



Állatorvostudományi Egyetem

Patológia Tanszék

**Mikrobiom és bélnyálkahártya változások a házinyúl
járványos enteropátiájában**

Microbiom and intestinal mucosa changes in epizootic rabbit enteropathy

Sándor Balázs

Témavezető:

Dr. Szenes Áron

Tudományos munkatárs, ÁTE Patológiai Tanszék

Önkéntes oktató, ELTE Biokémiai Tanszék

2023

Absztrakt

A nyúltenyésztés ágazata az elmúlt évtizedekben jelentős változásokon ment keresztül, és ez mind a hazai, mind pedig a nemzetközi nyúlhústermelést komoly kihívások elé állítja. Az olyan járványos betegségek, mint amilyen az epizootikus nyúlenteropátia is, komoly gazdasági károkat okoz világszerte. Ennek a gyakran magas morbiditással és mortalitással járó betegségnek a kóroktana a mai napig nem ismert teljesen. A legvalószínűbb, hogy egy jelenleg még nem ismert baktérium állhat a hátterében. Kialakulására jelentős hatással van a tartástechnológia és a takarmányozás. A mikrobiológiai és bioinformatikai módszerek fejlődése hozhat áttörést a betegség kóroktanának megismerésében, mégpedig a mikrobiom vizsgálata metagenomikai módszerekkel. 25 darab ERE-ben szenvedő nyúlnak végeztem el a kórbonctani vizsgálatát, és 10 állat különböző bélszakaszaiból vettem szövettani mintát, hogy azokat összehasonlítsam egészséges nyulakból származó minták adataival. Valamint bemutatom azokat a mikrobiológiai és bioinformatikai módszereket, amelyek segítségével az ERE kóroktanában szerepet játszó baktériumok megismerhetők az ehhez szükséges mikrobiomot reprezentáló minták metagenom adatainak megfelelő feldolgozása segítségével.

Abstract in English

The rabbit breeding sector has undergone significant changes in recent decades, presenting serious challenges to both domestic and international rabbit meat production. Epidemic diseases such as epizootic rabbit enteropathy cause substantial economic damage on a global scale. The etiology of this disease, often associated with high morbidity and mortality, remains incompletely understood to this day, with the most likely scenario involving a yet unidentified bacterium as the underlying cause. The development of microbiological and bioinformatic methods may bring a breakthrough in understanding the pathogenesis of the disease through the examination of the microbiome using metagenomic approaches. I conducted post-mortem examinations on 25 rabbits suffering from ERE and obtained histological samples from different segments of the intestines of 10 animals for comparison with data from healthy rabbits. Furthermore, I will introduce the microbiological and bioinformatic methods that can help identify the bacteria playing a role in the etiology of ERE, through appropriate processing of metagenomic data representing the microbiome.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezető	5
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1. A hazai nyúltenyésztés és az ágazat jellemzői	7
2.2. Az epizootikus nyúl enteropátia jellemzése	8
2.3. <i>Clostridium cuniculi</i> az ERE lehetséges kiváltója.....	16
2.4. Az ERE és a takarmány rosttartalma közötti kapcsolat.....	18
2.5. A metagenom elemzés alapjai és lehetséges felhasználása	20
3. Célkitűzések.....	22
4. Anyag és módszerek.....	23
4.1. Az ERE diagnózisának felállítása.....	23
4.2. Szövetteni mintavétel ERE-ben szenvedő és egészséges nyulakból	24
4.3. Metszetkészítés és szkennelés	25
4.4. A metszetek mely bélszakaszból származtak	25
4.5. A metszeteken végzett mérések és azok kiértékelése.....	26
4.6. DNS-izolálás beteg állatokból	27
4.7. 16S rRNS amplikonszekvenálás.....	27
4.8. A mikrobiom változásának vizsgálata qiime 2 segítségével	29
4.8.1. A nyers adatok előkészítése az elemzéshez	29
4.8.2. A taxonok azonosítása.....	31
5. Eredmények és megvitatásuk.....	33
5.1. Kórbonctani vizsgálatok	33
5.2. Bélbolyhok vizsgálata eltérő tápfelhasználás esetén	35
5.3. Bélbolyhok vizsgálata az ERE kórkép esetén	38
5.4. Metagenom DNS-izolálás.....	42
6. Összefoglalás.....	43
Irodalomjegyzék.....	44
Köszönetnyilvánítás	51

Rövidítések jegyzéke

ERE (Epizootic Rabbit Enteropathy): epizootikus nyúl enteropátia

NGS (New Generation Sequencing): újgenerációs szekvenálás

OTU (Operational Taxonomical Unit): operatív rendszertani egység

ORF (Open Reading Frames): nyitott leolvasási keret

NDF (Neutral Detergent Fiber): neutrális detergens rost

MLST (Multi-Locus Sequence Typing): multilókuszos szekvenciatipizálás

wgMLST (whole genom MLST): teljes genom multilókuszos szekvenciatipizálás

ITS (Internal Transcribed Spacer): belső transzkripció tér

ASV (Amplicon Sequence Variant): amplikon szekvencia-variáns

1. Bevezető

A világ nyúltenyésztésének legfőbb színhelyét egészen a hatvanas évekig a vidéki családi gazdaságok és kistermelők jelentették, azonban napjainkban az ágazatban átvette a vezető szerepet az intenzív nagyüzemi tartási technológia. [1] Az így megnövekedett termelés ellenére a nyúlhús-fogyasztás az Európai Unión belül a többi húshoz képest továbbra is jelentősen elmarad, mindössze 0,5 kg-ra tehető egy fő éves átlagfogyasztása. Továbbá a termelés csökkenése is jellemző volt az elmúlt években a legjelentősebb európai nyúlhústermelő országokban. [2] Ebben lényeges szerepe van az elmúlt években kialakult eltérő szemléletnek és életvitelnek, valamint a gazdasági helyzet és a nyúltartás körülményeit érintő változásoknak is. [3] Egyes országokban tovább árnyalja az ágazat helyzetét, hogy a nyúl- és a baromfihús ára nagyon közel áll egymáshoz, mivel azonban a háziállatként tartott nyulaknak a száma növekvő tendenciát mutat, illetve a tudatosabb fogyasztói szemlélet is egyre inkább jelen van, a kedvező árak ellenére is a nyúlhús-fogyasztás messze elmarad a baromfítétől. Ezen változások hatására a legjelentősebb nyúlhústermelő ország szerepét mára Kína vette át: itt a fogyasztás és a termelés továbbra is jelentős növekedést mutat az európai viszonyokhoz képest. [2] A termelés intenzitásának és mértékének megváltozása; a nagyüzemi körülmények, a különböző járványos betegségek rendkívül nagy kockázatot jelentenek. A legnagyobb gazdasági kártételt hozó fertőző kórokozónak a megjelenése szoros összefüggésben áll a tartástechnológiával, a higiéniai viszonyokkal és a menedzsmenttel. Az ezekből származó veszteségek csökkentése elengedhetlenné teszi az ágazaton belül a nagymértékű antibiotikum-felhasználást. A házinyúlállományokon belül jelentkező járványos betegségek a fiatal állatokat érintik a leggyakrabban. Ebben szerepe van a még fejletlen immunrendszerüknek és a választáskori stressznek is. Egy elkerülhetetlen és rendkívül komoly hajlamosító tényező maga az időjárás: az őszi és téli időszakban fordulnak elő a leggyakrabban és a legnagyobb számban a nagyüzemi nyúltartást leginkább terhelő betegségek. Az olyan gyakran előforduló és súlyos problémát okozó kórokozók, mint a *Staphylococcus aureus*, amely többek között pododermatitist vagy mastitist okozhat, valamint a *Pasteurella multocida* és Bordetella fajok által okozott pneumonia komoly veszteségeket képesek okozni. Azonban ezek közös jellemzője, hogy a háttérükben álló egzakt kórokozók és az általuk okozott kórlefolyás is ismert, ez pedig lehetővé teszi a célzott védekezést és kezelés alkalmazását velük szemben. [4] A 90-es évek vége óta tömeges elhullásokat okozó epizootikus nyúl enteropátia (ERE) ezzel szemben egy sokkal kevésbé ismert betegségként jelent komoly akadályt a modern nyúlhús-előállításban. Az ERE kórfejlődésének megértésében elért eredmények ellenére a kialakulás pontos okára továbbra sem sikerült fényt deríteni. Mivel egy rendkívül komoly gazdasági kártétellel járó betegségről

van szó, kordában tartásának és kezelésének kérdése egy komoly és mielőbbi megoldást igénylő feladatot jelent mind a hazai, mind pedig a nemzetközi nyúltenyésztésben. [5] Ebben változást hozhat a bioinformatika gyors ütemben zajló fejlődése, valamint az újgenerációs szekvenálás (NGS) és a metogenomikai módszerek egyre szélesebb körben való alkalmazása. [6]

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A hazai nyúltenyésztés és az ágazat jellemzői

A magyarországi nyúltenyésztés esetén főként nagyüzemi kereteken belül, és elsődlegesen külföldi export céljából zajló termelés történik. Az így megtermelt nyúlhús 95%-a külföldön kerül értékesítésre. Legfontosabb felvásárlónak a nyugat-európai országok számítanak, közülük is a legjelentősebb Svájc, de exportálunk Németországba, Olaszországba, Franciaországba és a Benelux államokba is. [2] Az exportpiac bővítése céljából többéves tárgyalásokat követően 2021-ben a Kanadába való export is megindult. [7] A hazai nyúltenyésztés még a 60-as évek elején kezdődött. Egészen a 80-as évekig a felvásárolt nyúlhús 90%-át kisüzemekben állították elő, de ezek szerepe ma már elenyésző, mivel a helyüket nagyüzemek vették át, ahol ma már a termelés több mint 95%-a zajlik. [8] Az európai szinten is jelentős termelés ellenére a hazai nyúlfogyasztás rendkívül alacsony: az egy főre jutó évi fogyasztás átlagosan 20 dekagramm, ami messze elmarad a többi húsféléttől. [2, 9] A nyúlhús az egészséges táplálkozás szempontjából rendkívül kedvező tulajdonságokkal bír: magas a fehérjetartalma, míg a zsír- és koleszterintartalma alacsony. A nagy mennyiségű fehérjetartalom mellett annak aminosav-összetétele is ideális élettani szempontból. Azonban a kedvező tápanyag-összetétel és a nyúlfogyasztást népszerűsítő kampányok ellenére az elmúlt években sem történt jelentős növekedés a hazai piacon a nyúlfogyasztás terén. Ez minden bizonnyal egy többtényezős folyamat eredménye, amire egyrészt hatással van a kedvezőtlen gazdasági helyzetből adódó fokozott vásárlói árérzékenység és a megváltozott fogyasztói szemléletmód is. [2, 8, 10]

Az itthon zajló nyúltenyésztést számos egyéb kihívás is nehezíti, ilyen a tudatosabb táplálkozás és a kedvtelésből való nyúltartás népszerűségének növekedése is. A szigorodó nagyüzemi nyúltartásra vonatkozó előírások miatt a gazdasági haszonállatok jóllétének biztosítása is egyre nagyobb szerepet kap. Az ezzel járó komoly plusz költségeket csak a nyugati országokban való magasabb értékesítési ár tudja kompenzálni. [11] A hagyományos ketreces tartással szemben a környezet gazdagításával, valamint a nagyobb alapterület biztosításával az új, fejlesztett ketreceknek az a céljuk, hogy az állatok etológiai szükségleteit jobban kielégítsék, és ezzel a változó vásárlói szemléletnek is inkább megfelelő körülményeket biztosítsanak az állatok számára. A technológia ezenfelül segíthet a teljes ágazat fejlődésében és hosszú távú fenntarthatóságának biztosításában. A hagyományos technológiákkal összevetve, a takarmányozás és a gyógyszerelés költségei is csökkentek az alkalmazásukkor, azonban a modern ketrecek velejárója a szaporodási költségek emelkedése, illetve a beszerzési árak is

lényegesen magasabb az elődjeiknél. Ezen okokból kifolyólag gazdasági előnnyel nem jár a használatuk, viszont a termelés fenntarthatósága szempontjából előnyökkel járhat az alkalmazásuk. [12, 3]

A nyúltenyésztés során a kiadások legjelentősebb részét a takarmányozás és a gyógyszerelés költsége jelenti, az utóbbinak mind a beltartalmi értéke, mind pedig a beszerzési ára kritikus pontja a termelésnek. A gyógyszerekkel járó jelentős plusz költségek mellett nagyon fontos kihívást jelent az antibiotikum-rezisztenciának egyre szélesebb körben való terjedése is. [9] Ennek nagy jelentősége van a nyúltenyésztésben, mivel egy nagy mennyiségű antibiotikumot felhasználó ágazatról van szó. Az antibiotikum-rezisztencia nemcsak állategészségügyi, hanem közegészségügyi szempontból is egy olyan probléma, amelynek a megfékezését csak azok felelős felhasználásával és lehetséges alternatív terápiás és megelőzési módszerek alkalmazásával lehet elérni. [13] Ráadásul mivel a gazdaságos termelés fenntartása végett a tenyészállomány 120%-a kerül selejtezésre átlagosan egy évben, folyamatos járványtani veszélyt jelenthetnek a gazdaságba érkező új tenyészállatok. Sok esetben ezeket a termelők maguk állítják elő, viszont a genetikai előrehaladás fenntartása végett sokszor elkerülhetetlen kockázatot jelentenek az ilyen új állományokból érkező állatok. [6]

2.2. Az epizootikus nyúl enteropátia jellemzése

Az ERE egy elsősorban hizónyúlállományokat érintő, nagy gazdasági kártételt okozó komplex oktanú, rendkívül ragályos, ismeretlen eredetű betegség. A ma ismert kórkép első részletes leírása 1996-ban Nyugat-Franciaországban történt, ahol hirtelen és kevés idő alatt nagyszámú elhullás történt, majd rövidesen Európa számos másik országában, köztük hazánkban is megjelent. Ma már nemzetközi problémává nőtte ki magát: mind a külföldi, mind pedig a hazai nyúltenyésztésben komoly veszteségeket okoz. [5] A kilencvenes éves végén és a kétezres évek elején 30–80%-os mortalitás jellemezte, közel 100%-os morbiditással. [14] A betegség az állományban horizontálisan képes terjedni, egyik állatról a másikra bélsár útján, vagy pedig az állatok normál érintkezésekor. A gyors terjedésnek a feltételei a nagyüzemi körülmények között tökéletesen megvalósulnak, az állatok nagy sűrűsége és a ketrecek szoros elrendezése miatt. [15] Nagy valószínűséggel a kezdeti kitörések óta a javuló tartáskörülmények, a szaporodás-menedzsment, a higiénia és a nyulak élettani igényeinek jobban megfelelő takarmányok segítettek az ERE által okozott mortalitás csökkentésében, de gazdasági jelentősége ennek ellenére továbbra sem változott. [16] Itt is felmerül a kérdés, hogy lehetséges-e olyan, genetikailag rezisztens vonalak létrehozása, amelyek ellenállóbbak a betegséggel szemben.

Mivel egy multifaktoriális betegségről van szó, számos különböző tényezőt és faktort kell figyelembe venni, ami tovább nehezíti ezt a feladatot. A különböző emésztőszervi kórképek jelentősége miatt viszont ez egy olyan terület, ahol a genetikai előrehaladásra nagy szükség van: a kezdeti eredmények kedvezőnek bizonyultak, viszont további kutatások szükségesek még a hosszú távú előrelépéshez ehhez a téren. [17]

A kezelés jelenleg antibiotikumokkal lehetséges: a metafilaktikus kezelés segítségével jelentősen csökkenthető az elhullások száma, és a kitörés hosszának időtartama is redukálható. Az antibiotikumok hatására több klinikai tünet megjelenése is csökken, mint például a felfúvódás és a hasmenés, továbbá a felpuffadt állatok is nagyobb valószínűséggel épülnek fel. Az antibiotikum-kezelés ezenkívül a napi testtömeg-gyarapodásra is pozitívan hat a kitörést követő kritikus szakaszban. [16, 18] A gyógykezelés időpontjának megválasztása fontos szempont. Az ERE kialakulása után annak mielőbbi alkalmazása segíthet mind a morbiditás, mind pedig a mortalitás csökkentésében. [19] Jelenleg a megfelelő és gazdaságos termelés elképzelhetetlen a különböző antibiotikumok felhasználása nélkül, ugyanakkor ezek felhasználásának a csökkentése az antibiotikum-rezisztencia kialakulásának veszélye miatt fontos feladatot jelent. Kedvező hatásuk mellett azonban az esetleges mellékhatásairól sem szabad megfeledkezni. Növényevőkről lévén szó a nyulaknál a rostemésztésnek rendkívül fontos szerepe van, amihez elengedhetetlen a mikrobiom egyensúlyának megőrzése. Az antibiotikum-kezelés nemcsak a patogén mikroorganizmusokra, de a vakbél normál flórájára is hatással van, ezáltal megváltoztatva az ott zajló fermentáció során képződő végtermékek arányát. Diszbiózis alakulhat ki, ami az elszaporodó Clostridiumok és E. Coli hatására enterotoxaemia, colitis vagy hasmenés kialakulását okozhatja. [20, 21] Annak érdekében, hogy az ERE során felhasznált antibiotikumok mennyiségét csökkenteni tudjuk, elengedhetetlen, hogy kialakulásának pontos eredetét megismerjük.

