

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 tézisei

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

.....
Dr. Pálmai Nimród

Bevezetés és célkitűzések

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. A kórokozó az Országos Állategészségügyi Intézetben (jelenlegi neve Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal, Központ, Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság) akkor mintegy 3300, különböző fajú, elhullott vadmadárhulla (köztük 165 hattyú) vizsgálata során összesen 67 bütykös hattyúban 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.

Hazánkban madárinfluenza vírus okozta megbetegedések először az 1960-70-es években kerültek megállapításra. Tanyi 1997-ben 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 háziasított 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 egyed számú 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 kacsa-elhullásokat okozott. Emberi megbetegedésről hazánkban nincs tudomásunk. 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 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.

Anyag és módszer

Minták és mintavétel

2006 januárjától március végéig, a magyarországi madárinfluenza járvány első hulláma során, a H5N1 altípusú madárinfluenza fertőzés 67 bütykös hattyúban (*Cygnus olor*) került megállapításra. A pozitív esetek zöme egy dél-magyarországi kitörési gócból, Nagybaracska környékéről érkezett.

2006 június-júliusában Bács-Kiskun megyében és 2007 januárjában Csongrád megyében, házi víziszárnyasokkal sűrűn betelepített régióban, összesen 15 lúd- és 15 kacsa- (11 pekingi és 4 mulard) állomány betegedett meg. Diagnosztikai vizsgálatra általában állományonként 3-5 állat (összesen 55 lúd és 65 kacsa) került. A vizsgált állatok a járvány első napjaiban hullottak el, esetenként élő, moribund állapotban küldték azokat diagnosztikai vizsgálatra.

A vírus szervotropizmusát 10 bütykös hattyú, 6 házi lúd, 6 mulard kacsa és 5 pekingi kacsa esetén vizsgáltuk. Az összes egyedből mintát vettünk kórszövettani és IH vizsgálatra, és ezzel párhuzamosan qRRT-PCR vizsgálatot is végeztünk 3 házilúd, 4 mulard kacsa és 4 pekingi kacsa esetén.

Kórbonctan, kórszövettan, immunhisztokémia

A kórbonctani vizsgálatot követően szövettani vizsgálatra rutin diagnosztika során az agyvelő, hasnyálmirigy és a szív került mintavételre. 35 hattyú egyednél illetve állományonként 1-3 vízibarmfi esetén 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 3-4 µm-es metszeteket készítettünk, amelyeket hematoxilin-eozinnal festettünk.

Az immunhisztokémiai vizsgálat során a deparaffinált metszeteket 0,1%-os proteázoldattal (típuszám:XIV, Sigma Aldrics Co.) 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 (klónszám: AA5H, Serotec, Oxford, Nagy-Britannia). Az antigén-ellenanyag kapcsolódást tormagyökéroxidázzal jelölt tesztel (EnVision™ + anti-mouse HRP, Dako, Glostrup, Dánia) mutattuk ki. Kromogénként 3-amino-9-etilkarbazol oldatot (Sigma Aldrich Co., St.

Louis, MO, USA), kontrasztfestésként Mayer-féle hematoxilint használtunk. Negatív kontrollként foszfátpuffert használtunk monoklonális ellenanyag helyett.

Vírusizolálás és meghatározás, PCR

A vírust embrionált SPF tyúktojásokban izoláltuk, azonosításukat pedig H5 és H7 szubtypusra specifikus poliklonális savók igénybevételével, 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.

Kvantitatív RRT-PCR

A vírusrészlet 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 használtunk. 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.

Eredmények

A megtalálás helyén a kisszámú, még élő hattyú jellegzetes idegrendszeri tüneteket (körben úszás, fej-, nyaktekergetés) mutatott. A járvány által érintett víziszárnyas állományokban a naponkénti elhullások száma meredeken emelkedett. A betegség állományszintű lefolyásának megfigyelésére a hatósági intézkedés (kiirtás) miatt nem volt lehetőség. A megbetegedett állatokon bágyadságot, étvágytalanságot, savós rhinitist, könnyezést és idegrendszeri tüneteket (rendellenes fejtartást, fejremegést, fejdaltartást, valamint láb-és/vagy szárnybénulást) lehetett megfigyelni. Az állatokat esetenként előzetes tünetek észlelése nélkül, elhullva találták. Bőrelváltozások (cyanosis, oedema, vérzés, elhalás) nem mutatkoztak.

