

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

**Vírusos baromfif betegségek molekuláris diagnosztikája,
különös tekintettel a csirkék fertőző nephritisét okozó vírus
kimutatására és különböző törzseinek genetikai összehasonlító
vizsgálatára**

Doktori értekezés

Készítette:

Dr. Mándoki Míra

**Budapest
2006**

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Prof. Dr. Vetési Ferenc
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék

Prof. Dr. Rudas Péter †
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Élettani és Biokémiai Tanszék

Prof. Dr. Belák Sándor
The National Veterinary Institute, Department of Virology
Uppsala, Svédország

Készült 8 példányban. Ez a sz. példány.

.....
dr. Mándoki Míra

TARTALOMJEGYZÉK

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | RÖVIDÍTÉSEK | 5 |
| 2. | ÖSSZEFOGLALÁS | 6 |
| 3. | BEVEZETÉS | 8 |
| 4. | IRODALMI ÁTTEKINTÉS | 13 |
| 4.1. | A madárvese felépítése és a kiválasztás jellegzetességei | 13 |
| 4.2. | A köszvény | 15 |
| 4.3. | A köszvény kialakulásának okai..... | 15 |
| 4.4. | Az astrovírusokkal kapcsolatos ismeretek..... | 16 |
| 4.4.1. | <i>Előzmények humán vizsgálatok alapján</i> | 16 |
| 4.4.2. | <i>Az astrovírusok taxonómiája és patogenitása.....</i> | 18 |
| 4.4.3. | <i>Laboratóriumi diagnosztika.....</i> | 20 |
| 4.4.4. | <i>Morfológia, genomszerveződés és replikáció</i> | 22 |
| 4.5. | Az astrovírusok előfordulása madarakban és az általuk okozott kórképek..... | 23 |
| 4.6. | Az avian nephritis vírus..... | 25 |
| 4.7. | Az avian nephritis vírus okozta kórképpel kapcsolatos ismeretek..... | 25 |
| 4.8. | A PCR technika rövid áttekintése..... | 27 |
| 4.9. | Egyes PCR technikák és nukleinsavvizsgáló módszerek rövid leírása | 29 |
| 5. | ANYAG ÉS MÓDSZER | 31 |
| 5.1. | Vizsgálati minták..... | 31 |
| 5.2. | Kórelőzmény, kórbonctani morfológiai vizsgálatok | 32 |
| 5.3. | Kórszövetteni vizsgálat..... | 32 |
| 5.4. | Bakteriológiai vizsgálat | 33 |
| 5.5. | Transzmissziós elektronmikroszkópos morfológiai vizsgálat..... | 33 |
| 5.6. | Vírus RNS tisztítása..... | 33 |
| 5.7. | Primertervezés | 34 |
| 5.8. | ANV RT-PCR..... | 36 |
| 5.9. | ANV nested PCR..... | 36 |
| 5.10. | Az IBV kimutatására használt RT-PCR | 37 |
| 5.11. | Gélelektroforézis (vizualizáció) | 38 |
| 5.12. | A kontamináció veszélyének kivédése | 38 |
| 5.13. | Szekvenálás | 38 |

| | | |
|--------|---|----|
| 5.14. | Szekvencia elemzés | 39 |
| 5.15. | Filogenetikai vizsgálatok | 39 |
| 6. | EREDMÉNYEK | 40 |
| 6.1. | Boncolási eredmények..... | 40 |
| 6.2. | Kórszövettani vizsgálatok eredménye | 42 |
| 6.3. | A boncolási eredmények összefoglalása | 45 |
| 6.4. | Bakteriológiai vizsgálat | 46 |
| 6.5. | Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálati eredmények | 46 |
| 6.6. | RT-PCR vizsgálatok | 47 |
| 6.6.1. | <i>Az avian nephritis vírus hazai előfordulása.....</i> | 48 |
| 6.6.2. | <i>A nested PCR vizsgálat</i> | 49 |
| 6.6.3. | <i>Az 1991-ből származók minták vizsgálata</i> | 51 |
| 6.6.4. | <i>Az ORF2 vizsgálata.....</i> | 52 |
| 6.6.5. | <i>A fertőző bronchitis vírus vizsgálata</i> | 53 |
| 6.6.6. | <i>A „Fa” primer párral végzett RT-PCR vizsgálatok</i> | 55 |
| 6.7. | Filogenetikai elemzés | 56 |
| 7. | MEGBESZÉLÉS | 60 |
| 7.1. | A köszvény | 60 |
| 7.2. | A fertőző bronchitis vírus | 61 |
| 7.3. | Az avian nephritis vírus | 62 |
| 7.3.1. | <i>PCR vizsgálatok.....</i> | 62 |
| 7.3.2. | <i>Filogenetikai vizsgálatok</i> | 63 |
| 7.3.3. | <i>Az elváltozások szöveti megoszlása és ennek jelentősége.....</i> | 65 |
| 7.3.4. | <i>A magyarországi esetek eloszlása.....</i> | 66 |
| 7.4. | A megbeszélés összefoglalása | 67 |
| 8. | ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK | 68 |
| 9. | IRODALOM | 69 |
| 10. | A JELÖLT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓI | 77 |
| 10.1. | A kutatási témában megjelent szakcikkek..... | 77 |
| 10.2. | A kutatási témában tartott előadások..... | 77 |
| 10.3. | Egyéb közlemények referált lapokban | 78 |
| 10.4. | Egyéb előadások és közlemények | 79 |
| 11. | KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 81 |
| 12. | SUMMARY | 82 |

1. RÖVIDÍTÉSEK

| | |
|--|---|
| AN(V) - Avian Nephritis (Virus) | fertőző vesegyulladás (vírusa) |
| BCN (Baby Chicken Nephropathy) | napos csirkék nephropathiája (köszvénye) „vese-működészavar-komplexus” (Tanyi, 1970) |
| bp (base pair) | bázis pár |
| cDNA (complementary deoxyribonucleic acid) | komplementer dezoxiribonukleinsav (cDNS) |
| CKC (Chicken Kidney Cell) | csirke vesesejt |
| CPE (Cytopathic Effect) | citopatogén hatás |
| DNS | dezoxiribonukleinsav |
| dNTP | dezoxiribonukleotid-trifoszfát |
| EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetate) | etiléndiamin-tetraacetát |
| EM | elektronmikroszkóp |
| TEM vizsgálat | transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat |
| EU (European Union) | Európai Unió |
| HE | hematoxin-eozin |
| IBV (Infectious Bronchitis Virus) | fertőző bronchitis vírus |
| KSH | Központi Statisztikai Hivatal |
| mRNS (messenger RNS) | hírvivő RNS |
| MTA | Magyar Tudományos Akadémia |
| ORF (Open Reading Frame) | nyílt olvasási keret |
| PBS (phosphate-buffered saline) | foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat |
| PCR (polymerase chain reaction) | polimeráz láncreakció |
| PEC (poult enteritis complex) | fiatal pulykák bélgyulladás kórképcsoportja |
| PEMS (poult enteritis mortality syndrome) | pulykák helikopter betegsége |
| RNS | ribonukleinsav |
| RSS (Runting Stunting Syndrome) | “fertőző satnyaság” |
| RT-PCR | reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció |
| RRT-PCR (real-time RT-PCR) | valós idejű, reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció |
| SRVs (small round viruses) | kis kerek vírusok |
| TBE | trisz-borát-EDTA |
| TRT (turkey rhinotracheitis) | pulykarhinotracheitis |
| UV (ultraviolet) | ultraibolya |

2. ÖSSZEFOGLALÁS

Az avian nephritis vírus okozta kórkép a baromfi egy kevésbé vizsgált, de széles körben elterjedt, gazdaságilag jelentős fertőző betegsége, amely makroszkóposan is felismerhető morfológiai elváltozásokat hoz létre. A baromfiállományok állatorvosi felügyelete során gyakran tapasztalható heveny veseelégtelenségből, illetve köszvényből adódó tömeges elhullás, azonban a kiválasztás jellegzetességei miatt számos oka lehet ilyen veseelváltozás létrejöttének. A tanszékünkre bekerülő napos baromfi hullaanyag vizsgálata során felmerült egy vesekárosító fertőző ágens esetleges jelenlétének, a néhány országban már leírt avian nephritis vírus okozta fertőzésnek a gyanúja. Ez a gyanú alapozta meg a specifikus diagnosztika iránti igényt, az egyéb más okok által előidézett köszvénytől való elkülönítést, és az avian nephritis vírus jelenlétének megerősítését vagy kizárását.

Mivel a köszvényes elváltozást mutató hullák egy részének kórbonctani és kórszövettani diagnosztikai vizsgálatával egyértelműen vírusos megbetegedésre utaló elváltozásokat állapítottunk meg, kiegészítő transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatot végeztünk, amely során kb. 28 nm nagyságú, öt- vagy hatágú csillagra emlékeztető alakú, ikozaéder felépítésű nukleokapsziddal rendelkező, burok nélküli virionok jelenlétét mutattuk ki a tubuláris hámsejteken, ami ANV fertőzés okozta vesekárosodásra utalt.

A génbankban közölt teljes ANV genomszekvencia (NC_003790) alapján az 5' nem kódoló régióra primereket terveztünk. A specifikus, reverz transzkripciót követően polimeráz láncreakció (RT-PCR), majd egy nested PCR segítségével a referencia törzsön kipróbáltuk és optimalizáltuk a reakciót. Az állat-egészségügyi diagnosztikai intézetekben őrzött korábbi vizsgálati anyagokban, valamint számos, nephritisben szenvedő csirkeállományban vizsgáltuk az ANV jelenlétét. A képződött, 816 bázispár hosszúságú terméken direkt nukleinsav-szekvencia meghatározást hajtottunk végre. A kapott nukleinsav szekvencia a legnagyobb, 92%-os hasonlóságot az ANV-hoz mutatta, ezzel igazoltuk, hogy az amplifikált termék valóban a mintában jelenlévő vírus nukleinsav alapján képződött (Mándoki és mtsai, 2006b).

2002 és 2005 között különböző baromfitartó telepekről behozott, különböző korú, fertőzöttségre gyanús hullákból elsősorban vese- és vékonybél-mintákat gyűjtöttünk, amelyeket állományszintű szűrővizsgálatra keverten, részletes szervi vizsgálatra egyedenként homogenizáltunk és RNS-t tisztítottunk belőlük. Az így létrehozott és megvizsgált mintacsoportokból gyűjtöttük a pozitív eseteket.

Mivel a későbbiek során a nagyobb specifikusságú és érzékenységgű rendszert fejlesztettünk ki, és kedvezőbb primertapadási helyeket sikerült azonosítani, új primereket

szintetizáltattunk a vírus ORF1 régiójára, amelyet a további szűrővizsgálatokban alkalmaztunk. A képződött, 607 bázispár hosszúságú termékeken újabb direkt nukleinsav-szekvencia meghatározást hajtottunk végre. További pozitív PCR termékek szekvenálásával filogenetikai analízist végeztünk (Mándoki és mtsai, 2006a), amellyel bebizonyítottuk, hogy a magyarországi ANV törzsek a vizsgált szakaszon meglepően nagy eltérést (76-86%) mutatnak a referencia törzstől, sőt egymástól is. Ez az eltérés nemcsak különböző telepekről származó mintákra, hanem adott esetben egy gazdaságban nevelt, különböző korú baromfiból származó mintákra is igaznak bizonyult.

A módszer segítségével több hazai csirkeállományban igazoltuk a vírus jelenlétét, és az adatokat felhasználva felmértük a vírus által okozott kórkép hazai elterjedtségét (Mándoki és mtsai, 2005). Vizsgálataink eredményei alapján a fertőzöttség országszerte előfordul, és a kórkép valószínűleg gyakrabban áll egyes csirkeállományok nem megfelelő fejlődésének hátterében, mint korábban vélhető volt.

A fentiekben leírt, és elsősorban alapkutató jellegű laboratóriumi vizsgálatok gyakorlati munkában is hasznosítható eredménye az volt, hogy kialakítottunk egy olyan, a további diagnosztikai szűrővizsgálatok számára is felhasználható, gyors, megbízható PCR módszert, amely – a vírus meglehetősen nagy változékonysága ellenére is – képes a fertőzöttség kimutatására, ezáltal lehetőséget teremt a jövőben az avian nephritis vírus hazai elterjedtségének feltérképezésére, a kórokozó megbetegítő képességének vizsgálatára és a magyarországi vírustörzsek további jellemzésére. Emellett ez az RNS vírus – magas mutagenitása alapján – modellként szolgálhat a vírusevolúció tanulmányozásában, amit a rövid, jól kezelhető, viszonylag olcsón végigszekvenálható genom is segít.

3. BEVEZETÉS

A baromfiipar hazánk fontos agrárágazata, amely révén olcsón, nagy mennyiségben lehet zsírszegény, a modern étrendi követelményeknek is megfelelő proteinforrást előállítani. A hazai húsfogyasztás egy főre jutó mennyiségének fele baromfihús, illetve baromfihús-készítmény. Ezt az is igazolja, hogy a Központi Statisztikai Hivatal (KSH) 2004. évi adatai alapján a vágóbaromfi-termelés a 1999-ben mért adatokhoz képest másfélszeresére nőtt, és a baromfi termékpálya részesedése a mezőgazdasági termelésben 9%. A 2004-ben előállított baromfihús közel egynegyede exportra került.

A baromfiipar nyereségességét befolyásoló tényezők, a minőségi és élelmiszerbiztonsági szempontból kifogástalan termék előállításának igénye és a gazdaságossági mutatók miatt a termelési paramétereket meghatározó állatbetegségek különösen fontosak. Az iparszerű termelési rendszerek jelentik a fejlődés motorját, de az ezzel járó tartási körülmények miatt a fertőző betegségek kiemelt jelentőségűek, hiszen a baromfitartás általában igen nagy létszámú állatállomány egy légtérben való tartását feltételezi, ebből következően:

- amennyiben betegség üti fel a fejét, a gazdasági kár jelentős lehet;
- a kór terjedését nagyon nehéz megállítani;
- az eredményes védekezés feltétlenül gyors diagnosztikai munkát igényel.

Míg a világszerte terjedő, baromfiállományokra is veszélyt jelentő járványok (pl. a madárinfluenza) csak átmenetileg csökkentik a baromfihús iránti keresletet, addig folyamatosan tovább fokozzák az állattartóknak az állatorvosokkal és a diagnosztikai munkával szemben támasztott követelményeit. Egy-egy esetleges járványra való felkészülés mindig aktuális, továbbá a már kialakult helyzetben csak tökéletes minőségű, biztonságosan előállított termékek vehetik fel a versenyt az exportpiacon. Fel kell készülnünk arra, hogy a növekvő arányban jelenlévő „tudatos” fogyasztó nem a legolcsóbb terméket veszi meg.

Egyre több hír szól arról 2005 vége óta, hogy az EU korlátozza a baromfihús exportját különböző országokból a madárinfluenza megjelenése miatt, vagy a fertőzés továbbterjedésének megakadályozására. Ez egyrészt jelentős károkat okoz a baromfiágazatnak, másrészt nagy felelősséget ró az állategészségügy egészére. A fogyasztók megnyugtatója csak állatorvosi ráhatással és meggyőző szakszerű intézkedésekkel lehetséges. Természetesen nem szabad figyelmen kívül hagyni azt, hogy a laikusok az állatbetegségekkel

kapcsolatban érzékenyebbek, hiszen az állati eredetű élelmiszerrel kapcsolatos aggályok a fogyasztókat nagyban befolyásolják.

Állatorvosként, mindig figyelemmel kell lennünk a fertőző betegségek esetleges megjelenésére, hiszen többek között a vírusok miatt időről-időre új és új változatokban jelennek meg fokozott mutációs hajlamuk, például a pulykarhinotracheitis (TRT), a madárinfluenza, vagy az avian nephritis vírusa, esetlegesen új tüneteket, vagy kórbonctani elváltozásokat okoznak (pl. fertőző bronchitis nephrotoxikus törzsei), és ezáltal a védekezés is nehezebb ellenük. A megelőzés mindig szerencsésebb, mint a bizonytalan vagy esetleg (gazdaságossági vagy élelmiszerbiztonsági okokból) lehetetlen gyógykezelés. A nagy létszámú állományokban fokozottan igaz az, hogy a védekezés első lépése a gyors és specifikus diagnózis, ami hagyományos (kórbonctani-kórszövettani) és modern (molekuláris biológiai) módszereken alapul, ezért ennek fejlesztése kiemelt jelentőségű.

A boncolás nem minden esetben lehet kórjelző, pathognomicus értékű, mert a szervezet a számtalan kóroki tényezőre csak nagyon hasonló folyamatokkal tud reagálni. A fertőző ágensek, baktériumok vagy vírusok kitenyésztése, valamint a kórszövettani vizsgálatok napokat vehetnek igénybe. A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat nem elérhető rutindiagnosztikai laboratóriumokban, nem specifikus és szintén napokat vesz igénybe. Ezért van szükség a célszerűbb és gyors, órákon belül elvégezhető, és megfelelő elővigyázatosság mellett kórjelző értékkel bíró PCR alapú diagnosztikai módszerek széleskörű alkalmazására is.

A diagnosztikai munka – legyen az orvosi vagy állatorvosi – nagyfokú hatékonyságot, gyorsaságot és pontosságot igényel. Bár a klasszikus értelemben vett kórbonctani diagnosztika – a boncolás és a kórszövettani vizsgálat – mindig elengedhetetlen marad a kórisme megállapításához, a morfológiai vizsgáló eszközöket ki kell egészíteni a molekuláris szinten alkalmazható technikákkal, hiszen a kutatásban való elterjedt felhasználásuk nyilvánvalóvá tette alkalmasságukat és széles körben való alkalmazhatóságukat.

Az állatorvosi kórbonctanban – a boncasztal mellett az azonnali diagnózist megállapítani képes, nagy tudással rendelkező szakemberek tudása mellett – a gyarapodó információ mennyisége valamint az igényelt diagnózis mélysége miatt egyre nagyobb igény van specifikus diagnosztikai kiegészítő módszerek kidolgozására, alkalmazására. A célzott diagnosztikai tesztek rövid idő alatt elvégezhetőek és nem elhanyagolható módon érzékenységüknel fogva a diagnosztikai munka hatékonyságát is javítják. Napjainkra a molekuláris diagnosztika illetve azon belül a PCR alapú kórokozó-kimutatás rutinszerű

vizsgálati módszerré vált, és így előnyeit nem szabad figyelmen kívül hagyni. Ezek az előnyök a következők:

- Rendkívül gyors, vagyis beállított, működő rendszerek mellett a minta-előkészítés, a tényleges vizsgálat és a vizualizáció folyamata néhány órán belül eredményt ad. A módszertől függően a diagnosztikában elsődleges „igen - nem” (fertőzött - nem fertőzött) válasz mellett a vizsgálat bizonyos kórokozók esetében még tipizálásra is képes.

- Mindemellett érzékeny is, hiszen akár már 5-10 kópiát is képes kimutatni a keresett nukleinsavból. Tisztában kell lennünk emellett azzal is, hogy ez az érzékenység még hátrányt is jelenthet a pozitív eredmény megállapítása és a tényleges kórkép kialakulása közötti összefüggés mérlegelésekor. Ugyanis gyakran a PCR pozitivitás nem jelenti egyértelműen a tünetek kialakulásával kísért megbetegedés megjelenését, mivel ez utalhat akár rövid idővel a mintavétel előtt végzett állatorvosi preventív tevékenységre (vakcinázásra) is.

A primertervezés, a PCR vizsgálatok, a klónozás és a többi molekuláris biológiai módszer, valamint az előmunkálatok és eredményértékelés elvégzéséhez egyre jobb szoftverek, vegyszerek, sőt kitek kaphatók megkönnyítve ezzel a kutató és a diagnosztika munkáját, nem is említve az interneten fellelhető hatalmas adatmennyiséget.

A feladat elvégzéséhez a kórokozó - szerencsés esetben a génbankban rendelkezésre álló - szekvenciája alapján olyan genomszakaszt kell keresni, amely specifikus a kórokozóra, ugyanakkor nincs jelen az adott állatfaj genomjában. A választás során mindenképpen figyelembe kell venni, hogy a kiválasztott szekvencia megfelelő konzervativitással rendelkezzen, hogy az esetleges mutációk ellenére az adott kórokozó genotípusainak széles skáláját ki tudja mutatni. Mindezek a munkálatok főként irodalomkutatásra és számítógépes összehasonlító vizsgálatokra alapozódnak. Majd sor kerül a primerek szintetizálására és az optimális reakciókörülmények kidolgozására. A pozitív kontroll minta többféle módon előállítható: természetes esetből, ha a kiválasztott régióból származó termék szekvenálásával igazolást nyer a genom nagymértékű hasonlósága vagy egyezése, a referencia törzs felhasználásával, illetve pl. szövettanyészeten izolált vírus pozitív kontrollként való alkalmazásával. A pozitív PCR termékeket agaróz-gél elektroforézissel mutatjuk ki. A pozitív kontrollal azonos mérettartományban futó DNS darabkákat például szekvenálással lehet félreérthetetlenül azonosítani a téves diagnózis elkerülése érdekében.

A PCR alapú diagnosztikai módszerek felhasználását baromfiállományokban a kedvező költség/haszon-elemzés is támogatja. Bár a polimeráz láncreakció kivitelezése fejlett

laboratóriumi háttérrel és viszonylag magas vegyszerigényeket feltételez, nagy állományokban a jelentkező költségek mégis elenyészők lesznek az egyéb kiadásokat figyelembe véve. E szolgáltatásokat a baromfitartók már most is rendszeresen igénylik és a jövőben valószínűleg még szélesebb körben fogják igénybe venni.

A PhD munkám keretében feladatom az előzőek tükrében egyrészt az állatorvosi kórbonctani diagnosztika általános fejlesztése volt: a háziállatok, ezen belül is a baromfifajok vírusos fertőző betegségei kimutatásának korszerűsítése molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával és a szerzett tapasztalatok értékelése, figyelembe véve a módszerek érzékenységét és a pozitív eredmény interpretálásának esetleges nehézségét.

A háziállat-tartási szokások, illetve az iparszerűen tartott állatállományok (pl. baromfi) állat-egészségügyi helyzete sokat változott az elmúlt években. Bizonyos betegségek jelentősége háttérbe szorult a preventív védekezési eljárások bevezetésével, mások, például az immunszuppresszióval járó kórképek, előtérbe kerültek. E betegségek hajlamosító tényezőként játszanak szerepet az állatok legyengítésében és más fertőzések elterjedésében, valamint pl. gazdasági haszonállatok esetén a növekedésben való visszamaradás és testtömeg-gyarapodás csökkenés mellett, esetenként még súlyosabb veszteségek kialakulását teszik lehetővé további kórokozók másodlagos hatásával.

Az állatok rohamos teljesítménynövekedése magas szintű, tudatos állat-egészségügyi ellátást, a különböző fajok betegségeinek modern, gyors, megbízható diagnosztikáját igényli. Az állatorvosi kórbonctani diagnosztikai munka során a beérkező vizsgálati anyagok esetében az elhullás okának megállapításához a legfontosabb teendő a makroszkópos vizsgálat. Emellett azonban legtöbbször felhasználunk kiegészítő vizsgálati módszereket is. Elengedhetetlenül szükséges a diagnosztikai boncolás mellett az elváltozást mutató szervek kórszövettani vizsgálata, valamint a fertőző és inváziós betegségekre utaló kórbonctani elváltozások esetén a megfelelő szervek bakteriológiai, virológiai vagy parazitológiai vizsgálata is. Igénybe vesszük még esetenként a kórokozó ágensek transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálattal történő kimutatását. Bizonyos esetekben azonban a pontos diagnózishoz még ezek a módszerek sem elegendők. Gyakran a kórokozó már nincs jelen a szervezetben, a hulla vagy hullarészek önmésztődése lehetetlenné teszi pl. valamilyen vírus izolálását, vagy az általa okozott jellegzetes elváltozásokat elfedik a másodlagosan kialakult elváltozások. Ilyen esetekben a vérben, vagy más szövetben a kórokozók még fellelhetők és kimutathatók megfelelően adaptált molekuláris biológiai módszerrel, például polimeráz láncreakcióval (PCR), amely a baktérium vagy vírus genetikai anyagát felismerni és sokszorosítással láthatóvá tenni képes.

PhD munkám fő célja olyan állatorvosi gyakorlatban használható molekuláris biológiai diagnosztikai módszerek kidolgozása volt, amelyek könnyen elvégezhetőek, és nagy pontossággal, kórjelző értékű diagnózist tudnak adni. Elsősorban a PCR technikával foglalkoztam, amelynek előnye, hogy gyors, megbízható, megfelelő belső és külső kontrollok beépítésével a hibás diagnózis kockázata minimálisra csökkenthető. Ezen kívül az állományok rutinszerűen kivitelezhető szűrővizsgálatával bizonyos fertőző betegségek országos elterjedtségét fel lehet mérni, majd a megfelelő adatok és ismeretek birtokában akár ezek további terjedését is meg lehet akadályozni.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A napos korú baromfi második leggyakoribb elhullási oka a köszvény, amelyet csak a kelésgyengeség előz meg (Siller, 1981). Tulajdonképpen bármilyen kórokra vezethető vissza a köszvény kialakulása, már a kikelés utáni első naptól láthatóak veseelváltozások, és a legnagyobb számú elhullás rendszerint az ötödik napon jelentkezik (Siller, 1981). Ezért kapta a kórkép a „baby chicken nephropathy” (BCN) elnevezést (Shirai és mtsai, 1992), ami magyarul a napos csirkék köszvényének felel meg. Több kóroki tényező játszhat szerepet egyidejűleg a súlyos, elhullásra vezető veseelfajulás, a köszvény kialakításában. Még a súlyos fokú légzsákgyulladás esetleges jelentőségét is felvetették, mikor degeneratív veseelváltozásokat (elhalásokat, tophus-képződést és zsigeri köszvényt) állapítottak meg kísérletes fertőzést követően embriók és napos korú csirkék vizsgálatával. Azt a következtetést vonták le, hogy a szöveti oxigénhiány a vese vérkeringésének fejletlenségét vonja maga után, és ezért alakulnak ki a regresszív folyamatok a vese szövetében (Yamagiwa és mtsai, 1968). Az 1960-as, 1970-es években végül még arra sem találtak választ a különböző kutatócsoportok, hogy a napos csirkék köszvénye felfogható-e egy állandó kóroktanú, egységes betegségnek (Bokori, 1963; Siller, 1981).

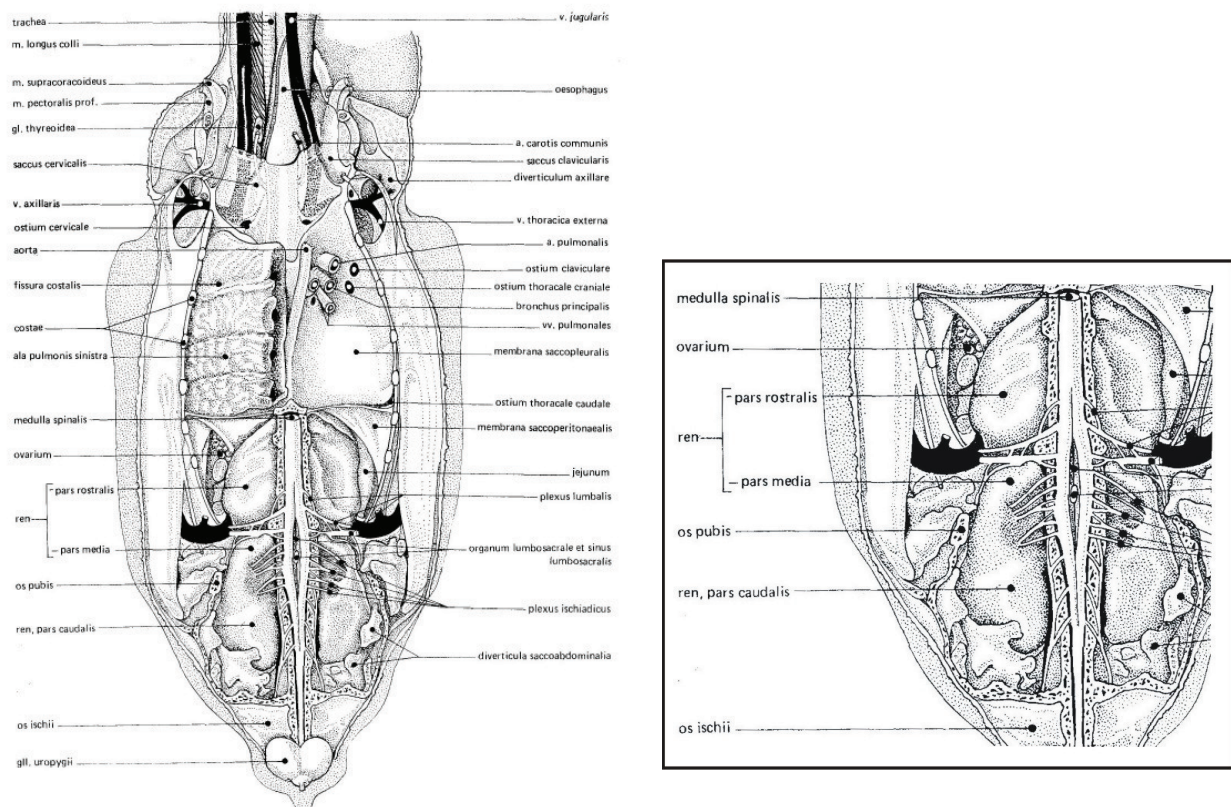
4.1. A madárvese felépítése és a kiválasztás jellegzetességei

A madárvese a gerincoszlop két oldalán, csontos alapon fekvő, oldalanként három-három elkülönülő, bár parenchyma-hidakkal összekötött egységből áll (**1. ábra**). Vesemedence, húgyhólyag, valamint húgycső nem fejlődött ki, a vizelet húgyvezetőkön keresztül vezetődik el az urodaenumba.

