

Állatorvostudományi Egyetem
Aujeszky Aladár Elméleti Állatorvostudományok Doktori Iskola

**Alacsony patogenitású madárinfluenza vírus kórfejlődésének
vizsgálata baromfiban**

PhD értekezés

Dr. Bóna Márta

2024.

Témavezetők és témabizottsági tagok:

.....

Prof. Dr. Mándoki Míra

Tanszékvezető, egyetemi tanár
Állatorvostudományi Egyetem
Patológiai Tanszék
belső témavezető

.....

Dr. Kiss István PhD

Ceva-Phylaxia Zrt.
Tudományos Támogató Igazgatóság
külső témavezető

Prof. Dr. Rusvai Miklós DSc

nyugalmazott egyetemi tanár
témabizottsági tag

Dr. Thuma Ákos PhD

Kórbontan Osztályvezető
Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
témabizottsági tag

Készült 4 példányban. Ez a sz. példány.

.....

Dr. Bóna Márta

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. ÖSSZEFOGLALÁS	7
2. BEVEZETÉS	11
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	12
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	13
4.1. A H9N2 vírusról	13
4.2. Történeti áttekintés, előfordulás, járványtan	15
4.3. A H9N2 genetikai evolúciója, sokszínűsége	18
4.4. A H9N2 vírusok zoonotikus jelentősége (belső gének).....	20
4.5. Virulenciamarkerek és emlősadaptáltsági markerek jelenléte H9N2 vírusokban	23
4.6. Kórtani, klinikai, patológiai vonatkozások	24
4.7. H9N2 fertőzés társfertőzések jelenlétében	26
4.8. A Közel-Kelet és Észak-Afrika jelentősége a baromfiiparban és a vadmadárvonulásban	27
4.9. Vakcinás védekezés a H9N2 endémiás területeken	28
5. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	31
5.1. Vizsgálati elrendezés.....	31
5.1.1. Különböző földrajzi területekről (Közel-Kelet 1 és 2, Észak-Afrika) származó H9N2 törzsek szöveti tropizmusának és patogenitásának vizsgálata IN&IT ráfertőzés esetén	32
5.1.2. A H9N2 'A' törzs (A/chicken/Middle East/8616/2016) szöveti tropizmusának vizsgálata különböző ráfertőzési módok (intranasal & intratracheal [IN&IT] valamint intravénás) alkalmazásával.....	32
5.1.3. Az 'A' H9N2 vírus törzs szöveti tropizmusának vizsgálata egyidejű IN&IT társfertőzés (IBV) mellett	33
5.2. Klinikai és kórbonctani vizsgálat, mintavételek	33
5.3. Kórszövettan	33
5.4. Immunhisztokémia	34
5.5. PCR.....	38

5.6. Statisztikai értékelés	39
6. EREDMÉNYEK	41
6.1. Általános kórtani ismertető	41
6.1.1. Klinikai tünetek és elhullás	41
6.1.2. Kórbonctan	42
6.1.3. Kórszövettani eredmények	43
6.1.4. Immunhisztokémiai eredmények	46
6.1.5. PCR eredmények.....	49
6.1.6. Különböző diagnosztikai módszerekkel kapott eredmények összehasonlítása	49
6.2 Különböző földrajzi eredetű törzsek kórfejlődésének vizsgálata.....	50
6.2.1. Klinikai tünetek.....	50
6.2.2. Kórbonctan	53
6.2.3. Kórszövettan	53
6.2.4. Immunhisztokémia	55
6.2.5. PCR.....	56
6.3. Különböző ráfertőzési módok hatása a kórfejlődésre	59
6.3.1. Klinikai tünetek.....	59
6.3.2. Kórbonctan	60
6.3.3. Kórszövettan	60
6.3.4. Immunhisztokémia	61
6.3.5. PCR.....	61
6.4. IBV társfertőzés hatása a H9N2 kórfejlődésére	63
6.4.1. Klinikai tünetek.....	63
6.4.2. Kórbonctan	63
6.4.3. Kórszövettan	64
6.4.4. Immunhisztokémia	65
6.4.5. PCR.....	65
6.5. Módszertani újítások.....	67

6.5.1	Immunhisztokémia	67
6.5.2	Statisztika	67
7.	MEGBESZÉLÉS/KÖVETKEZTETÉS.....	68
8.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	72
9.	IRODALOM.....	73
10.	A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK TUDOMÁNYOS KÖZLÉSEI	78
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	79

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- ABC (avidin-biotin complex): avidin-biotin komplex
- AI (avian influenza): madárinfluenza
- AIV (avian influenza virus): madárinfluenza vírus
- ANOVA (analysis of variance): varianciaanalízis
- BALT (bronchus associated lymphoid tissue): bronchus asszociált lymphoid szövet
- CLM (Cumulative Link Model): kummulatív link model
- CR (continuation ratio): continuation ratio (magyar elnevezése nem ismert)
- DPI (day post infection): ráfertőzés utáni nap
- ELISA (enzime-linked immunosorbent assay): enzimhez kapcsolt immunszorbens teszt
- FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció
- H vagy HA: hemagglutinin
- HE: hematoxin-eozin
- HP (highly pathogenic): magas patogenitású
- HPAI (V) (highly pathogenic avian influenza [virus]): magas patogenitású madárinfluenza (vírus)
- IB (V) (infectious bronchitis [virus]): fertőző bronchitis (vírus)
- IH (C): immunhisztokémia
- IN&IT: intranasal és intratracheal ráfertőzési mód
- ISH: in situ hibridizáció
- IV: intravénás ráfertőzési mód
- LP (low pathogenic): alacsony patogenitású
- LPAI (V) (low pathogenic avian influenza [virus]): alacsony patogenitású madárinfluenza (vírus)
- LSD (Least Significant Difference): Fisher-féle egzakt teszt, legkevesbé szignifikáns különbség statisztikai teszt
- N, vagy NA: neuraminidáz
- OIE (World Organisation for Animal Health [korábban: Office International des Épizooties]):
Nemzetközi Állatjárványügyi Hivatal
- OR (odds ratio): esélyhányados
- PCR (polymerase chain reaction): polimeráz láncreakció
- qRRT-PCR (quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reaction): kvantitatív, valós idejű reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
- RNS (RNA): ribonukleinsav
- RRT-PCR (real time reverse transcriptase polymerase chain reaction): valós idejű reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A H9N2 altípusú alacsony patogenitású madárinfluenza-vírus (LPAIV) a baromfi széles körben elterjedt kórokozója, amely az embert is megfertőzheti. Világszerte elterjedt, endémiás a Közel-Keleten, Észak-Afrikában és Ázsiában. A vírusfertőzések jellemzése összetett folyamat, amely klinikai, patológiai és virológiai vizsgálatokat foglal magában.

Tanulmányom célja az volt, hogy megvizsgáljuk: (i) a különböző földrajzi régiókból izolált H9N2 vírusok virulenciáját; (ii) a különböző ráfertőzési módok (intranazális&intratracheális, IN&IT és intravénás, IV) kórfejlődésre gyakorolt hatását és (iii) a fertőző bronchitis vírussal (IBV) való együttes fertőzés lehetséges hatását. Különböző módszereket alkalmaztunk a G1 sublineage-ba tartozó H9N2 törzsek jellemzésére, melyeket Marokkóban, Egyiptomban és Szaúd-Arábiában telepi fertőzésekből izoláltak.

Huszoney napos brojlercsirkéket fertőztünk rá a fenti három H9N2 vírustörzsszel IN&IT-vel, míg az egyik törzs („A” törzs = Szaud-Arábiai = Közel-Kelet 1. törzs) segítségével vizsgáltuk a különböző fertőzési módok (azaz IN&IT vs. IV) hatását, illetve a nefropatogén IBV-vel való együttes fertőzést. A kontrollcsoportot foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) kezeltük ugyanazon a ráfertőzési módon. A madarakat a fertőzést követő 11 napon keresztül (dpi) megfigyeltük, a csoport egy részét az 5. dpi-n – a fertőzés akut fázisában- a másik részét pedig a 11. dpi-n – a fertőzés idült fázisában- extermináltuk és vizsgáltuk. A kórfejlődést a klinikai tünetek, a patológiai és szövettani elváltozások súlyossága, az immunhisztokémiai festéssel (IHC) láthatóvá tett vírusantigén-mennyiség, valamint a vírus RNS szemi-kvantitatív RT-PCR segítségével történő kimutatása alapján értékeltük.

Munkám során az IHC festési eljárást a H9N2 vírusra adaptáltuk, amely lehetővé tette az antigénterhelés egyszerűbb és pontosabb értékelését és pontozását. Az általunk javasolt IHC protokoll legfontosabb jellemzői a következők voltak: (i) a DAB (diamino-benzidin) helyett AEC-t (3-amino-9-etil-karbazol) használtunk kromogénként; és (ii) avidin-biotin komplexek helyett monoklonális elsődleges és peroxidázzal jelölt anti-egér másodlagos ellenanyagokkal indirekt kétlépcsős immunreakcióit használtunk. A madárinfluenza-vírus antigén vörös színreakcióként jelenik meg az érintett sejtek sejtmagjában, de a szervtől függően citoplazmában is azonosítható. A statisztikai elemzéshez egy fejlettebb és kifinomultabb statisztikai módszert, azaz ordinális változókhöz igazított regressziós modelleket alkalmaztunk, amelyet a korábbi influenza-kutatásokban nem használtak.

A kontroll csoportban a vizsgálat során sem klinikai tüneteket, sem patológiai vagy szövettani elváltozásokat nem észleltünk, valamint az IHC- és PCR-vizsgálatok nem mutatták ki az LPAIV-fertőzés jeleit.

Általában légzőszervi tüneteket, azaz szörtyögést, gurgulázást, tüsszögést, zihálást és esetenként különböző súlyossági fokú nehézlégzést figyeltünk meg a legtöbb ráfertőzött madárnál 3-11 dpi között, függetlenül a vírustörzstől, a fertőzés módjától vagy az IBV-vel való társfertőzéstől. A különböző

csoportokban az elhullási arány 0% és 22% között változott, azonban ez a jelentősnek látszó különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak, valószínűleg az alacsony mintaszám miatt.

A ráfertőzött madarak légsővében, légcsákjában és tüdejében enyhe hiperémia és pangás volt megfigyelhető, és néhány esetben fibrines exsudátumot találtunk a bifurkációnál. A légsőben, a tüdőben és a vesében szövettani elváltozásokat figyeltünk meg, míg a lépben, a hasnyálmirigyben és az agyvelőben egyetlen csirke esetében sem találtunk elváltozást.

Az 5. napon a minták 30-50%-ában IHC-vel kimutattuk a vírusantigént a légutakban és a vesében. A 11. napon nem észleltünk IHC-jelet, ami a víruszaporodás leállását jelzi. A különböző H9N2 vírustörzsek között a vírusantigén expressziójában enyhe különbségeket találtunk, de a magas patogenitású madárinfluenzával (HPAI) ellentétben, az agyvelőben és a hasnyálmirigyben nem mutattunk ki vírusantigént.

A vírusürítést PCR segítségével értékeltük az 5. és 11. dpi-n vett oronazális és kloakális tamponokból. Az 5. dpi-n az oronazális úton egy kivételével valamennyi csirke ürítette a vírust, azonban a 11. dpi-n ez jelentősen csökkent, a csoportok között nagy különbségekkel. A törzsek PCR-rel különböző mértékben voltak kimutathatóak a légutakban az 5. és a 11. dpi-n. A vírus RNS csak az 5. dpi-n volt esetenként jelen a vesében és a lépben.

Minden vizsgált H9N2 törzs légúti és húgyúti tropizmust mutatott, függetlenül a ráfertőzés módjától vagy az IBV-vel való társfertőzéstől. A három izolátum között egyértelmű különbség mutatkozott: az Észak-Afrikából származó törzs szignifikánsan virulensebbnek bizonyult, mint az egyiptomi és a szaúd-arábiai, amelyek nem mutattak lényeges különbséget. A különböző diagnosztikai módszerek összehasonlítása szignifikáns, de mérsékelt korrelációt mutatott, ellentmondásos eredmények nélkül. Az általunk módosított IHC-t a H9N2 LPAIV fertőzések jellemzésére szolgáló módszertan informatív, látványos, jól bírálható eszköze, az újonnan alkalmazott statisztikai elemzést pedig a finomabb különbségek kvantitatív értékelését lehetővé tevő módszernek tekinthetjük.

SUMMARY

The H9N2 subtype of low-pathogenic avian influenza viruses (LPAIV) is a widespread pathogen of poultry that can also infect humans. It is apparent worldwide and is endemic in the Middle East, North Africa and Asia. The characterization of viral infections is a complex process, involving clinical, pathological, and virological investigations.

The aim of my study was to investigate the virulence of H9N2 viruses (i) isolated from different geographical regions (Middle East and North Africa); (ii) the potential effect of different inoculation routes (intranasal&intratracheal, IN&IT and intravenous, IV) and (iii) the potential effect of co-infection with Infectious Bronchitis Virus (IBV). Different methods were used for characterization of the H9N2 strains, which belonged to the G1 sublineage and were recently isolated from field infections in Morocco, Egypt and Saudi-Arabia.

Twenty-one-day-old broiler chickens were inoculated with the above mentioned three different strains of H9N2 virus by IN&IT, while one of those strains („A” strain=Saud-Arabian = Middle-East 1. strain) was used to investigate the effect of different infection routes (i.e, IN&IT vs IV) or co-infected with nephropathogenic IBV. The control group received phosphate-buffered saline (PBS) by the same route of application. The birds were observed daily for 11 days post infection (dpi), some of them (in each group) were euthanised on dpi 5 to examine the acute phase of infection and the rest were exterminated on dpi 11. Pathogenicity was evaluated based on clinical signs, gross pathological and histopathological lesions, viral antigen load assessed by immunohistochemistry staining (IHC), and semi-quantitative detection of the genetic material by real-time PCR.

During my work, we adapted the IHC technique to the H9N2 virus for detection of viral antigen in different tissues, which allowed an easier and more precise assessment and scoring of the antigen load. The key features of our suggested IHC protocol were: (i) DAB (diamino-benzidine) was substituted with AEC (3-amino-9-ethyl carbazole) as chromogen; and (ii) indirect two-step immune reactions of monoclonal primary and peroxidase-labeled anti-mouse secondary antibodies were used instead of avidin–biotin complexes. Avian influenza virus antigen appears as a red precipitate in the nuclei of affected cells but can also be identified in the cytoplasm. We applied a more advanced and sophisticated statistical method i.e regression models adapted to ordinal variables for statistical analysis, which is not used in previous influenza research.

Neither clinical symptoms were observed, nor were gross pathological or histopathological lesions demonstrated, as well as IHC and PCR tests failed to detect any trace of the LPAIV infection in the control group during the study.

Generally, respiratory signs, i.e., sniffing, gurgling, sneezing, wheezing, and, occasionally, dyspnea in different grades of severity were observed in most of the challenged birds between 3-11 dpi, regardless of the challenge virus strain or route of infection or co-infection with IBV. Mortality rate varied between 0% and 22% in the different groups, however, this visually remarkable difference proved statistically non-significant, probably due to the low sample size.

Mild hyperemia and congestion were observed in the trachea, air sac, and lungs of the challenged birds, and fibrinous exudate was found at the bifurcation in a few cases. Histopathological lesions were observed in the trachea, lung, and kidney, while no alteration was found in the spleen, pancreas, and brain of any chicken.

On day 5, viral antigen was detected by IHC in the respiratory tract and kidney in 30–50% of the samples. On day 11, no IHC signal was observed, indicating the lack of viral replication. Slight differences in viral antigen expression were found between the different H9N2 virus strains, but, in contrast to highly pathogenic avian influenza (HPAI), no viral antigen was detected in the brain and pancreas.

Virus excretion was evaluated by PCR, from oronasal and cloacal swabs taken on dpi 5 and 11. All but one chicken shed the challenge virus via oronasal swab on dpi 5, however, it was markedly decreased

on dpi 11 with a high difference between the groups. The challenge strains could be detected by PCR in the respiratory tract at different levels on dpi 5 and 11. The virus genome was occasionally present in the kidney and spleen on dpi 5 only.

It was demonstrated that all H9N2 strains tested exhibited respiratory and urinary tract tropism irrespective of the route of inoculation or co-infection with IBV. Thus, our modified IHC can be considered as an informative, visual addition to the toolkit for the characterization of H9N2 LPAIV infections. A clear difference was demonstrated among the three isolates: the North-African strain proved to be significantly more virulent than those of the Egyptian and Saudi Arabian ones, which showed no remarkable difference. Comparing the different diagnostic methods, a significant but moderate correlation was demonstrated without controversial results.

2. BEVEZETÉS

„Nobody ever figures out what life is all about, and it doesn't matter.

Explore the world. Nearly everything is really interesting if you go into it deeply enough. „

Richard P. Feynman

Az elmúlt években a magas patogenitású madárinfluenza vírus (HPAIV) rendszeres jelenléte nehéz helyzetbe sodorta a világ, így Magyarország baromfi ágazatát is. Egyre többet tudunk ezekről a vírusokról; kiterjedt monitorozások és molekuláris epidemiológiai vizsgálatok révén egyre jobban megismerjük, hogyan terjednek kontinensről kontinensre, hogyan váltanak gazdafajt, hogyan erősödik a megbetegítő képességük, hogyan terjednek vadmadárról baromfira. Korábban a vadmadarak által behurcolt HPAIV-k (H5 és H7) az alacsony patogenitású madárinfluenza vírusokból (LPAIV) mutáció révén váltak magas patogenitásúvá baromfiban. A vadmadarakban nagy genetikai változatosságot mutató LPAIV-k között zajló génátrendeződés jelentősen hozzájárult a baromfiállományokban felbukkanó vírusok sokféleségéhez. Éppen ezért az LPAIV-k is a tudományos kutatás középpontjába kerültek az elmúlt 20 évben. Megismerésükkel egy lépéssel talán a HPAIV-k előtt járhatunk a védekezésben, megelőzésben.

Megbetegítő képessége alapján a H9N2 altípus az LPAIV-k közé tartozik, így a fertőződés lehet tünetmentes, de enyhe klinikai tünetekkel vagy akár elhullással is végződhet. A H9N2 azért figyelemre méltó altípus, mert jól példázza, hogy anélkül is kialakulhat az emberre átvihető vírus, hogy egy közvetítő emlős fajban, mint a sertés, „megfordulna”. Az AIV fertőzés által okozott humán megbetegedések kisebb részében ugyan, de kimutatható a H9N2 altípus is, jellemzően enyhe légúti tünetekkel jellemezhető esetekben. Az altípus zoonotikus jelentőségét növeli, hogy a halálos kimenetelű humán fertőzéseket előidéző AIV-k esetében (akár H5N1/H5N6, akár H7N9 altípusról legyen szó), az ún. belső gének legalább részben a H9N2 AIV-ből származnak.

A H9N2 fertőzések baromfiban az esetek többségében nem önállóan, hanem egyéb légúti, vagy immunszuppresszív hatású kórokozókkal (pl. csirkék fertőző bronchitis vírusával, metapneumovírusokkal, Mycoplasmákkal, *Ornithobacterium rhinotracheale*-val) társfertőzésben okoznak klinikai tünetekben is megnyilvánuló megbetegedéseket, elhullást, illetve jelentős gazdasági károkat. Figyelemre méltó, hogy a H9N2 altípus patogenitása fokozható bakteriális staphylokináz jelenlétében, amelyet bizonyos *Staphylococcus sp.* baktériumok termelnek, melyek a baromfitelepeken elterjedtek (*Kishida, Sakoda, Eto, Sunaga és Kida, 2004*).

A magas patogenitású H5 AI vírusokkal gyakorlatilag egy időben váltak endemiássá a H9N2 LPAIV-k baromfiban, Kínában, de azóta jelentősen eltérő utat jártak be, köszönhetően alacsony patogenitásuknak és az eltérő monitorozási, járványvédelmi intézkedéseknek. Amíg a HPAIV H5 kártétele nagyon is valós fenyegetettség Európában, addig az LPAIV H9 sporadikusan felbukkanó, nem jelentős, vadmadár adaptált kórokozóként mutatkozott idáig. Ugyanakkor, a 20 éve még nagyon távoli,

ázsiai, csirkéhez adaptálódott H9N2 LPAIV-k mára meghódították a Közel-Keletet és Észak-Afrikát is, új légzőszervi kórokozóként léptek fel a baromfiállományokban.

Összegezve: az e dolgozat tárgyát képező kutatómunka jelentőségét és aktualitását a zoonotikus és állategészségügyi (gazdasági) szempontból egyaránt fontos H9N2 LPAIV-k kórokozóképességének (patogenitás) alaposabb megismerése adja. Ezek az ismeretek hozzájárulnak a hatékony védekezési módszerek (pl. vakcinák) jobb kidolgozásához. Munkám a Ceva-Phylaxia Zrt. laboratóriumaiban folyó H9N2 vírusokkal kapcsolatos kutatások részét képezte.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám átfogó célja a H9N2 altípusú madárinfluenza vírusok kórokozó képességének, az általuk okozott betegség kórfejlődésének, kórtanának alaposabb megismerése volt mesterséges fertőzésnek kitett brojlercsirkében; részben pedig annak vizsgálata, hogy a kórokozó képességben meglevő esetleges különbségek magyarázhatók-e genetikai variabilitással.

A konkrét, részletes célok az alábbiak voltak:

- különböző földrajzi eredetű H9N2 vírustörzsek kórokozó képességének, szöveti megoszlásának, kórfejlődési jellegzetességeinek felmérése, az általuk okozott elváltozások leírása.
- egy adott H9N2 vírustörzssel, különféle ráfertőzési módok esetén az előző pontban megfogalmazott célok vizsgálata.
- egyidejű IBV társfertőzés esetén a H9N2 fertőzés lefolyásának vizsgálata, mivel a gyakorlatban a légzőszervi kórokozók legtöbbször társfertőzésként vannak jelen és a kórokozó panel egyik leggyakoribb szereplője az IBV. A telepi fertőzések során megfigyelték, hogy a hajlamosító tényezők összeadódása miatt a H9N2 fertőzés klinikai lefolyása súlyosabb, mint a standardizált körülmények között csak H9N2 vírussal ráfertőzött madarakban (*Nagy, Mettenleiter és Abdelwhab, 2017*).
- a H9N2 vírus ürítés vizsgálata a kórfejlődés során.
- patológiai módszertan fejlesztése a H9N2 okozta elváltozások pontosabb/mélyebb megismeréséhez.
- több diagnosztikai módszer együttes alkalmazásával nyert eredmények értelmezése: klinikum, kórbonctan, kórszövettan, PCR, immunhisztokémia.
- ráfertőzési modell kialakítása vakcinás védekezés hatékonyságának bírálatához.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. A H9N2 vírusról

Az influenzavírusok az *Orthomyxoviridae* családba tartoznak, negatív polaritású egyszálú RNS genommal rendelkező burkos vírusok. A nukleoprotein (NP) és a mátrix (M1) belső fehérjék antigén szerkezete alapján A, B, C és D típusba sorolhatók. A madárinfluenza vírusok az A típusba tartoznak. A vírusgenom 8 szegmensből áll: a PA, PB1 és PB2 fehérjék a nukleoproteinnel (NP) együtt az ún. ribonukleoprotein komplexet alkotják. A PB1-ről további két, kisebb fehérje is átíródik, a PB1-F2 és az N40. A kapszid belsejében található továbbá nem strukturális fehérjék (NS1 és NS2, utóbbit nuclear export proteinnek [NEP] is nevezik). A kapszid kialakításában a mátrix 1 és 2 fehérjék vesznek részt (M1 és M2, utóbbi egy ioncsatorna a kapszid belseje és a burok külső felszíne között). A burokba ágyazva található az influenzavírusok altípusba sorolásának alapját képező két felszíni glikoprotein, a hemagglutinin (HA) és a neuraminidáz (NA).

Jelenleg 18 HA és 11 NA altípus ismert, melyekből madarakban 16 HA (1-16) és 9 NA (1-9) altípus fordul elő, míg a többi altípust (H17N10 és H18N11) denevérekben írták le (*Verhagen és mtsai.*, 2017).

A hemagglutinin (HA) felelős a vírusnak a sejtek szíalsav receptoraihoz való kapcsolódásáért és a gazda-sejtmembránnal való összeolvadásért. A hemagglutinin ellen neutralizáló ellenanyagok termelődnek a szervezetben, így az fontos szerepet játszik az immunitásban, a klinikai tünetek elleni természetes, vagy vakcinás védelemben. A neuraminidáz (NA) egy receptor bontó enzim (szialidáz), amely az utóvírusok szíalsavról való levágása útján elősegíti azok leválását a gazdasejtről, ezáltal a kórokozó szervezeten belüli terjedését (*Gao és mtsai.*, 2021).

Az influenzavírusnak a fertőzés előtt aktiválásra van szüksége. A vírusaktiválás a HA proteolitikus hasítását jelenti: a HA0 prekursor fehérje HA1-re és HA2-re hasad, ami a vírus sejtbe jutásához szükséges. Az influenzavírusok között eltérés mutatkozik a hasítóhely aminosav szekvenciájában, ami a befolyásolja a hasításra alkalmas proteázok körét, ezen keresztül a vírus szervtropizmusát. Így a vírus virulenciájának fontos meghatározója a HA hasítási helye (*Klenk, Rott, Orlich és Blödorn*, 1975. 68. o.; *Bosch, Garten, Klenk és Rott*, 1981. 113. o.; *Chen és mtsai.*, 1998; *Tse és Whittaker*, 2015). A HA hasítására alkalmas proteázok előfordulása az alacsony patogenitású AIV esetén, korábbi megfigyelések szerint, az ember és a madarak felső légúti, valamint bélrendszerére korlátozza az influenzafertőzést (*Garten és Klenk*, 1999). Ezzel szemben a magas patogenitású (HP) madárinfluenza vírusok esetén testszerte jelen vannak a hasításra alkalmas proteázok, ezáltal a generalizálódó fertőződés súlyos megbetegedések, elhullások okozója. Jelen ismereteink szerint a HPAIV-k kizárólag a H5 és H7 altípusú vírusok közül kerülnek ki. A HPAIV-k hemagglutininjében minden esetben polibázikus hasítási helyet találunk. Ez a molekuláris marker jól használható a H5 és H7 vírusokon belül a magas virulenciájú patotípus azonosítására. Ezzel szemben a H9N2 esetén mono-, di- vagy tribázikus hasítási hely található. Ellentétben a H5 és H7 vírusokkal, a H9 esetén csupán a hasítási hely polibázikussá történő megváltozása nem elegendő a magas patogenitású fenotípus

kialakításához. A HA hasítási hely megváltozásán túl az összes többi szegment H5N1 eredetű szegmensre cserélése vezetett a HP vírus kialakulásához kísérletes körülmények között (*Gohrbandt és mtsai.*, 2011). Mindez jelzi, hogy a többi szegmensben levő virulencia markerek jelenléte is szükséges a vírus patogenitásának jelentős megváltozásához.

Miután a vírus a gazdasejt felszínéhez kötődik, receptor-mediált endocitózis révén internalizálódik, és az endoszómális kompartmentbe kerül (*Skehel és Wiley*, 2000). Az endoszómális érés során a pH az endoszómális lumenben csökken, ami a HA-t konformációs változásokra készíteti (*Bullough, Hughson, Skehel és Wiley*, 1994). A HA2-ben lévő fúziós peptid közreműködésével az endoszómális és a vírusemembrán összeolvad, ami pórusképződés útján lehetővé teszi, hogy a vírus ribonukleoproteinek (vRNP-k) kiszabaduljanak a citoplazmába.

Mint a legtöbb RNS vírusnak, az influenzavírusoknak is magas a mutációs rátájuk a virális polimeráz működésének sajátosságaiból kifolyólag, ezáltal számottevő és folyamatos változatosságot biztosítva a vírusoknak (genetikai sodródás). A vírus evolúcióját szintén meghatározó másik mechanizmus a reasszortáció (genetikai átrendeződés), melynek során az azonos gazdasejtet fertőző különböző vírusok génszegmensei kicserélődnek, ami újfajta genetikai összetételhez vezet. Ez a jelenség rendre nyomon követhető volt az eddigi pandémiás vírusok kialakulásakor (*Nagy és mtsai.*, 2017).

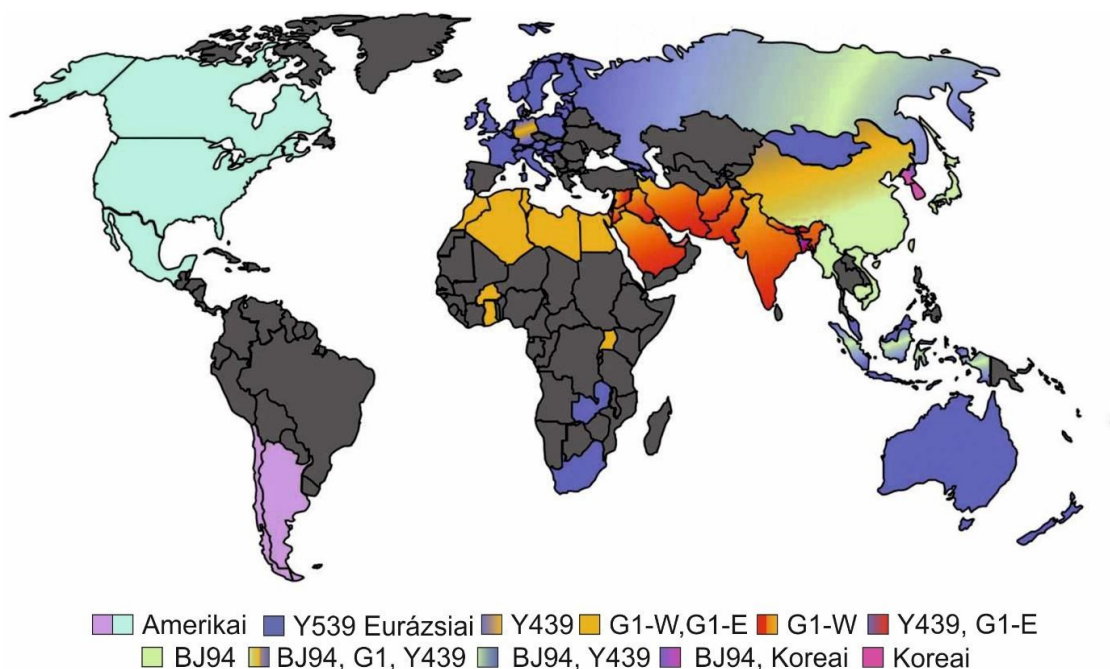
A H9N2 (elsősorban a G1 genotípusú, lásd később) belső génjei megtalálhatóak pl. a H5N1, H5N6, H7N9 és H10N8 altípusú zoonotikus vírusokban is. A reasszortációs folyamatokban a H9N2 nem csupán szegmens donorként vesz részt, hanem recipiensként is. Így számos kínai H9N2 törzs tartalmaz szegmenseket H5N1 vírusokból, továbbá a Pakisztánban és Bangladesben izolált recens járványtörzsek HPAIV H5N1 és HPAIV H7N3 eredetű szegmenseket is tartalmaznak (*Peacock, James, Sealy és Iqbal*, 2019).

A vírust meglehetősen jól feltérképezték molekuláris markerek szempontjából, beleértve a receptor kötődést, vírus stabilitást, a HA-n lévő HA aktiválás markereket, továbbá a polimeráz géneken (PB2, PB1 és PA) lévő emlős adaptációs markereket (*Sun, Belser és Maines*, 2020. 12. o.).

4.2. Történeti áttekintés, előfordulás, járványtan

H9N2 madárinfluenza vírusokat pulykákban izoláltak először, az Egyesült Államokban, 1966-ban (Nagy és mtsai., 2017). Azóta az USA-ban sporadikusan fordult csak elő (főképpen vadmadarak által fertőzött pulykában), 2001 óta baromfiban nem is detektálták, ugyanakkor különösen tengerparti madarak felmérő vizsgálatainak során rendszeresen kimutatható ez az altípus (Arbani, Ducatez, Houadfi és Fellahi, 2022).

Euráziában a legkorábbi feljegyzések 1975-85 közötti időszakban írják le a vírust klinikailag egészséges házi kacsákban, Hong Kongban. A korai vírusok genetikai vizsgálata többszöri behurcolásra utal vadon élő vízimadarakból kacsáállományokba. Lényeges változás következett be a vírus járványtanában a 90-es évek során. 1994-97 között több esetben is kimutatták a H9N2 fertőzést Kína Guangdong tartományában, csirkében, majd a 90-es évek végére a csirkéhez adaptálódott vírus az élőállat piacok közreműködésével Kína csaknem összes tartományába áterjedt (Carnaccini és Perez, 2020). A 2000-es éveket a H9N2 altípus egyre növekvő elterjedése jellemezte, melynek során a vírus fokozatosan haladt nyugat felé, elérve a Közel-Keletet, majd Észak-Afrikát. A 2010-es években nemcsak, hogy elérte Afrika nyugati partvidékét, de elkezdett dél felé terjedni, szub-szaharai országokban (pl. Nigéria, Kenya) is megjelent, (1. ábra) (Lee és mtsai., 2016; Arbani és mtsai., 2022). A folyamatosan bővülő ismeretek lehetővé teszik az eurázsiai altípus előretörésében szerepet játszó mechanizmusok megismerését (Butt, Siddique, Idrees és Tong, 2010; Nagy és mtsai., 2017).



