

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**A bütykös hattyú, a házilúd, a pekingi és a mulard kacsá
madárinfluenzájának patomorfológiájával kapcsolatos
 hazai tapasztalatok és megfigyelések**

PhD értekezés

Dr. Pálmai Nimród

2010

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Dr. Glávits Róbert CSc.

tudományos főmunkatárs

MgSzHK-Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

Témavezető

Dr. Bálint Ádám PhD.

MgSzHK-Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

a témabizottság tagja

Dr. Palya Vilmos

Ceva-Phylaxia Zrt.

a témabizottság tagja

Dr. Tekes Lajos, CSc.

ny. igazgató

MgSzHK-Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

a témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez az sz. példány.

.....
Dr. Pálmai Nimród

TARTALOMJEGYZÉK

I.	Rövidítések jegyzéke	4
II.	Összefoglalás	5
III.	Summary.....	8
IV.	Bevezetés	11
V.	Irodalmi áttekintés.....	13
VI.	Vizsgálatok	20
	1. fejezet	
	A madárinfluenza patomorfológiája és diagnosztikája bütykös hattyúban.....	20
	1.1. Anyag és módszer	20
	1.1.1. Minták és mintavétel	20
	1.1.2. Kórbonctan, kórszövettan, immunhisztokémia	20
	1.1.3. Vírusizolálás és meghatározás	21
	1.1.4. Reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció.....	21
	1.2. Eredmények.....	23
	1.2.1. Kórbonctan, kórszövettan, immunhisztokémia	23
	1.2.2. Vírusizolálás, meghatározás, molekuláris biológia.....	33
	1.3. Megbeszélés	34
	2. fejezet	
	A madárinfluenza patomorfológiája és diagnosztikája házilúdban, pekingi és mulard kacsában	40
	2.1. Anyag és módszer	40
	2.1.1. Minták és mintavétel	40
	2.1.2. Kórbonctan, kórszövettan, immunhisztokémia	40
	2.1.3. Vírusizolálás és meghatározás	40
	2.1.4. Reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció.....	40
	2.2. Eredmények.....	41
	2.2.1. Kórbonctan, kórszövettan, immunhisztokémia.....	41
	2.2.2. Vírusizolálás, meghatározás, molekuláris biológia.....	49
	2.3. Megbeszélés.....	50
	3. fejezet	
	Az erősen patogén, H5N1 altípusú madárinfluenza vírus okozta kórkép összehasonlító vizsgálata patológiai, immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel, természetes körülmények között fertőződött bütykös hattyúkban, háziludakban, pekingi és mulard kacsákban.....	53
	3.1. Anyag és módszer	53
	3.1.1. Minták és mintavétel	53
	3.1.2. Kórszövettan, immunhisztokémia.....	53
	3.1.3. Vírusizolálás és meghatározás	54
	3.1.4. Kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (qRRT-PCR).....	54
	3.2. Eredmények.....	55
	3.2.1. Virologia, RT-PCR, RRT-PCR.....	55
	3.2.2. Kórszövettan, immunhisztokémia, kvantitatív RRT-PCR	55
	3.3. Megbeszélés	67
	4. fejezet	
	Új eredmények.....	74

VII:	Irodalom.....	75
VIII.	Tudományos publikációk	83
IX.	Melléklet.....	85
X.	Köszönetnyilvánítás	88

I. Rövidítések jegyzéke

AI: (avian influenza) madárinfluenza

AIV: (avian influenza virus) madárinfluenza vírus

E. coli: *Escherichia coli*

FAO: (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Az ENSZ Mezőgazdasági és Élelmezési Világszervezete

H: hemagglutinin

HAG: hemagglutináció gátlás

HE: hematoxin-eozin

HP: (highly pathogenic) magas patogenitású

HPAI(V): (highly pathogenic avian influenza [virus]) magas patogenitású madárinfluenza (vírus)

LP: (low pathogenic) alacsony patogenitású

LPAI(V): (low pathogenic avian influenza [virus]) alacsony patogenitású madárinfluenza (vírus)

N: neuraminidáz

Nyh: nyálkahártya

OIE: (World Organisation for Animal Health [korábban: Office International des Épizooties]) Nemzetközi Állatjárványügyi Hivatal

IF: immunfluoreszcencia

IH: immunhisztokémia

IHC: immunohistochemistry

Ig: log₁₀ (tízes alapú logaritmus)

P. multocida: *Pasteurella multocida*

PCR: (polymerase chain reaction) polimeráz láncreakció

qRRT-PCR: (quantitative real time reverse transcriptase polimerase chain reaction) kvantitatív, valós idejű reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció

RNS: (RNA) ribonukleinsav

RRT-PCR: (real time reverse transcriptase polimerase chain reaction) valós idejű reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció

SPF: (specific pathogen free) specifikált kórokozóktól mentes

WHO: (World Health Organisation) Egészségügyi Világszervezet

VLA: Veterinary Laboratories Agency

II. Összefoglalás

- I. 2006 februárjában a Duna dél-magyarországi szakasza mentén elhullott 35 bütykös hattyú (*Cygnus olor*) részletes kórbonctani, kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük el. Valamennyi egyedben virológiai és molekuláris biológiai vizsgálattal igazoltuk a H5N1 altípusú, magas patogenitású madárinfluenza vírus fertőzést. A megtalálás helyén a kisszámú, még élő állat jellegzetes idegrendszeri tüneteket (körben úszást, fej-, nyaktekergetést) mutatott.

A leggyakrabban talált kórbonctani elváltozások a szív epicardiuma alatt, a mirigyegyomor nyálkahártyájában, a hasnyálmirigyben és a vázizomzatban megtalálható vérzések, a hasnyálmirigyben, a májban látott gócos elhalások, a szívizom-elfajulás; valamint a lép és a tüdő heveny pangásos bővérűsége volt. Néhány esetben sero-mucinosus váladék halmozódott fel a testüregekben.

Kórszövettani vizsgálattal gliasejt-sarjadzással és esetenként perivascularis vérzéssel járó lymphocytas agyvelő- és agyhártyagyulladás, lympho-histiocytas beszűrődéssel kísért gócos szívizom-elfajulás és -elhalás, körülírt elhalásokkal járó hasnyálmirigy-gyulladás, tüdőbővérűség, interstitialis tüdő-oedema és a légcső nyálkahártyájának oedemas beivódása, valamint a fiatalabb madarakban a Fabricius-tömlő lymphocytakiürüléssel és apoptosissal járó sorvadása mutatkozott.

A talált elváltozások és a vizsgált állatok jó-közepes kondíciója megfelelt a szakirodalomban, más madárfajokban korábban már leírt, gyors lefolyású HPAIV fertőzések esetén tapasztaltakkal. A jó-közepes tápláltsági állapotú állatok elhullása a HPAIV okozta elváltozásokra volt visszavezethető. A gyengébb virulenciájú törzsekkel való fertőzöttségre jellemző, gyakran észlelt légúti (beleértve az infraorbitalis sinusokat és a légzsákokat is) vagy nemi szervi elváltozásokat és lesoványodást, továbbá a tyúkfélék HPAI vírushordozásakor gyakran megfigyelhető bőrelváltozásokat (cyanosist, vérzést, oedemat, elhalást) nem észleltünk.

Immunhisztokémiai vizsgálattal a légcső kivételével minden vizsgált szervben sikerült kimutatni a vírusantigént. Legnagyobb mennyiségben az agyvelő tartalmazott virális nukleoproteint.

A vírust embrionált SPF tyúktojásokban izoláltuk, azonosításukat pedig H5 és H7 szubtípusra specifikus poliklonális savók igénybevételeivel, haemagglutináció-gátlási (HAG) próbával végeztük. A H5 és N1 gének kimutatását illetve szekvenálását az EU madárinfluenza referencia-laboratóriuma (Avian Virology Laboratory, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, UK) által kiadott protokoll alapján végeztük hagyományos és real time PCR alkalmazásával.

Diagnosztikai megfigyeléseink adatokat szolgáltatottak a hattyú H5N1 HPAI járványtanában betöltött szerepének értelmezéséhez.

- II. A madárinfluenza erősen virulens, H5N1 altípusú vírustörzse okozta megbetegedéseket 2006 június-júliusában illetve 2007 januárjában a Duna-Tisza közének déli részén, víziszárnyas állományokkal sűrűn betelepített régióban, 15 lúd- és 15 kacsá- (11 pekingi és 4 mulard) állományban állapítottunk meg. Kis- és nagylétszámú állományok egyaránt érintettek voltak, és egy kislétszámú állományban házityúk és gyöngytyúk is megbetegedtek. A lúdállományok zöme 1000 és 5000, a kacsáállományok 3000 és 30000 egyed közöttiek voltak, de kislétszámú (30-100 egyedet tartó) állományok is érintettek voltak.

Az érintett állományokban a naponkénti elhullások száma meredeken emelkedett. A betegség állományszintű lefolyásának megfigyelésére a hatósági intézkedés (kiirtás) miatt nem volt lehetőség. A megbetegedett állatokon bágyadtságot, étvágytalanságot, savós rhinitist, könnyezést és idegrendszeri tüneteket (rendellenes fejtartást, fejremegést, fejjoldaltartást, valamint láb- és/vagy szárnybénulást) lehetett megfigyelni. Az állatokat esetenként előzetes tünetek észlelése nélkül, elhullva találták. Bőrelváltozások (cyanosis, oedema, vérzés, elhalás) nem mutatkoztak.

A vizsgálat alá vont 55 házilúd és 65 pekingi illetve mulard kacsá kórbonctani és kórszövettani vizsgálata során az erősen virulens madárinfluenza vírustörzsek hatására jellemző, heveny-félheveny elváltozásokat figyeltünk meg. A különböző szövetekben, szervekben, főként a savóshártyákon vérzéseket találtunk, a hasnyálmirigyben, a szívizomzatban, a májban gócos elhalásokat észleltünk, továbbá csaknem minden esetben lymphocytas agyvelőgyulladást találtunk szövettanilag. Az elváltozások mind a kacsá-, mind a lúdállományok esetében hasonló jelleggel és gyakorisággal, azonban a kacsákban enyhébb formában voltak megfigyelhetők. Immunhisztokémiai vizsgálattal a vírusantigént főként az elhullott ludak, kacsák agyvelejében és pekingi kacsák kivételével, különböző szerveiben mutattuk ki.

A vírust embrionált SPF tyúktojásokban izoláltuk, azonosításukat pedig H5 és H7 szubtypusra specifikus poliklonális savók igénybevételével, hemagglutináció-gátlási (HAG) próbával végeztük. A H5 és N1 gének kimutatását illetve szekvenálását az EU madárinfluenza referencia-laboratóriuma (Avian Virology Laboratory, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, UK) által kiadott protokoll alapján végeztük hagyományos és real time PCR alkalmazásával.

Diagnosztikai megfigyeléseink adatokat szolgáltatottak a házi víziszárnyas állományokban lezajlott H5N1 HPAI fertőzés járványtanának értelmezéséhez, valamint a vadon élő víziszárnyasokban lezajlott elhullásokkal való járványtani kapcsolat elemzéséhez.

III. Tekintettel arra, hogy a H5N1 altípusú madárinfluenza vírus hazánkban elsősorban víziszárnyas fajok megbetegedését és elhullását idézte elő, amelyek a korábbi szakirodalmi adatok szerint a madárinfluenza vírusfertőzésre kevésbé fogékonyként vagy rezisztensként voltak ismertek, a vírus szervtropizmusát négy különböző faj egyedeiben vizsgáltuk részletesen. Természetes körülmények között elhullott, virológiai és PCR vizsgálattal H5N1 HPAIV pozitív, 10 bütykös hattyú, 6 házilúd, 6 mulard és 5 pekingi kacsza szerveiben vizsgáltuk a vírus okozta kórszövettani elváltozásokat, a vírus mennyiségét immunhisztokémiai, illetve a három háziszárnyas faj esetében ezzel párhuzamosan kvantitatív RRT-PCR módszerrel. Vizsgáltuk az agyvelő agykérgi, agytörzsi, kisagyvelői területeinek, továbbá a szívizomzat, a hasnyálmirigy, a vese, a lép, a máj, a tüdő, a légcső valamint alkalmanként a vázizom, a vékonybél, a Fabricius-féle tömlő és a bőr vírusrészletét.

Immunhisztokémiai vizsgálattal valamennyi faj összes vizsgált egyedében sikerült a vírusantigént kimutatni. A vizsgált hattyúszerv minták 70%-a, a libaszervek 59%-a, a mulard kacsza szervek 61%-a, a pekingi kacsza szervek 12%-a volt pozitív. A pekingi kacsza esetében csupán az agykamrák falában sikerült kimutatni a vírusantigént, a többi szervminta negatív maradt.

Kvantitatív RRT-PCR módszerrel csak a háziszárnyas fajok kerültek vizsgálatra. Mindegyik faj valamennyi vizsgált egyedében igazolható volt a H5N1 vírus RNS jelenléte. A ludak vizsgált szerveinek 100%-a, a mulard kacsák szerveinek 25%-a, a pekingi kacsák szerveinek 43%-a volt e módszerrel pozitív. Összevetve a két módszer érzékenységét, 4,31 lg kópia/reakció feletti RNS mennyiség esetén az immunhisztokémiai módszer is következetesen pozitív eredményt adott, míg ennél alacsonyabb vírusrészlet esetén IH módszerrel pozitív és negatív eredmények egyaránt előfordultak. Mindkét módszer következetesen az agyvelőben mutatta ki a legnagyobb vírusrészletet, igazolva ezzel a H5N1 vírus neurotrop tulajdonságát.

A vizsgálatok eredményei adatokat szolgáltatottak a természetes úton H5N1 HPAI vírussal fertőződött bütykös hattyú, házilúd, pekingi és mulard kacsza esetében a madárinfluenza vírus okozta szöveti elváltozások és a vírus szervtropizmusának, valamint az alkalmazott módszerek érzékenységének összehasonlító tanulmányozásához.

III. Summary

- I. The results of pathological, immunohistochemical, virological and polymerase chain reaction examinations carried out on 35 mute swans (*Cygnus olor*), that succumbed to a H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAI) infection during the 2006 outbreak in Southern Hungary are here reported. In all affected birds the presence of H5N1 HPAIV was confirmed by classical virological and molecular-biological methods. In the area where birds were originally found some individuals still alive have shown such signs of neurological disorders as circle swimming, tremor, incoordination, torticollis.

In the swans examined the most frequently observed macroscopic lesions included haemorrhages under the epicardium, in the proventricular and duodenal mucosa, pancreas and sometimes skeletal muscles; focal necrosis in the pancreas and liver was seen together with myocardial degeneration and congestion of spleen and lung. Accumulation of sero-mucinous exudate in the body cavities was also observed.

Histopathological lesions comprised lymphocytic meningo-encephalomyelitis accompanied by gliosis and occasional perivascular haemorrhages; multi-focal myocardial degeneration with lympho-histiocytic infiltration; pancreatitis with focal necrosis; congestion and oedema of lung; oedema of tracheal mucosa and in case of young birds the atrophy of the bursa of Fabricius as a result of lymphocyte depletion and apoptosis was observed, too.

The observed lesions and the moderate to good body conditions were compatible with findings in acute HPAI infections of other bird species reported in the literature. Skin lesions and lesions typical for infections caused by strains of low pathogenicity (LPAI) such as emaciation or fibrinous changes in the reproductive and respiratory organs, sinuses and airsacs were not observed.

The virus was isolated in embryonated SPF fowl eggs and typing was carried out by haemagglutination inhibition test using H5 and H7 subtype-specific polyclonal sera. H5 and N1 genes were identified by conventional and real time PCR following the recommendations of EU avian influenza reference laboratory (Veterinary Laboratories Agency, VLA, Weybridge, UK).

Our observations contribute to understand the role of mute swan in the epidemiology of H5N1 HPAI.

- II. In June-July 2006 and January 2007 diseases caused by highly pathogenic avian influenza strain (H5N1 subtype) were confirmed in 15 domestic goose and 15 domestic duck (11 Pekin duck and 4 mulard duck) flocks in a region of dense population of waterfowl in the Southern part of the Danube-Tisza interfluvium region. The number of animals in the goose flocks varied between 1000 and 5000 and that of duck flocks between 3000 and 30 000.

Small (30-100 animals) flocks were also involved and among them one, where hens and guinea fowls were diseased, as well. Daily number of death increased dramatically in the infected goose and duck flocks. Due to the official measure (extermination) enacted any observation of the flock level course of the disease was not possible. Infected animals showed lethargy, anorexia, serous nasal discharge, lacrimation and neurological signs (deviation of the head, head-tremor, lateral deviation of the head, leg and wing paralysis). In some cases animals were found dead without any previous clinical signs. In the 55 geese and 65 ducks examined there were no skin lesions (cyanosis, oedema, haemorrhage, necrosis) observed. During post mortem and histological examinations – both in case of duck and goose similarly and of the same frequency but in ducks in milder form – acute-subacute changes typical to highly pathogenic avian influenza strains were observed. These were: haemorrhages in different tissues, organs, mainly on serous membranes, necrotic foci in the pancreas, myocardium, liver and almost in all cases lymphocytic encephalitis. Immunohistochemical examination revealed viral antigen in the brain and with the exception of Pekin ducks in other visceral organs of geese and ducks.

The virus was isolated in embryonated SPF hen eggs and typing was carried out by haemagglutination inhibition test using H5 and H7 subtype-specific polyclonal sera. H5 and N1 genes were identified by conventional and real time PCR following the recommendations of EU avian influenza reference laboratory (Veterinary Laboratories Agency, VLA, Weybridge, UK).

Our diagnostical observations help to interpret the epidemiology of H5N1 HPAI in domestic waterfowl and its epidemic connection with wild waterfowl.

- III. The epidemic of H5N1 subtype highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) in Hungary caused the largest losses in wild aquatic birds (mute swan) and domestic ducks and geese which were supposed to be the most resistant to this pathogen according to the literature at the time. The presence of pathological lesions and the amount of viral antigen were quantified by histopathology and immunohistochemistry (IHC) in the organs of four waterfowl species (mute swans, domestic geese, mulard ducks and Pekin ducks) collected during the epidemic. H5N1 subtype HPAIV was isolated from all animals. Quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRRT-PCR) was also applied on a subset of samples. Viral antigen was detected by IHC in all individuals of all species examined. However the overall presence of viral antigen in tissue samples was quite variable. It was 70% in swan, 59% in goose, 61% in mulard duck and 12% in Pekin duck tissue samples. No AIV antigen was found in Pekin duck tissue samples other than the brain. Quantitative RRT-PCR examination was carried out only on domestic waterfowl. H5N1 subtype HPAIV was detected by qRRT-PCR in all birds examined; in 100% of goose,

in 25% of mulard duck and in 43% of Pekin duck tissue samples. The IHC was much less sensitive compared to virus isolation and qRRT-PCR. Above 4,31 Ig copies/reaction the IHC was consistently positive, but it gave very variable results below that level. The neurotropism of the isolated virus strains was demonstrated by finding the largest amount of viral antigen and highest average RNA load and the most severe histological lesions in the brain in all four waterfowl species examined.

Our results help to understand the tissue lesions and tissue tropism of H5N1 HPAIV in mute swan, domestic goose, mulard and Pekin duck naturally infected, using and comparing different diagnostic tools.

IV. Bevezetés

A madárinfluenza erősen patogén H5N1 altípusú vírustörzse okozta járvány első hulláma 2006 elején elérte hazánkat, és az év első negyedében vadmadár elhullásokat idézett elő az ország középső részének déli területein (Pálmai és mtsai., 2006, 2007). A kórokozó az Országos Állategészségügyi Intézetben (jelenlegi neve Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Központ, Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság) akkor mintegy 3000, különböző fajú, elhullott vadmadárhulla (köztük 165 hattyú) vizsgálata során összesen 67 bütykös hattyúban (*Cygnus olor*), 2 dankasirályban (*Larus ridibundus*), 1 szárcsában (*Fulica atra*), 1 tőkés récében (*Anas platyrhynchos*) és 1 kormoránban (*Phalacrocorax carbo*) került kimutatásra. A járvány második és harmadik hulláma 2006 második negyedében illetve 2007 januárjában a Duna-Tisza közén, víziszárnyasokkal sűrűn betelepített területen tömeges házikacsa- és házilúd-elhullásokat okozott, és 15 kacsa-, valamint 15 lúdállomány került a fertőzés miatt kiirtásra (Ivanics és mtsai., 2007 a,b).

Hazánkban madárinfluenza vírus okozta megbetegedések először az 1960-70-es években kerültek megállapításra. Tanyi (1997) gyöngytyúkokból a világon először, tőkés récéből, pézsmakacsából, pulykából Közép-Európában, házikacsából Magyarországon elsőként mutatott ki influenzavírusokat.

2002 előtt a különböző patogenitású madárinfluenza vírustörzsek világszerte elsősorban a tyúkfélékben, pulykákban okoztak tömeges megbetegedést és elhullást, míg háziiasított és vadonélő víziszárnyas-fajokban csupán enyhefokú megbetegedés vagy tünetmentes vírushordozás volt a jellemző.

A H5N1 altípusú vírustörzs 2002-ben Nyugat-Kínában a Qinghai-tó környékén heveny megbetegedés után elpusztította az ott élő mintegy 6000 egyedet számláló vadmadár populációt, köztük a vízimadarakat. Utóbbi fajokban okozott elhullások alapján a kórokozó vízimadár-patogén tulajdonságúnak tekinthető. E vírustörzs jutott el 2005-ben – ázsiai és közel-keleti országokon keresztül – Európába, így hazánkba, ahol heveny hattyú-, lúd- és kacsaelhullásokat okozott. Emberi megbetegedésről hazánkban nincs tudomásunk (Ellis és mtsai., 2004, Swayne és Halvorson, 2003, 2008, Oyana és mtsai., 2006, Sabirovic és mtsai., 2006, Terregino és mtsai., 2006, Webster és mtsai., 2006, Pálmai és mtsai., 2007, Tiefke és mtsai., 2007).

Vizsgálataim célja az volt, hogy tanulmányozzam az erősen patogén, H5N1 altípusú madárinfluenza vírus okozta hazai járvány során a bütykös hattyúban, a házilúdban és a házikacsában kialakuló klinikai tüneteket, patomorfológiai (kórbonctani és kórszövettani) elváltozásokat és a vírusantigén, valamint a virális RNS kimutathatóságát, szervi illetve sejtszintű lokalizációját, mennyiségi viszonyait, ezáltal a vírus szervtropizmusát. Össze kívántam hasonlítani a vírus viselkedését két lúdféle és két réceféle fajban.

Megfigyeléseink, valamint a 2006. évi járvánnyal kapcsolatos külföldi vizsgálatok (Sabirovic és mtsai., 2006, Terregino és mtsai., 2006, Tiefke és mtsai., 2007) árnyalják azt a korábbi nézetet, amely szerint a víziszárnyas fajok – és a vízimadarak – kevésbé fogékonyak a madárinfluenza fertőzés iránt és rájuk csak a tünetmentes fertőzöttség, a vírushordozás a jellemző, ami lehetővé teszi a vírus nagy távolságokra történő eljuttatását, és ez a leggyakoribb forrása a házasított állományok elsődleges fertőződésének.

V. Irodalmi áttekintés

Influenzának ma az Orthomyxoviridae családba tartozó vírusok okozta, többnyire felsőlégúti fertőzéseket és megbetegedéseket tartjuk, amelyek emberben, lóban, házi sertésben, számos madárfajban, nyércben és különféle tengeri emlősökben fordulnak elő. Baromfifajokban az influenzavírusok okozta fertőzések a tünetmentes fertőzöttségtől a légúti megbetegedéseken és a tojástermelés csökkenésén át egészen a perakut lefolyású, akár 100 %-os mortalitással is járó szisztémás megbetegedésig különböző formákban nyilvánulhatnak meg (Easterday és mtsai., 1997). Az utóbbi kórformát az erősen virulens madárinfluenzavírusok okozzák, amelyeket eddig csak a H5 és H7 altípusok között találtak. A H5 altípusok nem mindegyike erősen virulens azonban madarakra.

A madárinfluenzavírusokat az *Orthomyxoviridae* család *Influenzavirus A* genusába soroljuk. A vírus 80-120 nm-es, gömb, pleomorf, esetenként filamentózus, szimpla szálú RNS vírus (Perdue és mtsai., 1999, Shortridge és mtsai., 1998, Suarez és mtsai., 1998, Swayne, 1997, Swayne és Halvorson, 2003, 2008).

A természetben az influenzavírusok tünetmentes hordozói, genetikai rezervoárjai a *Lúdalkatúak-Anseriformes* (főként a récefélék, lúdfélék és hattyúfélék családja) és a *Lilealkatúak-Charadriiformes* (főként a sirályfélék, csérfélék, liléfélék családja) rendhez tartozó madarak (Stallknecht, 1998, Webster és mtsai., 1992). Szárazföldi vadmadaraktól nagyon ritkán izolálják a vírust (Swayne és Halvorson, 2003, 2008).

1981-ben a „First International Symposium on Avian Influenza” vezette be a magas patogenitású madárinfluenza vírusokra a „highly pathogenic avian influenza” (HPAI) hivatalos terminológiát. A 2002-es „Fifth International Symposium on Avian Influenza” az alacsony patogenitású madárinfluenza vírusok hivatalos megjelölésére bevezette a „low pathogenic avian influenza” (LPAI) megnevezést. Ez a csoport az összes madárinfluenzát magában foglalja, melyek nem elégitik ki a HPAI-ra vonatkozó kritériumokat (Swayne és Halvorson, 2003, 2008).

A Nemzetközi Állat-járványügyi Hivatal (Office International des Epizooties) a bejelentési kötelezettség alá tartozó madárinfluenza (notifiable AI) megnevezést alkalmazza, mely csoport a HPAI vírusokat (HP notifiable AI [HPNAI]) és a LPAI vírusok közül a H5 és H7 szubtypusokat (LP notifiable AI [LPNAI]) foglalja magában (Alexander, 2000, Office International des Epizooties, 2004). Az OIE International Animal Health Code szerint a HPNAIV kritériuma az 1,2-nél nagyobb intravénás patogenitási index (IVPI) 6 hetes csirkékben, illetve legalább 75%-os mortalitás 4-8 hetes csirkékben intravénás fertőzés esetén. Azon H5 és H7 vírusokat, melyek ezeknek a kritériumoknak nem felelnek meg, szekvenálni kell annak kiderítésére, hogy rendelkeznek-e többszörösen bázikus aminosavakkal a hemagglutinin vágási helyén. Ha a vágáshely hasonló más HPNAI

izolátumokéihoz, az adott izolátumot is HPNAI-nak kell tekinteni. LPNAI vírusok azok a H5, H7 vírusok, melyek nem sorolhatók a HPNAI csoportba (Swayne és Halvorson, 2003, 2008). Annak ellenére, hogy a madárinfluenza vírusoknak laboratóriumi módszerekkel csak két patotípusát (LP és HP) lehet elkülöníteni, természetes fertőzés során a betegség klinikai lefolyása széles határok között változhat a vírustörzs, a gazda faja illetve kora és a környezeti faktorok függvényében. A mortalitás mértéke, a klinikai tünetek és a kártétel alapján erősen, mérsékelten és enyhén virulens, valamint avirulens klinikai csoportba sorolhatók a madárinfluenza vírusok (Swayne és Halvorson, 2003, 2008). Az *erősen virulens* törzsek nagy, közel 100%-os, elhullással járó súlyos, szisztémás megbetegedést idéznek elő, mely a legtöbb szervet érinti, beleértve az idegrendszert és a cardio-vasculáris rendszert. Ebbe a klinikai csoportba a H5 és H7 HPAI vírusok tartoznak, melyek főként tyúkfélékben okoznak betegséget (Swayne és Suarez, 2000). A *mérsékelten virulens* klinikai csoportba olyan LPAIV törzsek tartoznak, melyek jellemzően légzőszervi, reprodukív szervi, vese és hasnyálmirigy elváltozásokat okoznak. 5-97%-os mortalitást idéznek elő (nagyobb arányú elhullást jellemzően a fiatal madarakban okozva) és a klinikai tünetek súlyosbodásában a másodlagos fertőzéseknek is nagy szerepe van (Capua és Marangon, 2000, Capua és mtsai., 2000, Newman és mtsai., 1981). Az *enyhén virulens* csoportba tartozó LPAI vírusokra enyhe légzőszervi tünetek és a tojástermelés csökkenése jellemző. Az elhullás általában 5% alatt marad és inkább az idősebb madarakat érinti. Az *avirulens* csoportba olyan LPAI vírusok tartoznak, melyek jellemzően az *Anseriformes* és *Charadriiformes* rendbe tartozó vadon élő madarakban okoznak klinikai tünetek nélküli, inapparens fertőzést. Olykor házi baromfiállományok szerológiai áthangelődését is okozhatják egyes gyengén gazda-specifikus LPAIV törzsek, melyek vadmadarakkal történő érintkezés során jutnak a baromfiállományokba (Johnson és Maxfield, 1976, Hooper és Selleck, 1998, Ziegler és mtsai., 1999, Swayne és Halvorson, 2003, 2008). Járvány esetén tapasztalhatjuk a négy klinikai csoport keveredését is, kevert fertőzés, illetve egy H7 vagy H5 LP → HP patotípusváltozás során (Swayne és Halvorson, 2008).

Az influenzavírusok a fertőzött állatok orrváladékával, kötőhártya váladékával és bélsarával ürülnek a környezetbe. Fogékony egyedek direkt érintkezéssel vagy indirekt módon cseppfertőzéssel, fertőzött bélsárral illetve az azzal kontaminált ragályfogó tárgyak útján fertőződhetnek (Swayne és Halvorson, 2008).

Az influenzavírusok fajspecifikusak, azonban előfordul fajok közti terjedés is, elsősorban azonos taxonómiai családon belül (pl.: tyúk - pulyka), de néha előfordul két különböző rendhez tartozó faj közt is (pl.: kacsza [*Anseriformes* rend] - pulyka [*Galliformes* rend]). Ennél még ritkább, hogy különböző osztályok közt (madár – emlős) terjed a vírus (Swayne, 2000). Madárinfluenza vírusok emberben vagy sporadikus, egyedi komplett AI virionnal való fertőzéseket okoznak, vagy humán influenza pandemiákból izolált törzsekben mutatnak ki

madárinfluenza génszegmenteket. Előbbi esetek jóval gyakrabban fordultak elő a H5N1 HPAI vírusok esetében, összehasonlítva egyéb HPAI vírusokkal, és előfordulnak fatális kimenetellel végződő megbetegedések is. Olyan humán esetekben, ahol emberi influenza és madárinfluenza vírus egyszerre van jelen, mód nyílik a vírusok génszakaszai közötti reasszortációra (Swayne és Halvorson, 2003, 2008).

Az *alacsony patogenitású* madárinfluenza vírusok (LPAIV) okozta kórbonctani elváltozások a légzőszerveket érintik, leggyakrabban savós-fibrines gyulladást okozva. A légcső nyálkahártyája vizenyős, bővérű, alkalmanként vérzéseket lehet benne megfigyelni. Előfordulhat fibrines légzsákgyulladás. Az infraorbitális sinusok duzzadtak lehetnek és savós, savós-hurutos orrfolyás jelentkezhet. Hurutos-fibrines bronchopneumonia is kialakulhat, elsősorban másodlagos baktériumos (*Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*) társfertőzések következtében. Leírtak még fibrines hashártyagyulladást, vak- és vékonybélgyulladást, tojócsőgyulladást és deformált, alacsony kalciumtartalmú tojások képződését. Szövettanilag heterophilsejtes-lymphocytas tracheitis, bronchitis, peribronchitis, acinaris necrosissal járó pancreatitis (elsősorban pulykában), a lymphoid szervekben lymphocytas kiürülés, apoptosissal, a vesében nephrosissal és nephritis láthatók. A vírusantigén gyakran mutatható ki az elhalt légzőszervi nyálkahártyákban, a vesetubulus hámszámban és a pancreas mirigyvégek kamráinak hámszámban (Swayne és Halvorson, 2003, 2008).

