

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Különböző fertőző bronchitis vírustörzsek
pathomechanizmusának összehasonlító
vizsgálata

PhD értekezés

Dr. Benyeda Zsófia

2011

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....
Prof. Dr. Rusvai Miklós
az MTA doktora, egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Kórbonctani és Igazságügyi
Állatorvostani Tanszék

Témabizottsági tagok:

.....
Dr. Bakonyi Tamás
PhD, egyetemi docens
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai
Tanszék

.....
Dr. Glávits Róbert
az állatorvos-tudomány kandidátusa
Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

.....
Dr. Palya Vilmos
az állatorvos-tudomány kandidátusa, igazgató
CEVA-PHYLAXIA Oltóanyag termelő Zrt., Tudományos Támogató Igazgatóság

Készült 8 példányban. Ez a ...sz. példány.

.....
Dr. Benyeda Zsófia

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Összefoglalás	7
3. Summary	9
4. Bevezetés, célkitűzések	11
5. Irodalmi áttekintés	14
5.1 A fertőző bronchitis története	14
5.2 Kóroktan	14
5.2.1 Taxonómiai besorolás	14
5.2.2 A vírus szerkezete	15
5.2.3 A vírus sejten belüli szaporodása	18
5.2.4 A vírus gazdaspektruma	18
5.2.5 A vírus terjedése	19
5.3 Előfordulás	19
5.4 Csoportosítás	19
5.4.1 Funkcionális csoportosítás	20
5.4.2 Nem-funkcionális csoportosítás	21
5.5 Gyakrabban előforduló szerotípusok	21
5.5.1 Massachusetts szerotípus	22
5.5.2 Fontosabb szerotípusok Amerikában	23
5.5.3 Fontosabb szerotípusok Európában	23
5.6 Szerotípusok Magyarországon	26
5.7 Immunitás	27
5.8 Pathogenezis	28
5.8.1 Légutak	28
5.8.2 Bélcsatorna	29
5.8.3 Vese	29
5.8.4 Szaporítószervek	31
5.8.5 Izomzat	33
5.8.6 Egyéb szervek	33
5.9 Fogékony kor, lappangási idő, morbiditás és mortalitás	33
5.10 Kórhatározás	34
5.10.1 Kórhatározást befolyásoló tényezők	34
5.10.2 A kórhatározás módszerei	36
5.11 Védekezés	39
5.11.1 Élő attenuált vakcinák	39
5.11.2 Inaktivált vakcinák	40
5.11.3 Rekombináns vakcinák	40
6. Anyag és módszer	41
6.1 A vizsgálatban felhasznált vírustörzsek	41
6.1.1 A minták származása	41
6.1.2 A vírusok kimutatása vírusizolálással és azonosítása RT-PCR reakcióval	42
6.1.3 Szekvencia meghatározás és filogenetikai vizsgálatok	44
6.2 Állatfertőzőési vizsgálat	45
6.2.1 A törzsek szaporítása és a fertőző inokulum előállítása	45
6.2.2 Kísérleti állatok és elhelyezésük	46
6.2.3 Kísérleti elrendezés	46
6.2.4 A fertőző törzsek visszatitralása	47
6.2.5 Az egyes csoportok közötti fertőzésátvitel kizárása	48
6.2.6 Mintavétel és kórbonctani vizsgálat	48
6.2.7 A fertőző törzsek visszaizolálása	48
6.2.8 Csillóaktivitási teszt	48
6.2.9 Ellenanyagválasz	49
6.2.10 Real-Time RT-PCR (RRT-PCR)	50
6.2.11 Kórszöveti vizsgálatok	51

6.2.12 Immunhisztokémiai vizsgálatok	52
7. Eredmények	53
7.1 A vizsgálatban felhasznált vírustörzsek.....	53
7.2 Az izolált vírustörzsek véghígításos tisztítása, valamint a fertőző inokulum tisztasági vizsgálata és titere	55
7.3 A fertőző inokulum visszatitrálása	55
7.4 Klinikai tünetek	56
7.5 Kórbonctani elváltozások.....	56
7.6 Csillóaktivitási teszt	59
7.7 A fertőző törzsek visszaizolálása.....	59
7.8 Ellenanyagválasz.....	60
7.8.1 Ellenanyagválasz naposkori fertőzést követően	60
7.8.2 Ellenanyagválasz az ivarérett kakasok fertőzését követően	61
7.9 RRT-PCR	61
7.9.1 RRT-PCR naposkori fertőzés esetén	62
7.9.2 RRT-PCR ivarérett kakasok fertőzése esetén	67
7.10 Kórszövettani vizsgálat.....	69
7.10.1 Kórszövettani vizsgálat naposkori fertőzés esetén	70
7.10.2 Kórszövettani vizsgálat ivarérett kakasok fertőzése esetén	79
7.11 Immunhisztokémiai vizsgálat.....	82
8. Megvitatás	90
9. Új tudományos eredmények.....	106
10. Felhasznált irodalom	107
11. A témában megjelent tudományos publikációk	118
12. Köszönetnyilvánítás	120

1. Rövidítések jegyzéke

AEC	3-amino 9-ethylcarbazol	3-amino 9-etilkarbazol
AGPT	agar gel precipitation test	agargél precipitációs teszt
AI	avian influenza	madárinfluenza
AS	amino acid	aminosav
BALT	bronchus-associated lymphoid tissue	bronchusokhoz kötődő nyirokszövet
BCoV	bovine coronavirus	szarvasmarhák coronavírusa
BHQ-1	black hole quencher-1	
c.tons.	ceacalis tonsilla	vakbélbejárati nyiroktüsző
ICAV	infectious chicken anaemia virus	fertőző csirkeanémia vírus
cDNS	complementary DNS	DNS másolat RNS-ről
CT	cycle threshold	ciklus küszöbérték
DNS	deoxy-ribonucleic-acid	dezoxi-ribonukleinsav
dNTP	deoxy-ribonucleotide-triphosphate	dezoxiribonukleozid-trifoszfát
DPI	day post infection	fertőzést követően eltelt napok
DPV	day post vaccination	vakcinázást követően eltelt napok
E	envelope protein	burokfehérje
EID₅₀	egg infective dose 50%	50% embriófertőzést előidéző vírudózis
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	enzimhez kötött immunadszorpciós vizsgálat
FAM	6-carboxifluorescein	6-karboxifluorescein
FCoV	feline coronavirus	macskák coronavírusa
g	g-force	gravitációs gyorsulás
H₂O₂	hydrogen peroxide	hidrogén-peroxid
HAG	haemagglutination inhibition	hemagglutináció gátlás
HE	haematoxylin-eosin	hematoxin-eozin
HPAI	highly pathogenic AI virus	magas patogenitású madárinfluenza vírus
HRP	horse radish peroxidase	torma-peroxidáz
IB	infectious bronchitis	fertőző bronchitis
IBDV	infectious bursal disease virus	fertőző bursitis vírus
IBV	infectious bronchitis virus	fertőző bronchitis vírus
IgY	immunoglobulin Y	immunglobulin Y
IgM	immunoglobulin M	immunglobulin M
IHC	immunohistochemistry	immunhisztokémia
kb	kilo base	kilobázis
log	logarithm	logaritmus
M	membrane protein	membránfehérje
M	mole	mol
MAb	monoclonal antibody	monoklonális ellenanyag
Mass	Massachusetts serotype	Massachusetts szerotípus
MEM-H	Hanks' minimum essential medium	Hanks féle minimálisan szükséges tápoldat

MgCl₂	magnesium chloride	magnézium-klorid
MHV	murine hepatitis virus	egerek májgyulladást okozó vírusa
MMLV	moloney murine leukaemia virus	egérleukémia vírus
mRNS	messenger RNS	hírvivő RNS
N	nucleocapsid protein	nukleokapszid fehérje
Na Cl	sodium chloride	nátrium-klorid
NDV	Newcastle disease virus	baromfipestis vírus
nm	nanometer	nanométer
OD	optical density	fényelnyelő képesség
ORF	open reading frame	nyitott leolvasási keret
PBS	phosphate buffered saline	foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
RFLP	restriction fragment length polymorphism	restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus
RNA	ribonucleic-acid	ribonukleinsav
RRT-PCR	real time RT-PCR	valós idejű RT-PCR
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
S	spike glycoprotein	tüske glükoprotein
SARS	severe acute respiratory syndrome	súlyos heveny légzőszervi szindróma
SPF	specific pathogen free	specifikus kórokozótól mentes
TBE	tris-borate-ethylenediamine-tetraacetate	tris-borát-etilén-diamin-tetraacetát
TGE	transmissible gastro-enteritis	sertés vírusos hasmenése
TMB	tetramethylbenzidine	tetrametil-benzidin
UTR	untranslated region	nem kódoló régió
VN	virus neutralisation	vírusneutralizáció
W	watt	watt
µl	microlitre	mikroliter

2. Összefoglalás

A csirkék fertőző bronchitise az 1930-as évektől ismert betegség. Ennek ellenére az elmúlt közel 100 év alatt jelentőségéből semmit sem veszített. Kezdetben az egyre változatosabb kórformák kialakulása, napjainkban, pedig a számtalan új szerotípus megjelenése jelenti a legnagyobb kihívást az ágazatban dolgozó szakemberek számára.

A vírus hatására kialakuló légzőszervi kórkép mellett, a tojóállományokban már a kezdetekben tojástermelés csökkenés és héjminőség romlás is jelentkezett. A vesekárosító törzsek megjelenése a '60-as évekre vezethető vissza. Azóta pedig további, főként az emésztőtraktus különböző szakaszainak károsodásával összefüggésbe hozható törzsek kártételéről számoltak be világszerte.

A légzőszerven kívüli kórformák gyakran csak bizonyos szerotípusok jelenlétéhez illetve bizonyos korhoz köthetőek. Ezek a szerotípusok antigénszerkezeti sok esetben oly mértékben különböznek a törzsek többségétől, hogy a jelenleg forgalomban lévő vakcinákkal kialakított immunvédelem hatástalan marad a velük való fertőzéssel szemben.

Hasonló a helyzet a '90-es években megjelent QX szerotípus esetén is. Kezdetben Kínában, majd 2004-től Európa országaiban okozott jelentékeny morbiditással és mortalitással kísért járványokat. A légzőszervi tüneteken túl a QX törzsekkel kapcsolatban súlyos vesekárosodásról, mirigyegyomor-gyulladásról és "áltojó-szindróma" kialakulásáról számoltak be.

Munkánk elsődleges célja az volt, hogy megvizsgáljuk a QX szerotípus törzsei által okozott fertőzés pontos pathomechanizmusát és tisztázzuk, hogy mely kórformák kialakulása hozható összefüggésbe ezen törzsek kártételével. A vizsgálatot az Európában legelterjedtebb két szerotípus – Massachusetts (Mass) és 4/91 – egy-egy referencia törzsével összehasonlításban végeztük el. Első lépésben törzseket izoláltunk öt ország járványeseteiből, majd miután mind a kínai, a francia, a szlovák, a görög és a magyar mintából származó izolátum esetén igazoltuk, hogy azok a QX szerotípusba tartoznak, fertőzési kísérletet végeztünk.

Az állatfertőzési vizsgálat során napos korú jércéket, valamint a magyar és a két referencia törzs esetén kakasokat is fertőztünk. 42 napon át követtük az egyes csoportokban kialakuló klinikai tüneteket, kórbonctani és kórszöveti elváltozásokat, a vírus RNS megjelenését a kiválasztott szervekben, valamint a fertőzésre adott ellenanyag választ. Ezenkívül, a fertőzést követő 14. napig vizsgáltuk a légcsövekben a csillómozgás károsodásának mértékét, valamint a vírusantigén jelenlétét a kiválasztott szervekben. A kakasok fertőzését ivarérett korú egyedeken is elvégeztük,

hogy adatokat gyűjtsünk a herék, és ezáltal a kakasok termékenységének lehetséges károsodásáról.

A fertőzés és az azt követő laboratóriumi vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a QX szerotípus jellemezhető a legkifejezettebb károsító hatással és a legkiterjedtebb szervtropizmussal. Erőteljes légzőszervi hatásukon túl vesekárosító potenciával is rendelkeznek, képesek előidézni az "áltojó-szindrómához" vezető fiatalkori tojócsőkárosodás kialakulását, valamint nagy mennyiségben és tartósan képesek megtelepedni a vakbélbejárat nyiroktüszőkben és feltehetően a bélcsatorna további részeiben is.

A QX szerotípuson belül is jelentkeztek különbségek a izolátumok biológiai tulajdonságai között. A vizsgált szervek összességét tekintve legerősebb károsító hatást a kínai izolátummal való fertőzést követően észleltük, leggyengébb hatása a magyar és a francia izolátumnak volt.

A kísérletben használt Mass referenciatörzs az irodalmi adatok alapján a vártnál enyhébb hatást mutatott. A légzőszerveket érintő károsítás ugyan a QX szerotípussal azonos erősségű volt, a többi szervben mégsem tudtuk igazolni a tartós megtelepedését és jelentékeny károsító hatását.

A vizsgálatba vont vírustörzsek közül a 4/91 szerotípust reprezentáló 793/B bizonyult a legkevésbé virulensnek. Eredményeink alapján ez a törzs kizárólag légzőszervi típusnak tekinthető.

A herében mindkét korosztály fertőzése esetén csak kis mértékű kórszöveti elváltozás utalt a vírus jelenlétére, amit azonban az antigénkimutatással nem sikerült megerősítenünk. Ennek ellenére a magyar QX izolátum RNS-ét mindkét esetben jelentősebb mennyiségben mutattuk ki, így célszerű volna a vírusnak a hím ivar terméketlenségben betöltött esetleges szerepét újabb, továbbgondolt vizsgálatokkal elemezni.

A korábbiakban más, főleg a kínai szerzők által, a mirigyegyomorban leírt elváltozások egyik csoportban sem alakultak ki és a laboratóriumi vizsgálatok sem utaltak a vírus jelenlétére ebben a szervben. Az egyre szaporodó nemzetközi közleményeket figyelembe véve azonban, egy mirigyegyomrot érintő kórbonctani lelet esetén gondolni kell az IBV jelenlétére is.

3. Summary

Avian infectious bronchitis is a well known disease since the 1930-ies. Despite of this long history, its impact has not decreased at all. At the beginning, the appearance of variable pathotypes and today the introduction of numerous new serotypes represent the most challenging problem for people working in the poultry industry.

Besides the respiratory manifestation of the disease, falls in egg production and poor eggshell quality was reported in laying hens. Not much later, in the '60-ies, nephropathogenic strains appeared. In more recent years, worldwide circulation of strains associated with diarrhea or pathological alterations in digestive tract has been reported.

The non-respiratory manifestation is usually induced either by certain serotypes or it can be developed by infection of birds at a defined age. Due to the high antigenic difference between these serotypes and the 'conventional' ones, the immune response induced by commercially available vaccines remains often ineffective against them.

Similar situation features the serotype QX, reported at first in the '90-ies. It caused considerable morbidity and mortality of broilerflocks in China and in several European countries from 2004. Besides respiratory signs, severe kidney lesions, proventriculitis and the impaired development of infantile oviduct, have been reported in association with this serotype. The last symptom leads to 'false layer syndrome' in laying flocks.

The main goal of my thesis was to investigate the exact pathomechanism of this new serotype and to clarify which symptoms can be induced by these strains. The investigation was performed in comparison with two strains representing the two most common serotypes – Massachusetts (Mass) and 4/91 – in Europe. The first approach was the isolation of strains from five different countries. After proving that all the five (Chinese, French, Slovakian, Greek, Hungarian) isolates belong to the QX serotype, a pathogenicity trial was performed on the target species.

One day old female chicks were infected with the five QX and with the two reference strains. In case of groups infected with Hungarian QX and the two reference strains cockerels were also involved in the investigation. Clinical signs, pathological changes, appearance of virus RNA in designated organs and the immune response were followed through 42 days after infection. Ciliar activity test and immunohistochemical staining of the virus antigen was conducted until 14 days post infection. The infection of the cockerels was repeated in mature cocks, in order to collect data about the possible impairment of the testis and infertility of male gender.

Results of the pathogenicity evaluation and the consecutive laboratory tests proved that the QX serotype is the most harmful and possesses the widest dissemination capacity. Beyond its respiratory effect, it has strong potential to cause lesions in the

kidneys. It also induces lesions in the infantile oviduct leading to 'false layer syndrome' in older age. It replicates and persists in ceecal tonsils and possibly in other parts of the intestinal tract.

Difference could be also observed among strains belonging to the QX serotype. Considering all the investigated organs, the Chinese isolate was the most pathogenic and mildest lesions could be detected after infection by the French or the Hungarian QX isolates.

The Mass reference strain used in this experiment had milder effect, as it was predicted by previously published data on this serotype. Its detrimental effect in the respiratory tract was similar to that induced by the QX serotype, but in the other investigated organs we could not prove its long persistence and harmful effect.

Taking into account all the serotypes used in this work, the 4/91 seemed to be the less virulent, which was represented by strain 793/B. According to our result, this isolate is an obligate respiratory pathogen virus.

In case of both age-groups, only few histopathological lesions indicated the presence of the virus in the testis, but unfortunately we could not confirm it with the IHC staining. Despite of this, we measured high degree of virus RNA in both age groups after infection with the Hungarian QX isolate. Therefore we propose further investigation of the role of IBV in the infertility of cocks.

Proventriculitis, in association with infection by QX serotype, was reported previously mainly from China. This symptom did not develop in our experiment and no results of the laboratory investigation indicated the presence of the virus in this organ. Notwithstanding, considering the increasing number of publications in this subject, we should not ignore the possible presence of IBV in case of proventricular findings.

4. Bevezetés, célkitűzések

A fertőző bronchitis (IB: infectious bronchitis) a csirkék heveny légzőszervi tünetekkel járó, vírusos eredetű fertőző betegsége. A fertőzés a külföldi és hazai nagyüzemi állományokban mára általánossá vált, és a megbetegedésekből, elhullásokból, valamint a közvetett kiesésekből eredő gazdasági kár komoly terhet jelent a baromfi-ágazat számára.

A kórkép az 1930-as években jelent meg Észak-Dakotában (USA), fiatal csirkékben. A későbbiekben mind az érintett korcsoport, mind pedig a klinikai manifesztáció köre bővült (Történeti összefoglalás: Fabricant, 1998). Jérce- és tojókorú állományok is megbetegedtek, és a légutakat érintő tünetek mellett jelentékeny tojástermelés csökkenés is jelentkezett (Történeti összefoglalás: Fabricant, 1998). A vesekárosító törzseket az 1960-as években észlelték először (Winterfield és Hitchner, 1962; Cumming, 1963), majd további, az emésztőtraktus különböző részeit is érintő járványokról számoltak be napjainkig (Ambali és Jones, 1990; Wang és mtsai., 1998; Domanska-Blicharz és mtsai., 2006).

A betegség eredetének tisztázása után nagy előrelépést jelentett az a felismerés, hogy a járványok és különböző kórképek hátterében, egyazon vírus többféle patho- illetve szerotípusa állhat (Történeti összefoglalás: Fabricant, 1998). Mára világszerte több mint 65 szerotípust tartanak nyilván, de a valóságban ez a szám jóval nagyobb lehet (Ignjatovic és mtsai., 2006). A szerotípusok előfordulása földrajzi területenként különbözik, és a megbetegítő képességük, valamint a kiváltott klinikai tünetek is nagy eltérést mutathatnak. Ez jelentősen megnehezíti, mind a betegség diagnosztikáját, mind pedig az ellene való védekezés lehetőségeit.

Az elsőként azonosított és a világon máig a legelterjedtebb a Massachusetts (Mass) szerotípus. Ausztráliát kivéve, ahol az IBV (IB vírus) evolúciója a világ többi részétől függetlenül fejlődött, minden nagyüzemi baromfitartó országban jelen van (Ignjatovic és mtsai., 2006). Igen széleskörű elterjedtsége részben a különböző Mass törzs (M41, H120, H52, Ma5, stb.) tartalmú vakcinák általános használatának köszönhető (Cavanagh és Naqi, 2003). A szerotípus számtalan ismert törzse igen nagy eltérést mutat a virulenciát és szövetaffinitást tekintve. A törzsek többsége csak légzőszervi tüneteket okoz, de több esetben leírtak vesekárosodást (Jones, 1974; Owen és mtsai., 1991; Butcher és mtsai., 1990; Chen és mtsai., 1996) és „áltojó-szindróma” kialakulását is (Jones és Jordan, 1970; 1972; Crinion és mtsai., 1971a; b; Crinion és Hofstad, 1972).

Európában a másik legelterjedtebb a 793/B vagy 4/91 szerotípus. Ezt a törzset Angliában írták le először 1992-ben (Gough és mtsai.; Parsons és mtsai.). Feltehetően 1991-ben jelenhetett meg, és a szokványos IB tünetek mellett tojóállományokban a

mély mellizmok elhalásával hozták összefüggésbe (Gough és mtsai., 1992; Parsons és mtsai., 1992). Később kiderült, hogy ugyanez a szerotípus Franciaországban már évek óta jelen volt, és a legkorábbi törzsét (CR88) 1985-ben izolálták Picault és munkatársai (1995). Gyors terjedése miatt Európában hamarosan bekerült a vakcinatörzsek repertoárjába, ami az előfordulási gyakoriságát a Mass szerotípushoz hasonlóvá tette. Az elkövetkező években a D274 (Cook, 1984; Davelaar és mtsai., 1984), a B1648 (Meulemans és mtsai., 1987), a D1466 (Davelaar és mtsai., 1984) és az Italy-02 (Bochkov és mtsai., 2006) szerotípusok megjelenése okozott nagyobb gazdasági károkat. Előfordulásuk azonban a kezdeti emelkedés után csökkent. Feltehetően azért, mert a forgalomban lévő vakcinák megfelelő kombinációja kellően széles spektrumú védelmet indukált több szerotípussal szemben.

QX szerotípusba tartozó törzset Európában, 2004-ban izolálták először, egy hollandiai tojóállományban (Landman és mtsai., 2005). A szerotípus eredetileg Kínából származik, ahol mirigyegyomor-gyulladással kísért járványokban okozott jelentős elhullásokat (Wang és mtsai., 1998; Zhou és mtsai., 1998). A kínai tapasztalatokhoz hasonlóan, az új szerotípus Európában is gyorsan terjedt, és törzsei sorra bukkantak fel a nyugat-európai országok többségében. A veszteségek mind Kínában, mind Európában nagyok voltak, mert a nagy antigenitásbeli különbség miatt a QX törzsek képesek voltak áttörni a hagyományos vakcinák által biztosított védelmet (Beato és mtsai., 2005; 2006; Domanska-Blicharz és mtsai., 2006; Zenella és mtsai., 2006; Gough és mtsai., 2008; Worthington és mtsai., 2008). Az itteni járványokban a kifejezett légzőszervi tünetek mellett elsősorban vesekárosodásról, illetve tojóállományokban „áltojó-szindróma” kialakulásáról számoltak be.

Hazánkban 2006-ban izolálták először a QX-szerotípus törzseit (Mató és mtsai., 2007; Palya és mtsai., 2007). A megbetegedések főként brojler állományokat érintettek, ahol kifejezett vesekárosodást okoztak. A fiatal korban fertőzött tojóállományok egyedei pedig irreverzibilis tojócső károsodást szenvedtek el. Az izolátumok a genetikai vizsgálat alapján 98%-os hasonlóságot mutattak az elsőként izolált kínai QX törzssel.

A QX szerotípus kontinenseket átívelő gyors terjedése és az ismert törzsekhez képest erős patogén hatása miatt indokoltnak találtuk a QX törzsek részletesebb vizsgálatát és összehasonlítását a két legelterjedtebb szerotípus egy-egy referencia törzsével.

Munkánk során öt klinikai esetből származó mintából izoláltunk QX szerotípusú törzseket. Az öt különböző országból származó izolátum viselkedését napos korú SPF csirkék kísérletes fertőzésével hasonlítottuk össze. A kapott eredmények objektívabb megítélhetősége érdekében a vizsgálatot párhuzamosan, a már részleteiben tanulmányozott Mass és 4/91 referencia törzsekkel is elvégeztük. A fertőzést követően figyelemmel kísértük a klinikai tüneteket és több szervre kiterjedően vizsgáltuk a pathomorfológiai elváltozásokat. A vírus antigénjének és nukleinsavának

kimutatásával, illetve az utóbbi mennyiségének meghatározásával nyomon követtük a vírustörzsek szervszintű lokalizációját és szaporodásuk dinamikáját. A publikált esetek alapján, a QX szerotípus által leggyakrabban károsított szerveken kívül vizsgáltuk még a tüdőre, a vékonybélre, a petefészekre és a herére gyakorolt esetleges károsító hatást is. A három szerotípus lehetséges herekárosító potenciáját ivarérett kakasok fertőzését követően is vizsgáltuk. Az izolátumok antigénhatásáról a humorális ellenanyagok mérésén keresztül tájékozódunk.

Az eredmények összegzésével és összehasonlításával megkíséreltük meghatározni és összehasonlítani az egyes izolátumok, illetve a három szerotípus virulenciáját és pontos szervtropizmusát, valamint a három szerotípus közötti és a QX szerotípuson belüli különbségeket. Ezenkívül, elsősorban a QX izolátumok tekintetében, tisztázni szeretnénk volna azok valós mirigygyomor-, vese- és tojócsőkárosító hatását. A herék vizsgálatával az IBV kakasok terméketlenségében betöltött szerepéről szeretnénk volna tájékozódni.

5. Irodalmi áttekintés

A csirkék fertőző bronchitise brojler- és tojótyúk állományok egyik legnagyobb gazdasági kárt előidéző fertőző betegsége.

5.1 A fertőző bronchitis története

A házityúk (*Gallus gallus*) coronavírusa 1931-ben, Észak-Karolinában (USA), mint légzőszervi betegség okozója jelent meg. Az érintett fiatal brojlerállományokban kifejezett légzőszervi tünetek alakultak ki, amelyeket később idősebb korosztályoknál és tojóállományokban is megfigyeltek (Történeti összefoglalás: Fabricant, 1998). A bántalom vírusos eredetét 1936-ban Beach és Schalm igazolta, majd 1937-ben Baudettenek és Hudsonnak sikerült embrionált tyúktojásban izolálnia a kórokozót, a coronavirusok között elsőként (Történeti összefoglalás: Fabricant, 1998). Jelentős mérföldkövet jelentett a vírussal kapcsolatos kutatásokban az a felismerés, hogy a betegség kóroktanában több szerotípus is szerepet játszik (Történeti összefoglalás: Fabricant, 1998). Az eredetileg izolált Massachusetts típus máig a legelterjedtebb világszerte, napjainkra azonban az ismert szerotípusok száma meghaladja a 65-öt is (Ignatjovic és mtsai., 2006). A légzőszervi forma megjelenését további kórképek követték. A '40-es évektől kezdve tojó állományokban súlyos termelés csökkenésről és a tojáshéj minőségének romlásáról számoltak be (Történeti összefoglalás: Fabricant, 1998), míg a vesekárosító hatással rendelkező törzsek a '60-as évek elején Amerikában (Winterfield és Hitchner, 1962) és Ausztráliában (Cumming, 1963) közel egyidejűleg jelentek meg. A fertőzéssel összefüggésbe hozható kórképekről napjainkig jelennek meg közlemények, bár a vírus és a megfigyelt tünetek, illetve elváltozások közti kapcsolat nem minden esetben bizonyított (Ambali és Jones, 1990; Wang és mtsai., 1998; Yu és mtsai., 2001; Boltz és mtsai., 2004; Landman és mtsai., 2005; Villareal és mtsai., 2007). Az elsősorban brojler szülőpár állományokban kialakult mellizomelhalást az akkoriban megjelent 793/B szerotípus hatásának tulajdonították (Gough és mtsai., 1992; Parsonss és mtsai., 1992). A bélcsatorna különböző részei a mai ismereteink szerint szintén potenciális teret biztosíthatnak a vírus szaporodásának. Így szerepe lehet a tisztázatlan kóroktanú mirigygyulladás etiológiájában (Wang és mtsai., 1998), valamint jelenléte időről-időre kimutatható egyéb enterális elváltozások hátterében is (Ambali és Jones, 1990; Villareal és mtsai., 2007).

5.2 Kóroktan

5.2.1 Taxonómiai besorolás

A fertőző bronchitis vírus a *Nidovirales* rend *Coronaviridae* családjának *Coronavirus* nemzetségébe tartozik (Cavanagh, 1997). A coronavirusokat antigenitásbeli és

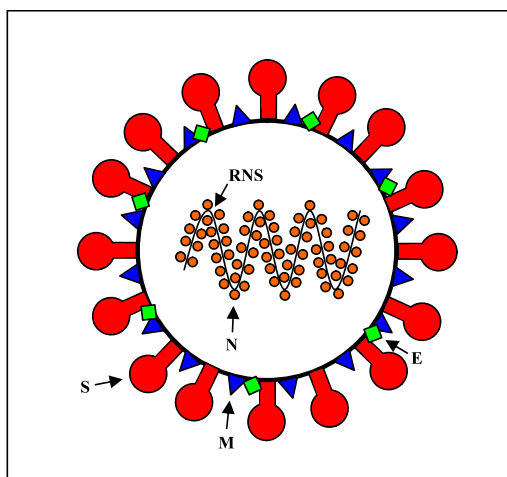
genetikai kapcsolatok alapján három (1, 2, 3) csoportba sorolták (1. táblázat), amelyek közül az első és második csoport *a*, illetve *b* alcsoportjaiban találjuk az emlős és humán koronavírussokat (Pensaert és mtsai., 1981). A harmadik csoport kezdetben kizárólag a többi koronavírustól jól elkülönülő IBV-t tartalmazta, mára azonban több madár eredetű vírussal bővült a létszám (Lai és Cavanagh, 1997; Cavanagh, 2005; Hughes és mtsai., 2009; Muradrasoli és mtsai., 2010). A csirkék, pulykák és fácánok koronavírussai mellett ide sorolták az elmúlt években kimutatott, és jelentős genetikai eltéréseket mutató liba, kacska és galamb eredetű törzseket is (Jonassen és mtsai., 2005). 2006-ban egy további, a három csoportba be nem illeszthető koronavírust izoláltak dilatációs mirigyegyomor szindrómában elpusztult amazon papagájából (Gough és mtsai., 2006).

1. táblázat: Koronavírussok és csoportosításuk:

1. csoport	1a alcsoport	<i>Sertés vírusos hasmenésének (TGE) vírusa</i> <i>Kutya enterális koronavírusa</i> <i>Macska koronavírusa</i>
	1b alcsoport	<i>Sertés TGE-szerű megbetegedésének vírusa</i> <i>Humán coronavirus 229E és más fajok vírusa</i> <i>Denevér coronavirus</i>
2. csoport	2a alcsoport	<i>Egér hepatitisz koronavírusa</i> <i>Humán coronavirus OC43 és más fajok vírusa</i> <i>Borjak coronavirusos hasmenésének vírusa</i> <i>Kutya légzőszervi koronavírusa</i> <i>Malacok agy- és gerincvelő-gyulladását okozó hemagglutináló koronavírusa</i> <i>Atlanti vészmadár (Puffinus puffinus) koronavírusa</i>
	2b alcsoport	<i>SARS-coronavirus</i>
3. csoport		<i>Csirkék fertőző bronchitisének vírusa</i> <i>Pulykaenteritis vírusa</i> <i>Fácán koronavírusa</i> <i>Liba koronavírusa</i> <i>Kacska koronavírusa</i> <i>Galamb koronavírusa</i>

5.2.2 A vírus szerkezete

Az IBV 120nm nagyságú, burkos, egyszálú RNS genommal és megközelítőleg 20nm hosszúságú felületi nyúlványokkal rendelkező kórokozó (1. ábra) (Lai és Cavanagh, 1997).

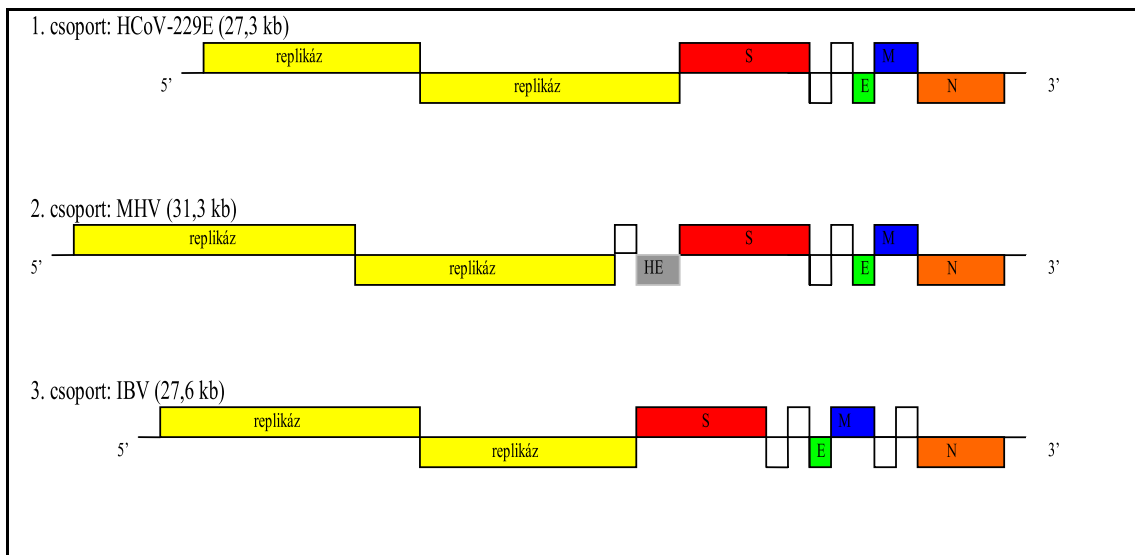


1. ábra: A coronavírusok vázlatos felépítése: strukturális fehérjék a fertőző bronchitis vírus esetén (S, M, N, E fehérjék)

5.2.2.1 Vírusnukleinsav

A coronavírusok pozitív lefutású, egy szálú RNS vírusok, amelyek genomja a legnagyobb az RNS vírusok között (27,6-32 kb). Az RNS nagy mérete olyan speciális javító mechanizmusokat feltételez, amellyel a vírus képes korrigálni az RNS szintézis során keletkező hibákat. A coronavírusok 7-10 funkcionális génnel rendelkeznek, amelyek közül 4 vagy 5 strukturális fehérjét kódol. Ezekon kívül eltérő számú és helyeződésű, nem-strukturális és részben nem esszenciális fehérjéket kódoló géneket találunk a strukturális szakaszokat kódoló részek közé ékelődve (2. ábra). Ezeknek a géneknek a felépítése és helyeződése jelentős eltérést mutat az egyes coronavírusok között. A génszerkezet változékonysága jelzi a coronavírusok kifejezett plaszticitását, amely a rekombinációk előfordulásának gyakori lehetőségét mutatja (Lai és Cavanagh, 1997). A rekombináció szimultán fertőzéskor az IBV esetén is gyakori, amelyet mind kísérletes körülmények között (Kottier és mtsai., 1995), mind pedig vadvírus izolátumoknál számos alkalommal megfigyeltek (Cavanagh és mtsai., 1992b; Bratu és mtsai., 2004; Jackwood és mtsai., 2010; Mardani és mtsai., 2010; Hewson és mtsai., 2011; Lim és mtsai., 2011).

Az IBV esetén az RNS 27,6 kb nagyságú és 7 gént kódol, amelyek közül 4 strukturális fehérjét határoz meg. Ezek elrendezése: 5'-S-E-M-N-3'. A strukturális fehérjéket kódoló gének közé ékelődve találjuk a járulékos fehérjéket kódoló 3-as és 5-ös gént (Lai és Cavanagh, 1997). A genetikai állomány közel kétharmadát a két nyitott leolvasási keretet (ORF 1a, 1b) tartalmazó polimeráz gén teszi ki (2. ábra).



2. ábra: Az 1, 2, és 3 csoportba tartozó coronavírusok vázlatos genomszerkezete (A HE a hemagglutinin-észteráz, az S a felületi, az E a burok, az M a membrán és az N a nukleokapszid struktúrfehérjéket kódoló génszakaszokat, az üres négyzetek a nem strukturális gének számát és helyzetét jelölik)

5.2.2.2 Fehérjeszerkezet

A fertőző bronchitis vírust tehát 4 strukturális és 3 többnyire ismeretlen funkciójú nem strukturális fehérje építi fel.

A struktúrfehérjék közül a legnagyobb (1160 AS) a felületi nyúlványokat képző S (spike) glükoprotein, amely a fertőzéskor bekövetkező sejtfúzió során a furin és furin-szerű enzimek hatására S1 és S2 alegységre hasad. Az S1 fehérje a célsejthez való kötődésért felelős, míg az S2 alegység a burok és a sejtmembrán fúzióját biztosítja. Az S fehérje aminosav sorrendje a legváltozékonyabb a coronavírusok között és ez a különbség elsősorban az S1 alegységen figyelhető meg, ahol a mutációk, deléciók, rekombinációk előfordulása különösen gyakori (Lai és Cavanagh, 1997). A világszerte leírt IBV szerotípusok folyamatosan bővülő száma az itt megvalósuló rendkívüli változékonyágnak köszönhető. Az S fehérje felelős elsődlegesen a protektív immunitás kialakításáért és az ellene termelődő ellenanyagok neutralizáló hatásúak.

A korábbi vizsgálatok alapján arra lehetett következtetni, hogy a coronavírusok esetében a spike fehérje határozza meg a patogenitást és a gazdaspektrumot (de Haan és mtsai., 2002). Meghatározó szerepe IBV esetén is bizonyított, de a patogenitásban betöltött szerepe az újabb adatok alapján csak közvetett módon, a szervtropizmus meghatározásán keresztül valósul meg (Armesto és mtsai., 2009).

A méretükben lényegesen kisebb M (membrane protein) és E (envelop protein) fehérjéknek a virion felépítésében van meghatározó szerepük. Az M fehérje N terminális vége a burok felületén helyezkedik el, és néhány glikolizációs kötőhellyel rendelkezik. A C terminális rész szerepe kevésbé ismert, feltehetően a burkon belül

helyezkedik el. A fehérje köztes része 3 helikális membrán domént képez. Az N (nucleocapsid) foszfoprotein a vírus nukleinsavhoz szorosan kötődő helikális szerkezetű nukleokapszidot alkot. Az RNS támasztása mellett, szerepe van a genomszintézis modulálásában is (Lai és Cavanagh, 1997).

A többi coronavírushoz hasonlóan az IBV is rendelkezik az *in vitro* szaporodáshoz nem esszenciális, ismeretlen szerepet betöltő járulékos fehérjékkel. A 3-as és az 5-ös gén két-két ilyen (3a-b, 5a-b) proteint kódol. A genom kétharmad részét a replikáz gén teszi ki, amely 2 (pp1a és pp1b) poliprotein aminosav sorrendjét határozza meg. Ezeket a poliproteineket az IBV esetén a vírus eredetű proteáz 15 nem strukturális fehérjére (Nsp2-16) hasítja. Armesto és munkatársai (2009) által a Beaudette és az M41 vírustörzs reverz genetikai rendszerrel létrehozott rekombináns törzseinek vizsgálata azt a feltételezést támasztja alá, miszerint ezeknek a nem strukturális fehérjéknek valamelyike lehet felelős egy adott törzs pathogenitásáért.

5.2.3 A vírus sejten belüli szaporodása

Az IBV a sejtek citoplazmájában szaporodik. A folyamatos transzkripció mechanizmus során 6 mRNS keletkezik, amely számos mutáció kialakulásával járhat (Lai és Cavanagh, 1997). A virionok nem a sejt felszínen, hanem az endoplazmatikus retikulum membránjáról leválva keletkeznek, majd a sejten belüli vezikulumokban halmozódnak fel. A fertőző vírusok sejtől való kiszabadulásának folyamata még nem tisztázott (Cavanagh és Naqi, 2003). Az első új virionok 3-4 órával a fertőzést követően jelennek meg, majd a sejt a maximális kibocsátást 12 órán belül éri el 37°C-on (Cavanagh és Naqi, 2003).

5.2.4 A vírus gazdaspektruma

Az IBV természetes gazdája a házityúk (*Gallus gallus*), amely fogékony a fertőzés iránt, és amelyben a fertőzés klinikai tünetekben nyilvánul meg (Cavanagh és Naqi, 2003). Az elmúlt években az erősen patogén madárinfluenza (HPAI) törzsek okozta járványok (Capua és Alexander, 2004), valamint a SARS-coronavírus megjelenése, terjedése és az ezzel kapcsolatban megfigyelt gazdafajváltások ráirányították a figyelmet a különböző madárfajok vírusainak, köztük a coronavirusoknak és ezen belül a madarakhoz köthető fajoknak a kutatására (Cavanagh, 2003). A megfigyelések alapján akár a SARS, akár más 2. (BCoV) vagy 1. (FCoV) csoportbeli coronavirusok példája arra enged következtetni, hogy egyes fajok gazdaspektruma a feltételezettnél jóval szélesebb lehet (Cavanagh, 2005). Ez látszik igazolódni a madár eredetű coronavirusok esetén is, ahol számos tyúkalkatú és nem-tyúkalkatú vad- és házimadárfajból mutattak ki feltételezhetően IBV, vagy ahhoz genetikailag és antigénszerkezetiileg nagyon közel álló vírustörzseket (Cavanagh, 2005; Liu és mtsai., 2005; Hughes és mtsai., 2009; Muradrasoli és mtsai., 2010). Függetlenül attól, hogy

ezekben a fajokban kialakulnak-e klinikai tünetek vagy sem, számíthatunk arra, hogy a házityúkkal, főleg extenzív viszonyok között kapcsolatba kerülő különböző madárfajok képesek lehetnek a kórokozó hordozására és nagyobb távolságokra való szállítására (Cavanagh, 2005). A házilúdból (*Anser anser*), tőkés récéből (*Anas platyrhynchos*) és házigalambból (*Columbia livia*) kimutatott 3. csoportbeli coronavírusok genetikai alapon jól elkülönülnek az ismert IBV törzsektől, azonban izolátumok hiányában a házityúk velük szembeni fogékonyságát nem vizsgálták (Jonassen és mtsai., 2005).

5.2.5 A vírus terjedése

Az IB vírus aerogén úton, vagy ragályfogó tárgyak közvetítésével terjed. A vektoroknak mai ismereteink szerint nincs szerepük a fertőzés átvitelében (Cavanagh és Naqi, 2003). Állományon belül a kórokozó gyorsan terjed. Fogékony állatokat fertőzött környezetbe helyezve, 48 órán belül kialakulnak a légzőszervi tünetek. Az IBV törzseket az érintett állományokból származó vakbélbejárati nyiroktüsző, vese vagy kloáka-tampon mintákból hetekkel, akár 14-20 héttel a fertőzés után is kimutathatjuk (Alexander és Gough, 1977). Tojóállományokban megfigyelték, hogy a heveny szakasz lezajlása után negatívvá vált egyedek a tojásrakás megindulásakor újra üríteni kezdték a vírust (Jones és Ambali, 1987). Az IBV fertőzést követő perzisztálás még nem teljesen ismert, de a vese feltehetően kellő védelmet biztosít a megbúvó vírusok számára (Dhinakar Raj és Jones, 1997). A perzisztensen fertőzött állományokban időről-időre visszatérő vírusürítés komoly kockázatot jelent az állományok közötti fertőzésátvitelben (Cavanagh és Naqi, 2003).

5.3 Előfordulás

A házityúk (*Gallus gallus*) coronavírusa minden intenzív baromfitartással rendelkező országban jelen van, és a fertőzöttség mértéke a legtöbb helyen megközelíti a 100%-ot (Ignjatovic és Sapats, 2000). A legkorábban megjelent Mass szerotípus mellett, amely – Ausztráliát – kivéve világszerte elterjedt, számos további, többnyire endémiásan előforduló szerotípus okoz folyamatos problémát és jelentékeny gazdasági kárt vakcinázatlan és megfelelően immunizált állományokban egyaránt (Cavanagh és Naqi, 2003).