1. ábra: H9 altípusú influenza A vírusok elterjedtsége a világban különböző genetikai ágak (lineage)/alágak (sublineage) szerint, beleértve a vadmadár és a baromfi vírusokat is (hózzávetőleges világtérkép a 2020-ig elérhető jelentések alapján). A H9N2 altípus a természetben a leggyakrabban előforduló kombináció közöttük. A sötétszürke a világ azon területeinek felel meg, ahol a H9 influenza vírusok jelenléte vagy cirkulációja ismeretlen (Carnaccini és Perez, 2020). Megjegyzés: a BJ94 csoport a széles körben Y280-nak nevezett alág alternatív megnevezése, az Y439 megnevezés a vadmadár genetikai csoportra utal.

Az elmúlt alig 2 évtized alatt, nem csupán a panzootikus genetikai vonal robbanásszerű terjedése volt jellemző, de az endémiássá vált területeken is zajlott a vírus mikroevolúciója. A mikroevolúció során számos változás ment végbe a víruson: A korábbi genetikai csoportok eltűntek, újabbak megjelentek, diverzifikálódtak, egyre erősödött a baromfihoz való adaptáció (azaz a baromfihoz adaptálódott csoportokban kifejezett légzőszervi fertőzési utak alakultak ki) (*Peacock és mtsai.*, 2019), fokozódott a vírusírítás és csirkében növekedett a patogenitás, továbbá a víziszárnyasok fertőzésére való képesség kezdett elveszni (*Pu és mtsai.*, 2015).

Pu és mtsai 68 genotípust különítettek el a Kínában 1994-2013 között detektált vírusok sokszínűségének és a genetikai változatok evolúciójának bemutatására (G01-G68) 2015-ben (*Pu és mtsai.*, 2015). A Kínában először 2007-ben kimutatott G57 variáns fokozott fertőzőképességet mutatott csirkékben, majd egyre inkább elterjedt házi baromfiban, vízi szárnyasokban, sőt, sertésekben is, kiszorítva egyéb variánsokat (*Pu és mtsai.*, 2015).

2014-ben Hong Kongban már humán fertőzésből is izolálták (*Peacock és mtsai.*, 2019). Mára a G57 a legelterjedtebb H9N2 AIV genotípus Kínában, köszönhetően a különféle környezeti tényezőkhöz való hatékony adaptációs képességének (*Wang és mtsai.*, 2021). Nem meglepő, hogy az először szintén Kínában leírt H7N9 AIV összes belső génje a G57 H9N2 genotípustól származott.

Ugyancsak alaposan tanulmányozták a közel-keleti és észak-afrikai vírusok genetikai változatosságát, a genetikai csoportok megjelenésének és eltűnésének dinamikáját. Így Irán, Izrael és Egyiptom esetében is azt tapasztalták, hogy rendszeresen olyan újabb genotípusok jelennek meg kiszorítva a régieket, amelyek jobb adaptáltságuk, eltérő antigenitásuk révén evolúciós előnyhöz jutnak (*Fusaro és mtsai.*, 2011. 85. o.; *Adel és mtsai.*, 2022. 14. o.).

Miután a H9 madárinfluenza vírusok hemagglutininjuk alapján egy szerotípusba tartoznak, jelentős szerológiai keresztreakcióra képesek egymás között. Ugyanakkor a nagyfokú genetikai változatosság szerológiai változatosságot is eredményez, ami a vakcinázás hatékonyságára befolyással lehet (*Adel és mtsai.*, 2022).

A madárinfluenza vírusok rezervoárjai a vadon élő vízimadarak. Így elsődlegesen a madárvonulások biztosítják az AIV-k hosszú távú terjedését, így azok megjelenését a háztáji gazdaságokban, egymástól akár nagymértékben elkülönülő földrajzi régiókban is (*Wu és mtsai.*, 2015; *Nagy és mtsai.*, 2017). Ez igaz a H9N2 altípus esetében is azokon a területeken, ahol megjelenése baromfiban csak sporadikus (Európa, Amerika). Az endémiás területeken a vírus tovább hurcolásának már nem a vadmadarak és élőállat piacok, hanem sokkal inkább a tipikus baromfi kórokozó vírusokhoz hasonlóan a baromfi szállítás, járművek, ragályfogó tárgyak és emberek mozgása a fő mozgatórugója (*Arbani és mtsai.*, 2022). A marokkói törzsek elterjedésében is kiemelt szerepe volt az előbbieken felsorolt tényezőknek, továbbá az illegális madárimportnak is (így csempészett H9N2-vel fertőzött sólymok is szerepet játszottak a vírus széthurcolásában (*El Houadfi, Fellahi, Nassik, Guérin és Ducatez*, 2016). Az élőállat piacoknak az endémiás területeken továbbra is jelentős a szerepe a járványtanban, elsődlegesen a különböző madárinfluenza vírusok olvasztótégelyeként szolgálnak.

Ezzel együtt nem szabad figyelmen kívül hagyni a vadmadarak és a házi baromfi között továbbra is fennálló kölcsönös fertőződést. Az endémiás területeken számos vadmadár vonulási útvonal halad keresztül (ld. később). A nem vonuló madarak nagy számban jelen lévő képviselői (galambok, verebek, varjak, íbiszek) folyamatos kontaktust biztosítanak a költöző madarak és a baromfiállományok között. Meg kell továbbá említeni a ragadozó madarak (sólyom, héja) átviteli szerepét is (*Wu és mtsai.*, 2015; *Nagy és mtsai.*, 2017). Amíg Európában eddig pulykában, kacsában a behurcolt vadmadár adaptált törzsek okoztak ritkán fertőzést (*Śmietanka, Bocian, Meissner, Ziętek-Barszcz és Żółkoś*, 2016), addig endemikus területeken több alkalommal mutattak ki már a csirkéhez adaptálódott vírusvonalat vadmadárból (*Larbi és mtsai.*, 2022. 322. o.), ami alapján feltételezhető, hogy a vadmadarak közvetítő szerepe is hozzá fog járulni a házityúkhoz adaptált vírusok nagyobb távolságokra történő terjedéséhez.

Jelenleg világszerte a H9N2 a legszélesebb körben elterjedt LPAIV altípus a baromfiban (*Carnaccini és Perez*, 2020). A vadmadarakon és a házasított madárfajokon túl, sertésekben és emberekben, továbbá lovakban, nyérekben, vadászgöreyekben is kimutatták, de néhány izolátum jól replikálódik kísérletesen fertőzött kutyákban, egerekben, hörcsögökben és patkányokban (*Meng és mtsai.*, 2014; *Wu és mtsai.*, 2015). Emlősök esetében az eddigi vizsgálatok madaraktól történő rendszeres újra fertőződésre utalnak, egyik fajban sem mutattak ki fajon belüli terjedés útján hatékonyan fenntartott fertőzési láncot (*Peacock és mtsai.*, 2019).

A H9N2 vírusok együtt cirkulálnak az endémiás HP H5Nx vírusokkal a Közel-Keleten és Dél-Ázsiában egyaránt, súlyosbítva a gazdasági károkat és állategészségügyi problémákat, továbbá lehetőséget biztosítva újabb, „különleges” genetikai összetételű reassortánsok kialakulására (*Monne és mtsai.*, 2013). Ezeknek a változásoknak a nyomon követése kiemelt jelentőségű a H9N2 vírusok zoonotikus és pandémiás potenciáljának megítélésében, mivel a HPAI vírusoktól származó génszegmensek a virulencia növekedését eredményezhetik (*Gohrbandt és mtsai.*, 2011; *Nagy és mtsai.*, 2017).

Az endemikus területeken a H9 vírusokat zömmel komplex háttérű esetekben írják le. A felmérések és a diagnosztikai esetek kivizsgálásának eredménye alapján a H9N2 AIV fertőzés általában társ-fertőzésekkel együtt fordul elő, mint *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, fertőző bronchitis vírusa (IBV), baromfipestis vírusa (NDV), H5N1 és H5N8 HPAIV, illetve légúti kórképet okozó baktériumok (*Avibacterium paragallinarum*, *Ornithobacterium rhinotracheale*).

4.3. A H9N2 genetikai evolúciója, sokszínűsége

A H9N2 AIV evolúciója meglehetősen változatos eredményezett az elmúlt évtizedekben. Néhány változat eltűnt, mások további átalakulásokon mentek át, illetve dominánssá váltak.

Ellentétben a H5 vírusoknál kialakított egységes nevezéktannal a HA alapján történő kládok, alkládok elkülönítésére és egyértelmű azonosítására, a H9 vírusok esetén többféle csoportosítással lehet találkozni az irodalomban, ami megnehezíti a különböző kutatócsoportok által leírt genetikai csoportok azonosítását. A hemagglutinin alapú tipizálás esetén leírt főbb csoportokat az 1. táblázatban foglaljuk össze a könnyebb követhetőség érdekében. Amiben mindig egyetértés van, az két fő genetikai ág (lineage) elkülönítése: az amerikai és az eurázsiai.

1. táblázat: Madárinfluenza H9 vírusok főbb genetikai csoportjai (HA alapú csoportosítás) (*Peacock és mtsai.*, 2019).

Fő genetikai ág (lineage)	Genetikai alágak (sublineage)	Kisebb genetikai vonalak	Klád rendszerű megnevezés	Előfordulás (baromfiban endemikus csoportok sötétebb háttérrel)
Eurázsiai	G1	G1-W	h9.4.2	Baromfi, Indiától a Közel-Keleten keresztül Észak-Afrika nyugati széléig
		G1-E	h9.4.1	Kisebb jelentőségű baromfi fajok (pl. fűrj), Kelet Ázsia (Kína déli része, Vietnam)
	Y280 (vagy BJ94)	-	h9.3	Baromfi, Kelet-Ázsia (Kína, Vietnam, Kambodzsa, Indonézia, Malajzia)
	Y439	Koreai	h9.2.2	Baromfi, Korea
		Y439 vadmadár	h9.2	Vadmadarak, sporadikusan baromfi, Teljes Eurázsia
Amerikai	Észak-Amerikai	-	h9.1	Vadmadarak, korábban sporadikus megjelenés baromfiban; Észak- és Közép-Amerika
	Dél-Amerikai	-	h9.1.2	Vadmadarak Dél-Amerika

Az eurázsiai ágon belül a hagyományos, leggyakrabban használt nevezéktan prototípus törzsek alapján különít el alágakat (sublineage). A három sublineage a (1) G1-szerű (A/quail/Hong Kong/G1/97 törzs alapján), (2) Y280-szerű (A/duck/Hong Kong/Y280/97 törzs alapján, amely sublineage több publikációban a pár évvel korábbi A/Chicken/Beijing/1/94 törzs alapján BJ94-szerű megnevezéssel jelenik meg), és (3) Y439-szerű/Koreai (A/chicken/Korea/38349-P96323/96 törzsnek megfelelően). Az Y439-szerű törzseken belül gyakran elkülönítik a baromfihoz adaptálódott genetikai csoportot („Koreai”) és a vadmadarakban jelenlévő törzseket („Eurázsiai vadmadár”). Ez a nevezéktan is jelzi, hogy az Y439 sublineage baromfiban csak Koreára lokalizáltan van jelen.

A G1 sublineage a legelterjedtebb, Afrika nyugati partjától a Közel-Keleten keresztül a Távol-Keletig előfordul (*Peacock és mtsai.*, 2019). Ennek megfelelően ez a csoport mutatja a legnagyobb genetikai változatosságot. Több kutatócsoport csak két ágat különít el ezen belül, amely az izolátumok földrajzi eredete szerint „keleti” (G1 Eastern, G1-E), illetve „nyugati” (G1 Western, G1-W) nevet kapta. A „G1-E” csoport egy viszonylag kis területen, Kelet-Ázsiában fordul elő (Dél-Kína, Vietnam, Kambodzsa, 1. ábra), főképpen kisebb jelentőségű baromfi fajokban, mint például fürjek. Ezzel részben átfedő területen vannak jelen az Y280 csoportba tartozó vírustörzsek csirkében. Ázsia déli részét már a „G1-W” csoport uralja Indiától és Nepáltól kezdődően Nyugat felé haladva. A zóna keleti részén még esetenként előfordul Y280 típus behurcolása, de ezek a vírusok nem maradnak fenn tartósan. A Közel-Kelet, Észak-Afrika esetében a baromfiban rendszeresen, endemikusan detektált H9N2 vírusok minden esetben a G1-W csoporthoz tartoznak.

Gyakori a G1-W csoporton belül további kisebb csoportok elkülönítése, melyből csupán a Közel-Keletre és Afrikára irányuló kutatások ismertetésében használt „lineage A” és a „lineage B” elkülönítésére térünk ki. Ez is jó példája annak, hogy a szakirodalom mennyire nem következetes a hierarchia különböző szintjén álló csoportok megnevezésében, hiszen itt a sublineage alatti kategóriákról van szó. Az „A” genetikai ág foglalja magába az 1998 és 2016 között a Közel-Keleten, illetve Észak-Afrikában detektált járványtörzseket, továbbá a közelmúltban jelenlévő, széles körben elterjedt (panzootic) H9N2 AIV törzseket is. A „B” genetikai ág a 1998 és 2007 között Szaud-Arábiában, Iránban és Izraelben kimutatott törzsekből áll.

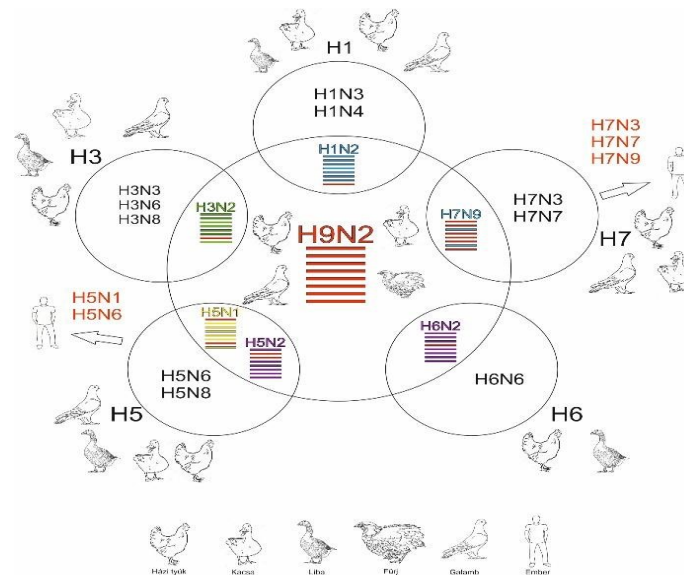
Bár a nevezéktan nagyon szigorú földrajzi elkülönülést sugall a főbb genetikai csoportok elterjedésében, vannak olyan határzónák a genetikai vonalak elterjedési területe között, ahol többféle baromfi eredetű vírus is előfordul (1. ábra). Az amerikai és eurázsiai H9 két fő lineage esetében sem áll már fenn a teljes földrajzi elkülönülés. Érdekes figyelemmel lenni az elmúlt években már kétszer is megfigyelt áthurcolásra, majd ebből kialakuló járványra Észak-Amerikában 2014-ben (*Lee és mtsai.*, 2015. 89. o.), majd 2021 végén (*Caliendo és mtsai.*, 2022). Mindkét esetben a nagy fertőzőképességű H5 2.3.4.4. klád jelent meg Kanadában – 2014-ben a nyugati területeken Alaszka felől, majd 2021-ben keletről az Atlanti-óceán felől-, majd innen terjedt tovább a járvány délre és a kontinens belseje felé. Ugyan H9 járvány még nem alakult ki Amerikában, de tengerparti madarakban már több felmérés során az eurázsiai Y439 vadmadár vonalat mutatták ki Észak-Amerikában (*Jackwood és Stallknecht*, 2007;

Ramey és mtsai., 2015), megerősítve a kontinensek közti áthurcolás lehetőségét vadmadarak segítségével a H9 esetén is.

A genetikai módszerek robbanásszerű fejlődése lehetővé teszi, hogy az összes génszegmens alapján is megvalósulhasson nagyszámú madárinfluenza vírus jellemzése. Ennek megfelelően a genetikai csoportosításban is megjelent az azonos HA típuson belül a különböző reasszortánsok elkülönítése. Ezek a vizsgálatok Kínában feltárták, hogy a H9 vírusok között is aktívan zajlanak génkicserélődési folyamatok, amelyek 1996 és 2015 között 23 különböző szegmens konstellációt eredményeztek (A-W). Ezek többsége csak rövid ideig maradt fenn, ugyanakkor közülük 2 (így az első BJ/94 törzsre jellemző „A” változat, és egy 1998-ban megjelent „H” változat) körülbelül 10 évig rendszeresen kimutatható volt, mindaddig, amíg a dominanciát át nem vette a fentebb már említett G57 genotípusnak megfelelő „S” változat (Gu, Xu, Wang és Liu, 2017). Ez is nagyon szép példája annak, hogy csak bizonyos génszegmensek együtt állása eredményez megfelelő biológiai rátermettséggel rendelkező vírusokat.

4.4. A H9N2 vírusok zoonotikus jelentősége (belső gének)

Az eddig feltárt esetekben minden, az ember halálos kimenetelű fertőződését okozó madárinfluenza vírus (H5N1, H5N6, H7N9, H10N8) belső génjei részben vagy teljesen H9N2 altípusú vírusoktól származtak (2. ábra) (Wu és mtsai., 2015).



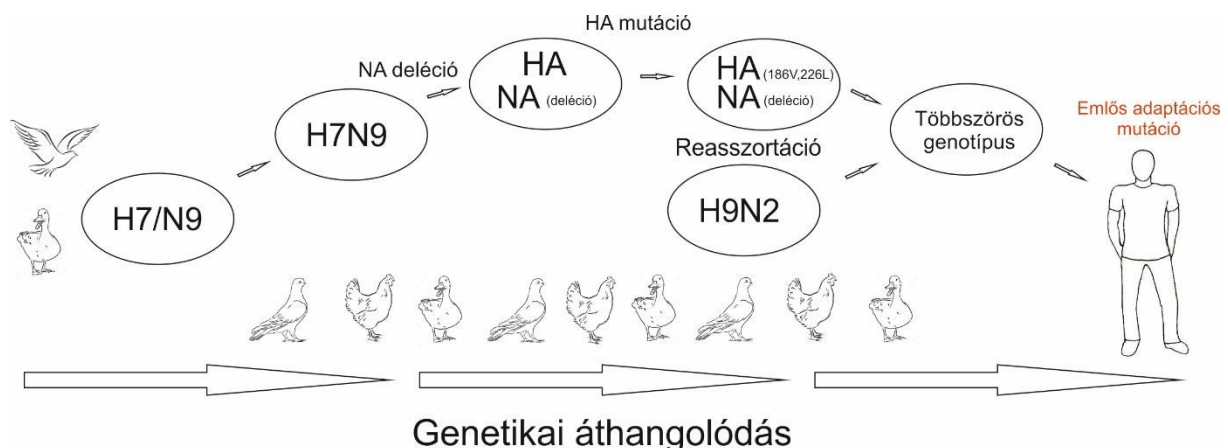
2. ábra: A baromfiban előforduló madárinfluenza vírusok reasszortálódási folyamatának sematikus illusztrációja a kelet-kínai Zheijang tartomány élő baromfi piacairól 2013-14 során izolált vírusok vizsgálata alapján. A H9N2 vírusok belső géneket adtak át más vírusoknak (ld. pirossal jelzett szegmensek). A 8 génszegmens (fentről lefelé) minden vírusban a PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M és NS. Mindegyik szín más-más eredetű szegmenst jelent. Az egyszerűsített sematikus ábra nukleotid szekvencia távolság összehasonlításra és a filogenetikai elemzésen alapul. A nyilak jelzik a madárinfluenza vírus azon detektált altípusait, melyek emberi fertőzést okozhatnak (Wu és mtsai., 2015).

Az először 2013-ban, Kínában izolált H7N9 AIV törzs belső génjei a G57-es H9N2 törzsből származtak. A H7N9 triplán reasszortálódott vírus: a HA és NA gének vándorló madaraktól, illetve kacsáktól származnak, míg a belső gének csirke H9N2 eredetűek. Ezt követően a reasszortáns vírus evolúciója tovább zajlott. Nem csupán mutációk révén változott a vírus, hanem további génátrendeződések következtek be az élőállat piacok közvetítésével. Továbbá, az 5. járványhullám idején egy új mutáns vírus jelent meg, amelyben már a hasítási hely multibázikusává válása révén a korábban alacsony patogenitású vírus magas patogenitásúvá alakult át. A H7N9 vírusnak különböző változatai fertőzték meg sikeresen az embert több hullámban és okoztak nagy számban súlyos, halálos kimenetelű megbetegedést (Liu és mtsai., 2021).

Ezen túlmenően immár tucatnyi, különféle altípusba tartozó (pl. H5N1, H7N7, H10N8) influenza vírusról derült ki, hogy belső génjeik a G57 H9N2 vírusból származnak (Wang és mtsai., 2021).

Összefoglalva kiemelendő, hogy minden madárinfluenza vírus, mely idáig emberben halálos betegséget okozott (H5N1, H5N6, H7N9, H10N8), a belső génszegmenseit részben vagy teljesen a H9N2 vírusoktól szerezte.

Az „A” típusú madárinfluenza-vírusok által okozott emberi fertőzések állandó veszélyt jelentenek, amint azt a H5N1/H5N6, a H7N9, a H9N2 és újabban a H10N3/H10N8 altípusok okozta fertőzések illusztrálják. A H9N2 és egyéb madárinfluenza vírusok „masszív” jelenléte Kínában és a szomszédos régiókban különösen kedvez a madárról emberre történő átvitelnek, továbbá a madarakban újabbnál újabb reasszortánsok kialakulásának. Így a számos, ebben a régióban fellelhető H9N2 genotípus hozzájárul(t) az új, zoonotikus H7N9, H5N6 és H10N8 vírusok megjelenéséhez (2. ábra, 3. ábra).



3. ábra: Az „A” típusú madárinfluenzák (H7N9) feltételezett genetikai áthangolódási mechanizmusa a fajok közötti átvitel során. A folytonos nyíl a genetikai áthangolódás feltételezett sematikus módját jelzi, magában foglalva az aminosav mutációkat és a belső gének reasszortációját a fajok közötti átvitel során. A szimbolikus rajzok a folyamat adott szakaszában szerepet játszó fajokat mutatják (Wang és mtsai., 2014).

Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság 2022. júniustól szeptemberig tartó időszakra vonatkozó összefoglalója alapján a H9N2 AIV a leggyakrabban kimutatott, nem bejelentési kötelezettség alá tartozó altípus baromfiban, Ázsiában, Közel-Keleten és Afrikában. Ezek a régiók 2022. szeptember 9-ig endemikusak maradtak a H9N2 LPAI fertőzésre. 1998 óta és 2022. szeptember 14-ig világszerte 114 igazoltan H9N2 vírus által okozott humán fertőzést jelentettek, köztük két halálesetet. A H9N2 emberi fertőzésekben a 10 év alatti gyerekek voltak érintettek, akiknél enyhe tünetek jelentkeztek. Minden esetben élő vagy leölt baromfit és az ürülékükkel szennyezett környezetet jelentettek (*Adlhoch és mtsai., 2022*).

A madárinfluenza vírusok emberben legtöbbször önkorlátozó légúti fertőzést okoznak, amely immunhiányos betegekben több szerv elégtelenségét okozva akár halálos kimenetelű is lehet (*Nagy és mtsai., 2017*). Elsőként a H5N1 altípus kapcsán tapasztaltak nagyobb számban humán megbetegedéseket: ez idáig 865 megbetegedést regisztrált világszerte a WHO 2003 óta, amiből 456 volt halálos kimenetelű, az esetek halálozási aránya (Case Fatality Rate) 53%. Ezzel ez az altípus vezeti a listát a halálozási arány alapján (2. táblázat). Ugyanakkor érdemes figyelembe venni, hogy 2018-tól kezdődően elenyésző számú, csupán évi 1-2 H5N1 esetet jelentenek. A H7N9 altípushoz köthető megbetegedést 2013-ban írtak le először, majd a legtöbb esetet a 2018-as járványhullámban észlelték. Ázsiában, Közel-Keleten és Afrikában a baromfiállományok széleskörű vakcinázásával a baromfi járványesetek (HP H7N9) és a humán megbetegedések is jelentősen visszaszorultak. A H5N6 alcsoportot először 2014-ben detektálták humán megbetegedés háttérében, az utóbbi időszakban ez az altípus okozza a legtöbb H5Nx humán esetet (*WHO, 2022*).

2. táblázat: Madárinfluenza megbetegedések száma és súlyossága az elhalálozási arány alapján rangsorolva a zoonotikus altípusokat a 2022. szeptemberi állapot alapján (*Adlhoch és mtsai., 2022*).

AIV altípus	Humán megbetegedések száma	Halálos kimenetelű esetek száma (eset-halálozási arány)
H10N8	3	2 (67%)
H5N1	865	456 (53%)
H5N6	81	33 (41%)
H7N9	1568	616 (39%)
H9N2	114	2 (2%)
H3N8	2	0 (0%)
H7N4	1	0 (0%)
H10N3	2	0

A H9N2 vírussal való fertőződés napjainkban is rendszeresen előfordul, alacsony letalitással járó kórforma jellemzi. Érdekes eltérés a többi altípushoz képest, hogy a klinikai tünetekkel járó H9 fertőzéseket főképpen 8 évnél fiatalabb gyermekekben diagnosztizálták (*Carnaccini és Perez, 2020*). A legtöbb esetet eddig Kínából és Hong Kongból jelentették, a többi érintett ország esetén minimális a diagnosztizált H9N2 megbetegedések száma (*Peacock és mtsai., 2019*). A rendelkezésre álló humán eredetű H9N2 szekvenciák elemzése azt mutatta, hogy eddig az Y280 vonal volt a felelős a legtöbb emberi megbetegedésért (*Peacock és mtsai., 2019*). A vírus növekvő elterjedtsége baromfiban valószínűsíti az egyre gyakrabban előforduló eseteket emberben is.

A baromfiágazatban dolgozók szerológiai felmérő vizsgálatainak eredményei arra utalnak, hogy a H9N2 vírusokkal való humán fertőzöttség jóval magasabb, mint amire a bejelentett esetek számából következtetni lehetne (*Qi és mtsai., 2021*), ugyanakkor figyelembe véve a H9N2 vírusok széles elterjedtségét, ez az altípus egyelőre nem jelent magas humán kockázatot a betegség súlyossága alapján. A H9N2-re ennek ellenére úgy tekintünk, mint egy potenciálisan világjárványt okozó madárinfluenza törzscsoportra, mivel a H9N2 vírus előzetes adaptáció nélkül is képes emlősöket, beleértve embert is megfertőzni (*Peacock és mtsai., 2019*). A humán esetekből származó vírusok minden esetben nagyon szoros rokonságot mutatnak az aktuálisan baromfiban jelenlévő törzsekkel, ami alátámasztja a közvetlen baromfi-ember fertőzési utat. A kockázatelemzés másik szempontja, az emberek közti terjedés képessége. Bár a H9N2 vírustörzs esetén vadászgörényekben leírtak légúti transzmissziót is, ugyanakkor nem bizonyított, hogy a H9N2 vírus képes lenne humán-humán terjedésre az eddigi megfigyelések szerint (*Carnaccini és Perez, 2020*). Mindezek alapján a H9N2 vírusok rendszeres monitorozása, emlős adaptáltsági markereinek követése nagy jelentőségű a zoonotikus veszély naprakész megítéléséhez.

4.5. Virulenciamarkerek és emlősadaptáltsági markerek jelenléte H9N2 vírusokban

A H9N2 madárinfluenza vírusokról elmondható, hogy ugyan fenotípusosan még mindig alacsony patogenitású vírusok, de számos magas patogenitású vírusra jellemző mutációt, továbbá számos emlőshöz való alkalmazkodási markert is hordoznak.

Így például az első marokkói baromfi járványesetektől izolált vírusok jellemzésekor összesen 15 emlős adaptációs markert azonosítottak 8 különböző vírusfehérjén (3. táblázat). Ezen felül 10 pozícióban is jelentősebb virulenciára utaló aminosavat figyeltek meg (*El Houadfi és mtsai., 2016*) (3. táblázat). Teljeskörű áttekintést ad a madár, illetve emlős adaptáltsághoz, illetve fokozott virulenciához köthető jellemző genetikai markerekről S. Carnaccini és D. Perez publikációja (*Carnaccini és Perez, 2020*), amelynek részletes ismertetése nem képezi e dolgozat tárgyát.

3. táblázat: A virulencia és a gazda specificitás molekuláris meghatározói marokkói H9N2 izolátumokban (*El Houadfi és mtsai.*, 2016).

Vírusfehérje	A virulencia molekuláris meghatározói	A gazdaspecificitás molekuláris meghatározói (emlősökhöz való alkalmazkodás markerei)
PB2	147 V, 504 V	318 R, 590 S, 661 T
PB1		13 P
PB1-F2	66 N	82 L
PA	127 V, 550 L, 672 L	100 I, 312 R, 409 N
PA-X		
HA ^a		158 N, 183 H, 226 L, 391 K
NP		372 D
NA		
M1		15 I
M2		16 D
NS1	42 S, 189 D	
NS2	31 M, 56 H	

A fent bemutatott marokkói törzsek csupán kiragadott példaként szerepelnek. Mind az ázsiai, mind a közel-keleti régióban találtak számos olyan H9N2 törzset, amely az emlősökhöz való adaptációt megkönnyítő mutációkat tartalmazott. Így például a Hong Kong-i élőállat piacokról gyűjtött H9N2 AIV törzsek a humán H3N2 vírusokhoz hasonló receptor specificitást mutattak (*Matrosovich, Krauss és Webster*, 2001). Mivel egy pandémia kialakulásának a „madár→emlős” receptor preferencia váltás az egyik előfeltétele, az említett megfigyelés okkal kelt aggodalmat az egészségügyi hatóságokban.

4.6. Kórtani, klinikai, patológiai vonatkozások

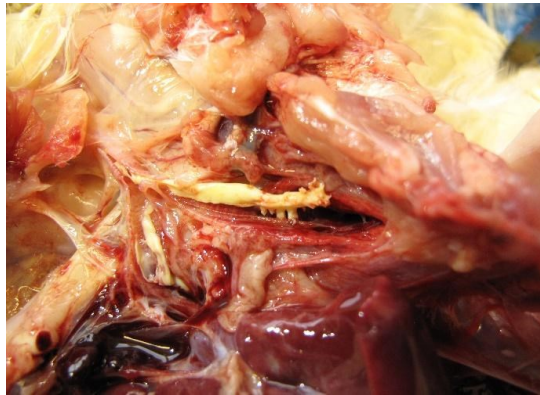
Észak-Afrikában, a Közel-Keleten és Ázsiában jelentős gazdasági veszteségekkel járó elhullást és tojástermelés csökkenést eredményez a H9N2 altípussal való fertőzöttség (*Nagy és mtsai.*, 2017).

Súlyosbító másodlagos kórokozók jelenléte nélkül a H9N2 fertőzés brojlercsirkében általában enyhe légzőszervi tünetekkel jár, de akár klinikailag tünetmentes is lehet. Többnyire gyenge légzési zörej, köthártya-gyulladás, tüsszögés, orrfolyás jelentkezik. Ilyenkor legfeljebb kissé kipirult trachea és enyhén elhomályosult légzsák látható a kórbonctani vizsgálat során (*Nagy és mtsai.*, 2017).

Társkórokozókkal, kedvezőtlen környezeti tényezők megléte esetén viszont súlyos légzőszervi tünetekkel találkozhatunk. Erre jó példa, hogy 1998-ban a H9N2 vírust Iránban magas morbiditással és mortalitással járó fertőzöttség formájában mutatták ki első alkalommal brojlercsirkékben. A bekövetkezett gazdasági károkat minden valószínűség szerint társfertőzések (IBV, *E. coli*,

Ornithobacterium rhinotracheale, *Mycoplasma gallisepticum*) súlyosbították (Nagy és mtsai., 2017). A klinikai tünetek sinusitisben, faciális ödémában, orr és szemváladékozásban, súlyos légúti rendellenességben nyilvánultak meg. 1998-2002 között a vírus számos telep között cirkulált több, mint 65 %-os mortalitással. Kísérleti körülmények között a vírus fürjekben és csirkékben szaporodott enyhe klinikai tünetekkel, de mortalitást nem okozott, alátámasztva a társfertőzések és tartási problémák jelentőségét a kórkép súlyosbításában (Ebrahimi, Ziapour, Tebianian, Dabaghian és Mohammadi, 2011; Nagy és mtsai., 2017). Nagyszámú járványesetet áttekintve Qi és mtsai jellemzően 5 és 30% közötti elhullásról számoltak be brojlerekben (Qi és mtsai., 2021).

