

dc_834_14

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A sertés torzító orrgyulladása: a kóroktan, a kórfejlődés és az
immunvédelem egyes kérdéseinek vizsgálata**

Magyar Tibor

Magyar Tudományos Akadémia
Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet

2014

dc_834_14

Összefoglalás

A torzító orrgyulladás a sertés széles körben elterjedt és tetemes gazdasági veszteségeket okozó fertőző betegsége. Kóroktana összetett, a *Bordetella bronchiseptica* és *Pasteurella multocida* toxikus törzsei mellett különböző hajlamosító tényezők is jelentős szerepet játszanak kialakulásában. Kutatásaim célja az volt, hogy az általam vezetett vagy meghatározó részvételemmel végzett munkákkal a betegség kóroktana, kórfejlődése és az immunvédelem egyes kérdéseiről szerezzünk új ismereteket.

Az első kísérletsorozatban a *B. bronchiseptica* dermonekrotikus toxin (DNT) kórtani jelentőségét vizsgáltuk. Ehhez DNT– mutáns törzseket állítottunk elő, majd az így nyert izogén DNT– mutáns és virulens DNT+ szülői törzspárok (B58 – B58GP és KM22 – KB24) megbetegítő képességét hasonlítottuk össze laboratóriumi egerekben és a baktérium egyik természetes gazdájában, a sertésben.

A DNT– *B. bronchiseptica* mutáns törzsek előállítását kétféle módon oldottuk meg. A *B. bronchiseptica* B58 jelű törzs esetében a klónozott *dnt* gén egy belső fragmentjét deletáltuk, melynek helyére egy kanamicin-rezisztencia kazettát helyeztünk, majd az így nyert konstrukciót kicseréltük az anyatörzs *dnt* génjével (így kaptuk a *B. bronchiseptica* B58GP jelű mutáns törzset). A *B. bronchiseptica* KM22 jelű törzs esetében a *B. pertussis* *dnt* gén egy megfelelően jelölt fragmentjét tartalmazó mutációs plazmidot inszertáltunk a szülőitörzs *dnt* génjébe (*B. bronchiseptica* KB24). A DNT termelés megszüntetésének sikerét mutatta, hogy a mutáns törzsekből készített kivonatok nem reagáltak az immunoblotban a DNT specifikus monoklonális ellenanyagokkal, míg a szülői törzsek tiszta csíkot adtak a reakcióban.

A két szülői *B. bronchiseptica* törzs, a B58 és KM22 ultrahanggal feltárt sejtmentes kivonatai az egér léptesztben letálisnak bizonyultak, míg a mutáns törzsek (B58GP és KB24) kivonatai egyáltalán nem mutattak toxikus hatást. Másrésről az élő sejt formájában intravénásan beoltott szülői (B58) és mutáns (B58GP) *B. bronchiseptica* törzsek egymáshoz hasonló mértékű virulenciával rendelkeztek. Ezek az eredmények igazolták, hogy a *B. bronchiseptica* B58GP törzs esetében sikeresen megszüntettük a DNT termelését, míg a kórokozó képességhez nélkülözhetetlen egyéb fontos virulencia tényezők a szülői törzshöz hasonló mértékben termelődtek.

A DNT+ *B. bronchiseptica* B58 jelű törzs kifejezett orrkagyló sorvadást idézett elő az orron keresztül fertőzött egerekben, ami viszont nem volt megfigyelhető a DNT– törzsszel

(B58GP) fertőzött társaikban. Ez arra utal, hogy a DNT felelős az egerekben kialakuló orrkagyló sorvadás kialakulásáért, és nem az I. fázisú (bvg+) *B. bronchiseptica* törzsek által termelt egyéb virulencia tényezők valamelyike. Vizsgálataink azt is megerősítették, hogy a *B. bronchiseptica* DNT-nek léptoxikus hatása van egérben, míg DNT hiányában a nyirokszervek stimulációjának jelei láthatók. A *B. bronchiseptica* B58GP jelű DNT– törzzsel fertőzött egerekben jellegzetes lympho-histiocytás, peribronchialis és perivascularis infiltrációval kísért hurutos tüdőgyulladás fejlődött ki. A *B. bronchiseptica* B58 jelű DNT+ törzzsel fertőzött egerekben viszont gyulladásos reakcióval övezett nagy nekrotikus területek voltak láthatók, utalva arra, hogy a DNT képes közvetlenül károsítani a tüdőszövetet, legalábbis egerekben.

A következő kísérletben a *B. bronchiseptica* B58 – B58GP és a KM22 – KB24 izogén törzspárok megbetegítő képességét hasonlítottuk össze szopós malac modellben. Ennek során a törzsek adhézis (kolonizációs) képességét, valamint a törzsek által a tüdőben és az orrüregben előidézett patológiai elváltozásokat tanulmányoztuk. Mind a négy törzs nagyszámban megtelepedett a felső és az alsó légutakban, bár az orrüregben a DNT+ törzsek kolonizációja valamivel nagyobb mértékű volt, mint a DNT– törzseké. Orrkagyló sorvadás csak a DNT+ törzzsel fertőzött malacokban fejlődött ki. Ugyanezen állatok tüdejében a hurutos folyamatok mellett fibrines-elhalásos jellegű elváltozások is mutatkoztak, melyekben a *B. bronchiseptica* immun-hisztokémiai eljárással kimutatható volt. A kísérlet eredményei megerősítették feltevésünket, hogy a *B. bronchiseptica* DNT nélkülözhetetlen a *B. bronchiseptica* által indukált orrkagyló sorvadás kialakításában. Úgy tűnik, hogy a *B. bronchiseptica* okozta hurutos pneumóniát kísérő alveoláris nekrozisért – összhangban az egér kísérletekben kapott megfigyelésekkel – szintén a DNT tehető felelőssé.

A sertés orrüreg csontos képleteinek megjelenítésére alkalmas nem invazív képalkotó eljárás, a komputertomográfia (CT) használhatóságának lehetőségeit az orrkagyló sorvadás különböző fokozatait reprezentáló 27 hetes korú sertésekben vizsgáltuk. Eredményeink azt igazolták, hogy ez a képalkotó eljárás kiválóan megfelel a torzító orrgyulladás tanulmányozására. Szignifikáns korrelációt találtunk az orrkagyló és orrsövény elváltozások hagyományos kórbonctani pontozása és a CT felvételek vizuális értékelése között. Elsőként vizsgáltuk CT felhasználásával és kontrollált körülmények között végzett fertőzéses modellkísérletekben a betegség progresszív (progresszív) és nem progresszív (nem progresszív) formájának kórfejlődését. Megerősítettük azt a korábbi, indirekt megfigyeléseken alapuló feltételezést, hogy a *B. bronchiseptica* fertőzés önmagában csak

közepesen súlyos orrkagyló sorvadást idéz elő, és ezek az elváltozások idővel teljes mértékben regenerálódhatnak. Az elváltozások az állatok 6 hetes életkoráig súlyosbodtak, majd 30 nappal később jelentős javulást észleltünk, amelyet a fertőzés utáni harmadik hónap végére teljes gyógyulás követett.

Az általánosan elfogadott nézet szerint a toxikus *P. multocida* súlyos és irreverzibilis orrkagyló sorvadást idéz elő (progrediáló, progresszív kórforma). Így meglepő és váratlan eredmény volt, hogy *B. bronchiseptica* és toxikus *P. multocida* kombinált fertőzésnek kitett malacok többségében szintén a teljes csontstruktúra tökéletes regenerációját figyelhetjük meg a fertőzést követő 60. naptól kezdődően, annak ellenére, hogy a csoport egyedeinek nagy részénél súlyos fokú orrkagyló sorvadás alakult ki a hathetes életkor eléréséig.

Jelenlegi irodalmi ismereteink alapján a torzító orrgyulladás kísérletes előidőzésére három fertőzési modell alkalmas: *B. bronchiseptica* fertőzés önmagában, ecetsavas előkezelést követő *P. multocida* fertőzés és *B. bronchiseptica* - *P. multocida* kombinált fertőzés. Munkánk következő részében arra kerestünk választ, hogy a rendelkezésre álló fertőzési modellek közötti különbségek hogyan befolyásolják a torzító orrgyulladás elleni kombinált vakcinák hatékonysági vizsgálatait.

A kísérletekben két különböző összetételű, kereskedelmi forgalomban kapható oltóanyagot használtunk fel. Az „A” jelű vakcina sertés eredetű inaktivált toxikus *B. bronchiseptica* és toxikus D típusú *P. multocida* törzset, valamint 2% alumínium-hidroxid adjuvánst tartalmazott. A „B” jelű vakcina sertés eredetű inaktivált toxikus *B. bronchiseptica* törzseket és formalinnal inaktivált, D típusú toxikus *P. multocida*-ból származó tisztított *P. multocida* toxint (PMT), valamint olaj-a-vízben emulziós adjuvánst tartalmazott. A két különböző összetételű oltóanyagot alkalmazva megvizsgáltuk, hogy a fertőzési modellek mennyiben alkalmasak a betegség elleni kombinált vakcinák hatékonyságának mérésére. A két vakcina különböző szintű védelmet nyújtott a *B. bronchiseptica* és az ecetsav – *P. multocida* fertőzésekkel szemben, aszerint, hogy melyik komponens volt a jobb immunogén a kombinációban („A” jelű vakcina: *B. bronchiseptica* antigén, „B” jelű vakcina: *P. multocida* antigén). Ebből az következik, hogy a torzító orrgyulladás elleni kombinált oltóanyagok legjobb értékmérő módszere az alkotóelemenkénti specifikus vizsgálatok (*B. bronchiseptica*, illetve ecetsav – *P. multocida* fertőzőes modell) külön-külön elvégzése. Az előzőekkel szemben a *B. bronchiseptica* – *P. multocida* kombinált fertőzőes modellben a két oltóanyag egyformán teljesített, valószínűleg azért, mert ebben az esetben a komponensek előnyös és hátrányos

tulajdonságai kiegyenlítették egymást. Mindez arra utal, hogy a *P. multocida* – *B. bronchiseptica* fertőzési modell inkább a torzító orrgyulladás elleni kombinált vakcinák védőképességének gyakorlati jellegű kipróbálásában nyújthat hasznos információt.

A torzító orrgyulladás elleni vakcinák továbbfejlesztésének lehetőségeit vizsgáló kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy az adjuváns típusa és a vakcina antigén összetétele jelentősen képes befolyásolni az áthangolódás mértékét. A torzító orrgyulladás szempontjából fontos specifikus ellenanyagok szintje növelhető, amennyiben az alumínium-hidroxid helyett ásványi olaj adjuvánst vagy valamelyik új típusú immunstimulánst használunk. Ebből a szempontból az egyik új típusú immunstimuláns, a Montanide IMS 1313 (SEPPIC; Paris, France) bizonyult a legsikeresebbnek. Tisztított és formalinnal inaktivált PMT (fPMT) hozzáadásával jelentősen fokozódott a torzító orrgyulladás kórfejlődése szempontjából kulcsfontosságú szerepet játszó PMT specifikus áthangolódás mértéke. Másrészt masszív *B. bronchiseptica* és *P. multocida* kombinált fertőzés esetén a monovalens fPMT tartalmú vakcina nem biztosította a klinikai védettség várt szintjét, megerősítve azt, hogy a *B. bronchiseptica* fertőzés is fontos szerepet játszik a torzító orrgyulladás kiváltásában. Ugyanakkor azt is megállapítottuk, hogy a szerológia profil és a betegség elleni védettség között nincs feltétlen összefüggés. Ennek egyik érdekes megnyilvánulása volt az a megfigyelésünk, miszerint a vakcina *P. multocida* bakterin komponense ugyan negatív hatással volt a PMT specifikus ellenanyag titer alakulására, *B. bronchiseptica* – *P. multocida* kombinált fertőzés esetén tökéletesebb védelmet kaptunk, ha az oltóanyag az fPMT mellett egész sejt *P. multocida* alkotó elemet is tartalmazott. Ez arra utal, hogy a *P. multocida* teljes-sejt antigéneknek is szerepe lehet a torzító orrgyulladás elleni hatékony immunitás kialakításában.

Rövidítések jegyzéke

AA	acetic acid (ecetsav)
<i>B. bronchiseptica</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
Bb	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
BG táptalaj	Bordet-Gengou táptalaj
bp	bázispár
Bvg	Bordetella virulencia gén
BvgAS	kétkomponensű szabályozó rendszer
CFU	telepformáló egység
CT	komputertomográfia
CyaA	adenilát-cikláz hemolizin toxin
DNT	dermonekrotikus toxin
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FIM	fimbria
fPMT	formalinnal inaktivált <i>P. multocida</i> toxin
H-E	hematoxin-eozin
kb	kilóbázis
LD ₅₀	50 %-os letális dózis
NF	nem vakcinázott, fertőzött
NN	nem vakcinázott, nem fertőzött
PBS	phosphate buffered saline (foszfáttal pufferelt sóoldat)
<i>P. multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
Pm	<i>Pasteurella multocida</i>
PMT	<i>P. multocida</i> toxin
SPF	specifikus kórokozótól mentes
<i>vag</i>	<i>vir</i> activated genes
<i>vrg</i>	<i>vir</i> repressed genes

Tartalomjegyzék

Összefoglalás	1
Rövidítések jegyzéke	5
Tartalomjegyzék.....	6
1. Bevezetés	9
2. Irodalmi áttekintés.....	11
2.1. A torzító orrgyulladás.....	11
2.1.1. A torzító orrgyulladás jellemzői.....	14
2.1.1.1. Klinikai tünetek.....	14
2.1.1.2. Kórbonctani elváltozások.....	16
2.1.1.3. Kórszövettani elváltozások	18
2.1.1.4. Gazdasági jelentőség	18
2.1.1.5. A betegség leküzdésének lehetőségei	19
2.1.1.5.1 Gyógykezelés	19
2.1.1.5.2 Immunizálás	21
2.1.1.5.3 Megelőzés.....	22
2.2. A kórfejlődés szempontjából fontos ismeretek.....	22
2.2.1. A <i>B. bronchiseptica</i> virulenciáját meghatározó tényezők.....	22
2.2.1.1. Adhezinek	23
2.2.1.2. Toxinok	24
2.2.1.2.1 Dermonekrotikus toxin (DNT).....	24
2.2.2. A <i>B. bronchiseptica</i> virulencia tényezőinek genetikai szabályozása	27
2.3. A <i>P. multocida</i> toxin	29
2.4. A torzító orrgyulladás és a csontanyagcsere.....	31
2.5. Következtetések	33
3. A kutatómunka indokoltsága és céljai.....	34
4. A <i>B. bronchiseptica</i> dermonekrotikus toxin (DNT) kórtani szerepének vizsgálata egérben és sertésben	35
4.1. Anyagok és módszerek.....	36
4.1.1. Baktérium törzsek és tenyésztési körülmények	36
4.1.2. A <i>B. bronchiseptica</i> B58 DNT– mutánsának (B58GP) előállítása.....	37
4.1.3. A <i>B. bronchiseptica</i> KM22 DNT– mutánsának (KB24) előállítása	38
4.1.4. Hemagglutinációs próba.....	39
4.1.5. A baktériumtörzsek virulencia faktorainak immunoblottal történő azonosítása	39
4.1.6. Virulencia és toxicitás vizsgálata egérben (egér lépteszt).....	39
4.1.7. Egérfertőzés.....	40
4.1.8. Sertések kísérletes fertőzése.....	40
4.1.9. A kolonizáció mértékének meghatározása	41
4.1.10. Kórbonctani vizsgálat.....	41
4.1.11. <i>B. bronchiseptica</i> kimutatása immun-hisztokémiai eljárással	42
4.1.12. Statisztikai elemzés	43
4.2. Eredmények	43

4.2.1. A <i>B. bronchiseptica</i> B58/B58GP és KM22/KB24 törzspárok jellemzői.....	43
4.2.2. Egérfertőzési kísérlet	44
4.2.2.1. Klinikai megfigyelés.....	44
4.2.2.2. Kórszövettani vizsgálat.....	45
4.2.3. Sertések kísérletes fertőzése	49
4.2.3.1. Klinikai tünetek	49
4.2.3.2. A testhőmérséklet alakulása	49
4.2.3.3. Testtömeg gyarapodás	50
4.2.3.4. A légutak kolonizációja	50
4.2.3.4.1 Orrüreg	50
4.2.3.4.2 Szöveti kolonizáció.....	51
4.2.3.5. Kórbonctan	52
4.2.3.5.1 Orrkagylók	52
4.2.3.5.2 Légcső	53
4.2.3.5.3 Tüdő	54
4.2.3.6. Immunhisztokémia	56
4.2.3.7. Egyéb elváltozások	57
4.3. Megvitatás.....	58
5. A torzító orrgyulladásra jellemző elváltozások alakulásának nyomon követése	
<i>komputertomográfia alkalmazásával</i>	62
5.1. Anyagok és módszerek	63
5.1.1. Kísérleti állatok.....	63
5.1.2. Baktérium törzsek	64
5.1.3. Kísérleti elrendezés.....	64
5.1.4. Orrváladék gyűjtése és bakteriológiai vizsgálata.....	65
5.1.5. Komputertomográfia.....	65
5.1.6. Az orrelváltozások pontozása	65
5.1.7. A CT felvételek értékelése.....	65
5.1.8. Statisztikai elemzés.....	66
5.2. Eredmények.....	67
5.2.1. Az orrelváltozások vizsgálhatósága CT alkalmazásával	67
5.2.2. Kísérletes fertőzések	69
5.2.2.1. Klinikai megfigyelés és bakteriológia vizsgálat.....	69
5.2.2.2. A CT felvételek értékelése	69
5.3. Megvitatás.....	74
5.3.1. Az orrelváltozások vizsgálhatósága CT alkalmazásával	74
6. A fertőzési modell, a vakcina-összetétel, a szerológiai profil és a betegség elleni	
<i>védettség közötti összefüggések felderítése.....</i>	78
6.1. Anyagok és módszerek	79
6.1.1. Kísérleti állatok.....	79
6.1.2. Vakcinák	80
6.1.2.1. A fertőzési modellkísérletekben használt vakcinák.....	80
6.1.2.2. PMT detoxifikálás	80
6.1.2.3. Baktérium szuszpenziók.....	81
6.1.2.4. A szerológiai profil vizsgálathoz használt vakcinák összetétele.	81
6.1.3. Baktérium törzsek	82

6.1.4. Kísérleti elrendezés	82
6.1.4.1. A fertőzési modellek összehasonlítása.....	82
6.1.4.2. A három fertőzési modell.....	83
6.1.4.2.1 1. kísérlet: <i>B. bronchiseptica</i> – <i>P. multocida</i> (Bb/Pm) kombinált fertőzés	83
6.1.4.2.2 2. kísérlet: ecetsavas előkezelést követő <i>P. multocida</i> (ecetsav/Pm) fertőzés	83
6.1.4.2.3 3. kísérlet: <i>B. bronchiseptica</i> (Bb) fertőzés	83
6.1.4.3. Szerológiai profil vizsgálatok	83
6.1.4.3.1 Az adjuvánsok összehasonlító vizsgálata.....	83
6.1.4.3.2 A tisztított és inaktivált PMT vizsgálata	84
6.1.4.3.3 Mesterséges ráfertőzési kísérlet.....	84
6.1.5. Értékelés	85
6.1.5.1. A fertőzési modellek összehasonlítása.....	85
6.1.5.2. Szerológiai profil vizsgálatok	86
6.1.6. Statisztikai módszerek	86
6.2. Eredmények	87
6.2.1. A három fertőzési modell összehasonlítása	87
6.2.2. A különféle adjuvánsok hatása a <i>B. bronchiseptica</i> és a PMT elleni áthangolódásra.....	91
6.2.3. A kizárólag fPMT-t, illetve <i>P. multocidával</i> és/vagy <i>B. bronchisepticával</i> kombinált fPMT-t és különböző adjuvánsokat tartalmazó vakcinák összehasonlítása	92
6.2.4. A vakcina összetételének hatása a szerológiai profilokra kocákban és malacokban.....	94
6.2.5. A vakcina összetételének hatása a torzító orrgyulladás paraméterekre a fertőzött malacokban	96
6.3. Megvitatás	97
7. Új tudományos eredmények	105
8. Irodalomjegyzék.....	107
9. Saját közlemények	120
Köszönetnyilvánítás	127

1. Bevezetés

A sertés torzító orrgyulladás egy meglehetősen régen ismert fertőző betegség (első leírása 1830-ból származik), amely a nagyüzemi sertéstartás megjelenésével terjedt el világszerte, így hazánkban is, és tett szert nagyobb jelentőségre. Többnyire nem jár megrázó klinikai tünetekkel, látványos elhullásokat pedig egyáltalán nem idéz elő, mégis tetemes gazdasági károkat okozhat az állattartó telepeknek, elsősorban a csökkent súlygyarapodás, a kezelési és/vagy megelőzési költségek és a vele járó kereskedelmi korlátozások következtében.

A jellemzően már egész fiatal korban bekövetkezett fertőződés kezdetben felső légúti tünetekben (tüsszögésben, orrfolyásban, orrvérzésben) nyilvánul meg. Eközben az érintett állatok orrcsontjainak fejlődése zavart szenved, a kórkép súlyos formájában az orrkagylók egyik vagy mindkét oldalon teljesen elsorvadnak, ennek megfelelően az orr a beteg oldal felé elcsavarodik, eltorzul (innen ered a kórkép hazai elnevezése) vagy megrövidül. Következmenyképpen csökken az állatok takarmányfelvétele, az orr szűrőszerepének kiesése miatt pedig nő a másodlagos fertőzések veszélye.

Jelenlegi ismereteink szerint két baktériumfaj, a *Bordetella bronchiseptica* és a *Pasteurella multocida* képes az orrkagylók sorvadását előidézni, de úgy tűnik, nem egyforma mértékben. Az általánosan elfogadott nézet szerint a *B. bronchiseptica* okozta elváltozások közepes mértékűek és regenerálódásra hajlamosak, míg a *P. multocida* toxikus törzseivel fertőzött malacokban a betegség súlyos és tartós formája alakul ki. Ennek megfelelően jelenleg két kórkép elkülönítését javasolják a szakemberek: progresszív forma (progresszív torzító orrgyulladás) és nem progresszív forma (bordetellosis).

A kérdést bonyolítja azonban az a tény, hogy a *P. multocida* megtelepedéséhez és elszaporodásához viszont valamilyen, a nyálkahártyát károsító hajlamosító hatásra van szükség, melyek közül – gyakorlati szempontból – a *B. bronchisepticával* történt előzetes fertőzés a legismertebb és a legvalószínűbb. A *B. bronchiseptica*, miután bejutott az orrüregbe, az adhéziót szolgáló felületi képletei segítségével hozzátapad a nyálkahártya csillós hámsejtjeihez, majd elszaporodik a nyálkahártya felületén. Mindez előfeltétele annak, hogy anyagcseretermékei révén károsíthassa a szervezetet. Ez utóbbiak közül a dermonekrotikus toxin (DNT) látszik a legfontosabbnak. Feltehető ugyanis, hogy a DNT felelős mind a *B. bronchiseptica* által előidézett orrkagyló

sorvadásért, mind azon nyálkahártya elváltozásokért, melyek asszisztálnak a *P. multocida* sikeres kolonizációjához. A nyálkahártyán megtelepedett *P. multocida* szintén kiválaszt egy hőérzékeny toxint (*P. multocida* toxin, PMT), amely megzavarja az orrkagylók csontosodási folyamatait, valamint csontlebomlást is előidéz, ami az orrüreg csontos képleteinek súlyos sorvadásának kialakulását eredményezi.

A kórkép felismerése óta nagyszámú, a betegség különböző vonatkozásait tárgyaló közlemény jelent meg a szakirodalomban. Ennek ellenére mindig merülnek fel újabb, még tisztázásra váró kérdések, melyek időről időre kiújuló vitákhoz vezetnek. Ennek egyik fő oka, hogy a sertés torzító orrgyulladás az összetett okú és a polimikrobiális betegségek kategóriájába egyaránt beleillik, így több szempontból is modell értékűnek tekinthető kórkép, amely összetettsége miatt a nehezebben megismerhető bántalmak közé tartozik.

Intézetünkben a torzító orrgyulladás kutatása 30 éves múltra tekint vissza, azt a bábolnai SPF és a mezőhegyesi magas egészségi státuszú sertés állományok létrehozását célzó programok hívták életre. A magyar sertéstartó – sertéstenyésztő hagyományok megkövetelték, különösen a már említett kereskedelmi korlátozások hátrányaira és az egyéb gazdasági veszteségekre tekintettel, hogy ezzel a fontos betegséggel nemzetközileg is elismert kutatásokat folytassunk. Ez alatt számos, a torzító orrgyulladás kóroktanával, kórfejlődésével, járványtanával és az ellene való védekezés lehetőségeivel kapcsolatos vizsgálatot végeztünk, melyek egy része érdekes új megállapításokhoz vezetett. Kandidátusi értekezésemben (1993) a *B. bronchiseptica* virulenciáját meghatározó tényezők és a *B. bronchiseptica* és a *P. multocida* közötti kölcsönhatás kísérletes vizsgálata területén elért eredményeket mutattam be. Az utána következő időszakban a torzító orrgyulladással kapcsolatos kutatómunka elsősorban a kóroktan, a kórfejlődés és a betegség elleni immunvédelem néhány sajátosságának tanulmányozása területén tárt fel új ismereteket. Az értekezésben ezek közül számolok be néhány, nemzetközi szinten is kiemelkedőnek vélt és kellő részletességgel tárgyalható eredményről.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A torzító orrgyulladás

A sertés torzító orrgyulladása a világon mindenütt előforduló fertőző betegség, amely különösen az iparszerű sertéstartással rendelkező országok számára jelent egészségügyi kockázatot. A betegség jellemzője egy kezdeti heveny orrgyulladás, melyet az orrüreg csontos elemeinek krónikus sorvadása követ. Az egyéb fertőzésekkel szembeni fokozott fogékonyság, a megnövekedett gyógyszerköltség, a rosszabb takarmányértékesítésből fakadó hosszabb elkészülési idő és a tenyészállatok forgalmazásának korlátozottsága tetemes gazdasági veszteségeket eredményezhet az állattenyésztésnek.

A kórképet Franque (1830) írta le először Németországban ("Snüffelkrankheit" néven), több mint 180 évvel ezelőtt. A torzító orrgyulladás első hazai irodalmi összefoglaló ismertetését Ősz Gyula (1956) jelentette meg a Magyar Állatorvosok Lapjában. A betegség magyarországi felbukkanásáról Áldásy és Ványi (1962) számoltak be elsőként, akik import sertések utódaiban figyelték meg a kórképre jellemző elváltozásokat. Külön ki kell emelni Éliás Béla nevét, aki hosszabb időn keresztül foglalkozott a torzító orrgyulladással, és számos cikket publikált, különösképpen a *B. bronchiseptica* tulajdonságairól és a megfelelő immunvédelem kialakításának lehetőségeiről (Éliás és mtsai, 1990a, 1990b, 1993).

A betegség kialakulását kezdetben takarmányozási (nem megfelelő kalcium és foszfor diéta, A- vagy D-vitamin hiánya) és/vagy genetikailag öröklődő rendellenességekkel magyarázták (Franque, 1830; Brown és mtsai, 1966; Seifert, 1971; Horváth és mtsai, 1972, Éliás és Hámori, 1975). Később ezeket elvetették, mint elsődleges kórokokat (Logomarsino, 1974; Switzer, 1981), és helyettük a bántalomnak a fertőző jellege került az érdeklődés előterébe. A korai kutatások különféle baktériumok (*Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Spherophorus*, *Corynebacterium* és mycoplasmák), vírusok (cytomegalovírus) és trichomonasok szerepét próbálták bizonyítani (összefoglalva: Switzer, 1956; Switzer és Farrington, 1975). Az említett kórokozók tiszta kultúráival azonban nem sikerült a jellemző elváltozásokat előidézni.

Jelenlegi ismereteink szerint csupán két baktériumfaj, a *B. bronchiseptica* és a *P. multocida* bizonyos törzsei képesek arra, hogy jelentős mértékű orrkagyló sorvadást idézzenek elő sertésben. A *B. bronchiseptica* ilyen irányú képességét Switzer (1956) írta

le először, amit később Cross és Claflin (1962) megerősített. A *P. multocidát* Gwatkin és mtsai (1953), majd röviddel ezután Braend és Flatla (1954) hozta kapcsolatba a torzító orrgyulladással, bár ennek bizonyítására több mint húsz évet kellett várni.

A *B. bronchiseptica* sertés orrüregéből történt első izolálását követően Switzer (1956) azt is bebizonyította, hogy a baktérium képes az orrkagylók sorvadását önállóan előidézni. Később számos kutató jutott még ugyanerre a következtetésre (Brassine és mtsai, 1976; Cross and Claflin, 1962; Kemeny, 1972; Ross és mtsai, 1963, Shimizu és mtsai, 1971), ami azt eredményezte, hogy hosszabb időn keresztül a *B. bronchisepticát* tekintették a bántalom egyedüli kórokozójának. Ugyanakkor kétségek is felmerültek, melyeket a következő megfigyelések támasztottak alá:

1. Többen megállapították (Tornoe és mtsai, 1976; Giles és mtsai, 1980), hogy a *B. bronchiseptica* elterjedtsége sokkal nagyobb a sertésállományokban, mint a súlyos klinikai torzító orrgyulladás előfordulás aránya. Ennek egyik lehetséges magyarázata az, hogy a természetben található törzsek között virulencia különbségek vannak. Erről számoltak be kutatók az Egyesült Államokból (Ross és mtsai, 1967; Skelly és mtsai, 1980), Kanadából (Miniats és Johnson, 1980) és Nagy-Britanniából (Collings és Rutter, 1985). Skelly és mtsai (1980) állításukat arra alapozták, hogy az általuk vizsgált izolátumoknak csupán 50%-a eredményezett jelentős mértékű orrkagyló sorvadást orron át fertőzött SPF malacokban. Vizsgálataikat 4-6 hetes malacokban végezték, ami a *B. bronchisepticával* szembeni igazi fogékonyság korhatárán már túl van, emellett törzseik jellemzése is elégtelen, így nincs mire visszavezetni a virulenciában feltételezett különbségeket. Az utóbbi mondható el Miniats és Johnson (1980) munkájáról is, akik ugyan már hétnapos korban fertőztek gnotobiotikus malacokat, a kialakult elváltozások súlyosságában különbségeket is találtak, de törzseiknek csak növekedési és biokémiai jellemzőit írták le, melyekben semmiféle eltérést nem tudtak kimutatni. Ross és mtsai (1967) különböző állatfajokból (sertés, kutya, macska, nyúl, patkány) származó izolátumok megbetegítő képességét hasonlították össze háromnapos korban orron át fertőzött malacokban. A nem sertés eredetű törzsek között találtak ugyan sertéssel szemben mutatott virulencia különbségeket, a sertésből izolált törzsek azonban hasonló mértékben hoztak létre orrkagyló sorvadást. Rutter és mtsai (1982) szintén úgy találták, hogy a torzító orrgyulladással terhelt, illetve attól mentes állományokból származó *B. bronchiseptica* izolátumok virulenciája meglehetősen egyöntetű: sem a sertést megbetegítő képességükben, sem az egerekben mutatott LD₅₀ értékeikben nem tudtak szignifikáns különbségeket kimutatni.

2. Annak ellenére, hogy a *B. bronchiseptica*-val kísérletesen fertőzött malacokban kifejezett orrkagyló sorvadás alakulhat ki, ezek az elváltozások a kórokozó tartós orrbeli megtelepedése mellett sem súlyosbodtak és mutatták a betegség progrediáló formájára jellemző képet (Pedersen és Barfod, 1981). Még a 10 legvirulensebbnek tartott Egyesült Királyságban izolált *B. bronchiseptica* törzs sem produkált szignifikáns orrkagyló sorvadást (Rutter és mtsai, 1982). Ugyanakkor azt is hangsúlyozni kell, hogy a malacok *B. bronchiseptica* fertőzéssel szembeni érzékenysége alapvetően függ az életkortól. A jellemző elváltozások csak az élet első heteiben fertőződött állatokban alakulnak ki (Rutter, 1985).

3. A *B. bronchiseptica* kiváltotta elváltozások regenerálódásra hajlamosak (Rutter, 1981; Tornøe és Nielsen, 1976). Úgy tűnik, hogy az ehhez szükséges időtartam szintén az életkorral áll összefüggésben. A négyhetes korban fertőzött malacok orrkagylóinak regenerációja már a fertőzés után 6-8 héttel bekövetkezett. Ugyanez a 3 napos korban fertőzött malacok esetében 5 hónapot vett igénybe (Ross és mtsai, 1963).

Mindezek alapján elmondható, hogy a *B. bronchiseptica* fertőzöttség önmagában nem magyarázza a torzító orrgyulladás megjelenését, különösen nem a heveny járványkitörések során tapasztalt súlyos elváltozások kialakulását.

A felmerült kétségek arra ösztönözték a kutatókat, hogy más tényezők után nézzenek. Így került a betegséggel korábban már összefüggésbe hozott *P. multocida* ismét az érdeklődés előterébe.

A *P. multocida* torzító orrgyulladással kapcsolatos jelentőségének tisztázása akkor vált lehetővé, amikor felfedezték, hogy a törzsek egy része toxintermelő képességgel rendelkezik (Iljina és Zasukhin, 1975, de Jong és mtsai, 1980). Azt is megállapították, hogy kizárólag a toxint termelő törzsek képesek súlyos és irreverzibilis orrkagyló sorvadást előidézni kísérletes fertőzések során (Pedersen és Barfod, 1981, Rutter és Rojas, 1982, Pedersen és Elling, 1984). A toxintermelő *P. multocida* kóroktani jelentőségét segítettek tisztázni azok a kísérletek, amikor orrba csepegtetett (Iljina és Zasukhin, 1975) vagy izomba oltott (Rutter és Mackenzie, 1984) toxintartalmú sejtkivonatokkal sikerült a jellegzetes elváltozásokat létrehozni. A *P. multocida* toxin szerepét megerősítette, mikor D szerocsoportú *P. multocida*-ból tisztított és orrba juttatott (Dominick és Rimler, 1986), vagy hasüregbe oltott (Chanter és mtsai, 1986) fehérje toxin súlyos orrkagyló sorvadást idézett elő gnotobiotikus malacokban. A *P. multocida* toxin (PMT) – legalábbis mesterséges fertőzési kísérletekben játszott – kulcsszerepének végső bizonyítékát Lax és Chanter

(1990) szolgáltatta, akik rekombináns PMT segítségével sikeresen reprodukálták a torzító orrgyulladás jellemző elváltozásait.

Az ismertetett eredmények arra engednek következtetni, hogy a két baktérium által előidézett elváltozások súlyossága és lefolyása különbözik egymástól. A *B. bronchiseptica* enyhe-közepes mértékű elváltozásokat idéz elő, melyek idővel képesek regenerálódni, míg a PMT termelő *P. multocida* súlyos és tartósan megmaradó orrkagyló sorvadást képes létrehozni. Ezen az alapon született meg a javaslat, hogy különböztessünk meg progrediáló (progresszív) és nem progrediáló (nem progresszív) kórformát, aszerint, hogy milyen elsődleges kóroktani tényező található az adott állományban (de Jong és Nielsen, 1990).

Tovább bonyolítja azonban a kérdést, hogy a *P. multocida* egymagában fertőzve csak kis számban képes megtelepedni a kísérleti állatok sértetlen orrnyálkahártyáján, és az ilyen malacokban csupán enyhe orrkagyló elváltozásokat észleltek (Rutter és Rojas, 1982). A *P. multocida* ép orrnyálkahártyához való gyenge affinitását más szerzők vizsgálatai is alátámasztják (Frymus és mtsai, 1986, Jacques és mtsai 1988, Nakai és mtsai, 1988). Mindez arra utal, hogy a *P. multocida* akkor tud az orrüregben a betegség előidézéséhez szükséges mennyiségben megtapadni és elszaporodni, ha előzőleg a nyálkahártya megfelelő elváltozásai jönnek létre. Eddig ezt kétféle módon sikerült mesterségesen előidézni: az orrnyálkahártya 1%-os ecetsavval történő ecsetelésével (Pedersen és Elling, 1984), illetve a *P. multocidát* megelőző *B. bronchiseptica* fertőzéssel (Pedersen és Barfod, 1981, Rutter és Rojas, 1982). Gyakorlati szempontból az utóbbi tűnik jelentősebbnek.

2.1.1. A torzító orrgyulladás jellemzői

2.1.1.1. Klinikai tünetek

A torzító orrgyulladás klinikai tünetei közé tartozik a fiatal állatok tüszögése, a savós, súlyosabb esetben savós-gennyes orrfolyás, könnyezés, a belső szemzugból kiinduló félhold alakú elszíneződés, esetenként orrvérzés, végül az egyik vagy mindkét oldali orrkagyló, illetve egyéb csontos elemek nagymértékű, vagy teljes elsovadása, ami ennek megfelelően az orr egyik irányban történő elferdülését, vagy pedig megrövidülését eredményezi (Rutter, 1985). Az érintett sertések gyakran rosszul értékesítik a takarmányt, és fejlődésükben visszamaradnak. A torzító orrgyulladás klinikai tünetei általában 4-12 hetes kortól kezdődően jelennek meg (de Jong, 1999). Súlyos esetekben a malacok egy részében az összes felsorolt tünet látható, míg másokban csupán egy részük. Másrésről, a tünetek többsége egyéb tényezők hatására is kialakulhat, egyedül az orr tipikus torzulása

tekinthető kórjelző értékű elváltozásnak, amely az orrcsontok fejlődésének zavarai miatt alakul ki. Ennek egyik jele a brachygnathia superior, amikor a felső állcsont megrövidülése következtében az alsó állcsont túlnyúlik azon, és így a metszőfogak nem találkoznak (1. ábra). A megrövidült orr fölött a bőr vaskos ráncokba rendeződik. Amikor a csontosodási zavar az egyik oldalt nagyobb mértékben érinti, mint az ellenoldalt, akkor az orr oldalirányú elferdülése következik be (2. ábra), ami a betegség legfeltűnőbb megnyilvánulási formája. Mindkét oldali sorvadás az orr rövidüléséhez vezet (3. ábra), ami általában kevésbé látványos, mint az egyik oldalra korlátozódó forma.



1. ábra: Brachygnathia superior

A felső állcsont megrövidülése következtében a metszőfogak nem találkoznak.



2. ábra: A torzító orrgyulladás klinikai képe

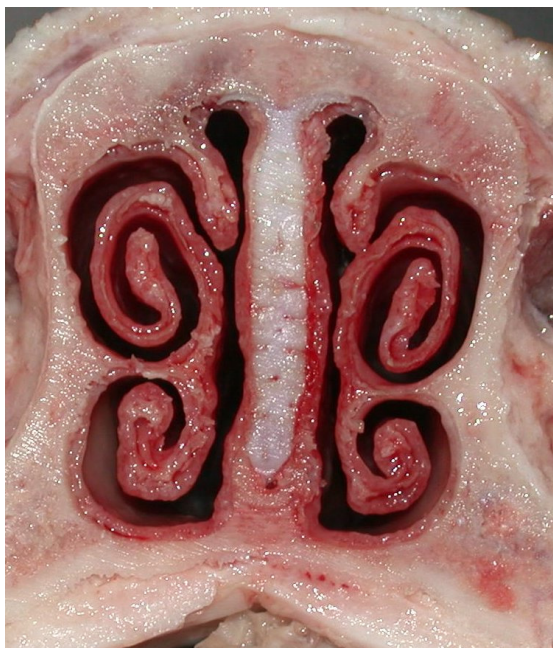
Az orr jobbra csavarodott.



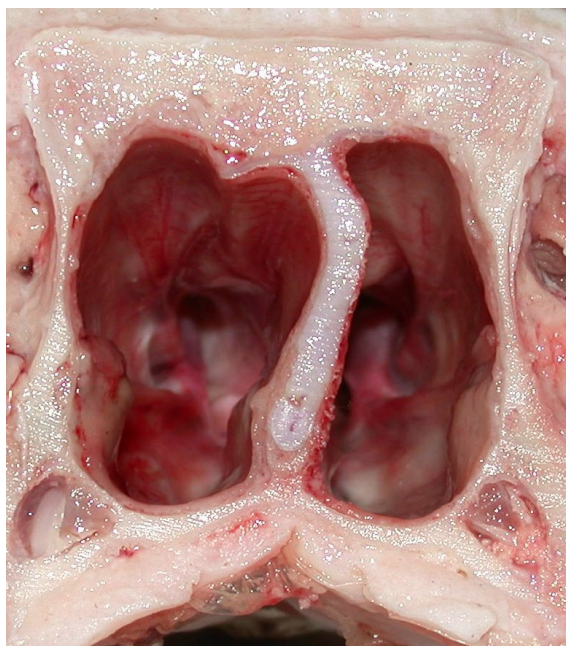
3. ábra: A torzító orrgyulladás klinikai képe
Az orr megrövidült, az orrhát bőre durva ráncokat vet.

2.1.1.2. Kórbonctani elváltozások

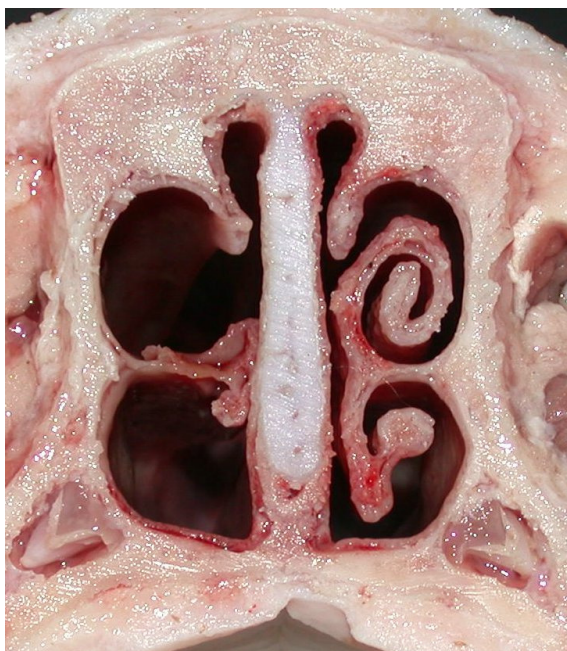
A torzító orrgyulladás legszembetűnőbb kórbonctani elváltozása az orrkagylók sorvadása, amit az orrüreg első-második elő-zápfogak vonalában készített harántmetszetén szokás értékelni, ahol a felső és az alsó orrkagylók a legfejlettebbek. Az orrelváltozások leggyakrabban a malacok 6-12 hetes korában jelennek meg (Rutter, 1985). Enyhe – közepes esetekben az alsó orrkagylók ventralis csavarulatai a leginkább érintettek, az elváltozás az enyhe zsugorodástól a teljes sorvadásig terjedhet (4-6. ábra). Súlyosabb esetekben az alsó orrkagylók dorsalis csavarulatai, a felső orrkagylók és a rostacsont is sorvadnak. A bántalom legsúlyosabb formájában az orrszerkezet teljes hiánya figyelhető meg. Gyakori lelet az orrsővény oldalirányú elferdülése is. Az orr feltűnő elváltozásai a figyelmet főleg erre a területre irányították. Ugyanakkor lehetséges, hogy kóros elváltozások a test egyéb részein is előfordulhatnak, amik azért maradtak észrevétlenek, mert nem keresték őket. Hoskins és mtsai (1997) például a húgyhólyag falának elváltozását figyelték meg egy kísérleti fertőzés során.



4. ábra: Egészséges sertésorr harántmetszete
Az orrszerkezet normális képet mutat.



5. ábra: A torzító orrgyulladás súlyos formáját mutató sertés orrának harántmetszete
Az orrkagylók teljes sorvadása és nagyfokú orrsövényferdülés alakult ki.



6. ábra: A torzító orrgyulladás egyik oldalra korlátozódó formáját mutató sertés orrának harántmetszete
A baloldali ventralis orrkagylók súlyos fokú sorvadása figyelhető meg.

2.1.1.3. Kórszövettani elváltozások

A betegségre jellemző az orrnyálkahártya hámsejtjeinek hiperpláziája és metapláziája, a sejtek többrétegű köbhámsejteké alakulása és a submucosa gyulladásos sejtekkel történő infiltrációja. Súlyos esetekben a hámsejtek rendezettsége felborul, és papillákat vagy tarajokat képeznek, néhol laphámsejtes metaplázia jelenik meg, melyet a csillók elvesztése kísér. Az orrkagyló csontos trabeculáinak felszívódása szintén megfigyelhető, melynek helyén összezsugorodott rostszövet massa jelenik meg. Súlyos toxikus *P. multocida* fertőzést követően a parenchymalis szervek elváltozásait is leírták már (de Jong, 1983; Rutter, 1983).

2.1.1.4. Gazdasági jelentőség

A torzító orrgyulladás gazdasági jelentőségét elsősorban az a feltételezés adja, miszerint rontja az állatok súlygyarapodását (Pedersen és Barfod, 1981). Ez a kérdés azonban még ma is vita tárgyát képezi, mivel egymásnak gyökeresen ellentmondó eredmények látnak napvilágot (Bäckström és mtsai, 1985, Kabay és mtsai, 1992, Straw és mtsai, 1983, 1984). Ezzel együtt nagyon valószínűnek látszik, hogy a súlyosabb torzító

orrgyulladás járványok nem elhanyagolható veszteségeket okoznak a sertéstartóknak (Muirhead, 1979; Penny és Penny, 1976). Donkó és mtsai (2005) kifejezett összefüggést találtak egy sertésállományban az orrkagyló elváltozások súlyossága és a súlygyarapodás csökkenése között.

