

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Magyarországi brojlerállományok emésztőszervi
kórképeivel kapcsolatos vizsgálatok, különös tekintettel a
közelmúltban kimutatott parvovírusok szerepére**

Doktori értekezés tézisei

Készítette:

Dr. Palade Elena Alina

2011

Témavezető:

Dr. Rusvai Miklós, MTA doktora
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Budapest
Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék

Témabizottsági tagok:

Dr. Benkő Mária, MTA doktora
Magyar Tudományok Akadémia, Budapest
Állatorvos-tudományi Kutatóintézet

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

Bevezetés

Az újonnan felbukkant, világszerte súlyos gazdasági károkat okozó enterális kórképpel (enteric disease: ED) járó szindrómák komoly kihívást jelentenek a baromfibetegségek kutatói számára. A kórtan és kórfejlődés pontos meghatározása a megelőzési és terápiás beavatkozási lehetőségek kiaknázásának potenciális lehetőségét nyújthatja, és ezáltal az anyagi veszteségek csökkentése és a baromfi hústermékek biztonságának fokozása lehetségessé válhat. Kutatásaink célja az intenzív körülmények között tartott csirkék és pulykák ED szindrómái kórtanának és kórfejlődésének felderítésére irányuló kutatásokhoz való hozzájárulás volt, a magyarországi brojlerállományok helyzetéről kapott eredmények és adatok tükrében.

Csirkék enterális kórképpel kísért tünet-együttese

A brojlerscsirkék legfontosabb ED-je az úgynevezett „malabsorbtió” vagy „satnyaság és törpenövés tünetegyüttese” (runting-stunting syndrome: RSS). Klinikailag az RSS hasmenés, levertség, alomfogyasztás, fájdalmas csipogás és összebújás formájában nyilvánul meg. A morbiditás és a mortalitás változó, a gazdasági veszteségek pedig elsődlegesen a fertőzött madarak növekedésének visszamaradásában és gazdasági paramétereinek csökkenésében, valamint a terápiás beavatkozások költségeire és a takarmány csökkent hasznosítására vezethetők vissza, ugyanakkor súlyos esetekben az immunrendszer károsodását, valamint fokozott elhullást is leírtak már. Az ED-ben szenvedő csirkék emésztőcsatornájában számos víruscsalád tagját azonosították: *Astroviridae*, *Coronaviridae*, *Reoviridae*, *Rotaviridae*, a közelmúltban pedig a *Parvoviridae* víruscsalád tagját is. Mindezen kórokozók szerepük az ED kialakulásában nem teljesen tisztázott, de jelentőségük a beteg madarak baktérium- és parazitamentes béltartalmával történő kísérleti fertőzéssel igazoltnak bizonyult.

A csirkebrojlerrek emésztőszervi vírusos fertőzéseinek túlnyomó része az első három hétben következik be, de bizonyos esetekben egyes fertőzések az élet későbbi szakaszában is jelentkezhetnek. Mivel egyes vírusfertőzések nagyon hasonló klinikai tünetek kialakulásához vezetnek, nagyon nehéz közvetlen összefüggést találni egy bizonyos kórkép kialakulása és egy adott vírus jelenléte között. Továbbá bonyolítja a diagnosztikai kiértékelést az a tény, hogy az ismert kórokozók különböző kombinációja a betegség más és más megnyilvánulásához vezethet. Összességében általánosan elfogadott tény, hogy egy vírussal történő fertőzés esetében magas morbiditáshoz alacsony mortalitás kapcsolódik, míg a magas mortalitással és súlyos gazdasági veszteségekkel több vírussal történő egyidejű fertőzés esetén kell számolni. A pontos kórtan és kórfejlődés ismeretének hiányában jelenleg nem létezik az RSS-t célzó átfogó és hatékony megelőzési vagy terápiás protokoll.

Pulykák enterális kórképpel kísért tünet-együttese

Hathetes korig a pulykákban jelentkező emésztőszervi kórképpel kísért tünet-együttes az úgynevezett pulyka bélgyulladásos komplex (poult enteritis complex: PEC), mely klinikailag hasmenés, levertség, alomfogyasztás, immunszuppresszió és fokozott elhullás jellemzi. Kifejezetten magas elhullási arány esetében a betegség a pulyka bélgyulladásos és elhullásos tünet-együttes (poult enteritis and mortality syndrome: PEMS) elnevezést viseli. A PEMS súlyosabb formáiban a morbiditás és mortalitás elérheti a 100%-ot is. A szindróma kórtana nem teljesen tisztázott, de általános elfogadott tény, hogy a háttérben több kórokozó áll. A PEC és PEMS-ben szenvedő pulykák bélcsatornájában számos vírusos és bakteriális kórokozót kimutattak. A baktériumok közül az enteropathogen *Escherichia coli* (*E. coli*) törzsek igazoltan részt vesznek a kórkép kialakulásában. Gazdasági állatfajként, a pulyka emésztőcsatornájának épsége fokozott jelentőséggel bír. A tápanyagok megfelelő hasznosítása mindenekelőtt egy egészséges emésztőcsatornában lehetséges, ami főleg a fiatal madarak esetében kifejezetten fontos, mivel a fiatalkórban jelentkező, bármilyen emésztőcsatorna-bántalom az állomány irreverzibilis jellegű gazdasági veszteség formájában tükröződik.

Hasonló tüneteket eredményező vírusos kórokozókkal egyidejűleg történő fertőzések

A csirke nephritisének vírusával (avian nephritis virus: ANV) és a fertőző bronchitis vírusával (infectious bronchitis virus: IBV) történő fertőzés nephropathiához és következményes köszvényhez, valamint bélgyulladásához vezethet. A fertőző bronchitis (infectious bronchitis: IB) a légutakat, vesét, bélcsatornát és a szaporodásért felelős szerveket károsító heveny, kifejezetten ragályos vírusos fertőzés, mely súlyos gazdasági károkat eredményez a brojler- és tojóállományokban egyaránt.

Annak ellenére, hogy az IBV légzőszervi fertőzést okoz, a kórokozó számos, nem-légúti hámstruktúrában is képes multiplikálódni (pl. vesékben, nemi szervekben, tojócsőben és az emésztőcsatornában), ahol azt követően következményes patológiai elváltozások is megfigyelhetők. A fertőző bursitis vírus (infectious bursal disease virus: IBDV) a modern baromfiipar egyik legjelentősebb, immunszuppressziót okozó ágense. Az immunszuppresszió következtében az állomány másodlagos kórokozókkal fertőződik, melyek sok esetben bélgyulladás kialakulásához vezetnek. A hasonló klinikai tüneteket és elváltozásokat mutató állományok magas aránya alapján gyakran felmerül az egyes vírusos kórokozókkal (ANV, IBV, IBDV) történő egyidejű fertőzés valószínűsége. Mivel a kórokozók gyors és megbízható kimutatására a gyakorlati életben egyértelmű igény merült fel, vizsgálataink egyik célja az erre a célra alkalmas, multiplex RT-PCR (mRT-PCR) alapú eljárás kidolgozása volt.