Az ERE megállapítása a betegség kórokozójának a tenyésztése, vagy egyéb diagnosztikai módszerek segítségével történő kimutatása annak ismeretlen háttere miatt nem lehetséges. A diagnózis felállítását nehezíti, hogy mellette különböző másodlagos fertőzések is gyakran előfordulnak, amelyek komplikálják a tényleges kórokozónak vagy kórokozónak az azonosítását. Az eddigi kutatások során a közismert nyúl patogén ágensek és az ERE között egyértelmű összefüggést egyelőre nem találtak. [5, 14, 22] Leggyakrabban a választás után, többnyire 6-8 hetes hízó nyulakban jelentkezik, ritkább esetekben fiatalabb, még szopós vagy a választáskor előtti állatokban is megjelenhet. Alkalomadtán fordul csak elő idősebb egyedekben, valamint akár a házikedvencként tartott állatokban is kialakulhat, hajlamosító

tényezők fennállása esetén. [14, 23] Rendkívül magas morbiditással és változó mértékű, de gyakran kifejezetten magas mortalitással jár. A betegséget túlélő állatok lassan tudnak csak felépülni belőle, a napi testtömeg-gyarapodás drasztikus csökkenése miatt komoly gazdasági veszteséget jelent, mivel ez a vágósúly szignifikáns csökkenését vonja maga után. Tipikus klinikai tünetei közé tartozik az étvágy és a vízfogyasztás hirtelen és tartós csökkenése. Gyulladás kialakulása egyáltalán nem jellemző, és láz kialakulása sem szokott előfordulni. [5, 14, 24] Az esetek jelentős részében a beteg nyulak hasát áttapintva a vakbelet kitöltő kemény, pangó béltartalom érezhető, ennél is gyakoribb a has nagymértékben való felpuffadása és a hallgatózás során hallható bélkorgás. Hasmenés jelentkezésekor az többnyire kis mennyiségű és vízszerű. Bélsár útján a ketrecben lévő társaikat és a mellettük lévő ketrecekben lévő állatokat is könnyen fertőzhetik, így a nagyüzemi termelés miatti magas állatsűrűség következtében az állományon belül a betegség gyors terjedése tud megvalósulni. A takarmányfelvétel csökkenése miatt az állatok kondíciója erősen romlik, viselkedésük többnyire apatikus, letargikus. Abból adódóan, hogy a tapasztalt tünetek más betegségek során is ugyanúgy előfordulhatnak, a pontos diagnózis felállítása sok esetben nehéz, és leginkább alacsony virulenciájú törzsek esetén jelent komoly nehézséget. [5, 14] Az állatokat az elhullást követően sok esetben már csak a makroszkópos elváltozások alapján lehet diagnosztizálni, mivel telepi körülmények között a részletes kórelőzményét nem lehet tudni a nagyszámú állatállomány miatt. Az egyik leggyakrabban előforduló elváltozás a gyomornak és a vékonybélnek gázos és folyadékos felfúvódása, ezeket a béltartalom és a gáz feszülésig kitöltheti. A vakbélben gyakori kórbonctani lelet, hogy azt teljes terjedelmében kemény pangó tartalom tölti ki, ami akár külső vizsgálat során is tapintható. Ilyen esetekben a vastagbélben egyáltalán nem, vagy csak kevés bélsár található, mivel ez a pangó tartalom meggátolja a béltartalomnak a caudális irányba történő továbbítását. Az esetben, amikor a vakbelet nem az imént említett tartalom zárja el, akkor ezt a vékonybélhez hasonlóan nagy mennyiségű gáz és folyadék töltheti ki, feszülésig. A vastagbél teljes hosszában sokszor tapasztalható átlátszó és nagy mennyiségű nyálkának a jelenléte. Ez a nyálka a beteg állattal egy ketrecben lévő többi nyulat és a ketrecet is beszennyezheti, és egy laikus könnyen összetévesztheti a közönséges hasmenéssel. [5, 14] A kórbonctani vizsgálat során megtekintve a többi szervet is, teljesen negatív a máj, vese, lép, szív és tüdő. Az ERE-ben elpusztult és az abban szenvedő nyulaknál szintén, a szabad szemmel is megfigyelhető kórbonctani elváltozások az emésztőszervrendszerre korlátozódnak. [14]

A tapasztalható szövettani elváltozások is kifejezetten enyhék, bizonyos fertőzött állatok esetében pedig ezek egyáltalán nem is figyelhetők meg. A tapasztalt elváltozások sem tekinthetők patognomisztikusnak; a mesterségesen fertőzött kísérleti állatoknál a vékonybél lamina propriájának és submucosájának enyhe gyulladása és a polimorfonukleáris sejtes infiltrációja a legjellemzőbb. A jejunumnál a gyulladás hatására értágulat és bővérűség alakulhat ki. Az egyik legszembetűnőbb mikroszkópos elváltozás a bélbolyhokat érintő atrófia és azok fúziója. A hámréteg egysége is meg bomlik és károsodik. Az enterocyták és a kripták esetén apoptózis tapasztalható. Megfigyelték a bélfal vastagságának és a vastagbél kriptáinak méretbeli csökkenését is az egészséges állatokhoz képest. A vastagbél kriptáinak méretbeli változása összefüggésben állhat a vakbél elzáródásából következő tápanyaghiánnyal, de a különböző patogén baktériumok megjelenése, úgymint a Clostridiaceae család tagjai is felelősek lehetnek ezért. Feltűnő változás még a goblet sejtek hiperpláziája, ez pedig kapcsolatban állhat a fokozott nyálkatermeléssel. [5, 14, 23, 25, 26] Közvetlenül a betegséghez köthető szövettani elváltozások csak a belekben tapasztalhatók, nem figyelhető meg a normálistól való eltérés a májban, tüdőben, gyomorban, vakbélben és vastagbélben sem. [22] A másodlagos bakteriális fertőzések viszont okozhatnak mikroszkóposan és makroszkóposan is észlelhető elváltozásokat, ezek azonban a betegséggel összefüggő motilitás leállása miatt bekövetkező bél mikrobiomban megtalálható opportunistá patogén mikroorganizmusok abundanciájának következményes növekedésével állhatnak kapcsolatban. [23, 22, 27] A jellemző makroszkópos elváltozások szintén a béltartalom továbbításának leállása miatt következhetnek be. Ez a leállás diszbiózis kialakulását okozhatja, vagyis nem a betegség kialakulásának közvetlen oka, hanem egy annak hatására kialakuló változásról beszélhetünk. [28]

Az ERE kialakulásának bakteriális hátterét az évek során több tanulmány is megerősítette, de kétségtelenül ennek legkézenfekvőbb bizonyítéka, hogy antibiotikum-kezelés segítségével a kialakulása sikeresen csökkenthető, vagy akár meg is akadályozható. Egészséges, antibiotikummal kezelt és semmilyen kezelésben nem részesülő, szintén egészséges nyulaknak, valamint fertőzött, nem kezelt állatoknak a vakbél tartalmából végzett 16S rRNS vizsgálata is azt igazolja, hogy az előbbi két csoport esetén a mikrobiomot alkotó baktériumcsaládok rendkívül hasonlóak, és diszbiózis nem alakult ki egy példány esetén sem. Ezzel szemben a fertőzött állatok adatai teljesen elkülönülnek a másik kettőtől, diszbiózis alakul ki, aminek hatására a taxonómiai diverzitás és fajgazdagság is jelentősen megváltozik: számottevő módon csökken. Kiemelendő azonban, hogy az állomány a kísérletet megelőzően preventív kezelésben

részesült, így lehetséges, hogy ez hozzájárulhatott ahhoz, hogy az antibiotikumot kapó csoport és a nem kezelt, de egészséges csoport között rendkívül kis eltérés volt csak megfigyelhető. Az ERE-re jellemző a nagy mennyiségű nyálka szekréciója, főleg a vakbélben és a vastagbélben. Az itt termelt nyálkának a bélsár továbbítása mellett a nem specifikus védekezésben is fontos szerepe van normál bélműködés esetén. A nyálka szekréciójáért és a különböző gyulladáskeltő citokinek termeléséért felelős gének fokozott expressziója jellemző fertőzött állatoknál. Ezeknek a gyulladáskeltő citokineknek a felszabadulása hatással van a nyálkatermelésért felelős goblet sejtekre, és fokozza azok nyálkakiválasztását. Az így időben elkülönülő gyulladásnak a kialakulása és az azt követő fokozott nyálkakiválasztás a betegség kórfejlődésének két különböző szakaszát jelentheti. [28] A fertőző kórokozó jelenlétét igazolta az is, hogy sikerült több ERE kitörés során érintett üzemnek a nyulaiból nyert vakbél-tartalom-mintákból előállított oltóanyag segítségével a betegséget reprodukálni. Ezt sikeresen elvégezték különböző beadási módokkal és eltérő dózissal is. A tapasztalható tünetek és a boncolás során megfigyelt elváltozások megegyeztek az eddig leírtakkal. Egy érdekes megfigyelés: a másodlagos fertőzések kórlefolyásban betöltött szerepére enged következtetni, hogy az SPF állatokon végrehajtott kísérletek során az elhullások száma jelentősen elmaradt a telepi körülmények között megfigyeltektől, ezzel is bizonyítva azt, hogy a diszbiózis kialakulása csak mellékhatása a tényleges kórokozónak. [14, 22] Mesterségesen fertőzött állatoknál a kórokozóval szembeni immunreakció bizonyítéka lehet, hogy ugyanazon oltóanyaggal ismételten fertőzve az állatokat, nem alakult ki újra a betegség. [15] A bakteriális eredet mellett felmerült többek között, hogy a kórkép kialakulásának hátterében takarmányozási ok, vírus okozta fertőzés vagy valamilyen parazitózis állhat mint annak fő okozója. Ezeket a felvetéseket azóta sikerült kizárni, mivel a betegség olyan oltóanyag felhasználásával is replikálható volt, amely nem tartalmazott vegetatív stádiumú parazitákat és azok oocisztáit sem. Ezenkívül *Eimeria* oocisztákat tartalmazó oltóanyag esetén is az ERE mellett szintén csak szubklinikai coccidioózis volt megfigyelhető. [14, 22] Az ERE kialakulásában egyértelműen jelentős szerepe van a takarmányozásnak. Az alacsony rost-, a magas szénhidrát- és fehérjetartalom kétséget kizáróan egy fontos hajlamosító tényező, azonban nem tekinthető az egyedüli kiváltójának, viszont mint passzív vektor szerepe lehet a terjedésében. A magas szénhidrát-tartalom nemcsak az ERE kialakulásnak kedvez, de olyan gyakori kórokozó baktérium számára is ideális körülményeket teremt, mint a *Clostridium*ok és *Escherichia*kiák. A megfelelő takarmány a gyógykezelésben és a megelőzésben is fontos lehet, annak rost- és energiatartalmát az állatok élettani igényei szerint módosítva kedvező hatású. [5, 23, 27, 15] A kísérleti céllal már korábbi kutatásokban használt, parazitológiai, virológiai és bakteriális

szempontból is vizsgált *Clostridium spiriforme*-t leszámítva, specifikus nyúl patogén baktériumot nem tartalmazó TEC3 oltóanyagban a benne található mikroorganizmusok, toxinok és fehérjék sűrűség, méret alapján történő frakcionálásával nyert mintákkal végzett állatoltási kísérlettel sikerült kizárni, hogy a kialakulásának hátterében valamilyen vírus vagy ismert toxin állna. [29]

Egyszerű baktérium tenyésztése során számos információt veszítünk a különböző nem tenyészhető baktériumtörzsek és fajok kiesése miatt. Ez az információ viszont kritikus fontosságú lehet az ERE kóroktanában és hátterében álló mikroorganizmusok megismerésében, annak érdekében, hogy a mikrobiom teljes közösségét megismerjük a betegség során. Az újgenerációs szekvenálás segítségével történő metagenom vizsgálata az, ami ebben előrelépést hozhat. 16S rRNS vizsgálatokkal az egészséges és az ERE-ben szenvedő állatok emésztőtraktusának mikrobiomját összehasonlítva, a betegség megjelenését követően kialakuló diszbiózis hatására jól látható módon megváltozik a gyomor, a vékonybél és a vakbél bakteriális összetétele. Jelentős mértékben csökkent az emésztőtraktus előbb említett három szakaszában a taxonómiai diverzitás és a fajgazdagság is a beteg állatoknál. A nyulak táplálkozásának élettanából adódóan a legfajgazdagabb és diverzebb bélszakaszuk a vakbél, az itt található flórának a megváltozása nemcsak a másodlagos kórokozók megjelenése miatt káros, de az itt lévő anaerob baktériumok által végzett rostemésztés miatt a normális energiaháztartás fenntartásában is kulcsszerepe van. A nyulakra jellemző cecotrófia hiányában az állatok a szükséges fehérjékhez és vitaminokhoz sem képesek megfelelően hozzájutni. [27, 30] Számos baktériumot sikerült már tenyésztéssel kimutatni a természetesen és a mesterségesen fertőzött állatokból egyaránt, de ezen baktériumokat megvizsgálva csak olyan opportunistáknak sikerült azonosítani, amelyek nem lehetnek az ERE kiváltói.

A Jin és munkatársai által végzett 16S rRNS vizsgálatok a mikrobiomban bekövetkező változásoknak és a potenciálisan az ERE kialakulásában részt vevő törzseknek a megismerését célozta. A vakbelet, vékonybelet és gyomrot a betegség során kolonizáló taxonok megismeréséhez kulcs lehet az itt található mikroorganizmusok metagenomjának a megismerése. Más kísérletekhez hasonlóan a betegség során a különböző bélszakaszok és a gyomor flórájának csökkenő diverzitása mellett az opportunistáknak relatív abundanciájának növekedése volt tapasztalható. Az *E. Coli* abundanciája jelentősen megnőtt, igaz, hogy ez nagy valószínűséggel a bél mikrobiomjának az egyensúlyában bekövetkező változás eredménye, hiszen az egészséges állatokban szintén megtalálható baktériumról van szó, és a betegség közvetlen kialakulásában ismert szerepet nem tölt be, csak mint másodlagos

kórokozó súlyosítja az ERE lefolyását. [22, 31] Különböző *Clostridium* fajok – mint a *Clostridium perfringens* és spiriforme – gyakori előfordulását már több alkalommal leírták, enterotoxaemiát okozó baktériumok ellenére nem tekinthetők a betegség kiváltóinak. [22, 32] A *Clostridium perfringens* az ERE-ben szenvedő nyulak vakbél tartalmában 80%-os gyakorisággal fordult elő. A tipikus, makroszkóposan is megfigyelhető elváltozások és az általuk termelt alfa-toxin közötti lehetséges összefüggés nem hanyagolható el. Nyulakban A és C toxintípusokat sikerült eddig azonosítani. [22] A *Bacteroides* és *Akkermansia* fajok abundanciájának növekedése szintén gyakori a fertőzött nyulaknál. Az *Akkermansia muciniphila* mint nyálkabontó baktérium az egészséges állatok vakbelének normál lakója, viszont az abundanciája feltűnő módon megnő az ERE-s nyulakban. Ez egyértelműen összefüggésben állhat a kialakulását követő fokozott nyálkaszekrécióval; opportunista patogénről lévén szó az ERE kialakulásában vagy annak lefolyásában betöltött szerepe nem kizárható. [33, 34, 35] A *Bacteroides* nemzetségre is jellemző, hogy a betegség során jelentősen elszaporodnak. Szerepük van az itt lévő egyensúly fenntartásában, hozzájárulva ezzel a megfelelő élettani működéshez, azonban számos opportunista patogén is előfordul a genuson belül. Ezeknek a betegségben betöltött szerepe nem ismert jelenleg, de relatív abundanciájuk változása azzal összefüggést mutat. Egészséges nyulak vakbelében a Firmicutes, Bacteroidetes, Verrucomicrobia és Proteobacteria törzsek fordultak elő a legnagyobb számban, közülük is a Firmicutes törzs abundanciája a legnagyobb mind az egészséges, mind pedig a beteg csoportban. Az ERE hatására nemcsak az imént említett baktériumtörzsek abundanciája változott meg, de az következményesen az itt keletkező illózsírsavak és egyéb metabolitok mennyisége és aránya is eltért az egészséges állatokétól. A teljes illózsírsav-tartalom csökkenésének hátterében a különböző növényi eredetű szénhidrátok bontására képes baktériumok számának hanyatlása állhat. Ezt alátámasztja az olyan taxonok abundanciájának a csökkenése is, amelyeknek az ebben betöltött szerepe ismert. A beteg állatok által termelt illózsírsavaknak – mint az ecetsav, a propionsav és a vajsav – koncentrációja jelentős mértékben csökkent, az ecetsavnak a moláris részaránya viszont pozitív irányban változott a többihez képest. A vajsavtermelésben bekövetkező változásnak negatív hatása lehet a betegség lefolyására, mivel szerepe van a vakbél hámjának energiaellátásában és a gyulladós folyamatok, valamint az immunrendszer szabályozásában is. Ezért hiányában a vakbél patogénekkal szembeni védelme sérülhet, ami a kialakuló diszbiózis tüneteit súlyosbíthatja. [27, 36]