Kísérletes fertőzések esetében szintén zavaros a kép. *B. bronchiseptica* és toxikus *P. multocida* kombinált fertőzés gyakran eredményez súlygyarapodás csökkenést (Foged és mtsai, 1989, Pedersen és Barfod, 1981, 1982; Riising és mtsai, 2002). Pedersen és Barfod (1981, 1982) arról számolt be, hogy *B. bronchiseptica* fertőzés sem önmagában sem nem toxikus *P. multocida* fertőzéssel kombinálva nem okozott törést az állatok fejlődésében, amiből arra következtettek, hogy a toxikus *P. multocida* felelős a fejlődési erély megrendüléséért. Ezt a nézetet támasztották alá van Diemen és mtsai (1994), akik szerint az alacsonyabb súlygyarapodás az orrelváltozások súlyosságával mutatott összefüggést ecetsavval kezelt és toxikus *P. multocida* törzsszel fertőzött malacokban.

2.1.1.5. A betegség leküzdésének lehetőségei

2.1.1.5.1 Gyógykezelés

A klinikai formában jelentkező torzító orrgyulladás leküzdésére a lehetséges beavatkozások komplex alkalmazása a megfelelő megközelítés. A legfontosabb cél a fiatal malacok fertőzöttségének csökkentése a kocák szakszerű vakcinázásával, a malacok antibiotikumos kezelésével és szükség esetén gyógyszeres takarmány etetésével. Ugyanilyen fontos, hogy a tartási és menedzsment körülmények javításával minél jobb feltételeket teremtsünk különösen a malacoknak, ami csökkenti a betegségekkel szembeni fogékonyságukat.

Azonnali antibiotikum terápia alkalmazható, amikor egy hevenyen jelentkező torzító orrgyulladás járványkitörés ellen szeretnénk fellépni, esetleg megelőzésképpen is, ha egy állományban nagy a veszélye a heveny megbetegedésnek. A torzító orrgyulladás kezelésére elsőként hatékonyan használt antibiotikumok a szulfonamidok voltak (Switzer, 1963), melyeket ma is széles körben alkalmaznak akár egymagában, akár egyéb antibiotikumokkal kombináltan, illetve trimethoprimmel potenciált formában. A sertés eredetű *B. bronchiseptica* törzsek általában érzékenyek a különféle tetraciklinekre (Sisak és mtsai, 1978; Pijpers és mtsai, 1989, Kadlec és mtsai, 2004), melyeknek a parenteralisan adagolt hosszú hatású formulái különösen alkalmasnak bizonyultak a fiatal malacok *B. bronchiseptica* okozta megbetegedéseinek gyógykezelésére, hasonlóan a

fluorokinolonokhoz, melyeket szintén ajánlanak a betegség leküzdésére (Hannan és mtsai.,1989). A legtöbb *P. multocida* izolátum érzékeny penicillinre, tetraciklinekre és klóramfenikolra (Sisak és mtsai, 1978). Egyéb, a *P. multocida* fertőzöttség leküzdésére általánosan használt antibiotikumok közé tartozik még a tilozin, linkomicin/spektinomycin, ampicillin, amoxicillin, spiramicin, kinolon származékok, cephalosporinok és a tiamulin. A torzító orrgyulladás elleni alkalmazásukkor számításba kell azonban venni a *B. bronchiseptica* szűkebb antibiotikum érzékenységi spektrumát.

Kínai *B. bronchiseptica* izolátumok antibiotikum rezisztenciája (furazolidon, ampicillin, cefazolin, streptomycin és az amoxicillin/klavulánsav) meghaladta a 70%-ot. Ezért ezen a földrajzi területen ezek az antimikrobiális szerek nem alkalmazhatók terápiás céllal (Zhao és mtsai, 2011). Tang és mtsai (2009) szerint az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mértéke sertés eredetű *P. multocida* izolátumok esetében Kínában magasabb, mint más országokban, és az izolátumok 93,1%-a mutat többszörös rezisztenciát. A multirezisztencia 2003-2007 között csaknem négyszeresére növekedett. A torzító orrgyulladást okozó *P. multocida*val szemben leghatékonyabbnak cefalosporinok, a florfenikol, valamint a fluorokinolonok mutatkoztak. Sertésekből származó hazai *P. multocida* izolátumok vizsgálata a fentiekkel ellentétben apramicin, szulfonamid és tetraciklin rezisztenciáról számol be (Sellyei és mtsai, 2009).

Általános gyógykezelési stratégia a kocák antibiotikumos takarmánnyal etetése a vemhesség utolsó hónapjában, a malacokra nehezedő fertőzési nyomás csökkentése céljából. Emellett a malacok is kezelhetők körültekintéssel megválasztott injekciós készítmények terápiás adagjaival az élet első 3-4 hetében. Leírtak spray formában orrüregbe juttatott oxitetra-ciklin kezelést is (de Jong, 1983). Gyakorlati tapasztalatok azt mutatják, hogy a malacokban kialakuló heveny betegség potenciált szulfonamidokkal, ampicillinnel, tetraciklinekkel, ceftiofurral vagy enrofloxacin-nal eredményesen kezelhető.

Hazai fejlesztésű, széles spektrumú antibakteriális készítményt (Vetricin) 1989-ben kezdtek el használni a torzító orrgyulladás megelőzésére és kezelésére. A Getroxel, klórkinadol és oxitetra-ciklin kombinációjával SPF malacokon végzett kísérletekben a fertőzést követő 30. napra a *P. multocida* nem volt kimutatható az orrüregekből, míg a *B. bronchiseptica* csak kis számban volt visszaizolálható (Varga és mtsai, 1991).

Általánosan elfogadott, hogy a torzító orrgyulladás kialakulását elősegíti a nagy állománysűrűség, az alacsony higiéniai szint és a nem megfelelő menedzsment is. Ezek javítása nagymértékben segíti a specifikus gyógykezelési eljárások hatékonyságát.

2.1.1.5.2 Immunizálás

A vakcinázás általánosan használt eszköz arra, hogy a torzító orrgyulladás által sújtott állományokban csökkentsék a betegség előfordulási arányát. A torzító orrgyulladás elleni vakcinák fejlődése a betegség kóroktanáról alkotott nézetek változását tükrözi. Az 1960-70-es években, amikor a *B. bronchiseptica* szerepelt elsődleges kórokként, a monovalens *B. bronchiseptica* vakcinák használata terjedt el. Bár az endémiásan fertőzött állományokban a klinikai tünetek jelentős visszaszorulását figyelték meg az oltóanyag használatát követően, jelentős hatékonyságbeli eltérésekről is beszámoltak (Giles és Smith, 1983). A jelenlegi ismereteink fényében egy monospecifikus *B. bronchiseptica* vakcina kétféle módon csökkentheti az orrkagyló sorvadás súlyosságát: (1) gátolja a *B. bronchiseptica* megtelepedését, és így az általa előidézett orrkagyló károsodást, (2) rontja a *P. multocida* kolonizációjához szükséges körülmények kialakulását, és így indirekt módon csökkenti az orrüregben jelenlevő PMT mennyiségét. Másrészt, ez a vakcina nem ad direkt (specifikus) védelmet a toxikus *P. multocida* aktivitásával szemben. Ez az indirekt védelem tovább csökkenhet, ha a *B. bronchiseptica*n kívül egyéb tényezők is segítették a *P. multocida* sikeres megtelepedését. Ebből következően, a betegség polimikrobiális természetének általános elfogadását követően, egy korszerű oltóanyagtól azt várjuk, hogy mindkét kórokozó káros hatása ellen nyújtson specifikus védelmet. Ennek megfelelően, a jelenleg forgalmazott vakcinák egyaránt tartalmaznak *P. multocida* és *B. bronchiseptica* antigéneket. Annak ellenére, hogy mára már meglehetősen sokat tudunk a *B. bronchiseptica* virulencia tényezőiről, ez a komponens továbbra is teljes sejt formájában szerepel a legtöbb oltóanyagban. A PMT-nek a progrediáló torzító orrgyulladás kórfejlődésében játszott kulcsszerepének felismerése óta általánossá vált a tisztított és inaktivált PMT szerepeltetése a vakcinában, akár egymagában, akár teljes sejt *P. multocida* bakterinnel kombinált formában, sőt monovalens PMT vakcinák is megjelentek a piacon.

Az immunizálás általános gyakorlata a kocák vakcinázása, amikor a kocákat kétszer oltják az első vemhességük alatt, majd minden további vemhességük során egy-egy emlékeztető oltásban részesülnek. Az áthangolódott kocák malacokat az anyai ellenanyagok tejen keresztül történő passzív átvitelével látják el immunvédelemmel. Vannak országok, ahol a kocák immunizálását a malacok vakcinázásával ajánlják kiegészíteni. Kétségtelen, hogy a malacok vakcinázása áthangolódást eredményez, de ennek haszna kérdéses, mivel a jellemző elváltozások kialakulásához a fertőzésnek

egészen fiatal (1-2 hetes) korban (az anyai ellenanyagok jelenléte idején) kell megtörténnie.

Egyes gyártók a malacok 1-3 napos korban történő vakcinázását javasolják, de saját vizsgálataink során a malacok vakcinázása nem mutatott semmi előnyt a csupán kocák vakcinázásához képest (Kovács és Magyar, 1996).

2.1.1.5.3 Megelőzés

A vakcinák önmagukban csak a torzító orrgyulladás klinikai megjelenését képesek gátolni, de nem eliminálják a kóroktani tényezőket az állományból. A *B. bronchiseptica* általánosan elterjedt a sertések körében, és képes a természetes vizekben is fennmaradni egy ideig (Porter és mtsai, 1991), a teljes kiirtása nehezen elképzelhető. A *P. multocida* toxikus törzsei kevésbé elterjedtek a sertésállományokban, és lehetségesnek tartják eltávolításukat a fertőzött telepekről, egy legalább öt évig tartó intenzív vakcinázást követően (de Jong, 1999), amit saját tapasztalatok is megerősítettek (Mester és Magyar, 2007). A torzító orrgyulladás mentesség elérésének jelenleg ismert legbiztosabb módja a meghatározott kórokozóktól mentes (Specified Pathogen Free, SPF), vagy gyógyszeres kezeléssel kombinált korai választás után elkülönítetten felnevelt (Alexander és mtsai, 1980) malacokból kialakított állományok létrehozása. Itt is nélkülözhetetlen azonban egy hatékony mikrobiológiai barrier létesítése és fenntartása, amit alapos és folyamatos monitorozásnak kell kísérnie.

2.2. A kórfejlődés szempontjából fontos ismeretek

2.2.1. A *B. bronchiseptica* virulenciáját meghatározó tényezők

A Bordetella nemzetség tagjai légzőszervi kórokozók. A *B. bronchiseptica* széles körben elterjedt a természetben. Első izolálásának idején (Ferry, 1911) a szopornyica kórokozójának hitték, később úgy gondolták, hogy a kutya vírusos fertőzései során kialakuló súlyos szövődményekért felelős. Végül kimutatták, hogy fontos szerepet játszik a kutya ún. kennel köhögésének kóroktanában (Bemis, 1977). A *B. bronchiseptica* járványos megbetegedéseket képes előidézni tengerimalacban, nyúlban, patkányban és majmokban. A macska és a ló fogékonyságát szintén megállapították. (Goodnow, 1980). A *B. bronchiseptica* iránti érdeklődést jelentősen fokozta, amikor a kórokozót a sertések torzító orrgyulladásával hozták kóroktani összefüggésbe (Switzer, 1956). Az utóbbi időben

szaporodnak az ember megbetegedéseiről szóló leírások is, ami a *B. bronchiseptica* esetleges közegészségügyi jelentőségére hívja fel a figyelmet (Woolfrey, 1991).

A *B. bronchiseptica* rövid pálcika alakú, Gram-negatív, aktív mozgásra képes baktérium. A virulens törzsek számos virulencia faktort termelnek, melyek közül a legfontosabbak az adhezinek és a toxinok.

2.2.1.1. Adhezinek

A nyálkahártyát megbetegítő baktériumok okozta fertőzések előfeltétele a nyálkahártya sejtjeihez való tapadás (adhézió), és az azon történő elszaporodás (egyszóval kolonizáció) képessége, hogy a kórokozó elkerülhesse a szervezet fizikai védekező mechanizmusai által történő kisodródást (Beachey, 1981; Isaacson, 1983). Ehhez az illető mikrobának a megtapadást szolgáló mechanizmussal (adhezinnel) kell rendelkeznie, amely biztosítja a célsejthez történő specifikus kötődést (az adhéziót). A *B. bronchiseptica* – ellentétben a *P. multocidával* – nagy affinitással kötődik a felsőlégutak csillós hámsejtjeihez (Yokomizo és Shimizu, 1979; Magyar és mtsai, 1983; Nakai és mtsai, 1988; Jacques és mtsai, 1988; Chung és mtsai, 1990). A *B. bronchiseptica* több terméke, köztük a filamentózus hemagglutinin, a pertaktin és különböző fimbriák tartoznak a feltételezett adhezinek közé, de a kolonizációban játszott pontos szerepük még tisztázásra vár.

A *B. bronchiseptica* adhezinjei közül különösen nagy jelentősége van a filamentózus hemagglutininnek, amely különböző kötőhelyeket felismerő régiói segítségével vesz részt az adhézióban. Így a filamentózus hemagglutinin szerepet játszik a makrofágokhoz és egyéb leukocytákhoz való kötődésben, és fontos a csillós nyálkahártya hámsejtekhez kapcsolódásban is, míg a heparin-kötő helyének a hemagglutinációban és a nem csillózott epithel sejtvonalakhoz történő adhézióban van jelentősége. Nagyfokú immunogenitása miatt a filamentózus hemagglutinin a sejtmentes vakcinák egyik fő komponense (Cotter és Miller, 2001). A pertaktin autotranszporter külső membránfehérje, amely az eukarióta sejtekhez való kapcsolódásban fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítása révén vesz részt. Ezen kívül ismert, hogy a pertaktin a *B. bronchiseptica* bakteriofágjának receptora (Jacob-Dubuisson és Loch, 2007). Ahogy a legtöbb Gram-negatív baktérium, a *B. bronchiseptica* is expresszál fimbriákat. A fimbria helikális szerkezetű polimer fehérje, amely rendelkezik heparin-kötő régióval. Ezeknek a vékony fehérjecsövecskéknek szintén a gazdasejthez való kötődés a feladatuk, és

elengedhetetlenek az epithel sejtekhez való kötődésben és a tartós kolonizációban (Cotter és Miller, 2001).

2.2.1.2. *Toxinok*

A *B. bronchiseptica* virulencia faktorainak másik fontos csoportját a toxinok képezik, melyek közül a legfontosabbak az adenilát-cikláz hemolizin toxin (CyaA), tracheális citotoxin és a dermonekrotikus toxin (DNT).

A CyaA nagymértékben konzervált, 200 kDa-os fehérjetermészetű toxin. Az egyetlen eddig ismert szekretált protein, melyet mind a *B. pertussis*, a *B. parapertussis* és a *B. bronchiseptica* is expresszál, ezért is tulajdonítanak a CyaA toxinnak meghatározó szerepet a Bordetella fajok légzőszervi patogénként elért evolúciós sikerében (Buboltz és mtsai, 2008). A CyaA toxinnak lényeges szerepe van a sikeres kolonizációban, ugyanis késlelteti a gazdaszervezet immunválaszának kialakulását. Gátolja mind a veleszületett immunitás, mind az adaptív immunitás effektor funkcióit, így például a kemotaxist, a fagocitózist és az oxidatív „burst”-ot. Csökkenti a gyulladásokért felelős citokinek, és elősegíti a szuppresszív citokinek termelődését. Makrofágokban apoptózist indukál, és megakadályozza a dendritikus sejtek érését, így gátolva az antigén prezentáció folyamatát. Mindezek következtében akadályozza a T-sejtek aktiválódását is (Lebrun és mtsai, 2009). A tracheális citotoxin a bakteriális sejtfal újraképzése során keletkező toxin, amelynek citopatogén hatása a csillós nyálkahártya hámsejtek nagymértékű elhalását okozza. A tracheális citotoxin glikopeptid természetű molekula, mely minden Gram-negatív baktériumban megtalálható, de csak a *Neisseria gonorrhoeae*, illetve a Bordetella nemzetség tagjai ürítik környezetükbe. A *B. pertussis* ezzel okozza a számarköhögszre jellemző epitheliális citopatogén hatást (Cotter és Miller, 2001).

2.2.1.2.1 Dermonekrotikus toxin (DNT)

A hőlabilis toxinnak is nevezett DNT volt a Bordetella nemzetség elsőnek azonosított virulencia tényezője (Bordet és Gengou, 1909). DNT-t a Bordetella nemzetségbe tartozó baktériumok termelnek, így a *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* és *B. pertussis*, valamint az ezekkel távolabbi rokonságban álló *B. avium* is. A DNT elnevezés az intradermálisan oltott állatoknál tapasztalt, a toxin által létrehozott jellegzetes bőrelváltozásokra utal (Livey

és Wardlaw, 1984). A mesterségesen feltárt baktérium sejtből kiszabaduló DNT kísérleti állatokba oltva letális hatást fejt ki. Természetes körülmények között azonban a DNT elsődlegesen a baktériumok citoplazmájában található, ahonnan csak a baktérium szétesése közben jut ki (Cowell és mtsai, 1979). Így érthető, hogy teljes sejt baktériummal kezelt állatok esetében kevesebb toxint lehet kimutatni, mint azoknál, amelyeket ultrahanggal feltárt baktérium kivonattal kezelnek. Weiss és Goodwin (1989) a DNT expressziójában gátolt *B. pertussis* mutáns törzsszel szopós egereket fertőztek intranasalisan, és azt az eredeti törzshöz hasonló mértékben virulensnek találták, amiből arra következtettek, hogy a DNT nem nélkülözhetetlen a virulenciához. Hasonló jelenséget figyeltek meg mások is, amikor egy sertésből izolált és DNT-t nem termelő *B. bronchiseptica* törzset egérbe intravénásan (Magyar, 1990) vagy intracerebrálisan (Lendvai és mtsai, 1992) oltottak. A DNT-expresszióban mutáns *B. avium* avirulens volt egy pulyka modellkísérletben (Temple és mtsai, 1998), de ez a mutáns kevésbé jól jellemzett, mint a *B. pertussis* mutánsok. Valószínű, hogy a DNT kifinomult szerepet játszik a szervezetben. Minden bizonnyal hatást gyakorol a bordetellák és egyéb kórokozókkal szembeni védekező mechanizmusokra és immunitásra. Az immunfunkciók gátlásának képessége nem is annyira meglepő egy olyan toxin esetében, amely megzavarja az Rho fehérjék normális működését. Ezek a hatások elősegítik a másodlagos fertőzéseket, ami nagyon is jellemző a bordetellák okozta megbetegedések során. Mindemellett a jelek szerint a DNT közvetlenül is befolyásolja a csontképződési folyamatokat.

A DNT-t már elég korán kapcsolatba hozták a sertés torzító orrgyulladásával kórfejlődésével. A gyanút Hanada és mtsai (1979) munkája ébresztette fel, akik egy toxikus *B. bronchiseptica* törzs ultrahanggal feltárt sejtmentes kivonatát juttatták ismételtelen malacok orrüregébe, amellyel a természetes esetekben látott elváltozásokat produkáltak, bár azt ők is hozzátesszik, hogy kivonatuk a DNT-n kívül más bakteriális komponenseket (endotoxint, hemagglutinint, K-antigént) is tartalmazhatott. További bizonyítékot szolgáltatott egy sertésből izolált természetes DNT-t nem termelő és egy ugyancsak sertés eredetű DNT pozitív *B. bronchiseptica* törzs összehasonlító vizsgálata (Magyar és mtsai, 1988, Magyar, 1990). A természetes DNT- törzs a DNT+ törzshöz hasonló mértékben termelt adenilát-cikláz hemolizin toxint és legalább egy adhezinnel is rendelkezett, egérben virulensnek bizonyult, és a malacok orrüregében a DNT+ törzshöz hasonló számban telepedett meg. Ugyanakkor orrkagyló sorvadást csak a DNT+ törzs volt képes előidézni. Itt is meg kell azonban említeni, hogy nem zárható ki teljesen, hogy a törzsek között más, nem azonosított különbségek is lehettek.

A DNT nagyméretű, intracellulárisan ható toxin, amit a célsejtek pH-függő folyamat során vesznek fel (Lacerda és mtsai, 1997). A toxin 1464 aminosavból álló egyláncú polipeptid, amely mérete kb. 160 kDa (Kashimoto és mtsai, 1999). A DNT-t kódoló génszakasz konzervált, a többi virulencia génhez hasonlóan a BvgAS rendszer szabályozása alatt áll (Nakase, 1957; Walker és Weiss, 1994; Weiss és Falkow, 1984). A DNT-gén szekvenciáját először *B. pertussis*-ban azonosították (Walker és Weiss, 1994), bár az első rekombináns DNT-t *B. bronchiseptica*-ból állították elő (Pullinger és mtsai, 1996). A DNT-gén nem tartalmaz szignálszekvenciát, és nem ismertek olyan kapcsolódó fehérjék, amik a szekréciót segítenék. Bár lehetséges, hogy a szekréciónak egy eddig nem ismert mechanizmusa van jelen, minden rendelkezésre álló bizonyíték arra utal, hogy a DNT csak a bakteriális sejtlízis során szabadul fel (Cowell és mtsai, 1979; Nakai és mtsai, 1985), azaz a DNT-t a haldokló baktériumsejtek ürítik, hogy az élő baktériumokat segítsék a fertőzés során.

A toxin N-terminális régiója, ami 30 aminosavat foglal magába, segíti elő a célsejtekhez való kötődést; míg a C-terminális régió, ami 300 aminosavat foglal magába, katalitikus aktivitással rendelkezik. Utóbbi régió homológiát mutat az *Escherichia coli* vagy *Yersinia pseudotuberculosis* eredetű citotoxikus nekrotizáló faktorok C-terminális régiójával (Walker és Weiss 1994; Lemichez és mtsai, 1997; Kashimoto és mtsai, 1999; Matsuzawa és mtsai, 2002; Hoffmann és Schmidt, 2004; Knust és Schmidt, 2010; Fukui-Miyazaki és mtsai, 2011). A 45-166 AS régió egy feltételezett transzmembrán domént tartalmaz, a toxin proteolitikus hasításon megy keresztül az Arg(44) és Glu(45) között egy furinszerű proteáz hatására (Matsuzawa és mtsai, 2004). Tehát a DNT kötődik a célsejtekhez az N-terminális régión át, majd intramolekuláris hasításon megy keresztül, és az enzimatikusan aktív régió transzlokálódik a citoplazmába (Fukui és Horiguchi 2004; Fukui-Miyazaki és mtsai, 2011). A DNT az Rho családba tartozó fehérjékre hat (Horiguchi és mtsai, 1995b; 1997). Ezek kis, GTP-kötő fehérjék, melyek a GTP-hez kötődve effektor proteinekkel kerülnek kölcsönhatásba, ugyanakkor GTPáz enzimet is tartalmaznak (Ridley, 1996). Feladatuk a sejtfunkciók sok aspektusának, így a citoskeletális rendszer, a génexpresszióhoz és a sejtciklushoz kapcsolódó jelátviteli utak szabályozása. A DNT a Gln(63) deaminációját (Horiguchi és mtsai, 1997), illetve transzglutaminációját (Masuda és mtsai, 2000; Schmidt és mtsai, 1999) katalizálja, így gátolja a G-protein GTPáz aktivitását. Ez folyamatos aktivációt eredményez, ami a tirozin foszforilációjához és a fokális adhézis kináz aktiválásához vezet (Lacerda és mtsai,

1997), ami a citoskeleton és intracelluláris jelátviteli utak másik kulcsfontosságú szabályozója. A kapcsolat a DNT által előidézett Rho GTP-kötő fehérjék GTPáz aktivitásnak gátlása és a dermonekrotikus elváltozások között nem teljesen világos, de a citoskeleton átrendeződések és az alakváltozások vezethetnek a zonula occludens töréseihez az endotheliumban, ami kísérleti modellekben is látható érrendszeri szivárgást és kék-fekete zúzódásszerű elváltozásokat eredményez.

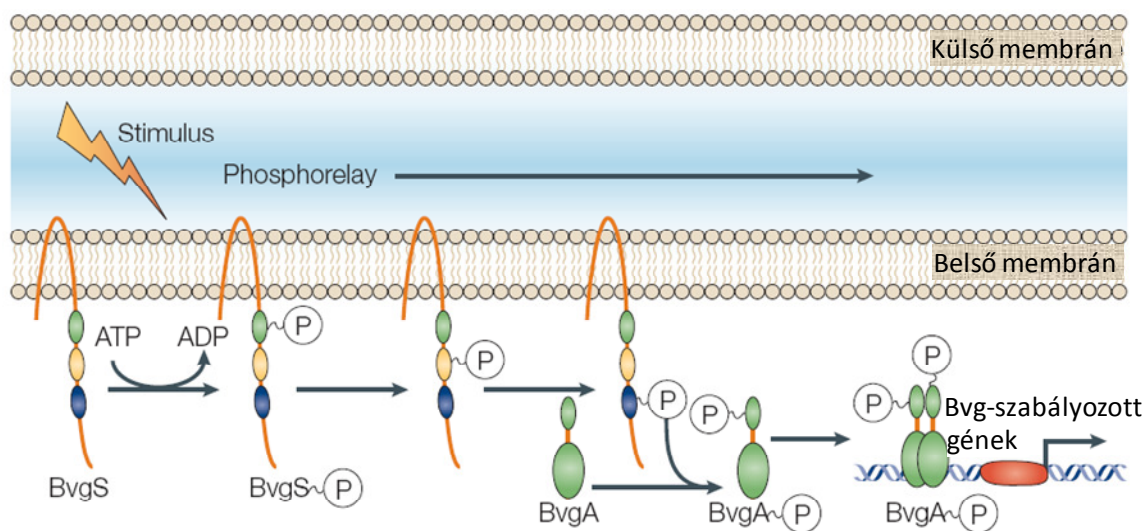
Celluláris szinten a DNT megváltoztatja a sejtmorfológiát (Horiguchi és mtsai, 1991), stimulálja a DNS- és fehérjeszintézist (Horiguchi és mtsai, 1993, 1994), továbbá gátolja az osteoblastok differenciálódását (Horiguchi és mtsai, 1991). A DNT-indukált morfológiai változásokat a célsejtekben kialakult aktin stresszrostok és fokális adhéziók jelzik (Horiguchi és mtsai, 1995b).

2.2.2. A *B. bronchiseptica* virulencia tényezőinek genetikai szabályozása

A *B. bronchiseptica* virulencia faktorainak expresszióját a BvgAS (*Bordetella virulence gene*) kétkomponensű transzdukciós rendszer, különböző környezeti ingerekre adott válasz alapján szabályozza. A belső membránon található 135 kDa-os transzmembrán BvgS szenzor kináz környezeti stimulus hatására egy négylépcsős foszforilációs kaszkádot indít el, ezáltal aktiválja a citoplazmában található 23 kDa-os BvgA transzkripciós aktivátort. Ennek következtében az aktivált BvgA kapcsolódik a specifikus virulencia gének promóteréhez és megindul az adhezinek és toxinok transzkripciója, így filamentózus hemagglutinin, fimbria, pertaktin, továbbá adenilát-cikláz hemolizin és dermonekrotikus toxin termelődik (Matto és Cherry, 2005). (7.ábra)

Meghatározott *in vitro* tenyésztési körülmények között (37 °C-on, MgSO₄ és/vagy nikotinsav hiányában) a BvgAS rendszer aktiválja a *vag* (*vir* activated genes [a BvgAS-t eredetileg *vir*-nek jelölték] és gátolja a *vrg* (*vir* repressed genes) lókuszon található gének transzkripcióját. Ilyen körülmények között a baktérium virulens, ún. Bvg+ fázisban van. A *vag* lókuszon található gének kódolják az adhézióért felelős fehérjéket, a toxinokat és a külső membrán fehérjéket (8. ábra). Cotter és Miller (1994) igazolták, hogy a Bvg+ fázis szükséges és elégséges feltétel a *B. bronchiseptica* számára a légzőszerv hámsjának kolonizációjához. Amikor a hőmérséklet 26 °C-nál alacsonyabb, továbbá millimólos mennyiségű MgSO₄ és/vagy nikotinsav van jelen, a mikroba avirulens Bvg– fázisba kerül. Az avirulens fázisban a *vag* lókuszfunkciója gátolt, a *vrg* lókusze pedig aktivált (Cotter és Miller, 2001). *B. pertussis* esetében a *vrg* gének

ismeretlen funkciójú külső membrán proteinek kódolnak, míg *B. bronchiseptica*-ban feltehetően nem íródnak át ezek a gének. A *B. bronchiseptica* törzsekben ekkor a motilitásért (flagellin) és - többek között - az ureáz termelésért felelős gének expressziója maximális (8. ábra).



7. ábra: A BvgAS rendszer működése

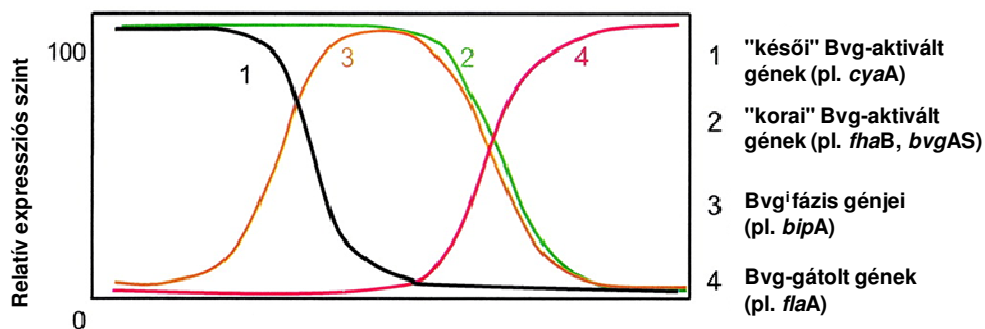
(Forrás: Preston és mtsai, 2004)

Cotter és Miller (1994) vad típusú és Bvg⁻ fázisban lévő mutáns *B. bronchiseptica* törzseket vizsgálva kimutatták, hogy tápanyag-limitált környezetben csak az avirulens fázisban lévő mikrobák tudtak fennmaradni. Vagyis míg a Bvg⁺ fázisban a légzőtraktus kolonizációjához szükséges virulencia faktorok (adhezinek és toxinok) expresszálódnak, addig a Bvg⁻ fázisban a külvilágban való túlélésnél előnyös tulajdonságok fejeződnek ki (Ottemann és Miller, 1997). Az 1990-es évek elején leírtak egy átmeneti (Bvgⁱ) fázist is, amit az adhezinek megjelenésével és a toxinok hiányával jelöltek (Scarlato és Rappuoli, 1991). Napjainkra kiderült, hogy ez az intermedier fázis sokkal bonyolultabb, és az előzők mellett a Bvg-represszált fenotípus, valamint számos, magas immunogenitású faktor maximális termelődése jellemzi. Az elsőként jellemzett Bvgⁱ-fázisú gén a *bipA* volt, ami egy külső membrán fehérjét kódol, és az *Escherichia coli* intimin, valamint a *Yersinia spp.* invasin aminosav összetételével nagymértékű homológiát mutat (Stockbauer és mtsai, 2001). Az átmeneti fázisban néhány Bvg aktivált virulencia gén (*fhaB*, *fim*) kifejeződik, valamint a csak erre a fázisra karakterisztikus egyedi gének (*bipA*, *bcfA*) és fenotípusos tulajdonságok megjelenése jellemző (Nicholson és mtsai, 2011) (8. ábra). Irie és mtsai (2004) kimutatták, hogy a *B. bronchiseptica* képes biofilm képzésre *in vitro*, és ezt is a BvgAS rendszer

szabályozza. A filamentózus hemagglutinin és a fimbriák részt vesznek a biofilm képzésében, míg az adenilát-cikláz hemolizin toxin gátolja azt, így a biofilm fenotípusának a Bvgⁱ fázis kedvez.

A fent leírt szabályozási mechanizmus az ún. fenotípusos (antigén) moduláció (Lacey, 1960), amely a virulencia faktorok szintézisének reverzibilis gálását jelenti (a transzkripció szintjén), és bizonyos környezeti hatásokra adott válaszként jelenik meg. Egy másik szabályozó mechanizmus az ún. fázisváltás, melynek alapja egy frameshift mutáció, amely a környezeti hatásoktól független (irreverzibilis) Bvg⁻ variánsokat eredményez. A moduláló környezeti hatások között nevelt virulens (Bvg⁺) törzsek fenotípusosan hasonlóak a Bvg⁻ törzsekhez (Passerini de Rossi és mtsai, 1997).

A Bordetella fajokat a BvgAS rendszer nagyfokú hasonlósága jellemzi. A BvgA és BvgS fehérjék aminosav szekvenciája 100 és 96 %-os hasonlóságot mutat a *B. pertussis* és a *B. bronchiseptica* között (Martínez de Tejada és mtsai, 1996), míg a filamentózus hemagglutinin, pertaktin és CyaA fehérjék vizsgálatával 92, 91 és 97 %-os aminosav szekvencia hasonlóságot mutattak ki a két faj között (Parkhill és mtsai, 2003). Ezek alapján feltételezhető, hogy a nemzetség virulencia faktorai hasonló funkciót töltenek be a fertőzés folyamatában, továbbá a fellépő polimorfizmusok specifikus gazdaadaptációra utalhatnak.



8. ábra: A BvgAS rendszer működése az egyes fázisokra jellemző relatív expressziós szintek tükrében

2.3. A *P. multocida* toxin

A *P. multocida* toxin (PMT) felfedezése a torzító orrgyulladás kutatásához kötődik. A *P. multocida* szerepének tisztázását eleinte zavarossá tette a gyakorlatban előforduló esetek és a *P. multocida* jelenlétének összefüggésbe hozása (Gwatkin és mtsai, 1953), amit az a felismerés oldott fel, hogy csak egyes törzsek termelnek toxint. Toxikus

P. multocida tisztítatlan, illetve részben tisztított kivonata, valamint tisztított rekombináns PMT intraperitonealisan beadva a lép- és húgyszervek hiperpláziás elváltozását okozta (Chanter és mtsai, 1986; Lax és Chanter, 1990; Rutter és Mackenzie, 1984).

A PMT nagyméretű (146 kDa) fehérje (Lax és mtsai, 1990; Petersen, 1990), és génszekvenciájának elemzése világított rá működésének egyes elemeire. Az N-terminális régióhoz közel található egy hidrofób régió, ami valószínűleg helikális szerkezetű (Pullinger és mtsai, 2001). Ilyen tulajdonságok a transzmembrán régiókra jellemzőek, és ez a régió nagy hasonlóságot mutat az *E. coli* citotoxikus nekrotizáló faktor transzmembrán régiójával (Lemichez és mtsai, 1997). Kimutatták azt is, hogy a C-terminális régióról expresszáldott fragmentumok sejtbe juttatása DNS-szintézist indukál (Busch és mtsai, 2001; Pullinger és mtsai, 2001).

A PMT-aktivált jelátviteli utak tanulmányozását az osteoblastokban akadályozta az a tény, hogy a toxin szubsztrátja ismeretlen volt. Feltételezték, hogy a PMT a sejtek felületén található gangliozyd receptorokhoz kapcsolódik. Az nem valószínű, hogy magának a toxin kötődésének és felvételének bármi hatása lenne a sejtre. Ezt támasztja alá, hogy a C-terminális közelében, a 1165-ös pozícióban cisztein helyett szerint tartalmazó módosított PMT, ami az eredetihez képest nem mutatott strukturális változást (Ward és mtsai, 1998), és a célsejtekhez képes volt kapcsolódni és azokba bejutni, állatkísérletekben nem mutatott toxikus hatást (Ward és mtsai, 1998). Nemrégiben határozták meg a PMT működését molekuláris szinten. A toxin serkenti a heterotrimer G-fehérje jelátvitelét. A heterotrimer G-fehérjék α -alegységének "switch" (kapcsoló) II régiójában a PMT dezaminál egy specifikus glutamint, ami részt vesz a GTP-hidrolízisben (Orth és mtsai, 2009; Orth és Aktories, 2012). Ennek következményeként többszörös jelátviteli utak aktiválódnak, ami sejttípus-specifikus erős mitogénitáshoz, anti-apoptotikus hatáshoz vagy a citoszkeleton átalakításához vezet (Seo és mtsai, 2000; Preuss és mtsai, 2010). A PMT hatása nagyon erős; 10% szérumhatással megegyező mértékű DNS-szintézist indukál, és alacsonyabb koncentrációban hatékony, mint bármely ismert növekedési faktor.

2.4. A torzító orrgyulladás és a csontanyagcsere

A csont összetett szövet, mely az élet során folyamatosan átépül. A szövetet alkotó két fő sejttípus a csontépítő osteoblastok és a több sejtmaggal rendelkező, csontlebontásért felelős osteoclastok. Ezek a sejtek különböző eredetűek: az osteoblastok a mesenchymalis őssejtekből, az osteoclastok pedig a monocyta/makrofág sejtvonalból fejlődnek (Suda és mtsai, 1999). A csontépülés és -reszorpció szorosan együttműködő folyamatok, az osteoblastok és az osteoclastok differenciálódása és aktivitása szigorúan szabályozott folyamat. Az osteoblast differenciálódást különböző tényezők stimulálják (pl. BMP [bone morphogenic protein], PTH [parathyroid hormon] vagy növekedési faktorok [IGF vagy TGF]) különböző típusú receptorokhoz kötődve (Chen és mtsai, 2012.) A korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a különböző heterotrimer G-fehérjék és a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok részt vesznek az osteoblast differenciálódás szabályozásában.

Ismert tény, hogy a *B. bronchiseptica* DNT és a *P. multocida* PMT hatással vannak a csontanyagcserére. Ezeket több szinten vizsgálták: (i) élő állatban, elsősorban sertésben, de kisebb részben egérmodellen is; (ii) csontszövet-tenyészeteken és (iii) izolált sejteken. A gyakorlat számára ezek közül az a legrelevánsabb, ami az élő állatban történik, de ebben az esetben a molekuláris és sejtszintű változások vizsgálata lehetetlen. Másrészt, bár a sejtek vizsgálata lehetővé teszi az ilyen szintű elemzést, az *in vivo* helyzetnek megfelelő körülmények megteremtése nehéz. Míg korábban élő baktériumokkal dolgoztak, újabban bakteriális kivonatokat vagy tisztított toxinokat használnak. A PMT hatásait sokkal részletesebben vizsgálták, részben azért, mivel a PMT-t tartják a torzító orrgyulladás fő kialakító tényezőjének, részben pedig, mert jobban hozzáférhető.

Torzító orrgyulladás esetekből származó orrkagylók hisztológiai vizsgálata feltárta, hogy mind csontreszorpció, mind az osteoblastok és osteocyták degenerációja előfordulhat (Rutter, 1985). Patkányokat szubletális mennyiségű DNT-vel oltva a koponyacsonton a periostealis sejtek és osteoblastok nekrozisát, valamint a csontmátrix szintézisének súlyos visszaesését idézték elő (Horiguchi és mtsai, 1995a). Kísérleti modellekben a *B. bronchiseptica* baktérium vagy a DNT által kiváltott kóros elváltozásokat csak az osteoblastokban vagy az osteocytákban figyeltek meg (Fetter és mtsai, 1975; Silveira és mtsai, 1982; Horiguchi és mtsai, 1995a). Ezzel szemben a *P. multocida* baktérium vagy PMT stimulálta osteoclastok aktivitását és károsodott az

osteoblastikus csontképzés (Foged és mtsai, 1987; Kimman és mtsai, 1987; Martineau-Doizé és mtsai, 1993; Ghoshal és Niyo, 1993; Mullan és Lax, 1996).

Alacsony, szubletális ($1 \mu\text{g kg testtömeg}^{-1}$) dózisú PMT-vel inokulált kísérleti állatokban csonttömeg-csökkenés alakult ki (Lax és Chanter, 1990). Kísérletes állatfertőzés során a húgyhólyag és az ureter epitheliumának proliferációja is előfordulhat (Lax és Chanter, 1990; Rutter és Mackenzie, 1984, Hoskins és mtsai, 1997), de az nem ismert, hogy a gyakorlatban előforduló torzító orrgyulladás esetén jelentkezik-e ilyen elváltozás. Az intraperitonetalisan beadott PMT súlyos máj- és veseelváltozásokhoz vezet, de az nem világos, hogy ez mitogén folyamatok eredménye-e. A nem mitogén C1165S mutáns még a letális dózis ezerszeres adagjában sem toxikus (Ward és mtsai, 1998), ami azt támasztja alá, hogy a PMT-nek csak egyféle hatása van. Az *in vitro* szöveti kultúrákat használó tanulmányok azt találták, hogy a PMT csontreszorpciót okozott (Felix és mtsai, 1992; Kimman és mtsai, 1987; Sterner-Kock és mtsai, 1995), de az nem volt egyértelmű, hogy ez a hatás az osteoclastokon vagy az osteoblastokon keresztül jött-e létre.

A PMT a primer osteoblastokra erős mitogénként hat. A PMT-kezelés hatására az osteoblast-szerű sejtekben csökken az alkalikus foszfatáz aktivitás és ez a primer osteoblastokra is igaz (Mullan és Lax, 1996; Sterner-Kock és mtsai, 1995). A PMT gátolja a preosteoblastokat abban, hogy mineralizálódott csomókat hozzanak létre (Gwaltney és mtsai, 1997). Ezekben a sejtekben citoszkeletális átrendeződést okoz, így rávilágít arra, hogy a Rho-család fehérjéinek is lehet szerepe az osteoblast differenciálódásban és csontépülésben. A PMT osteoclastokra való hatása kevésbé ismert. Bár az általánosan elfogadott, hogy a PMT befolyásolja az osteoclast aktivitást, de az nem világos, hogy ezt direkt hatásként vagy az osteoblastokon keresztül teszi. Néhány adat az utóbbit támasztja alá (Mullan és Lax, 1998), de az sem kizárt, hogy mindkét mechanizmus működik. Továbbá a PMT több tanulmány szerint serkenti az osteoclast aktivitást (Gwaltney és mtsai, 1997; Jutras és Martineau-Doizé, 1996; Kimman és mtsai, 1987; Martineau-Doizé és mtsai, 1993), míg legalább egy munkában ennek ellenkezőjét figyelték meg (Ackermann és mtsai, 1993).

2.5. Következtetések

A kérdés továbbra is aktuális marad: mi is valójában a torzító orrgyulladás? A betegség legfontosabb általánosan elfogadott tünetei a súlyos fokú, huzamos ideig fennálló orrkagyló sorvadás, az arcorri rész deformációja, és a már ellentmondásosabb csökkent növekedési erély. Jelenlegi tudásunk alapján a PMT domináns szerepet játszik a torzító orrgyulladásra jellemző elváltozások kialakításában, így a toxikus *P. multocida* a betegség elsődleges kórokanak tekinthető. Másrészt, az is biztosnak látszik, hogy a *P. multocida* nem tudja ezt a szerepet betölteni hajlamosító körülmények, a nyálkahártya egyelőre pontosabban nem meghatározott elváltozásai nélkül, melyek a megtelepedéséhez megfelelő feltételeket teremtenek. Tekintettel a szóba jöhető segítő tényezők hosszú sorára, a torzító orrgyulladás többtényezős betegségként határozható meg, a *P. multocidát* pedig joggal soroljuk a fakultatív kórokozók közé. A *B. bronchiseptica* és a *P. multocida* között lévő specifikus együttműködés alapján a betegség a polimikrobiális kórképek közé is sorolható, amely hasznos modellje lehet az ilyen jellegű komplex megbetegedéseknek.

További kutatások szükségesek a lezajló molekuláris folyamatok pontosabb megértéséhez és újabb terápiás lehetőségek feltárásához. A PMT-vel és a DNT-vel kapcsolatban még számos kérdést kell tisztázni. Például, a *P. multocida* és a *B. bronchiseptica* toxin gének transzkripció szabályozása és a fehérje szekréciója kevésbé ismert folyamat. E toxinok receptor molekuláit sem azonosították még egyértelműen, pedig fontos lenne különbséget tenni a toxin-érzékeny és rezisztens sejtek között a gazdaszövetekben. A PMT és a DNT, amelyek specifikus kis GTP-ázokra vagy heterotrimer GTP-ázokra vannak hatással, a csontképződés jelátviteli útjaira hatva okoznak csontelváltozásokat. Így ezek a toxinok nemcsak protektív antigéneket jelenthetnek a betegségekkel szemben, hanem az osteogenezis és a jelátviteli utak közötti kapcsolatok felderítéséhez is hasznos információkkal szolgálhatnak.

3. A kutatómunka indokoltsága és céljai

Amint az a korábbiakból kiderült, a sertés torzító orrgyulladása több szempontból is sajátos, modellértékű betegségnek tekinthető: összetett kóroktanú, soktényezős és polimikrobiális kórkép. Története során nemegyszer felmerült már, hogy sikerült a probléma végső megoldását megtalálni. Legutóbb a téma egyik kiemelkedő holland szakértője nyilatkozott úgy, hogy a kocák szakszerű vakcinázása mellett nem kell a bántalommal számolnunk (szóbeli közlés). Saját tapasztalataim ezt a derülátó álláspontot nem támasztják alá. A betegség bármikor és bármelyik állományban felbukkanhat, az összetett kóroktanban általában szerepet játszó fertőző és nem fertőző tényezők is állandóan változnak (pl.: míg korábban kizárólag a D kapszula típusú *P. multocida* törzsek között fordult elő toxintermelő, mára a legtöbb helyen már az A kapszula típus dominál a PMT-t produkáló törzsek között). Ráadásul, a sertés légzőszervi betegség komplex fogalmának bevezetése a torzító orrgyulladást is egy szélesebb összefüggés-rendszerbe helyezi. Az utóbbi időben öröndetesen megnövekedett tenyészállat export szintén növelte a betegség jobb megismerésének és leküzdésének igényét, mivel a vevők többnyire ragaszkodnak a torzító orrgyulladástól való mentességhez. Mindezek alapján, a betegség kutatása mindenképpen megalapozott volt, és a jövőben is indokoltnak nevezhető.

