (166, 175).

A módszer, bár viszonylag rossz a reprodukálhatósága és a kontaminációra is rendkívül érzékeny (akár a polimerázban található DNS szennyezés is a mintázat megváltozását eredményezheti) (118), egyszerűsége, gyorsasága, nagy áteresztőképessége és kis költsége miatt a legelterjedtebb metodikák egyike.

Bár a szó szoros értelmében nem repetitív elemek, különböző inszerciók szekvenciák szintén alkalmasak hasonló vizsgálatok végzésére, így például a *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 szekvenciája (82, 154, 167).

2.2.3.2.4. AFLP

Az **AFLP** két restrikciós enzimmal (egy ritkán és egy gyakran hasítóval) kettősen emésztett genomból specifikus adapter oligonukleotidok és az adapterekre specifikus primerekkel végzett PCR segítségével kiválogatja a két végén különböző hasítási helyet hordozó, amplifikációra alkalmas méretű darabokat. A módszert általában valamelyik primer fluoreszcens jelölésével teszik vizualizálhatóvá (126, 142, 172). Jól reprodukálható, jó felbontóképességű (49), de bonyolultsága miatt nem minden laboratórium számára elérhető módszer, számos kórokozó tipizálására alkalmazták (59, 74, 75, 122, 144, 180). Használható kórokozó (121, 142) és magasabb rendű eukarióták tipizálására is (58).

Az AFLP mellett egy elvében nagyon hasonló módszert (**IRS-PCR**) is leírtak, de ez eddig nem terjedt el széles körben (98).

2.3. A tipizáló módszerek eredményének értékelése

A tipizáló módszerek alkalmazása során nyert adatokból csak kevés adatpont esetén könnyű direkt következtetést levonni, nagyszámú vizsgálat (izolátum) esetén, illetve két vagy több, módszer eredményeinek összevetéséhez szükséges az adatok matematikai analízise.

Az egyes izolátumok (adatsorok, mintázatok) közötti hasonlóság (rokonság) kétféle modellel közelíthető meg. A kladisztikus modellek valamilyen evolúciós modell segítségével elemzik az adatokat (118), így inkább olyan esetekben használhatóak, mikor a tipizálás eredményéből közvetlenül következtethetünk a rokonságra (ilyen módszer a direkt szekvencia-analízis, amit a vírusok tipizálására alkalmaznak, illetve az MLST). Mivel a legtöbb tipizáló módszer hasonlóságot mér, ezért a járványtani elemzések sokkal elterjedtebben alkalmaznak fenetikus módszereket, amelyek csak a hasonlóságok és különbségek alapján, azok számszerűsítése és matematikai analízise útján csoportosítja a mintázatokat (118).

A hasonlóság (similarity) mérésére különböző indexek léteznek, amelyek általában alkalmasak bonyolult mintázatok összevetésére is. A hasonlóság mértéke 0 és 100% (0 és 1) közé eshet, ahol 100% (illetve 1) a tökéletes egyezést jelenti. Az indexek mindig két mintázatot hasonlítanak össze egymással, több mintázat összevetéséhez ezeken az indexeken alapuló csoportosító (clustering) módszerek alkalmazása szükséges (168).

2.3.1. A hasonlóság mérése

A mintázat lehetséges elemei (sávok, mutációk, rezisztenciaértékek, stb.) négy csoportba sorolhatók a két mintázat összehasonlítása során. i) mindkét összehasonlítandó mintázatban megvan (a), ii) csak „A” mintázatban van meg (b), iii) csak „B” mintázatban van meg (c) iv) egyik mintázatban sincs meg (d). Ezek száma alapján számolható ki a két mintázat hasonlósága (similarity; S), vagy különbözősége (distance; D). A különböző indexek abban térnek el, hogy melyik csoport kap nagyobb hangsúlyt az indexben (168).

Spoligotipizálás esetén például, ahol egy elem hiánya a meglétével megegyező értékű információ (ismert az összes lehetséges elem), érdemes olyan indexet választani, ami mind a

meglevő, mind a hiányzó elemeket egyforma súllyal veszi figyelembe, mint az egyszerű egyezés koefficiens (S):

$$S = \frac{a + d}{a + b + c + d}.$$

Olyan esetekben ahol a mintázat elemeinek nincs előre meghatározott helye, mint például PFGE vagy rep-PCR gélfotók sávmintázatának összehasonlítása esetén jól alkalmazhatóak a Jaccard (S_J) és a Dice (S_D) koefficiensek, amelyek figyelmen kívül hagyják a mindkét mintázatból hiányzó elemeket (d). A Dice koefficiens nagyobb súlyt helyez a megegyező elemekre (a) (168):

$$S_J = \frac{a}{a + b + c};$$

$$S_D = \frac{2a}{2a + b + c}.$$

A különböző mintáztpárokhoz rendelt hasonlósági indexből mátrixot képezve jutunk el a hasonlósági mátrixhoz, ami tartalmazza a mintázatok közötti hasonlósági adatainkat. Egy bizonyos (meglehetősen kicsi) mintaelemszám fölött azonban a mátrixok áttekinthetetlené válnak, így további matematikai elemző módszerekre van szükség a kiértékelésükhöz. Ezeket a módszereket csoportanalízisnek (cluster analysis) nevezzük.

2.3.1. Csoportanalízis (cluster analysis)

A csoportanalízis célja az adatsorunk adatpontjainak hasonlóságok illetve különbségek alapján történő csoportokba rendezése. A módszerek az alkalmazott megközelítés alapján a hierarchikus és a nem hierarchikus csoportokba sorolhatóak. A hierarchikus módszerek egymásra épülő csoportokat képeznek, amelyeket egy hierarchikus rend szerint rendeznek, így egy lépcsőzetesen felépülő dendrogramhoz (fához) jutunk. A nem hierarchikus módszerek esetén ilyen struktúra nem jön létre, az egyes adatpontok nem egymás részeként ábrázolt alcsoport-csoport-főcsoport rendben ábrázolódnak (118).

Míg például az MLST értékelésére nem hierarchikus módszerek is szóba kerülnek, az elektroforetikus mintázatok kiértékelésére leggyakrabban különböző hierarchikus módszereket alkalmaznak (118). Ezek közül a legelterjedtebb az UPGMA módszer. Ennek lényege (és fő hátránya a kapott csoportosítás valódisága szempontjából), hogy mindig a két egymással aktuálisan leghasonlóbb mintázat átlagával számolva képez egy új (egy elemmel kisebb) hasonlósági mátrixot. Tehát az UPGMA módszer egy mintázat (csoport) átlagos

távolságát mutatja meg egy másik mintázathoz (csoporthoz) képest. Mivel a valóságban az egyes rokon törzsek nem ugyanakkor sebességgel távolodnak genetikailag egymástól, ezek a távolságok általában nem pontosan a két csoport átlagával egyenlők. Az UPGMA módszer jól alkalmazható az adatsorban levő hasonlósági csoportok azonosítására (illetve újabb mintázatok már ismert csoportokkal való összehasonlítására), emiatt a fent említett torzítása ellenére a legelterjedtebb módszer az elektroforetikus mintázatok kiértékelése során (118, 168).

A fent leírt hasonlósági számítások és csoportanalitikai módszerek elvégzésére ma már különböző szoftverek állnak rendelkezésre (BioNumerics, Foretics, stb.) (117).

2.4. A molekuláris tipizáló módszerek jelentősége

A tipizáló módszerek célja tehát egy izolátum csoporton belül a hasonlóságok és különbségek kimutatása. A legtöbb tipizáló módszer legfőbb korlátja, hogy a hasonlóságot méri, és ebből következtet a genetikai rokonságra (a hasonló izolátumok között feltételezhető a genetikai rokonság). Fontos tehát szem előtt tartani, hogy a legtöbb tipizáló módszer alkalmatlan filogenetikai és taxonómiai következtetések levonására (118). Az így kapott adatok elsődleges felhasználási területe tehát a járványtani kapcsolatok felderítése (21, 44, 82). Ez egyszersmind azt is jelenti, hogy ezek a módszerek a járványtani adatokra épülve alkalmazandók, megfelelő járványtani adatok hiányában kevés információt nyújtanak (82). Természetesen ezek a módszerek nem kizárólag járványtani vizsgálatra alkalmazhatóak, hanem például mikrobák vízzel vagy talajban való terjedésének vizsgálatára is (101, 131), de ebben az esetben is az izolátumok közötti ismert vagy feltételezett térbeli és/vagy időbeli kapcsolat elemzésére szolgálnak.

A vizsgálatok fő alkalmazási területe a járványtani nyomozás, tehát egymással járványtani összefüggésbe hozható izolátumok (esetek) kapcsolatának bizonyítása (21, 44, 55, 114, 118, 145). Ez lehetőséget ad a kórokozó terjedésének pontos nyomon követésére (source tracking), amelynek ismerete fényt derít azokra a pontokra, ahol hatékony beavatkozásra van lehetőség (82, 114, 131). Felhívhatja a figyelmet áljárványokra is, például a laboratóriumi keresztkontamináció esetére (82)

Emellett a módszerek (megfelelő reprodukálhatóság esetén) alkalmasak a kórokozók térbeli és/vagy időbeli monitorozására (surveillance), megállapítva a leggyakoribb

mintázatok, így újak halmozódása esetén hamarabb nyilvánvalóvá válhat egy járvány (12, 21, 82).

A tipizálás segítséget nyújt a betegség (kórokozó) átvitelének dinamikájával kapcsolatos vizsgálatok során (44, 82), például az adott típusokkal való fertőződés rizikófaktorainak illetve a különösen fogékony populációk felderítésében (80), vad-vakcina (48, 73, 135, 141, 150), illetve a virulens és az avirulens törzsek (kolonizáció és infekció) elkülönítésében is (114, 178, 181).

2.5. Az értekezés témájául szolgáló baktériumok bemutatása

Jelen munka két fontos baromfipatógén baktérium, a *Pasteurella multocida* és a *Riemerella anatipestifer* vizsgálatával foglalkozik. Mindkét baktérium jelentős gazdasági károkat okoz különböző baromfiállományokban, így az állatorvosi (baromfiegészségügyi) diagnosztika szempontjából kiemelkedő jelentőségűek.

A molekuláris tipizáló módszerek alkalmazása különösen informatív lehet a két faj esetében, mert különböző virulenciájú törzsek lehetnek jelen az állományban anélkül, hogy klinikai megbetegedést okoznának (37, 41), a terjedésben számos különböző tényező szerepet játszhat, emellett a megelőzésben jelentős szerepet játszik különböző vakcinák alkalmazása (62), tehát a különböző izolátumok pontos azonosítása bizonyos esetekben lényeges lehet.

2.5.1. *Pasteurella multocida*

A *P. multocida* apró, nem mozgó, spórátlan, fakultatív anaerob Gram negatív pálca vagy coccobacillus. A törzsek nagy része poliszacharid vagy hialuronsav tokkal rendelkezik, amely fontos virulenciafaktor. A szerocsoportokba sorolás is a tokantigének alapján történik, ezek alapján A, B, D, E, és F csoportokba sorolható (31). Az egyes buroktípusoktól függetlenül a szomatikus antigének alapján további (Heddlestone-) típusok határozhatóak meg (68).

Tápigényes, tenyésztésére véres agart használnak, amelyen hemolízist nem mutat. A telepek 1-2 mm átmérőjűek, szürkék, esetenként összefolyók, mukoid jellegűek lehetnek. A dextrózt, a szacharózt és a mannitot gázképződés nélkül fermentálják, kataláz, indol, oxidáz és nitrát pozitívak. Az indoltermelés esetenként nagyon kis mennyiségű is lehet, ilyenkor

kimutatása nem mindig sikerül. Kis mennyiségű kén-hidrogént a törzsek egy kis hányada szintén képezhet. Metilvörös, Voges-Proskauer és ureáz negatív (32, 52).

A gazdaspecifitása széles, a legtöbb gazdaságilag jelentős háziállatot megbetegíti. Az egészséges állatok hordozzák a kórokozók a légutak normál flórájában, a megbetegedés általában stressz hatására következik be (62, 67, 160).

Sertésben a dermonekrotikus toxint termelő (főleg D, ritkábban A csoportba tartozó törzsek) torzító orrgyulladást okoznak a *Bordetella bronchiseptica*-val együtt. Sertésben előfordulhat még *P. multocida* okozta pneumonia, ebben az A, ritkábban a D burokantigént hordozó törzseknek van kóroki szerepe (67, 160).

Szarvasmarhában, bivalyban, kiskérődzőkben az A és D buroktípusok elsősorban alsó légúti fertőzést, ritkábban szepszist okoznak. A trópusi, szubtrópusi területeken a szarvasmarha és a bivaly esetében hiperakut, tömeges elhullással járó vérzéses betegség is előfordul, Ázsiában a B, Afrikában az E buroktípus elterjedt (67, 160).

Szintén pneumonia és következményes szepszis az eredménye a házinyúl *P. multocida* fertőzésének, amelyet A és D buroktípusú törzsek okoznak (160).

Ragadozó emlősökben gyakori a tünetmentes hordozás (62, 67, 160), emiatt kutya, macska által okozott sérüléseket követő sebfertőzésekben gyakran kitenyészthető humán mintákból is (52, 62, 130). Harapás nélkül történő átvitele is ismert (22).

Madarakban baromfikolerát okoz, amely akut formájában szepszis, krónikus formájában krónikus felső légúti hurut, hasmenés, arthritis képében jelentkezik (62, 160). Az okozott kórkép az adott törzs virulenciájától, és a gazdaállat ellenálló képességétől függ, bár vannak olyan hipervirulens törzsek is, amelyek hajlamosító tényezők nélkül is igen magas elhullással járó járványokat okoznak. A baromfikolerára leginkább fogékony a pulyka és a vízibaromfi, de gyakorlatilag minden háziszárnyasban (házityúk, gyöngytyúk, galamb, strucc) és vadmadárban előfordulhat. A házityúk fogékonyága a korral nő, idősebb, tojó- és tenyészállományok a brojlerállományoknál fogékonyabbak. A járványokban az A, D és F buroktípusok fordulnak elő (37, 67, 160).

A baromfikolera gyors lefolyása és magas mortalitása miatt az egyik legnagyobb gazdasági kárt okozó megbetegedés a nagyüzemi baromfitartás számára (29, 105). Ez alól csak a viszonylag kevésbé fogékony brojlerállományok kivételek (37, 62, 160). Mivel a kórokozót az állomány egyes egyedei tünetmentesen hordozhatják (37, 41), ezen kívül számos vadmadár fajban (vadrécék, vadludak, ragadozók, parti madarak) kimutatható (23, 88, 112, 176), mind zártan, mind nem zártan tartott állományokban előfordulnak ismétlődő járványok.

Több tanulmány foglalkozik a baromfikolera patogenezisében szerepet játszó virulencifaktorokkal. A burok szerepe nyilvánvaló, antifagociter és antikomplement hatású (25, 39, 67), fontos még a lipopoliszacharid szerepe a patogenezisben (67). A torzító orrgyulladásban a termelt dermonekrotikus toxinnak van szerepe (67, 90) Emellett felmerült a vaskötő proteinek, fimbriák, és egy hemolitikus észteráz szerepe is (3, 26, 67).

Jelentősége miatt számos munka foglalkozik a *P. multocida* epidemiológiájával is (71 és referenciái). A szerotipizálás, a buroktípusok gazdaspecifitása miatt nem kellően diszkriminatív (37). Ribotipizálás és teljes genom RFLP segítségével több munkában bizonyítottak átvitelt különböző USA-beli pulykatelepek között, illetve a telepeken szabadon élő állatok és a pulykák között (35, 36, 30, 139, 140). A ribotipizálást alkalmazták humán eset (22) és regionális diverzitás (18) vizsgálatára is. Alkalmaztak RAPD-ot (34, 70, 130), rep-PCR-t (6, 127, 136, 156), AFLP-t is (6, 70). PFGE alkalmazásáról is több szerző beszámolt (22, 45, 46, 65, 84, 88, 112, 157).

2.5.2. *Riemerella anatipestifer*

Sokáig a *Pasteurella* genusba sorolták, 1993-ben hozták létre a *Riemerella* genust (132). A baktérium Gram negatív apró pálca illetve coccobacillus, csillótlan, tokot nem képez, nem spórasodik. A *P. multocida*-tól, amelyhez morfológiailag és tápigényét tekintve igen hasonló, nitrát negativitása, a szénhidrázok fermentációjának hiánya és zselatinbontása alapján különíthető el (32). Eddig 21 szerotípusát különítették el (17, 92).

Baromfipatogén, legfogékonyabbak a kacsák, emellett a libát és a pulykát képes megbetegíteni (160). A törzsek virulenciája változatos, emellett az okozott megbetegedés súlyossága a gazdafajtól, az állomány korától és általános állapotától függ. Fiatal (2-4 hetes) kacsáállományokban a mortalitás 75% is lehet. Vezető tünet a felső légúti nyálkahártyák és a savós hárttyák gyulladása, meningitis is meglehetősen gyakran fordul elő.