5.4 Csoportosítás

A fertőző bronchitis betegséget előidéző különböző vírustörzsek csoportosítása, tipizálása nemcsak kutatási, járványtani és fejlődéseméleti vizsgálatokban fontos, hanem a gyakorlati állatorvoslás szempontjából is meghatározó. Az eredmények értékelése sok esetben nem egyszerű a különböző laboratóriumokban használt eltérő módszerek, a nem egységes nevezéktan és a vírus biológiai sajátosságainál fogva.

Az izolátumok, vagyis adott járványesetből izolált vírustörzsek, csoportba sorolása a funkcionális és a nem-funkcionális tesztek eredményén alapul. Az előbbi a vírus biológiai tulajdonságairól ad információt, az utóbbi a virális RNS-t vizsgálja (De Wit, 2000).

5.4.1 Funkcionális csoportosítás

A törzsek a biológiai tulajdonságaik alapján, a vizsgálati módszertől függően antigén- vagy protektív-típusokba sorolhatók.

5.4.1.1 Antigén típusok

A klasszikus funkcionális csoportosítás a törzsek szerotípusának meghatározását jelenti, amely a vizsgált törzs, valamint csirkében termelt szerotípus-specifikus IBV ellenanyag reakcióján alapul. A törzsek szerotípusát legnagyobb mértékben az S fehérje S1 alegysége határozza meg (Mockett és mtsai., 1984). A meghatározást hagyományosan a vírus-neutralizációs próbával végzik (De Wit, 2000). Két IBV törzs abban az esetben tartozik egy szerotípusba, ha a kétirányban elvégzett heterológ neutralizációs teszt (A vírustörzs és B antiszérum, valamint B vírustörzs és A antiszérum) alapján kapott titerek kevesebb, mint hússzoros eltérést mutatnak a homológ tesztben (A vírustörzs és A antiszérum, valamint B vírustörzs és B antiszérum) kapott értékekhez képest (Hesselink, 1991). A szerotípusok többségének aminosav sorrendje 20-25%-ban különbözik az S1 fehérjén, de szélsőséges esetben ez az eltérés 50% is lehet, míg máskor az aminosavak 2-3%-át érintő különbség is a szerotípus megváltozását okozza (Cavanagh és mtsai., 1992a). Az S1 fehérjét kódoló génen bekövetkező, akár csak néhány aminosavat érintő mutáció okozta szerotípus váltás magyarázatául szolgál a jelenleg ismert szerotípusok igen nagy számának (Cavanagh és mtsai., 1992a).

A meghatározott szerotípusokon belül további epitop-típusokat, vagyis variáns törzseket különíthetünk el, egyes epitopok jelenlétének, illetve hiányának meghatározásával (De Wit, 2000). Két azonos szerotípusú vírustörzs akkor tartozik egy epitop-típusba, ha monoklonális ellenanyagokkal vizsgálva a felületi antigénjük ugyanazon epitopokat tartalmazza.

Szerotípus-specifikus MAb használata esetén a próba alkalmas az antigén típus meghatározására is. Kockázata azonban az, hogy a MAb-al reagáló epitopon bekövetkező mutáció fals negatív eredményt adhat, amennyiben a mutáció nem jár a szerotípus megváltozásával.

5.4.1.2 Protektív típusok

Gyakorlati szempontból nagyobb jelentősége a protektív típusoknak van, amelyek ismeretében tájékozódhatunk az egyes szerotípusok közti keresztvédelemről, illetve

annak hiányáról. Azon törzsek sorolhatók egy protektív típusba, melyek kereszt-immunizációs próbában keresztvédelmet alakítanak ki. A protektív típusok száma nem ismert, de a kereszt-fertőzési kísérletek alapján alacsonyabb a szerotípusokhoz képest. Meghatározásuk, bár gyakorlati immunizálási szempontból rendkívül hasznos volna, nagyon költséges, munkaigényes és megfelelő izolációs körülményeket kíván (De Wit, 2000).

5.4.2 Nem-funkcionális csoportosítás

A nem-funkcionális csoportosítás a törzsek genetikai jellemzésén alapul, és azok genotípusáról ad tájékoztatást.

5.4.2.1 Genotípusok

A vírus RNS genetikai vizsgálatával az egyes törzsek genotípus szerint is csoportosíthatók. A genotipizálás történhet genotípus specifikus RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) módszerrel, RT-PCR-t követő szekvenálással, vagy bizonyos enzimhasítási (RFLP) helyek meghatározásával. A genetikai vizsgálat az előzőekhez képest objektívebb, kevésbé módszerfüggő és járványtani vizsgálatra is alkalmas módszer (De Wit, 2000). Hátránya azonban, hogy az így eltérőnek mutató törzsek nem feltétlenül tartoznak különböző szerotípusba és fordítva (Cavanagh és mtsai., 1992b). Tehát egy adott törzs genetikai tulajdonságai alapján nem következtethetünk egyértelműen annak szerotípusára, vagyis biológiai tulajdonságaira. Mindezt figyelembe véve, egy újonnan megjelenő törzs esetén, ha annak genetikai elemzése nem ad kellő információt annak antigenitásáról, a hagyományos laboratóriumi és *in vivo* módszerek elvégzése (SPF állatok kísérletes fertőzése) elengedhetetlen (De Wit, 2000).

5.5 Gyakrabban előforduló szerotípusok

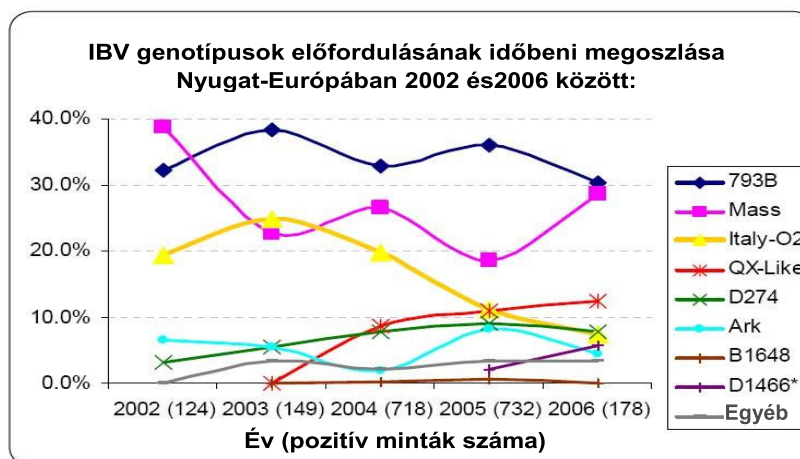
A koronavírusok között az IBV esetén írták le legnagyobb számban szerotípusok és variáns törzsek előfordulását. Világszerte több mint 65 különböző szerotípusról számoltak be (Ignjatovic és mtsai., 2006), de az valós számuk mára már 100 felett lehet (Cavanagh, 2007).

A szerotípusok nagy része 20-25%-ban tér el aminosav szinten az S1 fehérjén (Adzhar és mtsai., 1997). Az S2 fehérjén és a többi strukturális-proteinen ez a különbség körülbelül fele az S1 szakaszon megfigyeltnék. Egyes esetekben az S1 fehérjén bekövetkező, az aminosavaknak akár csak 2-3%-át érintő eltérés is előidézheti a szerotípus megváltozását, amely az adott törzsek között mutató keresztvédelem csökkenésében is megnyilvánulhat (Cavanagh, 2003). Általánosságban elmondható, hogy egy adott szerotípus által kiváltott védelem, közepes és gyenge között változik egy heterológ szerotípussal való fertőzés esetén.

A különböző szerotípusok és variáns törzsek kialakulásának hátterében az RNS genom nagyfokú mutációs és rekombinációs hajlama, a rendszeres, élő vírussal való vakcinázás, a cirkuláló vírusokra az immunis állományok által gyakorolt immunbiológiai nyomás (Ignatjovic és mtsai., 2006) és az IBV vírus széles szöveti affinitása állhat (Cavanagh, 2005).

5.5.1 Massachusetts szerotípus

Az elsőként megjelent, és azóta is világszerte a legelterjedtebb a Mass szerotípus. Jelentőségét fokozza, hogy törzseiből elsőként állítottak elő vakcinát a múlt század első felében (pl.: H120, Ma5, M41, stb.), amelyeket napjainkban is minden intenzív baromfitartással rendelkező országban kiterjedten használnak (Cavanagh és Naqi, 2003). A Mass törzsek egyedül Ausztráliában nem fordulnak elő, ahol az IBV evolúciója a világ többi részétől függetlenül fejlődött (Ignatjovic és Sapats, 2000). Európában a '40-es évektől kezdve vannak jelen a törzsei (Cavanagh és Davis, 1992) és mindmáig a legelterjedtebb szerotípusok közé tartozik (3. ábra, Worthington és mtsai., 2008). Az IBV-re jellemző légzőszervi tünetek mellett, e törzsekkel összefüggésben megfigyeltek eltérő súlyosságú vesekárosodást (Jones, 1974; Butcher és mtsai., 1990; Owen és mtsai., 1991; Chen és mtsai., 1996) és „áltojó-szindróma” kialakulását is (Crinion és mtsai 1971a; b; Jones és Jordan, 1972). A világszerte elvégzett felmérő vizsgálatok mindenütt a törzsek kifejezett prevalenciáját bizonyítják, ami túlnyomó részben a kiterjedt vakcinahasználat számlájára írható. A rutin diagnosztikai eljárások többnyire nem teszik lehetővé, a vakcina és a vadvírus törzsek elkülönítését, de az S1 génen elvégzett szekvenálási adatok szerint az izolátumoknak legalább a fele 100%-ban egyezett a vakcinatörzsekkel (Worthington és mtsai., 2008).



3. ábra: IBV genotípusok előfordulásának időbeni megoszlása Nyugat-Európában 2002 és 2006 között (Worthington és mtsai., 2008)

5.5.2 Fontosabb szerotípusok Amerikában

Az Egyesült Államokban a Mass szerotípus elterjedését a Connecticut megjelenése követte (Jungherr és mtsai., 1956). Azóta számtalan új szerotípust és variáns törzset izoláltak, amelyek közül az Arkansas és Delaware 072 máig is igen nagy arányban fordulnak elő országszerte, feltehetően szintén a vakcinatörzsként való használatuknak köszönhetően (Jackwood és mtsai., 2005; Alvarado és mtsai., 2006). A jelentősebb variáns törzseket (pl.: Holte, Gray, JMK, Florida, Iowa, Georgia) ma már nem, vagy csak elvétve, adott földrajzi régiókhoz kötötten izolálják (Jackwood és mtsai., 2005; Alvarado és mtsai., 2006).

5.5.3 Fontosabb szerotípusok Európában

A Mass törzs izolálását követően Európában is számtalan újabb szerotípus jelent meg, amelyek közül csak néhány jelenléte bizonyult tartósnak és több országra kiterjedőnek.

5.5.3.1 D274

A Dániából származó D274 szerotípus szokványos légzőszervi tüneteket idézett elő. Hamarosan megjelent Hollandiában (Davelaar és mtsai., 1984), majd az Egyesült Királyságban domináns törzssé vált a '80-as években (Cook, 1984). Jelenlétük mára már lényegesen lecsökkent, többnyire csak a vakcinatörzsek visszaizolálásával kell számolnunk (3. ábra, Worthington és mtsai., 2008).

5.5.3.2 793/B

A D274 előfordulását a 793/B (vagy CR88, vagy 4/91) szerotípus megjelenése szorította vissza (Adzhar és mtsai., 1997). Az új szerotípusról először Angliában közel egy időben Parsonss (1992), valamint Gough és munkatársai (1992) számoltak be, de egy későbbi közlemény alapján törzseit (CR88) először Franciaországban izolálták 1985-ben (Picault és mtsai., 1995). A légzőszervi tünetek mellett, a fertőzéssel összefüggésben megfigyelték a mély mellizmok károsodását és elhalását tojó- és szülőpár-állományokban (Parsonss és mtsai., 1992). A szerotípus később Európa további részein is megjelent, eltérő gyakorisággal (Capua és mtsai., 1999; Cavanagh és mtsai., 1999). Egy több országra kiterjedő felmérés során azonosították Szaud-Arábia, Japán, Svédország, Dánia, Franciaország, Lengyelország és Argentína állományaiban, valamint szerotípus specifikus ellenanyagot mutattak ki thaiföldi, mexikói, görög, holland, spanyol és német állományokból származó savókból (Cook és mtsai., 1996). A szerotípussal szembeni védekezés céljából kezdetben a D274 elleni vakcinákat használták, amelyek kombinációban hatékonynak bizonyultak a tünetek kialakulásával szemben. Nem sokkal később megjelentek a 4/91 vakcinák is, amelyek hatására a törzshöz köthető megbetegedések visszaszorultak, azonban a kiterjedt

immunizálásnak köszönhetően az egyik leggyakrabban kimutatott európai szerotípus lett (3. ábra, Worthington és mtsai., 2008).

5.5.3.3 D1466

Az eddig ismert szerotípusoktól az S1 fehérjén a legnagyobb genetikai eltérést mutató törzset (Kusters és mtsai., 1989) 1978-ban izolálták először Hollandiában (Davelaar és mtsai., 1984). A D1466 szerotípus több országban, köztük Angliában is megjelent (Gough és mtsai., 1996), mégsem vált domináns törzssé, mint ahogy arra az antigenitásbeli tulajdonságai alapján számíthattunk volna. Egyes elképzelések szerint előfordulhat az is, hogy az ismert törzsek többségével reagáló rutindiagnosztikai módszerek nem minden esetben alkalmasak ennek a szerotípusnak a kimutatására, és így fals negatív eredményt kapunk (Worthington és mtsai., 2008). Egy 2005 és 2006-ban elvégzett felmérés alapján a D1466 törzsek alacsony számban, de ma is jelen vannak, ahogy azt az angol, francia, német, holland és belga állományok pozitív mintái igazolták (3. ábra, Worthington és mtsai., 2008).

5.5.3.4 B1648

Az 1984-ben Belgiumban izolált B1648 szerotípus (Meulemans és mtsai., 1987) a kifejezett nephropathogén hatása és a magas elhullási ráta miatt vált ismertté. Jelenlétét több nyugat-európai országban is kimutatták, de előfordulási aránya jelentősen elmaradt a domináns törzsekhez képest (3. ábra, Capua és mtsai., 1999; Worthington és mtsai., 2008).

A 2002 és 2006 között Worthington és munkatársai (2008) által végzett felmérés alapján napjainkban elsősorban két nem vakcina eredetű, az Italy-02 és a QX szerotípus kártételével kell számolnunk (3. ábra).

5.5.3.5 Italy-02

Az Italy-02 szerotípus első törzsét 1995-ben Olaszországban izolálták. A törzs nukleotid-sorrendje 2002-ben került fel a GeneBank adatbázisára (Bochkov és mtsai., 2006). Dolz és mtsai (2006) négy spanyol IBV izolátum vizsgálata során kimutatták, hogy az Italy-02-vel megegyező törzsek már 1996-ban jelen voltak Spanyolországban. Az izolátumok aminosav-sorrendje az S1 fehérjén a 793/B (81,7-83,7%), a D274 (79,8-81,7%) és a B1468 (79,3-80%) szerotípusokhoz állt legközelebb.

Az új szerotípus hamarosan megjelent Angliában, Németországban, Franciaországban, Hollandiában, Belgiumban és Szlovéniában is (Jones és mtsai, 2005a; Worthington és mtsai., 2008; Krapez és mtsai., 2011). Jones és munkatársainak (2005b) vizsgálatait azt mutatták, hogy két különböző szerotípusú, kereskedelmi forgalomban elérhető bronchitis vakcina kombinált használata kellő

védelmet nyújt a tünetek kialakulásával szemben. Típus-specifikus élő vakcinát nem fejlesztettek, így – feltehetően a kombinált immunizálásnak köszönhetően – 2003 óta jelentősen csökkent az Italy-02 pozitív minták száma (3. ábra, Worthington és mtsai., 2008).

5.5.3.6 QX

A fentiekkel szemben egy másik, nem vakcina eredetű szerotípus egyre intenzívebb terjedést mutat (3. ábra, Worthington és mtsai., 2008).

Az első QX szerotípusú vírustörzset 1996-ban, Kína Qingdao nevű tartományában izolálták egy súlyos mirigyegyomor-gyulladással kísért járványból (Wang és mtsai., 1996). 1999 és 2004 között Kína 4 tartományára kiterjedő felmérő vizsgálat során számos, genetikailag igen hasonló törzset izoláltak, főként vesekárosodással járó megbetegedésekből (Liu és Kong, 2004). A törzsek vizsgálatával bebizonyosodott, hogy egy új szerotípusról van szó, amelyet az első izolátumra utalva QX szerotípusnak neveztek el. További, Kína több tartományára kiterjedő vizsgálatok a QX törzsek egyre kiterjedtebb előfordulását igazolták (Liu és mtsai., 2006; Zou és mtsai., 2010). A legfrissebb adatok szerint Kínában az izolált törzsek több mint 50%–a a QX szerotípusba sorolható (Han és mtsai., 2010).

Kína után először Oroszország keleti határának közelében izoláltak QX törzset 2001-ben, majd a rákövetkező évben az ország nyugati felében is megjelent (Bochkov és mtsai., 2006).

2004-ben a QX törzsek elérték Európát, és néhány év alatt a kontinens csaknem összes országa fertőződött. Először Hollandiából számoltak be az új szerotípus tojtyúk-állományokban okozott kártételéről 2004-ben (Landman és mtsai., 2005). Hamarosan izolálták Olaszország északi tartományaiban is (Beato és mtsai., 2005; 2006; Zenella és mtsai., 2006), majd egy, Worthington és munkatársai (2008) által végzett felmérés igazolta megjelenésüket Franciaországban, Németországban és Belgiumban is. 2006-ban beszámoltak a QX törzsek előfordulásáról Lengyelországban és Magyarországon (Domanska-Blicharz és mtsai., 2006; Mató és mtsai., 2007), 2008-ban Angliában (Gough és mtsai., 2008), majd 2009-ben Szlovéniában (Krapez és mtsai., 2011).

Az európai járványokban a légzőszervi tünetek mellett többnyire vesekárosodás (Beato és mtsai., 2005; 2006; Zenella és mtsai., 2006; Gough és mtsai., 2008; Terregino és mtsai., 2008; Worthington és mtsai., 2008) és „áltojó-szindróma” alakult ki (Landman és mtsai., 2005; Beato és mtsai., 2005; 2006; Jones, személyes közlés, 2006; Worthington és mtsai., 2008). Az eredeti izolátummal összefüggésbe hozott mirigyegyomor-gyulladás kialakulásáról csak a lengyel és angol esetek kapcsán számoltak be (Domanska-Blicharz és mtsai., 2006; Irvine és mtsai., 2010).

A leírtak alapján érzékelhető, hogy a QX törzsek, mind Kínában, mind Európában példátlanul gyorsan és nagy károkat okozva terjedtek el. Ez feltehetően annak tudható be, hogy egyes oltóanyagok kombinációját hatékonynak találták ugyan a fertőzéssel szemben (Terregino és mtsai., 2008; Worthington és mtsai., 2008), a gyakorlatban mégis úgy tűnt, hogy a forgalomban lévő vakcinák a nagy antigenitásbeli eltérés miatt nem biztosítanak kellő védelmet a tünetek kialakulása ellen.

A QX szerotípus az irodalmi adatok alapján 7 év alatt jutott Kínából Európába feltehetően a H5N1 AI törzsekhez hasonló úton, csak kicsit lassabban (Worthington és mtsai., 2008). Ellentétben azonban a H5N1 törzsekkel, a vadmadarak egyértelmű fertőzőközvetítő szerepe IBV esetén még nem igazolódott. Az IBV törzsek jelenlétét ugyan egyre több vándorló és vadmadár fajból sikerült kimutatni (lásd: 5.2.4), de ezek valódi rezervoár és fertőzőközvetítő szerepe további vizsgálatok tárgyát képezi. Amíg ezt nem sikerül egyértelműen igazolni, sokkal valószínűbbnek látszik, hogy a ténylegesen létező illegális élőállat kereskedelem biztosítja az átjárást a kontinensek között (Worthington és mtsai., 2008).

Az időről-időre megjelenő variáns törzsek és szerotípusok az esetek többségében csak endémiásan, adott földrajzi területhez kapcsolódóan fordulnak elő (Zenella és mtsai., 2003; Bochkov és mtsai., 2006). Ezek a törzsek feltehetően a hatékony immunizálás, vagy egy sikeresebb kompetitor törzs miatt szorulnak vissza és jelenlétüket a kezdeti időszakot követően csak elvétve lehet kimutatni. Más törzsek azonban kifejezett terjedésre képesek, és nagyobb területeken domináns törzsekké válnak. Ilyen volt pl. Európában a 793/B, vagy napjainkban nagy földrajzi kiterjedésben a QX szerotípus. Ennek egyik oka lehet, hogy ezek a törzsek az adott területen honos típusoktól nagy antigenitásbeli eltérést mutatnak. Az S1 fehérjén legnagyobb AS szekvencia különbséget mutató D1466 szerotípus azonban mégsem volt képes tartósan és nagy arányban elterjedni, tehát a törzseknek rendelkezniük kell olyan további tulajdonságokkal is, amelyek képessé teszik őket a hatékony terjedésre.

5.6 Szerotípusok Magyarországon

Hazánkban a fertőző bronchitis jelenlétét először a hatvanas években Derzsy és Lomniczi (1966) mutatta ki szerológiailag, majd néhány évvel később Mass szerotípusú törzseket izoláltak légzőszervi tüneteket mutató fiatal brojler- és termelés csökkenéssel jellemzett tojóállományokban egyaránt (Lomniczi és Stipkovits, 1968).

A '90-es évekig csak Mass vírustörzsek jelenlétét igazolták, innentől kezdve azonban új szerotípusok és variáns törzsek is megjelentek (AITarcha és mtsai., 1990). Ekkor tűntek fel és terjedtek el a 793/B szerotípusba tartozó törzsek is (Palya és mtsai., 2007). Az intenzív baromfitartással rendelkező országokhoz hasonlóan a fertőzés nálunk is gyakran előfordul és súlyos gazdasági károkat idéz elő immunizált és

vakcinázatlan állományokban egyaránt. A hazai kereskedelmi forgalomban lévő vakcinák közül egyesek a Mass szerotípusba tartozó H120 vagy Ma5 törzsek mellett egyéb, Európában előforduló törzseket (4/91, D274, 249G) is tartalmaznak. Az általánosan alkalmazott egyszeri vagy többszöri vakcinázás ellenére, főleg az adott vakcinákban nem alkalmazott szerotípusok vagy variáns törzsek továbbra is komoly veszteségeket okozhatnak. Hazánkban 2006-ban azonosították először QX vírustörzsek jelenlétét súlyos károkat elszenvedett állományokból (Mató és mtsai., 2007). Bár pontos felmérések a szerotípus hazai előfordulási gyakoriságával kapcsolatban nem készültek, az eddigi tapasztalatok és megfigyelések alapján napjainkban, elsősorban e szerotípus kártételével kell számolnunk (Palya és mtsai., 2007).

5.7 Immunitás

Az IBV-vel szembeni védelem kialakításában az S fehérje S1 alegységének elsődleges szerepet tulajdonítanak, amely indukálja a vírusneutralizáló- és hemagglutinációt gátló ellenanyagok termelődését (Ignjatovic és Galli, 1994). A betegség klinikai tüneteinek kialakulását megelőző mechanizmus azonban nem teljesen tisztázott (Cavanagh és Naqi, 2003).

A fertőzés hatására kialakuló specifikus aktív immunitást a B- és T-lymphocyták, a macrophagok és a memóriasejtek biztosítják. A fertőzést követően a sejtes immunválasz elsődleges elemei a cytotoxikus T-lymphocyták proliferálnak (Seo és Collisson, 1997). A B-lymphocyták által termelt IgY és IgM ellenanyagok megjelenése a szérumban jól nyomon követhető, bár szintjük a kialakuló immunitással nem minden esetben korrelál (Pensaert és mtsai., 1981). A humorális immunválasz csak vadvírus fertőzést követően mutat jelentős emelkedést. Ebben az esetben nyugodtak lehetünk afelől, hogy egy esetleges újrafertőzés esetén az állomány kellő védelemmel van ellátva a vírus légzőszerven kívüli hatásával szemben. Egy élővírusos vakcinázást követően azonban a mérhető titeremelkedés sok esetben nem szembetűnő, így, ha nem ismerjük az immunizálásra vonatkozó kórelőzményt, a humorális ellenanyagok mérése önmagában nem informatív az állomány immunstátuszával kapcsolatban. A keringő ellenanyagoknak elsősorban a légutakból kiinduló virémia megakadályozásában tulajdonítanak szerepet, megvédve a fertőzésre fogékony szerveket (vese, tojócső) a vírus okozta károsító hatás kialakulásától.

A légúti fertőzés kivédésében és a vírus felső légutakban való megtelepedésének megakadályozásában a lokális immunitás a meghatározó. A légúti fertőzést követően, a Harder-mirigyben található nagyszámú plazmasejt által termelt, lokális ellenanyagok biztosítják a nyálkahártya védelmét a későbbi fertőzésekkel szemben. A könnyben mért ellenanyag titerek ennek megfelelően jól tükrözik az adott állományban kialakult

immunitást (Cook és mtsai., 2001). Ezt igyekeznek kihasználni a spray technológián alapuló immunizálás, mivel ilyenkor a vírusrészecskék az itatásos módszerrel ellentétben elsősorban a légúti nyálkahártyára és a kötőhártyára kerülnek.

A természetes úton fertőződött vagy megfelelően immunizált szülőállományok utódaiban bizonyos szintű maternális immunitás mérhető. Ez a védelem a légúti fertőzés megeredését nem befolyásolja, azonban homológ szerotípussal való fertőzés esetén megakadályozza a virémia kialakulását, ezáltal a tojócső és a vese károsodását (Yachida és mtsai., 1981). A légzőszervi megbetegedések kivédése minél korábbi lokális immunválasz biztosítása révén érhető el, amelynek létrejöttét a keringő maternális ellenanyagok csak kevésbé gátolják.

5.8 Pathogenezis

A törzsek eltérő virulenciájából és tropizmusából adódóan, de a fertőződött állatok korától és immunállapotától függően is különböző pathotípusokat és klinikai formákat különíthetünk el. A betegség elnevezése – fertőző bronchitis – egyes esetekben nem tükrözi a sokféle klinikai és kórbonctani megjelenést, melynek háttérében részben a törzsek eltérő szöveti affinitása áll.

5.8.1 Légutak

A légúti fertőzést követően a vírus legelőször a felső légutak csillós hámsejtjeiben és nyálkatermelő sejtjeiben szaporodik el. A fertőződés hatására kialakuló nyálkahártya károsodás jellemző, de nem pathognomikus klinikai tüneteket eredményez, melyek szövődésmenymentes esetben 5-7 napig tartanak, majd a nyálkahártya, a fertőzést követő 10-14. npra regenerálódik (Nakamura és mtsai., 1991; Dhinakar Raj és Jones, 1997). A légzőszervi tünetek, jellegzetes formában fiatal állományokban alakulnak ki, míg 6 hetes kor felett a tünetek sok esetben észrevétlenek maradnak (Cavanagh és Naqi, 2003). Leggyakrabban tüszögés, szörtyögés, orrfolyás, nehezített légzés figyelhető meg, amelyhez esetenként kötőhártyagyulladás és az infraorbitalis sinus duzzanata is társul.

A légúti tünetekhez kapcsolódó kórbonctani és kórszövettani elváltozások legjellegzetesebb formában a légcsőben figyelhetők meg. Makroszkóposan, a gyulladással nyálkahártya felületén több-kevesebb savós, hurutos, vagy nyálkás váladékot, kombinált fertőzésben az üreget részben vagy egészében eltömítő fibrindugót találunk (Parsonss és mtsai., 1992). A kórszövettani elváltozások 3 jellegzetes fázist követnek (Purcell és McFerran, 1972; Nakamura és mtsai., 1991). A fertőzést követő 1., 2. napon jelentkezik a degeneratív stádium, ezt követi a hiperpláziás szakasz, majd a 10-20. npra teljes gyógyulás következik be (Chen és mtsai., 1996).

Minden IBV törzs esetén, a légutak felső szakasza a vírusreplikáció elsődleges színhelye. Az ezt követő virémia során a vírus szétszóródik a szervezetben. Epitheliotrop tulajdonságánál fogva elsősorban hámeredetű sejtek cytoplazmájában szaporodik testszerte. A különböző törzsek légzőszerven kívüli szövetekben való megjelenése azonban eltéréseket mutat és nagyban függ a szerotípustól és a szöveti affinitástól (McMartin, 1993).

A felső légutakhoz hasonló vírustiterrek mérhetőek a tüdőben, illetve a légzsákokban is. A tüdőben makroszkópos elváltozást ritkán találunk, de a nagyobb bronchusok környezetében, kisebb területre kiterjedő gyulladás alakulhat ki (Dhinakar Raj és Jones, 1997). A légzsákban, főleg másodlagos *E. coli* fertőzéssel társult esetekben a fal elhomályosodása, megvastagodása és az üregben savós-fibrines exsudatum felhalmozódása figyelhető meg.

5.8.2 Bélcsatorna

Számos IBV törzset kimutattak a béltraktus különböző részeiből, valamint nyelőcső- és kloákatamponokból is (Alexander és Gough, 1977; Alexander és mtsai., 1978; Cook, 1984; Ambali és Jones, 1990; Lucio és Fabricant, 1990; Owen és mtsai., 1991). Az esetek egy részében a kimutatott törzset enterális tünetekkel vagy elváltozásokkal is kapcsolatba hozták (Ambali és Jones, 1990; Yu és mtsai., 2001; Villareal és mtsai., 2007). A vírus jelenlétét és szaporodását ugyan már sokféle módszerrel igazolták – elsősorban a béltraktus alsó szakaszaiban –, de a megfigyelt klinikai tünetek és kórbonctani elváltozások, valamint a vírusszaporodás között nem sikerült egyértelműen bizonyítani az összefüggést (Ambali és Jones, 1990; Dhinakar Raj és Jones, 1997). A vakbelek bejáratában lévő Peyer-plakkokban hosszantartó vírus perzisztálást írtak le (Owen és mtsai., 1991; Alvarado és mtsai., 2006), így az innen származó minta alkalmas egy korábban lezajlott fertőzöttség kimutatására.

5.8.3 Vese

A törzsek szöveti tropizmusát tekintve, a légzőszervek mellett a vese a leginkább vizsgált szerv. Az eddig ismert izolátumoknak ugyan csak kis része rendelkezik kifejezett nephropathogén hatással, jelentőségük mégis meghatározó, figyelembe véve, hogy akár önmagukban is jelentékeny mortalitást idézhetnek elő (Cavanagh, 2003). Az első vesekárosító hatással rendelkező törzsek a '60-as évek elején jelentek meg közel egyidejűleg Ausztráliában és az Egyesült Államokban (Winterfield és Hitchner, 1962; Cumming, 1963). Azóta számtalan nephropathogén IBV törzset írtak le a világ különböző részein (Albassam és mtsai., 1986; Meulemans és mtsai., 1987; Butcher és mtsai., 1990; Kinde és mtsai., 1991; Lambrechts és mtsai., 1993; Liu és Kong, 2004).

A vírusreplikáció a tubulushámsejtek cytoplazmájában történik, és a nephron teljes hosszában (proximális és disztális kanyarulat csatornák, Henle-kacs, gyűjtőcsövek), valamint a húgyvezetőkben is megfigyelték (Purcell és McFerran, 1972; Albassam és mtsai., 1986; Owen és mtsai., 1991; Lee és mtsai., 2004). Abdel-Moneim és munkatársai (2009) mesterségesen fertőzött embriók glomerulus-hámsejtjeiben is kimutatták a vírusantigén jelenlétét. A következményes hámsejtdegeneráció és szövetközi gyulladás a nephroso-nephritis néven ismert kórképet idézi elő. A súlyos esetben kialakuló heveny veseelégtelenség az állat elhullását okozza.

Kórbonctani vizsgálat során ilyenkor duzzadt, sápadt veséket, valamint húgysavval kitöltött tubulusokat és elvezető húgyutakat, esetleg generalizált köszvényt találunk (4. ábra). Enyhébb esetekben az elváltozások csak kórszövettanilag jelentkeznek, némelykor a fertőzés után hetekkel is megfigyelhető krónikus aktív, vagy inaktív ductulo-tubuláris interstitialis nephritis képében (Albassam és mtsai., 1986). Krónikus aktív gyulladás esetén a perzisztens fertőzés sokáig kimutatható a vesékből (Albassam és mtsai., 1986; Chen és mtsai., 1996).



4. ábra: IBV fertőzés következtében kialakult súlyos húgysavlerakódás a tubulusok és húgyvezetők üregében (Dobos-Kovács Mihály és Palade Elena Alina felvétele).

A nephropathogén IBV okozta kártételt a fertőző törzsön kívül, jelentősen befolyásolja az állomány kora és a hasznosítás típusa. A fiatal brojlerállományokat ért fertőzéskor a mortalitás lényegesen meghaladja a tojóállományokban megfigyeltet (Pensaert és Lambrechts, 1994).

A vesében a vírusok replikációja igen korán, akár már a mesterséges fertőzést követő 1. naptól kezdve kimutatható (Ambali és Jones, 1990), a kórszövettani elváltozások pedig a fertőzést követő 4. naptól kezdve jelentkeznek (Albassam és mtsai., 1986; Chen és mtsai., 1996; Lee és mtsai., 2004; Chousalkar és mtsai., 2007a; b). A kialakult

elváltozások a különböző törzsek esetén azonosak, a különbség a károsítás mértékében mutatkozik meg (Albassam és mtsai., 1986; Chen és mtsai., 1996; Chousalkar és mtsai., 2007a; b).

5.8.4 Szaporítószervek

5.8.4.1 Tojócső

Naposkorú állatok fertőződése:

Az IBV tojócsőre gyakorolt károsító hatása régóta ismert, kimenetele azonban nagyban függ a fertőződés idejétől. A két hetesnél fiatalabb állományok fertőződése a tojócső maradandó károsodását idézi elő az érintett egyedek egy részénél. Ezt legelőször bizonyos Mass típusú törzsekkel összefüggésben figyelték meg (Crinion és mtsai., 1971a; Jones és Jordan, 1970; 1972). A tojócső fejlődésében bekövetkezett károsodás a nyálkahártya-mirigyek hypopláziáját, vagy teljes hiányát és egyes szakaszok elégtelen kialakulását okozza. A fiatal korban fertőződött és később elhullott állatokban erőteljesen kitágult, vékonyfalú, savószerű folyadékkal kitöltött tojócsövet figyelhetünk meg. A tojókorba kerülő, de tojásrakásra képtelen egyedek többsége klinikai tüneteket nem mutat, elvéve egy-két kitelt, lógó hasú tojót találunk az állományban (Crinion és mtsai., 1971a; b). A kórbonctani vizsgálat során általában ép, funkcionáló petefészkek mellett, eltérő mértékben kifejlődött, sokszor cisztaszerűen kitágult szakaszokat tartalmazó tojócsövet láthatunk (5. ábra). Az „áltojó-szindróma” néven emlegetett kórkép csak egyes törzsek hatására, az érintett állomány bizonyos hányadában alakul ki. Elsősorban a '60-as, 70-es években okozott problémát, majd a szülőpárállományok vakcinázásának általánossá válásával, mely a fiatal egyedekben megfelelő szintű maternális ellenanyagot biztosított a virémia kialakulása ellen, a kórkép háttérbe szorult. Az elmúlt években a QX szerotípus megjelenésével összefüggésben csaknem teljesen azonos elváltozások kerültek leírásra (Landman és mtsai., 2005; Palya és mtsai., 2007). Ez a szerotípus, feltehetően a nagy antigenitásbeli különbség miatt, képes áttörni a hagyományos vakcinák által biztosított maternális immunitást és eljutva a fejlődő tojócsőbe, annak maradandó károsodását okozza.



5. ábra: Áltjó egyed testüregét kitöltő, savószerű folyadékkal telt, erősen kitágult tojócső (Dr. Cserép Tibor felvétele).

Tojó korú állományok fertőződése:

Tojó korú állományok fertőződése súlyos tojáshozam-kieséssel, a tojáshéj minőségének romlásával és a tojásfehérje konzisztenciájának csökkenésével jár (McDougall, 1968). A vírus okozta termelés-csökkenés kevésbé törzsfüggő, jelentkezhet légzőszervi tünetekkel vagy anélkül egyaránt (Cook, 1984). A tojástermelés, a fertőzést követő két-három hét múlva, az elvárhatóhoz képest többnyire alacsonyabb szintre képes csak visszaállni. Rendellenes héjú és színű tojások (6. ábra) a ciklus végéig előfordulhatnak (Jones és Jordan, 2006). A vírus a tojócsőben a csillós hám károsodását, a propria gyulladásos beszűrődését és a nyálkahártyamirigyek hypopláziáját idézi elő (Dhinakar Raj és Jones, 1997). A tojásfehérje konzisztenciájának romlását elsősorban a mirigykárosodás okozza (Butler és mtsai., 1972).



6. ábra: Tojóállomány IBV fertőzése következtében kialakult rendellenes héjformák (www.gov.mb.ca).

5.8.4.2 Here

Az IBV herére és mellékherére gyakorolt esetleges károsító hatása az elmúlt években vetődött fel. Heregyulladást, a mellékherében fokozott kőképződést és következményes, növekvő terméketlenséget figyeltek meg élő, attenuált vakcinák használata mellett (Boltz és mtsai., 2004), vagy vadvírussal való fertőződést követően (Villareal és mtsai., 2006).

5.8.5 Izomzat

A 793/B (4/91, CR88) szerotípus megjelenésével a légzőszervi tünetek mellett tojó, valamint brojler szülőpár állományokban egy újabb kórképet, a mellizmok myopátiáját írták le (Gough és mtsai., 1992). Egyes vizsgálatok alapján arra lehetett következtetni, hogy az elváltozás nem a vírus közvetlen hatására jön létre, hanem közvetett módon, a fertőzés indukálta antigén-ellenanyag komplexek fokozott termelődése és azoknak az erek falára rakódása miatt (Dhinakar Raj és Jones, 1996). Felvetődött azonban más magyarázat is, miszerint a légúti fertőzés hatására a mellizom mély rétegeinek oxigénellátása romlik, ami izomdegenerációt okozhat (a mai brojlerhibridek mellizom vastagsághoz viszonyított tüdő-szív kapacitás aránya kedvezőtlenebb, mint korábban).

5.8.6 Egyéb szervek

A vírus jelenlétét a felsoroltakon kívül számos egyéb szervben is igazolták (lép, máj, hasnyálmirigy stb.) (Ambali és Jones, 1990; Otsuki és mtsai., 1990; Geerligs és mtsai., 2011), de azokban szövetkárosító hatással nem volt összefüggésbe hozható. Az immunszervek közül a Harder-mirigyből (Dhinakar Raj és Jones, 1996) és a Fabricius tömlőből (Ambali és Jones, 1990) izolálták a vírust, melyek közül az előbbinek kiemelkedő szerepet tulajdonítanak az oculonasalis nyálkahártyát védő, lokális immunválasz kialakításában (Dhinakar Raj és Jones, 1997). Az IBV bejuthat a tojásba és az ondóba egyaránt, de mivel a fertőzött embrió életképtelen, vertikális transzmisszióval nem kell számolnunk (Cook, 1971). Abdel-Moneim és munkatársai (2009) 10 napos embriók kísérletes fertőzését követően IBV antigént mutattak ki egy sor embrionális szervből, köztük nem hám eredetű szövetekből is. Immunhisztokémiai reakcióval antigén pozitív sejteket találtak az ornyálkahártyában, a tüdőben, a légcsőben, a lépben, a szívizomban, a májban, a zúzó- és mirigyegyomorban, a vesében, a bőrben és a központi idegrendszerben is.

5.9 Fogékony kor, lappangási idő, morbiditás és mortalitás

A fertőzésre minden korosztály fogékony, de legsúlyosabb tünetek a napos korú állatok fertőződése esetén alakulnak ki (Cavanagh és Naqi, 2003). A kor előrehaladtával a csirkék egyre ellenállóbbá válnak a fertőzés okozta vese- és tojócső-károsító hatással

szemben, és ilyenkor a mortalitásra mértéke is alacsonyabb (Crinion és Hofstad, 1972; Smith és mtsai., 1985; Albassam és mtsai., 1986).

A fertőzés módjától függően a lappangási idő eltérő lehet. Természetes körülmények között fertőződött állományoknál legalább 36 óra szükséges, hogy megjelenjenek az első tünetek, míg kísérletes fertőzést követően, a fertőzés módjától függően, már 18-36 órán belül észlelhetünk légzőszervi reakciót (Cavanagh és Naqi, 2003).

Egy érintett állományon belül minden egyed fertőzötté válik, azonban a mortalitás mértéke a vírus virulenciájának, valamint az állomány korának, immunállapotának és egyéb külső tényezőknek megfelelően, igen tág határok között mozoghat (Cavanagh és Naqi, 2003).

5.10 Kórhatározás

Az, hogy egy adott állományban a felsoroltak közül mely tünetek és milyen súlyossággal alakulnak ki, a vírus szerotípusán és pathogenitásán kívül számos egyéb tényező függvénye. Meghatározó szerepe van az állomány korának és a hasznosítási irányának, a tartási és takarmányozási körülményeknek, vagy az egyidejűleg fennálló egyéb fertőzéseknek.

Az IBV okozta fertőzés kórhatározása optimális esetben a klinikai tünetek, kórbonctani elváltozások, szerológiai áthangolódás, valamint vírusizolálás, vagy nukleinsav kimutatás eredményeinek együttes figyelembe vételével történik (Cavanagh és Naqi, 2003).

A törzsek közti jelentős antigenitásbeli különbség, valamint a vakcinák sokfélesége miatt, a diagnózist követően célszerű az adott izolátum szero- vagy genotípusát is meghatározni. A kimutatás sikerét azonban számos tényező negatívan befolyásolhatja, ezért elengedhetetlen a betegség pathogenezisének ismerete és az adott járványra jellemző körülmények figyelembe vétele (Dhinakar Raj és Jones, 1997).

5.10.1 Kórhatározást befolyásoló tényezők

A laboratóriumi módszerekkel való kimutatás eredményességét meghatározza a fertőződés és a mintavétel között eltelt idő, a csirkék immunállapota, az elegendő számú minta gyűjtése, a fertőzés korának függvényében a megfelelő szervek kiválasztása, a csirkék genetikai tulajdonságai (fogékonyság), a tartási körülmények, az esetlegesen fennálló immunszuppresszív tényezők és az interkurrens fertőzések (De Wit, 2000).

5.10.1.1 A fertőzés és a mintavétel között eltelt idő

A fertőzést követően a vírusreplikáció elsődleges helye a felső légút. Ennek megfelelően a heveny szakaszban a tracheából mutatható ki legnagyobb eséllyel a kórokozó. A legmagasabb értékeket 3-5 nappal a fertőzést követően mérték, majd

ezután, a vírus egyéb szervekbe való disszeminációjával párhuzamosan, rohamosan csökkentek a titerek (Crinion és mtsai., 1971a; Ambali és Jones 1990; Nakamura és mtsai., 1991; De Wit és mtsai., 1998). A fertőzés idült szakaszában, a vakbél bejáratában lévő nyiroktüszők (caecalis tonsillák), esetleg a kloáka tampon a legalkalmasabb a vírus kimutatására (De Wit és mtsai., 1998). Számos vizsgálat igazolta az IBV igen hosszú, akár 2-7 hónapos perzisztálását, majd reaktiválódását a vesékben és a caecalis tonsillákban egyaránt (Jones és Ambali, 1987; Bhattacharjee és mtsai., 1995; De Wit, 2000).