A madárvesében kéreg- és velőállomány nem különböztethető meg. A veséket vékony kötőszövetes tok borítja, amelyből sövények erednek a vesék állományába. A vesék felületén erőteljes tagoltság látszik, ami részben a környező szervek, részben a vesén áthaladó erek és idegek benyomata miatt alakul ki (Dobos-Kovács, 1994).

A lebenyek csúcsukra állított kúp alakú lebenyekre tagolódnak, amelyek a vese funkcionális egységei. A vizeletképzést nagyszámú nephron végzi, amely madarakban is vesetestecskéből és vesecsatornácskákból áll, ezek a vese „kéreg”-állományában lokalizálódnak. A glomerulusok patkó alakban helyeződnek el a centrális véna körül a vese felületéhez közel, és a vesecsatornák nem bocsátanak kacsokat a „velő” állomány felé (Siller, 1981). Fiatal, 6 hetesnél nem idősebb madarakban a lobulus szabadon álló felületéhez közel gyöngyszerűen helyeződő, basophil kerek képletek sora ismerhető fel kórszövetteni

metszetben. Ezek embrionális glomerulus maradványok, amelyek bizonyos körülmények között valódi, működő glomerulussá tudnak differenciálódni (Siller, 1981). Jellegzetes szövettani szerkezet a madárvese fénymikroszkópos vizsgálata során a proximális kanyarulatos húgycsatornácskákát bélelő hámsejtek kefeszegélye, amelyeket microvillusok képeznek. Ezáltal könnyen elkülöníthetők a distális kanyarulatos húgycsatornácskáktól, amelyek hámsejtjein microvillusok nem találhatóak.



1. ábra: A madárvese anatómiai elhelyezkedése

(Fehér, 1980)

A Bowman-tok üregébe a glomerulus kapillárisainak falán keresztül passzívan, illetve a tubulusok üregébe aktív tubuláris szekréció eredményeként jutnak a fehérje-anyagcsere vízben oldott bomlástermékei, elsősorban nagy mennyiségű húgysav (Guzsal, 1981). A proximális kanyarulatos húgycsatornácskák működészavara az urátszekréció csökkenésében nyilvánul meg. A nephronok kiterjedt és súlyos elváltozása gyorsan fokozódó hyperurikaemiához vezet, ami a jól ismert és szemmel látható urát-depozitumok kialakulásával jár (Siller, 1981). Bár a glomerulus filtrátum napi mennyisége meglehetősen nagy, a víz jelentős része visszaszívódik részben a glomerulusban, részben a kloákában. A

kloákából ürített bélsárban normális körülmények között is jól látható a kikristályosodó húgysavas só (Fehér, 1980).

4.2. A köszvény

Amennyiben kóros húgysavkiválasztás jön létre a madarak szervezetében a nitrogén anyagcsere rendellenessége vagy vesekárosodás és -elégtelenség következtében, akkor a húgysav felhalmozódik, és húgysavas sók formájában kicsapódik, először a vese tubulusaiban és a húgyvezetőben, később a vesefunkciós zavar esetleges súlyosbodásával egyéb szervekben is (Sályi, 1999). Ekkor köszvényről (uricosisról) beszélünk. A köszvénynek két fő formáját különböztetjük meg: a heveny, zsigeri illetve az elhúzódó formáját, az ízületi köszvényt (Bokori, 1962). A húgysavas sók szürkésfehér, letörölhető bevonatot képeznek a savós- és nyálkahártyákon (Jármai, 1925), a bőr alatti kötőszövetben, illetve esetenként felhalmozódnak egyéb parenchymás szervekben (zsigeri köszvény) és az ízületek üregében (ízületi köszvény). A parenchymás szervekben (a májban, a lépben, a tüdőben) történő húgysavkiválasztást gyulladásosejtes szöveti reakció követi. Ennek során a különféle szervekben jellegzetes szöveti szerkezetet mutató góccok (tophusok) figyelhetők meg, vagyis granulomaképződéssel járó gyulladás alakul ki (Reece és mtsai, 1992). Ez a kórkép – az ember és a főemlősök kivételével – emlősökben kevésbé jelentős, de madarakban és hüllőkben az összes fehérje-bomlástermék húgysav formájában kerül kiválasztásra.

4.3. A köszvény kialakulásának okai

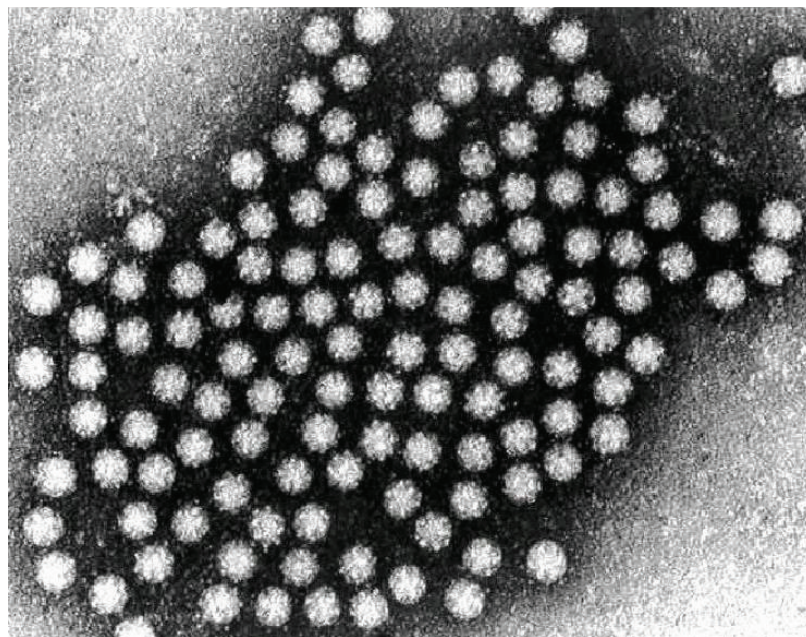
Elsőként kell megemlítenünk a technológiai hibákból adódó kórképeket (Dobos-Kovács, 1994). Előfordul, hogy az állatok nehezen találják meg az itatót, esetleg késedelmes a vízellátás a telepen, és így hamar kialakul vízhiányra visszavezethető köszvényes kórkép. A takarmány belső összetételének hibái, vagy a takarmányban előforduló tubulushám károsító toxikus anyagok hajlamosíthatnak veseelégtelenségre és végül köszvény létrejöttére (Jármai, 1925; Bokori, 1963; Kumar és mtsai, 2004). Mindemellett a napos csirkék hőmérséklet igénye magas, a lehűlés szintén erősen megterheli a vesét, köszvényt előidézve. Jól ismert, hogy bizonyos baktériumok, pl. az *Escherichia coli*, a *Staphylococcus aureus* vagy az *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* okozta fertőzéseknek (Sokkar és mtsai, 1998) továbbá egyes vírusos eredetű kórképeknek (pl. fertőző bronchitis, fertőző bursitis) nem elhanyagolható a vesére kifejtett hatásuk (Cosgrove, 1962; Ziegler és mtsai, 2002; Lee és mtsai, 2004; Meir és mtsai, 2004). Winterfield és munkatársa (1962) egyenesen „fertőző

bronchitis nephritis”-nek nevezte az IBV nephrotoxikus törzsei által előidézett kórképet, ők használták először a „nephritis-nephrosis” kifejezést az egyidejű gyulladós és degeneratív jelenségek leírására (Winterfield és Hitchner, 1962). Cosgrove 1962-ben „avian nephrosis”-ként említette a fertőző bursitis vírus által előidézett betegséget, mert minden esetben talált veseelváltozást is a bursa megbetegedése mellett. Akkor hagyták el ezt az elnevezést, mikor kísérletes fertőzéssel az állatok 5%-ban sikerült csak veseelfajulást létrehozni (Helmboldt és Garner, 1964).

4.4. Az astrovírusokkal kapcsolatos ismeretek

4.4.1. Előzmények humán vizsgálatok alapján

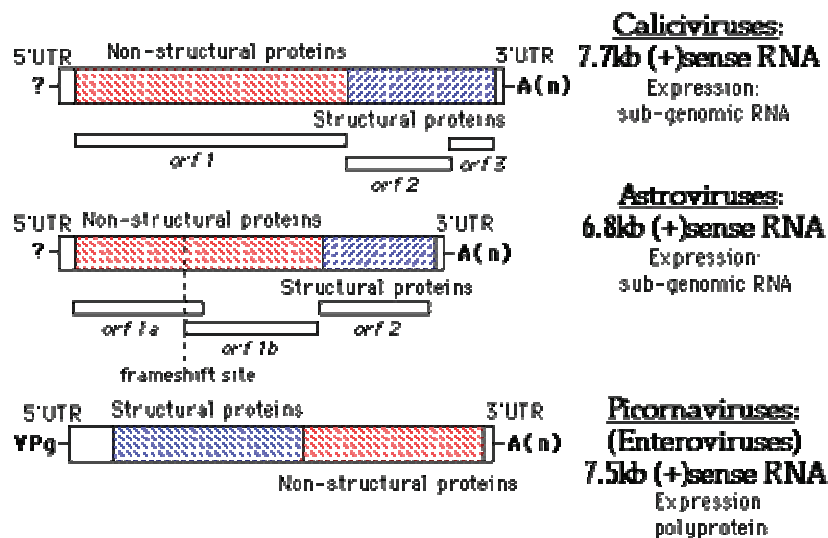
Az astrovírusokat először 1975-ben írták le Skóciában egy emberi hasmenés járvány lehetséges kórokozójának keresésekor (Madeley és Cosgrove, 1975). TEM vizsgálattal fedezték fel a jellegzetes morfológiájú vírusrészecskéket, majd sejttenyészetten izolálták őket, és kísérletes fertőzéssel bizonyították kórokozó képességüket. Később felmérő vizsgálatokkal kimutatták, hogy az astrovírusok világszerte rendkívül elterjedtek, és a gyermekekben diagnosztizált gyomor-bélgyulladások 2-8%-ban astrovírusok tehetők felelőssé a betegség kialakulásáért (Roderick és mtsai, 1995; Wilhelmi és mtsai, 2003). Mivel azonban az astrovírusok nehezen tenyésztethők (McNulty és mtsai, 1990), eleinte csak azok a laboratóriumok vizsgálták a jelenlétüket, amelyek TEM vizsgálatot tudtak végezni.



2. ábra: A sertés astrovírusának elektronmikroszkópos képe
(http://www.oardc.ohio-state.edu/lisailab/porcine_astrovirus.htm)

A görög eredetű „astron = csillag” szóból származó elnevezés onnan ered, hogy a csoportba tartozó vírusok a TEM vizsgálat során általában sajátos megjelenési formát mutatnak (**2. ábra**). Két réteg fedezhető fel, egy sima vagy esetenként enyhén egyenetlen külső elektrondenz héj és egy belső, nem elektrondenz, 5 vagy 6 ágú csillagra emlékeztető mag (Tuboly, 1998). A víruspartikuláknak csak mintegy 10%-ában látható a jellegzetes csillag-szerű rajzolat, a többi virion sima felületű, és ezáltal nehezen elkülöníthető más hasonló méretű vírusoktól.

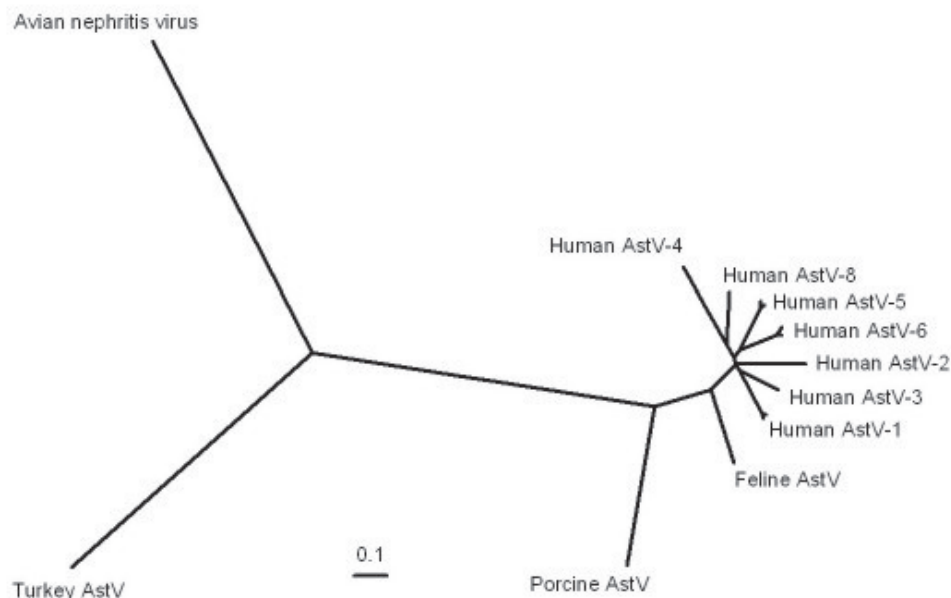
Az astrovírusok általános morfológiai jellemzőik tekintetében és ezért a mintákban látott transzmissziós elektronmikroszkópos képük alapján hasonlítanak a parvo-, a circo-, a calici-, vagy a picornavírusokra, hiszen kb. 28-30 nm átmérőjű, ikozaéder szimmetriájú, burok nélküli vírusok. Korábban éppen a TEM vizsgálatok során látott hasonló megjelenésük alapján a „kis kerek vírusok” („small round viruses”, SRVs) csoportjába sorolták őket (Caul és Appleton, 1982; Koci és Schultz-Cherry, 2002). Ez a gyűjtőfogalom az újabban nyert szekvencia adatok ismeretében, illetve a virológiában ma használt meghatározás-rendszer szerint már elavultnak tekinthető, hiszen az öt különböző víruscsalád tagjai közül még a szimpla szálú, pozitív irányultságú RNS genommal rendelkező vírusok is eltérnek egymástól szaporodási stratégiájuk és genetikai szerkezetük tekintetében (**3. ábra**).



3. ábra: A hasonló méretű RNS vírusok (SRVs) genomszerkezete
 (<http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Diarrhoea.html>)

Az astrovírusok viszonylag ellenállóak; pH 3-as közegben, vagy 60°C-on 5 percig is megőrzik fertőzőképességüket (Murphy és mtsai, 1999). A környezetben a leggyakrabban használt fertőtlenítőszerrel is nehezen lehetett őket elpusztítani (Koci és Schultz-Cherry, 2002).

Az emberi astrovírusok által okozott klinikai tünetek hasonlóak a calicivírusoknál megfigyelhetőekhez, mert az astrovírusok is főként hasmenéssel járó gyomor-bélgyulladást idéznek elő. Abban viszont a reo/rotavírusokra emlékeztetnek, hogy egész évben találkozhatunk általuk előidézett megbetegedésekkel, mégis a téli hónapokban okoznak nagyobb számú, klinikailag felismerhető fertőzést (Jakab és mtsai, 2005; Liu és mtsai, 2006).



4. ábra: Az astrovírusok rokonsági foka a kapszidfehérjét kódoló gének eltérései alapján (<http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/Astroviridae/news.htm>)

4.4.2. Az astrovírusok taxonómiája és patogenitása

Az astrovírusok az Astroviridae családba tartozó burok nélküli vírusok, amelyek fiatal állatokban vagy embereknél, gyengült immunrendszerű gyermekekben és idősekben elsősorban gyomor-bélgyulladást idézhetnek elő (Vernacchio és mtsai, 2006). Jelenleg 18 astrovírust tartanak nyilván, ezek közé 8 humán (HAstV1-8) és 5 madár astrovírus sorolható, míg a többi különböző más emlősállatfajokat (szarvasmarhát, juhót, macskát, sertést és nyércet) betegít meg (**4. ábra**). Jonassen és munkatársai (2001) vizsgálatai során a 3' régió kapszidfehérjét kódoló génjének szekvenálása és összehasonlítása alapján arra derült fény,

hogy a macska (FAstV) és a sertés (PAstV) astrovírusai közelebb állnak filogenetikailag az emberi astrovírusokhoz (HAstV1-8), mint a juh astrovírushoz (OAstV). Jonassen és munkacsoportja azt is kimutatta, hogy az astrovírusok genomjának 3' végén egy olyan RNS motívum található, amely szinte minden astrovírusban fellelhető. Ez a szakasz egyébként nagyon hasonlít a *Coronaviridae* családba tartozó fertőző bronchitis vírusban (IBV-ban) található ős-hurokhoz, ami utalhat egy ősi természetes rekombinációra (Jonassen és mtsai, 1998). Két, viszonylag távoli rokonságban álló RNS vírus csoport egy genomrészlete közötti ilyen mértékű hasonlóság új megvilágításba helyezheti az RNS vírusok evolúciójáról alkotott elképzeléseket.

Néhány fontosabb astrovírus teljes genomszekvenciáját megállapították az elmúlt években. A 8 különböző humán astrovírus szerotípusból 4-et ismerünk, ezen kívül elérhető 1 macska, 1 sertés, 1 juh valamint 3 madár astrovírus teljes genomszekvenciája a génbankban. Ezekre az adatokra támaszkodva Lukashov és Goudsmit (2002) filogenetikai vizsgálatot végzett. Az astrovírus családon belül két nagy, különböző eredetű csoportot alakítottak ki, amelyeket két genusba, a Mamastro- és az Avastrovirus nemzetségbe soroltak, ezek elnevezése az emlősökben, illetve a madarakban található astrovírusok csoportjára utal (Koci és Schultz-Cherry, 2002).

Az astrovírusok gyakran okoznak manifesztálódó, esetenként azonban csak szubklinikai gastroenteritist, amely hamar lezajlik a közösségben vagy állatállományban. A különböző vírustörzsek fajspecifikusak, különböző állatfajok szoros együtt-tartása során sem okoznak keresztfertőzést, csak a gazdafajt betegítik meg. Csak elvétve okoznak súlyos kórképet, emberek esetében halálra, vagy állatorvosi vonalon elhullásra igen ritkán vezetnek. Kizárólag fiatal állatokban vannak jelen, idősebb korban kialakul az immunitás (Murphy és mtsai, 1999). Különböző állattartó telepeken endémiásan fordulhatnak elő. A fertőzés szájon keresztül következik be, általában bélsárral kontaminált víz vagy takarmány felvételét követően (<http://www.stanford.edu/group/virus/1999/jwdavy/astrovirus.html>) 1-4 nap lappangási idő után jelenik meg az enyhe vízszerű hasmenés, ami szintén 1-4 napig tart. Olyan fajokban, amelyek képesek rá, hányás is előfordulhat.

A betegség patogenezise nem teljesen tisztázott napjainkban sem, bár több kutatócsoport (Wilhelmi és mtsai, 2003; Moser és Schultz-Cherry, 2005) eredményei szerint a vírus először a bélhámsejtekben szaporodik. Ezt támasztja alá, hogy kísérletes fertőzések során bárányokban és borjakban azt tapasztalták, hogy a vírusok elpusztították az érett bélhámsejteket, és így a bélbolyhok felső kétharmadát. A szövettani képet ezért villus-atrophia és crypta-hyperplasia jellemzi a hasmenéses állatokban.

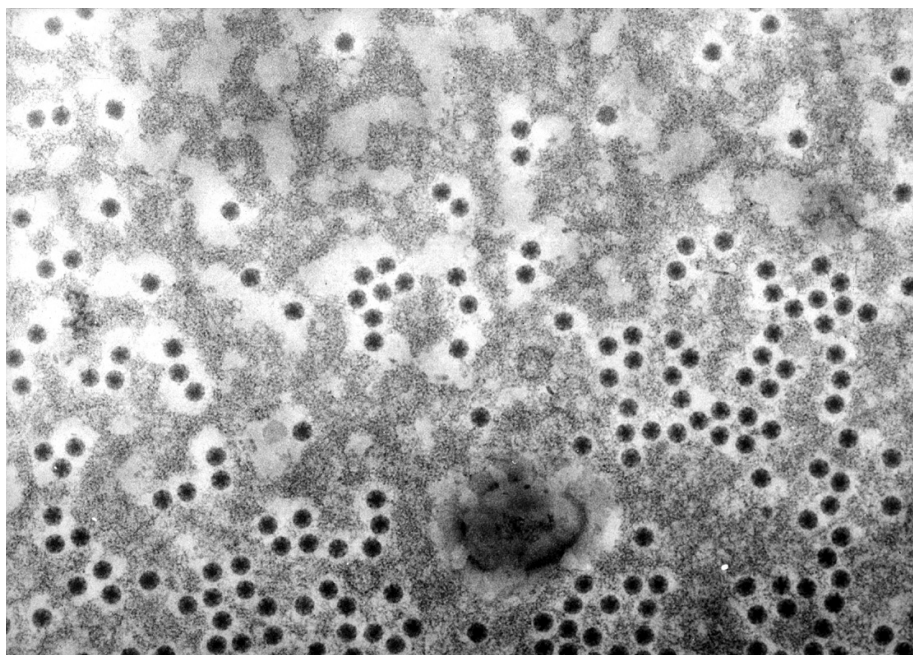
Napos korú csirkékben kísérletes fertőzést követően a Lieberkühn-mirigyekben található enterocyták degenerációját és elhalását lehetett megfigyelni, enyhe fokú lymphoid sejtes és makrofág infiltráció mellett (Frazier és Reece, 1990)

Mivel az astrovírusok által előidézett kórképek többnyire mindenféle beavatkozás nélkül elmúlnak, vakcinát sem állítottak elő ellenük. Újabb keletű kutatásokban laboratóriumi állatkísérletekkel vizsgálták, hogyan váltják ki az astrovírusok a hasmenést, és milyen védekező válaszreakciót váltanak ki a szervezetből (Behling-Kelly és mtsai, 2002). Igazolták, hogy a vérben keringő lymphocyták száma nem változik jelentősen, míg a lépben a vírusfertőzés hatására olyan makrofágok képződtek, amelyek nagyobb mennyiségben termeltek nitrogén-oxidot. A nitrogén-oxid *in vivo* kísérletekben is gátolta az astrovírusok szaporodását (Koci és mtsai, 2004).

Az állatok nagy része, akár több mint a fele is szeropozitív lesz felnőttkorára, de tünetekkel is kísért megbetegedésekről főleg napos vagy fiatal korban, illetve súlyos immunszuppresszált állapotban lévő állatoknál számolnak be (Narita és mtsai, 1990).

4.4.3. Laboratóriumi diagnosztika

Az astrovírusok kimutatására különböző diagnosztikai módszereket alkalmaztak, de ezek érzékenységben, specifikusságban és/vagy a kivitelezhetőség vonatkozásában eltérő megítélés alá esnek.



5. ábra: A HAdV-1 elektronmikroszkópos képe klinikai mintában (<http://www.clinical-virology.org/gallery/images/em/astrovirus.jpg>)

A szövettanyésztés az astrovírusok esetén sajnos nehézkes és bizonytalan érzékenységgű módszer, mert ezek a vírusok nem tenyésztethők az általánosan használt sejtvonalakon, általában csak lassan szaporodnak sejt-kultúrákon és citopatogén hatásuk is minimális (Frazier és mtsai, 1990).

A virionok körülbelül 5 nappal a fertőzés után jelennek meg a bélsárban, de többféle enterális kórképet előidéző vírus (parvo-, picorna-, entero-, calicivírus) is keveredhet a mintában, sőt a jellegzetes morfológiát nem mutató, sima felületű astrovírusok is zavarhatják a pontos diagnózis felállítását. Tapasztalatok szerint (Murphy és mtsai, 1999) a hasmenéses klinikai tüneteket mutató állatok bélsármintáiban többnyire nagy számban ($>10^{10}$ TCID₅₀/gr) található virionok (**5. ábra**), azonban a TEM vizsgálat mégsem elég érzékeny a diagnózis megállapításához emellett, hogy költséges és meglehetősen munkaigényes módszer a víruskimutatásra.

Az immun-transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat jól használható, mert specifikus savó használatával a különböző vírusok könnyen és biztosan elkülöníthetők, tehát ez egyúttal a specifikus kórjelzést is biztosítja. Az ELISA vizsgálatot széles körben alkalmazzák (Decaesstecker és Meulemans, 1991), továbbá a reverz transzkripció után végzett PCR (RT-PCR) vizsgálat is megfelelő érzékenységgű teszt az astrovírusok kimutatására (Koci és mtsai, 2000a).

A közegészségügyi kórtani vizsgálatokban a real-time RT-PCR is bevezetésre került, mint olyan rendkívül érzékeny és nagyon gyors diagnosztikai teszt, amely a mintában jelenlévő astrovírusok mennyiségi analízisére is képes. Így a vírusok kórtani szerepének tisztázását is elősegíti a klinikai tünetekben megmutatkozó esetben (Royuela és mtsai, 2005).

Állatorvosi diagnosztikában a több kórokozó által előidézett „pulyka bélgyulladás-elhullás szindrómáját” kialakító vegyes fertőzések kiderítését célzó multiplex real-time RT-PCR-t dolgoztak ki Spackman és mtsai (2005), amellyel nemcsak a pulyka 2-es típusú astrovírusát, de a feltételezett kórokozóként jelenlévő pulyka coronavírust és a pulyka reovírust is ki tudták mutatni.

Néhány humán, macska, sertés illetve szarvasmarha astrovírust sikerült fajazonos embrionális vesesejt-tenyészetben izolálni, de csak a humán és sertés astrovírusok voltak képesek adaptálódni és tovább szaporodni a szövettanyészetben.

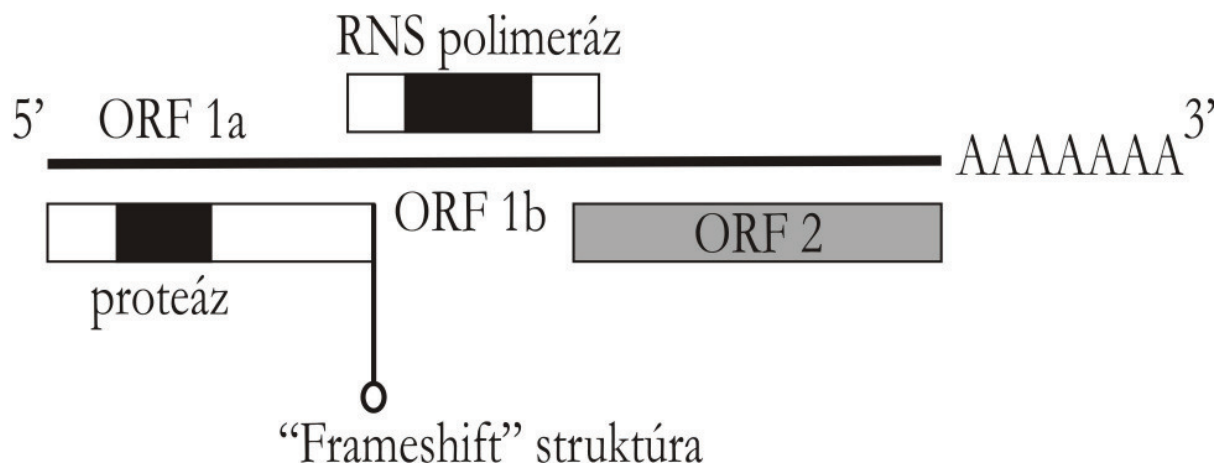
A kacsza astrovírusát embrionált csirketojásban tudták szaporítani, amnionüregbe oltva. A kikelő madarak satnyák voltak, és a májukon elhalásos góccok jelentek meg, amelyekben a virionokat meg lehetett találni (Murphy és mtsai, 1999).

4.4.4. Morfológia, genomszerveződés és replikáció

Az astrovírusok kisméretű, kb. 25-30 nm átmérőjű vírusok, amelyeknek jellegzetes ikozaéder alakú fehérjékből álló tokjuk (kapszidjuk) van. A teljes genomjuk többnyire 6800-7900 bázispár hosszúságú, pozitív szimpla szálú RNS. Így a sejtbe kerülő vírus-nukleinsav azonnal fertőző, hiszen a gazdasejt riboszómája 5'-3' irányban le tudja olvasni a bekerült vírus RNS-t. Az astrovírusok szekvenciájában általában 45-47% a guanin-citozin tartalom.

