

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Kardos Gábor

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum  
Orvosi Mikrobiológiai Intézet

2007

## 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 pulzáló mezejű gél elektroforézis (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.

## 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.

### 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. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat standard korongdiffúziós módszerrel végeztük. Az izolátumokat a vizsgálatok elvégzéséig liofilizált formában vagy -80 °C-on tároltuk. Összesen három visszatérő járványsorozatot vizsgáltunk.

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. 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.

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 (A-F) volt érintett, legalább 18 járványból összesen 27 izolátum tipizálását végeztük el.

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 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 őszen megszűntek, sporadikus baromfikolera miatti elhullások még 2006 végén is előfordultak. Összesen 19, ezekből a járványokból származó, valamint négy járványtanilag független (földrajzilag távol tartott állományból származó) izolátumot

vizsgáltunk meg. Emellett az előző két esetből származó törzsekkel is összehasonlítottuk az izolátumokat.

A munka során a *P. multocida* izolátumok mellett 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. Összesen 38 törzset vizsgáltunk meg.

## Módszerek

A munka során species- illetve szerocsoport-specifikus PCR-kat, PCR-alapú tipizáló eljárásokat és pulzáló mezejű gélelektroforézist alkalmaztunk.

A bakteriális genomi DNS-t hőkezeléssel illetve Chelex-100 gyanta (Bio-Rad) segítségével tisztítottuk. A hőkezeléses tisztításhoz a 24 órás tiszta levestenyészetből (agy-szív kivonat 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.

A *P. multocida* fajhoz tartozást és a buroktípust egy irodalomban leírt multiplex PCR segítségével határoztuk meg (Townsend és mtsai, J Clin Microbiol. 2001;39(3):924-9). A *R. anatipestifer* azonosítására egy új PCR-t dolgoztunk ki. A rendelkezésre álló *R. anatipestifer* izolátumok közül ötöt 16S rDNS szekvencia alapján pontosan azonosítottunk, hogy a biokémiai azonosítás eredményét megerősítsük. A génbankban ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) *in silico* tesztelés után nem találtunk kellően specifikus primerpárt tervezésére alkalmas szekvenciát, ezért az izolátumok bélbaktériumokra jellemző repetitív intergénikus konszenzus szekvenciákon alapuló (ERIC) -PCR ujjlenyomatában egy kb. 700 bp hosszú közös fragmentumot öt különböző ERIC-PCR ujjlenyomatot reprezentáló öt izolátum esetén megszekvenáltattunk (Biomi Kft., Gödöllő). A kapott szekvenciákból készült 669 bp hosszú konszenzus szekvenciát használtuk a primerek tervezéséhez. A megtervezett primerpár

(669AF: 5'-TTACCGACTGATTGCCTTCTAG-3'

-669AR: 5'-AGAGGAAGACCGAGGACATC-3') alkalmazásával optimalizáltuk a PCR elegy összetételét. 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 specifitását 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.

A *P. multocida* esetén az izolátumok tipizálására egyrészt ERIC-PCR-t valamint az első járványsorozat vizsgálatokor random amplifikált polimorf DNS (RAPD) módszert, másrészt pulzáló mezejű gélelektroforézist (PFGE) alkalmaztunk. Mindegyik módszert irodalmi protokollok alapján (Amonsin és mtsai. J Clin Microbiol. 2002;40(8):3025-31.; Chalus-Dancla és mtsai. Vet Microbiol. 1996;52(1-2):91-102.; Lainson és mtsai. J Clin Microbiol. 2002;40(2):588-93.) végeztük. *R. anatipestifer* tipizálására ERIC-PCR-t, *Salmonella* Enteritidis repetitív elem (SERE)-PCR-t és BOX-PCR-t, valamint PFGE-t adaptáltunk és alkalmaztunk, a *R. anatipestifer* PFGE során SmaI enzimmel (Promega) emésztettünk.