Az, hogy a megfigyelt látencia és az azt követő ürítés valós jelenség-e, vagy csak állandó újrafertőződés, illetve időszakosan nem kimutatható mértékű folyamatos ürítés következménye, további vizsgálatok tárgya. Az egyéb szervekből (tojócső, here, tüdő) való mintavétel mindig a kórlefolyás és a kórbonctani elváltozások figyelembe vételével történik (Cavanagh és Naqi, 2003).

5.10.1.2 A csirkék immunállapota a fertőzés pillanatában

A szerzett immunitás mértéke a fertőződéskor meghatározó jelentőségű lehet a kimutatható vírus mennyisége és a kimutathatóság tartama szempontjából. Homológ törzssel való fertőződés egy korábban vakcinázott állományban sokkal kisebb mértékben és rövidebb ideig mutatható ki, mint egy vakcinázatlan és korábban nem fertőzött állomány esetében (Pensaert és Lambrechts, 1994; De Wit és mtsai., 1998). Egy vakcinázott állomány heterológ törzssel való fertőzésekor általában gyengébb védelemre számíthatunk, azonban a kimutathatóság mértéke nagyobb lesz (De Wit és mtsai., 1998). A megfelelően vakcinázott egyedek esetén a vírus mérsékelt terjedési képessége tovább nehezítheti a kimutathatóságot (De Wit és mtsai., 1998).

5.10.1.3 Mintagyűjtés

Fogékony állományban a fertőzést követő heveny szakaszban a legtöbb állat nagy mennyiségben üríti a vírust. A fertőzés idült fázisában, vagy jól immunizált állományban jóval kevesebb egyed és csak alacsonyabb titerben üríti a kórokozót. Ilyenkor a fertőzés korának figyelembe vételével kiválasztott mintákat kell begyűjteni, lehetőleg minél nagyobb számú egyedből.

5.10.1.4 Fertőzés korának megfelelő szervek kiválasztása

A légúti szervek mintázása heveny légzőszervi tünetek megléte esetén indokolt. A fertőzés idült szakaszában, vagy vakcinázott állományok esetén, ahol alacsony vírustiterre számíthatunk, célszerű a vesékből, vagy a vakbélbejárat nyiroktüszőkből gyűjteni a mintát.

5.10.1.5 Fogékonyság

Vizsgálatok igazolták, hogy a különböző fajták, vonalak fogékonysága és fertőzésre adott válasza között eltérések lehetnek. Otsuki (1990), valamint Nakamura (1991) és munkatársai különbségeket mutattak ki két fehér Leghorn vonal között a fertőzést követően kialakult tünetek súlyosságában, a légzőhám károsodásának mértékében, valamint a vírus szövetekben való szaporodásában. Smith és munkatársai (1985) különböző fajtákat IBV-vel, vagy IBV-vel és *E. coli*-val szimultán fertőzve, eltérő mortalitást figyeltek meg.

5.10.1.6 Tartási körülmények

Az alkalmazott tartástechnológia, a higiéniai és járványtani viszonyok és az ezekkel szorosan összefüggő másodlagos fertőzések kialakulásának kockázata nagyban befolyásolja az IBV fertőzések kimenetelét (Butcher és mtsai., 1990; De Wit, 2000).

5.10.1.7 A fertőzéskor fennálló immunszuppresszív tényezők

A fiatalkori fertőző bursitis (IBDV) és csirke anémia vírus (CAV) okozta fertőződés csökkenti az IBV vakcinázásra adott immunválaszt, vagyis az állomány fogékonyabb lesz a vadvírus fertőzésre (Pejkovski és mtsai., 1979; Cook és mtsai., 1991; Toro és mtsai., 2006; Van Santen és mtsai., 2006). Ezzel egyidejűleg azonban, a fertőző bursitis vírus okozta immunszuppresszió elősegíti az IBV kimutathatóságát (De Wit, 2000). Az immunszuppresszált állományok vadvírus okozta fertőződése esetén a klinikai tünetek súlyossága és a vírus perzisztálása egyaránt fokozódik (Toro és mtsai., 2006; Van Santen és mtsai., 2006).

5.10.1.8 Interkurrens fertőzések

Eltérő a helyzet azon interkurrens fertőzések esetén, ahol a fertőzést okozó vírusok célsejtjei megegyeznek az IBV célsejtjeivel (avian metapneumovirus, aMPV; baromfipestis vírus/Newcastle disease virus, NDV), illetve, ha egyazon szervezetet egyszerre több IBV variáns fertőz. Ezekben az esetekben az egyidejűleg jelenlévő vírusok fertőzési idejének és reprodukciós potenciájának függvényében egyik, vagy másik vírus elfedheti a másik jelenlétét.

5.10.2 A kórhatározás módszerei

5.10.2.1 Vírusizolálás

A vírus kimutatása hagyományosan embrionált tyúktovábbításban, légcső-szövetkultúrában, esetleg sejtenyészeten való izolálással történik (De Wit, 2000). Az embriókárosító vagy ciliosztatikus hatás megjelenését követően a vírus jelenlétét megfelelő antigén vagy nukleinsav kimutatási módszerrel, esetleg elektronmikroszkóppal kell igazolni.

5.10.2.2 *Vírusantigén kimutatás*

A vírusantigén kimutatására sokféle módszer létezik, amelyekben IBV specifikus ellenanyagot használnak. Az agargél precipitációs teszt csoportspecifikus antigének kimutatására alkalmas, míg az immunfluoreszcenciás, immunhisztokémiai és ELISA módszerek az alkalmazott ellenanyag függvényében, alkalmasak mind a csoport-, mind a típus-specifikus antigének detektálására (De Wit, 2000).

5.10.2.3 *Vírusnukleinsav kimutatás*

A vírusnukleinsav kimutatása közvetlenül a vizsgált szövetmintából, vagy előzetes vírusizolálást követően az allantoisz folyadékból RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) módszer segítségével történik. A vizsgálat céljának megfelelően PCR-rel detektálhatók a genom konzervatív, vagyis csoportspecifikus régiói, míg a variábilis génszakaszok (az S1 génen) a szerotípus vagy a genotípus meghatározására alkalmasak (Cavanagh és mtsai., 1999). Új, madár eredetű koronavírussok, vagy korábban ismeretlen IBV variánsok kimutatására a polimeráz gén ORF 1b régiója az optimális, amely az összes koronavírus (emlős és madár) tekintetében nagyfokú homológiát mutat (Cavanagh, 2005).

5.10.2.4 *A törzsek osztályozása*

A kimutatott törzs osztályozása járványtani, evolúcióvizsgálati és gyakorlati szempontból egyaránt fontos lehet, bár ez a sokszor zavaros nevezéktan miatt (Cavanagh, 2001), valamint a standardizált módszerek hiányában nehézségekbe ütközhet (De Wit, 2000). Az osztályozásra alkalmas módszereknek két nagy csoportja van attól függően, hogy a vírus biológiai (funkcionális tesztek) vagy genetikai (nem funkcionális tesztek) tulajdonságairól tájékozódunk.

A funkcionális tesztek közül a protektív típus meghatározására kereszt-immunizációs vizsgálatok elvégzése szükséges (lásd: 5.4.1.2) (De Wit, 2000). Az antigéntípus, ezen belül a szerotípus és az epitóp-típus meghatározása szintén a törzs biológiai tulajdonságairól ad tájékoztatást. A szerotípus meghatározását vírusneutralizációs (VN) próbával végzik, mely a legáltalánosabban használt tipizáló módszer. Az epitóp-típusok (variánsok) meghatározása monoklonális ellenanyagokkal történik.

A törzsek genotípusának a meghatározása többféle módszerrel lehetséges (lásd: 5.4.2.1). A törzsek szero- és genotípusa az esetek többségében jól korrelál (De Wit, 2000). Máskor két jól elkülönülő szero-, vagy protektív típus genotípusa nagyfokú hasonlóságot mutat, míg azonos szero-, vagy protektív típusú törzsek genotípusa jelentősen eltér (Cavanagh, 1992b).

5.10.2.5 Ellenanyag kimutatás

Az IBV fertőzés igazolásának lehetséges módszere az IBV-specifikus ellenanyagok megjelenésének, vagy jelentős emelkedésének a kimutatása. A klinikai tünetek és a fertőzés közti valódi összefüggés igazolásához savópár vizsgálatot kell végezni (De Wit, 2000).

A víruskimutatáshoz hasonlóan az ellenanyag kimutathatóságát is számos tényező befolyásolja, mint pl. az állatok kora, a maternális ellenanyagok jelenléte, a szerotípusok közti keresztreakciók, esetleges immunszuppresszió és a fertőzés kori immunállapot.

Csoport-specifikus tesztek:

A legtöbb szerotípus esetén a közös epitopok által indukált csoport-specifikus ellenanyagok termelődését agargél precipitációs teszttel (AGPT), vagy csoport-specifikus indirekt ELISA-val mutathatjuk ki. Az agargél precipitációs teszt egyszerű és olcsó, bár rosszul korrelál a többi szerológiai teszt eredményével. Ez elsősorban annak köszönhető, hogy az ebben a próbában kimutatott precipitáló ellenanyagok csak rövid ideig (kb. 1 hétig) vannak jelen a fertőzést követően, majd nagyon gyorsan a kimutathatósági szint alá csökkennek. Az indirekt ELISA a fertőzést követő 1 héten belül pozitív reakciót ad. A nagyszámú pozitív minta tehát egy nemrég lezajlott fertőzést feltételez, míg egy jóval korábbi fertőzés észrevétlen maradhat. Egy a kereskedelmi forgalomban is kapható indirekt ELISA érzékenysége vakcinázott és kontroll állatok savóinak vizsgálata alapján, viszonylag alacsony (49-55%), míg specificitása nagy (98-100%, De Wit és mtsai., 1997)

Az IBV specifikus IgM ellenanyagok egy fertőzést vagy vakcinázást követően csak rövid ideig vannak jelen, ezért az IgM ELISA eredményből egy nemrégiben lezajlott fertőzésre, vagy immunizálásra következtethetünk. Az IgM ellenanyag a fertőzést követő 1. héttől van jelen, a 2. héten mérhető a legmagasabb koncentrációban, majd a 3. héttől mennyisége a kimutathatósági szint alá csökken (Mockett és Cook, 1986).

Típus-specifikus tesztek:

A szerotípus-specifikus VN és HAG (haemagglutináció gátlási) tesztek az eltérő szerotípusok által indukált specifikus ellenanyagok elkülönítésére használják. A VN a leggyakrabban alkalmazott módszer, mellyel az S1 fehérje által indukált vírusneutralizáló ellenanyagokat mutatják ki. A vírusneutralizáló ellenanyagok a fertőzést követő 9-21. nap között jelennek meg, kb. a 35. napra érik el a maximum szintet, majd hosszan perzisztálnak. Különböző törzsek okozta egyidejű, vagy ismételt fertőzés esetén keresztreakciók lehetnek (De Wit, 2000). A HAG teszt az S1 fehérje által indukált haemagglutinációt gátló ellenanyagokat mutatja ki, melyek a fertőzést követő 9. nap körül jelennek meg, a 14-17. napig növekednek, majd szintjük lecsökken.

5.11 Védekezés

A fertőző bronchitis okozta gazdasági károk mértéke számos tényező függvénye. A koncentráltan elhelyezkedő és intenzíven működő telepek járványtani eszközökkel való mentesen tartása lehetetlen feladatnak tűnik. Az ilyen területeken a veszteségek csökkentése és a védekezés az állományok aktív immunizálásával valósítható meg (Cavanagh és Naqi, 2003; Cavanagh, 2007). A vakcinázásra élő attenuált, inaktivált és rekombináns vakcinák állnak rendelkezésre.

5.11.1 Élő attenuált vakcinák

Az élő vakcinák használta több mint fél évszázadra nyúlik vissza és a brojlerállományok, valamint a tenyész- és tojóállományok bevezető immunizálására használják. Napjainkban legtöbb naposcsibe a keltetőben spray módszerrel kerül vakcinázásra. A tenyész- és tojóállományokat később többször is vakcinázzák a tojásrakást nem sokkal megelőző ideig, bevonva a variáns vakcinatörzseket is (Cavanagh és Naqi, 2003). A brojlerállományok esetében is egyre indokoltabb egy, a keltetői immunizálást 7-14 nappal követő újabb vakcinázás, különös tekintettel a variáns törzsek elleni védelem kialakítására. A légúti nyálkahártya védelme egyszeri vakcinázást követően rövid, az immunizálást követő 6-9. héttől csökkenni kezd (Darbyshire és Peters, 1984).

Az élő vakcina egyszeri alkalmazását követően a vakcinatörzssel homológ szerotípussal és az egyazon protektív típusba tartozó törzsekkel szemben biztosíthatunk védelmet. Ugyanazon szerotípust tartalmazó booster vakcinázással növelhetjük az immunválasz homogenitását, míg egy heterológ szerotípust tartalmazó oltóanyag használata szélesíti azon szerotípusok spektrumát, amellyel szemben az állomány védetté válik egy esetleges vadvírus fertőzéssel szemben (Cook és mtsai., 1999). Ez a lehetőség különösen fontos, ha figyelembe vesszük, hogy míg a homológ törzsekkel szemben a vakcina indukálta védelem kiváló, egy heterológ szerotípussal való fertőződés a keresztvédelem hiánya miatt súlyos károkat okozhat (Bijlenga és mtsai., 2004).

Az első élővírusos IBV vakcinát a Mass szerotípusú törzsekből állították elő, és máig a legszélesebb körben alkalmazzák világszerte, Auszália kivételével. Kiterjedt használatának az az elsődleges oka, hogy a legtöbb helyen ez volt az első, és leginkább elterjedt IBV szerotípus. A folyamatosan megjelenő újabb szerotípusok közül, egyes tartósan fennmaradt és elterjedt törzsek is bekerültek az adott régió vakcinarepertoárjába. Európában a Mass szerotípusba tartozó törzsek (H120, M41) mellett használják a 793/B (4/91), D274 és a D1466 szerotípusok törzseit tartalmazó vakcinákat is (Cavanagh és Naqi, 2003). Az egyre kiterjedtebben előforduló QX

szerotípus törzseiből előállított gyengített vakcina is várhatóan hamarosan piacra kerül (Geerligts és mtsai., 2011).

Az élő vakcinák használatakor azonban figyelembe kell venni, hogy a nem megfelelő időben és dózisban adott IBV vakcina gátolni képes az azonos célsejtekkel rendelkező aMPV és NDV vakcinák által kiváltott védelmet (Thornton és Muskett, 1975; Cook és mtsai., 2001).

5.11.2 Inaktivált vakcinák

Az inaktivált vakcinákat a '60-as, '70-es években fejlesztették ki, azzal a céllal, hogy hosszan tartó védelmet biztosítsanak a tojóállományokban tapasztalt tojástermelés csökkenés ellen. Egyszeri, önmagában való alkalmazása azonban csak minimális védelmet biztosított a vírus káros hatásaival szemben (McDougall, 1969). Ezért a tojó- és tenyészállományok magas szintű védelmét a nevelési időszakban többször ismételt élővírusos vakcinázást követően, inaktivált készítmények oltásával biztosíthatjuk, amely egyúttal alkalmas az utódállományok megfelelő szintű maternális ellenanyaggal való ellátására is (Cavanagh és Naqi, 2003).

5.11.3 Rekombináns vakcinák

A technológia fejlődésével számos új generációs rekombináns IBV vakcina került kifejlesztésre. Alegység vakcinákat az S, illetve az N fehérje felhasználásával hoztak létre. A baculovírussal expresszált S fehérje képes volt önmagában immunitás kiváltására, sajnálatosan azonban többszöri alkalmazását követően is csak az állatok kevesebb, mint 50%-ban (Song és mtsai., 1998). Az S1 gént a madárhimlő illetve adenovírus DNS-ébe klónozva vektorvakcinákat is előállítottak. A nem patogén adenovírus vektor kísérletesen 90-100%-os védelmet indukált, feltehetően azért, mert képes a légutakban is szaporodni (Johnson és mtsai., 2003).

A baromfiágazat sajátos lehetősége a vakcináknak 18 napos embrióba (*in ovo*) történő bejuttatása. A módszer feltételei technikailag adottak, azonban ez ideig csak a Marek és a gumboroi betegség elleni vakcinákkal sikerült megfelelő eredményeket elérni. A többi tesztelt vakcina, köztük egy IBV vakcina is negatívan befolyásolta a keltethetőséget (Cavanagh, 2007). A jövőben komoly előrelépést jelenthet a Tarpey és mtsai (2006) által előállított klónozott IBV törzs. A kutatócsoport reverz genetikai rendszer segítségével az a patogén Baudette törzs (Mass szerotípus) S génjét eltávolította és helyére a patogén M41 törzs S génjét inzertálta. Ezzel a rekombináns törzssel végzett *in ovo* vakcinázás nem befolyásolta a keltethetőséget és megfelelő védelmet biztosított homológ törzssel való fertőzéssel szemben.

Mind a mai napig azonban egyetlen rekombináns technikával előállított vakcina sem került kereskedelmi forgalomba, mind megakadt a kísérleti stádiumban.

6. Anyag és módszer

Munkánk során célunk az újonnan megjelent és nagy kártételt okozó QX szerotípus törzseinek vizsgálata és a már ismert M41 és 793/B vírustörzsekkel való összehasonlítása volt. Ennek érdekében bizonyítottan vagy feltételezhetően QX szerotípus okozta járványesetekből gyűjtöttünk mintákat Európa különböző országaiból, valamint a szerotípus megjelenési helyéről, Kínából.

Az öt, klinikai esetből származó QX izolátummal, valamint a M41 és 793/B referenstörzssel ezután állatfertőzési kísérletet végeztünk a QX szerotípus pathogenitásának és szervtropizmusának megismerése céljából. Fokozott figyelmet fordítottunk az új szerotípussal összefüggésben leírt mirigygyomor-gyulladás, vesekárosodás és „áltozó-szindróma” kialakulásának vizsgálatára.

Ezzel párhuzamosan tanulmányoztuk az IBV– tojástermelés csökkentésében betöltött szerepén túl – kakasokra kifejtett hatását is. Ennek érdekében három fertőzött csoportba a nőivarú állatok mellé kakasokat is bevontunk. Később a vizsgálatot egyszerűsített formában ivarérett korú kakasokon is megismételtük.

6.1 A vizsgálatban felhasznált vírustörzsek

6.1.1 A minták származása

A vizsgálat során öt különböző ország, klinikai eseteiből származó mintákat használtunk fel. A minták a 2005. és 2006. években észlelt, IBV-re jellemző tünetekkel kísért járványkitörésekből érkeztek.

A kínai minta Qinhuangdao környékéről származott. A megbetegedések 2005-ben egy brojlertelep 3-4 hetes korú, a korábbiakban Mass vakcinával immunizált állományaiban jelentkeztek. Súlyos légzőszervi tünetek mellett kifejezett vesekárosodásra utaló kórbonctani leletről számoltak be. A telep négy állományából származó vese- és caecalis tonsilla (c. tonsilla, vakbélbejárat nyiroktüsző) mintákat dolgoztunk fel.

A Steenvordeból (Franciaország) származó légcső- és vesemintákat R.C. Jones (University of Liverpool, UK) bocsátotta rendelkezésünkre. A 2005-ben hússzülőpár állományban „áltozó-szindrómával” kísért járványból R.C. Jones és munkatársai QX törzset mutattak ki (személyes közlés, 2006).

Szlovákiában 2006-ban észleltek légzőszervi tünetekkel és vesekárosodással járó megbetegedéseket. A boncolások során fibrines légzsákgyulladás és mállékony, elfajult vese volt a legfeltűnőbb elváltozás. A brojlerállomány 10%-os elhullást követően vészelté át a fertőzést. Vizsgálatunk elvégzéséhez vese-, légcső-, tüdő- és c. tonsilla mintákat küldtek az állományból.

Görögországban (Epirus) 2005-ben, 4-5 hetes brojlersirkékben szokványos légzőszervi tünetekkel járó megbetegedések jelentkeztek. Az állomány 8 és 25 napos korban H120 vírustörzset tartalmazó vakcinával lett immunizálva. Ennek ellenére a mortalitás 7 nap alatt elérte az 5%-ot. Az állományból légcső és vékonybélminták érkeztek vizsgálat céljára.

A magyarországi minták egy Debrecen környéki brojlerállományból érkeztek, ahol a korábbi vakcinázás ellenére fokozott légzőszervi tüneteket, elhullásokat és súlyos vesekárosodást figyeltek meg. A beküldött minták az érintett egyedek veséjéből és légcsövéből származtak.

6.1.2 A vírusok kimutatása vírusizolálással és azonosítása RT-PCR reakcióval

A klinikai esetekből származó mintákból izolálást követő RT-PCR módszerrel mutattuk ki a vírusnukleinsavat.

6.1.2.1 Vírusizolálás

A szervmintákat egységesítettük, homogenizáltuk, majd hozzávetőlegesen 1:10 arányban, antibiotikumot tartalmazó PBS-sel kevertük. A homogenizátumot 10 percre 12000× g-vel centrifugáltuk, majd a felülúszót leszívtuk.

A felülúszót ezután mintánként 5-5 db, 9 napos embrionált SPF tyúktojás (Charles River Laboratories, Wilmington, USA) allantoisz üregébe fecskendeztük (200 µl/tojás), majd a tojásokat 7 napig 37°C-on inkubáltuk és naponta lámpáztuk. 1-3 vakpasszást végeztünk a IBV-re jellemző embrió-elváltozások – törpenövés, satnyaság, görbült tartás – kialakulásáig. A megfelelő elváltozást mutató embriók allatoisz folyadékát összegyűjtöttük és csoportonként egységesítettük.

6.1.2.2 RNS kivonás

Emésztés céljából 250 µl allantoisz folyadékot 750 µl TRI reagenssel (Sigma, St. Louis, USA) elegyítettünk, majd szobahőmérsékleten 10 percre állni hagytuk. Ezután 200 µl fenol-kloroformmal kevertük az elegyet, majd 15 percre 12000× g-vel centrifugáltuk. A centrifugálással az elegy 3 részre vált. Az RNS tartalmú felső vizes fázist leszívtuk, 500 µl izopropanolt tartalmazó eppendorf csőbe mértük és szobahőmérsékleten 10 percre állni hagytuk. A nukleinsav kicsapásához az elegyet 10 percre 12000× g-vel centrifugáltuk. A cső aljában leülepedett RNS-ről a felülúszót leöntöttük és 1 ml 75%-os etanol hozzáadásával mostuk. Újabb (10 perc, 12000× g) centrifugálást követően, az etanolt eltávolítottuk és a cső aljában lévő üledéket enyhe kiszáradásig állni hagytuk. Ezután 20 µl dietil-pirokarbonát-ot tartalmazó vízben vettük fel a tisztított RNS-t, homogenizáltuk, 5 µl-ét átírtuk cDNS-é (copy DNS: DNS másolat), a maradékot pedig –80°C-on tároltuk.

6.1.2.3 cDNS előállítás

A tisztított RNS-t első lépésben átírtuk cDNS-é. Ehhez mintánként 25 µl reakcióelegyet készítettünk. A reakcióelegy 8 µl DEPC-es vizet, 5 µl MMLV puffert (Moloney murine leukemia virus, egérleukémia vírus, Promega, Wisconsin, USA), 4 µl dezoxinukleozid trifoszfátot (dNTP, Promega, Wisconsin, USA), 1 µl random hexamert (Fermentas, Litvánia), 1 µl RNase inhibitor (Fermentas, Litvánia), 1 µl reverz transzkriptáz enzimet (Fermentas, Litvánia) és 5 µl RNS templátot tartalmazott. A reverz transzkripciót 50°C-on 30 percig végeztük ABI PRISM 2720 Thermal Cycler automatában (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Az elkészült cDNS-t további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

6.1.2.4 RT-PCR

A DNS másolatot polimeráz láncreakció segítségével amplifikáltuk. A reakcióhoz használt primerek célterülete az S1 génnek azon konzervatív szakasza, amely a különböző szerotípusok többségében konszenzus szekvenciájú résznek tekinthető, így az ismert szerotípusok legtöbbszörének, köztük a QX-nek, a kimutatására is alkalmasak. A primereket a nemzetközi szakirodalomban publikált adatok (Cavanagh és mtsai., 1999) alapján rendeltük a Biomi Kft-től (Gödöllő). A primerek szekvenciáját, tapadási helyét és a termék nagyságát a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: Az RT-PCR során felhasznált primerek.

Primer neve	Primer szekvenciája	Primer helyeződése az S1 génen	Termék nagysága
XCE1+	5'- CACTGGTAATTTTTTCAGATGG -3'	728 - 749	464 bp
XCE2-	5'- CTCTATAAACACCCTTACA -3'	1168 - 1193	

A DNS amplifikáció során a mintákból előállított cDNS 5 µl-ét az alábbi táblázatban látható összetételű reakcióelegyhez adtuk:

3. táblázat: PCR reakcióelegy.

PCR puffer	8 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTP	4 µl
TAQ polimeráz	1 µl
Primer	1 µl
Desztillált víz	1 µl

A PCR program első lépése a 95°C-on, 15 percen át tartó denaturáció volt. Ezt követően 35-ször ismételtük a következő lépéseket: 95°C-on 40 másodperc

denaturáció, 52°C-on 50 másodperc primer tapadás és 72°C-on 60 másodperc láncszintézis. A folyamat a végső láncszintézissel zárult, ami 72°C-on 10 percig tartott. A DNS amplifikálását ABI PRISM 2720 Thermal Cycler automatával (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) végeztük.

6.1.2.5 A PCR eredményének láthatóvá tétele

Az amplifikációval kapott termék 7,5 µl-ét, 2,5 µl 6×Orange Loading Dye-al (Fermentas, Litvánia) kevertük és 0,5 µl/ml etidium-bromidot tartalmazó, TBE (Tris-borate-EDTA) pufferben oldott, 1,5%-os agaróz gélben elektroforetizáltuk 8 V feszültségen, 60 percen át. A megfestett terméket 302 nm hullámhosszú ultraibolya átvilágítással vizsgáltuk, és a Kodak DS Electrophoresis Documentation and Analysis System, valamint a kapcsolódó Kodak Digital Science 1D szoftver segítségével rögzítettük és dokumentáltuk. A génszakasz nagyságát 50 bázispár osztású DNA Ladder (Fermentas, Litvánia) marker segítségével határoztuk meg.

6.1.3 Szekvencia meghatározás és filogenetikai vizsgálatok

6.1.3.1 DNS-fragmentumok tisztítása gélből

Ahol megfelelő méretű terméket kaptunk, a PCR-t megismételtük, és a termék teljes mennyiségét 0,8%-os, alacsony olvadáspontú agarózgélben futtattuk meg 8 V feszültségen, 2 órán át. Az amplikon helyzetét rövid idejű ultraibolya átvilágítás alatt ellenőriztük, a terméket tartalmazó darabot kivágtuk a gélből. A DNS szakaszt a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) segítségével a gyártó utasítása szerint vontuk ki a gélből. A termékeken ezután kétirányú, direkt fluoreszcencián alapuló szekvenálást végeztünk el (Biomi Kft., Gödöllő) az RT-PCR során használt primerekkel. A kapott szekvenciát a BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) program segítségével azonosítottuk. A kétirányú szekvenálással kapott szekvenciaadatokat egymással és a génbankban elérhető törzsek azonos részletével hasonlítottuk össze az Align Plus4 for Windows 95, version 4.0. SciEdCentral (Scientific és Educational Software) program segítségével. A filogenetikai törzsfá generálásához ClustalX 1.81 programot használtunk. A törzsfá készítéshez a saját szekvenciáinkon kívül, a génbankban elérhető fontosabb IBV szerotípusok szekvenciáit is kigyűjtöttük. A bootstrap értékeket a program 1000 megismételt törzsfá rekonstrukciós adatai alapján kalkulálta. A törzsek közti filogenetikai viszonyok ábrázolásához a TreeView version 1.6.6 számítógépes programot használtuk fel.

6.1.3.2 Génbanki elérhetőségi kódok

A vizsgálat során meghatározott IBV szekvenciákat a következő akcessziós számokon töltöttük fel a génbanki adatbázisba: GQ403795-GQ403799.

6.2 Állatfertőzési vizsgálat

6.2.1 A törzsek szaporítása és a fertőző inokulum előállítása

A QX szerotípus vizsgálata céljából a 6.1.1 pont alatt részletezett mintákból származó 5 vadvírus törzset és összehasonlításképpen az Európában leginkább elterjedt Mass és 4/91 szerotípus egy-egy referencia törzsét (M41 és 793/B) használtuk fel.

6.2.1.1 A vadvírus törzsek tisztítása

A klinikai mintákból izolált vírustörzsek tisztítását embrionált SPF tyúktojásban végzett véghígításos módszerrel végeztük, annak érdekében, hogy a fertőzéshez homogén, más kórokozótól mentes víruspopulációt nyerjünk. Ehhez a izolált vírustörzseket tartalmazó allantoisz folyadékból 8 lépéses tízszeres hígítást készítettünk, és a 6.1.2.1 részben leírtak szerint 5-5 embrionált tyúktojásba oltottuk. Az inkubációs idő lejártá után azt a legnagyobb hígítást, amelyben még specifikus embrió-elváltozás volt látható, az előzőek szerint újra hígítottuk. A harmadik hígítást követően ismételt a legnagyobb, még elváltozást mutató tojások allantoisz folyadékát eltávolítottuk, majd ezt használtuk az állatok fertőzésére, az inokulumban lévő vírustörzs azonosítása, tisztasági vizsgálata és titrálása után.

6.2.1.2 A fertőző inokulumban lévő vírustörzs azonosítása

Az izolált vírustörzsek véghígításos tisztítását követően az egyes mintákban lévő vírustörzsek kimutatását és azonosítását a 6.1.2 és 6.1.3 pontban leírtak szerint RT-PCR módszerrel és azt követő szekvenálással végeztük.

6.2.1.3 A fertőző inokulum tisztasági vizsgálata

A fertőző inokulumok mindegyikével steril próbát, haemagglutinációs, valamint mycoplasma kimutatására irányuló tesztet, és PCR-t végeztünk a főbb baromfi patogén ágensek jelenlétének kizárása céljából.

6.2.1.4 Összehasonlító törzsek

Az Európában leggyakoribb Mass és 4/91 szerotípusok 1-1 referenciatörzse a weybridge-i laboratóriumból származott (Veterinary Laboratories Agency, Avian Virology Department, Weybridge, UK). A Mass szerotípushoz tartozó M41 törzs 3, a 4/91 szerotípushoz tartozó 793/B törzs 2 tojáspasszást követően érkezett. Titermeghatározást követően a törzseket -70°C -on tároltuk.

6.2.1.5 A fertőző inokulum titrálása és hígítása

A véghígításos módszerrel végzett tisztítás során nyert inokulumból nyolc lépéses tízszeres hígítást készítettünk. A hígítások mindegyikével a 6.1.2.1 pontban leírtak

szerint 5-5 embrionált SPF tyúktojást oltottunk. Az embrió mortalitást 7 napon keresztül regisztráltuk, majd az oltást követő 7. napon elbíraltuk a különböző hígítások esetén kialakult embrió-elváltozásokat. A kiindulási anyagnak azt a legnagyobb hígítását, ahol még IBV specifikus mortalitást vagy elváltozásokat észleltünk, tíz lépéses kétszerező hígítással továbbtitráltuk. Hígításonként 5-5 SPF tojás oltásával határoztuk meg az inokulum EID₅₀ titerét, amit a fertőzés céljából 10^{5,7} EID₅₀-re állítottunk be. A hígítást, közvetlenül a fertőzés előtt, laboratóriumi körülmények között, PBS-el végeztük.

6.2.2 Kísérleti állatok és elhelyezésük

Napos korú, specifikus kórokozótól mentes (SPF: specific pathogen free) tojásokból (Spafas, Line 22, Charles River Laboratories, Wilmington, USA) kelt csibéket véletlenszerűen 8 csoportba osztottunk. Az első 4 csoport, csoportonként 50 jércét, az 5., 6. és 7. csoport az 50 jérce mellett 50 napos korú kakast a kontrol pedig 20 jércét és 10 kakast tartalmazott. Az egyes csoportok egymástól jól szeparált egységekben és elkülönített gondozás mellett kerültek elhelyezésre. Az állatokat mélyalmon tartottuk, az ivóvíz és a takarmány *ad libitum* állt rendelkezésre.

6.2.3 Kísérleti elrendezés

A kísérletben 8 csoportot alakítottunk ki. Az első 4 csoportba 50-50 jércét osztottunk szét és a kínai, francia, szlovák és görög izolátummal fertőztük őket. Az 5., 6. és 7. csoportokban az 50 jérce mellett 50-50 kakas is fertőzésre került a magyar, az M41 és a 793/B törzzsel. A placebóval (PBS) kezelt negatív kontroll (K) csoportot 20 jérce és 10 kakas alkotta. A fertőzés során a napos korú állatok kötőhártyaszájába és orrnyílásába 40 µl 5,7 log₁₀ EID₅₀ titerű vírusszuszpenziót cseppentettünk. A fertőzést követően napi megfigyelést végeztünk és a klinikai tüneteket nyugalmi állapotban, illetve enyhe meghajtás után rögzítettük. A 4. és 42. nap között 8 alkalommal mintát vettünk minden csoportból. Az egyes csoportokban a klinikai tünetek és kórbonctani elváltozások mellett, vizsgáltuk a fertőzésre adott ellenanyagválasz kialakulását, a légcső csillós hámsejteinek aktivitását, a vírusantigén jelenlétét az egyes szervekben, a vírus indukálta kórszöveti elváltozásokat, valamint a vizsgált szervekben a vírus RNS megjelenését és mennyiségi viszonyait. Az első 4 csoportból alkalmanként 5-5 állatot, az 5., 6., 7. csoportokból 5 jércét és 5 kakast, a kontroll (K) csoportból 2 jércét és 1 kakast véreztettünk el mintavétel céljából. Mintaként azon szerveket/szervrészeket távolítottuk el, ahol vírusszaporodást, illetve következetes szövetkárosítást vártunk. A csoportbeosztást és a mintavételt a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat: Kísérleti elrendezés: napos korú csibék fertőzése esetén.

Fertőző törzs	Ivar szerinti beosztás		Mintavétel (4, 7, 11, 14, 21, 28, 35, 42 DPI): szövettan, RRT-PCR								
			légcső	tüdő	mirigyes-gyomor	csípőbél	c.tons*	vese	petefészek	tojócső	here
Kínai	50♀		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
Francia	50♀		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
Szlovák	50♀		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
Görög	50♀		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
Magyar	50♀	50♂	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M41	50♀	50♂	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
793/B	50♀	50♂	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
-	20♀	10♂	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

*csak RRT-PCR céljára vettünk mintát

Az IB vírus esetleges terméketlenséget növelő hatásának vizsgálata céljából a naposkori fertőzést követő időszak here mintavételén túl, ivarérett korú kakasokat is fertőztünk. Ez esetben is a magyar, az M41 és a 793/B törzzsel fertőztünk, majd a fertőzést követően 14 napon át követtük a klinikai tüneteket és a kórbonctani elváltozásokat. A fertőzést megelőzően, tíz véletlenszerűen kiválasztott állat szérumvizsgálatával meggyőződünk a kakasok IB negatív státuszának fennmaradásáról. Negatív kontrollként 8 placebóval (PBS) fertőzött kontroll madarat vontunk be a vizsgálatba. A mintavételek az 5. táblázatban leírtak szerint a légcső, vese és a here kórszövettani és RRT-PCR célú feldolgozására történtek. A mintavételek alkalmával kakasonként 10-10 ml vért is felfogtunk IBV ellenanyag mérése céljából.

5. táblázat: Kísérleti elrendezés: ivarérett korú kakasok fertőzése.

Fertőző törzs	Ivar szerinti beosztás	Mintavétel (4, 7, 11, 14,DPI): szövettan, RRT-PCR		
		légcső	vese	here
Magyar	15♂	✓	✓	✓
M41	15♂	✓	✓	✓
793/B	14♂	✓	✓	✓
-	8♂	✓	✓	✓

6.2.4 A fertőző törzsek visszatitrlása

A fertőzés előtt kihígított vírusszuspenzió 0,2 ml-ét a fertőzés végeztével lefagyasztottuk a fertőző titer ellenőrzése céljából. Az ellenőrzésre azért volt szükség, mert az inokulum hígítását laboratóriumi körülmények között végeztük, a csoportok pedig eltérő helyszíneken kerültek fertőzésre, így minden csoport esetén eltelt

valamennyi idő a hígítás és a fertőzés megkezdése között. Az ez idő alatt bekövetkezett esetleges titerérték csökkenés, illetve a hígítás pontosságának ellenőrzése céljából az inokulumokat a 6.1.2.1 és a 6.2.1.5 pontokban leírtak alapján embrionált tyúktojásba oltottuk és meghatároztuk EID₅₀ titerüket.

6.2.5 Az egyes csoportok közötti fertőzésátvitel kizárása

A klinikai tünetek napi megfigyelését mindig a kontroll csoportban kezdtük és minden csoporthoz külön védőruházatot használtunk. A kórbonctani vizsgálatok és a mintafeldolgozások során is ugyanezt a sorrendet követtük. A minták eltávolítása és feldolgozása során csoportonként külön steril eszközökkel dolgoztunk. Végül a csoportok közti átfertőződés kizárása céljából a ráfertőző törzset visszaizoláltuk és RT-PCR-t követő szekvenálással azonosítottuk.

6.2.6 Mintavétel és kórbonctani vizsgálat

A mintavételek alkalmával először minden állatból vért vettünk, majd exterminálás után kórbonctani vizsgálatot végeztünk. A fertőzést követő 4-14 napokon a véreztetést követően azonnal eltávolítottuk a teljes légcsövet, és steril tápfolyadékba helyeztük. A kórbonctani elváltozások regisztrálását követően, a következő szervekből vettünk mintát kórszövetteni vizsgálat és/vagy kvantitatív RT-PCR elvégzése céljából: légcső, tüdő, csípőbél, vakbélbejárat nyiroktüszők, vese, petefészek, tojócső és here (csak a magyar QX, M41 és 793/B vírustörzsel fertőzött és a kontroll csoportok esetén). A mirigyegyomor és vékonybél mintákat a fertőzést követő 4., 7., 11., 14. és 21. napokon gyűjtöttük, mivel az addig feldolgozott minták eredménye nem indokolta a további mintavételt.

6.2.7 A fertőző törzsek visszaizolálása

A fertőzést követő 4. napon eltávolított légcsőminták egy része a fertőző törzsek visszaizolálása és a keresztfertőzések kizárása céljából is feldolgozásra került. Az egyes csoportok mintáit egységesítettük és az izolálást, az RT-PCR-t és a szekvenálást csoportonként a 6.1.2 és a 6.1.3 pontokban leírtak szerint végeztük el.

6.2.8 Csillóaktivitási teszt

A fertőzést követő 4., 7., 11. és 14. napokon az állatok elvéreztetése után csipesszel és ollóval eltávolítottuk a teljes légcsövet, és 4-5 ml MEM-H (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) tápfolyadékot tartalmazó Wasserman csőbe helyeztük. Ezután a légcső alsó és felső szakaszából 3-3, a középsőből 4, kb. 1 mm széles, lehetőleg 1 légcsőporcot magába foglaló karika metszetet készítettünk. A gyűrűket sejttenyésztésre is alkalmas, vájulatonként 50 µl tápfolyadékot tartalmazó, 96 lyukú lemez 1-1 mélyedésébe helyeztük, úgy, hogy egy légcső mind a 10 gyűrűje egy sorba kerüljön. A

preparátumokat a mintavételtől számított legfeljebb 2 órán belül elbíráltuk. A bírálatot fénymikroszkóppal, kis nagyításon végeztük.

A csillóaktivitást (mozgás intenzitását, illetve a légcsőgyűrűben aktívan mozgó csillók arányát) 0-tól 4-ig terjedő számmal (score) értékeltük Cook és mtsai (1999) által leírtak szerint:

- 0 ép aktivitás a teljes gyűrűn (100%)
- 1 csillómozgás a gyűrű 75%-án
- 2 csillómozgás a gyűrű 50%-án
- 3 csillómozgás a gyűrű 25%-án
- 4 aktivitás teljes hiánya (0%)
- - bírálatra alkalmatlan gyűrű

6.2.9 Ellenanyagválasz

A csibék vírus indukálta humorális immunválaszát indirekt ELISA módszerrel mértük. A fertőzést követő 4., 14., 21. és 42. napokon vett vérminták savóit vizsgáltuk az IBV elleni ellenanyagok jelenlétére.

A reakcióban használt antigént M41 IBV törzssel oltott embrionált tyúktojás allantoisz folyadékából tisztítottuk. A durva szennyeződést 1000× g-vel 30 perces centrifugálással, majd szűrőpapíron való átengedéssel távolítottuk el. Ezt követően az antigéntisztítás első lépése a kiülepítés volt, amelyet 7500× g-vel, 2 órás centrifugálással végeztünk. Az üledéket 7,4-es pH-jú NTE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, és 1 mM EDTA) pufferben rehidráltuk. A rehidrált antigén fehérjekoncentrációja 0,48 mg/ml volt. A tisztítás második lépéseként a fehérjét 33,8%-os és 60%-os cukorpárna közé ülepítettük 12000× g-vel, 5 órás centrifugálással.

A tisztított antigént ezután 0,05% N-laroylsarcosine-t tartalmazó, 0,05 M-os karbonát pufferben (pH 9,6) 200-szorosra hígítottuk és a kapott oldatból 100-100 µl-t kis kötőképességű (Tomtec Plastics, Budapest, Magyarország) lemez vajúlataiba mértük.

Az érzékenyített lemezt 60 percig 37°C-os rázótermosztátban, majd 24 órán át 4°C-on inkubáltuk. A kimosott lemezt 100 µl, 0,5% tejport tartalmazó PBS-sel fedtük, majd 1 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. Mosást követően 100 µl savót mértünk rá, majd újra inkubáltuk (1 óra, 37°C) és mostuk. Ezután 100 µl 2000×-re hígított, HRPO jelzett anti-csirke IgG-vel (Phylabs, Kalifornia, USA) fedtük a lyukakat. A savómintákat és a konjugátumot 0,5 M NaCl-ot és 0,05% Tween-20-at (Promega, Wisconsin, USA) tartalmazó PBS-el (PBT-N) hígítottuk.

A mintákból, a kalibrációból és a negatív savóból 100-szoros hígítást készítettünk. A kalibráció egy 9,3-as vírusneutralizációs (VN) titerű savóból készült 7 tagú, kétszerező hígítási sor, valamint egy negatív (SPF) savó volt. A mintákat és a kalibrációt is 2-2 paralelben tettük a lemezre, így lemezenként 40 savót tudunk vizsgálni. Az előhívás

hidrogénperoxid-TMB-vel (tetrametil-benzidin, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) történt 15 perc alatt szobahőmérsékleten, majd a reakciót 0,05 ml 2 M-os kénsavval állítottuk le. Az eredményt Multiskan FC típusú fotométerrel (Labsystems Oy, Helsinki, Finnország) olvastuk le és a fényelnyelési (optical density, OD) értékeket 610 nm hullámhosszon mértük. A kapott fényelnyelési eredmények kiértékelését az Excel táblázatkezelő programban végeztük. A kalibrációból szerkesztett OD – log₂ VN titer függvényhez illesztett logaritmikus görbén olvastuk le a minták által adott OD értékhez tartozó VN titereket. A vizsgált mintát ≥3 log₂ VN titer esetén tekintettük pozitívnak.