A bemutatott kutatások során a következő kérdéseket kívántuk közelebbről tanulmányozni:

- *B. bronchiseptica* DNT jelentősége a sertés torzító orrgyulladása kórfejlődésében: a DNT szerepének vizsgálata természetes esetből izolált DNT termelő bvg+ virulens törzs és az abból mesterségesen előállított DNT-t nem termelő izogén mutáns törzs segítségével laboratóriumi egérben és sertésben.
- A betegségre jellemző elváltozások alakulásának nagyobb felbontású megjelenítése és precíz nyomon követése korszerű, nem invazív képalkotó eljárás (komputertomográfia) alkalmazásával.
- A torzító orrgyulladás elleni vakcinák hatékonyságának mérésekor a betegség kísérletes előidézésére használt fertőzési modellek összehasonlító vizsgálata, valamint a fertőzési modell, a vakcina-összetétel, a szerológiai profil és a betegség elleni védettség közötti összefüggések felderítése.

4. A *B. bronchiseptica* dermonekrotikus toxin (DNT) kórtani szerepének vizsgálata egérben és sertésben

Bár a *B. bronchiseptica* potenciális virulencia tényezőinek szerepe még nem tisztázott kellőképpen, nagy bizonyossággal feltételezhető, hogy sertésekben az orrüreg kolonizációja és a baktériumtörzsek DNT termelő képessége a legfontosabb tényező a *B. bronchiseptica* által okozott orrkagyló sorvadás kórfejlődésében. A *B. bronchiseptica* DNT meghatározó szerepére már több kísérletes bizonyíték is napvilágot látott (Roop és mtsai, 1987, Magyar és mtsai, 1988), azonban a természetben előforduló DNT-negatív törzsek DNT-pozitív mezei törzsekkel történő összehasonlítása felveti azt a lehetőséget, hogy *in vitro* nem azonosított egyéb tényező vagy tényezők is szerepet játszhatnak az orrkagyló hipoplázia kialakulásában. Eddig az elegendő mennyiségű, nagy tisztaságú DNT vagy az izogén DNT-negatív mutáns törzs előállításának nehézségei akadályozták, hogy felderítsük a DNT pontos szerepét az orrkagyló sorvadás kórfejlődésében.

Az egér ugyan nem természetes gazdája a *B. bronchisepticának*, mégis többféle módon lehet használni a virulencia jellemzésére. Az egér léptoxicitási tesztben (Krüger és Horsch, 1982) ultrahanggal feltárt és intravénásan oltott sejtmentes kivonatokkal a *B. bronchiseptica* DNT termelő képessége pontosan meghatározható, míg a *B. bronchiseptica* teljes sejt szuszpenziók az adott törzs DNT termeléstől független virulenciájának meghatározására alkalmasak (Magyar, 1990). Újszülött egerek intranasalis fertőzése pedig az orrkagyló sorvadás kórfejlődésének modellezésére mutatkozott megfelelőnek (Sawata és Kume, 1982, Magyar és mtsai, 1985, Kielstein és mtsai, 1987), mivel a DNT termelő bvg+ *B. bronchiseptica* törzzsel fertőzött egerekben az orrüregben észlelt elváltozások hasonlóak voltak a sertések torzító orrgyulladásánál leírtakhoz.

Az itt bemutatott kísérletek célja az volt, hogy DNT– mutáns *B. bronchiseptica* törzseket konstruáljunk, majd az izogén DNT– mutáns és virulens DNT+ szülői törzspárok megbetegítő képességét laboratóriumi egér- és malacfertőzőési modellekben összehasonlítsuk, és így egyértelműen meghatározzuk a *B. bronchiseptica* által termelt DNT kórtani szerepét.

4.1. Anyagok és módszerek

4.1.1. Baktérium törzsek és tenyésztési körülmények

A B58 (Magyar és mtsai, 1988) és KM22 jelű *B. bronchiseptica* törzseket torzító orrgyulladás klinikai tüneteit mutató sertésállományokból izoláltuk. Egerekben mindkét törzs virulensnek és toxikusnak bizonyult, és az I. fázisú (bvg+) törzsekre jellemző virulencia faktorokat termeltek.

A *B. bronchiseptica* törzseket 10% juhvérrel kiegészített Bordet-Gengou (BG) agar táptalajon (Oxoid, Basingstoke, UK) inkubáltuk, 37°C-on 48 órán át. A *B. bronchiseptica* B58 és KM22 DNT– mutánsait (B58GP és KB24) hasonló körülmények között, kanamicinnel (50µg/ml), illetve gentamicinnel (100µg/ml) kiegészített BG táptalajon tenyésztettük.

A fertőzéshez használt baktérium szuszpenziókat foszfáttal puffereelt sóoldat (PBS) felhasználásával készítettük el. A malacok fertőzéséhez használt *B. bronchiseptica* B58 szuszpenzióból készített hígítási sort kanamicint nem tartalmazó BG táptalajra oltottuk, a csíraszámot milliliterenként 3×10^5 telepformáló (CFU/ml) egységre állítottuk be, és a telepmorfológia (domború telepek, hemolízis jelenléte) alapján a telepek 100%-a I. fázisú (bvg+) volt. A *B. bronchiseptica* B58GP inokulumból készített hígítási sort kanamicinnel (50µg/ml) kiegészített BG táptalajra oltottuk, a csíraszám ebben az esetben is 3×10^5 CFU/ml volt, azonban a telepeknek csak mintegy 58%-a látszott I. fázisúnak. A *B. bronchiseptica* KM22 és KB24 inokulumok hígításait gentamicin nélküli, illetve azzal kiegészített BG táptalajra oltottuk, a csíraszám mindkét esetben 1×10^6 CFU/ml volt, és a telepek 100%-a bizonyult I. fázisúnak.

Az értekezésben felhasznált törzsek leírását az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat: Az értekezésben szereplő baktérium törzsek leírása

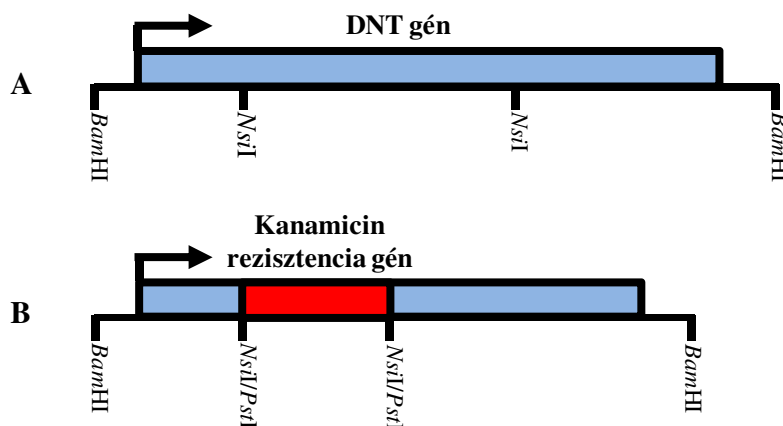
Törzs	Faj	Eredet	Bvg	DNT	PMT
B58	<i>B. bronchiseptica</i>	sertés orr	+	+	-
B58GP	<i>B. bronchiseptica</i>	labor	+	-	-
KM22	<i>B. bronchiseptica</i>	sertés orr	+	+	-
KB24	<i>B. bronchiseptica</i>	labor	+	-	-
LFB3	<i>P. multocida</i>	sertés orr	+	-	+

B. = Bordetella, P. = Pasteurella, Bvg = Bordetella virulencia gén
DNT = dermonekrotikus toxin, PMT = *P. multocida* toxin

4.1.2. A *B. bronchiseptica* B58 DNT– mutánsának (B58GP) előállítása

Munkánk során a rekombináns DNS technikáknál a Sambrook és Russell (2001) által leírtak szerint jártunk el.

A *B. bronchiseptica* B58 DNT-negatív mutáns előállításának alapját a korábban leírt (Pullinger és mtsai,1996), a *B. bronchiseptica* B58 teljes DNT génjét hordozó pBluescript alapú plazmid (pBH1) képezte. A pBH1-et *Nsi*I restriktációs endonukleázzal hasítottuk, az így kapott fragmenteket agaróz gélelektroforézissel választottuk el egymástól. A nagyobb méretű fragmenthez hozzákapcsoltuk a pUC4K jelű plazmidból (Amersham Pharmacia) származó, *Pst*I-el történő hasítást követően elektroelúcióval kinyert, kanamicin rezisztenciát kódoló gént (1.2 kb), ilyenképpen az újonnan kapott plazmid mérete mintegy 600 bp-al csökkent (9. ábra). Ezt a plazmidot *E. coli* XLI-Blue kompetens sejtekbe transzformáltuk, végül ampicillin (100 µg/ml), tetraciklin (20 µg/ml) és kanamicin (25 µg/ml) rezisztens telepeket szelektáltunk ki.



9. ábra: A DNT mutáns *B. bronchiseptica* B58GP törzs előállítása

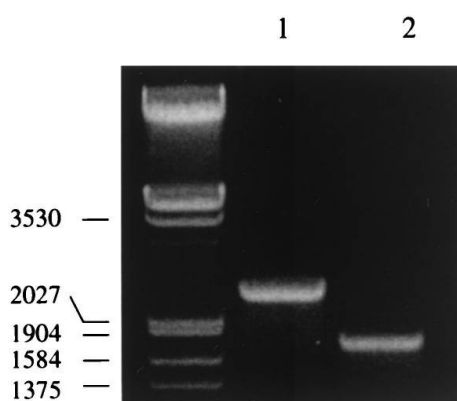
(A): Fizikai térkép a pBH1 plazmid 5 kb-os inszertjéről, ami tartalmazza a teljes DNT gént.

(B): Fizikai térkép az inszetről, melyben az *Nsi*I hasítóhelyek közötti szakaszt (1,8 kb) a kanamicin rezisztencia gén helyettesíti (1,2 kb).

A hármas rezisztenciával rendelkező telepekből plazmidtisztítást és *Bam*HI hasítást követően az inszertet *Bam*HI-el felnyitott ampicillin rezisztencia gént hordozó pRTP1 jelű plazmidba (Stibitz és mtsai, 1986) ligáltuk, majd e plazmidot az *E. coli* SM10 jelű törzsébe transzformáltuk, ampicillin és kanamicin szelekciót alkalmazva. A DNT– mutáns baktérium előállítására konjugációt használtunk, amelyben a recipiens törzs egy spontán mutációval létrejött nalidixinsav rezisztens *B. bronchiseptica* B58 volt, donor törzsként pedig az inszert-plazmidot hordozó *E. coli* SM10 szerepelt. A

transzkonjugánsokat szelekció után (40 µg/ml kanamicin és 40 µg/ml nalidixin sav) 30 mM MgSO₄ tartalmú BG táptalajra oltottuk, majd ampicillin és kanamicin tartalmú BG táptalajon "replica plating" technikával azonosítottuk az ampicillin rezisztens telepeket.

A feltételezett mutánsokból genomiális DNS-t tisztítottuk (Wizard genomic DNA purification kit, Promega), majd a mutációt tartalmazó DNT szakaszt standard PCR módszerrel felszorzottuk az alábbi primereket alkalmazva: DNTS (5'-GTTCGCCTACGACGAATTGG-3') és DNTAS (5'-CTCCTGCAGGTATCGATATG-3'). A teljes DNT-t tartalmazó pBH1 esetben 2,3 kb méretű PCR termék keletkezett, míg a mutáns genom esetében csak 1.7 kb méretű PCR terméket mutattunk ki; vagyis a mutáns hordozta a deléciót (10. ábra).



10. ábra: DNT-PCR eredményei agaróz gélelektroforézissel

A polimeráz láncreakcióban templátként (1): pBH1 kontrollt és (2): B58GP genomiális DNS-t alkalmaztunk. A kép bal oldalán a molekulatömeg markert (Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*III marker, Fermentas) tüntettük fel (bp).

4.1.3. A *B. bronchiseptica* KM22 DNT– mutánsának (KB24) előállítása

A *B. bronchiseptica* KM22 DNT– mutánsát háromszülős keresztezéssel hoztuk létre, a korábban leírtak szerint (Walker és Weiss 1994). A donor *E. coli* törzs a pKEW42 plazmidot, a helper *E. coli* törzs a pRK2013 mobilizáló plazmidot hordozta, a recipiens törzs pedig a *B. bronchiseptica* KM22 volt a konjugáció során. A donor baktériumban lévő plazmid a *B. pertussis* *dnt* génjének *Not*I és *Bam*HI restrikciós endonukleázokkal történő hasítással kapott 1,8 kb-os szakaszát tartalmazta, amibe a 3,7 kb-os GenR/oriT génkazettát inszertáltuk a rekombinálódás és a rekombinánsok szelekciójának elősegítésére. A donor és helper törzsek elleni szelekcióra *E. coli* DM1178 (pCLB1)-ből tisztított Colicin B-t használtunk (Bullock és mtsai, 1990). A transzkonjugánsok esetében a *dnt* génbe való inszerciót Southern-blottal igazoltuk. Az

általunk vizsgált transzkonjugánsok mindegyike tartalmazta a donor plazmidot. További vizsgálatainkhoz egy olyan transzkonjugánst (KB24) választottunk ki, ami antibiotikumot nem tartalmazó táptalajon tíz átoltás után is stabil maradt.

4.1.4. Hemagglutinációs próba

Tárgylemez agglutinációs módszert alkalmaztunk, melyet a korábban leírtak alapján végeztünk el (Semjén és Magyar, 1985). A *B. bronchiseptica* törzseket BG táptalajon 24 órán át 37°C-on tenyésztettük, és azok hemagglutinációs aktivitását szarvasmarha vörösvértestek 5%-os szuszpenziójával vizsgáltuk.

4.1.5. A baktériumtörzsek virulencia faktorainak immunoblottal történő azonosítása

A törzsek fehérje expresszióját immunoblot módszerrel vizsgáltuk. A teljes sejt kivonatokból származó fehérjéket nátrium-laurilszulfát tartalmú poliakrilamid gélelektroforézis segítségével különítettük el a Doucet és mtsai (1990) által leírtak alapján, 10% poliakrilamid tartalmú gélben. A nitrocellulózra való transzferálás után a korábban leírtak (Register és Ackermann, 1997) szerint immunoblottot végeztünk. A DNT, filamentózus hemagglutinin, pertaktin és adenilát-cikláz hemolizin toxin termelését a már korábban leírt AE9 (Pullinger és mtsai, 1996), X3C (Leininger és mtsai, 1993), BPE3 (Brennan és mtsai, 1988) és 9D4 (Hewlett és mtsai, 1989) monoklonális ellenanyagok segítségével mutattuk ki.

4.1.6. Virulencia és toxicitás vizsgálata egérben (egér lépteszt)

A virulenciát és a toxicitást egér léptesztben vizsgáltuk, a korábban leírtaknak megfelelően (Magyar, 1990). Röviden: teljes-sejt szuszpenziókat és ultrahanggal feltárt sejtmentes kivonatokot készítettünk. Csoportonként öt fehér CFLP (LATI, Gödöllő, Magyarország), 16-18 g testtömegű egeret oltottunk intravénásán a vizsgálandó anyagok 0,2 ml-ével, hármass léptékű sorozatos hígításokból. Az elhullásokat az oltást követő 7 napig jegyeztük fel, amikor a túlélőket kiirtottuk és meghatároztuk a léptömegeket. Összehasonlításuképpen a relatív léptömegeket számítottunk ki 10g testtömegre vonatkozóan (lép tömeg (mg)/testtömeg (g) x 10).

4.1.7. Egérfertőzés

A vizsgálatban két csoportba 5-5 alomból, egy csoportba pedig három alomból vontunk be egereket. Az 1. csoportot, amely 51 újszülött egeret tartalmazott, a *B. bronchiseptica* B58 jelű törzzsel fertőztük. A 2. csoportot, amely 50 újszülött egerből állt, *B. bronchiseptica* B58GP jelű törzzsel fertőztük. A harmadik csoport tartalmazta a kezeletlen kontroll egereket (27 db).

A *B. bronchiseptica* törzseket 10% juhvérrel kiegészített BG agar táptalajon tenyésztettük 37°C-on 48 órán át, majd azokból PBS-ben (pH=7,2) 5×10^6 CFU/ml töménységű szuszpenziót készítettünk. Az egereket 1-2 napos korban oltottuk, 0,003 ml baktérium szuszpenziót cseppentve mindkét orrnyílásba Hamilton precíziós fecskendővel. 21 nappal a fertőzés után éter túladagolással kiirtottuk az egereket, és kórbonctani vizsgálatot végeztünk. Minden alomból két, véletlenszerűen kiválasztott egér jobboldali tüdőleányéból mintát vettünk baktériumtenyésztésre; az orr, a tüdő és a lép szövetmintáit pedig 10%-os pufferelt formalinban fixáltuk a kórszövettani vizsgálatokhoz.

4.1.8. Sertések kísérletes fertőzése

Két hasonlóan kivitelezett kísérletet végeztünk. Az első kísérletben a *B. bronchiseptica* B58/B58GP törzspárral, a második kísérletben a *B. bronchiseptica* KM22/KB24 törzspárral dolgoztunk. Mindkét kísérlet során a császármetszéssel világra hozott, kolosztrumot nem kapott malacokat három csoportra osztottuk, és egyhetes korukban intranasalisan fertőztük őket összesen 1 ml (0,5 ml/orrnyílás) DNT+ szülői, illetve DNT– mutáns *B. bronchiseptica* törzsből készült szuszpenzió valamelyikével vagy PBS oldattal (placebo). Az első kísérlet során 6 malac volt minden csoportban; a második kísérlet során a *B. bronchiseptica* KB24-gyel és PBS oldattal inokulált csoportokban 8-8, a *B. bronchiseptica* KM22-vel fertőzött csoportban pedig 6 állat volt. A kísérlet kezdete előtt minden állatból mandula és orrtampon mintát vettünk, hogy ellenőrizzük a *B. bronchiseptica* fertőzöttségtől mentes állapotukat. A klinikai tüneteket és testhőmérsékletet naponta, a testtömeget heti két alkalommal rögzítettük. A fertőzést követő 28. napon a sertéseket barbiturát adagolásával túlaltattuk, majd az állatokat kórbonctani vizsgálatnak vetettük alá.

4.1.9. A kolonizáció mértékének meghatározása

Az orrüreg átmosását a *B. bronchiseptica* fertőzés utáni első, második és harmadik héten (az első kísérlet során még a negyedik héten is) végeztük el az orrüreg kolonizációjának vizsgálatára. Ez úgy történt, hogy 5 ml PBS oldatot fecskendeztünk az orrüregbe az egyik orrnyíláson keresztül, a visszaáramló folyadékot pedig főzőpohárba gyűjtöttük össze. Ebből a mosófolyadékból tízes alapú hígítási sort készítettünk, majd minden hígításból 100-100 µl-t szélesztettünk 2-2 20 µg/ml penicillint, 10 µg/ml amphotericin B-t, 10 µg/ml sztreptomomicint és 10 µg/ml spektinomicint tartalmazó véres agar táptalajra. A fertőzést követő negyedik héten, miután az állatokat túlaltattuk, ismert súlyú orrkagyló, légcső és tüdőmintát Ten Broeck homogenizálóban PBS oldattal eldörzsöltünk. A *B. bronchiseptica* mennyiségét (CFU/gramm szövet) úgy határoztuk meg, hogy a homogenizátum tízes alapú hígításaiból 100-100 µl-t 2-2 szelektív véres agar táptalajra szélesztettünk. A *B. bronchiseptica* telepeket Bordetella specifikus hibridizációs próba (Register és mtsai, 1995) segítségével azonosítottuk. Ezen kívül, a megfelelő hígításokból az első kísérletben kanamicinnel, a második során gentamicinnel kiegészített BG táptalajra is oltottunk ki, és összehasonlítottuk a csíraszámot a véres agar táptalajon talált telepszámmal, annak bizonyítására, hogy ténylegesen a mutáns, illetve a szülői törzs kolonizálta-e az állat szerveit.

4.1.10. Kórbonctani vizsgálat

Az állatok orrából az első praemoláris fog magasságában harántmetszetet készítettünk. A bal és jobb oldali ventralis orrkagylók dorsalis és ventralis csavarulatait külön-külön pontoztuk (0 – 4 közötti értékkel), a következőképpen:

0 = nincs elváltozás,

1 = az orrkagyló csavarulat kis része (maximum fél csavarulat) hiányzik,

2 = enyhe atrófia – több mint egy fél csavarulat hiányzik,

3 = közepes atrófia – az orrkagyló kiegyenesedett, csak egy kis darabja található meg,

4 = súlyos atrófia – az orrkagyló eltűnt.

Az orrsövény deformálódására adott pont 0 – 2 közötti érték lehetett:

0 = nincs elváltozás,

1 = enyhe deformálódás,

2 = súlyos elferdülés.

A négy orrkagyló csavarulat és az orrsövény pontjait minden állat esetében összeadtuk, így a maximális érték 18 lehetett.

A boncolás során a tüdő érintettségét az egyes lebenyek érintettségének százaléka és az adott lebeny teljes tüdőhöz viszonyított százalékos aránya alapján határoztuk meg. Az egyes lebenyek teljes tüdőtérfogát százalékat a következőképpen vettük figyelembe: bal felső lebeny 5%, bal középső lebeny 6%, bal alsó lebeny 29%, jobb felső lebeny 11%, jobb középső lebeny, 10%, jobb alsó lebeny 34%, járulékos lebeny 5%.

Az orrkagylókból, légcsőből és a tüdőből kórszövettani vizsgálatokhoz is vettünk mintát, amit 10%-os puffertelt formalinban fixáltunk 24 órán keresztül, majd 90%-os etanolba helyeztünk át. Az orrkagylókat a fixálást követően EDTA oldatban dekalcifikáltuk 24 órán keresztül. A mintákat ezután paraffinba ágyasztuk, metszeteket készítettünk, majd hematoxin-eozinnal festettük őket.

4.1.11. *B. bronchiseptica* kimutatása immun-hisztokémiai eljárással

A *B. bronchiseptica* KM22/KB24 törzspárral végzett (második) fertőzési kísérlet végén, a *B. bronchiseptica* antigén jelenlétét a szövettani metszetekben egy alkalikus foszfatáz kimutatási módszerrel (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, USA) vizsgáltuk (Ackermann és mtsai, 1997). Röviden: a metszeteket normál (hígítatlan) kecske szérumban áztattuk 10 percig, majd rövid öblítés után az 1:5000 arányban hígított elsődleges (nyúlban termelt *B. bronchiseptica* specifikus poliklonális) ellenanyagban inkubáltuk őket egy órán keresztül szobahőmérsékleten. A kontroll metszetek esetében vagy hiányzott az elsődleges ellenanyag, vagy *B. bronchiseptica* negatív nyúlsavót alkalmaztunk. Mindezekén túl, a *B. bronchiseptica* specifikus elsődleges ellenanyag nyomokban sem adott jelet, amikor *B. bronchiseptica* fertőzöttségtől mentes malacokból származó tüdő és orrkagyló szövetekkel teszteltük. Ezután a tárgylemezeket 1:40 arányban hígított másodlagos ellenanyaggal (biotinnal jelölt anti-nyúl kecskesavó) kezeltük 30 percen át. Végül a metszeteket streptavidin-

foszfátazzal és foszfatáz szubsztráttal inkubáltuk, majd Mayer-féle hematoxilinnel festettük.

4.1.12. Statisztikai elemzés

Az orron keresztül fertőzött egerek körében tapasztalt letalitás statisztikai elemzése Tukey-Kramer teszttel történt. A kísérletesen fertőzött sertések esetében kétmintás, nem párosított Student-féle t-próbával hasonlítottuk össze a kolonizáció mértékét, az orrkagyló-elváltozások pontértékeit és a tüdőelváltozások kiterjedését a szülői és a mutáns törzsekkel fertőzött csoportok között, nem egyenlő varianciát feltételezve, $P < 0,05$ szignifikancia szinttel.

4.2. Eredmények

4.2.1. A *B. bronchiseptica* B58/B58GP és KM22/KB24 törzspárok jellemzői

Mindkét mutáns törzs – a szülői törzsekhez hasonlóan – *B. bronchiseptica* I. fázisú (bvg+) telepmorfológiát mutatott: BG agar táptalajon sima, kicsiny, éles szélű, a fajra jellemző módon hemolizáló telepeket képezett, ez utóbbival bizonyítva, hogy a mutáns törzsek is megőrizték az adenilát-cikláz hemolizin toxint termelő képességüket. Mind a négy törzs agglutinálta a szarvasmarha vörösvértesteket, ami az I. (bvg+) fázisú törzsekre szintén jellemző adhézis képességre utal.

A teljes sejt kivonatokkal végzett immunoblot alapján mind a négy törzs termelt filamentózus hemagglutinint, pertaktint és adenilát-cikláz hemolizin toxint, de csak a B58 és KM22 törzsek állítottak elő DNT-t (11. ábra).

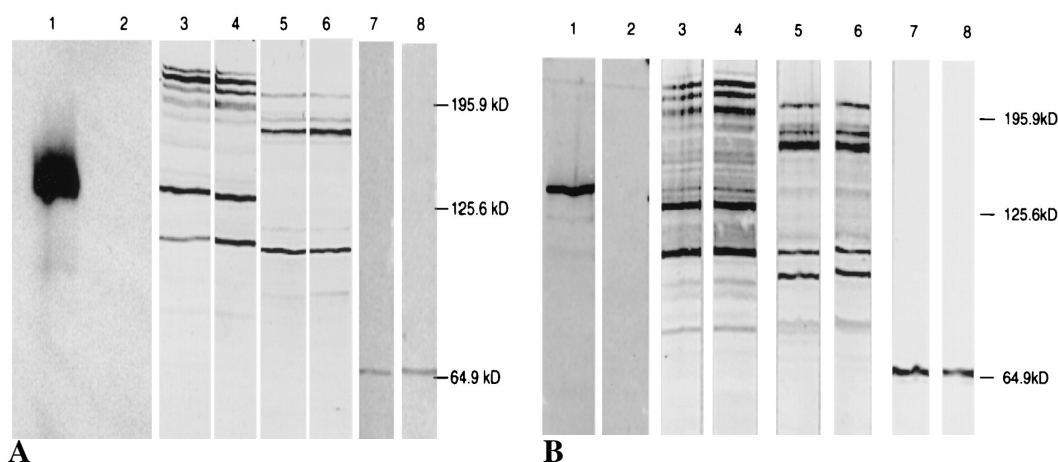
A *B. bronchiseptica* B58/B58GP törzspárral az egér léptesztben kapott eredményeket az 2. táblázat mutatja be. A *B. bronchiseptica* B58 teljes sejt szuszpenzió és annak sejtmentes szűrlete egyaránt letális hatással volt az egerekre, szubletális dózisban pedig a lép tömegének csökkenését idézték elő. A *B. bronchiseptica* B58GP a szülőitörzshöz hasonló mértékben letálisnak bizonyult teljes sejt szuszpenziót alkalmazva, azonban a túlélő egerekben jelentős lép hipertrófia volt megfigyelhető. Ezzel szemben a *B. bronchiseptica* B58GP jelű törzsből készített sejtmentes szűrlet semmilyen káros hatást nem gyakorolt az egerekre, csupán a lép tömegének enyhe növekedését váltotta ki.

A *B. bronchiseptica* KM22 ultrahanggal feltárt sejtmentes kivonata az egér léptesztben szintén letálisnak bizonyult, míg a mutáns törzsé (KB24) nem mutatott ilyen hatást (az adatok nincsenek feltüntetve).

4.2.2. Egérfertőzőési kísérlet

4.2.2.1. Klinikai megfigyelés

A *B. bronchiseptica* B58, illetve B58GP tenyészetekkel orron keresztül fertőzött újszülött egerek esetében a háromhetes megfigyelési időszakban kapott eredményeket a 3. táblázat foglalja össze. A kezeletlen kontroll egerek mind életben maradtak, és *B. bronchisepticát* nem izoláltunk ezekből az állatokból. Ezzel szemben, mindkét fertőzött csoport egereinél közel 50%-os letalitást tapasztaltunk, melynek mértéke függetlennek bizonyult a fertőzéshez használt *B. bronchiseptica* törzs DNT termelési képességétől. Másrészt viszont, körülbelül 20-szor kevesebb *B. bronchiseptica* B58GP-t izoláltunk vissza a tüdőből, mint *B. bronchiseptica* B58-t.



11. ábra: A DNT, a filamentózus hemagglutinin, az adenilát-cikláz hemolizin toxin és a pertaktin expressziója

A B58 (1., 3., 5., és 7. oszlop), illetve a B58GP törzsből (2., 4., 6., és 8. oszlop) (A), valamint a KM22 (1., 3., 5., és 7. oszlop), és a KB24 törzsből (2., 4., 6., és 8. oszlop)

(B) készített kivonat fehérjéit nátrium-laurilszulfát tartalmú poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét, majd nitrocellulózra vittük át. A DNT-t, a filamentózus hemagglutinin, az adenilát-cikláz toxint és a pertaktint AE9 (1. és 2. oszlop), X3C (3. és 4. oszlop), 9D4 (5. és 6. oszlop), és BPE3 (7. és 8. oszlop) monoklonális ellenanyagokkal mutattuk ki.

2. táblázat: *B. bronchiseptica* B58 és B58GP törzsekből készült teljes sejt szuszpenziók (TSS) és ultrahanggal kezelt, sejtmentes kivonatok (SK) vizsgálata egér léptesztben

Hígítás	B58				B58GP			
	TSS let	rlt	SK let	rlt	TSS let	rlt	SK let	rlt
UD	5/5	-	5/5	-	5/5	-	0/3	64
3	5/5	-	5/5	-	5/5	-	0/3	69
9	3/5	38 ^a	0/5	32	5/5	-	0/3	58
27	0/5	44	0/5	28	0/5	136	NV	NV
81	0/5	53	0/5	49	0/5	103	NV	NV

let = letalitás (elhullott / összesen)

rlt = relatív léptömeg (10 g testtömegre számítva: lép tömege (mg)/testtömeg (g) x10)

UD = hígítatlan

NV = nem vizsgált

A kontroll relatív léptömege = 59 (öt kontroll egeret oltottunk baktériummentes BG lemez PBS oldattal történő lemosása után)

3. táblázat: Elhullások és a tüdőből izolált *B. bronchiseptica* átlagos száma *B. bronchiseptica* B58, illetve B58GP tenyészetekkel orron keresztül fertőzött újszülött egerekben

Csoport	Átlagos alomszám	Elhullások átl. száma (%)	Bb CFU átlag*
1 (B58)	10.2	48.1 ^a	3.7 x 10 ⁴
2 (B58GP)	10.0	44.0 ^a	7.8 x 10 ⁵
3 (Kontroll)	9.0	0 ^b	0

**B. bronchiseptica* átlagos száma/ tüdőszövet g

a, b : az oszlopon belül az értékek szignifikánsan különböznek (p <0,05)

CFU = telepformáló egység

Bb = *Bordetella bronchiseptica*

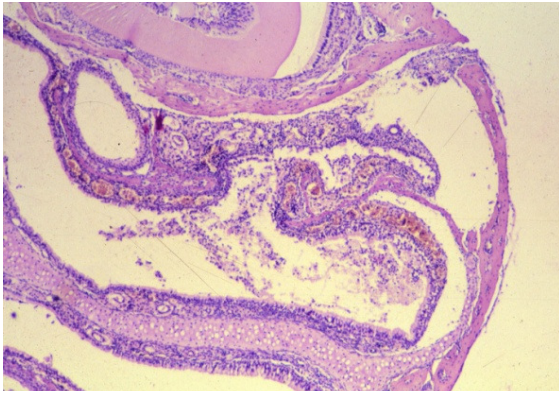
4.2.2.2. Kórszövettani vizsgálat

A kórszövettani vizsgálatok során talált jellemző elváltozásokat, illetve azok előfordulási gyakoriságát a 4. táblázat foglalja össze.

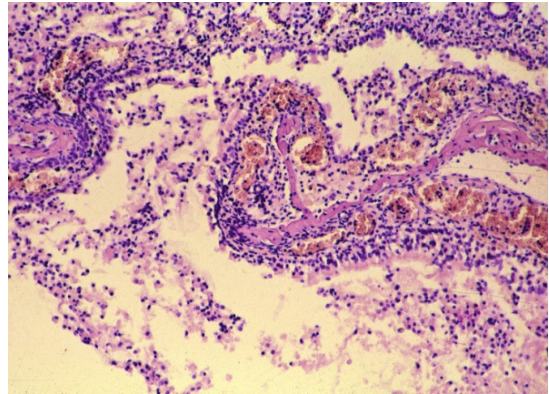
4. táblázat: Kórszövettani elváltozások a *B. bronchiseptica* B58 és B58GP törzsekkel fertőzött egerekben

Tünet	Törzs	B58	B58GP	kontroll
Orrkagylók:				
- hámszövet hiperplázia		+	-	-
- hámszövet diszplázia		+	-	-
- hámsejtek csillóinak elvesztése		+	-	-
- csontfelszívódás		+	-	-
- fibroblasztok számának emelkedése		+	-	-
- orrkagyló-sorvadás		+	-	-
- lymphocytá és plazmasejt gócok kialakulása		+	+	-
- gyulladásos izzadmány az orrkagylók csavarulataiban		+	+	-
Tüdő:				
- elhalásos tüdőgyulladás		+	-	-
- peribronchialis és perivascularis lympho-histiocytás infiltrációval kísért hurutos tüdőgyulladás		-	+	-
Lép:				
- lymphocytá deplécia		+	-	-
- az extramedullaris vérképzés intenzitásának csökkenése		+	-	-
- lymphoid hiperplázia		-	+	-

A DNT+ *B. bronchiseptica* B58 törzsszel történt fertőzés okozta a legsúlyosabb elváltozásokat. Ezekben az egerekben az orrkagylók hámjának sejtjei rendezetlenné váltak. Hiperplázia, diszplázia és hámleválás egyaránt kimutatható volt a hámrétegben. A legfeltűnőbb különbséget a *B. bronchiseptica* B58 jelű törzsszel fertőzött és a többi csoport között a hámsejtek csillóinak elvesztése, valamint a csontfelszívódás jelenléte képezte, ami a kizárólag ebben a csoportban előforduló orrkagyló sorvadás kialakulásához vezetett (12. és 13. ábra). A DNT– *B. bronchiseptica* B58GP törzsszel fertőzött egerek orrkagylóinak hámszövetében csupán kismértékű lympho-histiocytás beszűrődés, az orrüregben pedig gyulladásos izzadmány felhalmozódása volt megfigyelhető, egyéb, az orr szerkezetét érintő elváltozások megjelenése nélkül (14. és 15. ábra).



12.

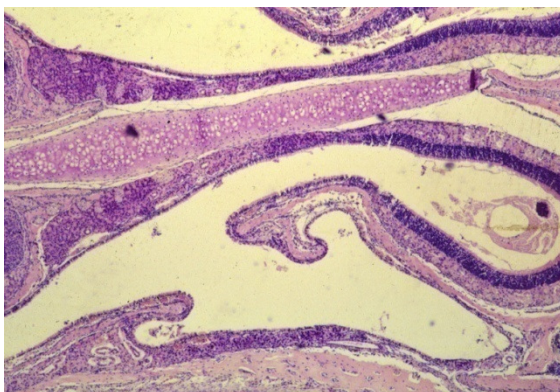


13.

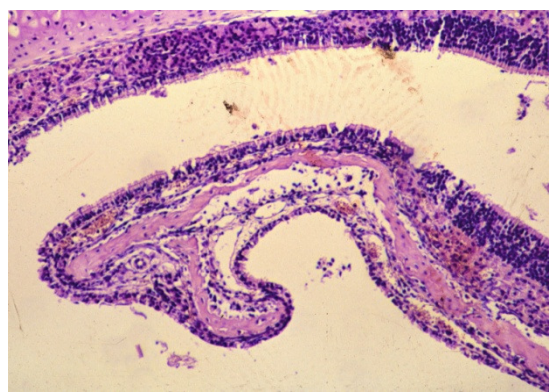
12. és 13. ábra: DNT+ *B. bronchiseptica* B58 törzsszel fertőzött egér orrürege

Az orrkagylók sorvadása, a hámréteg elváltozása (csillók elvesztése, diszplázia, hámsejtek leválása), csontfelszívódás és a kötőszöveti réteg lympho-histiocytás beszűrődése figyelhető meg. Hematoxilin-eozin (H-E), 40x (12. ábra), 200x (13. ábra)

A *B. bronchiseptica* B58 törzsszel fertőzött csoportban nagy elhalásos területeket figyeltünk meg a tüdőben (16. ábra), a lépben pedig súlyos fokú lymphocytá depléción volt látható (17. ábra). Ezzel szemben a *B. bronchiseptica* B58GP törzsszel fertőzött csoportban hurutos tüdőgyulladás jelentkezett, jellegzetes lympho-histiocytás, peribronchialis és perivascularis beszűrődéssel – de nekrosis nélkül (18. ábra). A lépben lymphoid hiperplázia és az extramedulláris haematopoiesis intenzitásának növekedése (19. ábra) volt megfigyelhető.



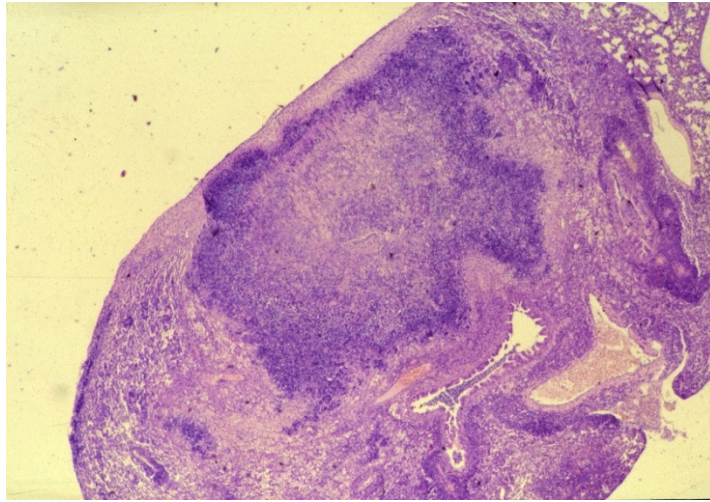
14.



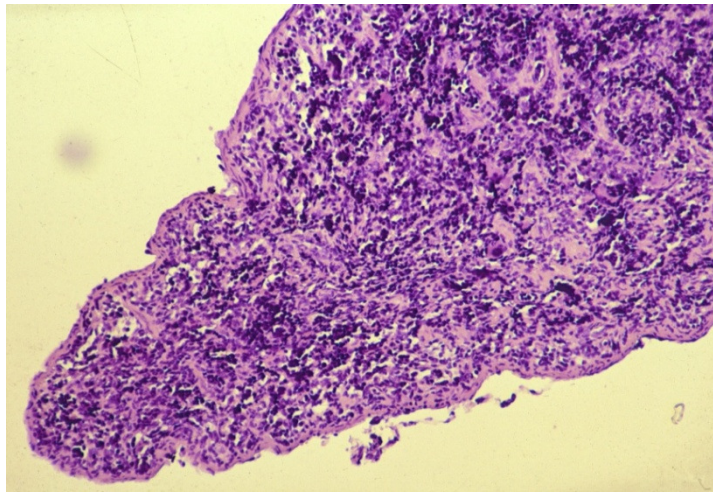
15.

14. és 15. ábra: DNT– *B. bronchiseptica* B58GP törzsszel fertőzött egér orrürege

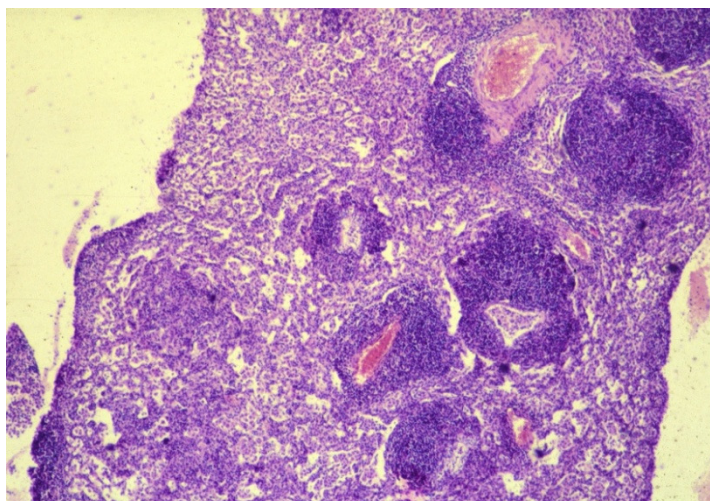
Enyhe fokú lympho-histiocytás beszűrődés (egyéb elváltozások nélkül). H-E, 40x (14. ábra), 200x (15. ábra)



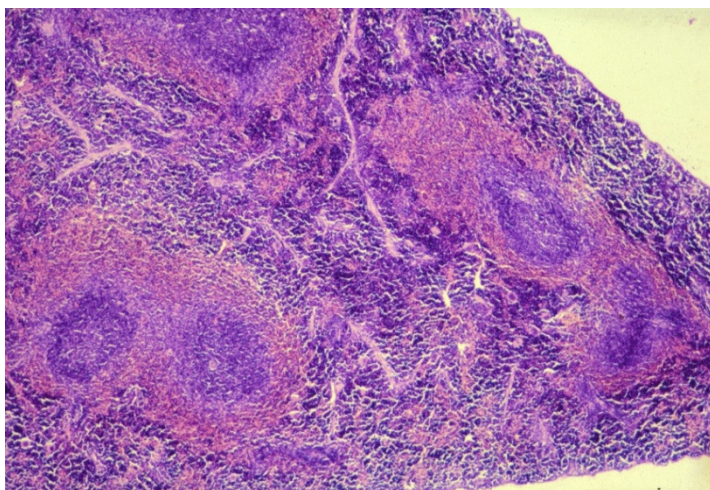
16. ábra: Gyulladásos reakcióval övezett elhalásos területek a DNT+ *B. bronchiseptica* B58 törzsszel fertőzött egér tüdejében. H-E, 40x



17. ábra: Súlyos fokú lymphocyta depléció (a Malpighi testek sorvadása) a DNT+ *B. bronchiseptica* B58 törzsszel fertőzött egér lépében. H-E, 200x



18. ábra: Peribronchialis és perivascularis lympho-histiocytás infiltrációval kísért hurutos tüdőgyulladás a DNT– *B. bronchiseptica* B58GP törzsszel fertőzött egér tüdejében. H-E, 40x



19. ábra: Lymphoid hiperplázia a Malpighi testekben és sejtben gazdag vörös pulpa a DNT– *B. bronchiseptica* B58GP törzzsel fertőzött egér lépében. H-E, 40x

4.2.3. Sertések kísérletes fertőzése

4.2.3.1. Klinikai tünetek

A *B. bronchiseptica*val fertőzött állatok – függetlenül attól, hogy a DNT+ szülői vagy a DNT– mutáns törzzsel történt a fertőzés – a vad törzsre jellemző klinikai tüneteket (tüsszögés, köhögés, orrdugulás, könnyezés, orrfolyás) mutatták. A beteg állatok száma és a lefolyás hossza alapján a szülői törzzsel fertőzött malacok kis mértékben betegebbek voltak, mint a DNT– mutánssal fertőzött társaik. Az első (B58/B58GP) kísérlet során a *B. bronchiseptica* fertőzésnek tulajdonítható klinikai kép mellett a *B. bronchiseptica* B58 vagy B58GP törzzsel fertőzött csoportokban egyéb tünetek is megfigyelhetők voltak: ízületgyulladás, sántaság, fokozott bágyadság és anorexia. A *B. bronchiseptica* B58-as törzzsel fertőzött csoportban az egyik állat a fertőzést követő 12. napon elhullott. A csak PBS oldattal inokulált állatok egyik kísérletben sem mutattak klinikai tüneteket.

4.2.3.2. A testhőmérséklet alakulása

Az első (B58/B58GP) kísérlet során mindkét *B. bronchiseptica*val fertőzött csoport egyedei belázasodtak. Az egészséges malacok normális testhőmérséklete 40°C alatt marad. A *B. bronchiseptica* B58-as törzzsel fertőzött állatok átlagos testhőmérséklete az első 7 napban $\geq 40^{\circ}\text{C}$ volt, míg a DNT– mutáns B58GP törzzsel fertőzött állatok

testhőmérsékletének átlaga csak két napig volt $\geq 40^{\circ}\text{C}$. A PBS oldattal kezelt kontroll csoportban az átlagos testhőmérséklet sohasem érte el a 40°C -t, azaz az állatok láztalanok maradtak. A második (KM22/KB24) kísérletben a *B. bronchiseptica* KM22-vel fertőzött csoportból egy malac hőmérséklete volt két napig $\geq 40^{\circ}\text{C}$, a másik két (KB24 és kontroll) csoportban nem fordult elő hőemelkedés.