Erősebb patogenitású törzsek okozta járvány esetén az állatok kis részében a H9 fertőzés önállóan is képes a súlyos légzőszervi kórkép kialakítására. Súlyos légzőszervi tüneteket mutató állatokban tipikus a trachea bifurkációnál és a főbb bronchusokban a jelentős fibrin kiválás (4. ábra), ami kezdetben nehézlégzést okoz, majd a fibrindugó fulladáshoz vezethet. Ugyancsak jellemző a súlyosan érintett állatokban a közepes-súlyos fibrines légzsákgyulladás, tüdőgyulladás. Vírustörzstől függően hasmenés is jelentkezhet. Nagyüzemi tartásban a víz és a takarmányfogyasztás csökkenése, a súlygyarapodás elmaradása is kísérheti a fertőződést.



4. ábra: Kipirult, gyulladt légcső és fibrines törmeléktől elzáródott bronchusok.

A tojástermelés csökkenés kísérletes körülmények között - a másodlagos kórokozók kizárásával - vizsgálva is igen jelentős, hosszantartó, amit a petevezető gyulladására vezettek vissza. A heveny szakaszban körülbelül 60% visszaesést, majd a krónikus szakaszban tartósan, több, mint 10 héten keresztül körülbelül 30% visszaesést tapasztaltak, miközben a tojáshéj minősége szignifikánsan nem változott (Gu és mtsai., 2017). Ezzel szemben egy másik törzssel végzett vizsgálatban a tojáshéj szerkezetének jelentős változásáról és a héj elvékonyodásáról is beszámoltak (Qi és mtsai., 2021). Telepi körülmények között tenyész- és tojóállományokban akár 70%-os tojástermelés csökkenést is leírtak.

A vírus átmeneti immunszuppressziót is előidézhethet (mivel thymus és bursa atrófiát is okoz), amely más, társ- vagy másodlagos fertőzések fellobbanását okozhatja (Perdue és Swayne, 2005).

Pulykákban általában súlyosabb kórkép jelentkezik, mint csirkékben. Kísérletes fertőzés során gubbasztást, az infraorbitális sinusok duzzanatát, tüszögést, orrfolyást, közepes-súlyos kötőhártyagyulladást figyeltek meg. Kórbonctani vizsgálatban az infraorbitális sinusban nyálkás-túró

váladékot, légzságyulladást, a pancreasban kisebb-nagyobb kiterjedésű vérzéseket találtak, miközben ugyanez a vírustörzs csirkében nem okozott tüneteket (*Śmietanka és mtsai.*, 2016).

Számos egyéb madárfaj is fertőzött lehet, jellemzően tünetmentesen, vagy csak enyhe tünetekkel. A vírus endemiássá vált és adaptálódott több, kevésbé jelentős baromfifajhoz is, így fürjhöz, gyöngytyúkhöz, fogolyhoz és fácánhoz, továbbá struccban is megjelent. Érdeemes megjegyezni, hogy a fürjek, amelyek a H9 vírusok vízimadarakból szárazföldi madarakra történő átvitelének kulcsszereplői, már jelentős arányban rendelkeznek „emlösszerű” receptorokkal (2,6-kötésű szialsav). A vízimadár eredetű vírusok fürjben való passzálódása a gazdaspektrum szélesedéséhez, emlősök fertőzésére való képességhez vezet (*Peacock és mtsai.*, 2019).

4.7. H9N2 fertőzés társfertőzések jelenlétében

Bakteriális közreműködéssel fokozódhat a H9N2 AIV virulenciája.

Több proteázról, főként tripszinszerű szerinproteázokról kimutatták, hogy aktiválják az influenza HA-t (*Böttcher-Friebertshäuser, Klenk és Garten*, 2013). Ugyanakkor a HA aktiválásához szükséges proteázok nem korlátozódnak a gazdasejt enzimjeire, hanem bakteriális proteázok is részt vehetnek ebben a folyamatban (*Böttcher-Friebertshäuser és mtsai.*, 2013; *Tse és Whittaker*, 2015).

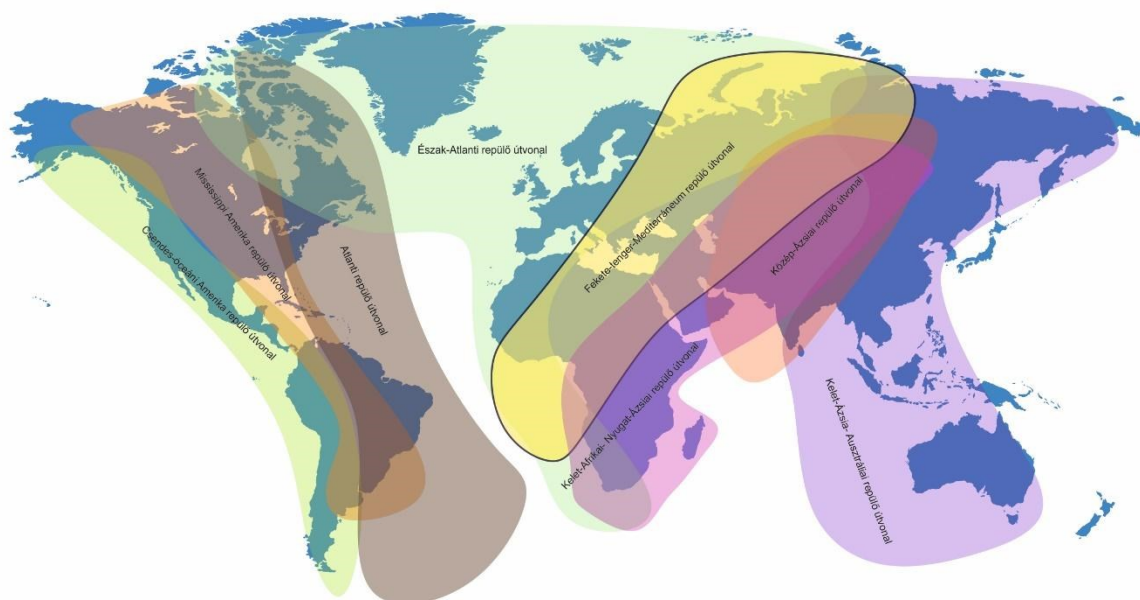
Dél-Koreában 1996-ban több farmon akár 30%-os elhullással járó megbetegedéseket észleltek, melyekből következetesen az MS96 jelű H9N2 AI vírust izolálták. A vírust a tüdőn kívül számos szervben megtalálták, ami a fertőzés generalizálódására utalt. Ugyanakkor a kórkép reprodukálása céljából kísérletesen fertőzött SPF csirkék kivétel nélkül felépültek a betegség egyébként viszonylag enyhe tüneteiből. A vírus elemzése kimutatta, hogy a HA vágáshely P2 pozíciójában egy Ser → Tyr szubsztitúció volt (vagyis az R-S-S-R vágáshely R-S-Y-R-re módosult), ami a plazminnal történő hasításhoz biztosít megfelelő szubsztrátot. Azt is kiderítették, hogy a *Staphylococcus* fajok (*S. aureus*) által termelt staphylokináz (plazminogén aktivátor) enzim képes a plazminogén → plazmin átalakulást katalizálni, vagyis *staphylococcusok* jelenlétében fokozódhat a H9N2 AIV virulenciája. Kishida és mtsai kísérletes fertőzésben bizonyították, hogy mind a *S. aureus*, mind a *H. paragallinarum* társfertőzés esetén erősödik a H9N2 vírus replikációja, továbbá a kórkép súlyossága (*Kishida és mtsai.*, 2004). Ugyanilyen jelenséget figyeltek meg a pandémiás H1N1 vírusokkal kapcsolatban is, továbbá azt, hogy a streptokináz is hasonló szerepet tölthet be. Tehát a légzőszervi fertőzésekben nem ritkán együttesen szereplő influenza vírusok és baktériumok jelenléte ebből a szempontból figyelmet érdemel (*Tse és Whittaker*, 2015).

4.8. A Közel-Kelet és Észak-Afrika jelentősége a baromfiiparban és a vadmadárvonulásban

A Közel-Keleti és Észak-Afrikai országok 14,4 millió km²-en helyezkednek el, a földfelszín 11,1 %-t elfoglalva és körülbelül 3-4-szer nagyobb területet tesznek ki, mint az Európai Unió. A régió 2,4 billió baromfit állított elő 2014-ben, ami a világ teljes baromfi termelésének 10,4 %-a. Az éves átlagos húsfogyasztás 20 év alatt megduplázódott: a 1990-es években 12 kg/főről 2010-ben 24 kg/főre. 2000 óta a baromfitermelés teljes növekedése megközelíti az évi 5 %-ot. Irán a legnagyobb baromfitermeléssel rendelkező ország a Közel-Keleten, világviszonylatban is az első 10 között van. A régióból számos további ország szerepel előkelő helyen a baromfitermelés különböző ágaiban. Izrael, Marokkó, Tunézia, Algéria és Egyiptom a 10.-20. közötti helyet foglal el a rangsorban a pulykahús termelésben világszerte. Egyiptom kacsahús termelésben a 9. lúd- és gyöngytyúktermelésben az 5. helyen áll. Szintén a 10 legnagyobb lúd- és gyöngytyúk termelő közé tartozik Irán és Izrael (*FAOSTAT T.F.a.A.O.C.S.D.*, 2017). Egyiptom, Szaúd-Arábia és Jordánia kiemelkedő helyet képviselnek a galamb és más madarak (strucc, fűrj) tenyésztésében. A régió fontos piacot jelent sok ország (USA, Kína, Brazília, Európa) számára a baromfi termékek és takarmányok importja és exportja által (*Nagy és mtsai.*, 2017).

A Közel-Keleten és Észak-Afrikában elhelyezkedő országok számos vadmadár vonulási útvonal mentén helyezkednek el. A hét vadmadár vonulási útvonal közül négy fő útvonal (Közép-Ázsiai, Kelet-Afrika - Nyugat-Ázsiai, Fekete-tenger és Mediterráneumi, valamint az Észak- Atlanti útvonal) átszeli a Közel-Keleti és Észak-Afrikai régiót. Ezek kereszteződnek a Kelet-Ázsiai- Ausztráliai útvonallal, ezzel növelve a különböző madárfajok érintkezésének lehetőségét (5. ábra). Tehát különböző madárfajok milliói repülnek keresztül ezeken az országokon, és használják a lápvidékeket leszállóhelyként. A pihenőhelyek Egyiptom, Jordánia, Izrael, Szaúd-Arábia, Omán, az Egyesült Arab Emírátsok, Irak és Irán területein találhatóak. Emellett ezekben az országokban gyakoriak és széles körben elterjedtek az állandó vadmadarak, mint a galamb, gerle, íbisz, veréb- és hollófélék, amelyek képesek a vad és a háztáji madarakkal is kapcsolatba lépni (*Nagy és mtsai.*, 2017).

Ezáltal a fenti régióban, a nagyszámú baromfiban már endemikusan jelenlevő H9N2 vírusok változatosságának növeléséhez könnyen hozzájárulnak a vadmadarak által behurcolt vírusok és *vice versa*, a tenyésztett állatok fertőzési forrásként jelentkehetnek, majd a már baromfihoz adaptálódott vírustörzsek a vadmadarak közvetítésével távoli területekre juthatnak el.



5. ábra: Vadmadarak vonulási útvonalai a világban, valamint a Közel-Keleten és Észak-Afrikában. Az észak-afrikai és közel-keleti országok számos vadmadár vonulási útvonal mentén helyezkednek el, így különböző madárfajok milliói repülnek át ezeken az országokon. A vonuló madarak közé keveredve jelen vannak olyan állandó fajok is (galamb, verébfélék, hollófélék), melyek könnyen képesek háztáji baromfifajokkal kapcsolatba lépni (Nagy és mtsai., 2017).

4.9. Vakcinás védekezés a H9N2 endémiás területeken

Fontos megjegyezni, hogy a rutinszerűen alkalmazott járványvédelmi intézkedések nem elegendőek a vírus bejutásának megakadályozásához. Miután a H9 LPAIV nem tartozik a bejelentés köteles betegségek közé, nem segítik a betegség megfékezését fokozott odafigyelést megkövetelő hatósági intézkedések. Így a védekezés fontos eszköze a vakcinázás, amely csökkenti az elhullások, termelési mutatókra gyakorolt negatív hatás és a vírusterjedés mértékét. Dong és mtsai részletes áttekintést adnak a különböző vakcina típusokról, beleértve a fejlesztési szakaszban levő technológiákat is (Dong, Zhou, Pu és Liu, 2022). Jelen dolgozatban részletesebben csak a már forgalomban levő, illetve más betegségek esetén baromfiban már széles körben használt technológiákra térünk ki.

Napjainkban zömmel csak inaktivált vakcinák vannak forgalomban a H9N2 vírusokkal szemben, melyeket mono- ill. bivalens formában, azaz baromfipestis (ND) komponenssel együtt alkalmaznak. Miután ezek a vakcinák teljes vírust tartalmaznak előlt formában, így az összes immunogén vírusfehérjére jól mérhető immunválaszt váltanak ki. Ez ugyanakkor azt is jelenti, hogy az ily módon vakcinázott és a vadvírussal fertőzött állatok ellenanyag válasza nem különböztethető meg. Fontos megjegyezni, hogy ezek a vakcinák nagyon érzékenyek a maternális ellenanyagok semlegesítő hatására, ami sok esetben a korai, aktív védelem céljából már nappal korábban alkalmazott vakcinázás

eredménytelenségéhez vezethet (*Pan és mtsai.*, 2022). Gyakran felmerülő aggály a H9 vakcinák hatékonyságával kapcsolatban, hogy a vírus folyamatos változékonyságával csak a vakcinatörzsek rendszeres cseréjével lehet lépést tartani. Ezt a megközelítést követve Kínában és Koreában reverz genetikai módszerrel előállított - azaz jó antigén kihozatalú vakcinatörzsekben levő, HA és NA géneknek az aktuális járványtörzsekből származó génekre való lecserélésével -, naprakész vakcina törzsek használatával igyekeznek magas szintű védettséget kialakítani (*Dong és mtsai.*, 2022). A magas antigén tartalmú, hatékony adjuválási technológiával készített inaktivált vakcinák a H9N2 vírus jelentősebb antigenitásbeli változásának áthidalására is képesek és kevésbé válnak a maternális ellenanyagok áldozatává, mint kevésbé immunogén társaik, ezáltal a mezei vírusok kisebb mértékű antigenitásbeli változása nem feltétlenül jelenti a vakcina hatékonyságának elvesztését.

A madárinfluenzára vonatkozó genetikai adatok hozzáférhetősége és a molekuláris virológia eszköztárának bővülése révén lehetőségek nyílnak az újabb koncepciójú vakcinák kifejlesztésére. Az alábbiakban felsorolt vakcinatípusok mindegyikére igaz, hogy lehetővé teszi a madárinfluenzával fertőzött baromfi ELISA-alapú megkülönböztetését a vakcinázott, de nem fertőződött baromfítól egy nukleoprotein elleni antitestek mérésén alapuló ELISA felhasználásával. Ezt nevezzük ún. DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) megközelítésnek.

Működési mechanizmusukban az inaktivált vakcinákkal megegyeznek a VLP (Virus Like Particle, vírusszerű részecske) és az aleggység vakcinák. Előnyük, hogy a vakcina előállítása során nem szükséges a madárinfluenza vírus felszaporítása tojásban, ami növeli az előállítás biztonságosságát. A H9 VLP kísérleti vakcinázás egyszeri adagja jelentős ellenanyag titert eredményezett csirkében, és csökkentette a fertőző vírus szaporodását a légző- és emésztőrendszerben (*Lee és mtsai.*, 2011).

Számos baromfi vírusos betegség ellen széles körben használnak vektorvakcinákat, amelyek egy ártalmatlan baromfivírust használnak vektorként és ebbe beépítve tartalmazzák 1-2 egyéb kórokozóból származó fő protektív fehérje génjét. Többféle vektorral is készítettek kísérleti vakcinákat, a legszélesebb körben alkalmazott termékek a tyúkhimlő (fowl pox virus, FPV) és a pulykaherpesz vírus (herpesvirus of turkeys, HVT) vektort alkalmazó vakcinák lettek. A HVT alapú vakcinák DIVA kompatibilitáson túlmutató előnye, hogy nagyon hosszú - nagyüzemi tartásban életre szóló - immunitástartósságot adnak (*Palya és mtsai.*, 2014), és keltetői vakcinázásra is alkalmasak (akár *in ovo*, akár bőr alá oltva), mivel nem neutralizálják a maternális ellenanyagok. Baromfipestis (ND), gumboroi betegség (IBD), fertőző gége- és légcsőgyulladás (ILT) esetén széles körben használtak, de H5 és H7 altípusú madárinfluenza vírus ellen is már forgalomban vannak ilyen típusú vektorvakcinák (*Wang és mtsai.*, 2014). Ezekről bebizonyosodott, hogy az inaktivált vakcinákhoz mérten, alacsonyabb humorális ellenanyagszint jelenlétében is képesek védettséget kialakítani, és kevésbé érzékenyek a maternális ellenanyagok semlegesítő hatására, továbbá a különböző mezei vírusok antigenitásbeli különbségeire. Így H9 esetén is felmerül ennek a vakcinatípusnak az alkalmazása a közeljövőben (*Liu és mtsai.*, 2019).

A nukleinsav alapú vakcinák (DNS vagy mRNS vagy replikon) egyelőre nem terjedtek el baromfiban, bár már léteznek törzskönyvezett vakcinák H5 HPAIV esetén.

Az alacsony patogenitású vírusokkal történő fertőződés esetén a lokális immunitás kiemelt jelentőségű, emiatt nem képesek az inaktivált vakcinák teljesen megakadályozni a H9 vírusok szaporodását és terjedését, bár jelentős mértékben csökkentik azt. Így további kutatások folynak olyan vektor alkalmazására, amely erős nyálkahártya immunitást is ki tud váltani, tömegvakcinázásra alkalmas, és napos korban, maternális ellenanyagok jelenlétében hatékony vakcinázást tesz lehetővé (*Dong és mtsai., 2022*).

Az immunizált baromfi hiányos védettsége gyakran szerepel a szakirodalomban. Ilyenkor nagyon gyakran kizárólag a vadvírusok antigén sodródásának eredményeként kialakuló hatékonyságcsökkenést tekintik a kudarc okának. Ahogy már a korábbiakban is utaltunk rá, ezen a szemponton túl számos egyéb tényező az elvárt hatékonyság elmaradásához vezethet, így például a rivális vírusos vagy bakteriális fertőzések, a fiatal életkorban maternális ellenanyagok jelenlétében beadott vakcinák szuboptimális működése, alacsony antigéntartalmú/immunogenitású vakcinák. Mindez a rendszeres szerológiai tipizálás és a kontrollált körülmények között végzett keresztvédettségi vizsgálatok szükségességére hívja fel a figyelmet.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. Vizsgálati elrendezés

A vizsgálatba vont 100 db, 21 napos, vegyes ivarú kommersz brojlercsirkét (Ross 308) izolátorban (6. ábra) helyeztük el, kereskedelembe kapható nevelőtáp és ivóvíz *ad libitum* biztosítása mellett. (Származási hely: Baromfi-coop Kft., Hajdúnánás). A kísérlettervezésnél és a csoport létszámok meghatározásánál messzemenően követtük az állatkísérletek etikájában megkívánt 3R (reduction, refinement, replacement) elvet. Kórtani munkáról lévén szó, az állat modell kiváltása (replacement) lehetetlen volt, azonban a csoport létszámokat (18 db/ fertőzött csoport) a még értékelhető legkisebbre korlátoztuk (reduction) és több, egyidejű kezelt csoport mellett egyetlen kontrollcsoportot használtunk 10 madárral. A beavatkozások számát és jellegét úgy határoztuk meg, hogy a lehető legkevesebb szenvedést okozzuk a kísérleti állatoknak (refinement). A leölés a szakma szabályai szerint, elfogadott, humánus módon, pentobarbital injekció (Release 300 mg/ml) intravénás beadásával történt. (Talán nem teljesen érdektelen kitérő, hogy ha még lenne igény az állatorvosi szaknyelv magyarosítására, a 3R elvet magyarul 3CS-nek lehetne nevezni: Csökkentés, Csillapítás, Csere szavak használatával.) Az egyedek csoportokba sorolását az ivarra és testtömegre randomizáltan végeztük. Betelepítés előtt szerológiai (ELISA) vizsgálattal bizonyosodtunk meg a H9 AIV ellenanyagok – azaz korábbi fertőződés és anyai ellenanyagok – hiányáról. Öt ráfertőzött és egy kontroll csoportot alakítottunk ki. Mindegyik csoport elkülönített izolátorban kapott helyet az azonos tartási körülmények biztosításával (22 °C, 60% relatív páratartalom, 16 h megvilágítási program).

A kórfejlődés heveny és idült szakaszának a vizsgálatára az 5. és a 11. mintavételi napot választottuk az irodalom alapján (*Aslam és mtsai.*, 2015). A továbbiakban a „dpi” (day post infection) rövidítést használom a mintavételi nap jelölésére. A ráfertőzött csoportokból az 5. napon 10 madarat, a 11. napon 8 madarat terveztünk mintázni, amit a természetes elhullások módosítottak. A kontroll csoportból 5-5 madarat boncoltunk mintavételi naponként.

A vizsgálatot az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács PE/EA/00512-6/2022 számú projektengedélye szerint végeztük.

Kísérleteinkben genom szekvenálással azonosított, G1-lineage-be (azon belül a G1-szerű sublineage-be) tartozó, természetes fertőzésekből izolált H9N2 vírus törzseket A/chicken/Middle East/8616/2016 ('A'), A/chicken/Middle East/4531/2016 ('B'), and A/chicken/North Africa/2021/2016 ('C') használtunk. A brojlercsirkéket 10^8 EID₅₀ vírus mennyiséggel fertőztük 0.2 ml térfogatban minden ráfertőzési mód esetén. A kontroll csoportot 0.2 ml PBS pufferral kezeltük intranasal & intratrachealisan (IN&IT).

A vírustörzsek patogenitását az alábbi módszerekkel vizsgáltuk: (a) klinikai tünetek, (b) kórbonctani elváltozások, (c) általános kórszövettan, (d) immunhisztokémián alapuló vírus antigén terhelés, (e) genom szakasz félkvantitatív kimutatása valós idejű PCR-rel.



6. ábra: Az állatok elhelyezésére szolgáló izolátor.

5.1.1. Különböző földrajzi területekről (Közel-Kelet 1 és 2, Észak-Afrika) származó H9N2 törzsek szöveti tropizmusának és patogenitásának vizsgálata IN&IT ráfertőzés esetén

Az 'A' (A/chicken/Middle East/8616/2016), a 'B' (A/chicken/Middle East/4531/2016) és a 'C' (A/chicken/North Africa/2021/2016) H9N2 LPAIV törzsekkel IN&IT (10^8 EID₅₀) fertőztük a csoportokat az 4. táblázat szerint. Itt az volt a cél, hogy a potenciális különbségeket vizsgáljuk a különböző származású vírusok kórfejlődésében.

Az összehasonlíthatóság érdekében kontroll csoport (6. csoport) is beállításra került alacsonyabb állatlétszámmal (9 db).

4. táblázat: Vizsgálati elrendezés különböző H9N2 törzsek esetén.

Csoport	Ráfertőző törzs	Beadási mód	Állatszám	
			5 dpi	11 dpi
1	H9N2 'A'	IN&IT	11	7
4	H9N2 'B'	IN&IT	10	8
5	H9N2 'C'	IN&IT	10	7
6	kontroll	IN&IT	3	6

5.1.2. A H9N2 'A' törzs (A/chicken/Middle East/8616/2016) szöveti tropizmusának vizsgálata különböző ráfertőzési módok (intranasal & intratracheal [IN&IT] valamint intravénás) alkalmazásával.

A különböző ráfertőzési módok hatását vizsgáló kísérleti elrendezést az 5. táblázat szemlélteti.

5. táblázat: Vizsgálati elrendezés különböző ráfertőzési módokra.

Csoport	Ráfertőző törzs	Beadási mód	Állatszám	
			5 dpi	11 dpi
1	H9N2 'A'	IN&IT	11	7
2	H9N2 'A'	intravénás	10	8
6	kontroll	IN&IT	3	6

5.1.3. Az 'A' H9N2 vírus törzs szöveti tropizmusának vizsgálata egyidejű IN&IT társfertőzés (IBV) mellett

A 3. csoport esetében a H9N2 'A' törzs ráfertőzése mellett, egyidejűleg, azonos ráfertőzési móddal IS/885/00-szerű nefropatogén variáns IBV törzset is alkalmaztunk a társfertőzés megvalósítására (6. táblázat).

6. táblázat: Vizsgálati elrendezés IBV társfertőzéssel.

Csoport	Ráfertőző törzs	Beadási mód	Állatszám	
			5 dpi	11 dpi
1	H9N2 'A'	IN&IT	11	7
3	H9N2 'A' + IS/885/00-like IBV	IN&IT	10	8
6	kontroll	IN&IT	3	6

5.2. Klinikai és kórbonctani vizsgálat, mintavételek

A mintagyűjtést az 5. és 11. napon végeztük a fertőzés akut és a krónikus fázisának leírására. Az oronazális és kloáka tamponokat az élő madaraktól gyűjtöttünk. További tamponmintát boncolás során a légcsákoból vettünk PCR vizsgálat céljára. Légcső, tüdő, vese, lép, hasnyálmirigy és agyvelő mintákat kórszövettani, IHC és PCR vizsgálatokhoz gyűjtöttünk. A természetes elhullásokat is ugyanígy mintáztuk (kivéve az 5. csoport dpi 6. napon elhullott madárból csak kórboncolás történt).

A H9N2 'A' törzs esetében naponta oronazális és kloáka tampon mintákat vettünk a vírus ürítés monitorozására. A madaraktól naponta megfigyeltük a klinikai tünetek és az elhullás rögzítése céljából a megfigyelési időszak alatt (D0-D11). A klinikai tüneteket az alábbiak szerint pontoztuk: 0= nincs tünet, 1= enyhe légúti tünet szisztémás tünetek nélkül (pl. megnövekedett légzésszám, légúti váladék, piros szemek), 2= mérsékelt légúti tünetek (pl. markánsan megemelkedett légzésszám vagy nehézlégzés) általános tünet nélkül vagy bágyadság mellett, 3= súlyos légúti tünetek (feltűnő nehézlégzés, zihálás) levertséggel.

5.3. Kórszövettan

A boncolás alkalmával a szövetmintákat 10% -os pufferolt formalinba helyeztük, 24 h fixálási idő mellett, majd a mosás-dehidráció-beágyazás (Paraffin Biowax Blue, BioGnost Kft, Zagreb, Horvátország) standard technikáját alkalmaztuk. Standard mikrotómmal (Shandon Finesse) a paraffinba ágyazott blokkokból 1,5 µm vastagságú metszeteket vágunk, majd hematoxylin-eozinnal megfestettük az általános szövettani módszerek szerint (*McGraw-Hill és Luna, 1968*). A metszeteket akromatikus Leica objektívvel és kamerával (3D Histech Kft., Budapest, Magyarország) felszerelt Nikon Eclipse E200 fénymikroszkóppal (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) vizsgáltuk.

Szövetteni metszetek értékelése

A kórszövetteni elváltozások értékelésére pontozási rendszert alkalmaztunk szervenként és elváltozásonként a statisztikai feldolgozhatóság és a csoportok összehasonlíthatósága érdekében. A légcsőben limfociták gyulladást, hámfelfajulást és metapláziát; a tüdőben interstitialis gyulladást, bronchitist, hurutos beszűrődést, ödémát és hiperpláziát (BALT); a vesében limfociták gyulladást, tubulonefrózt, glomerulonefritist; a lépben limfociták depléciót; agyvelőben limfociták gyulladást és ödémát; a hasnyálmirigyben elhalást és gyulladást pontoztunk. A légcsőben, a tüdőben és a vesében találtuk az elváltozások változatosabb megnyilvánulási formáit, ezért '0-nincs', '1-enyhe', '2-közepes', '3-súlyos' skálán pontoztunk. A lép, az agyvelő és a hasnyálmirigy esetében az elváltozások jelenlétének kifejezésére '0-nincs', '1-va' pontozást alkalmaztunk.

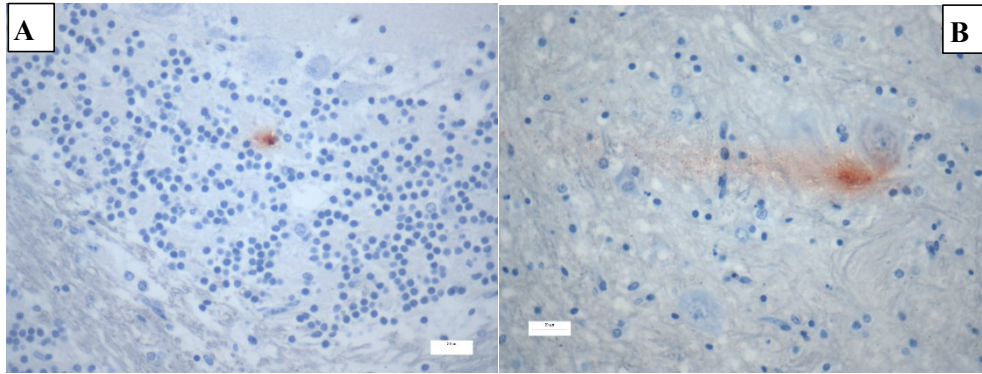
5.4. Immunhisztokémia

Az IHC vizsgálatok során a HPAIV esetében alkalmazott IHC festési eljárásokat adaptáltuk a H9N2 vírusra, mert az LPAIV-ra rendelkezésre álló szakirodalom szerinti festés nem biztosította a megbízható bírálhatóságot.

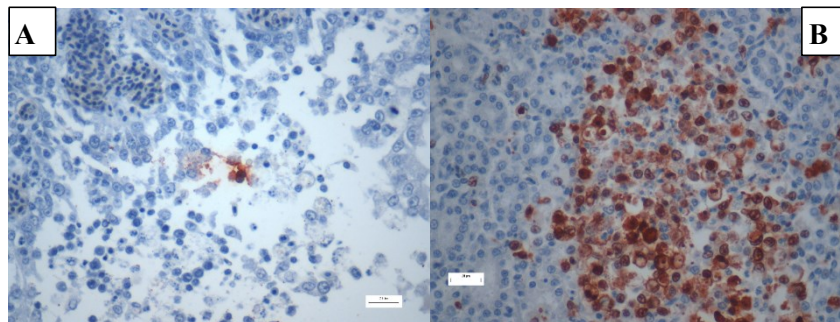
A paraffinba ágyazott mintákból először Pantin-Jackwood ABC módszerével végeztük az IHC vizsgálatot, azonban a színek és a kontrasztok nem voltak megfelelő minőségűek (7., 8. és 9. ábra). Az IHC festés avidin-biotin komplex (ABC) módszere az avidin biotinhoz való erős affinitására támaszkodik. Az avidin nagyméretű glikoprotein, amelynek igen erős az affinitása a kis molekulatömegű biotinhoz, ez a kötődés lényegében visszafordíthatatlan. Az avidin több biotinkötő hellyel rendelkezik. A biotin kémiaiilag konjugálható peroxidázzal, valamint ellenanyagokkal is. Az ABC módszer a következő lépésekből áll:

- (1) Jelöletlen elsődleges ellenanyagot viszünk fel a szövettenyészetre.
- (2) Biotinilált másodlagos ellenanyagokat alkalmazunk, amely biotin molekulákat visz be az elsődleges ellenanyagok helyére.
- (3) Avidint és torma-peroxidázzal konjugált biotin komplexét alkalmazzuk.
- (4) A peroxidázt ezután DAB vagy más kromogén szubsztrátok festik, hogy az antigén helyét színreakció jelölje.