Anyag és módszer

Csirketelepekről származó minták

Kutatásaink során vizsgált mintákat 2007. január - 2010. március időszakban ED tüneteket mutató állományokból gyűjtöttük. A csirkék, melynek kora 6 nap és 3 hét közötti volt, fokozott elhullással és csökkent termelési paraméterekkel küszködő 15 magyarországi brojlerállományból származtak. A csirkékek a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának (Szie ÁOTK) Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékére küldték diagnosztikai kivizsgálás céljából. Az ED járványtanának jobb megismerése és a statisztikai elemzése elősegítése céljából vizsgálatainkba 13, az ED tüneteit nem mutató magyarországi állományból származó csirkéket is bevontunk.

Pulykatelepekről származó minták

A vizsgált mintákat 2008 januárja és 2010 decembere között a PEC vagy PEMS klinikai tüneteit és magas elhullási arányt mutató magyarországi pulykaállományokból gyűjtöttük.

Kutatásainkba a kaposvári Mezőgazdasági Szakhatóság (MgSzH) diagnosztikai laboratóriuma által 49 pulykatelepről gyűjtött és Dr. Nemes Csaba révén rendelkezésünkre bocsátott kevert bélmintát (epésbél és csípőbél) is bevontuk. Mindegyik minta egy állományt vagy ólt képvisel, és minden esetben 5 madárból származott. A pulykák kora 6 nap és 43 nap közötti volt. Továbbá két mintát 2010-ben gyűjtöttünk a SzIE ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékére küldött diagnosztikai esetekből.

Módszerek

Kutatásaink során a következő vizsgálati módszereket alkalmaztuk: (1) makroszkópos vizsgálat (boncolás), (2) rutin, aerob körülmények között végzett bakteriológiai vizsgálat, (3) kórszövettan, (4) immunhisztokémia (IHC), (5) elektronmikroszkópos vizsgálat (EM), valamint (6) genetikai vizsgálatok. Genetikai vizsgálatok során nukleinsav izolálásra, diagnosztikai célú primerpárok tervezésére, PCR-alapú génszakaszok sokszorosítása (PCR, RT-PCR, mRT-PCR), restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus (restriction fragment length polymorphism: RFLP) alapú eljárás tervezésére és alkalmazására (a ChPV, TuPV, illetve a TuPV-szerű ChPV törzsek gyors és megbízható elkülönítésére alkalmas *AvaII*-alapú gyorsteszt), valamint nukleinsav szekvenciák meghatározására és filogenetikai vizsgálatok elvégzésére került sor.

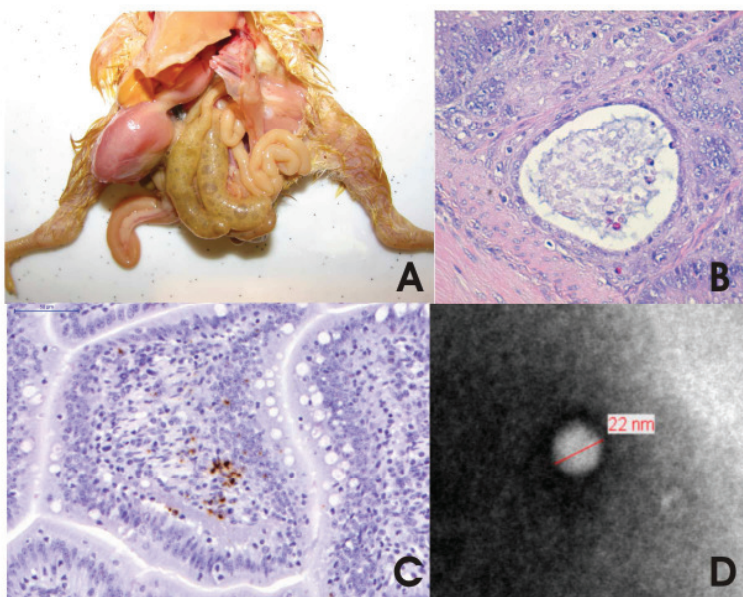
Eredmények

Csirkék emésztőszervi kórképpel kísért tünet-együttese

A tulajdonosok és/vagy állatorvosok által rendelkezésre bocsátott kórelőzményi adatok alapján az állományokban kissé emelkedett elhullási arány, a növekedés visszamaradása és hasmenés volt megfigyelhető. A boncolás során az állományokban szétnövést, hasmenésre utaló elváltozásokat, egyes vékonybélszakaszok lumenében pedig folyékony-nyálkás tartalom és nagy mennyiségű gáz felhalmozódását állapítottuk meg (1/A ábra).

A rutin, aerob körülmények között végzett bakteriológiai vizsgálat minden esetben negatív eredménnyel zárult. A kórszövettani vizsgálat során az ellapult hámsejtekkel bélelt vékonybélkripták mérsékelt és súlyos fokú tágulatát (1/B ábra) állapítottuk meg, üregükben levált hámsejtekkel. Az epésbélben és csípőbélben kyszámú hámsejtleválással és vegyes gyulladással kísért heveny hurutos bélgyulladás, valamint boholyatrophia és mérsékelt boholyfúzió volt megfigyelhető.

1. ábra



Az IHC vizsgálat során az epésbélben és a csípőbélben ChPV pozitív magfestődés volt megfigyelhető (1/C ábra). A homogenizált bélminták ultracentrifugálása után kapott szeparált rétegek EM alapú vizsgálata során számos, ikozahedrális, buroknélküli vírusrészecskét figyeltünk meg, melyeket morfológiájuk és méretük alapján az *Astroviridae*,

Parvoviridae (1/D ábra), illetve a *Reoviridae* víruscsaládok tagjaiként azonosítottunk.

