

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

**A sertések cirkovírus-2 típus és a sertések citomegalovírus okozta
megbetegedések komplex vizsgálata hazai állományokban**

PhD értekezés

Készítette:

Dr. Deim Zoltán

2006

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Iskolavezető:

Dr. Huszenicza Gyula, Dsc
Egyetemi tanár

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Glávits Róbert, kandidátus
témavezető
Országos Állategészségügyi Intézet

Dr. Tekes Lajos, kandidátus
főigazgató
Országos Állategészségügyi Intézet

Dr. Biksi Imre Ph.D.
diagnosztikai laboratóriumvezető
SZIE-ÁOTK, Nagyállatklinika Diagnosztikai laboratórium

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

.....
Dr. Huszenicza Gyula

.....
Dr. Deim Zoltán

Tartalomjegyzék

Rövidítések	4
1. Összefoglalás	5
2. Bevezetés	7
3. Irodalmi áttekintés	9
3.1. A sertések választás utáni cirkovírusos sorvadása	10
3.2. A sertések dermatitis nephropathia szindrómája (pdns)	11
3.3. A pcv-2 vírus szaporodásbiológiai kártétele	12
3.4. A sejtzárványos rhinitis	15
4. Anyag és módszer	17
4.1. Kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok	17
4.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok	18
4.3. Molekuláris biológiai/patológiai eljárások (pcr, ish)	18
4.3.1. Polimeráz láncreakció (pcr)	18
4.3.2. In situ hibridizáció (ish)	20
5. Eredmények	23
5.1. A cirkovírusos fertőzöttség előfordulása Magyarországon	23
5.2. A sertések választás utáni cirkovírusos sorvadása (pmws)	28
5.3. A sertések dermatitis nephropathia szindrómája (pdns)	35
5.4. A pcv-2 replikáció és a szöveti elváltozások közötti összefüggés	43
5.5. A pcv-2 vírus szaporodásbiológiai kártétele	45
5.6. A sejtzárványos rhinitis	49
6. Megbeszélés	54
6.1. Legfontosabb eredmények	60
8. Publikációk	68
9. Köszönetnyilvánítás	70

Rövidítések

bp	bázispár
cDNS	<i>copy</i> dezoxi-ribonukleinsav
DEPC	<i>diethyl-pyrocarbonate</i>
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
DTT	<i>dithiothreitol</i>
IF	<i>immunfluorescent</i>
IH	<i>immunohistochemistry</i>
IIF	<i>indirect immunfluorescens</i>
ISH	<i>in situ hybridization</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
M-MLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
NTB/BCIP	<i>4-nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCMV	<i>porcine cytomegalovirus</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCV-2	<i>porcine circo virus type 2</i>
PDNS	<i>porcine dermatitis-nephropathia</i>
PMWS	<i>post-weaning multisystemic wasting syndrome</i>
PRRSV	<i>porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i>
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
UP	<i>ultra puriss</i>
VN	<i>virusneutralization</i>

1. Összefoglalás

Kutatásom során a sertések cirkovírus-2 (PCV-2) és a sertések citomegalovírusa (PCMV) okozta fertőzéseket, illetve kórképeket vizsgáltam. A magyarországi sertés állományokban eddig a járványtani, valamint molekuláris biológiai vizsgálatok komplex értékelése nem történt, ezért vizsgálataim a vírus, illetve az általa okozott kórképek elterjedésének pontosabb kórjelzésének megismerésére irányult. Vizsgáltam a vírusok által okozott szöveti elváltozásokat, és a vírus DNS-ek szekvenciáját molekuláris biológiai módszerekkel. Szükségesnek tartottam a pontosabb diagnózis, valamint a kutatás érdekében antigén és DNS kimutatási módszerek kifejlesztését. Ennek érdekében kidolgoztam a PCV-2-re és a PCMV-re specifikus *in situ* hibridizációs, valamint a PCV-2 kimutatását segítő immunhisztokémiai módszert. Ezek segítségével tanulmányoztam a vírusok támadáspontját a szervekben, illetve szövetekben, valamint a szaporodásuk során okozott kártételt.

A fent említett vírusok elterjedésére vonatkozó adatokat az Országos Állategészségügyi Intézet Emlős- Kórbonctani és Vadbetegségek Osztályára beérkező sertés hullák, valamint a helyszíni szemlék során gyűjtött minták alapján állítottam össze és értékeltem.

A 2003-2005 közötti időszakban 1250 sertés szerveit vizsgáltam molekuláris biológiai módszerrel (PCR), a PCV-2 fertőzöttség szempontjából. Ennek során 1190 esetben (95,2 %-os) találtam pozitivitást. A cirkovírusos fertőzés PMWS formáját – a klinikai tünetek és a patomorfológiai elváltozások alapján – 789 (63,12 %) sertésnél állapítottam meg, és ezekben PCR vizsgálatok PCV-2 szempontjából valamennyi esetben pozitív eredményt adtak. Ezekben az esetekben szövődményes baktériumos tüdőgyulladást és a bélcsatornára szorító baktériumos fertőzéseket, esetenként szepitkémiaát (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.* stb.) találtam. A PDNS -t ugyanebben az időszakban 34 (2,72 %) esetben állapítottam meg.

A vizsgálataim során 367 (29,36 %) sertésnél találtam PCV-2 pozitivitást, olyan esetekben, amik a PMWS vagy a PDNS klinikai, és kórszöveti elváltozásai nem mutatkoztak. Annak felderítésére, hogy a PMWS-t és a PDNS-t azonos vírus okozza-e, a vírusokat szekvencia analízissel vizsgáltam. A vizsgálataim során megállapítottam, hogy a vírusok bázissorrendjében mutatkozott különbség, viszont ez az eltérés nem járt aminosav változással.

A vírus szaporodása és az általa okozott szöveti elváltozások közötti összefüggéseket a szervek kórszöveti vizsgálatával és a szervekben jelen lévő, a PCV-2 replikációs génszintézis RNS molekulák vizsgálatával tanulmányoztam. Ennek során megállapítottam, hogy a vírus szaporodása összefüggésben van a szervekben észlelhető elváltozásokkal.

A PCV-2 magzat károsító szerepét 25 alom magzataiban igazoltam. A fertőzés vetélésben, korafialásban, valamint gyenge életképességű magzatok születésében nyilvánult meg. Változó alomszám mellett, almon belül a magzatok méretbeli különbségét figyeltem meg. A vírus egyéb szervek – tüdő, lép, máj, vese, nyirokcsomó – mellett a thymust is károsította.

A sertések citomegalovírusa által előidézett sejtzárványos orrgyulladást Magyarországon először 2002-ben állapítottam meg. A 2003 és 2005 közötti időszakban 15 állományban észleltem a megbetegedést, valamint 49 állományból 35-ben találtam pozitívítást a vírus kimutatását célzó PCR vizsgálattal. A betegség megállapításához a klinikai tünetek és kórlefolyás mellett kórjelző értékű elváltozásnak ítéltam meg az ornyálkahártya mirigyhámsejtjeinek megnagyobbodásait és a basophil magzárványok jelenlétét. Ezek a zárványok nagy mennyiségű vírusrészecskét tartalmaztak, amelyet elektronmikroszkópos, valamint *in situ* hibridizációs technikával igazoltam. A hazai sertésállományokban három eltérő formája jelentkezett. Az egyik esetben előhasi kocákban koraellés, halvaszületés és vetélés jelentkezett, miután a kocákat a 60-70. vemhességi napon áthelyezték a vemhes kocaszállásra, ahol már az immunológiai szempontból áthangolódott kocákkal érintkeztek. Az ezt követő fialások komplikáció mentesen zajlottak. A fertőzésnek másik két formája a szopós malacokban jelentkezett. Egyrészt az újszülött malacok klinikai tünetek nélkül az élet első 24 órájában elhullottak, míg a másik forma esetében a 2 hetes malacoknál tüszögés, remegés és változó mértékű (20-40 %-os) elhullás jelentkezett.

2. Bevezetés

Az utóbbi években a hazai és külföldi sertésállományokban is több olyan vírushatás [sertések légzőszervi és szaporodási zavarát okozó vírus, (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV), a sertés cirkovírus 2 (Porcine Circovirus type 2, PCV-2)], valamint a sertés citomegalovírus (Porcine cytomegalovirus, PCMV) jelent meg, amelyek különböző szervek megbetegítésével, valamint az állatok védekező-mechanizmusának károsításával jelentős gazdasági veszteséget okoznak. Közülük egyes vírusok megváltoztatják (csökkentik, vagy kóros mértékben fokozzák) a légzőszervek (és az egész szervezet) fertőzések elleni védelmében kulcsszerepet játszó sejtek működését. A különböző szervek súlyos károsodása akár már önmagában is az állat elhullását okozhatja, de még lényegesebb, hogy a szervezet fogékonyává válik különböző, nagyrészt fakultatív patogén ágensek (baktériumok, gombák, protozoonok stb.) kártételével szemben. További közös jellemzője az említett fertőzéseknek, hogy járványtanuk, kórfejlődésük, a kórokozók szervezettel kialakított kölcsönhatása még csak részben, vagy egyáltalán nem tisztázott. Az említett vírusok közül tervezett kutatásaimban elsősorban a PCV-2-vel és a PCMV-vel foglalkoztam.

A PCV-2 okozta fertőzöttség leggyakrabban két eltérő klinikai, és kórtani formában jelentkezik. Az egyik forma a sertések ún. választás utáni cirkovírusos sorvadása (PMWS), amely elsősorban választás után (40-60 napos életkorú) állatokban fordul elő. A heveny esetek lázas hőmérsékletemelkedéssel, légzőszervi tünetekkel, valamint több-kevesebb elhullással járnak. Az elhúzódó forma – innen ered a tünetegyüttes elnevezése is –, az állomány szétnövését, fejlődésben való visszamaradást, valamint immunszuppressziót, következményes (leggyakrabban baktériumos) fertőzések előfordulását idézi elő. A PCV-2 okozta betegség másik lényeges megjelenési formája a dermatitis-nephropathia szindróma (PDNS), jellegzetes bőr- és veseelváltozásokkal jár. A vírus a lymphocytákban és a macrophagokban szaporodik, ennek megfelelően a lymphoid szervekben enyhébb-súlyosabb lymphocytá depletio, valamint a több szervben lympho-histiocytás beszűrődéssel és macrophag-proliferációval kísért interstitialis gyulladás figyelhető meg. A fertőzöttség kimutatására szerológiai, molekuláris biológiai, virológiai módszerek alkalmazhatók. A lymphocytá populációkban és a macrophagokban a vírus hatására bekövetkező változások, pl. áramlás-citometriai és *in situ* hibridizációs (ISH) módszerekkel detektálhatók.

A PCMV fertőzés egyes sertésállományokban gazdasági kártétellel is járó betegséget, ún. sejtzárványos rhinitist okoz. A betegséget Magyarországon 2002-ben állapították meg először Deim és mtsai (Deim és mtsai., 2003). A PCMV a betaherpes alcsaládba tartozó

cytomegalovírus, amely szintén a macrophagokban és a lymphocytákban, valamint az ornyálkahártya mirigyhámsejtjeiben szaporodik. A vírusfertőzés klinikai tünetekben megnyilvánuló formája szopós malacokban jelentkezik, és jelentős arányú elhullást okozhat. Hatására elsősorban a légzőszervekben és a nyirokszervekben jelentkezik lympho-histiocytás gyulladás. A vírusfertőzöttség igazolása szerológiai, molekuláris biológiai, virológiai módszerekkel lehetséges.

A tervezett kutatás során mindenekelőtt adatokat kívántam szerezni az említett vírusfertőzések hazai sertésállományokban tapasztalható elterjedtségéről. Ehhez statisztikailag érvényes véletlenszerű mintavételezést, valamint kórbonctani-kórszövettani, immunhisztokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztem. Kutatásom további célja volt annak vizsgálata, miként befolyásolja a PCV-2 és/vagy a PCMV fertőzés a sertések immunrendszerének működését. Az előbbieket mellett a fertőző eredetű betegségek diagnosztizálására az *in situ* hibridizációs (ISH) módszert fejlesztettem ki, és ennek segítségével tanulmányoztam a vírusok támadáspontját és kártételét. Vizsgálataim eredményei megítélésem szerint tudományos adatokat szolgáltathatnak a sertések immunrendszerének vírusfertőzés hatására bekövetkező károsodásáról, illetve az említett kórokozók hazai elterjedtségéről és kártételéről. A munka során szerzett tapasztalatok elősegíthetik a fentiekben említett kórképek diagnosztizálását.

3. Irodalmi áttekintés

Az elmúlt években külföldön és hazánkban jelentős mértékben elterjedtek és a kutatások középpontjába kerültek a sertések PCV-2 okozta betegségei, amelyek számos állományban jelentős gazdasági kártételt okoznak (Süveges, 2003). A vírus horizontálisan és vertikálisan (orr-, hüvely- és hörgőváladékkal, vizelettel, ondóval), valamint ragályfogó tárgyakkal egyaránt terjedhet. A vírus transplacentalisan bejuthat a magzatokba, és ezesetben a vemhességi kortól függően különböző magzatkárosodást válthat ki (Okuda et al., 2003). A vírus fajspecifikus, de nem sertés eredetű sejttenyészetekben is osztódásnak indul. A vírus szaporodása a szervezetben a lymphocytákban és a macrophagokban zajlik (Nielsen et al., 2003). Ennek következtében súlyos immunszuppresszió alakulhat ki, és más kórokozókkal szembeni immunválasz is hiányozhat (Segalés et al., 2001a., Nielsen et al., 2003). Az érintett állományokban a fakultatív patogén kórokozók gyakoribb szerephez jutása jelentős veszteségeket okozhatnak.

A *Circoviridae* víruscsaládba tartozó vírusok egyszálú DNS vírusok. Az egyszálú genom negatív irányítottságú, cirkuláris formájú. Viszonylag kis méretű ikozahedrális szimmetriájú, burok nélküli vírusok. A komplett genom kb. 1700-2400 bázispárt tartalmaz. A vírusok nukleokapszidja izometrikus, 17-24 nm átmérőjű.

A cirkovírusok számos más állatfajban is okozhatnak fertőzöttséget és megbetegedést, így a házi tyúknak, a papagájnak, a kanárinak, libának, kacsának, galambnak, sirálynak, sőt az embernek is van saját cirkovírusa (Bassami et al., 1998, Mankertz et al., 2000, Miyata et al., 1999, Phenix et al., 2001, Todd et al., 1991. Todd et al., 2001). A sertések cirkovírusának két típusa van, a PCV-1 és PCV-2. A PCV-1 sertésekben nem okoz betegséget, apatogén.

3.1. A sertések választás utáni cirkovírusos sorvadása

A PCV-2 oktani szerepet játszik a **sertések választás utáni cirkovírusos sorvadásában** (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, **PMWS**) (Allan et al., 2003 Ramos et al., 1997, Segalés et al., 1997, Smith et al., 1993), valamint a **sertések dermatitis nephropathia szindrómájában** (Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome: PDNS) (Rosell et al., 2000). Mindkét kórforma hazánkban is gyakorta előfordul (Dán et al., 2003, Kiss et al., 2000, Molnár et al., 2002). A cirkovírus egyes szerzők szerint a légzőszervi megbetegedés komplexben (porcine respiratory disease complex, PRDC) (Kim et al., 2003), a kocák vetéléseiben (West et al., 1999), és újabban a választott malacok bélgyulladásában (Kim et al., 2004a) is szerepet játszhat.

A PCV-2 okozta fertőzés klinikai és kórtani megjelenését illetően két, egymástól eltérő formában jelentkezik. A heveny forma esetén levertség, lázas hőemelkedés, valamint nehezített légzés jelentkezhet. Ezekben az esetekben a kórbonctani vizsgálat során súlyos fokú tüdőoedema, mellvízkór, szívburok vízkór, a nyirokcsomók megnagyobbodása figyelhető meg

A **PMWS** főként a választás utáni időszakban (esetleg a hízalási fázis első időszakában) az állatok fejlődésbeni elmaradásában, az állományok szétnövésében, elégtelen takarmány hasznosításban valamint másodlagos baktériumos és parazitás fertőzések gyakoribb előfordulásában (Allan et al., 2003, Süveges 2004) nyilvánulnak meg. A kórbonctani vizsgálat során a gyenge tápláltsági állapot mellett a perifériás és a belfodri nyirokcsomók jelentős megnagyobbodása, tüdőgyulladás, fundus tájéki gyomorfekély és a szövődményeknek megfelelő elváltozások figyelhetők meg. A kórszövettani vizsgálatokkal megállapítható elváltozások jól demonstrálják a vírus immunrendszert károsító hatását (Kim et al., 2003, Nielsen et al., 2003). A lymphoid szervekben (lép, nyirokcsomók, thymus) lymphocyta depletio, gócos elhalás, syntitialis óriássejtek, valamint esetenként basophil citoplazmazárványok mutatkoznak (Segalés et al., 2001b). A tüdőben a vírus gócos atelectasia mellett mononuclearis sejtes interstitialis gyulladást, macrophag proliferációt és ugyancsak syntitialis óriássejtek képződését idézi elő. Az agyvelőben esetenként perivascularis gyulladással sejtes érfalbeszűródések figyelhetők meg (Segalés et al., 2001b, Okuda et al., 2003).

3.2. A sertések dermatitis nephropathia szindrómája (PDNS)

A PDNS főleg idősebb életkorban, legtöbbször sporadikusan fordul elő, és kórtanilag vérzéses-elhalásos bőrgyulladásban, valamint interstitialis vesegyulladásban nyilvánul meg (Duran et al., 1997, Morilla et al., 2002, Smith et al., 1993, Thibault et al., 1998, Thomson et al., 2002). Kóroktana még ma sem egyértelműen tisztázott (Morilla et al., 2002, Duran et al., 1997, Thibault et al., 1998). Patogenezisében immunpatológiai folyamatokat (tartós antigén hatás, vírus, parazita, stb., és egyidejű ellenanyagképződés következtében immunkomplexek képződését és lerakódását) feltételezik, amely magyarázza a kórkép kísérletes előidézhetőségének nehézségét is. Egyre több adat támasztja alá – az említett kórfejlődést is feltételezve – a PCV-2 oktani szerepét (Rosell et al., 1999, Dán et al., 2003, Molnár et al., 2002). A PCV-2 a lymphocytákban és a macrophagokban szaporodik, ennek megfelelően az említett kórképekben a lymphoid szervekben enyhébb-súlyosabb fokú lymphocytá depletio, az egyéb szervekben pedig egyebek mellett lympho-histiocytás beszűrődéssel és macrophag-proliferációval kísért interstitialis gyulladás figyelhető meg (Smith et al., 1993).

A lymphocyták és a macrophagok PCV-2 okozta károsodását *in situ* hibridizációs és áramlás-citometriás vizsgálatok segítségével igazolták. A megbetegedések egyedi és/vagy állományszintű diagnosztizálására IF, IH, ELISA, PCR, ISH módszerek alkalmazhatók (Darwich et al., 2002).

A PCV-2 fertőzés mindkét megjelenési formája (különösen a PMWS), jelentős gazdasági kárt okozhat. Ez megnyilvánulhat az elhullások nagy számában, a szövödmények megelőzésére és a gyógykezeléshez alkalmazott antibiotikumok költségében, a gyenge takarmányhasznosulás következtében kialakuló megnövekedett takarmányfelvételben és a testtömeg gyarapodás elmaradásában.

A PCV-2 okozta betegségek számos sertéstelepen jelentős gazdasági veszteséget okoznak. Azokban az állományokban, ahol a PMWS kórforma tartósan jelen van, jelentős mértékű elhullás jelentkezik. Az érintett állományokban a morbiditás jelentősen eltérő, de általában 25-30 % közötti, míg a megbetegedett egyedekben a mortalitás közel 90 %-os. Done és munkatársai az Egyesült Királyságban végzett vizsgálataik során a cirkovírus fertőzéssel összefüggésben sertésenként 10 angol font veszteséget állapítottak meg, a sertés hizlalási költsége kilogrammonként 0,15 angol fonttal emelkedett. Pointon és munkatársai (1999) szerint az idült légzőszervi betegségekkel (*Pasteurella* és *Mycoplasma* tüdőgyulladás) és PCV-2-vel érintett állományokban a fejlődési erély 12-15 %-kal is csökkenhet, és 30 nappal meghosszabbodhat a hizlalási időszak. Az érintett állományokban a fajlagos

takarmányfelhasználás 13-20 %-kal nagyobb, az állatok testtömeggyarapodása egészséges társaihoz képest 25-30 %-kal maradt el. Az említett veszteségekhez még hozzájárul az elhullásból, a vágóhídi kobzásokból és technológiai selejtből képződő veszteség, valamint a gyógykezelésekre fordított költség. Magyarországon eddig nem történt gazdaságossági elemzés a sertések cirkovírus okozta kártételével kapcsolatban, de tapasztalataink szerint, figyelembe véve a hazai tartástechnológiai és takarmányozási viszonyokat, a pénzügyi veszteség a fent említett értékekhez képest hasonló vagy még nagyobb mértékű is lehet.

3.3. A PCV-2 vírus szaporodásbiológiai kártétele

Irodalmi adatok utalnak arra, hogy a PCV-2-nek szaporodásbiológiai zavarok előidézésében is lehet szerepe. West és mtsai 1999-ben vizsgálták a PCV-2 vertikális terjedését, valamint a vírussal kapcsolatos szaporodási zavarokat. A PCV-2 fertőzéssel kapcsolatban észleltek kocáknál vetélést, koraellést, valamint szívizom károsodást. Kutatásuk során a kocák vemhességének késői stádiumában történő vetéléseket és korafialásokat vizsgálták. Ennek során a magzatokból megkísérelték izolálni a vírust, valamint a magzatok szerveinek IH vizsgálatát végezték el a PCV-2 kimutatására. Az antigénkimutatás során (IH) minden esetben a máj, tüdő és a vesék tartalmaztak különböző mennyiségben cirkovírus antigént, míg egy esetben találtak a vírusfertőzéssel kapcsolatos szívizomgyulladást. Egyéb magzatkárosító és szaporodásbiológiai zavarokat okozó vírusokat, mint a PPV, PRRSV, encephalomyocarditis vírus és enterovirus jelenlétét is vizsgálták annak felderítése céljából, hogy a kocáknál jelentkező szaporodási zavart önmagában okozhat-e a PCV-2. A vizsgálatukba vont kocák magzatai az említett kórokozóktól mentesek voltak.