Az *erősen patogén* madárinfluenza vírusok (HPAIV) multiplex elhalásokat és/vagy gyulladást okoznak. A legkövetkezetesebben ezek az elváltozások az agyat, a szívet, a tüdőt, a hasnyálmirigyet, a primer és szekunder nyirokszerveket érintik. Gyakori a gócos gliosis kísért lympho-histiocytas meningo-encephalitis, idegsejt-elhalással, neuronocytophagiával, de oedema és vérzések is előfordulhatnak. Gócos szívizom-elfajulás és gócos-diffúz coagulatio necrosis szintén gyakran kerül megfigyelésre, melyet sokszor kísért lympho-histiocytas gyulladás. Ezek az elváltozások a neuronokban és a myocytákban megtalálható vírusproteinek jelenlétével hozhatók összefüggésbe. Egyéb gyakori elváltozások még a vázizomrostokban, a vérér endothel sejtekben, a mellékvesekéreg sejtjeiben, a hasnyálmirigy exokrin sejtjeiben és a vesetubulusokban megfigyelhető elhalások. 3-5 nap túlélés után az elhalások száma csökken és a lympho-histiocytas gyulladás kerül előtérbe. A lymphoid szervek atrophia jellemzi. Légzőszervi elváltozások előfordulhatnak, de nem jellemzőek. A tollal nem borított bőrben számos esetben elhalások jelentkezhetnek, melyek microthrombusokkal, vasculitisszel, endothelkárosodással illetve -elhalással, perivascularis oedemával hozhatók összefüggésbe (Swayne és Halvorson, 2003, 2008).

A vírus izolálásáról és meghatározásáról szóló módszereket, valamint a szerológiai diagnosztikát részletesen leírták a szakirodalomban (Easterday és mtsai., 1997, Swayne és Halvorson, 2003, 2008). A vírusantigén kimutatására szolgáló módszerek közül immunhisztokémiai (immunperoxidáz festés, IH; Slemons és Swayne, 1990, Van Campen és

mtsai., 1989b), antigén kereső ELISA (Kodihalli és mtsai., 1993) és immunfluoreszcenciás (IF; Skeeles és mtsai., 1984) módszerek sikeres alkalmazásáról számoltak be. Van Campen és mtsai. (1989a) *in situ* hibridizációs technikát dolgoztak ki.

Vadon élő madárfajok HPAIV fertőzés okozta kórtani elváltozásairól csak kisszámú adat található a szakirodalomban. Struccban heveny bélgyulladást, valamint a májban és a lépben elhalásokat figyeltek meg. Mérsékelt virulenciájú vírustörzsek hatására emuban, nanduban és struccban sinusitis, légcső- és légzsákgyulladás, interstitialis tüdőgyulladás, esetenként fibrines szívburok- vagy hashártyagyulladás észlelését említik (Swayne és Halvorson, 2003, 2008).

Vadmadarakban a legtöbb alacsony patogenitású madárinfluenza vírus okozta fertőzés szubklinikai marad és az egyed hordozóvá válik (Swayne és Halvorson, 2003, 2008). Vadmadarakban az 1961-es – küszvágó csérben történő – megállapítástól eltekintve nem írtak le HPAIV fertőzést (Becker, 1966), a közelmúlt európai járványai azonban azt mutatták, hogy a magas patogenitású madárinfluenza törzsek – mint a H5N1 ázsiai vonala – letális fertőzéseket is okozhatnak egyes vadon élő madárfajokban. A napjainkban járványt okozó H5N1 törzsek 1996-ban bukkantak föl a kínai Guandong tartományban, kezdetben csak háziszárnyasokban. Először Hongkong irányába terjedtek 1997-ben, aztán Kelet-Ázsia felé és fokozatosan nyugatra Mongólia, Kazahsztán, Oroszország felé, majd 2005 nyarán-őszén elérték Európát (Romániát, Törökországot, Görögországot és Horvátországot), majd az Európai Unió számos tagállamát, köztük hazánkat is. A 2002. évi hongkongi, majd a kínai Qinghai tavon 2005-ben lezajlott járvány során számos vadmadárfaj, utóbbi esetben jelentős számú vándormadár (indiai lúd) is elpusztult. Európában a járvány zömmel az *Anseriformes* rend néhány tagjára szorítkozott (bütykös és énekes hattyú, kontyos réce, kanadai lúd) (Ellis és mtsai., 2004, Swayne és Halvorson, 2003, 2008, Oyana és mtsai., 2006, Sabirovic és mtsai., 2006, Terregino és mtsai., 2006, Webster és mtsai., 2006, Pálmai és mtsai., 2007, Tiefke és mtsai., 2007, Brown és mtsai., 2008).

A hattyú influenzavírus iránti fogékonyságáról és lehetséges járványtani szerepéről történtek ugyan feljegyzések Japánban 1982-ben (Otsuki és mtsai., 1982), de hattyút érintő H5N1 fertőzés kórlefolyásáról, patogeneziséről és a kórbonctani elváltozásokról a 2006. évben egyes európai országokban (Nagy-Britanniában, Olaszországban, Németországban) történt megállapításokat és ezt követő kísérletes fertőzéseket (Sabirovic és mtsai., 2006, Terregino és mtsai., 2006, Tiefke és mtsai., 2007, Brown és mtsai., 2008, Kalthoff és mtsai., 2008) megelőzően részletes leírást nem találtunk.

A 2006. évben járványt előidéző, H5N1 altípusú madárinfluenza vírustörzs Németország észak-nyugati részén, Rügen szigetén hattyúelhullásokat okozott. Az elhullott bütykös és énekes hattyúk kórbonctani és kórszövettani vizsgálatával az erősen patogén

madárinfluenza vírustörzsek hatására jellemző elváltozásokat (a hasnyálmirigyben gócos elhalásokat és vérzéseket, tüdőbővülést és -ödémát, valamint a szív epicardiuma alatt vérzéseket; szövettani vizsgálattal a hasnyálmirigy exocrin mirigyének körülírt területeken mutatkozó elhalását és idegsejt elfajulással kísért lymphocytas agyvelőgyulladást) figyeltek meg. Ezeken kívül a lépben és a Peyer-plakkokban enyhefokú lymphocytas elhalás volt még felismerhető. Immunhisztokémiai vizsgálattal az influenzavírus nukleoprotein – összhangban a szöveti elváltozásokkal – főként a hasnyálmirigyben és az agyvelőben, kisebb mértékben a mellékvesékben, a tüdőben és a májban volt kimutatható (Tiefke és mtsai., 2007).

A világ különböző részein 1955 óta 26 olyan, nagy veszteségekkel járó madárinfluenza járványkitörést regisztráltak, amelyeket erősen virulens (H5 vagy H7 altípusú) vírustörzsek idéztek elő (Swayne és Halvorson, 2003, 2008). Az említett járványokat okozó vírustörzseket zömében csirkékből (14 esetben), valamint pulykákból (8 esetben) izolálták. Az erősen virulens törzsek okozta járványok során, esetenként kisebb arányban, házi víziszárnyasok (főként kacsák) elhullását is észlelték (Alexander, 1993, McNulty és mtsai., 1985, Tanyi, 1997, Turner, 1976).

Az 1999-2000. évi olaszországi, H7N1 altípusú vírustörzs okozta madárinfluenza járvány során, Padova környékén elhullott libákat és barbari kacsákat vizsgáltak kórbonctani-kórszövettani módszerekkel és olyan elváltozásokat találtak, melyek az erősen patogén madárinfluenza-vírusok hatását igazolták. Immunhisztokémiai vizsgálattal az influenzavírus nukleoprotein a ludakban a hasnyálmirigy parenchyma-elhalásainak széli területein a mirigyhámsejtekben, valamint az agyvelő kiterjedt területein az idegsejtek és gliasejtek cytoplasmájában volt kimutatható. A barbari kacsákban mindössze az agyvelő kisebb körülírt területein, néhány idegsejtre szorítkozóan sikerült az antigént kimutatni (Capua és Marangon, 2000).

A H5N1 altípusú vírustörzs víziszárnyas fajokra kifejtett patogenitásának lényeges emelkedéséről a 2002-es hongkongi járványkitörés kapcsán számoltak be (Ellis és mtsai., 2004). Ezt követően a járvány fokozatos terjedése során az ázsiai, majd a közel-keleti országokban hasonló megfigyelések történtek. A magas patogenitású H5N1 madárinfluenza vírusok okozta mortalitás házikacsában és házilúdban azonban erősen függött a vírustörzstől és az állat korától. Ezen vírusok 1997 és 2001 közötti izolátumaival intranazális fertőzéssel nem lehetett előidézni a betegséget illetve az elhullást kacsákban, azonban a 2002 után izolált törzsek már megbetegítették a fertőzött, 4-6 hetes tőkésrécéket és változó mértékű mortalitással is jártak. Ezek a törzsek jellemzően a légcsővön keresztül ürültek, míg a korábbi H5N1 és a LPAIV törzsek döntően a kloákán át (Sturm-Ramirez és mtsai., 2004). Ez utóbbi jelenséget számos szerző megfigyelte kísérletes hattyú-, lúd- és kacsafertőzések

során (Hulse-Post és mtsai., 2005, Sturm-Ramirez és mtsai., 2005, Brown és mtsai., 2008, Kalthoff és mtsai., 2008, Keawcharoen és mtsai., 2008, Löndt és mtsai., 2008). Bizonyos 2002-es hongkongi törzsek intranazálisan fertőzve elhullásokat okoztak 2 hetes kacsákban, de az 5-6 hetes korosztályban már csak kisebb mortalitást figyeltek meg, vagy egyáltalán nem volt elhullás. Ez, az állatok korával összefüggést mutató érzékenységbeli különbség megmagyarázza, miért volt a házikacsák és ludak mortalitása alacsony az „utcai” vírushatás során (Pantin-Jackwood és Swayne, 2007, Pantin-Jackwood és mtsai., 2007). Löndt és munkatársai (2010) 8 és 12 hetes pekingi kacsák közötti hasonló érzékenységbeli különbségről számoltak be.

A 2004. évi thaiföldi járvány során izolált H5N1 vírustörzs nukleoprotein antigénjének jelenlétét immunfluoreszcenciás módszerrel tanulmányozták a betegség következtében elhullott csirkék, japán fürjek és kacsák különböző szerveiben. A két tyúkféle szerveiben a vírusantigén eloszlása és lokalizációja hasonló volt. Legnagyobb mennyiségben a szívizomsejtekben (a csirkék 88, a fürjek 89%-ában), valamint a légzőszervekben, az emésztőcsatorna és a húgyutak nyálkahártyájában volt kimutatható a vírusantigén. A kacsák szerveiben szignifikánsan kisebb mennyiségű vírusantigén volt észlelhető, és az emésztőcsatorna hámlában egyáltalán nem lehetett azt kimutatni (Antarasena és mtsai., 2006).

Amerikai kutatók (Perkins és Swayne, 2003) az 1997-ben, Hongkongban zoonotikus tulajdonságra is szert tett H5N1 vírustörzsszel 17 madár- és 2 emlősfajt kísérletesen fertőztek azért, hogy összehasonlítsák a különböző fajok érzékenységét, a klinikai tüneteket, a patológiai elváltozásokat és az immunhisztokémiai módszerrel kimutatható vírusantigén eloszlását és lokalizációját a különböző szervekben. Eredményeik összesítő értékelése alapján a vizsgált fajokat négy csoportba sorolták.

- 1.: A vírus szisztémás szétterjedése a szervezetben, gyors kórlefolyás és magas mortalitás (tyúkfélék)
- 2.: Idegrendszeri tünetekkel járó megbetegedés, szubakut lefolyás, 0-75% közötti elhullás (emdeni lúd, emu, zebrapinty, törpepapagáj)
- 3.: Enyhefokú, átmeneti megbetegedés vagy tünetmentes fertőzöttség, kismértékű vírusszaporodással, elhullás nélkül (pekingi kacska, sirály, veréb)
- 4.: A vírushatás nem ered meg (galamb, seregély, emlősök)

A pekingi kacska (4 hetes) az emdeni lúddal (2 hetes) összevetve kisebb érzékenységűnek mutatkozott. Egyik faj egyedei sem hullottak el, ugyanakkor a kacsák meg sem betegedtek és bennük makroszkópos elváltozások sem alakultak ki, a szövettani elváltozások enyhébbek és a kimutatható vírusantigén és a visszaizolálható vírus titere is alacsonyabb volt.

Brown és munkatársai (2008) kísérletesen fertőztek hattyúfajokat és indiai illetve kis kanadai ludat. A hattyúk mind elhullottak, a ludaknál viszont csak 40 illetve 75%-os elhullás volt tapasztalható. A fertőzött összes egyed az első napon már ürítette a vírust, viszont a kontakt ludak jóval később kezdtek üríteni a kontakt hattyúkhöz képest. Az összes fajban neurotrop tulajdonságú volt a vírus, a kialakult szövettani elváltozás és a vírusantigén mennyisége összhangban volt a lefolyással. A túlélő ludak esetében csak igen enyhe elváltozás és kis antigénmennyiség mutatkozott.

Hulse-Post és munkatársai (2005) kísérletesen fertőztek a 2002. után járványt okozó H5N1 vírussal tőkés récéket és azt tapasztalták, hogy az állatok túléltek a fertőzést és akár 17 napig is ürítették a vírust. A kacsában a kórokozó csökkent patogenitását tapasztalták, ugyanakkor az továbbra is fatális kimenetelű kórképet okozott házityúkban. A vírus viselkedése egyensúly, kórokozó-gazda adaptáció kialakulására enged következtetni a kacsában. Ez a H5N1 rezervoár szerep lehetővé teszi a nagyobb távolságokra történő vírushurcolást. Egy másik kísérletes fertőzés során különböző vadon élő récefajokat (8-11 hónapos életkorú egyedeket) hasonlítottak össze, és itt is az úszórécék (*Anas* genus), köztük a tőkés réce, bizonyultak a legkevésbé érzékenynek a fertőzésre, ám e faj egyedei ürítették a legnagyobb mennyiségben a vírust, miközben klinikailag tünetmentesek maradtak. A bukórécék a hattyúhoz hasonlóan szentinelnek tekinthetők, ugyanis bennük a hattyúhoz hasonló, súlyos tünetek, elhullások, és elváltozások jelentkeztek, amik lehetlenné teszik a vírus további terjesztését (Keawcharoen és mtsai., 2008).

VI. Vizsgálatok

1. Fejezet

A madárinfluenza patomorfológiája és diagnosztikája bütykös hattyúban

1.1. Anyag és módszer

1.1.1. Minták és mintavétel

2006 januárjától március végéig, a magyarországi madárinfluenza járvány első hulláma során, 3300 házi és vadmadár hulla került vizsgálatra az Országos Állategészségügyi Intézetben a madárinfluenza monitoring program keretében. A számos vadmadár faj közt 165 hattyú volt. Ebben az időszakban a H5N1 altípusú madárinfluenza fertőzés 67 bütykös hattyúban (*Cygnus olor*), 2 dankasirályban (*Larus ridibundus*), 1 kormoránban (*Phalacrocorax carbo*) 1 szárcsában (*Fulica atra*) és 1 tőkésrécében (*Anas platyrhynchos*) került megállapításra. A pozitív esetek zöme egy dél-magyarországi kitörési gócból, Nagybaracska környékéről érkezett. Ezt a kitörési gócot 10 nappal később követte egy, a Duna vonalát követő, északról délre haladó járvány, mely elérte az előző régiót.

A 2006 februárja és márciusa közt vizsgált 67, H5N1 vírus pozitív bütykös hattyú közül 35, véletlenszerűen kiválasztott egyed esetében kibővített, részletesebb protokoll szerint végeztük a kórbonctani és kórszövetteni vizsgálatot.

1.1.2. Kórbonctan, kórszövetten, immunhisztokémia

A kórbonctani vizsgálatot követően szövettani vizsgálatra rutin diagnosztika során az agyvelő, hasnyálmirigy és a szív került mintavételre. 35 egyednél a fent említett szerveken felül tüdő, máj, vese, lép, vékonybél, esetenként légcső, gerincvelő, harántcsíkolt izomszövet (comb, mellizomzat), mirigyes gyomor és fiatal egyedeknél a Fabricius-féle tömlő is vizsgálatra került. A szövetmintákat 10%-os, pufferolt formaldehid oldatban fixáltuk, paraffin blokkokba ágyasztuk és belőlük 3-4µm-es metszeteket készítettünk, amelyeket hematoxin-eozinnal festettünk.

10 állat esetében immunhisztokémiai vizsgálatot is végeztünk, melynek során a deparaffinált metszeteket 0,1%-os proteázoldattal (Sigma Aldrics Co.; típuszám: XIV) 37°C-on 10 percig, ezután 3%-os H₂O₂ oldattal 10 percig, majd 2%-os tejporoldattal szobahőmérsékleten újabb 10 percig kezeltük. Ezután a metszeteket 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk az 1:16 000 hígítású primer, egérben előállított, influenza A nukleoprotein-

specifikus monoklonális ellenanyaggal (Serotec, Oxford, Nagy-Britannia; klónszám: AA5H). Az antigén-ellenanyag kapcsolódást tormagyökérperoxidázzal jelölt kittel (EnVision™ + anti-mouse HRP, Dako, Glostrup, Dánia) mutattuk ki. Kromogénként 3-amino-9-etilkarbazol oldatot (AEC+ High Sensitivity Substrate Chromogen, Dako), kontrasztfestésként Mayer-féle hematoxilint használtunk. Negatív kontrollként foszfátpuffert használtunk monoklonális ellenanyag helyett (Szeredi és mtsai., 2007).

1.1.3. Vírusizolálás és meghatározás

A szervek előkészítése során a Nemzetközi Állat-járványügyi Hivatal (Office International des Epizooties) ajánlásait vettük figyelembe (Alexander, 2000., Avian Influenza Diagnostic Manual, 2006). A tüdőt, légcsövet és bélszakaszt tartalmazó mintát homogenizátor illetve dörzsmozsár segítségével antibiotikumot és antimikotikumot (0,25 mg/ml gentamicin, 5000 NE/ml nisztatin) tartalmazó foszfát pufferben (phosphate buffered saline, PBS) homogenizáltuk. 10-20% (w/v)-os szuszpenziót készítettünk a homogenizátumból, melyet szobahőmérsékleten inkubáltunk 1-2 órán keresztül, majd centrifugáltuk (1000xg, 10 perc). Minden minta esetén 100µl mennyiséget oltottunk be a felülúszóból öt embrionált, 9-11 napja előkeltetett SPF tyúktojás allantoisz üregébe. A beoltott tojásokat 37°C-on 4-7 napig inkubáltuk. Az elpusztult és moribund embriókat, valamint az inkubációs periódus végére élve maradtakat 4°C-ra hűtöttük és megvizsgáltuk az allantoisz folyadék hemagglutinációs aktivitását 1%-os tyúk vörösvérsejt szuszpenzióval. Ha egy folyadék nem mutatott hemagglutinációt, azt még egy tojásba oltottuk és megismételtük az előbbi eljárást. Ha a második passzázs is negatív eredménnyel zárult, a mintát negatívnak minősítettük. A hemagglutináló allantoisz folyadékot HAG teszttel azonosítottuk, H5 és H7 specifikus referencia savók alkalmazásával (VLA Weybridge, UK). A keresztreakció kizárása érdekében két H5 (H5N2, H5N7) és két H7 (H7N1, H7N7) savót használtunk. A neuraminidáz alcsoport meghatározása az EU madárinfluenza referencia-laboratóriumában (Avian Virology Laboratory – VLA, Weybridge, UK) történt.

1.1.4. Reverz-transzkriptáz polimeráz lánreakció

A klasszikus virológiai módszerekkel párhuzamosan, az összes szervmintát megvizsgáltuk molekuláris biológiai módszerekkel is az EU madárinfluenza referencia-laboratóriuma (Avian Virology Laboratory, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, UK) illetve a WHO által kiadott protokoll (Anonymus, 2006, WHO, 2005) alapján, hagyományos és real time PCR alkalmazásával. A szervmintákat TissueLyser készülékkel homogenizáltuk (Qiagen, Hilden, Németország) a gyártó ajánlásának megfelelően. A homogenizátum felülúszójának 100µl-

éből RNS kivonást végeztünk X-tractor Gene nukleinsav kivonó robot segítségével (Corbett Robotics Pty. Ltd., Queensland, Ausztrália). Ehhez a gyártó utasítása szerinti RNS kivonó kittet (Total RNA Isolation Kit, Nucleospin 96 RNA, Macherey-Nagel, Düren, Németország) használtuk. A PCR reakciókat automata (CAS-1200 Robotic Liquid Handling System, Corbett Robotics Pty. Ltd.) segítségével mértük össze. A PCR terméket 2 w/v%-os agaróz gél (Invitrogen, UK) elektroforézis és QIAquick géles extrakciós kittel (Quiagen, UK) történő tisztítás után etídium bromidos festéssel tettük láthatóvá. Az influenza A típusának meghatározása real-time polimeráz láncreakcióval (PCR) Spackman és mtsai (2002) által leírt módon történt. A H5 és N1 gén azonosítását real-time valamint hagyományos agaróz gél alapú PCR módszerrel végeztük (Anonymus, 2006, WHO, 2005).

1.2. Eredmények

1.2.1 Kórbonctan, kórszövettan, immunhisztokémia

Valamennyi hattyú közepes vagy jó tápláltsági állapotban volt, ami a betegség gyors lefolyására utalt. Az észlelt elváltozások mindegyik esetben az erősen virulens madárinfluenza vírustörzsek következtében alakultak ki és a más madárfajokban is leírt elváltozásoknak feleltek meg (Acland és mtsai., 1984, Alexander, 1982, 1993, 2000b, Kobayashi és mtsai., 1996). A virulens törzsek okozta kórképpel kapcsolatban, tyúkokban leírt bőrelváltozásokat (a fejfüggelékek és a lábak bőrének cyanosisát, vérzést, elhalást, periorbitális oedemat) azonban hattyúkban nem tapasztaltunk.

A kórbonctani és kórszövetteni elváltozások gyakoriságát az **1. táblázat** foglalja össze.

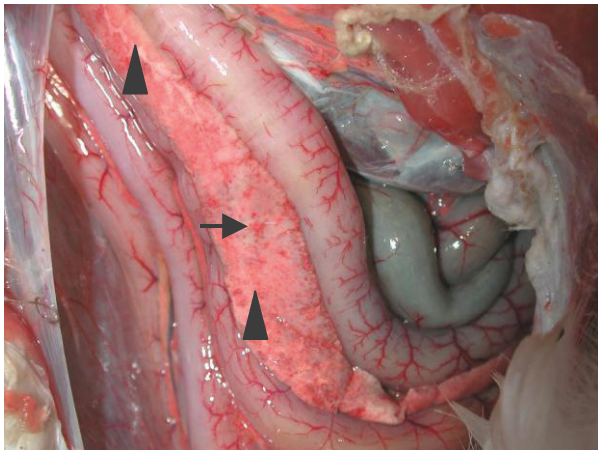
1. táblázat: Az erősen virulens, H5N1 altípusú madárinfluenza vírusfertőzés következtében elhullott, 35 bütykös hattyúban kialakult kórbonctani és kórszövettani elváltozások, kiemelve a diagnosztikai szempontból fontos leleteket

		ELVÁLTOZÁSOK	AZ ÉRINTETT ÁLLATOK SZÁMA	%-OS MEG- OSZLÁS
KÓRBONCTAN	Tápláltsági állapot	jó	10	29
		közepes	22	63
		gyenge	3	8
	Hasnyálmirigy:	- vérzések	34	97
		- 2-4 mm átmérőjű, szürkésfehér gócok	19	54
	Szív:	- vérzések az epicardium alatt	30	86
		- szürkésfehér gócok	12	34
	Tüdő:	- bővérűség	35	100
		- oedema	10	29
	Légzsák:	- savókilépés	9	26
	Mirigyesgyomor:	- vérzések	25	71
	Bél:	- heveny hurut	35	100
		- vérzések a duodenum nyh-ban	21	60
	Lép:	- bővérűség/duzzanat	35	100
KÓRSZÖVETTAN	Agyvelő:	- lymphocytas agyvelő- és agyhártyagyulladás	35	100
		- perivascularis vérzés	9	26
	Gerincvelő:	- lymphocytas gerincvelőgyulladás	6/14 állat	43
	Szív:	- gócos szívizomelfajulás	29	83
		- lympho-histiocytas gyulladás	31	89
	Hasnyálmirigy:	- elhalásos gócok/térképszerű elhalások	27	77
		- lympho-histiocytas gyulladás	19	54
	Tüdő:	- bővérűség, interstitialis oedema	35	100
		- interstitialis, lympho-histiocytas beszűrődés	4	11
	Légcső:	- oedema a nyálkahártyában	7/12 állat	58
		- lympho-histiocytas beszűrődés a nyh-ban	4/12 állat	33
	Máj:	- interstitialis, lympho-histiocytas gyulladás	24	69
		- elhalásos gócok	16	46
	Bél:	- desquamativ hurutos gyulladás	35	100
- vérzések		29	83	
Fabricius bursa:	- lymphocytas kiürülés, lymphocytas elhalás	22/22 állat	100	
Lép	- lymphocytas kiürülés, lymphocytas elhalás	35	100	
Vázizom:	- gócos izomrost-elfajulás, -elhalás, vérzés	5/12 állat	42	

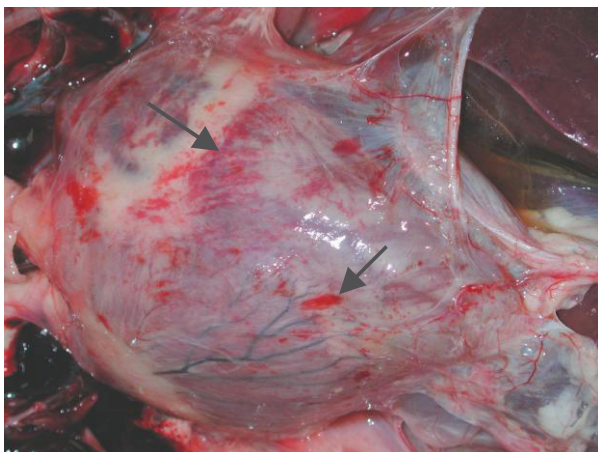
A legjellegzetesebb vírusfertőzésre gyanút keltő **kórbonctani** elváltozás a hasnyálmirigy állományában észlelt fokális, néha térképszerű szürkésfehér elhalás volt (**1., 2. kép**). Ez alapján már makroszkópos vizsgálattal felmerült az érintett egyed H5N1 fertőzöttsége. A pontszerű vérzések jelenléte a szívburokban és az epicardium alatt (**3. kép**), a mirigyesgyomor illetve a duodenum nyálkahártyájában (**4., 5. kép**), sero-mucinosus váladék felhalmozódása a légzsák üregében (**6. kép**) tovább erősítették a gyanút.



1. kép: Hasnyálmirigy-elhalások (▼)



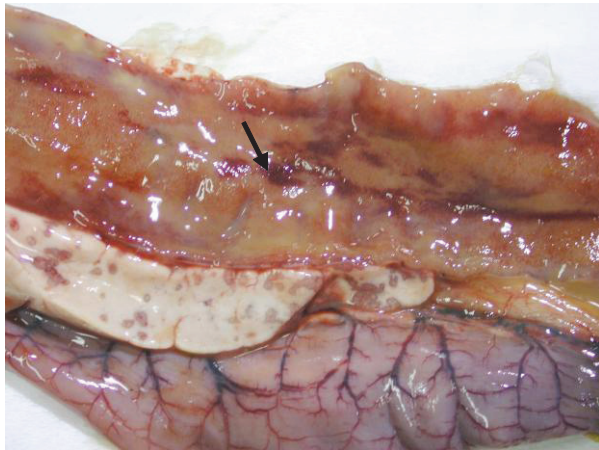
2. kép: Térképszerű elhalások (▲), vérzések (→) a hasnyálmirigyben



3. kép: Vérzések a szívburokban (→)



4. kép: Vérzések a mirigyesgyomor nyálkahártyájában (→)



5. kép: Vérzések a duodenum nyálkahártyájában (→)

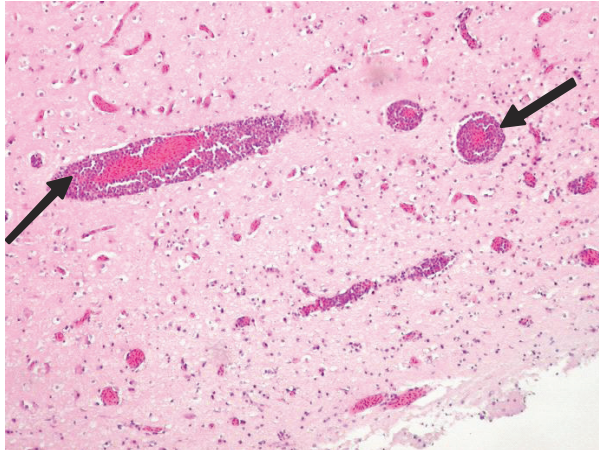


6. kép: Sero-mucinosus légzsákgulladás, alvadásra hajlamos savó a légzsák üregében (→)

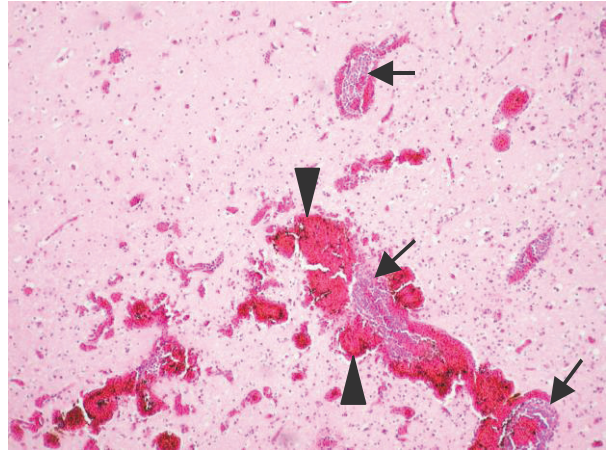
Heveny bélhurut, tüdő és lép bővérűség, oedema a tüdőben és a légcső nyálkahártyában voltak még gyakori, ám nem jellegzetes elváltozások, melyek az állatok 100%-ában jelentkeztek, de nem tekinthetők specifikusnak a H5N1 fertőzésre nézve.

Kórszövettani vizsgálat során az idegrendszer, a hasnyálmirigy és a szív elváltozásai esetén nagy biztonsággal valószínűsíthettük a madárinfluenza-fertőzést. Jellegzetes elváltozások a fokális gliózissal, valamint idegsejtelhalással, neuronocytophagiával és perivascularis vérzésekkel kísért lympho-histiocytas agyvelő-, agyhártya-, és gerincvelőgyulladás (**7., 8., 9., 10. kép**), gócos elhalások és multiplex, gócos, lympho-histiocytas gyulladás a hasnyálmirigy állományában (**15., 17. kép**) továbbá a multifokális szívizom-elfajulás és elhalás (**19. kép**) voltak. Ezeken kívül leírtunk még gócos elhalásokat a máj állományában (**21. kép**), ritkábban a vázizomzatban és oedémát, esetenként gócos lympho-histiocytas beszűrődést a tüdőben illetve a légcsőben, valamint bélhurutot (**25., 27. kép**). A lép állományában, valamint a fiatal madarak Fabricius-féle tömlőjében lymphocytakiürülést és -elhalást találtunk.

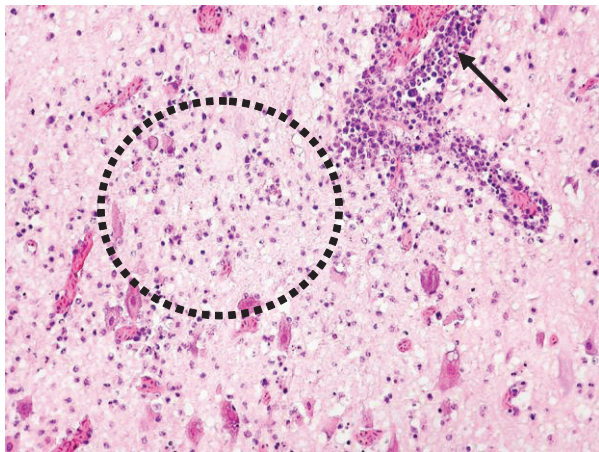
Immunhisztokémiai vizsgálattal elsősorban a sejtmagvakban és ritkábban a cytoplasmában mutattuk ki a vírusantigént az általunk vizsgált összes szervben, a légcső kivételével. A legnagyobb vírusrészegyet az agyvelőben találtuk, ahol a nagyagyvelőben, az agytörzsben és a kisagyban a neuronok, az oligodendro- és microgliasejtek, az astrocyták, az ependyma sejtek, a vérpályában lévő monocyták és a vérerek myocytáiban volt megfigyelhető a vírusantigén. Számos esetben azonban a cytoplasmában is a sejtmagra jellemző erős festődést találtunk. Jellemzően vagy nagyobb összefüggő területeken volt jelentős antigén mennyiség, vagy körülírt területeken szinte valamennyi sejt fertőzött volt (**11., 12., 13., 14. kép**).