Ismeretes néhány potenciális virulenciafaktor (40, 146), a különböző törzsek virulenciája eltérő lehet (146). A kórokozó tipizálására szerotipizálás áll rendelkezésre, de alkalmazását nehézkessége mellett számos keresztreagáló típus meglete nehezíti (119). Leírtak teljes genom RFLP-n (119) és rep-PCR-en (69) alapuló protokollokat is, de a kórokozót biztosan kimutató illetve jól reprodukálhatóan tipizáló molekuláris módszer eddig nem volt ismeretes.

3. Célkitűzések

1. Baromfikolera járványokból izolált *Pasteurella multocida* törzsek összehasonlítása PFGE és rep-PCR segítségével, retrospektív járványtani nyomozás céljából.
2. *Riemerella anatipestifer* specifikus kimutatására alkalmas PCR kidolgozása a faj pontos azonosítása érdekében.
3. *R. anatipestifer* tipizálására alkalmas PFGE protokoll kidolgozása és alkalmazása hazai *R. anatipestifer* törzsek jellemzésére.

4. Anyag és módszer

4.1. Izolátumok

4.1.1. *Pasteurella multocida* izolátumok

A munka során a volt Debreceni Állategészségügyi Intézet és az Avilab Kft. *P. multocida* törzsgyűjteményében található izolátumokat vizsgáltunk. Minden izolátum moribund vagy elpusztult állatok szerveiből származott, tenyésztésük és azonosításuk a megfelelő protokollok szerint történt (32). Az izolátumokat a vizsgálatok elvégzéséig liofilizált formában vagy -80 °C-on tároltuk. Összesen három visszatérő járványsorozatot vizsgáltunk.

4.1.1.1. Az első járványsorozat

Az első járványsorozat összesen öt tulajdonos egy délkelet-magyarországi településen tartott lúdállományaiban zajlott, 2001 és 2003 között. A tulajdonosok közül kettő (B és E) cég, három magánszemély volt. Összesen legalább 12 járványból származó 16 izolátumot vizsgáltunk (1. táblázat). (A retrospektív vizsgálat miatt az egymáshoz közeli időpontban kitenyésztett izolátumokról nem mindig állapítható meg, hogy két egymást gyorsan követő járványkitörésből származnak, vagy egyazon járvány akut és lecsengő fázisából.) A járványok nagy része (8 járvány) az egyik cég (B) állományában zajlott, a többi tulajdonos állományában csak egyetlen (C, D, E), illetve egy esetben két (A) járvány zajlott.

1. táblázat: Az első baromfikolera járványsorozat elemzése során megvizsgált izolátumok

Izolálás dátuma	Jelzés	Tulajdonos	Izolálás dátuma	Jelzés	Tulajdonos
2001.10.02.	1	A	2002.12.16.	9	B
2002.01.30.	2	B	2003.01.03.	10	B
2002.02.18.	3	C	2003.01.20.	11	B
2002.07.05.	4	A	2003.01.20.	12	B
2002.08.22.	5	D	2003.02.19.	13	B
2002.08.29.	6	E	2003.02.21.	14	B
2002.10.15.	7	B	2003.03.10.	15	B
2002.12.02.	8	B	2003.04.25.	16	B

4.1.1.2. A második járványsorozat

A második járványsorozat egy kelet-magyarországi nagyüzemi termelő különböző, általában egymástól távol (akár több 10 km távolságra) elhelyezkedő pulykatelepein zajlott, 1998 és 2003 között. Az állatokat mindegyik telepre ugyanabból a keltetőből telepítették, a telepek között állatmozgás nem történt. Összesen hat telep volt érintett, legalább 18 járványból összesen 27 izolátum tipizálását végeztük el (2. táblázat). Fontos tudni, hogy újabb járványok kitörését telepspecifikus vakcina alkalmazásával próbálták meggátolni, de ez a próbálkozás sikertelen volt. A vizsgálat retrospektív módja miatt sajnos a vakcina összetételét és az antigén természetét nem tudtuk kideríteni és a vakcinatörzs sem állt rendelkezésünkre.

2. táblázat: A második baromfikolera járványsorozat elemzése során megvizsgált izolátumok

Izolálás dátuma	Jelzés	Telep	Izolálás dátuma	Jelzés	Telep
98. 03. 24.	1	ismeretlen	2001. 07. 10.	15	F
98. 09. 07.	2*	A	2001. 08. 07.	16	F
98. 09. 28.	3	A	2001. 10. 12.	17	B
99. 10. 19.	4	B	2001. 10. 30.	18	B
2000. 02. 24.	5	B	2001. 11. 12.	19	C
2000. 02. 24.	6	B	2001. 11. 16.	20	B
2000. 08. 09.	7	C	2001. 11. 16.	21	D
2000. 10. 04.	8	B	2001. 11. 19.	22	D
2000. 10. 06.	9	B	2001. 11. 30.	23	C
2001. 02. 21.	10	C	2002. 01. 10.	24	D
2001. 02. 22.	11	C	2002. 01. 31.	25	E
2001. 02. 27.	12	A	2002. 02. 11.	26	E
2001. 03. 05.	13	D	2003. 08. 11.	27	C
2001. 07. 05.	14	E			

* A 2 jelzésű izolátum a telepen szabadon tartott baromfikolerás tyúkból származik

4.1.1.3. A harmadik járványsorozat

A harmadik járványsorozat egy kelet-magyarországi nagyüzemi lúdtenyésztő cég egymástól földrajzilag távol elhelyezkedő állományaiban zajlott, két nagyobb részletben. Az első járványok 2003-ban zajlottak, ebből a járványsorozatból mindössze kettő, különböző telepről származó izolátum állt rendelkezésre. A járványok visszatérésének megelőzésére ebben az esetben is inaktivált telepspecifikus vakcinát állítottak elő, amely a telepről izolált törzs mellett két Magyarországon elterjedt *P. multocida* törzs elleni komponenst is tartalmazott. A vakcina alkalmazása mellett a járványok abbamaradtak, és egészen 2006-ig nem tört ki baromfikolera járvány. 2006-ban viszont változatlan vakcina és vakcinázási protokoll mellett súlyos, nagy veszteségeket okozó járványok törtek ki a cég különböző telepein egymást követően. Bár a járványok 2006 őszén megszűntek, sporadikus baromfikolera miatti elhullások még 2006 végén is előfordultak. Összesen 19, ezekből a járványokból származó (3. táblázat), valamint négy járványtanilag független (földrajzilag távol tartott állományból származó) izolátumot vizsgáltunk meg. Emellett az előző két esetből származó törzsekkel is összehasonlítottuk az izolátumokat.

3. táblázat: A harmadik baromfikolera járványsorozatból származó vizsgált izolátumok

sorszám	származási hely	izolálás éve
V1	Kömörő	2003
V2	Nagyszekeres	2003
V3	Jánkmajtis	2006
V4	Szamosszeg	2006
V5	Nábrád	2006
V6	Jánkmajtis	2006
V7	Csengerújfalu	2006
V8	Csengerújfalu	2006
V9	Csengerújfalu	2006
V10	Zajta	2006
V11	Zajta	2006
V12	Jánkmajtis	2006
V13	Jánkmajtis	2006
V14	Kömörő	2006
V15	Kömörő	2006
V16	Szamosszeg	2006
V17	Zsarolyán	2006
V18	Nábrád	2006
V19	Nábrád	2006

4.1.2. *Riemerella anatipestifer* izolátumok

A munka során a volt Debreceni Állategészségügyi Intézet és az Avilab Kft. *R. anatipestifer* törzsgyűjteményében található izolátumokat vizsgáltunk. Az izolátumok különböző tiszántúli és Duna-Tisza közti kacsá- és lúdállományokból származtak, az állományokból helyszínen gyűjtött mintákból, moribund vagy elpusztult állatok szerveiből illetve a volt Intézetbe beküldött állatok szerveiből származtak, tenyésztésük és azonosításuk a megfelelő protokollok szerint történt (32). Összesen 38 törzset vizsgáltunk (4. táblázat). Az egy településről izolált törzsek általában egy állományból, vagy egymás melletti telepekről származnak, tehát egymással járványtani kapcsolatban állnak. A kivételt (Kerekegyháza) jelöltük.

4. táblázat: A megvizsgált *R. anatipestifer* izolátumok

sorszám	származási hely	izolálás éve	sorszám	származási hely	izolálás éve
1	Mélykút	2003	20	Hódmezővásárhely	2003
2	Mélykút	2003	21	Makó	2003
3	Kunfehértó	2003	22	Makó	2003
4	Kiskunmajsa	2003	23	Bócsa	2003
5	Kunfehértó	2003	24	Kerekegyháza B	2003
6	Mélykút	2003	26	Rém	2005
7	Móricgát	2003	27	Bócsa	2005
8	Biharugra	2003	28	Rém	2005
9	Biharugra	2003	29	Kiskunmajsa	2005
10	Biharugra	2003	30	Kiskunfélegyháza	2005
11	Kiskunfélegyháza	2003	31	Bócsa	2005
12	Kiskunfélegyháza	2003	33	Bócsa	2005
13	Kiskunfélegyháza	2003	36	Kiskunfélegyháza	2005
14	Kerekegyháza A	2003	37	Kiskunhalas	2005
15	Kerekegyháza A	2003	39	Kiskunmajsa	2005
16	Tótkomlós	2003	40	Mélykút	2005
17	Tótkomlós	2003	41	Gyoma	2005
18	Kerekegyháza B	2003	42	Mélykút	2005
19	Hódmezővásárhely	2003	43	Kiskunhalas	2005

4.2. Az antibiotikum érzékenység meghatározása

Csak az első két esetből származó *P. multocida* izolátumok antibiotikum-érzékenységét vizsgáltuk. A meghatározás a CLSI (régebben NCCLS) ajánlása szerint, korongdiffúziós eljárással történt. A vizsgált antibiotikumok a penicillin, ceftiofur, nalidixsav,

enrofloxacin, marbofloxacin, trimethoprim+sulfamethoxazol, oxitettraciklin, klórtetraciklin és neomycin voltak.

4.3. PCR módszerek

4.3.1. A DNS kivonása a sejtekből

A bakteriális genomi DNS-t hőkezeléssel illetve Chelex-100 gyanta (Bio-Rad,) segítségével tisztítottuk. A hőkezeléses tisztításhoz a 24 órás tiszta levestenyészetből (BHI leves) egy kacsnyit desztillált vízben vagy TE-pufferben (100 mM Tris, 10 mM EDTA) felszuszpendáltunk, majd 15 percig 98 °C-on inkubáltuk. A gyantás tisztításhoz a szuszpenzióhoz 6% Chelex-100-at adtunk, 20 percig 65 °C-on, majd 10 percig 100 °C-on, végül 5 percig -20 °C inkubáltuk. A *R. anatipestifer*-specifikus PCR teszteléséhez használt klinikai mintákból a DNS-t homogenizálás után szintén Chelex-100 gyanta alkalmazásával tisztítottuk.

Centrifugálás után a felülúszó DNS koncentrációját spektrofotométer segítségével 20 ng/μl-re állítottuk be, és minden PCR esetén ezt használtuk a reakciók templátjaként. A reakciók elvégzéséig a DNS-t 4 °C-on, hosszabb tárolás esetén -80 °C-on tartottuk.

4.3.2. *Pasteurella multocida* kimutató és kapszuláris tipizáló PCR

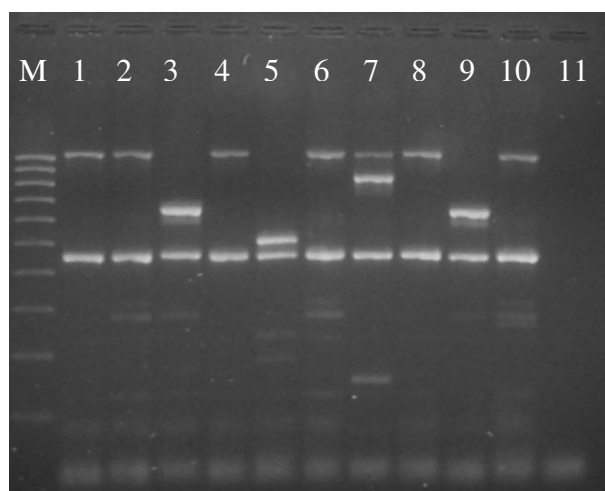
A megbízható tipizálási eredmények érdekében meg kellett bizonyosodni arról, hogy az izolátumok valóban a *P. multocida* fajhoz tartoznak, mivel más morfológiailag és biokémiaiilag hasonló fajoktól a klasszikus mikrobiológiai módszerekkel nem különíthető el teljes biztonsággal. Erre a Townsend és mtsai által leírt PCR-t alkalmaztuk (158), amely egy *P. multocida*-specifikus primerpárt (KMT1-F és KMT1-R) és további öt, a különböző (A, B, D, E, F) buroktípusokra specifikus primerpárt (CAPA-F, CAPA-R; CAPB-F, CAPB-R; CAPD-F, CAPD-R; CAPE-F, CAPE-R; CAPF-F, CAPF-R) tartalmazó multiplex PCR (5. táblázat).

A PCR elegy tartalmazott 2 mM MgCl₂-ot, 2 mM dNTP mixet, 0,5 μM-t mindegyik primerből és 3U/50 μl Amplitaq Gold polimerázt (Applied Biosystems). A bevitt templát mennyisége 400

ng/50 µl volt. A reakciót MyCycler (Bio-Rad) vagy GeneCycler (Bio-Rad) készülékben végeztük, hőprofilja a következő: 5 perces 95 °C-on végzett kezdeti denaturáció után 5 cikluson át 94 °C 45s, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min, majd 30 cikluson át 94 °C 45s, 45 °C 1 min, 72 °C 2 min, ezt 7 perc végső lánchosszabbítás követte 72 °C-on.

A multiplex PCR-ben a lehetséges amplikonokat a 3. ábra mutatja.

3. ábra: A buroktípus meghatározására alkalmas multiplex PCR lehetséges eredményei. Mindegyik *P. multocida* törzs a MTA Állatorvostudományi Kutatóintézetének *P. multocida* gyűjteményéből származik. M: 100 bp lambda DNS-létra (Fermentas), 1.: A típus, 2.: A típus, 3.: D típus, 4.: A típus, 5.: E típus, 6.: A típus, 7.: A+F típus, 8.: A típus, 9.: D típus, 10.: A típus. 11.: negatív kontroll. (C buroktípusú törzs nem állt rendelkezésünkre.)



4.3.3. *Riemerella anatipestifer* kimutató PCR

A *R. anatipestifer* kimutatására szolgáló PCR-t az angol nyelvű szakirodalomban nem találtunk. A *R. anatipestifer* azonosításának megerősítésére egy specifikus PCR módszert terveztünk és próbáltunk ki.

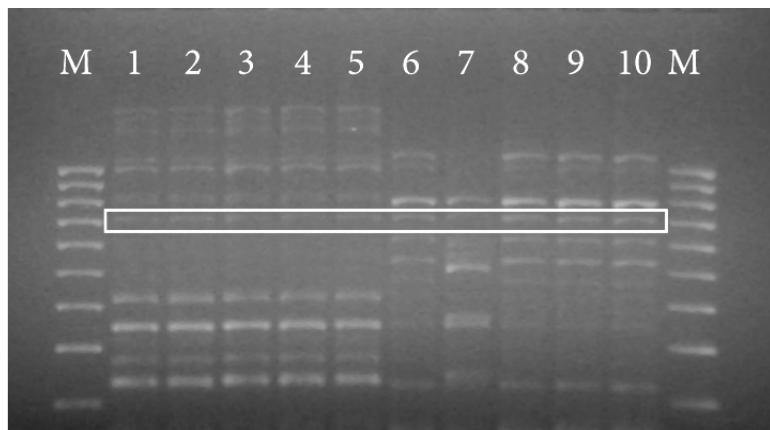
A rendelkezésre álló *R. anatipestifer* izolátumok közül ötöt 16S rDNS szekvencia alapján pontosan azonosítottunk (86), hogy a biokémiai azonosítás eredményét megerősítsük.

A génbankban (www.ncbi.nih.gov) található OmpA, CAMP és p45 feltételezett virulenciagének szekvenciáit, valamint az elérhető 16S rDNS szekvenciákat elemeztük. A kapott konszenzus szekvenciák alapján nyolc primerpár-jelöltet terveztünk a Primer Designer szoftver (Version 2.0; Scientific and Educational Software, State Line, PA, USA) segítségével,

majd ezeket a génbankban *in silico* teszteltük. Mivel már *in silico* sem találtunk kellően specifikus primerpárt, és a génbankban további alkalmas génszekvenciák nem voltak, más megközelítést választottunk.

Az izolátumok ERIC-PCR (leírását lásd alább) ujjlenyomatában egy kb. 700 bp hosszú közös fragmentumot a találtunk (4.ábra).

4. ábra: A *R. anatipestifer* törzsekben talált közös ERIC-PCR fragmentum (bekeretezve).