Szaporodási mechanizmusuk továbbra sem teljesen tisztázott; valószínűleg a citoplazmában zajlik, bár egy sejtmagban lezajló lépés sem kizárt. A virionok tehát a citoplazmában képződnek és sejtoldódást követően jutnak ki az extracelluláris térbe.

A replikációkor kétféle RNS képződik. Az egyik egy a 3' végen poliadenilált farokkal rendelkező, teljes genomikus RNS, amely fertőző, illetve egy kb. 2,4 kilobázis hosszúságú szubgenomikus RNS, amely a fő kapszidfehérjét kódolja, és nagy mennyiségben képződik. Ez a szubgenomikus RNS nem épül bele a virionba, ellentétben a calicivírusokkal, ahol igen.



6. ábra: Az astrovírusok genomja (Murphy és mtsai, 1999)

A transzláció során két nagy kapszidprotein és több kis szerkezeti fehérje keletkezik, illetve az astrovírusokban megtalálható riboszomális „frameshift” további fehérjék létrehozását teszi lehetővé. A nyílt olvasási keretek (ORF-ek) átfedik egymást és a riboszomális „frame-shift” segítségével kötődik egymáshoz az ORF1a és b (**6. ábra**).

Az ORF2 348 bázispárja által kódolt kapszid protein bizonyos szakaszokon meglehetősen nagy konzervativizmust mutat, ezért gyakran használják tipizálásra. A régió szekvencia- és filogenetikai analízisével sikerült a humán astrovírusokat 8 genotípusba sorolni (Lukashov és Goudsmit, 2002; Ulloa és mtsai, 2005).

Az utóbbi években sikerült megismerni több, emberi illetve állati astrovírus (Human AstV 1, 2, 3, és 8; Ovine AstV, Turkey AstV-1, -2 valamint az ANV 1) teljes genomszekvenciáját (Koci és mtsai, 2000b; Jonassen és mtsai, 2003).

4.5. Az astrovírusok előfordulása madarakban és az általuk okozott kórképek

Baxendale és Mebatsion (2004) megvizsgálták a madarakban található astrovírusokat és öt különböző vírust írtak le (**1. táblázat**). Két saját astrovírusa van a pulykáknak (Tang és mtsai, 2005), egy található kacsákban és az avian nephritis mellett leírtak egy új, ugyancsak csirkében előforduló astrovírust, amelyet CAstV-ként jelölnek (Baxendale és Mebatsion, 2004). Az ANV önálló vírus, amely más fajok astrovírusaival mindössze kb. 20 %-os rokonságot mutat.

Általában embrionális szövettenyészetben szaporíthatók csak (Frazier és mtsai, 1990), tenyésztésükhöz legjobban elsődleges embrionális csirke-vesesejtek (chicken kidney cell - CKC) használhatók (Murphy és mtsai, 1999). A vírusszaporodás eredményeként esetenként nagyobb virulenciájú vírustörzs és/vagy fogékonyabb baromfivonal esetén citopatogén hatásként (cytopathic effect - CPE) sejtlekerekedést, illetve plakk-formálódást lehet megfigyelni (Frazier és mtsai, 1990).

1. táblázat: Az Avastroviridae csoportba tartozó vírusok (Baxendale és Mebatsion, 2004)

| | Név | Rövidítés | Szekvencia | Előfordulás |
|----|--|---|---------------------------|--|
| 1. | <i>Turkey astrovirus 1</i> | <i>TAstV-1</i> | Teljes genom | pulyka |
| 2. | <i>Turkey astrovirus 2</i> | <i>TAstV-2</i> | Teljes genom | pulyka PEMS szindrómában lehet kórokozó szerepe |
| 3. | <i>Duck astrovirus 1</i> | <i>DAstV-1</i> <i>(korábban DHV-2)</i> | Nincs adat | Kacsa Kacsahepatitis 2-es típusát alakítja ki |
| 4. | <i>Avian nephritis virus 1</i> <i>(Avian nephritis virus 2 ?)</i> | <i>ANV-1</i> <i>(ANV-2 ?)</i> | Teljes genom Csak ORF2 | Napos csirke |
| 5. | <i>Chicken astrovirus</i> | <i>CAstV</i> | Nincs adat | Napos csirke hasmenés |

Először 1991-ben figyelték meg Amerika dél-keleti államaiban a 7-28 napos pulykák hirtelen, nagyarányú elhullásával és bélgyulladásával járó kórképét, amelyet PEMS-nek (Poult Enteritis and Mortality Syndrome) neveztek el (Perry és mtsai, 1991a és b), és

kialakulásában szerepet tulajdonítanak a TAsV-2 vírus típusnak (Koci és mtsai, 2000b; Yu és mtsai, 2000; Behling-Kelly és mtsai, 2002). Az elhullás heveny esetben nagyszámú, de léteznek elhúzódó, inkább fejlődésben való visszamaradással járó tömeges megbetegedések is (Schultz-Cherry és mtsai, 2001). Kóroktanilag több vírus szerepét feltételezik (Saif és mtsai, 1990), de a betegséget kísérletesen csak egyidejű bakteriális (*Escherichia coli*) fertőzéssel tudták reprodukálni, illetve gyakran csak a másodlagos bakteriális fertőzés súlyosbította elhullásig a kórképet (Qureshi és mtsai, 2001).

Az elhullott pulykák számos szövetéből, többek között a vérükből is kimutatható a vírus, ami a fertőzés során létrejövő viraemia jele (Koci és mtsai, 2003). Meglepő módon a súlyos hasmenés ellenére, a kórszövettani vizsgálatok nem mutattak ki súlyos gyulladásra jellemző szöveti reakciókat a vékonybél nyálkahártyájában vagy egyéb rétegeiben.

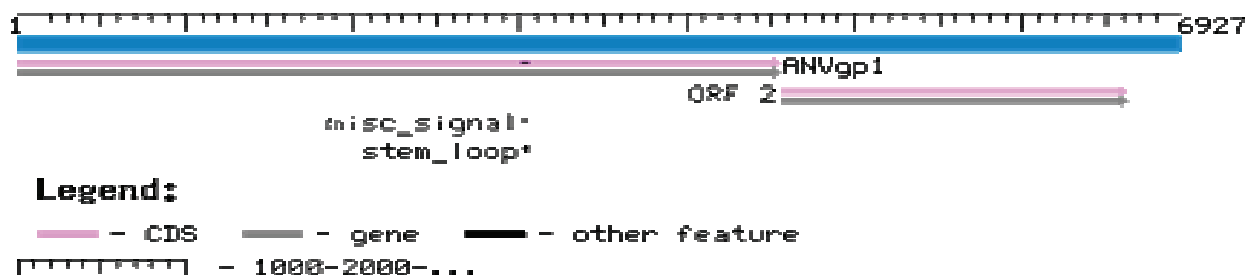
A kacsásvírusának a kacsáshépatitis 2-es (DHV-2) típusának kialakításában tulajdonítanak szerepet (Gough és mtsai, 1984, Baxendale és Mebatsion, 2004). Ez a betegség egyelőre csak Angliában fordult elő, 10 napos kortól 6 hetes korig okozva kacsában vérzéses májgyulladást. A kórokozó csak különböző diagnosztikai vizsgálatokkal különíthető el az 1-es, 3-as és 4-es típusú kacsáshépatitistól, amit két picornavírus szerotípus illetve egy hepadnavírus okoz.

Az avian nephritis 1-es típusáról egyre több ismeretünk van, de a feltételezett 2-es típust még nem sikerült izolálni, ezért konkrét adatok nincsenek a kártételéről sem. Az avian nephritis vírus (ANV), amely csirkékben idéz elő fertőző vesegyulladást, az *Astroviridae* víruscsalád *Avastrovirus* nemzetségébe tartozik (Imada és mtsai, 2000). Először 1976-ban izolálták Japánban nephritises csirkékből (Imada és mtsai, 1979) és akkor a picornavírusok közé tartozó enterovírusnak gondolták, amely különbözik a csirkék encephalomyelitis vírusától és a kacsák vírusos májgyulladásának kórokozójától (Yamaguchi és mtsai, 1979; Imada és Kawamura, 1997).

Napos korban okoz heveny esetben jellegtelen, általános tünetekkel járó megbetegedést, illetve esetenként testtömeg-gyarapodás csökkenést (McNulty és mtsai, 1990), majd két hetes kor körül veseelfajulás és szövetközi vesegyulladás jelenik meg (Shirai és mtsai, 1992), ami súlyosabb esetben zsigeri köszvény kialakulásához és elhulláshoz vezet (Siller, 1981; Varga és mtsai, 1999).

4.6. Az avian nephritis vírus

Az avian nephritis vírus, amelyet 2000-ben soroltak be az astrovírusok közé, 6927 bp hosszúságú, pozitív szimpla szálú RNS genommal rendelkező vírus, ami az Avastrovirus nemzetségbe, a madarak astrovírusai közé tartozik. A genom nem szegmentált, egyetlen molekula képezi, strukturális és nem strukturális fehérjéket kódol (7. ábra).



7. ábra: Az avian nephritis vírus genomjának szerkezete
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

A genomban három nyílt olvasási keretet (ORF-et) különböztetünk meg (2. táblázat). A jelenlegi ismereteink szerint az ORF1a kódolja a vírus proteázt, míg az ORF1b felelős az RNS függő RNS polimeráz létrehozásáért. Az ORF2 kódolja a strukturális fehérjéket, melyek a kapszidot alkotják (Koci és mtsai, 2000b). A genom két végén, jelen tudásunk szerint, nem kódoló terminális szakaszok vannak (<14 és >6622nt).

2. táblázat: Az avian nephritis vírus genomszerveződése

| Jele | Neve | Hossza | Funkció |
|--------------|--------|-----------|---|
| ORF1a | ANVgp1 | 14-4551 | Nem strukturális konzervatív protein (szerin-proteáz) |
| ORF1b | | | RNS dependens RNS polimeráz |
| ORF2 | ANVgp2 | 4571-6622 | Strukturális polyprotein (kapszid kódoló régió, vagy poliprotein prekursor) |
| Poly A farok | | | |

4.7. Az avian nephritis vírus okozta kórképpel kapcsolatos ismeretek

Az 1976-ban picornavírusként azonosított, majd Yamaguchi és munkatársai által 1979-ben leírt vírust, a csirkék fertőző nephritisének, az avian nephritisnek a kórokozóját Imada és

munkatársai 2000-ben astrovírusként azonosították (Yamaguchi és mtsai, 1979; Imada és mtsai, 2000). Magyarországon napos csirke hullák boncolása során a Japánban leírt ANV jelenléte már a 70-es évek végén felmerült (Tanyi és Sári, 1970), de akkor ezt nem lehetett egyértelműen igazolni.

A fertőző vesegyulladás szintén a fent említett úgynevezett „baby chicken nephropathy” (BCN), ami lényegében a „napos csirkék köszvénye” vagy „veseműködészavar-komplexus” (Tanyi és Sári, 1970) néven említett tünetcsoport részletjelensége. Elsősorban a napos csirkék betegsége, amely a fertőződés utáni 3. naptól hasmenésben nyilvánul meg, továbbá az állatok fejlődésben való visszamaradását, súlygyarapodásának csökkenését okozza. Az elhullási arány általában alacsony, főként azokban az esetekben számolhatunk vele, amikor a vesetubulusok hámsejtjeinek elváltozásai miatt nephrosonephritis, majd zsigeri köszvény alakul ki az állatban (Shirai és mtsai, 1991b).

Az avian nephritis vírus kártétele egyéb hajlamosító tényezők együtthatására, tartási és takarmányozási hibákra (Jármai, 1925; Mézes és Kőrösi, 2006), valamint immunszuppresszív állapotra visszavezethetően válhat jelentőssé (Narita és mtsai, 1990).

Több országban végeztek széleskörű felmérést a fertőző vesegyulladás vírusának jelenlétét vizsgálva, és azt tapasztalták, hogy a fertőzés elterjedt, sőt pulykában is ki tudtak mutatni ANV ellenanyagokat (Connor és mtsai, 1987; Cavanagh, 2001). Ezen kívül szűrővizsgálatok során számos országban találtak SPF (specified pathogen-free) csirkeállományokban is ANV ellenanyagokat (Connor és mtsai, 1987; McNulty és mtsai, 1989), ami felvetette egy esetleges vakcina kontamináció gyanúját. Az 1990 körül kereskedelmi forgalomban elérhető baromfi vakcinákban azonban sem *in vitro*, sem *in vivo* módszerekkel nem sikerült az akkor még picornavírusnak gondolt fertőző ágens jelenlétét igazolni (Frazier és mtsai, 1990). Decaesstecker és munkatársai (1988) ezzel kapcsolatban leírták, hogy a vakcinák vizsgálatánál alkalmazott vírusizolálási kísérletek gyakran vezetnek téves negatív eredményre olyan esetekben, amikor transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálattal igazolható a picornavírus részecskék jelenléte (Decaesstecker és mtsai 1988).

A házityúk minden életkorban fogékony a vírus iránt, de a kialakuló elváltozások súlyossága függ az életkortól (Varga és mtsai, 1999). Irodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy az állatok megfertőződhetnek anélkül, hogy kialakulnának a klinikai tünetek is (Imada és mtsai, 1983). Nem egyértelműen tisztázott jelenleg, hogy van-e vertikális fertőzés. Kísérletesen, nagy adag vírussal embrióelhalást lehet előidézni (Imada és mtsai, 1981).

Az állatok szájon keresztül veszik fel a vírust, majd az a bélhámsejtekben szaporodik el. Miután kialakult a viraemia, a kórokozó különböző szervekben okoz elváltozást, amelyek közül legfontosabb a vese károsodása (Imada és mtsai, 1983). Az avian nephritis vírus elsősorban a proximális tubulusok hámsejtjeiben szaporodik tovább, azok degeneratív elváltozásait és következményes szövetközi vesegyulladás kialakítva (Shirai és mtsai, 1990a; Koci és Schultz-Cherry, 2002).

Napos csirkékben jobbra szubklinikai kórképet idéz elő, amely főként hasmenésben, vesekárosodásban illetve a testtömeg-gyarapodás csökkenésben jelentkezik (Goodwin és mtsai, 1993). Az elhullások száma nem magas, de a túlélőkben a későbbiek során a betegség elhúzódó formájára lehet számítani (Shirai és mtsai, 1989). Fertőzési kísérletekben igazolták, hogy a fertőzést követő 4. napon van a legmagasabb vírusszint a vesében, a 10. npra megemelkedik a vérplazma urátszintje, általában mégis kevés a köszvény miatt elpusztult állat (Shirai és mtsai, 1990b; Shirai és mtsai, 1991a).

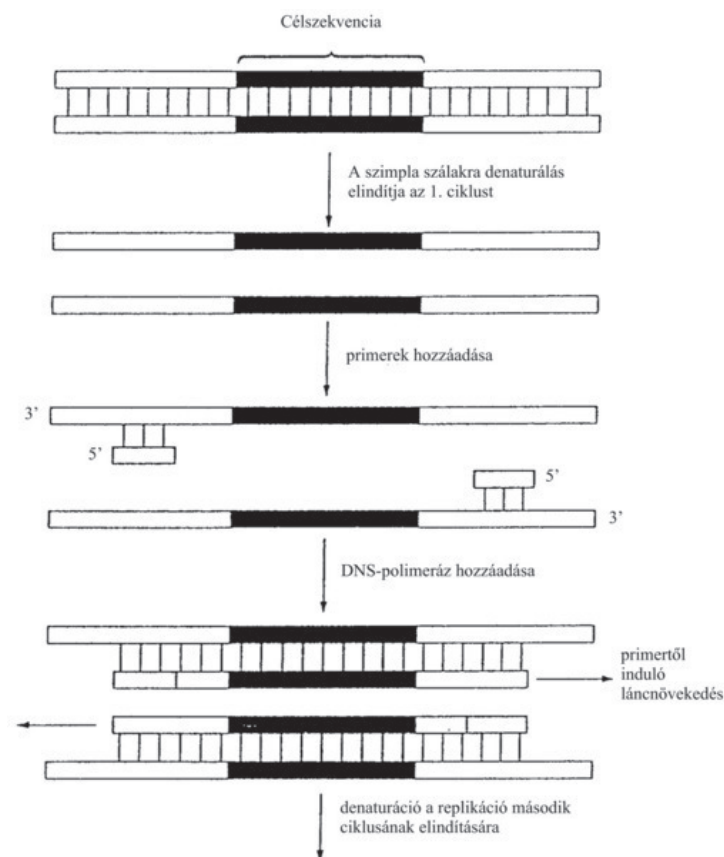
A kórjelzés meglehetősen nehéz, hiszen a megfigyelt klinikai tünetek és a talált kórbonctani-kórszövettani elváltozások több fertőző és nem fertőző baromfibetegségnél előfordulhatnak. A vírus izolálása rutinszerűen nem kivitelezhető, csak csirkeembrió vesehámsejt-tenyészetben szaporítható (Frazier és mtsai, 1990; Varga és mtsai, 1999). A kórjelzésben azonban felhasználhatók a modern, molekuláris diagnosztikai módszerek (Cavanagh és mtsai, 1997), hiszen a vírus genomjának teljes szekvenciája megtalálható a nemzetközi génbankban (GenBank, NCBI). A vírus nukleinsav sorrendjének ismeretében vált lehetővé egy specifikus, a reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióra (RT-PCR) alapozott diagnosztikai eljárás kialakítása, amelyet először munkacsoportunk alkalmazott (Mándoki és mtsai, 2006b). Vizsgálataink során először a makroszkópos kép, majd a kiegészítő vizsgálatok eredményei hívták fel a figyelmünket az avian nephritis vírus esetleges újabb kori hazai jelenlétére.

4.8. A PCR technika rövid áttekintése

A molekuláris genetikai vizsgálatokat az 1980-as évek végétől forradalmasította a polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction, PCR) felfedezése (Mullis és mtsai, 1986). A módszer kidolgozásáért Karry B. Mullis 1993-ban kémiai Nobel díjat kapott (Dezső és Nagy, 2005). A PCR segítségével lehetővé vált a DNS egy rövid (néhány száz bázispár méretű) szakaszának a megsokszorozása (amplifikálása) (Saiki és mtsai, 1985).

A PCR lényege, hogy három, különböző hőmérsékleten lejátszódó reakciót (ami együttesen alkot egy ciklust) 25-45-ször megismétlünk (Dezső és Nagy, 2005). Az első a

DNS denaturálása, 93-95°C-on ugyanis a DNS két szála elválik egymástól. A második reakció (primerkapcsolódás) általában 45-60°C-on játszódik le, ekkor a reakcióelegyben lévő oligonukleotid primerek odakötődnek a megsokszorozandó, egyszálú formában jelen lévő DNS két specifikus szakaszához (Gibbs, 1990). A PCR reakció egyébként 68°C kapcsolódási hőmérsékletig zavartalanul működik. Az oligonukleotidok 20-30 bázispárból álló, szimpla szálú DNS-darabkák, melyek bázissorrendje komplementer a megsokszorozandó DNS-szakasz végén lévő bázissorrenddel. A primerkapcsolódás a PCR egyik legkritikusabb pontja, mert a reakció specifikusságát alapvetően befolyásolja. Ha alacsony tapadási hőmérsékletet alkalmazunk, a primerek akár egy nem-specifikus DNS szakaszhoz is képesek kapcsolódni, vagyis olyanhoz amelynek homológiája nem teljes és így képesek hibás pozitív eredményt adni. A harmadik reakció (láncszintézis) során, 72°C-on, a jelenlévő DNS-polimeráz enzim lemásolja a két primer közötti DNS-szakaszt (templát), azaz új DNS-szálat szintetizál. A következő ciklusokban ugyanezek a reakciólépések ismétlődnek meg, de most már mindig kétszer annyi lemásolható DNS-molekula van jelen, mint az első ciklusban (**8. ábra**).



8. ábra: A PCR reakció sematikus ábrázolása (Stansfield, 1997)

Mivel a DNS-fragmentum mennyisége minden egyes lépésben megkétszereződik, az amplifikáció exponenciális. E három lépésből (denaturálás vagy szétválasztás, primerkapcsolódás, láncszintézis) álló ciklus nagyszámú (kb. 30-szoros) ismétlése eredményeként vizuálisan értékelhető mennyiségű specifikus DNS keletkezik, amelyet gélben elektroforetizálva választunk el a fel nem használt primerektől és szabad nukleotidoktól, majd etídium-bromid jelöléssel teszünk láthatóvá.

A PCR kivitelezése során a reakció valamennyi komponensét (templát DNS, primerek, polimeráz enzim, nukleotidok) összemérjük, a ciklusok pontos végrehajtásáról automata gondoskodik. Egy-egy reakciólépés ideje 1-2 perc, így a teljes művelet csak néhány órát vesz igénybe. A megsokszorozott DNS-fragmentumot számos további molekuláris biológiai technikával vizsgálhatjuk. A betegségekért felelős kórokozók, vagy génmutációk felismerésére, DNS-szintű diagnosztikájára is lehetőség kínálkozik (Reiss, 1991; Kiss és mtsai, 1997; Townsend és mtsai, 1998).

4.9. Egyes PCR technikák és nukleinsavvizsgáló módszerek rövid leírása

Polimeráz láncreakció (PCR): A fentiekben leírt (4.8.) PCR technika olyan *in vitro* nukleinsav sokszorozó eljárás, melynek specificitását és érzékenységét a reakcióban alkalmazott, rövid, általában 18-25 bázispár hosszúságú oligonukleotid primerek biztosítják (Mullis és mtsai, 1992). A PCR technika lehetővé teszi fixált szövetminták vizsgálatát is, ami az elváltozások retrospektív értékelésére is alkalmas, így a betegségek akár több évre visszamenően nyomon követhetővé válnak (Singh és mtsai, 2005). Az eredmények értékelésénél figyelembe kell venni a DNS lehetséges károsodását és lebomlását. Mai tudásunk szerint a 200 bázis-párnál hosszabb DNS szakaszok néhány évig maradnak egyben, ezért nagy szakaszokat közrefogó primerek használatát retrospektív vizsgálatok esetén kerülni kell (McOrist és mtsai, 1994).

Az eredetileg kifejlesztett PCR technika alapján a kutatási igényeknek megfelelően a módszert továbbfejlesztették, és számos változatát dolgozták ki, melyek közül legtöbbet a diagnosztikában is rendszeresen alkalmaznak (Belák és Ballagi-Pordány, 1993; Loda és DeLellis, 1994; Biksi és mtsai, 1998). Ezek nagyobb részét PhD munkám során alkalmaztam, ezért célszerűnek látom rövid ismertetésüket.

RT-PCR: A mintából kivont RNS-t reverz transzkriptáz enzim segítségével átalakítjuk komplementer cDNS-sé, és ez utóbbit használjuk fel a PCR-ben templátként. RNS-vírusok

kimutatása mellett (Koci és mtsai, 2000a) a génkifejeződés (mRNS szintézis) vizsgálatára is széles körben alkalmazzák.

Nested-PCR: Egy adott target nukleinsav régióra tervezett első primerpárral elvégzett PCR érzékenységének és specificitásának további növelésére alkalmas második primerpárral végzett PCR kör. Leegyszerűsítve: az első reakcióban kapott PCR-terméket használjuk egy második reakcióban templátként, az eredeti primereken belül (“nested” módon) elhelyezkedő primerek felhasználásával. Ezért a nested-PCR vizsgálat során az első PCR termékénél rövidebbet kapunk.

Nukleotidsorrend meghatározás (szekvenálás): A megsokszorozott nukleinsav fragmentek nukleotid sorrendjét nagy teljesítményű ún. szekvenáló automaták segítségével végzik. Az így kapott információ számítógépes elemzésével, nagy pontossággal megállapíthatóak az adott kórokozók/kórokozó csoportok rokonsági viszonyai (Herczeg és mtsai, 1999).

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. Vizsgálati minták

Tanszékünkön 2002 és 2005 között elsősorban rutindiagnosztikai vizsgálatra behozott csirkéket boncoltunk fel. Ezek különböző korú, élő, diagnosztikai vizsgálatra beküldött illetve elhullott állatok voltak, amelyek klinikai tüneteket nem, vagy esetleg csak jellegtelen elváltozásokat mutattak. A kórelőzményi adatok alapján az állomány nem fejlődött a fajtának megfelelő eréllyel, illetve a szokásosnál nagyobb arányú elhullás is mutatkozott a nevelés első heteiben.

Másrészt előboncolt napos csirkékből származó nyers szervmintákat is küldtek be az állatorvos kollégák olyan esetekben, mikor az általuk felboncolt napos csirkében veseelfajulást, köszvényt, és/vagy a kórszövetteni vizsgálat alapján vesegyulladás állapítottak meg. Általában vékonybélből és veséből, de esetenként egyéb szervből kimetszett darabokat kaptunk molekuláris diagnosztikai vizsgálat céljára.

Emellett az ország különböző helyein működő állategészségügyi diagnosztikai intézetek jóvoltából számos baromfitartó telepről beérkező mintából kaptunk vizsgálati anyagot, amelyekről a **3. táblázatban** adunk áttekintést.

Két esetben 1991-ből származó, mélyfagyasztott archív mintából vese és thymus szövetet vizsgáltunk meg.

3. táblázat: A vizsgált minták összefoglaló táblázata

| Beküldő | Vizsgált telepek száma | Összes eset száma |
|--|------------------------|-------------------|
| SzIE ÁOTK Kórbonctan | 25 | 42 |
| Országos Állategészségügyi Intézet | 15 | 37 |
| Kaposvári Állategészségügyi Intézet | 11 | 25 |
| Debreceni Állategészségügyi Intézet | 2 | 4 |
| Állatgyógyászati Oltóanyag, Gyógyszer- és Takarmányellenőrző Intézet | - | 5 |
| ÖSSZESEN: | 53 | 113 |

Valamennyi beérkező mintát megvizsgáltunk fertőző bronchitis vírus jelenlétére is, továbbá ellenőriztük egyes általánosan használt IBV vakcinák kontaminációjának lehetőségét, mivel az irodalomban leírt felvetés és az elváltozások időnkénti tömeges előfordulása alapján bennünk is felmerült annak a gyanúja, hogy az állatok esetleg az oltási program során fertőződnek AN vírussal napos korban.

5.2. Kórelőzmény, kórbonctani morfológiai vizsgálatok

Először 2002 nyarán merült fel az avian nephritis vírus hazai kártételének a gyanúja. Tíz (5 elhullott, valamint 5 élő és általunk diagnosztikai célból elvéreztetett) 15 napos korú ROSS-308 fajtájú csirke hulláját boncoltuk fel. A hullák egy olyan telepről érkeztek boncolásra, ahol a letelepítés után szokásos elhullás, illetve az elfogadható 2%-os elhullás fölött további 3% jelentkezett a 10. naptól kezdve. A 15. napon még mindig jelentős volt az elhullások száma, bár semmi magyarázatot nem találtak a veszteség okára. A kezelő állatorvos kísérőirata szerint a nevelés első hetében enyhe hasmenés volt megfigyelhető az állományban.

Ettől az alkalomtól kezdve Magyarország különféle régióiból folyamatosan kaptunk vizsgálatra hasonló kórelőzményi adatokkal különböző korú és fajtájú csirkéket, amelyekben a boncolási lelet szintén hasonló volt.

A rutinszerű kórbonctani és kórszövettani diagnosztikai vizsgálat elvégzése után, az általunk felboncolt állatok elváltozásokat mutató veséiből és vékonybeléből mintákat gyűjtöttünk, amelyeket további vizsgálatig -20°C -on illetve -80°C -on tároltunk. Ezenkívül két esetben thymus, illetve egy esetben pancreas szövetet is kaptunk vizsgálatra.

5.3. Kórszövettani vizsgálat

Minden állatot felboncoltunk és a különféle elváltozást mutató, illetve makroszkóposan egészségesnek látszó szerveiket (veséket, valamint egyéb parenchymás szerveket, továbbá vékonybeleket, thymust, Fabricius-féle tömlőt, agyvelőt) 8%-os pufferolt neutrális formaldehid oldatban fixáltuk kórszövettani vizsgálatok céljára.

Kivágás után felszálló alkoholsorban víztelenítettük a szöveteket és paraffinba ágyaztuk őket, majd $5\mu\text{m}$ vastagságú metszeteket készítettünk belőlük Reichert típusú szánkás mikrotómmal, és hematoxilin-eozinnal (HE) megfestettük a szövetszelvényeket.

5.4. Bakteriológiai vizsgálat

A hullák májából és vékonybeléből rutin bakteriológiai vizsgálatot végeztünk, melynek során véres- és Drigalski-agarra szélesztettünk a vizsgálni kívánt szervekből. A táptalajokat 24 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk aerob körülmények között.