A kapott repetitív elem alapú PCR, RAPD és PFGE mintázatokat a Fingerprinting II szoftver (Bio-Rad) segítségével elemeztük. A hasonlóságok leírására a Dice koefficiens, a csoportanalízisre az UPGMA módszert alkalmaztuk. Mindegyik esetben elvégeztük a különböző módszerek eredményeinek együttes értékelését lehetővé tevő kompozit analízist is.

## Eredmények és következtetések

### Az első baromfikolera járványsorozat

A tizenhat izolátum mindegyike A buroktípusba tartozó *P. multocida*-nak bizonyult. Mindegyik izolátum érzékeny volt penicillinre, ceftiofurra, trimetoprim+sulfamethoxazol-ra, neomycinre és fluorokinolonokra, rezisztens volt nalidixsavra és tetraciklinekre. A buroktípus meghatározása illetve a rezisztenciakép 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. Hasonló eredményt kaptunk ERIC-PCR és PFGE alkalmazásával, bár a PFGE módszerrel a 2. számú izolátum mintázata is a B tulajdonos állományából származó többi izolátum mintázatához volt hasonló.

A molekuláris tipizálás segítségével tehát két nagy rokon csoportot lehetett 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.

Az eredmények alapján retrospektíve a következő járványtani kapcsolatrendszert 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 második baromfikolera járványsorozat

Az első három izolátum és az F jelű telepről származó összesen két izolátum A buroktípusúnak, míg a többi 22 izolátum F buroktípusúnak bizonyult. 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 2001-ben

kitört két járványból származó két (A buroktípusú) izolátum, a harmadikba pedig a 2000 és 2003 között izolált összes többi (F buroktípusú) izolátum.

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 (rezervoárokbán) tartósan fennmaradt, a telepeket ebből a rezervoár(ok)ból 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 (F) 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, trimethoprim+sulfamethoxazol-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, a fluorokinolon rezisztencia kialakulását figyeltük meg a törzsben.

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.

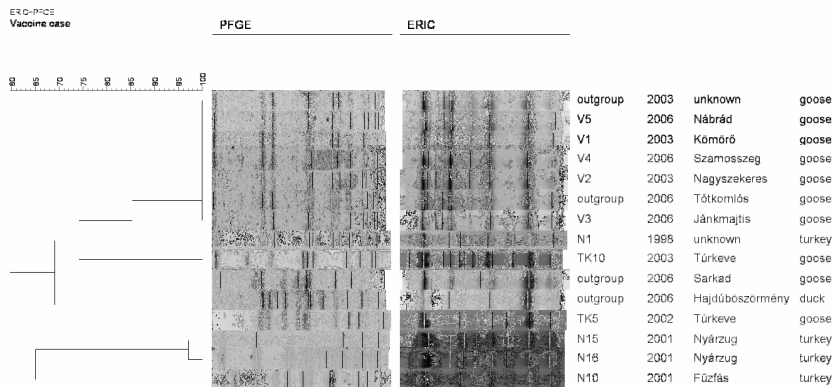
### **A harmadik baromfikolera járványsorozat**

A járványsorozatból származó mind a 19 izolátum A buroktípusúnak bizonyult. A járványsorozat izolátumai mind ERIC-PCR-rel mind a PFGE-vel megkülönböztethetetlenek



voltak egymástól. Érdekes, hogy a járványtanilag független kontroll törzsek közül kettő szintén megkülönböztethetetlen volt a 19 járványsorozat alkotta rokonsági csoporttól. 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 harmadik járványsorozat egyes 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 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 rágcsálók 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.

### **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, lásd fentebb) működése a következő PCR elegyben volt optimális: 50 µl végtérfogatban 1x PCR pufferben 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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, míg heterológ kórokozókkal, köztük a 16 különböző *P. multocida* szerotípust reprezentáló referenciatörzsszel minden esetben negatív eredményt adott. A szervmintákból a PCR eredménye a tenyésztéssel megegyező volt. 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.