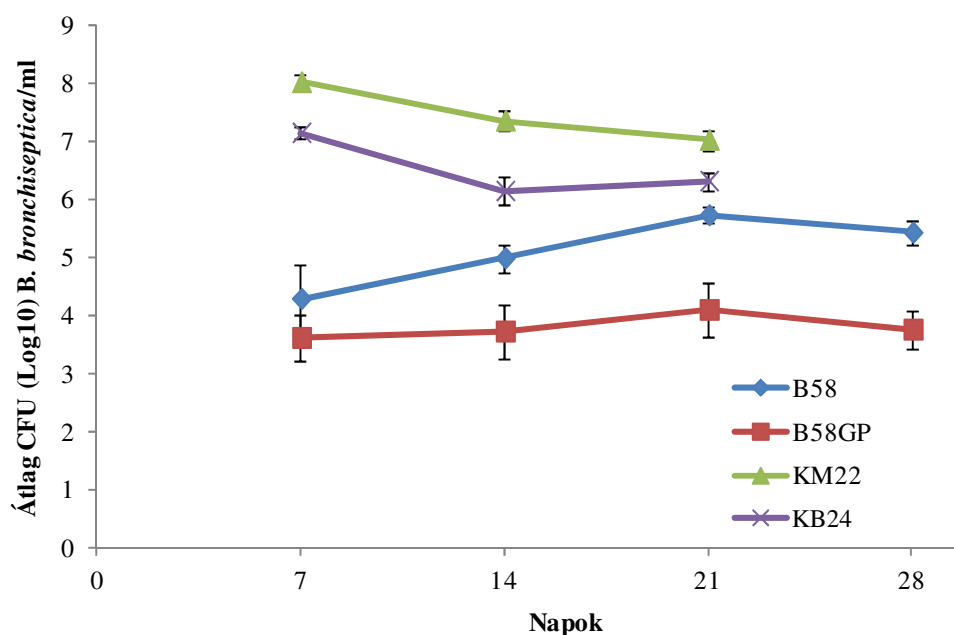
4.2.3.3. Testtömeg gyarapodás

Az első (B58/B58GP) kísérletben mindkét *B. bronchiseptica*-val fertőzött csoport testtömeg gyarapodásának átlaga alacsonyabb volt (3,61 kg a B58GP-vel és 4,02 kg B58-cal fertőzött csoportban), mint a PBS oldatot kapott csoporté (5,32 kg). A *B. bronchiseptica* B58GP törzsszel fertőzött csoport átlagos testtömeg gyarapodása szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a PBS oldatot kapott kontroll csoporté ($P=0.009$). A *B. bronchiseptica* B58 törzsszel fertőzött csoport testtömeg gyarapodása statisztikailag nem volt szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll csoporté ($P=0.074$), amit az értékek közötti nagyobb variancia és a kisebb elemszám magyarázhat (egy malac a kísérlet befejezése előtt elhullott ebből a csoportból). A B58 illetve B58GP törzsekkel fertőzött csoportok átlaga között nem volt statisztikailag szignifikáns különbség ($P=0.62$). A második, a KM22/KB24 törzsekkel végzett kísérlet során nem találtunk különbséget a csoportok testtömeg gyarapodásában.

4.2.3.4. A légutak kolonizációja

4.2.3.4.1 Orrüreg

A 20. ábra az orrüregben kimutatható *B. bronchiseptica* baktérium számok alakulását mutatja be, melyet a heti orrüreg átmosások során nyert orrmosó folyadékokból végzett csíraszámlálások eredményei alapján állapítottuk meg. A szülői törzseket mindkét kísérletben nagyobb számban nyertük vissza, mint a DNT- mutáns törzseket. Ez a különbség a *B. bronchiseptica* B58 és B58GP törzsekkel végzett első kísérletben a 14., 21. és 28. napon, a *B. bronchiseptica* KM22 és KB24 törzsekkel végzett második kísérletben pedig a 7., 14. és 21. napon szignifikáns volt. A kolonizáció mértéke nagyobb volt a *B. bronchiseptica* KM22 és KB24 törzsek esetében, mint a *B. bronchiseptica* B58 és B58GP törzseknél. A PBS oldattal inokulált állatokból egyetlen alkalommal sem sikerült *B. bronchiseptica*-t izolálni.



20. ábra: *B. bronchiseptica* B58, B58GP, KM22 vagy KB24 törzsekkel fertőzött malacok orrüregének kolonizációja, a 7., 14., 21. (és az első kísérletben még a 28.) napon végzett orrüreg átmosások alapján

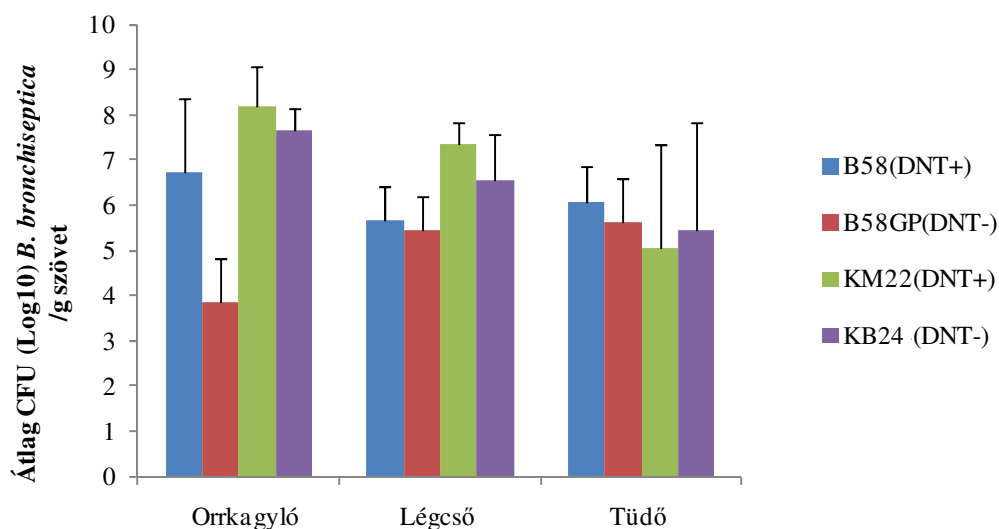
A B58/B58GP közötti különbség a 14., ($P=0.046$), 21., ($P=0.016$) és 28. napon ($P=0.003$), a KM22/KB24 esetén a 7., ($P=0.001$), 14., ($P=0.001$) és 21. napon ($P=0.01$) szignifikáns volt.

4.2.3.4.2 Szöveti kolonizáció

A 21. ábra a különböző légúti szervek szöveti kolonizációját mutatja be a fertőzés után 4 héttel végzett kórbonctani vizsgálatkor. Bár az egy grammnyi szövetből izolált baktériumok átlagos száma általában magasabb volt a DNT+ szülői törzzsel fertőzött malacok esetében, mint a DNT- mutáns törzsekkel fertőzött malacokban, ez a különbség az orrkagylók esetén csak az első (B58/B58GP) kísérletben volt szignifikáns ($P=0.013$). A kolonizáció mértéke itt is nagyobb volt a KM22 és KB24 törzsek esetében, mint a B58 és B58GP törzseknél. A PBS oldatot kapott állatokból egyetlen alkalommal sem izoláltunk vissza *B. bronchisepticát*.

Az első (B58/B58GP) kísérletben az orrüreg átmosásból és szövetek bakteriológiai vizsgálatából nyert törzsekből véletlenszerűen kiválasztottunk néhányat, melyeket kanamicines BG agar táptalajra átvitve igazoltuk, hogy csak a szülői, illetve mutáns törzset izoláltuk vissza a megfelelő csoportokból. Ehhez hasonlóan a második (KM22/KB24) kísérlet során az orrüreg átmosással nyert folyadék megfelelő hígításait gentamicinnel kiegészített BG agar táptalajra oltva megerősítettük, hogy csak a fertőzésre használt törzs telepedett meg a megfelelő állatok légzőszerveiben.

dc_834_14



21. ábra: *B. bronchiseptica* B58, B58GP, KM22 vagy KB24 törzsekkel fertőzött malacok orrkagylóinak, légcsövének és tüdejének kolonizációja 28 nappal a fertőzést követően

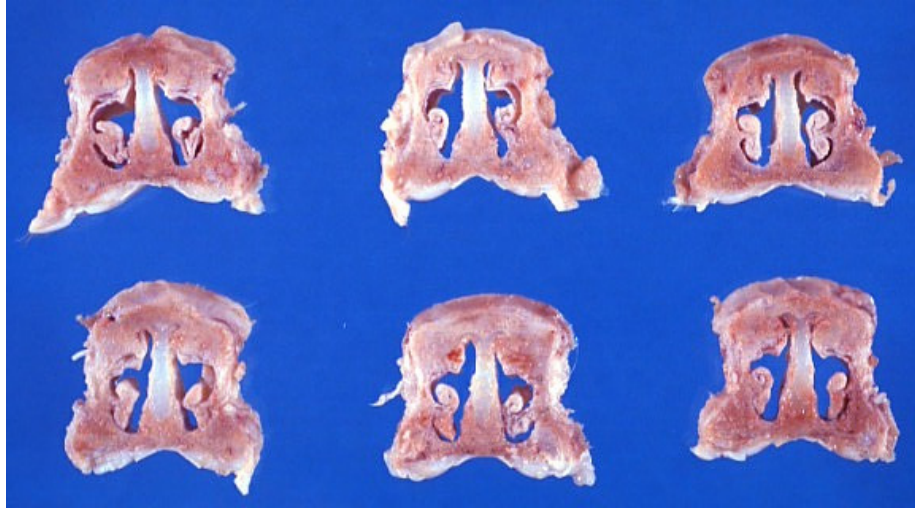
A B58 és B58GP törzsszel fertőzött csoportok között a kolonizáció mértékének különbsége az orrkagylóban szignifikáns volt ($P=0.013$).

4.2.3.5. Kórbonctan

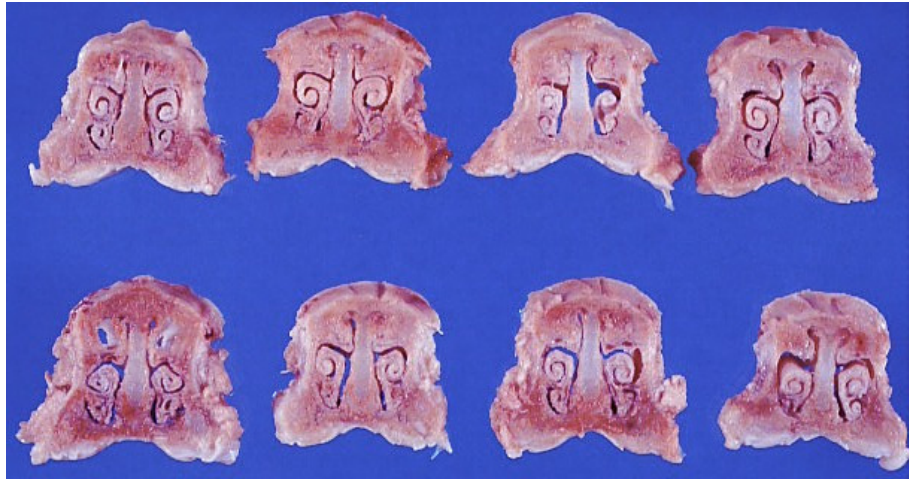
4.2.3.5.1 Orrkagylók

A kórboncolások során a DNT+ *B. bronchiseptica* B58 és KM22 törzsekkel fertőzött malacok orrkagylói a sorvadás jeleit mutatták, a DNT– *B. bronchiseptica* B58GP és KB24 törzsekkel fertőzött állatok orrkagylói azonban kitöltötték az orrüreget, és a kontroll csoporthoz voltak hasonlóak (22. ábra). A DNT+ törzsekkel fertőzött malacok orrkagyló-elváltozás pontértékeinek átlaga statisztikailag magasabb volt, mint a DNT– törzsekkel fertőzött csoportoké (5. táblázat). A DNT+ törzsekkel fertőzött állatok szövettani mintáiban rhinitis, változó mennyiségű intraluminaris mucopurulens exsudatum, a submucosában lymphocytás, plazmasejtes infiltráció és intraepithelialis neutrofil granulocytá aggregátumok voltak megfigyelhetők. Az epiheliumban a csillók pusztulása, hiperplázia és metaplázia volt leírható. A csontszövet részben felszívódott, a periosteum fibrocitás rétegében a fibroblasztok száma megnőtt. A DNT– mutáns törzsekkel fertőzött állatok orrkagylóinak vizsgálata során szintén jelen voltak rhinitisre utaló elváltozások, a submucosában lymphocytás, plazmasejtes infiltráció és intraepithelialis neutrofil granulocytá aggregátumok, intraluminaris mucopurulens exsudatum volt megfigyelhető, de az epiheliumban és a csontszövetben nem volt elváltozás.

A



B



22. ábra: *B. bronchiseptica* KM22 (A) és KB24 (B) törzsekkel fertőzött malac orráról készült harántmetszet, amely az orrkagyló sorvadás mértékét mutatja 28 nappal a fertőzést követően

4.2.3.5.2 Légső

A kontroll és a DNT– *B. bronchiseptica* törzsekkel fertőzött állatok légsőve nem mutatott elváltozást. A DNT+ *B. bronchiseptica* törzsekkel fertőzött állatok tracheájában változó mértékű csillópusztulás, az epithelium elvékonyodása, metaplázia és intraluminaris mucopurulens exsudatum volt megfigyelhető.

5. táblázat: Az orrkagyló elváltozások pontértékeinek átlaga és a tüdőgyulladás által érintett tüdőterület százaléka a fertőzést követő 4. héten

Törzs	Átlagos orrpontszám (szélsőérték)^a	Tüdőgyulladás átlagos kiterjedése (%)^b
1. kísérlet		
B58(DNT ⁺)	8,80(3-13)	14,2
B58GP(DNT ⁻)	0,33(0-1)	0
P érték	0,011	0,071
2. kísérlet		
KM22(DNT ⁺)	8,00(8)	16,8
KB24(DNT ⁻)	0,75(0-4)	<1
P érték	0,00003	0,0031

^a Orrkagyló pontozása = 0-2 normál, 3-6 enyhe sorvadás, 7-10 közepes sorvadás, 11-16 súlyos fokú sorvadás, lásd bővebben az Anyagok és módszerek (4.1.10) részben.

^b Tüdő pontozása = tüdőgyulladás által érintett tüdőterület százaléka, lásd bővebben az Anyagok és módszerek (4.1.10) részben.

4.2.3.5.3 Tüdő

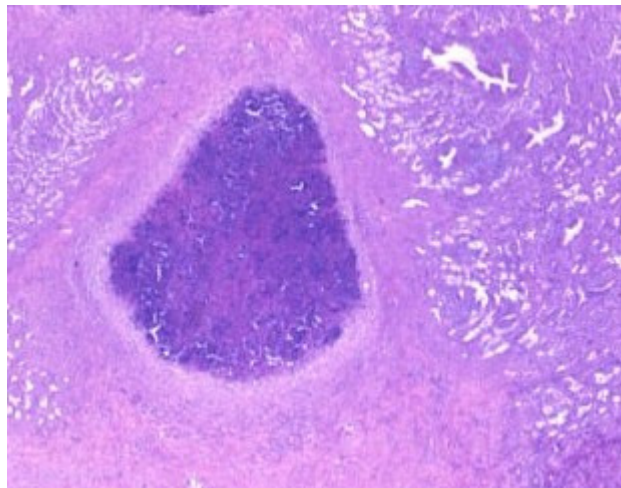
A nem fertőzött kontroll állatok tüdejében sem makro- sem mikroszkópos elváltozás nem volt megfigyelhető. A *B. bronchiseptica* B58GP törzsszel fertőzött malacok közül egynek sem, a *B. bronchiseptica* KB24 törzsszel fertőzöttek közül pedig csak egy tüdejében volt látható makroszkópos elváltozás. Ennél az állatnál egy körülírható terület, ami a teljes tüdő kevesebb, mint 2%-át tette ki, a normálisnál vörösebb és tömöttebb volt. Kórszövettani vizsgálattal enyhe hisztiocytás és neutrofil granulocytás tüdőgyulladás volt megállapítható. A DNT+ *B. bronchiseptica* törzsekkel fertőzött malacok esetén, a hat B58-as törzsszel fertőzött állatból 4, a hat KM22-vel fertőzött állatból pedig mindegyik esetében makroszkópos és szövettani vizsgálattal is tüdőgyulladást állapítottunk meg (4. táblázat). Makroszkópos vizsgálat során az elváltozások tömött, sárgásbarna, a felső és középső lebenyeken elhelyezkedő területek voltak (23. ábra). Kórszövettanilag az elváltozásokat fibroplázia, az alveolusok makrofágokkal és neutrofil granulocytákkal való változó mértékű kitöltöttsége, II-es típusú pneumocytá hiperplázia és az alveoláris szeptumok közepes mértékű fibrinnel vagy kollagénnel való megvastagodása jellemezte. Egyes metszeteken fokális, jól demarkálódott tályogok voltak jelen, melyek részben mineralizálódott, számos elhalt

neutrofil granulocytát tartalmazó nekrotikus zónákból és az azokat körülvevő vastag, érett kollagén kötőszövetből álltak (24. ábra). A bronchusok lumenét változó mértékben váladék és neutrofil granulocyták töltötték ki, a bronchusok epithelje hipertrófiát és hiperpláziát mutatott (25. ábra).



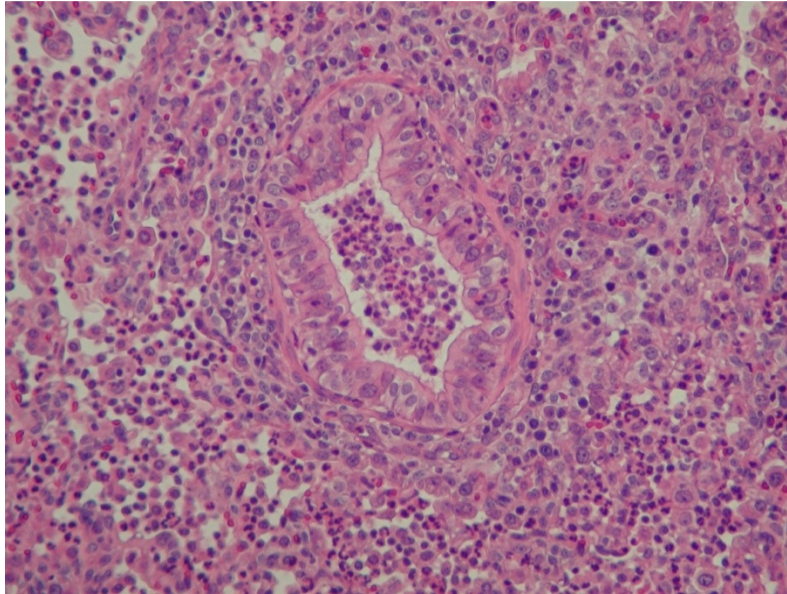
23. ábra: *B. bronchiseptica* KM22 törzsszel fertőzött malacok tüdejének kórbonctani vizsgálata 28 nappal a fertőzést követően

A makroszkópos vizsgálat során a jobb felső, középső lebenyen és az alsó lebeny egy részén sárgásbarna, fibrózus, tömött terület látható.



24. ábra: *B. bronchiseptica* KM22 törzsszel fertőzött malacok tüdejének kórszövettani vizsgálata 28 nappal a fertőzést követően

Eltályosodott lobulus, a nekrotikus góc körül vastag kollagénes kötőszövet kórszövettani képe. H-E festés. 1cm = 350µm.

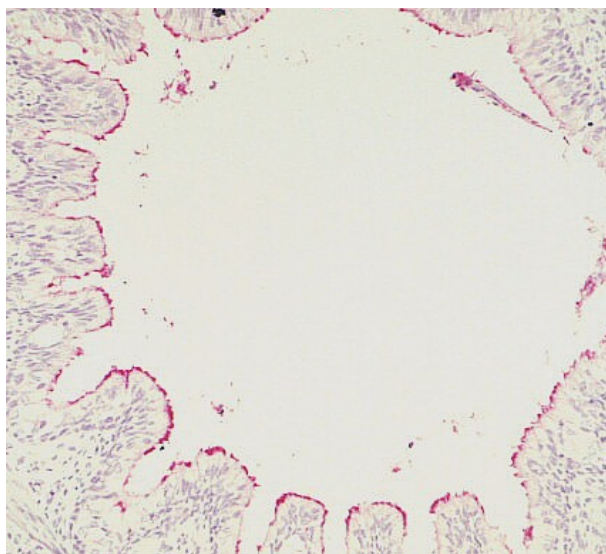


25. ábra: *B. bronchiseptica* KM22 törzsszel fertőzött malacok tüdejének kórszövettani vizsgálata 28 nappal a fertőzést követően

Az alveoláris lumenek neutrofil granulocytákkal való extenzív, fokális kitöltöttségének és a neutrofil granulocytás bronchiolitis kórszövettani képe. H-E festés. 1cm = 110µm.

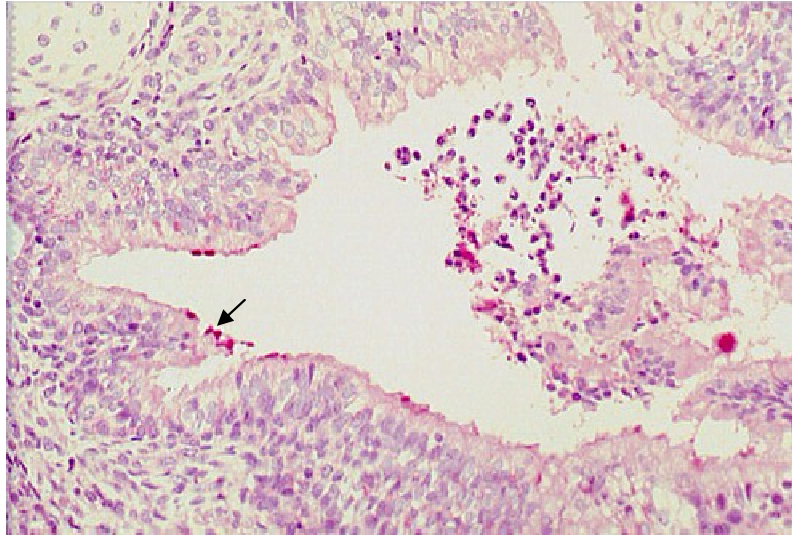
4.2.3.6. Immunhisztokémia

A *B. bronchiseptica* KB24 (26. ábra) és KM22 (27. ábra) törzsekkel fertőzött malacok orrkagylójából, légcsövéből és tüdejéből készült metszeteken a *B. bronchiseptica* antigén jelen volt az epithel sejtek csillóin. A KM22 törzsszel fertőzött állatok tüdejének tályogjaiból is kimutatható volt a *B. bronchiseptica* antigén (28. ábra).

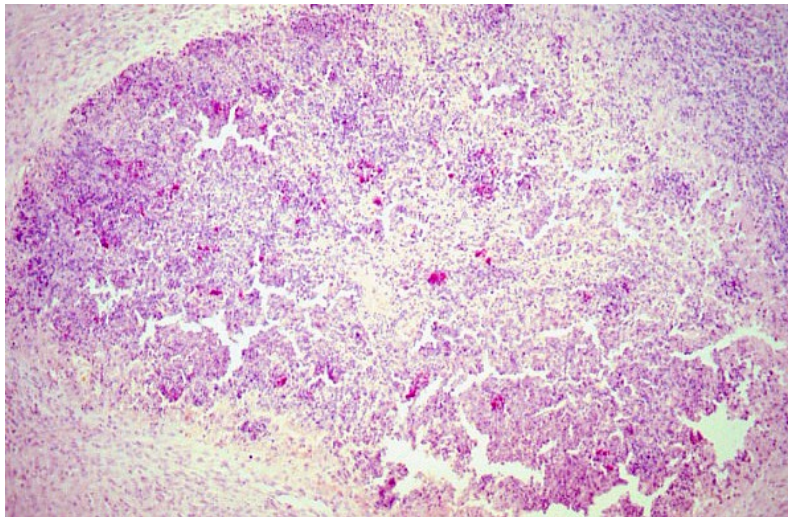


26. ábra: *B. bronchiseptica* KB24 törzsszel fertőzött malac tüdejének immunhisztokémiai vizsgálata

Baktériumok egy bronchus hámsejtjének csillóin.



27. ábra: *B. bronchiseptica* KM22 törzsszel fertőzött malac tüdejének immunhisztokémiai vizsgálata
Baktériumok egy bronchus hámsejtjeinek csillóin (nyíl)



28. ábra: *B. bronchiseptica* KM22 törzsszel fertőzött malac tüdejének immunhisztokémiai vizsgálata
Baktériumok egy tüdőtályog területén.

4.2.3.7. Egyéb elváltozások

Az első kísérlet során mindkét *B. bronchiseptica*-val fertőzött csoportban hat állatból négyenél fibrines polyserositis volt jelen. Ilyen elváltozás nem volt megfigyelhető a kontroll csoportban. Az érintett malacok peritoneális, perikardiális, illetve ízületi folyadékából nem sikerült baktériumot izolálni.

4.3. Megvitatás

A Bordetella dermonekrotikus toxin (DNT) egy olyan hatékony molekula, amely módosítja és aktiválja a jelátviteli fehérjék Rho családjának tagjait (Masuda és mtsai, 2000). Az Rho fehérjék elengedhetetlenek a sejt citoszkeleton szabályozásában, krónikus aktiválásuk sok szempontból hatással van a sejtműködésre, beleértve az intracelluláris jelátviteli útvonalakat és a sejtciklus progresszióját is (Ridley, 1996). Az azonban kevésbé tisztázott még, hogy milyen szerepet is játszik a DNT *in vivo*, mivel például a *B. pertussis* DNT gén deléciója nem befolyásolta az egérben mért letalitást (Weiss és Goodwin, 1989).

Az itt bemutatott kísérletsorozatunk először egér modellben írja le a *B. bronchiseptica* DNT expresszió hatását, összehasonlítva egy vad típusú *B. bronchiseptica* törzs (B58) és annak izogén DNT– mutáns párját (B58GP), amelyben a strukturális gén egy részét egy antibiotikum rezisztencia kazetta váltotta fel. Míg az intravénásan bevitt feltárt és sejtmentes *B. bronchiseptica* B58 kivonatok toxikusnak bizonyultak az egerekben, a *B. bronchiseptica* B58GP törzsből készített hasonló kivonatok egyáltalán nem mutattak toxikus hatást. Ugyanakkor az élő sejt formájában intravénásan beoltott szülői (B58) és mutáns (B58GP) *B. bronchiseptica* törzsek egymáshoz hasonló mértékű virulenciával rendelkeztek. Ezek az eredmények igazolták, hogy a *B. bronchiseptica* B58GP törzsben sikeresen megszüntettük a DNT termelését, míg a kórokozó képességhez nélkülözhetetlen egyéb fontos virulencia tényezők a szülői törzshöz hasonló mértékben termelődtek. Egy korábbi vizsgálatunk (Magyar, 1990) szerint egy sertés eredetű DNT-t nem termelő *B. bronchiseptica* mezei izolátum (PV6) hasonlóképpen viselkedett intravénásan oltott egerekben, amiből már akkor is arra következtettünk, hogy a DNT nem befolyásolja az egérben mért virulenciát. Ezt a feltételezést erősítették meg a jelenlegi eredmények is, az előbbinél egzaktabb módon, egy *B. bronchiseptica* DNT+ és DNT– izogén törzspár vizsgálatának segítségével.

A DNT+ *B. bronchiseptica* B58 törzs kifejezett orrkagyló sorvadást idézett elő az orron keresztül fertőzött egerekben, ami viszont nem volt megfigyelhető a DNT– *B. bronchiseptica* B58GP törzsszel fertőzött társaikban. Az egér orrüregének kis mérete miatt nem volt lehetséges számszerűsíteni a két *B. bronchiseptica* törzs kolonizációját. Ennek ellenére, a letalitás mértékének összehasonlíthatósága a két, *B. bronchiseptica* törzsszel fertőzött csoportok között, és az orr nyálkahártyájában szövettani vizsgálattal megfigyelhető gyulladás jelei a B58GP törzsszel fertőzött egerekben azt valószínűsítik,

hogy a B58GP törzs elegendő számban volt jelen az orrüregben az egyéb virulencia faktorok megfelelő mértékű prezentálásához. Ez arra utal, hogy a DNT felelős az egerekben kialakuló orrkagyló sorvadás létrehozásáért, és nem az I. fázisú (bvg+) *B. bronchiseptica* törzsek által termelt egyéb virulencia tényezők valamelyike.

Vizsgálatunk azt is megerősítette, hogy a *B. bronchiseptica* DNT-nek lienotoxikus hatása van egérben, míg a DNT termelés hiányában a nyirokszervek stimulációjának jelei láthatók, csakúgy, mint azt a már említett munkákban feltételeztük (Magyar, 1990). A *B. bronchiseptica* DNT-ről leírták, hogy egerekben gátolja az antigénekre adott ellenanyagválaszt (Horiguchi és mtsai, 1992). A szerzők úgy vélték, hogy ez az immunszuppresszió a DNT által elsorvasztott lép zavarának tulajdonítható. Magyar és Glávits (1990) viszont arra gondoltak, hogy a *B. bronchiseptica* DNT úgynevezett lienotoxikus hatása lényegében a lymphoid, mieloid és vérlemezke rendszerhez tartozó sejtek osztódásának szelektív gátlásán alapszik. Jelen eredményeink megerősítik, hogy a *B. bronchiseptica* DNT káros hatást gyakorol a gazdaállat immunrendszerére.

Bár mind a szülői (B58), mind a mutáns (B58GP) *B. bronchiseptica* törzs tüdőgyulladást idézett elő az intranasalisan fertőzött egerekben, a két eset patológiája alapvetően különbözött egymástól. A B58GP jelű DNT– *B. bronchiseptica* törzsszel fertőzött egerekben jellegzetes lympho-histiocytás, peribronchialis és perivascularis infiltrációval kísért hurutos tüdőgyulladás fejlődött ki. A B58 jelű DNT+ *B. bronchiseptica* törzsszel fertőzött egerekben gyulladással járó reakcióval övezett nagy nekrotikus területek voltak láthatók. Mindez azt sugallja, hogy a DNT képes közvetlenül károsítani a tüdőszövetet, legalábbis egerekben. A tüdőszövetből végzett csíraszámolás eredménye pedig arra utal, hogy a DNT okozta elváltozások támogatják a *B. bronchiseptica* szaporodását a tüdőben, feltehetően azáltal, hogy súlyos károkat okoznak a tüdőszövetben, és csökkentik a helyi ellenálló képességet.

Korábbi vizsgálatok eredményei alapján már széles körben feltételezték a kutatók, hogy a *B. bronchiseptica* DNT fontos kóroktani szerepet játszhat a kórokozóval fertőzött sertésekben kialakuló orrkagyló sorvadásban és esetleg a tüdőgyulladás létrejöttében is (Ackermann és mtsai, 1991; Magyar és mtsai, 1988; Roop és mtsai, 1987). Azt itt közölt eredmények egzakt módon megerősítik, hogy a DNT termelése szükséges ezeknek az elváltozásoknak a kialakításához. Orrkagyló sorvadás és tüdőgyulladás csak a DNT termelő szülői törzsekkel fertőzött malacokban alakult ki.

Eredményeink nem zárják ki annak lehetőségét, hogy a DNT mellett egyéb tényezők is hozzájárulhatnak, legalábbis indirekt módon, az említett elváltozások

kialakításához, illetve azt sem, hogy a más állatfajokban jelentkező *B. bronchiseptica* okozta megbetegedések során tapasztalt elváltozások hátterében más tényezők is állhatnak. Bár a DNT– törzsek orrkagyló sorvadást nem produkáltak, és tüdőgyulladást okozó képességük is jelentős mértékben csökkent a sertésben, mégsem voltak teljesen avirulensek. A DNT– törzsekkel fertőzött malacok köhögtek, tüsszögtek és orrgyulladás is megfigyelhető volt. A fertőzés létrejöttéhez minden bizonnyal a megtapadást biztosító, a DNT– törzsekben is jelenlevő adhezinekre van szükség, a továbbra is produkált egyéb toxinok pedig elősegíthetik a baktérium gazdaállatban való fennmaradását. *B. pertussis* baktériummal fertőzött egerekben kimutatták, hogy az adenilát-cikláz hemolizin toxin és pertussis toxin a kolonizáció fokozásán és/vagy a kórokozó eliminálásának megakadályozásán keresztül, indirekt módon hozott létre elváltozásokat a tüdőben (Khelef és mtsai, 1994). Úgy látszik, hogy a DNT nem játszik jelentős szerepet az egér letalitási modellben mért virulenciában, mivel a DNT– *B. bronchiseptica* és *B. pertussis* törzsek ugyanolyan virulensnek bizonyultak, mint a DNT+ törzsek (Gueirard és Guiso, 1993; Magyar, 1990; Weiss és Goodwin, 1989).

A sertés modellben végzett első (B58/B58GP) kísérlet során a *B. bronchiseptica* törzsekkel fertőzött malacokban tapasztalt láz és csökkent testtömeg gyarapodás oka lehetett a törzsek közötti különbség, esetleg egy másik kórokozóval való párhuzamos fertőzöttség is. Az utóbbi ellen szól, hogy más kórokozót nem izoláltunk ezekből az állatokból, de az ilyen jellegű elváltozásokból jellemzően nehéz fertőző mikroorganizmust kitenyészteni. Nem ismert, hogy a *B. bronchiseptica* polyserositist okozna, de a kontroll állatokon nem észleltünk ilyen elváltozásokat. Másrésről viszont ismert, hogy a *B. bronchiseptica* fertőzöttség elősegítheti a *Streptococcus suis* megtelepedését, ami sertésekben okozhat polyserositist (Vecht és mtsai, 1989, 1992).

Érdekes – az egérkísérletben tapasztaltakkal összecsengő – különbséget találtunk az orrüregben kimutatható DNT+ és DNT– *B. bronchiseptica* baktériumok mennyiségében: az adott DNT+ törzs előfordulási aránya mindig meghaladta a párját képező megfelelő DNT– mutáns törzs előfordulási arányát. Következésképpen a DNT termelés pozitívan befolyásolhatja a felső légutak *B. bronchiseptica* általi kolonizációját. Ez valószínűleg nem direkt hatás, hiszen a DNT-nek nincsenek ismert adhezív tulajdonságai, nagyobb a valószínűsége annak, hogy a légzőhám károsodása indirekt módon vezet fokozott kolonizációhoz. Felmerülhet a gondolat, hogy az orrüreg csökkent kolonizációja áll a szülői és mutáns törzsekkel fertőzött csoportok között az atrófia mértékében tapasztalható eltérések hátterében. Ez azonban nem valószínű,

tekintve, hogy a mutáns törzsekkel fertőzött csoportok között a legnagyobb kolonizációt mutató állatok és a szülői törzsekkel fertőzött csoportok leggyéresebb kolonizációt mutató állatainak eredményei egybeestek, és az azonos mértékű kolonizációt mutató állatok esetében is szignifikáns különbség mutatkozott az orrkagyló sorvadás mértékében.

Az orrkagylókban a leggyakrabban tapasztalt elváltozás a gyulladás volt (ami enyhébb formában a DNT– *B. bronchiseptica* törzsekkel fertőzött állatokban is jelen volt), valamint az epithelium elváltozásai és a lamina propria fibrózisa voltak, ami megegyezik a korábban leírtakkal (Duncan és mtsai, 1966b). A *B. bronchiseptica* által okozott jellegzetes elváltozások a tüdőben az itt és korábban leírtak szerint is korai gyulladásos és vascularis elváltozások, amit fibrózis követ (Duncan és mtsai, 1966a). Az elváltozások kialakításának pontos módja egyelőre ismeretlen. Azt már tudjuk, hogy a *B. bronchiseptica* DNT hatást gyakorol a sejt kultúrákra, így például gátolja az alkalikus foszfatáz aktivitást, és csökkenti az I-es típusú kollagén felhalmozódást, amelyek közül mindkettő az osteoblast differenciálódáshoz köthető az MC3T3-E1 osteoblast sejt vonalban. Így a csont őssejtek differenciálódásra való képtelensége csökkent csonttermeléshez vezethet, és – legalábbis részben – magyarázhatja az orrkagyló sorvadás kialakulását (Horiguchi és mtsai, 1991). A DNT serkenti a DNS és fehérje szintézist az MC3T3-E1 sejtekben, de gátolja a sejtosztódást, így polinukleotikus sejtek kialakulását eredményezi (Horiguchi és mtsai, 1993, 1994). A DNT módosítja az Rho családba tartozó G-fehérjéket is, deamináció vagy poliamináció által. Mindkét változás a fehérje aktiválódásához vezet, így egy hibás aktiválású szignáltranszdukciós kaszkád indít be (Horiguchi és mtsai, 1997, Masuda és mtsai, 2000). Még nem ismert, pontosan hogyan vezetnek ezek a folyamatok a kialakuló elváltozásokhoz. A gyulladás és fibrózis a hibás szignáltranszdukciós jel által okozott citokin ürülés eredménye lehet. Érdekes lehet annak vizsgálata is, hogy a citokinek, vazoaktív komponens és/vagy fibrózt kiváltó faktorok termelése fokozódik-e a *B. bronchiseptica* hatására, különös tekintettel a DNT jelenlétére.

5. A torzító orrgyulladásra jellemző elváltozások alakulásának nyomon követése komputertomográfia alkalmazásával

Az irodalmi áttekintésben már említett indirekt megfigyelések alapján az a nézet alakult ki, hogy a *B. bronchiseptica* fertőzés enyhe-közepes fokú orrkagyló elváltozásokat képes előidézni sertésben, amik regenerálódhatnak a vágósúly elérésének idejére (Rutter, 1981; Tornoe és Nielsen, 1976), míg a toxikus *P. multocida* törzseket súlyosabb és visszafordíthatatlan elváltozások kialakítására tartják képesnek (Pedersen és Barfod, 1981; Rutter és Rojas, 1982). Ez a feltételezés vezetett a torzító orrgyulladás progrediáló (progresszív) és nem progrediáló (nem progresszív) formájának megkülönböztetéséhez, attól függően, hogy melyik meghatározó kórokozó található meg a kérdéses állományban (de Jong, 2006). A szakirodalomban azonban nem található részletekbe menő leírása annak, hogyan is alakulnak a betegség különböző formái során a kórfolyamatok a fiatal korban bekövetkezett fertőződéstől a vágási súly eléréséig.

Hagyományosan az orrkagyló sorvadás mértékének vizsgálata a sertés orrán az első/második praemoláris fogak magasságában való keresztbe metszésével történik, ahol egészséges állatban a dorsalis és ventralis orrkagylók a legteljesebb fejlettségüket érik el. A torzító orrgyulladás lefolyásának jobb megismerését célzó korábbi vizsgálatok során nagyszámú kísérleti állatra volt szükség, hogy meghatározott időpontokban feláldozva őket, következtetések levonására alkalmas mennyiségű orrkeresztmetszetet lehessen elbírálni. Ráadásul, ez a megközelítés nem szolgáltatott adatokat a betegségnek az egyes állatokban lezajló egyedi történéseiről, mivel ugyanazon állat vizsgálata csak egyszeri alkalommal volt lehetséges. Ezeket a problémákat hidalja át a korszerű képalkotó eljárások kifejlesztése, ami lehetőséget teremtett különféle betegségek, így a torzító orrgyulladás kórfejlődésének nem invazív módon történő nyomon követésére egy adott állaton belül, annak feláldozása nélkül (Jolie és mtsai, 1990; Shryock és mtsai, 1998).

Az orrkagyló sorvadás *in vivo* tanulmányozására tett korai próbálkozások során röntgenes vizsgálatot (Schöss és Siggel, 1973; Done, 1976; Eikelenboom és mtsai, 1978; Plonait és mtsai, 1980), vagy rhinoszkópiát (Plonait és mtsai, 1980) kíséreltek meg felhasználni. Ezek azonban csak korlátozottan alkalmasak fiatal állatok hosszú távú nyomon követésére vagy enyhe lefolyású megbetegedések vizsgálatára (Schöss, 1983).

Áttörést a komputertomográfia (CT) megjelenése hozott, amely módszer alkalmasnak ígérkezett a sertés orrüreg csontos képleteinek vizsgálatára (Jolie és mtsai, 1990; Shryock és mtsai, 1998).

A fejezetben bemutatott vizsgálataink során először CT segítségével kapott orrkeresztmetszeti felvételeket hasonlítottuk össze a hagyományos értékelési módszerrel, majd a torzító orrgyulladás kórfolyamatát követtük nyomon kísérletesen fertőzött malacokban az állatok orrüregének CT-vel végzett többszöri leképezésének alkalmazásával.

5.1. Anyagok és módszerek

5.1.1. Kísérleti állatok

A CT alkalmazhatóságának vizsgálatához összesen 23 magyar nagyfehér fajtájú sertést használtunk a kísérletben, melyeket egy torzító orrgyulladás elleni vakcina üzemi hatékonysági vizsgálatában szereplő egyedek közül válogattunk ki, az orrkagyló sorvadás különböző fázisait reprezentáló, nem vakcinázott kontroll állatokkal együtt. Az állatokat 27 hetes korukban vetettük alá CT vizsgálatnak, ezt követően túlaltattuk őket és vizuálisan értékeltük az orrüreg makroszkópos elváltozásait.

A kísérletesen indukált torzító orrgyulladás vizsgálata során kísérletenként huszonnyolc, zárt állományból származó újszülött malacot választottunk ki. Az állományban torzító orrgyulladás klinikai tünetei nem fordultak elő, toxikus *P. multocida*t soha nem izoláltak, és a telepen sohasem vakcináztak torzító orrgyulladás ellen. Az állatok toxikus *P. multocida* baktériumtól mentes állapotát a kísérlet kezdete előtt bakteriológiai vizsgálattal igazoltuk. A *B. bronchiseptica* mentesség biztosítása érdekében gyógyszeres kezeléssel kombinált korai választást alkalmaztunk. Az anyaállatokat 1 ml/40 kg tulathromicinnel (Draxxin inj., Pfizer, New York, USA) kezeltük az ellés előtt egy héttel. A malacokat 1-2 napos korukban izolált, fűtött kutricákba helyeztük át. Az állatok Sprayfo tejpótló tápszert (Sloten, Deventer, Hollandia) kaptak 28 napos korukig, melyet Mambo itató (Sloten, Deventer, Hollandia) segítségével adagoltunk a gyártó előírása szerint. A malacokat 28 napos korukban elválasztottuk, és a tejpótló helyett prestarter tápot kaptak, majd 6 és 10 hetes koruk között starter tápra tértünk át, végül a kísérlet befejezéséig hízótápot adagoltunk önetetéből ad libitum. Az ivóvízhez mindvégig szabadon hozzáfértek. Nem részesültek

olyan kezelésben, ami befolyásolta volna a kísérlet kimenetelét, így nem kaptak immunszuppresszív gyógyszereket, vagy légutakban ható antibiotikumokat sem.

5.1.2. Baktérium törzsek

A torzító orrgyulladás klinikai tüneteit mutató állományból izolált KM22 jelű toxikus *B. bronchiseptica* törzset használtuk. Az LFB3 jelű toxikus *P. multocida* törzset Dr. J. M. Rutter (Institute for Animal Health, Compton, UK) bocsátotta rendelkezésünkre. A *B. bronchiseptica* KM22 törzset BG agar táptalajon tenyésztettük, 37°C-on 48 órán át, majd PBS-ben (pH 7.2) 1×10^6 CFU/ml töménységű szuszpenziót készítettünk belőle. A *P. multocida* LFB3 törzset 5% juhvéres agaron tenyésztettük, 37°C-on 24 órán át, majd agy-szív (brain heart infusion broth) levesben (Difco, Detroit, USA) 1×10^8 CFU/ml töménységű szuszpenziót készítettünk belőle. A *P. multocida* LFB3 törzs toxintermelő képességét egy korábban leírt membrán próba segítségével vizsgáltuk (Magyar és Rimler, 1991).

5.1.3. Kísérleti elrendezés

Két kísérletet végeztünk. Mindkét kísérlet során két, egyenként 14 random módon kiválasztott állatot tartalmazó csoportot hoztunk létre. Az első kísérlet 1. csoportjának malacait *B. bronchiseptica*-val, a második kísérlet 1. csoportjának malacait pedig *B. bronchiseptica* és *P. multocida* kombinációval fertőztük. A 2. csoport malacait nem fertőztük (negatív kontroll) egyik kísérletben sem. Mindkét esetben a *B. bronchiseptica* fertőzés volt az adott kísérlet 0. napja (D0).

Az első kísérlet 1. csoportjának malacait 4 napos korukban orrnyílásonként 0,5 ml *B. bronchiseptica* szuszpenzióval fertőztük. A második kísérlet 1. csoportjának malacait 4 napos korukban orrnyílásonként 0,5 ml *B. bronchiseptica* szuszpenzióval, 8 napos korukban pedig hasonló módszerrel *P. multocida* szuszpenzióval inokuláltuk.

Az első kísérlet a malacok 132 napos korában, a második kísérlet pedig a malacok 128 napos korában ért véget. A kísérlet befejezésekor a malacokat túlaltattuk, és a csoportbeosztást nem ismerve, vakon vizsgáltuk az orrkagyló sorvadás, orrsövényferdülés és tüdő elváltozások jelenlétét és mértékét.

5.1.4. Orrvadásék gyűjtése és bakteriológiai vizsgálata

A malacokból minden CT vizsgálat alkalmával orrtampon mintát gyűjtöttünk. A mintákban a *B. bronchiseptica* jelenlétét MacConkey agar táptalajon (BBL, Sparks, USA), a korábban leírtak szerint vizsgáltuk (Magyar és mtsai, 1988). A *P. multocida* toxin jelenlétét a tamponból leoltott vegyes kultúrában egy PMT ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) teszt (Oxoid, Hampshire, UK) segítségével mutattuk ki, a gyártó által javasolt protokoll szerint.

5.1.5. Komputertomográfia

A sertéseket a vizsgálat idejére történő immobilizálásához 4 mg/ttkg azaperon (Stresnil, Janssen Pharmaceutica) intramuscularis beadásával bódítottuk, az anesztéziát pedig 9 mg/ttkg ketamin hidroklorid (SBH-Ketamin inj., SelBruHa) adagolásával biztosítottuk.

Az altatott sertéseket nyújtott testhelyzetben, egy erre a célra kialakított eszközben rögzítettük a vizsgálat idejére. A CT felvételek Somatom Plus 40 (Siemens, Erlangen, Németország) harmadik generációs készülékkel készültek. A felvételkedészítés kezdőpontja az első felső praemoláris fog előtt körülbelül 10 mm-re volt, majd egymást követő 3 mm rétegvastagságú képeket készítettünk az asztal 5 mm-es léptetésével. A képalkotó protokoll úgynevezett „magas” algoritmus volt, ami a sűrű struktúrák tartományában érzékeny. A zoom faktor 3,5 volt.