Valamennyi hattyú közepes vagy jó tápláltsági állapotban volt, ami a betegség gyors lefolyására utalt. Az vízibaromfik túlheveny esetekben közepes, a félheveny esetekben a közepesnél kissé gyengébb kondícióban voltak. A leggyakrabban talált kórbonctani elváltozások a következők voltak: vérzések a szív epicardiuma alatt, a mirigyegyomor nyálkahártyájában, a hasnyálmirigyben és a vázizomzatban; gócos elhalások a hasnyálmirigyben, a májban; szívizom-elfajulás; valamint heveny pangásos bővérűség a lépben és a tüdőben; néhány esetben sero-mucinosus váladék felhalmozódása a testüregekben.

Kórszövettani vizsgálat során az idegrendszer, a hasnyálmirigy és a szív elváltozásai esetén nagy biztonsággal valószínűsíthettük a madárinfluenza-fertőzést.

A legjellemzőbb, összes egyedre érintő kórszövettani elváltozás a gliosissal és esetenként perivascularis vérzésekkel kísért lympho-histiocytás meningo-encephalomyelitis volt, ami hattyúban kifejezettebb volt, mint lúdiban és lúdiban kifejezettebb volt, mint a két kacsafajban. 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. Kisebb arányban mutatkozott multiplex, gócos myocardialis degeneráció és lympho-histiocytás gyulladás, ami kifejezettebb volt lúdiban, mint hattyúban, mulardban és pekingi kacsában. Ezenkívül minden hattyúban és lúdiban találtunk heveny, intersticiális májgyulladást, gócos (olykor diffúz, térképszerű) májparenchyma elhalást és vérzést, három mulardban pedig csak enyhe, gócos intersticiális lymphocytás 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. A tüdők többsége és a légcső oedemas volt. Ezekon kívül leírtunk még gócos elhalásokat a vázizomzatban, valamint

bélhurutot. A lép állományában, valamint a fiatal madarak Fabricius-féle tömlőjében lymphocyta-kiürülést és -elhalást találtunk.

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

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, míg mulardokban minden agyi területen. 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 (**1. táblázat**).

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. A vírusantigén elsősorban a sejtmagban fordult elő, míg a cytoplasmában csak ritkán lehetett azt megfigyelni. Nagymennyiségű nukleoprotein antigén fordult elő a hasnyálmirigy és a máj elhalásainak területén és azok szomszédságában lévő sejtekben. A vírusantigént a hasnyálmirigyben az exokrin mirigyhámsejtek, a májban a hepatocyták és esetenként a monocyták sejtmagjában mutattuk ki. Azon májakban, melyekben nem voltak elhalások, zömében a Kupffer-sejtekben mutatkozott pozitív reakció. A szívizomban a myocyták és az epicardium sejteinek magjában és cytoplasmájában, a tüdőben a tüdőszíjak falában lévő macrophagok magjában és a légzőhámokban fordult elő a vírus. 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 tartalmazták vírusantigént a sejtmagban és a cytoplasmában egyaránt. A vékonybélben a *plexus submucosus* sejtjeiben, a *muscularis mucosae* myocytáiban, valamint a propria sejtjeiben fordult elő a vírusantigén. Néhány vázizomsejtben és a vesék egy részének interstitiumában is kimutatható volt a vírus. Immunhisztokémiai módszerrel olyan területeken is nagy mennyiségben sikerült kimutatni a vírusantigént, ahol még nem alakult ki kórszöveti elváltozás.

1. táblázat: Kórszövettani elváltozások és az A-típusú madárinfluenza vírus nukleoprotein antigénjének jelenléte és mennyisége (IH) négy víziszárnyas faj természetes úton fertőződött egyedeinek diagnosztikailag fontos szerveiben

	agyvelő ¹		hasnyál- mirigy ^{2,4}		szív ^{2,3}		máj ^{2,4}		tüdő ²		légcső ²		lép ⁶		vese ⁵		
	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 kacsa	1.	+	++	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	++	+	+	-
	2.	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	++	+	+	+	+
	3.	+	++	+	-	-	+	+	+	-	-	-	++	++	+	-	-
	4.	++	++	-	-	-	+	+	-	+	-	+			+	-	-
	5.	+	++	+	-	+	++			-	+				-	-	-
	6.	+	++	+	+	++	+++			-	+	-	+		-	+	+
átl.	+	++	-/+	-	-/+	+	+	+/+++	+	-/+	+	-	+	++	+/+++	+	-/+
Pekingi kacsa	1.	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	2.	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
	3.	++	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-
	4.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
	5.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
átl.	+	+	-	-	-/+	-	-	-	-/+	-	-	-	++	-	-	-	

*: állat sorszáma

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

- = negatív
- +
- ++ = körülírt területen 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)

- 1.: lympho-histiocytás agyvelőgyulladás
- 2.: lympho-histiocytás gyulladás
- 3.: elfajulás
- 4.: gócos elhalások
- 5.: tubulonephrosis, köszvény
- 6.: lymphocyták kiürülése, lymphocyták elhalása

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.