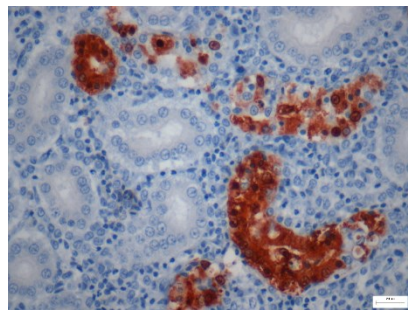
A módszer hátránya, hogy az avidin-biotin komplex hibásan kötődik a szövetben természetesen létező elemekkel. Ismeretes, hogy az avidin kötődik a szöveti lektinekhez, hozzájárulva a nem specifikus festődéshez. Az ABC komplex endogén biotinnal való kötődése fals pozitív festési eredményekhez vezethet (*Pantin-Jackwood, 2014; Spackman, 2020*).



7. ábra: Artefact az agyban. H&E háttérfestés (A) 40 x. (B) 20x.



8. ábra: Nem jól bírható IHC festés ABC komplex módszerrel. 40x. (A) Légcsőben. (B) Vesében.



9. ábra: IHC festés ABC komplex módszerrel: Nem konzekvensen festődnek a szövettípusok. Néhol a citoplazma és a mag is festődik, máshol meg egyik sem. A kefeszegély nem ad reakciót. Vese 40 x.

Ezért a módszert több ponton módosítottuk a megbízhatóbb és következetes értékelés érdekében. Indirekt kétlépéses immunreakciót alkalmaztunk, melynek során monoklonális elsődleges ellenanyagot és peroxidázzal jelölt anti-egér másodlagos ellenanyagot használtunk AEC (3-amino-9-ethyl carbazole) kromogénnel.

Az LPAI vírus antigén piros precipitátumként jelenik meg az érintett sejtek magjában, helyenként a citoplazmában. A módosítás lényege a következő:

- enzim indukálta antigen feltárás 0,1 % proteázzal 10 percig, 37 °C
- az elsődleges ellenanyag hígítása 1:3000
- az elsődleges ellenanyag inkubációs ideje: egy éjszaka, 4 °C-on.
- AEC használata a streptavidin-biotin komplex helyett.

Először azt vizsgáltuk, hogy a szövetminták vastagsága (4- 3- 2-1 μm) befolyásolja-e a reakció bírálhatóságát. Úgy találtuk, hogy minél vékonyabb a metszet annál jobban bírálható, mert így a reagens könnyebben tud penetrálni az anyagba. Az 1 μm -es metszet azonban már túl könnyen szakadt, emiatt a trágylemezre helyezése, manipulálása nehézkessé vált. A jó bírálhatóság és megfelelő kezelhetőség kompromisszumát a 1,5 μm vastag metszetben találtuk meg.

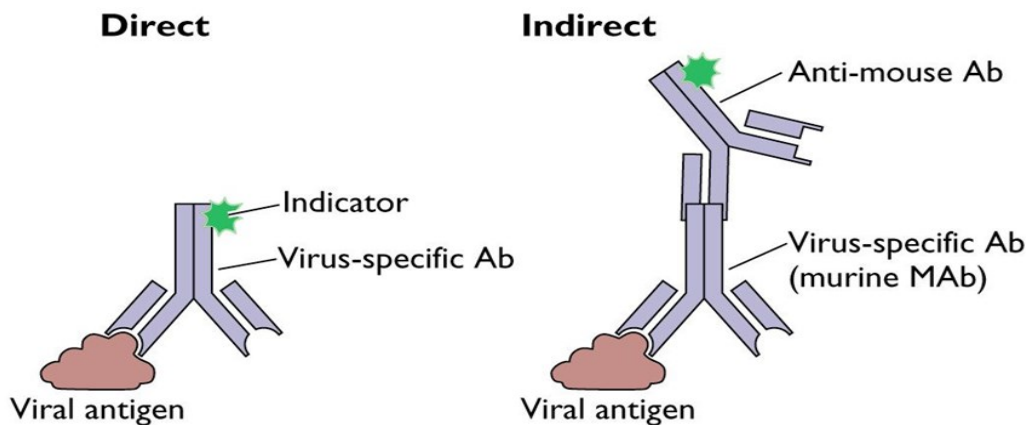
A 37°C vízfürdőben úszó szövetmetszeteket óvatosan az előkezelt Super Frost Ultra Plus tárgylemezre helyeztük (Thermo Fisher Scientific Inc.). A lemezeket 30 percig 60°C-on termosztátban szárítottuk.

A deparaffináláshoz frissen készített xilolt és 96%-os alkoholt alkalmaztunk. Az antigén feltárást 0,1% proteáz oldattal végeztük, 37 °C-on, 10 percig.

A szövetekben lévő endogén peroxidáz blokkolására 3% H_2O_2 oldatot használtunk 10 percig, szobahőmérsékleten, majd a fehérjék blokkolására sovány tejport, 0,03% Tritont (Triton X-100, Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) és PBS- oldatot 20 percig szobahőmérsékleten. A tritont (200 μl /lemez) azért használtuk, hogy az anyagok olajosságát növeljük, ezáltal elősegítve a jobb tapadást és a hatékonyabb fehérjeblokkolást.

Elsődleges ellenanyagként Anti Influenza A (NP) egér monoklonális IgG1 antitestet használtunk 1:3000 hígításban, 200 μl /lemez mennyiségben. A megfelelő hígítás megtalálása itt is kisszámú mintán való többféle hígítás kipróbálása után alakult ki: 1:5000, 1:4000, 1:3000, 1:2000, 1:1000. Az 1:3000 hígítás biztosította a legmegbízhatóbb bírálhatóságot. Az elsődleges ellenanyaggal történő inkubáció egy éjszakán át tartott 4 °C-on, párasító kamrában.

Másnap, az anti-egér másodlagos ellenanyag (EnVision + Single reagent HRP egér ellenanyag, Agilent DAKO, Santa Clara, CA, USA) hozzáadásával folytattuk a folyamatot szobahőmérsékleten, 30 percig. A jelerősítést 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC) (AEC+ szubsztrát kromogén, ready-to-use, Agilent DAKO, K3461) használatával végeztük szobahőmérsékleten, 10 percig, párasító kamrában. A kit/készlet EnVision reagense peroxidáz-konjugált polimer váz, amely anti-egér IgG ellenanyag molekulákat hordoz (10. ábra). Számos peroxidáz konjugált IgG ugyanazon a polimeren elhelyezkedve jó vizualizációs rendszert biztosítanak. Így az EnVision rendszer érzékenyebb, mint az egyszerű HRP-hez kötött IgG. A kék háttérfestődést a folyó csapvíz alatti mosás és a szobahőmérsékleten végzett, 2 percig tartó Mayer-féle hematoxilin festés biztosította.



10. ábra: A direkt and indirekt immunohisztokémiai módszer sematikus áttekintése (Racaniello, 2010).

A kialakított protokollt a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat: Immunhisztokémiai protokoll Anti Influenza A (NP) antigénre.

-
1. A blokkok deparaffinálása, víztelenítése
 2. Enzim-indukált antigen feltárás (0.1% Proteáz enzim)
 3. Metszetek öblítése PBS pufferrel
 4. Az endogén peroxidáz blokkolása (3% H₂O₂, 10 min)
 5. Metszetek öblítése, pufferolása
 6. Fehérje blokkolás (2% sovány tejpor, 20 min, szobahőmérséklet)
 7. A felesleges blokkoló oldat eltávolítása (öblítés nélkül)
 8. A metszetek inkubálása elsődleges antiszérummal (egér monoclonális ellenanyag, 1 éjszaka, 4 °C)
 9. Metszetek öblítése, pufferolása
 10. Inkubálás másodlagos ellenanyag (anti-egér IgG) + HRP konjugátummal (30 min, szobahőmérséklet)
 11. Metszetek öblítése, pufferolása
 12. Immunreakció kimutatása kromogénnel (AEC oldat, 10 min, szobahőmérséklet)
 13. Öblítés csapvízzel (10 min)
 14. Háttérfestés Mayer's hematoxylin-nal (3 min)
 15. Öblítés csapvízzel (10 min)
 16. Dehidratálás és fedés vízdékony mediummal
-

A madárinfluenza vírus antigénje piros/vörös precipitátumként látható az érintett sejtek magjában, de megfigyelhető a citoplazmában is. A metszeteket Nikon Eclipse E200 mikroszkóppal vizsgáltuk akromatikus Leica objektívekkel (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA).

Immunhisztokémiai értékelés (scoring)

A légúti és a vese elváltozások súlyosságának számszerűsítésére pontozási rendszert fejlesztettünk ki (8. táblázat). A metszeteket 40-szeres nagyítással, mikroszkóppal vizsgáltuk 10 látótérben. Mivel a vese tubuláris epithel sejtjeiben diffúz elváltozásokat tapasztaltunk, így a vesére, mint szerve, külön pontozási rendszert határoztunk meg.

8. táblázat: Immunhisztokémiai pontozási rendszer tüdőre, légcsőre, lépre és vesére.

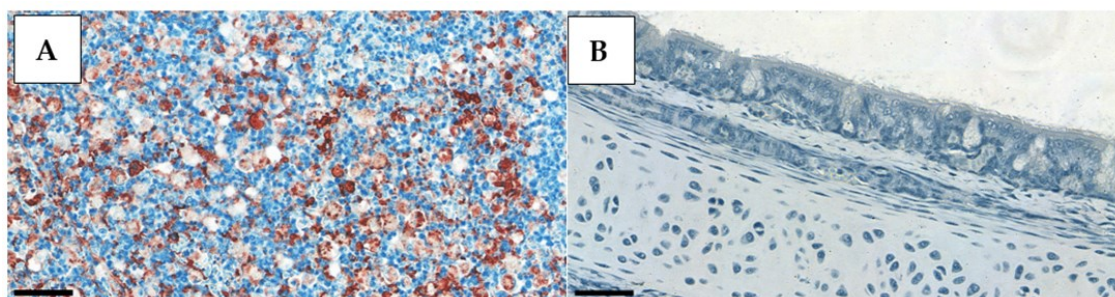
Tüdő, légcső, lép	
Pontszám	A pozitív sejtek száma
0	0
1	≤10
2	>10

Vese	
Pontszám	tubuláris epithelsejtek (kefeszegély) festődése
0	Nincs
1	foltszerű kiterjedés
2	diffúz kiterjedés

A tüdő, a légcső és a lép 0-s pontszáma azt jelenti, hogy egyetlen sejtben sem volt kimutatható AIV antigén. Az 1 azt jelenti, hogy a vírust legfeljebb 10 sejtben mutattuk ki, míg a 2-es pontszám azt jelenti, hogy több mint 10 sejtben találtuk meg a vírus antigént jelző piros színreakciót.

A vesében az 1-es pontszám foltszerű, a 2-es pedig a vírus antigén diffúz kiterjedését jelenti. A 0 pont az észlelés hiányát jelenti.

Az AI-mentes, illetve a HPAI-fertőzött madarak szövetmetszeteit használtuk negatív, illetve pozitív kontrollként, hogy igazoljuk megállapításainkat. A pozitív kontrol lemezeket H5N1 HPAI járványból kaptuk (11. ábra).



11. ábra: (A) Pozitív kontroll. Természetes fertőzésből származó, HPAI lép metszet. (B) Negatív kontroll, légcső. Indirekt kétlépéses immunreakció, hematoxilin háttérfestés. 40×, Lépték = 50 µm.

5.5. PCR

A mintákat Tissue Lyser II (Qiagen) segítségével 1 ml steril PBS-ben eluáltuk (acélgolyókkal homogenizáltuk) a tamponfejekből. Az RNS-t a cador Pathogen 96 QIAmp HT Liquid kittel (Qiagen) vontuk ki a QIAcube HT eszközzel, a gyártó utasításai szerint. Négy µl-es RNS-kivonatot használtunk templákként az egylépéses RT-PCR-hez (AIV qPCR TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). A mátrixgén egy fragmentumának amplifikálására és kimutatására használt primereket és próbákat korábban Spackman és munkatársai leírása alapján használtuk (*Spackman és mtsai.*, 2002).

A módszer küszöbértékét Ct 36-ra állítottuk be; azaz a Ct <36-os mintákat pozitívnak, a ≥36-os mintákat negatívnak tekintettük. Az amplifikáció nélküli negatív mintákat a maximális ciklusszámra 40-re állítottuk be, mert ez a szám jelzi a minta negativitását, ami a statisztikai elemzéseknél használható.

5.6. Statisztikai értékelés

A klinikai tünetek, a kórbonctani és kórszöveti elváltozások súlyosságának jellemzésére pontozási rendszert (0- nincs, 1- enyhe, 2- mérsékelt, 3- súlyos) alkalmaztunk az irodalomból vett ajánlás szerint (*Landmann és mtsai.*, 2021) (lásd még: 5.2 és 5.3 fejezet). Az IHC vizsgálatban a vírus antigén terhelés mértékét 0- 'nincs', 1- 'alacsony' vagy 2- 'magas' skálával írtuk le minden egyes vizsgált szövet esetében. Egyes megfigyeléseket, például a légcső epitheliális degenerációt és a glomerulonefritist dichotom (bináris) változóként, azaz 0- 'nincs', 1- 'van'-ként határoztuk meg. Ha több részből álló ugyanazon szervet pontoztuk (pl. a 4 légzsák) vagy ugyanarra a szervre (tüdőre, vesére) különböző paramétereket állapítottunk meg, akkor az adott pontszámok összegét használtuk a statisztikai értékeléshez. A kontroll csoportban minden megfigyelt paramétert fiziológiásnak tekintettünk (azaz nem volt elváltozás); ezért a statisztikai elemzésekben a kontroll csoport nem szerepelt. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értékre állítottuk be.

Tekintve, hogy az itt felsorolt pontozási rendszerek döntő többsége ordinális skálát eredményez (kivéve a „van/nincs” változókat, pl. elhullás), ezek összefoglaló leírására kontingencia táblázatokat készítettünk, amelyek oszlopait az elváltozások súlyossági pontszáma, sorait a vizsgálati csoportok adták. Dichotom változók (van/nincs) esetében ugyanígy jártunk el, ott azonban értelemszerűen csak két oszlop szerepelt. Először az IHC vizsgálatok elemzését végeztük el „hagyományos” statisztikai módszerekkel, vagyis az ordinális változókra általánosan alkalmazott ún. nem paraméteres tesztekkel. Két csoport összehasonlítása esetén a Mann-Whitney U tesztet, több csoport esetén a Kruskal-Wallis nem paraméteres ANOVA-t használtuk, amennyiben itt szignifikáns különbséget jelzett a teszt, akkor páros összehasonlításra a Dunn próbát végeztük el Bonferroni korrekcióval (*Landmann és mtsai.*, 2021). Első megközelítésben a többi ordinális változó – naponkénti klinikai pontszámok, kórbonctani lelet, kórszöveti – esetén is a fenti statisztikai módszert alkalmaztuk, azonban később ezeket újabb, kifinomultabb, más elvekre alapozott statisztikával újra elemeztük, ami az influenzavírusok jelenlegi és korábbi irodalmához képest statisztikai módszertani fejlesztésnek, előrelépésnek tekinthető (lásd később). A valós idejű PCR Ct-értékei folytonos változók, ezért eloszlásukat először Kolmogorov-Smirnov-féle normalitáspróbával vizsgáltuk. Ha legalább két csoport megfelelt a normalitásvizsgálaton, akkor egyirányú ANOVA-t végeztünk, majd a páros összehasonlításokhoz Fisher Least Significant Difference (LSD) post hoc tesztjét futtattuk. Ha az eredeti Ct eloszlások nem feleltek meg a normál eloszlásnak, Kruskal-Wallis nemparametrikus ANOVA-t és korrigált Dunn post hoc tesztet végeztünk. A PCR vizsgálati eredményeket a $Ct=36$ cutoff érték alapján (lásd 5.5) pozitívnak ($Ct < 36$) illetve negatívnak ($Ct \geq 36$) minősítve, dichotom változóként is értékeltük, újabb statisztikai módszerrel (lásd később). A csoportok közötti elhullási arányok összehasonlítását a Fisher-féle egzakt teszttel végeztük. Ezeket a statisztikai próbákat az R szoftver 4.2.1 és az SPSS 26 verziójával végeztük.

Az influenza irodalomban újszerű, *ordinális változókra igazított regressziós modellezés* elvén alapuló statisztikai megközelítés bevezetése a klinikai pontszámok esetében merült fel. Itt nem független megfigyelésekről van szó, hiszen minden nap ugyanazon madarak klinikai tüneteit pontozzuk, tehát

ismételt megfigyelésekről van szó, ezért az egyszerű nemparametrikus próbák nem tekinthetők adekvátnak. Hasonló regressziós modellezéssel azután újra elemeztük a kórbonctani, kórszövettani, IHC eredményeket is.

A klinikai pontszámok modellezésére – ismétlődő megfigyelések miatt – „mixed effect continuation ratio, CR” modellt alkalmaztunk, amelyben két fix hatást (a kezelési csoport és az idő) valamint egy random hatást (a csirke azonosító) vettünk figyelembe (Liu, 2010; Dimitris Rizopoulos, 2022). A modellt a GLMMadaptive csomag `cr_setup()` és `mixed_model()` függvényeivel az R szoftver 4.2.1-es verziójával (2022-06-23 ucr) illesztettük. A több mint két kategóriát tartalmazó kimenetek (például a különböző súlyossági szintek) esetében kumulatív link modellt (Cumulative Link Model; CLM) alkalmaztunk, ahol a kapcsolati függvény a logaritmus függvény volt (Ananth és Kleinbaum, 1997; Haubo és Christensen, 2018). A CLM eredményeként esélyhányadosokat (odds ratio, OR) kapunk, amelyek e dolgozat során a következőképpen értelmezendők:

- dpi 11 vs. dpi 5 összehasonlítása esetén: az esélyhányados (továbbiakban OR (dpi11/dpi5) jelentése az, hogy hányszor akkora a kisebb pontszámok esélye (oddsza) a dpi 11 esetén a dpi 5-höz képest. Tehát, ha ez az arány nagyobb, mint 1, akkor dpi 11 esetén a kisebb pontszámok (enyhébb tünetek) esélye nagyobb, tehát dpi11 esetén enyhébb tünetek figyelhetők meg, mint dpi 5 esetén. Amennyiben az arány kisebb, mint 1, úgy dpi 5 esetén figyelhetők meg az enyhébb tünetek.
- A vírustörzsek összehasonlítása esetén is a fent leírtak szerint értelmeztük az eredményeket. Például OR (A törzs/ B törzs) esetén, ha az arány 1-nél nagyobb, akkor az A törzs esetén az enyhébb tünetek esélye nagyobb, mint a B törzs esetén, a konkrét érték pedig azt számszerűsíti, hogy ez az esély hányszor nagyobb (vagy kisebb). A kumulatív link modellt az ordinal csomag `clm()` függvényével az R szoftver 4.2.1-es verziójával (2022-06-23 ucr) illesztettük.

A PCR eredményeket (pozitív/negatív) logisztikus regresszióval modelleztük. Mivel bizonyos mintákban, illetve vizsgálati időpontban (pl. dpi 11) rendkívül ritka volt a pozitív eredmény, ezért a logisztikus regresszió egy speciális változatát (penalized maximum likelihood logistic regression) alkalmaztunk, amely képes kezelni a ritka események torzító hatását. A modell segítségével a pozitív PCR eredmény valószínűségét becsültük a dpi és a vírustörzs függvényében. (David Firth, 1993). A modellt az R 4.2.1 (2022-06-23 ucr) verzió `logistf` csomag `logistf()` függvényével illesztettük.

Páronkénti összehasonlításokat végeztünk az `emmeans` csomag `emmeans()` függvényével és a `graphics` csomag `pairs()` függvényével. Ez a statisztikai módszer lehetővé teszi, hogy azonosítsuk, mely csoportok között találunk statisztikailag szignifikáns különbségeket. A p-értékek adjusztálására a "tukey" módszert alkalmaztunk.

Végezetül a kórszövettani, IHC és PCR eredmények korrelációját Spearman rang korrelációs módszerrel vizsgáltuk.

6. EREDMÉNYEK

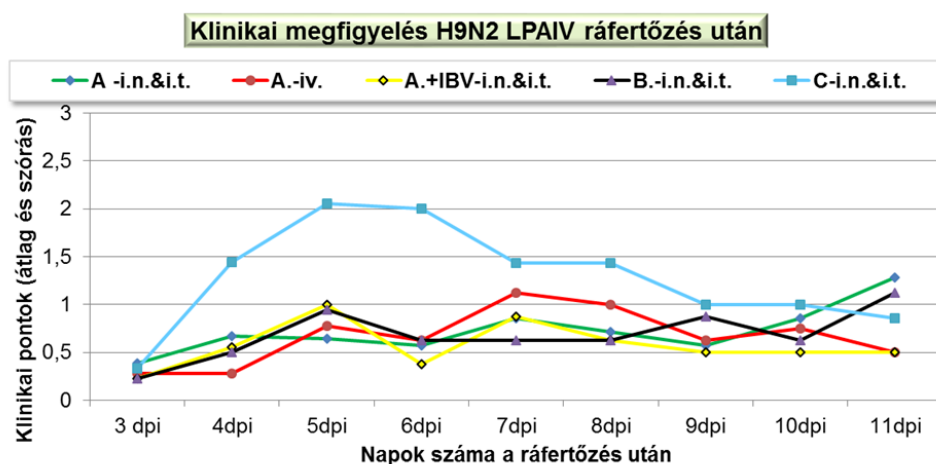
A kontroll csoportban sem klinikai tüneteket, sem kórbonctani és kórszövettani elváltozásokat nem figyeltünk meg. Az IHC és a PCR nem mutatták ki az LPAIV fertőzés nyomait a vizsgálat során. Ezért az alábbi eredményeket csak a fertőzött csoportokra vonatkozóan foglaltam össze.

6.1. Általános kórtani ismertető

6.1.1. Klinikai tünetek és elhullás

Általában légúti tüneteket, szipogást, gurgulázást, tüszögést, ziháló légzést és esetenként nehézlégzést figyeltünk meg a legtöbb fertőzött madárnál 3 és 11 dpi között, függetlenül a ráfertőző vírustörzstől.

A 12. ábrán látható, hogy az 'A- Közel-Kelet1.' és a 'B-Közel-Kelet2.' törzsekkel ráfertőzött csoport kórfejlődése közel azonos módon alakul a klinikai tünetek súlyosságát tekintve. A 'C-Észak-Afrika' törzs kiugróan súlyosabb klinikai tüneteket okozott elsősorban a kórfejlődés heveny szakaszában, ami az idült időszakra lecsendesedett a többi törzsnél tapasztalt mértékre.



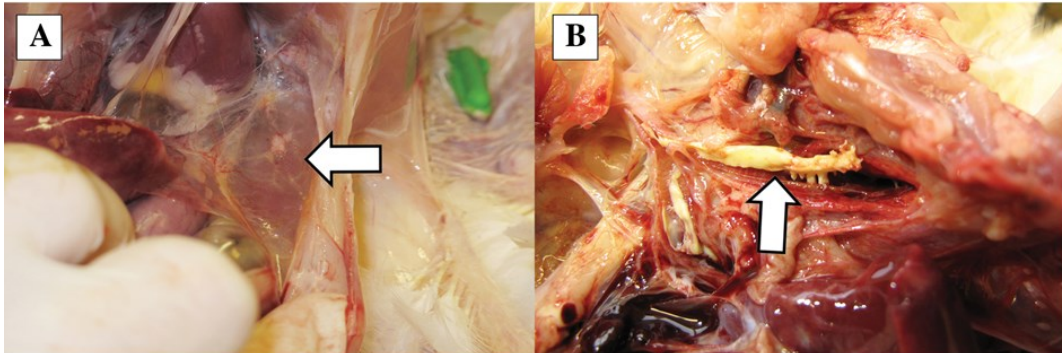
12. ábra: A különböző csoportokban a klinikai tünetek pontértékei a megfigyelési időszakban: Szemmel láthatóan magasabb klinikai pontszámokat mutat a 'C-Észak-Afrika' törzsszel ráfertőzött csoport a teljes megfigyelési időszak alatt, de kiemelkedően a heveny szakaszban.

Mortalitás

Az „A- Közel-Kelet1.” csoportból egy csirke (5,5%) és a „C-Észak-Afrikai” csoportból négy madár (22%) pusztult el 4–6 dpi-nél, míg a „B-Közel-Kelet2.” csoportban (0%) nem fordult elő elhullás. A halálozási arányok nem mutattak szignifikáns különbséget (Fisher-féle egzakt teszt $p = 0,113$).

6.1.2. Kórbonctan

Makroszkópos elváltozásokat észleltünk a légutakban, beleértve a vöröses vagy lilás-piros légső nyálkahártyáját, a légzsákokon lévő erezes belövelltséget és a tüdőben pangást (13A ábra), esetenként fibrindugót a bifurkációnál (13B. ábra).



13. ábra: Post-mortem elváltozások: enyhe hiperémia a légzsákokban (nyíl) (A) és fibrines exudátum (nyíl) a légső bifurkációban (B).

A boncolás során az 'A-Közel-Kelet 1.' és a 'B- Közel-Kelet 2.' törzs esetén a 5 dpi-n a kiirtott egyedekben helyenként kipirult légsövet, enyhén beszűródött légzsákokat figyeltünk meg; az elpusztult madarakban a légső nyálkahártya teljes hosszában haragos vörös, a mellkasi légzsákban erezes belövelltség és opálos beszűródést, a hasi légzsákokban enyhe beszűródést, és haragos vörös, néhol ödémás tüdőt figyeltünk meg. A 'C- Észak-Afrika' törzs esetében az elhullott madarak légsövében fibrindugót, a nagy légutakban fibrin kiválást és az általa okozott eltömődést figyeltünk meg. Súlyos esetben a hasi légzsákokra is kiterjedő erezes belövelltség és opálos beszűródés, valamint az intrapulmonális légutakban fibrindugó volt látható. A leölt madarakban a fent leírt folyamatok enyhébb mértékben voltak megfigyelhetőek.

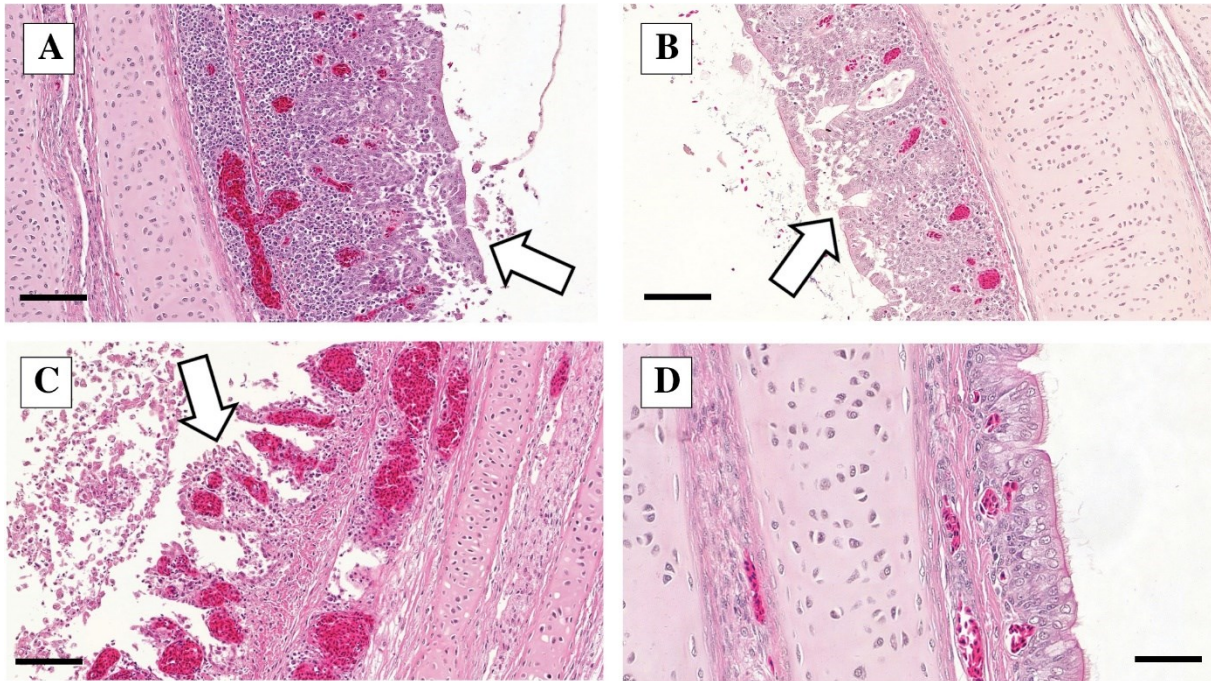
Dpi 11-en a boncolás során a légső és a tüdő elváltozások eltűntek, csak a légzsákokban találtunk erezes belövelltséget és opálos beszűródést a csoportokban.

6.1.3. Kórszövettani eredmények

A légcsőben, a tüdőben és a vesében kórszövettani elváltozásokat figyeltünk meg, míg lépben, hasnyálmirigyben és agyban nem találtunk elváltozást.

Légcső

A légcső elváltozásokat limfocitás gyulladás jellemezte (a gyulladással sejtek, főleg a limfociták, leváló epitheliális hámsejtek, epithel degeneráció) (14. ábra).



14. ábra: Légcső H&E festés dpi 5. A-C ábra: ráfertőzött csoportok - limfocitás gyulladás epithel degenerációval (nyilak), 20 x, lépték= 100 μ m. D ábra: kontroll csoport - ép csillós hámsejtek. 40 \times , lépték = 50 μ m.

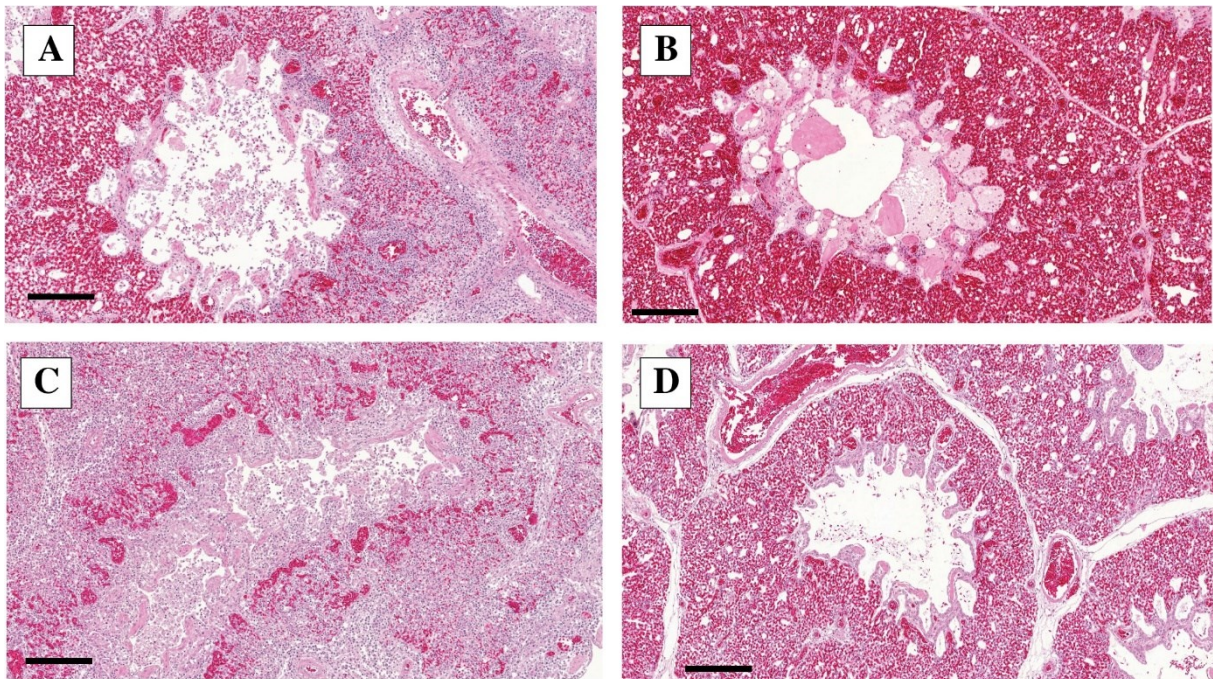
A limfocitás gyulladást 0-3 skálán értékeltük; a hámdegeneráció minden madárnál jelen volt dpi 5-nél, és megszűnt minden madárnál dpi 11-nél.

A limfocitás gyulladás pontszámok esetén a dpi változó szignifikánsnak bizonyult ($p < 0,0001$), ami azt jelenti, hogy az elváltozások súlyossága szignifikánsan csökkent dpi 11-re dpi 5-höz képest (OR (dpi11/dpi5): 262), és szignifikáns különbségeket tudtunk kimutatni az „A-Közel-Kelet1” és a „C-Észak-Afrika” törzsek között (OR (A-Közel-Kelet1/ C-Észak-Afrika): 8,36, $p = 0,0116$).

Tüdő

A tüdőelváltozások közé tartozott az interstitialis tüdőgyulladás (azaz a perivascularis és peribronchialis szövet gócos infiltrációja limfoid sejtek és makrofágok által), valamint hurutos hörgőgyulladás (azaz gyulladással váladék, infiltráció és ödéma) (15. ábra).