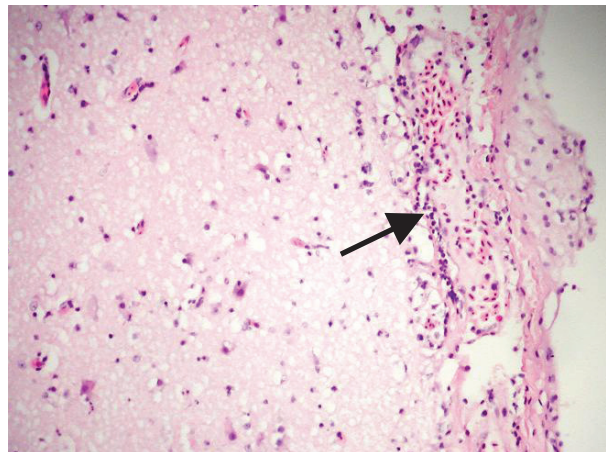
7. kép: *Lympho-histiocytas perivasculitis* (→), nagyagyvelő
HE., 100x



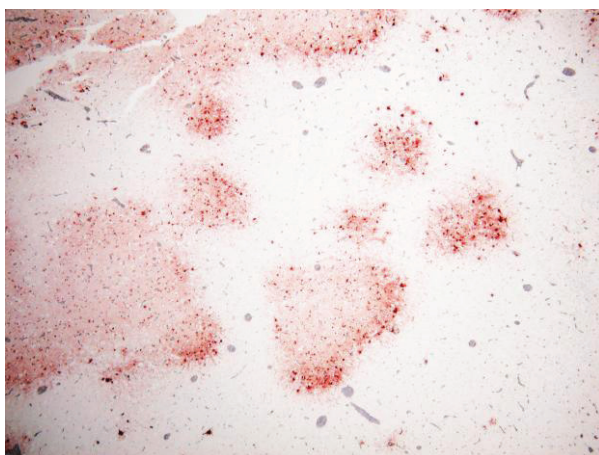
8. kép: *Lympho-histiocytas perivasculitis* (→) és vérzések (▲), nagyagyvelő
HE., 100x



9. kép: *Lympho-histiocytas perivasculitis* (→), gliosis(⊙), nagyagyvelő
HE., 200x



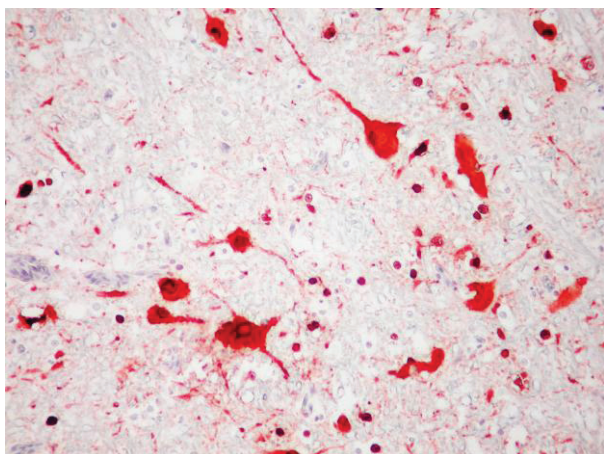
10. kép: *Lympho-histiocytas perivascularis* beszűródés (→) és oedema a lágyagyburokban, savós lágyagyburokgyulladás
HE., 200x



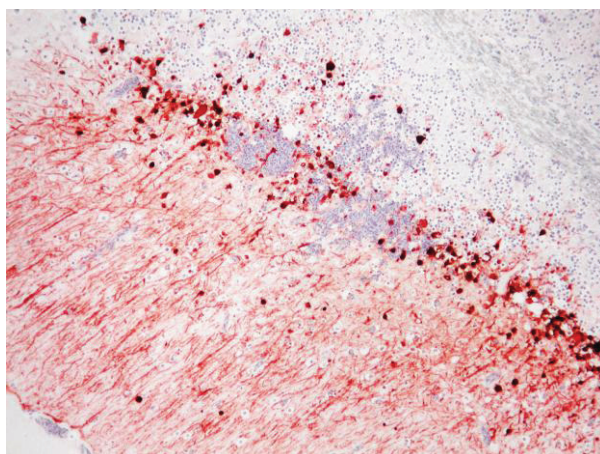
11. kép: Az influenzavírus antigén kiterjedt területeken az idegsejtek-ben és a gliasejtben is megfigyelhető a nagyagyvelőben
IH., 20x



12. kép: Erős festődés jelzi a vírusantigén jelenlétét a molekuláris és a szemcsés réteg nagy területén a kisagyvelőben
IH., 20x

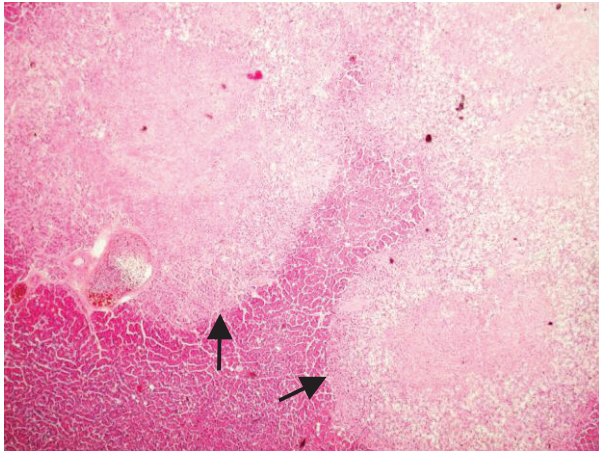


13. kép: Nagymennyiségű vírusantigén mutatható ki a neuronok és gliasejtek sejtmagjában illetve az előbbiek cytoplasmájában és axonjaiban is a nagyagyvelőben
IH., 200x

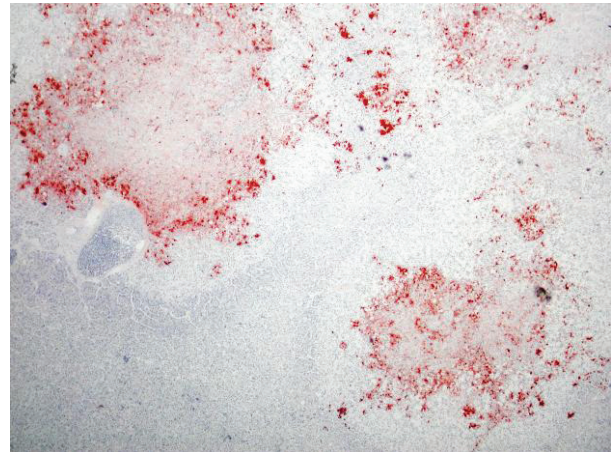


14. kép: A vírus a molekuláris és szemcsés rétegen kívül nagymennyiségben van jelen a kisagyvelő Purkinje-sejteiben is
IH., 100x

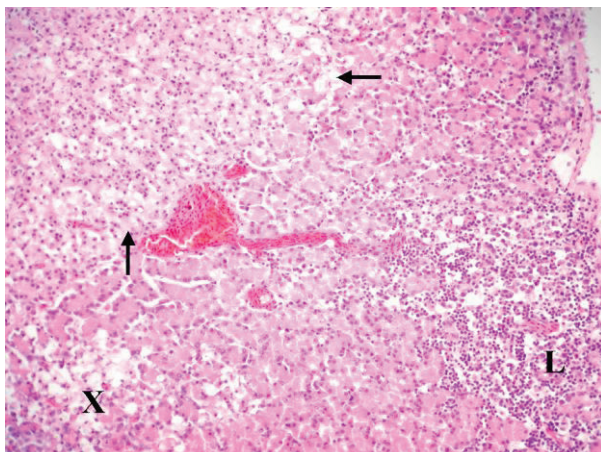
Nagymennyiségű nukleoprotein antigén fordult elő a hasnyálmirigy és a máj elhalásainak területén és azok szomszédságában lévő sejtekben (**16., 23. kép**). A vírusantigént a hasnyálmirigyben az exokrin mirigyhámsejtek, a májban a hepatocyták és esetenként a monocyták sejtmagjában mutattuk ki (**18., 22. kép**). Azon májmintákban, melyekben nem voltak elhalások, zömében a Kupffer-sejtekben mutatkozott pozitív reakció (**24. kép**). A szívizomban a myocyták és az epicardium sejteinek magjában és cytoplasmájában (**20. kép**), a tüdőben a tüdősípok falában lévő macrophagok magjában és a légzőhámában fordult elő a vírus (**26. kép**). A lépben körülírt területeken ugyancsak nagyszámban találtunk fertőzött sejteket. Itt elsősorban a vérerek endothelsejtjei, a vérerek falának simaizom sejtjei, a vérerek körüli reticulum sejtek, a lépgerendák simaizomsejtjei és a vörös illetve fehér léppulpa macrophagjai tartalmaztak vírusantigént a sejtmagban és a cytoplasmában egyaránt (**28., 29., 30. kép**). A vékonybélben a *plexus submucosus* sejteiben, a *muscularis mucosae* myocytáiban, valamint a propria sejteiben fordult elő a vírusantigén (**31. kép**). Néhány vázizomsejtben és a vesék egy részének interstitiumában is kimutatható volt a vírus (**32., 33. kép**).



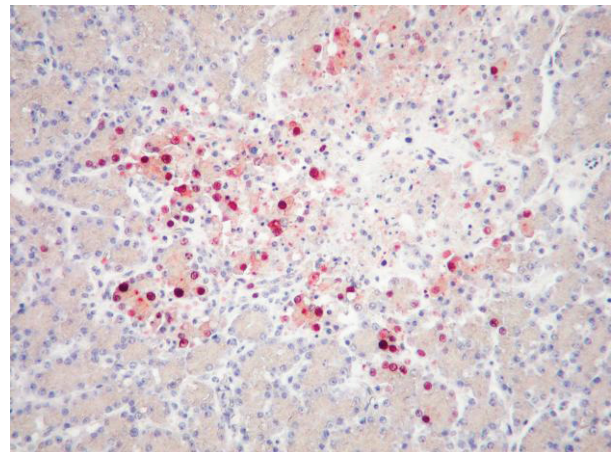
15. kép: Multiplex, gócos elhalás (→) a hasnyálmirigy állományában
HE., 100x



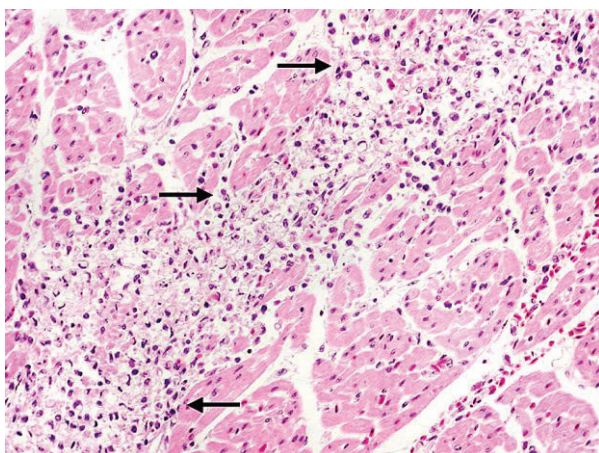
16. kép: Az elhalások széli területén nagymennyiségű vírusantigén (a 15. képen látható terület)
IH., 100x



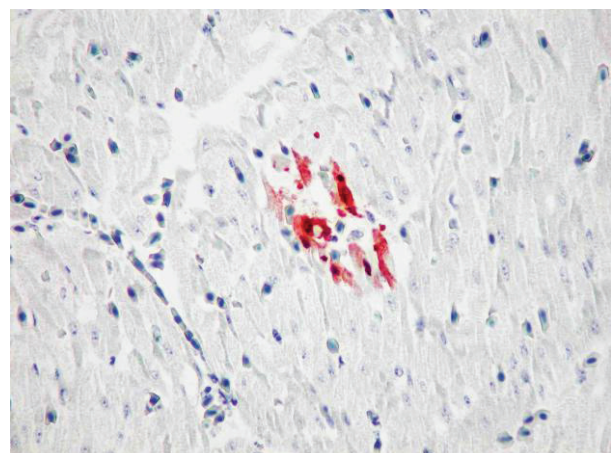
17. kép: Hasnyálmirigy-elhalás (→), vacuolus elfajulás (X) és lymphohistiocytas beszűrődés (L)
HE., 200x



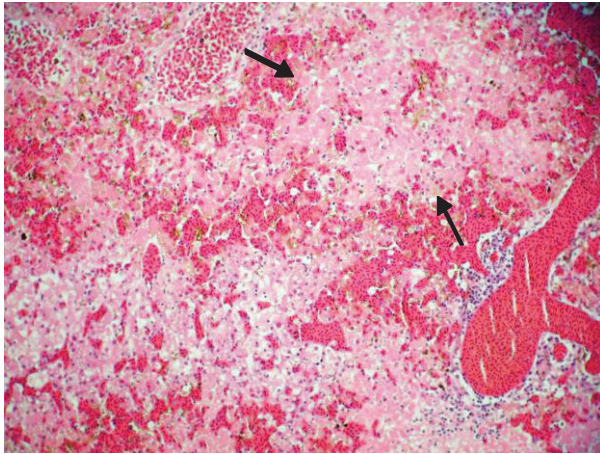
18. kép: Az influenzavírus-antigén elsősorban a mirigyhámsejtek magjában figyelhető meg egy elhalásos gócban és annak közelében a hasnyálmirigyben
IH., 200x



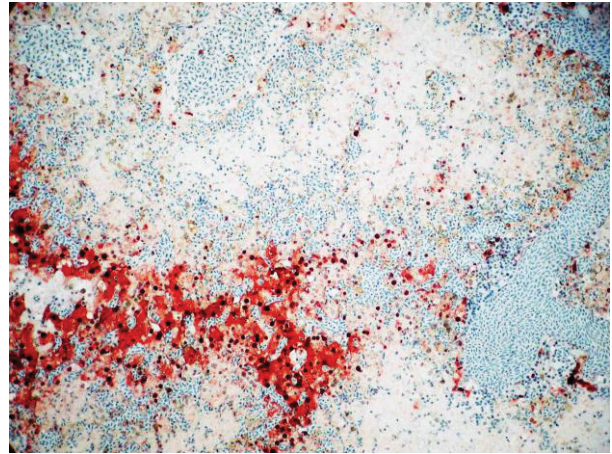
19. kép: Izomrostelfajulás és -elhalás, valamint lymphohistiocytas beszűrődés a myocardiumban (→)
HE., 200x



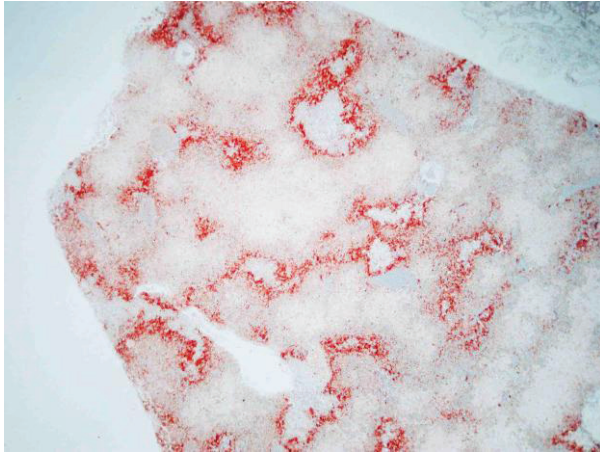
20. kép: Vírusantigén a myocyták magjában és cytoplasmájában, szívizom
IH., 400x



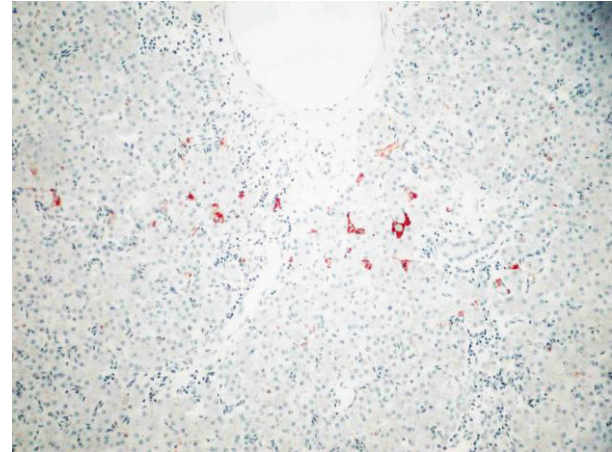
21. kép: Térképszerű elhalások a máj állományában (→)
HE., 200x



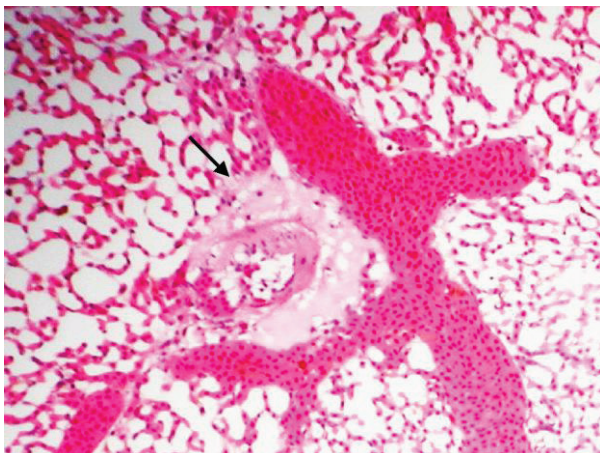
22. kép: A 21. képnek megfelelő területen az elhalások határán nagymennyiségű vírusantigén a májsejtekben
IH., 200x



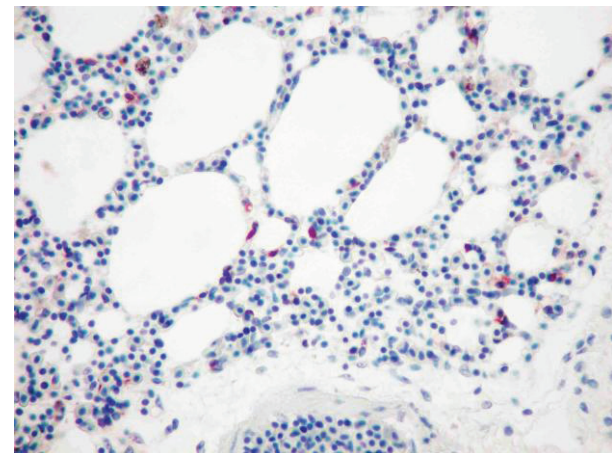
23. kép: A térképszerű elhalások széli területein nagymennyiségű vírusantigén látható a májban
IH., 100x



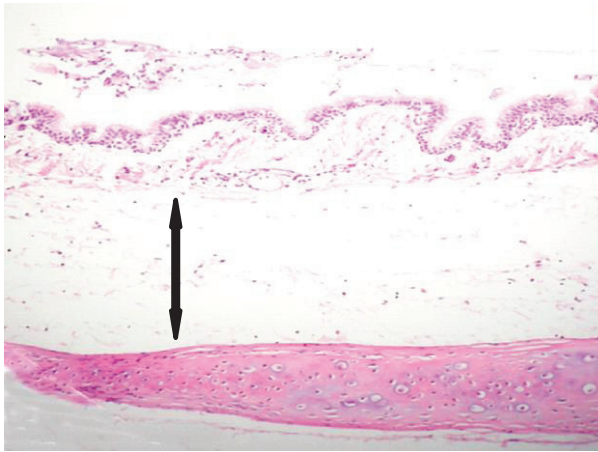
24. kép: Vírusantigén a máj Kupffer-sejtjeinek cytoplasmájában
IH., 200x



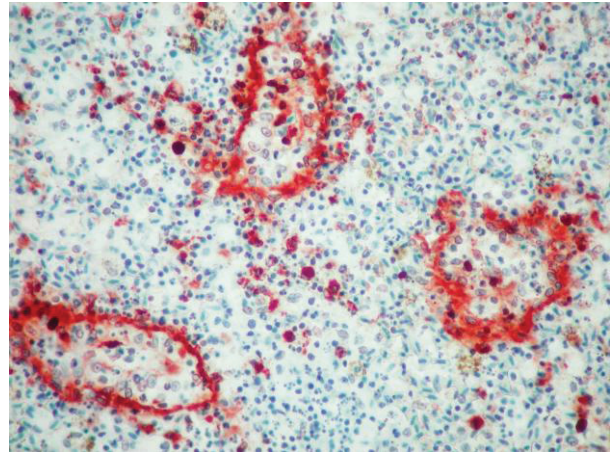
25. kép: Heveny pangásos bővérűség és intersticiális oedema a tüdőben (→)
HE., 100x



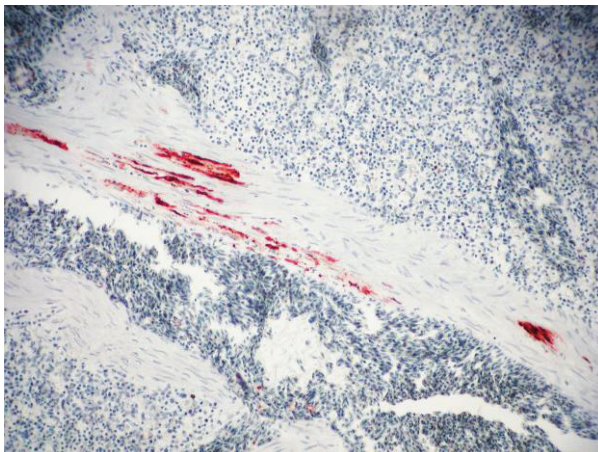
26. kép: Kismennyiségű vírusantigén a tüdő-septumokban lévő MPS sejtekben, valamint a légzőhámban
IH., 400x



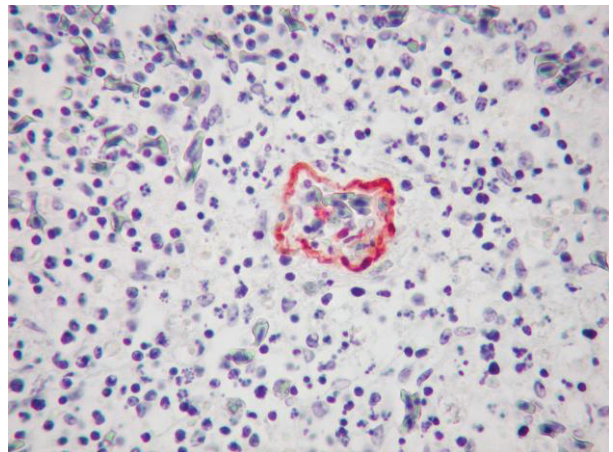
27. kép: A légcső nyálkahártyájának és submucosájának súlyos fokú oedemas beivódása (↕)
HE., 100x



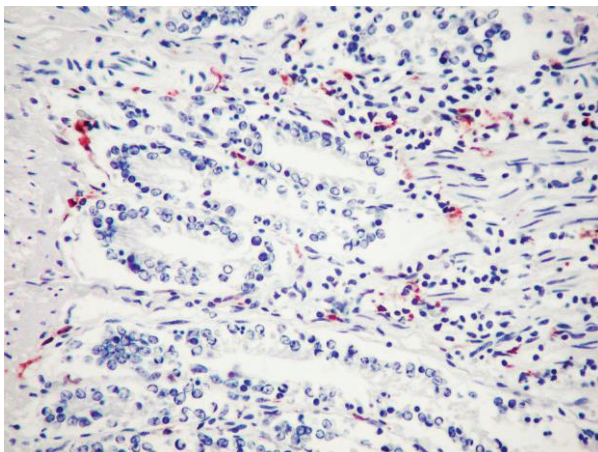
28. kép: A lép MPS sejtjeiben és az ecsetartériák körüli reticulumsejtekben számos sejtben megfigyelhető a vírus-antigén
IH., 400x



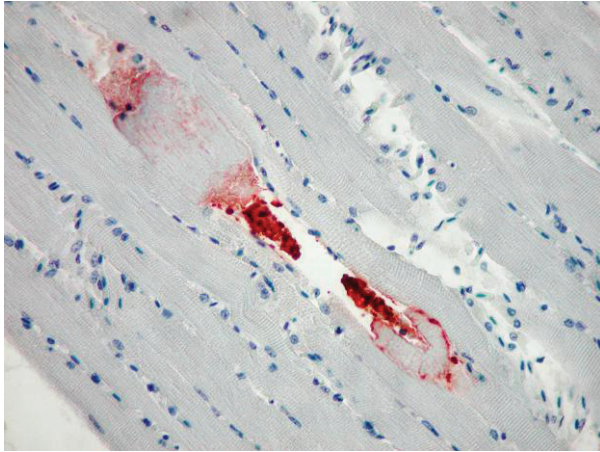
29. kép: Nagymennyiségű antigén mutatható ki a lépgeredák myocytainak magjában és cytoplasmájában
IH., 200x



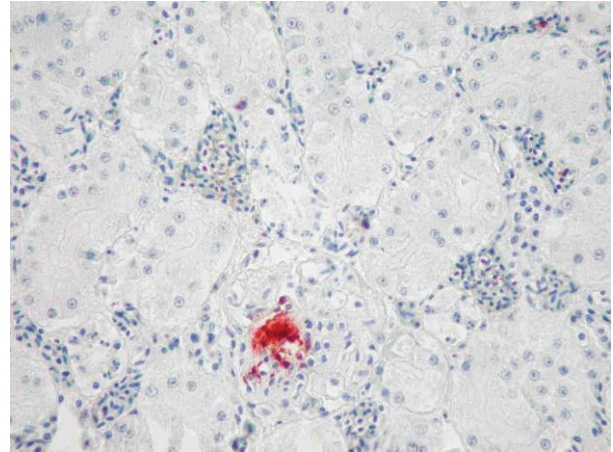
30. kép: Az influenzavírus a vérerek endothelsejtjeiben, valamint keringő monocytákban lelhető fel a lépben
IH., 400x



31. kép: A vékonybél nyálkahártyájában a propria kötőszöveti sejtjei, simaizomsejtjei és MPS sejtjei antigén pozitívak, az enterocytokban antigén festődés nem látható
IH., 400x



32. kép: Erős festődés jelzi a vírus jelenlétét egy elhalt vázizom-rostban IH., 400x

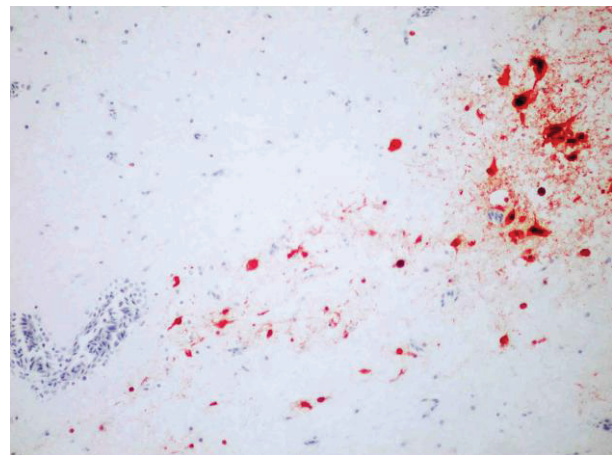


33. kép: Körülírt területen, egy vese-glomerulusban kimutatható a vírusantigén IH., 400x

Immunhisztokémiai módszerrel olyan területeken is nagy mennyiségben sikerült kimutatni a vírusantigént, ahol még nem alakult ki kórszöveti elváltozás. Az agyvelőben a szövettani elváltozások (perivasculitis, vérzések) többnyire nem estek egybe az IH-val pozitív területekkel (34., 35. kép).



34. kép: Kezdődő lympho-histiocytas perivasculitis (→) a nagyagyvelőben HE., 200x



35. kép: A 34. képnek megfelelő terület, az elváltozástól távol, intakt területeken nagymennyiségű vírusantigén a neuronokban és gliasejtekben IH., 200x

1.2.2. Vírusizolálás, meghatározás, molekuláris biológia

Virologiai vizsgálattal 67 bütykös hattyúban állapítottuk meg a HPAI fertőzést. A beoltott csirkeembriók 30 órán belül elhullottak, ami a HPAIV jelenlétét valószínűsítette. A vírusizolátumok hemagglutinációs titere 1:32 és 1:1024 közt mozgott. Az izolátumok haemagglutinációs aktivitását minden esetben sikerült gátolni H5N2 és H5N7 antisavókkal de H7N1 illetve H7N7 és baromfipestis savóval nem.

A klasszikus virológiai módszerekkel elért összes eredményt megerősítettük molekuláris biológiai eszközökkel is. Mind a 67, H5-pozitív minta szekvencia analízise megtörtént és valamennyi a HPAI patotípusba tartozó volt.

A bütykös hattyúból Nagybaracska térségében izolált vírusok 100%-os szekvencia azonosságot mutattak a HA gén tekintetében egymással. Ezt a csoportot HUN1 csoportnak neveztük. A 10 nappal később, Dunakeszinél izolált törzs és a vele rokon, a Duna vonala mentén déli irányban izolált törzsek egy másik genetikai ágba tartoznak. Ezt a csoportot neveztük HUN2 csoportnak (Szeleczy és mtsai., 2009, Id.: Melléklet).

1.3. Megbeszélés

A magas és alacsony patogenitású madárinfluenza vírusok okozta kórbonctani és kórszövettani elváltozásokra vonatkozóan a szakirodalomban nagy számban lehet találni leírásokat. Ezen közlések zöme természetes módon vagy kísérletesen fertőzött házityúkokban és pulykákban észlelt elváltozásokról számol be (Krohn, 1925, Jungherr és mtsai., 1946, Beard és Helfer, 1972, Cooley és mtsai., 1989, Swayne és mtsai., 1992, Webster és mtsai., 1992, Laudert és mtsai., 1993, Swayne és Slemmons, 1994, Swayne és Slemmons, 1995 b, Tanyi, 1997, Perdue és mtsai., 1999, Capua és mtsai., 2000, Capua és Marangon, 2000, Swayne és Suarez, 2000, Swayne és Halvorson, 2003, 2008). Néhány, házikacsával, lúddal, emuval és nanduval kapcsolatos közlemény is napvilágot látott (Alexander, 1982, Cooley és mtsai., 1989, Laudert és mtsai., 1993, Tanyi, 1997, Swayne és Halvorson, 2003, 2008). A H5N1 vírusfertőzés lefolyásának és a kialakuló patológiai elváltozásoknak a részletes leírása hattyú vonatkozásában azonban, a 2006. évben egyes európai országokban történt megállapításokat és az ezt követő kísérletes fertőzéseket megelőzően (Sabirovic és mtsai., 2006, Terregino és mtsai., 2006, Tiefke és mtsai., 2007, Brown és mtsai., 2008, Kalthoff és mtsai., 2008) nem történt meg.

Házityúkban és pulykában a HPAI fertőzés kapcsán heveny vérzések, elhalások és oedema uralják a kórbonctani és kórszövettani képet. Jellemző a fej, a nyak és a láb bőrének oedemája, tüdővizenyő, vérzések találhatóak a bőrben, a savóshártyákon, a nyálkahártyákban és a pectorális izomzatban, továbbá elhalásokat lehet megfigyelni a bőrben, hasnyálmirigyben, lépben és a szívben (Alexander, 1982, 1993, Acland és mtsai., 1984, Kobayashi és mtsai., 1996, Swayne és Suarez, 2000, Swayne és Halvorson, 2003, 2008). A keringés heveny összeomlásának jelein kívül, perakut lefolyás esetén hiányozhatnak a fenti, specifikus elváltozások. A legjellemzőbb kórszövettani elváltozások a lympho-histiocytas agyvelő- és agyhártyagyulladás, gócos szívizomelfajulás és lympho-histiocytas szívizomgyulladás, a hasnyálmirigy állományának és olykor más szerveknek (tüdő, lymphoid szervek és a vázizomzat) gócos elhalása. A légzőrendszer érintettsége az enyhétől a súlyos fokúig változhat.

Alacsony patogenitású madárinfluenza törzsek legtöbbször lesoványodással járó, elhúzódó kórképet okoznak. A kórbonctani elváltozások között dominál a savós-hurutos-fibrines rhinitis, sinusitis, conjunctivitis, légcső- és tüdőgyulladás, melyeket gyakran kísér fibrines légzsák- és hashártyagyulladás, petefészek- és tojócsőgyulladás, valamint bélgyulladás. Ezeket a késői elváltozásokat általában másodlagos bakteriális fertőzések (pl.: *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*) okozzák. Az elhalásos hasnyálmirigy-gyulladás nem olyan gyakori csirkékben, mint pulykákban (Mo és mtsai., 1997, Hooper és Selleck, 1998, Swayne és Halvorson, 2003, 2008).