5.5. Transzmissziós elektronmikroszkópos morfológiai vizsgálat

Az általunk diagnosztikai célból frissen elvéreztetett állatokból 1mm³ méretű vesedarabkákat 24 órán át 4°C-on 4%-os pufferolt paraformaldehid oldatban fixáltunk. A mintákat tartósítás után 1% ozmium-tetroxiddal kezeltük. A fixált mintákat felszálló etil-alkohol sorban dehidráltuk, majd szintetikus rezinbe (Durcupan ACM, Fluka, Switzerland) ágyasztuk be. Ultravékony metszeteket vágunk belőlük, majd uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztfestést végeztünk és az így előkészített metszeteket transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (JEM 1011, JEOL Ltd., Tokyo, Japán).

5.6. Vírus RNS tisztítása

A mélyfagyasztott szövetmintákat kiolvastottuk, majd apró darabokra vágtuk a szervrészeket. A kb. rizsszemnyi szövetdarabokat steril porcelán dörzscsészében és steril homok hozzáadásával homogenizáltuk. A szövetek pépesítése után 1,5ml steril foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldatot (phosphate-buffered saline, PBS) adtunk a mintához, Eppendorf csőbe öntöttük és 6000*g szöggyorsulással 10 percig centrifugáltuk a sejttörmelék leülelése érdekében. A centrifugált minta felülúszóját használtuk vírusizolálás céljára.

A kórokozó genetikai anyagának tisztításához a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Németország) RNS tisztító készletet használtuk a gyártó utasításai szerint (Nakazato és Edmonds, 1972). Röviden: 140µl vírussuszpenziót adtunk 560µl lízispufferhez, amely hordozó RNS-t (carrier RNA) is tartalmazott egy 1,5ml-es Eppendorf csőben. Vortex segítségével megkevertük az oldatot, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Feltárás után 560µl abszolút etanolt adtunk az elegyhez, majd az alkoholos kicsapást követően a mintát szilikagél membránra adszorbeáltuk úgy, hogy a kapott oldat felét centrifugálható, szűrővel ellátott oszlopra mértük és 6000*g szöggyorsulással egy percig centrifugáltuk. A lecsepegett folyadékot eltávolítottuk, a maradék oldatot is a szűrőre mértük, majd ismét centrifugáltuk a mintát. Ezután különböző etanol tartalmú mosóoldattal eltávolítottuk a szennyező elemeket, és a kötődött RNS-t 60µl eluáló pufferrel leoldottuk az adszorbensről.

5.7. Primertervezés

A munka során több primerpárt terveztünk és használtunk fel, a **4. táblázat** és a **7. ábra** a legfontosabb jellemzőiket és az ANV genomban elfoglalt helyüket mutatja be. A tervezéshez a Primer Designer 4 SECentral (Scientific and Educational Software Cary, NC, USA) illetve a Primer 2.0 programot használtuk. A primereket a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont (Gödöllő) szintetizálta. A primerpárok alkalmasak voltak diagnosztikai vizsgálatok megerősítésére és filogenetikai elemzésekre is. A nested PCR-hez két, az ORF1-re tervezett primerpárt állítottunk össze, hogy a primerek a konzervatív szakaszon megtapadva biztosan eredményezzenek terméket. A diagnosztikai kimutatásra használt primerek, amelyek a filogenetikai vizsgálatok alapját adták, szintén az ORF1-en helyeződtek el, ugyanis az ORF2-re tervezett primerpárok – feltehetően a strukturális fehérjék nagy változékonysága miatt – nem adtak PCR terméket. Az ORF2, illetve a teljes genom vizsgálatára további primerpárokat terveztünk.

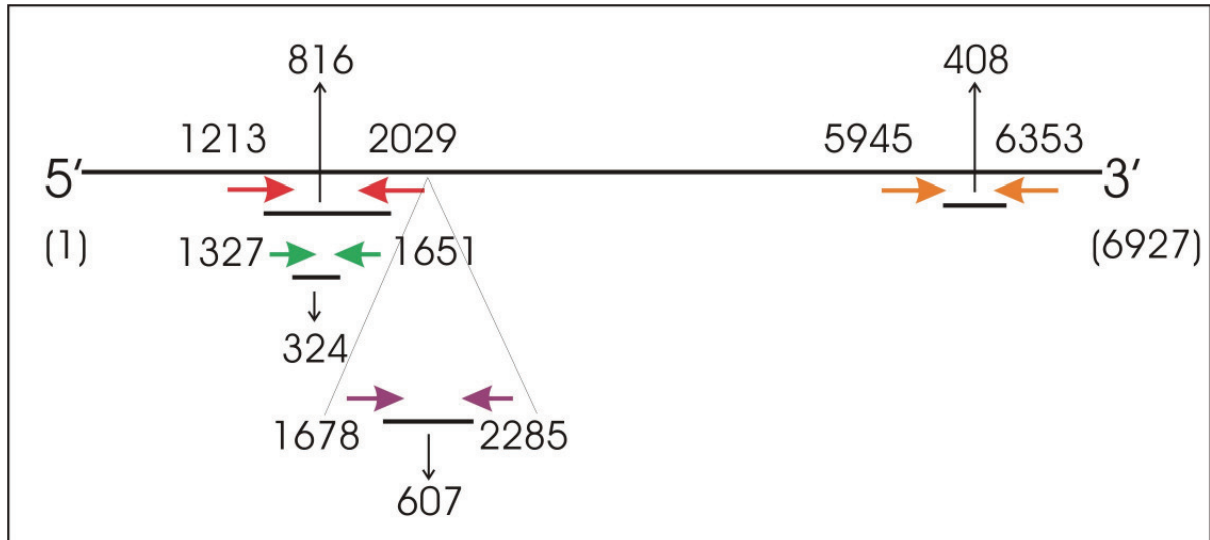
4. táblázat: Az ANV kimutatására tervezett primerek helyeződése

| Neve | Szekvenciája | Helye* | Termék hossza |
|------------------|----------------------------------|-----------|---------------|
| „Nested külső A” | 5'-TGCCTGGTCCATAATGTTAC-3' | 1213-1232 | |
| „Nested külső B” | 5'-AATCTCATCAGCGAGGTCTT-3' | 2010-2029 | 816bp |
| „Nested belső A” | 5'-CGGCTTCCGTTATCTAACTG-3' | 1327-1346 | 324bp |
| „Nested belső B” | 5'-GAGAACCTTGGCTTGAGATG-3' | 1632-1651 | |
| Fa-primer A | 5'-AGA TAC GCT TGC TCG TCT TG-3' | 1678-1697 | |
| Fa-primer B | 5'-CCT CTA ACC GGC GAT ATT CT-3' | 2266-2285 | 607bp |
| ORF2 - F | 5'-CCA GCT CAC AAG CGA GTT AC-3' | 5945-5964 | |
| ORF2 - R | 5'-CTG TGC CTC CAG TAT TGA AG-3' | 6334-6353 | 408bp |

*A megadott számok az ANV referencia törzs génbankban megtalálható (NC_003790) genom szekvenciájára utalnak

Az IBV fertőzés megerősítésre vagy kizárására először az irodalomban leírt diagnosztikai primerpárokat és reakció körülményeket (Farsang és mtsai, 2002), majd saját

tervezésű, ugyancsak diagnosztikai primerpárt használtunk (5. táblázat), melynek reverz primere együttműködött a már meglévő, korábban alkalmazott forward primerrel is.



7. ábra: A primerek lokalizációja az ANV referencia-törzs genomján

5. táblázat: Az IBV kimutatására tervezett primerek helyeződése

| Neve | Szekvenciája | Cél** | Helye* | Termék hossza |
|---|--|-------|----------------------------|---------------|
| N 784 N 1145 (Farsang és mtsai, 2002) | 5'-AATTTTGGTGATGACAAGATGA-3' 5'-CATTGTTTCCTCCTCATCTG-3' | D | 26566-26587 26948-26968 | 403bp |
| avian corona f avian corona r | 5'-ACATGTCTATCGCCAGGGAA-3' 5'-CGGCACTGGCATCTTTATAC-3' | D | 27280-27299 27399-27418 | 139bp |

*A megadott számok az IBV génbankban található Beaudette referencia törzsének (M95169) genom szekvenciájára utalnak

** D - diagnosztika

5.8. ANV RT-PCR

Az RT-PCR-t a reverz transzkripció és PCR egymás utáni elvégzésére alkalmas QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) felhasználásával ún. „egylépéses” rendszerben végeztük. Minden 50 μ l reakcióelegy 10 μ l ötszörös töménységű puffert, 2,5mM végső magnéziumklorid (MgCl₂) koncentrációt, 0,4mM dezoxiribonukleotid-trifoszfát (dNTP) keveréket, 20 egység (U = unit) ribonukleáz gátlót (Ribonuclease Inhibitor, Fermentas, Vilnius, Lithuania), mindkét primerből 40pmol-t, valamint 2 μ l polimeráz enzim mixet (*Escherichia coli* baktériumban expresszált Omniscript és Sensiscript reverz-transzkriptáz rekombináns heterodimer enzimek és ugyancsak *E. coli* baktériumban expresszált HotStarTaq DNS polimeráz rekombináns enzim) tartalmazott. Templát RNS-ből minden esetben 5 μ l-t adtunk a reakcióelegyhez.

A reverz transzkripció 50°C-on 30 perc alatt játszódott le. Ezután a szétválasztás (denaturáció) következett 95°C-on 15 percig a reverz transzkriptáz inaktiválására, valamint a kezdeti nukleinsav szétválasztásra. A PCR reakció 40 ciklusból állt, amelynek lépései a következők voltak: szétválasztás 94°C-on 40 másodperc, a primerkapcsolódás 55°C-on 45 másodperc és a láncszintézis 72°C-on 1 perc. A láncszintézisek teljes befejezését 10 perces inkubációval végeztük el 72°C-on. Az ANV kimutatására alkalmazott valamennyi primerpár esetében 55°C-os primerkapcsolódási hőmérsékletet, és azonos reakciókörülményeket használtunk. A reverz transzkripciót és a polimeráz láncreakciót Omnigene Thermal Cycler (Hybaid, USA) automata készülékben hajtottuk végre. Minden futtatásban szerepelt negatív és pozitív kontroll is. A negatív kontroll templát helyett kétszer desztillált vizet tartalmazott, míg pozitív kontrollnak a referencia törzset használtuk, melyet Dr. Palya Vilmos (CEVA-Phylaxia, Budapest) volt szíves rendelkezésünkre bocsátani.

5.9. ANV nested PCR

A PCR reakció érzékenységének és specificitásának javítására nested PCR reakciót dolgoztunk ki, amelyben az RT-PCR során a „Nested külső A és B” primerekkel (**4. táblázat**) kapott terméket használtuk templátként. Az RT-PCR során alkalmazott program megegyezett a korábban (5.8.) leírtakkal, a kapott termék méretét gél-futtatással ellenőriztük az 5.10. pontban leírtak szerint.

A második PCR-nél alkalmazott reakcióelegy 4mM dezoxiribonukleotid-trifoszfát (dNTP) keveréket és 1,5mM MgCl₂-t tartalmazott. A „Nested belső A és B” primerekből

0,8 μ M-t, továbbá 2 μ l amplifikált terméket és 1,5U (egység) Taq DNA polimerázt használtunk a megfelelő pufferközegben (MBI Fermentas, Vilnius, Litvánia).

Ebben a reakcióban a sokszorosítást 25 ciklusban végeztük (94°C, 30mp; 52°C 40mp; és 72°C, 50mp). Ezután a végső láncszintézis befejezéséhez a mintákat 5 percig 72°C-on tartottuk. A terméket agargél-elektroforézissel tettük láthatóvá a későbbiekben (5.11.) leírt módszer szerint.

5.10. Az IBV kimutatására használt RT-PCR

Az „N 784” és „N 1145” primerek esetén irodalomban leírt reakció-körülményeket alkalmaztuk. Az „avian corona f és r” primerpár esetében az alábbi leírás szerint végeztük a vizsgálatokat.

Az RT-PCR-t ebben az esetben is a reverz transzkripció és PCR egymás utáni elvégzésére alkalmas QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) felhasználásával „egylépéses” rendszerben végeztük.

Minden 10 μ l reakcióelegy 2 μ l ötszörös töménységű puffert, 2,5mM végső magnéziumklorid (MgCl₂) koncentrációt, 0,4mM dezoxiribonukleotid-trifoszfát (dNTP) keveréket, 10 egység (U = unit) ribonukleáz gátlót (Ribonuclease Inhibitor, Fermentas, Vilnius, Litvánia), mindkét primerből 1 μ M-t, valamint 0,4 μ l polimeráz enzim mixet (*E. coli* baktériumban expresszált Omniscript és Sensiscript reverz-transzkriptáz rekombináns heterodimer enzimek és ugyancsak *E. coli* baktériumban expresszált HotStarTaq DNS polimeráz rekombináns enzim) tartalmazott. Templát RNS-ből minden esetben 1 μ l-t adtunk a reakcióelegyhez.

A reverz transzkripció 50°C-on 30 perc alatt játszódott le. Ezután a denaturáció következett 95°C-on 15 percig a reverz transzkriptázok inaktiválására, a polimeráz láncreakcióhoz szükséges polimeráz enzim aktiválására, valamint a kezdeti nukleinsav szétválasztásra. A PCR reakció első 4 ciklusában a szétválasztás 94°C-on 40 másodperc, a primerkapcsolódás - a specificitás növelése érdekében - 55°C-on 50 másodperc és a láncszintézis 72°C-on 1 perc volt. A második rész 34 cikusból állt, amelynek lépései a következők voltak: a szétválasztás 94°C-on 40 másodperc, a primerkapcsolódás 50°C-on 50 másodperc és a láncszintézis 72°C-on 1 perc. A kezdeti 5°C-kal magasabb tapadási hőmérséklet alkalmazása a specifikusabb primerkapcsolódást szolgálta. A leírt primerkapcsolódási hőmérséklet valamennyi primerpár esetében működött. A láncszintézisek teljes befejezését 10 perces inkubációval végeztük el 72°C-on. A reverz transzkripciót és a

polimeráz láncreakciót Omnigene Thermal Cycler (Hybaid, USA) automata készülékben hajtottuk végre. Minden futtatásban szerepelt negatív és pozitív kontroll is. A negatív kontroll templát helyett kétszer desztillált vizet tartalmazott, míg pozitív kontrollnak a kereskedelmi forgalomban használt, fertőző bronchitis vírus elleni vakcina törzset használtuk, melyet Dr. Farsang Attila (ÁOGyTI, Budapest) volt szíves rendelkezésünkre bocsátani.

5.11. Gélelektroforézis (vizualizáció)

Vizsgálataink során a reakcióelegyből 10 μ l-t trisz-borát-etilén-diamin-tetraacetát (TBE) pufferben oldott, 0,5 μ g/ml etídium-bromidot tartalmazó, 1%-os, illetve a kisebb molekulatömegű termékek esetén 2%-os agarózgélben (SeaKem® FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA) elektromos térben futtattunk (elektroforetizáltunk) 6-8V/cm feszültség mellett 1 óráig. A termék méretét GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litvánia) DNS létrával ellenőriztük. Ezt követően a gélt 302nm-es ultraibolya fény (UV) átvilágítással (AITM-26 transzluminátor, Alpha Innotech Corporation, USA) vizsgáltuk és az adatokat Kodak DS Electrophoresis Documentation and Analysis System leképező készüléken, a Kodak Digital Science 1D program segítségével számítógépes információ formájában tároltuk.

5.12. A kontamináció veszélyének kivédése

PCR vizsgálatok során minden munkafázist (szervhomogenizálás, RNS kivonás, PCR összeállítás, vizualizáció) a laboratórium elkülönülő helyiségeiben végeztünk, a mintákat tartalmazó Eppendorf csöveket csak gumikesztyűben érintettük meg. Valamennyi PCR reakciót, különös tekintettel a nested PCR vizsgálatokra, steril PCR munkaállomásban mértünk össze. Minden mintánál pipetta hegyet cseréltünk, továbbá minden esetben szűrővel ellátott hegyet alkalmaztunk. A reverz transzkripciót és az azt követő PCR-t egy lépéses kit felhasználásával végeztük. A munkafázisok, valamint a minták feldolgozása között steril gumikesztyűt cseréltünk a kontamináció lehetőségének minimálisra csökkentése érdekében.

5.13. Szekvenálás

A ORF1 régióhoz tapadó specifikus primerpárok által felerősített terméket (amplikont) TBE pufferben oldott, 0,5 μ g/ml etídium-bromidot tartalmazó, 0,8%-os agarózgélben (Standard Low-_{mr} Agarose Gel, Bio-Rad, Richmond, CA, USA) elektromos térben futtattuk (elektroforetizáltuk) 6-8 V/cm feszültség mellett kb. 3 óráig. Az amplikon helyzetét rövid,

alacsony dózisu (rövid idejü) 302nm-es UV átvilágítással (AITM-26 transzluminátor, Alpha Innotech Corporation, USA) vizsgáltuk, majd kb 500mg mennyiségü amplikont tartalmazó géldarabkát vágunk ki a géllemezéből és QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Németország) segítségével kitisztítottuk az elegyből a DNS-t a gyártó utasításai szerint.

A kitisztított PCR termékek nukleotid sorrendjének vizsgálatát az esetek egy részében a MTA Szegedi Biológiai Kutató Központjában, más mintákat a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban „Abi-Prism 310 genetic analyzer” (Perkin-Elmer Corp., Wellesley, MA, USA) automata szekvenálón végeztettük fluoreszcens alapú direkt szekvenálással, amely során a termékeket mindkét irányban megvizsgálták. A szekvenáláshoz használt primerek azonosak voltak az általunk a PCR reakcióban használtakkal.

5.14. Szekvencia elemzés

A szekvenáló reakció során leolvasott nukleotid-sorrendeket BLAST homológiakereső program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) segítségével azonosítottuk a génbanki vírusgenomokkal. A komplementer szál átfordításához és a két szál összehasonlításához AlignPlus 4 (Scientific and Educational Software, Cary, NC, USA) és Clustal X (Thomson és mtsai, 1997) programokat használtuk. Az eltérően leolvasott nukleotidoknál a kromatográfiás görbék egyedi ellenőrzésével és összehasonlításával állapítottuk meg a helyes szekvenciát. A szekvenált genomrészleteket a National Centre for Biotechnology Information (NCBI) adatbankban megtalálható rokon vírusok szekvenciájával vetettük össze.

5.15. Filogenetikai vizsgálatok

A filogenetikai törzsfá létrehozásakor a Phylip v3.5 programcsomagot használtuk (<http://evolution.gnetics.washington.edu/phylip.html>; Felsenstein, 1989) az egyenként 465 bp hosszúságú nukleotid-blokkok összeállításához, a szekvencia-párok közötti távolságot Kimura 2 paraméteres model (Kimura, 1980) segítségével határoztuk meg.

A fa megjelenítése TreeView programmal történt (Page, 1996). A genetikai rokonságot mutató filogenetikai fa úgy van ábrázolva (rooted), hogy legősibbnek a japán referencia törzset (NC_003790) véljük és mutatjuk. A törzsfá megbízhatóságát 1000-szer megismételt „bootstrap” újramintázási elemzéssel igazoltuk.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Boncolási eredmények

A diagnosztikai boncolás során a napostól a néhány hetes korú csirkékben különféle kórbonctani elváltozásokat lehetett diagnosztizálni. A hullák a boncolás során a csirkék fertőző vesegyulladására kortól függően jellemző elváltozásokat mutatták: 3-5 napos korban inkább a hasmenés dominált, későbbi életkorban pedig a veseelváltozások uralták a képet.



8. ábra: A kloáka-környéki szennyezett tollazat hasmenésre utal napos baromfiban.

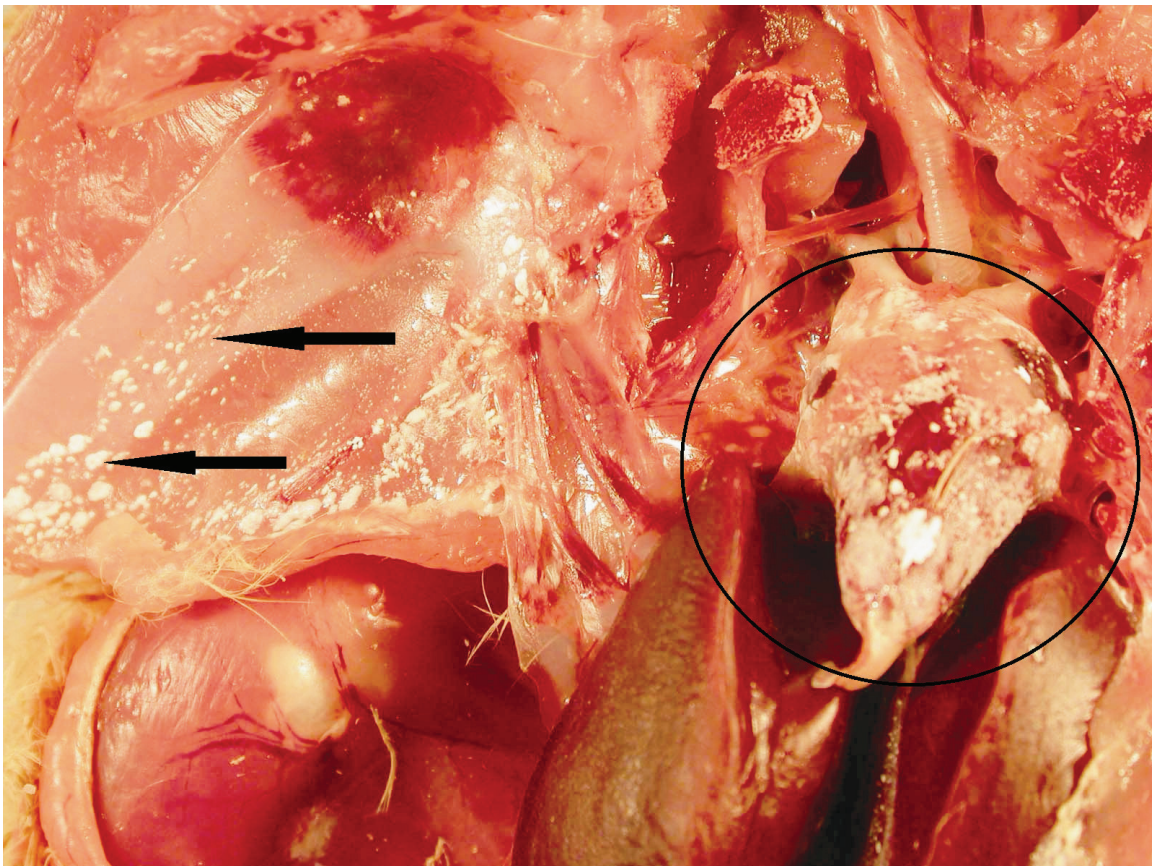
Saját vizsgálataink során a kikelés után három nappal hasmenés nyomait (**8. ábra**), az életkor előrehaladtával senyvességet, makroszkóposan is felismerhető veseelfajulást és esetenként zsigeri köszvényt állapítottunk meg (**6. táblázat**).

Esetenként másodlagosan kialakult elváltozásokat lehetett találni a boncolás során. Ilyen elváltozás a sziktömlő-visszamaradás, heveny fibrines hashártyagyulladás, zúzógyomor fekély, vagy a pneumomycosis.

6. táblázat: Egy imrehegyi telepről származó állatcsoport mintáinak vizsgálati eredményei (csoportonként 10 állat boncolási eredményének összefoglalása)

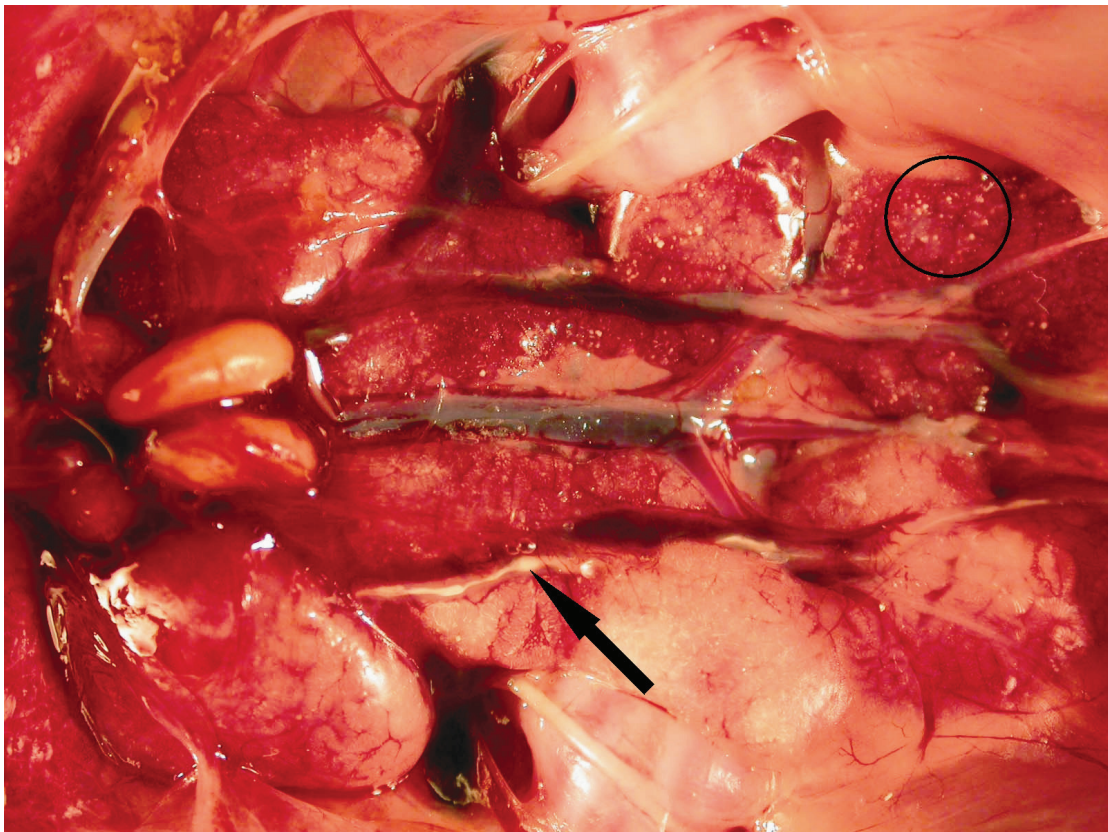
| Életkor | Bonclelet | ANV | ANV | IBV | IBV |
|---------|---|---------------------|------|-----------|------|
| | | Vékonybél | Vese | Vékonybél | Vese |
| 3. nap | Vírusos vékonybélgyulladás | - | - | - | - |
| 6. nap | Heveny veselfajulás | +++ Pancreas (+) | - | - | - |
| 12. nap | Nephroso-nephritis | (+) | ++ | - | + |
| 14. nap | Nephroso-nephritis; Zsigeri köszvény | - | + | - | - |

A hullák felnyitásakor a legtöbb esetben a bőr alatti kötőszövetben és a savóshártyákon szürkésfehér, vakolatszerű, törmelékes anyag lerakódása volt látható (**9. ábra**). A talált elváltozás súlyos fokú heveny zsigeri köszvénynek felel meg.



9. ábra: Húgysavkiválás jelei a testüreget bélelő savóshártya alatt (nyíllal jelölve) és a szívburokban (körrel kiemelve).