Ezt a fragmentumot öt különböző ERIC-PCR ujjlenyomatot reprezentáló öt izolátum esetén megszekvenáltattuk (Biomi Kft., Gödöllő). A kapott szekvenciákból készült 669 bp hosszú konszenzus szekvenciát használtuk a primerek tervezéséhez.

A kapott primerpár (669AF-669AR; 5. táblázat) alkalmazásával optimalizáltuk a PCR elegy összetételét; különböző templát (20-500 ng/50 µl), MgCl₂ (1-20 mM), dNTP mix (1-10 µM; Fermentas), primer (0,1-1 µM; Biomi Kft.) és Taq polimeráz (0,5-2 U/50 µl; Fermentas) koncentrációkat próbáltunk ki. Az anellációs hőmérsékletet 50 és 60 °C között teszteltük.

A várható 546 bp hosszúságú termékben két MboII hasítóhely található, amely azt három, 236, 302 és 8 bp hosszú darabra hasítja, így az amplikon azonosítására szekvenálás nélkül is lehetőség van. Ehhez a termék 4 órán át zajló MboII-emésztését végeztük el, a gyártó (Promega) utasításait követve.

A PCR reprodukálhatóságának tesztelését több különböző PCR készülékben (Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler; Bio-Rad GeneCycler; Bio-Rad MyCycler; Bio-Rad ICycler) végeztük, illetve egy másik PCR diagnosztikai laboratóriumban, a volt Országos Állategészségügyi Intézet Bakteriológia Osztályán végezték.

A módszer specifikitását 38 *R. anatipestifer* izolátumon és néhány heterológ baromfiból izolálható kórokozón (*Mycoplasma synoviae*, *M. meleagridis*, *M. gallisepticum*, *M. iowae*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Bordetella avium*, *Haemophilus paragallinarum*,

Escherichia coli, *Salmonella* Enteritidis, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Virchow*, csirke fertőző bronchitis vírus, *P. multocida*) végeztük. A fő diagnosztikai problémát jelentő *P. multocida* esetén a 16 Heddleston-szerotípust reprezentáló tesztörzsek mindegyikével elvégeztük a tesztelést.

Bár a PCR kidolgozásával eredeti célunk a *R. anatipestifer* gyakran nehézkes hagyományos azonosításának kiváltása volt, a módszert 13 *Riemerella* fertőzésre gyanús állatból származó klinikai mintán (tüdő-légcső kompozit minták, agyburok minták, orrmelléküreg minták és egy orrtampon minta) is elvégeztük.

4.3.4. rep-PCR-ek

4.3.4.1. ERIC-PCR

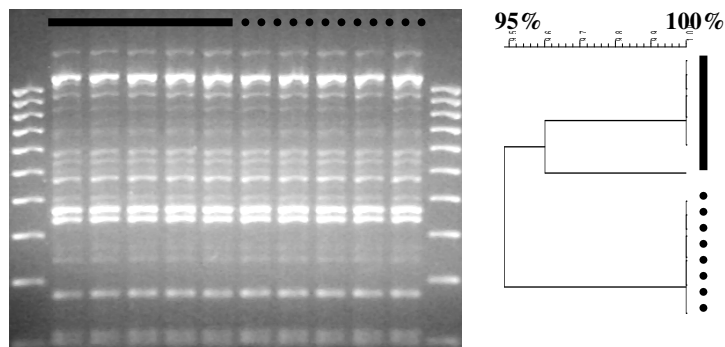
Az ERIC-PCR elvégzéséhez kétféle primer állt rendelkezésünkre (ERIC1R és ERIC2; 5. táblázat). Az ujjlenyomatkészítéshez ezek mind párban, mind külön-külön alkalmazhatóak, az optimális primer illetve primerpár a tipizálandó organizmustól függ. Mi a két primer kombinációját (ERIC1-2) alkalmaztuk mindkét vizsgált baktérium esetén, a reakció során Amonsin és mtsai módszerét (6) követtük.

Az ERIC-PCR esetén a reakció 50 µl végtérfogatban, 1x PCR pufferben zajlott, az elegy 7 mM MgCl₂-t, 2 mM dNTP mixet, 0,1 µg/µl BSA-t, 0,35-0,35 µM primert és 2,5U/50 µl Amplitaq Gold polimerázt (Applied Biosystems) tartalmazott. A bevitt templát mennyisége 100 ng/50 µl volt. A reakciót MyCycler (Bio-Rad) vagy GeneCycler (Bio-Rad) készülékben végeztük, hőprofilja a következő volt: 5 perces 95 °C-on végzett kezdeti denaturáció után 94 °C 30s, 40 °C 3 min, 72 °C 2 min 35 cikluson át, ezt 7 perc végső lánchosszabbítás követte 72 °C-on.

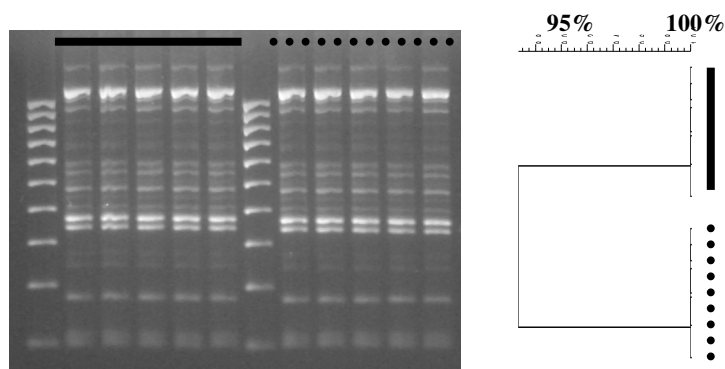
Mindkét vizsgált kórokozó esetén meghatároztuk a módszer stabilitását egymást követő passzázsok (*P. multocida*: 5/A ábra; *R. anatipestifer* 5/C ábra), valamint *P. multocida* esetében egy izolátum több telepének (5/B ábra) párhuzamos vizsgálata útján. A módszer mindhárom vizsgálatban megfelelően stabilnak bizonyult.

5. ábra: Az ERIC-PCR stabilitásának vizsgálata. A.: két *P. multocida* törzs öt-öt egymást követő passzázsából végzett ERIC-PCR eredménye. B.: két *P. multocida* törzs öt-öt különböző izolált telepéből végzett ERIC-PCR eredménye. C.: négy *R. anatipestifer* törzs három-három passzázsából végzett ERIC-PCR eredménye.

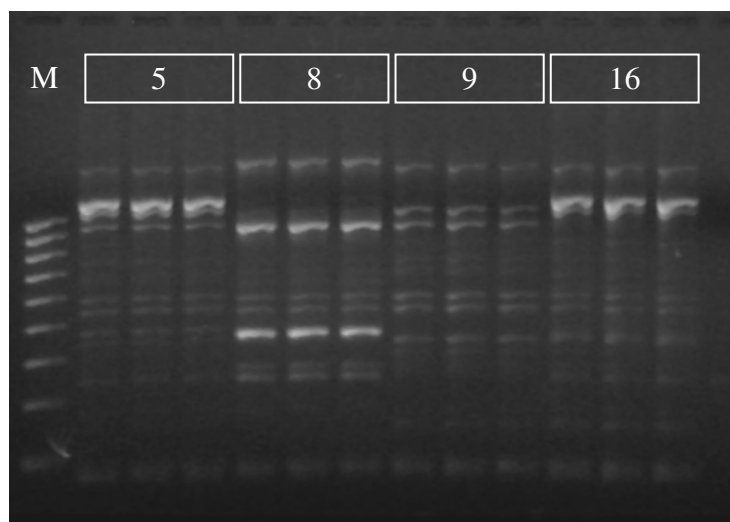
A.



B.



C.



4.3.4.2. SERE-PCR

A SERE-PCR elvégzése során az irodalomban megjelent primert alkalmaztuk (SERE, 5. táblázat) és az ott leírt módszert követtük (116). A PCR elegy 3 mM MgCl₂-t, 2 mM dNTP mixet, 0,1 µg/µl BSA-t, 0,7 µM primert és 2,5U/50 µl Amplitaq Gold polimerázt (Applied Biosystems) tartalmazott, a reakció 50 µl végtérfogatban, 1x PCR pufferben zajlott, a bevitt templát mennyisége 100 ng/50 µl volt. A reakciót MyCycler (Bio-Rad) készülékben végeztük, hőprofilja a következő volt: 5 perces 95 °C-on végzett kezdeti denaturáció után 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min 35 cikluson át, ezt 15 perc végső lánchosszabbítás követte 72 °C-on.

4.3.4.3. BOX-PCR

A BOX-PCR elvégzése során az irodalomban megjelent BOXA1R primert alkalmaztuk (5. táblázat) és az ott leírt módszert követtük (163). A reakcióelegy összetétele a következő volt: 3,5 mM MgCl₂, 2 mM dNTP mix, 0,01 µg/µl BSA, 0,5 µM primer és 2U/50 µl Amplitaq Gold polimeráz (Applied Biosystems), emellett adjuvánsként 1,25 mM DMSO-t tartalmazott. A reakció 50 µl végtérfogatban, 1x PCR pufferben, MyCycler (Bio-Rad) készülékben zajlott, a bevitt templát mennyisége 50 ng/50 µl volt.

Mivel a BOX elem egy hajtű alakú struktúra, amplifikációjához szokatlan PCR programra van szükség: 5 perces 95 °C-on végzett kezdeti denaturáció után 30 cikluson át 92 °C 30 s, 50 °C 1 min, 65 °C 8 min.

4.3.5. RAPD

RAPD vizsgálatot csak az első baromfikolerás járványsorozat esetén végeztünk. Ennek az volt az oka, hogy egy PCR-ban végezve jól értékelhető eredményt kaptunk, ez azonban nem volt kellően reprodukálható. Mivel a másik két esetsorozatban feldolgozott izolátumok, valamint a *R. anatipestifer* izolátumok nagy száma miatt azok egy reakcióban nem voltak feldolgozhatóak, a gyenge reprodukálhatóság miatt a RAPD ezekben az esetekben kétséges eredményt adott volna.

A RAPD primert (OPG13, 5. táblázat) és reakciókörülményeket szintén irodalmi adatok alapján alkalmaztuk (34). A reakcióelegy összetétele a következő volt: 5,5 mM MgCl₂,

1 mM dNTP mix, 0,1 µg/µl BSA, 0,7 µM primer és 1,25U/50 µl Amplitaq Gold polimeráz (Applied Biosystems). A reakció 25 µl végtérfogatban, 1x PCR pufferben, Rapidcycler (Idaho Tech) készülékben zajlott, a bevitt templát mennyisége 500 ng/25 µl volt.

A reakció hőprofilja a következő volt: 4 perces 94 °C-on végzett kezdeti denaturáció után 40 cikluson át 94 °C 20 s, 37 °C 20 s, 72 °C 30 s, ezt 10 perc végső láncosszabbítás követte 72 °C-on.

5. táblázat: A munka során alkalmazott PCR primerek szekvenciái

primer neve	szekvencia (5'-3')
KMT1-F	5'-ATCCGCTATTTACCCAGTGG-3'
KMT1-R	5'-GCTGTAAACGAAGCTCGCCAC-3'
CAPA-F	5'-TGCCAAAATCGCAGTCAG-3'
CAPA-R	5'-TTGCCATCATTGTCAGTG-3'
CAPB-F	5'-CATTTATCCAAGCTCCACC-3'
CAPB-R	5'-GCCCCGAGAGTTTCAATCC-3'
CAPD-F	5'-TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC-3'
CAPD-R	5'-CATCTACCCACTCAACCATATCAG-3'
CAPE-F	5'-TCCGCAGAAAATTATTGACTC-3'
CAPE-R	5'-GCTTGCTGCTTGATTTTGTC-3'
CAPF-F	5'-AATCGGAGAACGCAGAAATCAG-3'
CAPF-R	5'-TTCCGCCGTCAATTACTCTG-3'
669AF	5'-TTACCGACTGATTGCCTTCTAG-3'
669AR	5'-AGAGGAAGACCGAGGACATC-3'
ERIC1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'
ERIC2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'
SERE	5'-GTGAGTATATTAGCATCCGCA-3'
BOXA1R	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'
OPG13	5'-AGGGCCGTCT-3'

4.3.6. Elektroforézis, dokumentálás

A kapott amplikonokat 0,5 µg/ml etidium-bromidot tartalmazó 2%-os agaróz (Sigma) gélben 100 V-os feszültségen két óráig elektroforetizáltuk. A mintázatot UV fényben hívtuk elő, és egy digitális kamera (KODAK) segítségével dokumentáltuk.

4.4. PFGE

A PFGE módszert először irodalmi adatok (84) alapján *P. multocida* vizsgálatára állítottuk be, majd a már működő protokoll optimalizálásával párhuzamosan végeztük a *R. anatipestifer* tipizálására alkalmas protokoll kidolgozását. A végső protokollok olyan hasonlóak voltak, hogy a továbbiakban egy egységesített protokollt alkalmaztunk.

A PFGE-hez szintén BHI levesben 24 óráig növesztett levestenyészetből indultunk ki. A tenyészet sűrűségét spektrofotométerrel mértük 600 nm-en, majd TE pufferben (100 mM Tris, 250 mM EDTA, pH 8,0) 4×10^8 /ml-re állítottuk be. Ebből 100 μ l-t pipettával alaposan összekevertünk 100 μ l 2%-os alacsony olvadáspontú agarózzal (Bio-Rad) vagy ugyanennyi 2%-os SeaPlaque agarózzal (Cambrex), amely 1% nátrium lauril-szarkozil szulfátot és 1 mg/ml Proteináz K-t (Sigma) is tartalmazott. A kapott szuszpenziót öntőformába pipettáztuk és 20 percig 4°C-on dermedztettük.

Dermedés után a dugókat 1 ml lízis pufferben (100 mM EDTA, 1% nátrium lauril-szarkozil szulfát, 0,2% nátrium-dezoxikolát, 1 mg/ml Proteináz K, pH 8,0) 52 °C-on emésztettük legalább 18 órán keresztül. Ezt követően a dugókat 15 percig desztillált vízzel mostuk, ezt további 4, egyenként 1 órás TE pufferes mosás követte. Az első egy órás mosáskor a mosópufferhez 0,35 mg/ml PMSF-et adtunk, a Proteináz K inaktiválása érdekében.

A mosást követően a dugókat vagy azonnal emésztettük, vagy friss mosópufferben 4 °C-on tároltuk a feldolgozásig. A restrikciós emésztéshez a dugókat 1 órán át restrikciós enzimhez a gyártó által javasolt 1x pufferben mostuk, majd friss, 20U megfelelő restrikciós enzimet tartalmazó pufferben egy éjszakán át emésztettük. *P. multocida* esetén ApaI, míg *R. anatipestifer* esetén SmaI restrikciós enzimeket (Promega) alkalmaztunk.

A futtatást az emésztés után azonnal megkezdjük. Ehhez Pulse-Field Certified Agarose-t (Bio-Rad) vagy SeaKem Gold Agarose-t (Cambrex) használtunk, az agaróz töménysége *P. multocida* esetén 1%-os, míg *R. anatipestifer* esetén 1,2% volt. A futtatás CHEF DRIII PFGE készülékben (Bio-Rad) 14 °C-on, 0,5x TBE pufferben zajlott. A futtatási paraméterek a következők voltak mindkét baktérium és mindkét restrikciós enzim esetén: 6V/cm, 120°-os reorientációs szög, a futtatás két blokkban zajlott. A pulzusidő az első, 15 órás blokk során 5-ről 30 másodpercre nőtt (linear ramp), ezt a blokkot egy 7 órás követte, amely során a pulzusidő 30-ról 90 másodpercre nőtt.

A futtatást követően a gélt 30 percig etidium-bromiddal festettük, majd legalább két órán keresztül desztillált vízzel mostuk. A dokumentálás a PCR-nél leírtak szerint zajlott.

4.5. A mintázatok kiértékelése

A kapott rep-PCR, RAPD és PFGE mintázatokot a Fingerprinting II szoftver (Bio-Rad) segítségével elemeztük. A hasonlóságok leírására a Dice koefficiens, a csoportanalízisre az UPGMA módszert alkalmaztuk. Az analízis során a pozíciótűrés és az optimalizáció értékét, valamint az ujjlenyomat végén a pozíciótűrés változását minden módszer esetében egyedileg állítottuk be. Mindegyik esetben elvégeztük a különböző módszerek eredményeinek együttes értékelését lehetővé tevő kompozit analízist is.