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a hattyúban észlelt kórtani elváltozások hasonlóak voltak az egyéb fajokban leírt HPAI fertőzés során találtakhoz. Bütykös hattyúban azonban nem találtunk a házityúknál leírt bőrelváltozásokat (pl.: cyanosis, vérzések, elhalások, periorbitális oedema). Szintén hiányzott az alacsony patogenitású madárinfluenza törzsekre jellemző savós-fibrines felsőlégúti (sinus, légzsák) és szaporító szerveket érintő gyulladás (Mo és mtsai., 1997, Hooper és Selleck, 1998).

Tapasztalataink szerint a fent leírt kórbonctani és kórszövettani elváltozások, különösen az agyvelő, gerincvelő, szív és hasnyálmirigy elváltozásai szorosan összefüggenek a H5N1 vírus jelenlétével bütykös hattyúban, ezért a kórszövettani vizsgálat nagyon fontos diagnosztikai eszköznek bizonyult. 56°C-os formalin oldatban történő gyors fixálás és fagyasztásos metszetkészítés után a fenti szervek szövettani vizsgálatával, a bonclelet és a kórelőzményi adatok alapján felmerült madárinfluenza fertőzés gyanúját néhány órán belül megállapíthatjuk.

Kórbonctani észleléseink szerint a bütykös hattyú különösen érzékeny a H5N1 típusú madárinfluenza fertőzésre, mely akut lefolyású, nagy mortalitású betegséget okoz ebben a fajban. Ezért megfigyeléseink alapján kis esélyt látunk elhúzódó kórkép kialakulására, elnyújtott vírusürítésre és a fertőzés nagy távolságok között történő terjesztésére.

A 2006. február 6-tól március 22-ig tartó járvány először egymáshoz igen közel fekvő településeken (Nagybaracska, Csátalja, Bátmonostor, Dávod, Hercegszántó) jelentkezett. Az itteni izolátumok (HUN1), és a velük legszorosabb filogenetikai rokonságban lévő horvátországi törzs őse egy Volga mentén és a Kaszpi tengernél izolált törzs volt (Szeleczyk és mtsai., 2009, Id.: Melléklet). Ez éppen egybeesik az ott élő vadmadarak, köztük a bütykös hattyúk, tőkésrécék vonulási irányával a telelési hely felkeresése céljából (Delany, 2006). Rinder és munkatársai (2007) a bajorországi járvány során először izolált, de egy másik genetikai ágba tartozó törzsnél szintén Volga menti és mongol genetikai rokonságot állapítanak meg, ezzel egy kelet-nyugati irányú fertőzési útvonalat határozva meg Ázsia felől. Az Észak-Németországban, Rügen szigetén ugyanebben az időben járványt okozó törzs, azonban a magyar izolátumhoz közeli genetikai ágba tartozik (Szeleczyk és mtsai., 2009, Id.: Melléklet).

Február 16. és március 7. között, nem olyan jól körülhatárolt területen újabb járványkitörés jelentkezett. Ez a Duna vonala mentén, északról délre haladva okozott elhullásokat (időrendben: Dunakeszi, Dunaszentbenedek, Dávod, Százhalombatta, Szentendre, Mohács, Dunaföldvár). Hattyún kívül kormoránt, danka sirályt, szárcsát és tőkés récét is érintett. Az itt izolált törzsek (HUN2) genetikailag távol álltak a HUN1 izolátumoktól. Dávodon először a HUN2 csoport egy tagját izolálták szárcsából, és csak két nappal később azonosították az HUN1 csoport egyik tagját hattyúból, így bizonyítást nyert a két csoport

egyidejű jelenléte az első kitörési gócban. A HUN2 csoportot is magában foglaló genetikai ág (clade 2.2.1.) első tagja egy olasz törzs volt és hasonlóan a szlovén, osztrák, francia, szlovák, cseh izolátumokhoz rokon volt egy nigériai törzssel, melyet 2006 januárjában izoláltak. Ez megfelel egy dél-észak irányú terjedés elméletének Afrikából (Szeleczy és mtsai., 2009). A bajor járvány második, az elsőtől genetikailag távolabb lévő, izolátuma cseh, török, egyiptomi, nigériai törzsekkel, valamint a magyar járvány második törzsével (HUN2) volt rokon. A német kutatók is felvetik az Afrikából történő terjedés lehetőségét (dél-észak irányú vonulás) (Rinder és mtsai., 2007). Az Afrikából való terjedés elméletére ellenérvként ugyanezen szerzők azonban megjegyzik, hogy váratlan volt a 2006. februári járványkitörés, mivel a 2005 augusztusában Kína, Oroszország, Kazahsztán irányába, a madárvonulásnak megfelelően, terjedő H5N1 októberben elérte Törökországot, Romániát és Horvátországot, és a járvány megállt. Csak tavaszra várták annak folytatását, mikor a vándormadarak Afrika felől visszaindulnak. A 2006. februári járványkitörést azzal magyarázták, hogy a HPAI fertőzés néhány hónapig felderítetlen maradhat, addig, amíg be nem köszönt a fagy és a madarak nagy csoportokban össze nem gyűlnek a be nem fagyott vízterületeken. Itt kezdődik a vírus átadása, szétterjedése. Ezt a vélekedést támasztja alá a 2005-2006-os év igen kemény tele. Szeleczy és munkatársai (2009) véleménye is ezt erősíti, mely szerint a magyar első és második izolátum genetikai vonalába tartozó vírusok izolálásra kerültek már 2005 során Romániában és Törökországban, tehát a vonal már jelen volt Európában az olasz járványkitörés előtt. A progenitorvírust azonban még nem sikerült azonosítani. A Rügen szigetéről kiinduló észak-európai járványt végképp nem lehet magyarázni a tél folyamán egy délről észak felé történő vándorlással, viszont úgy igen, hogy a 2005-től Európában jelen lévő vírus korábban jutott el Észak-Európába és ott csak a kemény tél beköszöntével okozott járványt. Tiefke és munkatársai (2007) leírták, hogy igen kemény fagyok miatt csak kis tengerparti területeken maradtak nyílt vízfelületek, ahol sokféle vízimadár akkumulálódott egy időben, ami fontos feltétele volt az észak-németországi járványkitörésnek. Delany (2006) is a 2006 elején beköszöntött hideg téli időjárás következtében fellépő migrációval magyarázza a H5N1 vírus Dél- és Közép-Európába jutását.

Euráziában a bütykös hattyú két fő metapopulációban él (Delany, 2006). Az európai metapopuláció jelentős növekedését tapasztalták az 50-60-as évek fordulóján becsült 35 ezer egyedről a 2002-ben becsült 300 ezer egyedre, melyből 250 ezer Közép-Európában él (Albert és mtsai., 2004). A másik, Közép-ázsiai, Kaszpi- és Fekete-tenger környéki metapopuláció ugyancsak 300 ezer egyedből áll (Delany, 2006).

Az európai bütykös hattyú állomány részlegesen vonulónak tekinthető. Egyes területeken (Anglia, Írország, Franciaország), ahol főleg elvadult állományok élnek és a hőmérséklet sem

gyakran süllyed fagypontra alá, az állatok helyben maradnak, illetve csak kis mértékű helyi elmozdulások figyelhetők meg az állományban. Az Angliában gyűrűzött madarak 94%-a kevesebb, mint 50 km-t tesz meg a jelölés helyétől számítva. Észak-Európában (Skandináviában és Észak-Németországtól Észtországig) a faj nagyrészt vonuló, kiemelt vedlőhelyei vannak a dán és svéd partoknál, illetve fontos telelőhelyei a Balti-tengeri dán szigetvilágnál, Dél-Svédországnál és Észak-Németországnál. Kemény teleken ezekből a populációkból származó egyedek eljuthatnak Hollandiáig, Belgiumig, Észak-Franciaországig és Délkelet-Angliáig, illetve alkalmanként Svájcig, ahol lengyel és litván gyűrűvel ellátott madarakat is megfigyeltek. Igazán hideg teleken litván madarak eljutottak Skóciába (1700 km-es elmozdulás) és Olaszországba az adriai partok térségébe, illetve Balti-tengeri madarak a mediterráneumba. A madarak a lehetőségekhez képest igyekeznek a költő- illetve vedlőhelyekhez közelebb eső telelőhelyet keresni, aminek feltétele, hogy az enyhébb telek következtében a folyók, tavak ne fagyjanak be. Természetesen keményebb telek esetén a madarak kénytelenek a távolabbi, jégmentes vizeket felkeresni, amit számos, Lengyelország különböző területein jelölt madár magyarországi, illetve Magyarországon jelölt hattyúk észak-németországi, dániai, baltikumi megfigyelése is bizonyít. A telelőhelyet váltó egyedek esetén a különböző években felkeresett telelőhelyek közötti távolság nagy százalékban kevesebb volt, mint 100 km, kisebb arányban meghaladta a 200 km-t, és csak elvétve fordult elő 600 km-nél nagyobb elmozdulás (Albert és mtsai., 2004). Az általunk vizsgált, H5N1 pozitívnak bizonyult, Nagybaracska térségéből származó hattyúk között találtunk két szerb, belgrádi jelzésű gyűrűvel ellátott egyedet, de sajnos a zömük gyűrűzetlen volt. Mi tehát mintegy 200 km-es vándorlást igazolhatunk. A virológiailag negatív egyedek közt azonban találtunk fehérorosz, lengyel, horvát gyűrűvel ellátottakat, melyek 688, 644 illetve 124 km-es vándorlásokat bizonyítanak.

A Fekete-tengeri, közép-ázsiai metapopuláció nagyobb mértékben vándorol. A szárazföld belseje felől a populáció nagy része dél felé, a Fekete-tenger partjára vonul télre, ám egy kisebb hányaduk eljut a Duna deltához, Törökországba, a Balkán félszigetre illetve Dél-Olaszországba (Delany, 2006).

A magyarországi populáció nagysága a 1970-ben történő első hivatalosan megállapított fészkeléstől, nyugatról keleti irányban, különösen a 90-es évek közepétől, jelentősen emelkedik. Éppen a jelen járványban leginkább érintett Bács-Kiskun megyében volt a legnagyobb mértékű a növekedés. A hazai állományt 2002-ben 275-300 párba becsülték. Az állomány 75%-a a Dunántúlon (Balaton, Velencei-tó, Szigetköz, Fertő-tó) él, a Duna-Tisza közén pedig Bács-Kiskun megyében él a legnagyobb populáció (Albert és mtsai., 2004). Az elhullott 165 hattyú mindenképpen nagy (kb. 25%-os) veszteséget jelentett a hazai bütykös hattyú populációban.

Kísérletes hattýúfertőzések során bizonyították, hogy a bütykös hattýú a fertőzés utáni napon már nagy titerben üríti a vírust, miközben a klinikai tünetek csak az 5-7. napon mutatkoznak. Tehát a lappangási idő alatt akár jelentős távolságokra elhurcolhatják a fertőzött állatok a vírust (Brown és mtsai., 2008). Az előbbi fertőzésnél használt 10^6 EID₅₀ és egy, két nagyságrenddel kisebb dózis összehasonlításával a nagy dózisú csoportban hasonló eredményeket kaptak (4-9 napos lappangási idő, 1-6 napos vírusürítés), míg a kis dózisúban 7-14 napos lappangás és 3-15 napos vírusürítés mellett túlélő egyed is volt, melyben megszűnt a vírusürítés (Kalthoff és mtsai., 2008). A lefolyás tekintetében nem volt különbség az intranazálisan és a kontakt úton fertőzött, valamint az első esetben használt 5-6 hetes növendék illetve a második esetben fertőzött 1-4 éves felnőtt egyedek között, nincs tehát korhoz kötött érzékenységbeli különbség a bütykös hattýúban.

Ha pontos adataink lennének a Fekete-tenger térségéből Dél-Európába vándorló populáció nagyságáról, megítélhetnénk, hogy a 7-14 napos lappangási idővel számolva, egymásnak átadva a vírust, néhány életben maradó állat eljuttathatja-e térségünkbe. A kísérletes fertőzések tükrében azonban nem lehet kétséges, hogy az Európába eljutott HPAIV elterjesztésében a bütykös hattýúnak jelentősége lehet.

Delany (2006) kiemeli, hogy Horvátország és Magyarország határterülete egyben a két fő metapopuláció határa is, ahol azok egyedei találkozhatnak a telelés során. Felvetődik annak lehetősége, hogy szerepet játszhatott-e a járvány terjedésében az európai populáció teljes védtelensége, szemben az Ázsia felől érkező, másik metapopuláció egyedeinek esetleges részleges immunitásával.

A H5N1 HPAI ázsiai vonalába tartozó törzs Európába juttatásában nagyobb szerepet játszhattak különböző kacsafajok, különösen a tőkésréce. Hulse-Post és munkatársai (2005) kísérletesen fertőztek a H5N1 – 2002 után járványt okozó – vírusával tőkésrécéket és azt tapasztalták, hogy az állatok túléltek a fertőzést és akár 17 napig ürítették a vírust. A kacsafajban a kórokozó csökkent patogenitását tapasztalták, ugyanakkor az továbbra is fatális kimenetelű kórképet okozott házityúokban. A vírus viselkedése egyensúly – kórokozó-gazda adaptáció – kialakulására enged következtetni a kacsában. Ez a H5N1 HPAIV rezervoár szerep lehetővé teszi a nagyobb, akár interkontinentális, távolságokra történő vírushurcolást.

Egy másik kísérletes fertőzés során különböző vadon élő kacsafajokat hasonlítottak össze, és itt is az úszóréce, köztük a tőkés réce, bizonyultak a legkevésbé érzékenyek a fertőzésre. E faj egyedei ürítették a legnagyobb mennyiségben a vírust, miközben klinikailag tünetmentesek maradtak, ami lehetővé teszi a HPAI vírusok nagy távolságokra való elhurcolását. A bukóréce – a hattýúhoz hasonlóan – szentinelnek tekinthetők, ugyanis bennük a hattýúhoz hasonló mortalitással, súlyos tünetekkel és kórbonctani elváltozásokkal járó kórkép jelentkezett, ami lehetetlenné teszi a vírus további terjesztését (Keawcharoen és

mtsai., 2008). Munster és munkatársai (2005) felhívják a figyelmet, hogy a tőkésrécek őszi, dél felé tartó vándorlásuk során számos, H5 és H7 szubtypusú LPAI vírust hurcolhatnak magukkal. Ezek közül minden, 1997 után jelentkező HPAI járvány során izolált törzs (az olaszországi, 1997-es H5N2, az 1999-2000-es H7N1, valamint a hollandiai, 2003-as H7N7) LPAIV rokonát megtalálták. A tőkés réce tehát LPAIV terjesztőként és rezervoárként is szerepet játszhat HPAI járványok kirobbantásában, mivel a H5, H7 LPAI vírusok magas patogenitásra tehetnek szert.

Az LPAI vírusok kacsákban endémiásak, míg lúdalkatúakban, így a hattyúban is, csak időszakos patogének. Utóbbiak azonban a telelési helyükre való vándorlásuk során részben azonos pihenőhelyeket használnak, ahol lehetőség nyílik a vírus átadására a különböző fajok közt. A vonulásokra jellemző, hogy a madarak sokkal több időt töltenek táplálkozással és a további felkészüléssel, mint repüléssel, így időt engedve a fertőzés fajok közti terjedésének. A tőkésréce is jellemző az Észak-Európából és Belső-Ázsiából Dél-Európába történő vándorlás a tél beálltával, mely útvonal részben fedi a bütykös hattyút. Könnyen elképzelhető, hogy a kacsában alacsonyabb patogenitásúként viselkedő H5N1 vírust, az LPAI vírusokhoz hasonlóan, eljuttathatta Európába. Itt a bütykös hattyú, szentinelként gyorsan jelezte a HPAI jelenlétét. Az „örsem” szerepre alkalmassá teszi mérete és színe is, másrészt az a tény, hogy nyílt, jól megfigyelhető vízfelületeken él (Olsen és mtsai., 2006). Az általunk tapasztalt igen heveny lefolyás a bütykös hattyúban szintén inkább azt feltételezi, hogy hazánkba is más fajokkal került be a kórokozó. A pontos fertőzési forrás azonban egyelőre tisztázatlan.

LPAI vírusok terjesztésében regionális és európai szinten mindenképp számításba kell venni a bütykös hattyút, de a jelen járvány során tapasztaltak alapján HPAI vírusok jelentős távolságra való (kontinensek közötti) elhurcolására, a heveny lefolyás miatt, gyakorlatilag nem kell számítanunk. A kísérletes eredmények tükrében viszont regionális szinten szerepük lehet HPAI vírusok terjesztésében is. Az európai és a hazai bütykös hattyú populáció nagysága mindenképpen felveti annak szükségességét, hogy egy területen tömeges bütykös hattyú elhullásokat tapasztalva, legelőször a HPAI jelenlétét kell kizárni.

Azt gondoljuk, hogy megfigyeléseink fontos adatot szolgáltatnak a hattyú, H5N1 HPAIV járványtanában betöltött szerepének értelmezéséhez. A bütykös hattyú növekvő egyedszámából és „örsem” szerepéből adódóan, megbízhatóan jelzi egy területen a HPAIV jelenlétét, de a fertőzés terjesztésében elsősorban kisebb távolságokon belül, valamint más fajok fertőzése révén van szerepe.

2. Fejezet

A madárinfluenza patomorfológiája és diagnosztikája házilúdban, pekingi és mulard kacsában

2.1. Anyag és módszer

2.1.1. Minták és mintavétel

A madárinfluenza H5N1 altípusú vírustörzse okozta hazai járvány vadmadarakat érintő első hullámának lecsengése után még két hullámban jelentkezett. 2006 június-júliusában Bács-Kiskun megyében és 2007 januárjában Csongrád megyében, házi víziszárnyasokkal sűrűn betelepített régióban, összesen 15 lúd- és 15 kacsá- (11 pekingi és 4 mulard) állomány betegedett meg. A lúdállományok létszáma általában 1000 és 5000 között, a kacsállományoké pedig 3000 és 30000 között változott. Előfordultak azonban kislétszámú (30-100 egyed tartó) háztáji állományok is, köztük egy olyan vegyes állomány, melyben házityúk és gyöngytyúk is megbetegedtek.

Diagnosztikai vizsgálatra általában állományonként 3-5 állat (összesen 66 lúd és 71 kacs) került. A vizsgált állatok a járvány első napjaiban hullottak el, esetenként élő, moribund állapotban küldték azokat diagnosztikai vizsgálatra.

2.1.2. Kórbonctan, kórszövetten, immunhisztokémia

A részletes kórbonctani vizsgálat során 10 %-os, pufferolt formaldehid oldatban fixáltuk minden vizsgált állomány 1-3 egyedének agyvelő, szív, hasnyálmirigy és tüdő mintáit, esetenként kiegészítve a légcső, a lép, a máj, a vese, a vékonybél, valamint mellizom és bőr mintákkal. A szervdarabokat paraffinba ágyasztuk, majd a metszeteket hematoxin-eozinnal festettük. Immunhisztokémiai vizsgálatot a korábban leírtak (1.2.2.) szerint, jellegzetes kórbonctani és kórszövetten elváltozásokat mutató 6 lúd, 6 mulard kacs és 5 pekingi kacs egyednél végeztünk, kiegészítve légcső, lép, máj, vese, vékonybél, esetenként vázizom és bőr mintákkal.

2.1.3. Vírusizolálás és meghatározás

Az 1.2.3. pontban leírt, hattyú esetében alkalmazott módszer szerint jártunk el.

2.1.4. Reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció

Az 1.2.4. pontban leírt, hattyú esetében alkalmazott módszer szerint jártunk el.

2.2. Eredmények

A fertőzött lúd- és kacsáállományokban a naponkénti elhullások száma meredeken emelkedett. Ahol rendelkezünk kórelőzményi adattal, ott jellemző volt a napi 1-2 elhullás következő napra 20, majd 50, 100-ra való emelkedése. Mivel a járvány előrehaladtával már a tízszeres elhullás növekedés esetén megtörtént a beküldés és a leölés, a betegség állományszintű lefolyásának nyomon követésére nem volt lehetőség. Az érintett kacsák életkora 4-8 hét, a ludaké 3 hét és 5 év között volt.

A klinikai tünetek a túlhevény esetekben hiányoztak, az állatokat előzetes tünetek nélkül elhullva találták. Azokban az esetekben, amikor az állatok néhány napig betegek voltak, bágyadtságot, étvágytalanságot (a takarmányfogyasztás drasztikus csökkenését), elesettséget, egyensúlyzavart, orrfolyást, könnyezést és gyakran idegrendszeri tüneteket (rendellenes fejtartást, fejremegést, fejdaltartást, valamint szárny- és lábbénulást) lehetett megfigyelni (36., 37. kép). Ezek a tünetek 1-2 napon belül nagyszámú állaton mutatkoztak. Bőrvérzéseket, bőrelhalást, cyanosist vagy a bőralatti kötőszövet oedemas beivódását a megbetegedett ludakon, kacsákon nem észleltünk. Nem mutatkozott szembetűnő duzzanattal járó orrmelléküreg-gyulladás sem.



36. kép: Idegrendszeri tünetek (rendellenes fejtartás, nyaktekergetés, szárnybénulás) H5N1 vírussal fertőződött mulard kacsákban



37. kép: Orrfolyás és könnyezés H5N1 vírussal fertőződött mulard kacsában

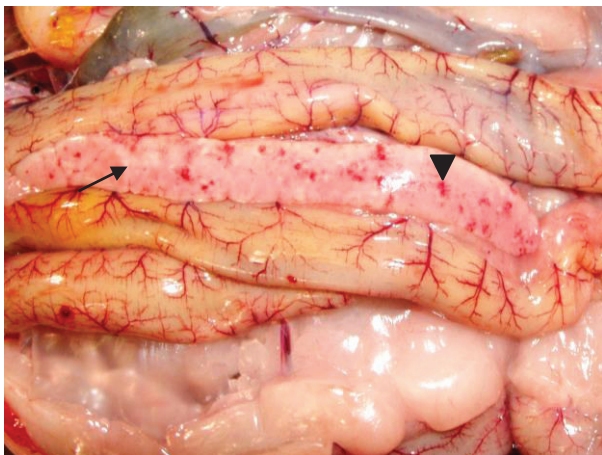
2.2.1. Kórbonctan, kórszövettan, immunhisztokémia

Kórbonctani vizsgálattal a lúd- és kacshullákban hasonló elváltozások voltak, de a ludakban ezek súlyosabb és kiterjedtebb formában mutatkoztak. Az elváltozások gyakoriságában nem volt szignifikáns eltérés a fajok között (2. táblázat).

2. táblázat: A madárinfluenza erősen virulens (H5N1 altípusú) vírustörzse által előidézett kórbonctani és kórszövettani elváltozások gyakorisága ludakban és kacsákban (%).
(A diagnosztikai szempontból fontos leletek kiemelve)

	ELVÁLTOZÁSOK	LÚD, KACSA (PEKINGI ÉS MULARD)		
KÓRBONCTAN	Tápláltsági állapot:	- közepes vagy jó - közepesnél gyengébb	30 70	
	Orr:	- orrgyulladás - orrmelléküreg gyulladás (sinusitis)	60 20	
	Szem:	- kötőhártyagyulladás	80	
	Hasnyálmirigy:	- vérzések - 2-4 mm átmérőjű, szürkés-fehér góccok	70 60	
	Szív:	- vérzések az epicardium alatt - savófelhalmozódás a szívburokban - szürkésfehér góccok	70 60 20	
	Tüdő:	- bővérűség - oedema	35 25	
	Légzsák:	- savófelhalmozódás	10	
	Légcső:	- nyálkahártya oedema	20	
	Mirigyegyomor:	- vérzések	30	
	Bél:	- hurutos tartalom	100	
	Lép:	- duzzanat	20	
	Vázizom:	- vérzések	10	
	KÓRSZÖVETTAN	Agyvelő:	- lymphocytas agyvelő- és agyhártyagyulladás - perivascularis vérzések	95 10
		Szív:	- gócos szívizomelfajulás - lympho-histiocytas gyulladás	30 50
		Hasnyálmirigy:	- elhalásos góccok / térképszerű elhalások - lympho-histiocytas gyulladás	70 30
		Tüdő:	- bővérűség - interstitialis oedema - interstitialis, lympho-histiocytas beszűrődés	35 25 50
		Légcső:	- oedema a nyálkahártyában - lympho-histiocytas beszűrődés a nyh-ban	20 6
Máj:		- interstitialis, lympho-histiocytas gyulladás - solitaer májsejtelhalások	70 30	
Bél:		- desquamativ hurutos gyulladás - vérzések	100 60	
Vázizom:		- gócos izomrost-elfajulás, elhalás - vérzés	10 20	
Lép		- lymphocytas-kiürülés, -elhalás	100	

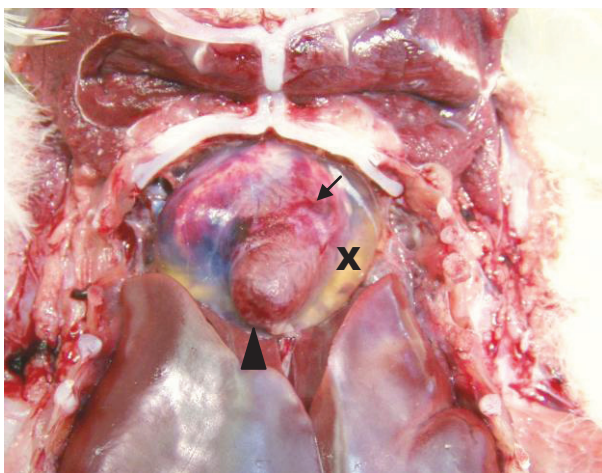
Az állatok a túlhevény esetekben közepes, a félhevény esetekben a közepesnél kissé gyengébb kondícióban voltak. A kötőhártya erezetesen belövellt, a szemgolyók beesettek voltak, gyakran látszottak az exsiccosis jelei. A szem- és az orrnyílások környékén általában kevés savós váladék mutatkozott. Számos állat esetében a kloáka környéke híg bélsárral volt szennyezett. Bőrvérzések, bőrelhalás vagy a bőralatti kötőszövet oedemas beivódása nem fordult elő. Az izomzatban vérzések csak ritkán mutatkoztak. A hasnyálmirigyben jellemzően vérzéseket és elhalásos gócot találtunk (38., 39. kép). A szívburokban a szabad tartalom esetenként megszorodott, az epi- és pericardiumban gyakran vérzések látszottak (40. kép), a szívizomzat pedig sávokban szürkésfehér színű volt. A tüdő rendszerint bővérű volt, a légcső nyálkahártyája többnyire intakt volt, csak ritkán mutatott enyhefokú bővérűséget és oedemas beivódást. Az emésztőcsatornában csak kismennyiségű tartalom volt és a belek nyálkahártyájában elvétve lehetett csak néhány vérzést megfigyelni. A bélcsatorna nyálkahártyája minden esetben duzzadt volt és hurutos nyálka fedte. A lép rendes vagy esetenként kissé duzzadt, a máj gyakran fakóbarna, mállékony, a vesék bővérűek voltak.



38. kép: Elhalások (→) és vérzések (▼) házilúd hasnyálmirigyében



39. kép: Térképszerű elhalások (→) házilúd hasnyálmirigyében



40. kép: A szívburokban savófelszaporodás (X), pericardialis (→) és epicardialis vérzések (▲) pekingi kacsában

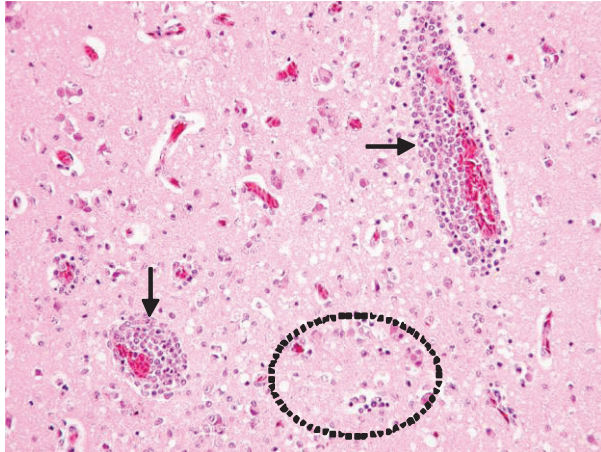
Kórszövetani vizsgálattal az agyvelőben, a ludaknál és a kacsáknál is csaknem minden egyedben, egy vagy több körülírt területen (agytörzs, agykéreg illetve kisagyvelő), lymphohistiocytas vérér körüli beszűrődéseket, gócos vagy kiterjedt gliasejt-sarjadzást, idegsejt-elfajulást illetve -elhalást és gócosban a lágyagyburok lymphohistiocytas beszűrődését lehetett felismerni (**41. kép**). Néhány esetben friss keletű perivascularis vérezések is mutatkoztak (**42. kép**). A hasnyálmirigyben körülírt illetve térképszerűen összefolyó elhalások látszottak, melyeket gyakran reaktív lymphohistiocytas gyulladás is kísért, valamint az interstitiumban is megfigyelhető volt hasonló gócos gyulladással járó sejtes beszűrődés (**49. kép**). A szívizomzatban az esetek egy részében körülírt területeken az izomrostok elfajulása és lymphocytakból, valamint histiocytakból álló gyulladással járó beszűrődés mutatkozott (**51. kép**). A májban többnyire a kötőszövet lymphohistiocytas gyulladással és esetenként a parenchyma gócos elhalásával lehetett megfigyelni. A tüdőben pangásos bővérűség, interstitialis oedema és ritkán körülírt, hurutos gyulladás, olykor lymphohistiocytas beszűrődés látszott. A légcső nyálkahártyájában oedemat, esetenként lymphohistiocytas beszűrődést, a bélcsatorna nyálkahártyájában hurutos gyulladást, a lép Malpighi-testjeiben a lymphocyták megfogyását, a vöröspulpában vérezéseket lehetett gyakran észlelni. A vesében egyes csatornaszakaszok hámsajtjeinek megduzzadása, a vázizomzatban pedig ritkán diapedesises vérezések, egyes izomrostok megduzzadása, szerkezetük elmosódása volt még felismerhető.

Immunhisztokémiai technikával a vizsgált 6 lúd, 6 mulard kacs, valamint 5 pekingi kacs közül valamennyiben sikerült kimutatni az A típusú influenzavírus antigént.

Az agyvelő vizsgálata során az összes egyedben kimutatható volt a vírusantigén a nagyagyvelőben, az agytörzsben és a kisagyban egyaránt. Lúd esetében mindhárom agyvelőrészen számos sejt adott pozitív reakciót nagy, összefüggő területeken, mulardoknál azonban csak körülírt területeken, kisszámú fertőzött sejt mutatkozott. Pekingi kacsák esetében kizárólag az ependymara szorítókozóan találtunk antigént tartalmazó sejteket, és egy egyedben a lágyagyburok is pozitív volt. A vírusantigén elsősorban a sejtmagban fordult elő, míg a cytoplasmában csak ritkán lehetett azt megfigyelni (**43-48. kép**). A pekingi kacsák egyéb, vizsgálat alá vont szervei negatívak voltak. A ludak és mulard kacsák tüdő, szív, máj és lép mintáiban közel azonos arányban és mennyiségben találtunk vírusantigént. A lúd hasnyálmirigy-mintákban nagyobb arányban és jóval nagyobb mennyiségben találtunk nukleoprotein antigént, a légcső esetében viszont csak mulardok esetében találtunk pozitív mintát (**50., 52-57. kép; 4. táblázat**).

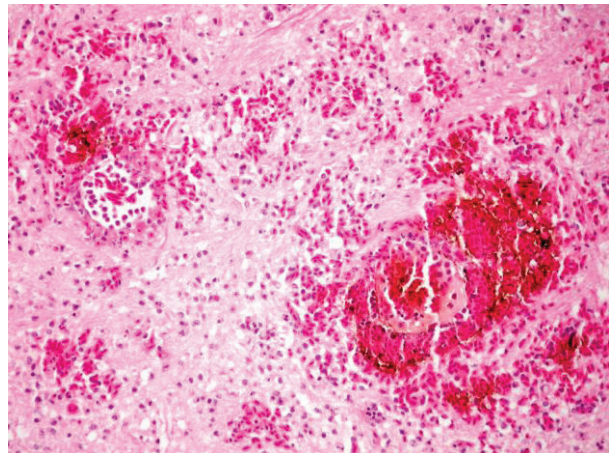
A vírus nukleoprotein antigénje számos sejttípus cytoplasmájában, de jellemzőbben azok sejtmagjában volt kimutatható. Ilyenek voltak az agyvelő ideg-, glia-, ependyma- és Purkinje sejtjei, a szív illetve vázizom myocytái, a vérerek falának myocytái és endothel sejtjei, a

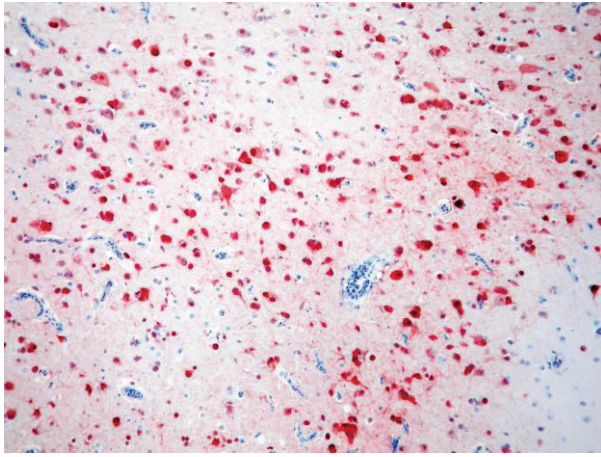
hasnyálmirigy mirigyvégkamráinak hámsejtjei, a mononuclearis phagocytá rendszer sejtjei, a májsejtek, a vese tubuláris epithel sejtjei, a tüdő levegőkapillárisait és parabronchusokat béleelő respirációs hámsejtek, az interstitiumban lévő MPS sejtjei, a lép reticulumsejtjei, a lépgerendák simaizomsejtjei, MPS sejtjei, valamint a vékonybél nyálkahártya propria rétegének lymphoid sejtjei, simaizom elemei és a plexus submucosus idegsejtjei.