Kiszámoltuk a pontozott elváltozások (interstitialis tüdőgyulladás, hörgőgyulladás, hurutos infiltráció és ödéma) összesített értékét is. Az elemzési eredmények azt mutatják, hogy az elváltozások súlyossága dpi 11-en szignifikánsan csökkent az 5 dpi-hez képest (OR (dpi11/dpi5): 281, $p < 0,0001$), de a három törzs között nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni.

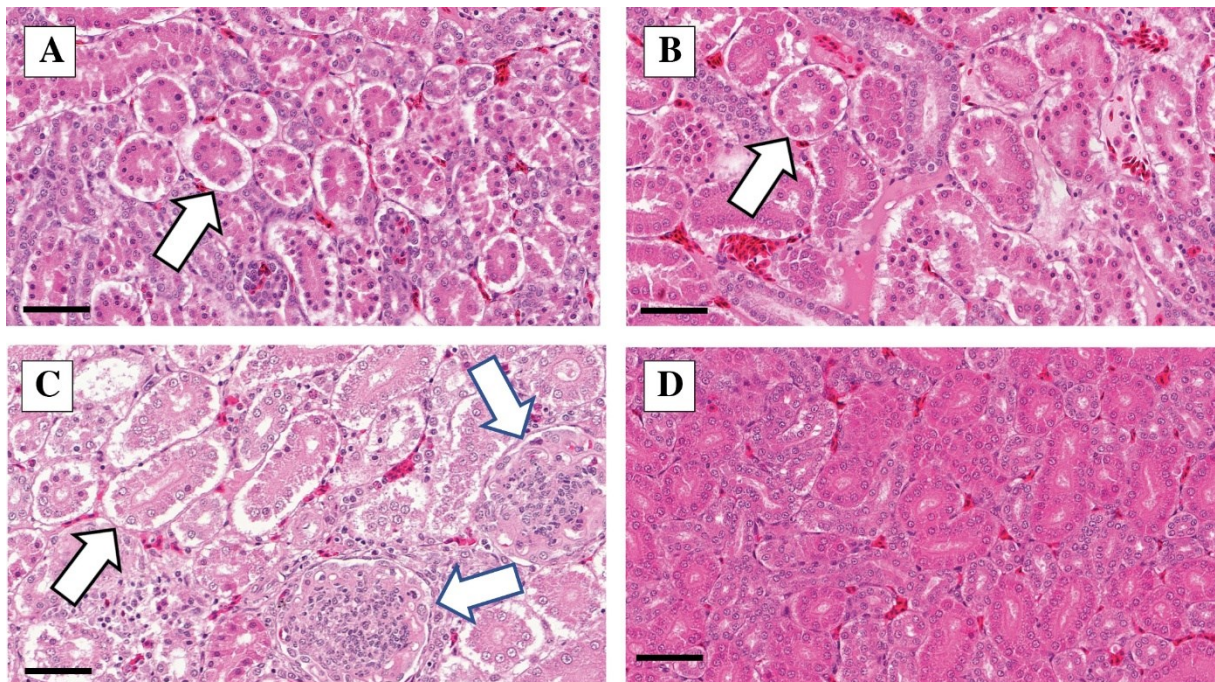


15. ábra: Tüdő H&E festés 5 dpi. (A) „A-Közel-Kelet 1” törzssel fertőzött tüdő: interstitialis gyulladás score 3, bronchitis score 3, hurutos beszűródés score 2, ödéma score 2, alveolusban több leváló alveoláris epithelsejt látható. H&E, 10 \times , lépték = 200 μ m. (B) „B-Közel-Kelet 2” törzssel fertőzött tüdő: interstitialis gyulladás score 2, bronchitis score 2, hurutos beszűródés score 2, ödéma score 1, H&E, 10 \times , lépték = 200 μ m. (C) „C-Észak-Afrika” törzssel fertőzött tüdő: interstitialis gyulladás score 3, bronchitis score 3, hurutos beszűródés score 3, ödéma score 2. H&E, 10 \times , lépték = 200 μ m. (D) Kontroll tüdő: nincs interstitialis gyulladás, bronchitis, hurutos beszűródés vagy ödéma. H&E, 10 \times , lépték = 200 μ m.

Vese

Kórszövettani elváltozásokat a vesében csak a 5 dpi-n vett mintákban észleltünk.

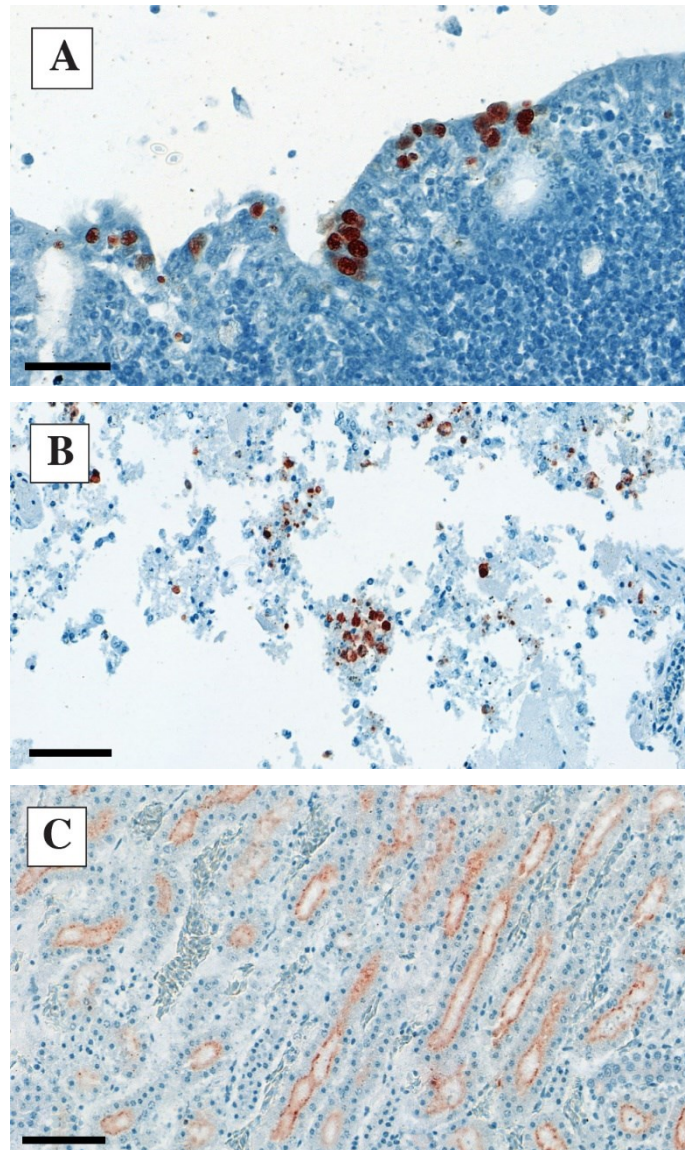
Az elváltozásokat főként tubulonefrózis (azaz: a tubuláris epiteliális sejtek regresszív elváltozásai) és glomerulonefritis (limfo-hisztiocitás infiltráció) jellemezte, néhány esetben enyhe limfocitás gyulladást csak 5 dpi-n figyeltünk meg. A limfocitás gyulladás, tubulonefrózis és glomerulonefritis pontszámok vizsgálata során szignifikáns különbséget csak a tubulonefrózis esetében találtunk az „A-Közel-Kelet1.” és a „C-Észak-Afrika” törzs (OR (A-Közel-Kelet1/ C-Észak-Afrika): 31,95, $p = 0,0026$), valamint a „B-Közel-Kelet2.” és a „C-Észak-Afrika” törzs (OR (B-Közel-Kelet2/ C-Észak-Afrika): 248,25, $p = 0,0002$) között. A vese kórszövettani elváltozásait az 16. ábra mutatja.



16. ábra: Vese H&E festés dpi 5; 40 \times , lépték = 50 μm . (A) „A-Közel-Kelet1.” törzssel fertőzött vese: diffúz, mérsékelt fokú tubulonefrózis score 2, a tubulus sejtek leváltak az alaphártyáról (fekete nyíl), karyorrhexis, karyopyknosis. (B) „B-Közel-Kelet2.” törzssel fertőzött vese: Fokális tubulonefrózis score 2, (C) „C-Észak-Afrika” törzssel fertőzött vese: tubulonefrózis (tubulus sejtek leváltak az alaphártyáról (fekete nyíl), karyopyknosis, karyorrhexis score 3, glomerulonefritis: mesangium proliferáció (kék nyíl). (D) Kontroll vese: az alaphártyán ülő ép tubulus sejtek.

6.1.4. Immunhisztokémiai eredmények

A vírusantigént a fertőzött madarak légső-, tüdő- és vesemintáinak 30-50 %-ában azonosítottuk. Pozitív IHC eredményeket csak a fertőzött csirkéktől az 5 dpi-n vett mintákban találtunk, azaz minden kontroll állat mindkét mintavételi napon, illetve a 11 dpi-n vett minták negatívak voltak. A pozitív IHC festődés nagyon kontrasztos, jól látható sötétvörös precipitátumként jelenik meg a légsőben leváló hámsejtek magjában (17A és 18. ábra), a tüdő alveoláris hámsejtjeiben (17B és 19. ábra) valamint a vese kefeszegély (tubuláris epithelium) citoplazmájában (17C és 20. ábra). A vesében nagyobb arányban volt megfigyelhető a teljes sejt festődés, míg a légutakban a sejtmagok festődése volt megfigyelhető, melyeket könnyen meg lehetett számolni. Emiatt a vesében eltérő pontozási rendszert használtunk.

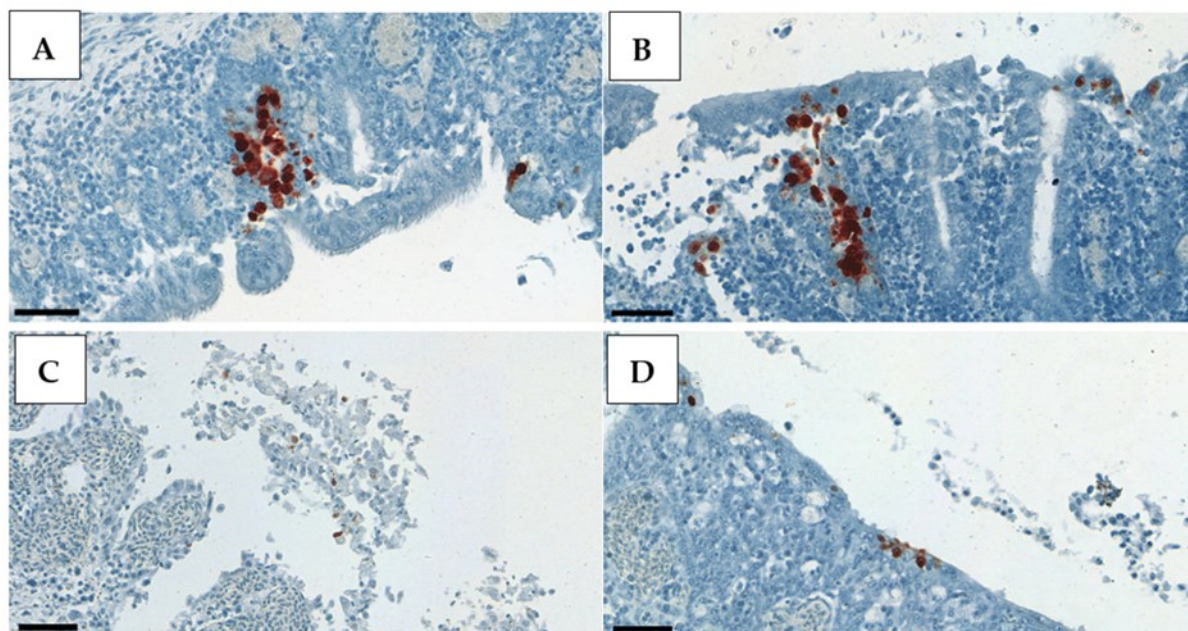


17. ábra: Immunhisztokémiai festődés dpi 5. H&E háttérfestés 40 \times , lépték = 50 μ m

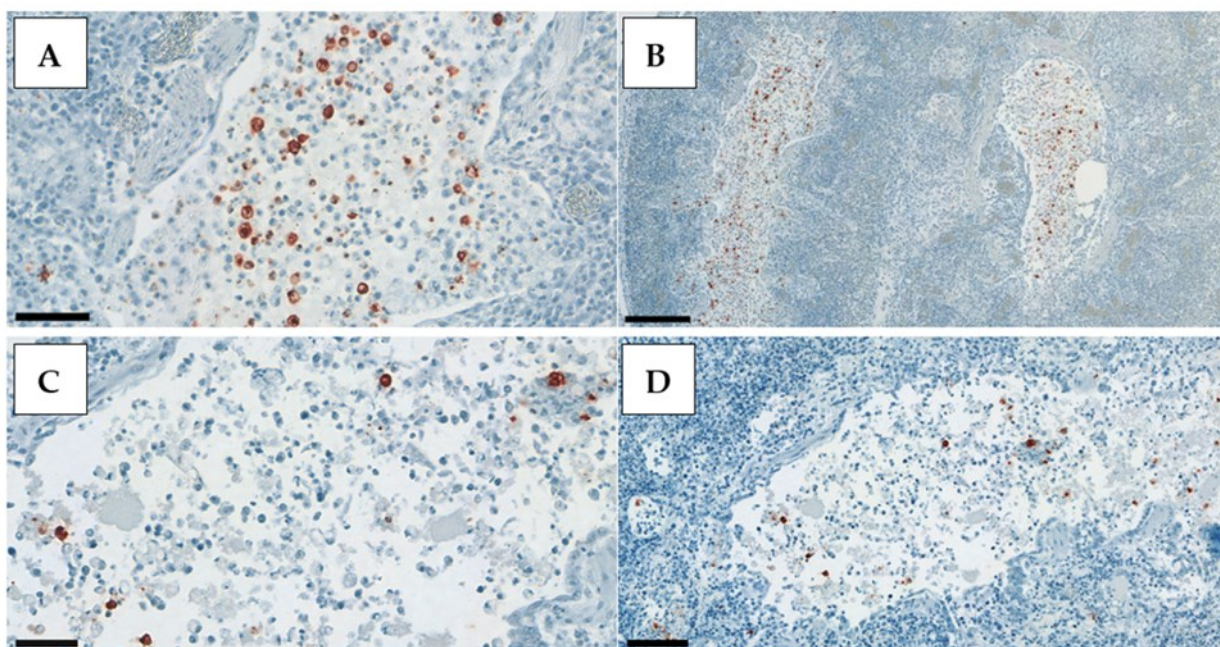
(A) Látható sötétvörös lerakódás a leváló hámsejtek magjában, a légsőben.

(B) Sötétvörös festődő vírusantigén a tüdő leváló alveoláris hámsejtjeiben.

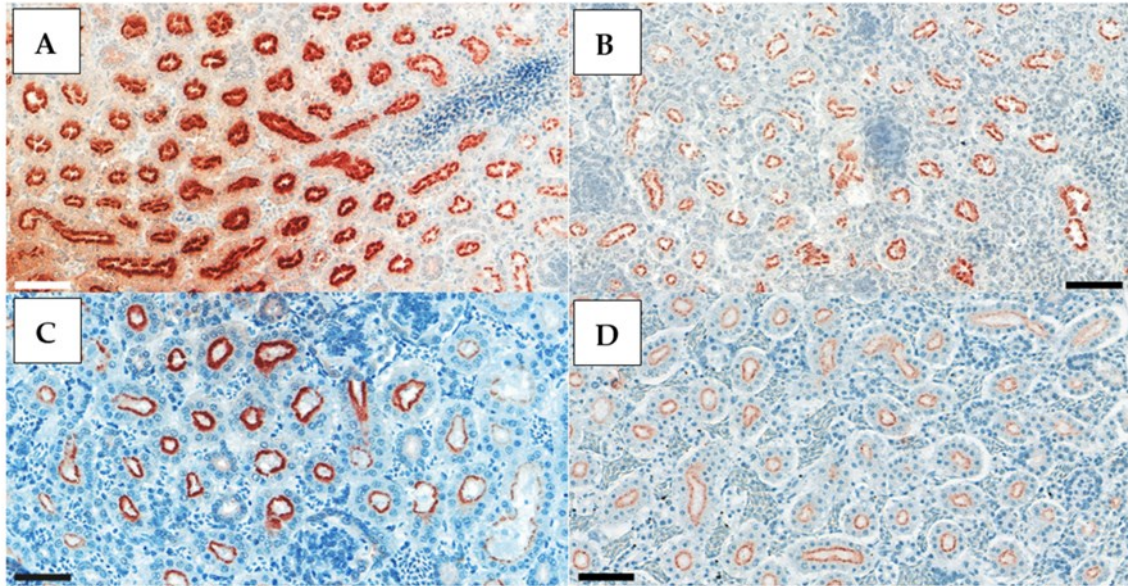
(C) Sötétvörös festődés a kefeszegélyben, vesében.



18. ábra: Légcső leváló hámsejtjeinek IHC festődése. (A, B): „A-Közel-Kelet1.” törzs IV ráfertőzési mód, score 2. (C, D): „C-Észak-Afrika” törzs, IN&IT ráfertőzés, score 2. Indirekt kétlépéses immunreakció, haematoxinin háttérfestés, 40×, lépték = 50 µm.



19. ábra: Vírusantigén kimutatás a tüdő leváló alveoláris hámsejtben. A tárgylemezek háttérfestése hematoxilinnal készült. A vírus antigén szemcsésstől diffúz formában, vörös festődésként jelenik meg, többnyire a sejtmagokban, a ritkán a fertőzött sejtek citoplazmájában. (A): „C-Észak-Afrika” törzs, IN&IT ráfertőzés), score 2, 40× nagyítás. (B): „C-Észak-Afrika” törzs, score 2, 10×, lépték = 200 µm. (C): „A-Közel-Kelet1.” törzs IBV társfertőzéssel, IN&IT ráfertőzés), score 2, 40×, lépték = 50 µm. (D): „A-Közel-Kelet1.” törzs IBV társfertőzéssel, score 2, 20×, lépték = 100 µm. Indirekt kétlépéses immunreakció.



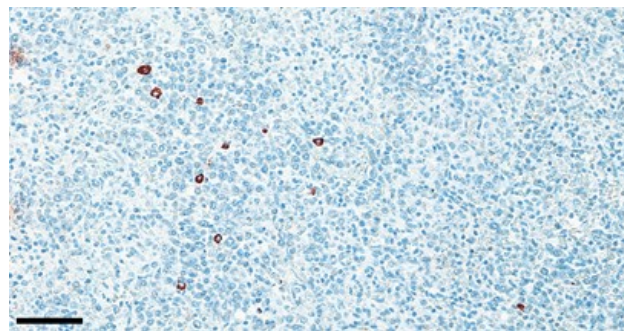
20. ábra: Vírusreplikáció a vesében: diffúz, vörös festődés a tubuláris epithelialis sejtekben.

(A, B): „A-Közel-Kelet 1.” törzs IBV társfertőzéssel, IN&IT ráfertőzés, score 2.

(C): „B-Közel-Kelet 2.” törzs, IN&IT ráfertőzés), score 1.

(D): „C-Észak-Afrika” törzs, IN&IT ráfertőzés), score 1.

A score 1-es pontszám azt jelenti, hogy a vörös elszíneződés a vese meghatározott területén látható. A score 2-es pontszám az jelenti, hogy a színreakció az egész vesében látható. Indirekt kétlépéses immunreakció, haematoxin háttérfestés, 40×, lépték = 50 µm.

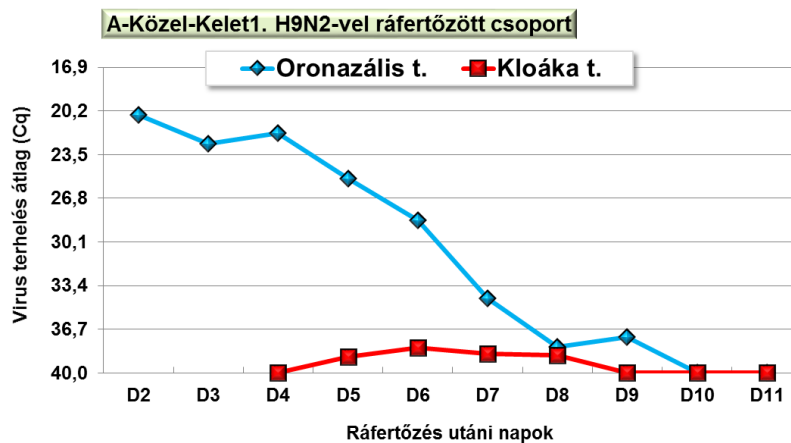


21. ábra: IHC festődés a lépben. H9N2 AIV-val IN&IT beoltott 26 napos csirke lépe- „C-Észak-Afrika” törzs. Indirekt kétlépéses immunreakció, hematoxin háttérfestés, 40×, lépték= 50 µm.

Alkalmanként a lépben a csirkék 8 %-ban találtunk vírus antigént a három, különböző vírustörzsszel ráfertőzött csoportban (21. ábra). A hasnyálmirigyben és az agyban nem volt kimutatható a vírusantigén, minden minta egyaránt negatívnak bizonyult az 5 és 11 dpi-n.

6.1.5. PCR eredmények

Az 'A-Közel-Kelet 1. törzs esetében naponta oronazális és kloáka tampon mintákat vettünk a vírusűrités vizsgálatára. A 22. ábrán látható, hogy az IN&IT ráfertőzés után az oronazális tamponból már a 2. napon kimutatható a vírus, míg a kloáka tamponból csak 2 nappal később mutatható ki, akkor is csak nagyon kis mértékben. A felső légutakból a 4. nap után drasztikusan csökken a vírusűrités, ami a 8. naptól már szinte minimálisnak, a 10. naptól negatívnak tekinthető. A kloákán át történő vírusűrités a 4. naptól észlelhető, ami a megfigyelési időszak előrehaladtával kismértékben emelkedik, majd a 9. naptól megszűnik.



22. ábra: A-Közel-Kelet 1. törzs esetében a vírusűrités vizsgálata oronazális és kloáka tampon mintákból a megfigyelési időszak alatt.

6.1.6. Különböző diagnosztikai módszerekkel kapott eredmények összehasonlítása

A Spearman-féle rangkorrelációs együtthatókat (r_s) számoltunk a kórszövetten és az IHC, valamint a kórszövetten és a PCR összehasonlítására a légcsőben, a tüdőben és a vesében, mivel a légutakban és a vesében okozott különböző súlyosságú, de figyelemre méltó elváltozásokat a ráfertőző vírus. Statisztikailag szignifikáns ($p < 0,0500$), de mérsékelt pozitív korrelációt mutattunk ki a kórszövetteni és az IHC eredmények között ($r_s = 0,37$ a légcső és a tüdő esetében; $0,47$ a vese esetében). Hasonlóképpen szignifikáns és mérsékelt, de negatív korrelációt mutattunk ki a kórszövetteni pontszámok és a PCR Ct-értékei között ($r_s = [-0,39]$ a vesére, $[-0,48]$ a tüdőre és $[-0,6]$ a légcsőre).

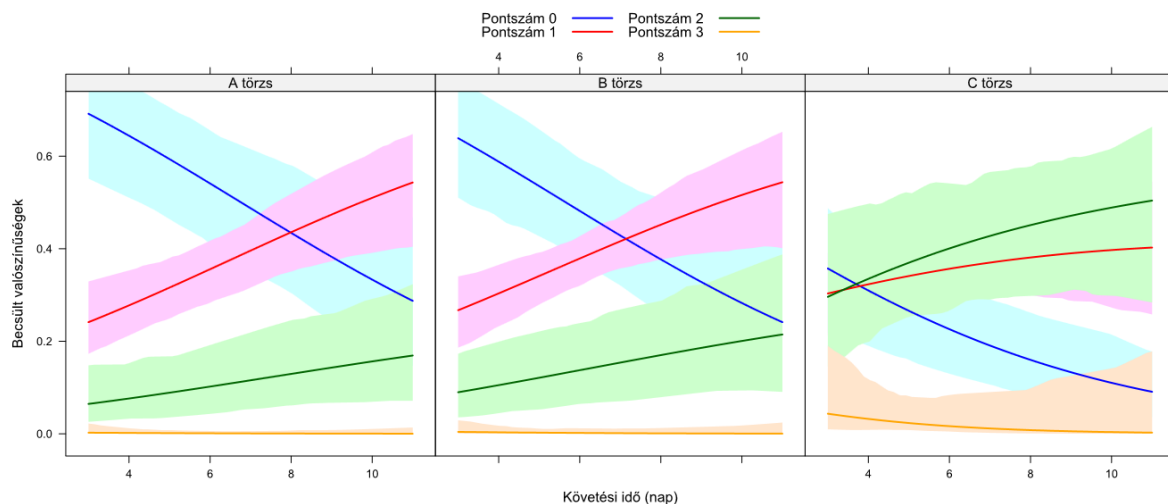
6.2 Különböző földrajzi eredetű törzsek kórfejlődésének vizsgálata

Azonos ráfertőzési mód (IN&IT) mellett vizsgáltuk a különböző földrajzi területekről származó H9N2 LPAI vírusok okozta fertőzés kórlefolyását a patogenitásbeli és egyéb különbségek megfigyelése céljából.

6.2.1. Klinikai tünetek

Szignifikáns különbség volt megfigyelhető az 'A – Közel-Kelet1.' és a 'C- Észak-Afrika' törzs között ($p=0,011$), valamint a 'B- Közel-Kelet 2.' és a 'C- Észak-Afrika' törzs között ($p=0,0055$). Azonban a statisztikai elemzés nem mutatott ki szignifikáns különbséget az 'A- Közel-Kelet 1.' és a 'B- Közel-Kelet 2.' törzs között ($p=0,8078$).

A 23. ábra az alkalmazott modell (CR modell) által a klinikai pontszámok becsült valószínűségeit (95%-os konfidencia sávokkal) szemlélteti, a három vírustörzs esetén a megfigyelési időszak során. Nevezetesen, az 'A- Közel-Kelet1.' és a 'B- Közel-Kelet 2.' törzs esetében hasonló mintázatokat figyeltünk meg, míg a 'C- Észak-Afrika' törzs esetében a csirkék általában magasabb pontozási kategóriájúak voltak, ami rosszabb klinikai állapotot jelez.



23. ábra: Klinikai tünetek pontszámainak modell által becsült valószínűségei és 95%-os konfidencia sávok minden pontszám kategóriában, a három csoportban a megfigyelési időszakban. Az 'A- Közel-Kelet1.' és a 'B- Közel-Kelet 2.' törzs esetében hasonló mintázatot látunk a klinikai tünetek súlyosságában, míg a 'C- Észak-Afrika' törzs esetében a súlyosabb klinikai tüneteket jelző, magasabb pontozás látható.

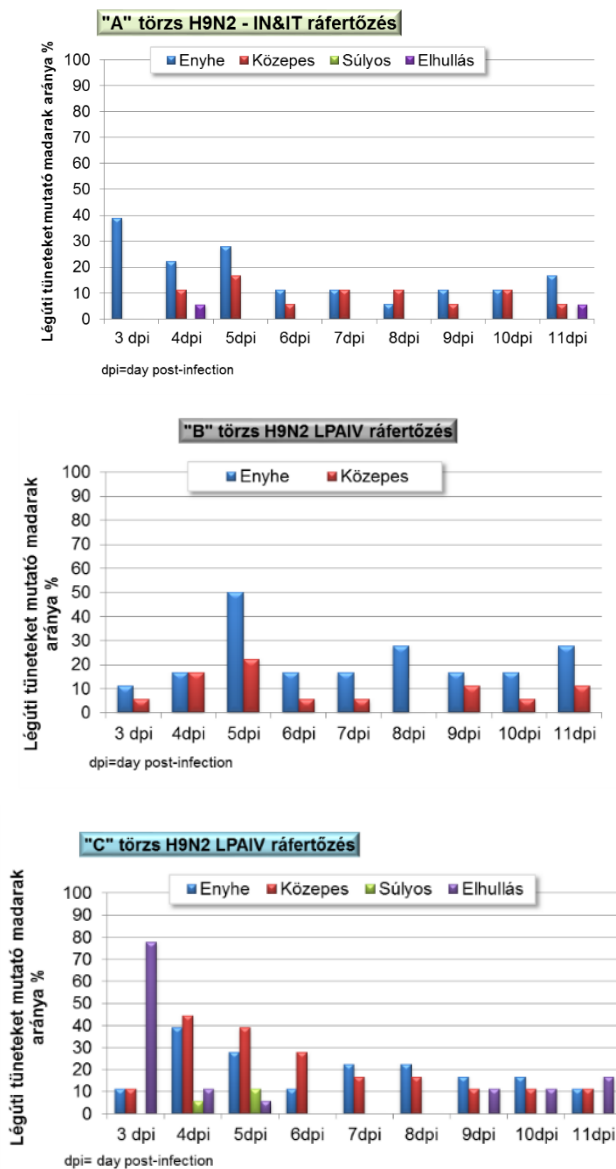
Ha a különböző törzsek okozta klinikai tüneteket nézzük azonos ráfertőzési mód mellett, akkor megállapítható, hogy

- a „B- Közel-Kelet2.” és a „C-Észak-Afrika” törzs az 5 dpi-n okozza a legsúlyosabb klinikai tüneteket,

- a „C-Észak-Afrika” törzs esetében csökkennek a tünetek 5 dpi után
- A „C-Észak-Afrika” törzs okozza a legsúlyosabb tüneteket a három törzs közül.

Ebből arra következtethetünk, hogy a kórfejlődés heveny (5 dpi) és idült (11 dpi) szakasza szépen elválik egymástól, így a mintázás idejét jól határoztuk meg; valamint a „C-Észak-Afrika” törzs súlyosabb tüneteket okoz, tehát patogénebbnek bizonyul a klinikai tünetek alapján.

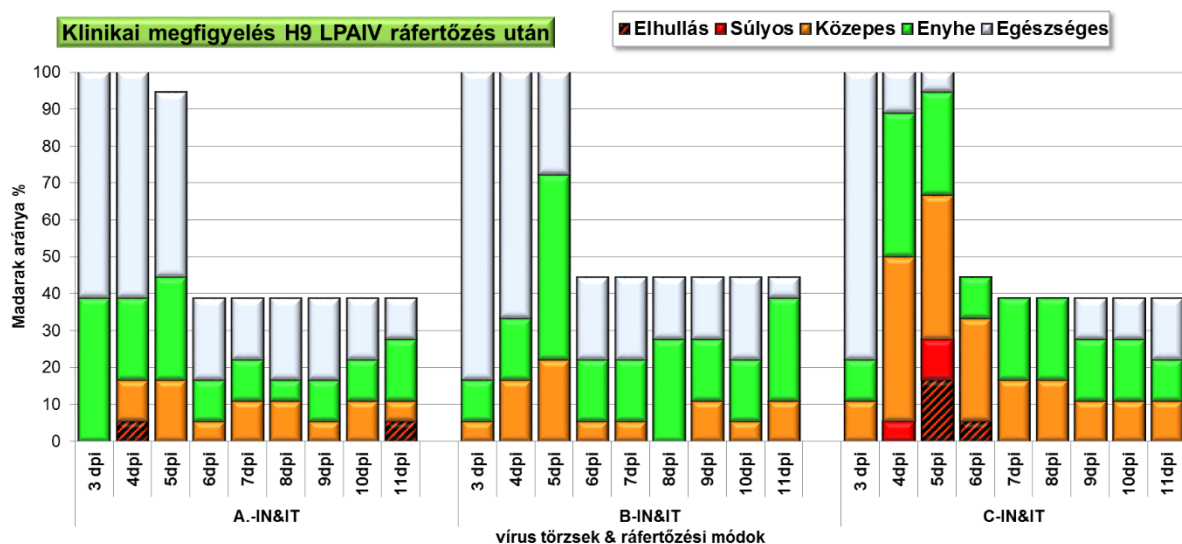
A 24. ábrán láthatóak a törzsek által okozott tünetek és elhullások a megfigyelési időszak alatt. Az „A-Közép-Kelet1.” és a „C-Észak-Afrika” törzs okozott elhullást a megfigyelési időszakban. A „C-Észak-Afrika” törzs okozta a súlyos, és a legtöbb közepes légúti tüneteket.



24. ábra. Különböző törzsek által okozott légúti tüneteket mutató madarak aránya a megfigyelési időszak alatt. A „C-Észak-Afrika” törzs okozta a súlyosabb és a legtöbb közepes légúti tüneteket.