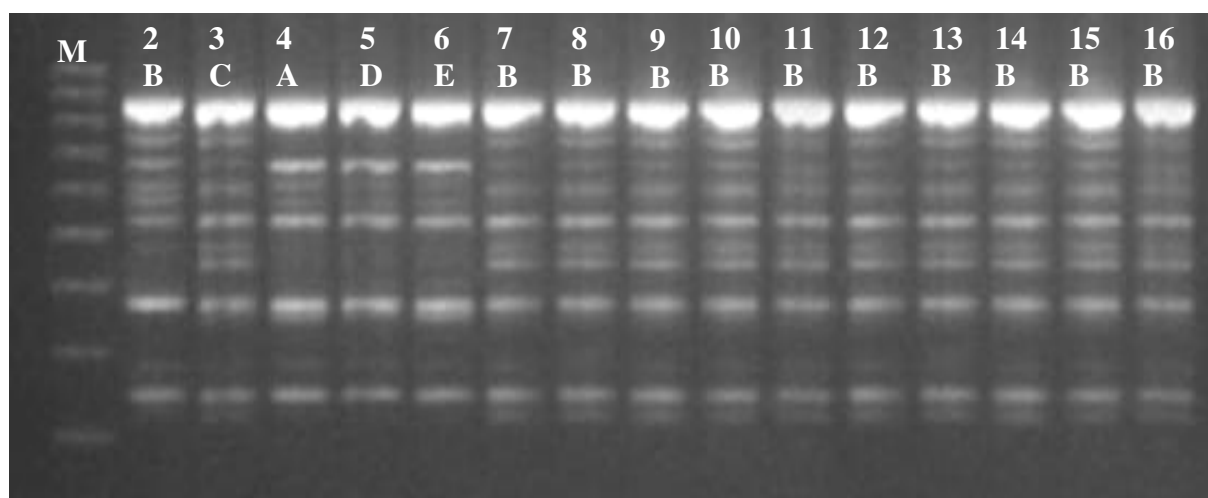
5. Eredmények és értékelésük

5.1. Az első baromfikolera járványsorozat

A tizenhat izolátum (1. táblázat) mindegyike A buroktípusba tartozó *P. multocida*-nak bizonyult. A buroktípus meghatározása alapján tehát nem tudtuk elkülöníteni a törzseket egymástól.

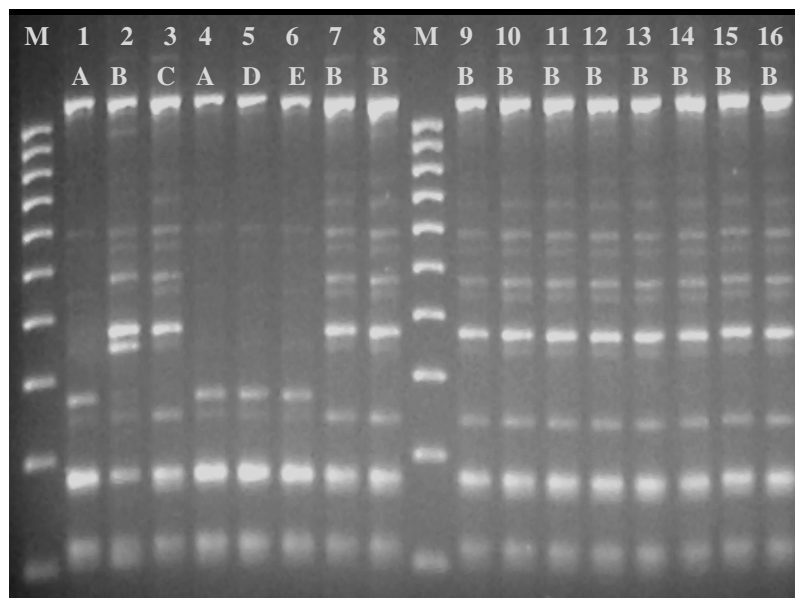
A RAPD alapján a B tulajdonos állományából származó izolátumok a 2. számú izolátum kivételével teljesen egyforma mintázatot mutattak, amely megegyezett a C tulajdonos állományából származó 3. számú izolátuméval. Ugyancsak egyformák voltak az 1., 4., 5. és 6. számú, A, D és E tulajdonosok állományából származó izolátumok mintázatai (6. ábra).

6. ábra: Az első járványsorozatból származó izolátumok RAPD analízisének eredménye. A számok az izolátumokat, a betűk az izolátumok származási helyét mutatják (1. táblázat). M: 100 bp lambda DNS-létra (Fermentas).

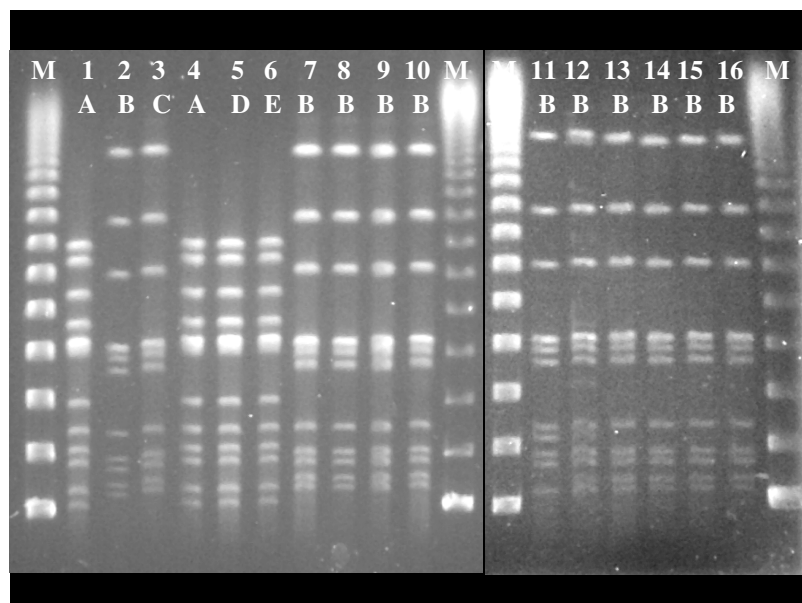


Az ERIC-PCR és a PFGE eredménye megerősítette a RAPD eredményét, bár a PFGE módszerrel a 2. számú izolátum mintázata is a B tulajdonos állományából származó többi izolátum mintázatához volt hasonló (7. és 8. ábra).

7. ábra: Az első járványsorozatból származó izolátumok ERIC-PCR analízisének eredménye. A számok az izolátumokat, a betűk az izolátumok származási helyét mutatják (1. táblázat). M: 100 bp lambda DNS-létra (Fermentas).



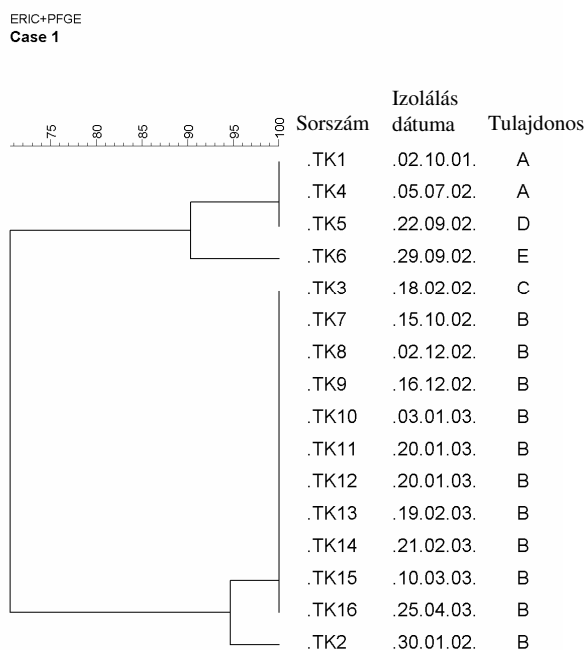
8. ábra: Az első járványsorozatból származó izolátumok PFGE (ApaI) analízisének eredménye. A számok az izolátumokat, a betűk az izolátumok származási helyét mutatják (1. táblázat). M: lambda konkatamer létra (Bio-Rad).



Az ERIC-PCR és a PFGE mintázatok alapján készített törzsfán (9. ábra) tehát két nagy rokon csoportot lehet megkülönböztetni. Az elsőbe az összes B tulajdonos állományából származó izolátum és a C tulajdonos állományából származó egyetlen izolátum tartozott. A másik nagy rokon csoportba a másik három tulajdonos állományaiból izolált Pasteurellák tartoznak. A 2. számú izolátum esetén a RAPD és ERIC-PCR, illetve a PFGE eredményének

különbsége utalhat az eredeti (2. számú) törzs mikroevolúciójára, bár nem zárható ki az izolátum kontaminációja sem.

9. ábra: Az első járványsorozat izolátumainak az ERIC-PCR és a PFGE mintázatok együttes értékelésével készült törzsfája.



Mindegyik izolátum érzékeny volt penicillinre, ceftiofurra, TMP+SMX-ra, neomycinre és fluorokinolonokra, rezisztens volt nalidixsavra és tetraciklinekre.

Az eredmények alapján retrospektíve a következő járványtani kapcsolatrendszer valószínűsítettük. A területen két különböző A buroktípusú *P. multocida* törzs okozott járványokat. Az egyik az A tulajdonos állományában 2001-től 2002-ig fennmaradva, 2002-ben újabb járványt okozott, majd áterjedt D és E tulajdonosok állományaira. A másik törzs B és C tulajdonosok állományai között terjedhetett, és B tulajdonos állományában tartósan fennmaradva többször is járványt okozott. Mivel az állományok között tudomásunk szerint nem volt állatmozgás, a transzmisszió emberi közvetítéssel vagy vadállatok segítségével valósulhatott meg.

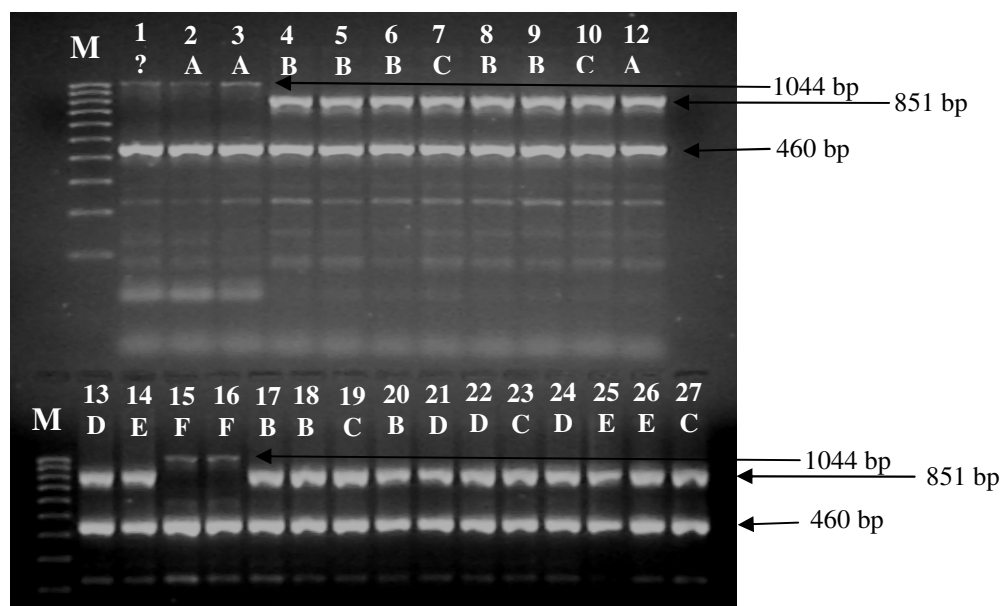
A vadállatok által közvetített átvitelt több tanulmány bizonyította (42, 139, 140). Ha a *P. multocida* bejutott egy állományba, ott az alomban, különböző berendezési tárgyakon, vagy tünetmentes hordozó egyedekben sokáig fennmaradhat (41). Újabb járvány akkor keletkezik, ha az állományt stressz éri, így legalább néhány egyed fogékonysága megnő. E néhány egyed

által ürített nagyobb kórokozómennyiség már elegendő lehet a kevésbé fogékony egyedek fertőződéséhez.

5.2. A második baromfikolera járványsorozat

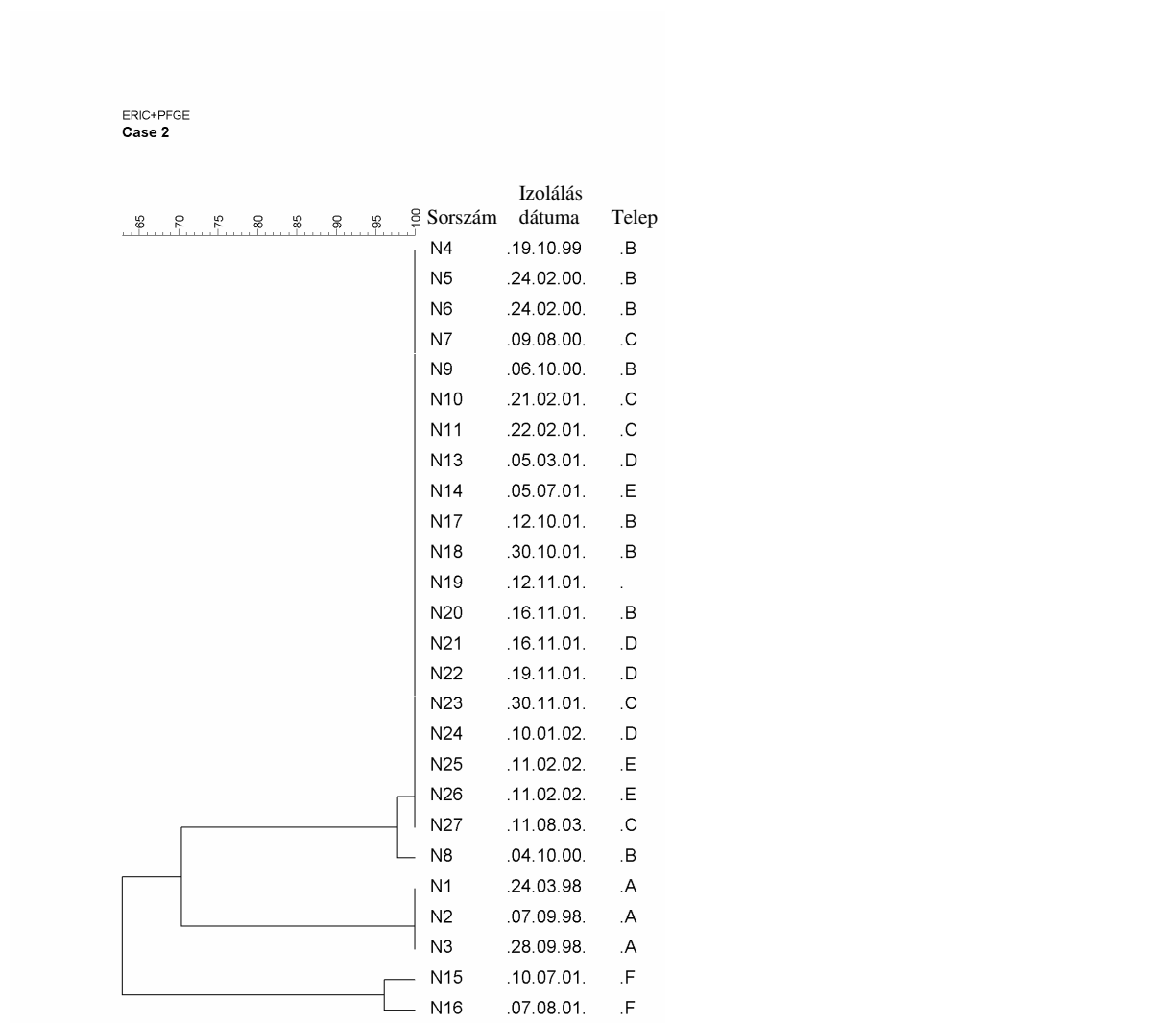
Az azonosító PCR mind a 27 izolátum (2. táblázat) esetén megerősítette a *P. multocida* eredményt. Az első három és az F jelű telepről származó összesen két izolátum A buroktípusúnak, míg a többi 22 izolátum F buroktípusúnak bizonyult (10. ábra).

10. ábra: Az azonosító és a buroktípus meghatározására alkalmas multiplex PCR (158) eredménye. A 460 bp hosszú amplikont minden *P. multocida* törzs esetében megtalálható, az 1044 bp és a 851 bp hosszú pedig az A illetve az F buroktípusért felelős gének egy-egy szakasza. A számok az izolátumokat, a betűk az izolátumok származási helyét mutatják (2. táblázat). M: 100 bp lambda DNS-létra (Fermentas).



Az ERIC-PCR és a PFGE alapján három rokonsági csoportot mutattunk ki. Az egyikbe az első három (A buroktípusú, 1998-ból származó) izolátum tartozott, a másodikba az F jelű telepen kitört két járványból származó két (A buroktípusú) izolátum, a harmadikba pedig a 2000 és 2003 között izolált összes többi (F buroktípusú) izolátum (11. ábra).

11. ábra: A második járványsorozat izolátumainak az ERIC-PCR és a PFGE mintázatok együttes értékelésével készült törzsfája.



Az eredmények alapján az 1998-as járványokat követően egy új, F buroktípusú törzs behurcolása történt meg. Ez a cég hat érintett pulykatelepe közül ötön elterjedt, és több visszatérő járványt okozott. Ez a törzs egy ismeretlen közös rezervoárban tartósan fennmaradt, a telepeket ebből a rezervoárból érthette el. A fertőzést a rezervoár és az állományok között közvetíthette takarmány vagy a szállítójárművek szennyezett belseje. A vadállatok közvetítő szerepe a járványok nagy térbeli és időbeli távolsága miatt nem valószínű. A hatodik telepen két egymással rokon, de nem azonos törzs okozott két egymást követő járványt, amelyek az 1998-as törzstől is különböztek. Utóbbi telepet az F buroktípusú törzs nem érte el.