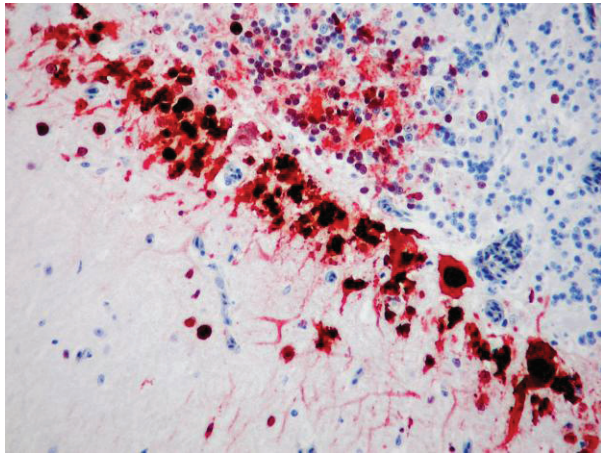
41. kép: *Lympho-histiocytas perivascultis* (→) és *gliasejt sarjadzás* (○) házi-lúd agyvelejében
HE., 100x

42. kép: Vérzések az agyvelő károsodott falú vérerei körül, házilúd agyvelő
HE., 100x

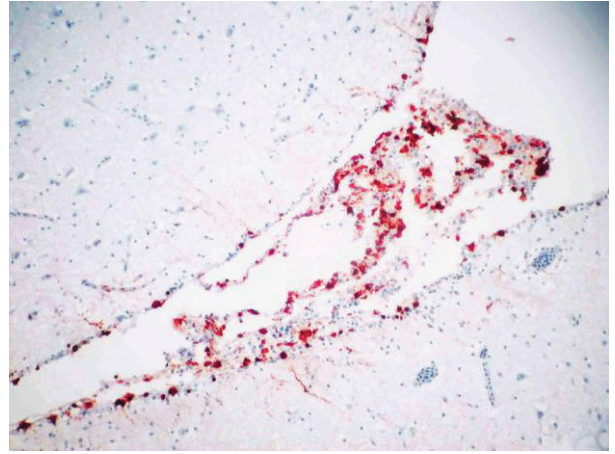




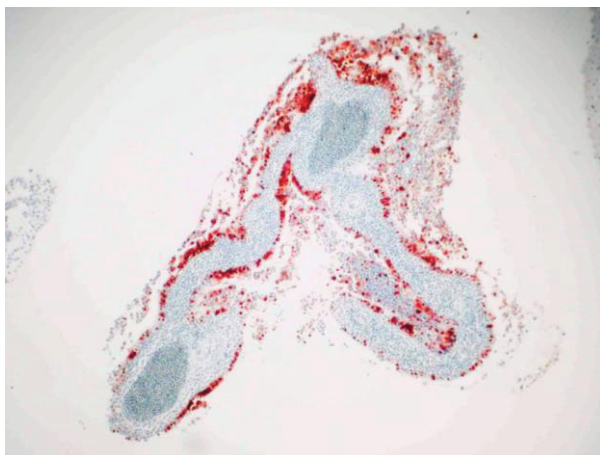
43. kép: Nagy, összefüggő területeken vírusantigén-pozitív neuronok és gliasejtek házilúd nagyagyvelőben
IH., 100x



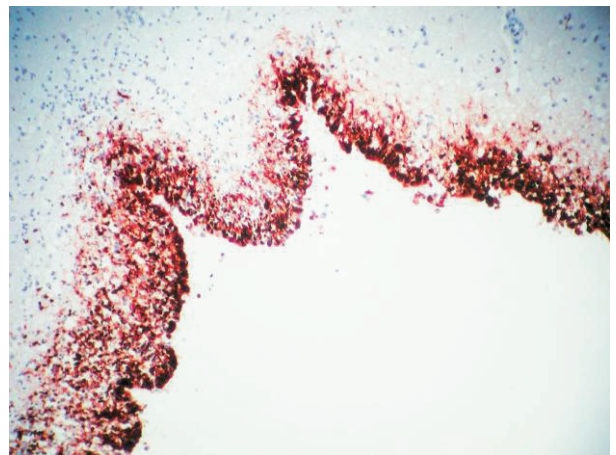
44. kép: Az influenza-vírus a Purkinje-sejtek magjában nagy-mennyiségben van jelen, de kimutatható a cytoplasmában és az axonokban is házilúd kisagyvelőben
IH., 200x



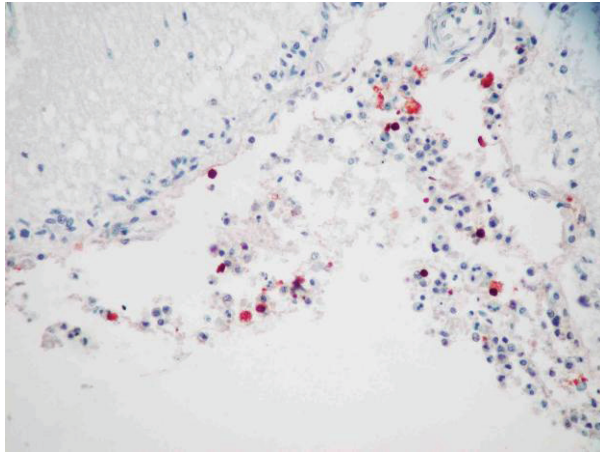
45. kép: Az ependyma-sejtek magjában nagymennyiségű influenzavírus antigén pekingi kacsában
IH., 200x



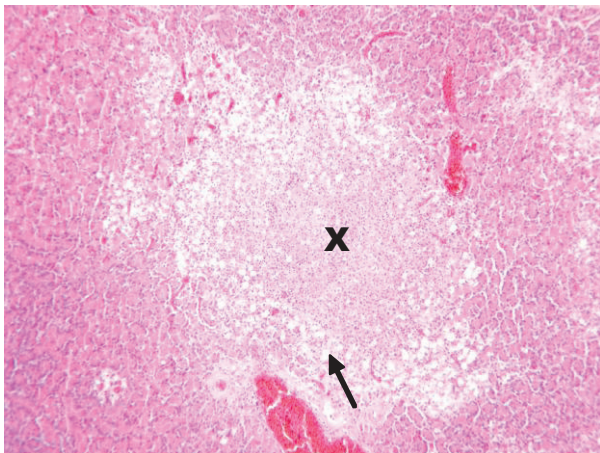
46. kép: A plexus chorioideust borító ependymában nagymennyiségű fertőzött sejt pekingi kacsá agykamrájában
IH., 100x



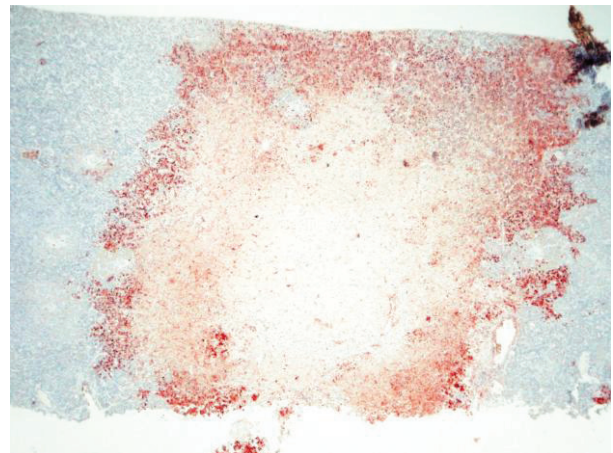
47. kép: Az agykamrát bélelő ependyma és a szomszédos területek nagymennyiségű vírusantigént tartalmaznak mulard kacsá nagyagyvelőben
IH., 200x



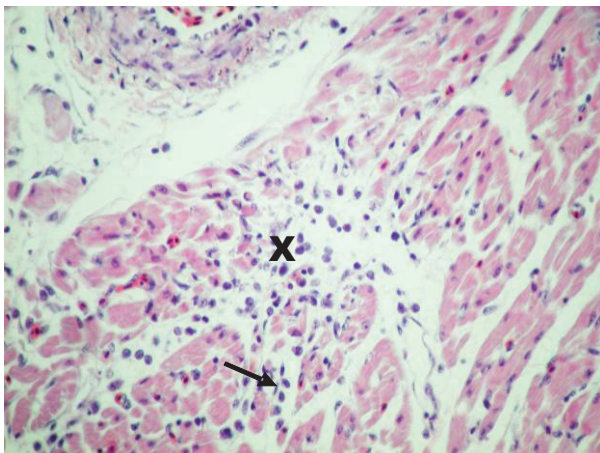
48. kép: A kisagyvelőt borító lágyagyburok körülírt területen néhány fertőzött mononuclearis sejtet tartalmaz pekingi kacsában
IH., 400x



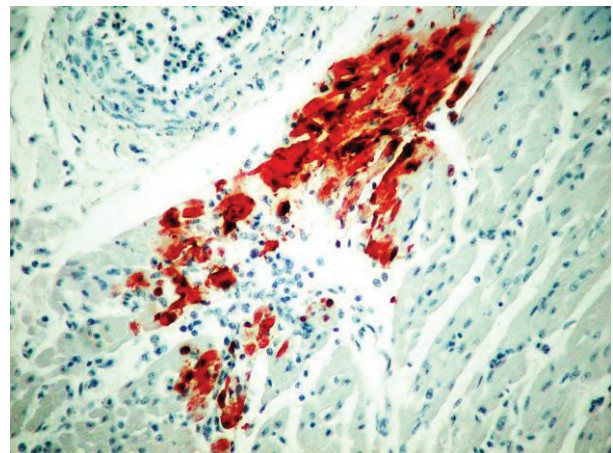
49. kép: Körülírt elhalás (X), a környező parenchyma sejtek vacuolisatiója (→), házikacsa hasnyálmirigy
HE., 100x



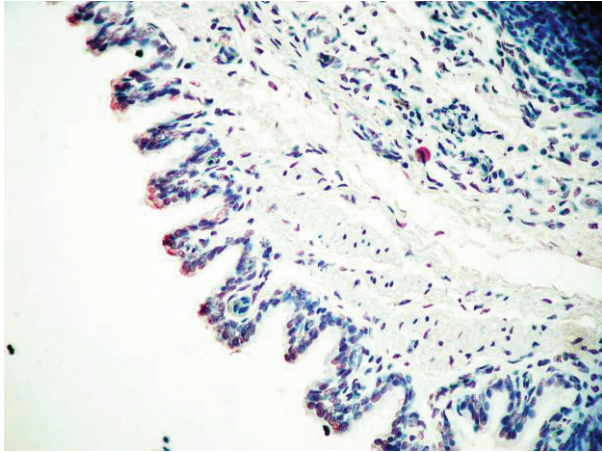
50. kép: Terjedelmes elhalás széli területén nagymennyiségű fertőzött mirigyhámsejt, házilúd hasnyálmirigy
IH., 40x



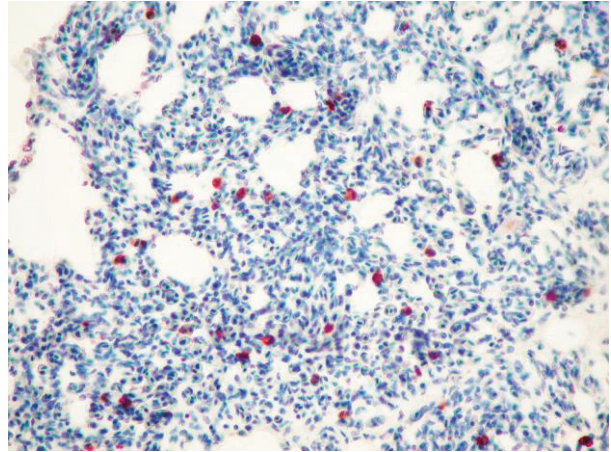
51. kép: Gócos izomrost-elfajulás (X) és lympho-histiocytas beszűrődés (→), házilúd myocardium
HE., 400x



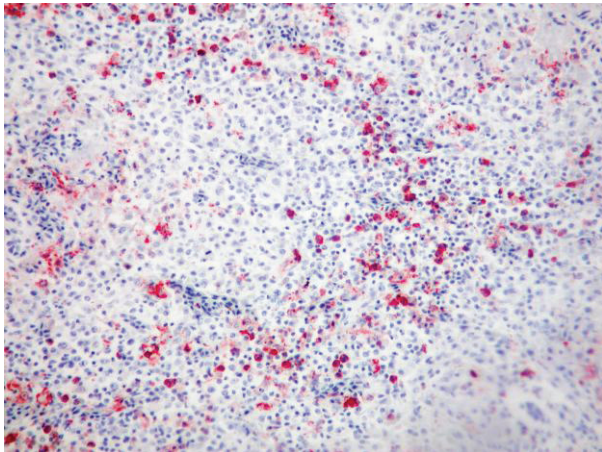
52. kép: Nagymennyiségű vírusantigén mutatható ki az 51. képen látható elhalásos góc szomszédságában lévő, károsodott myocytakban
IH., 400x



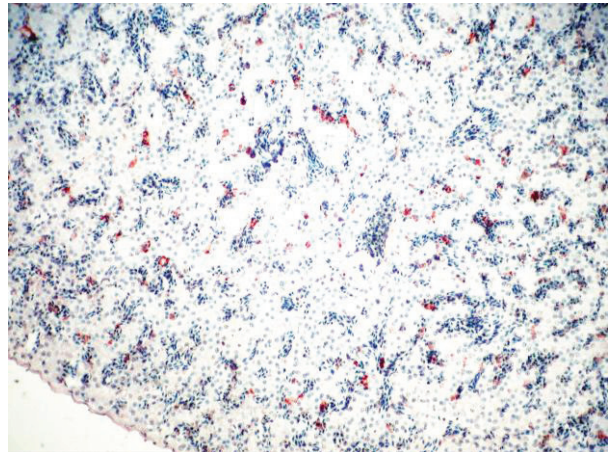
53. kép: A bronchus hámsejtek közepes mennyiségű vírusantigént tartalmaznak mulard kacsában
IH., 400x



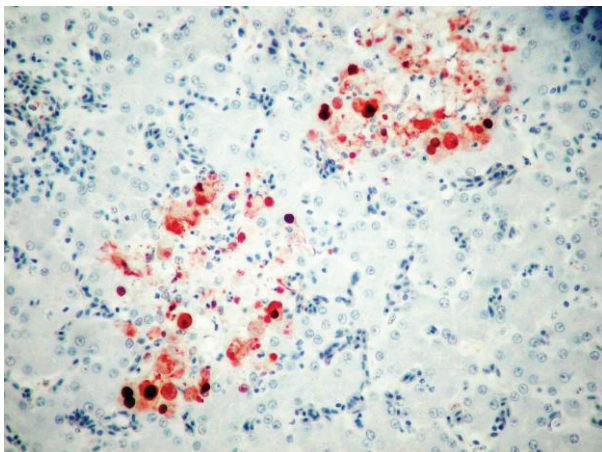
54. kép: A pericapillaris kötőszövetben lévő MPS sejtekben kimutatható a vírusantigén mulard kacsá tüdejében
IH., 400x



55. kép: Nagyszámú fertőzött monocyta mulard kacsá lépben
IH., 100x



56. kép: Diffúzan, közepes mennyiségű vírusantigén a máj Kupffer-sejtjeiben mulard kacsában
IH., 200x



57. kép: körülírt területen nagyszámú nukleoprotein antigén mutatható ki a májparenchyma elhalásainak széli területein lévő májsejtben és MPS sejtekben házilúdban
IH., 400x

Rutin bakteriológiai vizsgálattal az esetek túlnyomó többségében kórokozó baktériumokat nem lehetett kimutatni. Néhány esetben a májból és a szívvérből *E. coli* baktériumokat izoláltunk.

2.2.2. Vírusizolálás, meghatározás, molekuláris biológia

Vírusizolálással, valamint szekvenálással is megerősített PCR-vizsgálatok alapján valamennyi vizsgált madárban (ludakban, pekingi kacsákban és mulard kacsákban) a H5N1 madárinfluenza vírus magas patogenitású törzsének jelenlétét állapítottuk meg. A 2006. június-júliusi járvány során mulard kacsából, pekingi kacsából és lúdból izolált törzsek különböztek a vadmadaraktól kimutatott HUN1 és HUN2 csoportba tartozó izolátumoktól, így egy külön HUN3 csoportba soroltuk azokat. A 2007. januári izolátumok szintén egy külön genetikai ágba tartoznak, melyet HUN4 csoportnak nevezünk (Szeleczy és mtsai., 2009, Id.: Melléklet).

2.3. Megbeszélés

A 2003 végén és 2004 elején délkelet-ázsiai országokban (Kambodzsában, Kínában, Indonéziában, Japánban, Laoszban, Dél-Koreában, Thaiföldön és Vietnamban) lezajlott madárinfluenza járvány során a H5N1 vírus tömegesen elpusztította a különféle vadon élő és háziiasított víziszárnyasokat. Ebben a térségben mintegy 100 millió madár hullott el vagy került kiirtásra (Oyana és mtsai., 2006). A H5N1 vírusnak ez a változata Közép-Ázsiában, a Közel-Keleten és több afrikai országban is megjelent, és főként az *Anseriformes* rend néhány tagjában okozott elhullásokat (énekes és bütykös hattyú, kanadai lúd, indiai lúd, kontyos réce). Ragadozó madarak, sirályok csak kivételesen betegedtek meg. (Sabirovic és mtsai., 2006). A 2006. év első negyedében a H5N1 járvány magyarországi első hulláma vadmadár – főként hattyú - elhullásokat okozott. Ezt követte a járvány második hulláma 2006. június 7-től július 9-ig, Bács-Kiskun megye középső és déli részén (Kiskunmajsa-Bodoglár, Móricgát, Szank, Petőfiszállás, Jászszenlászló), majd 2007. január 21. és 25. között a harmadik hullám, mely Csongrád megyében (Szentés-Lapistó, Derekegyház-Ördöngös) jelentkezett. Az utóbbi két járványkitörés során házi víziszárnyas fajok (lúd- és kacsállományok) voltak érintettek.

A hazánkban előfordult lúd- és kacsaelhullások vizsgálata során – hasonlóan a hattyúban észleltekhöz – olyan kórbonctani és kórszövettani elváltozásokat találtunk, amelyek gyors lefolyású heveny megbetegedésre voltak jellemzőek. A hattyúk nagy többsége közepes-átlagos kondícióban volt, ami esetükben hevenyebb lefolyásra enged következtetni, mint a házi víziszárnyasok esetében, ahol az állatok zöme az átlagosnál gyengébb kondíciójú volt. Hasonlóan elhúzódóbb kórlefoyasra enged következtetni a házi víziszárnyasok esetében kialakuló felsőlégúti elváltozások (conjunctivitis, rhinitis; Pálmai és mtsai., 2006, 2007, Ivanics és mtsai., 2007 a,b).

Az idegrendszeri tünetek rendszeresen és jellegzetes formában jelentkeztek. A kórbonctani-kórszövettani elváltozások hasonlóak voltak azokhoz, amilyenekről a szakirodalom a HP madárinfluenza esetén beszámol (Acland és mtsai., 1984, Alexander, 1982, 1993, 2000 b, Kobayashi és mtsai., 1996, Swayne és Halvorson, 2003, 2008, Swayne és Suarez, 2000). Bőrelváltozások (cyanosis, oedema, vérzés, elhalás) azonban a háziiasított víziszárnyasokon nem mutatkoztak. Az idegrendszeri tünetek hátterében lymphocytas agyvelőgyulladás volt megállapítható. A hazai víziszárnyas állományok egyedeinek nagyszámú megbetegedésére magyarázatul szolgálhat az extenzív tartástechnológia, amely igen jellemző volt a hazai víziszárnyas tartásban. Ennek sajátossága a ludak és a házikacsák nagy területeken való szabadtartása, ami olyan kis tavakkal való közvetett vagy közvetlen érintkezést is magában foglal, amelyekhez a vadon élő víziszárnyasok is szabadon hozzáférnek. Ez jelenthette a házi víziszárnyasok fő fertőzési forrását. Songserm és munkatársai (2006) a thaiföldi járvány

során szintén a nyílt és félig nyitott tartásmódot találták a madárinfluenza vírusfertőzés szempontjából a leginkább érintettnek. Zárt tartásra áttérve a helyzet jól kontrollálhatóvá vált, noha ezzel összefüggésben olyan egyéb, súlyos állategészségügyi problémák jelentkeztek számos tenyészetben, mint az intestinalis spirochaetosis (Nemes és mtsai., 2006).

A madárinfluenza-vírus IH módszerrel történő kimutatásáról ludakban tudomásunk szerint eddig csak kisszámú adat ismert (Perdue és mtsai., 1999, Capua és Mutinelli, 2001, Perkins és Swayne, 2003, Brown és mtsai., 2008, Neufeld és mtsai., 2009). A H5N1 altípusú vírus elsősorban a központi idegrendszerben, jellegzetes szöveti elváltozások kíséretében volt kimutatható. Ez megegyezik egyes madárfajokban (kacsában, varjúban, galambban), mások által észlelt víruslokalizációval, és további megerősítő adat a H5N1 altípusú HPAI vírus neurotrop tulajdonságához (Antarasena és mtsai., 2006, Ellis és mtsai., 2004, Klopfleisch és mtsai., 2006, Tanimura és mtsai., 2006, Szeredi és mtsai., 2007). Pekingi kacsákban ugyanakkor IH-val csak kis mennyiségben, az agyvelőben, az agykamrákat bélelő ependymában volt lehetséges a vírusantigént kimutatni. Mulard kacsában a lúdhöz képest kevesebb szervben és kisebb mennyiségben, de a pekingi kacsával szemben az agyvelőn kívül, egyéb szervekben is sikerült a vírust kimutatni, annak ellenére, hogy a H5N1 vírus a negatív szervekből is izolálható, az általa létrehozott szöveti elváltozások (agyvelőgyulladás) pedig kimutathatóak voltak. Az agyvelőben észlelt szövettani elváltozások, összevetve a ludakéval, itt enyhébbek voltak. A kacsafélék H5N1 altípussal szembeni eltérő érzékenységét mások is megfigyelték (Perkins és Swayne, 2003, Antarasena és mtsai., 2006, Keawcharoen és mtsai., 2008).

Amerikai szerzők (Perkins és Swayne, 2003) különböző fajok érzékenységét vizsgálták az 1997-ben, Hongkongban izolált H5N1 vírustörzsszel szemben. Megállapításaik szerint a vírustörzs a háziasított és a vadon élő tyúkféléket (7 különböző faj egyedeit) 100%-ban ölte meg. Az egyéb vizsgált fajok közül azonban a ludakat és a kacsákat nem pusztította el. A ludak megbetegedtek és bennük a madárinfluenza vírusa patológiai elváltozásokat idézett elő, míg a pekingi kacsák nem betegedtek meg és szerveikben makroszkópos elváltozásokat sem lehetett találni. A kacsa a lúddal összevetve kisebb érzékenységűnek mutatkozott, mivel abban makroszkópos elváltozások nem alakultak ki, a szövettani elváltozások enyhébbek voltak és a kimutatható vírusantigén és a visszaizolálható vírus titere is alacsonyabb volt.

A 2003-2004. évi délkelet-ázsiai járvány során, valamint a 2006. évben hazánkban is, a H5N1 vírus már heveny – félheveny lefolyással okozott elhullásokat különböző fajú víziszárnyasokban (Oyana és mtsai., 2006, Pálmai és mtsai., 2006). Hazai vizsgálataink során a kórbonctani és kórszövettani elváltozások megfeleltek a madárinfluenza erősen virulens vírustörzsei hatásaként leírt elváltozásoknak, és minden esetben idegrendszeri tünetek és elváltozások is kialakultak. A hazai víziszárnyas (liba, pekingi kacsa, mulard kacsa) állományokban lezajlott H5N1 vírus okozta megbetegedések morbiditási és

mortalitási adatainak állományszintű meghatározására a hatósági intézkedés (kiirtás) miatt nem volt lehetőség. Fertőzési kísérletet eddig nem végeztünk. Emberi megbetegedés nem történt.

Az igénybevett diagnosztikai módszerek közül a hagyományosnak tekinthető kórszövettani vizsgálat (agyvelőgyulladás megállapítása) adott leggyorsabban pozitív eredményt. Kóroktani diagnózishoz immunhisztokémiai, vírusizolálási, valamint a PCR módszerrel jutottunk.

A Bodogláron izolált vírustörzs (HUN3) különbözött a H5N1 járvány első – hattyúkat érintő – hulláma során izolált két törzstől (HUN1, HUN2). Genetikai rokonság a 2006 februárjában, Bajorországban számos fajból (többségben hattyúból) elsőként izolált törzssel mutatható ki (Rinder és mtsai., 2007). A progenitor vírus feltételezhetően közös (Szeleczy és mtsai., 2009, ld.: Melléklet).

A Csongrád megyében izolált törzsek (HUN4) egy Nagy-Britanniában, pulykából izolált törzssel mutatnak szoros genetikai rokonságot, de a közös őst még nem sikerült azonosítani. A brit hatóságok szerint szubklinikailag fertőzött pulykák húásával került a vírus a szigetországba, és közös forrást feltételeznek, mely a magyar ludakat és a pulykákat fertőzte. Ez azonban nem bizonyított (Department for Environment, Food and Rural Affairs 2007, Szeleczy és mtsai., 2009, ld.: Melléklet).

3. Fejezet

Az erősen patogén, H5N1 altípusú madárinfluenza vírus okozta kórkép összehasonlító vizsgálata patológiai, immunhisztokémiai és molekulárisbiológiai módszerekkel, természetes körülmények között fertőződött bütykös hattyúkban, háziludakban, pekingi és mulard kacsákban

3.1. Anyag és módszer

3.1.1. Minták és mintavétel

Huszonhét növendék-felnőtt, H5N1 altípusú madárinfluenza vírustörzssel természetes körülmények között fertőződött és elhullott, vírusizolálással és PCR módszerrel pozitív, víziszárnyas egyedet vizsgáltunk. A fajonkénti megoszlás a következő volt: 10 bütykös hattyú, 6 házi lúd, 6 mulard kacska és 5 pekingi kacska. Valamennyi egyedben megfigyelhetők voltak az elhullás előtt a magas patogenitású madárinfluenza fertőzésre utaló klinikai tünetek (fej-, nyaktekergetés, körben úszás, forgás, apátia), továbbá kórbonctani és kórszövetteni elváltozások. Az összes egyedből mintát vettünk kórszövetteni és IH vizsgálatra, és ezzel párhuzamosan qRRT-PCR vizsgálatot 3 házilúdd, 4 mulard kacska és 4 pekingi kacska esetén végeztünk.

3.1.2. Kórszövetten és immunhisztokémia

Vizsgáltuk az agyvelőt (agytörzs, nagyagykéreg, kisagyvelő), a szívet, a hasnyálmirigyet, a vesét, a lépet, a májat, a tüdőt, a légcsövet, a harántcsikolt izomszövetet és a vékonybelet. 10%-os, pufferolt formalinban fixáltuk az említett szervekből kimetszett szövetmintákat, majd paraffinba ágyasztuk őket és 4 µm vastag metszeteket készítettünk, melyeket hematoxilín-eozinnal festettünk meg. A szervekben lévő vírusantigén detektálására immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk két különböző monoklonális ellenanyag alkalmazásával. A korábban leírt (1.2.2.) illetve egy új monoklonális ellenanyagot hasonlítottunk össze (A illetve B ellenanyag). A B-ellenanyag alkalmazása során deparaffinálást követően a metszeteket 0,1 %-os proteáz oldattal (Sigma Aldrich Co.; típuszám: XIV) 37°C-on 10 percig, ezután 3%-os H₂O₂ oldattal 10 percig, majd 2%-os tejpor oldattal szobahőn 20 percig kezeltük. A következő lépésben a metszeteket 1:6000-ben hígított, az A típusú influenzavírus nukleoproteinje ellen egérben termelt monoklonális ellenanyaggal 4°C-on, egy éjszakán át inkubáltuk (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark; klónszám: HYB 340-05). Az antigén-ellenanyag kapcsolódás kimutatását egy tormaperoxidázzal jelölt polimert

tartalmazó kittel végeztük (EnVision™ + anti-mouse HRP, Dako, Glostrup, Denmark). Kromogénként a 3-amino-9-etilkarbazol oldatot használtuk (AEC+ High Sensitivity Substrate Cromogen, Dako), a kontrasztfestést pedig Mayer-féle hematoxilinnel végeztük. Negatív kontrollként egy-egy szériametszeten a monoklonális ellenanyagot foszfátpuffer-oldatra cseréltük.

3.1.3. Vírusizolálás és meghatározás

A magas patogenitású madárinfluenzavírus jelenlétét minden esetben a korábban (1.2.3. pont) leírtak szerint igazoltuk (Alexander, 2000, Avian Influenza Diagnostic Manual, 2006).

3.1.4. Kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (qRRT-PCR),

A szervmintákat TissueLyser készülékkel homogenizáltuk (Qiagen, Hilden, Németország) a gyártó ajánlásának megfelelően. A homogenizátum felülúszójának 100µl-éből RNS kivonást végeztünk X-tractor Gene nukleinsav kivonó robot segítségével (Corbett Robotics Pty. Ltd., Queensland, Ausztrália). Ehhez a gyártó utasítása szerinti RNS kivonó kittet (Total RNA Isolation Kit, Nucleospin 96 RNA, Macherey-Nagel, Düren, Németország) használtuk. A PCR reakciókat automata (CAS-1200 Robotic Liquid Handling System, Corbett Robotics Pty. Ltd.) segítségével mértük össze.

A vírusedettség meghatározására és összehasonlítására a házilúd, mulard és pekingi kacsák szerveit kvantitatív RRT-PCR vizsgálatnak vetettük alá (Taqman Influenza A/H5 detection kit Version 1.0, Applied Biosystems). Az agyvelő, a szív, a hasnyálmirigy, a vese, a lép, a tüdő és a légcső került vizsgálatra. A kvantitatív analízis standard görbéjének megrajzolásához a kitéhez tartozó tízszeres hígítási sorozatú (10^2 - 10^8 kópia) átírt RNS pozitív kontrollt használtuk. A standard görbét az automatizált Rotor-Gene szoftverrel (Corbett Robotics Pty. Ltd.) számoltuk ki, mely a küszöb ciklus (cycle threshold, Ct) értékeket az ismert koncentrációjú standardokhoz képest ábrázolta és extrapolálta a görbéhez tartozó lineáris regressziós egyenest. A vírus kópiaszámot a minták Ct értékei és az eredményül kapott standard egyenes összehasonlításából számoltuk ki. Az eredményeket a Ct érték alapján számolt tízes alapú logaritmus (lg víruskópia/reakció) egységben adtuk meg.

3.2. Eredmények

3.2.1. Viroológia, RT-PCR, RRT-PCR

Mind a 27 madárból izoláltuk a madárinfluenza vírusát. Minden izolátum 5-ös szubtypusnak bizonyult a HAG teszttel és H5N1 szubtypusnak az RT-PCR illetve RRT-PCR tesztekkel és a szekvencia analízissel. A részletes vizsgálat alá vont bütykös hattyúból izolált törzsek (A/mute swan/Hungary/4030/06, A/mute swan/Hungary/6170/06 és A/mute swan/Hungary/7973/06) a HUN1-es csoportba, a lúdból izolált törzsek (A/goose/Hungary/14756/06, A/goose/Hungary/15012/06, és A/goose/Hungary/3413/06, A/goose/Hungary/2823/06) a HUN3 és a HUN4 csoportba, a mulard és pekingi kacsából izolált törzsek (A/mulard duck/Hungary/15310/06, A/Pekin duck/Hungary/15981/06) a HUN3 csoportba tartoztak (Szeleczy és mtsai., 2009, ld.: Melléklet 1. ábra).