Egy frissebb tanulmányban Puón-Peláez és mtsai. ERE-ben szenvedő állatokból és egészséges kontroll nyulakból származó vakbél tartalom 16S rRNS gén V3-V4 régiójának szekvenálását végezték el. Korábbi tanulmányokkal ellentétben a szekvenálást nem előzte meg a vizsgált minták PCR-rel történő amplifikálása. Ennek a lépésnek az elhagyását a felhasználásából származó taxonómiai ellentmondás indokolta. Az eltérő PCR-módszerek használata magyarázatot adhat a különböző tanulmányokban megfigyelt eltérő mikrobiom adatokra is. Több probléma is felmerül a PCR használatával kapcsolatban az ilyen jellegű minták feldolgozása esetén. A vizsgált minták számos ismeretlen fajt tartalmaznak, és nem tudjuk, hogy az amplifikálás során használt univerzális primerek mekkora hatékonysággal képesek kötődni ezekhez az ismeretlen DNS templátokhoz, így azt sem tudhatjuk, hogy mennyi információt veszítünk emiatt. A PCR használatával elkerülhetetlen, hogy bizonyos információ a közösségek abundanciájáról elveszzen, továbbá az amplifikálás során fellépő hibák előfordulása is természetes. A módszer hatékonyságát befolyásolhatja a nukleotidok összetétele és a DNS templátok másodlagos szerkezete is. [26, 37] Jelen esetben az adatok metaxonómia vizsgálata során megfigyelt változások sok szempontból összhangban voltak a korábbi tanulmányokban leírtakkal, de eltérések is megfigyelhetők voltak. Az új módszer a vakbél mikrobiomot kolonizáló fő baktériumtörzsekben nem mutatott eltérést: Firmicutes, Bacteroides és Verrucomicrobia törzsek fordultak elő a legnagyobb számban mind az egészséges, mind pedig a beteg nyulakban. A Firmicutes törzs relatív abundanciája az ERE hatására csökkent, és több, ebbe a rendbe tartozó baktériumcsaládnak a változása is korrelációt mutat annak megjelenésével. A megfigyelt változások a tápanyaghiánnyal is szoros kapcsolatban állhatnak. Ez kialakulhat mind a csökkenő táplálékfelvétel hatására, de a vakbél elzáródása is lehet a közvetlen okozója. Az olyan komplex szénhidrátok bontásában részt vevő baktériumcsaládokban bekövetkező változás, mint a Ruminococcaceae és Lachnospiraceae abundanciájának a csökkenése az itt keletkező illózsírsavak termelésére is közvetlen hatással van. Ahogy az már említésre került, ezek mennyisége csökken, miáltal a vakbélben zajló fermentáció útján biztosított tápanyag-ellátottság sérül, ami szintén hozzájárul a betegség hatására drasztikusan romló általános kondícióhoz. A Verrucomicrobia törzs szintén szoros összefüggést mutat az ERE-vel. Az ide tartozó *Akkermansia muciniphila* abundanciájának a növekedése és az ERE kialakulása közötti párhuzamot több tanulmány is alátámasztja. A goblet sejtek fokozott nyálkaszekréciója könnyen magyarázattal szolgálhat a megfigyelt változásra, de az sem kizárható, hogy más baktériumokkal való kölcsönhatás is szerepet játszik, ami a diszbiózis miatt hirtelen megváltozó baktérium-közösségek egymásra gyakorolt hatásainak eredménye is lehet. Igaz, ebben a tanulmányban olyan Clostridium fajt nem sikerült kimutatni,

ami a betegséggel összefüggésbe hozható lenne, de a nemzetség abundanciájának változása alapján egyértelmű kapcsolatot mutat a kórképpel. A Synergistetes törzs és az ERE kapcsolata ennél kevésbé egyértelmű. Nem minden esetben sikerült a jelenlétét kimutatni NGS segítségével, viszont, mivel a más állatfajokban lehetséges oportunista patogén és a genusba tartozó *Cloacibacillus porcorum* összefüggést mutat a betegséggel, ezért jelenlétük semmiképpen sem elhanyagolható. A *C. porcorum* egy aminosavakat és nyálkát fermentáló baktériumfaj, és annak ellenére, hogy Jin és munkatársai is sikeresen azonosították, egyelőre nem sikerült összefüggést találni közte és az ERE között. Abundanciája beteg állatok esetén nagyobb volt, mint az egészségeseknél, és lehet, hogy a fokozott nyálkaszekrécióban is szerepet tölt be. [27, 28, 26, 38]

2.3. *Clostridium cuniculi* az ERE lehetséges kiváltója

AZ ERE hátterében a legvalószínűbb, hogy a paraszimpatikus idegrendszerre ható és ezzel a gasztrointesztinális rendszer átmeneti bénulását okozó neurotoxint termelő ismeretlen baktériumfaj a felelős. Pontos kialakulásának hátterében viszont a multifaktoriális eredet a legvalószínűbb. Lehetséges, hogy a vakbél flórájában bekövetkező változások mind csak következményei a tényleges kórokozó által kiváltott motilitás leállításából következő diszbiózisnak. A betegség kóroktanának felderítését rendkívüli módon megnehezíti a diszbiózis miatt drasztikusan megváltozó mikrobiom folyamatosan és dinamikusan változó öszképe, mivel a leölést vagy elhullást követően nyert mintákból származó információ nem reprezentálja a betegség kialakulását megelőző, vagy pedig a kialakulás pillanatában lévő aktuális állapotot. Ahhoz, hogy megértsük az ERE kialakulásának hátterében álló okokat, olyan adatokra van szükségünk, amelyek lehetővé teszik a mikrobiomban bekövetkező változások megismerését a kialakulásától egészen az állatok következményes elhullásáig vagy leöléséig. Djukovic és mtsai. ezért egy longitudinális kísérlet segítségével elemezték a mikrobiomnak a betegséget megelőző, a kialakuláskori és az azt követő időszak során fellépő változásait. [39] Mivel a vakbél tartalomhoz csak leölés vagy műtét útján lehetséges hozzájutni, ezért annak közvetlen vizsgálata körülményesnek és alkalmatlannak bizonyult a jelen kutatás céljából. A nyúlfélék vakbelében zajló rostfermentáció során keletkező cektrofóviz viszont rendkívül megbízhatóan tudja reprezentálni a vakbél mikrobiomjának aktuális kompozícióját, ezért tökéletes alternatívának bizonyult. [40] Alátámasztja a választott módszer validitását, hogy az ERE-ben szenvedő nyulakból vett vakbél tartalom beadásával a betegség reprodukálható. [22] A cektrofóviz felvételét egy gallér segítségével megakadályozták, az így nyert mintákból megtörtént a 16S rRNS gén V3-V4 régióinak az amplifikálása és szekvenálása. Ezt követően az így kapott adatok

metagenomikai módszerekkel történő kiértékelésére került sor. A választást követően az ERE kialakulásának időpontját az állatok táplálékfogyasztásának több mint 50%-os csökkenésével azonosították az előző napihoz képest. A tápanyagfelvétel csökkenését számos tanulmányban leírták az ERE egyik első tüneteként; könnyű nyomon követhetősége miatt a betegség gyanújának egyszerű diagnosztizálására kifejezetten alkalmas kísérleti körülmények között. A tünetek megjelenését követően a korábbi tanulmányokkal megegyezően, a Shannon indexét összehasonlítva a beteg és egészséges állatoknál annak csökkenése jelezte az ERE-s állatok mikrobiomjában bekövetkező diverzitás-csökkenést és a kialakult diszbiózist, ami az egészséges nyulaktól szignifikánsan eltérő flóra kialakulását okozta. [30] Az olyan korábban már említett nemzetségek, amelyek az ERE során nagy számban jelentek meg – mint a *Clostridiumok*, *Akkermansia* és *Bacteroides* – abundanciájában bekövetkező változás itt is előfordult. [27] Ezen folyamat megismeréséhez a longitudinális vizsgálat tette lehetővé, hogy a betegség kialakulását megelőző időszak adatait összevessék az iniciáció időpontjában vett mintákkal. Azon nemzetségek tagjai, amelyek változásai a diszbiózis során megfigyelhetők, nem mutattak eltérést az egészséges és a fertőzött állatok között ebben az időszakban, továbbá nem volt különbség a szekvenciáknak a 97%-os hasonlósága alapján létrehozott úgynevezett OTU-kban (Operational Taxonomic Units) és a sikeresen azonosított baktériumfajokban sem. Ez alátámasztja azt a már említett felvetést, hogy a diszbiózis csak a kialakulását követően alakul ki. A mikrobiom egészét tekintve nem volt megfigyelhető változás az ERE kialakulásának napja és az egészséges kontroll állatok között. Az egyetlen változás, ami megfigyelhető volt a kialakulás napján, illetve közvetlenül azt megelőzően, egy, a *Clostridium* nemzetségbe tartozó, addig ismeretlen OTU-nak az abundanciájában bekövetkező változás, amit egészséges nyulakból egyáltalán nem sikerült kimutatni. Az ERE-ben való pontosan betöltött szerepének a megismerése végett izolálták és a genomját szekvenálták. Az eddig ismeretlen fajt a szerzők *Cl. cuniculinak* nevezték el. A *Cl. perfringens*szel és botulinummal való szoros filogenetikai rokonság, valamint az ORF-ok vizsgálata során azonosított lehetséges toxinok is felvetik a lehetőségét, hogy szerepe van az ERE kialakulásában. Ezek a toxinok magyarázatot adhatnak több, a betegség során megfigyelhető makroszkópos és szövettani elváltozás kialakulásának az okára is, ezért ezek a *Cl. cuniculi* által kódolt fehérjék és azoknak a betegségben betöltött szerepe számos kérdésre választ adhat. [39] Más tanulmányban a *Cl. cuniculit* még nem sikerült azonosítani, ebben változást hozhat a metagenom elemzés egyre szélesebb körben való alkalmazása.

2.4. Az ERE és a takarmány rosttartalma közötti kapcsolat

Mind az ERE kialakulásában, mind pedig a kezelésében a takarmány rosttartalmának lényeges szerepe van. A nyúltenyésztés egyik legköltségesebb pontja az állatok takarmányozása, ezért a különböző rostfrakciók változásának és a betegség közötti kapcsolatnak a megértésével segíthetjük az általa okozott veszteségek csökkentését. [9] A nem megfelelő rostellátottság szerepe ismert a betegség kialakulásában; egy fontos hajlamosító tényező lehet az ERE során. Alacsony rosttartalmú takarmánnyal a betegséget kísérleti körülmények között elő is tudták idézni. [27] Annak megismerése, hogy a különböző rostfrakciók egymáshoz, valamint a többi tápanyaghoz viszonyított arányának a változása miként hat az ERE lefolyására vagy az abból való felépülésre, segíthet az antibiotikum-felhasználás, valamint a betegséggel járó veszteségek csökkentésében. [19]

Összevetve az olyan ERE-s nyulak adatait, amelyek két különböző emészthető rost- és keményítőtartalmú takarmányt kaptak a betegség alatt, egyértelműen szemlélteti a megfelelő takarmány megválasztásának a jelentőségét a kórlefolyás szempontjából. A magas rosttartalmú tápban az emészthető rost és keményítő aránya 2.5:1 volt. Ezeknek az állatoknak a növekedési erélye és a vágáskori súlya is nagyobb volt, mint a kettőt azonos, 1:1 arányban tartalmazó tápot fogyasztó nyulak esetén. A morbiditás is jelentősen csökkent a magasabb rostarány mellett. A legnagyobb változás azonban az elhullások számában volt tapasztalható: a mortalitás közel a harmadára csökkent. Ezt a korai antibiotikum-kezeléssel kiegészítve még kedvezőbb eredmények születtek. [19]

A betegséget átvészelő egyedekre jellemző, hogy a vágósúlyuk elmarad az egészséges fajtársaiktól. Annak megállapítására, hogy magasabb neutrális detergens rost (NDF) etetésével javítható-e a vágáskori testsúly, ERE-t átvészelő nyulakat etettek a biológiai igényeit kielégítő (32%) és egy potenciálisan előnyös hatású, magasabb NDF-tartalmú (36%) takarmánnyal. Ezenkívül megvizsgálták a két eltérő takarmány lehetséges hatásait a mikrobiomot alkotó mikroorganizmusokra és az ott zajló anyagcsere során keletkező végtermékekre. Az ERE által a nyulak emésztőrendszerének mikrobiom-közösségében okozott változását számos tanulmányban leírták, valamint ismert az itt zajló mikrobiális fermentáció során keletkező anyagcsere-termékek arányainak és mennyiségének megváltozása is a betegség hatására. Ez felvetette annak a hipotézisnek a lehetőségét, hogy a takarmány NDF-tartalmának megváltoztatásával befolyásolható-e a mikroorganizmusok közössége és az anyagcsere-termékek termelése oly módon, hogy az ERE káros hatásait moderálni lehessen. A mikrobiom

változásainak megismeréséhez bélsár- és cekotróf minták újgenerációs szekvenálással történő vizsgálatára került sor. A beteg állatok mellett a két különböző NDF-tartalmú takarmánnyal etetett egészséges kontroll állat szolgált viszonyítási alapnak a kísérlet során. Más tanulmányokhoz hasonlóan a beteg állatok súlya és tápanyagfelvétele is alacsonyabb volt, mint az egészséges fajtársaiké, ezzel szemben az imént említett két csoport mikrobiomja több eltérést is mutatott. A cekotróf minták adatait megvizsgálva a Simpson index, ami figyelembe veszi a különböző fajok számát és azok relatív abundanciáját, nem mutatott jelentős különbséget a beteg és az egészséges csoportok között. Ez arra enged következtetni, hogy a népesebb fajok számában jelentős változás nem történt. Ezzel szemben a Shannon index, ami nagyobb hangsúlyt helyez a fajgazdagságra, magasabb értéket mutatott a korábban beteg állatok mintáiban, az alacsony rosttartalmú takarmányon tartott állatok esetén pedig az értéke lényegesen nagyobbak bizonyult a kontroll állatokéhoz képest. A magyarázat a mikrobák közösségének faji megoszlásában bekövetkező változásban keresendő; miközben egy rendkívül diverz flóra maradt meg a betegség átvészélése után is, az hosszú távon megváltozik annak hatására. A Chao 1 index a ritka OTU-kra érzékeny, fajgazdagságot kifejező módszer. A felépült és az alacsony rosttartalmú diétán tartott nyulak Chao 1 indexe magasabb értéket mutatott, mint a kontroll nyulaké, a másik diétán lévő betegcsoportnál is magasabb volt ez az érték, de elmaradt az alacsony rosttartalmú diétán lévő csoportétól. A megfigyelések alapján kijelenthető, hogy a mikrobiom bizonyos mértékben tartósan megváltozik a betegséget követően. A bélsárminták eredményei nem voltak összhangban ezekkel az eredményekkel, de eltérések ott is megfigyelhetők voltak a két különböző egészségi státuszú csoport között. A vizsgált mintákban is a Verrucomicrobia törzsbe tartozó *Akkermansia muciniphila* volt kimutatható, abundanciája viszont nem mutatott összefüggést a betegséggel vagy a diétával. A Clostridiumok csak az alacsony rosttartalmú diétán tartott állatok mintáiban voltak kimutathatók, de csak alacsony szinten. [41]

Az állatok élettani igényeit kielégítő, megfelelő rosttartalmú takarmány megválasztása egyértelműen egy fontos kritériuma az optimális nyúltenyésztésnek. Azonban az ERE esetén arra egyelőre nem találtak bizonyítékot, hogy az ennél magasabb NDF-tartalmú takarmány előnyös hatással lenne annak lefolyására vagy az abból történő felépülésre. [41] Az eltérő arányú oldható és oldhatatlan rostot tartalmazó takarmányok etetése során az egészséges nyulak növekedési erélyét, emésztését és nitrogén-anyagcseréjét megvizsgálva szintén nem tapasztaltak pozitív változást azt követően, hogy a takarmány NDF-tartalma elérte az állatok által igényelt értéket. Az ERE kialakulásának megelőzésében a takarmány rosttartalma, illetve

annak a szénhidrátokhoz és fehérjékhez való aránya egyértelműen egy fontos kérdés, de a betegség kezelése során a szükséges rosttartalom biztosításán kívül jelentősége nincs a betegség lefolyására és az abból való felépülésre. [42, 43]