Az izolátumok mindegyike érzékeny volt penicillinre, ceftiofurra, TMP+SMX-ra, tertaciklinekre, és rezisztens neomycinre és nalidixsavra. Az első nyolc izolátum, valamint az F telepről származó 15 és 16 számú két izolátum fluorokinolonokra érzékeny volt, a többi (9-14 és 17-27) izolátum pedig rezisztens. Mivel a fentiek alapján egyazon törzshöz tartozó

genetikailag rokon izolátumokról van szó (11. ábra), a fluorokinolon rezisztencia kialakulását figyeltük meg a törzsben. A fluorokinolon rezisztencia háttérben álló mechanizmus kimutatására nem tettünk kísérletet.

Carpenter és mtsai (30) szerint hasonló, egy cég különböző telepei közötti transzmisszió nem ritka esemény, és gyakran valamilyen járványvédelmi hiba eredménye. Mivel a baromfikolera gyors lefolyású, nagy gazdasági kárt okozó megbetegedés (29, 105), a megelőzés elsőrendű fontosságú.

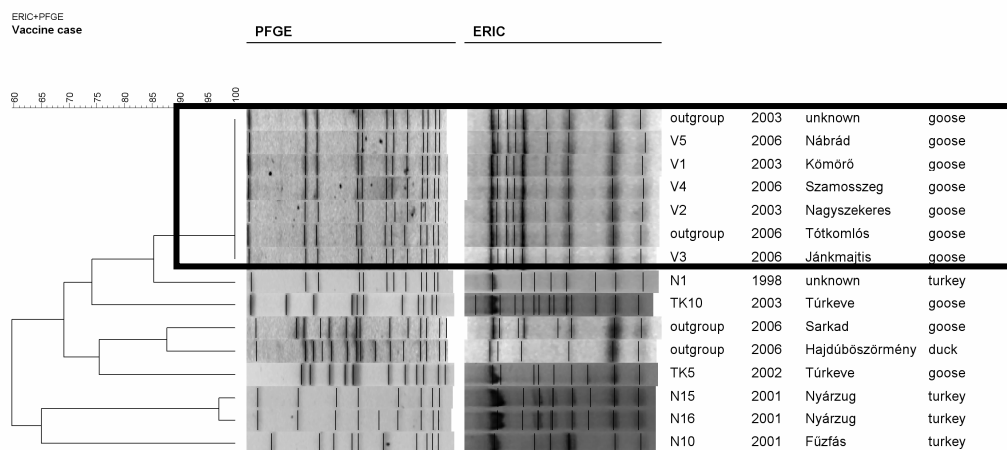
Az eddig ismertett két eset egyik tanulsága, hogy a megelőzés (járványvédelem) során elkövetett hibák felderítésével nagy veszteségek előzhetőek meg. Az alkalmazott módszerek segítségével megkülönböztethetővé tehető az új törzs behurcolása a perzisztens törzs által okozott recidívától. Perzisztencia esetén megfelelően széles körű mintavételezéssel a rezervoár felderíthető, így azonosítható az a pont a járványvédelmi intézkedések folyamatában, amely elégtelen volta lehetővé teszi a törzs tartós fennmaradását.

Ha tehát a fenti két eset retrospektív analízise helyett az első néhány járványkitörést követően a járványokból kitenyészett izolátumok tipizálását rutinszerűen elvégzik, a perzisztencia igazolásával az első esetben öt, a másodikban akár 12 járványt is megelőzhetővé lehetett volna tenni. Ha a betegség okozta nagy veszteségeket figyelembe vesszük, a vizsgálatok komoly kárt előzhettek volna meg, így alkalmazásuk, meglehetősen magas költségük ellenére is, költséghatékony lett volna.

5.3. A harmadik baromfikolera járványsorozat

A járványsorozatból származó mind a 19 izolátum A buroktípusúnak bizonyult. A járványsorozat izolátumai mind ERIC-PCR-rel mind a PFGE-vel megkülönböztethetetlenek voltak egymástól (12. ábra).

12. ábra: A harmadik járványsorozat izolátumainak (V1-V5; a többi 14 izolátum mintázatai mindkét módszer esetén megkülönböztethetetlenek voltak), a vizsgált négy járványtanilag független izolátumnak (outgroup) és az első (TK5, TK10) illetve a második (N1, N10, N15, N16) járványsorozatból izolált különböző törzseket reprezentáló izolátumnak az ERIC-PCR és a PFGE mintázatok együttes értékelésével készült törzsfája. A keret a járványsorozatot okozó törzsekből kialakult csoportot mutatja.



Érdekes, hogy a járványtanilag független kontroll törzsek közül kettő szintén megkülönböztethetetlen volt a 19 járványsorozat alkotta rokonsági csoporttól (12. ábra). Ez arra utalhat, hogy létezik egy a régióban széles körben elterjedt virulens klón. Az első és a második járványsorozatot reprezentáló törzsek és a másik két járványtanilag független kontroll viszont világosan különbözött a harmadik járványsorozatot okozó törzstől.

A járványsorozat tehát, az előző két esetben tapasztaltakhoz hasonlóan, egy törzs éveken keresztül fennálló perzisztenciájára volt visszavezethető. Jelen harmadik eset érdekessége, hogy a törzs a telepspecifikus (az egyik 2003-as izolátumból készített) vakcina rendszeres alkalmazása mellett maradt fenn az állományban. Bár a perzisztenciát igazoltuk, adataink alapján nem dönthető el pontosan, hogy a járványok 2006. évi kiújulását mi okozta. Lehetséges magyarázat, hogy valamilyen újonnan fellépő, szokatlan stressz érte az állatokat, bár ez ellen szól az, hogy több telep is érintett volt, valamint hogy a járványokat hónapokon keresztül sporadikus esetek követték. Elképzelhető, hogy a 2006-ban alkalmazott vakcina nem volt megfelelő (például nem megfelelő tárolás miatt), illetve a vakcinázási protokoll hibája is előidézhette a betegség elterjedését.

A vizsgálatok tanulsága kettős. Egyrészt mindenképpen szükséges a vakcina és a vakcinázási protokoll ellenőrzése, hiszen az adott törzs ellen addig jól védő vakcina hatékonyságát veszítette. Másrészt talán még fontosabb a tartós fennmaradást elősegítő

tényezők és a fennmaradás helyének (tünetmentes állatok, ólak berendezési tárgyai, telepi rágcslók vagy más állatok) felderítése. Hasonlóan az előző esethez, itt is fontos adat lenne a telepek közötti terjedés módjának kiderítése. Egy valószínű terjesztő közeg lehet a libák tépését végző brigád, az ő szerepükre utal az is, hogy a járványok kitörésének sorrendje követte a tépőcsapat telepről telepre haladását.

Hasonló, a vakcina védő hatásának csökkenésének hátterében álló okokat a törzsek rokonsági viszonyainak vizsgálatának útján kutató tanulmányok inkább vírusok okozta betegségek esetében ismertek (33, 79, 96, 109). Baktériumok okozta betegségek közül a pertussis (104, 165) és az erysipeloid (48, 73), valamint a szarvasmarha *Mycoplasma mycoides ssp. mycoides* (99) és *Mannheimia haemolytica* (182) okozta pneumóniája esetében történtek hasonló célú vizsgálatok.

P. multocida esetén is ismertek teljes genom RFLP-t illetve AFLP-t és RAPD-t alkalmazó tanulmányok (lásd fentebb), amelyek vakcinázott baromfiállományokból származó törzsek és vakcinatörzsek rokonságát vizsgálják, de ezek felmérő jellegű vizsgálatok, nem pedig egy járványsorozat feldolgozásából nyert adatok.

A vakcináció hatástalanná válásának lehetséges fő okai i) új törzs behurcolása (57), ii) élő vakcina reverziója (79, 96, 109, 182), vagy iii) a kórokozó vakcina miatti mikroevolúciója (104). Ezek teljesen eltérő ellenintézkedéseket követelnek, hiszen reverzió és mikroevolúció esetén a vakcinázás protokolljában kell keresnünk a hibát, míg új törzs behurcolása esetében a járványvédelem hibájával állunk szemben. A bemutatott eset és a fenti hivatkozások jól demonstrálják az ujjlenyomat technikák alkalmazhatóságát a beavatkozás módjának megállapítása során.

5.4. A *Riemerella anatipestifer* kimutató PCR

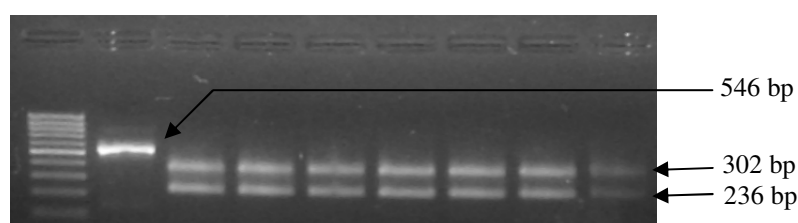
A 16S rDNS szekvenálásával azonosított öt törzs mindegyike 99% egyezést mutatott a génbanki *R. anatipestifer* 16S rDNS szekvenciákkal. Ezzel igazolódott az általunk alkalmazott hagyományos módszer (biokémiai tesztek) alkalmassága a *R. anatipestifer* azonosítására.

A megtervezett primerpár (669AF-669AR; 5. táblázat) működése a következő PCR elegyben volt optimális: 50 µl végtérfogatban 1x PCR pufferben 2,5 mM MgCl₂, 2mM dNTP mix, 0,1 µg/µl BSA, 0,5-0,5 µM primerek, 1U/50 µl Taq polimeráz enzim (Fermentas). Az optimális PCR program pedig 94 °C-on 4 percig végzett kezdeti denaturáció után 95°C 1 perc,

55°C 1 perc, 72 °C 1 perc hőprofilú 35 ciklusból és az azt követő 72 °C 7 perc végső lánchosszabbító lépésből állt. Ez az elegy és program az összes kipróbált PCR készüléken megfelelően működött.

A PCR az összes tesztelt *R. anatipestifer* izolátummal a várt 546 bp nagyságú terméket adta. A terméket három egymással genetikailag rokon (ERIC-PCR és PFGE alapján, lásd fent) izolátum kivételével az MboII a várt méretű szakaszokra hasította (13. ábra)

13. ábra: A *R. anatipestifer*-specifikus PCR MboII hasításának eredménye. A marker (100 bp létra; Fermentas) mellett a hasítatlan PCR termék, a többi minta az MboII-vel hasított termékek elektroforetikus képét mutatja.



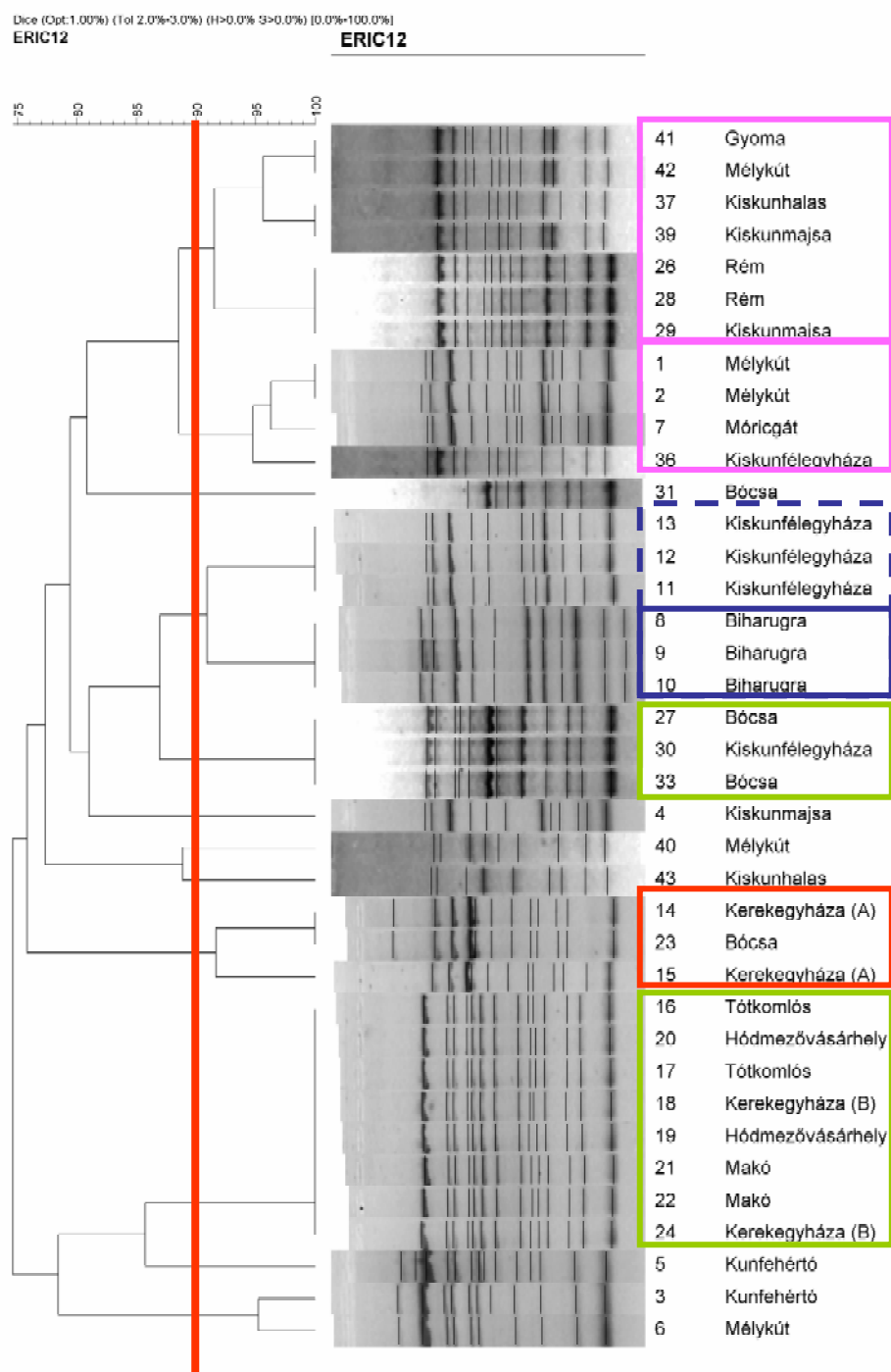
A PCR a heterológ kórokozókkal, köztük a 16 különböző *P. multocida* szerotípust reprezentáló referenciatörzzsel minden esetben negatív eredményt adott. A szervmintákból a PCR a tenyésztéssel megegyező eredményt adott. Ezek alapján felvetődik a módszer diagnosztikai alkalmazhatóságának lehetősége, azonban ennek tisztázására további vizsgálatok szükségesek.

Mivel a kórokozó azonosítása a hagyományos tesztekkel nehézkes és néha nem egyértelmű, a leírt módszer pontosabb és gyorsabb lehetőséget adva a *R. anatipestifer* azonosítására segíti a betegség diagnosztikáját.