3.2.2. Kórszövettan, immunhisztokémia, kvantitatív RRT-PCR

A vírusfertőzéssel összefüggésben minden fajban azonos kórszövetteni elváltozásokat találtunk, de a pekingi és mulard kacsákban kisebb számú és enyhébb fokú elváltozás mutatkozott. Immunhisztokémiai vizsgálattal a madárinfluenza-vírusantigént a vizsgált hattyúk, a ludak, a mulard és pekingi kacsák 100%-ában sikerült kimutatni. A B ellenanyag érzékenyebbnek bizonyult az A-nál, ezért azt alkalmaztuk a további vizsgálatok során. Az egyes madárfajok szervmintáiban előforduló kórszövetteni elváltozások és az immunhisztokémiailag kimutatható vírusantigén gyakoriságát, valamint a két IH ellenanyag érzékenységbeli különbségét a 3. táblázat mutatja be.

3. táblázat: Természetes úton fertőződött, négy víziszárnyas faj szövetmintáiban talált kórszövetteni elváltozások és immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeinek összesítése, kétféle IH ellenanyag összehasonlításával, külön szerepeltetve az agyvelőn kívüli, egyéb szervekben kapott eredményeket

	Szövettan	Szövettan agyvelő nélkül	IH „A” ellenanyag	IH „B” ellenanyag	IH agyvelő nélkül („B” ellenanyag)
Hattyú (n=10)	56% 48/86	50% 38/76	45% 41/86	70% 60/86	66% 50/76
Lúd (n=6)	69% 27/39	64% 21/33	33% 13/39	59% 23/39	52% 17/33
Mulardkacsa (n=6)	54% 25/46	48% 19/40	9% 4/46	61% 28/46	55% 22/40
Pekingi kacsa (n=5)	35% 15/43	26% 10/38	0% 0/43	12% 5/43	0% 0/38

Azért szerepelnek külön az agyvelőn kívüli szervek eredményei, mert az agyvelőminták minden faj minden egyedében az összes módszerrel pozitívak voltak.

A legjellemzőbb, összes egyedet érintő **kórszövettani** elváltozás a gliosisal és esetenként perivascularis vérzésekkel kísért lympho-histiocytas meningo-encephalomyelitis volt, ami hattyúban volt a legkifejezettebb, lúdban kevésbé súlyos volt, míg a két kacsafajban mutatkozott a legenyhébb formában.

A hasnyálmirigy exocrin mirigyeinek gócos elhalása és az azt kísérő gyulladás az összes hattyút és ludat érintette és bennük súlyosabb, kiterjedtebb formában jelentkezett, mint a kacsákban, ahol mulardban csak enyhe formában és csak az állatok felénél, míg pekingiben csak egy állatban jelentkezett.

Kisebb arányban mutatkozott multiplex, gócos myocardialis degeneráció és lympho-histiocytas gyulladás, ami kifejezettebb volt lúdban, mint hattyúban, mulardban és pekingi kacsában.

Ezenkívül minden hattyúban és lúdban találtunk heveny, intersticiális májgyulladást, gócos (olykor diffúz, térképszerű) májparenchyma elhalást és vérzést, három mulardban pedig csak enyhe, gócos intersticiális lymphocytas beszűrődést. A pekingi kacsák májmintáiban nem találtunk elváltozást. A tüdőben a lúd és a két kacsafaj esetében az esetek kb. felében, míg a hattyúk közül csak egy állatban találtunk körülírtan, perivascularis interstitialis lymphocytas-histiocytas gyulladást. Körülírt, enyhe fokú lympho-histiocytas beszűrődést a légcső nyálkahártyában két hattyúban és egy lúdban figyeltünk meg. A lép lymphocytainak megfogyását, amihez több esetben társult karyorrhesis, az összes egyedben megfigyeltük. A bélcsatornában csak enyhe, aspecifikus kehelysejt aktivitás-fokozódást tapasztaltunk. Mulardokban köszvényre utaló húgysavkristály kiválást is megfigyeltünk a tubulusok lumenében illetve tophusok képződését a vese interstitiumában. Gócos Zenker-féle vázizom elfajulást és elhalást egy lúdban tapasztaltunk (**4. táblázat**).

4. táblázat: A vírusfertőzéssel összefüggő kórszövettani elváltozások előfordulása H5N1 HPAI vírussal természetes úton fertőződött négy víziszárnyas faj egyedeiben

		agyvelő ¹	hasnyál- mirigy ^{2,4}	szív ^{2,3}	máj ^{2,4}	tüdő ²	légcső ²	lép ⁶	vékony- bél ²	vese ⁵	izom ³	egyéb
Bütykös hattyú	1.*	++	+	+	+	-		++	-	-		mirigy -
	2.	++	++	+	++	-		+	-	-		
	3.	+++	+	-	+	+	+	+	-	-		bursa ++ ⁶
	4.	++	++	+	+++	-		+	-	-		
	5.	+++	+++	+	++	-		++	-	-		
	6.	++	++	-	+	-	+	+	-	-		
	7.	++	++	-		-		+	-	-	-	gv** + ¹
	8.	+++	+	-					-	-	-	
	9.	++	+++	-	+	-		++		-	-	gv. -
	10.	+++	+++	+	+	-		++	-	-	-	gv. ++
	átl.	++/+++	++	-/+	+/+++	-	+	+/+++	-	-	-	
Házilúd	1.	++	+++	+	++					-		
	2.	+	++		++	+	-					
	3.	+	+++	++		+	+					
	4.	+	+++	+						-		
	5.	+++	++	+	++	-	-	++	-	-		bőr -
	6.	+	+	+	+	-	-	+		-	++	bőr -
	átl.	+/+++	++ /+++	+	++	-/+	-	+/+++	-	-	++	
Mulard kacsa	1.	+	-	-	-	+	-	++	-	+		
	2.	+	-	+	+	+	-	++	-	+		
	3.	+	+	-	+	+	-	++	-	+		
	4.	++	-	-	+	-	-		-	+		
	5.	+	+	+		-				-		
	6.	+	+	++		-	-			-		
	átl.	+	-/+	-/+	+	-/+	-	++	-	+		
Pekingi kacsa	1.	+	-	+	-	+	-	+		-		
	2.	+	-	+	-	-	-	++		-		
	3.	++	-	-	-	+	-	++		-		
	4.	+	+	-	-	-	-	++	-	-		
	5.	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	
	átl.	+	-	-/+	-	-/+	-	++	-	-	-	

A kórszövettani elváltozások kiterjedtsége és súlyossága:

- = negatív
- + = körülírt területeken enyhe elváltozás
- ++ = körülírt területen kifejezettebb, vagy multiplex, illetve diffúz módon jelentkező enyhe elváltozás (máj: +: gyulladás, ++/+++ : gócos-diffúz elhalások)
- +++ = multiplex vagy diffúz, kifejezett elváltozás

¹: lympho-histiocytas agyvelőgyulladás/gerincvelő (gv.)-gyulladás

²: lympho-histiocytas gyulladás

³: elfajulás

⁴: gócos elhalások

⁵: tubulonephrosis, köszvény

⁶: lymphocyták-kiürülés, lymphocyták-elhalás

*: állat sorszáma

** : gerincvelő

Immunhisztokémiailag az agyvelőben mind a négy faj összes egyedében sikerült kimutatni a madárinfluenza vírusantigént. A pekingi kacsá összes egyéb szerve negatív eredményt adott.

Az agyvelőn kívüli szervek pozitivitása, a pekingi kacsá kivételével hasonló arányokat mutat, mint az összes szervet tekintve (**3. táblázat**).

Hattyúban és lúdban az agyvelőben jóval nagyobb mennyiségben mutattuk ki a vírusantigént, mint a két kacsafajban, melyek közt szintén jelentős különbség volt, hiszen pekingi kacsában csak az ependymában tudtuk kimutatni a vírus jelenlétét kis mennyiségben, míg mulardokban minden agyi területen és nagyobb mennyiségben.

A hasnyálmirigy vizsgálatával még nagyobb különbség mutatkozott, hiszen a kacsafajok ezen szerve gyakorlatilag negatív volt.

A myocardiumban lúdban és mulardban találtunk erősebb festődést, a hattyúhoz és a teljesen negatív pekingi kacsához képest.

A légzőrendszert tekintve a mulard fajban találtuk a legtöbb vírusantigént a légcsőben és a tüdőben egyaránt, míg hattyúban és lúdban csak a tüdőben volt látható nagyjából azonos mértékű pozitívítás. A májban és a lépben hattyúban, lúdban és mulardban hasonló mennyiségeket detektáltunk.

Hattyúban és mulard kacsában a vesékben, hattyúban a vázizomzatban, a bélnyálkahártyában és egy esetben a bursában is találtunk pozitív reakciót adó sejteket. Egy lúd bőrszövet mintájának izomelemeiben is kimutatható volt a vírusantigén (**5. táblázat**).

5. táblázat: Immunhisztokémiai vizsgálattal kimutatott A-típusú madárinfluenza vírus nukleoprotein antigén jelenléte négy, természetes úton H5N1 HPAI vírussal fertőződött víziszárnyas faj egyedeiben

		agyvelő	hasnyál- mirigy	szív	máj	tüdő	légcső	lép	vékony- bél	vese	izom	egyéb
Bütykös hattyú	1.*	+++	++	-	+	-		+	+	-		mirigyos -
	2.	++	+++	+	+	+		+	-	-		
	3.	+++	+++	-	-	-	-	+	+	+		bursa +
	4.	+++	+++	+	+++	++		+++	+	+		
	5.	+++	+++	-	+	-		+	+	-		
	6.	+++	+++	-	+	-	-	-	-	-		
	7.	+++	+++	+		-		++	+	+	+	gv**. +
	8.	+++	++	+					-	-	-	
	9.	+++	+++	+	++	+		++		+	-	gv. +
	10.	+++	+++	+	+	+		+	+	-	+	gv. +++
	átl.	+++	+++	-/+	+	-/+	-	+/+++	+	-/+	-/+	
Házi lúd	1.	+++	+++	++	+					-		
	2.	+++	+++		-	+	-					
	3.	+++	+++	+		-	-					
	4.	+++	+++	++						-		
	5.	+++	+++	++	++	+	-	++	-	-		bőr +
	6.	+++	-	+	-	+	-	-		-	-	bőr -
	átl.	+++	++/+++	+/++	+	+	-	+	-	-	-	
Mulard kacsza	1.	++	-	-	+	+	++	+	-	-		
	2.	+	-	+	+	+	-	+	-	+		
	3.	++	-	+	+	-	-	++	-	-		
	4.	++	-	+	-	+	+		-	-		
	5.	++	-	++		+				-		
	6.	++	+	+++		+	+			+		
	átl.	++	-	+/++	+	+	+	+/+++	-	-/+		
Pekingi kacsza	1.	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
	2.	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
	3.	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
	4.	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
	5.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		átl.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A-típusú madárinfluenza vírus nukleoprotein antigénjének mennyisége :

- = negatív
- + = kisszámú antigén pozitív sejt (elszórta)
- ++ = közepes mennyiségű antigén pozitív sejt (elszórta, vagy kisebb csoportokban)
- +++ = nagymennyiségű antigén pozitív sejt (nagy, összefüggő területeken)

*: állat sorszáma

** : gerincvelő

Az antigén jelenléte az agyvelőben, a hasnyálmirigyben és a májban minden fajban összhangot mutatott a szövettani elváltozásokkal. A szívben ez igaz volt a hattyúra, de lúdban és mulardban erősebb antigén festődést találtunk, mint amilyenre a kórszövettani elváltozások alapján számítottunk. Pekingi kacsában pedig találtunk néhány szövettani elváltozást kimutatható antigén nélkül. A tüdőben jó korreláció volt a kórszövettani és IH eredmények között lúdban és mulardban, de hattyúban és pekingi kacsában különböző eredmények születtek. Utóbbit találtuk a légcsőben is. (6. táblázat)

6. táblázat: Kórszöveti elváltozások és az A-típusú madárinfluenza vírus nukleoprotein antigénjének jelenléte és mennyisége (IH) négy víziszármaz faj természetes úton fertőződött egyedeinek diagnosztikailag fontos szerveiben (a szövettani elváltozások leírását ld.: a 4. táblázatnál)

	agyvelő		hasnyálmirigy		szív		máj		tüdő		légcső		lép		vese		
	Sz. tan	IH	Sz. tan	IH	Sz. tan	IH	Sz. tan	IH	Sz. tan	IH	Sz. tan	IH	Sz. tan	IH	Sz. tan	IH	
Bütykös hattyú	1.*	++	+++	+	++	+	-	+	+	-	-		++	+	-	-	
	2.	++	++	++	+++	+	+	++	+	-	+		+	+	-	-	
	3.	+++	+++	+	+++	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	
	4.	++	+++	++	+++	+	+	+++	+++	-	++		+	+++	-	+	
	5.	+++	+++	+++	+++	+	-	++	+	-	-		++	+	-	-	
	6.	++	+++	++	+++	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	
	7.	++	+++	++	+++	-	+			-	-			+	++	-	+
	8.	+++	+++	+	++	-	+									-	-
	9.	++	+++	+++	+++	-	+	+	++	-	+			++	++	-	+
	10.	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	-	+			++	+	-	-
	átl.	++ /+++	+++	++	+++	-/+	-/+	+ /+++	+	-	-/+	+	-	+ /+++	+ /+++	-	-/+
Házi lúd	1.	++	+++	+++	+++	+	++	++	+						-	-	
	2.	+	+++	++	+++			++	-	+	+	-	-				
	3.	+	+++	+++	+++	++	+			+	-	+	-				
	4.	+	+++	+++	+++	+	++								-	-	
	5.	+++	+++	++	+++	+	++	++	++	-	+	-	-	++	++	-	-
	6.	+	+++	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
átl.	+ /+++	+++	++ /+++	++ /+++	+	+ /+++	++	+	-/+	+	-	-	+ /+++	+	-	-	
Mulard kacsá	1.	+	++	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	+	+	-	
	2.	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	++	+	+	+	
	3.	+	++	+	-	-	+	+	+	-	-	-	++	++	+	-	
	4.	++	++	-	-	-	+	+	-	+	-	+			+	-	
	5.	+	++	+	-	+	++			-	+				-	-	
	6.	+	++	+	+	++	+++			-	+	-	+		-	+	
átl.	+	++	-/+	-	-/+	+ /+++	+	+	-/+	+	-	+	++	+ /+++	+	-/+	
Pekingi kacsá	1.	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
	2.	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	
	3.	++	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++	-	-	
	4.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	
	5.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	
	átl.	+	+	-	-	-/+	-	-	-	-/+	-	-	-	++	-	-	

*: állat sorszáma

A szövettani elváltozások kiterjedtsége és súlyossága / A-típusú madárinfluenza vírus nukleoprotein antigénjének mennyisége:

- = negatív
- +
- ++ = körülírt területeken enyhe elváltozás / kisszámú antigén pozitív sejt (elszórta)
- +++ = körülírt területen kifejezettebb, vagy multiplex, illetve diffúz módon jelentkező enyhe elváltozás / közepes mennyiségű antigén pozitív sejt (elszórta, vagy kisebb csoportokban)
- +++ = multiplex vagy diffúz, kifejezett elváltozás / nagymennyiségű antigén pozitív sejt (nagy, összefüggő területeken)

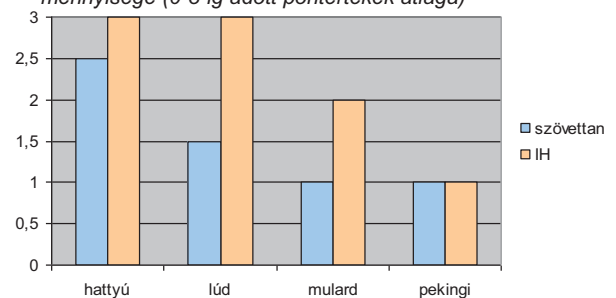
Megjegyzés: a bütykös hattyú minták esetében a HUN1, az 1., 2., 3., 4. számú házilúd és a mulard illetve pekingi kacsák esetén a HUN3, míg az 5., 6. házilúd esetében a HUN4 törzs került megállapításra (Szeleczy és mtsai., 2009).

A vesében a hattyúk felében kimutattuk az antigént szövettani elváltozás nélkül. Legtöbbször csak MPS sejtekben mutatkozott az antigén, ami megmagyarázza, hogy miért volt szövettanilag negatív a vesé. Mulard kacsá esetében, a hattyúhoz hasonlóan, szövettanilag negatív illetve nem vírusfertőzés-specifikus elváltozásokhoz (tubulonephrosis,

uricosis) társult enyhe antigén festődés az interstitiumban. A vékonybél esetén nem találtunk vírusfertőzésre utaló elváltozásokat és a vírusantigént sem a bélhámsejtekben, hanem a propria MPS sejtjeiben, simaizom elemeiben és a plexus submucosus sejtjeiben sikerült kimutatni. A lépben hasonló elváltozásokat tapasztaltunk pekingi kacsában, mint a többi fajban, a vírus jelenlétét azonban nem sikerült igazolni. Hozzá kell tenni, hogy az itt látott elváltozások (lymphocyta-depletio és –rrhexis) nem jellegzetesek a madárinfluenza diagnosztikája szempontjából.

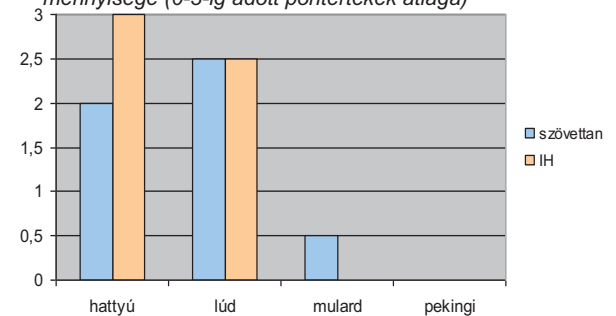
Kórszövettani és immunhisztokémiai eredményeink alapján a H5N1 HPAI vírus mind a négy fajban neurotrop. Bütykös hattyúban és házilúdban a neurotropizmus kifejezettebb, mint a kacsafajokban. Szövettani elváltozások az agyvelőben hattyú esetében kifejezettebbek voltak, mint lúdban, a kacsafajokban pedig a lúdnál is kevésbé voltak súlyosak. A legkevesebb nukleoprotein antigént pekingi kacsában találtuk, mulard kacsában nagyobb mennyiségben, míg hattyúban és lúdban találtuk meg azt a legnagyobb mennyiségben, viszont a két faj között különbséget nem találtunk (6. táblázat, 1. ábra).

1. ábra: Az agyvelőben mutatkozó kórszövettani elváltozások és az ott kimutatott vírus nukleoprotein mennyisége (0-3-ig adott pontértékek átlaga)



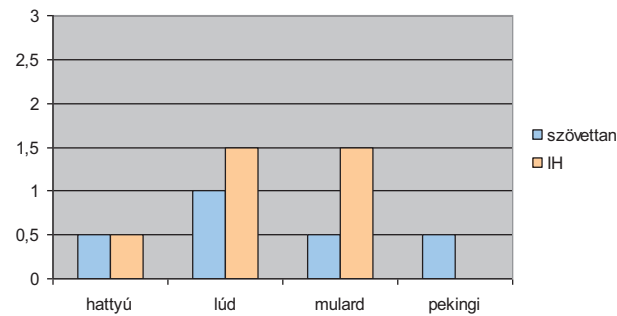
Hattyúban és lúdban a vírus kifejezetten epitheliotrop (pancreatotrop) is. Egyes ludakban (1., 2., 3., 4. számú állatok) a szövettani elváltozások alapján az epitheliotropizmus kifejezettebb, mint a neurotropizmus. Az elváltozások valamivel súlyosabbak voltak lúdban, mint hattyúban, ellenben hattyúban valamivel több vírusantigént detektáltunk (6. táblázat, 2. ábra). A májelváltozások súlyosabbak is megerősíti a hámsejtekhez való nagyobb affinitást hattyúban és lúdban, ellentétben a kacsafajokkal.

2. ábra: A hasnyálmirigyben mutatkozó kórszövettani elváltozások és az ott kimutatott vírus nukleoprotein mennyisége (0-3-ig adott pontértékek átlaga)



Házilúdban, és mulard kacsában kifejezettebben, hattyúban enyhébb fokban myotrop (cardiotrop) tulajdonságúnak találtuk a vírus replikációját. Bingham és munkatársai (2009) által leírt kifejezett myotropizmust találtunk a 6. számú mulard kacsában, hiszen itt a szívben súlyosabb elváltozást illetve nagyobb antigén mennyiséget detektáltunk az agyvelővel összehasonlítva (6. táblázat, 3. ábra).

3. ábra: A szívizomzatban mutatózó kórszöveti elváltozások és az ott kimutatott vírus nukleoprotein mennyisége (0-3-ig adott pontértékek átlaga)



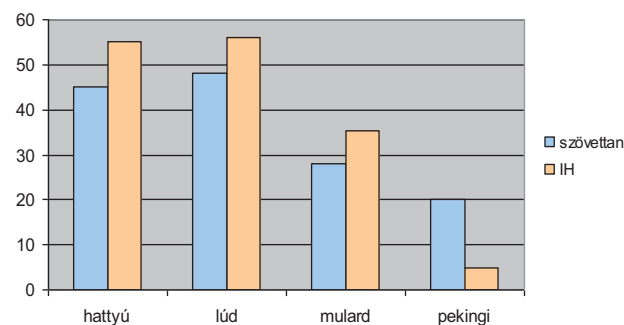
Hattyúban, lúdban és mulardban a léphez (lymphotrop) való affinitást is jelentősnek találtuk. A légzőrendszerhez egyik faj esetében sem tapasztaltunk kiemelkedő tropizmust.

Hattyú esetében leírt endotheliotrop vírusszaporodást (Kalthoff és mtsai., 2008) egyik fajban sem tapasztaltunk.

A 6. számú lúd egyed felnőtt állat volt ellentétben a fajtársaival és benne jelentősen enyhébb szöveti elváltozások mutatkoztak a hasnyálmirigyben és a májban antigénfestődés nélkül.

Amennyiben az összes vizsgált szervet tekintjük, hattyúban és lúdban nagyságrendileg azonos súlyosságú elváltozásokat és antigén tartalmat találtunk, mulard kacsában ennél enyhébb elváltozást és alacsonyabb vírusszámot, míg a legenyhébb elváltozást illetve antigén festődést a pekingi kacsában találtuk (6. táblázat, 4. ábra).

4. ábra: Az összes vizsgált szervben mutatózó kórszöveti elváltozások és az ott kimutatott vírus nukleoprotein mennyisége (a 6. táblázatban látható pontértékek azonos vizsgálati mintaszámra [40 szervminta] korrigálva)



A kvantitatív RRT-PCR vizsgálataink során a H5N1 HPAIV jelenlétét minden vizsgált faj összes egyedében sikerült igazolni (3/3 liba, 4/4 mulard kacsá és 4/4 pekingi kacsá). A vizsgált szervmintákat összevetve csak a házilúd esetében találtunk 100 %-os pozitívítást (agyvelő, tüdő, légcső, szív, hasnyálmirigy, lép, vese; [19/19 szövetminta]), a mulard kacsák esetében ez az arány csak 25 %-os (agyvelő, tüdő, lép; [7/28 szövetminta]), a pekingi kacsák esetében pedig 43 %-os (agyvelő, tüdő, légcső, szív, vese; [12/28 szövetminta]) volt. (7., 8. táblázat). A vírusszám a különböző szervekben 1,91 és 7,77 lg kópia/reakció között változott, ami közel 6 nagyságrendnyi különbséget jelent. Az összes faj esetében az agyvelőben mutattuk ki a legnagyobb vírusszámot, ám a házilúd esetében 3-4

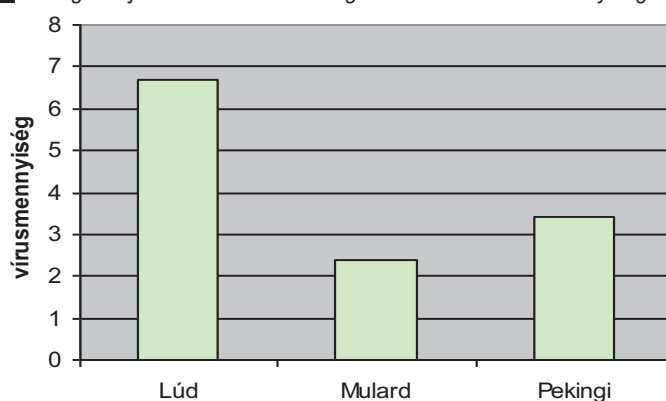
nagyságrenddel magasabb átlagos nukleinsav-mennyiséget mértünk (7,53 lg kópia/reakció), mint a pekingi kacsákban illetve mulard kacsákban (4,19 illetve 3,21 lg kópia/reakció). Az agyvelő tehát minden fajban pozitív eredményt adott, míg a többi szerv esetében egyedül a házilúdban találtuk meg a virális RNS-t az összes egyéb szervben, míg a mulard kacsáknál ez az arány 13%-os, a pekingi kacsáknál pedig 33%-os volt. (7., 8. táblázat)

7. táblázat. H5N1 madárinfluenza vírus RNS mennyisége három vízszármazás faj, természetes úton fertőződött egyedeiben (vírusmennyiség: lg kópia/reakció)

	állat sor-szám	agyvelő	hasnyál-mirigy	szív	tüdő	légcső	lép	vese
házilúd	3.	5,93	4,56	3,67	1,91		2,31	
	5.	7,77	2,25	4,31	3,22	2,58	3,73	3,62
	6.	7,62	2,93	5,53	2,49	3,08	3,05	3,62
	átlag	7,53	4,09	5,08	2,83	2,89	3,35	3,62
mulard kacska	1.	2,84	0	0	2,05	0	0	0
	2.	3,71	0	0	0	0	0	0
	3.	2,14	0	0	2,01	0	0	0
	4.	2,75	0	0	0	0	2,29	0
	átlag	3,21	0	0	1,73	0	1,68	0
pekingi kacska	2.	2,35	0	0	0	0	0	0
	3.	3,45	0	0	3,31	3,11	0	0
	4.	3,45	0	2,72	2,21	2,06	0	0
	5.	4,75	0	3,67	3,75	0	0	2,39
	átlag	4,19	0	3,11	3,29	2,55	0	1,78

A lúd szervminták átlagosan 6,68, a mulard kacska minták 2,39, a pekingi kacska minták pedig 3,43 lg kópia/reakció nukleinsavmennyiséget tartalmaztak, ami 20 illetve 2 ezerszeres különbséget jelent (5. ábra)

5. ábra: A vizsgált fajok szervmintáinak átlagos vírus nukleinsav mennyisége (lg kópia/reakció)



A 8. táblázatban azt mutatjuk be, hogy az összes vizsgált szerv közül milyen arányban fordultak elő elváltozások illetve pozitív eredmények kórszövettani továbbá IH és qRRT-PCR módszerekkel. Külön szerepeltettük az agyvelőn kívüli szerveket, mivel az agyvelő minden faj esetén, az összes módszerrel pozitív volt. A szövettani elváltozások arányát és a PCR

illetve az IH módszerek eredményeit ez nem befolyásolja lényegesen, kivéve a pekingi kacsát, ahol IH-val minden agyvelőn kívüli minta negatív maradt.

8. táblázat: Az IH és qRRT-PCR módszerekkel pozitív szervek aránya (%) az összes vizsgált szervhez képest, külön feltüntetve az agyvelőn kívüli szervek pozitívitasát

	Szövettan	IH	qRRT-PCR	Szövettan agyvelő nélkül	IH agyvelő nélkül	qRRT-PCR agyvelő nélkül
Lúd (n=3)	68% 13/19	58% 11/19	100% 19/19	63% 10/16	50% 8/16	100% 16/16
Mulard kacsá (n=4)	59% 16/27	59% 16/27	25% 7/28	52% 12/23	52% 12/23	13% 3/24
Pekingi kacsá (n=4)	39% 11/28	14% 4/28	43% 12/28	29% 7/24	0% 0/24	33% 8/24

Megjegyzendő, hogy kórszövettanilag és IH-val hasonló arányban találtunk elváltozást illetve pozitívitasát, mint korábban, nagyobb mintaszám esetén (ld.: **5. táblázat**). Úgy tűnik, az utóbbi kisebb mintaelemszám jól reprezentálja a – korábban csak szövettanilag és IH-val vizsgált - nagyobb számú egyedeket. A szövetteni eredmények torzítanak, mivel a lépnel tapasztalt elváltozások (lymphocyta-depletio) habár gyakoriak voltak, nem tekinthetők specifikusnak a H5N1 fertőzésre nézve. A H5N1 HPAI diagnosztikájában az agyvelőnek, a szívnek és a hasnyálmirigynek van kitüntetett szerepe. Ezért a **9. táblázat**ban ezen szerveken hasonlítjuk össze a különböző módszerekkel kapott eredményeket.

9. táblázat: H5N1 diagnosztikai szempontból fontos szervek (agyvelő, szív, hasnyálmirigy) összehasonlítása

	Szövettan	IH	qRRT-PCR
Lúd (n=3)	100% (9/9)	89% (8/9)	100% (9/9)
Mulard kacsá (n=4)	50% (6/12)	58% (7/12)	33% (4/12)
Pekingi kacsá (n=4)	50% (6/12)	33% (4/12)	50% (6/12)

Annak érdekében, hogy a kórszövetteni, az IH és a qRRT-PCR módszerekkel kapott eredményeket összevethessük, a PCR eredményeket is pontoztuk, és a **10. táblázat**ban együtt szerepeltetjük a szövetteni és az IH eredményekkel, egyedenként és átlagolva. Meg kell jegyezni, hogy az így kapott átlagok jobban közelítik a valóságot, mivel így nem torzítja el az eredményt egy kiugró, több nagyságrenddel nagyobb érték (ld. a házilúd hasnyálmirigy esetében +++ , + és + átlaga ++, de amennyiben a lg értékek átlagát kiszámoljuk, az 4,09, vagyis +++-es érték lesz).

10. táblázat: H5N1 HPAI vírussal természetes körülmények között fertőződött három víziszármazás faj kórszövetteni, immunhisztokémiai és qRRT-PCR módszerekkel történő vizsgálatának eredményei, egyenként és szervenként (a szövettani elváltozások leírását ld.: a 4. táblázatnál)

	agyvelő			hasnyálmirigy			szív			tüdő			légcső			lép			vese			
	sz. tan	IH	PCR	sz. tan	IH	PCR	sz. tan	IH	PCR	sz. tan	IH	PCR	sz. tan	IH	PCR	sz. tan	IH	PCR	sz. tan	IH	PCR	
Házilúd	3*	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.	+++	+++	+++	++	+++	+	+	++	++	-	+	+	-	-	+	++	++	++	-	-	++
	6.	+	+++	+++	+	-	+	+	+	+++	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	++
	áll.	++	+++	+++	++	++/+++	++	+	+/++	++	-/+	+	+	-/+	-	+	+/++	+	+	-	-	++
Mulard kacsza	1.	+	++	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	++	-	++	+	-	+	-	-
	2.	+	+	++	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	++	+	-	+	+	-
	3.	+	++	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	++	++	-	+	-	-
	4.	++	++	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
	áll.	+	++	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-/+	-	+	-	++	+	-	+	-
Pekingi kacsza	2.	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
	3.	++	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	++	-	-	-	-	-
	4.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	++	-	-	-	-	-
	5.	+	+	+++	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	+
	áll.	+	+	+/++	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-/+	++	-	-	-	-	-

Szövetten - = negatív
 + = körülírt területeken enyhefokú elváltozás
 ++ = körülírt területen kifejezettebb, vagy multiplex, illetve diffúz módon jelentkező enyhe elváltozás
 +++ = multiplex vagy diffúz, kifejezett elváltozás

IH - = negatív
 + = kisszámú antigén pozitív sejt (elszórta)
 ++ = közepes mennyiségű antigén pozitív sejt (elszórta, vagy kisebb csoportokban)
 +++ = nagymennyiségű antigén pozitív sejt (nagy, összefüggő területeken)

qRRT-PCR: - = 0 lg kópia/ reakció
 + = 0-3,5 lg kópia/ reakció
 ++ = 3,5-4,5 lg kópia/ reakció
 +++ = >4,5 lg kópia/ reakció

*: állat sorszáma

Megjegyzés: a 3. számú házilúd és a mulard illetve pekingi kacsák esetén a HUN3, míg az 5., 6. házilúd esetében a HUN4 törzs került megállapításra (Szeleczy és mtsai., 2009).