A 25. ábrán a klinikai tüneteket súlyossági fokuk szerint láthatjuk csoportonként. A színek a pontozási értékben kifejezett enyhe- 1, mérsékelt-2, súlyos-3 klinikai tüneteket, illetve az elhullásokat mutatja, a sávok hosszúsága az állomány %-os érintettségét mutatja. A csoportok többségében enyhe klinikai tünetek láthatók. Mérsékelt/közepes tünetek elsősorban a 4-5-6 dpi napon láthatók a 'C-Észak-Afrika' vírussal fertőzött csoportban. Súlyos tünetek csak a 'C-Észak-Afrika' vírussal fertőzött csoportban láthatók. Elhullás az 'A-Közél-Kelet1.' törzzsel fertőzött csoportban a heveny és az idült szakaszban; a 'C-Észak-Afrika' törzzsel fertőzött csoportban az 5-6 dpi napon, a heveny szakaszban fordult elő.

A „C” törzs nagyobb arányban okozott enyhe és közepesen súlyos tüneteket, míg súlyos tüneteket csak ez a törzs okozott. A „B” törzsnél is több az enyhe tünet az „A” törzsnél tapasztalhatóhoz képest.



25. ábra: A klinikai tünetek súlyossága és azok %-os megoszlása a ráfertőzött vírustörzsek szerint.

A „C” törzs nagyobb arányban okozott enyhe és közepesen súlyos tüneteket, míg súlyos tüneteket csak ez a törzs okozott.

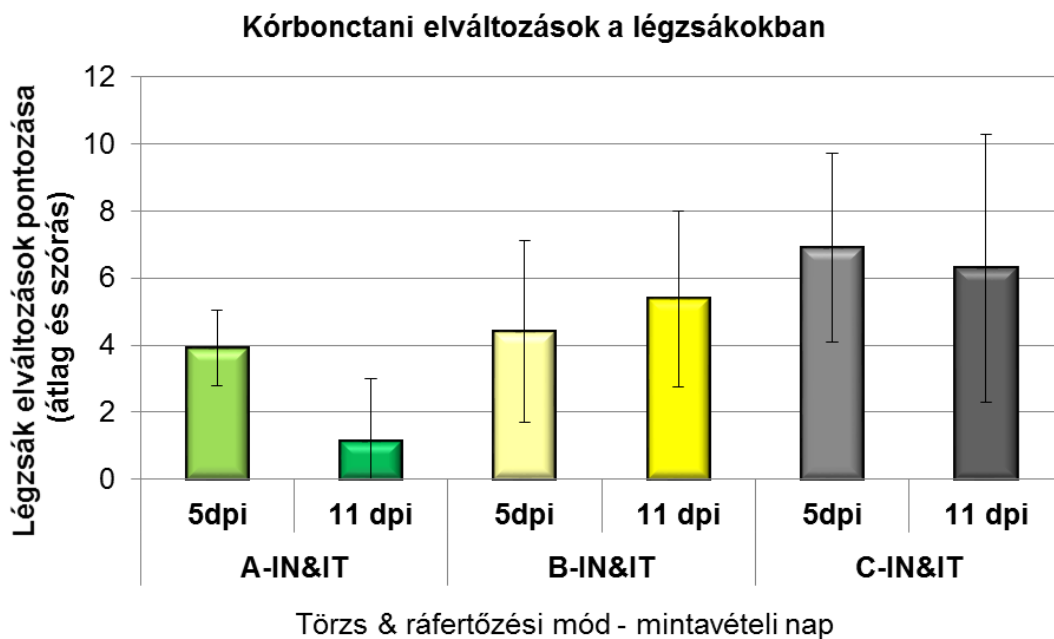
6.2.2. Kórbonctan

Légcső

A trachea elváltozás pontszámok esetében a dpi változó szignifikánsnak bizonyult (OR (dpi 11/dpi 5): 3,7, $p = 0,0158$). A három törzs között azonban nem tudunk szignifikáns különbséget kimutatni.

Légzsákok

A légzsákok elemzése során szignifikáns különbségeket tudunk kimutatni az 'A- Közel-Kelet1' és a 'B- Közel-Kelet2.' törzs (OR (A/B): 10,34, $p = 0,0199$) és az 'A- Közel-Kelet1' és a 'C-Észak-Afrika' törzs között. (OR (A/C): 33,97, $p = 0,0003$). A 26. ábrán látható, hogy a „B-Közel-Kelet2.” és a „C-Észak-Afrika” törzs esetében súlyosabb légzsák elváltozásokat (opálos elszíneződés, eresztes belövelltség, fibrin pelyhek felrakódása) figyeltünk meg, mely 11 dpi-re csökkenő tendenciát mutatott, kivéve a „B-Közel-Kelet2.” törzs esetén, ahol 11 dpi-re súlyosbodtak az elváltozások.

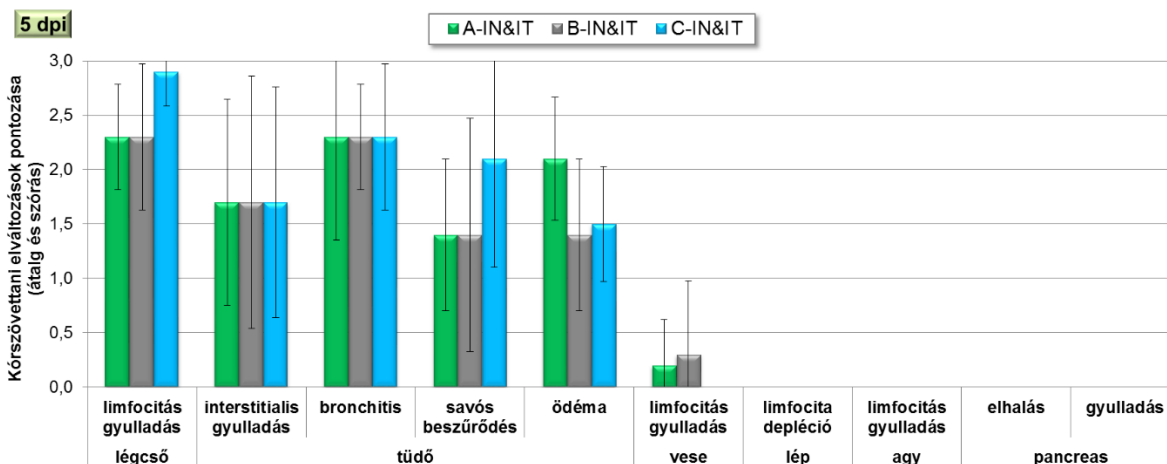


26. ábra: Légzsákok kórbonctani elváltozásai a különböző törzsekkel fertőzött csoportokban.

A „C-Észak-Afrika” törzs esetében súlyosabb légzsákelváltozásokat látunk.

6.2.3. Kórszövettan

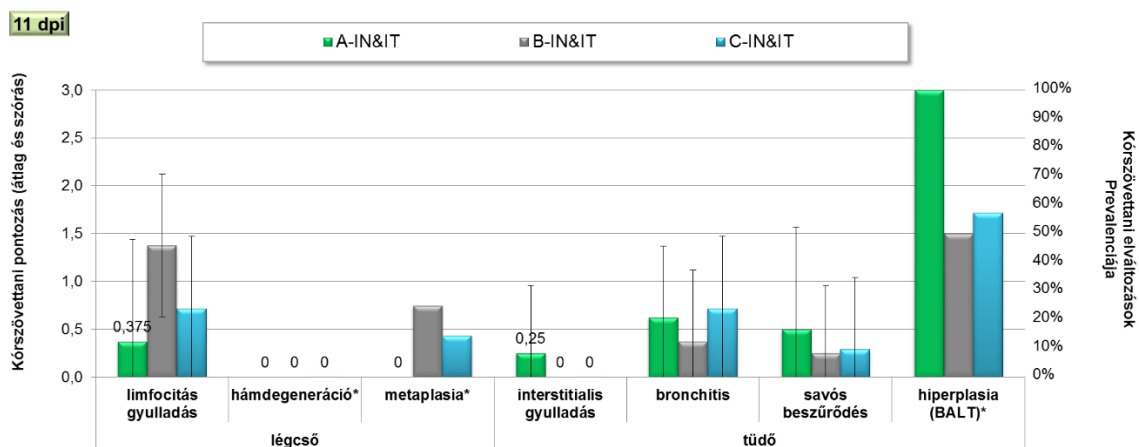
A kórszövettan eredmények összefoglalását a 27. és a 28. ábra tartalmazza. A 27. ábra mutatja a ráfertőzés utáni 5. napon (5 dpi) vett minták szövettani elváltozásait a vírustörzsek szerint: Légcső elváltozásokat azonos ráfertőzési mód mellett a „C-Észak-Afrika” törzs okozott súlyosabb mértékben. A tüdőben interstitialis gyulladást és bronchitist azonos ráfertőzési mód mellett a törzsek azonos mértékben alakítottak ki. A tüdő savós beszűrődésénél is hasonló a helyzet, azzal a kitételrel, hogy a „C-Észak-Afrika” törzs kiemelkedően súlyosabb elváltozást mutatott. A lépben egyik törzsnél sem találtunk kórszövettan elváltozást.



27. ábra A ráfertőzés utáni 5. napon vett minták összesített kórszövetani pontozása vírustörzsenként.

A 28. ábrán a 11 dpi-n talált elváltozások láthatók, melyek sokkal kisebb mértékben nyilvánulnak meg, mint 5 dpi-n, jelezve, hogy a kórfejlődés idült fázisában járunk, lecsengett a fertőzés.

Azonos ráfertőzési mód mellett a légcsőben a „B-Közel-Kelet 2.” törzs mutat nagyobb mértékű limfocitás gyulladást és metapláziát; a tüdőben a „C-Észak-Afrika” törzs nagyobb mértékű bronchitist, az „A-Közel-Kelet 1.” törzs nagyobb mértékű savós beszűrődést és hiperpláziát mutat.



28. ábra A ráfertőzés utáni 11. napon vett minták összesített kórszövetani pontozása. Az ábra jobb oldalán %-an kifejezve.

A kórszövetani elváltozások elemzése során nem lehet egyértelmű sorrendiséget felállítani a törzsek között.

6.2.4. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai eredmények alapján összehasonlítva a három H9N2 törzs patogenitását azonos ráfertőzési módok (IN-IT) mellett,

- az „A-Közel-Kelet 1.” törzs esetén a légső 55%-ban, a tüdő 36%-ban, a vese 18%-ban és a lép 9%-ban,
- a „B-Közel-Kelet 2.” törzs esetén csak a légső 30%-ban és a vese 40%-ban volt kimutatható;
- a „C-Észak-Afrika” törzs esetén a légső 60%-ban, a tüdő 70%-ban, a vese 90%-ban és a lépminták 10%-ban volt megtalálható a vírus antigén.

A súlyossági pontszámok megerősítik a törzsek közötti különbségeket, amelyeket az elváltozások gyakorisága mutatott: Az „A-Közel-Kelet1.” törzssel beoltott csoportokból egy kivételével minden tüdőminta 1-es pontszámot kapott, ugyanezt a megfigyelést kaptuk a „B-Közel-Kelet 2.” törzs esetén is (1 trachea minta 2 scoring pontot kapott). A „C-Észak-Afrika” törzssel fertőzött csoportban az elváltozások súlyosabbak voltak: A légső és a vese minták többsége 2-es pontot kapott (a pozitív minták 40%-a és 50%-a). A statisztikai összehasonlítások szignifikáns különbségeket tártak fel a törzsek között a tüdő és a vesetropizmus esetében ($p = 0,0065$ and $0,0008$). A „C-Észak-Afrika” törzssel fertőzött madaraktól származó tüdőminták felfelé elmozdulást mutattak a „B-Közel-Kelet 2.” törzssel fertőzöttekhez képest ($p = 0,0045$), miközben nem volt szignifikáns különbség az „A-Közel-Kelet 1.” törzssel fertőzött tüdőszövetek medián IHC pontszámai között összehasonlítva a „B-Közel-Kelet 2.” és a „C-Észak-Afrika” törzsekkel.

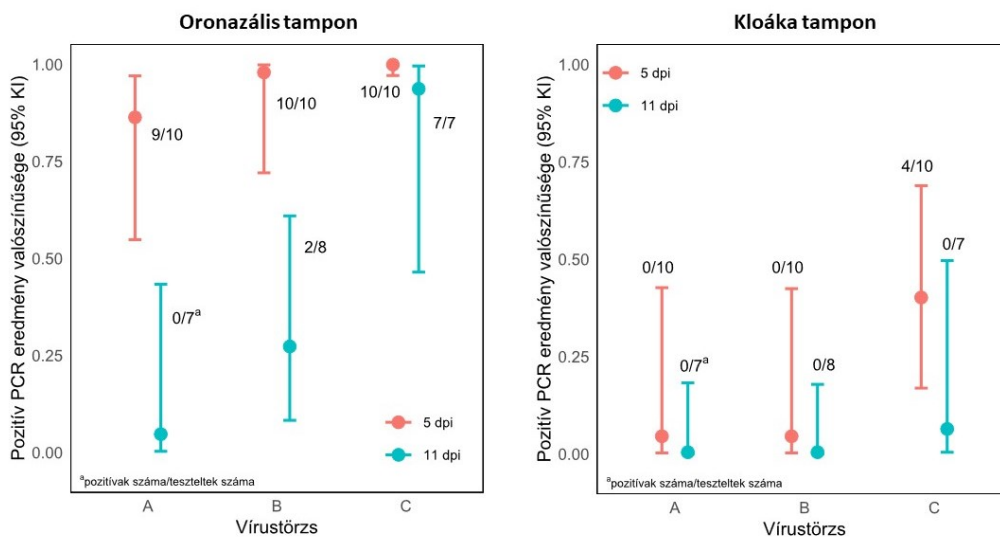
Veseminták tekintetében a „C-Észak-Afrika” törzs virulensebbnek bizonyult, mint az „A-Közel-Kelet 1.” és a „B-Közel-Kelet 2.” törzs, amit a szignifikánsan magasabb medián IHC pontszám jelez ($p = 0.0008$ and $p = 0.0166$). Az összesített IHC pontszámok mediánja szintén szignifikáns összefüggést mutatott a törzs típusával ($p=0,0028$), hasonló páronkénti különbségekkel, mint a veseminták esetében. Vagyis a vírus antigén mennyisége magasabb volt a „C-Észak-Afrika” törzssel fertőzött madarakban, mint az „A-Közel-Kelet 1.” és a „B-Közel-Kelet 2.” törzsek esetén ($p=0,0215$ és $p=0,0042$). A légső- és a lépminták esetében nem mutattunk ki szignifikáns különbséget a törzsek között.

A légső IHC pontszámainak összesítése során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a három vírustörzs között. A vese IHC pontszámaival összefüggésben azonban szignifikáns különbséget találtunk az „A-Közel-Kelet 1.” törzs és a „C-Észak-Afrika” törzs között (OR (A-Közel-Kelet 1./C-Észak-Afrika): 11,37, $p = 0,0184$).

A kontrollcsoportból származó minták IHC negatívak voltak, ami azt jelzi, hogy a vizsgált csoportok között nincs keresztszennyeződés.

6.2.5. PCR

A víruskiválasztást PCR-rel vizsgáltuk az 5 és 11 dpi-n vett oronazális és kloáka-tamponokból. Egy kivétellel ("A- Közel- Kelet 1." csoport) minden csirke ürítette a ráfertőzött vírust a dpi 5-ön, az oronazális tamponon keresztül; azonban 11 dpi-n jelentősen csökkent a vírusürítés, ami a csoportok között nagy különbséget mutatott. A 29. ábra a törzs és a dpi várható hatásait mutatja a pozitív PCR eredmények valószínűségére. Az oronazális tampon PCR eredményeinél a dpi változó szignifikánsnak bizonyult ($p < 0,0001$), és szignifikáns különbséget tapasztaltunk az „A-Közel- Kelet1.” és a „C-Észak-Afrika” törzsek között ($p = 0,0175$). A kloákaminta esetében a dpi változó nem volt szignifikáns, és nem tudtuk szignifikáns különbséget kimutatni a törzsek között.



29. ábra: Pozitív PCR eredmények valószínűségeinek becslése és 95%-os konfidencia-intervallumok: oronazális (bal) és a kloáka (jobb) tampon. A törzs= Közel-Kelet 1. B törzs= Közel-Kelet 2. C törzs= Észak-Afrika H9N2 vírus.

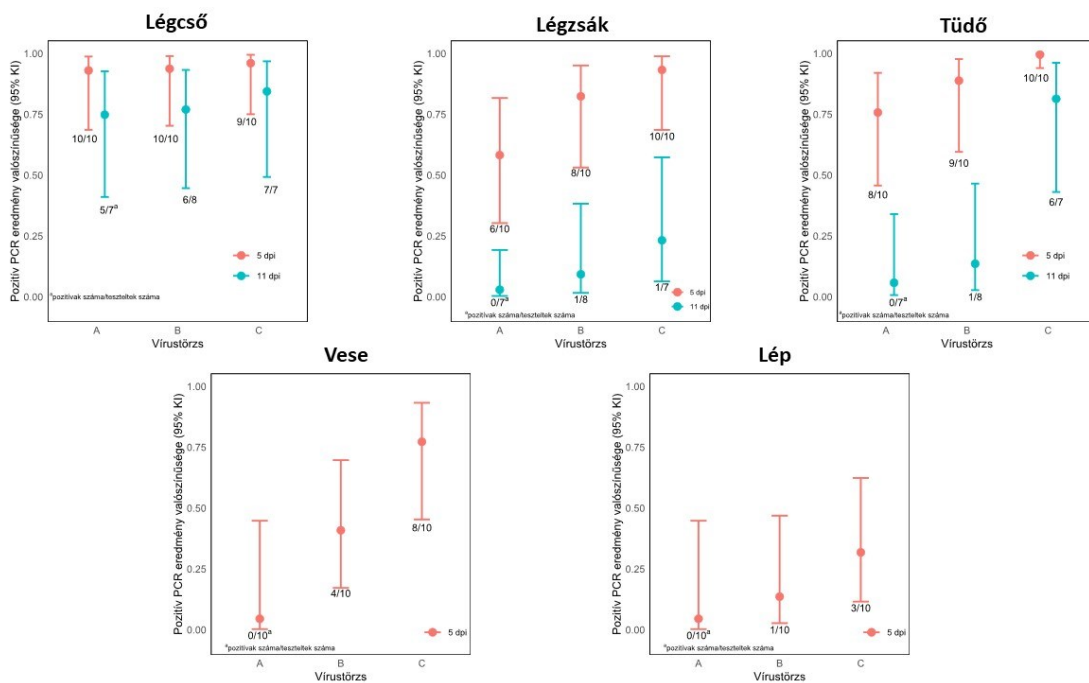
A ráfertőzött törzsek PCR-rel detektálhatóak a légutakban, különböző mértékben 5 és 11 dpi-n az alábbiak szerint:

- A légcsőben: egy kivétellel minden madár 5 dpi-n pozitív eredményt mutatott, többségük (22-ből 18, 82%) 11 dpi-n is. A légcső PCR eredmények statisztikai értékelése során azt láttuk, hogy az 5. és 11. mintavételi napok összehasonlítása során nem kaptunk szignifikáns különbséget sem a törzsek, sem a mintavételi napok között.
- A légcsákokban: a csirkék 80%-a (30-ből 24) volt pozitív 5 dpi-n és 9%-a (22-ből 2) 11 dpi-n. Ennek megfelelően a dpi változó szignifikánsnak bizonyult ($p < 0,0001$), de nem kaptunk szignifikáns különbséget a három törzs között;
- Tüdőben: 5 dpi-n a csirkék 90%-át (30-ből 27), 11 dpi-n 32%-át (22-ből 7) találtuk pozitívnak. A tüdő PCR eredményei esetében a dpi változó szignifikáns ($p < 0,0001$). Szignifikáns különbséget állapítottunk

meg az „A-Közél-Kelet 1.” és a „C-Észak-Afrika” törzsek ($p = 0,0093$), valamint a „B- Közél-Kelet 2.” és a „C-Észak-Afrika” törzsek ($p = 0,0257$) között.

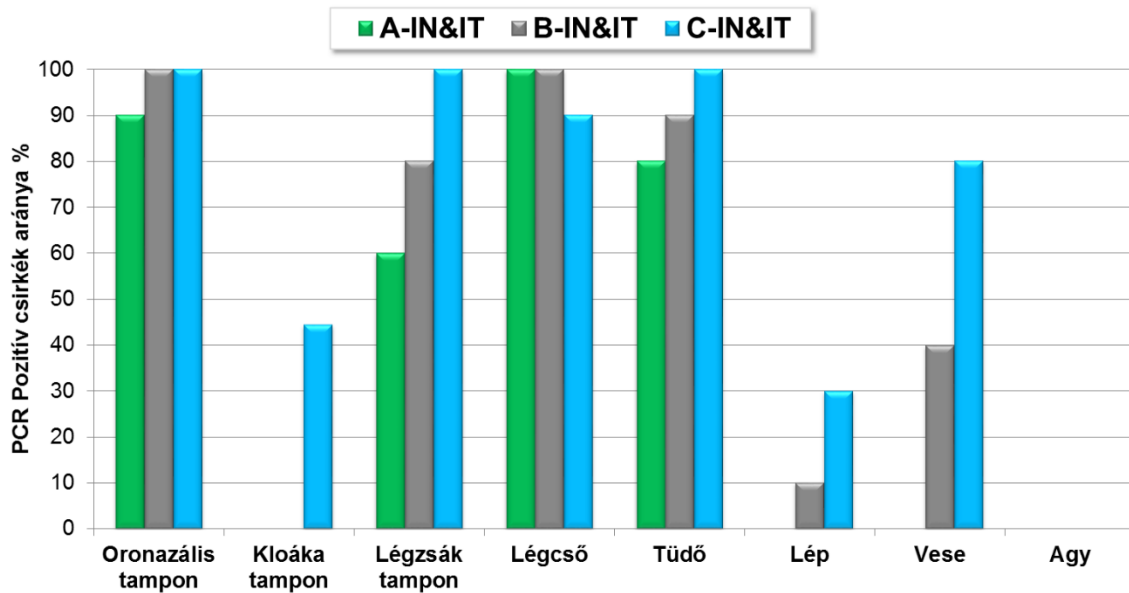
A 30. ábra a vírustörzs és a dpi becsült hatásait mutatja a pozitív PCR-eredmények valószínűségére a légcsőben, a légzsákokban, a tüdőben, a vesében és a lépben.

A vírusgenomot alkalmanként a vesében és a lépben csak 5 dpi-n mutattuk ki. A lépben nem volt szignifikáns különbség a három törzs között, míg a vese PCR eredményei esetén az „A- Közél-Kelet 1.” és a „C-Észak-Afrika” törzsek között szignifikáns különbséget találtunk ($p = 0,0351$).



30. ábra: Pozitív PCR eredmények valószínűségeinek becslése és 95%-os konfidencia-intervallumok

Az 5 dpi-n mért PCR eredmények összefoglaló ábrázolása a 31. ábrán látható. Az agyban egyik H9N2 vírus törzs sem volt kimutatható. Az oronazális tamponban, a légzsákban, a légsőben és a tüdőben mindegyik vírustörzs megjelent, ezzel is alátámaszta a H9N2 vírus szöveti tropizmusát a felső légutakban és a tüdőben. A PCR eredmények alapján a törzsek közötti patogenitás különbség is látszik: a „C-Észak-Afrika” törzs jelent meg legtöbbször a legnagyobb mértékben, a szervekben és tampon mintákban. Figyelemreméltó, hogy a kloáka tampon mintákban csak a „C-Észak-Afrika” törzset; a lép és vese mintákban a „B-Közél-Kelet 2.” és a „C-Észak-Afrika” törzseket mutattuk ki.



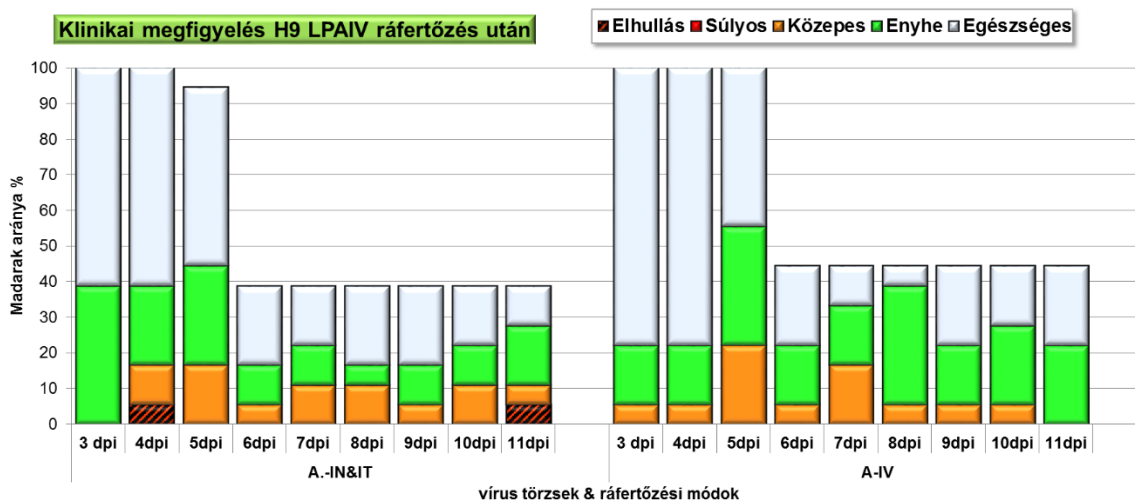
31. ábra: Az 5 dpi-n mért PCR eredmények a három vírustörzs összehasonlításában.
A törzsek között patogenitás különbség mutatkozik.

6.3. Különböző ráfertőzési módok hatása a kórfejlődésre

6.3.1. Klinikai tünetek

Az „A- Közel-Kelet1.” törzs a különböző ráfertőzési módok függvényében (32. ábra- IN&IT és IV), a klinikai tünetek eltérő ütemben jelennek meg:

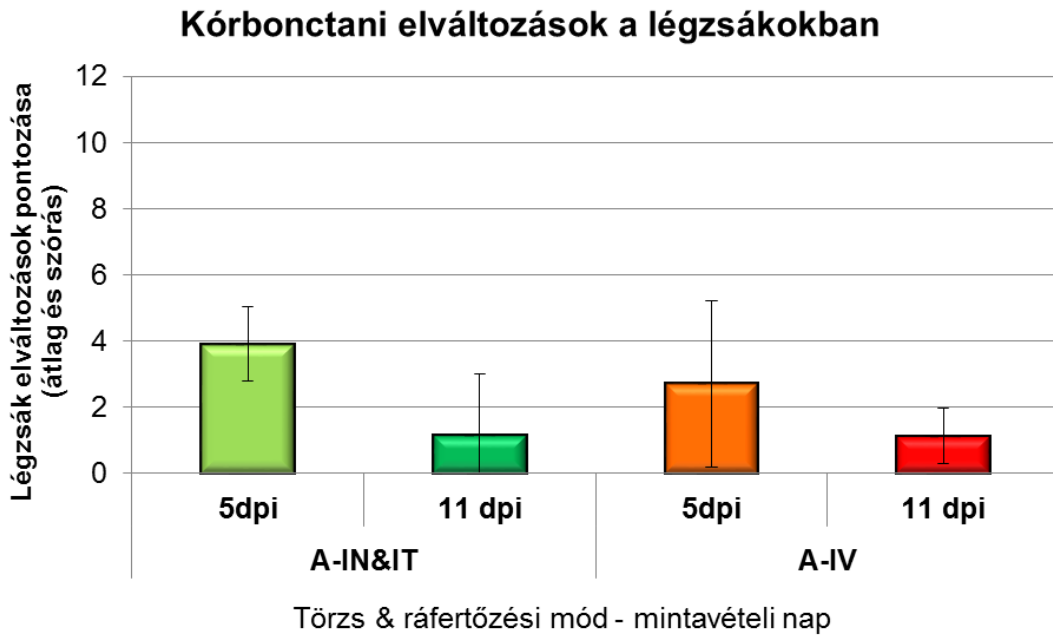
- IN&IT ráfertőzés során a klinikai tünetek az idő előrehaladtával enyhén súlyosbodnak, de 1 pontozási érték alatt maradnak.
- IV ráfertőzés esetén a klinikai tünetek 2 nappal később érik el az IN&IT ráfertőzés okozta pontozási értéket, de hamarabb, és magasabb pontozási értéket mutatnak a 7 és 8 dpi-n, majd csökkenő értékeket mutat.



32. ábra: Az „A- Közel-Kelet1.” törzs által okozott légúti tünetek IN&IT, valamint IV ráfertőzés esetén. Az IV ráfertőzés több enyhe tünetet váltott ki.

6.3.2. Kórbonctan

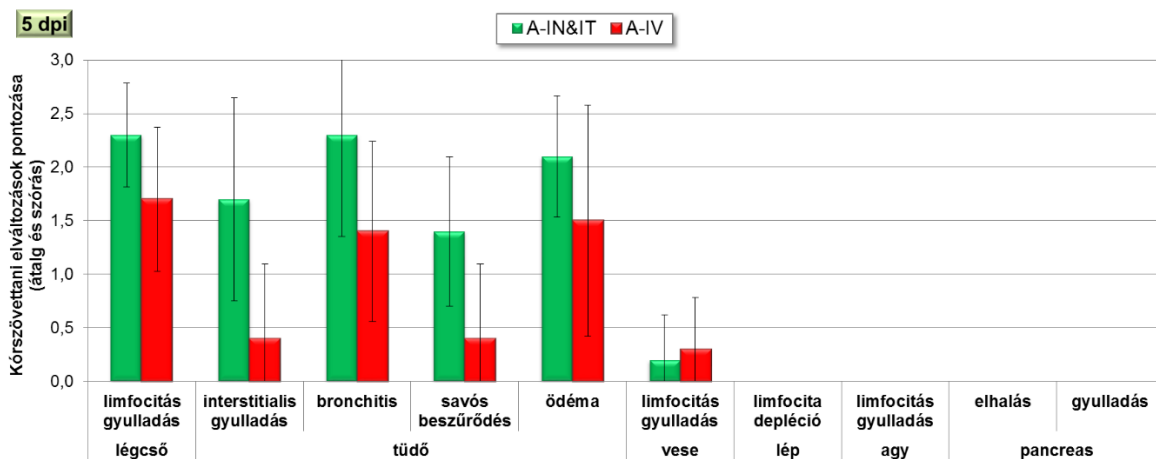
Kórbonctani elváltozások esetében az IV ráfertőzési mód esetében 5 dpi-n enyhébb elváltozásokat láttunk a légzsákok bírálata során, míg 11 dpi-n azonos mértékben alig láttunk elváltozásokat (33. ábra).



33. ábra: Kórbonctani elváltozások a légzsákokban ugyanazon vírustörzs IN&IT és IV ráfertőzési mód esetében. Az IV ráfertőzés során 5 dpi-n enyhébb elváltozásokat láttunk.

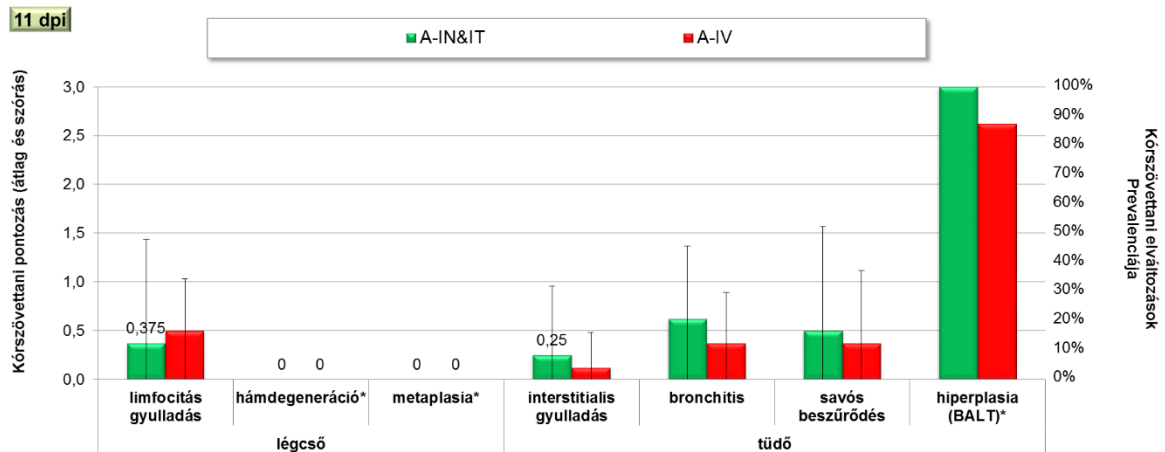
6.3.3. Kórszövettan

Az IV ráfertőzés esetén 5 dpi-n enyhébb mértékű kórszövettan elváltozásokat láttunk a légsőben és a tüdőben, míg a vesében súlyosabb elváltozásokat. A lépben, agyban és pancreasban egyik ráfertőzési mód mellett sem találtunk elváltozást (34. ábra).