Az első kísérlet során a CT felvételek minden állatról a 0., 9., 41., 70., 101. és 132. napon készültek, a második kísérletben pedig a 0., 4., 18., 25., 32., 60., 88. és 128. napon. A keresztfertőzés elkerülése érdekében a nem fertőzött malacokat minden esetben a fertőzöttek előtt vizsgáltuk.

5.1.6. Az orrelváltozások pontozása

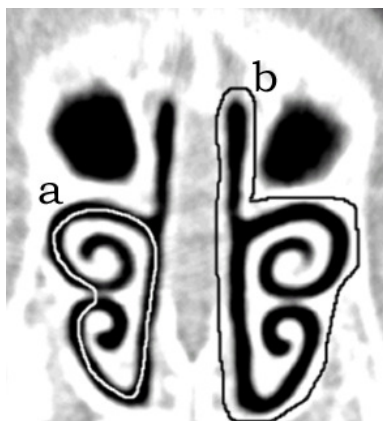
A 4.1.10 pontban leírtak szerint történt.

5.1.7. A CT felvételek értékelése

Az orr elváltozásainak számszerű értékelését az orrüreg struktúráinak vizuális vizsgálata és pontozása mellett a CT felvételek megfelelő régióinak morфомetriás

analízise alapján is elvégeztük. Az orr szerkezetének szabad szemmel történő vizsgálata és pontozása a CT felvételeken is az első praemoláris fog síkjában történt, ugyanazon értékelési skála szerint, mint a post mortem vizsgálatok esetében.

A CT felvételeken látható orrkagyló és orrsövény elváltozások pontozása mellett a szövet-levegő terület arányt is meghatároztunk, ami az orrüregről készített felvételeken látható denzitásbeli különbségek alapján történt. Erre a célra ugyanazt a képet használtuk, aminek alapján a vizuális pontozást is elvégeztük. A szövet-levegő terület meghatározása két lépésben történt. Először az orrüregben található teljes levegő területet (cm^2) határoztuk meg (29. ábra "b" jelű körülhatárolt terület sötét része); a Hounsfield (HU) skálán $-1000 - (-)200$ értéket felvevő területeket tekintettük ilyennek. Ezután a ventralis orrkagyló (HU $200 - 1000$ denzitású szövet terület) kiterjedését (cm^2) mértük meg (29. ábra "a" jelű körülhatárolt terület világos része). A két érték arányát az orrüreg jobb és a bal oldalának esetében is kiszámoltuk, amelynek segítségével végül az adott állatra vonatkozó teljes szövet-levegő terület arányt is meghatároztuk. A területek mérését és az arányok számítását a Kaposvári Egyetem Diagnosztikai és Onkológiai Intézete által fejlesztett számítógépes program segítségével végeztük.



29. ábra: Szövet-levegő arány meghatározása

5.1.8. Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzés során Spearman korrelációt használtunk SPSS 10 felhasználásával.

5.2. Eredmények

5.2.1. Az orrelváltozások vizsgálhatósága CT alkalmazásával

Az orrelváltozások különböző módszerekkel elvégzett értékelésének eredményeit az 6. táblázat foglalja össze. A vizuális vizsgálat során adott orrelváltozás pontértékek változatossága azt jelzi, hogy a kiválasztott sertéspopuláció az orrkagyló elváltozások széles skáláját reprezentálta, a teljesen egészséges orrtól kezdődően az orrkagylók teljes felszívódását képviselő esetekig.

6. táblázat: Orrelváltozás pontértékek és a szövet-levegő terület arányok alakulása 27 hetes malacokban

A sertéseket a kórbonctani vizsgálat során meghatározott orrelváltozás pontok alapján rendeztük sorba, növekvő sorrendet követve.

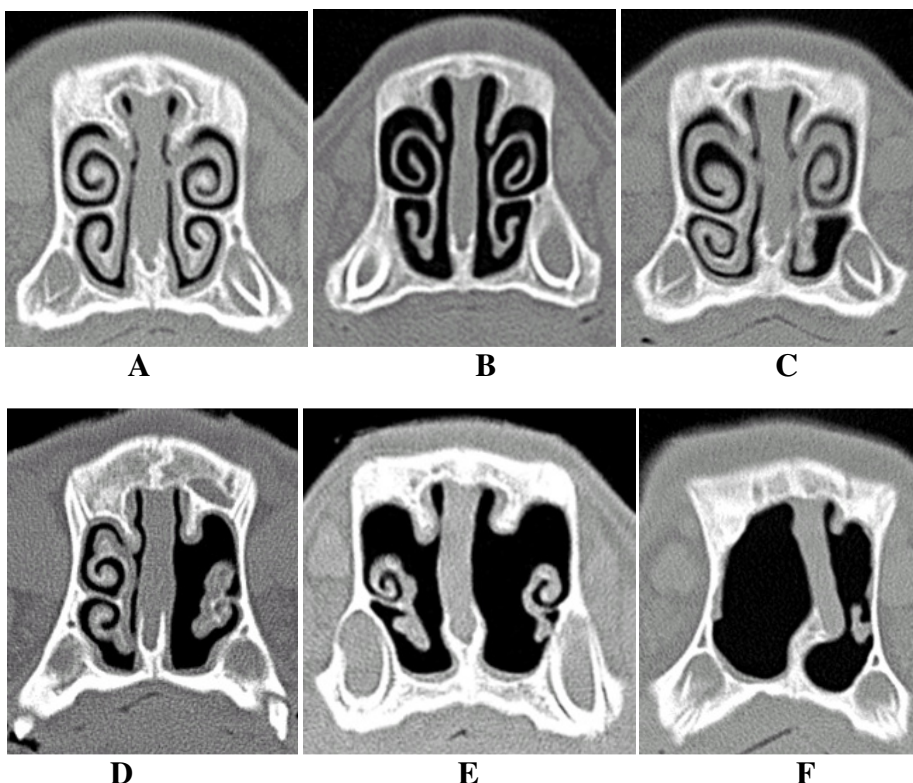
sertés szám	Orrelváltozás pontérték			terület arány
	PM	CT	CT*	
64	0	0	0	0.32
145	0	1	1	0.27
150	0	0	0	0.21
247	0	1	1	0.24
130	1	0	0	0.36
82	3	5	4	0.34
142	3	2	2	0.19
206	3	2	2	0.18
63	4	4	4	0.05
45	5	6	6	0.17
128	5	5	4	0.27
243	5	5	4	0.17
46	6	7	6	0.28
70	7	7	5	0.09
50	8	8	8	0.13
121	8	7	5	0.12
164	12	12	10	0.05
187	15	13	12	0.02
262	17	16	16	0.00
87	18	17	16	0.00
89	18	16	16	0.00
186	18	18	16	0.00
266	18	17	16	0.04

PM = post mortem vizsgálat

CT = komputertomográfia

*Orrsövényferdülés nélküli pontértékek

A 30. ábrán látható CT felvételeken a normál orrszerkezet (30A. ábra) és az orrkagyló sorvadás különböző stádiumai (30B–F. ábra) figyelhetők meg. A képek nagy részletgazdagsággal mutatják meg az arcorri rész anatómiai viszonyait, így nagyon jól megítélhetők az orrüregben és környékén kialakult elváltozások, köztük az orrkagylóknak a betegség következtében létrejött sokszor igen bizarr deformitásai is.



30. ábra: 27 hetes sertések orrának keresztmetszeti CT felvételei az első praemoláris fog magasságában

- A: az orr normál anatómiája (64 sz. sertés),
 B: a ventralis orrkagyló csavarulatainak száma és hossza megtartott, de mind a dorsalis, mind a ventralis orrkagylók szövete elvékonyodott (63 sz. sertés),
 C: a baloldali ventralis orrkagyló dorsalis csavarulatának enyhe atrófiája, a jobboldali ventralis orrkagyló ventralis csavarulatának nagyfokú atrófiája és az orrsövény enyhe elferdülése figyelhető meg (243 sz. sertés),
 D: a baloldali ventralis orrkagyló enyhe atrófiája, a jobboldali ventralis orrkagyló súlyos atrófiája, az orrsövény normális (50 sz. sertés),
 E: mindkét ventralis orrkagyló súlyos fokú atrófiája, a jobboldali ventralis orrkagyló ventralis csavarulata felszívódott, az orrsövény enyhén elferdült (187 sz. sertés),
 F: az orrkagylók teljesen hiányoznak, az orrsövény súlyosan elferdült (186 sz. sertés).

Érdekes esetet mutat be a 30B ábra, amelyen egy olyan sertésorr átmetszete látható, ahol az orrkagylók csavarulatainak száma és hossza megtartott, de mind a dorsalis, mind a ventralis orrkagylók szövete elvékonyodott, a csontos elemek pedig gyakorlatilag eltűntek. Szabad szemmel vizsgálva ez az elváltozás igen enyhének tűnt, és mindössze 4 pontot kapott (6. táblázat). Ugyanezen szempontok alapján (a csavarulatok számát és

hosszát figyelembe véve), a CT felvételek szabad szemmel való elbírálása szintén hasonló eredményre vezetett. Ugyanakkor a vizuális vizsgálat pontjai és a szövet-levegő terület arány között nagy eltérés alakult ki (6. táblázat). A szövet-levegő terület arány alapján ez az állat azok közé az esetek közé sorolható, amelyeknél a legnagyobb mértékű szövetfelszívódás alakult ki.

Kifejezetten szignifikáns összefüggés volt a CT felvételek szabad szemmel való értékelése és a kórboncolás során való megtekintéskor adott pontértékek között ($r = 0,98$, $p < 0,0001$).

5.2.2. Kísérletes fertőzések

5.2.2.1. Klinikai megfigyelés és bakteriológia vizsgálat

Az első kísérletben a csak *B. bronchiseptica*-val fertőzött malacok nem mutattak említésre méltó klinikai tüneteket: csupán sporadikus tüsszögés, enyhe orrfolyás és könnyezés volt megfigyelhető az állatok egy részénél. A második kísérletben a *B. bronchiseptica* fertőzés után hasonló volt a helyzet, a *P. multocida* fertőzés utáni 2. naptól kezdődően azonban kifejezett tüsszögés jelentkezett, amely kb. egy héten keresztül tartott, azután fokozatosan megszűnt.

Három malacot állatjóléti okokból el kellett altatnunk, mivel az első élethetek során erős fogyás és gyengeség jeleit mutatták. Az állapotuk és a fertőzés között azonban nem volt kimutatható kapcsolat.

Az első kísérletben, a *B. bronchiseptica*-val fertőzött állatokból vett orrtampon mintákból a kórokozó a 41. napig volt visszaizolálható, ugyanakkor a malacok PMT negatívak maradtak a teljes megfigyelési időszak alatt. A második kísérletben, a *B. bronchiseptica* – *P. multocida* kombinált fertőzésnek kitett állatok többségéből a *B. bronchisepticát* a 60. napig tudtuk visszaizolálni. A *P. multocidával* fertőzött állatokból vett mintákból a PMT jelenléte nem volt konzisztensen kimutatható (7. táblázat). A kontroll állatokból egyik kísérletben sem izoláltunk *B. bronchisepticát*, és PMT-t sem tudtunk belőlük kimutatni.

5.2.2.2. A CT felvételek értékelése

A nem fertőzött kontroll állatok felvételein patológiás elváltozás nem volt megfigyelhető.

Mindkét fertőzött csoport (első és második kísérlet) egyedeinél az orrstruktúrák regresszív elváltozásait észleltük (8. és 9. táblázat).

7. táblázat: *P. multocida* toxin (PMT) kimutatása a 2. kísérlet 1. csoportjának malacaiból

A malacokat intranasalisan fertőztük, 4 napos korukban (D0) *B. bronchiseptica*-val, majd 8 napos korukban (D4) *P. multocida*-val. A PMT-t PMT ELISA (Oxoid, Hampshire, UK) segítségével mutattuk ki.

Állatszám	Fertőzés utáni nap							
	0	4	18	25	32	60	88	128
4	-	-	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	-	-
9	-	-	+	+	-	-	-	-
12	-	-	-	+	+	-	-	-
13	-	-	-	+	+	-	-	-
16	-	-	-	+	-	+	-	-
19	-	-	+	-	+	-	-	-
21	-	-	+	-	+	+	-	-
22	-	-	+	+	+	-	-	-
25	-	-	-	+	-	+	-	-
27	-	-	-	+	+	-	-	-
29	-	-	+	-	+	-	-	-
30	-	-	-	+	+	-	-	-
32	-	-	+	-	-	-	-	-

8. táblázat: Az 1. kísérlet 1. csoportjának orrelváltozás pontértékei

A malacokat 4 napos korukban (D0) fertőztük *B. bronchiseptica*-val intranasalisan.

Állatszám	Fertőzés utáni nap					
	0	9	41	70	101	132
1	0	8	Elhullott			
2	0	Elhullott				
3	0	Elhullott				
4	0	3	3	2	1	0
5	0	3	3	0	0	0
6	0	1	1	0	0	0
7	0	0	12	5	1	0
9	0	4	11	3	1	0
10	0	3	8	4	3	2
13	0	0	2	1	0	0
16	0	0	0	1	0	0
21	0	6	8	2	1	1
22	0	1	0	0	0	0
24	0	4	6	0	0	0
Átlag	0	2,8	4,9	1,6	0,6	0,3

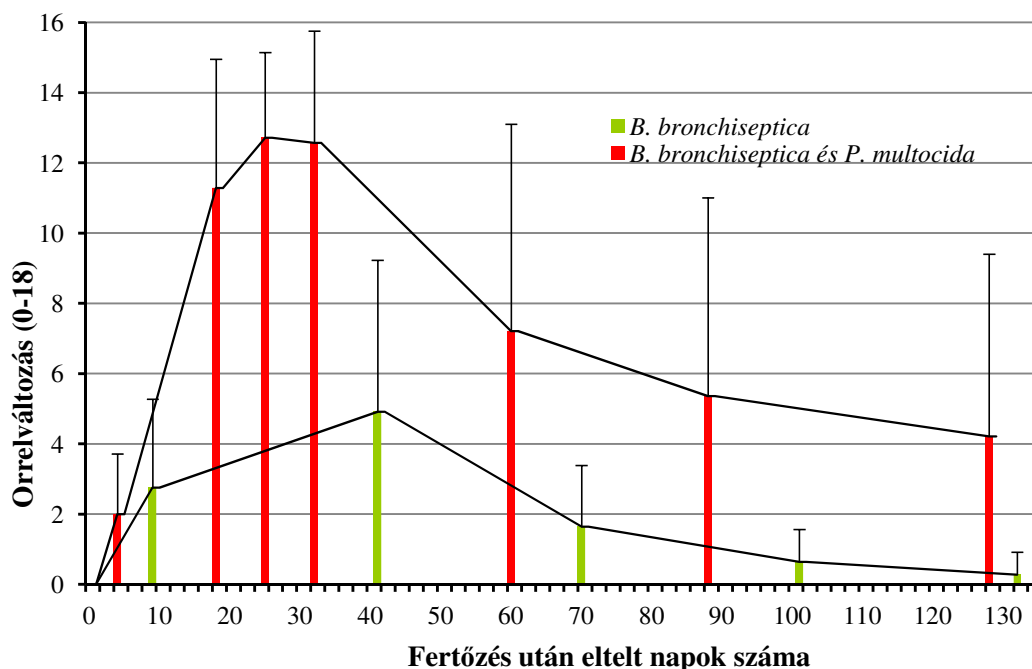
9. táblázat: A 2. kísérlet 1. csoportjának orrelváltozás pontértékei

A malacokat intranasalisan fertőztük, 4 napos korukban (D0) *B. bronchiseptica*val, majd 8 napos korukban (D4) *P. multocida*val.

Állatszám	Fertőzés utáni nap							
	0	4	18	25	32	60	88	128
4	0	2	12	15	15	3	2	0
5	0	3	12	12	10	0	0	1
9	0	0	2	6	6	1	1	0
12	0	0	11	14	13	12	12	7
13	0	0	6	8	7	1	0	0
16	0	1	13	13	14	11	8	9
19	0	1	15	14	14	9	3	3
21	0	2	13	15	15	15	11	11
22	0	3	14	14	16	17	18	16
25	0	3	14	14	16	8	5	9
27	0	4	14	14	14	5	3	4
29	0	5	9	12	12	4	5	3
30	0	4	14	14	14	15	11	6
32	0	0	9	12	10	1	0	0
Átlag	0,0	2,0	11,3	12,6	12,6	7,3	5,6	4,9

A kórfolyamatok alakulása azonban nagy egyedi eltéréseket mutatott. A *B. bronchiseptica*val fertőzött malacokban alacsonyabb pontértékű elváltozások alakultak ki, és ezek az elváltozások nagyobb változatosságot mutattak, mint a *B. bronchiseptica* – *P. multocida* baktériumokkal kombinált módon fertőzött csoportban, ahol egyenletesebb képet kaptunk, és magasabb pontértékű sorvadásos folyamatokat regisztráltunk (31. ábra).

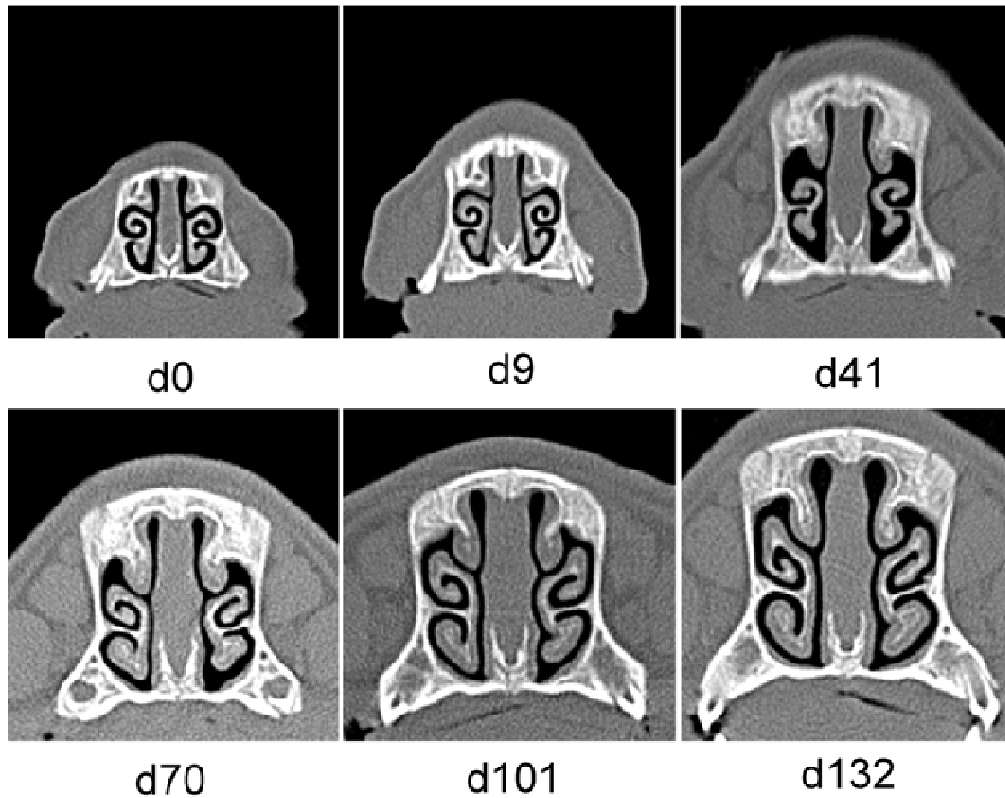
A *B. bronchiseptica*val fertőzött csoportban, a kísérlet 41. napján, a 11 életben maradt malac közül csak négynek volt 8, vagy annál magasabb az összesített orrelváltozás pontszáma. A 41. nap után az elváltozások regenerálódni kezdtek, és a 132. napra, azaz a kísérlet befejezésére gyakorlatilag minden állat elváltozásoktól mentesnek bizonyult. A 32. ábrán a hetes számú malac felvételsorozata látszik, amelyik a csoportban a legsúlyosabb elváltozást produkálta a 41. napon (orrelváltozás pontszám = 12), ugyanakkor teljesen ép orrszerkezetet mutatott a kísérlet befejezésekor.



31. ábra: Az orrelváltozás pontértékek alakulása a fertőzött malacokban

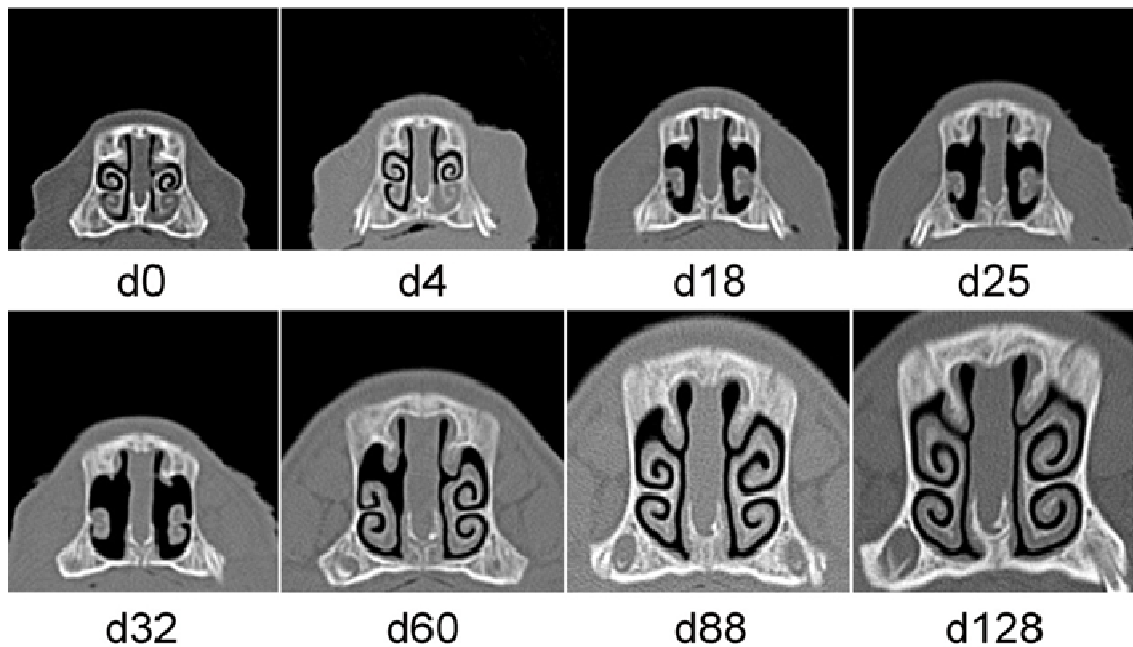
A malacokat *B. bronchiseptica*-val (1. kísérlet, 1. csoport) illetve *B. bronchiseptica*-val és *P. multocida*-val (2. kísérlet, 1. csoport) fertőztük. A diagram az átlagos összesített orrelváltozás pontokat mutatja, amit a megfigyelési időszak alatt nyert komputertomográfias felvételek egyedi pontértékeiből számítottunk ki.

A *B. bronchiseptica* – *P. multocida* baktériumokkal kombinált módon fertőzött csoportban (második kísérlet, 1. csoport) a kísérlet 25. napján a 14 malacból tizenkettőnek volt 12, vagy ennél magasabb összesített orrelváltozás pontszáma, ami az egész csoportban jelentkező gyors lefolyású és súlyos fokú orrkagyló sorvadás kialakulását jelzi. Ugyanakkor meglepő módon a malacok nagy része nem várt gyógyulás jeleit mutatta a 60. naptól kezdődően, és a kísérlet végén (128. nap) a 14-ből 7 állat pontértéke volt 3, vagy annál kisebb. A 33. ábra egy ilyen, a 25. és 32. napon 15 pontot kapott, és utána teljes mértékben regenerálódott orrkagyló sorvadás esetét illusztrálja. A 34. ábrán pedig az egyetlen olyan esetet mutatja be, ahol a súlyos fokú orrkagyló sorvadás és orrsövényferdülés a kísérlet végéig fennmaradt.



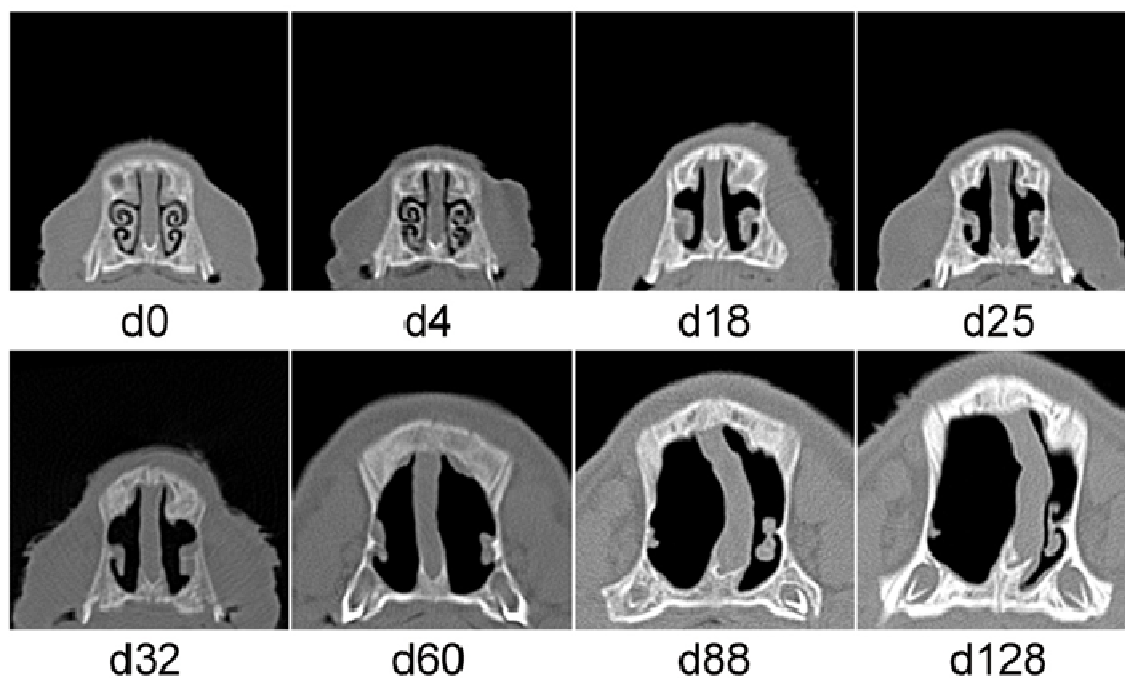
32. ábra. Különböző életkorban készült CT felvételek az 1. kísérletben

A 7 sz. malacot 4 napos korában (D0) fertőztük *B. bronchiseptica*-val. A csoportban ennél a malacnál alakult ki a legsúlyosabb orrkagyló sorvadás (orrelváltozás pontérték: 12), ami a kísérlet 101. napjára teljesen regenerálódott.



33. ábra. Különböző életkorban készült CT felvételek a 2. kísérletben

A 4 sz. malacot 4 napos korában (D0) fertőztük *B. bronchiseptica*-val, majd 8 napos korban (D4) *P. multocida*-val. Az orrkagylók teljes regenerációja volt megfigyelhető annak ellenére, hogy a 18.-tól a 23. napig súlyos fokú orrkagyló sorvadás (orrelváltozás pontérték: 15) volt megfigyelhető.



34. ábra. Különböző életkorban készült CT felvételek a 2. kísérletben
 A 22 sz. malacot 4 napos korában (D0) fertőztük *B. bronchiseptica*-val, majd 8 napos korban (D4) *P. multocida*-val. Kifejezett orrkagyló sorvadás és orrsövényferdülés (orrelváltozás pontérték: 16-18) alakult ki, amely a megfigyelési időszak alatt végig fennmaradt.

5.3. Megvitatás

5.3.1. Az orrelváltozások vizsgálhatósága CT alkalmazásával

Az orrkagyló elváltozások széles skáláját reprezentáló sertéspopuláció véletlenszerűen kiválasztott egyedeinek CT alkalmazásával végzett vizsgálata azt igazolta, hogy ez a képalkotó eljárás kiválóan alkalmazható a torzító orrgyulladás vizsgálatára. Eredményeinket a korábban publikált leírásokkal (Jolie és mtsai, 1990, Shryock és mtsai, 1998) összevetve az is megállapítható, hogy a képek felbontása sokat javult a régebben bemutatottakhoz képest, valószínűleg a CT készülékek folyamatos fejlődésének köszönhetően. A nagyobb felbontás részletekben gazdagabb képet eredményez, ami a torzító orrgyulladás kórfejlődésnek pontosabb megértését teszi lehetővé. Jó példa erre a 30B ábrán bemutatott eset, ahol egy első látásra enyhének ítélt elváltozásról kiderült, hogy a szövet-levegő terület arány alapján a legnagyobb mértékű szövetfelszívódást elszenvedő esetek közé sorolható, ami a szerkezetüket látszólag megtartott orrkagylók csontos elemeinek felszívódásával kísért jelentős mértékű elvékonyodásának köszönhető. Nagyon valószínű, hogy bár az orrkagylók felszíne normális maradt, a szöveti struktúrákban bekövetkező változások hatással vannak az

orrkagylók működésére is. További vizsgálatok szükségesek a szövettani elváltozások részletesebb leírására és az ilyen jellegű elváltozások jelentőségének megértéséhez.

A CT segítségével végzett nem invazív vizsgálatok további előnye, hogy nem szükséges az állatokat feláldozni az értékeléshez, illetve, hogy egy állatot többször is vizsgálhatunk egy hosszabb megfigyelési periódus alatt. Mindez a CT-t a post mortem pontozásnál sokkal jobban használható vizsgálati módszerré teszi.

A CT vizsgálat szabad szemmel való elbírálása és a szövet-levegő terület arány is jó korrelációt mutattak egymással ($r = -0,82$, $p < 0,0001$). A szövet-levegő terület arányt a CT képen mérhető denzitás különbségek adják, és ez a strukturális változások objektív mérését teszi lehetővé a szubjektív pontozással szemben. A módszernek azonban legalább egy komoly hátránya van: az így kapott értéket az orrsövényferdülés nem befolyásolja, mivel az deformálódott pozíciójú orrsövény általában megtartja a térfogatát, azaz a képen ugyanakkora területet foglal el, mint az eredeti helyzetét megtartó egyenes orrsövény. Másrészt viszont a szövet-levegő terület arány alapján az orrkagylók térfogata megbecsülhető az egymást követő felvételeken. Ezt az információt az orrsövényferdüléssel kiegészítve már teljes képet kaphatunk az orrüreg állapotáról, anélkül, hogy az állat post mortem vizsgálatára lenne szükség.

A kísérletes fertőzések során kapott eredményeink alátámasztják több más szerző (Pedersen és Barfod, 1981; Rutter, 1981; Tornoe és Nielsen 1976) feltételezését, amely szerint a *B. bronchiseptica* fertőzés önmagában legfeljebb csak közepesen súlyos orrkagyló sorvadást idéz elő, és ezek az elváltozások idővel teljes mértékben regenerálódhatnak. Az itt leírt elváltozások az állatok 6 hetes életkoráig súlyosbodtak, majd 30 nappal később jelentős javulást észleltünk, amelyet a kísérlet végére bekövetkező teljes gyógyulás követett.

A korábbi *B. bronchiseptica* fertőzési kísérletek ellentmondásos eredményt hoztak az orrkagyló sorvadás mértékét illetően. Az egyik lehetséges magyarázat az lehet, hogy a fertőzésre használt *B. bronchiseptica* törzsek virulenciája közötti különbségek befolyásolták a kísérletek kimenetelét. Azonban Rutter és mtsai (1982) nem tudták igazolni ezt a feltételezést, amikor torzító orrgyulladásától mentes, illetve attól szenvedő állományokból izolált *B. bronchiseptica* törzsek közötti különbségeket vizsgálták. Valószínűbbnek látszik, hogy a kialakuló elváltozások súlyossága nagymértékben függ a kísérleti állatok általános egészségi státuszától. Ugyanazt a *B. bronchiseptica* törzset (B58) használva, császármetszéssel világra hozott és kolosztrum mentesen felnevelt (4.3.2.5.1 fejezet, 5. táblázat), illetve gnotobiotikus malacokban (Magyar és mtsai,

1988) a kísérleti fertőzés közepes mértékű orrkagyló sorvadást eredményezett, míg torzító orrgyulladásától mentes, de konvencionális malacok esetében súlyos elváltozások alakultak ki (6.2.1 fejezet, 13. táblázat). Lehetséges, hogy a konvencionális állatok érzékenyebbek a *B. bronchiseptica* fertőzéssel szemben, esetleg a sertés légzőszervi betegség komplex egy közelebbiről nem meghatározott másik eleme vesz részt a folyamatban, amely elősegítheti a *B. bronchiseptica* fertőzés patológiai hatásainak teljesebb kibontakozását. Az itt bemutatott kísérletben mi is az Alexander és mtsai (1980) által leírt alapelvek alapján előállított magas egészségügyi státuszú állatokat használtunk, ami magyarázattal szolgálhat az alacsonyabb orrelváltozás pontértékek által jelzett kevésbé súlyos elváltozások kialakulására.

Általánosan elfogadott az a nézet, hogy a toxikus *P. multocida* súlyos és visszafordíthatatlan orrkagyló sorvadást idéz elő. Így meglepő eredmény volt, hogy a fertőzött malacokban a teljes csontstruktúra tökéletes regenerációját figyelhettük meg annak ellenére, hogy a *B. bronchisepticával* és toxikus *P. multocidával* fertőzött állatok nagy részénél súlyos fokú orrkagyló sorvadás alakult ki a kísérlet 25. és 32. napjára. A bakteriológiai vizsgálat ugyan nem erősítette meg egyértelműen a nyálkahártya toxikus *P. multocidával* való folyamatos kolonizációját, a jellegzetes elváltozások kialakulása a kombinált fertőzés sikerességét jelzi. Harminc nappal később azonban a 14 fertőzött állatból 9 esetben az elváltozások jelentős mértékű regenerálódása látszott, miközben egy állatban a jellegzetes, súlyos fokú orrkagyló sorvadás és orrsövényferdülés fennmaradt a megfigyelési időszak végéig. Semmilyen egyéb vizsgált paraméter - ideértve a bakteriológiai vizsgálat eredményét is - nem tért el a többi állatban tapasztalttól, ami magyarázhatná, miért maradtak fenn ezek az elváltozások a kísérlet végéig ezen állat esetében.

Az is figyelemreméltó, hogy a legnagyobb mértékű átlagos orrkagyló sorvadás hathetes korban jelentkezett mindkét fertőzött csoportban, ami az Európai Pharmacopoeia (2005) előírásainak megfelelően a vakcina hatékonysági vizsgálatok értékelésénél használatos életkor. Ez azt jelenti, hogy a hatékonysági vizsgálatokat abban az életkorban végzik, mikor az elváltozások a legsúlyosabbak, ami optimális a torzító orrgyulladás elleni vakcinák vizsgálatára. Másrészt viszont kérdéses, milyen lenne a betegség lefolyása ez után az életkor után, és talán érdekesebb lenne további kísérletekben vizsgálni, hogyan hat ez a jelenség a vakcinák védőhatásának értékmérésére.

Jolie és mtsai (1990), akik először alkalmaztak CT vizsgálatot a torzító orrgyulladás diagnosztizálására, egy torzító orrgyulladás klinikai tüneteit mutató kommersz állományból származó, háromhetes korától a vágásig vizsgált malacban írták le az orrüregbeli elváltozások hasonló gyógyulását. Az ebből az állatból származó orrtampon mintákból azonban sem *P. multocida*t sem *B. bronchiseptica*t nem sikerült izolálni, így sem a torzító orrgyulladás pontos kóroktana, sem a torzító orrgyulladás típusa nem volt megállapítható. Így az itt bemutatott kísérlet az első megfelelően dokumentált bizonyítása annak, hogy az orrkagylók még a progrediáló (progresszív) torzító orrgyulladásra jellemző legsúlyosabb esetekben is regenerálódhatnak. Egyben ez azt is jelentheti, hogy a progrediáló (progresszív) torzító orrgyulladás definícióját érdemes lenne átgondolni. Eredményeink ugyanis arra utalnak, hogy egy korábbi *B. bronchiseptica* fertőzés által támogatott masszív PMT termelő *P. multocida* fertőzés sem feltétlenül elégséges a torzító orrgyulladással sújtott sertésállományokban a vágóhídi vizsgálatok során megfigyelt súlyos és visszafordíthatatlan orrkagyló sorvadás kialakulásához. A torzító orrgyulladást, mint a sertés légzőszervi betegség komplexének részét, az összetett okú betegségek közé sorolják, ahol két, régóta ismert patogén (a *B. bronchiseptica* és a toxikus *P. multocida*) működik együtt számos hajlamosító tényezővel, mint pl. további kórokozók, nem megfelelő tartási körülmények és/vagy rossz menedzsment viszonyok jelenléte. További vizsgálatok szükségesek más tényező vagy tényezők felismeréséhez, és annak tisztázására, hogy mi lehet a szerepük a torzító orrgyulladás kórfejlődésében.

A CT vizsgálat jól használható módszernek bizonyult ezekhez a vizsgálatokhoz. A CT készülékek folyamatos fejlődésének eredményeként a képek felbontása fokozatosan javul, ami az egyre gyorsabb képalkotással együtt egyre finomabb részletek vizsgálatát teszi lehetővé. Nagy a jelentősége annak is, hogy a betegség nyomon követhető az állat feláldozása nélkül, így más betegségek longitudinális tanulmányozására is alkalmas, ahogy ezt a tüdőgyulladás korai felismerése és a betegség lefolyásának tanulmányozása esetében is láthattuk (Pósa és mtsai, 2011, 2013).

6. A fertőzési modell, a vakcina-összetétel, a szerológiai profil és a betegség elleni védettség közötti összefüggések felderítése

A vakcinázás széles körben használt módszer a torzító orrgyulladás megelőzésére. A legtöbb vakcina mind *B. bronchiseptica* mind *P. multocida* antigéneket tartalmaz. A vakcinák hatékonyságát fertőzéses állatkísérletekben vizsgálják, melyek során a betegség tüneteit kontrollált körülmények között, mesterségesen idézik elő. A jelenleg érvényes Európai Pharmacopoeia monográfia (2005) szerint a PMT tartalmú vakcinákat (attól függetlenül, hogy tartalmazznak-e vagy sem teljes *P. multocida* sejteket) *P. multocida* fertőzéses állatkísérletben kell vizsgálni. Az olyan vakcinákat amik PMT-t (attól függetlenül, hogy tartalmazznak-e vagy sem teljes *P. multocida* sejteket) és/vagy *B. bronchiseptica* antigéneket tartalmazznak, kombinált *B. bronchiseptica* – *P. multocida* fertőzéses kísérletben kell vizsgálni. Kizárólag *B. bronchiseptica* specifikus fertőzést egyik esetben sem írnak elő, bár a szabályozási irányelvek kombinált vakcinák esetében általában az egyes alkotóelemekre specifikus külön-külön fertőzéses kísérleteket követelnek meg. Ennek az eltérésnek az a magyarázata, hogy a jelenlegi Európai Pharmacopoeia (2005) szabályozás, ami kötelező erejű jogszabály, a *B. bronchisepticát* csak a toxikus *P. multocida* „segítő” tényezőjének tekinti a progresszív torzító orrgyulladás patogenezisében.

Jelentős mértékű orrkagyló sorvadás háromféle módon idézhető elő az ismert kórokozókkal: *B. bronchiseptica* – *P. multocida* kombinált fertőzéssel, ecetsavas előkezeléssel kombinált *P. multocida* fertőzéssel (Pedersen és Elling, 1984), és önmagában *B. bronchiseptica* fertőzéssel. Arról viszont nincs összehasonlító adat a szakirodalomban, hogy a rendelkezésre álló fertőzési modellek közötti különbségek hogyan befolyásolják a torzító orrgyulladás elleni kombinált vakcinák hatékonysági vizsgálatait. Elméletileg lehetséges, hogy például a *B. bronchiseptica* – *P. multocida* kombinált fertőzés túlbecsüli az olyan vakcinák esetén a *P. multocida* elleni védelmet, amikben a *B. bronchiseptica* komponens kiemelkedően jó immunogén tulajdonságokkal rendelkezik. Fordított esetben viszont előfordulhat, hogy az ecetsav – *P. multocida* és *B. bronchiseptica* – *P. multocida* modellek nem megfelelően határozzák meg a *B. bronchiseptica* komponens hozzájárulását a kombinált vakcina védőerejéhez. Annak ellenére, hogy a *B. bronchiseptica* bizonyítottan különálló kórok ebben a betegségben (Giles, 1992), a jelenlegi torzító orrgyulladás elleni vakcinák vizsgálatára vonatkozó szabályozás nem tekinti védőfaktornak a vakcinák

B. bronchiseptica komponensét. Az itt bemutatásra kerülő munkánk információt nyújt a három fertőzési modell összehasonlíthatóságáról, az önálló *B. bronchiseptica* fertőzést is vizsgálva, az eredmények pedig alátámasztják, hogy a torzító orrgyulladás vakcinák minden összetevőjét külön-külön lenne szükséges vizsgálni.

A torzító orrgyulladás elleni hagyományos vakcinák általában mindkét kóroktani mikroorganizmus elölt, teljes sejt kultúráját tartalmazzák, a modernebbeket pedig megerősítik valamilyen PMT preparátummal, mivel a betegség kialakításában játszott fontos szerepe miatt a PMT elleni védettség a vakcina hatékonyságának kritikus követelményévé vált (Foged és mtsai, 1989; Nielsen és mtsai, 1991).

Habár nem teljesen megalapozott, hogy a szerokonverzió és a védettség közvetlenül összefügg egymással, az anti-PMT titer mérése széles körben alkalmazott a torzító orrgyulladás elleni vakcinák értékelésében. Elméletileg két lehetséges mód van a PMT specifikus szerokonverzió javítására: jobb adjuvánst tartalmazó oltóanyag, és/vagy tisztított és detoxifikált PMT hozzáadása a vakcinához. A fejezetben ezeket a lehetőségeket is vizsgáljuk, kiegészítve azzal, hogy a változtatások zavarják-e a vakcinára adott szerológiai választ és hogyan hatnak a torzító orrgyulladás elleni védettség kialakulására.

6.1. Anyagok és módszerek

6.1.1. Kísérleti állatok

A fertőzési modellek összehasonlítását célzó vizsgálatokhoz kísérletenként negyven, zárt állományból származó kocát választottunk ki. Az állományban korábban soha nem figyeltek meg torzító orrgyulladás jelenlétére utaló klinikai tüneteket, soha nem izoláltak toxikus *P. multocida* baktériumot, és soha nem használtak torzító orrgyulladás elleni vakcinát a telepen. Az állomány *P. multocida* fertőzöttségtől mentes státuszát a vizsgálat előtt reprezentatív számú állat bakteriológiai vizsgálatával erősítettük meg. A kocákat a fialás előtt tíz nappal egy elkülönített épületbe telepítettük át, ahol a malacoknak leválasztott fűthető résszel rendelkező egyedi fiaztató ágyon helyeztük el őket. Semmilyen olyan kezelés nem volt engedélyezett, ami a kísérlet kimenetelét befolyásolta volna, mint például immunszuppresszív hatású gyógyszerkészítmények, a légutakra ható antibiotikumok, vagy a kocák egyéb vakcinákkal való kezelése. A kísérletek megfeleltek a hatályos állategészségügyi szabályozásnak.

A szerológiai profil vizsgálatával kapcsolatos kísérletekben összesen 140, hozzávetőlegesen 7 hetes korú választott malac, valamint 18 koca és az utódai vettek részt. Minden malac egyetlen zárt állományból származott. Az állományban a torzító orrgyulladás klinikai tüneteit soha figyelték meg, az ellenőrző vizsgálatok során toxikus *P. multocida*-t soha nem sikerült kimutatni, és az állomány nem részesült torzító orrgyulladás elleni vakcinázásban. A választott malacok csoportjait egymástól elkülönített térben helyeztük el. A kockák 10 nappal a fialást megelőzően egyedi fiasztató kutricákba kerültek, melyekhez a malacok számára egy különálló, fűtött rész tartozott.

6.1.2. Vakcinák

6.1.2.1. A fertőzési modellkísérletekben használt vakcinák

A kísérletekben két, kereskedelmi forgalomban kapható oltóanyagot használtunk fel. Az „A” jelű vakcina sertés eredetű inaktivált toxikus *B. bronchiseptica* és toxikus D típusú *P. multocida* törzset és 2% alumínium-hidroxid adjuvánst tartalmazott. A „B” jelű vakcina sertés eredetű inaktivált toxikus *B. bronchiseptica* törzset, formalinnal inaktivált, D típusú toxikus *P. multocida*-ból származó tisztított PMT-t és olaj-a-vízben emulziós adjuvánst tartalmazott.

6.1.2.2. PMT detoxifikálás

A Cheville és Rimler (1989) által leírt módszer szerint tisztított *P. multocida* toxint Dr. R. B. Rimler (NADC, Ames, Iowa, USA) bocsátotta rendelkezésünkre. A *P. multocida* toxin detoxifikálásához a fagyasztva szárított PMT-t 0,5% pufferelt formalinban oldottuk fel, oly módon, hogy 0,4 µg/µl-es koncentrációt érjünk el. Egy 4 napos, 37°C-on történt inkubációt követően a kezelt PMT oldatot 1:2 arányban hígítottuk 0,5% pufferelt formalinban (fPMT). Így a végkoncentráció 0,2 µg/µl volt. Egy 8 napos, 37°C-on történt inkubációt követően a detoxifikáció ellenőrzését egerek intraperitoneális oltásával (10 µg fPMT PBS-ben, 0,5 ml térfogatban) végeztük el. A detoxifikációt akkor minősítettük sikeresnek, ha egy egér sem pusztult el vagy mutatott kedvezőtlen reakciót. Az fPMT ezután a meghatározott vakcinákban került felhasználásra.