### **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, míg a PFGE öt rokonsági csoportba sorolt összesen 23 izolátumot, kijelölt három hasonló izolátumpárt, míg nyolc izolátumot csoportfüggetlennek mutatott. 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. Az endémiás klónok terjedéséért leginkább különböző vadmadarak lehetnek felelősek.

## Az eredmények összefoglalása

1. Igazoltuk, hogy mindhárom járványsorozat egy-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 szolgáltathatott volna a járványsorozat jelentős részének megelőzéséhez, így a munka bemutatja a módszerek potenciális hasznosíthatóságát az állatorvosi diagnosztikában.
2. A második járványeset során igazoltuk, hogy a perzisztáló törzs másodlagosan fluorokinolon rezisztenciát szerzett.
3. Egy közös ERIC-PCR fragmentumból kiindulva *R. anatipestifer* specifikus PCR-t dolgoztunk ki, optimalizáltunk és teszteltünk. A módszer pontosan azonosítja a baktériumot, előzetes eredményeink alapján alkalmas lehet a baktérium különböző mintákból való közvetlen kimutatására is.
4. A *P. multocida* esetén alkalmazott módszerekből kiindulva *R. anatipestifer* tipizálására alkalmas ERIC-PCR és PFGE módszert állítottunk be. Ezek segítségével felmérve Délkelet-Magyarországról származó izolátumok diverzitását megállapítottuk, hogy a törzsek eloszlása sem térben, sem időben nem homogén, tehát a kórokozó endémiás jelenlétét valószínűsíthető.
5. A munka bemutatja a molekuláris tipizáló módszerek alkalmazhatóságát az állategészségügyi diagnosztikában, és modellként szolgálhat további állategészségüggyel kapcsolatos felhasználási területekhez.

## Köszönetnyilvánítás

Témavezetőimnek, Dr. Kiss Istvánnak és Prof. Dr. Gergely Lajosnak.

Rendesné Székely Évának, Szedlák Erzsébetnek és Incze Attilának a technikai segítségért.

Dr. Bistyák Andreának és Dr. Turcsányi Ibolyának a törzsek izolálásában és azonosításban nyújtott segítségért.

Dr. Magyar Tibornak az ismert buroktípusú *P. multocida* törzsekért.

Toldy Tündének a *Riemerella anatipestifer* izolátumok gyűjtésében nyújtott segítségért.

Dr. Szarka Krisztinának, Dr. Majoros Lászlónak és Dr. Nógrády Noéminek a dolgozat korábbi verziójának kritikus elolvasásáért.

A volt Debreceni Állategészségügyi Intézet minden dolgozójának.

Az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden dolgozójának.

## Közlemények

### Az értekezésben felhasznált közlemények

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

### Egyéb közlemények

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. 2007. 50 (3):178-182  
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. Kecskeméti, **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. Szóke, 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

## **Idézhető absztraktok**

1. (Abstr.) **Kardos G.**, Sóczó G., McNicholas P., Falusi E., Hegedűs J., Majoros L.: Time-kill studies show that posaconazole is fungicidal against some *Candida* species. The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Paris, France, 2006. Poster No P-0089.  
IF: 1.46 idézve: 0
2. (Abstr) Tóth B., Falusi E., Miszti C., Borbély Á., **Kardos G.**, Majoros L. Comparison of MICRONAUT-*Candida*, a new yeast identification system to API ID32C. The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Paris, France, 2006. Poster No P-0428.  
IF: 1.46 idézve: 0
3. (Abstr) Sóczó G., McNicholas P., **Kardos G.**, Falusi E., Majoros L. Further studies on fungicidal activities of posaconazole 46th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington D.C., Abstr. A-2151. 2006 (poster)  
IF: 4,379 idézve: 0
4. (Abstr) Majoros L., **Kardos G.**, McNicholas P.: Determination of minimal inhibitory and minimal fungicidal concentrations of posaconazole against four human pathogenic *Candida* Species. Abstr. M-1611. 45th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington D.C., 2005 (poszter)  
IF: 4,216 idézve: 0
5. (Abstr) **G. Kardos** and L. Majoros: Comparison of colonizing ability of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in murine model. 2002. Abstr. Mycoses, 45, Suppl. 2., p. 30  
IF(2002): 0,545 idézve: 0