Kórszövettani és immunhisztokémiai eredményeink alapján a H5N1 HPAI vírus mind a négy fajban neurotrop. Bütykös hattyúban és házilúdban a neurotropizmus kifejezettebb, mint a kacsafajokban, és e fajokban a vírus kifejezetten epitheliotrop (pancreatotrop) is. Házilúdban, és mulard kacsában kifejezettebben, hattyúban enyhébb fokban myotrop (cardiotrop) tulajdonságúnak találtuk a vírus replikációját. Hattyúban és lúdban a májhoz (epitheliotrop) való affinitást is jelentősnek találtuk. A légzőrendszerhez egyik faj esetében sem tapasztaltunk kiemelkedő tropizmust.

A **kvantitatív RRT-PCR vizsgálataink** során a vizsgált szervmintákat összevetve csak a házilúd esetében találtunk 100 %-os pozitivitását, a mulard kacsák esetében ez az arány csak 25 %-os, a pekingi kacsák esetében pedig 43 %-os volt. (**2. táblázat**). A vírusrészlet mennyisége 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 vírusrészlet mennyiséget, 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.

2. táblázat. H5N1 madárinfluenza vírus RNS mennyisége három víziszárnyas faj, természetes úton fertőződött egyedeiben (vírusmennyiség: log10 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 kacsza	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 kacsza	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

Lúd esetében a szervek átlagos vírusmennyisége 6,68 lg kópia/reakció volt, mely 3 illetve 4 nagyságrendnyi különbséget jelent pekingi kacsával (3,43 lg kópia/reakció) illetve mulard kacsával (2,39 lg kópia/reakció) összehasonlítva.

Annak érdekében, hogy a kórszövettani, az IH és a qRRT-PCR módszerekkel kapott eredményeket összevethessük, a PCR eredményeket is pontosítottuk, és a **3. táblázatban** együtt szerepeltetjük a szövettani és az IH eredményekkel, egyedenként és átlagolva.

3. táblázat: H5N1 HPAI vírussal természetes körülmények között fertőződött három víziszárnyas faj kórszövetteni, immunhisztokémiai és qRRT-PCR módszerekkel történő vizsgálatának eredményei, egyedenként és szervenként (szövetteni elváltozások leírását ld.: 1. 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 kacsa	1.	+	++	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	++	-	++	+	-	+	-	-	
	2.	+	+	++	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	++	+	-	+	+	-	
	3.	+	++	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	++	++	-	+	-	-	
	4.	++	++	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-			+	+	-	-	
	áll	+	++	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-/+	-	+	-	++	+	-	+	-	-
Pekingi kacsa	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 log₁₀ kópia/ reakció
 + = 0-3,5 log₁₀ kópia/ reakció
 ++ = 3,5-4,5 log₁₀ kópia/ reakció
 +++ = >4,5 log₁₀ kópia/ reakció

*: állat sorszáma

A **3. táblázat**ból 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 vese esetén a PCR érzékenyebb volt.

Mulard kacsa 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, a hasnyálmirigy pedig negatív maradt mindhárom módszerrel. Ha a **3. táblázat** összes szervét tekintjük, még inkább csökken a PCR-rel pozitív szervek aránya az IH-hoz képest (ld.: lép, tüdő, légcső). Magyarán szólhat, hogy egy véletlenszerű darab került kivágásra minden szervből és nem ugyanazt a darabot vizsgáltuk PCR-rel, mint szövettenal illetve IH-val. Talán érdemes lett volna szervenként több mintát venni és azokat homogenizálni (PCR) illetve több síkban

lemetszeni a szöveteket (szövettan, IH). 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 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 víziszárnyas fajban. Mindhárom módszerrel igazoltuk a vírus epitheliotrop (pancreatotrop) tulajdonságát házilúdban, míg a myotrop (cardiotrop) voltát kifejezettebbnek találtuk lúdban, mint kacsákban. A légzőkészülékhez való affinitás egyik fajra sem volt jellemző. A lépben tapasztalt jellemző, ám nem specifikus 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 légszák 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.

Új tudományos 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 vírushatóanyagának összehasonlítása immunhisztokémiai és kvantitatív PCR módszerekkel.
4. Bütykös hattyúban, házilúdban, pekingi kacsában és mulard kacsában egyaránt az agyvelőben volt kimutatható a legnagyobb vírushatóanyag, 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 mennyiség 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 mennyiség több nagyságrenddel meghaladta a két kacsafaj szerveiben kimutatható értékeket.

A témában megjelent 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 kórszöveti 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 kacsállóományokban. / 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 mallard 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

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.