O'Connor és mtsai, 2001-ben egy 3000 kocás telepet vizsgáltak a kocák magas reprodukciós veszteségei miatt, ahol az almok 15 %-ánál mumifikációt, 8 %-nál koraellést, valamint 11 % választás előtti mortalitást figyeltek meg. Az általuk vizsgált telep kocái PPV, PRRSV, *Brucella* valamint Aujeszky-betegségtől mentes volt. A szaporodási zavarban elvetélt illetve korafialt kocák magzatainak vizsgálata során krónikus passzív bővérűséget, szívizom hypertrophiát és diffúz szívizomgyulladást észleltek. A PCV-2 jelenlétének igazolására PCR-t és vírusizolálást végeztek, az antigén kimutatását és a vírus okozta sejt illetve szöveti szintű károsodásokat IH módszerrel vizsgálták. Az érintett magzatok szerveinek vizsgálata során a vírus diffúz lympho-histiocytás szívizomgyulladást és hypertrophiát okozott. A tüdőben intralobularis interstitialis gyulladást figyeltek meg, és az interstitumba beszűrődött lymphocyták és histiocyták nagy mennyiségben tartalmaztak PCV-2

antigént. A lép vizsgálata során lymphocyta depletiót, és egyes esetekben megakariocyta proliferációt észleltek.

Mikkelsen és mtsai (2001) SPF állományban figyeltek meg PCV-2 fertőzéssel összefüggésbe hozható mumifikációt, vetélést és korafialást.

Kim és mtsai (2004b.,) 2000. október és 2002. szeptembere közötti időszakban elvetélt és korafialt almok retrospektív vizsgálatát végezték el, annak felderítése céljából, hogy a PCV-2 szerepet játszik-e a kocák vetélésében. A vírus jelenlét PCR, ISH és IH módszerekkel igazolták az archívumban lévő paraffinba ágyazott blokkokból. A vizsgálataik során 350 koraeltett vagy vetélt alom magzatainak szerveit vizsgálták. A 350 alom közül 46 (13,1 %) esetben igazolták a PCV-2 jelenlétét és magzatkárosító hatását. A vírust a vemhesség különböző stádiumában vetélt vagy korafialt magzatok esetében egyaránt igazolták, a vírus magzatkárosító hatásának a vemhes magzatok életkorához kapcsolódó összefüggését nem igazolták. A vírust elsősorban a lép, máj, vese, tüdő és thymus macrophagjaiban mutatták ki.

Park és mtsai (2005) kísérletes fertőzéssel próbálták a PCV-2 okozta magzatkárosító és a kocák szaporodási zavarát előidéző hatást reprodukálni. A kísérlet során 6 vemhes kocát fertőztek intranasalisan PCV-2-vel a várható fialás előtt három héttel. A fertőzött kocák egy része elvetélt, míg másik része a várható ellés időpontja előtt fialtak, a kísérletbe vont kettő koca, amelyeket nem fertőztek (negatív kontroll), klinikai tüneteket illetve rendellenes fialást nem mutattak. A vetélt és a korafialt almok magzatainak kórbonctani, kórszövettani és bakteriologia vizsgálata mellett a szervek PCV-2 antigén és DNS kimutatásának és a vírus replikációjának igazolása céljából ISH is IH módszereket alkalmaztak. Az immunrendszerhez tartozó szervek (nyirokcsomók, lép, tonsilla, thymus) vizsgálata során a vírust a lymphocytákban, histocytákban mutatták ki, valamint a lymphocyta depletiót észleltek. A tüdőben az interstitium lympho-histiocytás beszűrődését, illetve a szöveti monocyták PCV-2 pozitivitását figyelték meg. A májban a vírus antigént és DNS-t az interstitumba beszűrődött lymphocytákban, histiocytákban, valamint a Kupffer-sejtekben mutattak ki ISH és IH módszerekkel. Vizsgálati eredményeik alapján megállapították, hogy a vírus transzplacentárisan terjed, a magzatokban a PCV-2 szaporodik és a vírusnak szerepe lehet a kocák fertőző eredetű szaporodási zavarában.

Sanchez és mtsai. (2001) is vizsgálták a PCV-2 szaporodásbiológiai kártételét. Kutatásuk során vizsgálták a vírus szaporodását, és azt, hogy milyen hatással van a vemhesség különböző stádiumában lévő magzatokra a PCV-2 fertőzés. Ennek felderítése céljából, a kísérletbe vont vemhes kocák különböző vemhességi stádiumában lévő magzataikat fertőzték PCV-2-vel. Intrauterin, a magzati szikhólyagba jutattak PCV-2-t a vemhesség 57., 75. és 92.- napján, majd a fertőzést követő 21. napon a magzatokat

császármetszéssel eltávolították. Az eltávolított magzatok makroszkópos vizsgálata mellett a szervek szövettani vizsgálatát is elvégezték. Annak megválaszolására, hogy a vírus a magzati szervekben szaporodik-e, és hogy van sejtkárosító hatása, illetve a vírus sejtszintű támadáspontját megismerjék ISH és IH módszereket alkalmaztak. Emellett a vírus jelenlétét igazoló PCR-vizsgálatokat is végeztek. Vizsgálatik során megfigyelték, hogy a vírus mindhárom vemhességi stádiumban képes a magzatokat megfertőzni és azokban szaporodni is képes. Az antigén és DNS kimutatási módszerek (ISH, IH) segítségével megállapították azt is, hogy az 57. napon fertőzött magzatok esetében szignifikánsan magasabb volt a víruskoncentráció és intenzívebb volt a vírus szaporodása, a 75. és a 92. napon fertőzött magzatokhoz viszonyítva. A méhen belüli vírusterjedés kiderítése céljából egy méhen belül a magzatok egy részét fertőzték, így a nem fertőzött magzatok vizsgálata választ adott a kérdésre. A nem fertőzött magzatokban a molekuláris biológiai (PCR, ISH) és immunhisztokémiai módszerekkel nem mutattak ki PCV-2-t. A szervek PCR, ISH és IH vizsgálata során a szívizomban találtak legintenzívebb vírusszaporodást, valamint virális antigént tartalmazó sejteket. A magzatok PCV-2 elleni védekező képességének vizsgálata során a PCV-2 ellenanyagokat kizárólag azokban a magzatokban találtak, amelyeket a vemhesség 75. illetve 92. napján fertőztek.

Pensaert és mtsai (2004) a PCV-2 fertőzés magzatra gyakorolt hatását, valamint a fertőzést követő virémiát vizsgálták. Kísérletük során vírusszuspenzióval transzplacentárisan fertőztek kocákat, és vizsgálták a vírus terjedését és szaporodási helyét. A vérvizsgálati eredmények arra mutattak, hogy a szervezetbe került vírus keringhet szabadon vagy a perifériás vér mononukleáris sejtjeihez kötötten egyaránt. A vírus szaporodására vonatkozóan arra a megállapításra jutottak, hogy képes szaporodni magzati szervekben és a placentában is. Egyes esetekben mind a magzati szervekbe, mind pedig a placentában egyidejűleg megfigyelték a vírusszaporodást, míg más esetekben kizárólag a magzatokban vagy a placentában. A PCV-2 fertőzéssel kapcsolatos szaporodási zavarok részletesebb megismerése érdekében vizsgálták azt is, hogy a vírusfertőzést követő virémia hatással van-e a vemhes méhre, és ha igen, akkor az milyen elváltozásokat okoz a méhben. Ennek felderítése céljából a PCV-2 szempontjából szeronegatív kocákat fertőztek oronasalisan PCV-2-vel. Ezt követően vizsgálták a vérplazmában, valamint a perifériásan keringő mononukleáris sejtekben vírus jelenlétét és a vírus szaporodása során megjelenő virális DNS másolatokat. Fertőző vírust csak a fertőzést követő 21. napon találtak a vérplazmában, míg sejthez kötötten a vírus (a vérben keringő mononukleáris sejtekben) a fertőzést követő 14. napon jelent meg, és a 49. napon még kimutatható volt a keringő mononukleáris sejtekben. A virális DNS megjelenésének és perzisztálásának vizsgálata a következő eredményre vezetett. A vírus DNS

a vérplazmában a 14. napon jelent meg, és a 49. napon még kimutatható volt, míg sejthez kötötten a 7. napon már detektálható és a fertőzést követő 63. napon is még ki lehet mutatni. A vírus közvetlen magzatkárosító hatását méhen belüli magzatfertőzés segítségével vizsgálták. A fertőzést a vemhesség 57., 75. és a 92. napján végezték, és a fertőzést követő 21. napon császármetszéssel eltávolították a magzatokat. A fertőzést követően a kocák nem vetéltek el. Vizsgálataik során mind a három fertőzési stádium esetében erőteljes vírusszaporodást észleltek a magzatokban, magzatelhalást azokban az esetekben észleltek, amikor a fertőzés a vemhesség 57. napján történt. A vírust és a PCV-2 ellen képződött ellenanyagokat azoknak a kocáknak a magzataiban mutattak ki, amelyeket a vemhesség 75. és a 92. napján fertőztek.

Vizsgálati eredményeikből azt a következtetést vonták le, hogy a PCV-2 fertőzést követően a virémia nagyrészt sejthez kötött formában jelentkezik, és a vírus magzatban történő szaporodása kedvezőtlenül befolyásolja a vemhes méh magzatainak életbemaradását, és magzatelhalással illetve mumifikációval járhat.

3.4. A sejtzárványos rhinitis

A **sejtzárványos rhinitis (Inclusion Body Rhinitis)** szopós malacokban elsőként Done írta le 1955-ben. A betegség világszerte elterjedt (Done, 1955; Harding, 1958; Edington, 1999), előidézője a betaherpes családba tartozó fajspecifikus citomegalovírus. A vírus horizontálisan (orr- és könny, vizelet, hüvelyváladék útján) és vertikálisan egyaránt terjedhet. A vemhesség korai szakaszában történő fertőződés esetén embrionális elhalás, mumifikáció alakulhat ki (Edington et al., 1988). A vemhesség utolsó stádiumában a magzati fertőzés a születés utáni néhány napon belül hirtelen elhullások formájában jelentkezhet. Az utóbbi esetben enyhe anaemia, állkapcsi- és tarsalis ízületi oedema figyelhető meg. Szopóskori fertőzés esetén a vírusürítés 3-5 hetes korban történik, és kedvezőtlen tartási körülmények között klinikai tünetek (főként az orrnyálkahártya gyulladása) is jelentkezhetnek. Három hetesnél fiatalabb malacok esetében remegés, tüsszögés, orrfolyás és rendellenes légzés, és akár 20-25 %-ot is elérő elhullás mutatkozhat, a gyógyultaknál pedig a vírus fejlődésben való visszamaradást eredményezhet (Varga és mtsai., 1999). Süldőkben a vírusfertőzés az immunszuppresszió következtében egyéb betegségek fellobbanásához vezethet.

Kísérletes fertőzések után a 21. napon exterminált malacok szerveinek kórszövettani vizsgálatával a rhinitis mellett valamennyi egyed ornyálkahártyájának mirigyeiben cytomegaliát és sejtzárványokat állapítottak meg. A vesecsatornácskákban, a nyál- és könnymirigy hámsejtjeiben mononuklearis sejtes beszűrődés mellett szintén sejtzárványok voltak. Az agyvelőben az esetek 40 %-ában lymphocytás perivasculitist és a plexus chorioideusban idült gyulladáso s sejtes beszűrődést figyeltek meg (Edington és mtsai., 1976; Kelly, 1967). A fertőzöttség kimutatására IF, IIF, ELISA és VN módszerek alkalmazhatók. Külföldi adatok szerint a megbetegedés az ornyálkahártya mirigyeiben kialakuló jellegzetes elváltozások alapján már kórszövettani vizsgálattal is nagy valószínűséggel megállapítható. A megbetegedések egyedi és/vagy állományszintű diagnosztizálására IF, IH, ELISA, PCR, ISH módszerek alkalmazhatók (Hamel et al., 1999; Lim et al., 2002).

Magyarországon először 2002-ben Deim és munkatársai állapították meg a betegséget (Deim és mtsai, 2003). A kórlefolyás az általuk megfigyelt hazai állományokban a nemzetközi irodalomban említett formában jelentkezett. Az elhullás mértéke az általuk vizsgált állományokban esetenként a 40 %-ot is elérte.

4. Anyag és módszer

A kutatásom alapjául szolgáló vizsgálati anyag legnagyobb része az Országos Állategészségügyi Intézet Emlős-kórbonctani és Vadbetegségek Osztályára kórhatározás céljából beérkező különböző korú élő és elhullott sertések képezték. Az előbbieket mellett telepi vizsgálatok során gyűjtött minták célirányos feldolgozását, valamint kilőtt és elhullott vaddisznók vizsgálatát végeztem el.

A PCV-2 vírus fertőzöttség gyakoriságának felismeréséhez a kórbonctani-és kórszövettani vizsgálat mellett, ISH, IH, valamint PCR módszert alkalmaztam a vírus kimutatása céljából. Azonos állományból, illetve udvarból érkezett sertések esetében az elhullott egyedekből összesített mintavételt (pool) használtam, amely a költségeket úgy csökkentette, hogy a vizsgálati eredményeket nem befolyásolta. Ismeretes ugyanis, ha egy állományban jelen van a PCV-2, abban az esetben a fertőzöttség általában jelentős mértékben elterjedt.

A PCV-2 elterjedésének felmérése során vizsgálateimat kiterjesztettem olyan állományokra is, amelyekből intézetünkbe küldött sertésekben a kórbonctani elváltozások nem vetették fel a PMWS vagy a PDNS gyanúját, vagy éppenséggel egyéb (pl. baktériumos vagy más eredetű) megbetegedésre utaltak.

4.1. Kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok

A **diagnosztikai célú kórboncolás** a külső- és a belső vizsgálatból állt. A külső vizsgálat során meghatároztam az állat korához, fajtájához és neméhez viszonyított – élő súly, testhossz és az övméret alapján számított érték alapján – fejlettségi és tápláltsági állapotát. Megtekintettem a kültakarót, természetes testnyílásokat és a látható nyálkahártyákat.

A belső vizsgálatok során a mell- és hasüregi szervek vizsgálatát végeztem el. Ennek során a testüregek savóshártyáinak, és szabad tartalmának megtekintése után a részletes szervboncolás következett. A lép, máj és vesék, ezután a gyomor-és bélcsatorna savóshártyájának, falának, tartalmának és nyálkahártyájának a vizsgálatát végeztem el. Ezt követte a szív, a légutak és a tüdő állapotának a vizsgálata. A szervek vizsgálata során látható elváltozásokból, és a vírusok szempontjából lényeges szervekből további vizsgálatok céljából szervrészleteket metszettem ki. A mintavételt követően a minták kezelése, illetve tárolása a különböző vizsgálatok megkezdéséig a módszerek előírásainak megfelelően történt.

Kutatásaim során említett két vírus esetében elsősorban a lymphoid szövetek (tonsilla, lép, nyirokcsomók, thymus), az orrnyálkahártya, a tüdő, a vesék és az agyvelő vizsgálatát végeztem el.

A **kórszövet**tani feldolgozás során fagyasztásos (cryostat) technikát és pufferolt formaldehid oldatban történő fixálást alkalmaztam.

A vizsgálandó mintákat 12-24 óra fixálódást követően paraffin blokkokba ágyazzuk be, majd 4 µm vékony metszeteket készítünk, és zsírtalanított üveg tárgylemezen hővel fixáljuk a metszetet. A rutin szövettani festések közül a haematoxin-eosin festést használtam.

4.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok

A deparaffinálást követően a metszeteket 0,1 %-os protease XIV (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) oldattal 37°C-on 10 percig inkubáltam, ezután 3 %-os H₂O₂ oldatban 10 percig, majd 2 %-os tejpor oldattal 37°C-on, 10 percig kezeltem. A PCV-2 kimutatását egy kereskedelmi forgalomban kapható egérben előállított monoklonális ellenanyaggal (36A9) végeztem (Ingenasa, Madrid, Spanyolország). A metszeteket az 1:15000-ben hígított monoklonális ellenanyaggal 37°C-on 20 percig inkubáltam. Az antigén-ellenanyag kapcsolódás kimutatását tormaperoxidázzal jelölt polimert tartalmazó teszttel végeztem el (EnVisionTM + anti-mouse HRP, Dako, Glostrup, Dánia). Kromogénként a 3-amino-9-ethylcarbazole oldatot használtam (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), és a kontrasztfestést Mayer-féle hematoxinnal végeztük. Negatív kontrollként egy szériametszeten a PCV-2 specifikus ellenanyagot foszfátpuffer-oldatra cseréltem. A metszetek vizsgálatakor megfigyeltem és értékeltem a vírusok kártételét, a szöveti reakciókat, valamint az antigén lokalizálódását.

4.3. Molekuláris biológiai/patológiai eljárások (PCR, ISH)

4.3.1. Polimeráz lánreakció (PCR)

A szövetekben lévő vírusnukleinsavat **polimeráz lánreakció** (PCR) segítségével mutattam ki. A PCR reakciót a DNS kivonás előzi meg, amelyet a következő módszerrel végeztem.

A vizsgálandó szervből borsónyi darabot porcelán mozsárban dörzsöléssel homogenizáltam, majd 200 µl 1 %-os TE pufferben elkevertem. Ebből a homogenizátumból 100 µl-t Eppendorf-csőbe tettem, és hozzáadtam 10 µl 10 %-os Sarcosyl oldatot és 4 µl

proteinase K-t, majd egy éjszakán át 55°C-on a mintákat rázattam. Ezt követően hozzáadtam 300 µl Guanidine HCl-t és 20 µl ammónium-acetátot, és szobahőmérsékleten 60 percig inkubáltam, alkalmanként a mintákat megrázattam, majd azokat 1 ml jéghideg abszolút etanollal összeráztam őket, és 12 percig 13000 fordulat/perc sebességen centrifugáltam. A minták felülúszójának leöntése után 1 ml 4°C-os 70 %-os etanollal mostam, majd 5 percig 13000 fordulat/percen centrifugáltam, ezt követően a felülúszó leöntése után a mintákat elszívófülkében beszárítottam és 50 µl nagy tisztaságú vízben (ultra puriss, UP) szuszpendáltam. Az így kapott szuszpenzió alkalmas volt a PCR reakció elvégzéséhez.

Az eljárás során a vizsgálni kívánt vírus egy kiválasztott genom régiójának ellentétes szálaira – az ismert szekvencia adatok alapján – specifikus primereket (forward és reverz) terveztem és szintetizáltattam. A ciklusok folyamán a primerek a mintában lévő denaturált vírus DNS komplementer szakaszaihoz kapcsolódnak, majd egy hőstabil DNS polimeráz a hozzáadott szabad nukleotidokból in vitro szintetizálja a primerek által behatárolt régiót. Az így amplifikált termék méretét, azonosítását gélelektroforézissel ellenőriztem.

A PCR reakcióhoz szükséges anyagokat a következő arányban állítottam össze:

- 1 µl templát,
- 2 µl forward primer (D-PCV-2/F: 5'-TGCAGTAAAGAAGGCAACTTACT-3')
- 2 µl reverse primer (D-PCV-2/R: 5'-GACAGCAGTTGAGGAGTACCATT-3')
- 20 µl UP víz
- 25 µl Readymix

A vírus jelenlétét a PCV-2 ORF-2 génjére tervezett primerekkel végzett PCR reakciókkal az alábbi ciklus szerint igazoltam: 2 perc 95°C, 35 × (30 másodperc 95°C, 30 másodperc 58°C, 40 másodperc 72°C), 5 perc 72°C.

A PCR reakció során kapott terméket 1, 5 %-os 0, 5 µl/ml ethidium-bromidot tartalmazó agarózgélben gélelektroforézissel vizsgáltam.

Kutatásom során a vírus szervezetben történő szaporodása és az általa okozott elváltozások közötti összefüggést – a szervezetben jelenlévő mRNS kimutatásával és kórszövettani vizsgálattal – vizsgáltam. A vírus replikációs génje az 51-995-ös számú régióban van. Amennyiben a vírus szaporodási stádiumban van, akkor a REP génről szintetizálódó RNS molekulákat a mintában ki lehet mutatni úgy, hogy a REP génre tervezett primerekkel (F: 5'-GCAGCACCTCAGCAGCAACAT-3' 32-52 nt; R: 5'-TAGACCACGTAGGCCTCGGCACT-3', 1158-1136 nt) PCR reakcióval lehet azonosítani a mintából készített cDNS segítségével. A mRNS kimutatására irányuló molekuláris biológiai eljárást az alábbiak szerint végeztem el.

Frissen elvéreztetett vagy néhány órán belül elhullott állatok szerveiből – lép, máj, vese, tüdő, hasnyálmirigy, mandula, szív, agyvelő és nyirokcsomó – borsónyi nagyságú mintákat vettem

és porcelán mozsárban dörzsöléssel homogenizáltam, majd 250 µl homogenizátumhoz 750 µl Trizol reagenst adtam és 20 percig szobahőmérsékleten állni hagytam. Ezután a mintához 200 µl kloroformot adtam, 15 másodpercig ráztam és 5 percig állni hagytam, majd 15 percig, 4°C-on 12000 fordulat/percen centrifugáltam. A felső vizes fázist pipettával eltávolítottam, és 500 µl izopropanolt adtam hozzá és 20 percig szobahőmérsékleten tartottam és újra 15 percig, 4 °C-on 12000 fordulat/percen centrifugáltam. Ezután az alkohol eltávolítását követően a pellethez 500 µl 75 %-os etanolt adtam és 15 percig, 4°C-on 12000 fordulat/percen centrifugáltam. A felülúszó alkohol eltávolítását követően a pelletet 30 percig elszívófülke alatt beszárítottam, majd huszonöt µl DEPC-es vízben szuszpendáltam a mintát, ami alkalmas az RT-PCR reakcióhoz.