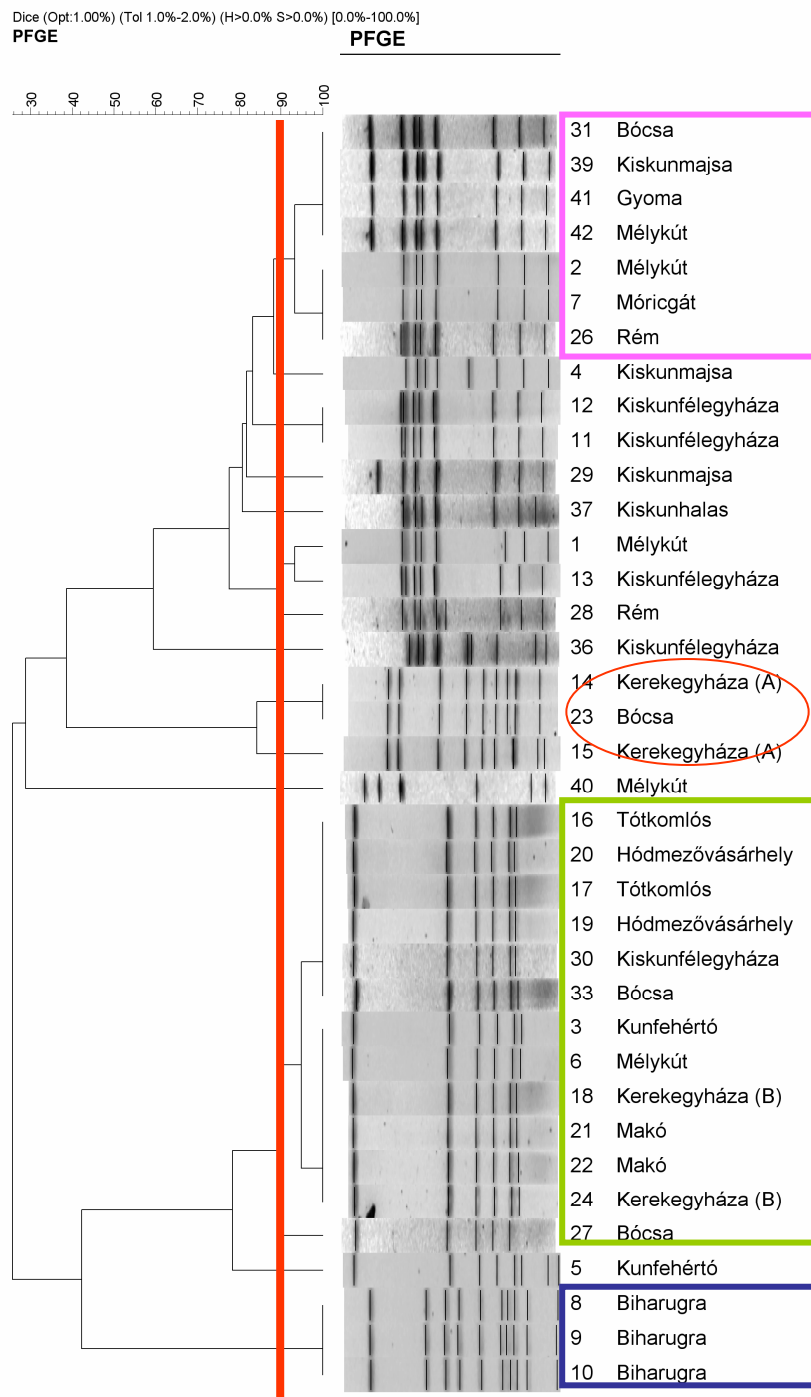
5.5. A *Riemerella anatipestifer* izolátumok vizsgálata

Az ERIC-PCR, a SERE-PCR és a BOX-PCR közül az ERIC-PCR jól kiértékelhető ujjlenyomatokat adott, míg a másik két PCR nem, így utóbbi kettő optimalizálását nem folytattuk tovább. A 38 vizsgált izolátum között ERIC-PCR-rel hat rokon csoportot, egy hasonló izolátumpárt és öt a csoportoktól független izolátumot mutattunk ki (14. ábra), míg a PFGE öt rokonsági csoportba sorolt összesen 23 izolátumot, kijelölt három hasonló izolátumpárt, míg nyolc izolátumot csoportfüggetlennek mutatott (15. ábra). A 43. számú izolátum esetén a PFGE sikertelen volt.

14. ábra: A *R. anatipestifer* izolátumok ERIC-PCR mintázata alapján készült törzsfája. A különböző színű keretek a különböző rokonsági csoportokat jelölik. Az összetartozó csoportokat azonos színnel jelöltem a 14., 15. és 16. ábrákon.



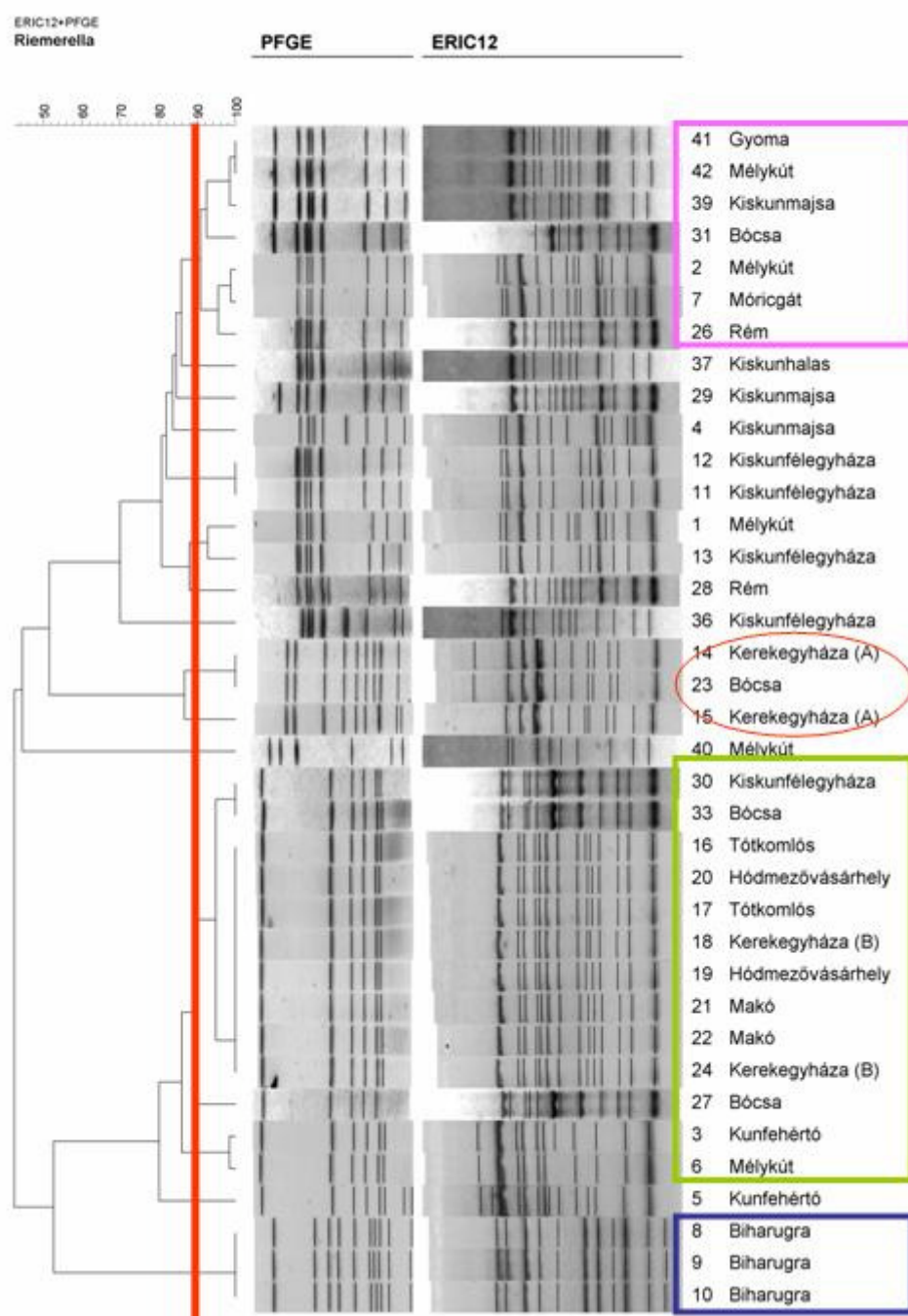
15. ábra: A *R. anatipestifer* izolátumok PFGE (SmaI) mintázata alapján készült törzsfája. A különböző színű keretek a különböző rokonsági csoportokat jelölik. Az összetartozó csoportokat azonos színnel jelöltem a 14., 15. és 16. ábrákon. Az ovális piros keret a bizonytalan, de valószínű csoportot jelzi.



A 14. és 15. ábra összevetésével látható, hogy a két módszerrel kapott rokonsági csoportok között vannak eltérések. Ez demonstrálja, hogy mindig legalább két független tipizáló módszer eredményének együttes vizsgálatát kell elvégezni ahhoz, hogy helytálló

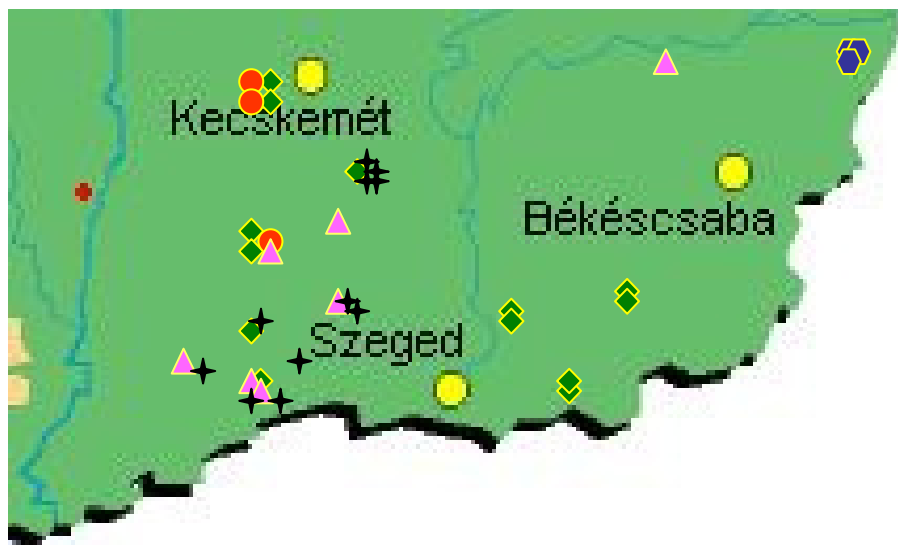
következtetést vonhassunk le. Ennek eredményét a mindkét módszer eredményeinek figyelembe vételével készült törzsfá mutatja (16. ábra).

16. ábra: A *R. anatipestifer* izolátumok ERIC-PCR és PFGE mintázatainak alapján készült törzsfája. A különböző színű keretek a különböző rokonsági csoportokat jelölik. Az összetartozó csoportokat azonos színnel jelöltem a 14., 15. és 16. ábrákon. Az ovális piros keret a bizonytalan, de valószínű csoportot jelzi.



A csoportok az izolálás helyét és idejét tekintve nem voltak homogének, tehát a vizsgált területen a *R. anatipestifer* számos törzse van egyidejűleg jelen, és ezek a különböző telepek között esetenként nagy távolságokra is terjedhetnek (17. ábra).

17. ábra: A különböző nagyobb rokonsági csoportokba tartozó *R. anatipestifer* izolátumok eloszlása az izolálás helye szerint. A különböző színű jelek a közös, ERIC-PCR és PFGE mintázatok figyelembe vételével készült (kompozit) dendrogramon látható csoportokat reprezentálják. A fekete kereszttek a nagyobb csoportba nem sorolható izolátumokat (hasonló párok tagjai és független izolátumok) jelzik. A sárga foltok a megyeszékhelyek.



A kapott adatok szerint a *R. anatipestifer* több törzse lehet egyidejűleg egy állományban (illetve több, de egy járványtani egységet képező állományban). Hasonló eredményre jutottak szerotipizáláson alapuló tanulmányok is (125). A *R. anatipestifer* esetében tehát több, a vizsgált területen endémiás klónt találtunk, amelyeknek a terjedéséért különböző vadmadarak lehetnek felelősek, ha figyelembe vesszük, hogy mekkora időbeli és térbeli távolság van egyes rokonnak bizonyult izolátumok között.

6. Összefoglalás

Jelen munkában a modern molekuláris epidemiológia módszerek első alkalmazásáról számolok be a hazai állategészségügyi diagnosztikában. Két fontos baromfikórokozó baktérium, a *Pasteurella multocida* és a *Riemerella anatipestifer* vizsgálatát tűztük ki célul irodalomból adaptált és saját fejlesztésű módszerek segítségével.

Az izolátumok azonosítását PCR alapú módszerekkel és rDNS szekvenálással erősítettük meg, a *R. anatipestifer* azonosítására alkalmas PCR módszert dolgoztunk ki. Az izolátumok genetikai rokonságának vizsgálatára különböző PCR-alapú (RAPD, rep-PCR) tipizáló módszereket és PFGE módszert vezettünk be, a *R. anatipestifer* tipizálására szolgáló PFGE módszer saját magunk dolgoztuk ki a *P. multocida* tipizálására alkalmas irodalmi módszer felhasználásával.

A módszerek segítségével három baromfikolera járványsorozatot dolgoztunk fel retrospektív módon, illetve felmértük a hazai, kelet-magyarországi *R. anatipestifer* izolátumok genetikai diverzitását.

Igazoltuk, hogy a három járványsorozat egy *P. multocida* törzs perzisztenciájára volt visszavezethető, a harmadik esetben a vakcina hatástalanságának okát is megvizsgáltuk. A módszerek valós időben (nem retrospektív módon) történő alkalmazása kulcsinformációt szolgáltatathatott volna a járványsorozat jelentős részének megelőzéséhez, így a munka bemutatja a módszerek potenciális hasznosíthatóságát az állatorvosi diagnosztikában. A *R. anatipestifer* törzsekkel kapcsolatos eredmények alapján a törzsek eloszlása sem térben, sem időben nem volt homogén, tehát a kórokozó endémiás jelenlétét valószínűsítettük.

A munka bemutatja a molekuláris tipizáló módszerek alkalmazhatóságát az állategészségügyi diagnosztikában, és modellként szolgálhat további állategészségüggyel kapcsolatos felhasználási területekhez. Így például a módszerek rendkívül hasznos információkat szolgáltathatnak a zoonózist okozó, valamint a bioterrorizmus szempontjából fontos baktériumok elleni megelőző/védekező eszközök kidolgozásához is. Ezek közül kiemelt fontosságúak az élelmiszer-biztonsághoz kapcsolódó vizsgálatok, ahol a bemutatottakhoz hasonlóan a fertőzés forrásának azonosításában és terjedésének felderítésében hasznosíthatóak ezek a módszerek. (Egy ilyen, a leggyakoribb *Salmonella* szerovariánsok és a termotoleráns *Campylobacter* fajok farmtól a fogyasztóig történő nyomon követésére irányuló modellvizsgálat jelenleg is folyik.)

7. Irodalomjegyzék

7.1. Felhasznált irodalom

1. Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue):W728-33.
2. Abele-Horn M, Vogel U, Klare I, Konstabel C, Trabold R, Kurihara R, Witte W, Kreth W, Schlegel PG, Claus H. Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 2006 44(11):4009-13.
3. Adler B, Bulach D, Chung J, Doughty S, Hunt M, Rajakumar K, Serrano M, van Zanden A, Zhang Y, Ruffolo C. Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. *J Biotechnol.* 1999;73(2-3):83-90.
4. Alam S, Brailsford SR, Adams S, Allison C, Sheehy E, Zoitopoulos L, Kidd EA, Beighton D. Genotypic heterogeneity of *Streptococcus oralis* and distinct aciduric subpopulations in human dental plaque. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(8):3330-6.
5. Alam S, Brailsford SR, Whiley RA, Beighton D. PCR-Based methods for genotyping viridans group streptococci. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):2772-6.
6. Amonsin A, Wellehan JF, Li LL, Laber J, Kapur V. DNA fingerprinting of *Pasteurella multocida* recovered from avian sources. *J Clin Microbiol.* 2002;40(8):3025-31.
7. Andrews RH, Chilton NB. Multilocus enzyme electrophoresis: a valuable technique for providing answers to problems in parasite systematics. *Int J Parasitol.* 1999;29(2):213-53.
8. Appuhamy S, Parton R, Coote JG, Gibbs HA. Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* by a combination of PCR methods. *J Clin Microbiol.* 1997;35(1):288-91.
9. Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzolez O, Rodriguez-Ferri EF, Bunschoten AE, Van Embden JD, Cousins D. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1996;34(11):2734-40.
10. Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw D, Gow NA, Odds FC. Multilocus Sequence Typing of the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 2007;45(5):1469-77.
11. Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H, Werren JH. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(11):7098-110.

12. Barrett TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP, Greene KD, Lewis J, Griffin PM. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J Clin Microbiol.* 1994;32(12):3013-7.
13. Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol.* 1998;36(9):2413-8.
14. Bartie KL, Williams DW, Wilson MJ, Potts AJ, Lewis MA. PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplastic candidosis and other oral conditions. *J Clin Microbiol.* 2001;39(11):4066-75.
15. Bingen EH, Denamur E, Elion J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7(3):311-27.
16. Birren B, Lai E. Pulsed field gel electrophoresis. A practical guide. p. 129-140. Academic Press. 1993. San Diego, CA, USA
17. Bisgaard, M. Antigenic studies on *Pasteurella anatipestifer*, species incertae sedis, using slide and tube agglutination. *Avian Pathology* 1982;11:341-350
18. Blackall PJ, Fegan N, Chew GT, Hampson DJ. Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia. *Microbiology.* 1998;144:279-89.
19. Blackwell JM, Melville SE. Status of protozoan genome analysis: trypanosomatids. *Parasitology.* 1999;118 Suppl:S11-4.
20. Blaiotta G, Fusco V, von Eiff C, Villani F, Becker K. Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (egc) polymorphism and spa typing analyses. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(9):6117-23.
21. Blanc DS. The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. *Infect Genet Evol.* 2004;4(3):193-7.
22. Boerlin P, Siegrist HH, Burnens AP, Kuhnert P, Mendez P, Pretat G, Lienhard R, Nicolet J. Molecular identification and epidemiological tracing of *Pasteurella multocida* meningitis in a baby. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1235-7.
23. Botzler RG. Epizootiology of avian cholera in wildfowl. *J Wildl Dis.* 1991;27(3):367-95.
24. Bown KJ, Lambin X, Ogden NH, Petrovec M, Shaw SE, Woldehiwet Z, Birtles RJ. High resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* using multi-locus variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol.* 2007 Apr 18; [Epub ahead of print]
25. Boyce JD, Adler B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect Immun.* 2000;68(6):3463-8.