6.2.10 Real-Time RT-PCR (RRT-PCR)

A vizsgált szervezetekben, a különböző mintavételi időpontok egy részében, a vírushatómennyiség meghatározására és összehasonlítására kvantitatív RRT-PCR-t végeztünk. A fertőzést követő vírusreplikáció dinamikáját figyelembe véve, az első 4 vagy 5 mintavétel alkalmával nyert szöveteket dolgoztuk fel. Azokban az esetekben, ahol már a korábbi mintázásoknál is negatív eredményt kaptunk, a további minták feldolgozásától eltekintettünk.

A mintaként vett szervezetekhez először mintavételenként és csoportonként hozzávetőleg 1:10 arányban antibiotikumot tartalmazó PBS-t adtunk. A szervmintákat ezután TissueLyser készülékkel homogenizáltuk (Qiagen, Hilden, Németország). Az így kapott homogenizátum felülúszójából mintánként 50 µl-et leszítettünk, és az egy csoporthoz, szervhez és mintavételhez tartozó mennyiségeket egységesítettük. Az így kapott 250 µl-nyi elegyet ezután közvetlen felhasználtuk az RNS kivonásra és a cDNS-é való átírásra a 6.1.2.2 és 6.1.2.3 pontoknak megfelelően.

Az IBV nukleinsav kvantitatív meghatározására TaqMan® próba alapú, csoportspecifikus, valós idejű PCR-t (RRT-PCR) alkalmaztunk a Callison és munkatársai (2006) által leírtak szerint. A primerek, valamint a próba egyaránt az M41 törzs 5'-nem kódoló régiójához (5'-UTR: 5'-untranslated region) lettek tervezve. A kettős jelölésű TaqMan® próbához kromoforként FAM-ot (6-karboxifluoreszcein) kötöttek, a 3' véghez kapcsolva pedig BHQ-1 (black hole Quencher-1) quencher (Gene Link, New York, USA) használtunk. A reakcióban használt primerek és a próba tapadási helyét valamint szekvenciáját a 6. táblázat mutatja.

6. táblázat: RRT-PCR során használt primerek és próba.

Név	Írány	Szekvencia	Helyeződése az 5'-UTR génen
IBV5_GU391	Forward	5'- GCTTTTGAGCCTAGCGTT -3'	391–408
IBV5_GL533	Reverse	5'- GCCATGTTGTCAGTGTCTATTG -3'	533–512
IBV5_G	Forward	5'- CACCACCAGAACCTGTACCTC -3'	494–473

Az egy mintára vonatkozó reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 10 µl TaqMan® Master Mix, 0,2 µl próba, 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer, 5,8 µl desztillált víz és 2 µl cDNS. A reakcióparaméterek a következők voltak: 95°C-on 10 perc denaturáció, majd 50 cikluson keresztül az alábbi lépések ismétlődtek:

- denaturáció: 95°C-on 15 másodperc
- primer tapadás: 60°C-on 1 perc
- láncszintézis: 72°C-on 1 perc.

Az RRT-PCR-t, valamint a kapcsolódó számítógépes kalkulációt az ABI Prism 7500 Real-Time PCR System automatával végeztük (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Minden reakcióhoz két negatív kontrollt adtunk, ahol a cDNS-t nukleáz mentes vízzel helyettesítettük. A kvantitatív analízis standard görbéjének megrajzolásához tízszeres hígítási sorozatú (10^{-1} – 10^{-7}), ismert titerű ($10^{7.26}$ EID₅₀/0,2 ml) 4/91 IBV törzs cDNS pozitív kontrollt használtunk. A szoftver a küszöbérték ciklusszámot (cycle threshold: CT) az ismert titerű standard hígítási sorhoz képest ábrázolta és extrapolálta a görbéhez tartozó lineáris regressziós egyenest. Az adott szervezetben lévő vírus EID₅₀ titerét a minták CT értékei és az eredményül kapott standard egyenes összehasonlításából kalkulálta a szoftver. Az EID₅₀ eredményeket tízes alapú logaritmus (\log_{10}) egységben adtuk meg. A kópiaszámmal szemben, az EID₅₀-ben kifejezett értékek használatát az indokolta, hogy a baromfivírusokkal kapcsolatos publikációk, köztük az IBV RRT-PCR-rel foglalkozók is ezt a formát használják. A vizsgálat elvégzésével leginkább a törzsek egymáshoz viszonyított arányáról és a megjelenés, valamint a kiürülés tendenciájáról szeretnénk volna tájékozódni.

6.2.11 Kórszöveti vizsgálatok

A kórbonctani vizsgálat során eltávolított légcső, tüdő, mirigyegyomor, csípőbél, vese, petefészek, tojócső és here mintákkal végeztük a kórszöveti vizsgálatot. A szövetmintákat 1 napig 10%-os pufferolt formaldehid oldatban fixáltuk, paraffin blokkokba ágyasztuk, 4 µm-es metszeteket készítettünk, végül hematoxylin-eosinnal festettük. A metszeteket fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk és az IBV fertőzésre jellemző elváltozásokat Nakamura és mtsai (1991) által leírtak szerint pontosítottuk. Elváltozás hiányában 0, enyhe elváltozás esetén 1, közepes esetén 2, súlyosnál pedig 3 ponttal értékeltük a látottakat. Egyes minták esetén PAS vagy alciankek festést is alkalmaztunk a nyálka kimutatására. A kalcium kristályok lerakódását von Kossa-féle festéssel tettük láthatóvá.

6.2.12 Immunhisztokémiai vizsgálatok

Immunhisztokémiai festést a fertőzést követő 4., 7., 11., 14. napokon végeztünk, amikor még feltételeztük a vírusantigén jelenlétét. A reakcióhoz a kórszöveti vizsgálat során vett mintákat használtuk fel. A paraffin blokkokból 4 µm-es metszeteket készítettünk, amelyeket adhézions tárgylemezre (SuperFrost Plus, Menzel-Glässer, Németország) terítettünk. A mintákat 56°C-on, 1 éjszakán át szárítottuk, majd deparaffináltuk. 4 perces, PBS-ben történő mosás után következett az antigénfeltárás, melynek során a metszeteket 0,1 M citrát-pufferben (pH 6) főztük (mikrohullámú sütőben 10 percig 700-800 W-on, majd 30 percig 200-300 W-on). Az IBV antigén kimutatásához a DAKO EnVision+ System-HRP AEC kittet (Dako, Denmark) használtuk. Újabb öblítés után 10 perces szobahőmérsékleten történő 3%-os H₂O₂-os kezelést végeztünk az endogén peroxidázok blokkolása céljából. A metszeteket újra öblítettük PBS-el, majd az aspecifikus kötőhelyek lefedésére a mintákat szobahőmérsékleten 10 percig 2%-os sovány tejporos oldatba helyeztük. Elsődleges antitestként egérben termeltetett IBV nukleokapszid fehérje elleni monoklonális ellenanyagot (clone Ch/IBV 48.4; Prionics, Lelystad, Hollandia; 1:100-as hígítás) használtunk 37°C-on 1 éjszakán át. PBS-el való mosást követően egér-Ig ellenes polimer-tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (EnVision kit, Dako, Denmark) szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeteket. 30 perc elteltével PBS-el öblítettük, majd a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten AEC (3-amino 9-ethylcarbazol) kromogénnel (EnVision kit, Dako, Denmark) fedtük. A színreakció kifejlődését követően, a tárgylemezeket 10 percen át csapvíz alatt, majd desztillált vízzel mostuk. Magfestésre Mayer féle hematoxylint használtunk 4 percen át. A metszeteket glicerín-zselatinnal fedtük, ráhelyeztük a fedőlemezt, majd a mikroszkópos elbírálásig 4°C-on tároltuk, hogy az AEC szubsztrát stabilitását megőrizzük.

7. Eredmények

7.1 A vizsgálatban felhasznált vírustörzsek

Az izolálás során 2-3 számú vakpasszázst követően kialakultak az IBV specifikus embrió-elváltozások. Az elváltozást mutató tojásokból leszívott és mintánként egységesített allantoisz folyadékából elvégzett RT-PCR alapján mind az öt klinikai esetből származó minta IBV-nek bizonyult. A kínai, francia, szlovák, görög és magyar izolátumok szerotípusának megállapításához szekvenenciaanalízist végeztünk az S1 gén PCR-rel felerősített szakaszán. Az izolált törzsek a legnagyobb hasonlóságot a QX szerotípus törzseihez mutatták. A szekvenenciaanalízis alapján, a francia, szlovák, görög és magyar izolátumok 99%-ban, a kínai pedig 96%-ban bizonyult azonosnak az eredeti QX törzssel (QXIBV, akcessziós szám: AF193423).

Az M41 és a 793/B referens törzs szekvenciája a vizsgált szakaszon 79, és 82%-ban tért el az eredeti QX törzsetől. Ugyanez az eltérés az általunk izolált öt QX törzs esetén 78-79, valamint 80-82%-nak adódott.

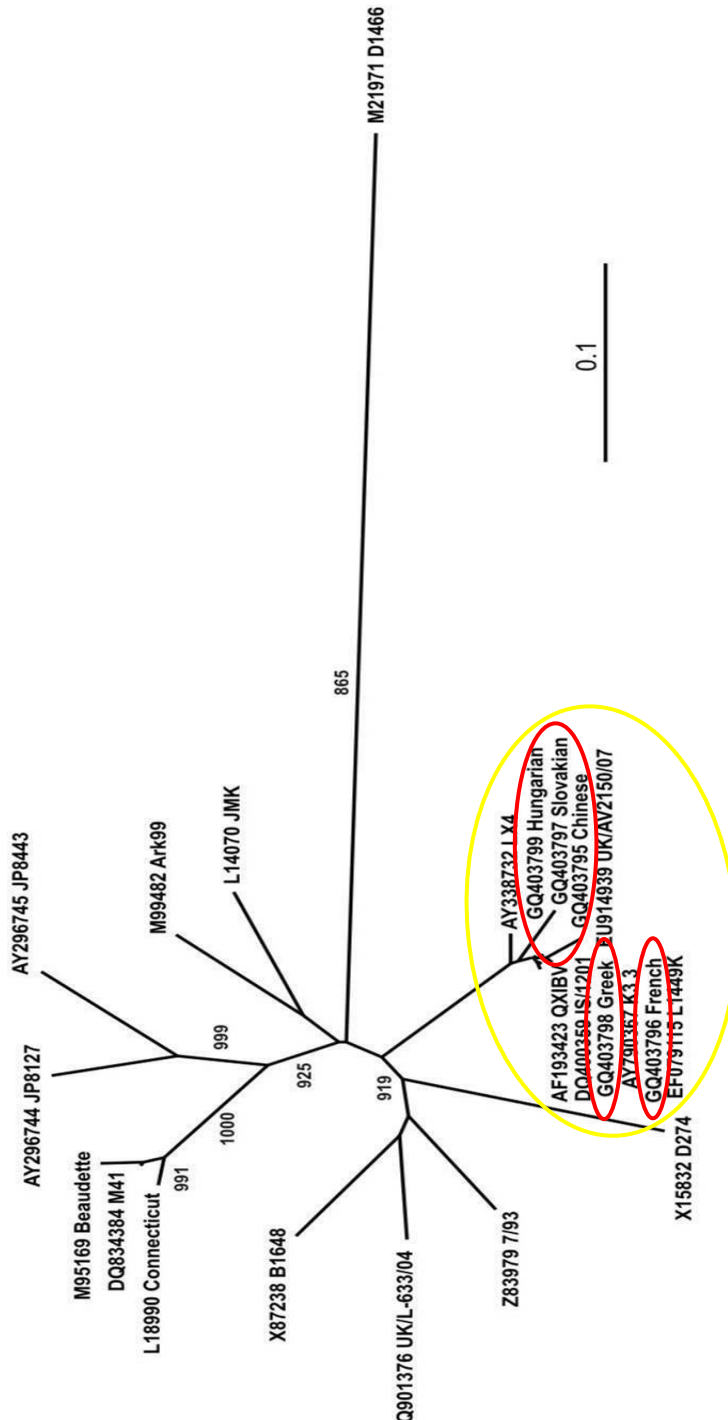
Az összehasonlító genetikai, illetve filogenetikai vizsgálatok során az általunk meghatározott öt szekvencián kívül, felhasználtuk a nemzetközi adatbázisban szereplő (GenBank, Bethesda, USA, www.ncbi.nih.gov) IBV szekvenciák egy részét is. A törzsfakészítéshez az öt vizsgált QX izolátum szekvenciáin kívül, azt a 18 törzset választottuk ki, melyek jól reprezentálják az IBV fontosabb szerotípusait (7.táblázat).

7. táblázat: A filogenetikai törzsfá generálásához felhasznált IBV törzsek.

Név/ a vírustörzs jele	Akcessziós szám	Szerotípus	A vírustörzs származása	Pathotípus
Beaudette	M95169	Massachusetts	USA	légzőszervi
M41	DQ834384		USA	
Connecticut	L18990	Connecticut	USA	légzőszervi
7/93	Z83979	4/91	Anglia	légzőszervi
Ark99	M99482	Arkansas	USA	légzőszervi
D274	X15832	D274	Hollandia	légzőszervi
B1648	X87238	B1648	Belgium	vesekárosító
JMK	L14070	JMK	USA	vesekárosító
D1466	M21971	D1466	Hollandia	légzőszervi
JP8443	AY296745	JP	Japán	vesekárosító
JP8127	AY296744			
UK/L-633/04	DQ901376	Italy-02	Anglia	légzőszervi
LX4	AY338732	QX	Kína	vesekárosító
QXIBV	AF193423			mirigyegysímirigygyulladás
IS/1201	DQ400359		Izrael	ismeretlen
K3_3	AY790367		Dél-Korea	
L1449K	EF079115		Hollandia	vesekárosító
UK/AV2150/07	EU914939		Anglia	

A Clustal X 1.81 programmal készített, TreeView version 1.6.6 programmal ábrázolt törzsfa az alábbiakban látható.

A szekvenenciaanalízis és a filogenetikai törzsfa vizsgálata alapján, mind az öt klinikai esetből származó minta egyértelműen a QX törzsek csoportjába sorolható.



8. ábra: Az ábrán az S1 génre vonatkozó részleges szekvenenciaadatok alapján készített törzsfa látható. A csomópontoknál feltüntetett számok az 1000 ismétlés alapján számított bootstrap értékeket jelölik. Sárgával bekeretezve a QX csoport látható, ezen belül a pirossal bekeretezett törzsek az általunk vizsgált öt QX izolátumot jelölik.

7.2 Az izolált vírustörzsek véghígításos tisztítása, valamint a fertőző inokulum tisztasági vizsgálata és titere

A vadvírus törzsek háromszori, 8 lépéses tízszeres hígítással végzett véghígításos tisztításának eredményeképpen kapott allantoisz folyadék, RT-PCR-rel, és az azt követő szekvenálással egyéb IBV törzstől mentesnek bizonyult. A járványok idején QX vírustörzset tartalmazó vakcina még nem volt kereskedelmi forgalomban, így egy esetleges QX vakcinatörzssel való kontamináció nem jött szóba.

Ugyanakkor mind az öt QX izolátum esetében tisztasági vizsgálatot is végeztünk. Az elvégzett steril próba és a mycoplasma kimutatási teszt negatív eredményt adott, mint ahogy az inokulum a haemagglutináló ágensektől és a fontosabb baromfi pathogén kórokozóktól is mentesnek bizonyult.

A tisztaságra való törekvésünk eredményét megnyugtató módon igazolta az is, hogy a vizsgálatok során alkalmazott további módszerek egyikével sem merült fel idegen ágens jelenlétének gyanúja.

A vizsgált törzsek esetén két lépésben elvégzett EID₅₀ titerértékek meghatározásakor a 8. táblázatban látható eredményeket kaptuk. Az M41 és 793/B törzsek korábbiakban meghatározott EID₅₀ értékei a következők voltak: 8,2 és 5,57 log₁₀ EID₅₀ /0,2 ml.

8.táblázat: A QX izolátumok titermeghatározásának eredménye.

Törzs	Log₁₀ EID₅₀/0,2 ml
Kínai	6,9
Francia	6,3
Szlovák	6,9
Görög	5,3
Magyar	5,7

Az inokulumként használt vírusszuszpenziókat ezután szükség esetén PBS-sel hígítottuk 10^{5,7} vírus/ 40 µl/ állat fertőző dózissra.

7.3 A fertőző inokulum visszatitrálása

A fertőzés alkalmával kihígított, majd a fertőzés végeztével azonnal visszafagyasztott vírusszuszpenzió titrálása alapján a 9. táblázatban látható EID₅₀ értékeket kaptunk. A kínai törzs esetén kis mértékben túlhígítottuk a szuszpenziót. A 793/B törzsnél nem végeztünk hígítást, viszont a visszatitrálás alapján a törzs titere magasabb volt a dokumentált értéknél. A görög törzssel fertőzött csoport, a visszatitrálás eredménye szerint, a többi csoporthoz képest 1×log₁₀ nagyságrenddel kevesebb vírussal lett kezelve

9. táblázat: A fertőzést követően a lefagyasztott vírusszuszpenzió titrálásával kapott értékek.

Törzs	Log₁₀ EID₅₀/0,2 ml
Kínai	5,5
Francia	5,7
Szlovák	5,7
Görög	4,9
Magyar	5,7
M41	5,7
793/B	5,9

7.4 Klinikai tünetek

Az IBV-re jellemző légzőszervi tünetek a fertőzést követő 3. napon a kínai, a magyar és az M41 törzssel fertőzött csoportokban jelentkeztek először. Tüsszögés, fejrázás, váladékos ornyílás és egy-egy gubbasztó csirke jellemezte a klinikai képet. A többi csoportban ekkor még csak enyhe, az állatok meghajtása után jelentkező légúti tünetek voltak megfigyelhetők. A 4. npra már minden fertőzött csoportban kialakultak a légzőszervi tünetek, majd az 5. naptól a tünetek enyhülni kezdtek és a 7., 8. npra minden csoport átesett a fertőzés felső légutakat érintő szakaszán. A 10-14. nap között a kínai és a francia izolátumokkal fertőzött csoportokban néhány egyedre korlátozódó hasmenést figyeltünk meg. Egyéb klinikai tünetek a megfigyelési időszak végéig nem jelentkeztek, és IBV fertőzés okozta elhullás sem alakult ki.

Az ivarérett korú kakasok esetén légzőszervi tüneteket nem észleltünk, csak a fertőzést követő 4. napon, az állatok kézbevétele és közeli meghallgatása alkalmával lehetett enyhe szörtyögést, pattogást észlelni a fertőzött csoportokban.

A kontroll csoportokban klinikai tünetek, illetve elhullás a megfigyelési időszak alatt nem fordult elő.

7.5 Kórbonctani elváltozások

A fertőzést követő kezdeti szakaszban a felsőlégúti elváltozások domináltak (10. táblázat). A 4. napon minden fertőzött csoportban megfigyelhető volt a légcső enyhe kipiroltsága és savós-hurutos gyulladása. A szabad szemmel látható légcsőelváltozások a 11. npra gyógyultak. Legenyhébb formában a görög és a 793/B törzsszel fertőzött egyedeknél jelentkeztek az elváltozások.

A légzsákokban a 11. naptól kezdve figyeltünk meg savókilépést, esetenként fibrinlerakódással társulva (10. táblázat). A mélyebb légutakat érintő elváltozások a 21.

napra csaknem nyomtalanul gyógyultak, egyedül a légzsákok falán lehetett enyhe homályosodást észlelni elsősorban a kínai törzssel fertőzött csoportban.

A vese makroszkópos elváltozásai a 14. naptól váltak nyilvánvalóvá. A kínai, francia, szlovák és magyar izolátummal fertőzött csoportokban főként a vesék duzzanata, fakósága volt látható, de egyes esetekben kifejezett húgysavlerakódást is megfigyeltünk (10. táblázat). A többi csoportokban vesét érintő makroszkópos elváltozás nem alakult ki.

Mind az öt QX izolátummal fertőzött csoportban folyadékfelhalmozódást és következményes tágulatot figyeltünk meg a tojócsőben (9. ábra). Ezek az elváltozások a fertőzést követő 14. naptól jelentek meg és a kísérlet végéig folyamatosan, de csak szórványosan fordultak elő (10. táblázat).

A kontroll csoportokban és az ivarérett korban fertőzött kakasok esetén makroszkópos elváltozások nem mutatkoztak.



9. ábra: Folyadék felhalmozódás és következményes tojócső tágulat a fertőzést követő 28. napon a magyar törzssel fertőzött csoportban.

10. táblázat: A különböző IBV törzsekkel fertőzött csoportokban kialakult kórbonctani elváltozások összefoglalója (elváltozást mutató egyedek száma / vizsgált egyedek száma, pirossal kiemelve a pozitív kórbonctani lelettel rendelkező csoportokat).

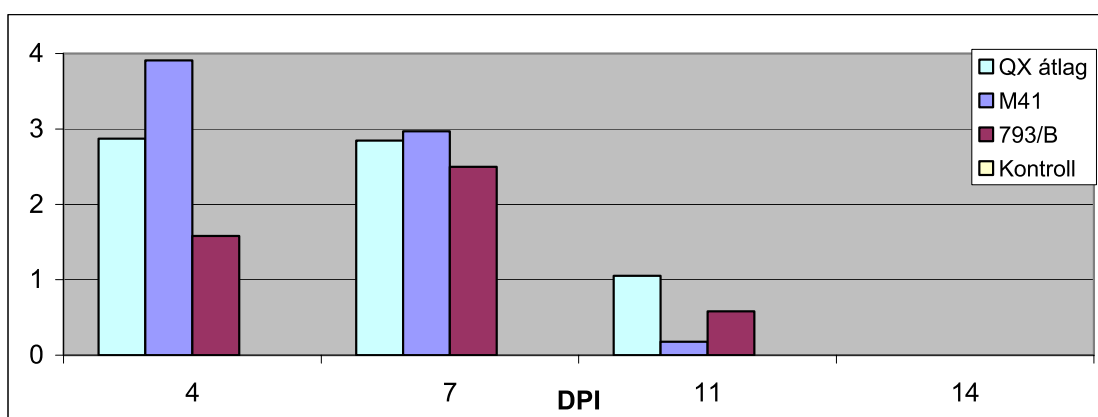
	DPI	Elváltozás jellege	Kínai	Francia	Szlovák	Görög	Magyar	M41	793/B	
Légcső	4	kipirult	5/5	5/5	4/5	3/5	5/5	5/5	5/5	
		váladékos	3/5	3/5	2/5	0/5	4/5	4/5	2/5	
	7	kipirult	2/5	3/5	3/5	2/5	2/5	2/5	1/5	
		váladékos	4/5	3/5	4/5	2/5	3/5	3/5	2/5	
	11	kipirult	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
		váladékos	2/5	2/5	3/5	1/5	0/5	1/5	0/5	
Légzsák	11	savókilépés	1/5	3/5	2/5	0/5	2/5	0/5	3/5	
		fibrilerakódás	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5	0/5	
	14	savókilépés	4/5	0/5	0/5	1/5	2/5	0/5	0/5	
		fibrilerakódás	1/5	3/5	1/5	1/5	2/5	1/5	1/5	
	21	falvastagodás	4/5	0/5	1/5	1/5	2/5	0/5	0/5	
	Vese	14	duzzadt, fakó	0/5	1/5	1/5	1/5	2/5	0/5	1/5
húgysavlerakódás			0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
21		duzzadt, fakó	2/5	1/5	2/5	1/5	0/5	1/5	0/5	
		húgysavlerakódás	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
28		duzzadt, fakó	1/5	2/5	1/5	1/5	2/5	0/5	0/5	
		húgysavlerakódás	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
35		duzzadt, fakó	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	1/5	
		húgysavlerakódás	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
42		duzzadt, fakó	2/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
		húgysavlerakódás	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
Tojócső		14	savófelhalmozódás	2/5	0/5	1/4	1/5	0/5	0/5	0/5
		21	savófelhalmozódás	0/5	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5
	28	savófelhalmozódás	2/5	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5	
	35	savófelhalmozódás	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	
	42	savófelhalmozódás	1/4	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

7.6 Csillóaktivitási teszt

A légcső csillós hámsejtjeinek károsodását ellenőrző vizsgálatot a fertőzést követő 4., 7., 11. és 14. napokon végeztük. A legsúlyosabb csillókárosodás az első két mintavétel alkalmával volt megfigyelhető. A 14. napra a cíliumok mozgása teljesen normálissá vált. A legenyhébb károsodást a görög és a 793/B törzzsel fertőzött csoportokban észleltük. A legsúlyosabb csillóshám destrukciót a kínai és a szlovák izolátum idéze elő (11. táblázat, 10. ábra). A kontroll csoportban a csillók aktivitása mind a négy mintavétel alkalmával sértetlen volt.

11. táblázat: A csillóaktivitási teszt eredményének csoportonkénti átlaga a különböző mintavételi időpontokban (0-4-ig adott pontértékek átlaga).

DPI	Kínai	Francia	Szlovák	Görög	Magyar	M41	793/B	Kontroll
4	3,42	3,26	3,42	0,25	4	3,91	1,58	0
7	3,61	2,87	3,3	2	2,45	2,97	2,5	0
11	1,39	0,83	1,62	1,26	0,16	0,18	0,58	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0



10. ábra: A három IBV szerotípus csillómozgást károsító hatása az idő függvényében. A QX törzsek átlagát a görög törzs alacsony értékei negatív irányba torzítják (0-4-ig adott pontértékek átlaga).

7.7 A fertőző törzsek visszaizolálása

Az első mintavétel alkalmával eltávolított légcsövek cílium tesztből, szövettani és RRT-PCR-re való mintázásából megmaradt darabjait csoportonként egységesítettük és embrionált tyúktojásba oltottuk a fertőzés megeredésének igazolása és a keresztfertőzések kizárása céljából. A légcső-homogenizátum tojásba való oltásakor az IBV-re jellemző embrió-elváltozások kialakultak és az allantoisz folyadékból vett mintákon elvégzett RT-PCR, valamint az azt követő szekvenálás minden fertőzött csoport esetén igazolta a megfelelő törzs jelenlétét és kizárta az eltérő szerotípussal való lehetséges kontamináció lehetőségét.

7.8 Ellenanyagválasz

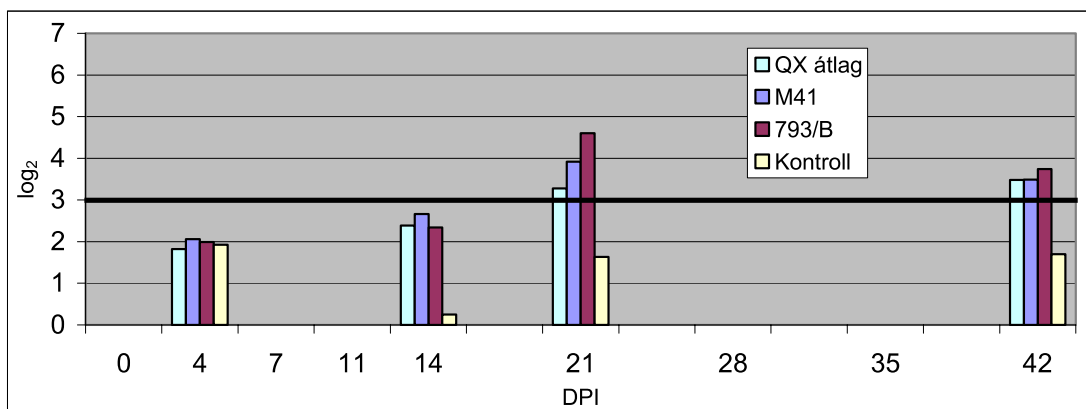
A savók indirekt ELISA-val végzett vizsgálata során azokat a mintákat értékeltük pozitívnak, amelyeknek a mért OD értékek alapján leolvasott VN titerük $\geq \log_2 3$ volt.

7.8.1 Ellenanyagválasz naposkori fertőzést követően

A mintavételek alkalmával felfogott vérminták közül a 4., 14., 21. és 42. napi savókat használtuk fel az ELISA vizsgálatra. Az egyes csoportok mintáinak átlagát összevetve (12. táblázat, 11. ábra) az látható, hogy leghamarabb a görög izolátummal fertőzött csoport hangolódott át. A kínai, az M41 és a 793/B törzsek esetén a pozitivitás a 21. napra érte el a küszöbértéket, míg a francia és a magyar izolátummal fertőzött egyedeknél csak az utolsó mérési időpontban voltak kimutathatók határérték feletti ellenanyagtiterek. A szlovák izolátum a megfigyelési időszak alatt nem idézett elő a küszöbértéket meghaladó immunválaszt. Meg kell jegyezni azonban, hogy valamennyi fertőzött csoportban a fertőzést követő 14. naptól a kontroll csoporthoz képest magasabb, vadvírus fertőzés bekövetkeztére utaló titereket lehetett mérni.

12. táblázat: A napos korban fertőzött és a kontroll csoportok savóiban, indirekt ELISA-val mért IBV ellenanyag mennyiségének átlaga \log_2 VN titerben kifejezve.

DPI	Kínai	Francia	Szlovák	Görög	Magyar	M41	793/B	Kontroll
4	1,62	1,86	1,92	1,8	1,92	2,06	1,99	1,93
14	2,96	2,08	1,7	3,16	2,02	2,66	2,34	0,25
21	5	2,38	2,72	3,36	2,91	3,92	4,6	1,63
42	4,98	3,08	2,76	3,12	3,47	3,49	3,74	1,7



11. ábra: A naposkori fertőzést követően a három IBV szerotípus által kiváltott humorális immunválasz indirekt ELISA-val mért átlagai az idő függvényében (a savókat $\geq \log_2 3$ VN titer esetén tekintjük pozitívnak).

7.8.2 Ellenanyagválasz az ivarérett kakasok fertőzését követően

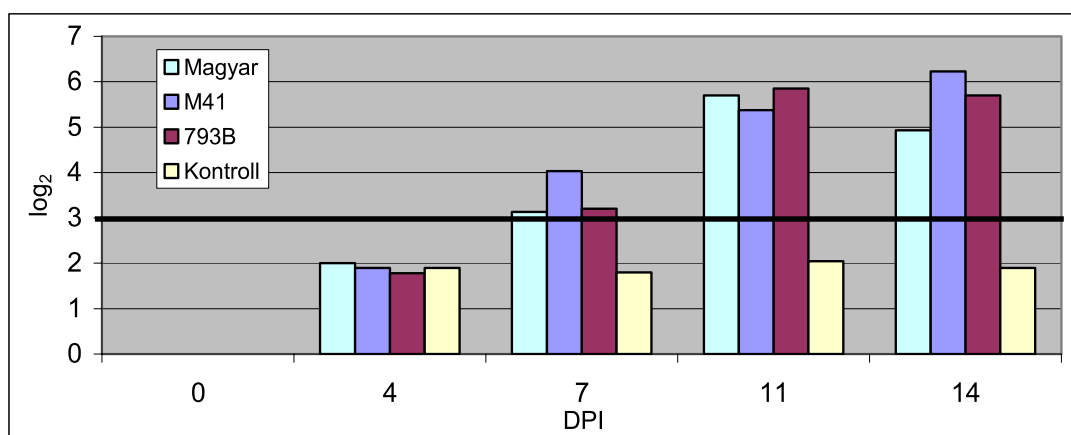
Az ivarérett kakasok fertőzését megelőzően elvégzett ellenanyagmérés alapján az állatok a nevelési időszak alatt szeronegatívak maradtak IBV-vel szemben.

A kakasok fertőzését követően a 4., 7., 11., és 14. napokon vett vérminták mindegyikét feldolgoztuk ugyanazzal a módszerrel. A csoportok eredményeinek átlaga a következő táblázatban, illetve ábrán látható. A naposkori fertőzéssel ellentétben mindhárom csoport esetén már a fertőzést követő 7. napon ki lehetett mutatni az IBV-vel szemben termelődött ellenanyagokat.

A kontroll csoportok mindkét fertőzést követően negatívak maradtak.

13. táblázat: Az ivarérett korban fertőzött és a kontroll csoportok savóiban, indirekt ELISA-val mért IBV ellenanyag mennyiségének átlaga \log_2 VN titerben kifejezve.

DPI	<i>Magyar</i>	<i>M41</i>	<i>793/B</i>	<i>Kontroll</i>
4	2	1,9	1,78	1,9
7	3,13	4,03	3,2	1,8
11	5,7	5,38	5,85	2,05
14	4,93	6,23	5,7	1,9



12. ábra: Az ivarérett korú kakasok fertőzését követően a három IBV szerotípus által kiváltott humorális immunválasz indirekt ELISA-val mért átlagai az idő függvényében (a savókat $\geq \log_2 3$ VN titer esetén tekintjük pozitívnak).

7.9 RRT-PCR

A különböző szervezetekben lévő vírus RNS kimutatása és mennyiségi meghatározása minden reakció esetén a CT értékek alapján történt. A reakcióhoz hozzáadott ismert titerű ($10^{7.26}$ EID₅₀/0,2ml) 4/91 IBV törzs 7 lépéses tízszeres hígításának CT eredményei alapján a szoftver standard görbét hozott létre. A kalibrációból szerkesztett CT – \log_{10} EID₅₀ titer függvényhez illesztett görbe alapján adta meg a szoftver a minták CT értékéhez tartozó EID₅₀ titereket.

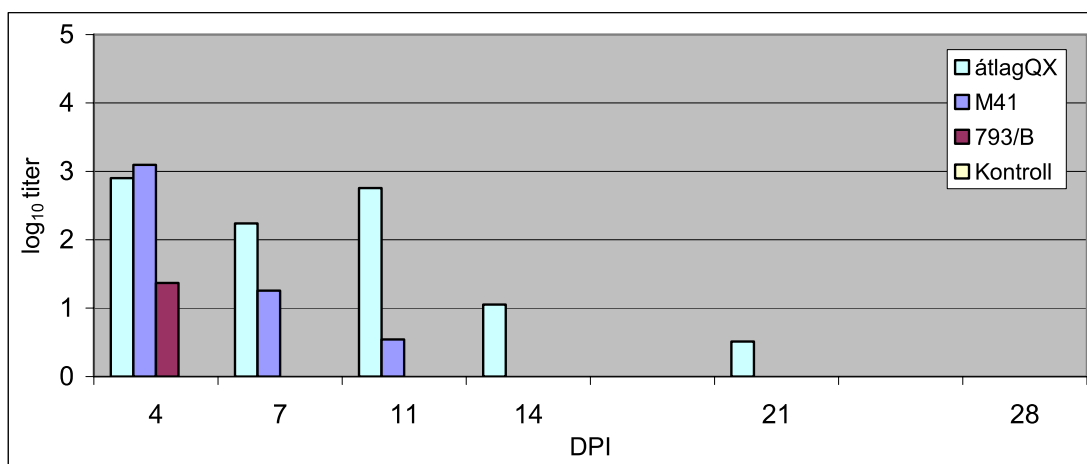
7.9.1 RRT-PCR naposkori fertőzés esetén

Naposkori fertőzést követően a minták feldolgozásánál figyelembe vettük a vírus RNS várható megjelenését, illetve a csökkenésének ütemét, így a vizsgálatot csak azokon a mintákon végeztük, ahol pozitív reakcióra számítottunk. Amennyiben az eredmény egy adott szervben negatív lett és ez megfelelt a vírusszaporodás dinamikájának, a további feldolgozást az adott szervből felfüggesztettük. Kétes eredmény esetén a reakciót megismételtük.

A vírus RNS-t minden vizsgált szervben ki tudtuk mutatni, habár ez a mennyiség a mirigyegyomor és tojócső esetén elhanyagolható volt. A QX izolátumok a vizsgált szervek mindegyikében adtak pozitív reakciót, az M41 törzs a tojócsőben, a 793/B a tüdőben és a tojócsőben nem érte el a kimutathatósági küszöböt.

7.9.1.1 Légcső

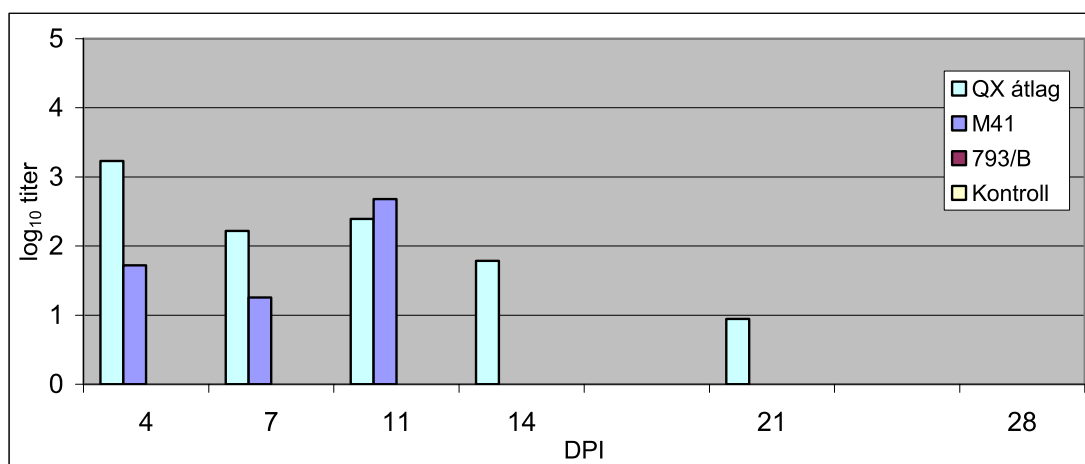
A légcsőben a fertőzést követő 4. napon mértük a legmagasabb titereket mindhárom szerotípus esetén (13. ábra). A legalacsonyabb mennyiségben a 793/B törzset lehetett kimutatni, amelynek a mennyisége már a 7. napon a kimutathatósági szint alá került. Az M41 törzs esetén az RNS mennyisége fokozatosan csökkent a 11. napig. A QX törzsek többsége is fokozatos csökkenést mutatott a negyedik naptól, kivéve a szlovák és a görög izolátumot. A szlovák izolátummal fertőzött egyedekben a 7. napon mértük a legmagasabb RNS szintet, míg a görög a 11. napon érte el a maximumot. A QX szerotípussal fertőzött csoportok átlagát tekintve legmagasabb titereket a kínai, majd a szlovák, a legalacsonyabbat a magyar izolátum adta.



13. ábra: A naposkori fertőzést követően a három IBV szerotípus légcsőben mért RNS mennyisége (\log_{10} EID₅₀ titerben kifejezve).

7.9.1.2 Tüdő

A tüdőben csak a QX és az M41 törzsek esetén kaptunk pozitív eredményt (14. ábra). A QX izolátumok értékei, a kínai kivételével, a 4. napon voltak a maximumon, majd fokozatosan csökkentek a 21. napig. A kínai a 7. napon érte el a maximumot, míg az M41 törzs a 11. napon, de a következő mintavétel alkalmával már nem volt jelen kimutatható mennyiségben a tüdőben. A QX izolátumok közül a kínai, majd a magyar izolátum érte el a legnagyobb koncentrációt, míg a legkisebb titerértéket a francia esetén mértük. Az M41 átlagtitere alulmaradt minden QX izolátum átlagától.



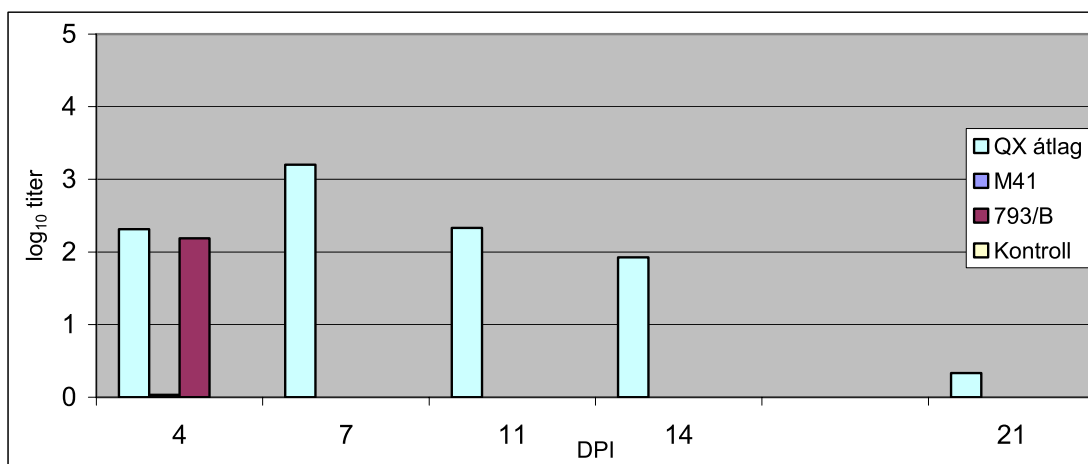
14.ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus tüdőben mért RNS mennyisége (log₁₀ EID₅₀ titerben kifejezve).

7.9.1.3 Mirigyesgyomor

A mirigyesgyomor mintáit a 7. és 14. napokon mértük. Az eredmények a szlovák izolátumal fertőzött 7. napi mintán (0.9 log₁₀) kívül vagy teljesen negatívak voltak, vagy a kimutathatósági küszöböt éppen csak meghaladták, így a további mintafeldolgozástól eltekintettünk.

7.9.1.4 Vékonybél

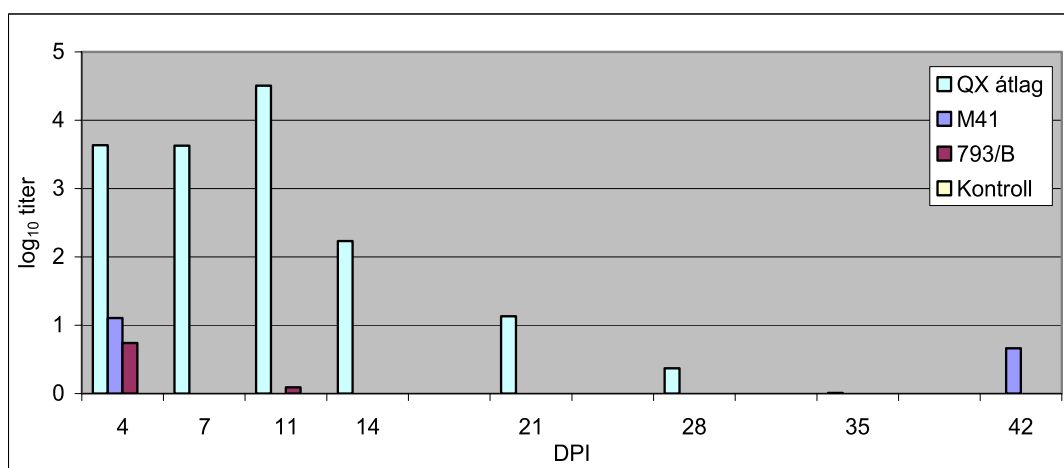
A vékonybélben a 793/B és az M41 vírustörzsek csak a 4. napon voltak jelen, és az utóbbi mennyisége alig érte el a kimutathatósági küszöböt (0,03 log₁₀). A QX szerotípus törzseinek átlagát vizsgálva a fertőzést követő 7. napon látható a legmagasabb EID₅₀ titer (15. ábra), ami a 21. napra fokozatosan csökkent. Egyedileg értékelve az eredményeket, a legmagasabb átlagot a görög, majd a szlovák, a legalacsonyabbat a magyar izolátum esetén mértük. A QX szerotípussal fertőzött csoportokban mért titerek minden esetben meghaladták a két összehasonlító törzs esetén mértet. A görög izolátummal fertőzött csoportban a 11., a szlováknál a 7. napon volt a maximumon a vírusszám.



15. ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus vékonybélben mért RNS mennyisége (\log_{10} EID₅₀ titerben kifejezve).