A 9. és 10. táblázatból jól látszik, hogy házilúdban az összes módszer nagy biztonsággal jelzi a betegséget. A hasnyálmirigy, a tüdő és a lép vizsgálata során mindhárom módszer közel azonos eredményt adott, míg az agyvelő és a szív esetén az IH és a PCR érzékenyebbnek bizonyult, mint a kórszövetten. A légcső és a vesze esetén a PCR érzékenyebb volt.

Mulard kacsza esetén csak az agyvelő vizsgálatával kaptunk minden módszerrel pozitív eredményt, a legerősebb reakciót az IH adott. A szív esetén azonban csak az IH mutatta ki a fertőzést, kórszövetteni elváltozás is csak egy mintában volt, és a hasnyálmirigy negatív maradt mindhárom módszerrel. Ha a 10. táblázat összes szervét tekintjük, még inkább csökken a PCR-rel pozitív szervek aránya az IH-hoz képest (ld.: lép, tüdő, légcső). A veseelváltozások nem álltak összefüggésben a szervben történő vírusreplikációval.

Pekingi kacsáknál is csak az agyvelő volt mindhárom módszerrel pozitív és a PCR volt a legérzékenyebb. A hasnyálmirigy negatív volt, és a szívben is csak a PCR mutatta ki a fertőzést csakúgy, mint a légzőszervekben.

Mindhárom házi víziszárnyas faj esetében az agyvelő vizsgálata során 100%-os biztonsággal vethetjük fel a fertőzés gyanúját (kórszövettan) illetve állapíthatjuk meg a kóroktani diagnózist (IH, PCR).

Eredményeink igazolják a H5N1 HPAIV neurotrop tulajdonságát mindhárom háziszárnyas fajban. Mindhárom módszerrel igazoltuk a vírus pancreatotrop tulajdonságát házilúdban, míg a myotrop (cardiotrop) voltát kifejezettebbnek találtuk lúdban, mint a két kacsafajban. A légzőkészüléket tekintve lúd és mulard esetén a tüdő nagyobb mértékben volt elváltozott, illetve több vírus antigént tartalmazott, mint pekingi kacsában, ahol csak a PCR adott pozitív eredményt, légcső esetén ez a különbség nem szembetűnő. A lépben tapasztalt jellemző, ám nonspecifikus elváltozásokat csak lúdban és mulardban tudtuk a vírus jelenlétével összefüggésbe hozni. A vesében elváltozás nélkül volt jelen a virális RNS lúd esetében, míg mulardban az elváltozások ellenére sem mutattuk azt ki, csupán egy esetben találtunk IH-val virális antigént. A mintavétel során elkerülhetetlen, hogy a vesét fedő légszak ne kontaminálja a mintát, így elképzelhető, hogy a légzőkészülék érintettsége okozta a vese pozitivitását lúdban és az 5. számú pekingi kacsában. Az adott egyedek tüdőmintái ugyanis PCR-el pozitívak voltak. Ezt a kontaminálódási lehetőséget kísérletes fertőzés során is felvetették (Bingham és mtsai., 2009).

Házilúdban több nagyságrenddel nagyobb vírusnukleinsav mennyiséget találtunk, mint a két kacsafajban.

3.3. Megbeszélés

Minden vizsgált faj esetében, az összes egyedben a jellegzetes kórszövettani elváltozások mellett az agyvelőben sikerült a legnagyobb mennyiségű HPAIV nukleoprotein antigén és a legnagyobb mennyiségű virális RNS jelenlétét kimutatni. E megállapítások megerősítik az általunk vizsgált, H5N1 magas patogenitású madárinfluenza vírustörzs neurotrop tulajdonságát. A 2002 után izolált H5N1 HPAI vírusok neurotropizmusát számos szerző megállapította (Ellis és mtsai., 2004, Sturm-Ramirez, 2004, Klopffleisch és mtsai., 2006, Tiefke és mtsai., 2007, Brown és mtsai., 2008, Kalthoff és mtsai., 2008, Löndt és mtsai., 2008, Guionie és mtsai., 2009, Löndt és mtsai., 2010), ezzel szemben Bingham és munkatársai (2009) kifejezetten myotrop (szívizom, vázizom, simaizom affinitású) tulajdonságúnak találták a fertőzéshez használt egyik, nagyobb virulenciájú törzset. A kísérlet utolsó napján az ő vizsgálatuk is a mi, hullákban leírt eredményeinkkel mutat azonosságot, miszerint az agyvelő, a szív és a hasnyálmirigy mutatott magasabb antigén tartalmat. Ebben az esetben a kísérletes fertőzések eredményei jól összeegyeztethetők a járvány során észleltekkkel, ahol csak a manifesztálódó betegséget mutató egyedek vizsgálatára volt módunk. A vírusnak a fertőzés előrehaladtával változik a tropizmusa. Bingham és munkatársai (2009) vizsgálatai szerint a fertőzést követő első napon a lép és a tüdő, majd a 2-3. naptól az összes szövet (különösen az izomszövetek) és az 5. napon az agy, a szív és a hasnyálmirigy mutat erős antigén festődést. Löndt és munkatársai (2008, 2010) szerint szintén az első napon a tüdő és a lép, majd a többi szövet, és az 5. napon az agyvelő, a szív és a hasnyálmirigy esetén mutatható ki a legnagyobb mennyiségű vírusantigén.

Az agykamrák ependymájának érintettségét hangsúlyosnak találtuk a vírus szaporodása szempontjából pekingi kacsában, hiszen az IH módszerrel vizualizálható fertőzöttség kizárólag e területre korlátozódott. Hasonló eredményt kaptak Bingham és munkatársai (2009), egy pekingi kacsára alacsonyabb patogenitással bíró H5N1 HPAI törzsszel való fertőzési kísérletben, ahol az agyvelőben szintén csak az ependymában mutatták ki a vírusantigént. Löndt és munkatársai (2008) ezzel szemben az agyvelő minden területén kimutatták a vírusantigént.

Megfigyelésünket, miszerint a HPAI vírusok nem a bélhamban szaporodnak, kísérletes fertőzések során is igazolták. Hozzánk hasonlóan e fertőzések során sem mutatták ki a vírus nukleoprotein antigénjét az enterocytákban (Keawcharoen és mtsai., 2008, Löndt és mtsai., 2008, Bingham és mtsai., 2009). Ez magyarázza a kloákán való ürülés háttérbe szorulását az oropharingeális úttal szemben, melyet ugyancsak számos fertőzési kísérlet kapcsán

leírtak (Sturm-Ramirez és mtsai., 2004, 2005, Hulse-Post és mtsai., 2005, Pantin-Jackwood és Swayne, 2007 a, b, Brown és mtsai., 2008, Kalthoff és mtsai., 2008, Keawcharoen és mtsai., 2008, Löndt és mtsai., 2008, 2010, Guionie és mtsai., 2009).

Az általunk használt módszerek érzékenységét értékelve a virális antigén jelenléte jól kimutatható összefüggést mutatott a kórszöveti elváltozásokkal a bütykös hattyú és házilúd fajokban, azonban ez nem volt ilyen következetes a mulard kacsá és a pekingi kacsá vonatkozásában. Pekingi kacsában csak az agyvelő esetén korreláltak az eredmények, mulardban ezenkívül a szívben, a májban, a tüdőben és a lépben is megfigyelhettünk hasonló összefüggést.

Lúdban és pekingi kacsában az immunhisztokémiai vizsgálat érzékenysége, hasonlóan a korábbi megfigyelésekhez (Tiefke és mtsai., 2007, Keawcharoen és mtsai., 2008), alacsonyabb volt, mint a kvantitatív RRT-PCR. Mulard kacsában azonban az IH módszerrel több pozitív eredményt kaptunk, ugyanis 11 szervminta qRRT-PCR-rel negatív maradt, míg IH-val pozitív eredményt adott (**Id.: 9., 10. táblázat**). Magyarázatul szolgálhat, hogy egy véletlenszerű darab került kivágásra minden szervből és nem ugyanazt a darabot vizsgáltuk PCR-rel, mint szövettannal illetve IH-val. A paraffinba ágyazott szervmintákból több alkalommal is megkíséreltük a virális RNS kimutatását, de ezek a próbálkozások nem vezettek sikerre. Talán érdemes lett volna szervenként több mintát venni és azokat homogenizálni (PCR) illetve több síkban lemetszeni a szöveteket (szövettan, IH). Löndt és munkatársai (2008) hozzánk hasonlóan PCR negatív szervekben találtak IH pozitivitást, amit a szöveti elváltozások és az antigén jelenlétének fokális eloszlásával magyaráztak, csakúgy, mint Bingham és munkatársai (2009) akik IH és vírusizolálás során kapott eredmények közötti különbségekkel kapcsolatban jutottak hasonló megállapításra. Ez befolyással lehet a különböző módszerekkel kapott eredményekre, mivel más-más szervdarab kerül vizsgálatra az egyes diagnosztikai technikák során.

4,31 lg kópia/reakció RNS mennyiség fölött az IH vizsgálatok következetesen pozitívak voltak, de ez alatt a szint alatt az IH különböző eredményeket adott. Magyarázat lehet erre, hogy az IH teszt talán csak az intracellulárisan helyeződő vírusantigének kimutatására képes, míg az extracellulárisan, főként a viraemia alatt a vérpályában vagy a szövetnedvben, szabadon keringő vírusantigént nem képes detektálni, mivel az a metszetkészítés folyamán eltávozik a szervmintából. Ezzel szemben a vírusizolálás és a PCR technika képes a vérpályában keringő vírusok kimutatására is (Bingham és mtsai., 2009). A vérpályában az MPS sejtekben keringő vírusantigén ugyan ritkán, de észlelhető volt immunhisztokémiai technikával (**30. kép**).

Érdekes módon a pekingi kacsák esetében – a többi fajjal ellentétben – a parenchymás szervek között nem találtunk IH pozitív mintát a 2,06-3,75 lg kópia/reakció vírustartalmú

szervek között. Ezzel szemben mulardokban PCR negatív szervekben és a 2,05-3,71 lg kópia/reakció nukleinsav tartalmú tartományban is találtunk nukleoprotein antigént. Kísérletes fertőzések során szintén leírtak IH negativitást tőkés récében, pozitív virológiai és PCR leletekkel együtt (Keawcharoen és mtsai., 2008), mások viszont számos szervből (és az agyvelőben sem csak az ependymából) kimutatták a vírusantigént pekingi kacsában (Pantin-Jackwood és mtsai., 2007 a, b, Löndt és mtsai., 2008, Bingham és mtsai., 2009, Löndt és mtsai., 2010).

Számos esetben tapasztaltuk, hogy egy adott szerv parenchyma sejtjei IH-val negatívak voltak, az interstitiumban levő MPS sejtekben azonban sikerült kimutatni az antigén jelenlétét. Annak elkülönítése nehéz, hogy ilyen esetekben a keringő sejtekről, vagy az adott szerv szöveti MPS sejtjeiről van-e szó. Elképzelhető, hogy a keringésben lévő MPS sejtek jutnak el a szervbe és ebben a stádiumban csak ezek észlelhetők IH-val, és ezt követi később a szerv parenchyma sejtjeinek fertőződése. Az MPS sejtek szerepét a vírus szervezeten belüli terjedésében leírták a szakirodalomban (Swayne és Halvorson, 2008). Az RRT-PCR a szabadon illetve MPS sejtekben keringő vírus nukleinsavat is kimutatja, de ebben az esetben nem lehet elkülöníteni, hogy az így kapott eredmény a szerv parenchyma sejtjeinek pozitívításából ered-e, vagy a keringésben illetve szövetnedvben lévő vírusoktól. A szigorú értelemben vett szerv-parenchyma negatív maradhat IH vizsgálattal. Vizsgálataink alapján, alacsony vírusrészlet esetén az IH alkalmasabb egy adott szerv fertőzöttségének felderítésére, mivel RRT-PCR igen magas érzékenysége miatt összemósodik a vérpályában keringő és a parenchymasejtekben lévő vírus okozta pozitívítás, és a kontamináció veszélye is nagyobb. Eredményeink pontosíthatók, ha szervenként több területre is kiterjesztjük az IH vizsgálatot.

Számottevő különbségek tapasztalhatók a H5N1 HPAIV fertőzésre való érzékenység tekintetében a különböző víziszárnyas fajok között. Európában a bütykös hattyút találták a legérzékenyebbnek a vadon élő madárfajok közül természetes (Pálmai és mtsai., 2007, Tiefke és mtsai., 2007) és kísérletes fertőzések során (Brown és mtsai., 2008). Ezt követi a kis kanadai lúd majd az indiai lúd, mely fajokban a hattyúval összevetve kisebb arányú elhullás és elhúzódóbb kórkép jelentkezett fertőzési kísérlet során (Brown és mtsai., 2008). Vizsgálataink során mi is gyorsabb lefolyásúnak gyanítjuk a kórképet a bütykös hattyúban, mivel az állatok közepes-jó kondícióban voltak, házilúdban viszont az egyedek zöme közepesnél gyengébb kondíciójú volt, ami valamivel elhúzódóbb kórlefoyasra enged következtetni. Hattyú esetében a viraemia következtében fellépő keringési elégtelenség jeleit (tüdő ödéma, légcső nyálkahártya ödéma, mirigyegységek vérvései, pangásos bővérűség a lépben) nagyobb arányban tapasztaltuk a háziszárnyasokhoz képest, ami valamivel gyorsabb kórlefoyasra kelt gyanút. Hattyúval ellentétben, egyes ludakban és kacsákban

kialakultak felsőlégúti elváltozások (kötőhártya-gyulladás, orrhurut, orrmelléküreg-gyulladás), amelyek esetükben kissé elhúzódóbb kórlefordulás gyanúját vetik fel (ld.: **1., 2. táblázat**).

Perkins és Swayne (2003) kísérletesen igazolták az embeni lúd nagyobb érzékenységét a pekingi kacával összehasonlítva. Elhullások ugyan ludakban és kacsákban sem jelentkeztek, de a ludak fele megbetegedett és jelentkeztek bennük kórbonctani elváltozások, szemben a kacsákkal. A szöveti elváltozások súlyosabbak voltak, a virális antigén nagyobb mennyiségben és kiterjedésben volt látható, a vírusizolálás egy nagyságrenddel nagyobb eredményt adott a kacával összevetve.

Az olasz H7N1 HPAI járvány során két házilúd és két mosusz kacsa is érintett volt. Csak lúdban találtak azonban kórbonctani elváltozásokat (hasnyálmirigy elhalások) és csak itt sikerült a vírus izolálása, kórszövettanilag és IH-val pedig lúdban kifejezettebb elváltozás illetve antigén festődés mutatkozott, mint mosusz kacsában (Capua és Mutinelli, 2001). A patogenezisben itt leírt különbségek hasonlóak az általunk tapasztaltakhoz lúd és mulard (mosusz és pekingi kacsa fajhibrid) vonatkozásában, felvetve a házilúd fokozottabb érzékenységét a HPAIV fertőzésre, mularddal összehasonlítva. Mulardok kísérletes fertőzéséről csak LPAI vonatkozásában találtunk adatot a szakirodalomban (Ferreira és mtsai., 2009). Songserm és mtsai. (2006) a 2004-es thaiföldi járvány során a szabadon tartott és a háztáji kacsáállományok (köztük mulardok) kórbonctani, kórszövettani vizsgálata során nem említenekülönbséget az érzékenységben a mulard és pekingi kacsák között. Antarasena és munkatársai (2006) természetes járvány során nem találtak különbséget a mosuszkacsa és a khaki campbell (*A. platyrhynchos*) között kórbonctani, kórszövettani elváltozások tekintetében.

Saját vizsgálataink alapján tapasztaltunk némi érzékenységbeli különbséget a mulard és a pekingi kacsa között. Míg IH eljárással számos szervben (agyvelő, tüdő, légcső, lép, máj, vese, hasnyálmirigy, szív) sikerült kimutatni a vírusantigén jelenlétét a mulard kacsa esetében, addig az agyvelő ependyma sejtjein és a környező agyi területeken kívül ez egyetlen más szervben sem sikerült pekingi kacsák vizsgálata során. Ezzel szemben viszont a pekingi kacsában sokkal nagyobb vírus RNS mennyiségeket mértünk, több szervmintából, mint a mulardokban (**7. táblázat**). Lehetséges magyarázat lehet valamilyen fajta-érzékenységbeli különbség a fertőzéssel szemben, amit számos más kórokozóval történt kísérletes fertőzés során leírtak. A mulard kacsa ugyanis a hím mosuszkacsa (*Cairina moschata*) és a tojó pekingi kacsa (*Anas platyrhynchos*) keresztezése, melyet széleskörűen hasznosítanak hizott kacsamáj- és hústermelésre. A mosusz és a pekingi kacsa jelentősen eltér egymástól bizonyos kacsa és lúdvírus-fertőzésekkel szembeni érzékenység tekintetében. Például, míg a kacsahépatitis vírusa fiatal pekingi kacsákban fatális megbetegedéseket okoz, addig a mosusz kacsát nem betegíti meg. Ezzel szemben a lúd

parvovírus megbetegíti a mosusz kacsát, de nem okoz betegséget pekingi kacsában (Gough, 2003, 2008, Woolcock, 2003, 2008, Palya, személyes közlés, 2008).

Annak ellenére, hogy a kacsafajokat tekintették a legellenállóbbnak a H5N1 HPAIV fertőzéssel szemben, a betegség súlyossága széles határok között változott a klinikai tünetektől mentes átvészéléstől a súlyos tünetekben megnyilvánuló, elhullással járó kórképig mind természetes, mind mesterséges fertőzés során (Perkins és Swayne, 2003, Hulse-Post és mtsai., 2005, Kwon és mtsai., 2005, Sturm-Ramirez és mtsai., 2004, 2005, Songserm és mtsai., 2006, Keawcharoen és mtsai., 2008, Löndt és mtsai., 2008, 2010, Bingham és mtsai., 2009, Guionie és mtsai., 2009). Korábban kísérletes fertőzések során beigazolódott, hogy különböző kacsafajok érzékenysége eltérő a H5N1 HPAIV fertőzéssel szemben (Keawcharoen és mtsai., 2008). Pantin-Jackwood és Swayne (2007 a, b) azt találták 2 és 5 hetes pekingi kacsák fertőzéses kísérlete során, hogy a vírusantigén mindkét korcsoportban kimutatható volt, de a mortalitási adatokban nagy eltérés mutatkozott: 78% volt a fiatalabb, míg csak 13% az idősebb korosztályban. A fertőzött szervek száma és a vírusantigén mennyisége is alacsonyabb volt az idősebb csoportban. Keawcharoen és munkatársai (2008) ugyanazon törzzsel való fertőzéssel, nem váltottak ki betegséget 8-11 hónapos pekingi kacsákban, amellyel Löndt és munkatársai (2008) 4 hetes kacsákat fertőzve 100%-os mortalitást tapasztaltak. Löndt és munkatársai (2010) 8 illetve 12 hetes pekingi kacsák fertőzése során írtak le 100%-os mortalitást illetve enyhe tünetekkel járó átvészélést. Pantin-Jackwood és Swayne (2007a,b) által tapasztalt 5 hetes korban meglévő rezisztenciát utóbbi szerző azzal magyarázza, hogy ott még egy 2005 előtti (clade 1) törzset használtak, míg most egy 2005-ös, magasabb virulenciájú (clade 2.2.) izolátumot. Guionie és munkatársai (2009) kísérletes mosusz kacsák fertőzés során magas mortalitást, oropharingeális vírusürítést és a két vírustörzs (subclade 2.2.3. és 2.2.1.) neurotropizmusát írtak le 5-6 hetes állatokban. Ezen megállapítások megerősítik az életkor szerepének jelentőségét a vírus patogenezésében. A vizsgálataink alá vont háziszárnyasok a 4-9 hetes növendék korosztályba tartoztak, kivéve a 6. számú lúd egyedet, mely egy 1 éves törzslúd volt. A hattyúk között vegyesen voltak felnőttek és növendékek és korcsoporttól függetlenül minden egyed elhullott és bennük ugyanolyan súlyos elváltozások mutatkoztak a vírusfertőzés következtében, ami a vírustörzs magas patogenitását jelzi. Ezen megfigyelésünket kísérletesen is megerősítették, megállapítva, hogy a fertőzés kimenetelét bütykös hattyúban nem befolyásolja az életkor illetve a fertőzéshez használt vírus dózisa (Kalthoff és mtsai., 2008). Neufeld és munkatársai (2009) kanadai ludak fertőzése során a növendék állatok 100%-os mortalitásával szemben a felnőtteknél csak 20%-os elhullást tapasztaltak, és a túlélő felnőttekben enyhébb elváltozások mutatkoztak és kisebb mennyiségű vírusantigén volt kimutatható. Az általunk vizsgált egy felnőtt lúd esetében — összehasonlítva a növendék

ludakkal – mi is enyhébb elváltozásokat találtunk a hasnyálmirigyben, a májban és a lépben, kimutatható vírus nukleoprotein nélkül (ld.: **6. táblázat**). Ez a különbség a qRRT-PCR eredményekben nem mutatkozik meg (ld.:**7., 10. táblázat**).

Az életkorból adódó nagyobb ellenállóképesség a HPAIV fertőzéssel szemben tőkésrécében és lúdban megerősíti e fajok nagy távolságok közötti vektor szerepét (Keawcharoen és mtsai., 2008, Brown és mtsai., 2008, Löndt és mtsai., 2010), de nem kizárt a bütykös hattyúk illetően szerepe sem, a természetes viszonyokat megközelítő, alacsony dózisu fertőzések során (Kalthoff és mtsai., 2008).

Nem tekinthetünk el attól a tényről, hogy a különböző fertőzési kísérletek és természetes fertőzések során más-más vírustörzsek hatásait látjuk. Sturm-Ramirez és munkatársai (2005) pekingi kacsákat és tőkésrécéket (mindkettő *Anas platyrhynchos*) fertőztek 23 különböző dél-kelet ázsiai H5N1 HPAI vírussal, és a kórlefolást a 100%-os elhullással járó idegrendszeri kórképtől az enyhe tünetekkel járó átvészelésig tapasztalták, a pekingi kacsá esetében kissé gyorsabb lefolyással. Hasonló eredményre jutottak Songserm és munkatársai (2006) khaki campbell kacsák vonatkozásában. Pantin-Jackwood és munkatársai (2007a,b) is a vírustörzsek közti különbségeket és a fertőzött állatok korát emelik ki a kórlefolás tekintetében. Hulse-Post és munkatársai (2005) kísérletes fertőzéseik során a tőkés récét a H5N1 vírus „trójai falovának” nevezik, ugyanis akár 17 napos vírusürítést tapasztaltak tünetek megjelenése nélkül. Mindkét szerző arra a következtetésre jutott, hogy a kacsában alacsonyabb patogenitással bíró H5N1 törzsek rezervoárja, hordozója lehet a tőkésréce, amely fajban a vírus egyensúlyi állapotot érhet el, míg ugyanez a vírus továbbra is fatális kimenetelű betegséget okoz tyúkfélékben. Más szerzők (Bingham és mtsai., 2009) szerint azok a törzsek képesek hatékonyan fenntartani a populáció fertőzöttségét, amelyek súlyosabb tüneteket, nagyobb titerű vírusürítést, de nem nagy mortalitást okoznak. Ezek a kacsafajhoz jobban adaptálódtak, szemben a tünetmentes vírusürítést okozó törzsekkel.

1961 óta nem történt olyan HPAI fertőzés, mely vadonélő víziszárnyasokat érintett, egészen a 2002-ben ilyen tulajdonságra szert tett H5N1 vírus megjelenéséig. Ekkor még a kacsafajok is nagy érzékenységet mutattak az új vírus okozta fertőzésre, noha a hongkongi járványkitörés során az idegrendszeri tüneteket mutató kacsák negyede túlélte a fertőzést. A 2002 előtti törzsek nem okoztak betegséget e fajban, de a H5 antigént érintő drift következtében igen virulensek lettek kacsában is (Sturm-Ramirez és mtsai., 2004). Sturm-Ramirez és munkatársai (2005) és Hulse-Post és munkatársai (2005) kísérletes fertőzés során azt tapasztalták, hogy a 2002 utáni erősen virulens vírusok egy része ismét alacsony patogenitásúvá vált tőkésrécében. Ezek a törzsek a korábbi törzsekkel és az LP vírusokkal ellentétben zömmel nem a kloákán, hanem a trachean keresztül ürültek. Az új törzs tőkés récében visszatérni látszik a korábban jellemző, gazdafajhoz adaptált egyensúlyi állapotba.

Vizsgálataink során, a későbbi szekvencia analízis alapján három, genetikailag különböző törzsnek bizonyult (HUN1, HUN3, HUN4) izolátum kórtani hatását tekintettük át természetes úton fertőződött négy víziszárnyas faj egyedeiben. A hattyúból a HUN1, a két kacsafajból a HUN3, a libákból vegyesen HUN3 és HUN4 törzseket izoláltuk. A ludakban egyik vizsgáló módszerrel sem találtunk különbséget a vírustörzsek patogenitását illetően, a törzsek pedig nem álltak túlságosan távol egymástól genetikailag (Szeleczky és mtsai., 2009). A hattyúból izolált HUN1 törzsek távolabbi ágba tartoznak, de a szövettani elváltozások és az IH eredmények közti különbségek megfeleltethetők hattyú és lúd között a kísérletes fertőzés során tapasztalt érzékenységbeli különbségnek (Brown és mtsai., 2008). Véleményünk szerint a három izolátumcsoport patogenitását tekintve nem mutatott számottevő különbséget, így lehetőségünk nyílt a fertőzés kimenetelének összehasonlítására a különböző fajokban.

Mulardok kísérletes HPAI fertőzéséről nem találtunk irodalmi adatot, így kísérletesen csak az igazolt, hogy a legérzékenyebb a bütykös hattyú, kevésbé érzékenyek a lúdfélék, legkevésbé érzékeny a pekingi kacs. Természetes fertőzés (Capua és Mutinelli, 2001) és saját vizsgálataink alapján a mulard kacs a lúdféléknél rezisztensebbnek, ám pekingi kacsánál érzékenyebbnek tűnik a H5N1 HPAIV fertőzésre. Szükségesnek tartjuk további kísérletes fertőzések elvégzését mind a négy faj bevonásával, hogy a filogenetikailag meglehetősen diverz *Anatidae* család tagjai között a H5N1 fertőzés patogenezisének különbségeit tovább elemezhessük.

Munkánkban első alkalommal hasonlítottuk össze három, természetes körülmények között megfertőződött víziszárnyas faj szerveinek H5N1 HPAI vírusmennyiségét párhuzamosan immunhisztokémiai és kvantitatív RRT-PCR módszerekkel. Eredményeink alátámasztják más kutatók eredményeit (Perkins és Swayne, 2003, Antarasena és mtsai., 2006) abban a tekintetben, hogy szignifikánsan alacsonyabb vírusmennyiséget állapítottunk meg kacsákban, más fajokkal (bütykös hattyú és házilúd) összehasonlítva. A mulard kacs ilyen irányú vizsgálatával kapcsolatban nem találtunk irodalmi adatot. További vizsgálatok szükségesek a H5N1 HPAI patobiológiájával kapcsolatban a különböző kacsafajok érzékenységeinek összehasonlítására.

4. Fejezet

Új eredmények

1. A víziszárnyas-patogén tulajdonságra szert tett, H5N1 altípusú HP madárinfluenza vírus által, a 2006. évi hazai járvány során bütykös hattyúban okozott kórbonctani és kórszövettani elváltozások leírása és a fertőzés járványtanának értelmezése.
2. A H5N1 HPAI vírus okozta kórbonctani és kórszövettani elváltozások hazai leírása házilúdban, pekingi kacsában és mulard kacsában.
3. Három, természetes körülmények között fertőződött víziszárnyas faj (a házilúd, a pekingi kacska és a mulard kacska) kiválasztott szervei kórszövettani elváltozásainak és H5N1 vírusrészecskékének összehasonlítása immunhisztokémiai és kvantitatív PCR módszerekkel.
4. Bütykös hattyúban, házilúdban, pekingi kacsában és mulard kacsában egyaránt az agyvelőben volt kimutatható a legnagyobb vírusrészecskék mennyisége, ami megerősíti a H5N1 altípusú, magas patogenitású madárinfluenzavírus erősen neurotróp tulajdonságát.
5. Bütykös hattyúban és házilúdban a szövettani elváltozások súlyosabbak, az IH módszerrel kimutatott vírus nukleoprotein mennyisége pedig lényegesen nagyobb volt mind az agyvelőben, mind a szervekben, összevetve a két vizsgált kacsafajjal.
6. A házilúd szervekben a kvantitatív RRT-PCR módszerrel kimutatható vírus nukleinsav mennyisége több nagyságrenddel meghaladta a két kacsafaj szerveiben kimutatható értékeket.

VII. Irodalom

- Acland, H.M., Silverman, L.A., Eckroade, R.J.: **Lesions in broiler and layer chickens in an outbreak of highly pathogenic avian influenza virus infection**, *Veterinary Pathology*, 21. 564-569, 1984.
- Albert L., Hajt6 L., Szinai P.: **Status of the Mute Swan (*Cygnus olor*) in Hungary at the beginning of the 21st century**, *Aquila*, 111. 19-41, 2004.
- Alexander, D.J.: **Avian influenza. Recent developments**, *Veterinary Bulletin*, 52. 341-359, 1982.
- Alexander, D.J.: **Orthomyxovirus Infections**. In: *Virus infections of birds*. Szerk.: J.B. McFerran & M.S. McNulty. London: Elsevier Science, 1993. p. 287-316.
- Alexander, D.J. **Highly pathogenic avian influenza (fowl plague)**. In *OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. List A and B diseases of mammals, birds and bees*. 4-th ed., Office International des Epizooties, Paris, France. 2000.a p. 212-220.
- Alexander, D.J.: **A review of avian influenza in different bird species**, *Veterinary Microbiology*, 74. 3-13, 2000.b
- Anonymus: **Commission decision of 4 August 2006 approving a diagnostic manual for avian influenza as provided for in council directive 2005/94/EC [notified under document number C(2006) 3477 (2006/437/EC)]**. Official Journal of the European Union, Luxembourg, 2006.
http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/l_237/l_23720060831en00010027.pdf
- Antarasena, C., Sirimujalin, R., Prommuang, P., Blacksell, S.D., Promkuntod, N., Prommuang, P.: **Tissue tropism of a Thailand strain of high-pathogenicity avian influenza virus (H5N1) in tissues of naturally infected native chickens (*Gallus gallus*), Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and ducks (*Anas spp.*)**, *Avian Pathology*, 35. 250-253, 2006.
- Avian Influenza Diagnostic Manual: **Commission Decision of approving a Diagnostic Manual establishing diagnostic procedures, sampling methods and criteria for evaluation of the laboratory tests for the confirmation of Avian Influenza**, Brussels. 2006.
- Beard, C.W., Helfer, D.H.: **Isolation of two turkey influenza viruses in Oregon**, *Avian Diseases*, 16. 1133-1136, 1972.
- Becker, W.B.: **The isolation and classification of tern virus: influenza virus A/tern/South Africa/1961**, *Journal of Hygiene*, 64. 309-320, 1966.
- Bingham, J., Green, D.J., Lowther, S., Klippel, J., Burggraaf, S., Anderson, D.E., Wibawa, H., Hoa, D.M., Long, N.T., Vu, P.P., Middleton, D.J., Daniels, P.W.: **Infection studies with two highly pathogenic avian influenza strains (Vietnamese and Indonesian) in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*), with particular reference to clinical disease, tissue tropism and viral shedding**, *Avian Pathology*, 38. 267-278, 2009.