34. ábra: Kórszövettan elváltozások 5 dpi-n eltérő ráfertőzési mód esetén. Az IV ráfertőzés esetében a légutakban enyhébb, míg a vesében súlyosabb elváltozásokat láttunk.

11 dpi-n a légcsőben az IV ráfertőzési mód esetében a légcső limfocitás gyulladása nagyobb pontszámot kapott, míg a tüdőben az IN&IT ráfertőzési mód esetén láttunk súlyosabb elváltozásokat (35. ábra). Ez a megfigyelés a vírus szöveti tropizmusára ad információt: ráfertőzési módtól függetlenül a felső légutakban és a tüdőben található meg a H9N2 vírus.



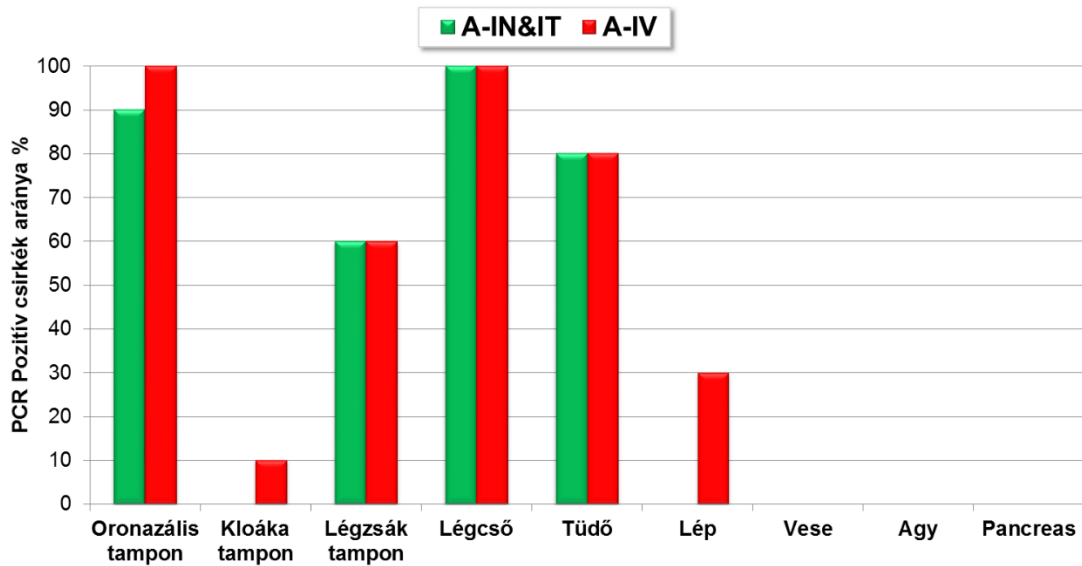
35. ábra: Kórszöveti elváltozások 11 dpi-n eltérő ráfertőzési mód esetén. Ráfertőzési módtól függetlenül a H9N2 vírus szöveti tropizmusa a felső légutakban és a tüdőben van.

6.3.4. Immunhisztokémia

Az IV ráfertőzés több antigén kimutatást eredményezett a vesében (50% vs. 18%), a lépben (20% vs. 9%), és kevesebbet a tüdőben (20% vs. 36%). A légsőminták pozitív aránya meglehetősen hasonló volt (60% vs. 55%). Az IV csoportban az elváltozások valamivel súlyosabbak voltak: összesen 15 pozitív mintából 6 minta 2-es pontszámot kapott (40%), ellentétben az IN&IT csoporttal, ahol a 13 pozitív mintából csak 1 (8%) kapott 2-es pontszámot. A számszerű trendek ellenére a Mann-Whitney U-teszt nem mutatott szignifikáns eltéréseket a fertőzési módok között ($p > 0,05$ szövetenként és az összesített pontszámokban).

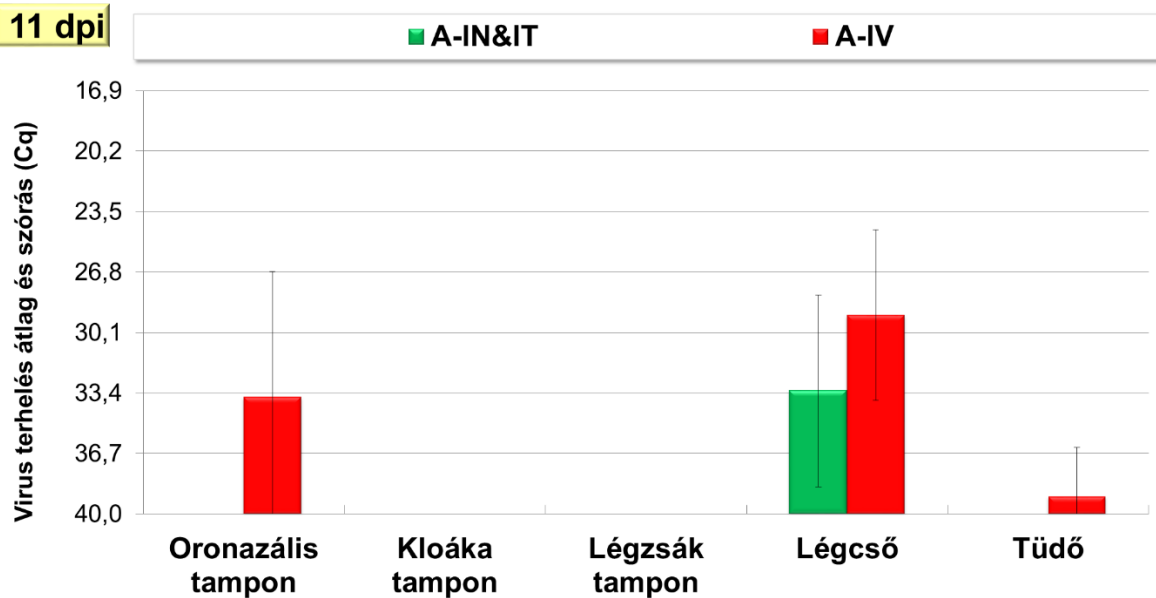
6.3.5. PCR

Az 5 dpi-n PCR céljára vett tampon és szerv minták eredményei alapján elmondható, hogy IV ráfertőzés esetén olyan mintákban (kloáka tampon és a lép) is kimutatható a vírus, ami a természetes fertőzési mód (IN&IT) esetén nem. Az IV ráfertőzés esetén a légzsák tampon, légcső és tüdő esetében azonos mértékben, az oronazális tampon esetében nagyobb mértékben mutatható ki a vírus, mint IN&IT ráfertőzési mód esetén. A PCR eredmények is alátámasztják, hogy a vírus szerv tropizmusa a felső légutak és a tüdő (36. ábra).



36. ábra: 5 dpi-n vett minták PCR eredménye. IV ráfertőzés esetén olyan szervekbe is eljut a vírus, ahova IN&IT ráfertőzés esetén nem.

A 11 dpi-n vett minták PCR eredménye azt mutatja, hogy a természetes ráfertőzési mód (IN&IT) esetén a vírus szinte teljes mértékben kiürül a szervezetből, csak a légcső mintákból mutatható ki. Az IV ráfertőzés esetén a légcsőből, az oronazális tamponból és kis mértékben a tüdőből kimutatható a vírus. (37. ábra).

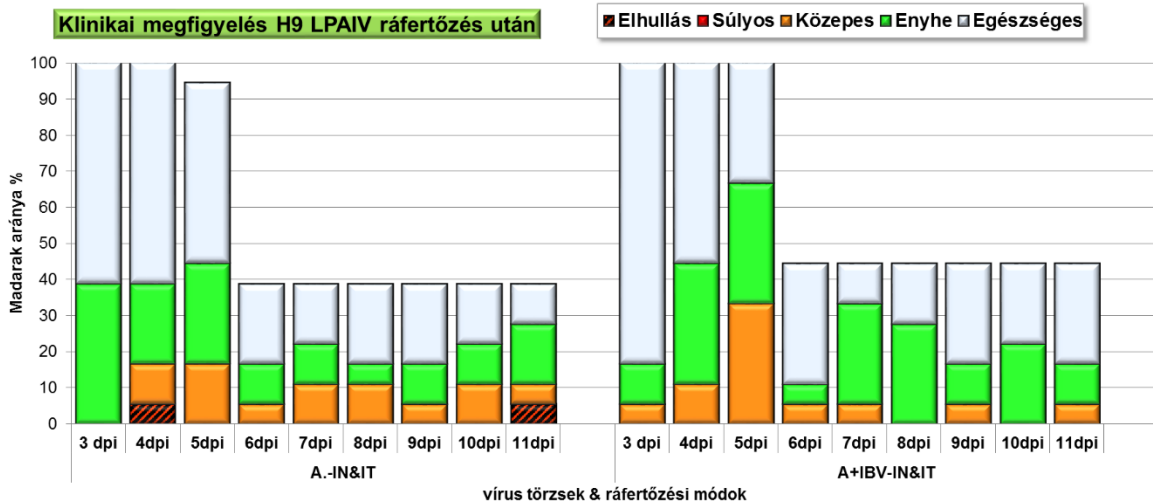


37. ábra: 11 dpi-n vett PCR minták eredménye: Az IN&IT ráfertőzés esetén a vírus a légcső kivételével kiürült a szervezetből, míg az IV fertőzés esetén az légcsőből, az oronazális tamponból, és kismértékben a tüdőből is kimutatható.

6.4. IBV társfertőzés hatása a H9N2 kórfejlődésére

6.4.1. Klinikai tünetek

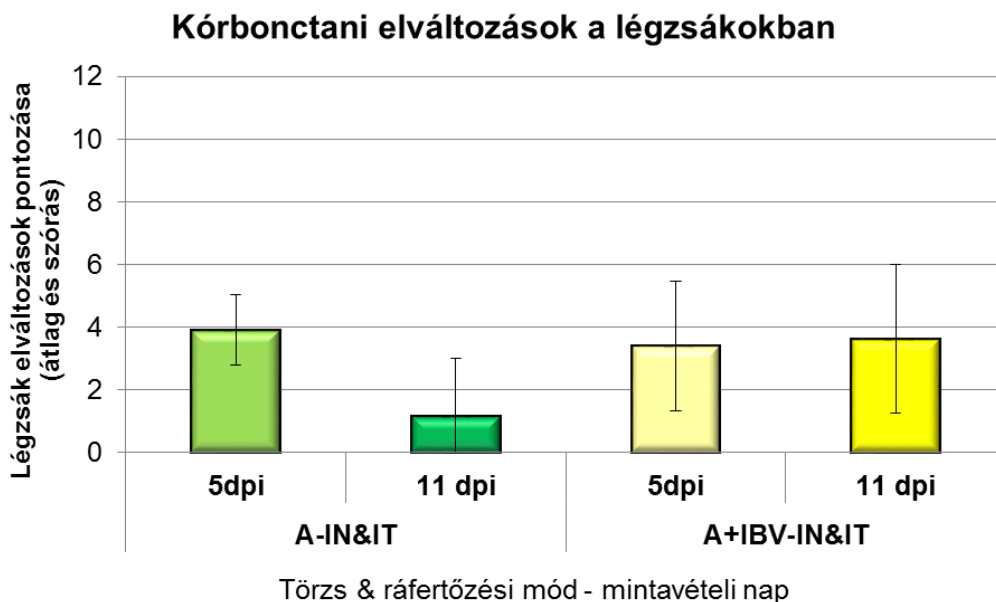
A klinikai tüneteket tekintve a társfertőzéses csoportnál azt láttuk, hogy egy nappal később jelentkeznek magasabb arányban enyhe és közepes légúti tünetek, melyek a 7-8, 10 dpi-n is magasabb arányban fordulnak elő, mint csak a H9N2-vel fertőzött csoportban (38. ábra). A társfertőzéses csoportban elhullás nem fordult elő.



38. ábra: Légúti tünetek a megfigyelési időszakban az „A-Közel-Kelet 1.” és az A törzs + IBV társfertőzéses csoportban.

6.4.2. Kórbonctan

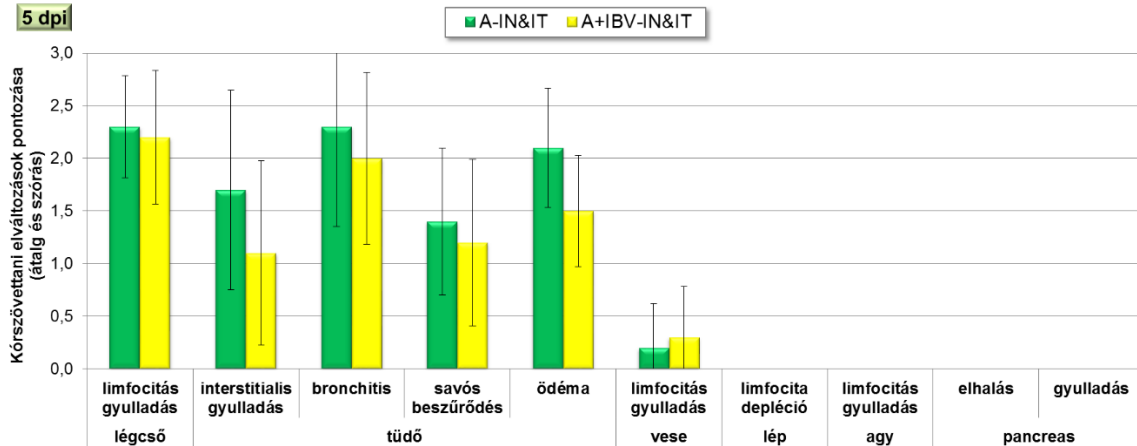
A boncolás során a társfertőzéses csoportban a légzsák elváltozások növekvő tendenciát mutatnak 11 dpi-n, 5 dpi-hez képest. A csak H9N2-vel fertőzött csoportokban a légzsák elváltozások pontozása csökkenő mértéket mutat 11 dpi-re (39. ábra).



39. ábra: Légzsákok kórbonctani elváltozásainak pontozása 5 és 11 dpi-n a vizsgált csoportokban.

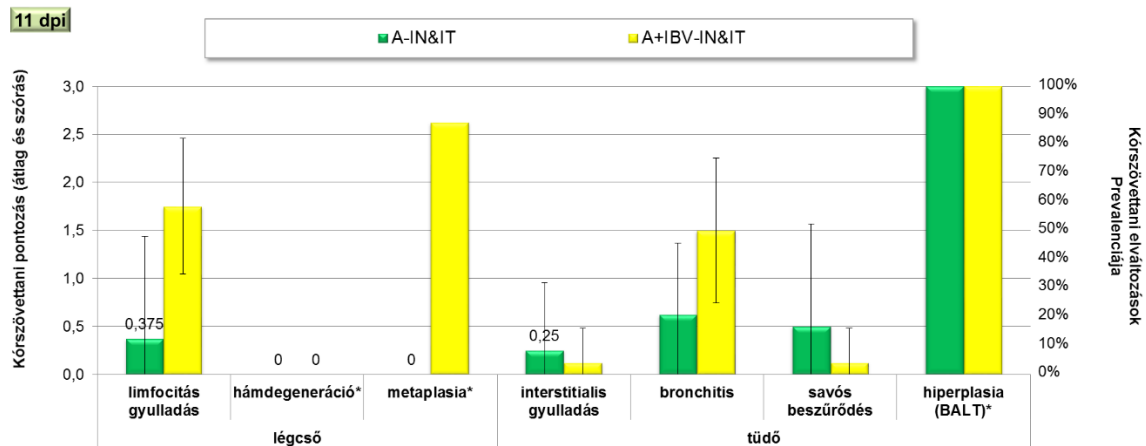
6.4.3. Kórszövettan

A társfertőzéses csoportban az elváltozás közepes mértékben volt jelen. A 40. ábrán az 5 dpi-n vett minták kiértékelése alapján elmondható, hogy a H9N2 fertőzés a légutakban önmagában súlyosabb elváltozásokat okozott, mint társfertőzéssel. A vesében az IBV társfertőzés súlyosabb elváltozásokat mutatott, ami megerősíti, hogy a H9N2 vírus szöveti tropizmusa a felső légutak és a tüdő.



40. ábra: Az 5 dpi-n talált kórszövetani elváltozások láthatók társfertőzéssel összehasonlítva. A H9N2 fertőzés a légutakban önmagában súlyosabb elváltozásokat okozott, mint társfertőzéssel.

Az idült fázisban az IBV társfertőzéses csoport mutat súlyosabb elváltozásokat a légutakban. Szembetűnően magasabb pontozás, tehát súlyosabb elváltozások láthatók a társfertőzéses csoportban a légcső limfocitás gyulladása és metapláziája, valamint bronchitis esetén 11 dpi-n (41. ábra).



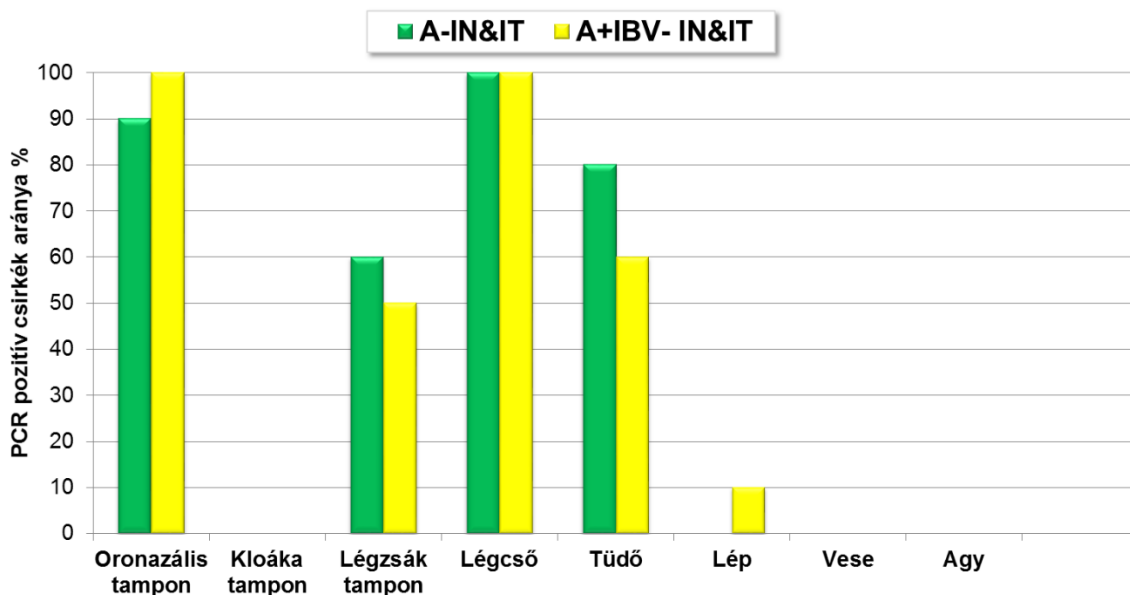
41. ábra: A 11 dpi-n talált kórszövetani elváltozások a társfertőzéssel összehasonlítva. A társfertőzéses csoportban magasabb pontszámú gyulladós folyamatokat látunk.

6.4.4. Immunhisztokémia

A nefropatogén IBV-vel és az „A-Közel-Kelet1.” törzssel való együttes fertőzés lényegesen gyakrabban mutatta ki az AIV-t a vesében (60% vs 18%). Érdekes módon kevesebb vírust találtunk a tüdőben és a légcsőben (30% vs 36% illetve 20% vs 55%). A súlyosság rendkívül eltérőnek tűnt a vesemintákban: 6-ból mindössze 2 (33%) kapott 2-es pontszámot a társfertőzött csoportban, míg 2 pozitív vese volt 1-es pontszámmal az „A-Közel-Kelet1.” törzssel fertőzött csoportban. A statisztikai összehasonlítás azt mutatta, hogy a vese IHC pontszámok szignifikánsan magasabbak voltak a nefropatogén IBV-vel társfertőzött csoportban, mint az egyszeri H9N2-fertőzötteknél ($p=0,0449$). Más szövetek esetében nem volt szignifikáns a különbség.

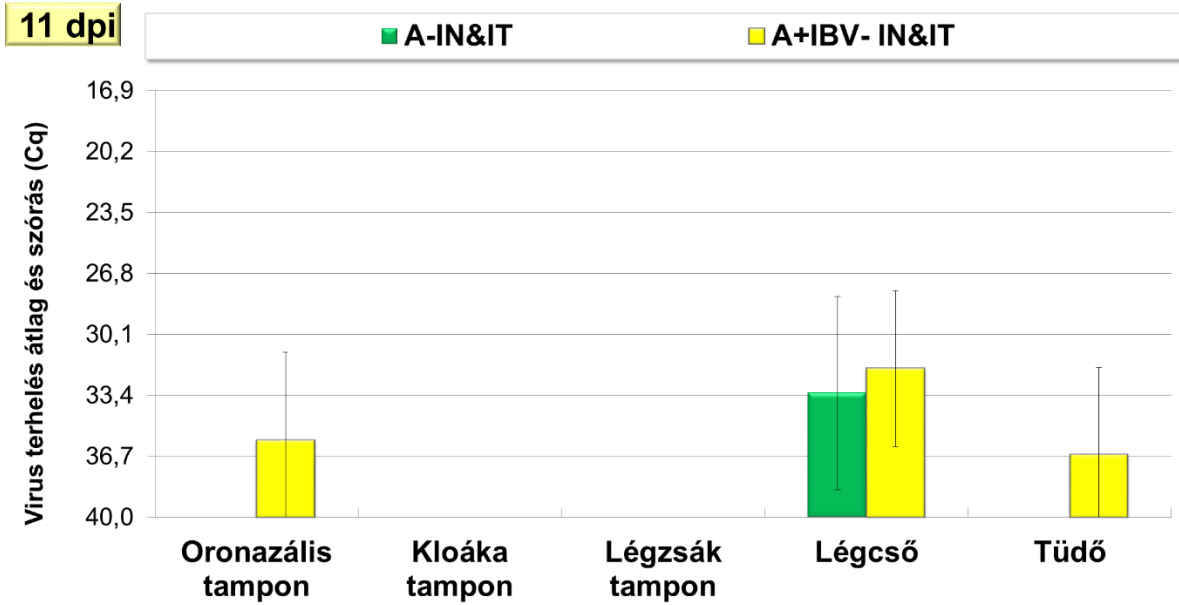
6.4.5. PCR

Az 5 dpi PCR eredmények alapján a H9N2 vírust a légcsőben, azonos mértékben, a légzsák tampon és tüdő esetében nagyobb mértékben, az oronazális tampon esetében kisebb mértékben mutattuk ki a társfertőzéses csoporthoz képest. A lépben csak a társfertőzéses csoport esetében mutattuk ki a H9N2 vírust (42. ábra). A kloáka tamponban, az agyban és a vesében nem mutattunk ki H9N2 vírust egyik csoportban sem.



42.ábra. Az 5 dpi-n mért PCR eredmények a társfertőzéssel összehasonlítva.

A kórfejlődés idült fázisát jelző 11 dpi-n mért PCR eredmények azt mutatják, hogy a H9N2 vírus fertőzés már lezajlott, csupán a légsőben találtunk vírust, míg a társfertőzéses csoportban az oronazális tamponban, a légsőben és a tüdőben találtunk H9N2 vírust, tehát elhúzódott a kórlefordulás a társfertőzés jelenlétében (43.ábra).



43. ábra: A 11 dpi-n mért PCR eredmények a társfertőzéssel összehasonlítva. A társfertőzés jelenlétében elhúzódik a H9N2 fertőzés kórlefordulása.

6.5. Módszertani újítások

6.5.1 Immunhisztokémia

Az avidin-biotin komplex módszer kipróbálása után az értékelhetőség és a megbízhatóság növelése érdekében az újgenerációsnak tekinthető indirekt, kétlépéses immunreakciót alkalmaztunk peroxidáz-jelölt másodlagos ellenanyaggal és 3-amino-9-etil-karbazol (AEC) szubsztrát kromogénnel. Ennek a kitnek az EnVision reagense egy peroxidázzal konjugált polimer váz, amely emellett egér immunglobulinok elleni másodlagos ellenanyag molekulákat is hordoz. Több peroxidáz molekula és több másodlagos ellenanyag-molekula kombinációja ugyanazon a polimeren egyszerű, mégis érzékenyebb vizualizációs rendszert biztosít. Folyó csapvíz alatti mosás és szobahőmérsékleten 2 percig tartó Mayer-féle hematoxilinnal végzett festés kék hátteret biztosít, melyben a piros immunfestés könnyen értékelhető. A módszert már HPAIV esetén használják, munkánk során a H9N2 LPAIV-ra adaptáltuk a módszert a protokoll módosításával, ezáltal a meglévő módszert új dologra használtuk. Részleteket lásd az 5.4. fejezetben.

6.5.2 Statisztika

A szakirodalomban hagyományosan alkalmazott Kruskal-Wallis, Man-Whitney U és Dunn teszt mellett a Continuation Ratio mixed effect (CR) modellt és a Cumulative link modellt (más néven arányos oddsz modell) alkalmaztuk. A dolgozatban bemutatott a random hatással kibővített CR modell alkalmazása nemcsak azért előnyös, mert kifejezetten ordinális adatok modellezésére optimalizált, hanem azért is, mert így lehetőségünk nyílt az ismételt mérésekből (nem független megfigyelésekből) származó adatok helyesebb modellezésére is. Részleteket lásd az 5.6. fejezetben.

7. MEGBESZÉLÉS/KÖVETKEZTETÉS

Szakirodalmi adatok alapján a kommersz brojlercsirkék kísérleti fertőzése H9N2 LPAIV törzsekkel általában enyhe vagy közepesen súlyos klinikai tüneteket eredményezett, amelyek többnyire a fejen és a felső légutakban jelentkeztek, mint például könnyezés, szem- és/vagy arcduzzanat, tüszögés, zihálás és orrfolyás. Enyhe levertséget, valamint csökkentett takarmány- és vízfelvételt is gyakran megfigyeltek. Ezek a tünetek 2–3 dpi-nél jelentkeztek, és 5–7 dpi-ig fennálltak; a madarak általában 10–12 dpi-re gyógyultak meg elhullás nélkül (*Subtain, Chaudhry, Anjum, Maqbool és Sadique, 2011; Shahid és mtsai., 2019*). Kivételesen súlyosabb klinikai tüneteket jelentettek – pl. bágyadság, borzolt tollazat, enyhe légúti tünetek, beleértve a köhögést, tüszögést és néha zihálást, különösen a Mycoplasma-pozitív alcsoportokban, az elhullási arány akár 40%-os is volt – veséből izolált H9N2 törzssel történt kísérleti fertőzést követően (*Pazani, Vasfi Marandi, Ashrafihelan, Marjanmehr és Farid, 2008*). Mások súlyos patológiás elváltozásként hiperémiát, petechiális vérzéseket, alkalmanként a légcsőben (a bifurkációnál) és a tüdőben fokális fibrinlerakódást, valamint megvastagodott, opálos légzsákokat észleltek, időnként duzzadt veséket (*Pazani és mtsai., 2008; Subtain és mtsai., 2011; Awadin, Said, Abdin és El-Sawak, 2018; Begum és mtsai., 2023*).

Minden kísérleti ráfertőzéses vizsgálatban a kórbonctani elváltozásokhoz hasonlóan, a kórszövettani elváltozások is túlnyomó részben a légutakban találhatóak, amelyet gyulladáson és nekrotikus folyamatok jellemeznek. A kehelysejtek szaporodása először a légcsőben volt megfigyelhető, ezt követte a légcső csillós hám leválása és a nyálkahártya limfocita infiltrációja. A tüdőben beszűrődés és perivaszkuláris vérzés mutatkozott, heterofil sejtek infiltrációjával és az alveolusok összeesésével, az erek körüli ödémával. Halvány kékes nyálka és heterofil felhalmozódás is jelen volt a másodlagos bronchiolusok lumenében (*Pazani és mtsai., 2008; Subtain és mtsai., 2011; Awadin és mtsai., 2018; Shahid és mtsai., 2019*).

A vesében interstitialis pangást, vérzést, a kefeszegélyben vakuolás degenerációt, glomeruláris degenerációt és periglomeruláris fibrosissal járó összeesést mutattak. A vese elváltozások gyakorisága meglehetősen változó volt a vizsgálatok között. (*Pazani és mtsai., 2008; Subtain és mtsai., 2011; Shahid és mtsai., 2019*). Alkalmanként a májban a hepatociták duzzanatát és nekrozisát (*Shahid és mtsai., 2019*), valamint a gyomor-bélrendszer érintettségét is megfigyeltek (*Begum és mtsai., 2023*).

A H9N2 vírus antigének jelenlétét (azaz: vírusterhelést) sötétbarna szemcsék formájában mutatták ki a légcső hámrétegében (*Awadin és mtsai., 2018*) a tüdőhámsejtek magjaiban, valamint a nekrotikus vese tubuláris epithelium sejtmagjaiban vagy citoplazmájában ABP-vel. (avidin-biotin-peroxidáz) formalin-fixált mintákban (*Subtain és mtsai., 2011*).

A vírusokat rendszerint szájúregi/oropharyngeális/ és kloáka tamponok PCR vizsgálatával mutatták ki. Hasonlóképpen, a Bangladesh H9N2 törzs esetében is figyelemreméltó vírusürítést találtak oronazális úton, és sokkal kevesebb vírus ürült a bélsárral/vizelettel. Érdekes módon a helyi fajtájú (Sonali) csirkékben elhúzódóbbnak tűnt a vírusürítés, mint a kommersz brojler hibrideknél (*Begum és mtsai., 2023*).

Saját megfigyeléseink a klinikai tünetek tekintetében megegyeztek az irodalomban találtakkal: általában enyhe vagy mérsékelt légúti tünetek, szisztémás tünetek nélkül 3 és 11 dpi között. Súlyos légúti tünetek nyilvánvaló bágyadtsággal csak alkalmanként voltak megfigyelhetőek, akkor is csak a dpi 4-5-n, a „C-Észak-Afrika” H9N2 vírussal fertőzött csoportban. A ≥ 1 klinikai pontszám elérésének valószínűsége szignifikánsan magasabb volt a „C-Észak-Afrika” H9N2 törzssel fertőzött csoportban, mint az „A-Közel-Kelet 1.” vagy a „B-Közel-Kelet 2.” H9N2 törzssel fertőzött csoportban.

Elhullás többnyire a dpi 5-ön (három csirke a „C-Észak-Afrika” H9N2 vírussal fertőzött csoportból), egy esetben a dpi 4-en („A-Közel-Kelet 1.” csoport) és egy a dpi 6-on („C-Észak-Afrika” csoport) fordult elő a fibrindugó okozta fulladás következtében. Bár a „C-Észak-Afrika” csoportban a 18 madárból 4 elhullás magasabbnak tűnik, mint az 1 elhullás az „A-Közel-Kelet 1.” csoportban, illetve 0 elhullás a „B-Közel-Kelet 2.” csoportban, a különbség nem szignifikáns, valószínűleg a viszonylag alacsony mintaszám (állatlétszám) miatt. Ezek az eredmények összhangban vannak azokkal, amelyeket mások a H9N2 vírusokkal végzett kísérleti fertőzésekre vonatkozóan leírtak. Mindazonáltal figyelemre méltó, hogy a telepi jelentések általában súlyosabb klinikai tüneteket és magasabb mortalitási arányt említenek, mint a kísérleti fertőzési vizsgálatokban, ami jól magyarázható a számos hajlamosító tényezővel és a légúti mikroorganizmusokkal való társfertőzéssel az állattartó telepen. A látható patológiás elváltozások a (felső) légutakra korlátozódtak, légcső- és légzsákgyulladás formájában, esetenként összezsugorodott fibrindugókkal a légcső bifurkációjában. A légcső elváltozások szignifikánsan súlyosabbak voltak dpi 5-nél, mint dpi 11-nél, nem volt szignifikáns különbség a csoportok között, míg a légzsákok szignifikánsan súlyosabb elváltozásokat mutattak a „C-Észak-Afrika” csoportban, mint az „A-Közel-Kelet 1” és a „B-Közel-Kelet 2.” csoportokban dpi 5-ön.

Vizsgálatainkban a légcső kórszöveti elváltozásait limfocitás gyulladás jellemezte leváló hámsejtekkel és hám degenerációval. A limfocitás gyulladás mind az 5, mind a 11 dpi-nél nyilvánvaló, és szignifikánsan súlyosabb volt a „C-Észak-Afrika” csoportban, mint az „A-Közel-Kelet1.” csoportban 5 dpi esetén; ezt azonban a légcsőminták IHC és PCR eredményei nem erősítették meg. A hám degeneráció dpi 11-re megszűnt tehát a madarak meggyógyultak. A tüdő kórszöveti elváltozásait interstitialis pneumonia, bronchitis, hurutos beszűrődés és ödéma jellemezte, a csoportok között nem volt szignifikáns különbség; azonban minden csoportban a súlyosság szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető 5 és 11 dpi között. A vese kórszöveti vizsgálata során elsősorban tubulonefrózist és glomerulonefritist állapítottunk meg, esetenként limfocitás gyulladással. A tubulonefrózis szignifikánsan gyakrabban fordult elő a „C-Észak-Afrika” H9N2 vírussal ráfertőzött csoportokban, mint az „A-Közel-Kelet 1.” és „B-Közel-Kelet 2.” törzsekkel fertőzött csoportokban.