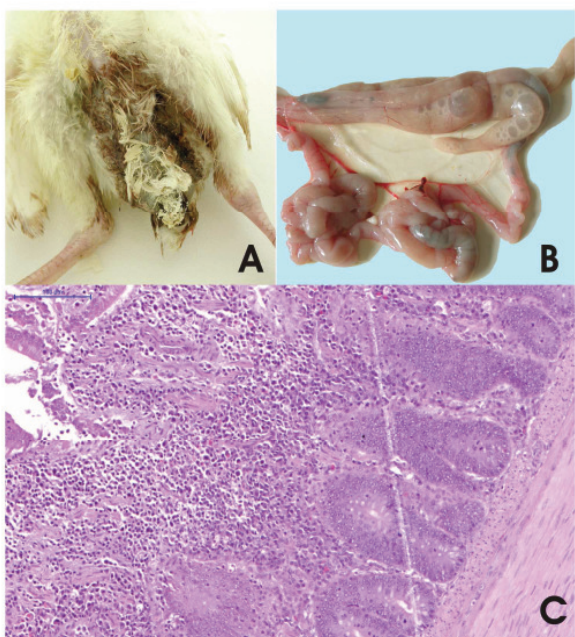
A csirkeminták PCR és RT-PCR alapú vizsgálatok összesített eredménye alapján a ChPV fertőzés magas előfordulása (28 mintából 17 pozitív) volt megállapítható. A vizsgált csirkeállományok közül 8 a PCR-alapú analízis alapján a ChPV kivételével minden egyéb vírusos és bakteriális kórokozó esetében negatívnak bizonyult. Az astrovírusok gyakorisága is igen magasnak bizonyult (28 mintából 12 pozitív): ezen belül az ANV volt a leggyakrabban kimutatható. Az ED tüneteit nem mutató állományok közül csupán kettő volt ChPV pozitív, hat ANV, 4 pedig baromfi reovírus (avian reovirus: ARV) pozitív.

Pulykák emésztőszervi kórképpel kísért tünet-együttese

Az állományokban az elfogadottnál nagyobb arányú elhullást, a növekedés visszamaradását, hasmenést (2/A ábra), dehidrációt és kifejezett szétművét figyeltek meg. A vékonybél ürege folyékony-nyálkás tartalommal és gázzal volt teli (2/B ábra). Makroszkóposan a vékonybél vérereiben bővérűség, az epésbélben és a csipőbélben hurutos bélgyulladás, a Fabricius-tömlőben pedig sorvadás volt megfigyelhető. A rutin, aerob körülmények között végzett bakteriológiai vizsgálat során két esetben *E. coli* baktériumpopulációt tenyésztettünk ki.

Kórszövettanilag az éhbélben az evidens gyulladási reakció mellett a bélbolyhok hámsajtjeinek részleges leválása és a bolyhok fúziója volt megfigyelhető (2/C ábra). Az IHC vizsgálat során TuPV pozitív magfestődés volt az epésbél és az éhbél hámsajtjeiben és a nyálkahártya saját kötőszövetes rétegében található gyulladási sejtjeiben, továbbá a Fabricius-tömlőben, májban és hasnyálmirigy külső elválasztási sejtjeiben.

2. ábra



A pulykaminták PCR és RT-PCR alapú vizsgálatok összesített eredménye alapján pulyka astrovírusok (turkey astrovirus: TAsTV) az esetek 83,67%-ában, míg a TAsTV-2 pedig az esetek 26,53%-ában voltak kimutathatók. A pulyka koronavírus (turkey coronavirus: TCV) és az ARV a minták csupán 14,28%-ában volt kimutatható. Két minta ANV pozitívnak bizonyult: a váratlan módon pozitív eredményt nukleinsav szekvencia meghatározásával is alátámasztottuk. Az 51 minta közül 25 (49,01%) TuPV pozitívnak bizonyult. Egy kórokozóval történő

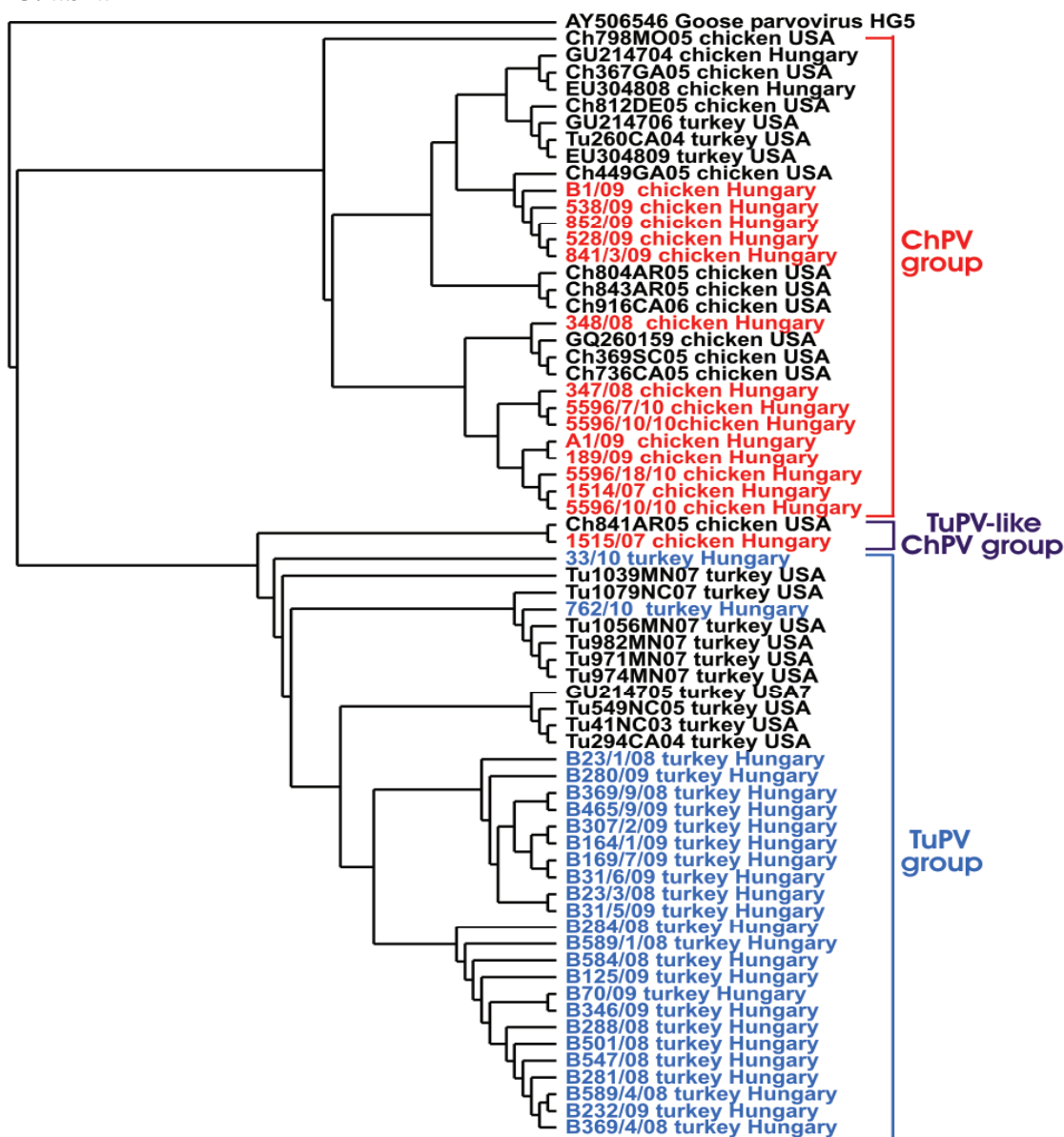
fertőzést 12 (23,52%) állományban sikerült igazolni, ezek közül 6 (11,76%) TAsTV pozitív, 5 (9,8%) TuPV pozitív, míg 1 (1,9%) TCV pozitív volt.