7.9.1.5 Vakbélbejárati nyiroktüszők

A vakbélbejárati nyiroktüszőkben mértük a legmagasabb titereket a QX izolátumok esetén (16. ábra). Legintenzívebb szaporodást a görög és a szlovák izolátumok mutattak, a fertőzést követő 11. napon. A másik három csoportban a 4. napon volt a legnagyobb az RNS koncentráció. A QX szerotípussal fertőzött csoportok bélmintáiból a 28. napig tudtuk kimutatni a ráfertőző vírust. Az M41 törzs esetén a 4. és 42. napon kaptunk pozitív eredményt, de a vírusszaporodás mértéke nagyságrendekkel elmaradt a QX szerotípussal fertőzött csoportokban mérttől. A 793/B törzs RNS-ét csak a 4. napon tudtuk kis mennyiségben kimutatni.

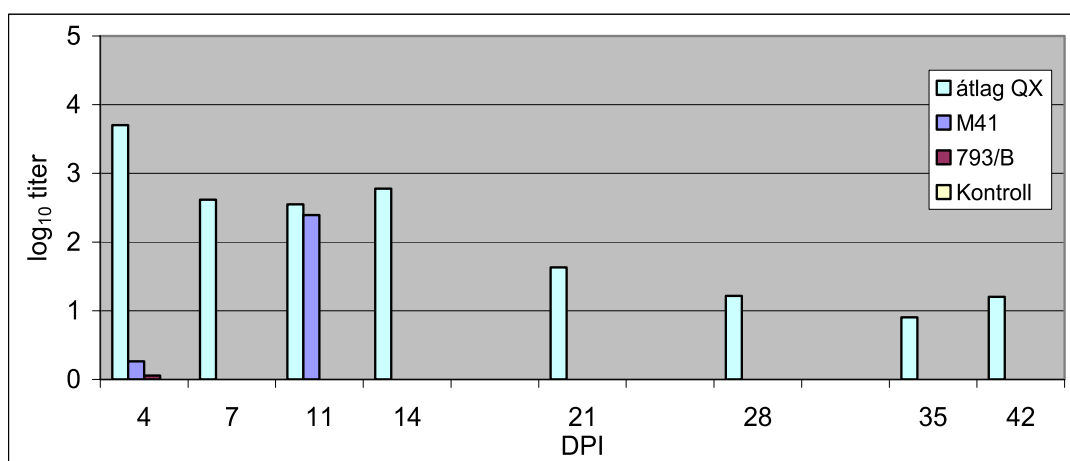


16. ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus vakbélbejárati nyirokcsomókban mért RNS mennyisége (\log_{10} EID₅₀ titerben kifejezve).

7.9.1.6 Vese

A veséből a megfigyelési időszak végéig kimutathatók voltak a QX szerotípus törzsei (17. ábra). Legnagyobb mértékben a szlovák és a kínai izolátum szaporodott el. Az előbbi a 7., az utóbbi már a 4. napon elérte a legmagasabb koncentrációt, majd szintjük fokozatosan csökkent a 28. napig. A csökkenést követően a megfigyelési időszak végéig enyhe emelkedés következett. A francia izolátummal fertőzött csoportban a 4. naptól a 42. napig tartó fokozatos csökkenést mértünk, míg a görög és a magyar izolátummal fertőzött csoportokban a 14. és 21. napokon volt a legmagasabb a vírusszaporodás. A legalacsonyabb titereket a görög izolátum mintáiban észleltük.

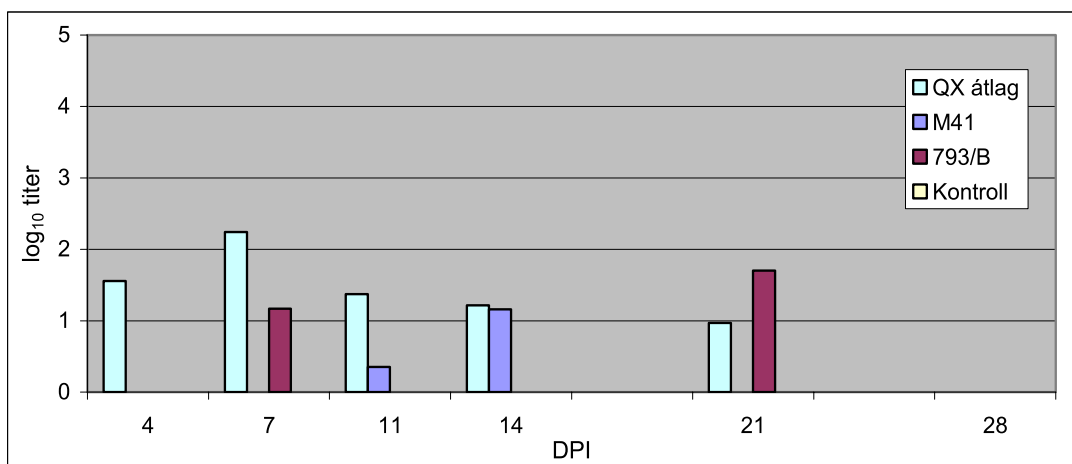
Az M41 törzset csak a 11. napon tudtuk kimutatni jelentősebb mennyiségben, míg a 793/B törzs egyedül a 4. napon adott alig mérhető pozitívítást.



17. ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus vesében mért RNS mennyisége (\log_{10} EID₅₀ titerben kifejezve).

7.9.1.7 Petefészek

A petefészekben mindhárom szerotípus RNS-ét kimutattuk, de csak alacsony mennyiségben (18. ábra). Az M41 törzs a fertőzést követő 11. és 14., a 793/B a 7. és 21. napokon adott pozitív reakciót. A QX izolátumok végig jelen voltak és a 7. napon érték el a legmagasabb koncentrációt, majd a 21. napig szintjük fokozatosan csökkent. A szlovák izolátum kiemelkedő mennyiségben volt kimutatható a petefészekben. Ennél a csoportnál már a 4. napon maximális RNS szintet mértünk, ami aztán csökkenésnek indult és a 28. napra elérte a nullát.

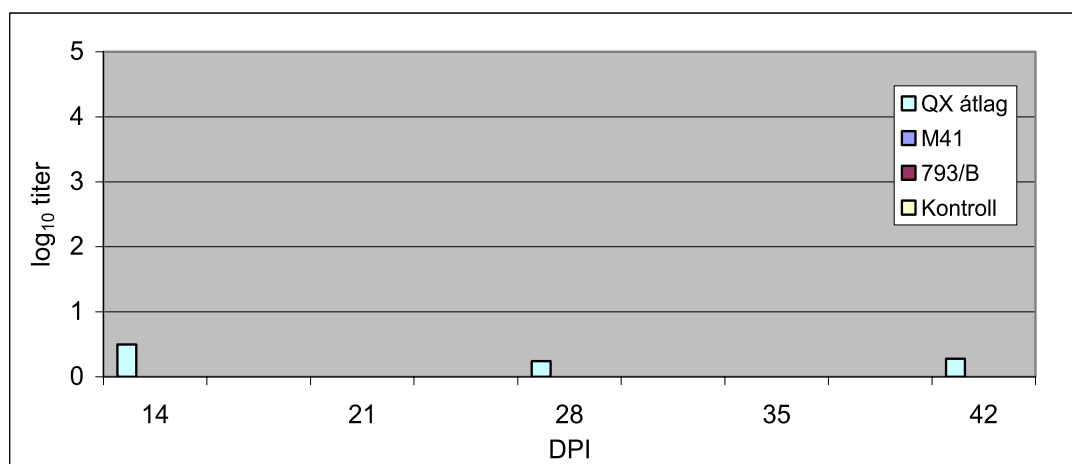


18. ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus petefészekben mért RNS mennyisége (\log_{10} EID₅₀ titerben kifejezve).

7.9.1.8 Tojócső

A tojócső mintáit a 14., 28. és 42. napokon vizsgáltuk. A vizsgálati napok kiválasztásával a korai virémiát követő időszakban esetlegesen megjelenő vírus RNS kimutatására törekedtük, ugyanis Palya és mtsai (2007, személyes közlés) által egy QX törzzsel végzett korábbi vizsgálat eredménye azt mutatta, hogy a fertőzést követő korai szakaszban a vírus RNS a tojócsőben, illetve az üregében felhalmozódó savószerű folyadékban nincs jelen. A mi méréseink alapján a QX szerotípus törzsei ugyan kimutathatók voltak a tojócső mintákból, azonban a mért RNS koncentráció elhanyagolhatóan alacsony volt a többi vizsgált szervhez képest (19. ábra).

A két referens törzs esetén minden tesztelt minta negatív eredményt adott.

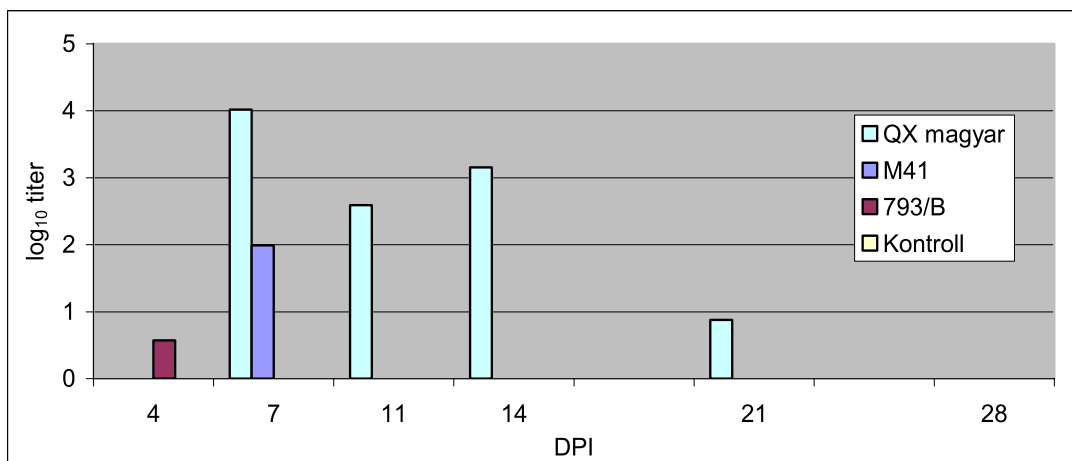


19. ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus tojócsőben mért RNS mennyisége (\log_{10} EID₅₀ titerben kifejezve).

7.9.1.9 Here

A herében a magyar QX, az M41 és a 793/B törzsek megjelenését vizsgáltuk. A 793/B törzs a 4. napon kis mennyiségben, az M41 a rákövetkező mintavétel alkalmával, egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban volt jelen. A magyar QX izolátum RNS-ét a fertőzést követő 7. és 21. napok között, az előző két törzset lényegesen meghaladó koncentrációban mutattuk ki (20. ábra).

A kontroll csoport mintái minden vizsgált szerv esetén negatív reakciót adtak.



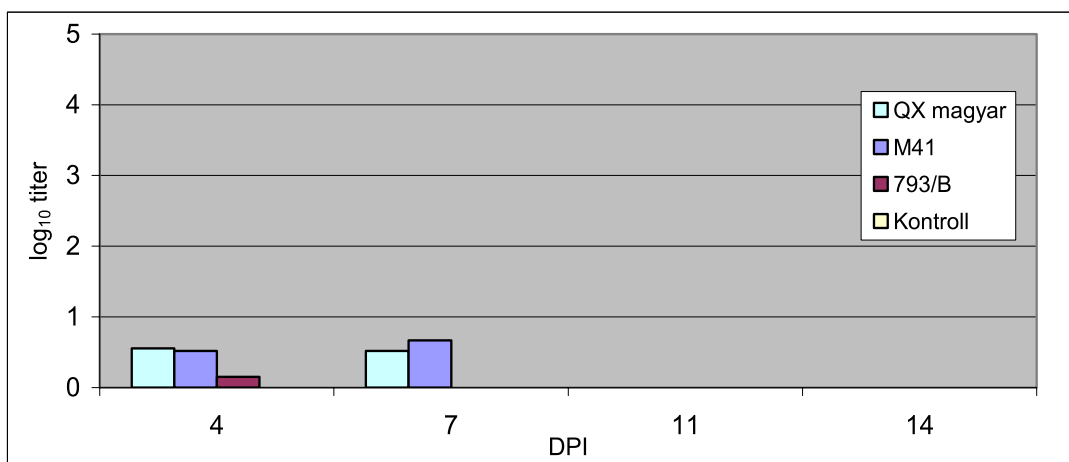
20. ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus herében mért RNS mennyisége (\log_{10} EID₅₀ titerben kifejezve).

7.9.2 RRT-PCR ivarérett kakasok fertőzése esetén

Az ivarérett korú kakasok esetén a mintavétel a fertőzést követő 4., 7., 11. és 14. napokon a légcső, vese és here mintákra korlátozódott. A kisebb mintaszámra való tekintettel, azok mindegyikét feldolgoztuk.

7.9.2.1 Légcső

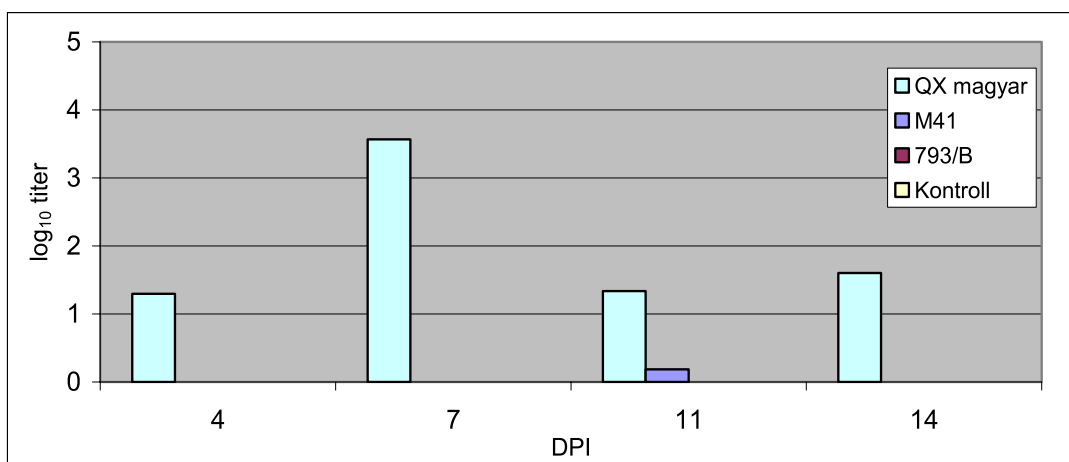
A légcsőben mindössze a fertőzést követő 4. és 7. napokon kaptunk pozitív eredményt. A magyar QX és az M41 törzs mindkét időpontban, a 793/B törzs csak az első mintavételkor volt kimutatható. A mért RNS koncentráció mindhárom szerotípus esetén kifejezetten alacsony volt (21. ábra).



21. ábra: Ivarérett korú kakasok fertőzését követően, a három IBV szerotípus légcsőben mért RNS mennyisége (log₁₀ EID₅₀ titerben kifejezve).

7.9.2.2 Vese

A vesében a 793/B törzs egyáltalán nem, az M41 csak a 11. napon elhanyagolható mennyiségben volt kimutatható. A magyar QX izolátum mind a négy mintavételi alkalommal pozitív reakciót adott, jelentősebb mennyiséget azonban csak a 7. napon mértünk (22. ábra).

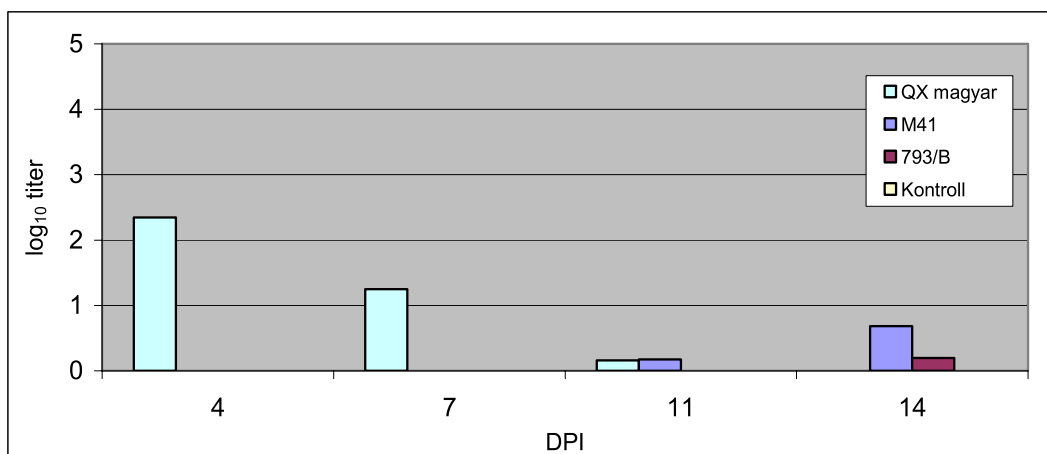


22. ábra: Ivarérett korú kakasok fertőzését követően, a három IBV szerotípus vesében mért RNS mennyisége (log₁₀ EID₅₀ titerben kifejezve).

7.9.2.3 Here

A herében a QX izolátum már a 4. napon közepes mennyiségben megjelent, majd a koncentrációja fokozatosan csökkent (23. ábra). Az M41 törzs RNS-e az utolsó két mintavétel alkalmával volt mérhető, míg a 793/B törzs RNS-e csak a 14. napon. A két utóbbi csoportban alacsony volt a kimutatott vírusrészecske mennyiség.

A kontroll egyedek mintái mindhárom vizsgált szervben negatívak maradtak.



23. ábra: Ivarérett korú kakasok fertőzését követően, a három IBV szerotípus herében mért RNS mennyisége (log₁₀ EID₅₀ titerben kifejezve).

7.10 Kórszövettani vizsgálat

A kórszövettani vizsgálatra minden eltávolított szervrészletet felhasználtunk. A feldolgozás során azonban a minták kis méretéből adódóan (különösen a korai mintavételek idején), azok egy kis hányada nem került be a metszési síkba. Ezekben az esetekben 5 helyett előfordult, hogy csak 4 vagy 3 minta alapján tudtuk a csoportra jellemző elváltozásokat megítélni.

Azokat az elváltozásokat, amelyeket az IBV fertőzés hatásának véltünk, a súlyosságtól függően 0-tól 3-ig pontoztuk. A szervenként figyelembe vett elváltozásokat a 14. táblázatban foglaltuk össze.

14. táblázat: A kórszövettani vizsgálat során pontozott elváltozások.

Szerv	Pontozott elváltozás
Légcső	Csillóvesztés a légzőhámsejteken
	Légzőhámsejt degeneratio
	Propria lymphoid sejtes beszűrődése
	Mucintermelő sejtek kiürülése
	Exsudatum felhalmozódása a légcső üregében
	Nyálkamirigy hypertrophia
	Hámsejt hyperplasia és metaplasia
Tüdő	Bronchitis, mesobronchitis
	Gócos lymphoid sejtes beszűrődés
	Diffúz lymphoid sejtes beszűrődés
	Peribronchitis
Mirigyesgyomor	Propria lymphoid sejtes beszűrődése
Vékonybél	Propria lymphoid sejtes beszűrődése
Vese	Gócos lymphoid sejtes beszűrődés
	Diffúz lymphoid sejtes beszűrődés
	Tubuláris hám degeneratio
	Gyulladás az elvezető csatornáknban
Petefészek	Oophoritis
	Mészlerakódás a petetűszőkben
Tojócső	Tojócső falának lymphoid sejtes beszűrődése
	Tojócső üregének tágulata, falának elvékonyodása
Here	Orchitis, epididymitis

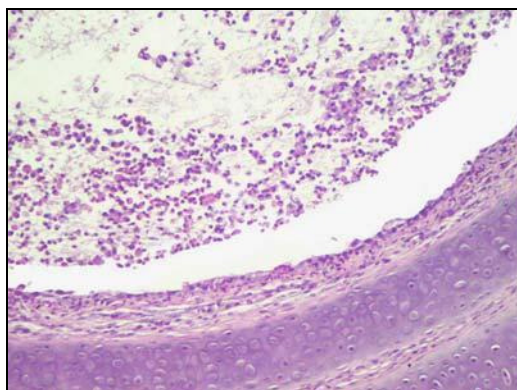
7.10.1 Kórszövetteni vizsgálat naposkori fertőzés esetén

7.10.1.1 Légcső

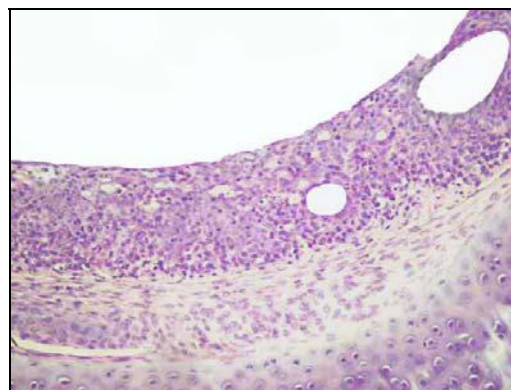
A légcsőben megfigyelt kórszövetteni elváltozások minden csoportban azonosak voltak. Eltérések az elváltozások súlyosságában és időtartamában jelentkeztek. A nyálkahártya károsodás az első mintavételtől megfigyelhető volt, majd a légzőhám a fertőzést követő 14-21. napon teljes mértékben regenerálódott. A vírus hatására lezajlott elváltozások három, időben is elkülöníthető fázisban követték egymást.

A degeneratív szakaszban a mikroszkópos képet a csillós hámsejtek károsodása és leválása uralta, azonban a károsodás a mucintermelő- és a kehelysejteket is érintette. A nyálkahártya propria rétegében eltérő súlyosságú lymphocytás és histiocytás beszűrődés alakult ki, majd a súlyosabb esetekben a gyulladáshoz sejt és a levált hámsejtek megjelentek a légcső üregében is (24. ábra).

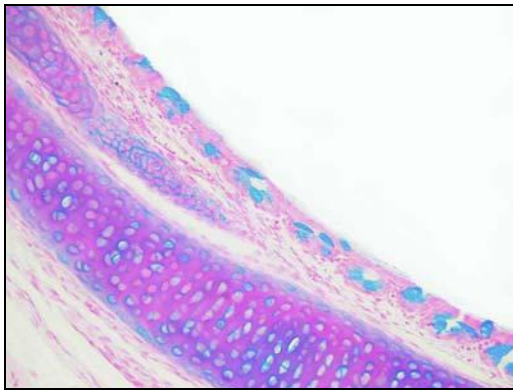
A 7., 11. napon a hyperplasiás szakaszban, a lymphocyták és histiocyták kifejezett akkumulációja és a károsodott hámsejtek között újonnan kialakult, esetenként még csillótlan, lap vagy köb alakú, több rétegben elhelyezkedő hámsejtek megjelenése volt a legjellemzőbb kép. A képződő hámsejtek között még nem pótlódtak a nyálkatermelő és a kehelysejtek (25-27. ábra).



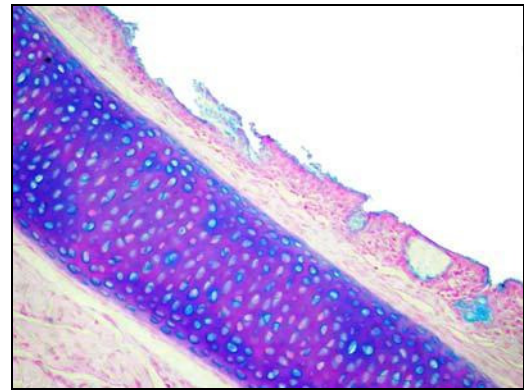
24. ábra: A naposkori fertőzést követő 4. napon a kínai törzsszel fertőzött csoportból származó, súlyos, degeneratív stádiumban lévő légcső szövettani képe (100×, HE).



25. ábra: A naposkori fertőzést követő 11. napon a szlovák törzsszel fertőzött csoportból származó, hyperplasiás stádiumban lévő légcső szövettani képe (200×, HE).



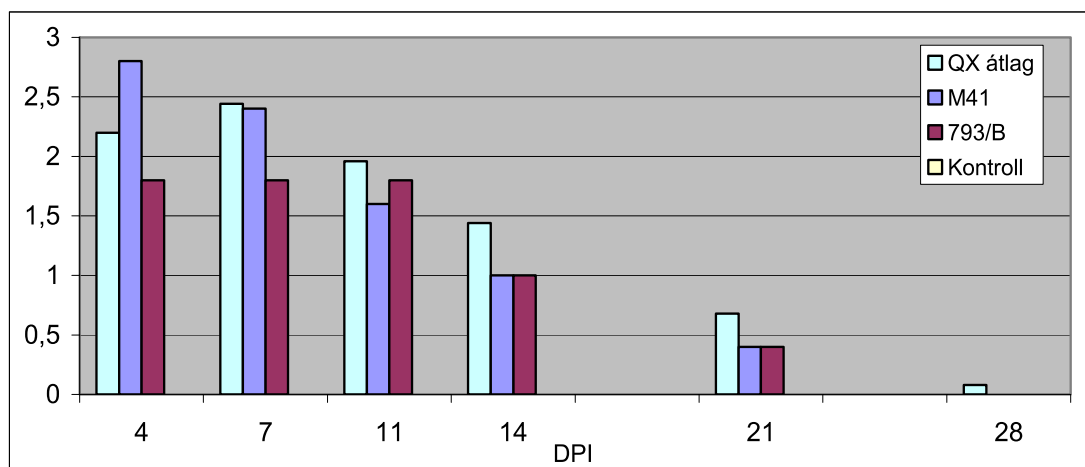
26. ábra: A naposkori fertőzést követő 7. napon a kontroll csoportból származó légcsőben az élettani állapotnak megfelelő kehelysejtek és nyálkamirigyek alciánkék festéssel demonstrálva (100×).



27. ábra: A naposkori fertőzést követő 7. napon a 793/B törzssel fertőzött csoportból származó légcsőben a kék festődés csökkent intenzitása jelzi a kiürült kehelysejtek és nyálkamirigyek helyét (100×).

A regenerációs szakasz végére újra megjelentek a normál légcsőre jellemző csillós hengerhámsejtek, köztük az elszórtan elhelyezkedő kehelysejtekkel és nyálkatermelő mirigyekkel. A propria rétegben helyenként kis számban még előfordultak lymphocyták és histiocyták.

A 4. napon a kínai és az M41 törzsek esetén észleltük a legsúlyosabb elváltozásokat. A többi törzsnél a károsodás mértéke a 7. napon volt a legkifejezettebb. A kínai, francia, szlovák, magyar és M41 törzsek hatása közel azonos volt a légcsőben, míg a 793/B és a görög izolátum lényegesen enyhébb reakciót váltott ki (28. ábra). A gyógyulás jele a 14. napon már minden csoportban egyértelműen látható volt. A kontroll csoportban a nyálkahártya mindvégig érintetlen maradt.

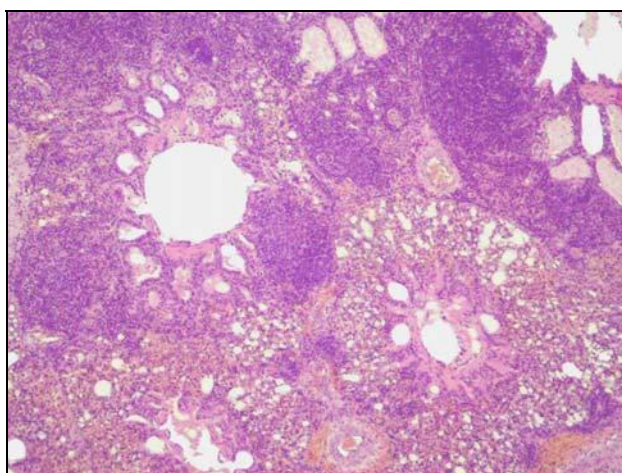


28. ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus által a légcsőben kiváltott kórszöveti elváltozások mértéke (0 és 3 között pontozva).

7.10.1.2 Tüdő

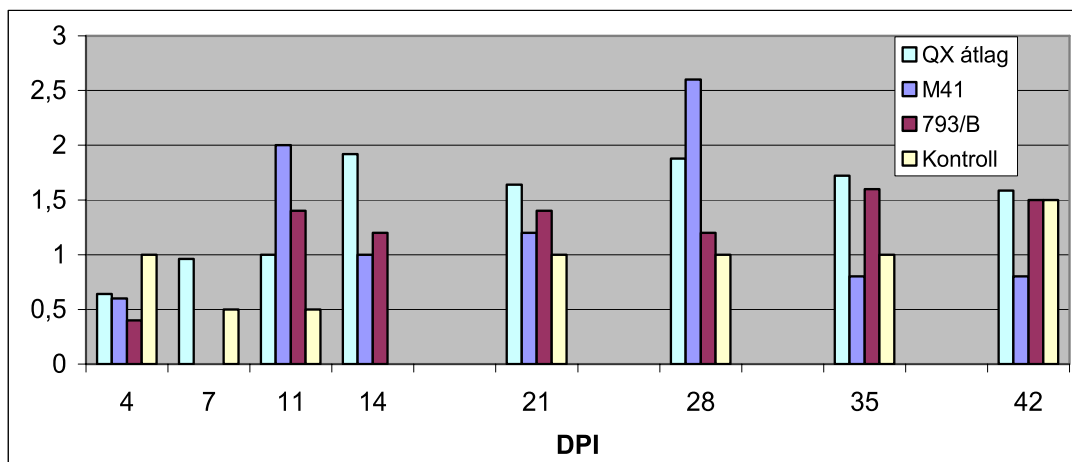
A tüdőben megfigyelt kórszövettani elváltozások az elsődleges és másodlagos bronchusokban, valamint a parenchymában alakultak ki.

A bronchusok nyálkahártyájában megfigyelhető szöveti reakció megegyezett a légcsőben leírtakkal. A legjellemzőbb elváltozás azonban itt a nyálkahártya propria rétegének kifejezett lympho-histiocytás beszűrődése volt. A nyálkahártyában zajló folyamatok csillapodását gyakran jól körülhatárolt lymphoid góccok megjelenése követte. Peribronchiális, inter- vagy intralobuláris mononukleáris sejtes beszűrődést (29. ábra) nem konzekvensen, de a teljes megfigyelési időszak alatt minden csoportban észleltük. Mivel kisebb kiterjedésű lympho-histiocytás beszűrődést a kontroll mintákban is találtunk, a tüdőben előforduló elváltozások nem tekinthetők minden esetben a vírusfertőzés következményének.



29. ábra: Naposkori fertőzést követő 11. napon a francia törzssel fertőzött csoportban a parabronchusok körül kialakult diffúz lympho-histiocytás gyulladás (100×, HE).

A QX izolátumokkal fertőzött minden csoport átlag pontértékei meghaladták a két referens törzs által előidézett károsító hatást. Mivel azonban a kontroll csoport sem volt teljesen negatív, a kapott eredmény (30. ábra) értékelése csak az RRT-PCR eredményének figyelembe vételével lehetséges.



30. ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus által a tüdőben kiváltott kórszöveti elváltozások mértéke (0 és 3 között pontozva).

7.10.1.3 Mirigyesgyomor

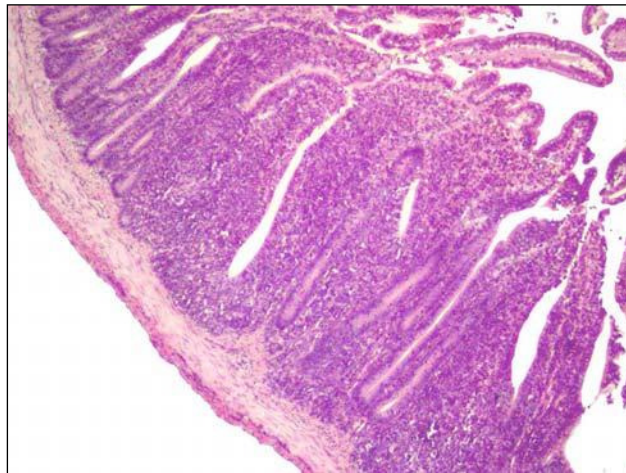
A mirigyesgyomor nyálkahártyájának propria rétegében minden csoportban, beleértve a kontroll egyedeket is, kisebb-nagyobb kiterjedésű mononukleáris sejtpopulációt találtunk. A sejtes beszűrődés kiterjedése, a mintavétel ideje, illetve a mintázott csoport között nem találtunk egyértelmű összefüggést.

Kisebb számú mintában a submucosa mirigyei között is megfigyeltünk körülírt lymphoid sejtes beszűrődést.

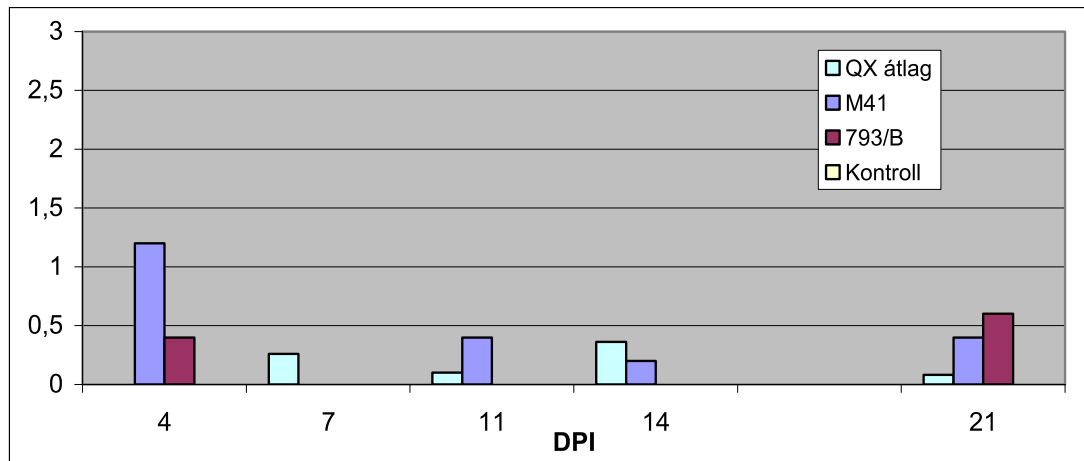
A specifikus kórszöveti eredmények hiányában a mintavételt ebből a szervből a 21. napon túl már nem folytattuk.

7.10.1.4 Vékonybél

A vékonybélben a kínai izolátummal fertőzött és a kontroll csoportban kórszöveti elváltozást nem észleltünk. A többi csoport mintáiban is csak elvétve fordult elő gyulladásos beszűrődés a bélnyálkahártya hámrétege alatt (31. ábra). A csoportok átlagpontjait értékelve az M41, majd a francia izolátum mintái esetén találtunk leggyakrabban, illetve legsúlyosabb elváltozást (32. ábra).



31. ábra: A naposkori fertőzést követő 14. napon a francia törzssel fertőzött csoportban a vékonybél nyálkahártyájának propria rétegében kialakult diffúz lympho-histiocytás gyulladás (40×, HE).



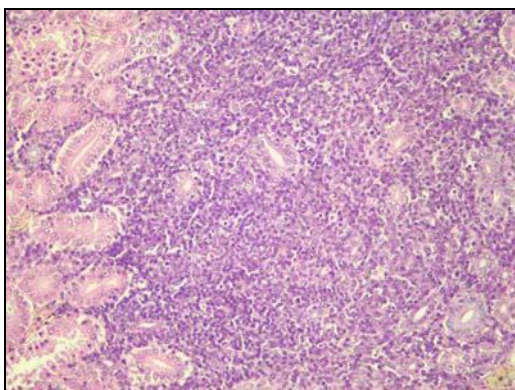
32. ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus által a vékonybélben kiváltott kórszöveti elváltozások mértéke (0 és 3 között pontozva).

7.10.1.5 Vese

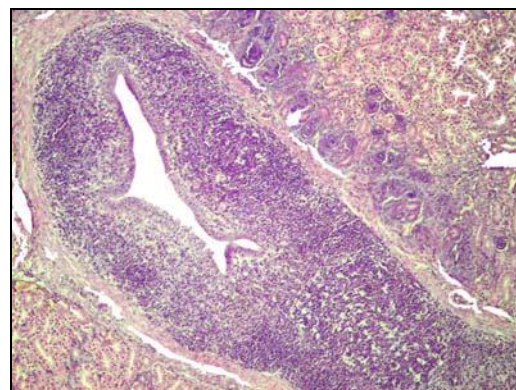
A vesében a fertőzést követő 4. napon megjelentek a vírus okozta elváltozások. Kezdetben az interstitiumban, a tubulusok között enyhe vizenyő és egyes gyűjtőcsatornácskák tágulata volt megfigyelhető. Az érintett területeken kis kiterjedésű gyulladással sejtes beszűrődés is kialakult.

A 7. naptól az ödéma visszahúzódott, a kórszöveti képet a kisebb-nagyobb terjedelmű, gócos vagy diffúz lympho-histiocytás gyulladás uralta (33. ábra). A lymphoid sejtek környezetében lévő tubulushámsejtekben gyakran következményes vakuoláz elfajulás, magányos sejtelhalás és -leválás alakult ki. A megfigyelési időszak második felében a gyulladással sejtek egyre inkább folliculus-szerű képletekbe tömörültek. Ebben a szakaszban a tubulushámsejtek már nem mutattak degeneratív elváltozásokat, és a gyulladással reakció követő reparatív jelenségek is elmaradtak.

Mononukleáris sejtszaporulatot az uréterek nyálkahártyájának hámrétege alatt is több esetben láttunk (34. ábra). Ez részben fiziológiás jelenség, és a kontroll csoport egyes mintáiban is megfigyelhető volt. A fertőzött csoportokban a mikroszkópos vizsgálat alapján nem tudtuk elkülöníteni a fiziológiás és a fertőzés következtében megjelent gyulladásos sejteket, így a kontroll egyedekben észlelt sejtpopulációt is pontosztuk.

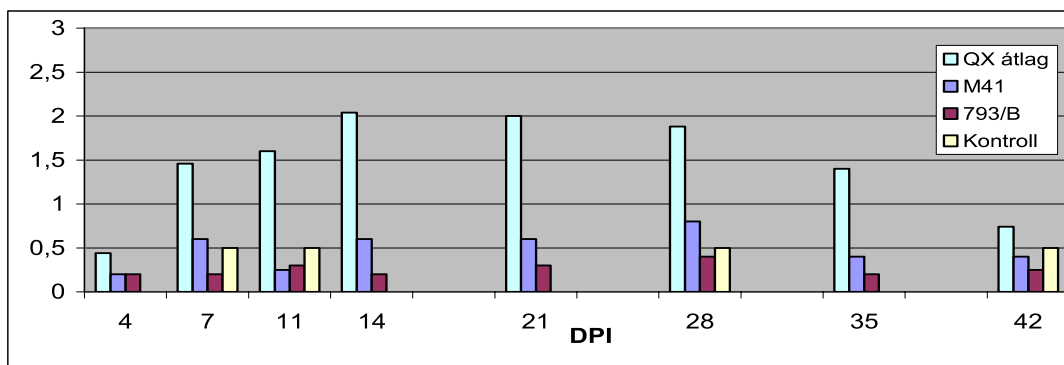


33. ábra: A naposkori fertőzést követő 11. napon a kínai törzssel fertőzött csoportban a vese interstitiumában megjelent gyulladásos sejtpopuláció, valamint egyes tubulusokra terjedő hámkárosodás (100×, HE).



34. ábra: A naposkori fertőzést követő 14. napon a szlovák törzssel fertőzött csoportban a húgyvezető nyálkahártyájának hámrétegében kialakult lympho-histiocytás gyulladás (40×, HE).

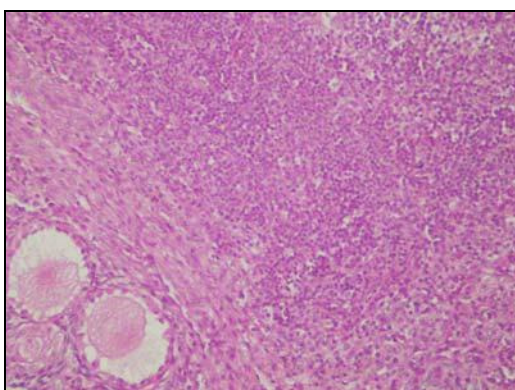
A kínai izolátummal fertőzött állatok mintáiban már a negyedik napon kifejezett gyulladásos sejtes beszűrődés alakult ki. A többi csoportban ez a kép a 7. napra toldódott el és a 14., 21. napokon csúcsosodott ki. Ekkortól kezdve a megfigyelt elváltozások gyakorisága és súlyossága fokozatosan csökkent a megfigyelési időszak végéig. Az M41 és 793/B törzsekkel fertőzött csoportokban a gyulladás lényegesen enyhébb formában jelentkezett (35. ábra). A QX izolátumok közül a szlovák, majd a francia kártétele volt a legerősebb, míg a legenyhébb elváltozásokat a görög izolátum okozta.



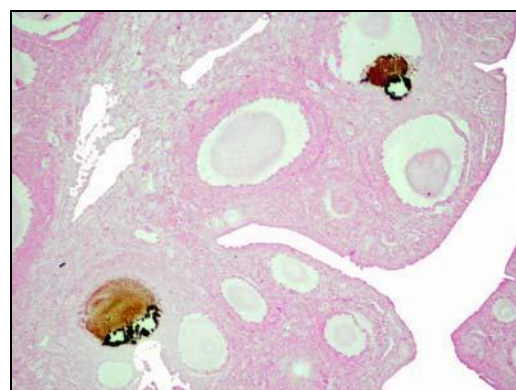
35. ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus által a vesében kiváltott kórszöveti elváltozások mértéke (0 és 3 között pontosztva).

7.10.1.6 Petefészek

A kontroll és a francia izolátummal fertőzött csoportok petefészek mintáiban nem találtunk kórszövettani elváltozást. A többi csoport mindegyikében megfigyeltünk fokális, vagy diffúz mononukleáris sejtes beszűrődést a kéreg-, vagy a velőállomány interstitiumában (36. ábra). Ezek a gyulladásos reakciók csak elvétve, egy-egy mintára korlátozódva jelentek meg. A szlovák és a 793/B törzsek mintáiban az elsődleges tüszőkben kalciumlerakódást is megfigyeltünk. Ez a jelenség a szlovák izolátummal fertőzött csoportban már a 7. napon kialakult, a többi esetben (2 szlovák és 1 793/B csoportbeli mintánál) a 42. napon észleltük (37. ábra).

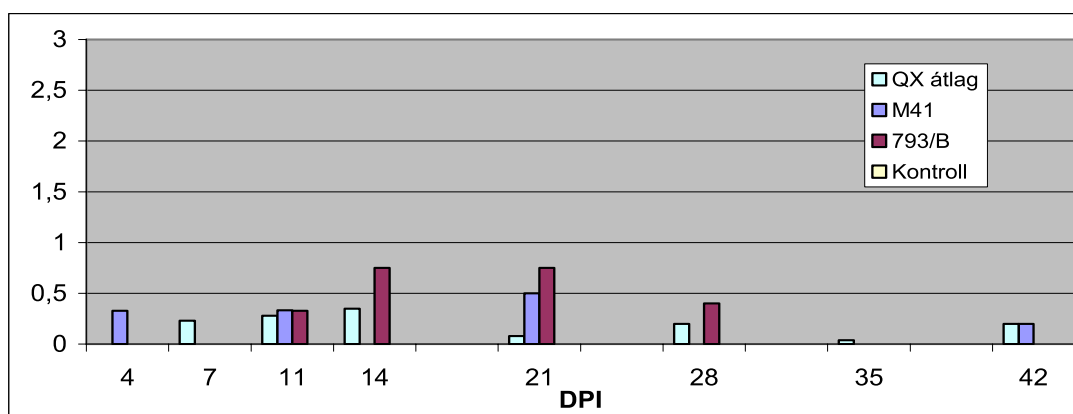


36. ábra: A naposkori fertőzést követő 21. napon a 793/B törzssel fertőzött csoportban a petefészek interstitiumában kialakult gócos lympho-histiocytás gyulladás (100×, HE).



37. ábra: A naposkori fertőzést követő 42. napon a szlovák törzssel fertőzött csoportban a petefészek primer tüszőiben megfigyelhető kalcium lerakódás (40×, von Kossa festés).