A vírusterhelést IHC-vel kimutattuk a légcsőben, a tüdőben, a vesében és néhány esetben, a lépben, dpi 5-ön. Nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között, kivéve a vese esetében, ahol az illesztett kumulatív kapcsolat modell (clm) szignifikánsan magasabb esélyhányados értéket mutatott a vírus antigén jelenlétére a „C-Észak-Afrika” törzssel fertőzött csoportban. A laborfázis során olyan IHC módszert dolgoztunk ki, amely a baromfiszövetekhez igazodik. A madárszövetek magas

pigment tartalma miatt a humán és állatgyógyászati IHC-ben is gyakoribb DAB helyett az AEC-t részesítettük előnyben. A közvetett, kétlépéses immunreakció, amely magában foglal egy primer monoklonális anti-AIV NP antitestet és egy polimer gerinchez kapcsolt HRP-vel jelölt másodlagos ellenanyagot, érzékeny és specifikus kimutatási rendszert biztosított. A módszer H9N2 LPAIV-re adaptálása kontrasztos, jól látható metszeteket eredményezett, ami lehetővé teszi a vírusfertőzött sejtek könnyű azonosítását és megszámlálását. A H9N2 LPAIV különböző törzsei által okozott elváltozások szöveti eloszlása, gyakorisága és súlyossága jelentős eltéréseket mutat. A vírus antigén gyakran kimutatható volt a hámsejtekben és a légutak (trachea és tüdő) beszűrődő gyulladással sejtjeiben, a vese tubuláris epitheliális sejtjeiben és esetenként a lépben. Ezzel szemben vírus antigént egyetlen mintában sem mutattunk ki az agyban vagy a hasnyálmirigy acinus epitheliumban. A H9N2 LPAIV szűkebb szöveti tropizmusának lényeges különbség a HPAI vírusokhoz képest.

A vírusgenomot a légcsőben, a légcsőcsökben és a tüdőben mutattunk ki dpi 5. és 11.-n, annak ellenére, hogy a kópiaszám szignifikáns csökkenését láttuk 5 dpi és 11 dpi között. A vese és lép minták csak dpi 5.-n mutattak pozitív PCR eredményt. A „C-Észak-Afrika” vírussal ráfertőzött csoportban szignifikánsan több vírus genomot mutattunk ki a vesékben, mint az „A-Közél-Kelet 1.” törzs esetében.

Szignifikánsan több vírus ürült oronazális úton dpi 5-ön, mint dpi 11-en minden csoportban. Ugyanezt a statisztikai eredményt kaptuk dpi 5-nél a „C-Észak-Afrika” és az „A-Közél-Kelet 1.” csoportok összehasonlításakor.

A ráfertőzött madarak hasnyálmirigyében és agyvelejében egyik laboratóriumi módszerrel sem mutattunk ki H9N2 vírust.

Több paraméter alapján próbáltuk meghatározni a különböző eredetű H9N2 LPAIV törzsek lehetséges virulenciabeli különbségeit. Ezek a szélesebb körű diagnosztikai eszközök lehetővé tették számunkra, hogy megvizsgáljuk a kórszövetten és az IHC, valamint a kórszövetten és a PCR közötti összefüggéseket. Szignifikáns, de mérsékelt korrelációt mutattunk ki, ellentmondásos eredmények nélkül.

A „C-Észak-Afrika” H9N2 vírus virulensebbnek bizonyult vizsgálatainkban az „A-Közél-kelet 1.” és a „B-Közél-Kelet 2.” törzsekhez képest. Azonban további vizsgálatok, beleértve több, különböző földrajzi eredetű H9N2 LPAIV-t és a mintavételek gyakoriságának növelését, segíthetnek a törzsek közötti virulencia különbségek pontosabb meghatározásában.

A különböző ráfertőzési módok vizsgálata során megfigyeléseink szerint az IN&IT fertőzés kisebb gyakorisággal, ámde súlyosabb tüneteket illetve elváltozásokat okoz, míg IV ráfertőzési mód esetén a klinikai tünetek nagyobb gyakorisággal, de enyhébb megnyilvánulási formában jelentkeznek. Lehetséges magyarázatunk erre a jelenségre az, hogy az IV fertőzéssel kikerülhetőek a (felső) légutak aspecifikus védekező mechanizmusai, tehát több állatban eredhet meg a fertőzés, ugyanakkor az LPAIV-k HA hasítására alkalmas proteázok jellemzően a légutakban találhatóak meg, ami indokolhatja a súlyosabb klinikai tüneteket és kifejezettebb elváltozásokat.

A társfertőzés vizsgálata során azt találtuk, hogy mindkét vírusnak (LPAIV és IBV) van a felső légutakhoz szöveti affinitása, így egyidejű fertőzés esetén egymás versenytársai a sejteken, tehát nagyobb vírus mennyiséggel küzd meg a lokális immunválasz, így nagyobb arányban láttunk enyhe, 5 dpi-n közepes légúti tüneteket. A kórbonctani vizsgálat során a légzsák-elváltozások megmaradása, illetve kismértékű emelkedése a folyamat aktív voltára enged következtetni. Tehát a társfertőzés a kórfejlődés idejének kitolódását eredményezi. Valószínűleg versengés lépett fel mindkét kórokozó között a receptor kötődési helyekért, ezért nem tudott olyan súlyos elváltozás kialakulni, mintha csak a H9N2 törzsekkel történik a ráfertőzés. Idült fázisban, a légutakban súlyosabb elváltozásokat láttunk, amiből arra következtethetünk, hogy (i) két kórokozó esetén a kórlefolyás elnyújtottan valósul meg, illetve (ii) a H9N2 fertőzés lezajlása után az IBV fertőzés kerül aktív fázisba. A társfertőzéssel való összehasonlítás során a PCR vizsgálat is alátámasztja, hogy a H9N2 vírus szerv tropizmus a felső légutak és a tüdő.

Következtetések

Megfigyeléseink és méréseink által nyert megállapításaink megerősítették a H9N2 LPAIV törzsek egyértelmű szöveti tropizmusát a légutakhoz, valamint változó mértékben a veséhez. A vizsgált AIV törzsek nem mutattak replikációt a központi idegrendszerben. A vírusok jelenléte és az általuk okozott elváltozások túlsúlyban voltak a fertőzés akut fázisában (dpi 5.), illetve szignifikánsan csökkentek vagy eltűntek a szubakut, krónikus szakaszban (dpi 11.). Több paraméterben statisztikailag szignifikáns, egyértelmű virulenciabeli különbséget mutattunk ki az eltérő földrajzi eredetű H9N2 izolátumok között, amelyek azonos altípusba (H9N2) és azonos lineageba (genetikai vonalba) (G1) tartoztak: a „C-Észak-Afrika” törzs szignifikánsan virulensebbnek bizonyult, mint a közel-keleti („A” és „B”) törzsek, melyek nem mutattak figyelemre méltó eltérést. További vizsgálatok szükségesek a H9N2 törzsek virulencia növekedését feltehetőleg magyarázó genetikai változatosság feltérképezéséhez.

Az IN&IT fertőzés kisebb gyakorisággal, ámde súlyosabb tüneteket, illetve elváltozásokat okozott, míg IV ráfertőzési mód esetén a klinikai tünetek nagyobb gyakorisággal, de enyhébb megnyilvánulási formában jelentkeztek, ugyanakkor ezek az eltérések statisztikailag nem szignifikánsak.

A megbetegedés az LPAIV és IBV társfertőzést követően a tünetek és az elváltozások szignifikáns különbsége nélkül a légutakra lokalizálódik, és időben elhúzódóbb jelleget mutat.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A H9N2 vírus virulenciájának és szöveti tropizmusának vizsgálata során megállapítottuk, hogy:

1. A vizsgált különböző földrajzi eredetű (Közel-Keletről, valamint Észak-Afrikából származó) H9N2 LPAIV törzsek között statisztikailag szignifikáns virulenciabeli különbség állapítható meg, mivel a „C-Észak-Afrika” törzs számottevően súlyosabb klinikai tüneteket, magasabb arányú elhullást, kifejezettebb kórszövettani elváltozásokat okoz, valamint IHC-val több vírus antigén, PCR-rel pedig nagyobb mennyiségű vírus genom detektálható, mint az „A-Közel-Kelet 1.” és a „B-Közel-Kelet 2.” törzsek esetében. Utóbbi két törzs kórokozóképességében nem észleltünk jelentős eltérést.

2. A H9N2 vírusok szöveti tropizmusa elsősorban a felső légutakhoz és a tüdőhöz kötődik, de a vesében is megjelenik, így az IBV-hez hasonló enyhe felső légúti tüneteket okoz. Az adott régiókban tanácsos a fent felsorolt tünetek esetében szűrővizsgálatokat végezni a H9N2 vírus kimutatása, vagy kizárása érdekében.

3. Kísérletes körülmények között is sikerült olyan súlyos fertőzést kialakítani, amit a telepi eseteknél leírunk. Ez alapján elmondható, hogy a H9N2 vírus hajlamosító tényező nélkül is képes súlyos lefolyású betegséget kialakítani, alkalmanként elhullást is okozva. A H9N2 vírus törzstől függően a tapasztalt klinikai tünetek tág határok között változnak: a bágadtságtól a fibrindugó okozta fulladásig.

4. Immunhisztokémiai módszer adaptálása az LPAIV-re: Az avidin-biotin komplex képződésen alapuló módszer helyett az indirekt, kétlépéses immunreakciót alkalmaztuk peroxidáz-jelölt másodlagos ellenanyaggal a megbízhatóbb értékelhetőség érdekében a H9N2 vírusra adaptálva.

5. Újabb statisztikai módszer alkalmazása. A szakirodalomban hagyományosnak tekinthető (és nem minden esetben adekvát) nemparametrikus tesztek (Kruskal-Wallis, Man-Whitney U) mellett/helyett ordinális változókra adaptált regressziós modelleket alkalmaztunk, amelyek az influenzavírus kutatások adat elemzésében teljesen új megközelítést jelentenek.

9. IRODALOM

Adel A, Abdelmagid MA, Mohamed AA, Wasberg A, Mosaad Z, Selim K, Shaaban A, Tarek M, Hagag NM, Lundkvist A, Ellstrom P, Naguib MM. (2022): **Genetic Variations among Different Variants of G1-like Avian Influenza H9N2 Viruses and Their Pathogenicity in Chickens.** *Viruses*, 5. 1030. doi:10.3390/v14051030

Adlhoch CFA, Gonzales JL, Kuiken T, Marangon S, Niqueux É, Staubach C, Terregino C, Aznar I, Chuzhakina K, Munoz Guajardo I, Baldinelli F. (2022): **Avian Influenza Overview June-September 2022** o. 7597.

Ananth C. V, Kleinbaum D. G. (1997): **Regression models for ordinal responses: a review of methods and applications.** 26, 6. 1323–1333. doi:https://doi.org/10.1093/ije/26.6.1323

Arbani O, Ducatez M, Houadfi ME, Fellahi S. (2022): **Low Pathogenic Avian Influenza: A Permanent Threat to Poultry Farming in Africa.** *Broiler Industry, Intech Open*,

Aslam R, Aslam A, Tipu Y, Nazir J, Ghafoor A, Fatima S. (2015): **Histopathological and immunohistochemical studies for the pathogenesis of a low pathogenicity H9 avian influenza virus in experimentally infected commercial broilers.** *Journal of Animal and Plant Sciences*, 45–52.

Awadin W, Said H, Abdin S, El-Sawak AA (2018): **Pathological and Molecular Studies on Avian Influenza Virus (H9N2) in Broilers.** 3. 232–244. doi:10.3923/ajava.2018.232.244

Begum J.A, Hossain I, Nooruzzaman M, King J, Chowdhury E.H, Harder T. C, Parvin R. (2023): **Experimental Pathogenicity of H9N2 Avian Influenza Viruses Harboring a Tri-Basic Hemagglutinin Cleavage Site in Sonali and Broiler Chickens.** *Viruses*, 2. doi:10.3390/v15020461

Bosch F. X., Garten W., Klenk H. D, Rott R. (1981): **Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of avian influenza viruses.** *Virology*, 2. 725–735. doi:10.1016/0042-6822(81)90201-4

Böttcher-Friebertshäuser E, Klenk HD, Garten W (2013): **Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium.** *Pathogens and Disease*, 2. 87–100. doi:10.1111/2049-632X.12053

Bullough P. A, Hughson F. M., Skehel J. J, Wiley D. C. (1994): **Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion.** *Nature*, 6492. 37–43. doi:10.1038/371037a0

Butt A. M., Siddique S, Idrees M, Tong Y (2010): **Avian influenza A (H9N2): Computational molecular analysis and phylogenetic characterization of viral surface proteins isolated between 1997 and 2009 from the human population.** *Virology Journal*, 1. 319. doi:10.1186/1743-422X-7-319

Caliendo V., Lewis N. S, Pohlmann A, Baillie SR., Banyard AC., Beer M., Brown IH, Fouchier RAM, Hansen RDE, Lameris TK, Lang AS, Laurendeau S, Lung O, Robertson G, van der Jeugd H, Alkie TN, Thorup K, van Toor ML, Waldenstrom J, Yason C, Kuiken T, Berhane Y. (2022): **Transatlantic spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 by wild birds from Europe to North America in 2021.** *Scientific Reports*, 1. 11729. doi:10.1038/s41598-022-13447-z

Carnaccini S, Perez D. R. (2020): **H9 Influenza Viruses: An Emerging Challenge.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6. a038588. doi:10.1101/cshperspect.a038588

Chen D., Ji X., Harris M. A, Feng J. Q, Karsenty G, Celeste A. J, Rosen V, Mundy GR, Harris S. E. (1998): **Differential Roles for Bone Morphogenetic Protein (BMP) Receptor Type IB and IA in**

Differentiation and Specification of Mesenchymal Precursor Cells to Osteoblast and Adipocyte Lineages. *The Journal of Cell Biology*, 1. 295–305. doi:10.1083/jcb.142.1.295

David Firth (1993): **Bias Reduction of Maximum Likelihood Estimates.** *Vol.80*, No.1. pp.27-38. doi:<https://doi.org/10.2307/2336755>

Dimitris Rizopoulos (2022): **Ordinal Mixed Models** • https://drizopoulos.github.io/GLMMadaptive/articles/Ordinal_Mixed_Models.html

Dong J, Zhou Y, Pu J és Liu L (2022): **Status and Challenges for Vaccination against Avian H9N2 Influenza Virus in China.** *Life*, 9. 1326. doi:10.3390/life12091326

Ebrahimi SM, Ziapour S, Tebianian M, Dabaghian M, Mohammadi M (2011): **Study of Infection with an Iranian Field-Isolated H9N2 Avian Influenza Virus in Vaccinated and Unvaccinated Japanese Quail.** *Avian Diseases*, 2. 195–200. doi:10.1637/9538-092110-Reg.1

El Houadfi M, Fellahi S, Nassik S, Guérin JL, Ducatez MF. (2016): **First outbreaks and phylogenetic analyses of avian influenza H9N2 viruses isolated from poultry flocks in Morocco.** *Virology Journal*, 1. 140. doi:10.1186/s12985-016-0596-1

FAOSTAT T. F.a.A.O.C.S.D. (2017): **FAOSTAT** • <https://www.fao.org/land-water/land/land-governance/land-resources-planning-toolbox/category/details/en/c/1029516/>

Fusaro A, Monne I, Salviato A, Valastro V, Schivo A, Amarin NM, Gonzalez C, Ismail MM, Al-Ankari AR, Al-Blowi MH, Khan OA, Maken Ali AS, Hedayati A, Garcia Garcia J, Ziay GM, Shoushtari A, Al Qahtani KN, Capua I, Holmes EC, Cattoli G (2011): **Phylogeography and Evolutionary History of Reassortant H9N2 Viruses with Potential Human Health Implications.** *Journal of Virology*, 16. 8413–8421. doi:10.1128/JVI.00219-11

Gao J, Wan H, Li X, Rakic Martinez M, Klenow L, Gao Y, Ye Z, Daniels R (2021): **Balancing the influenza neuraminidase and hemagglutinin responses by exchanging the vaccine virus backbone.** *PLOS Pathogens*, 4. e1009171. doi:10.1371/journal.ppat.1009171

Garten W, Klenk HD (1999): **Understanding influenza virus pathogenicity.** *Trends in Microbiology*, 3. 99–100. doi:10.1016/S0966-842X(99)01460-2

Gohrbandt S, Veits J, Breithaupt A, Hundt J, Teifke JP, Stech O, Mettenleiter TC, Stech J (2011): **H9 avian influenza reassortant with engineered polybasic cleavage site displays a highly pathogenic phenotype in chicken.** *Journal of General Virology*, 8. 1843–1853. doi:10.1099/vir.0.031591-0

Gu M, Xu L, Wang X, Liu X (2017): **Current situation of H9N2 subtype avian influenza in China.** *Veterinary Research*, 1. 49. doi:10.1186/s13567-017-0453-2

Haubo R, Christensen B (2018): **Cumulative Link Models for Ordinal Regression with the R Package ordinal** • <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:59572956>

Jackwood MW. Stallknecht DE. (2007): **Molecular Epidemiologic Studies on North American H9 Avian Influenza Virus Isolates from Waterfowl and Shorebirds.** *Avian Diseases*, s1. 448–450. doi:10.1637/7536-032706R.1

Kishida N, Sakoda Y, Eto M, Sunaga Y, Kida H. (2004): **Co-infection of Staphylococcus aureus or Haemophilus paragallinarum exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens.** *Archives of Virology*, 11. 2095–2104. doi:10.1007/s00705-004-0372-1

Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blödorn J (1975): **Activation of influenza A viruses by trypsin treatment.** *Virology*, 2. 426–439. doi:10.1016/0042-6822(75)90284-6

- Landmann M, Scheibner D, Graaf A, Gischke M, Koethe S, Fatola OI, Raddatz B, Mettenleiter TC, Beer M, Grund C, Ulrich Reiner (2021): **A Semiquantitative Scoring System for Histopathological and Immunohistochemical Assessment of Lesions and Tissue Tropism in Avian Influenza.** *Viruses*, 5. doi:10.3390/v13050868
- Larbi I, Ghedira K, Arbi M, Butcher GD, Rego N, Naya H, Tougorti H, Lachhab J, Behi IE, Nsiri J, Ghram A (2022): **Phylogenetic analysis and assessment of the pathogenic potential of the first H9N2 avian influenza viruses isolated from wild birds and Lagoon water in Tunisia.** *Virus Research*, 198929. doi:10.1016/j.virusres.2022.198929
- Lee DH, Park JK, Lee YN, Song JM, Kang SM, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS (2011): **H9N2 avian influenza virus-like particle vaccine provides protective immunity and a strategy for the differentiation of infected from vaccinated animals.** *Vaccine*, 23. 4003–4007. doi:10.1016/j.vaccine.2011.03.067
- Lee DH, Swayne DE, Sharma P, Rehmani SF, Wajid A, Suarez DL, Afonso CL. (2016): **H9N2 low pathogenic avian influenza in Pakistan (2012–2015).** *Veterinary Record Open*, 1. e000171. doi:10.1136/vetreco-2016-000171
- Lee DH, Torchetti MK, Winker K, Ip HS, Song CS, Swayne DE. (2015): **Intercontinental Spread of Asian-Origin H5N8 to North America through Beringia by Migratory Birds.** *Journal of Virology*, 12. 6521–6524. doi:10.1128/JVI.00728-15
- Liu L, Wang T, Wang M, Tong Q, Sun Y, Pu J, Sun H, Liu J (2019): **Recombinant turkey herpesvirus expressing H9 hemagglutinin providing protection against H9N2 avian influenza.** *Virology*, 7–15. doi:10.1016/j.virol.2019.01.004
- Liu WJ, Xiao H, Dai L, Liu D, Chen J, Qi X, Bi Y, Shi Y, Gao GF, Liu Y (2021): **Avian influenza A (H7N9) virus: from low pathogenic to highly pathogenic.** *Frontiers of Medicine*, 4. 507–527. doi:10.1007/s11684-020-0814-5
- Liu Xing (2010): **Ordinal Regression Analysis: Fitting the Continuation Ratio Model to Educational Data Using Stata. 1,**
- Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. (2001): **H9N2 Influenza A Viruses from Poultry in Asia Have Human Virus-like Receptor Specificity.** *Virology*, 2. 156–162. doi:10.1006/viro.2000.0799
- McGraw-Hill és Luna L. G. (1968): *Manual of Histologic Staining Methods.* New York, NY, USA
- Meng Z, Han R, Hu Y, Yuan Z, Jiang S, Zhang X, Xu J. (2014): **Possible pandemic threat from new reassortment of influenza A (H7N9) virus in China.** *Eurosurveillance*, 6. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.6.20699
- Monne I, Hussein HA, Fusaro A, Valastro V, Hamoud MM, Khalefa RA, Dardir SN, Radwan MI, Capua I, Cattoli G (2013): **H9N2 influenza A virus circulates in H5N1 endemically infected poultry population in Egypt: H9N2 influenza virus in Egypt.** *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 3. 240–243. doi:10.1111/j.1750-2659.2012.00399.x
- Nagy A, Mettenleiter T. C, Abdelwhab E. M. (2017): **A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa.** *Epidemiology & Infection*, 16. 3320–3333.
- Palya V, Tatár-Kis T, Mató T, Felföldi B, Kovács E, Gardin Y (2014): **Onset and long-term duration of immunity provided by a single vaccination with a turkey herpesvirus vector ND vaccine in commercial layers.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1–2. 105–115. doi:10.1016/j.vetimm.2013.11.008

Pan X, Su X, Ding P, Zhao J, Cui H, Yan D, Teng Q, Li X, Beerens N, Zhang H, Liu Q, de Jong MCM, Li Z (2022): **Maternal-derived antibodies hinder the antibody response to H9N2 AIV inactivated vaccine in the field.** *Animal Diseases*, 1. 9. doi:10.1186/s44149-022-00040-0

Pantin-Jackwood M.J. (2014): **Immunohistochemical staining for the detection of the Avian Influenza virus in tissues** In: *Erica Spackman (ed.) Animal Influenza virus: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ. p 77-83 Chapter 10. • https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_5

Pazani J, Vasfi MM, Ashrafihelan J, Marjanmehr S, Farid G (2008): **Pathological Studies of A / Chicken / Tehran / ZMT - 173/99 (H9N2) Influenza Virus in Commercial Broiler Chickens of Iran.** *International Journal of Poultry Science*, doi:10.3923/ijps.2008.502.510

Peacock T. P, James J, Sealy JE, Iqbal M (2019): **A Global Perspective on H9N2 Avian Influenza Virus.** *Viruses*, 7. 620. doi:10.3390/v11070620

Perdue ML, Swayne D. E. (2005): **Public Health Risk from Avian Influenza Viruses.** *Avian Diseases*, 3. 317–327. doi:10.1637/7390-060305R.1

Pu J, Wang S, Yin Y, Zhang G, Carter RA, Wang J, Xu G, Sun H, Wang M, Wen C, Wei Y, Wang D, Zhu B, Lemmon G, Jiao Y, Duan S, Wang Q, Du Q, Sun M, Bao J, Sun Y, Zhao J, Zhang H, Wu G, Liu J, Webster RG. (2015): **Evolution of the H9N2 influenza genotype that facilitated the genesis of the novel H7N9 virus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2. 548–553. doi:10.1073/pnas.1422456112

Qi Y, Guo W, Liu C, Li W, Gu Y, Li S, Chen X (2021): **Seroprevalence of influenza A (H9N2) virus infection among humans in China: A meta-analysis.** *Microbial Pathogenesis*, 104881. doi:10.1016/j.micpath.2021.104881

Racaniello Vincent (2010. szeptember 30.): **Detecting viral proteins in infected cells or tissues by immunostaining** • <https://www.virology.ws/2010/09/30/detecting-viral-proteins-in-infected-cells-or-tissues-by-immunostaining/>

Ramey AM, Reeves AB, Sonsthagen SA, TeSlaa JL, Nashold S, Donnelly T, Casler B, Hall JS. (2015): **Dispersal of H9N2 influenza A viruses between East Asia and North America by wild birds.** *Virology*, 79–83. doi:10.1016/j.virol.2015.03.028

Shahid M. F, Yaqub T, Tipu M. Y., Aslam A, Yaqub S, Rahman A, Ali M. (2019): **Comparative pathogenic potential of avian influenza A/H9N2 viruses isolated from commercial, backyard and fancy birds.** 2. 143–148. doi:10.17582/journal.pujz/2019.34.2.143.148

Skehel JJ, Wiley Don C. (2000): **Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin.** *Annual Review of Biochemistry*, 1. 531–569. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.531

Śmietanka K, Bocian Ł, Meissner W, Ziętek-Barszcz A, Żółkoś K (2016): **Assessment of the Potential Distance of Dispersal of High Pathogenicity Avian Influenza Virus by Wild Mallards.** *Avian Diseases*, 1s. 316–321. doi:10.1637/11080-040715-RegR

Spackman E., Senne D. A., Myers T. J., Bulaga L. L., Garber L. P., Perdue M. L., Lohman K, Daum LT, Suarez D. L. (2002): **Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes.** 9. 3256–3260. doi:10.1128/JCM.40.9.3256-3260.2002

Spackman Erica (2020): *Animal Influenza Virus: Methods and Protocols*. Humana Press, New York, NY, USA

Subtain SM, Chaudhry ZI, Anjum AA, Maqbool A, Sadique U. (2011): **Study on Pathogenesis of Low Pathogenic Avian Influenza Virus H9 in Broiler Chickens.** *PAKISTAN JOURNAL OF ZOOLOGY*, 5. 999–1008.

Sun X, Belser JA, Maines TR. (2020): **Adaptation of H9N2 Influenza Viruses to Mammalian Hosts: A Review of Molecular Markers.** *Viruses*, 5. 541. doi:10.3390/v12050541

Tse Victor, Whittaker Gary (2015): **Modification of the Hemagglutinin Cleavage Site Allows Indirect Activation of Avian Influenza Virus H9N2 by Bacterial Staphylokinase.** *Virology*, 1–8. doi:10.1016/j.virol.2015.03.023

Verhagen JH, Lexmond P, Vuong O, Schutten M, Guldemeester J, Osterhaus A. D. M. E, Elbers ARW, Slaterus R, Hornman M, Koch G, Fouchier Ron A. M. (2017): **Discordant detection of avian influenza virus subtypes in time and space between poultry and wild birds; Towards improvement of surveillance programs.** *PLOS ONE*, 3. doi:10.1371/journal.pone.0173470

Wang D., Yang L., Gao R., Zhang X., Tan Y., Wu A., Zhu W, Zhou J, Zou S, Li X, Sun Y, Zhang Y, Liu Y et al, Shu Y. (2014): **Genetic tuning of the novel avian influenza A(H7N9) virus during interspecies transmission, China, 2013.** *Eurosurveillance*, 25. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.25.20836

Wang J, Jin X, Hu J, Wu Y, Zhang M, Li Xiao, Chen J, Xie S, Liu J, Qi W, Liao M, Jia Weixin (2021): **Genetic Evolution Characteristics of Genotype G57 Virus, A Dominant Genotype of H9N2 Avian Influenza Virus.** *Frontiers in Microbiology*, 633835. doi:10.3389/fmicb.2021.633835

WHO (2022): **Western Pacific Region Avian Influenza Weekly Update** • <https://iris.who.int/handle/10665/351652>

Wu H, Peng X, Peng X, Cheng L, Lu X, Jin C, Xie T, Yao H, Wu N (2015): **Genetic and molecular characterization of H9N2 and H5 avian influenza viruses from live poultry markets in Zhejiang Province, eastern China.** *Scientific Reports*, 1. 17508. doi:10.1038/srep17508

10. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK TUDOMÁNYOS KÖZLÉSEI

Lektorált, impakt faktorraal bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk:

Bóna Márta, Tatár-Kis Tímea, Mándoki Míra, Farsang Attila, Kiss István: A H9N2 altípusú madárinfluenza-vírus növekvő jelentősége a világban Irodalmi összefoglaló Magyar Állatorvosok Lapja 145./19-36. <https://doi.org/10.56385/magyllorv.2023.01.19-36>

Bóna, M.; Kiss, I.; Dénes, L.; Szilasi, A.; Mándoki M. Tissue tropism of H9N2 Low Pathogenic Avian Influenza virus in broiler chickens by Immunohistochemistry. *Animals* 2023, 13 (6), 1052; <https://doi.org/10.3390/ani13061052>

Bóna, M.; Földi, J.; Dénes, L.; Harnos A.; Paszerbovics, B.; Mándoki, M. Evaluation of the Virulence of Low Pathogenic H9N2 Avian Influenza Virus Strains in Broiler Chickens. *Veterinary Sciences* 2023, Volume 10, Issue 12, 671 <https://doi.org/10.3390/vetsci10120671>

Marta Bona, Anna Szilasi, Mira Mandoki, Time Tatar-Kis, Istvan Kiss (poszter)
Immunohistochemical examination of tissues from broiler chickens infected with H9N2 low pathogenic avian influenza virus in experimental studies. XXIInd Congress of World Veterinary Poultry Association, September 4-8, 2023 Verona, Italy

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom **Dr. Palya Vilmosnak**, hogy olyan témát biztosított, amely igen sokszínű és fontos az állatorvosi területen. A téma kapcsán sokrétű és színes tapasztalatra tettem szert a diagnosztikai módszerek területén is.

Köszönetet mondok **Baska Ferencnek**, aki a kezdetekkor segített a szakmai munka Phd keretek közötti elindításában.

Hálásan köszönöm témavezetőim, **Mándoki Míra** és **Kiss István** kitartó szakmai támogatását e sokrétű munkánk során. Mindig tudták mivel tudnak motiválni.

Köszönettel tartozom a Ceva-Phylaxia Zrt. Tudományos Támogató Igazgatóság csapatának, név szerint **Tatár-Kis Tímeának**, **Kovács Editnek**, **Felföldi Baláznak**, akik befogadtak és elfogadtak munkatársként a vizsgálatok állat- és laborfázisában, valamint segítettek az ábrák elkészítésében. Köszönettel tartozom **Homonnay Zalánnak**, aki bevezetett a PCR világába.

Külön köszönöm **Kolonicsné Tirbusz Tímea** kórszövetten asszisztens munkáját a kórszövetten kivitelezésében nyújtott segítségével.

Köszönettel tartozom **Gégényiné Sveda Évának**, aki az immunhisztokémia fortélyait mutatta meg.

Köszönettel tartozom a Patológiai Tanszék munkatársainak, **Pop Renátának** a kórszövetten és immunhisztokémiai munkájáért; **Dénes Lillának** az in situ hibridizáció és a publikációk során nyújtott segítségével; **Szilasi Anna Katalinnak** az immunhisztokémia kiértékelésében nyújtott segítségével.

Hálásan köszönöm a Biostatistika Tanszék vezetőjének, **Harnos Andreának** és kollégáinak, **Paszerbovics Bettinának** és **Bakony Mikoltnak** a statisztikai vizsgálatok során nyújtott segítségükért, magyarázataikért.

Hálásan köszönöm **Földi József** kollégámnak, hogy kitűnő meglátásaival segítségemre volt az angol cikkek megvalósítása kapcsán. Külön köszönöm, hogy levelező szerzőként támogatott gyermekágyas időszakom alatt is.

Köszönettel tartozom **Könyves László** tanszékvezető úrnak, aki közvetlen főnökömként az optimális munkaterhelés beállításával hozzájárult, hogy az oktatás mellett a Phd munkámon is dolgozhassak.

Hálás szívvel gondolok mindazon kollégáimra, akikhez segítségül fordulhattam elakadásaim során. A teljesség igénye nélkül köszönet illeti **Albert Mihályt**, **Jurkovich Viktort**, **Fornyo Kingát**, **Vass-Bognár Barbarát**, hogy tapasztalataikat, jó tanácsaikat megosztották velem.

Köszönöm opponenseimnek, hogy rendkívül alaposan olvasták és bírálták munkámat, ezzel is segítve, hogy az a követelményeknek megfelelő legyen.

Hálás vagyok barátaimért, akik türelmükkel, szakmai észrevételeikkel támogattak és hittek bennem.

Végül, de nem utolsó sorban hálával és köszönettel tartozom családomnak, elsősorban **férjemnek**, **Schmidt Attila Ádámnak**, amiért támogatott és biztatott munkám során.