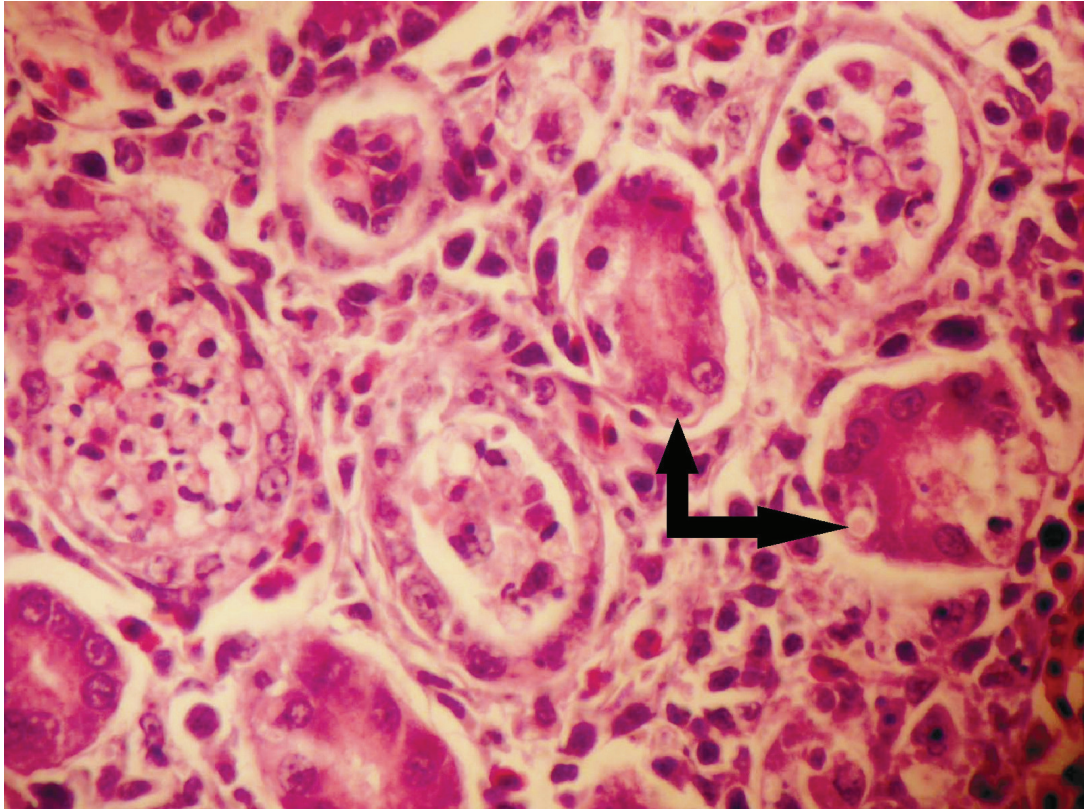
A felboncolt állatokban a testüreg megnyitásakor a légzsákok simák, fénylők, átlátszóak voltak. A lép minden esetben normális alakú és nagyságú volt. A parenchymás szervekben makroszkópos elváltozás nem volt felismerhető. A fiatalabb állatokban a vékonybelek folyadékkal teltek és erezetesen belövelltek voltak. A közel két hetes vagy annál idősebb csirkehullák veséi duzzadtak, fakó színűek voltak, a felszínükön szembetűnő tubuláris rajzolattal, továbbá a húgyvezetőket minden esetben feszülésig szürkésfehér, törmelékes húgysavas só töltötte ki. Egyes esetekben a halvány, fakóbarna vesékben elszórtan, nagy számban jelentek meg tűszúrásnyi-gombostűfejnyi méretű szürkésfehér góccskák, tophusok (10. ábra).



10. ábra: Duzzadt, fakó vesék, felületükön kivált húgysavas sóból álló csomócskákkal (körrel kiemelve), és húgysavas sókkal kitöltött, kitégult húgyvezetőkkel (nyíllal jelölve).

6.2. Kórszövettani vizsgálatok eredménye

A kórszövettani vizsgálatok során kórbonctani elváltozásokat főként a vesékben láttunk, ahol különböző súlyosságú szövetközi vesegyulladás, illetve köszvényt lehetett megállapítani.

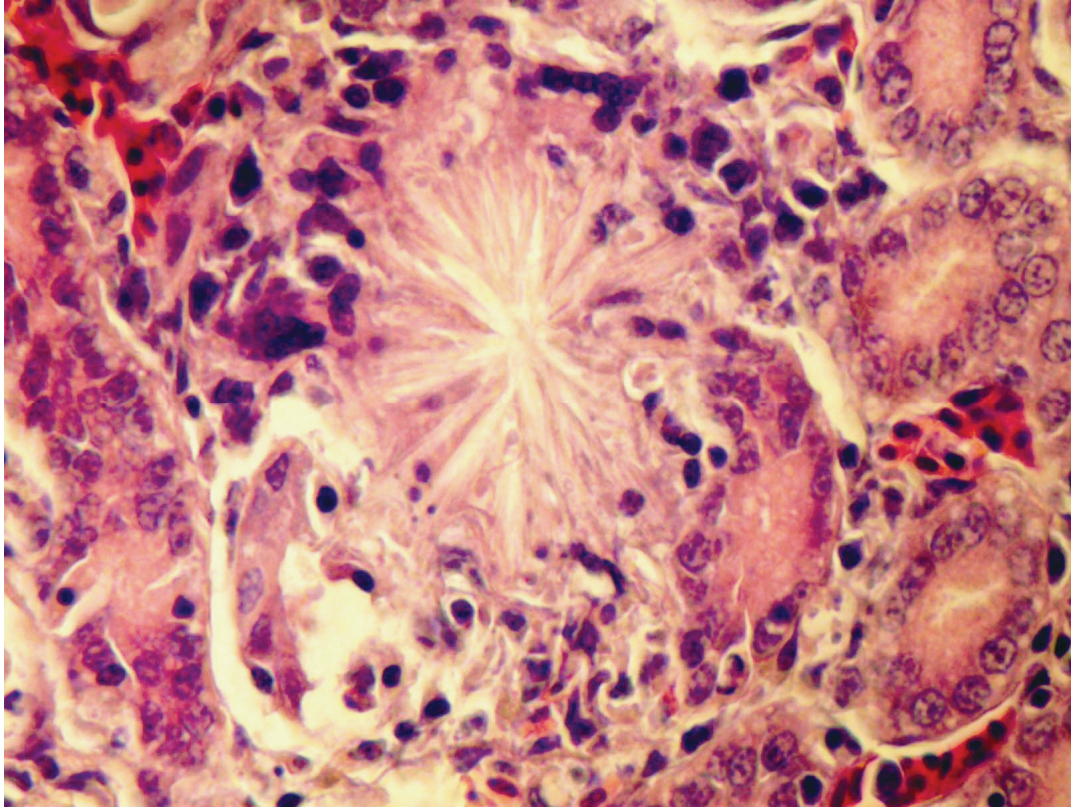


11. ábra: A vírusos vesegyulladásra jellemző kórszövettani kép: kezdődő mononukleáris sejtes beszűrődés az interstitiumban, degenerálódott hámsejtek a kanyarulatos húgycsatornácskák lumenében, továbbá a tubulushámsejtek cytoplasmájában zárványok láthatók (nyíllal jelölve)

A hasmenés jeleit mutató állatok vékonybelében esetenként enyhe fokú bélhámsejt degeneráció és elhalás, valamint a submucosa egyes területein diszkrét lymphoid sejtes beszűrődés és macrophag aktiválódás szövettani jelei voltak megállapíthatók. A többi szerv vizsgálata során érdemleges elváltozásokat nem lehetett megfigyelni.

Kórszövettani vizsgálattal megerősítettük az irodalomban leírt, jellegzetes veseelváltozások jelenlétét (**11. ábra**). A veseszövetből készült metszetekben gócos lymphocytás infiltráció, valamint a proximális kanyarulatos húgycsatornácskák epithelsejtjeinek degenerációja látszott. A degenerálódott, elhalt és a tubulusok lumenébe sodródott hámsejtek citoplasmájában acidophil zárványszerű képletek voltak felismerhetők hematoxin-eozin festéssel, amely zárványok víruszaporodás esetén szoktak megjelenni.

A tubulusokban kicsapódó húgysavas sók rozettaszerűen rendeződő, tű alakú kristályai károsították a hámsejteket és kötőszövetes reakciót váltottak ki (**12. ábra**). Elhúzódóbb esetekben a fent említett elváltozások mellett enyhe fokú fibrosis is felismerhető volt a vese kötőszövetes állományában.



12. ábra: A túszerűen rendeződő, kioldódott húgysavas sók és a tophus körül sarjadzó kötőszövet.

6.3. A boncolási eredmények összefoglalása

Összességében elmondható, hogy a tanszékünkön vizsgált, kórbonctani diagnosztikai vizsgálatra küldött hullák, illetve általunk diagnosztikai célból elvéreztetett állatok eredményei eltérőek voltak, de hangsúlyozni kell, hogy PCR vizsgálatot csak kiegészítő vizsgálatként alkalmaztunk, amikor a látott klinikai tünetek és kórbonctani elváltozások alapján a vírusos vesegyulladás gyanúja felmerült.

A csirkékben 3-5 napos korban hasmenés jeleit láttuk a boncolás során. Ezekben az esetekben a kórszövettani vizsgálat enyhe fokú vékonybélhámsejt degenerációt és heveny reaktív lymphocytás gyulladást mutatott. Legkorábban hat napos korban alakultak ki heveny veseelfajulásra jellemző elváltozások. Ilyen esetekben vékonybélhurutot és hasmenésre utaló kórbonctani elváltozásokat is megállapítottunk.

Az életkorukhoz képest kis testtömegű, legalább 9 napos hullákban legtöbbször a kialakult tubulonephrosisra, nephroso-nephritisre és a veseköszvényre utaló kórbonctani elváltozásokat lehetett látni, amit a kórszövettani vizsgálat is megerősített.

Három hetes korban már tophusok képződését és az elhúzódó intersticiális gyulladás következtében kialakuló fibrosist is lehetett tapasztalni.

A beküldött csirkehullák mindegyikében megtaláltuk a veseelfajulás miatt kialakuló kórbonctani elváltozásokat, amelyek felvetették a vírusos vesegyulladás gyanúját, mert a baromfitelepekről halmozottan jelentkező hasmenéses és/vagy köszvényes megbetegedés esetén célzottan - gyakran helyszíni felmérő boncolás után - kaptuk a mintákat vizsgálatra.

Az Országos és a Kaposvári állategészségügyi intézetből akkor kaptunk mintát, ha a morfológiai vizsgálatok során felmerült a vírusos vesegyulladás gyanúja. Minden esetben küldtek mintát az ANV fertőzés megerősítésére vagy kizárására, ha a napos csirkék boncolása során vékonybélgyulladást, illetve egy hetesnél idősebb csirkékben zsigeri vagy veseköszvényet, és nephrosist állapítottak meg halmozottan. Ezekben az esetekben a vesék kórszövettani vizsgálata során tubulushám-sejt degenerációt, cytoplazma zárványok jelenlétét és intersticiális nephritist találtak.

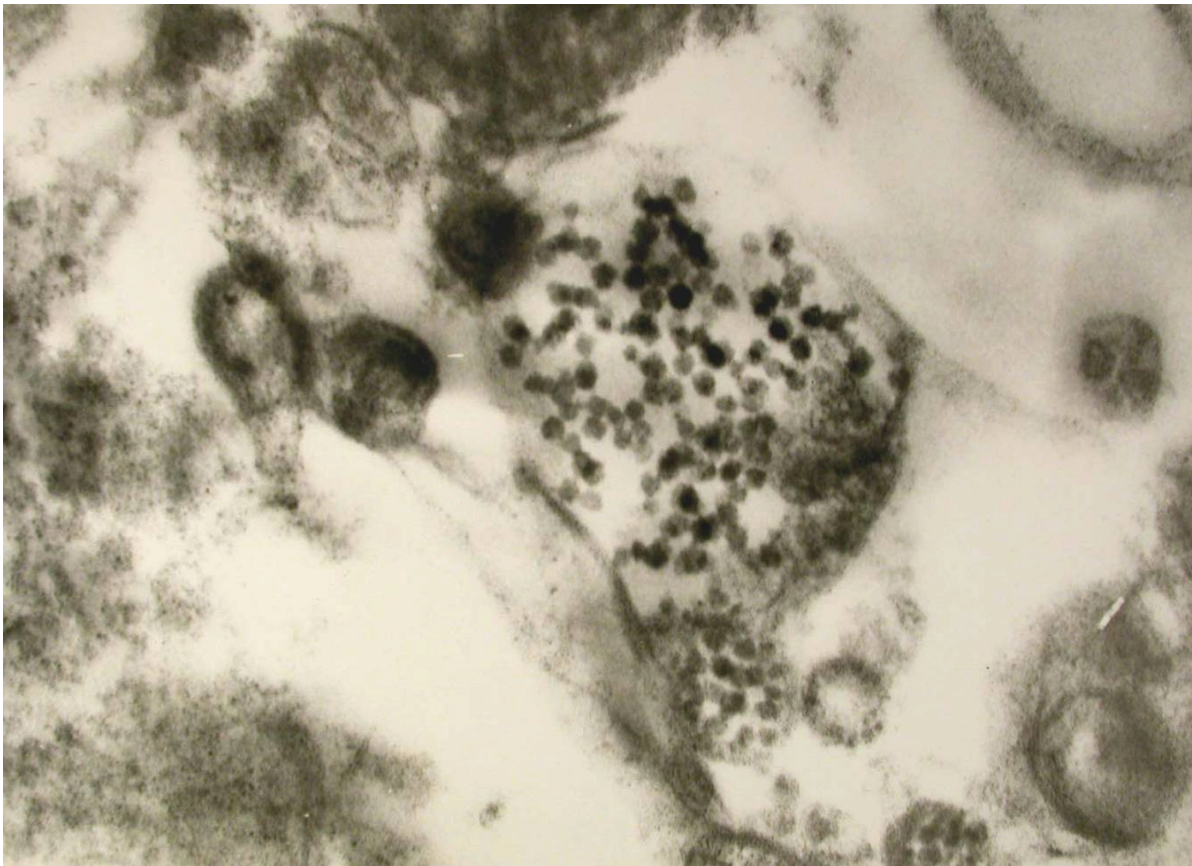
Az 1991-ből származó minták esetében a Debreceni Állategészségügyi Intézet feljegyzéseiből sikerült kideríteni, hogy az egyik esetben (669-V/91) fejletlenséget, vékonybélhurutot és veseelégtelenséget állapítottak meg a boncolás során, míg a másik beküldött esetet (721-BI/91) vírusos vesegyulladásaként diagnosztizálták.

6.4. Bakteriológiai vizsgálat

A rutinszerű bakteriológiai vizsgálat során a parenchymás szervekből, és a csontvelőből nem lehetett kórokozó baktériumot kitenyészteni. A vékonybél vizsgálata során néhány szövődényes esetben *Escherichia coli* baktériumok jelenlétét állapítottuk meg.

6.5. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálati eredmények

Elektronmikroszkópos vizsgálattal a vese tubulushám-sejtjeinek citoplazmájában az astrovírusokra utaló nagyságú és morfológiájú virionokat láttunk (**13. ábra**). Az irodalomban leírtaknak megfelelően a csillagra emlékeztető rajzolat a mi esetünkben sem volt felismerhető, de a vírusrészecskék 28-30 nm nagyságú, burok nélküli virionok voltak.



13. ábra: Pozitív kontraszt elektronmikroszkópos felvétel a 28-31 nm átmérőjű virionokról, levált tubuláris hámsejtekben.

6.6. RT-PCR vizsgálatok

Az ANV specifikus RT-PCR reakcióval a vizsgált 53 baromfitelep közül 33 esetben találtunk pozitív szervmintákat (**7. táblázat**). A különböző korú, a betegség tüneteit, illetve a kórbonctani elváltozásokat mutató állatok veséjéből, thymusából, pancreasból és vékonybélszakaszaiból sikerült kimutatni az avian nephritis vírus jelenlétét.

7. táblázat: A pozitív esetek összesítő táblázata

| Vizsgálatokat végző intézmény | Összes minta száma | Vizsgált telepek száma | Pozitív telepek |
|---|--------------------|------------------------|-----------------|
| SzIE ÁOTK Kórbonctan | 42 | 25 | 17 |
| Országos Állategészségügyi Intézet | 37 | 15 | 7 |
| Kaposvári Állategészségügyi Intézet | 25 | 11 | 8 |
| Debreceni Állategészségügyi Intézet | 4 | 2 | 1 |
| Állatgyógyászati Oltóanyag, Gyógyszer-és Takarmányellenőrző Intézet | 5 | - | - |
| ÖSSZESEN: | 113 | 53 | 33 |

A PCR reakció specificitását úgy ellenőriztünk, hogy valamennyi mintát többször ellenőriztünk, mindegyik különböző primerpárral megvizsgáltuk és a kapott eredmények az ismételt tesztek során megegyeztek. A kapott termékek ANV-sal való egyezését direkt nukleinsav sorrend meghatározással támasztottuk alá. Mivel a génbankban csak egy vírustörzs nukleinsav sorrendje szerepel és nekünk is csak viszonylag rövid genomszakaszok álltak rendelkezésre, nem volt lehetőség a PCR reakció érzékenységének további vizsgálatára. Vizsgálataink és a szekvencia elemzés alapján a használt primerek mindig specifikusan az avian nephritis vírus genetikai anyagához tapadtak.

Három esetben vizsgáltunk meg polimeráz láncreakcióval olyan csirke veseszövet-homogenizátumot, ahol a vírusfertőzés gyanúja nem merült fel. A vizsgálatra beküldött, különböző telepekről származó 4, 9 illetve 10 napos korú csirkék a kórbonctani elváltozások szerint veseelfajulásban és köszvényben pusztultak el, de a kórszövettani vizsgálat alapján toxikus eredetű tubulushám-sejt károsodást diagnosztizáltunk. A PCR vizsgálat során egyik esetben sem mutattuk ki ANV specifikus nukleinsav jelenlétét.

A RT-PCR során használt primerpár esetleges baromfifajok közötti keresztreakciójának vizsgálatára egy esetben pulykából származó, veseszövetből kivont RNS-t vizsgáltunk, ami a RT-PCR vizsgálat során szintén negatív lett.

6.6.1. Az avian nephritis vírus hazai előfordulása

A pozitív eseteket, melyek az ország különböző pontjairól származtak, Magyarország térképvázlatán jelezzük (**14. ábra**).

Egy-egy telepről ugyanazon állományból különböző életkorú állatokból több esetben is küldtek mintát. Van olyan telep, ahol néhány nap eltéréssel többször is vizsgáltuk a telepen élő csirkéket (**6. táblázat**). Így folyamatában is volt alkalmunk vizsgálni a kórképet. Az is előfordult, hogy egy település különböző állattartóitól, állatorvosaitól vagy a regionális állat-egészségügyi intézettől több különböző mintát is kaptunk, de ezeket külön nem tüntettük fel. Ezért van eltérés a térképen szereplő pontok száma és a 7. táblázatban szereplő, a pozitív telepek számát mutató adat között.

Azokat a telepeket, ahonnan kaptunk mintákat, de azok negatívnak bizonyultak szintén nem jelöltük be a térképen.

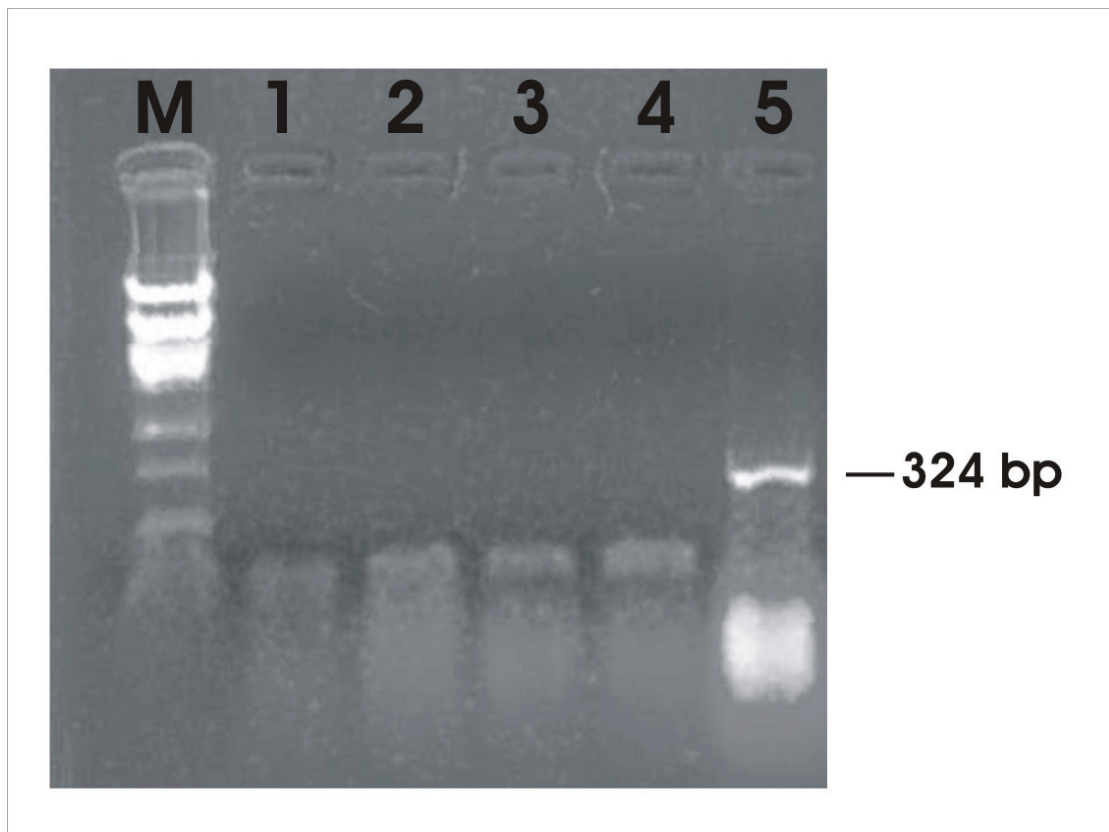


14. ábra: Az avian nephritis vírus hazai előfordulása a 2005-ig beküldött minták vizsgálata alapján.

6.6.2. A nested PCR vizsgálat

Az első jellegzetes kórbonctani elváltozásokat mutató 5 csirkehulla vesemintáin végeztük el a reakciót (**15. ábra**). A génbankban letétbe helyezett ANV genomszekvencia alapján tervezett primerpárok a vírus jelenlétének kimutatására alkalmasnak bizonyultak. A várt molekulatömegű termékek a vizualizáció során tiszta és határozott csíkként jelentek meg. A negatív kontrollok esetében az amplifikáció nem eredményezett terméket.

A PCR reakció optimalizálása után, megpróbáltuk a nested reakció primer párjait külön is használni. Mindkét primer pár értékelhető csíkot adott, ezért a továbbiakban az esetleges kontamináció veszélyének csökkentése érdekében a külső primer párral végeztünk el a PCR reakciót, és a termék nukleotid sorrendjét meghatároztattuk.



15. ábra: A 324bp hosszú termék, amely a nested PCR reakcióval vizsgált 5 csirkehulla veseszövet mintái közül egyben a vírus jelenlétére utal

Az első, TEM vizsgálattal is megerősítetten pozitív mintából (Beb1/15/02) a nested PCR reakció külső primer párjával határozott terméket kaptunk. A termék nukleotid sorrendjének meghatározása után kapott szekvencia az ANV referencia törzs génbankban megtalálható (NC_003790) genom szekvenciájának 1253-1937. nukleotidja közé volt illeszthető. A nested PCR reakció külső primer párjával kapott 684bp hosszúságú DNS szekvencia génbanki elérhetősége: AY831433 (**16. ábra**).

```

NC_003790      1253  gaacttatggcatttacagagtttcctccttgaactccaaatagtcactac
ANV Hu-03      1      .....t.....c..

NC_003790      1303  cgtggttgtttgtacggctgggttcggcttccggttatctaactggtacgg
ANV Hu-03      51     .....a.....t.....

NC_003790      1353  ttacgattactgaaccagatggaaccgtaaagaagtacaagaggatTTTT
ANV Hu-03     101     .....t.....t.....c.

NC_003790      1403  aatgccaaagagtgcaattggcactatTTTcaacagTTTTTTTTgaaaaagc
ANV Hu-03     151     .....a.....C..C.....

NC_003790      1453  caaggccatacgtgggggtgataccttcccttcccaagtaaggccgataaca
ANV Hu-03     201     .....C.....t.....

NC_003790      1503  tcgtaaaaattgaggtagatgTTgatggtggttctgctggagttggcttt
ANV Hu-03     251     .....g.....g....g.....c

NC_003790      1553  agacttggcaactacatctacacagcaggccatgTTgTTggagaagcaaa
ANV Hu-03     301     c.....t.....t.....g.....t..

NC_003790      1603  aatagctaaaatcacctggaaaggcttaacatctcaagccaaggTTctcg
ANV Hu-03     351     .g.t.....a.....t.

NC_003790      1653  gtcacattgagttaccactcttcacagatacgttTgctcgtcttgaaatt
ANV Hu-03     401     ....a.....C.g.....t.....C..a.....C.....gg.a

NC_003790      1703  ccaaaacctTTTTcaacaactcccagTctTTtagactagcaaagTcttctga
ANV Hu-03     451     .....C..C.g.....

NC_003790      1753  gaacgactatgtgcagatggTctgTTTTgacaatcaattgcaaaacgTtg
ANV Hu-03     501     ...t.....a.....t..C.....a.....a.....a.

NC_003790      1803  tcactttctcaggtggtgtaataattgacggcgattacctgaatgctccc
ANV Hu-03     551     .t.....g.....g.....t..C.....a.....

NC_003790      1853  TTCgaaacctatgcaggtacatcgggttcacctattataaatagggacgg
ANV Hu-03     601     ..t.....t.....a.....t..

NC_003790      1903  gaggatgcttggTgtccatTTTggtagtaacgccg
ANV Hu-03     651     ...a..t.....t.....t....

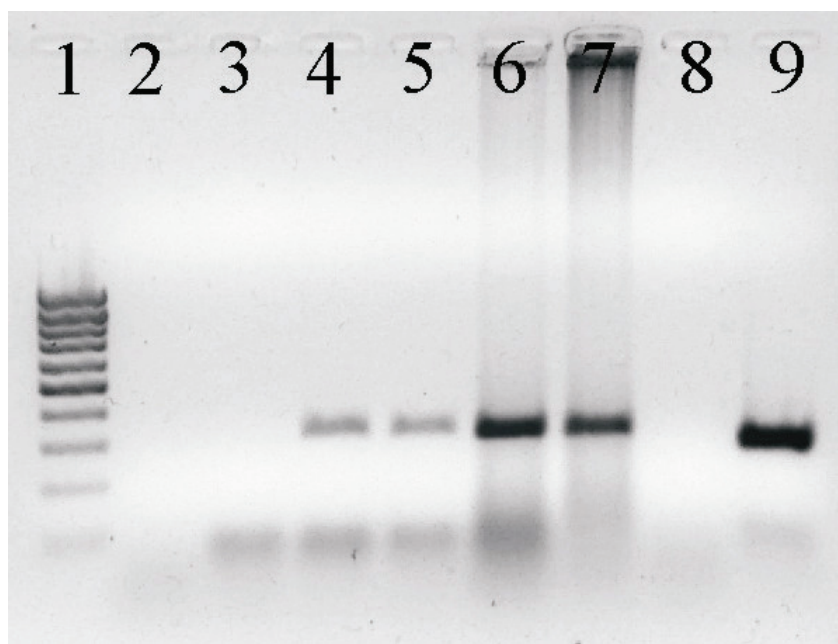
```

16. ábra: A Beb1/15/02 számmal azonosított (az ábrán „ANV Hu-03” jelöléssel ellátott) vírustörzs PCR termékének nukleotid szekvencia illesztése a génbankban közölt referencia törzs megfelelő régiójához, amellyel 92%-ban mutatott hasonlóságot

6.6.3. Az 1991-ből származók minták vizsgálata

A Debreceni Állategészségügyi Intézet archívumából rendelkezésünkre bocsátott két minta közül az egyik ANV nukleinsav jelenlétére pozitívnak bizonyult. Mindkét esetből vese, illetve thymus mintát dolgoztunk fel. A boncolt állathullák életkoráról nem állt adat a rendelkezésünkre.

A **17. ábrán** a 2. oszlop a „721-BI/91” vese mintát, a 3. oszlop „721-BI/91” thymus mintát mutatja, amelyek nem tartalmaztak kimutatható AN vírusra jellemző RNS-t. Ennek a mintának az IBV nukleinsav kimutatásra irányuló PCR vizsgálata pozitív eredményre vezetett (**18. ábra**). Ez megfelel az 1991-ben felállított diagnózisnak, ahol vírusos vesegyulladás állapították meg. A 4. oszlopban a „669-V/91” jelölésű, több, azonos állományból származó egyed kevert veseszövet mintájának, az 5. oszlopban a „669-V/91” jelölésű kevert thymus szövet homogenizátumának pozitív eredménye olvasható le. Ebben az esetben is alá lehetett támasztani a korábbi diagnózist (fejletlenség, bélhurut és veseelégtelenség). A 4. és 5. csík gyenge pozitivitást mutatott. (A 6. és 7. oszlopban más telepről származó, később gyűjtött minták pozitív eredménye olvasható le.)

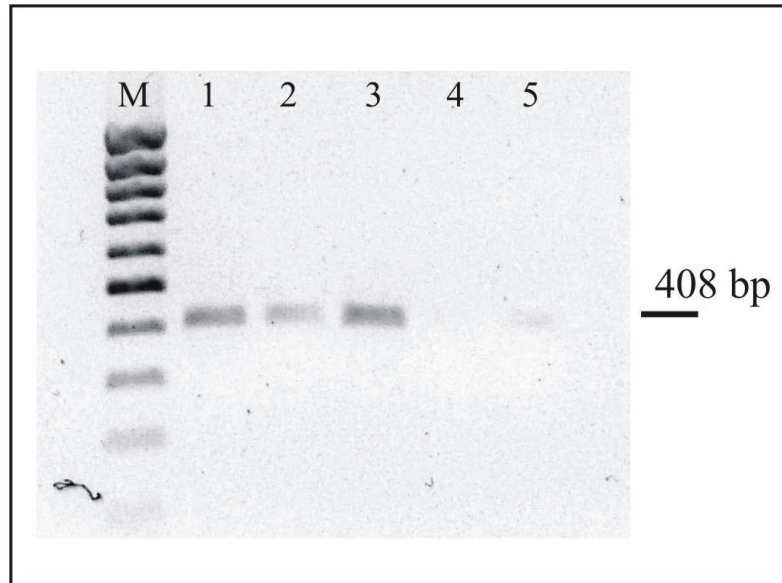


17. ábra: Az 1991-ből származó minták vizsgálata nested PCR reakcióval

(1. zseb: 100bp DNS létra; 2-7. zseb: minták; 8. zseb: negatív kontroll; 9. zseb: pozitív kontroll. A 4., 5., 6., 7. zseb mutatja a megfelelő, 324bp hosszúságú ANV termék jelenlétét és ezáltal pozitívnak minősítettük, a 2. és 3. zsebben nem látható termék, ezek a minták negatívak ANV nukleinsav jelenlétére.)