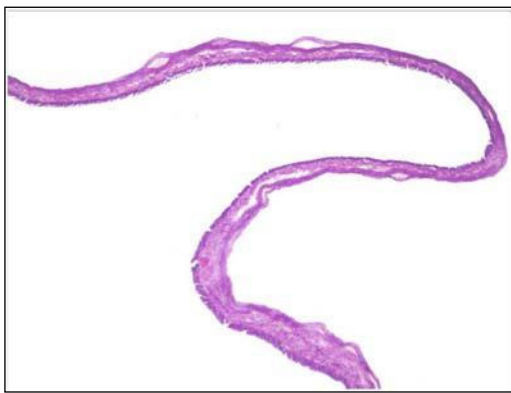
A 38. ábrán látható, hogy a petefészekben talált elváltozások mindhárom szerotípussal történt fertőzést követően csak kis számban és/vagy enyhe formában fordultak elő. A 793/B és a szlovák izolátum mintáiban figyeltük meg leggyakrabban a fent leírt jelenségeket.



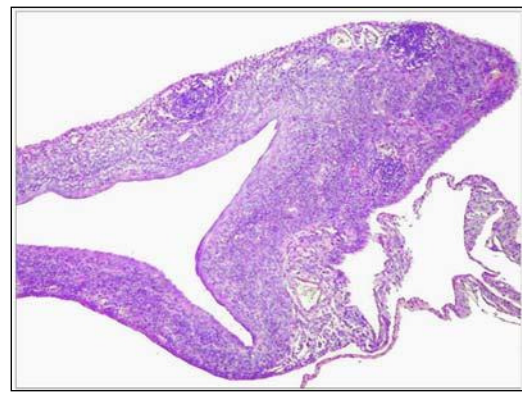
38. ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus által a petefészekben kiváltott kórszövettani elváltozások mértéke (0 és 3 között pontozva).

7.10.1.7 Tojócső

A tojócsőben a QX szerotípus csoportjaiban ugyan kialakultak szabad szemmel is látható elváltozások, a szervben megfigyelt kórszövettani kép mégis szegényes volt. A kitágult üregű tojócső esetén mikroszkóposan a fal elvékonyodása és a fejlődésben lévő redők különböző mértékű ellapulása volt látható (39. ábra). Egyes esetekben gócos mononucleáris sejtes beszűrődést is megfigyeltünk a hámréteg, vagy a savóshártya alatt (40. ábra). A vírus indukálta kifejezett hámkárosodást, gyulladást, fokozott váladéktermelésre utaló kórszövettani elváltozást, illetve egyéb olyan jelenséget nem figyeltünk meg, ami magyarázatot adna a tojócső tágulatának pathomechanizmusára.

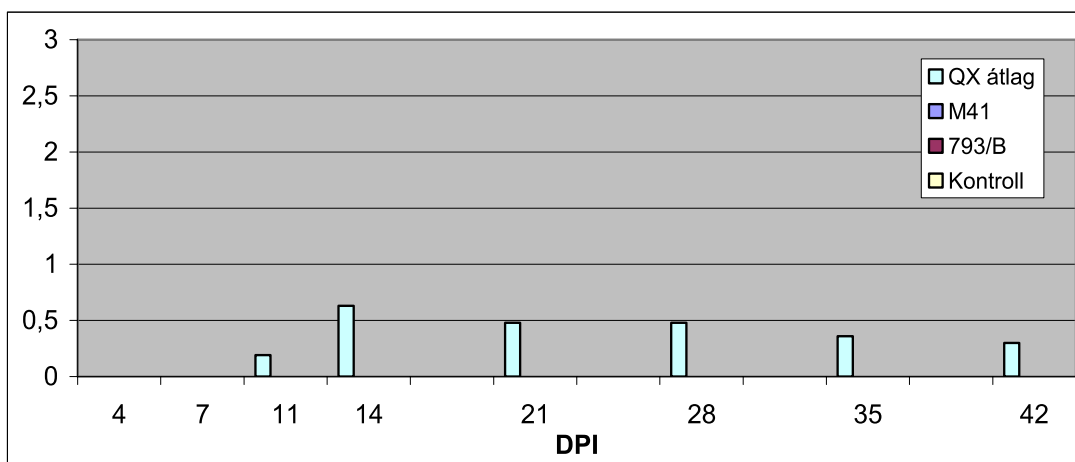


39. ábra: A naposkori fertőzést követő 42. napon a kínai törzssel fertőzött csoportban a tojócső üregének kifejezett tágulata, falának elvékonyodása, a redők teljes ellapulása látható (40×, HE).



40. ábra: A naposkori fertőzést követő 14. napon a szlovák törzssel fertőzött csoportban a tojócső savóshártyája alatt kialakult gócos lympho-histiocytás gyulladás (40×, HE).

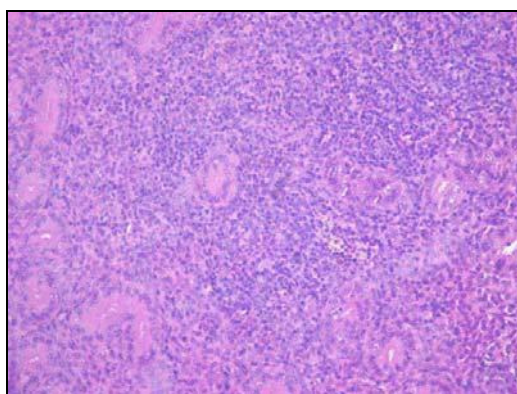
A leírt elváltozások legkorábban a szlovák és a magyar izolátummal fertőzött csoportokban alakultak ki. A vizsgálat fennmaradó idejében a tojócső tágulata végig megfigyelhető volt, azonban alkalmanként csak egy-két egyedben alakult ki. Leggyakrabban a kínai, majd a szlovák izolátumok idézték elő ezt az elváltozást. Az M41, 793/B törzssel fertőzött és a kontroll csoport mintáiban a tojócső mindvégig az adott fejlődési stádiumnak megfelelő kórszövettani képet mutatta (41. ábra).



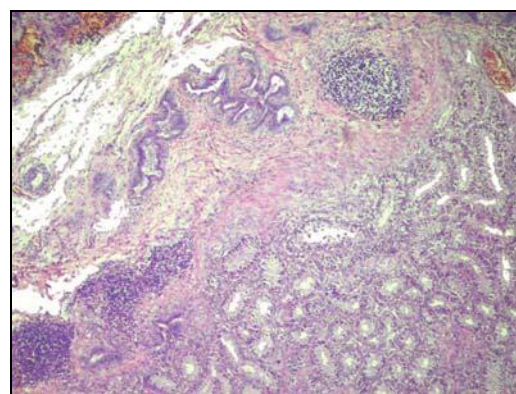
41.ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus által a tojócsőben kiváltott kórszöveti elváltozások mértéke (0 és 3 között pontozva).

7.10.1.8 Here

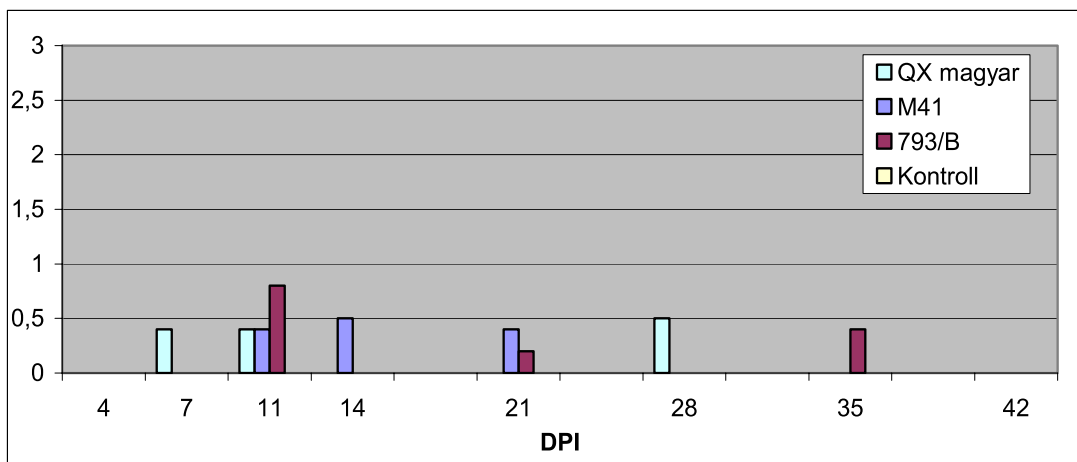
A herében az IBV okozta esetleges károsító hatást a magyar QX, az M41 és a 793/B törzsek esetén vizsgáltuk. Mindhárom csoport mintáiban megfigyeltünk gócos, vagy diffúz lymphoid sejtes beszűrődést a here interstitiumában (42. ábra), szubkapszulárisan, vagy a mellékhere-csatornácskák között (43. ábra). Az elváltozások a heré parenchymájában is csak elvétve, de minden csoport esetén jelentkeztek (44. ábra). Legkorábban a 7. napon a QX izolátummal fertőzött csoportban alakult ki gyulladás. Legtöbb érintett mintát a 793/B törzssel fertőzött csoportban találtunk.



42. ábra: A naposkori fertőzést követő 11. napon a magyar törzssel fertőzött csoportban a here interstitiumában kialakult diffúz lympho-histiocytás gyulladás (100×, HE).



43. ábra: A naposkori fertőzést követő 42. napon a 793/B törzssel fertőzött csoportban a mellékhere állományában kialakult gócos lympho-histiocytás gyulladás (40×, HE).



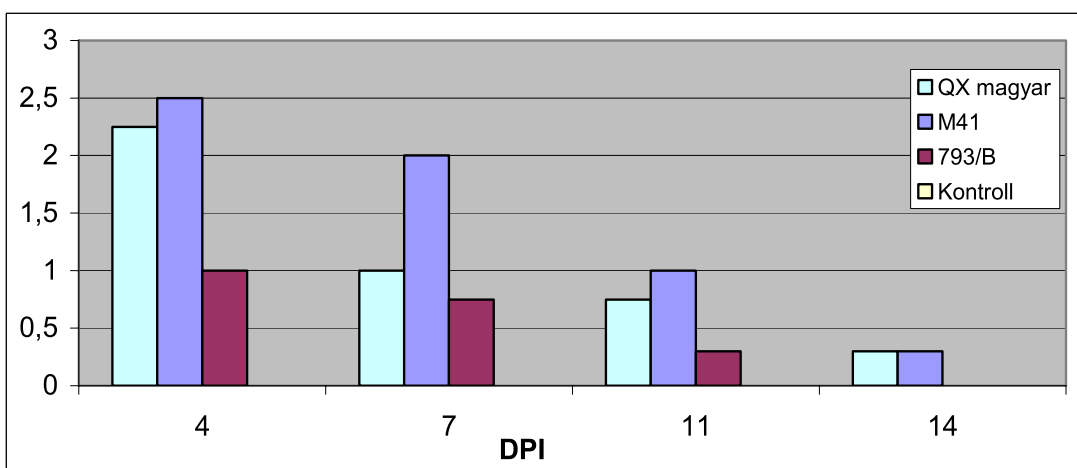
44. ábra: A naposkori fertőzést követően, a három IBV szerotípus által a herében kiváltott kórszöveti elváltozások mértéke (0 és 3 között pontozva).

7.10.2 Kórszöveti vizsgálat ivarérett kakasok fertőzése esetén

Az ivarérett korú kakasok fertőzését követően a 4., 7., 11. és 14. napokon a légcsőből, veséből és heréből nyert mintákat vizsgáltuk.

7.10.2.1 Légcső

A légcsőben mindhárom csoport esetén a naposkori fertőzést követő elváltozásokkal azonos kórszöveti képet találtunk. Az elváltozások súlyossága azonban mindhárom esetben valamivel enyhébb volt és a nyálkahártya gyorsabban regenerálódott. A legerősebb felsőlégúti károsító hatást az M41, a legenyhébbet a 793/B törzs idézte elő (45. ábra).

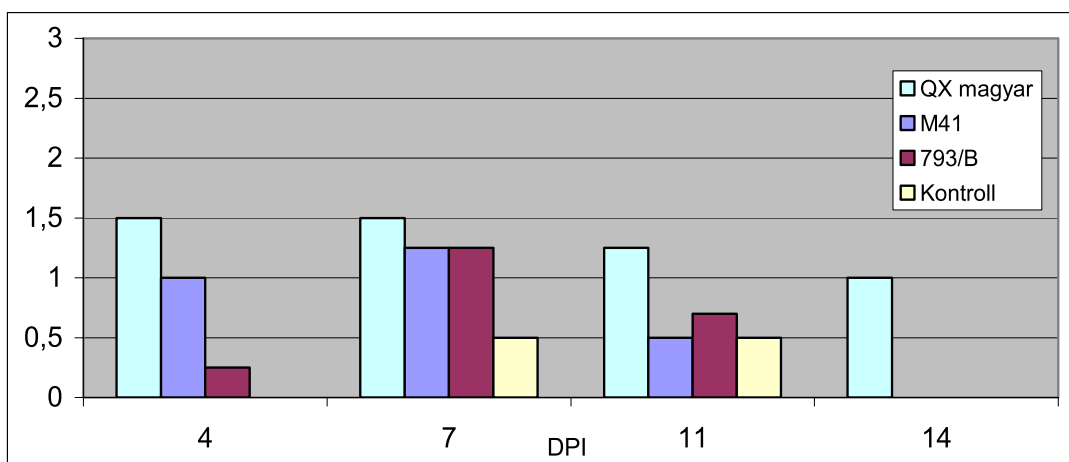


45. ábra: Ivarérett korú kakasok fertőzését követően, a három IBV szerotípus által a légcsőben kiváltott kórszöveti elváltozások mértéke (0 és 3 között pontozva).

7.10.2.2 Vese

A vesében látott kórszöveti kép megegyezett a fiatal csirkékben leírtakkal. A magyar izolátum esetén a naposkori fertőzésekor megfigyeltnél kevésbé súlyos formában

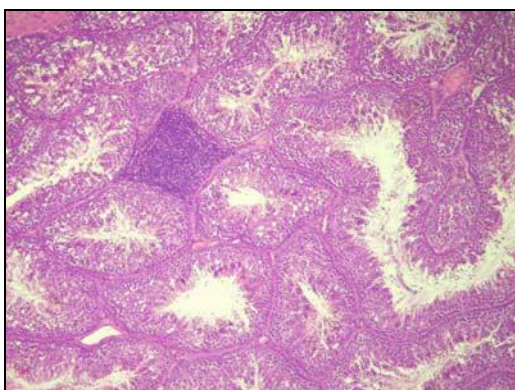
jelentkeztek az elváltozások, míg a két referens törzs a korábbiakhoz hasonlóan, csak enyhe elváltozásokat indukált. A kontroll csoportban ez esetben is megfigyeltünk mononukleáris sejtpopulációt a húgyvezetők és az ureterek nyálkahártyájának hámrétege alatt, amit a többi csoporthoz hasonló pontozással értékeltük (46. ábra).



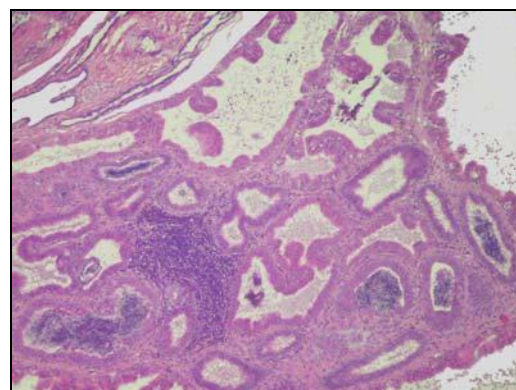
46. ábra: Ivarérett korú kakasok fertőzését követően, a három IBV szerotípus által a vesében kiváltott kórszövettani elváltozások mértéke (0 és 3 között pontozva).

7.10.2.3 Here

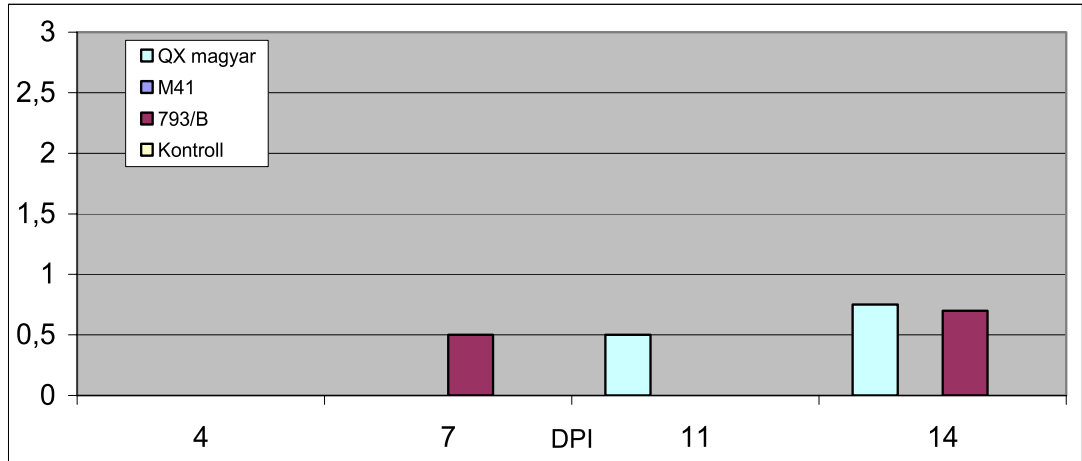
A herében csak a magyar és a 793/B törzssel fertőzött csoportban találtunk a korábbiakhoz hasonló kórszövettani elváltozást (47. és 48. ábra). A gyulladásra utaló sejtes beszűrődés itt is csak szórványosan fordult elő (49. ábra), a magyar izolátummal fertőzött kakasokban a 11. és 14. napokon 1, illetve 2 esetben, a 793/B törzssel fertőzött csoportban a 7. és 14. napokon 1-1 mintában. A spermiumképződésben a szövettani kép alapján nem lehetett károsodást tapasztalni és fokozott kőképződésre utaló elváltozás sem jelentkezett.



47. ábra: Ivarérett korú kakasok fertőzését követő 14. napon a magyar törzssel fertőzött csoportban a here interstitiumában kialakult gócos lymphohistiocytás gyulladás (40×, HE).



48. ábra: Ivarérett korú kakasok fertőzését követő 14. napon a magyar törzssel fertőzött csoportban a mellékhere csatornácskák között kialakult lymphohistiocytás gyulladás (40×, HE).



49. ábra: Ivarérett korú kakasok fertőzését követően, a három IBV szerotípus által a herében kiváltott kórszöveti elváltozások mértéke (0 és 3 között pontozva).

7.11 Immunhisztokémiai vizsgálat

Az immunhisztokémiai festést az első négy mintavétel metszetein végeztük el. A kontroll és a görög izolátummal fertőzöttet kivéve, minden csoportban ki tudtuk mutatni az IBV antigént, habár a pozitív minták száma viszonylag alacsony volt.

A légcsőben a fertőzést követő 4. napon a nyálkahártya hámsejtek mutattak pozitív festődést (50. ábra). Súlyosabb fertőzés esetén a vírusantigén a levált hámsejtek és a gyulladásozó sejtek citoplazmájában is láthatóvá vált. A 7. napon már mindössze egy pozitív mintát találtunk a magyar izolátummal fertőzött csoportban, az összes további légcsőminta negatívnak bizonyult (15. táblázat).

A tüdőben a fertőzést követő 4. napon a francia, a 7. napon a kínai, francia és magyar izolátummal fertőzött csoportban találtunk egy-egy pozitív mintát. Az antigénfestődés a bronchiolusok, illetve a parabronchusok hámsejtjeinek citoplazmájában jelentkezett, és csak néhány sejtre korlátozódott (51. ábra).

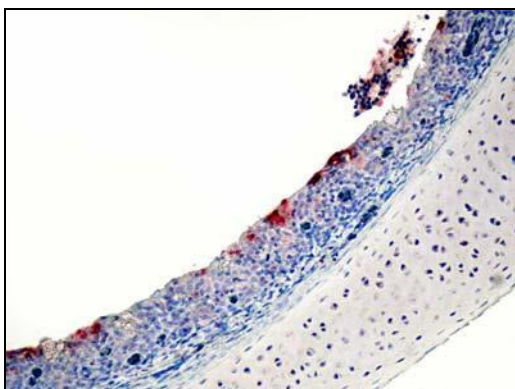
A mirigyes gyomorban a 11. napon a francia, a vékonybélben a 7. napon a kínai izolátummal fertőzött csoportban találtunk egy-egy pozitív mintát. Az antigénfestődés itt is a nyálkahártya hámsejtjeinek citoplazmájában volt látható (52. és 53. ábra).

A vesében a kínai, a francia, a szlovák és a magyar izolátum mintáiban tudtuk kimutatni a vírusantigént. A festődés a tubulushámsejtekben (54a és 54b ábra), illetve a gyűjtőcsatornácskák (55. ábra) és a húgyvezető nyálkahártyájának hámsejtjeiben jelentkezett. A kínai, francia és magyar izolátum mintáiban a 4. és 7. napokon, a szlovák izolátumnál a 4. és 14. napokon kaptunk pozitív reakciót (15. táblázat).

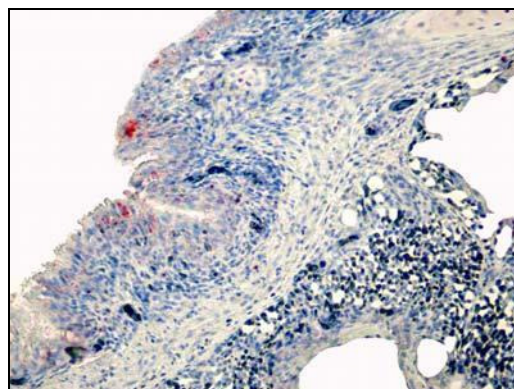
A petefészek, tojócső és here mintáiban nem sikerült vírusantigént kimutatni.

15. táblázat: Naposkori fertőzést követő 4. és 7. napi légcső és vese mintákon elvégzett immunhisztokémiai vizsgálat eredménye (a pozitív reakciót adó minták száma/ összes vizsgált minta)

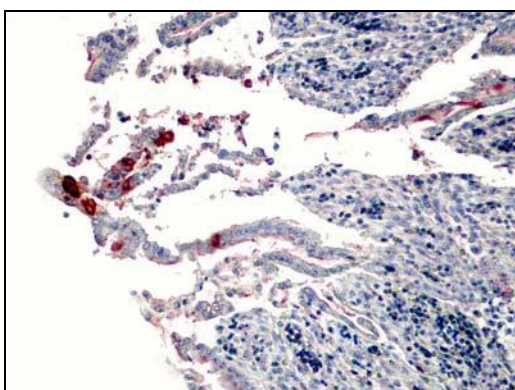
Törzs	Légcső		Vese	
	4 DPI	7 DPI	4 DPI	7 DPI
Kínai	2/5	0/5	1/5	3/5
Francia	3/5	0/5	1/5	4/5
Szlovák	0/5	0/5	1/5	0/5
Görög	0/5	0/5	0/5	0/5
Magyar	3/5	1/5	2/5	1/5
M41	3/5	0/5	0/5	0/5
793/B	3/5	0/5	0/5	0/5
Kontroll	0/5	0/5	0/5	0/5



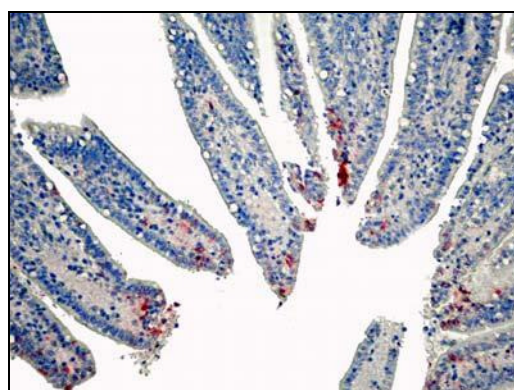
50. ábra: A naposkori fertőzést követő 4. napon a kínai törzssel fertőzött csoportban a légcső hámsejtjeinek citoplazmájában megfigyelhető vírusantigén (100×).



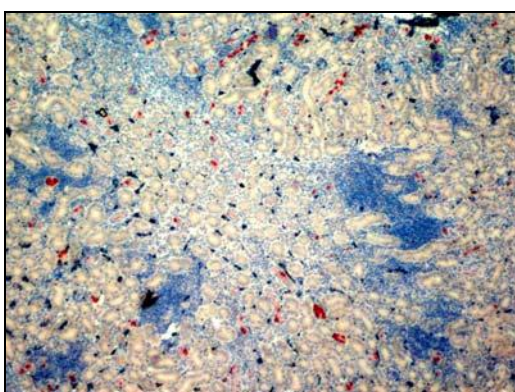
51. ábra: A naposkori fertőzést követő 4. napon a francia törzssel fertőzött csoportban a tüdő bronchiolus hámsejtjeiben megfigyelhető vírusantigén (100×).



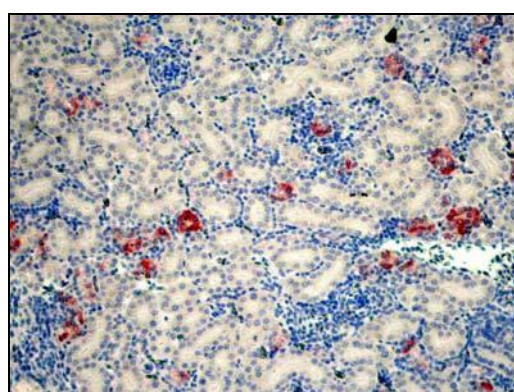
52. ábra: A naposkori fertőzést követő 11. napon a francia törzssel fertőzött csoportban a mirigyesgyomor nyálkahártya hámsejtjeiben megfigyelhető vírusantigén (100×).



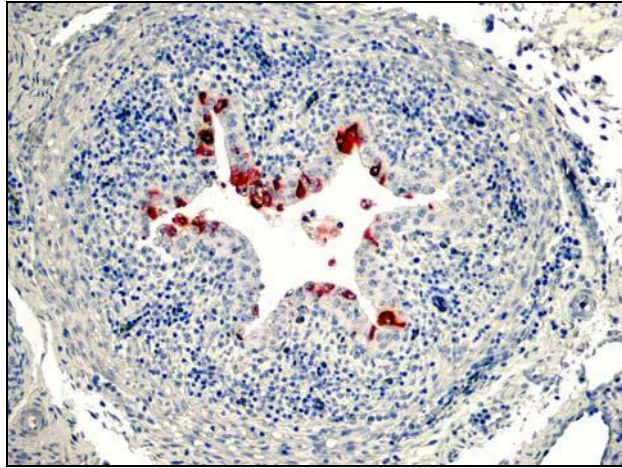
53. ábra: A naposkori fertőzést követő 7. napon a kínai törzssel fertőzött csoportban a vékonybél bolyhok hámsejtjeiben megfigyelhető vírusantigén (100×).



54a. ábra: A naposkori fertőzést követő 4. napon a magyar törzssel fertőzött csoportban a vese tubulus hámsejtjeiben megfigyelhető vírusantigén (40×).



54b. ábra: A naposkori fertőzést követő 4. napon a magyar törzssel fertőzött csoportban a vese tubulus hámsejtjeiben megfigyelhető vírusantigén (100×).



55. ábra: A naposkori fertőzést követő 4. napon a kínai törzssel fertőzött csoportban a húgyvezető nyálkahártya hámsejtjeiben megfigyelhető vírusantigén (100×).

Az RRT-PCR, a kórszövettani és az immunhisztokémiai vizsgálat eredményeinek jobb összehasonlíthatósága érdekében az RRT-PCR-el kapott értékeket is pontoztuk és a 16. és 17. táblázatban együtt szerepeltetjük a szövettani eredményekkel. Az IH reakció pozitív voltát piros színnel való kiemeléssel jelöltük.

RRT-PCR: - = negatív
 + = 0-2 \log_{10} EID₅₀
 ++ = 2-4 \log_{10} EID₅₀
 +++ = >4 \log_{10} EID₅₀

Szövettan: - = negatív
 + = enyhe elváltozás
 ++ = közepes mértékű elváltozás
 +++ = súlyos elváltozás

Immunhisztokémia: azokat a szövettani átlagértékeket, ahol pozitív IH reakciót kaptunk, illetve azokat a mintavételi napokat, amikor IH reakciót végeztünk, pirossal kiemelve jelöltük.

16. táblázat: A 7 vizsgált IBV törzs napos korban történt kísérletes fertőzést követő RRT-PCR, kórszöveti és immunhisztokémiai vizsgálatának eredménye mintavételi időpontok és szervek szerinti csoportosításban (NV = nem vizsgált).

	légcső		tüdő		mirigyegy.		vékonybél		c.tons		vese		petefészek		tojócsó		here	
	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR
DPI																		
4	+++ (5/5)	+++	+ (2/5)	++	NV	NV	-	+	+++	+++	+	+++ (4/5)	-	+	-	NV	NV	
7	++ (5/5)	++	+ (2/5)	+++	++ (4/5)	-	-	++	++	++	+	++ (3/5)	-	++ (2/4)	-	NV	NV	
11	++ (4/5)	NV	+ (5/5)		++ (5/5)	NV	-	NV	NV	NV	+	++ (3/5)	-	+	-	NV	NV	
14	+ (5/5)	++	+ (3/5)	++	++ (5/5)	-	-	+	++	++	+	++ (4/5)	-	+	+	-	NV	
21	+ (3/5)	+	++ (4/5)	+	++ (5/5)	NV	-	+	-	-	++	++ (5/5)	-	+	-	NV	NV	
28	-	-	++ (4/5)	-	NV	NV	NV	NV	-	-	++	++ (4/5)	-	-	+	-	NV	
35	-	NV	++ (5/5)	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	++	++ (5/5)	-	-	+	NV	NV	
42	-	NV	++ (5/5)	-	NV	NV	NV	NV	-	-	++	++ (3/5)	-	-	+	-	NV	
4	+++ (5/5)	++	+ (3/5)	++	NV	NV	-	++	+++	+++	+	++ (2/5)	-	+	-	NV	NV	
7	+++ (5/5)	++	++ (5/5)	+	++ (5/5)	-	+	++	++	++	++	++ (4/5)	-	-	-	NV	NV	
11	++ (5/5)	NV	+ (2/5)	NV	++ (5/5)	NV	-	NV	NV	NV	++	++ (5/5)	-	-	-	NV	NV	
14	+ (4/4)	-	+++ (5/5)	-	++ (5/5)	-	+	-	+	+	++	++ (5/5)	-	-	+	-	NV	
21	+ (3/5)	NV	++ (5/5)	+	++ (5/5)	NV	+	+	++	++	++	++ (5/5)	-	-	+	+	NV	
28	-	NV	+ (4/5)	-	NV	NV	NV	NV	+	+	++	++ (4/5)	-	-	-	+	NV	
35	-	NV	++ (4/5)	NV	NV	NV	NV	NV	+	+	+	++ (4/5)	-	-	-	NV	NV	
42	-	NV	+ (4/5)	-	NV	NV	NV	NV	-	-	+	++ (1/5)	-	-	-	-	NV	
QX Kína																		
QX francia																		

	légcső		tüdő		mirigyegy.		vékonybél		c.tons		vese		petefészek		tojócső		here	
	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR
DPI																		
4	++ (5/5)	++	+ (1/5)	++	NV	NV	-	+	++	+	+	+	-	+++	-	-	NV	NV
7	++ (5/5)	++	+ (3/5)	++	++ (5/5)	+	+	+++ (1/5)	+++	+++	+	+	+	++ (1/5)	-	-	NV	NV
11	++ (5/5)	++	+ (4/5)	++	+	NV	-	++ (4/5)	+++	+++	++	++	-	-	+	+	NV	NV
14	++ (5/5)	-	++ (4/5)	++	++ (5/5)	-	+	++ (1/5)	++	++	+++ (5/5)	+++ (5/5)	+	+	+	+	NV	NV
21	+ (4/5)	NV	+ (2/5)	+	++ (5/5)	NV	-	-	-	-	++ (5/5)	++ (5/5)	-	+	+	+	NV	NV
28	+ (1/5)	NV	++ (5/5)	-	NV	NV	NV	NV	+	+	++ (5/5)	++ (5/5)	+	+	+	+	NV	NV
35	-	NV	++ (5/5)	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	+	+	+	NV	-	-	NV	NV
42	-	NV	++ (4/4)	-	NV	NV	NV	NV	-	-	++ (3/4)	++ (2/4)	+	-	+	+	NV	NV
4	+ (3/5)	++	+ (1/5)	++	NV	NV	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	NV	NV
7	++ (4/4)	+	+ (1/5)	+	+	-	-	+++	++	++	+	+	+	+	+	+	NV	NV
11	++ (5/5)	++	+ (1/5)	+	++ (5/5)	NV	-	+++	+++	+++	+	+	-	+	-	-	NV	NV
14	+ (5/5)	+	++ (4/5)	+	++ (4/5)	-	+	+	++	++	+	+	+	-	+	+	NV	NV
21	+ (4/5)	+	++ (5/5)	+	++ (4/4)	NV	-	-	+	+	++ (4/5)	++ (4/5)	-	+	+	+	NV	NV
28	-	NV	++ (4/5)	-	NV	NV	NV	NV	-	-	+	+	+	+	+	+	NV	NV
35	-	NV	+ (5/5)	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	+	+	-	-	-	-	NV	NV
42	-	NV	+ (4/5)	-	NV	NV	NV	NV	-	-	+	+	+	-	-	-	NV	NV

QX szlovák

QX görög

	légcső		tüdő		mirigyegy.		vékonybél		c.tons		vese		petefészek		tojócső		here	
	szian	RRT-PCR	szian	RRT-PCR	szian	RRT-PCR	szian	RRT-PCR	szian	RRT-PCR	szian	RRT-PCR	szian	RRT-PCR	szian	RRT-PCR	szian	RRT-PCR
DPI																		
4	+++ (5/5)	+	+	++ (2/5)	NV	NV	-	+	++ (1/5)	+++ (1/5)	+	+	-	-	-	NV	NV	
7	+++ (5/5)	+	+	++ (2/5)	++ (4/4)	-	+	+	++ (4/4)	++ (4/4)	+	+	-	+	-	NV	+	
11	++ (5/5)	NV	+	++ (3/5)	+	NV	+	+	++ (4/5)	-	+	+	+	+	+	NV	++	
14	+	+	++	++ (5/5)	++ (5/5)	-	-	++	++ (5/5)	-	+	+	+	+	-	-	++	
21	+	-	++	++ (5/5)	++ (5/5)	NV	-	-	++ (4/5)	++ (4/5)	+	+	-	+	+	NV	+	
28	+	NV	++	++ (5/5)	NV	NV	NV	NV	++ (5/5)	++ (5/5)	+	+	+	+	+	-	+	
35	-	NV	++	++ (5/5)	NV	NV	NV	NV	++ (4/5)	NV	+	+	-	-	+	NV	NV	
42	-	NV	+	+	NV	NV	NV	NV	-	NV	-	-	-	-	-	-	-	
4	+++ (5/5)	++	+	++ (2/5)	NV	NV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NV	-	
7	++ (4/5)	+	-	+	++ (5/5)	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	NV	+	
11	++ (5/5)	+	++	++ (5/5)	++ (5/5)	NV	+	+	+	++ (1/4)	+	+	-	+	-	NV	-	
14	+	-	+	++ (3/5)	++ (5/5)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
21	+	NV	+	++ (3/5)	+	NV	+	+	+	NV	+	+	+	+	+	NV	NV	
28	-	NV	+++	+++ (5/5)	NV	NV	-	NV	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
35	-	NV	+	++ (4/5)	NV	NV	NV	NV	+	NV	+	+	-	-	-	NV	NV	
42	-	NV	+	++ (4/5)	NV	NV	NV	NV	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
QX magyar																		
M41																		

	légcső		tüdő		mrigyesgy.		vékonybél		c.tons		vese		petefészek		tojócső		here	
	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR
DPI																		
4	++ (4/5)	+	+	-	NV	NV	+	++ (1/5)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
7	++ (5/5)	-	-	-	++ (5/5)	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
11	++ (5/5)	NV	+	NV	++ (5/5)	NV	-	-	+	+	+	NV	+	-	-	-	+	NV
14	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
21	+	NV	+	NV	++ (5/5)	NV	+	++ (2/5)	NV	NV	++ (5/5)	+	+	+	-	-	+	NV
28	-	NV	+	-	NV	NV	NV	NV	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
35	-	NV	++ (5/5)	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	+	+	-	-	-	-	+	NV
42	-	NV	++ (4/4)	-	NV	NV	NV	NV	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	-	NV	NV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	+	-	++ (2/2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	+	-	++ (2/2)	NV	-	-	NV	NV	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
21	-	-	+	-	+	NV	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
28	-	-	+	-	NV	NV	NV	NV	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
35	-	NV	+	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	-	-	-	-	-	-	-	NV
42	-	NV	++ (2/2)	-	NV	NV	NV	NV	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

793/B

Kontroll

17. táblázat: A magyar QX, az M41 és a 793/B törzs ivarérett korú kakasok kísérletes fertőzését követő RRT-PCR, kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatának eredménye mintavételi időpontok és szervek szerinti csoportosításban (NV = nem vizsgált).

	DPI	Naposkori fertőzés						Ivarérést követő fertőzés					
		légcső		vese		here		légcső		vese		here	
		sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR	sztan	RRT-PCR
QX magyar	4	+++ (5/5)	+	+(1/5)	+++	NV	NV	++ (4/4)	+	++ (4/4)	+	-	++
	7	+++	+	++ (4/4)	++	+(1/5)	+	+(2/4)	+	++ (2/4)	++	-	+
	11	++ (5/5)	NV	++ (4/5)	-	+(1/5)	++	+(3/4)	-	+(3/4)	+	+(1/4)	+
	14	+(5/5)	+	++ (5/5)	-	-	++	+(1/3)	-	+(1/3)	+	++ (2/3)	-
M41	4	+++ (5/5)	++	+(1/5)	+	-	-	+++ (4/4)	+	+(4/4)	-	-	-
	7	++ (4/5)	-	+(3/5)	-	NV	+	++ (4/4)	+	+(3/4)	-	-	-
	11	++ (5/5)	+	+(1/4)	++	+(1/5)	-	+(4/4)	-	+(1/4)	+	-	+
	14	+(4/5)	-	+(3/5)	-	+(1/4)	-	+(1/3)	-	-	-	-	+
793/B	4	++ (4/5)	+	+(2/5)	+	-	+	+(2/4)	+	+(1/4)	-	-	-
	7	++ (5/5)	-	+(1/5)	-	-	-	+(2/4)	-	+(3/4)	-	+(1/4)	-
	11	++ (5/5)	NV	+(3/5)	NV	+(2/5)	NV	+(1/3)	-	+(2/3)	-	-	-
	14	+(5/5)	-	+(5/5)	-	-	-	-	-	+(1/3)	-	+(1/3)	+
Kontroll	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	+(1/2)	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	+(1/2)	-	-	-
	14	-	-	+(1/2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

8. Megvitatás

Az állattenyésztésen belül a baromfiágazat napjainkra a fogyasztói igényekhez igazodva rendkívüli fejlődésen ment keresztül. A több mint 6,4 milliárd fős emberiség állati eredetű élelmiszer ellátásának egyharmadát a baromfi hús- és tojástermelés adja (Horn, 2009). A fogyasztás kevesebb, mint ötven év alatt közel tízszeresére emelkedett, így a baromfihús termelés az 1961-ben regisztrált 10 millió tonnáról 2007-re 85 millió tonnára nőtt. Ebből csak a csirkehús 76 millió tonnát tesz ki. Az étkezési tojás-előállítás 1961 és 2007 között 15-ről 63,5 millió tonnára nőtt (www.faostat.fao.org). A rendkívüli növekedéshez a termeléstől a feldolgozásig a teljes baromfi ágazati vertikum fejlődése hozzájárult. A genetikai szelekciós módszerek továbbra is előremutató eredményeket mutatnak fel. PI. az Egyesült Államokban a brojlerhús-termelés összegzett hatékonysága 3%-al, a tojástermelés 1%-al növekedik évente, csak a tenyésztők erőfeszítéseinek köszönhetően (Horn, 2009). Sajnos a meglévő genetikai potenciál realizálódása hazánkban az elavult tartási rendszerek és az ehhez is köthető állategészségügyi problémák halmozódása miatt, az előirányzott teljesítménytől jelentősen elmarad (Bárány, 2011).

A nagyüzemi körülmények között történő baromfitartás Magyarországon az ötvenes években kezdődött. A nagy létszámú zárt ólakban tartott állományok kialakításával újabb és újabb nem várt állategészségügyi problémák ütötték fel a fejüket. Ezek közül egyre jelentősebb károkat okoztak a sokszor komplex oktanú légzőszervi betegségek (Történeti összefoglalás: Palya és Benyeda, 2009). Ezek közül a mai napig is az egyik legjelentősebb légzőszervi ágens, a fertőző bronchitis vírus 1962-63-ban jelent meg először fiatal jérce- és tojóállományokban (Derzsy és Lomniczi, 1966). Azóta a fertőzöttség, a hamarosan bevezetett vakcinázás ellenére is (Történeti összefoglalás: Palya és Benyeda, 2009) folyamatosan jelen van, és a sorra megjelenő variáns törzsek állandó fenyegetést jelentenek a brojler- és tojóállományokra egyaránt. Jelentőségéből napjainkra sem vesztett, ugyanis egy intézeti felmérés alapján, mind a napos, mind pedig a növendék és felnőtt korú állományokban folyamatos problémát jelent, és 2009-ben az egyik leggyakrabban kimutatott vírusos betegség volt (Bistyák, 2009). Az elmúlt években a legnagyobb károk a 2006-ban (Palya és mtsai., 2007) megjelent, kínai eredetű QX szerotípus terjedésével keletkeztek. Ezek a törzsek mára már egész Európában előfordulnak, és képesek áttörni a forgalomban lévő vakcinák által kiváltott védelmet (Landman és mtsai., 2004; Beato és mtsai., 2005; 2006; Domanska-Blicharz és mtsai., 2006; Zenella és mtsai., 2006; Gough és mtsai., 2008; Worthington és mtsai., 2008; Krapez és mtsai., 2011). A QX törzsek terjedésével összefüggésben jelentkező károk és a változatos kórformák kialakulása szolgáltatta az alapot a jelen dolgozat témájához. Célunk az volt, hogy különböző földrajzi területekről izoláljunk QX

szerotípusú vírustörzseket, majd fertőzési kísérletekben vizsgáljuk azok biológiai tulajdonságait. Az eredmények objektívabb megítélhetősége érdekében két összehasonlító törzset is bevontunk a vizsgálatokba, amelyek a két leggyakoribb európai szerotípust reprezentálják.

A vírusizoláláshoz kifejezetten olyan esetekből gyűjtöttünk mintát, ahol bizonyítottan vagy a járványmenet alapján vélhetően QX szerotípus okozhatta a megbetegedéseket. A francia állomány esetén molekuláris vizsgálattal már a korábbiakban igazolták a QX pozitivitást. A minta egy „áltojó-szindróma” tüneteit mutató húszlőpár állományt érintő járványból származott. Az általunk izolált vírustörzsek légzőszervi (görög), vagy vesegyulladásal is komplikált (kínai, szlovák, magyar) esetekből származtak. A vírusizolálás, az RT-PCR és az azt követő szekvenálás eredménye mindegyik mintában igazolta a QX izolátum kórtani szerepét. Ez az eredmény megerősítette Palya és munkatársainak (2007) korábbi megfigyelését, miszerint a QX szerotípus hazánkban is jelen van, valamint elsőként izoláltunk QX szerotípusú vírustörzset Szlovákiából és Görögországból.

Az izolátumok biológiai tulajdonságainak vizsgálata során klinikai, kórbonctani és laboratóriumi vizsgálatokon keresztül tanulmányoztuk azok virulenciáját és szöveti affinitását, valamint a fertőzés kiváltotta ellenanyagválaszt.