A kimutatott kórokozók előfordulása közötti esetleges összefüggések és korrelációk felderítése érdekében korrelációs analízis alapú statisztikai vizsgálatot végeztünk. A vizsgálat eredményei alapján pár kivétellel nincs szignifikáns statisztikai korreláció az egyes kórokozók előfordulási gyakorisága között. Az egyetlen statisztikailag szignifikáns negatív érték a TAsTV-2 és a TuPV előfordulása, valamint a TCV és a TAsTV-k előfordulása között volt megfigyelhető, míg az egyetlen, statisztikailag „majdnem” releváns korreláció a TAsTV-2 és az ARV előfordulása között volt megállapítható.

ChPV és TuPV törzsek nukleinsav-szekvencia és filogenetikai vizsgálata

Vizsgálataink során 15 ChPV és 25 TuPV törzs nukleinsav szekvenciájának meghatározására és elemzésére került sor. A szekvenálás után a ChPV törzsek esetében 524 bp, míg a TuPV törzsek esetében 527 bp hosszú szekvenciákat kaptunk. Az NS1 gén részleges nukleinsav szekvenciája alapján készített filogenetikai fán a különböző eredetű törzsek nyilvánvaló csoportosulása (ChPV, illetve TuPV csoport) volt megfigyelhető (3. ábra).

3. ábra



Két ChPV törzs (a magyarországi 1515/07, illetve az amerikai Ch841AR05 minták) szorosabb rokonsági viszonyban voltak a TuPV törzsekkel, mint a csirke eredetű ChPV törzsekkel. A 1514/07 és a 1515/07 jelzésű minták ugyanarról a telepről, de különböző ólaktól származnak: ennek ellenére a filogenetikai fa eltérő ágain helyeződtek el. Ugyanez a jelenség volt megfigyelhető más, ugyanabban az időben ugyanarról a telepről, de más ólaktól

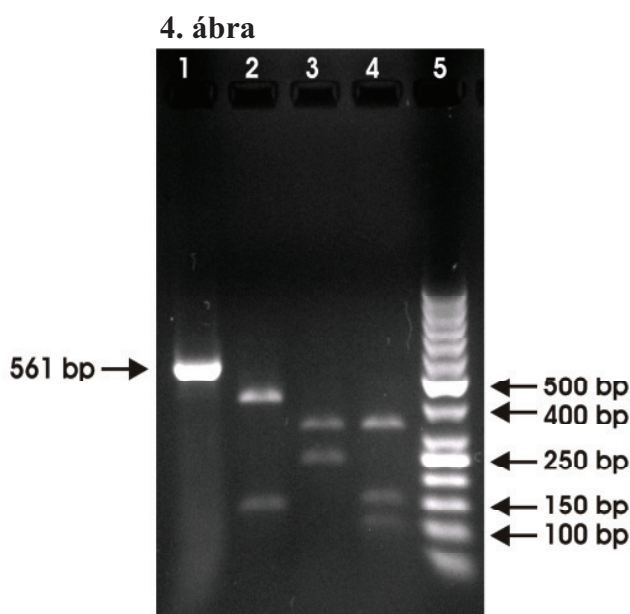
származó minták esetében is. Két minta kivételével (33/10 and 762/10) a magyarországi pulyka eredetű minták az amerikai törzsektől eltérő ágon csoportosultak.

A vizsgált törzsek közötti nukleinsav hasonlóság 88,8-99,8% között változott: a legalacsonyabb érték a 1515/07 jelzésű minta és a referencia törzs (EU 304808) között, míg a legmagasabb hasonlóság a B307/2/09 és B31/6/09 jelzésű minták között volt megfigyelhető. Egy, a rekombinációkat detektáló program (recombination detection program: RDP) segítségével végzett vizsgálat alapján a vizsgált vírustörzsek között az elemzett szakaszon nem következett be genetikai rekombinációs jelenség.

A következtetett aminosav szekvenciák vizsgálata során a ChPV törzsek esetében 174, míg a TuPV törzsek esetében 175 aminosav hosszú szekvenciákat kaptunk. Az így kapott aminosav szekvenciák alapján készített filogenetikai vizsgálat a nukleinsav szekvenciák alapján végzett vizsgálattal azonos eredményre és csoportosulásokra vezetett: a ChPV és TuPV törzsek ebben az esetben is rendeződésük alapján egyértelműen elkülöníthetők voltak.

ChPV, TuPV és TuPV-szerű ChPV törzsek RFLP-alapú elkülönítése

Az összes, a GenBank-ba letétbe helyezett TuPV és ChPV törzsek, a magyarországi vírusok és az amerikai törzsek nukleinsav szekvenciájának összehasonlítása alapján a vizsgálat NS1 szakaszon található olyan enzimhasítási hely, mely segítségével a ChPV és TuPV törzsek, valamint a filogenetikai vizsgálat során külön rendeződő két, TuPV-szerű ChPV törzs egyértelműen azonosítható egy RFLP alapú eljárás segítségével.

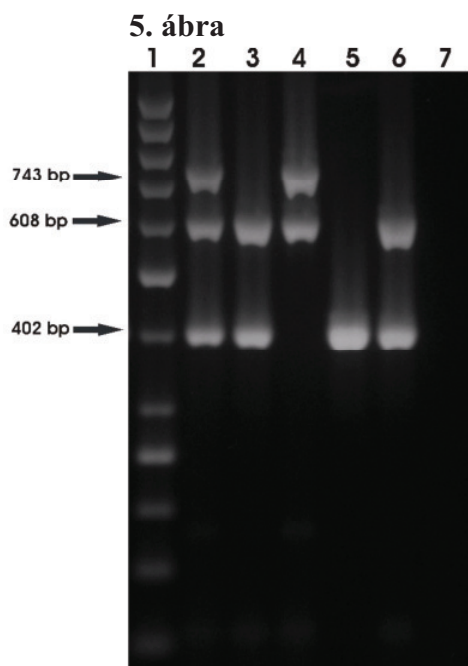


Az újonnan kidolgozott, *AvaII*-alapú eljárás alapján a ChPV törzsek esetében a gélelektroforézist követően 415 bp és 146 bp nagyságú két, jól elkülöníthető csík figyelhető meg, a TuPV törzsek esetében a termékek mérete 323 bp és 238 bp, míg a TuPV-szerű ChPV törzsek esetében az enzimes emésztés három, jól elkülönülő termék (323 bp, 146 bp és 92 bp) képződéséhez vezet. A PCR-t, az

AvaII-alapú emésztést és a gélelektroforézist követően kapott eredmény megegyezett a nukleinsav szekvenciák összehasonlítására alapozott elvárásoknak (4. ábra).