Tekintettel arra, hogy a PCR egy DNS alapú molekuláris biológiai módszer, ezért RNS kimutatás esetén az RNS láncról cDNS-t reverz transzkripcióval szintetizálni kell. A módszert az alábbiakban foglalom össze.

Egy PCR csőbe 5 µl RNS-t, 6 µl DEPC-es vizet, valamint 0, 5 µl Random Hexamert mértem és 10 percig 70°C-on, majd felhasználásig 4°C-on tartottam. Párhuzamosan egy másik PCR csőbe: 4 µl 5× RT puffer, 1 µl dNTP, 2 µl 0, 1M DTT, 0, 5 µl M-MLV reverz transzkriptázt és 0, 5 µl Rn-áz inhibitor mértem. Ezt követően a két PCR cső tartalmát elegyítettem, majd a következő PCR reakcióval előállítottam a cDNS molekulákat: 10 perc 70 °C, 90 perc 42°C, 5 perc 95 °C, ezt követően a mintát felhasználásig 4 °C-on tartottam.

A vírus szaporodását a PCV-2 REP-1 génjére tervezett primerekkel végzett PCR reakciókkal igazoltam az alábbi ciklus szerint: 2 perc 95 °C, 35 × (30 másodperc 95°C, 30 másodperc 58°C, 40 másodperc 72°C), 5 perc 72°C, majd a kapott terméket 1, 5 %-os 0,5 µl/ml ethidium-bromidot tartalmazó agarózgélben gélelektroforézissel vizsgáltam.

4.3.2. In situ hibridizáció (ISH)

Vizsgálataim során a PCV-2 okozta – PMWS heveny és elhúzódó formája, valamint a PDNS – betegségekre jellemző klinikai tüneteket és kórbonctani elváltozásokat mutató sertések szerveit dolgoztam fel, kórszövettani és *in situ* hibridizációs módszerrel. Vizsgálataim célja a PDNS esetében jelentkező kórszövettani elváltozások pontos megfigyelése, az elváltozott területeken a PCV-2 jelenlétének igazolása, valamint a PCV-2 sejtszintű lokalizációjának meghatározása volt.

A feldolgozás során a vizsgálandó mintákat 12-24 órán át 10 %-os pufferolt formaldehid oldatban fixáltam, majd ezt követően paraffinba ágyaztam. A mintákból ezután 4 µm vékony metszeteket készítettem és azokat zsírtalanított üveg tárgylemezen hővel fixáltam. Ezt követően a metszeteket deparaffináltam és 5 percig szobahőmérsékleten 50 mM-os (pH = 8) TRIS/HCl-ba helyeztem, majd a mintákra 200 µl Proteinase K (Proteinase K, Roche) oldatot öntöttem. A mintákat ezt követően fedőlemezzel fedtem és 30 percig 37°C-on nedves kamrában inkubáltam. Ezután a lemezeket 2 × 10 percig +4°C-os magas tisztaságú (UP) vízbe helyeztem, közben az UP vizet cseréltem.

A lemezeket ezután szobahőmérsékleten 15 percig 4 %-os paraformaldehid fixáló oldatban tartottam, majd 1 %-os PBS (10 × PBS, Roche) oldattal háromszor lemostam. Ezt követően a preparátumokat 2 percig felszálló (70 %, 90 %, 96 %-os) alkoholsorozatba helyeztem, majd szárítottam őket. A száraz preparátumokra 200 µl ún. előhibridizáló puffert (1000 µl DIG Easy Hyb oldat, Roche + 1 µl 10 µg/µl-es hering sperma, Roche) tettem, a metszeteket fedőlemezzel fedtem, majd előmelegített nedves kamrában 1 órán át 42°C-on inkubáltam. Az inkubáció után levettem a fedőlemezt, majd a felesleges folyadékot leráztam. Ezután mintánként 100 µl hibridizációs keveréket (1000 µl DIG Easy Hyb, Roche, + 10 µl próba) tettem a metszetekre, majd lefedtem, és azokat 92°C-on 10 percig inkubáltam. Ezt fokozatos hűtés után 42°C-on nedves kamrában 16-20 óráig tartó inkubálás követte. Ezután 2 % SSC oldatban (20 % SSC oldat, Roche) leúsztattam a fedőlemezeket és a lemezeket kétszer 60 percig, majd egyszer 40 percig 42°C-on „stringent” mosóoldatban (2, 5 ml 20 × SSC + 450 ml UP víz + 0, 2 g MgCl₂ + 0,5 ml Tween 20, Roche) inkubáltam. Közben az oldatokat cseréltem. A mintákat 1 % SSC-oldatban 2 × 10 percig, 1 % PBS oldatban és mosópufferben (Washing Buffer Roche; 10 ml 10 %-os törzsoldat + 90 ml UP víz) 5-5 percig rázattam. A lemezekre 200 µl blokkolóoldatot (Blocking Solution, Roche; 10 ml 10 %-os blokkolóoldat + 90 ml 1 %-os maleinsav) tettem, majd azokat 37°C-on 30 percig nedves kamrában inkubáltam. Ezt követően a mintákra 100 µl ellenanyagoldatot (1000 µl blokkolóoldatban 1 µl antidigoxigenin-AP konjugátum FAB fragmens, Anti-DIG FAB fragment, Roche) csepegtettem, majd fedés után 37°C-on 60 percig tartó inkubálás következett. Ezután mosópufferben háromszor 10 percig gyengén rázattam a mintákat, közben cseréltem a pufferoldatot. A mosás után 200 µl 1 %-os detektálópuffert helyeztem a metszetekre és 10 percig szobahőmérsékleten hagytam. A puffer lecsurgatása után 200 µl NBT/BCIP oldatot (980 µl 1 × detektálópuffer + 20 µl NBT/BCIP törzsoldat, Roche) juttattam a lemezekre, majd sötétben szobahőmérsékleten 60 percig tartó inkubálás következett. A metszeteket ezután festőkádba tettem, 5 percig folyó csapvíz alatt mostam, ezt követően egymás után gyorsan 70 %-os, 95 %-os, 100 %-os, 95 %-os és 70 %-os alkoholt öntöttem a festőkádba. Az oldatokat

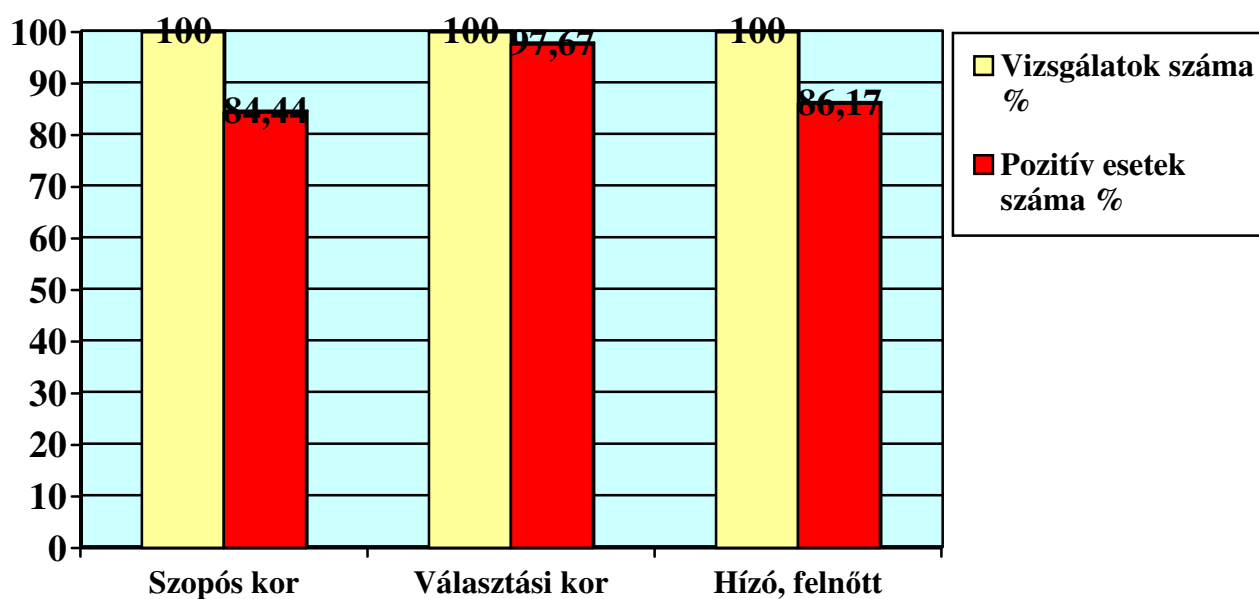
rögtön cseréltem, majd a preparátumokat levegőn hagytam megszáradni. Teljes száradás után a mintákat kontraszt magfestésként 5 percig hematoxin oldatban tartottam, és 5 perces folyóvízes mosás után meleg glicerines-zselatinos oldat segítségével a metszeteket fedőlemezzel fedtem (Schwarzacher és mtsai, 2000).

5. Eredmények

5.1. A cirkovírusos fertőzöttség előfordulása Magyarországon

Az Országos Állategészségügyi Intézetbe a 2003-2005 közötti időszakban 2527 sertés és 785 magzat érkezett kórhatározás céljából. A sertések 78 %-a (2617 minta) nagylétszámú telepekről, 22 %-a (739 minta) kislétszámú udvarokból származott.

Célirányosan PCV-2 irányba történő PCR vizsgálatokat 1250 különböző életkorú (szopós, elválasztott, illetve hízó) sertés szerveiből végeztem el, és 1190 esetben (95,2 %) kaptam pozitív eredményt (1. ábra).

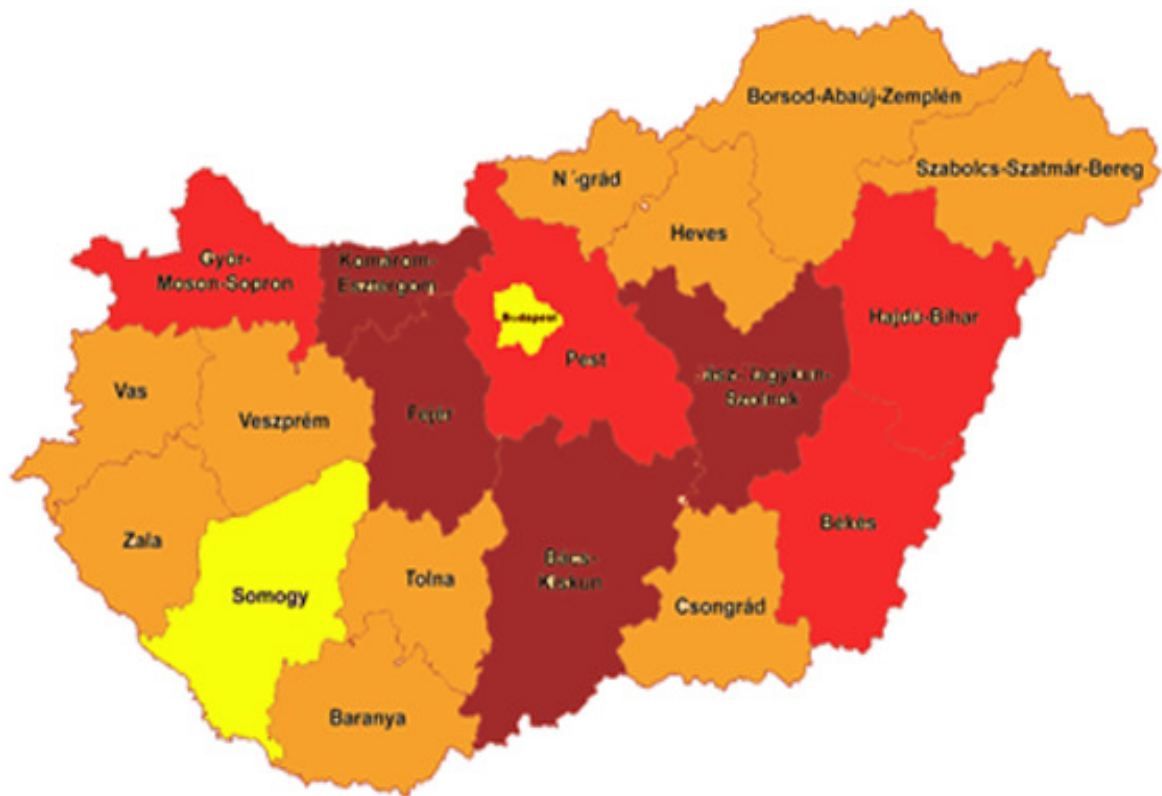


1. ábra. A PCV-2 fertőzés előfordulásának gyakorisága korcsoportonként

A PCR vizsgálatba bevontam cirkovírus fertőzésre (PMWS-re, PDNS-re) jellemző elváltozásokat mutató állatokat, valamint olyanokat is, amelyekben PCV-2-re gyanút keltő elváltozásokat nem észleltem és az elhullások egyéb okokkal (főként baktériumos fertőzések) voltak magyarázhatók. A PCV-2 széles körben elterjedt a magyarországi sertésállományokban. A PMWS klinikai tünetekben és kórbonctani elváltozásokban is megnyilvánuló formáját az ország különböző részein található 111 sertéstelepen 789 egyedben állapítottam meg (1. táblázat, 2. ábra).

1. táblázat. A PCV-2 okozta fertőzés és az azzal összefüggő kórképek előfordulása 2003-2005 között hazánkban, az OÁI-ba beküldött sertések vizsgálata alapján

Megye	Tünetmentes fertőzés; állomány/egyed	PDNS; állomány/egyed	PMWS; állomány/egyed
Bács-Kiskun megye	55/214	0	27/191
Baranya megye	0	0	4/30
Békés megye	3/6	6/7	3/29
Borsod-Abaúj-Zemplén megye	0	4/5	0
Budapest	1/19	0	1/23
Csongrád megye	6/13	1/1	2/28
Fejér megye	2/5	3/3	13/45
Győr-Moson-Sopron megye	2/3	1/1	8/37
Hajdú-Bihar megye	2/17	5/5	5/39
Heves megye	3/5	0	4/38
Jász-Nagykun-Szolnok megye	3/16	2/2	10/49
Komárom-Esztergom megye	4/28	0	13/103
Nógrád megye	2/7	3/3	4/62
Pest megye	6/19	2/2	4/27
Somogy megye	0	0	1/1
Szabolcs-Szatmár-Bereg megye	1/3	4/4	0
Tolna megye	2/4	0	7/26
Vas megye	1/2	0	2/2
Veszprém megye	2/4	1/1	5/44
Zala megye	0	0	2/5
Összesen	95/367	30/34	111/789



2. ábra. A PCV-2 fertőzés és az azzal összefüggő kórképek megyénkénti előfordulása 2003-2005 között az OÁI-ba beküldött sertések vizsgálata alapján

- * sárga: <20 %
- narancs: 20-40 %
- piros: 40-70 %
- bordó: >70 %

A PMWS előfordulását csaknem kizárólag (102 telep, 92 %) nagy létszámú telepeken észleltem, míg a PDNS formát a háztáji sertésállományokban fordult elő (32 kisgazdaság, 94 %).

A cirkovírusos fertőzöttség PMWS formája a klinikai tünetek és a patomorfológiai elváltozások alapján 789 (63,12 %) sertésnél került megállapításra és ezekben PCR vizsgálatok PCV-2 szempontjából valamennyi esetben pozitív eredményt adtak (2. táblázat).

2. táblázat. A PCV-2 fertőzéseinek elterjedése és az általa okozott kórképek előfordulása korcsoportonként

	Az intézetben vizsgált sertések száma	PCV-2 irányában történő vizsgálatok száma	PCR módszerrel PCV-2 pozitív	Elhullás oka		
				PMWS *	PDNS **	Egyéb ***
Szopós malac	353	45	38	0	0	<i>E. coli</i> , <i>Clostr.</i> <i>Perfr. A</i> , <i>Streptococ</i> <i>. spp.</i>
Választás után (4-8 hetes életkor)	1423	988	965	728	11	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Streptococ</i> <i>. spp.</i> , stb.
Hízlalási időszak	751	217	187	61	23	<i>A. peuropn.</i> , <i>P. multocida</i> , stb.
Összesen	2527	1250	1190	789	34	367

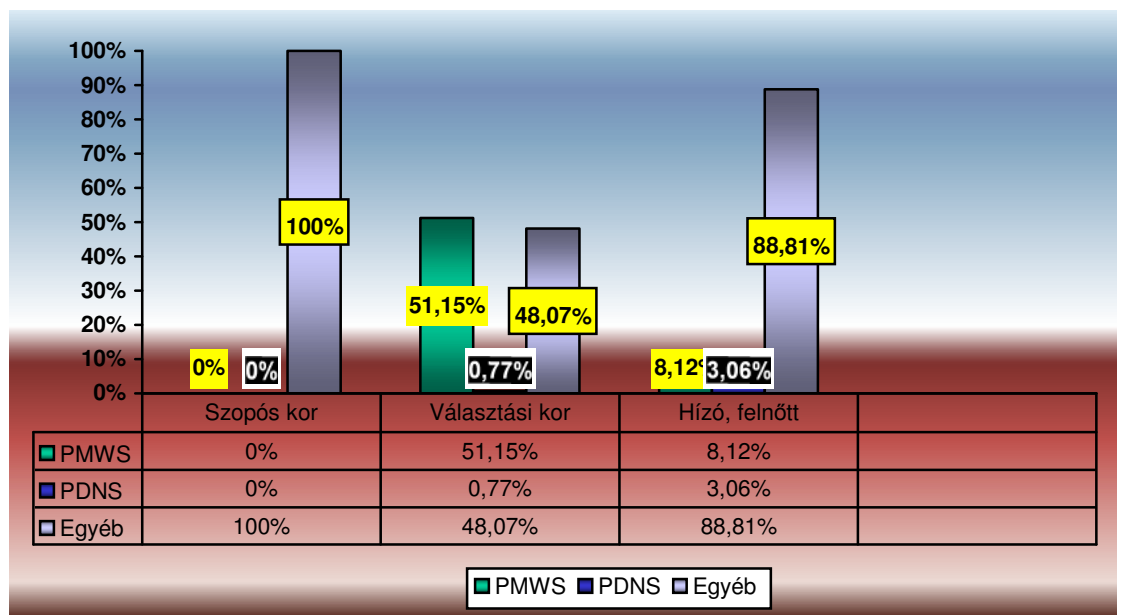
*A PMWS klinikai tüneteit, kórbonctani és kórszövettani elváltozásait mutató sertések, gyakran szövődményes baktériumfertőzéssel

** A PDNS klinikai tüneteit, kórbonctani és kórszövettani elváltozásait mutató sertések, szövődményes megbetegedés nélkül

*** A PMWS és PDNS klinikai tüneteit, kórbonctani és kórszövettani elváltozásait nem mutató PCV-2 pozitív sertések

Az elhullások hátterében szövődményes baktériumos tüdőgyulladást, valamint a bélcsatornára szorítókozó baktériumos fertőzések, esetenként szeptikémia (*E. coli*, *Salmonella spp.* stb.,) voltak a jellemzőek. A PDNS a két éves időszakban 34 (2,72 %) esetben állapítottam meg. A vizsgálataim során PCR módszerrel 367 (29,36 %) sertésnél találtam PCV-2 pozitivitást, ahol a PMWS heveny illetve elhúzódó formája, illetve a PDNS klinikai tünetek, kórbonctani, és kórszövettani elváltozásai nem mutatkoztak.

A PMWS kórforma elsősorban (63,12 %) közvetlenül a választás utáni (4-8 hetes életkorban) időszakban jelentkezett az érintett állományokban. A hízlaldákban szórványosan (5 %) lehetett megfigyelni a PMWS-re jellemző képet (2. táblázat, 3. ábra).



3. ábra. A PMWS és a PDNS előfordulásának gyakorisága kórcsoportonként

A PCV-2 okozta kórformák előfordulásának gyakoriságában eltérést az egyes sertésfajták között nem észleltem.

A PCV-2 által okozott betegséget vaddisznóban is megállapítottam. A kérdéses időszakban 15 vaddisznó hulla vizsgálatát végeztem el. Ezeket a vaddisznókat elhullottan találták vagy vadászatok során kilőtt egyedek voltak. A kórbonctani és kórszövetteni, valamint ISH és IH vizsgálattal a PCV-2 fertőzésre utaló elváltozásokat 5 esetben találtam, amelyek a PCV-2 okozta megbetegedés heveny formáját mutatták. További három esetben kórbonctani és kórszövetteni elváltozásokat nem mutató állatokban kaptam pozitív PCR reakciót a PCV-2 jelenlétére.

5.2. A sertések választás utáni cirkovírusos sorvadása (PMWS)

A PMWS elsősorban 50-70 napos malacokban, a battériás időszakban fordult elő heveny vagy idült formában. A heveny forma esetében gyakori a hirtelen elhullás, valamint egy-két napon keresztül légzőszervi tüneteket észlelhetők. Elhúzódó esetekben a PMWS-re jellemző sorvadás, állomány szétnövés figyelhető meg az érintett egyedeknél. Az egyes kórformáknál előforduló elváltozásokat a 3. táblázatban foglalom össze.