## **Előadások, poszterek**

1. L. Majoros, C. Miszti, **G. Kardos**, I. Andirkó, B. Szabó: Repeated positive *Candida* cultures from male urine samples, 1<sup>st</sup> Joint meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, 2000. (előadás)
2. L. Majoros, C. Miszti, **G. Kardos**, I. Andirkó, B. Szabó: Fungal sepsis in newborns and childhood. 1<sup>st</sup> Joint meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, 2000. (előadás)
3. **Kardos G.**, Majoros L., Erdész Cs.: Egy ritka patogén, *Candida dubliniensis* izolálása és azonosítása. Ph.D.konferencia, Debrecen, 2001. (előadás)
4. Erdész Cs., **Kardos G.**, Miszti C., Majoros L., Szikszay E., Szegedi I., Kiss Cs.: Szisztémás gombafertőzések neutropéniás betegekben – korszerű diagnosztika és kezelés. Magyar Gyermekaneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság Országos Tudományos Ülése, Debrecen, 2001. (előadás)
5. Majoros L., **Kardos G.**, Miszti C., Szabó B.: Vesetranszplantált betegek vizeletéből kitenyésztett kórokozók species szerinti megoszlása és rezisztenciája. Magyar Kemoterápiás Társaság Közgyűlése, Hajdúszoboszló, 2001. (előadás)



6. Majoros L., Miszti C., **Kardos G.**, Szabó B.: A cefepime, az imipenem, a meropenem és a piperacillin/tazobactam in vitro érzékenységének összehasonlító vizsgálata vegyes klinikai anyagból gram-negatív baktériumok esetén Magyar Kemoterápiás Társaság Közgyűlése, Hajdúszoboszló, 2001. (előadás)
7. Majoros L., **Kardos G.**, Miszti C., Szabó B.: Klinikai anyagból izolált sarjadzó gombák species szintű eloszlása és antimikotikumok iránti érzékenysége. Magyar Mikrobiológiai Társaság Jubileumi Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001. (előadás)
8. **Kardos G.**, Majoros L., Erdész Cs., Miszti C., Szabó B.: Egy ritka patogén, *Candida dubliniensis* izolálása és azonosítása. Magyar Mikrobiológiai Társaság Jubileumi Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001. (előadás)
9. **Kardos G.**, Majoros L.: *Candida albicans* és *Candida dubliniensis* kolonizációs képességének összehasonlítása egér modellben. Ph.D. konferencia, Debrecen, 2002. (előadás)
10. **Kardos G.**, Majoros L.: *Candida albicans* és *Candida dubliniensis* kolonizációs képességének összehasonlítása egér modellben. II. Magyar Mikológiai Konferencia, Szeged, 2002. (poszter)
11. Majoros L., **Kardos G.**, Pócsi I., Szabó B., Miszti C. (2002) Sarjadzó gombák kóroki szerepe az egyes testtájak fertőzései esetén. Ritkábban izolálható *Candida* speciemek klinikai jelentősége. II. Magyar Mikológiai konferencia, Szeged, 2002. (előadás).
12. **G. Kardos** and L. Majoros: Comparison of colonizing ability of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in murine model. 8<sup>th</sup> Congress of the European Confederation of Medical Mycology, Budapest, 2002. (poszter)
13. L. Majoros, **G. Kardos**, C. Miszti, J. Szabó, B. Szabó: Changes in species distribution of yeasts isolated in the University of Debrecen during a six year period. (előadás) 23<sup>rd</sup> International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest, 2003
14. **G. Kardos**, A. Maráz, Á. Belák, M. Sápy, G. Reményi, L. Majoros and B. Szabó: Comparison of different methods for fluconazole susceptibility testing of *Candida inconspicua* (poszter). 23<sup>rd</sup> International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest, 2003.
15. M. Kovács, Á. Belák, L. Majoros, **G. Kardos**, A. Maráz: Molecular characterization of *Candida inconspicua* clinical isolates (poszter) 23<sup>rd</sup> International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest, 2003.
16. G. Szládek, A. Juhász, **G. Kardos**, T. Major, I. Tar, L. Gergely, K. Szarka: Co-infection with TTV may increase the oncogenic effects of HPV infection in laryngeal carcinomas. 2<sup>nd</sup> Joint meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, 2003. (előadás)
17. Majoros L., **Kardos G.**, Miszti C., Szabó J., and Szabó., B. (2003) In vivo investigation of fluconazole resistance in case of *Candida inconspicua*. In program and Abstracts of the