6.6.4. Az ORF2 vizsgálata

Az **4. táblázatban** jelölt „ORF2 - F” és „ORF2 - R” névvel jelölt, az ANV strukturális fehérjét kódoló szakaszára tervezett primerpárok a vírus jelenlétének kimutatására alkalmasnak bizonyultak, mert sikerült megfelelő méretű, 408bp molekulatömegű terméket kapni. A termékek a vizualizáció során tiszta és határozott csíkként jelentek meg. A negatív kontrollok esetében az amplifikáció nem eredményezett terméket.

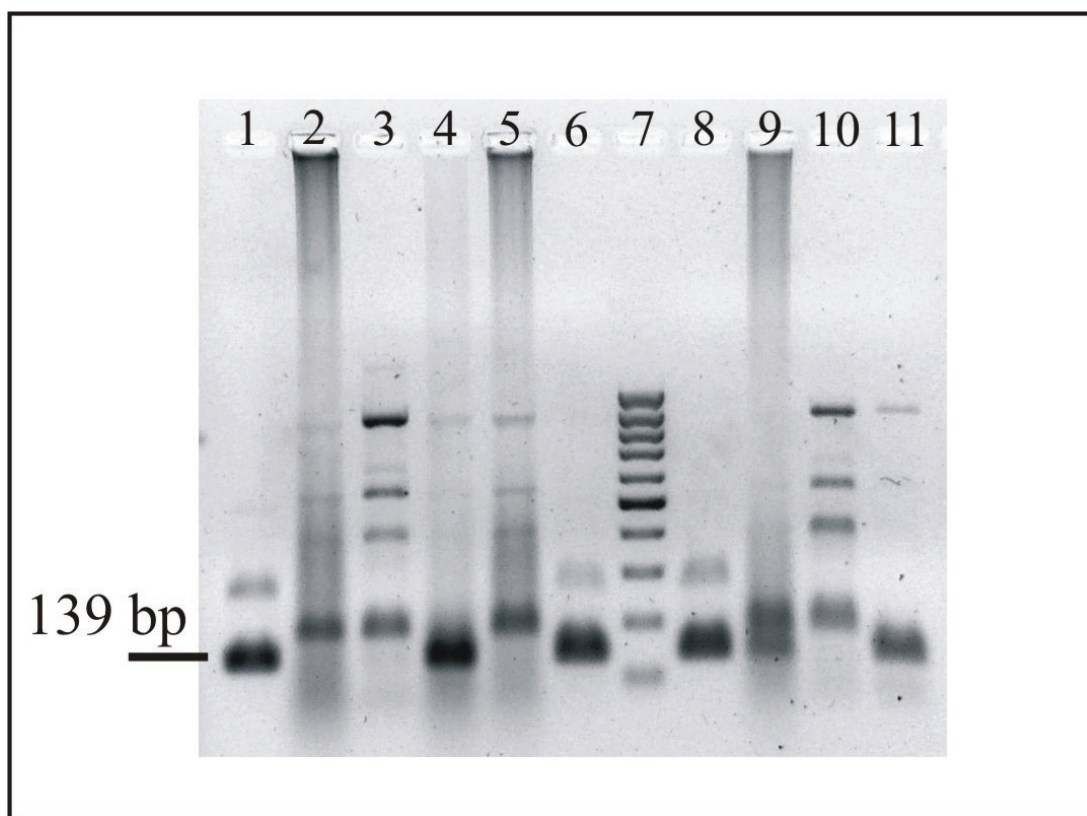


18. ábra: Az ANV ORF2 régió nukleinsav részletének kimutatására irányuló PCR vizsgálat első eredményei

(M zseb: 100bp DNS létra; Az 1., 2. és 3. zseb mutatja a megfelelő, 408bp hosszúságú ANV termék jelenlétét, és ezáltal pozitívnak minősítettük, a fennmaradó zsebekben nem látható megfelelő molekulaméretű termék, ezekben a minták negatívak ANV nukleinsav jelenlétére.)

6.6.5. A fertőző bronchitis vírus vizsgálata

Az irodalomban közölt, illetve a génbankban letétbe helyezett IBV genomszekvencia alapján tervezett primerpárok a vírus jelenlétének kimutatására alkalmasnak bizonyultak, mert az összes általunk használt primerpárral sikerült megfelelő méretű terméket kapni, vagyis az IB vírusra jellemző genetikai anyagot kimutatni. A várt molekulatömegű termékek a vizualizáció során tiszta és határozott csíkként jelentek meg. A negatív kontrollok esetében az amplifikáció nem eredményezett terméket.



18. ábra: Az IBV nukleinsav kimutatására irányuló PCR szűrővizsgálat eredményeinek egy csoportja

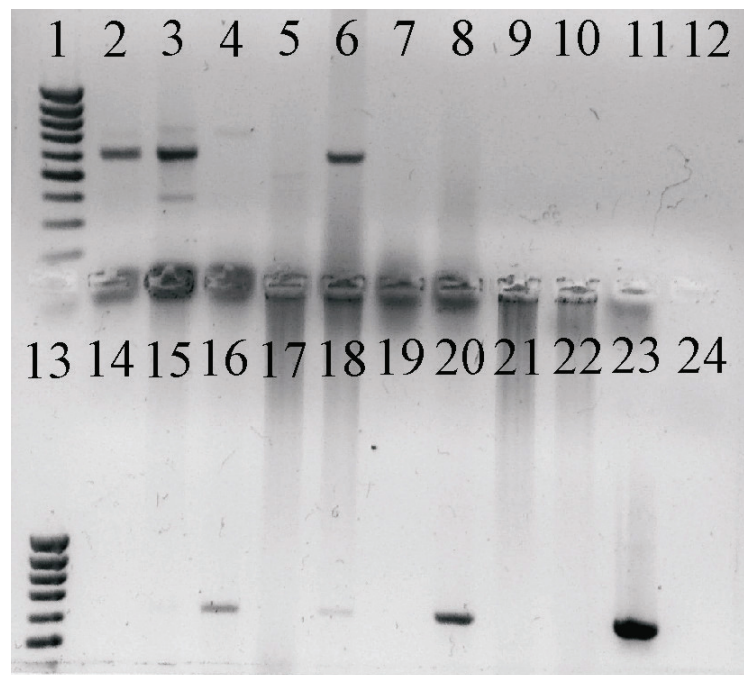
(A 6. zseb tartalmazza a pozitív kontrollt (vakcina); 7. zseb: 100bp DNS létra; Az 1, 4, 8, 9, és 11. zseb mutatja a megfelelő, 139bp hosszúságú IBV termék jelenlétét, és ezáltal pozitívnak minősítettük, a fennmaradó zsebekben nem látható megfelelő molekulaméretű termék, ezek a minták negatívak IBV nukleinsav jelenlétére.)

A Farsang és munkatársai (2002) által leírt PCR az általunk vizsgált mintákon is működött, de a specificitása nem volt megfelelő a számunkra, mivel a pulykák coronavírus okozta bélgyulladásának, a kék-taraj betegségnek (bluecomb disease) vírusát is kimutatta. A

nested PCR reakció esetében már a külső primerpár alkalmazásánál is a várt erősségű és molekulatömegű terméket kaptunk. A rendszer megfelelő érzékenységű volt, ezért a belső primerpárt a továbbiakban nem alkalmaztuk. Mivel a reakció beállítása során más állatfaj koronavírussal is pozitív eredményt kaptunk, a továbbiakban a szűrővizsgálatok során a saját tervezésű diagnosztikai primerpárt, az „avian corona f és r” primereket használtuk (**5. táblázat**), melyeknél a termék várt mérete 139bp (**18. ábra**). Külön kiemelendő az 1991-ből származó másik minta retrospektív vizsgálatának eredménye: az 1. zseb az „721-BI/91” thymus, a 8. zseb a „721-BI/91” vese mintából kapott PCR terméket mutatja, mindkettő pozitívnak bizonyult az IBV nukleinsav jelenlétére.

Egyetlen esetben sem mutattuk ki ANV nukleinsav jelenlétét a fertőző bronchitis vírus elleni immunizálásra használt, kereskedelmi forgalomban lévő vakcinákból a négy leggyakrabban használt vakcinatípus PCR vizsgálata során.

A **19. ábrán** látható gélfotó 9-12. oszlopára mértük be az IBV elleni vakcinákból származó mintákat és mindegyik negatívnak bizonyult ANV jelenlétére.



19. ábra: Az IBV vakcinák esetleges ANV kontaminációjának kizárása RT-PCR reakcióval.

(1.-13. zseb: 100bp DNS létra; 2-22. zseb: minták; 23. zseb: pozitív kontroll; 24. zseb: negatív kontroll. A 2., 3., 6., 16., 20. zseb mutatja a megfelelő, 607bp hosszúságú ANV termék jelenlétét, és ezáltal pozitívnak minősítettük, a fennmaradó zsebekben nem látható termék, ezek a minták negatívak ANV nukleinsav jelenlétére.)

8. táblázat: Az IBV fertőzés vizsgálata során kapott eredmények

| Vizsgálatokat végző intézményektől származó minták | Vizsgált telepek száma | ANV + telepek | ANV +/- IBV + | ANV +/- IBV - | ANV -/ IBV + | ANV -/ IBV - |
|--|------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|--------------|
| SzIE ÁOTK Kórbonctan | 25 | 17 | 2 | 15 | 3 | 5 |
| Országos Állategészségügyi Intézet | 15 | 7 | 2 | 5 | 2 | 6 |
| Kaposvári Állategészségügyi Intézet | 11 | 8 | 4 | 4 | 0 | 3 |
| Debreceni Állategészségügyi Intézet | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| ÁOGyTI (Állatgyógyászati Oltóanyag, Gyógyszer- és Takarmányellenőrző Intézet) | - | - | 0 | - | (5) vakcina | - |
| ÖSSZESEN: | 53 | 33 | 9 | 24 | 6 (11) | 14 |

Az összes beérkezett mintát megvizsgáltuk IBV jelenlétére is (**8. táblázat**). A vizsgálatok alapján az ANV pozitív telepek 27%-ban (33/9) IB vírussal is fertőzöttnek bizonyultak. Míg önálló IBV fertőzés az esetek 30%-ban (20/6) fordult elő. Az összes vizsgált telepet figyelembe véve 26%-ban (53/14) nem tudtuk kimutatni vírus nukleinsav jelenlétét. Ezek közé, a negatív minták közé tartozik a három telepről származó, toxikus veseelfajulásban elpusztult csirkék szöveteinek eredménye is.

Az Országos Állategészségügyi Intézetből kapott egyik esetben 44 napos csirkehullák boncolása során állapítottak meg boncolással és kórszövettani vizsgálattal nephritist, ami az életkor miatt nem felel meg a napos csirkék nephropathiája kórképnek. Ebben az esetben kettős fertőzöttséget, egyidejű ANV és IBV pozitivitást állapítottunk meg.

6.6.6. A „Fa” primer párral végzett RT-PCR vizsgálatok

Az első vizsgálatok után tervezett újabb primerpárral (**4. táblázat**) szűrővizsgálatot végeztünk a beküldött mintákon, a 11 pozitívnek minősült mintából kapott amplikont szekvenáltattunk és filogenetikai fát készítettünk a magyar törzsek felhasználásával.

A kapott pozitív szakasz az ANV referencia törzs génbankban megtalálható (NC_003790) genom szekvenciájának 1753-2217. nukleotidja közé volt illeszthető.

A „Fa” primer-párral vizsgált 607bp hosszúságú termékből a direkt nukleotid sorrend meghatározás után 465bp hosszúságú szekvenciát tudtunk valamennyi vizsgált törzs esetében összeilleszteni. Ezért ezeknek szakaszoknak a filogenetikai vizsgálatát végeztük el. A filogenetikai fa alapjául szolgáló 465bp hosszúságú DNS szekvenciák hivatkozási számai a következők: DQ327608 - DQ327618 (**9. táblázat**).

9. táblázat: Az ANV magyarországi törzseinek 465bp hosszúságú szekvenciái

| Szám | Név | Jelölés | Iktatási szám | Életkor (nap) | Szerv |
|------|----------|---------|---------------|---------------|-------|
| 1. | DQ327608 | Sza1 | 114 | 8 | Bél |
| 2. | DQ327609 | Sza2 | 136 | 13 | Bél |
| 3. | DQ327610 | Za11 | 262 | 18 | Bél |
| 4. | DQ327611 | Laj1 | 844 | 11 | Vese |
| 5. | DQ327612 | Imr1 | 865 | 12 | Bél |
| 6. | DQ327613 | Imr2 | 876 | 14 | Vese |
| 7. | DQ327614 | Hos1 | 947 | 10 | Bél |
| 8. | DQ327615 | Boc1 | 1045 | 7 | Bél |
| 9. | DQ327616 | Beb2 | 2827 | 15 | Vese |
| 10. | DQ327617 | Kec1 | 4239 | 11 | Vese |
| 11. | DQ327618 | Sze1 | 11156 | 10 | Vese |

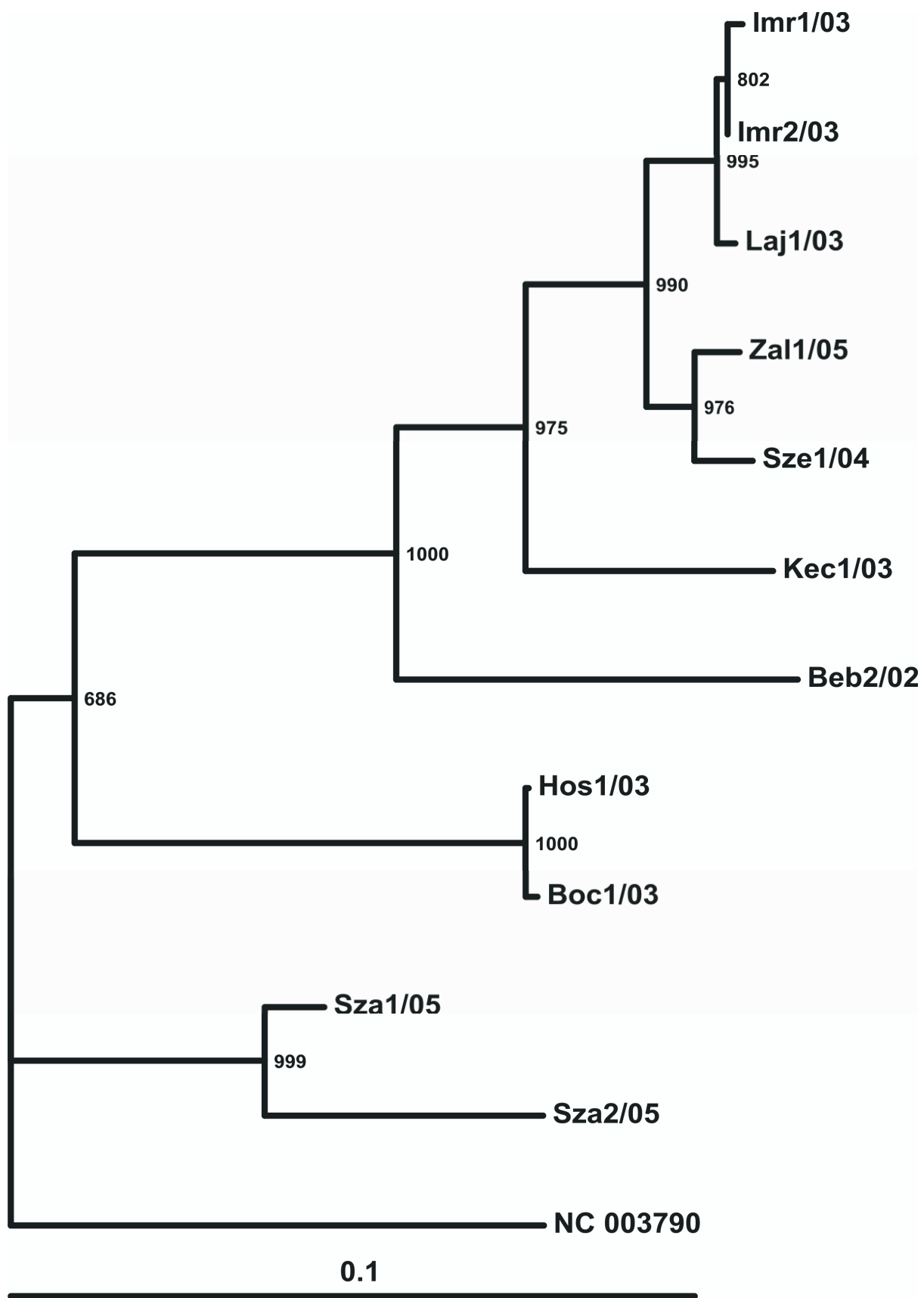
6.7. Filogenetikai elemzés

A PCR termékek nukleotid szekvenciáját meghatároztuk és elhelyeztük a génbankban (NCBI) (táblázat DQ327608-DQ327618). Minden általunk kapott szekvencia a génbankban (NCBI) közölt japán referencia törzs (NC_003790, Imada és mtsai, 2000) ORF1 régiójával mutatta a legnagyobb hasonlóságot a BLAST homológiaeresés során. A szekvenciákat egymáshoz és a referencia törzshöz illesztettük, amely alapján 76 és 86% között változott a hasonlóság mértéke. Az ismert nukleotid sorrendű szekvenciákat az aminosavakat kódoló tripletek ismeretében polipeptid láncá alakítottuk, az így kapott 154 aminosav hosszúságú polipeptidek, amelyek a vírus nem strukturális fehérjéjének egy részét képezték, 88 és 93%

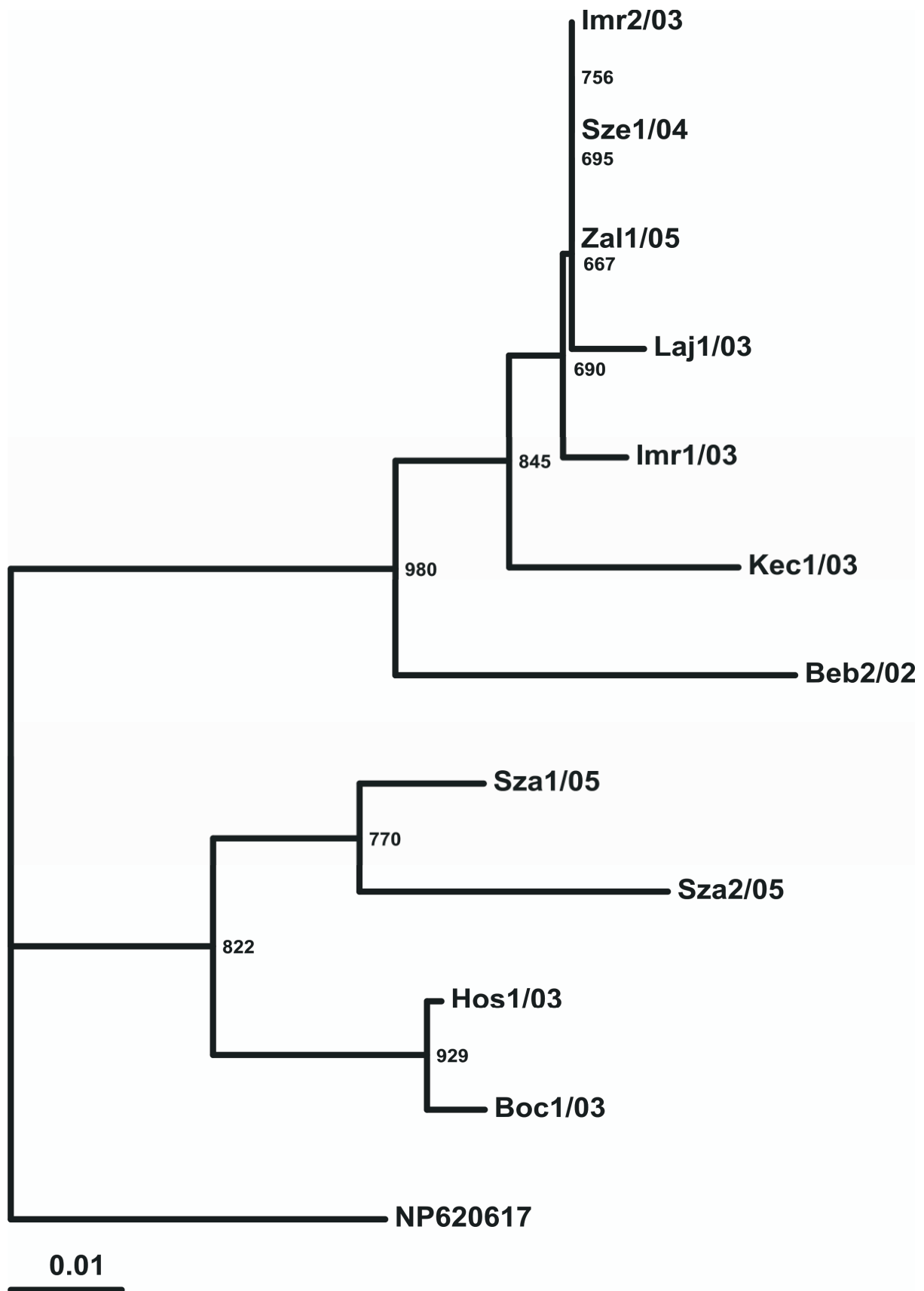
közötti hasonlóságot mutattak egymással és a referencia törzs (NP_620617) megfelelő adataival.

A nukleinsav valamint az aminosav sorrendek alapján genetikai rokonságot mutató filogenetikai fákat készítettünk (**20. ábra és 21. ábra**). Az avian nephritis vírus nukleotid szekvenciája alapján készített filogenetikai fa jól szemlélteti, hogy a magyarországi genotípusok nagy eltéréseket mutatnak (**20. ábra**). Két fő csoportot lehetett megkülönböztetni; az egyik két, azonos állományból származó, 2005-ben gyűjtött szekvenciát tartalmazott, míg a másikba sorolható az összes többi Magyarországon izolált vírustörzs. Ez a második csoport további két részre osztható. Egy egyikbe kettő, 2003-ból származó, közeli rokonságot mutató genotípus tartozik, a másikba hét, 2002 és 2005 között ANV pozitívnak talált mintát sorolhattunk, amelyek további alcsoportokat alkotnak.

Az aminosav sorrend filogenetikai vizsgálata a nukleotid szekvenciáékétől kissé eltérő csoportosítást eredményezett (**21. ábra**). Ezen a filogenetikai fán 2005-ből izolált, egy telepről származó minták és két, 2003-ból származó vírus formál egy, a többi szekvenciától eltérő, monofiletikus csoportot. Ennek érdekessége, hogy a nukleotid szekvenciákat vizsgálva ezek a törzsek más csoportba tartoztak. A többi vizsgált szekvencia eloszlása is változik a nukleotid sorrendnél megállapítottéhoz képest. Három, különböző évben talált (2003, 2004 és 2005) vírustörzsben tanulmányozott genom részlet feltételezett aminosav sorrendje megegyezik, miközben más, ugyanarról a telepről, 2003 folyamán gyűjtött vírusminta elkülönül tőlük. A „bootstrap” elemzés hasonló genomcsoportok kialakulását eredményezte mind a nukleotid, mind az aminosav szekvenciák alapján készült törzsfákon.



20. ábra: Az avian nephritis vírus magyarországi genotípusainak nukleotid szekvenciája alapján készített törzsfa



21. ábra: Az avian nephritis vírus magyarországi genotípusainak aminosav sorrendje alapján készített törzsfa

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. A köszvény

A kórbonctani diagnosztikai munka során gyakran állapítunk meg napos korú baromfiban elhullási okként köszvényt. A köszvény kialakulását alapvetően több különféle, nem fertőző és fertőző okra lehet visszavezetni (Bokori, 1963). A nem fertőző okok között kell megemlíteni a vesekárosító kémiai anyagok, ezek között egyes gyógyszerek (pl. gentamicin) vagy mikotoxinok szervezetbe jutását (Jármai, 1925; Kumar és mtsai, 2004). Ugyancsak a nem fertőző okok közé tartoznak: az etetett takarmány által előidézett fokozott fehérje terhelés (Bokori, 1965), nem megfelelő zsírsavösszetétel (Mézes és Kőrösi, 2006) illetve ásványi anyag bevitel, az ivóvíz hiányra visszavezethető kiszáradás, a napos kori megfázás (Dobos-Kovács, 1994), a hideg okozta stressz, az immunszuppresszió vagy pl. az A-hypovitaminózis (Bokori, 1966). A fertőző okok közül - az esetleges bakteriális fertőzések mellett (Sokkar és mtsai, 1998) - kiemelendő a fertőző bronchitis vírus egyes nephrotoxikus törzseinek vesekárosító hatása (Tanyi és Sári, 1970; Siller, 1981; Maeda és mtsai, 1979; Sályi, 1999), sőt még egyes IBV vakcinatörzsek is létrehozhatnak vesekárosodást, ami súlyos esetben zsigeri köszvény kialakulására vezet.

Eseteink során a csirkékben feltűnően gyakran alakult ki köszvény és ennek következtében elhullás, általában a kelés utáni második héten, annak ellenére, hogy a kórelőzmény, valamint az állatok napi rendszeres megfigyeléséből származó adatok alapján a tartási körülmények megfelelőek voltak: többek között ismert eredetű, megfelelő összetételű indító tápot etettek, a vesekárosodást okozó gyógyszerek (pl.: gentamicin) használatát mellőzték. A kórbonctani és fénymikroszkópos vizsgálatok alapján feltételeztük, hogy a csirkehullákban észlelt nephroso-nephritis minden valószínűség szerint vírusos eredetű ugyanis többek között a kórszövettani kép jellegzetességei alapján kizárható volt az elváltozások hátterében elsődleges nem fertőző ok jelenléte, például a folyadékhiány, továbbá a toxikus ártalom. A lehetséges ágensek között jelenlegi ismereteink alapján elsődlegesen valamely nephrotoxikus coronavírus törzs illetve a fertőző nephritis vírusa volt gyanítható.

A hazai baromfitelegeken vizsgált napos csirke hullákban talált elváltozások alapján évek óta gyanítottuk az avian nephritis vírus (ANV, Astroviridae) magyarországi jelenlétét.

7.2. A fertőző bronchitis vírus

A koronavírusok kimutatására kifejlesztett PCR próba eredményei alapján eseteinkben előfordult a koronavírus fertőzés önállóan és ANV fertőzéssel együtt is, sőt olyan halmozottan jelentkező baromfiköszvény esetek is voltak, ahol az egyébként vírushatásoknál talált és jellemzőnek tartott klinikai tünet és kórbonctani elváltozás dacára sem sikerült molekuláris diagnosztikai módszerrel a vizsgált két vírus valamelyikének jelenlétét igazolni.

A fertőző bronchitis vírusa - elnevezésével ellentétben - többféle szövetben képes szaporodni. A légutak nyálkahártyáján kívül elsősorban a gyomor-bélcsatorna, a vese, a gonádok és a bursa Fabricii hámsejtjeiben szaporodik (Cavanagh, 2005). Mivel az IBV patogenitás és szöveti tropizmus vonatkozásában szélesebb sejt- és szervspektrummal rendelkezik, mint az ANV, elképzelhető, hogy a fertőző bronchitis vírus szaporodása által kiváltott sejtkárosító hatás segíti az ANV elszaporodását és fokozza annak kártételét a csirkék veséjében. Több vírus együttes fertőzése esetén gyakran lép fel szinergizmus, vagy vírusexaltáció. Ilyenkor az együttes károsító hatás erősebb, ezért valószínűleg a kórbonctani makroszkópos és mikroszkópos vizsgálatokkal a szövődényes esetek bizonyíthatók jobban, míg a csak ANV pozitív esetek kevésbé kifejezettek.

Az IBV fertőzöttség valamivel nagyobb százalékban (30%) fordult elő önállóan. De az ANV pozitív állatok közel egy harmada (27%) pozitívnak bizonyult IBV jelenlétére is (**8. táblázat**). Ez azt is jelezheti egyúttal, hogy a vizsgálatra mintát küldő gazdaságokban az elhullás akkor emelkedett meg jelentősebben, amikor az ANV fertőzöttséget az IBV fertőzés súlyosbította. Feltételezhető, hogy a látens ANV fertőzés esetleg ilyenkor okozott látható klinikai tüneteket és kórbonctani elváltozásokat.