26. Boyce JD, Adler B. How does *Pasteurella multocida* respond to the host environment? *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(1):117-22.
27. Burucoa C, Lhomme V, Fauchere JL. Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: experimental results and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 1999;37(12):4071-80.
28. Campbell G, Garcia HH, Nakao M, Ito A, Craig PS. Genetic variation in *Taenia solium*. *Parasitol Int.* 2006;55 Suppl:S121-6.
29. Carpenter TE, Snipes KP, Wallis D, McCapes R. Epidemiology and financial impact of fowl cholera in turkeys: a retrospective analysis. *Avian Dis.* 1988;32(1):16-23.
30. Carpenter TE, Snipes KP, Kasten RW, Hird DW, Hirsh DC. Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* in turkeys. *Am J Vet Res.* 1991;52(8):1345-9.
31. Carter GR. Improved hemagglutination test for identifying type A strains of *Pasteurella multocida*. *Appl Microbiol.* 1972;24(1):162-3.
32. Carter GR. *Pasteurella* and *Francisella*. p 129-142. In: Carter GR, Cole JR (eds) *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology.* (Fifth edition.) Academic Press. 1990. San Diego, USA.
33. Catelli E, Cecchinato M, Savage CE, Jones RC, Naylor CJ. Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. *Vaccine.* 2006;24(42-43):6476-82.
34. Chaslus-Dancla E, Lesage-Decauses MC, Leroy-Setrin S, Martel JL, Coudert P, Lafont JP. Validation of random amplified polymorphic DNA assays by ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella* from animals. *Vet Microbiol.* 1996;52(1-2):91-102.
35. Christiansen KH, Carpenter TE, Snipes KP, Hird DW, Ghazikhanian GY. Restriction endonuclease analysis of *Pasteurella multocida* isolates from three California turkey premises. *Avian Dis.* 1992;36(2):272-81.
36. Christiansen KH, Carpenter TE, Snipes KP, Hird DW. Transmission of *Pasteurella multocida* on California turkey premises in 1988-89. *Avian Dis.* 1992;36(2):262-71.
37. Christensen JP, Bisgaard M. Fowl cholera. *Rev Sci Tech.* 2000;19(2):626-37.
38. Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science.* 1986;234(4783):1582-5.
39. Chung JY, Wilkie I, Boyce JD, Townsend KM, Frost AJ, Ghoddusi M, Adler B. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infect Immun.* 2001;69(4):2487-92.

40. Crasta KC, Chua KL, Subramaniam S, Frey J, Loh H, Tan HM. Identification and characterization of CAMP cohemolysin as a potential virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. *J Bacteriol.* 2002;184(7):1932-9.
41. Curtis PE, Ollerhead GE. Investigation to determine whether healthy chickens and turkeys are oral carriers of *Pasteurella multocida*. *Vet Rec.* 1981;108(10):206-7.
42. Curtis PE. Transmission of *Pasteurella multocida* infection from the brown rat (*Rattus norvegicus*) to domestic poultry. *Vet Rec.* 1983;113(6):133-4.
43. de la Puente-Redondo VA, del Blanco NG, Gutierrez-Martin CB, Mendez JN, Rodriguez Ferri EF. Detection and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* and *tbpB* genes. *Res Microbiol.* 2000;151(8):669-81.
44. Dijkshoorn L, Towner K. An introduction to the generation and analysis of microbial typing data. p 1-30. In: Dijkshoorn L, Towner K, Struelens M (eds). *New approaches for the generation and analysis of microbial typing data.* Elsevier. 2003. Amsterdam, Netherlands
45. Donnio PY, Le Goff C, Avril JL, Pouedras P, Gras-Rouzet S. *Pasteurella multocida*: oropharyngeal carriage and antibody response in breeders. *Vet Res.* 1994;25(1):8-15.
46. Donnio PY, Allardet-Servent A, Perrin M, Escande F, Avril JL. Characterisation of dermonecrotic toxin-producing strains of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolated from man and swine. *J Med Microbiol.* 1999;48(2):125-31.
47. Dunne WM Jr, Kehl KS, Holland-Staley CA, Brueggemann AB, Pfaller MA, Doern GV. Comparison of results generated by serotyping, pulsed-field restriction analysis, ribotyping, and repetitive-sequence PCR used to characterize penicillin-resistant pneumococci from the United States. *J Clin Microbiol.* 2001;39(5):1791-5.
48. Eamens GJ, Forbes WA, Djordjevic SP. Characterisation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from pigs associated with vaccine breakdowns. *Vet Microbiol.* 2006;115(4):329-38.
49. Fernandez-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. [Applications of PCR techniques for molecular epidemiology of infectious diseases] [Article in Spanish]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22(6):355-60.
50. Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2001;20(4):157-71.
51. Finger SA, Velapatino B, Kosek M, Santivanez L, Dailidene D, Quino W, Balqui J, Herrera P, Berg DE, Gilman RH. Effectiveness of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR and random amplified polymorphic DNA fingerprinting for *Helicobacter pylori* strain differentiation. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(7):4713-6.

52. Fodor L, Jákics É. *Pasteurella*. p 448-453. In: Czirók É (főszerk) *Klinikai és járványügyi bakteriológia*. Melania. 1999. Budapest.
53. Foley SL, Simjee S, Meng J, White DG, McDermott PF, Zhao S. Evaluation of molecular typing methods for *Escherichia coli* O157:H7 isolates from cattle, food, and humans. *J Food Prot.* 2004;67(4):651-7.
54. Fox A. Mass spectrometry for species or strain identification after culture or without culture: Past, present, and future. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2677-80.
55. Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol.* 2001;153(12):1135-41.
56. Franciosa G, Tartaro S, Wedell-Neergaard C, Aureli P. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in invasive and noninvasive listeriosis outbreaks by PCR-based fingerprinting techniques. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(4):1793-9.
57. Frey J. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine.* 2006 Dec 5; [Epub ahead of print]
58. Garcia-Martinez S, Andreani L, Garcia-Gusano M, Geuna F, Ruiz JJ. Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: utility for grouping closely related traditional cultivars. *Genome.* 2006;49(6):648-56.
59. Garcia Del Blanco N, Dobson ME, Vela AI, De La Puente VA, Gutierrez CB, Hadfield TL, Kuhnert P, Frey J, Dominguez L, Rodriguez Ferri EF. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol.* 2002;40(8):2964-72.
60. Gatei W, Das P, Dutta P, Sen A, Cama V, Lal AA, Xiao L. Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infect Genet Evol.* 2007;7(2):197-205.
61. Gil-Lamagnere C, Roilides E, Hacker J, Muller FM. Molecular typing for fungi-a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(3):172-85.
62. Glisson JR. Bacterial respiratory diseases of poultry. *Poultry Science* 1998;77:1139–1142.
63. Groenen MA, Cheng HH, Bumstead N, Benkel BF, Briles WE, Burke T, Burt DW, Crittenden LB, Dodgson J, Hillel J, Lamont S, de Leon AP, Soller M, Takahashi H, Vignal A. A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Res.* 2000;10(1):137-47.
64. Gulati PS, Viridi JS. The *rrn* locus and *gyrB* genotyping confirm the existence of two clonal groups in strains of *Yersinia enterocolitica* subspecies *palearctica* biovar 1A. *Res Microbiol.* 2007 Apr;158(3):236-43.

65. Gunawardana GA, Townsend KM, Frost AJ. Molecular characterisation of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. *Vet Microbiol.* 2000;72(1-2):97-109.
66. Han SR, Zschausch HC, Meyer HG, Schneider T, Loos M, Bhakdi S, Maeurer MJ. *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. *J Clin Microbiol.* 2000;38(10):3646-51.
67. Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;265(1):1-10.
68. Heddleston KL, Gallagher JE, Rebers PA. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.* 1972;16:925-936.
69. Huang B, Subramaniam S, Chua KL, Kwang J, Loh H, Frey J, Tan HM. Molecular fingerprinting of *Riemerella anatipestifer* by repetitive sequence PCR. *Vet Microbiol.* 1999;67(3):213-9.
70. Huber BS, Allred DV, Carmen JC, Frame DD, Whiting DG, Cryan JR, Olson TR, Jackson PJ, Hill K, Laker MT, Robison RA. Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism analyses of *Pasteurella multocida* isolates from fatal fowl cholera infections. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):2163-8.
71. Hunt ML, Adler B, Townsend KM. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol.* 2000 Mar 1;72(1-2):3-25.
72. Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol.* 1990;28(9):1903-5.
73. Imada Y, Takase A, Kikuma R, Iwamaru Y, Akachi S, Hayakawa Y. Serotyping of 800 strains of *Erysipelothrix* isolated from pigs affected with erysipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5):2121-6.
74. Ip M, Lyon DJ, Chio F, Enright MC, Cheng AF. Characterization of isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Hong Kong by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):4980-5.
75. Jacobs JA, Tjhi JH, Smeets MG, Schot CS, Schouls LM. Genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis reveals persistence and recurrence of infection with *Streptococcus anginosus* group organisms. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):2862-6.
76. John JF Jr, Twitty JA. Plasmids as epidemiologic markers in nosocomial gram-negative bacilli: experience at a university and review of the literature. *Rev Infect Dis.* 1986;8(5):693-704.
77. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous

detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35(4):907-14.

78. Kardos G., Antal M., Tóth I., Kiss I., Nagy B. Discrimination between *E. coli* O157 isolates using PCR-mediated fingerprinting based on SER element. Abstr. No. P523, 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Nice, France, April 1-4 2006
79. Kiss I, Sami L, Kecskemeti S, Hanada K. Genetic variation of the prevailing porcine respiratory and reproductive syndrome viruses occurring on a pig farm upon vaccination. *Arch Virol.* 2006 Nov;151(11):2269-76.
80. Koeuth T, Versalovic J, Lupski JR. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res.* 1995 Nov;5(4):408-18.
81. Kolader ME, Dukers NH, van der Bij AK, Dierdorp M, Fennema JS, Coutinho RA, Bruisten SM. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Amsterdam, The Netherlands, shows distinct heterosexual and homosexual networks. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2689-97.
82. Kulaga S, Behr MA, Schwartzman K. Genetic fingerprinting in the study of tuberculosis transmission. *CMAJ.* 1999;161(9):1165-9.
83. Lagatolla C, Dolzani L, Tonin E, Lavenia A, Di Michele M, Tommasini T, Monti-Bragadin C. PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. *J Clin Microbiol.* 1996;34(10):2440-3.
84. Lainson FA, Aitchison KD, Donachie W, Thomson JR. Typing of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with and without porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2):588-93.
85. Landeras E, Gonzalez-Hevia MA, Alzugaray R, Mendoza MC. Epidemiological differentiation of pathogenic strains of *Salmonella enteritidis* by ribotyping. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2294-6.
86. Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115–175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., 1991. London, UK.
87. Lay JO Jr. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev.* 2001;20(4):172-94.
88. Leotta GA, Chinen I, Vigo GB, Pecoraro M, Rivas M. Outbreaks of avian cholera in Hope Bay, Antarctica. *J Wildl Dis.* 2006;42(2):259-70.
89. Lia VV, Confalonieri VA, Ratto N, Hernandez JA, Alzugaray AM, Poggio L, Brown TA. Microsatellite typing of ancient maize: insights into the history of agriculture in southern South America. *Proc Biol Sci.* 2007;274(1609):545-54.

90. Lichtensteiger CA, Steenbergen SM, Lee RM, Polson DD, Vimr ER. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. J Clin Microbiol. 1996;34(12):3035-9.
91. Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. Electrophoresis. 2005;26(13):2567-82.
92. Loh, H., Teo, T.P., Tan, H.C., 1992. Serotypes of '*Pasteurella*' anatipestifer isolates from ducks in Singapore: a proposal of new serotypes. Avian Pathol. 21, 453-459.
93. Lupski JR, Weinstock GM. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. J Bacteriol. 1992;174(14):4525-9.
94. Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. Annu Rev Microbiol. 2006;60:561-88.
95. Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, Walker J, Mitchell T, Andrew P, Prudhomme M, Alloing G, Hakenbeck R. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic Acids Res. 1992;20(13):3479-83.
96. Martin J, Ferguson GL, Wood DJ, Minor PD. The vaccine origin of the 1968 epidemic of type 3 poliomyelitis in Poland. Virology. 2000;278(1):42-9.
97. Mayer LW. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev. 1988;1(2):228-43.
98. Mazurek GH, Reddy V, Marston BJ, Haas WH, Crawford JT. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. J Clin Microbiol. 1996;34(10):2386-90.
99. Mbulu RS, Tjipura-Zaire G, Lelli R, Frey J, Pilo P, Vilei EM, Mettler F, Nicholas RA, Huebschle OJ. Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) caused by vaccine strain T1/44 of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Vet Microbiol 2004;98(3-4):229-34.
100. McKnight AJ, Maxwell AP, Sawcer S, Compston A, Setakis E, Patterson CC, Brady HR, Savage DA. A genome-wide DNA microsatellite association screen to identify chromosomal regions harboring candidate genes in diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2006;17(3):831-6.
101. Meays CL, Broersma K, Nordin R, Mazumder A. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. J Environ Manage. 2004;73(1):71-9.
102. Mercier E, Jumas-Bilak E, Allardet-Servent A, O'Callaghan D, Ramuz M. Polymorphism in *Brucella* strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements. J Clin Microbiol. 1996;34(5):1299-302.
103. Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortes P, Gonzalez JJ, Lavilla S, Miro E, Muniesa M, Saco M, Tortola MT, Mirelis B, Coll P, Llagostera M, Prats G, Navarro F. Extended-

- spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(1):211-5.
104. Mooi FR, van Loo IH, King AJ. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence? *Emerg Infect Dis.* 2001;7(3 Suppl):526-8.
 105. Morris MP, Fletcher OJ. Estimate of economic impact of fowl cholera in turkeys in Georgia in 1986. *Avian Dis.* 1988;32(4):718-21.
 106. Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1998;73(1):127-41.
 107. Nachamkin I, Bohachick K, Patton CM. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(6):1531-6.
 108. Nakai H, Taniwaki M, Tanaka S, Nishigaki H, Nakagawa H, Misawa S, Kashima K. Characterization of a 14q+ marker chromosome in philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia by DNA analysis and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995;81(1):83-91.
 109. Nielsen HS, Oleksiewicz MB, Forsberg R, Stadejek T, Botner A, Storgaard T. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J Gen Virol.* 2001;82(Pt 6):1263-72.
 110. Noller AC, McEllistrem MC, Pacheco AG, Boxrud DJ, Harrison LH. Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec;41(12):5389-97.
 111. Onteniente L, Brisse S, Tassios PT, Vergnaud G. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):4991-7.
 112. Pedersen K, Dietz HH, Jorgensen JC, Christensen TK, Bregnballe T, Andersen TH. *Pasteurella multocida* from outbreaks of avian cholera in wild and captive birds in Denmark. *J Wildl Dis.* 2003;39(4):808-16.
 113. Pena SD, Chakraborty R. Paternity testing in the DNA era. *Trends Genet.* 1994;10(6):204-9.
 114. Pfaller MA. Molecular epidemiology in the care of patients. *Arch Pathol Lab Med.* 1999;123(11):1007-10.
 115. Pradel N, Boukhors K, Bertin Y, Forestier C, Martin C, Livrelli V. Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(6):2460-8.

116. Rajashekara G, Koeuth T, Nevile S, Back A, Nagaraja KV, Lupski JR, Kapur V. SERE, a widely dispersed bacterial repetitive DNA element. *J Med Microbiol.* 1998;47(6):489-97.
117. Rementeria A, Gallego L, Quindos G, Garaizar J. Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7(6):331-6.
118. Riley L. Molecular epidemiology of infectious diseases. Principles and practices. ASM Press. 2004. Washington DC, USA.
119. Rimler RB, Nordholm GE. DNA fingerprinting of *Riemerella anatipestifer*. *Avian Dis.* 1998;42(1):101-5.
120. Rodriguez-Barradas MC, Hamill RJ, Houston ED, Georghiou PR, Clarridge JE, Regnery RL, Koehler JE. Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *J Clin Microbiol.* 1995;33(5):1089-93.
121. Rubio JM, Berzosa PJ, Benito A. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for genotyping the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology.* 2001;123(Pt 4):331-6.
122. Ruiz M, Rodriguez JC, Rodriguez-Valera F, Royo G. Amplified-fragment length polymorphism as a complement to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4820-2.
123. Sails AD, Swaminathan B, Fields PI. Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4733-9.
124. Sampaio JL, Viana-Niero C, de Freitas D, Hofling-Lima AL, Leao SC. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;55(2):107-18.
125. Sandhu T, Harry EG. Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolated from commercial White Pekin ducks in the United States. *Avian Dis.* 1981;25(2):497-502.
126. Savelkoul PH, Aarts HJ, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker JL, Schouls L, Lenstra JA. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J Clin Microbiol.* 1999;37(10):3083-91.
127. Saxena MK, Singh VP, Kumar AA, Chaudhuri P, Singh VP, Shivachandra SB, Biswas A, Sharma B. REP-PCR Analysis of *Pasteurella multocida* Isolates from Wild and Domestic Animals in India. *Vet Res Commun.* 2006;30(8):851-61.
128. Schlotterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma.* 2000;109(6):365-71.