3. táblázat. A PMWS heveny és idült formáinak kórbonctani és kórszövettani jellegzetességei

	PMWS heveny forma	PMWS idült forma
lép: lymphocyta depletio	+	+
nyirokcsomók: lymphocyta depletio elhalások, zárványok	+	+
vese: interstitialis gyulladás	-/+	+
máj: interstitialis gyulladás	-/+	+/-
tüdő: interstitialis gyulladás syntitialis óriássejt interstitialis vizenyő	+	+
	-	+
	+	+/-
Mellvízkór és/vagy szívburok vízkór	+	-/+
agyvelő: perivasculitis	-/+	-/+
senyveség, fejlődésben való visszamaradás	-	+

A PMWS heveny esetében a mellvízkór és/vagy szívburokvízkór sok esetben súlyos fokú interstitialis vizenyő (1. kép) és általános savós nyirokcsomó duzzanat volt megfigyelhető.

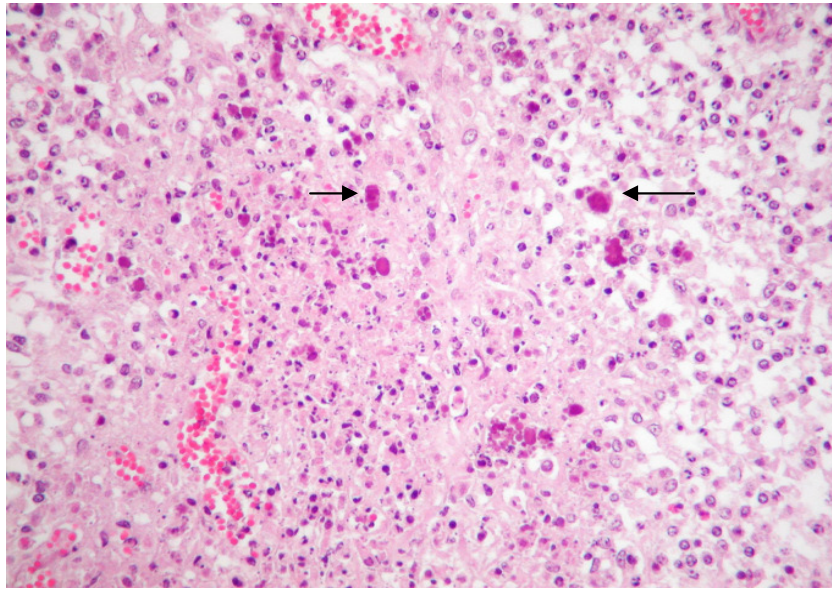


1. kép. A tüdő súlyos fokú interstitialis vizenyője PMWS heveny esetében

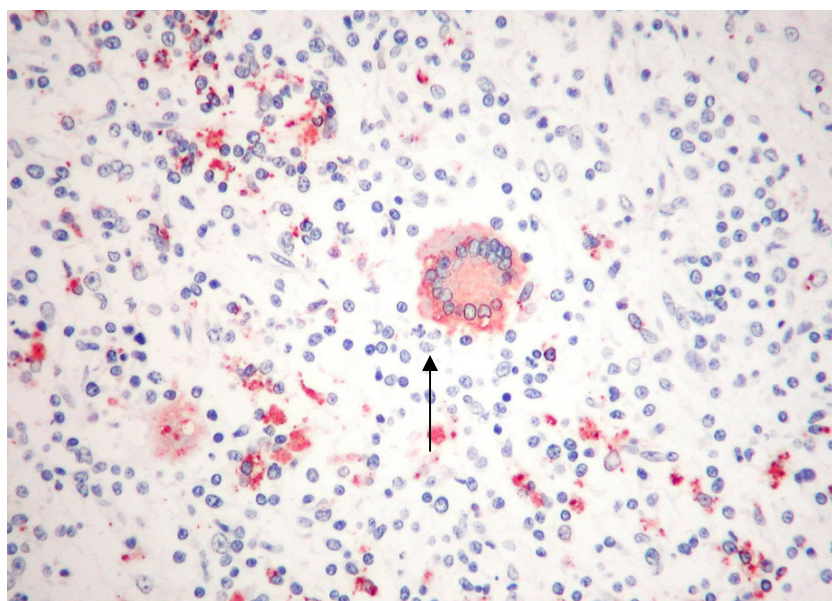
Idült forma esetében az állományokban a malacok 10-35 %-ában fejlődésben való visszamaradást, szétnövést tapasztaltam. Az érintett malacok nem fejlődtek, „kiszőrösödtek”, illetve testtömeggyarapodásuk elmaradt egészséges társaikhoz képest. A PMWS elhúzó formája esetében diagnosztikai vizsgálatok során a gyenge tápláltsági állapot mellett, a testtájéki nyirokcsomók (főleg az ágyékiak) duzzanata mellett ritkán mellüregben híg, alvadásra nem hajlamos szalmasárga szabad savószerű tartalom van. A tüdő esetenként megnagyobbodik, a lebenyek közötti kötőszövet megszélesbedett, kocsonyás tartalommal beszűrődött. Amennyiben a tüdőben másodlagos baktériumos fertőzés is mutatkozik, akkor a társfertőzésnek megfelelő kórbonctani elváltozások figyelhetők meg (heveny vagy félheveny pleuritis, hurutos-gennyes bronchopneumonia stb.) a lép (ha baktériumos jellegű vérfertőzés nem mutatkozott) kóros elváltozást nem mutatott. Az esetek 10-15 %-ában heveny vagy idült máj- és veseelfajulást, valamint fundusi gyomorfekélyt találtam. A vékony és vastagbélben esetenként heveny gyulladás fordult elő. A PCV-2 okozta megbetegedések esetén elvétve lehetett elhalásos vékony- és vastagbélgyulladást látni.

A PMWS-ben elhullott állatok kórboncolása során gyakorta észlelhetők a tetemesen megnagyobbodott vékonybélfodri nyirokcsomók.

A nyirokcsomók kórszövettani vizsgálatával heveny esetekben savós duzzanat mellett enyhébb-súlyosabb lymphocyta depletiót figyeltem meg. Elhúzódó esetekben pedig 90-100 %-os mértékű lymphocyta kiürülést, és kiterjedt elhalásokat találtam, a macrophag okban pedig sokszor figyeltem meg egy vagy több kerek, basophil cytoplasmazárványt (2. kép) és alkalmanként nagyszámú óriássejtet (3. kép).

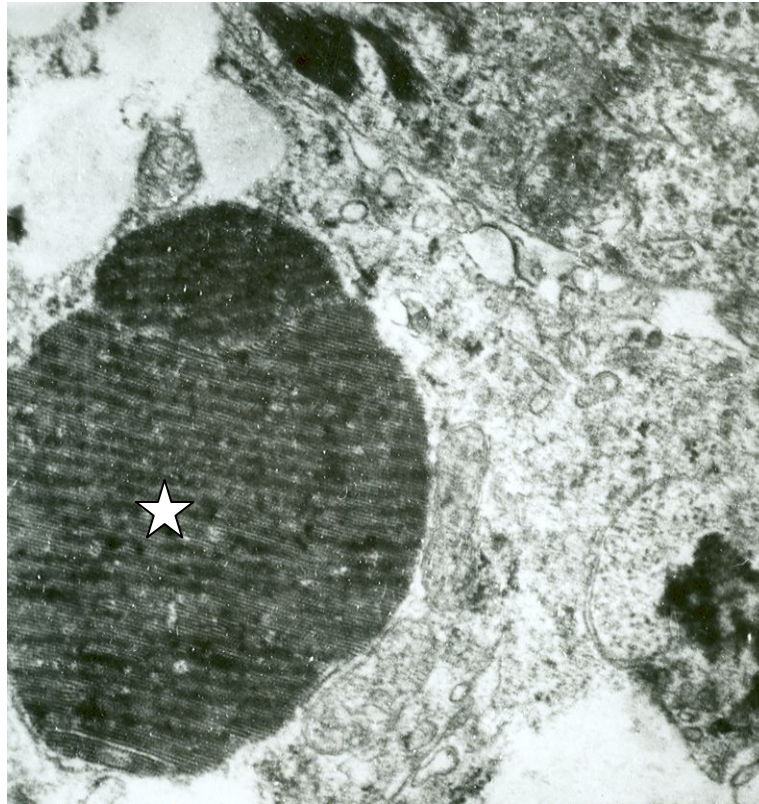


2. kép. Súlyos fokú lymphoid depletio és basophil cytoplasmazárványok (→) a bélfodri nyirokcsomóban. HE, 200×



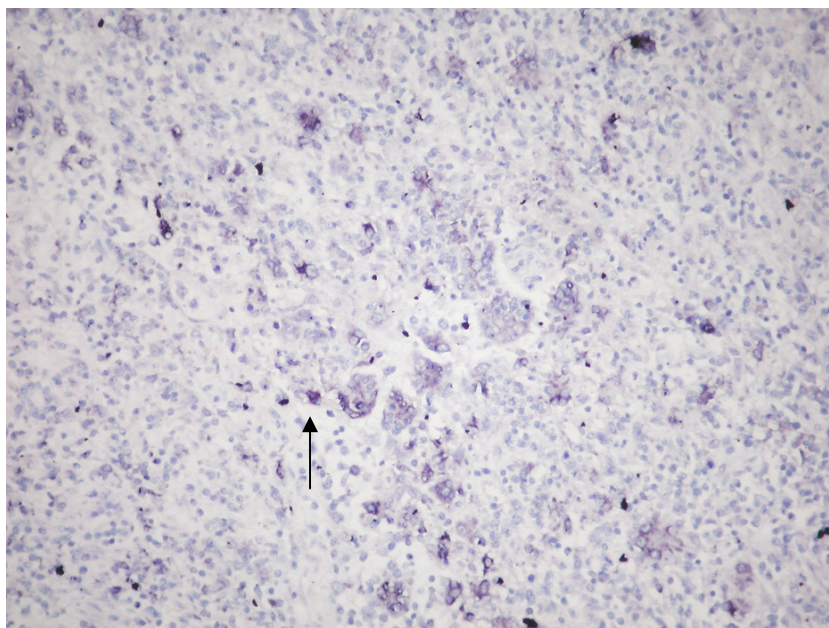
3. kép. Többmagú óriássejt (→) a hörgő körüli nyirokcsomóban. IH, 200×

A basophil cytoplasmazárványokban elektronmikroszkópos vizsgálattal szemcsés-rögös szerkezetű, amorph, elektrondenz anyagban ágyazottan 12-14 nm méretű, burokkal nem rendelkező, helyenként parakristályosan rendeződött vírusrészecskéket lehetett kimutatni (4. kép.).



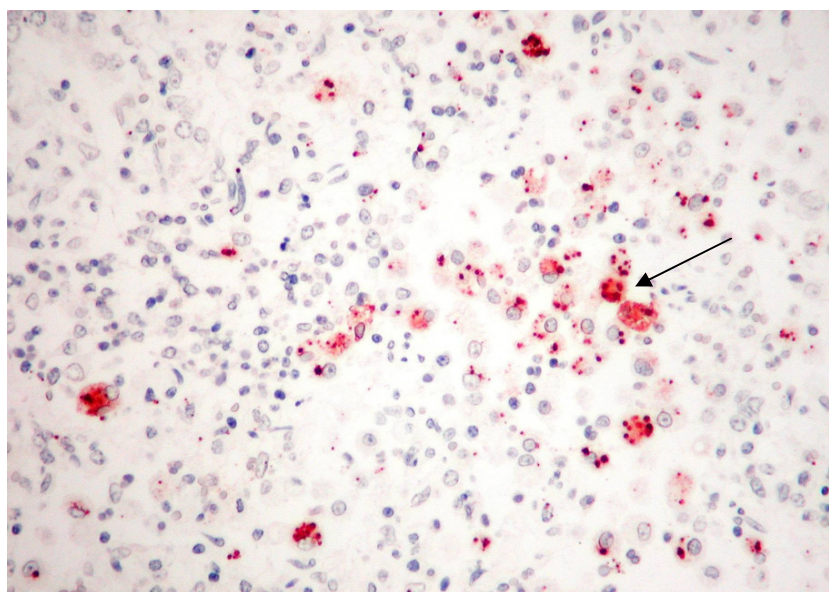
4. kép. Parakristályosan rendeződött, 12-14 nm méretű vírusrészecskék (fehér csillag) a bélfodri nyirokcsomóban található zárványban, EM felvétel, 30400× (az OÁI archívumából)

Enyhébb-súlyosabb fokú lymphoid depletiót, kiterjedt elhalásokat valamint a histiocyták proliferációját más lymphoid szervben is megfigyeltem, és ezekben a vírust IH és ISH módszerekkel nagy mennyiségben ki is mutattam (5. kép).



5. kép. PCV-2 (→) a lép syntitialis óriássejtjeiben. ISH, 100×

A tüdő szövettani vizsgálatával az alveolusok üregében alveoláris macrophag proliferációval és syntitialis óriássejt képződéssel kísért, intralobularis, interstitialis pneumoniát észleltünk. Az alveoláris macrophag ok cytoplasmájában IH és ISH módszerekkel a vírust sokszor egy vagy több zárvány alakjában mutattam ki (6. kép).

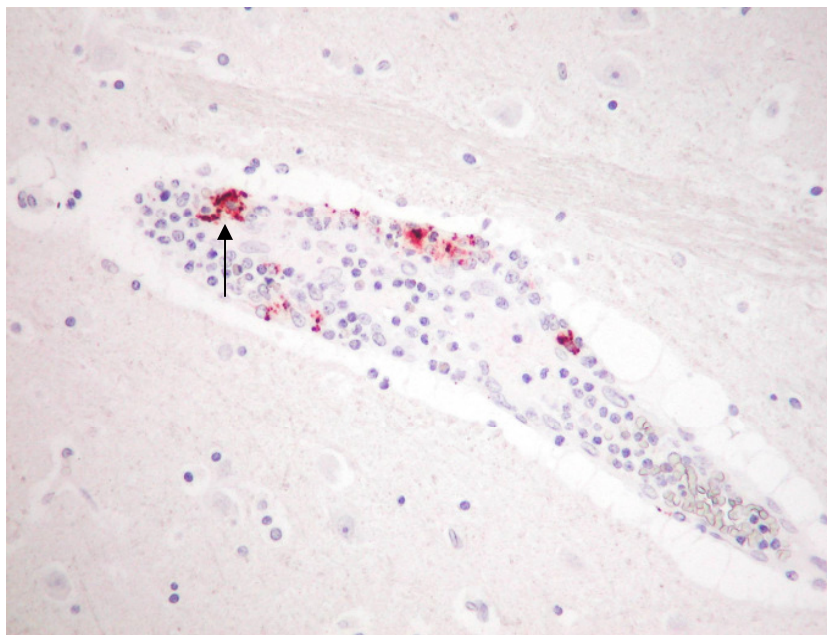


6. kép. PVC-2 cytoplasmá zárványok (→) formájában látható több alveolaris macrophagban, a tüdőben. IH, 200×

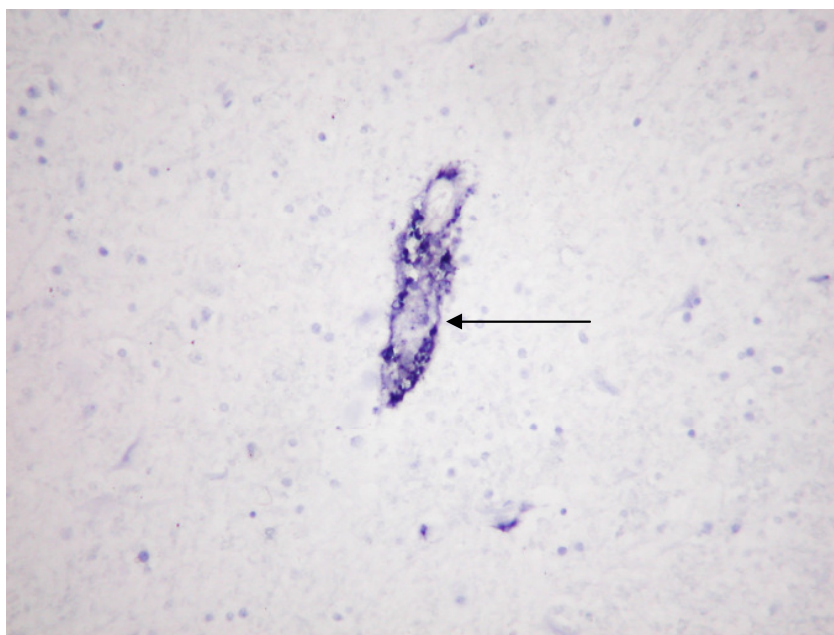
A vírussal fertőzött sejtek nagy számban fordultak elő a tüdő parenchymájában is. Az említett elváltozások mellett gyakran megfigyelhető a vírus immunrendszer károsító hatása miatt kialakuló, másodlagos baktériumos fertőzésre jellemző heveny-félheveny-idült hurutos-gennyes esetleg elhalásos tüdőgyulladás.

A máj szövettani vizsgálata során az esetek többségében félheveny savós májgyulladás mutatkozott, és itt is nagy mennyiségű vírussal fertőzött sejtet találtam. Heveny és elhúzódó esetekben egyaránt az interstitium gyulladással sejtes beszűrődése áll az előtérben.

Egyéb vizsgált szervek közül a vesében gyakran lehetett multiplex göcos lymphohistiocytás interstitialis beszűrődéseket megfigyelni. Egy-egy alkalommal az agyvelő véreinek falában és az agyburokban lymphohistiocytás és enyhébb-súlyosabb fokú neutrophil granulocytás beszűrődést észleltem, és a gyulladással sejtek egy részében a vírus is kimutattam (7-8. kép).



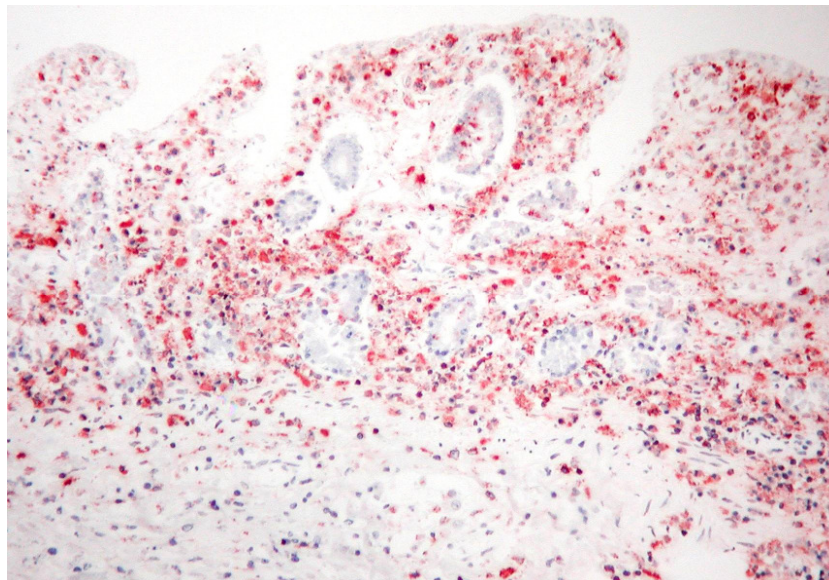
7. kép. Néhány PCV-2-vel fertőzött sejt (→) egy vérér körül kialakult gyulladásban, az agyvelőben. IH, 200×



8. kép. PCV-2-vel fertőzött sejtek (→) a vérér körül kialakult gyulladásban, az agyvelőben.

ISH, 200×

Ritkán a vékonybél egyes szakaszain felületes, esetenként a nyálkahártya mélyebb rétegeire is terjedő elhalást figyeltem meg és ezeken a területeken is a vírussal fertőzött sejtek tömegével fordultak elő. Egyes esetekben, a bélfodor kifejezett vizenyőjének kíséretében a vastagbélben is kiterjedt nyálkahártya-elhalást találtam és a vírust ezekben is nagy mennyiségben mutattam ki (9. kép).



9. kép. PCV-2-vel fertőzött sejtek tömegesen a csípőbél falának valamennyi rétegében

IH, 200×

5.3. A sertések dermatitis nephropathia szindrómája (PDNS)

A PDNS sporadikusan a hizlalási időszak bármelyik szakaszában jelentkezhet, bár megfigyelésem szerint gyakrabban fordul elő idősebb hízókorban, ritkán a tenyészállatokban is, elsősorban kocákban. A PDNS-ben elhullott sertések kórbonctani vizsgálatával a bőrben a test különböző területein szembeűnők a pontszerű-lencsényi vérzések, amelyek extrém esetben csaknem az egész test bőrében térképszerűen is mutatkoztak (10. kép).

Az említett bőrelváltozások mellett a vesében mutatkoztak jellegzetes elváltozások. A vesekapui nyirokcsomók mindegyik esetben a normálnál nagyobb, duzzadtak, barnavörösen tarkázottak voltak. A vesék felületén és metszslapján vérzéseket és szürkés-fehér gombostűfejnyi gócot figyeltem meg (11. kép). A súlyos veseelváltozásokkal összefűgésben, a következményes veseelégtelenség miatt gyakran fordult elő fundusi gyomorfeűkély kialakulása, valamint a karbamid kiválasztásban bekövetkezett ammónia felszaporodás következtében vizeletszag, uremia.