Mivel a napos baromfit vakcinázzák fertőző bronchitis ellen, az sem kizárható, hogy a vakcinavírus reziduális jelenlétét sikerült kimutatnunk. Ennek azonban kóroktani szerepe valószínűleg nincs, bár hajlamosító hatása ennek is lehet. Jelenleg nem tudjuk genom szinten elkülöníteni a nephrotoxikus IBV törzseket a vesekárosodást nem vagy csak kismértékben okozó IBV törzsektől illetve vakcinatörzsektől, tehát nem áll rendelkezésre olyan molekuláris biológiai diagnosztikai módszer, amellyel specifikusan a vesét károsító bronchitis törzseket lehetne azonosítani.

Tudva azt, hogy az IBV gyakran van jelen, és komoly károkat okoz a baromfiállományokban, továbbá, hogy a vakcinázás egyáltalán nem vagy csak részlegesen véd a számos szerocsoport nagyfokban eltérő antigenitása miatt (Farsang és mtsai, 2002;

Cavanagh, 2003), a fertőző bronchitis kártételére mindig számítani kell. Emellett azt is leírják az irodalomban, hogy tulajdonképpen minden IBV törzsnek van bizonyos szintű vesekárosító hatása (Tanyi és Sári, 1970), de az a fertőződés után legkorábban 1 hét múlva, de általában 3 hét után manifesztálódik a vesében. Lehetséges, hogy az általunk mindkét vírussal fertőzöttnek talált esetekben az 10-12 napos vagy idősebb (akár 44 napos!) csirkék veséjében a napos kori fertőződés után perzisztáló bronchitisvírus segítette elő az ANV okozta kórkép kialakulását.

Vizsgálataink alapján meg kell említeni, hogy az ANV és az IBV együttes előfordulásának a kórbonctani elváltozások súlyossága és az elhullások hirtelen megnövekedése szempontjából lehet jelentősége.

Az IBV vakcinák molekuláris biológiai módszerrel történt tesztelése az esetleges ANV kontamináció tisztázása céljából előrelépést jelentett a korábbi szövettényesztési és transzmissziós elektronmikroszkópos ellenőrző vizsgálatokhoz képest (Frazier és mtsai, 1990; Decaesstecker és mtsai 1988). A PCR vizsgálatok felhasználásával kizártuk azt a felvetést, hogy a napos csirkékben hirtelen tömegesen jelentkező ANV fertőzöttség a preventív célból végzett IBV vakcinázás következtében alakult ki. A polimeráz láncreakció érzékenysége miatt a vakcinák kontaminációjának lehetőségét nagy valószínűséggel elvethetjük.

7.3. Az avian nephritis vírus

Tanszékünkön az elmúlt évek vizsgálatai során többször állapítottunk meg fiatal baromfiban bizonytalan tünetek mellett testtömeg-gyarapodás csökkenéssel járó szubklinikai megbetegedést. Mivel a boncolás illetve fénymikroszkópos vizsgálat a jellegtelen, kevésbé pathognomicus elváltozások miatt nem tudott a kórkép oktanára vonatkozóan pontos diagnózist nyújtani, és felmerült az ANV fertőzés gyanúja, a vírusos eredetű fertőző vesegyulladás kórokozójának specifikus kimutatása vált szükségessé. Az általunk kidolgozott, PCR alapú diagnosztikai módszerrel a vizsgált 53 telep közül 33 telepről származó satnya, vesekárosodás és zsigeri köszvény jeleit mutató csirkékben sikerült megállapítani az avian nephritis vírus jelenlétét.

7.3.1. PCR vizsgálatok

A vírus jelenlétének igazolásához, valamint a kórokozó genom egy részének megismeréséhez gyors, és megbízható módszerként PCR teszt kidolgozását, a kapott termékek szekvenálását és a szekvenciák bioinformatikai feldolgozását választottuk

(Mándoki és mtsai, 2006b). A kidolgozott módszer megfelelő diagnosztikai felmérő és szűrő vizsgálatok végzésére, sőt eltérő törzsek filogenetikai elemzését is lehetővé teszi (Mándoki és mtsai, 2006a). A többszörös ellenőrzés bizonyította, hogy téves pozitív eredményt nem kaptunk. A PCR teszt eredményeként kapott megfelelő molekulatömegű termékek a szekvenálás során minden esetben az ANV szekvenciájával mutatták a legnagyobb hasonlóságot.

Az ORF2 régióra tervezett primerpárok közül először egyikkel sem kaptunk terméket, ami felvette annak a lehetőségét, hogy a vírus strukturális fehérjét kódoló régióján még nagyobb a különböző törzsek közötti szekvencia eltérés, mint az ORF1-en, illetve arra utal, hogy esetleg az általunk tervezett primerpárok tapadási helyén van mutáció. Mivel a génbankban csak egy teljes genomszekvencia szerepel, nem volt lehetőségünk több ANV szekvencia felhasználásával továbblépni. Az ORF2-re tervezett primerek különböző párosítása után egy primerpárral (**4. táblázat**) sikerült mégis megfelelő molekulatömegű terméket kapnunk. Az ORF2 régióra tervezett primerekkel jelenleg folyik a pozitív esetek szűrővizsgálata, hogy az egyes vírustörzsek rokonságát a strukturális fehérjék vonatkozásában is vizsgálhassuk. Egyelőre korlátozott számú szekvenciaadat áll rendelkezésünkre, de az identitási értékek nagyjából azonosak a nem strukturális fehérjék régióján kapott értékekkel (NS: 79-80%; AS: 88-91%). A vírustörzsek nagyfokú szekvencia eltérései ellenére a genom mindkét régiójára sikerült eddigi vizsgálataink szerint univerzálisan működő primerpárt tervezni. További cél a vírus izolálása, és így - lehetőség szerint - a teljes genom megismerése.

7.3.2. *Filogenetikai vizsgálatok*

Az avian nephritis vírus ORF1 genomrégiójának a vizsgált szakasz szekvenálását követő filogenetikai elemzése a magyarországi genotípusok rendkívüli változékonyságát mutatta annak ellenére, hogy az ellenanyagok által szelekciós nyomásnak nem kitett, a strukturális proteint kódoló génszakasz összehasonlító vizsgálatát végeztük el. A Magyarországon 2002 és 2005 között gyűjtött vírustörzsek genetikai távolsága hasonló volt egymástól, mint a 30 évvel ezelőtt izolált japán referencia törzstől. Noha a magyarországi és japán baromfiállományok földrajzilag teljesen elkülönültek egymástól, az egymástól sokszor kis távolságra lévő magyarországi telepekről származó izolátumok közötti eltérés körülbelül azonos mértékű volt, mint a magyar és a japán törzsek közötti különbség. Ez azért is meglepő, mert más vírusok esetében a viszonylag konzervatív nem strukturális fehérjét kódoló régió nem szokott ilyen magas lenni a mutációs hajlam.

Mindemellett, voltak olyan esetek, ahol ugyanarról a telepről származó, de eltérő életkorú csirkékből mutattunk ki különböző genotípusokat annak ellenére, hogy az állatok azonos keltetőből származtak. Az ANV olyan magas mutációs rátával rendelkezik, hogy még a molekuláris biológiai vizsgálatok alkalmazása sem minden esetben elegendő a baromfiállományt sújtó ANV fertőzés eredetének kiderítésére. Ezért nem lehetünk teljesen bizonyosak abban, hogy az általunk negatívnak talált esetekben valóban nem volt jelen az ANV. Ezt csak az valószínűsíti, hogy a különböző régiókra tervezett primerek egyikével sem kaptunk pozitív eredményt ezekben az esetekben.

A következtetett aminosav sorrend adatok vizsgálata azt sugallja, hogy sok a néma mutáció és az esetleg különböző genotípushoz tartozó törzsek fenotípusuk alapján nem mutatnak eltérést (pl.: Imr2/03, Sze1/04, Zal1/05). Másrészt olyan minták között is találtunk aminosav sorrendbeli különbséget, amelyeket ugyanarról a telepről, ugyanabban az időpontban gyűjtöttünk (pl.: Sza1/05 és Sza2/05, vagy Imr1/03 és Imr2/03; **21. ábra**).

A nagyfokú változékonyság esetleg befolyásolhatja a PCR alapú kimutatási módszerek használhatóságát abban az esetben, ha a primerek tapadási helyén alakul ki mutáció. Azonban ennek ellenére a diagnosztikai munkában a PCR alkalmazása tűnik megfelelőnek a hagyományos virológiai kimutatási módszerekkel szemben, hiszen a vírus szövettenyészetben csak nehezen és körülményesen izolálható speciális sejtvonal igénye, lassú szaporodása és elenyésző citopatogén hatása miatt (Frazier és mtsai, 1990).

A mutációk során kialakuló fehérjeszerkezeti változások megváltoztathatják a vírustörzsek patogenitását és antigenitását. Fertőzéses állatkísérletekben és klinikai esetek megfigyelése során azt tapasztalták, hogy az ANV patogenitása függ a tartási tényezőktől, a felhasználási típustól (tojó hibrid vagy brojler csirke), a tenyésztett baromfivonaltól, de az állatok nemétől és korától is (Frazier és mtsai, 1990; Imada és mtsai, 1981; Imada és mtsai, 1983). Az említett tényezők mellett a törzsek virulenciájának eltérései is befolyásolhatják a kialakuló kórkép, vagyis a vesegyulladás súlyosságát. Shirai és munkatársai (1991b és 1992) leírták, hogy a napos csirkék köszvényében elpusztult állatokból izolált AN vírustörzsek állatkísérletekben fertőző anyagként felhasználva eltérő mortalitást okoztak, és a kórbonctani elváltozások megjelenési formája is különbözött.

Az általunk vizsgált törzsek szekvenciaelemzése alapján hasonló patogenitásbeli különbségek Magyarországon is valószínűek. További vizsgálatokkal lehet majd tisztázni a kialakuló nephritis és a vírus genetikai jellemzői közötti oki összefüggést, a törzsek közötti genetikai diverzitás hatását, vagy akár a fertőző és nem fertőző eredetű hajlamosító tényezőknek a klinikai és kórbonctani elváltozások súlyosságára gyakorolt befolyását.

A mutációk a patogenitáson kívül a vírus antigenitására is hatással vannak. Jelenleg két avian nephritis vírushoz tartozó elkülönülő szerotípust különböztetnek meg (Shirai és munkatársai, 1991b és 1992). Sajnos az ANV kettes szerotípusának csak részleges, az ORF2 régióról származó szekvenciája (AB046864) található meg a génbankban. Mivel ez a szakasz a vírus strukturális poliproteinjét, vagyis kapszid fehérjéket kódoló régióját képviseli, az általunk filogenetikai analízisre felhasznált, ORF1 nem strukturális fehérjéről származó magyarországi törzseket nem tudtuk összehasonlítani a 2-es típusú AN vírussal. Az antigenitásbeli különbségekre azonban figyelemmel kell lenni egy esetleges fertőző vesegyulladás elleni vakcina kifejlesztése során.

Az első vizsgálatok során az ORF1-en nested PCR-rel kapott 92%-os homológia a referencia törzssel szintén alacsony, ezért gondoltuk, hogy az ORF1 további régióinak filogenetikai elemzése is érdekes eredményre vezethet. A nagyfokú változékonyság, amit tapasztaltunk, kétségessé tette, hogy az ORF2-n lehetséges általánosan vagy széles körben tapadó primerpárt tervezni, hiszen a vírus strukturális fehérjéket kódoló genomszakaszán jóval magasabb mutáció várható. További vizsgálatok elvégzését tervezzük az általunk mostanáig elemzett vírustörzsek ORF2 régióján amplifikált termékkel. Így megvizsgálhatjuk a strukturális fehérjék törzsfá elemzése mellett, hogy a magyarországi vírustörzsek a génbankban található ANV 1-es vagy esetleg a 2-es típusával mutatnak nagyobb hasonlóságot.

Vizsgálataink során természetes esetekből származó, nagy eltérést mutató vírustörzsek összehasonlítását végeztük el. Ez alapján kimondhatjuk, hogy az általunk tervezett RT-PCR módszer nagyszámú, köszvényben elpusztult vagy vírusos vékonybél- és vesegyulladás képét mutató állat szervmintájából magas arányban volt alkalmas eltérő vírustörzsek kimutatására és összehasonlítások elvégzésére. A PCR teszt a későbbiekben is használható lesz további minták vizsgálatára, és elemzésére. Az ANV különböző, akár környező országokból származó újabb genotípusainak átfogó filogenetikai vizsgálata tisztázhatja majd a vírus pontos kóroktani szerepét a csirkék fertőző vesegyulladás kórképének, és a következményes veseelégtelenség kártételének kialakulásában.

7.3.3. Az elváltozások szöveti megoszlása és ennek jelentősége

Feldolgozott eseteinkben az egy hetesnél fiatalabb állatokban a vékonybél gyakran mutatott erős pozitívítást az ANV vírus nukleinsav jelenlétére, míg ugyanazon állatok vesemintáiból nem sikerült vírusnukleinsavat kimutatnunk. Vizsgálatainkkal alá tudtuk támasztani az irodalomban is közölt feltételezett patogenezist, vagyis azt, hogy a fertőzés

során a szájon át felvett kórokozó valószínűleg elsődlegesen a vékonybélben szaporodik el. Emellett volt rá példa, hogy mivel az elhullások nem álltak le az első hét után, ugyanarról a telepről néhány nap elteltével ismét kaptunk anyagot és a másodszor megvizsgált mintákban már a vesében is megjelent a vírusnukleinsav jelentését bizonyító PCR pozitivitás. Ez utalhat a köztes időszakban lezajlott viraemiára és a vírus következményes megjelenésére az egyéb szervekben. Ezt az is alátámasztja, hogy más vizsgált szervekből (pl. hasnyálmirigyből és thymusból) is kimutatható volt a vírus genetikai anyaga.

Ebben az esetben azonban be kell látnunk, hogy az esetleges negatív eredmény nem mindig fogadható el feltétel nélkül. Hiszen a betegség elnevezéséből adódóan – fertőző vesegyulladás – sok esetben a napos korú állatokból is csak veseszövet mintát kaptunk, ezért a kapott negatív eredmény esetleg nem valódi negativitást, hanem a mintavétel hiányosságait tükrözi. Ugyanakkor a bélben jelentkező pozitivitás sem jelenti azt, hogy az állat nephritisben, illetve annak következtében kialakult köszvényben pusztult vagy pusztult volna el, hiszen vesekárosodás esetleg ilyenkor még nem alakulhatott ki. A napos korban kialakult hasmenéses kórkép is gyorsan vezethet a fiatal állatok kiszáradására, lesóványodására. Ezekben az esetekben sem volt idő a vesebeli elváltozások kialakulására, illetve az is feltételezhető, hogy a vékonybélbeli elváltozások gyógyulása után nem is jelent volna meg a vesegyulladás. Ellenben az állatok a fejlődés kezdeti szakaszában hátrányt szenvednek, illetve szubklinikai vírusfertőzés marad fenn az állományban, ezért kialakul a szétnövés, és a gazdasági mutatóktól eltérő erélyű gyarapodás.

Végző soron kijelenthetjük, hogy mind pozitív, mind negatív eredmény esetén fontos a körülmények értékelése (Press és mtsai, 1999).

7.3.4. A magyarországi esetek eloszlása

A fertőzöttnek talált telepek megoszlása alapján nem sikerült olyan összefüggést találni, ami magyarázatot adna a betegség földrajzi eloszlására vagy a fertőződés módjára vonatkozóan (Mándoki és mtsai, 2005). Vizsgálataink során felmerült, hogy esetleg az azonos keltetőből származó állatokban alakult ki a kórkép és/vagy fajtához köthető az érzékenység a kórokozóval szemben, de a vizsgált telepek különböző forrásból szereztek be a napos baromfiállományukat, és a kórkép is különböző fajtájú csirkékben jelentkezett.

A takarmánykeverő és -beszállító cég sem volt ugyanaz a vizsgált telepek esetében, ami a takarmányeredetű hajlamosító tényezők irányába fordította volna az esetleges további vizsgálatok irányát. Irodalmi adatok, illetve a jelenleg szórványos előfordulást mutató esetek alapján szóba jöhet a takarmány fitáz kiegészítésének a vizsgálata és hajlamosító tényezőként

való azonosítása (Mézes és Kőrösi, 2006). A fitáz alkalmazását 2003-ban vezették be a nagy takarmánygyártó cégek Magyarországon és erre az időszakra tehető az esetek járványszerű előfordulási gyakorisága. Ebből azonban nem lehet biztos következtetést levonni ennek, a komplex kóroktanú betegségnek a megjelenésére vonatkozóan. Mindenesetre azt el lehet mondani, hogy az általunk vizsgált mintákkal kapcsolatban kiderült, hogy az indítótápok minősége minden esetben megfelelt a követelményeknek.

7.4. A megbeszélés összefoglalása

A kezdeti felmérő, majd az első igazolt pozitív minta után elvégzett szűrő PCR vizsgálat igazolta (Mándoki, 2006b), hogy az AN vírus jelen van a magyarországi baromfiállományokban, illetve összefüggésbe hozható a rutin kórbonctani, kórszövettani vizsgálatok eredményével (Mándoki, 2005). A Magyarországon eddig még nem diagnosztizált vírusnak kimutatására alkalmas PCR módszer kidolgozását, a rutindiagnosztikába való bevezetését, valamint a hazánkban előforduló törzsek filogenetikai analízisét végeztük el a doktori képzés keretében végzett munka során (Mándoki, 2006a). Az általunk kidolgozott teszt jól hasznosítható a hazai járványtani, virológiai és kórbonctani diagnosztika területén és a gyakorlati életben is felhasználható a baromfiállományok fertőzöttségének gyorsdiagnosztikájára és állomány-vizsgálatra (Ballagi-Pordány és Belák, 1996; Vanechoutte és Van Eldere, 1997).

A vizsgált esetek és a levonható következtetések kapcsán megállapítottuk az avian nephritis vírus széles körű magyarországi jelenlétét. Bár a vírus többnyire szubklinikai fertőzést okoz a néhány hetes csirkeállományokban, és számottevő elhullás csak ritkán, egyéb hajlamosító tényezőkkel együtt következik be, a fertőzöttség által okozott következmények (kisebb növekedési erély, rossz takarmányértékesítés, az állományok szétnövése) miatt mégis jelentős gazdasági károkat okozhat.

Az irodalmi adatokkal teljesen egyező megfigyeléseink és a talált elváltozások felvetik annak a gyanúját, hogy az AN vírus okozta fertőzöttség és a kialakuló szubklinikai bántalom, amely fejlődésben való visszamaradással és esetenként elhullással járva okoz károkat a baromfitartóknak, gyakori hazánkban.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Morfológiai, valamint genetikai módszerekkel bizonyítottam a csirkék fertőző vesegyulladását okozó vírus, az *avian nephritis vírus* (ANV) jelenlétét Magyarországon.
- Diagnosztikai PCR módszert dolgoztam ki, amely - megfelelő laboratóriumi háttér mellett - rutinszerűen alkalmazható az állatorvosi kórbonctani diagnosztikai munkában. Ez a PCR próba a továbbiakban a vesekárosodással és köszvényel járó esetekben alkalmas kóroktani és elkülönítő kórjelzést elősegítő vizsgálatok végzésére.
- Bizonyítottam, hogy a baromfiállományokban nagy gazdasági kárt okozó köszvényesetek jelentős részében kimutatható az ANV jelenléte, ennek alapján kórtani szerepe erősen valószínű.
- Igazoltam, hogy az ANV Magyarországon széles körben és országszerte elterjedt a különböző fajtájú és különböző rendszergazdákhoz tartozó állományokban.
- A pozitív eredményt adó PCR vizsgálat során keletkezett termékek nukleinsav szekvencia sorrendjének meghatározásával különböző avian nephritis törzsekkel hasonlítottam össze és filogenetikai vizsgálatokkal megállapítottam, hogy Magyarországon nagy a vírustörzsek diverzitása, továbbá a leírt magyarországi genotípusok szekvenciája jelentősen különbözik a génbankban szereplő egyetlen szekvenciától is.
- Bizonyítottam, hogy a tünetmentes vagy jellegtelen klinikai tüneteket mutató, de gyenge növekedési erélyű baromfiállományokban a gazdasági kár hátterében az *avian nephritis* vírus szubklinikai jelenléte is szerepelhet.
- Igazoltam, hogy a coronavírusok közé tartozó IBV teljesen azonos klinikai tüneteket és kórbonctani elváltozásokat (nephroso-nephritist és ennek következtében köszvényt) okozhat fogékony állatokban, továbbá, hogy az ANV-sal fertőzött állományban az IB vírus fertőzés súlyosabb kórképet idéz elő.

9. IRODALOM

- BALLAGI-PORDÁNY, A., BELÁK, S.: The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Molecular and Cellular Probes* (1996) 10 (3): p. 159-164.
- BAXENDALE, W., MEBATSION, T.: The isolation and characterization of astroviruses from chickens. *Avian Pathology* (2004) 33: p. 364-370.
- BEHLING-KELLY, E., SCHULTZ-CHERRY, S., KOCI, M., KELLEY, L., LARSEN, D., BROWN, C.: Localization of astrovirus in experimentally infected turkeys as determined by in situ hybridization. *Veterinary Pathology* (2002) 39 (5): p. 595-598.
- BELÁK, S., BALLAGI-PORDÁNY, A.: Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Veterinary Research Communications* (1993) 17: p.55-72.
- BIKSI, I., KACSKOVICS, I., MÁNDOKI, M., IVÁN, J., HORVÁTH-PAPP, I., MAKAY, G., VETÉSI, F.: Detection of *Lawsonia intracellularis* in Hungarian swine herds by polymerase chain reaction. *Acta Veterinaria Hungarica* (1998) 46 (4): p. 415-420.
- BOKORI J.: A baromfiköszvényről: I. A betegség előfordulása, lényege és gazdasági jelentősége. *Magyar Állatorvosok Lapja* (1962) 17: p. 247-251.
- BOKORI J.: A baromfiköszvényről: II. A betegség kóroktana, tünetei és kórbonctana. *Magyar Állatorvosok Lapja* (1963) 18: p. 214-217.
- BOKORI J.: A baromfiköszvényről: III. Kísérletek mesterséges köszvény kiváltására fehérjedús takarmányok etetésével. *Magyar Állatorvosok Lapja* (1965) 20: p. 322-328.
- BOKORI J.: A baromfiköszvényről: IV. Kísérleti etetés mesterséges A-avitaminózis és köszvény kiváltására. *Magyar Állatorvosok Lapja* (1966) 21: p. 211-216.
- CAUL, E.O., APPLETON, H.: The electronmicroscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *Journal of Medical Virology* (1982) 9: p. 257-265.
- CAVANAGH, D., MAWDITT, K., SHAW, K., BRITTON, P., NAYLOR, C.: Towards the routine application of nucleic acid technology for avian disease diagnosis. *Acta Veterinaria Hungarica* (1997) 45: p. 281-298.
- CAVANAGH, D.: Innovation and discovery: the application of nucleic acid-based technology to avian virus detection and characterization. *Avian Pathology* (2001) 30: p. 581-598.
- CAVANAGH, D.: Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathology* (2003) 32 (7): p. 567-582.
- CAVANAGH, D.: Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology* (2005) 34 (6): p. 439-448.

- CONNOR, T.J., MCNEILLY, F., MCFERRAN, J.B., MCNULTY, M.S.: A survey of avian sera from Northern Ireland for antibody to avian nephritis virus. *Avian Pathology* (1987) 16: p. 15-20.
- COSGROVE, A.S.: An apparently new disease of chickens – avian nephrosis. *Avian Diseases* (1962) 6: p. 385-389.
- DECAESSTECKER, M., CHARLIER, G., MEULEMANS, G.: Epidemiological study of enteric viruses in broiler chickens: comparison of tissue culture and direct electron microscopy. *Avian Pathology* (1988) 17: p. 477-486.
- DECAESSTECKER, M., MEULEMANS, G.: An Elisa for the detection of antibodies to avian nephritis virus and related entero-like viruses. *Avian Pathology* (1991) 20: p. 523-530.
- DEZSŐ P., NAGY J.: A polimeráz láncreakció (PCR) és gyógyszerkutatói alkalmazásai. *Magyar Kémiai Folyóirat* (2005) 111 (4): p. 153-158.
- DOBOS-KOVÁCS M.: A húgyszervek kórbonctana. Az Állatorvostudományi Egyetem jegyzete, Budapest (1994) p. 66-67.
- FARSANG, A., ROS, C., RENSTROM, L.H., BAULE, C., SOÓS, T., BELÁK, S.: Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian Pathology* (2002) 31: p. 29-36.
- FEHÉR GY.: A húgyszervek. In: A háziállatok funkcionális anatómiája. Harmadik kötet, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest (1980) p. 800-803.
- FELSENSTEIN, J.: Phylip – Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* (1989) 5: p. 164-166.
- FRAZIER, J.A., HOWES, K., REECE, R.L., KIDD, A.W., CAVANAGH, D.: Isolation of non-cytopathic viruses implicated in the aetiology of nephritis and baby chick nephropathy and serologically related to avian nephritis virus. *Avian Pathology* (1990) 19: p. 139-160.
- FRAZIER, J.A., REECE, R.L.: Infectious stunting syndrome of chickens in Great Britain: intestinal ultrastructural pathology. *Avian Pathology* (1990) 19: p. 759-777.
- GIBBS, R.A.: DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry* (1990) 62 (13): p. 1202-1214.
- GOODWIN, M.A., DAVIS, J.F., MCNULTY, M.S., BROWN, J., PLAYER, E.C.: Enteritis (so-called runting stunting syndrome) in Georgia broiler chicks. *Avian Diseases* (1993) 37: p. 451-458.
- GOUGH, R.E., COLLINS, M.S., BORLAND, E., KEYMER, L.F.: Astrovirus-like particles associated with hepatitis in ducklings. *Veterinary Record* (1984) 114 (11): p. 279.
- GUZSAL E.: A házimadarak szerveinek szövettana. In: Háziállatok szövettana. Mezőgazda Kiadó, Budapest (1981) p. 388-394.

HELMBOLDT, C.F., GARNER, E.: Experimentally induced Gumboro disease (IBA). *Avian Diseases* (1964) 8: p. 561-575.

HERCZEG, J., WEHMANN, E., BRAGG, R.R., TRAVASSOS DIAS, P.M., HADJIEV, G., WERNER, O., LOMNICZI, B.: Two novel genetic groups (VIIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIIb) of which reached Southern Europe. *Archives of Virology* (1999) 144: p. 2087-2099.

<http://www.clinical-virology.org/gallery/images/em/astrovirus.jpg>

<http://evolution.gnetics.washington.edu/phylip.html>

<http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/Astroviridae/news.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/pubmed>

http://www.oardc.ohio-state.edu/Isaiflab/porcine_astrovirus.htm

<http://www.stanford.edu/group/virus/1999/jwdavy/astrovirus.html>

<http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Diarrhoea.html>

IMADA, T., YAMAGUCHI, S., KAWAMURA, H.: Pathogenicity for Baby Chicks of the G-4260 Strain of the Picornavirus "Avian Nephritis Virus". *Avian Diseases* (1979) 23: p. 451-458.

IMADA, T., TANIGUCHI, T., YAMAGUCHI, S., MINETOMA, T., MAEDA, M., KAWAMURA, H.: Susceptibility of chickens to avian nephritis virus at various inoculation routes and ages. *Avian Diseases* (1981) 25: p. 294-302.

IMADA, T., MAEDA, M., FURUTA, K., YAMAGUCHI, S., KAWAMURA, H.: Pathogenicity and distribution of avian nephritis virus (G-4260 strain) in inoculated laying hens. *National Institute of Animal Health Quarterly, Japan* (1983) 23: p. 43-48.

IMADA, T., KAWAMURA, H.: Avian nephritis. In: *Diseases of Poultry* Edited by CALNEK, B.W., BARNES, H.J., BEARD, C.W., MCDUGALD, L.R., SAIF, Y.M. 10th ed. Iowa State University Press, Ames; (1997) p. 761-765.

IMADA, T., YAMAGUCHI, S., MASE, M., TSUKAMOTO, K., KUBO, M., MOROOKA, A.: Avian Nephritis Virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA. *Journal of Virology* (2000) 18: p. 8487-8493.

JAKAB, F., PÉTERFAI, J., MELEG, E., BÁNYAI, K., MITCHELL, D.K., SZÜCS, G.: Comparison of clinical characteristics between astrovirus and rotavirus infections diagnosed in 1997 to 2002 in Hungary. *Acta Paediatrica* (2005) 94 (6): p. 667-671.

JÁRMAI K.: Penészes kukorica, mint a baromfiak köszvényének egyik okozója. *Állatorvosi Lapok* (1925) 15: p. 153-155.