14<sup>th</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 2003  
Abstract M-13.

18. **G. Kardos**, L. Majoros: Comparison of in vitro development of fluconazole resistance in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. 2<sup>nd</sup> Joint meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, 2003. (előadás)
19. **G. Kardos**, I. Kiss: Molecular fingerprinting of avian *Pasteurella multocida* isolates from Hungary. 2<sup>nd</sup> Joint meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, 2003. (előadás)
20. **Kardos G.**, Kiss I.: Baromfikolera járványok molekuláris epidemiológiai vizsgálata. MTA Állatorvosi Osztályának Gyűlése, Budapest, 2004. (előadás)
21. **Kardos G.**, Kiss I.: Különböző eredetű *Salmonella* Enteritidis törzsek DNS-ujjlenyomat vizsgálata. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2004. (előadás)
22. **Kardos G.**, Majoros L.: Különböző testtájokról 2000-2003 között izolált *Candida* törzsek amphotericin B és flukonazol iránti érzékenységének összehasonlító vizsgálata Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2004. (előadás)
23. **Kardos G.**, Pappné Falusi E., Bódi T., Szabó B., Majoros L.: Amphotericin B, vorikonazol és 5-fluorocitozin in vitro aktivitása *Candida inconspicua* ellen. III. Magyar Mikológiai Konferencia, Mátraháza, 2005. (poszter)
24. Majoros L., **Kardos G.**, Pappné Falusi E., Hegedűs J., Szabó B., Sipiczki M.: *Candida inconspicua* klinikai izolátumok érzékenysége caspofungin iránt. III. Magyar Mikológiai Konferencia, Mátraháza, 2005. (előadás)
25. **G. Kardos**, L. Majoros: Genetic diversity of *Candida albicans* strains isolated from oral, urine and blood samples. 1<sup>st</sup> Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary, 2005. (előadás)
26. **G. Kardos**, M. Antal, I. Tóth, I. Kiss, B. Nagy: Genetically related clusters among hungarian *Escherichia coli* O157 EHEC and EPEC strains. 1<sup>st</sup> Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary, 2005. (előadás)
27. L. Majoros, **G. Kardos**, P. McNicholas: Determination of Minimal Inhibitory and Minimal Fungicidal Concentrations of Posaconazole against Four Human Pathogenic *Candida* Species. Abstr. M-1611. 45<sup>th</sup> Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington D.C., 2005 (poszter)
28. **Kardos G.**, Farkas T., Kiss I.: Ételfertőzést okozó baktériumok előfordulásának vizsgálata csirkeállományokban. MTA Állatorvosi Osztályának Gyűlése, Budapest, 2006. (előadás)
29. **G. Kardos**, M. Antal, I. Tóth, I. Kiss, B. Nagy: Discrimination between *E. coli* O157 isolates using PCR-mediated fingerprinting based on SER element. 16<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Nice, France, 2006. (poszter)