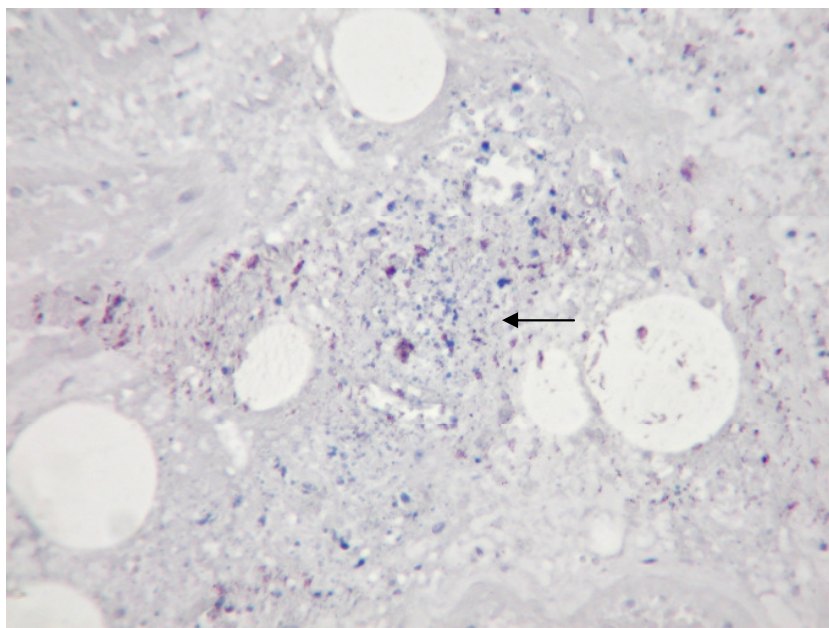
10. kép. Multifokális vérzses bőrgyulladás



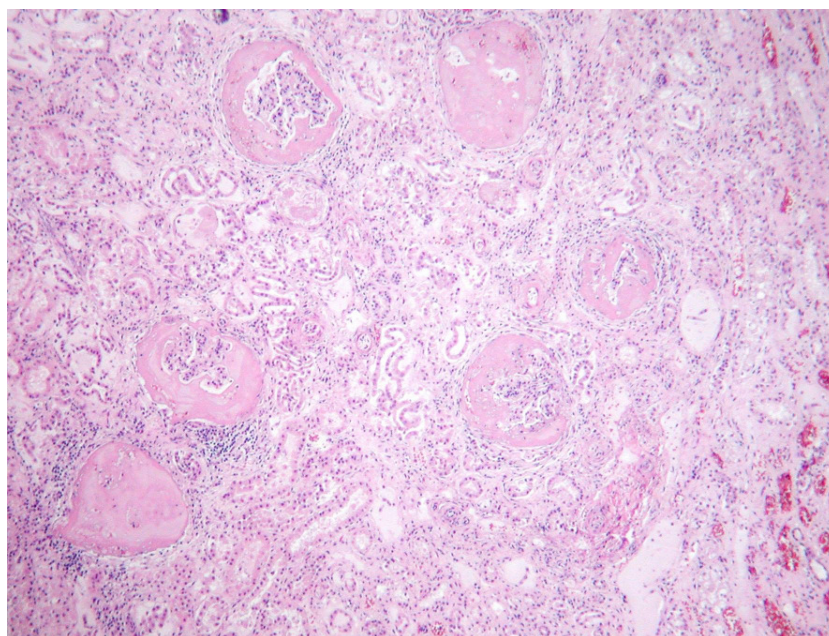
11. kép. Szürkés-fehér góccal és vérzésekkel tarkított, duzzadt vese, és a hozzátartozó nyirokcsomó véres infiltrációja

A tüdő vizsgálata során enyhébb-súlyosabb mértékű tüdőoedemát figyeltem meg.

A kórszövettani vizsgálatok során a bőrben vérzésekkel, hámlalással, a vérerek lympho-histiocytás, alkalmanként eosinophil granulocytás beszűrődésével, fibrinoid necrosisával és thrombotizációjával (12. kép.) kísért gyulladást találtam. A vesékben félheveny-idült, lympho-histiocytás beszűrődéssel, interstitialis fibrosissal és többmagvú óriássejtek képződésével, valamint a tubulusok kitágulásával kísért vesegyulladást észleltem (13. kép). A periglomerularisan, és a Bowman-tok üregében található homogén, eozinofilan egyneműen festődő – feltehetően immunkomplexek képződésével kapcsolatos, fehérje természetű – anyag kongóvörös (amyloid kimutatására irányuló), valamint van Gieson (hyalin kimutatására irányuló) festéssel negatív eredményt adott.



12. kép. Bőrbeli vérér thrombotizáció (→), ISH, 100×



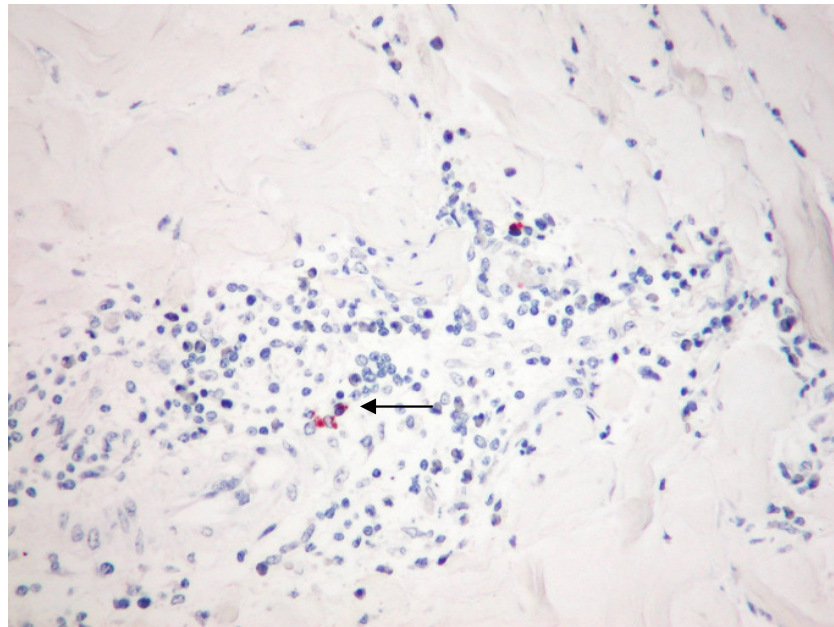
13. kép. Súlyos fokú exudatív glomerulonephritis HE, 40×

A tüdőben esetenként syntitialis óriássejt-képződéssel, valamint lympho-histiocytás beszűrődéssel kísért intralobuláris, interstitialis tüdőgyulladást és szövődményes hurutos-gennyves gyulladást figyeltem meg. A nyirokcsomókban és a lépben histiocyta-sarjadzással és lymphocyta-depletioval, esetenként óriássejtek képződésével, valamint gócos elhalással kísért gyulladás mutatkozott. A májban az interlobuláris kötőszövet enyhébb-súlyosabb lympho-histiocytás beszűrődésével járó interstitialis gyulladást és a májsejtsorok között az MPS-sejtek gócos proliferációját figyeltem meg. Egy esetben az agyvelőben lympho-histiocytás vasculitist találtam (4. táblázat).

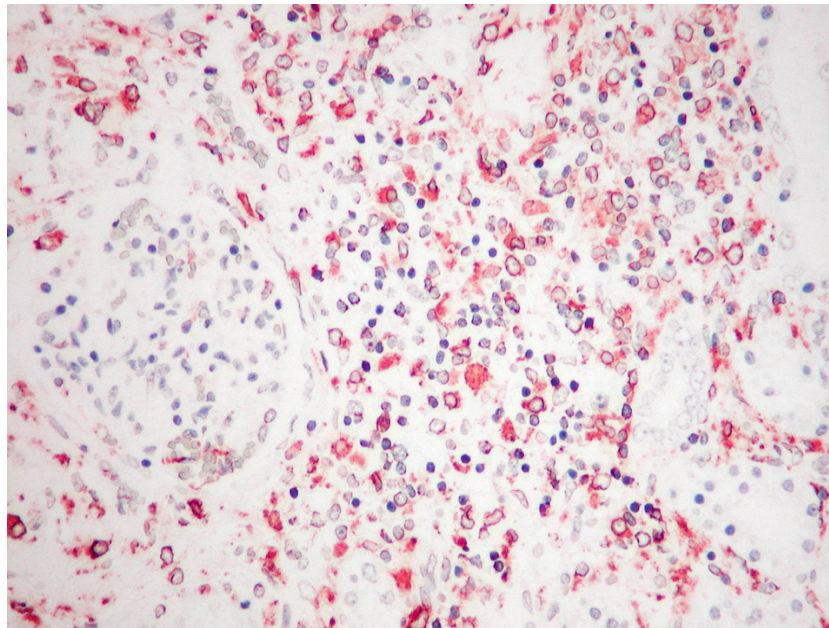
4. táblázat. Az elváltozást mutató szervek gyakorisága 21 PDNS-ben elhullott sertésben (elváltozások száma/vizsgált szervek száma; %)

Bőr	Vese	Máj	Tüdő	Agyvelő	Nyirokcsomó, lép
21/21 100 %	21/21 100 %	9/21 42,9 %	15/21 71,4 %	3/21 14,3 %	15/21 71,4 %

A vírust immunhisztokémiai módszerrel a bőrben, kizárólag az irharétegben elhelyezkedő néhány macrophag sejtben mutattam ki (14. kép), a vese kéreg- és velőállományban, körülírt területeken nagyszámú vírussal fertőzött sejtet találtam (15. kép). A vírust kisebb mennyiségben a tonsillában és a testtájéki nyirokcsomókban is kimutattam.

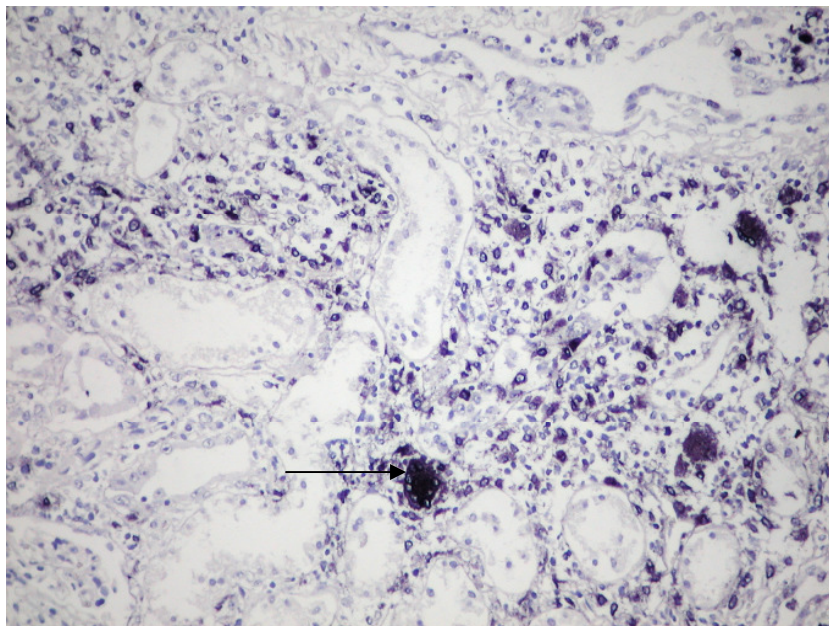


14. kép. A PCV-2 (→) a bőr irharétegében lévő macrophagban. IH, 200×

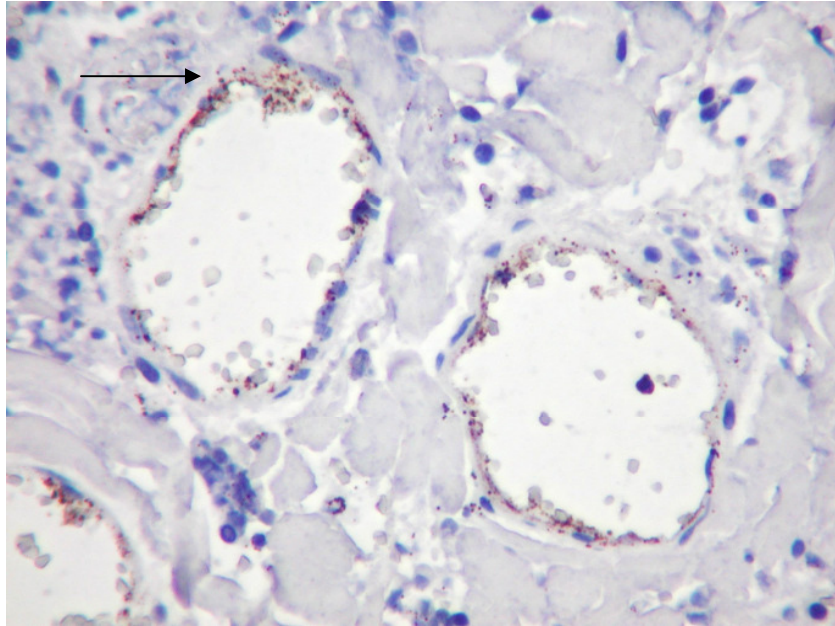


15. kép A PCV-2 a vesében (vörös színreakció) IH, 200 ×

Az ISH vizsgálatok során PCV-2 nukleinsavat a vizsgált szervekben nagyrészt intracellulárisan, a sejtek cytoplasmájában lehetett kimutatni. A PCV-2 specifikus nukleinsavat a vesében a Bowman-tok parietális és viscerális falának epithelsejtjeiben, a tubulushámsejtjeiben valamint a lymphocytákban, a histiocytákban és az óriássejtjeiben (16. kép) figyeltem meg, a bőrben pedig a vérerek endothelsejtjeiben (17. kép), valamint a lymphocytákban és a histiocytákban lehetett kimutatni.

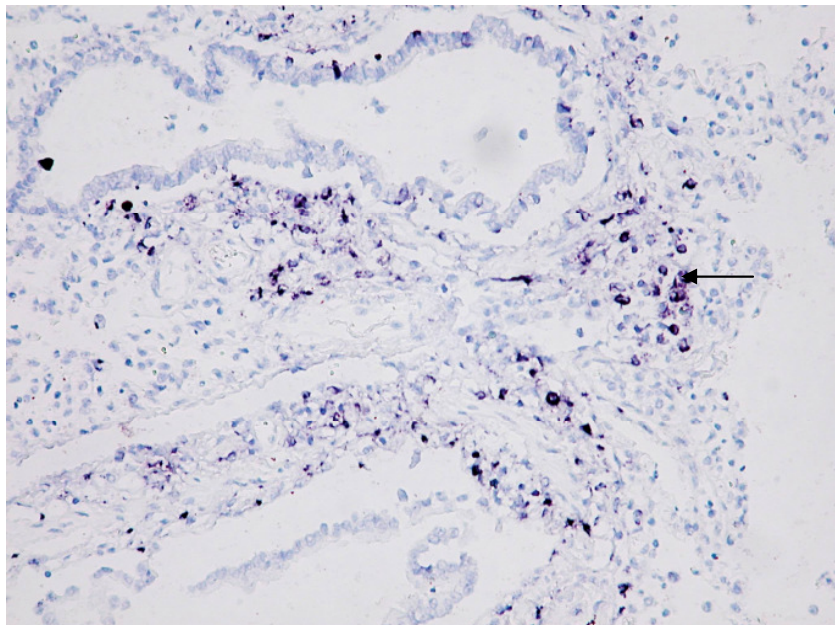


16. kép. PCV-2 nukleinsav (→) a vesében található többmagvú óriássejtjeiben, ISH, 100×

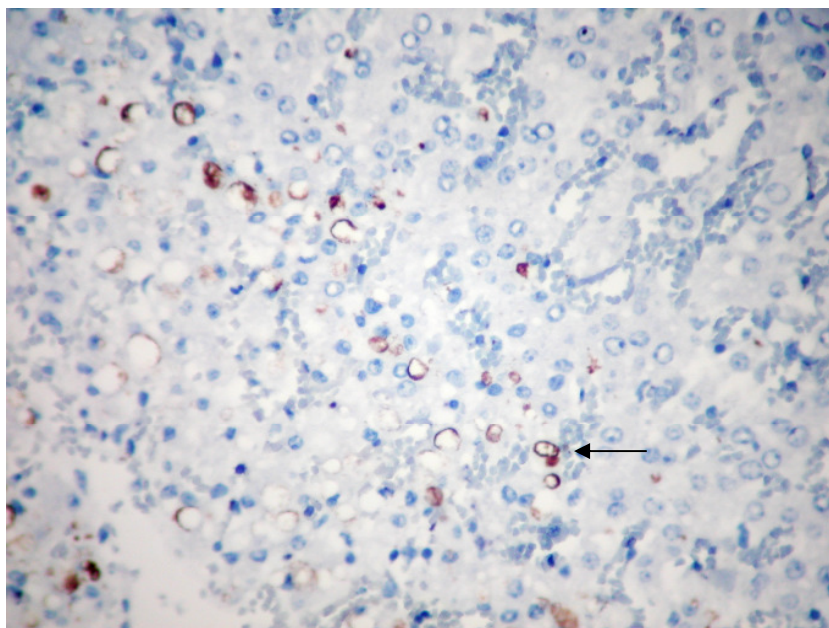


17 kép. PCV-2 nukleinsav (→) a bőralatti kötőszövet ereinek endothelsejtjeiben ISH, 400×

A PCV-2 a tüdő interstitiumában ugyancsak a lymphocytákban és a histiocytákban (18. kép), valamint az alveoláris macrophagokban volt jelen, a nyirokcsomókban, a lépben, az agyvelőben pedig a lymphocyták és histiocyták cytoplasmájában mutattam ki. A májban szintén a lymphocytákban és a histiocytákban, valamint a Kupffer-sejtekben észleltük a PCV-2 nukleinsav jelenlétét (19. kép). A bőr és a nyirokcsomók elhalt területein a vírus jelenlétét ezzel a módszerrel nem lehetett igazolni.

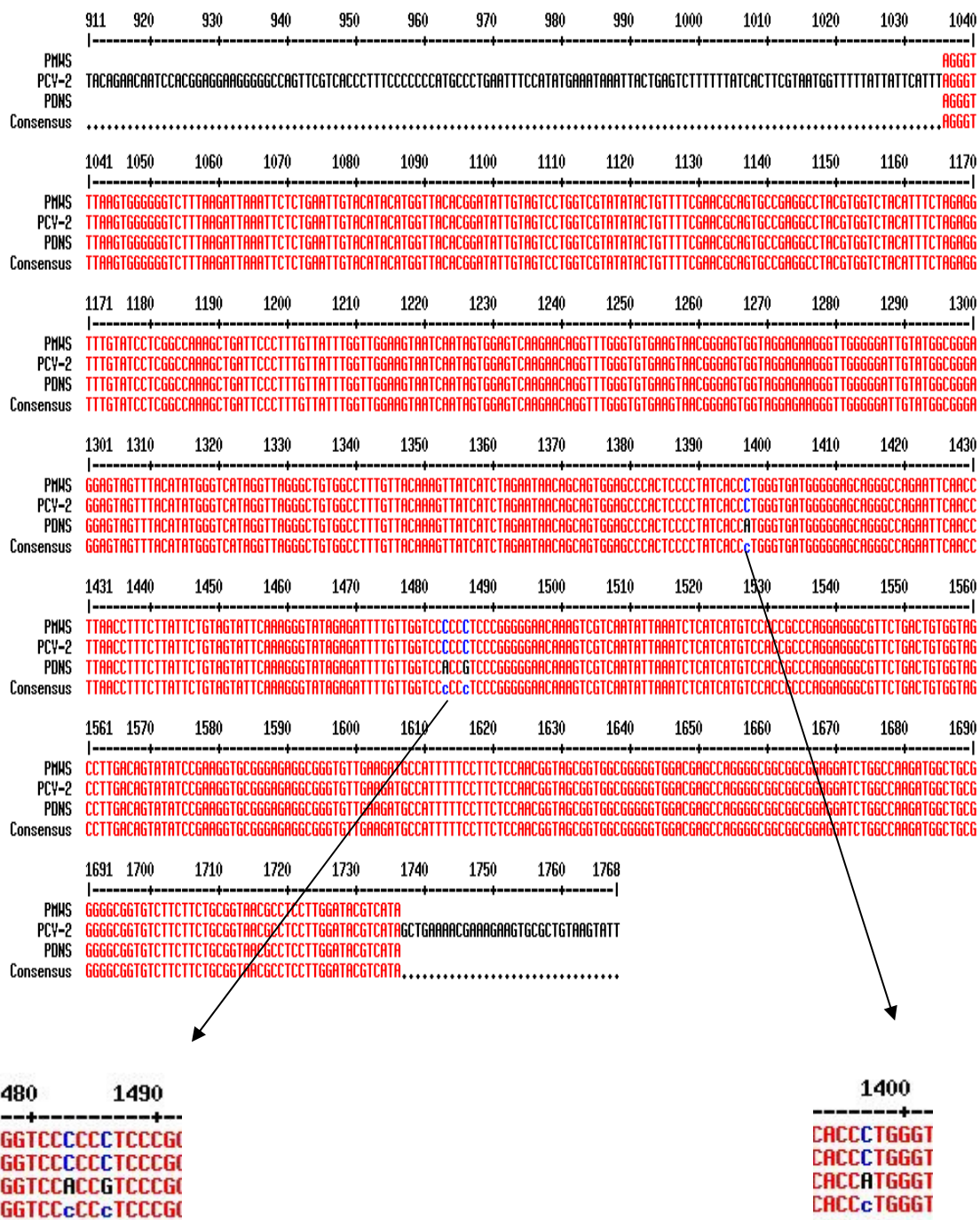


18. kép. PCV-2 nukleinsav (→) a tüdő interstitiumában ISH, 100×



19. kép. PCV-2 nukleinsav (→) májbeli lymphocytákban, histiocytákban és Kupffer-sejtekben, ISH, 200×

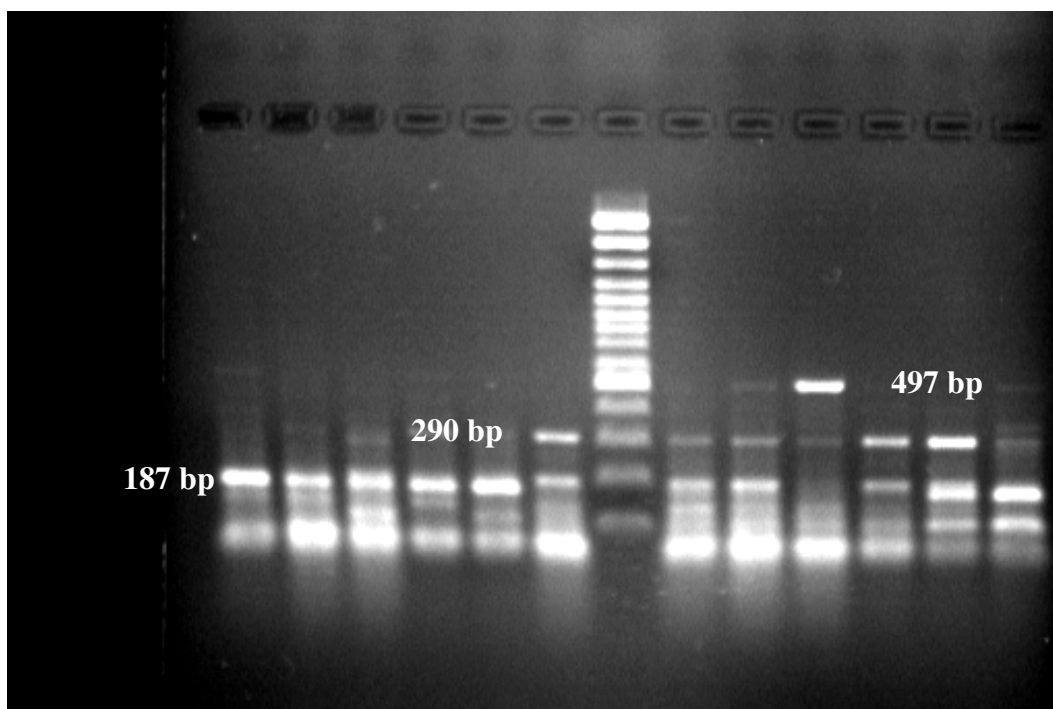
Annak megválaszolására, hogy a PMWS és a PDNS kialakulásában – a kórforma életkori jelentkezése és a kórfejlődésben mutatkozó különbségén kívül – esetleg a PCV-2 szekvenciájának különbsége is szerepet játszhat, a két különböző kórképben elhullott sertések szerveiből történő vírus DNS-ek szekvencia vizsgálatát végeztük el RFLP-vel és szekvencia analízissel. Tíz különböző minta vizsgálata során 7 esetben teljesen azonos nukleotid sorrendet találtam, míg 3 esetben volt ugyan szekvenciabeli különbség, de ezek a változások nem okoztak az általuk kódolt aminosavban változást (4. ábra).