2.5. A metagenom elemzés alapjai és lehetséges felhasználása

Az újgenerációs szekvenálás térnyerése és a bioinformatika fejlődésének hatására a metagenomika egyre jelentősebb szerephez jut. Segítségével a környezet rendkívül összetett mikrobaközösségeinek ismert tagjain túl a korábban ismeretlen és tenyésztethetetlen mikrobák sokaságának a megismerése is lehetővé vált. [6] Nagy áteresztőképességű módszerről van szó, amely egyszerre több millió nukleinsav egyidejű szekvenálására képes rövid idő alatt. Az újgenerációs szekvenálás egy mikroba genetikainformációjának 99%-át képes lefedni, mindezt jóval olcsóbban és gyorsabban, mint ahogy az a Sanger-szekvenálással megvalósítható – igaz, ez utóbbi módszer a hosszú read-ek és alacsony leolvasási hibák miatt továbbra is gold standard-nek számít. [6, 44] A mikroorganizmus-közösségek megismerése olyan konzervált génszakaszok amplifikálásával valósítható meg, mint a 16S rRNS régió. Az így nyert genetikai adatok segítségével a különböző taxonok közötti filogenetikai rokonság, az ismert és ismeretlen enzimeket kódoló génszakaszok, új hipotézisek felvetésének alapját képezhetik, és a teljes közösségek egymástól való elkülönítését és azonosítását is lehetővé teszi. [6] Különböző virulenciájú *Staphylococcus aureus* törzsek Magyarországi nyúltelepekről származó mintái teljes genomszekvenálásával nyert adatait, valamint külföldi adatbázisokból származó genomszekvenciák vizsgálata során az alacsony virulenciájú törzsek PCR és Sanger-szekvenálás segítségével elvégzett multilokus szekvenciatipizálás (MLST) adatait összevetették a teljes genom MLST (wgMLST) eredményeivel, és ez eltérő végeredménnyel szolgált. A MLST a törzsek nagyobb diverzitása miatt azokat több csoportba sorolta, ezzel szemben wgMLST ugyanezen törzsek valószínűsíthető klonális eredetét állapította meg. [44] A megfelelő eredményekhez elengedhetetlen, hogy a levett minták jól reprezentálják a környezetet, amelyből származnak, kontaminációmentesek legyenek, és megfelelő mennyiségű és minőségű nukleinsavat tartalmazzanak. Figyelembe kell venni továbbá, hogy a mikrobiális közösségek nem statikusak, azok gyorsan változhatnak; egy dinamikus rendszert alkotnak. Ez nehézséget jelenthet olyan komplex oktanú betegségek vizsgálatában, mint az ERE, hiszen lehetlenné teheti az elhullott állatokból való reprezentatív mintavételt. A különböző ismeretlen eredetű mikroorganizmusok klasszifikálásához a lehető legnagyobb mennyiségű genetikai információra van szükségünk: minél nagyobb számú read-ünk van, annál könnyebben tudjuk azokat ismert referencia-adatbázisokhoz hasonlítani. Minél nagyobb számú read-et fed

le egy adott génszekvencia, annál megbízhatóbb eredményekre számíthatunk annak érdekében, hogy a különböző klasszifikáló algoritmusok kellően magas konfidenciával tudjanak dolgozni. Az egyszeres read-ek rosszabb minősége miatt a klasszifikáció és a funkcionális annotáció is nehezebb, az alacsony számú read-ek és a kismértékű átfedés csak magasabb rendszertani csoportokba való klasszifikációt tesz lehetővé. Jelenleg nem áll rendelkezésre olyan referencia adatbázis, amivel az összeállított metagenom adatunkat össze tudnánk vetni, és azt ennek alapján elbírálni. A szekvenálás rendkívül nagy mennyiségű adatának az annotációja manuálisan nem megvalósítható, ezért annak automatizálása kulcsfontosságú. A metagenom annotálás már ismert funkciók és/vagy taxonómiai egységekkel való megegyezés keresésén alapszik. Mindezek ellenére a metagenom szekvenciáknak csak egy része annotálható. Az olyan szakaszokat, amelyek annotációja nem lehetséges, ORF-oknak nevezzük. Több hipotézis is létezik arra, hogy mi lehet az eredete ezen szakaszoknak. Az egyik legegyszerűbb magyarázat az, hogy a használt programok hibája miatt a kódoló szekvenciák hibásan kerülnek azonosításra, egyszeres read-ek esetén pedig az ilyen téves eredmények előfordulása még valószínűbb. Az is lehetséges, hogy ismeretlen biokémiai funkciót betöltő génekről van szó, vagy pedig olyan új, ezelőtt ismeretlen génekről, amelyek ismert fehérjékkel megegyező fehérjéket kódolnak. A metagenom elemzés egyre szélesebb körben való felhasználásával és a szekvenálás árának csökkenésével folyamatosan növekszik a rendelkezésünkre álló genetikai információ mennyisége, viszont ennek az egyre gyarapodó adatmennyiségnek a tárolása és megosztása egy jelenleg még nem megoldott probléma. A jövőben zajló számos kutatásban rendkívül értékesnek bizonyulhatnak a korábban elvégzett kutatások és kísérletek során nyert szekvenált metogenomikai adatok. Ezt a törekvést szolgálja az egységes metaadatnyelv használata is, ezeket a „Minimum Information about any (x) Sequence checklists” biztosítja. Egységes adatokat szolgáltat a környezeti és kísérleti adatokról, így a rendelkezésre álló adatok összevetése és azok több szempontból való kritikus elbírálása mindenkinek a közös érdekében történhet. [6]

A metogenomika által megismerhetővé válik a különböző mikrobiális közösségek diverzitása, ezt meghatározza a fajgazdagság és a fajok egyenletessége. [6] Fontos, hogy a mintákban található mikroorganizmusok valós egyedszámáról nem rendelkezünk információval, ezért azok relatív abundanciájának változását tudjuk csak vizsgálni, ebből kifolyólag a megfigyelt változások nem tükrözik a mikrobiális közösségben bekövetkező valós számszerű változásokat; csak azok egymáshoz viszonyított eltéréseit látjuk. Ennek figyelmen kívül hagyása az adatok hibás interpretációját vonhatja maga után. Egy taxon relatív abundanciájának növekedése

bekövetkezhet annak tényleges elszaporodása miatt, azonban ugyanezt a következtetést vonhatjuk le változatlan egyedszám esetén is, ha a többi taxon száma ezzel szemben csökkenést mutat. Ezen logika mentén továbbhaladva a biomassza csökkenése esetén a relatív abundanciának a növekedése csak azt mutatja meg számunkra, hogy az adott taxon csökkent a legkisebb mértékben. [45] Különböző sejtszámlálási módszerek használatával, mint például az áramlásos citometria, lehetséges az abszolút abundanciavizsgálat, azonban a plusz költségek, továbbá az alacsony áteresztőképesség mellett a metodikai hibák is ellene szólnak. Ráadásul mivel ez a módszer sem fagyasztott minták, sem pedig már kész adatbázisok esetén nem alkalmazható, ezért nem is elterjedt a használata. [46] Sok esetben a mikrobák pontos számának meghatározása nem megvalósítható, vagy egyszerűen az nem gyakorlatias, és ez szükségessé teszi egy olyan általánosan elfogadott módszernek a kidolgozását, amivel az ebből eredő hibák kellő odafigyeléssel kiküszöbölhetők. A megfelelő vonatkoztatási rendszer megválasztásával jó eséllyel elkerülhetők ezek a hibák. Használhatunk úgynevezett differenciál rangsoroláson alapuló módszert, amely során a taxonokat egymáshoz viszonyítva állapítjuk meg, hogy melyikben következik be a legnagyobb változás. [45] Az olyan ismeretlen eredetű betegségek megismerésében, mint amilyen az ERE is, a metagenomika fejlődése komoly áttörést hozhat mind a technológiai fejlődés, mind pedig a rendelkezésre álló adatmennyiség növekedése által.

3. Célkitűzések

Szakedolgozatom célja az epizootikus nyúl enteropátia hatásának bemutatása egyrészt a betegségben szenvedő állatok bélrendszerének nyálkahártyájára, valamint a vékonybél bolyhainak és a vakbél redőinek hosszára gyakorolt közvetlen hatásának vizsgálata. Célom továbbá egészséges állatok bélrendszeréből származó szövettani metszeteken végzett nagyszámú mérés segítségével meghatározni, hogy a beteg állatokból mekkora mintaelemszámra lenne még szükség ahhoz, hogy az eredmények statisztikai erejét növelni lehessen. Ezenkívül ismertetem az egyre szélesebb körben elérhető legújabb mikrobiológiai és bioinformatikai módszereket, amelyek segítségével az ERE háttérében húzódó mikrobiom-változások megismerhetők és kiértékelhetők, ezáltal közelebb kerülve az ismeretlen oktanú és nagy gazdasági károkat okozó betegség pontosabb megismeréséhez.

4. Anyag és módszerek

4.1. Az ERE diagnózisának felállítása

A kórkép megismerésében és annak diagnosztizálásában való gyakorlat szerzésében Dr. Német Zoltán segített. Összesen 15 ERE-ben szenvedő húsnyúlak a kórbonctani vizsgálatát végeztem el az üllői Dóra Major Haszonállat Diagnosztikai Központban. A vizsgált állatok egy Dabason található kísérleti nyúltelepéről származtak, ez egy 2000 állat számára helyet adó ketreces istálló, ezek 4 sorban vannak elrendezve, ketrecenként 5 állattal. Az etetés manuálisan módon történik, mivel ez lehetővé teszi, hogy a táplálékfelvételt ketrecenként pontosan mérni lehessen. Az itatás automata rendszerrel történik. Ott tartózkodásunk alkalmával egy kísérlet zajlott, amelynek során az állatok barackmag alkaloidot kaptak ivóvízben. A ketrecek egymással szorosan érintkeznek, az állatok között a direkt kapcsolat könnyen megvalósul. A betelepítés all in all out rendszerrel történik, hizlalási ciklusonként átlagosan 10%-os szokott lenni az elhullás.

Az ERE-ban szenvedő állatok azonosítása a klinikai tünetek alapján történt, az elhullott állatok esetén pedig a kórbonctani vizsgálat segített ennek megállapításában. Az ERE-ben szenvedő nyulak felismerése egyrészt a hasmenés, továbbá a végbélnyílás és a hátsótestfél bélsárral való szennyezettsége alapján volt lehetséges. Az ilyen állatokkal közvetlenül érintkező fajtársaik szőrzete is gyakran volt bélsárral szennyezett, s ez a betegség felismerését szintén megkönnyítette. Az ERE egy másik tünete a táplálékfelvétel hirtelen és tartós csökkenése, ezért a beteg állatok kondíciója romlik, ami szintén segítette az egészséges társaiktól való elkülönítést. [39] A takarmányfelvétel csökkenése miatt a fertőzött állatok viselkedése is megváltozott: elgyengültek, letargikussá, apatikussá váltak, a fajtársaikhoz képest aktivitásuk nagymértékben csökkent. Az emésztőtraktus szerveit kitöltő nagy mennyiségű gáz és folyadék hatására a has felpuffadt, és azt áttapintva több állatnál is érezhető volt a vakbelet elzáró kemény pangó bélsárnak a jelenléte. Az ebből eredő fájdalom a viselkedés megváltozásához is kétségkívül hozzájárult. Az ERE klinikai tüneteit produkáló állatoknak a leölése hozzáértő módon, az állatok fejére mért hirtelen ütéssel történt. [47] Egy állat esetén végeztem el annak részletes belső vizsgálatát, a többi példánynál a belső vizsgálat során az emésztőtraktust vizsgáltam meg tüzetesen, mivel a közvetlenül az ERE által okozott makroszkópos elváltozások erre a régióra korlátozódnak, a többi szervrendszert a betegség közvetlenül nem érinti. (Természetesen a mellette megjelenő másodlagos fertőzések hatására kialakulhatnak egyéb szervekben is elváltozások.) [14]

4.2. Szövetteni mintavétel ERE-ben szenvedő és egészséges nyulakból

Összesen 10 beteg állatból került sor szövettani minta vételére, ennek helyszíne a debreceni Hús-Nyúl Tenyésztő Kft. volt. Itt debreceni fehér nyúlfajtát tartanak, és nagyüzemi húsnyúltenyésztéssel és hizlalással foglalkoznak. Az állatok 6-7 hetes kor körül voltak. A mintavétel időpontja egybeesett az állományban jelentős számú elhullást okozó ERE tömeges megjelenésével. Az érintett állatok azonosítása a ERE-re jellemző klinikai tünetek megállapításával történt, az olyan tünetek együttes előfordulásával, mint a puffadás, hasmenés, rossz kondíció, gubbasztás, letargia, csökkent táplálékfelvétel. A diagnózis végül kórbonctani vizsgálattal került megerősítésre. Az állatok szakszerű leölését a kellő tapasztalattal rendelkező telepi dolgozó végezte. [47] A hasüreg felnyitása és a belső szervek vizsgálata után a diagnózis megerősítésre került, ezt követően azonnal elvégeztem a mintavételt. A két lépés között fontos volt, hogy ne teljen el hosszú idő, mivel az önméztődés a bélhám mikroszkópos finom struktúrájának gyors károsodását okozta volna, ezzel megnehezítve vagy lehetetlenné téve a nyert minták kiértékelését. Mind a 10 állatnak a béltraktusából összesen 4 darab 2×2 cm-es szövettani minta vételére került sor, ez egyedenként 4 darab mintát jelentett, amelyek a duodenumból, jejunumból, ileumból és caecumból származtak.

A duodenumból a pylorus után 10-15 cm-el lévő szakaszból vágtam ki a szükséges méretű keresztmetszeti mintát. A jejunumból az előzővel megegyező módszerrel, a bélszakasz morfológiája és anatómiai helyeződése alapján való azonosítást követően annak középső szakaszából történt a mintavétel. Az ileum esetén ugyanezt a módszert alkalmaztam, a sacculus rotundust felkeresve azonosítottam a bélszakaszt, majd ettől cranialisan körülbelül 10 cm-re elvégeztem a mintavételt. A vakbél felkeresésében annak mérete és fajra jellemző megjelenése segített, a nagyobb átmérő miatt itt egy 2×2 cm-es mintát metszettem ki a corpus ceci területéről. A kimetszést követően a minták bélsártól való megtisztítása 10%-os foszfáttal pufferealt sóoldat (PBS) használatával történt. Következő lépésként ezek $40 \times 28 \times 7$ mm-es szövettani beágyazó kazettákba kerültek, végül pedig az összes megjelölt kazetta 10%-os formalinoldatban lett fixálva a későbbi feldolgozáshoz.

Az egészséges nyulak szövettani mintái 30 darab vágókorban lévő pannon fehér fajtájú húsnyúlból származtak. A mintavételre a vágóhídon került sor, ami az állatok kábítása és kivéreztetése után azonnal megtörtént. A levett minták 10%-os formalinoldatban kerültek fixálásra. A mintavételt Mayer András és Dr. Német Zoltán végezte. Ezek az állatok 3 különböző 10 fős csoportot alkottak, közöttük a különbséget az eltérő takarmányozásuk

jelentette. A hizlalás során 17%, 19% és 21% nyers rosttartalmú takarmánnyal etették őket. [Mayer András publikálatlan eredményei]

4.3. Metszetkészítés és szkennelés

A minták fixálása 10%-os semleges pufferezt formaldehid-oldatban zajlott 24–48 órán át. A szövettani metszetek feldolgozása az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékén történt. A fixálást követően a minták víztelenítő automatával, etanol és xilol segítségével dehidratálva lettek, ezt a paraffinba ágyazás követte. A paraffinblokkokból üvegtárgylemezre 3–4 µm-es metszetek készültek, amelyek rutin eljárással hematoxilinnel és eozinnal kerültek festésre. A metszetek digitalizálása egy Panoramic Midi (3D Histech, Budapest, Hungary) szkennel segítségével történt meg, 20-szoros nagyítású objektívet használva. [48] Az egészséges nyulakból 70 darab, a beteg példányokból pedig 20 darab a különböző bélszakaszok szövettani metszeteit tartalmazó lemezeket a szkennelésére került sor. A minták nyomon követhetőségét az egészséges állatok esetén azok fülszámainak rögzítése biztosította, a beteg állatok esetén pedig a mintavételkor a szövettani beágyazó kazettákon rögzített egyedi azonosító.

4.4. A metszetek mely bélszakaszból származtak

Az állatokból származó metszetek anatómiarégiójuk szerint történő csoportosítását szövettani szerkezetük alapján végeztem el. A patkóbél nyálkahártyája bélbolyhokban gazdag, azok vékonyak és levél alakúak, a bolyhok hosszabbak, mint az éhbél és a csípőbél esetén. A legfontosabb különbség, ami az imént említett bélszakaszoktól való elkülönítést lehetővé tette, a submucosában található Brunner-mirigyek jelenléte volt, mivel ezek kizárólag a duodenumban találhatók meg; de ezenkívül még az itt lévő, a másik két vékonybélszakasznál jelentősen mélyebb Lieberkühn-kripták. A jejunumnak azonosítása a nyálkahártya bolyhainak szerkezete és mérete alapján nem volt megvalósítható – igaz, ezek inkább kúp alakúak, és hasonlóan a duodenumhoz, nagyszámban vannak jelen. A legfontosabb könnyen felismerhető különbség, hogy a submucosa mentes a Brunner-mirigyektől és a Peyer-plakoktól. A jejunum Lieberkühn-kriptáinak felépítése nem tér el a duodenumtól, a különbség azok méretében volt csak látható, mivel azok itt jelentősen kisebbek voltak. Az ileum szerkezetét tekintve rendkívül hasonló volt az éhbélhez, de a submucosában lévő Peyer-plakok által elkülöníthető volt tőle, a bélbolyhok alakjukban különböztek a másik két vékonybélszakasztól, viszont azok nem kellően jellegzetesek ahhoz, hogy elkülönítsük őket általuk. A vakbél a bélbolyhok hiánya miatt a

vékonybélszakaszoktól könnyen elkülöníthető volt, a vakbél nyálkahártyájára jellemző jellegzetes redőszerű szerkezete is segítette annak azonosítását. [49, 50]

4.5. A metszeteken végzett mérések és azok kiértékelése

A digitalizált metszeteken végzett mérések elvégzéséhez és kiértékeléséhez a CaseViewer (Verzió: 2.4) (3D Histech, Budapest, Hungary) szoftverét használtam. A mérésekhez a szoftver annotációkhoz használható eszközei közül a több mérési pont elhelyezését lehetővé tevő „Draw an open polygon” eszközt használtam. Ennek segítségével a bélbolyhok és a vakbélredők alakjában lévő változásokat képes voltam pontosan lekövetni. A duodenum, jejunum és ileum méréseihez olyan szakaszokat próbáltam kiválasztani a metszeteken, ahol a Lieberkühn-kripták felismerhetők voltak, és lehetővé tették a bélbolyhok alakjának pontos azonosítását. Lehetőség szerint olyan bélbolyhokat választottam, amelyek nem voltak sérültek, és lefutásuk megközelítőleg egyenes volt. Ezek csúcsi része felismerhető és nem károsodott, szerkezetük ép, és a bélhámsejtek határai is felismerhetők. A méréshez a bélbolyhok apexének egyrétegű, kefeszegélyes hengerhámjának csúcsi hámsejtjeitől húztam a bélbolyh lefutását követő vonalat a programban. Odafigyeltem arra, hogy az annak a középvonalában legyen és az alapjáig tartson, aminek azonosításában a kripták segítettek. A vakbélmetszetek esetén a redők nagyságának a mérését végeztem el, a méréshez a redők egyrétegű hengerhámjának a csúcsi sejtjeitől azok középvonalában a két egymás mellett lévő redő közötti területet használva állapítottam meg a mérési mélységet. Az eltérő egészségügyi státuszú csoportok adatai két külön Excel-táblázatban kerültek rögzítésre. Az egyes metszetekhez tartozó értékek mellett a bélszakaszok pontos megnevezése, valamint az azonosításukra szolgáló jelölések szintén felkerültek ide. A szövettani metszetekről képek készültek a CaseViewer szoftver „snapshot” funkciójával.