- Brown, J.D, Stallknecht, D.E., Swayne, D.E.: **Experimental infection of swans and geese with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) of Asian lineage**, *Emerging Infectious Diseases*, 14.136–142, 2008.
- Capua, I., Marangon, S.: **The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000, A review**, *Avian Pathology*, 29. 289-294, 2000.
- Capua, I., Mutinelli, F., Marangon, S., Alexander, D.J.: **H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys**, *Avian Pathology*, 29. 537-543, 2000.
- Capua, I., Mutinelli, F.: **Mortality in Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser var. domestica*) associated with natural infection with a highly pathogenic avian influenza virus of H7N1 subtype**, *Avian Pathology*, 30. 179-183, 2001.
- Cooley, A.J., Van Campen, H., Philpott, M.S., Easterday, B.C., Hinshaw, V.S.: **Pathological lesions in the lungs of ducks infected with influenza A viruses**, *Veterinary Pathology*, 26. 1-5, 1989.
- Delany, S.: **The Mute Swan in Europe – A preliminary assessment of numbers, distribution and potential risks in dissemination of HPAI – H5N1**, *Wetlands International*, 2006. február 14.
<http://www.wetlands.org/LinkClick.aspx?fileticket=0hONijRYbSs%3D&tabid=56>
- Department for Environment, Food and Rural Affairs: **Outbreak of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Suffolk in January 2007**. A report of the epidemiological findings by the National Emergency Epidemiology Group, Defra (közzétéve: 2007. április 5.)
http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/ai/documents/epid_findings070405.pdf
- Easterday, B.C., Halvorson, D.A., Hinshaw, V.S.: **Influenza**. In: *Diseases of Poultry*. Szerk.: Saif, Y. M. 10th ed. Ames, IA. Iowa State University Press, 1997. p. 583-605.
- Ellis, T. M., Bousfield, R. B., Bissett, L.A., Dyrting, K.C., Luk, G.S.M., Tsim, S.T., Sturm-Ramirez, K., Webster, R.G., Guan, Y., Peiris, J.S.M.: **Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002**, *Avian Pathology*, 33. 492-505, 2004.
- Ferreira, H., Pirlot, J.F., Kaspers, B., Kothlow, S., van den Berg, T., Lambrecht, B.: **Development of specific ELISAs to evaluate the Duck Immune Response after Experimental Infection with H5N1 and H7N1 LPAI Viruses**, *Avian Diseases*, Preprint, 2009. szeptember 1.
- Gough, R.E.: **Goose Parvovirus Infection**, In: *Diseases of Poultry*. Szerk.: Saif, Y.M. 11th edn Ames, IA: Iowa State University Press. 2003. p. 367-374.
- Gough, R.E.: **Goose Parvovirus Infection**, In *Diseases of Poultry* Szerk.: Saif, Y.M. 12th edn Oxford, Blackwell Publishing Ltd. 2008. p. 397-402.
- Guionie, O., Guillou-Cloarec, C., Courtois, D., Bougeard, S., Amelot, M., Jestin, V.: **Experimental Infection of Muscovy Ducks with Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) belonging to clade 2.2**, *Avian Diseases*, Preprint, 2009.

- Hooper, P., Selleck, P.: **Pathology of low and high virulent influenza virus infections.** In: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza.* Szerk.: Slemmons, R. D. Animal Health Association, USA, Richmond, VA. 1998. p.134-141.
- Hulse-Post, D.J., Sturm-Ramirez, K.M., Humberd, J., Seller, P., Govorkova, E.A., Krauss, S., Scholtissek, C., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, R.D., Long, H.T., Naipospos, T.S., Chen, H., Ellis, T.M., Guan, Y., Peiris, J.S., Webster, R.G.: **Role of domestic ducks in the propagation and biological evaluation of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia.** *Proceedings of the National academy of Sciences USA*, 102, 10682-10687. 2005.
- Ivanics, É., Bálint, Á., Pálmai, N., Márton, L., Dán, Á., Ursu, K., Szeredi, L., Rigó, D., Deim, Z., Tekes, L., Zarka, P., Nagy Eörsné, Dobos-Kovács, M., Glávits, R.: **A madárinfluenza erősen virulens (H5N1 altípusú) vírustörzse okozta megbetegedések hazai liba- és kacsállományokban,/ Diseases in Hungarian goose and duck flocks caused by highly pathogenic avian influenza strain (H5N1 subtype), Magyar Állatorvosok Lapja, 129. 387-399, 2007.a (Magyar és angol nyelven, teljes terjedelmében)**
- Ivanics É., Glávits R., Bálint Á., Palya V., Márton L., Dán Á., Ursu K., Szeredi L., Rigó D., Deim Z., Pálmai N., Tekes L., Dobos-Kovács M., Kovács Z.: **Tömegesen előforduló vesekárosodás és köszvény H5N1 altípusú madárinfluenza vírussal fertőződött kacsállományban,** Magyar Állatorvosok Lapja, 129. 535-541, 2007.b
- Johnson, D.C., Maxfield, B.G.: **An occurrence of avian influenza virus infection in laying chickens,** *Avian Diseases*, 20. 422-424, 1976.
- Jungherr, E.L., Tyzzer, E.E., Brandly, C.A., Moses H.E.: **The comparative pathology of fowl plague and Newcastle disease,** *American Journal of Veterinary Research*, 7. 250-288, 1946.
- Kalthoff, D., Breithaupt, A., Teifke, J.P., Globig, A., Harder, T., Mettenleiter, T.C., Beer, M.: **Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) in Experimentally Infected Adult Mute Swans,** *Emerging Infectious Diseases*, 14. 1267-1270, 2008.
- Keawcharoen, J., Van Riel, D., Van Amerongen, G., Bestebroer, T., Beyer, W. E., Van Lavieren, R., Osterhaus, A. D., Fouchier, R. A., Kuiken, T.: **Wild Ducks as Long-Distance Vectors of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1),** *Emerging Infectious Diseases*, 14. 600-607, 2008.
- Klopfleisch, R.-Werner, O., Mundt, E., Harder, T., Tiefke, J.P.: **Neurotropism of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A/Chicken/Indonesia/2003 (H5N1) in Experimentally Infected Pigeons (*Columbia livia f. domestica*),** *Veterinary Pathology*, 43. 463-470, 2006.
- Kobayashi, Y., Horimoto, R., Kawaoka, Y., Alexander, D.J. & Itakura, C.: **Pathological studies of chickens experimentally infected with two highly pathogenic avian influenza viruses,** *Avian Pathology*, 25. 285-304, 1996.
- Kodihalli, S., Sivanandan, V., Nagaraja, K. V., Goyal, S. M., Halvorson, D. A.: **Antigen-capture enzyme-immunoassay for detection of avian influenza-virus in turkeys,** *American Journal of Veterinary Research*, 54. 1385-1390, 1993.
- Krohn, L.D.: **A study on the recent outbreak of a fowl disease in New York City,** *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 20. 146-170, 1925.

- Kwon, Y.K., Joh, S.J., Kim, M.C., Sung, H.W., Lee, Y.J., Choi, J.G., Lee, E.K., Kim, J.H.: **Highly pathogenic avian influenza (H5N1) in commercial domestic ducks of South Korea**, *Avian Pathology*, 34. 367-370, 2005.
- Laudert, E., Halvorson, D., Sivanandan, V., Shaw, D.: **Comparative evaluation of tissue tropism characteristics in turkeys and mallard ducks after intravenous inoculation of type A influenza viruses**, *Avian Diseases*, 37. 773-780, 1993.
- Löndt, B.Z., Nunez, A., Banks, J., Nili, H., Johnson, L.K., Alexander, D.J.: **Pathogenesis of highly pathogenic avian influenza A/turkey/Turkey/1/2005 H5N1 in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) infected experimentally**, *Avian Pathology*, 37. 619-627, 2008.
- Löndt, B.Z., Núñez, A., Banks, J., Alexander, D.J., Russell, C., Richard-Löndt, A.C., Brown, I.H.: **The effect of age on the pathogenesis of a highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) infected experimentally**, *Influenza and other respiratory viruses*, 4. 17-25, 2010.
- McNulty, M.S., Allan, G.M., McCracken, R.M., McParland, P.J.: **Isolation of a highly pathogenic influenza virus from turkeys**, *Avian Pathology*, 14. 173-176, 1985.
- Mo, I.P., Brugh, M., Fletcher, O.J., Rowland, G.N., Swayne, D.E.: **Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity**, *Avian Diseases*, 41. 125-136, 1997.
- Munster, V.J., Wallensten, A., Baas, C., Rimmelzwaan, G., Schutten, M., Olsen, B., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M.: **Mallards and Highly Pathogenic Avian Influenza Ancestral Viruses, Northern Europe**, *Emerging Infectious Diseases*, 11. 1545-1551, 2005.
- Nemes, Cs., Glávits, R., Dobos-Kovács, M., Ivanics, É., Kaszanyitzky, É., Beregszászi, A., Szeredi, L., Dencső, L.: **Typhlocolitis associated with spirochaetes in goose flocks**, *Avian Pathology*, 35. 4-11, 2006.
- Neufeld, J.L., Embury-Hyatt, C., Berhane, Y., Manning, L., Ganske, S., Pasick, J.: **Pathology of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) infection in Canada geese (*Branta canadensis*): Preliminary Studies**, *Veterinary Pathology*, 46. 966-970, 2009.
- Newman, J., Halvorson, D., Karunakaran, D.: **Complications associated with avian influenza infections**. In: *Proceedings of the First International Symposium on Avian Influenza*. U. S. Animal Health Association, Richmond, VA. 1981. p. 8-12.
- Office International des Epizooties (OIE) **Highly Pathogenic Avian Influenza (Fowl Plague)**. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Fifth Edition. OIE, Paris, France. 2004. Chapter 2.7.12.
- Olsen, B., Munster, V.J., Wallenstein, A., Waldenström, J., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A.: **Global pattern of influenza A virus in wild birds**, *Science*, 312. 384-388, 2006.
- Otsuki, K., Kawaoka, Y., Nakamura, T. & Tsubokura, M.: **Pathogenicity for chickens of avian influenza viruses isolated from whistling swans and a black-tailed gull in Japan**, *Avian Diseases*, 26. 314-320, 1982.

- Oyana, T.J., Dai, D., Scott, K.E.: **Spatiotemporal Distributions of Reported Cases of the Avian Influenza H5N1 (Bird Flu) in Southern China in Early 2004**, *Avian Diseases*, 50. 508-515, 2006.
- Palya, V.: Személyes közlés, 2008.
- Pálmai, N., Deim, Z., Erdélyi, K., Bálint, Á., Dán, Á., Márton, L., Glávits, R.: **A madárinfluenza erősen virulens (H5N1 altípusú) törzse okozta kórbonctani és kórszöveti elváltozások bütykös hattyúban (*Cygnus olor*), / Gross-and histopathological lesions caused by highly pathogenic avian influenza virus (H5N1 in mute swans (*Cygnus olor*), Magyar Állatorvosok Lapja, 128. 265-272, 2006. (Magyar és angol nyelven, teljes terjedelmében)**
- Pálmai, N., Erdélyi, K., Bálint, Á., Márton, L., Dán, Á., Deim, Z., Ursu, K., Brown, I. H., Löndt, B. Z., Glávits, R.: **Pathobiology of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) infection in mute swans (*Cygnus olor*)**, *Avian Pathology*, 36. 245-249, 2007.
- Pantin-Jackwood, M.J., Suarez, D.L., Spackman, E., Swayne, D.E.: **Age at infection affects the pathogenicity of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in ducks**, *Virus Res.*, 130. 151-61, 2007.a
- Pantin-Jackwood, M. J., Swayne, D.E.: **Pathobiology of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in ducks**, *Avian Diseases*, 51. 250-259, 2007.B
- Perdue, M.L., Suarez, D.L., Swayne, D.E.: **Avian influenza in the 1990s**, *Poultry and Avian Biology Reviews*, 11. 1-20, 1999.
- Perkins, L.E.L., Swayne, D.E.: **Comparative susceptibility of selected avian and mammalian species to a Hong Kong-origin H5N1 high-pathogenicity avian influenza virus**, *Avian Diseases*, 47. 956-967, 2003.
- Rinder, M., Lang, V., Fuchs, C., Hafner-Marx, A., Bogner, K.H., Neubauer, A., Büttner, M., Rinder, H.: **Genetic Evidence for Multi-event Imports of Avian Influenza Virus a (H5N1) into Bavaria, Germany**, *J. Vet., Diagn. Invest.*, 19. 279-282, 2007.
- Sabirovic, M., Wilesmith, J., Hall, S., Coulson, N., Landeg, F.: **Outbreaks of HPAI H5N1 virus in Europe during 2005/2006 (An overview and commentary)** Department for Environment, Food and Rural Affairs (közzétéve: 2006. június 30.) <http://www.animal-health-online.de/drms/gef/defra300606.pdf>
- Shortridge, K.F., Zhou, N.N., Guan, Y., Gao, P., Ito, T., Kawaoka, Y., Kodihalli, S., Krauss, S., Markhill, D., Murti, G., Norwood, M., Senne, D., Sims, L., Takada, A., Webster, R. G.: **Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong**, *Virology*, 252. 331-342, 1998.
- Skeeles, J.K., Morressey, R.L., Nagy, A., Helm, F., Bunn, T.O., Langford, M.J., Long, R.E., Apple, R.O.: **The use of fluorescent antibody (FA) techniques for rapid diagnosis of avian influenza (H5N2) associated with the Pennsylvania outbreak of 1983-1984**. In: *Proceeding of the 35th North Central Avian Disease Conference*. 1984. 32.
- Songserm, T., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Meemak, N., Hulse-Post, D.J., Sturm-Ramirez, K.M., Webster, R.G.: **Domestic Ducks and H5N1 Influenza Epidemic, Thailand**, *Emerging Infectious Diseases*, 12. 575-581, 2006.

- Spackman, E., Senne, D.A., Myers T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T. & Suarez D.L.: **Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes**, *Journal of Clinical Microbiology*, 40. 3256–3260, 2002.
- Stallknecht, D.E.: **Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations: Waterfowl, shorebirds, pelicans, cormorans, etc.** In: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza*. Szerk.: Slemons, R. D. Richmond, VA. U. S. Animal Health Association, 1998. p. 61-69.
- Sturm-Ramirez, K.M., Ellis, T., Bousfield, B., Bissett, L., Dyrting, K., Rehg, J.E., Poon, L., Guan, Y., Peiris, M., Webster, R.G.: **Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks**, *Journal of Virology*, 78. 4892-4901, 2004.
- Sturm-Ramirez, K.M, Hulse-Post, D.J., Govorkova, E.A., Humberd, J., Seiler, P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Chaisingh, A., Long, H.T., Naipospos, T.S.P., Chen, H., Ellis, T.M., Guan, Y., Peiris, J.S.M., Webster, R.G.: **Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia?** *Journal of Virology*, 79. 11269-11279, 2005.
- Suarez, D.L., Perdue, M.L., Cox, N., Rowe, T., Bender, C., Huang, J., Swayne, D.E.: **Comparison of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens form Hong Kong**, *Journal of Virology*, 72. 6678-6688, 1998.
- Swayne, D.E.: **Pathobiology of H5N1 Mexican avian influenza virus infections of chickens**, *Veterinary Pathology*, 34. 557-567, 1997.
- Swayne, D.E.: **Understanding the ecology and epidemiology of avian influenza viruses: implications for zoonotic potential.** In: *Emerging diseases of animals*. Szerk.: Bolin, C. A. Washington, D. C.: ASM Press, 2000. p. 101-130.
- Swayne, D.E., Ficken, M.D., Guy, J.S.: **Immunohistochemical demonstration of influenza A nucleoprotein in lungs of turkeys with natural and experimental influenza respiratory disease**, *Avian Pathology*, 21. 547-557, 1992.
- Swayne, D.E., Halvorson, D.A.: **Influenza**. In: *Diseases of poultry*. Szerk.: Saif, Y. M. 11th ed. Iowa State Press, Ames. 2003. p. 135-160.
- Swayne, D.E., Halvorson, D.A.: **Influenza**. In *Diseases of Poultry* Szerk.: Saif, Y.M., 12th edn Oxford, UK:Blackwell Publishing Ltd. 2008. p. 153-184.
- Swayne, D.E., Slemons, R.D.: **Comparative pathology of a chickens origin and two duck-origin influenza virus isolates in chickens: The effect of route of inoculation**, *Veterinary Pathology*, 31. 237-245, 1994.
- Swayne, D.E., Slemons, R.D.: **Comparative pathology of intravenously inoculated wild duck- and turkey-origin type A influenza virus in chickens**, *Avian Diseases*, 39. 74-84, 1995.B
- Swayne, D.E., Suarez, D.: **Highly pathogenic avian influenza**, *Scientific and Technical Review, Office International des Epizooties*, 19. 463-482, 2000.

- Szeleczy, Zs., Dán, Á., Ursu, K., Ivanics, É., Kiss, I., Erdélyi, K., Belák, S., Muller, C.P., Brown, I.H., Bálint, Á.: **Four different sublineages of highly pathogenic avian influenza H5N1 introduced in Hungary in 2006-2007**, *Veterinary Microbiology*, 139. 24-33, 2009.
- Szeredi L., Pálmai N., Erdélyi K., Deim Z., Márton L., Glávits R.: **A madárinfluenza-vírus erősen patogén, H5N1 altípusának kimutatása immunhisztokémiai módszerrel bütykös hattyúból (*Cygnus olor*)**, *Magyar Állatorvosok Lapja*, 129. 98-102, 2007.
- Tanimura, N., Tsukamoto, K., Okumatsu, M. Mase, M., Imada, T., Nakamura, K., Kubo, M., Yamaguchi, S., Irishio, W., Hayashi, M., Nakai, T., Yamauchi, A., Nishimura, M., Imai, K.: **Pathology of fatal highly pathogenic H5N1 avian influenza virus infection in large-billed crows (*Corvus macrorhynchos*) during the 2004 outbreak in Japan**, *Veterinary Pathology*, 43. 500-509, 2006.
- Tanyi, J.: **Egyes állatbetegségek diagnosztikai eredményeinek és járványtanának értékelése**, MTA Doktori disszertáció, Debrecen. 1997.
- Terregino, C., Milani, A., Capua, I., Marino, A., Cavaliere, N.: **Highly pathogenic avian influenza H5N1 subtype in mute swans in Italy**, (Letter) *The Veterinary Record*, 158. 491, 2006.
- Tiefke, J.P., Klopfleisch, R., Globing, A., Starick, E., Hoffmann, B., Wolf, P.U., Beer, M., Mettenleiter, T.C. & Harder, T.C.: **Pathology of natural infections by H5N1 highly pathogenic avian influenza virus in mute (*Cygnus olor*) and whooper (*Cygnus cygnus*) swans**, *Veterinary Pathology*, 44. 137-143, 2007.
- Turner, A.J.: **The isolation of fowl plague virus in Victoria**, *Aust. Vet. J.*, 52. 384, 1976.
- Van Campen, H., Eastarday, B.C., Hinshaw, V.S.: **Pathogenesis of a virulent avian influenza A virus: lymphoid infection and destruction**, *The Journal of General Virology*, 70. 467-472, 1989.a
- Van Campen, H., Eastarday, B.C., Hinshaw, V.S.: **Virulent avian influenza A viruses: their effect on avian lymphocytes and macrophages in vivo and in vitro**, *The Journal of General Virology*, 70. 2887-2895, 1989.b
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y.: **Evolution and ecology of influenza A viruses**, *Microbiological Reviews*, 56. 152-179, 1992.
- Webster, R.G., Peiris, M., Chen, H., Guan, Y.: **H5N1 outbreaks and enzootic influenza**, *Emerging Infectious Diseases*, 12. 123-128, 2006.
- Woolcock, P.R. **Duck hepatitis**. In: *Diseases of Poultry*. Szerk.: Saif, Y.M., 11th edn Ames, IA.: Iowa State University Press. 2003. p. 343-354.
- Woolcock, P.R.: **Duck hepatitis**. In: *Diseases of Poultry*. Szerk.: Saif, Y.M. 12th edn Oxford: UK:Blackwell Publishing Ltd., 2008. p. 373-381.
- World Health Organisation. (2005). **Recommended laboratory tests to identify influenza A/H5 virus in specimens from patients with an influenza-like illness**. [http://www.wpro.who.int/internet/resources.ashx/CSR/Publications/labtest to identify influenza A%28H5%29 virus in specimens from Patients with an influenza like illness.pdf](http://www.wpro.who.int/internet/resources.ashx/CSR/Publications/labtest%20to%20identify%20influenza%20A%20H5%20virus%20in%20specimens%20from%20patients%20with%20an%20influenza%20like%20illness.pdf)

Ziegler, A.F., Davison, S., Acland, H., Eckroade, R.J.: **Characteristics of H7N2 (nonpathogenic) avian influenza virus infection in commercial layers, in Pennsylvania, 1997-98.** Avian Diseases, 43. 142-149, 1999.

VIII. Tudományos publikációk

Pálmai Nimród, Deim Zoltán, Erdélyi Károly, Bálint Ádám, Dán Ádám, Márton Lázár, Glávits Róbert: **A madárinfluenza erősen virulens (H5N1 altípusú) törzse okozta kórbonctani és kórszövettani elváltozások bütykös hattyúban (*Cygnus olor*). / Gross, and histopathological lesions caused by highly pathogenic avian influenza virus (H5N1 in mute swans (*Cygnus olor*), Előzetes közlemény. Magyar Állatorvosok Lapja, 128. 265-272, 2006. (Magyar és angol nyelven, teljes terjedelmében)**

Pálmai Nimród, Erdélyi Károly, Bálint Ádám, Márton Lázár, Dán Ádám, Deim Zoltán, Ursu Krisztina, Brandon Z. Löndt, Ian H. Brown, Glávits Róbert: **Pathobiology of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) infection in mute swans (*Cygnus olor*), Avian Pathology, 36. 245-249, 2007.**

Szeredi Levente, Pálmai Nimród, Erdélyi Károly, Deim Zoltán, Márton Lázár, Glávits Róbert: **A madárinfluenza-vírus erősen patogén, H5N1 altípusának kimutatása immunhisztokémiai módszerrel bütykös hattyúból (*Cygnus olor*), Magyar Állatorvosok Lapja, 129. 98-102, 2007.**

Ivanics Éva, Bálint Ádám, Pálmai Nimród, Márton Lázár, Dán Ádám, Ursu Krisztina, Szeredi Levente, Deim Zoltán, Rigó Dóra, Tekes Lajos, Zarka Péter, Nagy Eörsné, Dobos-Kovács Mihály és Glávits Róbert: **A madárinfluenza erősen virulens (H5N1 altípusú) vírustörzse okozta megbetegedések hazai liba- és kacsáállományokban. / Diseases in Hungarian goose and duck flocks caused by highly pathogenic avian influenza strain (H5N1 subtype), Magyar Állatorvosok Lapja, 129. 387-399, 2007. (Magyar és angol nyelven, teljes terjedelmében)**

Ivanics Éva, Glávits Róbert, Bálint Ádám, Palya Vilmos, Márton Lázár, Dán Ádám, Ursu Krisztina, Szeredi Levente, Rigó Dóra, Pálmai Nimród, Tekes Lajos, Dobos-Kovács Mihály és Kovács Zoltán: **Tömegesen előforduló vesekárosodás és köszvény H5N1 altípusú madárinfluenza vírussal fertőzött mulard kacsá állományban, Magyar Állatorvosok Lapja, 129. 535-541, 2007.**

Szeredi Levente, Dán Ádám, Pálmai Nimród, Ursu Krisztina, Bálint Ádám, Szeleczy Zsófia, Ivanics Éva, Erdélyi Károly, Rigó Dóra, Tekes Lajos, Glávits Róbert: **Tissue tropism of high-pathogenicity avian influenza virus subtype H5N1 in naturally infected mute swans (*Cygnus olor*), domestic geese (*Anser anser var. domestica*), Pekin duck**

(*Anas platyrhynchos*) and mulard duck (*Cairina moschata* x *Anas platyrhynchos*),
Acta Veterinaria Hungarica, 58. 133-145, 2010.

Rigó Dóra, Pálmai Nimród, Dán Ádám, Ursu Krisztina, Szeredi Levente, Szeleczy Zsófia, Bálint Ádám, Glávits Róbert: **Experimental study of avian influenza virus strains of different pathogenicity (H5N1, H5N2, H3N8, H10N4) in chicken embryos,** Acta Veterinaria Hungarica, 2010. Közlésre előkészítve

IX. Melléklet

Szelezcky és mtsai. (2009) által elvégzett filogenetikai analízis összefoglalója

A bütykös hattyúból Nagybaracska térségében izolált reprezentatív vírusok (A/mute swan/Hungary/4030/06, A/mute swan/Hungary/6170/06 és A/mute swan/Hungary/7973/06) 100%-os szekvencia azonosságot mutattak a HA gén tekintetében egymással és az első hazai H5N1 izolátummal (A/mute swan/Hungary/3472/06) Ezt a csoportot HUN1 csoportnak nevezték. A legnagyobb nukleotidsorrend-azonosság a HA génben az A/mute swan/Croatia/1/05(H5N1) törzzsel mutatkozott (GenBank Accession No.: CY016819). Velük egy genetikai ágba (sublineage 2,2B [WHO/FAO/OIE]) tartoznak olyan törzsek, melyeket Csehországban, Észak-Németországban, Dániában, Svédországban, az Egyesült Királyságban, Oroszországban, és Nigériában izoláltak vadon élő madaraktól, köztük hattyúkból és récékből 2005 végén és 2006 elején (pl.: A/swan/Germany/R65/2006, A/cygnus olor/Astrakhan/Ast05-2-10/05, A/chicken/Nigeria/1047-30/05)

Az „A/mute swan/Hungary/3472-I/2006” izolátum haemagglutinin génjének HA1 fragmentjét szekvenálva (967 nukleotid) a PQGERRRK*GLF proteáz vágási hely aminosav sorrendjét találták. Ez volt a jellemző a legtöbb 2005/2006-os kelet-európai és délkelet-ázsiai H5N1 HPAI vírusizolátumra.

A 10 nappal később, Dunakeszinél izolált „A/mute swan/Hungary/4571/2006” törzs és a vele rokon, a Duna vonala mentén déli irányban izolált törzsek (A/coot/Hungary/5217/06, A/mute swan/Hungary/7055/06, A/black-headed gull/Hungary/5237/06, A/mute swan /Hungary/7054/06, A/mute swan/Hungary/6945/06, A/mute swan/Hungary/5203/06) egy másik genetikai ágba (clade 2.2.1.) tartoznak. Ezt a csoportot nevezték HUN2 csoportnak. Legszorosabb rokonságot egy olasz törzzsel (A/mute swan/Italy/808/2006) mutatnak. Ebbe az ágba tartoznak még cseh, szlovák, svéd, illetve kissé távolabb osztrák, szlovén, francia, török, egyiptomi és nigériai izolátumok.

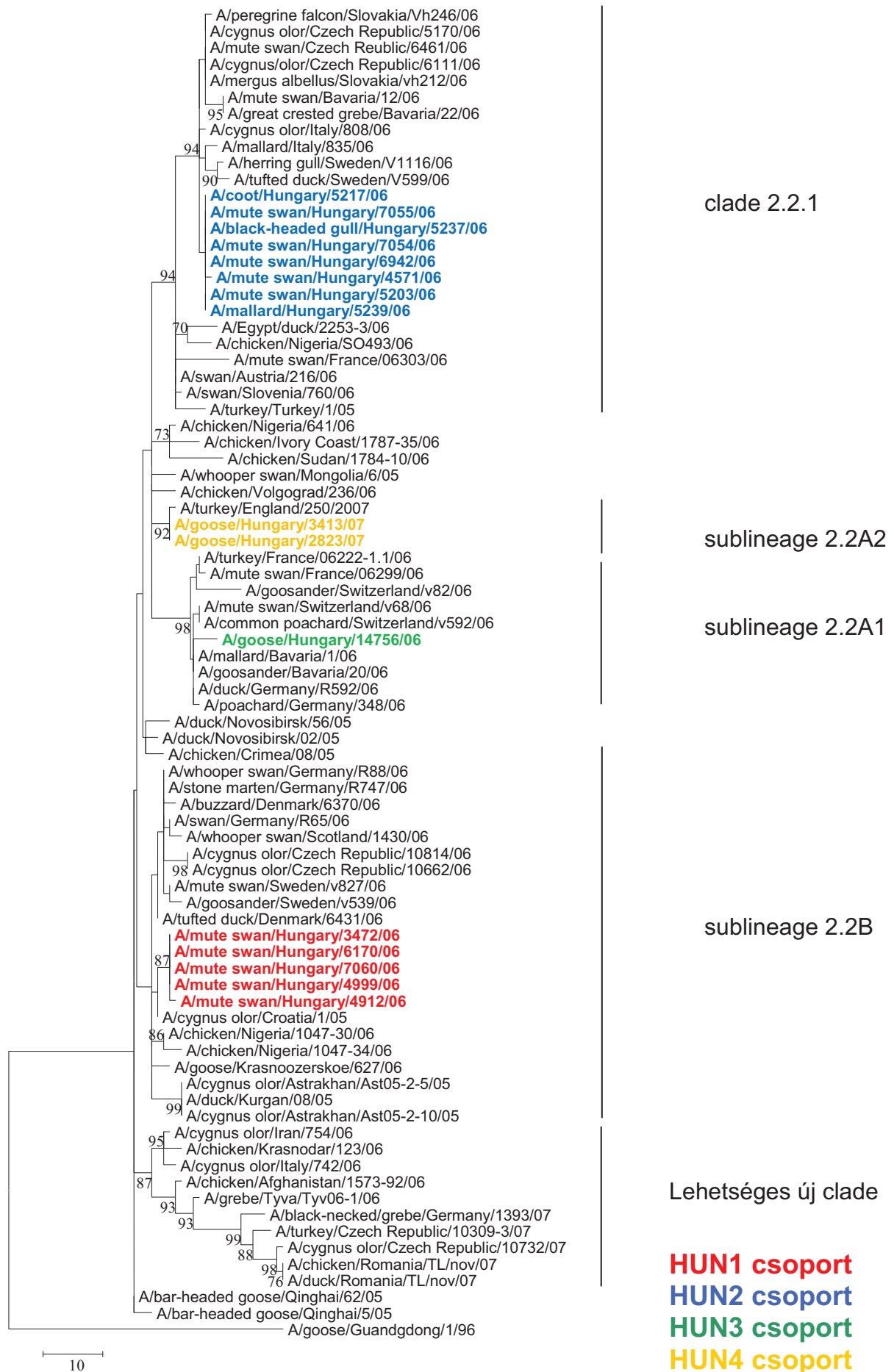
Az eredmények azt mutatják, hogy az általunk izolált vírus ugyanabban a filogenetikai ágban (clade 2.2) foglal helyet, melyet a 2005 áprilisában a kínai Qinghai tónál izolált progenitor vírus alapján Qinghai-like kládnak neveznek.

A 2006. június-júliusi járvány során mulard kacsából, pekingi kacsából és lúdból izolált törzsek (A/mulard duck/Hungary/15310/06, A/Pekin duck/Hungary/15981/06 és A/goose/Hungary /15012/06) esetében a HA gén 100%-os nukleotid szekvencia azonosságát tapasztaltuk egymáshoz és az első hazai, háziszárnyas-izolátumhoz képest (A/goose/Hungary/14756/06). Ezek a törzsek különböztek a vadmadaraktól kimutatott HUN1 és HUN2 csoportba tartozó izolátumoktól, így egy külön HUN3 csoportba sorolhatók. A legnagyobb mértékű szekvencia azonosságot az elsőként izolált bajor

A/mallard/Bavaria/1/06 törzssel találtuk, észak-német (A/duck/Germany/R592/06), francia és svájci törzsek mellett (sublineage 2.2A1). A közös eredet feltételezhető, de annak bizonyítása még nem történt meg.

A 2007. januári két izolátum (A/goose/Hungary/2823/07 és A/goose/Hungary/3472/06) szintén egy külön genetikai ágba tartozik (HUN4), és egy brit izolátummal (A/turkey/United Kingdom/250/07) mutat szoros rokonságot (sublineage 2.2A2). A közös ő és az eredet azonban egyelőre bizonytalan (Szeleczy és mtsai., 2009) (**1. ábra**).

1. ábra: Szeleczy és mtsai. (2009) által elvégzett filogenetikai analízis összefoglaló eredménye



X. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani munkám során nyújtott hathatós segítségéért, iránymutatásáért mindenek előtt témavezetőmnek, dr. Glávits Róbertnek.

A kórbonctani vizsgálatokban és az adminisztrációban köszönöm dr. Deim Zoltán, dr. Erdélyi Károly, Ferencz Attila, Malinovszki János, dr. Molnár Tamás, dr. Rigó Dóra, Turák Julianna segítségét.

A kórszövettani metszetek elkészítésében köszönöm Kelemen Edit és Lakosi Szilvia segítségét, az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzésében és kiértékelésében nyújtott segítségükért és iránymutatásukért köszönettel tartozom Ráczné Mészáros Ágnesnek és dr. Szeredi Leventének.

Köszönöm a virológiai munkában való segítségüket dr. Bálint Ádámnak, Ratkainé Michna Juditnak és dr. Szeleczky Zsófiának.

A molekulárisbiológiai vizsgálatok elvégzésében köszönettel tartozom dr. Dán Ádámnak, Dencső Lászlónak, Juhász Ágnesnek, Ottinger Ernőnének és dr. Ursu Krisztinának.