4. ábra. PMWS-ben és PDNS-ben elhullott sertésekből izolált PCV-2 ORF-2 génjének szekvencia analízise

5.4. A PCV-2 replikáció és a szöveti elváltozások közötti összefüggés

Négy különböző állományból származó két-két, a PMWS-re jellemző klinikai tüneteket mutató malacot elvégeztem, majd RT-PCR-rel vizsgáltam a szerveikben jelenlévő PCV-2 REP génjéről szintetizálódott RNS molekulákat. Ugyanezeknek a szerveknek elvégeztem a kórszövettani vizsgálatát is, annak felderítésére, hogy a vírus szaporodása az elváltozásokra hatással van-e. Az RT-PCR reakció során 187 bp, 290 bp és egy kb. 497 bp nagyságú termékeket kaptam (5. ábra), amelyek szekvencia analízise során a PCV-vel megegyező bázissorrendet találtam.



5. ábra. 187, 290 és 497 bp nagyságú cDNS termékek detektálhatók a vírus szaporodása során (RT-PCR)

5. táblázat. PMWS-ben elhullott 8 malac szerveiben észlelt szöveti elváltozások.

	Lép	Máj	Vese	Tüdő	Agy velő	Tonsilla	Hasnyálmirigy	Szív	Nyirokcsomó
1	h	a	-	c, a, b, g	-	h	-	-	h
2	h, e	a	-	c, b, g	-	h, b	-	-	h
3	h	a,d, k	a	c, a	-	h, b	-	-	h
4	h	a,d, k	-	c	-	-	-	-	h
5	h, f	f	-	a	-	h	-	-	h
6	h	a	-	c	-	-	-	-	h
7	h	-	a	c	-	-	-	-	h
8	h	-	-	-	-	-	-	-	h

Megjegyzés: a piros színnel jelzett elváltozások esetében az RT-PCR PCV-2-re pozitív eredményt adott.

- | | |
|----------------------------------|------------------------|
| a. lympho-histiocytás beszűrődés | g. elhalás |
| b. hurutos-gennyes beszűrődés | h. lymphocytá depletio |
| c. interstitialis gyulladás | k. savós májgyulladás |
| d. fibrosis | |
| e. megakariocytá képződés | |
| f. savós-gennyes serositis | |

Az eredmények arra utalnak, hogy a vírus szaporodása és a szövetekben létrejövő elváltozások között összefüggés mutatható ki. A vírus szaporodása a lépben lymphocytá depletio-t okozott, a májban pedig lympho-histiocytás interstitialis beszűrődés látható. A sejtes beszűrődés és a PCR reakció során detektált mRNS molekulák közötti kapcsolatot a vírus lymphoid elemekben történő szaporodásával lehet magyarázni. Ez a jelenség a tüdőben is megfigyelhető, ugyanis abban az esetben voltak pozitívak a PCR reakciók, amelyben a tüdő interstitiumában lympho-histiocytás beszűrődés jelentkezett. A tonsillában valamint a nyirokcsomókban a vírus aktív szaporodása eredményeként lymphocytá depletio-t okozott (5. táblázat).

5.5. A PCV-2 vírus szaporodásbiológiai kártétele

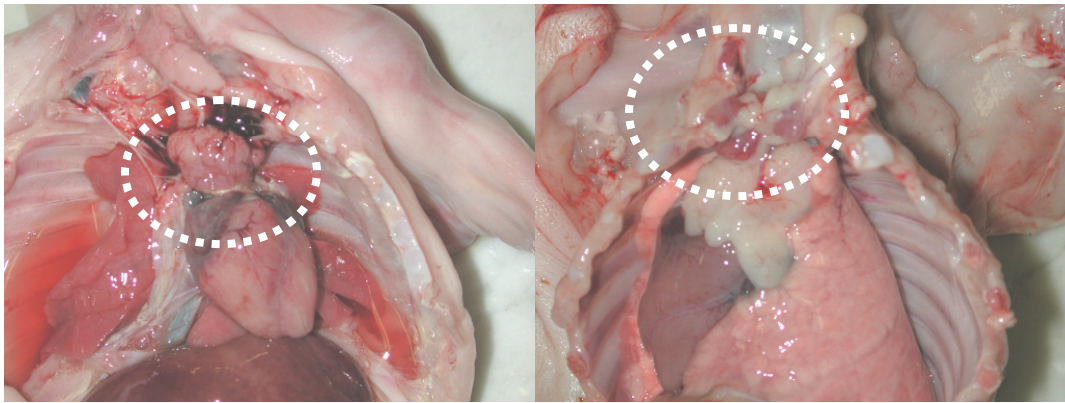
Vetélések, koraellések és rendellenes fialások háttérében tanulmányoztam a PCV-2 lehetséges oktani szerepét. Az idő előtti fialásokból származó, valamint a normálisnál alacsonyabb egyedszámú és eltérő egyednagyságú almok malacait vizsgáltam kórbonctani, kórszövettani és *in situ* hibridizáció (ISH) módszerrel.

Az OÁI-ban diagnosztikai vizsgálat céljából beküldött 25 alom vizsgálatát végeztem el, almonként 5 magzatot. Az érintett esetekben jellemző volt a változó alomszám (5-13), a közel azonos időben vetélt vagy koraellet almok magzatai különböző nagyságúak (18-30 cm) voltak, sőt egy almon belül is voltak nagyságbeli/fejlődésbeli különbségek (20. kép).



20. kép. Azonos vemhességi stádiumban (105. nap) koraellet almok egyedeinek méretbeli különbsége jól látszik (jobb oldali kép a PCV-2 vírussal terhelt alom)

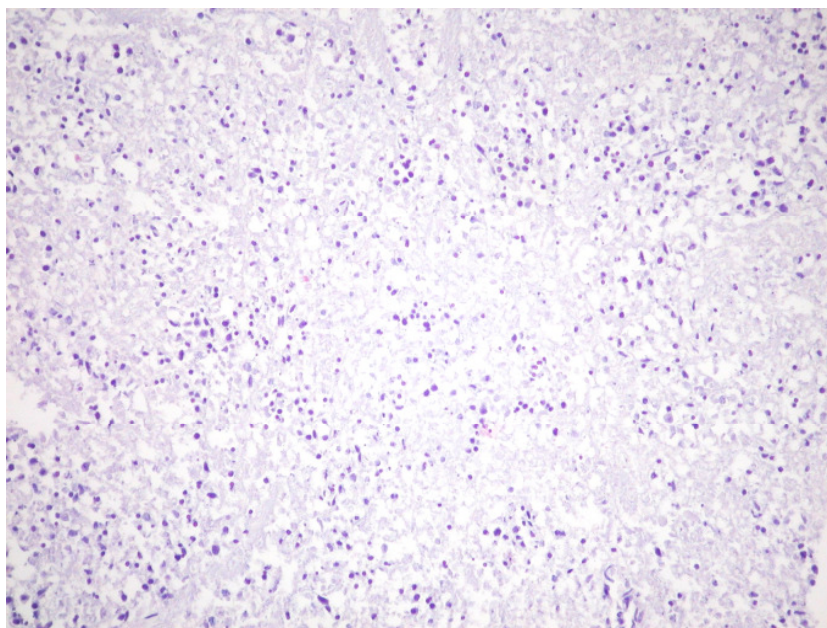
A magzatok kórbonctani vizsgálata során szembetűnő volt, hogy a thymus nagysága az érintett almok egyedeinek 30-70 %-ánál eltért, hosszúsága 1-4 cm között volt (21-22. kép) Egyéb szervek kórbonctani elváltozást nem mutattak. A kórszövettani vizsgálatok során a thymusban a makroszkóposan látható atrophíával arányos mértékű lymphocyta depletiót, kéregatrophíát, a lymphocyták kiürülését, a lebenykék kéregállományának sorvadását, valamint a thymoepithelsejtek proliferációját figyeltem meg (23. kép).



21. kép. A magzatokban a thymus nagysága eltérő az érintett almok egyedeiben (bal oldali képen az egészséges thymus látható, fehér szaggatott körvonal jelzi a thymust)



22. kép. A PCV-2-vel fertőződött koraszületett malacok thymusa kisebb egészséges társaihoz viszonyítva (a baloldali kontroll)

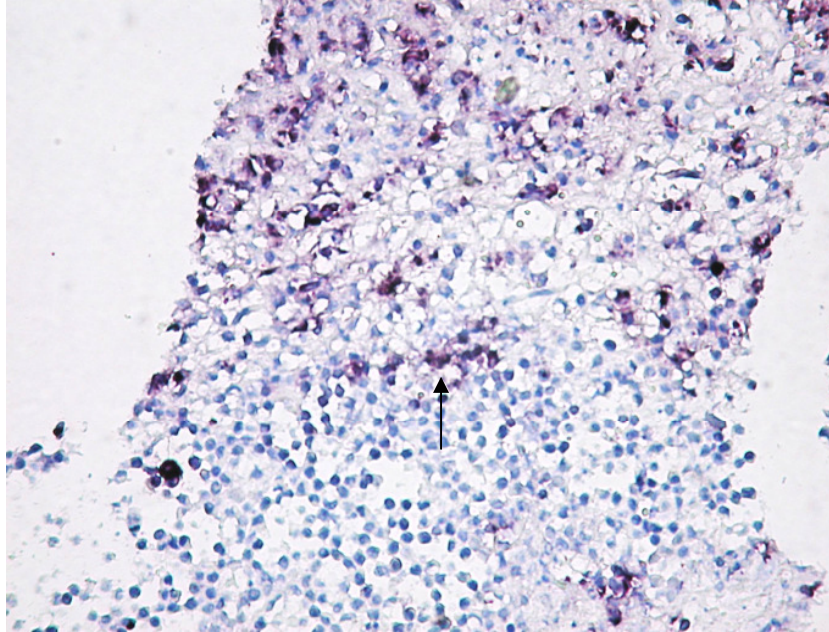


23. kép. Thymoepithel sejtek proliferációja PCV-2-vel fertőződött magzat thymusában HE, 40x

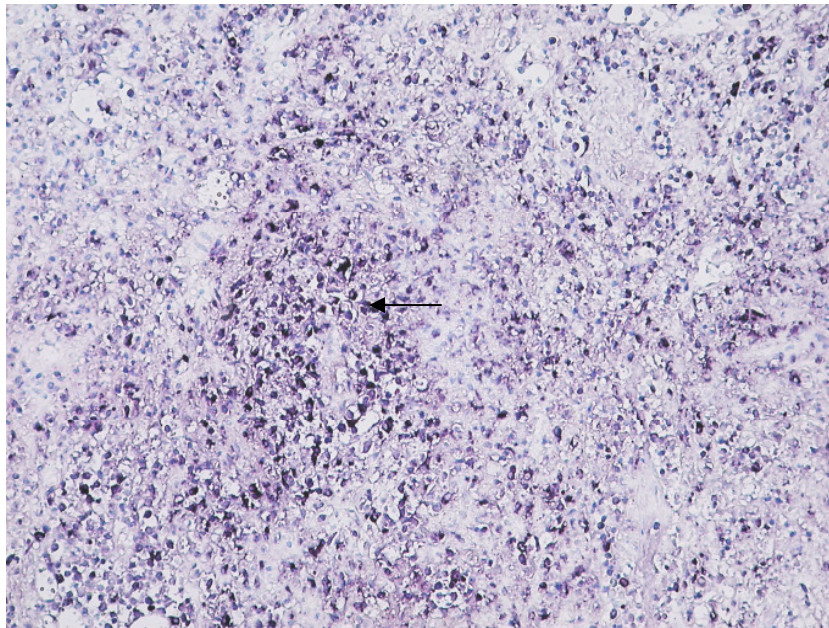
Ötvenkilenc esetben (47,2 %) a nyirokcsomókban gócos elhalások mellett lymphocytadepletio volt. A lépben lymphocytadepletiót, syntitialis óriássejt képződést, megakaryocytaproliferatiót láttam 37 (29,6 %) magzatnál, a tüdőben intralobuláris interstitialis tüdőgyulladást 13 (10,4 %) esetben figyeltem meg. 27 (21,6 %) májban MPS-aktivációmorfológiai jeleit, valamint 38 (30,4 %) vesében glomerulo- és tubulonephrosist és gócos interstitialis gyulladást láttam. A szívizom kóros elváltozást nem mutatott. Az ISH vizsgálatok során a vírust az immunszervek sejtsejtes elemeiben, a thymocytákban, a lymphocytákban, a syntitialis óriássejtben és a megakaryocytákban lehetett kimutatni az érintett szervek esetében (lép: 25. kép, máj, vese, nyirokcsomó, thymus: 24. kép, tüdő). 6. táblázat.

6. táblázat. A magzati szervek PCV-2 pozitívitasának és az elváltozásainak száma

	Thymus +/-	Mesenterialis nyirokcsomó +/-	Lép +/-	Tüdő +/-	Máj +/-	Vese +/-
Szövet-tani elváltozás	45/125	59/125	37/125	13/125	27/125	38/125
PCV-2 pozitívitas ISH-val	67/125	65/125	65/125	35/125	39/125	41/125



24. kép. PCV-2 nukleinsav (→) a thymusban, ISH, 100×



25. kép. PCV-2 nukleinsav (→) a lépben, ISH, 100×

5.6. A sejtzárványos rhinitis

A sejtzárványos rhinitist – amelyet a bétaherpesz alcsaládba tartozó cytomegalovírus (PCMV) idéz elő – munkatársaimmal elsőként állapítottuk meg 2003-ban Magyarországon. A diagnosztikai vizsgálataim során 2004-2005 években további 15 hazai sertésállományban ismertem fel a kórképet. A vírus hazai elterjedésére vonatkozóan a PCMV kimutatására irányuló PCR vizsgálatok 49 állományból 35-ben mutatták ki a vírus jelenlétét.

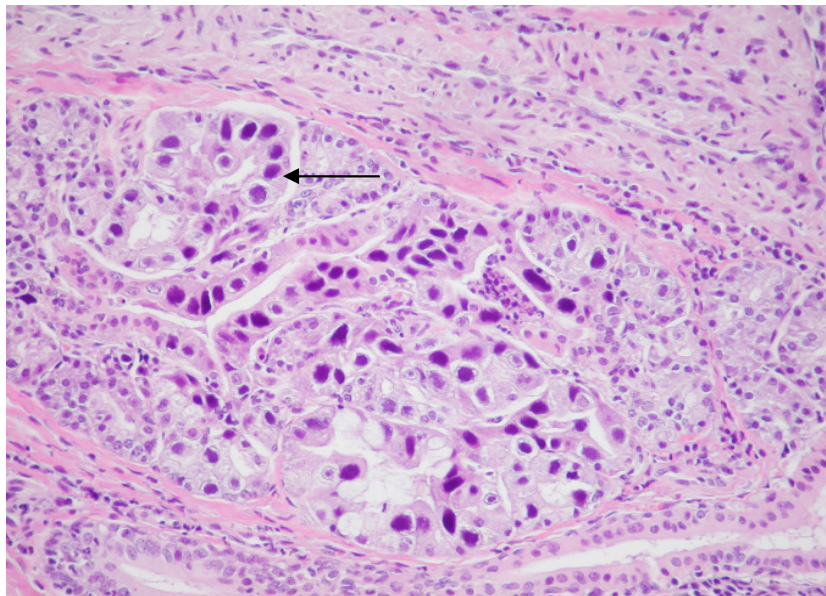
Az első megállapítás során a két érintett (200 és 350 kocás) sertéstelep földrajzi elhelyezkedését tekintve egymástól független volt, élőállat és egyéb kapcsolat a két állomány között nem volt. A telepek járványvédelme és higiénias állapota nem felelt meg a minimálisan elvárható szintnek. Mindkét telepen az újszülött malacok között 2-3 napos korban tapasztalt, előzmény nélküli hirtelen elhullások, valamint a 2-3 hetes korcsoportban jelentkező tüszögés, légzőszervi tünetek vetették fel a sejtzárványos rhinitis gyanúját. A fiaztatókban a klinikai tünetek nagyszámú malacnál jelentkeztek. Mindkét telepen a szopós malacok elhullása 4-8 héten át folytatódott, így a malacok közel 40 %-a elhullott. Az elhullások hátterében a baktériumos szövődmények álltak-az egyik állományban *Streptococcus suis* okozta vérfertőzés, a másik állományban pedig *Actinobacillus pleuropneumoniae* okozta tüdő- és mellhártyagyulladás, valamint *E. coli* hasmenés halmozott előfordulását figyeltem meg. Az elhullások csupán a szopós malacoknál jelentkeztek, a választott malacoknál illetve hízóknál és tenyészállatoknál klinikai tünetekben megnyilvánuló megbetegedést nem tapasztaltam. Az érintett almoknál a baktériumos szövődmények okozta veszteségeket széles spektrumú antibiotikus kezeléssel lehetett mérsékelni.

A kórbonctani vizsgálat során a 2-3 hetes malacok közepesnél gyengébb tápláltsági állapota és a bőralatti kötőszövet oedemás beszűrődése mellett a mell- és hasüregben közepes mennyiségű savós tartalom felhalmozódását, valamint a tüdő interstitiumának megszélesbedését és savós beivódását figyeltem meg. Az orrkagylók nyálkahártyája mindegyik esetben duzzadt és haragosvörös volt.

A bélcsatorna aerob és anaerob flórájának vizsgálata során az esetek nagy részében közel színtenyészetben vérsajtoldó tulajdonságú *E. coli* baktériumokat tenyésztettem ki.

A kórszövetteni vizsgálat során az orrnyálkahártya heveny savós gyulladása mellett, a mirigyhámsejtekben egymagvú óriássejt képződést (cytomegaliát) és basophil sejtmagzárványokat figyeltem meg (26. kép). A tüdőben heveny savós-vérzéses gyulladást, helyenként sajátos proliferatív jellegű „zabsejtes” beszűrődést és fibrines mellhártyagyulladást figyeltem meg. Egyes esetekben mononukleáris sejtes beszűrődéssel és

macrophag proliferációval kísért intralobuláris, interstitialis gyulladást találtam. Egyéb szervekben (a parenchymás és a lymphoid szervekben, a nyálmirigyben, a könnymirigyben stb.) nem találtam vírusszaporodásra utaló elváltozásokat.



26. kép. Cytomegalia és zárványok (→) az orrnyálkahártya mirigyeinek hámsejtjeiben.
HE, 400×

Veszprém megyében egy 400 kocás telepen szintén megállapítottam a sejtzárványos orrgyulladást, de ebben az esetben főként az újszülöttek megbetegedése jelentkezett. A kocák vérenek Parvo-, PRRRS-, PCV-2 vírusok, valamint *Brucella* spp. irányában végzet szerológiai és molekuláris biológiai vizsgálata negatív eredménnyel zárult. A telepen szinkronizáltan történt fiaztatás, és 60 előhasi kocát, 60-70 napos vemhességi stádiumban áthelyeztek a vemhes kocaszállásra, ahol 80 többször ellett koca volt. Az előhasi kocák rendes időben (117 nap) és normális számú (10-12 malac almonként) malacot fialtak. Tizennyolc előhasi koca esetében azonban rendellenes fialás jelentkezett, gyakran halva születés, gyenge életképességű malacok világrajövetelével. Utóbbiak nagy része néhány órán belül, de legkésőbb 24 órán belül elhullottak. Azok a malacok, amelyek túléltek az első néhány napot – almonként 2-3 malac – a battériás időszakban, illetve a hizlaldában a testtömeggyarapodásuk elmaradt egészséges társaikhoz képest.