6.1.2.3. *Baktérium szuszpenziók*

A toxikus *B. bronchiseptica* és *P. multocida* (D buroktípusú) törzsek formalinnal inaktivált teljes sejt kultúráit (bakterin) a Boehringer Ingelheim Animal Health, Inc. (St. Joseph, Missouri, USA) biztosította számunkra. A bakterineket a gyártó ajánlása szerint, 0,8 ml/dózis, illetve 1,6 ml/dózis mennyiségben használtuk. A kombinált vakcinákban a két komponenst összekevertük, és az oltóanyag összetételétől függő mértékben koncentráltuk (YM30 membrane, Amicon, Berkeley, USA), hogy az alkalmazott vakcina térfogata ne haladja meg a 2 ml-t.

6.1.2.4. *A szerológiai profil vizsgálatához használt vakcinák összetétele*

Különböző adjuvánsokat tartalmazó vakcinákat készítettünk. Az adjuvánsok összehasonlítása érdekében 2,4 ml bakterin keverék koncentráálásával 1 ml *B. bronchiseptica* – *P. multocida* szuszpenziót (Bb/Pm) állítottunk elő, melyet ásványi olaj alapú adjuvánssal (ISA 206), vagy a következő újabb típusú immunstimuláns egyikével kevertünk össze: Montanide IMS 1113, Montanide IMS 1313, Montanide IMS 2213, Montanide IMS 3013 (SEPPIC; Paris, France). Az alum (alumínium kálium-foszfát) tartalmú vakcina elkészítéséhez 1 ml Bb/Pm szuszpenziót a következő komponensekkel kevertünk össze: 0,2 ml desztillált víz, 0,38 ml fiziológiás konyhasóoldat (Natrium Chloratum 0,9 % inj. Isotonica, Biogal, Debrecen, Hungary), 3 µl 10% EDTA, 16 µl 10 N NaOH, és 0,4 ml 10% alum, oly módon, hogy a végtérfogat 2 ml (pH 6,5) legyen.

Az adjuvánsok, a bakterinek és az fPMT különböző kombinációi által előidézett hatás összehasonlításához három adjuvánst (ISA 206, IMS 1313 vagy IMS 1113) kevertünk össze fPMT-vel, az IMS 1313-at pedig Bb/Pm, Bb/Pm/fPMT vagy Bb/fPMT-vel kombináltuk. Az fPMT dózisa minden esetben 30 µg (0,15 ml térfogatban), az adjuváns térfogata 1 ml, a Bb/Pm szuszpenzió térfogata 0,8 ml koncentrátum, a *B. bronchiseptica* bakterin térfogata pedig 0,8 ml volt, koncentrálás nélkül. A vakcinák 2 ml-es térfogatát fiziológiás konyhasóoldat felhasználásával állítottuk be.

A saját előállítású vakcinák mellett az első pontban már ismertetett két kereskedelmi forgalomban lévő vakcinát (az „A” és „B” jelűeket) használtunk kontrollként.

6.1.3. Baktérium törzsek

A torzító orrgyulladás tüneteit mutató állományokból származó B58 és KM22 jelű I. fázisú (bvg+) toxikus *B. bronchiseptica* törzseket, valamint az LFB3 jelű toxikus *P. multocida* törzset használtuk. A *B. bronchiseptica* törzseket 10% juhvérral kiegészített BG agar táptalajon tenyésztettük, 37°C-on 24 órán keresztül, majd PBS-ben (pH 7,2) szuszpendáltuk 1×10^6 CFU/ml töménységűre. Az *P. multocida* LFB3 törzset 5% juhvérral kiegészített véres agar táptalajon tenyésztettük, 37°C-on 24 órán át, majd agy-szív levesben 1×10^8 CFU/ml töménységű szuszpenziót hoztunk létre. A *P. multocida* LFB3 törzs toxintermelő képességét membrán teszt segítségével vizsgáltuk (Magyar és Rimler, 1991).

6.1.4. Kísérleti elrendezés

6.1.4.1. A fertőzési modellek összehasonlítása

Három kísérletet végeztünk. Mindhárom vizsgálat során 10-10 kocát és azok malacait soroltuk random kiválasztással négy csoportba. Az 1. csoport kocáit az „A” jelű (Bb bakterin + Pm bakterin + alumínium-hidroxid) vakcinával, a 2. csoport kocáit a „B” jelű (Bb bakterin + inaktivált PMT + olaj adjuváns) vakcinával immunizáltuk. A 3. csoportot nem vakcináztuk, de a kocák malacait fertőztük a megfelelő ráfertőző törzzsel vagy törzsekkel (pozitív kontroll), a 4. csoport kocái sem részesültek vakcinázásban, de ebben az esetben a malacokat sem fertőztük (negatív kontroll).

Az 1. és 2. csoportba tartozó kocákat két alkalommal (a várható fialás előtt 6 és 2 héttel) immunizáltuk intramuscularisan, alkalmanként 2 ml oltóanyaggal. A 3. és 4. csoportok egyedei ugyanekkor placebo kezelést kaptak.

Mintapopulációnak minden alomból három-három malacot választottunk ki véletlenszerűen, melyeket a kocavakcinázás hatékonyságának vizsgálatához használtunk, szerológiai paraméterek, a súly és a vágáskori adatok meghatározásával, illetve feljegyzésével.

Az 1-2-3. csoportok összes malacát a következő pontban leírt módon fertőztük. Az 1. kísérlet a malacok 10 hetes korában ért véget, a 2. és 3. kísérlet pedig azok 6 hetes korában. A 2. és 3. kísérlet időtartamát azért rövidítettük le, hogy összehangba hozzuk az European Pharmacopoeia Monográfia sertés progresszív torzító orrgyulladás elleni inaktivált vakcinákra vonatkozó követelményeivel (European Pharmacopoeia, 2005). A kísérlet végén a mintapopuláció állatait túlaltattuk, és vizsgáltuk az orrkagyló sorvadás,

az orrsövényferdülés és a tüdőelváltozások jellegét és kiterjedését. Az értékeléshez a kísérlet folyamán kiesett állatokat azonos alomból származó, véletlenszerűen kiválasztott malacokkal helyettesítettük.

6.1.4.2. A három fertőzési modell

6.1.4.2.1 1. kísérlet: *B. bronchiseptica* – *P. multocida* (Bb/Pm) kombinált fertőzés

Az 1-2-3. csoportok malacait 4 napos korukban orrnyílásonként 0,5 ml *B. bronchiseptica* B58, 8 napos korukban pedig orrnyílásonként 0,5 ml *P. multocida* LFB3 törzsből készített szuszpenzióval fertőztük.

6.1.4.2.2 2. kísérlet: ecetsavas előkezelést követő *P. multocida* (ecetsav/Pm) fertőzés

Az 1-2-3. csoportok malacait 6 és 7 napos korukban orrnyílásonként 0,5 ml 1%-os PBS-ben hígított ecetsavval kezeltük. Az 1-2-3. csoportok malacait 8 napos korukban orrnyílásonként 0,5 ml *P. multocida* LFB3 szuszpenzióval fertőztük.

6.1.4.2.3 3. kísérlet: *B. bronchiseptica* (Bb) fertőzés

Az 1.-3. csoport malacait 4 napos korukban orrnyílásonként 0,5 ml *B. bronchiseptica* B58 szuszpenzióval fertőztük.

6.1.4.3. Szerológiai profil vizsgálatok

A vizsgálat három egymást követő kísérletből épült fel.

6.1.4.3.1 Az adjuvánsok összehasonlító vizsgálata

Az első kísérletben az alumínium kálium-foszfát (alum), egy ásványi olaj (ISA 206) és néhány új típusú immunstimuláns (IMS 1113, IMS 1313, IMS 2213) *B. bronchiseptica*, illetve PMT specifikus ellenanyag termelést serkentő képességét kívántuk összehasonlítani. Ehhez 7 malaccsoportot különböző módon adjuvált *B. bronchiseptica* – *P. multocida* kombinált vakcinával oltottunk kétszer (7 és 11 hetes korban) (10. táblázat).

6.1.4.3.2 A tisztított és inaktivált PMT vizsgálata

A második kísérletben már csak a munka előző fázisában legígéretesebbnek talált 2 kísérleti adjuvánst (IMS 1313 és IMS 1113) vizsgáltuk, hogy kiválasszuk a PMT elleni áthangolódást leginkább biztosító oltóanyag kombinációt. Összehasonlításként az ISA 206 ásványi olaj adjuvánst használtuk. A kísérletben 7 malaccsoport vett részt, melyeket két alkalommal (7 és 11 hetes korban) vakcináztunk (11. táblázat).

10. táblázat: Az adjuvánssok összehasonlító vizsgálatának kísérleti elrendezése

Csoport	n	vakcina	adjuváns
1	10	Bb/Pm bakterin	alum
2	10	Bb/Pm bakterin	ISA 206
3	10	Bb/Pm bakterin	IMS 1113
4	10	Bb/Pm bakterin	IMS 1313
5	10	Bb/Pm bakterin	IMS 2213
6	10	Bb/Pm bakterin	IMS 3013
7	10	placebo	-

11. táblázat: A tisztított és inaktivált PMT (fPMT) vizsgálatának kísérleti elrendezése

Csoport	n	vakcina	adjuváns
1	10	tisztított és inaktivált PMT	ISA 206
2	10	tisztított és inaktivált PMT	IMS 1313
3	10	tisztított és inaktivált PMT	IMS 1113
4	10	Bb/Pm bakterin	IMS 1313
5	10	Bb/Pm/fPMT bakterin - toxoid	IMS 1313
6	10	Bb/fPMT bakterin - toxoid	IMS 1313
7	10	placebo	-

6.1.4.3.3 Mesterséges ráfertőzési kísérlet

A harmadik kísérletben csoportonként 3 (összesen 18) vemhes koca vett részt a malacaival együtt. A kocákat két alkalommal vakcináztuk (6, illetve 2 héttel a várható fialást megelőzően), a 12. táblázatban szereplő elrendezés szerint. A malacokat 4 napos

korukban orrnyílásonként 0,5 ml *B. bronchiseptica* KM22, 8 napos korukban pedig orrnyílásonként 0,5 ml *P. multocida* LFB3 törzsből készített szuszpenzióval fertőztük.

12. táblázat: A vakcinák hatékonysági vizsgálatának kísérleti elrendezése

Csoport	n	vakcina	adjuváns	malacok száma
1	3	tisztított és inaktivált PMT	IMS 1313	26
2	3	Bb/fPMT bakterin - toxoid	IMS 1313	30
3	3	Bb/Pm/fPMT bakterin - toxoid	IMS 1313	27
4	3	„A” vakcina (Bb/Pm)	alum	20
5	3	„B” vakcina (Bb/fPMT)	olaj-a-vízben	27
6	3	placebo	-	29

6.1.5. Értékelés

6.1.5.1. A fertőzési modellek összehasonlítása

A vakcina hatékonyság vizsgálatának fő paramétere az orrelváltozások pontértéke volt, ami az orrkagyló sorvadás és az orrsövényferdülés pontok összegéből állt. Másodlagos paraméterként szerepelt a malacok súlygyarapodása, a mortalitás, a post mortem tüdőelváltozások és a vakcinázást követő szerológiai áthangolódás mértéke.

Vérmintát a kocáktól a kísérlet kezdete előtt, a malac mintapopulációból pedig a fertőzés előtt vettünk.

A szérum *B. bronchiseptica* elleni agglutinációs ellenanyag titerének meghatározására a Pedersen (1975) által leírt cső-agglutinációs próbát használtuk. A vizsgálathoz egy sertésből izolált I. fázisú (bvg+) *B. bronchiseptica* törzset használtunk antigénként. A baktériumot 20% juhvért tartalmazó BG agar táptalajon, 37°C-on 48 órán át inkubáltuk. A tenyészetet PBS-sel mostuk le (pH 7.2), és fotometria segítségével 5×10^9 CFU/ml töménységűre állítottuk be.

A vizsgálathoz használt sertésszérumot 30 percig 56°C-on inaktiváltuk. A szérumból PBS-ben (pH 7,2) kettesalapú hígítási sort készítettünk. Minden hígításhoz azonos mennyiségű standardizált antigént adtunk. Ezt 37°C-on 2 órán át inkubáltuk, majd egy éjszakára szobahőmérsékleten tartottuk. Az 1:10-es hígítás alatti pozitív eredményeket nem-specifikusnak értékeltük. Az agglutináció mértékét a következőképpen fejeztük ki: – nincs agglutinált üledék, + kismértékű üledékképződés, homályos felülúszó, ++ nagymértékű üledékképződés, kissé homályos felülúszó, +++

teljes üledékképződés, tiszta felülúszó. A ++ és +++ eredményeket tekintettük pozitívnak.

Az PMT specifikus ellenanyagok jelenlétét, illetve azok titerét a szérumban egy kereskedelmi forgalomban kapható PMT ELISA (Oxoid, Hampshire, UK) teszttel vizsgáltuk, a gyártó utasításainak megfelelően.

Az orrelváltozások értékelése és a tüdőelváltozások kiterjedésének meghatározása a 4.1.10 pontban leírtak szerint történt.

6.1.5.2. Szerológiai profil vizsgálatok

A szerológiai vizsgálatokhoz minden malactól vért vettünk az első vakcinázást megelőzően, valamint azt követően 2 és 4 héttel, majd a második vakcinázás után 2 héttel. A mesterséges fertőzési kísérletekhez a kocáktól az első vakcinázás előtt, illetve fialáskor, a malacoktól pedig 4 napos korban vettünk vérmintát.

A *B. bronchiseptica* specifikus ellenanyagokat az előző pontban leírt cső-agglutinációs teszt segítségével határoztuk meg, a PMT specifikus ellenanyagok jelenlétét pedig egy PMT ELISA (Oxoid, Hampshire, UK) teszttel vizsgáltuk, az ehhez szükséges kiegészítő reagensek felhasználásával.

A PMT kimutatását orrból és mandulából vett tampon mintákból is megkíséreltük. Az orrtampon mintákat a kísérlet kezdése előtt, illetve 6 hetes korban, a kísérlet befejezésekor vettük a malacokból. A mandula tampon mintákat a kórbonctani vizsgálat során gyűjtöttük. A mintákat 2 mg/ml amikacint, 4 mg/ml vankomicint, és 4 mg/ml amphotericin B-t tartalmazó 5% juhvérrel készített táptalajon tenyésztettük, hogy a *P. multocida* növekedését elősegítsük. A PMT jelenlétét a primer kultúrákban szintén a már említett PMT ELISA alkalmazásával mutattuk ki.

A malacok súlyát a születés után azonnal, majd 3 és 6 hetes korban is lemértük, hogy kiszámíthassuk a megfigyelési időszakra vonatkozó súlygyarapodást.

A malacokat 6 hetes korban humánus módon túlaltattuk, majd megállapítottuk az orrelváltozások pontértékeit és a tüdőelváltozások kiterjedésének százalékos arányát.

6.1.6. Statisztikai módszerek

A szerológiai vizsgálatokból származó adatok normalizálásához a reciproktiter értékek kettesalapú logaritmusát vettük. A logaritmus-transzformált reciproktiteret,

az orrelváltozások pontértékeit és a napi súlygyarapodást varianciaanalízissel elemeztük (PROC GLM). A kísérleti csoportok között a páronkénti összehasonlításhoz a Tukey-féle post hoc tesztet alkalmaztuk. A PMT jelenlétének, vagy hiányának és a mortalitásnak az adatait Chi-négyzet próbával (PROC FREQ) értékeltük. A tüdőelváltozások elemzésére a Wilcoxon tesztet használtuk (PROC NPAR1WAY). Minden esetben a $P < 0.05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak. Összefüggés vizsgálatot Pearson-féle korrelációs koefficiens számításával végeztünk a logaritmikusan transzformált titer értékek és az orrelváltozás pontok között.

A statisztikai elemzéseket a rendelkezésünkre álló legfrissebb verziójú SAS for Windows programcsomag segítségével végeztük el (SAS Institute, 2004).

6.2. Eredmények

6.2.1. A három fertőzési modell összehasonlítása

Mortalitás tekintetében nem volt statisztikailag szignifikáns különbség sem az egyes kísérletek, sem a különböző kísérleti csoportok között, ezért ezt a paraméter nem vizsgáltuk részletesebben.

Az átlagos orrelváltozás pontértékek mindhárom kísérletben magasabbak voltak a nem vakcinázott fertőzött (NF) kontroll csoportokban, mint a vakcinázott csoportokban vagy a nem vakcinázott, nem fertőzött (NN) kontroll csoportban ($p \leq 0,0001$) (13. táblázat). A mindhárom NF kontroll csoportra jellemző magas értékek azt mutatják, hogy mindhárom fertőzési modell képes volt súlyos orrkagyló sorvadást előidézni a kísérleti állatokban az adott kísérleti körülmények között.

Mindkét vakcina megfelelő védelmet nyújtott az orrelváltozások kialakulása ellen, megfigyeltünk azonban néhány különbséget is. Az 1. kísérletben (Bb/Pm modell) nem volt eltérés a két vakcinázott csoport között. Az NN csoport malacai azonban szignifikánsan alacsonyabb pontokat kaptak, mint a vakcinázott csoport malacai ($p < 0,008$), ami azt jelzi, hogy egyik vakcina sem nyújtott teljes védelmet a kísérletben alkalmazott *B. bronchiseptica* – *P. multocida* kombinált fertőzés hatására kialakuló orrkagyló sorvadás ellen.

13. táblázat: A kísérleti malacok átlagos orrelváltozás pontértékei^a

Fertőzési modell	Kísérleti csoportok			
	1. csoport	2. csoport	3. csoport	4. csoport
	A vakcina	B vakcina	NF kontroll	NN kontroll
<i>Bb/Pm</i>	5.67 ^{aA}	6.23 ^{aA}	14.50 ^{bA}	3.97 ^{cA}
<i>AA/Pm</i>	8.13 ^{aB}	5.77 ^{bAB}	14.20 ^{cA}	2.40 ^{dB}
<i>Bb</i>	3.37 ^{aC}	4.60 ^{bB}	13.23 ^{cA}	2.47 ^{aB}

^a A sorokban a különböző kisbetűkkel jelzett értékek szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0.05$); Az oszlopokban a nagybetűkkel jelzett értékek különböznek egymástól ($p < 0.05$). NF, nem vakcinázott, fertőzött; NN, nem vakcinázott, nem fertőzött, AA, ecetsav.

A 2. kísérletben (ecetsav/Pm modell), a „B” jelű vakcina szignifikánsan jobb teljesítményt nyújtott, mint az „A” jelű vakcina ($p < 0,0005$). Az NN csoport malacainak pontértékei azonban ezúttal is szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a vakcinázott csoportoké ($p < 0,0001$), ami ismét az orrkagyló sorvadás elleni tökéletes védelem hiányát jelzi.

A 3. kísérlet során (Bb modell), az „A” jelű vakcinával oltott malacok orrelváltozás pontjai az NN kontroll malacokéhoz hasonlóan alacsonyak voltak. Az „A” jelű vakcinával immunizált malacok pontértékeinek átlaga szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a „B” jelű vakcinával oltottaké ($p < 0,02$). Ez a megfigyelés arra utal, hogy az „A” jelű vakcina kiváló immunizáló képességű *B. bronchiseptica* komponenst tartalmaz, amely képes teljes védelmet nyújtani a *B. bronchiseptica* által okozott torzító orrgyulladás ellen.

A három kísérletet összehasonlítva, mindhárom fertőzési modell hasonlóan súlyos mértékű orrelváltozásokat hozott létre az NF kontroll állatokban. Az „A” jelű vakcina teljesítménye a három kísérlet során hullámzó volt: az ecetsav – *P. multocida* módszer jelentette a legnagyobb kihívást az oltóanyag számára, ezt követte a *B. bronchiseptica* – *P. multocida* kombinált fertőzés, míg a *B. bronchiseptica* fertőzés következményei ellen megfelelő védelmet nyújtott.

A „B” jelű vakcina esetén nem találtunk ilyen különbséget, amikor az ecetsav/Pm ráfertőzési kísérlet eredményeit hasonlítottuk össze a Bb/Pm, illetve a Bb kísérletekben kapott eredményekkel. A *B. bronchiseptica* – *P. multocida* kombinált fertőzés ezzel szemben szignifikánsan súlyosabb elváltozásokat okozott, mint a *B. bronchiseptica* fertőzés az ezzel a vakcinával oltott csoportokban.

Abban az esetben, amikor csak *P. multocidával* fertőztük az állatokat (ecetsav/Pm modell), nem volt a csoportok között különbség az átlagos napi súlygyarapodásban (14. táblázat). Ezzel ellentétben, amennyiben *B. bronchiseptica* fertőzés is történt (Bb/Pm és Bb modellkísérletek), az NF csoportokban szignifikánsan kisebb volt a napi súlygyarapodás, mint a vakcinázott és az NN kontroll csoportokban.

14. táblázat: Átlagos napi súlygyarapodás (g) születéstől 5–6 hetes korig^a

Fertőzőési modell	Kísérleti csoportok			
	1. csoport A vakcina	2. csoport B vakcina	3. csoport NF kontroll	4. csoport NN kontroll
<i>Bb/Pm</i>	200 ^{aA}	219 ^a	162 ^{bA}	215 ^a
<i>AA/Pm</i>	204 ^{AB}	204	191 ^B	209
<i>Bb</i>	222 ^{aB}	220 ^a	167 ^{bA}	223 ^a

^a A sorokban a különböző kisbetűkkel jelzett értékek szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0.05$); Az oszlopokban a nagybetűkkel jelzett értékek szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0.05$). NF, nem vakcinázott, fertőzött; NN, nem vakcinázott, nem fertőzött, AA, ecetsav.

Abban az esetben, amikor nem történt *B. bronchiseptica* fertőzés (ecetsav/Pm modell), nem találtunk elváltozást a tüdőben (15. táblázat). A *B. bronchiseptica* fertőzések után (mind önállóan, mind kombinációban) megfigyelhető volt a tüdő érintettsége. Az elváltozott tüdőterületek átlagos kiterjedése mindkét kísérlet során nagyobb volt az NF csoportban, mint az NN és a vakcinázott csoportokban ($p < 0,02$). Az NF csoportban a tüdőgyulladásra utaló elváltozások gyakoribbak voltak az 1. kísérlet (Bb/Pm modell) során, mint a 3. kísérletben (Bb modell) ($p < 0,005$).

Az első vakcinázás előtt néhány koca *B. bronchiseptica* agglutinációs titere *B. bronchisepticával* nem fertőződött és nem vakcinázott sertésállományokra jellemző módon alacsony volt. A titerek átlagában nem volt különbség a csoportok között egyik kísérletben sem.

Az NF és NN csoportok malacai az anyaállatokhoz hasonlóan alacsony ellenanyag titereket mutattak. A vakcinázott kocák malacainak *B. bronchiseptica* specifikus ellenanyag titerei szignifikánsan magasabbak voltak, ami azt jelzi, hogy a vakcinázott anyák szerológiai áthangolódással reagáltak a vakcinázásra, és az ellenanyagokat utódaiknak is átadták (16. táblázat). Az orrelváltozás pontértékek és a *B. bronchiseptica* ellenanyag titerek között nem volt szignifikáns összefüggés ($p > 0,05$).

15. táblázat: Elváltozást mutató tüdőterületek átlagos kiterjedése (tüdőterület %)^a

Fertőzési modell	Kísérleti csoportok			
	1. csoport	2. csoport	3. csoport	4. csoport
	A vakcina	B vakcina	NF kontroll	NN kontroll
<i>Bb/Pm</i>	0.40 ^a	0.53 ^a	5.8 ^{bA}	0.17 ^a
<i>AA/Pm</i>	0	0	0 ^B	0
<i>Bb</i>	0.15 ^a	0 ^a	1.77 ^{bC}	0 ^a

^a A sorokban a különböző kisbetűkkel jelzett értékek szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0.05$); Az oszlopokban a nagybetűkkel jelzett értékek szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0.05$). NF, nem vakcinázott, fertőzött; NN, nem vakcinázott, nem fertőzött, AA, ecetsav.

16. táblázat: Átlagos reciprok *B. bronchiseptica* agglutinációs titerek 2–8 napos malacokban^a

Fertőzési modell	Kísérleti csoportok			
	1. csoport	2. csoport	3. csoport	4. csoport
	A vakcina	B vakcina	NF kontroll	NN kontroll
<i>Bb/Pm</i>	446 ^{aA}	680 ^{bA}	15 ^{cA}	13 ^{cA}
<i>AA/Pm</i>	576 ^{aB}	690 ^{aA}	17 ^{cA}	18 ^{bB}
<i>Bb</i>	461 ^{aAB}	630 ^{bA}	25 ^{cB}	21 ^{cB}

^a A sorokban a különböző kisbetűkkel jelzett értékek szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0.05$); Az oszlopokban a nagybetűkkel jelzett értékek szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0.05$). A kocákban a vakcinázás előtt nem volt kimutatható PMT elleni ellenanyag. NF, nem vakcinázott, fertőzött; NN, nem vakcinázott, nem fertőzött, AA, ecetsav.

A vakcinázás előtt egyik koca véréből sem tudtunk PMT specifikus ellenanyagokat kimutatni. A nem vakcinázott kontroll csoportok malacai PMT ellenanyag negatívak maradtak a kísérlet teljes időtartama alatt (17. táblázat). Mindkét vakcina képes volt az anyaállatokban PMT specifikus ellenanyagok termelődését kiváltani, melyek passzívan a malacokba is átkerültek az anyatejjel. Említésre méltó azonban, hogy a „B” jelű vakcinával kezelt csoportban körülbelül kétszer annyi malacban volt megtalálható a PMT specifikus ellenanyag, mint az „A” jelű vakcinával oltott csoportban.

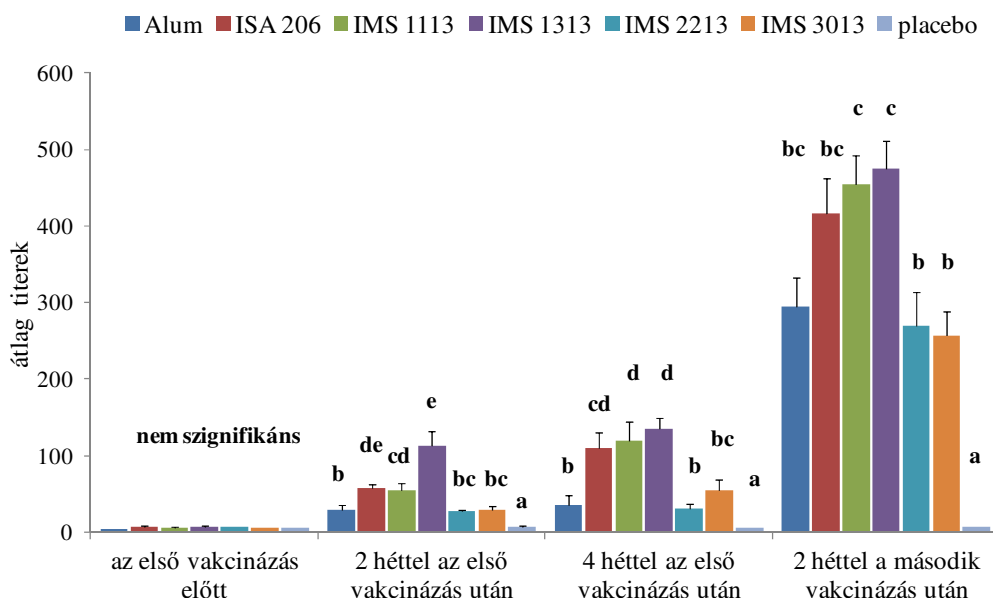
17. táblázat: PMT specifikus ellenanyag kimutatása 2–8 napos malacok szérumból (%)^a

Fertőzőési modell	Kísérleti csoportok			
	1. csoport	2. csoport	3. csoport	4. csoport
	A vakcina	B vakcina	NF kontroll	NN kontroll
<i>Bb/Pm</i>	53 ^{aA}	100 ^{bA}	0 ^{cA}	0 ^{cA}
<i>AA/Pm</i>	37 ^{aA}	87 ^{bB}	0 ^{cA}	0 ^{cA}
<i>Bb</i>	44 ^{aA}	93 ^{bAB}	0 ^{cA}	0 ^{cA}

^a A sorokban a különböző kisbetűkkel jelzett értékek szignifikánsan különböztek egymástól ($p < 0.05$); Az oszlopokban a nagybetűkkel jelzett értékek szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0.05$). NF, nem vakcinázott, fertőzött; NN, nem vakcinázott, nem fertőzött, AA, ecetsav.

6.2.2. A különféle adjuvánsok hatása a *B. bronchiseptica* és a PMT elleni áthangolódásra

Az első kísérletben (adjuvánsok összehasonlító vizsgálata), a vakcinázást megelőzően minden malac negatív volt *B. bronchiseptica* agglutináló ellenanyagokra nézve, és a placebo (fiziológiás sóoldat) kezelést kapott kontroll állatok a megfigyelési időszak végéig mentesek maradtak az ilyen ellenanyagoktól (35. ábra).



35. ábra: A *B. bronchiseptica* agglutinációs titerek alakulása a különböző adjuvánsokat tartalmazó vakcinák alkalmazásakor

A malacokat kétszer immunizáltuk (7, illetve 11 hetes korban) a megfelelő adjuvánsot tartalmazó *Bb/Pm* bakterinnel vagy fiziológiás sóoldattal (placebo). Az értékek az átlagos reciprok agglutinációs titert jelentik. A különböző betűjellel ellátott átlagok szignifikáns eltérést mutatnak ($p < 0.05$). Bb = *Bordetella bronchiseptica*; Pm = *Pasteurella multocida*.

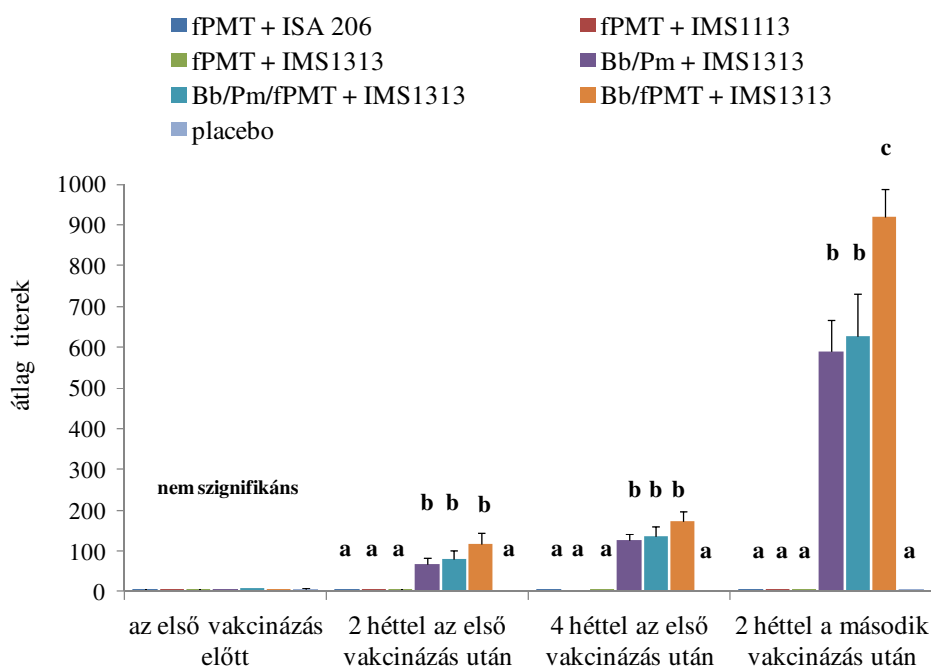
Kettő és négy héttel az első vakcinázást követően, minden oltott malac alacsony *B. bronchiseptica* specifikus ellenanyag titerrel rendelkezett, ami az emlékeztető oltás után jelentősen megemelkedett. Az adjuvánsok teljesítménye között mutatkozó különbségek két héttel a második immunizációt követően váltak láthatóvá. Ebben a kísérletben az IMS 1313 bizonyult a legjobb adjuvánsnak, ezt követte az IMS 1113 és az ISA 206. Az utóbbi két adjuváns összehasonlításakor nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. A vakcinák (adjuvánsok) rangsora a szerokonverzió tekintetében csökkenő sorrendben a következő volt: IMS1313> IMS 1113, ISA 206> alum, IMS 2213, és IMS 3013.

A vakcinázás előtt minden állat negatív volt PMT specifikus ellenanyagra nézve. Az első immunizációt követően egyik állatban sem történt szerokonverzió. A második vakcinációt követően az IMS 2213-mal vagy IMS 3013-mal adjuvált, vagy fiziológiás sóoldattal oltott malacok egyike sem rendelkezett kimutatható PMT specifikus ellenanyaggal. Viszont a fennmaradó 4 csoportban néhány állat szerokonverziót mutatott (IMS 1313: 4/10 pozitív malac / összes malac; IMS 1113: 3/10; ISA 206: 2/10). Mindezek alapján az IMS 1313, az IMS 1113 és az ISA 206 jelű adjuvánsokat választottuk ki a további vizsgálatokhoz.

6.2.3. A kizárólag fPMT-t, illetve *P. multocidával* és/vagy *B. bronchisepticával* kombinált fPMT-t és különböző adjuvánsokat tartalmazó vakcinák összehasonlítása

A második kísérletben (az fPMT komponens hatásának vizsgálata), az immunizációt megelőzően minden állat szeronegatív volt *B. bronchiseptica* specifikus ellenanyagra nézve, a placebo kezelést kapott kontroll csoport pedig a megfigyelési időszak végéig *B. bronchiseptica* specifikus ellenanyagtól mentes maradt (36. ábra). A várakozásnak megfelelően, *B. bronchiseptica* specifikus ellenanyag válasz nem volt kimutatható a monovalens fPMT-vel történt vakcinációt követő időszakban, függetlenül az adjuváns típusától. Azokban a malacokban, melyeket IMS 1313-mal adjuvált Bb/Pm, Bb/Pm/fPMT, vagy Bb/fPMT vakcinával oltottunk, már 2 héttel az első vakcináció után kimutattuk a *B. bronchiseptica* specifikus ellenanyagok jelenlétét. Ezek az ellenanyag titerek 4 héttel az első immunizációt követően kismértékben, majd a második vakcinációt követően drasztikusan megemelkedtek. A legmagasabb *B. bronchiseptica* ellenanyag titert a Bb/fPMT + IMS 1313 kombináció alkalmazása esetében sikerült

elérni, ezt követték a Bb/Pm/fPMT + IMS1313 és a Bb/Pm + IMS 1313 összetételű vakcinák.



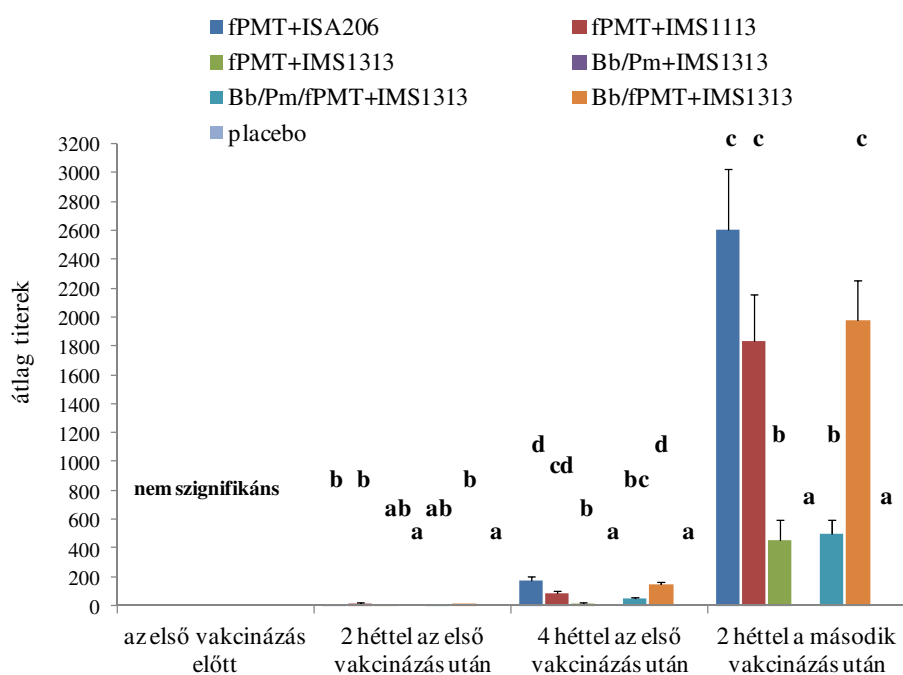
36. ábra: A *B. bronchiseptica* agglutinációs titerek alakulása az fPMT nélküli, illetve fPMT-t különböző adjuvánsokkal tartalmazó vakcinák alkalmazásakor

A malacokat kétszer immunizáltuk (7, illetve 11 hetes korban) a megfelelő vakcina kombinációval vagy fiziológiás sóoldattal (placebo). Az értékek az átlagos reciprok agglutinációs titeret jelentik. A különböző betűjellel ellátott átlagok szignifikáns eltérést mutatnak ($p < 0.05$). Bb = *Bordetella bronchiseptica*; Pm = *Pasteurella multocida*; fPMT = *Pasteurella multocida* toxoid.

Az immunizálást megelőzően egy állat sem mutatott PMT specifikus ellenanyagokat, a placebóval kezelt kontroll malacok pedig a teljes megfigyelési időszak alatt mentesek maradtak az ilyen ellenanyagoktól (37. ábra). A Bb/Pm kombinált oltóanyaggal vakcinázott állatok egyike sem rendelkezett kimutatható PMT specifikus ellenanyagokkal az első immunizációt követően, és az ebben a csoportban lévő 10 malac közül mindössze kettő esetében tapasztaltunk szerokonverziót a második vakcinációt követően. Ezzel szemben, az fPMT-t tartalmazó vakcinák (fPMT, Bb/fPMT, és Bb/Pm/fPMT) már az első vakcinázást követően is szerokonverziót indukáltak minden csoportban, határozott booster hatással a második vakcináció után. A legmagasabb átlagos PMT specifikus titer a kizárólag fPMT-t + ISA 206 adjuvánsot tartalmazó vakcinával oltott állatoknál volt megfigyelhető (1:2601), ezt a Bb/fPMT (1:1973) és a monovalens fPMT (1:1833) követte, mindkettő IMS 1313-mal adjuvált formában. A három kombináció közti titer eltérés nem volt szignifikáns ($p > 0.05$). A

Bb/Pm/fPMT + IMS 1313 vakcina szignifikánsan alacsonyabb ellenanyag titert (1:500) produkált az azonos adjuvánst tartalmazó Bb/fPMT vakcinához képest. Ezáltal úgy tűnik, a vakcina *P. multocida* komponense zavarja az fPMT-re adott szerológiai immunválasz intenzitását. A monovalens fPMT + IMS 1113 vakcina is kevésbé kedvező teljesítményt mutatott, az 1:450 átlagos titer azt jelzi, hogy az IMS 1113 az IMS 1313-nál és az ISA 206-nál kevésbé hatékony adjuváns.

A malacfertőzéses kísérlethez (3. kísérlet) a következő oltóanyag kombinációkat választottuk ki: monovalens fPMT, Bb/fPMT és Bb/Pm/fPMT vakcinák, mindhárom IMS 1313-mal adjuvált formában.



37. ábra: A PMT ELISA titerek alakulása az fPMT nélküli, illetve fPMT-t különböző adjuvánsokkal tartalmazó vakcinák alkalmazásakor

A malacokat kétszer immunizáltuk (7, illetve 11 hetes korban) a megfelelő vakcina kombinációval vagy fiziológiás sóoldattal (placebo). Az értékek az átlagos reciprok agglutinációs titert jelentik. A különböző betűjellel ellátott átlagok szignifikáns eltérést mutattak ($p < 0.05$). Bb = *Bordetella bronchiseptica*; Pm = *Pasteurella multocida*; fPMT = *Pasteurella multocida* toxoid.

6.2.4. A vakcina összetételének hatása a szerológiai profilokra kocákban és malacaikban

A kísérletsorozatnak ebben a részében (3. kísérlet: vakcinázott kocák malacainak mesterséges fertőzése) az IMS 1313-mal adjuvált fPMT-t, Bb/fPMT-t és Bb/Pm/fPMT-t értékeltük, hogy megállapítsuk, melyik kombináció váltja ki a leghatékonyabb immunválaszt a kocákban és eredményez magas ellenanyagszinteket a malacaikban. Ez

alkalommal is a két kereskedelmi forgalomban lévő vakcinát („A” = Bb/Pm és alumínium-hidroxid és „B” = Bb/PMT + olaj adjuváns) használtuk összehasonlítás céljából. Az átlagos *B. bronchiseptica* agglutinációs titer vakcinázás előtt nagyon alacsony volt minden kocában (18. táblázat). Ez jellemző az oltatlan sertés populációkra, melyek alacsony *B. bronchiseptica* fertőzési nyomásnak vannak kitéve. A fialás idejére a kocák jelentős mennyiségű *B. bronchiseptica* elleni ellenanyagot termeltek, a monovalens fPMT-vel oltott és fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoportok kivételével. A legmagasabb titert a Bb/fPMT-vel immunizált kocák mutatták, ezt követte a „B” vakcina, a Bb/Pm/fPMT, és végül az „A” vakcina. Ez a rangsor volt megfigyelhető a 4 napos korú malacok esetében is, jelezve, hogy a különböző csoportokban lévő kocák az anyai ellenanyagszintekkel szoros összefüggést mutató mennyiségű kolosztrális ellenanyagot továbbítottak az utódaikba. A PMT specifikus ellenanyag titert megvizsgálva, a leghatékonyabb vakcina az fPMT-t önmagában (tehát kiegészítő bakterin hozzáadása nélkül) tartalmazta, ezt követte a Bb/fPMT, a Bb/Pm/fPMT, majd a „B” vakcina (19. táblázat). Az „A” vakcinával immunizált állatok – a fiziológiás sóoldatot kapottakhoz hasonlóan – negatívak maradtak PMT specifikus ellenanyagokra nézve.

18. táblázat: Átlagos reciprok *B. bronchiseptica* agglutinációs titer a kocák és malacaik szérumában

	fPMT	Bb/fPMT	Bb/Pm/fPMT	„A” vakcina	„B” vakcina	placebo
Kocák a kísérlet kezdetén	13 (2,7)	16 (7,1)	16 (7,1)	16 (2,7)	10 (2,7)	13 (2,0)
Kocák fialáskor	16 (7,1) ^a	1287 (341) ^c	407 (85) ^{bc}	322 (85) ^b	1024 (0) ^{bc}	26 (5,3) ^a
4 napos korú malacok	9 (1,5) ^a	976 (97) ^c	509 (56) ^b	315 (29) ^b	815 (90) ^c	10 (1,3) ^a

Bb: *Bordetella bronchiseptica*; Pm: *Pasteurella multocida*; fPMT: *Pasteurella multocida* toxoid; zárójelben: standard hiba; ^a minden sorban, az értékek különböző felső indexszel szignifikáns eltérést mutatnak (P < 0,05)

19. táblázat: Átlagos reciprok PMT ELISA titer a kocák és malacok szérumában

	fPMT	Bb/fPMT	Bb/Pm/fPMT	„A” vakcina	„B” vakcina	placebo
Kocák a kísérlet kezdetén	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Kocák fialáskor	519 (269) ^d	197 (15) ^c	94 (42) ^c	0 (0) ^a	17 (8,7) ^b	0 (0) ^a
4 napos korú malacok	609 ^d (229) ^d	309 (44) ^c	284 (13) ^c	0 (0) ^a	23 (7,5) ^b	0 (0) ^a

Bb: *Bordetella bronchiseptica*; Pm: *Pasteurella multocida*; fPMT: *Pasteurella multocida* toxoid; zárójelben: standard hiba; ^a minden sorban, az értékek különböző felső indexszel szignifikáns eltérést mutatnak (P < 0,05)

6.2.5. A vakcina összetételének hatása a torzító orrgyulladás paraméterekre a fertőzött malacokban

A placeboval (fiziológiás sóoldattal) kezelt kontroll csoport rendelkezett a legmagasabb átlagos orrelváltozás pontszámmal, amely a torzító orrgyulladás legtipikusabb jellemzőjének, az orrkagyló sorvadásnak a mértékére utal, és jelzi a kísérletes fertőzés eredményességét (20. táblázat). Minden vakcina biztosított valamilyen mértékű védettséget az orrkagyló sorvadás kifejlődése ellen, viszont a csoportok között jelentős különbségek mutatkoztak ebben a vonatkozásban. Az átlagos orrelváltozás pontszámok összehasonlítása alapján a vakcinák a következő rangsorba kerültek: Bb/Pm/fPMT (3,2), Bb/fPMT (4,5) > „B” vakcina (8,4), fPMT (9,8) > „A” vakcina (12,6) > fiziológiás sóoldattal kezelt (placebo) kontroll (15,3). A vakcina csoportok közötti szignifikáns eltérést a > jellel való elválasztás jelzi (p < 0,05).

20. táblázat: A 6 hetes korú malacok átlagos orrelváltozás pontszáma és súlygyarapodása

	fPMT	Bb/fPMT	Bb/Pm/fPMT	„A” vakcina	„B” vakcina	placebo
Orrelváltozás pontszám	9,8 ^b (0,8)	4,5 ^a (0,5)	3,2 ^a (0,3)	12,6 ^c (1,0)	8,4 ^b (0,8)	15,3 ^d (0,3)
Súlygyarapodás	8,8 ^{ab} (0,2)	9,0 ^{ab} (0,3)	9,9 ^b (0,3)	9,1 ^{ab} (0,4)	9,2 ^{ab} (0,4)	8,3 ^a (0,3)

Bb: *Bordetella bronchiseptica*; Pm: *Pasteurella multocida*; fPMT: *Pasteurella multocida* toxoid; zárójelben: standard hiba; ^a minden sorban, az értékek különböző felső indexszel szignifikáns eltérést mutatnak (P < 0,05)

Az elváltozást mutató tüdőterület átlagos százalékos aránya minden csoportban alacsony volt, 0-2.41%-ig terjedő értékekkel. Az eltérés sehol nem volt szignifikáns ($p = 0,38$).