30. **Kardos G.**, Antal M., Bistyák A., Turcsányi I., Kiss I.: Baktériumok nyomon követése DNS-ujjlenyomat technikákkal: felmérő vizsgálatok és esettanulmányok. 14. Derzsy Napok, Eger, 2006. (előadás)
31. Tóth B., Falusi E., Miszti C., Borbély Á., **Kardos G.**, Majoros L. Sarjadzó gombák azonosításának összehasonlító vizsgálata Micronaut-Candida és API ID 32C panelek segítségével. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2006. (előadás)
32. Sóczó G., **Kardos G.**, Falusi E., Miszti C., McNicholas P., Majoros L. Posaconazol fungicid hatásának a vizsgálata az idő-ölés görbék segítségével különböző Candida fajok ellen. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2006. (előadás)
33. **G. Kardos**, T. Farkas T., Nógrády N., Kiss I. 2006 MMT (Keszthely, okt17-20): Development and optimization of a PCR assay specific to Salmonella enterica serovar Infantis. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2006. (előadás)
34. **G. Kardos**, L. Fodor, I. Kiss: A pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of Hungarian Histophilus somni isolates. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2006. (előadás)
35. **G. Kardos**, T. Farkas, A. Bistyák, I. Turcsányi, I. Kiss: Isolation of Arcobacter cryaerophilus and A. skirrowi from Hungarian broiler samples. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2006. (előadás)
36. T. Farkas, **G. Kardos**, A. Bistyák, I. Turcsányi, I. Kiss: Detection of potential food-borne pathogens from stool samples of broiler chickens. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2006. (előadás)
37. Ungvári A., **Kardos G.**, Nógrády N., Turcsányi I., Pászti J., Spinu M., Kiss I.: Csirke eredetű Salmonella enterica serovar Infantis törzsek molekuláris epidemiológiai vizsgálata. MTA Állatorvosi Osztályának Gyűlése, Budapest, 2006. (előadás)
38. **Kardos G.**, Kiss I.: Csatlakozás a Pulsenet-Europe nemzetközi molekuláris járványtani figyelőhálózathoz. MTA Állatorvosi Osztályának Gyűlése, Budapest, 2006. (előadás)
39. **Kardos G.**, Nagy J., Bistyák A., Kiss I.: Telepspecifikus vakcinával védett lúdállományokban ismétlődő áttörésező baromfikolera járványok molekuláris járványtani vizsgálata. MTA Állatorvosi Osztályának Gyűlése, Budapest, 2006. (előadás)
40. **Kardos G.**, Mészáros J., Galántai Zs., Turcsányi I., Bistyák A., Farkas T., Juhász Á., Damjanova I., Pászti J., Kiss I.: Termotoleráns Campylobacter és Arcobacter fajok előfordulásának vizsgálata csirke eredetű mintákban és csirke eredetű élelmiszerben. MTA Állatorvosi Osztályának Gyűlése, Budapest, 2006. (előadás)
41. **Kardos G.**, Sóczó G., McNicholas P., Falusi E., Hegedűs J., Majoros L.: Time-kill studies show that posaconazole is fungicidal against some Candida species The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Paris, France, 2006 (poszter)

42. Sóczó G., **Kardos G.**, Gesztelyi R., Majoros L. In vitro and in vivo studies with *C. tropicalis* isolates, exhibiting paradoxical growth in the presence high concentration of caspofungin 8th European Congress of Chemotherapy and Infection, Budapest, Hungary, 2006 (poszter)
43. **Kardos G.**, Sóczó G., Gesztelyi R., Majoros L. Killing activity of amphotericin B against *Candida krusei* cannot be predicted by standard susceptibility testing: An in vitro comparison of methods 8<sup>th</sup> European Congress of Chemotherapy and Infection, Budapest, Hungary, 2006. (poszter)
44. **Kardos G.**, Mészáros J., Galántai Zs., Turcsányi I., Bistyák A., Juhász Á., Damjanova I., Pászti J., Kiss I. Prevalence of thermotolerant *Campylobacters* in broilers, eggs, chicken abattoir and human samples in a Hungarian county. 17<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Muenchen, Germany, 2007. (poszter)

Kumulatív impakt (idézhető absztraktok nélkül): 30,407

Idegen hivatkozások száma: 16