ANV, IBV és IBDV törzsek mRT-PCR-alapú egyidejű kimutatása

Az mRT-PCR tesztelése és optimalizálása során a reagensek gyártójának használati utasításait az irodalomban talált javaslatoknak megfelelően módosítottuk. Az mRT-PCR eljárás legfontosabb paraméterei a primerek megfelelő választása, a meghosszabbítás (extenzió) tartama és a tapadási hőmérséklet.



A vizsgálat során használt primerek hossza 18 és 22 bp között volt, a GC arány pedig az ajánlott 35 és 60% között. Mivel a reakció során több génszakasz egyidejű sokszorosítására kerül sor, a polimeráz enzimnek több időre van szüksége ahhoz, hogy az összes termék szintetizálását megfelelő módon elvégezze. Ennek megfelelően a meghosszabbítási időt 2 perc és 30 másodpercre módosítottuk annak reményében, hogy ez megfelelő szintetizálási időt biztosít az enzim részére. Annak ellenére, hogy a három kiválasztott primerpár tapadási hőmérséklete meglehetősen

eltért (53°C az ANV, 55°C az IBV és 60°C az IBDV esetében), vizsgálatunk bebizonyította, hogy a tapadási hőmérséklet 53°C-ra való csökkentésével elérhető az összes termék egyidejű sikeres sokszorosítása.

A klinikai mintákat az optimalizált mRT-PCR vizsgálatnak vetettük alá, a kapott termékeket pedig gélelektroforézist követően ultraibolya (ultraviolet: UV) fény segítségével láthatóvá tettük. A primerpárok szimultán használhatóságát a termékek sikeres, nem-specifikus termékek nélküli sokszorosítása igazolta (5. ábra).

Megbeszélés

A mélyreható és előrehaladott ED kutatás ellenére, a kórkép kialakulásában résztvevő vírusos kórokozók szerepe, akárcsak a kórkép pontos kórfejlődése, a mai napig sem tisztázott. Jelenleg számos vírus igazoltan vagy feltehetően vesz részt az ED kórtanában, többek között astrovírusok, coronavírusok, reovírusok és rotavírusok. A közelmúltban a *Parvoviridae* víruscsalád egyik új komponense is általánosan elfogadott tagja lett a RSS-t előidéző kórokozók csoportjának, amint azt már pár évtizeddel ezelőtt sejtették.

Az ED kialakulásában résztvevő vírusos kórokozók járványtani felmérése csirkeállományokban

Vizsgálatainkba összesen 28 csirkeállományból származó mintát vontunk be, melyből 15 esetben RSS-re jellemző klinikai tüneteket figyeltek meg, 13 pedig ED-mentes, rutin állományegészségi állapot felmérése céljából diagnosztikai vizsgálatra beküldött csirkéből származott.

Az RSS tüneteit mutató állományokból származó csirkeminták kórszövettani vizsgálata során a vékonybélkripták mérsékelt és súlyos fokú tágulatát és vegyes gyulladásos sejtes beszűrődéssel kísért heveny hurutos vékonybélgyulladást, a vékonybélbolyhok rövidülését és fúzióját, valamint a bélhámsejtek részleges leválását figyeltünk meg. Mindezek korábban már leírásra kerültek, ED-re jellemző elváltozások. Pár esetben a vékonybélben aktív regenerációra utaló elváltozások voltak megfigyelhetők: ezek nagy valószínűséggel a madarak életében az elhullást megelőzően bekövetkezett, de túlélte vírusos fertőzés következtében alakultak ki. Ennek ellenére, amint azt a PCR-alapú vizsgálatok igazolták, a madaraktól származó bélmintákban a kórokozók továbbra is kimutathatók voltak. A csirkemintákban gócos lympho-histiocytás hasnyálmirigy gyulladás is megfigyelhető volt: a kórképet jellemző kórfejlődés pontos ismeretének hiányában a megfigyelt elváltozást sajnos nem lehet egyértelműen egy adott kórokozó jelenlétéhez kapcsolni. A reovírusok ismertek okoznak hasnyálmirigy károsodást, viszont az RSS tüneteit mutató csirkeállományok közül csak 3 bizonyult ARV pozitívnak. A rutin, aerob körülmények között végzett bakteriológiai vizsgálat minden esetben negatív eredménnyel zárult, ami arra enged következtetni, hogy a megfigyelt makroszkópos és kórszövettani elváltozások nagy valószínűséggel a kimutatott vírusos kórokozók jelenlétére vezethetők vissza.

A ChPV mellett az astrovírusok magas gyakorisága volt megállapítható a csirkeállományokban, azok közül is az ANV bizonyult a leggyakoribbnak. Ez viszonylag várató eredmény volt, mivel korábbi felmérések alapján, az RSS tüneteit mutató és egészséges

állományokban az emésztőszervi vírusok közül az astrovírusok mutathatók ki a leggyakrabban. Meglepő módon a rutin állományegészségi vizsgálat keretén belül elemzett 13 állomány közül az ANV 6-ban volt igazolható, míg ugyanaz a vírus az RSS tüneteit mutató 15 állományból csupán 3 esetben volt kimutatható. Az összes RSS tüneteket mutató állomány ChPV pozitívnak bizonyult, ugyanakkor a kórokozó két, klinikailag egészséges állományból származó mintában is jelen volt.