129. Schlotterer C. Genealogical inference of closely related species based on microsatellites. *Genet Res.* 2001;78(3):209-12.
130. Schuur PM, Haring AJ, van Belkum A, Draaisma JM, Buiting AG. Use of random amplification of polymorphic DNA in a case of *Pasteurella multocida* meningitis that occurred following a cat scratch on the head. *Clin Infect Dis.* 1997;24(5):1004-6.
131. Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, Farrah SR, Lukasik J. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(12):5796-803.
132. Segers P, Mannheim W, Vancanneyt M, De Brandt K, Hinz KH, Kersters K, Vandamme P. *Riemerella anatipestifer* gen. nov., comb. nov., the causative agent of septicemia anserum exsudativa, and its phylogenetic affiliation within the *Flavobacterium-Cytophaga* rRNA homology group. *Int J Syst Bacteriol.* 1993;43(4):768-76.
133. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol.* 1986;51(5):873-84.
134. Shangkuan YH, Yang JF, Lin HC, Shaio MF. Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. *J Appl Microbiol.* 2000;89(3):452-62.
135. Shin EK, Seo YS, Han JH, Hahn TW. Diversity of swine *Bordetella bronchiseptica* isolates evaluated by RAPD analysis and PFGE. *J Vet Sci.* 2007;8(1):65-73.
136. Shivachandra SB, Kumar AA, Gautam R, Saxena MK, Chaudhuri P, Srivastava SK. Detection of multiple strains of *Pasteurella multocida* in fowl cholera outbreaks by polymerase chain reaction-based typing. *Avian Pathol.* 2005;34(6):456-62.
137. Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25(10):847-51.
138. Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int J Parasitol.* 1997;27(10):1135-45.
139. Snipes KP, Hirsh DC, Kasten RW, Carpenter TE, Hird DW, McCapes RH. Homogeneity of characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife in California, 1985-88. *Avian Dis.* 1990;34(2):315-20.
140. Snipes KP, Hirsh DC, Kasten RW, Hansen LM, Hird DW, Carpenter TE, McCapes RH. Use of an rRNA probe and restriction endonuclease analysis to fingerprint *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife. *J Clin Microbiol.* 1989;27(8):1847-53.

141. Snipes KP, Hirsh DC, Kasten RW, Carpenter TE, Hird DW, McCapes RH. Differentiation of field isolates of *Pasteurella multocida* serotype 3,4 from live vaccine strain by genotypic characterization. *Avian Dis.* 1990;34(2):419-24.
142. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(2):332-70.
143. Spano F, Crisanti A. *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. *Int J Parasitol.* 2000;30(4):553-65.
144. Speijer H, Savelkoul PH, Bonten MJ, Stobberingh EE, Tjhi JH. Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 1999;37(11):3654-61.
145. Struelens, M. J., and the Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM), of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* 2:2–11.
146. Subramaniam S, Huang B, Loh H, Kwang J, Tan HM, Chua KL, Frey J. Characterization of a predominant immunogenic outer membrane protein of *Riemerella anatipestifer*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7(2):168-74.
147. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV; CDC PulseNet Task Force. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(3):382-9.
148. Swaminathan B, Gerner-Smidt P, Ng LK, Lukinmaa S, Kam KM, Rolando S, Gutierrez EP, Binsztein N. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodborne Pathog Dis.* 2006;3(1):36-50.
149. Syrmis MW, O'Carroll MR, Sloots TP, Coulter C, Wainwright CE, Bell SC, Nissen MD. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *J Med Microbiol.* 2004;53(Pt 11):1089-96.
150. Takayama M, Takayama N. New method of differentiating wild-type varicella-zoster virus (VZV) strains from Oka varicella vaccine strain by VZV ORF 6-based PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Virol.* 2004;29(2):113-9.
151. Tenover FC. Plasmid fingerprinting. A tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community-acquired infections. *Clin Lab Med.* 1985;5(3):413-36.
152. Terhes G, Brazier JS, Urban E, Soki J, Nagy E. Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in regions of Hungary. *J Med Microbiol.* 2006;55(Pt 3):279-82.

153. Terletski V, Schwarz S, Carnwath J, Niemann H. Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars *Choleraesuis*, *Typhimurium*, *Dublin* and laboratory strains of *Escherichia coli* using subtracted restriction fingerprinting (SRF). *Microbiol Res.* 2003;158(2):135-42.
154. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1990;28(12):2668-73.
155. Top J, Schouls LM, Bonten MJ, Willems RJ. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol.* 2004 Oct;42(10):4503-11.
156. Townsend KM, Dawkins HJ, Papadimitriou JM. REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates that cause haemorrhagic septicaemia. *Res Vet Sci.* 1997;63(2):151-5.
157. Townsend KM, Dawkins HJ, Papadimitriou JM. Analysis of haemorrhagic septicaemia-causing isolates of *Pasteurella multocida* by ribotyping and field alternation gel electrophoresis (FAGE). *Vet Microbiol.* 1997;57(4):383-95.
158. Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol.* 2001;39(3):924-9.
159. Tripathy S, Kumar N, Mohanty S, Samanta M, Mandal RN, Maiti NK. Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from freshwater culture systems. *Microbiol Res.* 2006 Sep 26; [Epub ahead of print]
160. Tuboly S. (szerk) Állatorvosi járványtan I. Mezőgazda Kiadó. 1998. Budapest
161. van Belkum A, De Jonckheere J, Quint WG. Genotyping *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri* isolates by interrepeat polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(10):2595-8.
162. van Belkum A, Sluijter M, de Groot R, Verbrugh H, Hermans PW. Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Clin Microbiol.* 1996;34(5):1176-9.
163. van Belkum A, Hermans PWM. BOX PCR fingerprinting for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae*. p 49-55. In: van Belkum A, Duim B, Hays JP (eds) *Experimental Approaches for Assessing Genetic Diversity Among Microbial Pathogens*. Eds. Parisen & Looijen. 2003. Wageningen, Netherlands
164. van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;49(1):22-7.

165. van Boven M, Mooi FR, Schellekens JF, de Melker HE, Kretzschmar M. Pathogen adaptation under imperfect vaccination: implications for pertussis. *Proc Biol Sci.* 2005;272(1572):1617-24.
166. van der Zee A, Verbakel H, van Zon JC, Frenay I, van Belkum A, Peeters M, Buiting A, Bergmans A. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *J Clin Microbiol.* 1999;37(2):342-9.
167. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2):406-9.
168. van Ooyen A. Theoretical aspects of pattern analysis. p 31-45. In: Dijkshoorn L, Towner K, Struelens M (eds). *New approaches for the generation and analysis of microbial typing data.* Elsevier. 2003. Amsterdam, Netherlands
169. van Steenberghe TJM, Colloms SD, Hermans PWM, de Graaff J, Plasterk RHA. Genomic DNA fingerprinting by restriction fragment end labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995;92:5572-5576
170. Vazquez JA, Berron S. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. [Multilocus sequence typing: the molecular marker of the Internet era] [Article in Spanish] *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22(2):113-20.
171. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(24):6823-31.
172. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(21):4407-14.
173. Weller TM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? *J Hosp Infect.* 2000;44(3):160-72.
174. Weng X, Wang Z, Liu J, Kimura M, Black WC 4th, Brennan PJ, Li H, Vissa VD. Identification and Distribution of *Mycobacterium leprae* genotypes in a high prevalence region for leprosy in China: A three year molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol.* 2007 Apr 11; [Epub ahead of print]
175. Wenzel R, Herrmann R. Repetitive DNA sequences in *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(17):8337-50.
176. Windingstad RM, Kerr SM, Duncan RM, Brand CJ. Characterization of an avian cholera epizootic in wild birds in western Nebraska. *Avian Dis.* 1988;32(1):124-31.
177. Witonski D, Stefanova R, Ranganathan A, Schutze GE, Eisenach KD, Cave MD. Variable-number tandem repeats that are useful in genotyping isolates of *Salmonella*

enterica subsp. enterica serovars Typhimurium and Newport. J Clin Microbiol. 2006 Nov;44(11):3849-54.

178. Yap MN, Barak JD, Charkowski AO. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. Appl Environ Microbiol. 2004;70(5):3013-23.
179. Yatsu K, Mizuki N, Hirawa N, Oka A, Itoh N, Yamane T, Ogawa M, Shiwa T, Tabara Y, Ohno S, Soma M, Hata A, Nakao K, Ueshima H, Ogihara T, Tomoike H, Miki T, Kimura A, Mano S, Kulski JK, Umemura S, Inoko H. High-resolution mapping for essential hypertension using microsatellite markers. Hypertension. 2007;49(3):446-52.
180. Yoshino T, Laine ML, van Winkelhoff AJ, Dahlen G. Genotypic characterization of *Porphyromonas gingivalis* isolated from Swedish patients with periodontitis and from periodontal abscesses. Oral Microbiol Immunol. 2007;22(3):195-200.
181. Zadoks RN, Schukken YH. Use of molecular epidemiology in veterinary practice. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2006;22(1):229-61.
182. Zeman D, Neiger R, Nietfield J, Miskimins D, Libal M, Johnson D, Janke B, Gates C, Forbes K. Systemic *Pasteurella haemolytica* infection as a rare sequel to avirulent live *Pasteurella haemolytica* vaccination in cattle. J Vet Diagn Invest. 1993 Oct;5(4):555-9.

7.2. A szerző az értekezéshez felhasznált közleményei

1. G. Kardos, I. Turcsányi, A. Bistyák, J. Nagy, I. Kiss: Application of molecular epidemiology methods to study breakthrough outbreaks occurring in vaccine-protected poultry stocks. Közlésre benyújtva.
2. I. Kiss, G. Kardos, J. Nagy, M. Tenk and E. Ivanics: DNA-fingerprinting of *Riemerella anatipestifer* isolates. Vet. Rec. 2007. 160: 26-28.
IF(2005): 1,017 idézve: 0
3. G. Kardos, J. Nagy, M. Antal, A. Bistyák, M. Tenk, I. Kiss: Development of a novel diagnostic PCR assay specific for *Riemerella anatipestifer*. Lett. Appl. Microbiol. 2007. 44: 145-148.
IF(2005): 1,440 idézve: 0
4. G. Kardos, I. Kiss: Molecular epidemiology investigation of outbreaks of fowl cholera in geographically related poultry flocks. J Clin Microbiol. 2005, 43(6): 2959-61.
IF(2005): 3,537 idézve: 2

7.3. A szerző egyéb közleményei

1. **G. Kardos**, T. Farkas, M. Antal, N. Nógrády, I. Kiss: Novel PCR assay for identification of *Salmonella enterica* serovar Infantis. Lett Appl Microbiol. Közlésre elfogadva.
2. G. Sóczó, **G. Kardos**, P. M. McNicholas, E. Falusi, L. Gergely, L. Majoros: Posaconazole susceptibility testing against *Candida* species: Comparison of broth microdilution and Etest methods. Mycoses. In press
IF(2005): 0.765 idézve: 0
3. A. Bistyák, S. Kecskeméti, R. Glávits, I. Tischler, S. T. Nagy, **G. Kardos**, I. Kiss: Pacheco's disease in a hungarian zoo bird population: a case report. Acta Vet. Hung. 2007. 55 (2): 213-218
IF(2005): 0,530 idézve: 0
4. T. Farkas, M. Antal, L. Sámi, P. Germán, S. Kecskeméti, **G. Kardos**, S. Belák, I. Kiss: Rapid and simultaneous detection of avian influenza and Newcastle disease viruses by duplex polymerase chain reaction assay. Zoonoses Public Health. 2007 54: 38–43
IF(2005): 1,505 idézve: 0
5. L. Majoros, I. Szegedi, **G. Kardos**, Cs. Erdész, J. Kónya, Cs. Kiss: Slow response of invasive *Candida krusei* infection to amphotericin B in a clinical time-kill study. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2006. 25 (12): 803-806
IF(2005): 2,061 idézve: 0
6. I. Kiss, P. Germán, L. Sámi, M. Antal, T. Farkas, **G. Kardos**, S. Kecskeméti, Á. Dán, S. Belák: Application of real-time RT-PCR utilising lux (light upon extension) fluorogenic primer for the rapid detection of avian influenza viruses. Acta Vet. Hung. 2006. 54 (4):

525-533

IF(2005): 0,530 idézve: 0

7. A. Csagola, S. Kecskemeti, **G. Kardos**, I. Kiss and T. Tuboly: Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. Arch. Virol. 2006, 151(3): 495-507
IF(2005): 1,819 idézve: 0
8. L. Majoros, **G. Kardos**, B. Szabó, and M. Sipiczki: Caspofungin Susceptibility Testing of Candida inconspicua: Correlation of Different Methods with the Minimal Fungicidal Concentration. Antimicrob. Agents Chemother. 2005, 49(8): 3486-8.
IF(2005): 4,379 idézve: 1
9. Majoros, L., **G. Kardos**, P. Feiszt, B. Szabó: Efficacy of amphotericin B and flucytosine against fluconazole-resistant Candida inconspicua clinical isolates. J. Antimicrob. Chemother. 2005, 56(1): 253-4.
IF(2005): 3,886 idézve: 1
10. Szládek, G., A. Juhasz., **G. Kardos**, K. Szőke, T. Major, I. Sziklai, I. Tar, I. Márton, J. Kónya, L. Gergely, K. Szarka: High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. J Clin Pathol. 2005, 58(4):402-5
IF(2005): 2,170 idézve: 3
11. Majoros, L., **G. Kardos**, B. Szabó, M. Kovács, A. Maráz: Fluconazole susceptibility testing of Candida inconspicua clinical isolates: comparison of four methods. J Antimicrob Chemother. 2005, 55(2):275-6
IF(2005): 3,886 idézve: 2
12. Kiss, I., **G. Kardos**, L.H. Farkas: Baktérium törzsek tipizálása DNS ujjlenyomat technikákkal (Szemleciikk) Magyar Állatorvosok Lapja 2004, 126(3):161-6
IF(2004): 0,158 idézve: 1
13. Majoros, L., **G. Kardos**, Á. Belák, A. Maráz, L. Asztalos, E. Csánky, Z. Barta, B. Szabó: Restriction enzyme analysis of ribosomal DNA shows that Candida inconspicua clinical isolates can be misidentified as Candida norvegensis with traditional diagnostic procedures. J Clin Microbiol. 2003, 41(11):5250-3.
IF(2003): 3,489 idézve: 4
14. Majoros L, **Kardos G**, Pócsi I, Szabó B.: Distribution and susceptibility of Candida species isolated in the Medical University of Debrecen. Acta Microbiol Immunol Hung. 2002, 49(2-3):351-61
IF: - idézve: 2

8. Tárgyszók

Molekuláris epidemiológia; Rep-PCR; Pulzáló mezejű gélelektroforézis; *Pasteurella multocida*; *Riemerella anatipestifer*; Baromfikolera

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Kiss István témavezetőmnek, aki a molekuláris tipizálás állatorvosi diagnosztikába való alkalmazására irányította a figyelmemet és mindvégig inspirált és támogatott jelen és számos más munka során.

Köszönöm Rendesné Székely Évának, Szedlák Erzsébetnek és Incze Attilának a kiváló technikai segítséget és a mindig vidám munkahelyi hangulatot, Dr. Bistyák Andreának, Tündének és a Baromfiosztály többi dolgozójának a *Pasteurella multocida* izolátumok biztosítását, illetve Turcsányi Ibolyának és a Bakteriológiai Osztály minden dolgozójának az izolátumok azonosításában nyújtott segítséget. Köszönöm a volt Debreceni Állategészségügyi Intézet minden dolgozójának, hogy barátsággal fogadtak, és ha szükség volt rá, mindenben segítettek.

Köszönöm Dr. Magyar Tibornak az ismert buroktípusú *P. multocida* törzseket. Köszönöm Toldy Tündének a *Riemerella anatipestifer* izolátumok gyűjtésében nyújtott segítséget.

Köszönettel tartozom belső témavezetőmnek Prof. Dr. Gergely Lajosnak, aki lehetővé tette, hogy az Orvosi Mikrobiológiai Intézet dolgozójaként a volt Debreceni Állategészségügyi Intézetben is dolgozhassak és mindvégig támogatott a munka során.

Köszönöm az Intézet, és különösen a Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratórium minden dolgozójának, hogy segítettek abban, hogy sok más teendőm mellett elkészülhessen a dolgozatom.

Külön köszönet illeti kollegáimat, Dr. Szarka Krisztinát, Dr. Majoros Lászlót, Miszti Cecíliát és Dr. Farkas Tibort, akik sok hasznos tanáccsal láttak el.

Végezetül köszönöm Dr. Szarka Krisztinának, Dr. Majoros Lászlónak és Dr. Nógrády Noéminek, hogy a dolgozat elkészülését kritikai megjegyzéseikkel segítették.

10. Függetlenség