A 0-tól 6 hetes korig mért súlygyarapodás (3. táblázat) szignifikáns csökkenése a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoport és a Bb/Pm/fPMT-vel vakcinázott csoport között volt megfigyelhető ($p < 0,05$). A többi kísérleti csoport az említett két csoport között helyezkedett el, és szignifikáns eltérés sehol nem volt kimutatható.

Hathetes korban az IMS 1313 adjuvánst tartalmazó Bb/Pm/fPMT összetételű vakcinával immunizált csoportban volt a legalacsonyabb a PMT pozitív malacok aránya (21. táblázat), de még ez a csökkenés sem volt statisztikailag szignifikáns a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporttal való összehasonlításakor. A mandulákból kimutatható PMT-vel rendelkező állatok aránya minden vakcinázott csoportban hasonló volt, mint amit a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoport állatainál találtunk.

21. táblázat: A PMT pozitív malacok százalékos aránya 6 hetes korban

Detektálás	fPMT	Bb/fPMT	Bb/Pm/fPMT	„A” vakcina	„B” vakcina	placebo
Orrtampon	67	76	37*	68	60*	86
Mandula	75	86	70 ⁺	95 ⁺	72	86

Bb: *Bordetella bronchiseptica*; Pm: *Pasteurella multocida*; fPMT: *Pasteurella multocida* toxoid;

* minden sorban, az arány szignifikáns eltérést mutat ($P < 0,05$) a fiziológiás sóoldathoz képest;

+ minden oszlopban, az arányok szignifikáns eltérést mutatnak ($P < 0,05$)

6.3. Megvitatás

Az orrkagyló sorvadás kísérletes reprodukálására alkalmas három fertőzési modellt összehasonlító kísérleteink során arra kerestünk választ, hogy vajon a fertőzés módja befolyásolja-e a kialakuló torzító orrgyulladás klinikai paramétereit és a torzító orrgyulladás elleni vakcinák hatékonyságának mérési eredményeit.

A kórkép kiváltására alkalmas virulens kórokozókkal történő fertőzést követően súlyos orrkagyló sorvadás alakult ki mindhárom fertőzési modellben, így a kizárólag *B. bronchiseptica*-val fertőzött kísérleti állatokban is. Ez arra utal, hogy bizonyos körülmények között a *B. bronchiseptica* fertőzés önmagában is képes a torzító orrgyulladás progresszív (progresszív) formájára jellemző súlyos orrkagyló sorvadás előidézésére, ami eléggé meglepő eredmény, tekintve, hogy ezt a légzőszervi kórokozót általában csak enyhe-közepes orrkagyló sorvadással hozzák összefüggésbe (Rutter és

Rojas, 1982; Pedersen és Barfod, 1982). Eredményeinkre magyarázattal szolgálhat az egyes szerzők által leírt, a *B. bronchiseptica* virulenciájában, illetve toxintermelő képességében mutató változékonyság (Collings, 1983; Miniats és Johnson, 1980; Skelly és mtsai, 1980). Másrésről, ezt a lehetőséget Rutter és mtsai (1982) nem tudták megerősíteni, amikor torzító orrgyulladásban szenvedő, illetve attól mentes állományokból származó *B. bronchiseptica* törzsek virulenciáját hasonlították össze sertésben. Mindent összevetve, nagyobb a valószínűsége annak, ahogy azt korábban már említettük, hogy a különböző kísérletekben felhasznált állatok egészségügyi státuszában mutató különbségek lehetnek a megfigyelés hátterében.

Az itt bemutatott kísérletben hathetes malacokban állapítottuk meg a *B. bronchiseptica* által létrehozott orrkagyló sorvadás mértékét, amely életkorban – a CT-vel nyomon követett, a betegség kórfejlődését vizsgáló tanulmányaink szerint – az elváltozások a maximális kifejlődésüket érik el. Az orrkagyló sorvadás általunk tapasztalt súlyossága azonban mindenképpen felveti a *B. bronchiseptica* kórfejlődésben játszott szerepének a jelenleg elfogadott nézetekhez képest nagyobb jelentőségét, bár a nevelés során az elváltozások regenerálódásra való képességére utaló korábbi leírásokat (Rutter, 1981) az előző fejezetben leírt saját megfigyeléseink is megerősítik. Másrésről eredményeink arra utalnak, hogy lehetnek olyan, jelenleg még kevésbé ismert körülmények, amelyek hatására a *B. bronchiseptica* monoinfekció is súlyos következményekkel járhat.

Talán az adjuváns jellegének köszönhetően, de a „B” jelű (Bb bakterin + inaktivált PMT + olaj adjuváns) vakcina kifejezettebb *B. bronchiseptica* elleni áthangolódást eredményezett, mint az „A” jelű (Bb + Pm bakterin + alumínium-hidroxid) vakcina. Ez a különbség azonban nem mutatkozott meg a betegség klinikopatológiai képe tekintetében: a *B. bronchiseptica*-val önmagában történt fertőzés (Bb modell) után az „A” vakcinával kezelt csoportban az orrelváltozások pontértéke hasonlóan alakult, mint a nem vakcinázott – nem fertőzött (NN) kontrollokban, azaz a vakcina teljes védelmet nyújtott az orrkagyló sorvadás kialakulásával szemben. A „B” vakcinával oltott kocák malacai viszont kevésbé kedvező eredményt produkáltak. Ez arra utal, hogy az agglutinációs próbában kimutatható *B. bronchiseptica* specifikus ellenanyagok jelenléte jó indikátora lehet ugyan az immunválasz minőségének, de ezek a titerek és a fertőzéssel szembeni védelem mértéke nem feltétlenül korrelál egymással. Az „A” vakcina *B. bronchiseptica*-val szemben nyújtott teljes védelme azt jelzi, hogy a vakcina

egy kiváló minőségű *B. bronchiseptica* komponenssel rendelkezik, amelyre ebben az esetben feltétlenül szükség van a megfelelő immunvédelem kialakításához.

A *P. multocida* – *B. bronchiseptica* kombinált fertőzés (Bb/Pm modell) alkalmazásakor az „A” és „B” vakcina hasonló teljesítményt nyújtott a tesztben. Azonban, amikor a malacokat ecetsavas előkezelés után fertőztük *P. multocidával* (ecetsav/Pm modell), a „B” vakcina teljesítménye szignifikánsan jobb volt, mint az „A” vakcináé. Ez az eredmény várható volt, mivel a „B” vakcina tisztított és inaktivált PMT komponensének köszönhetően, magas PMT specifikus ellenanyag titereket képes indukálni. Az már inkább meglepő volt, hogy az „A” vakcina – bár alacsony áthangolódási arányokat produkált – mégis megfelelő védelmet nyújtott a fertőzés következményei ellen. Ez arra utal, összhangban más szerzők (Coyle és mtsai, 1994) véleményével, hogy a PMT-n kívül a toxikus *P. multocida* egyéb antigénjei is hatékonyak lehetnek a protektív immunválasz kiváltásában. Következésképpen úgy tűnik, hogy egy torzító orrgyulladás elleni vakcina hatékonysága nem feltétlenül függ a PMT ellenanyag termelődést kiváltó képességétől. Ugyanakkor, egyik vakcina sem tudott teljes védelmet nyújtani a *P. multocida* fertőzés következményei ellen. A Bb/Pm, illetve az ecetsav/Pm kísérletekben a vakcinázott és fertőzött malacok orrelváltozás pontjai szignifikánsan magasabbak voltak, mint a kezeletlen kontroll állatoké.

Az ecetsav/Pm fertőzési modellben nem alakultak ki elváltozások a tüdőben. Ez nem annyira meglepő, hiszen *P. multocidával* önmagában nehéz sikeres fertőzést előidézni (Pijoan, 1992), ráadásul a D buroktípusú törzsek, amelyent a kísérletben is használtunk, ritkábban idéznek elő tüdőgyulladást, mint az A buroktípusú *P. multocida* törzsek (Iwamatsu és Sawada, 1988). Továbbá az is joggal feltételezhető, hogy ellentétben az orrüreg kolonizációjával (Pedersen és Elling, 1984), az ecetsavas előkezelés nem növeli a tüdő *P. multocida* fertőzöttséggel szembeni érzékenységét. A *B. bronchisepticával* és a *P. multocida* – *B. bronchiseptica* kettőssel fertőzött sertésekben megfigyelhetőek voltak tüdőelváltozások, bár ezek gyakorisága még a nem vakcinázott – fertőzött (NF) kontroll csoportban sem volt jelentősnek mondható. Az mindenesetre megállapítható, hogy a kombinált *P. multocida* – *B. bronchiseptica* fertőzés idézte elő a legtöbb tüdőelváltozást, ami arra utal, hogy a két kórokozó között a tüdőben is létezhet egy, az orrüreg esetében már kellőképpen igazolt együttműködés (Chanter és mtsai, 1989). Mindkét vakcina csökkentette a *B. bronchiseptica* vagy *P. multocida* – *B. bronchiseptica* fertőzéssel összefüggő tüdőgyulladás előfordulásának gyakoriságát és súlyosságát az NF kontroll csoporthoz képest. Eredményeink alapján

feltételezhető, hogy a vakcina hatékonyságának ez az aspektusa legjobban a *P. multocida* – *B. bronchiseptica* fertőzési modellben vizsgálható.

A torzító orrgyulladás hatása a súlygyarapodásra még mindig vita tárgyát képezi (Bäckström és mtsai, 1985; Donkó és mtsai, 2005; Rutter és mtsai, 1984; Scheidt és mtsai, 1992; Straw és mtsai, 1984). Egyes szerzők a csökkent súlygyarapodást kombinált *B. bronchiseptica* – toxikus *P. multocida* fertőzésnek tulajdonítják (Foged és mtsai, 1989). Mások szerint a csökkent növekedési rátáért a toxikus *P. multocida* a felelős, mivel azt figyelték meg, hogy sem a *B. bronchiseptica*, sem a nem toxikus *P. multocida* nem befolyásolja a súlygyarapodást (Pedersen és Barfod, 1981, 1982). Ezzel a nézettel értenek egyet van Diemen és mtsai (1994) is, akik azt tapasztalták, hogy a súlygyarapodás ütemének csökkenése az ecetsav/PMT fertőzés során kialakuló orrkagyló elváltozások súlyosságával függött össze. Ezzel szemben, a mi vizsgálatainkban csak azokban a nem vakcinázott – fertőzött kontroll csoportokban csökkent a súlygyarapodás, melyeket *B. bronchiseptica*-val fertőztünk, akár önmagában, akár *P. multocida*-val kombinált formában. A vakcinázott csoportokban a súlygyarapodás mértéke megegyezett a kezeletlen (negatív) kontroll csoportok állataival, vagyis az állatok teljes védelmet élveztek a fertőzésnek az állatok fejlődésére gyakorolt negatív következményeivel szemben. Úgy tűnik, hogy a torzító orrgyulladás és a súlygyarapodás összefüggésének kérdése még napirenden marad egy darabig.

Mindhárom vizsgálati modell alkalmas a vakcinák által kialakított immunvédelem vizsgálatára, de az egyes modellek a vakcinák adottságait nem egyforma módon képesek értékelni. Az „A” és „B” jelű vakcinák különböző szintű védelmet nyújtottak a *B. bronchiseptica* és az ecetsav/*P. multocida* fertőzésekkel szemben, *P. multocida* – *B. bronchiseptica* kombinált fertőzés (Bb/Pm modell) alkalmazásakor viszont egyformán teljesítettek. A *B. bronchiseptica* fertőzöttség hajlamosítja az állatokat a *P. multocida* fertőződésre, így a jó *B. bronchiseptica* komponenssel rendelkező bivalens Bb–Pm vakcinák teljesítményét a kombinált *P. multocida* – *B. bronchiseptica* fertőzés túlértékelheti a két különböző, az egyes kórokozókra specifikus fertőzéshez képest. Hasonló módon, a jó *P. multocida* komponens valódi értékét legjobban egy ecetsav/*P. multocida* fertőzési modell alkalmazása mutatja meg.

Az European Pharmacopoeia (2005) monográfia előírásainak való megfelelés érdekében a *B. bronchiseptica* és *P. multocida* vakcinákat (függetlenül attól, hogy PMT-t tartalmaznak-e vagy sem) *P. multocida* – *B. bronchiseptica* és ecetsav –

P. multocida fertőzőses modellben is vizsgálni kell. Eredményeink azt mutatják, hogy a kombinált vakcinák hatékonyságát, azon belül is a *B. bronchiseptica* komponens hatékonyságát ez a módszer nem jellemzi kielégítően. Mindebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a vakcina komponensek legjobb vizsgáló módszere az alkotóelemenkénti specifikus vizsgálatok külön-külön elvégzése. Ugyanakkor, a *P. multocida* – *B. bronchiseptica* fertőzőési modellnek mindenképpen szerepe kell, hogy legyen a kombinált torzító orrgyulladás vakcinák védőképességének gyakorlati jellegű kipróbálásában, mivel ez modellezi legpontosabban a természetes körülmények között kialakuló fertőzést, és leginkább az engedélyezés végső fázisában végzett vizsgálatokhoz javasolható.

A különböző, kereskedelmi forgalomban lévő adjuvánsokat összehasonlító kísérleteinkből kiderült, hogy a hagyományos vakcinák továbbfejleszthetők: a torzító orrgyulladás szempontjából fontos specifikus ellenanyagok szintje (az áthangolódás mértéke) növelhető, amennyiben az alumínium tartalmú komponens helyett ásványi olaj adjuvánsot vagy valamilyen új típusú immunstimulánsot használunk. Ebből a szempontból a Montanide IMS 1313 különösen sikeresnek bizonyult. Korábban Kabay és mtsai (1992) alumínium alapú adjuváns helyett inkomplett Freund adjuvánsot alkalmaztak egy torzító orrgyulladás elleni vakcinában, és magasabb növekedési rátáról, valamint a betegség egyéb jeleivel szembeni jobb védettségről számoltak be. Mindemellett, a Freund adjuváns gyakran okoz kellemetlen gyulladást a befecskendezés helyén. Az itt vizsgált adjuvánsok esetében hasonló nemkívánatos mellékhatás nem volt tapasztalható.

A kísérletben használt vakcinák hatékonyságának további fokozása volt elérhető az aktív komponensek változtatásával. Összességében elmondható, hogy ezek a módosítások nem befolyásolták a vakcinák ártalmatlanságát, semmilyen kedvezőtlen mellékhatást nem észleltünk az alkalmazásuk során.

Már a fertőzőési modelleket összehasonlító kísérletünkben azt tapasztaltuk, hogy a *B. bronchiseptica* specifikus ellenanyag titer 1,5-ször magasabb volt, ha a vakcina olaj-a-vízben emulzióval adjuvánsolt tisztított és detoxifikált PMT-t tartalmazott („A” jelű vakcina), szemben az alumínium-hidroxiddal adjuvánsolt és a detoxifikált PMT helyett teljes sejt *P. multocida* komponenset tartalmazó vakcinával („B” jelű vakcina). A célzottan a szerológiai profilokat vizsgáló kísérletünkben a vakcinázott malacok szintén fokozott *B. bronchiseptica* specifikus ellenanyagválaszt mutattak, amikor a *B. bronchiseptica* antigént fPMT-vel kombináltuk, és a vakcinát egy új immunstimulánsal, a Montanide IMS 1313-mal adjuvánsoltuk. Nagyon valószínű, hogy a

jelenségért mindkét esetben leginkább a hatékonyabb adjuváns a felelős. Másrészt, csökkent *B. bronchiseptica* elleni ellenanyag titert diagnosztizáltunk, amikor az oltóanyag *P. multocida* teljes sejt komponenset tartalmazott, függetlenül attól, hogy az fPMT jelen volt vagy sem a vakcinában. Ez viszont azt sugalmazza, hogy a teljes sejt formában hozzáadott *P. multocida* komponens zavarhatja a *B. bronchiseptica* alkotóelem elleni szerokonverziót, és a vakcinából való kihagyása hozzájárulhat a *B. bronchiseptica* elleni tökéletesebb áthangolódás eléréséhez.

Megfelelő szintű PMT specifikus ellenanyagválasz csak az fPMT-t tartalmazó vakcinákkal immunizált állatok esetében volt megfigyelhető. Úgy tűnik, hogy a *P. multocida* citoplazmájában elhelyezkedő PMT (iDali és mtsai, 1991) a sejt spontán szétesése során szabadul ki a leves-tenyészet felülúszójába (Kamp és mtsai, 1987; Foged és mtsai, 1987). Bizonyos mennyiségű fPMT így nyilvánvalóan jelen van a toxikus *P. multocida* törzsek formalinnal inaktivált teljes sejt kultúrájában is. A munkánk során a *B. bronchiseptica* – *P. multocida* (Bb/Pm) kombinációval vakcinázott csoportokban alkalmazott *P. multocida* bakterin természetes fPMT tartalma viszont a legtöbb állatban elégtelennek bizonyult a PMT ellenanyagok kimutatható szintjének kialakításához.

Az szintén érdekes kérdés, hogy a vakcinához adott teljes sejt *P. multocida* komponens zavarja-e a PMT elleni szerokonverziót, vagy sem. A *P. multocida* bakterint és fPMT-t együtt tartalmazó vakcinával immunizált állatok termeltek ugyan PMT specifikus ellenanyagokat, de a *P. multocida* komponens elhagyva az ellenanyag titer 4-5-ször magasabb volt, mint a *P. multocida* bakterint is tartalmazó oltóanyaggal immunizált állatok esetében. Ez a megfigyelés azt feltételezi, hogy az egész sejt *P. multocida* komponens negatív hatást gyakorolt az fPMT-re adott immunválaszra. A legmagasabb anti-PMT ellenanyag titerek a monovalens fPMT vakcinák alkalmazása esetében voltak kimutathatóak.

A kocák és malacok szerológiai profilját és a különböző vakcina összetételekre adott választ vizsgáló kísérleteink azt mutatták, hogy a kocák sikeresen továbbították az általuk termelt ellenanyagokat az utódokba. A *B. bronchiseptica* és PMT titer értékek azt jelezték, hogy a kocák a Bb/fPMT/IMS 1313 kombinációra és a „B” vakcinára reagáltak a legintenzívebben, és ennek megfelelően az utódok esetében is itt találtuk a legmagasabb ellenanyag titereket. Ez egybeesik azzal a megállapítással, hogy a növendék malacokban a *P. multocida* zavarja a magasabb *B. bronchiseptica* és a PMT specifikus ellenanyag titerek kialakulását. Mindezek alapján kimondható, hogy a

hagyományos vakcinák torzító orrgyulladás specifikus ellenanyag titereket indukáló kapacitása nagyban növelhető, ha a *P. multocida* bakterint detoxifikált fPMT-re cseréljük.

A kérdést, hogy a bizonyos vakcina komponensekre adott válaszként megemelkedett ellenanyag titer vajon jobb védettséget biztosít-e a torzító orrgyulladás ellen, vakcinázott kocáktól származó, *B. bronchiseptica* – *P. multocida* kombinált fertőzésnek kitett malacokon tanulmányoztuk. Az orrelváltozás pontszámok kedvezőbbek (alacsonyabbak) voltak az fPMT-t is tartalmazó vakcinával immunizált malacoknál, mint ezt a komponenst nem tartalmazó vakcinák alkalmazása esetében. A monovalens fPMT vakcina viszont nem biztosított elegendő védettséget az orrelváltozások kialakulása ellen, jelezve, hogy – legalábbis a jelen kísérlet körülményei között – a *B. bronchiseptica* fertőzés jelentős szerepet játszott a betegégre jellemző elváltozások kialakításában.

A legalacsonyabb orrelváltozás pontszámokat a Bb/fPMT és Bb/Pm/fPMT kombinált vakcinák esetében tapasztaltuk, ami arra utal, hogy a *B. bronchiseptica* és az fPMT a protektivitás szempontjából egyaránt fontos oltóanyag összetevők. Ez összhangban van azokkal a korábbi (és időnként megkérdőjelezett) megfigyelésekkel is, melyek szerint a *P. multocida* mellett a *B. bronchiseptica* is jelentős szerepet játszik a torzító orrgyulladás kialakításában (Chanter és mtsai, 1989; Pedersen és Barfod, 1981; Rutter és Rojas, 1982). Habár az orrelváltozás pontszámok a Bb/fPMT vagy Bb/Pm/fPMT vakcinákkal immunizált csoportokban nem mutattak szignifikáns eltérést, a Bb/Pm/fPMT esetében az átlagos pontszám alacsonyabb volt (3,2, szemben a 4,5-tel). Ez viszont azt jelzi, hogy mindhárom komponens kombinációja jobb klinikai védelmet nyújt a torzító orrgyulladás ellen, mint amikor az egész sejt *P. multocida* alkotó elemet kihagyjuk belőle. Ez pedig azt sugallja, hogy a PMT mellett más *P. multocida* antigéneknek is szerepe lehet a torzító orrgyulladás elleni hatékonyabb védettség kialakításában.

Függetlenül attól, hogy a kísérleti állatok milyen immunválaszt produkáltak a vakcinázásra, a PMT a fertőzött malacok orr- és mandula tampon mintáiból 37-95%-ban volt kimutatható a kísérlet végén. Ez az arány ötször (orrtampon), illetve háromszor (mandulák) magasabb volt ahhoz képest, melyet egy Bb/Pm/fPMT kombinációt és olaj-a-vízben adjuvánst tartalmazó vakcinával oltott kocák malacaival kaptak Hollandiában (Voets és mtsai, 1992). Ezt az eltérést magyarázhatja a bakteriális vakcina komponensek, az adjuváns vagy a fertőzéshez használt törzsek közötti különbség is. Azt

azonban mindkét kísérlet bizonyítja, hogy - függetlenül az inaktivált PMT komponens jelenlététől – egyik vakcina sem képes a szokásosan alkalmazott ráfertőzési modellben a toxikus *P. multocida* teljes eradikációjára.

A nem vakcinázott, de fertőzött állatok az oltottakhoz képest alacsonyabb súlygyarapodást mutattak. Ez alátámasztja azt a nézetet, mely szerint a torzító orrgyulladás növekedési retardációhoz vezethet (Cowart és mtsai, 1990; Donkó és mtsai, 2005; Pejsak és mtsai, 1994). A születéstől 6 hetes korig elért súlygyarapodás szignifikánsan jobb volt a mindhárom komponenssel (Bb/Pm/fPMT) immunizált kocák malacainál.

Az orrelváltozás pontszámok és a súlygyarapodás eredményei határozottan arra utalnak, hogy a legjobb védettség nem szükségszerűen mutat szoros összefüggést a legmagasabb torzító orrgyulladás elleni specifikus ellenanyag titerekkel. Ennél fogva az ellenanyag titer a torzító orrgyulladás specifikus antigénekre adott immunválasz jó indikátorának tűnik, de a tesztelt vakcina készítmények esetében nem feltétlenül mutatja a védettség mértékét. Ez megerősíti a fertőzési modell kísérletek során tapasztaltakat, amikor is a Bb/fPMT vakcina + olaj-a-vízben adjuváns produkálta a legmagasabb torzító orrgyulladás elleni specifikus ellenanyag titereket, miközben nem ez a csoport rendelkezett – legalábbis az adott kísérleti körülmények között – az elváltozások kialakulásával szembeni legjobb védettséggel.

Összegezve, eredményeink azt mutatják, hogy az adjuváns típusa és a vakcina antigén összetétele jelentős mértékben befolyásolja a szerokonverziót. Úgy találtuk, hogy a torzító orrgyulladás elleni vakcina *P. multocida* komponense negatív hatással van a PMT specifikus ellenanyag titer alakulására. Másrészt masszív *B. bronchiseptica* és *P. multocida* kombinált fertőzés esetén a monovalens PMT vakcina nem biztosítja a klinikai védettség várt szintjét, utalva arra, hogy a *B. bronchiseptica* fertőzés fontos szerepet játszik a torzító orrgyulladás kialakításában. A bemutatott adatok azt jelzik, hogy a torzító orrgyulladás kórokozóra specifikus ellenanyag titerek nem szükségszerűen korrelálnak a betegség elleni védettséggel, és a PMT mellett a *P. multocida* teljes sejt antigéneknek is szerepe lehet a torzító orrgyulladás elleni hatékony immunitás kialakításában.

7. Új tudományos eredmények

Az értekezésben bemutatott eredmények közül a következőket tartom nemzetközileg is újnak és kiemelésre érdemesnek:

1. Elsőként hoztunk létre kizárólag a *B. bronchiseptica* dermonekrotikus toxin (DNT) termelésének képességében (jelenlétében, illetve hiányában) különböző DNT+ és DNT- izogén törzspárokat, amelyek lehetővé tették a DNT szerepének a korábbiakhoz képest egzaktabb vizsgálatát.
2. A *B. bronchiseptica* izogén törzspárok segítségével kísérletesen bizonyítottuk, egerekben és sertésben egyaránt, azt a korábban már kevésbé egzakt módszerekkel megalapozott feltételezést, hogy egyedül a *B. bronchiseptica* DNT felelős az orrkagyló sorvadás kialakulásáért, ehhez a kórokozó további potenciális virulencia tényezőire nincs szükség.
3. Az intravénásan oltott egerekben tapasztalt toxicitás szintén a DNT hatásának tulajdonítható, ugyanakkor a DNT az élő baktérium egerekben mért virulenciájához nem járul hozzá. Egerek tüdejében a DNT jelenléte elhalásos folyamatokat eredményez.
4. Megállapítottuk, hogy a technikai fejlődésnek köszönhetően a komputertomográfia felbontó képessége sokat javult, és így jól használható az orrüreg képleteinek finom részleteket is bemutató leképezésére, valamint a torzító orrgyulladás kórfejlődésének nyomon követéses vizsgálatára.
5. Az orrkagyló és orrsövény elváltozások hagyományos kórbonctani pontozása és a CT felvételek vizuális értékelése között szignifikáns korrelációt állapítottunk meg. Ugyanakkor az orrkagyló sorvadás mértékének számszerűsítésére is alkalmas, az orrüregben található szövet-levegő terület arányának az ott lévő képletek denzitás különbségei alapján történő meghatározásával módszerünket a vizuálisan kevésbé feltűnő elváltozások értékelésére is alkalmassá tettük.
6. A torzító orrgyulladás elváltozásainak alakulását az állat egész életén át nyomon követő fertőzőes modellkísérletben elsőként bizonyítottuk azt a korábbi, csupán indirekt megfigyeléseken alapuló feltételezést, hogy a *B. bronchiseptica* fertőzés okozta orrkagyló sorvadás hajlamos a teljes regenerálódásra. Ezek az elváltozások

enyhe – közepes mértéket értek el, melyek a fertőzést követően 3 hónap alatt teljesen meggyógyultak.

7. Elsőként állapítottuk meg azt is, hogy a toxikus *P. multocida* által termelt toxin (PMT) okozta súlyos fokú orrkagyló sorvadás – az eddigi feltételezésekkel ellentétesen – szintén képes teljes regenerálódásra, ami felveti a torzító orrgyulladás definíciójának, igazgatási és gazdaságossági szempontjainak újragondolását.
8. Elsőként végeztük el a torzító orrgyulladás kísérletes előidézésére rendelkezésre álló fertőzési modellek vakcina hatékonyság mérésére való alkalmasságának összehasonlító vizsgálatát. Eredményeink arra utalnak, hogy a torzító orrgyulladás elleni kombinált vakcinák összetevői az egyes modellekben különböző módon viselkednek. Elsőként jutottunk arra a következtetésre, hogy az oltóanyag komponensek legprecízebb vizsgálatára az alkotóelemenkénti specifikus vizsgálatok (*B. bronchiseptica*, illetve ecetsav – *P. multocida* fertőzéses modellek) külön-külön elvégzése a legmegfelelőbb. Ugyanakkor a *P. multocida* – *B. bronchiseptica* fertőzési modellnek mindenképpen szerepe lehet a torzító orrgyulladás elleni kombinált vakcinák védőképességének gyakorlati jellegű kipróbálásában, mivel ez modellezi legpontosabban a természetes körülmények között kialakuló fertőzést, és ennek megfelelően leginkább az oltóanyag engedélyezés végső fázisában végzett vizsgálatokhoz javasolható.
9. Kimutattuk, hogy az adjuváns típusa és a vakcina antigén összetétele nagymértékben befolyásolja a torzító orrgyulladás elleni vakcinára adott szerológiai áthangolódás mértékét, amely az újabb típusú adjuvánsok és/vagy tisztított és inaktivált PMT hozzáadásával jelentős mértékben növelhető.
10. Ugyanakkor azt is elsőként állapítottuk meg, hogy a szerológiai profil és a betegség elleni védettség között nincs feltétlen összefüggés. Ennek egyik érdekes megnyilvánulása az a megfigyelés, miszerint a vakcina *P. multocida* komponense ugyan negatív hatással van a PMT specifikus ellenanyag titer alakulására, *B. bronchiseptica* – *P. multocida* kombinált fertőzés előfordulása esetén tökéletesebb védelmet kapunk, ha a vakcina a PMT mellett egész sejt *P. multocida* alkotó elemet is tartalmaz. Ez arra utal, hogy a *P. multocida* teljes sejt antigéneknek is szerepe lehet a torzító orrgyulladás elleni hatékony immunitás kialakításában.

8. Irodalomjegyzék

- Ackermann M. R., Adams D.A., Gerken L.L., Beckman M.J., Rimler R.B.** (1993): Purified *Pasteurella multocida* protein toxin reduces acid phosphatase-positive osteoclasts in the ventral nasal concha of gnotobiotic pigs. *Calcif. Tissue Int.*, 52: 455-459.
- Ackermann M.R., Register K.B., Gentry-Weeks C., Gwaltney S.M., Magyar T.** (1997): A porcine model for the evaluation of virulence of *Bordetella bronchiseptica*. *J. Comp. Path.*, 116: 55-61.
- Ackermann M.R., Rimler R.B., Thurston J.R.** (1991): Experimental model of atrophic rhinitis in gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.*, 59: 3626-3629.
- Áldásy P., Ványi A.** (1962): Torzító orrgyulladás előfordulása importsertések utódaiban. *Magy. Állatorv. Lapja*, 17: 291-295.
- Alexander T.J.L., Thornton K., Boon G., Lysons R.J., Gush A.F.** (1980): Medicated early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. *Vet. Rec.*, 106: 114-119.
- Bäckström L., Hoeffling D.C., Morkoc A.C., Cowart R.P.** (1985): Effect of atrophic rhinitis on growth rate in Illinois swine herds. *JAVMA*, 187: 712-715.
- Beachey E.H.** (1981): Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.*, 143: 325-345.
- Bemis D.A.** (1977): Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Cornell Vet.*, 67: 282-293.
- Bordet J., Gengou O.** (1909): Le microbe de la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur*, 20: 731-741.
- Braend M., Flatla J.L.** (1954): Rhinitis infectiosa atroficans hos gris. *Nord. Vetmed.*, 6: 81-122.
- Brassine M., Dewaele A., Gouffaux M.** (1976): Intranasal infection with *Bordetella bronchiseptica* in gnotobiotic piglets. *Res. Vet. Sci.*, 20: 162-166.
- Brennan M.J., Li Z.M., Cowell J.L., Bisher M.E., Steven A.C., Novotny P., Manclark C.R.** (1988): Identification of a 69-kilodalton nonfimbrial protein as an agglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 56: 3189-3195.
- Brown W.R., Krook L., Pond W.G.** (1966): Atrophic rhinitis in swine. Etiology, pathogenesis and prophylaxis. *Cornell Vet.*, 56(Suppl. 1): 1-108.
- Buboltz A.M., Nicholson T.L., Parette M.R., Hester S.E., Parkhill J., Harvill E.T.** (2008): Replacement of adenylate cyclase toxin in a lineage of *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.*, 190, 5502-5511.
- Bullock J.O., Armstrong S.K., Shear J.L., Lies D.P., McIntosh M.A.** (1990): Formation of ion channels by colicin B in planar lipid bilayers. *J. Membrane Biol.*, 114: 79-95.
- Busch C., Orth J., Djouder N., Aktories K.** (2001): Biological activity of a C-terminal fragment of *Pasteurella multocida* toxin. *Infect. Immun.*, 69: 3628-3634.
- Chanter N., Magyar T., Rutter J.M.** (1989): Interactions between *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs. *Res. Vet. Sci.*, 47: 48-53.

- Chanter N., Rutter J.M., MacKenzie A.** (1986): Partial purification of an osteolytic toxin from *Pasteurella multocida*. J. Gen. Microbiol., 132: 1089-1097.
- Chen G., Deng C., Li Y.P.** (2012): TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. Int. J. Biol. Sci., 8: 272-288.
- Cheville N.F., Rimler R.B.** (1989): A protein toxin from *Pasteurella multocida* type D causes acute and chronic hepatic toxicity in rats. Vet. Pathol., 26: 148-157.
- Chung W.B., Collins M.T., Bäckström L.R.** (1990): Adherence of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* to swine nasal ciliated epithelial cells in vitro. APMIS, 98: 453-461.
- Collings L.A.** (1983): The pathogenicity of *Bordetella bronchiseptica* in porcine atrophic rhinitis. PhD Thesis, Reading, University of Reading, UK, 129-194.
- Collings L.A., Rutter J.M.** (1985): Virulence of *Bordetella bronchiseptica* in the porcine respiratory tract. J. Med. Microbiol., 19: 247.
- Cotter P.A., Miller J.F.** (1994): BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. Infect. Immun., 62: 3381-3390.
- Cotter, P.A., Miller, J.F.** (2001) *Bordetella*. In: Principles of Bacterial Pathogenesis. Groisman, E.A. (ed) Academic Press, San Diego, California. ISBN 0123042208. pp: 619-674.
- Cowart R.P., Lipsey R.J., Hedrick H.B.** (1990): Measurement of conchal atrophy and pneumonic lesions and their association with growth rate in commingled feeder pigs. JAVMA, 196: 1262-1264.
- Cowell J.L., Hewlett E.L., Manclark C. R.** (1979): Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. Infect. Immun., 25: 896-901.
- Coyle D., Ostle A.G., Frank C., Kregness B., Rehder J., Welter M.** (1994): Comparative evaluation of two commercial atrophic rhinitis vaccines. Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella International Conference, Edinburgh, 47.
- Cross R.F., Clafflin R.M.** (1962): *Bordetella bronchiseptica* induced porcine atrophic rhinitis. J. Am. Vet. Med. Assoc., 141: 1467-1468.
- de Jong M.F., Nielsen J.P.** (1990): Definition of progressive atrophic rhinitis. Vet. Rec., 27: 93.
- de Jong M.F., Oei H.L., Tetenburg G.J.** (1980): AR pathogenicity tests for *Pasteurella multocida* isolates. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Congr., Copenhagen, p. 211.
- de Jong, M.F.** (1983): Atrophic rhinitis caused by intranasal or intramuscular administration of broth-culture and broth-culture filtrates containing AR toxin of *Pasteurella multocida*, p. 136-146. In K. B. Pedersen and J. C. Nielsen (ed.), *Atrophic Rhinitis in Pigs*. Report EUR 8643 EN. Commission of the European Communities, Luxembourg, Luxembourg.
- de Jong, M.F.** (1999): Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis, In Diseases of Swine. 9th edition. Edited by Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2006:577-602.
- de Jong M.F.** (2006): Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. In Diseases of Swine. 9th edition. Edited by Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; pp. 577-602.

- Dominick M.A., Rimler R.B.** (1986): Turbinate atrophy in gnotobiotic pigs intranasally inoculated with protein toxin isolated from type D *Pasteurella multocida*. Am. J. Vet. Res., 47: 1532-1536.
- Done J.T.** (1976): Porcine atrophic rhinitis: Snout radiography as an aid to the diagnosis and detection of the disease. Vet. Rec., 98: 23-28.
- Donkó T., Kovács M., Magyar T.** (2005): Association of growth performance with atrophic rhinitis and pneumonia detected at slaughter in a conventional pig herd in Hungary. Acta Vet. Hung., 53: 287-298.
- Doucet J.P., Murphy B.J., Tuana B.S.** (1990): Modification of a discontinuous and highly porous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel system for minigel electrophoresis. Anal. Biochem., 190: 209-211.
- Duncan J.R., Ramsey F.K., Switzer W.P.** (1966a): Pathology of experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in swine: pneumonia. Am. J. Vet. Res., 27: 467-472.
- Duncan J.R., Ross R.F., Switzer W.P., Ramsey F.K.** (1966b): Pathology of experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in swine: atrophic rhinitis. Am. J. Vet. Res., 27: 457-466.
- Eikelenboom G., Dik K.J., de Jong M.F.** (1978): De waarde van het röntgenologisch onderzoek voor de diagnostiek van Atrofische Rhinitis. Tijdschr. Diergeneesk., 103: 1002-1008.
- Éliás B., Boros G., Albert M., Tuboly S., Gergely P., Papp L., Barna-Vetró I., Rafai P., Molnár E.** (1990a): Clinical and pathological effects of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in specific-pathogen-free piglets. Jap. J. Vet. Sci., 5: 677-688.
- Éliás B., Hámori D.** (1975): Adatok a sertés torzító orrgyulladásának kóroktanához. V. A genetikai tényezők szerepe. Magy. Állatorv. Lapja. 30: 535-539.
- Éliás B., Herpay M., Albert M., Fekete J., Tuboly S., Rafai P., Molnár E.** (1990b): The influence of growth conditions of *Pasteurella multocida* on its ability to colonise the nasal mucosa of SPF piglets. Vet. Microbiol., 24: 81-88.
- Éliás B., Kruger M., Gergely P., Voets R., Rafai P.** (1993): Interaction between immunity to *Bordetella bronchiseptica* and infection of pig herds by *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida*. J. Vet. Med. Sci., 55: 617-622.
- European Pharmacopoeia**, 5th edition. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, European Pharmacopoeia Commission, 2005.
- Felix R., Fleisch H., Frandsen P.L.** (1992): Effect of *Pasteurella multocida* toxin on bone resorption in vitro. Infect. Immun., 60: 4984-4988.
- Ferry N.S.** (1911): Etiology of canine distemper. J. Infect. Dis., 8: 399-420.
- Fetter A.W., Switzer W.P., Capen C.C.** (1975): Electron microscopic evaluation of bone cells in pigs with experimentally induced *Bordetella* rhinitis (turbinate osteoporosis). Am. J. Vet. Res., 36: 15-22.
- Foged N.T., Nielsen J.P., Jorsal S.E.** (1989): Protection against progressive atrophic rhinitis by vaccination with *Pasteurella multocida* toxin purified by monoclonal antibodies. Vet. Rec., 125: 7-11.
- Foged N.T., Pedersen K.B., Elling F.** (1987): Characterization and biological effects of the *Pasteurella multocida* toxin. FEMS Microbiol. Letters, 43: 45-51.
- Franque L.W.** (1830): Was ist die Schnüffelkrankheit der Schweine? Dtsch. Z. Gesamte Tierheilkd., 1: 75-77.

- Frymus T., Wittenbrink M.M., Petzold K.** (1986): Failure to demonstrate adherence of *Pasteurella multocida* involved in atrophic rhinitis to swine nasal epithelial cells. J. Vet. Med. Ser. B., 33: 140-144.
- Fukui A., Horiguchi Y.** (2004): *Bordetella* dermonecrotic toxin exerting toxicity through activation of the small GTPase Rho. J. Biochem. 136: 415-419.
- Fukui-Miyazaki A., Ohnishi S., Kamitani S., Abe H., Horiguchi Y.** (2011): *Bordetella* dermonecrotic toxin binds to target cells via the N-terminal 30 amino acids. Microbiol. Immunol., 55: 154-159.
- Ghoshal N.G., Niyo Y.** (1993): Histomorphologic features of the nasal cavity of pigs exposed to *Pasteurella multocida* type-D dermonecrotic toxin. Am. J. Vet. Res., 54: 738-742.
- Giles C.J.** (1992): Bordetellosis. In: Leman AD, Glock RD, Mengeling WL, Penn RHC, School E, Straw B, editors. Diseases of Swine, 7th Edition. Ames, Iowa, USA, Iowa State University Press, pp. 436-45.
- Giles C.J., Smith I.M.** (1983): Vaccination of pigs with *Bordetella bronchiseptica*. Vet. Bull., 53: 327-338.
- Giles C.J., Smith I.M., Baskerville A.J., Brothwell E.** (1980): Clinical, bacteriological and epidemiological observation on infectious atrophic rhinitis of pigs in Southern England. Vet. Rec., 106: 25-28.
- Goodnow R.A.** (1980): Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol. Rev., 44: 722-738.
- Gueirard P., Guiso N.** (1993): Virulence of *Bordetella bronchiseptica*: role of adenylate cyclase-hemolysin. Infect. Immun., 61: 4072-4078.
- Gwaltney S.M., Galvin R.J.S., Register K.B., Rimler R.B., Ackermann M.R.** (1997): Effects of *Pasteurella multocida* toxin on porcine bone marrow cell differentiation into osteoclasts and osteoblasts. Vet. Pathol., 34: 421-430.
- Gwatkin R., Ozenis L., Byrne J.L.** (1953): Rhinitis of swine. VII. Production of lesions in pigs and rabbits with a pure culture of *Pasteurella multocida*. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 17: 215-217.
- Hanada M., Shimoda K., Tomita S., Nakase Y., Nishiyama Y.** (1979): Production of lesions similar to naturally occurring swine atrophic rhinitis by cell-free sonicated extract of *Bordetella bronchiseptica*. Jpn. J. Vet. Sci., 41: 1-8.
- Hannan P.C., O'Hanlon P.J., Rogers N.H.** (1989): *In vitro* evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. Res. Vet. Sci., 46: 202-211.
- Hewlett E.L., Gordon V.M., McCaffery J.D., Sutherland W.M., Gray M.C.** (1989): Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: identification and purification of the holotoxin molecule. J. Biol. Chem., 264: 19379-19384.
- Hoffmann C., Schmidt G.** (2004): CNF and DNT. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 152: 49-63.
- Horiguchi Y., Inoue N., Masuda M., Kashimoto T., Katahira J., Sugimoto N., Matsuda M.** (1997): *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 11623-11626.
- Horiguchi Y., Matsuda H., Koyama H., Nakai T., Kume K.** (1992): *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin suppresses in vivo antibody responses in mice. FEMS Microbiol. Lett., 69: 229-234.

- Horiguchi Y., Nakai T., Kume K.** (1991): Effects of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin on the structure and function of osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. *Infect. Immun.*, 59: 1112-1116.
- Horiguchi Y., Okada T., Sugimoto N., Morikawa Y., Katahira J., Matsuda M.** (1995a): Effects of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin on bone formation in calvaria of neonatal rats. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 12: 29-32.
- Horiguchi Y., Senda T., Sugimoto N., Katahira J., Matsuda M.** (1995b) *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin stimulates assembly of actin stress fibers and focal adhesions by modifying the small GTP-binding protein rho. *J. Cell. Sci.*, 108: 3243-3251.
- Horiguchi Y., Sugimoto N., Matsuda M.** (1993): Stimulation of DNA synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells by *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin. *Infect. Immun.*, 61: 3611-3615.
- Horiguchi Y., Sugimoto N., Matsuda M.** (1994): *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin stimulates protein synthesis in an osteoblastic clone, MC3T3-E1 cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 120: 19-22.
- Horváth Z., Papp L., Éliás B.** (1972): Studies of Ca and P metabolism in atrophic rhinitis of swine. II. Bone Ca and P contents of healthy and pigs affected with atrophic rhinitis. *Acta Vet. Hung.*, 22: 45-51.
- Hoskins I.C., Thomas L.H., Lax A.J.** (1997): Nasal infection with *Pasteurella multocida* causes proliferation of bladder epithelium in gnotobiotic pigs. *Vet. Rec.*, 140: 22.
- iDali C., Foged N.T., Frandsen P.L., Nielsen M.H., Elling, F.** (1991): Ultrastructural localization of the *Pasteurella multocida* toxin in a toxin-producing strain. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 1067-1071.
- Iljina Z.M., Zasukhin I.** (1975): Role of *Pasteurella* toxins in the pathogenesis of infectious atrophic rhinitis. *Sb. Nauchn. Rab. Sib. Zon Nauch. Vet. Inst. Omsk.*, 25: 76-86.
- Irie Y., Mattoo S., Yuk M.H.** (2004): The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.*, 186: 5692-5698.
- Isaacson R.E.** (1983): Bacterial adherence to mucosal surfaces: an attribute of virulence. *Bull. Eur. Physiopath. Resp.*, 19: 75-80.
- Iwamatsu S., Sawada T.** (1988): Relationship between serotypes, dermonecrotic toxin production of *Pasteurella multocida* isolates and pneumonic lesions of porcine lung. *Jap. J. Vet. Sci.*, 50: 1200-1206.
- Jacob-Dubuisson F., Loch C.** (2007): The *Bordetella* adhesins. In: Loch C. (ed.): *Bordetella. Molecular microbiology*. Scientific Press, Wymondham, 69-96.
- Jacques M., Parent N., Foiry B.** (1988): Adherence of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* to porcine nasal epithelial cells. *Can. J. Vet. Res.*, 52: 283-285.
- Jolie R., de Roose P., Tuytens N.** (1990): Diagnosis of atrophic rhinitis by computerised tomography: A preliminary report. *Vet. Rec.*, 126: 591-594.
- Jutras I., Martineau-Doizé B.** (1996): Stimulation of osteoclast-like cell formation by *Pasteurella multocida* toxin from hemopoietic progenitor cells in mouse bone marrow cultures. *Can. J. Vet. Res.*, 60: 34-39.