Járványtani felmérésünk során számos, az ED kialakulásában igazoltan résztvevő vírusos kórokozót vizsgáltunk, mint például astrovírusokat, coronavírusokat, reovírusokat, rotavírusokat, adenovírusokat, de egy, a közelmúltban javasolt és elfogadott kórokozót is, a ChPV-t. Eredményeink alapján a ChPV nagy gyakorisággal fordul elő a csirkeállományokban: az összes 28 vizsgált állomány közül 17 (60,71%) ChPV pozitívnak bizonyult. Sajnálatos módon jelenleg nagyon kevés irodalmi adat létezik a ChPV előfordulásáról egészséges állományokban, és tudomásunk szerint semmilyen adat nem létezik a ChPV gyakoriságáról ED tüneteit mutató állományokban. Az ARV viszonylag kis gyakorisággal fordult elő a vizsgált állományokban: 3 esetben az ED tüneteit mutató állományokban és 4 esetben az egészséges csirkeállományokban. Ez az eredmény megegyezik az irodalomban található adatokkal, miszerint a kórokozó ritkán ugyan, de úgy a beteg, mint az egészséges állományokban egyaránt előfordul. Csirke astrovírus (CAstV) csupán az ED tüneteit mutató 15 állomány közül 4-ben (26,66%) volt kimutatható, ami meglepő eredmény, hiszen korábbi vizsgálatok a kórokozó viszonylag nagy előfordulási gyakoriságáról számoltak be egészséges csirkeállományokban.

Az ED kialakulásában résztvevő vírusos kórokozók járványtani felmérése pulykaállományokban

Vizsgálataink során az 51 pulykaállományban kimutatott kórokozók megegyeznek az irodalomban szereplő adatokkal. Ugyanakkor az ED járványtanának jobb megismerésének céljából vizsgálatainkat több kórokozó bevonásával végeztük el, beleértve a kevésbé ismert TuPV-t is. A TuPV jelenlétét az 51 ED tüneteit mutató pulykaállomány közül 25-ben (49,01% igazoltuk), ami alapján a TuPV ezekben az állományokban az astrovírusok után a második leggyakrabban előforduló kórokozó. A közelmúltban a TuPV széleskörű elterjedéséről számoltak be amerikai pulykaállományokban. Tudomásunk szerint jelenleg semmilyen adat nem létezik a TuPV szerepéről az ED kialakulásában, holott eredményeink alapján, a korábbi feltételezéseknek megfelelően, egy ilyen jellegű szerep valószínűsíthető.

Vizsgálataink során az astrovírusok voltak a leggyakrabban kimutatható vírusos kórokozók, ugyanakkor korábbi irodalmi adatok alapján ezek a vírusok nagy gyakorisággal

fordulnak elő egészséges pulykaállományokban is, így megnehezítve az eredmények értékelhetőségét. Az ANV-t, ami ismertén fiatal csirkéket és fácánokat fertőz és betegít meg, összesen 15 állományban sikerült kimutatni. Ugyanakkor jelenleg semmilyen adat nem létezik az ANV és PEMS közötti esetleges összefüggésről, ráadásul a kórokozó jelenlétét csupán a közelmúltban igazolták először egészséges pulykaállományban. Az eredmény újdonságának tükrében az ANV pozitivitást nukleinsav szekvencia meghatározással is alátámasztottuk.

Egy vírussal történő fertőzést 12 állományban (23,52%) igazoltunk: ezek közül 6 (11,76%) TAsTV pozitív, 5 (9,80%) TuPV pozitív és csupán 1 (1,9%) TCV pozitívnek bizonyult. A tény, hogy egyetlen vírusos kórokozóval fertőzött állományok is mutathatják a PEC vagy PEMS tüneteit nem meglepő, mivel a TAsTV fertőzés igazoltan okozhat súlyos veszteségeket pulykaállományokban, főleg amikor azokban TAsTV-2 törzsek mutathatók ki. A PEC és PEMS kutatásának első éveiben elfogadott tény volt, hogy ezek a kórképek nem alakulhatnak ki TCV hiányában (és ennek következtében a TCV volt a PEC és PEMS kórtanában elfogadott első vírusos kórokozó), későbbi kutatások és kísérleti fertőzések viszont igazolták, hogy a kórképek a TCV hiányában is kialakulhatnak.

A reovírusok szerepét a PEC és PEMS kialakulásában heves viták övezték. Egyes szerzők igazolták, hogy a PEMS tüneteit mutató pulykákból izolált CU98 ARV törzs képes a kórkép tüneteit előidézni.

A statisztikai vizsgálat eredményei az ARV és TuPV, valamint a TCV és TAsTV közötti negatív korrelációra derített fényt, tehát ha az egyik vírus jelen van, akkor a második nagy valószínűséggel nem mutatható ki. Az egyetlen „majdnem” pozitív korreláció a TAsTV-2 és ARV között volt, mivel e két kórokozó a vizsgált állományokban leggyakrabban együtt fordult elő.

Az emésztőszervi kórképben szereplő baromfi parvovírus azonosítása és genetikai jellemzése

Vizsgálataink során 15 ChPV és 25 TuPV törzs részleges nukleinsav szekvenciájának meghatározására került sor. A szekvenciák alapján készített filogenetikai vizsgálat alapján a különböző eredetű vírustörzsek faj szerinti egyértelmű csoportosulása (ChPV, illetve TuPV csoport) volt megfigyelhető. Ez az eredmény megegyezik a többi parvovírus esetében megfigyelt jelenséggel (például kutya és macska parvovírus).

Két ChPV törzs (a magyarországi 1515/07 és az amerikai 841AR05 jelzésű törzs) szorosabb rokonsági viszonyban állt a TuPV csoport vírustörzseivel, továbbá számos egyedi aminosav azonosságot mutattak azokkal. Ez a megfigyelés nagy jelentőséggel bír, hiszen a parvovírusok viszonylag kisméretű, kb. 5000 nukleotidnyi genommal rendelkeznek, és

bármilyen jelentéktelennek tűnő mutáció kulcsfontosságú aminosav cseréhez vezethet és ezáltal akár a vírus gazdaspektrum változását is előidézhetheti. Mindezek alapján a ChPV és TuPV közös vírusból való származása nem zárható ki. Annak ellenére, hogy az RDP-alapú vizsgálat alapján az ismert szekvenciákkal rendelkező törzsek között az elemzett szakaszon nem volt kimutatható rekombinációs jelenség, ez a tény nem zárható ki teljes meggyőződéssel. Ugyanakkor ezek a vírustörzsek a többi ChPV törzstől függetlenül is kialakulhattak.

Kutatásaink során vizsgált csirke- és pulykaminták különböző földrajzi területekről származtak. Ugyanakkor egyes mintákat (5596/7/10 HUN, 5596/10/10 HUN, 5596/13/10 HUN, 5596/18/10 HUN) ugyanabban az időpontban, ugyanarról a telepről, de különböző korcsoportokból és ólaktól gyűjtötték. Ennek ellenére csak két minta volt 100%-ban azonos a vizsgált szakaszon. A leletnek két magyarázata is lehet: az adott állomány három különböző vírustörzssel fertőződött egyidejűleg, vagy az állományt fertőző vírustörzs nagyon rövid időn belül drasztikus genetikai változásokon ment keresztül – ez utóbbi nagyon valószínűtlennek tűnik a parvovírusok esetében. Két pulykaminta (33/10 és 762/10) kivételével az összes magyarországi törzs az amerikai törzsektől függetlenül két alcsoportba rendeződött. A filogenetikai vizsgálat alapján nem volt időszertinti csoportosulás. Ennek ellenére, a 2008-ból és 2009-ből származó törzsek két külön alcsoportba rendeződtek. Mivel a minták különböző csoportosulása ellenére a fertőzött állományok termelési paraméterei között nem volt észlelhető evidens különbség, az egyes törzsek patogenitásában jelentkező esetleges eltérésekről nem vonható le megalapozott következtetés.