Az egészséges nyulakból származó minták statisztikai elemzését a SAS (Statistical Analysis Software) programcsomag segítségével végezte el Dr. Gerencsér Zsolt. Mint ahogy az már korábban említésre került, ezek az állatok 17%, 19% és 21% nyersrostot tartalmazó takarmányt kaptak. Annak megállapítása végett, hogy ennek a három csoportnak a bélbolyh és a vakbélredő hosszai összefüggést mutatnak-e a takarmány eltérő nyersrosttartalmával, egyszempontos ANOVA módszer segítségével került elbírálásra. Az eltérő takarmányok és az adott bélszakasznál mért értékek közötti változásoknak a kapcsolata szintén elbírálásra került, ez a Tukey-féle tartományteszt elvégzésével történt. A beteg nyulakból származó adatoknak a statisztikai kiértékelését én végeztem el az Excel-programban, annak adatelemzési bővítményét

használva. A beteg és egészséges csoportból származó adatokat kétmintás T-próba használatával értékeltem ki.

4.6. DNS-izolálás beteg állatokból

A beteg állatok kórbonctani vizsgálata során a későbbi DNS-izolálás céljából szintén sor került mintavételre az egyik nyúlból. Az állat leölése után, a hasüreg megnyitása és a belső vizsgálat elvégzését követően fagyasztócsövekben mintát vettünk a gyomor-, a vékonybél-, a vakbél- és a vastagbélartalomtól. Annak érdekében hogy a minták megfelelő minőségűek legyenek, a leölés és a mintavétel között kevés idő telt el. Igaz, a legoptimálisabb az lett volna, ha ez közvetlenül a leölés után történik, de erre jelen esetben nem volt lehetőség. A levett minták rögtön a fagyasztóba kerültek, majd egy hűtőtáskában az Állatorvostudományi Egyetem Patológia Tanszékére, ahol $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on kerültek tárolásra a feldolgozásig. A minták felolvasztása után a feldolgozáshoz a fagyasztócsövekből megfelelő mennyiségű mintát mértünk ki centrifugálásra alkalmas 1,5 ml-es gyűjtőcsövekbe, majd a gyomormintához $200\text{ }\mu\text{L}$, a többihez pedig $400\text{ }\mu\text{L}$ 1X PBS puffert adtunk. A keresztkontamináció elkerülése érdekében a minták között cseréltük a pipettahegyet. A következő lépésben homogenizálás céljából a mintáinkat 15 másodpercig vortexeltük, ezt centrifugálás követte 3000 g fordulatszámon 15 másodpercig.

Az izolálás a MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction kit-tel, valamint a MagCore automata nukleinsav-izoláló berendezés használatával történt. Az automata berendezés a nukleinsav kinyeréséhez mágneses részecsketechnológiát használ, ami a régebbi módszerekkel szemben gyorsabb, egyszerűbb, valamint biztonságosabb alternatívát kínál. [51] A kivonóberendezés minden tartozéka DNáz-, valamint RNáz-mentes, illetve az izoláló berendezés kialakításának köszönhetően nem áll fent a keresztkontamináció veszélye a mintáink között, ezzel is biztosítva a megfelelő tisztaságú nukleinsav kivonását. A mintagyűjtő csövekbe $10\text{ }\mu\text{L}$ hordozó RNS-t (1 mg/ml), valamint $20\text{ }\mu\text{L}$ proteteinázK-t (10 mg/ml) pipettáztunk. Ezt követően megtörtént a minták hozzáadása, amelyekből $200\text{ }\mu\text{L}$ pipettáztunk a csövekbe. Az automatában a megfelelő helyre elhelyeztük az előkészített mintánkat tartalmazó csöveket, pipettahegyeket és tisztítócsöveket is. Az izoláció a 202-es programon zajlott.

4.7. 16S rRNS amplikonszekvenálás

A szekvenálásban áttörést hozó nagy átteresztőképességű NGS teremtette meg a 16 rRNS amplikonszekvenálásnak az alapját. A technológia lehetővé teszi a hagyományos módszerekkel nem tenyésztető baktériumok egyszerű és rövid időn belül történő kimutatását. [52] A Sanger-

szekvenálással szemben a read-ek hossza rövidebb, ez elsőgenerációs berendezések esetén ez 100 bázispárt jelent, míg a második és harmadik generációsoknál már 350–400 bázispár hosszúságú read-eket kapunk. Nagy lefedettségi mélységgel rendelkezik, egy szekvenálás során 300 000–400 000 read-et kapunk ezért a kisebb számban jelen lévő mikroorganizmusokról is információt nyerünk. [53]

A rövidebb read-ek miatt indokoltá vált olyan génszakaszoknak a kiválasztása a szekvenáláshoz, amelyekre nagymértékű variabilitás jellemző. Ilyen a gombák esetén az ITS, valamint a baktériumok és archeák esetén a 16S gén. A riboszomális RNS 16S alegység génje egy olyan konzervatív génszakaszt is tartalmazó régió, amely tökéletesen alkalmas az amplifikálásra, mivel ezek a szakaszok kellően univerzálisak ahhoz, hogy a megfelelően megválasztott primerek kötődni tudjanak, ugyanakkor lehetőséget ad a különböző mikroorganizmus-közösségek azonosítására is a génben elszórtan található variábilis szakaszok révén. Összesen 9 ilyen hipervariábilis génszakasz áll rendelkezésre, ezek nagyjából 50–100 bázispár hosszúságúak. Ezek a hipervariábilis szakaszok a V1-V9 régiók, amik lehetővé teszik a nemzetségi, vagy akár a fajszintű azonosítást. [53] A szekvenálás során egy fontos döntés, hogy az említett régiók közül melyeket válasszuk célpontnak. Attól függően, hogy melyik nemzetségen belül lévő fajokat szeretnénk hatékonyan azonosítani, kell megválasztanunk a régiókat. [54] A legpontosabb eredményekre akkor számíthatunk, ha a teljes gén szekvenálására sor kerül. Ennél gyorsabban eredményhez tudunk jutni, ha csak bizonyos régiókra fókuszálunk. A V2 és V3 ígéretes eredményeket mutatnak az általános nemzetségszintű azonosításhoz. A taxonómiai azonosítás nem minden esetben lehetséges a faj vagy nemzetség szintjén, illetve a 16S gén konzerváltsága miatt a taxonok közötti finom különbségek is elveszhetnek. [55]

Akárcsak a legtöbb ilyen technológia, ez sem hibamentes. A már kész adataink feldolgozásakor használt amplikon szekvenálási hibákat, valamint a kiméraszekvenciákat eltávolító algoritmusok a hibás szekvenciáink egy részét képesek sikeresen eltávolítani, viszont a vizsgált mikrobaközösségek diverzitásának a túlbecslését ezzel nem tudjuk elkerülni. Az ebből eredő hibák csökkentése különböző ismert összetételű mesterséges közösségek bevonásával lehetséges. Határozott előnnyel jár, ha ugyanazon vizsgált közösségből egyidejűleg nemcsak egy mintát veszünk, hanem kettőt, vagy akár hármat is. Így az esetleges szekvenálási hibák is könnyebben felismerhetők, ez a szekvenáláshoz szükséges idő- és költségcsökkenés miatt ma már egyre könnyebben megvalósítható. [56]

4.8. A mikrobiom változásának vizsgálata qiime 2 segítségével

4.8.1. A nyers adatok előkészítése az elemzéshez

A qiime 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) egy decentralizált nyílt forráskódú bioinformatikai szoftvercsomag, amelynek segítségével az ERE-ben szenvedő állatok mikrobiomja a rendelkezésre álló metagenom adatok feldolgozása révén elemezhető és kutatható. A szoftver futtatása Linux operációs rendszeren lehetséges, a Qiime 2 telepítéséhez a Linux Mint (Verzió: 21.2) disztribúcióját választottam. A program parancssor alapú kezelőfelületének a futtatása a conda nyílt forráskódú csomag- és környezetkezelő rendszerrel történt. A program által használt adatoknak és eredményeknek a neve „artifact”, ezeknek keletkezése nyomon követhető, és létrejöttük részletes folyamatábrája a QIIME 2 View felületen meg is tekinthető. Ez azért lehetséges, mert az adatok feldolgozásának különböző lépéseit a teljes folyamat során végigkísérik. Ez lehetővé teszi mások számára is az eredmények értelmezését és a kutatás nyomon követhetőségét is. Ezért bármilyen adatról is legyen szó, az első lépés során szükséges a nyers adatainkat importálni a qiime által preferált formátumba, így qza fájlokat fogunk kapni, amelyek tartalmazzák az adatainkat és a hozzájuk tartozó metaadatokat egyaránt. [57]

A metagenom-elemzéshez felhasznált minták ERE-s állatok vakbeléből származtak, több különböző telepről és időben eltérő járványkitörésekből. A 16S rRNS szakaszok szekvenálása az Illumina MiSeq eszközével történt, a szekvenálást követően a nyers adatok demultiplexelt fastq fájlformátumban érkeztek vissza. Adataink használatához ezeket importálni kell a qiime által használt qza fájlformátumba. Ez teszi lehetővé, hogy az adatok származása automatikusan nyomon követhető legyen. Ezenkívül szükséges az is, hogy az adatainkat át tudjuk alakítani különböző adatformátumokba, ami a szemantikus típus megerősítéséhez is szükséges. A szemantikus típusok teszik lehetővé annak az eldöntését a qiime-n belül, hogy a rendelkezésre álló adatunk alkalmas-e az általunk kívánt művelet elvégzéséhez. [57]

A következő lépésben a demultiplexelt minták minőségének elbírálásához, a böngészőből elérhető QIIME 2 View felülete használható, ami lehetővé teszi a qiime által létrehozott qza és qzv formátumú fájlok megtekintését. Jelen esetben vizualizálható az importált adatunk, és megtekinthetjük a rendelkezésünkre álló szekvenciák és a minták számát. Valamint láthatjuk a szekvenciákhoz tartozó minőség pontszámokat is, ezek ismeretében tudjuk elbírálni, hogy a szekvenciáink minőségileg alkalmasak-e a további vizsgálatokra, vagy pedig előbb a rossz minőségű read-ek eltávolítása szükséges hozzá. Ezért került elkészítésre a demultiplexelt

adatok összefoglaló vizualizációja. Annak érdekében, hogy megfelelő minőségi adatokkal lehessen dolgozni, 30-as minőségi pontszám lett alapul véve; ez esetben 1000 read-ből átlagosan 1 read az, ami hibás. Ez 99.9%-os pontosságot jelent, ami ennek a kritériumnak a vizsgált mintáink megfeleltek. [57]

A következő lépés során használt DADA2 algoritmus segítségével megtörtént a zajos mintáknak, kiméráknak és a mindössze egyszer előforduló „singelton” read-eknek az eltávolítása. Ezenkívül annak érdekében, hogy a nagy méretű adathalmazzal járó teljesítmény- és memóriaigény kisebb legyen, az ismétlődő szekvenciák is eltávolításra kerültek. Ezen szekvenciáknak a pontos száma rögzítésre került, természetesen. A DADA2 ezenkívül figyelembe veszi a Illumina-szekvenálásnak a vele járó hibáit is, illetve segíti az OTU-k használatából eredő hiányosságok kiküszöbölését. Ezek létrehozása a szekvenciák százalékos hasonlósága alapján történő csoportosításon alapul, viszont az NGS által létrehozott magas minőség a szekvenált adatokat nem veszi figyelembe. Ezért olyan finom különbségek is elveszhetnek a vizsgált közösségekről, amik fontosak lehetnek olyan esetekben, amikor különböző patogenitású törzseket, vagy pedig a komplex oktanú betegségeket szeretnénk jobban megismerni. [58] A DADA2 használata során nem OTU-k keletkeznek, hanem úgynevezett amplikonszekvencia-variánsok (ASV). A másik lehetőségünk, hogy a Deblur bővítményt használjuk az adataink feldolgozásához. Ez egy kétlépcsős folyamat segítségével történik. Először a szekvenciák minőségi pontszámok által való szűrésére kerül sor. Ezután a „deblur denoise-16S” eljárást használjuk, itt megadjuk azt a pozíciót, ahol a szekvenciákat vágni akarjuk. Ehhez érdemes azt az értéket megválasztani, ahol a minőségi pontszámok mediánja 30 alá csökken. [57]

A következő lépésben a legtöbb vizsgálathoz elengedhetetlen adatmátrix létrehozása történt, ez a „feature table”, amelyben az oszlopok tartalmazzák a mintáinkat, a sorok pedig az ASV-eket. A kapott adatokat vizualizálva információt kapunk arról, hogy az egyes mintákhoz hány darab szekvencia tartozik. [57]

4.8.2. A taxonok azonosítása

A taxonok azonosítása klasszifikáló algoritmusokkal lehetséges. Ezek olyan markergének, mint a riboszomális 16S, vagy gombák esetén az ITS és 18s gének segítségével képesek a szekvenciákat azonosítani. Ezen géneknek a hipervariábilis génszakaszait összevetve a referencia adatbázisokkal, a felhasználó által megadott százalékos hasonlóság alapján a taxonok azonosíthatók. Ilyen referencia adatbázis a Silva 16S rRNS adatbázis 138-as és a Greengenes 2022.10-es verziójának a 99%-os egyezés alapú változata. Az adatbázis minősége fontos a klasszifikáció során, valamint pontosabb eredményekre számíthatunk, ha azok súlyozottak, vagyis figyelembe veszik, hogy nem minden taxon fordul elő azonos gyakorisággal a vizsgált mintákon belül. [57, 59]

A rendelkezésre álló programok legnagyobb része csak a megfelelő beállítások esetén képes maximális hatékonysággal működni, ezért mindenképpen érdemes azokat specifikusan megválasztani annak függvényében, hogy a célunk új fajok felismerése-e, vagy az adott közösséget alkotó ismert mikrobákat szeretnénk kutatni. A különböző taxonokba való besorolás a felhasználó által megadott küszöbértékek alapján zajlik. A klasszifikációhoz számos programot használhatunk. A qiime 2 esetén a q2-feature-classifier bővítmény teszi ezt lehetővé. Használhatunk előre betanított algoritmusokat, de a betanítási folyamatot mi is elvégezhetjük. Az ilyen gépi tanulás alapú algoritmusok esetén szükségünk van az általunk választott referencia adatbázisra és a vizsgálni kívánt adatainkra. A betanítási folyamat az első elvégzendő lépés, és azt követően specifikus lesz a vizsgálni kívánt adatbázisra és marker génekre. 16S amplikon szekvenálás esetén érdemes a referencia adatbázisunkat trimmelni az amplifikálás során is használt primerekkel. Fontos tényező, hogy az adott klasszifikáló program a szekvenciákat az alapján osztályozza, hogy minden taxon azonos gyakorisággal fordulhat-e elő a kérdéses szekvenciák között, vagy pedig azok valamelyest előre megbecsülhetők. Az olyan gépi tanulás alapján működő algoritmusok, mint például a „naive Bayes” is, sokkal pontosabban képesek a taxonokat azonosítani és felismerni, ha azok vizsgálata előtt a taxonok kompozíciója előre ismert volt. Ennek relevanciája, hogy a rendelkezésre álló adat mennyisége a különböző mikrobaközösségekről folyamatosan bővül, ami lehetővé teszi, hogy célzottabb módszerekkel tudjuk a különböző mikrobaközösségeket kutatni. Végző lépés során a betanított algoritmusunk elvégzi a minták annotációját. Ennek hatékonyságát – ahogy azt már fentebb jeleztem – nagymértékben befolyásolja, hogy mi a célunk. Az algoritmus módszere és konfigurációja meghatározza, hogy az új, még ismeretlen taxonok azonosítására alkalmasabb-e, vagy pedig a már ismertek felismerésére. Az ilyen, eddig még nem azonosított taxonok felismerése esetén

azok a referencia adatbázisban nem szerepelnek, viszont optimális esetben a legközelebbi taxonómiai származás eredetét képes azonosítani, ellenben a taxonok túl-, alul- vagy félrecsoportosítása hibás eredményekhez vezethet. Az amplikonszekvenálás mellett a teljes genom shotgun szekvenálásával sokkal nagyobb számú eltérő, egyedi szekvenciához juthatunk. A módszer hatékony eszköze az ismeretlen taxonok megismerésének, ezek annotációja azonban nehezebb a read-ek eltérő hosszúsága, valamint a rendelkezésre álló genetikai információ kevésbé egységes lefedettsége miatt [57, 59].