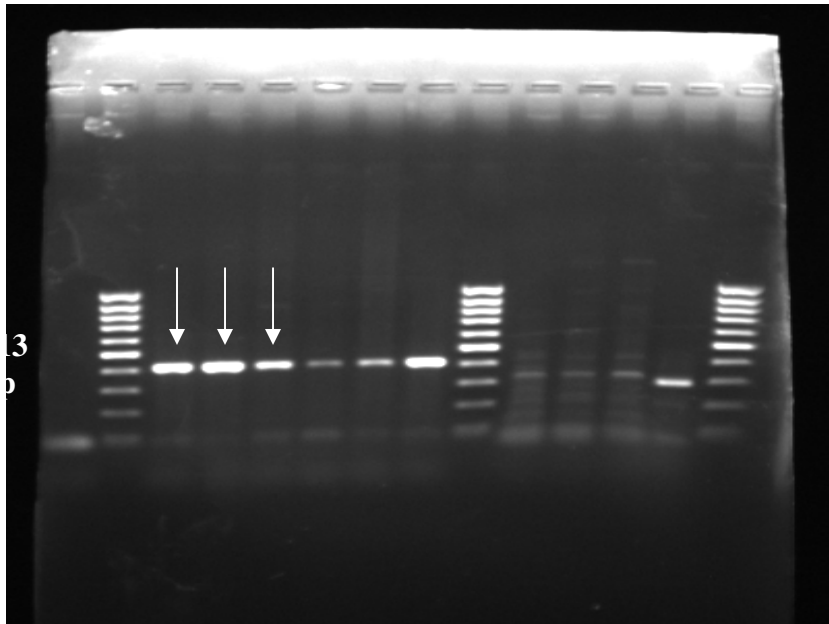
A kórbonctani vizsgálat során a mell- és hasüregi szervek bővítését, a tüdőben helyenként légtelen területeket, valamint az orrnyálkahártyák megszálesbedését és kipirulását találtam. A lép, máj és a bélcsatorna bakteriológiai vizsgálata során kórokozó baktériumokat nem tenyésztettem ki. A tüdő kórszövetteni vizsgálata során enyhébb-súlyosabb mononukleáris-sejtes beszűrődéssel kísért intralobularis, interstitialis gyulladást figyeltem

meg. Az ornyálkahártya szerkezete felbomlott, lympho-histiocytás beszűrődést és helyenként a nyálkahártya mirigyeinek sejtjeiben basophil zárványokat lehetett látni.

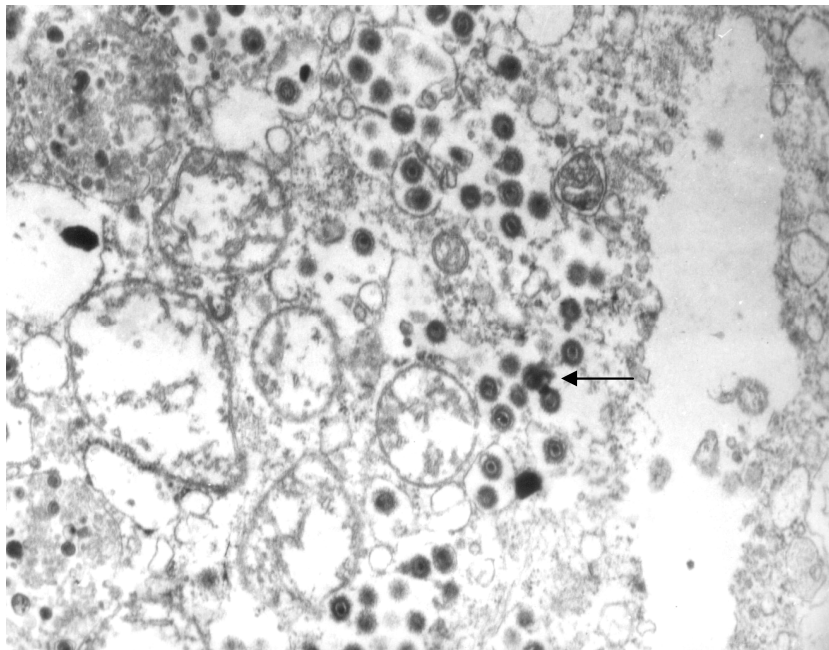
2004-ben egy Győr-Moson-Sopron megyei 350 kocás telepen jelentkezett a sejtzárványos orrgyulladás. A betegség klinikai tünetei a fiaztatóban, 1-3 hetes szopós malacoknál jelentkeztek. A malacoknál tüsszögés, remegés jelentkezett, amely közel 15 %-os elhullással járt. A klinikai tünetek és az elhullások kb. 10 napig tartottak. A kórbonctani vizsgálat során mellvízkórt, a tüdőben helyenként légtelen területeket, valamint heveny gyomor- és bélgyulladást figyeltem meg (7. táblázat). A szervek aerob és anaerob bakteriológiai vizsgálata során a vékonybélből vérsejtoldó tulajdonságú *E. coli* baktériumokat, a tüdőkből pedig szintén vérsejtoldó tulajdonságú *Streptococcus suis*-t. tenyésztettem ki. A tüdő kórszövettani vizsgálata során lympho-histiocytás beszűrődéssel kísért intralobuláris, interstitialis gyulladást, valamint gennysejtes hörgőgyulladást figyeltem meg. Az ornyálkahártya lympho-histiocytás beszűrődése mellett a nyálkahártya mirigyeinek sejtjeiben basophil zárványokat lehetett látni.

A kitenyésztett kórokozó baktériumok (*E. coli*, *Streptococcus suis*) korongdiffúziós módszerrel végzett rezisztencia vizsgálatának eredményének ismeretében a gyógykezelés hatására a klinikai tünetek és az elhullások mérséklődtek, majd 10-14 nap múlva megszűntek.

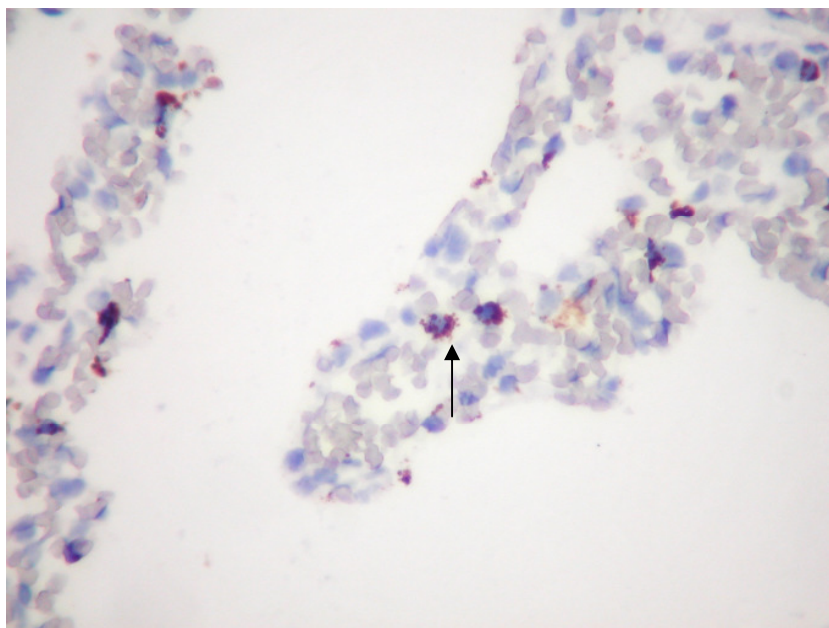
A vírus jelenlétét a zárványokban PCR-rel (413 bp, 6. ábra), ISH-val valamint EM-os vizsgálattal igazoltam. Az egyéb szervekre is kiterjesztett ISH vizsgálat során a vírust az ornyálkahártyában jelenlévő zárványokon kívül, a tüdő monocytáiban és macrophágjaiban (28. kép), a lép és a nyirokcsomók immunsejtjeiben, valamint máj Kupffer-sejtjeiben és az interstitiumba beszűrődött lymphocytákban is kimutattam. Az orrkagylók mirigyhámsejtjeinek elektronmikroszkópos vizsgálatával a zárványt tartalmazó sejtek magjában nagy számban 100-110 nanométer nagyságú, ikozahedralis szimmetriájú nukleokapszid részecskéket mutattam ki (27. kép.), amelyeket a cytoplasmában már burok vett körül.



6. ábra. 413 bp nagyságú termék (fehér nyíl) a PCMV vírus molekuláris biológiai vizsgálatával



27. kép. PCMV (→) az orr nyálkahártyája mirigyhámsejtjeinek cytoplasmájában. EM felvétel, 10 500x



28. kép. PCMV nukleinsav (→) az alveoláris macrophagokban, ISH, 400x

7. táblázat. A PCMV okozta fertőzésekhez társult klinikai tünetek az egyes korcsoportokban

Korcsoport	Klinikai tünetek
újszülött	hirtelen elhullások
2-3 hetes szopós	tüsszögés, orrfolyás, nehezített légzés
vemhességi és fialási időszak	halva fialás, korafialás, életképtelen magzatok, gyenge fejlettségű újszülöttek

6. Megbeszélés

Az utóbbi években külföldi és hazai sertésállományokban is számos olyan vírusfertőzés (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus – PRRSV –, a sertés cirkovírus 2 – PCV-2 –, valamint a sejtzárványos orrgyulladás okozó cytomegalovírus – PCMV) jelent meg, amelyek közvetlen hatásuk révén, valamint az állatok védekező rendszerének károsítása, ezáltal szövődményes baktériumos stb. fertőzések iránti fogékonyság növelése miatt is jelentős gazdasági veszteségeket okoznak. Vizsgálataim célja volt, hogy ezek közül a PCV-2-vel összefüggő kórképeket, a sertések választás utáni sorvadását (PMWS), valamint a dermatitis-nephropathiát (PDNS) és a PCV2 lehetséges szaporodásbiológiai kártételét, továbbá a sejtzárványos rhinitis tanulmányozzam. Adatokat kívántam gyűjteni az említett kórképek hazai elterjedéséről, és tanulmányozni kívántam a kórfejlődést, elsősorban a vírus különböző szervekre és sejtekre – köztük az immunszervekre – kifejtett hatását. Az elért eredményeket elsősorban e kórképek diagnosztikájának fejlesztésében, megbízhatóságának növelésében szándékoztam felhasználni. A gyorsabb és pontosabb körjelzés nagyban elősegítheti a védekezési eljárások eredményességét.

A PCV-2 hazai elterjedésére vonatkozó hazai adatok eddig nem álltak rendelkezésre. Az eredményekben részletezett vizsgálataim eredményei szerint, a 2003-2005 között időszakban az Országos Állategészségügyi Intézetben vizsgált 1250 vizsgált sertés közül a cirkovírusos fertőzöttség PMWS formája a klinikai tünetek és a patomorfológiai elváltozások alapján 789 (63,12 %) sertésnél került megállapításra, és ezekben PCR vizsgálatok PCV-2 szempontjából valamennyi esetben pozitív eredményt adtak. Ezekben az esetekben az elhullások háttérében szövődményes baktériumos tüdőgyulladást és elsősorban a bélsatornára szorító baktériumos fertőzések, esetenként szeptikémia (*E. coli*, *Salmonella* stb.) voltak a jellemzőek. A PDNS a két éves időszakban 34 (2,72 %) esetben állapítottam meg. A vizsgálataim során 367 (29,36 %) sertésnél találtam PCV-2 pozitivitást, ahol a PMWS – heveny illetve elhúzódó formája – és a PDNS klinikai, kórbonctani, és kórszöveti elváltozásai nem voltak láthatók. A sertés cirkovírus károsító szerepét vetélt, koraeltett, gyenge életképességű sertésmagzatokban 25 alom magzatában igazoltam.

A PCV-2 által előidézett kórformák közül leggyakrabban a PMWS fordult elő, és ez okozza a legnagyobb gazdasági kártételt is. A fertőzött, egyébként egészséges állatokban a vírus DNS-t vagy a vírus antigént minimális szöveti elváltozások mellett vagy a nélkül, ritkán kis mennyiségben is kimutatták (Segalés and Domingo, 2002). Ezért a PCV-2 detektálása sertések szöveteiből önmagában még nem elégséges a diagnózis felállításához. Segalés and Domingo (2002) meghatározása alapján PMWS abban az esetben állapítható meg, ha az

állatokban a jellemző klinikai tünetek és a jellegzetes szövettani elváltozások (különösen a nyirokszervekben) mellett, a vírus egy vagy több szervben ki is mutatható.

A PCV-2 szövettani metszetben történő kimutatására az *in situ* hibridizációt és az immunhisztokémiát egyaránt alkalmas eljárásnak találták (Segalés and Domingo, 2002). Mindkét módszer esetében a kórokozó szöveten belüli elhelyezkedése és a hisztopatológiai elváltozások párhuzamosan értékelhetők. Az antigénkimutatás (IH) előnye, hogy összehasonlítva az *in situ* hibridizációval kisebb a munkaerőigénye, valamint kevésbé bonyolult eljárás. Hátránya, hogy egy friss vizsgálat alapján a módszer az *in situ* hibridizációnál valamivel alacsonyabb érzékenységgű (Kim et al., 2004a). A kereskedelmi forgalomban eddig csak fluoreszcein isothiocyanáttal jelölt porcine cirkovírus specifikus, sertés eredetű, polyclonalis szérum van forgalomban (VMRD, Pullman, USA). Ez a reagens a PCV-1-gyel és PCV-2-vel egyaránt reagál, és ennek segítségével a kriosztátos metszetben az immunfluoreszcens mikroszkóppal végzett vizsgálat során csupán a vírus jelenlétét vagy hiányát lehet megállapítani. Az utóbbi időben került kereskedelmi forgalomba egy olyan monoklonális ellenanyag (36A9), amelyet a PCV-2 ORF2 génszakasza által kódolt kapszidfehérjével szemben állítottak elő, és kiválóan alkalmas formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákból készített metszetekben a PCV-2 antigén kimutatására. Az ellenanyag érzékenységét mutatja, hogy a fenti mintákban igen magas hígításban is (saját megfigyelések alapján 1:50 000 hígításban is) jelezni képes a vírus előfordulását.

Az irodalmi adatokkal megegyezően a PCV-2 fertőzés következtében megbetegedett sertések esetében a vírust a legkülönbélebb szervekben elsősorban a macrophagokban mutattam ki.

Az immunhisztokémiai eljárással az elváltozásokat mutató szervekben a PCV-2 antigén jelenlétét következetesen kimutattam. A módszer viszonylag olcsó, és segítségével már a szövettani mintavételt követő 3. nap eredményhez juthattam. A reakció során alkalmazott valamennyi vegyszer a kereskedelmi forgalomban beszerezhető. Tapasztalataink és a nemzetközi ajánlások alapján az ismertetett immunhisztokémiai eljárást alkalmasnak tartom arra, hogy az a hazai diagnosztikai gyakorlatban is alkalmazásra kerüljön.

Az ISH előnye az, hogy a PCV-2 mellett azoknál a kórokozóknál is alkalmazható, amelyek esetében az IH vizsgálatok elvégzéséhez nincs forgalomban diagnosztikum. Ebben az esetben egy egyszerű PCR reakcióval a keresett kórokozó ismert nukleinsav szekvenciájával azonos próbát állíthatok elő, amely alkalmas lesz az ISH végrehajtásához.

A sertések PCV-2 fertőzéssel összefüggésbe hozott kórképei közül a dermatitis-nephropathia szindróma oktana még nem egyértelműen tisztázott (Duran et al., 1997, Morilla et al., 2002, Süveges 2004a). Ebben feltehetően szerepet játszik, hogy – szemben a PMWS-sel

– a megbetegedést, illetve a kóros elváltozásokat kísérletes PCV-2 fertőzéssel eddig nem sikerült előidézni. Feltételezik, hogy a kórfejlődésben immunpatológiai folyamatok – közöttük immunkomplexek képződése és lerakódása – is szerepet játszhatnak (Duran et al. 1997, Molnár et al., 2002, Morilla et al., 2002, Süveges 2004a). Egyre több adat igazolja azonban a kórforma kialakulásában a PCV-2 oktani szerepét (Choi and Chae 2001, Meehan et al., 2001, Molnár et al., 2002, Rosell et al., 1999, Thibault et al., 1998).

A PDNS-re utaló elváltozásokat mutató sertésekben, a bőrben és a vesékben, esetenként a tüdőben, a májban, a nyirokcsomókban, a lépben és az agyvelőben találtam a kórképre jellemző szöveti elváltozásokat. A bőrben – mások megfigyelésével (Dán et al., 2003, Duran et al., 1997, Molnár et al., 2002, Morilla et al., 2002, Ramos et al., 1997, Smith et al., 1993, Thibault et al., 1998) összhangban – lympho-histiocytás vasculitissal, helyenként vérér thrombotisatióval és gennysejtes beszűrődéssel kísért gyulladást és következményes elhalást, a vesében heveny exsudatív glomerulonephritist és lympho-histiocytás interstitialis gyulladást, elhúzódó esetben pedig a tubulusok tágulatával, sorvadásával kísért vesefibrosist figyeltünk meg. A tüdőben és a májban esetenként lympho-histiocytás gyulladás, az agyvelőben egy esetben gócos nem gennyes vasculitis mutatkozott. Az immunrendszerhez tartozó szervekben (a lépben, a nyirokcsomókban) lymphocyta-depletiót, főként a nyirokcsomókban többmagvú óriássejteket figyeltem meg. A PCV-2 nukleinsav ISH módszerrel elsősorban a lymphocyták és a histiocyták (macrophagok) cytoplasmájában figyeltem meg, de emellett a bőr vérereinek endothelsejtjeiben, a vesetestecskék, a Bowman-tok parietalis és visceralis falának epithelsejtjeiben is kimutattam. A kórképre külföldi szerzők által is jellemzőnek tartott vérérvárosodás, thrombotisatio, vérzések, elhalások (bőrben, vesében stb.) háttérben vizsgálati eredményeink alapján, az érfalak endothelsejtjeiben kimutatott PCV-2 oktani szerepe valószínűsíthető.

Tekintettel arra, hogy a két kórképet azonos tulajdonságú és szekvencia sorrendű vírus okozza, valamint a PDNS ismerten idősebb sertésekben is csak sporadikusan fordul elő, ezért feltehetően a kórkép kialakulásában az egyedi érzékenységben illetve válaszreakciókban keresendő a válasz.

A PCV-2 fertőzés két megjelenési formájára (PMWS, PDNS) jellemző klinikai, kórbonctani és kórszöveti elváltozások gyakran jellegzetesnek, esetenként kórjelző értékűek, azonban a vírus sejtszintű jelenlétének és kártételének bizonyítása érdekében ISH vagy IH módszerekkel kell meg vizsgálni az immunszerveket, a tüdőt, valamint az elváltozást mutató szerveket. Így eredmények birtokában – amennyiben az említett vizsgálatok pozitív

eredményt adnak, és a kórszöveti vizsgálatok sejtre illetve szervre kiterjedő károsodást igazolnak – a PCV-2 oktatási szerepét igazolni lehet.

A PCV-2 magzatkárosító hatását a vetélések, koraellések és rendellenes fialások háttérben tanulmányoztam. Huszonöt alom vizsgálatát végeztem el, almonként 5-5 magzatot dolgoztam fel és más szerzőkkel összehangban – (Kim et al., 2002; Park et al., 2005) – jellemző volt a változó alomszám (5-13), a közel azonos időben vetélt vagy koraellett almok magzatai különböző nagysága (18-30 cm), sőt egy almon belül is nagyságbeli/fejlődésbeli különbségek mutatkoztak.

A magzatok kórbonctani vizsgálata során szembetűnő volt, hogy a thymus nagysága az érintett almok egyedeinek 30-70 %-ánál eltért, hosszúsága 1-4 cm között volt (a thymus nagysága fiziológiásan 4-6 cm). Egyéb szervek kórbonctani elváltozást nem mutattak. A kórszöveti vizsgálatok során a thymusban a makroszkóposan látható atróphiával arányos mértékű lymphocytá depletiót, kéregatrófiát, a lymphocyták kiürülését, a lebenyek kéregállományának sorvadását, valamint a thymoepithelsejtek proliferációját figyeltem meg.

A thymus, a lép és a nyirokcsomók károsodása az immunszuppresszió lehetőségét is felveti, ugyanis ha az immunrendszer már a magzati korban károsodik, akkor a megszületett malac immunrendszere nem lesz képes megfelelően reagálni a különféle patogén vagy akár fakultatív patogén kórokozókkal szemben. A thymus fontos szerepet játszik az immunrendszer fejlődésében illetve az immunreakciók kialakításában, emellett az egyedfejlődés során elengedhetetlen a fajra és fajtára jellemző genetikailag determinált fejlődési erély eléréséhez. A thymus által termelt hormonszerű anyag a fejlődés kezdetén szükséges ahhoz, hogy a lymphocyták az antigéneket „felismerjék”, és az ellenük való védekezésre specializálódjanak. Fontos szerepe van a sejtes immunitás kialakításában résztvevő T-lymphocyták kialakulásában. Ez észlelhető az újszülött vagy növendékkorban elszenvedett súlyos terhelések (fertőzés, éhség, hideg hatása, megerőltető igénybevétel stb.) esetén, amikor a bekövetkező stresszreakciók a mellékvesekéreg hormontermelését fokozzák, és ennek hatására a thymus gyorsan, hanyatlóan átalakul. Ezután azonban a szervezet immunreakciói már sohasem érik el az illető állatfajra jellemző optimális szintet. Ezen kívül a thymus az agyalapi miriggyel és a pajzsmiriggyel együtt meghatározza a test alakját és nagyságát is, szabályozza a mellékveséket és az ivarmirigyek funkcióját.

PCV-2 esetén a thymus súlyosfokú károsodását figyeltem meg („biológiai thymectomia”), amely alapján felmerül, hogy ez a folyamat szerepet játszhat a PMWS kórfejlődésében.