A fertőzést követő felső légúti tünetek a 3. napon váltak nyilvánvalóvá. Sun és munkatársai (2011) által, 3 eltérő QX törzssel végzett fertőzés is hasonló eredményre vezetett, bár a tünetek súlyosabb formában jelentkeztek és 2 csoport esetén elhullással is jártak. Más szerzők vizsgálataiban a tünetek általában már a fertőzést követő 2. napon kialakultak (Purcell és McFerran, 1972; Jones, 1974; Terregino és mtsai., 2009), ami vélhetően az alkalmazott nagyobb fertőző dózissnak, illetve az eltérő módon bejuttatott fertőző anyagnak köszönhető. A klinikai, kórbonctani és laboratóriumi vizsgálatok együttes eredménye alapján a görög és a 793/B törzsnek volt a legenyhébb légcsőkárosító hatása. Ugyanakkor érdekes jelenségnek tartjuk, hogy a görög izolátum esetén az RRT-PCR módszerrel az elváltozások alapján a vártnál jóval magasabb titerben tudtuk kimutatni a vírus RNS-t. Ezzel szemben a magyar izolátummal fertőzött csoportban a QX szerotípus törzsei közül a legalacsonyabb titereket mértük, mégis kifejezett tünetek és elváltozások jelentkeztek.

Az IHC festés eredménye mindkét esetben a morfológiai vizsgálatok eredményét támasztotta alá. A többi csoport vizsgálata során közel azonos erősségű elváltozások alakultak ki, amelyek összhangban álltak az RRT-PCR-el kapott vírustiter értékekkel. Az M41 törzs mintáiban mért titer kicsit elmaradt a QX izolátumokkal fertőzött csoportok mintáiban mérthez képest. Az IHC festéssel minden csoportban a vártnál kisebb számú pozitív mintát kaptunk. A szlovák izolátum esetén a kifejezett elváltozások és a magas vírustiter ellenére sem tudtuk kimutatni az IBV antigént. Ez

feltehetően az IHC szempontjából túl kései mintavétellel, valamint e módszer PCR-hez viszonyítva alacsonyabb érzékenységevel magyarázható. Korábbi, különböző virulens IBV törzsekkel végzett fertőzéseket követően a legkorábbi mintavételek alkalmával tudtak legnagyobb mennyiségben vírusantigént kimutatni. Az M41 szerotípusba tartozó törzsekkel végzett vizsgálatokban Owen és munkatársai (1991) a fertőzést követő 3., Chen és munkatársai (1996) a 2. és 6. nap között, Lee és munkatársai (2004) az 1. és 4. napon, Kotani és munkatársai (2000) egy nepropathogén törzssel végzett vizsgálatban már egy napon belül kimutatták a vírusantigén jelenlétét monoklonális ellenanyagokkal. Ezzel szemben Geerligts és munkatársai (2011) által a gyengített L1148 QX törzssel végzett disszeminációs vizsgálatban az immunizálást követő 4. és 11. nap között találták pozitívnak a mintákat. Ez feltehetően a gyengített törzs alacsonyabb virulenciájának és hosszabb perzisztálásának köszönhető. Nakamura (1991), valamint Abdel-Moneim és munkatársai (2009) által végzett vizsgálatokban a hosszabban tartó IHC pozitívítás vélhetően az alkalmazott poliklonális ellenanyagok nagyobb reakcióképességének köszönhető.

Az irodalmi adatok és az általunk kapott eredmények alapján tehát az látszik, hogy a legelső mintavétel ideje az IHC vizsgálat eredményét negatívan befolyásolta, mivel a vírus sok esetben már valószínűleg kiürült az adott szervből. Tovább ronthatja a helyzetet az alkalmazott ellenanyag nagy specificitása, valamint az a tény, hogy a szövettani feldolgozás során csak egy-egy metszési síkot tudunk értékelni, ami nem biztos, hogy a legjobban reprezentálja a teljes szervben végbemenő folyamatokat.

Az RRT-PCR szempontjából is valószínűleg indokolt lett volna egy korábbi mintavétel is, mivel a legtöbb esetben a 4. napon mértük a legmagasabb titereket. Figyelembe véve az IBV embrionált tyúktojásban megfigyelt igen gyors szaporodását (Cavanagh és Naqi, 2003), elképzelhető, hogy a 4. napon a víruszaporodás már nem a logaritmus növekedés fázisában volt. Mindazonáltal, az RRT-PCR-rel mért értékeket nem befolyásolja, hogy jelen van-e élő vírus, vagy csak maga az RNS, ezért a végső eredmény ebben a vizsgálatban kevésbé torzul.

A cílium teszt és a kórszövettani vizsgálatok ideje a leletek alapján optimálisnak tűnik, mivel a morfológiai elváltozások megjelenése kissé késleltetett a víruszaporodás maximumához képest. Geerligts és munkatársai (2011) által végzett vizsgálatban a kevésbé (8 passzázzsal) gyengített L1148, valamint a virulens D388 QX törzsekkel végzett fertőzésben a mi eredményünkhöz hasonlóan, az első (5DPV/DPI) mintavétel alkalmával mérték a legsúlyosabb csillókárosodást. Ezzel szemben az erősen attenuált vakcinatörzsek esetén a károsodás mértéke alacsonyabb szinten és későbbi (7/8 DPV) időpontban csúcsosodott ki (Pénzes és mtsai., 2010; Geerligts és mtsai., 2011).

A légcső kórszövettani vizsgálata során megfigyelt elváltozások és azok kronológiai sorrendje megegyezett más szerzők korábbi munkájában leírtakkal. Eltérések csak a

leletek súlyosságában jelentkeztek, ami feltehetően az alkalmazott törzs virulenciájának, az eltérő fertőző dózisonak és applikálási módnak köszönhető (Purcell és McFerran, 1972; Jones, 1974; Nakamura és mtsai., 1991; Owen és mtsai., 1991; Chen és mtsai., 1996; Kotani és mtsai., 2000; Lee és mtsai., 2004; Terregino és mtsai., 2008).

A tüdőben kapott kórszövettani eredmények értékelését némileg nehezíti, hogy a kontroll csoport egyedeiben is találtunk nem specifikus elváltozásokat. A bronchusok és bronchiolusok falában jelentkező elváltozások egyértelműen az IBV fertőzésnek tudhatók be, ahogy azt néhány minta esetén a vírusantigén jelenléte is igazolta. A parabronchiálisan jelentkező gócos lympho-histiocytás beszűrődés általában nagyobb számban és kiterjedtebb formában jelent meg a fertőzött csoportok esetén. Jelenlétükkel élettani körülmények között – a bronchus-associated lymphoid tissue, BALT fiziológiás kialakulásával kapcsolatban – is számolnunk kell (Randall és Reece, 1996). A kórszövettani, RRT-PCR és IHC vizsgálat eredményének együttes értékelése alapján a 793/B törzs enyhe, az M41 törzs pedig a QX izolátumoknál gyengébb károsító hatással rendelkezik a tüdőben. A QX szerotípus törzsei közül a kínai és a magyar izolátum bizonyult a leginkább patogénnek ebben a szervben.

A légcsőhöz képest itt kissé később és elhúzódva jelent meg a vírus az RRT-PCR és IHC vizsgálat alapján. Ennek megfelelően a kórszövettani elváltozások is késleltetve jelentkeztek és a parabronchiális területeken megfigyelt leletek az egész vizsgálat ideje alatt fennálltak.

Kevés irodalmi adat áll rendelkezésre az IBV tüdőben előidézett károsító hatásáról. Purcell és McFerran (1972) vizsgálataikban az általunk találtakhoz hasonló elváltozásokat írtak le. Megfigyeléseik szerint a károsodás leggyakrabban a tüdő elülső és hátulsó ventrális csúcsában jelentkezett, és a légzsákokból másodlagosan áttérjedő kontakthatásnak vélték. Vizsgálatunkban magunk nem figyeltünk meg hasonló összefüggést az elváltozások lokalizációját illetően. Abdel-Moneim és munkatársai (2009) M41 törzssel mesterségesen fertőzött csirkeembriók tüdejének érrendszerében detektálták a vírust a fertőzést követő 2. és 4. nap között. Mivel ők poliklonális ellenanyaggal dolgoztak, eredményük nehezen megítélhető. Geerligts és munkatársai (2011) által végzett disszeminációs vizsgálatban a 80 embriópasszázzsal gyengített L1148 QX törzset nem sikerült a tüdőből kimutatni.

Mirigyegyomor-gyulladást a '70-es években írtak le először csirkékben. A kórforma hátterében fertőző és nem fertőző okokat egyaránt számba vettek, de a betegség kóroktana egyelőre tisztázatlan. Egyes szerzők (Xiao és mtsai., 2010) az IBV szerepét is felvetették, mint lehetséges kóroktani tényezőt. 1995-ben, Kínában egy mirigyegyomor-gyulladással járó járványból IB vírust izoláltak (Xiao és mtsai., 2010). Ettől kezdve a proventriculitisszel kísért IBV okozta megbetegedések endémiássá

váltak Kínában (Wang és mtsai., 1997; 1998; Yu és mtsai., 2001; Ma és mtsai., 2004; Xiao és mtsai., 2010). Ezekben az esetekben leírt legjellegzetesebb kórbonctani elváltozás a mirigyegyomor kifejezett duzzanata és a nyálkahártyán kialakult vérzések, fekélyek és elhalások megjelenése volt. A megbetegedésekből származó minták RT-PCR-rel való vizsgálata a QX, míg máskor H120 variáns, vagy az un. proventriculitis csoportba tarozó vírustörzsek jelenlétét igazolták (Wang és mtsai., 1998; Yu és mtsai., 2001; Ma és mtsai., 2004; Han és mtsai., 2010; Xiao és mtsai., 2010; Zou és mtsai., 2010). Hasonló megbetegedéseket a világ többi részén is leírtak, de sehol sem öltött olyan méreteket, mint Kínában (Escorcía és mtsai., 2002; Jackwood és mtsai 2005; Domanska-Blicharz és mtsai., 2006; Irvine és mtsai., 2010). Európában csak a QX szerotípussal összefüggésben jelentkeztek hasonló megbetegedések, de a szerotípus előfordulási gyakoriságához képest, igen kis számban (Domanska-Blicharz és mtsai., 2006; Irvine és mtsai., 2010).

A gyulladás miatt kialakuló nagy gazdasági károk okán kísérletünkben mi is vizsgáltuk az egyes szerotípusok és törzsek hatását a mirigyegyomorban. Sem a kórbonctani, sem a kórszövettani vizsgálat nem utalt vírus okozta károsodásra a vizsgálat ideje alatt. Ezt támasztotta alá az RRT-PCR során kapott negatív eredmény is. Egyedül az IHC reakcióval, egy, a francia izolátummal fertőzött egyed nyálkahártya hámsejtben kimutatott vírusantigén jelenléte utalt a QX szerotípus lehetséges replikálódására e szervben. Hasonló eredményre jutottak Sun és munkatársai (2011), akik 3 QX törzzsel való fertőzést követően nem találtak elváltozást a mirigyegyomorban. Ambali és Jones (1990) által, egy enterotróp izolátummal végzett fertőzést követően, a vírust ugyan alacsony titerben izolálták a mirigyegyomorból, de sem kórszövettanilag, sem immunfluoreszcenciás vizsgálattal nem tudták igazolni jelenlétét. Mesterségesen fertőzött embriók esetén azonban sikerült kimutatni IBV antigént a mirigyegyomor nyálkahártyájában (Escorcía és mtsai., 2002; Abdel-Moneim és mtsai., 2009), valamint a gyomor izomrétegében is (Abdel-Moneim és mtsai., 2009).

A korábbiakban több, igazoltan IBV okozta járvány kapcsán beszámoltak hasmenéssel járó tünetek megjelenéséről (Ambali és Jones, 1990; Villareal és mtsai 2007), valamint több izolátum esetén vizsgálták azok megjelenését és szaporodását az emésztőrendszer különböző részeiben (Chong és Apostolov, 1982; Ambali és Jones, 1990; Lucio és Fabricant, 1990; Villareal és mtsai., 2007; Geerligts és mtsai., 2011).

Esetünkben az RRT-PCR mindhárom szerotípus jelenlétét igazolta a vékonybélben, bár a 793/B és főleg az M41 törzsek titerei jelentősen elmaradtak a QX csoportoknál mérttől. A kórszövettani és IHC vizsgálat eredménye nem tükrözte ezt a markáns különbséget, mivel az előbbieket esetén minden csoportban inkább csak elvétve alakultak ki gyulladással kísért elváltozások, az utóbbi esetben pedig csak egyetlen mintában sikerült kimutatni a vírusantigén jelenlétét. A QX izolátumoknál,

a 7. és 21. napok között mért nagy mennyiségű RNS jelenléte mégis arra utal, hogy a vírus megjelenik a bélben, de szaporodása feltehetően inkább a bélrendszer hátsó szakaszaira korlátozódik. Geerligts és munkatársai (2011) által végzett IHC vizsgálat során a vakcinavírus jelenlétét igazolni tudták a hasnyálmirigyben és a kloáka tampon mintákban, azonban a duodenumból származó metszetek mindvégig negatívak maradtak. Hasonló eredményre jutott Chong és Apostolov (1982), akik immunfluoreszcenciás vizsgálattal kísérelték meg a vírusantigén kimutatását. Ambali és Jones (1990) által végzett, az emésztőtraktus teljes egészét magába foglaló, részletes vizsgálat során azt találták, hogy a vékonybél elülső szakaszában ugyan kis mennyiségben izolálni lehet a kórokozót, szövettanilag és immunfluoreszcenciás vizsgálattal mégis nyoma a vírus szaporodásának. Ezzel szemben az ileumban, de még inkább a vakbélbejárat nyiroktüszőkben és a végbélben a fertőzést követő 3. és 14. nap között jelentős mértékű szaporodást mértek, aminek morfológiai következményei, mind szövettani, mind immunfluoreszcenciás vizsgálattal nyilvánvalóak voltak.

Az IBV vakbélbejárat nyiroktüszők iránti kifejezett affinitását további vizsgálatok is igazolják, amelyek vagy kórszövettanilag, vagy a vírus kimutatásával demonstrálták annak szaporodását és hosszú perzisztálását e szervben (Karaca és mtsai., 1990; Lucio és Fabricant, 1990; Owen és mtsai., 1991; Alvarado és mtsai., 2006; Geerligts és mtsai., 2011; Sun és mtsai., 2011). A QX izolátumok esetén a mi vizsgálatunkban is itt sikerült a legnagyobb mennyiségben és leghosszabb időn keresztül kimutatnunk a vírus RNS-t az összes vizsgált szerv közül. A 793/B törzs csak a 4., az M41 a 4. és 42. napon adott mérhető titereket. Eredményeink ugyan igazolták a QX izolátumok kifejezett, valamint a két összehasonlító törzs mérsékelt affinitását a vakbélbejárat nyiroktüszőkhöz és a vékonybélhez, a pontos bélbeli folyamatok megértéséhez egy, a bél hátsó szakaszait is átfogó, kiterjedtebb mintavételre és feldolgozásra volna szükség.

A QX törzsek megjelenésével a legnagyobb gazdasági károkat azok vesekárosító hatása okozta az ismert esetek legtöbbszörében (Liu és Kong, 2004; Beato és mtsai., 2005; 2006; Liu és mtsai., 2006; 2009; Zenella és mtsai., 2006; Mató és mtsai., 2007; Gough és mtsai., 2008; Terregino és mtsai., 2008; Worthington és mtsai., 2008; Zou és mtsai., 2010; Han és mtsai., 2011). Kísérletünkben az általunk izolált öt QX törzs nephropathogén potenciáját vizsgáltuk. A görögöt leszámítva, minden izolátum kifejezett affinitást mutatott a veséhez. Ezt mind az RRT-PCR, mind a kórszövettani és IHC vizsgálatok is egyértelműen igazolták. A görög izolátum mintáinak vizsgálatával kapott eredmények lényegesen elmaradtak a többi QX izolátumhoz képest, ami feltehetően a fertőzésnél használt vírussuszpenzió alacsonyabb titerének következménye volt, amit a vírustitrálási adat igazolt. További QX törzsekkel való

fertőzést követően más szerzők által publikált adatok is hasonló eredményre vezettek. Terregino (2008), valamint Sun és munkatársai (2011) egyaránt igazolták a QX szerotípusok vesekárosító hatását. Geerligts és munkatársai (2011) az alacsonyabb passzázsszámú L1148-as törzssel való fertőzést követően az 5. és 10. napon találta a legsúlyosabb kórszövetteni elváltozásokat. Hasonlóan korán tetőztek az elváltozások Owen (1991), Chen (1996) valamint Lee és munkatársainak (2004) más szerotípussal végzett vizsgálatainak során is. Mivel a megfigyelési idő esetükben csak 10-14 nap volt, nincs információnk az elváltozások esetleges progrediálásáról. A mi vizsgálatunkban az elváltozások a 14. és 28. napok között csúcsosodtak, és bizonyos késéssel követték az antigén, illetve az RNS megjelenését, hasonlóan a más szerzők által leírtakhoz (Owen és mtsai., 1991; Chen és mtsai., 1996; Lee és mtsai., 2004; Geerligts és mtsai., 2011). A megfigyelt elváltozások minden publikált munkában hasonlóak voltak, csak azok súlyosságában jelentkeztek kifejezett eltérések (Jones, 1974; Albassam és mtsai., 1985; Butcher és mtsai., 1990; Owen és mtsai., 1991; Chen és mtsai., 1996; Lee és mtsai., 2004; Terregino és mtsai., 2008; Geerligts és mtsai., 2011).

Az M41 törzs esetén a kórszövetteni és RRT-PCR eredmények a vesekárosító hatás szempontjából elmaradtak a QX izolátumokkal fertőzött csoportokhoz képest, és az IHC vizsgálat nem igazolta az M41 antigén jelenlétét a vesében. Más nephropathogénnek tartott szerotípusok vizsgálata során Lee és munkatársai (2004) is hasonló eredményt kaptak és úgy vélték, hogy az élő vírus kimutatása nem feltétlenül jelenti annak replikálódását az adott szervben. A pozitív reakció egyes esetekben feltehetően csak a virémia következménye. Valószínűleg ezzel magyarázható az is, hogy számos nem nephropathogén törzset kimutatnak a veséből is. Jones (1974) az M41 törzs vizsgálatakor arra a következtetésre jutott, hogy a nem kifejezetten vesekárosító törzsek, csak bizonyos körülmények együttes fennállása esetén képesek a vesében elváltozást létrehozni. Feltehetően ez a helyzet az általunk vizsgált Mass szerotípusú törzs esetén is, ugyanis számos korábbi vizsgálat és megfigyelés ugyanúgy érvel ezen szerotípus vesekárosító és nem vesekárosító hatása mellett is (Jones, 1974; Butcher és mtsai., 1990; Owen és mtsai., 1991; Chen és mtsai., 1996). A 793/B törzs nem adott pozitív reakciót sem az IHC reakció, sem az RRT-PCR során. A kórszövettanilag megfigyelt elváltozások, pedig nem sokkal haladták meg súlyosságban a kontroll csoportban megfigyelt kisszámú lympho-histiocytás aggregációt. A kontroll egyedekben hasonló jelenségeket figyeltek meg Owen és munkatársai (1991) is, ami önmagában, a kórszövetteni adatok alapján, megnehezíti a vesében kialakuló károsodás megítélését.

A fertőzés hatására a tojócsőben kialakuló elváltozások szempontjából két kritikus időszak van. Az első a kelést közvetlenül követő periódus, amikor maternális ellenanyag hiányában bizonyos törzsek olyan károsodást idéznek elő, amely a

tojókorba érve „áltojó-szindróma” kialakulásához vezet. Az ivaréret követő, vagy a tojásrakás során bekövetkező fertőzés az állomány egyedeit különböző mértékben érintő, eltérő mértékű (11-73%) tojástermelés csökkenéssel és héjminőség romlással jár. A termelés mértéke az esést követően csak igen lassan, vagy egyáltalán nem tér vissza a technológiailag elvárt szintre (Jones és Jordan, 2006). A termelés-csökkenés és a héjminőségi romlás ilyenkor a vírus hatására a petefészek működésében bekövetkező zavar és a tojócső falában fellépő hámsejtek és a tubuláris mirigyek károsodásának a következménye (Jones és Jordan, 1971; 2006; Chousalkar és mtsai., 2007a; b).

A kelést követően maternális ellenanyagok hiányában a csibe védtelen a virémia révén a tojócsőbe kerülő vírus károsító hatásával szemben. Broadfoot és munkatársai 1956-ban számoltak be megfigyelésükről, miszerint minél fiatalabbak a csirkék a fertőzés pillanatában, annál nagyobb eséllyel lesznek áltojók ivarérett korban. Ezt a későbbiekben további vizsgálatok sora igazolta (Jones és Jordan, 1970; 1972; Crinion és mtsai., 1971a; b). A megfigyelések ezen túlmenően azt is igazolták, hogy csak bizonyos szerotípusok és törzsek képesek a fiatalkori tojócső károsodást előidézni (Crinion és Hofstad, 1972). Az addigi vizsgálatok alapján csak különböző Mass típusú törzsek, és az ausztráliai T törzs okozott elváltozást maternális ellenanyaggal nem rendelkező csirkében (Jones és Jordan, 1970; 1972; Crinion és mtsai., 1971a; b; Crinion és Hofstad, 1972). A szülőpár állományok vakcinázásának bevezetésével, és ezáltal a megfelelő szintű maternális ellenanyag szintjének kialakulásával, az „áltojó-szindróma” előfordulása gyakorlatilag megszűnt.

2004-ben, Hollandiában egy QX törzs által előidézett járvány során újra felütötte fejét a jelenség (Landman és mtsai., 2005). A szerotípus gyors terjedésével pedig egyre több közlemény jelent meg a tojókorú állományokban manifesztálódó problémáról (Beato és mtsai., 2005; 2006; Jones, személyes közlés, 2006; Worthington és mtsai., 2008). A kórkép újbóli megjelenésének feltehetően az a magyarázata, hogy a forgalomban lévő vakcinák által indukált maternális ellenanyagok, a szerotípusok közti nagy antigenitásbeli eltérés miatt, nem nyújtanak kellő védelmet a fiatal korban bekövetkező fertőzést követő virémia tojócsőkárosító hatásával szemben. Kísérletünkben az SPF állatok naposkori fertőzését követően csak a QX szerotípus törzseivel fertőzött csoportokban jelentkeztek a tojócsövet érintő elváltozások. A szabad szemmel is látható cisztaszerű tágulat az eddigi vizsgálatokhoz képest legkorábban, már a fertőzést követő 14. napon kialakult és a megfigyelési időszak végéig előfordult. A korábbi vizsgálatokban a tágulat a naposkori fertőzést követő 44., 35., vagy a 20. napon jelent meg (Crinion és mtsai., 1971a; Crinion és Hofstad, 1972; Jones és Jordan, 1972). Az esetünkben megfigyelt korábbi manifesztáció feltehetően a törzsek ilyen irányú nagyobb patogenitásával lehet összefüggésben.

A '70-es években leírt, pozitív tojócsőlelettel járó fertőzési kísérletek szinte mindegyikét a Mass szerotípus valamelyik törzsével végezték (Jones és Jordan, 1970; 1972; Crinion és mtsai., 1971a; b; Crinion és Hofstad, 1972). Ennek ellenére a mi vizsgálatunkban, ahol maternális ellenanyag hiányában az SPF csirkék védtelenek voltak az M41 törzs által előidézett virémiától, nem alakult ki sem makroszkópos, sem más laboratóriumi módszerekkel detektálható elváltozás. Ez feltehetően az eltérő dózisonak, applikálási módnak, vagy passzázsszámnak volt köszönhető. Esetleg az eltelt több mint 30 év alatt, a vírus-gazda viszonyában bekövetkező evolúciós változásoknak tudható be. Hasonlóan negatív eredményeket kaptunk a 793/B törzssel fertőzött csoportban is, ez azonban nem okozott meglepetést, tekintve, hogy egy korábbi publikációban sem említik ennek a törzsnek az esetleges tojócső károsító hatását.

Meglepő volt azonban az, hogy a QX izolátumokkal fertőzött csoportokban, az igen látványos makroszkópos leletek ellenére a kórszövettani kép viszonylag szegényes volt és az RRT-PCR-rel csak alig, az IHC reakcióval pedig egyáltalán nem tudtuk kimutatni a vírus jelenlétét. A tojócső különböző szakaszaiban a vírusantigén kimutatását célzó immunfluoreszcenciás vizsgálat Lucio és Hitchner (1970), valamint Jones és Jordan (1972) kísérletében is negatív eredménnyel zárult, azonban Crinion és Hofstad (1972) hiperimmun savóval végzett IF vizsgálata pozitív eredményt adott a fertőzést követő 3. és 6. napon a tojócső nyálkahártya hámsejtjeiben. Crinion és munkatársai (1971a; b) a szövettani vizsgálat során is lényegesen gazdagabb elváltozásokat írtak le a tojócső végső szakaszán (1971a), illetve a magnum és az isthmus határán (1971b). Beszámolójuk alapján már a fertőzést követő 2. napon megjelennek a mononucleáris gyulladásozó sejtek a tojócső falában, és mennyiségük a 10. napig fokozatosan növekszik. Utána ezek a sejtek lymphoid gócbba tömörültek, majd a 20. naptól hypoplasiával kísért ürepszűkületet figyeltek meg a hámsejtek károsodása mellett. Megfigyeléseik szerint ez a szűkület a magnum és az isthmus határán (Crinion és mtsai., 1971a), vagy a tojócső végső vaginális részén (Crinion és mtsai., 1971b) alakult ki. A szűkület kialakulását, craniálisan hamarosan a cisztaszerű tágulat megjelenése követte, a caudálisan elhelyezkedő terület pedig mindvégig intakt maradt. A több korcsoportra kiterjedő és a naposkori fertőzést tojókorig végigkövető vizsgálataik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a ciszták kialakulása a hámsejtek károsodása, leválása és a fal gyulladásozó beszűródése okozta szűkület következménye. A perzisztáló ciszták pedig a tojócső falában fejlődő mirigyek hypoplasiáját okozva a tojókorban rendellenes héjképződéshez, beltartalmi elégtelenséghez, vagy átojó megjelenéséhez vezetnek (Crinion és mtsai., 1971a; b; Crinion és Hofstad, 1972). Ezzel szemben Jones és Jordan (1972) a ciszták megjelenése ellenére nem talált lényegeso kórszövettani elváltozást. Terregino (2008),

valamint Geerligs és munkatársai (2011) által különböző QX törzsekkel végzett fertőzést és immunizálást követően nem alakultak ki a tojócsőben makroszkópos vagy szövettani elváltozások. Ugyanakkor Terregino és munkatársai (2008) a petefészekből és tojócsőből eltávolított közös mintából a 4-6. napon kimutatta a vírus jelenlétét. Az ő esetükben az elváltozások hiánya egyértelműen a kései, 35. napon végzett fertőzés és rövid megfigyelési időszak következménye lehetett. Sun és munkatársai (2011) ugyan 30 napos korig vizsgálták az egyedeket, mégsem jelentkeztek a tojócsövet érintő makroszkópos elváltozások. A fertőzéshez három, Kínában izolált QX törzset használtak, amelyek a kórelőzményi adatok alapján vesekárosodással járó megbetegedéseket okoztak. Valószínűsíthető, hogy a 20 napos korban végzett fertőzésnek már nem volt hatása a tojócsőre. Geerligs és munkatársai (2011) az L1148 törzs tojócsőkárosító hatását csak a 80. passzázson vizsgálták, ami megfelelő attenuálási foknak bizonyult a virémia elkerülése szempontjából. Palya és munkatársai (2007) által, a QX törzssel végzett fertőzést követően az 5. héten jelentek meg a ciszták a tojócsőben, azonban a fertőzést követő 14. napig a tojócsőből nem tudták kimutatni a fertőző vírus jelenlétét. Erre a vizsgálatra alapozva a víruskimutatást a 14. naptól folytattuk, de a későbbi szakasz sem hozta meg a várt eredményt. A korai szakasz mintáinak IHC reakcióval való vizsgálata is végig negatív maradt. Valószínűsíthető, hogy akár egy korábbi mintavétel, valamint a tojócső több szakaszát is érintő további laboratóriumi feldolgozás értékelhetőbb eredményt hozott volna a tojócsőben lejátszódó folyamatok pontos menetének megértéséhez. Ennek ellenére az általunk kapott és több szerző munkájában is leírt szegényes eredmények alapján az is elképzelhető, hogy a ciszták képződését a tojócső embrionális fejlődésének végső, kelés utáni szakaszában a vírusherélés másodlagos következményeként bekövetkező zavar okozza. A tojócső falában detektálható elváltozások, a vírusantigén, a fokozott folyadéktermelésre utaló váladéktermelő sejtek/mirigyek hiánya, a minden esetben a tojócső végső szakaszában kialakuló szűkület és az ettől craniálisan felgyülemplő folyadék, arra enged következtetni, hogy az elzáródás a kloákába való szájadzás területén kell, hogy kialakuljon. A Müller-vezeték fejlődésének végső, posztembrionális szakaszában történik a tojócső coprodeumba való szájadzása, ami biztosítja az összeköttetést a kloáka és a vagina között. Ez a megnyílás a kelést követő egy héten belül fejeződik be (Pécely, 1987). Az ebben az időszakban bekövetkező bármely gyulladással, vagy szövethárosodással kísért hatás esetén sérülhet a fiziológias folyamat, ami a vezeték beszájadásának részleges, vagy teljes hiányával járhat. Ha figyelembe vesszük az IB vírus nagyfokú affinitását a bélhez, különösen annak a hátsó szakaszaihoz, nem kizárható, hogy a korai fertőzést követően a kloáka tájékán megjelenő vírusok által okozott gyulladós reakció másodlagos következménye a tojócső elzáródása, illetve megnyílásának az elmaradása. Ez magyarázná az összes,

témában megjelent kísérleti eredményt is, miszerint az elváltozás csak a kelést követő rövid időn belül bekövetkező fertőzés esetén manifesztálódik. Természetesen ahhoz, hogy a feltételezés igazolható legyen, további, a tojócső egészét és a kloáka érintett szakaszait is magában foglaló morfológiai és a vírus kimutatására irányuló vizsgálatok szükségesek.

A petefészket a korábbi vizsgálatok többségében nem, vagy csak a tojócsővel közösen vizsgálták. Mind a naposkori (Crinion és mtsai., 1971a; b; Jones és Jordan, 1972), mind pedig az ivarérett kori (Jones és Jordan, 2006; Chousalkar és mtsai., 2007) fertőzést követően az elváltozást mutató tojócső mellett intakt petefészket találtak. Crinion (1971a) valamint Terregino és munkatársai (2008), valamint Jones és Jordan (1972; 2006) ugyan vírusizolálással igazolta a vírus jelenlétét az ováriumban, szövettani elváltozást, illetve vírusantigént nem tudtak kimutatni. Hasonló eredményre jutottunk mi is, bár kisszámú minta esetén észleltünk enyhe gyulladással besűrűsödést a szövetközi állományban, illetve elmeszesedést a primer tüszőkben. Ezek a jelenségek fokozottabban jelentkeztek a szlovák QX és a 793/B törzzsel fertőzött csoportban. A vírus RNS kimutatás esetünkben is igazolta a vírus jelenlétét, jelentősebb titereket a 4. és 11. nap között a QX szerotípus törzseivel fertőzött csoportokban kaptunk, különösen kiemelkedő értékkel a szlovák izolátum esetén. Nem zárható ki azonban az a lehetőség sem, hogy az IB vírussal történő fertőzést követő virémia során – kimutatható petefészek elváltozás nélkül – neuro-hormonális mechanizmus révén csökken a petefészek működése és a tüszőérés intenzitása, amely más betegségek esetén is gyakran megfigyelhető (Glávits, személyes közlés, 2010)

A herék vizsgálatával egy nemrégiben felmerült problémára szeretnénk volna választ kapni, miszerint vadvírus fertőzés, vagy ismételt IBV vakcinázás hatására fokozott kőképződés indulhat meg a herében és a mellékherében, ami a későbbiekben a termékenység romlásához vezethet (Boltz és mtsai., 2004; Villareal és mtsai., 2006). A jelenséggel már Mahecha és munkatársai (2002) is foglalkoztak, miután több esetben is kalcium (Ca) köveket találtak termékenységi problémával küzdő telepek kakasainak heréjében és mellékheréjében. Szövettani vizsgálattal a hámsejtekben Ca lerakódást és a környezetükben gyulladással besűrűsödést találtak. Megfigyeléseik szerint a kőképződés csak a házityúk kakasainál jelentkezik, egyéb baromfi fajokban és vadmadarakban nem számoltak be hasonló jelenségről. Esetünkben az IBV kóroki szerepét ELISA vizsgálatra alapozva kizárták, de nem tudtak összefüggést kimutatni az ivóvízzel, vagy a takarmánnyal bevitt fokozott mennyiségű kalciummal sem. Hasonlóan nem találtak összefüggést a szájon át bevitt Ca mennyisége és a herében kialakult jelenségek között Boltz és munkatársai (2004), akik Mass szerotípusú törzzsel végzett ismételt vakcinázást követően találtak a bántalommal. Vizsgálataik szerint a 26. hétre csökkent a kakasok spermatermelése, a vérük tesztoszteron koncentrációja

és a herék tömege. Az érintett egyedek kórszövettani vizsgálata alapján a here és a mellékhere csatornácskáiban kőképződést, a környezetükben pedig lympho-histiocytás beszűrődést állapítottak meg. A leírt kórszövettani képpel azonos leletet találtak Villareal és munkatársai (2006) is 57 hetes tenyészállományban, ahol a termékenységcsökkenést légzőszervi tünetek és vesekárosodás is megelőzte. A tüdőből, a veséből és a heréből sikeresen izolálták az IB vírust, amely szekvenálást követően D274 szerotípusnak bizonyult. Mass szerotípussal való kísérletes fertőzést követően a korábbiakban Crinion és munkatársai (1971a) is izolálni tudták a vírust a heréből a fertőzést követő 2. napon. A mi vizsgálatunkban a magyar QX, az M41 és a 793/B vírustörzsek hatását tanulmányoztuk a herékben. Az RRT-PCR-rel kimutatott RNS mennyisége a QX izolátum esetén magas volt, értéke nem maradt el a fertőzésben érintett más szervek eredményeitől. A magyar QX izolátum a 7. és 14. nap között adott pozitív reakciót, míg az M41 törzs csak a hetedik napon volt jelen a herékben kisebb mennyiségben, a 793/B törzset pedig a 4. napon tudtuk mérni alacsony titerben. A szövettani eredmények nem tükrözték ezt az egyértelmű különbséget, ugyanis elváltozásokat csak ritkán, a csoportok között nagyjából azonos megoszlásban találtunk. A megfigyelési idő alatt kőképződést, Ca lerakódást nem figyeltünk meg, csak a lympho-histiocytás beszűrődés utalt a vírus esetleges jelenlétére, bár az IHC reakcióval ezt nem sikerült megerősítenünk. Valószínűleg itt is arról van szó, hogy a virémia kapcsán a kórokozó eljut a herébe, akár meg is telepedhet, de termékenységet csökkentő károsító hatása, ha bekövetkezik, csak később, az ivaréretet követően jelentkezik. Az IHC és a kórszövettani vizsgálat pozitív eredményét valószínűleg elősegítette volna, ha a mintavétel nagyobb területeket foglalt volna magába.

A herék vizsgálatát ivarérett korú kakasokon is elvégeztük. A ráfertőzést követően itt csak 14 napig követtük a történéseket a légcsőben, vesében és a herében. Összességében a kórszövettani elváltozások mindhárom szervben enyhébben jelentkeztek és a mért vírustiterek is alacsonyabbak voltak. A naposkori fertőzéshez képest legjelentősebb csökkenést a légcsőben mértünk, ahol a kórszövettani elváltozások gyorsabb és enyhébb lefolyásúak voltak és mindhárom törzset csak igen alacsony titerben lehetett kimutatni. Legsúlyosabb szövettani károsodást az M41 törzssel fertőzött csoport légcsőveiben figyeltünk meg.

A vesében a szövettani elváltozások többsége a QX izolátum hatására jelentkezett, amit az RRT-PCR eredménye is megerősített. A két összehasonlító törzs esetén a mért titerek értéke elhanyagolható volt.

A herében szövettani elváltozást a naposkori fertőzéshez hasonlóan csak kis számú mintában találtunk, azonban itt az M41 törzs mintái negatívak maradtak. A gyulladással járó sejtes beszűrődés mellett egyéb lelet itt sem jelentkezett. Az RRT-PCR-el az M41 és

793/B törzs esetén mért értékek elhanyagolhatóak voltak, a QX izolátum pedig a naposkorinál mérthez képest alacsonyabb titerben volt jelen.

A magyar QX izolátum esetén mindkét korcsoportban igazolódott, hogy a vírus képes eljutni és feltehetően szaporodni a herében, azonban a következményes károsító hatás tanulmányozása érdekében egy hosszabb időtartamú megfigyelésre lenne szükség.

A fertőzés hatására kialakult ellenanyagválasz lefutása a két korcsoportban meglehetősen eltérően alakult.

Naposkori fertőzést követően, a magyar izolátummal fertőzöttet kivéve, minden csoportban a 14. napon mértünk először vadvírus fertőzésre jellemző magas titereket. A csoportok teljes áthangelódása azonban csak a 21. napra alakult ki. Ezzel szemben az ivarérett kakasoknál már a 7. napon áthangelódás volt mérhető, ami a 11. és 14. napra tovább növekedett. A napos és az ivarérett kakasok immunválasza közötti különbség az eltérő immunérettiséggel magyarázható, mivel a naposkorú állatok messze nem képesek olyan erős immunválaszra mint a megfelelő immunérettiséggel rendelkező kakasok. Hasonló eredményt kaptak Sun és munkatársai (2011) 20 napos csirkék három eltérő QX törzssel való fertőzését követően. Esetükben a 7. és 9. nap között mindhárom csoport közel 100%-ban áthangelódott a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA-val mért eredmények alapján.

A QX izolátumok átlagát tekintve az ellenanyagválasz kissé elmaradt az M41 és 793/B törzsek esetén mérthez képest. Egyenként vizsgálva a QX szerotípus törzseit azonban az látható, hogy míg a kínai izolátumnak igen erős volt az antigénhatása, a szlovák és a francia izolátum igen gyenge immunválaszt indukált. Mivel a vizsgált 5 QX izolátum genetikailag igen hasonló, nehéz elképzelni, hogy ilyen antigenitásbeli különbségek legyenek köztük. Valószínűbbnek látszik, hogy az általunk használt ELISA antigén valamilyen okból gyengébben reagál az említett két törzssel szemben termelődött ellenanyaggal.

A három vizsgált szerotípus szervezetre gyakorolt hatását mérlegelve, legkisebb pathogenitással és inváziós képességgel a 793/B törzs jellemezhető. A két másik szerotípushoz képest a légzőszervi elváltozások enyhébbek voltak és inkább csak a felső légutakat érintették. A többi vizsgált szerv közül csak a vékonybélben, a petefészekben és a herében tudtuk igazolni a jelenlétét, de mennyisége egyik szervben sem volt jelentős. A vesében és a vakbélbejárat nyiroktüszőjében alig, vagy nem találtunk a kórokozó jelenlétére utaló elváltozást, illetve RNS-t. Úgy tűnik, hogy ez a szerotípus kisebb inváziós képességgel és következményes károsító hatással rendelkezik, és így kevésbé hajlamos az említett szervekben való hosszú perzisztenciára. Ez ellentmond Dhinakar Raj és Jones (1996) által megfigyelteknek, miszerint brojler csirkékben ez a szerotípus hasmenéses tüneteket okozott, és a

laboratóriumi vizsgálatok alapján sokkal inkább mutatott enterotrop, mint pneumotrop tulajdonságot.

A szerológiai vizsgálat alapján ennek az izolátumnak volt a legerősebb antigénhatása, ami elképzelhető, hogy ebben az esetben egy önkorlátozó folyamatot jelentett, miután a nagy mennyiségben képződő humorális ellenanyagok megakadályozhatták a vírus hatékony perzisztálását a szervezeten belül.

A M41 törzs légzőszerveken kívüli hatása némileg enyhébb volt, mint ahogyan azt a szakirodalomban korábban publikált eredmények alapján vártuk. A légcsőben a QX szerotípussal azonos erősségű hatása volt, a tüdőben kissé elmaradt attól. A petevezetőt kivéve, a többi szervben vagy a mikroszkópos elváltozások, vagy a vírus RNS utalt a törzs jelenlétére, azonban az IHC vizsgálat egyik esetben sem igazolta annak tartós megtelepedését. Ezzel szemben Karaca (1990), Butcher (1990) és Owen és munkatársai (1991) vírusizolálással tartósabban, vagy magasabb titerben tudtak kimutatni valamely Mass szerotípusba tartozó törzset a vakbélbejárat nyiroktüszőkben. A vesékben is számos közlemény igazolta ezen törzsek károsító hatását (Jones, 1974; Owen és mtsai., 1981; Butcher és mtsai., 1990; Chen és mtsai., 1996), bár az eredmények alapján úgy tűnik, hogy csak néhány izolátum, bizonyos körülmények együttes fennállásakor idéz elő elváltozást. A tojócsőben a naposkori elváltozások megjelenése a '60-as években szinte minden esetben a Mass törzsek hatásának volt betudható (Crinion és Hofstad, 1971a; b; 1972; Jones és Jordan, 1970; 1972). A szülőpár állományok homológ szerotípussal való immunizálása megszüntette ezen kórkép kialakulását az utódállományokban. Mi ugyan maternális ellenanyaggal nem rendelkező SPF csibéket fertőztünk, a szerotípus tojócsőkárosító hatását mégsem észleltük.

A QX szerotípus törzsei a két referencia törzshöz képest jóval határozottabb inváziós képességet mutatattak, és ezáltal károsító hatásuk is kifejezettebb volt. A felső és alsóbb légutakban egyaránt erőteljes légzőszervi hatás mellett, kifejezetten magas vírustiter volt kimutatható a vékonybélben és a vakbélbejárat nyiroktüszőkben. Bár sok esetben következményes morfológiai elváltozást nem tudtunk kimutatni az általunk vizsgált metszetekben. A vírus izolálással, vagy immunfluoreszcenciás eljárással megerősített jelenléte mellett, korábbi kísérletekben is a szövettani elváltozások hiányát figyelték meg ezen szervekben (Ambali és Jones, 1990; Owen és mtsai., 1991; Dhinakar Raj és Jones, 1996). Ez alapján úgy tűnik, hogy az IB vírus szaporodása sem minden esetben von maga után szövetkárosodást és tüneteket. A bélben a tünetek kialakulását valószínűleg egyéb, fakultatív pathogén kórokozók együttes jelenléte segíti.

A vesében egyértelműen megmutatkozott az izolátumok kifejezett károsító hatása, ami megfelel a legtöbb, ezen szerotípussal kapcsolatos járványtani és kísérleti

megfigyelésnek (Liu és Kong, 2004; Beato és mtsai., 2005; 2006; Liu és mtsai., 2006; 2009; Zenella és mtsai., 2006; Gough és mtsai., 2008; Terregino és mtsai., 2008; Worthington és mtsai., 2008; Zou és mtsai., 2010; Han és mtsai., 2011; Sun és mtsai., 2011).

A petefészekben a QX szerotípus törzseit is csak alacsonyabb titerben tudtuk kimutatni és mivel kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre, nehéz megmondani, hogy a talált elváltozások valóban a vírus jelenlétének következményei-e? A tojócsőben mind az öt vizsgált QX izolátum kiváltotta az "áltojó-szindrómához" vezető cisztaszerű elváltozást. Ezt a kórformát csak viszonylag kisszámú gyakorlati esetben figyelték meg (Landman és mtsai., 2005; Beato és mtsai., 2005; 2006; Jones, személyes közlés, 2006; Worthington és mtsai., 2008), feltehetően a kialakulás szempontjából kritikus időszak rövidege, valamint a manifesztálódáshoz szükséges hosszú idő miatt.