A kapott eredményeink megjeleníthetők a taxonokat egy grafikusán ábrázoló oszlopdiagram formájában, ez megmutatja a sikeresen azonosított taxonok relatív frekvenciáját egymáshoz képest. A taxonómiai szint megválasztásának segítségével ábrázolhatjuk azt a kívánt rendszertani kategóriát, amit megjeleníteni szeretnénk a grafikonon. [57]

5. Eredmények és megvitatásuk

5.1. Kórbonctani vizsgálatok

Kórbonctani vizsgálatra a dabasi kísérleti nyúltelep és a debreceni Hús-Nyúl Tenyésztő Kft. állatain került sor. A Dabasról származó vizsgált állatokat, az állományt végigjárva talált, betegségben elhullott nyulak adták. A többi állat pedig az ERE jellegzetes tünetei alapján lett kiválasztva és leölve. A tapasztalt klinikai tünetek megegyeztek a szakirodalomban is leírtakkal, a beteg állatok gyakran elfekvők és apatikusak voltak. Hasuk felpuffadt, azt áttapintva kemény összeállt tartalom volt tapintható az állatok bélrendszerében. Mivel elhullásuk és leölésük nem azonos időpontban történt, ezért a hullamerevség különböző stádiumait lehetett tapasztalni a tetemenek. A régebben elhullott nyulaknál a különböző hullajelenségek a pontos diagnózis felállítását nehezítették, de az itt tapasztalható előrehaladottabb autólízis és autodigestio ellenére a betegséget sikeresen azonosítani lehetett. Ezeknél a régebbi tetemeken már a hasüreg felnyitása előtt szürkészöld színváltozás volt látható a has területén, a szulf-hemoglobin képződés miatt. A boncolás megkezdése előtt a 15 darab tetemet megsemeztéltem – elvégeztem azok külső vizsgálatát. A kondíciójuk általánosságban gyenge volt, külső sérülés és elváltozás nem volt látható, több egyednek bélsár szennyezte be a szőrzetét.

Egy állat részletes kórbonctani vizsgálatát végeztem el, ezt röviddel a boncolás előtt ölték le. Kültakarója sérülésektől mentes volt, a külső testnyílások épek voltak, kóros elváltozást nem lehetett rajtuk látni. A végbélnyílás és a hátsó lábak területén a szőrzetet a hasmenés miatt híg bélsár szennyezte be. Kondíciója gyenge volt, az messze elmaradt egészséges társaitól. A bőr alatti kötőszövet zsírral gyengén átszőtt, az izomzatnak a fejlettsége pedig elmaradt az állat korától. A hasúri szervek helyeződése normális volt, illetve kóros hasúri és mellúri tartalmat nem lehetett látni. Az emésztőszervrendszeren kívül más szervben vagy szervrendszerben az ERE makroszkóposan látható elváltozást nem okozott. A gyomor tapintata feszes, közepes mennyiségű zöld színű, félig emésztett tartalom volt benne. A vékonybelek a gyomorhoz hasonlóan felfúvódtak, és világosbarna, sűrű béltartalom töltötte ki lumenüket. A vakbelet teljes hosszában sötétbarna, pangó béltartalom zárta el, ez egyértelműen meggátolta az állat élete során a tőle craniális irányból érkező további béltartalom továbbítását. A tapasztalt elváltozások és kórbonctani kép megegyezett a betegség számos más tanulmányban is leírt megjelenésével [5, 14, 25]. Az ERE egyik tipikus tünete a fokozott nyálkakiválasztás, ez a vastagbélben volt a legjobban látható. A vakbéltartalomtól élesen elkülönülő szürkésfehér színű áttetsző nyálka

teljes egészében kitöltötte a vastagbelet. A béltartalom továbbításában való zavart szintén megerősítette, hogy a nyulakra jellemző kemény és lágy bélsár a vastagbélben nem volt látható. A betegségre jellemző módon gyulladás nem fordult elő az állatban. A többi nyúl emésztőszervrendszerének vizsgálata során hasonló elváltozások voltak láthatók. A vakbelet nem minden esetben zárta el annak összeálló tartalma, és a vastagbelet sem töltötte ki nyálka minden elhullott állat esetén, viszont a felpuffadt gyomor, a vékonybelekben és vakbélben lévő nagy mennyiségű folyadék, gáz és a fokozott nyálkatermelés, valamint a többi szervnek az érintetlensége és a gyulladás hiánya alapján az ERE diagnosztizálható volt. A régebbi tetemek esetén a tapasztalt felfúvódás nem tekinthető egyértelműen a betegség tünetének, mivel az a bélrendszerben található bakteriális tevékenység hatására meginduló rothadás miatt is kialakulhatott.

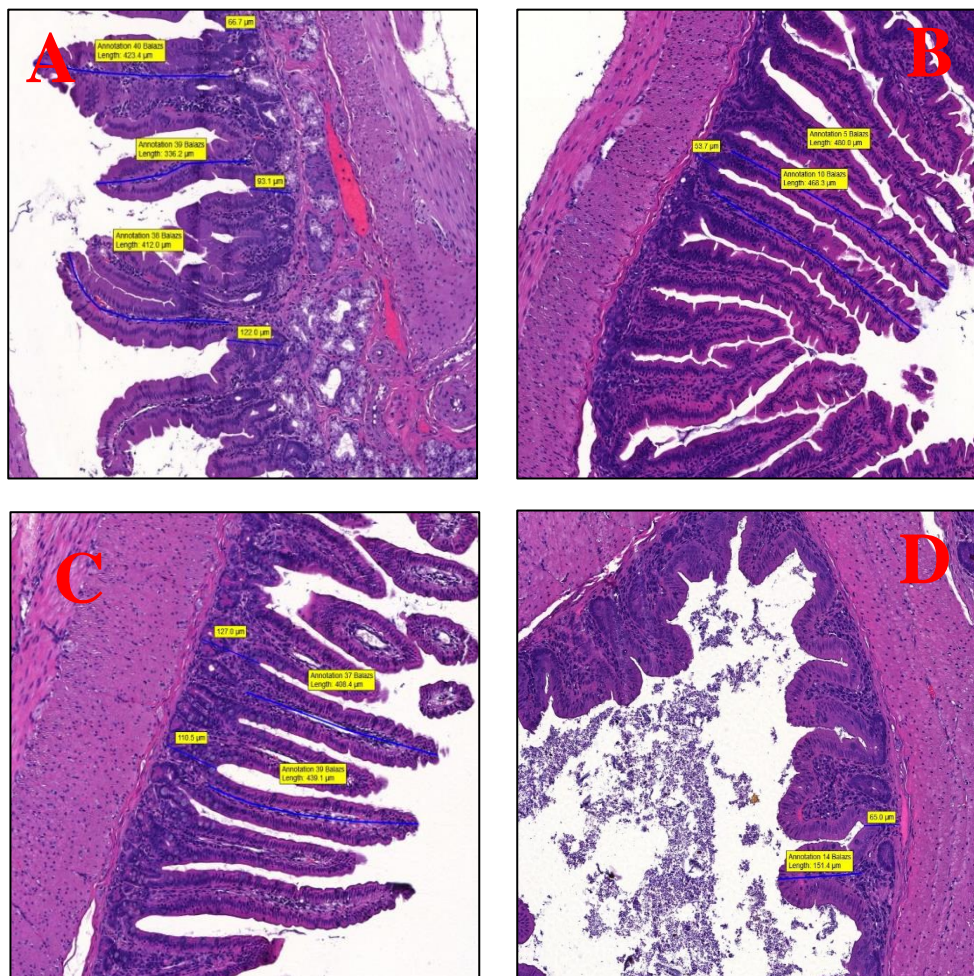
A Debrecen mellett végzett szövettani mintavétel során a hasúri szervek kórbonctani vizsgálatára szintén sor került. Az állatok a mintavétel idején 6-7 hetes kor körül voltak. Az ERE tipikusan a választást követően ebben a korban szokott jelentkezni. [5, 14] Ez esetben 10 darab nyúl közvetlenül a vizsgálat előtt került leölésre, ezért a klinikai tüneteket is sikerült minden beteg állaton megfigyelni még ezt megelőzően. Az állatok kevésbé voltak aktívak, a ketrecek közelről megszemlélve, vagy azokat felnyitva több példány nem próbált sem elmenekülni, sem pedig felállni. Egészséges fajtársaikhoz képest letargikusak, apatikusak voltak, valamint a kondíciójuk is gyengébb volt. A ERE-s állatok elgyengülésének legfőbb oka a táplálék- és vízfelvétel drasztikus csökkenése volt, ezek akár teljesen meg is szűnhetnek a kór kialakulása miatt. A kiválasztott nyulak egy részének hasmenése volt, ez a beteg állatok megtalálását is segítette, mivel nemcsak saját magukat, de a ketrectársaikat is beszennyezték a bélsárukkal. A leölés után megtörtént a külső vizsgálat, itt a bélsárral szennyezett szőrzeten kívül egyéb elváltozás sem volt látható. A hasüreget megnyitva, a hasúri szerveket megszemlélve azok helyeződése normális volt, a gyomor és a belek a fiziológiásnál nagyobbak voltak a bennük található nagy mennyiségű folyadék és gáz hatására. Mivel az állatok kórbonctani vizsgálatára a leölést követően azonnal sor került, ez nem olyan post mortem elváltozás volt, ami közvetlenül a halál után alakulhatott volna ki. Ez esetben is több állatnál megfigyelhető volt a kemény, sötétbarna, pangó vakbél tartalom, egyes esetekben ezt a tartalmat csak az apex ceci területén tapasztaltam. A vastagbelet teljesen kitöltő nyálka némelyik állatnál szintén előfordult. Az állatok tüdejét is megvizsgáltam, két állat esetén volt elváltozás. Ez valószínűleg másodlagos fertőzések nyomán kialakult tüdőgyulladás volt, amit Pasteurellák

vagy Bordetellák idézhetek elő. [4] Gyulladás, illetve más szerveknek a károsodása nem volt tapasztalható.

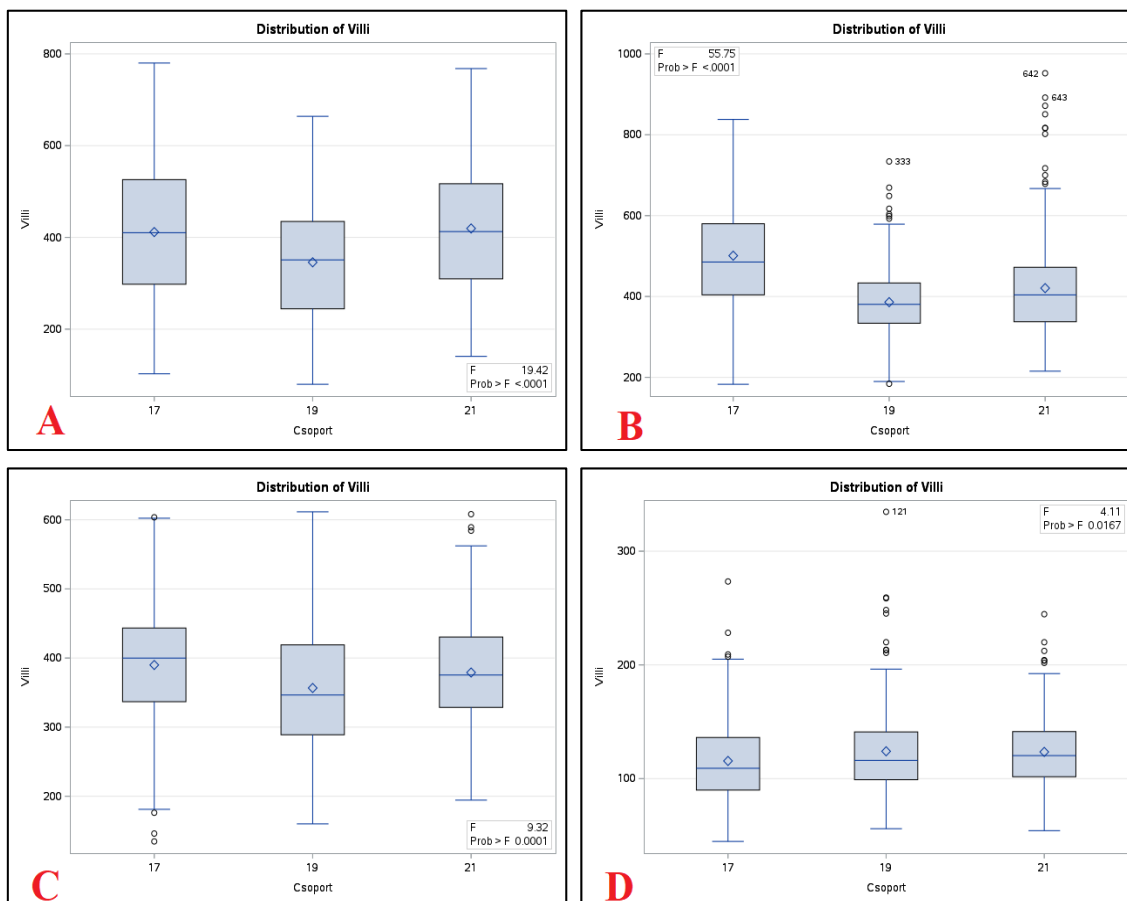
5.2. Bélbolyhok vizsgálata eltérő tápfelhasználás esetén

Az egészséges nyulakból származó szövettani metszeteket megvizsgálva, azok szövettani rétegéi, illetve az ezeket felépítő különböző sejtek állománya tökéletesen felismerhető és egymástól jól elkülöníthető volt a minták esetén. A metszetek magas minősége lehetővé tette a nagyszámú mérés megbízható elvégzését. Kóros elváltozásokat, amelyek a hibás mintavétel, vagy valamilyen szubklinikai fertőzés nyomán alakulhattak volna ki, egyik szövettani metszet esetén sem tapasztaltam.

A mérések során a duodenumból, jejunumból és ileumból származó metszeteken a bélbolyhok hosszának mérését végeztem el, a caecumból származókból pedig a nyálkahártyarendők



1. ábra: Egészséges nyulak hematoxin-eozinal festett bél metszeti és a rajtuk végzett mérések. A: Duodenum B: Jejunum C: Ileum D: Caecum



2. ábra: A három különböző nyersrost tartalmú takarmányon tartott egészséges nyúl bélboly hosszairól és vakbél redőiről készült boxplotok (Mayer András publikálatlan eredményei) A: Duodenum B: Jejunum C: Ileum D: Caecum

nagyságát. A 30 darab egészséges nyútból származó szövettani metszeten összesen 2861 mérést végeztem el. A duodenumból 620 darab, jejunumból 731 darab, ileumból 710 darab bélboly hosszát mértem meg. A vakbélmetsetek esetén 800 darab mérésre került sor. Metszetenként legalább 10 mérést végeztem, de ahol a minőség azt lehetővé tette, ennél többre is sor került. Az 1. ábrán láthatók képek a négy bélszakaszból készült metszetekről.

A duodenum esetén a 3 csoport 600 mért értékének adatai alapján szignifikáns különbség volt megállapítható azok hossza és az eltérő takarmányozás között. A 19%-os rosttartalmú takarmányon tartott csoport bélbolyhainak átlagos hossza szignifikánsan elmaradt a másik két csoporttól. Ennek a két csoportnak az adatait egymással is összevetve a mért átlaghosszúságok közel megegyezőek voltak. A jejunumnak 710 mért adatát vizsgálva szintén szignifikáns különbség volt felismerhető a csoportok között. A bélbolyhok hossza a 17%-os nyersrosttartalmú takarmánnyal etetett nyulak esetén volt a legnagyobb, a legrövidebbek pedig itt is a 19%-os rosttartalom esetén voltak megfigyelhetők. A 21%-os rosttartalomnál a

bélbolyhok hossza a 17%-os csoportnál jelentősen kisebb volt, míg a 19%-os csoportnál pedig szignifikánsan nagyobb. Az ileumnak 690 mért adatát összevetve, szintén összefüggést lehetett megállapítani a mért adatok és az eltérő rosttartalom között. Az ileumban megfigyelt változások hasonlóak voltak a jejunumban is leírtakhoz, a 19%-os csoport átlagos hossza elmaradt a másik kettőtől. A 17% és 21%-os csoport bélbolyhainak átlagos hossza között viszont nem volt szignifikáns különbség kimutatható. A mért vakbélredő-hosszok 770 adatát megvizsgálva itt lehetett a legkisebb változást tapasztalni az eltérő csoportok között, de ez itt is szignifikáns eltérést mutatott 95%-os konfidencia intervallum mellett. A legkisebb rosttartalmú takarmányon tartott csoportnál mért hosszúságok elmaradtak a két magasabb rosttartamú csoporttal szemben. Az imént említett két csoportnak az átlagai viszont egyezést mutattak: nem volt köztük szignifikáns eltérés. A 2. ábrán az eltérő rosttartalom hatását ábrázoló boxplotok láthatók.