ChPV, TuPV és TuPV-szerű ChPV törzsek RFLP-alapú elkülönítése

A TuPV, ChPV, valamint a TuPV-szerű ChPV vírusok csoportjába tartozó törzsek *AvaII* emésztési tulajdonsága közti különbségek alapján mindezen vírusok gyors és megbízható módon elkülöníthetők, hosszadalmas és költséges nukleinsav szekvencia meghatározás nélkül.

Az úgynevezett TuPV-szerű ChPV csoportba jelenleg csupán két, különböző földrajzi származású (egyik amerikai, a másik magyarországi) csirke eredetű vírustörzs tartozik. A vizsgálat szakaszon megfigyelt egyedi nukleinsav szekvenciák ellenére valószínűsíthető, hogy az idő elteltével és a diagnosztikai eljárások fejlődésével egyre több hasonló vírustörzs azonosítására sor kerül. Az elkövetkezendőkben az újonnan kidolgozott eljárás gyors és megbízható járványtani ismeretek megszerzéséhez vezethet. Az eljárás gyakorlatiasságát és használhatóságát tovább fokozhatná az, ha a jövőben végzett felmérések és kísérleti

fertőzések a korábban említett csoportokba sorolt vírustörzsek patogenitása között esetleges különbségekre derítenek fényt.

ANV, IBV és IBDV törzsek mRT-PCR-alapú egyidejű kimutatása

Eredményeink igazolják, hogy az újonnan tervezett mRT-PCR-alapú eljárás a korábban említett kórokozók megbízható, egyidejű kimutatására alkalmas. A kidolgozott módszer differenciál-diagnosztikai vizsgálatok esetében indokolt, főleg olyan esetekben, amikor a tapasztalt klinikai és patológiai elváltozások a kimutatott kórokozók bármelyikére visszavezethetők. A kapott eredményeket ugyanakkor célszerű óvatosan értelmezni vakcinázás segítségével kontrollált vírusos fertőzések (pl. IBV, IBDV) esetében. A jelen kutatások célkitűzései között nem szerepelt a vad- és vakcinavírusok elkülönítése.

Az újonnan kidolgozott eljárás egy megbízható és gyors vizsgálati módszer az ANV, IBDV és IBV egyidejű, szervmintákból történő kimutatására, és nagyon hasznos alkalmazhatósággal bír a magyarországi csirkeállományokból származó minták esetében, hiszen korábbi vizsgálatok alapján ebben a földrajzi régióban az egyidejű vírusfertőzések gyakorisága igen magas.

Összesítve, vizsgálataink során Magyarország különböző földrajzi régióiban található 28 csirke- és 51 pulykaállományból származó mintákat vizsgáltunk az ED kórképben szerepet játszó vírusos kórokozók kimutatása céljából. Meggyőződésünk, hogy a számos kórokozóra kiterjedő vizsgálataink eredményei hozzájárulnak a baromfiállományokban fokozott gazdasági veszteségeket okozó kórkép járványtanának és kórfejlődésének jobb megismeréséhez, és ezáltal hozzájárul a kórkép által okozott veszteségek megelőzéséhez szükséges intézkedések feltárásában.

Új tudományos eredmények

- A magyarországi csirke és pulyka brojlerállományok járványtani felmérése az emésztőszervi kórképpel kísért tünet-együttes viszonylatában.
- Az emésztőszervi kórkép oktanába a közelmúltban elfogadott csirke (ChPV) és pulyka parvovírus (TuPV) törzsek genetikai vizsgálata.
- A két, korábról ismert ChPV és TuPV törzsek csoportja mellett egy új, úgynevezett „TuPV-szerű ChPV” törzsek alcsoportja létezésének igazolása.
- A ChPV, TuPV és TuPV-szerű ChPV törzsek gyors és megbízható elkülönítése egy újonnan kidolgozott, *AvaII*-alapú RFLP eljárás segítségével.
- A ChPV és TuPV kimutatására alkalmas immunhisztokémiai eljárás kidolgozása.
- A fertőző bronchitis vírus (IBV), a csirke nephritis vírus (ANV) és a fertőző bursitis vírus (IBDV) egyidejűleg történő kimutatása újonnan kidolgozott multiplex RT-PCR alapú diagnosztikai eljárással.

Tudományos közlemények

Az értekezés témakörében, lektorált folyóiratokban megjelent közlemények

Palade E.A., Demeter Z., Dobos-Kovács M., Rusvai M., Mándoki M.: A fertőző bronchitis vírus, a csirke nephritis vírus és a fertőző bursitis vírus kimutatása multiplex RT-PCR alapú diagnosztikai eljárással. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2008, 130: 559-564. [IF: 0,155]

Palade E.A., Kisary J., Benyeda Zs., Mándoki M., Balka Gy., Jakab Cs., Végh B., Demeter Z., Rusvai M. Naturally occurring parvoviral infection in Hungarian broiler flocks. *Avian Pathology*, 2011, 40 (2): 191-197. [IF: 1,654]

Palade E.A., Demeter Z., Hornyák Á., Nemes Cs., Kisary J., Rusvai M. High prevalence of turkey parvovirus in turkey flocks from Hungary experiencing enteric disease syndrome. *Avian Diseases*, in press. [IF: 2,003]

Az étekezés témakörében, kongresszusi kiadványokban megjelent összefoglalók

Palade E.A., Demeter Z., Benyeda Zs., Mándoki M., Rusvai M.: Parvoviral Infection in Hungarian Broiler Flocks and the genetic diversity of the causative agent. A Magyar Tudományos Akadémia és az Állatorvos-tudományi Doktori Iskola közös beszámolója, 2011. január 26., Budapest, Magyarország

Palade E.A., Demeter Z., Dobos-Kovács M., Rusvai M., Kisary J., Mándoki M.: Etiological investigations of naturally occurring runting stunting syndrome in hungarian flocks. A Magyar Tudományos Akadémia és az Állatorvos-tudományi Doktori Iskola közös beszámolója, 2010. január 26., Budapest, Magyarország

Palade E.A., Hornyák Á., Demeter Z., Dobos-Kovács M., Benyeda Zs., Rusvai M., Kisary J.: Etiological investigations of naturally occurring runting stunting syndrome in hungarian flocks. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2009, 56: 114-263.