- Kabay M.J., Mercy A.R., Lloyd J.M., Robertson G.M.** (1992): Vaccine efficacy for reducing turbinate atrophy and improving growth rate in piggeries with endemic atrophic rhinitis. *Aust. Vet. J.*, 69: 101-103.
- Kadlec K., Kehrenberg C., Wallmann J., Schwarz S.** (2004): Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from porcine respiratory tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48: 4903-4906.
- Kamp E.M., Van der Heijden P.J., Tetenburg B.J.** (1987): Purification of a heat labile dermonecrotic toxin from culture fluid of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, 13: 235-248.
- Kashimoto T., Katahira J., Cornejo W.R., Masuda M., Fukuoh A., Matsuzawa T., Ohnishi T., Horiguchi Y.** (1999): Identification of functional domains of *Bordetella* dermonecrotizing toxin. *Infect. Immun.*, 67: 3727-3732.
- Kemeny L.J.** (1972): Experimental atrophic rhinitis produced by *Bordetella bronchiseptica* culture in young pigs. *Cornell Vet.*, 62: 477-485.
- Khelef N., Bachelet C.M., Vargaftig B.B., Guiso N.** (1994): Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or toxins. *Infect. Immun.*, 62: 2893-2900.
- Kielstein P., Heilmann P., Magyar T.** (1987): *Pasteurella multocida* als Erreger der Rhinitis atrophicans: Bedeutung des Dermonecrottoxins im Babymaustest sowie In-vitro-Nachweis von Adharenzeigenschaften. *J. Vet. Med. B.*, 34: 216-226.
- Kimman T.G., Löwik C.W., van de Wee-Pals L.J., Thesingh C.W., Defize P., Kamp E.M., Bijvoet O.L.** (1987): Stimulation of bone resorption by inflamed nasal mucosa, dermonecrotic toxincontaining conditioned medium from *Pasteurella multocida*, and purified dermonecrotic toxin from *P. multocida*. *Infect. Immun.*, 55: 2110-2116.
- Knust Z., Schmidt G.** (2010): Cytotoxic necrotizing factors (CNFs) - a growing toxin family. *Toxins*, 2: 116-127.
- Kovács F., Magyar T.** (1996): Evaluation of Ingelvac AR4 vaccine under field condition. 14th IPVS Congress Bologna, p. 254.
- Krüger M., Horsch F.** (1982): Untersuchungen zur Differenzierung von *Bordetella bronchiseptica* Stämmen. 1. Mitteilung: Nachweis des hitzenlabilen Exotoxins und des Haemagglutinins. *Arch. Exp. Vet. Med. Leipzig*, 36: 691-698.
- Lacerda H.M., Pullinger G.D., Lax A.J., Rozengurt E.** (1997): Cytotoxic necrotizing factor 1 from *Escherichia coli* and dermonecrotic toxin from *Bordetella bronchiseptica* induce p21^{rho}-dependent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, 272: 9587-9596.
- Lacey B.W.** (1960): Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *J. Hyg.*, 58: 57-93.
- Lax A.J., Chanter N.** (1990): Cloning of the toxin gene from *Pasteurella multocida* and its role in atrophic rhinitis. *J. Gen. Microbiol.*, 136: 81-87.
- Lax A.J., Chanter N., Pullinger G.D., Higgins T., Staddon J.M., Rozengurt E.** (1990): Sequence analysis of the potent mitogenic toxin of *Pasteurella multocida*. *FEBS Lett.*, 277: 59-64.
- Lebrun I., Marques-Porto R., Pereira A.S., Pereira A., Perpetuo E.A.** (2009): Bacterial toxins: an overview on bacterial proteases and their action as virulence factors. *Mini-Reviews in Med. Chem.*, 9: 820-828.

- Leininger E., Probst P.G., Brennan M.J., Kenimer J.G.** (1993): Inhibition of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin-mediated cell adherence with monoclonal antibodies. FEMS Microbiol. Lett., 106: 31-38.
- Lemichez E., Flatau G., Bruzzone M., Boquet P., Gauthier M.** (1997): Molecular localization of the *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor CNF1 cell-binding and catalytic domains. Mol. Microbiol., 24: 1061-1070.
- Lendvai N., Magyar T., Semjén G.** (1992): Cross-protection studies on *Bordetella bronchiseptica* in mice using an intracerebral challenge model. Vet. Microbiol., 31: 191-196.
- Livey I., Wardlaw A.C.** (1984): Production and properties of *Bordetella pertussis* heat labile toxin. J. Med. Microbiol., 17: 91-103.
- Logomarsino J.V., Pond W.G., Sheffy B.E., Krook L.** (1974): Turbinate morphology in pigs inoculated with *Bordetella bronchiseptica* and fed high or low calcium diets. Cornell Vet., 64: 573-583.
- Magyar T.** (1990): Virulence and lesionotoxicity of *Bordetella bronchiseptica* in mice. Vet. Microbiol., 25: 199-207.
- Magyar T., Chanter N., Lax A.J., Rutter J.M., Hall G.A.** (1988): The pathogenesis of turbinate atrophy in pigs caused by *Bordetella bronchiseptica*. Vet. Microbiol., 18: 135-146.
- Magyar T., Glávits R.** (1990): Immunopathological changes in mice caused by *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida*. Acta Vet. Hung., 38: 203-210.
- Magyar T., Lendvai N., Semjén G., Réthy L.** (1983): Investigation of the biological activities of *Bordetella bronchiseptica*. II. Adherence to the target cell. Ann. Immunol. Hung., 23: 361-366.
- Magyar T., Rimler R.B.** (1991): Detection and enumeration of toxin-producing *Pasteurella multocida* with a colony-blot assay. J. Clin. Microbiol., 29: 1328-1332.
- Magyar T., Semjén G., Osváth, Zs.** (1985): Investigation of adhesive and non-adhesive *Bordetella bronchiseptica* strains in a suckling-mouse model. Acta Vet. Hung., 33: 137-141.
- Martineau-Doizé B., Caya I., Gagné S., Jutras I., Dumas G.** (1993): Effects of *Pasteurella multocida* toxin on the osteoclast population of the rat. J. Comp. Pathol., 108: 81-91.
- Martínez de Tejada G., Miller J.F., Cotter P.A.** (1996): Comparative analysis of the virulence control systems of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Mol. Microbiol., 22: 895-908.
- Masuda M., Betancourt L., Matsuzawa T., Kashimoto T., Takao T., Shimonishi Y., Horiguchi Y.** (2000): Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin. EMBO J., 19: 521-530.
- Matsuzawa T., Fukui A., Kashimoto T., Nagao K., Oka K., Miyake M., Horiguchi Y.** (2004): *Bordetella* dermonecrotic toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner. J. Biol. Chem., 279: 2866-2872.
- Matsuzawa T., Kashimoto T., Katahira J., Horiguchi Y.** (2002): Identification of a receptor-binding domain of *Bordetella* dermonecrotic toxin. Infect. Immun., 70: 3427-3432

- Mattoo S., Cherry J.D.** (2005): Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. Clin. Microbiol. Rev., 18: 326-382.
- Mester K., Magyar T.** (2007): Torzító orrgyulladás - lehetünk-e mentesek? Magy. Állatorv. Lapja, 129: 231-238.
- Miniats O.P., Johnson J.A.** (1980): Experimental atrophic rhinitis in gnotobiotic pigs. Can. J. Comp. Med., 44: 358-365.
- Muirhead M.R.** (1979): Respiratory diseases of pigs. Br. Vet. J., 135: 497-508.
- Mullan P.B., Lax A.J.** (1996): *Pasteurella multocida* toxin is a mitogen for bone cells in primary culture. Infect. Immun., 64: 959-965.
- Mullan P.B., Lax A.J.** (1998): *Pasteurella multocida* toxin stimulates bone resorption by osteoclasts via interaction with osteoblasts. Calcif. Tissue Int., 63: 340-345.
- Nakai T., Kume K., Yoshikawa H., Oyamada T., Yoshikawa Y.** (1988): Adherence of *Pasteurella multocida* or *Bordetella bronchiseptica* to the swine nasal epithelial cell *in vitro*. Infect. Immun., 56: 234-240.
- Nakai T., Sawata A., Kume K.** (1985): Intracellular locations of dermonecrotic toxins in *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica*. Am. J. Vet. Res., 46: 870-874.
- Nakase Y.** (1957): Studies on *Hemophilus bronchisepticus* III: differences of biological properties between phase I and phase III of *H. bronchisepticus*. Kitasato Arch. Exp. Med., 30: 79-84.
- Nicholson T.L., Brockmeier S.L., Loving C.L., Register K.B., Kehrli M.E., Stibitz S.E., Shore S.M.** (2011): Phenotypic modulation of the virulent Bvg phase is not required for pathogenesis and transmission of *Bordetella bronchiseptica* in swine. Infect. Immun., 80: 1025-1036.
- Nielsen J.P., Foged N.T., Sorensen V., Barfod K., Bording A., Petersen S.K.** (1991): Vaccination against progressive atrophic rhinitis with a recombinant *Pasteurella multocida* toxin derivative. Can. J. Vet. Res., 55: 128-138.
- Orth J.H., Aktories K.** (2012): Molecular Biology of *Pasteurella multocida* Toxin. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 361: 73-92.
- Orth J.H., Preuss I., Fester I., Schlosser A., Wilson B.A., Aktories K.** (2009): *Pasteurella multocida* toxin activation of heterotrimeric G proteins by deamidation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106: 7179-7184.
- Ottemann K.M., Miller J.F.** (1997): Roles for motility in bacterial-host interactions. Mol. Microbiol., 24, 1109-1117.
- Ősz Gy.** (1956): A sertések torzító orrgyulladása. Magy. Állatorv. Lapja, 11: 244-251.
- Parkhill J., Sebaihia M., Preston A., Murphy L.D., Thomson N., Harris D.E., Holden M.T.G., Churcher C.M., Bentley S.D., Mungall K.L., Cerdeno-Tárraga A.M., Temple L., James K., Harris B., Quail M.A., Achtman M., Atkin R., Baker S., Basham D., Bason N., Cherevach I., Chillingworth T., Collins M., Cronin A., Davis P., Doggett J., Feltwell T., Goble A., Hamlin N., Hauser H., Holroyd S., Jagels K., Leather S., Moule S., Norberczak H., O'Neil S., Ormond D., Price C., Rabinowitsch E., Rutter S., Sanders M., Saunders D., Seeger K., Sharp S., Simmonds M., Skelton J., Squares R., Squares S., Stevens K., Unwin L., Whitehead S., Barrell B.G., Maskell D.J.** (2003): Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Nat. Genet., 35: 32-40.

- Passerini de Rossi B.N., Friedman L.E., Darnaud S., de Torres R.A., Franco M.A.** (1997): Flagellin, a major protein present in SDS-PAGE profiles of Sarkosyl-OMP-enriched fraction from *Bordetella bronchiseptica* Bvg⁻ or modulated Bvg⁺ strains. Vet. Microbiol., 56: 65-77.
- Pedersen K.B.** (1975): The serology of *Bordetella bronchiseptica* isolated from pigs compared with strains from other animal species. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 83: 590-594.
- Pedersen K.B., Barfod K.** (1981): The aetiological significance of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of swine. Nord. Vet. Med., 33: 513-522.
- Pedersen K.B., Barfod K.** (1982): Effect on the incidence of atrophic rhinitis of vaccination of sows with vaccine *Pasteurella multocida* toxin. Nord. Vet. Med., 34: 293-302.
- Pedersen K.B., Elling F.** (1984): The pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs induced by toxigenic *Pasteurella multocida*. J. Comp. Path., 94: 203-214.
- Pejsak Z., Wasinska B., Markowska-Daniel I., Hogg A.** (1994): Field evaluation of thirteen regimens for the control of progressive atrophic rhinitis. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 17: 125-132.
- Penny R.H.C., Penny J.C.** (1976): Priorities for pig research. Vet. Rec., 99: 451-453.
- Petersen S.K.** (1990): The complete nucleotide sequence of the *Pasteurella multocida* toxin gene and evidence for a transcriptional repressor, TxaR. Mol. Microbiol., 4: 821-830.
- Pijoan C.** (1992): Pneumonic pasteurellosis. In: Leman A.D., Glock R.D., Mengeling W.L., Penn R.H.C., School E., Straw B., editors. Diseases of Swine, 7th Edition. Ames, Iowa, USA, Iowa State University Press, 1992: 552-529.
- Pijpers A., van Klingeren B., Schoevers E.J., Verheijden J.H., van Miert A.S.** (1989): *In vitro* activity of five tetracyclines and some other antimicrobial agents against four porcine respiratory tract pathogens. J. Vet. Pharmacol. Ther., 12: 267-276.
- Plonait H., Heinel K.G., Bollwahn W.** (1980): Vergleich von Endoskopie und Röntgenaufnahmen als Hilfsmittel zur Diagnose der Rhinitis atrophicans am lebenden Schwein. Praktischer. Tierarzt., 61: 1056-1064.
- Porter J.F., Parton R., Wardlaw A.C.** (1991): Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without added nutrients. Appl. Environ. Microbiol., 57: 1202-1206.
- Pósa R., Donkó T., Bogner P., Kovács M., Repa I., Magyar T.** (2011): Interaction of *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, and fumonisin B1 in the porcine respiratory tract as studied by computed tomography. Can. J. Vet. Res., 75: 176-182.
- Pósa R., Magyar T., Stoev S.D., Glávits R., Donkó T., Repa I., Kovács M.** (2013): Use of computed tomography and histopathologic review for lung lesions produced by the interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and fumonisin mycotoxins in pigs. Vet. Pathol., 50: 971-979.
- Preston A., Parkhill J., Maskell D.J.** (2004): The *Bordetellae*: lessons from genomics. Nat. Rev. Microbiol., 2: 379-390.

- Preuss I., Hildebrand D., Orth J.H., Aktories K., Kubatzky K.F.** (2010): *Pasteurella multocida* Toxin is a potent activator of anti-apoptotic signalling pathways. *Cell Microbiol.*, 12: 1174-1185.
- Pullinger G.D., Adams T.E., Mullan P.B., Garrod T.I., Lax A.J.** (1996): Cloning, expression, and molecular characterization of the dermonecrotic toxin gene of *Bordetella* spp. *Infect. Immun.*, 64: 4163-4171.
- Pullinger G.D., Sowdhamini R., Lax A.J.** (2001): Localization of functional domains of the mitogenic toxin of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.*, 69: 7839-7850.
- Register K.B., Ackermann M.R.** (1997): A highly adherent phenotype associated with virulent Bvg⁺-phase swine isolates of *Bordetella bronchiseptica* grown under modulating conditions. *Infect. Immun.*, 65: 5295-5300.
- Register K.B., Ackermann M.R., Dyer D.W.** (1995): Nonradioactive colony lift-hybridization assay for detection of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 2675-2678.
- Ridley A.J.** (1996): Rho: theme and variations. *Curr. Biol.*, 6: 1256-1264.
- Riising H.J., Van-Empel P., Witvliet M.** (2002): Protection of piglets against atrophic rhinitis by vaccinating the sow with a vaccine against *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Rec.*, 150: 569-571.
- Roop R.M., Veit H.P., Sinsky R.J., Veit S.P., Hewlett E.L., Kornegay E.T.** (1987): Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated with the production of infectious atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine. *Infect. Immun.*, 55: 217-222.
- Ross R.F., Duncan J.R., Switzer W.P.** (1963): Turbinate atrophy in swine produced by pure cultures of *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Med.*, 58: 566-570.
- Ross R.F., Switzer W. P., Duncan J.P.** (1967): Comparison of pathogenicity of various isolates of *Bordetella bronchiseptica* in young pigs. *Can. J. Comp. Med.*, 31: 53-57.
- Rutter J.M.** (1981): Quantitative observations on *Bordetella bronchiseptica* infection in atrophic rhinitis of pigs. *Vet. Rec.*, 108: 451-454.
- Rutter J.M.** (1983): Virulence of *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica*. *Res. Vet. Sci.*, 34: 287.
- Rutter J.M.** (1985) :Atrophic rhinitis in swine. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 29: 239-279.
- Rutter J.M., Francis L.M., Sansom B.F.** (1982): Virulence of *Bordetella bronchiseptica* from pigs with or without atrophic rhinitis. *J. Med. Microbiol.*, 15: 105-116.
- Rutter J.M., Mackenzie A.** (1984): Pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs: a new perspective. *Vet. Rec.*, 114: 89-90.
- Rutter J.M., Rojas X.** (1982): Atrophic rhinitis in gnotobiotic piglets: differences in the pathogenicity of *Pasteurella multocida* in combined infections with *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Rec.*, 110: 531-535.
- Rutter J.M., Taylor R.J., Crighton W.G., Robertson I.B., Benson J.A.** (1984): Epidemiological study of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in atrophic rhinitis. *Vet. Rec.*, 115: 615-619.
- Sambrook J., Russell D.W.** (eds) (2001): Molecular cloning - a laboratory manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

- Sawata, A., Kume K.** (1982): Nasal turbinate atrophy in young mice inoculated with *Bordetella bronchiseptica* of pig origin. Am. J. Vet. Res., 43: 1845-1847.
- SAS Institute Inc.** (2004): SAS/STAT® 9.1 User's Guide. Cary, NC, USA.
- Scarlato V., Rappuoli R.** (1991): Differential response of the bvg virulence regulon of *Bordetella pertussis* to MgSO₄ modulation. J. Bacteriol., 173: 7401-7404.
- Scheidt A.B., Mayrose V.B., Hill M.A., Clark L.K., Einstein M.E., Frantz S.F., Runnels L.J., Knox K.E.** (1992): Relationship to growth performance of pneumonia and atrophic rhinitis lesions detected in pigs at slaughter among four seasons. JAVMA, 200: 1492-1496.
- Schmidt G., Goehring U.-M., Schirmer J., Lerm M., Aktories K.** (1999): Identification of the C-terminal part of *Bordetella* dermonecrotic toxin as a transglutaminase for Rho GTPases. J. Biol. Chem., 274: 31875-31881.
- Schöss P.** (1983): Clinical diagnosis of atrophic rhinitis. In: Atrophic rhinitis of pigs. Ed. K. B. Pedersen and N. C. Nielsen. Comm. Eur. Communities Rep EUR 8643 EN. Luxembourg, p.13-21.
- Schöss P., Siggel H.J.** (1973): Das Röntgenverfahren als Hilfsmittel zur Erkennung der Rhinitis atrophicans beim. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr., 80: 1-6.
- Seifert H.** (1971): Genetic aspects of atrophic rhinitis in the pig. Monatsh. Vetmed., 26: 770-772.
- Sellyei B., Varga Zs., Szentesi-Samu K., Kaszanyitzky É., Magyar T.** (2009): Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry. Acta Vet. Hung., 57: 357-367.
- Semjén G., Magyar T.** (1985): A bovine haemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* respon-sible for adherence. Acta Vet. Hung., 33: 129-136.
- Seo B., Choy E.W., Maudsley W.E., Miller W.E., Wilson B.A, Luttrell L.M.** (2000): *Pasteurella multocida* toxin stimulates mitogen-activated protein kinase via Gq/11-dependent transactivation of the epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem., 275: 2239-2245.
- Shimizu T., Nakagawa M., Shibata S., Suzuki K.** (1971): Atrophic rhinitis produced by intranasal inoculation of *Bordetella bronchiseptica* in hysterectomy produced colostrum-deprived pigs. Cornell Vet., 61: 696-705.
- Shryock T.R., Losonsky J.M., Smith W.C., Gatlin C.L., Francisco C.J., Kuriashkin I.V., Clarkson R.B., Jordan W.H.** (1998): Computed axial tomography of the porcine nasal cavity and a morphometric comparison of the nasal turbinates with other visualization techniques. Can. J. Vet. Res., 62: 287-292.
- Silveira D., Edington N., Smith I.M.** (1982): Ultrastructural changes in the nasal turbinate bones of pigs in early infection with *Bordetella bronchiseptica*. Res. Vet. Sci., 33: 37-42.
- Sisak F., Gois M., Kuksa F.** (1978): The sensitivity of the strains of *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma hyorhinis*, isolated from pigs, to antibiotics and chemotherapeutics. Vet. Med. (Prague), 23: 531.
- Skelly B.J., Pruss M., Pellegrino R., Andersen D., Abruzzo G.** (1980): Variation in degree of atrophic rhinitis with field isolates of *Bordetella bronchiseptica*. Copenhagen, Proceedings of the 6th IPVSC, 210.
- Sterner-Kock A., Lanske B., Uberschar S., Atkinson M.J.** (1995): Effects of the *Pasteurella multocida* toxin on osteoblastic cells *in vitro*. Vet. Pathol., 32: 274-279.

- Stibitz S., Black W., Falkow S.** (1986): The construction of a cloning vector designed for gene replacement in *Bordetella pertussis*. *Gene*, 50: 133-140.
- Stockbauer K.E., Fuchslocher B., Miller J.F., Cotter P.A.** (2001): Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol. Microbiol.*, 39: 65-78.
- Straw B.E., Burgi E.J., Hilley H.D.** (1983): Pneumonia and atrophic rhinitis in pigs from a test station. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 182: 607-611.
- Straw B.E., Leman A.D., Robinson R.A.** (1984): Pneumonia and atrophic rhinitis in pigs from a test station: A follow-up study. *JAVMA*, 185: 1544-1546.
- Suda T., Takahashi N., Udagawa N., Jimi E., Gillespie M.T., Martin T.J.** (1999): Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.*, 20: 345-357.
- Switzer W.P.** (1956): Infectious atrophic rhinitis: concept that several agents may cause turbinate atrophy. *Am. J. Vet. Res.*, 17: 478-484.
- Switzer W.P.** (1963): Elimination of *Bordetella bronchiseptica* from the nasal cavity of swine by sulphonamide therapy. *Vet. Med.*, 58: 571-574.
- Switzer W.P.** (1981). Bordetellosis, p. 497-507. In A. D. Leman, R. D. Glock, W. L. Mengeling, R. H. C. Penny, E. Scholl, and B. Straw (ed.), *Diseases of Swine*, 5th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Switzer W.P., Farrington D.O.** (1975). Infectious atrophic rhinitis, p. 687-711. In H. W. Dunne and A. D. Leman (ed.), *Diseases of Swine*, 4th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Tang X., Zhao Z., Hu J., Wu B., Cai X., He Q., Chen H.** (2009): Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *J. Clin. Microbiol.*, 47: 951-958.
- Temple L.M., Weiss A.A., Walker K.E., Barnes H.J., Christensen V.L., Miyamoto D.M., Shelton C.B., Orndorff P.E.** (1998): *Bordetella avium* virulence measured *in vivo* and *in vitro*. *Infect. Immun.*, 66: 5244-5251.
- Tornoe N., Nielsen N.C.** (1976): Inoculation experiments with *Bordetella bronchiseptica* strains in SPF pigs. *Nord. Vet. Med.*, 28: 233-242.
- Tornoe N., Nielsen N.C., Svendsen J.** (1976): *Bordetella bronchiseptica* isolations from the nasal cavity of pigs in relation to atrophic rhinitis. *Nord. Vetmed.* 28: 1.
- van Diemen P.M., de Jong M.F., de Vries Reilingh G., van der Hel P., Schrama J.W.** (1994): Intranasal administration of *Pasteurella multocida* toxin in a challenge-exposure model used to induce subclinical signs of atrophic rhinitis in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 55: 49-54.
- Varga J., Magyar K., Fodor L., Romváry A.** (1991): Prevention and treatment of atrophic rhinitis in pigs with Getroxel, chlorquinaldol and oxytetracycline. *Acta Vet. Hung.*, 39: 127-135.
- Vecht U., Arends J.P., Van der Molen E.J., Leengoes L.A.** (1989): Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 50: 1037-1043.
- Vecht U., Wisselink H.J., Van Dijk J.E., Smith H.E.** (1992): Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infect. Immun.*, 60: 550-556.

- Voets M.T., Klaassen C.H., Charlier P., Wiseman A., Descamps J.** (1992): Evaluation of an atrophic rhinitis vaccine under controlled conditions. *Vet. Rec.*, 20: 549-553.
- Walker K.E., Weiss A.A.** (1994): Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella*. *Infect Immun.*, 62: 3817-3828.
- Walker K.E., Weiss A.A.** (1994): Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella*. *Infect. Immun.*, 62: 3817-3828.
- Ward P.N., Miles A.J., Sumner I.G., Thomas L.H., Lax A.J.** (1998): Activity of the mitogenic *Pasteurella multocida* toxin requires an essential C-terminal residue. *Infect. Immun.*, 66: 5636-5642.
- Weiss A.A., Falkow S.** (1984): Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 43: 263-269.
- Weiss A.A., Goodwin M.S.** (1989): Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect. Immun.*, 57: 3757-3764.
- Woolfrey B.F., Moody J.A.** (1991): Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4: 243-255.
- Yokomizo Y., Shimizu T.** (1979): Adherence of *Bordetella bronchiseptica* to swine nasal epithelial cells and its possible role in virulence. *Res. Vet. Sci.*, 27: 15-21.
- Zhao Z., Xue Y., Wang C., Ding K., Wu B., He Q., Cheng X., Chen H.** (2011): Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from pigs with respiratory diseases on farms in China. *J. Vet. Med. Sci.*, 73: 103-106.

9. Saját közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. Ackermann M.R., Register K.B., Gentry-Weeks C., Gwaltney S.M., Magyar T.
A porcine model for the evaluation of virulence of *Bordetella bronchiseptica*
JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY, **116**:(1) pp. 55-61. (1997)
2. Magyar T., Glávits R., Pullinger G.D., Lax A.J.
The pathological effect of the Bordetella dermonecrotic toxin in mice
ACTA VETERINARIA HUNGARICA, **48**:(4) pp. 397-406. (2000)
3. Brockmeier S.L., Register K.B., Magyar T., Lax A.J., Pullinger G.D., Kunkle R.A.
Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in swine
INFECTION AND IMMUNITY, **70**:(2) pp. 481-490. (2002)
4. Magyar T., King V.L., Kovács F.
Evaluation of vaccines for atrophic rhinitis - A comparison of three challenge models
VACCINE, **20**:(13-14) pp. 1797-1802. (2002)
5. Magyar T., Kovács F., Donkó T., Bíró H., Romvári R., Kovács M., Repa I.
Turbinate atrophy evaluation in pigs by computed tomography
ACTA VETERINARIA HUNGARICA, **51**:(4) pp. 485-491. (2003)
6. Donkó T., Kovács M., Magyar T.
Association of growth performance with atrophic rhinitis and pneumonia detected at slaughter in a conventional pig herd in Hungary
ACTA VETERINARIA HUNGARICA, **53**:(3) pp. 287-298. (2005)
7. Magyar T., Donkó T., Kovács F.
Atrophic rhinitis vaccine composition triggers different serological profiles that do not correlate with protection
ACTA VETERINARIA HUNGARICA, **56**:(1) pp. 27-40. (2008)
8. Magyar T., Donkó T., Repa I., Kovács M.
Regeneration of toxigenic *Pasteurella multocida* induced severe turbinate atrophy in pigs detected by computed tomography
BMC VETERINARY RESEARCH, **9**:(222) pp. 1-7. (2013)
9. Magyar T., Lax A.J.
Atrophic rhinitis
In: Brogden KA, Guthmiller JM (szerk.),
Polymicrobial diseases,
Washington: ASM International, 2002. pp. 169-197

Külföldi folyóiratban megjelent közlemények az előző fokozat megszerzése óta:

1. Rimler R.B., Register K.B., Magyar T., Ackermann M.R.
Influence of chondroitinase on indirect hemagglutination titers and phagocytosis of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F
VETERINARY MICROBIOLOGY, 47:(3-4) pp. 287-294. (1995)
2. Register K.B., Magyar T.
Optimized ribotyping protocol applied to Hungarian *Bordetella bronchiseptica* isolates: identification of two novel ribotypes
VETERINARY MICROBIOLOGY, 69:(4) pp. 277-285. (1999)
3. Kovács F., Magyar T., Rinehart C., Elbers K., Schlesinger K., Ohnesorge W.C.
The live attenuated bovine viral diarrhoea virus components of a multi-valent vaccine confer protection against fetal infection
VETERINARY MICROBIOLOGY, 96:(2) pp. 117-131. (2003)
4. Genzow M., Kovács F., Molnár T., Magyar T.
Concurrent vaccination of piglets with Ingelvac (R) PRRS MLV and with Ingelvac (R) M. hyo
TIERARZTLICHE UMSCHAU, 61:(12) pp. 649-652. (2006)
5. Magyar T., Glávits R.
Clinical comparison of tissue tolerance of meloxicam 20mg injectable and flunixin injectable in pigs
THE PIG JOURNAL, 59: pp. 112-124. (2007)
6. Pósa R., Kovács M., Donkó T., Szabó-Fodor J., Mondok J., Bogner P., Repa I., Magyar T.
Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* and fumonisin B1 toxin on the lung in pigs
ITALIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE, 8:(3) pp. 172-174. (2009)
7. Máder K., Terhes G., Hajdú E., Urbán E., Sóki J., Magyar T., Márialigeti K., Katona M., Nagy E., Túri S.
Outbreak of septicaemic cases caused by *Acinetobacter ursingii* in a neonatal intensive care unit
INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY, 300: pp. 338-340. (2010)
8. Sellyei B., Bányai K., Magyar T.
Characterization of the *ptfA* gene of avian *Pasteurella multocida* strains by allele specific polymerase chain reaction
JOURNAL OF VETERINARY DIAGNOSTIC INVESTIGATION, 22:(4) pp. 607-610. (2010)
9. Sellyei B., Wehmann E., Makrai L., Magyar T.
Characterisation of *Pasteurella dagmatis*-like isolates recovered from the feline oral cavity
VETERINARY MICROBIOLOGY, 145:(3-4) pp. 279-285. (2010)
10. Pósa R., Donkó T., Bogner P., Kovács M., Repa I., Magyar T.
Interaction of *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, and fumonisin B1 in the porcine respiratory tract as studied by computed tomography
CANADIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH, 75:(3) pp. 176-182. (2011)

11. Sellyei B., Wehmann E., Makrai L., Magyar T.
Evaluation of the Biolog system for the identification of certain closely related *Pasteurella* species
DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE, 71: pp. 6-11. (2011)
12. Gyuranecz M., Dénes B., Hornok S., Kovács P., Horváth G., Jurkovich V., Varga T., Hajtós I., Szabó R., Magyar T., Vass N., Hofmann-Lehmann R., Erdélyi K., Bhide M., Dán Á.
Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hungary: Screening of dairy cows, sheep, commercial milk samples, and ticks
VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES, 12:(8) pp. 650-653. (2012)
13. Gyuranecz M., Reiczigel J., Krisztalovics K., Monse L., Kükedi Szabóné G., Szilágyi A., Szépe B., Makrai L., Magyar T., Bhide M., Erdélyi K.
Factors influencing emergence of tularemia, Hungary, 1984–2010
EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 18:(8) pp. 1379-1381. (2012)
14. Sellyei B., Wehmann E., Magyar T.
Sequencing-independent method for the differentiation of the main phylogenetic lineages of *Pasteurella multocida*
JOURNAL OF VETERINARY DIAGNOSTIC INVESTIGATION, 24:(4) pp. 735-738. (2012)
15. Gyuranecz M., Kreizinger Zs., Horváth G., Rónai Zs., Dán Á., Nagy B., Szeredi L., Makrai L., Jánosi Sz., Hajtós I., Magyar T., Bhide M., Erdélyi K., Dénes B.
Natural IS711 insertion caused Omp31 gene suppression in *Brucella ovis*
JOURNAL OF VETERINARY DIAGNOSTIC INVESTIGATION, 25:(2) pp. 234-238. (2013)
16. Kreizinger Zs., Hornok S., Dán Á., Hresko S., Makrai L., Magyar T., Bhide M., Erdélyi K., Hofmann-Lehmann R., Gyuranecz M.
Prevalence of *Francisella tularensis* and Francisella-like endosymbionts in the tick population of Hungary and the genetic variability of Francisella-like agents
VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES, 13: pp. 160-163. (2013)
17. Kreizinger Zs., Makrai L., Helyes G., Magyar T., Erdélyi K., Gyuranecz M.
Antimicrobial susceptibility of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* isolates from Hungary, Central Europe
JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY, 68:(2) pp. 370-373. (2013)
18. Pósa R., Magyar T., Stoev S.D., Glávits R., Donkó T., Repa I., Kovács M.
Use of computed tomography and histopathologic review for lung lesions produced by the interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and fumonisin mycotoxins in pigs
VETERINARY PATHOLOGY, 50:(6) pp. 971-979. (2013)
19. Varga Zs., Volokhov D.V., Stipkovits L., Thuma Á., Sellyei B., Magyar T.
Characterisation of *Pasteurella multocida* strains isolated from geese
VETERINARY MICROBIOLOGY, 163:(1-2) pp. 149-156. (2013)

Hazai kiadású, angol nyelven megjelent közlemények az előző fokozat megszerzése óta:

1. Semjén G., Magyar T., Laczay P.
Therapeutic efficacy of doxycycline against experimental *Pasteurella multocida* infection in broiler chickens
ACTA VETERINARIA HUNGARICA, 46:(1) pp. 85-93. (1998)
2. Donkó T., Kovács M., Magyar T.
The effect of atrophic rhinitis (AR) on the weight-gain of swine
AGRICULTURAE CONSPECTUS SCIENTIFICUS, 68:(3) pp. 161-164. (2003)
3. Donkó T., Molnár M., Csató L., Kovács M., Magyar T.
Effect of atrophic rhinitis on the behaviour of piglets (preliminary results)
ACTA AGRARIA KAPOSVÁRIENSIS, 10:(2) pp. 291-295. (2006)
4. Varga Zs., Sellyei B., Magyar T.
Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Hungary
ACTA VETERINARIA HUNGARICA, 55:(4) pp. 425-434. (2007)
5. Sellyei B., Varga Z., Ivanics E., Magyar T.
Characterisation and comparison of avian *Pasteurella multocida* strains by conventional and ERIC-PCR assays
ACTA VETERINARIA HUNGARICA, 56:(4) pp. 429-440. (2008)
6. Sellyei B., Varga Zs., Szentesi-Samu K., Kaszanyitzky É., Magyar T.
Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry
ACTA VETERINARIA HUNGARICA, 57:(3) pp. 357-367. (2009)
7. Khayer B., Rónai Zs., Wehmann E., Magyar T.
Detection of urease-negative *Bordetella bronchiseptica* from the field
ACTA VETERINARIA HUNGARICA, 39:(3) pp. 289-293. (2011)
8. Pósa R., Kovács M., Donkó T., Repa I., Magyar T.
Non invasive (CT) investigation of the lung in *Bordetella bronchiseptica* infected pigs
AGRICULTURAE CONSPECTUS SCIENTIFICUS, 76:(4) pp. 357-359. (2011)
9. Bálint Á., Kiss I., Bányai K., Biksi I., Szentpáli-Gavallér K., Magyar T., Jankovics I., Rózsa M., Szalai B., Takács M., Tóth Á.Gy., Dán Á.
Emergence and characterisation of pandemic H1N1 influenza viruses in Hungarian swine herds
ACTA VETERINARIA HUNGARICA, 61: pp. 125-134. (2013)
10. Sellyei B., Ivanics É., Magyar T.
Characterisation of avian *Pasteurella multocida* strains with PCR-RFLP analysis of the ompH gene
ACTA VETERINARIA HUNGARICA, 61:(1) pp. 1-8. (2013)

Magyar nyelvű közlemények az előző fokozat megszerzése óta:

1. Kiss G., Fábíán K., Radványi Sz., Magyar T., Papp L., Magdus M.
A *Staphylococcus intermedius* előfordulása kutyákban
MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA, 49:(5) pp. 299-302. (1994)
2. Magyar T.
A *Bordetella bronchiseptica* biológiájának néhány érdekes kérdése
MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA, 121: pp. 267-274. (1999)
3. Donkó T., Kovács M., Magyar T.
A sertés torzító orrgyulladásának hatása a súlygyarapodásra. 1. Megfigyelések a betegséggel érintett állományokban
MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA, 127:(6) pp. 330-338. (2005)
4. Donkó T., Kovács M., Magyar T.
A sertés torzító orrgyulladásának hatása a súlygyarapodásra. 2. Kísérleti körülmények között végzett megfigyelések
MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA, 127: pp. 654-660. (2005)
5. Mester K., Magyar T.
Torzító orrgyulladás - lehetünk-e mentesek?
MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA, 129: pp. 231-238. (2007)
6. Donkó T., Kovács M., Magyar T.
A torzító orrgyulladás és a tüdőgyulladás súlygyarapodásra gyakorolt hatásának vizsgálata egy hazai sertésállományban
ANIMAL WELFARE - ETOLÓGIA ÉS TARTÁSTECHNOLÓGIA, 4:(2) pp. 598-605. (2008)
7. Sellyei B., Varga Zs., Samu P-né, Magyar T.
Nyúlból izolált *Pasteurella multocida* törzsek jellemzése
MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA, 130: pp. 396-403. (2008)
8. Magyar T., Vörös B., Wehmann E.
Macskák *Bordetella bronchiseptica* okozta felső légúti megbetegedése. Összefoglaló ismertetés
MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA, 131:(8) pp. 464-469. (2009)
9. Gyuranecz M., Hauser Zs., Dénes B., Szeredi L., Rónai Zs., Bozi R., Makrai L., Magyar T., Jánosi Sz.
A kutyák *Brucella canis* okozta megbetegedése Magyarországon
MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA, 133:(8) pp. 471-479. (2011)
10. Khayer B., Wehmann E., Demeter Z., Rónai Zs., Jánosi Sz., Rusvai M., Magyar T.
Kutya eredetű *Bordetella bronchiseptica* törzsek molekuláris vizsgálata
MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA, 133:(10) pp. 594-600. (2011)
11. Szeredi L., Jánosi Sz., Magyar T., Sellyei B., Rónai Zs., Barta E.
Pasteurella aerogenes okozta vetélés két esete sertésben: patológiai, immunhisztokémiai, bakteriológiai és molekuláris biológiai vizsgálatok
MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA, 133:(4) pp. 214-219. (2011)

Konferenciaközlemények az előző fokozat megszerzése óta

1. Semjén G., Magyar T., Laczay P.
Efficacy of doxycycline in the treatment of experimentally induced fowl cholera in broiler chickens
Proc. 6th International Congress of European Association for Vet. Pharmacol. Toxicol.,
Edinburgh, pp. 260-261. (1994)
2. Ackermann M., Register K., Gentry-Weeks C., Gwaltney S., Magyar T.
Virulence of two strains of *Bordetella bronchiseptica* in colostrum-deprived, cesarian-derived pigs
In: Monetti PG, Vignola G (szerk.)
14th IPVS Congress Bologna.
Konferencia helye, ideje: Bologna, Olaszország, 1996.07.07-1996.06.11.
Bologna: p. 252.
3. Kovács F., Magyar T.
Evaluation of Ingelvac AR4 vaccine under field condition
In: Monetti PG, Vignola G (szerk.)
14th IPVS Congress Bologna.
Konferencia helye, ideje: Bologna, Olaszország, 1996.07.07-1996.06.11.
Bologna: p. 254.
4. Magyar T., Kovács F.
Efficacy of a vaccine against combined infection with *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in newborn piglets
In: Monetti PG, Vignola G (szerk.)
14th IPVS Congress Bologna.
Konferencia helye, ideje: Bologna, Olaszország, 1996.07.07-1996.06.11.
Bologna: p. 253.
5. Magyar T., Kovács F., Vestergaard-Nielsen K.
Vaccine efficacy comparison against combined infection with *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in newborn piglets
In: Cargill C, McOrist S (szerk.)
16th Int Pig Vet Soc Congress.
Konferencia helye, ideje: Melbourne, Ausztrália, 2000.09.17-2000.09.20.
Melbourne: p. 479.
6. Labarque G., Magyar T., Kovács F., Van Reeth K., Nauwynck H., Pensaert M.
Efficacy testing of a modified live PRRSV vaccine using the clinical synergy between PRRS virus and bacterial lipopolysaccharides
In: Harris DLH (szerk.)
International Pig Veterinary Society Congress 17th Proceedings.
Konferencia helye, ideje: Ames, Amerikai Egyesült Államok, 2002.06.02-2002.06.05.
Iowa State University, p. 430.
7. Magyar T., Kovács F.
Vaccination against *Bordetella dermonecrotic* toxin and *Pasteurella multocida* toxin protects pigs from turbinate atrophy
In: Harris DLH (szerk.)
International Pig Veterinary Society Congress 17th Proceedings.
Konferencia helye, ideje: Ames, Amerikai Egyesült Államok, 2002.06.02-2002.06.05.
Iowa State University, p. 319.

8. Magyar T., Kovács F., Donkó T., Bíró H., Kovács M., Repa I.
Computed tomography - A powerful tool to track turbinate atrophy in pigs
In: Blaha Thomas, Pahlitzsch Christoph (szerk.)
Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress.
Konferencia helye, ideje: Hamburg, Németország, 2004.06.27-2004.07.01.
Hamburg: IPVS Veranstaltungen GmbH, p. 198.

9. Magyar T., Kovács F., Pesch S., Molnár T.
Development of a sow challenge model with European PRRSV isolates
In: Nielsen JP, Jorsal SE (szerk.)
International Pig Veterinary Society Congress 19th Proceedings.
Konferencia helye, ideje: Copenhagen, Dánia, 2006.07.16-2006.07.19.

10. Pósa R., Donkó T., Bogner P., Kovács M., Repa I., Magyar T.
Synergy between *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and fumonisin B1 toxin in the porcine respiratory tract
In: Proceedings of 20th International Pig Veterinary Society Congress (IPVSC).
Konferencia helye, ideje: Durban, Dél-Afrika, 2008.06.22-2008.06.25.
p. 195.

11. Pósa R., Kovács M., Donkó T., Szabó-Fodor J., Mondok J., Bogner P., Repa I., Magyar T.
Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and fumonisin B1 toxin in the porcine respiratory tract
In: D'Allaire S, Friendship R (szerk.)
Proceedings 21th International Pig Veterinary Society Congress (IPVSC).
Konferencia helye, ideje: Vancouver, Kanada, 2010.06.18-2010.06.21.
p. 654.

Könyvfejezet az előző fokozat megszerzése óta:

1. Magyar T., Lax A.
Pasteurella multocida
In: Motarjemi Y, Moy G, Todd E (szerk.)
Encyclopedia of food safety
Amsterdam; Boston; London: Elsevier, 2014. pp. 476-479.
(ISBN:9780123786128)

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani azoknak, akik elindítottak a kutatói pályán: **Mészáros János** akadémikusnak, aki felvett az intézet munkatársai közé, és sokat segített, ha nehézségeim támadtak, **Semjén Gábor** professzornak, aki bevezetett a kutatómunka rejtelseibe, **Réthy Lajos** professzornak, akit szintén tanítómesteremnek tekintek, és dr. **Lomniczi Bélának**, aki gyakran látott el baráti jó tanácsaival miközben példát is mutatott nekem.

A pályám során és az értekezés közben kapott számtalan jó tanácsért **Nagy Béla** akadémikusnak tartozom köszönettel. A kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok elvégzésében nyújtott munkájáért **dr. Molnár Tamást** és **dr. Glávits Róbertet** illeti köszönet. Hálás vagyok **dr. Kovács Ferencnek** a sokévi közös munkáért, melynek során érdekesebbnél érdekesebb kísérleteket valósítottunk meg.

Köszönettel tartozom munkacsoportom mindenkori munkatársainak, akikkel együtt dolgozhattam. Közülük is kiemelném dr. **Wehmann Enikőt**, aki támaszom volt a fiatal kollégákkal való foglalkozásban, és nagyon sokat segített az értekezés szerkesztésében. **Hegedűs Éva** immáron húsz éve segíti munkámat, lelkiismeretes közreműködése nagyban hozzájárult a kísérletes kutatások eredményes megvalósításához, és aki **Schihlgruberné Oryszcsák Katalinnal** együtt a mintafeldolgozás és laboratóriumi tesztek megszámlálhatatlan mennyiségét végezte el.

Hálás vagyok a Kaposvári Egyetemmel hosszú ideje folyó együttműködés lehetőségéért **Kovács Melinda** akadémikusnak, aki társául fogadott több PhD hallgató témavezetésében, **Repa Imre** professzornak, aki lehetővé tette a nagyszámú CT vizsgálat elvégzését az általa vezetett Egészségügyi Centrumban, valamint a Centrum összes munkatársának, akik közül feltétlenül meg kell említenem dr. **Donkó Tamás**, **Szabó Gergő**, **Takács István**, dr. **Petrási Zsolt** és **Romvári Róbert** professzor nevét. Külön köszönet illeti dr. **Bíró Hunor** c. egyetemi docent a kísérletes munka során nyújtott fáradhatatlan munkájáért.

Alistair Lax professzornak (King's College, London) köszönöm a több mint húsz éves barátságunkat, melynek során többször is alkalmunk nyílt együtt dolgozni, és aki a közös munkáinkban a nyelvi lektor szerepét is elvállalta.

Köszönet illeti a National Animal Disease Center (Ames, Iowa, USA) munkatársai közül a néhai dr. **Richard Rimlert**, aki több alkalommal befogadott a munkacsoportjába, és ráadásul még barátságával is kitüntetett, valamint **Susan Brockmeiert**, **Karen Registert** és **Mark Ackermann**t, akik nélkül az ottani munkámat nem tudtam volna sikeresen elvégezni.

Köszönöm a gyakorlatban dolgozó kollégáknak és munkatársaiknak a mintagyűjtés és az üzemi kísérletek során végzett mindig áldozatkész munkáját.

Végül, de nem utolsó sorban hálás köszönettel tartozom **szüleim**nek, hogy felneveltek, és lehetővé tették, hogy az állatorvosi pályát választhassam, **családom**nak pedig köszönöm türelmüket és megértő támogatásukat.