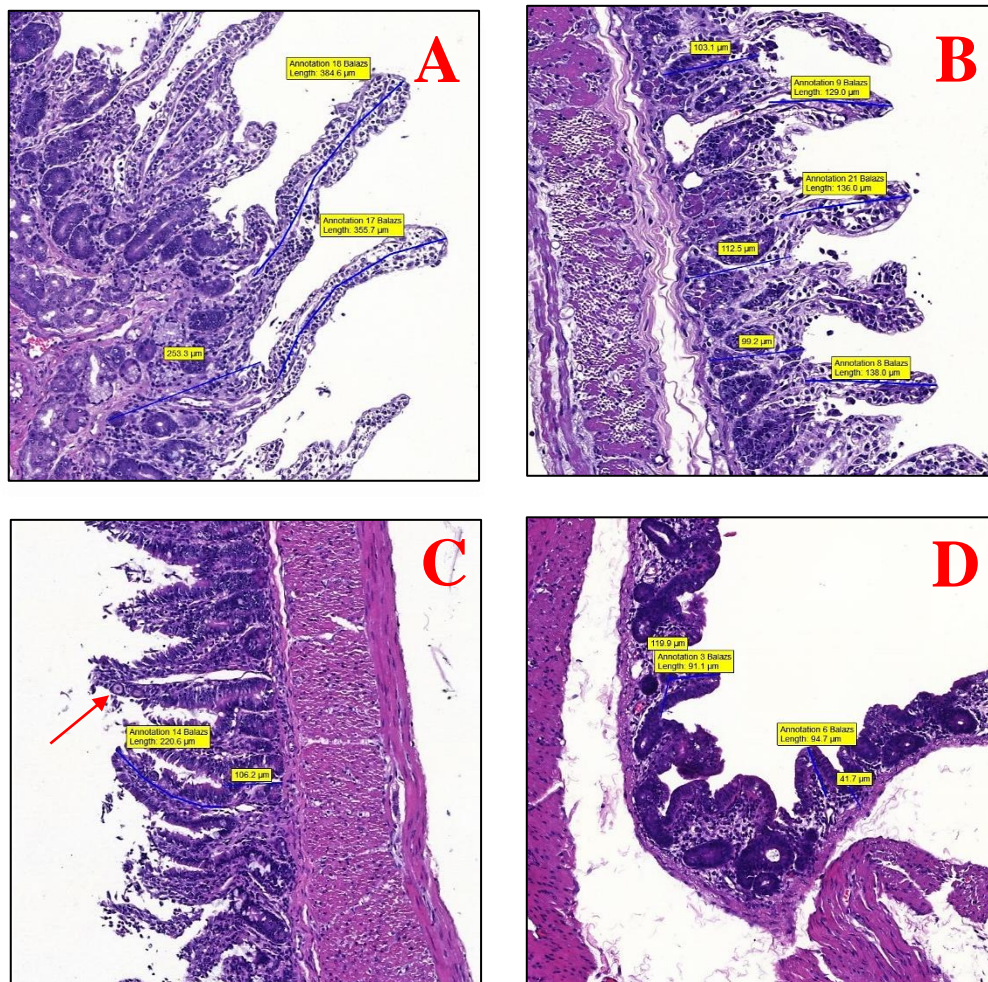
A jejunumban látott elváltozásokhoz hasonló megfigyeléseket írtak le egy tanulmányban, ahol a hízónyulákat három eltérő NDF-tartalmú takarmánnyal etettek. Azt figyelték meg, hogy a jejunum bélbolyhainak hossza csökkent az NDF-tartalom növekedésének hatására. [43] Ezen vizsgálat során is tapasztalható volt a jejunum hosszának csökkenése az emelt nyersrosttartalmú takarmányok esetén. Itt fontos kitérni arra, hogy a nyersrosttartalom növekedése mellett az NDF tartalma is emelkedett: a takarmányok növekvő sorrendjében 38%, 39%, 40% volt az értékük. [Mayer András publikálatlan eredményei] Azonban esetünkben a középső, azaz a 19%-os nyersrosttartalmú takarmánnyal etetett csoportnál csökkent a legnagyobb mértékben a jejunum hossza. Ebben a változásban szerepe lehet annak, hogy a rosttartalom csökkenése miatt a vékonybélből történő abszorpció szerepe fokozódik, mivel a vakbélben zajló fermentáció mértéke csökkenni fog a kevesebb elfogyasztott rost hatására. Ezért elképzelhető, hogy a vakbélfermentáció mértékének csökkenéséből adódó energiaveszteség kompenzálása végett a vékonybél szerkezete megváltozik annak érdekében, hogy hatékonyabbá váljon az itt zajló emésztés és a tápanyagok felszívása. Ennek egyik velejáró változása lehet a bélbolyhok hosszának növekedése is, hiszen ez a felszívó felület nagyságát nagymértékben növelni képes. A nyálkahártyában bekövetkező változások pontosabb megismerése végett érdemes lenne a kripták hosszát is megmérni, és azok arányát a bélbolyhok hosszával is összevetni.

A vakbélben megfigyelt változásokra is magyarázattal szolgálhatnak a vékonybél esetén leírtak, azzal a különbséggel, hogy az itt megfigyelt morfológiai változások a rostemésztés szerepének növekedése hatására alakulhattak ki. Az itt zajló bakteriális fermentáció mind az illózsírsav-termelés, mind pedig a cektótróf képződés miatt rendkívül fontos szerepet tölt be az állatok

megfelelő energia- és tápanyagellátásának biztosításában. A három eltérő takarmánynak a bélszakaszok morfológiájára gyakorolt hatását még átfogóbban lehetne megismerni, ha ezek hosszát és súlyát egymáshoz is viszonyítanánk.

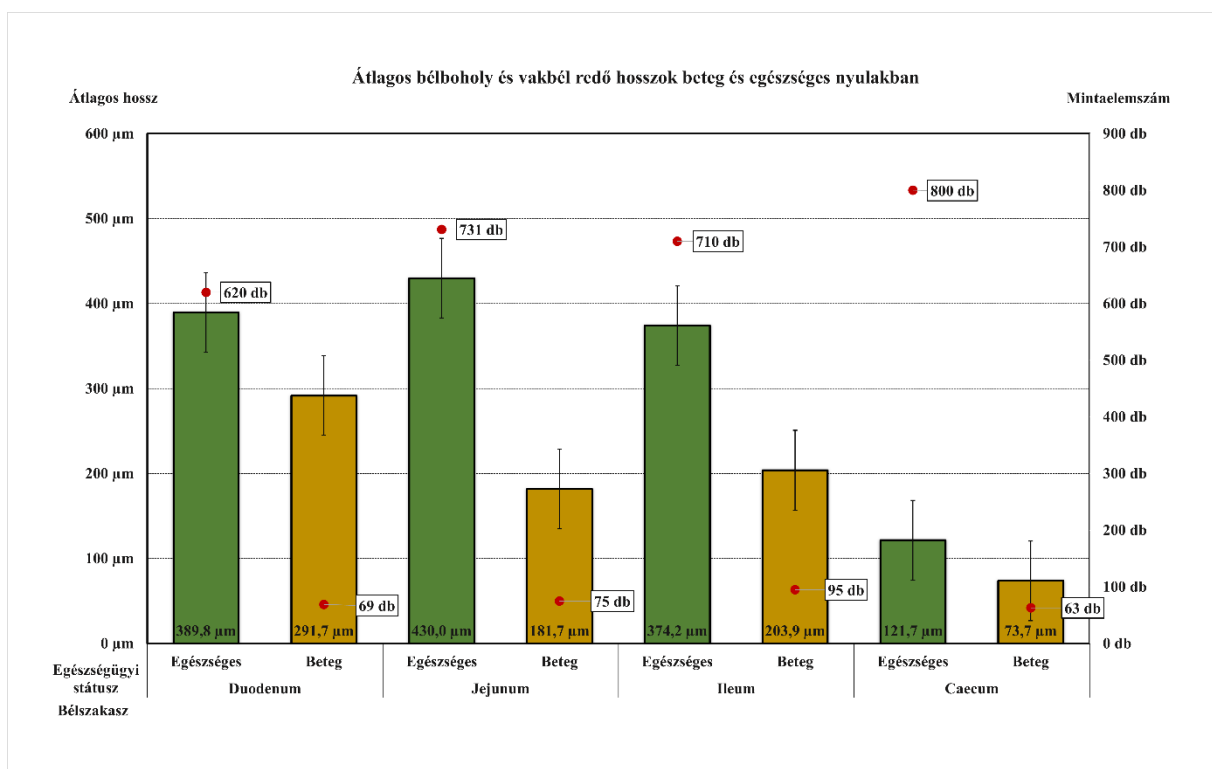
5.3. Bélbolyhok vizsgálata az ERE kórkép esetén

A ERE-ben szenvedő nyulakból származó szövettani metszeteket megvizsgálva, azok jelentős károsodása volt tapasztalható. A másik csoport mintáival szemben ezek minősége gyengébbnek bizonyult, a szövettani struktúrák kevésbé voltak felismerhetők hozzájuk képest. Összesen 302 darab mérés történt, 69 darab a duodenum, 75 darab a jejunum, 95 darab az ileum és 63 darab a caecum esetén. A 3. ábrán látható képek a beteg állatok 4 vizsgált bélszakaszát mutatják. A különböző bélszakaszokon tapasztalt károsodás a bélbolyhok és vakbélredők hosszának a mérését is megnehezítette, mivel sok esetben súlyosan sérült a nyálkahártya szerkezete, így az



3. ábra: Epizootikus nyúl enetropátiában szenvedő nyulak hematoxilin-eozinal festett bél metszetei és a rajtuk végzett mérések. A: Duodenum, a piros nyíl a schizonta fészket jelöli a bélbolygolyban B: Jejunum C: Ileum D: Caecum

itt található struktúrák integritása is. Feltűnő volt a nagyszámú enterocytának és goblet sejtnak az atrófiája, valamint a visszamaradó sejttörmeléknek a jelenléte. A bélbolyhok atrófiája vagy fúziója eltérő mértékben, de mindegyik vékonybél minta esetén tapasztalható volt. A lamina propria és submucosa lymphocytás infiltrációja is több metszeten felismerhető volt. A metszeten tapasztalt szövettani elváltozások az ERE esetén jellemzőnek mondhatók. Azonban az ERE során gyakran előforduló hiperpláziáját a goblet sejteknek nem tapasztaltam a minták vizsgálata során. A legvalószínűbbnek azt tartom, hogy a bélnyálkahártya jelentős károsodása miatt nem volt felismerhető a vizsgált metszetek esetén. [5, 14, 26, 60] A kóros elváltozások a vékonybél mindhárom szakaszát érintették, a vakbél hámja szintén jelentősen károsodott. Ez lehetetlenné tette a 3 duodenum-, 1 jejunum-, 4 ileum- és 4 vakbél metszet kiértékelését. A kiértékelhető bélszakaszok esetén is kevesebb mérés elvégzésére voltam csak képes, mint az egészséges állatokból származó mintáknál. Az epithelium károsodása mellett sokszor a mélyebb rétegek is érintettek voltak, a lamina propria állománya is több metszet esetén sérült volt.



4. ábra: Oszlopdigram a bélbolyhok és vakbél redők átlagos hosszúságáról és a mintaelemszámokról, különböző egészségügyi státuszú nyulak esetén.

A szövettani metszetek kiértékelése során az állomány parazitafertőzöttségét is sikerült megállapítanom. A 10 állatból 4 nemcsak járványos enteropátiában szenvedett, hanem valamilyen kokcidiózisban is. A jejunum és ileum területén jól láthatók voltak valamely *Eimeria* faj ivaros és ivartalan szaporodási ciklusai. Ezek nagyszámban a bélbolyhok nyálkahártyájában voltak megtalálhatók és felismerhetők. A mucosában zajló szizogonia és gametogonia valószínűleg szerepet tölthetett be a bélnyálkahártya károsodásában a fertőzött állatok esetén – a 3. ábrán az ileumban a schizogonia látható egy bélbolyh mucosájában. Mivel számos faj fertőzheti ezt a két bélszakaszt, ezért a pontos fajt nem tudtam a szövettani képe alapján meghatározni. Valószínű azonban, hogy egy kevésbé patogén fajjal lehetett fertőzve az állomány, mivel vérzéses bélgyulladás jelei nem voltak láthatók a kórbonctani vizsgálat során. Korábbi tanulmányokban a kokcidiózist mint az ERE fő kiváltóját sikeresen kizárták, viszont, mivel számos emésztőszervi tünetet okozhatnak, ezért az ERE lefolyását súlyosbíthatják, felismerését pedig megnehezíthetik. [14, 61]

Az elvégzett mérések kiértékeléséhez készítettem egy oszlopdigramot a két különböző egészségügyi státuszú csoportból, összehasonlítva azok bélbolyhainak és vakbélredőinek az átlagos hosszát, ez a 4. ábrán látható.

A két csoport esetén egyértelmű különbség volt tapasztalható. Az így felmerülő hipotézist, amely szerint ez a betegség hatására alakult ki, statisztikailag is alá kellett támasztani. Első lépésben F-próbát használtam annak eldöntésére, hogy a beteg és az egészséges nyulaknál mért adatok varianciája a különböző bélszakaszok esetén eltérést mutat-e. Az eredményeim alapján a nullhipotézis megdőlt, a beteg és az egészséges állatok méréseinek a szórásnégyzete nem egyezett meg. Ez alapján el tudtam dönteni, hogy melyik T-próbával folytassam az adataim elemzését. A kétmintás nem egyenlő szórás négyzetű T-próba segítségével döntöttem el, hogy statisztikailag igazolható-e, hogy a mért átlagok közötti különbség valóban összefüggésben áll a betegséggel. A T-próba értékei alapján a bélbolyhok méretbeli eltérései statisztikailag szignifikáns összefüggést mutattak a betegséggel, mivel mindegyik bélszakasz esetén a p érték kisebb volt, mint 0,05. A beteg nyulak bélbolyhainak hossza jelentősen kisebb volt, mint az egészséges állatoké. A duodenum bélbolyhainak átlagos hossza az ERE-s állatokban 291,7 μm , a jejunumnak 181,7 μm és az ileumnak pedig 203,9 μm . A bélbolyhok károsodásában a ERE során elszaporodó opportunistá baktériumoknak valószínűleg szerepe lehet. Jellemző az ERE kialakulását követően a *Clostridium*ok relatív abundanciájának jelentős növekedése, valamint több, az ebbe a nemzetségbe tartozó fajnak is ismert toxintermelő hatása. A kór lehetséges kiváltója a *Cl. cuniculi* is több lehetséges toxint kódol, ezeknek szerepe lehet akár a

bélműködés motilitásának leállításában és a bélbolyhok károsodásában is. [22, 39] A tapasztalt elváltozásokban a takarmányfelvétel csökkenésének is szerepe lehetett. A takarmányfelvételben korlátozott növendék nyulak esetén azonban eltérő változásokat figyeltek meg, az ad libitum takarmányt kapó csoporthoz képest a bélbolyhok hosszának növekedése volt jellemző a korlátozást követően. Abból adódóan, hogy a vizsgált állatok egy hízótelepről származtak, a ketrecenkénti takarmányfogyasztásról nem állt rendelkezésre információ, mivel az automata rendszer, amivel a takarmány kiosztása történt, nem tette lehetővé ennek monitorozását. A beteg állatok viselkedése és rossz kondíciója azonban alátámasztotta ezt a felvetést. Lényeges különbség volt, hogy a beteg csoport egyedei 6-7 hetesek voltak, míg az egészséges csoporté 9-10 hetesek, ezért a bélbolyhok hosszában való különbségben nem elhanyagolható tényező az állatok kora, de a jelentős méretbeli különbségre, mint egyedüli magyarázat ez nem állja meg a helyét. [62]

A fertőzött nyulak vakbelének redőit összehasonlítva a másik csoportéval, azok méretében is egyértelműen változás volt tapasztalható: átlagos hosszuk ez esetben is kisebbnek bizonyult. A beteg csoportban az átlagos hossz $73,7\ \mu\text{m}$, a másikban pedig $121,7\ \mu\text{m}$ volt. Az eltérésben itt is szerepe volt a vakbél nyálkahártyáját érintő nagyfokú károsodásnak.

Az egészséges csoport átlagos bélbolyh-hosszai nem mutattak semmilyen kóros eltérést. A duodenum esetén $389,8\ \mu\text{m}$, jejunumnál $430,0\ \mu\text{m}$, az ileumnál $374,2\ \mu\text{m}$ volt az átlagos hosszúságuk. Ezek az értékek eltérnek egy korábbi tanulmányban leírtaktól, azoknál több mint $100\ \mu\text{m}$ -rel kisebbek voltak a mért eredményeim az összes bélszakasz esetén, ebben szerepe lehetett az eltérő takarmánynak, valamint az állatok eltérő életkorának is. Hasonlóság volt azonban, hogy az ileum bélbolyhainak átlagos hossza az általam végzett mérések esetén is a legkisebbnek bizonyultak a három vékonybélszakasz közül. [49]

A megfigyelt elváltozások alapján megállapítható, hogy az ERE a bél nyálkahártyájának a szerkezetére és az itt található bélbolyhoknak a hosszára negatív hatással van. Ennek mértékének alaposabb és precízebb megismeréséhez mindenképpen hozzájárulna a nagyobb mintaelemszám, valamint a szövettani metszeteknek az ilyen téren nagyobb gyakorlattal rendelkező személy általi elvégzése.

5.4. Metagenom DNS-izolálás

A dabasi tesztelepen egy tipikus ERE-tüneteket mutató nyúl került leölésre. Ennek az állatnak a kórbonctani vizsgálata mellett mintavételre is sor került, éspedig a gyomor- és béltartalmából. A leölést követően hamarosan elvégzett mintavétel miatt a mikrobiomot megfelelően reprezentáló mintákat sikerült kinyerni. Összesen 4 mintát dolgoztam fel. A gyomorból vett tartalom közepes mennyiségű, zöld színű és folyékony, a vékonybélből vett tartalom pedig világosbarna és normál konzisztenciájú volt. Ez a két minta a fiziológiástól nem mutatott eltérést. A vakbelet nagy mennyiségű sötétbarna, összeálló béltartalom töltötte ki, ebből került sor mintavételre. A vakbéltartalomtól a vastagbél tartalma élesen elkülönült, azt teljes hosszában szürkésfehér, áttetsző színű nyálka töltötte ki. A mintákból a DNS-izolálás megtörtént, azok a szekvenálásra készen állnak.