Palade E.A., Hornyák Á., Demeter Z., Dobos-Kovács M., Benyeda Zs., Rusvai M., Kisary J.: Genetic characterization of Chicken parvovirus strains from naturally infected Hungarian flocks. Az Európai Állatorvosi Viroológus Társaság (ESVV) 8. nemzetközi konferenciája, 2009. augusztus 23-26., Budapest, Magyarország, (pp. 204).

Palade E.A., Mándoki M., Dobos-Kovács M., Demeter Z., Rusvai M.: Diagnosis of infectious bronchitis, avian nephritis and infectious bursal disease by multiplex RT-PCR, and the phylogenetical analysis of infectious bursal disease virus strains circulating in Hungary. A Magyar Tudományos Akadémia és az Állatorvos-tudományi Doktori Iskola közös beszámolója, 2008. január 22., Budapest, Magyarország

Palade E.A., Mándoki M., Demeter Z., Dobos-Kovács M., Benyeda Zs., Rusvai M.: Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of infectious bronchitis virus and avian nephritis virus. A Magyar Tudományos Akadémia és az Állatorvos-tudományi Doktori Iskola közös beszámolója, 2007. január 23., Budapest, Magyarország

Nem az értekezés témakörében, lektorált folyóiratokban megjelent közlemények

Palade E.A., Gál J., Mándoki M.: Avian encephalomyelitis vírus okozta megbetegedés magyarországi importált brojlerállományban. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2011, 133, 220-223. [IF: 0,155]

Mándoki M., **Palade E.A.**, Kléh Zs., Dobos-Kovács M., Gál J.: Derzsy betegség okozta tömeges elhullás libaállományban. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2011, 133, 13-18. [IF: 0,155]

Demeter Z., **Palade E.A.**, Soós T., Farsang A., Jakab Cs., Rusvai M.: Misleading results of the *MboII*-based identification of type 2a canine parvovirus strains from Hungary reacting as type 2c strains. *Virus Genes*, 2010, 41, 37-42. [IF: 1,705]

Demeter Z., **Palade E.A.**, Hornyák Á., Rusvai M.: Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Veterinary Microbiology*, 2010, 142, 420-426. [IF: 2,073]

Palade E.A., Bajnok L., Dobos-Kovács M., Demeter Z., Rusvai M.: A csirkék fertőző anaemiáját okozó, Magyarországon előforduló vírustörzsek genetikai jellemzése. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2009, 131, 154-161. [IF: 0,155]

Gál J., Demeter Z., **Palade E.A.**, Rusvai M., Géczy Cs.: Harderian gland adenocarcinoma in a Florida red-bellied turtle (*Pseudemys nelsoni*). *Acta Veterinaria Hungarica*, 2009, 57, 275-282. [IF: 0,64]

Gál J., Landauer K., **Palade E.A.**, Ivaskevics K., Rusvai M., Demeter Z.: Squamous cell carcinoma and consequent otitis in a Long-eared Hedgehog (*Hemiechinus auritus*). *Acta Veterinaria Hungarica*, 2009, 57, 69-74. [IF: 0,64]

Demeter Z., Gál J., **Palade E.A.**, Rusvai M.: Feline parvovirus infection in an Asian palm civet (*Paradoxurus hermaphroditus*). *Veterinary Record*, 2009, 164, 213-215. [IF: 1,098]

Palade E.A., Biró N., Dobos-Kovács M., Demeter Z., Mándoki M., Rusvai M.: Poxvirus infection in Hungarian great tits (*Parus major*). *Acta Veterinaria Hungarica*, 2008, 56, 539-546. [IF: 0,64]

Gál J., Pásztor I., Demeter Z., **Palade E.A.**, Ursu K., Bálint Á., Pap T., Farkas Sz.: Amursikló (*Elaphe schrenki*) vírus okozta savós-fibrines tracheitise és következményes fulladása. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2008, 130, 421-424. [IF: 0,155]

Gál J., **Palade E.A.**, Majoros G., Landauer K., Pásztor I.: Cryptosporidiosis első hazai megállapítása leopárd gekkóban (*Eublepharis macularius*). *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2008, 130, 535-542. [IF: 0,155]

Demeter Z., Lakatos B., **Palade E.A.**, Kozma T., Forgách P., Rusvai M.: Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. *Veterinary Microbiology*, 2007, 122, 258-269. [IF: 2,073]

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, **dr. Rusvai Miklós** professzor úrnak a mérhetetlen bizalmat és támogatást.

Hálával tartozom a Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék minden egyes munkatársának, akivel szerencsém volt együtt dolgozni, értékes tanácsaikért és a tanulmányaim során nyújtott segítségükért: **dr. Mándoki Míra, dr. Benyeda Zsófia, dr. Jakab Csaba, dr. Baska Ferenc, dr. Gál János, dr. Balka Gyula, dr. Vetési Ferenc**. Külön köszönettel tartozom **dr. Dobos-Kovács Mihálynak** a baromfipatológia csodálatos világa felfedezésének első lépéseiben nyújtott felbecsülhetetlen segítségéért. Vizsgálataim során értékes segítséget kaptam a Tanszék további volt és jelen munkatársától is, különösen **Pop Renátától, Szilágyi Judittól, Végh Borbálától, Herczeg Ilonától és Terényi Annától**. Köszönet illeti a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék minden egyes (volt és jelen) munkatársát is a molekuláris biológia rejtelseinek felderítésében nyújtott segítségért, különösen **dr. Bakonyi Tamást, dr. Hornyák Ákost, dr. Forgách Petrát, dr. Kővágó Csabát és dr. Tapaszi Zsuzsannát**. Hálás vagyok **dr. Kisary Jánosnak** a csirke és pulyka parvovírussal kapcsolatos segítségért és tanácsokért, valamint **dr. Zsák Lászlónak** a vizsgálataim során felhasznált, amerikai eredetű csirke és pulyka parvovírus nukleinsav szekvenciáikért, **dr. Nemes Csabának** a pulyka eredetű minták rendelkezésemre bocsátásáért, valamint **Abonyi Tóth Zsoltnak** az eredményeim statisztikai értelmezésében nyújtott értékes segítségért.

Továbbá köszönettel tartozom azoknak az állatorvos kollégáknak, akiktől a vizsgálataim során felhasznált mintákat kaptam, különösen **dr. Dobos Andrásnak**.

A doktori tanulmányaim anyagi háttérét biztosító ösztöndíjért az Oktatási Minisztériumnak tartozom köszönettel.