- JONASSEN, C.M., JONASSEN, T.O., GRINDE, B.: A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhinovirus. *Journal of General Virology* (1998) 79 (4): p. 715-718.
- JONASSEN, C.M., JONASSEN, T.O., SAIF, Y.M., SNODGRASS, D.R., USHIJIMA, H., SHIMIZU, M., GRINDE, B.: Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *Journal of General Virology* (2001) 82 (5): p. 1061-1067.
- JONASSEN, C.M., JONASSEN, T.O., SVEEN, T.M., GRINDE, B.: Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. *Virus Research* (2003) 91 (2): p. 195-201.
- KIMURA, M.: A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* (1980) 16: p. 111-120.
- KISS I., MATIZ K.; KECSKEMÉTI S., TANYI J.: PCR alkalmazásával nyert tapasztalatok a Debreceni Állategészségügyi Intézetben. *Magyar Állatorvosok Lapja* (1997) 119: p. 566-558.
- KOCI, M.D., SEAL, B.S., SCHULTZ-CHERRY, S.: Development of an RT-PCR diagnostic test for an avian astrovirus. *Journal of Virological Methods* (2000a) 90 (1): p. 79-83.
- KOCI, M.D., SEAL, B.S., SCHULTZ-CHERRY, S.: Molecular characterization of an avian astrovirus. *Journal of Virology* (2000b) 74 (13): p. 6173-6177.
- KOCI, M.D., SCHULTZ-CHERRY, S.: Avian astroviruses. *Avian Pathology* (2002) 31: p. 213-227.
- KOCI, M.D., MOSER, L.A., KELLEY, L.A., LARSEN, D., BROWN, C.C., SCHULTZ-CHERRY, S.: Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. *Journal of Virology* (2003) 77 (21): p. 11798-11808.
- KOCI, M.D., KELLEY, L.A., LARSEN, D., SCHULTZ-CHERRY, S.: Astrovirus-induced synthesis of nitric oxide contributes to virus control during infection. *Journal of Virology* (2004) 78 (3): p. 1564-1574.
- KUMAR, A., JINDAL, N., SHUKLA, C.L., ASRANI, R.K., LDOUX, D.R., ROTTINGHAUS, E.: Pathological changes in broiler chickens fed ochratoxin A and inoculated with *Escherichia coli*. *Avian Pathology* (2004) 33: p. 413-417.
- LEE, C.W., BROWN, C., HILT, D.A., JACKWOOD, M.W.: Nephropathogenesis of chickens experimentally infected with various strains of infectious bronchitis virus. *Journal of Veterinary Medical Science* (2004) 66 (7): p. 835-840.
- LIU, C., GRILLNER, L., JONSSON, K., LINDE, A., SHEN, K., LINDELL, A.T., WIRGART, B.Z., JOHANSEN, K.: Identification of viral agents associated with diarrhea in young children during a winter season in Beijing, China. *Journal of Clinical Virology* (2006) 35 (1): p. 69-72.
- LODA, M., DELELLIS, R.A.: Molecular Diagnostic Techniques. In: *Principles and Practice of Surgical and Cytopathology, Chapter 6*. (1994) p. 1-18.

- LUKASHOV, V.V., GOUDSMIT, J.: Evolutionary relationships among Astroviridae. *Journal of General Virology* (2002) 83 (6): p. 1397-1405.
- MADELEY, C.R., COSGROVE, B.P.: Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *The Lancet* (1975) 2 (7932): p. 451-452.
- MAEDA, M., IMADA, T., TANIGUCHI, T., HORIUCHI, T.: Pathological Changes in Chicks Inoculated with the Picornavirus „Avian Nephritis Virus”. *Avian Diseases* (1979) 23: p. 589-596.
- MÁNDOKI M., DOBOS-KOVÁCS M., IVANICS É., NEMES Cs., BAKONYI T., RUSVAI M.: Az avian nephritis vírus okozta kórkép előfordulásának első hazai leírása és elterjedtségének vizsgálata. *Magyar Állatorvosok Lapja* (2005) 127: p. 720-726.
- MÁNDOKI, M., BAKONYI, T., IVANICS, É., NEMES, Cs., DOBOS-KOVÁCS, M., RUSVAI, M.: Phylogenetic diversity of Avian Nephritis Virus in Hungarian chicken flocks. *Avian Pathology* (2006a) 35 (3): p. 1-6.
- MÁNDOKI, M., DOBOS-KOVÁCS, M., BAKONYI, T., RUSVAI, M.: Molecular diagnosis of avian nephritis. *Acta Veterinaria Hungarica* (2006b) 54: p. 51-60.
- M McNULTY, M.S., CONNOR, T.J., MCNEILLY, F.: A serosurvey of specific pathogen free chicken flocks for antibodies to chicken anaemia agent, avian nephritis virus and group A rotavirus. *Avian Pathology* (1989) 18: p. 215-220.
- M McNULTY, M.S., CONNOR, T.J., MCNEILLY, F., MCFERRAN, J.B.: Biological characterization of avian enteroviruses and entero-like viruses. *Avian Pathology* (1990) 19: p. 75-87.
- M CORIST, S., GEBHART, C.J., LAWSON, G.H.K.: Polymerase chain reaction for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Veterinary Microbiology* (1994) 41: p. 205-212.
- MEIR, R., ROSENBLUT, E., PERL, S., KASS, N., AYALI, G., PERK, S., HEMSANI, E.: Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian Diseases* (2004) 48 (3): p. 635-641.
- MÉZES M., KÖRÖSI L.: Adalékok a növendék csirkék “fertőző” vesegyulladására kóroktanához. (Levél a szerkesztőséghez.) *Magyar Állatorvosok Lapja* (2006) 128: p. 186-188.
- MOSER, L.A., SCHULTZ-CHERRY, S.: Pathogenesis of astrovirus infection. *Viral Immunology* (2005) 18 (1): p. 4-10.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (1986) 51 (1): p. 263-273.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* (1992) 24: p. 17-27.
- MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J.: Astroviruses. In: *Veterinary Virology*; Third Edition. Academic Press. San Diego, CA, USA (1999) p. 543-547.

- NAKAZATO, H., EDMONDS, M.: The isolation and purification of rapidly labeled polysome-bound ribonucleic acid on polythymidylate cellulose. *Journal of Biological Chemistry* (1972) 247: p. 3365-3377.
- NARITA, M., KAWAMURA, H., FURUTA, K., SHIRAI, J., NAKAMURA, K.: Effects of cyclophosphamide in newly hatched chickens after inoculation with avian nephritis virus. *American Journal of Veterinary Research* (1990) 51: p. 1623-1628.
- PAGE, R.M.D.: TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* (1996) 12: p. 357-358.
- PERRY, R.W., ROWLAND, G.N., GLISSON, J.R.: Poult malabsorption syndrome. I. Malabsorption in poult enteritis. *Avian Diseases* (1991a) 35 (4): p. 685-693.
- PERRY, R.W., ROWLAND, G.N., GLISSON, J.R.: Poult malabsorption syndrome. II. Pathogenesis of skeletal lesions. *Avian Diseases* (1991b) 35 (4): p. 694-706.
- PRESS, N., ROMNEY, M., TAKAYA, S., CONWAY, B.: Molecular diagnosis of infections in the new millennium. *Canadian Medical Association Journal* (1999) 161 (10): p. 1294.
- QURESHI, M.A., SAIF, Y.M., HEGGEN-PEAY, C.L., EDENS, F.W., HAVENSTEIN, G.B.: Induction of functional defects in macrophages by a poult enteritis and mortality syndrome-associated turkey astrovirus. *Avian Diseases* (2001) 45 (4): p. 853-861.
- REECE, R.L., HOWES, K., FRAZIER, J.A.: Experimental factors affecting mortality following inoculation of chickens with avian nephritis virus (G-4260). *Avian Diseases* (1992) 36: p. 619-624.
- REISS, J.: The polymerase chain reaction and its potential role in clinical diagnostics and research. *Journal of Internal Medicine* (1991) 230 (5): p. 391-395.
- RODERICK, P., WHEELER, J., COWDEN, J., SOCKETT, P., SKINNER, R., MORTIMER, P., ROWE, B., RODRIQUES, L.: A pilot study of infectious intestinal disease in England. *Epidemiology and Infection* (1995) 114: p. 277-288.
- ROYUELA, E., NEGREDO, A., SANCHEZ-FAUQUIER, A.: Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. *Journal of Virological Methods* (2005) 28 [Epub ahead of print].
- SAIF, Y.M., SAIF, L.J., HOFACRE, C.L., HAYHOW, C., SWAYNE, D.E., DEARTH, R.N.: A small round virus associated with enteritis in turkey poults. *Avian Diseases* (1990) 34 (3): p. 762-764.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* (1985) 230 (4732): p. 1350-1354.
- SÁLYI G.: A baromfi egyes nitrogén-anyagforgalmi zavarai, a köszvény, a húgykövesség és a naposkori „nephropathia”. Irodalmi áttekintés. *Magyar Állatorvosok Lapja* (1999) 121: p. 91-99.

- SCHULTZ-CHERRY, S., KING, D.J., KOCI, M.D.: Inactivation of an astrovirus associated with poult enteritis mortality syndrome. *Avian Diseases* (2001) 45 (1): p. 76-82.
- SHIRAI, J., NAKAMURA, K., NARITA, M., FURUTA, K., HIHARA, H., KAWAMURA, H.: Visceral urate deposits in chicks inoculated with avian nephritis virus. *Veterinary Record* (1989) 124: p. 658-661.
- SHIRAI, J., NAKAMURA, K., NARITA, M., FURUTA, K., KAWAMURA, H.: Avian nephritis virus infection of chicks: Virology, Pathology and Serology. *Avian Diseases* (1990a) 34: p. 558-565.
- SHIRAI, J., OBATA, H., NAKAMURA, K., FURUTA, K., HIHARA, H., KAWAMURA, H.: Experimental infection in specific-pathogen-free chicks with avian reovirus and avian nephritis virus isolated from broiler chicks showing runting syndrome. *Avian Diseases* (1990b) 34: p. 295-303.
- SHIRAI, J., NAKAMURA, K., NOZAKI, H., KAWAMURA, H.: Differences in the induction of urate deposition of specific-pathogen-free chicks inoculated with avian nephritis virus passaged by five different methods. *Avian Diseases* (1991a) 35: p. 269-275.
- SHIRAI, J., NAKAMURA, K., SHINOHARA, K., KAWAMURA, H.: Pathogenicity and antigenicity of avian nephritis isolates. *Avian Diseases* (1991b) 35: p. 49-54.
- SHIRAI, J., TANIMURA, N., URAMOTO, K., NARITA, M., NAKAMURA, K., KAWAMURA, H.: Pathologically and serologically different avian nephritis virus isolates implicated in etiology of baby chick nephropathy. *Avian Diseases* (1992) 36: p. 369-377.
- SILLER, W.G.: Renal pathology of the fowl – a review. *Avian Pathology* (1981) 10: p. 187-262.
- SINGH, V.K., SAI KUMAR, G., PALIWAL, O.P.: Detection of classical swine fever virus in archival formalin-fixed tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science* (2005) 79 (1): p. 81-84.
- SOKKAR, S.M., MOHAMED, M.A., ATAWIA, M.: Experimental induction of renal lesions in chickens. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* (1998) 111 (5): p. 161-163.
- SPACKMAN, E., KAPCZYNSKI, D., SELLERS, H.: Multiplex real-time reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of three viruses associated with poult enteritis complex: turkey astrovirus, turkey coronavirus, and turkey reovirus. *Avian Diseases* (2005) 49 (1): p. 86-91.
- STANSFIELD, W.D.: *Genetika. Elmélet és gyakorlat*. PANEM-McGraw-Hill, Budapest (1997) 440.
- TANG, Y., MURGIA, A.M., SAIF, Y.M.: Molecular characterization of the capsid gene of two serotypes of turkey astroviruses. *Avian Diseases* (2005) 49 (4): p. 514-519.
- TANYI J., SÁRI I.: A csirkék vírusos vesegyulladásának hazai előfordulása. (Occurrence in Hungary of virus induced nephritis of chicken.) *Magyar Állatorvosok Lapja* (1970) 25: p. 545-547.

- THOMPSON, J. D., GIBSON, T.J., PLEWNIAC, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G: The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* (1997) 25: p. 4876-4882.
- TOWNSEND, K.M., FROST, A.J., LEE, C.W., PAPADIMITRIOU, J.M., DAWKINS, H.J.: Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* (1998) 36 (4): p. 1096-1098.
- TUBOLY S. (Szerk.): Még nem csoportosított RNS-vírusok. In: Állatorvosi mikrobiológia: Bakteriológia, virológia, immunológia (Állatorvosi járványtan I.) Mezőgazda Kiadó, Budapest; (1998) p. 405.
- ULLOA, J.C., MATIZ, A., LAREO, L., GUTIERREZ, M.F.: Molecular analysis of a 348 base-pair segment of open reading frame 2 of human astrovirus. A characterization of Colombian isolates. *In Silico Biology* (2005) 5 (4): p. 0048 [Epub ahead of print].
- VANEECHOUTTE, M., VAN ELDERE, J.: The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *Journal of Medical Microbiology* (1997) 46 (3): p. 188-194.
- VARGA J., TUBOLY S., MÉSZÁROS J.: A csirkék nephritis-(picorna) vírus fertőzöttsége. In: A háziállatok fertőző betegségei. Állatorvosi járványtan II., Mezőgazda Kiadó, Budapest; (1999) p. 373.
- VERNACCHIO, L., VEZINA, R.M., MITCHELL, A.A., LESKO, S.M., PLAUT, A.G., ACHESON, D.W.: Diarrhea in American infants and young children in the community setting: incidence, clinical presentation and microbiology. *The Pediatric infectious disease journal* (2006) 25 (1): p. 2-7.
- WILHELMI, I., ROMAN, E., SÁNCHEZ-FAUQUIER, A.: Viruses causing gastroenteritis (Review). *Clinical Microbiology and Infection* (2003) 9: p. 247-262.
- WINTERFIELD, R.W., HITCHNER, S.B.: Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *American Journal of Veterinary Research* (1962) 97: p. 1273-1279.
- YAMAGIWA, S., ONO, T. ITAKURA, C., INOUE, M.: Aerocystitis erosive observed in embryos, dead and dull chicks on the day of hatching. *Research Bulletin, Obihiro University* (1968) 5: p. 495-522.
- YAMAGUCHI, S., IMADA, T., KAWAMURA, H.: Characterization of a picornavirus isolated from broiler chicks. *Avian Diseases* (1979) 23: p. 571-581.
- YU, M., TANG, Y., GUO, M., ZHANG, Q., SAIF, Y.M.: Characterization of a small round virus associated with the poult enteritis and mortality syndrome. *Avian Diseases* (2000) 44 (3): p. 600-610.
- ZIEGLER, A.F., LADMAN, B.S., DUNN, P.A., SCHNEIDER, A., DAVISON, S., MILLER, P.G., LU, H., WEINSTOCK, D., SALEM, M., ECKROADE, R.J., GELB, J. JR.: Nephropathogenic infectious bronchitis in Pennsylvania chickens 1997-2000. *Avian Diseases* (2002) 46 (4): p. 847-858.

10. A JELÖLT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓI

10.1. A kutatási témában megjelent szakcikkek

Mándoki Míra, Dobos-Kovács Mihály, Ivanics Éva, Nemes Csaba, Bakonyi Tamás, Rusvai Miklós:
Az avian nephritis vírus okozta kórkép előfordulásának első hazai leírása és elterjedtségének vizsgálata.
(First description and distribution of the avian nephritis infection in Hungary)
Magyar Állatorvosok Lapja, (2005) 127, 720-726.

Mándoki, M., Dobos-Kovács, M., Bakonyi, T., Rusvai, M.:
Molecular Diagnosis of Avian Nephritis
Acta Veterinaria Hungarica, (2006) 54: 51-60.

Mándoki, M., Bakonyi, T., Ivanics, É., Nemes, Cs, Dobos-Kovács, M., Rusvai, M.:
Phylogenetic diversity of avian nephritis virus in Hungarian chicken flocks
Avian Pathology, (2006) 35 (3): 1-6.

10.2. A kutatási témában tartott előadások

Dobos-Kovács Mihály, **Mándoki Míra**, Etter László, Zentai Gábor Zsolt, Vetési Ferenc, Rusvai Miklós:
Avian nephritis vírus kimutatása hazai brojlercsirke állományban
Előadás, 12. Derzsy Napok, Tapolca, 2004. június 3-4.

Mándoki Míra, Dobos-Kovács Mihály, Bakonyi Tamás, Kecskeméti Sándor, Ivanics Éva, Rusvai Miklós:
A csirkék fertőző nephritisét okozó vírus magyarországi törzseinek összehasonlító vizsgálata
Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése, Keszthely, 2004. okt. 7-9.

Dobos-Kovács Mihály, Palya Vilmos, Glávits Róbert, Bakonyi Tamás, Ivanics Éva, Nemes Csaba, **Mándoki Míra**, Benyeda János:
A csirkék fertőző nephritisének (avian nephritis) járványos előfordulása Magyarországon.
Akadémiai beszámoló, 2006.

Dobos-Kovács Mihály, Palya Vilmos, Mató Tamás, Bakonyi Tamás, Ivanics Éva, Nemes Csaba, **Mándoki Míra**, Rusvai Miklós, Glávits Róbert:
A fertőző nephritis előfordulása és járványtani jelentősége hazai csirkeállományokban.
Előadás, 14. Derzsy Napok, Eger, 2006. június 8-9.

Mató Tamás, **Mándoki Míra**, Bakonyi Tamás, Ivanics Éva, Nemes Csaba, Palya Vilmos, Rusvai Miklós:
A fertőző nephritis molekuláris diagnosztikája és a hazai törzsek genetikai diverzitása.
Előadás, 14. Derzsy Napok, Eger, 2006. június 8-9.

10.3. Egyéb közlemények referált lapokban

Biksi, I.; Kacs Kovics, I.; **Mándoki, M.**; Iván, J.; Horváth-Papp, I.; Makay, G.; Vetési, F.:
Detection of Lawsonia intracellularis in Hungarian swine herds by polymerase chain reaction
Acta Veterinaria Hungarica, (1998) 46: (4) 415-420.

Leav, I.; Merk, F.B.; Lee, K.F.; Loda, M.; **Mándoki, M.**; McNeal, J.E.; Ho, S.K.:
Prolactin Receptor expression in the developing human prostate and in hyperplastic, dysplastic, and neoplastic lesions.
American Journal of Pathology, (1999) 154: (3) 863-870.

Mándoki M., Vetési F.:

A Tyzzer-betegség hazai megállapítása kutyában
(First report of Tyzzer's disease in a dog in Hungary)
Magyar Állatorvosok Lapja, (2000) 122: (5) 263-267.

Széll Z., Dobos Kovács M., Bakos Z., **Mándoki M.**, Molnár B., Lukács Z., Varga I.:
Lovak anoplocephalosisa
Rövid irodalmi áttekintés és esetismertetések
(Anoplocephalosis in horses)
Magyar Állatorvosok Lapja, (2001) 123: (12) 735-742.

Gál J., Marosán M., Faragó S., **Mándoki M.**:
A mezei nyulak (*Lepus europaeus* L.) hereelváltozásainak vizsgálata a Lajta-Hanság területén
(Examination of testicular changes of hares (*Lepus europaeus* L.) in the territory of Lajta-Hanság)
Magyar Állatorvosok Lapja, (2002) 124: (12) 749-753.

Gál J., **Mándoki M.**, Jakab Cs., Kiss K., Radványi Sz.:
Pseudomonas aeruginosa okozta hurutos-gennyes tüdőgyulladás zöld fapitonban
[Chondropyton (Morelia) viridis]
Catarrhal-purulent pneumonia caused by Pseudomonas aeruginosa in green tree python [Chondropyton (Morelia) viridis]
Magyar Állatorvosok Lapja, (2002) 124: (12) 739-741.

Gál J., **Mándoki M.**, Vincze Z., Sós E.:
Elhalásos vastagbélgyulladás sárga bikasiklóban (*Pituophis catenifer affinis*)
Necrotic colitis in gopher snake (*Pituophis catenifer affinis*)
Magyar Állatorvosok Lapja, (2003) 125: (6) 379-381.

Gál J., **Mándoki M.**, Jakab Cs., Sós E., Marosán M.:
Entamoebosis zöld leguánban (*Iguana iguana*)
Entamoebosis in green iguana (*Iguana iguana*)
Magyar Állatorvosok Lapja, (2003) 125: (7) 422-424.

Gál J., **Mándoki M.**, Sós E., Marosán M.:
Tojásvisszatartás és következményes savós-fibrines savóshártya-gyulladás vitorlás agáma (*Hydrosaurus amboinensis*) testüregében
Egg retention and consequent catarrhal-fibrinoid inflammation of serous membrane in

a sailfin lizard's (*Hydrosaurus amboinensis*) abdominal cavity
Magyar Állatorvosok Lapja, (2004) 126: (5) 290-292.

Gál J., **Mándoki M.**, Sós E., Marosán M.:

Zöld fapiton (*Morelia/Chondropyton viridis*) tartási hibáiból eredő megbetegedési
Egg retention and consequent catarrhal-fibrinoid inflammation of serous membrane in
a sailfin lizard's (*Hydrosaurus amboinensis*) abdominal cavity
Magyar Állatorvosok Lapja, (2004) 126: (9) 561-566.

10.4. Egyéb előadások és közlemények

Mándoki Míra

A Tyzzer betegség – egy új zoonózis
Fiatal Pathologusok Fóruma, 2000. június 16.
Simmelweis Egyetem I sz. Pathologiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

Mándoki Míra

Tyzzer betegség, mint potenciális zoonózis
Szent-Iványi – Binder Napok, 2000. november 15-17.
Magyar Zoonózis Társaság Konferenciája, Pécs

Mándoki Míra

Tyzzer's disease in the dog
CL Davis Foundation European Division, Pathology Symposium, 2001. július 5-7.
Szie ÁOTK, Budapest

Vetési Ferenc - **Mándoki Míra**

A Tyzzer-betegség mint potenciális zoonózis
Állatorvosi kamarai hírek, a Magyar Állatorvosi Kamara lapja, 2001. 12/4. 26. p.

Mándoki Míra

Gentamycin toxicosis sertésben
11. Köves Napok, 2002. május 8-9.
MOÁE Sertés-egészségügyi Társaság, Eger

Mándoki Míra

Gentamicin toxicosis sertésben, Ad us. vet., 2002. 4. szám; 6-7. p.

Mándoki, M., Gál, J., Faragó, S., Rusvai, M.:

Effect of the *Pasteurella multocida* on the European brown hare population in
Hungary
Verhandlungsbericht des 41. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der
Zoo- und Wildtiere, 28. May – 01. June 2003, Rome, Italy

Virág, G., **Mándoki, M.**, Odermatt, M.:

Characterization of *Pasteurella multocida* recovered from live rabbits at a small-scale
farm previously manifesting death by pyothorax and pyometra
short paper, 8th World Rabbit Congress, Convention Center, Puebla City, Mexico
September 7 - 10, 2004

Gál, J., **Mándoki, M.**, Dobos-Kovács, M., Sós, E.:

Poxvirus dermatitis in a green iguana (*Iguana iguana*)

Verhandlungsberichte zu Erkrankungen der Zootiere, (2005) 42: 218-221.

Gál, J., Sós, E., Mezősi, L., Radványi, Sz., **Mándoki, M.**, Tóth, T.:

Abscess formation caused by *Plesiomonas shigelloides* in the body cavity of the lizard

Ameiva ameiva (Linnaeus, 1758) (Short communications)

Salamandra, (2006) 42, 53-56.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Vetési Ferenc** professzor úrnak, hogy már hallgató koromtól, majd az oktatóvá, kutatóvá válásom első lépéseitől kezdve egyengette utamat - mindig a precíz, aprólékos, kreatív munkára sarkallva. Tőle tanultam meg az állatorvosi kórbonctan szépségét és sokszínűségét.

Köszönetet mondok **Dobos-Kovács Mihály** tanár úrnak, aki mellett átéreztem a baromfiágazat fontosságát, és a hatékony, gyors diagnózis különleges jelentőségét. Ő hívta fel figyelmemet a munka alapját képező avian nephritis vírusra, és a kapcsolódó kutatási lehetőségekre. Tudományos témáját önzetlenül átengedte, de közben mindig támogatott. Türelme, kitartása, fáradhatatlansága örök mintaként fog szolgálni állatorvosi munkám során.

Köszönöm **Rudas Péter** professzor úrnak (†) - aki példaképem volt magánemberként, kutatóként és egyetemi emberként is.

Meg kell említenem **Bakonyi Tamást**, aki a gyakorlati munka során kérdéseimre készségesen válaszolt, a felmerülő nehézségeket elhárította, minden buktatón átsegített. Cikkeim megírása során értékes tanácsokat adott, aprólékos figyelemmel olvasta át kézirataimat és észrevételeivel mindig emelte az értéküket.

Hornyaák Ákos segítségével rengeteget számított a disszertáció elkészülésének hajrájában. Beszélgetéseink során sok hasznos információt kaptam tőle, és ötleteivel mindig új, érdekes tudományos kérdések megválaszolására irányította figyelmemet.

Minden kollégámnak, munkatársamnak, valamint barátomnak köszönettel tartozom azért, hogy bátorítottak, segítettek és mindvégig mögöttem álltak.

Balogh Károlynak köszönöm, hogy 1995-ben, Bostonban a Harvard Egyetem kórbonctani laboratóriumában dolgozhattam, megismerkedhettem a molekuláris patológia alapjaival és megérthettem a modern kórbonctani diagnosztikával szemben támasztott elvárások lényegét.

Utolsóként fejezem ki köszönetemet **Lomniczi Bélának**, aki nélkül egy köszönetnyilvánítás sem lehet teljes. Lomniczi Béla nagymértékben formálta világgépemet mind szakmailag, mind emberileg.

12. SUMMARY

Avian nephritis (AN) is a widely distributed viral kidney disease of newly hatched chickens resulting in well recognizable macroscopic lesions. Poultry is prone to develop uricosis, so it is often diagnosed as cause of death. There are several non-infectious and also infectious causes classified in the aetiology of uricosis. PM examination of young chickens sent to the Department of Pathology and Forensic Veterinary Medicine indicated that the diagnosed tubulonephrosis and interstitial nephritis might be of viral origin, most probably ANV. As any condition which results in nephropathy and renal failure leads to gout, the differential diagnosis of ANV became essential. The aim of this thesis work was to prove the presence of the avian nephritis virus in Hungary and to develop a fast and reliable method to diagnose ANV in samples sent to our laboratory from different farms experiencing high losses.

In order to detect Avian Nephritis Virus (ANV), kidney samples from chickens diagnosed with acute nephritis and gout were subjected to histopathologic and electron microscopic examination. The EM examination revealed the presence of small round, non-enveloped virions of 28-31 nm in diameter in the tubular epithelial cells with the characteristic five-pointed or six-pointed star-like morphology of the icosahedral capsid.

ANV-specific primer pairs were designed on the 5' non-structural region of the reference strain (GeneBank accession number NC_003790). An RT-PCR assay followed by a nested reaction was developed. After the optimization of the PCR reaction on the reference strain, other kidney samples were also screened. The reactions resulted in distinct products with the previously calculated size, 816bp after the RT-PCR and 325bp after the nested RT-PCR reaction. The nucleotide sequence of the 816bp long amplicon was determined. It has shown the highest identity with the nucleotide sequence of the targeted genome region of ANV in BLAST search. The sequence was aligned with the complete ANV genome, exhibiting 92% identity between the Hungarian genotype and the GP1 genome section of the reference virus strain.

Between 2002 and 2005 numerous kidney and intestine samples were collected from chickens of different age from different Hungarian flocks showing the special pathological changes. The samples were pooled for screening or stored individually for particular organ examinations, then homogenized for subsequent RNA extraction/purification. The PCR resulted in a detection of a specific product in several samples from Hungarian flocks.

To shorten the time necessary for the diagnosis and to minimize the possibility of contamination, a fast and reliable ANV specific RT-PCR based detection method without a nested step has been developed with a new primer pair positioned on the ORF1. The nucleotide sequence of the new, 607bp long amplicons was determined and aligned. Several positive samples were used in a phylogenetic analysis, showing high divergence (76-86%) from each other and the reference strain.

Using this test we proved the presence of the avian nephritis virus in several Hungarian flocks (Mándoki et al., 2005) and the results of the screening helped to clarify the occurrence of this viral disease. According to our data the infection is widely distributed in the Hungarian flocks, and the avian nephritis virus infection might more often be the reason for the improper breeding results in chicken industry, than diagnosed.

This ANV specific RT-PCR based detection method can not only be used for research purposes, but on the other hand it is a quick, specific and reliable screening method for the diagnosis of the disease even in case of this highly mutagenic RNA virus. Further investigations can be performed to identify the distribution of ANV in Hungary, the connection between the nephritis and the presence of the virus, virulence and genetic diversity of the different ANV strains. The phylogenetic analysis of more ANV isolates might allow a better understanding of the virus evolution, as the sequence analysis of this genome, which is relatively small, and easy to handle easily manageable is possible at small expenses.