6. Összefoglalás

Annak ellenére, hogy az ERE által okozott elhullások száma csökkent a 2000-es évek eleje óta, jelentősége a mai napig sem változott. A számos kutatás ellenére, amelyek a betegséget kiváltó kórokozónak a felderítésére irányultak, azt kétséget kizáró módon továbbra sem sikerült azonosítani. Ezért az ERE által okozott kórképnek a megismerése továbbra is egy fontos feladatot jelent abból a célból, hogy célzott kezelési és megelőzési stratégiákat lehessen kidolgozni vele szemben. Mind a dabasi kísérleti telepen, mind pedig a Debrecen melletti hízótelepen a betegség komoly veszteségeket okozott a növendék állatokban. A fertőzött állatokon megfigyelt klinikai tünetek és a későbbi kórbonctani vizsgálat során tapasztalt elváltozások megegyeztek más tanulmányokban is leírt tüneteivel. A beteg nyulakból származó szövettani minták vizsgálata során az enterocitáknak, goblet sejteknek és bélbolyhoknak az atrófiáját, valamint a bélbolyhok fúzióját tapasztaltam. Az elvégzett mérések az ERE-ben szenvedő állatok mind a négy vizsgált bélszakaszán jelentős eltérést mutattak az egészséges állatokban mért értékekhez képest. A bélbolyhok átlagos hossza az egészséges állatok mintáihoz képest a jejunum és ileum esetén csökkent a legnagyobb mértékben, de a duodenum esetén is szignifikáns különbség volt látható. A vakbélben azok redőinek hosszát megmérve szintén jelentősen csökkent azoknak hossza az egészséges nyulakéhoz képest. A bélszakaszok vizsgálata, valamint az elvégzett mérések alapján megállapítható, hogy az ERE során a nyulak bélnyálkahártyája nagymértékben károsodik, és ez hatással van az itt található nyálkahártya finom szövettani struktúrájára, amit a bélbolyhok hosszának és a vakbél redőinek változása is tükröz. Az eredmények elbírálásában azonban fontos szempont még, hogy a minták levételekor nem rendelkeztem ilyen téren gyakorlattal, ezért a minták gyengébb minősége és nagyfokú károsodásában ennek is szerepe lehetett, valamint az ezekből elvégzett mérések száma is elmaradt az egészséges állatokból származóktól. A két csoport esetén még lényeges különbség volt az állatok eltérő kora, mivel az egészségesek körülbelül 3 héttel idősebbek voltak a mintavétel idején, ezért azok bélbolyh-hosszuk a korukból adódóan is fejlettebbek voltak, mint a másik csoporté. Az egészséges nyulak adatait egymással is összevetve, a takarmány rosttalmának a bélbolyhok és a vakbél szerkezetére való szerepe is bizonyításra került. Az ERE által okozott makroszkópos és mikroszkópos elváltozások jelentősége ellenére a legnagyobb kihívást a háttérben álló kórokozó megtalálása jelenti a mai napig. A rendelkezésre álló újabb metagenom kutatási módszerek és az ilyen téren nyert egyre nagyobb mennyiségű adatmennyiség az, ami az eredményességet a közeljövőben előremozgathatja.

Irodalomjegyzék

1. Trocino A, Cotozzolo E, Zomeño C, Petracci M, Xiccato G, Castellini C (2019) Rabbit production and science: the world and Italian scenarios from 1998 to 2018. *Italian Journal of Animal Science* 18:1361–1371. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1662739>
2. Csipkés M (2021) A nyúlhúspiac és az egy főre jutó nyúlhúsfogyasztás alakulása Magyarországon. *Gazdálkodás* 65:413–429. https://doi.org/10.53079/GAZDALKODAS.65.5.t.pp_413-429
3. Nielsen S, Alvarez J, Bicout D, Calistri P, Depner K, Drewe J, Garin-Bastuji B, Gonzales J, Gortázar C, Michel V, Miranda MA, Roberts H, Sihvonon L, Spooler HAM, Stáhl K, Velarde A, Viltrop A, Buijs S, Edwards S, Winckler C (2020) Health and welfare of rabbits farmed in different production systems. *EFSA Journal* 18:. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5944>
4. Espinosa J, Ferreras MC, Benavides J, Cuesta N, Pérez C, García Iglesias MJ, García Marín JF, Pérez V (2020) Causes of Mortality and Disease in Rabbits and Hares: A Retrospective Study. *Animals* 10:158. <https://doi.org/10.3390/ani10010158>
5. Puon Peláez X-H, Mcewan N, Olvera-Ramírez A (2018) Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE): A Review of Current Knowledge. *European Scientific Journal ESJ* 14:. <https://doi.org/10.19044/esj.2018.v14n36p137>
6. Thomas T, Gilbert J, Meyer F (2012) Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp* 2:3. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>
7. (2021) Új piac nyílt meg a magyar nyúlhús számára: nagy lehetőség előtt állnak a termelők. In: Agrárszektor. <https://www.agrarszektor.hu/elelmiszer/20210716/uj-piac-nyilt-meg-a-magyar-nyulhus-szamara-nagy-lehetoseg-elott-allnak-a-termelok-31320>. Accessed 25 Sep 2023
8. Szendrő ZS, Matics ZS, Gerencsér ZS, Radnai I, Hullár I (2010) Nyúltenyésztés, Kaposvári Egyetem <http://dtk.tankonyvtar.hu/xmlui/handle/123456789/13021>
9. Bodnár K (2018) A NYÚLHÚS TERMÉKPÁLYA HAZAI KIHÍVÁSAI In A Logisztika a Dél-Alföldön. Logisztika napja 2018
10. Dalle Zotte A, Szendrő Z (2011) A nyúlhús, mint funkcionális élelmiszer. *Baromfi Ágazat* 4:84–88

11. Szendrő K (2015) A világ és Magyarország nyúlhústermelése és külkereskedelme. GAZDÁLKODÁS: Scientific Journal on Agricultural Economics. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.208275>
12. Mondin C, Trestini S, Trocino A, Di Martino G (2021) The Economics of Rabbit Farming: A Pilot Study on the Impact of Different Housing Systems. *Animals* 11:3040. <https://doi.org/10.3390/ani11113040>
13. Falcão-e-Cunha L., Castro-Solla L., Maertens L., Marounek M., Pinheiro V., Freire J., Mour (2010) Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review. *World rabbit sci* 15:127–140. <https://doi.org/10.4995/wrs.2007.597>
14. Licois D, Wyers M, Coudert P (2005) Epizootic Rabbit Enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet Res* 36:601–613. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005021>
15. Licois, D., Vautherot, J.F., Coudert, P., & Dambrine, G. (1998). Epizootic Enterocolitis of the Rabbit: Review of Current Research. (Round Table) *World Rabbit Science* 6,349-353. <https://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2000-Valencia/Papers/Pathology/P00TR-Licois.pdf>
16. Dip R, Nemet Z, Schiessl B, Klein U, Strehlau G (2015) Efficacy and tolerability of early administration of valnemulin hydrochloride premix on epizootic rabbit enteropathy. *The Veterinary Journal* 204:309–314. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.12.036>
17. de Rochambeau H, Licois D, Gidenne T, Verdelhan S, Coudert P, Elsen JM (2006) Genetic variability of the resistance for three types of enteropathy in the growing rabbit. *Livestock Science* 101:110–115. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.019>
18. Maertens L, Cornez B, Vereecken M, Oye S (2010) Efficacy study of soluble bacitracin (Bacivet S(R)) in a chronically infected epizootic rabbit enteropathy environment. *World Rabbit Science* 13:. <https://doi.org/10.4995/wrs.2005.520>
19. Xiccato G, Trocino A, Carraro L, Fragkiadakis M, Majolini D (2008) Digestible fibre to starch ratio and antibiotic treatment time in growing rabbits affected by epizootic rabbit enteropathy. *Proceedings 9th World Rabbit Congress* 847–851
20. Abecia L, Fondevila M, Balcells J, Edwards JE, Newbold CJ, McEwan NR (2007) Effect of antibiotics on the bacterial population of the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters* 272:144–153. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00746.x>
21. Smith MV (2013) *Textbook of Rabbit Medicine*. Elsevier Health Sciences

22. Marlier D, dewree R, Lassence C, Licois D, Mainil J, Coudert P, Meulemans L, Ducatelle R, Vindevogel H (2006) Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: Isolation and attempts to reproduce the syndrome. *Veterinary journal* (London, England : 1997) 172:493–500. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.07.011>
23. Haligur M, Ozmen O, Demir N (2009) Pathological and Ultrastructural Studies on Mucoid Enteropathy in New Zealand Rabbits. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18:224–228. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2009.06.006>
24. Jobert JL, Eono F, Legall-Recule G, Guittet M (2001) Reproduction expérimentale du syndrome d'Entérocolite Epizootique du Lapin: étude anatomo-clinique et hématologique. pp 135–138
25. Allen AL, Bryant UK (2009) “What’s up, Doc?” *Can Vet J* 50:1297–1299
26. Puón-Peláez X-HD, McEwan NR, Gómez-Soto JG, Álvarez-Martínez RC, Olvera-Ramírez AM (2020) Metataxonomic and Histopathological Study of Rabbit Epizootic Enteropathy in Mexico. *Animals* 10:936. <https://doi.org/10.3390/ani10060936>
27. Jin DX, Zou HW, Liu SQ, Wang LZ, Xue B, Wu D, Tian G, Cai J, Yan TH, Wang ZS, Peng QH (2018) The underlying microbial mechanism of epizootic rabbit enteropathy triggered by a low fiber diet. *Sci Rep* 8:12489. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30178-2>
28. Bäuerl C, Collado MC, Zúñiga M, Blas E, Pérez Martínez G (2014) Changes in Cecal Microbiota and Mucosal Gene Expression Revealed New Aspects of Epizootic Rabbit Enteropathy. *PLoS One* 9:e105707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105707>
29. Szalo IM, Lassence C, Licois D, Coudert P, Poulipoulis A, Vindevogel H, Marlier D (2007) Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions. *The Veterinary Journal* 173:652–657. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.12.013>
30. Harcourt-Brown F (2003) *Textbook of rabbit medicine*, reprint. Butterworth-Heinemann, Oxford
31. Padilha, M. T. S., Licois, D. & Coudert, P. (1996) Frequency of carriage and enumeration of *Escherichia coli* in caecal content of 15 to 49-dayold rabbits. In: *Proceeding of the 6th World Rabbit Congress*, Toulouse, France pp, 99–102
32. Baker DG (1998) Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research. *Clin Microbiol Rev* 11:231–266

33. Zhu Y, Wang C, Li F (2015) Impact of dietary fiber/starch ratio in shaping caecal microbiota in rabbits. *Can J Microbiol* 61:771–784. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0201>
34. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM (2004) *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1469–1476. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02873-0>
35. Ganesh BP, Klopfeisch R, Loh G, Blaut M (2013) Commensal *Akkermansia muciniphila* Exacerbates Gut Inflammation in *Salmonella* Typhimurium-Infected Gnotobiotic Mice. *PLoS One* 8:e74963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074963>
36. Lührs H, Gerke T, Müller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberger F, Scheppach W, Menzel T (2002) Butyrate Inhibits NF- κ B Activation in Lamina Propria Macrophages of Patients with Ulcerative Colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1080/003655202317316105>
37. Zhou X, Li Y, Liu S, Yang Q, Su X, Zhou L, Tang M, Fu R, Li J, Huang Q (2013) Ultra-deep sequencing enables high-fidelity recovery of biodiversity for bulk arthropod samples without PCR amplification. *Gigascience* 2:4. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-2-4>
38. Looft T, Levine UY, Stanton TB (2013) *Cloacibacillus porcorum* sp. nov., a mucin-degrading bacterium from the swine intestinal tract and emended description of the genus *Cloacibacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:1960–1966. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.044719-0>
39. Djukovic A, Garcia-Garcera M, Martínez-Paredes E, Isaac S, Artacho A, Martínez J, Ubeda C (2018) Gut colonization by a novel *Clostridium* species is associated with the onset of epizootic rabbit enteropathy. *Veterinary Research* 49:123. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0617-8>
40. Michelland R, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Monteils V, Fortun-Lamothe L (2008) Characterization of bacterial communities in caecum, hard and soft feces of rabbit using 16S rRNA genes capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP).
41. Puón-Peláez X-HD, McEwan NR, Álvarez-Martínez RC, Mariscal-Landín G, Nava-Morales GM, Mosqueda J, Olvera-Ramírez AM (2022) Effect of Feeding Insoluble Fiber on the Microbiota and Metabolites of the Caecum and Feces of Rabbits

- Recovering from Epizootic Rabbit Enteropathy Relative to Non-Infected Rabbits. *Pathogens* 11:571. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050571>
42. Fariás-Kovac C, Nicodemus N, Delgado R, Ocasio-Vega C, Noboa T, Abdelrasoul RA-S, Carabaño R, García J (2020) Effect of Dietary Insoluble and Soluble Fibre on Growth Performance, Digestibility, and Nitrogen, Energy, and Mineral Retention Efficiency in Growing Rabbits. *Animals* 10:1346. <https://doi.org/10.3390/ani10081346>
43. Álvarez JL, Marguenda I, Rebollar PG, Carabaño R, Blas CD, Corujo A, Ruiz AIG (2007) Effects of type and level of fibre on digestive physiology and performance in reproducing and growing rabbits. *World Rabbit Science* 15:09–17. <https://doi.org/10.4995/wrs.2007.610>
44. Németh Z, Albert E, Dán Á, Balka G, Szenes Á, Sipos R, Bódizs S, Biksi I (2020) Genomic Analysis of *Staphylococcus aureus* Strains Originating from Hungarian Rabbit Farms Reinforce the Clonal Origin of Various Virulence Types. *Animals (Basel)* 10:1128. <https://doi.org/10.3390/ani10071128>
45. Morton JT, Marotz C, Washburne A, Silverman J, Zaramela LS, Edlund A, Zengler K, Knight R (2019) Establishing microbial composition measurement standards with reference frames. *Nat Commun* 10:2719. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10656-5>
46. Vandeputte D, Kathagen G, D'hoë K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, Wang J, Tito RY, De Commer L, Darzi Y, Vermeire S, Falony G, Raes J (2017) Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature* 551:507–511. <https://doi.org/10.1038/nature24460>
47. Egészségügyi és Élelmiszerbiztonsági Főigazgatóság (Európai Bizottság) (2018) Nyulak kábítása/leölése gazdaságban. Az Európai Unió Kiadóhivatala, LU <https://data.europa.eu/doi/10.2875/297825>
48. Horváth G (2018) A PRRSV kimutatása RNS alapú in situ hibridizációval. In: Tudományos Diákköri Konferencia, 2018.11.21., Budapest
49. Ranjan R, Das P (2020) GROSS, HISTOLOGICAL AND MORPHOMETRICAL STUDIES ON THE SMALL INTESTINE OF RABBIT (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*). 59:75–79
50. Ranjan R, Das P (2021) GROSS AND HISTO-MORPHOLOGICAL STUDIES ON THE LARGE INTESTINE OF RABBIT. 60:86–91
51. Berensmeier S (2006) Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:495–504. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0675-0>

52. Luna RA, Fasciano LR, Jones SC, Boyanton BL, Ton TT, Versalovic J (2007) DNA Pyrosequencing-Based Bacterial Pathogen Identification in a Pediatric Hospital Setting. *J Clin Microbiol* 45:2985–2992. <https://doi.org/10.1128/JCM.00630-07>
53. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J (2009) Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clin Chem* 55:856–866. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.107565>
54. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D (2007) A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 69:330–339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
55. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J (2009) Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clin Chem* 55:856–866. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.107565>
56. Poretsky R, Rodriguez-R LM, Luo C, Tsementzi D, Konstantinidis KT (2014) Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics. *PLOS ONE* 9:e93827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093827>
57. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciulek T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu Y-X, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Pruesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hoft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, Caporaso JG (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data

- science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37:852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
58. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP (2016) DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13:581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
59. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, Huttley GA, Gregory Caporaso J (2018) Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* 6:90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>
60. Dewrée R, Meulemans L, Lassence C, Desmecht D, Ducatelle R, Mast J, Licois D, Vindevogel H, Marlier D (2007) Experimentally induced epizootic rabbit enteropathy: clinical, histopathological, ultrastructural, bacteriological and haematological findings. *World Rabbit Science* 15:91–102. <https://doi.org/10.4995/wrs.2007.602>
61. Hornok S (2014) PROTOZOOLÓGIA Egysejtű élősködők, A/3 nyomdaipari és kiadói szolgáltató kft., Budapest
62. MAKOVICKY P, TUMOVA E, VOLEK Z, MAKOVICKY P, VODICKA P (2014) Histological aspects of the small intestine under variable feed restriction: The effects of short and intense restriction on a growing rabbit model. *Exp Ther Med* 8:1623–1627. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1924>

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Szenes Áronnak, aki végtelen türelemmel és jóindulattal válaszolt minden felmerülő kérdésemre és adott folyamatos iránymutatást, ami nélkül szakdolgozatom nem készülhetett volna el. Szeretném megköszönni a segítségét Mayer Andrásnak, aki rendelkezésemre bocsátotta a szakdolgozatomban is felhasznált mintákat és a hozzájuk tartozó lényegi információkat. Köszönöm Dr. Gerencsér Zsoltnak a segítségét az általam végzett mérések statisztikai kiértékelésében. Hálával tartozom Dr. Német Zoltánnak, aki gyakorlati és elméleti tudásának megosztásával segítette munkámat. Külön köszönettel tartozom Juráskó Robertnek, aki a nyúltelepén körbevezetett, és lehetőséget biztosított az állataiból való mintavételhez. Köszönöm a segítségét Dr. Horváth Dávid Gézának, aki megosztotta velem szövettani ismereteit és a minták kiértékelésében segítségemre volt. Köszönöm továbbá Dénes Lillának és Igriczi Barbarának a DNS-izolálásban való segítségét. A 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2020-00174 számú projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a 2020-1.1.2-PIACI KFI pályázati program finanszírozásában valósult meg.