Tekintettel arra, hogy a PCV-2 szaporodásbiológiai kártételét a nemzetközi tapasztalatokkal összhangban vizsgálataim is igazolják, ezért a vetélések, halva születések esetében célszerű a PCV -2 fertőzöttség irányába történő vizsgálatokat is végezni.

A sejtzárványos rhinitis első hazai megállapítása (Deim és mtsai., 2003) során ismerttem a betegségre jellemző klinikai tüneteket, valamint kórbonctani és kórszövettani elváltozásokat. A betegséget 2004-2005 években további 15 hazai sertésállományban ismertem fel, és 49 állományból származó malacok közül 35 állomány fertőzöttségét mutattam ki.

A PCMV fertőzés okozta kártételt három különböző formában észleltem. Az irodalmi adatok szerint a kocák PCMV fertőzése esetén korafialást, halva születést, mumifikációt, gyenge életképességű malacokat, valamint a kocáknál orrvérzést lehet észlelni, és a hazai sertésállományokat tanulmányozva hasonlókat észleltem, a kocáknál jelentkező orrvérzést kivéve.

Az egyik esetben előhasi kocáknál jelentkeztek a vírus által okozott szaporodásbiológiai zavarok. Ebben az esetben az előhasi kocákat a vemhességük 60-70. napján helyezték át a vemhes kocaszállásra, ahol többször ellett, a vírus szempontjából már immunológiailag áthangolódott egyedekkel találkoztak. A vemhesség ebben a stádiumában a magzat még immunológiai szempontból éretlen, továbbá az előhasi kocák még nem találkoztak a vírussal, így képes volt a vírus magzatkárosító hatást kifejteni a magzatokra. Ezeknél az előhasi kocáknál a második fialáskor már nem jelentkeztek szaporodási problémák, ugyanis az áthangolódás a megfelelő ellenanyagszint megvédte a vemhes méhet a PCMV magzatkárosító hatásától. Hasonló esetben az előhasi kocákat célszerű még a vemhesítés, vagy a várható fialás előtt áthelyezni a vemhes kocaszállásra, ily módon elkerülhető a vírus magzatkárosító hatásának kártétele.

A PCMV fertőzés másik két formája, az elsősorban a szopós malacoknál jelentkezett. Egyik esetben az újszülötteknél az élet első 24 órájában észleltem klinikai tünetek nélküli hirtelen elhullásokat, míg a másik esetben a 2 hetes életkorban jelentkező, klinikai tünetekben – tüsszögésben, remegésben – is megnyilvánuló formáját. Ezekben az esetekben az elhullásokat a másodlagos baktériumos fertőzések következtében kialakuló tüdőgyulladások és vérfertőzések okozták. Az utóbbiak gyógykezelése az elhullásokat mérsékelte és 2-4 hét múltán teljesen megszüntették. Az előbbieket mellett a tartási- és higiéniai viszonyok javítása is döntően hozzájárult a veszteségek csökkentésében.

A PCMV szervezetben történő elszaporodása elsősorban az ornyálkahártya károsodását idézte elő, amelyekhez csak esetenként társult interstitialis pneumonia. Egyéb szervekben (lymphoid szervekben, a parenchymás szervekben, a nyálmirigyben, a könnymirigyben stb.)

nem észleltem vírusreplikációra utaló szöveti elváltozásokat. Ennek ellenére figyelemre méltó volt, hogy a PCMV által megbetegedett malacokban – a cirkovírus fertőzésnél tapasztaltakhoz hasonlóan – gyakran voltak a baktériumos eredetű (*Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* stb.) szövődményes megbetegedések.

A bántalom hajlamosító tényezőivel, megelőzésével és gyógykezelésével kapcsolatban nincsenek széles körű tapasztalataink, és tekintetben, a szakirodalomban is meglehetősen kevés adat áll rendelkezésre. A gazdasági kár enyhítése céljából a másodlagos baktériumos szövődmények ellen antibiotikus kezeléssel védekezhetünk, valamint a tartástechnológia javítását kell megkísérelnünk.

6.1. Legfontosabb eredmények

1. Kutatómunkám során elsőként gyűjtöttem adatokat a PCV-2 hazai elterjedtségéről.
2. Megismertem a PCV-2 okozta kórképek előfordulásának gyakoriságát a hazai sertésállományok egy részében.
3. Megállapítottam, hogy a vaddisznókban a cirkovírus és a betegségre jellemző elváltozások is jelen vannak.
4. Összehasonlító vizsgálatokat végeztem a PMWS akut és elhúzódó formái között.
5. A vírusok (PCV-2, PCMV) kimutatására irányuló *in situ* hibridizációs módszert dolgoztam ki.
6. A PCV-2 antigén vizsgálatára alkalmas immunhisztokémiai módszert kifejlesztettük.
7. A vírusok okozta károsodásokat, valamint a vírusok támadáspontját vizsgáltam ISH és IH módszerekkel, és ezáltal új ismeretekhez jutottam a vizsgált kórképek patogenezisében.
8. A PDNS-re utaló elváltozásokat mutató sertésekben megállapítottam, hogy a vérérkárosodás, thrombotisatio, vérzések, elhalások (bőrben, vesében stb.) hátterében az érfalak endothelsejtjeiben kimutatott PCV-2 oktatni szerepe valószínűsíthető és mivel a PDNS idősebb sertésekben csak sporadikusan fordul elő, ezért a kórkép kialakulásának a hátterében az egyedi érzékenység illetve válaszreakciók állhatnak.
9. A PCV-2 szaporodási zavarát vizsgálata során a thymus súlyosfokú károsodását figyeltem meg („biológiai thymectomia”), amely alapján felmerül, hogy ez a folyamat szerepet játszhat a PMWS kórfejlődésében.
10. A PCV-2 okozta kórképeket (PMWS, PDNS) különböző szekvenciájú vírusok okozzák, bár ez a szekvenciabeli különbség aminosav változással nem járt.
11. A cirkovírus szövetekben történő szaporodása és az általa okozott szöveti elváltozások között szoros összefüggést állapítottam meg.
12. Elsőként állapítottam meg Magyarországon a sejtzárványos orrgyulladást.
13. IH módszerekkel vizsgáltam a PCMV sejt szintű támadáspontját és a vírus okozta károsodásokat.
14. A PCMV fertőzés három megjelenési formáját észleltem (kocák szaporodási zavara, újszülött malacok hirtelen elhullása, szopós malacok klinikai tünetekben megnyilvánuló forma).
15. A PCMV a vizsgált állományokban széles körben elterjedt.

7. IRODALOM

ALLAN, G.-MCNEILLY, F.-MEEHAN, B.-MCNAIR, I.-ELLIS, J.-KRAKOWKA, S.-FOSSUM, C.-WATTRANG, E.-WALLGREN, P.-ADAIR, B.: Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs experimentally inoculated with a Swedish porcine circovirus 2 isolate. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2003., 15. p. 553-560.

BASSAMI, M. R., BERRYMAN, D., WILCOX, G. E. & RAIDAL, S. R.: Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology*, 1998., 249, p. 453-459.

CHOI C, CHAE C.: Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephrology syndrome by double-labeling technique. *Vet Pathol.*, 2001., 38. p. 436-41.

DAN A, MOLNAR T, BIKSI I, GLAVITS R, SHAHEIM M, HARRACH B.: Characterisation of Hungarian porcine circovirus 2 genomes associated with PMWS and PDNS cases. *Acta Vet Hung.*, 2003. 51. p. 551-562.

DARWICH L, SEGALES J, DOMINGO M, MATEU E.: Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 2002., 9. (2). p. 236-42.

DEIM ZOLTÁN, GLÁVITS RÓBERT, BIKSI IMRE, DENCŐ LÁSZLÓ, RÁCZNÉ M. ÁGNES.: A sejtzárványos rhinitis első megállapítása hazai sertésállományokban. Kövesnapok, Kecskemét, 2003

DONE J. T.: An inclusion body rhinitis of pigs. *Vet. Rec.*, 1955., 67, p. 525-527.

DURAN CO, RAMOS-VARA JA, RENDER JA .: Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a new condition to include in the differential diagnosis list for skin discoloration in swine. *Swine Health Prod.*, 1997., 5. p. 241-245.

EDINGTON, N., PLOWRIGHT, W AND WATT, R. G.: Generalized porcine cytomegalic inclusion disease: distribution of cytomegalic cells and virus. *J Comp. Path.*, 1976., 86, p. 191-202.

EDINGTON, N.; W.; WRATHALL, A. E.; AND DONE, J. T.: Porcine cytomegalovirus in early gestation. *Vet Microbiol.*, 1988., 17, p. 117-128.

EDINGTON, N. W.: (1999) Cytomegalovirus *In* Straw et al. (eds): Diseases of Swine 8th ed., Iowa State University Press, p. 125-131.

HAMEL AL, LIN L, SACHVIE C, GRUDESKI E, NAYAR GP.: PCR assay for detecting porcine cytomegalovirus. *Clin Microbiol.*, 1999., 11, p. 3767-3768.

HARDING, J. D. J.: Inclusion body rhinitis of swine in Maryland. *Amer. J. Vet. Res.*, 1958., 19, p. 907-912.

KELLY, D. F.: Pathology of extranasal lesions in experimental inclusion body rhinitis of pigs. *Res. Vet. Sci.*, 1967., 8, p. 472-478.

KIM, J.-CHUNG, H. K.-CHAE, C.: Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet. J.*, 2003., 166. p. 251-256.

KIM, J.-CHAE, C.: Comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridisation for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2004a., 16. p. 45-50.

KIM J, JUNG K, CHAE C.: Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Vet Rec.*, 2004b., Oct 16; 155(16), p. 489-92.

KIM, J.-HA, Y.-JUNG, K.-CHOI, C.-CHAE, C.: Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Can. J. Vet. Res.*, 2004c., 68. p. 218-221.

KISS, I.-KECSKEMÉTI, S.-TUBOLY, T.-BAJMÓCZI, E.-TANYI, J.: New pig disease in Hungary: Postweaning multisystemic wasting syndrome caused by circovirus. *Acta Vet. Hung.*, 2000., 48. p. 469-475.

L' ECUYER, C. & CORNER, A. H.: Propagation of porcine cytomegalic inclusion disease virus in cell culture. *Can J Comp Med.*, 1996., 30, p. 321-326.

LIM, G, K, ET AL.: Development of PCR and nested PCR for its detection and isolation and sequencing of porcine cytomegalovirus. Proc. 17th IPVS Congress, Ames Iowa, p. 595.

MANKERTZ A, HATTERMANN K, EHLERS B, SOIKE D.: Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. *Arch Virol.*, 2000., 145, p. 2469-2479.

MAURICE B. PENSAERT, ROMEO E. SANCHEZ, JR., ANNE-SOFIE LADEKJÆR-MIKKELSEN, GORDON M. ALLAN AND HANS J. NAUWYNCK.: Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet Microbiol.*, 2004 Feb 4., 98(2), p. 175-83.

MEEHAN BM, MCNEILLY F, MCNAIR I, WALKER I, ELLIS JA, KRAKOWKA S, ALLAN GM.: Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Arch Virol.*, 2001. 146. p. 835-42.

MIKKELSEN AS LADEKJAER, NIELSEN J, STORGAARD T, BOTNER A, ALLAN G, AND MCNEILLY F.: Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. *Vet Rec.*, 2001., 148, p.759-760.

MIYATA, H., H. TSUNODA, A. KAZI, A. YAMADA, M. A. KHAN, J. MURAKAMI, T. KAMAHORA, K. SHIRAKI, AND S. HINO.: Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J. Virol.*, 1999., 73, p. 3582-3586

MOLNÁR, T.-GLÁVITS, R.-SZEREDI, L.-DÁN, Á.: Occurrence of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Hungary. *Acta Vet. Hung.*, 2002., 50. p. 5-16.

MORILLA A., KYOUNG-JIN YOON, JEFFREY J. ZIMMERMAN.: Trends in emerging viral infections of swine, Iowa State Press, USA, 2002., 9.6. p. 313-318.

NIELSEN J, VINCENT IE, BOTNER A, LADEKJAER-MIKKELSEN A, ALLAN G, SUMMERFIELD A, MCCULLOUGH KC.: Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Immunol Immunopathol.*, 2003., 92. (3-4). p. 97-111.

O'CONNOR B., GAUVREAU H., WEST K., BOGDAN J., AYROUD M., CLARK E.G., KONOBY C., ALLAN G. AND ELLIS J.A.: Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can. Vet. J.*, 2001., 42, p. 551-553

OKUDA Y, ONO M, YAZAWA S, SHIBATA I.: Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. *J Vet Diagn Invest.*, 2003., 15 (2). p. 107-14.

PARK JS, KIM J, HA Y, JUNG K, CHOI C, LIM JK, KIM SH, CHAE C.: Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J Comp Pathol.*, 2005., 132(2-3), p. 139-44.

PENSAERT MB, SANCHEZ RE JR, LADEKJAER-MIKKELSEN AS, ALLAN GM, NAUWYNCK HJ.: Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet Microbiol.*, 2004., 98(2), p. 175-83.

PHENIX, K. V., J. H. WESTON, I. YPELAAR, A. LAVAZZA, J. A. SMYTH, D. TODD, G. E. WILCOX, AND S. R. RAIDAL.: Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *J. Gen. Virol.*, 2001., 82, p. 2805–2809.

RAMOS-VARA JA, DURAN O, RENDER JA, CRAFT D.: Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. *Vet Rec.*, 1997., 141. p. 479-80.

ROSELL C, SEGALES J, PLANA-DURAN J, BALASCH M, RODRIGUEZ-ARRIOJA GM, KENNEDY S, ALLAN GM, MCNEILLY F, LATIMER KS, DOMINGO M.: Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp Pathol.*, 1999., 120, p. 59-78.

ROSELL, C.- SEGALÉS, J.- RAMOS-VARA, J. A.- FOLCH, J.M.- RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M.- DURAN, C.O.- BALASCH, M.- PLANA - DURÁN, J.- DOMINGO, M.: Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet. Rec.*, 2000., 146. p. 40-43.

SANCHEZ RE JR, NAUWYNCK HJ, MCNEILLY F, ALLAN GM, PENZAERT MB.: Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation. *Vet Microbiol.*, 2001., 83(2), p. 169-76.

SEGALÉS, J., SITJAR, M., DOMINGO, M., DEE, S., DEL POZO, M., NOVAL, R., DE LAS HERAS, A., SACRISTÁN, C., FERRO, A. AND LATIMER, K.S.: First report of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Spain. *Vet. Rec.*, 1997., 141, p. 600-601.

SEGALES J, ALONSO F, ROSELL C, PASTOR J, CHIANINI F, CAMPOS E, LOPEZ-FUERTES L, QUINTANA J, RODRIGUEZ-ARRIOJA G, CALSAMIGLIA M, PUJOLS J, DOMINGUEZ J, DOMINGO M.: Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol.*, 2001a., 81. (1-2), p. 37-44.

SEGALES J, ALONSO F, ROSELL C, PASTOR J, CHIANINI F, CAMPOS E, LOPEZ-FUERTES L, QUINTANA J, RODRIGUEZ-ARRIOJA G, CALSAMIGLIA M, PUJOLS J, DOMINGUEZ J, DOMINGO M.: Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol.*, 2001b., 83 (1-2). p. 53-67

SEGALÉS, J.-DOMINGO, M.: Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet. Quart.*, 2002., 24, p. 109-124.

SMITH WJ, THOMSON JR, DONE S.: Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Vet Rec.*, 1993., 47. p. 132.

SÜVEGES T.: A sertés cirkovírus-II okozta megbetegedései. *Magyar Állatorvosok Lapja.*, 2003. 125, p. 262-272

SÜVEGES, T.: A sertés-cirkovírus-II (PCV-II) által okozott betegség a (postweaning multisystemic wasting syndrome) során észlelt hisztopatológiai elváltozások, azok diagnosztikai, kórfejlődéstani és klinikai értékelése. *Magyar Állatorvosok Lapja.*, 2004., 126, p. 465-481.

SÜVEGES T.: *Balantidium coli* okozta enterális elváltozások cirkovírussal (PCV-II-vel) fertőzött választott malacokban. *Magyar Állatorvosok Lapja.*, 2004., 11. p. 664-669.

THIBAUT S, DROLET R, GERMAIN MC, D'ALLAIRE S, LAROCHELLE R, MAGAR R.: Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol.*, 1998., 35, p. 108-16.

THOMSON JR, HIGGINS RJ, SMITH WJ, DONE SH.: Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. clinical and pathological features of cases in the United Kingdom (1993-1998). *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.*, 2002., 49 (8). p. 430-7. 16.

TODD, D., F. D. NIAGRO, B. W. RITCHIE, W. CURRAN, G. M. ALLAN, P. D. LUKERT, K. S. LATIMER, W. L. STEFFENS III, AND M. S. MCNULTY.: Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes. *Arch. Virol.*, 1991., 117, p. 129-135.

TODD, D., J. H. WESTON, D. SOIKE, AND J. A. SMYTH.: Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology.*, 2001., 286, p. 354-362

TRUDE SCHWARZACHER & PAT HESLOP-HARRISON: Practical in situ Hybridization, Bios Scientific Publishers Limited, 2000.

VARGA JÁNOS – TUBOLY SÁNDOR – MÉSZÁROS JÁNOS: A háziállatok fertőző betegségei. Általános járványtan II., 1999. 324-325

WEST, K.H.-BYSTORM, J.M.-WOJNAROWICZ, C.-SHANTZ, N.-JACOBSON, M.-ALLAN, G.M.-HAINES, D.M.-CLARK, E.G.-KRAKOWKA, S.-MCNEILLY, F.-KONOBY, C.-MARTIN, K.-ELLIS, J.A.: Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. vet. Diagn. Invest.*, 1999., 11. p. 530-532.

8. PUBLIKÁCIÓK

Cikkek

Z. DEIM, R. GLAVITS, I. BIKSI, L. DENCZO, AGNES RACZNE M. First report of porcine inclusion body rhinitis in Hungary, Vet. Rec., Közlésre elfogadva

SZEREDI L., DEIM Z.: A sertések 2-es típusú cirkovírusának (PCV-2) immunhisztokémiai módszerrel történő kimutatása az ún. választás utáni sorvadásban és dermatitis nephropathia szindrómában elhullott sertések szerveiből, MÁL, 2005. 8, 463-470

DEIM Z., DENCŐ L., BIKSI I., RÁCZNÉ M. Á., GLÁVITS R.: Adatok a sertések dermatitis-nephropathia szindrómájának kóroktanához és kórfejlődéséhez, MÁL, 2005. 4, 207-212

Z. Deim, R. Glavits, F. Szalay, K. Ursu, I. Biksi: Porcine bursitis: Cystic adventitial disease of the vena saphena, Vet. Rec., Közlésre elfogadva

D. Cadar, A. Cságola, Á. Dán, Z. Deim, Marina Spînu, V. Miclăuș, L. Kőbölkuti, G. Czirják, T. Tuboly: Porcine circovirus type 2 and associated diseases in Romania, Vet. Rec., Közlésre elküldve

Z. Deim, L. Dencso, R. Glavits, I. Biksi: A role of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets, Vet. Rec., Közlésre elküldve

Előadások

DEIM ZOLTÁN, DENCŐ LÁSZLÓ, BIKSI IMRE, RÁCZNÉ M. ÁGNES, GLÁVITS RÓBERT. Újabb ismeretek a sertések dermatitis nephropathia szindrómájának kóroktanához és kórfejlődéséhez. Köves-napok, Nyíregyháza, 2005

DEIM ZOLTÁN, DENCŐ LÁSZLÓ, BIKSI IMRE, RÁCZNÉ M. ÁGNES, GLÁVITS RÓBERT. Adatok a sertések dermatitis nephropathia szindrómájának (pdns) kóroktanához és kórfejlődéséhez. MTA akadémiai beszámolók, Budapest, 2005

DEIM ZOLTÁN, DENCŐ LÁSZLÓ, BIKSI IMRE, RÁCZNÉ M. ÁGNES, GLÁVITS RÓBERT. A sertés cirkovírus (pcv-2) oktatni szerepének vizsgálata a kocák egyes szaporodási zavaraiban és a magzatok károsodásában. MTA akadémiai beszámoló, Budapest, 2005

DEIM ZOLTÁN, DENCŐ LÁSZLÓ, BIKSI IMRE, RÁCZNÉ M. ÁGNES, GLÁVITS RÓBERT. Újabb ismeretek a sertések PCV-2 okozta betegségéről VI. Országos Sertés-konferencia, Budapest, 2004

DEIM ZOLTÁN, GLÁVITS RÓBERT, BIKSI IMRE, DENCŐ LÁSZLÓ, RÁCZNÉ M. ÁGNES. A sejtzárványos rhinitis hazai sertésállományokban. MTA Akadémiai beszámoló, Budapest, 2004

Deim Z, Glávits R, Szalay F, , Ráczné M. Ágnes, Ursu K, Biksi I. Az ún. adventitialis bursitis (csánkfeletti nyálkatömlő gyulladása) kliniko-patológiai jelentősége és oktatni vizsgálata. Köves-napok, Komárno, Szlovákia, 2004

DEIM ZOLTÁN, GLÁVITS RÓBERT, BIKSI IMRE, DENCŐ LÁSZLÓ, RÁCZNÉ M. ÁGNES. A sejtzárványos rhinitis első megállapítása hazai sertésállományokban. Köves-napok, Kecskemét, 2003

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatómunkám során nyújtott segítségekért az alábbi kollégáknak szeretnék köszönetet mondani:

Dencső László
Dr. Biksi Imre
Dr. Glávits Róbert
Dr. Molnár Tamás
Dr. Pálmai Nimród
Dr. Rigó Dóra
Dr. Szeredi Levente
Dr. Tekes Lajos

Ferencz Attila
Juhász Ágnes
Malinovszki János
Ottigerné Marika
Ráczné. M. Ágnes
Turák Julianna