A herében viszonylag magas titerben jelent meg a vírus, ami feltételezi az esetleges károsító hatás jelentkezését, de ennek pontos elbírálása egy hosszabb távú nyomon követést feltételez.

A QX izolátumokat egyenként és az összes vizsgált szerv figyelembe vételével értékelve, enyhe különbség látható az egyes törzsek között. Legerősebbnek a Kínából származó izolátum hatása tűnik. Ezt követte a szlovák, majd a görög izolátum, míg a magyar és a francia izolátum egyik szervben sem mutatott olyan kiemelkedő károsító hatást, mint amit a másik három csoport esetén láttunk. A kínai izolátum indukálta a legmagasabb ellenanyagválaszt és a legerősebb légzőszervi és tojócsőkárosító hatást annak ellenére, hogy nem találtunk olyan közleményt, ami Kínában a QX törzsek ivarszervi károsító hatásáról számolna be. A szlovák izolátum mutatkozott a leginkább nephropathogénnek és a petefészekben is kifejezetten magas titerben volt kimutatható. A vékonybélben és a vakbélbejárat nyiroktüszőkben a görög izolátum volt jelen legnagyobb mennyiségben, ami összefüggésben lehet azzal, hogy a törzs eredetileg az emésztőtraktusból lett izolálva. Az összes adatot figyelembe véve úgy tűnik, hogy ha sikerült volna a többi törzssel azonos titerben alkalmaznunk ezt az izolátumot, akkor más szervekben is erősebb károsító hatása jelentkezett volna. Habár az egyes QX izolátumok közti különbségek nem jelentkeztek olyan határozottan, általánosságban elmondható, hogy a két referens törzshöz képest magasabb titerben és hosszabb ideig lehetett kimutatni őket.

A mirigyegyomor vizsgálata egyik szerotípus esetén sem hozott értékelhető eredményt, annak ellenére, hogy a QX szerotípussal kapcsolatban több esetben is beszámoltak az előgyomor eltérő súlyosságú gyulladással megbetegedéséről (Wang és mtsai., 1996; Domanska-Blicharz és mtsai., 2006; Irvine és mtsai., 2010). A Kínában publikált irodalmi adatok alapján, bizonyos törzsekhez kötődően, egyre több esetben fordul elő a kórkép, így a jövőben ilyen kórbonctani lelet esetén mindenképpen

gondolni kell az IBV esetleges kóroki szerepére is. Ugyanakkor azt is figyelembe kell venni, hogy IBV fertőzés esetén, az esetek jelentős részében, mirigyesgyomor elváltozás hiányában is izolálni lehet (tojásoltással) a vírust ebből a szervből (Palya személyes közlés, 2010).

Az eredmények alapján látható, hogy a legfogékonyabb szerveket, vagyis a légcsövet és a vesét leszámítva, a kórszövettani és víruskimutatásra irányuló vizsgálatok eredményei nem mindig vannak összhangban. A vírus RNS jelenléte sok esetben nem, vagy csak ritkán járt szöveti reakció megjelenésével, illetve a vírusantigént csak nagyon rövid ideig és kevés mintában tudtuk kimutatni. Ennek feltehetően az az oka, hogy az RNS-t akkor is ki tudjuk mutatni, ha a vírus csak virémia útján jut el egy adott szervbe, de valós megtelepedés és szaporodás nem feltétlenül történik. A vírusantigén kimutatása jóval nehezebb az RNS-hez viszonyítva, azok felezési idejében meglévő jelentős különbség miatt, valamint mivel a monoklonális ellenanyaggal történő antigénkimutatás egy sokkal kevésbé érzékeny rendszer.

A kórszövettani és IHC eredményeket tovább befolyásolhatja, hogy egy adott szervnek legtöbb esetben csak bizonyos szegmensét és annak is csak egyetlen síkját vizsgáljuk, ami egy nagyméretű szerv, mint pl. a bél esetén nem feltétlenül tartalmaz elváltozást, esetleg nem reprezentálja megfelelően a szervben végbemenő folyamatokat. Az RRT-PCR-rel való szövetfeldolgozás esetén igyekeztünk azonos méretű mintákat eltávolítani és feldolgozni, ami mindig egy arányosan jóval nagyobb szervmennyiséget jelentett, mint a mikroszkóp alatt megjelenő egyetlen metszési sík. Mindezen nehézségeket és az eredményeinket figyelembe véve a további, IBV pathomechanizmusára irányuló vizsgálatok esetén célszerű lenne a nagyobb szervek több szakaszt érintő, célirányos mintázása, valamint a mintavétel fertőzést követő korábbi időbe történő eltolása és sűrítése is. Így elkerülhető lenne az adott szervekben a vírus korai megjelenéséből és kiürüléséből adódó negatív eredmények sora is. Valószínűleg legalább ennyire fontos lenne egy, a természetes fertőzési módot jobban modellező, aerosolos fertőzésben vizsgálni a pathogenitást.

9. Új tudományos eredmények

1. Fertőző bronchitis okozta esetekből, különböző országokból gyűjtött mintákból izoláltunk öt, a közelmúltban megjelent QX törzset.
2. Mind az öt vizsgált fertőző bronchitis vírus izolátum esetében bizonyítottuk azok szoros rokonságát a Kínában izolált QX törzssel, és elsőként határoztuk meg azok részleges S1 gén szekvenciáját.
3. Elsőként számoltunk be a QX szerotípus Szlovákiában és Görögországban való megjelenéséről.
4. Elsőként végeztünk el a QX szerotípus pathomechanizmusát elemző vizsgálatot és annak összehasonlítását a két legelterjedtebb európai (Massachusetts és 4/91) szerotípussal.
5. Napos korú csibék kísérletes fertőzését követően leírtuk a három vizsgált szerotípus által előidézett tüneteket, kórbonctani és kórszövettani elváltozásokat.
6. A kiválasztott szervekben kórszövettani, immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel összehasonlítottuk az egyes törzsek hatására kialakuló elváltozások súlyosságát, a vírusantigén jelenlétét és a vírusrészecskék mennyiségét.
7. A három szerotípus között és a szerotípuson belül, az öt QX izolátumot tekintve, jól érzékelhető eltéréseket figyeltünk meg. Legnagyobb patogenitással és legszélesebb szöveti affinitással a QX szerotípus, azon belül a kínai izolátum jellemezhető.
8. A QX izolátumok kifejezett légzőszervi és vesekárosító hatása mellett, ezen szerotípus esetén elsőként írtuk le a kísérletes fertőzést követően a tojócsőkárosodás kialakulását. Emellett megállapítottuk, hogy a vírus legnagyobb mennyiségben a vakbélbejárat nyiroktüszőkben volt kimutatható.
9. Az eredmények alapján az általunk vizsgált 793/B törzs kizárólag, az M41 pedig elsősorban légzőszervi típusnak bizonyult.
10. A vizsgált törzsek tekintetében kizártuk azok mirigygyulladás-gyulladás előidéző hatását.
11. Új magyarázatot adtunk az „áltozó-szindróma” kialakulásának pathomechanizmusára.
12. Kísérletes fertőzést követően elsőként bizonyítottuk az IBV megjelenését a herékben, mind naposkorú, mind ivarérett kakasok esetén.

10. Felhasznált irodalom

- Abdel-Moneim, A.S., Zlotowski, P., Veits, J., Keil, G.M., és Teifke, J.P. 2009. Immunohistochemistry for detection of avian infectious bronchitis virus strain M41 in the proventriculus and nervous system of experimentally infected chicken embryos. *Virology Journal*, 6: 15.
- Adzhar, A., Gough, R.E., Haydon, D., Shaw, K., Britton, P. és Cavanagh, D. 1997. Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. *Avian Pathology*, 26: 625-640.
- Albassam, M.A., Winterfield, R.W. és Thacker, H.L. 1986. Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases*, 30: 468-476.
- Alexander, D.J. és Gough, R.E. 1977. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. *Research in Veterinary Science*, 23: 344-347.
- Alexander, D.J., Gough, R.E. és Pattison, M. 1978. A long-term study of the pathogenesis of infection of fowls with three strains of avian infectious bronchitis virus. *Research in Veterinary Science*, 24: 227-233.
- Altarcha, B., Kojnok, J. és Varró, Cs. 1990. Isolation and characterization of new infectious bronchitis virus variants in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 38: 287-298.
- Alvarado, I.R., Villegas, P., El-Attrache, J. és Jackwood, M.W. 2006. Detection of Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus in broilers. *Avian Diseases*, 50: 292-297.
- Ambali, A.G. és Jones, R.C. 1990. Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases*, 34: 809-817.
- Armesto, M., Cavanagh, D. és Britton, P. 2009. The replicase gene of avian Coronavirus infectious bronchitis virus is a determinant of pathogenicity. *PLoS ONE*, 10: e7384.
- Bárány, L. 2011. A baromfi ágazat versenyképességének kritikus pontjai. Proceedings from 19. Derzsy Napok, Sárvár, Magyarország.
- Beach, J.R. és Schalm, O.W. 1936. A filterable virus, distinct from that of laryngotracheitis, the cause of respiratory disease of chicks. *Poultry Science*, 15: 199-206.
- Beato, M.S., De Battisti, C., Terregino, C., Drago, A., Capua, I. és Ortali, G. 2005. Evidence of circulation of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy. *Veterinary Record*, 156: 720.
- Beato, M.S., Ortali, G., Bianchi, E., Terregino, C. és Capua, I. 2006. Clinical disease caused by the Chinese variant of infectious bronchitis (QXIBV) in broiler and layer farms in Northern Italy. Proceedings from V. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses, Rauschholzhausen, Németország. pp: 157-160.
- Beaudette, F.R. és Hudson, C.B. 1937. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 90: 51-58.

- Bistyák, A. 2009. Intézeti vizsgálati anyagokban gyakrabban előforduló, vagy különleges kórképek: baromfi, galamb. *Proceedings from 18. Derzsy Napok, Zalakaros, Magyarország.*
- Bhattacharjee, P.S., Carter, S.D., Savage, C.E. és Jones, R.C. 1995. Re-excretion of infectious bronchitis virus in chickens induced by cyclosporin. *Avian Pathology*, 24: 435-441.
- Bijlenga, G., Cook, J.K.A., Gelb, J. Jr. és De Wit, J.J. 2004. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. *Avian Pathology*, 33: 550-557.
- Bochkov, Y.A., Batchenko, G.V., Shcherbakova, L.O., Borisov, A.V. és Drygin, V.V. 2006. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis virus in Russia. *Avian Pathology*, 35: 379-393.
- Boltz, D.A., Nakai, M. és Bahr, J.M. 2004. Avian Infectious Bronchitis Virus: A Possible Cause of Reduced Fertility in the Rooster. *Avian Diseases*, 48: 909-915.
- Bratu, H., Mikló, Cs., Mató, T., Benyeda, J., Péntzes, Z. és Palya, V. 2004. Epidemiology of avian infectious bronchitis virus in Hungary. Identification of a field recombinant IB. *Proceedings from IV. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses, Rauschholzhausen, Németország.* pp: 117-124.
- Broadfoot, D.I., Pomeroy, B.S. és Smith, W.M., Jr. 1956. Effects of infectious bronchitis in baby chicks. *Poultry Science*, 35: 757-762.
- Butcher, G.D., Winterfield, R.W. és Shapiro, D.P. 1990. Pathogenesis of H13 nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Diseases*, 34: 916-921.
- Butler, E.J., Curtis, M.J., Pearson, A.W. és McDougall, J.S. 1972. Effect of infectious bronchitis virus on the structure and composition of egg albumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23: 359-369.
- Callison, S.A., Hilt, D.A., Boynton, T.O., Sample, B.F., Robison, R., Swayne, D.E. és Jackwood, M.W. 2006. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens *Journal of Virological Methods*, 138: 60-65.
- Capua, I. és Alexander, D.J. 2004. Avian influenza: recent developments. *Avian Pathology*, 33: 393-404.
- Capua, I., Minta, Z., Karpinska, E., Mawditt, K., Britton, P., Cavanagh, D. és Gough, R.E. 1999. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). *Avian Pathology*, 28: 587-592.
- Cavanagh, D. és Davis, P.J. 1992. Sequence analysis of strains of avian infectious bronchitis coronavirus isolated during the 1960s in the U.K. *Archives of Virology*, 130: 471- 476.
- Cavanagh, D., Davis, P.J., Cook, J.K.A., Li, D., Kant, A. és Koch, G. 1992a. Location of amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, 21: 31-43.
- Cavanagh, D., Davis, P.J. és Cook, J.K.A. 1992b. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype, *Avian Pathology*, 21: 401-408.

- Cavanagh, D. 1997. *Nidovirales*: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Archives of Virology*, 142: 629-633.
- Cavanagh, D., Mawditt, K., Britton, P. és Naylor, C.J. 1999. Longitudinal studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28: 593- 605.
- Cavanagh, D. 2001. A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status. *Avian Pathology*, 30: 109-115.
- Cavanagh, D. 2003. Severe acute respiratory vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathology*, 32: 567-582.
- Cavanagh, D. és Naqi, S.A. 2003. Infectious bronchitis, in: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R. és Swayne, D.E. (Eds.), *Diseases of Poultry*, Iowa, 11th edition, Ames, Iowa State University Press. pp: 101-119.
- Cavanagh, D. 2005. Coronaviruses in poultry and other birds. Review article. *Avian Pathology*, 34: 439- 448.
- Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Review article. *Veterinary Research*, 38: 281-297.
- Chen, B.Y., Hosi, S., Nunoya, T. és Itkura, C. 1996. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. *Avian Pathology*, 25: 269-283.
- Chong, K.T. és Apostolov, K. 1982. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. *Journal of Comparative Pathology*, 92: 199-211.
- Chousalkar, K.K., Roberts, J.R. és Reece, R. 2007a. Comparative histopathology of two serotypes of infectious bronchitis virus (T and N1/88) in laying hens and cockerels. *Poultry Science*, 86: 50-58.
- Chousalkar, K.K., Roberts, J.R. és Reece, R. 2007b. Histopathology of two serotypes of infectious bronchitis virus in laying hens vaccinated in the rearing phase. *Poultry Science*, 86: 59-62.
- Cook, J.K.A. 1984. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathology*, 13: 733-741.
- Cook, J.K.A. 1971. Recovery of infectious bronchitis virus from eggs and chicks produced by experimentally inoculated hens. *Journal of Comparative Pathology*, 81: 203-211.
- Cook, J.K.A., Davison, T.F., Huggins, M.B. és McLaughlan, P. 1991. Effect of *in ovo* bursectomy on the course of an infectious bronchitis virus infection in line C white leghorn chickens. *Archives of Virology*, 118: 225-234.
- Cook, J.K.A., Orbell, S.J., Woods, M.A. és Huggins, M.B. 1996. A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793B). *Veterinary Record*, 138: 178-180.

Cook, J.K.A., Orbell, S.J., Woods, M.A. és Huggins, M.B. 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different liveattenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous types. *Avian Pathology*, 28: 471-479.

Cook, J.K.A., Huggins, M.B., Orbell, S.J., Mawditt, K. és Cavanagh, D. 2001. Infectious bronchitis virus vaccine interferes with the replication of avian pneumovirus vaccine in domestic fowl. *Avian Pathology*, 30: 233-242.

Crinion, R.A.P., Ball, R.A. és Hofstad, M.S. 1971a. Pathogenesis of oviduct lesions in immature chickens following exposure to infectious bronchitis virus at one day-old. *Avian Diseases*, 15: 32-41.

Crinion, R.A.P., Ball, R.A. és Hofstad, M.S. 1971b. Abnormalities in laying chickens following exposure to infectious bronchitis virus at one day-old. *Avian Diseases*, 15: 42-48.

Crinion, R.A.P. és Hofstad, M.S. 1972. Pathogenicity of four serotypes of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. *Avian Diseases*, 16: 351-363.

Cumming, R.B. 1963. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 39: 145-147.

Davelaar, F.G., Kouwenhoven, B. és Burger, A.G. 1984. Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in egg and brojler production in The Netherlands. *The Veterinary Quarterly*, 6: 114-120.

Derzsy, D. és Lomniczi, B. 1966. Occurrence of infectious bronchitis of poultry in Hungary. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 21: 194-196.

Darbyshire, J.H. és Peters R.W. 1984. Sequential development of humoral immunity and assessment of protection in chickens following vaccination and challenge with avian infectious bronchitis virus. *Research in Veterinary Science*, 37: 77-86.

De Haan, C.A., Masters, P.S., Shen, X., Weiss, S. és Rottier, P.J. 2002. The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. *Virology*, 296: 177-189.

De Wit, J.J., Mekkes, D.R., Kouwenhoven, B. és Verheijden, J.H.M. 1997. Sensitivity and specificity of serological tests for detection of infectious bronchitis virus induced antibodies in brojlers. *Avian Pathology*, 26: 105-118.

De Wit, J.J., de Jong, M.C.M., Pijpers, A. és Verheijden, J.H.M. 1998. Transmission of infectious bronchitis virus within vaccinated and unvaccinated groups of chickens. *Avian Pathology*, 27: 464-471.

De Wit, J.J. 2000. Detection of infectious bronchitis. *Avian Pathology*, 29: 71-93.

Dhinakar Raj, G. és Jones, R.C. 1996. Immunopathogenesis of infection in SPF chicks and commercial brojlers of a variant infectious bronchitis virus of economic importance. *Avian Pathology*, 25: 481-501.

Dhinakar Raj, G. és Jones, R.C. 1997. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in chicken. Review article. *Avian Pathology*, 26: 677-706.

Dolz, R., Pujols, J., Ordóñez, G., Porta, R. és Majó, N. 2006. Antigenic and molecular characterization of isolates of the Italy 02 infectious bronchitis virus genotype. *Avian Pathology*, 35: 77-85.

Domanska-Blicharz, K., Minta, Z. és Smietanka, K. 2006. Molecular studies on infectious bronchitis virus isolated in Poland. Proceedings from V. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses, Rauschholzhausen, Németország. pp: 147-153.

Escorcia, M., Fortoul, T.I., Petrone, V.M., Galindo, F., López, C. és Téllez, G. 2002. Gastric gross and microscopic lesions caused by the UNAM 97 variant strain of infectious bronchitis virus after the eighth passage in specific pathogen-free chicken embryos. *Poultry Science*, 81: 1647-1652.

Fabricant, J. 1998. The early history of infectious bronchitis. *Avian diseases*. 42: 648-650.

Geerligs, H.J., Boelm, G.J., Meinders, C.A.M., Stuurman, B.G.E., Symons, J., Tarres-Call, J., Bru, T., Vila, R., Mombarg, M., Karaca, K., Wijmenga, W. és Kumar, M. 2011. Efficacy and safety of an attenuated live QX-like infectious bronchitis virus strain as a vaccine for chickens. *Avian Pathology*, 40: 93-102.

Gough, R.E., Randall, C.J., Dagless, M., Alexander, D.J., Cox, W.J. és Pearson, D. 1992. A new strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Veterinary Record*, 130: 493-494.

Gough, R.E., Cox, W.J., Gutierrez, E., MacKenzie, G., Wood, A.M., és Daglass, D.M. 1996. Isolation of 'variant' strains of infectious bronchitis virus from vaccinated chickens in Great Britain. *The Veterinary Record*, 139: 552.

Gough, R.E., Drury, S.E., Culver, F., Britton, P. és Cavanagh, D. 2006. Isolation of a coronavirus from a green-cheeked Amazon parrot (*Amazon viridigenalis* Cassin). *Avian Pathology*, 35: 122-126.

Gough, R.E., Cox, W.J., Welchman, D.deB., Worthington, K.J. és Jones R.C. 2008. Chinese QX strains of infectious bronchitis virus isolated in the UK. *Veterinary Record*, 162: 99.

Han, Z., Sun, C., Yan, B., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Zhang Q., Ma, Y., Shao, Y., Liu, Q., Kong, X. és Liu, S. 2010. A15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China. *Infection, Genetic and Evolution*, doi:10.1016/j.meegid.2010.09.002

Hesselink, W.G 1991. Serotyping avian infectious bronchitis virus: selection of a unified method. Proceedings of the II International Symposium on Infectious Bronchitis Rauschholzhausen, Németország. pp. 87-97.

Hewson, K.A., Ignjatovic, J., Browning, G.F., Devlin, J.M. és Noormohammadi, A.H. 2011. Infectious bronchitis viruses with naturally occurring genomic rearrangement and gene deletion. *Archives of Virology*, 156: 245-252.

Horn, P. 2009. A baromfiágazat versenyképessége a világ élelmiszer-ellátásában. Proceedings from MOÁE Baromfi-egészségügyi Társasága 50 éves jubileumi kongresszusa, Budapest, Magyarország.

Hughes, L.A., Savage, C., Naylor, C., Bennett, M., Chantrey, J. és Jones, R.C. 2009. Genetically Diverse Coronaviruses in Wild Bird Populations of Northern England *Emerging Infectious Diseases*, 15: 1091-1094.

Ignjatovic, J. és Galli, L. 1994. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Archives of Virology*, 138: 117-134.

Ignjatovic, J. és Sapats, S. 2000. Avian infectious bronchitis virus. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Epizooties*, 19: 493-508.

Ignjatovic, J., Gould, G. és Sapats, S. 2006. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Archives of Virology*, 151: 1567-1585.

Irvine, R.M., Cox, W.J., Ceeraz, V., Reid, S.M., Ellis, R.J., Jones, R.C., Errington, J., Wood, A.M., McVicar, C. és Clark, M.I. 2010. Detection of IBV QX in commercial broiler flocks in the UK. *Veterinary Record*, 167: 877-879.

Jackwood, M.J., Brown, T.P. és Huff, G.R. 2005. Reproduction of proventriculitis in commercial and specific-pathogen-free broiler chickens. *Avian Diseases*, 49: 352-360.

Jackwood, M.W., Boynton, T.O., Hilt, D.A., McKinley, E.T., Kissinger, J.C., Paterson, A.H., Robertson, J., Lemke, C., McCall, A.W., Williams, S.M., Jackwood, J.W. és Byrd, L.A. 2010. Emergence of a group 3 coronavirus through recombination. *Virology*, 398: 98-108.

Johnson, M.A., Pooley, C., Ignjatovic, J. és Tyack, S.G. 2003. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *Vaccine*, 21: 2730-2736.

Jones, R.C. és Jordan, F.T.W. 1970. The exposure of day-old chicks to infectious bronchitis and the subsequent development of the oviduct. *Veterinary Record*, 87: 504-505.

Jones, R.C. és Jordan, F.T.W. 1971. The site of replication of infectious bronchitis virus in the oviducts of experimentally infected hens. *Veterinary Record*, 89: 317-318.

Jones, R.C. és Jordan, F.T.W. 1972. Persistence of the virus in the tissues and development of the oviduct in the fowl following infection at day-old with infectious bronchitis virus. *Research in Veterinary Science*, 13: 52-60.

Jones, R.C. 1974. Nephrosis in laying chickens caused by Massachusetts-type infectious bronchitis virus. Short Communication. *Veterinary Record*, 319: 319.

Jones, R.C. és Ambali, A.G. 1987. Re-excretion of an enterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day old. *Veterinary Record*, 120: 617-619.

Jones, R.C., Worthington, K.J. és Gough, R.E. 2005a. Detection of the Italy 02 strain of infectious bronchitis virus in the UK. *Veterinary Record*, 156: 260.

Jones, R.C., Worthington, K.J., Capua, I. és Naylor, C.J. 2005b. Efficacy of live infectious bronchitis vaccines against a novel European genotype, Italy 02. *Veterinary Record*, 156: 646-647.

Jones, R.C. és Jordan, F.T.W. 2006. Variation in effects of infectious bronchitis virus on the reproductive performance of individual laying hens: an experimental study. Proceedings from V. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses, Rauschholzhausen, Németország. pp: 276-285.

Jonassen, C.M., Kofstad, T., Larsen, I.L., Lovland, A., Handeland, K., Follestad, A. és Lillehang, A. 2005. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting greylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columba livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *Journal of General Virology*, 86: 1597-1607.

Jungherr, E.L., Chomiak, T.W. és Luginbuhl, R.E. 1956. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis. In Proceedings of the 60th Annual Meeting of the United States Livestock Sanitary Association, Chicago, Illinois, USA. pp: 203-209.

Karaca, K., Naqi, S.A., Palukaitis, P. és Lucio, B. 1990. Serological and molecular characterization of three enteric isolates of infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Diseases*, 34: 899-904.

Kinde, H., Daft, B.M., Castro, A.E., Bickford, A.A., Gelb, J. és Reynolds, B. 1991. Viral pathogenesis of a nephrotropic infectious bronchitis virus isolated from commercial pullets. *Avian Diseases*, 35: 415-421.

Kotani, T., Shiraishi, Y., Tsukamoto, Y., Kuwamura, M., Yamate, J., Sakuma, S. és Gohda, M. 2000. Epithelial cell kinetics in the inflammatory process of chicken trachea infected with infectious bronchitis virus. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 62: 129-134.

Kottier, S.A., Cavanagh, D. és Britton, P. 1995. Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*, 213: 569-580.

Krapez, U., Slavec, B. és Rojs, O.Z. 2011. Circulation of infectious bronchitis virus strains from Italy 02 and QX genotypes in Slovenia between 2007 and 2009. *Avian Diseases*, 55: 155-161.

Kusters, J.G., Niesters, H.G.M., Lenstra, J.A., Horzinek, M.C. és Van Der Zuest, B.A.M. 1989. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology*, 169: 217-221.

Lai, M.M. és Cavanagh, D. 1997. The molecular biology of coronaviruses, *Advances in Virus Research*, 48: 1-100.

Lambrechts, C., Pensaert, M. és Ducatelle, R. 1993. Challenge experiments to evaluate cross-protection induced at the trachea and kidney level by vaccine strains and Belgian nephropathogenic isolates of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, 22: 577-590.

Landman, W.J.M., Dwars, R.M. és De Wit, J.J. 2005. High incidence of false layers in (re)production hens supposedly attributed to a juvenile infectious bronchitis virus infection. Proceedings from 14th World Veterinary Poultry Congress, Istambul, Törökország. pp: 369.

Lee, C.W., Brown, C., Hilt, D.A. és Jackwood, M.W. 2004. Nephropathogenesis of chickens experimentally infected with various strains of infectious bronchitis virus. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 66: 835-840.

- Lim, T.H., Lee, H.J., Lee, D.H., Lee, Y.N., Park, J.K., Youn, H.N., Kim, M.S., Lee, J.B., Park, S.Y., Choi, I.S. és Song, C.S. 2011. An emerging recombinant cluster of nephropathogenic strains of avian infectious bronchitis virus in Korea. *Infection, Genetetic and Evolution*, 11: 678-685.
- Liu, S. és Kong, X. 2004. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. *Avian Pathology*, 33: 321-327.
- Liu, S., Chen, J., Chen, J., Kong, X., Shao, Y., Han, Z., Feng, L., Cai, X., Gu, S. és Liu, M. 2005. Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas crecca*). *Journal of General Virology*, 86: 719-725.
- Liu, S.W., Zhang, Q.X., Chen, J.D., Han, Z.X., Liu, X., Feng, L., Shao, Y.H., Rong, J.G., Kong, X.G. és Tong, G.Z. 2006. Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Archives of Virology*, 151: 1133-1148.
- Liu, S.W., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Han, Z., Shao, Y., Li, H. és Kong, X. 2009. Molecular characterization and pathogenicity of infectious bronchitis coronaviruses: complicated evolution and epidemiology in china caused by cocirculation of multiple types of infectious bronchitis coronaviruses. *Intervirology*, 52: 223-234.
- Lomniczi, B. és Stiptkovits L. 1968. Serologic investigations for the diagnosis of infectious bronchitis in Hungary. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 23: 600-603.
- Lucio, B. és Fabricant, J. 1990. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases*, 26: 508-51.
- Ma, F.L., Fu, X.L., Chen, G.Z., Jia, S.Y., Chen, R.M., Liu, W.S. és Xuan, H. 2004. The isolation, identification and experimental vaccination of avian infectious bronchitis virus causing proventriculitis. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 24: 225-227.
- Mahecha, G.A., Oliveira, C.A., Balzuweit, K. és Hess, R.A. 2002. Epididymal lithiasis in roosters and efferent ductule and testicular damage. *Reproduction*, 124: 821-834.
- Mardani, K., Noormohammadi, A.H., Ignjatovic, J. és Browning, G.F. 2010. Naturally occurring recombination between distant strains of infectious bronchitis virus. *Archives of Virology*, 155: 1581-1586.
- Mató, T., Farkas, T., Kardi, V., Benyeda, Zs., Péntzes, Z., Kiss, I. és Palya, V. 2007. Magyarországi fertőző bronchitis izolátumok filogenetikai vizsgálata. Proceedings from MTA Állatorvos-Tudományi Bizottsága, Szent István Egyetem Állatorvos-Tudományi Kar Doktori Iskola Akadémiai Beszámoló: Immunológia, bakterológia, virológia, Budapest, Magyarország. pp: 13.
- McDougall, J.S. 1968. Infectious bronchitis in laying fowls: its effect upon egg production and subsequent egg quality. *Veterinary Record*, 83: 84-86.
- McDougall, J.S. 1969. Avian infectious bronchitis virus: the protection afforded by an inactivated virus vaccine. *Veterinary Record*, 85: 378-381.
- McMartin, D.A. 1993. Infectious bronchitis. In J. B. McFerran. és M. S. McNulty (Eds) *Virus Infections of Vertebrates. Virus Infections of Birds*, Vol. 4, Amsterdam: Elsevier Science Publis. pp: 249-275.

- Meulemans, G., Carlier, M.C., Gonze, M., Petit, P. és Vandebroek, M. 1987. Incidence, characterization and prophylaxis of nephropathogenic avian infectious bronchitis viruses. *Veterinary Record*, 120: 205-206.
- Mockett, A.P.A., Cavanagh, D. és Brown, T.D.K. 1984. Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41. *Journal of General Virology*, 65: 2281-2286.
- Mockett, A.P.A. és Cook, J.K.A. 1986. The detection of specific IgM to infectious bronchitis virus in chicken serum using an ELISA. *Avian Pathology*, 15: 437- 446.
- Muradrasoli, S., Bálint, A., Wahlgren, J., Waldenström, J., Belák, S., Blomberg, J. és Olsen, B. 2010. Prevalence and phylogeny of coronaviruses in wild birds from the Bering Strait area (Beringia). *PLoS One*, 5: e13640.
- Nakamura, K., Cook, J.K.A., Otsuki, K., Huggins, M.B. és Frazier, J.A. 1991. Comparative study of respiratory lesions in two chicken lines of different susceptibility infected with infectious bronchitis virus: histology, ultrastructure and immunohistochemistry. *Avian Pathology*, 20: 241-257.
- Otsuki, K., Huggins, M.B. és Cook, J.K.A. 1990. Comparison of the susceptibility to avian infectious bronchitis virus infection of two inbred lines of white leghorn chickens. *Avian Pathology*, 19: 467-475.
- Owen, R.L., Cowen, B.S., Hattel, A.L., Naqi, S.A. és Wilson, R.A. 1991. Detection of viral antigen following exposure of one-day old chickens to the Holland-52 strain of infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, 20: 663-673.
- Palya, V., Mató, T., Péntzes, Z. és Bratu, H. 2007. Az IBV újabb szerotípusának megjelenése- járványtani és patológiai megfigyelések. Proceedings from 15. Derzsy napok, Balatonfüred, Magyarország.
- Palya, V. és Benyeda, J. 2009. A házityúk betegségei hazai helyzetének áttekintése az elmúlt 50 évben. Proceedings from MOÁE Baromfi-egészségügyi Társasága 50 éves jubileumi kongresszusa, Budapest, Magyarország.
- Parsonss, D., Ellis, M.M., Cavanagh, D. és Cook, J.K.A. 1992. Characterisation of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. *Veterinary Record*, 131: 408-411.
- Pejkovski, C., Davelaar, F.G. és Kouwenhoven, B. 1979. Immunosuppressive effect of infectious bursal disease virus on vaccination against infectious bronchitis. *Avian Pathology*, 8: 95-106.
- Pensaert, M.B., Debouck, P. és Reynolds, D.J. 1981. An immunoelectron microscopic and immunofluorescent study on the antigenic relationship between the coronavirus-like agent, CV 777, and several coronaviruses. *Archives of Virology*, 68: 45-52.
- Pensaert, M. és Lambrechts, C. 1994. Vaccination of chickens against a Belgian nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus B1648 using attenuated homologous and heterologous strains. *Avian Pathology*, 23: 631-641.
- Pécely P. A nőtény madarak ivarszerveinek szerkezete és a petesejt képződése. 1987. In: A madarak szaporodásbiológiája. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, Magyarország. pp: 11-46.

- Pénzes, Z., Soós, P., Jorge, C., Glávits, R., Zolnai, A., Benyeda, Zs. és Palya, V. 2010. A fertőző bronchitis elleni vakcinázás hatásának nyomon követése brojler csirkék légsőmintáinak laboratóriumi vizsgálatával. Proceedings from 18. Derzsy napok, Balatonalmádi, Magyarország.
- Picault, J.P., Drouin, P., Lamande, J., Allee, C., Toux, J.Y., Le Coq, H., Guittet, M. és Bennejean, G. 1995. L'épizootie récente de bronchite infectieuse aviaire en France: importance, evolution et etiologie. Proceedings of the 1eres Journée de la Recherche Avicole, Angers, Franciaország. pp: 177-179.
- Purcell, D.A. és McFerran, J.B. 1972. The histopathology of infectious bronchitis in the domestic fowl. *Journal of Veterinary Science*, 13: 116-122.
- Randall, J.R. és Reece, R.L. 1996. Color Atlas of Avian Histopathology. Mosby-Wolfe, Elsevier Health Sciences, Maryland, USA. pp: 15-230.
- Seo, S.H. és Collisson, E.W. 1997. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. *Journal of General Virology*, 71:5173-5177.
- Smith, H.W., Cook, J.K.A. és Parsell, Z.E. 1985. The experimental infection of chickens with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *Journal of General Virology*, 66: 777-786.
- Song, C.S., Lee, Y.J., Lee, C.W., Sung, H.W., Kim, J.H., Mo, I.P., Izumiya, Y., Jang, H.K. és Mikami, T. 1998. Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus. *Journal of General Virology*, 79: 719-723.
- Sun, C., Han, Z., Ma, H., Zhang, Q., Yan, B., Shao, Y., Xu, J., Kong, X. és Liu, S. 2011. Phylogenetic analysis of infectious bronchitis coronaviruses newly isolated in China, and pathogenicity and evaluation of protection induced by Massachusetts serotype H120 vaccine against QX-like strains. *Avian Pathology*, 40: 43-54.
- Tarpey, I., Orbell, S.J., Britton, P., Casais, R., Hodgson, T., Lin, F., Hogan, E. és Cavanagh, D. 2006. Safety and efficacy of an infectious bronchitis virus used for chicken embryo vaccination. *Vaccine*, 24: 6830-6838.
- Terregino, C., Toffan, A., Beato, M.S., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., Ortali, G., Mancin, M. és Capua, I. 2008. Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathology*, 37: 487-493.
- Thornton, D.H. és Muskett, J.C. 1975. Effect of infectious bronchitis vaccination on the performance of live Newcastle disease vaccine. *Veterinary Record*, 96: 467-468.
- Toro, H., Van Santen, V.L., Hoerr, F.J., Li, L., Van Santen, E. és Lockaby, S. 2006. Immunodeficiency in chickens influences the pathologic outcome of infectious bronchitis Proceedings from V. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses. pp: 294-295.
- Xiao, C.T., Liu, R., Song, Z.Y., Liao, M. és Zhou, J.Y. 2010. Genomic characterization of a proventriculitis-associated infectious bronchitis coronavirus. *Virus Genes*, 40: 421-422.

- Van Santen V.L., Toro H., Van Ginkel F.W., Joiner K.S. és Hoerr F.J. 2006. Effects of CAV and/or IBDV on IBV infection and immune responses. Proceedings from V. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses, Rauschholzhausen, Németország. pp: 296-299.
- Villareal, L.Y.B., Assayag M.S., Brandao P.E., Chacón J.L.V., Maiorca P.C., Saidenberg A.B.S. és Ferreira A.J.P. 2006. Avian infectious bronchitis virus and avian pneumovirus associated with orchitis in roosters with decreased fertility Proceedings from V. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses, Rauschholzhausen, Németország. pp: 286-293.
- Villareal, L.Y.B., Brando, P.E., Chacon, J.L.V., Saidenberg, A.B.S., Assayag, M.S., Jones, R.C. és Ferreira A.J.P. 2007. Characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from enteric contents of Brazilian laying hens and broilers with diarrhoea. Proceedings from 15th World Veterinary Poultry Congress, Peking, Kína. pp: 166.
- Wang, Y.D., Wang, Y.L., Zhang, Z., Fan, G., Jiang, Y., Liu, X., Ding, J. és Wang, S. 1998. Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 15: 1-3.
- Winterfield, R.W. és Hitchner, S.B. 1962. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 23: 1273-1279.
- Worthington, K.J, Currie, R.J.W. és Jones, R.C. 2008. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathology*, 37: 247-257.
- Yachida, S., Sugimori, G., Aoyama, S., Takahashi, N., Iritani, Y. és Katagiri, K. 1981. Effectiveness of maternal antibody against challenge with infectious bronchitis viruses. *Avian Diseases*, 25: 736-741.
- Yu, L., Jian, Y., Low, S., Wang, Z., Nam, S.J., Liu, W. és Kwang, J. 2001. Characterisation of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculitis in vaccinated chickens. *Avian Diseases*. 45: 416-424.
- Zenella, A., Barbieri, I., Gavazzi, L. és Tosi, G. 2006. Avian infectious bronchitis: isolation of an umpteenth new serotype of virus in Italy. Proceedings from V. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses, Rauschholzhausen, Németország. pp: 161-168.
- Zhou, J., Yu, L., és Hong, J. 1998. Isolation, identification and pathogenicity of virus causing proventricular-type infectious bronchitis. *Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Diseases*, 20: 62-65.
- Zou, N.L., Zhao, F.F., Wang, Y.P., Liu, P., Cao, S.J., Wen, X.T. és Huang, Y. 2010. Genetic analysis revealed LX4 genotype strains of avian infectious bronchitis virus became predominant in recent years in Sichuan area, China. *Virus Genes*, 41: 202-209.

11. A témában megjelent tudományos publikációk

Benyeda, Zs., Rusvai, M. és Palya, V. 2009. A csirkék fertőző bronchitise. Irodalmi összefoglaló. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 131/4: 217-225.

Benyeda, Zs., Mató, T., Süveges, T., Szabó, É., Kardi, V., Abonyi-Tóth, Zs., Rusvai, M. és Palya, V. 2009. Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions. *Avian Pathology*, 38: 449-456.

Benyeda, Zs., Szeredi, L., Mató, T., Süveges, T., Balka, Gy., Abonyi-Tóth, Zs., Rusvai, M. és Palya, V. 2010. Comparative histopathology and immunohistochemistry of QX-like, Massachusetts and 793/B serotypes of infectious bronchitis virus infection in chickens. *Journal of Comparative Pathology*, 143: 276-283.

A témában tartott tudományos előadások

Mató T., Farkas T., Kardi V., **Benyeda Zs.**, Péntes Z., Kiss I. és Palya V.: Magyarországi fertőző bronchitis izolátumok filogenetikai vizsgálata. Akadémiai beszámoló, 2007. Budapest

Benyeda, Zs., Mató, T., Süveges, T. és Palya, V. (előadás): Comparison of pathogenicity of QX-like IBV strains from different pathological conditions. World's Poultry Congress, 2008, Brisbane, Ausztrália.

Benyeda Zs., Süveges T., Mató T., Glávits R., Rusvai M. és Palya V.: Különböző fertőző bronchitis törzsek összehasonlító kórszövettani vizsgálata. Akadémiai beszámoló, 2008. Budapest

Benyeda Zs., Mató T., Süveges T., Szabó É., Kardi V., Rusvai M. és Palya V.: A QX fertőző bronchitis törzsek összehasonlító patológiai vizsgálata. Derzsy Napok, 2008. Balatonalmádi

Benyeda, Zs., Szeredi, L., Palya, V. és Rusvai, M.: Immunohistochemical studies on traditional and recently emerged QX-like infectious bronchitis virus strains in chicken. Magyar Mikrobiológiai Társaság, 2008. Keszthely

Benyeda Zs.: A fertőző bronchitis aktuális problémái. Állatorvos Napok, 2008.
Harkány

Benyeda Zs., Mató T., Szeredi L., Rusvai M. és Palya V.: Fertőző bronchitis törzsek
herére gyakorolt hatásának vizsgálata. Akadémiai beszámoló, 2009. Budapest

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Rusvai Miklósnak a tudományos munkám anyagi és infrastrukturális feltételeinek biztosításában, a kutatás menetének irányításában, a kapott eredmények értékelésében és a publikációim kéziratának lektorálásában nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom Dr. Palya Vilmosnak, témabizottságom tagjának, hogy rám bízta a tudományos munkám gerincét képező kutatási témát, hogy biztosította a vizsgálattal járó infrastrukturális és szakmai háttérrel, valamint hogy folyamatos iránymutatásával segítette az eredmények értékelését és publikációim kéziratának javítását.

Köszönöm Dr. Glávits Róbertnek, témabizottságom tagjának, hogy páratlan kórszövettani ismereteivel hozzájárult a vizsgálat során keletkezett minták szövettani értékeléséhez, valamint, hogy segítséget nyújtott publikációim kéziratának javításában.

Köszönöm Dr. Bakonyi Tamásnak, témabizottságom tagjának, segített a munkához nélkülözhetetlen módszerek elsajátításában és az eredmények értékelésében.

Köszönettel tartozom a CEVA-PHYLAXIA Oltóanyagtermelő Zrt. akkori Virologiai Fejlesztés osztályán dolgozó Kardi Veronikának, Fodor Editnek, Varga Máriának, Katonáné Lénárd Magdolnának, Bratu Hajnalkának és Mató Tamásnak a kísérlet során végzett mintavételek, a minták feldolgozása és a módszerek betanulása során nyújtott önzetlen segítségéért. Külön köszönöm Mató Tamásnak a molekuláris biológiai módszerek és azok elméleti háttérének megismertetésében, valamint kivitelezésében nyújtott segítségét és hasznos iránymutatásait.

Dr. Süveges Tibornak köszönöm a kórszövettani leletek értékelésében nyújtott segítséget. Továbbá köszönettel tartozom Dr Szeredi Leventének és Ráczné Mészáros Ágnesnek az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzésében és kiértékelésében nyújtott segítségükért, valamint Popp Renátának a kórszövettani metszetek elkészítésében nyújtott alapos munkájáért.

Köszönettel tartozom a PROPHYL Kft-nek és az állatkísérleti munkában résztvevő munkatársainak, hogy biztosították az anyagi, személyi és infrastrukturális feltételeket a dolgozat kísérletes szakaszának elvégzéséhez.

Külön köszönöm továbbá volt kollégáimnak, Dr. Balka Gyulának, Dr. Baska Ferencnek, Dr. Demeter Zoltánnak, Dr. Dobos-Kovács Mihálynak, Dr. Gál Jánosnak, Dr. Jakab Csabának, Dr. Mándoki Mírának és Dr. Palade Elena Alinának, hogy együttműködésükkel és szakmai támogatásukkal hozzájárultak a dolgozatom elkészüléséhez.

Végül köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy állandó támogatásukkal lehetővé tették számomra hogy minél több időt és energiát fordíthassak kutatásaimra.